Nanoszerkezetű gyógyszerhordozó rendszerek

Kiss Éva
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Kémiai Intézet
Határfelületi és Nanoszerkezetek Laboratórium

Nanomedicina

EU stratégia

- megelőzés
- diagnózis
- gyógyítás
- követés

Betegségek: szív- és érrendszeri, rák, mozgásszervi, idegrendszeri, cukorbetegség, baktérium- és vírusfertőzések

in vivo: gyógyítás és diagnosztika (képalkotás)
gyógyszerhordozó nanorészecskék,
képalkotást segítő nanorészecskék

in vitro: diagnosztika: szenzorok, lab-on-chip

Gyógyítás

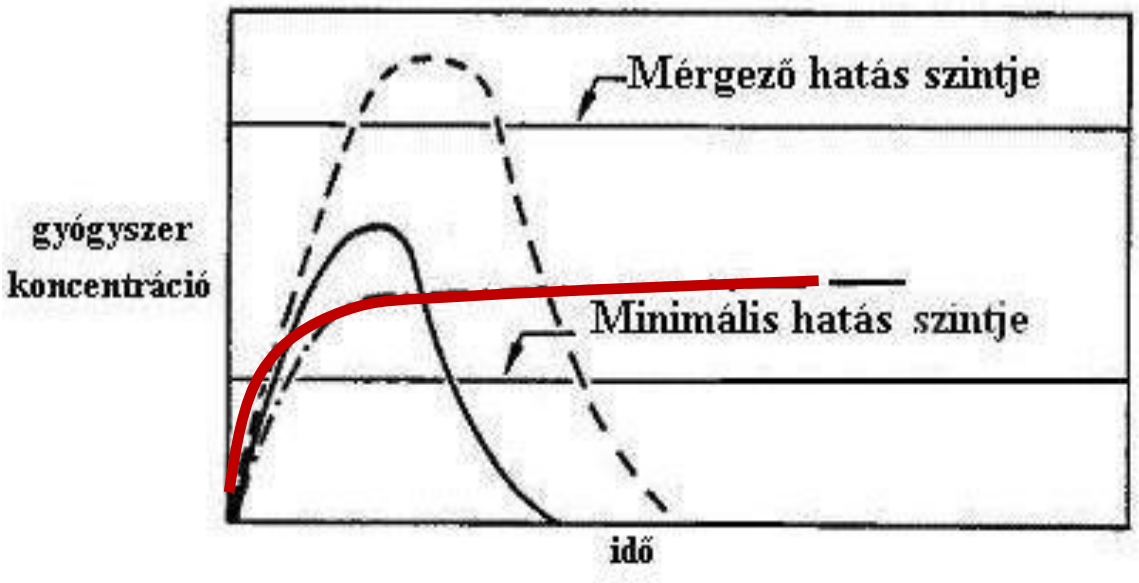
Mit várunk el a korszerű gyógyszerhordozóktól?

Főbb hagyományos gyógyszerhordozók, gyógyszerformák:

- tabletta
- por, kapszula
- oldatok (injekció, cseppek)
- kenőcsök…

Újabbak:

retard tabletta, retard kapszula (késleltetett hatóanyagleadás),
film tabletta,
vízben oldhatatlan hatóanyag szolubilizált formája vízben



Nagyobb hatékonyság
Kevesebb mellékhatás
Kényelmesebb adagolás
Új, kombinált hatóanyagok

Gyógyszerhordozó nanorészecskék

Nanorészecskék: < 200nm

Megoldható:
„a csomagolással”

nem vízoldható hatóanyag bevitele
érzékeny hatóanyag bevitele (pl. peptid)

jobb eloszlatás (nagyobb diszperzitásfok),
jobb biohasznosulás

a hatóanyag célbajuttatása
biológiai gátakon való átjuttatása pl. BBB,
sejtmagba való bejuttatása (génterápia)

Korszerű gyógyszerhordozók:

- időben és térben szabályozott hatóanyagtranszport
- a hatóanyag eljuttatásának és felszabadításának irányítása és követése

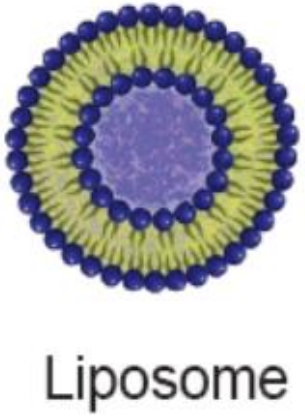
A nanorészecskék

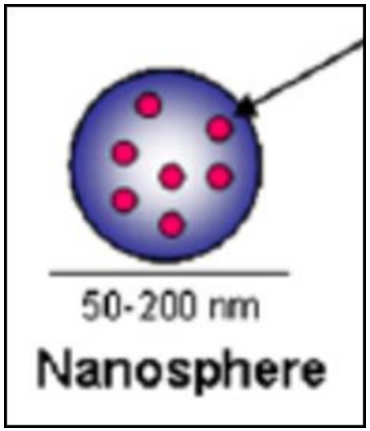
- típusa,
- összetétele,
- mérete,
- szerkezete
- felületi tulajdonságai

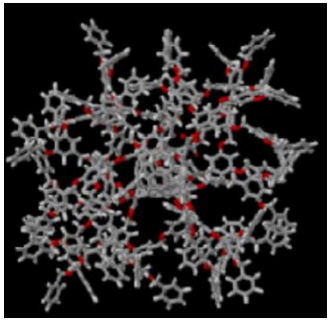
Nanorészecskék

Nanorészecskék főbb típusai

Szerves alapúak:





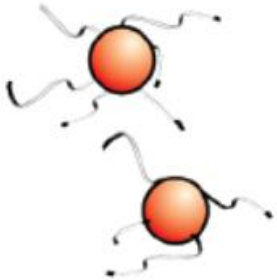


dendrimer

Lipidekből önrendeződéssel felépülő liposzómák (d: 100-10 000nm)
Polimer nanorészecskék (d: 50-200nm)
Dendrimerek, elágazó, gömbalakú polimer molekulák (5 nm)

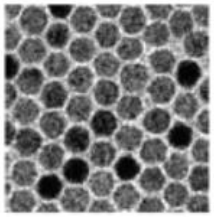
Szervetlen alapúak:

Fém: arany
Félvezető: QD
Fémoxid: paramágneses, ferrimágneses



Gold

Quantum dot



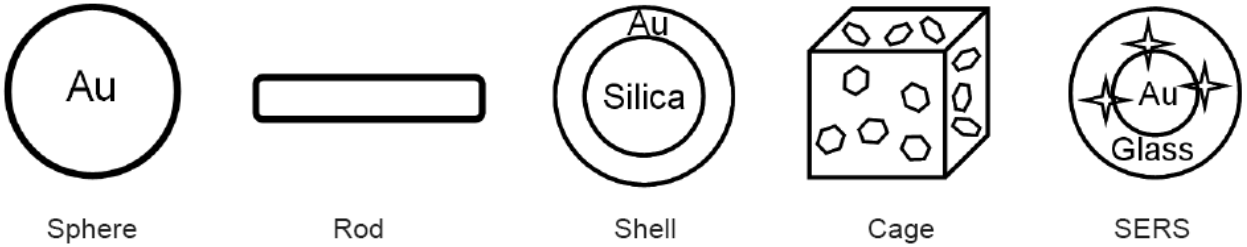
Iron oxide

Arany nanorészecskék

Alkalmazás: érzékelés (60%), fototermális terápia (25%)

Előállítás:

kémiai, redukció, méret és alak szabályozás



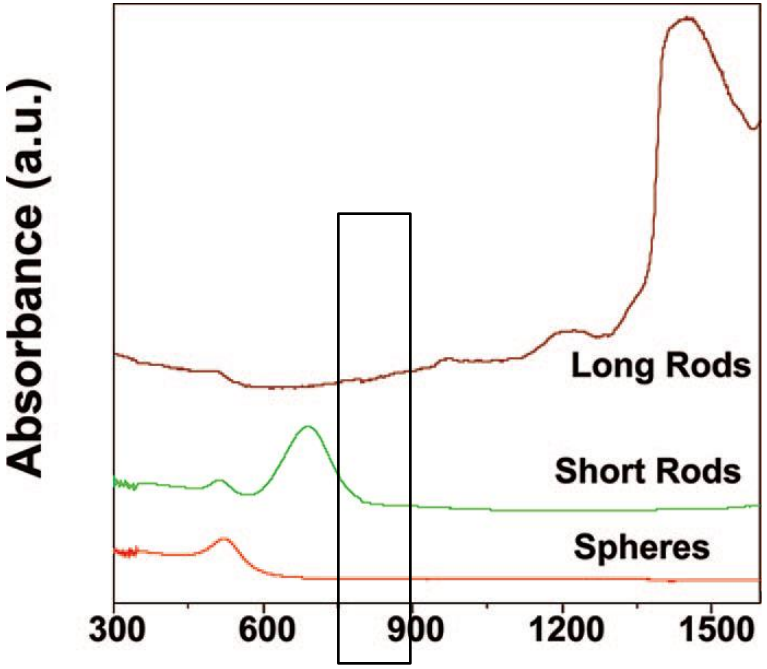
Előnye:

- inert,
- nem toxikus (?),
- mérete, alakja szabályozható
- kapcsolható
- előnyös optikai tulajdonságok
- hipertermiás kezelés (irányítással)

Példa: hatóanyaggal konjugált , PEG-ezett arany gömb, célzott terápia és hipertermia (klinikai vizsg.)

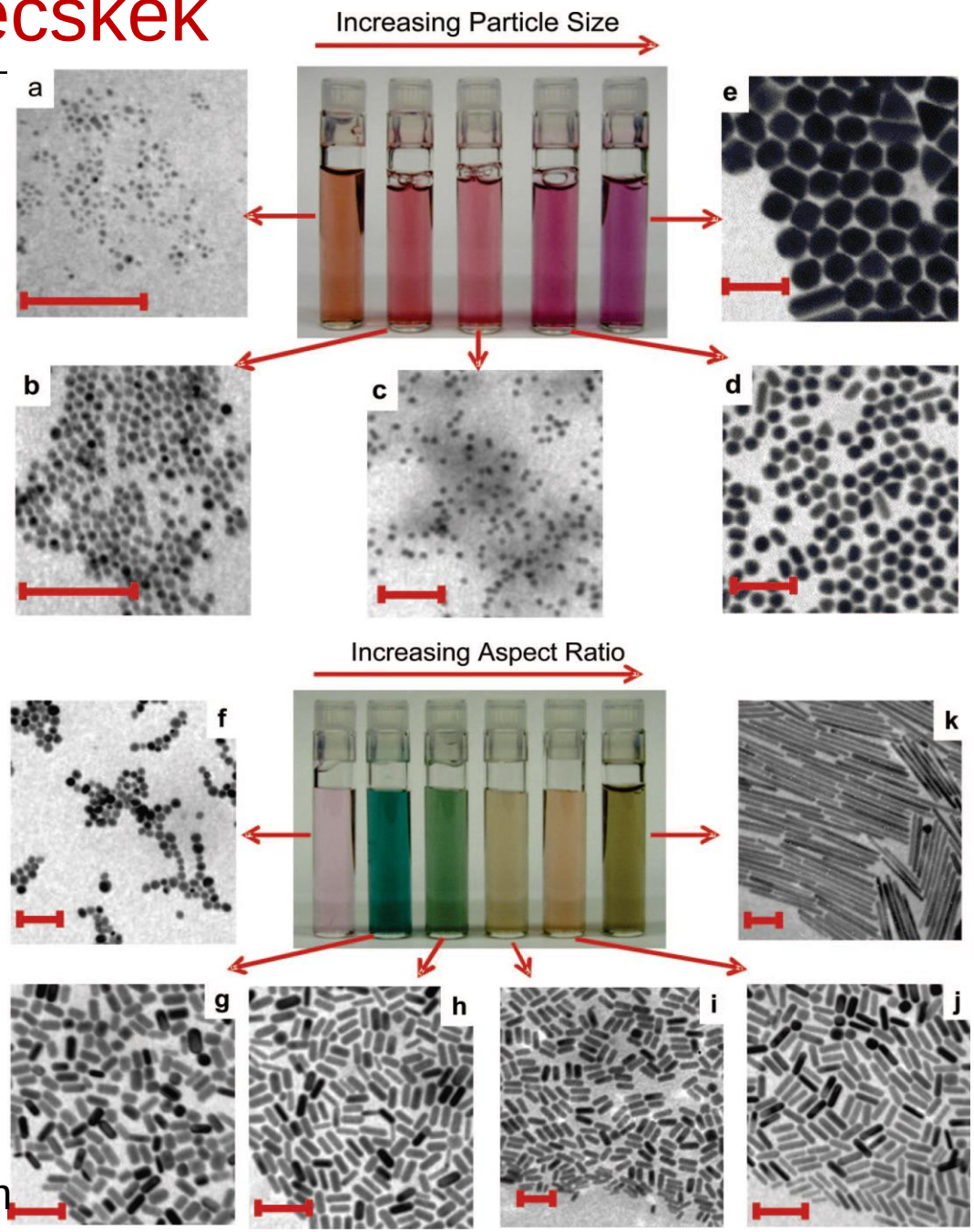
Arany nanorészecskék

Gömbök: 4-40nm
egy abszorciós sáv



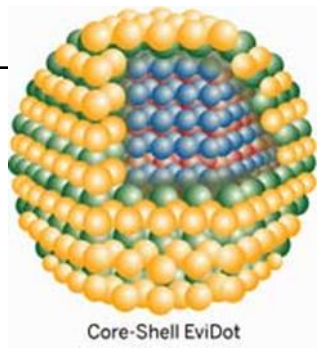
Rudak:
tengelyarány 1,3-tól 20-ig
Intenzív absz. nagy hullámh.

Bioanyagok
absz. minimuma:
700-900nm



bar: 100nm

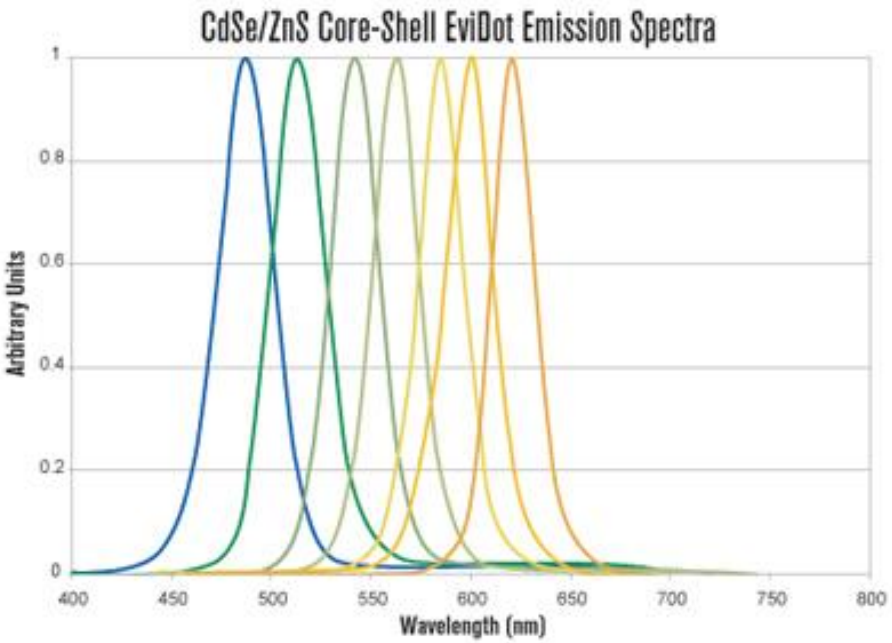
QD nanorészecskék



QD: 2-10 nm lumineszcens félvezető nanokristályok 50-100 atomból
ideális lumionofor: éles emisszió,
nagy kvantumhatákonyság (40-50%)
szűk méreteloszlás (5%)

Különleges optikai tulajdonság

Az emisszió hullámhossza
hangolható a mérettel
350 nm-től [kék] 2300 nm-ig [infravörös]



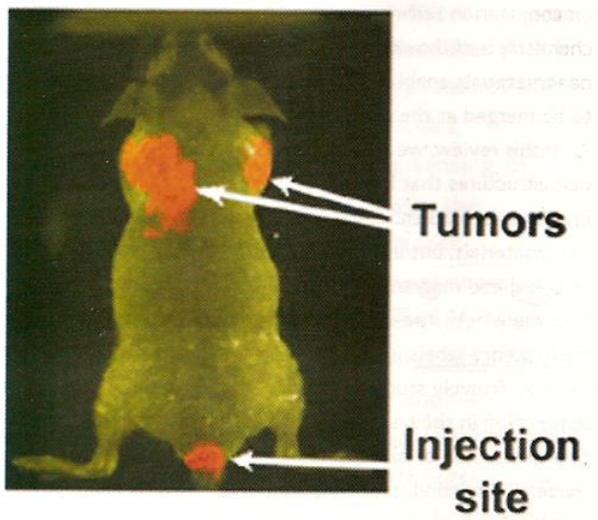
CdSe QD megőrzi az
optikai tulajdonságát,
ha szilika bevonatot kap:
hidrofil, „vízoldható” lesz,
biokompatibilis,
kapcsolható
biomolekulákkal.

biológiai érzékelés,
képalkotás biológiai rendszerben
in vivo

QD nanorészecskék

- Az élő test vizsgálatához olyan QD, ami NIR-ben emittál.

d: 15.8 nm, ideális méret a nyirokrendszer vizsgálatához,
1 cm mélyről látszik, erős lumineszcencia

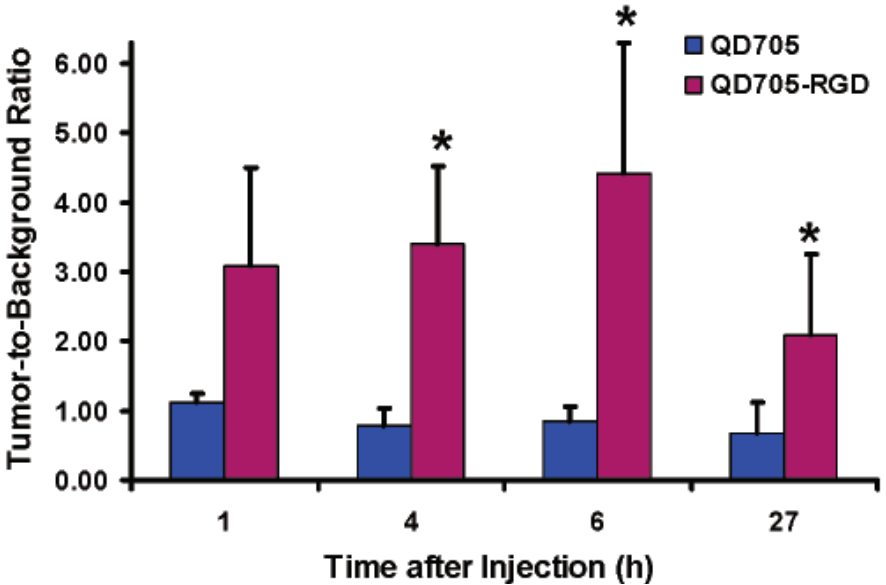


- Fluoreszcens jelző

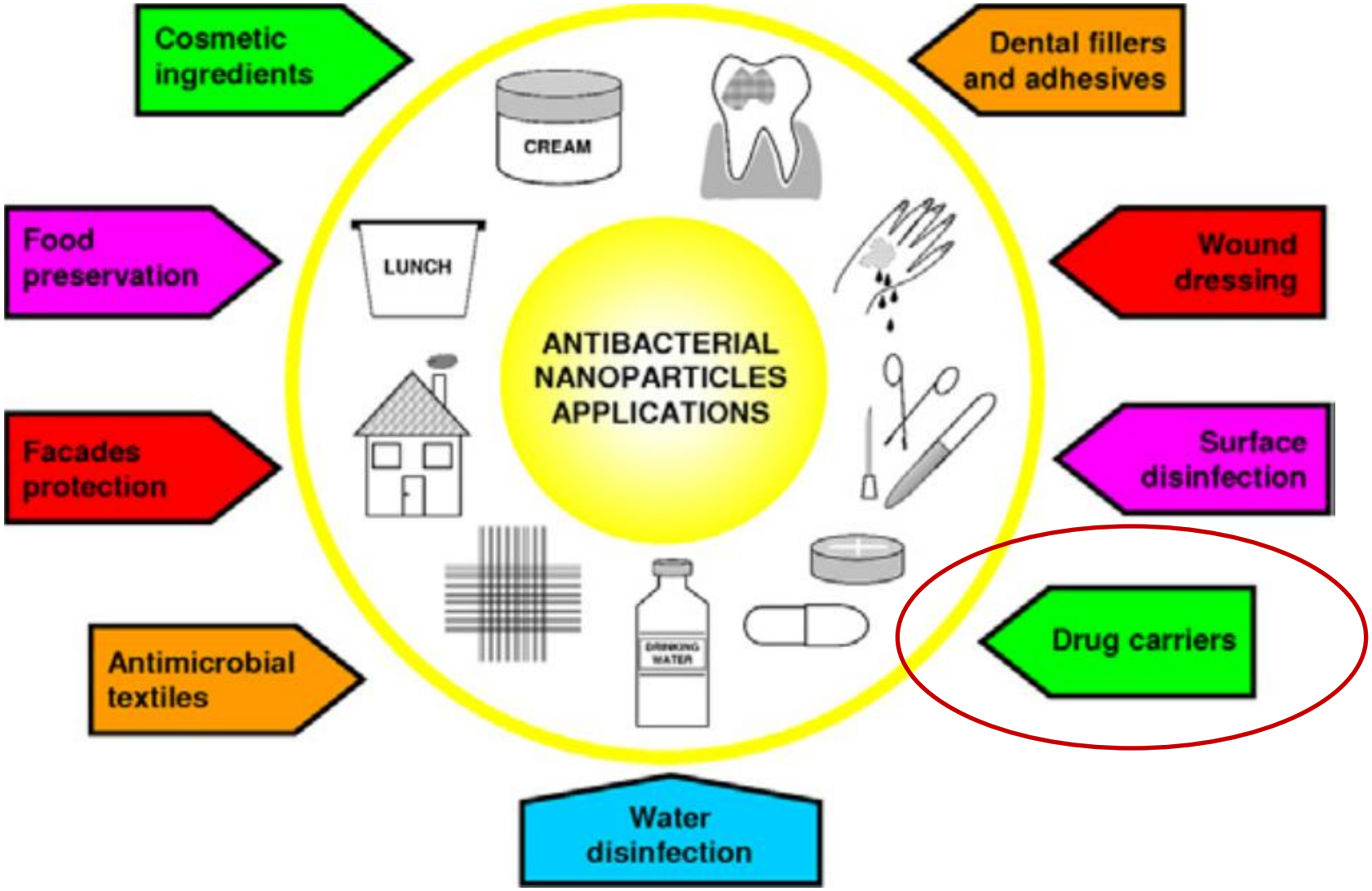
nagy moláris extinkció, keskeny, éles emisszió,
egy fényforrással többféle részecske gerjeszthető
szimultán, eltérő lumineszcencia

- Biospecifikus **funkcionalizálás**: szilika

burokhoz kapcsolható: antitest, antigén, peptid,
irányító molekula .
A tumoros sejten lévő receptorhoz kötődik,
ott szabadul fel a hatóanyag.



Antibakteriális nanorészecskék



Antibakteriális nanorészecskék

Szervetlen: fémek: ezüst, cink, réz
fémoxidok: titándioxid, cinkoxid
fémsók

Szerves: kis molekulák,
polimerek, polielektrolitok
lipidbe csomagolt molekulák

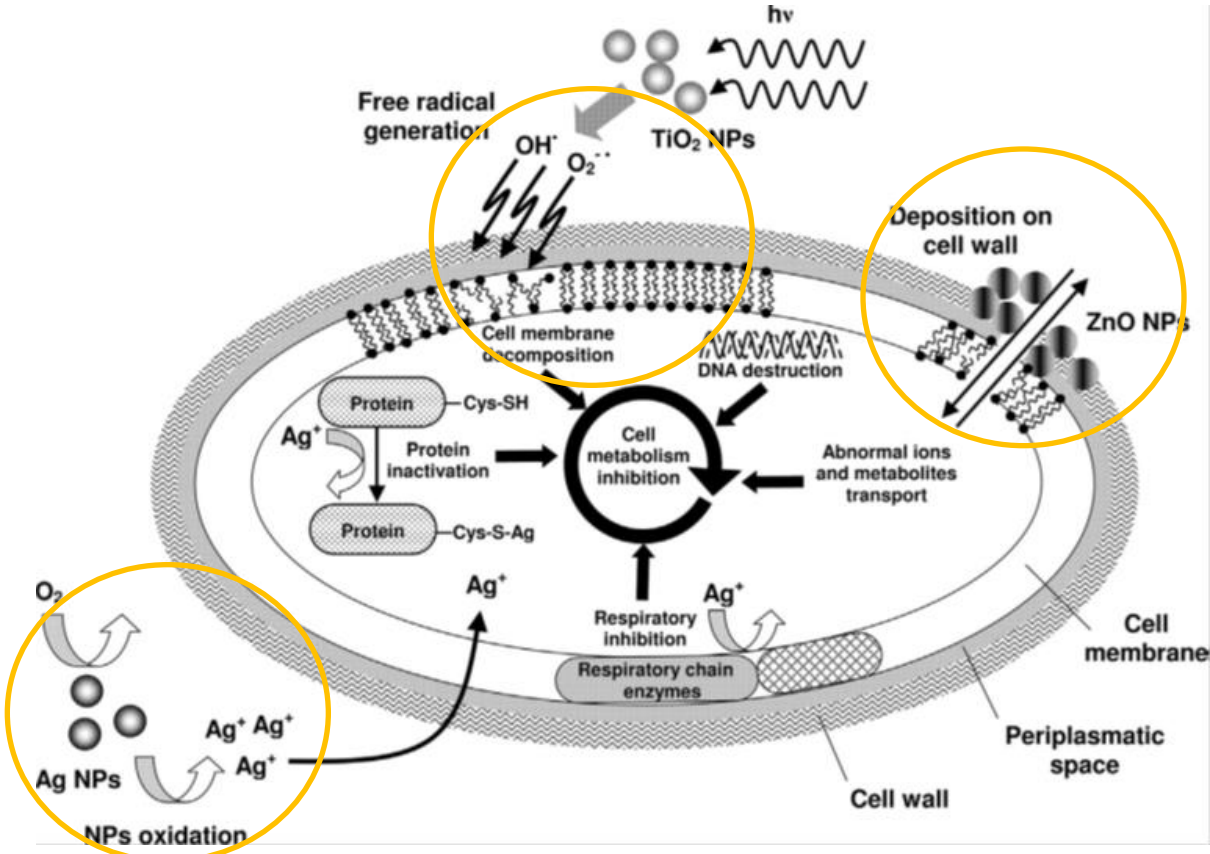
Hibrid rendszerek

Mechanizmus:
sejtfal roncsolás
Ag ionok biológiai hatása

Felületmódosítás:
ha nem megfelelő a rögzítés

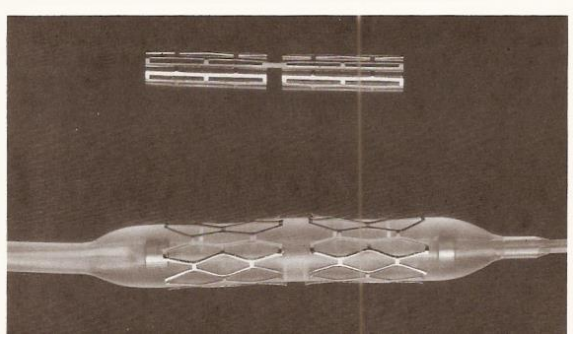
hatástalan,
távozás a környezetbe…

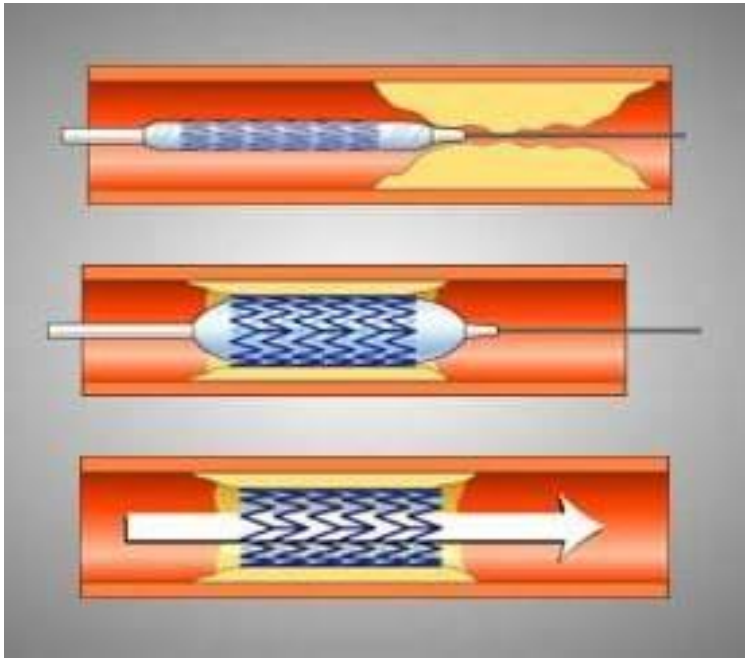
Rövid és hosszútávú
toxicitás felmérése
(nem specifikus)

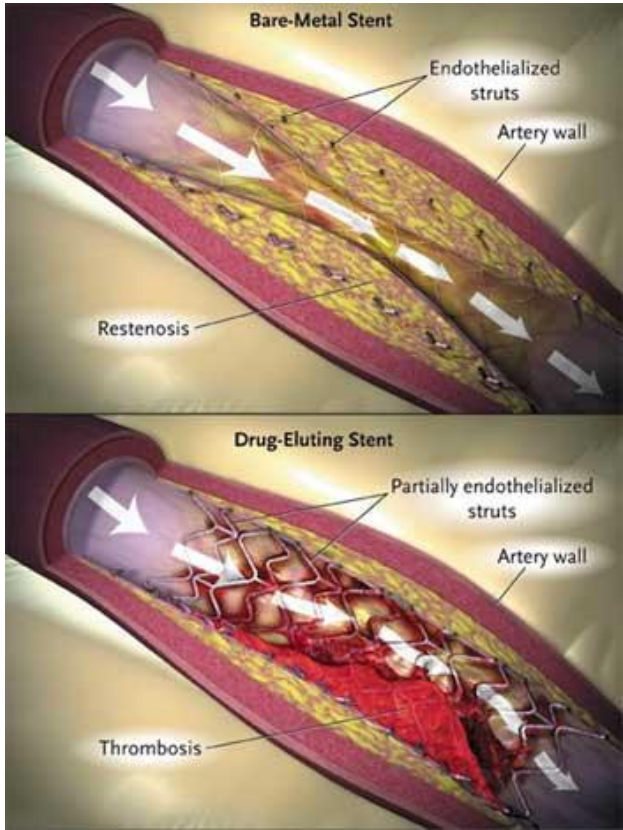


Gyógyszertartalmú bevonatok

Stent: beszűkült artéria tartós tágítása, kitámasztása
polimer és fém kombinálása







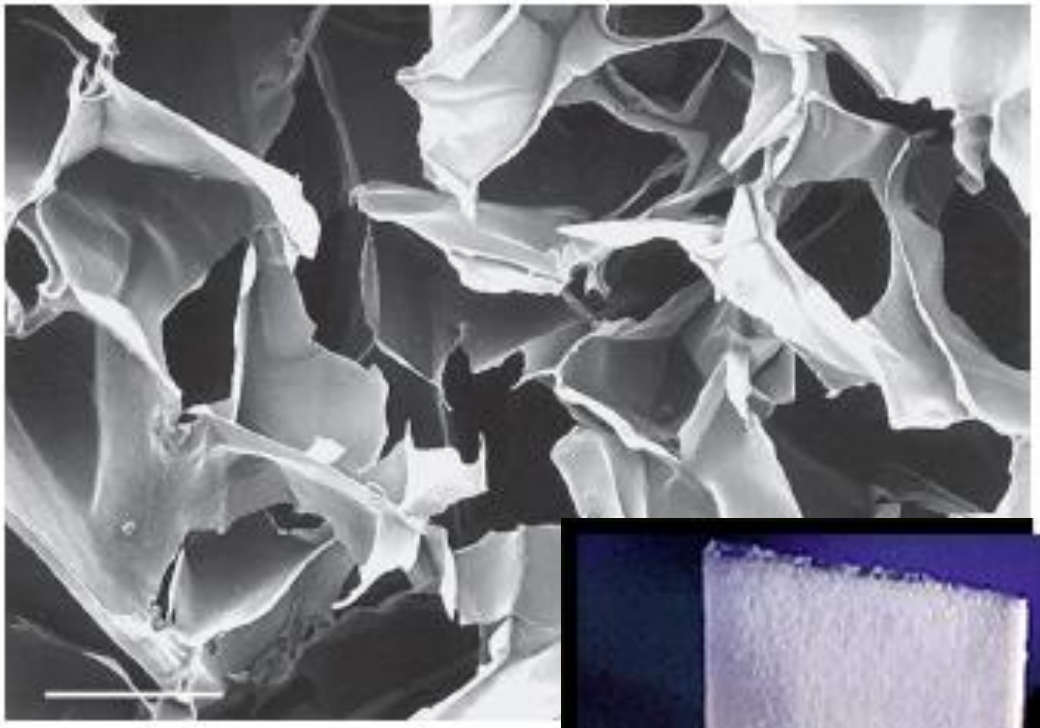
Az újbóli beszűkülés megakadályozására a stentet hatóanyagkibocsátó polimer réteggel vonják be

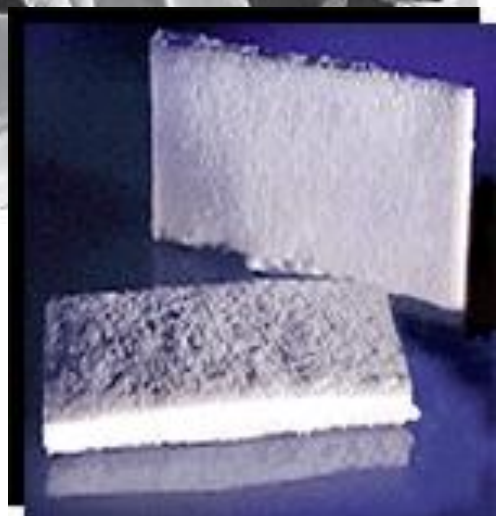
Gyógyszertartalmú bevonatok: szövettámasz

Biológiailag lebomló, felszívódó polimerből kialakított pórusos test

Sejtmegtapadás, szaporodás, benövés
Véredények kialakulása

- Pórusméret (szövetfüggő)
- Pórusméreteloszlás
- **Porozitás** (90%-nál nagyobb)
- Átjárhatóság, összefüggő pórusok
- Felület nagysága
- Felület minősége:
  - kémia,
  - morfológia





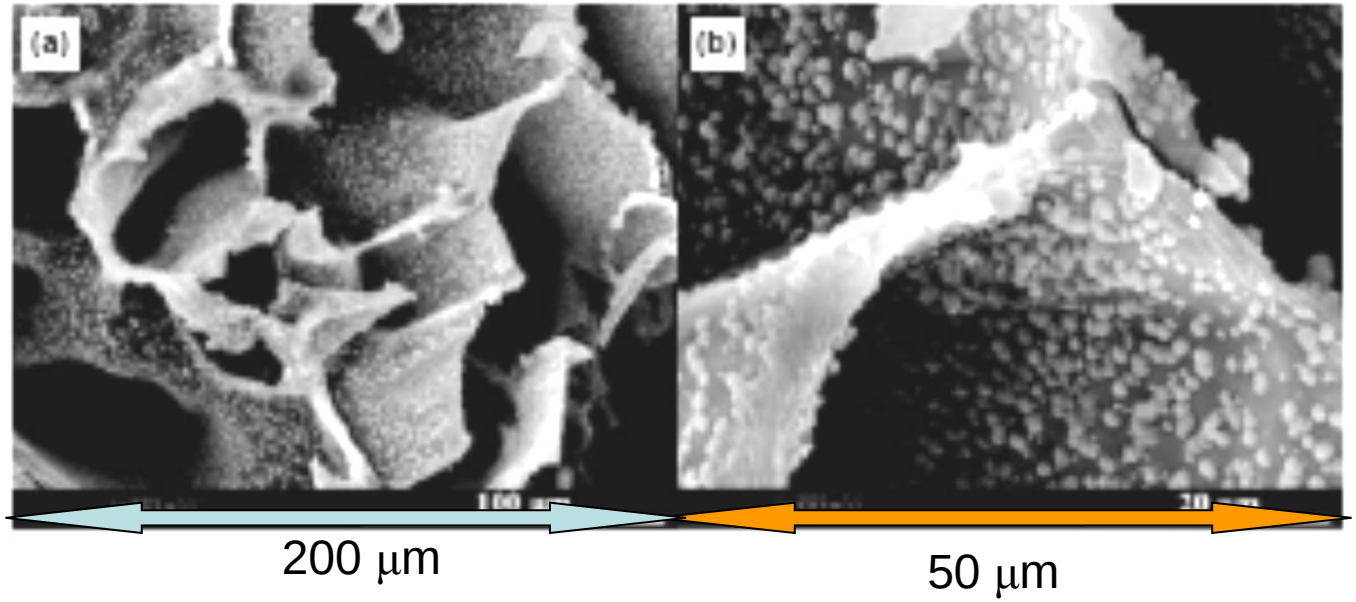
Megjelenés (jó megmunkálhatóság):
szálak, fóliák, kötött, szövött anyagok, szivacsos elemek…

Szövettámasz

Sejtmegtapadás, szaporodás, benövés
Véredények kialakulása

- Pórusméret (szövetfüggő)
- Pórusméreteloszlás
- Porozitás (90%-nál nagyobb)
- Átjárhatóság, összefüggő pórusok
- Felület nagysága
- Felület minősége: **kémia**, morfológia

Hidroxiapatit szemcsék képzése a pórusfalon

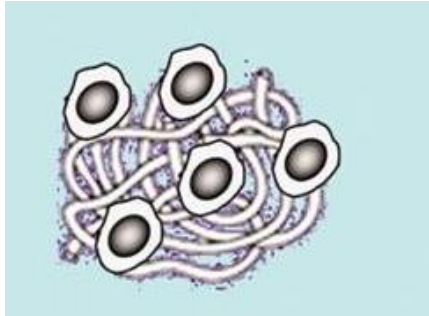


Szövettámasz: csont, porc

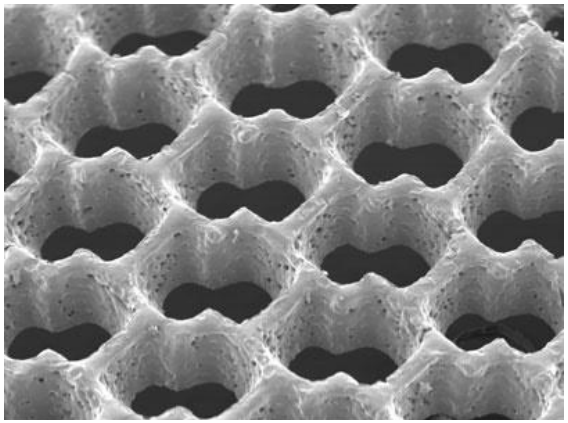
nyersanyagok

sejtek a
paciens szövetéből

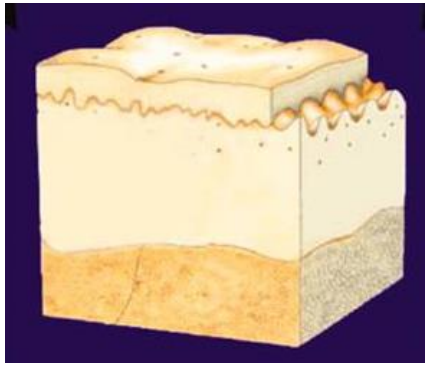
szintetikus
szövettámasz



megtapadó,
szaporodó sejtek



Szövettámasz, melyet őssejtekkel vagy szívizomsejtekkel borítanak. A beültetés után a polimer támasz fokozatosan feloldódik, a helyén pedig ott marad az új szívizom szövet, amely várhatóan a szív saját szövetének megfelelő tulajdonságú.



beültetésre előkészített szövetpótló

Személyre szabott implantáció

Méret és szerkezet

Válogatás a szerves alapú gyógyszerhordozók közül a növekvő méret sorrendjében

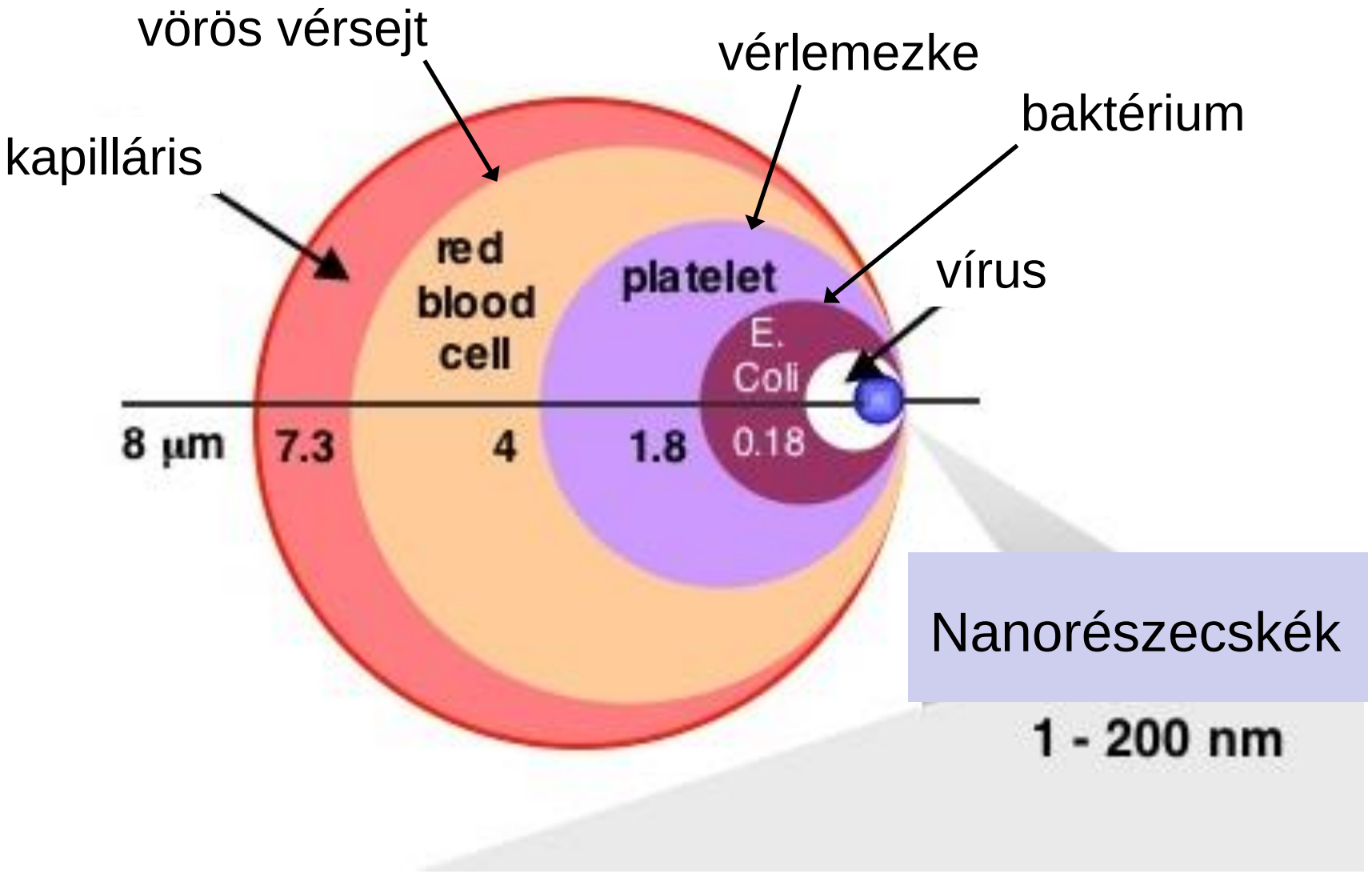
DENDRIMER

LIPOSZÓMA,

POLISZÓMA,

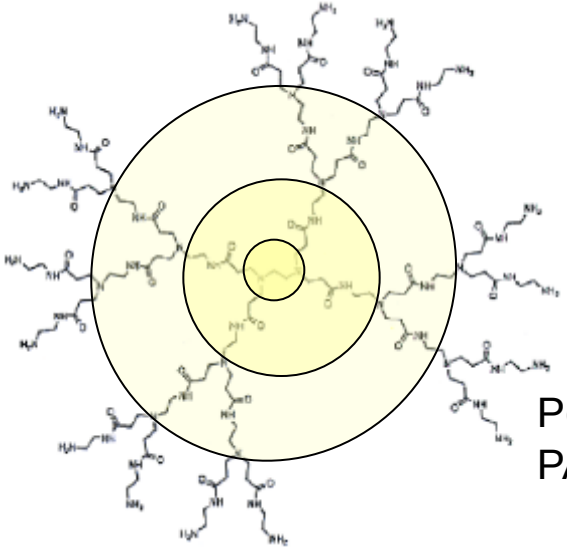
POLIMER GÖMBÖK (nano- és mikro-részecskék)

Méretek


vörös vérsejt
vérlemezke
baktérium
kapilláris
vírus
red blood cell
platelet
E. Coli
8 µm
7.3
4
1.8
0.18
Nanorészecskék
1 - 200 nm

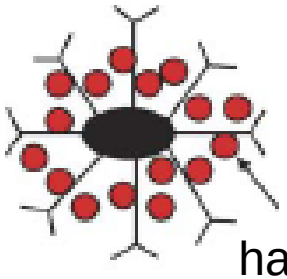
Dendrimerek, csillag polimerek

Elágazó makromolekula **szabályozható mérettel** és alakkal.
Nanoméretű, stabil, monodiszperz, nagyszámú funkciós csoporttal a felületén.

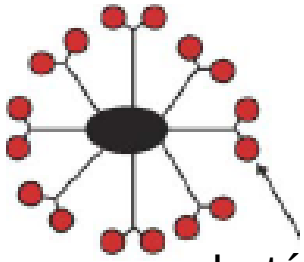


Poliamidoamin
PAMAM

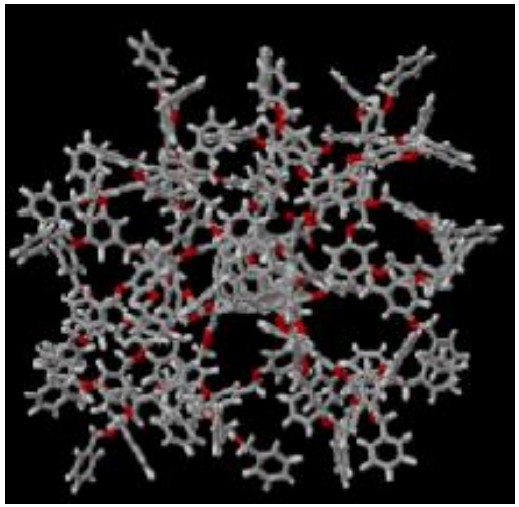
Alkalmazás **gyógyszerhordozóként**



hatóanyag

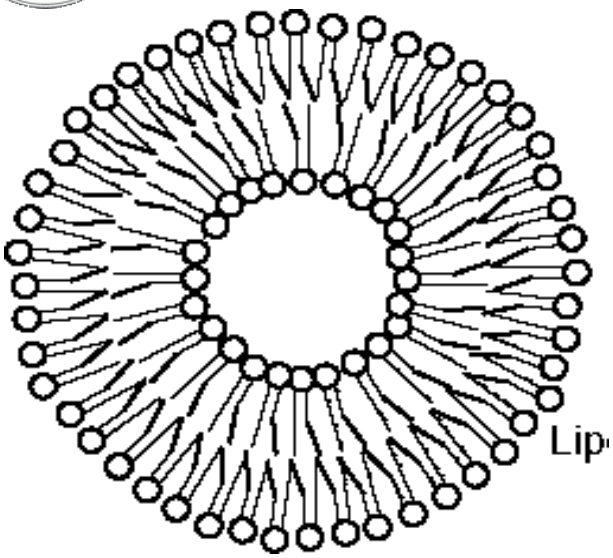


hatóanyag



<u>Dendrimer</u>, mint irányított gyógyszerhordozó.
A poliamidoamin dendrimer előnyei: stabil, 5 nm-nél kisebb, átjut az érfalon és be a tumorsejtbe, nem vált ki immunreakciókat, sok funkciós csoportja van:
acetilezett PAMAM-ra folsav kapcsolás, ami az irányító,
a metotrexát, ami a hatóanyag, és fluoreszcens szinezék, ami a nyomkövetést biztosítja.
Az egyszerű hatóanyaghoz képest szignifikáns, 10x-es hatás.

Vezikulumok, liposzómák

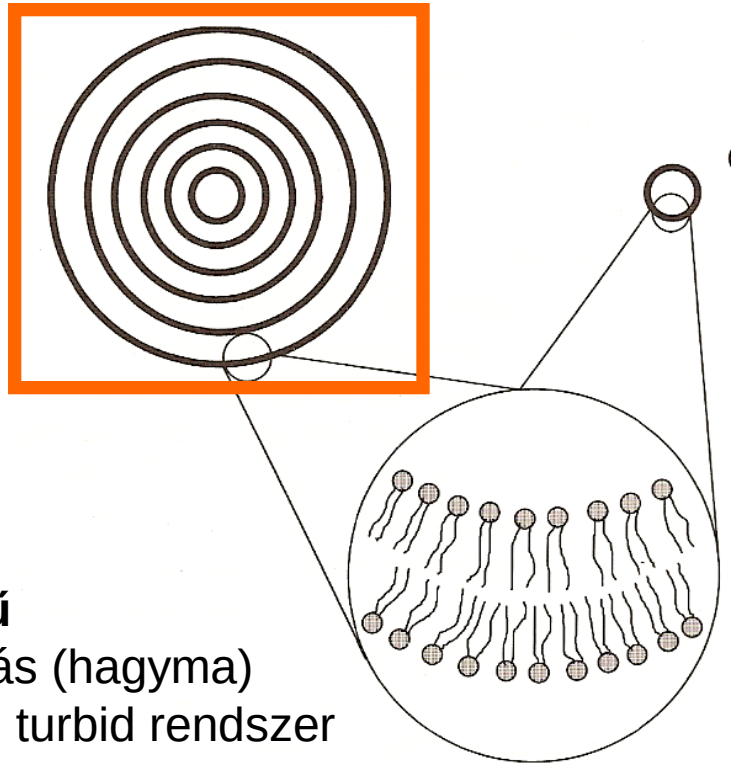


Lipidek aggregátumai: liposzómák (1965)

Zárt, gömbalakú, üreges szerkezet vizes közegben

egyrétegű, d: 50nm, transzparens rendszer

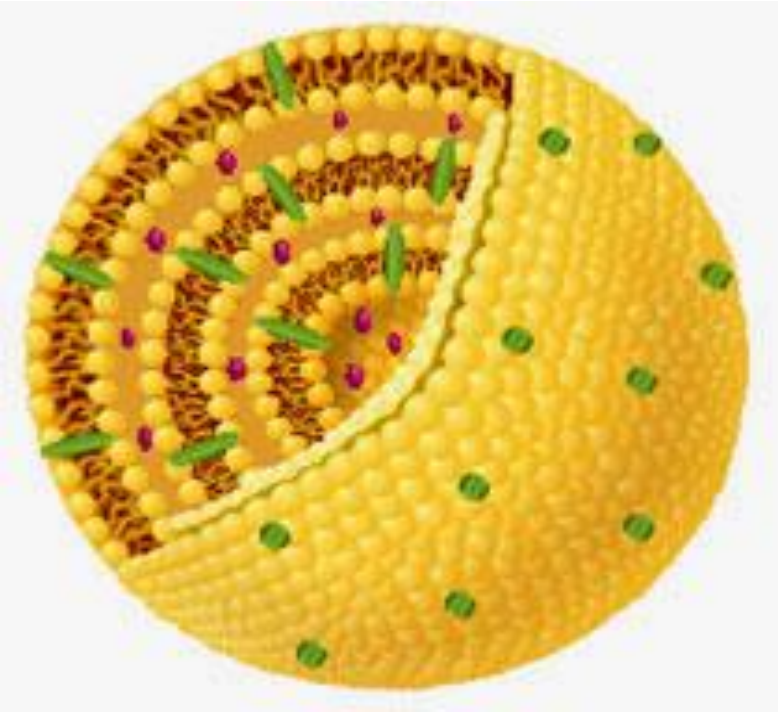
Ultrahang kezelés



többrétegű
multilamellás (hagyma)
d: ~500nm, turbid rendszer

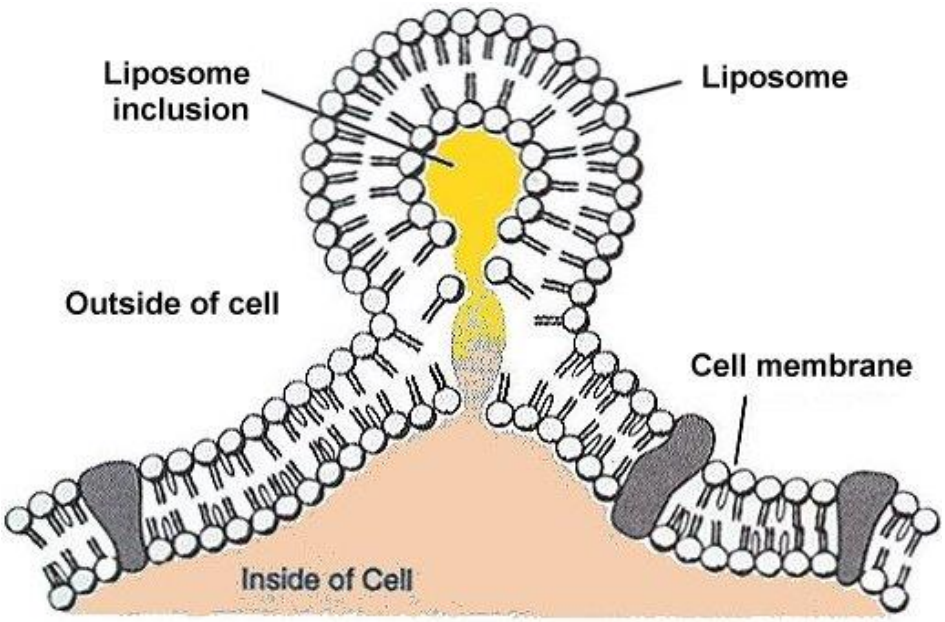
Liposzómák

Többrétegű liposzóma: nagy kapacitás



Sok foszfolipid kettősréteg közöttük vízzel. **Hidrofób vegyületek** (zöld) a foszfolipid kettősrétegbe illeszkednek, a **hidrofil vegyületek** (piros) a rétegek közötti vizes fázisban helyezkednek el.

Liposzómák



A liposzóma befogadása a sejtbe:

- összefolyás
- a sejtmembrán hasonló lipid kettősrétegével

Gyors kiürülés elleni felületmódosítás: **”LOPAKODÓ” liposzómák**
polimerburkolat (PEG), hetekig cirkulál a vérben… (1990-

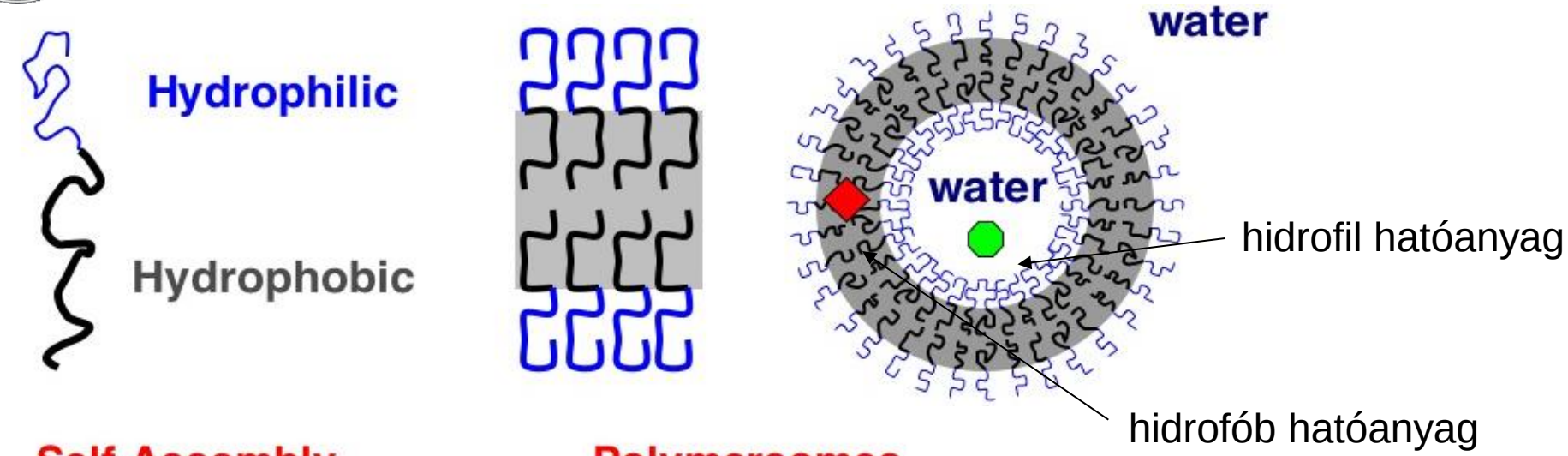
- Passzív irányítás

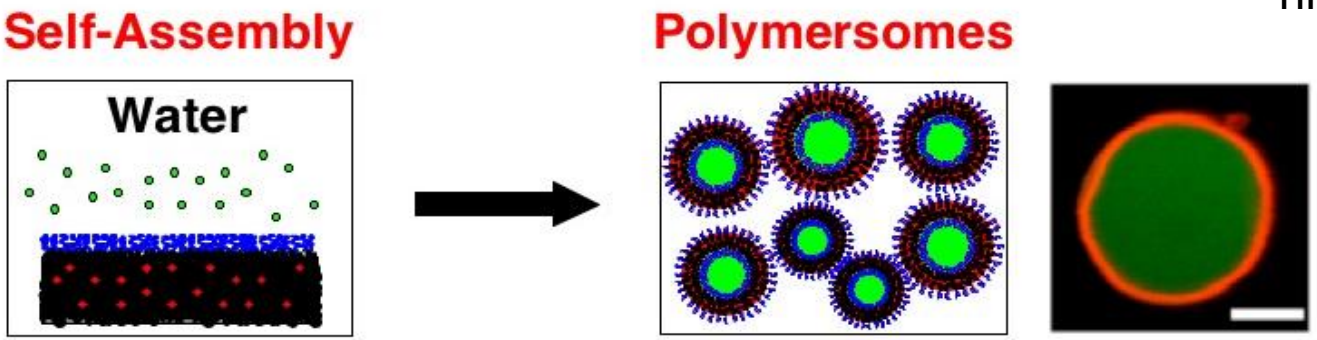
méret, töltés, lipidösszetétel, koleszterintartalom

- Aktív irányítás (1980-

specifikus biológiai kölcsönhatás: glikolipiddel, antitest-antigén

Poliszómák



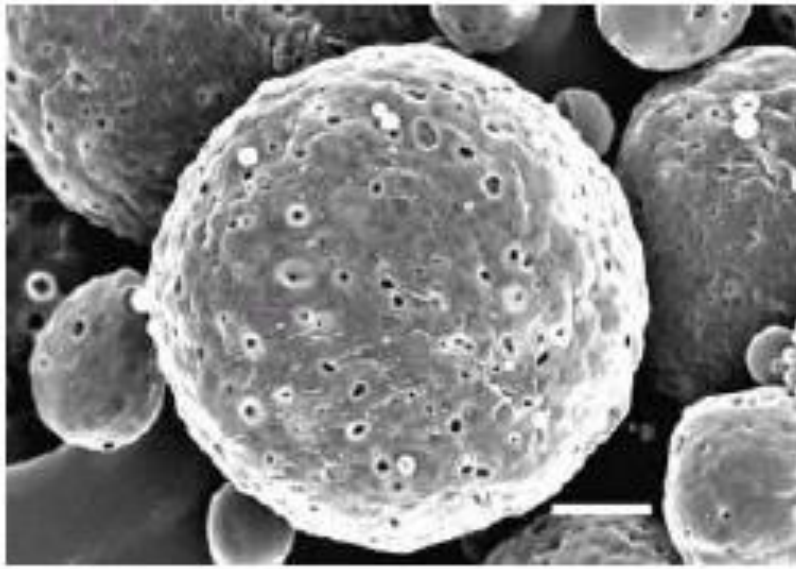


Méret növelhető, szűk méreteloszlás

Felületi funkcionalizálás → Célzott terápia

Polimer gömböcskék

Alkalmazás: orális, intravénás, nyálkahártyán át (orrspray, tüdő)



20 µm

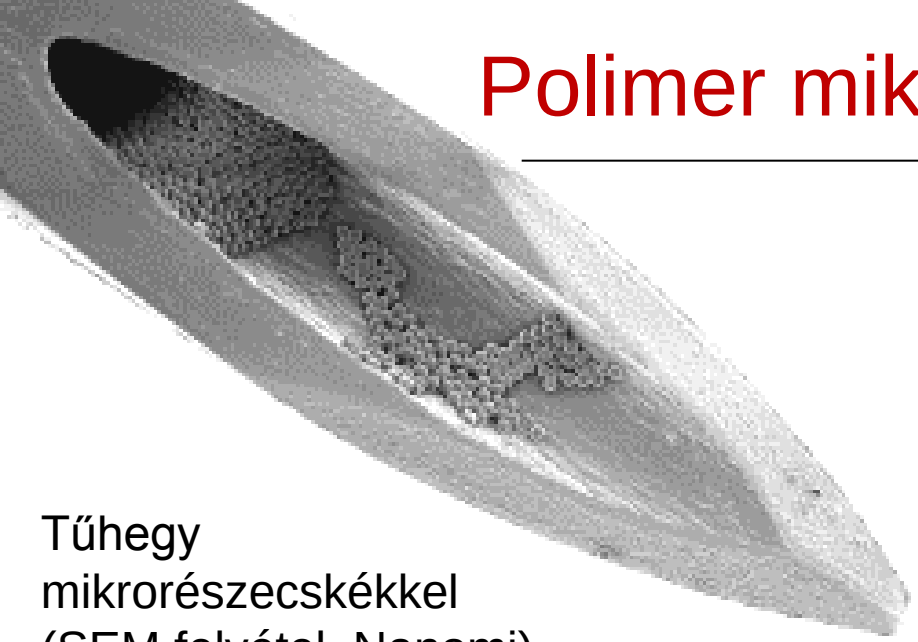
Hatóanyag szállítására és szabályozott leadására képes részecskék **biodegradábilis, biokompatibilis** polimerből.

Hidroxikarbonsavak poliészeterei: PLA, PLGA, PCL

A bomlástermékek nem toxikusak

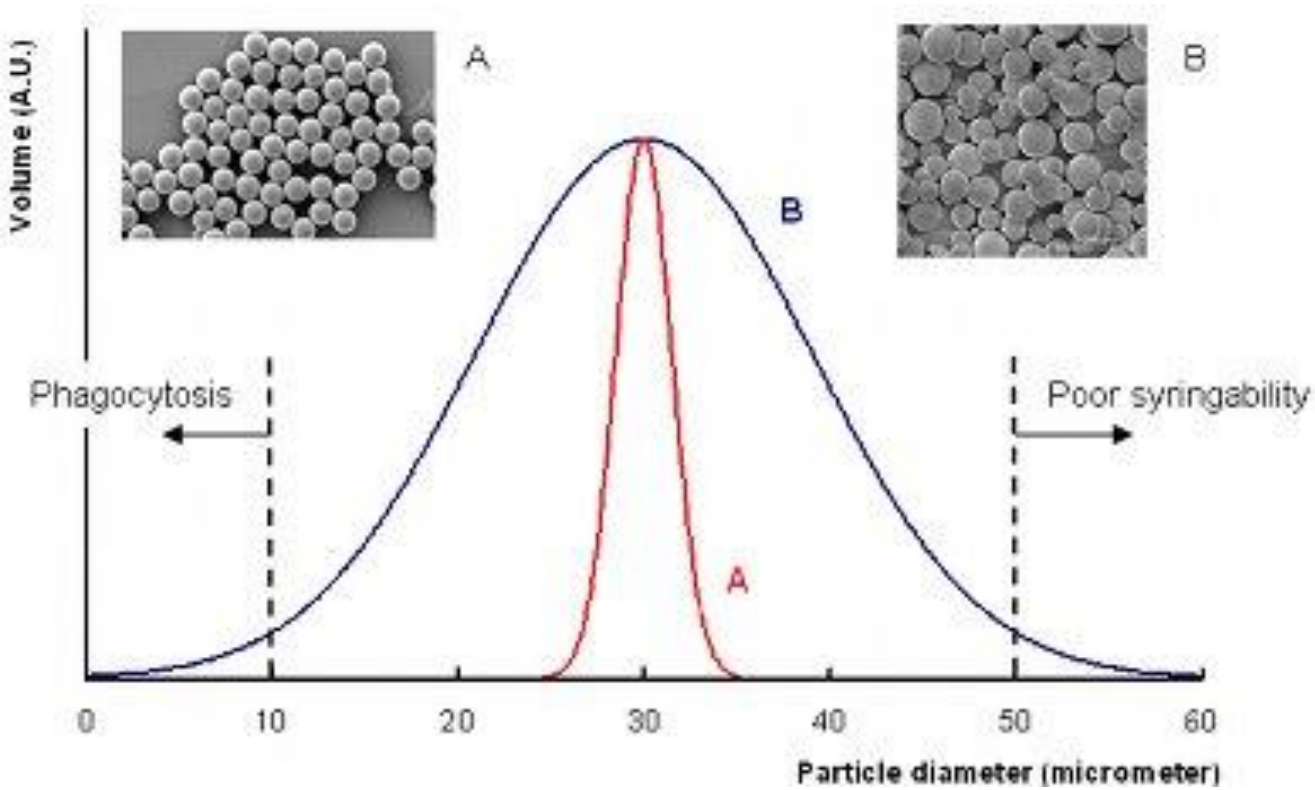
Előállítás: emulzió vagy v/o/v kettős emulzió,
oldószerelpárologtatás,
lecsapás oldószercserével

Polimer mikrorészecskék



Tűhegy mikrorészecskékkel (SEM felvétel, Nanomi)

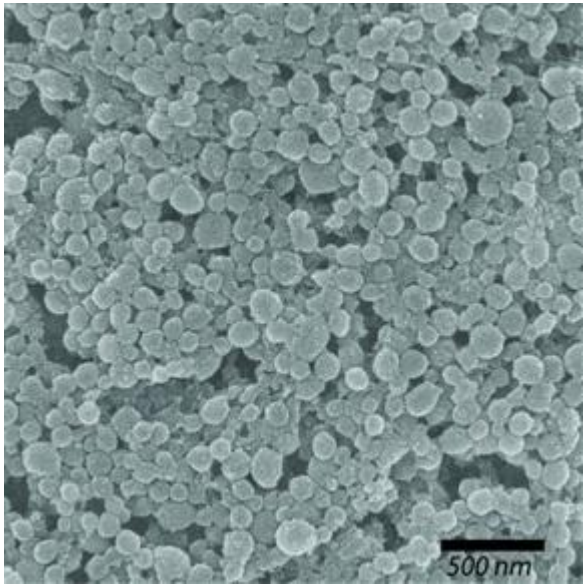
Miért fontos a méretszabályozás?
A hatóanyag jobban injektálható,
az injekció kevésbé fájdalmas.
Fagocitózissal nem fog
idő előtt eltávozni a szervezetből



Polimer nanorészecske

Gyógyszerhordozó: nanogömböcskék: 40-200 nm

Alkalmazás: orális, intravénás, nyálkahártyán át (orrspray, tüdő)



Hatóanyag szállítására és **szabályozott leadására** képes részecskék

biodegradábilis, biokompatibilis polimerből.

Hidroxikarbonsavak poliészeterei:
PLA, PLGA, PCL

A bomlástermékek nem toxikusak

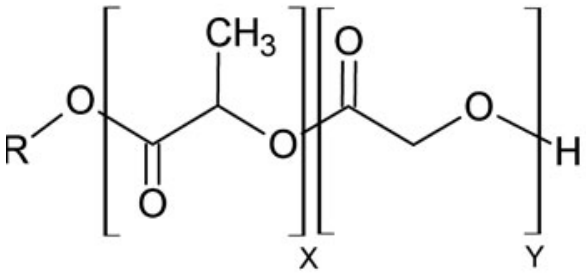
Előállítás: emulzió vagy v/o/v kettős emulzió,
oldószerelpárologtatás,
lecsapás oldószercserével: nanoprecipitáció

PLGA nanorészecske

Hatóanyag „becsomagolás”:

előállítás közben

a mag hidrofób jellegű



Hatóanyag szállítás:

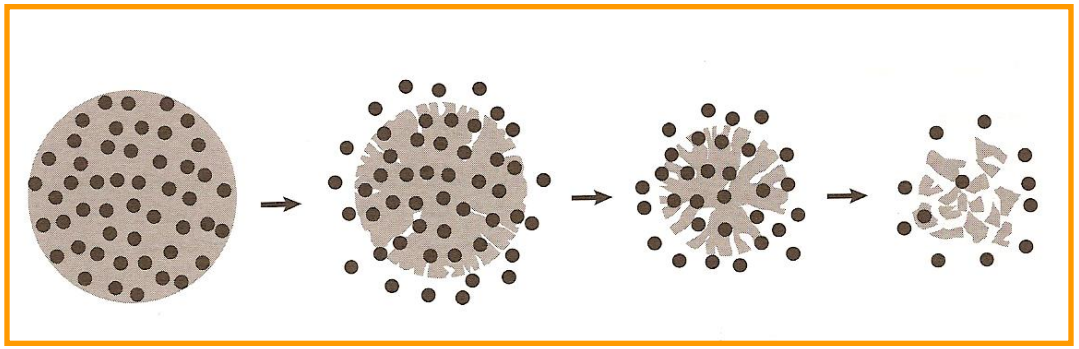
kiürülés, felületi hidrofilizálás: PEG

passzív irányítás: méret, és méreteloszlás

Hatóanyag felszabadulás:

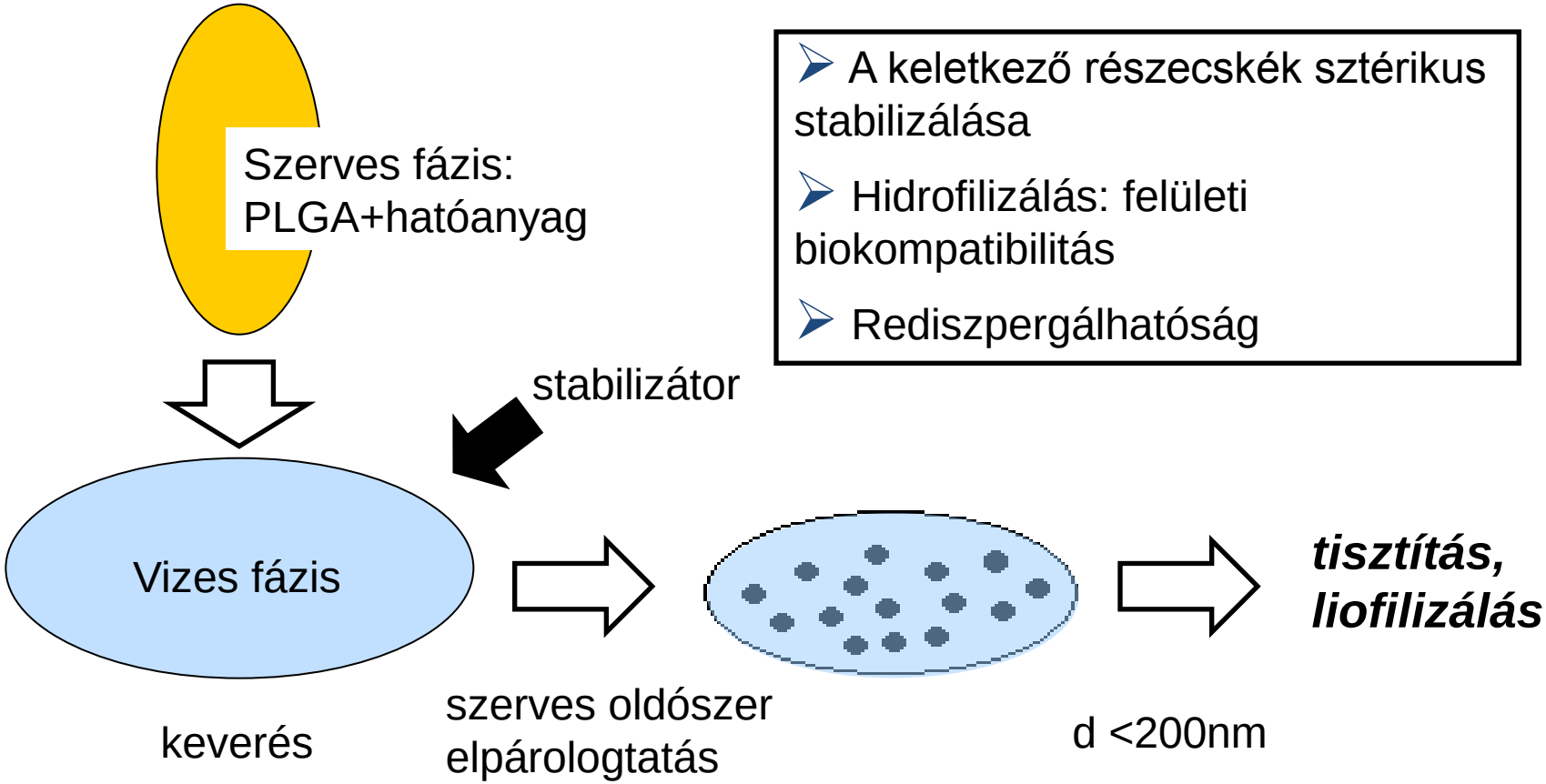
duzzadás, diffúzió

a polimer mátrix hidrolízis útján degradálódik:
erózió és porozitás növekedés



Nanorészecskék előállítása

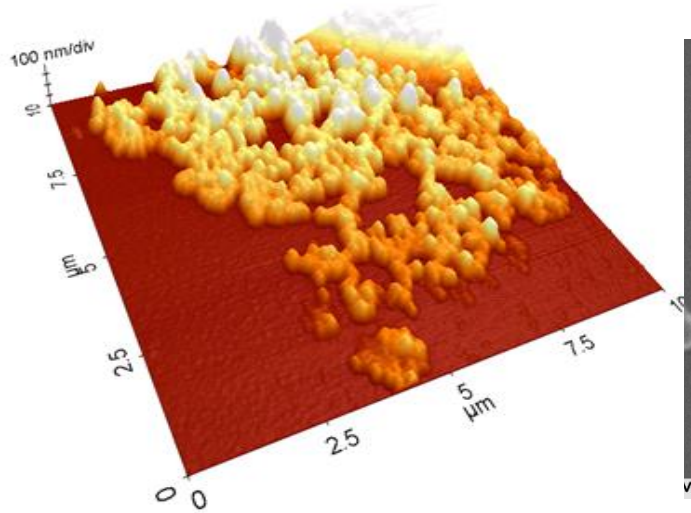
- Emulziós/ oldószer elpárologtatási módszer
- Nanoprecipitációs módszer - oldószercsere



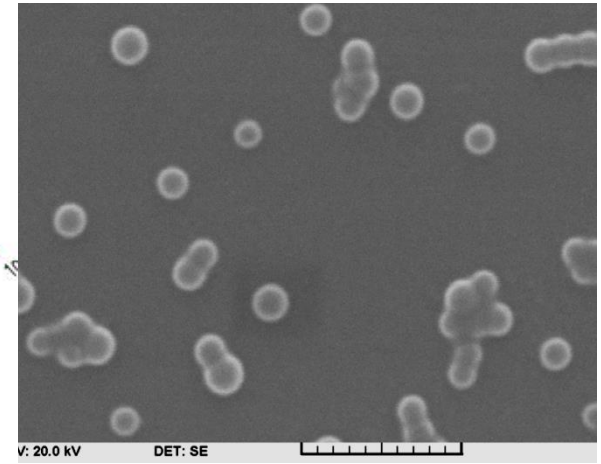
- A keletkező részecskék sztérikus stabilizálása
- Hidrofilizálás: felületi biokompatibilitás
- Rediszpergálhatóság

PLGA nanorészecskék

Nanoprecipitációval előállított PLGA nanorészecskék

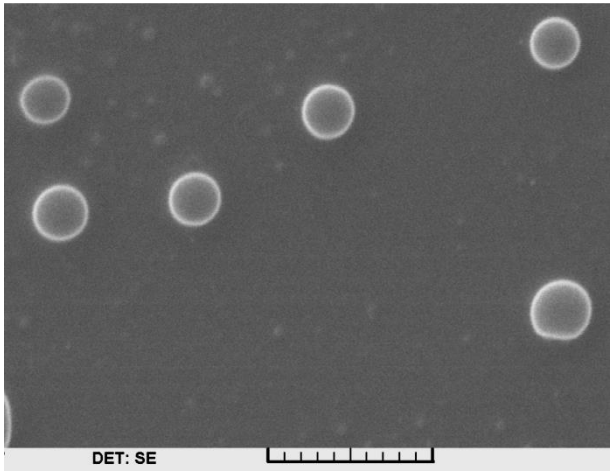


„üresen”

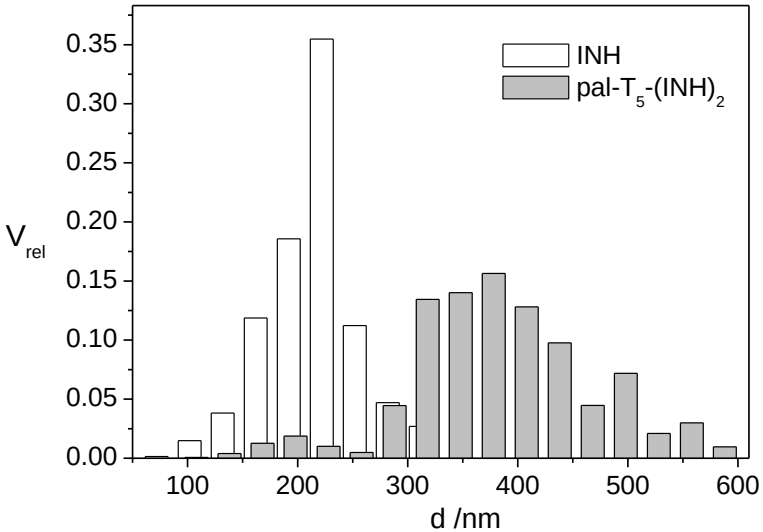


1 µm

40% hatóanyaggal



1 µm



A méret a passzív irányítás eszköze

A **40% hatóanyag** nanokapszulázása méretnövekedést okozott

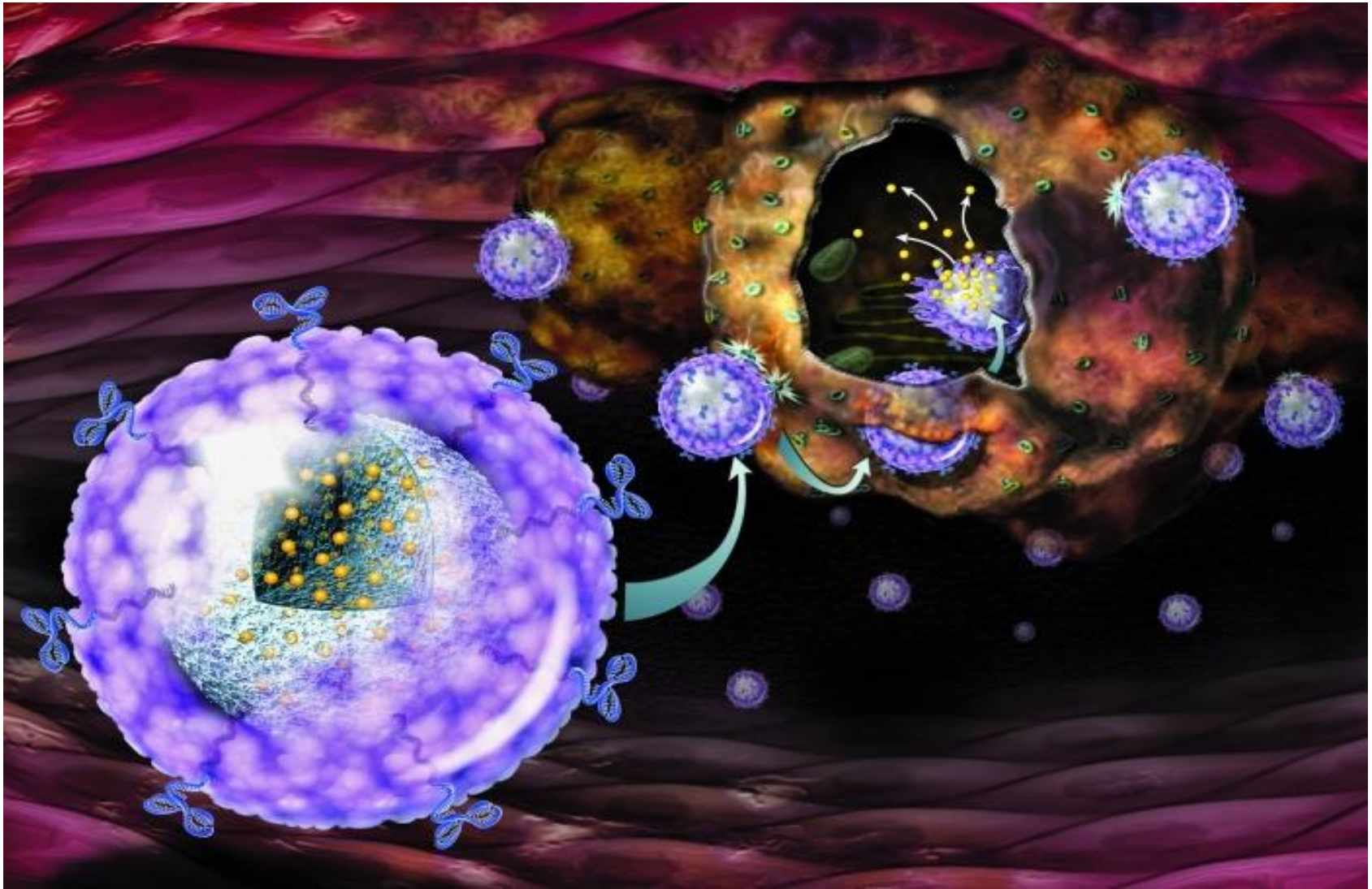
É. Kiss, D. Schnöller, K. Pribranská, K. Hill, Cs. B. Pénzes, K. Horváti, Sz. Bősze: Nanoencapsulation of antitubercular drug isoniazid and its lipopeptide conjugate *J. Disp. Sci Technol.* (2011)

Sejtbe jutás

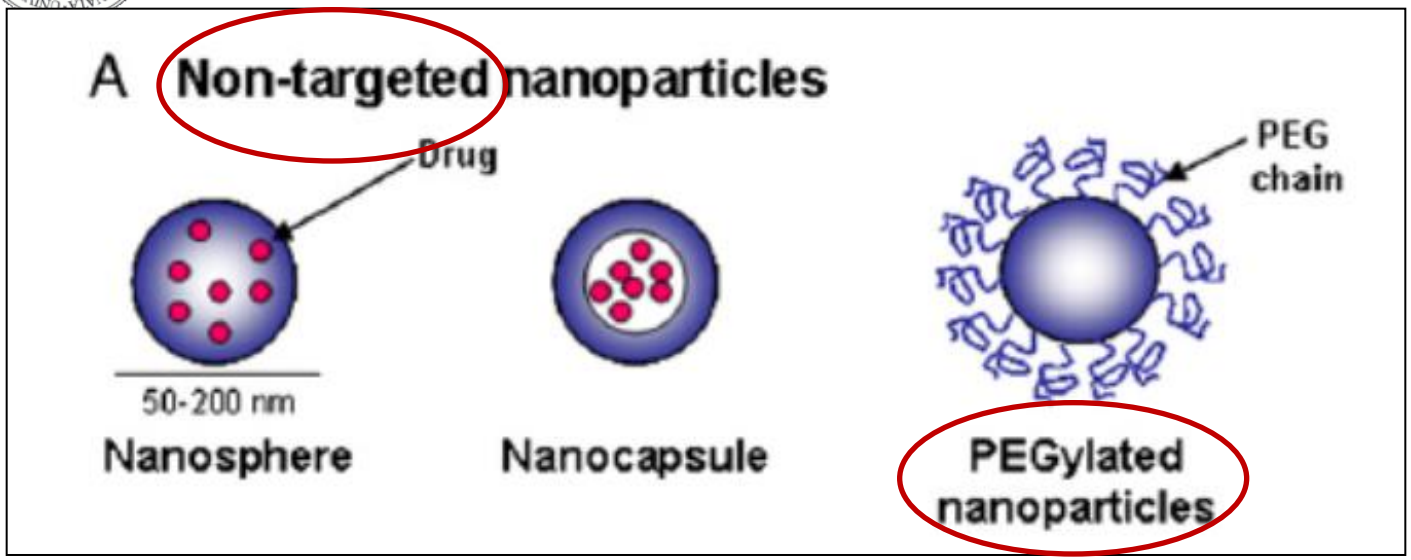
Felület: kedvező „bioválasz”

ne ürüljön ki, maradjon a véráramban a kívánt ideig: PEG-ezés

specifikus kölcsönhatásra alkalmas irányító komponensek a felületen, célbajutattás

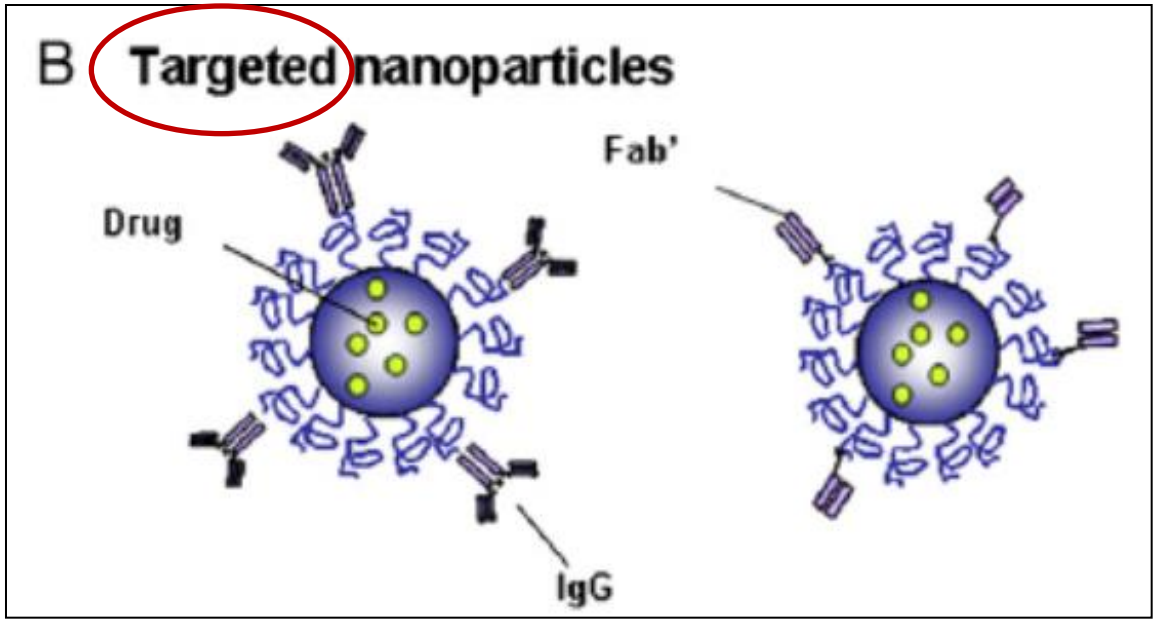


Gyógyszerhordozók felületi funkcionalizálása



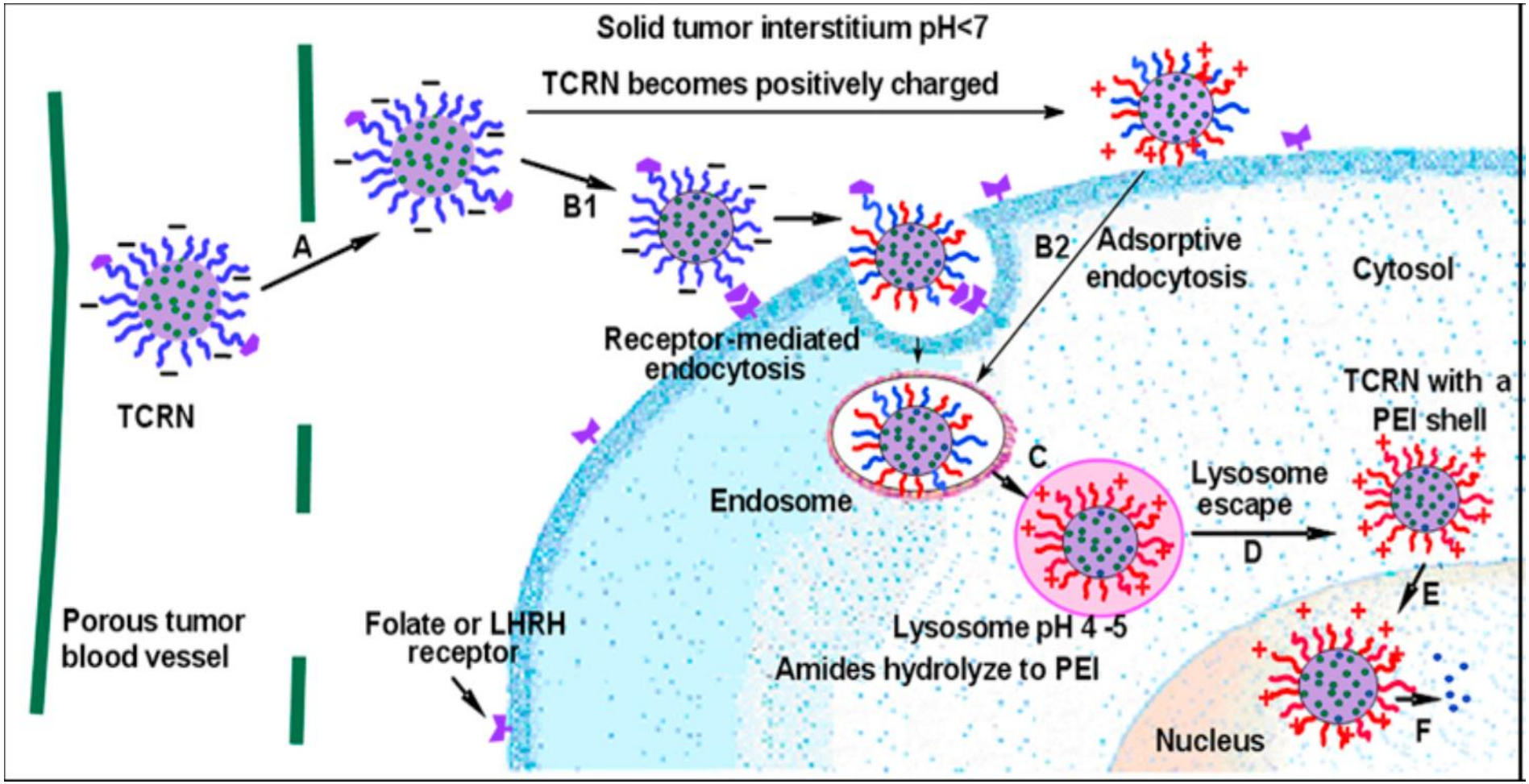
1980-tól

2000-től



Gyógyszerhordozó nanorészecskék

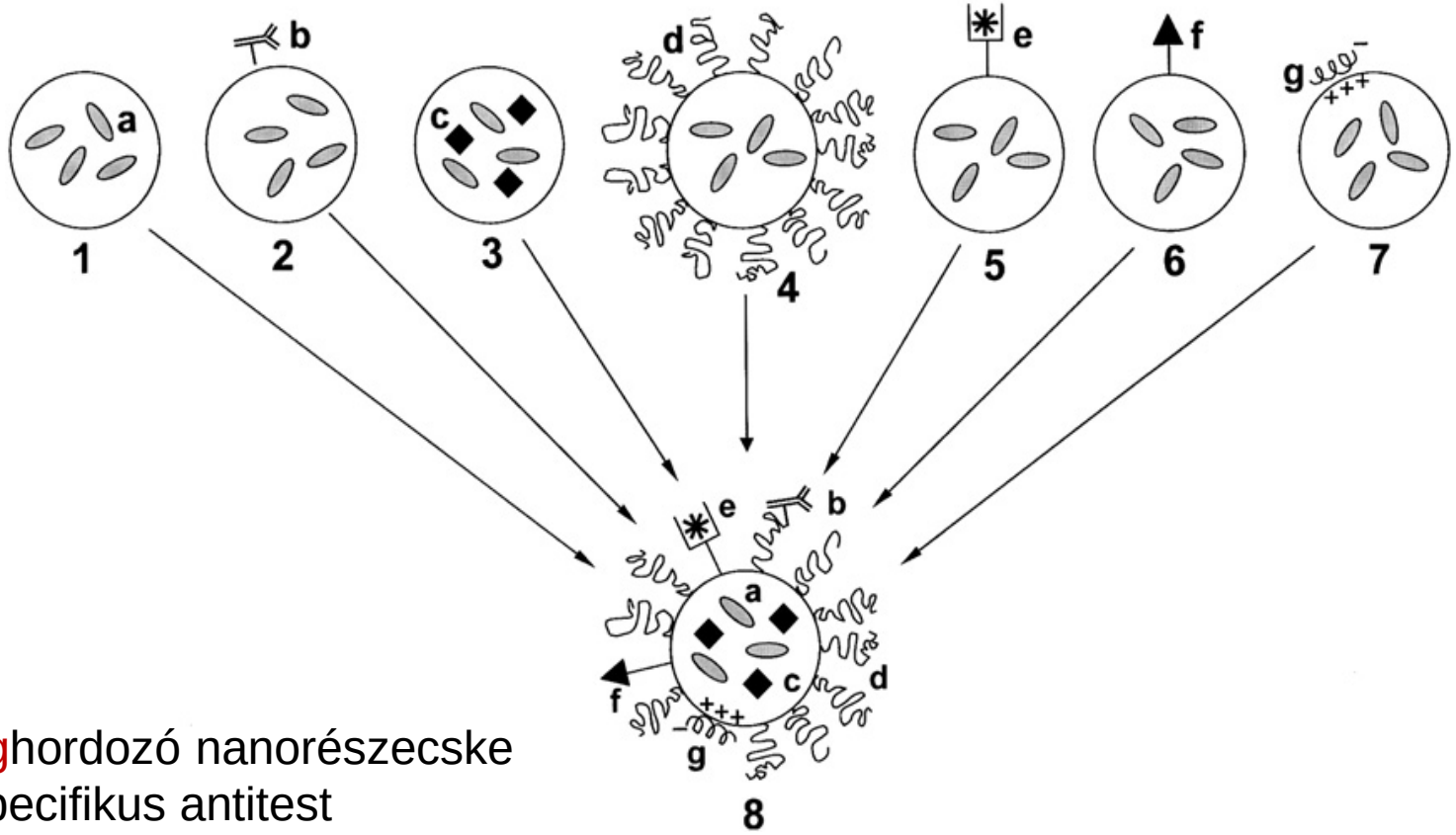
Többfunkciós nanorészecskék



Irányított, töltést-váltó nanorészecske, ami eljut a sejtmagba

Zachary: Fabrication of Micellar Nanoparticles for Drug Delivery Through the Self-Assembly of Block Copolymers Progr in Polym Sci (2010) targeted charge-reversal nanoparticle

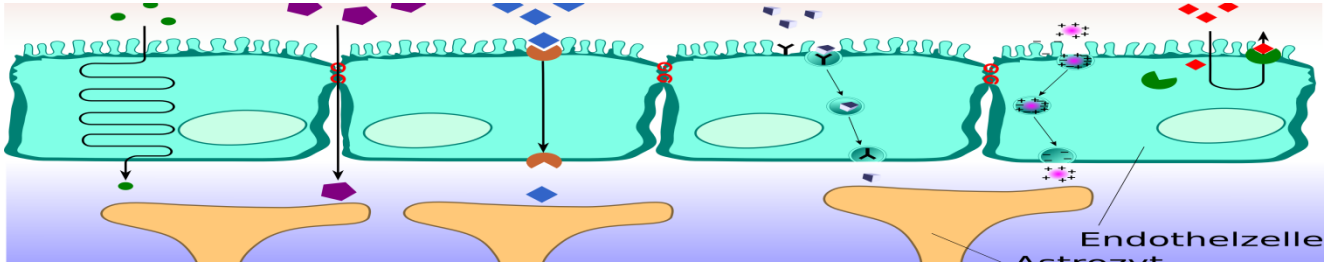
Többfunkciós nanorészecskék



1 – hatóanyaghordozó nanorészecske
2 – irányító specifikus antitest
3 – mágneses részecske (irányítható külső térrel, képalkotó)
4 – PEG réteg a biokompatibilitásért
5 – kontraszt anyag (Gd, Mn – gamma- vagy MR képalkotáshoz;
6 – sejt-penetráló peptid
7 – DNS-komplex

A vér-agy gáton átjutó nanorészecskék

Védi a központi idegrendszert, megnehezíti a hatóanyag bejuttatását



Stratégiák:

Invazív (roncsoló): életveszélyes, fertőzéseknek is utat nyit.

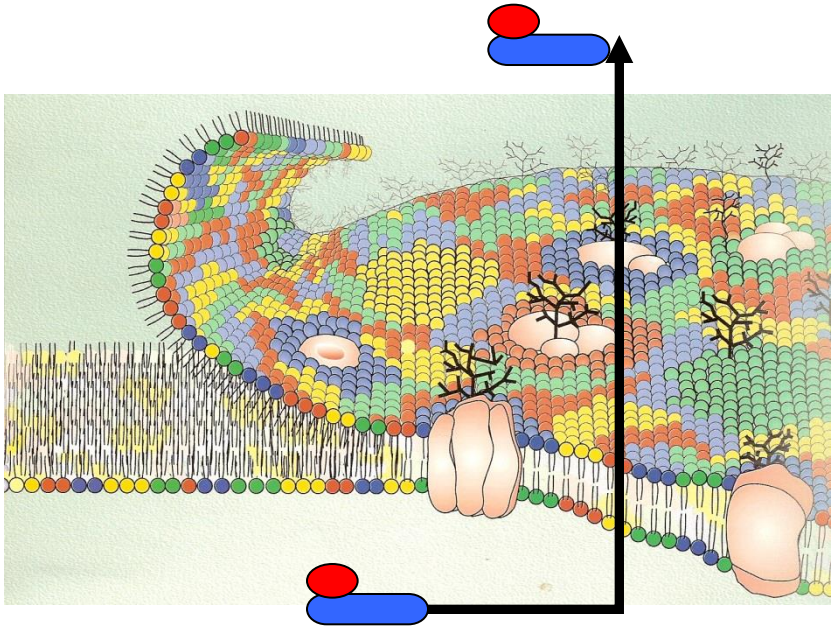
Alternatív út, elkerüli a keringést: orron át,
gond lehet a kis pH és az orr nyálkahártya gyulladása.

Álcázás: produg, ami metabolikus lépésekben aktiválódik

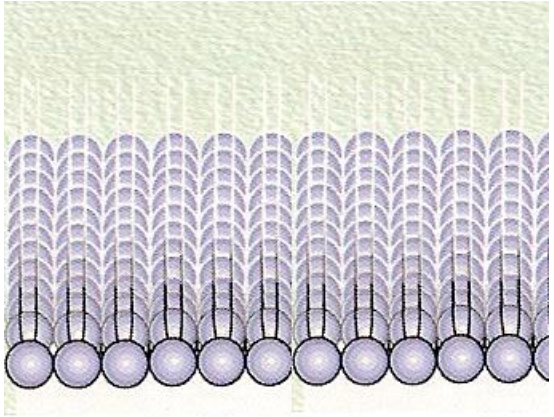
Nanorészecskék: max. 50-60nm, aggergációs stabilitás
biodegradábilis
többfunkciós
(passzív transzport)
irányítás (nem antitesttel)
receptor-közvetített endocitózis,
közepes erősségű kapcsolat
megfelelő ligandum kiválasztása

Határfelületi kölcsönhatások

A gyógyszerhordozó rendszereknek számos határfelületen kell átjutniuk, hogy eljussanak a hatás helyére



A sejtmembrán lipid kettősrétegének egyszerűsített modellje

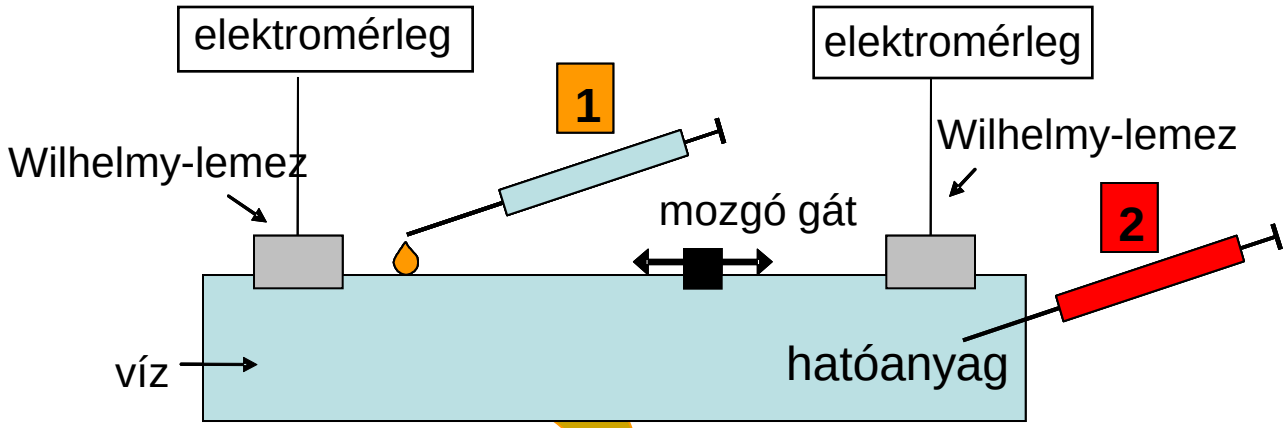


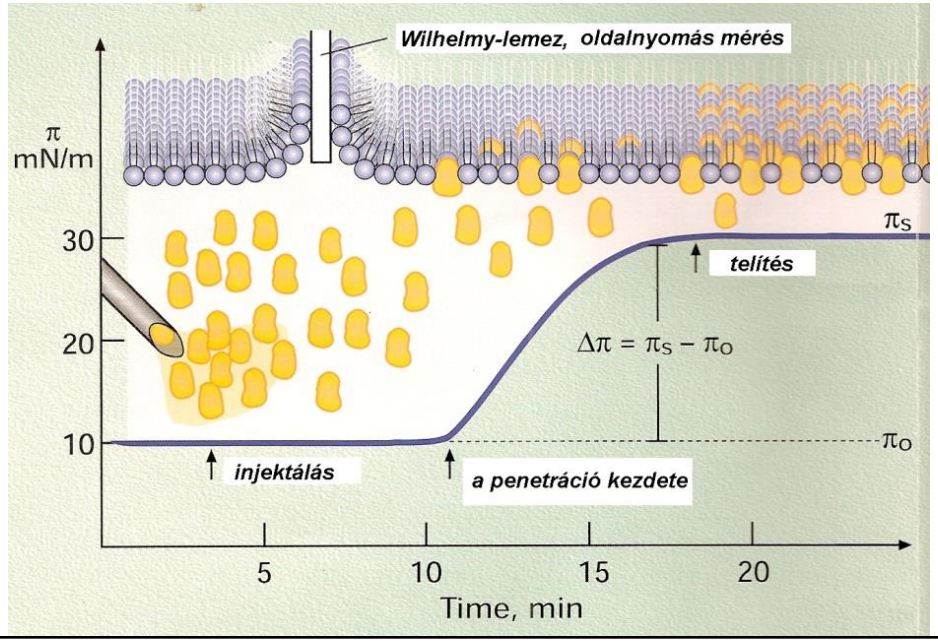
Lipid molekulák rendezett monorétege

Langmuir-mérleg, penetráció mérés

1 Rendezett lipid réteg kialakítása

2 Hatóanyag rendszer bejuttatása az alsó fázisba

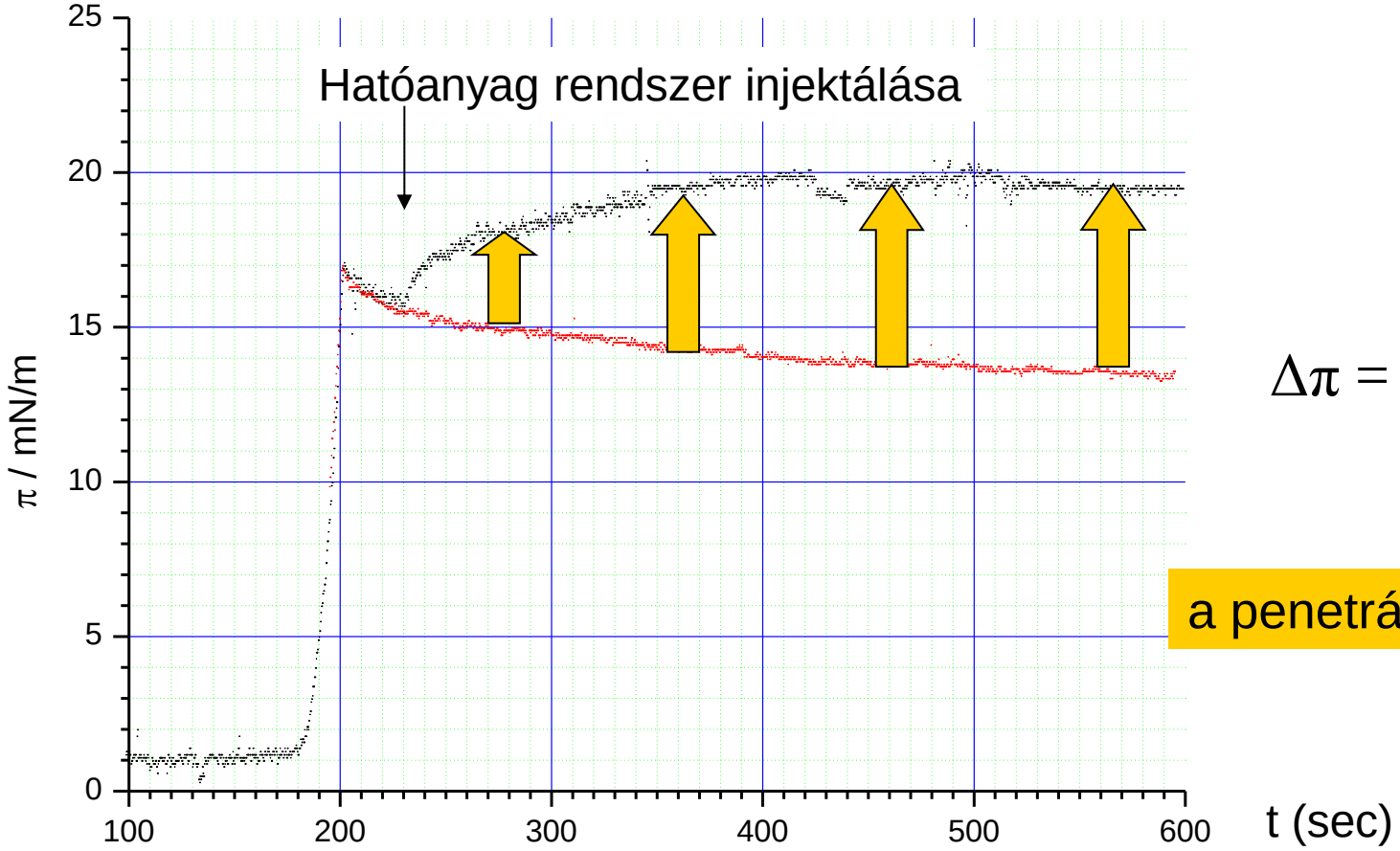




A lipidréteghez való kötődés, a penetráció mértéke követhető az oldalnyomás változásából, és LB-filmként a szerkezeti változás megjeleníthető (AFM)

K. Hill, Cs. B. Pénzes, D. Schnöller, K. Horváti, Sz. Bősze, F. Hudecz, T. Keszthelyi, **É. Kiss**: Characterisation of the membrane affinity by tensiometry, AFM and SFG using a phospholipid Langmuir monolayer model Phys. Chem. Chem. Phys. 2010

Penetráció a lipid filmbe



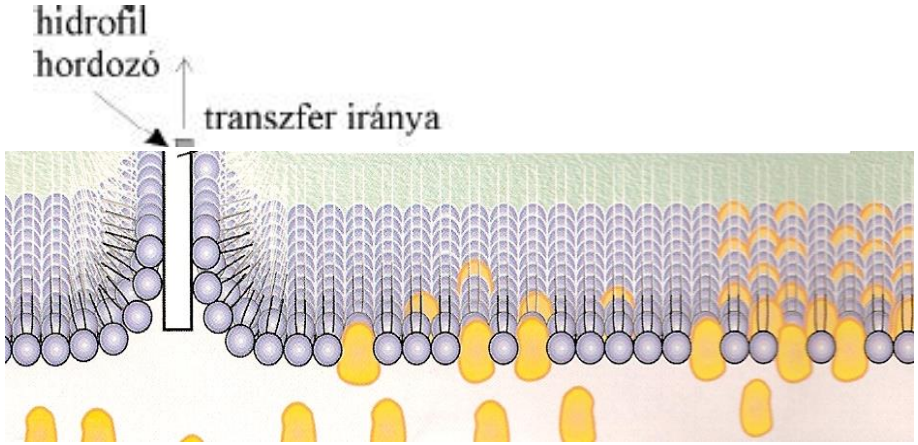
$\Delta\pi =$ a penetráció által kiváltott oldalnyomás növekedés

a penetráció mértéke

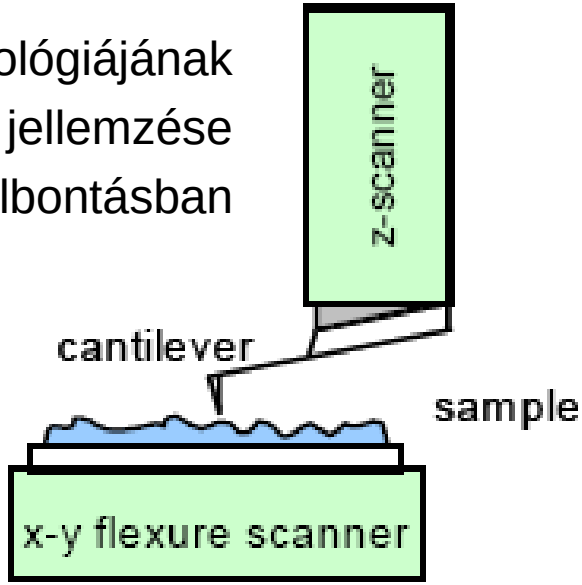
Cs. B. Pénzes, D. Schnöller, K. Horváti, Sz. Bősze, G. Mező, **É. Kiss**: Membrane affinity of antituberculotic drug conjugate using lipid monolayer containing mycolic acid
Colloids Surf. A 413 142– 148 (2012)

LB-film AFM vizsgálata

Langmuir-mérleg,filmhúzó lift, adott oldalnyomású film átvitele szilárd hordozóra: LB-réteg
Hordozó: frissen hasított csillám



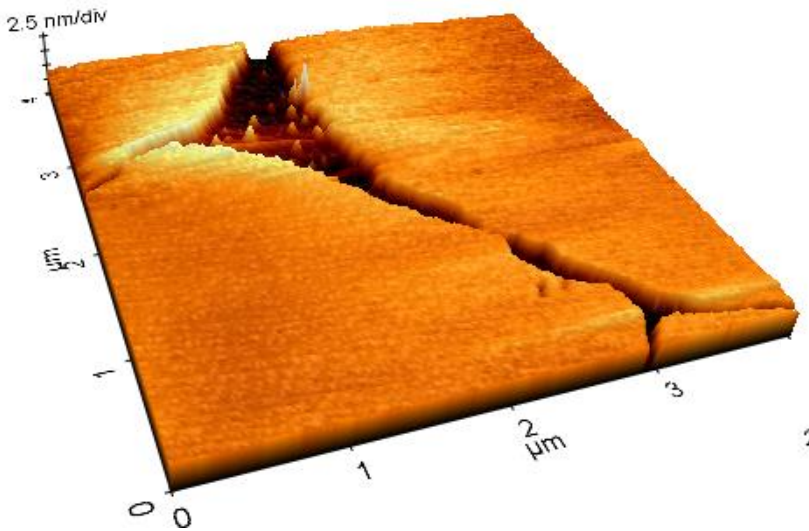
A szilárd felület morfológiájának jellemzése nanométeres felbontásban



- Tűhegy tapogatja le a minta felületét, kontakt és nem kontakt mód
- x és y irányban pásztázás, z irányú jel
- Profil: magasságértékek vonal mentén
- Érdességi paraméterek vonal, sáv mentén vagy területen

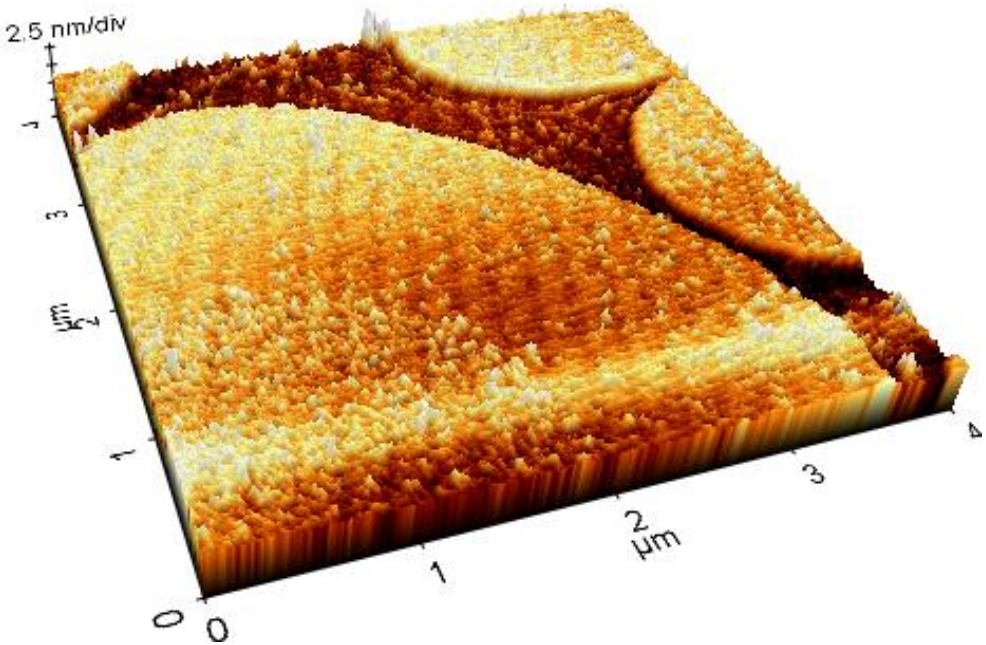
Egy lipidréteg (LB-film) penetráló hatóanyaggal vagy anélkül

AFM, penetráció a lipid filmbe



tiszta lipid film
doménes szerkezet,
sima felszín,
a lipid molekulák tömör, orientált elrendeződése

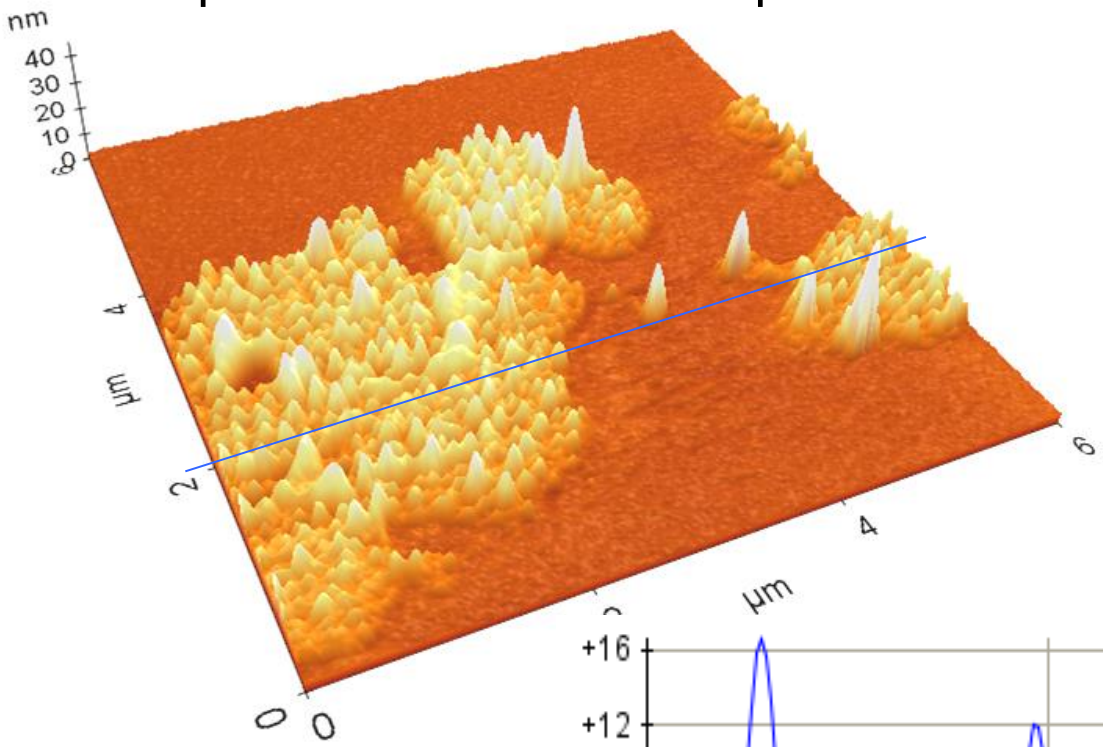
lipid film hatóanyag penetráció után



K. Hill, Cs. B. Pénzes, D. Schnöller, K. Horváti, Sz. Bősze, F. Hudecz, T. Keszthelyi, É. Kiss: Characterisation of the membrane affinity by tensiometry, AFM and SFG using a phospholipid Langmuir monolayer model Phys. Chem. Chem. Phys. 2010

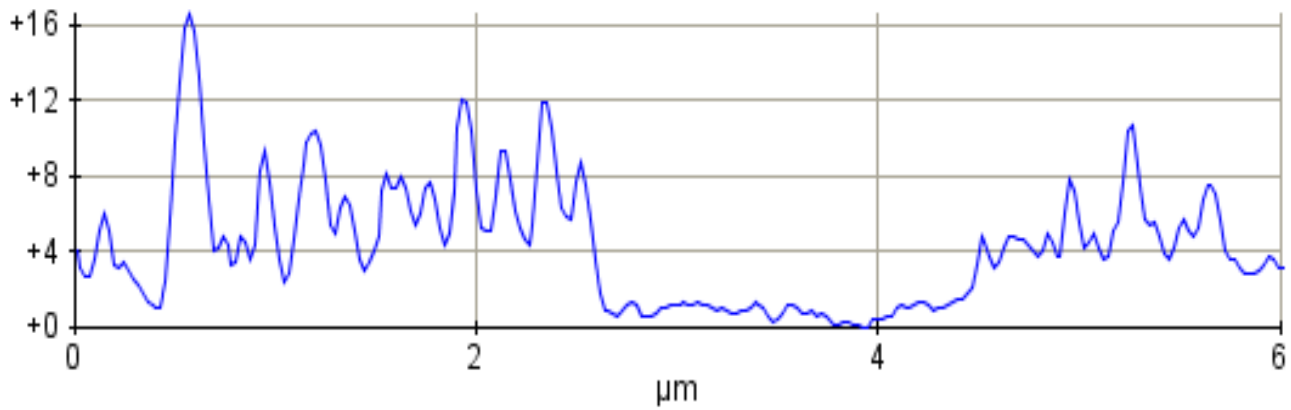
AFM, penetráció a lipid filmbe

Lipid film - antibakteriális polielektrolit kölcsönhatás



Szerkezeti változás

A rendezett molekularéteg megbomlott, aggregátumos szerkezet, érdesség: 20nm



É. Kiss, E. T. Heine, K. Hill, Y-C. He, N. Keusgen, Cs. B. Pénzes, D. Schnöller, G. Gyulai, A. Mendrek, H. Keul, M. Möller: Membrane affinity and antimicrobal properties of polyelectrolytes with different hydrophobicity Macromolecular Bioscience 12 (9) 1181–1189 (2012)

Polimer gyógyszerhordozók

PLGA előnyei:

- biokompatibilitás
- biológiai lebonthatóság (*toxicitás*)
- be tud jutni a sejtekbe (passzív, aktív irányítás)
- szabályozható hatóanyag felszabadulás
- sokféle hatóanyagra alkalmas
- FDA és EMA engedély

Megoldandó: nagyobb hatóanyag tartalom
a gyártás méretnövelése
olcsóbb előállítás

Nanomedicina

EU stratégia

Betegségek: szív- és érrendszeri, rák, mozgásszervi, idegrendszeri, cukorbetegség, baktérium- és vírusfertőzések

További feladatok:

irányított hatóanyagtranszportban új célzó egységek, sejten belüli irányítás, több célpont, több hatóanyag

többfunkciós nanorészecskék: hatóanyagszállítás és képalkotás, szabályozott leadás és követése

intelligens rendszerek: határrétegen való átjutás, külső hatásra reagáló viselkedés

Együttműködők

Bősze Szilvia, Horváti Kata, Bacsa Bernadett, Mező Gábor, Hudecz Ferenc
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Szabó Nóra
Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet

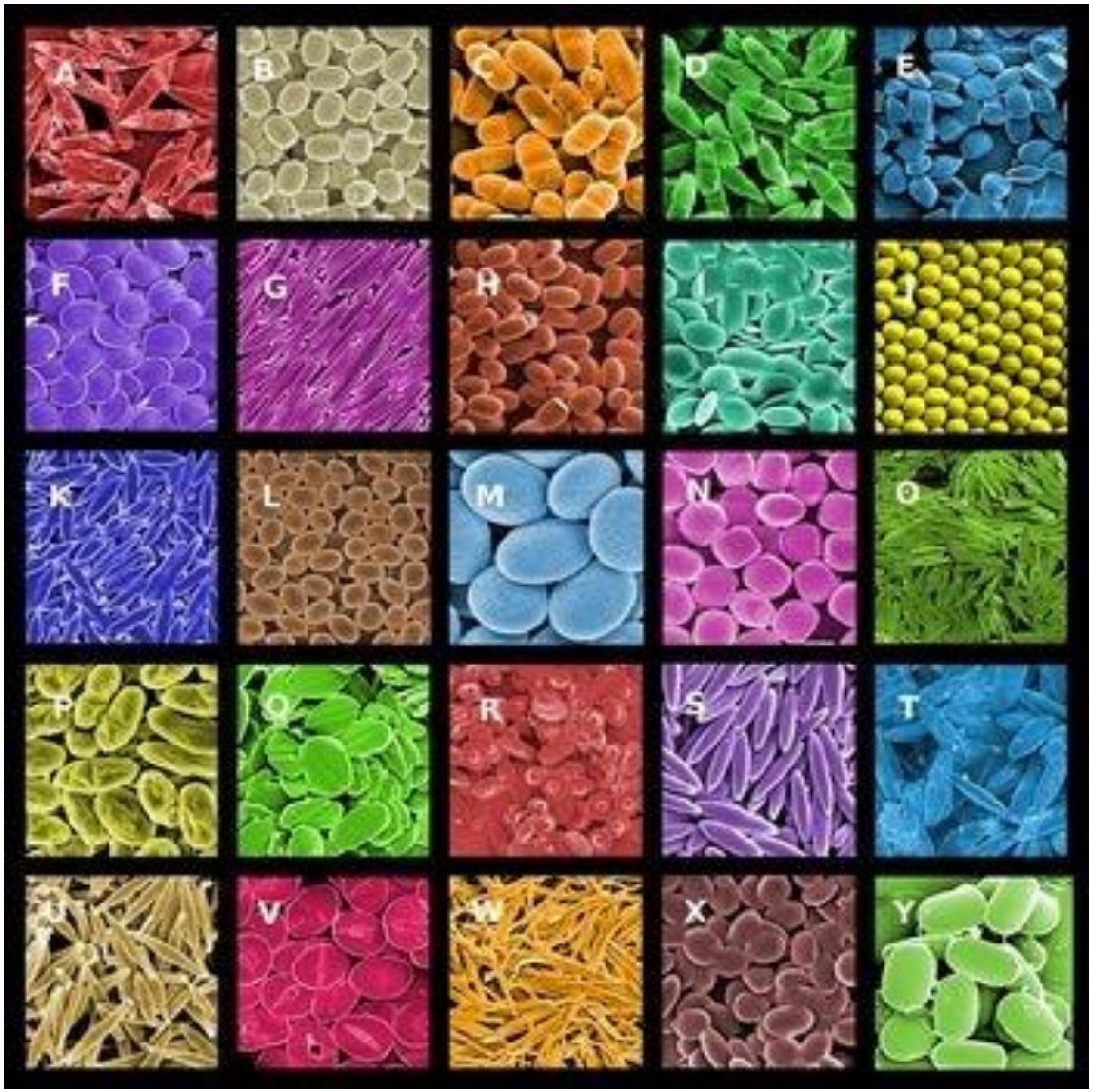
Kálmán Mihály
SE I. Anatómiai Intézet

Keszthelyi Tamás
MTA Kémiai Kutatóközpont

Támogatók:

TB-INTER Jedlik NKTH
BIOSPONA TeT-08-SG-STAR
OTKA 68120, 68358, 104
BIOSURF Jedlik NKTH
FP7 NanoBond

Köszönöm a figyelmet!



Julie A. Champion, Yogesh K. Katare, and Samir Mitragotri (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11901-11904