

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242911 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **435749**

(22) Data zgłoszenia: **2020.10.21**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.04.25 BUP 17/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.05.15 WUP 20/2023**

(51) MKP:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/34 (2017.01)

A61L 31/14 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

A61L 31/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 41/17 (2020.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**FILIPPO PIERINI, Łomianki, PL
PAWEŁ NAKIELSKI, Warszawa, PL
CHIARA RINOLDI, Warszawa, PL
SYLWIA PAWŁOWSKA, Gdańsk, PL
XIAORAN LI, Szanghaj, CN
YANG SI, Szanghaj, CN
BIN DING, Szanghaj, CN**

(74) Pełnomocnik:

Anna Grzelak, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Nanoplatforma dostarczania leków na żądanie, sposób jej wytwarzania oraz zastosowanie

PL 242911 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nanoplatforma dostarczania leków na żądanie zawierająca hydrożel poli(N-izopropylakryloamid-ko-N-izopropylometakryloamid) (P(NIPAAm-co-NIPMAAm)), polimer i substancję czynną, sposób jej wytwarzania oraz zastosowanie do leczenia trudno gojących się zainfekowanych ran lub leczenia nowotworów w połączeniu z terapią fototermiczną.

Tkanki i narządy mają złożone funkcje, które ulegają istotnym zmianom podczas zabiegów medycznych. Ilość leków w płynach ustrojowych powinna być utrzymywana na poziomie terapeutycznym, którego stężenie powinno być skuteczne bez powodowania problemów dla pacjenta. Dlatego istnieje pilna potrzeba opracowania systemów zdolnych do dostarczania pożądanych ilości leków w kontrolowany sposób, umożliwiając tym samym utrzymanie stężenia bioaktywnych cząsteczek na poziomie odpowiadającemu zakresowi terapeutycznemu.

Biomateriały polimerowe oferują duże możliwości zwiększenia biodystrybucji leków w różnych zastosowaniach biomedycznych (np. w terapii nowotworów lub antybakteryjnej). Tradycyjne strategie pasywnego i aktywnego dostarczania leków stoją jednak przed wieloma wyzwaniami, takimi jak niska penetracja guzów w leczeniu nowotworów czy niska internalizacja leków hydrofilowych w komórkach bakteryjnych, np. w przypadku środków przeciwdrobnoustrojowych. Ponadto, komórki nowotworowe rozwijają różne mechanizmy oporu wobec konwencjonalnego leczenia monoterapią (np. chemioterapią), podczas gdy w przypadku zakażeń bakteryjnych rozpowszechniają się bakterie wielolekooporne.

Dostępna literatura przedmiotu wskazuje, że istnieje potrzeba poszukiwania nowych strategii dostarczania leków. W tym kontekście włókniste materiały polimerowe zyskują coraz większe zastosowanie badaczy. Poza tworzeniem rusztowań dla hodowli komórek w inżynierii tkankowej, coraz częściej elektroprzędzone nanowłókna polimerowe są stosowane jako systemy dostarczania leków (Contreras-Cáceres R, Cabeza L, Perazzoli G, Diaz A, López-Romero JM, Melguizo C, Prados J. Electrospun Nanofibers: Recent applications in drug delivery and cancer therapy. *Nanomaterials* 2019; 9: 656, Doi: 10.3390/nano9040656).

Natomiast w publikacji autorstwa Pawłowskiej i współpracowników zaproponowano włóknistą matę P(NIPAAm-co-NIPMAAm)-PLCL jako system rdzeń-otoczka do dostarczania leków, w której PLCL działał jako warstwa ochronna (otoczka) hamująca wydostawanie się leku z rdzenia, którym jest hydrożel zamknięty w otoczce PLCL. Przy czym, ujawniona włóknista mata z włókien typu rdzeń-otoczka została wykonana według dedykowanej techniki elektroprzędzenia współosiowego, wspomaganą przez polimeryzację wolnorodnikową inicjowaną promieniowaniem UV in situ w kontrolowanych warunkach środowiskowych w trakcie prowadzenia procesu elektroprzędzenia. Następnie mata poddana została dodatkowej po-elektroprzędzeniowej obróbce promieniowaniem UV. Zamknięcie hydrożelu w postaci nanowłókien, gdzie struktura każdego pojedynczego włókna to układ rdzeń-otoczka, możliwe było dzięki zastosowaniu otoczki z polimeru poli-L-laktyd-co-kaprolakton (PLCL). Przy czym, rdzeń stanowił wspomniany hydrożel zawierający substancję aktywną (lek). Uwalnianie leku z tak zaproponowanego systemu następuje poprzez wypchnięcie go przez wodę zawartą w hydrożelu w wyniku wzrostu temperatury, która jest ściśle uzależniona od temperatury środowiska, w którym system się znajduje (Pawłowska S, Rinoldi C, Nakielski P, Ziai Y, Urbanek O, Li Z, Kowalewski TA, Ding B, Pierini F. Ultraviolet Light-Assisted Electro spinning of Core-Shell Fully Cross-Linked P(NIPAAm-co-NIPMAAm) Hydrogel-Based Nanofibers for Thermally Induced Drug Delivery Self-Regulation. *Adv. Mater. Interfaces* 2020, 2000247). Zaproponowany system nie umożliwia jednak dostarczania leków na żądanie.

Celem wynalazku jest opracowanie nowego systemu dostarczania leków na żądanie przy jednoczesnej kontroli czasu i tempa dostarczania leków.

Istotą wynalazku jest nanoplatforma dostarczania leków na żądanie pod wpływem światła z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) zawierająca w pełni usieciowany hydrożel P(NIPAAm-co-NIPMAAm), polimer oraz substancję czynną, charakteryzująca się tym, że substancja czynna jest inkorporowana w elektroprzędzone nanowłókna polimeru, a hydrożel poli(N-izopropylakryloamid-ko-N-izopropylometakryloamid) (P(NIPAAm-co-NIPMAAm)) jest połączony z nanomateriałem plazmonowym, którym są nanopreciki złota tworząc poli(N-izopropylakryloamid-ko-N-izopropylometakryloamid)-nanopreciki złota (P(NIPAAm-co-NIPMAAm)-AuNR), przy czym wspomniana platforma tworzy komponent typu „sandwich” składający się z hierarchicznych poziomów, gdzie pomiędzy dwiema warstwami nanowłókien polimeru z inkorporowaną substancją czynną zlokalizowany jest wspomniany hydrożel z nanoprecikami złota.

Korzystnie substancja czynna jest wybrana z grupy obejmującej leki przeciwbólowe, antybiotyki, antymikotyki, leki antywirusowe, leki przeciwnowotworowe.

Korzystnie elektroprzędzone nanowłókna wybrane są z grupy obejmującej poli(L-laktyd) (PLLA), poliglikolid (PGA), polikaprolakton (PCL) i ich kopolimerów poli(L-laktyd-ko-kaprolakton) (PLCL), poli(D,L-laktydu-ko-glikolidu) (PLGA).

Korzystnie ilość substancji czynnej inkorporowanej w elektroprzędzonych nanowłóknach wynosi 1% wag. względem całkowitej masy polimeru.

Kolejną istotą wynalazku jest sposób wytwarzania nanoplatfomy dostarczania leków według wynalazku, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) przygotowanie roztworu polimeru w rozpuszczalniku organicznym lub mieszaninie rozpuszczalników organicznych;
- b) wprowadzenie substancji czynnej do roztworu polimeru wytworzonego w etapie a);
- c) elektroprzędzenie nanowłókien polimeru z substancją czynną, w którym włókna zbierano na uziemiony kolektor w postaci folii umieszczonej na poruszającym się walcu;
- d) usunięcie pozostałości rozpuszczalnika poprzez umieszczenie wytworzonego w etapie c) materiału włóknistego w próżni;
- e) wykonanie krążków z elektroprzędzonych nanowłókien zawierający inkorporowaną substancję czynną;
- f) przygotowanie roztworu prekursora hydrożelu z nanopręcikami złota;
- g) wytworzenie struktury typu „sandwich” poprzez naniesienie prekursora hydrożelu z nanopręcikami złota na pierwszy krążek z elektroprzędzonych nanowłókien zawierający inkorporowaną substancję czynną i umieszczenie drugiego krążka z elektroprzędzonych nanowłókien zawierającego substancję czynną na wierzch roztworu prekursora hydrożelu;
- h) ściśnięcie struktury typu „sandwich”;
- i) polimeryzacja hydrożelu poprzez naświetlanie struktury typu „sandwich” światłem UV;
- j) płukanie wytworzonej nanoplatfomy.

Korzystnie w etapie i) polimeryzacja hydrożelu poprzez naświetlanie UV jest prowadzona w łaźni wodnej w temperaturze 15°C i przez 5 minut.

Wynalazek dotyczy również nanoplatfomy według wynalazku do zastosowania do leczenia trudno gojących się zainfekowanych ran lub leczenia nowotworów w połączeniu z terapią fototermiczną.

Wynalazek dostarcza następujących korzyści:

- zapewnia dostarczenie leków na żądanie, a tym samym pozwala na uniknięcie nadmiernego i niebezpiecznego uwalniania bioaktywnych cząsteczek podczas pierwszego etapu podawania leków, przy jednoczesnym wydłużeniu czasu dostarczania leku;
- jest biokompatybilny;
- poprzez konwersję światła na ciepło, opisany system kaskadowy według wynalazku może drastycznie przyspieszyć uwalnianie leków, zwiększając ich kinetykę i jednocześnie indukując przejście fazowe hydrożelu, co prowadzi do uwolnienia wody z jego objętości i przyspieszenia transportu leków dzięki konwekcji leku z systemu jego dostarczania. Strategia ta otwiera duże możliwości w zakresie rozwoju zupełnie nowych systemów dostarczania leków, w których czas i tempo uwalniania leków są kontrolowane na kilku poziomach;
- nanoplatfoma według wynalazku składa się hierarchicznych poziomów, zaprojektowanych w celu wygenerowania serii kontrolowanych, szybkich i odwracalnych kaskadowych zmian strukturalnych po napromieniowaniu światłem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR), które zwiększa temperaturę do 42°C dzięki interakcji plazmonowego hydrożelu i światła. Uwalnianie leku jest napędzane przez desorpcję leku z powierzchni włókna (tj. elektroprzędzonego nanowłókna) i późniejszą dyfuzję z konwekcją kontrolowaną temperaturą i światłem NIR;
- ze względu na obecność plazmonowego hydrożelu, lek może być dostarczany jednocześnie z terapią fototermiczną w przypadku raka lub w leczeniu antybakteryjnym z wykorzystaniem synergicznego działania multiterapeutycznego w celu skuteczniejszego zabijania komórek. Takie podejście może pomóc przezwyciężyć niedostateczne uwalnianie leku w miejscach docelowych, co jest głównym ograniczeniem konwencjonalnych systemów uwalniania;
- zapewnia biomimetyczne mikrośrodowisko odpowiednie do przyłączania się i namnażania komórek, bez żadnego działania toksycznego;

Wynalazek przedstawiono w przykładach wykonania oraz na figurach rysunku, na którym fig. 1 przedstawia analizę żywotności komórek poddanych działaniu nanoplatfomy według wynalazku, gdzie a) przedstawia żywotność linii komórkowej mysich fibroblastów L929 po 1, 3, i 7 dniach hodowli,

określona za pomocą testu PrestoBlue dla trzech rodzajów materiałów: TCP (kontrola), elektroprzędzone nanowłókna PLLA i nanoplatfoma według wynalazku (Nano platforma), przy czym istotne różnice: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ są określone w stosunku do TCP, b) przedstawia mikrografy do badań żywych/nieżywych po 1 i 7 dniach hodowli komórek na TCP (kontrola), elektroprzędzonych nanowłóknach PLLA i nanoplatformie według wynalazku (Nano platforma): komórki barwiono barwnikami, zieloną fluorescencyjną dla żywych komórek (Żywe) i czerwoną fluorescencyjną dla martwych (Martwe); fig. 2 przedstawia kumulatywne uwalnianie analogu leku w trzech różnych temperaturach (24°C, 37°C i 42°C): (a) we wszystkich punktach czasowych (do 1700 godzin); (b) dla pierwszych 100 godzin procesu uwalniania; (c) przedstawia kumulatywne uwalnianie analogu leku po 10 cyklach naświetlania laserem, gdzie szare pionowe linie reprezentują jednogodzinne cykle naświetlania laserem w zakresie bliskiej podczerwieni; (d) przedstawia wykres kolumnowy przedstawiający uwalnianie analogu leku z podziałem na uwalnianie podczas naświetlania laserem (szare – naświetlanie włączone – Wł.) i bez naświetlania (czarny – naświetlanie wyłączone Wył.).

Przykład 1.

Sposób wytworzenia nanoplatfomy według wynalazku

Nanostrukturalna platforma (Nanoplatfoma) według wynalazku opiera się na połączeniu nanomateriałów plazmonowych, termo-reagującego hydrożelu P(NIPAAm-co-NIPMAAm) i elektroprzędzonych nanowłókien w hierarchicznej strukturze.

W tym przykładzie wykonania do wytworzenia elektroprzędzonych nanowłókien zastosowano poli(L-laktyd), natomiast można zastosować również inne biodegradowalne polimery, takie jak poliglikolid (PGA), polikaprolakton (PCL) lub kopolimery takie jak poli(L-Laktyd-co-kaprolakton (PLCL) czy poli(laktyd-koglikolid) (PLGA).

Roztwór polimeru przygotowano poprzez rozpuszczenie poli(L-laktydu) (PLLA, PL18, CorbionPurac, Holandia) w mieszaninie chloroformu (CHCl_3) i dimetyloformamidu (DMF). Skład masowy roztworu polimeru wynosił: PLLA – 0,554 g, CHCl_3 – 9 g, DMF – 1 g.

Następnie do roztworu polimeru dodano wybraną substancję czynną. W tym nieograniczającym przykładzie wykonania zastosowano sól sodową ibuprofenu (Na-ibuprofen). Przy czym, sól sodowa ibuprofenu (Na-ibuprofen) została wybrana ze względu na łatwe jej oznaczanie ilościowe za pomocą metod spektroskopowych oraz szerokie spektrum potencjalnych zastosowań, jednakże inne leki (np. dokсорubicyna, amfoterycyna B, cisplatyna, cytarabina, daunorubicyna, epirubicyna, fluorouracyl, karboplatyna, paklitaksel) mogą być dodane na tym etapie.

Do wytworzenia nanowłókien PLLA z inkorporowaną substancją czynną (włókniny PLLA) zastosowano technikę elektroprzędzenia. Przy czym, ilość Na-ibuprofenu w nanowłóknach wynosiła 25 μg na jeden krążek włókniny PLLA, a stężenie Na-ibuprofenu w włókninie ustalono na 1% wag. względem całkowitej masy polimeru.

W tym przykładzie wykonania w procesie elektroprzędzenia użyto dodatnie napięcie 17 kV i natężenie przepływu 800 $\mu\text{L/h}$. Zastosowano igłę 26G. Włókna zebrano na uziemiony kolektor obracający się z prędkością 500 obrotów na minutę i umieszczony w odległości 15 cm od igły. Typowa temperatura i wilgotność odnotowane w trakcie prowadzonego procesu elektroprzędzenia wynosiły odpowiednio 23°C i 50–60%.

Materiał włóknisty zbierany był na folię aluminiową o wymiarach 4 cm \times 23 cm. Folia umieszczona była na walcu, który poruszał się ruchem posuwisto zwrotnym. Po zakończeniu procesu elektroprzędzenia, matę umieszczano w próżni (20 mbar przez noc) w celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika. Aby uniknąć kurczenia się i zwijania materiału, został on pozostawiany na folii przez co najmniej 24 godziny.

Do przygotowania pojedynczej nanostrukturalnej platformy według wynalazku użyto dwóch krążków wyciętych korkoborem (średnica wewnętrzna 1,3 cm) z elektroprzędzonego nanomateriału włóknistego poli-L-laktydu (PLLA) z inkorporowanym Na-ibuprofenem (krążki o średniej masie około 2,5 mg, średnicy 1,3 cm i grubości około 100 μm) oraz roztworu prekursora hydrożelu o następującym składzie masowym: NIPAAm (N-izopropylakrylamid) – 462,5 mg, NIPMAAm (N-izopropylometakrylamid) – 12,5 mg, BIS-AAm (N, N'-metylenobisakrylamid) – 25 mg, Irgacure 2959 – 10 mg, nanopreczki złota (AuNR) – 2 mL, H_2O – 8 mL.

Przy czym, krążek z elektroprzędzonych nanowłókien z inkorporowanym Na-ibuprofenem umieszczono w 4-dołkowej płytce hodowlanej o wielkości pojedynczego dołka 10 mm średnicy i 1 mm głębokości. Krążek został dokładnie dopasowany do dołka, a jego krawędź skierowana do góry. Następnie naniesiono 50 μL roztworu prekursora hydrożelu z AuNR (po 10 minutach procesu usuwania

tlenu poprzez zanurzenie w fiolce z prekursorem dyfuzora przez który przepuszczano argon, celem wyparcia tlenu) równomiernie rozprowadzono go na powierzchni krążka z nanowłókien.

Na koniec, drugi elektroprzędzony krążek z Na-ibuprofenem został umieszczony na wierzchu roztworu hydrożelu, tworząc kompozyt typu „sandwich”, podczas gdy krawędzie obu krążków zostały ściśnięte pęsetą w celu zapewnienia połączenia i szczelności. Tak przygotowaną strukturę pozostawiono w płytce hodowlanej na jedną minutę przed naświetlaniem UV, aby zapewnić, że prekursor hydrożelu przeniknął do porów materiału z nanowłókien i pozwolił na właściwe zakotwiczenie na styku hydrożel-włókno.

Przygotowany kompozyt był naświetlany lampą UV (Dymax, 400 W, gęstość mocy 225 mW cm⁻²) przez 5 minut z wykorzystaniem łaźni chłodzącej w celu utrzymania temperatury poniżej 15°C. Po polimeryzacji hydrożelu, całość płukano w wodzie dejonizowanej uzyskując gotową nanoplatformę według wynalazku.

Przykład 2.

Nanoplatforma PLLA/P(NIPAAm-co-NIPMAAm)/AuNR wykonana sposobem według przykładu 1, posiada hierarchiczną strukturę, która składa się z dwóch warstw elektroprzędzonych nanowłókien PLLA (Poli-L-laktyd) z solą sodową ibuprofenu, które pomiędzy sobą zawierają plazmonowy hydrożel P(NIPAAm-co-NIPMAAm)/AuNR.

Mechanizm działania

Mechanizm uwalniania leku z nanoplatformy według wynalazku polega na tym, że mechaniczny skurcz całej platformy uwalniania leku, spowodowany wzrostem temperatury w wyniku oddziaływania hydrożelu plazmonowego ze światłem z zakresu bliskiej podczerwieni NIR, powoduje gwałtowne uwolnienie wody z wewnętrznej struktury (hydrożelu), która przenika przez elektroprzędzoną włókninę z lekiem przyspieszając jego uwalnianie. Efekty wzrostu temperatury i wymuszonego przepływu wody stymulują uwalnianie się cząsteczek leku z nanowłókien.

Szybkość uwalniania leków z nanoplatformy według wynalazku jest samoczynnie programowalna, dzięki obecności zarówno termo-reagującego hydrożelu plazmonowego zawierającego nanopreciki złota, jak i włókniny PLLA zawierającej sól sodową ibuprofenu, która jest desorbowana z powierzchni nanowłókien PLLA i przenoszona przez wodę wypływającą z hydrożelu pod wpływem wzrostu temperatury. Rola hydrożelu ma zasadnicze znaczenie w mechanizmie regulacji, ponieważ ulega on odwracalnym zmianom fizycznym po przekroczeniu normalnej temperatury ciała (np. podczas chorób lub stanów zapalnych). Układ hydrożelowy P(NIPAAm-co-NIPMAAm) ma dolną krytyczną temperaturę rozpuszczalności (LCST) wynoszącą około 37°C, podobnie jak temperatura ciała ludzkiego, co umożliwia układowi indukowaną termicznie samoregulację dostarczania leku.

Natomiast dzięki obecności cząsteczek złota, temperaturę tę można stymulować i kontrolować mocą i czasem naświetlania promieniowaniem lasera w bliskiej podczerwieni (NIR), generując temperaturę na przykład 42°C. Stąd też obecność nanoprecików złota w macierzy hydrożelu jest kluczowym elementem. Występuje na nich bowiem efekt powierzchniowego rezonansu plazmonowego, polegający na pochłonięciu promieniowania lasera NIR a następnie przekazania energii w formie cieplnej do otoczenia. Zadaniem nanoprecików złota jest zarówno kontrolowanie szybkości uwalniania leku stymulowanej temperaturą, jak i umożliwiają one zastosowanie niniejszej platformy w terapii fototermicznej (PTT).

Przykład 3.

Analiza biokompatybilności i toksyczności nanoplatformy według wynalazku

Testy toksyczności i biokompatybilności zostały przeprowadzone przy użyciu komórek mysich fibroblastów L929. Zastosowano następujące oznaczenia prób:

- TCP – płytka do hodowli komórkowej (z ang. tissue culture plate) jako kontrola doświadczenia
- PLLA – elektroprzędzone nanowłókna PLLA
- Nano platforma – nanoplatforma według wynalazku.

Komórki mysich fibroblastów L929 hodowano na próbce kontrolnej (TCP), czystym materiale włóknistym PLLA oraz na nanoplatformie według wynalazku przez 1, 3 i 7 dni, a żywotność komórek oceniano za pomocą testów PrestoBlue (Invitrogen) i oznaczenia żywych/martwych komórek (Żywe/Martwe na fig. 1b). Test PrestoBlue zastosowano zgodnie ze wskazówkami producenta. Wszystkie przebadane materiały były w stanie wspomagać wzrost komórek L929. Stwierdzono, że po 3 dniach hodowli liczba komórek na TCP i na poduszkach nanostrukturalnych znacznie wzrosła w porównaniu z dniem 1 (fig. 1a). W przypadku PLLA wzrost ten nie był widoczny, a komórki hodowane na mikroarchitekturze włóknistej miały przypuszczalnie mniejszą szybkość wiązania się do podłoża. Większa

liczba komórek dla wszystkich materiałów była widoczna od 3 dnia do 7 dnia, podczas gdy wartości dla materiału nanowłóknistego PLLA i nanoplatformy według wynalazku znacznie różniły się od tych dla TCP. Wynika to z faktu, że komórki hodowane w 2D mają łatwiejszy dostęp do składników odżywczych i łatwo migrują. Badania żywotności wykazały, że po 7 dniach hodowli, liczba martwych komórek na nanoplatformie według wynalazku i nanowłóknach PLLA była wyższa niż dla TCP (fig. 1b). Żywotność komórek dla obu materiałów wyniosła jednak ponad 75%, a biorąc pod uwagę wyniki PrestoBlue, oba materiały można uznać za niecytotoksyczne.

Ponadto, reakcja komórek *in vitro* została również zbadana w warunkach napromieniowania światłem NIR w celu wykazania jej bezpieczeństwa dla zastosowań biomedycznych. Badania żywotności wykonano po wystawieniu komórek na działanie światła NIR do 15 min/dzień. Wyniki wykazały, że naświetlanie NIR nie wpłynęło negatywnie na żywotność komórek, co dało wynik porównywalny z nienaświetlanymi próbkami. Tak więc, naświetlanie światłem NIR (stosowane w tym badaniu) może być uznane za bezpieczne dla platform biomedycznych. Wyniki te sugerują, że platforma według wynalazku oferuje biokompatybilną powierzchnię wspierającą żywotność, proliferację i rozprzestrzenianie się komórek.

W związku z tym sugeruje się, że w związku z laserową funkcją uwalniania leków i dobrą biokompatybilnością, nanoplatforma według wynalazku może być stosowana w multiterapii, gdzie na żądanie potrzebna jest zwiększona biodostępność leków i fototerapia.

Nanoplatforma według wynalazku może być zatem bezpiecznie wszczepiana np. w miejsce pooperacyjne po usunięciu guza i dodatkowo poddane obróbce światłem NIR w celu zabicia pozostałych komórek nowotworowych. Ten sam proces można zastosować w przypadku nie gojących się i zainfekowanych ran, gdzie platforma poddana zabiegowi laserowemu może uwalniać miejscowo antybiotyki, a wytworzone ciepło zmniejszałoby ilość kolonii bakterii.

Przykład 4.

Analiza potwierdzająca kontrolowane uwalnianie leku z nanoplatformy według wynalazku

Badania sprawdzające słuszność hipotezy o możliwości sterowania ilością uwalnianego leku potwierdzono przeprowadzając serie eksperymentów, zarówno z wykorzystaniem światła w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR), jak i porównując uzyskane wyniki z danymi uzyskanymi z eksperymentów prowadzonych bez promieniowania NIR, a jedynie w określonej temperaturze (brak reakcji fototermicznej, stosowanie ciepłarki w celu podwyższenia temperatury ośrodka hydrożelowego).

Do analiz wykorzystano nanoplatformę według wynalazku wytworzoną sposobem według przykładu 1, z tym że zamiast ibuprofenu zastosowano Rodaminę B (dalej jako analog leku).

Podczas eksperymentów dotyczących uwalniania analogu leku, nanoplatformy według wynalazku zanurzono w 1 mL wody dejonizowanej, a następnie zostały one napromieniowywane wiązką laserową w sposób cykliczny, przy czym jeden cykl trwał 1 godzinę. Maksymalna ilość cykli wynosiła 10. Okresy wyłączenia lasera wahały się od 6 godzin na początku, do 12 godzin po kilku cyklach. Wyniki przedstawiono na fig. 2.

Po pierwszym cyklu naświetlania laserem (fig. 2c, pionowa czerwona linia), ilość uwolnionego analogu leku wyniosła około 12%, podczas gdy w cyklu wyłączenia lasera (trwającym 6 godzin) łączna masa uwolnionego leku wzrosła do 18%. Kolejny cykl naświetlania zwiększył uwalnianie o ponad 2%, podobnie jak dodatkowe cykle naświetlania laserem (fig. 2d, czerwona linia). Widać, że w ciągu godziny trwającego eksperymentu, stymulowane uwalnianie leku przy włączonym laserze jest znacznie wyższe niż w cyklu wyłączonego lasera ($k_{on} = 2,9 \pm 3,1\%/godz.$; $k_{off} = 0,2 \pm 0,1\%/godz.$). Tendencja uwalniania analogu leku w ciągu godziny wykazuje zmniejszoną szybkość uwalniania przy kolejnych cyklach naświetlania. Jednak po 100 godzinach doświadczenia z uwalnianiem, około 45% analogu leku zostało już uwolnione, w porównaniu z zaledwie 14% leku po uwolnieniu w temperaturze 42°C (co wynika z porównania fig. 2a i 2c).

Uzyskane wyniki potwierdzają, że nanoplatforma według wynalazku wykazuje kinetykę podawania leków zależną od temperatury, gdzie uwalnianie leku jest kontrolowane przez wzrost temperatury. Podczas cykli stymulacji laserowej zaobserwowano trzykrotnie większe uwalnianie leku w porównaniu do uwalniania kontrolowanego temperaturowo, które może być regulowane poprzez wprowadzenie określonej liczby cykli włączania/wyłączenia (Wł./Wył.) lasera. Szybkość dyfuzji silnie zależy od temperatury – im wyższa temperatura, tym wyższy współczynnik dyfuzji cząsteczek leku, a co za tym idzie, tym większe jest stężenie uwalnianego leku w czasie.

Dodatkową zaletą nanostrukturalnej platformy (nanoplatformy) według wynalazku jako systemu uwalniania leków na żądanie jest wydłużony czas uwalniania oraz możliwość wykorzystania jej w strategii multiterapeutycznej w terapii fototermicznej przy jednoczesnym uwalnianiu leków.

Ponadto nanoplatforma według wynalazku jest w stanie samoregulować dostarczenie leku, unikając w ten sposób nadmiernego i niebezpiecznego uwalniania cząstek bioaktywnych podczas pierwszego etapu podawania leku, jednocześnie wydłużając czas jego dostarczenia.

Zastrzeżenia patentowe

1. Nanoplatforma dostarczania leków na żądanie pod wpływem światła z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) zawierająca w pełni usieciowany hydrożel P(NIPAAm-co-NIPMAAm), polimer oraz substancję czynną, **znamienna tym**, że substancja czynna jest inkorporowaną w elektroprzędzone nanowłókna polimeru, a hydrożel poli(N-izopropylakryloamid-ko-N-izopropylometakryloamid) (P(NIPAAm-co-NIPMAAm)) jest połączony z nanomateriałem plazmonowym, którym są nanopreciki złota tworząc poli(N-izopropylakryloamid-ko-N-izopropylometakryloamid)-nanopreciki złota (P(NIPAAm-co-NIPMAAm)-AuNR), przy czym wspomniana nanoplatforma tworzy komponent typu „sandwich” składający się z hierarchicznych poziomów, gdzie pomiędzy dwiema warstwami nanowłókien polimeru z inkorporowaną substancją czynną zlokalizowany jest wspomniany hydrożel z nanoprecikami złota.
2. Nanoplatforma według zastrz. 1, **znamienna tym**, że substancja czynna jest wybrana z grupy obejmującej leki przeciwbólowe, antybiotyki, antymikotyki, leki antywirusowe, leki przeciwnowotworowe.
3. Nanoplatforma według zastrz. 1 albo 2, **znamienna tym**, że elektroprzędzone nanowłókna wybrane są z grupy obejmującej poli(L-laktyd) (PLLA), poliglikolid (PGA), polikaprolakton (PCL) i ich kopolimerów poli(L-laktyd-ko-kaprolakton) (PLCL), poli(d,l-laktyd-ko-glikolid) (PLGA).
4. Nanoplatforma według zastrz. od 1 do 3, **znamienna tym**, że ilość substancji czynnej inkorporowanej w elektroprzędzonych nanowłóknach wynosi 1% wag. względem całkowitej masy polimeru.
5. Sposób wytwarzania nanoplatformy dostarczania leków jak określonej w dowolnym z poprzednich zastrz. od 1 do 4, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy, w których:
 - a) Przygotowuje się roztwór polimeru w rozpuszczalniku organicznym lub mieszaninie rozpuszczalników organicznych;
 - b) Wprowadza się substancję czynną do roztworu polimeru wytworzonego w etapie a);
 - c) Elektroprzędzie się nanowłókna polimeru z substancją czynną, przy czym włókna zbiera się na uziemiony kolektor w postaci folii umieszczonej na poruszającym się walcu;
 - d) Usuwa się pozostałości rozpuszczalnika poprzez umieszczenie wytworzonego w etapie c) materiału włóknistego w próżni;
 - e) Wykonuje się krążki z elektroprzędzonych nanowłókien zawierających inkorporowaną substancję czynną;
 - f) Przygotowuje się roztwór prekursora hydrożelu z nanoprecikami złota;
 - g) Wytwarza się struktury typu „sandwich” poprzez naniesienie prekursora hydrożelu z nanoprecikami złota na pierwszy krążek z elektroprzędzonych nanowłókien zawierający inkorporowaną substancję czynną i umieszcza się drugi krążek z elektroprzędzonych nanowłókien zawierający substancję czynną na wierzch roztworu prekursora hydrożelu;
 - h) Ściska się struktury typu „sandwich”;
 - i) Polimeryzuje się hydrożel poprzez naświetlanie struktury typu „sandwich” światłem UV;
 - j) Płucze się wytworzone nanoplatformy.
6. Sposób według zastrz. 5 **znamienny tym**, że w etapie i) polimeryzację hydrożelu poprzez naświetlanie UV prowadzi się w łaźni wodnej w temperaturze 15°C i przez 5 minut.
7. Nanoplatforma według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 4, do zastosowania do leczenia trudno gojących się zainfekowanych ran lub leczenia nowotworów w połączeniu z terapią fototermiczną.

Rysunki

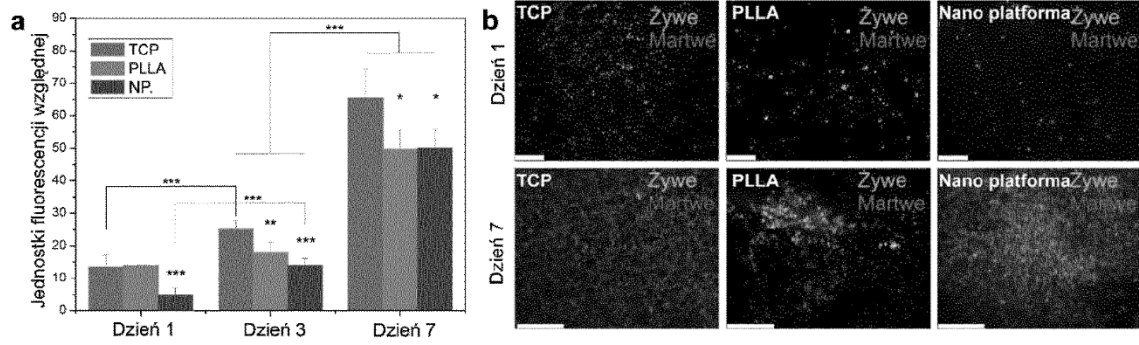


Fig. 1

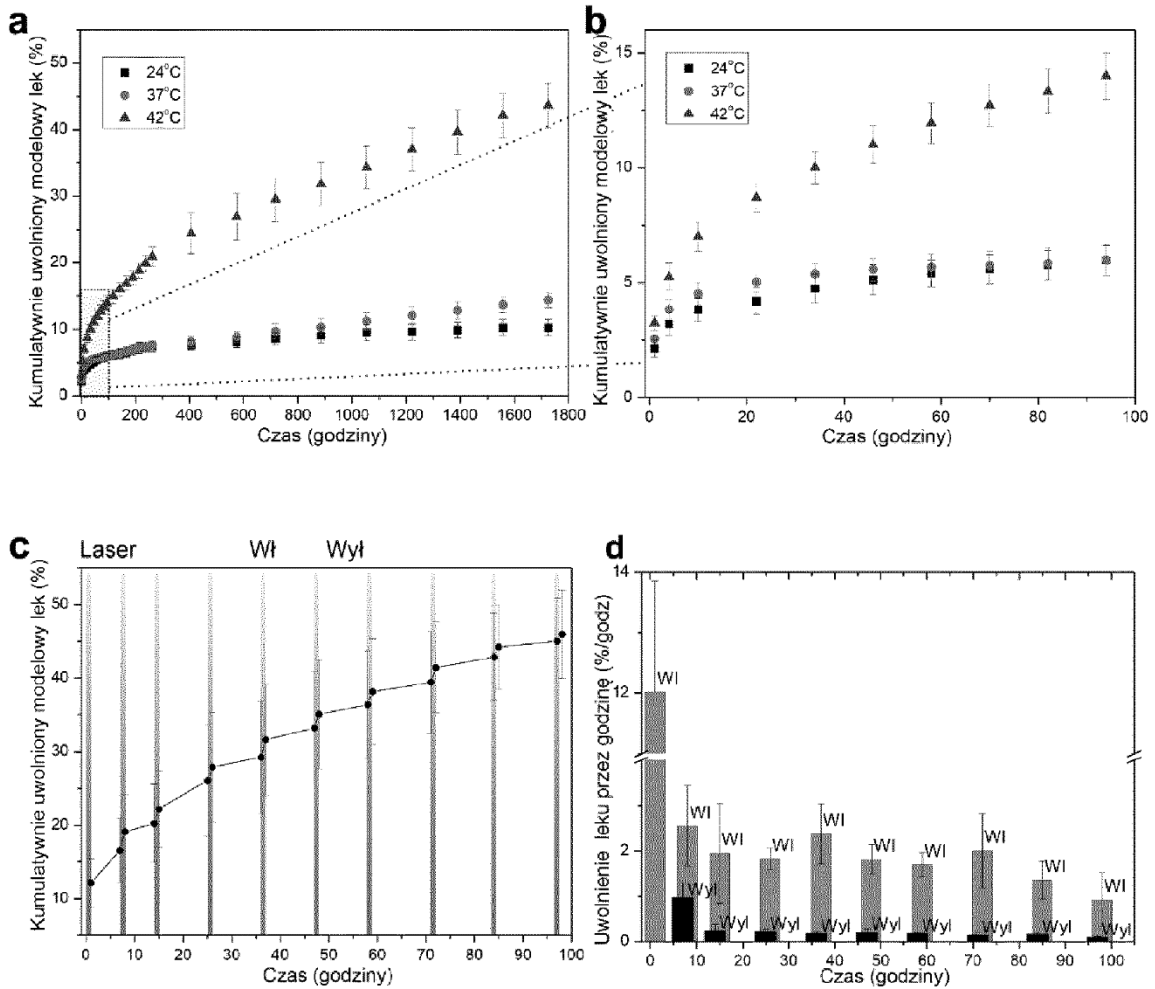


Fig. 2