



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00444**

(22) Data de depozit: **25/07/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2024 BOPI nr. **1/2024**

(71) Solicitant:

• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **SPITALUL CLINIC JUDEȚEAN DE URGENȚĂ CLUJ NAPOCA, STR. CLINICILOR NR.3-5, COD 400006, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;**
• **INSTITUTUL ONCOLOGIC "PROF.DR. ION CHIRICUȚĂ" DIN CLUJ-NAPOCA, STR.REPUBLICII NR.34-36, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:

• **FLORIAN IOAN- ȘTEFAN, STR.BORHANCIULUI NR.59, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **ȘUȘMAN VALERIU-SERGIU, ALEEA RECOLTEI NR.25, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **EDE BODOKI, STR. CÂMPULUI NR.193, CORP 2, AP.2, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;**
• **SORIȚĂU OLGA, STR.SOMEȘUL RECE NR.1233C, SAT GILĂU, COMUNA GILĂU, CJ, RO;**
• **PEȘTEAN PETRU-COSMIN, STR. OAȘULUI NR.218 A, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;**
• **FLORIAN IOAN-ALEXANDRU, STR. EPISCOP MARTON ARON NR.23 A, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;**
• **IACOB BOGDAN- CEZAR, STR.M. SORESCU NR.4, AP.31, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **BĂRĂIAN ALEXANDRA- IULIA, PIAȚA 14 IULIE NR.12, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **BURUIANĂ ANDREI, ALEEA NUCULUI BL.1, SC.B, AP.8, FĂLTICENI, SV, RO**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNUI DISPOZITIV PENTRU LIVRAREA PRELUNGITĂ ȘI CONTROLATĂ A RUXOLITINIBULUI ÎN GLIOBLASTOM**

(57) Rezumat:

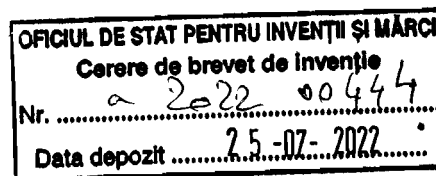
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui sistem farmaceutic pentru administrarea locală a ruxolitinibului (RUX) în cavitatea rămasă după rezecția chirurgicală a glioblastomului (GBM), pentru vindecarea post-chirurgicală. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: sinteza gelului de fibrină prin adăugarea la o soluție de fibrinogen a unei soluții de trombină umană la 37°C, în solvent tampon fosfat salin (PBS) cu pH 7,4, încorporarea RUX liber sau RUX încărcat în nano-

particule polimerice amprentate molecular, menținerea amestecului la 37°C până la gelifiere completă, rezultând un sistem cu eliberare rapidă, imediată a RUX în cavitatea rezecată, urmată de o eliberare susținută a RUX din gelul de fibrină, cu menținerea concentrației eficiente timp de minimum 1...4 săptămâni.

Revendicări: 2
Figuri: 24

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





Procedeu pentru obținerea unui dispozitiv pentru livrarea prelungită și controlată a ruxolitinibului în glioblastom

Descrierea invenției

Invenția se referă la dispozitive de livrare prelungită și controlată a ruxolitinibului (inhibitor JAK/STAT3) în glioblastom.

Glioblastomul (GBM) este cea mai frecventă și mai agresivă tumoră cerebrală malignă primară. În ciuda tratamentului maximal actual (rezechție chirurgicală, chimioterapie cu temozolomidă și radioterapie), supraviețuirea mediană a pacienților tratați este de doar 15 luni. În ultimii 30 de ani, nu s-au făcut progrese pentru a îmbunătăți prognosticul acestor pacienți [1]. Caracteristica definitorie a GBM este natura agresivă și infiltrativă a celulelor tumorale în parenchimul cerebral. Din această cauză, este imposibilă terapia cu intenție curativă în ciuda rezechției macroscopice largi. Prin urmare, recurența GBM apare invariabil în toate cazurile la aproximativ 2-3 cm de la marginea cavității de rezechție, ducând în cele din urmă la decesul pacientului.

STAT3 este un factor de transcripție implicat în semnalizarea mediată de citokine și a factori de creștere. Activat constitutiv în diferite patologii neoplazice, STAT3 este un nod oncogen critic în glioblastoma, modulând expresia mai multor gene implicate în proliferare (MYC, CCND1, CCND2, KLF4, PIM1, SMAD7), inhibarea apoptozei (BCL2, BCLXL, BIRC5), angiogenează (HIF1A, VEGF) și invazie (MMP2, MMP9 și ICAM1) [2-6]. În plus, activarea STAT3 este asociată cu rezistența la tratamentul standard chimio- și radioterapic [7]. Studii din literatura de specialitate sugerează că există de asemenea o corelație puternică între activarea STAT3 și scăderea supraviețuirii pacienților cu GBM [8-10]. În ultimii ani au fost dezvoltate diverse molecule pentru a inhiba calea de semnalizare JAK/STAT3. Dovezile clinice ale inhibării STAT3 au fost validate cu aprobarea FDA pentru ruxolitinib (inhibitor JAK/STAT3) în mielofibroza primară și policitemia vera, arătând o creștere a supraviețuirii în comparație cu alte alternative terapeutice disponibile [11].

Relevanța ruxolitinibului ca tratament GBM constă în inactivarea STAT3, conducând astfel la inhibarea proliferării, angiogenezei, recurenței și scăderea rezistenței la tratamentul standard actual. S-a demonstrat că ruxolitinib scade fosforilarea STAT3 în culturi celulare de GBM într-o manieră dependentă de doză [12,13].

Având în vedere profilul de siguranță al ruxolitinibului și faptul că este aprobat de FDA, progresul către un studiu de fază incipientă pentru GBM a fost un efort fezabil și un studiu clinic (NCT03514069) este deja în desfășurare la Cleveland Clinic, Case Comprehensive Cancer Center. Cu toate acestea, așa cum s-a dovedit pe modelele animale, ruxolitinib nu străbate BHE și nu pătrunde în mod eficient în parenchimul cerebral [14]. Din păcate, acest studiu evaluează administrarea sistemică (nu locală) de ruxolitinib în asociere cu TMZ și RT. Cum administrarea orală sau intravenoasă nu poate elibera concentrații eficiente de medicamente fără evenimente adverse sistematice semnificative și glioblastomul metastatic este extrem de rar descris în literatură [15], o administrare sistemică a ruxolitinibului se dovedește nepotrivită.

Problema majoră în dezvoltarea moleculelor destinate patologiilor sistemului nervos central o constituie bariera hemato-encefalică (BHE). Strategiile locale de livrare a medicamentelor, cum ar fi aplicarea topică în cavitatea de rezecție a sistemelor de livrare a medicamentelor („drug delivery systems”, DDS) sunt soluții inovatoare pentru a ocoli BHE. Un alt avantaj al DDS este furnizarea de concentrații locale mari ale medicamentului antitumoral încărcat, o fereastră terapeutică lungă, evitând efectele secundare sistemice. Sistemul propus se bazează pe combinarea unui gel de fibrină bogat în trombocite care încorporează ruxolitinib împreună cu nanoparticule polimerice (NP) încărcate cu ruxolitinib care asigură o eliberare susținută.

DDS ideal trebuie să se lipească de marginile cavității de rezecție, să fie adaptabil la forma sa și să aibă proprietăți mecanice apropiate de cele ale creierului pentru a evita creșterea presiunii intracraniene [16]. Din aceste motive, componenta majoră a DDS-ului nostru este gelul de fibrină, deja folosit în neurochirurgie ca biomaterial de vindecare postoperatorie pentru a umple cavitatea de rezecție. Gelul de fibrină acționează și ca un DDS, asigurând o eliberare rapidă a ruxolitinibului, suficientă pentru atingerea rapidă a concentrației țintă. Deoarece majoritatea medicamentelor au timpi de înjumătățire scurți la nivel cerebral, sistemul este optimizat prin încorporarea nanoparticulelor tip rezervor, încărcate cu ruxolitinib.

La momentul actual, singurul dispozitiv de livrare topică de pe piață cu aplicabilitate în glioblastom este reprezentat de Gliadel®. Acest sistem eliberează carmustină, un agent alchilant utilizat ca alternativă la tratamentul sistemic cu temozolomidă. Totuși, acest DDS s-a dovedit inferior terapiei standard cu temozolomidă în ceea ce privește supraviețuirea [17]. Având în vedere lipsa de specificitate și eficiența scăzută a agenților alchilanți, terapiile țintite încorporate în sisteme de livrare topică reprezintă un pas necesar în tratamentul acestei maladii.

În ultimii ani au fost dezvoltate numeroase platforme pentru livrarea medicamentelor, pe baza materialelor anorganice, organice sau hibride. Dintre acestea, materialele polimerice sunt considerate cele mai promițătoare datorită proprietăților lor maleabile, cum ar fi încorporarea de diferiți compuși chimioterapici, stabilitate ridicată, căi variate de administrare. Sinteza nanoparticulelor polimerice prin imprimare moleculară permite generarea de situsuri specifice, cu dimensiuni și funcții complementare moleculei ”șablon”. Specificitatea acestor situsuri determină o posibilitate de încărcare superioară cu substanța farmaceutic activă (API), îmbunătățirea cineticii de eliberare și chiar livrarea la țintă a substanței [18].

Polimerii imprimați molecular (MIP) sunt nanoparticule sintetice frecvent utilizate în domeniul biomedical, în tehnici analitice sau de diagnostic, ca biosenzori sau sisteme de transport și eliberare susținută sau controlată a medicamentelor [19].

Elemente de noutate

Dispozitivul propus are structura unui dublu-rezervor, cu scopul de a ceda chimioterapicul cu viteze diferite. Hidrogelul de fibrină va conferi o eliberare rapidă a substanței, în decursul a câteva zile, în timp ce MIP-urile dispersate în vehicul vor asigura eliberarea susținută, menținând concentrația eficientă timp de 1-4 săptămâni. DDS este conceput pentru a fi administrat în cavitatea post-rezecție tumorală, țintind celulele canceroase infiltrative, responsabile de reapariția tumorii.

Unul dintre elementele de noutate constă în administrarea locală a RUX în terapia GBM, sub formă de bază încorporată în hidrogel. Această abordare avantajoasă din punct de vedere a eficacității și efectelor secundare, oferind proprietăți superioare terapiei uzuale sistemice.

La nevoie, hidrogelului i se poate asocia cu un sistem de tip rezervor medicamentos pe bază de polimeri imprimați molecular, pentru ajustarea cineticii de cedare și îmbunătățirea eficacității. Utilizarea materialelor polimerice biocompatibile permite adaptarea încărcăturii medicamentoase a DDS cu scopul de a modula profilul de cedare și de a ajusta doza astfel încât să asigure eficacitatea dorită. Un al doilea element de noutate constă în încărcarea prin tehnica imprimării moleculare a RUX, prin scopul de a obține un dispozitiv pentru cedare prelungită. De asemenea, administrarea de MIP-uri în GBM este o nouă abordare ce evidențiază acest studiu față de literatură. Alegerea și sinteza MIP-uri biocompatibile și biodegradabile este ideală, prin proprietățile de eroziune hidrolitică care pot oferi o cedare superioară față de materialele non-erodabile.

DDS poate include orice sistem de tip polimeric, însă atenția este îndreptată spre MIP-uri, datorită avantajelor semnificative față de alte sisteme de transport. Se ia în calcul și posibilitatea utilizării de hidrogeluri din alte materiale biocompatibile (gelatină, chitosan, carboximetilceluloză, sau alți derivați sintetici sau semisintetici similari, etc.). Totuși, hidrogelul de fibrină oferă posibilitatea de a fi preparat chiar din plasma pacientului, prelevată în timpul intervenției chirurgicale, asigurând biocompatibilitate maximă, fără efecte imunogene.

Avantajele sistemului de transport

- Posibilitatea încărcării unei cantități/concentrații superioare de citostatic, sau orice alt API
- sistemul oferă o doză de atac prin substanța liberă încărcată în vehiculul tip hidrogel
- dispozitivul asigură în mod susținut concentrația minimă eficientă pe o perioadă de timp de 1-4 săptămâni
- administrarea locală a formulării în cavitatea rămasă după rezecția chirurgicală a glioblastomului
- încorporarea RUX în MIP contribuie la protecția substanței față de procesele de degradare citosolică
- polimerii imprimați molecular rezultați prezintă o stabilitate fizico-chimică superioară altor materiale, fiind de asemenea și biocompatibili cu țesutul cerebral
- utilizarea hidrogelului de fibrină ca vehicul contribuie pozitiv la vindecarea post-chirurgicală
- selectivitatea RUX față de celulele canceroase care supraexprimă oncogenă STAT3 exclude efecte secundare toxice la nivelul celulelor sănătoase
- posibilitatea individualizării formulării prin sinteza hidrogelului din componente prelevate direct din sângele pacientului în momentul intervenției
- oferă posibilitatea exploatării căii de semnalizare, aceasta fiind studiată doar în cazul administrării pe cale sistemică

Descriere tehnică

1. Studii preliminare

Afinitatea RUX față de monomeri funcționali acrilici a fost evaluată prin titrare calorimetrică izotermă. Acidul trifluormetacrilic (TFMAA) a demonstrat cea mai mare afinitate față de RUX, urmat de acidul metacrilic (MAA) și apoi acrilamida (AM) (Figura 1 a și b).

Dozarea RUX a fost realizată inițial printr-o metodă spectrofluorimetrică, folosind un sistem modular Avantes (Olanda) cu sursă de lumină de xenon (Figurile 2 și 3). Ulterior, cuantificarea RUX a fost realizată prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC), utilizând un sistem cromatografic Agilent 1200 cu detector DAD. Faza staționară a fost o coloană cromatografică Agilent Eclipse XDB-C18 (4,6x150mm, 5μm ID), iar ca fază mobilă s-a folosit un amestec de 30% ACN și 70% tampon acetat (5mM, pH= 4,5). Ceilalți parametri corespunzători metodei: volumul injectat 10μl, temperatura 40°C, debitul 0.8ml/min, detecția 225 nm. Soluțiile de injectare pentru construirea curbei de calibrare au fost constituite din RUX dizolvat în acetonitril (ACN), de diferite concentrații. Dreapta de regresie liniară s-a obținut cu ajutorul a 7 concentrații diferite de RUX situate în domeniul 0.1 – 100 μg/ ml injectate în triplicat. Linearitatea a fost evaluată prin analiza regresiei lineare (Figura 5).

2. Sinteza și caracterizarea hidrogelului de fibrină

În această etapă s-a realizat sinteza gelului de fibrină prin protocolul de mai jos și apoi a fost evaluată performanța formulărilor prin studiul eliberării *in vitro* a RUX. Tehnologia de preparare a gelului s-a bazat pe adăugarea la o soluție de fibrinogen, a unei soluții de trombină umană la 37°C. S-au testat diverse concentrații de fibrinogen, respectiv trombină, urmărindu-se să se obțină într-o primă fază un gel cu o consistență potrivită. Ulterior au fost evaluate două amestecuri prin studii de cedare *in vitro* (Tabelul 1). Ca solvent la prepararea gelurilor s-a folosit tampon fosfat salin (PBS) cu pH=7.4. În scop comparativ, pentru a observa influența gelului de fibrină asupra cedării RUX, a fost preparat și testat un amestec de RUX în aceeași cantitate, în PBS.

Tabelul 1. Compoziția formulărilor gelului de fibrină încărcat cu RUX.

| Componenta hidrogelului | Cantitate și codul formulării | | |
|-------------------------|-------------------------------|-------------|---------|
| | 20.1 / 20.2 | 40.1 / 40.2 | RUX-PBS |
| Fibrinogen | 20 mg | 40 mg | 0 |
| Trombină 0.1UI/μL | 8,75 μL | 8,75 μL | 0 |
| Ruxolitinib | 700 μg | 700 μg | 700 μg |
| PBS pH=7.4 | 300 μL | 300 μL | 300 μL |

Experimentele de cedare au fost efectuate cu ajutorul unui sistem de celule de difuzie Franz (PermeGear, USA), folosind membrane sintetice hidrofile de polisulfonă. Celulele de difuzie Franz au prezentat o suprafață de difuzie de 0,6362 cm² și un volum al compartimentului receptor de 10 ml. Ca mediu receptor s-a utilizat soluția salină de tampon fosfat pH=7.3. Pe toată durata testului, soluția a fost menținută la temperatura de 37 °C cu ajutorul unei băi termostatate cu circulație externă (Julabo Corio C-B) iar mediul receptor a fost agitat continuu (500 rpm) cu

ajutorul unui agitator magnetic. Membrana sintetică a fost montată între compartimentul donor și cel receptor al celulelor de difuzie și a fost menținută în prealabil 30 de minute în mediul receptor pentru echilibrare. În compartimentul donor au fost adăugate toate componentele necesare preparării gelului, urmat de menținerea amestecului la 37 °C până la gelificare completă. Apoi a fost adăugată soluția PBS în compartimentul acceptor acesta fiind momentul 0 al studiului. Câte 50 μL soluție receptoare au fost apoi prelevați la diverși timpi (3, 6, 10, 13, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 minute și 3, 4, 5, 6, 18, 20, 24, 42, 44 ore) fiind înlocuiți cu mediu receptor proaspăt.

În urma studiilor de cedare *in vitro* folosind celulele Franz (Figura 6), se poate observa că în cazul soluției de RUX în PBS, cedarea a atins platoul la 90 minute, iar în compartimentul receptor s-au regăsit ~95 μg RUX. În cazul gelurilor pe bază de fibrină, cedarea s-a realizat mai lent iar platoul a fost atins la concentrații mai mici. În cazul gelului cu concentrație ridicată de fibrinogen (40 mg), cedarea a avut loc mai rapid și s-a eliberat o cantitate mai mare de RUX (~85 μg RUX/10 mL) decât în cazul în care s-au utilizat 20 mg fibrinogen.

3. Sinteza și caracterizarea MIP-urilor

Dintre numeroasele tipuri de materiale și sisteme de transport, s-au sintetizat și caracterizat ca exemple trei MIP-uri pe bază de acrilat și unul pe bază de stiren, dar nu se exclude utilizarea oricărui alt MIP biocompatibil și/sau biodegradabil.

Pe baza caracteristicilor structurale ale moleculei țintă, au fost selectați patru monomeri funcționali pentru sinteza de MIP: acrilamidă (AM) pentru MIP1, acid trifluoromecric (TFMAA) pentru MIP2, acid metacrilic (MAA) pentru MIP3 și stiren (STY) pentru MIP4. În toate cazurile, trimetilolpropan trimetacrilat (TRIM) a fost utilizat ca agent de reticulare și 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN) ca inițiator al reacției de polimerizare. Acești compuși sunt frecvent utilizați datorită imprimării eficiente, stabilității ridicate și a biocompatibilității.

MIP-urile au fost sintetizate prin fotopolimerizare. După amestecarea tuturor componentelor (Tabel 2), amestecurile de pre-polimerizare au fost ținute sub lumină UV (365 nm) timp de 24 ore la temperatura camerei pentru a polimeriza. Particulele polimerice au fost separați de solvent prin centrifugare (7830rpm, 30min), supernatantul a fost prelevat și utilizat pentru teste ulterioare, iar pulberea rămasă a fost uscată la temperatura camerei timp de 2-24h. Polimeri non-imprimați (NIP) cu scopul de a fi utilizați ca referințe au fost preparați în condiții similare, fără adăugarea substanței active.

Raportul molar a fost păstrat identic în toate cazurile, respectiv șablon:monomer:agent de reticulare de 1:1:8. Concentrațiile au variat între 2.5-5mM pentru monomeri și RUX, 20-40mM pentru TRIM și 1.5-3 mM AIBN.

Tabelul 2. Compoziția amestecurilor de pre-polimerizare

| Polimer | Șablon 2.5 – 5mM | Monomer functional 2.5 – 5mM | Agent de reticulare 20 – 40mM | Inițiator 1.5 – 3mM | Solvent |
|---------|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|---------|
| MIP 1 | RUX | AM | TRIM | AIBN | ACN |
| MIP 2 | | TFMAA | | | |
| MIP 3 | | MAA | | | |
| MIP 4 | | STY | | | |
| NIP 1 | - | AM | | | |
| NIP 2 | | TFMAA | | | |
| NIP 3 | | MAA | | | |
| NIP 4 | | STY | | | |

Legendă: ACN= acetonitril, AM= acrilamidă, AIBN= azobis(izobutironitril), MAA= acid metacrilic, MIP= polimer imprimat molecular, NIP= polimer non-imprimat, RUX= ruxolitib, STY= stiren, TFMAA= acid trifluormetacrilic, TRIM= trimetilolpropan trimetacrilat

Intervalul de încorporabilitate a pulberii de MIP în vehicul se situează în intervalul 1-50 mg pulbere la 1 mL hidrogel, determinată empiric pe baza observațiilor legate de stabilitatea suspensiilor. În funcție de cantitatea maximă de pulbere încorporată, doza totală se poate ajusta prin încărcarea cu RUX liber pentru a compensa diferența până la doza terapeutică minim necesară. De asemenea, intervalul de timp prestabilit pentru a asigura eficacitatea este un parametru ajustabil în funcție de necesitatea clinică, pentru a putea oferi o terapie individualizată.

Caracterizarea fizico-chimică

Nanoparticulele (NP) au fost caracterizate în ceea ce privește morfologia, dimensiunea și potențialul lor Zeta prin tehnica dispersiei dinamice a luminii (DLS) și prin microscopie electronică de baleiaj. Cel mai mic diametru al particulelor a fost observat pentru MIP2 cu 484 ($\pm 19,92$) nm, urmat de MIP4 cu 1779 ($\pm 58,82$) nm și MIP1 cu 1780 ($\pm 44,29$) nm, și în final MIP3 cu 2677 ($\pm 37,07$) nm. În cazul NIP-urilor, diferențele între particule au fost mai puțin semnificative (Tabel 3).

Capacitatea de încărcare a MIP-urilor a fost evaluată indirect, pe baza concentrației RUX din supernatantul rezultat după polimerizare. MIP2 a prezentat cea mai mare capacitate de încărcare de 38,01 ($\pm 8,03$), urmată de MIP1 cu 31,48 ($\pm 0,56$) și MIP3 cu 31,45 ($\pm 5,44$) μg RUX/mg polimer (Figura 7).

Tabel 3. Caracteristicile NP determinate prin DLS

| Polimer | D (nm) \pm SD | PDI \pm SD | ZP (mV) \pm SD | Mob ($\mu\text{mcm/Vs}$) \pm SD | Cond (mS/cm) \pm SD |
|---------|----------------------|----------------------|-----------------------|--|--------------------------|
| MIP 1 | 1780 \pm 44,29 | 0,799 \pm 0,074 | -47,07 \pm 0,404 | -3,689 \pm 0,033 | 0,03787 \pm 0,00155 |
| MIP 2 | 484 \pm 19,92 | 0,584 \pm 0,045 | -36,57 \pm 1,168 | -2,867 \pm 0,094 | 0,00453 \pm 0,00433 |
| MIP 3 | 2677 \pm 37,07 | 0,873 \pm 0,219 | -43,00 \pm 0,300 | -3,369 \pm 0,025 | 0,00582 \pm 0,00212 |
| MIP4 | 1779 \pm 58,82 | 0,637 \pm 0,175 | -38,70 \pm 0,721 | -3,035 \pm 0,055 | 0,00473 \pm 0,00284 |
| NIP 1 | 1291 \pm 427,76 | 0,920 \pm 0,139 | -26,50 \pm 1,510 | -2,073 \pm 0,121 | 0,00849 \pm 0,00894 |
| NIP 2 | 1179 \pm 244,25 | 0,929 \pm 0,066 | -40,60 \pm 2,193 | -3,172 \pm 0,167 | 0,00950 \pm 0,00631 |
| NIP 3 | 1696 \pm 95,35 | 0,831 \pm 0,123 | -41,5 \pm 1,020 | -3,250 \pm 0,080 | 0,00880 \pm 0,00970 |
| NIP 4 | 1784 \pm 305,31 | 0,935 \pm 0,097 | -35,10 \pm 0,872 | -2,751 \pm 0,069 | 0,00305 \pm 0,00212 |

Legendă: D= diametru, MIP= polimer imprimat molecular, NIP= polimer non-imprimat, PDI= indice de polidispersie, SD= deviația standard, ZP= potențial Zeta

Pentru a evalua eficiența imprimării, NIP-urile corespunzătoare au fost expuse la RUX timp de 24 de ore, evaluând legarea lor nespecifică. Au fost obținute următoarele valori: 9,031 ($\pm 0,672$) pentru NIP1, 8,765 ($\pm 0,398$) pentru NIP2 și 1,710 ($\pm 0,452$), exprimate în $\mu\text{g RUX/mg}$ polimer. Astfel, a fost demonstrată superioritatea MIP-urilor față de NIP-uri în ceea ce privește eficiența imprimării și legarea specifică de molecula țintă (Figura 8).

Studii de cedare

Studiile de cedare a fost realizate în mediu de tampon fosfat (pH=7.4) la 37 °C. Pentru a asigura condițiile "sink", a fost adăugat laurilsulfat de sodiu 2% la mediul de cedare. Au fost prelevate probe la intervale regulate de timp și analizate spectrofluorimetric sau prin HPLC-UV.

a) Metoda spectrofluorimetrică

Profilul de cedare a RUX din polimeri a fost evaluat inițial prin experimente în timp real, folosind un sistem bazat pe celule Franz cuplate cu detecție fluorimetrică. Pentru aceasta a fost utilizată un sistem închis, constituit dintr-o celulă Franz conectată la o baie de apă termostată la 37°C. Prelevarea probelor a avut loc în mod automat cu ajutorul unei pompe peristaltice care prelevează în mod continuu soluție din celula Franz și o transferă în celula de detecție. Au fost testate mai multe tipuri de membrane (filtrantă, dializă, PermeaPad, PermeaPlain, Merck). Schema ansamblului utilizat este reprezentată în Figura 9.

În figurile 10 și 11 sunt prezentate profilurile de cedare ale MIP2 și MIP4, de unde se poate observa eliberarea susținută a RUX timp de >200 ore.

b) Metoda HPLC

În cazul acestei metode, experimentele au fost realizate similar, cu ajutorul celulelor de difuzie Franz, însă probele au fost prelevate cu ajutorul unor capilare de sticlă și analizate prin HPLC. Din profilul de cedare a RUX liber din hidrogel (Figura 12) se poate observa faptul că vâscozitatea ridicată hidrogelului asigură o cedare susținută a RUX liber în timp, ceea ce justifică utilizarea acestuia ca vehicul pentru DDS.

Tabel 4. Procentele de cedare a RUX din hidrogel

| Timp (h) | RUX cedat (%) \pm SD |
|----------|------------------------|
| 1 | 8,545 \pm 0,225 |
| 2 | 23,387 \pm 7,087 |
| 3 | 26,893 \pm 4,265 |
| 4 | 33,655 \pm 5,289 |
| 8 | 30,136 \pm 8,040 |
| 18 | 38,683 \pm 2,575 |
| 24 | 46,151 \pm 8,350 |
| 70 | 47,534 \pm 8,642 |

Pentru o evaluare mai rapidă a cedării, am recurs la studii de cedare accelerată, unde polimerii au fost puși în contact direct cu mediul de cedare și amplasate pe un sistem de agitare continuă prin rotație. Din figura 13 se poate observa faptul că MIP2 oferă cele mai bune rezultate din punct de vedere a cantității de substanță activă eliberată (~42%).

Tabel 5. Procentele de cedare a RUX din MIP

| Timp (h) | RUX cedat(%) \pm SD | | |
|----------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| | MIP 1 | MIP 2 | MIP 3 |
| 1 | 18,020 \pm 4,480 | 25,860 \pm 7,826 | 22,568 \pm 8,644 |
| 2 | 21,503 \pm 4,864 | 33,439 \pm 10,462 | 24,940 \pm 9,091 |
| 3 | 22,953 \pm 5,295 | 35,785 \pm 9,664 | 26,501 \pm 9,784 |
| 6 | 24,510 \pm 6,117 | 37,954 \pm 9,411 | 27,727 \pm 10,657 |
| 12 | 25,576 \pm 6,428 | 38,999 \pm 9,439 | 28,656 \pm 10,824 |
| 24 | 26,292 \pm 6,527 | 40,124 \pm 9,549 | 29,383 \pm 10,906 |
| 48 | 26,877 \pm 7,036 | 40,575 \pm 9,734 | 29,996 \pm 11,171 |
| 72 | 27,737 \pm 7,025 | 41,165 \pm 9,570 | 30,984 \pm 11,458 |
| 96 | 28,232 \pm 7,072 | 41,998 \pm 9,703 | 31,501 \pm 11,618 |

Modelare matematică

Cinetica de cedare a fost fitată pe modelul Korsmeyer-Peppas cu ajutorul programului SigmaPlot. Coeficientul "n" arată o difuzie de tip Fickian, eliberarea având loc în sensul gradientului de concentrație.

Tabel 6. Coeficienții de corelație cu modelul Korsmeier-Peppas

| MIP | Korsmeier-Peppas model | | | |
|-----|------------------------|-------|---------|--------|
| | R | AIC | k | n |
| 1 | 0,9921 | 18,75 | 14,8172 | 0,0725 |
| 2 | 0,9848 | 42,32 | 41,5276 | 0,0593 |
| 3 | 0,9971 | 17,47 | 24,0309 | 0,0613 |

Determinarea dozelor terapeutice de RUX pe linia celulară C6

Pentru determinarea dozelor terapeutice de RUX a fost efectuat testul de viabilitate MTT, care oferă informații despre numărul celulelor viabile și metabolismul acestora. Pentru asta a fost utilizată linia celulară C6, obținută de la șobolani Wistar cu GBM indus chimic. După aderarea celulelor pe plăci (24 de ore), la mediul de cultură au fost adăugate diferite concentrații de RUX în etanol sau dimetilsulfoxid (DMSO). Se observă că doza de 200 μ M este cea mai apropiată de IC50 și faptul că DMSO în proporție de 0.5% nu induce efecte toxice (Figura 16).

Efectele polimerilor imprimați asupra viabilității celulelor C6

Efectele polimerilor imprimați (MIP) și a celor non-imprimați (NIP) au fost evaluate pe celulele C6. La celulele aderate s-au atașat inserturi cu membrană permeabilă de policarbonat, conținând hidrogel de fibrină (fibrinogen 20mg/mL, trombină 4UI) în care au fost suspendate MIP-urile. (M1- acrilamidă, M2-acid trifluormetacrilic, M3-stiren). Plăcile au fost sterilizate prin expunere la UV, 20 minute. Co-cultura celulelor C6 cu inserturile cu polimeri s-a efectuat timp de 24, 48 și 96 ore (Figura 15). Evaluarea efectelor citotoxice ale polimerilor s-a efectuat prin testul de viabilitate Alamar Blue și prin preluarea imaginilor de microscopie.

În primele 24 ore, efectele citotoxice au fost observate doar la RUX liber 200 μ M. MIP-urile și NIP-urile nu au produs efecte citotoxice în primele 24 de ore. După 48 de ore, viabilitatea celulară a scăzut drastic pentru toate probele, în special MIP/NIP 2 și MIP/NIP 3. Scăderile viabilității celulare au fost și mai accentuate după 96 de ore. În cadrul aceluiași experiment au fost preluate imagini de microscopie optică a celulelor. La 24 ore se observă ca celulele și-au păstrat viabilitatea și chiar au proliferat mai intens față de control (Figura 16). După 48 ore celulele vizualizate microscopic au prezentat modificări drastice ale numărului și morfologiei (Figura 17). Efectele RUX liber au fost dependente de doză (Figura 18). Astfel, aparent atât polimerii imprimați cât și cei neimprimați au indus citotoxicitate după 48 ore și 96 de ore, fenomen ce a fost investigat mai în detaliu în cele ce urmează.

Determinarea efectului monomerilor asupra celulelor de glioblastom C6

Deoarece se consideră ca citotoxicitatea asociată expunerii la polimeri poate fi datorată monomerilor reziduali din matricea polimerică, s-a evaluat efectul diversilor monomeri funcționali asupra viabilității celulare prin testul CCK8. Monomerii testați au fost: acrilamidă (AM), acid trifluormetacrilic (TFMAA), stiren (STY), acid metacrilic (MAA), polidimetilsiloxan (PDMS), acid itaconic (AI), vinilacetat (VA), etilenglicolvinileter (EGVE), acid 4-stirensulfonic (SSA), trimetilolpropan trimetacrilat (TRIM), divinilbenzen (DVB). În paralel s-au testat și 4 doze de RUX (200, 150, 100 și 75 μ M) și o doză de temozolomidă (50 μ M). Rezultatele sunt ilustrate în Figura 19. Monomerii care nu au indus efecte citotoxice sunt cei mai hidrofilii: AM, MAA, AI și SAA. Cu toxicitate intermediară dependentă de doză, au fost STY, PDMS, VA și DVB. RUX liber 200 μ M și temozolomida 50 μ M au indus o scădere a viabilității celulare cu 50%.

Evaluarea efectului biologic asupra celulelor de glioblastom C6 al ruxolitinib încorporat în gelul de fibrină

Efectul ruxolitinibului încorporat în gelul de fibrină, și implicit evaluarea eliberării acestuia în mediul de cultură a fost testat prin testul de apoptoză. Protocolul experimentului a constat în însămânțarea celulelor C6 pe plăci cu 6 godeuri. După aderarea celulelor, la 24 ore s-au adăugat inserturi Millicell cu pori de 0,4 μ m, la fiecare godeu. În prealabil, în inserturi s-a adăugat soluție de fibrinogen cu o concentrație de 15mg/ml PBS (câte 500 μ l în fiecare godeu). Încorporarea ruxolitinibului s-a efectuat cu două doze (concentrație finală de 200 și 400 μ M) iar pentru temozolomide cu o concentrație finală de 50 μ M. Gelificarea spre gel de fibrina s-a obținut prin adăugarea în fiecare godeu de 24 μ l de soluție de trombina (24UI). Inserturile au fost incubate timp de 15 min la 37°C și după gelificarea fibrinei au fost inserate în plăcile cu 6 godeuri cu celulele C6. Controlul negativ a fost reprezentat de celulele netratate iar controlul pozitiv a fost reprezentat de tratamentul direct al celulelor cu ruxolitinib liber (200 μ M). După 20 de ore, celulele au fost vizualizate prin microscopie optică, apoi tripsinizate și numărate. După o spălare cu tampon fosfat rece, 1x10⁶ celule au fost suspendate în 100 μ l mediu (Annexin Binding Buffer). La suspensia de celule s-a adăugat 5 μ l de soluție de annexin și 1 μ l de soluție de iodură de propidiu (100 μ g/ml), urmată de incubare 15 min la temperatura camerei. La final, în fiecare probă s-au adăugat încă 500 μ l de Annexin Binding Buffer. Celulele au fost menținute pe gheață până la efectuarea citirilor cu un citometru de flux BioRad. Rezultatele microscopiei optice și histogramele obținute la citometru de flux sunt ilustrate în Figurile 20 și 21. Controlul netratat a prezentat un procent de 3,31% celule apoptotice (0,76% în apoptoză precoce și 2,64 în apoptoză tardivă; 3,39% necroză). Celulele co-cultivate cu gelul de fibrină au avut un procent ușor mai crescut de celule apoptotice de 5,88% (0,76% apoptoză precoce, 5,12% apoptoză tardivă; 5,77% necroză). Cel mai înalt procent de apoptoză a fost observat la celulele tratate cu ruxolitinib liber (200 μ M) de 50,2% (40,3% apoptoză precoce, 9,57% apoptoză tardivă; 0,84% necroză) (Figura 20).

Celulele co-cultivate cu inserturi la care s-a încorporat ruxolitinib (200 și 400 μ M) și temozolomidă (50 μ M) au avut rate de apoptoză mult mai scăzute față de cele tratate cu Rux liber, dar totuși mai mari decât controlul netratat, sugerând o eliberare controlată ale substanțelor active. Astfel la doza

de Rux de 200 μ M, procentul celulelor apoptotice a fost de 9,15% (2,73% apoptoză precoce și 6,42% apoptoză tardivă; 3,42% necroză). Crescând concentrația de Rux la 400 μ M, s-a observat un indice apoptotic și mai crescut de 14,11% (3,4% apoptoză precoce și 10,71% apoptoză tardivă; 3,85% necroză). Efectul temozolomidei a fost mult mai atenuat cu un procent de celule apoptotice de 6,44% (0,85% apoptoză precoce și 5,59% apoptoză tardivă; 3,12% necroză) (Figura 21).

Rezultate legate de inducerea apoptozei la nivele mai scăzute pot fi un indiciu indirect al eliberării susținute de ruxolitinib din gelul de fibrină după 20 de ore, contrastând cu procentul crescut de moarte celulară indus la aceeași concentrație de ruxolitinib liber.

Modelul animal și efectul tratamentului local prin DDS încărcat cu ruxolitinib

Pentru experimentele *in vivo* au fost folosiți masculi de șobolani Wistar de aproximativ 6 săptămâni. În prima etapă s-a realizat inducerea tumorii după următorul protocol: anestezia a fost realizată cu o combinație de ketamină 100mg/kg și xilazină 10 mg/kg, administrate intraperitoneal. Volumele utilizate pentru preparare au fost folosite după cum urmează: ketamină 2.0 ml, xilazină (20mg/ml) 1.0 ml, apă 10 ml, obținându-se 4.0 ml pentru administrarea a 20 de doze. Analgezia postoperatorie a fost realizată cu buprenorfină 0.05 mg/kg. În timpul intervenției chirurgicale s-a administrat oxigen pe mască, monitorizându-se pulsul și saturația SpO₂. Pentru a împiedeca uscarea corneei, s-a aplicat gel oftalmic. Pentru reversarea anesteziei s-a administrat atipamezol (agent antagonist pentru xilazina).

Intervenția chirurgicală, realizată în condiții sterile (Figura 22), a avut loc după următorii pași:

- Fixarea animalului cu mijloace de contenție la nivelul unei plăci de polistiren
- Dezinfectarea zonei de intervenție la nivelul scalpului cu o soluție de betadină 100 mg/ml
- Realizarea inciziei la nivelul liniei mediane a scalpului de 1 cm cu expunerea oaselor parietale
- Realizarea unei găuri de trepan de aproximativ 3 mm cu ajutorul unui dril, la nivelul osului parietal stâng, la 2 mm de sutura sagitală și 2 mm de sutura coronală
- injectarea în gaura de trepan prin punșionarea durei mater la o adâncime de 3 mm în parenchimul cerebral a 20.0000 celule tumorale din linia C6, suspendate în 5 uL de mediu
- Sutura tegumentului

Urmărirea imagistică CT a avut loc la interval de 2 zile, pentru evaluarea prezenței tumorii în parenchimul cerebral (Figura 23). Animalele au dezvoltat tumori vizibile la examenul CT la un interval de 7-10 zile de la injectarea celulelor tumorale. 50% din animalele de experiență au dezvoltat tumori, cu o rată de dezvoltare mai mare decât cea raportată în literatură (~ 20%).

Animalele care au dezvoltat tumoră au fost supuse unei alte intervenții cu scop terapeutic:

- anestezie realizată după protocolul descris mai sus
- dezinfectarea zonei de intervenție la nivelul scalpului cu o soluție de betadină 100 mg/ml
- reincizia pe același traiect cu incizia inițială

- secționarea durei mater cu expunerea parenchimului cerebral la nivelul găurii de trepan
- injectarea cu o seringă Hamilton a unui volum de 5-10 μ L din suspensia MIP2 (4 mg/mL) în fibrinogen (10 mg/mL)
- administrarea la suprafață a 5 μ L soluție trombină (100 UI/mL) pentru a forma rețeaua de fibrină
- sutura plăgii
- urmărirea clinică a animalelor de experiență (Tabelul 7)

Tabelul 7. Parametrii urmăriți la animalele de experiență pe parcursul studiului

| Animal | Injectare celule C6 | Prezența tumorii | CT | Tratament | Tip tratament | Deces | Supraviețuire (zile) |
|--------|---------------------|------------------|----------|-----------|---------------|----------|----------------------|
| 1 | 10.01.21 | nu | 20.01.21 | nu | - | - | - |
| 2 | 10.01.21 | nu | 20.01.21 | nu | - | - | - |
| 3 | 07.03.21 | da | 15.03.21 | nu | - | 27.03.21 | 20 |
| 4 | 07.03.21 | nu | 15.03.21 | nu | - | - | - |
| 5 | 14.04.21 | nu | 22.04.21 | nu | - | - | - |
| 6 | 14.04.21 | da | 22.04.21 | nu | - | 07.05.21 | 23 |
| 7 | 05.05.21 | da | 12.05.21 | nu | - | 24.05.21 | 19 |
| 8 | 05.05.21 | nu | 12.05.21 | nu | - | - | - |
| 9 | 05.05.21 | nu | 12.05.21 | nu | - | - | - |
| 10 | 21.06.21 | da | 02.07.21 | nu | - | 12.07.22 | 18 |
| 11 | 21.06.21 | da | 02.07.21 | nu | - | 16.07.22 | 22 |
| 12 | 21.06.21 | nu | 02.07.21 | nu | - | - | - |
| 13 | 07.02.22 | da | 15.02.22 | da | RUX | 28.02.22 | 21 |
| 14 | 07.02.22 | nu | 15.02.22 | nu | - | - | - |
| 15 | 07.02.22 | nu | 15.02.22 | da | RUX | 27.02.22 | 20 |
| 16 | 14.02.22 | nu | 20.02.22 | nu | - | - | - |
| 17 | 01.03.22 | da | 10.03.22 | da | RUX | 22.03.22 | 21 |
| 18 | 01.03.22 | da | 10.03.22 | da | RUX | 23.03.22 | 22 |
| 19 | 05.03.22 | nu | 12.03.22 | nu | - | - | - |
| 20 | 05.03.22 | nu | 12.03.22 | nu | - | - | - |
| 21 | 10.03.22 | da | 23.03.22 | da | MIP2 | 05.04.22 | 35 |
| 22 | 10.03.22 | da | 23.03.22 | da | MIP2 | 12.04.22 | 42 |
| 23 | 18.03.22 | da | 14.04.22 | da | MIP2 | 11.04.22 | 33 |
| 24 | 18.03.22 | da | 14.04.22 | da | MIP2 | 28.04.22 | 50 |

În urma evaluării histologice a țesutului tumoral indus la model de rozătoare (Figura 23b) se observă aspectul caracteristic al unei tumori gliale infiltrative, cu grad înalt de anaplazie cu largi zone de necroză foarte asemănătoare cu cele prezente la pacienții umani.

Rezultatele preclinice comparative obținute pe model de rozătoare cu glioblastom indică o creștere semnificativă a supraviețuirii animalelor cu aproximativ 2 săptămâni în cazul aplicării unui tratament cu gel de fibrină și ruxolitinib încărcat în MIP2, în comparație cu lotul netratat sau cel tratat cu ruxolitinib liber (Figura 24).

Bibliografie

- [1] A. F. Tamimi and M. Juweid, "Epidemiology and Outcome of Glioblastoma,," S. De Vleeschouwer, Ed. Brisbane (AU), 2017.
- [2] Z. G. Ouedraogo, J. Biau, J.-L. Kemeny, L. Morel, P. Verrelle, and E. Chautard, "Role of STAT3 in Genesis and Progression of Human Malignant Gliomas," *Mol. Neurobiol.*, vol. 54, pp. 1–18, Oct. 2017.
- [3] N. Kiuchi *et al.*, "STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene,," *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 1, pp. 63–73, Jan. 1999.
- [4] T.-L. Lee, J. Yeh, C. Van Waes, and Z. Chen, "Bcl-xL is regulated by NF-KappaB and STAT3 through p53-dependent control in head and neck squamous cell carcinoma," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 7_Supplement, p. 1115, Apr. 2004.
- [5] P. Sepúlveda, A. Encabo, F. Carbonell-Uberos, and M. D. Miñana, "BCL-2 expression is mainly regulated by JAK/STAT3 pathway in human CD34+ hematopoietic cells," *Cell Death Differ.*, vol. 14, no. 2, pp. 378–380, 2007.
- [6] J. Huynh, A. Chand, D. Gough, and M. Ernst, "Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer - using tissue repair as a road map,," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 19, no. 2, pp. 82–96, Feb. 2019.
- [7] Z. G. Ouédraogo *et al.*, "STAT3 Serine 727 Phosphorylation: A Relevant Target to Radiosensitize Human Glioblastoma," *Brain Pathol.*, vol. 26, no. 1, pp. 18–30, Jan. 2016.
- [8] K. Masliantsev *et al.*, "Impact of STAT3 phosphorylation in glioblastoma stem cells radiosensitization and patient outcome," *Oncotarget*, vol. 9, no. 3, pp. 3968–3979, Dec. 2017.
- [9] G.-S. Lin, Y.-P. Chen, Z.-X. Lin, X.-F. Wang, Z.-Q. Zheng, and L. Chen, "STAT3 serine 727 phosphorylation influences clinical outcome in glioblastoma," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, no. 6, pp. 3141–3149, May 2014.
- [10] G. Lin *et al.*, "STAT3 Tyr705 phosphorylation affects clinical outcome in patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma," *Med. Oncol.*, vol. 31, no. 4, pp. 1–924, Apr. 2014.
- [11] C. Harrison *et al.*, "JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 9, pp. 787–798, Mar. 2012.
- [12] S. Fehling, B. McFarland, and E. Benveniste, "Ruxolitinib inhibits STAT-3 activation in glioblastoma," *Cancer Res.*, vol. 76, p. 3861, Jul. 2016.
- [13] D. A. Almiron Bonnin *et al.*, "Secretion-mediated STAT3 activation promotes self-renewal of glioma stem-like cells during hypoxia," *Oncogene*, vol. 37, no. 8, pp. 1107–1118, 2018.
- [14] CHMP, "Jakavi Product Characteristics."
- [15] J. D. Hamilton *et al.*, "Glioblastoma multiforme metastasis outside the CNS: three case reports and possible mechanisms of escape,," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 22, pp. e80-4, Aug. 2014.
- [16] C. Bastiancich, E. Bozzato, U. Luyten, F. Danhier, G. Bastiat, and V. Pr at, "Drug combination using an injectable nanomedicine hydrogel for glioblastoma treatment," *Int. J. Pharm.*, vol. 559, pp. 220–227, 2019.
- [17] J. P. Fisher and D. C. Adamson, "Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas,," *Biomedicines*, vol. 9, no. 3, Mar. 2021.
- [18] A. E. Bodoki, B. C. Iacob, and E. Bodoki, "Perspectives of molecularly imprinted polymer-based drug delivery systems in cancer therapy," *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 12, Dec.

2019.

- [19] S. He *et al.*, “Advances of molecularly imprinted polymers (MIP) and the application in drug delivery,” *Eur. Polym. J.*, vol. 143, p. 110179, Jan. 2021.

Revendicări

- 1) Procedul de obținere a unui sistem farmaceutic pentru administrarea locală a ruxolitinibului, caracterizat prin aceea că, se încorporează într-un hidrogel de fibrină substanța activă cu sau fără nanoparticule de polimeri imprimați molecular, cu cedare dependentă de timp, formând un sistem complex pentru tratamentul glioblastomului, care să asigure nivele terapeutice minime pentru distrugerea celulelor care determină recidive, caracterizat de următoarele proprietăți: asigură o eliberare rapidă, imediată a ruxolitinibului în cavitatea rezecată urmată de o eliberare susținută a substanței active, cu menținerea concentrației eficiente timp de minim 1-4 săptămâni.
- 2) Sistem de livrare complex bazat pe hidrogel de fibrină și nanoparticule polimerice imprimați molecular, care asigură cedarea ruxolitinibului, obținut prin procedeul definit prin **revendicarea 1**.

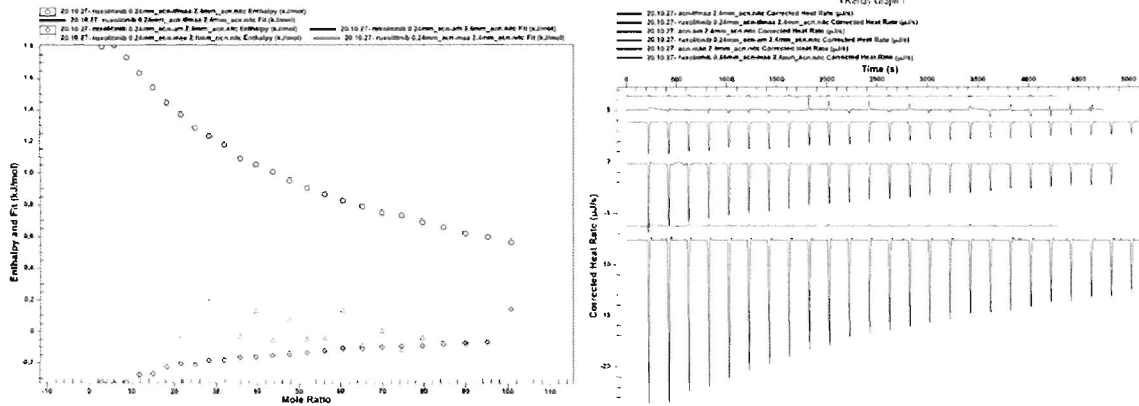


Figura 1. Analizele ITC. 1.a) Entalpia în funcție de raportul molar 1.b) Rata de căldură în funcție de timp

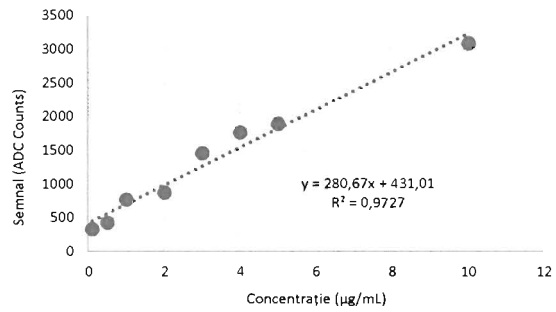
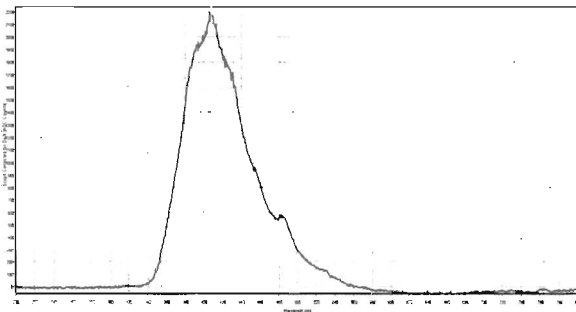


Figura 2. Spectrul de fluorescență al RUX Figura 3. Dreapta de calibrare în spectrofluorimetrie

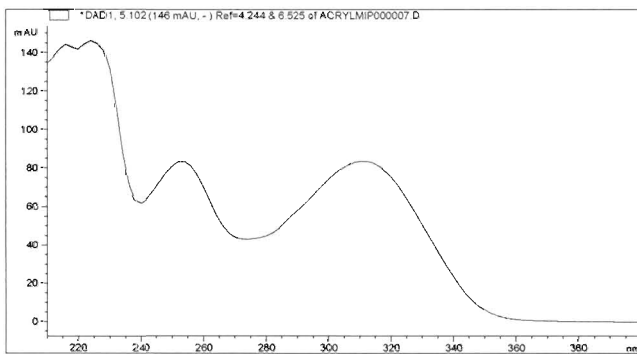


Figura 4. Spectrul UV al RUX

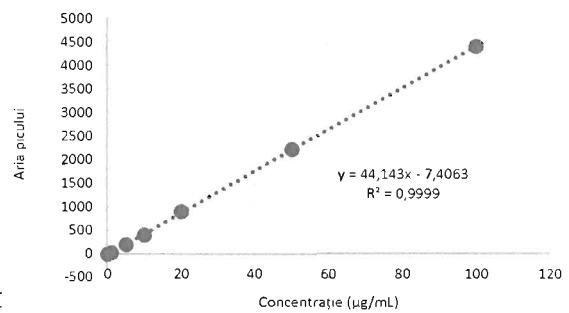


Figura 5. Dreapta de calibrare în HPLC

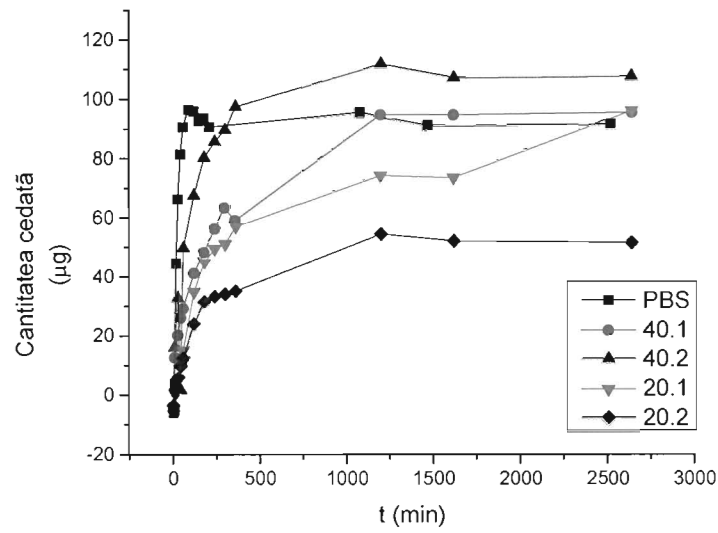


Figura 6. Profilurile cinetice cumulative de permeație ale RUX din hidrogelurile pe bază de fibrină, comparativ cu o soluție de RUX

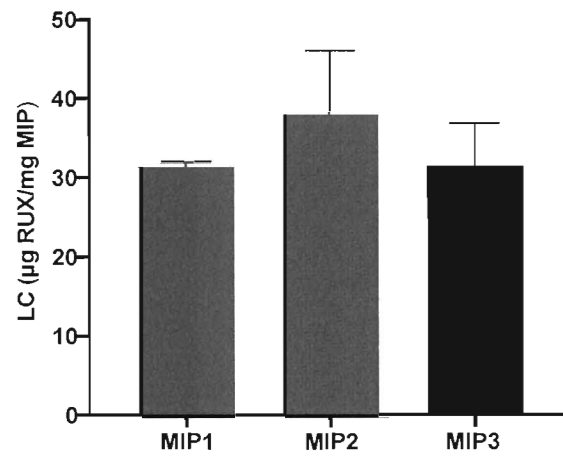


Figura 7. Capacitatea de încărcare a MIP-urilor

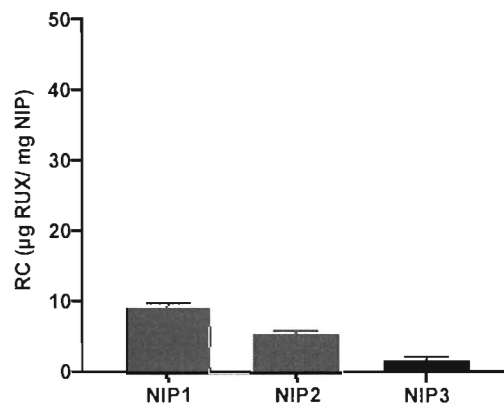


Figura 8. Capacitatea de recaptare a NIP-urilor

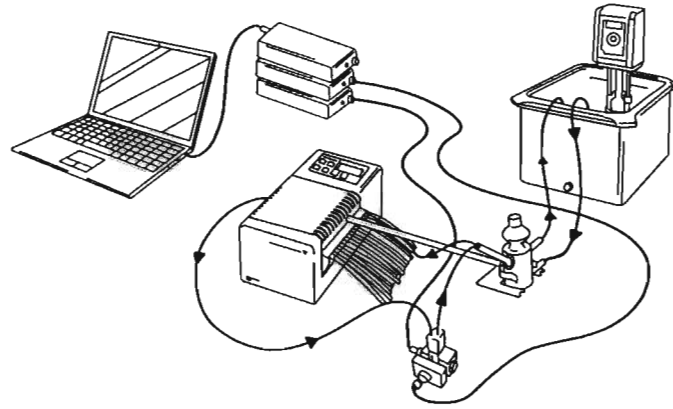


Figura 9. Schema sistemului automatizat pentru testele de difuzie

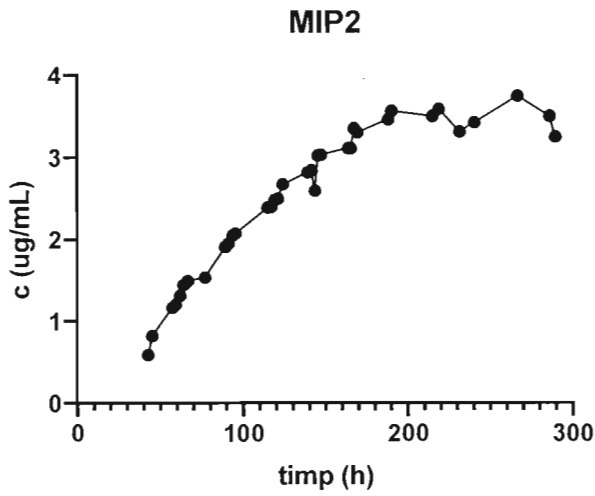


Figura 10. Profilul de cedare a MIP2

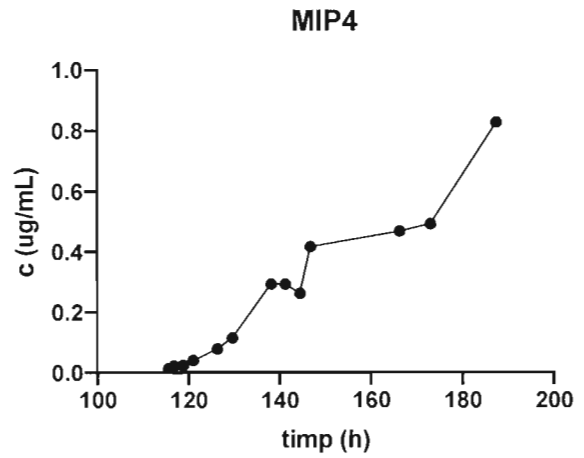


Figura 11. Profilul de cedare al MIP4

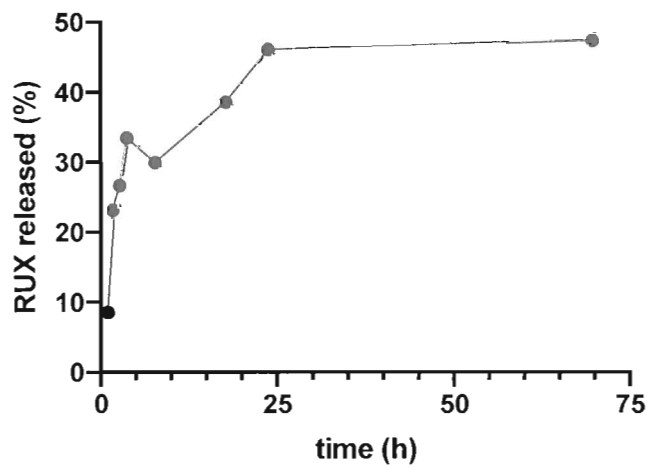


Figura 12. Profilul de cedare a RUX din hidrogel

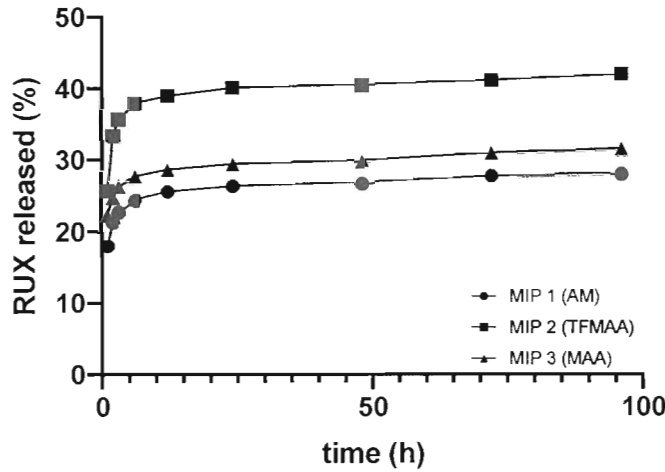


Figura 13. Profilurile de cedare ale MIP1, 2 și 3

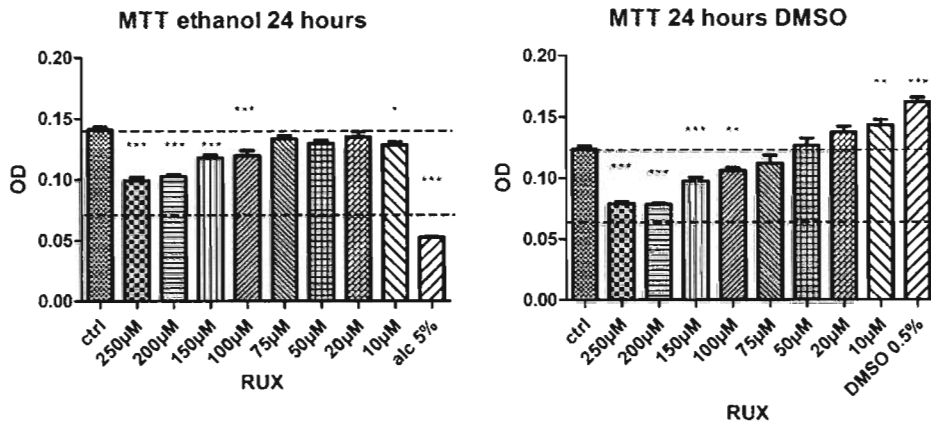


Figura 14. Testului de viabilitate MTT pentru celulele C6 tratate cu RUX

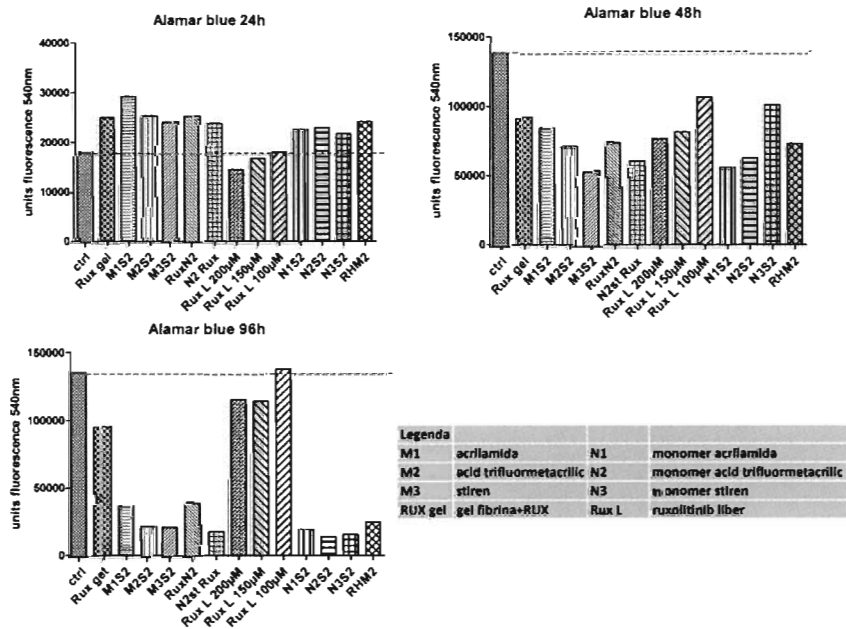


Figura 15. Testul de viabilitate celulară Alamar Blue

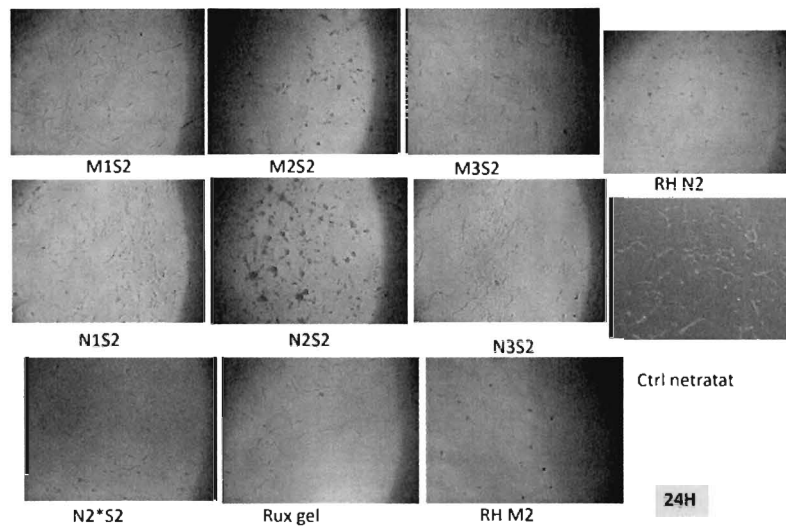


Figura 16. Imagini în microscopia optică în contrast de fază a celulelor de glioblastom C6 la 24h

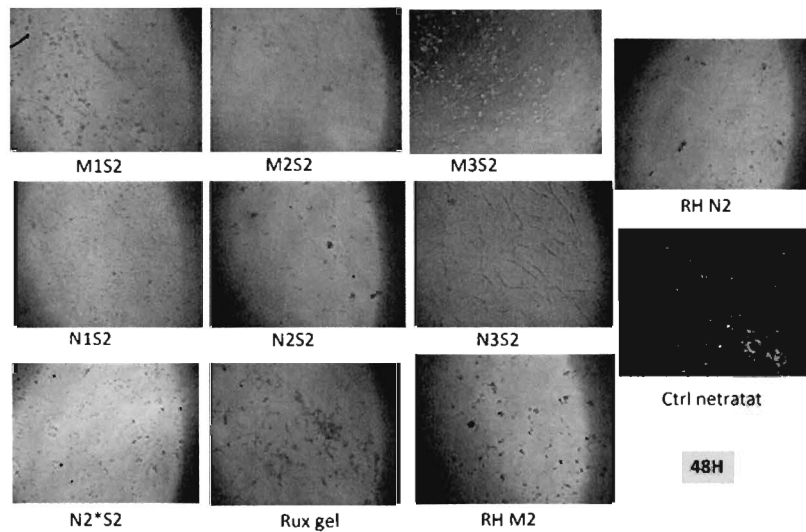


Figura 17. Imagini în microscopia optică în contrast de fază a celulelor de glioblastom C6 la 48h

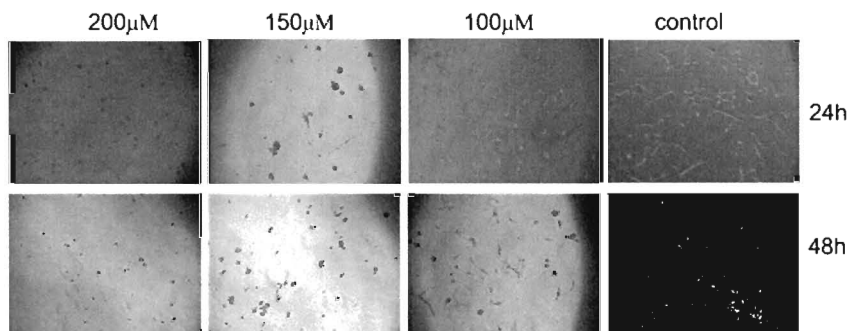


Figura 18. Imagini în microscopia optică în contrast de fază a celulelor de glioblastom C6 tratate cu RUX liber



Figura 22. Imagini din timpul intervenției de injectare a celulelor tumorale C6 la animalele de experiență. a) Realizarea inciziei tegumentului cu expunerea calotei craniene. b) Realizarea găurii de trepan de aproximativ 3 mm cu ajutorul unui drill. c) Injectarea celulelor cu ajutorul unei seringi Hamilton. Toată intervenția chirurgicală a avut loc în condiții sterile, sub microscopul operator

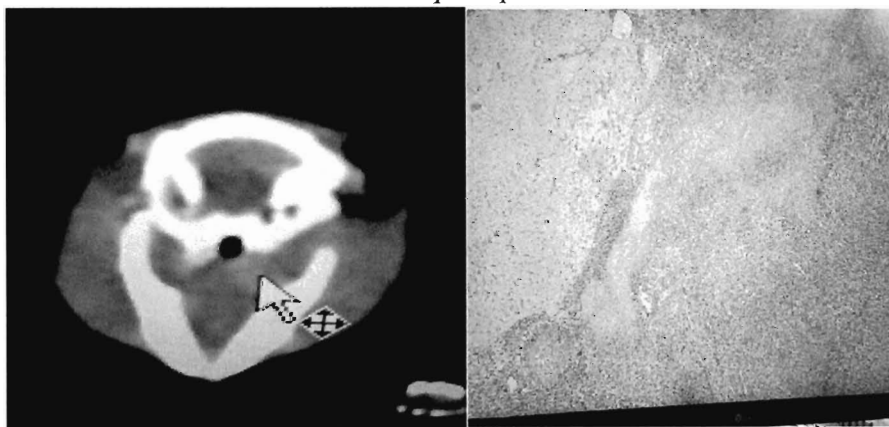


Figura 23. Secțiune CT la nivelul cutiei craniene a animalelor de experiență cu vizualizarea tumorii dezvoltate (săgeată) la locul de injectare a celulelor b) Aspectul microscopic al tumorii prelevate post mortem

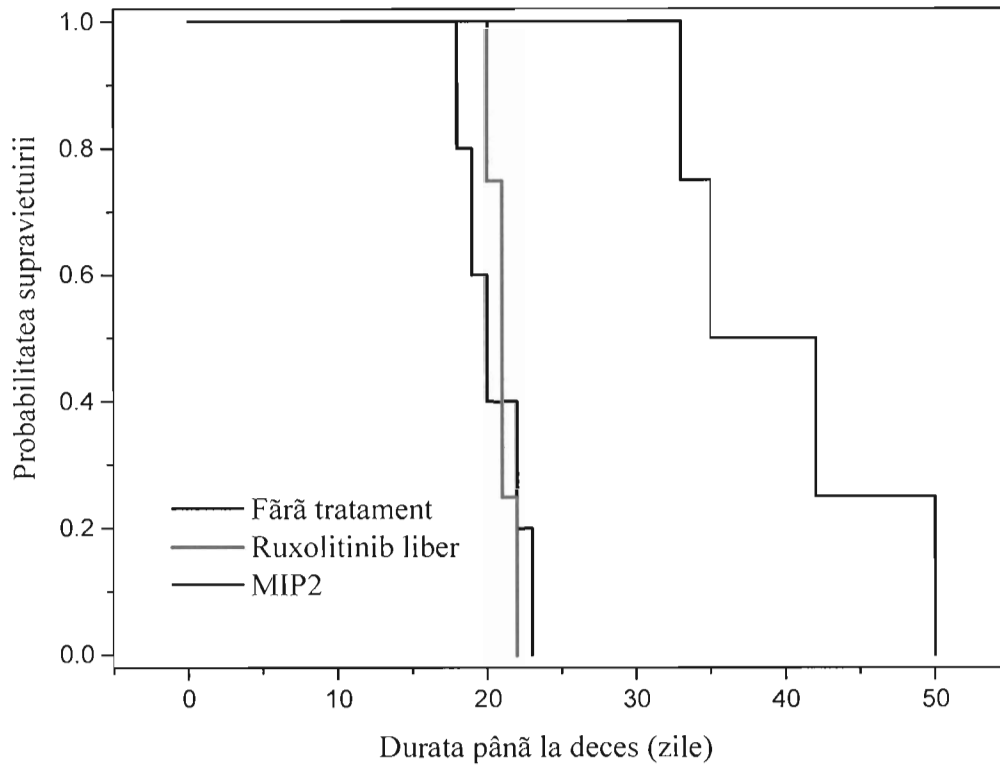


Figura 24. Curba de supraviețuire Kaplan-Meier comparând durata medie de supraviețuire a șobolanilor în funcție de tratamentul aplicat (negru – fără operație de rezecție a tumorii și fără administrare de Rux; roșu – administrare de Rux liber în gelul de fibrină; verde – administrare de MIP2 încărcat cu Rux în gelul de fibrină) ($p=0.001$ log-rank Mantel Cox)