Mukopenetrativne nanočestice - nov terapijski sustav za dostavu lijeka putem sluznica

Jajčević, Severina; Jug, Mario

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2017, 73, 613 - 620**

Journal article, Published version
Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:156210

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Mukopenetrativne nanočestice – nov terapijski sustav za dostavu lijeka putem sluznica

SEVERINA JAJČEVIĆ, MARIO JUG

Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku tehnologiju, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb

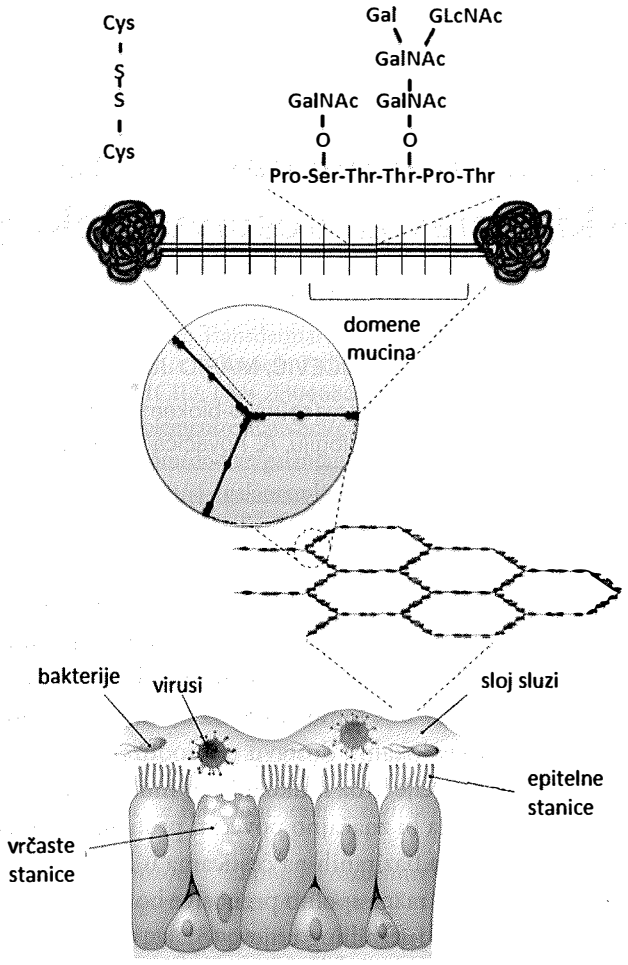
UVOD

Sluz je viskoelastični sloj gela koji oblaže sluznice dišnog, probavnog i ženskog reproduktivnog trakta te površinu oka. Ima primarno zaštitnu ulogu jer hvata i uklanja strane čestice i patogene (1, 2). Osim toga, djeluje kao lubrikant te sprječava gubitak vode i dehidraciju tkiva. Sluz nije samo značajna za održavanje homeostaze organizma, već značajno ograničava lokalnu dostavu te produženo djelovanje lijekova na sluznicama. Mogućnost penetracije kroz mukozni sloj mukoznog sloja bez ugrožavanja njegove zaštitne uloge mogla bi značajno povećati profilaktički i terapijski potencijal različitih terapijskih sustava baziranih na česticama u liječenju bolesti kao što su kronični rinitis, cistična fibroza, razne spolno prenosive bolesti, degenerativne bolesti oka, karcinom pluća te sindrom iritabilnog crijeva (3).

Sluz kao zaštitna barijera

Sluz se sastoji od 97 % vode i 1 % mucina te ostalih krutih komponenata kao što su imunoglobulini, anorganske soli, lipidi te odumrle stanice i stanični otpad. Luče je vrčaste i submukozne stanice. Unatoč različitim fiziološkim karakteristikama na različitim sluznicama tijela (tablica 1.), osnovna građa mucina u sluzi u načelu je slična (2, 4).

Mucini su glikoproteini velike molekulske mase od 0,5–40 MDa sastavljene od niza mucinskih monomera veličine 0,3–0,5 MDa te su presvučeni širokim spektrom proteoglikana. Sadrže dvije domene; proteinske okosnice mucina s regijama bogatim ponavljajućim aminokiselinama prolinom, treoninom i serinom (PTS domene) koje su izrazito glikozilirane fukozom, galaktozom, sijalinskom kiselinom, N-acetilglukozaminom i N-acetilgalaktozaminom i golih hidrofobnih regija (slika 1.). Lipidi prisutni u sluzi vezani su za hidrofobne regije vlakana (5). Zbog visokog postotka



Slika 1. Shematski prikaz strukture sluzi na sluznicama tijela. Sluz luče vrčaste stanice, a riječ je o hidrogelu koji sadrži 2–5 % mucina. Mucin je glikoprotein u kojem se razlikuju neglikolizirane domene bogate cisteinom te domene u kojima se izmjenjuju serin (Ser), treonin (Thr) i prolin (Pro) koji sadrže O-vezane oligosaharidi kao što su N-acetilglukozamin (GlcNAc) i N-acetilgalaktozoamin (GalNAc). Monomeri mucina povezuju se disulfidnim mostovima preko cisteinom bogatih regija u umreženu strukturu odgovornu za reološka svojstva sluzi. Prilagođeno prema (7).

glikozilacije, ugljikohidrati čine 80 % sadržaja suhe tvari sluzi, a za njih se vjeruje da štite proteinsku osnovu od razgradnje. Dvije su PTS domene vezane preko malih domena bogatih cisteinom, dok su N-krajevi odgovorni za di- i trimerizaciju molekula. Mucinska vlakna obično su promjera 3–10 nm s pokrovom od 20–30 ugljikohidrata na 100 aminokiselina (2). Visok udio sijalinske kiseline i sulfata stvara snažan negativan naboj što pruža polimeru rigidnost uslijed odbijanja naboja. Naboj se mijenja s rasporedom vezanih oligosaharida, a uočeno je i da crijevni mucini posjeduju izraženiji negativni naboj nego želučani (6). Umrežavanje molekula mucina rezultira

nastajanjem trodimenzionalne strukture slične mreži s veličinom pora od oko 350–500 nm i odgovorno je za reološka svojstva sluzi. Osim kovalentnog umrežavanja putem disulfidnih mostova na cisteinom bogatim regijama, mucin je podložan i nekovalentnom umrežavanju ovisnom o ionima Ca^{2+}, što dodatno smanjuje veličinu pora u nastaloj umreženoj strukturi 30–100 nm (5, 7). Mucini su kodirani s više od dvadeset MUC gena, a ekspresijski obrazac ovisi o fiziološkom položaju (4). Sluz se neprestano izlučuje, a njen životni vijek je kratak; svega nekoliko minuta do nekoliko sati (tablica 1.). Najbrža fiziološka obnova uočena je na površinama s najtanjim slojem sluzi, što pridonosi njenoj zaštitnoj ulozi.

Tablica 1. Fiziološke karakteristike sluzi na različitim sluznicama u tijelu. Prilagođeno prema (10).

Sluznica	Debljina sloja (μm)	Vrijeme klirensa (min)	Brzina klirensa (mm/min)	Temperatura (°C)	pH vrijednost
Oko	0,02–0,05	5–7,7	–	37,0	7,8
Gornji dišni putevi	15	10–20	5–11	30,2–34,4	5,5–6,5
Donji dišni putevi	55	–	3,5–30	32,5–35,5	7,0
Želudac	170	24–48[A]	–	37,0	6,40
Tanko crijevo	10		–	37,0	5,5–7,5
Debelo crijevo	37–100		–	37,0	7,0
Rektum	125		–	37,0	7,2
Vagina	50	–	1,5–6,0[B]	37,0	3,5–4,0

[A] u satima
[B] mL/dan

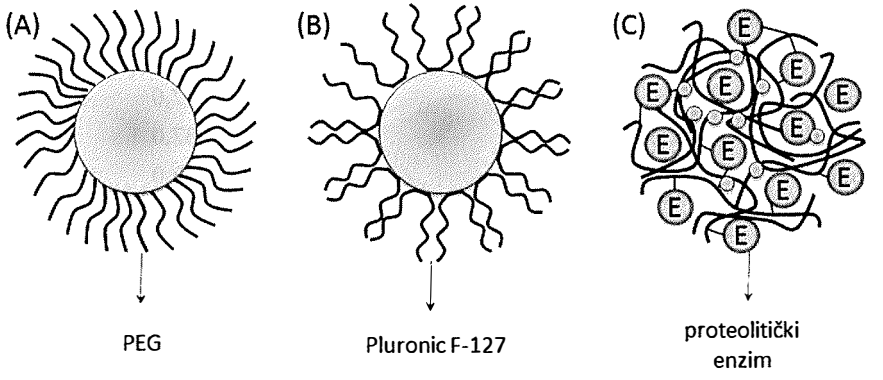
Sluz možemo podijeliti na onu niske i onu visoke viskoznosti. Sluz niske viskoznosti prekriva površinu sluznice probavnog i dišnog sustava te djeluje kao dinamička barijera. Kontinuirano lučenje i uklanjanje sluzi djelovanjem cilija s površine epitelnih stanica osigurava učinkovito odstranjivanje stranih čestica u udahnutom zraku. Sluz visoke viskoznosti sadrži mucine vezane na površinu epitelnih stanica te tvori učinkovitu steričku barijeru prolasku različitih bakterija i makromolekula koje su veće od veličine pora u strukturi mucina. Tako će, primjerice, difuzija herpes simplex virusa približne veličine 180 nm biti gotovo u potpunosti onemogućena, dok će manji virusi kao što su poliovirus (28 nm), virus hepatitisa B (43 nm), adenovirusi (60–90 nm) i rotavirus (75 nm) difundirati slobodnije. Osim toga, interakcija tvari s lancima mucina stvaranjem slabih kemijskih veza također može imobilizirati čestice u strukturi sluzi. Tako će lipofilne tvari ulaziti u interakcije s hidrofobnim domenama molekule mucina, dok će hidrofilne biti zadržane u sloju sluzi uslijed stvaranja vodikovih veza s hidrofilnim (glikoliziranim) domenama mucina. U slučaju pozitivno

nabijenih tvari, moguće je stvaranje ionskih veza s negativno nabijenim lancima sijalinske kiseline vezane na mucin (7–9).

S druge strane, kod sluznice probavnog trakta, difuzija molekula vode prema epitelu djeluje kao snažna pokretačka sila koja osigurava dostavu čestica do površine epitela. Taj učinak je naročito izražen u tankom crijevu, gdje brzina apsorpcije vode iznosi 0,1–0,2 mL/h cm^2 (10).

Strategije u razvoju mukopenetrativnih nanočestica

Mukopenetrativne nanočestice pokazuju svojstvo izražene penetrabilnosti kroz sloj sluzi do površine epitelnih stanica, dok konvencionalne čestice ostaju zadržane na površini i/ili strukturi sluzi, ovisno o svojoj veličini. Mukopenetrativnost se može postići pasivno, u prvom redu variranjem veličine i svojstava površine čestica, s ciljem svođenja interakcija između nosača i sluzi na najmanju mjeru, a moguć je i aktivni pristup kod kojeg se u čestice ugrađuju tvari koje kemijski mijenjaju strukturu sluzi (enzimi i mukolitici) (11, 12).



Slika 2. Shematski prikaz grade mukopenetrativnih nanočestica: (A) PEGilirane nanočestice, (B) nanočestice obložene poloksamerom i (C) mukolitičke nanočestice s površinom funkcionaliziranom enzimima. Prilagođeno prema (11).

PEGilirane nanočestice

Oblaganje površine čestica lancima polietilenglikola (PEG) niske molekulske mase jedna je od najčešće korištenih strategija u razvoju mukopenetrativnih nanočestica (slika 2.). U tu svrhu koriste se PEG derivati niske molekulske mase od 2–10 kDa, čime se izbjegava interpenetracija PEG lanaca s lancima mucina i posljedična mukoadhezivnost, do koje dolazi u slučaju PEG polimera većih molekulskih masa. Osim kovalentnog vezanja PEG lanaca na površinu čestica, jednako je učinkovita i fizička adsorpcija PEG lanaca na površini čestica. Time se osigurava hidrofilna površina koja ima nizak afinitet stvaranja vodikovih veza te značajno lakša penetracija nanočestica

kroz sluz (5, 10, 11). Ispitivanja na životinjskim modelima pokazuju da PEGilirane polistirenske nanočestice promjera manjeg od 230 nm brzo prodiru u kolorektalnu sluz u *ex vivo* uvjetima do površine epitela, dok istovrsne neobložene nanočestice zaostaju na površini sluzi te bivaju brzo uklonjene djelovanjem mukoznog klirensa (13). U istom istraživanju pokazana je značajno bolja distribucija PEGiliranih nanočestica i na *in vivo* modelu miša s ulceroznim kolitisom. Ulcerozni kolitis karakteriziran je značajno povećanom produkcijom sluzi koja predstavlja značajnu prepreku dostavi lijekova do površine sluznice, a PEGilirane nanočestice je uspješno prevladavaju te bi tako mogle biti novi nosač za lokalnu dostavu protuupalnih lijekova kod te bolesti, a imaju i značajan potencijal za lokalnu dostavu citostatika u liječenju karcinoma kolona, lokalnu dostavu mikrobiocida kod prevencije širenja seksualno prenosivih bolesti i slično (13). Slični rezultati su dobiveni i za PEGilirane nanočestice načinjene od polianhidridnog polimera (kopolimer metil vinil etera i anhidrida jabučne kiseline, Gantrez® AN), srednjeg promjera približno 160 nm. Sam polimer je mukoadhezivan, no njegovo oblaganje PEG-om blokira mukoadhezivnost te im omogućuje mukopenetrativnost. Pri tom se pokazalo da svojstvo mukopenetrativnosti ovisi o molekulskoj masi PEG-a te gustoći PEGiliranja. Najveću mukopenetrativnost pokazuju nanočestice gusto obložene PEG-om molekulske mase 6000, koje se nakon oralne primjene brzo transportiraju do tankog crijeva te tamo permeiraju do površine epitela sluznice, a zabilježeno je njihovo produženo zadržavanje na površini sluznice crijeva. Približno 25, 20 i 15 % nanočestica obloženih PEG-om 6000, 2000 i 10 000 ostalo je zadržano na površini epitela tankog crijeva nakon 3 sata, dok je ta vrijednost za neobložene čestice iznosila samo 5 % (14). Uklapanje paklitaksela u PEGiliane polianhidridne nanočestice povećalo je 3–7 puta intestinalnu permeabilnost lijeka u odnosu na komercijalno dostupnu formulaciju (Taxol®). Oralna bioraspoloživost lijeka primijenjenog kao nanočestice obložene PEG-om 2000 iznosila je 70 %, dok su oralnom primjenom otopine lijeka (Taxol®), koncentracije paklitaksela u krvi bile ispod granice određivanja HPLC metode (15). PEGilirane nanočestice u pravilu pokazuju dobru mukopenetrabilnost neovisno o materijalu koji je korišten za izradu jezgre nanočestice (lipidi, kopolimeri mliječne i glikolne kiseline (PLGA) ili lateks), a važno je da veličina terapijskog sustava bude približno 200 nm. Pri tome, PEGilirane čestice su negativno nabijene te ne pokazuju afinitet za vezanje na negativno nabijene lance mucina. Neki autori smatraju da upravo negativan naboj pridonosi brzoj permeaciji PEGiliranih nanočestica kroz mucinsku mrežu uslijed elektrostatskog odbijanja (14). Osim na intestinalnoj sluznici, dobra mukopenetrabilnost takvih čestica dokazana je i na vaginalnoj, okularnoj te sluznici dišnih putova (5).

Nanočestice obložene poloksamerima

Poloksameri (Pluronic®) su građeni od blokova polioksietilena (PEO) i polioksipropilena (PPO) i koriste se kao tenzidi te kao termogelirajući terapijski sustavi u

suvremenoj farmaceutici. Zahvaljujući istodobnoj prisutnosti hidrofilnih (PEO) i hidrofobnih (PPO) dijelova, poloksameri su prikladni za oblaganje nanočestica te za ugradnju u liposome. Pri tom hidrofobni dijelovi kopolimera priliježu uz hidrofobnu površinu nanočestica ili se interkaliraju u fosfolipidni dvosloj liposoma, dok hidrofilni dijelovi strše sa površine čestice, tvoreći četkastu strukturu sličnu onoj kod PEGiliranih nanočestica (slika 2.). Za tu svrhu nužno je da PPO segment bude molekulske mase veće od 3 kDa. Zbog toga se u razvoju mukopenetrativnih nanočestica najčešće koristi poloksamer 407 (Pluronic® F-127). Istraživanja su pokazala da oblaganje PLGA nanočestica poloksamerom značajno povećava njihovu brzinu difuzije u gustoj sluzi iz gornjih sinusa. Brzina difuzije obloženih čestica iznosila je 1/20 njihove teoretske brzine difuzije u vodi, dok je kod neobloženih čestica bila čak 1000 puta manja (10, 11).

Mukolitičke nanočestice

Uklapanjem mukolitičkih agensa kao što je N-acetilcistin, koji razgrađuje disulfidne mostove u cisteinom bogatim regijama mucina može se značajno smanjiti viskoznost sluzi te tako olakšati transport nanočestica. Drugi pristup uključuje imobilizaciju mukolitičkih enzima kao što su tripsin, papain ili bromelain na površinu nanočestica (slika 2.) ili na sam polimer prije formiranja nanočestica. Imobilizacija navedenih enzima postiže se kovalentnim vezanjem preko odgovarajućih prostetskih skupina ili ionskim interakcijama. Do sada dostupni podaci pokazuju da nanočestice funkcionalizirane s papainom pokazuju značajniju mukopenetrativnost kroz intestinalnu sluz. No, potrebno je istražiti hoće li takvo narušavanje zaštitne uloge sluzi primjenom mukolitičkih nanočestica imati za posljedicu i značajniju apsorpciju endotoksina i drugih toksičnih tvari (11, 12).

ZAKLJUČAK

Mukozne sluznice tijela prekrivene su slojem visokoelastične sluzi koja predstavlja steričku i dinamičku prepreku dostavi lijekova. Mukopenetrativne nanočestice predstavljaju potencijalnu strategiju koja će omogućiti prevladavanje mukozne barijere i učinkovitiju dostavu lijeka putem sluznica s ciljem lokalne i sistemske terapije niza bolesti oka, probavnog trakta te dišnog i reproduktivnog sustava. Pri tom valja osigurati učinkovitu dostavu lijeka na ciljano mjesto uz zadržavanje prirodne zaštitne uloge sluzi.

Mucopenetrative nanoparticles – a new mucosal drug delivery system

S. Jajčević, M. Jug

Abstract

Mucus is a viscoelastic and adhesive gel layer that protects eye, respiratory, gastrointestinal, reproductive tract and other mucosal surfaces of the human body. The most of foreign particles such as dust and microbes, as well as particle-based drug delivery system are efficiently trapped in the mucus by adhesion and steric obstruction and then removed from the mucosal tissues in time intervals ranging from minutes to several hours. A number of diseases and conditions, including chronic rhinitis, cystic fibrosis, inflammatory bowel disease, glaucoma, lung or colon cancer, glaucoma and sexually transmitted diseases could be treated more efficiently and with fewer side effects if the drug could be delivered to the underlying mucosal tissue in a controlled manner. Drug loaded mucoadhesive nanoparticles with non-adhesive coating or nanoparticles bearing the mucolytic enzymes, possessing the ability to rapidly penetrate mucus layer nearly as fast as they would penetrate pure water, are potential delivery system in this regard. This article presents a short overview of the mucus barrier properties and current technologies used to obtain the mucopenetration of nanoparticles.

Literatura – References

1. Cone RA. Barrier properties of mucus. Adv Drug Deliv Rev. 2009; 61:75–85.
2. Pearson JP, Chater IP, Wilcox MD. The properties of the mucus barrier, a unique gel – how can nanoparticles cross it? Ther Deliv. 2016; 7:229–44.
3. Ensign LM, Schneider C, Suk JS, Cone R, Hanes J. Mucus penetrating nanoparticles: Biophysical tool and method of drug and gene delivery. Adv Mater. 2012; 24:3887–94.
4. Corfield AP. Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. Biochim Biophys Acta. 2015; 1850:236–52.
5. Fröhlich E, Roblegg E. Mucus as Barrier for Drug Delivery by Nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol. 2014; 14:126–36.
6. Johansson ME V., Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013; 10:352–61.
7. Boegh M, Nielsen HM. Mucus as a barrier to drug delivery – Understanding and mimicking the barrier properties. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2015; 116(3):179–86.
8. Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. Adv Drug Deliv Rev. 2009; 61:158–71.
9. Sperandio B, Fischer N, Sansonetti PJ. Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies. Semin Immunol. 2015; 27(2):111–8.
10. Netsomboon K, Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. Eur J Pharm Biopharm. 2016; 98:76–89.
11. Liu M, Zhang J, Shan W, Huang Y. Developments of mucus penetrating nanoparticles. Asian J Pharm Sci. 2014; 10:275–82.

SREDIŠNJA KNJIŽNICA
FARMACEUTSKO - BIOKEMIJSKI FAKULT
10000 ZAGREB, ANTE KOVAČIĆ

12. Dünnhaupt S, Kammona O, Waldner C, Kiparissides C, Bernkop-Schnürch A. Nanocarrier systems: Strategies to overcome the mucus gel barrier. Eur J Pharm Biopharm. 2015; 96:447–53.

13. Maisel K, Ensign L, Reddy M, Cone R, Hanes J. Effect of surface chemistry on nanoparticle interaction with gastrointestinal mucus and distribution in the gastrointestinal tract following oral and rectal administration in the mouse. J Control Releas. 2015; 197:48–57.

14. Inchaurraga L, Martín-Arbella N, Zabaleta V, Quincoces G, Peñuelas I, Irache JM. In vivo study of the mucus-permeating properties of PEG-coated nanoparticles following oral administration. Eur J Pharm Biopharm. 2015; 97:280–9.

15. Zabaleta V, Ponchel G, Salman H, Agüeros M, Vauthier C, Irache JM. Oral administration of paclitaxel with pegylated poly(anhydride) nanoparticles: Permeability and pharmacokinetic study. Eur J Pharm Biopharm. 2012; 81(3):514–23.

Primljeno 12. lipnja 2017.