

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245879 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438023**

(22) Data zgłoszenia: **2021.05.31**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.12.05 BUP 49/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.10.28 WUP 44/2024**

(51) MKP:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/60 (2017.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**ACELLMED SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Zabrze, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ALEKSANDER FRANCISZEK SIKORSKI,
Rogoź, PL
KAZIMIERZ KULICZKOWSKI, Wrocław, PL
ALEKSANDER CZOGALLA, Wilczyce, PL
ADAM KONKA, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Krystian Żygadło, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Ukierunkowana liposomowa postać kompleksu RNA-polietylenoimina, zastosowanie postaci kompleksu liposomowego oraz sposób otrzymywania

PL 245879 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest ukierunkowana liposomowa postać kompleksu RNA-polietylenoimina, jego sposób otrzymywania oraz zastosowanie w terapii ostrej białaczki szpikowej/ostrej białaczki mieloblastycznej.

Ostra białaczka szpikowa (OBS, *AML – Acute Myeloid Leukemia*) jest najczęstszą białaczką u dorosłych z częstością występowania 4,2/100 000 wg danych amerykańskich z lat 2007–2013. Zasadnicze leczenie nie zmieniło się od 40 lat. Przżycie pięcioletnie u młodszych <60 lat wynosi 40%, a u starszych 10–20%. W związku z tym poszukiwane są sposoby leczenia oparte m.in. na leczeniu precyzyjnym, tzn. ukierunkowanym na defekty komórki nowotworowej, które stwierdzone są w badaniach molekularnych. Dotyczy to korygowania nieprawidłowości w drogach sygnałowych i receptorach, zmian w epigenetyce oraz wpływu na immunologię nowotworu. Do tego nurtu epigenetycznego należą terapie oparte o niekodujące RNA. Badania na liniach komórkowych i komórkach pacjentów wykazały, że brak lub nadmiar tego typu cząsteczek może mieć wpływ na proliferację nowotworową.

W polskim opisie patentowym PAT.208054B1 ujawniono kompozycję lipidową do wytwarzania lipidowego nośnika dla leków genetycznych, zawierającą 38,7% wagowych fosfatydylocholino (PC), 15,4% wagowych distearoilofosfatydyloetanolaminowej pochodnej glikolu polietylenowego 2000 (sól amonowa) (DSPE-PEG), od 10,9% do 16,8% wagowych dioleilofosfatydyloetanolaminy (DOPE), od 4,05% do 6,75% wagowych 3 β -N-dimetyloetanokarbamoilo cholesterolu (DC-CHOL) i od 23,4% do 30,6% wagowych soli trimetyloamoniowej 1,2-dioleilopropanu (DOTAP), przy czym PC, DOPE i DC-CHOL stanowią zewnętrzną błonę nośnika, a DOTAP wchodzi w skład rdzenia nośnika zamkniętego w jego wnętrzu.

W innym polskim opisie patentowym PAT.233741B1 opisano kompozycję lipidową służącą do wytworzenia kierowanego za pomocą przeciwciał liposomowego nośnika leków genetycznych w postaci asODN, miRNA, charakteryzującą się tym, że zawiera od 35,2% do 42,5% wagowych fosfatydylocholino (PC), od 12,3% do 14,8% wagowych dioleilofosfatydyloetanolaminy (DOPE), od 4,9% do 5,9% wagowych 3-N-dimetyloetanokarbamoilocholesterolu (DC-CHOL), od 10,7% do 16,6% wagowych DSPE-PEG, od 4,6% do 6,2% wagowych maleimidowej pochodnej DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal), od 19,8% do 25,7% wagowych soli trimetyloaminowej 1,2-dioleilopropanu (DOTAP), 8 \pm 1,4 μ g przeciwciał antyCD20/mg lipidu oraz 9 μ g kwasów nukleinowych/mg lipidu. Kompozycja znajduje zastosowanie do wytwarzania liposomowego nośnika leków genetycznych do leczenia białaczki.

Z polskiego zgłoszenia patentowego P.407947 znana jest ukierunkowana, liposomowa postać kompleksu oligonukleotyd (DNA)-polietylenoimina charakteryzująca się tym, że stosunek oligonukleotydu do polietylenoimini zawiera się w przedziale od 1 : 10 do 1 : 3, a kompleks otoczony jest dwuwarstwą lipidową umożliwiającą przyłączenie cząsteczki rozpoznającej marker powierzchniowy komórek patologicznych oraz jej sposób otrzymywania i zastosowanie. Kompozycję stosuje się do wytwarzania leku do leczenia nowotworów układu krwionośnego.

Problemem stawianym przed niniejszym wynalazkiem jest zaproponowanie skutecznego systemu liposom – kwas nukleinowy – czynnik rozpoznający określoną komórkę (jej marker powierzchniowy), który mógłby efektywnie być stosowany w terapii nowotworów, zwłaszcza ostrej białaczki szpikowej / ostrej białaczki mieloblastycznej. Celem wynalazku jest opracowanie ukierunkowanej, liposomowej postaci RNA hamującej proliferację komórek nowotworowych charakteryzującej się selektywnością działania, niską nieswoistością cytotoksycznością oraz wysoką wydajnością dostarczania kwasów nukleinowych do komórek nowotworowych, który osobno lub w połączeniu ze standardowo stosowanymi cytostatykami znacząco poprawi efektywność leczenia.

Aby liposomy mogły zostać zastosowane w formulacji farmaceutycznej, muszą zachowywać stabilność podczas wielomiesięcznego przechowywania. Dlatego celem wynalazku jest uzyskanie postaci leku, która nie tylko chroni zamknięte kwasy nukleinowe przed działaniem enzymów obecnych w płynach biologicznych, ale zachowuje określone parametry fizykochemiczne podczas długoterminowego przechowywania. Nieoczekiwanie, wspomniane problemy rozwiązano w prezentowanym wynalazku.

Pierwszym przedmiotem wynalazku jest ukierunkowana liposomowa postać kompleksu RNA-polietylenoimina, zawierająca miRNA skompleksowane z polikationem polietylenoimini (PEI – Polyethylenimine) 1 : 3 do 1 : 10, zamknięte w otoczce liposomowej, zawierającej 74,65–79,65 mol% uwodornionej fosfatydylocholino sojowej (HSPC – *hydrogenated soy L- α -phosphatidylcholine*), 5 mol% dioleilofosfatydyloetanolaminy (DOPE – *dioleoylphosphatidylethanolamine*), 4,55 mol% distearoilofosfatydyloetano-

loaminowej pochodnej glikolu polietylenowego 2000 w postaci soli amonowej, (DSPE-PEG – 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]), 0,8 mol% maleimidowej pochodnej DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal), 10–15 mol% cholesterolu, przy czym liposomowa postać kompleksu charakteryzuje się niską polidispersyjnością $PI < 0,1$ i zawiera przyłączoną cząsteczkę rozpoznającą marker powierzchniowy komórek patologicznych, przy czym miRNA stanowi MicroRNA-193b oraz MicroRNA-203. Korzystnie średnica tak uzyskanych liposomów nie przekracza 150 nm, korzystniej wynosi ona 120 nm (± 20 nm) i korzystnie postać kompleksu charakteryzuje się niską polidispersyjnością $PI < 0,1$ miRNA (microRNA, MicroRNA) znane jest ze stanu techniki [microRNA-193b (Bhayadia R, et al., 2018, J. Clin. Onc. 36,1007) oraz MicroRNA-203 (Guo Y, et al., 2019 Bioengineered, 10:1, 345–352)]. W korzystnej realizacji wynalazku otoczka liposomowa zawiera 77,15 mol% uwodornionej fosfatydylocholinoj sojowej (HSPC), 5 mol% DOPE, 12,5 mol% cholesterolu, 4,55 mol% DSPE-PEG, 0,8 mol% maleimidowej pochodnej DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal). W innej korzystnej realizacji wynalazku stosunek RNA/PEI wynosi 1 : 5.

Cel liposomu wyznaczają antygeny CD33, CD34 oraz CD117 na komórkach blastycznych białaczki mieloblastycznej. W rozwiązaniu wg wynalazku otrzymuje się liposomy posiadające na swojej powierzchni korzystnie aptamery, cząsteczki oligodezoksynukleotydów, wiążące swoiście wskazane powyżej antygeny CD33, CD34 lub CD117. Sekwencje odpowiednich aptamerów są znane ze stanu techniki, gdzie:

- dla CD33 sekwencja AGT CTT TTC CGA CCC ATC TTA AAA CGGT [Yang C. and Naranman-dura H, *Biomater. Sci.*, 2019, 7, 938]),
- dla CD34 (5'-CTT TAA TGC GGG GTA ATT TCT TTT CCA TAA TCG C-3') [Deng J, *Materials Science and Engineering C* 79 (2017) 305–314],
- dla CD117 (c-kit) 5'GGGG CCGG GGCA AGGG GGGG GTAC CGTG GTAG GAC3' [Zhao N, et al. *Biomaterials*. 2015; 67: 42–51].

Powyższe aptamery syntetyzowane są w postaci zmodyfikowanej na końcu 3' poprzez dodanie grupy tiolowej umożliwiającej wiązanie z maleimidową pochodną DSPE-PEG.

Drugim przedmiotem wynalazku jest zastosowanie ukierunkowanej, liposomowej postaci kompleksu RNA-polietylenoimina, określonej w pierwszym przedmiocie wynalazku, do zastosowania w leczeniu ostrej białaczki szpikowej / ostrej białaczki mieloblastycznej.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania liposomowej ukierunkowanej postaci kompleksu RNA/PEI, obejmujący:

- a) mieszanie RNA z polietylenoiminą w stosunku od 1 : 4 do 1 : 7,
- b) kompleksowanie mieszaniny RNA z PEI, korzystnie poprzez inkubację przez 30–60 min w temperaturze pokojowej 4–7 części molowych PEI (N) w wodzie o przewodności nie większej niż 0,06 $\mu\text{S}/\text{cm}$ z 1 częścią molową (P) RNA, również w wodzie o przewodności nie większej niż 0,06 $\mu\text{S}/\text{cm}$, uzupełniając mieszaninę 0,1 objętości 10-krotnie stężonego PBS,
- c) odparowywanie mieszaniny chloroformowych roztworów lipidów wchodzących w skład otoczki do uzyskania suchego filmu lipidowego,
- d) usuwanie pozostałości rozpuszczalników organicznych, korzystnie w wyparce próżniowej,
- e) uwadnianie się suchego filmu lipidowego z etapu d) mieszaniną, korzystnie RNA/PEI otrzymaną w etapie b), korzystnie przez 40 minut,
- f) kalibrowanie uzyskanych w etapie e) liposomów, korzystnie w ekstruderze ciśnieniowym, stosując filtry poliwęglowe.

W korzystnej realizacji wynalazku w etapie f) stosuje się kolejno filtry 400 nm, 200 nm i 100 nm.

W następnej korzystnej realizacji wynalazku filtrację w etapie f) powtarza się dziesięciokrotnie.

W kolejnej korzystnej realizacji wynalazku w etapie d) odparowuje się mieszaninę roztworów chloroformowych zawierających: 74,65–79,65 mol% uwodornionej fosfatydylocholinoj sojowej (HSPC – *hydrogenated soy L- α -phosphatidylcholine*), 5 mol% dioleilofosfatydyloetanolaminy (DOPE – *dioleoylphosphatidylethanolamine*), 4,55 mol% distearoilofosfatydylo etanolaminowej pochodnej glikolu polietylenowego 2000 (sól amonowa) (DSPE-PEG – 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]), 0,8 mol% maleimidowej pochodnej DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal), 10–15 mol% cholesterolu.

W jeszcze innej korzystnej realizacji wynalazku mieszanina roztworów chloroformowych zawiera: 77,15 mol% uwodornionej fosfatydylocholinoj sojowej (HSPC), 5 mol% DOPE, 12,5 mol% cholesterolu, 4,55 mol% DSPE-PEG, 0,8 mol% maleimidowej pochodnej DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal).

Proponowany według niniejszego wynalazku, kierowany za pomocą aptamerów preparat charakteryzuje się korzystnym stosunkiem lipid/lek, który umożliwi przenoszenie inhibitorowych cząsteczek RNA do komórek docelowych, działając przeciwnowotworowo i/lub uwrażliwiając komórki nowotworowe na leki o charakterze cytostatycznym. Dodatkowo, odpowiednio „szczelna” otoczka lipidowa stanowi ochronę miRNA przed działaniem rybonukleaz. Możliwe jest zamykanie w liposomach różnych cząsteczek RNA, a także przyłączanie różnych cząstek kierujących do otoczki liposomowej. Wynalazek odznacza się wysoką selektywnością i cytotoksycznością względem komórek docelowych, potwierdzonymi badaniami *in vitro* i *in vivo*, przez co minimalizuje efekty uboczne terapii cytostatykami. Ponadto, przedstawiony preparat liposomowy podawany w drodze iniekcji dożylnych powinna cechować wysoka stabilność zarówno podczas wielomiesięcznego przechowywania, jak i w kontakcie z surowicą ludzką, co czyni go kandydatem do stanowienia obiecującej, odpowiedniej formulacji farmaceutycznej.

Rozwiązanie zapewnia potencjał bezpiecznego stosowania tej grupy leków w leczeniu nowotworów w formie indywidualnej monoterapii lub w połączeniu ze stosowanymi powszechnie cytostatykami lub inhibitorami BCL-2 (np. Venetoclax), a zatem może poprawić efektywność leczenia nowotworów.

Przykład

Kompleks liposomów otrzymuje się jak poniżej:

- a) RNA miesza się z polietylenoiminą (PEI – Polyethyleneimine) w stosunku 1 : 5, gdzie poprzez stosunek RNA/PEI rozumie się ilość moli fosforu (P) w kwasie nukleinowym do moli azotu (N) w polietylenoiminie,
- b) mieszaninę RNA z PEI kompleksuje się, poprzez inkubację przez 30–60 min w temperaturze pokojowej 5 części molowych PEI (N) w wodzie miliQ (j.w. 0,06 $\mu\text{S}/\text{cm}$) z 1 częścią molową (P) RNA również w wodzie klasy miliQ, po czym uzupełnia się mieszaninę 1/10 projektowanej objętości końcowej preparatu 10-krotnie stężonego PBS (*phosphate-buffered saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna, tu 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4),
- c) mieszaninę chloroformowych roztworów lipidów, wchodzących w skład otoczki, o zawartości odpowiednio: 77,15 mol% uwodornionej fosfatydylocholiny sojowej (HSPC), 5 mol% DOPE, 12,5 mol% cholesterolu, 4,55 mol% DSPE-PEG, 0,8 mol% maleimidowej pochodnej DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal), odparowuje się do uzyskania suchego filmu lipidowego, po czym usuwa się pozostałości rozpuszczalników organicznych w wyparce próżniowej,
- d) uwadnia się suchy film lipidowy z etapu c) mieszaniną, RNA/PEI otrzymaną w etapie b), przez przynajmniej 40 minut,
- e) uzyskane w etapie d) liposomy kalibruje się, w ekstruderze ciśnieniowym, stosując filtry poliwęglanowe o średnicy porów 400, 200 oraz 100 nm kolejno (Nucleopore, WHATMAN), przy czym zawiesinę przeciska się dziesięciokrotnie przez każdy filtr,
- f) uzyskane liposomy o średnicy ok. 100 nm (80–150 nm) inkubuje się przez noc z roztworem tiolowanego aptameru, wiążącego swoiście antygeny CD33, CD34 lub CD117, w dwukrotnym nadmiarze molowym aptameru w stosunku do maleimidowej pochodnej DSPE-PEG,
- g) niezwiązany aptamer usuwa się poprzez chromatografię na kolumnie wypełnionej żelom Sepharose 6B (1 x 25 cm dla małych objętości) lub dializuje z zastosowaniem worków dializacyjnych o dużych porach (MWCO >30 kDa),
- h) uzyskany preparat liposomowy o średnicy 120 (+20 nm) charakteryzuje się niewielką polidispersyjnością (współczynnik PI <0,1).

Wielkość otrzymanych pęcherzyków mierzy się techniką dynamicznego rozpraszania światła przy użyciu aparatu ZetaSizer, firmy Malvern Ltd., UK.

Celem uzyskania kompleksu liposomów wg wynalazku stosowano maleimidową pochodną DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal). Reszta maleimidowa umożliwia kowalencyjne przyłączenie grup tiolowych białka, tworząc wiązanie tioeterowe charakteryzujące się dużą trwałością. Grupy tiolowe w przyłączanych aptamerach projektuje się na etapie ich syntezy.

Zastrzeżenia patentowe

1. Ukierunkowana liposomowa postać kompleksu RNA-polietylenoimina, zawierająca miRNA skompleksowane z polikationem polietylenoiminy (PEI – *polyethyleneimine*) w stosunku 1 : 4 do 1 : 7, zamknięte w otoczce liposomowej, zawierającej 74,65–79,65 mol% uwodornionej

- fosfatydylocholiny sojowej (HSPC – hydrogenated soy *L- α -phosphatidylcholine*), 5 mol% dioleilofosfatydyloetanolaminy (DOPE – *dioleoylphosphatidylethanolamine*), 4,55 mol% distearoilofosfatydyloetanolaminowej pochodnej glikolu polietylenowego 2000 w postaci soli amonowej, (DSPE-PEG – *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]*), 0,8 mol% maleimidowej pochodnej DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal), 10–15 mol% cholesterolu, przy czym liposomowa postać kompleksu charakteryzuje się niską polidispersyjnością $PI < 0,1$ i zawiera przyłączoną cząsteczkę rozpoznającą marker powierzchniowy komórek patologicznych, przy czym miRNA stanowi MicroRNA-193b oraz MicroRNA-203.
2. Ukierunkowana liposomowa postać kompleksu RNA-polietylenoimina wg zastrz. 1, **znamienna tym**, że średnica tak uzyskanych liposomów nie przekracza 150 nm, korzystniej wynosi ona 120 nm (± 20 nm).
 3. Ukierunkowana liposomowa postać kompleksu RNA-polietylenoimina wg zastrz. 1, **znamienna tym**, że otoczka liposomowa zawiera 77,15 mol% uwodornionej fosfatydylocholiny sojowej (HSPC), 5 mol% DOPE, 12,5 mol% cholesterolu, 4,55 mol% DSPE-PEG, 0,8 mol% maleimidowej pochodnej DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal).
 4. Ukierunkowana liposomowa postać kompleksu RNA-polietylenoimina wg zastrz. 1, **znamienna tym**, że cząsteczkę rozpoznającą marker powierzchniowy komórek patologicznych stanowią aptamery wiążące swoiście antygeny CD33, CD34 lub CD117.
 5. Ukierunkowana liposomowa postać kompleksu RNA-polietylenoimina wg zastrz. 1, **znamienna tym**, że stosunek RNA/PEI wynosi 1 : 5.
 6. Ukierunkowana liposomowa postać kompleksu RNA-polietylenoimina, określona w zastrz. 1, do zastosowania w leczeniu ostrej białaczki szpikowej / ostrej białaczki mieloblastycznej.
 7. Sposób otrzymywania liposomowej ukierunkowanej postaci kompleksu RNA/PEI, określonej w zastrz. 1, obejmujący:
 - a) mieszanie RNA z polietylenoiminą w stosunku molowym od 1 : 4 do 1 : 7 ,
 - b) kompleksowanie mieszaniny RNA z PEI, korzystnie poprzez inkubację przez 30–60 min w temperaturze pokojowej 4–7 części molowych PEI (N) w wodzie o przewodności nie większej niż 0,06 $\mu\text{S}/\text{cm}$ z 1 częścią molową (P) RNA, również w wodzie o przewodności nie większej niż 0,06 $\mu\text{S}/\text{cm}$, uzupełniając mieszaninę 0,1 objętości 10-krotnie stężonego PBS,
 - c) odparowywanie mieszaniny chloroformowych roztworów lipidów wchodzących w skład otoczki do uzyskania suchego filmu lipidowego,
 - d) usuwanie pozostałości rozpuszczalników organicznych, korzystnie w wyparce próżniowej,
 - e) uwadnianie się suchego filmu lipidowego z etapu d) mieszaniną, korzystnie RNA/PEI utrzymaną w etapie b), korzystniej przez 40 minut,
 - f) kalibrowanie uzyskanych w etapie e) liposomów, korzystnie w ekstruderze.
 8. Sposób wg zastrz. 7, **znamienny tym**, że w etapie f) stosuje się kolejno filtry 400 nm, 200 nm i 100 nm.
 9. Sposób wg zastrz. 7, **znamienny tym**, że w etapie a) RNA miesza się z PEI w stosunku 1 : 5.
 10. Sposób wg zastrz. 7, **znamienny tym**, że filtrację w etapie f) powtarza się dziesięciokrotnie.
 11. Sposób wg zastrz. 7, **znamienny tym**, że w etapie d) odparowuje się mieszaninę roztworów chloroformowych zawierających: 74,65–79,65 mol% uwodornionej fosfatydylocholiny sojowej (HSPC – *hydrogenated soy L- α -phosphatidylcholine*), 5 mol% dioleilofosfatydyloetanolaminy (DOPE – *dioleoylphosphatidylethanolamine*), 4,55 mol% distearoilofosfatydyloetanolaminowej pochodnej glikolu polietylenowego 2000 (sól amonowa) (DSPE-PEG – *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]*), 0,8 mol% maleimidowej pochodnej DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal), 10–15 mol% cholesterolu.
 12. Sposób wg zastrz. 11, **znamienny tym**, że mieszanina roztworów chloroformowych zawiera: 77,15 mol% uwodornionej fosfatydylocholiny sojowej (HSPC), 5 mol% DOPE, 12,5 mol% cholesterolu, 4,55 mol% DSPE-PEG, 0,8 mol% maleimidowej pochodnej DSPE-PEG (DSPE-PEG-Mal).