

Cílený transport léčiv

Kamil Záruba

2020

Aplikace léčiv

- ústní podání (pilulka)
- vdechnutí (inhalátor)
- injekčně
- sliznicí (lék pod jazyk)
- kůží
- implantát



Podmínky transportu

- krev, krevní sérum
- průměr nejmenších cév 1 mm (jemnější kapiláry s prům. až jednotky mikrometrů)
- mizně-cévní (lymfatický) systém
- hematoencefalická bariéra (BBB, blood brain barrier)

Podmínky využití

- nízká/žádná reakce imunitního systému
- vysoká afinita k extra- nebo intracelulárním receptorům cílové tkáně/buněk
- minimální/žádná afinita k zdravé tkáni/buňkám
- odbouratelné, netoxické

Transport léčiva

Table 3

Novel technologies for drug delivery.

Technology	Application
PEGylation	The active molecule is coated in PEG to improve the absorption of the drug or to mask it from the immune system
Bioadhesive polymers	Promote the diffusion of different drugs between intestinal cells
Chemical modification	Cobalamin-protein conjugates improve GI drug absorption via the normal vitamin B ₁₂ absorption pathway
Novel transdermal patches	Using two different physical mechanisms (iontophoresis and ultrasound) the permeability of drugs across the skin is improved
Microencapsulation	Inclusion of a peptide within a microparticle has a wide range of applications including long-term secretion of the therapeutic product, chemical and physical protection, targeted administration of the drug, vaccination, cell immobilization, gene therapy and so on
Nanotechnology	By reducing the size of the particle to less than 100 nm, improved uptake by the cells is achieved.
Microfabrication	The combination of microtechnology and biology for the controlled administration of one or more drugs
GI, gastrointestinal; PEG, polyethylene glycol.	

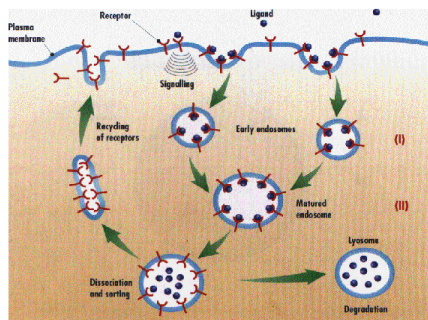
Current Opinion in Biotechnology 2003, 14:659–664

Rezistence a detekovatelnost nanoformulace

- nemodifikované nanočástice rychle odstraněny makrofágy
- obalení PEG – brání nespecifické adsorpci NP na povrchu makrofágů
- detekce množství nanočástic v cílové tkáni
 - fluorescenční ligand (fl. nezávislá na vnějších podmínkách) – detekce fluorescenčním mikroskopem;
 - NP a elektrondenzních materiálů – anorganické NP (kovové/polovodivé/dielektrické), magnetické NP – detekce elektronovým mikroskopem;
 - magnetické nanočástice – zobrazování magnetických nanočástic (MPI), nukleární magnetické zobrazování (MRI);
- ligand pro aktivní cílení

Cílení

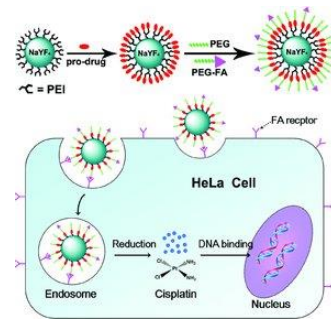
(Receptor Mediated Endocytosis)



<http://turs.d.ac.uk/VU/home-page/hot-topics/endo.html>

Cílení

(Targeted Drug Delivery – tumor cells)



<http://www.biomedlivesciences.com/>

Cílení

(Targeted Drug Delivery – tumor tissue)

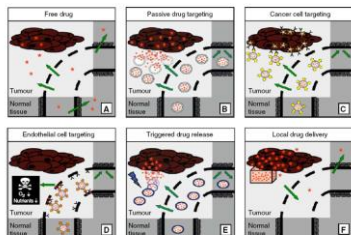


Figure 2 Overview of the clinically most relevant drug targeting strategies. (A) Upon the intravenous injection of a low-molecular weight (chemo)therapeutic agent, which is often rapidly cleared from blood, only low levels of the drug accumulate in tumours and in tumour cells, whereas their localization to certain healthy organs and tissues can be relatively high. (B) Upon the implementation of a passively targeted drug delivery system, by virtue of the enhanced permeability and retention (EPR) effect, the accumulation of the active agent in tumours and in tumour cells can be increased substantially. (C) Active drug targeting to interaction with cell surface receptors (overexpressed by cancer cells) generally intends to improve the relative uptake of the nanomedicine systems, and can be particularly useful for the intracellular delivery of macromolecular drugs, such as DNA, siRNA and proteins. (D) Active drug targeting to receptors (overexpressed by malignant endothelial cells) aims to reduce blood supply to tumours, thereby depleting tumour cells from oxygen and nutrients. (E) Stimuli-sensitive nanomedicines such as Thermosol can be activated (i.e. induced to release their contents) by externally applied physical triggers, such as hyperthermia, ultrasound, magnetic fields and light. (F) It is cases in which tumours are easily accessible, for example during surgery, sustained-release delivery devices can be implanted or injected directly into the inoperable parts of the tumours.

T. Lammers, W.E. Hennink and G. Storm, Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice, British Journal of Cancer (2008) 99, 392 – 397

Nosiče léčiv

(Drug Delivery Systems)

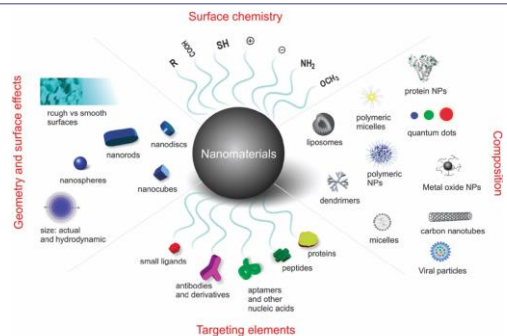


Fig. 11 NPs and their biophysical-chemical characteristics which affect their performance both in vivo and in vitro.

Nosiče léčiv

(Drug Delivery Systems)

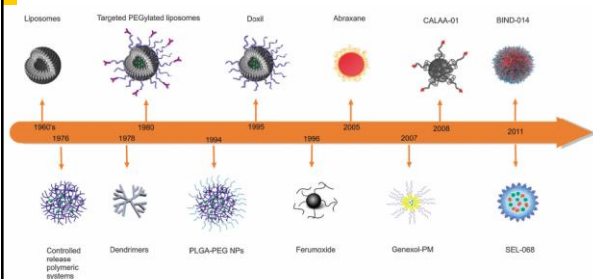
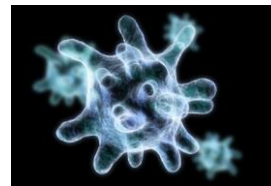


Fig. 1 Time line of clinical stage nanomedicine firsts. Liposomes,⁹ controlled release polymeric systems for macromolecules,¹⁰ dendrimers,¹¹ targeted-PEGylated liposomes,¹² first FDA approved liposome (DOXIL),¹³ long-circulating poly(lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) (PLGA-PEG) NPs,¹⁴ iron oxide MRI contrast agent NP (Ferumoxide),¹⁵ protein-based drug delivery system (Abraxane: nab technology),¹⁶ polymeric micelle NP (Genexol-PM),¹⁷ targeted cyclodextrin-polymer hybrid NP (CALAA-01),¹⁸ targeted polymeric NP (BIND-014; Accurin)¹⁹ and poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid) (SEL-068, JCK007; Takeda) ²⁰

Velikost DDS

- 20-200 nm, větší nedeforovatelné odfiltrovány ve slezině
- hydrofilní povrch
- prodloužená cirkulace



Cílení

- pasivní (velikost NP; EPR efekt)
- aktivní (modifikace povrchu NP protilátkou, ligandem, ...)
- vnějším polem (magnetické)

1. Pasivní cílení

(tkáňové nádory)

- EPR efekt (Enhanced Permeability and Retention factor)

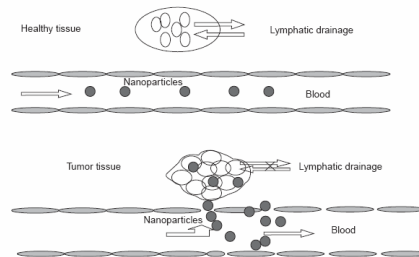


FIGURE 7 Schematic representation of passive targeting of nanoparticles by enhanced permeability and retention effect. Source: From Ref. 87.

EPR efekt

(Enhanced Permeability and Retention factor)

- zvýšená akumulace makromolekulárních látek v rakovině tkáni oproti tkáni zdravé

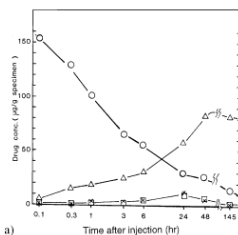


FIG. 1. (A) Time course of Evans blue dye-complexed albumin (O), blood plasma (Δ), tumor uptake, and □ normal muscle and skin tissues, respectively. (B) Intratumor accumulation

Maeida, Advan. Enzyme Regul., Vol. 41, pp. 189-207, 2001

Schválené nanoformulace pro léčbu rakoviny

Table 1 Approved anticancer drugs using nanocarriers*

Trade name/compound	Manufacturer	Nanocarrier
Abraxane/paclitaxel	Abraxis Biosciences	Albumin-bound paclitaxel
Bexxar/anti-CD20 conjugated to iodine-131	Cytosine/Gabosmithline	Radioimmunoconjugate
Dauno/Idarubicin/daunorubicin	Diatro (available in France)	Liposome
Doxil/Caelyx/doxorubicin	Ortho Biotech	Liposome
Myocet/doxorubicin	Cephalon (available in Europe)	Nonpegylated liposome
Oncaspar/PEG-I-asparaginase	Enzon	Polymer-protein conjugate
Ontal/IL-2 fused to diphtheria toxin	Eli Lilly Inc.	Immunotoxin fusion protein
SMANCS/cisplatin	Yamanouchi Pharma	Polymer-protein conjugate
Zevalin/anti-CD20 conjugated to yttrium-90	Cell Therapeutics Inc.	Radioimmunoconjugate
Zoladex/goserelin acetate	AstraZeneca	Polymer rods

*PEG, polyethylene glycol; IL-2, interleukin-2; SMANCS, styrene maleic anhydride neocarzinostatin. Reproduced by permission. *Jain Pharma/Biotech.

Jain *BMC Medicine* 2010, 8:83
<http://www.biomedcentral.com/1741-7015/8/83>

Nanoformulace pro léčbu rakoviny v klinických testech

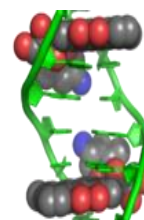
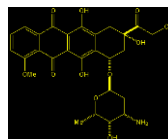
Examples of anti-cancer nanomedicines in clinical trials or on the market:

Nanomedicine type	Drug	Product name/company	Indication	Phase
Liposomes	Doxorubicin	Myocet [®] /Teva UK	Metastatic breast cancer	Approved
		Doxil [®] /Janssen	Kaplan's sarcoma	Approved
	Vincristine	Thermodox [™] /Celisun	Ovarian cancer (post-first line failure)	Phase III
			Multiple myeloma	
			Primary hepatocellular carcinoma	
Polymeric conjugates	Camptothecin	283-1013-888 Medicines BV	Refractory chest wall breast cancer	Phase II
		Mangla [™] /Spectrum Pharmaceuticals	Colorectal liver metastases	Phase II
	Asparaginase	DaunoXone [™] /Galea	Acute lymphoblastic leukaemia	Approved
		Decape [™] (PEG)/Baudia	HRV-related Kaposi's sarcoma	Approved
	Paclitaxel	Qasur [™] (polyglycerol adipate)/CTI Biopharma	Lymphomatous meningitis	Approved
Polymeric micelles	Paclitaxel	Genesol-PM [™] /Sanyang Biopharmaceuticals	Metastatic pancreatic cancer (2nd line)	Approved
		NK105/NanoCarrier [™]	Breast cancer	Phase III

J.I. Hare et al. / Advanced Drug Delivery Reviews 108 (2017) 25–38

Příklad: doxorubicin

- anthracyklin
- doxorubicin HCl i.v. jako roztok v NaCl
- rychlá distribuce
- pomalá eliminace (enzymatický rozklad)
- interkalace Doxo do DNA, inhibice topoisomerasy II



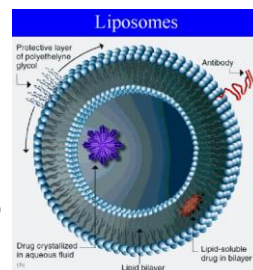
2. Aktivní cílení

Povrchové modifikace nanočástic pro TDD:

- reakce ligandu s povrchovými reaktivními skupinami (nevýhoda – nedostatečná konverze, vedlejší reakce)
- příprava NP z prekursoru ligand-monomer (nevýhoda – vliv na mechanismus tvorby NP)
- inkubace prekursoru ligand-monomer s předem vytvořenými NP – ligandová výměna

Povrchové modifikace pro TDD

- monoklonální protilátky, jejich fragmenty
- krátké peptidy (RGD, CREKA, ...)
- oligonukleotidy
- kyselina listová
- lektiny
- hydrofilicita (polyethylenglykoly, PEG)



Chem. Soc. Rev., 2012, 41, 2971–3010

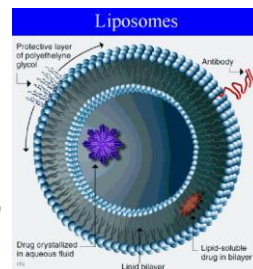
Povrchové modifikace pro TDD

Table 2 Examples of preclinical targeted polymeric nanoparticles

Material	Physicochemical Characteristics (Size, ζ -potential)	Targeting Strategy	Drug/Disease or Indication
Chitosan	200 nm, +40 mV	RGD, Charge	siRNA/Cancer
Chitosan-PEG	150 nm, +16 mV	Antibody	Caspase inhibitor peptide/Stroke
Poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) or poly(2- <i>N,N</i> -dimethylamino)ethyl methacrylate)	25–200 nm	Passive	Various
(Allyloxy) ₂ encurbit[6]uril polymer	70–90 nm	Triggered: Reducing environment sensitive	Cancer
Cyclodextrin polymer	100–150 nm, +15 mV	Transferrin	DNA/Cancer
Acetal modified dextran	250–300 nm, –5 mV to +12 mV	Passive	Various
DNA	410 nm	Passive	Various
Elastin-like polypeptides	20 nm	Triggered: pH-sensitive	Doxorubicin/Cancer
Gelatin	60 nm	RGD; T-sensitive	Cancer
poly(β -amino esters)	250–300 nm, –20 mV	Antibody	antiCD3 mAb/Cancer
Heparin	200 nm, –5 mV	RGD	DNA, Gen therapy
Hyaluronic acid	60 nm, –16 mV	Small molecule; Folate	Paclitaxel/Cancer
Hyaluronic acid-ceramide/pluronic 85	250–400 nm	Intrinsic	Cancer
Hydrophobically modified glycol chitosan	110–140 nm, –20 mV	Passive	Docetaxel/Cancer
Oligoethylene glycol pyridine disulfide nanogels	360 nm, +22 mV	Charge	Cancer
	190 nm	Reducing environment sensitive	Hydrophobic drugs

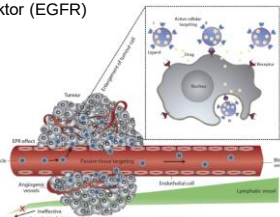
Povrchové modifikace pro TDD

- monoklonální protilátky, jejich fragmenty
- krátké peptidy (RGD, CREKA, ...)
- oligonukleotidy
- kyselina listová
- lektiny
- hydrofilicita (polyethylenglykoly, PEG)



Příklad: Aktivní cílení rakoviny

- albuminu vs. receptor „glykoprotein 60“
- hyaluronová kyselina vs. receptor „glykoprotein CD44“
- biotin (vitamin H) vs. jeho receptory
- kyselina listová vs. její receptory
- aptamer A10 vs. specifický membránový antigen prostaty (PSMA)
- specifická protilátka vs. růstový faktor (EGFR)
- peptidové sekvence vs. integrin

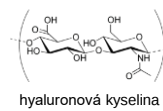


E. Pérez-Herrero, A. Fernández-Medarde / European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 93 (2015) 52–79

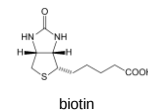
Příklad: Aktivní cílení rakoviny



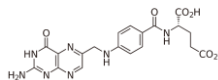
albumin



hyaluronová kyselina



biotin

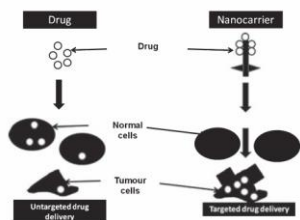


kyselina listová



aptamer

TDD



Fundamental & Clinical Pharmacology 23
(2009) 263–269

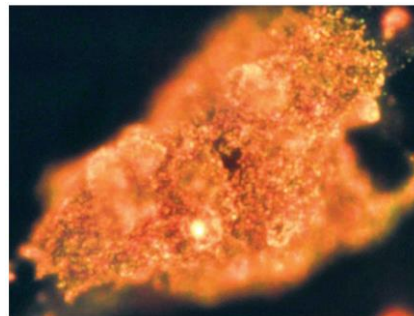
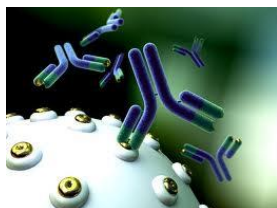
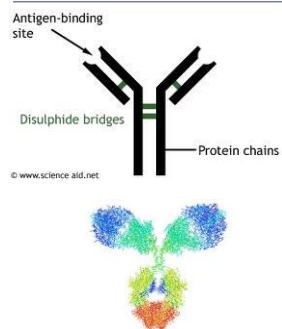


Fig. 4: Image of cancer cell decorated with gold nanorods bound to anti-EGFR.
(M. El-Sayed, Georgia Institute of Technology)

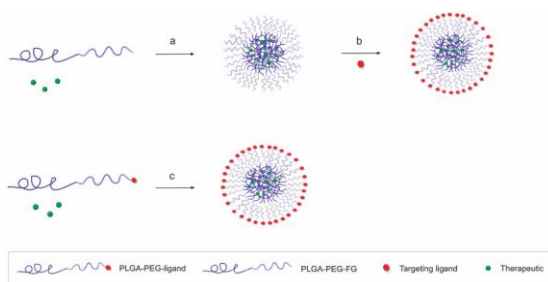
Huang X., El-Sayed I. H., Qian W., El-Sayed M. A. *JACS* 2006, 128, 2115–2120

TDD – protilátky



TDD – funkcionalizace povrchu

Chem. Soc. Rev., 2012, 41, 2971–3010



Chem. Soc. Rev., 2012, 41, 2971–3010

TDD – funkcionalizace povrchu

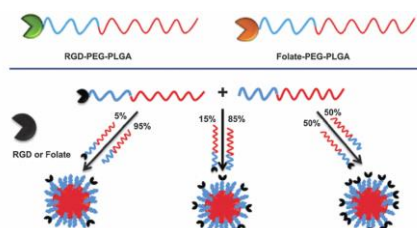
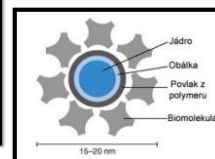
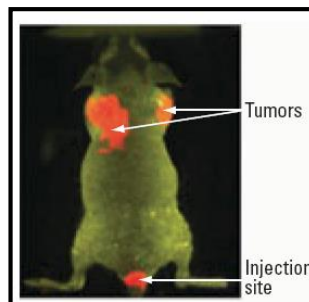


Fig. 8 PLGA-PEG-RGD and PLGA-PEG-folate triblock polymers used to prepare targeted NPs with different surface ligand densities. Figure taken from Valencia *et al.*²⁶

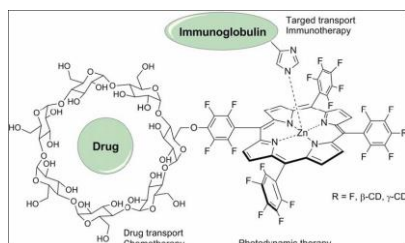
TDD - protilátky



Nat. Biotechnol. 2004, 8, 969–976.

Kombinovaná terapie

- cílení + dvě a více terapeutik



Chem. Soc. Rev., 2012, 41, 2971–3010

Kombinovaná terapie

- cílení + dvě a více terapeutik

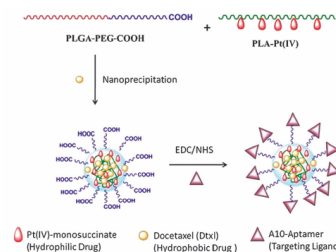


Fig. 15 Strategy for co-encapsulating hydrophobic Dtxl and more hydrophilic Pt(IV)-monosuccinate prodrug on a single nanoparticle. Figure taken from Kolishetti *et al.*⁴⁶

Fototermální účinek

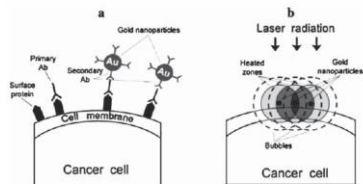
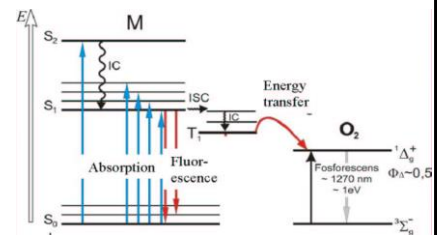


FIGURE 1 Principle of selective nanophotothermolysis of cancer cells targeted with gold nanoclusters. (a) The human breast adenocarcinoma cell targeted with primary antibodies (Abs), which are selectively attached to surface proteins; secondary Ab-goat antihorse immunoglobulin G, conjugated with 40-nm gold nanoparticles, is selectively attached to the primary Abs. (b) The schematics of laser-induced overlapping of heated zones and bubbles from the nanoparticles attached to cell membrane. Source: From Ref. 27.

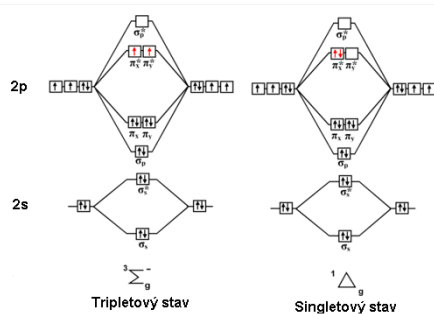
Fotodynamická terapie (PDT)

mechanismus

- a) $\text{Sensitizér} + h\nu \rightarrow \text{Sensitizér}^*$
- b) $\text{Sensitizér}^* + {}^3\text{O}_2 \rightarrow \text{Sensitizér} + {}^1\text{O}_2$
- c) ${}^1\text{O}_2 + \text{Substrát} \rightarrow \text{Oxidativní rozklad}$



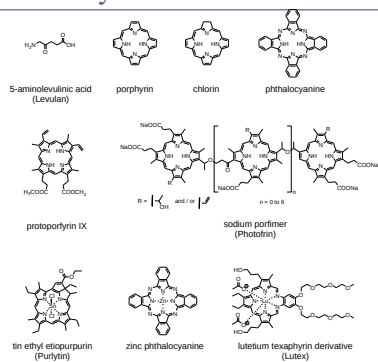
Kyslík v singletovém a tripletovém stavu



Fotodynamická terapie (PDT)



Fotosensitizéry



Modulární systém

rozpuštnost
a stabilizace léčiva

CD

Porfyrin

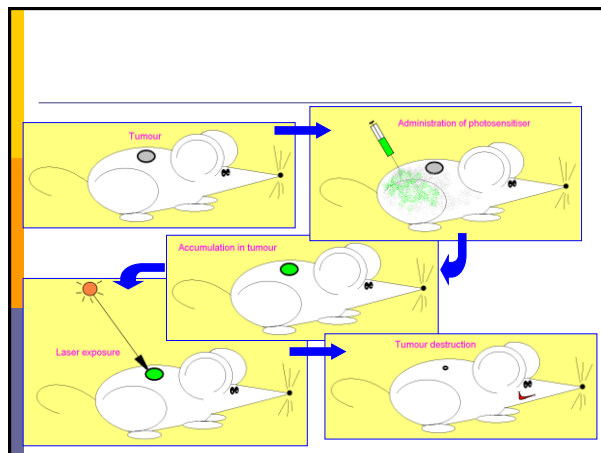
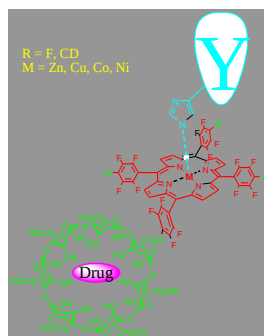
ropoznání rakovinných buněk,
vazba protilátky (příp. radiosenz.),
fotodynamická terapie (PDT)

Léčivo

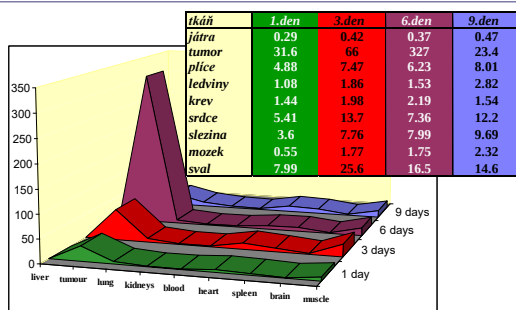
terapeutický účinek



Modulární systém



Lokalizace safyrinového konjugátu v rakovinné a normální tkáni myši (μg fotosenzitizéru / g tkáně)



Král V., Davis J., Andrievsky A., Králová J., Synytsya A., Poučková P., Sessler J.L., (2002) J Med Chem, 45, 1073-78

Selectivity for cancer cells Král at al.: J. Med. Chem. 2003: 30 -300x accumulation in malignant tissue

Experimental m/m mouse – experimental day 0



Experimental m/m mouse – experimental day 10

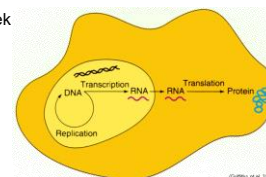


Genová terapie

- Dědičná onemocnění (cystická fibróza)
- Rakovina
- Autoimunitní onemocnění: rheumatoidní artritida

Expres genů

- jakou RNA, jaký protein daný úsek DNA kóduje



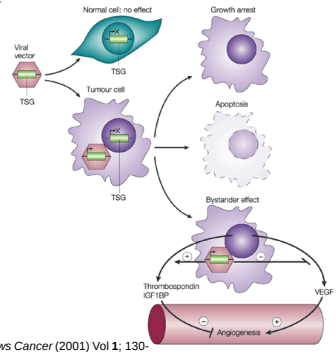
(Giffith et al. 1996)

Terapie založená na mechanismu exprese genů:

- potlačení exprese genu (*antisense therapy*)
- náhrada mutovaného genu
- zesílení imunitní reakce vůči poškozeným buňkám

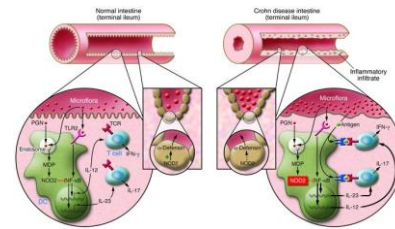
Náhrada mutovaného genu

- dodání funkční verze genu (gen potlačující zhoubné bujení, např. p53)



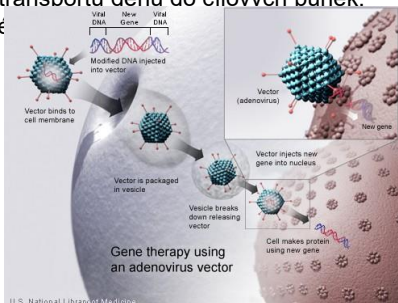
Zesílení imunitní reakce

- stimulace imunitní reakce proti vybraným buňkám
- omezení cévního zásobení (rakovina)



Kritéria genové terapie

- ❑ Efektivita transportu genů do cílových buněk, tkáně, celé



Kritéria genové terapie

- ❑ Efektivita transportu genů do cílových buněk, tkáně, celého organismu (způsob podání)
- ❑ Jakou mírou a jak dlouho bude docházet k expresi dodaného genu
- ❑ Specifita transportu a terapeutická dávka podávaného genu
- ❑ Míra nežádoucí imunologické reakce na

Genová terapie

1. vložení genu do transportéru
2. ochrana genu během transportu, endocytóza
3. transport do jádra
4. uvolnění aktivní formy genu

„VEKTOR“

Trojský kůň umožňující transport cizí genetické informace
do cílové buňky

TDD - souhrn

- očekávané přínosy
 - ▢ zvýšení účinku/snížení terapeutické dávky
 - ▢ prodloužení terapeutické aktivity (zpomalení uvolňování)
 - ▢ snížení vedlejších účinků (léčivo uvnitř transportéru, nižší dávka)
- aktivní cílení
 - ▢ biomarkery na povrchu buněk
 - ▢ na povrchu nanočástice (transportu) ligandy s charakteristickou bioafinitní interakcí s biomarkery
- pasivní cílení (rakovina – tuhé nádory)
 - ▢ EPR efekt nanočástic