

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239642**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426662**

(22) Data zgłoszenia: **16.08.2018**

(51) Int.Cl.
A61K 47/59 (2017.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54)

Kompozycja do doszklistkowego podawania białka leczniczego

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

24.02.2020 BUP 05/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

20.12.2021 WUP 38/21

(73) Uprawniony z patentu:

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE, Szczecin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

BOGUSŁAW MACHALIŃSKI, Szczecin, PL
MARIA DĄBKOWSKA, Szczecin, PL
DOROTA ROGIŃSKA, Szczecin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Witek

PL 239642 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy kompozycji do doszkliskowego podawania białka leczniczego, służącej leczeniu i zapobieganiu neurodegeneracyjnym chorobom siatkówki oka.

Choroby degeneracyjne siatkówki stanowią ważny problem kliniczny. Zwyródnienie siatkówki występuje u około 25 milionów ludzi na świecie. Szacuje się, że w 2020 roku odsetek osób niewidomych z powodu chorób degeneracyjnych siatkówki w populacji europejskiej wyniesie 19,1%.

Choroby te mają charakter progresywny: w ciągu kilku lat od momentu rozpoznania prowadzą do postępującej ślepoty i trwałego inwalidztwa. Zaawansowany wiek jest podstawowym czynnikiem ryzyka rozwoju wielu degeneracyjnych schorzeń siatkówki prowadzących do upośledzenia widzenia oraz ślepoty, takich jak jaskra, zwyródnienie barwnikowe siatkówki oraz zwyródnienie plamki związane z wiekiem (ang. *age-related macular degeneration*; AMD) [Xu H, Chen M, Forrester JV: Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res* 2009, 28(5): 348–68, Hims MM Ophthalmology 2003, 37: 109–125].

Są to schorzenia, uwarunkowane wieloma czynnikami, w tym środowiskowymi i genetycznymi, obecnie nieuleczalne ze względu na brak terapii przyczynowej [Ophthalmology. 2009; 116:57–65]. Zmiany funkcjonalne siatkówki tj. obniżenie ostrości widzenia, czułości kontrastowej, percepcji koloru, opóźnienie adaptacji do warunków nocnych [Jackson GR, Owsley C: Scotopic sensitivity during adulthood. *Vision Res* 2000, 40(18): 2467–73. Owsley C: Aging and Vision. *Vision Res* 2011, 51(13): 1610–22] są wynikiem nagromadzenia zaburzeń na poziomie molekularnym, obejmujących warstwę komórek nerwowych, nabłonka barwnikowego oraz błonę Brucha siatkówki oka.

Pomimo dużego postępu w obszarze leczenia chorób neurodegeneracyjnych dotychczas nie opracowano skutecznych terapii mających na celu zahamowanie procesów neurodegeneracyjnych i indukcję mechanizmów naprawczych w uszkodzonej siatkówce oka. Uważa się, że wpływ na degenerację siatkówki ma szereg czynników takich jak: spadek produkcji czynników neurotroficznych, wzrost stresu oksydacyjnego czy zmiany zachodzące w komórkach siatkówki pod wpływem stresu metabolicznego powodujące stany zapalne [LaVail, M.M. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 11249–11253, Paskowitz, D.M. *IOVS* 2007, 48, 430–437, Machalińska *Retina IOVS* 2013, 54, 13, 8292]. Mimo licznych doniesień dotyczących ochronnej roli neurotrofin na siatkówkę oka [Progress in retinal and Eye Research 29(2010) 443–465, Drug Discovery Today, 13, 3/4, p. 144; Macromolecular Biosci. 2012, 12, 608–620; Drug development and industrial pharmacy, 2013, 39(11): 1599–1617] do chwili obecnej nie został dokładnie zbadany długotrwały wpływ Neurotrofyny 4 (NT-4) na biologię siatkówki oka.

Pomimo wielu perspektywicznych zastosowań niskocząsteczkowych białek, takich jak neurotrofina-4, rozwój efektywnych technologii umożliwiających terapię celowaną obejmującą transport powyższego białka na biokompatybilnym nośniku, a następnie jego uwolnienie w określonym miejscu organizmu, nie został w dostatecznym stopniu określony. Jest to głównie spowodowane niedostateczną znajomością podstaw fizykochemicznych kontrolujących proces transportu i adsorpcji układu nośnik-białko i brakiem podejścia interdyscyplinarnego zespołów badawczych zajmujących się badaniami naukowymi dotyczącymi aspektów kinetycznych procesów adsorpcji/desorpcji białek na/z potencjalnie biokompatybilnych nośnikach w warunkach kiedy poddawane są one intensywnym siłom ściskania jakie występują w warunkach *in vivo*. Ponadto brak jest doniesień naukowych dotyczących tworzenia, w zdefiniowanych warunkach transportu dyfuzyjnego, biokompatybilnych stabilnych warstewek z zaadsorbowanymi białkami, o różnych ładunkach powierzchniowych i konformacji zaadsorbowanych makromolekuł, na powierzchniach o różnym stopniu szorstkości.

Dendrymery są to duże, trójwymiarowe, symetryczne polimery organiczne uzyskiwane w wyniku cyklicznego powtarzania serii reakcji polimeryzacji (określanej często jako polimeryzacja kaskadowa) wokół cząsteczki rdzeniowej prowadzących do dodawania kolejnych warstw do cząsteczki polimeru o kulistym kształcie. Dendrymery typu PAMAM (czyli poliamidoaminowe) uzyskiwane poprzez dobudowywanie do pojedynczej cząsteczki rdzeniowej (najczęściej NH_3 lub etylenodiamina) kolejnych warstw jednostek $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ otrzymywanych z sekwencyjnego przyłączania akrylanu metylu i etylenodiaminy, zostały odkryte i opisane przez Tomalia D.A. i wsp. (Tomalia D.A. i wsp. „Starburst Cascade Polymers: Molecular Level Control of Size, shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29:138 (1990)). W stanie techniki znane są również liczne sposoby ich otrzymywania (patrz: PCT/US83/02052, oraz patenty USA o numerach: 4 507 466, 4 558 120, 4 568 737, 4 587 329, 4 631 337, 4 694 064, 4 713 975, 4 737 550, 4 871 779 i 4 857 599). Kontrolowane i prowadzone etapowo warstwowe rozbudowywanie takiej struk-

tury prowadzi do otrzymywania kolejnych generacji polimerów o precyzyjnie określonych rozmiarach, masach cząsteczkowych oraz liczbie znajdującej się na ich powierzchni grup funkcyjnych (w szczególności reszt aminowych) decydujących o kationowym charakterze cząsteczki polimeru.

Przyłączenie sześciu warstw jednostek $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ do rdzeniowej cząsteczki etylenodiaminy prowadzi do uzyskania polimeru szóstej generacji dendrymeru PAMAM G 6.0 (numer CAS 163442-69-1) o masie cząsteczkowej 58046 11 a.j.m. i 256 powierzchniowych grupach aminowych. Związek ten jest dostępny komercyjnie od lat 90.

Celem wynalazku jest dostarczenie substancji i postaci leków nadających się do doszkliskowego podawania leków okulistycznych, zwłaszcza przeznaczonych do leczenia lub zapobiegania chorobom neurodegeneracyjnym siatkówki oka.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja do doszkliskowego podawania białka leczniczego, znamienna tym, że zawiera białko lecznicze oraz poliamidoaminowy polikation dendrymeryczny połączony elektrostatycznie z tym białkiem leczniczym, przy czym białkiem leczniczym jest neurotrofina-4 (NT-4), a poliamidoaminowym polikationem dendrymerycznym jest dendrymer PAMAM, korzystnie PAMAM G 6.0.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kompleks elektrostatyczny składający się z poliamidoaminowego polikationu dendrymerycznego PAMAM, korzystnie PAMAM G 6.0, oraz neurotrofyny-4 (NT-4).

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kompleks elektrostatyczny określony powyżej do stosowania w medycynie, korzystnie do stosowania w profilaktyce lub leczeniu chorób oczu.

Korzystnie, kompleks elektrostatyczny do zastosowania według wynalazku charakteryzuje się tym, że chorobą oka jest choroba degeneracyjna siatkówki oka, zwłaszcza wybrana z grupy obejmującej: zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, zanik girlandowaty, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki oraz jaskrę.

Korzystnie, kompleks elektrostatyczny do stosowania według wynalazku charakteryzuje się tym, że jest on stosowany w leku przeznaczonym do podawania doszkliskowego neurotrofyny-4, zwłaszcza w postaci leku o spowolnionym uwalnianiu neurotrofyny-4.

Szczegółowy opis wynalazku

Zgodnie z wynalazkiem uzyskano uniwersalny bionośnik w skali nanometrycznej, przeznaczony do zastosowań medycznych, zwłaszcza do indukowania regeneracji siatkówki (poprawa jej funkcjonowania), korzystnie w chorobach neurodegeneracyjnych. Do wytworzenia bionośnika służącego do transportu i kontrolowanego uwalniania czynników neurotroficzych, tj. neurotrofyny 4, po ich podaniu doszkliskowym zastosowano komercyjnie dostępne rozgałęzione polielektrolity, dendrymery poliamidoaminowe szóstej generacji (6G). Wyznaczono siłę wiązania czynnik troficzy-nośnik, co umożliwiło opracowanie systemu lokalnego, długotrwałego i nieprzerwanego uwalniania białka w ciągu 60 dni. W modelu mysim *in vivo*, wykazano, że zaproponowane zgodnie z wynalazkiem formy nanostruktur są odpowiednie do korzystnego dotkankowego dostarczania farmakologicznie aktywnych związków biologicznych, które wykazują wpływ na funkcje uszkodzonej siatkówki na poziomie komórkowym i cząsteczkowym, w tym na jej właściwości pro-regeneracyjne i anty-degeneracyjne.

Utworzony kompleks elektrostatyczny neurotrofina 4-dendrymer PAMAM 6G przetestowano w zaburzeniach funkcji siatkówki oka w modelu selektywnego, ostrego uszkodzenia nabłonka barwnikowego oraz jego roli w mechanizmie „pouszkodzeniowej” neuroregeneracji siatkówki oka. Przeprowadzono szczegółową ocenę kinetyki zmian funkcjonalnych i morfologicznych w obrębie uszkodzonej siatkówki oka u myszy poprzez podanie kompleksu białko NT-4-dendrymer PAMAM do środowiska siatkówki oka. Następnie dokonano oceny procesu regeneracji siatkówki myszy po indukcji uszkodzenia obejmującego selektywnie nabłonek barwnikowy (RPE) siatkówki oka.

W pierwszym etapie dokonano indukcji selektywnego uszkodzenia nabłonka barwnikowego siatkówki oka myszy za pomocą jodanu sodu (NaIO_3), według ustalonego protokołu. Następnie, podano doszkliskowo kompleks elektrostatyczny białko-dendrymer i przeprowadzono szczegółową analizę kinetyki zmian siatkówki oka zwierząt. Badane parametry obejmowały przyżyciową ocenę funkcjonalną (ERG, elektretinografia) oraz morfologiczną (OCT-SD, optyczna koherentna tomografia w domenie spektralnej) w wybranych 3 punktach czasowych – przed oraz w 7., 14. i 28. dobie od podania czynnika uszkadzającego (6 myszy każdej płci na punkt czasowy). W tych samych punktach czasowych, w pozyskanych preparatach siatkówki, zbadano kinetykę zmian siatkówkowej ekspresji czynnika neurotroficznego NT-4 na poziomie białka, co korelowało ze zmianami funkcjonalnymi siatkówki i endogenną odpowiedzią regeneracyjną pochodzącą z części nerwowej siatkówki. Zastosowane metody badawcze pozwoliły dokładniej określić efekt terapeutyczny zastosowanego układu białko-nośnik.

Przeprowadzone prace doświadczalne w modelu *in vitro* i *in vivo* pozwoliły na:

- uzyskanie stabilnego kompleksu elektrostatycznego białko NT-4-dendrymer PAMAM 6G umożliwiającego kontrolowaną w sposób ilościowy ciągłą desorpcję neurotrofin w obrębie szklistki i ich dyfuzję do komórek znajdujących się w nabłonku barwnikowym siatkówki w okresie 28 dni,
- określenie zakresów stężeń zaadsorbowanych białek oraz wpływu stężenia powierzchniowego biokompatybilnej warstwy neurotrofin na siatkówkę mysiego oka,
- wyznaczenie siły wiązania białko-dendrymer przez przeprowadzenie pomiarów desorpcji białek zarówno w roztworze buforu fosforanowego jak i układzie żelowym jakim jest szklistka oka mysiego; przeprowadzone pomiary umożliwiły wyznaczenie stałych równowagi dla wiązania białko-dendrymer oraz określiły szybkości dyfuzji neurotrofin ze szklistki do siatkówki,
- scharakteryzowanie stabilności utworzonych biokompatybilnych warstwek neurotrofin.

P r z y k ł a d 1. Otrzymywanie kompleksów elektrostatycznych składających się z PAMAM G 6.0 oraz neurotrofiny-4 (NT-4).

Roztwory NT-4

Sporządzanie roztworów neurotrofiny-4

Do uzyskania bionanośników dendrymer-neurotrofina 4 wykorzystano komercyjnie zakupione białko NT-4 (recombinant human neurotrophin 4, CF, zakupiona w firmie R&D Systems o nr katalogowym 268-N4-250ug/CF). Roztwory białka o stężeniu 500 mg/L uzyskiwano przez rozpuszczenie NT-4 w buforze fosforanowym następnie roztwór filtrowano używając filtrów (centrifree ultrafiltration device, Merck Millipore, nr kat 4104). Aby zminimalizować błędy w określaniu dokładnego stężenia przygotowywanych w PBSie roztworów neurotrofiny-4 przed rozcieńczeniem określano ich wartości dwiema komplementarnymi technikami spektrofotometrycznymi: metodą BCA (abcam, AB207002) i pomiarem absorbancji przy długości fali 280 nm. Przed każdym eksperymentem rozcieńczano wyjściowy roztwór neurotrofiny-4 do wartości 5–100 mg/L. Wszystkie roztwory białka NT-4 były przygotowywane w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej bez jonów wapnia i magnezu (płyn PBS) o osmomolarności 270–300 mOsmol/L i pH 7,4 +/- 0,2 (firma Biomed Lublin).

Skład płynu PBS: chlorek sodu NaCl 8 g/L, chlorek potasu KCl 0,2 g/L, wodorofosforan disodowy $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ 2,9 g/L; difosforan potasu KH_2PO_4 0,2 g/L.

Badanie roztworów neurotrofiny-4

Określenie parametrów fizykochemicznych białek tj. współczynnik dyfuzji, średnic cząstek, ruchliwości mikroelektroforetycznej i potencjału zeta białek w roztworach jest istotne do oceny odwracalności adsorpcji lub jej braku z powierzchni polimerów PAMAM i ma kluczowe znaczenie w tworzeniu efektywnego leku Neurotrofina-4 – PAMAM. Współczynnik dyfuzji jak i wielkość NT-4 były określone w roztworze metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS/dynamic light scattering) używając aparatu Zetasizer Nano ZS (Malvern). Przeprowadzono charakterystykę fizykochemiczną molekuł NT-4 w roztworach PBSu o sile jonowej 0,15 M dla dwóch wartości pH 3,5 i 7,4. W czasie 33 dni sprawdzono zmiany współczynników dyfuzji NT-4 (temp. 293 K) jak również średnicę hydrodynamiczną w roztworze PBSu.

Na Fig. 1 przedstawiono stabilność białka NT-4 jako zależność współczynnika dyfuzji (część a)/średnicy hydrodynamicznej (część b) w czasie. Punkty oznaczają wartości eksperymentalne z pomiarów DLS dla 200 $\mu\text{g/mL}$ NT-4, 0,15 M PBS: (●) pH 7,4 and (○) pH 3,5. Część C przedstawia histogram z rozkładem średnicy hydrodynamicznej molekuł NT-4 w roztworze 0,15 M PBS o pH=7,4. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe liczone z 6 pomiarów.

Na Fig. 2 przedstawiona została średnica hydrodynamiczna białka NT-4 określona metodą DLS w funkcji zmiany pH. Punkty oznaczają eksperymentalne wyniki uzyskane metodą dynamicznego rozpraszania światła dla roztworów NT-4 o stężeniu 200 $\mu\text{g/mL}$, 0,15 M PBS: (●, ○) po ultrafiltracji, i (▲) bez ultrafiltracji.

Ponadto sprawdzono wielkość molekuł NT-4 zaadsorbowanych na powierzchni miki mikroskopem sił atomowych NanoWizard AFM (JPK Instruments AG). Mikę zanurzono w roztworze NT-4 w PBSie, o stężeniu 1 mg/L, czas adsorpcji to 1 minuta, następnie obficie przepłukano wodą ultraczystą przez 1 minutę w celu usunięcia nie zaadsorbowanych molekuł białka z jej powierzchni. Tak przygotowaną próbkę wysuszone na powietrzu przed samą analizą. Następnie za pomocą mikroskopu AFM określono pokrycia powierzchni miki molekułami zaadsorbowanej neurotrofiny, które wyniosło 1 mg/m² za pomocą programu Loco's Shire v.2.8.24.0 i ImageJ określono średnicę zaadsorbowanej molekuly NT-4.

Na Fig. 3 przedstawione zostały zdjęcia z mikroskopu AFM przedstawiające molekuly białka NT-4 zaadsorbowane na powierzchni miki.

Jak można zauważyć molekuly NT-4 mają kształt kulisty czym przypominają białka globularne. Ich średnica z pomiaru AFM wynosi $5,1 \pm 2$ nm (po filtracji) co jest przedstawione na Fig. 3. Pomiary wielkości neurotrofiny zaadsorbowanej na powierzchni stałej techniką AFM są w dobrej zgodności z pomiarami tego białka w roztworze PBSu.

Zmierzono ruchliwość elektroforetyczną cząsteczek NT-4 w roztworze PBSu techniką mikroelektroforezy w celu ustalenia ładunku elektrokinetycznego jakie ma białko w roztworze elektrolitu PBS. Następnie przeliczono ją na potencjał zeta cząstki neurotrofiny co pozwoliło ustalić przy jakich wartościach pH używając oddziaływań elektrostatycznych można zaadsorbować białko NT-4 na powierzchni dendrymeru PAMAM.

Na Fig. 4 przedstawiony został potencjał zeta/ruchliwość elektroforetyczna (ξ/μ_e) NT-4 w funkcji pH roztworu w 0,15 M roztworze PBS w temperaturze 293 K.

Tak jak można zauważyć ruchliwość elektroforetyczną neurotrofiny-4 w pH 3,5 wynosi $0,95 \mu\text{m cm/s V}$ co odpowiada potencjałowi zeta 19 mV natomiast w pH 9,5 wynosi ona $-1,12 \mu\text{m cm/s V}$ co odpowiada potencjałowi zeta -20 mV. W roztworze PBS o pH 7,4 potencjał zeta przyjmuje nieznacznie ujemną wartość -5 mV.

Roztwory dendrymeru PAMAM

Do uzyskania kompleksów dendrymer-neurotrofina 4 wykorzystane zostały komercyjnie dostępne dendrymery PAMAM szóstej generacji 6G (Sigma Aldrich, nr katalogowy 536717). Roztwory PAMAM o stężeniu 50 mg/L uzyskiwano przez 1000-krotne rozcieńczenie w buforze fosforanowym PBS wyjściowego stężonego roztworu dendrymeru po czym roztwór filtrowano używając filtrów (0,1 μm lowest binding membrane for protein solutions, PVDF Durapore, Merck Millipore, nr produktu SLVV033RS). Wielkość (średnica hydrodynamiczna) polimeru PAMAM 6 była określona w roztworze metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS/dynamic light scattering) używając aparatu Zetasizer Nano ZS (Malvern). Na Fig. 5 przedstawiony został histogram rozkładu średnicy hydrodynamicznej dendrymeru PAMAM 6.0 określono metodą DLS. Punkty oznaczają eksperymentalne wyniki uzyskane metodą dynamicznego rozpraszania światła dla roztworów PAMAM o stężeniu 200 $\mu\text{g/mL}$ w 0,15 M PBS o pH 7,4.

Jak można zauważyć średnica molekuly PAMAM z pomiaru DLS wynosi $7 \pm 0,2$ nm (po filtracji) co jest przedstawione na rysunku nr 5. Histogram nr 5 pokazuje bardzo monodispersyjny rozkład wielkości dendrymeru 85% wszystkich molekuł PAMAM ma średnicę oscylującą w granicach 7 ± 1 nm.

Ruchliwość elektroforetyczną jak i potencjał zeta molekuł PAMAM określono w roztworze 0,15 M PBSu techniką mikroelektroforezy (LDV) w celu ustalenia ich nieskompensowanego ładunku elektrokinetycznego. Ruchliwość elektroforetyczna dendrymeru PAMAM w pH 7,4 wyniosła $1,16 \pm 0,19 \mu\text{m cm/s V}$ co odpowiada potencjałowi zeta $22,2 \pm 3,7$ mV.

Otrzymywanie i charakterystyka kompleksu elektrostatycznego dendrymer-neurotrofina-4

Zaadsorbowano białko na powierzchni dendrymeru PAMAM G 6.0 wykorzystując oddziaływania elektrostatyczne. Adsorpcja neurotrofiny-4 na nośniku dendrymerowym była prowadzona w roztworze PBS (skład jak powyżej) o sile jonowej 0,15 M i pH 7,4 w ependorfce o pojemności 2 ml. W zastosowanych warunkach neurotrofina-4, jak to wynika z wartości jej potencjału zeta -5 mV, posiadająca ujemny ładunek elektrokinetyczny dyfunduje do powierzchni dendrymeru PAMAM o potencjale zeta 22 mV, a więc o dodatnim ładunku elektrokinetycznym.

Adsorpcja białka na nanonośniku przebiegała według następującej procedury:

- i) zmierzono ruchliwość mikroelektroforetyczną białka NT-4 (metodą opisaną powyżej) oraz dendrymeru PAMAM (metodą opisaną powyżej),
- ii) warstwy NT-4 na powierzchni dendrymeru były formowane przez zmieszanie tych samych objętości roztworów tj. 0,5 ml roztworu NT-4 o stężeniu 40 mg L^{-1} z 0,5 ml roztworu PAMAM o stężeniu 100 mg L^{-1} ,
- iii) adsorpcja przebiegała przez 15 min co było wystarczającym czasem do osiągnięcia maksymalnego pokrycia/pełnej monowarstwy NT-4 na nanocząstce dendrymeru [Adamczyk, Z.; Bratek-Skicki, A.; Dąbrowska, P.; Nattich-Rak, M. Mechanisms of fibrinogen adsorption on latex particles determined by zeta potential and AFM measurements. *Langmuir* 2012, 28, 474–485],
- iv) cała procedura była wykonywana w ependorfkach przy intensywnym mieszaniu w temperaturze 293 K.

Zmierzono średnicę hydrodynamiczną wytworzonego kompleksu elektrostatycznego 20 $\mu\text{g/mL}$ NT-4-50 $\mu\text{g/mL}$ PAMAM w roztworze PBSu o pH 7,4 używając metody DLS. Wynosi ona $13,5 \pm 5$ nm.

Na Fig. 6 przedstawiony został histogram rozkładu średnicy hydrodynamicznej kompleksu elektrostatycznego NT-4-PAMAM 6.0 określono metodą DLS. Punkty oznaczają eksperymentalne wyniki uzyskane metodą dynamicznego rozpraszania światła dla roztworów NT-4 (20 $\mu\text{g/mL}$)-PAMAM (50 $\mu\text{g/mL}$) w 0,15 M PBS o pH 7,4.

Potencjał zeta kompleksu elektrostatycznego 20 $\mu\text{g/mL}$ NT-4-50 $\mu\text{g/mL}$ PAMAM zmierzony techniką mikroelektroforezy w 0,15 M PBS pH 7,4 wynosił 12 $\pm$ 8 mV.

Dodatkowo sprawdzono średnicę kompleksu elektrostatycznego NT-4-PAMAM zaadsorbowanych na powierzchni miki używając w tym celu mikroskopu sił atomowych NanoWizard AFM (JPK Instruments AG). Mikę zanurzano w roztworze NT-4-PAMAM w 0,15 M PBSie o pH 7,4, czas adsorpcji wynosił 15 minut, następnie obficie przepłukano strumieniem wody ultraczystej przez 1 minutę w celu usunięcia nie zaadsorbowanych cząsteczek białka lub kompleksu elektrostatycznego z jej powierzchni. Tak przygotowaną próbkę wysuszone na powietrzu przed samą analizą. Następnie za pomocą mikroskopu AFM określono pokrycia powierzchni miki molekułami zaadsorbowanego kompleksu elektrostatycznego, które wyniosło 0,5 mg/m^2 , za pomocą programu Loco's Shire v.2.8.24.0 i ImageJ określono średnicę zaadsorbowanych kompleksów elektrostatycznych NT-4-PAMAM.

Na Fig. 7 przedstawione zostały zdjęcia z mikroskopu AFM przedstawiające kompleksy NT-4-PAMAM zaadsorbowane na powierzchni miki.

Jak można zauważyć kompleksy NT-4-PAMAM mają kształt kulisty a ich średnica uzyskana w pomiarach AFM wynosi 18 $\pm$ 5 nm (po filtracji) co jest przedstawione na Fig. 7. Pomiary wielkości kompleksów NT-4-PAMAM zaadsorbowanych na powierzchni miki techniką AFM są w dobrej zgodności z pomiarami DLS w objętości roztworu.

Kinetyka desorpcji neurotrofyny-4 z kompleksów dendrymer-neurotrofina-4 w roztworze PBS

Badanie desorpcji neurotrofyny-4 z nanocząstek PAMAM w czasie 3 miesięcy wykonano techniką ubytku stężenia roztworu w jednostce czasu, metodą ELISA (test firmy R&D Systems kody DY992, DY990, DY994, DY999, DY995, WA126, DY006, DY268). W tym celu po adsorpcji NT-4 na dendrymerze PAMAM uzyskane roztwory poddano ultrafiltracji na sączkach o punkcie odcięcia 30 kDa w roztworze PBS. Masa cząsteczkowa pojedynczej molekuly neurotrofyny-4 wynosi 14 kDa dlatego wszystkie niezwiązane z dendrymerem białka NT-4 po filtracji znalazły się w przesączu. Stężenie NT-4 w uzyskanym przesączu oznaczano metodą ELISA. Technika ta była użyta do monitorowania uwalniania NT-4 z dendrymeru w funkcji czasu (Fig. 8) w roztworze 0,15 M PBSu o pH 7,4.

Na Fig. 6 przedstawiona została kinetyka desorpcji białka z nanobionośnika NT-4-PAMAM w funkcji czasu.

Z profilu kinetyki uwalniania NT-4 wynika, że zastosowanie nanobionośnika 50 $\mu\text{g/mL}$ PAMAM-20 $\mu\text{g/mL}$ NT-4 gwarantuje ciągłe uwalnianie białka na poziomach stężeń 200 $\pm$ 50 pg/mL w czasie co najmniej 102 dni.

Przykład 2. Stosowanie kompleksów elektrostatycznych składających się z PAMAM G 6.0 oraz neurotrofyny-4 (NT-4) w leczeniu chorób oczu.

Zwierzęta

Do badania wykorzystano myszy szczepu C57BL6/J/*cmdb* (Centrum Medycyny Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku) obu płci, ważące 27–30 g. Procedury z wykorzystaniem myszy zostały wszczęte po uzyskaniu pozytywnej opinii lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Poznaniu (uchwała nr 53/2017 z dnia 06.10.2017 roku). Hodowlę zwierząt prowadzono w systemie klatek indywidualnie wentylowanych (regał IVC: BIO A.S. Vent II Ehret, Emmendingen, Niemcy), z dwunastogodzinnym cyklem dzień/noc oraz z dostępem do pożywienia i wody *ad libitum*.

Model ostrego uszkodzenia siatkówki oka

NaIO_3 selektywnie niszczy nabłonek barwnikowy siatkówki oka, a następnie przylegającą do niego warstwę fotoreceptorową. Charakter uszkodzenia przypomina zmiany degeneracyjne siatkówki oka, obserwowane w przypadku jednostek chorobowych występujących u ludzi, np. zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, zanik girlandowaty, czy zwyrodnienie barwnikowe siatkówki. Dlatego model ten jest przydatny w badaniach nad opracowaniem strategii terapeutycznych w leczeniu chorób ocznych o charakterze degeneracyjnym u ludzi.

Przed przystąpieniem do procedury uszkodzenia siatkówki wywołanego toksycznym działaniem NaIO_3 , myszy zostały poddane anestezji poprzez dootrzewnowe podanie roztworu ketaminy (40 mg/kg) i ksylazyny (4 mg/kg) (oba preparaty z Biowet, Puławy, Polska). Dodatkowo, stosując 0,5% roztwór chlorowodoru proksymetakainy (Alcaine; Alcon, Fort Worth, TX, USA) znieczulono rogówkę. Następnie, do spotu żylnego zagałkowego podano zwierzętom NaIO_3 w pojedynczej dawce 25 mg/kg .

Doszklistkowe podawanie PAMAM oraz kompleksu PAMAM-NT4

Przed przystąpieniem do procedury, myszy zostały poddane anestezji poprzez dootrzewnowe podanie roztworu ketaminy (40 mg/kg) i ksylazyny (4 mg/kg). Dodatkowo, stosując 0,5% roztwór chlorowodorku proksymetakainy (Alcaine; Alcon, Fort Worth, TX, USA) znieczulono rogówkę. Kompleksy PAMAM-NT-4 oraz dendrymer PAMAM podano drogą doszklistkowej iniekcji do przeciwnych oczu. Objętość podawanego płynu wynosiła μl . Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, które otrzymały tylko iniekcję NaIO_3 .

Optyczna koherentna tomografia w domenie spektralnej (SD-OCT)

Optyczna koherentna tomografia w domenie spektralnej (ang. *spectral domain optical coherence tomography*; SD-OCT) umożliwia przyżyciową i nieinwazyjną ocenę morfologii siatkówki oka. Badanie wykonano przed oraz w 7. i 28. dobie od uszkodzenia siatkówki indukowanego toksyczną działalnością NaIO_3 i doszklistkowym podaniem kompleksu dendrymer-neurotrofina 4 ($n=12$ myszy), z zastosowaniem systemu BiopTigen Envisu™ R2200-HR SD-OCT (Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy).

Przed przystąpieniem do procedury, myszy zostały znieczulone poprzez dootrzewnowe podanie roztworu ketaminy (40 mg/kg) i ksylazyny (4 mg/kg). Następnie, w celu rozszerzenia źrenic, do worka spojówkowego zwierząt podano 1% roztwór atropiny (Atropinum Sulfuricum WZF; Polfa Warszawa, Polska). Podczas całego okresu trwania badania myszy stosowano krople żelowe do oczu (Systane Gel Drops; Alcon, Fort Worth, TX, USA), które utrzymywały przejrzystość rogówki i zapewniały dobrą jakość uzyskiwanych obrazów.

Analizę morfometryczną grubości siatkówki oka przeprowadzono w oparciu o oprogramowanie InVivoVue i narzędzia „calliper” (BiopTigen, Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy), mierząc odległość między pierwszą warstwą hiperrefleksyjną, tj. granicą szklistkowo-siatkówkową, a nabłonkiem barwnikowym. Pomiarów dokonano we wszystkich kwadrantach siatkówki, w odległości 450 μm od środka tarczy nerwu wzrokowego.

Przyjęto, że średnia wartość wszystkich uzyskanych pomiarów stanowiła całkowitą grubość siatkówki oka. Aby zobrazować zmiany w grubości siatkówki oka myszy w kinetyce czasu, dane zostały przedstawione jako procentowa wartość oszacowana indywidualnie dla każdego osobnika, na podstawie pomiaru uzyskanego w 7. i 28. dobie, w odniesieniu do wartości otrzymanej przed uszkodzeniem wywołanym toksycznym działaniem NaIO_3 i doszklistkowym podaniem kompleksu dendrymer-neurotrofina 4, która została przyjęta jako 100%.

Analiza morfometryczna skanów siatkówki oka wykazała, że w toku uszkodzenia siatkówki indukowanego toksyczną działalnością NaIO_3 dochodzi do znacznego spadku grubości siatkówki. W grupie myszy, które otrzymały doszklistkową iniekcję kompleksu PAMAM-NT4 oraz dendrymeru PAMAM zaobserwowano pełną regenerację siatkówki (Fig. 9 i 10).

Na Fig. 9 przedstawione zostały reprezentatywne tomogramy siatkówek mysich przed oraz w 7. i 28. dobie po podaniu PAMAM-NT4, PAMAM oraz NaIO_3 uzyskane za pomocą metody SD-OCT.

Na Fig. 10 przedstawiona została kinetyka zmian grubości siatkówki oka myszy przed oraz w 7. i 28. dobie po podaniu PAMAM-NT4, PAMAM oraz NaIO_3 , wyznaczona na podstawie pomiarów morfometrycznych skanów siatkówki, uzyskanych za pomocą metody SD-OCT. Wartości uzyskane w 0 dobie przyjęto jako 100%.

Elektroretinografia (ERG)

Elektroretinografia (ang. *electroretinography*; ERG) pozwala w sposób obiektywny i nieinwazyjny ocenić funkcję bioelektryczną siatkówki oka. Badanie wykonano przed oraz w 7. i 28. dobie od uszkodzenia siatkówki indukowanego toksyczną działalnością NaIO_3 i doszklistkowym podaniem kompleksu dendrymer-neurotrofina 4 ($n=12$ myszy), w warunkach skotopowych i fotopowych, z zastosowaniem stymulacji całopólowej (sag. *full field ERG*; ffERG, Ganzfeld).

Po całkowitej adaptacji do ciemności, do worka spojówkowego myszy podano 1% roztwór atropiny, w celu rozszerzenia źrenicy. Następnie, myszy zostały poddane anestezji poprzez dootrzewnowe podanie roztworu ketaminy (40 mg/kg) i ksylazyny (4 mg/kg). Aby zminimalizować dyskomfort zwierząt, spowodowany stosowaniem elektrod kontaktowych, rogówka została znieczulona 0,5% roztworem chlorowodorku proksymetakainy (Alcaine; Alcon, Fort Worth, TX, USA). Dla uzyskania zapisu ERG, zastosowano następujące rodzaje odprowadzeń: (i) elektroda czynna – rogówkowa, w postaci soczewki kontaktowej z wbudowanym złotym pierścieniem, (ii) elektroda bierna igłowa – referencyjna, umieszczana podskórnie w okolicy czołowej głowy myszy, pomiędzy uszami (iii) elektroda bierna igłowa – uziemiająca, wprowadzana podskórnie u podstawy ogona zwierzęcia (wszystkie rodzaje elektrod pochodziły z LKC Technologies, Gaithersburg, MD, USA).

Zapis ERG uzyskano przy użyciu systemu UTAS BigShot™ (LKC Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Protokół składał się z następujących etapów:

1. Odpowiedź pręcikowa, uzyskana w adaptacji nocnej, przez stymulację błyskiem światła białego o niskim natężeniu (filtr neutralny 24 dB). Uśredniono 8 zapisów, zarejestrowanych w odstępach 8-sekundowych.
2. Odpowiedź pręcikowo-czopkowa, inicjowana w adaptacji nocnej, przez stymulację błyskiem światła białego o maksymalnym natężeniu (błysk standardowy, filtr 0 dB). Uśredniono 2 zapisy, zarejestrowane w odstępie 28 sekund.
3. Potencjał oscylacyjny, indukowany w adaptacji nocnej, przez stymulację pojedynczym błyskiem światła białego o maksymalnym natężeniu (błysk standardowy, filtr 0 dB).
4. Odpowiedź czopkowa, otrzymana po 10-minutowej adaptacji dziennej (natężenie oświetlenia 30 cd/m²) i stymulacji standardowym błyskiem świetlnym (filtr 0 dB). Uśredniono 8 zapisów, zarejestrowanych w odstępach 1-sekundowych.

We wszystkich etapach używano filtra pasmowo-zaporowego do redukcji zakłóceń sieciowych (ang. *notch filter*).

Analizę funkcji bioelektrycznej siatkówki oka przeprowadzono w oparciu o amplitudę fali b, która była mierzona od największego załamania fali a do szczytu fali b lub, przy braku fali a, od linii izoelektrycznej do szczytu fali b.

Aby zobrazować zmiany elektrofizjologii siatkówki oka w kinetyce czasu, dane zostały przedstawione jako procentowa wartość oszacowana indywidualnie dla każdego osobnika, na podstawie pomiaru amplitudy fali b uzyskanego w 7. i 28. dobie, w odniesieniu do wartości otrzymanej przed uszkodzeniem wywołanym toksycznym działaniem NaIO₃ i doszklistkowym podaniem kompleksu dendrymer-neurotrofina 4, która została przyjęta jako 100%.

Analiza zapisów ERG w kinetyce czasu wykazała, że u wszystkich grup doświadczalnych dochodzi do spadku amplitudy fali b odpowiedzi pręcikowej, pręcikowo-czopkowej, czopkowej, a także sumy potencjałów oscylacyjnych, w odniesieniu do pomiarów uzyskanych przed uszkodzeniem siatkówki wywołanym NaIO₃ i doszklistkową iniekcją nanostruktur. Jednakże, w grupie myszy, którym podano kompleks PAMAM-NT-4, czynność bioelektryczna siatkówki była znacznie lepiej zachowana (Fig. 11 i 12).

Na Fig. 11 przedstawiono reprezentatywne elektretinogramy odpowiedzi pręcikowej (A), pręcikowo-czopkowej (B), czopkowej (D) oraz sumy potencjałów oscylacyjnych (C) uzyskane w 28. dobie po podaniu PAMAM-NT4, PAMAM oraz NaIO₃.

Na Fig. 12 przedstawiona została kinetyka zmian czynności bioelektrycznej siatkówki oka odpowiedzi pręcikowej (A), pręcikowo-czopkowej (B), czopkowej (D) oraz sumy potencjałów oscylacyjnych (C) przed oraz w 7. i 28. dobie po podaniu PAMAM-NT4, PAMAM oraz NaIO₃. Pomiary uzyskane w 0 dobie przyjęto jako 100%.

Izolacja białka

Przed oraz w 7., 14. i 28. dobie od uszkodzenia siatkówki indukowanego toksyczną działalnością NaIO₃ i doszklistkowym podaniem kompleksu dendrymer-neurotrofina 4, część myszy poddano eutanazji poprzez dyslokację rdzenia kręgowego i pobrano gałki oczne, z których wypreparowano osobno szklistkę oraz część neurosensoryczną siatkówki, wraz z nabłonkiem barwnikowym. Z otrzymanych bioptatów, przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu PARIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) izolowano białko całkowite. W pierwszym etapie izolacji, zamrożone tkanki przenoszono do 300 µl buforu lizującego (ang. *Cell Disruption Buffer*), wzbogaconego o mieszaninę inhibitorów proteaz (Protease Inhibitor Cocktail, set III; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) i fosfataz (1 mM fluorek sodu oraz 2 mM ortowanad sodu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)). Następnie, tkanki rozdrabniały, posługując się homogenizatorem ręcznym Omni TH zaopatrzonym w końcówki do prób twardych (Omni International, Kennesaw, GA, USA). Aby dokończyć proces lizy, homogenaty pozostawiono na lodzie na dodatkowe 10 min, a następnie wirowano z zachowaniem parametrów: 4°C, 14 000 rpm, 12 min. Uzyskany supernatant poddano spektrofotometrycznej ocenie stężenia białka metodą Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ekstrakt białkowy wykorzystano do oceny stężenia neurotrofyny-4 immunoenzymatyczną metodą ELISA.

Kinetyka desorpcji neurotrofyny-4 z kompleksu dendrymer-neurotrofina-4 w szklistkach i siatkówkach oczu mysich

W celu sprawdzenia wpływu kompleksu na poprawę funkcjonowania mysich siatkówek określono poziomy stężenie NT-4 w oku mysim przed i po doszklistkowym podaniu 50 µg/ml PAMAM-20 µg/ml

NT-4 w objętości 1 μ l. Charakterystykę rozpoczęto od sprawdzenia ekspresji neurotrofyny czwartej na poziomie narządu receptorowego jakim jest oko, po doszkliskowym podaniu NaIO_3 w celu indukcji uszkodzenia siatkówki, dlatego wyizolowano zarówno siatkówki jak i szklistki od myszy według procedury opisanej w punkcie 2.1.6.

Przy pomocy techniki ELISA (abcam, R&D Systems, BD Biosciences) w szklistkach mysich określono stężenia NT-4 w dniu 0 czyli bez podania NaIO_3 , w 7. dobie po podaniu i w 28. dobie po podaniu substancji uszkadzającej siatkówkę co przedstawiono na Fig. 13 i 14.

Na Fig. 13 przedstawiona została ocena poziomów stężeń białka NT-4 w szklistkach mysich po podaniu NaIO_3 , dendrymeru PAMAM, kompleksu NT-4-PAMAM w 0, 7., 14. i 28. dobie po podaniu. a) Stężenie białka NT-4 jest podane w jednostce [pg/ml] b) Stężenie białka NT-4 jest podane w jednostce [pg/mg] tzn. że jest znormalizowane w przeliczeniu na masę białka całkowitego zawartego w poszczególnych mysich szklistkach.

Na podstawie uzyskanych wyników określono stężenia NT-4 w szklistkach mysich bez podania NaIO_3 oznaczenie na rysunku jako 0 doba, które wynosiło 3,0 $\pm$ 1,9 pg/ml, w 7. dobie po podaniu 2,3 $\pm$ 0,3 pg/ml i w 28. dobie po podaniu 0 pg/ml. Na rysunku 8b) przedstawiono dane eksperymentalne dotyczące wyżej wymienionych stężeń NT-4 przeliczone na ilości neurotrofyny do całkowitej zawartości białka w szklistce. Całkowitą zawartość białka w szklistce określono przy pomocy metody Bradford.

Tą samą metodą zmierzono stężenia NT-4 w szklistkach uszkodzonego oka mysiego po podaniu doszkliskowym samego nośnika PAMAM w 7., 14. i 28. dobie od podania. Wyniki uzyskane przy pomocy techniki ELISA w szklistkach przedstawiono na rysunku 13a) i osiągnęły wartości w 7. dobie po podaniu 3,1 $\pm$ 1,7 pg/ml i w 28. dobie po podaniu 0 pg/ml. Na rysunku 13b) przedstawiono dane eksperymentalne dotyczące wyżej wymienionych stężeń NT-4 przeliczone na ilości neurotrofyny do całkowitej zawartości białka znajdującego się w szklistce.

Dodatkowo zmierzono stężenia NT-4 w szklistkach uszkodzonego oka mysiego po podaniu doszkliskowym kompleksu 50 μ g/ml PAMAM-20 μ g/ml NT-4 w 7., 14. i 28. dobie od podania. Wyniki uzyskane przy pomocy techniki ELISA w szklistkach przedstawiono na rysunku nr 13a) i osiągnęły wartości w 7. dobie po podaniu 654 $\pm$ 100 pg/ml i w 28. dobie po podaniu 28 $\pm$ 15 pg/ml. Na rysunku 13b) przedstawiono dane eksperymentalne dotyczące wyżej wymienionych stężeń NT-4 przeliczone na ilości neurotrofyny do całkowitej zawartości białka znajdującego się w szklistce.

Na Fig. 14 przedstawiona została ocena poziomów stężeń białka NT-4 w siatkówkach mysich po podaniu NaIO_3 , dendrymeru PAMAM, kompleksu NT-4-PAMAM w 0, 7., 14. i 28. dobie po podaniu. a) Stężenie białka NT-4 jest podane w jednostce [pg/ml] b) Stężenie białka NT-4 jest podane w jednostce [pg/mg], czyli jest znormalizowane w przeliczeniu na masę białka całkowitego zawartego w poszczególnych mysich siatkówkach.

Na podstawie uzyskanych wyników określono stężenia NT-4 [pg/ml] w siatkówkach mysich bez podania NaIO_3 oznaczenie na rysunku 14 jako 0 doba, które wynosiło 9,9 $\pm$ 0,2 pg/ml, w 7. dobie po podaniu 11,8 $\pm$ 1,2 pg/ml i w 28. dobie po podaniu 11,1 $\pm$ 1,1 pg/ml. Na rysunku 14b) przedstawiono dane eksperymentalne dotyczące stężeń NT-4 w siatkówkach mysich przeliczone na ilości neurotrofyny do całkowitej zawartości białka NT-4 w szklistce. Całkowitą zawartość białka w szklistce określono przy pomocy metody Bradford.

Tą samą metodą zmierzono stężenia NT-4 w siatkówkach uszkodzonego oka mysiego po podaniu doszkliskowym samego nośnika PAMAM w 7., 14. i 28. dobie od podania. Wyniki uzyskane przy pomocy techniki ELISA w szklistkach przedstawiono na rysunku nr 14a) i osiągnęły wartości w 7. dobie po podaniu 10,0 $\pm$ 2 pg/ml i w 28. dobie po podaniu 5,8 $\pm$ 1,5 pg/ml. Na rysunku 14b) przedstawiono dane eksperymentalne dotyczące wyżej wymienionych stężeń NT-4 przeliczone na ilości neurotrofyny do całkowitej zawartości białka NT-4 znajdującego się w szklistce.

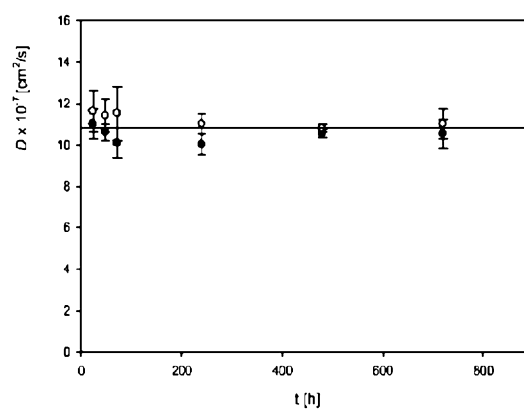
Zmierzono również stężenia NT-4 w siatkówkach uszkodzonego oka mysiego po podaniu doszkliskowym kompleksu 50 μ g/ml PAMAM-20 μ g/ml NT-4 w 7., 14. i 28. dobie od podania. Wyniki uzyskane przy pomocy techniki ELISA w szklistkach przedstawiono na rysunku nr 14a) i osiągnęły wartości w 7. dobie po podaniu 14,9 $\pm$ 5 pg/ml i w 28. dobie po podaniu 7,9 $\pm$ 3 pg/ml. Na rysunku 14b) przedstawiono dane eksperymentalne dotyczące wyżej wymienionych stężeń NT-4 przeliczone na ilości neurotrofyny do całkowitej zawartości białka NT-4 znajdującego się w szklistce.

Zastrzeżenia patentowe

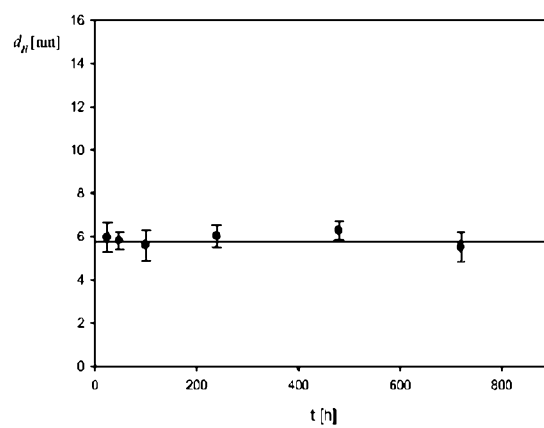
1. Kompozycja do doszkliskowego podawania białka leczniczego, **znamienna tym**, że zawiera białko lecznicze oraz poliamidoaminowy polikation dendrymeryczny połączony elektrostatycznie z tym białkiem leczniczym, przy czym białkiem leczniczym jest neurotrofina-4 (NT-4), a poliamidoaminowym polikationem dendrymerycznym jest dendrymer PAMAM, korzystnie PAMAM G 6.0.
2. Kompleks elektrostatyczny składający się z poliamidoaminowego polikationu dendrymerycznego PAMAM, korzystnie PAMAM G 6.0, oraz neurotrofiny-4 (NT-4).
3. Kompleks elektrostatyczny określony w zastrz. 2 do stosowania w medycynie, korzystnie do stosowania w profilaktyce lub leczeniu chorób oczu.
4. Kompleks elektrostatyczny do stosowania według zastrz. 3, **znamienny tym**, że chorobą oka jest choroba degeneracyjna siatkówki oka, zwłaszcza wybrana z grupy obejmującej: zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, zanik girlandowaty, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki oraz jaskrę.
5. Kompleks elektrostatyczny do stosowania według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jest on stosowany w leku przeznaczonym do podawania doszkliskowego neurotrofiny-4, zwłaszcza w postaci leku o spowolnionym uwalnianiu neurotrofiny-4.

Rysunki

część a



część b



część c

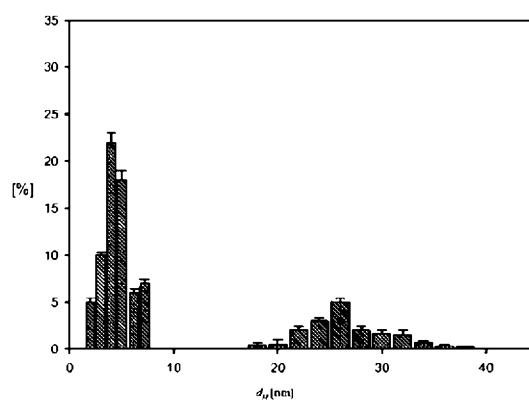


Fig. 1

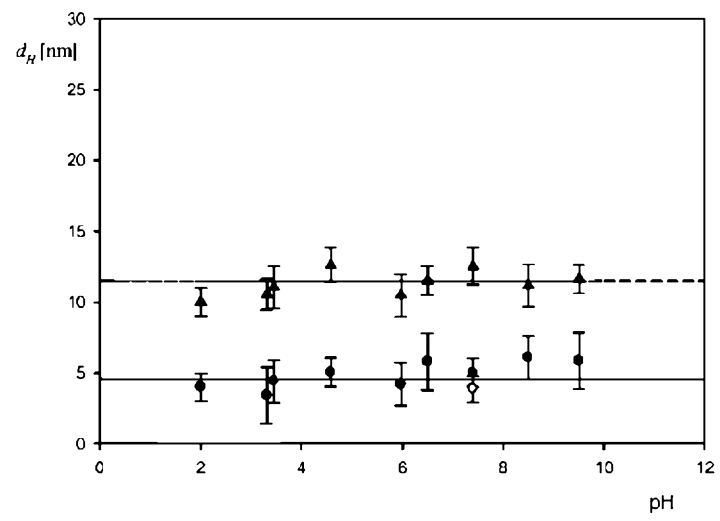


Fig. 2

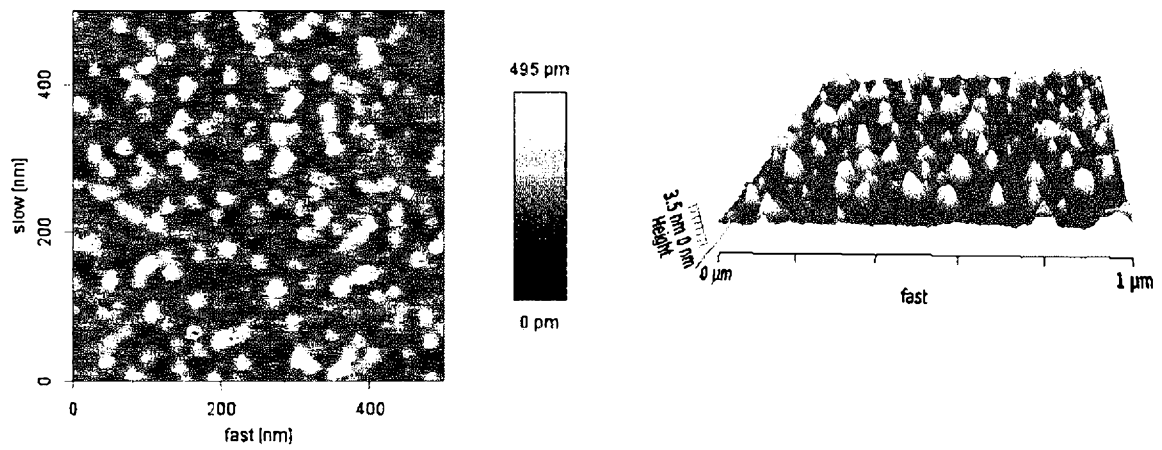


Fig. 3

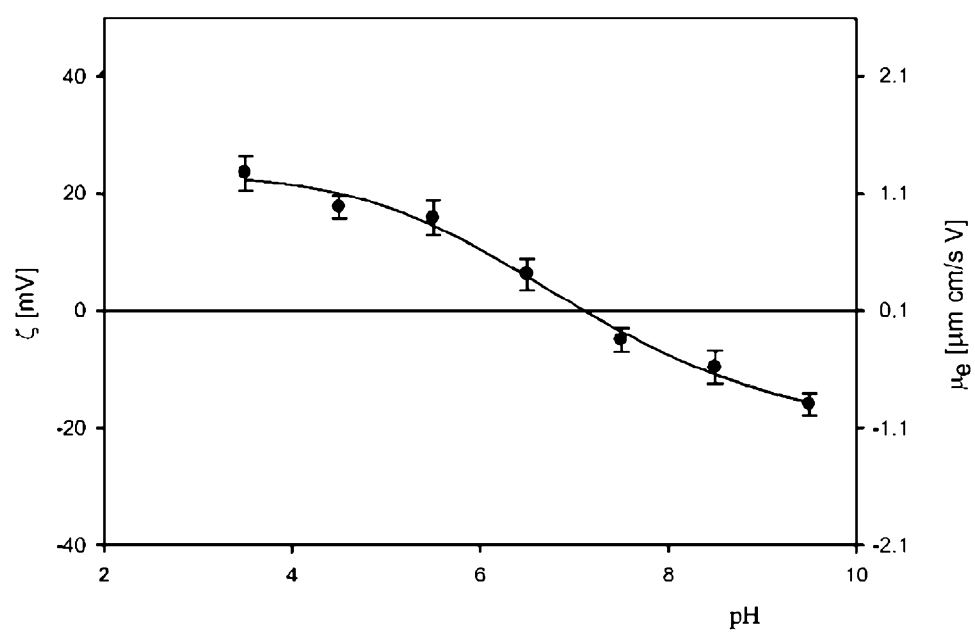


Fig. 4

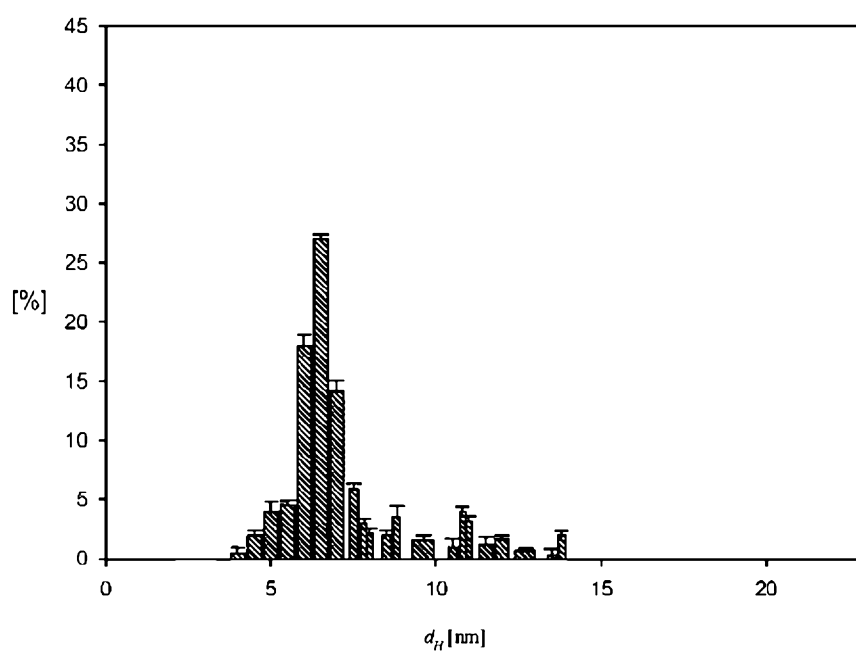


Fig. 5

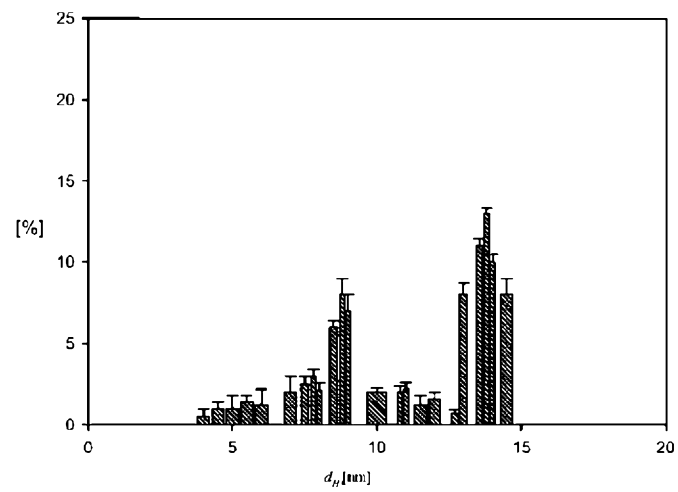


Fig. 6

Filename: save-2017.10.13-10.49.21.jp

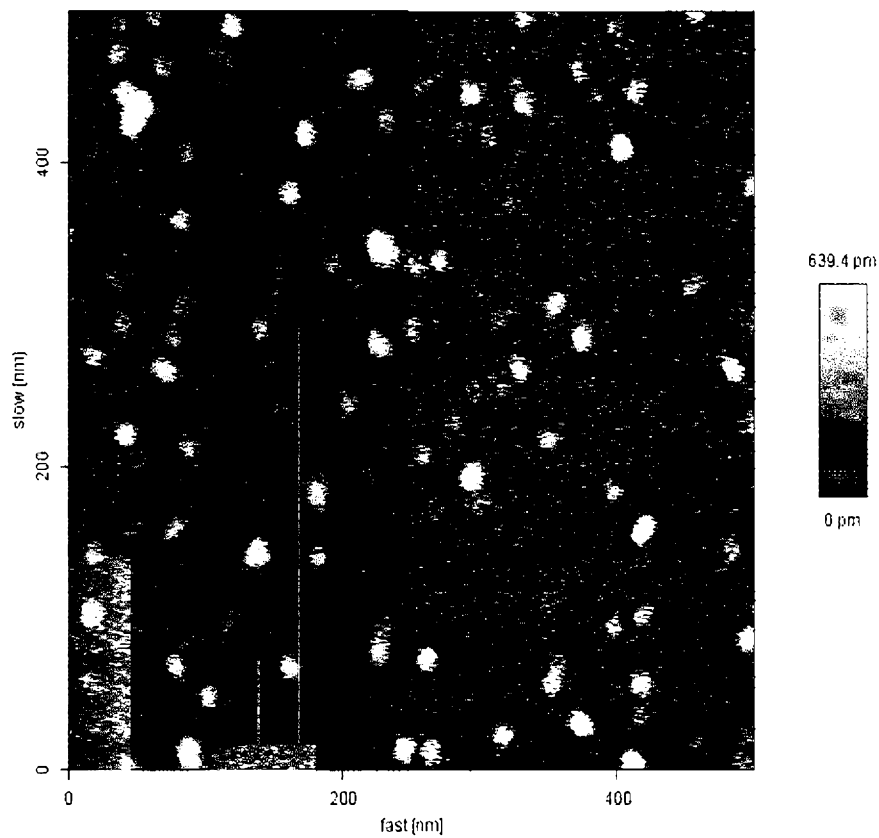


Fig. 7a

Filename: save-2017 10 13-11.10.40.jpik

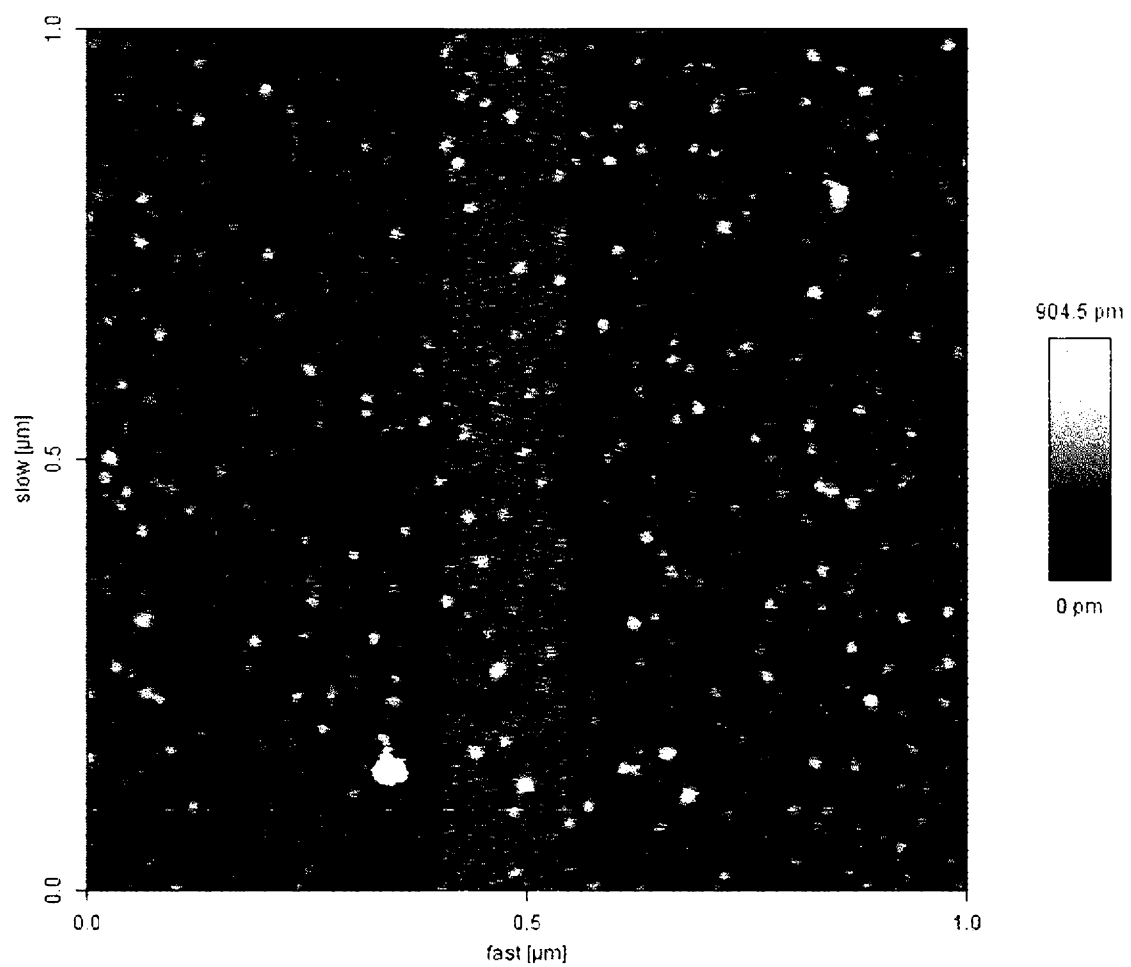


Fig. 7b

Filename: save-2017-09-29-10-15-43.jpg

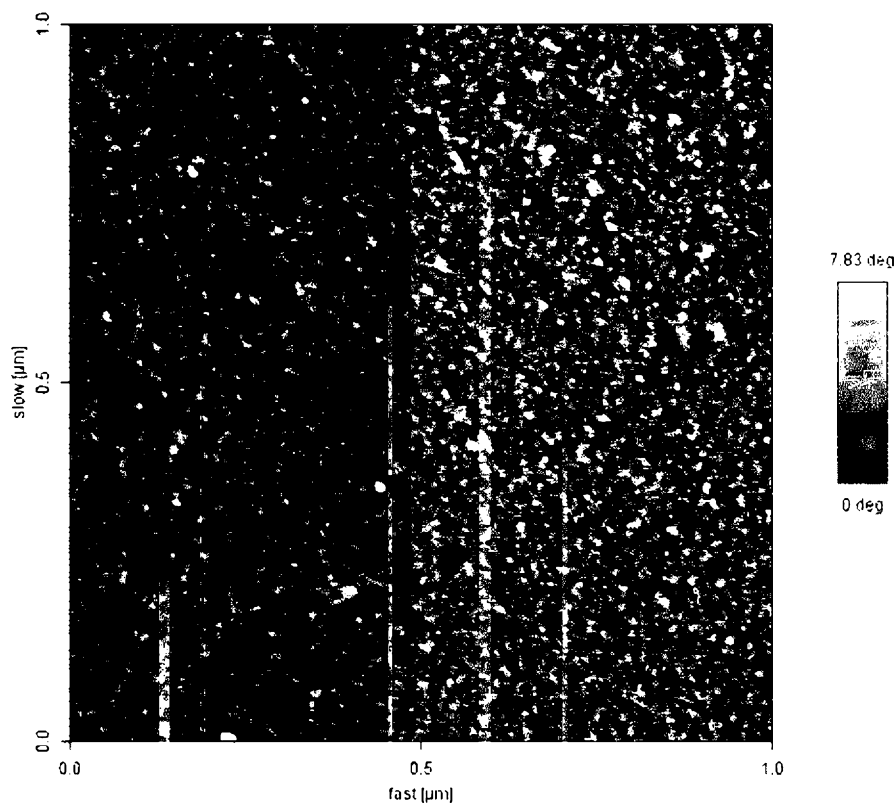


Fig. 7c

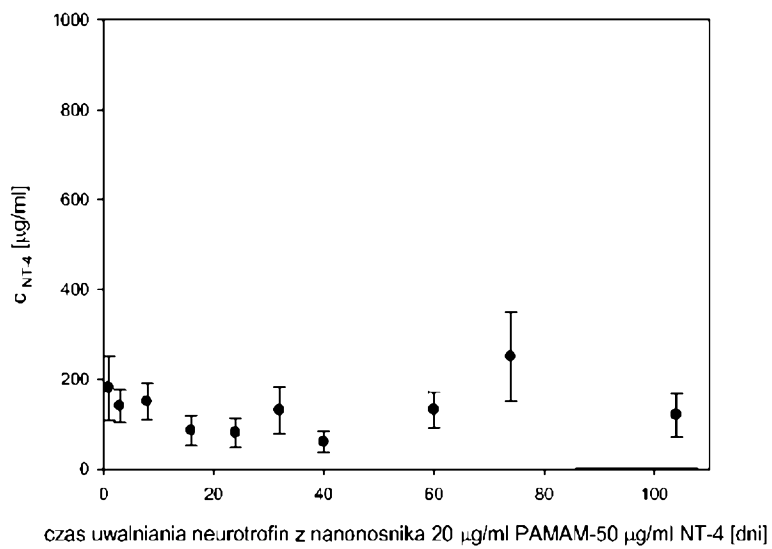


Fig. 8

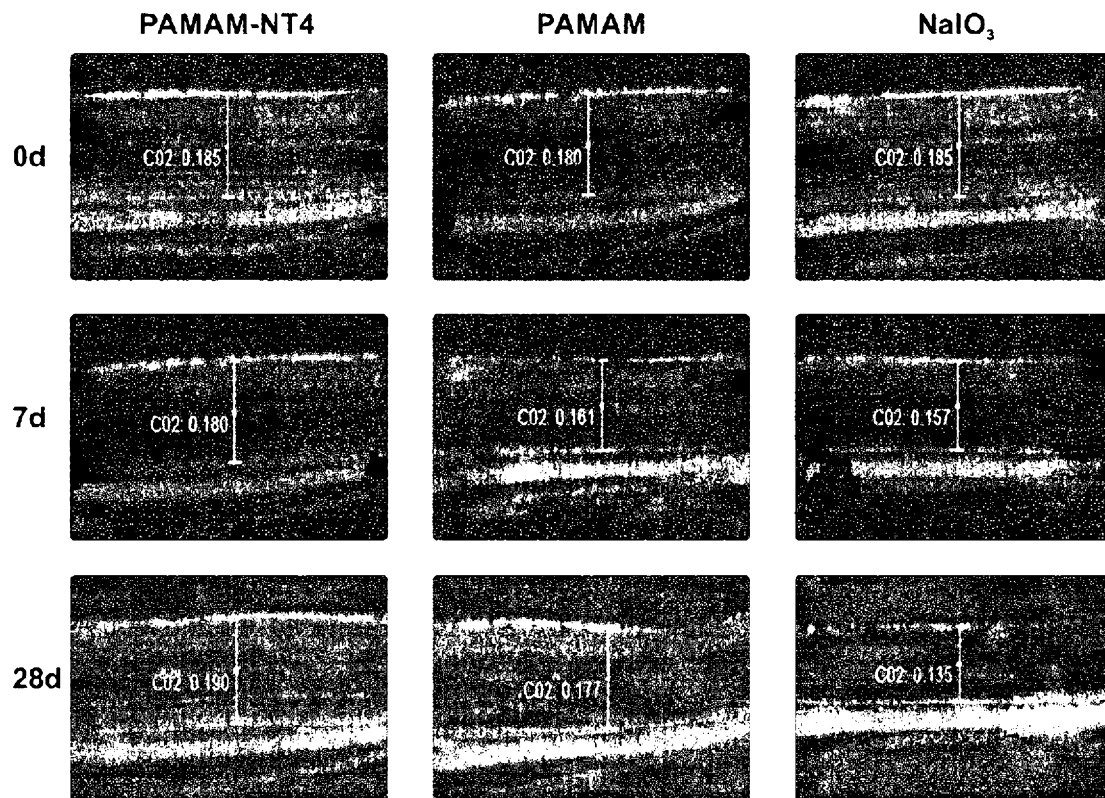


Fig. 9

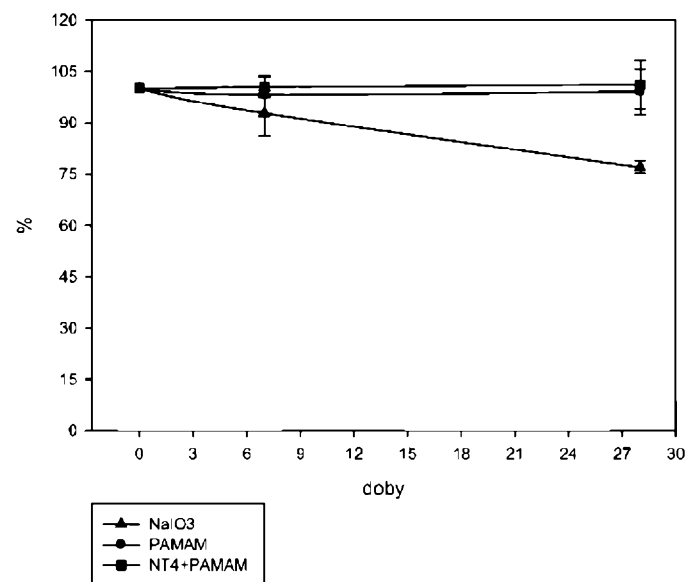


Fig. 10

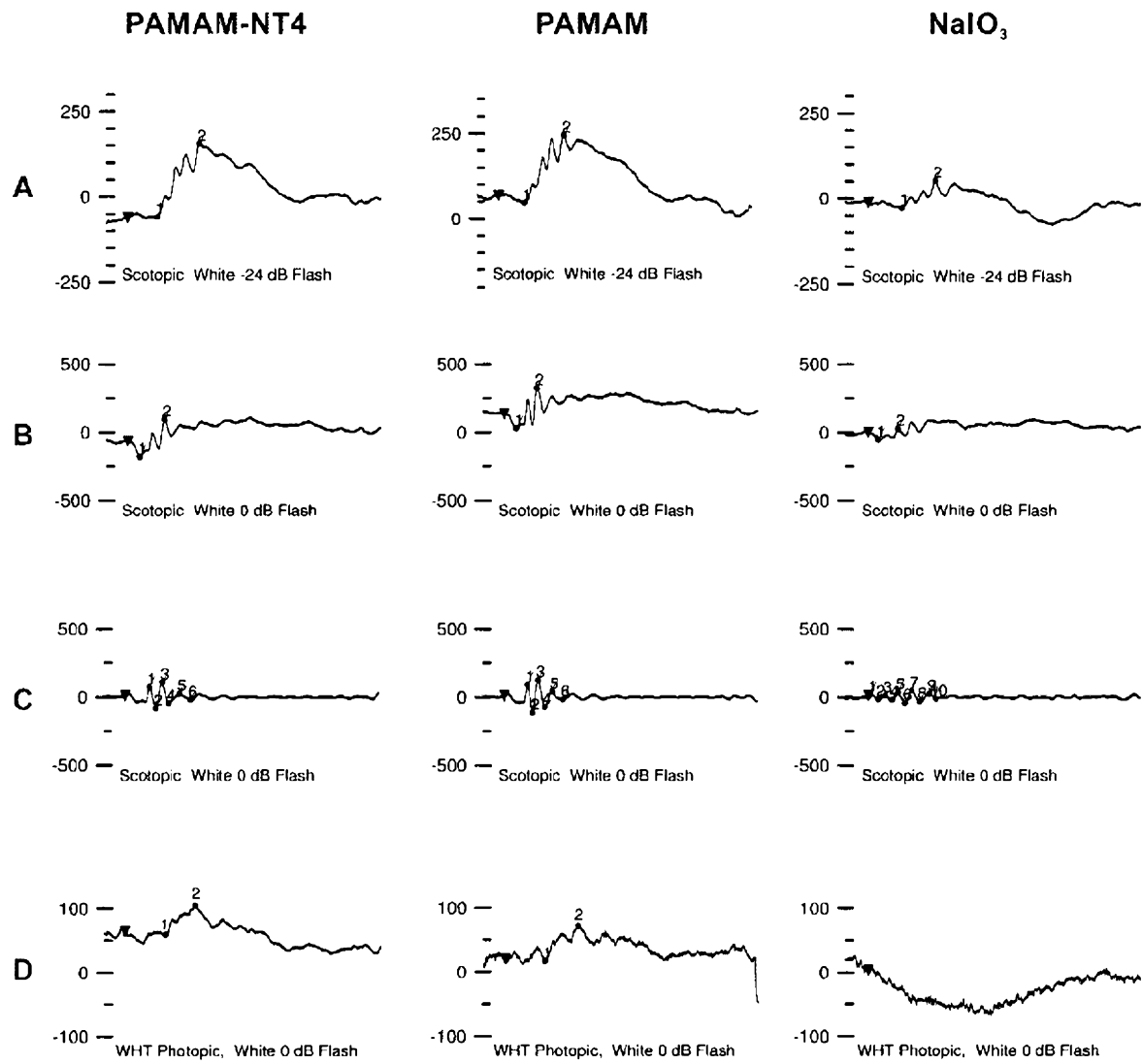
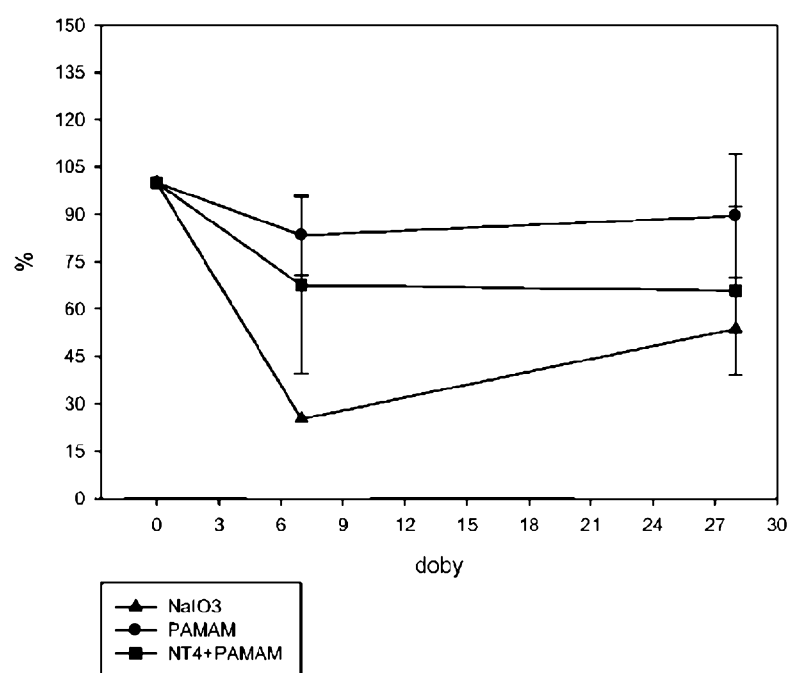
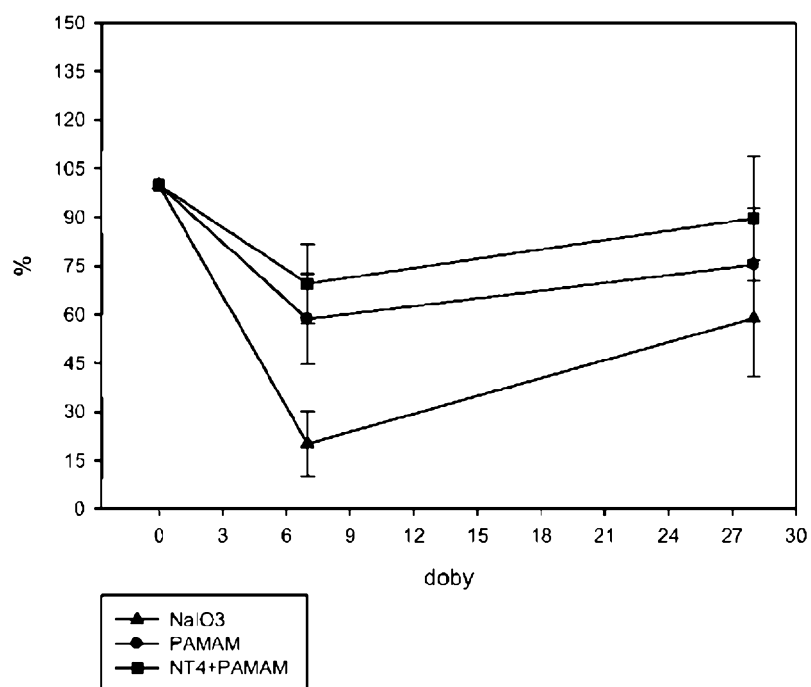


Fig. 11

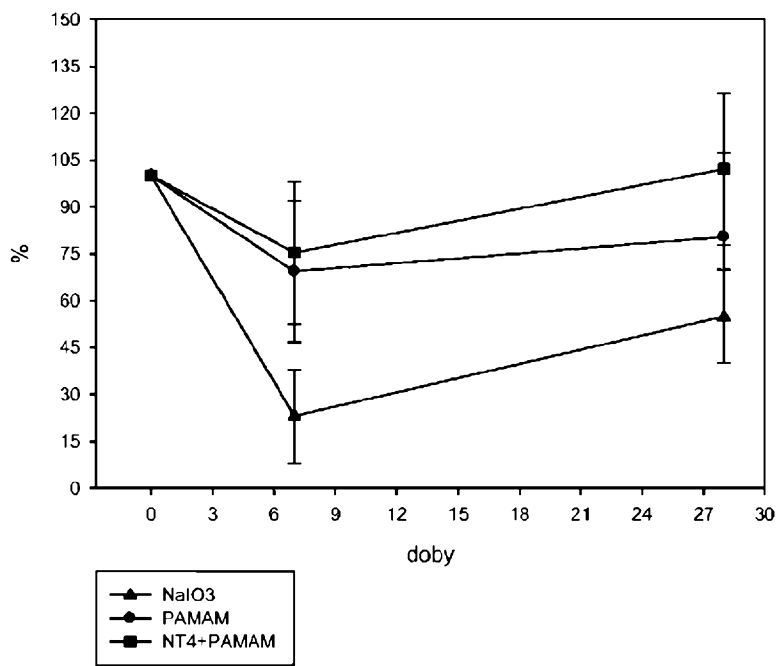
A)



B)



C)



D)

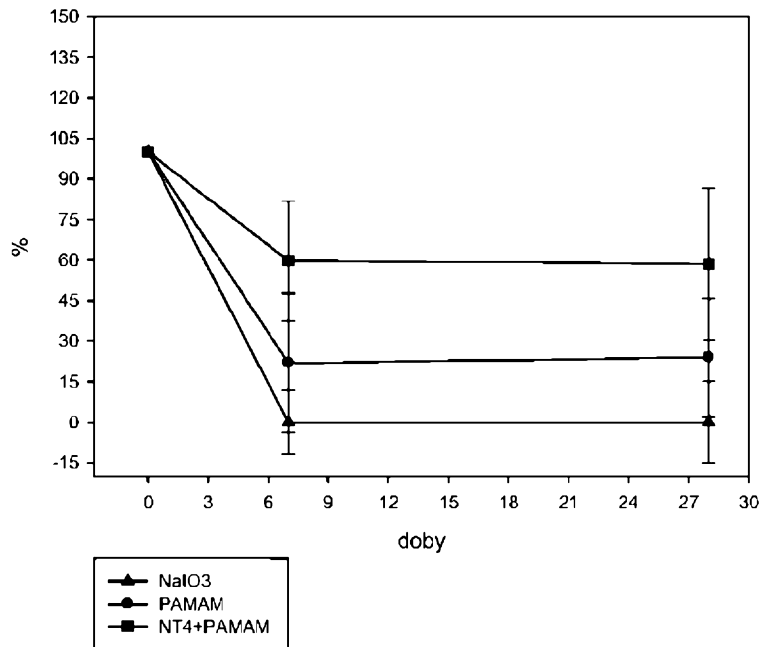
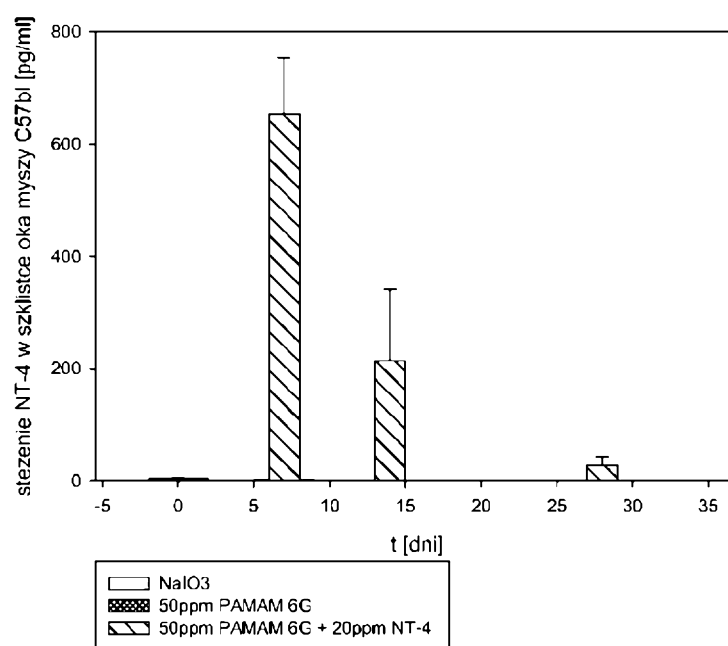


Fig. 12

a)



b)

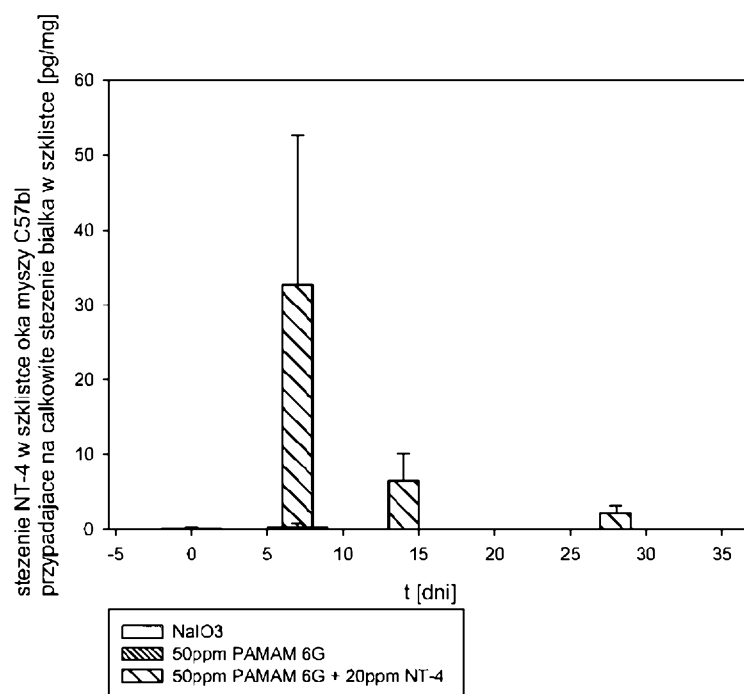
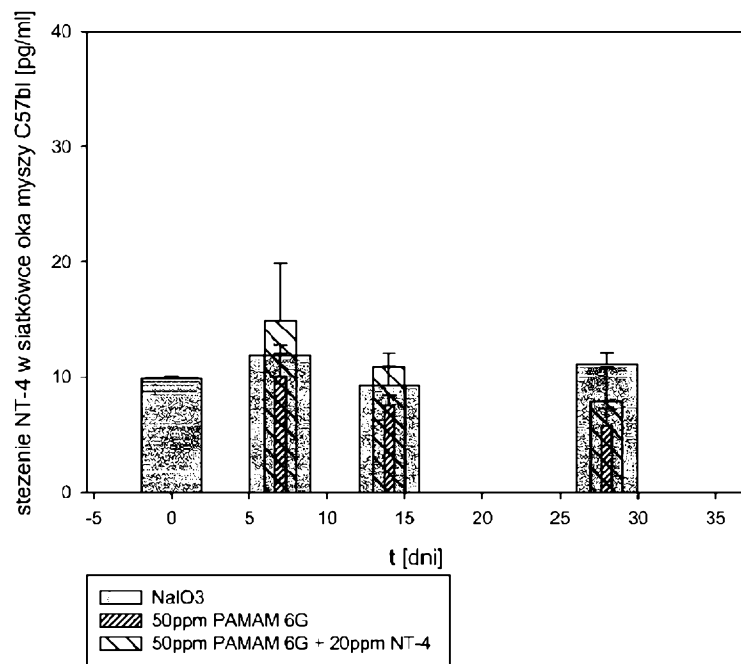


Fig. 13

a)



b)

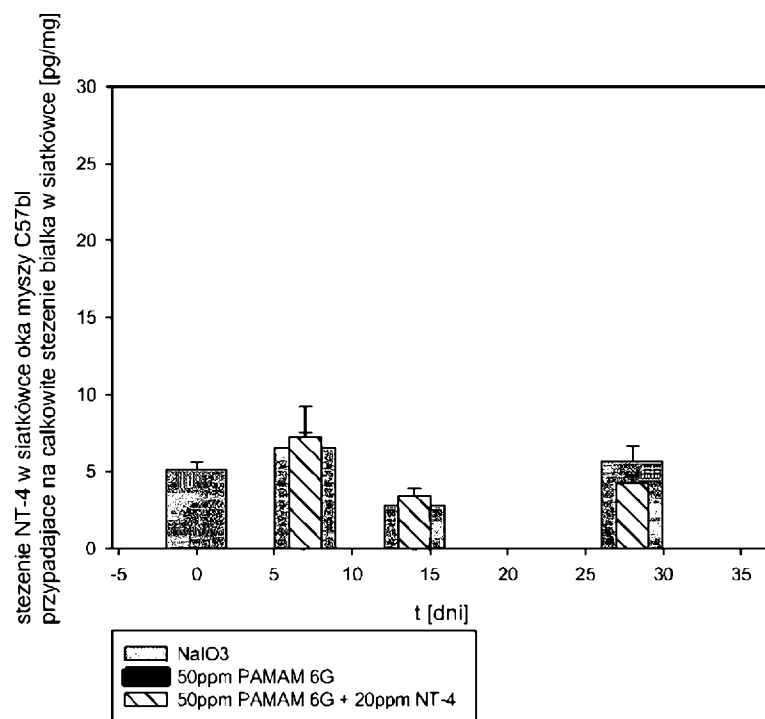


Fig. 14