



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01273

(22) Data de depozit: 06.12.2010

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN
CLUJ-NAPOCA, STR. MEMORANDUMULUI
NR.28, CLUJ NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• POPA CĂTĂLIN, STR. DONATH NR. 113,
AP. 19, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• CONT LIANA, ALEEA BUCURA NR. 3,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• DINDELEGAN GEORGE, STR. MOȚILOR
NR.4, AP. 22, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• SIMON VIORICA, STR. HOREA NR. 4,
AP. 22, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• BRIE IOANA, STR. PADIS NR. 3, SC.1,
ET. 2, AP. 7, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• PAVEL CODRUȚA, ALEEA BOHATIEL
NR. 16, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• CÂNDEA VIOREL CONSTANTIN,
STR.CÂMPULUI NR.178, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO

(74) Mandatar:
CABINET DE PROPRIETATE
INDUSTRIALĂ CIUPAN CORNEL, STR.
MESTECENILOR NR. 6, BL. 9E, AP. 2,
CLUJ NAPOCA, JUDEȚUL CLUJ

(54) PROCEDEU DE OBTINERE A STRUCTURILOR DE
SUSȚINERE CELULARĂ ȘI MATERIALE COMPOZITE
DESTINATE INGINERIEI ȚESUTURILOR

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de producere directă a structurilor de susținere celulară prin electrospinning realizat cu o instalație cuprinzând un colector de formă pătrată sau octogonală, din oțel austenitic, având pe margini o rețea de fante, pe care este plasat, pe rând, pe cele două fețe, un aranjament unidirecțional sau bidirecțional, din fire de natură resorbabilă, reprezentând matricea. Matricea și firele sunt din polimeri bioresorbabili diferiți, care asigură o durată optimă de bioerodare și de menținere a rezistenței mecanice a membranelor rezultate. Din membranele compozite astfel realizate se pot confecționa tuburi pentru creștere 3D de țesuturi, prin lipirea pe șablon cu polimerul dizolvat al matricei.

Revendicări: 6
Figuri: 9

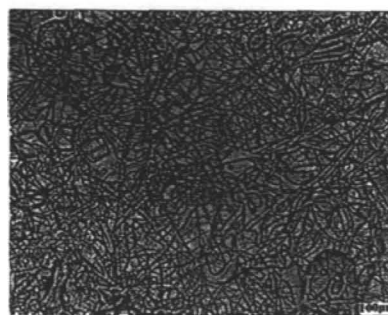
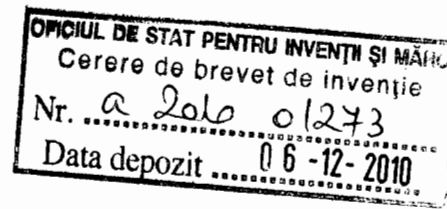


Fig. 8

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





Procedeu de obținere a structurilor de susținere celulară și materiale compozite destinate ingineriei țesuturilor

Invenția are ca domeniu de aplicare ingineria țesuturilor, definită prin „utilizarea materialelor biodegradabile sintetice sau naturale, implantate cu celule vii dacă este necesar, pentru regenerarea formei și / sau funcției unui țesut distrus sau bolnav sau a unui organ al unui pacient uman” [1]. Procedeu și materialele compozite produse conform invenției se referă la structuri din polimeri biodegradabili care vor fi utilizate ca suport pentru creșterea celulară – structuri de susținere celulară (*Scaffold* – engl.).

Confecționarea structurilor de susținere celulară este prima etapă tehnologică în ingineria țesuturilor. Acestea se obțin în special din polimeri bioresorbabili și se utilizează pentru asistarea formării *in vitro* de țesut artificial pornind, în general, de la celulele pacientului.

Structurile de susținere celulară trebuie să prezinte o serie de caracteristici esențiale, atât la nivelul materialului din care sunt confecționate, pentru realizarea unei atașări cât mai eficiente a celulelor și pentru o bioeroziune controlată, cât și la nivelul designului, pentru a se asigura morfologia și proprietățile mecanice necesare. Astfel, porozitatea trebuie să fie cât mai mare, având rolul de a asigura respirația și alimentarea cu nutrienți a celulelor. Cea mai eficientă metodă este utilizarea de textile neșesute, care ating porozități peste 80%. De asemenea, fibrele din materialul textil trebuie să fie de dimensiuni mici (până la ordinul micronilor), astfel încât bioerodarea să fie rapidă iar atașarea celulelor să fie eficientă.

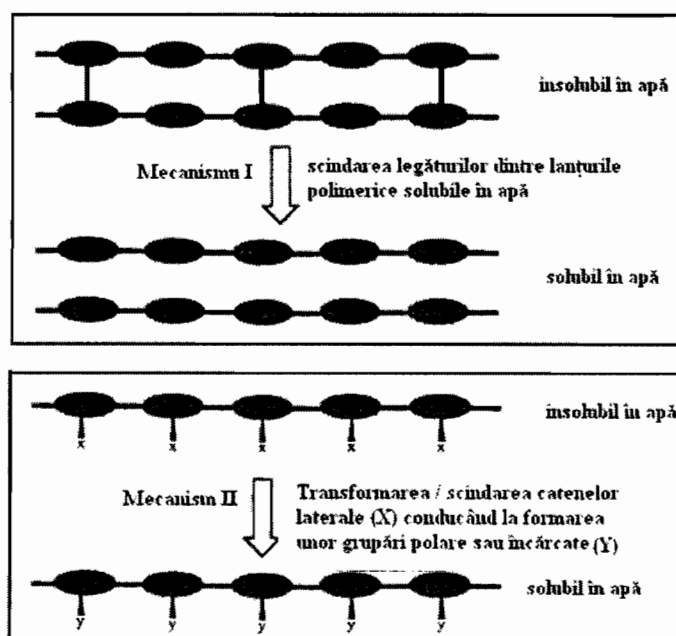
Prin macro și microstructura lor, structurile de susținere celulară trebuie să asigure, în funcție de tipul de aplicație [1]: comunicarea celulă-celulă și maximizarea alimentării celulelor cu nutrienți, factori de creștere și agenți farmaceutici activi; încetinirea activității celulare (de exemplu în adeziunea indusă chirurgical); ghidarea țesutului (sporind răspunsul celulei individuale țintă și inhibând răspunsul altor celule); sporirea atașamentului celular și activarea celulelor din stratul următor (de exemplu atașarea și proliferarea fibroblastelor și producerea de matrice extracelulară pentru repararea dermei); întârzierea răspunsului biologic (de exemplu blocarea anticorpilor împotriva celulelor homografe și xenografe utilizate în terapiile de înlocuire a organelor).

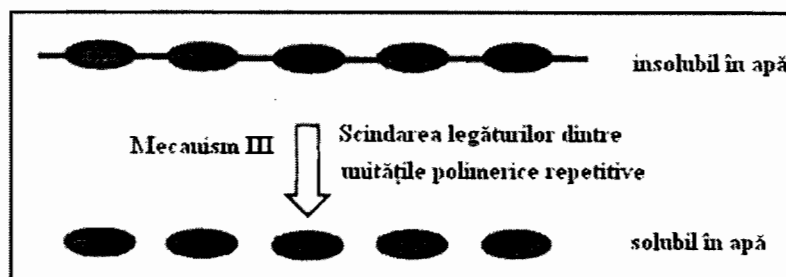
Polimerii biodegradabili utilizați trebuie să îndeplinească o serie de cerințe: disponibilitate, prelucrabilitate, proprietăți mecanice minime, toxicitate redusă sau neglijabilă pentru produse de degradare atât local, cât și sistemic[2].

Polimerii biodegradabili utilizați pentru *scaffolds* se clasifică în:

1. Polimeri naturali: colagen tip I, structuri colagenice de tip mătase, glicosaminoglicani, citosan, polihidroxiclorofila, etc.;
2. Polimeri sintetici: acizi poliglicolici, acizi polilactici, polidioxanonă, policaprolactonă, poli-ortoesterii, poliuretani, polianhidride, polifosfați, poli(amino acizi), pseudo-poli(amino acizi), etc.

Acești polimeri se degradează prin acțiune enzimatică, transformându-se din insolubili în solubili în apă, după unul dintre mecanismele din Fig.1. Reacțiile chimice pot determina ruperea legăturilor dintre lanțurile polimerice (Mecanism I), scindări ale lanțurilor laterale formându-se grupări polare sau grupări polarizate (Mecanism II), sau ruperi ale legăturilor dintre unitățile polimerice repetitive (Mecanism III) [2].





Mecanismele degradării chimice [2]

Factorii principali care determină viteza de bioerodare sunt: stabilitatea chimică a catenei principale, hidrofobicitatea, morfologia polimerului, greutatea moleculară inițială a polimerului, procesul de fabricație, prezența catalizatorilor, aditivilor sau plastifianților. Deși susceptibilitatea catenei principale este factorul cel mai important, combinația celorlalte caracteristici contribuie esențial la viteza de bioerodare. Morfologia polimerilor influențează și ea viteza de bioerodare. Acidul polilactic L și acidul polilactic D, L se degradează diferit. Deși au același lanț principal și același grad de hidrofobicitate, dispozitivele elaborate din acidul polilactic L tind să se degradeze mai lent decât cele elaborate din acidul polilactic D, L. Bioerodarea acidului polilactic L este mai lentă din cauza semicristalității acestui polimer stereoregular, în timp ce acidul lactic D, L, optic inactiv (racemic), este amorf. Procesul de fabricație determină într-o oarecare măsură și profilul eroziunii. De exemplu, Mathiowitz și co-autorii (Mathiowitz et al., 1990) [2] au demonstrat că microsferile produse prin încapsularea topiturii erau foarte compacte și slab erodate, în timp ce aceiași polimeri elaborați ca microsferă prin evaporarea solventului erau foarte poroși (deci mai permeabili la apă) și erodați mai rapid.

Polimerii naturali utilizați în prezent pentru *scaffolds* sunt:

1. Colagenul de tip I

Colagenul este elementul principal al țesutului conectiv natural, proteină animală însumând aproximativ 30 % din proteinele corpului uman [4][1]. Se găsește în orice țesut care necesită rezistență și flexibilitate (exemplu piele, os). S-au identificat 14 tipuri de colagen dar colagenul tip I este predominant. Din cauză că este atât de abundent (peste 90% din toate proteinele fibroase) și datorită proprietăților sale biologice și fizice, colagenul de tip I s-a utilizat foarte des în

elaborarea materialelor biomedicale. Structura sa este compusă din: glicol – într-o cantitate mică, acesta fiind singurul amino acid care are loc în interiorul spiralei, prolină și hidroxiprolină [5].

2. Pânza de păianjen

Pânza de păianjen este un material natural fibros utilizat frecvent datorită rezilienței, proprietăților mecanice excelente, rezistenței la torsiune. Spre deosebire de alte fibre de mătase obținute de la alte insecte, cum ar fi de la viermii de mătase, sau față de polimerii sintetici, prezintă rezistență mecanică ridicată și modul de elasticitate ridicat. Cu toate că produsele obținute din acest material nu se comercializează datorită slabei productivități, ele sunt folosite la fabricarea tendoanelor artificiale și pentru suturile chirurgicale nonalergene [5]. Comportamentul pânzei de păianjen este similar cu cel al materialelor cu memoria formei, cum ar fi al aliajului Ni-Ti (Nitinol). Acest aliaj produce o curba de încărcare – descărcare asemănătoare cu cea a pânzei de păianjen. Singura diferență este că pânza de păianjen revine singură la forma inițială, în timp ce aliajul își recapătă forma doar prin încălzire [4]. Apa influențează în mare măsură proprietățile mecanice ale pânzelor de păianjen. În contact cu apa, unele fibre de pânză de păianjen se contractă, ajungând la jumătate din lungimea lor și își dublează diametrul, fenomen numit „super contracție” [6]. Acest fenomen implică absorbția solventului de către mătase, deci scăderea rigidității.

3. Glicozaminoglicanii

Curpind dizaharide liniare, cu acid uronic (glucouronic) și o hexozamină. Cel mai des folosit, acidul hialuronic, este o polizaharidă anionică având unități de glucozamine și acid glicolic. Acidul hialuronic poate fi izolat din surse naturale (coaja de cocos) sau prin fermentarea microbiană. Este folosit ca biomaterial datorită faptului că nu este antigenic, nu provoacă inflamații și nici reacții de corp străin. Materialul are însă și dezavantaje, cum ar fi: rezistență scăzută în timp și proprietăți mecanice slabe. Glicozaminoglicanii sunt acizi, astfel sunt încărcăți negativ, atrăgând ioni pozitivi, în special Na^+ , care din punct de vedere osmotic atrag apa conducând la transformarea moleculei într-un gel. Glicozaminoglicanii ca condroitinul,

dermatanul sau heparanul pot fi sintetizați intracelular, sulfatați, secretați și, de regulă, sunt legați covalent în proetoglicani. Sunt cu mult mai mici decât acizii hialuronici [7].

4. Chitosanul

Acesta este o polizaharidă biosintetică derivată din chitină. Viteza de biodegradare a polimerului se determină în funcție de cantitatea reziduală de acetyl, parametru ușor de modificat. Gelurile, pulberea, filmele și fibrele de chitosan au fost elaborate și testate pentru diverse aplicații cum ar fi: încapsulări, membrane, materiale pentru lentilele de contact, substraturi pentru creșterea și atașarea de celule [8].

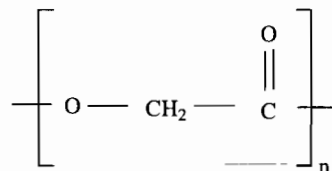
Dintre polimerii sintetici utilizați pentru scaffolds se pot enumera:

1. Hidroxiacizii α

Hidroxiacizii obținuți natural, cum ar fi cel glicolic, lactic și caprolactona, au fost utilizați pentru a sintetiza o serie de polimeri biodegradabili utili diferitelor aplicații medicale. Degradarea inițială apare până când masa moleculară ajunge la 5000 Da. Degradarea finală și resorbția polihidroxiacizilor implică activitatea celulelor inflamatorii (macrofage, limfocite, neutrofile). Polihidroxiacizii au proprietăți mecanice slabe și condiții de procesare modeste. Cu toate acestea, acești termoplaști pot fi prelucrați în filme, tuburi, matrici, utilizând metode cum ar fi: turnare, extrudare, spin casting, solvent casting, etc.

1.1 Acidul poliglicolic (PGA)

PGA are cea mai simplă structură dintre hidroxiacizii α.

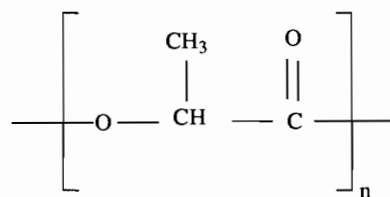


Acidul poliglicolic

Acidul poliglicolic are o structură înalt cristalină, punct de topire ridicat și solubilitate scăzută în solvenți organici. Datorită naturii sale hidrofile, PGA tinde să își piardă destul de rapid rezistența mecanică, de obicei după o perioadă de la 2 la 4 săptămâni post implantare. Pentru a putea adapta proprietățile materialului mai multor aplicații, s-au combinat copolimerii PGA cu acizi mai hidrofobi, cum ar fi PLA.

1.2 Acidul polilactic (PLA)

Datorită prezenței unei grupări metil adiționale în PLA, acesta este mai hidrofob decât PGA.



Acidul polilactic

Absorbția apei de către filmele subțiri este limitată la 2%, astfel rezultând o viteză de hidroliză mai scăzută decât cea a PGA. În plus, PLA este mult mai solubil în solvenți organici decât PGA, facilitând prelucrarea. Există în două forme stereozomerice care dau naștere la 4 polimeri diferiți, dintre care D-PLA și L-PLA sunt cele două tipuri de polimeri stereoregulari. Polimerii derivați din monomerii optic activi D și L sunt materiale semicristaline, pe când cei optici inactivi D și L – PLA sunt întodeauna amorf. De obicei, L-PLA este mai des folosit, deoarece hidroliza L – PLA produce acid lactic L (+), care este stereozomerul acidului lactic obținut pe cale naturală. L – PLA este un polimer amorf, preferat în cazurile în care se cere rezistență mecanică, de exemplu, suturile și dispozitivele ortopedice.

PLLA (acidul-poli-L-lactic) rezultă din polymerizarea acidului L-lactic. Cristalinitatea este de 37% iar temperatura de topire este $T_f=173-178^\circ\text{C}$. Poate fi procesat ca fibră sau ca film.

2. Polidioxanona (PDO)

Polidioxanona este un polieter-ester, fiind sintetizat prin polymerizarea *p*-dioxanonei cu un ciclu deschis. Datorită degradării monomerilor cu toxicitate mică *in vivo*, PDS este foarte folosit în domeniul medical și farmaceutic. Are un modul de elasticitate mai mic decât PLA și PGA, fiind primul polimer degradabil folosit pentru suturi monofilament.

3. Polifosfații

Polifosfații conțin un lanț anorganic azot - fosfor. Singht et al (2006) [1] a modificat proprietățile specifice ale polifosfaților, cum ar fi: viteza de degradare la temperatura de tranziție vitrosă, umectarea suprafeței, rezistența la tracțiune și modulul de elasticitate, pentru ca acești polimeri să poată fi folosiți în diverse aplicații medicale. Cei mai studiați polifosfați sunt cei hidrofobi, cu o slabă interacțiune cu țesutul, asemănătoare cu cea a teflonului.

4. Poliaminoacizii

Deoarece proteinele sunt compuse din aminoacizi, mulți cercetători au încercat să elaboreze polimeri sintetici derivați din aminoacizi pentru a servi ca modele în studii structurale, biologice și imunologice, cât și în aplicații biomedicale. Cum acești polimeri eliberează pe cale naturală amino acizi ca primi produși ai desfacerii scheletului polimeric, degradarea lor prezintă un nivel scăzut de toxicitate sistemică. Poliaminoacizii au fost investigați ca materiale pentru suturi, ca substistuiuri de piele prin tehnicile ingineriei țesuturilor și ca sisteme de dozare a medicamentelor. Secvențe scurte de aminoacizi, cum ar fi RGD și RGDS, promotorii adeziunii celulelor, au fost cuplați cu alți polimeri biodegradabili pentru a îmbunătăți creșterea celulelor în ingineria țesuturilor (Masuko et al., 2005; Yang et al., 2005) [1].

În concluzie, materialele biodegradabile, la modul general, trebuie să îndeplinească condiții mult mai riguroase în ceea ce privește biocompatibilitatea decât materialele bioinerte. Față de acestea, pentru materialele biodegradabile trebuie luată în considerare toxicitatea provenită din degradarea produșilor și reacția metabolismului de după degradare. Astfel, doar trei polimeri sintetici biodegradabili au fost aprobați de către FDA (Food and Drug Administration, S.U.A.) pentru a fi utilizați în medicina umană: PLA, PGA, PDO.

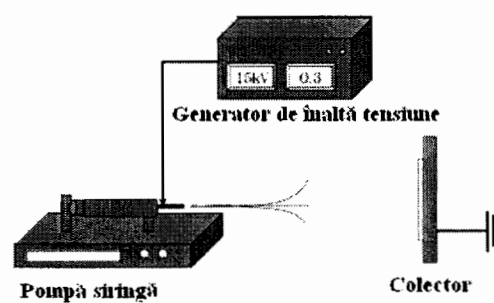
Materialele compozite produse conform prezentului brevet sunt alcătuite din PLA și PDO și pot fi dezvoltate și pentru PGA și PDO, respectiv copolimeri ai PLA și PGA.

Structurile de susținere celulară se pot fabrica printr-una dintre metodele [1, 13, 14, 15, 16]:

1. Legarea Fibrelor
2. „Electrospinning”
3. Turnarea solventului și solubilizarea particulelor
4. Formare prin turnare

5. Laminarea membranelor
6. Extrudare
7. Criodesicare
8. Separare de faze
9. Emulsia amestecului de fază (High Internal Phase Emulsion)
10. Formarea spumei cu gaz (spumarea gazului)
11. Elaborarea de compozit polimer-ceramic
12. Fabricarea rapidă a prototipurilor pentru formele solide libere
13. Autoasamblarea peptidelor
14. Polimerizare *in situ*

Electrospinning este o metodă modernă pentru a elabora structuri de susținere poroase din nano sau micro fibre biocompatibile și implică rotirea în câmp electrostatic a fibrelor, metoda fiind derivată din pulverizarea electrostatică a acoperirilor polimerice. Prin electrospinning se elaborează structuri de susținere cu porozitate ridicată din fibre neșesute și fibre ultrafine. Multi polimeri biocompatibili, cum ar fi PGA, PLGA și PCL pot fi fabricați prin electrospinning (electrofilare) în structuri de nanofibre de susținere cu porozități de peste 90% (Yashimoto et al., 2003) [1]. Soluția polimerică este introdusă într-o seringă și injectată printr-un tub metalic capilar la o viteză constantă cu ajutorul unei pompe pentru seringi. Tubului capilar i se aplică un câmp de înaltă tensiune, polarizând polimerul și direcționându-l spre suprafața de colectare împământată [14].



Ilustrarea schematică a unei instalații de electrospinning [14]

Odată cu dispunerea acestor fibre fine pe suprafața plană, solventul este evaporat, lăsând o structură poroasă neșesută. Grosimea fibrei, diametrul structurii de susținere și diametrul mediu al

porilor sunt controlate prin: solventului ales, concentrația polimerului, viteza de injectare, intensitatea curentului, diametrul tubului capilar, materialul de colectare de pe placă, distanța dintre vasul capilar și placa de colectare.

Metoda de producere de structuri fibroase prin *electrospinning* face obiectul unor brevete de invenție, cu referire la aplicații diverse [17] sau medicale. În acest caz, sunt brevetate structuri compozite tridimensionale din amestecuri de fibre de grosimi diferite și aplicații medicale generale [18], din componenți amestecați în stare dizolvată (PLGA și proteine naturale) [19] sau din fibre poroase având pori canelari [20]. În literatura de brevete din domeniu apar multe alte metode de producere a structurilor de susținere celulară, cu destinații medicale diferite. Dozare controlată de medicament este propusă pe fibre țesute, nețesute sau împletite [21]. Orientarea fibrelor se poate realiza printr-un proces de dizolvare – precipitare, într-o matrice cu porozitatea obținută prin spumare [22]. Porozitatea matricei (colagen) se poate obține și prin turnare pe o structură realizată în prealabil (din tendon ne-imunogenic) [23]. Problema structurilor 3D propriu-zise este abordată fie prin construcție pe un sistem de inele [24], fie prin utilizarea de straturi multiple suprapuse, cu roluri diferite – unul bioinert, unul biodegradabil și unul de acroșaj – pentru aplicații în vindecarea asistată a rănilor [25].

Bibliografie:

- [1] R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, *Principles of tissue engineering*, Elsevier Academic Press, third edition, 2007, ISBN 978-0-12-370615-7, 16, 324 – 333.
- [2] R. D. Buddy, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, *Biomaterials Science - An introduction to Materials in Medicine*, Edorsed by the Society for Biomaterials, Academic Press 1996, 66-72;
- [3] O. Hakimi, D. P. Knight., F. Vollrath, P. Vadgama, *Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials*, Composites: Part B 2007, 38, 324–337;
- [4] P. Golg, *Exploiting Spider's Silk*, Materials Today, Research News, 2002, 9(6), 41-47;
- [5] J. A. Kluge, O. Rabotyagova, G. G. Leisk, David. L. Kaplan., *Spider silks and their applications*, Trends in Biotechnology, Cell Press, 26(5), 224-251;
- [6] C. Veparia, D. L. Kaplana, *Silk as a biomaterial*, Elsevier, 2007, 32, 991-1007.;
- [7] http://www.steve.gb.com/science/extracellular_matrix.html, mai 2010;
- [8] <http://nano.ece.uiuc.edu/research/nanofab.html>, mai 2010;
- [9] [J.Ik. Lim, G. Woo, K. Jaesik., N. I. Sup, Noh. Youngsook. Son, *A novel method for porous chitosan scaffold*, Key Engineering Materials, Trans Tech Publications 2007, 342-343, 65-68;
- [10] <http://www.nanopolis.net/excerpts.php?page=es>, mai 2010;
- [11] <http://amgmedlb.com/productdetail.asp?id=5>, mai 2010;

- [12] http://www.bdbiosciences.com/image_library/Faceted_OPLA3.jpg, mai 2010;
- [13] [G. H. Kim, T. Min, Su. A. Park, W. D. Kim, *Coaxially electrospun micro/nanofibrous poly(ϵ -caprolactone)/eggshell-protein scaffold*, Iop publishing, 2008, 3, 1-8.
- [14] O. H. Kwon, I. S. Lee., Y. G. Ko, W. Meng, K. H. Jung, I. K. Kang, Y. Ito, *Electrospinning of microbial polyester for cell culture*, Insitute of Physics Publishing, Biomedical Materials, 2007, 2, 52-58.
- [15] A. Yamada, F. Niikura., K. Ikuta, *A three-dimensional microfabrication system for biodegradable polymers with high resolution and biocompatibility*, Iop Publishing, Institute of Physics Publishing, 2008, 18, 1-9.
- [16] I. S. Park, S. H. Kim, J. W. Han, Y. G. Ko, E. Chung, S Hyun. Kim, *Optimization of Scaffold for a Successful Hydrogel-seeding Method for Vascular Tissue Engineering*, Trans Tech Publications, 2007, 342-343, 333-336.
- [17] F. Ko, A. Macdiarmid, I.D. Norris, M. Shaker, R. Lec, *Electrospinning ultrafine conductive polymeric fibers*, U.S. Patent 7264762;
- [18] B. Chu, B.S. Hsiao, D. Fang, C. Brathwaite, *Biodegradable and/or bioabsorbable fibrous articles and methods for using the articles for medical applications*, Publication number: US 2004/0076661 A1;
- [19] P.I. Lelkes, M. Li, M. Mondrinos, F. Ko, *Electrospun blends of natural and synthetic polymer fibers as tissue engineering scaffolds*, U.S. Patent Application 20060263417, A1;
- [20] J.H. Wendorff, M. Steinhart, *Production of polymer fibres having nanoscale morphologies*, U.S. Patent Application 20040013873;
- [21] K.D. Nelson, A.A. Romero-Sanchez, G.M. Smith, N. Alikacem, D. Radulescu, P. Waggoner, Z. Hu, *Drug releasing biodegradable fiber implant*, U.S. Patent 6596296;
- [22] M. Slivka, G.G. Niederauer, K. Kieswetter, N.C. Leatherbury, *Fiber-reinforced, porous, biodegradable implant device*, U.S. Patent Application 20050240281, A1;
- [23] E. Sachlos, *Fibre - reinforced scaffold*, U.S. Patent Application 20090075382, A1;
- [24] R.W. Gillard, D.L. Lindstrom, H.B. Quach, M.G. Blum, K.K. Gray, B.K. Jang, *Scaffold system*, U.S. Patent 5560730;
- [25] J.C. Leung, F. Guilak, A. Seaber, F.T. Moutos, *Three-dimensional fiber scaffolds for injury repair*, WIPO Patent Application WO/2002/007961, A1, Application Number: PCT/US2001/040094.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția propusă este de a produce structuri de susținere celulară, realizate din materiale compozite fibroase cu caracteristici adecvate creșterii de țesuturi artificiale, printr-un procedeu rapid, simplu, eficient și care oferă o calitate constantă (repetitivă) a structurilor realizate, structuri care să ofere facilități în privind creșterea țesuturilor artificiale sau a grefelor complexe, în special a celor cu pereți subțiri.

Rezolvarea problemei propuse conduce la o soluție complexă cu referire la procedeu, instalația și materiale compozite realizate.

Procedeu de realizare a structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform invenției, constă în următoarele operații:

1. realizarea unei rețele plane, din fire de sutură bioresorbabile, obținută prin amplasarea unidirecțională, bidirecțională, sau țesută a firelor, pe un colector din oțel inoxidabil austenitic, având pe margini o rețea de fante care permit confecționarea rețelei;

2. fixarea colectorului pe instalația de electrospining și reglarea distanței dintre vârful acului seringii și colector în funcție de mărimea structurii și caracteristicile urmărite
3. rotirea acestuia cu o turație cuprinsă între 100 și 200 de rotații pe minut;
4. reglarea unei tensiuni între acul seringii și colector cuprinsă între 20 și 50 KV și programarea unui debit al pompei pentru seringi cuprins între 0.05 și 0.1 ml/min;
5. realizarea primei etape de electrospining prin injectarea constantă a materialului până la obținerea structurii dorite;
6. oprirea instalației, desprinderea materialului de pe colector și întoarcerea acestuia cu față în jos;
7. realizarea celei de-a doua etape de electrospining;
8. oprirea instalației și preluarea materialului compozit de pe colector;
9. modelarea materialului compozit pentru a obține o structură forma și dimensiunile dorite; dacă se dorește realizarea de structuri tubulare, materialul se rulează pe un șablon cilindric și se lipește cu același polimer din care s-a confecționat matricea.

Instalația de realizare a structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform invenției, se compune dintr-un dispozitiv de depunere prin rotație (*spin-coater*), pe axul căruia se așează un colector din oțel inoxidabil, dintr-o pompă pentru seringi cu care se injectează soluția din care se realizează materialul compozit și dintr-un generator de înaltă tensiune. Borna „+” a generatorului se leagă la acul seringii cu o bucsă de cupru iar colectorul este legat la masă prin intermediul unei role de cupru apăsate cu un arc.

Materialul de realizare a structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform invenției, constă dintr-un compozit cu o structură alcătuită din fire cu grosime medie de ordinul micronilor, cu unele picături solidificate, firele fiind bine ancorate de matrice, iar porozitatea matricii fiind de peste 80%.

Prezenta invenție oferă un procedeu de producere a structurilor de susținere celulară destinate creșterii de țesuturi artificiale, pornind de la celulele primare ale pacientului, sau de grefe complexe de formă tubulară (de exemplu intestin) pornind de la unități organoide. Procedeu se bazează pe tehnica de *electrospinning* și asigură realizarea simplă și directă a structurilor de susținere compozite fibroase, cu porozitate mare, armate cu fibre unidirecționale sau țesute. Atât matricea, cât și fibrele sunt confecționate din polimeri bioresorbabili. Din alegerea cuplurilor matrice – fibre se asigură resorbția structurii de susținere fără pierderea timpurie a proprietăților mecanice necesare. Compozitele de tip membrană obținute direct prin *electrospinning* pot fi rulate pentru a se obține structuri 3D tubulare necesare creșterii grefelor.

Se prezintă un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu figurile 1, 2, ..., 9, care reprezintă:

- figura 1, schema instalației de electrospining;
- figura 2, colectorul cu forma pătrată;
- figura 3, detaliu A din figura 2;

- figura 4, colectorul cu forma octogonală;
- figura 5, detaliu B din figura 4;
- figura 6, material compozit cu fire unidirecționale;
- figura 7, material compozit cu fire bidirecționale;
- figura 8, structura matricei PLA;
- figura 9, tub realizat din compozit bidirecțional.

Instalația de electrospining se compune dintr-un *spin-coater* 1, pe care se așază un colector 2, dintr-o pompa pentru seringi 3 cu o seringă 4 și dintr-un generator 5, de înaltă tensiune. Colectorul 2 se fixează pe axul dispozitivului de rotație cu ajutorul unei pompe de vid 6 și a unor garnituri 7.

Colectorul 2 se leagă la masă 8 cu o rolă 9.

Borna „+” a generatorului se leagă la acul 10 al seringii 4 prin intermediul unei role de cupru 11.

Debitul programat la pompa pentru seringi 4 este între 0.05 și 0.1 ml / min. Turația axului poate fi crescută cu accelerație programată, fixându-se între 100 și 200 rpm, timpul de rotație fiind între 90 și 800 s.

Distanța H dintre vârful acului 10 și colectorul 2 este reglabilă, între 5 și 8 cm, dar pe baza acestei soluții tehnice pot fi construite și alte variante tipodimensionale.

Într-un exemplu de realizare, colectorul 2, confecționat din tablă de oțel inoxidabil austenitic, are o formă pătrată (figura 2). Pe margini prezintă o rețea de fante de 0.5 mm grosime și 1 mm adâncime, aflate la distanțe „D” între 1 și 2 mm. Pe aceste fante se construiește un aranjament unidirecțional sau bidirecțional (două direcții perpendiculare) de fire de sutură bioresorbabile. În cazul aranjamentelor bidirecționale, firele nu sunt țesute, ci simplu așezate. Fixarea lor se realizează prin lipire cu matricea, după *electrospinning*. Firele de sutură bioresorbabile pot fi naturale (de tip colagenic) sau sintetice (polidioxanonă sau poliesteri), cu diametre între 0.02 și 0.1 mm (dimensiuni USP între 10 și 5).

În alte exemple de realizare, colectorul 2 poate avea forma unui octogon (figura 4) sau a unui cerc. Colectorul de formă octogonală oferă avantaje privind aranjarea sa pe platoul rotativ. Toate cele opt muchii ale colectorului prezintă decupări triunghiulare, realizate cu pas constant, pe toată lungimea lor. Muchiile notate cu V prezintă niște fante triunghiulare cu unghiul la vârf de 60° și la unghi de 30° față de axa y-y. Fantele de pe fețele V, destinate realizării unui aranjament de fire paralele cu axa y-y, sunt amplasate una față de alta la distanța D cuprinsă între 1 și 2 mm. Fantele de pe fețele H, destinate realizării unui aranjament de fire paralele cu axa x-x sunt realizate în mod similar cu cele de pe fețele V. Toate fantele sunt prevăzute cu raze de racordare R cu valoarea de 0.2-0.3 mm și au adâncimea de 1 mm față de latura octogonului.

În seringă se introduc soluții diluate de polimeri bioresorbabili sintetici (de exemplu 7% PLA în cloroform). Prin *electrospinning* se obțin microfibre, sub formă de textil neșesut, care se depun pe structura din fire de sutură. După încheierea primei etape de *electrospinning*, compozitul rezultat este desprins de pe colector și întors cu fața în jos. Urmează o a doua etapă de *electrospinning*, rezultând un compozit cu două straturi de microfibre sub formă de textil neșesut, între care este fixat aranjamentul de fire de sutură.

În cazul în care se dorește realizarea de structuri tubulare, compozitele produse după procesul descris anterior se rulează pe un șablon cilindric și se lipesc cu același polimer din care s-a confecționat matricea, în stare dizolvată. Prin orientarea axei de rulare față de direcția (direcțiile) firelor de armare se poate controla comportamentul mecanic al tuburilor compozite.

Se prezintă un exemplu de compozit PLA – PDO obținut prin metoda propusă. Firele din PDO au fost cu diametrul de 0.1 mm și plasate pe colector în aranjament unidirecțional (figura 6) sau bidirecțional (figura 7), ambele cu distanță $D = 1$ mm. Soluția de PLA a avut concentrația de 7%. Parametrii de lucru au fost: tensiune - 30 kV, debit - 0,04 ml/min, timp - 700 secunde. Amândouă probele prezentate au fost realizate cu depunere pe ambele fețe, în urma întoarcerii pe colector. Firele sunt bine ancorate de matrice. Structura acestora este alcătuită din fire cu grosime medie de 2.3 μm , cu multiple picături solidificate (figura 8). Porozitatea matricii, în cazul probelor prezentate, este de 80.63%. Cu membrana compozită din figura 7 s-a realizat un tub cu diametrul de 2.5 mm (figura 9) utilizabil pentru dezvoltarea unităților organoide intestinale.

Prezenta invenție se poate aplica în ingineria țesuturilor, pentru creșterea de țesuturi artificiale sau grefe complexe, pornind de la celulele pacienților sau de la unități organoide. Metoda propusă de fabricație a structurilor de susținere celulară (*scaffolds*) asigură o realizare mai ușoară și cu rezultate mai repetitive decât majoritatea metodelor utilizate până în prezent. În plus, se pretează la realizarea structurilor tubulare cu pereți subțiri, spre deosebire de celelalte metode de fabricație de *scaffolds* 3D. Materialele compozite realizate conform invenției își pot păstra rezistența mecanică necesară, chiar dacă procesul de bioeroziune al matricii este avansat. Această proprietate este necesară în cazul creșterii unităților organoide în *scaffolds* 3D. Metoda de fabricație se poate dezvolta și pentru alte tipuri de structuri de susținere celulară.

REVENDICĂRI

1. Instalație de realizare a structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, utilizează un colector (2), realizat din oțel inoxidabil austenitic, de formă pătrată având pe margini o rețea de fante de 0.5 mm grosime și 1 mm adâncime, practicate la un pas „D” cuprins între 1 și 2 mm.
2. Instalație de realizare a structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, utilizează un colector (2), de formă octogonală având pe margini o rețea de fante triunghiulare unghiul la vârf de 60° , cu adâncimea de 1 mm față de latura octogonului, prevăzute cu raze de racordare R cu valoarea de 0.2-0.3 mm, fantele de pe laturile V sunt practicate la unghi de 30 față de axa y-y, iar fantele de pe laturile H sunt practicate la unghi de 30 față de axa x-x, pasul dintre fante fiind D.
3. Procedeu de realizare a structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor pe o instalație de electrospining, constând din:
 - realizarea unei rețele plane, din fire de sutură bioresorbabile;
 - fixarea colectorului pe instalația de electrospining și reglarea distanței dintre vârful acului seringii și colector în funcție de tipul structurii și caracteristicile urmărite;
 - rotirea axului cu o turație corespunzătoare;
 - reglarea unei tensiuni între acul seringii și colector și reglarea debitului pompei pentru seringi;
 - realizarea electrospiningului;
 - realizarea compozitului în două etape, cu întoarcere față – verso pe colector;
 - oprirea instalației și preluarea materialului compozit de pe colector,**caracterizat prin aceea că**, rețeaua se obține prin trecerea firelor de sutură prin fantele colectorului și poate fi unidirecțională sau bidirecțională, prin faptul că parametrii instalației sunt: diferența de potențial aplicată între acul al seringii și colector este cuprinsă între 20 și 50 KV, debitul pompei pentru seringi este cuprins între 0.05 și 0.1 ml/min, turație a platoului cuprinsă între 100 și 200 rot/min și **caracterizată prin aceea că**, în prima etapă de electrospining are loc depunerea materialului compozit pe o față a rețelei plane, după care materialul se desprinde de pe colectorul (2) și se întoarce urmând a doua etapă de electrospining pentru depunerea materialului pe cealaltă față a rețelei

plane, uni sau bidireționale, firele rețelei lipindu-se cu materialul injectat în cele două etape de electrospining.

4. Procedeu de realizare a structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că**, pentru obținerea unor structuri cilindrice compozitele produse după procesul descris anterior se rulează pe un șablon cilindric și se lipesc cu același polimer din care s-a confecționat matricea, în stare dizolvată, iar prin orientarea axei de rulare față de direcția firelor de armare se poate controla comportamentul mecanic al tuburilor compozite.
5. Material de realizare a structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, **caracterizat prin aceea că**, s-a realizat din fire PDO cu diametrul de 0.1 mm cu care s-a creat o rețea unidirecțională pe un colector (2), iar prin electrospining, în două etape, cu procedeu și instalația prezentată, s-a injectat o soluție PLA cu concentrația de 7% , cu un debit de 0,04 ml/min, timp - 700 secunde pe o față, la o diferență de potențial de 30 kV, obținându-se un compozit cu o structură alcătuită din fire cu grosimea medie de 2.3 μm, cu multiple picături solidificate, firele fiind bine ancorate de matrice, iar porozitatea matricei fiind de peste 80%.
6. Material de realizare a structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform revendicării 5, **caracterizat prin aceea că**, s-a realizat o rețea bidirecțională din fire PDO, și caracterizat prin aceea că s-a rulat pe un șablon cilindric, rezultând un tub cu diametrul de 2.5 mm utilizabil pentru dezvoltarea unităților organoide intestinale.

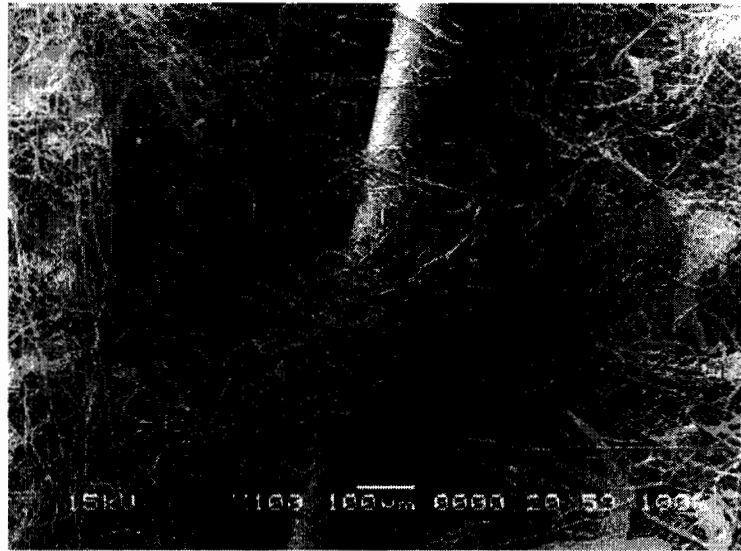


Figura 6

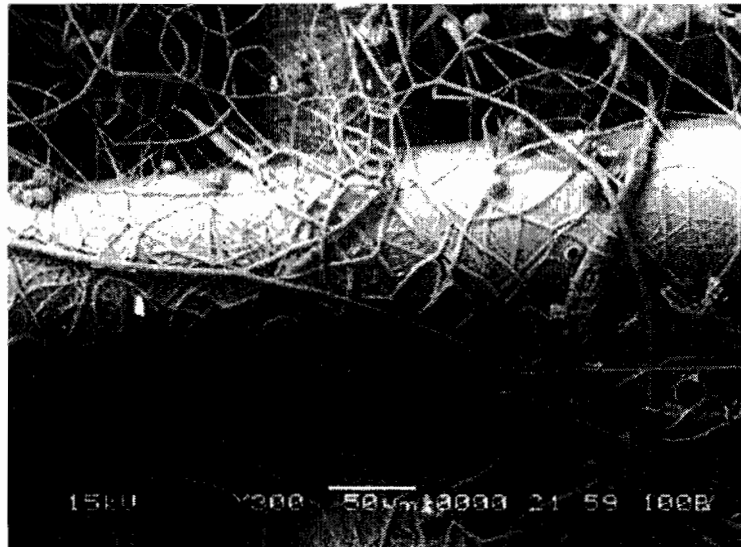


Figura 7

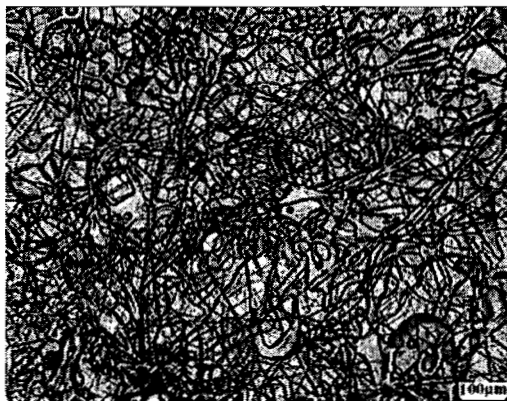


Figura 8



Figura 9