

Uniwersytet Medyczny

im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wydział Farmaceutyczny



Tomasz Urbaniak

Rozprawa doktorska

**Wytwarzanie mikronośników koniugowanych substancji
lecniczych na potrzeby chorób makrofago-zależnych**

Wrocław 2020

Promotor rozprawy:
Prof. dr hab. Witold Musiał
Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej i Biofizyki

Streszczenie

Wielkocząsteczkowe struktury, takie jak polimery lub białka, od dekad pełnią kluczową rolę w technologii farmaceutycznej oraz stanowią istotny element innowacyjnego podejścia do współczesnej terapii. Polimery mogą być wykorzystane w medycynie jako pojedyncze cząsteczki zdolne do wywołania efektu terapeutycznego, jak i materiały do tworzenia kompleksowych systemów terapeutycznych. Wyróżnia się makrocząsteczki biozgodne, biodegradowalne, termowrażliwe, reagujące na pH środowiska lub zmiany stężeń substancji obecnych w ich otoczeniu. Łączenie substancji czynnych z makromolekułami pozwala wykorzystać właściwości poszczególnych materiałów polimerowych w celu zwiększenia biodostępności, doprowadzenia leku do miejsca działania oraz np. modyfikacji profilu jego uwalniania. Zastosowanie polimerowych mikro- i nano- cząstek związanych z substancją leczniczą pozwala na celowanie w patologicznie zmienione regiony na poziomie pojedynczych komórek.

Nowe możliwości precyzyjnych terapii, projektowanych na poziomie molekularnym, pozwalają na oddziaływanie na atrakcyjne, dotychczas niewykorzystywane, cele terapeutyczne identyfikowane w ostatnich latach. W mijającej dekadzie dokonano istotnych odkryć dotyczących roli komórek układu odpornościowego - makrofagów - w szeregu jednostek chorobowych. Komórki te wykazują wyjątkową zdolność do fagocytarnego wychwytu obcych struktur, stanowiących potencjalne zagrożenie dla ludzkiego organizmu. Najnowsze badania wykazały ponadto ich istotną rolę w rozwoju procesów zwłóknieniowych płuc i nerek, w rozwoju otyłości, oraz w przewodzeniu impulsów nerwowych w sercu. W świetle najnowszych odkryć, komórki te stanowią obiecujący cel terapeutyczny dla precyzyjnych nośników leku. Wyjątkowa zdolność makrofagów do wychwytu mikronowych cząstek może zostać wykorzystana jako strategia dostarczania leku do tych komórek, lub za ich pośrednictwem do różnych tkanek i narządów. Nośnikiem odpowiednim do tego rodzaju strategii dostarczania leku mogą być biodegradowalne polimerowe mikro- i nano- cząstki. Struktury tego typu, o różnych właściwościach, można otrzymać w szeregu metod opracowanych w ciągu ostatnich lat. Ponadto, liczne procedury modyfikacji powierzchni otrzymanych cząstek pozwalają na dostosowanie ich fizykochemii do potrzeb terapii skierowanej na konkretną subpopulację komórek.

Celem badań podjętych w ramach rozprawy doktorskiej było opracowanie procedury otrzymywania modelowych nośników zdolnych do dostarczenia substancji leczniczej do komórek fagocytarnych. W ramach pierwszego etapu badań dokonano syntezy koniugatów lek-polimer poprzez zastosowanie modelowej substancji czynnej w roli inicjatora reakcji polimeryzacji z otwarciem pierścienia. Syntezy przeprowadzono z wykorzystaniem lamiwudyny – leku przeciwwirusowego wykorzystywanego w terapii zakażeń ludzkim wirusem niedoboru odporności. Na przestrzeni ostatnich lat potwierdzono istotną rolę makrofagów jako rezerwuarów wirusa, co stanowi jedną z przyczyn jego lekooporności. Otrzymane kowalencyjne koniugaty polimerowo-lekowe uformowano w sferyczne struktury metodą odparowania rozpuszczalnika z emulsji olej w wodzie. Poddano analizie wpływ parametrów procedury na rozmiar otrzymanych cząstek. Mikrosfery o średnicach ok. 2,4 μm , preferowanych przez makrofagi, poddano dalszym modyfikacjom. W związku z silnym wiązaniem powstałym pomiędzy matrycą polimerową a substancją leczniczą, nośniki uwalniały lamiwudynę z charakterystycznym opóźnieniem. Taki profil uwalniania pozwala zapobiec przedwczesnemu wyrzutowi leku z nośników i w konsekwencji umożliwia dostarczenie całkowitej dawki leku do fagocytarnych komórek docelowych. Powierzchnia cząstek została zmodyfikowana poprzez powlekanie polielektrolitami metodą layer-by-layer. Depozycja otoczek nadała nośnikom ładunek powierzchniowy preferowany przez makrofagi. Ponadto, zewnętrzne warstwy polielektrolitów zawierały grupy funkcyjne odpowiednie do koniugacji ligandów celujących. Cztery warianty otrzymanych nośników o różnej fizykochemii powierzchni poddano testom fagocytozy przez komórki modelowej linii makrofagów RAW 264.7. Cząstki posiadające zewnętrzną warstwę heparynową oraz niepowlekanie rdzenie były internalizowane z największą wydajnością. Badane nośniki nie wykazały toksyczności względem linii komórkowej makrofagów.

W ramach rozprawy doktorskiej przeanalizowano podstawowe zjawiska związane z otrzymywaniem oraz wykorzystywaniem proponowanych nośników leku. Możliwość manipulacji rozmiarem cząstek, fizykochemią ich powierzchni lub profilem uwalniania substancji leczniczej, oraz brak toksyczności potwierdzają możliwość zastosowania proponowanego systemu terapeutycznego w chorobach powiązanych z aktywnością makrofagów.

Abstract

Macromolecular species, including polymers and proteins, are crucial elements of contemporary pharmaceutical technology and innovative therapeutic approaches. Polymers may be utilized as active pharmaceutical ingredients alone, as well as materials for complex therapeutic system preparation. Current wide knowledge of particular polymers enables the utilization of their unique properties in pharmaceutical sciences. Polymers exhibiting following specific properties are valuable in the context of biomedical applications: biocompatibility, biodegradability, ability to respond to thermal, chemical and physical stimuli. Coupling of polymer molecules with active pharmaceutical ingredients may increase drug bioavailability, promote drug delivery to the site of action or modify drug release profile. Employment of polymer nano- and micro- particles coupled with drugs may be applied to target pathological tissues on the cellular level.

New possibilities of precise therapies can be used in the targeting of novel therapeutic goals identified in recent years. Significant findings were made in the field focused on the role of immune cells – macrophages – in the development of various pathologies. These cells exhibit a high capacity to uptake potentially harmful micro-sized foreign bodies. Recent research underline their importance in pathological phenomena such as lung and renal fibrosis, obesity development or abnormalities in cardiac neural signaling. In light of recent discoveries, the macrophages are promising therapeutic targets for precise drug delivery systems.

The extraordinary ability of macrophages to phagocyte foreign structures in vivo may be exploited as a drug delivery strategy. Nano- and micro- particles may be suitable for this approach of active pharmaceutical ingredients delivery. Numerous variants of such structures may be obtained in several methods developed in recent decades. Additionally, available methods of particle modification enable tuning of surface physicochemistry for the needs of a particular therapeutic approach.

The aim of the studies performed within the presented Ph.D. thesis was the development of a preparation procedure of phagocyte aiming prototype drug carrier. In the first stage of studies, drug-polymer conjugate was synthesized via ring-opening

polymerization initiated by model antiviral drug -lamivudine. The important role of macrophages in human immunodeficiency virus drug resistance was confirmed in recent years. Due to a relatively long lifespan, macrophages serve as reservoirs of virus in so-called anatomical sanctuaries. Obtained covalent polyester-drug conjugates were formulated into microparticles via o/w solvent evaporation method. The influence of procedure parameters on particle hydrodynamic diameter was investigated. Particles of diameter preferred by phagocytes, i.e. 2,4 μm , were subsequently modified. Due to strong covalent bonding between the polymer matrix and the drug, the particles release lamivudine with distinctive delay. This profile of drug release would prevent premature drug release before internalization by target cells. The particle surface was modified via layer-by-layer polyelectrolyte dip-coating. The deposition of nanolayers provided surface charge, which enhanced phagocytic uptake. Moreover, the presence of carboxylic and amine functionals, introduced onto the surface of the multilayer may be utilized for the immobilization of potential targeting ligands. Four particle variants of different surface physicochemistry were evaluated in in vitro phagocytosis assays; the model macrophage cell line RAW 264.7 was used. Particles with heparin external layer and uncoated polymer cores were internalized most efficiently, whereas the evaluated carriers did not exhibit cellular toxicity.

Within the framework of the doctoral thesis, fundamental phenomena related to the preparation and utilization of proposed drug carriers were evaluated. Possibility of size control, surface chemistry modification and drug release profile manipulation, along with non-toxicity of carriers after internalization by targeted cells, proves potential applicability of the proposed drug delivery system in macrophage-related diseases.