

Mikrokapsułki typu rdzeń/otoczka i sposób wytwarzania mikrokapsulek typu rdzeń/otoczka

Przedmiotem wynalazku są mikrokapsułki typu rdzeń/otoczka na bazie poliestrów i polisacharydów, z dodatkiem płatków tlenku grafenu, jako systemy dostarczania substancji bioaktywnych, z możliwością modulowania szybkości uwalniania i uwalniania na żądanie.

Inżynieria tkankowa to intensywnie rozwijająca się dziedzina nauk technicznych, której głównym celem jest wytwarzanie funkcjonalnych zamienników uszkodzonych tkanek lub całych narządów. Proponowane rozwiązania inżynierii tkankowej, które łączą wiedzę z zakresu bioinżynierii i inżynierii materiałowej, wychodzą naprzeciw problemom współczesnej medycyny regeneracyjnej, takim jak: (i) brak dawców dla przeszczepów tkanek, (ii) obciążenie pacjenta związane z przeszczepami autogenicznymi, (iii) powikłania związane z przeszczepami allogenicznymi lub ksenogenicznymi, (iv) brak integracji sztucznych protez z organizmem pacjenta.

Inżynieria tkankowa opiera się na manipulacjach żywymi komórkami umieszczanymi na sztucznych rusztowaniach wykonanych z nowoczesnych biomateriałów, które mają na celu podtrzymanie formującej się struktury przestrzennej. Właściwy rozwój kształtującej się w ten sposób tkanki wymaga zastosowania szczególnych bodźców środowiskowych, tj. bioaktywnych cząsteczek sygnalizacyjnych, w tym czynników wzrostu i hormonów.

Czynniki biologicznie aktywne, które są niezbędne dla zapewnienia prawidłowego przebiegu procesu różnicowania komórek, a następnie ich zrastania z tkanką gospodarza, dostarczane w sposób bezpośredni niosą za sobą również ryzyko powikłań. Wiele czynników bioaktywnych obecnie stosowanych charakteryzuje się plejotropowością, czyli zdolnością wielokierunkowego działania. Dlatego też bezpośrednio, niekontrolowane podawanie tych czynników związane jest z dużym ryzykiem występowania efektów niepożądanych. Na przykład, w przypadku czynnika BMP-2, który bierze udział w regulacji wzrostu i różnicowania osteoblastów i chondroblastów, jego niekontrolowana dyfuzja do pobliskich tkanek może powodować niepożądane ektopowe tworzenie się kości, resorpcję kości natywnej i obrzęk tkanek miękkich.

W związku z tym, opracowywanie takich układów, w których cząsteczki sygnalizacyjne będą dostarczane w odpowiednim czasie i stężeniu oraz chronione przed degradacją, jest jednym z najważniejszych kierunków badań w dziedzinie medycyny regeneracyjnej. Obecnie opracowywane są różne systemy dostarczania czynników bioaktywnych oparte głównie na matrycach polimerowych (mikro-, nanokapsułki i sfery, mikro- i nanowłókna, hydrożele, rusztowania, nanosfery lipidowe, i systemy kombinowane), gdzie inkorporacja następuje w sposób fizyczny (adsorpcja, enkapsulacja) lub chemiczny (z utworzeniem wiązań chemicznych pomiędzy czynnikiem a matrycą). Do tej pory najlepszą strategią dla zastosowań klinicznych jest zamykanie czynników w mikrosferach (enkapsulacja), szczególnie w technice nano- i mikrokapsułkowania, często zintegrowanych z biorusztowaniami.

Mikrokapsułkowanie, czy też mikroenkapsulacja, jest procesem polegającym na powlekanii lub zamykaniu danego materiału lub mieszaniny materiałów wewnątrz otoczki (membrany), którą stanowi określony materiał lub układ. Zazwyczaj materiały te różnią się właściwościami fizyko-chemicznymi, toteż w wyniku mikroenkapsulacji otrzymywany jest produkt kompozytowy – mikrokapsułki, złożone z rdzenia oraz otoczki o różnej charakterystyce materiałowej. Istnieje wiele metod mikroenkapsulacji, które można podzielić na dwie główne grupy: procesy chemiczne (np. koacerwacja, polimeryzacja międzyfazowa lub *in situ*) oraz procesy mechaniczne lub fizyczne (np. suszenie rozpyłowe, enkapsulacja mikroprzepływowa, wytłaczanie wirowe, technologia wibracji dysz). Jedną z najbardziej obiecujących jest komercyjnie dostępna technologia łącząca wytłaczanie współosiowe z wibracją dysz i elektrostatycznym rozpraszaniem. Urządzenia dostępne na rynku posiadają możliwość wytwarzania mikrokapsułek w warunkach sterylnych oraz w skali półprzemysłowej.

Najczęściej stosowanymi w enkapsulacji biomateriałami są resorbowalne materiały polimerowe naturalne i syntetyczne, wśród których wyróżnić należy dwie grupy: polisacharydy, w tym alginian, chitozan; oraz poliestry alifatyczne, takie jak polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA), kopolimer polilaktyd-glikolid (PLGA). W standardowym podejściu stosowane są różnego rodzaju kombinacje wymienionych polimerów, które mają na celu przedłużenie czasu uwalniania danego czynnika.

Nowoczesne podejście w systemach dostarczania substancji bioaktywnych celuje nie tylko w osiągnięcie przedłużonego uwalniania, ale również przejęcie kontroli nad uwalnianiem czynnika zawartego w mikrokapsułkach. Przy wyłącznym zastosowaniu powyższych polimerów

kontrola ta jest ograniczona, dlatego też szeroko badany jest wpływ różnego rodzaju dodatków, w celu osiągnięcia tak zwanego uwalniania na żądanie. Uwalnianie to może zachodzić pod wpływem różnych bodźców zewnętrznych. W zależności od zastosowanych dodatków, najczęściej nanocząstek, stosuje się różne bodźce uwalniające, np. pole magnetyczne przy zastosowaniu nanocząstek magnetycznych, bodźce elektryczne dla cząstek elektroreaktywnych, oraz światło (głównie w zakresie podczerwieni) dla cząstek o specyficznych właściwościach optycznych. Ta ostatnia spośród wymienionych technika aktywacji wykazuje najmniejszą inwazyjność i jest najszerszej badaną metodą. Ponadto metody laserowe są już powszechnie stosowane w praktyce medycznej, np. na potrzeby dermatologii.

Lasery działające w bliskiej podczerwieni (IR) o długości fali (750 – 1200 nm) mają większe głębokości penetracji tkanki niż lasery działające w zakresie widzialnym, czy ultrafioletowym. Dlatego lasery IR są dobrym wyborem jako bodziec stymulujący uwalnianie czynników z mikrokapsulek wcześniej zaaplikowanych w docelowe miejsce wymagające głębokich penetracji (np. pod tkanką podskórną). Uwalnianie za pomocą lasera IR bazuje na efekcie fototermicznym, który odnosi się do zjawiska pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego przez dany materiał, który ulega wzbudzeniu, w wyniku czego powstaje energia cieplna (ciepło). Opracowywanych jest wiele systemów uwalniania, które wykorzystują różne zjawiska, jakie zachodzą w materiale matrycy pod wpływem lokalnego podwyższenia temperatury; może to być np. zmiana konformacji łańcuchów polimerowych w tzw. „szczotkach polimerowych”. Wykorzystany w niniejszym wynalazku mechanizm uwalniania bazuje na następującym efekcie: nanocząstki o określonych właściwościach światłoczułych wprowadzone do matrycy polimerowej absorbując promieniowanie świetlne prowadzą do lokalnego nagrzewania się materiału, co w efekcie przyspiesza jego degradację i powoduje szybsze uwalnianie czynników bioaktywnych.

Naukowcy badają różne nanocząstki silnie absorbujące światło pod kątem ich zastosowania w mikrokapsułkach polimerowych do uwalniania przy pomocy IR. Do najbardziej perspektywicznych, szeroko badanych należą między innymi nanocząstki metali (głównie złota), nanorurki węglowe i grafen. Nanomateriały węglowe ze względu na swój skład i strukturę, wykazują największą zgodność biologiczną i harmonię interakcji z żywą materią. Dlatego też zarówno nanorurki węglowe, jak i grafen, dominują w najnowszych doniesieniach naukowych z zakresu nanomedycyny. Chociaż dość często wykorzystywany grafen wykazuje potencjał w zastosowaniu do niniejszego wynalazku ze względu na swoją unikalną zdolność do absorpcji

światła, to jednak posiada również słabe strony. Jedną z nich jest jego hydrofobowy charakter, niosący za sobą słabą dyspersję w większości płynów przyjaznych dla środowiska biologicznego. Ta cecha znacznie ogranicza jego zastosowanie w aplikacjach medycznych, ponieważ łatwo ulega aglomeracji w płynach ustrojowych, np. surowicy, czy soli fizjologicznej. Istnieje jednak inna jego forma, bardziej przyjazna dla organizmów żywych, czyli tlenek grafenu (z ang. graphene oxide, GO). GO wykazuje właściwości bardzo zbliżone do grafenu, przy tym posiada hydrofilowy charakter, przez co jest znacznie bardziej biozgodny oraz wykazuje mniejszą toksyczność niż grafen. GO daje zatem szerokie możliwości projektowania biozgodnych materiałów nanokopozytowych o interesujących właściwościach.

W przeciągu ostatnich pięciu lat pojawiło się kilka publikacji, które odnoszą się do mikrokapsulek z dodatkiem tlenku grafenu. Mikrokapsułki opisane w dwóch różnych publikacjach, które w zasadzie przedstawiają tę samą ideę (Luo, Q., et al. (2016). *Carbon*, 106, 125-131.; Dong, L., et al. (2017). *Ultrasonics sonochemistry*, 36, 437-445.), przygotowane są w procesie emulgacji (olej-woda), przy użyciu wodnej dyspersji GO i czynników rozpuszczonych w cieczy organicznej. Uniemożliwiają one jednak enkapsulację substancji hydrofilowych. Problem ten został niejako rozwiązany stosując inną metodę wytwarzania – suszenia rozpyłowego (Li, W., et al. (2014). *Chemical Communications*, 50(100), 15867-15869.), gdzie składnik czynny jest bezpośrednio umieszczany w dyspersji wodnej GO, co jednak powoduje że składnik znajduje się w otoczce mikrokapsułki, a nie w jej wnętrzu. Jeszcze innym rozwiązaniem było użycie nieorganicznych sferycznych cząstek jako szablonów dla powstającej otoczki zawierającej GO (Kurapati, R., et al. (2013). *Chemical Communications*, 49(7), 734-736.). Jednak zaproponowany system umożliwił enkapsulację wyłącznie czynników dodatnio naładowanych. W innej pracy zaprezentowano mikrokapsułki otrzymane techniką warstwowego osadzania powłok (z ang. layer-by-layer, LbL) na szablonowych sferach z żywicy melaminowej (Deng, L., et al. (2016). *ACS applied materials & interfaces*, 8(11), 6859-6868.). Niestety, metoda ta jest czasochłonna, ponadto całkowicie eliminuje możliwość enkapsulacji czynników w trakcie procesu wytwarzania, co jeszcze bardziej wydłuża proces przygotowania mikrokapsulek gotowych do aplikacji. Ponadto wszystkie powyżej opisane mikrokapsułki składają się jedynie z cienkiej otoczki (GO oraz dodatek scalający otoczkę, np. małowcząsteczkowy środek sieciujący, tzw. linker), są puste w środku, więc czy to na etapie usuwania szablonów, czy później w procesie suszenia nie zachowują one swojej sferycznej struktury. Zjawisko „zapadania się” mikrokapsulek jest oczywiście niepożądane, może

negatywnie wpływać na proces uwalniania, na jego mniejszą przewidywalność, a także utrudniać późniejsze wprowadzanie do rusztowań.

Dobrym rozwiązaniem jest zastosowanie układów mikroprzepływowych, które umożliwiają uzyskanie monodispersyjnych, mechanicznie wytrzymałych mikrokapsulek o grubszych ściankach otoczki (Kaufman, G., et al. (2017). *ACS applied materials & interfaces*, 9(50), 44192-44198.). Opisany system pozwala na enkapsulację czynników hydrofilowych. Otoczka sieciowana jest poprzez reakcję międzyfazową epoksydów naniesionych na płatki GO i makrocząsteczkowego płynu silikonowego sfunkcjonalizowanego grupami aminowymi. Płatki GO tworzą chemicznie usieciowany film na powierzchni kropel wody w oleju generowanych przez urządzenie mikroprzepływowe (emulsja w/o/w). W innym systemie korzystającym z mikroprzepływów, przedstawione mikrokapsułki posiadają podwójny film z GO, wewnątrz i na zewnątrz hydrożelowej otoczki (emulsja o/w/o) (Byun, A., et al. (2015). *Chemical Communications*, 51(64), 12756-12759.). W systemie tym otoczkę stanowi hydrożel na bazie MPC (metakrylanu 2-etylofosforylocholino) sieciowany światłem ultrafioletowym z użyciem dodatku fotoinicjatora (Darocur 1173). W obydwu systemach płatki GO gromadzą się pomiędzy fazą wodną a oleistą, ponieważ GO działa jako stabilizator w emulsjach Pickeringa. W takim przypadku modyfikacja przepuszczalności otoczki mikrokapsulek nie jest w pełni możliwa bez szkodliwego wpływu na stabilność mechaniczną mikrokapsulek. Co więcej, metody mikroprzepływowe mogą być wykorzystywane jedynie w skali laboratoryjnej, ze względu na ich małą wydajność.

Międzynarodowa publikacja patentowa WO2016199167A4 ujawnia w szerokim zakresie zastrzeżeń kompozycje mikrokapsulek typu rdzeń/otoczka modyfikowanych za pomocą nanomateriałów w celu kontrolowanego uwalniania środka czynnego, w tym także użycie w kompozycji tlenku grafenu jako nanomateriału oraz leków jako uwalnianych środków czynnych. Jednak opisana w tym patencie kompozycja spełnia się tylko w zastosowaniu do środków czynnych nierozpuszczalnych w wodzie, co zawęża znacząco jej zastosowanie. Wiele składników aktywnych biologicznie jest rozpuszczalnych jedynie w roztworach wodnych. Ponadto, opisany sposób wytwarzania mikrokapsulek umożliwia zastosowanie jedynie polimerów hydrofobowych rozpuszczalnych w cieczach organicznych, w tym wymieniono: polimocznik, poliuretan, poliestry i poliamidy.

W trzech z powyżej omówionych prac zaprezentowano wyniki uwalniania czynników za pomocą promieniowania podczerwonego, wykazując skuteczność tej metody dla danych

kompozycji z tlenkiem grafenu. W badaniach wykorzystano lasery IR emitujące promieniowanie elektromagnetyczne o długości fal 808 i 1064 nm.

W literaturze brak jest przykładów mikrokapsulek typu rdzeń/otoczka z dodatkiem GO, które mogłyby stanowić rozwiązanie problemu stabilności struktury mikrokapsulek. Problem ten znalazł rozwiązanie w obecnym wynalazku.

Szeroko ujmując, obecny wynalazek przewiduje zastosowanie płatków tlenku grafenu zdyspergowanych w hydrożelu w zastosowaniu na otoczkę mikrokapsulek do dostarczania czynników aktywnych. Czynniki aktywne zawarte są w porowatym rdzeniu mikrokapsułki uzyskanym na bazie emulsji zawierającej wodny roztwór środka bioaktywnego oraz roztwór polimeru w rozpuszczalniku organicznym.

Mikrokapsułki o strukturze typu rdzeń/otoczka, modyfikowane tlenkiem grafenu, według wynalazku charakteryzują się tym, że składają się z poliestrowego porowatego rdzenia zawierającego substancję biologicznie aktywną i otaczającej rdzeń hydrożelowej otoczki, wytworzonej z wodnego roztworu alginianu o stężeniu od 0,01% (w/o) do 30,0% (w/o), z dodatkiem tlenku grafenu w ilości od 0,01% (w/o) do 10,0% (w/o) w stosunku do objętości roztworu alginianu. Poliestrowy porowaty rdzeń jest wytworzony z emulsji otrzymanej z wodnego roztworu substancji bioaktywnej oraz roztworu poliestru w rozpuszczalniku organicznym, przy czym poliester jest wybrany z grupy zawierającej: polimery kwasu mlekowego (PLA), polimery kwasu glikolowego (PGA), polimery kwasu ϵ -kapronowego (PCL), i ich kopolimery, a rozpuszczalnikiem substancji aktywnej jest roztwór soli fizjologicznej lub biologicznie dopuszczalny bufor, zaś stosunek fazy organicznej do fazy wodnej wynosi od 1:1 do 20:1, korzystnie 10:1.

Rozpuszczalnikiem poliestru korzystnie jest hydrofobowy rozpuszczalnik organiczny, w tym: toluen, octan etylenu, trichloroetylen, eter diizopropylowy, pentan, keton metylo-etylowy, eter metylo-t-butylowy, heksan, heptan, eter dietylowy, dichlorometan, 1,2-dichloroetan, cykloheksan, chloroform, tetrachlorek węgla, octan butylu, n-butanol, benzen.

Korzystnie stosuje się rdzeń wytworzony z roztworu poliestru z dodatkiem surfaktantu stabilizującego emulsję typu w-o. Korzystnie jest to surfaktant niejonowy w stężeniu od 0,01% do 30,0%. Korzystnie stosuje się niejonowy monooleinian sorbitanu.

Korzystnie alginianem jest alginian sodu.

Korzystnie roztwór buforowy wybrany jest z grupy obejmującej: bufor kwas cytrynowy/fosforan, roztwór soli fizjologicznej (PBS), bufor octanowy, barbitalowy, boranowy, Brittona-Robinsona, kakodylanowy, cytrynianowy, kolidynowy, mrówczanowy, maleinianowy, McIlvaine'a, fosforanowy, Prideaux-Warda, bursztynianowy, cytrynianowo-fosforanowo-boranowy (Teorella-Stanhagena), octan/weronal, MES (kwas 2-(N15morfolino)etanosulfonowy), BIS-TRIS (bis(2-hydroksyetylo)iminotris(hydroksymetylo)-metan), ADA (kwas N-(2-acetamido)-2-iminodioctowy), ACES (kwas N-(karbamoilometylo)-2-aminoetanosulfonowy), PIPES (kwas piperazyno-N,N'-bis(2-etanosulfonowy)), MOPSO (kwas 3-(N-morfolino)-2-hydroksypropanosulfonowy), BIS-TRIS PROPANE (1,3-bis(tris(hydroksymetylo)metyloamino)propan), BES (kwas N,N-bis(2-hydroksyetylo)-2-aminoetanosulfonowy), MOPS (kwas 3-(N-morfolino)propanosulfonowy), TES (kwas N-tris(hydroksymetylo)metylo-2-aminoetanosulfonowy), HEPES (kwas N-(2-hydroksyetylo)piperazyno-N'-(2-etanosulfonowy), DIPSO (kwas 3-(N,N-bis(2-hydroksyetylo)amino)-2-hydroksypropanosulfonowy), MOBS (kwas 4-(N-morfolino)butanosulfonowy), TAPSO (kwas 3-(N-tris(hydroksymetylo)metyloamino)-2-hydroksypropanosulfonowy), 25 tris(hydroksymetyloaminometanowy, HEPPSO (kwas N-(2-hydroksyetylo)piperazyno-N'-(2-hydroksypropanosulfonowy), POPSO (kwas piperazyno-N,N'-bis(2-hydroksypropanosulfonowy)), TEA (trietanoloamina), EPPS (kwas N-(2-hydroksyetylo)piperazyno-N'-(3-propanosulfonowy), TRICINE (N-tris(hydroksymetylo)metyloglicyna), GLY-GLY (glicyloglicyna), BICINE (N,N-bis(2-hydroksyetylo)glicyna), HEPBS (kwas N-(2-hydroksyetylo)piperazyno-N'-(4-butanosulfonowy)), TAPS (kwas N-tris(hydroksymetylo)metylo-3-aminopropanosulfonowy lub AMPD (2-amino-2-metylo-1,3-propanodiol).

Korzystnie roztwór wodny substancji aktywnej zawiera także białko jako dodatkowy czynnik stabilizujący, takie jak: surowicza albumina wołowa, surowicza albumina ludzka, lizozym, albumina jaja kurzego.

Korzystnie mikrokapsułki mają wymiary w zakresie od 1 do 1000 μm .

Mikrokapsułki według wynalazku mogą być stosowane dla dowolnej substancji przeznaczonej do zastosowania biomedycznego. Korzystnie substancja aktywna jest wybrana spośród: czynników wzrostu, antybiotyków, środków antynowotworowych, środków przeciwzapalnych, hormonów, enzymów, witamin, cytokin. Szczególnie korzystnie jako

substancję aktywną stosuje się: białka morfogenetyczne kości, czynniki wzrostu hepatocytów, czynnik wzrostu keratynocytów, onkostatynę M, deksametazon, suplementy używane w hodowli komórek neuronalnych, zasadowe czynniki wzrostu fibroblastów, czynniki wzrostu śródbłonka naczyniowego, nikotynamid, interleukinę 6.

Sposób wytwarzania mikrokapsulek typu rdzeń/otoczka modyfikowanych tlenkiem grafenu, w technologii współosiowego wytłaczania z wykorzystaniem technologii wibracji dysz oraz elektrostatycznego rozpraszania uformowanych kropeł, według wynalazku charakteryzuje się tym, że sporządza się wodny roztwór alginianu, korzystnie alginianu sodu, o stężeniu od 0,01% (w/o) do 30,0% (w/o), z dodatkiem tlenku grafenu w ilości od 0,01% (w/o) do 10,0% (w/o) w stosunku do objętości roztworu alginianu, oraz emulsję z wodnego roztworu substancji bioaktywnej oraz roztworu poliestru w rozpuszczalniku organicznym, w której poliester jest wybrany z grupy zawierającej: polimery kwasu mlekowego, polimery kwasu glikolowego, polimery kwasu ϵ -kapronowego, i ich kopolimery, a rozpuszczalnikiem substancji aktywnej jest roztwór soli fizjologicznej lub biologicznie dopuszczalny bufor, zaś stosunek fazy organicznej do fazy wodnej wynosi od 1:1 do 20:1, korzystnie 10:1. Następnie z tego wodnego roztworu oraz tej emulsji formuje się mikrokapsułki, które następnie sieciuje się w wodnym roztworze chlorku wapnia lub chlorku strontu o stężeniu od 1 mM do 1 M (korzystnie 100 mM), w czasie od 0,1 godziny do 24 godzin (korzystnie 3 godziny). Następnie mikrokapsułki płucze się wodą, zamraża się i liofilizuje.

Korzystnie jako rozpuszczalnik poliestru stosuje się hydrofobowy rozpuszczalnik organiczny, w tym: toluen, octan etylenu, trichloroetylen, eter diizopropylowy, pentan, keton metyloowo-etylowy, eter metyloowo-t-butyloowy, heksan, heptan, eter dietylowy, dichlorometan, 1,2-dichloroetan, cykloheksan, chloroform, tetrachlorek węgla, octan butylu, n-butanol, benzen.

Korzystnie stosuje się rdzeń wytworzony z roztworu poliestru z dodatkiem surfaktantu stabilizującego emulsję typu w-o. Korzystnie jest to surfaktant niejonowy w stężeniu od 0,01% do 30,0%. Korzystnie jako surfaktant stabilizujący stosuje się niejonowy monooleinian sorbitanu.

Korzystnie roztwór sieciujący zawiera dodatek surfaktantu w ilości od 0,01% do 10,0%, który utrzymuje sferyczny kształt struktury sieciowanych mikrokapsulek. Korzystnie stosuje się etery oktylofenylowe glikolu polietylenowego.

Korzystnie stosuje się roztwór wodny substancji aktywnej z dodatkiem surowiczej albuminy wołowej, surowiczej albuminy ludzkiej, lizozymu lub albuminy jaja kurzego.

Jako substancję bioaktywną stosuje się dowolną substancję przeznaczoną do zastosowania biomedycznego.

Korzystnie substancja aktywna jest wybrana spośród: czynników wzrostu, antybiotyków, środków antynowotworowych, środków przeciwzapalnych, hormonów, enzymów, leków, witamin, cytokin. Szczególnie korzystnie jako substancję aktywną stosuje się: białka morfogenetyczne kości, czynniki wzrostu hepatocytów, czynnik wzrostu keratynocytów, onkostatyne M, deksametazon, suplementy używane w hodowli komórek neuronalnych, zasadowe czynniki wzrostu fibroblastów, czynniki wzrostu śródbłónka naczyniowego, nikotynamid, interleukinę 6.

Wodny roztwór alginianu sodu z tlenkiem grafenu oraz emulsję substancji aktywnej i poliestru wytłacza się przy pomocy pomp strzykawkowych do głowicy wibracyjnej, a następnie do dysz usytuowanych koncentrycznie, przy czym emulsję kieruje się do dyszy wewnętrznej, a wodny roztwór do dyszy zewnętrznej. Podczas procesu wytłaczania współosiowego formowanie się łańcucha kropel (a później mikrokapsulek) z ciągłego strumienia następuje poprzez dzielenie strumienia za pomocą wibracji. Następnie łańcuch kropelkowy rozpraszany jest poprzez siły elektrostatyczne działające w wytworzonym polu elektrostatycznym przez wbudowaną elektrodę znajdującą się przy wylocie z dysz. Oddziaływania elektrostatyczne powodują rozpraszanie się utworzonych kropel, zapobiegając ich koalescencji. Zarówno wartości częstotliwości drgań, jak napięcie na elektrodzie, ustawia się w zależności od zastosowanych cieczy, jak i średnicy dysz. Mikrokapsułki według wynalazku, korzystnie, wywarzane są przy użyciu dysz o średnicach 80 μm i 200 μm , odpowiednio dla dyszy wewnętrznej i zewnętrznej. Mikrokapsułki według wynalazku, wytwarzane są przy prędkościach przepływów cieczy zewnętrznej od 0,1 do 20,0 ml/min i w zakresie od 0,05 do 10,0 ml/min dla cieczy wewnętrznej.

W celu utworzenia emulsji, która bezpośrednio stosowana jest jako ciecz rdzeniowa, fazy organiczną i wodną homogenizuje się przy pomocy ultradźwięków. Roztwór polimeru o określonym stężeniu, korzystnie świeżo przygotowany, umieszcza się w kąpeli lodowej (aby nie dopuścić do temperaturowej degradacji substancji aktywnej podczas homogenizacji), następnie w roztworze umieszcza się końcówkę homogenizatora i po uruchomieniu ultradźwięków, zakrapla się roztwór substancji aktywnej. Proces tworzenia emulsji jest bardzo szybki i relatywnie bezpieczny dla enkapsulowanej substancji aktywnej, przy odpowiednio dobranych parametrach, takich jak amplituda, krótki czas pracy homogenizatora, oraz tryb pracy – impulsowy.

Wytworzona w ten sposób emulsja na bazie PBS charakteryzuje się dobrą stabilnością (20 godzin w temp. laboratoryjnej ok. 22°C), natomiast przy użyciu HEPES mniejszą stabilnością (3 godziny w temp. ok. 22°C). Stabilność emulsji będzie silnie zależała od użytego czynnika aktywnego oraz typu roztworu buforowego. Mikro kapsułki według wynalazku, korzystnie, wytwarzane są natychmiast po przygotowaniu emulsji rdzeniowej.

Zawiesina tlenku grafenu w roztworze alginianu, przykładowo NaAlg, może zostać uzyskana dwoma sposobami. Pierwszy z nich przewiduje sporządzenie w pierwszej kolejności wodnego roztworu NaAlg, a następnie dodanie stężonej zawiesiny wodnej GO w odpowiedniej ilości, aby uzyskać określone, pożądane stężenie końcowe płatków GO. Drugi sposób przewiduje sporządzenie w pierwszej kolejności wodnej zawiesiny GO o określonym, końcowym stężeniu, a następnie dodaniu do niej NaAlg w postaci stałej, w ilości odpowiedniej do uzyskania określonego stężenia NaAlg w roztworze. Pierwszy sposób przewiduje dyspergowanie płatków GO za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego o określonej amplitudzie, działającego przez krótki czas w trybie impulsowym. Drugim sposobem, dyspersja GO uzyskiwana jest podczas szybkiego mieszania składników przy pomocy mieszadła magnetycznego przez długi okres czasu (do 12 godzin). Oba sposoby pozwalają na uzyskanie zadowalającej dyspersji GO w roztworze NaAlg. Jednolite zdyspergowanie płatków GO zostało potwierdzone w badaniach obrazowania powierzchni mikro kapsułek przed procesem suszenia za pomocą mikroskopii sił atomowych (z ang. atomic force microscope, AFM). Uzyskane zawiesiny w podanych zakresach stężeń wykazują bardzo dobrą stabilność (w temp. 4°C nawet kilka tygodni), bez zastosowania dodatkowych stabilizatorów. Mikro kapsułki według wynalazku, korzystnie, wytwarzane są ze świeżo przygotowanej zawiesiny GO w NaAlg. Zarówno stężenie NaAlg, jak i GO mają wpływ na parametry reologiczne cieczy używanej do wytworzenia otoczki, co jest znaczące dla procesu wytwarzania mikro kapsułek. Mniejsze lub większe stężenia utrudniają lub uniemożliwiają przeprowadzanie procesu wytwarzania mikro kapsułek.

W wyniku sposobu według wynalazku uzyskuje się mikro kapsułki według wynalazku, które posiadają polimerowy rdzeń o strukturze porowatej, zawierający substancję bioaktywną, oraz otoczkę (membranę) polisacharydową na bazie wodnego roztworu alginianu sodu z dodatkiem płatków tlenku grafenu. Dzięki dodatkowi płatków tlenku grafenu mikro kapsułki według wynalazku pozwalają na uwalnianie na żądanie oraz modulowanie szybkości uwalniania substancji aktywnej poprzez zmianę przepuszczalności otoczki. Zastosowanym bodźcem

stymulującym jest emitowane przez laser promieniowanie podczerwone o długości fali 1064 nm. Osadzenie substancji aktywnej w polimerowym, porowatym rdzeniu zapewnia stabilność enkapsulowanego czynnika.

W mikrokapsułkach według wynalazku zastosowano biopolimery resorbowalne, w tym hydrożele, a mikrokapsułki mogą być wykorzystane do dostarczania czynników aktywnych rozpuszczalnych w roztworach wodnych. Jednak wynalazek może być też stosowany w przypadku czynników nierozpuszczalnych w wodzie, które mogą zostać bezpośrednio dodane do roztworu polimeru w rozpuszczalniku organicznym.

Mikrokapsułki wytwarzane są przy użyciu komercyjnie dostępnego urządzenia – enkapsulatora, który oparty jest na współosiowym wytlaczaniu z wykorzystaniem technologii wibracji dysz oraz elektrostatycznego rozpraszania uformowanych kropeł.

Wynalazek zapewnia satysfakcjonujące zastosowanie praktycznie dowolnego czynnika uwalnianego, przy czym jest on ukierunkowany głównie na środki bioaktywne typu: antybiotyki, czynniki wzrostu, środki antynowotworowe, środki przeciwzapalne, które wymagają przedłużonego bądź stymulowanego w czasie uwalniania.

Mikrokapsułki według wynalazku, mogą być aplikowane bezpośrednio w miejsce przeszczepu jako zasypka, pozabiegowo za pomocą iniekcji, lub wprowadzane do rusztowania hydrożelowego.

Wynalazek został zweryfikowany w badaniach *in vitro* przy wykorzystaniu modelowego czynnika enkapsulowanego, jakim jest surowicza albumina wołowa (z ang. bovine serum albumin, BSA, CAS: 9048-46-8), często stosowana w tego typu badaniach. Przeprowadzono również badania uwalniania na żądanie z wykorzystaniem lasera emitującego promieniowanie podczerwone o długości fali 1064 nm.

Poniżej przedstawiono dwa przykłady wykonania wynalazku, które prezentują modelowe kombinacje kompozycji składników stosowanych do wytworzenia mikrokapsułek oraz dobranych parametrów wytwarzania.

Na Fig. 1 przedstawiono mikrokapsułki uzyskane według kompozycji i sposobu wytwarzania podanego w przykładzie 1., czyli PLGA/CaAlg (rdzeń/otoczka) z dodatkiem 0,05% (w/o) płatków GO w membranie, z modelowym czynnikiem aktywnym BSA w roztworze HEPES.

Na Fig. 2 przedstawiono mikrokapsułki uzyskane według kompozycji i sposobu wytwarzania podanego w przykładzie 2., czyli PLGA/SrAlg (rdzeń/otoczka) z dodatkiem 0,25% (w/o) płatków GO w membranie, z modelowym czynnikiem aktywnym BSA w roztworze PBS.

Na Fig. 3 przedstawiono mikrokapsułki uzyskane według kompozycji i sposobu wytwarzania podanego w przykładzie 2., PLGA/SrAlg (rdzeń/otoczka) z BSA w roztworze PBS, modyfikowane różną zawartością płatków GO w membranie, odpowiednio (a) 0%; (b) 0,05%; (c) 0,1%; (d) 0,25% (w/o). W lewym górnym rogu wstawione są zdjęcia makro mikrokapsulek.

Na Fig. 4 przedstawiono zdjęcia SEM mikrokapsulek uzyskanych według kompozycji i sposobu wytwarzania podanego w przykładzie 2., PLGA/SrAlg (rdzeń/otoczka) z BSA w roztworze PBS, modyfikowane różną zawartością płatków GO w membranie, odpowiednio (a) 0%; (b) 0,05%; (c) 0,1%; (d) 0,25% (w/o) po procesie liofilizacji. W lewym górnym rogu wstawione są zdjęcia makro mikrokapsulek po procesie liofilizacji.

Na Fig. 5 przedstawiono mikrofotografie konfokalne mikrokapsulek z białkiem BSA oznaczonym pochodną fluoresceiny (FITC).

Na Fig. 6 przedstawiono krzywą skumulowanego uwalniania białka BSA z mikrokapsulek z różną zawartością GO. Uwalnianie prowadzono w roztworze PBS w temp. 37 °C, aby odzwierciedlić warunki panujące w ludzkim organizmie.

Na Fig. 7 przedstawiono krzywe uwalniania BSA z mikrokapsulek wytworzonych z 0,25% (w/o) dodatkiem GO. Krzywa uwalniania BSA z mikrokapsulek inkubowanych w 37°C (szara linia) oraz przy dodatkowym użyciu lasera IR (czarna linia). Laser zastosowano dwukrotnie w ciągu trwania inkubacji. Mikrokapsułki naświetlano przez 30 minut, laserem działającym w podczerwieni (1064 nm) z gęstością mocy 1,1 W/cm².

Przykład 1. – mikrokapsułki o kompozycji „GO05” sieciowane chlorkiem wapnia

Składniki kompozycji „GO05”				
Rdzeń				
Polimer (stężenie)	Rozpuszczalnik (objętość)	Surfaktant (stężenie)	Czynnik (stężenie)	Bufor czynnika (objętość)
PLGA (6% (w/o))	DCM (10 ml)	Span 80 (4% (w/o))	BSA (10 mg/ml)	HEPES (1 ml)

Otoczka				
Polimer (stężenie docelowe)	Rozpuszczalnik (objętość)	Stężenie docelowe GO	Roztwór sieciujący (stężenie)	Surfaktant w roztworze sieciującym (stężenie)
NaAlg (1,1% (w/o))	Woda demineralizowana (50 ml)	0,05% (w/o)	Chlorek wapnia (100 mM)	Triton X-100 (0.1%(o/o))

Początkowo utworzono emulsję typu w-o przez dodanie 1,0 ml roztworu BSA w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (10 mg/ml) do 10 ml roztworu PLGA (50:50) o stężeniu 6% (w/o) w dichlorometanie. W celu stabilizacji emulsji do roztworu PLGA dodano surfaktant Span 80 (4% (w/o)). Emulgację przeprowadzono w kąpeli lodowej za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego (Sonicator Sonics Vibra Cell VC-505) działającego przy amplitudzie 30% przez 90 sekund w trybie pulsacyjnym ustawionym na 5:3 sekund ("on": "off"). Roztwór BSA wkroplono do roztworu PLGA w DCM w ciągu pierwszych 30 s procesu homogenizacji.

Roztwór polimeru, który tworzy otoczkę mikrokapsulek, otrzymano poprzez dyspersję płatków tlenku grafenu w 1,15% (w/o) wodnym roztworze alginianu sodu. Do 47,92 ml roztworu NaAlg dodano 2,08 mg zawiesiny wodnej GO o stężeniu 1,2% (w/o), a następnie poddano procesowi homogenizacji przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego (Sonicator Sonics Vibra Cell VC-505), parametry procesu: amplituda 30%, czas 180 sekund, tryb pulsacyjny 5:3 sekund („on”:"off”). W ten sposób przygotowano zawiesinę GO o docelowym stężeniu 0,05% (w/o) w wodnym roztworze NaAlg o docelowym stężeniu 1,1% (w/o).

Świeżo przygotowane ciecze tworzące rdzeń i otoczkę stosowano do wytworzenia mikrokapsulek za pomocą enkapsulatora zgodnego z opisem powyżej (Encapsulator B-390, BUCHI, Switzerland), przy zastosowaniu dysz wewnętrznej i zewnętrznej o średnicach odpowiednio 80 i 200 µm, wyposażonego w dwie pompy strzykawkowe. Ciecze umieszczono w odpowiednich strzykawkach i włączano do komory wibracyjnej z zadanymi, ustalonymi empirycznie prędkościami przepływów, dalej ciecze były wytłaczane przez współosiowe dysze tworząc łańcuch kropeł wpadających do roztworu chlorku wapnia (100 mM) z dodatkiem Triton X-100 (0,1% (o/o)), przy ciągłym mieszaniu magnetycznym.

W oparciu o dokonany dobór parametrów enkapsulacji dla przygotowanych cieczy według kompozycji „GO05”, wybrano następujące optymalne wartości parametrów:

- a) Prędkość przepływu cieczy wewnętrznej (rdzeniowej): 0,4 ml/min,
- b) Prędkość przepływu cieczy zewnętrznej (otoczki): 4 ml/min,
- c) Częstotliwość drgań: 1000 Hz,
- d) Napięcie: 1000 V
- e) Odległość dyszy od poziomu roztworu sieciującego: 20 cm.

Mikrokapsułki trzymano w roztworze chlorku wapnia przez 3 godziny, w celu zakończenia żelowania oraz odparowania rozpuszczalnika organicznego znajdującego się w rdzeniu. Następnie mikrokapsułki przemyto kilkukrotnie wodą demineralizowaną i natychmiast zamrożono w ciekłym azocie (-196 ° C), a na koniec liofilizowano przez 24 godziny, przy temperaturze skraplacza -70°C.

Morfologię mikrokapsulek obserwowano przy użyciu mikroskopu optycznego (Bresser Biolux NV) po procesie sieciowania. Na Fig. 1 przedstawiono mikrokapsułki uzyskane według kompozycji i sposobu wytwarzania podanego w przykładzie 1., czyli PLGA/CaAlg (rdzeń/otoczka) z dodatkiem 0,05% (w/o) płatków GO w membranie. Modelowym czynnikiem aktywnym jest BSA w roztworze HEPES. Średni rozmiar mikrokapsulek wynosi 450 µm, rozmiar rdzenia ok. 100 µm. Przy powiększeniu 20x widać, że rdzeń mikrokapsułki nie styka się bezpośrednio z membraną, pomiędzy nimi znajduje się przestrzeń utworzona w wyniku odparowania rozpuszczalnika, tworzy ona „wnękę” o średnicy 220 µm. W większości przypadków rdzeń mikrokapsulek wytworzonych według przykładu 1. nie znajduje się w położeniu centralnym. Prawdopodobnie rdzeń jest „wypychany” w kierunku parowania rozpuszczalnika.

Przykład 2. – mikrokapsułki o kompozycji „GO25” sieciowane chlorkiem strontu

Składniki kompozycji „GO25”				
Rdzeń				
Polimer (stężenie)	Rozpuszczalnik (objętość)	Surfaktant (stężenie)	Czynnik (stężenie)	Bufor czynnika (objętość)

PLGA (6% (w/o))	Chloroform (10 ml)	Span 80 (4% (w/o))	BSA (10 mg/ml)	PBS (1 ml)
Otoczka				
Polimer (stężenie)	Rozpuszczalnik (objętość)	Stężenie docelowe GO	Roztwór sieciujący (stężenie)	Surfaktant w roztworze sieciującym (stężenie)
NaAlg (1,1% (w/o))	Woda demineralizowana (50 ml)	0,25% (w/o)	Chlorek wapnia (100 mM)	Triton X-100 (0.1%(o/o))

Emulsję rdzeniową typu w-o wytworzono identycznie jak w przykładzie 1.

Ciecz stosowaną na otoczkę mikrokapsulek, otrzymano poprzez dyspersję płatków tlenku grafenu w 1,39% (w/o) wodnym roztworze NaAlg. Do 39,58 ml roztworu NaAlg dodano 10,42 mg zawiesiny wodnej GO o stężeniu 1,2% (w/o), a następnie poddano procesowi homogenizacji przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego (Sonicator Sonics Vibra Cell VC-505), parametry procesu: amplituda 30%, czas 180 sekund, trybie pulsacyjnym 5:3 sekund („on” : ”off”). W ten sposób przygotowano zawiesinę GO o docelowym stężeniu 0,25% (w/o) w wodnym roztworze NaAlg o docelowym stężeniu 1,1% (w/o).

Świeżo przygotowane ciecze na rdzeń i otoczkę stosowano do wytworzenia mikrokapsulek za pomocą enkapsulatora (Encapsulator B-390, BUCHI, Switzerland), zgodnie z opisem jak w przykładzie 1., przy identycznych parametrach wytwarzania.

Mikrokapsułki trzymano w roztworze chlorku strontu przez 3 godziny, w celu zakończenia żelowania oraz odparowania rozpuszczalnika organicznego znajdującego się w rdzeniu. Następnie mikrokapsułki przemyto kilkakrotnie wodą demineralizowaną i natychmiast zamrożono w ciekłym azocie (-196 ° C), a na koniec liofilizowano przez 24 godziny, przy temperaturze skraplacza -70°C.

Morfologię mikrokapsulek obserwowano przy użyciu mikroskopu optycznego (Bresser Biolux NV) po procesie sieciowania. Na Fig. 2 przedstawiono mikrokapsułki uzyskane według kompozycji i sposobu wytwarzania podanego w przykładzie 2., czyli PLGA/SrAlg (rdzeń/otoczka) z dodatkiem 0,25% (w/o) płatków GO w membranie. Modelowym czynnikiem aktywnym jest BSA w roztworze PBS. Średni rozmiar mikrokapsulek wynosi 450 μm, rozmiar

rdzenia ok. 180 μm . Przy powiększeniu 20x widać, że rdzeń mikrokapsułki styka się z membraną, co spowodowane jest prawdopodobnie wolniejszym odparowaniem rozpuszczalnika z wnętrza mikrokapsułki, ze względu na mniejszą przepuszczalność membrany. Rdzeń jest również umiejscowiony centrycznie, co może być związane zarówno z wolniejszym odparowywaniem rozpuszczalnika, jak i zwiększoną lepkością cieczy zastosowanej na membraną.

Przykład 3.

Celem przedstawienia możliwości modulowania szybkości uwalniania poprzez zmianę zawartości płatków GO w membranie mikrokapsulek, wytworzono serię mikrokapsulek na podstawie kompozycji z przykładu 2., z różną zawartością GO (0,05; 0,1; 0,25% (w/o)). Dla celów porównawczych wykonano również mikrokapsułki o identycznej kompozycji i parametrach wytwarzania, ale bez dodatku tlenu grafenu. Badania uwalniania modelowego białka BSA prowadzono metodą *in vitro*, umieszczając ok. 2 mg mikrokapsulek w zamkniętej probówce zawierającej 1 ml PBS (pH 7,4). Probówki inkubowano temperaturze w 37°C z wytrząsaniem poziomym (100 rpm). W różnych odstępach czasu pobierano 300 μl PBS w którym znajdowały się inkubowane mikrokapsułki i dodawano taką samą ilość świeżego buforu, aby utrzymać warunki testu. Stężenie BSA w pobieranych próbkach roztworu oznaczano za pomocą zestawu odczynników do oznaczania białek (QuantiPro™ BCA, dla zakresu stężeń białka 0.5-30 $\mu\text{g/ml}$), rejestrując absorbancję przy długości fali 560 nm za pomocą spektrofotometru UV-Vis (FLUOstar Omega). Obliczenia stężenia BSA w poszczególnych interwałach czasu przeprowadzono na podstawie danych otrzymanych z krzywej kalibracyjnej dla standardowych próbek BSA w PBS. Oznaczenie absorbancji dla krzywej kalibracyjnej było prowadzone razem z badanymi próbkami. Profil uwalniania BSA z mikrokapsulek został zaprezentowany w postaci krzywej kumulatywnego odsetka uwalniania względem czasu inkubacji, w oparciu o dane zebrane z dziesięciu próbek dla każdego typu mikrokapsulek.

Morfologię mikrokapsulek obserwowano przy użyciu zarówno mikroskopu optycznego (Bresser Biolux NV), jak i elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM, Phenom ProX), odpowiednio przed i po procesie liofilizacji. Mikrokapsułki, według wynalazku, otrzymane według przykładu 2., zostały przedstawione na Fig. 3. Wzrost zawartości GO jest bezpośrednio obserwowalny poprzez zmianę zabarwienia mikrokapsulek, z przezroczystej dla mikrokapsulek bez dodatku GO do ciemno brązowej dla 0,25% (w/o) GO. Wraz ze wzrostem zawartości GO w membranie, rdzeń mikrokapsulek przyjmuje położenie centrale. Ponadto, można zaobserwować również niewielki

wzrost średnicy mikrokapsulek, oraz wzrost średnicy rdzenia. Wyraźny wpływ dodatku GO obserwujemy dla mikrokapsulek po procesie liofilizacji, który pozwala na zachowanie ich struktury sferycznej (Fig. 4). Na podanym przykładzie widać, że już niewielki dodatek GO (0,1%) powoduje znaczną poprawę sztywności otoczki, przez co stabilizację struktury mikrokapsulek.

Dla zobrazowania umiejscowienia enkapsulowanego czynnika, wytworzono również mikrokapsułki z białkiem BSA oznaczonym pochodną fluoresceiny (FITC). Obrazy mikrostruktury wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Leica TCS SP8). Widać wyraźnie, że BSA znajduje się w rdzeniu mikrokapsulek, skąd nastąpi późniejsze uwalnianie (Fig. 5).

Wyniki badania uwalniania otrzymane dla przykładowej serii mikrokapsulek, według wynalazku, zestawiono na Fig. 6. Widoczna jest wyraźna redukcja szybkości uwalniania białka z mikrokapsulek z dodatkiem GO. W czasie ok. 200 godzin z mikrokapsulek bez dodatku GO uwalnia się o ponad 20% więcej BSA niż z mikrokapsulek z 0,25% (w/o) dodatkiem GO. Całkowite uwolnienie substancji enkapsulowanej z mikrokapsulek bez GO następuje już po 300 godzinach inkubacji. W tym czasie uwalnia się niespełna 60% BSA z mikrokapsulek z 0,25% (w/o) dodatkiem GO. Modyfikowane płatkami tlenku grafenu mikrokapsułki wykazują wyraźnie zmniejszoną przepuszczalność. Dyspersja płatków GO tworzy w materiale trudno przepuszczalne bariery i wydłuża drogę substancji penetrującej materiał. Dzięki zastosowaniu odpowiedniej ilości dodatku płatków GO możliwe jest dostosowanie szybkości uwalniania danego czynnika.

Wstępne badania uwalniania białka BSA za pomocą lasera przeprowadzono przy użyciu lasera typu Nd:YAG, działającego w podczerwieni o długości fali 1064 nm. W trakcie inkubowania mikrokapsulek w temp. 37°C były one dwukrotnie poddawane działaniu światła lasera przez 30 min z mocą lasera 110 mW (średnica wiązki lasera wynosiła 0,1 cm²). Próbkę PBS (300 µl) byłby pobierane tuż przed wystawieniem mikrokapsulek na działanie laser, dwie godziny po i 24 godziny po działaniu światłem. Za każdym razem dodawano odpowiednią ilość świeżego roztworu PBS. Przedstawione na Fig. 7. wyniki uwalniania przy pomocy lasera wskazują, że możliwe jest uwalnianie białka „na żądanie”. Już dwie godziny po wystawieniu na działanie lasera widoczny jest wyraźny wzrost stężenia BSA w roztworze.