Sposób otrzymywania nanożeli uwalniających kowalencyjnie związaną trehalozę

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nanożeli uwalniających kowalencyjnie związaną trehalozę, mający zastosowanie w przedłużonym uwalnianiu trehalozy w mediach wodnych o pH > 7,0, zwłaszcza w temperaturach fizjologicznie istotnych.

Trehaloza jest naturalnym disacharydem, zbudowanym z dwóch cząsteczek glukozy, połączonych wiązaniem α,α'-1,1'-O-glikozydowym. Trehaloza występuje w wielu różnych organizmach, w tym w bakteriach, roślinach, owadach, drożdżach, grzybach i bezkręgowcach. Zapobiegając denaturacji białek, pełni różne funkcje ochronne przed warunkami stresowymi, takimi jak wysoka lub niska temperatura, utlenianie, wysuszanie i odwodnienie. Dzięki tym właściwościom trehaloza znalazła liczne zastosowania biomedyczne i jest zatwierdzoną przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) substancją bezpieczną do spożycia oraz farmaceutyczną substancją pomocniczą. Trehaloza jest stosowana jako stabilizator białek w wielu lekach, takich jak Advate®, Avastin®, Lucentis®, Herceptin®.

Dotychczasowe badania wykazały, że trehaloza działa jako modulator autofagii, dzięki czemu mogłaby być stosowana jako lek profilaktyczny w chorobach, w których autofagia odgrywa ważną rolę. Autofagia to naturalny proces zachodzący w organizmie, który umożliwia komórkom samodegradację składników wewnątrzkomórkowych w lizosomach w celu ich recyklingu. Zaburzenia autofagii wiążą się z wieloma chorobami. Aktywacja autofagii jest niezbędna w podejściach terapeutycznych w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, choroba Huntingtona i stwardnienie zanikowe boczne. Wiele związków regulujących autofagię jest opracowywanych do celów terapeutycznych, wśród nich trehaloza.

Z doniesień literatury niepatentowej znane jest, że trehaloza indukuje autofagię *in vitro* i *in vivo* [H. J. Lee, Y. S. Yoon, S. J. Lee, *Cell Death Disease*, 2018, 9; K. Pierzynowska et al., *Metaolic Brain Disease,* 2018, **33**, 989]. Ponadto aktualnie prowadzone są badania kliniczne dotyczące efektów terapeutycznych podawanej dożylnie trehalozy u pacjentów z chorobą Alzheimera (NCT04663854, faza 1) oraz zmniejszenia stanu zapalnego u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (NCT03700424, faza 2).

Z literatury patentowej znane są rozwiązania polegające na zastosowania trehalozy w różnych formulacjach przeznaczonych do stymulacji autofagii i leczenia chorób neurodegeneracyjnych.

W badaniach *in vivo* przedstawiono sposób podawania doustnego trehalozy poprzez pojenie zwierząt doświadczalnych 2-5% roztworem trehalozy w okresie kilku tygodni.

W patencieWO2017136922A1 twórcy przedstawili wyniki badań przeprowadzonych na szczurach celem zbadania potencjału trehalozy do leczenia różnych zaburzeń neurologicznych, w tym między innymi choroby Parkinsona.

Z chińskiego opisu patentowego CN109789316A znane jest wykorzystanie trehalozy w leczeniu lizosomalnych chorób spichrzeniowych.

Z innego opisu patentowego WO2018176098A1 znane jest zastosowanie trehalozy w zapobieganiu lub zmniejszaniu dysfunkcji poznawczych związanych z nabytym uszkodzeniem mózgu u myszy. Podawanie doustne trehalozy w wysokich dawkach jest konieczne ze względu na niewielką ilość jej wchłaniana do krwiobiegu. Powodem słabej biodostępności trehalozy są dwa czynniki: słaba przenikalność przez błony komórkowe oraz szybka enzymatyczna hydroliza trehalozy w jelitach za pomocą trehalazy.

Chcąc zwiększyć efektywność działania trehalozy twórcy patentu WO2017136449A1 zastosowali oprócz trehalozy jednocześnie inhibitor trehalazy. Badania prowadzili u myszy doświadczalnych w leczeniu miażdżycy i choroby stłuszczeniowej wątroby.

W opisie patentowym WO2019032685A1 przedstawiono pozajelitowe podawanie trehalozy poprzez drogi oddechowe, trehaloza stymulowała autofagię dla złagodzenia przewlekłych chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych.

Z innych opisów patentowych znane jest zastosowania trehalozy podawanej dożylnie w leczeniu miopatii i zaburzeń neurodegeneracyjnych związanych z nieprawidłową agregacją białek WO2014181333A2 oraz w leczeniu ataksji rdzeniowo-móżdżkowejWO2014181333A2.

W powyższych doniesieniach patentowych stosowane dawki doustne są bardzo wysokie (od 10 mg/kg/dzień do 1g/kg/dzień), a dla zapewnienia skuteczności działania trehaloza podawana jest przez długi okres czasu, w cyklach kilkutygodniowych. Wysokie dawki mogą powodować dyskomfort, np. biegunkę czy wzdęcia. W prowadzonych aktualnie badaniach klinicznych trehaloza podawana jest dożylnie w dawce 15 g/tydzień przez 12 tygodni. Brakuje rozwiązań, które pozwoliłyby na zmniejszenie dawki i częstotliwości podawania trehalozy, do tej pory nie są znane żadne formulacje zawierające stopniowo uwalnianą trehalozę w warunkach fizjologicznych do zastosowania w terapii.

Dotychczas nie są znane nanożele zawierające kowalencyjnie związaną trehalozę, które uwalniają trehalozę w sposób przedłużony w pH powyżej 7,0 i tworzą stabilne dyspersje w roztworach o sile jonowej podobnej do płynów ustrojowych.

Zagadnieniem technicznym wymagającym rozwiązania jest sposób otrzymywania nanożeli do uwalniania trehalozy w środowisku płynów ustrojowych o pH > 7,0 oraz do pozajelitowego jej podawania.

Celem wynalazku jest wytworzenie nanożeli o rozmiarze nie przekraczającym 500 nm zawierających kowalencyjnie związaną trehalozę, która jest uwalniana w sposób przedłużony w mediach wodnych o pH > 7,0, w szczególności w temperaturze fizjologicznie istotnej (35°C -40°C).

Cel ten osiągnięto poprzez kopolimeryzację wolnorodnikową (met)akrylanu-6-*O*-trehalozy z monomer(em/ami) typu akrylamidowego w obecności czynnika sieciującego techniką miniemulsji typu woda w oleju.

Ostatnie badania wykazały, że obecność w sieci polimerowej hydrożeli jednostek monomerycznych z grupy monomerów akrylamidowych (pierwszo- i drugorzędowych) znacznie przyśpiesza alkaliczną hydrolizę wiązania estrowego w jednostkach monomerycznych typu akrylanowego. [M. Burek, S. Waśkiewicz, A. Lalik, I. Wandzik, *Polymer Chemistry*, 2018, **9**, 3721, DOI: 10.1039/c8py00488a; M. Burek, I. Wandzik, *Polymers*, 2019, **11**, (art. No. 2027), DOI: 10.3390/polym11122027]. Wykazano, że odpowiedni dobór monomomerów do syntezy hydrożeli pozwala wyregulować szybkość hydrolizy wiązania estrowego, tak by przybiegała w środowisku umiarkowanie alkalicznym fizjologicznie istotnym (pH 7.4). Trehaloza została wbudowana w strukturę nanożeli poprzez ugrupowanie estrowe wykorzystując (met)akrylan 6-*O*-trehalozy, a jako komonomer(y) wykorzystano monomery z grupy monomerów akrylamidowych (pierwszo- i drugorzędowych). Przeprowadzenie polimeryzacji techniką miniemulsji pozwala uzyskać nanożele o rozmiarze nie przekraczającym 500 nm.

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest:

- przedłużony czas uwalniania trehalozy w mediach wodnych o pH > 7,0, w szczególności w temperaturze fizjologicznie istotnej (35%-40°C),
- możliwość regulowania ilości i szybkości uwalniania trehalozy,
- brak zależności szybkości uwalniania trehalozy od stężenia nanożeli,
- możliwość uzyskania nanożeli o wysokiej zawartości trehalozy (> 50% wagowych),

- stabilność dyspersji nanożeli w wielu mediach wodnych w tym, w mediach wykorzystywanych w badaniach biologicznych, w mediach izotonicznych z płynami ustrojowymi oraz w mediach zawierających serum,
- rozmiar nanożeli nie przekracza 500 nm.

Sposób otrzymywania nanożeli uwalniających kowalencyjnie związaną trehalozę, **polega na tym, że** prowadzi się kopolimeryzację wolnorodnikową z udziałem (met)akrylanu-6-*O*-trehalozy o wzorze ogólnym 1, gdzie R=H lub CH_3 w ilości od 10% do 90% wagowych w stosunku do wszystkich monomerów, z co najmniej jednym monomerem z grupy monomerów akrylamidowych w ilości co najmniej 10% w stosunku do wszystkich monomerów, w obecności czynnika sieciującego w ilości od 0,5% do 20,0% wagowych wszystkich monomerów, korzystnie w zakresie 5-10% wagowych.

Korzystnie w sposobie otrzymywania nanożeli według wynalazku kopolimeryzację prowadzi się techniką miniemulsji typu woda w oleju w stosunku objętościowym od 5% do 15% fazy wodnej, korzystnie 10%, gdzie fazę ciągłą stanowi rozpuszczalnik organiczny niemieszający się z wodą, a fazę rozproszoną stanowi wodny roztwór monomerów w zakresie od 2% do 75 % wagowych, korzystnie 20% wagowych, zawierający inicjator polimeryzacji wolnorodnikowej

Korzystnie w sposobie otrzymywania nanożeli według wynalazku jako monomery z grupy monomerów akrylamidowych stosuje się amidy pierwszo- i/lub drugorzędowe.

Korzystnie w sposobie otrzymywania nanożeli według wynalazku jako czynnik sieciujący stosuje się monomer zawierający co najmniej dwa wiązania reaktywne w polimeryzacji wolnorodnikowej, korzystnie *N,N'*-metylenobisakrylamid (MBA);

Korzystnie w sposobie otrzymywania nanożeli według wynalazku jako rozpuszczalnik organiczny stosuje się niemieszający się z wodą węglowodór nasycony, przy czym rozpuszczalnik zawiera niejonow(y/e) stabilizator(y) emulsji.

Korzystnie w sposobie otrzymywania nanożeli według wynalazku jako inicjator polimeryzacji wolnorodnikowej stosuje się inicjator termiczny, fotochemiczny lub redoks w ilości od 0,1 do 5% wagowych, korzystnie fenylo-(2,4,6-trimetylobenzoilo) fosfinian litu (LAP) jako fotoinicjator w ilości 1% wagowych.

Zastosowanie nanożeli otrzymanych sposobem określonym powyżej do przedłużonego uwalniania trehalozy w mediach wodnych o pH > 7,0.

W rozwiązaniu według wynalazku do wytworzenia nanożeli wykorzystano technikę miniemulsji typu woda w oleju, w której fazę rozproszoną stanowi wodny roztwór monomerów oraz inicjatora polimeryzacji wolnorodnikowej, a fazę ciągłą rozpuszczalnik organiczny niemieszający się z wodą zawierający niejonow(y/e) stabilizator(y) emulsji. Jako monomery zastosowano (met)akrylan 6-*O*-trehalozy (Wzór I), monomer(y) z grupy monomerów akrylamidowych (pierwszo- i/lub drugorzędowych) oraz czynnik sieciujący.

Przedmiot wynalazku objaśniono w poniższych przykładach.

Przykład 1

Polimeryzacja miniemulsyjna – synteza nanożeli

Reagenty: (i) Metakrylan lub akrylan 6-O-trehalozy o wzorze I; (ii) jeden lub więcej monomerów z grupy akrylamidowych, (iii) *N,N'*-metylenobisakrylamid (MBA), (iv) fenylo-(2,4,6-trimetylobenzoilo) fosfinianu litu (LAP) o łącznej masie 227,25mg rozpuszczono w 1 mL buforu PBS (pH 6,0) w temperaturze pokojowej. Tak przygotowana mieszanina monomerów została przeniesiona do 10 mL zimnego cykloheksanu zawierającego 611mg SPAN 80 i była sonikowana 5 minut. Następnie emulsja była naświetlana diodami LED (POWER LED 3W EPILEDS 395-405 nm) przez 30 minut. Po tym czasie produkt został wytrącony acetonem (40 mL), odwirowany i przemyty dwukrotnie acetonem. Po wysuszeniu surowy produkt był oczyszczony przez dializę przy zastosowaniu membrany dializacyjnej o MWCO 12-14 kDa w zakwaszonej wodzie (pH 6,0) jako roztworze zewnętrznym. Oczyszczony nanożel został zliofilizowany i przechowywany w temperaturze 4°C. Średnica hydrodynamiczna nanożelu w dyspersji w wodzie została oznaczona metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Zawartość trehalozy została oznaczona enzymatycznie za pomocą testu Trehalose Assay Kit (Megazyme International, Bray, Ireland).

Przykład 1.1

Synteza nanożelu TGN-1

Do syntezy zastosowano: akrylan 6-O-trehalozy o wzorze I, gdzie R=H (170 mg), chlorek 3-akrylamidopropylo)trimetyloamoniowy (AAPTMAC) (35 mg), MBA (20 mg), LAP (2,25 mg)

Wydajność nanożelu TGN-1: 62%

Średnica hydrodynamiczna nanożelu TGN-1: d_H =120 nm, PDI=0,24

Zawartość trehalozy: 57%

Przykład 1.2

Synteza nanożelu TGN-2

Do syntezy zastosowano: akrylan 6-O-trehalozy o wzorze I, gdzie R=H (153 mg), akrylamid (AM) (35 mg), AAPTMAC (17 mg), MBA (20 mg), (LAP) (2,25 mg)

Wydajność nanożelu TGN-2: 73%

Na Fig. 1A przedstawione jest widmo H^1 NMR (600 MHz) dyspersji nanożelu TGN-2 w D_2O (10 mg/mL) po syntezie i oczyszczeniu

Średnica hydrodynamiczna nanożelu TGN-2: d_H =84 nm, PDI=0,30

Zawartość trehalozy: 53%

Przykład 1.3

Synteza nanożelu TGN-3

Do syntezy zastosowano: akrylan 6-O-trehalozy o wzorze I, gdzie R=H (170 mg), AM (35 mg), MBA (20 mg), LAP (2,25 mg)

Wydajność nanożelu TGN-3: 54%

Średnica hydrodynamiczna nanożelu TGN-3: d_H =78 nm, PDI=0,29

Zawartość trehalozy: 59%

Przykład 2

Opis uwalniania trehalozy

Suchy nanożel (10 mg) został umieszczony w 1 mL wody dejonizowanej i pozostawiony na 15 minut, następnie mieszanina była sonikowana 30 sekund. Z tak przygotowanej dyspersji bazowej przygotowano dwie dyspersje w buforze PBS (pH 7,4): 1 mg/mL i 0,1 mg/mL. Dyspersje zostały umieszczone w inkubatorze (37°C) z ciągłym mieszaniem (250 rpm). Próbki do oznaczania uwolnionej trehalozy pobierano co 12 h, a trehalozę oznaczano enzymatycznie za pomocą testu Trehalose Assay Kit (Megazyme International, Bray, Ireland). Na Fig. 2A przedstawione są profile uwalniania trehalozy z nanożeli TNG-1, TNG-2 i TNG-3 o stężeniach 0,1 mg/mL. Na Fig. 2B przedstawione są profile uwalniania trehalozy z nanożelu TNG-2 o stężeniu 0,1 mg/mL i 1 mg/mL.

Na Fig. 1B przedstawione jest widmo H^1 NMR (600 MHz) dyspersji nanożelu TGN-2 w D_2O (10 mg/mL) po 72 godzinnej inkubacji w buforze PBS (pH 7,4) o temperaturze 37°C.

Przykład 3

Opis badania stabilności dyspersji

Stabilność dyspersji nanożeli była oznaczana dla stężenia 1 mg/mL w kilku mediach: wodzie, PBS (pH 7.4), izotonicznym 5% roztworze glukozy, DMEM + 10% FBS, RMPI + 10% FBS, oraz w medium do hodowli pierwotnych kultur komórkowych. Oznaczenie stabilności wykonano metodą turbidymetryczną poprzez pomiar absorbancji próbek przy długości fali 650 nm w temperaturze 37°C. Na Fig. 3 przedstawiono oznaczenia absorbancji w czasie 0 h (A), 24 h (B), 48 h (C), 72 h (D).

Skróty: PBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna; DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium, FBS –serum płodowe z cieląt; RMPI - Roswell Park Memorial Institute.

Rzecznik Patentowy

mgr inż. Katarzyna Borkowy