

Nanomateriály pro bioaplikace a farmacii

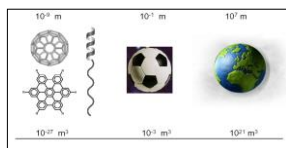
prof. Václav Švorčík
doc. Kamil Záruba

2020

Nanomateriály pro bioaplikace a farmacii

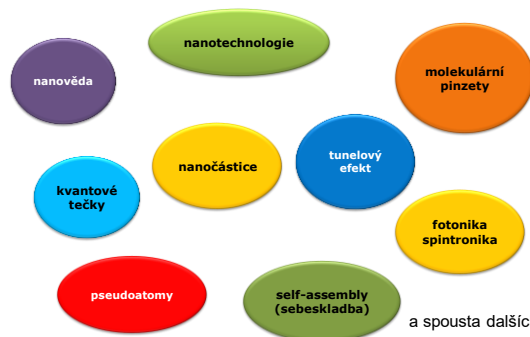
- kamil.zaruba@vscht.cz; lab. A232
 - Nanočástice ve farmacii, úvod
 - Polymerní nanočástice
 - Cílený transport léčiv
 - Kontrolované uvolňování
 - Kvantové tečky
 - Magnetické nanočástice
 - Nanouhlík
- prof. Švorčík
 - ... bioaplikace

Nano, nano, nano...

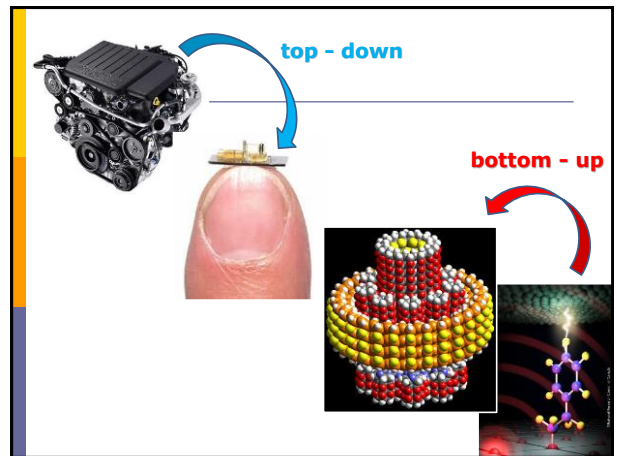
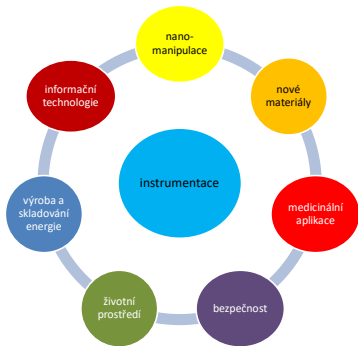


Nanotechnology is a technology involving (i) research & technology development at the atomic, molecular or macromolecular levels, in length scale of approximately 1-100 nm range, (ii) creating & using structures, devices & systems that have novel properties & functions because of their small and/or intermediate size, & (iii) ability to control or manipulate on the atomic scale

Nanosvět



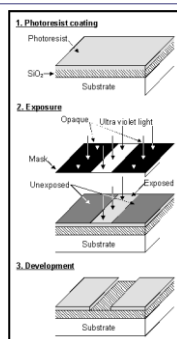
Význam nanotechnologií



Cesta „zhora dolů“

(top-down approach)

- fotolitografie
- fotocitlivé polymery
- omezení vlnovou délkou záření
- litografie svazkem elektronů

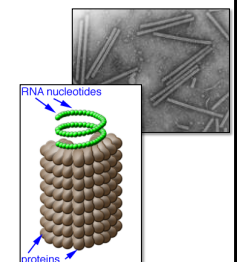


<http://pages.unibas.ch/phys-meso/Education/Projektstudien/Lithographie/Litho-M1-Lithography.html>

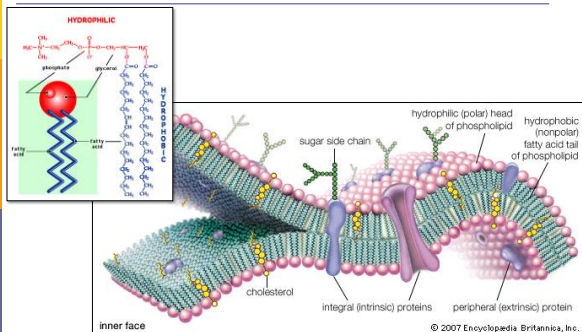
Cesta „zdola nahoru“

(bottom-up approach)

- spontánní tvorba ultratenkých vrstev
- sebeskladba (self-assembly)
- tvorba nanoobjektů v roztoku a na povrchu
- zkusíme to, co příroda běžně používá



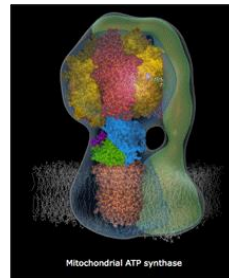
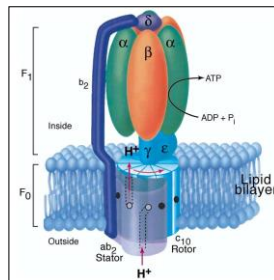
Fosfolipidová dvojvrstva



<http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/Structure.html>

Molekulární motor

(ATP synthase)



<http://www.molecularmovies.com/showcase/index.html>
<http://www.mrc-mbu.cam.ac.uk/research/atp-synthase>

Nanočástice ve farmacii

Vývoj nových formulací

- nanoformulace
 - zvýšení biodostupnosti
 - zvýšením rozpustnosti
 - zvýšením permeability membránou (tkání)
- nutnost prokázat shodu se schválenou formulací – zrychlený proces
- bez časově a finančně náročných testovacích fází

Vývoj nových léků

- nalezení cíle terapie (podstata onemocnění)
 - geny (genomika, proteomika)
- nalezení léčiva pro určený cíl
 - nové molekuly, nové použití „starých“ molekul
 - optimalizace struktury
 - proteinová léčiva
 - přírodní zdroje
- testování v laboratoři (bezpečnost, účinnost, testy *in vivo*), povolení pro testy na lidech

Vývoj nových léků (pokrač.)

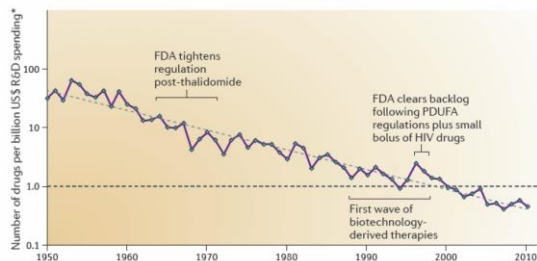
- testování v klinické praxi (fáze 1,2,3, (4))
 - Fáze 1: malá skupina zdravých dobrovolníků (test bezpečnosti, farmakokinetiky, farmakodynamiky)
 - Fáze 2: vybraná skupina pacientů (test požadovaných účinků)
 - Fáze 3: velká skupina pacientů (randomizované studie, interference s jinými léky, srovnání s používanou metodou)
- schválení nového léku
- výroba

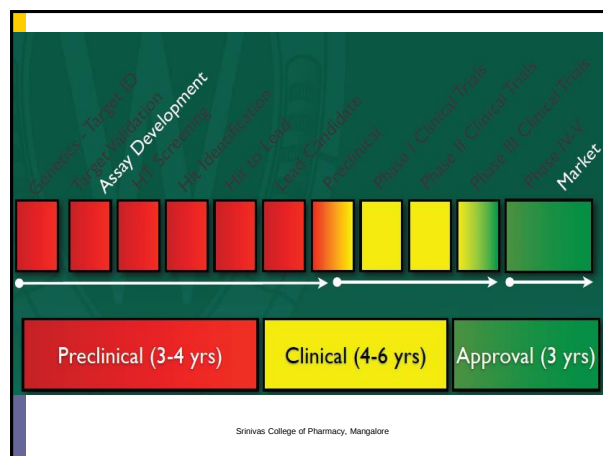
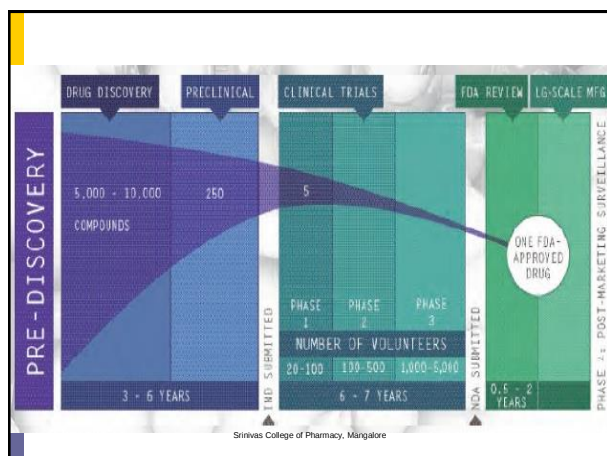
Vývoj nových léků

- extrémní nároky (intelektuální i ekonomické)
- někdy pomůže i náhoda
- uplatnění nanotechnologie: nové formulace pro optimální terapii, ale i diagnostiku

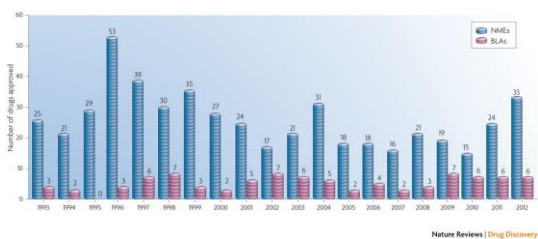
Vývoj nových léků

Eroom's law applies especially to neural drugs
Scannell, *Nature Revs Drug Disc.* 2012





Nová léčiva



New molecular entities (NMEs) and biologics license applications (BLAs) approved

Nová léčiva – nanoformulace

Table 9.4 Select list of marketed nanopharmaceutical products.

Nanotechnology	Drug	Commercial product name	Use
PEGylated liposomes	Doxorubicin	Doxil®	Cancer
PEGylated biologic	hGH (human growth hormone)	Somavert®	Acromegaly
Liposomes	Amphotericin B	AmBisome®	Fungal infections (antifungal)
NanoCrystal®	Sirolimus	Rapamune®	Transplant rejection prevention
SMEDDS (self-microemulsifying drug delivery systems)	Saquinavir	Forovase®	Viral infections (antiviral)
PEGylated biologic	anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) aptamer	Macugen®	Macular degeneration
Albumin-bound nanoparticles	Paclitaxel	Abraxane®	Cancer

Handbook of Clinical Nanomedicine: Nanoparticles, Imaging, Therapy, and Clinical Applications Edited by Raj Bawa, Gerard F. Audette, and Israel Rubinstein, kapitola 9

Nová léčiva – nanodiagnostika

Table 9.3 Select list of marketed biomedical products that incorporate nanotechnology for diagnostic imaging, dental restoration, tissue engineering and vaccination.

Nanotechnology	Commercial product name	Use
Carboxydextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles	Resovist®	MRI contrast agent for diagnostic imaging
superparamagnetic iron oxide nanoparticles	Feridex I.V.®	MRI contrast agent for diagnostic imaging
Nanofiller	ESPE Filtek®	Dental restoration
Nanostructured crystals	NanOss® Bioactive 3D	Advanced bone graft of synthetic human bone (tissue engineering)
Virosomes	Epaxal®	Vaccination (Hepatitis A)

Handbook of Clinical Nanomedicine: Nanoparticles, Imaging, Therapy, and Clinical Applications Edited by Raj Bawa, Gerald F. Audette, and Israel Rubinstein, Chapter 9

Základní předběžné testy

- absorpce do krve
- distribuce v místě působení
- účinné odbourávání a vyloučení z organismu
- test toxicity

Předklinický vývoj

- testování *in vitro* a *in vivo*
- optimalizace struktury

Registrační dokumentace

(více než 100 tis. stran)

- administrativní část (výrobce, složení, indikace, kontraindikace...)
- technologická část (složení léku, stabilita, výrobní postup, kvalifikace pracovníků...)
- toxikologická část (preklinické studie *in vitro* a na zvířatech)
- klinická dokumentace (klinické testy)

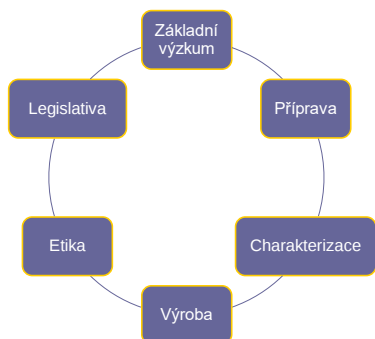
Nový výrobní postup

- přechod z malého na velké měřítko
- nová výrobní linka, rekonstrukce staré
- správná výrobní praxe (GMP)

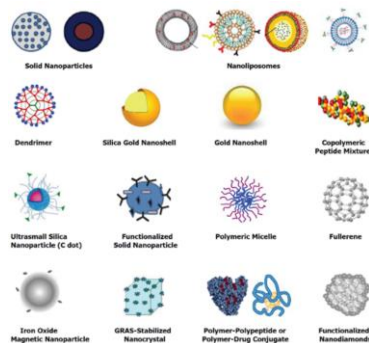
Nanopreparáty

- vlastnosti nanomateriálu (fy-chem vlastnosti, účinek, vlastnosti ovlivňující bezpečné aplikace)
- biokompatibilita (interakce s tělními tekutinami a tkáněmi)
- farmakokinetika, farmakodynamika
- toxikologie (cytotoxicita, genotoxicita)

Nanofarmaka



Nanočástice pro farmaceutický průmysl



Handbook of Clinical Nanomedicine: Nanoparticles, Imaging, Therapy, and Clinical Applications Edited by Raj Bawa, Gerard F. Audette, and Israel Rubinstein, kapitola 9

Nanočástice pro farmaceutický průmysl

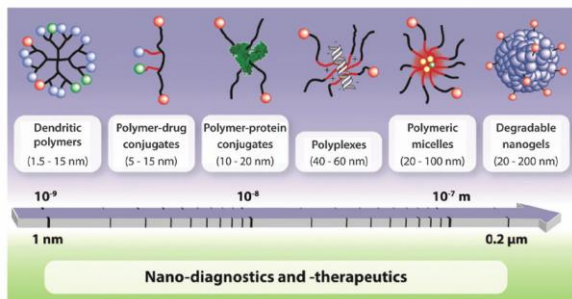


Fig. 1 Multifunctional polymeric nanosystems under clinical consideration.

Nanočástice pro farmaceutický průmysl

Zhora dolů (top-down):

- mletí, mikrofluidizace

Zdola nahoru (bottom-up):

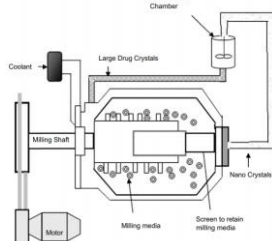
- polymerizace (dendrimetry), srážení a emulzifikace, superkritická fluidace, rozprašování

Metody „shora dolů“

Nanosuspenze, nanoemulze, nanomicelvy

Metody:

- Vysokotlaká homogenizace
- Nanomletí
- Inverze fází
- Sonifikace
- Mikrofluidace
- Spolusrážení
- ...



Current Drug Therapy, 2015, Vol. 10, No. 1

Nanočástice pro farmaceutický průmysl

□ Příklad přípravy polymerních NP

- disperze připravených polymerů
- polymerizace monomerů
- iontová gelace nebo vysolování hydrofilních polymerů
- vliv fyzikálně-chemických charakteristik NP na výsledné chování (efekt velikosti, tvaru, povrchových funkčních skupin atd.)

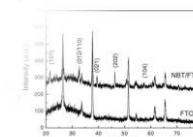
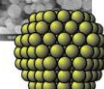
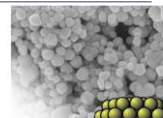
Nanočástice pro farmaceutický průmysl

Loading:

- absorpce léčiva na (do) vytvořené nanočástice
- inkorporace léčiva do nanočástic jeho přidáním do reakční směsi (ad/absorpce)
- vliv charakteru NP i léčiva
- vliv loadingu na výslednou farmakokinetiku (ad/absorpce vs. rychlé nebo zpomalené uvolňování; kontrola uvolňování)

Základní parametry nanočástic

- distribuce velikosti a tvaru
- struktura (krystalová forma, míra amorfního charakteru)
- povrchové vlastnosti (povrchový náboj, smáčivost, porozita, měrný povrch)
- agregace
- loading léčiva, distribuce v objemu NP
- uvolňování léčiva

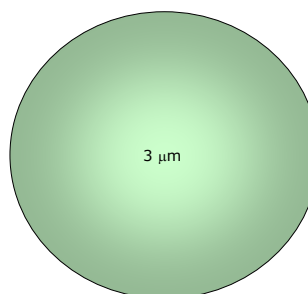


Metody charakterizace

Parameter	Conventional methods
Particle size, distribution and particle morphology*	Dynamic light scattering Photon correlation spectroscopy Scanning electron microscopy* Transmission electron microscopy* Atomic force microscopy*
Surface area, porosity	Gas adsorption
Surface charge, hydrophilicity	Electrophoresis Zeta potential Laser Doppler anemometry
Surface property	Static secondary ion mass spectroscopy Mössbauer spectroscopy
Surface element analysis	X ray photoelectron spectroscopy
Density	Pycnometer
Molecular weight	Gel or size-exclusion chromatography
Purity	Spectroscopy, FTIR, NMR
Polymorphism, Crystalline form	X ray diffraction Differential scanning calorimetry
Residual solvents	Gas chromatography
Drug release	Release testing Turbidity

Shah R.R., Khan M.A. In Nanotechnology in Drug Delivery, Cavallieri M. et al (Eds.), Springer, 2009

Mikronizace, „nanonizace“



30ti násobné zmenšení

100 nm

- povrch vzroste d_1/d_2 krát ($3\ 000 / 100 = 30$ krát)

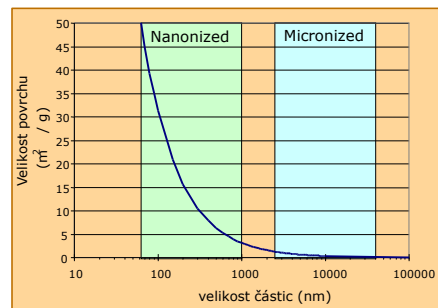
Rychlost rozpouštění

□ Noyes-Whitney

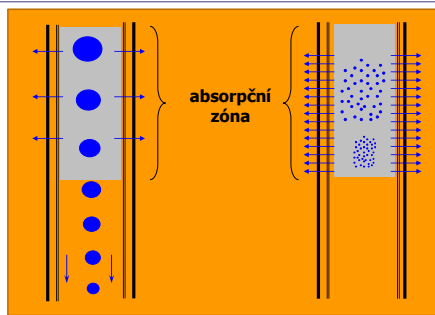
$$\frac{dc}{dt} = kS(c_s - c_t)$$

k – konstanta, S – **povrch částic léčiva**, c_s – rozpustnost léčiva (koncentrace u povrchu), c_t – koncentrace rozpuštěného léčiva v roztoku

Povrch vs. velikost částice



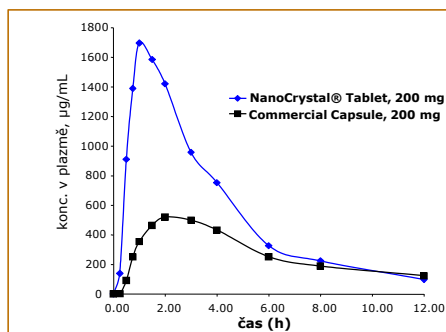
Orální absorpce špatně rozpustných látek



neúplná absorpce

kompletní absorpce

Zvýšená biodostupnost

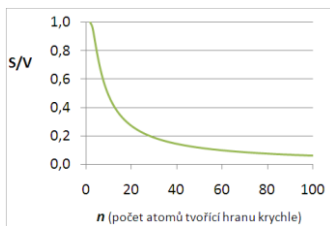


Na velikosti záleží

(podíl atomů na povrchu)

$$\frac{S}{V} = \frac{r^2}{r^3} = r^{-1}$$

$$\frac{S}{V} = \frac{6n^2 - 12n + 8}{n^3} = \frac{6}{N^{2/3}} \left(1 - \frac{2}{N^{1/3}} + \frac{8}{6N^{2/3}} \right)$$



Size Matters: Why Nanomaterials Are Different. Raduner E.: Chem. Soc. Rev 2006, 35, 583-592.

Na velikosti záleží

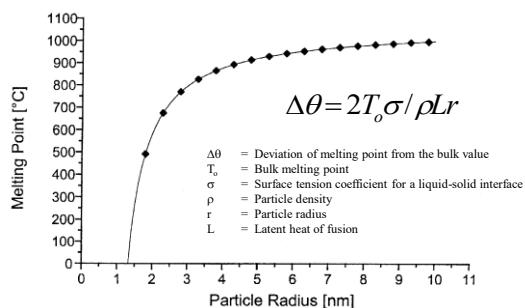
(podíl atomů na povrchu)

Full-shell Clusters	Total Number of Atoms	Surface Atoms (%)
1 Shell	13	92
2 Shells	55	76
3 Shells	147	63
4 Shells	309	52
5 Shells	561	45
7 Shells	1415	35

Source: Nanoscale Materials in Chemistry, Ed. K.J. Klabunde, Wiley, 2001

Na velikosti záleží

(Změna teploty tání zlata na velikosti částic)



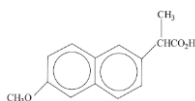
Source: Nanoscale Materials in Chemistry, Wiley, 2001

Nanoformulace schválených API

- nový život schválených preparátů
- nanomletí (*top-down approach*)
- řízená krystalizace (*bottom-up approach*)
 - v plynné fázi - tvorba suchého aerosolu (bez reakce, s chemickou reakcí)
 - v roztoku
- řízená krystalizace v roztoku
 - řízené mísení reaktantů v suspendující fázi se stabilizátory CJDp)
 - tvorba málorozpustných forem ionizovatelné látky ve vodě
 - srážení vlivem pH
 - vysolení
 - snížení rozpustnosti odpařením těkavějšího rozpouštědla

Naproxen

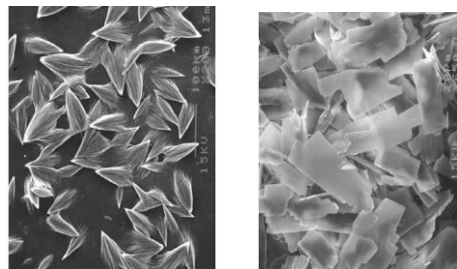
- nesteroidní protizánětlivé léčivo
- tvorba málorozpustných forem ionizovatelné látky ve vodě – tvorba karboxylátů iontů kovů
- srážení vlivem pH – COOH vs. COO⁻



Fine Particles in Medicine and Pharmacy, E. Matievic (Ed.), Springer, 2012

Naproxen

- tvorba soli Ca²⁺ (vlevo) a Ba²⁺ (vpravo) v přítomnosti surfaktantů (arabská guma (vlevo), Tween80 (vpravo))



Fine Particles in Medicine and Pharmacy, E. Matievic (Ed.), Springer, 2012

Naproxen

- roztok naproxenu o pH = 12 okyselen na pH = 6 (a) a pH = 4-5 (b)

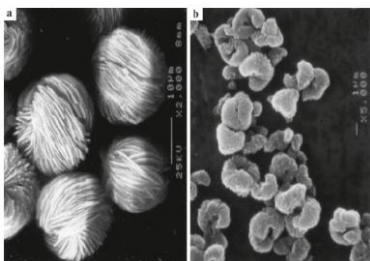
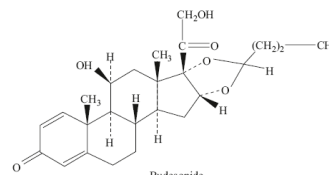


Fig. 2.1 Scanning electron micrographs (SEM) of naproxen particles. **a** Precipitated in a 0.02 mol dm⁻³ aqueous naproxen solution containing 1 wt% of (PVP), and acidified to pH 6 with HCl. **b** Naproxen particles produced at the same conditions as in (a) except at pH 4. **c** Higher

Fine Particles in Medicine and Pharmacy, E. Matievic (Ed.), Springer, 2012

Budesonid

- hydrokortizoid proti astmatu a alergiím
- rozp. v ethanolu, snížení rozpustnosti přidavkem vody nebo neionogenního sufraktantu (PEO)



Fine Particles in Medicine and Pharmacy, E. Matievic (Ed.), Springer, 2012

Budesonid

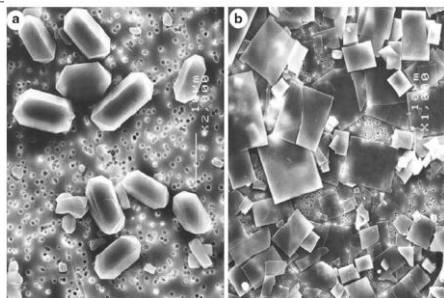
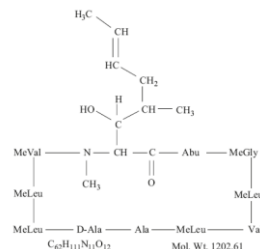


Fig. 2.6 Scanning electron micrographs (SEM) of budesonide crystals prepared by precipitation while sonocasting (a) 0.035 mol dm⁻³ solution of the drug in ethanol to which were added 4 cm³ of water, and (b) to 2 cm³ of a 0.009 mol dm⁻³ of the drug in ethanol were added 15 cm³ of water. [50]

Fine Particles in Medicine and Pharmacy, E. Malevic (Ed.), Springer, 2012

Cyklosporin

□ imunosupresor



Fine Particles in Medicine and Pharmacy, E. Malevic (Ed.), Springer, 2012

Cyklosporin

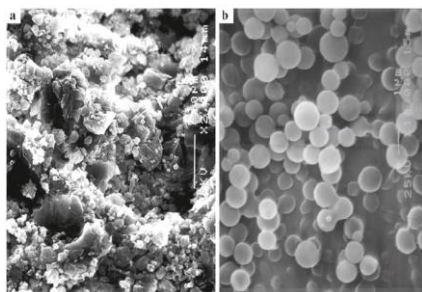


Fig. 2.10 Scanning electron micrographs (SEM) of (a) commercial cyclosporin powder, and (b) particles obtained by rapidly adding in an ultrasonic bath 4 cm³ of water (pH 6.5) into 2 cm³ of a 0.03 mol dm⁻³ solution of the drug in ethanol. [52]

Současnost nanofarmacie (1)

Brand Name	Drug	Type of Formulation	Indication	Approval	References
Myocet [®]	Doxorubicin	Liposomes	Late stage Metastatic breast cancer	Europe 2000	[1,11,130]
Doxo-Cyt [®]	Cytarabine	Liposomes	Lymphomatous meningitis	FDA 1992/2007	[1,11,130]
DoxoXone [®]	Doxorubicin Citrate	Liposomes	Advanced HIV related Kaposi's sarcoma	FDA 1996	[1,11,130,139]
AmBisome [®]	Amphotericin B	Liposomes	Fungal infections	FDA 1997	[1,1,130]
Surfaxin [®]	Artificial lung surfactant Replacement	Synthetic monodisperse polyepoxide liposomal lung surfactant	Respiratory distress syndrome	FDA 2012	[11]
IMOX-4	Lidocaine	Sposomes	topical anesthesia		[11]
Dopo-Du [®]	Morphine sulfate	Liposomes	For treatment of chronic pain in patients requiring a long-term daily around-the-clock opioid analgesic	FDA 2004	[1]
Doxil [®]	Doxorubicin hydrochloride	Liposomes	AIDS related Kaposi's sarcoma, multiple myeloma, ovarian cancer	FDA 1995	[1,11,130,139]
Mipos [®]	Miltefosine	Liposomes	New retentive drug resorbable containers	Europe 2009	[1]

Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, 2018, Vol. 22

Současnost nanofarmacie (2)

Adagen [®]	Adenosine Deaminase	PEGylated Adenosine deaminase	Enzyme replacement therapy in immunodeficiency disease	FDA 1990	[1,11,39]
Progen [®]	Interferon α 1b	PEGylated Interferon α 1b	Hepatitis C infection	FDA 2002	[1,11,39]
PEGIntron [®]	Interferon α 1b	PEGylated Interferon α 1b	Hepatitis C infection	FDA 2001	[1,11,39]
Sutimav [®]	MGR (human growth hormone)	PEGylated human growth hormone receptor antagonist	Acromegaly	FDA 2003	[1,11]
Neulasta [®]	Recombinant methoxyl human G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)	PEGylated filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor)	Neutropenia	FDA 2002	[1,11,39]
Onasemn [®]	Asparaginase	PEGylated L-asparaginase	Leukemia	FDA 1994	[1,1,39]
Macugen [®]	Anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) aptamer	PEGylated anti-VEGF aptamer	Macular degeneration	FDA 2004	[1,11,138,139]
Micron [®]	Epoetin beta (erythropoietin receptor activator)	PEGylated epoetin beta	Anemia associated with chronic renal failure	FDA 2007	[1]
Cimzia [®]	PEGylated antibody (Fab') fragment of a humanized anti-TNF- α antibody	PEGylated antibody	Crohn's disease, rheumatoid arthritis	FDA 2008	[1]

Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, 2018, Vol. 12.

Současnost nanofarmacie (3)

Brand Name	Drug	Type of Formulation	Indication	Approval	References
Reprocare [®]	Sildenafil	NanoCrystal [®]	Transplants	FDA 2002	[1,11,39]
Triglide [®]	Fenofibrate	NanoCrystal [®]	Lipid disorders	FDA 2004	[1,11]
Tricor [®]	Fenofibrate	NanoCrystal [®]	Primary hypercholesterolemia	FDA 2004	[1,11,139]
Activia [®]	Morphine sulfate	NanoCrystal [®]	Psycho-stimulants	FDA 2002	[11]
Emend [®]	Aprepitant	NanoCrystal [®]	Nausea in chemotherapy	FDA 2003	[1,11,39]
Megace ES [®]	Megestrol Acetate	NanoCrystal [®]	Antitumorics	FDA 2005	[1,11,39]
Focilex [®] XR	Chemotherapeutic HCl	NanoCrystal [®]	Attention deficit disorder	FDA 2008	[11]
Roche [®] LA	Methylphenidate HCl	NanoCrystal [®]	Attention deficit disorder	FDA 2002	[11]
Zandax [®]	Tamoxifen HCl	NanoCrystal [®]	Muscle relaxant	FDA 2002	[11]
Reovir [®]	Iron oxide	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with carboxy dextran	Organ-specific MRI contrast agent used for the detection and characterization of especially small focal liver lesions	Europe 2001	[11]
Fevixel LV [®]	Iron oxide	Iron oxide nanoparticles coated with dextran	MRI contrast agent used for the detection of liver lesions	FDA 1996	[1,11]
Feraheme TM	Iron oxide	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with dextran	Treatment of iron deficiency anemia in adults with chronic kidney disease	FDA 2009	[1]

Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, 2018, Vol. 12.

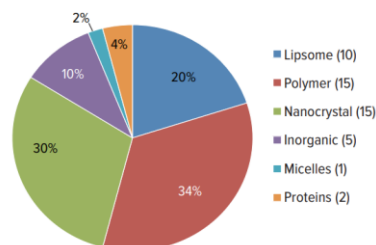
Současnost nanofarmacie (4)

NanoTherm [®]	Iron oxide	Amionolactone-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles	Local ablation in glioblastoma, prostate, and pancreatic cancer	Europe 2013	[1]
Nano [®]	Cyclosporin A	SMEEDOS (self-microemulsifying drug delivery system)	Transplants	FDA 2009	[11]
Favocin [®]	Sagittin	SMEEDOS	Antiviral	[11]	
Nervix [®]	Rituximab	SMEEDOS	Antitumoral	FDA 2009	[11]
Genex-3 PM [®]	Paclitaxel	Polymic micelles	Various cancers	South Korea 2001	[1]
Estace [®]	Estradiol	Micellar nanoparticles	Menopause	FDA 2003	[1,11,38]
Abiract [®]	Paclitaxel	Albumin - bound nanoparticles	Various cancers	FDA 2005	[1,11,138,139]
Abelcet [®]	Amphotericin B complex	Lipid based formulation	Systemic fungal infections	FDA 1995	[1,11,39]
Kadcyla [®]	Monoclonal antibody-drug conjugate	Lipid based formulation	Breast cancer	FDA 2013	[1]
Restasis [®]	Cyclosporin A	Lipid emulsion	Dry eye	FDA 2003	[11]
Dexam [®]	Dexamethasone	Lipid emulsion	Corticosteroid	FDA 2008	[11]

Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, 2018, Vol. 12.

Současnost nanofarmacie (5)

A. Types of NPs in Approved Drugs Available for Clinical Use (50)^{133,14}



Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs P. T. 2017 Dec; 4(212):

Vize nanofarmacie

- nanočástice pro diagnostiku a včasnou terapii
- kombinovaná terapie
- cílená terapie
- zvyšování rozpustnosti léčivých preparátů
- snížení nákladů (R&D; výrobní)
- zrychlení cesty nových léčiv na trh
- cílený transport léčiv (snížené dávkování, méně vedlejších účinků)

