



UNIVERSITAS IAGELLONICA
CRACOVIENSIS

STRESZCZENIE

**Nanokapsuły polielektrolitowe z ciekłym rdzeniem do
kontrolowanego podawania leków lipofilowych**

JOANNA SZAFRANIEC

Praca wykonana w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów
pod opieką:

Dr hab. Szczepana Zapotocznego, prof. UJ (Wydział Chemii UJ)

Prof. dr hab. Stefana Chłopickiego (Wydział Lekarski UJ CM)

KRAKÓW 2015

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektu Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007-2013



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



MOL-MED

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



1 Wprowadzenie

Projektowanie i wytwarzanie mikro- i nanonośników to jeden z bardzo intensywnie rozwijanych obszarów nauki na przełomie ostatnich kilkunastu lat. Ze względu na rosnące zapotrzebowanie na nowoczesne układy do kontrolowanego dostarczania i uwalniania związków biologicznie aktywnych większość badań prowadzona jest w obszarze nauk farmaceutycznych. Prace skupiają się głównie na opracowaniu strategii uzyskania maksymalnego korzystnego efektu terapeutycznego substancji czynnych dzięki zapewnieniu ochrony przed degradacją oraz ukierunkowaniu względem określonego miejsca działania. Możliwość kontroli miejsca i czasu uwalniania związku z nośnika zapewnia długotrwałe utrzymanie jego stężenia w obrębie okna terapeutycznego, co jest bardzo pożądane z medycznego i ekonomicznego punktu widzenia. Spośród wielu dostępnych materiałów szczególną rolę odgrywają związki makrocząsteczkowe, które stanowią podstawę konstruowania nośników o różnorodnej, ściśle określonej geometrii i zdefiniowanym miejscu działania. Koloidalne nośniki polimerowe (np. nanokapsuły, dendrymery, micelle) są szeroko stosowane ze względu na korzystny wpływ na biodostępność związków biologicznie aktywnych, ich farmakokinetykę oraz zmniejszenie ich toksyczności względem klasycznych technik podawania leków. Istotną zaletą nanokapsuł jest możliwość kontrolowanego podawania związków o charakterze lipofilowym, które mają ograniczoną biodostępność.

2 Cel pracy

Celem niniejszej pracy było uzyskanie nanokapsuł polimerowych z olejowymi rdzeniami zdolnych do magazynowania i transportowania związków lipofilowych. Istotnym postępowaniem w zakresie badań nad układami emulsyjnymi jest stabilizacja kropli oleju bez konieczności stosowania surfaktantów, których dodatek, zwłaszcza w układach o przeznaczeniu biomedycznym, jest często niepożądany.

Ze względu na hydrofobowy charakter wielu związków o istotnym znaczeniu biologicznym ich biodostępność jest ograniczona, zaś efekt terapeutyczny widoczny dopiero po zastosowaniu dużych dawek związku, co stanowi poważny problem podczas planowania i prowadzenia terapii. Jednym z rozwiązań jest zastosowanie polimerowych nośników, które zapewniają nie tylko dostarczenie leku do określonego miejsca

docelowego w organizmie, ale także stanowią warstwę ochronną, dzięki czemu związek aktywny dociera do miejsca działania w postaci nienaruszonej, bez utraty funkcjonalności i zmiany stężenia.

Spośród wielu typów polimerowych nośników dotychczas intensywnie badane były liposomy, dendrymery, micelle oraz kapsuły. Ze względu na szereg zalet, m.in. stabilność i łatwość otrzymywania kapsuły polimerowe stały się powszechnie stosowanymi zbiornikami, w których przechowywane i transportowane były związki aktywne różnego typu i przeznaczenia. Początkowo wielowarstwowe kapsuły otrzymywane były na „szablonach” stanowiących tzw. stałe rdzenie kapsuł, jednak konieczność ich wytrawiania celem załadowania związku aktywnego i towarzyszące temu zjawiska niepożądane sprawiły, że poszukiwane były nowe, lepsze rozwiązania. Doprowadziło to do rozwoju technik wykorzystujących nanoemulsje typu olej w wodzie (O/W) jako nośniki. Zastosowanie kropli emulsji umożliwia bowiem enkapsulację związków hydrofobowych, zapewniając jednocześnie kontrolę właściwości otoczki i rozmiarów otrzymywanych kapsuł. Dodatkowo, przez dobór polimeru zapewniającego odpowiedni ładunek powierzchniowy możliwe jest uzyskanie stabilnych formułacji o określonych właściwościach.

Ze względu na termodynamiczną niestabilność układu emulsyjnego istotny jest zastosowanie odpowiedniego stabilizatora. Małocząsteczkowe surfaktanty dobrze sprawdzają się w tej roli, jednak dobór odpowiedniego związku powierzchniowo czynnego do planowanego układu eksperymentalnego nie jest trywialny, bowiem utworzenie stabilnego kompleksu pomiędzy surfaktantem a polimerem stanowiącym pierwszą warstwę otoczki kapsuły warunkuje jej późniejszą stabilność i możliwość dalszego zastosowania. Ponadto układ taki zdolność do stabilizacji kropli oleju zyskuje dopiero po osiągnięciu granicznego stężenia, przez co jest wrażliwy na rozcieńczenie, do którego dochodzi np. po podaniu dożylnym. Swego rodzaju alternatywą jest zastosowanie surfaktantów polimerowych, jednak jonowa budowa sprawia, że układy te również są wrażliwe na zmiany siły jonowej i stężenia roztworów.

Rozwiązaniem tych problemów proponowanym w niniejszej pracy jest zastosowanie amfifilowych kopolimerów zbudowanych z hydrofilowego łańcucha głównego i hydrofobowych łańcuchów bocznych. Kopolimery te wykazują zdolność do samoorganizacji w roztworach wodnych, która wynika z konieczności minimalizowania kontaktu grup hydrofobowych z polarnym rozpuszczalnikiem, a jej efektem jest

utworzenie hydrofobowych domen zbudowanych z upakowanych łańcuchów hydrofobowych. Ciekawym wydawało się sprawdzenie, czy na granicy faz woda-olej możliwe będzie rozluźnienie upakowanej struktury makrocząsteczki i stabilizacja kropli oleju przez zakotwiczone w niej łańcuchy hydrofobowe. Zastosowanie kopolimeru amfifilowego pozwoliłoby na stabilizowanie emulsyjnych rdzeni kapsuł bez konieczności stosowania surfaktantów, których dodatek jest w wielu dziedzinach niepożądany. Próba zbadania i opisanie tego zjawiska stała się podstawą opisanych w niniejszej pracy badań.

Z punktu widzenia biomedycznych zastosowań nanokapsuł polimerowych możliwość uzyskania układu, w skład którego nie wchodzi małych cząsteczkowych surfaktantów jest niezwykle istotna, bowiem maleje stopień komplikacji układu, a tym samym ilość możliwych interakcji i wynikających z nich niepożądanych efektów ubocznych. Zaletą stosowania nanokapsuł na ciekłych rdzeniach jest także możliwość enkapsulacji aktywnych związków lipofilowych, których biodostępność jest ograniczona. Jest to szczególnie istotne w odniesieniu do leków onkologicznych, których hydrofobowy charakter połączony z wysoką toksycznością układową ogranicza skuteczność terapii.

Interesujące i niezwykle istotne są także substancje lecznicze wykorzystywane w terapii dysfunkcji śródbłonna naczyniowego. Ta wysoce wyspecjalizowana jednowarstwowa warstwa komórek wyściełająca naczynia krwionośne odpowiada za szereg kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu funkcji. Jej uszkodzenie prowadzi do wielu groźnych chorób, m.in. miażdżycy naczyń wieńcowych lub mózgowych skutkujących odpowiednio zawałem mięśnia sercowego czy udarem mózgu. Intensywnie poszukiwane są związki chemiczne pozwalające na poprawę czynności dysfunkcyjnego śródbłonna jak i suplementy wspomagające jego właściwe działanie i zapobiegające jego uszkodzeniu. Wśród związków o udowodnionym korzystnym wpływie na śródbłonek dużą grupę stanowią związki hydrofobowe, m.in. wielonienasycone kwasy tłuszczowe i polifenole o niskiej biodostępności, ostatnio popularne jako suplementy diety. Również wiele skutecznych leków ma charakter hydrofobowy i stosunkowo niską biodostępność, jak np. niektóre statyny, stanowiące dzisiaj jedną z podstawowych grup leków stosowanych w kardiologii. Enkapsulacja tych związków mogłaby znacząco poprawić ich biodystrybucję, a tym samym korzystnie wpłynąć na efekty terapii. Zastosowanie hydrofobowo modyfikowanych naturalnych polimerów do stabilizacji emulsji na bazie nienasyconych kwasów tłuszczowych to jedno z podjętych w niniejszej pracy zadań. Szczególną uwagę poświęca się możliwości

sterowania rozmiarami nośników (kapsuły o średnicach z zakresu 100-200 nm zdolne są do przenikania ścian naczyń krwionośnych w miejscach zmienionych chorobowo, nie zaś w obszarze zdrowej tkanki) oraz rodzajami oddziaływań powierzchni kapsuł ze śródbłonkiem i pokrywającym go glikokaliksem, co znacząco poprawia ich biodystrybucję i potencjalnie również ma wpływ na ich zwiększoną predylekcję do ściany naczyń krwionośnych.

3 Podsumowanie i wnioski

W toku badań otrzymano szereg związków makrocząsteczkowych zbudowanych z hydrofilowego łańcucha głównego i hydrofobowych łańcuchów bocznych, które „kotwiczą” w kropli oleju umożliwiając jej stabilizację bez konieczności stosowania małych cząsteczkowych surfaktantów.

Jako że podobne rozwiązania nie były wcześniej opisywane, badania rozpoczęto od syntezy modelowych fotoaktywnych kopolimerów szczepionych zbudowanych z hydrofilowego łańcucha głównego poli(2-akryloamido-2-metylo-1-propanosulfonianu sodu) lub chlorowodoru polialliloaminy (odpowiednio PAMPS lub PAH) z przyłączonymi bocznymi łańcuchami poliwinylonaftalenu. Seria kopolimerów o różnej gęstości szczepienia i długości łańcuchów bocznych została zsyntezowana techniką kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej w obecności trwałego rodnika hydroksylowego 4-hydroksy-TEMPO, scharakteryzowana i zbadana pod kątem zdolności stabilizacji emulsji typu O/W. Wyniki badań otworzyły serię eksperymentów nad modyfikacjami naturalnych polisacharydów i ich zastosowaniem do otrzymywania kapsulek na ciekłych rdzeniach.

Spontaniczna agregacja szczepionych kopolimerów PAMPS-*graft*-PVN i PAH-*graft*-PVN w środowisku wodnym została potwierdzona z wykorzystaniem metod spektroskopowych, dynamicznego rozpraszania światła oraz mikroskopii sił atomowych. Analiza wyników pozwoliła stwierdzić, że przestrzenna organizacja makrocząsteczek w roztworze jest bardzo wrażliwa na nawet niewielkie zmiany w składzie kopolimeru. Dla kopolimerów serii PAMPS obserwowano tendencję do tworzenia wewnątrzcząsteczkowych agregatów o średnicach nieprzekraczających 10 nm. Wyjątek stanowił kopolimer G1-3h zawierający najmniej łańcuchów VN o najmniejszej długości spośród badanych kopolimerów, który tworzył agregaty międzycząsteczkowe.

W przypadku serii kopolimerów PAH nie obserwowano różnic konformacji makrocząsteczek spowodowanych składem makrocząsteczek, wszystkie kopolimery tworzyły w wodzie agregaty międzycząsteczkowe.

Budowa makrocząsteczki wywiera także duży wpływ na parametry kapsuł stabilizowanych przez amfifilowe kopolimery. Pomimo luźnej struktury, która powinna ułatwić rozwinięcie łańcucha na powierzchni kropli oleju kopolimer PAMPS G1-3h nie zapewnił dostatecznej stabilizacji ze względu na zbyt małą ilość łańcuchów naftalenowych. Badania wykazały ponadto, że samo zwiększanie długości hydrofobowych łańcuchów bocznych nie jest wystarczające dla uzyskania kapsuł o dużej stabilności w czasie. Dopiero zagęszczenie hydrofobowych ramion pozwala na uzyskanie kapsuł o długotrwałej stabilności. W przypadku kopolimerów PAH-*graft*-PVN nie obserwowano różnic między parametrami kapsuł w zależności od budowy makrocząsteczek ani odczynu roztworu. Zaobserwowano natomiast znaczne różnice we właściwościach fotochemicznych kapsuł na bazie PAH. Układy stabilizowane przez kopolimer PAH G2-3h, zwłaszcza w roztworze o odczynie kwasowym były zdolne do bardzo wydajnego transferu energii, co otwiera wachlarz ich zastosowań jako nanoreaktorów, które mogą być stosowane m. in. w ochronie środowiska i fotowoltaice.

Przeprowadzone badania potwierdziły zdolność amfifilowych jonowych kopolimerów do tworzenia kapsuł wewnątrz których zamykać można lipofilowe barwniki fluorescencyjne bez naruszenia ich struktury i właściwości. Enkapsulacja barwników w rdzeniach kapsuł nie wpłynęła na parametry kapsuł, tj. ich rozmiar i stabilność. Dodatkowo wykazano, że stabilność kapsuł można zwiększyć przez pokrywanie ich powierzchni wielowarstwowymi filmami polimerowymi z wykorzystaniem techniki naprzemiennej adsorpcji warstwa po warstwie, co ma także wpływ na kinetykę uwalniania związków z rdzeni kapsuł

Uzyskane dla modelowych kopolimerów wyniki pozwoliły na podjęcie prac nad otrzymaniem biokompatybilnych kapsuł, których olejowe rdzenie stabilizowane są bez użycia małych cząsteczkowych surfaktantów. Ze względu na planowane zastosowanie kapsuł jako nośników związków o działaniu naczynioprotekcyjnym olejowe rdzenie stabilizowano pochodnymi kwasu hialuronowego, zapewniającego kompatybilność ze składem glikokaliksu pokrywającego endothelium. Podobnie jak dla serii syntetycznych kopolimerów, zaobserwowano wpływ budowy makrocząsteczki na stabilność kapsuł, zbyt krótkie łańcuchy alkilowe nie zapewniały dostatecznej stabilizacji kropli oleju.

Zaobserwowano także, że dla dużych stopni podstawienia długich łańcuchów bocznych występują ograniczenia w zdolności stabilizacji emulsji. Na podstawie wyników badań wytypowano pochodną modyfikowaną łańcuchami dodecyłowymi do dalszych badań, jako potencjalnie najlepszy nośnik. Kapsuły Hy-C12 cechowały się nie tylko stabilnością w czasie oraz możliwością jej zwiększenia przez pokrycie powierzchni kapsuł wielowarstwowymi filmami polimerowymi, ale także rozmiarami zapewniającymi przenikanie przez ściany naczyń krwionośnych. W badaniach *in vivo* kapsuły te wykazywały akumulację głównie w wątrobie w komórkach śródbłonka zatok wątrobowych (LSEC), ze względu na obecność specyficznych dla hialuronianu receptorów na powierzchni LSEC, ale także w płucach, co wskazuje na ich potencjał aplikacyjny w leczeniu chorób wątroby i płuc. Po wywołaniu u zwierząt doświadczalnych zapalenia, którego następstwem jest uszkodzenie śródbłonka i zwiększenie przepuszczalności naczyń obserwowana była zwiększona akumulacja kapsuł we wszystkich narządach szczególnie w wątrobie i w płucach przy spowolnieniu ich usuwania z moczem. Te obserwacje otwierają pole do dalszych badań celowanej terapii śródbłonka wątrobowego (LSEC) i płucnego z wykorzystaniem opracowanych nanokapsuł na bazie kwasu hialuronowego.

Dla celów porównawczych zbadano także inny biozgodny, a do tego tani i łatwo dostępny polisacharyd jakim jest chitozan. Badania wykazały, że dodecylova pochodna kationowego chitozanu pozwala na uzyskanie kapsuł o średnicach nieprzekraczających 350 nm, charakteryzujących się dobrą stabilnością w czasie. Zastosowanie techniki LbL do pokrywania kapsuł wielowarstwowymi filmami z kationowej i anionowej pochodnej chitozanu pozwoliło na otrzymanie wielowarstwowch kapsuł, przy czym podobnie jak dla kapsuł na bazie hialuronianu, dla pokryć pochodną anionową zaobserwowano większy efekt stabilizujący, którego miarą jest wartość potencjału dzeta. Prowadzone obecnie badania biologiczne pozwolą określić charakter aplikacyjny kapsuł chitozanowych i wskażą drogę dalszych badań mających na celu wdrażanie proponowanych rozwiązań.