

Sposób wytwarzania polimersomu zawierającego róż bengalski oraz jego zastosowanie w terapii fotodynamicznej raka podstawnocomórkowego skóry

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania polimersomu zawierającego róż bengalski (RB) oraz jego zastosowanie w terapii fotodynamicznej raka podstawnocomórkowego skóry.

Działanie polimersomu z różem bengalskim polega na wzmocnieniu przeciwnowotworowych (fototoksycznych) właściwości leku (rózu bengalskiego) poprzez zastosowanie nośnika – polimersomu.

Róż bengalski jest szeroko opisany w literaturze jako fotouczulacz - substancja aktywna w terapii fotodynamicznej. Opisy patentowe US8974363 oraz CA2415280 dotyczą wykorzystania rózu bengalskiego w różnych postaciach do leczenia chorób skóry, przewodu pokarmowego, oddechowego, moczowego oraz układu rozrodczego. Według tych opisów RB znajduje zastosowanie w przeciwdziałaniu infekcjom bakteryjnym, redukcji nadwrażliwości tkanek czy terapii przeciwnowotworowej.

Opis patentowy US9839688 dotyczy zastosowania roztworu rózu bengalskiego jako czynnika chemoablacyjnego w terapii różnych typów nowotworów.

Idealny fotouczulacz powinien charakteryzować się wysoką wydajnością generowania tlenu singletowego, brakiem toksyczności w ciemności, dobrą rozpuszczalnością, preferencyjnym lokowaniem się w komórkach nowotworowych i absorpcją w zakresie fal długich. Niestety większość klinicznie stosowanych fotouczulaczy nie spełnia wszystkich powyższych wymagań.

Aby poprawić funkcjonalność rózu bengalskiego, a tym samym zwiększyć jego potencjał fotodynamiczny opracowano kilka systemów dostarczania leku do guza, np.

opisany w zgłoszeniu wynalazku WO2006133271 system składający się z polimerowej otoczki oraz fotouczulającego rdzenia, czy w opisie patentowym JP5662431B2 różne nanocząstki połączone z fotouczulaczem lub w opisie zgłoszenia wynalazku US20170231903 połączenie fotouczulacza z metalo-organicznymi rusztowaniami.

Obecnie prowadzone badania mają na celu zastosowanie innowacyjnych nanonośników [Sztandera, K., Gorzkiewicz, M., Klajnert-Maculewicz, B. (2020). *Nanocarriers in photodynamic therapy—in vitro and in vivo studies*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 12(3), e1509], spośród których polimersomy zasługują na szczególną uwagę.

Polimersomy to nanoukłady zbudowane z amfifilowych, syntetycznych kopolimerów blokowych. Posiadają one sferyczną strukturę zbliżoną do liposomów. Dzięki wprowadzeniu grup fotolabilnych w strukturze opracowanych przez nas kopolimerów, możliwe jest przeprowadzenie sieciowania z wykorzystaniem światła UV, a tym samym uzyskanie struktur mogących wielokrotnie otwierać się i zamykać w zależności od warunków środowiskowych. Tego typu konstrukty mogą okazać się zdolne do wydajnego transportu leków bezpośrednio do miejsca ich działania, przyczyniając się w ten sposób do eliminacji niepożądanych skutków ubocznych. Zdolność polimersomu do otwierania się wyłącznie w pH charakterystycznym dla środowiska guza może dodatkowo zwiększyć selektywność działania rózu bengalskiego przez kontrolowane uwalnianie, a także chronić lek przed degradacją podczas krążenia we krwi, dając szansę na zmniejszenie dawki przy zachowaniu efektu terapeutycznego.

Do tej pory wykorzystywano polimersomy jako nośniki fotouczulaczy w terapii fotodynamicznej [Wang, Mian, et al. "Killing malignant melanoma cells with

protoporphyrin IX-loaded polymersome-mediated photodynamic therapy and cold atmospheric plasma." *International journal of nanomedicine* 12 (2017): 4117.; Sood, Nimil. "Multi-Functional Polymer Vesicles: Applications in Chemotherapy and Photodynamic Therapy." (2014). Sood, Nimil. "Multi-Functional Polymer Vesicles: Applications in Chemotherapy and Photodynamic Therapy." (2014).; Kyropoulou, M., DiLeone, S., Lanzilotto, A., Constable, E. C., Housecroft, C. E., Meier, W. P., & Palivan, C. G. (2019). Porphyrin Containing Polymersomes with Enhanced ROS Generation Efficiency: In Vitro Evaluation. *Macromolecular Bioscience*, 1900291.].

Sposób wytwarzania polimersomu zawierającego róż bengalski według wynalazku polega na syntezie kopolimeru blokowego B (BCP-B), który powstaje w wyniku zmieszania w ampule laboratoryjnej makroinicjatora PEG₅₄-Br, DPA (metakrylanu 2-(dimetyloamino)etylu) oraz substancji fotolabilnej B umożliwiającej sieciowanie powstałego polimersomu za pomocą promieniowania UV. Mieszaninę rozpuszcza się w 2-butanonie, a następnie do ampuley dodaje się CuBr i odgazowuje całość dodając do ampuley argon. Roztwór miesza się przez jedną dobę w podwyższonej temperaturze. Następnie w celu zakończenia polimeryzacji ochładza się roztwór, a ampuleę otwiera. Do roztworu dodaje się THF i całość filtruje. Powstały roztwór zagęszcza się i wytrąca przy użyciu n-heksanu, a następnie suszy.

W kolejnym etapie rozpuszcza się otrzymany wcześniej kopolimer blokowy B w kwasie solnym. Po całkowitym rozpuszczeniu podnosi się pH roztworu do lekko kwaśnego i miesza przez kolejne trzy doby. W następnej kolejności polimersom poddaje się sieciowaniu przy użyciu promieniowania UV. Tak przygotowany polimersom zostaje otwarty przez doprowadzenie roztworu do kwaśnego pH. Następnie do roztworu dodawany jest róż bengalski w celu jego enkapsulacji wewnątrz

polimersomu. Po jednej dobie mieszania zamyka się polimersom podwyższając jego pH do lekko zasadowego. Po tym procesie przeprowadzana jest dializa nanoukładu w celu oddzielenia gotowego preparatu od pozostałości różu bengalskiego. Poziom enkapsulacji określa się spektrofluorymetrycznie.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie polimersomu zawierającego róż bengalski w terapii fotodynamicznej raka podstawnocomórkowego skóry.

Zastosowanie według wynalazku polega na tym, że róż bengalski i polimersom stosuje się do wytwarzania leku w postaci koncentratu do przygotowania roztworu do iniekcji dożylniej lub maści.

Korzystnym skutkiem wynalazku jest możliwość jego usieciowania w prosty sposób używając lampy UV. Proces ten zwiększa stabilność nanoukładu, co jest szczególnie ważną cechą gotowego preparatu. Dodatkowo opracowany przez twórców wynalazku nanoukład cechuje się znacznym zwiększeniem produkcji tlenu singletowego, co stoi u podstaw aktywności fotodynamicznej fotouczulacza, tym samym pozwalając na podanie dużo mniejszej jego dawki do organizmu.

Wyniki wstępnych badań *in vitro* przeprowadzonych na modelu komórek raka podstawnocomórkowego skóry (AsZ i CsZ) [So, Po-Lin, et al. "Long-term establishment, characterization and manipulation of cell lines from mouse basal cell carcinoma tumors." *Experimental dermatology* 15.9 (2006): 742-750] wykazały, że otrzymany preparat wywiera oczekiwane, zwiększone działanie fototoksyczne w porównaniu z wolnym lekiem. Porównanie wyników produkcji tlenu singletowego oraz cytotoksyczności jednoznacznie wskazuje, iż wytworzony preparat działa skuteczniej, tzn. potrzeba mniejszej dawki leku, aby osiągnąć taki sam efekt terapeutyczny.

Opis figur rysunku

Fig. 1. przedstawia schemat syntezy kopolimeru blokowego B.

Fig. 2. uwalnianie rózu bengalskiego z polimersomu w pH 5 oraz pH 7.4. Dane przedstawiono jako średnia \pm SD z trzech niezależnych powtórzeń.

Na fig. 3. przedstawiono poziom produkcji tlenu singletowego po naświetlaniu wolnego rózu bengalskiego oraz preparatu rózu bengalskiego enkapsulowanego w polimersomie. Dane przedstawiono jako średnia \pm SD z trzech niezależnych powtórzeń.

Fig. 4. przedstawia efekt cytotoksyczny wolnego rózu bengalskiego oraz preparatu rózu bengalskiego enkapsulowanego w polimersomie na komórki raka podstawnocomórkowego skóry (AsZ [lewa strona] oraz CsZ [prawa strona]) po naświetlaniu związków (fototoksyczność) (panel A) oraz bez naświetlania (toksyczność ciemna) (panel B). Dane przedstawiono jako średnia \pm SD z trzech niezależnych powtórzeń.

Wynalazek został przedstawiony bliżej w przykładach.

Przykład 1.

Synteza kopolimeru blokowego B.

Syntezę kopolimeru blokowego B rozpoczyna się od połączenia ze sobą w ampule laboratoryjnej głównych składników: makroinicjatora PEG₄₅-Br (107 mg, 0.05 mmol), 2,2'-bipirydyny (14.5 mg, 0.093 mmol), metakrylanu 2-(dimetyloamino)etylu (666 mg, 3.35 mmol) oraz substancji fotolabilnej umożliwiającej sieciowanie za pomocą promieni UV (314.1 mg, 1.15 mmol). Składniki te rozpuszcza się w 2-butanonie (115 mL) i całość mrozi w ciekłym azocie. W kolejnym etapie do ampuly laboratoryjnej zawierającej powyższe składniki dodaje się CuBr (6.7 mg, 0.047 mmol), a mieszaninę odgazowuje. Po tym etapie dodaje się do mieszaniny argon i całość miesza przez jedną dobę podgrzewając do temperatury 50°C. W trzecim etapie

schładza się ampulę laboratoryjną do temperatury pokojowej i otwiera ją w celu zakończenia polimeryzacji. Powstały roztwór rozpuszcza się w THF, a następnie filtruje przez tlenek glinu w celu oddzielenia pozostałości miedzi. Roztwór zatęża się przy użyciu wyparki rotacyjnej. W celu wytrącenia kopolimeru blokowego B do roztworu dodaje się schłodzony n-heksan, a następnie suszy się próżniowo. Powstały produkt charakteryzuje się za pomocą ^1H NMR.

Przykład 2.

Składanie i sieciowanie polimersomu oraz wytworzenie gotowego preparatu.

Przygotowanie polimersomu rozpoczyna się od rozpuszczenia kopolimeru blokowego B w 0.01 M HCl, aby jego końcowe stężenie wynosiło 0.5 mg/ml, a następnie roztwór miesza się za pomocą mieszadła magnetycznego (150 rpm) przez 30 minut w celu całkowitego rozpuszczenia kopolimeru blokowego B. W dalszej kolejności dodaje się do niego 1 M NaOH w celu podniesienia pH do 5.5-6. Następnie roztwór miesza na mieszadle magnetycznym (150 rpm) przez 3 dni. Po tym czasie roztwór filtruje się za pomocą filtra strzykawkowego o porach wielkości 0.8 μm , a następnie umieszcza w komorze UV (OmniCure S2000®, Excelitas Technologies) na 180 sekund w celu usieciowania polimersomu.

Enkapsulacja rózu benagalskiego wewnątrz polimersomu rozpoczyna się od dodania 0.4 M PBS aby jego końcowe stężenie w roztworze wynosiło 10 mM, a następnie roztwór miareczkuje się przy pomocy 1 M HCL do osiągnięcia kwaśnego pH roztworu (pH 5) w celu otwarcia polimersomu. Po tym procesie do roztworu polimersomu dodaje się roztwór rózu bengalskiego (stężenie końcowe: 50 μM), a następnie miesza się w ciemności przez jeden dzień na mieszadle magnetycznym (150 rpm). Po 24 godzinach zamyka się polimersom przez podniesienie pH roztworu do 7.4

przy użyciu 1 M NaOH. Następnie przeprowadza się dializę roztworu polimersomu z różem bengalskim w celu oddzielenia wolnego (niezamkniętego wewnątrz polimersomu) różu bengalskiego. W tym celu do worka dializowego (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 3.5K MWCO, 22 mm, ThermoFisher) dodaje się powstały roztwór, a następnie umieszcza się go w PBS (pH 7.4) na 24 godziny wymieniając kilkakrotnie bufor zewnętrzny.

Po tym czasie procent enkapsulowanego różu bengalskiego określa się spektrofotometrycznie.

Przykład 3.

Wpływ wolnego różu bengalskiego i preparatu różu bengalskiego enkapsulowanego w polimersomie na produkcję tlenu singletowego.

Przygotowane roztwory wolnego różu bengalskiego oraz różu bengalskiego enkapsulowanego w polimersomie w stężeniach przeliczonych na stężenie różu bengalskiego wynoszących 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 oraz 1 μM nanosi się na czarną płytkę 96-cio dołkową a następnie poddaje się naświetlaniu lampą (Q.Light Pro Unit, z zastosowaniem filtra 385–780 nm) w obecności sondy SOSG w stężeniu 1 μM . Fluorescencję sondy mierzy się w interwałach 5-cio minutowych przez godzinę za pomocą czytnika płytek (Fluoroscanner Ascent FL). Długość fali wzbudzenia ustawiona jest na 500 nm, a fali emisji na 538 nm, co odpowiada długości fali wzbudzenia i emisji sondy SOSG.

Wyniki eksperymentu jednoznacznie wskazują znaczne zwiększenie produkcji tlenu singletowego przez róż bengalski enkapsulowany w polimersomie.

Przykład 4

Wpływ enkapsulacji różu bengalskiego na jego cytotoksyczność.

Komórki linii AsZ i CsZ hodowano w butelkach hodowlanych (Nunclon Delta Surface do hodowli komórek adherentnych firmy ThermoFisher) w podłożu 154 CF (Gibco) zawierającym: 2% inaktywowanej, chelatowanej płodowej surowicy bydlęcej (Sigma Aldrich) oraz 0.05 mM Ca^{2+} , w 37 °C w atmosferze 5% CO_2 .

Komórki wysiano na 96-cio dołkową transparentną płytkę w gęstości 3×10^4 komórek na dołek i inkubowano przez 24 godziny w 37 °C w atmosferze 5% CO_2 . Po tym czasie komórki inkubowano z enkapsulowanym różem bengalskim w polimersomie oraz wolnym różem bengalskim w stężeniach przeliczonych na stężenie różu bengalskiego wynoszących 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 oraz 1 μM przez 5 godzin. Następnie komórki przepłukano przy użyciu PBS. W dalszej kolejności komórki naświetlano za pomocą lampy Q.Light Pro Unit z zastosowaniem filtra 385–780 nm przez 30 min. Po naświetlaniu komórki inkubowano w świeżym medium hodowlanym przez 24 godziny w 37 °C w atmosferze 5% CO_2 , a następnie badano cytotoksyczność związków używając metody MTT.

Doświadczenia te pozwoliły jednoznacznie określić zwiększony efekt fototoksyczny przedstawionego nanoukładu. W badanych stężeniach wolny lek wykazywał umiarkowaną fototoksyczność, podczas gdy badany system cechował znacznie zwiększoną aktywnością fototoksyczną, a tym samym potencjałem zastosowania w terapii fotodynamicznej raka skóry.