

Ewa Skorupska

**Zastosowania spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego
w badaniach enkapsulacji leków w mezoporowatych
nanokrzemionkach**

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych

Polska Akademia Nauk

Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

Streszczenie w języku polskim

O skuteczności danej terapii decyduje nie tylko aktywność farmakologiczna, ale i postać substancji leczniczej. Z uwagi na fakt, że aż 40% znanych związków farmakologicznie czynnych nie rozpuszcza się w wodzie, co znacznie ogranicza ich biodostępność, poprawa tego parametru jest niezwykle istotna. Częściowym rozwiązaniem problemu może być tzw. mikronizacja lub tworzenie soli. Niestety istnieje wiele ograniczeń, które wykluczają zastosowanie tych metod. Innym sposobem jest stosowanie układów zdolnych do przenoszenia leków (ang. *Drug Delivery Systems, DDS*). Systemy dostarczania leków są też konieczne, gdy działanie substancji aktywnej w organizmie nie jest zadowalające z powodu małej stabilności chemicznej i/lub nieselektywnego działania terapeutycznego. Przemysł farmaceutyczny przeznacza coraz większe nakłady na poszukiwanie nowych formuł już istniejących preparatów celem uzyskania układów o określonych własnościach fizykochemicznych. Stosując specjalnie zaprojektowane nośniki oczekuje się, że enkapsulacja może zapewnić potrzebną ochronę substancji czynnej, większą selektywność i wyższą skuteczność terapeutyczną oraz bezpieczeństwo stosowania, szczególnie w przypadku leków przeciwnowotworowych, gdzie powszechnym problemem jest ich wysoka toksyczność. Wśród nich ważną grupę stanowią nanocząstki mezoporowatej krzemionki (ang. *Mesoporous Silica Nanoparticles, MSN*), jak MCM-41 (ang. *Mobile Crystalline Matter/Mobile Composite Matter*) i SBA-15 (ang. *Santa Barbara Amorphous*).

Mezoporowate krzemowe matryce to nieorganiczne polimery o porowatej mikrostrukturze i dużej powierzchni adsorpcji. Spośród tego typu materiałów, te o dobrze zdefiniowanej strukturze jak i wielkości porów (MCM-41, SBA-15), stały się szczególnie ważne we współczesnej chemii materiałów z uwagi na różnorodne możliwości ich zastosowań. Prosta modyfikacja ich powierzchni, polegająca na wprowadzaniu dodatkowych grup funkcyjnych lub też odpowiednich cząstek kierujących sprawia, że układy te mogą doskonale sprawdzić się w roli wskaźników chorobowo zmienionych tkanek. Dodatkowo, dzięki możliwości tworzenia oddziaływań typu gość-gospodarz mogą też pełnić funkcję wspomagającą proces oczyszczenia wody z określonych związków chemicznych, np. leków lub metali.

Z literatury przedmiotu wynika, że większość metod inkorporacji leków w pory nanokrzemionek polega na namaczaniu odpowiedniej matrycy w roztworze etanolowym lub

wodnym substancji aktywnej. Modelowym związkiem najczęściej stosowanym do testowania krzemowych matryc jako nośników typu DDS jest ibuprofen. Okazało się, że uzyskiwany w ten sposób stopień napełnienia porów badanych matryc nie jest w pełni satysfakcjonujący i oscyluje w granicach 20%. Większe wartości (ok.30%) otrzymano jedynie w przypadku, gdy do przygotowania roztworu ibuprofenu, jako rozpuszczalnika użyto heksanu. Heksan jednak, z uwagi na swą toksyczność, nigdy realnie nie zostanie wykorzystany do przygotowania systemów lek/nośnik.

W toku moich badań wykazałam przyczynę niskich wartości napełnienia matrycy lekiem w przypadku standardowo stosowanych metod z wykorzystaniem rozpuszczalników. W tym celu po raz pierwszy tak skutecznie zostały wykorzystane zaawansowane eksperymenty spektroskopii NMR w ciele stałym. Okazało się, że powinowactwo cząsteczek rozpuszczalnika do wolnych grup silanolowych krzemionki w porównaniu z cząsteczkami leku jest znacznie większe i w procesie namaczania to one szybciej wypełniają pory matrycy blokując dostęp substancji właściwej. Opisane zjawisko było często zaniedbywane we wcześniejszych opracowaniach na ten temat, choć „aktywowanie” porów matrycy przed impregnacją, poprzez wyprażanie krzemionki w temperaturze ok. 300 °C celem usunięcia cząsteczek wody, jest procedurą standardową.

Mała efektywność procesu impregnacji wyżej wymienionymi metodami, była podstawą do poszukiwania nowej, efektywniejszej, a przy tym spełniającej wymagania zielonej chemii, bezrozpuszczalnikowej termicznej metody (*ang. Thermal Solvent-Free, TSF*) inkorporacji substancji aktywnych farmaceutycznie w pory mezoporowatej nanokrzemionki.

Wykorzystując specyficzne właściwości fizykochemiczne wybranych związków modelowych (stosunkowo niskie temperatury topnienia) podjęłam próbę wprowadzenia wybranych leków w pory matrycy krzemowej korzystając z termicznej metody w ciele stałym, (*TSF*). Proces ten polegał na stopieniu mieszaniny fizycznej leku oraz matrycy krzemowej w temperaturze wyższej o około 5 °C od temperatury topnienia leku. Takie podejście eliminuje z systemu inne media niż lek i matryca oraz zdecydowanie skraca czas przeprowadzania procesu inkorporacji w pory krzemionki.

Ze względu na wysokie temperatury topnienia oraz niską stabilność termiczną niektórych substancji aktywnych, metoda *TSF* nie może być uznana jako uniwersalne narzędzie do przeprowadzania procesu enkapsulacji. Jest to niezwykle ważne w przypadku związków aktywnych, topiących się w bardzo wysokiej temperaturze, w której może rozpoczynać się proces ich degradacji. Zmianę tych własności można uzyskać dzięki tworzeniu kokryształów.

Kolejnym etapem moich badań było zaprojektowanie, otrzymanie oraz analiza kokryształów o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych. Kokryształy składają się z dwóch lub większej liczby różnych związków chemicznych i posiadają odmienne właściwości fizykochemiczne od wyjściowych komponentów. Moim celem była zmiana temperatury topnienia badanych układów, co pozwoliłoby na ich inkorporację w pory MCM-41/SBA-15 metodą *TSF*. W trakcie badań zaobserwowałam, że proces wprowadzenia kokryształu w MSN może przebiegać w różny sposób. Pierwszy, prowadzi do wtopienia materiału wraz z całkowitym lub częściowym odtworzeniem aranżacji wyjściowego kokryształu w porach matrycy krzemowej. W drugim przypadku odnotowałam częściową lub całkowitą separację komponentów kokryształu poprzez preferencyjne wiązanie jednego z nich z grupami funkcyjnymi matrycy krzemowej.

Główną techniką wykorzystaną do analizy przygotowanych układów lek/MSN lub kokryształ/MSN była spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego oraz techniki komplementarne takie jak spektroskopia w podczerwieni (ang. *Fourier Transformation Infra Red, FT-IR*) lub też metody termiczne, takie jak TGA (ang. *Thermal Gravimetric Analysis, TGA*) czy DSC (ang. *Differential Scanning Calorimetry, DSC*).

Do badań zostały wykorzystane klasyczne eksperymenty spektroskopii NMR w ciele stałym pozwalające zarejestrować widma jąder o niezerowym momencie magnetycznym, jak ^1H , ^{13}C , ^{15}N i ^{29}Si , obecnych w badanych układach. Widma ^1H MAS NMR ze względu na silne oddziaływania dipolowe charakteryzują się znacznym poszerzeniem sygnałów, co niewątpliwie utrudnia ich interpretację. Rozwiązaniem tego problemu jest technika VeryFast (VF) MAS NMR, w której badana substancja jest wirowana pod kątem magicznym z prędkością do 65kHz. Wirowanie próbek z taką szybkością eliminuje szereg niekorzystnych efektów NMR jak homo- i heterojądrowe sprzężenia dipolowe i anizotropia przesunięcia chemicznego. Pomimo faktu, iż spektroskopia NMR w ciele stałym jest podstawową techniką stosowaną w badaniach strukturalnych związków w fazie stałej, tylko w niewielkim stopniu była wykorzystana do opisu oddziaływań matryc krzemowych z lekami. Dodatkową zaletą spektroskopii NMR w ciele stałym jest możliwość przeprowadzenia pełnej charakterystyki dynamiki molekularnej cząsteczek leków w krzemowych matrycach porowatych, z uwzględnieniem wielkości porów i ich topologii jak i oddziaływań lek-matryca.

Wykonane prace badawcze pozwoliły na zbadanie oddziaływań typu „gość-gospodarz”, opis struktury leku wewnątrz matrycy a także na przeprowadzenie pełnej charakterystyki krzemowych materiałów mezoporowatych jako nośników leków z wykorzystaniem technik NMR w ciele stałym. Ponadto uzupełniona została wiedza dotycząca analizy mechanizmów

uwalniania leków, co jest nie bez znaczenia dla projektowania i kontroli szybkości tego procesu. Dodatkowo, przeprowadzone badania pozwoliły na zaprojektowanie takich układów jak kokryształ/DDS, co w przyszłości może umożliwić skuteczniejszą terapię farmakologiczną. Niewielka liczba prac podejmujących temat umieszczania kokryształów w MSN stanowi niewątpliwie o nowatorskim charakterze przedstawionej pracy doktorskiej.