

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244645 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437078**

(22) Data zgłoszenia: **2021.02.22**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.08.29 BUP 35/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.02.19 WUP 08/2024**

(51) MKP:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/34 (2017.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

A61L 27/18 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**PAWEŁ NAKIELSKI, Warszawa, PL
SYLWIA PAWŁOWSKA, Gdańsk, PL
MICHAŁ PRUCHNIEWSKI, Warszawa, PL
OLGA URBANEK-ŚWIDERSKA, Łomianki, PL
FILIPPO PIERINI, Łomianki, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Mariusz Kondrat, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

**Sposób otrzymywania wstrzykiwalnego biokompatybilnego nośnika leków, komórek
lub ich kombinacji, w postaci mikrorusztowań, kompozycja do podawania
przez wstrzykiwanie zawierająca wspomniane nośniki oraz jej zastosowanie**

PL 244645 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania wstrzykiwalnego biokompatybilnego nośnika leków, komórek lub ich kombinacji, w postaci mikrorusztowań, kompozycja do podawania przez wstrzykiwanie zawierająca wspomniane nośniki oraz bufor, a także zastosowanie wspomnianej kompozycji.

Kluczowym elementem procesu rekonstrukcji czy regeneracji tkanek jest przygotowanie odpowiedniego biomateriału do implantacji. Biomateriał ten, zwany z języka angielskiego skafoldem, stanowi przestrzenne rusztowanie umożliwiające wzrost komórek. Należy zauważyć, że implantowane rusztowanie może być uprzednio hodowane z komórkami pacjenta i być stosowane jako ich nośnik, bądź może zostać zasiedlone komórkami po implantacji rusztowania w docelowym miejscu uszkodzenia. Polimery używane jako rusztowanie powinny być biokompatybilne, biodegradowalne i biofunkcjonalne. Biokompatybilność w przypadku rusztowań komórkowych oznacza nietoksyczność jego składników (polimerów, monomerów, pozostałości rozpuszczalników i inicjatorów polimeryzacji) oraz obojętność fizjologiczną produktów jego biodegradacji. Składniki takiego układu i produkty jego biodegradacji nie powinny wywoływać stanów zapalnych, innych reakcji immunologicznych, zmian składu płynów ustrojowych, nie mogą wykazywać właściwości muta- i kancerogennych. Kolejnym istotnym kryterium jest biofunkcjonalność, oznaczająca zdolność biomateriału do spełnienia określonych funkcji wynikających z jego zastosowania. Bardzo ważna jest także porowatość ogólna biomateriału i wielkość porów. Przyjmuje się, że wielkość i układ porów powinny zapewniać właściwą migrację komórek tkanki oraz transport substancji w obrębie rusztowania a także osadzanie się nowej macierzy zewnątrzkomórkowej. Właściwości morfologiczne skafoldów w znacznym stopniu zależą od metody ich otrzymywania.

W literaturze naukowej opisywanych jest wiele typów porowatych rusztowań komórkowych, jednakże nie wszystkie z nich mają cechę wstrzykiwalności. Dwa główne typy wstrzykiwalnych rusztowań komórkowych to sieciowane *in situ* hydrożele i mikrocząstki. Sieciowane *in situ* hydrożele są najbardziej rozpowszechnionymi wstrzykiwalnymi rusztowaniami i można je klasyfikować np. w oparciu o metodę sieciowania. Fizycznie usieciowane hydrożele są mniej trwałe niż chemicznie usieciowane hydrożele. Właściwości rusztowań hydrożelowych do regeneracji w dużej mierze zależą od wybranego biomateriału, ponieważ kieruje on rozwojem komórkowym, różnicowaniem i organizacją w konstrukcjach inżynierii tkankowej. Biomateriał zapewnia również fizyczne wsparcie dla komórek, wsparcie dla transportu sygnałów chemicznych i biologicznych wymaganych do wydajnego tworzenia funkcjonalnych tkanek.

Badania przedkliniczne i kliniczne dostarczyły szeregu informacji o interakcji komórek z różnymi biomateriałami, które są dostępne w sprzedaży. Badano żele fibrynowe, Gelfoam™, usieciowany (zżelowany) lub płynny roztwór hialuronianu, gąbki kwasu hialuronowego (np. HyStem®, HYAFF) i Pura-matrix®. Stwierdzono, że hialuronian w postaciach płynnej lub żelowej wyróżnia się szerszą akceptacją w badaniach klinicznych, jako nośnik dostarczający allogeniczne mezenchymalne komórki macierzyste lub autologiczne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego. Jednak to hydrożele, jako nośniki komórek do regeneracji tkanek były częściej wybierane ze względu na ich łatwą obsługę i bardzo dobry profil bezpieczeństwa. Rzadziej jednak ze względu na pożądane efekty biologiczne konstruktu hydrożel-komórka lub degradację hydrożelu. Chociaż hydrożele pochodzenia naturalnego oferują szeroki zakres korzyści biologicznych, znalezienie odpowiedniego zakresu właściwości fizycznych może być trudne. Z drugiej strony, hydrożele syntetyczne sieciowane *in situ* mogą okazać się cytotoksyczne z uwagi na użycie toksycznych inicjatorów, prepolimerów lub monomerów oraz wzrost temperatury podczas sieciowania. Wspólną cechą hydrożeli, która może działać na ich niekorzyść jest półpłynna postać przed etapem sieciowania w trakcie wstrzykiwania, powodująca wyciek komórek z tkanki np. krążka międzykręgowego.

Z dokumentu **EP2701745 B1** znana jest wstrzykiwalna, biokompatybilna i silnie usieciowana hydrożelowa kompozycja polimerowa do stosowania w leczeniu, charakteryzująca się pamięcią kształtu po odkształceniu przez ściskanie lub odwodnienie. Przy czym, kompozycja charakteryzuje się porowatością wynoszącą co najmniej 75%. Kompozycja może mieć kształt dysku, walca, kwadratu, prostokąta lub sznurka. Korzystnie zawiera składnik wybrany z grupy obejmującej kwas hialuronowy, żelatynę, heparynę, dekstran, mączkę chleba świętojańskiego, PEG, pochodną PEG, kolagen, chitozan, karboksymetylocelulozę, pullulan, PVA, PHEMA, PNIPAAm lub PAAc.

Literatura wskazuje, że poza hydrożelami, mikrocząstki polimerowe zyskały zwiększoną atrakcyjność, jako nowy typ rusztowań wstrzykiwalnych (Constantini M, Guzowski J, Żuk PJ, Mozetic P,

De Panfilis S, Jaroszewicz J, Heljak M, Massimi M, Pierron M, Trombetta M, Dentini M, Świeszkowski W, Rainer A, Garstecki P, Barbetta A, *Electric field assisted microfluidic platform for generation of tailorable porous microbeads as cell carriers for tissue engineering*. *Advanced Functional Materials*, 2018, <https://doi.org/10.1002/adfm.201800874>). Mikrosfery opracowano głównie w celu kontrolowanego dostarczania leków (Lupron Depot). Ze względu na ich niewielkie rozmiary i dużą powierzchnię właściwą, mikrosfery mogą również działać jako wstrzykiwalne nośniki komórek w inżynierii tkankowej. W przeciwieństwie do hydrożeli, mikrosfery umożliwiają komórkom przyleganie i proliferację *in vitro* przed wstrzyknięciem konstruktów do uszkodzonego obszaru, co jest zaletą w pewnych zastosowaniach. Mikrosfery mogą być tworzone z polimerów naturalnych i syntetycznych oraz materiałów nieorganicznych. Podobnie jak hydrożele, właściwości fizykochemiczne (np. hydrofilowość, wytrzymałość i moduł Younga) i bioaktywności (np. biokompatybilność i szybkość degradacji) mikrosfer są regulowane przez wiele czynników, takich jak skład, proces wytwarzania, rozmiar cząstek, morfologia powierzchni i metody modyfikacji mikrosfer. Poza zastosowaniem ich bezpośrednio, jako wstrzykiwalnych nośników komórek, mikrosfery można stosować w inżynierii tkankowej razem z hydrożelami. Dużym ograniczeniem w stosowaniu mikrosfer jest brak włóknistej trójwymiarowej morfologii powierzchni, która umożliwiałaby wzmocnienie interakcji komórek z materiałem i funkcjonowanie w tkance np. w krążku międzykręgowym. Ponadto, polimerowe mikrosfery podczas degradacji wytwarzają większą niż nanowłókna ilość produktów ubocznych, co długoterminowo może działać niekorzystnie na otaczające tkanki.

Jedną z metod wytwarzania rusztowań komórkowych, mającą potencjał do zastosowania klinicznego jest technika elektroprzędzenia. Podczas elektroprzędzenia, lepki strumień roztworu polimeru jest wyrzucany z kropli w kształcie stożka, a następnie rozciągany w polu elektrycznym. Odparowanie rozpuszczalnika powoduje zastyganie rozciąganego strumienia i tworzenie nanowłókien, które są następnie zbierane na uziemionym kolektorze w postaci włókniny. Proces elektroprzędzenia jest procesem bardzo popularnym, ponieważ metoda ta daje możliwość zmian materiału w nanoskali i jest jedną z niewielu metod, które są w stanie wytworzyć materiały o wysokiej porowatości. Metoda ta daje również możliwość łatwego zwiększenia skali i produkcji w skali przemysłowej.

W celu poprawy właściwości powierzchniowych PLA lub poli(laktydu-co-glikolidu) (PLGA), w ciągu ostatnich dwudziestu lat optymalizowano metody hydrolizy powierzchniowej, powlekania powierzchni, obróbki plazmą, chemicznego szczepienia powierzchni oraz inne metody modyfikacji powierzchni. Spośród wszystkich tych metod, hydroliza powierzchniowa, zwłaszcza powierzchniowa hydroliza zasadowa z użyciem wodorotlenku sodu, okazała się najbardziej popularną z uwagi, że jest metodą prostą, wygodną i skuteczną.

W literaturze naukowej opisano szereg przykładów modyfikacji powierzchni polimerów. W pracy autorstwa Chen i współpracowników (Chen F, Lee CN, Teoh SH. *Nanofibrous modification on ultra-thin poly(ϵ -caprolactone) membrane via electrospinning*. *Materials Science and Engineering: C*, 2007, 27: 325–332) zmodyfikowano powierzchnię polikaprolaktonu 3 M wodorotlenkiem sodu przez czas około 3 godzin, dzięki czemu kąt zwilżania spadł ze 124° do 0. W innej pracy (Campos DM, Gritsch K, Salles V, Attik GN, Grosogeat B. *Surface Entrapment of Fibronectin on Electrospun PLGA Scaffolds for Periodontal Tissue Engineering*. *Biores Open Access*, 2014, 1; 3(3): 117–126) opisywano wpływ stężenia oraz czasu inkubacji w wodorotlenku sodu na stopień przyłączenia fibronektyny do nanowłókien PLGA. Autorzy wykazali, że stężenie 0,1 M i czas inkubacji około 20 min był wystarczający do funkcjonalizacji powierzchni włókien białkiem.

Możliwość modyfikowania i kształtowania powierzchni polimerów i materiałów kompozytowych ma duże znaczenie dla różnych zastosowań biomedycznych. Na przykład, zastosowanie femtosekundowej ablacji laserowej do tworzenia mikrowzorów na elektroprzędzonych materiałach z nanowłókien może być z powodzeniem stosowane do produkcji złożonych polimerowych wyrobów biomedycznych, w tym rusztowań. W pracy autorstwa Paula i współpracowników (Paula KT, Mercante LA, Schneider R, Correa DS., Mendonca CR. *Micropatterning MoS₂/Polyamide Electrospun Nanofibrous Membranes Using Femtosecond Laser Pulses*. *Photonics*, 2019, 6(1): 3), opisano ablację laserową jako łatwą i wygodną metodę tworzenia wzorów (micropatterning) na elektroprzędzonych nanowłóknach poliamidowych (PA6), które modyfikowano dwusiarczkiem molibdenu (MoS₂). Badano wpływ energii impulsu laserowego i prędkości strukturyzacji na topografię elektroprzędzonych nanowłókien kompozytowych. Uzyskane wyniki wykazały, że przy zastosowaniu optymalnych parametrów laserowych na elektroprzędzonych nanowłóknach tworzyły się mikropory z kontrolowaną skalą wielkości, przy zachowaniu wyjściowej morfologii włókniny. Większość prac literaturowych

dotyczy formowania wzorów na powierzchni włókniń (wgłębień, rynienek), w których można hodo-
wać komórki (Lim YC, Johnson J, Fei Z, Wu Y, Farson D, Lannutti JJ, Choi HW, Lee LJ. *Micropat-
tarning and characterization of electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofiber tissue scaffolds by
femtosecond laser ablation for tissue engineering applications*. Biotechnol. Bioeng., 108: 116–126.
doi:10.1002/bit.22914).

Projektowanie biomateriałów, które mogą naśladować macierz zewnątrzkomórkową, ma klu-
czowe znaczenie dla zwiększenia skuteczności metod terapeutycznych. Podczas gdy pokrywanie
powierzchniowych uszkodzeń, np. skóry, włókninami o wymiarach rzędu centymetrów jest stosunkowo
skuteczne, do tej pory niedostępne były możliwości wypełniania trudnodostępnych ubytków w tym
np. ubytków kości, chrząstki lub krążka międzykręgowego. Mikrorusztowania z nanowłókien, które
mogą zostać wprowadzone do ubytków poprzez iniekcję igłą i które pozostają w obszarze iniekcji, nie
są dostępne. Małoinwazyjne metody chirurgiczne stanowią alternatywę dla metod klasycznych lub
operacji mikrochirurgicznych, które często wymagają pełnego znieczulenia przed zabiegiem i uzyska-
nia dostępu do interesujących chirurga tkanek. Dzięki zastosowaniu małoinwazyjnych metod leczenia,
likwidowana jest przyczyna bólu, gdyż przez małe nacięcie skórne, do minimum skracany jest czas
spędzony w szpitalu (często poniżej 24 godzin) jak również umożliwiony jest powrót do normalnej
aktywności już w kilka dni po zabiegu. Technologia trójwymiarowych elektroprzędzonych włókien,
które można wstrzykiwać w sposób minimalnie inwazyjny, stanowi dużą wartość dodaną m.in. w tera-
piach komórkowych. W pracy autorstwa Michaleka i współpracowników (Michalek AJ, Buckley MR,
Bonassar LJ, Cohen I, Iatridis JC. *The effects of needle puncture injury on microscale shear strain*.
Spine J. 2010, 10(12): 1098–1105) wykazano, że przekłucie igłą pierścienia włóknistego w krążku
międzykręgowym powoduje drastyczną zmianę odkształcenia pierścienia w mikroskali. Zmiana ta
może bezpośrednio zainicjować degenerację krążka międzykręgowego, z uwagi na niekorzystną
zmianę w mechanotransdukcji w tkance. Dlatego w wielu przypadkach, konieczne jest wprowadzenie
rusztowań komórkowych za pomocą urządzeń/wyrobów/instrumentarium, które w minimalnym
stopniu uszkadzają tkanki. Dotychczas, otwarta operacja jest jedyną drogą implantacji konwencjo-
nalnych elektroprzędzonych włókien, które posiadają włóknistą strukturę zbliżoną do macierzy ze-
wnątrzkomórkowej.

W tym kontekście, z dokumentu **US20160136332A** (EP3014005 B1) znany jest sposób wytwa-
rzania trójwymiarowej porowatej struktury wykonanej z fragmentów, które wykonane zostały z włókni-
ny. Sposób obejmuje cięcie suchej lub mokrej włókniny wykonanej z nanowłókien (np. elektroprzę-
dzonych nanowłókien) na fragmenty za pomocą lasera (np. lasera piko- lub femtosekundowego)
i zawieszanie fragmentów włókniny w ciekłym ośrodku; lub cięcie włókniny wykonanej z nanowłókien
obecnych w ciekłym ośrodku na fragmenty za pomocą lasera, w wyniku czego powstaje zawiesina
fragmentów włókniny w ciekłym ośrodku; i co najmniej częściowe usunięcie ciekłego ośrodka, przy
pomocy samoorganizacji powstaje trójwymiarowa porowata struktura z fragmentów włókniny. Korzyst-
nie przed obróbką laserową włóknina jest traktowana etanolem i/lub promieniowaniem UV zapewnia-
jącym jej sterylizację i modyfikację właściwości fizycznych i/lub chemicznych oraz polimeryzację. Przy
czym, włóknina cięta laserowo jest odseparowana od kolektora. Tym samym podczas cięcia, stoso-
wany jest stół podciśnieniowy z odprowadzeniem spalin, a wycięte fragmenty mogą wydostawać się
wraz z zaciągającym powietrzem i konieczne jest ich wyłapywanie. Aspekty te nie zostały ujawnione
w dokumencie **US20160136332A**.

Z dokumentu **US20140294783** znany jest sposób wytwarzania implantów z elektroprzędzonych
nanowłókien, który składa się z etapów a) formowania biodegradowalnych, syntetycznych nanowłó-
kien; b) przetwarzania nanowłókien w celu wytworzenia fragmentów nanowłókien; c) ściskania frag-
mentów nanowłókien; oraz d) podgrzewanie fragmentów nanowłókien w celu wytworzenia porowate-
go, nanowłóknistego rusztowania tkankowego. Etap cięcia obejmuje produkcję fragmentów włókni-
o rozmiarach losowych lub jednorodnych. Według autorów omawianego dokumentu, takie cięcie może
być wykonane ręcznie lub poprzez frezowanie, mielenie, homogenizację i tym podobne. Autorzy nie
wspominają o metodzie cięcia za pomocą wiązki lasera, która to metoda jest kluczowa do osiągnięcia
rusztowań w skali mikro.

Z kolei dokument **KR20200056968A** ujawnia wstrzykiwalne rusztowania z nanowłókien oraz
sposób ich wytwarzania. Zgodnie z wynalazkiem elektroprzędzone nanowłókna z biodegradowalnego
polimeru powleka się roztworem prekursora hydrożelu i całość polimeryzuje wytwarzając nanowłókna
zawierające rdzeń z biopolimeru i otoczkę z hydrożelu. Przy czym, do elektroprzędzenia roztwór bio-
degradowalnego polimeru w wewnętrznej dyszy, a w zewnętrznej dyszy umieszcza się roztwór polisty-

renu (PS). Po elektroprzędzeniu powstają włókna zawierające rdzeń z biopolimeru i otoczkę z PS, którą następnie się usuwa pozostawiając sam rdzeń z biopolimeru, który następnie jest powlekany hydrożelem.

Natomiast z dokumentu **GB2544748A**, znane są mikrorusztowania zawierające porowatą cząstkę zawierającą trójwymiarową sieć elektroprzędzonych włókien zawierających biokompatybilny polimer o kształcie cylindrycznym lub graniastosłupa wielokątnego o średnicy 20–2000 μm oraz wysokości 10–200 μm . Korzystnie porowatość mikrorusztowań wynosi $>75\%$. Korzystnie mikrorusztowania zawierają materiał ferromagnetyczny (tlenek(II, III) żelaza). Korzystnie mikrorusztowania mogą zawierać składnik wybrany z grupy obejmującej cząsteczkę macierzy zewnątrzkomórkowej (np. hialuronidazę, d-lizynę, lamininę, witronektynę, fibronektynę, kolagen), peptyd, kwas nukleinowy, barwnik fluorescencyjny, streptawidynę, biotynę. Ujawnione rusztowania mogą znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej, inżynierii tkankowej, badaniach przesiewowych do użytku biologicznego lub badaniach przesiewowych leków. Mikrorusztowanie może ponadto składać się z materiału magnetycznego oraz metody manipulacji jednym lub kilkoma takimi mikrorusztowaniami poprzez wystawienie kompozycji składającej się z jednego lub kilku takich mikrorusztowań na działanie pola magnetycznego magnesu, a tym samym spowodowanie przyciągnięcia do tego magnesu jednego lub kilku mikrorusztowań w składzie przez przyciąganie magnetyczne.

Problemem znanych wstrzykiwalnych nośników jest ich wzajemna agregacja i osiadanie w roztworze, co może powodować zatykanie się igły podczas iniekcji. Dlatego celem niniejszego wynalazku jest opracowanie nowego sposobu wytwarzania biokompatybilnych wzajemnie nieagregujących *in vitro* nośników leków i/lub komórek do podawania przez wstrzykiwanie.

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania wstrzykiwalnego biokompatybilnego nośnika leków, komórek lub ich kombinacji, w postaci mikrorusztowań, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) przygotowanie roztworu zawierającego polimer oraz co najmniej jeden rozpuszczalnik;
- b) formowanie włókien o średnicy włókna wynoszącej od 50 nm do 10 μm na kolektorze płaskim w procesie elektroprzędzenia;
- c) laserowe cięcie warstwy włókniny uformowanej na kolektorze na pojedyncze oddzielne mikrorusztowania o grubości od 0,01 do 0,2 mm oraz o kształcie walca o średnicy podstawy wynoszącej od 0,1 do 0,4 mm albo graniastosłupa o długości boku podstawy wynoszącym od 0,04 do 0,4 mm;
- d) oddzielanie oddzielnych mikrorusztowań od kolektora;
- e) chemiczne modyfikowanie mikrorusztowań poprzez ich zawieszenie w wodnym roztworze NaOH o stężeniu 0,001–1 M przez 1–120 min albo fizyczne modyfikowanie mikrorusztowań poprzez ich zawieszenie w wodnym roztworze białka o stężeniu 0,001–0,5 M przez 2–120 min;
- f) odpłukanie nadmiaru NaOH albo białka z powierzchni mikrorusztowań.

Korzystnie polimer stanowi biodegradowalny polimer wybrany z grupy obejmującej poli(L-laktyd), poli(D-laktyd), polikaprolakton, poli-(D,L)-laktyd, poli-(L-laktyd-ko-D,L-laktyd), poliglikolid, poli-(laktyd-ko-glikolid), poli(laktyd-ko-kaprolakton), poliuretan, chitozan, kolagen, ich mieszanin lub kopolimery.

Korzystnie w etapie b) na kolektorze płaskim formowane są włókna o średnicy od 50 do 1000 nm.

Korzystnie w etapie b) zastosowano kolektor płaski wybrany z grupy obejmującej kolektor wykonany z materiału przewodzącego, kolektor metalowy, kolektor wykonany z cienkiego materiału nieorganicznego, kolektor szklany, kolektor pokryty warstwą materiału przewodzącego, kolektor wykonany z materiału przewodzącego pokryty folią polimerową.

Korzystnie etapie a) do roztworu polimeru dodaje się substancję aktywną w ilości $<1\%$ wag. masy czystego polimeru.

Korzystnie dodawaną substancją aktywną jest czynnik wzrostu wybrany z grupy obejmującej BMP-2, BMP-7, TGF, NGF lub BDNF.

Korzystnie w etapie c) warstwa nanowłókniny jest cięta wiązką lasera wybranego z grupy obejmującej laser ekscymerowy, pikosekundowy lub femtosekundowy.

Korzystnie w etapie c) warstwa nanowłókniny jest cięta wiązką lasera na graniastosłupy zawierające w podstawie figurę wybraną z grupy obejmującej trójkąt, kwadrat, prostokąt, romb, równoległobok, trapez.

Korzystnie w etapie e) do fizycznej modyfikacji mikrorusztowań stosuje się roztwór białka wybranego z grupy obejmującej lamininy, fibronektyny, kolagen, sekwencję RGD, proteoglikany.

Korzystnie sposób według wynalazku obejmuje etap g) obejmujący pokrywanie modyfikowanych chemicznie, odplukanych mikrorusztowań z etapu f) warstwą substancji wybranej z grupy obejmującej chitozan, siarczan chondroityny, czynnik lub czynniki wzrostu.

Kolejną istotą wynalazku jest kompozycja do podawania przez wstrzykiwanie zawierająca bufor oraz biokompatybilne wzajemnie nieagregujące *in vitro* nośniki leków, komórek lub ich kombinacji, charakteryzująca się tym, że nośniki stanowią mikrorusztowania z elektroprzędzonych włókien przygotowane sposobem według wynalazku, gdzie każde mikrorusztowanie stanowi pojedynczy nośnik o grubości od 0,01 do 0,2 mm oraz o kształcie walca o średnicy podstawy wynoszącej od 0,1 do 0,4 mm albo graniastosłupa o długości boku podstawy wynoszącym od 0,04 do 0,4 mm, którego powierzchnia jest zmodyfikowana chemicznie roztworem NaOH lub fizycznie roztworem białka, przy czym mikrorusztowania zawieszane w buforze tworzą zawiesinę nieagregujących mikrocząstek.

Korzystnie kompozycja zawiera komórki ssacze osadzone na mikrorusztowaniach, przy czym wspomniane komórki ssacze wybrane są z grupy obejmującej chondrocyty, osteoblasty, fibroblasty lub komórki macierzyste.

Korzystnie bufor stanowi woda lub bufor wybrany z grupy obejmującej: bufor zawierający pożywkę hodowlaną do kultur komórkowych, bufor fosforanowy, bufor HEPES (kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy), bufor MES (kwas 2-morfolinoetanosulfonowy), bufor BIS-TRIS ([bis(2-hydroksyetylo)imino]-tris(hydroksymetylo)metan), kwas hialuronowy, poloksamer, żel kolagenowy, żel alginianowy.

Kolejną istotą wynalazku jest kompozycja zawierająca bufor oraz elektroprzędzone mikrorusztowania, które zawieszane w buforze tworzą zawiesinę nieagregujących mikrocząstek, a każde mikrorusztowanie stanowi pojedynczy nośnik o grubości od 0,01 do 0,2 mm oraz o kształcie walca o średnicy podstawy wynoszącej od 0,1 do 0,4 mm albo graniastosłupa o długości boku podstawy wynoszącym od 0,04 do 0,4 mm, a powierzchnia każdego mikrorusztowania jest zmodyfikowana chemicznie roztworem NaOH lub fizycznie roztworem białka, do zastosowania w leczeniu uszkodzeń kości, chrząstek lub krążków międzykręgowych.

Nieoczekiwanie okazało się, że parametry mikrorusztowań według wynalazku tj. grubość mikrorusztowań, średnica podstawy mikrorusztowań o kształcie walca oraz długość boku podstawy mikrorusztowań w kształcie graniastosłupa muszą spełniać określone warunki.

Dolne wartości ujawnionych widełek grubości, średnicy oraz boku podstawy mikrorusztowań według wynalazku wynikają z ograniczeń fizycznych materiału m.in. jego wytrzymałości co przekłada się na rozpad tak małych mikrobiałek pod wpływem nawet niewielkich naprężeń ścinających spotykanych podczas mieszania z użyciem mieszadła. Najmniejsze, nierozpadające się w cieczy i po obróbce chemicznej mikrorusztowania dla kształtu walca posiadające okrąg w podstawie to 0,1 mm, zaś dla sześciianu, trójkąta i sześcioboku to minimalny wymiar boku wynosi 0,04 mm. Korzyścią wynikającą z tak niewielkiego rozmiaru (0,04 mm dla graniastosłupa w podstawie) jest możliwość wstrzykiwania polimerowych mikrorusztowań zawierających np. leki przez igły o rozmiarze 30G, czyli igły o średnicy wewnętrznej 0,159 mm, bez zatykania igieł przez mikrorusztowania. W przypadku wstrzykiwania konstruktów mikrorusztowanie-komórka, mikrorusztowania powinny być odpowiednio większe, aby zapewnić powierzchnię dla wzrostu komórek. Optymalny rozmiar mikrorusztowań, który można podawać igłą o rozmiarze 26G to 0,14 mm. Jeśli chodzi o terapie komórkowe wprowadzane do organizmu zazwyczaj przez igłę, zastosowanie igły o mniejszym rozmiarze powoduje mniejsze urazy tkanek (np. podczas nakłuwania pierścienia włóknistego w krążku międzykręgowym) i minimalizują wyciek komórek przez otwór powstały w wyniku wprowadzenia igły. Tylko zastosowanie tak niewielkich rozmiarów igieł rzędu 20G–30G jest w stanie zapewnić, iż przeprowadzona procedura dostarczania konstruktów mikrorusztowanie-komórka zostanie podana w sposób małoinwazyjny, zmniejszając skutki uboczne terapii komórkowej i skracając tym samym czas pobytu pacjenta w szpitalu.

Wynalazek dostarcza następujących korzyści:

- Sposobem według wynalazku powstają mikrorusztowania o zadanych kształtach i rozmiarach, które można zawiesić w wodzie, w której swobodnie i jednorodnie pływają w całej objętości, nie zlepiając się ze sobą;
- Przeprowadzona w ramach sposobu według wynalazku hydroliza lub naniesienie białka chronią wytwarzane nośniki przed aglomeracją i osadzaniem się na ściankach tym samym możliwe jest wstrzykiwanie wodnych zawiesin mikrorusztowań przez igłę o niewielkich rozmiarach 20–30G bez ich zatykania podczas iniekcji;

- Wytworzone mikrorusztowania stanowią biokompatybilne platformy będące rusztowaniem dla komórek jednocześnie umożliwiając przenikanie substancji odżywczych, tlenu i metabolitów;
- Wytworzone mikrorusztowania mogą być wykorzystane jako rusztowanie komórkowe zasiedlane w warunkach *in vitro* komórkami pobranymi od pacjentów w celu uzupełniania niewielkich ubytków kostnych lub regeneracji krążka międzykręgowego u tych samych pacjentów (pacjenci mogą w tym przypadku być dawcami i biorcami komórek);
- Wytworzone mikrorusztowania mogą być wykorzystane jako rusztowanie dla komórek w bioreaktorach do ekspansji kultur komórkowych;
- Wytworzone mikrorusztowania do wstrzykiwań, pozwalają na uwalnianie leku bezpośrednio w miejscu aplikacji, a jego dawka jest zredukowana, co ogranicza toksyczność systemową;
- Mikrorusztowania wytworzone sposobem według wynalazku wykazują dobrą poręczność, spoistość oraz bioaktywność;
- Brak cytotoksyczności dzięki wykorzystaniu cięcia laserem femtosekundowym umożliwiającym zimną ablację;
- Kompozycja według wynalazku zawierająca mikrorusztowania otrzymane sposobem według wynalazku może być stosowana jako biologiczny wypełniacz tkanek w leczeniu uszkodzeń kości, chrząstek i krążków międzykręgowych.

Wynalazek przedstawiono w przykładach wykonania oraz na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia mikrorusztowania wytworzone sposobem według wynalazku (analiza SEM, powiększenie $\times 85$, podziałka $200\ \mu\text{m}$); fig. 2 przedstawia morfologię włókniny z mikrorusztowania przed i po modyfikacji powierzchni metodą według wynalazku (analiza SEM, powiększenie $\times 5000$, podziałka $5\ \mu\text{m}$); fig. 3 przedstawia roztwory kwasu hialuronowego z różnymi stężeniami mikrorusztowań mających w podstawie czworokąt o wymiarach $0,14\ \text{mm}$ na $0,14\ \text{mm}$ po 1 minucie od wymieszania roztworu, widoczny jest brak mikrorusztowań na dnie próbki z niemodyfikowanymi mikrorusztowaniami i akumulacja na granicy międzyfazowej; fig. 4 przedstawia wyniki badań wstrzykiwalności mikrorusztowań modyfikowanych według wynalazku, mających w podstawie czworokąt o wymiarach $0,14\ \text{mm}$ na $0,14\ \text{mm}$, przez igły o rozmiarach 23, 24 i 26G; fig. 5 przedstawia charakterystykę uwalniania substancji modelowej z mikrorusztowań z polimerów PLGA, PLLA i PLCL; fig. 6 przedstawia analizę żywotności komórek fibroblastów mysich linii L929 w hodowli *in vitro* wraz z mikrorusztowaniami wytworzonymi sposobem według wynalazku (podziałka $50\ \mu\text{m}$), gdzie żywe komórki fibroblastów linii L929 są widoczne na powierzchni wspomnianych mikrorusztowań; fig. 7 przedstawia adhezję komórek fibroblastów mysich linii L929 do mikrorusztowań według wynalazku (analiza SEM, powiększenie $\times 500$, podziałka $50\ \mu\text{m}$), gdzie A) oznacza niemodyfikowane rusztowania kontrolne, B) oznacza modyfikowane mikrorusztowania wytworzone sposobem według wynalazku.

Przykład 1

W tym nieograniczającym przykładzie wykonania, 9 cz. w. poli(L-Laktydu-ko-kaprolaktanu) (PLCL, 70% L-laktyd, 30% kaprolaktan) rozpuszczono w 85,5 cz. w. chloroformu, a następnie dodano 5,2 cz. w. dimetyloformamidu. Polimer rozpuszczano w temperaturze pokojowej do całkowitego rozpuszczenia (przez minimum 24 godziny).

Choć w tym nieograniczonym przykładzie wykonania do wytworzenia rusztowań wybrano PLCL, to w sposobie według wynalazku można stosować także inne polimery (np. poli(L-laktyd), poli(D-laktyd), polikaprolaktan, poli-(D,L)-laktyd, poli-(L-laktyd-ko-D,L-laktyd), poliglikolid, poli-(laktydu-ko-glikolid), poliuretan, chitozan, kolagen, ich mieszanin lub kopolimery).

Tak otrzymany roztwór używano do wytworzenia włókniny. Przy czym, w sposobie według wynalazku wspomniana włóknina jest otrzymywana metodą przędzenia elektrostatycznego (elektroprzędzenie), w której strugi roztworu polimeru zostają rozciągnięte w polu elektrycznym do wymiaru ułamków mikrometra.

W tym przykładzie wykonania materiał przędzono przy napięciu 15 kV i odległości 20 cm od uziemionego płaskiego kolektora szklanego. Natomiast w sposobie według wynalazku można stosować także inne kolektory płaskie (np. kolektor metalowy, kolektor pokryty warstwą metalu czy kolektor z materiału przewodzącego pokryty folią polimerową).

Wydatek objętościowy pompy wynosił 0,8 ml/h. Materiały przygotowywane były w temperaturze pokojowej (ok. 22–24°C). Uzyskano materiał z nanowłókien o grubości 0,1 mm i porowatości około 80%. W dalszym kroku materiał wraz z kolektorem umieszczono na stole do obróbki laserem. W tym

nieograniczającym przykładzie wykonania zastosowano laser femtosekundowy, natomiast można również zastosować inne lasery (np. laser pikosekundowy czy laser ekscymerowy).

W oprogramowaniu lasera wprowadzono schemat cięcia materiału, który w tym przykładzie wykonania obejmował szereg cięć w kierunkach prostopadłych (w tym przykładzie wykonania przesunięcie linii w powstałej kratownicy wynosiło 0,04 mm w kierunku pionowym i poziomym). Po ustawieniu mocy lasera, liczby przejazdów wiązki oraz prędkości cięcia, otrzymano w rezultacie procesu obróbki laserowej mikrorusztowania w kształcie graniastosłupa, mającego w podstawie czworokąt o wymiarach 0,04 mm na 0,04 mm. Przy czym, zmieniając ustawienia lasera można uzyskać inny kształt mikrorusztowań (np. można uzyskać zarówno mikrorusztowania w kształcie walca lub mikrorusztowania graniastosłupowe, które posiadają w podstawie czworokąt, trójkąt, trapez, romb, równoległobok, kwadrat, prostokąt czy inny czworokąt, pięciokąt, sześciokąt, ośmiokąt czy inny wielokąt). Sposobem według wynalazku można zatem uzyskać rusztowania o różnym rozmiarze oraz kształcie. Przy czym, w zależności od wybranego kształtu parametry mikrorusztowań według wynalazku (tj. grubość mikrorusztowań, średnica podstawy mikrorusztowań o kształcie walca oraz długość boku podstawy mikrorusztowań w kształcie graniastosłupa), mikrorusztowania muszą spełniać określone warunki wynikających z ograniczeń fizycznych zastosowanych materiałów (tj. biodegradowalnych polimerów). Oznacza to, że najmniejsze nierozpadające się w cieczy i po obróbce chemicznej mikrorusztowania o kształcie walca to podstawa o średnicy 0,1 mm, zaś dla graniastosłupa to podstawa o minimalnym wymiarze boku 0,04 mm. Minimalne wymiary zapewniające stabilność rusztowań zostały ustalone eksperymentalnie.

Przy czym, cięcie włókniny osadzonej na kolektorze w procesie cięcia laserowego w sposobie według wynalazku odbywa się w wentylowanych komorach. Ponadto zastosowane w sposobie cięcia włókniny związanej z kolektorem jest korzystniejsze w porównaniu z cięciem samej włókniny. Materiały przed obróbką laserową przytwierdzone są do stołu z wykorzystaniem podciśnienia, zaś w samej komorze wykorzystywany jest odsys spalin. Wykonanie cięcia we włókninie bez kolektora powoduje uwolnienie wyciętych mikrorusztowań z włókniny i ich zasysanie do wyciągu spalin, co znacząco ogranicza liczbę wytworzonych mikrorusztowań.

Polimery stosowane do wytwarzania nanowłókien są materiałami hydrofobowymi, tym samym kąt zwilżania wody na włókninach jest wyższy niż 90° , a często wynosi powyżej 120° . Z tego powodu, pocięty materiał na kolektorze jest modyfikowany chemicznie poprzez zawieszenie mikrorusztowań w wodnym roztworze wodorotlenku sodu na zadany czas, a następnie płukany wodą dejonizowaną (lub destylowaną) celem usunięcia wodorotlenku sodu. Modyfikację wykonuje się w eppendorfach lub falkonach bądź w szklanych pojemnikach, jednocześnie mieszając całość na wytrząsarce laboratoryjnej, skracając tym samym czas procesu modyfikacji. W trakcie obróbki chemicznej zauważalna jest stopniowa modyfikacja mikrorusztowań i ich opadanie z powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz, na której się gromadzą, na dno fiolki. Po zaobserwowaniu braku mikrorusztowań na powierzchni międzyfazowej, przeprowadzane jest zwirowanie mikrorusztowań i usunięcie płynu z wodorotlenkiem (substancją modyfikującą). Zbyt długa inkubacja mikrorusztowań w roztworze wodorotlenku prowadzi do szybkiej degradacji polimeru, zaś w przypadku zbyt wysokich stężeń np. wodorotlenku sodu, obserwowane jest natychmiastowe rozpuszczenie mikrorusztowań.

Dlatego w tym przykładzie wykonania, po pocięciu włókniny na mikrorusztowania o zadanych kształtach, kolektor szklany wraz z pociętym materiałem umieszczono w naczyniu (Falcon 50 ml) z wodnym roztworem wodorotlenku sodu (NaOH) o stężeniu 0,5 M, jednocześnie zdejmując mikrorusztowania z powierzchni kolektora celem modyfikacji mikrorusztowań trwającej około 25 min. Następnie mikrorusztowania zwirowywano 5 min przy 13 500 rpm i usuwano roztworu wodorotlenku sodu. Następnie zmodyfikowane mikrorusztowania zawieszano w wodzie dejonizowanej celem wypłukania wodorotlenku sodu, oceny czy mikrorusztowania gromadzą się na powierzchni woda-powietrze i w przypadku modyfikacji wszystkich mikrorusztowań powtarzano procedurę wirowania i płukania wodą do uzyskania neutralnego poziomu pH. Przygotowane mikrorusztowania (przed i po obróbce) poddawano kontroli jakości z zastosowaniem mikroskopu elektronowego. Fig. 1 przedstawia rusztowania po modyfikacji chemicznej. Natomiast porównanie morfologii włókien na mikrorusztowaniach przed i po obróbce chemicznej wodorotlenkiem sodu przedstawiono na fig. 2.

Dzięki opisanemu sposobowi, powstałe mikrorusztowania o zadanych kształtach i rozmiarach można zawiesić w wodzie (lub w buforze złożonym), w której swobodnie i jednorodnie pływają w całej objętości. Tym samym możliwe jest wstrzykiwanie wodnych zawiesin mikrorusztowań przez igłę o niewielkich rozmiarach 20–30G, w szczególności 24–27G bez ich zatykania podczas iniekcji. Przy czym, ilość uzyskanych mikrorusztowań można zliczać wykorzystując w tym celu komory zliczeniowe

(np. komory Nageotte'a lub inne), co umożliwia dobranie stosownej koncentracji mikrorusztowań do wstrzyknięcia.

W tym przykładzie wykonania uzyskano zmodyfikowane NaOH mikrorusztowania o kształcie graniastosłupa o wysokości 0,1 mm (odpowiadającej grubości mikrorusztowania) oraz o podstawie czworokątnej o wymiarach 0,04 mm × 0,04 mm, które zawieszono w wodzie.

Przykład 2

Sposób jak w przykładzie 1, z tym, że w oprogramowaniu lasera wprowadzono schemat cięcia materiału, który w tym przykładzie wykonania obejmował szereg cięć w kierunkach prostopadłych (przesunięcie linii w powstałej kratownicy wynosiło 0,4 mm w kierunku pionowym i poziomym). Po ustawieniu mocy lasera, liczby przejazdów wiązki oraz prędkości cięcia, otrzymano w rezultacie procesu obróbki laserowej mikrorusztowania w kształcie graniastosłupa, mającego w podstawie czworokąt o wymiarach 0,4 mm na 0,4 mm. Natomiast modyfikację chemiczną pociętych rusztowań prowadzono w wodnym roztworze NaOH o stężeniu 0,001 M przez 120 min.

Przykład 3

W tym przykładzie wykonania 6,25 cz. w. poli(L-Laktydu) (PLLA) rozpuszczono w 84,38 cz. w. chloroformu, a następnie dodano 9,37 cz. w. dimetyloformamidu. Natomiast w sposobie według wynalazku można stosować inne polimery (np. poliglikolid, poli(D-laktyd), poli-(D,L)-laktyd, chitozan, kolagen). Polimer rozpuszczano w temperaturze pokojowej przez minimum 24 godziny. Tak otrzymany roztwór używano do elektroprzędzenia. Materiał przędzono przy napięciu 17 kV i odległości 15 cm od uziemionego płaskiego kolektora szklanego. Niemniej jednak można użyć inne typy kolektorów płaskich np. kolektor metalowy czy kolektor pokryty warstwą metalu. Wydatek objętościowy pompy wynosił 0,8 mL/h. Materiały przygotowywane były w temperaturze pokojowej (ok. 22–24°C). Uzyskano materiał z nanowłóki o grubości 0,09 mm i porowatości około 85%. W dalszym kroku materiał wraz z kolektorem umieszczono na stole do obróbki laserem. W oprogramowaniu lasera wprowadzono schemat cięcia materiału, który obejmował szereg cięć w kierunkach prostopadłych (przesunięcie linii w powstałej kratownicy wynosiło 0,14 mm w kierunku pionowym i poziomym). Po ustawieniu mocy lasera, liczby przejazdów wiązki oraz prędkości cięcia, otrzymano w rezultacie procesu obróbki laserowej mikrorusztowania w kształcie czworokąta o rozmiarze 0,14 mm na 0,14 mm. W dalszej części kolektor szklany wraz z pociętym materiałem umieszczono w naczyniu z wodą dejonizowaną, jednocześnie zdejmując mikrorusztowania z powierzchni kolektora. Mikrorusztowania pozostawiono w wodzie na 1 godzinę w celu zwilżenia głębszych warstw nanowłóki tworzących mikrorusztowanie przez cząsteczki wody, a tym samym polepszenie ich penetracji przez wodny roztwór. Po godzinie oddzielono mikrorusztowania z wody dzięki zastosowaniu wirowania (20 minut, 13 500 rpm). W przypadku niepowodzenia tego etapu ciecz można odciągnąć bardzo cienką igłą (np. 31G) tak aby nie odciągnąć mikrorusztowań. Po odsączeniu wody pozostawiono na dnie eppendorfa mikrorusztowania zawieszono w 0,1 M roztworze wodorotlenku sodu. Tak przygotowaną próbkę umieszczono na wytrząsarce w celu intensyfikacji procesu modyfikacji, sprawdzając co kilka minut jego postęp. Modyfikację chemiczną uznano za zakończoną, gdy zaobserwowano opadanie mikrorusztowań na dno eppendorfa z powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz. Średni czas modyfikacji mikrorusztowań z włókien PLLA w 0,1 M roztworze NaOH wynosił 45 minut. Następnie, roztwór wodny NaOH wraz z dyspergowanymi mikrorusztowaniami zwirowano (2 minuty, 13 500 rpm) w celu usunięcia roztworu wodorotlenku sodu. Mikrorusztowania zawieszano następnie w wodzie celem wypłukania wodorotlenku sodu i powtórzono procedurę wirowania i płukania do uzyskania neutralnego poziomu pH (co obejmuje średnio 6 cykli płukania). Przygotowane mikrorusztowania (przed i po obróbce) poddawano kontroli jakości z zastosowaniem mikroskopu elektronowego.

Przykład 4

Sposób jak w przykładzie 3, z tym, że zastosowano kolektor metalowy a modyfikacja mikrorusztowań jest modyfikacją fizyczną, gdzie kolektor wraz z pociętym materiałem umieszczono w naczyniu z wodą dejonizowaną, jednocześnie zdejmując mikrorusztowania z powierzchni kolektora.

Analogicznie jak w przykładzie 3, mikrorusztowania pozostawiono w wodzie na 1 godzinę w celu zwilżenia głębszych warstw nanowłóki tworzących mikrorusztowanie przez cząsteczki wody, a tym samym polepszenie ich penetracji przez wodny roztwór. Po godzinie oddzielono mikrorusztowania z wody dzięki zastosowaniu wirowania (20 minut, 13 500 rpm) (lub, w przypadku niepowodzenia, odciągnano ciecz bardzo cienką igłą (31G) tak aby nie odciągnąć mikrorusztowań). Po odsączeniu wody pozo-

stawione na dnie eppendorfa mikrorusztowania zawieszono w 0,1 M roztworze białka przez 45 min. Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania jako roztwór wodny białka zastosowano roztwór kolagenu. Natomiast w sposobie według wynalazku do modyfikacji chemicznej rusztowań można stosować również inne białka (np. lamininy, fibronektyny, sekwencję RGD, czy proteoglikany).

Po modyfikacji roztworem białek, mikrorusztowania są przepłukiwane 0,01 M buforem fosforanowym w celu usunięcia nadmiaru białka z powierzchni.

Przykład 5

Sposób jak w przykładzie 4, z tym że modyfikację fizyczną prowadzono przez 120 min w 0,001 M roztworze sekwencji RGD (tj. sekwencji peptydowej składającej się z aminokwasów argininy, glicyny i kwasu asparaginowego).

Przykład 6

W tym przykładzie wykonania 5 cz. w. polikaprolaktonu (PCL) rozpuszczono w 95 cz. w. heksafluoroizopropanolu (HFIP). Polimer rozpuszczano w temperaturze pokojowej przez minimum 24 godziny. Tak otrzymany roztwór używano do elektroprzędzenia. Materiał przędzono przy napięciu 12 kV i odległości 15 cm od uziemionego płaskiego kolektora szklanego (inne opcje: kolektor metalowy). Wydatek objętościowy pompy wynosił 0,8 mL/h. Materiały przygotowywane były w temperaturze pokojowej (ok. 22–24°C). Uzyskano materiał z nanowłókien o grubości 0,05 mm i porowatości około 80%. W dalszym kroku materiał wraz z kolektorem umieszczono na stole do obróbki laserem femtosekundowym. W oprogramowaniu lasera wprowadzono schemat cięcia materiału, który obejmował szereg cięć w kierunkach prostopadłych (przesunięcie linii w powstałej kratownicy wynosiło 0,05 mm w kierunku pionowym i poziomym). Po ustawieniu mocy lasera, liczby przejazdów wiązki oraz prędkości cięcia, otrzymano w rezultacie procesu obróbki laserowej mikrorusztowania w kształcie czworokąta o rozmiarze 0,05 mm na 0,05 mm. W dalszej części kolektor szklany wraz z pociętym materiałem umieszczono w naczyniu z wodą dejonizowaną, jednocześnie zdejmując mikrorusztowania z powierzchni kolektora. Mikrorusztowania pozostawiono w wodzie na 1 godzinę w celu zwilżenia głębszych warstw nanowłókien tworzących mikrorusztowanie przez cząsteczki wody, a tym samym polepszenie ich penetracji przez wodny roztwór. Po godzinie oddzielono mikrorusztowania z wody dzięki zastosowaniu wirowania (20 minut, 13 500 rpm) lub, w przypadku niepowodzenia, odciągano ciecz bardzo cienką igłą (np. 31G) tak aby nie odciągnąć mikrorusztowań. Po odsączeniu wody pozostawione na dnie eppendorfa mikrorusztowania zawieszono w 1 M roztworze wodorotlenku sodu. Tak przygotowaną próbkę umieszczono na wytrząsarce w celu intensyfikacji procesu modyfikacji, sprawdzając co kilka minut jego postęp. Modyfikację chemiczną uznano za zakończoną, gdy zaobserwowano opadanie mikrorusztowań na dno eppendorfa z powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz. Średni czas modyfikacji mikrorusztowań z włókien PCL w 1 M roztworze NaOH wynosił 40 minut. Następnie, roztwór wodny NaOH wraz z dyspergowanymi mikrorusztowaniami zwirowano (2 minuty, 13 500 rpm) w celu usunięcia roztworu wodorotlenku sodu. Mikrorusztowania zawieszano następnie w wodzie celem wypłukania wodorotlenku sodu i powtórzono procedurę wirowania i płukania do uzyskania neutralnego poziomu pH (zastosowano 6 cykli płukania).

Przygotowane mikrorusztowania (przed i po obróbce) poddawano kontroli jakości z zastosowaniem mikroskopu elektronowego.

Przykład 7

Sposób jak w przykładzie 6, z tym, że do cięcia mikrorusztowań wykorzystano laser pikosekundowy. Oprogramowanie lasera ustawiono tak, aby uzyskać rusztowania w kształcie walca o średnicy podstawy wynoszącej 0,05 mm. Kolektor wraz z pociętym materiałem umieszczono w naczyniu z wodą dejonizowaną, jednocześnie zdejmując mikrorusztowania z powierzchni kolektora. Mikrorusztowania pozostawiono w wodzie na 1 godzinę w celu zwilżenia głębszych warstw nanowłókien tworzących mikrorusztowanie przez cząsteczki wody, a tym samym polepszenie ich penetracji przez wodny roztwór. Po godzinie oddzielono mikrorusztowania z wody dzięki zastosowaniu wirowania (20 minut, 13 500 rpm) lub, w przypadku niepowodzenia, odciągano ciecz bardzo cienką igłą (np. 31G) tak aby nie odciągnąć mikrorusztowań. Po odsączeniu wody pozostawione na dnie eppendorfa mikrorusztowania zawieszono w 0,5 M roztworze białka przez 2 min. Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania jako roztwór wodny białka zastosowano roztwór lamininy.

Po modyfikacji fizycznej roztworem białek, mikrorusztowania są przepłukiwane 0,01 M buforem fosforanowym w celu usunięcia nadmiaru białka z powierzchni.

Przykład 8

W tym przykładzie wykonania 4 cz. w. poli(laktyd-koglikolidu) (PLGA) rozpuszczono w 96 cz. w. heksafluoroizopropanolu (HFIP). Polimer rozpuszczano w temperaturze pokojowej przez minimum 24 godziny. Tak otrzymany roztwór używano do elektroprzędzenia. Materiał przędzono przy napięciu 15 kV i odległości 14 cm od uziemionego płaskiego kolektora szklanego (inne opcje: kolektor metalowy). Wydatek objętościowy pompy wynosił 0,8 mL/h. Materiały przygotowywane były w temperaturze pokojowej (ok. 22–24°C). Uzyskano materiał z nanowłókien o grubości 0,1 mm i porowatości około 76%. W dalszym kroku materiał wraz z kolektorem umieszczono na stole do obróbki laserem. W oprogramowaniu lasera wprowadzono schemat cięcia materiału, który obejmował szereg cięć w kierunkach prostopadłych (przesunięcie linii w powstałej kratownicy wynosiło 0,14 mm w kierunku pionowym i poziomym). Po ustawieniu mocy lasera, liczby przejazdów wiązki oraz prędkości cięcia, otrzymano w rezultacie procesu obróbki laserowej mikrorusztowania w kształcie czworokąta o rozmiarze 0,14 mm na 0,14 mm. W dalszej części kolektor szklany wraz z pociętym materiałem umieszczono w naczyniu z wodą dejonizowaną, jednocześnie zdejmując mikrorusztowania z powierzchni kolektora. Mikrorusztowania pozostawiono w wodzie na 1 godzinę w celu zwilżenia głębszych warstw nanowłókien tworzących mikrorusztowanie przez cząsteczki wody, a tym samym polepszenie ich penetracji przez wodny roztwór. Po godzinie oddzielono mikrorusztowania z wody dzięki zastosowaniu wirowania (20 minut, 13 500 rpm) lub, w przypadku niepowodzenia, odciągano ciecz bardzo cienką igłą (31G) tak aby nie odciągnąć mikrorusztowań. Po odsączeniu wody pozostawione na dnie eppendorfa mikrorusztowania zawieszono w 0,05 M roztworze wodorotlenku sodu. Tak przygotowaną próbkę umieszczono na wytrząsarce w celu intensyfikacji procesu modyfikacji, sprawdzając co kilka minut jego postęp. Modyfikację chemiczną uznano za zakończoną, gdy zaobserwowano opadanie mikrorusztowań na dno eppendorfa z powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz. Średni czas modyfikacji mikrorusztowań z włókien PLGA w 0,05 M roztworze NaOH wynosił 40 minut. Następnie, roztwór wodny NaOH wraz z dyspergowanymi mikrorusztowaniami zwirowano (2 minuty, 13 500 rpm) w celu usunięcia roztworu wodorotlenku sodu. Mikrorusztowania zawieszano następnie w wodzie celem wypłukania wodorotlenku sodu i powtórzono procedurę wirowania i płukania do uzyskania neutralnego poziomu pH (średnio 6 cykli płukania).

Przygotowane mikrorusztowania (przed i po obróbce) poddawano kontroli jakości z zastosowaniem mikroskopu elektronowego.

Przykład 9

W tym przykładzie wykonania 0,22 cz. w. kolagenu rozpuszczono w 75 cz. w. etanolu i 24,78 cz. w. wody, zawierających dodatkowo 30 mM kwasu solnego. Polimer rozpuszczano w temperaturze pokojowej przez minimum 24 godziny. Tak otrzymany roztwór używano do elektroprzędzenia. Materiał przędzono przy napięciu 12 kV i odległości 10 cm od uziemionego płaskiego kolektora metalowego pokrytego folią polimerową. Wydatek objętościowy pompy wynosił 0,3 mL/h. Materiały przygotowywane były w temperaturze pokojowej (ok. 22–24°C) i wilgotności względnej 10%. Uzyskano materiał z nanowłókien o grubości 0,2 mm.

W dalszym kroku materiał wraz z kolektorem umieszczono na stole do obróbki laserem ekscymerowym. W oprogramowaniu lasera wprowadzono schemat cięcia materiału, zapewniający otrzymanie walca o średnicy podstawy wynoszącej 0,4 mm.

Następnie kolektor wraz z pociętym materiałem umieszczono na 20 min w eksykatorze zawierającym naczynie z 4 mL wody amoniakalnej, zaś w kolejnym kroku umieszczano w naczyniu z wodą dejonizowaną, jednocześnie zdejmując mikrorusztowania z powierzchni kolektora. Mikrorusztowania pozostawiono w wodzie na 1 godzinę w celu zwilżenia głębszych warstw nanowłókien tworzących mikrorusztowanie przez cząsteczki wody, a tym samym polepszenie ich penetracji przez wodny roztwór. Po godzinie oddzielono mikrorusztowania z wody dzięki zastosowaniu wirowania (20 minut, 13 500 rpm). Po odsączeniu wody pozostawione na dnie eppendorfa mikrorusztowania zawieszono w 0,01 M roztworze wodorotlenku sodu i prowadzono modyfikację chemiczną przez 1 min.

Następnie, roztwór wodny NaOH wraz z dyspergowanymi mikrorusztowaniami zwirowano (2 minuty, 13 500 rpm) w celu usunięcia roztworu wodorotlenku sodu. Mikrorusztowania zawieszano następnie w wodzie celem wypłukania wodorotlenku sodu i powtórzono procedurę wirowania i płukania do uzyskania neutralnego poziomu pH (zastosowano 6 cykli płukania). Przygotowane mikrorusztowania (przed i po obróbce) poddawano kontroli jakości z zastosowaniem mikroskopu elektronowego.

Przykład 10

W tym przykładzie wykonania 8 cz. w. chitozanu rozpuszczono w 83 cz. w. kwasu octowego i 9 cz. w. wody. Polimer rozpuszczano w temperaturze 30°C przez minimum 24 godziny. Tak otrzymany roztwór używano do elektroprzędzenia. Materiał przędzono przy napięciu 25 kV i odległości 7 cm od uziemionego płaskiego kolektora szklanego. Wydatek objętościowy pompy wynosił 1 mL/h. Materiały przygotowywane były w temperaturze pokojowej (ok. 22–24°C). Uzyskano materiał z nanowłókien o grubości 0,05 mm.

W oprogramowaniu lasera wprowadzono schemat cięcia materiału, zapewniający otrzymanie graniastosłupa z trójkątem w podstawie o boku 0,2 mm. Następnie kolektor wraz z pociętym materiałem umieszczono w naczyniu z wodą dejonizowaną, jednocześnie zdejmując mikrorusztowania z powierzchni kolektora. Mikrorusztowania pozostawiono w wodzie na 1 godzinę w celu zwilżenia głębszych warstw nanowłókien tworzących mikrorusztowanie przez cząsteczki wody, a tym samym polepszenie ich penetracji przez wodny roztwór. Po godzinie oddzielono mikrorusztowania z wody dzięki zastosowaniu wirowania (20 minut, 13 500 rpm). Po odsączeniu wody pozostawiono na dnie eppendorfa mikrorusztowania zawieszono w 0,01 M roztworze wodorotlenku sodu i prowadzono modyfikację chemiczną przez 60 min. Następnie, roztwór wodny NaOH wraz z dyspergowanymi mikrorusztowaniami zwirowano (2 minuty, 13 500 rpm) w celu usunięcia roztworu wodorotlenku sodu. Mikrorusztowania zawieszano następnie w wodzie celem wypłukania wodorotlenku sodu i powtórzono procedurę wirowania i płukania do uzyskania neutralnego poziomu pH (zastosowano 6 cykli płukania). Przygotowane mikrorusztowania (przed i po obróbce) poddawano kontroli jakości z zastosowaniem mikroskopu elektronowego.

Przykład 11

W tym przykładzie wykonania 7 cz. w. PLCL rozpuszczono w 93 cz. w. heksafluoroizopropanolu (HFIP) i pozostawiono na mieszadle magnetycznym przez 24 godz. do całkowitego rozpuszczenia polimeru. Otrzymany roztwór używano do elektroprzędzenia. Materiał przędzono przy napięciu 15 kV i odległości 15 cm od uziemionego płaskiego kolektora szklanego. Wydatek objętościowy pompy wynosił 0,8 mL/godz. Materiał był elektroprzędzony w temperaturze otoczenia (ok. 22–24°C). Uzyskane włókna były jednorodne na całej długości, a ich średni rozmiar wynosił 700 nm. Ostatecznie materiał na szklanym kolektorze umieszczono na stole do obróbki laserem i poddano cięciu laserem femtosekundowym na mikrorusztowania o kształcie i wymiarach zadanym przez oprogramowanie (np. kształcie czworokąta o rozmiarze 0,14 mm na 0,14 mm). W dalszej części kolektor szklany wraz z pociętym materiałem umieszczono w naczyniu z wodą dejonizowaną, aby poddać je procesowi ściągania z powierzchni kolektora do wody. Początkowo mikrorusztowania pozostawiono w wodzie na 1 godzinę w celu zwilżenia, po tym czasie odwirowano (20 minut, 13 500 rpm) lub, w przypadku niepowodzenia, odciągano ciecz bardzo cienką igłą (31G) tak aby nie odciągnąć mikrorusztowań. Następnie mikrorusztowania zostały zalane 0,05 M roztworem NaOH na 5 minut, w celu przeprowadzenia hydrolizy powierzchni. Po 5 minutach roztwór NaOH odwirowano, a mikrorusztowania płukano wodą w celu usunięcia resztek NaOH. Płukanie powtórzono 3 razy, a każde trwało około 15 minut, do osiągnięcia obojętnego pH roztworu. Tak przygotowane rusztowania umieszczono w roztworze NHS/EDC (50 mM NHS i 50 mM EDC) na 1 godzinę. Po tym czasie roztwór NHS/EDC odwirowano, a mikrorusztowania poddano płukaniu w wodzie dejonizowanej przez 5 minut. Ostatecznie mikrorusztowania umieszczono w uprzednio przygotowanym roztworze czynnika wzrostu. W tym przykładzie wykonania czynnikiem wzrostu był transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGF- β 1) o stężeniu 10 ng/ml w 0,01 M buforze fosforanowym. Mikrorusztowania inkubowano w roztworze czynnika wzrostu w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Po tym czasie ponownie odwirowano mikrorusztowania i poddano je płukaniu w wodzie dejonizowanej. Ostatecznie mikrorusztowania zostały osuszone i przechowywane w 4°C.

Przykład 12

Sposób jak w przykładzie 11, z tym, że 5 cz. w. PLCL rozpuszczono w 95 cz. w. HFIP i pozostawiono na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny do całkowitego rozpuszczenia polimeru. Otrzymany roztwór używano do elektroprzędzenia, gdzie materiał przędzono przy napięciu 15 kV i odległości 15 cm od uziemionego płaskiego kolektora szklanego. Wydatek objętościowy pompy wynosił 0,5 mL/h. Materiał był elektroprzędzony w temperaturze otoczenia (ok. 22–24°C). Uzyskane włókna były jednorodne na całej długości, a ich średnica wynosiła 100 nm. Natomiast sposobem według wynalazku można również uzyskać włókna o mniejszej średnicy, np. 50 nm.

Przykład 13

Sposób jak w przykładzie 11, z tym, że 15 PLCL rozpuszczono w 85 ml 2,2,2-trifluoroetanolu i pozostawiono na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny do całkowitego rozpuszczenia polimeru. Otrzymany roztwór używano do elektroprzędzenia, gdzie materiał przędzono przy napięciu 17 kV i odległości 12 cm od uziemionego płaskiego kolektora szklanego. Wydatek objętościowy pompy wynosił 0,8 mL/h. Materiał był elektroprzędzony w temperaturze otoczenia (ok. 22–24°C). Uzyskane włókna były jednorodnie na całej długości, a ich średnica wynosiła 10 μm.

Przykład 14

W celu wykonania roztworu zawierającego 95% ww. PLGA oraz 5% ww. chitozanu zastosowano dwustopniową metodykę rozpuszczania składników w heksafluoroizopropanolu (HFIP), tak aby ostatecznie osiągnąć roztwór o całkowitym stężeniu polimeru w roztworze wynoszącym 4% ww. w stosunku do rozpuszczalnika. Na początku chitozan rozpuszczano w kąpeli wodnej w temperaturze 50°C przez ok. 24 godziny. Następnie do roztworu chitozanu, który ochłodzono do temperatury pokojowej dodano PLGA i pozostawiono do rozpuszczenia przez kolejne 24 godziny. Tak otrzymany roztwór używano do elektroprzędzenia. Materiał przędzono przy napięciu 17 kV i odległości 15 cm od uziemionego płaskiego kolektora szklanego (inne opcje: kolektor metalowy). Wydatek objętościowy pompy wynosił 1,5 mL/h. Materiały przygotowywane były w temperaturze pokojowej (ok. 22–24°C). W zależności od napięcia i szybkości podawania roztworu włókna mogą uzyskać średni rozmiar wynoszący 350 nm. Ostatecznie materiał na szklanym kolektorze umieszczono na stole do obróbki laserem i poddano cięciu laserem na mikrorusztowania o kształcie i wymiarach zadanym przez oprogramowanie (np. kształcie czworokąta o rozmiarze 0,14 mm na 0,14 mm). W dalszej części kolektor szklany wraz z pociętym materiałem umieszczono w naczyniu z wodą dejonizowaną, gdzie mikrorusztowania zostały delikatnie ściągnięte z powierzchni kolektora do wody. Mikrorusztowania pozostawiono w wodzie na 1 godzinę w celu zwilżenia, następnie w celu separacji mikrorusztowań od wody zastosowano wirowanie (2 minuty, 13 500 rpm), po czym ostatecznie mikrorusztowania zostały zalane 0,05 M roztworem NaOH na 5 minut (hydroliza powierzchni). Następnie powtórzono procedurę wirowania i zalano mikrorusztowania wodą w celu wypłukania NaOH. Płukanie powtórzono 3 razy, a każde trwało ok. 15 minut. Tak przygotowane rusztowania umieszczono w roztworze NHS/EDC (50 mM NHS i 50 mM EDC) na 1 godzinę. Po tym czasie roztwór NHS/EDC odwirowano, a mikrorusztowania poddano 5-minutowemu płukaniu w wodzie. W tym przykładzie wykonania ostatecznie mikrorusztowania umieszczono w uprzednio przygotowanym roztworze siarczanu chondroityny o stężeniu 1 mg/ml w roztworze 0,02 M NaCl na 24 godziny. Natomiast zamiast siarczanu chondroityny można stosować inne roztwory, takie jak roztwory zawierające chitozan czy czynniki wzrostu. Po tym czasie ponownie odwirowano mikrorusztowania i poddano je trójrotnemu płukaniu (jeden raz w 0,02 M roztworze NaCl oraz dwa razy w wodzie dejonizowanej). Ostatecznie mikrorusztowania zostały osuszone i przechowywane w 4°C.

Przykład 15

Wytwarzanie mikrorusztowań z substancją aktywną.

W tym przykładzie wykonania 9 cz. w. poli(L-Laktydu-co-kaprolaktonu) (PLCL, 70% L-laktyd, 30% kaprolakton) rozpuszczono w 85,5 cz. w. chloroformu, a następnie dodano 5,2 cz. w. dimetyloformamidu. Polimer rozpuszczano w temperaturze pokojowej przez minimum 24 godziny. Do 1 grama roztworu polimeru dodano 5 mg surfaktanta SPAN-80, a następnie mieszano. Następnie, do roztworu polimeru z surfaktantem dodano w dwóch porcjach po 25 uL substancję aktywną, którą stanowił czynnik wzrostu w 0,01 M buforze fosforanowym. Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania zastosowanym czynnikiem wzrostu było białko morfogenetyczne kości 2 (BMP2), natomiast można stosować również inne substancje aktywne, w tym inne czynniki wzrostu (np. białko morfogenetyczne kości 7 BMP-7, czynnik wzrostu nerwów NGF czy neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego BDNF). W sposobie według wynalazku można stosować różne stężenia substancji aktywnej, jednak korzystnie ilość substancji aktywnej powinna stanowić <1% wag. masy względem czystego polimeru użytego do elektroprzędzenia.

Całość mieszano i wytrząsano do utworzenia jednorodnej i stabilnej emulsji wody w fazie organicznej. Materiał przędzono przy napięciu 15 kV i odległości 20 cm od uziemionego płaskiego kolektora szklanego. Wydatek objętościowy pompy wynosił 0,8 ml/godziny. Materiały przygotowywane były w temperaturze pokojowej (ok. 22–24°C). Uzyskano materiał z nanowłókien o grubości 0,1 mm i porowatości około 80%. W dalszym kroku materiał wraz z kolektorem umieszczono na stole do obróbki lase-

rem. W oprogramowaniu lasera wprowadzono schemat cięcia materiału, który obejmował szereg cięć w kierunkach prostopadłych (przesunięcie linii w powstałej kratownicy wynosiło 0,05 mm w kierunku pionowym i poziomym). Po ustawieniu mocy lasera, liczby przejazdów wiązki oraz prędkości cięcia, otrzymano w rezultacie procesu obróbki laserowej mikrorusztowania w kształcie czworokąta o rozmiarze 0,05 mm na 0,05 mm. W dalszej części kolektor szklany wraz z pociętym materiałem umieszczono w naczyniu (Falcon 50 ml) z wodnym roztworem wodorotlenku sodu 0,1 M, jednocześnie zdejmując mikrorusztowania z powierzchni kolektora celem modyfikacji mikrorusztowań trwającej około 5 min. Następnie mikrorusztowania odwirowywano i usuwano roztwór wodorotlenku sodu. Mikrorusztowania zawieszano następnie w wodzie celem wyplukania wodorotlenku sodu, oceny czy mikrorusztowania gromadzą się na powierzchni woda-powietrze i w przypadku modyfikacji wszystkich mikrorusztowań powtarzano procedurę wirowania i płukania do uzyskania neutralnego poziomu pH. Przygotowane mikrorusztowania (przed i po obróbce) poddawano kontroli jakości z zastosowaniem mikroskopu elektronowego.

Przykład 16

Kompozycja według wynalazku zawiera mikrorusztowania wykonane sposobem według wynalazku oraz bufor, gdzie mikrorusztowania poddano sterylizacji za pomocą 85% etanolu, zaś po zwirowaniu i odsączeniu etanolu, mikrorusztowania naświetlano promieniowaniem UV (2×30 min), następnie zawieszono w sterylnym buforze.

W tym nieograniczającym przykładzie wykonania kompozycja zawiera zmodyfikowane chemicznie (modyfikacja chemiczna roztworem 1 M NaOH, w czasie 2 min) mikrorusztowania z polikaprolaktonu (PCL) o porowatości wynoszącej około 80% oraz o kształcie graniastosłupa o wysokości 0,1 mm (odpowiadającej grubości mikrorusztowania) oraz o podstawie czworokątnej o wymiarach 0,14 mm × 0,14 mm, które zawieszono w 0,5% kwasie hialuronowym. Natomiast do zawieszenia kompozycji według wynalazku można zastosować inne bufor rozumiane jako standardowe bufor laboratoryjne, roztwory, w szczególności roztwory wodne, oraz wodę np. bufor zawierający pożywkę hodowlaną do kultur komórkowych, bufor fosforanowy, bufor HEPES (kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy), bufor MES (kwas 2-morfolinoetanosulfonowy), bufor BIS-TRES ([bis-(2-hydroksyetylo)imino]-tris(hydroksymetylo)metan), poloksamer, żel kolagenowy czy żel alginianowy.

Przy czym, wspomniane mikrorusztowania swobodnie i jednorodnie pływają w całej objętości buforu (tj. 0,5% roztworu kwasu hialuronowego) nie gromadząc się na granicy międzyfazowej roztwór-powietrze oraz nie agregują wzajemnie (fig. 3). Na fig. 3 przedstawiono roztwory kwasu hialuronowego z różnymi stężeniami mikrorusztowań mających w podstawie czworokąt o wymiarach 0,14 mm na 0,14 mm, gdzie po 1 minucie od wymieszania roztworu, widoczny jest brak mikrorusztowań na dnie próbki z niemodyfikowanymi mikrorusztowaniami i akumulacja na granicy międzyfazowej.

Tym samym możliwe jest wstrzykiwanie wodnych zawiesin mikrorusztowań przez igły o niewielkich rozmiarach (np. w zakresie 23–26G) bez ich zatykania podczas iniekcji. Wyniki badań wstrzykiwalności mikrorusztowań modyfikowanych według wynalazku, mających w podstawie czworokąt o wymiarach 0,14 mm na 0,14 mm, przez igły o rozmiarach 23, 24 i 26G przedstawiono na fig. 4. Jak wskazano na fig. 4 dla wszystkich testowanych typów igieł osiągnięto zadowalającą wstrzykiwalność (tj. powyżej 90%) mikrorusztowań według wynalazku.

Odnosnie ustalenia pożądanego stężenia mikrorusztowań w buforze. Mikrorusztowania w buforze można zliczać wykorzystując w tym celu komorę Nageotte'a (lub inne komory zliczeniowe), co umożliwi ustalenie stosownej koncentracji nośników do wstrzyknięcia lub inokulacji hodowli komórkowych. W tym przykładzie wykonania kompozycja zawiera 600 mikrorusztowań/mL roztworu kwasu hialuronowego.

Przykład 17

W tym przykładzie wykonania kompozycja według wynalazku zawiera mikrorusztowania wykonane sposobem według wynalazku z osadzonymi na nich ssaczymi komórkami oraz bufor zawierające podłoże do hodowli komórkowej.

Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania wspomniane komórki ssacze stanowią ludzkie komórki macierzyste szpiku. Natomiast kompozycja według wynalazku może zawierać mikrorusztowania, na których osadzone są również inne typy komórek (np. chondrocyty, osteoblasty czy fibroblasty).

W tym przykładzie wykonania zastosowano mikrorusztowania wytworzone sposobem według przykładu 6, które przed osadzaniem komórek poddano sterylizacji za pomocą 85% etanolu, zaś po zwirowaniu i odsączeniu etanolu, mikrorusztowania naświetlano promieniowaniem UV (2×30 min).

W celu osadzania komórek macierzystych na mikrorusztowaniach według wynalazku, komórki macierzyste szpiku kostnego w ilości $15 \cdot 10^3/\text{mL}$ hodowane były w nieadherentnych dołkach płytki hodowlanej razem z mikrorusztowaniami wytworzonymi według przykładu 6. Hodowlę prowadzono w podłożu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementowane 10% surowicą bydlęcą. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C przy atmosferze zawierającej 95% powietrza oraz 5% CO_2 . Po 24-godzinnej inkubacji hodowlę zbierano i odwirowano. Następnie odwirowane mikrorusztowania płukano w celu odpłukania nieosadzonych komórek. Następnie mikrorusztowania zawieszono w buforze, który w tym przykładzie wykonania stanowi pożywkę hodowlaną do kultur komórkowych EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) suplementowane 10% surowicą bydlęcą. Przy czym, wspomniane mikrorusztowania swobodnie i jednorodnie pływają w całej objętości buforu i nie agregują wzajemnie.

Choć w tym nieograniczającym przykładzie wykonania jako bufor zastosowano pożywkę EMEM suplementowaną 10% surowicą, to wspomnianym buforem mogą być również inne podłoża (same lub z dodatkami obejmującymi np. surowicę bydlęcą, antybiotyki, witaminy itp.) standardowo stosowane przy hodowlach komórek ssaczy. Przy czym, dobór pożywki zależy od komórek ssaczy, które mają zostać osadzone na mikrorusztowaniach według wynalazku.

Przykład 18

Kompozycja według wynalazku zawiera mikrorusztowania wykonane sposobem według wynalazku oraz bufor, gdzie mikrorusztowania poddano sterylizacji za pomocą 85% etanolu, zaś po zwirowaniu i odsączeniu etanolu, mikrorusztowania naświetlano promieniowaniem UV (2×30 min), następnie zawieszono w sterylnym buforze. Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania kompozycja zawiera zmodyfikowane chemicznie (modyfikacja chemiczna roztworem 0,5 M NaOH, w czasie 5 min) mikrorusztowania z poli(L-Laktydu-co-kaprolaktanu) (PLCL) z inkorporowaną substancją czynną, którą stanowi Rodamina B w ilości 1% wag. względem masy polimeru. Kształt mikrorusztowań stanowi graniastostup o wysokości 0,8 mm (odpowiadającej grubości mikrorusztowania) oraz o podstawie czworokątnej o wymiarach $0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm}$, które zawieszono w buforze zawierającym bufor fosforanowy. Analogicznie przygotowano mikrorusztowania z PLGA oraz PLLA.

Tak przygotowane mikrorusztowania w buforze można zliczać wykorzystując w tym celu komorę Nageotte'a (lub inne komory zliczeniowe), co umożliwi ustalenie stosownej koncentracji nośników do wstrzyknięcia lub inokulacji hodowli komórkowych. W tym przykładzie wykonania kompozycja zawiera 9000 mikrorusztowań/ml buforu.

Przy czym, wspomniane mikrorusztowania swobodnie i jednorodnie pływają w całej objętości buforu i nie agregują wzajemnie. Tym samym możliwe jest wstrzykiwanie wodnych zawiesin mikrorusztowań przez igły o niewielkich rozmiarach (np. w zakresie 20–27G) bez ich zatykania podczas iniekcji.

Następnie przygotowane mikrorusztowania z PLGA, PLLA oraz PLCL poddano analizie uwalniania substancji modelowej (tj. Rodamina) z badanych mikrorusztowań. Wyniki analizy przedstawiono na fig. 5. Jak wskazano na fig. 5, uwalnianie substancji czynnej z mikrorusztowań zawartych w kompozycji według wynalazku przebiega w sposób kontrolowany, gdzie w pierwszych godzinach po implantacji (tj. wstrzyknięciu kompozycji według wynalazku do tkanki docelowej, np. tkanki chrzęstnej) pojawi się wyrzut leku w zakresie 10–40% (w zależności od zastosowanego polimeru) początkowej dawki substancji aktywnej w mikrorusztowaniu, a następnie stopniowe uwalnianie substancji, które będzie trwało około 2–4 tygodni w zależności od wykorzystanego polimeru.

Przykład 19

Ocena cytotoksyczności mikrorusztowań wytworzonych sposobem według wynalazku.

Ocenę cytotoksyczności materiału wytworzonego według wynalazku przeprowadzono z zastosowaniem linii komórkowej mysich fibroblastów (L929) pozyskanych z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC). Przed doświadczeniem, mikrorusztowania poddano sterylizacji za pomocą 85% etanolu, zaś po zwirowaniu i odsączeniu etanolu, mikrorusztowania naświetlano promieniowaniem UV (2×30 min).

Hodowlę komórkową mysich fibroblastów L929 L cell, L-929, derivative of Strain L (ATCC® CCL-1™) prowadzono zgodnie z instrukcją producenta (ATCC) stosując podłoże hodowlane EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) suplementowane surowicą (temperatura 37°C , atmosfera 95% powietrza, 5% CO_2).

W celu przeprowadzenia analizy cytotoksyczności, komórki L929 były hodowane w dołkach nieadherentnych bezpośrednio w obecności zawieszonych mikrorusztowań według wynalazku. Po 24-godzinnej inkubacji w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C wykonywano barwienie różnicowe żywe/martwe w celu oceny ilości, żywotności (Live/Dead Fixable Dead Cell Stains (ThermoFisher Scientific, USA)) oraz badanie morfologii komórek ActinGreen™, and NucBlue™ Reagent (Invitrogen™, USA) za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.

Komórki żywe wykazywały zieloną fluorescencję, podczas gdy komórki martwe wykazywały czerwoną fluorescencję. Po 24-godzinnej inkubacji, obserwowano dużą ilość żywych komórek oraz pojedyncze komórki martwe. Żywe komórki wykazywały prawidłową morfologię i były dobrze rozplaszczane na materiale (fig. 6 i 7). Obserwacja ta potwierdza, że materiał nie jest cytotoksyczny w stosunku do fibroblastów i sprzyja adhezji komórek.

Brak cytotoksyczności mikrorusztowań wytworzonych sposobem według wynalazku umożliwia ich zastosowanie jako rusztowania dla komórek. Takie mikrorusztowanie stanowi porowatą włókninę będącą rusztowaniem dla komórek, umożliwiającą jednocześnie przenikanie substancji odżywczych, tlenu i metabolitów.

Kompozycja według wynalazku może zatem znaleźć zastosowanie jako rusztowanie komórkowe zasiedlane w warunkach *in vitro* komórkami pobranymi od pacjentów w celu uzupełniania niewielkich ubytków kostnych lub regeneracji krążka międzykręgowego u tych samych pacjentów (pacjenci mogą w tym przypadku być dawcami i biorcami komórek). Innym zastosowaniem biomateriału może być stanowienie rusztowania dla komórek w bioreaktorach do ekspansji kultur komórkowych.

Przykład 20

Ocena wstrzykiwalności mikrorusztowań wytworzonych sposobem według wynalazku.

Ocenę wstrzykiwalności mikrorusztowań mających w podstawie czworokąt o wymiarach 0,14 mm na 0,14 mm wykonano stosując jako nośnik 0,5% roztwór kwasu hialuronowego. Do strzykawki o pojemności 1 mL wprowadzono 50 mikrorusztowań w roztworze a następnie całość wystrzyknięto przez igłę o rozmiarze 23G. Tę samą procedurę powtórzono czterokrotnie zliczając za każdym razem mikrorusztowania wychodzące z igły. Badania przeprowadzono również z igłami o rozmiarach 24 i 26G (fig. 4).

Uzyskane wyniki potwierdzają, że kompozycja według wynalazku może zostać zastosowana jako wstrzykiwalny nośnik komórek, który dzięki swoim niewielkim rozmiarom może być podawany w sposób małoinwazyjny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania wstrzykiwalnego biokompatybilnego nośnika leków, komórek lub ich kombinacji, w postaci mikrorusztowań, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - a) przygotowanie roztworu zawierającego polimer oraz co najmniej jeden rozpuszczalnik;
 - b) formowanie włókien o średnicy włókna wynoszącej od 50 nm do 10 μm na kolektorze płaskim w procesie elektroprzędzenia;
 - c) laserowe cięcie warstwy włókniny uformowanej na kolektorze na pojedyncze oddzielne mikrorusztowania rusztowania o grubości od 0,01 do 0,2 mm oraz o kształcie walca o średnicy podstawy wynoszącej od 0,1 do 0,4 mm albo graniastosłupa o długości boku podstawy wynoszącym od 0,04 do 0,4 mm;
 - d) oddzielanie oddzielnych mikrorusztowań od kolektora;
 - e) chemiczne modyfikowanie mikrorusztowań poprzez ich zawieszenie w wodnym roztworze NaOH o stężeniu 0,001–1 M przez 1–120 min albo fizyczne modyfikowanie mikrorusztowań poprzez ich zawieszenie w wodnym roztworze białka o stężeniu 0,001–0,5 M przez 2–120 min;
 - f) odpłukanie nadmiaru NaOH albo białka z powierzchni mikrorusztowań.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że polimer stanowi biodegradowalny polimer wybrany z grupy obejmującej poli(L-laktyd), poli(D-laktyd), polikaprolakton, poli(D,L)-laktyd, poli(L-laktyd-ko-D,L-laktyd), poliglikolid, poli(laktyd-ko-glikolid), poli(laktyd-ko-kaprolakton), poliuretan, chitozan, kolagen, ich mieszanin lub kopolimery.

3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że w etapie b) na kolektorze płaskim formowane są włókna o średnicy od 50 do 1000 nm.
4. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 3, **znamienny tym**, że w etapie b) zastosowano kolektor płaski wybrany z grupy obejmującej kolektor wykonany z materiału przewodzącego, kolektor metalowy, kolektor wykonany z cienkiego materiału nieorganicznego, kolektor szklany, kolektor pokryty warstwą materiału przewodzącego, kolektor wykonany z materiału przewodzącego pokryty folią polimerową.
5. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 4, **znamienny tym**, że w etapie a) do roztworu polimeru dodaje się substancję aktywną w ilości <1% wag. masy czystego polimeru.
6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że dodawaną substancją aktywną jest czynnik wzrostu wybrany z grupy obejmującej BMP-2, BMP-7, TGF, NGF lub BDNF.
7. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 6, **znamienny tym**, że w etapie c) warstwa nanowłókniny jest ciętą wiązką lasera wybranego z grupy obejmującej laser ekscymerowy, pikosekundowy lub femtosekundowy.
8. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 7, **znamienny tym**, że w etapie c) warstwa nanowłókniny jest ciętą wiązką lasera na graniastosłupy zawierające w podstawie figurę wybraną z grupy obejmującej trójkąt, kwadrat, prostokąt, romb, równoległobok, trapez.
9. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 8, **znamienny tym**, że w etapie e) do fizycznej modyfikacji mikrorusztowań stosuje się roztwór białka wybranego z grupy obejmującej lamininy, firbronektyny, kolagen, sekwencję RGD, proteoglikany.
10. Sposób według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 9, **znamienny tym**, że obejmuje etap g) obejmujący pokrywanie modyfikowanych chemicznie odpłukanych mikrorusztowań z etapu f) warstwą substancji wybranej z grupy obejmującej chitozan, siarczan chondroityny, czynnik lub czynniki wzrostu.
11. Kompozycja do podawania przez wstrzykiwanie zawierająca bufor oraz biokompatybilne wzajemnie nieagregujące *in vitro* nośniki leków, komórek lub ich kombinacji, **znamienna tym**, że nośniki stanowią mikrorusztowania z elektroprzędzonych włókien przygotowane sposobem według dowolnego z poprzednich zastrz. 1–10, gdzie każde mikrorusztowanie stanowi pojedynczy nośnik o grubości od 0,01 do 0,2 mm oraz o kształcie walca o średnicy podstawy wynoszącej od 0,1 do 0,4 mm albo graniastosłupa o długości boku podstawy wynoszącym od 0,04 do 0,4 mm, którego powierzchnia jest zmodyfikowana chemicznie roztworem NaOH lub fizycznie roztworem białka, przy czym mikrorusztowania zawieszane w buforze tworzą zawiesinę nieagregujących mikrocząstek.
12. Kompozycja według zastrz. 11, **znamienna tym**, że zawiera komórki ssacze osadzone na mikrorusztowaniach, przy czym wspomniane komórki ssacze wybrane są z grupy obejmującej chondrocyty, osteoblasty, fibroblasty lub komórki macierzyste.
13. Kompozycja według zastrz. 11 albo 12, **znamienna tym**, że bufor stanowi woda lub bufor wybrany z grupy obejmującej: bufor zawierający pożywkę hodowlaną do kultur komórkowych, bufor fosforanowy, bufor HEPES (kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy), bufor MES (kwas 2-morfolinoetanosulfonowy), bufor BIS-TRIS ([bis(2-hydroksyetylo)imino]-tris(hydroksymetylo)metan), kwas hialuronowy, poloksamer, żel kolagenowy, żel alginianowy.
14. Kompozycja według dowolnego z poprzednich zastrz. od 11 do 13, zawierająca bufor oraz elektroprzędzone mikrorusztowania, które zawieszane w buforze tworzą zawiesinę nieagregujących mikrocząstek, a każde mikrorusztowanie stanowi pojedynczy nośnik o grubości od 0,01 do 0,2 mm oraz o kształcie walca o średnicy podstawy wynoszącej od 0,1 do 0,4 mm albo graniastosłupa o długości boku podstawy wynoszącym od 0,04 do 0,4 mm, a powierzchnia każdego mikrorusztowania jest zmodyfikowana chemicznie roztworem NaOH lub fizycznie roztworem białka, do zastosowania w leczeniu uszkodzeń kości, chrząstek lub krążków międzykręgowych.

Rysunki

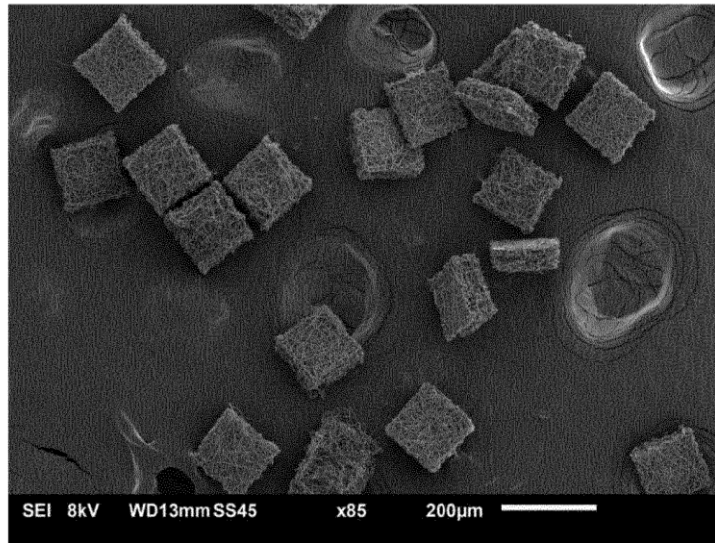


Fig. 1

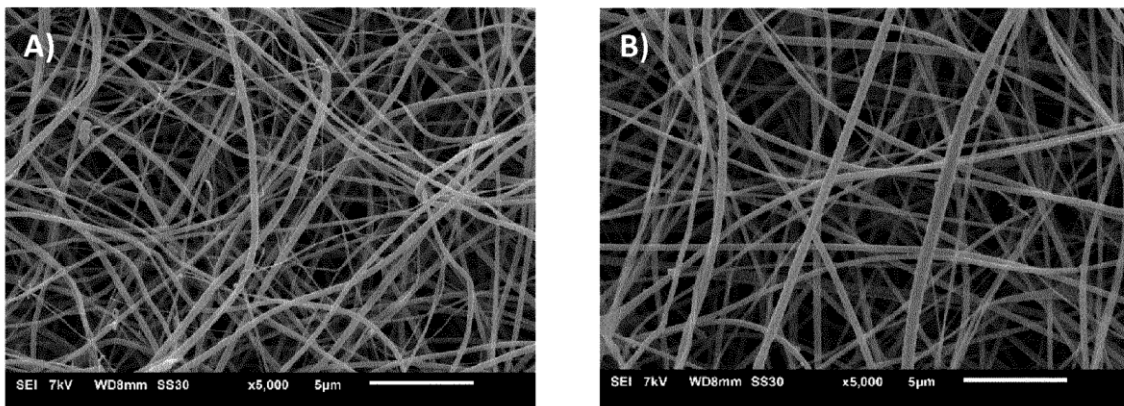


Fig. 2

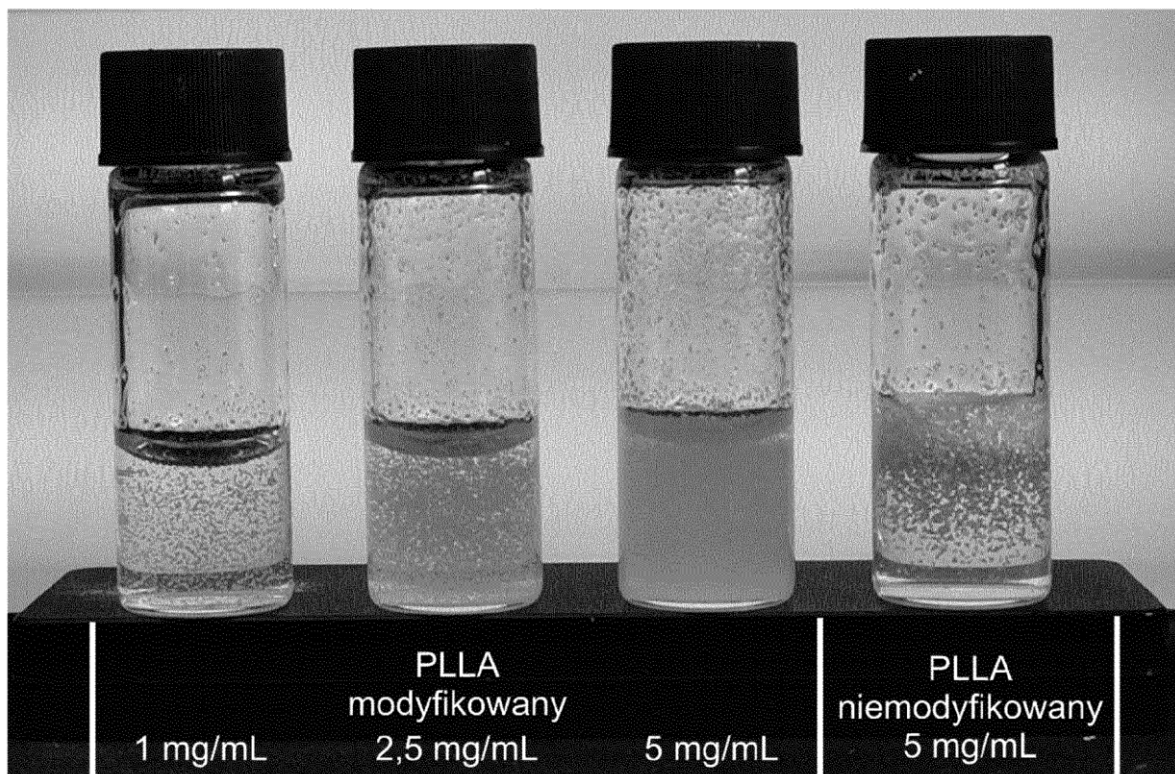


Fig. 3



Fig. 4

Charakterystyka uwalniania substancji modelowej z mikrorusztowań z polimerów PLGA, PLLA i PLCL

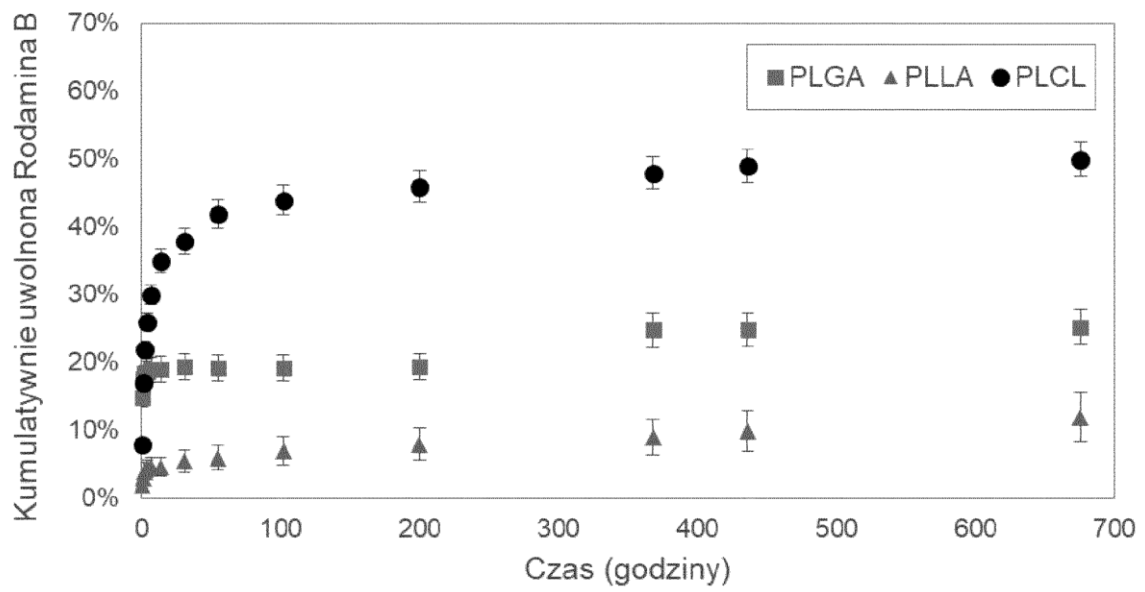


Fig. 5

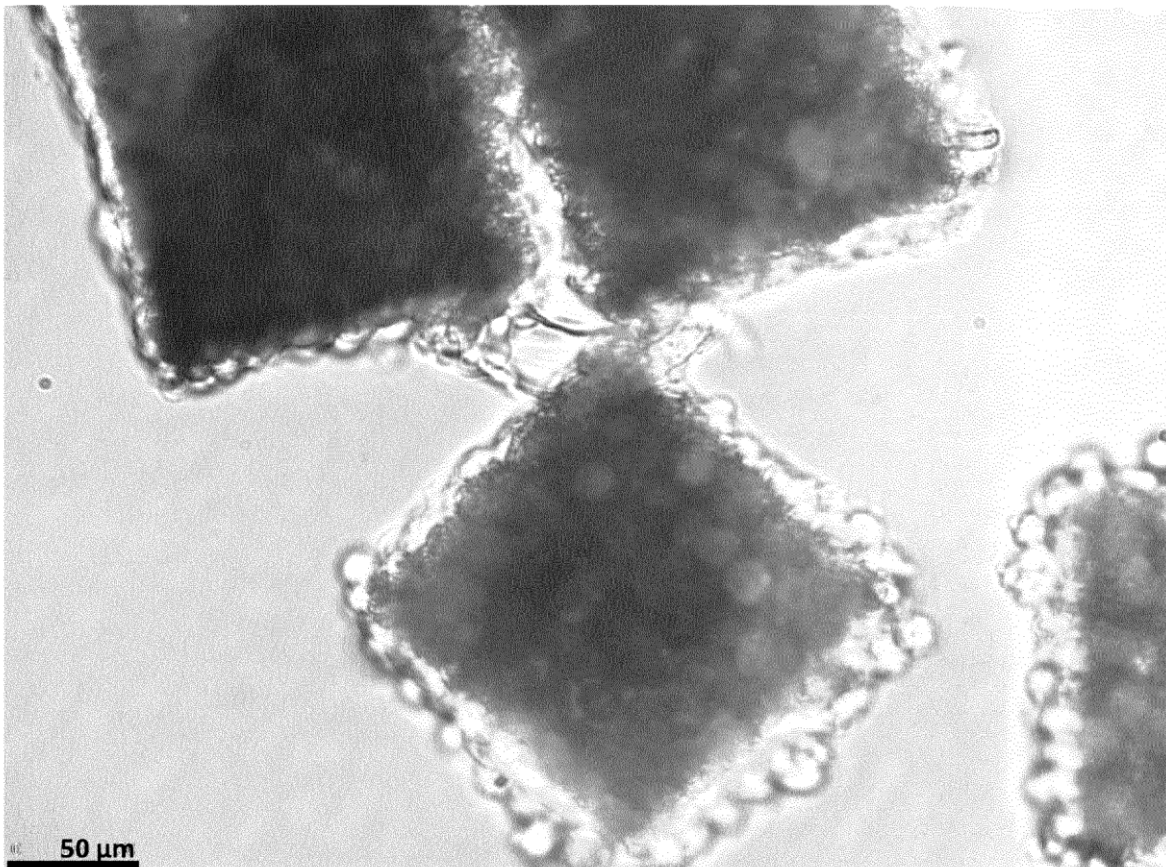


Fig. 6

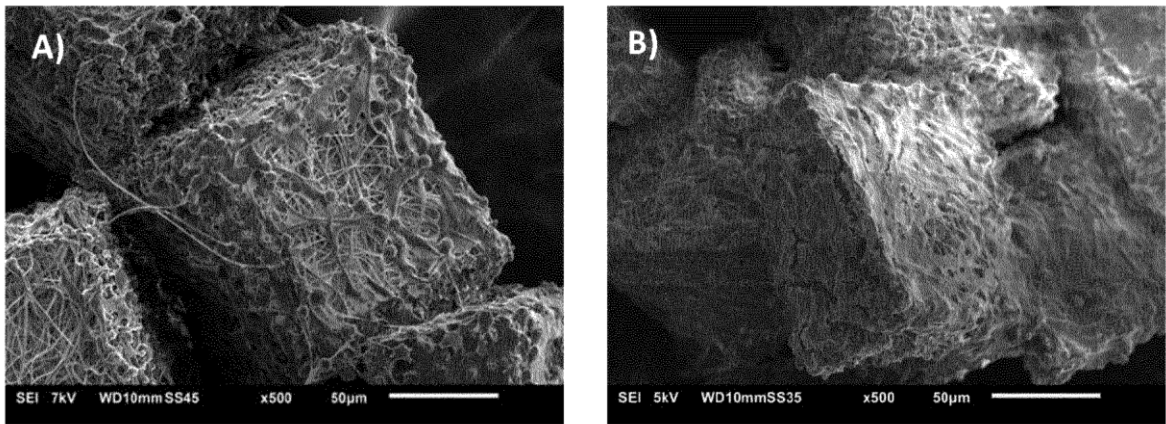


Fig. 7