

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2020 027**
(22) Paraiškos padavimo data: **2020-07-14**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2022-01-25**

(71) Pareiškėjas:
UAB „Femtika“, Saulėtekio al. 15, 10224 Vilnius, LT
(72) Išradėjas:
Linas JONUŠAUSKAS, LT
Roaldas GADONAS, LT
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Edita IVANAUSKIENĖ, 61, Advokatės Editos Ivanauskienės kontora, A. Goštauto g. 8-228, LT-01108 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Ląstelių mikroporatorius

(57) Referatas:

Išradimas priklauso biomedicinos sričiai, konkrečiau - ląstelių transfekavimo įrenginiams. Ląstelių mikroporatorius, susideda iš skysčio mikrokanalo (1) ir jame patalpintų mechaninio poveikio elementų, kurie padaryti kaip du besisukantys velenėliai (2, 2a, 2b) (sinonimas „vėleliai“) ir sumontuoti mikrokanalo (1) nišose (1a, 1b) vienas nuo kito atstumu mažesniu negu apdorojamų ląstelių dydis, vienas arba abu velenėliai (2, 2a, 2b) padaryti su krumpliais (3) arba spygliais (5) (adatoms), velenėliai yra pasyvūs, sukami pratekančio skysčio ir kontaktuoja su ląstelėmis vienu šonu. Siūlomi įvairūs velenėlių formos variantai: cilindriniai, išgaubtas- įgaubtas (pora), įgaubti, laiptuoti cilindriniai. Siūlomi velenėlių montavimo variantai: velenėliai galuose turi įdubas, o skysčio mikrokanale padarytos iškyšos (trumpos ašelės) ir atvirkščiai - velenėliai galuose turi įdubas, o skysčio mikrokanale padarytos iškyšos (trumpos ašelės), kurios tarnauja kaip slydimo guoliai, arba velenėliai sumontuoti ant ašių.

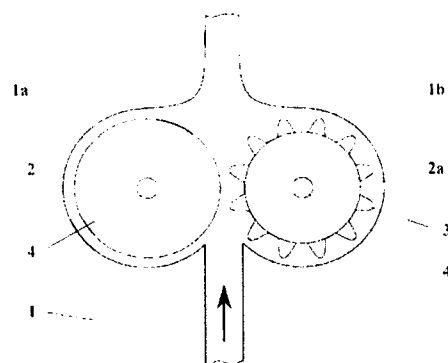


Fig.1

IŠRADIMO APRAŠYMAS

LĄSTELIŲ MIKROPORATORIUS

TECHNIKOS SRITIS

Išradimas priklauso biomedicinos sričiai, konkrečiau - ląstelių transfekavimo įrenginiams.

TECHNIKOS LYGIS

Transfekcija yra svetimų genų įvedimo į ląsteles technika. Ląstelės membrana apsaugo ląstelės vidų nuo svetimos biologinės medžiagos patekimo, todėl transfekcija turi laikinai sutrikdyti šią membranos barjerinę funkciją.

Yra žinomi ir naudojami įvairūs fiziniai transfekavimo būdai:

- elektroporacija, kai ląstelė trumpalaikiai veikiama elektriniu lauku;
- ląstelių poveikis kintamu slėgiu (angl. cell squeezing) ir jam artima hidrodinaminė transfekcija;
- sonoporacija - ląstelių poveikis ultragarsu;
- optinė transfekcija, kai ląstelės membranoje ypatingai gerai sufokusuotu lazerio spinduliu padaroma apie 1 mikrono skylutė;
- įvairūs mikroinjekcijos būdai, tokie kaip svetimos medžiagos įvedimas mikro stiklinių vamzdelių pagalba arba panaudojant genų patranką.

Visų išvardintų būdų esmė ta, kad ląstelės membranoje sukuriamos laikinos poros arba skylutės, per kurias į ląstelę yra įvedamos norimos pašalinės medžiagos, neorganiniai junginiai, vaistai, genetinės medžiagos, baltymai, angliavandeniai, sintetinio polimero ir farmacinės kompozicijos ir kt.

Patente US2020063163 aprašytas būdai ir antgalių rinkiniai medžiagai įvesti į ląsteles. Ląstelės, judančios skysčio pripildytu mikrokanalu ar praėjimu, padidina greitį mikrokanalo susiaurėjime, eidamos pro siauresnio skersmens išėjimo angą. Ląstelėse slėgis staiga pasikeičia

iš aukšto slėgio į žemą. Dėl slėgio pokyčio (iš aukšto į žemą) ląstelės laikinai ištempiamos, susidaro laikinos skylės ląstelių membranose, kurios leidžia patekti medžiagoms, esančioms ląstelę supančiame skystyje ar tirpale, įskaitant ir genetinę medžiagą cDNR, siRNR, miRNR. Maža Ca^{+2} koncentracija skystyje ar tirpale skatina prailginti laiką, reikalingą ląstelių membranoms užsandarinti, ir taip dar labiau skatina medžiagos patekimą į ląstelės vidų.

Išradime US2019262835 pateiktas tranfekcijos būdas, pasižymintis daugkartiniu ląstelių suspaudimu ir atpalaidavimu tekant laiptuoto skerspjūvio ploto skysčio mikrokanalu. Praeinant ląstelėms per suspaudimo intervalą ląstelių vidinis tūris sumažėja ("Vloss"), o patekus į atpalaidavimo sritį jų tūris padidėja ("Vgain") – jos sugeria dalį skystyje esančių molekulių.

Yra žinomas ląstelių transfekavimo būdas, (žr. patentą EP3556845), kuriame poros ląstelėse atsiranda dėl mikrokanale suformuotų kliūčių, pvz., dėl staigiai pakeisto ląstelių srauto vektoriaus.

Visuose aukščiau išvardintuose išradimuose ląstelių deformacija atliekama staigiu slėgio į ląstelės pasikeitimu, kuris vyksta dėl mikrokanalo formos pasikeitimo. Šių išradimų trūkumas, kad ląstelės, judėdamos mikrokanale, daugeliu atvejų yra veikiamos slydimo trinties – jos yra velkamos palei mikrokanalo sienelės.

Yra žinomas ląstelių mikroporatorius (žr. patentą US6846668). Jis turi vamzdelį su įėjimu ir išėjimu skystyje suspenduotoms ląstelėms pernešti ir injekcijos zoną su išsikišančia iš sienelės injekcijos adata, skirta ląstelėms pradurti, per kurią norima medžiaga įšvirkščiama į ląstelę arba išsiurbiamą medžiaga iš ląstelės. Tai gali būti atliekama bet kokia tvarka norimų skaičių kartų.

Šiame išradime naudojamas mechaninis transfekavimo būdas – jos praduriamos mikroadata. Norint padidinti ląstelių transfekcijos našumą, reikia montuoti daugybę mikrokanalų lygiagrečiai.

IŠRADIMO ESMĖ

Šio išradimo tikslas pasiūlyti našų ląstelių transfekavimo įrenginio dalį - mikroporatorių, kurį galima priskirti prie mechaninių transfekavimo priemonių. Siūlomas mikroporatorius apima tris ląstelių transfekavimo būdus:

- mechaninę ląstelių deformaciją (suspaudimą ir atpalaidavimą),
- ląstelių membranos pradūrimą,
- mišrų būdą (deformaciją ir pradūrimą).

Siekiant išradimo tikslo ląstelių mikroporatorius, susidedantis iš skysčio mikrokanalo ir jame patalpintų mechaninio poveikio elementų, pastarieji padaryti kaip du besisukantys velenėliai (sinonimas „voleliai“) ir sumontuoti mikrokanalo nišose vienas nuo kito atstumu mažesniu negu apdorojamų ląstelių dydis, vienas arba abu velenėliai padaryti su krumpliais arba spygliais, velenėliai yra pasyvūs, sukami pratekančio skysčio ir kontaktuoja su ląstelėmis vienu šonu.

Siūlomi įvairūs velenėlių formos variantai: cilindriniai, išgaubtas - įgaubtas (pora), įgaubti, laiptuoti cilindriniai. Siūlomi velenėlių montavimo variantai: velenėliai galuose turi įdubas, o skysčio mikrokanale padarytos iškyšos (trumpos ašelės) ir atvirkščiai - velenėliai galuose turi įdubas, o skysčio mikrokanale padarytos iškyšos (trumpos ašelės), kurios tarnauja kaip slydimo guoliai, arba velenėliai sumontuoti ant ašių.

Mikroporatorius gali turėti kelias velenėlių poras.

BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Išradimas iliustruojamas brėžiniais.

Brėžiniuose parodyti mikroporatoriaus skersiniai pjūviai, kuriuose mechaninio poveikio elementai yra velenėlių poros:

fig.1 - vienas velenėlis su lygiu cilindrinio paviršiumi, kitas su krumpliais,

fig.2 – abu velenėliai su krumpliais,

fig.3 - vienas velenėlis su lygiu cilindrinio paviršiumi, kitas su spygliais,

fig.4 – abu velenėliai su spygliais.

Mikroporatoriaus konstrukcijos aprašymas.

Mikroporatorius (fig.1), susideda iš mikrokanalo 1 su nišomis 1a ir 1b, kuriose sumontuoti cilindriniai (sudaromieji paviršiai yra cilindriniai) velenėliai 2 ir 2a. Velenėlio 2a sudaromajame paviršiuje padaryti krumpliai 3. Krumplių 3 forma nėra labai aktuali, svarbu, kad jų viršūnės būtų suapvalintos. Velenėliai 2, 2a sumontuoti ant ašių 4.

Fig. 2 parodytas mikroporatorius, turintis abu velenėlius 2a su krumpliais 3.

Mikroporatorius (fig.3), analogiškas kaip ir fig.1, skirtumas yra tas, kad jis turi vieną velenėlį 2b, kurio sudaromajame paviršiuje padaryti spygliai 5.

Fig. 4 parodytas mikroporatorius, turintis abu velenėlius 2a su spygliais 5.

Galimas velenėlių 2, 2a, 2b montavimas mikrokanale 1 ir kitais būdais. Velenėliai 2, 2a, 2b galuose gali turėti trumpas iškyšas, o mikrokanalo 1 sienelėse padarytas įdubas arba atvirkščiai – mikrokanalo sienelėse padarytos trumpos iškyšos, o velenėliuose 2, 2a, 2b įdubos ir tai yra slydimo guoliai.

Galimos tokios mikroporatorių modifikacijos, kai velenėlių porą sudaro:

- lygaus sudaromojo paviršiaus cilindrinis ir velenėlis su krumpliais,
- abu velenėliai su krumpliais,
- lygaus sudaromojo paviršiaus cilindrinis ir velenėlis su spygliais,
- abu velenėliai su spygliais,
- mišrus, kai vienas velenėlis su krumpliais, o kitas su spygliais.

Mikroporatoriai gali skirtis velenėlių sudaromųjų paviršių formomis. Aukščiau minėtos velenėlių poros turėjo cilindrinis sudaromuosius paviršius, bet gali turėti ir kitokius.

Velenėlių pora gali turėti tarpusavyje sutapdintus išgaubtą- įgaubtą, abu įgaubtus arba tarpusavyje sutapdintus cilindrinis laiptuotus, paviršius.

Visais atvejais tarpas tarp lygaus sudaromojo paviršiaus velenėlio 2 ir velenėlio 2a su krumpliais 3 arba tarpas abiejų velenėlių 2a su krumpliais 3, arba tarpas tarp lygaus sudaromojo paviršiaus velenėlio 2 ir velenėlio 2b su krumpliais 5, arba tarpas abiejų velenėlių 2b su spygliais 5 parinktas taip, kad jis būtų mažesnis už apdorojamų ląstelių dydį, bet nemažesnis negu ląstelėje esančių nespūdzių organelių (pavyzdžiui ląstelės branduolį) arba elementų matmenys.

IŠRADIMO REALIZAVIMAS

Mikroporatoriaus veikimas.

Įmontavus mikroporatorių į transfekavimo įrenginį siurblių pagalba mikrokanelu 1 teka skysta terpė, kurioje yra transportavimo skystis, apdorojamos ląstelės ir norima įterpti medžiaga. Praeidamos pro tarpą tarp velenėlių (fig.1, 2), jos deformuojamos, t.y. mechanškai suspaudžiamos, ląstelių vidinis tūris sumažėja, o praėjus pro tarpą tarp velenėlius 2, 2a jų vidinis tūris atsistato, ląstelės per poras membranose sugeria norimas įterpti medžiagas.

Kai transfekavimo įrenginyje naudojami mikroporatoriai, parodyti fig. 3, 4, praeinant ląstelėms tarp velenėlių poros 2, 2b arba 2b, 2b, jos dalinai deformuojamos ir spygliais 5 jų membrana yra praduriama. Praėjus tarpą tarp velenėlių ląstelių vidinis tūris stengiasi atsistatyti, per atsiradusias skylutes jos sugeria norimas įterpti medžiagas.

Skirtingai negu kituose žinomuose techniniuose sprendimuose siūlomuose mikroporatorių variantuose eliminuota ląstelių slydimo trintis ir šlyties deformacija, kuri yra žalinga ląstelėms.

Šiuo ateju ląstelės tarpelyje tarp velenėlių tik suspaudžiamos arba suspaudžiamos ir suspaudimo metu praduriama jų membrana.

Mikroporatorių charakteristika.

Orientaciniai kai kurių elementų matmenys mikronais (μm):

- mikrokanalo skerspjūvio plotas – $10\text{-}100\mu\text{m}^2$,
- velenėlių skersmuo – $100\text{-}600\mu\text{m}$,
- ašelių arba ašelių iškyšų skersmuo – $10\text{-}60\mu\text{m}$,
- tarpas tarp velenėlių ir mikrokanalo sienelių – $6\text{-}20\mu\text{m}$,
- krumplių aukštis – $3\text{-}20\mu\text{m}$,
- spyglių aukštis - $3\text{-}10\mu\text{m}$,
- spyglio viršūnėlės matmenys - $0,1\text{-}1\mu\text{m}$.

Svarbus mikroporatoriaus parametras yra tarpas, priklausomai nuo jo modifikacijos:

- tarpas tarp velenėlio su lygiu sudaromuoju paviršiumi ir krumplių, - $6\text{-}50\mu\text{m}$,
- tarpas tarp velenėlių krumplių, - $6\text{-}50\mu\text{m}$
- tarpas tarp velenėlio su lygiu sudaromuoju paviršiumi ir spyglių - $6\text{-}50\mu\text{m}$,
- tarpas tarp spyglių - $6\text{-}50\mu\text{m}$,
- tarpas tarp krumplių ir spyglių - $6\text{-}50\mu\text{m}$.

Žinoma, kad ląstelių deformacija mikroporatoriuje gali būti $10\text{-}80\%$ ląstelių vidutinio diametro, todėl konkretus mikroporatorius turi būti gaminamas konkrečiam ląstelių tipui, parenkant aukščiau minėtą modifikaciją ir tarpą.

Mikroporatoriaus gamyba.

Jis gali būti gaminamas keliais būdais. Pirmas būdas - kai skysčio mikrokanalas, su jame esančiomis nišomis velenėliui ir įdubomis, guolių elementams gali būti gaminamas ėsdinimo per kaukę reaktyvia plazma būdu. Ėsdinimo kaukė gali būti formuojama plokščiosios litografijos,

lazerinės litografijos arba spausdinimo būdais. Kitas būdas, tai - lazerinės abliacijos būdas (šis būdas tinkamas skaidrioms, neskaidrioms, organinėms, neorganinėms medžiagoms) arba eksponavimas lazerine spinduliuote, kombinuojant su šlapiuoju ėsdinimu. Pavyzdžiui, šlapias ėsdinimas gali būti atliekamas skaidriame padėkle, kai padėklas eksponuojamas fokusuota intensyvia trumpųjų ir ultratrumpųjų (femtosekundinių) impulsų lazerine spinduliuote, viršijant medžiagos pažeidimo slenkstį ir atliekant skenavimą, o po to padėklas apdirbamas ėsdinimui skirtu tirpalu. Stiklinio padėklo atveju, kai medžiagos pagrindas yra silicio dioksidas, ėsdinimo priemonė gali būti fluoro rūgštis tirpalas arba karštas kalio hidroksido vandeninis tirpalas.

Mikrokanalas gali būti formuojamas monolitinis kaip ertmė, sudaryta padėklo tūryje arba sudedamas iš dviejų sluoksnių - apatinio ir viršutinio (angl. "substratum" ir "superstratum"). Jeigu formuojamas dviejų sluoksnių derinys, tai apatiniame suformuojama mikrokanalo dalis, o viršutinis gali būti plokščias ir yra klijuojamas arba priviršinamas lazeriniu būdu prie apatinio sluoksnio. Šis veiksmas gali būti vadinamas mikrokanalo užsandarinimu. Įdubos arba guoliavietės gali būti formuojamos tais pačiais minėtais būdais lygiagrečiai arba iš eilės.

Kitos dalys, t.y. velenėlis, krumpliai, spygliai, adatos, ašys, iškyšos, guoliai įskaitant įdubas guoliavietėms gali būti gaminami keliais būdais. Patogiausi gamybos būdai - trimatė lazerinė litografija, adityvi lazerinį litografija, dvifotonė arba daugiafotonė lazerinė litografija, lazerinis 3D spausdinimas. Būdo esmę sudaro organinių arba organinių-neorganinių monomerų tirpalo arba kieto gelio vietinė ekspozicija, sufokusuota impulsine lazerine spinduliuote, viršijant polimerizacijos slenksčio dozę ir sukeliant lokalizuotą polimerizacijos reakciją. Skenuojant sufokusuotą lazerinį pluoštą galima pagaminti laisvos 3D sudėtingos geometrijos darinius. Po gamybos neeksponuota medžiaga ryškinimo proceso metu gali būti pašalinama atitinkamu tirpikliu. Tai yra procesas, nereikalaujantis surinkimo ir vadinamas besurinkimine technologija (angl. "non-assembly technology").

Medžiagos, kurios tam gali būti naudojamos, yra: SU-8,Ormocomp, SZ2080 ir kitos.

Tinkamiausia šiam procesui medžiaga yra SZ2080 – tai yra organinis-neorganinis polimero pirmtakas, skirtas lazerinei litografijai. Silicio, cirkonio ir deguonies pagrindu sudarytos ilgos

neorganinės grandinės su metilmetakrilato grupėmis, kurios netiesinės sąveikos su lazerine spinduliuote metu arba sąveikoje su priemaisių, kuriama radikalais, jungiasi tarpusavyje suformuojant polimero matricą.

Siekiant sumažinti slydimo trintį ir ląstelių prilipimą prie mikrokanalo sienelių elementų paviršiai gali būti papildomai apdoroti. Galima aktyvuoti polimerinio SZ2080 3D darinio paviršių su Piranijos tirpalu, kad paviršiuje susidarytų OH- grupės ir būtų galima silanizuoti mažą paviršiaus energiją turinčiais fluoro silanais, pvz., (*heptadekafluor-1,1,2-2-tetrahidradecil*) *dimetilchlorosilano*, arba į SZ2080 įmaišyti 5% pasižyminčio superhidrofobinėm savybėmis *1h*, *2h*, *2h-perfluoroktiltrietoksisilano*, kuris kondensacijos metu per -Si-O-Si- ryšius jungsis su SZ2080. Šio priedo nedidelis kiekis netrukdo fotopolimerizacijai ir po ryškinimo neišsiplauna,

Siūlomas mikroporatoriaus techninis sprendimas pasižymi šiomis savybėmis:

galimi trys ląstelių poveikio transfekavimo metu būdai - deformacija, pradūrimas ir deformacija ir pradūrimas,

transfekavimo metu tausojamose ląstelėse, jos mažai veikiamos slydimo trinties ir šlyties deformacijų,

ląstelėse transfekavimo metu neveikiamos šalutiniais faktoriais, tokiais kaip elektriniai, magnetiniai ar akustiniai laukai, jos neapšvitinamos

transfekavimo procesas labai našus.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

LĄSTELIŲ MIKROPORATORIUS

1. Ląstelių mikroporatorius, turintis skysčio mikrokanalą (1), kuriame yra patalpinti ląstelių mechaninio poveikio elementai b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad:
mechaninio poveikio elementai padaryti kaip du besisukantys velenėliai, iš kurių vieno (2) sudaromasis paviršius lygus, o kito (2a) - su krumpliais (3);
tarpas tarp abiejų velenėlių (2, 2a) sudaromųjų paviršių mažesnis už apdorojamų ląstelių dydį, bet nemažesnis negu ląstelėje esančių nespūdžių organelių arba elementų matmenys.
2. Mikroporatorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad abiejų velenėlių (2a) sudaromieji paviršiai turi krumplius (3).
3. Ląstelių mikroporatorius, turintis skysčio mikrokanalą (1), kuriame yra patalpinti ląstelių mechaninio poveikio elementai, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad:
mechaninio poveikio elementai padaryti kaip du besisukantys velenėliai, iš kurių vieno (2) sudaromasis paviršius lygus, o kito (2b) su spygliais (5) (adatom);
tarpas tarp abiejų velenėlių (2, 2b) sudaromųjų paviršių mažesnis už apdorojamų ląstelių dydį, bet nemažesnis negu ląstelėje esančių nespūdžių organelių arba elementų matmenys.
4. Mikroporatorius pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad abiejų velenėlių (2b) sudaromieji paviršiai turi spyglius (5).
5. Mikroporatorius pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad velenėlių (2, 2a, 2b) sudaromieji paviršiai yra cilindriniai.
6. Mikroporatorius pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad velenėlių (2, 2a, 2b) porų sudaromieji paviršiai yra sutapdinti tarpusavyje (išgaubtas- įgaubtas).
7. Mikroporatorius pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad velenėlių porų (2, 2a, 2b) sudaromieji paviršiai yra įgaubti.
8. Mikroporatorius pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad velenėlių poros (2, 2a, 2b) turi laiptuotus, sutapdintus tarpusavyje, cilindrinis sudaromuosius paviršius.
9. Mikroporatorius pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad velenėliai (2, 2a, 2b) galuose:

a) turi įdubas, o skysčio mikrokanale (1) padarytos iškyšos (trumpos ašelės), kurios tarnauja kaip slydimo guoliai;

b) turi iškyšas, o skysčio mikrokanalas (1) – įdubas, kurios tarnauja kaip slydimo guoliai.

10. Mikroporatorius pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad velenėliai užmauti ant ašių (4), kurios įtvirtintos skysčio mikrokanalo (1) sienelėse.

11. Mikroporatorius pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad velenėliai (2, 2a, 2b) sumontuoti skysčio mikrokanalo (1) simetriškose nišose (1a, 1b) ir su apdorojamomis ląstelėmis kontaktuoja vienu šonu.

12. Mikroporatorius pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad velenėliai (2, 2a, 2b) skysčio mikrokanale (1) yra pasyvūs ir sukami pratekančio skysčio.

13. Mikroporatorius pagal 1-2 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad krumplių (3) profilis yra bet kokios formos su apvalinta viršūne.

14. Mikroporatorius, pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad vienas (2a) iš velenėlių turi krumplius (3), o kitas (2b) - spyglius (5).

15. Mikroporatorius pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad skysčio mikrokanale (1) gali būti sumontuotos kelios velenėlių poros.

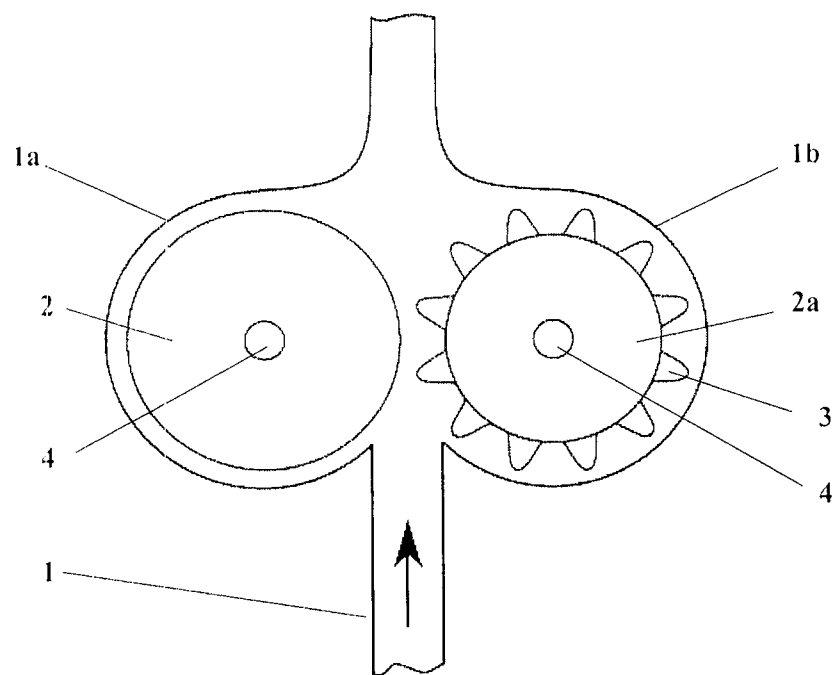


Fig.1

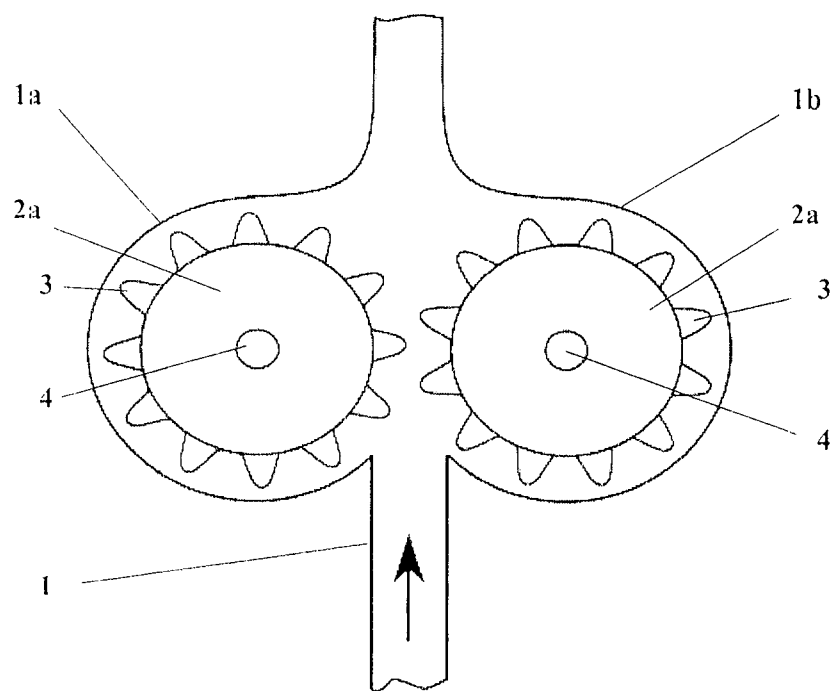


Fig.2

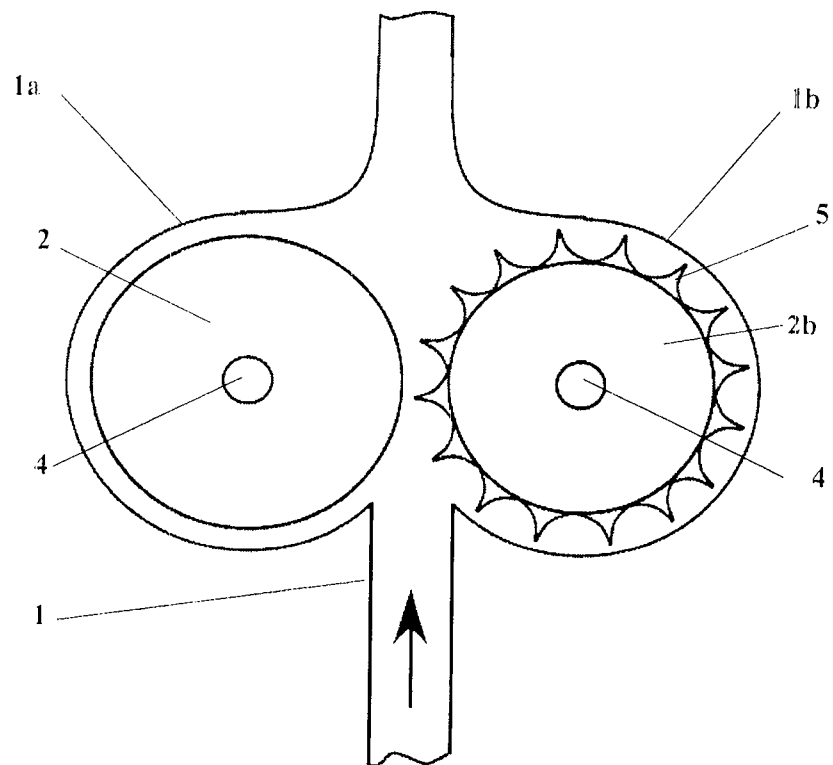


Fig.3

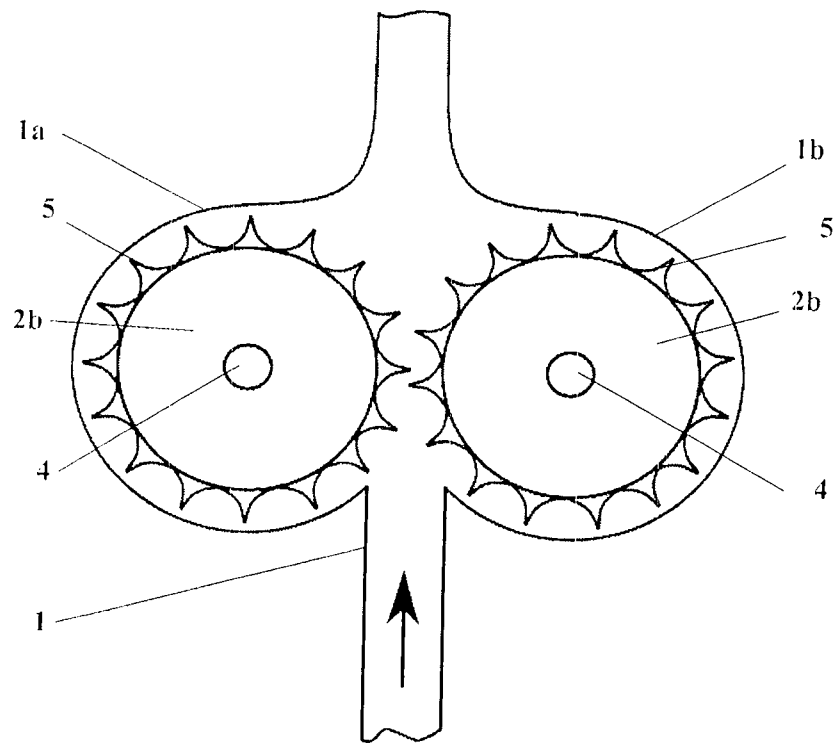


Fig.4