



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **420021**

(22) Data zgłoszenia: **29.12.2016**

(51) Int.Cl.

A61F 2/07 (2013.01)

A61F 2/82 (2013.01)

A61L 31/16 (2006.01)

(54) **Sposób wytwarzania z układu kopolimer-inhibitor szlaku mTOR powłoki
o kontrolowanej kinetyce uwalniania inhibitora szlaku mTOR
na polimerowych stentach naczyniowych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

02.07.2018 BUP 14/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

14.12.2020 WUP 20/20

(73) Uprawniony z patentu:

**CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH
I WĘGLOWYCH POLSKIEJ AKADEMII NAUK,
Zabrze, PL**

**AMERICAN HEART OF POLAND
SPÓŁKA AKCYJNA, Ustroń, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

KATARZYNA JELONEK, Częstochowa, PL

JOANNA JAWORSKA, Mikołów, PL

MAŁGORZATA PASTUSIAK, Zabrze, PL

PIOTR DOBRZYŃSKI, Zabrze, PL

JANUSZ KASPERCZYK, Katowice, PL

MICHAŁ SOBOTA, Częstochowa, PL

KRZYSZTOF MILEWSKI, Katowice, PL

PAWEŁ BUSZMAN, Katowice, PL

PIOTR BUSZMAN, Katowice, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Patrycja Rosół

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania z układu kopolimer–inhibitor szlaku mTOR powłoki o kontrolowanej kinetyce uwalniania inhibitora szlaku mTOR, zwłaszcza sirolimusu lub ewerolimusu, na polimerowych stentach naczyniowych, biostabilnych lub biodegradowalnych, stosowanych w zabiegach angioplastyki naczyniowej i zapobiegających restenozie.

Implantacja stentu podczas zabiegu angioplastyki wieńcowej jest uznaną metodą leczenia ostrych zespołów wieńcowych, a także stabilnej choroby wieńcowej u pacjentów z istotnym niedokrwieniem obszaru mięśnia sercowego zaopatrywanego przez zwężoną tętnicę. Najważniejszym ograniczeniem skuteczności tej metody, zwłaszcza w przypadku stosowania stentów metalowych jest zjawisko restenozy, polegające na nawrocie zwężenia leczonej tętnicy. Dlatego też coraz powszechniej w kardiologii inwazyjnej wykorzystywane są stenty uwalniające lek (DES, z ang. Drug Eluting Stents), zwykle pokryte powłokami stanowiącymi układ nośnika z lekiem. Jak opisano w publikacji D.M. Sun i in. pt. „Coronary drug-eluting stents: From design optimization to newer strategies”, J Biomed Mater Res A, 102 (2014) 1625–1640, zastosowanie DES pozwala na znaczną redukcję częstości restenozy po implantacji stentu z 20–30% do 3–20% oraz ponowną rewaskularyzację.

Do powszechnie stosowanych leków zapobiegających restenozie, jak wskazano m.in. w publikacji Y.Y. Huang i in. pt. „Drug-eluting biostable and erodible stents”, Journal of Controlled Release, 193 (2014) 188–201, zalicza się inhibitory mTOR tj. sirolimus, ewerolimus, zotarolimus i biolimus. Wiążą się one z białkiem FKBP12, tworząc kompleks, który hamuje aktywację kinaz regulatorowych zwanych mTOR (mammalian Target of Rapamycin), stanowiących podstawowe regulatory procesów wzrostu i proliferacji wielu typów komórek. W efekcie dochodzi do zablokowania cyklu komórkowego w fazie G0/G1, zahamowanie proliferacji i migracji komórek, głównie mięśni gładkich.

Jako nośniki leków coraz częściej stosowane są polimery biodegradowalne co zostało opisane m.in. w publikacji A. Ta, i in. pt. „Inception to actualization: Next generation coronary stent coatings incorporating nanotechnology”, J Biotechnol, 164 (2013) 151–170. Zastosowanie polimerów biodegradowalnych umożliwia dodatkową kontrolę uwalniania leku poprzez erozję matrycy powodowaną przez degradację hydrolityczną polimeru. Ponadto, równoczesny przebieg erozji polimeru i dyfuzji leku zapobiega utrzymywaniu się pozostałości leku w tkance.

Znane jest ze zgłoszenia WO2009112741 A2 urządzenie medyczne m.in. stent naczyniowy, zawierające składnik aktywny lub lek korzystnie zapobiegający restenozie oraz zabezpieczającą go biodegradowalną hydrofobową powłokę polimerową wytworzoną np. z glikolu polialkilenowego lub poliwinylpirolidonu.

Ze zgłoszenia PL402235 A1 znany jest układ powłok i powlekane urządzenie medyczne, korzystnie stent naczyniowy metalowy lub polimerowy, które charakteryzuje się tym, że co najmniej na części swojej powierzchni zawiera układ biokompatybilnych, polimerowych powłok biodegradowalnych, składający się z co najmniej dwóch powłok: jednej hydrofilowej i jednej hydrofobowej. Układ powłok korzystnie zawiera powłoki na bazie polimerów wybranych z grupy obejmującej poli(glikol etylenowy) PEG, poli(kwas mlekowy) PLA, poli(kwas glikolowy) PGA, kopolimery PGA-PLA, kopolimery kwasu mlekowego lub glikolowego z ϵ -kaprolaktonem PCL. Co najmniej jedna z powłok zawiera przynajmniej jedną substancję czynną korzystnie wybraną z grupy obejmującej leki antyproliferacyjne, przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe, leki o działaniu cytostatycznym i/lub immunosupresyjnym. Korzystnie substancję czynną stanowi lek wybrany z grupy obejmującej rapamycynę, pochodne rapamycyny, ich analogi i prekursorzy albo paklitaksel, docetaksel, ich analogi, prekursorzy oraz inne pochodne z grup taksanów.

W wielu badaniach nadal obserwowane są efekty uboczne zastosowania DES takie jak reakcje zapalne, późna zakrzepica w stencie, czy późna restenoza. Jak wskazano w publikacji K. Park pt. „Dual drug-eluting stent”, Journal of Controlled Release, 159 (2012) 1–1, efekty te spowodowane są przede wszystkim nieodpowiednim dostosowaniem dawki leku uwalnianego z DES, co istotnie wpływa na jego skuteczność. Przedwczesne uwalnianie leku z DES może zmniejszyć efektywność jego działania, a z kolei niekontrolowane wyrzuty leku lub nagłe uwolnienie zbyt dużej dawki może opóźniać regenerację śródbłonnka i zwiększyć ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Potwierdzają to wyniki randomizowanych badań klinicznych opisanych np. w publikacji G. Acharya, K. Park pt. „Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents”, Adv Drug Deliver Rev, 58 (2006) 387–401, które wskazują, że jedynie optymalna kinetyka uwalniania leku zapobiega restenozie i zapewnia prawidłowy proces odbudowy śródbłonnka.

Celem niniejszego wynalazku jest opracowanie sposobu wytwarzania z układu kopolimer-inhibitor szlaku mTOR powłoki o kontrolowanej kinetyce uwalniania inhibitora szlaku mTOR, zwłaszcza sirolimusu lub ewerolimusu, na polimerowych stentach naczyniowych, z której to powłoki inhibitor mTOR uwalniany jest do organizmu w sposób kontrolowany i dopasowany do procesu naprawy urazu naczyniowego.

Istota sposobu wytwarzania z układu kopolimer-inhibitor szlaku mTOR powłoki o kontrolowanej kinetyce uwalniania inhibitora szlaku mTOR, zwłaszcza sirolimusu lub ewerolimusu, na polimerowych stentach naczyniowych, w którym to sposobie na powierzchnię stentu nanosi się roztwór roboczy, zawierający kopolimer będący produktem procesu kopolimeryzacji komonomerów: L-laktydu lub D,L-laktydu i węglanu trimetylenu, przebiegającego na drodze otwarcia pierścienia, w stopie, w obecności inicjatora kopolimeryzacji, którym są związki cyrkonu (IV), charakteryzuje się tym, że kopolimer stanowiący składnik roztworu roboczego otrzymuje się przez ciągłe mieszanie komonomerów w postaci węglanu trimetylenu i laktydu w stosunku molowym w zakresie 0,15–0,6 mola węglanu trimetylenu i 0,4–0,85 mola laktydu w temperaturze 110–200°C, korzystnie 120–150°C, przez 6–96 godzin stosując jako inicjator reakcji kopolimeryzacji acetyloacetonian cyrkonu i/lub chlorek cyrkonu i/lub alkoholan cyrkonu o wzorze ogólnym $Zr(OR)_4$, w którym R oznacza grupy alkilowe o ogólnym wzorze C_nH_{2n+1} , przy zachowaniu stosunku molowego sumy użytych komonomerów do inicjatora kopolimeryzacji w zakresie od 300:1 do 1200:1. Z tak uzyskanego kopolimeru poli(laktydo-ko-węglan trimetylenu) o bezładnej mikrostrukturze łańcucha i średniej długości mikrobloków laktydylowych niższych od wartości 3,5 jednostek oraz o zawartości molowej laktydy 10–90%, a korzystnie 75%, wytwarza się roztwór roboczy poprzez rozpuszczenie go w chlorku metylenu, oczyszcza i suszy w warunkach podciśnienia 8–12 kPa w temperaturze 20–60°C przez 48–80 godzin do uzyskania stałej masy. Suchy kopolimer rozpuszcza się w chlorku metylenu, tak aby uzyskać roztwór o stężeniu 0,5–5,0% wagowych, korzystnie 1–2 % wagowych, dodaje do niego uprzednio przygotowany roztwór inhibitora szlaku mTOR, którym jest sirolimus lub ewerolimus, w chlorku metylenu o stężeniu 1–13 % wagowo-objętościowych i całość homogenizuje się. Roztwór roboczy zawierający poli(laktydo-ko-węglan trimetylenu) oraz inhibitor szlaku mTOR, którym jest sirolimus lub ewerolimus, w chlorku metylenu, nanosi się na polimerowy stent naczyniowy biostabilny lub biodegradowalny, w temperaturze 4–30°C, poprzez zanurzanie w nim stentu, przy ilości cykli 1–50, z szybkością zanurzania 40–3000 mm/min, przez 0,1–30 s, a czas trwania zanurzenia/wynurzenia wynosi 0,2–50 s/cykl. Utworzoną powłokę o korzystnej grubości 0,8–5,0 μm , zawierającą po usunięciu rozpuszczalnika 5–40 % wagowych zdyspergowanego w niej inhibitora szlaku mTOR, którym jest sirolimus lub ewerolimus, w stosunku do poli(laktydo-ko-węglan trimetylenu), a korzystnie 20–30 % wagowych, suszy się, utwardza i na koniec sterylizuje, korzystnie z wykorzystaniem promieniowania jonizacyjnego.

Korzystnie naniesioną z roztworu roboczego na stent powłokę suszy się w temperaturze 25°C przez 48 godzin, a następnie w warunkach podciśnienia 8–12 kPa przez kolejne 72 godziny.

Korzystnie roztwór roboczy nanosi się na polimerowy stent naczyniowy metodą zanurzeniową, z szybkością zanurzania 1000–3000 mm/min.

Korzystne jest, gdy w przypadku nanoszenia roztworu roboczego na polimerowy stent naczyniowy wykonany z alifatycznych poliestrów, czas trwania zanurzenia wynosi 0,2–3 s/cykl, a najlepiej 1–3 s/cykl, przy ilości cykli 1–4 i odstępie między cyklami 5–10 minut.

Korzystne jest także, gdy w przypadku nanoszenia roztworu roboczego na polimerowy stent naczyniowy wykonany poli(tereftalanu etylenu), czas trwania zanurzenia/wynurzenia wynosi 5–30 s/cykl, a najlepiej 5–15 s/cykl, przy ilości cykli 5–30 i odstępie między cyklami 20 s – 5 minut.

Sposób według wynalazku prowadzi do uzyskania produktu w postaci powłoki stanowiącej układ kopolimer-inhibitor szlaku mTOR, korzystnie sirolimus lub ewerolimus, która po naniesieniu na polimerowy stent naczyniowy w sposób kontrolowany uwalnia lek do organizmu, przez co zwiększa skuteczność zapobiegania restenozie po zabiegach angioplastyki naczyniowej.

Dobór komonomerów w postaci węglanu trimetylenu i laktydu oraz wykorzystanie nietoksycznych związków cyrkonu jako inicjatora kopolimeryzacji umożliwia otrzymanie kopolimeru o bezładnej mikrostrukturze łańcucha, co zapewnia jego równomierną degradację i stabilne uwalnianie inhibitor szlaku mTOR po wszczępieniu do organizmu pacjenta. Ilość leku od 5 do 50% wagowych masy całkowitej kopolimeru zapewnia wymaganą kinetykę jego uwalniania i właściwe działanie antyproliferacyjne.

Odpowiedni dobór polimeru, leku oraz metody nanoszenia pokryw na stenty umożliwia uzyskanie kinetyki uwalniania leku, która obecnie uważana jest za najwłaściwszą i polega na szybszym uwalnianiu w pierwszym tygodniu, a następnie na równomiernym poziomie przez co najmniej miesiąc po implantacji

stentu. Ponadto, dobór polimeru i leku oraz metody nanoszenia pokryć opisany w sposobie według niniejszego wynalazku gwarantuje jednakowy profil uwalniania leku niezależny od grubości warstwy pokrywającej oraz ilości leku w matrycy. Dzięki temu wyeliminowano ryzyko niekontrolowanego uwalniania leku po wszczępieniu stentu, co w praktyce stanowi główną przyczynę niebezpiecznych powikłań. Jak wykazały badania *in vitro*, w pierwszych 3 dniach z powłoki w uzyskanej sposobem wg. niniejszego wynalazku uwalniane jest w zależności od zastosowanego układu 41–47% leku, a 69–79 % w czasie kolejnych 21 dni, po czym utrzymuje się na równomiernym poziomie przez co najmniej kolejny miesiąc, tym samym spełniając wymogi kliniczne wskazane m.in. w publikacji T.Z. Hu, J.L. Yang, i in. pt. "Controlled Slow-Release Drug-Eluting Stents for the Prevention of Coronary Restenosis: Recent Progress and Future Prospects", *Acs Appl Mater Inter*, 7 (2015) 11695–11712.

Sposób według wynalazku pozwala na uzyskanie powłok o różnej grubości i zawartości leku. Jak wykazały przeprowadzone badania, mechanizm uwalniania leku nie zależy od grubości nałożonej na stent warstwy, co stanowi z technologicznego punktu widzenia dodatkową zaletę wynalazku.

Wytworzone sposobem wg wynalazku powłoki wykazują ponadto dobrą przyczepność i charakteryzuje je duża elastyczność. Nie ulegają one uszkodzeniu nawet przy dużych odkształceniach mechanicznych stentu.

Rozwiązanie według wynalazku przedstawiono poniżej w przykładach objaśniających realizację sposobu wytwarzania z układu kopolimer-inhibitor szlaku mTOR powłoki o kontrolowanej kinetyce uwalniania inhibitora szlaku mTOR na polimerowych stentach naczyniowych. Przykładów tych nie należy jednak uważać za ograniczające istotę lub zawężające zakres ochrony, gdyż stanowią one jedynie ilustrację wynalazku.

Na rysunku przedstawiono wyniki badań kinetyki uwalniania sirolimusu w okresie 70 dni w warunkach *in vitro*, w temperaturze 37°C w soli fizjologicznej:

fig. 1 – z powłoki zawierającej 20% wagowych sirolimusu w stosunku do poli(L-laktydo-ko-węgla trimetyleny), utworzonej z 2% (w/w) roztworu roboczego kopolimeru w chlorku metylenu zawierającego sirolimus, naniesionej na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm (oznaczonej jako 2%PLLA/TMC);

fig. 2 – z powłoki zawierającej 20% wagowych sirolimusu w stosunku do poli(L-laktydo-ko-węgla trimetyleny), utworzonej z 1% (w/w) roztworu roboczego kopolimeru w chlorku metylenu zawierającego sirolimus, naniesionej na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm (oznaczonej jako 1%PLLA/TMC);

fig. 3 – z powłoki zawierającej 20% wagowych sirolimusu w stosunku do poli(D,L-laktydo-ko-węgla trimetyleny), utworzonej z 2% (w/w) roztworu roboczego kopolimeru w chlorku metylenu zawierającego sirolimus, naniesionej na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm (oznaczonej jako 2%PDLA/TMC);

fig. 4 – z powłoki zawierającej 20% wagowych sirolimusu w stosunku do poli(D,L-laktydo-ko-węgla trimetyleny), utworzonej z 1% (w/w) roztworu roboczego w chlorku metylenu zawierającego sirolimus, naniesionej na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydo-ko-glikolidu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm (oznaczonej jako 1%PDLA/TMC);

fig. 5 – z powłoki zawierającej 20% wagowych ewerolimusu w stosunku do poli(L-laktydo-ko-węgla trimetyleny), utworzonej z 2% (w/w) roztworu roboczego w chlorku metylenu zawierającego ewerolimus, naniesionej na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm.

P r z y k ł a d 1

Najpierw wytworzono kopolimer w reakcji kopolimeryzacji z otwarciem pierścienia w stopie z 0,15 mola cyklicznego węglanu trimetyleny i 0,85 mola L-laktydu. Odmierzoną ilość komonomerów dodano do reaktora laboratoryjnego zaopatrzonego w mieszadło, króćce doprowadzające argon i podłączenie do membranowej pompy próżniowej. Zawartość stopiono w temperaturze 150°C, włączono mieszanie, podłączono pompę próżniową i oddestylowywano możliwe zanieczyszczenia przez 20 min. Po tym czasie wyłączyli pompę, wprowadzono argon a następnie dodano 0,001 mola acetylacetonianu cyrkonu (IV). Reakcję kopolimeryzacji prowadzono w zakresie temperatur od 140°C do 160°C przez 48 godzin pod lekkim nadciśnieniem argonu. Po tym czasie gorący produkt rozpuszczono w chloroformie i niezwłocznie wytrącono z zimnego metanolu. Otrzymany precypitat suszono do stałej masy w warunkach podciśnienia 8–12 kPa w temperaturze 45°C, otrzymując czysty poli(L-laktyd-ko-węglan trimetyleny) o zawartości 83% mol. laktydy z wydajnością 92% wagowych, o średniej liczbowo masie cząsteczkowej 48000 g/mol i średniej długości mikrobloków laktydylowych 2,5 jednostek laktydylowych.

Następnie odważono 0,266 g suchego poli(L-laktydo-ko-węglano trimetylenu) i rozpuszczono w 9 ml chlorku metylenu, po czym dodano uprzednio przygotowany roztwór sirolimusu otrzymany poprzez rozpuszczenie 0,0665 g sirolimusu w 1 ml chlorku metylenu. Całość mieszano w szczelnie zamkniętej fiolce przez 1 godzinę z użyciem mieszadła magnetycznego. Otrzymano 2% (w/w) roztwór roboczy kopolimeru w chlorku metylenu zawierający sirolimus, który naniesiono na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm. Roztwór naniesiono metodą zanurzeniową z wykorzystaniem urządzenia Dip Coater PTL-OV6P, MTI CORPORATION, przy szybkości zanurzania 1500 mm/min., czasie zanurzenia 1 s i 1 cyklu zanurzania. Pokryte roztworem stenty suszono przez 48 godzin na powietrzu w temperaturze 25°C, a następnie przez 72 godziny w warunkach podciśnienia 10,5 kPa. Uzyskano jednorodne pokrycie całej powierzchni stentu o średniej grubości warstwy 1,8 μm i gęstości pokrycia 170 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, o zawartości 20% sirolimusu w stosunku do poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetylenu). W końcowym etapie stent z powłoką poddano sterylizacji z wykorzystaniem promieniowania jonizacyjnego.

Zbadano kinetykę uwalniania sirolimusu z powłoki w warunkach *in vitro*, w soli fizjologicznej w temperaturze 37°C, mierząc uwalniane dobowe dawki leku. Uzyskane wyniki przedstawiono na fig. 1. Badania wykazały, że sirolimus uwalnia się po 1 dniu w ilości 35,9 %, po 3 dniach w ilości 50,3 %, a po 7 dniach w 62,6 %. Pozostała ilość leku uwalniała się równomiernie w okresie od 8 do 70 dni, ale już w mniejszej ilości.

Przykład 2

Odważono 0,133 g suchego kopolimeru poli(L-laktydo-ko-węglano trimetylenu) otrzymanego w przykładzie 1 i rozpuszczono w 9 ml chlorku metylenu, po czym dodano uprzednio przygotowany roztwór sirolimusu otrzymany poprzez rozpuszczenie 0,0332 g sirolimusu w 1 ml chlorku metylenu. Całość mieszano w szczelnie zamkniętej fiolce przez 1 godzinę z użyciem mieszadła magnetycznego. Otrzymano 1% (w/w) roztwór roboczy kopolimeru w chlorku metylenu zawierający sirolimus, który naniesiono na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm. Roztwór naniesiono metodą zanurzeniową z wykorzystaniem urządzenia Dip Coater PTL-OV6P, MTI CORPORATION, przy szybkości zanurzania 1500 mm/min., czasie zanurzenia 1 s i 1 cyklu zanurzania. Pokryte roztworem stenty suszono przez 48 godzin na powietrzu w temperaturze 25°C, a następnie przez 72 godziny w warunkach podciśnienia 10,5 kPa. Uzyskano jednorodne pokrycie całej powierzchni stentu o średniej grubości warstwy 1,6 μm i gęstości pokrycia 140 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, o zawartości 20% sirolimusu w stosunku do poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetylenu). W końcowym etapie stent z powłoką poddano sterylizacji z wykorzystaniem promieniowania jonizacyjnego.

Zbadano kinetykę uwalniania sirolimusu z powłoki w warunkach *in vitro*, w soli fizjologicznej w temperaturze 37°C, mierząc uwalniane dobowe dawki leku. Uzyskane wyniki przedstawiono na fig. 2. Badania wykazały, że sirolimus uwalnia się po 1 dniu w ilości 36,9%, po 3 dniach w ilości 44,3%, a po 7 dniach w 66,2%. Pozostała część leku uwalniała się równomiernie w okresie od 8 do 70 dni, w mniejszej ilości, przy czym po 70 dniach zaobserwowano prawie całkowite uwolnienie leku w ilości 97%.

Przykład 3

W pierwszej kolejności wytworzono kopolimer w reakcji kopolimeryzacji z otwarciem pierścienia w stopie z 0,2 mola cyklicznego węglanu trimetylenu i 0,8 mola D,L-laktydu. Odmierzoną ilość komonomerów dodano do reaktora laboratoryjnego zaopatrzonego w mieszadło, króćce doprowadzające argon i podłączenie do membranowej pompy próżniowej. Zawartość stopiono w temperaturze 150°C, włączono mieszanie, podłączono pompę próżniową i oddestylowywano możliwe zanieczyszczenia przez 20 min. Po tym czasie wyłączyono pompę, wprowadzono argon a następnie dodano 0,001 mola butanolanu cyrkonu (IV) $\text{Zr}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4$ w 2 ml toluenu. Zamknięto dopływ argonu i po podłączeniu pompy oddestylowano toluen. Ponownie wyłączyono pompę i wprowadzono argon. Reakcję kopolimeryzacji prowadzono w zakresie temperatur od 150°C do 180°C przez 12 godzin pod lekkim nadciśnieniem argonu. Po tym czasie gorący produkt rozpuszczono w chloroformie i niezwłocznie wytrącono z zimnego metanolu. Otrzymany precypitat suszono do stałej masy w warunkach podciśnienia 8–12 kPa w temperaturze 45°C, otrzymując czysty poli(D,L-laktydo-ko-węglan trimetylenu) o zawartości 75% mol. laktydydu z wydajnością 89% wagowych, o średniej liczbowo masie cząsteczkowej 34000 g/mol i średniej długości mikrobloków laktydydowych 2,5 jednostek laktydydowych.

Następnie odważono 0,266 g suchego poli(D,L-laktydo-ko-węglano trimetylenu) i rozpuszczono w 9 ml chlorku metylenu, po czym dodano uprzednio przygotowany roztwór sirolimusu otrzymany poprzez rozpuszczenie 0,0665 g sirolimusu w 1 ml chlorku metylenu. Całość mieszano w szczelnie zamkniętej fiolce przez 1 godzinę z użyciem mieszadła magnetycznego. Otrzymano 2% (w/w) roztwór

roboczy kopolimeru w chlorku metylenu zawierający sirolimus, który naniesiono na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm. Roztwór naniesiono metodą zanurzeniową z wykorzystaniem urządzenia Dip Coater PTL-OV6P, MTI CORPORATION, przy szybkości zanurzania 1500 mm/min., czasie zanurzenia 1 s i 1 cyklu zanurzania. Pokryte roztworem stenty suszono przez 48 godzin na powietrzu w temperaturze 25°C, a następnie przez 72 godziny w warunkach podciśnienia 8–10,5 kPa. Uzyskano jednorodne pokrycie całej powierzchni stentu o średniej grubości warstwy 1,6 μm i gęstości pokrycia 120 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, o zawartości 20% sirolimusu w stosunku do poli(D,L-laktydo-ko-węglanu trimetylenu). W końcowym etapie stent z powłoką poddano sterylizacji z wykorzystaniem promieniowania jonizacyjnego.

Zbadano kinetykę uwalniania sirolimusu z powłoki w warunkach *in vitro*, w soli fizjologicznej w temperaturze 37°C, mierząc uwalniane dobowe dawki leku. Uzyskane wyniki przedstawiono na fig. 3. Badania wykazały, że sirolimus uwalnia się po 1 dniu w ilości 33,3%, po 3 dniach w ilości 47,3%, a po 7 dniach w 76,2%. Pozostała część leku uwalniała się równomiernie w okresie od 8 do 70 dni, w mniejszej ilości, przy czym po 70 dniach zaobserwowano prawie całkowite uwolnienie leku w ilości 97,6%.

Przykład 4

Odważono 0,133 g suchego kopolimeru poli(D,L-laktydo-ko-węglanu trimetylenu) otrzymanego w przykładzie 3 i rozpuszczono w 9 ml chlorku metylenu, po czym dodano uprzednio przygotowany roztwór sirolimusu otrzymany poprzez rozpuszczenie 0,0332 g sirolimusu w 1 ml chlorku metylenu. Całość mieszano w szczelnie zamkniętej fiolce przez 1 godzinę z użyciem mieszadła magnetycznego. Otrzymano 1% (w/w) roztwór roboczy kopolimeru w chlorku metylenu zawierający sirolimus, który naniesiono na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydo-ko-glikolidu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm. Roztwór naniesiono metodą zanurzeniową z wykorzystaniem urządzenia Dip Coater PTL-OV6P, MTI CORPORATION, przy szybkości zanurzania 1500 mm/min., czasie zanurzenia 1 s i 1 cyklu zanurzania. Pokryte roztworem stenty suszono przez 48 godzin na powietrzu w temperaturze 25°C, a następnie przez 72 godziny w warunkach podciśnienia 10,5 kPa. Uzyskano jednorodne pokrycie całej powierzchni stentu o średniej grubości warstwy 1,2 μm i gęstości pokrycia 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, o zawartości 20% sirolimusu w stosunku do poli(D,L-laktydo-ko-węglanu trimetylenu). W końcowym etapie stent z powłoką poddano sterylizacji z wykorzystaniem promieniowania jonizacyjnego.

Zbadano kinetykę uwalniania sirolimusu z powłoki w warunkach *in vitro*, w soli fizjologicznej w temperaturze 37°C, mierząc uwalniane dobowe dawki leku. Uzyskane wyniki przedstawiono na fig. 4. Badania wykazały, że sirolimus uwalnia się po 1 dniu w ilości 38,8 %, po 3 dniach w ilości 41,5%, a po 7 dniach w 66,9 %. Pozostała część leku uwalniała się równomiernie w okresie od 8 do 70 dni, w mniejszej ilości, przy czym po 70 dniach zaobserwowano prawie całkowite uwolnienie leku w ilości 98,4%.

Przykład 5

Odważono 0,266 g suchego kopolimeru poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetylenu) otrzymanego w przykładzie 1 i rozpuszczono w 9 ml chlorku metylenu, po czym dodano uprzednio przygotowany roztwór ewerolimusu otrzymany poprzez rozpuszczenie 0,0665 g ewerolimusu w 1 ml chlorku metylenu. Całość mieszano w szczelnie zamkniętej fiolce przez 1 godzinę z użyciem mieszadła magnetycznego. Otrzymano 2% (w/w) roztwór roboczy kopolimeru w chlorku metylenu zawierający ewerolimus, który naniesiono na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm. Roztwór naniesiono metodą zanurzeniową z wykorzystaniem urządzenia Dip Coater PTL-OV6P, MTI CORPORATION, przy szybkości zanurzania 1500 mm/min., czasie zanurzenia 1 s i 1 cyklu zanurzania. Pokryte roztworem stenty suszono przez 48 godzin na powietrzu w temperaturze 25°C, a następnie przez 72 godziny w warunkach podciśnienia 10,5 kPa. Uzyskano jednorodne pokrycie całej powierzchni stentu o średniej grubości warstwy 1,8 μm i gęstości pokrycia 170 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, o zawartości 20% sirolimusu w stosunku do poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetylenu). W końcowym etapie stent z powłoką poddano sterylizacji z wykorzystaniem promieniowania jonizacyjnego. Zbadano kinetykę uwalniania ewerolimusu z powłoki w warunkach *in vitro*, w soli fizjologicznej w temperaturze 37°C, mierząc uwalniane dobowe dawki leku. Uzyskane wyniki przedstawiono na fig. 5. Badania wykazały, że po 21 dniach uwolnione zostało 75% ewerolimusu, a po 91 dniach 83,2%.

Przykład 6

Najpierw wytworzono kopolimer w reakcji kopolimeryzacji z otwarciem pierścienia w stopie z 0,5 mola cyklicznego węglanu trimetylenu i 0,5 mola D,L-laktydu. Odmierzoną ilość komonomerów dodano do reaktora laboratoryjnego zaopatrzonego w mieszadło, króćce doprowadzające argon i podłączenie do membranowej pompy próżniowej. Zawartość stopiono w temperaturze 150°C, włączono mieszanie,

podłączono pompę próżniową i oddestylowywano możliwe zanieczyszczenia przez 20 min. Po tym czasie wyłączono pompę, wprowadzono argon a następnie dodano 0,001 mola chlorku cyrkonu (IV) $ZrCl_4$. Reakcję kopolimeryzacji prowadzono w zakresie temperatur od 110°C do 130°C przez 48 godzin pod lekkim nadciśnieniem argonu. Po tym czasie gorący produkt rozpuszczono w chloroformie i niezwłocznie wytrącono z zimnego metanolu. Otrzymany precypitat suszono do stałej masy w warunkach podciśnienia 8–12 kPa w temperaturze 45°C, otrzymując czysty poli(D,L-laktydo-ko-węglan trimetyleny) o zawartości 55% mol. laktydyłu z wydajnością 92% wagowych, o średniej liczbowo masie cząsteczkowej 65000 g/mol i średniej długości mikrobloków laktydylowych 1,8 jednostek laktydylowych.

Następnie odważono 0,133 g suchego poli(D,L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny) i rozpuszczono w 9 ml chlorku metylenu, po czym dodano uprzednio przygotowany roztwór sirolimusu otrzymany poprzez rozpuszczenie 0,0332 g sirolimusu w 1 ml chlorku metylenu. Całość mieszano w szczelnie zamkniętej fiolce przez 1 godzinę z użyciem mieszadła magnetycznego. Otrzymano 1% (w/w) roztwór roboczy kopolimeru w chlorku metylenu zawierający sirolimus, który naniesiono na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(tereftalanu butylu) o średnicy 4 mm i długości 20 mm. Roztwór naniesiono metodą zanurzeniową z wykorzystaniem urządzenia Dip Coater PTL-OV6P, MTI CORPORATION, przy szybkości zanurzania 400 mm/min., ilość cykli – 10, czas zanurzenia: pierwszy cykl 20 s, następne cykle 1 s, czas pomiędzy cyklami 20 s. Pokryte roztworem stenty suszono przez 48 godzin na powietrzu w temperaturze 25°C, a następnie przez 72 godziny w warunkach podciśnienia 10,5 kPa. Uzyskano jednorodne pokrycie całej powierzchni stentu o średniej grubości warstwy 2,6 pm i gęstości pokrycia 310 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, o zawartości 40% sirolimusu w stosunku do poli(D,L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny).

Przykład 7

Roztwór roboczy wytworzony w przykładzie 5 naniesiono na biodegradowalny polimerowy stent naczyniowy z poli(L-laktydu) o średnicy 4 mm i długości 30 mm. Roztwór naniesiono metodą zanurzeniową z wykorzystaniem urządzenia Dip Coater PTL-OV6P, MTI CORPORATION, przy szybkości zanurzania 1800 mm/min., czasie zanurzenia 2 s, stosując 3 identyczne cykle zanurzania, z zastosowaniem 4 minutowego czasu przerwy pomiędzy cyklami. Pokryte roztworem stenty suszono przez 48 godzin na powietrzu w temperaturze 25°C, a następnie przez 72 godziny w warunkach podciśnienia 10,5 kPa. Uzyskano jednorodne pokrycie całej powierzchni stentu o średniej grubości warstwy 2,5 μm i gęstości pokrycia około 290 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, o zawartości 20% sirolimusu w stosunku do poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania z układu kopolimer-inhibitor szlaku mTOR powłoki kontrolowanej kinetyce uwalniania inhibitora szlaku mTOR, zwłaszcza sirolimusu lub ewerolimusu, na polimerowych stentach naczyniowych, w którym to sposobie na powierzchnię stentu nanosi się roztwór roboczy, zawierający kopolimer będący produktem procesu kopolimeryzacji komonomerów: L-laktydu lub D,L-laktydu i węglanu trimetyleny, przebiegającego na drodze otwarcia pierścienia, w stopie, w obecności inicjatora kopolimeryzacji, którym są związki cyrkonu (IV), **znamienny tym**, że kopolimer stanowiący składnik roztworu roboczego otrzymuje się przez ciągłe mieszanie komonomerów w postaci węglanu trimetyleny i laktydu w stosunku molowym w zakresie 0,15–0,6 mola węglanu trimetyleny i 0,4–0,85 mola laktydu w temperaturze 110–200°C, korzystnie 120–150°C, przez 6–96 godzin stosując jako inicjator reakcji kopolimeryzacji acetyloacetonian cyrkonu i/lub chlorek cyrkonu i/lub alkohol cyrkonu o wzorze ogólnym $Zr(OR)_4$, w którym R oznacza grupy alkilowe o ogólnym wzorze C_nH_{2n+1} , przy zachowaniu stosunku molowego sumy użytych komonomerów do inicjatora kopolimeryzacji w zakresie od 300:1 do 1200:1, po czym z tak uzyskanego kopolimeru poli(laktydo-ko-węglan trimetyleny) o beładnej mikrostrukturze łańcucha i średniej długości mikrobloków laktydylowych niższych od wartości 3,5 jednostek oraz o zawartości molowej laktydyłu 10–90%, a korzystnie 75%, wytwarza się roztwór roboczy poprzez rozpuszczenie go w chlorku metylenu, oczyszcza i suszy w warunkach podciśnienia 8–12 kPa w temperaturze 20–60°C przez 48–80 godzin do uzyskania stałej masy, a następnie suchy kopolimer rozpuszcza się w chlorku metylenu, tak aby uzyskać roztwór o stężeniu 0,5–5,0 % wagowych, korzystnie 1–2% wagowych, dodaje do

niego uprzednio przygotowany roztwór inhibitora szlaku mTOR, którym jest sirolimus lub ewerolimus, w chlorku metylenu o stężeniu 1–13% wagowo–objętościowych i całość homogenizuje się, po czym roztwór roboczy zawierający poli(laktydo-ko-węglan trimetylenu) oraz inhibitor szlaku mTOR, którym jest sirolimus lub ewerolimus, w chlorku metylenu, nanosi się na polimerowy stent naczyniowy biostabilny lub biodegradowalny, w temperaturze 4–30°C, poprzez zanurzenie w nim stentu, przy ilości cykli 1– 50, z szybkością zanurzania 40–3000 mm/min, przez 0,1–30 s, a czas trwania zanurzenia/wynurzenia wynosi 0,2–50 s/cykl, po czym utworzoną powłokę o korzystnej grubości 0,8–5,0 μm , zawierającą po usunięciu rozpuszczalnika 5–40% wagowych zdyspergowanego w niej inhibitora szlaku mTOR, którym jest sirolimus lub ewerolimus, w stosunku do poli(laktydo-ko-węglan trimetylenu), a korzystnie 20–30% wagowych, suszy się, utwardza i na koniec sterylizuje, korzystnie z wykorzystaniem promieniowania jonizacyjnego.

2. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że naniesioną z roztworu roboczego na stent powłokę suszy się w temperaturze 25°C przez 48 godzin, a następnie w warunkach podciśnienia 8–12 kPa przez kolejne 72 godziny.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór roboczy nanosi się na polimerowy stent naczyniowy metodą zanurzeniową, z szybkością zanurzania 1000–3000 mm/min.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku nanoszenia roztworu roboczego na polimerowy stent naczyniowy wykonany z alifatycznych poliestrów, czas trwania zanurzenia wynosi 0,2–3 s/cykl, a najlepiej 1–3 s/cykl, przy ilości cykli 1–4 i odstępie między cyklami 5–10 minut.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku nanoszenia roztworu roboczego na polimerowy stent naczyniowy wykonany poli(tereftalanu etylenu), czas trwania zanurzenia/wynurzenia wynosi 5–30 s/cykl, a najlepiej 5–15 s/cykl, przy ilości cykli 5–30 i odstępie między cyklami 20 s–5 minut.

Rysunki

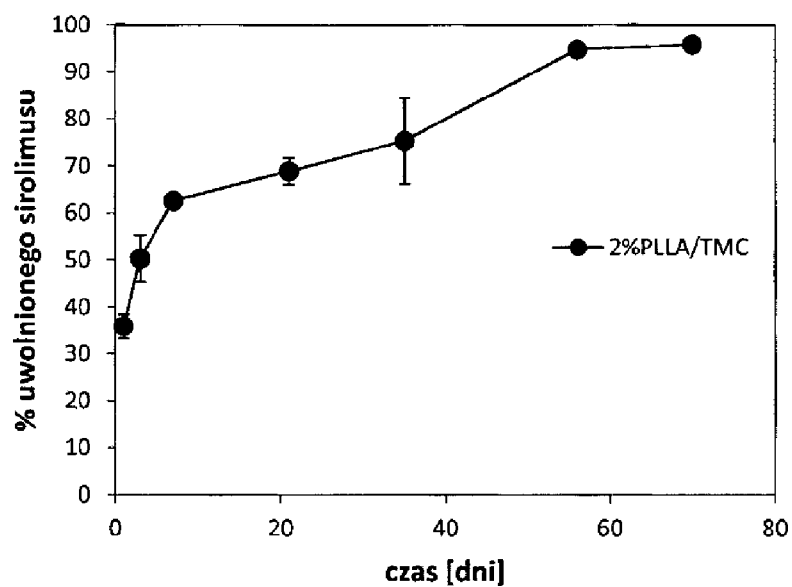


Fig.1

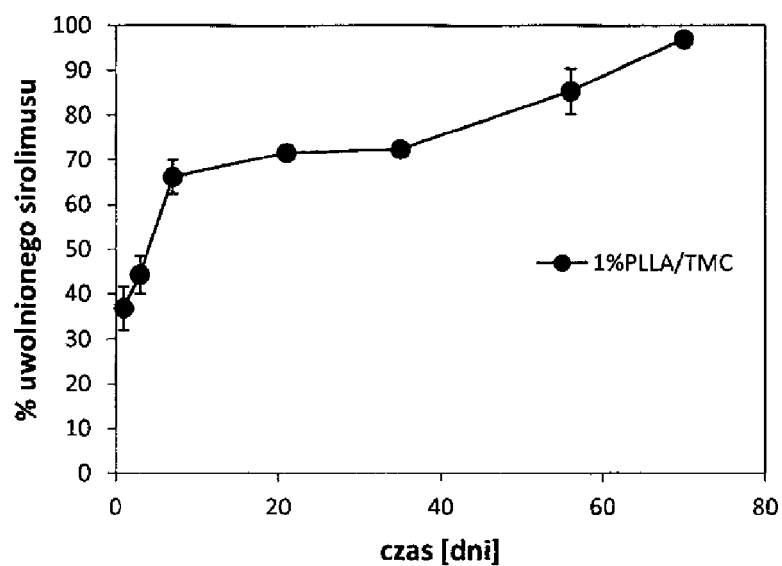


Fig.2

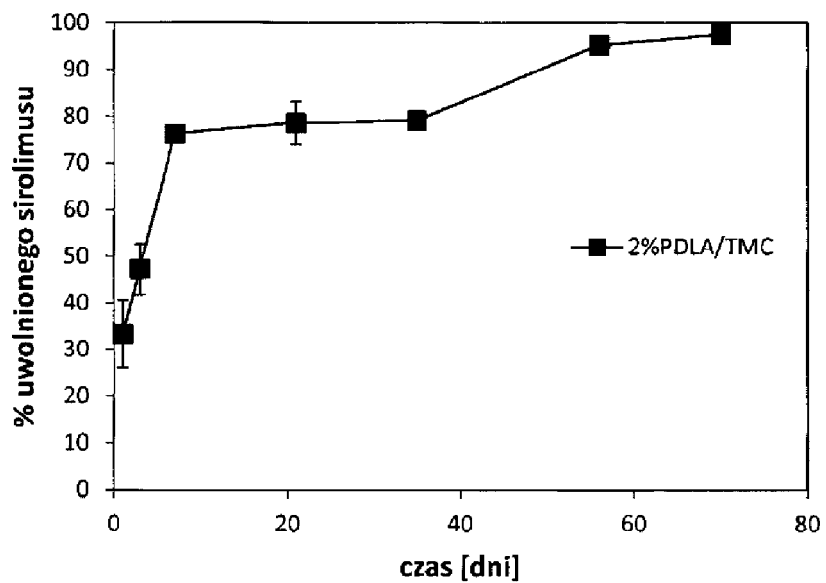


Fig. 3

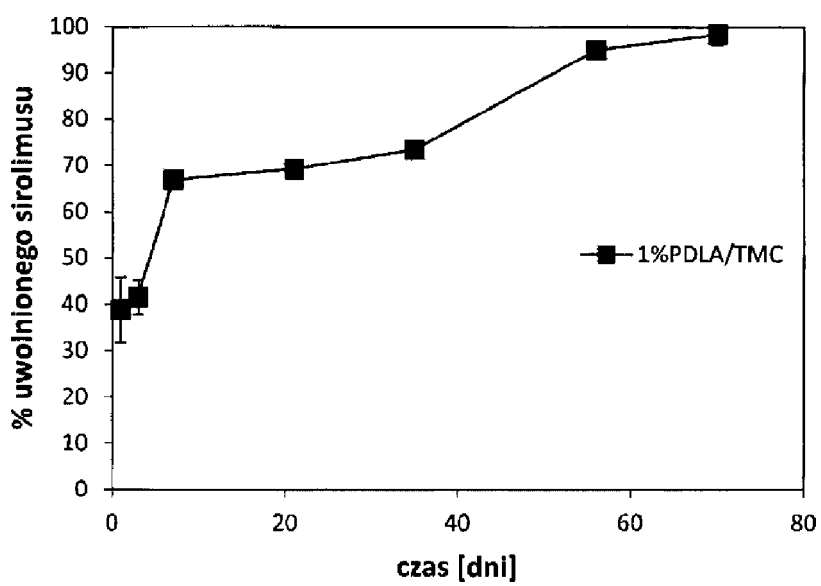


Fig. 4

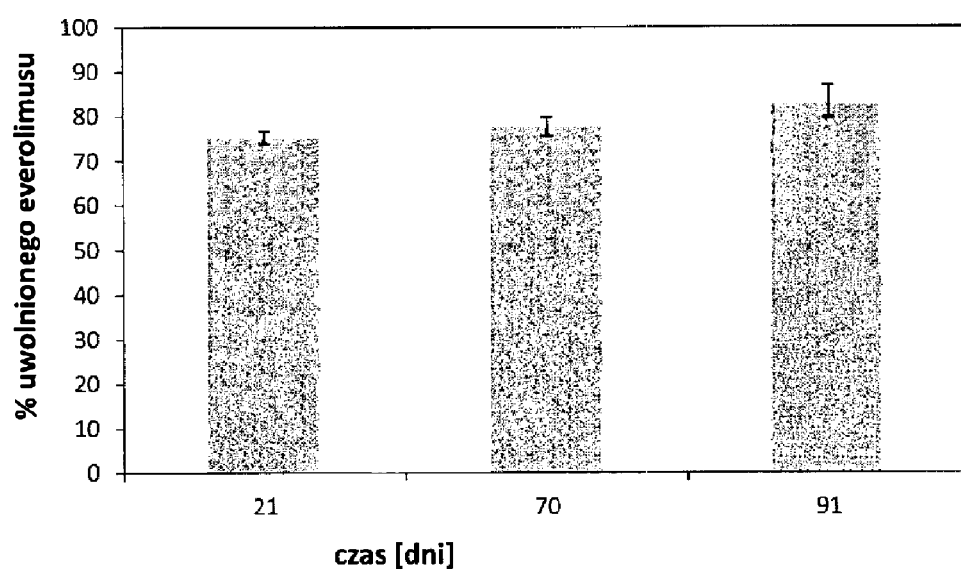


Fig. 5