

Sposób wytwarzania dwufunkcyjnych polilaktydowych skafoldów przeznaczonych do hodowli komórkowych

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania dwufunkcyjnych polilaktydowych skafoldów przeznaczonych do hodowli komórkowych.

Rusztowania komórkowe, nazywane także skafoldami (ang. *Scaffolds* - rusztowania) są przestrzennymi strukturami zbudowanymi z sieci wzajemnie połączonych trójwymiarowych porów. Skafoldy są stosowane w inżynierii tkankowej do odtwarzania uszkodzonych lub utraconych tkanek. Wówczas, najpierw pobiera się komórki regenerowanej tkanki z organizmu pacjenta, następnie izoluje się, namnaża w zwykłej hodowli dwuwymiarowej i przenosi się na skafold. Popularnym rozwiązaniem jest stosowanie do wytwarzania skafoldów polimerów biodegradowalnych, które rozkładają się do nietoksycznych produktów, które są z łatwością wydalane.

Rusztowanie komórkowe, aby mogło być stosowane do regeneracji tkanki, musi spełniać określone wymogi. Przede wszystkim musi być nietoksyczne wobec komórek organizmu oraz musi mieć także odpowiednią wielkość porów dopasowaną do rozmiaru komórek regenerowanej tkanki. Ponadto musi mieć właściwą dla danej tkanki wytrzymałość mechaniczną oraz odpowiedni czas degradacji, zbliżony do tempa regeneracji tkanki. Rusztowanie powinno także zapewniać dostęp substancji odżywczych i czynników wzrostu.

Do otrzymywania skafoldów wykorzystuje się zazwyczaj polimery, zarówno naturalne jak i syntetyczne. Wśród polimerów naturalnych popularnymi są przede wszystkim żelatyna, kolagen, czy chitozan. Związki te bardzo dobrze naśladują naturalną macierz zewnątrzkomórkową, ponadto są dobrze tolerowane przez organizm, a po rozłożeniu mogą stanowić składniki odżywcze dla komórek. Wadą tych związków jest słaba wytrzymałość mechaniczna oraz wrażliwość na zmiany warunków procesu przetwarzania (wysoka temperatura, zmiany pH), co znacznie obniża ich użyteczność w przemyśle. Alternatywą wobec związków pochodzenia naturalnego są biodegradowalne polimery syntetyczne tj. polilaktyd (PLA), poli- ϵ -kaprolakton, poliglikolid oraz ich kopolimery. Polimery te cechuje biodegradowalność i biogodność (w organizmach ulegają degradacji do nietoksycznych produktów – dwutlenku węgla i wody, które są łatwo wydalane) oraz dobre właściwości mechaniczne. Ponadto, odpowiednio dobierając rodzaj i długość łańcucha węglowego

polimeru, można sterować właściwościami mechanicznymi oraz czasem degradacji rusztowania.

Istnieje wiele metod otrzymywania skafoldów, wśród nich na szczególną uwagę zasługuje metoda inwersji faz, elektroprzędzenie oraz druk 3D. Każda z tych metod pozwala na otrzymanie rusztowań o zupełnie innych właściwościach. Istotnym jest, że metoda inwersji faz porównaniu do pozostałych charakteryzuje się łatwością, prostą wykonania, oraz niewielkimi ograniczeniami co do stosowanych materiałów (brak konieczności stosowania dużych zmian ciśnienia i temperatury).

Sposób otrzymywania wraz z odpowiednim materiałem ściśle wpływa na właściwości rusztowań, szczególnie na ich strukturę oraz wytrzymałość mechaniczną. Z tej przyczyny projektując skafold należy odpowiednio dobrać te parametry, w zależności od oczekiwanych efektów.

Z opisu polskiego zgłoszenia patentowego nr P.413603 znany jest sposób wytwarzania trójwymiarowych rusztowań polilaktydowych do hodowli ekwiwalentów skóry, w którym polilaktyd umieszcza się w rozpuszczalniku, którym jest chloroform lub dichlorometan, przy stężeniu roztworu polilaktydu w rozpuszczalniku 4-10% wag. i miesza się do całkowitego rozpuszczenia polimeru. Następnie do roztworu dodaje się alkohol metylowy lub alkohol etylowy w ilości od 3 do 20% wag. i miesza się do uzyskania jednorodnego roztworu, po czym dodaje się alkohol alifatyczny C3-C5, prosty lub rozgałęziony, w ilości od 3 do 12% wag. i nadal miesza się do uzyskania jednorodnego roztworu, po czym roztwór wylewa się na podłoże i suszy się. Stosuje się poli-L-laktyd o ciężarze cząsteczkowym 53 500-86 000 g/mol, o zawartości centrów D od 0,01-0,5% wag. W wyniku procesu przeprowadzonego zgodnie z wynalazkiem uzyskuje się trójwymiarowy, dwuwarstwowy skafold, w którym warstwa zewnętrzna jest warstwą litą, a warstwa wewnętrzna jest porowata. Warstwa lita nie przepuszcza wody ani związków małowcząsteczkowych, natomiast warstwa porowata jest warstwą przepuszczającą. Dzięki takiej strukturze związki wspomagające wzrost komórek niezbędne w hodowli tkanki skóry, takie jak aminokwasy, cukry, kwas hialuronowy, zostają zatrzymane wewnątrz rusztowania przez litą warstwę zewnętrzną.

Sposobem według zgłoszenia patentowego P.413603 otrzymuje się jednofunkcyjny skafold o średnicy porów większej niż 10 μm , o regularnych, równomiernie rozłożonych i wzajemnie połączonych porach. Taka struktura umożliwia wzrost komórek oraz zapewnia dobrą wytrzymałość mechaniczną, jednak ogranicza dostęp i utrzymywanie się składników odżywczych niezbędnych komórkom we wnętrzu skafoldu. Zwykle rusztowania takie wraz z komórkami umieszcza się w ciekłym medium hodowlanym, co zapewnia dyfuzję składników

odżywczych i metabolitów. Dyfuzja ta jest ograniczona porowatością materiału oraz jego właściwościami hydrofobowymi, co w konsekwencji może powodować niedobór składników odżywczych, a nawet śmierć komórek.

Rozwiązaniem powyższego problemu jest sposób według wynalazku, prowadzący do otrzymania dwufunkcyjnych skafoldów, które w swojej strukturze zawierają struktury pozwalające immobilizować wielkocząsteczkowe składniki odżywcze, co pozwala na precyzyjne i kontrolowane ich podawanie.

Sposób wytwarzania dwufunkcyjnych polilaktydowych skafoldów przeznaczonych do hodowli komórkowych polega na tym, że polilaktyd umieszcza się w rozpuszczalniku i miesza się do całkowitego rozpuszczenia polimeru, następnie do roztworu dodaje się metanol i miesza się do uzyskania jednorodnego roztworu, po czym dodaje się n-butanol lub n-propanol i nadal miesza się do uzyskania jednorodnego roztworu, po czym roztwór wylewa się na podłoże i suszy się. Sposób według wynalazku charakteryzuje się tym, że stosuje się czysty polilaktyd o ciężarze cząsteczkowym M_n 25–40 kg/mol i zawartości centrów D 0,51–1%, jako rozpuszczalnik polilaktydu stosuje się chloroform, dichlorometan lub tetrahydrofuran, a stężenie polilaktydu w roztworze rozpuszczalnika wynosi 6–15%_{wag.}, przy lepkości 350±50 cP. Metanol oraz n-butanol lub n-propanol stosuje się w stosunku 1:5 do rozpuszczalnika polilaktydu, po dodaniu n-butanolu lub n-propanolu mieszaninę podgrzewa się do temperatury 31–38°C, a suszenie prowadzi się przy wilgotności względnej 30–40% oraz w przepływie gazu inertnego.

Korzystnie jako polilaktyd stosuje się poli-L-laktyd.

W sposobie według wynalazku stosuje się czysty polilaktyd, bez dodatku stabilizatorów, inhibitorów degradacji bądź innych modyfikatorów. W przypadku, gdy polilaktyd zawiera takie dodatki należy je usunąć, np. poprzez wytrącanie polimeru z roztworu przy użyciu nierozpuszczalnika.

W wyniku procesu przeprowadzonego zgodnie z wynalazkiem uzyskuje się trójwymiarowy skafold, którego struktura wewnętrzna oprócz sieci połączonych porów zawiera także sferyczne struktury. Pory w rusztowaniu mogą być zasiedlane przez namnażające się komórki, zaś w strukturach sferycznych można immobilizować niezbędne komórkom wielkocząsteczkowe składniki odżywcze tj. białka, peptydy, czy oligocukry. W rezultacie komórkom dostarcza się niezbędne do wzrostu substancje odżywcze poprzez kontrolowane i stopniowe ich uwalnianie ze struktury skafoldu wraz z postępującą hodowlą. Dzięki temu zużycie substancji będzie niższe (brak strat na substancje pozostające w ciekłym medium hodowlanym).

W celu uzyskania takiego efektu niezbędne jest zastosowanie odpowiedniego polilaktydu, sporządzenie właściwego stężenia dla roztworu polimeru z jednoczesnym utrzymaniem właściwej lepkości, a następnie dodatku ciekłych prekursorów porów w odpowiednim stosunku objętościowym do polimeru oraz zastosowaniu właściwych warunków usuwania rozpuszczalników organicznych. Pakiet zmian wprowadzonych do sposobu według zgłoszenia patentowego P.413603, polegające na jednoczesnym zastosowaniu środków technicznych: polilaktydu o niskim ciężarze cząsteczkowym i wyższej zawartości centrów D, ściśle zdefiniowanych stosunków ilościowych i przedziału lepkości, suszenia przy określonej wilgotności i w atmosferze gazu obojętnego pozwolił na uzyskanie skafoldu o średnicy porów mieszczącej się w zakresie 10–30 μm , pomiędzy którym znajdują się struktury sferyczne o średnicy 30–50 μm , zawierające pory rzędu 15–25 μm . Równomiernie rozmieszczone pory stwarzają warunki do wzrostu komórek, zaś sfery mogą stanowić miejsce immobilizowania substancji odżywczych niezbędnych do prowadzenia hodowli.

Skafoldy otrzymane sposobem według wynalazku są przeznaczone do zastosowania w hodowli wybranych komórek, w których to niezbędne jest precyzyjne i kontrolowane dozowanie składników odżywczych. Jest to bardzo ekonomiczne podejście, gdyż ogranicza ilość składników, które w tradycyjnej hodowli są rozproszone w medium ciekłym.

Na rysunku przedstawiono:

Fig. 1 - obraz SEM dwufunkcyjnego polilaktydowego skafoldu (powiększenie 120x);

Fig. 2 - obraz SEM dwufunkcyjnego polilaktydowego skafoldu (powiększenie 300x);

Fig. 2 - obraz SEM dwufunkcyjnego polilaktydowego skafoldu (powiększenie 1000x)

Fig. 4 - obraz SEM jednofunkcyjnego polilaktydowego skafoldu (powiększenie 300x)

Fig. 5 - obraz SEM jednofunkcyjnego polilaktydowego skafoldu (powiększenie 1000x)

Sposób według wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach.

Przykład 1.

W kolbie stożkowej 50 mL rozpuszczano 0,75 g poli-L-laktydu (o M_n 37 000 g/mol, PDI 1,89, zawartość centrów D =1%) w 5 mL CHCl_3 przez 24 h, w 25°C. Następnie roztwór PLA/ CHCl_3 o lepkości 315 cP podgrzewano w łaźni wodnej do temperatury 35°C, ciągle mieszając przy użyciu mieszadła magnetycznego oraz elementu mieszającego (szybkość mieszania 200 min^{-1}). Po ustabilizowaniu się warunków dodawano 1 mL metanolu, a po rozpuszczeniu częściowo wytrąconego polilaktydu 1 mL n-butanolu. Po ponownym rozpuszczeniu PLA i dokładnym wymieszaniu się składników mieszaniny zawartość kolby

wylewano na szalkę Petriego o średnicy 60 mm. Przed wylaniem szalka była odtłuszczona przy użyciu EtOH, a następnie wysuszona. Następnie przez 48 h odparowywano rozpuszczalniki organiczne, zapewniając temp. 25–45°C, wilgotność względna 30–40% oraz przepływ powietrza. Otrzymany skafold zbadano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) (Fig. 1, 2, 3), przy czym przed badaniem próbkę skafoldu połamano w ciekłym azocie a następnie napyłono 7–10 nm warstwą złota przy użyciu napyłarki K550X Sputter Coater.

Przykład 2.

Przeprowadzono proces jak w Przykładzie 1 zgłoszenia patentowego P.413603. W reaktorze szklanym kulistym o pojemności 50 mL rozpuszczano 0,4 g PLA (o M_n 86 000 g/mol) w 5 mL CHCl_3 przez 24 h, w 25°C. Następnie roztwór PLA/ CHCl_3 podgrzewano w łaźni wodnej do temperatury 25°C, ciągle mieszając przy użyciu mieszadła magnetycznego (szybkość mieszania 600 min^{-1}). Po ustabilizowaniu się warunków dodawano 1 mL metanolu i podgrzewano roztwór do 30°C ciągle mieszając. Po rozpuszczeniu częściowo wytrąconego PLA dodawano 1 mL 1-butanolu. Po ponownym rozpuszczeniu częściowo wytrąconego PLA i dokładnym wymieszaniu się składników mieszaniny zawartość kolby wylewano na szalkę Petriego o średnicy 60 mm. Przed wylaniem szalka była odtłuszczona przy użyciu EtOH, a następnie wysuszona. W temperaturze 25°C odparowano rozpuszczalnik i nierozpuszczalnik polimeru w przepływie laminarnego powietrza przez 72 h. Otrzymano skafold jednofunkcyjny zawierający w swojej strukturze jedynie sieć porów, bez porowatych struktur kulistych (Fig. 4, 5).