

Cielený transport liečiv pomocou magnetických nanočastíc

Gábor Lancz

Vedúci:

doc. RNDr. Peter Kopčanský, CSc.

Konzultantka:

Ing. Martina Koneracká, CSc.

- Cielenie liečiv
- Príprava vzoriek
- Štruktúra magnetických kvapalín (SANS)
- Charakteristika častíc k magnetickému cieleniu (MC)
 - Rozmer, tvar, superparamagnetizmus, stabilita suspenzií
 - Kalorimetria (DSC)
 - Infračervená (IČ) spektroskopia
 - Uvoľňovanie liečiva
- In vivo experiment MC
- Záver



Potreba vývoja liekových preparátov

Problémy podávania liekov, liečiv vo voľnej forme:

Systemová distribúcia –

(Cytostatiká, protizápalové lieky...)

Účinné látky útočia aj na zdravé bunky

POTREBA OBMEDZIŤ ÚČINOK NA CHORÉ TKANIVO

Potrebné prídavné látky –

(napr. k rozpusteniu hydrofóbných liečiv)

Spôsobujú vážne vedľajšie účinky

(napr. polyetoxylovaný ricínový olej Cremophor EL v injekčnom preparáte taxolu)

Rýchla eliminácia –

Niekedy sa vyžaduje dlhodobý účinok

Alternatíva: nanočastice nosiace liečivo

Ak by boli magnetické, mohli by byť udržané v mieste cieľového tkaniva poľom (aplikovaným externe či interne)

Teória magnetického cielenia

Magnetická sila pôsobiaca na časticu:

Na časticu majúcu magnetický moment m v nehomogénnom magnetickom poli o indukcii B pôsobí sila

$$\vec{F} = (\vec{m} \nabla) \vec{B}$$

(Homogénne pole vyvoláva len rotáciu.)

Uvažujúc rovnosť medzi magnetickou silou a odporom prostredia (Stokesov vzťah) platí pre rýchlosť častice

$$v = \frac{m}{6\pi\eta a} \left| \frac{dB}{dz} \right|$$

η - viskozita, a - polomer častice, z - súradnica

Ak nanočastica je v slabo diamagnetickom prostredí ako voda:

$$\vec{m} = V\vec{M} \quad \vec{M} = \chi_{ef}\vec{H}$$

V - objem častice, $\chi_{ef} = \chi_m - \chi_{voda}$ - efektívna objemová susceptibilita častice vo vzťahu k vode, H - intenzita. Ak suspenzia nanočastíc je riedka, možno uvažovať s permeabilitou vákua μ_0

$$\vec{B} = \mu_0 \vec{H}$$

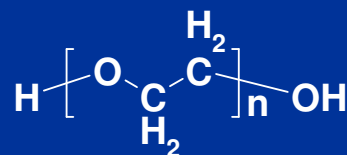
$$\vec{F} = \frac{V\chi_{ef}}{\mu_0} (\vec{B} \nabla) \vec{B}$$

Dôležitý je gradient indukcie, nielen indukcia!

Príprava vzoriek MKPEG

Magnetické nanočastice sú odstraňované z krvného obehu mononukleárovým fagocytovým systémom (RES).

K brzdeniu tohto javu je potrebný vhodný obal častíc
– polyetylénglykol (PEG).



Postup k získaniu biokompatibilnej magnetickej kvapaliny (MK) s PEGom:

- Príprava magnetitu (Fe_3O_4) koprecipitáciou

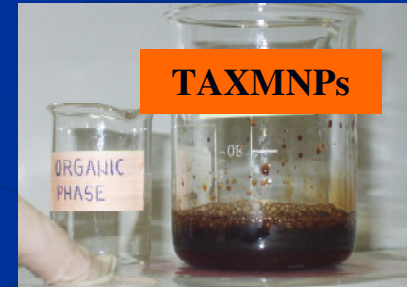
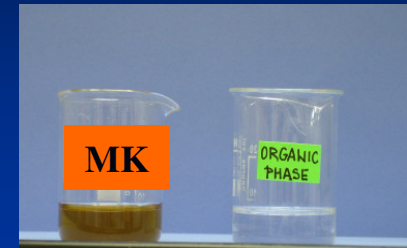


- Stabilizácia nanočastíc magnetitu oleátom sodným
(miešanie, ohrev do varu, centrifugácia)
- Pridanie roztoku PEGu (miešanie, ohrev do cca 50°C)

Príprava vzoriek

Taxolom naložené nanosféry (NPs) - nanoprecipitácia

- pripravujú sa dve sústavy:
 - 1) vodná s MK a stabilizujúcim surfaktantom a
 - 2) roztok nosného polyméru s liečivom v organickom (prchavom) rozpúšťadle
- organický roztok sa pridáva po kvapkách za miešania k vodnej sústave a potom sa odparuje; vznikajú liečivom naložené magnetické nanosféry (TAXMNPs)
- nežiadúce častice (agregáty) možno odfiltrovať (0,3 μm)



Nemagnetické:

H. Fessi, F. Puisieux, J. Ph. Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita, Int. J. Pharm. 55 (1989) R1

C. Fonseca, S. Simões, R. Gaspar, Journal of Controlled Release 83 (2002) 273

Zloženie NPs – východzie množstvá

■ Vodná časť

- Pluronic F68 v (injekčnej) vode
(8 ml; 3,2 mg/ml →)
25,6 mg / 100 mg polyméru
alebo albumín (BSA)

■ MKPEG

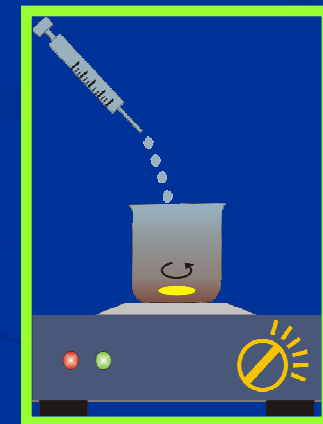
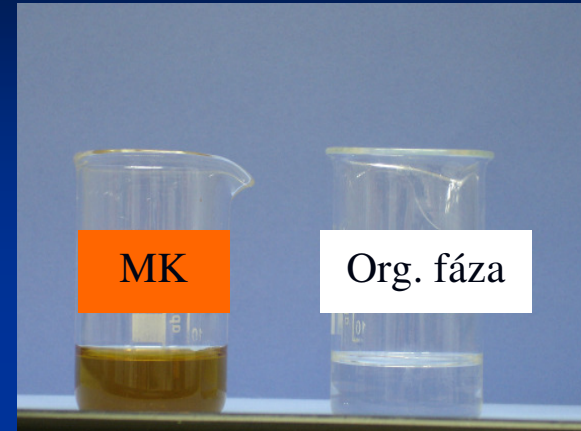
stabilizovaná oleátom sodným,
s pridaným PEGom (1 kg/mol)
k zvýšeniu biokompatibility

0,1 g Fe_3O_4 /ml, k in vivo pokusom: 0,5 ml
MKPEG 14. 11. 07: 0,026 g PEG/ml

■ Acetónový roztok

- taxol (5 mg ...)
- PLGA 85:15

5 mg TAX + 100 mg polyester + 50 mg Fe_3O_4
/ pôvodne 10 ml



Štruktúra MK skúmaná malouhlovým rozptylom neutrónov (small-angle neutron scattering)

Veľkosť rozptylového vlnového vektora
 $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$

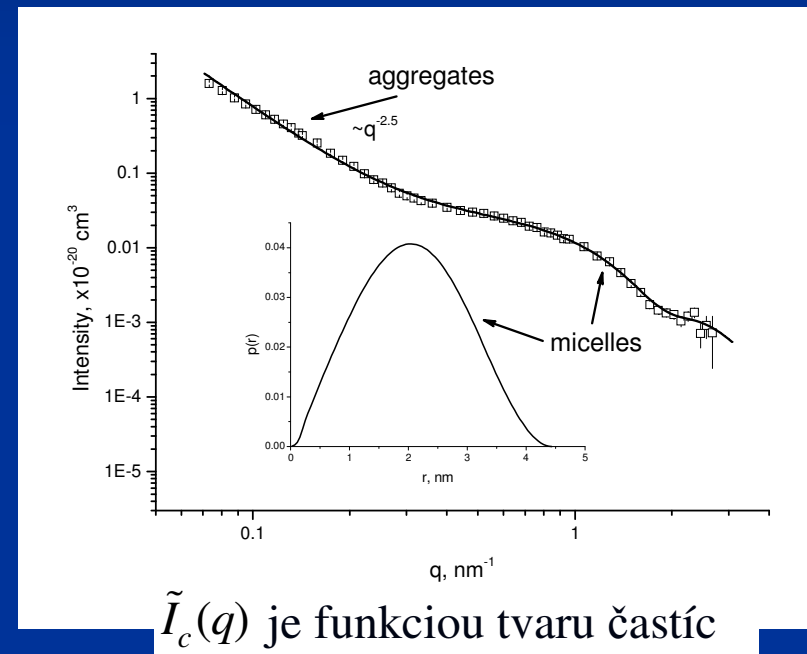
Intenzita rozptylu

$$I(q) = \tilde{I}_s(q) + \Delta\tilde{\rho}\tilde{I}_{cs}(q) + (\Delta\tilde{\rho})^2\tilde{I}_c(q)$$

Modifikovaný kontrast

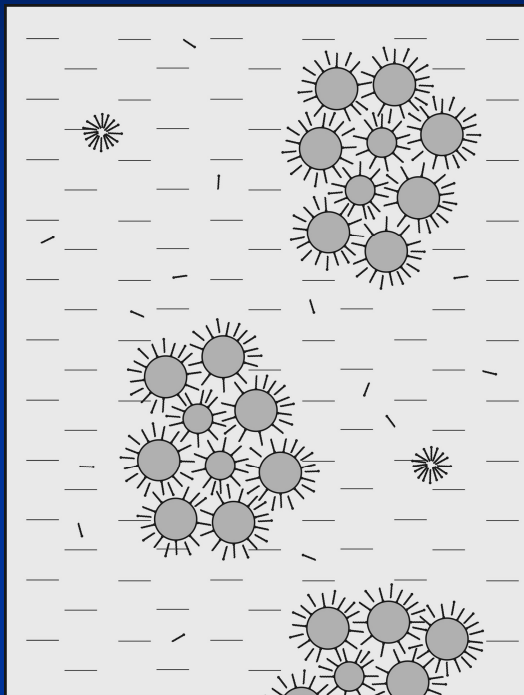
$$\Delta\tilde{\rho} = \bar{\rho}_g - \rho$$

Pri dostatočne veľkom kontraste prevláda $\tilde{I}_c(q)$

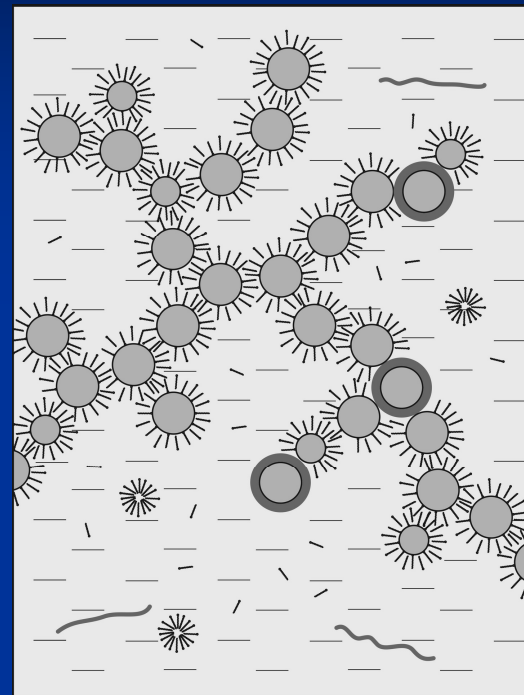


M. V. Avdeev, A. V. Feoktystov, P. Kopčanský, V. M. Garamus, R. Willumeit, M. Timko, M. Koneracká, V. Závishová, L. A. Bulavin, *Structure of water-based ferrofluids with sodium oleate and poly(ethylene glycol) stabilization by small-angle neutron scattering: contrast variation experiments*, článok zaslaný do Journal of Applied Crystallography

Malouhlový rozptyl neutráonov na MK



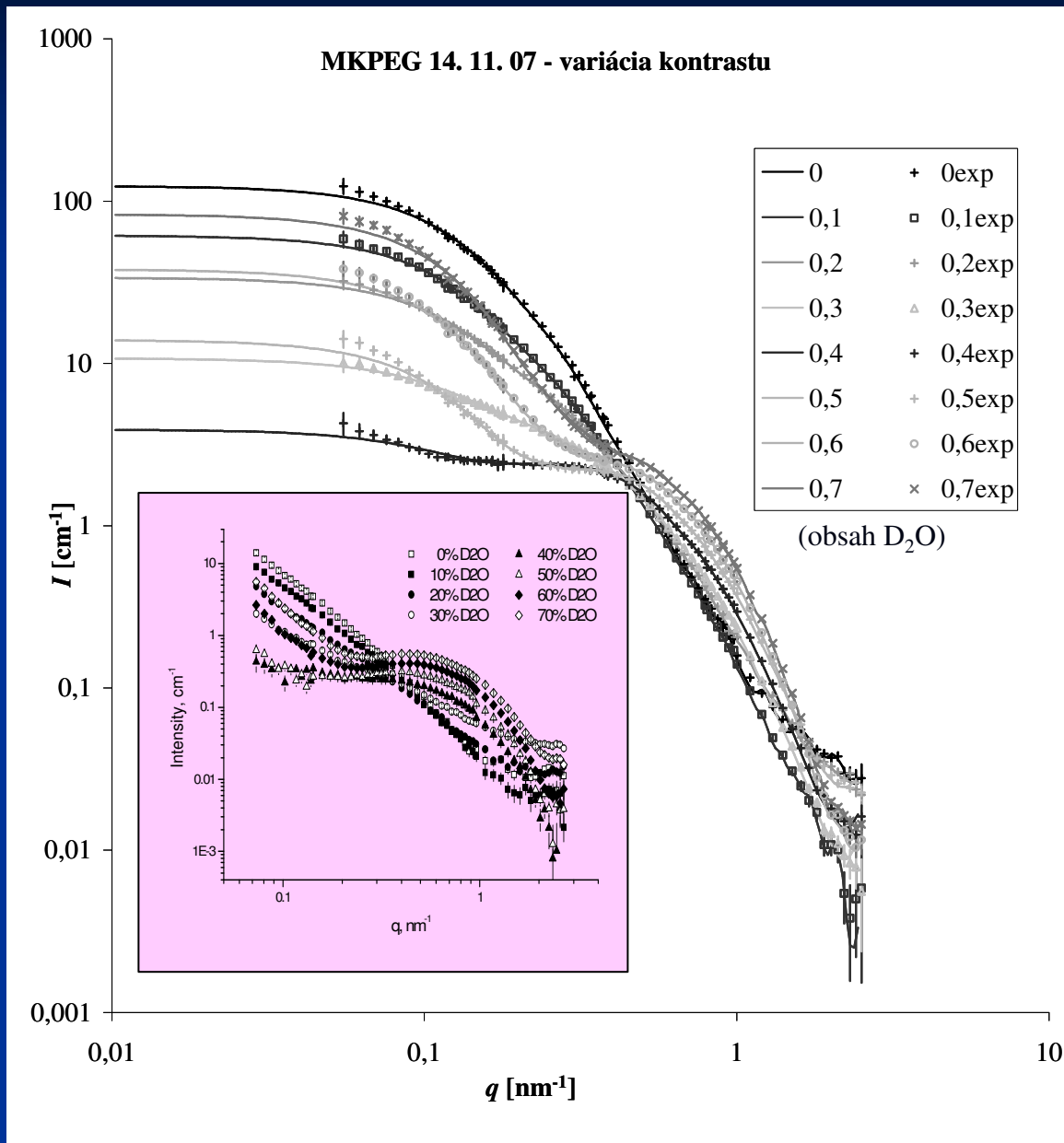
MK stabilizovaná oleátom sodným



MK s oleátom sodným a
PEGom
(magnetit : PEG hm.1 : 2,5)

M. V. Avdeev, A. V. Feoktystov, P. Kopčanský, V. M. Garamus, R. Willumeit, M. Timko, M. Koneracká, V. Závřšová, L. A. Bulavin, *Structure of water-based ferrofluids with sodium oleate and poly(ethylene glycol) stabilization by small-angle neutron scattering: contrast variation experiments*, článok zaslaný do Journal of Applied Crystallography

Štruktúra MKPEG

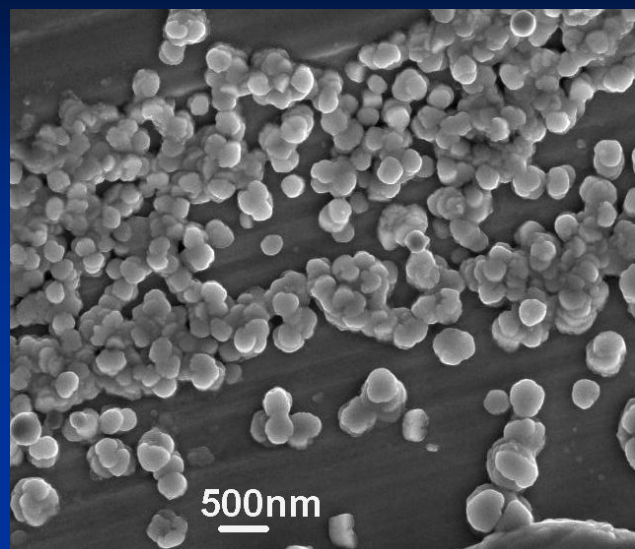


~~$$I(q) \sim q^{-k} ?$$~~

**Fraktály
nepozorované**

M. V. Avdeev, ... článok
zaslaný do Journal of Applied
Crystallography

Tvar, rozmer, koloidná stabilita NPs



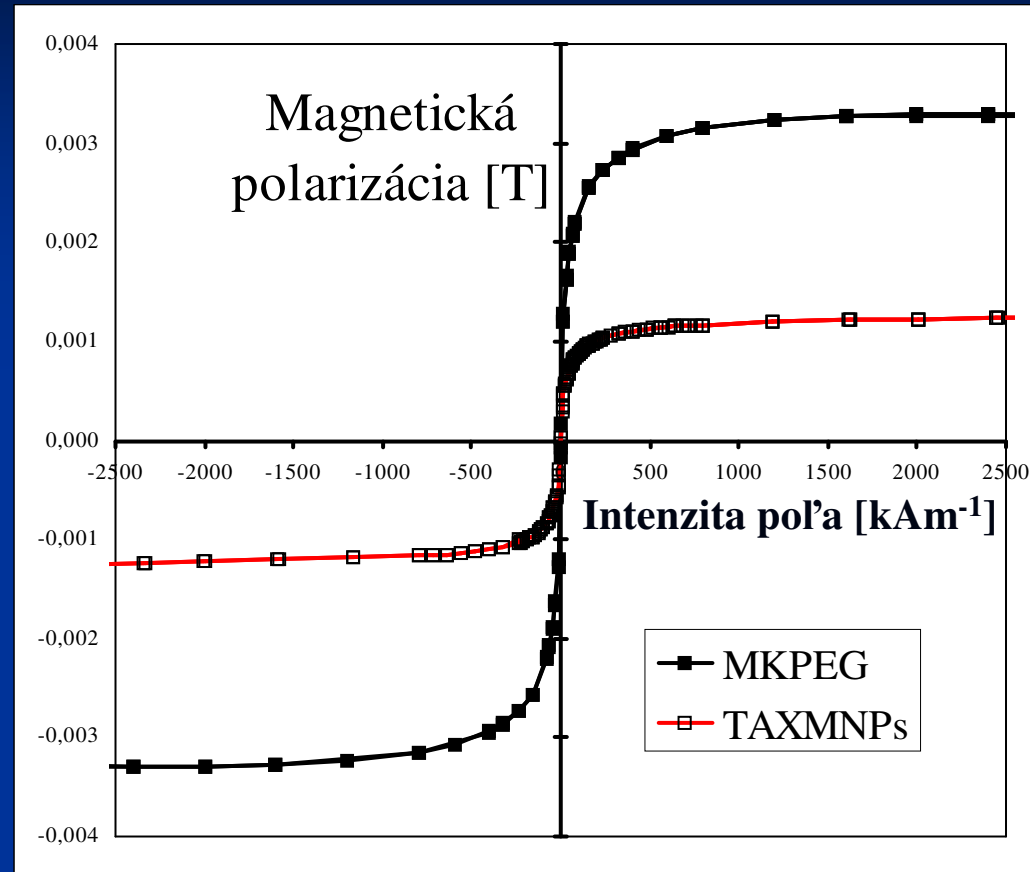
TAXMNPs



Vzorka	Rozmer [nm] (dynamický rozptyl svetla, medián)	Koncentrácia koagulácie [mol.dm ⁻³ NaCl] (turbidimetria)
MKPEG	65	0,095
NPs (bez MK/TAX)	195	1,45
TAXNPs (bez MK)	204	1,2
MNPs (bez TAX)	230	stabilná
TAXMNPs	232	stabilná

V. Záviová et al., *Synthesis and characterization of polymeric nanospheres loaded with the anticancer drug paclitaxel and magnetic particles*, J. Magn. Mater. 321 (2009) 1613–1616

Magnetické vlastnosti



SUPERPARAMAGNETIZMUS (AGREGÁCIA KVÔLI REMANENCII NEMOŽNÁ)

M. Koneracká, et al., *Encapsulation of anticancer drug and magnetic particles in biodegradable polymer nanospheres*, Journal of Physics: Condensed Matter, 20 (2008) 204151

Kalorimetria NPs

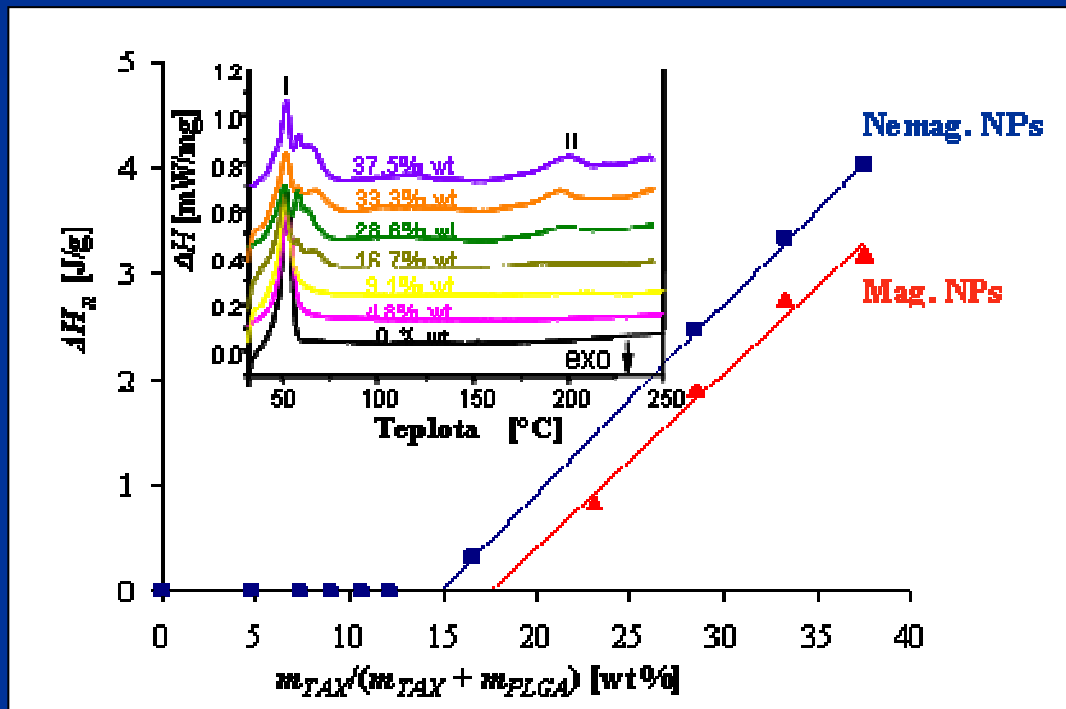
Liečivo v polyméri môže byť v rôznych formách [Dubernet]:

- Fyzikálna disperzia
- Ak v začiatočnom kroku prípravy je rozpustené, vzniká:
 - Tuhý roztok
 - Metastabilná molekulová disperzia
 - Kryštalická disperzia

Zdanlivá rozpustnosť liečiva v polyméri (pri teplote tavenia liečiva) slúžila ako odhad maximálneho možného nákladu.

Kalorimetria NPs

Sušiny NPs pripravené rôznymi východzími množstvami taxolu (PLGA 85:15) – pozorované tavenie odhaľuje „nadbytočné množstvo“



cca 17 mg TAX / 100 mg PLGA 85:15

cca 21 mg TAX / 100 mg PLGA 85:15

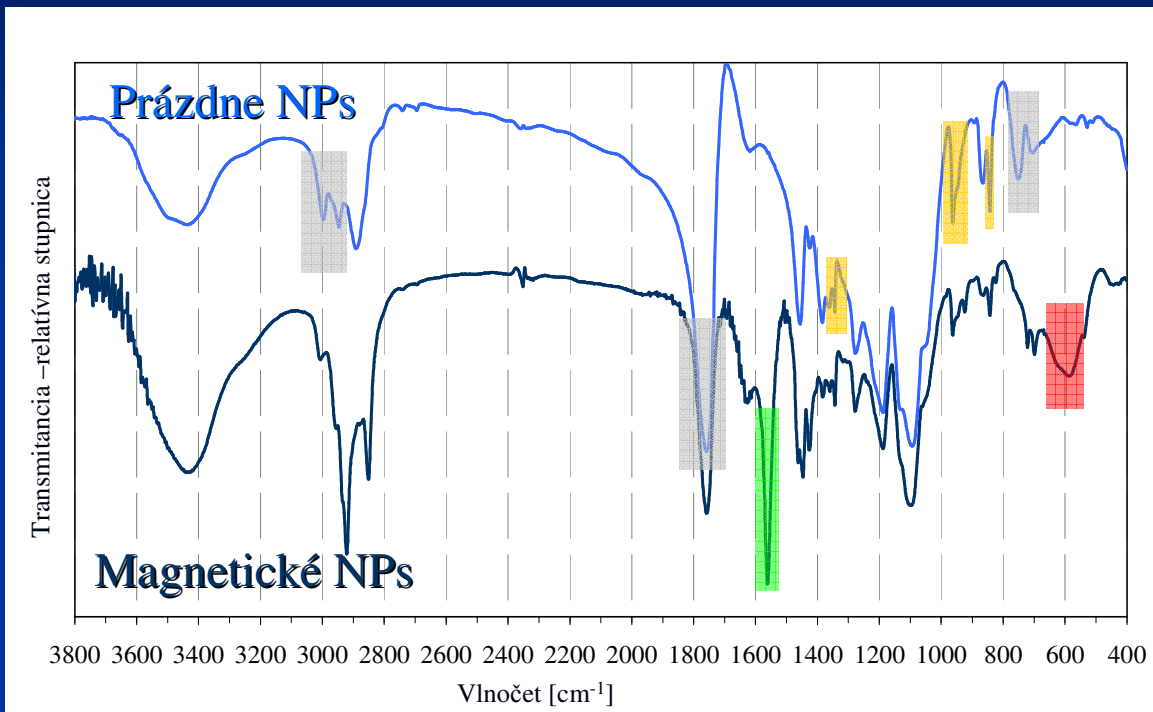
I – sklený prechod

II – tavenie

Skutočný maximálny náklad môže byť obmedzený koloidnou stabilitou (Nemagnetické NPs 10 mg TAX / 100 mg PLGA agregovali.)

IČ spektrá

Potvrdenie prítomnosti stavebných zložení NPs

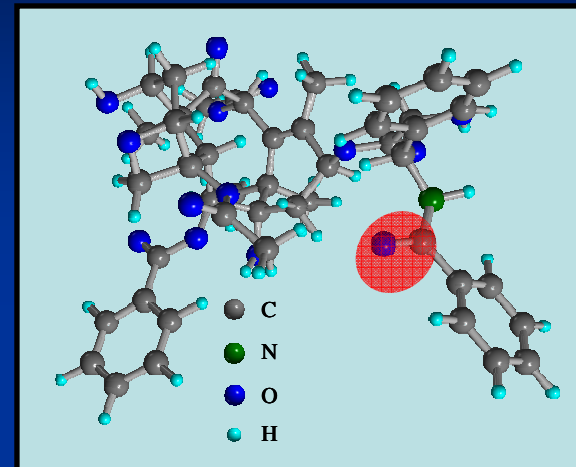
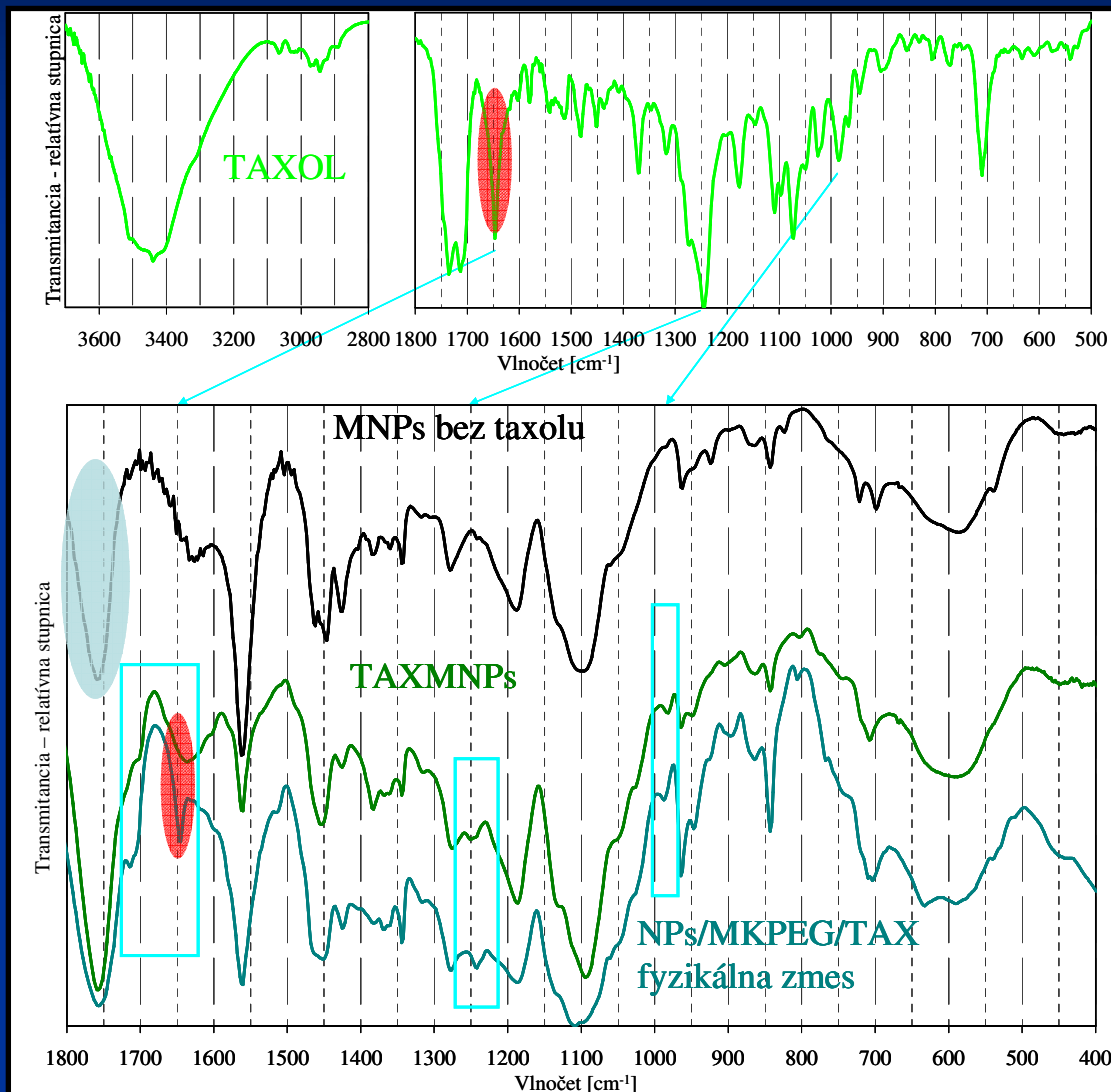


Vlnočet [cm ⁻¹] MNPs	Vibrácia
1562	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$ oleátový anión
586	$\nu(\text{Fe-O})$ oxid železa (magnetit)

Vlnočet [cm ⁻¹] Prázdne NPs	Priradenie vibrácie
2997, 2947	PLGA, $\nu(\text{C-H})$
2891	Pluronic, $\nu(\text{C-H})$
1759	PLGA, $\nu(\text{C=O})$ (ester)
1456	CH ₂ deformačná vibrácia
1344, 962, 843	Pluronic
750, 706	PLGA

IČ spektrá

Potvrdenie prítomnosti taxolu vo vzorkách NPs



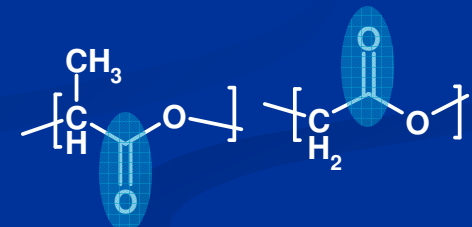
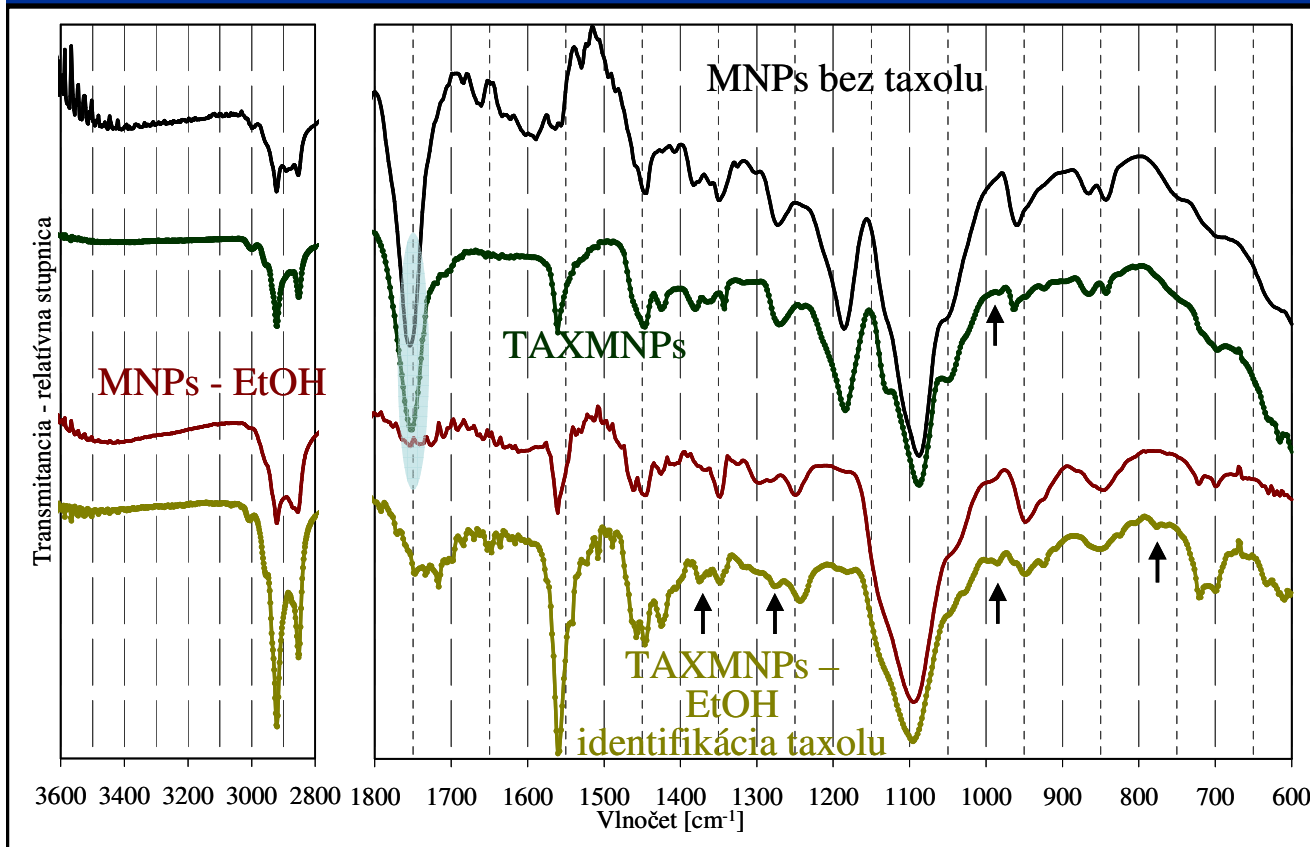
Dáta molekuly: G. J. Kleywegt et al.,
Acta Cryst. D54 (1998) 1119 (HIC-Up)

Vlnočet [cm ⁻¹] TAXMNPs	Pás taxolu
1637	$\nu(\text{C}=\text{O})$ amid (1647)
1250	(1244)
982	$\nu(\text{C}-\text{C})$ (985) [Zheng]

IČ spektrá

Metóda KBr tablety je neuspokojujúca pri nízkych nákladoch liečiva
(5 mg TAX / 100 mg PLGA).

Riešenie: ATR metóda (meranie totálnej reflektancie) v kombinácii s etanolovou
extrakciou

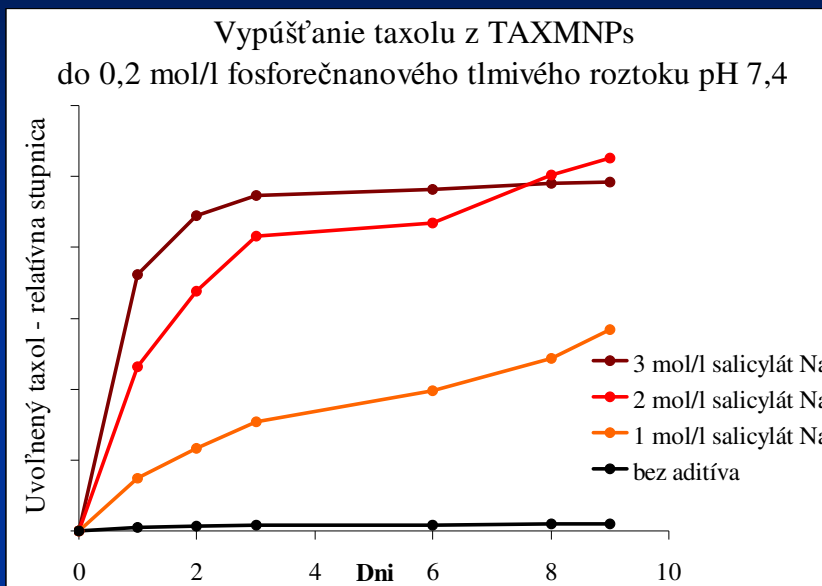


Laktidová & glykolidová
jednotka PLGA

Uvoľňovanie liečiva

Získavanie uvoľňovacích kriviek:

- Suché NPs v eppendorfkách s uvoľňovacími roztokmi
 - Inkubácia (37°C), trepanie
 - V daných časoch centrifugácia, supernatanty nahradené čerstvými roztokmi;
- Uvoľnený taxol stanovený chromatograficky (LCMS)



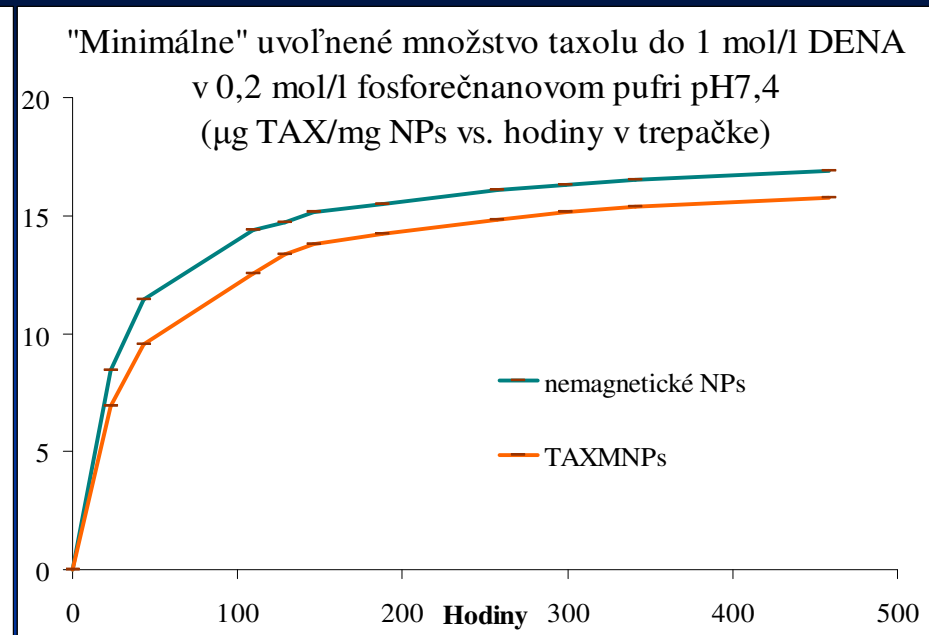
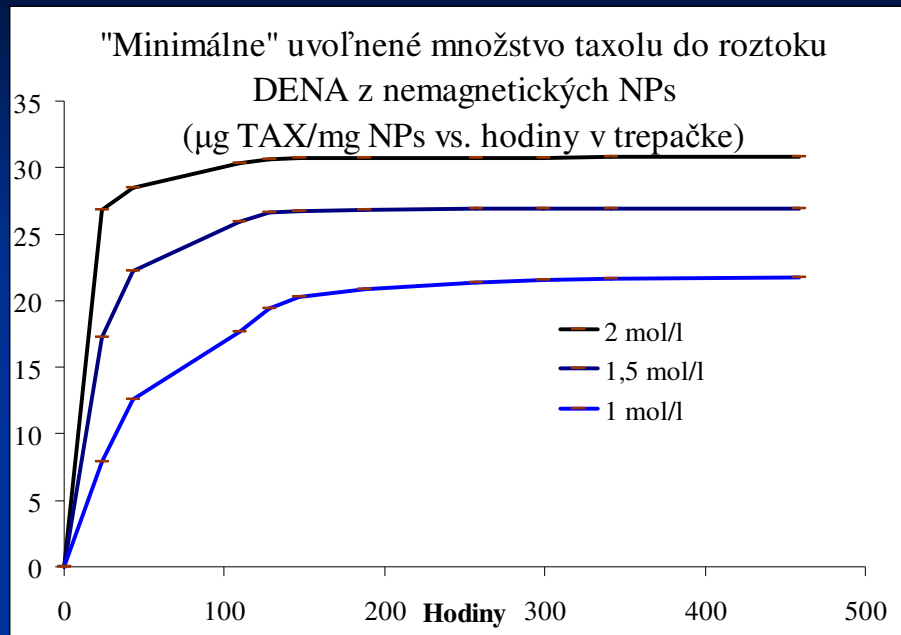
K získaniu vhodných kriviek vypúšťania taxolu z NPs treba použiť hydrotrópne činidlá [Lee]:

- N,N – dietylnikotínamid (DENA)
- Salicylát sodný

V. Závišová et al., *Synthesis and characterization of polymeric nanospheres loaded with the anticancer drug paclitaxel and magnetic particles*, J. Magn. Mater. 321 (2009) 1613

J. Lee, S.C. Lee, G. Acharya, C. Chang, K. Park, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1022

Uvoľňovanie liečiva



Modely uvoľňovania [Washington, Guy]:

■ Rýchlosť určujúcim stupňom je medzifázny prechod (napr. mikrokapsula) – aproximácia dlhých časov

$$\frac{M_t}{M_{max}} = 1 - \exp[-3\kappa't]$$

■ Difúzia bez energetickej bariéry na povrchu NP

$$\frac{M_t}{M_{max}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} n^{-2} \exp\left[-\frac{n^2 \pi^2 D}{r^2} t\right]$$

M_{max} - maximálne možné uvoľnené množstvo; κ' , h – parametre uvoľňovania; M_t - množstvo uvoľnené v čase t ; D - difúzny koeficient; r - polomer NP

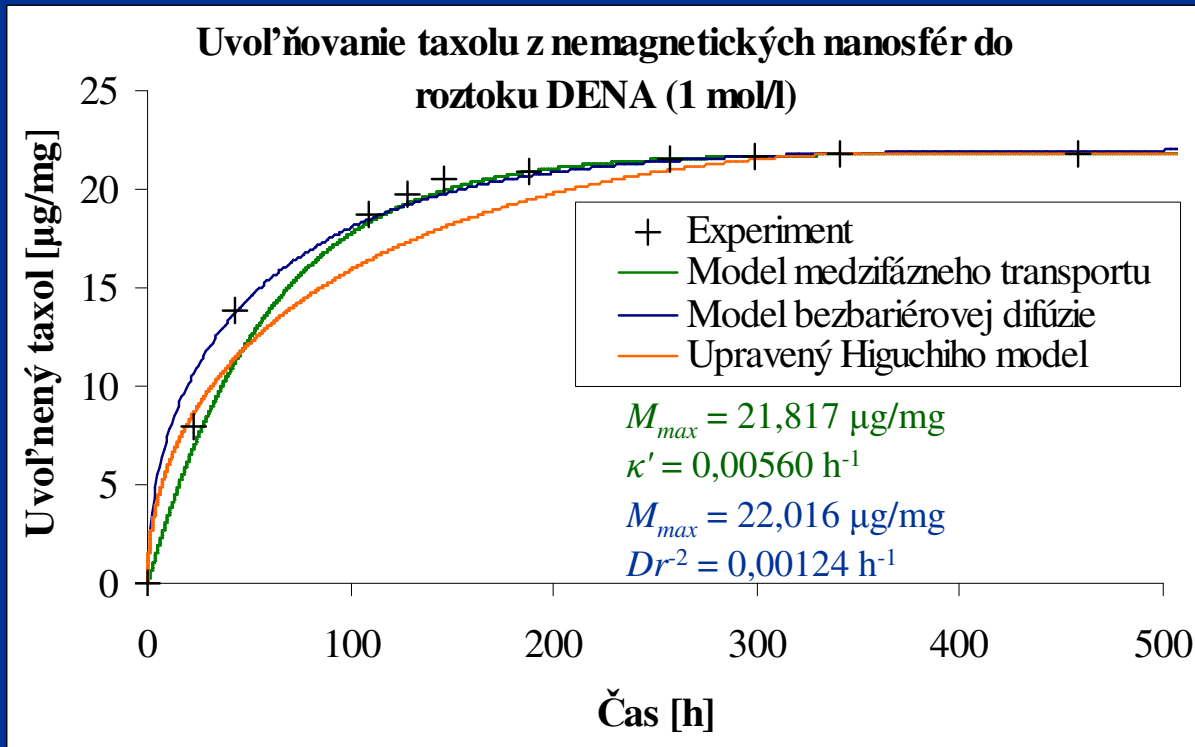
C. Washington, Int. J. Pharm. 58 (1990) 1-12

R. H. Guy et al., Int. J. Pharm., 11 (1982) 199-207

Uvoľňovanie liečiva

- Náklad liečiva je nad rozpustnosťou v polyméri
 - nerozpustené čiastočky v NP
- (Pôvodne študoval podobné systémy Higuchi)

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_{max}} \right)^{\frac{2}{3}} \right] - \frac{M_t}{M_{max}} = 3ht$$



$$\frac{D}{r^2} = 0,00124 \text{ h}^{-1}$$

$$r = 100 \text{ nm} \Rightarrow$$

$$D \approx 3 \cdot 10^{-21} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Uvolňovanie liečiva

Zhrnutie

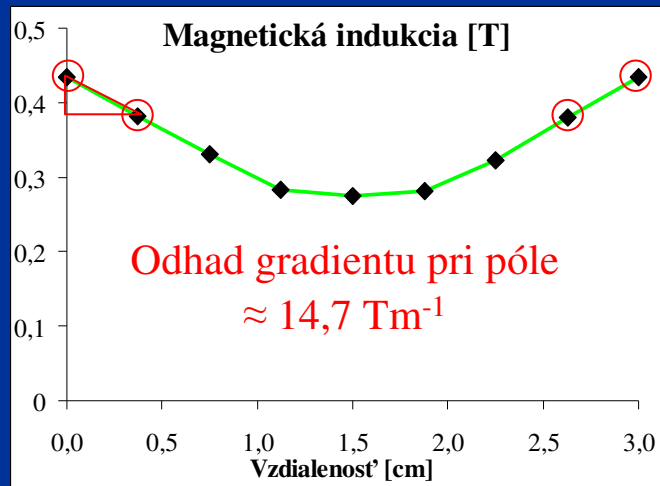
- K študovaniu uvolňovania hydrofóbného taxolu z polyesterových NPs bolo vhodné použiť činidlo zvyšujúce rozpustnosť.
- Počiatočná smernica uvolňovacej krivky stúpala so zvyšujúcou sa koncentráciou DENA.
- Uvolňovanie z MNPs bolo vo všeobecnosti pomalšie než z nemagnetických.
- Za daných podmienok uvolňovanie môže prebiehať podľa aproximatívneho modelu medzifázneho transportu, ale model bezbariérovej difúzie vyhovuje prakticky rovnako.

Vypúšťanie taxolu z PLGA NPs možno označiť za dlhodobé, pomalé.

In vivo experiment MC



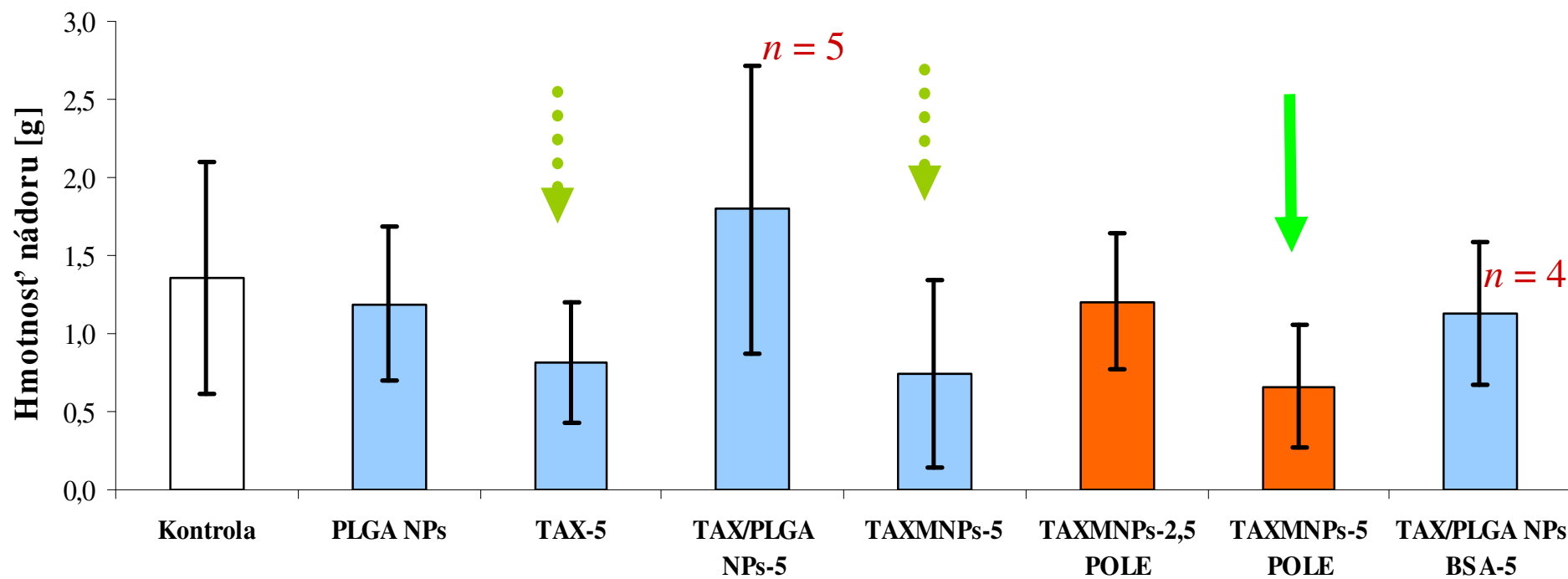
Magnet – NdFeB / Fe



- Myši, kmeň C 57BL/6
- Melanóm B16;
Subkutánná inokulácia
- Štyri dávky testovaného preparátu (2/týždeň); Myši držané v magnetickom poli cca 0,5 h po i. v. podaní v anestézii; (PLGA 85:15; 5 (2,5) mg TAX/kg)
 - taxol injekčný 5 mg/kg
 - prázdne NPs (F68, bez Fe_3O_4 a taxolu)
 - taxolom naložené nemagnetické NPs (F68)
 - TAXMNPs (F68, bez poľa)
 - TAXMNPs – polovičná dávka, **pole** (F68)
 - TAXMNPs **pole** (F68)
 - taxolom naložené nemagnetické NPs (BSA)

Výsledok MC

Účinnok suspenzií nanosfér a injekčného taxolu na rast melanómu B16 in vivo



Priemer \pm smerodajná odchýlka výberu. Pôvodne $n = 6$, niektoré zvieratá uhynuli.

Jednostranný nepárový t -test; šípky: $p < 0,10$ / $0,05$ (proti kontrolnej skupine)

(TAXMNP5-5 (POLE): významnosť aj v porovnaní s prázdnyimi NPs)

Akumulácia TAXMNPs v nádore – zmena konzistencie

Závery

- Skúmala sa štruktúra biokompatibilnej magnetickej kvapaliny MKPEG malouhlovým rozptylom neutrónov:
PEG vplýva na agregáciu častíc v závislosti od koncentrácie
- Využitím MKPEG boli pripravené magnetické nanosféry vhodné na cielený transport liečiva taxol (TAXMNPs)
- Zistilo sa, že TAXMNPs majú
 - vhodný rozmer a tvar ($< 0,3 \mu\text{m}$, sférický)
 - dostatočnú koloidnú stabilitu
 - vhodné magnetické vlastnosti (bez remanencie)
- Magneticky cielené TAXMNPs spôsobili štatisticky významnú redukciu nádoru a lepší celkový účinok ako konvenčná taxolová injekcia.

Vybrané prezentácie výsledkov a publikácie

■ Postre

- 7th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, Vancouver 2008

V. Závišová, M. Koneracká, M. Múčková, P. Kopčanský, A. Juríková, N. Tomašovičová, G. Lancz, M. Timko, M. Fabián,
The Synthesis and Characterization of Polymeric Spheres Loaded with Anticancer Drug Taxol and Magnetic Particles

- 16. konferencia českých a slovenských fyzikov, Hradec Králové 2008

G. Lancz, N. Tomašovičová, M. Koneracká, V. Závišová, M. Múčková, P. Kopčanský, F. Herchl,
Study of magnetic fluids using infrared spectroscopy

■ Prednáška

- 6th International Conference on Biomedical Applications of Nanotechnology „NanoMed“, Berlín 2009

G. Lancz, M. Múčková, M. Bednáriková, M. Koneracká, V. Závišová, P. Bartoš, N. Tomašovičová, M. Timko, A. Juríková, M. Fabián, J. Kováč, P. Kopčanský,
Antitumoural activity and distribution of Taxol carried by polymeric nanospheres for magnetic drug targeting

Vybrané prezentácie výsledkov a publikácie

■ Články

- M. Koneracká, M. Múčková, V. Závišová, N. Tomašovičová, P. Kopčanský, M. Timko, A. Juríková, K. Csach, V. Kavečanský, G. Lancz,
Encapsulation of anticancer drug and magnetic particles in biodegradable polymer nanospheres,
Journal of Physics: Condensed Matter, 20 (2008) 204151
- V. Závišová, M. Koneracká, M. Múčková, P. Kopčanský, N. Tomašovičová, G. Lancz, M. Timko, B. Pätoprstá, P. Bartoš, M. Fabián,
Synthesis and characterization of polymeric nanospheres loaded with the anticancer drug paclitaxel and magnetic particles,
Journal of Magnetism and Magnetic Materials 321 (2009) 1613–1616
- zaslaný článok
M. Múčková, M. Bednáriková, P. Bartoš, M. Koneracká, V. Závišová, N. Tomašovičová, A. Juríková, P. Kopčanský, M. Timko, G. Lancz,
Taxol loaded polymer nanospheres for magnetic drug targeting. Part I: in vitro studies,
článok zaslaný do Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

Výsledky získané v rámci projektov:

- APVV-99-026505
- VEGA 2/6166 & VEGA 2/0077/09
- APVV-0509-07
- APVV-0347-06

Ďakujem za spoluprácu
a Vám
za pozornosť