

M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar
Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék

Mukoadhézió: jelenség, jellemzés, alkalmazás

Gyarmati Benjámín



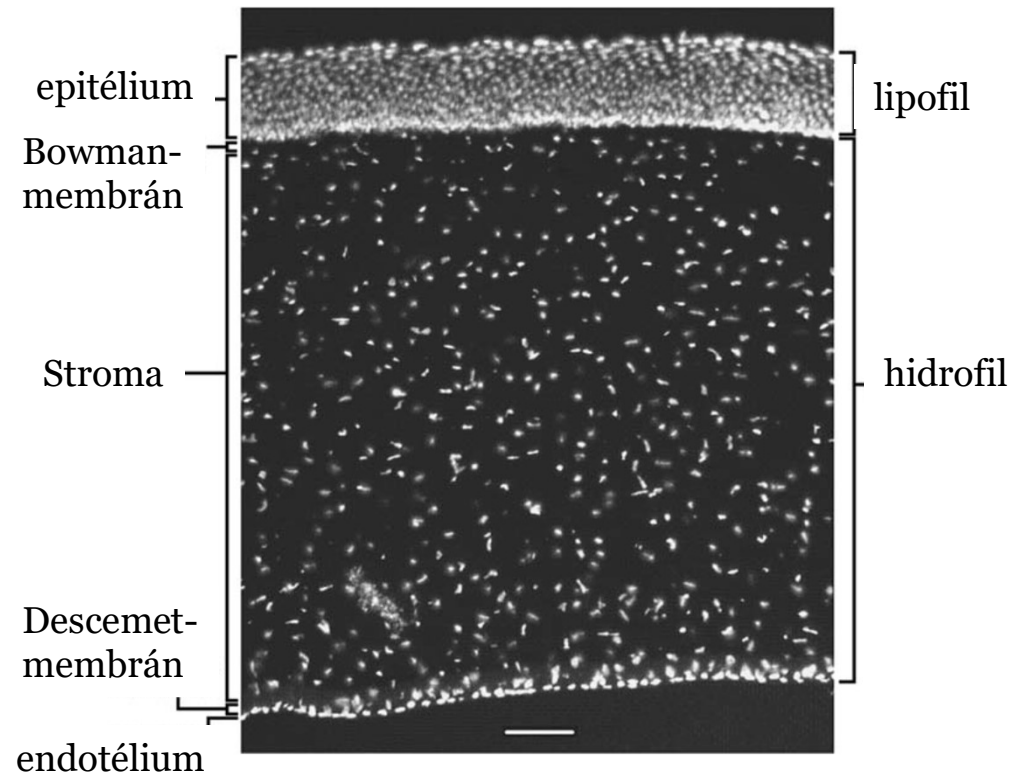
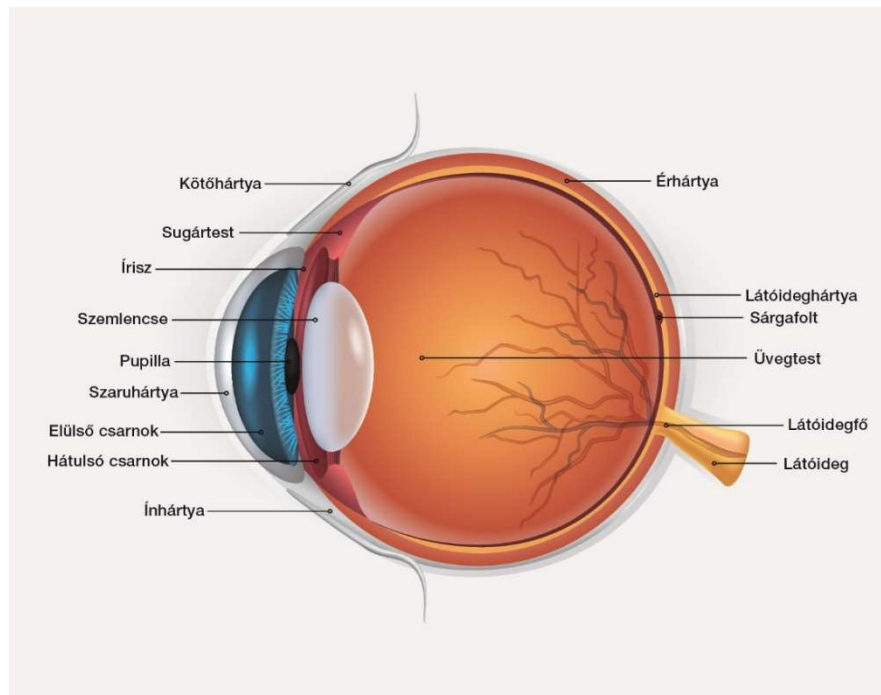
LÁGY
ANYAGOK

KUTATÓCSOPORT

2020. április 23.

A szem felépítése

Jelentőség: topikális szerek kimosódása, eltávolítás pislogással, kötőszövetből szisztémás elimináció, gyenge permeabilitás a corneán (szaruhártyán)

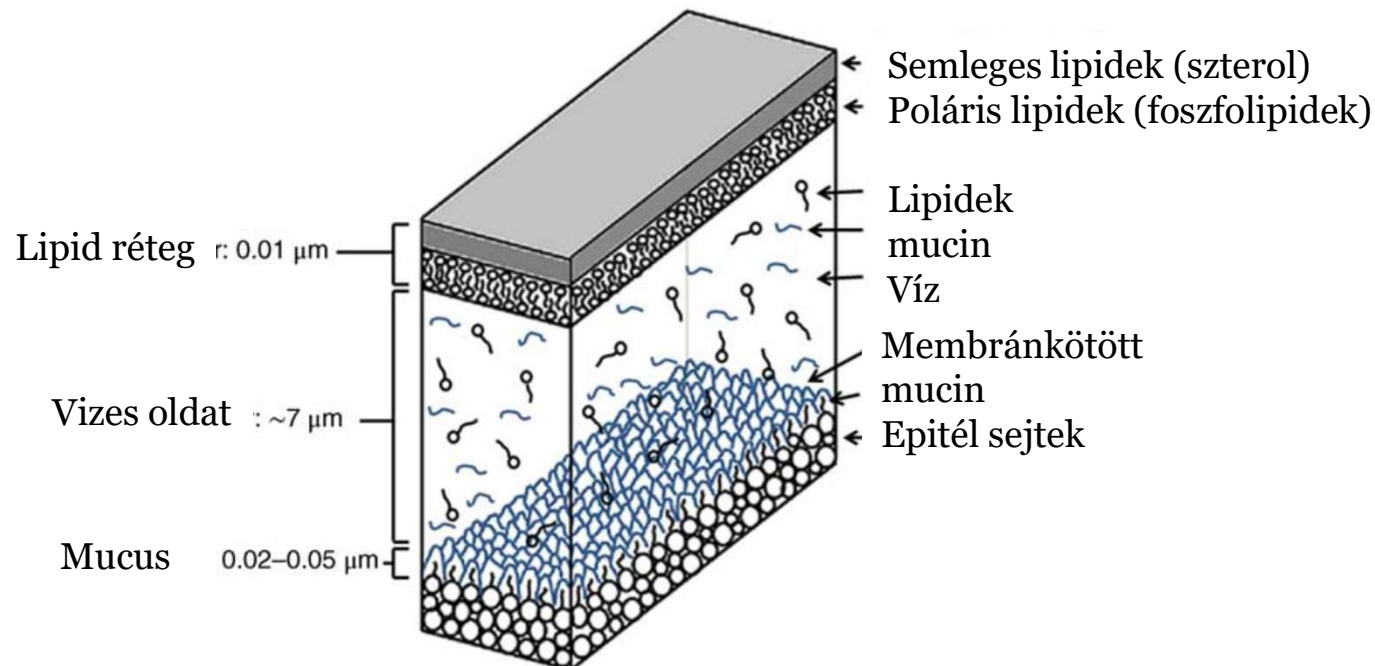
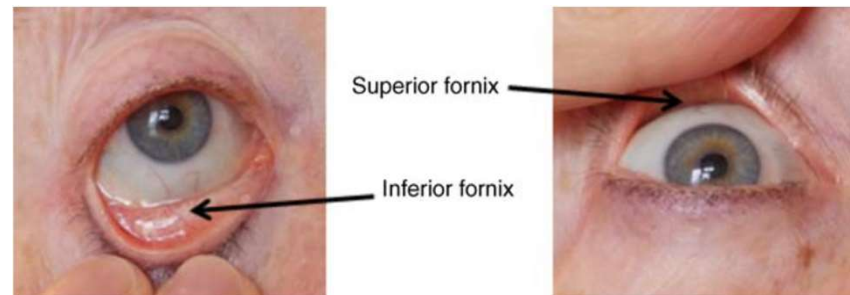


Epitél réteg (nagy triptofán-koncentráció): a hidrofil hatóanyag-molekulák 90%-át, a lipofilek 10%-át visszatartja

Stroma: hidrofil gélréteg, kb. 90%-a a corneának

A szem körüli kötőszövet és a könnyfilm

Mucus réteggel borított, laza védőréteg a szem környezetében, inzertek behelyezése itt valósítható meg



Terápiás célpontok, hatóanyag-beviteli módok

- Kötőszövet (conjunctiva), szemhéj, könnycsatornák
- Szaruhártya
- Elülső és hátsó csarnok
- Üvegtest, retina (érhártya)

Preferált: topikális beviteli mód, szemészeti készítmények 90%-a, de az alkalmazott dózis 1-3%-a jut át a szaruhártyán, kevesebb mint 1%-a jut el a hátsó csarnokig

Egyéb lehetőségek: szisztémás bejuttatás (toxikus mellékhatások), intraokuláris út (invazív megoldás)

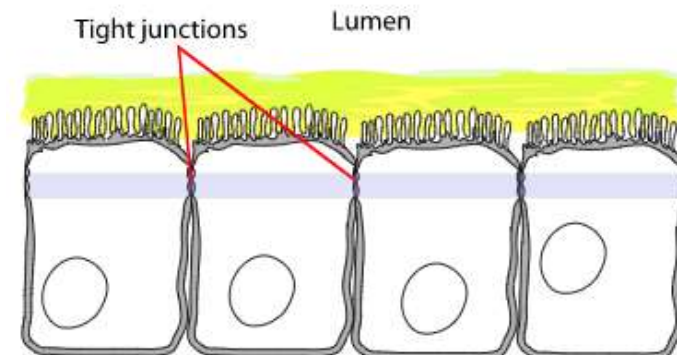
Epitél réteg: lipofil, gyenge permeabilitás a hidrofil hatóanyagok számára (tovább nehezítik a tight junction-ök)

Stróma: hidrofil, nehéz átjutás a lipofil hatóanyagok számára

Viszonylag gyors átjutás:

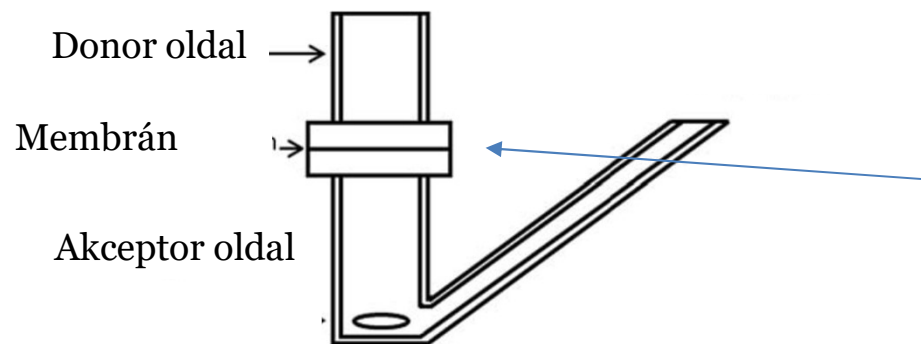
$$\log P = 2-3$$

$$\log P_{\text{oct/wat}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}^{\text{un-ionized}}}{[\text{solute}]_{\text{water}}^{\text{un-ionized}}} \right)$$



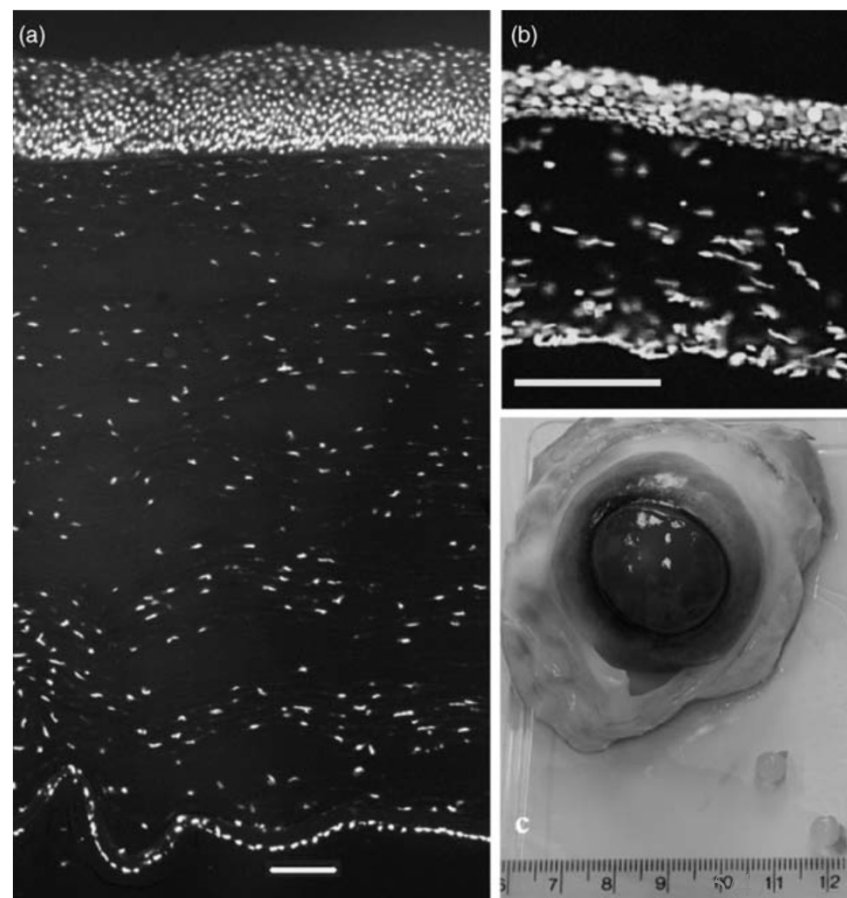
4/47

Hatóanyag-bevitel modellezése



Alkalmazott membránok (ex vivo):
Cornea, sclera, conjunctiva

Franz-cella (FDA által elfogadott)
Nagy különbség in vivo-hoz képezest:
elülső csarnokvíz (250 μ l, Franz cella
akceptor: 16 ml)

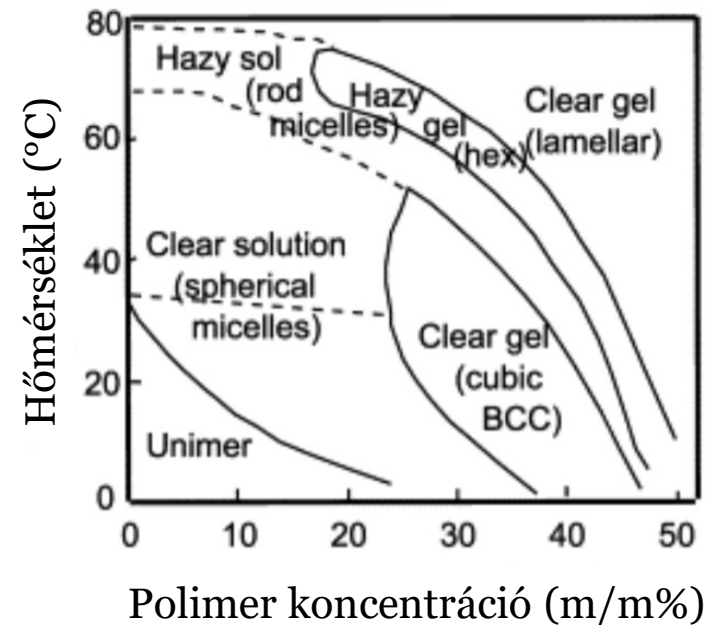
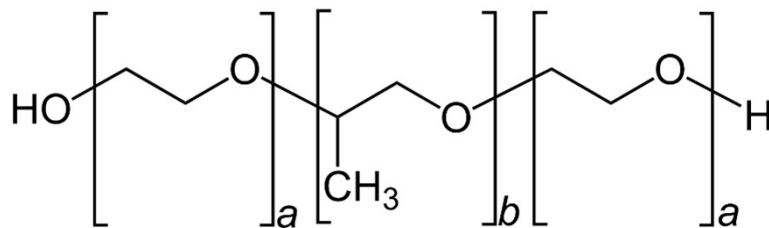
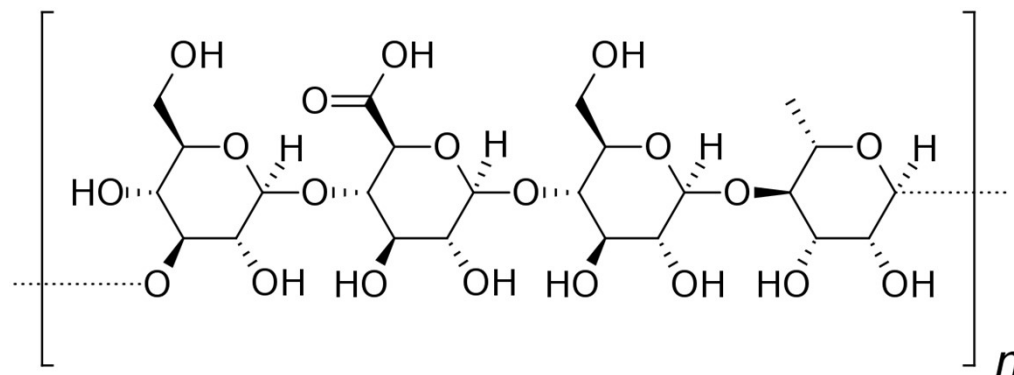


	Emberi .	Marha	Patkány
Könnytf.	7 μ l [52]	n/d ^a	n/d ^a
Könnyáram	1.2 μ l min ⁻¹ [52]	n/d ^a	n/d ^a
Cornea vast.	565 μ m [24]	1000 μ m ^b	250 μ m ^b
Cornea ter.	1.3 cm ² [54]	4.52 cm ² ^b	0.18 cm ² ^b
Érzékenység	0.2 g mm ² [54]	n/d ^a	n/d ^a
Pislogás	900 h ⁻¹ [55]	300 h ⁻¹ [55]	318 h ⁻¹ [56]
3. szemhéj	No	Yes	Yes

Terápiás hatékonyság javítási lehetőségei I

A tartózkodási idő növelése a cél a szem felszínén

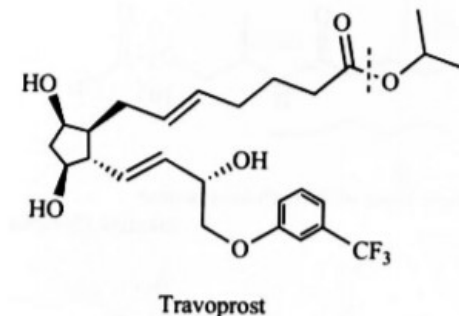
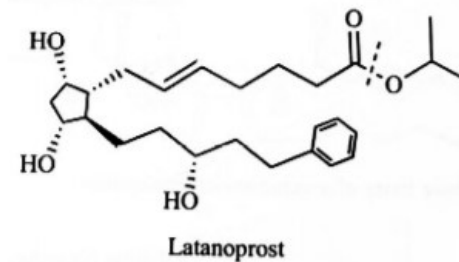
- Viskozitásnövelő adalékok (könnyezéssel, pislogással lassabb eltávolítás), cellulóz származékok, PVP, PVA, enyhén térhálós PAA, hialuronsav stb.
- **In situ gélesedő rendszerek** (pl. gellan gum/gellan gumi ionok jelenlétében, poloxamerek hőmérséklet-változás hatására)



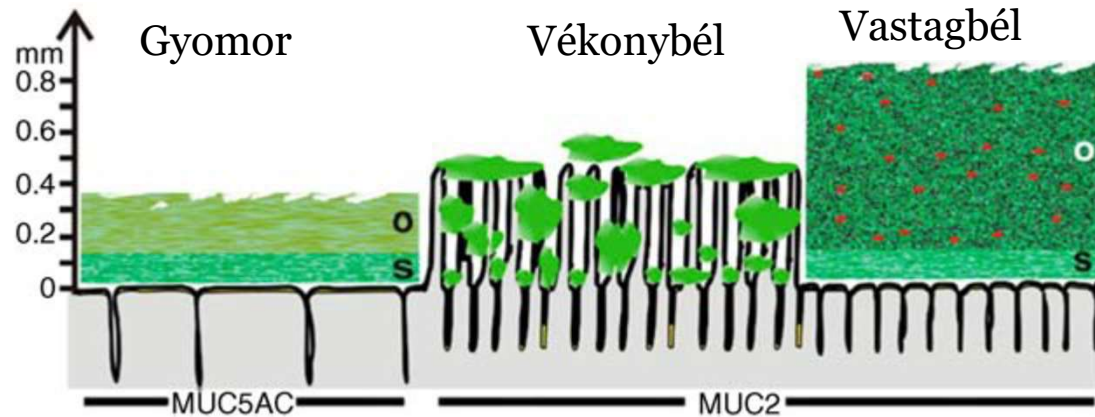
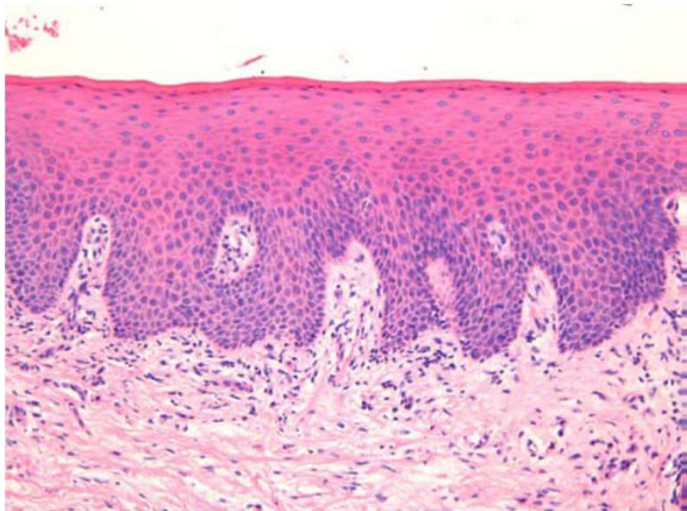
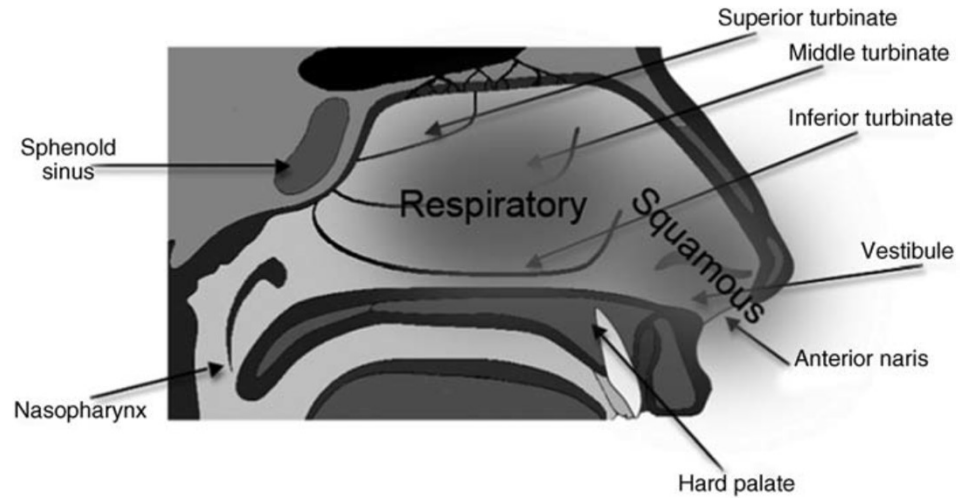
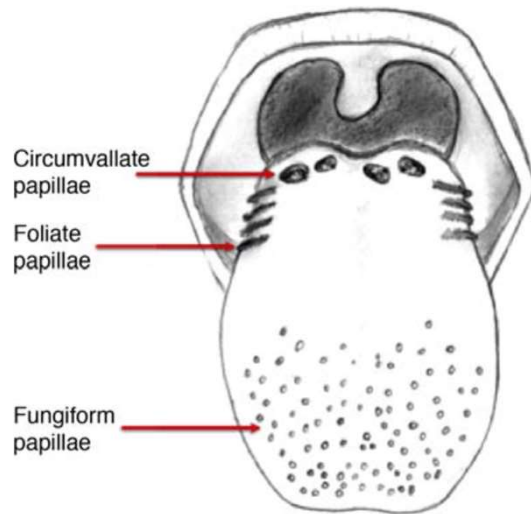
Terápiás hatékonyság javítási lehetőségei II

A tartózkodási idő növelése a cél a szem felszínén

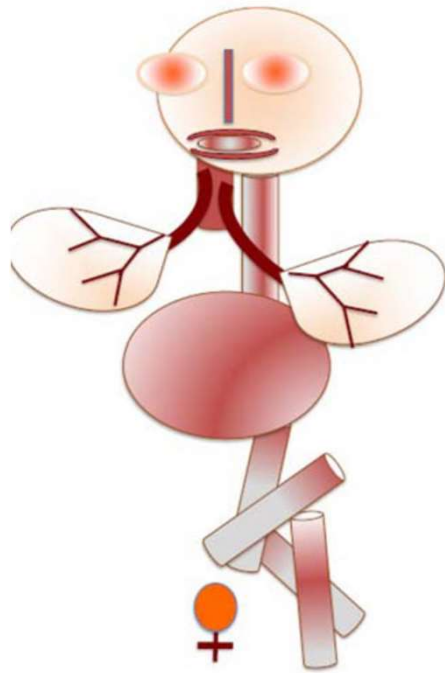
- **Mukoadhézió** – kölcsönhatás a mucosa és a gyógyszerformula (pontosabban annak valamely komponense) között
- Nanorészecskék (nagy fajlagos felület)
- Szemészeti inzertek
- Kenőcsök, emulziók – lassú kimosódás a könnyel
- Liposzómák – vízoldható és lipofil hatóanyag szállítása is, szabályozható logP (logD)
- Hidrogél kontakt lencsék
- Penetráció-fokozás (felületaktív anyagok vagy Ca-komplex képzők)
- Pro-drug molekulák alkalmazása (prostaglandinok, gyenge permeabilitás, Irritáció (sav csoportok))



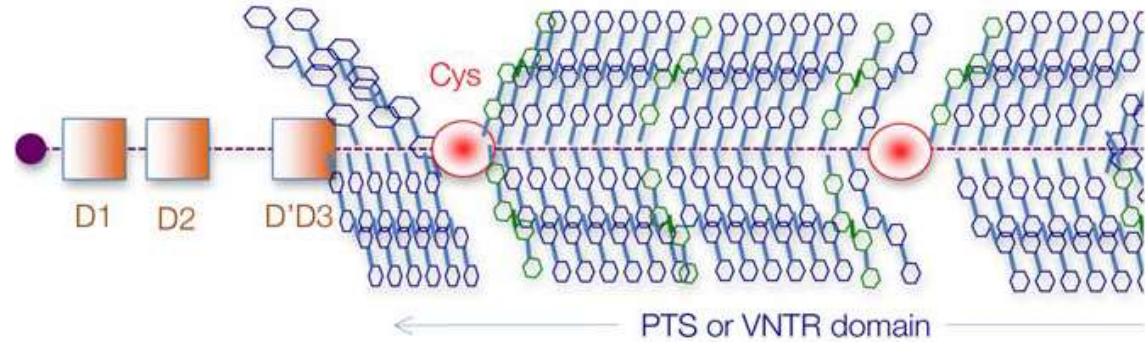
Nyálkahártyák a szervezet különböző pontjain



Mucin a szervezet különböző pontjain



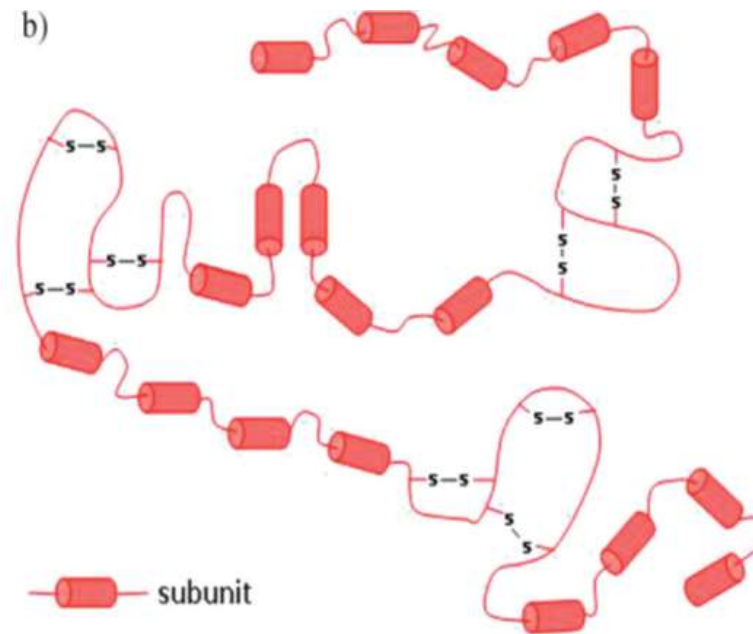
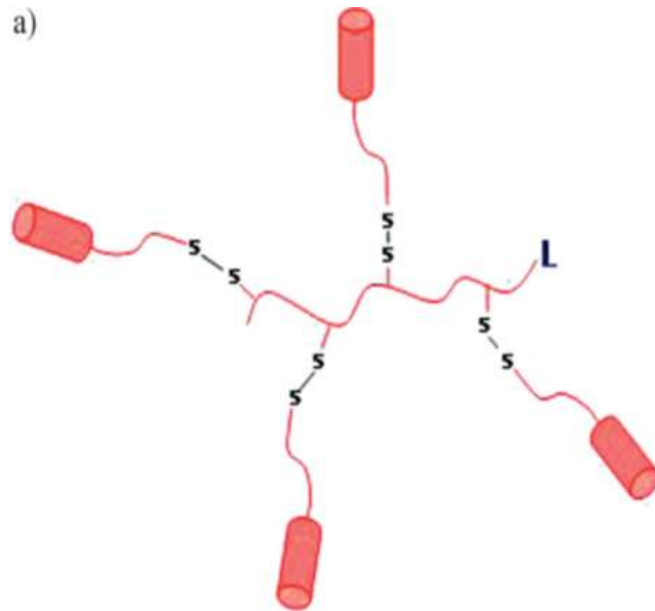
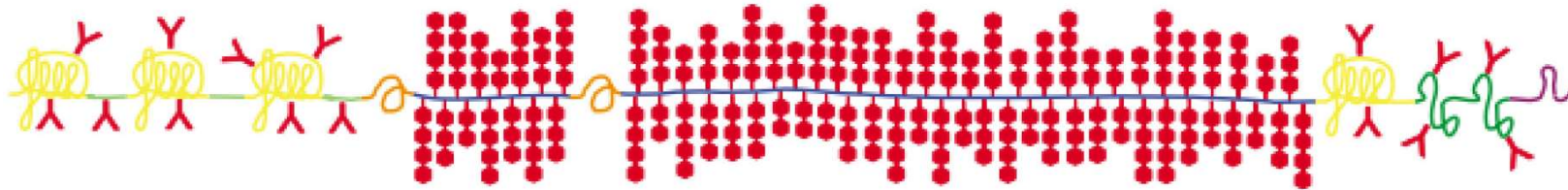
AFM kép:
3 μm hossz!



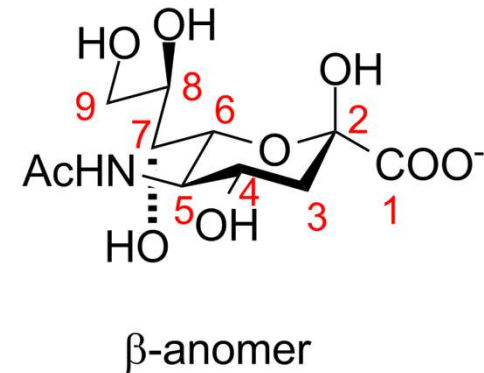
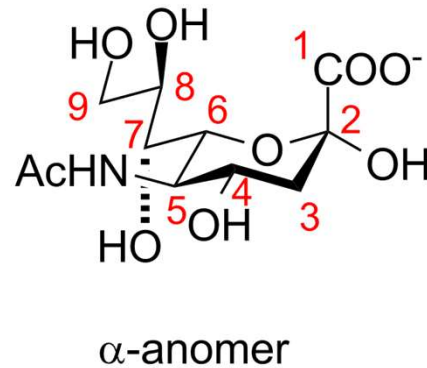
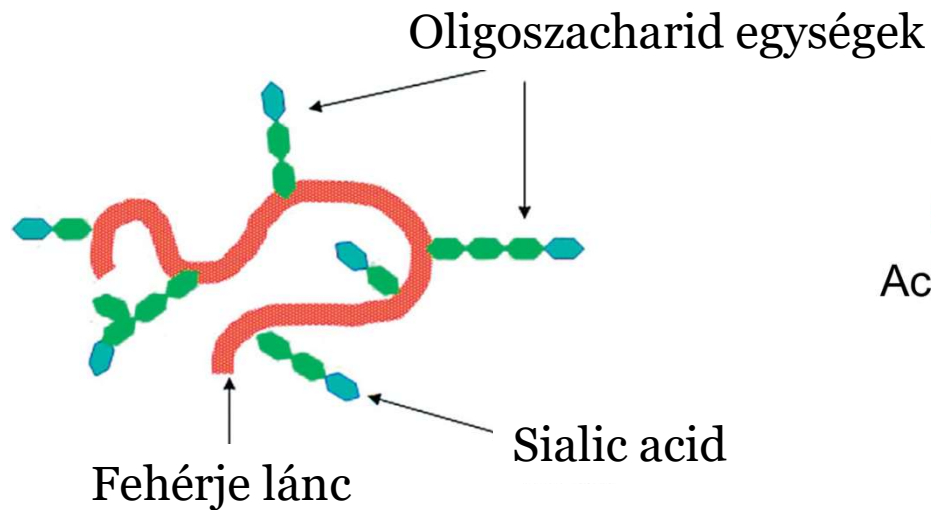
Mucin	Kromoszóma	Tandemhossz
Gélképző, nem kötött mucinok		
MUC2	11p15.5	23
MUC5AC	11p15.5	8
MUC5B	11p15.5	29
MUC6	11p15.5	169
MUC19	12q12	19
Nem gélképző, nem kötött mucinok		
MUC7	4q13 – q21	23
MUC8	12q24.3	13/41
MUC9	1p13	15
Membránkötött mucinok		
MUC1	1q21	20
MUC3A/B	7q22	17
MUC4	3q29	16
MUC12	7q22	28
MUC13	3q21.2	27
MUC15	11p14.3	none
MUC16	19p13.2	156
MUC17	7q22	59
MUC20	3q29	18
MUC21	6p21	15
MUC22	6p21.3	10

A mucin szerkezete

Nagy molekulatömegű fehérje (tipikusan 0.2-50 MDa)
PTS régió (prolin, treonin, szerin) glikozilált



A mucin szerkezete, kölcsönhatások



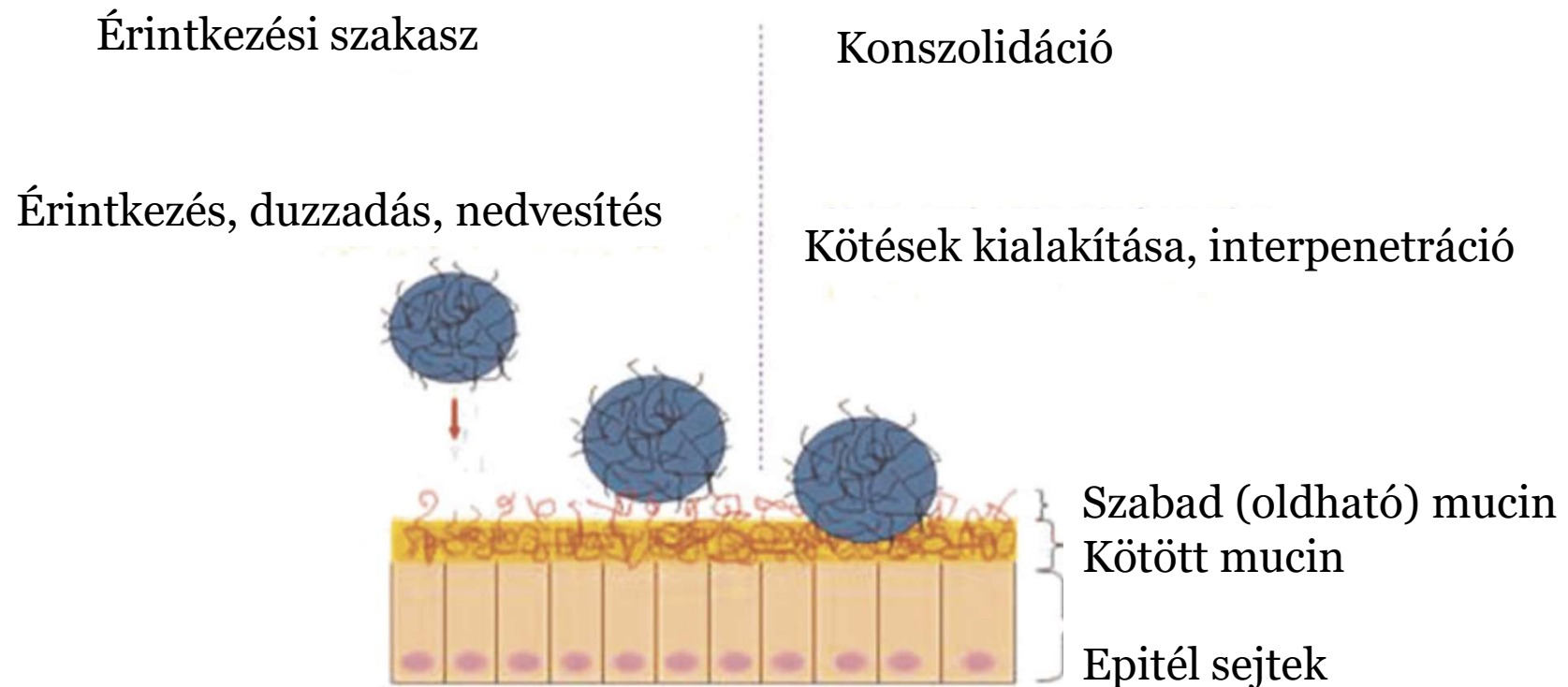
Lehetőség erős kölcsönhatásokra: H-híd, diszulfid híd stb., gélszerű állag

Előforduló összes kölcsönhatás mucin és polimer között:

- Ionos (elektrosztatikus)
- Kovalens
- Hidrogénhidas
- vdW kölcsönhatás
- hidrofób asszociáció

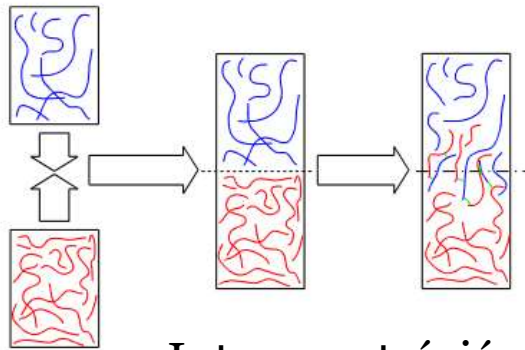
Mukoadhézió elméletei

1. **Elektrokémiai elmélet**
2. Adszorpciós elmélet
3. Nedvesedési elmélet
4. **Diffúziós elmélet**
5. Törési (szakítási) elmélet
6. Mechanikai elmélet



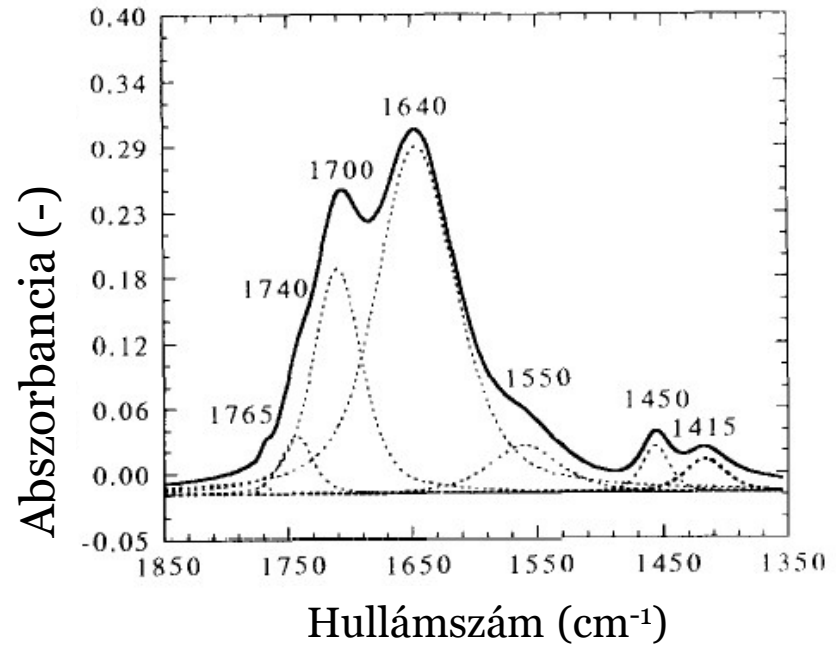
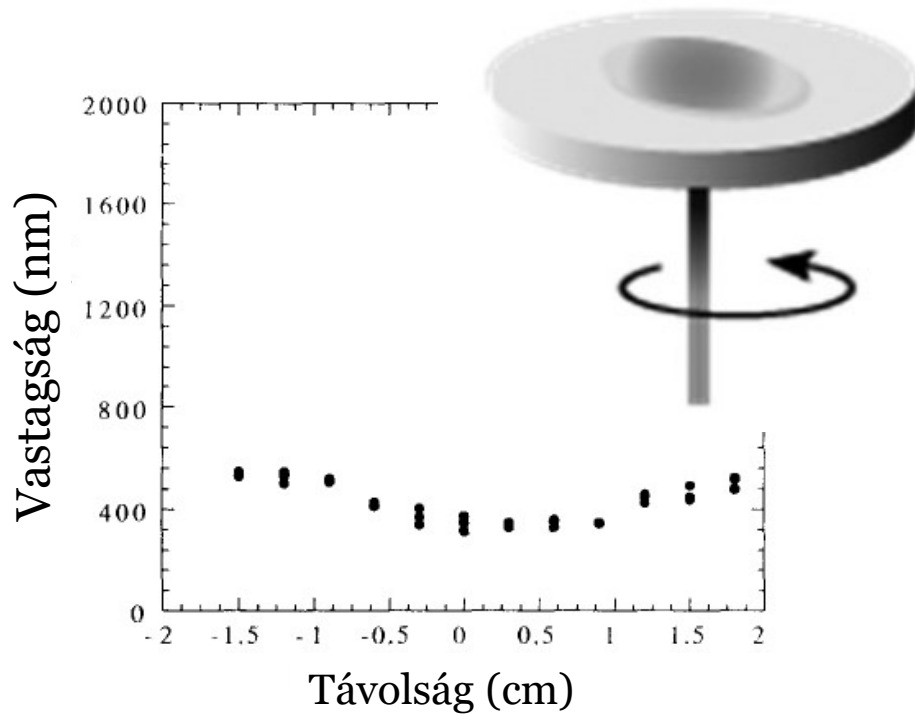
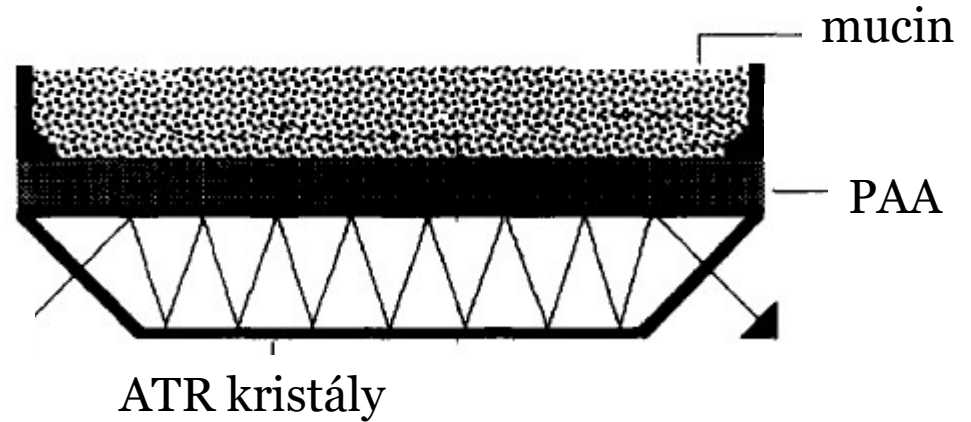
Interpenetráció

IR Behatolási mélység: 200 nm



Interpenetráció

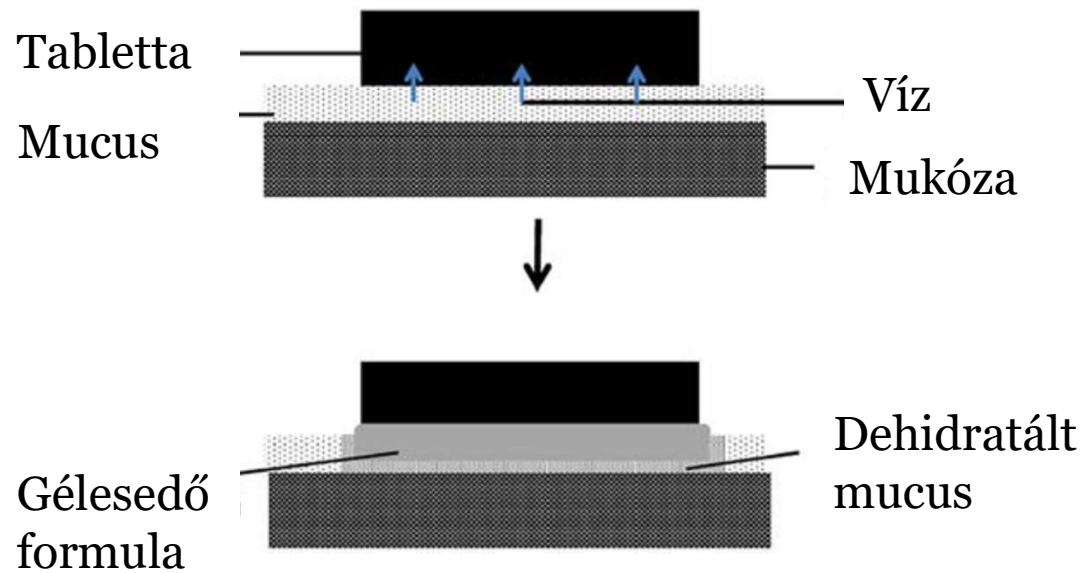
IR



Jabbari E, Wisniewski N, Peppas NA. Evidence of mucoadhesion by chain interpenetration at a poly (acrylic acid)/mucin interface using ATR-FTIR spectroscopy. Journal of Controlled Release 1993;26:99-108.

Dehidratációs elmélet

Duzzadó (gélesedő) formulák esetén jelentős



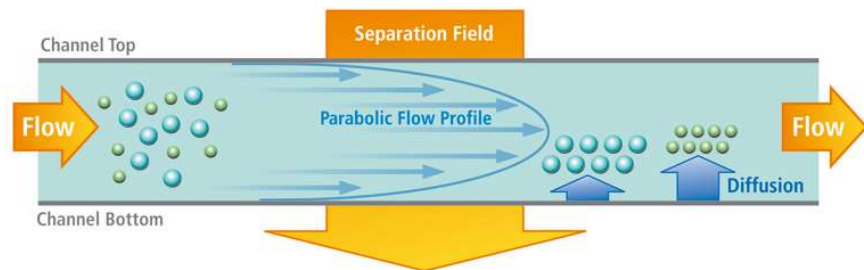
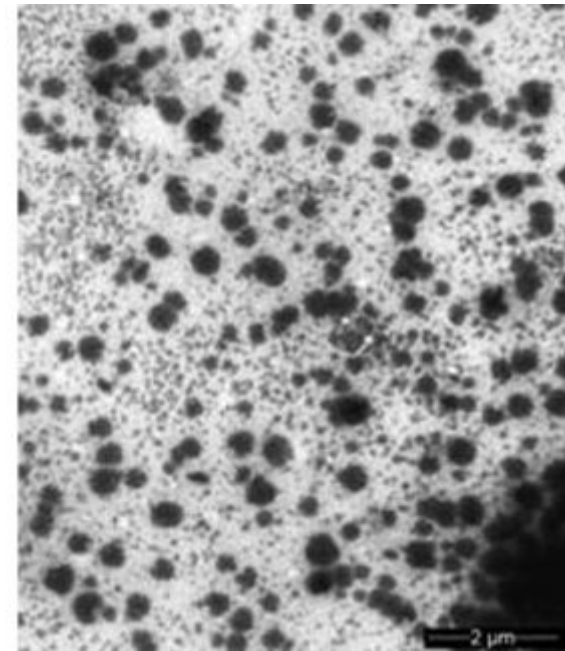
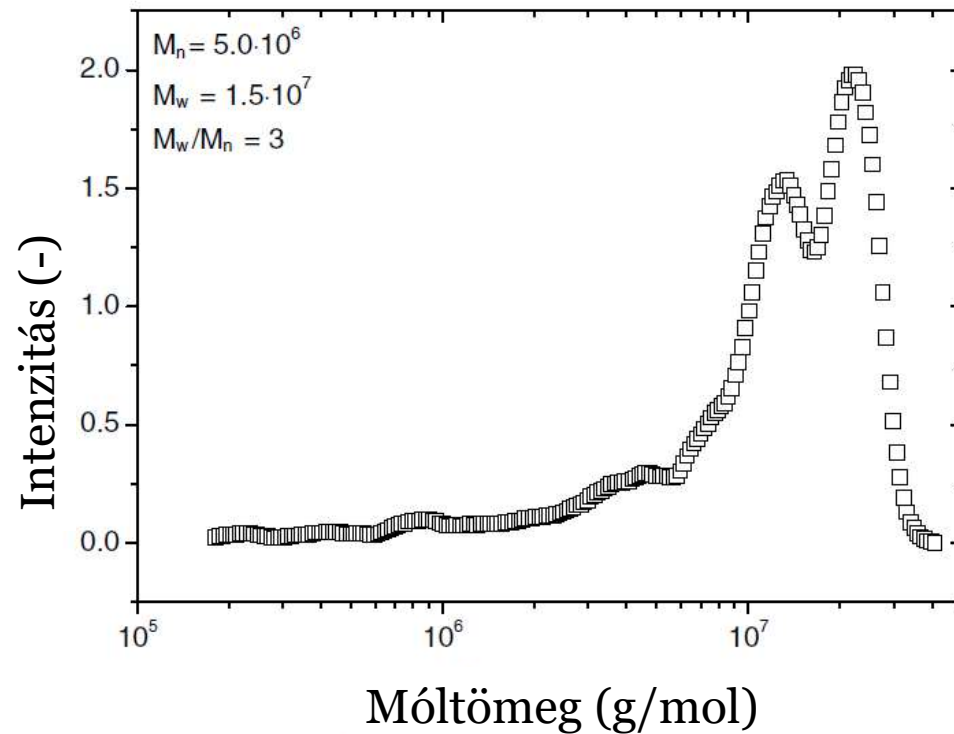
Enyhén térhálós poliakrilsavak jól duzzadnak, a nagy víztartalmú mucin gélréteget részben dehidratálja (ozmotikus hatás)

A mukoadhéziós kölcsönhatást befolyásoló szerkezeti tényezők - mucin

- Víztartalom: általában 90-98%
- Állag: változhat a viszkózus folyadéktól a lágy gélig (**gyomor mucin: pH-függő szol-gél átmenet, védelem az emésztés során!**)
- Töltés: erősen savas funkciós csoportok ($pK_a = 1,0-2,6$), fiziológias körülmények között erős nettó negatív töltés (kivéve gyomor)
- pH:
 - Tüdő, orr: 5,5-6,5
 - Szem: 7,8
 - Száj: 6,2-7,4
 - Gyomor: 1,0-7,0 (étkezéstől függ)
 - Vagina: 4,0-5,0 (terhesség alatt: 4,0 alatt, menopauza után 7,0 körüli)

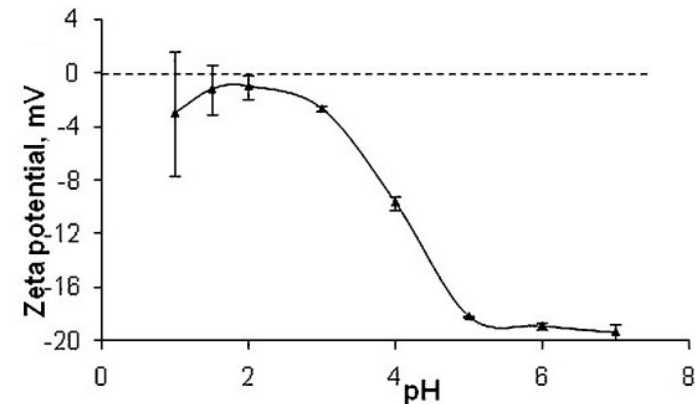
Gyorsan megújuló réteg: szemben 5-7 perc, légzőrendszerben 10-20 perc, GI traktusban 4-6 óra (átlagosan 200 mikronos réteg)

Mucin szerkezet a gyomor nyálkahártyában I



Asymmetric flow field flow fractionation (nagyon széles mérettartományon alkalmazható, nano-mikrorészecskék is)

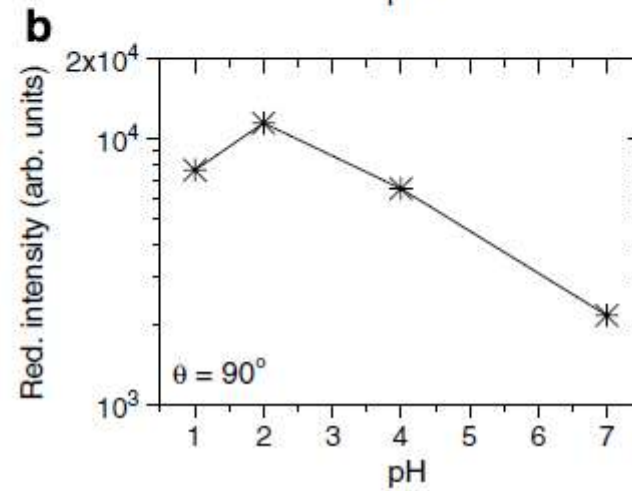
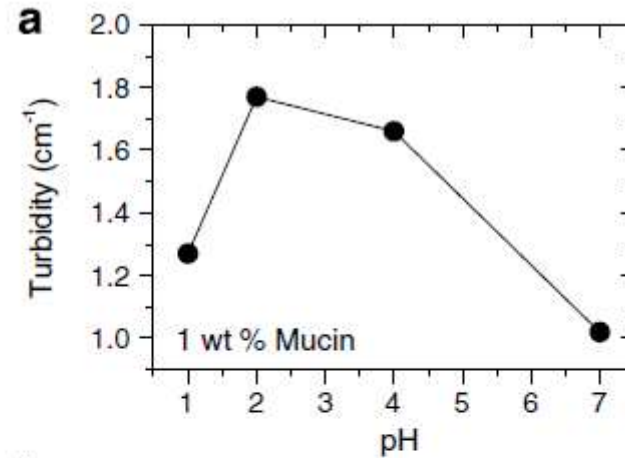
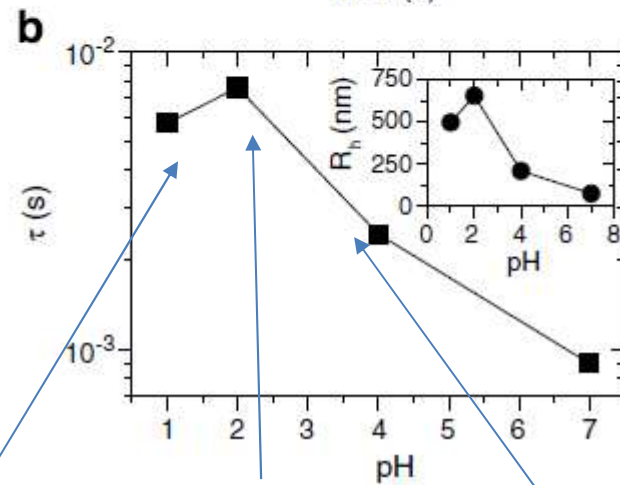
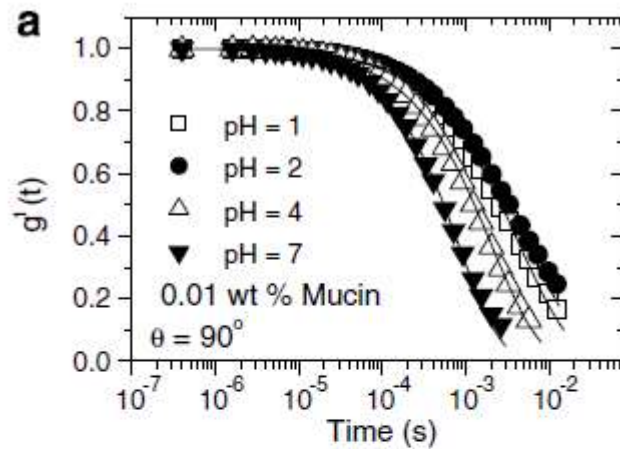
Transzmissziós elektronmikroszkópia



Maleki A, Lafitte G, Kjøniksen A-L, Thuresson K, Nyström B. Effect of pH on the association behavior in aqueous solutions of pig gastric mucin. Carbohydrate Research 2008;343:328-40.

Khutoryanskiy VV. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. Macromolecular Bioscience 2011;11:748-64.

Mucin szerkezet a gyomor nyálkahártyában II

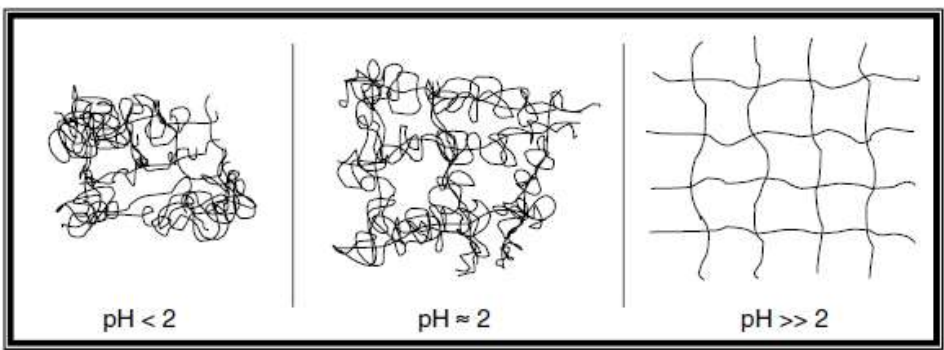
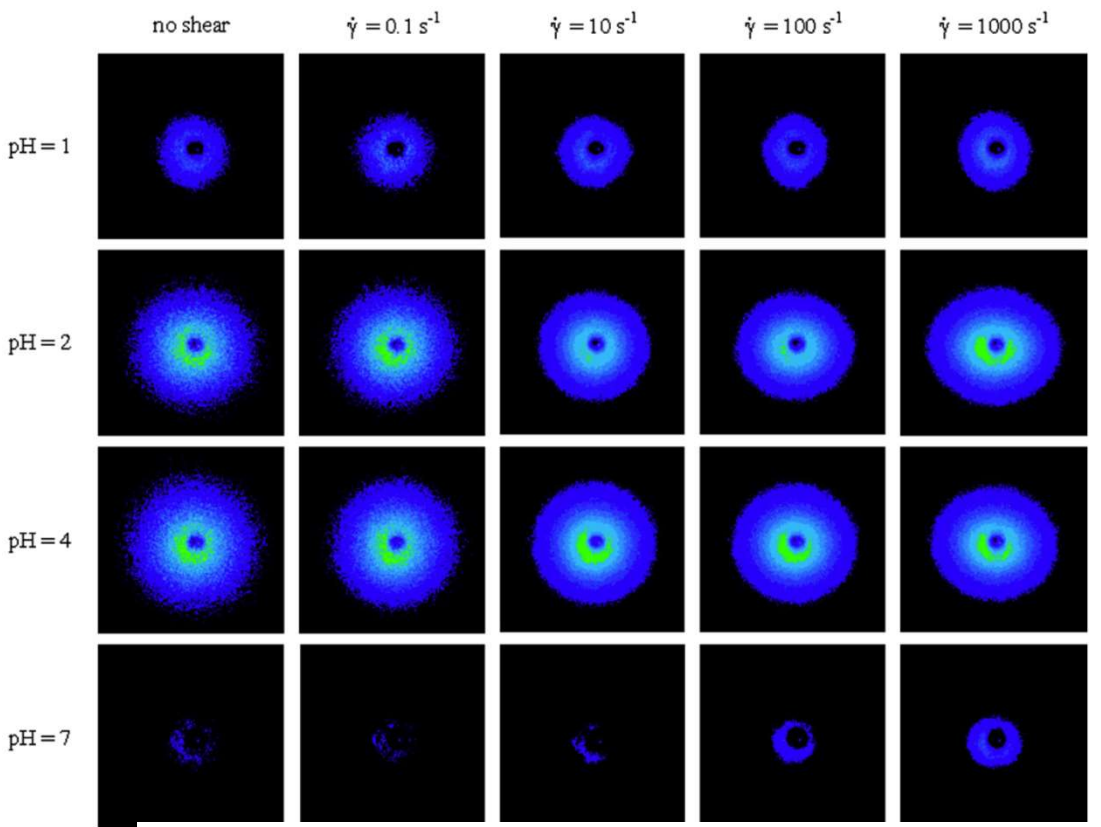
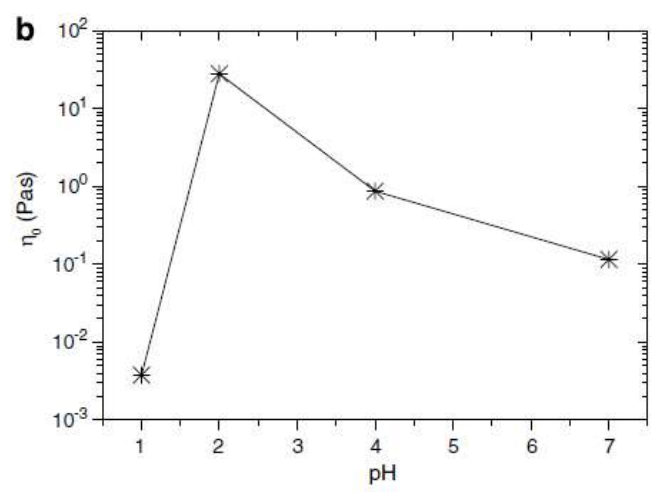
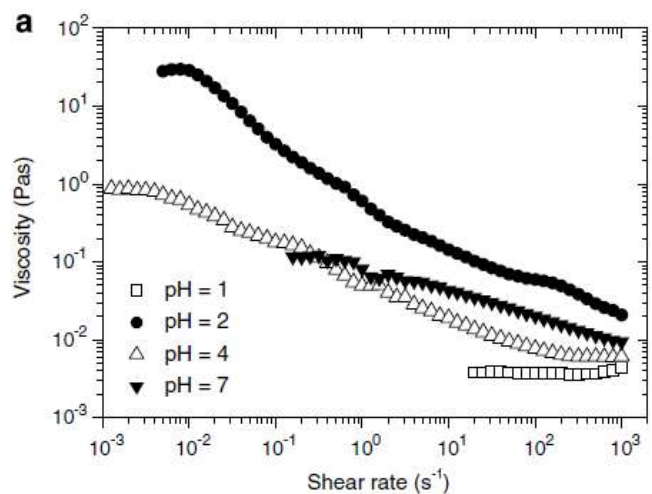


Hidrofób asszociáció

Pozitív töltés,
diszpergált rendszer

Negatív töltés,
diszpergált rendszer

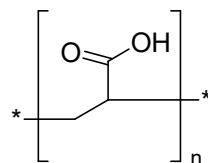
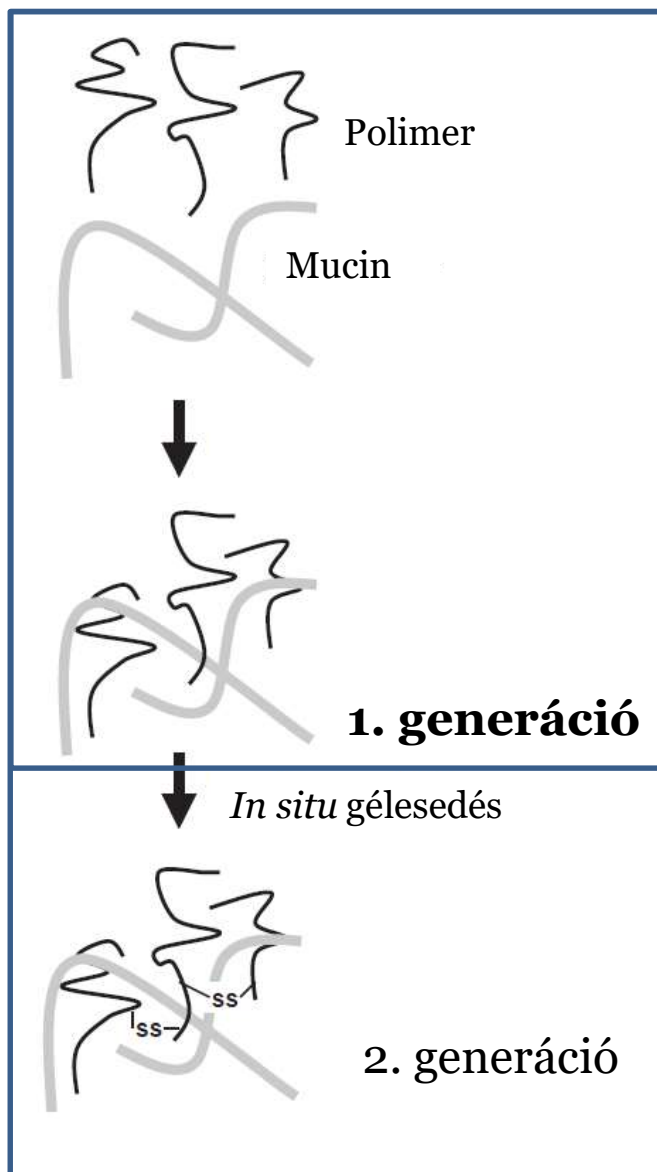
Mucin szerkezet a gyomor nyálkahártyában III



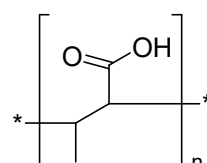
Csak erősen savas pH-n
newtoni profil

Maleki A, Lafitte G, Kjøniksen A-L, Thuresson K, Nyström B. Effect of pH on the association behavior in aqueous solutions of pig gastric mucin. Carbohydrate Research 2008;343:328-40.

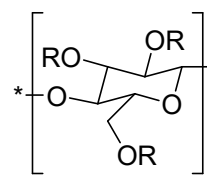
Mukoadhezív polimerek



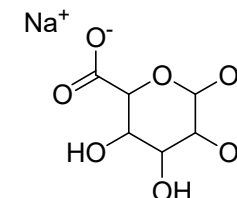
Poliakrilsav (PAA)



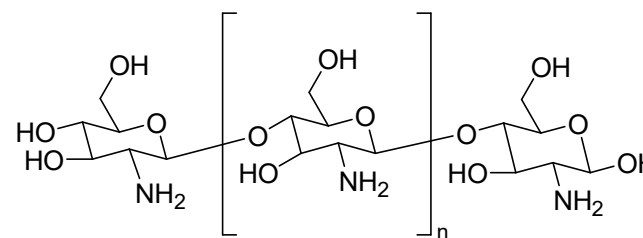
Polimetakrilsav (PAM)



R = H vagy CH₂CO₂H
Karboximetil-cellulóz



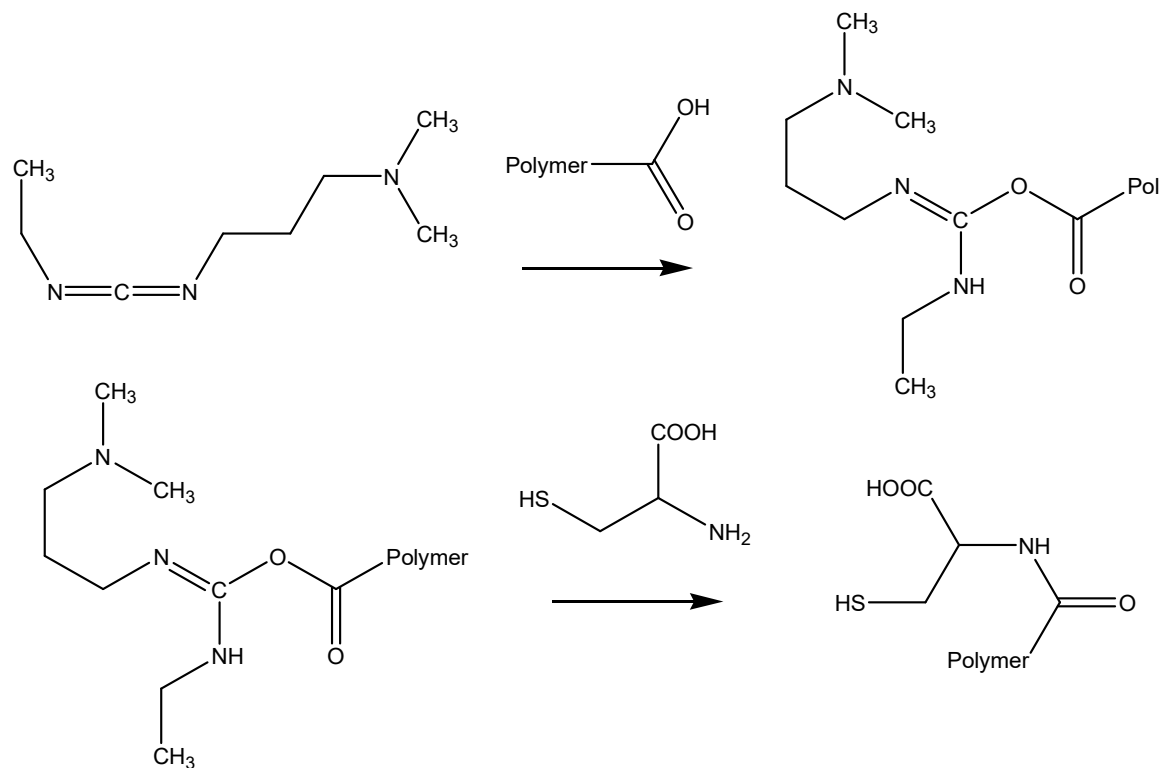
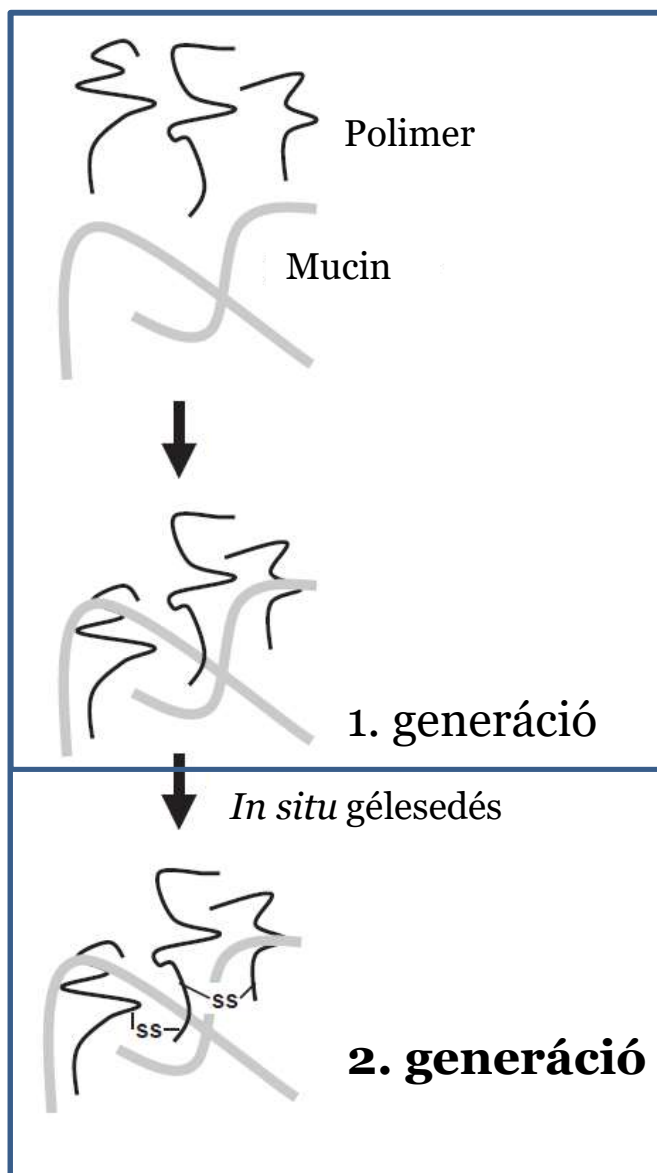
Nátrium-alginát



kitozán

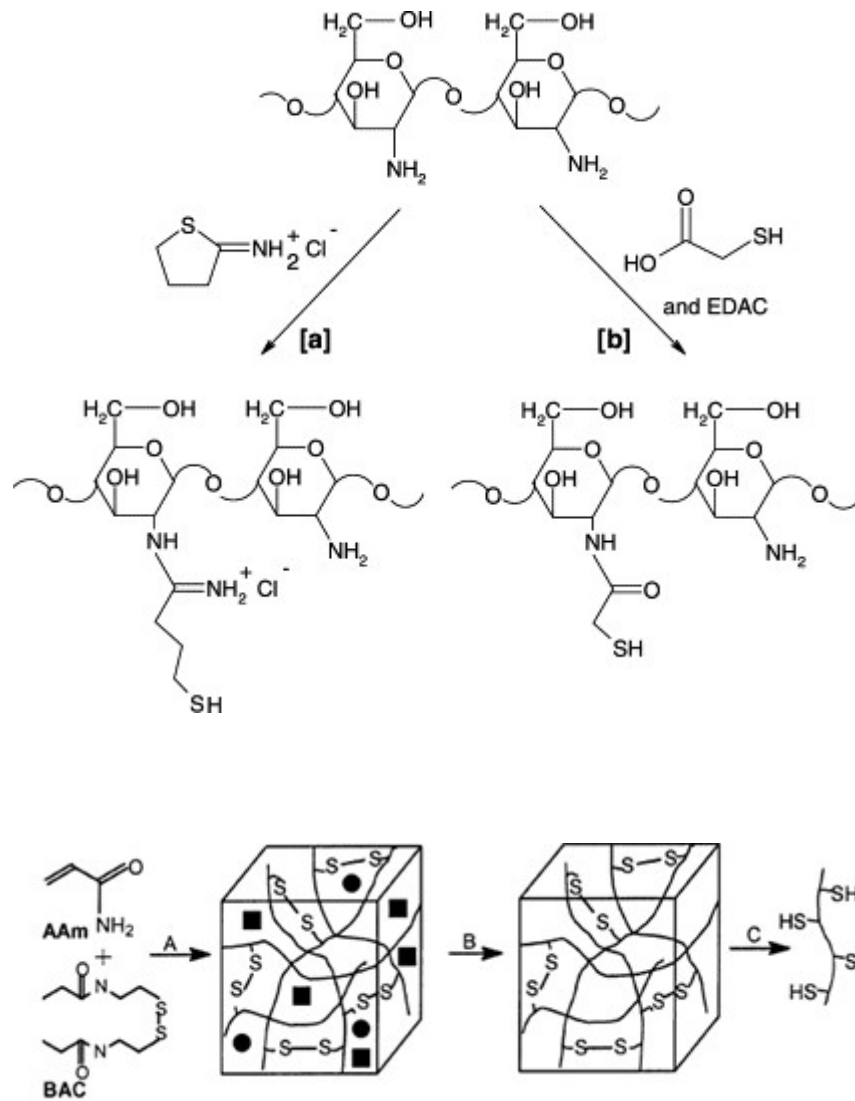
Negatív és pozitív töltésű polimerek is lehetnek mukoadhezívek!

Mukoadhezív polimerek



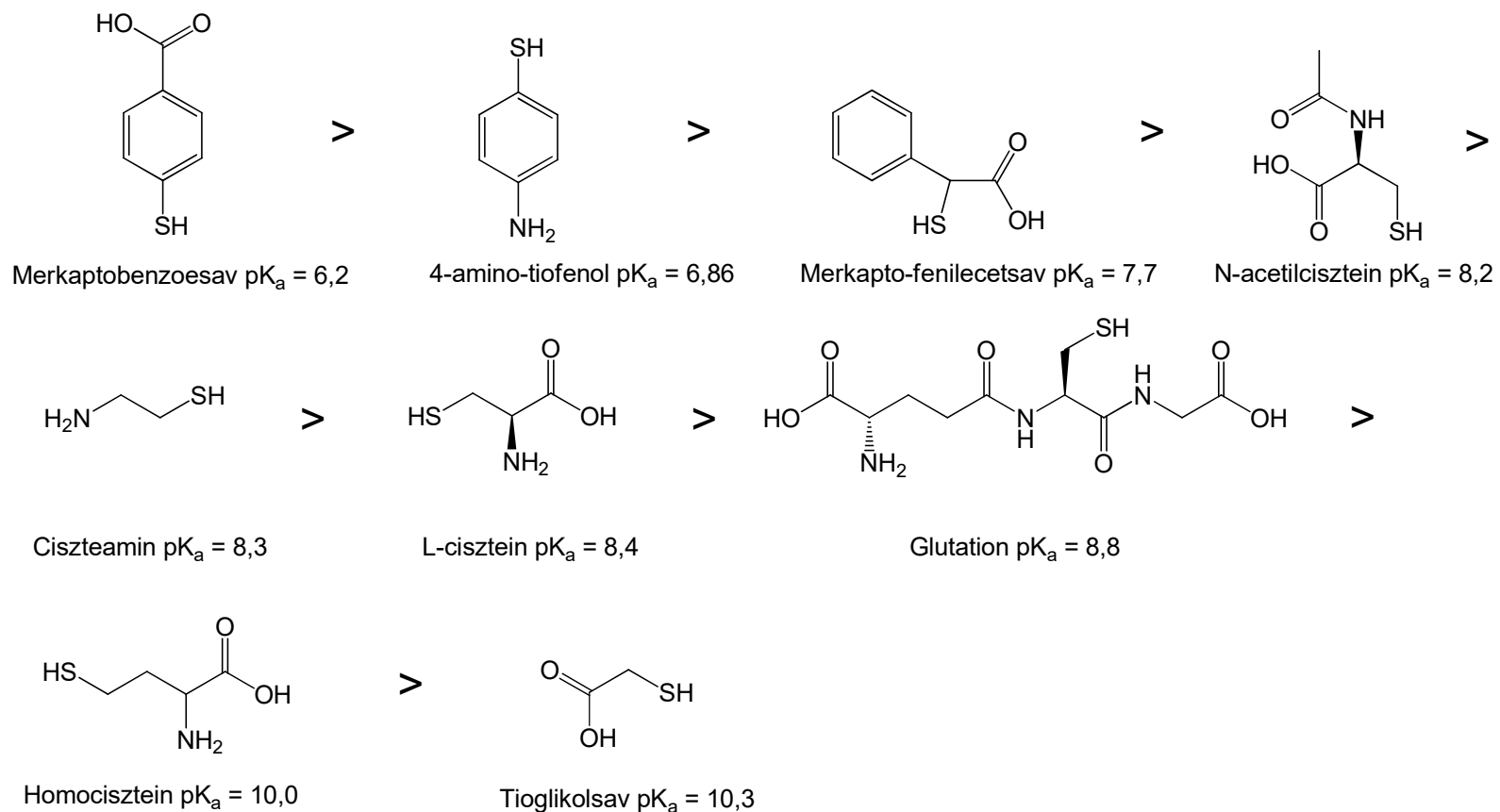
Bármely első generációs mukoadhezív polimer kémiai módosításával előállíthatóak (egyéb: lektinek, akrilátok, bakteriális fehérjék)

Tioltartalmú polimer előállítása

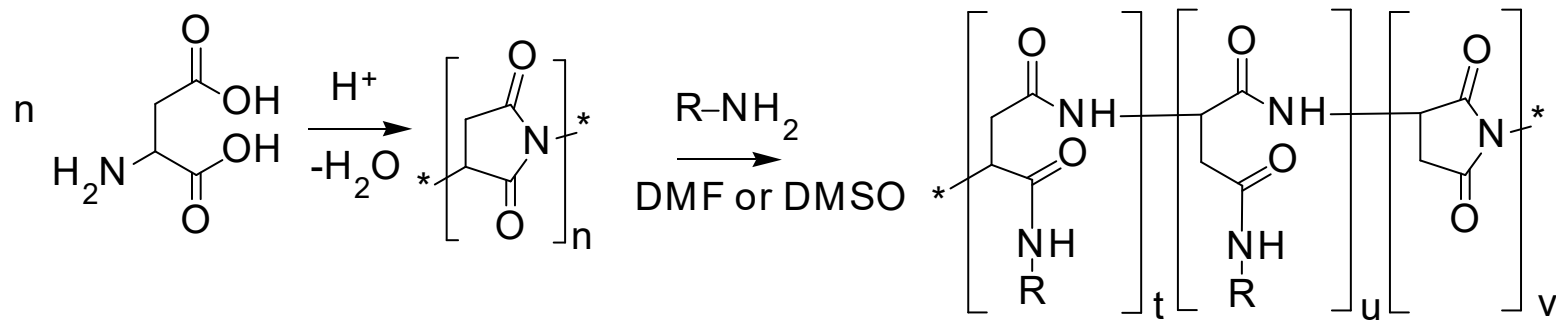


Amid kötés	a) Polkarbonsavak módosítása kismolekulás tiolokkal EDAC segítségével	
	b) Aminocsoportot tartalmazó kitozán módosítása 2-aminotiolámmal	
	c) Polietilén-glikol (PEG) és polietilén-imin (PEI) módosítása γ-tiobutiroktozzal	
Amid kötés	d) Kitozán reakciója izopropil-S-acetil-tioacetimiddal	
Amin kötés	e) Hidroxietil-cellulóz reakciója nátrium-perjodáttal és a képződő dialdehyd módosítása ciszteamminnal	
Brómozás	f) Hidroxietil-cellulóz brómozása LiBr, foszfor-ikl és N-bromo-szuccinimid segítségével, majd módosítása kismolekulás tiolal	

Kismolekulás módosítók, reaktivitás

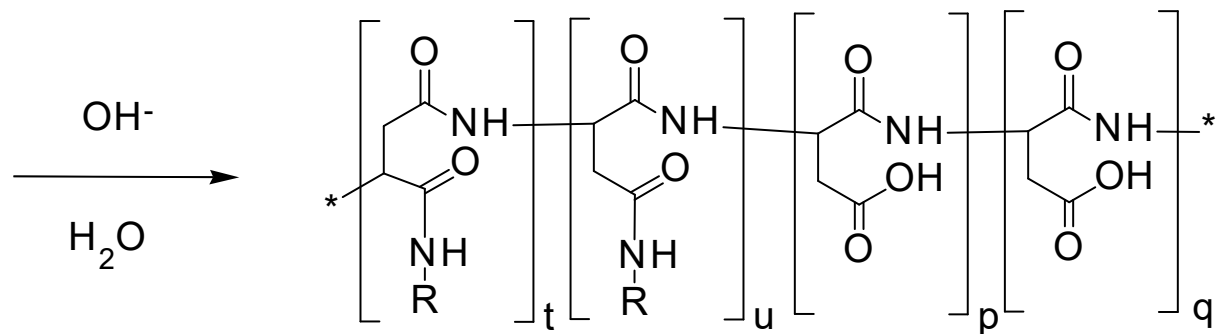


Poliaszparaginsav/poliaszpartamid kémia



Aszparaginsav Poliszukcinimid (PSI)

Módosított PSI



Módosított poliaszparaginsav (PASP)/poliaszpartamid

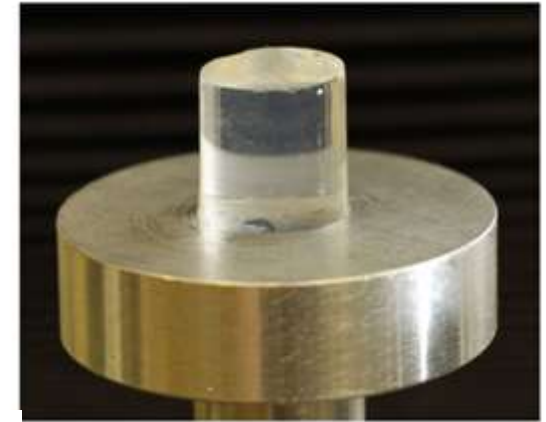
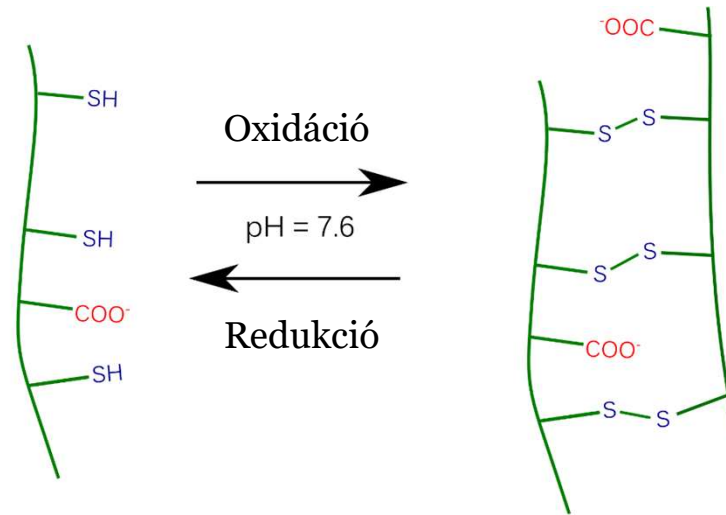
Gyarmati B, Vajna B, Némethy Á, László K, Szilágyi A. Redox- and pH-Responsive Cysteamine-Modified Poly(aspartic acid) Showing a Reversible Sol–Gel Transition. *Macromolecular Bioscience* 2013;13:633-40.

Németh C, Gyarmati B, Abdullin T, László K, Szilágyi A. Poly(aspartic acid) with adjustable pH-dependent solubility. *Acta Biomaterialia* 2017;49:486-94.

Oxidáció hatására gélesedő rendszerek



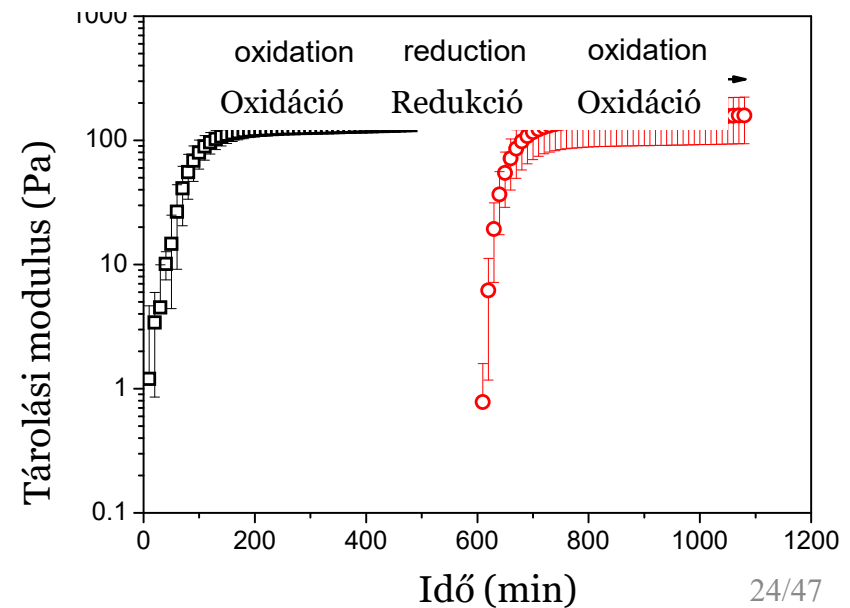
Tiolált PASP



Diszulfid híddal
térhálósított PASP

Folytatás: Aysel, Pesta Judit, Csobod Judit

Gyarmati B, Vajna B, Némethy Á, László K, Szilágyi A.
Redox- and pH-Responsive Cysteamine-Modified
Poly(aspartic acid) Showing a Reversible Sol–Gel Transition.
Macromolecular Bioscience 2013;13:633-40.



A mukoadhéziós kölcsönhatást befolyásoló szerkezeti tényezők – polimer oldalról

- Szilárd formulák

Általános móltömeghatár: 10 000 g/mol, max. 4 000 000 g/mol-ig

(kis móltömeg → gyors oldódás, nagy móltömeg → lassú interpenetráció)

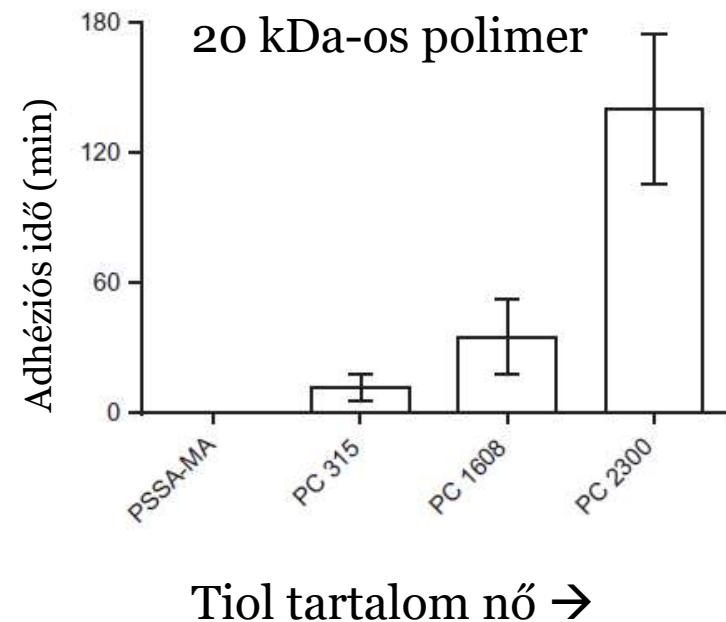
- Félszilárd készítmények

Kenőcsök (Orabase – CMC, zselatin, pektin paraffin bázisban)

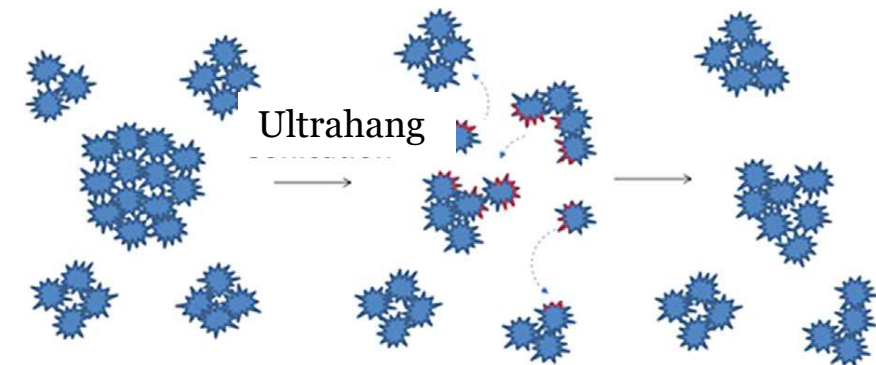
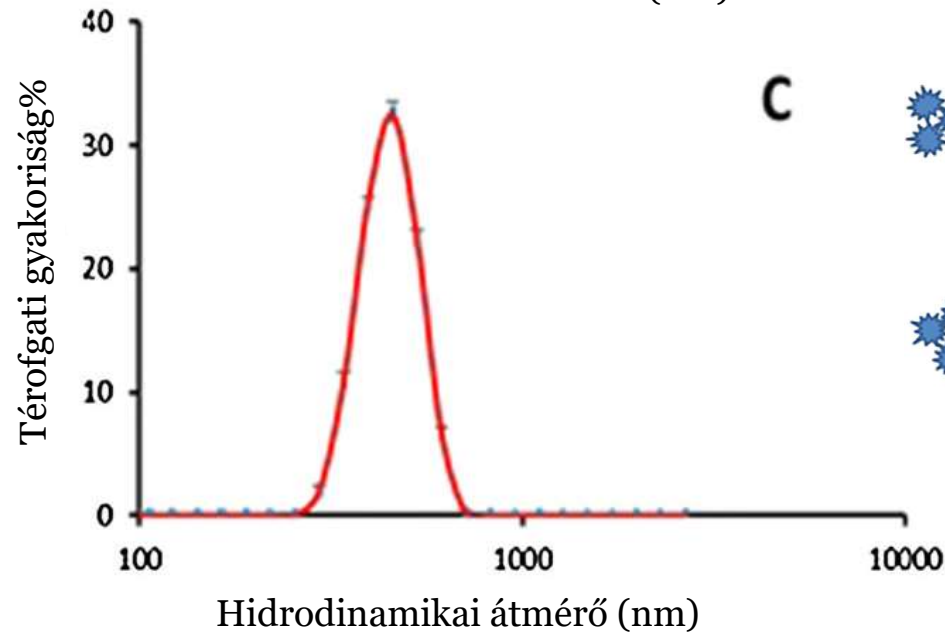
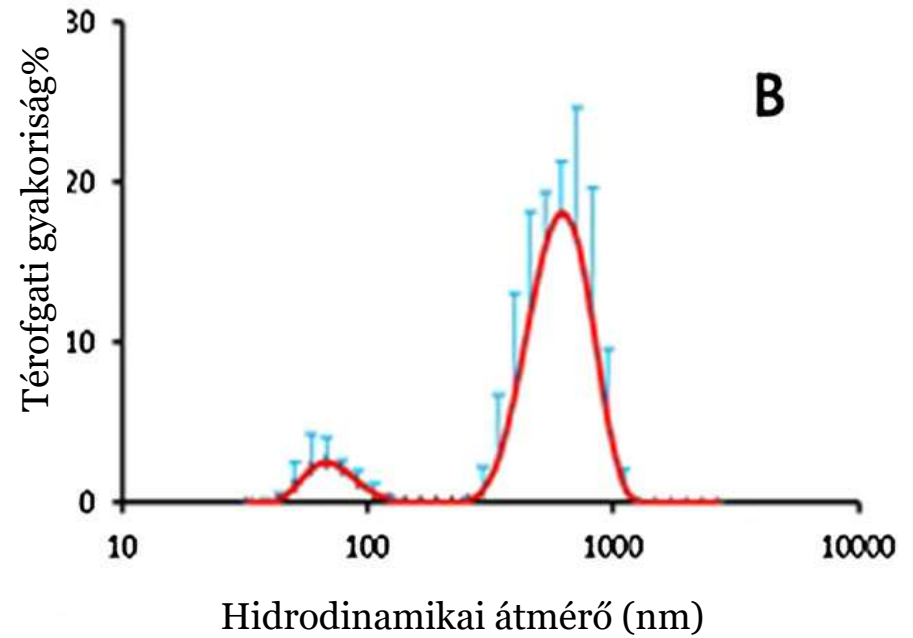
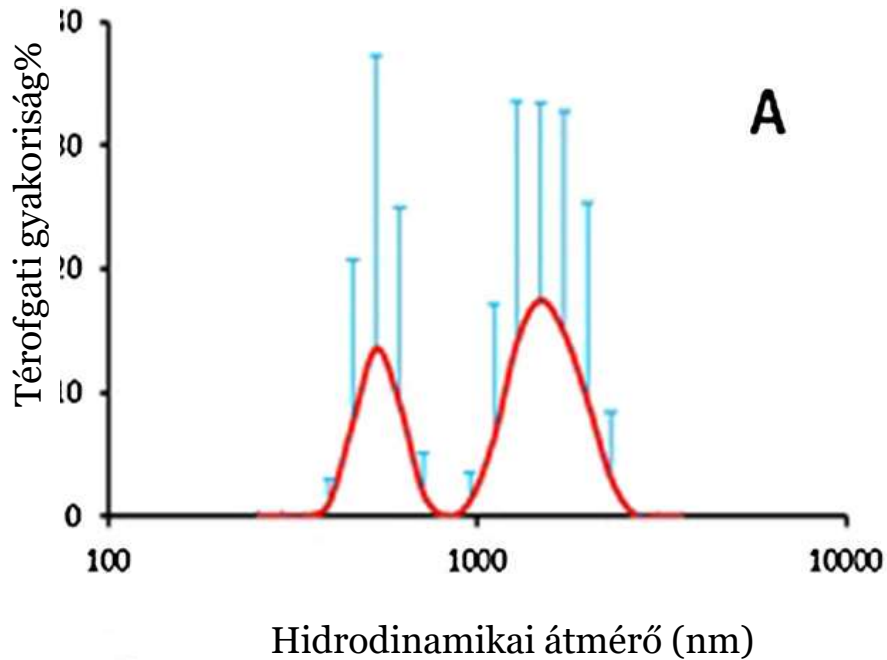
Gélszerű készítmények

- Folyadék készítmények

Kitozán tartalmú cseppek valamelyest kötődnek oldatból (kis viszkozitásúból is), de nagy részük az oldható mucinhoz kötődik, nagy a lemosódás aránya

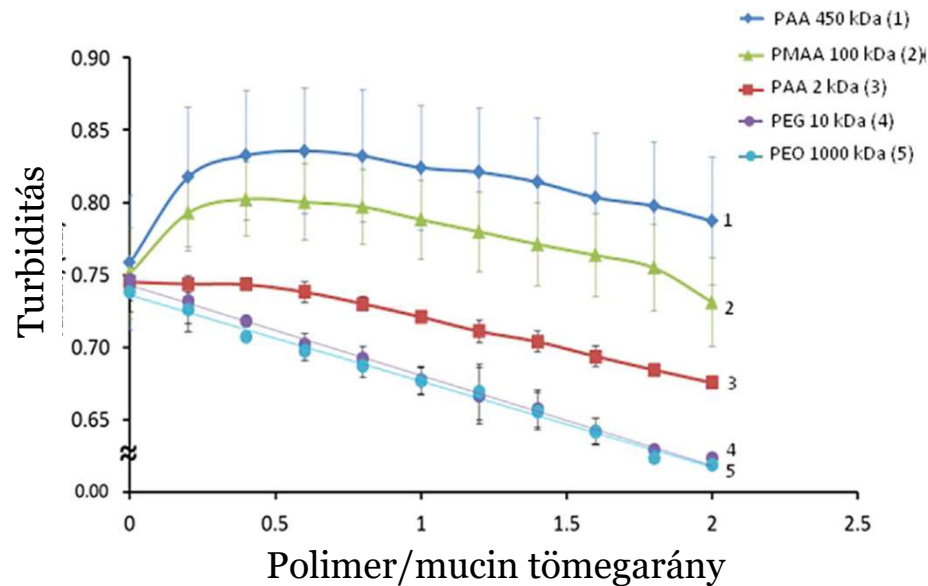


Mukoadhézió kolloid tartományon I

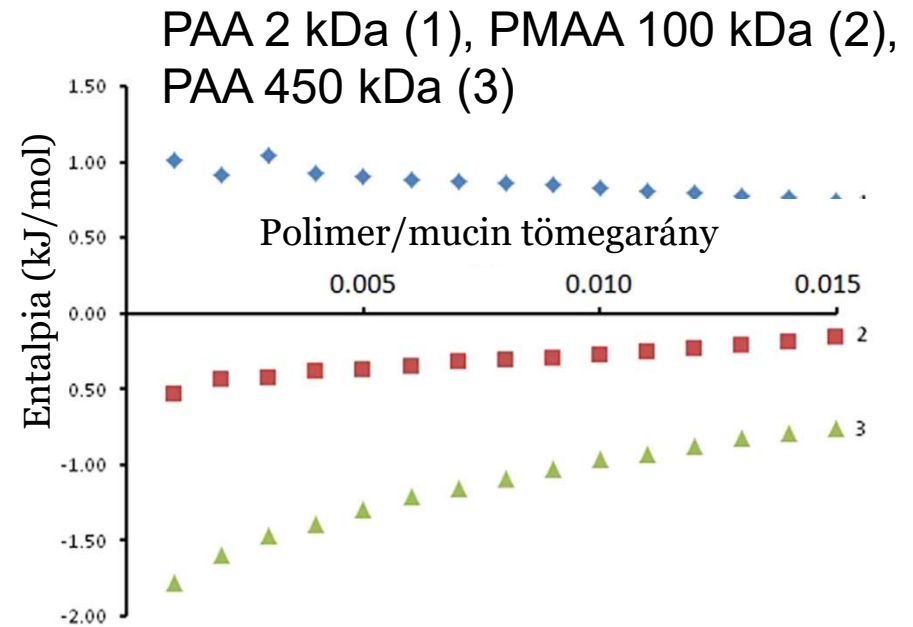


Albarkah YA, Green RJ, Khutoryanskiy VV.
Probing the Mucoadhesive Interactions Between
Porcine Gastric Mucin and Some Water-Soluble
Polymers. *Macromolecular Bioscience* 2015;15:1546-53. 26/47

Mukoadhézió kolloid tartományon II



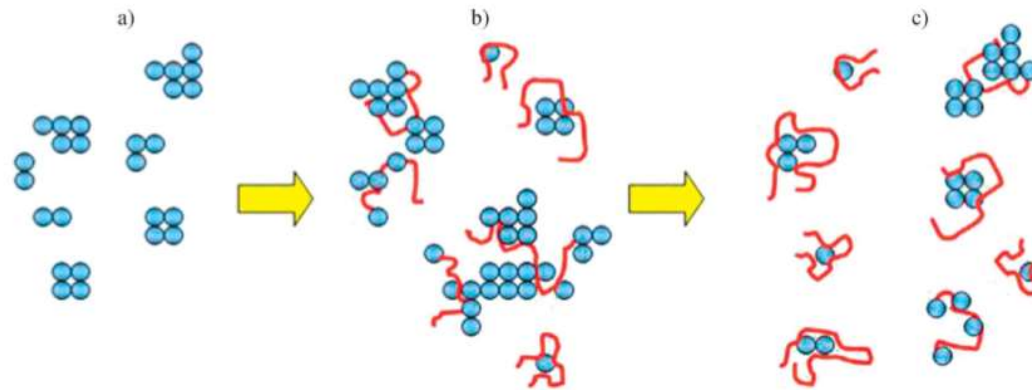
Turbiditás maximum:
aggregátumok kialakulása,
majd hígulás



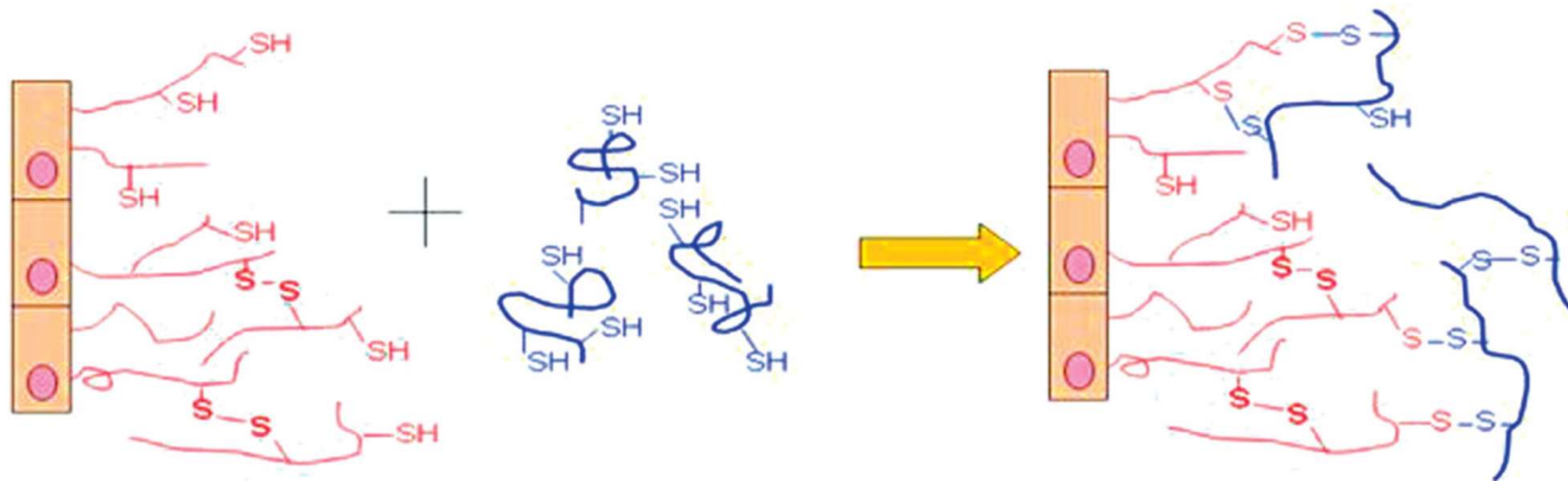
Molekulatömeg- és
szerkezetfüggő kölcsönhatás-
erősség

Mukoadhézió kolloid tartományban III

Kölcsönhatás polielektrolitokkal

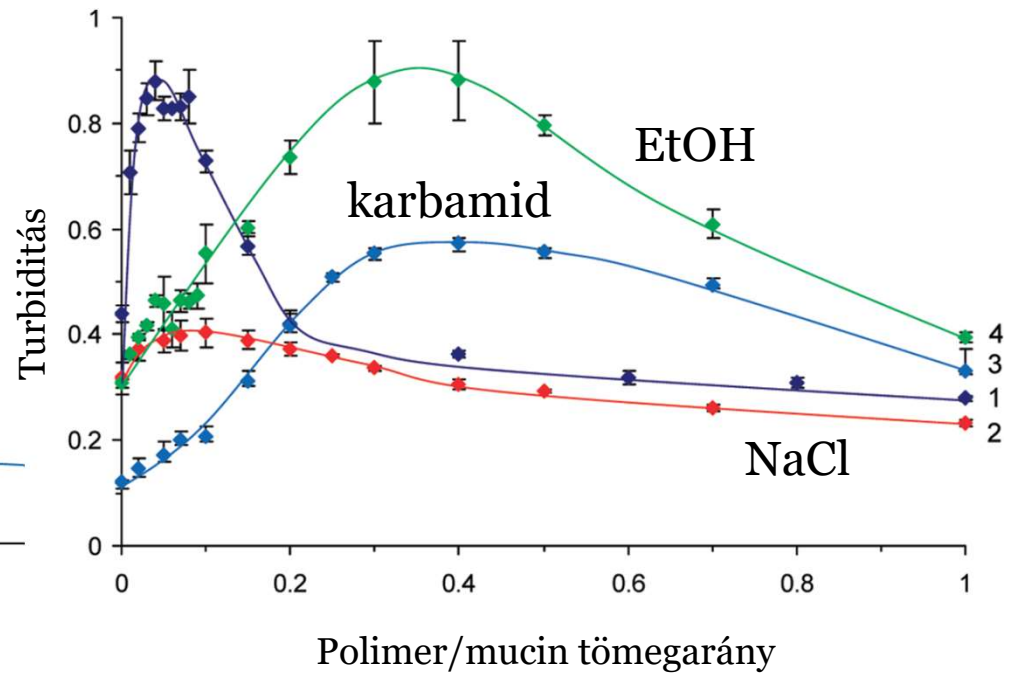
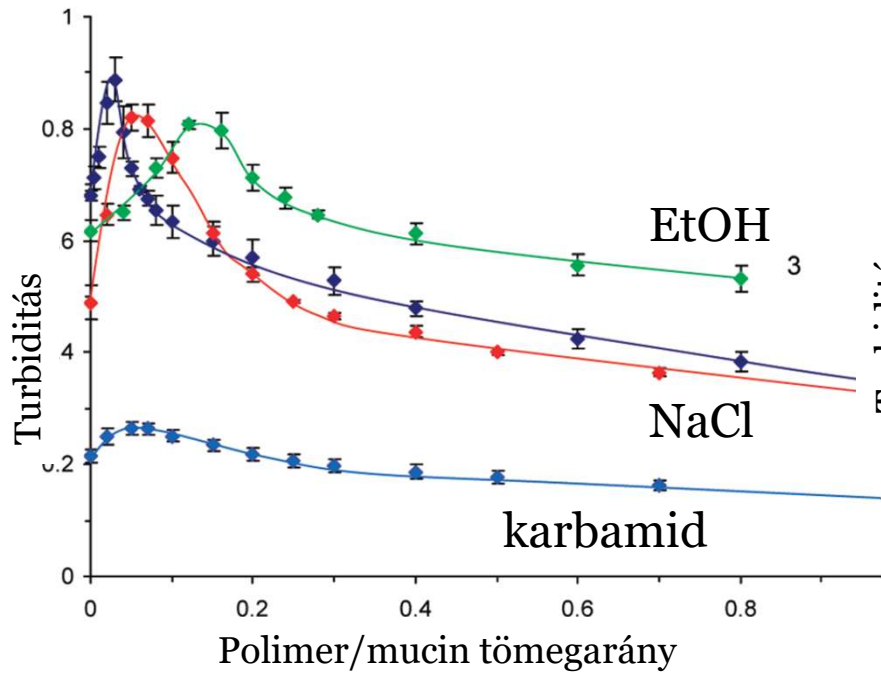


Kölcsönhatás diszulfidhídon keresztül



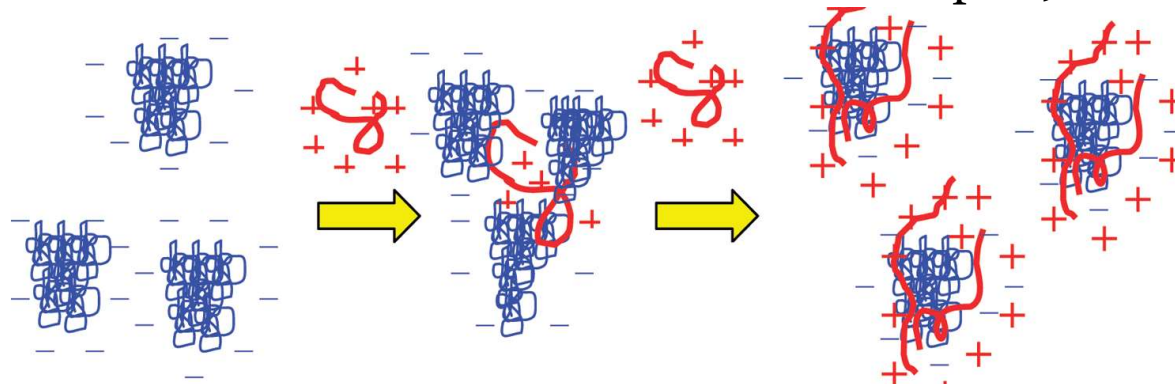
Albarkah YA, Green RJ, Khutoryanskiy VV. Probing the Mucoadhesive Interactions Between Porcine Gastric Mucin and Some Water-Soluble Polymers. *Macromolecular Bioscience* 2015;15:1546-53.

Mukoadhézió kolloid tartományban IV

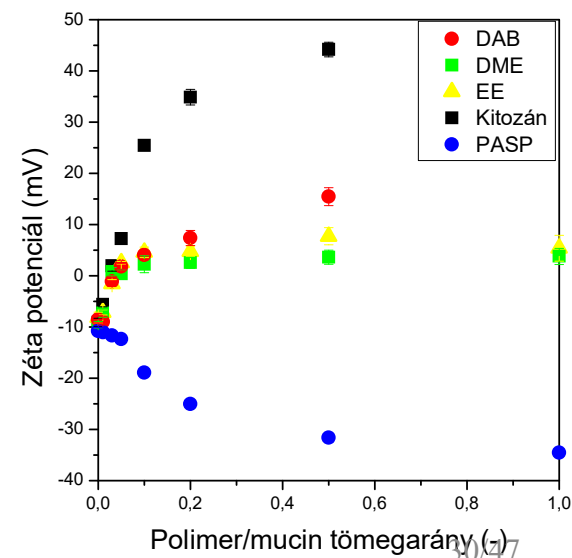
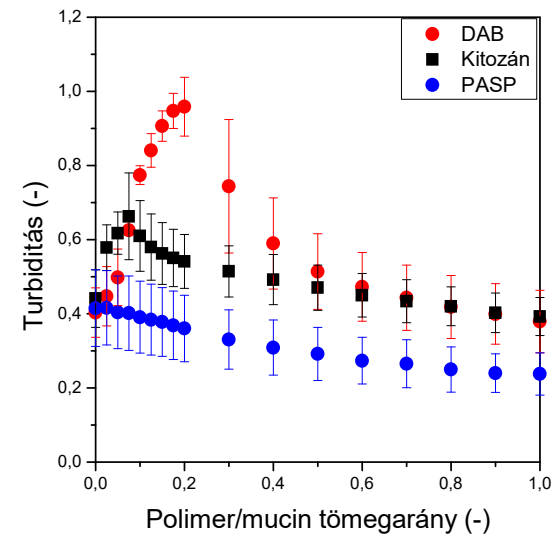
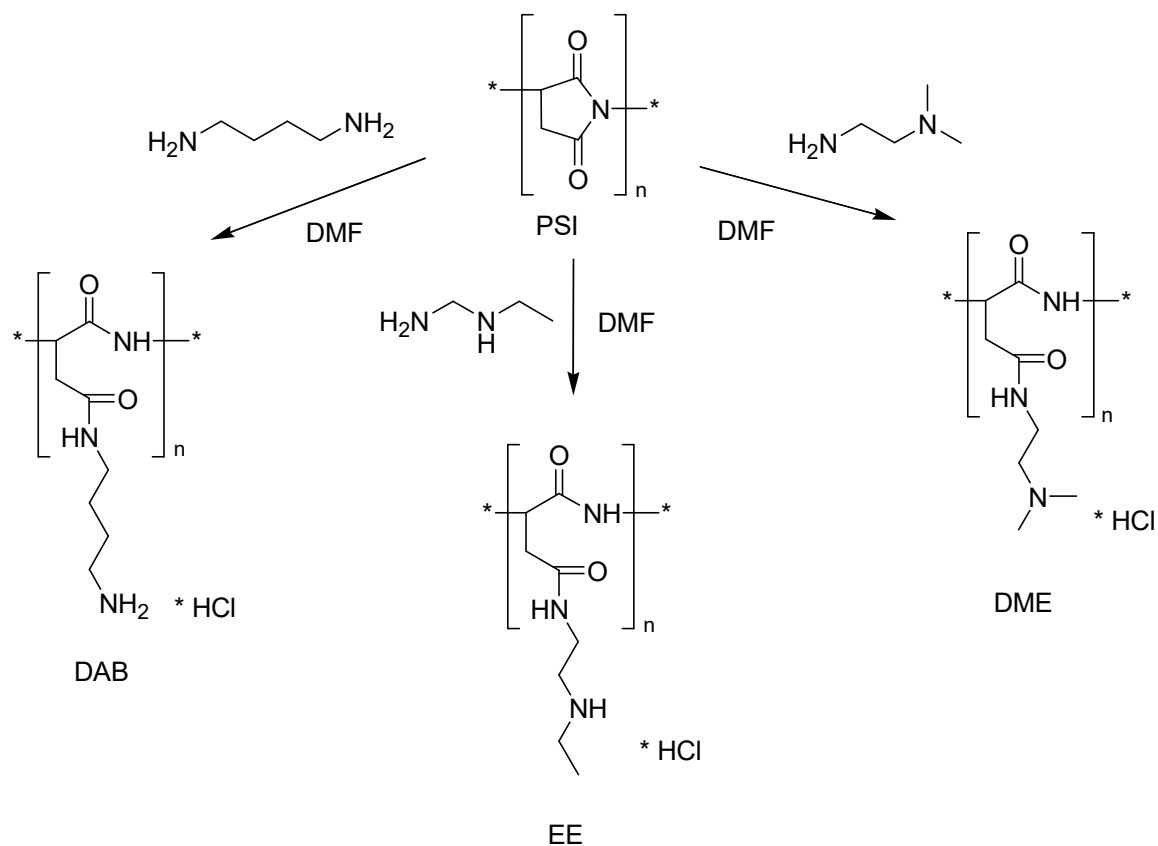


Kitozán (szabad amin csoportok)

Félig acetilezett kitozán (kevesebb szabad amin csoport)



Poliaszpartamidok kölcsönhatása mucinnal (Orovecz Viki, Szilágyi Barnabás)

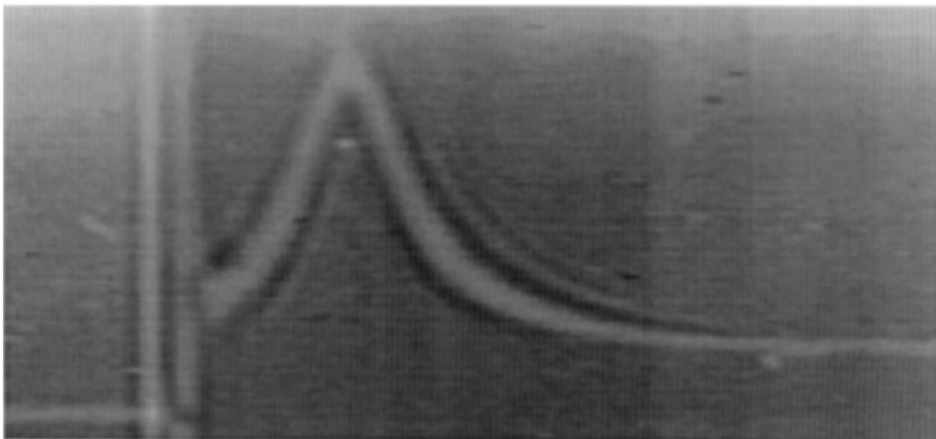
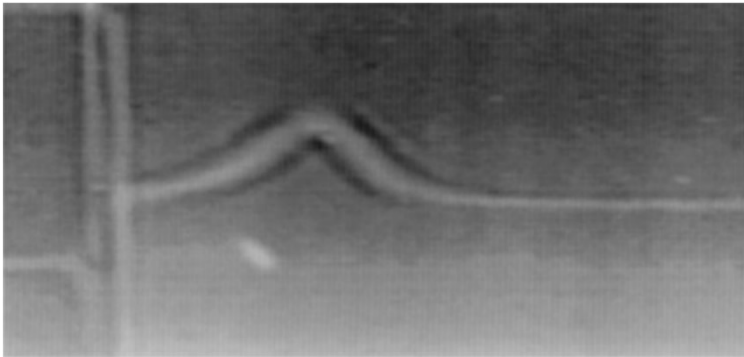


Folytatás: Stankovits Gergő (Reading), Erdős Dóra

Orovecz Viktória diplomamunka, Szilágyi B. közlésre beküldött publikáció

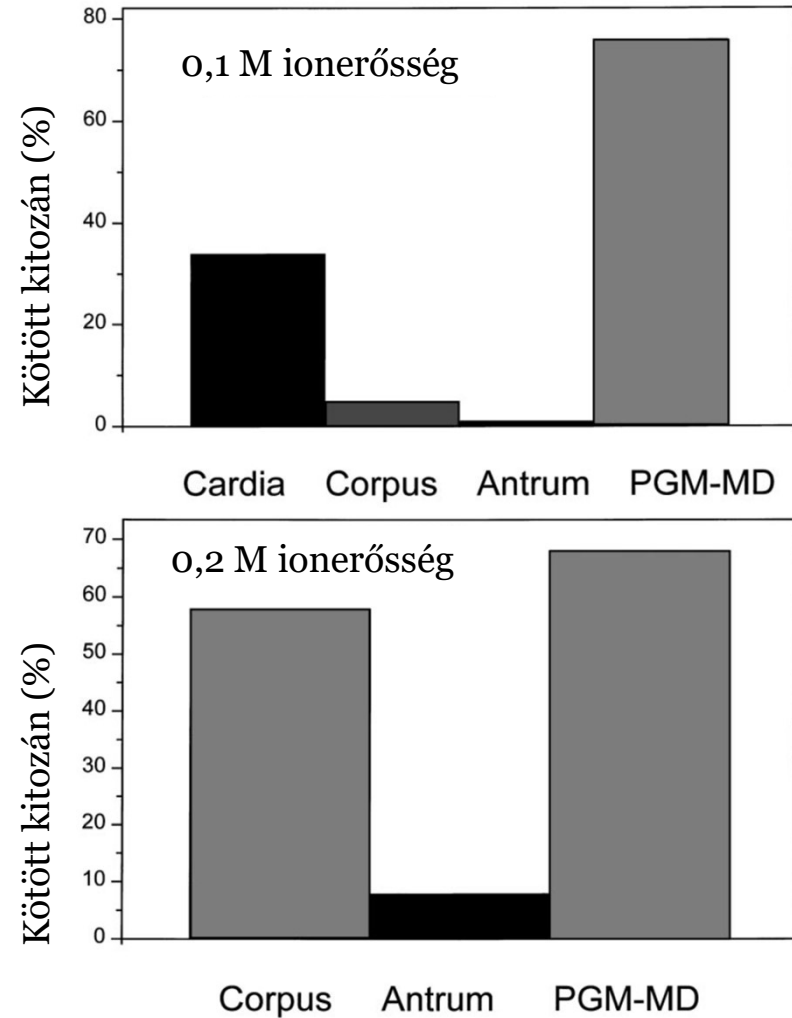
Mukoadhézió mérése II

Mucin + kitozán



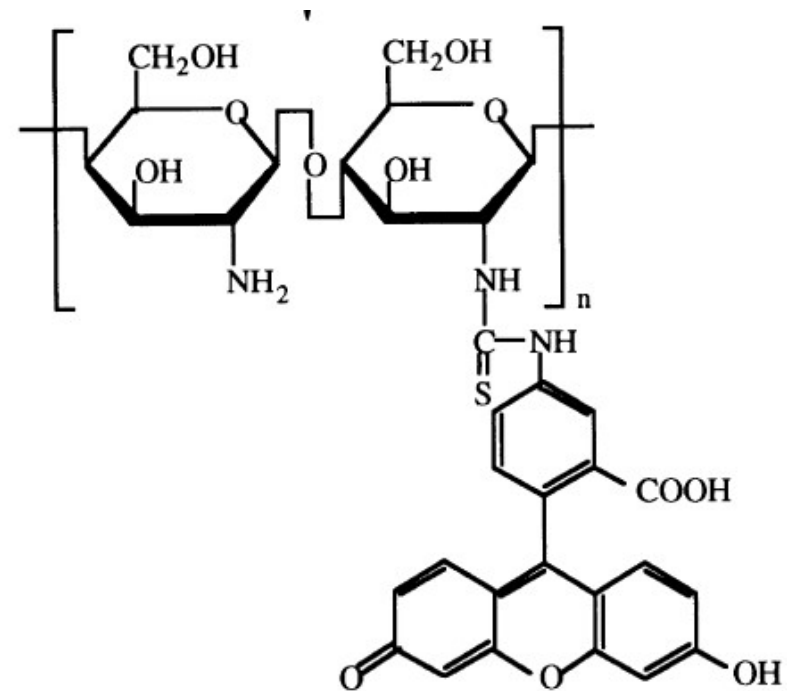
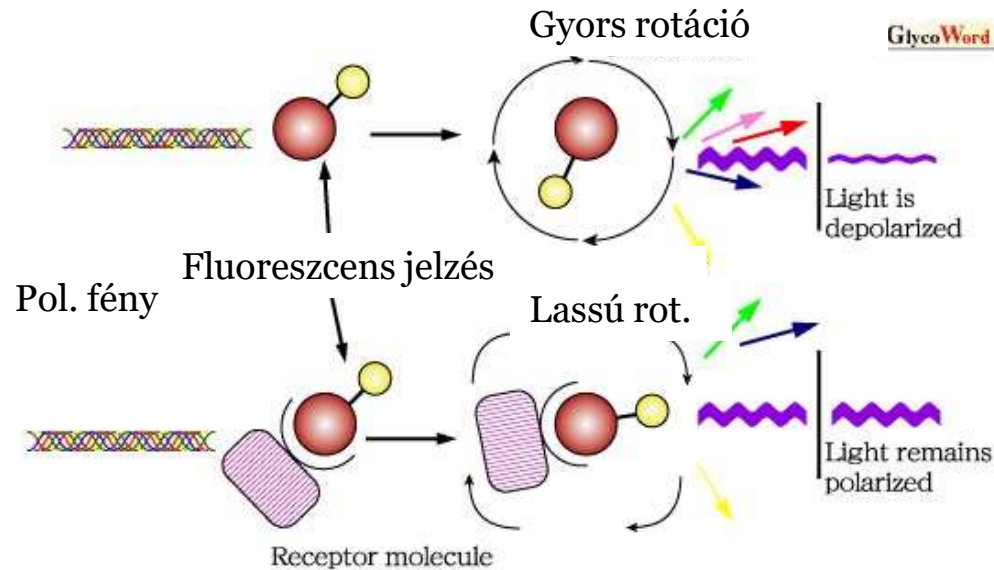
Kitozán kontroll

Ultracentrifuga, dn/dr mérése (törésmutató változása)



Deacon MP, Davis SS, White RJ, Nordman H, Carlstedt I, Errington N, et al. Are chitosan–mucin interactions specific to different regions of the stomach? Velocity ultracentrifugation offers a clue. *Carbohydrate Polymers* 1999;38:235-8.

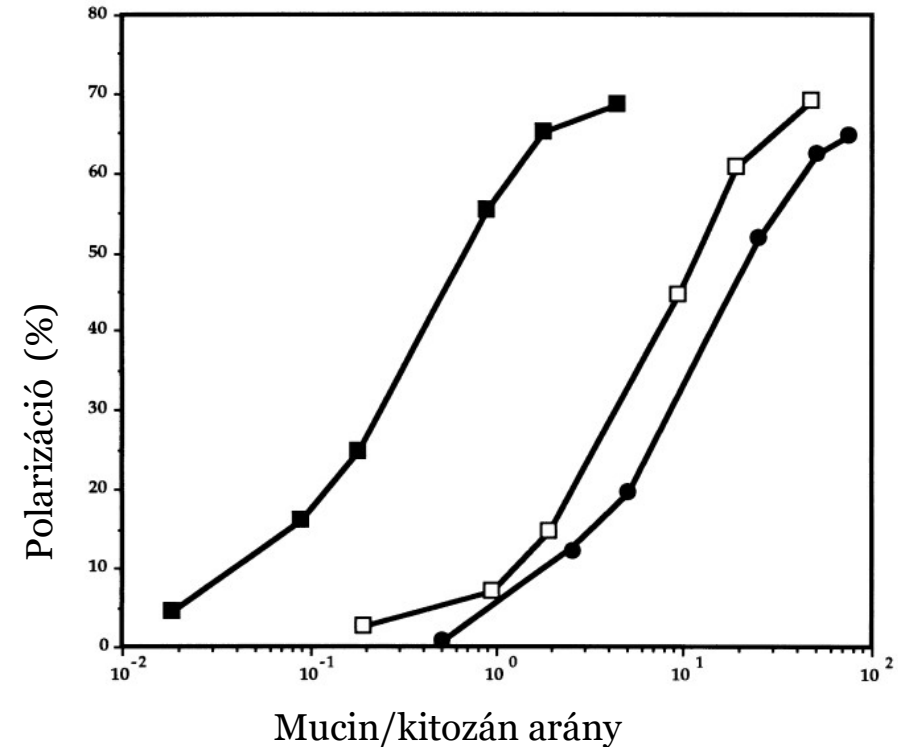
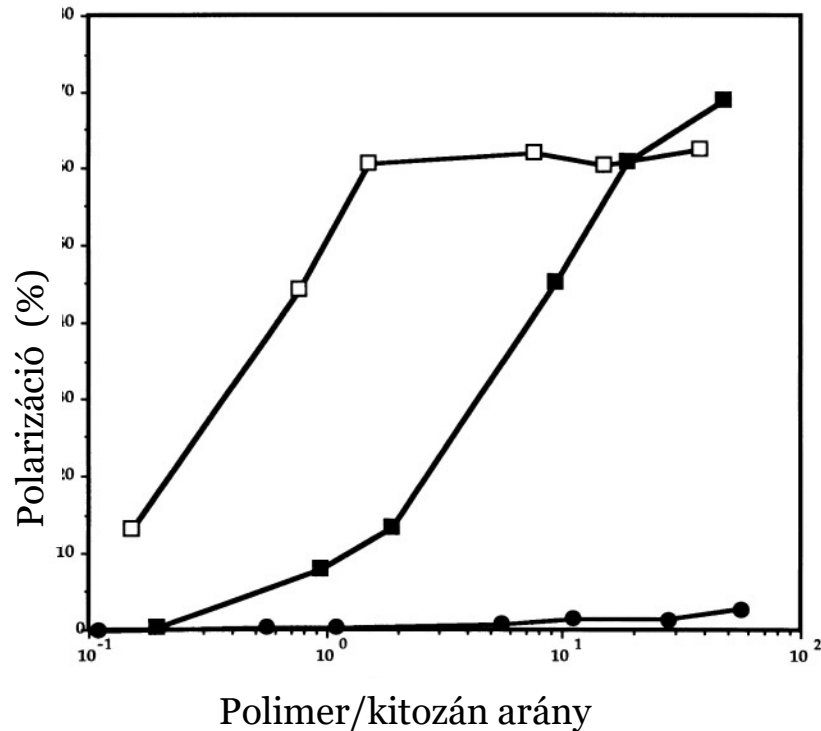
Mukoadhézió mérése III – Fluoreszcencia depolarizáció



Fluoreszcens kitozán

- Kismolekulák esetén gyors depolarizáció
- Makromolekulák esetén maradó polarizáció, steady-state mérhető

Mukoadhézió mérése III – Fluoreszcencia depolarizáció

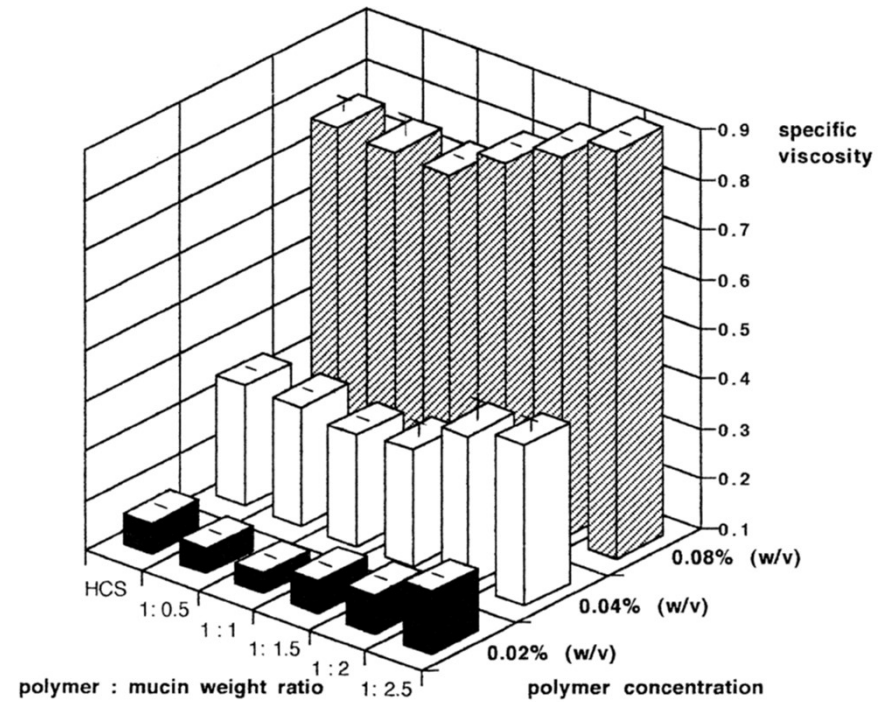
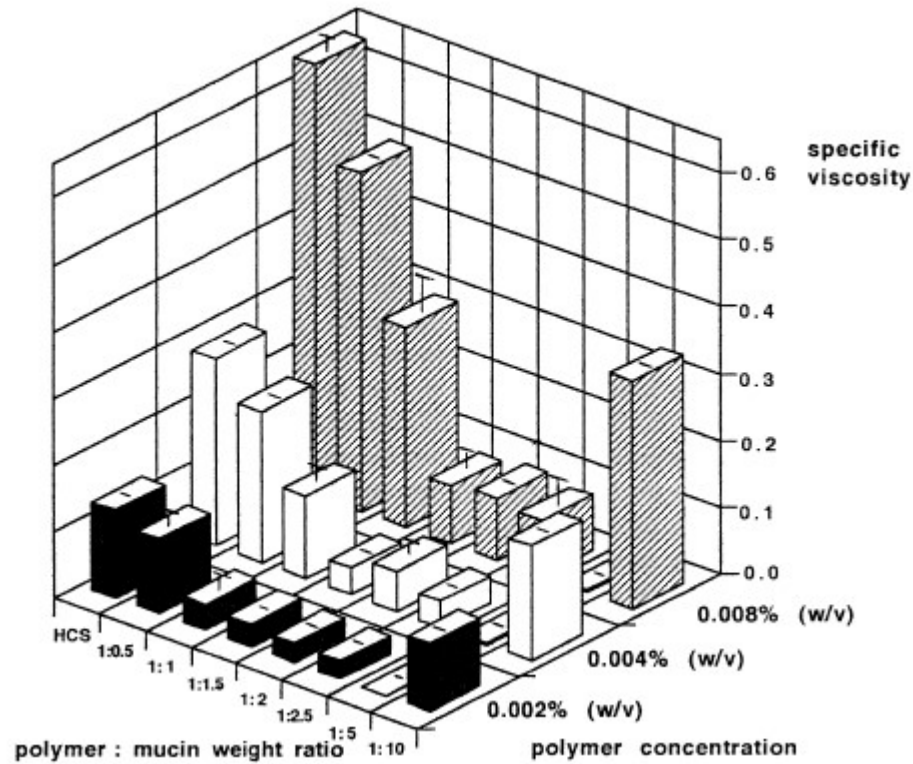


Kitozán: polikation

- Negatív kontroll: albumin
- Pozitív kontroll: dextrán szulfát (polianion)

Növekvő molekulatömeggel (jobbra) növelhető a mukoadhézió mértéke (több kölcsönhatási pont)

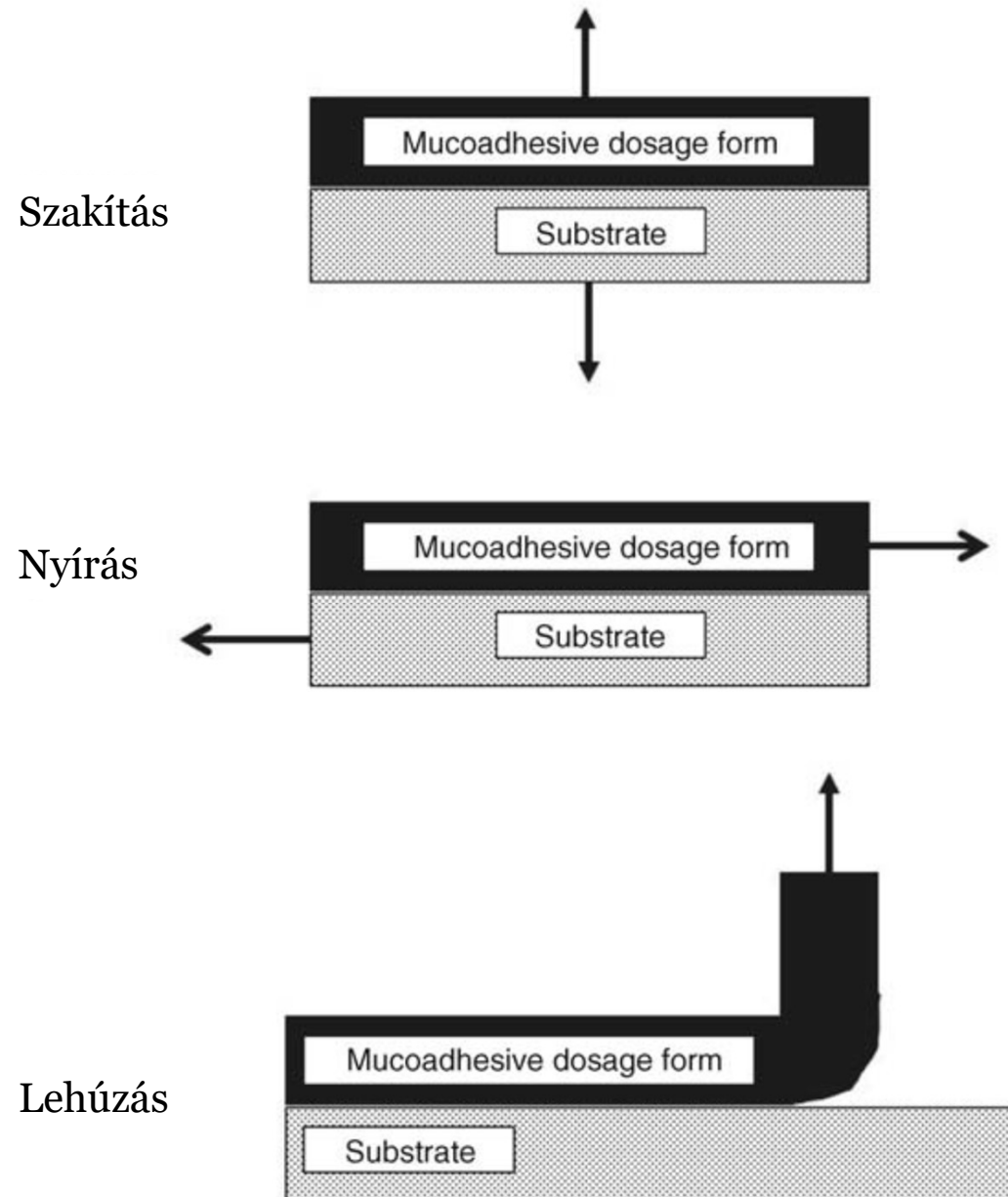
Mukoadhézió mérése IV – Viskozimetria



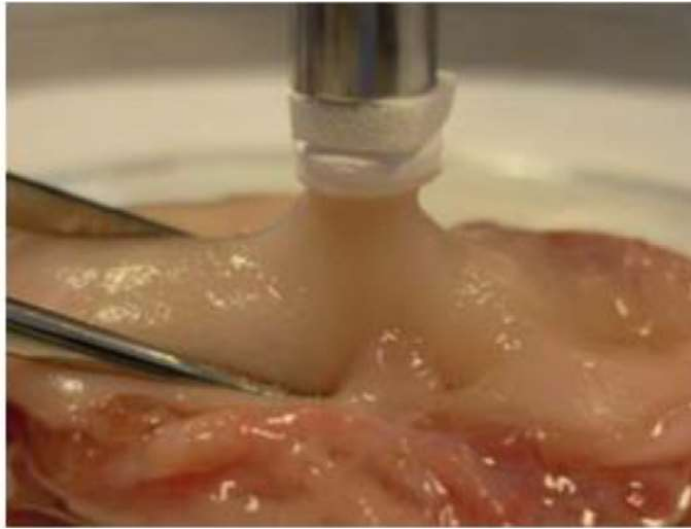
A viszkozitás kapcsolatba hozható az oldatban (szolban) lévő részecskék mennyiségével

$$\eta = \eta_0 (1 + 5/2\phi)$$

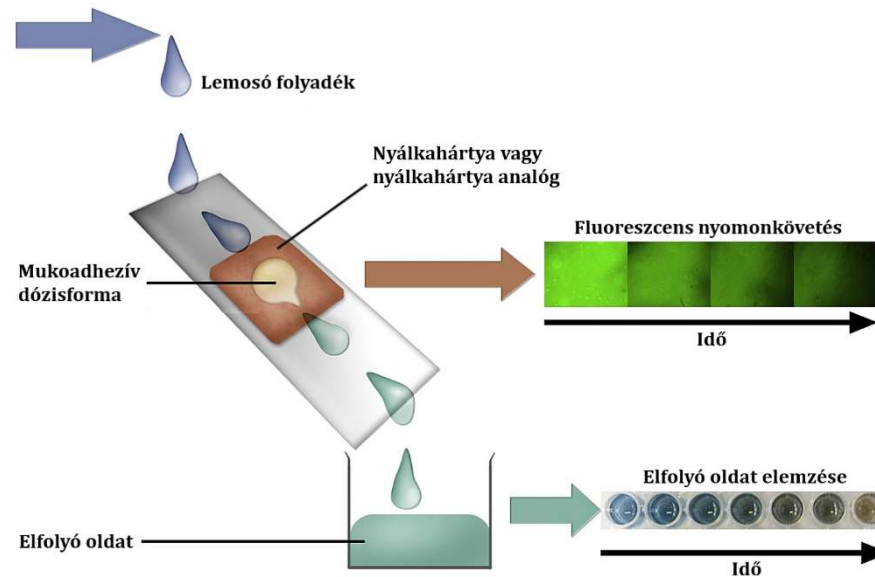
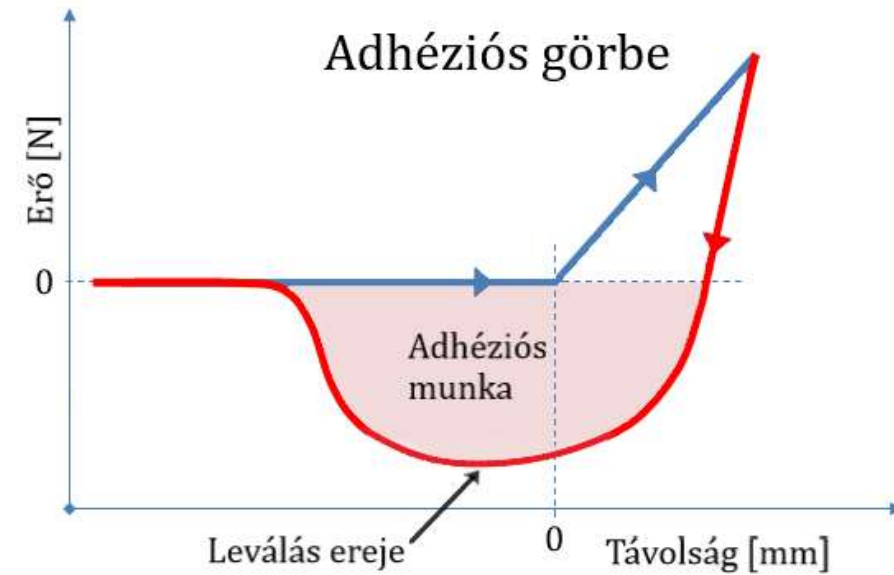
Mukoadhézió számszerűsítése makroszkopikusan



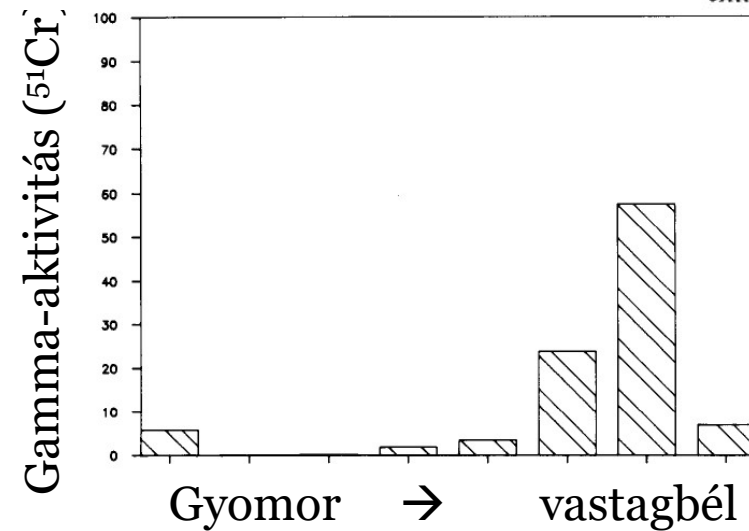
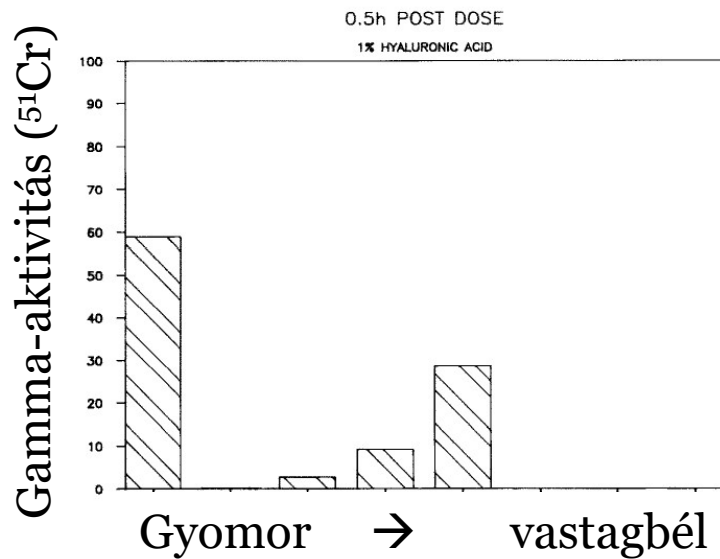
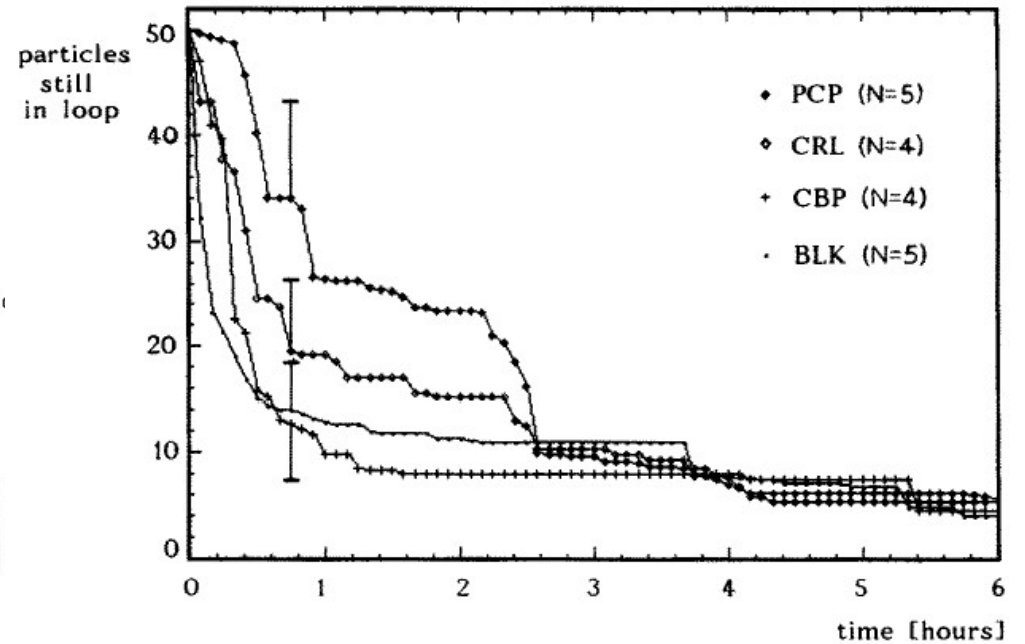
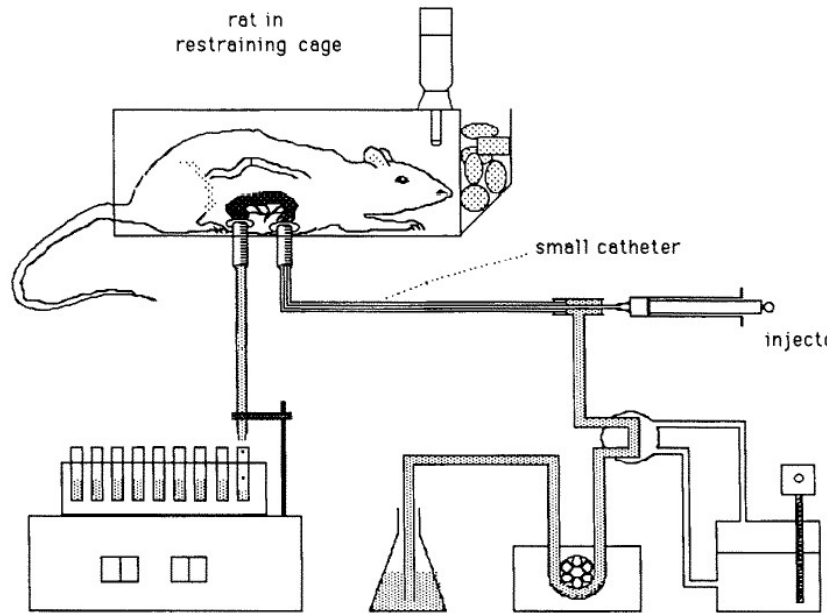
Mechanikai mérések, ex vivo



Szakító vizsgálat

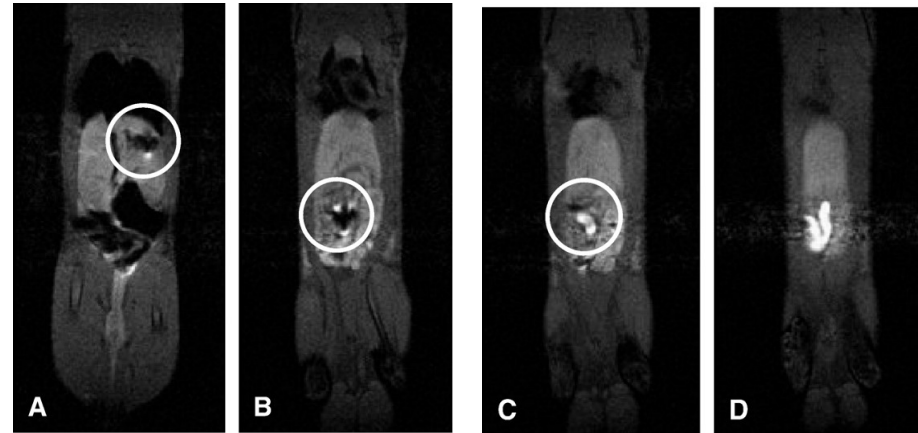


In vivo mérések

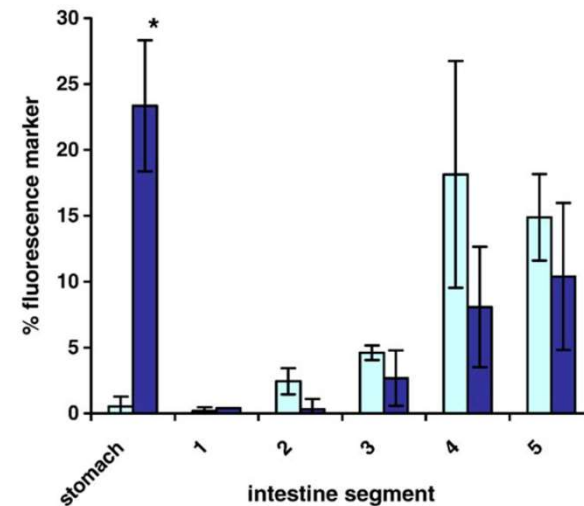
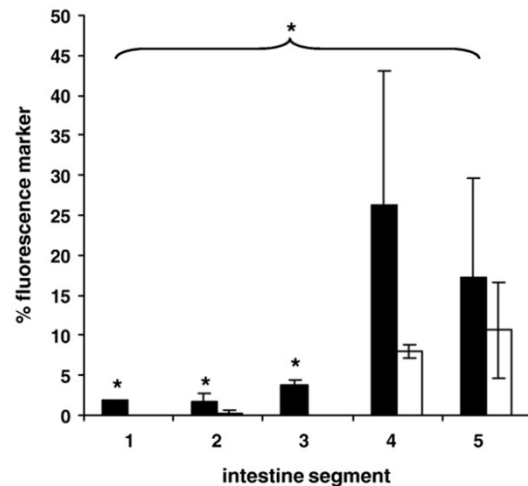


Harris D, Fell JT, Taylor DC, Lynch J, Sharma HL. GI transit of potential bioadhesive systems in the rat. *Journal of Controlled Release* 1990;12:55-65., Lehr C-M, Bouwstra JA, Tukker JJ, Junginger HE. Intestinal transit of bioadhesive microspheres in an in situ loop in the rat.... *Journal of Controlled Release* 1990;13:51-62.

In vivo mérések II



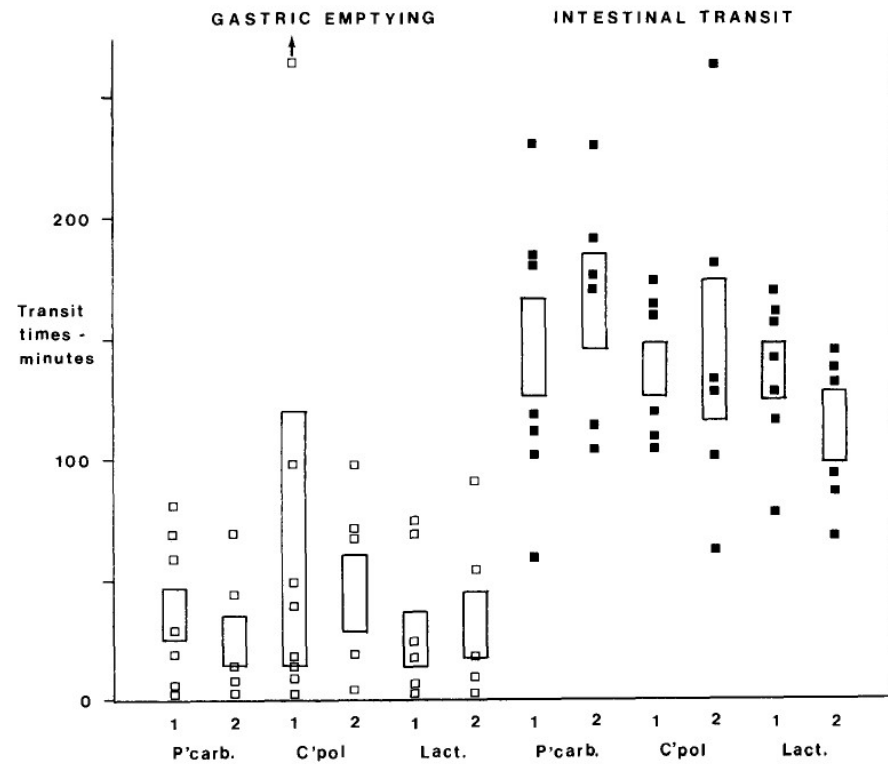
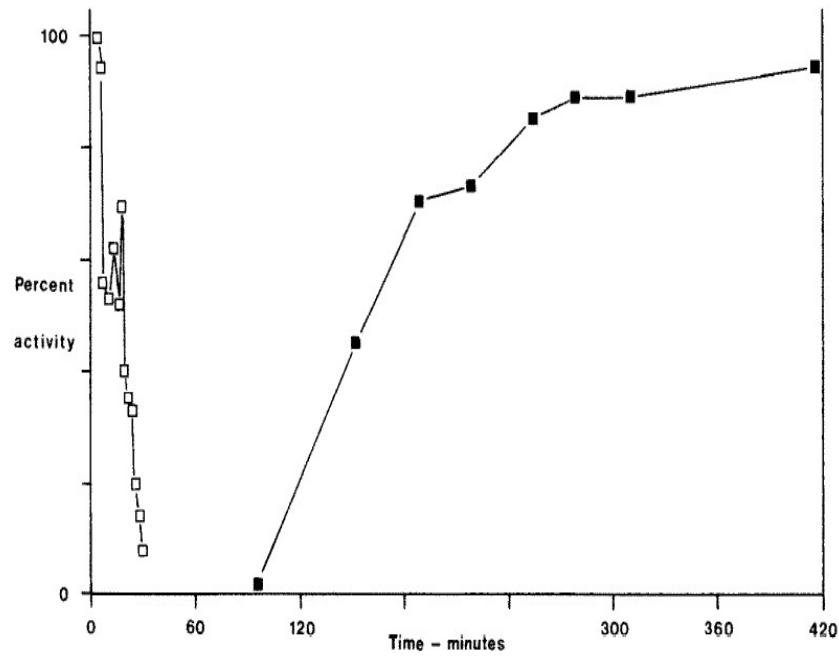
MRI képképzés (Tabletta útja, szétesése) Gd-jelzett mintával



Fluoreszcens jelzéssel mennyiségi elemzés is (prokinetikus szer hatása)

Harris D, Fell JT, Taylor DC, Lynch J, Sharma HL. GI transit of potential bioadhesive systems in the rat. *Journal of Controlled Release* 1990;12:55-65., Lehr C-M, Bouwstra JA, Tukker JJ, Junginger HE. Intestinal transit of bioadhesive microspheres in an in situ loop in the rat.... *Journal of Controlled Release* 1990;13:51-62.

In vivo mérések III

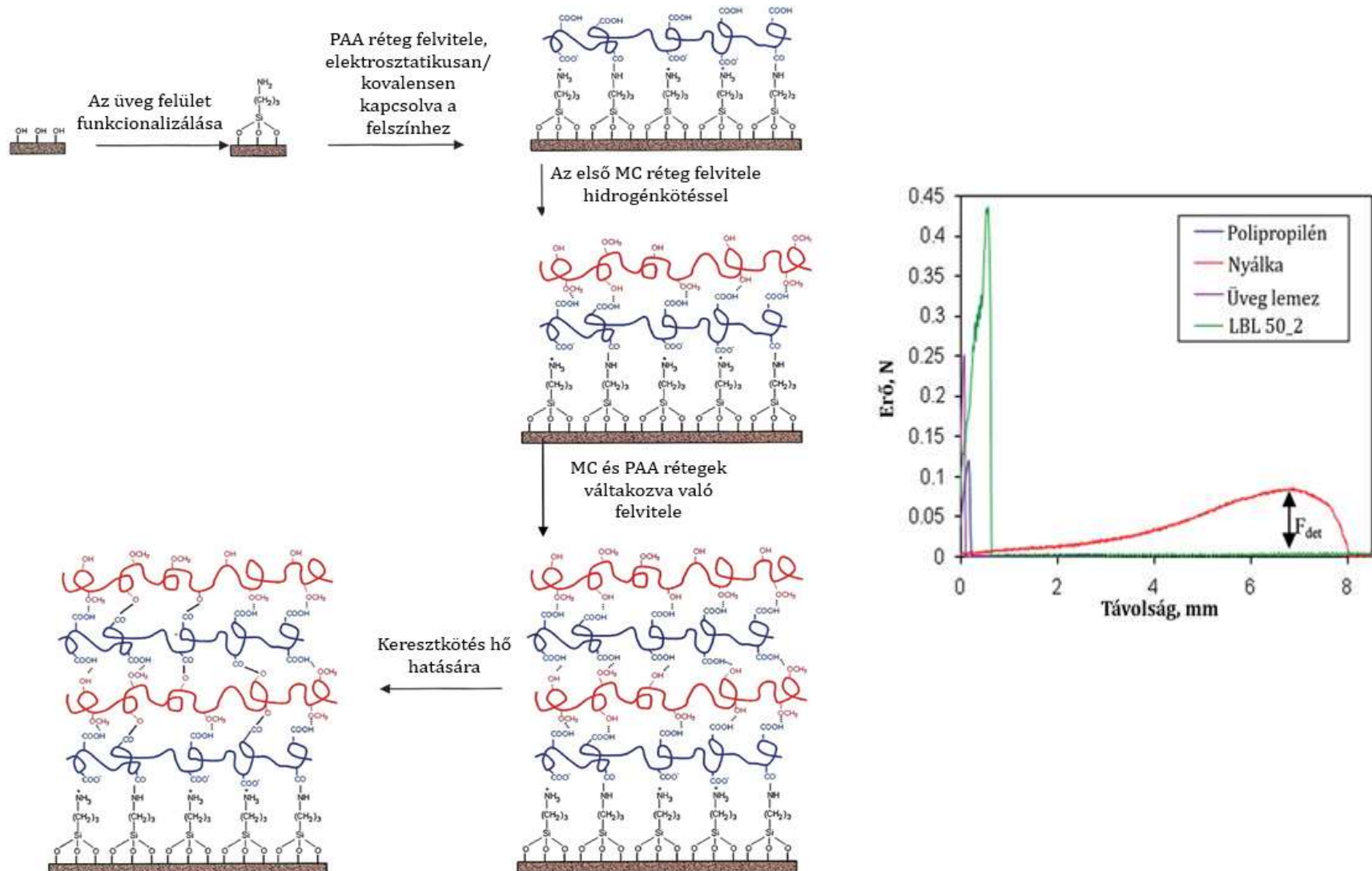


Gamma kamerás követés (Tc jelzett mikrogyönggyel jelölték a formulákat)

Harris D, Fell JT, Sharma HL, Taylor DC. GI transit of potential bioadhesive formulations in man: A scintigraphic study. Journal of Controlled Release 1990;12:45-53.

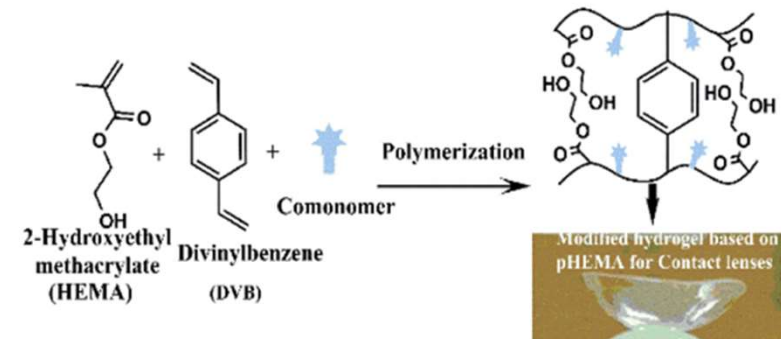
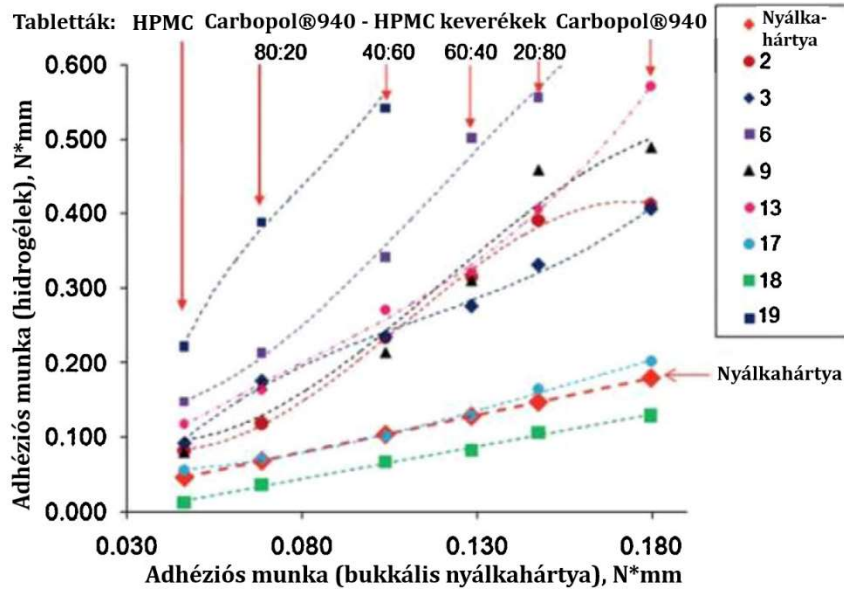
Nyálkahártya modellek

In vivo és ex vivo mérések: roppant nagy biológiai diverzitás, ex vivo: tárolási problémák

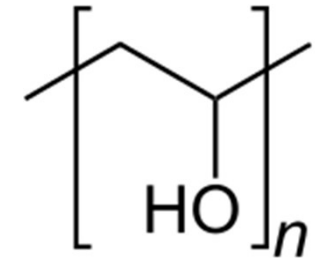
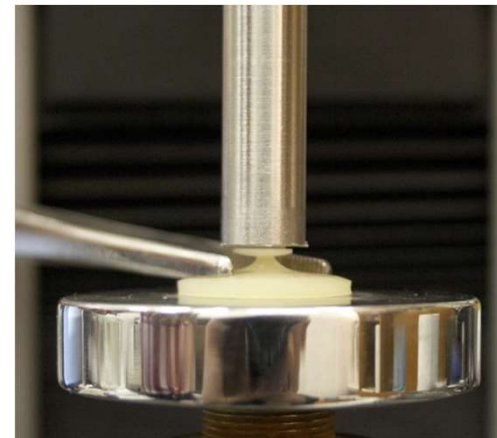


Khutoryanskaya OV, Potgieter M, Khutoryanskiy VV. Multilayered hydrogel coatings covalently-linked to glass surfaces showing a potential to mimic mucosal tissues. *Soft Matter* 2010;6:551-7

Nyálkahártya modellek (Stankovits G., Szilágyi B., Gyarmati B.)



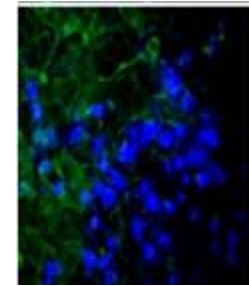
Minta	Ko-monomer(ek)	HEMA/ko-monomer arány (mol%)	Keresztkötő konc. (MBA, mol%)
2	-	100:0	0.1
3	-	100:0	0.5
6	N-vinil-pirrolidon (NVP)	90:10	0.01
9	2-hidroxietil-akrilát	90:10	0.1
13	Szorbitol-metakrilát	70:30	0.1
17	AGA	80:20	0.1
18	AGA	70:30	0.1
19	NVP:AGA	80:10:10	0.1



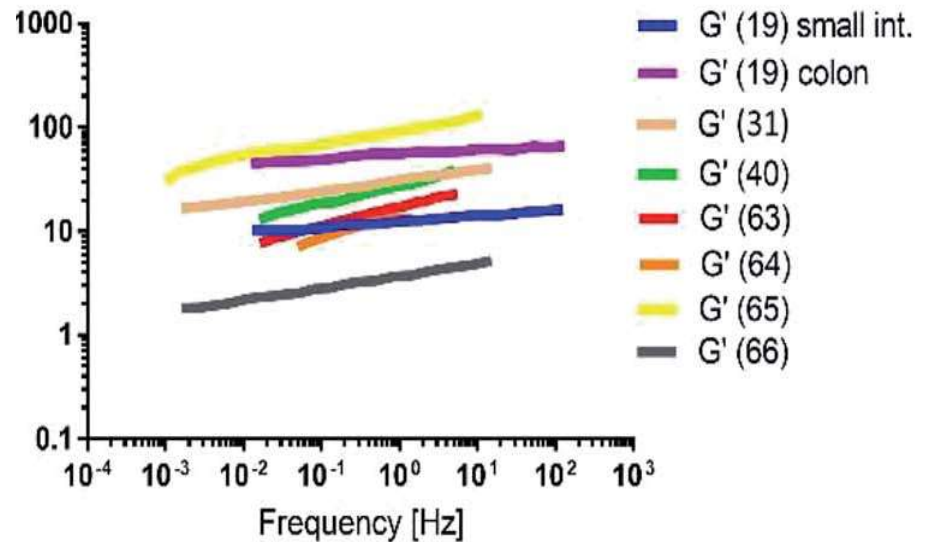
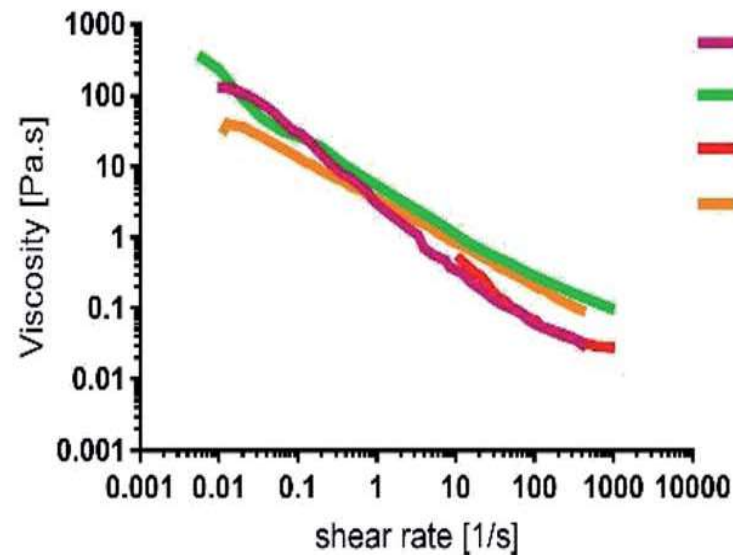
Folytatás: Stankovits Gergő, Pesta Judit

Nyálkahártya modellek osztályozása I

- Sejtszintű modellek (Caco-2 és HT-29 MTX sejtek)
- Fiziológias modellek (mucin, lipid és egyéb komponensek)



C

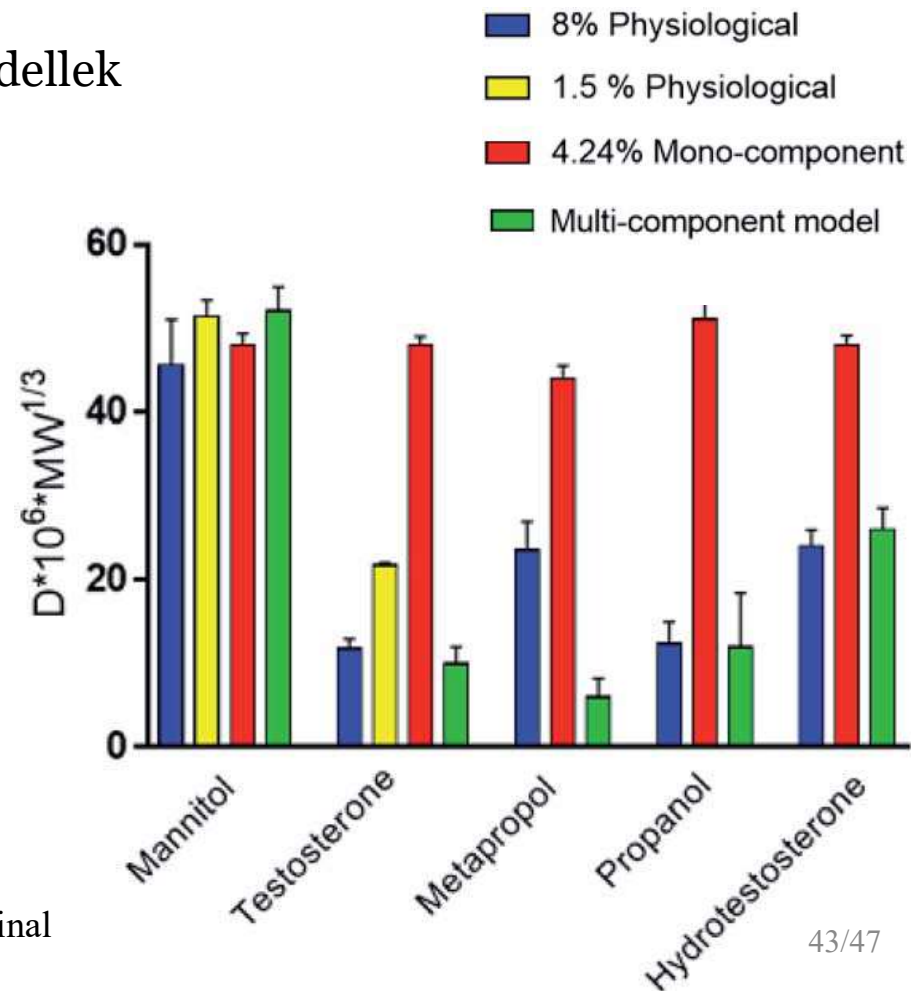
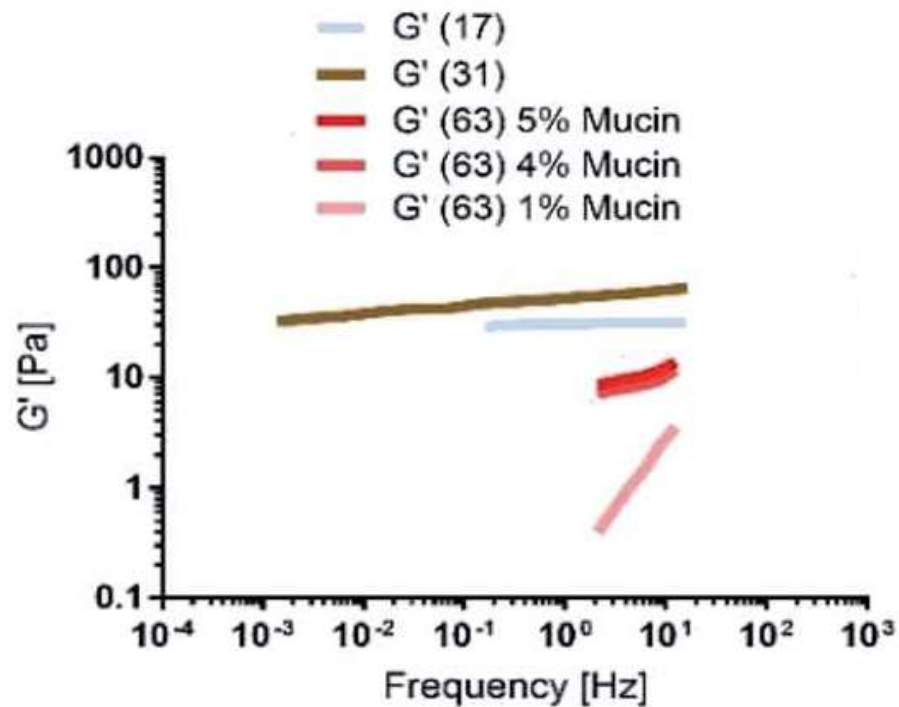


Mérések: permeabilitás, szintetikus nanorészecskék transzportja (tight junction)

Nyálkahártya modellek osztályozása II

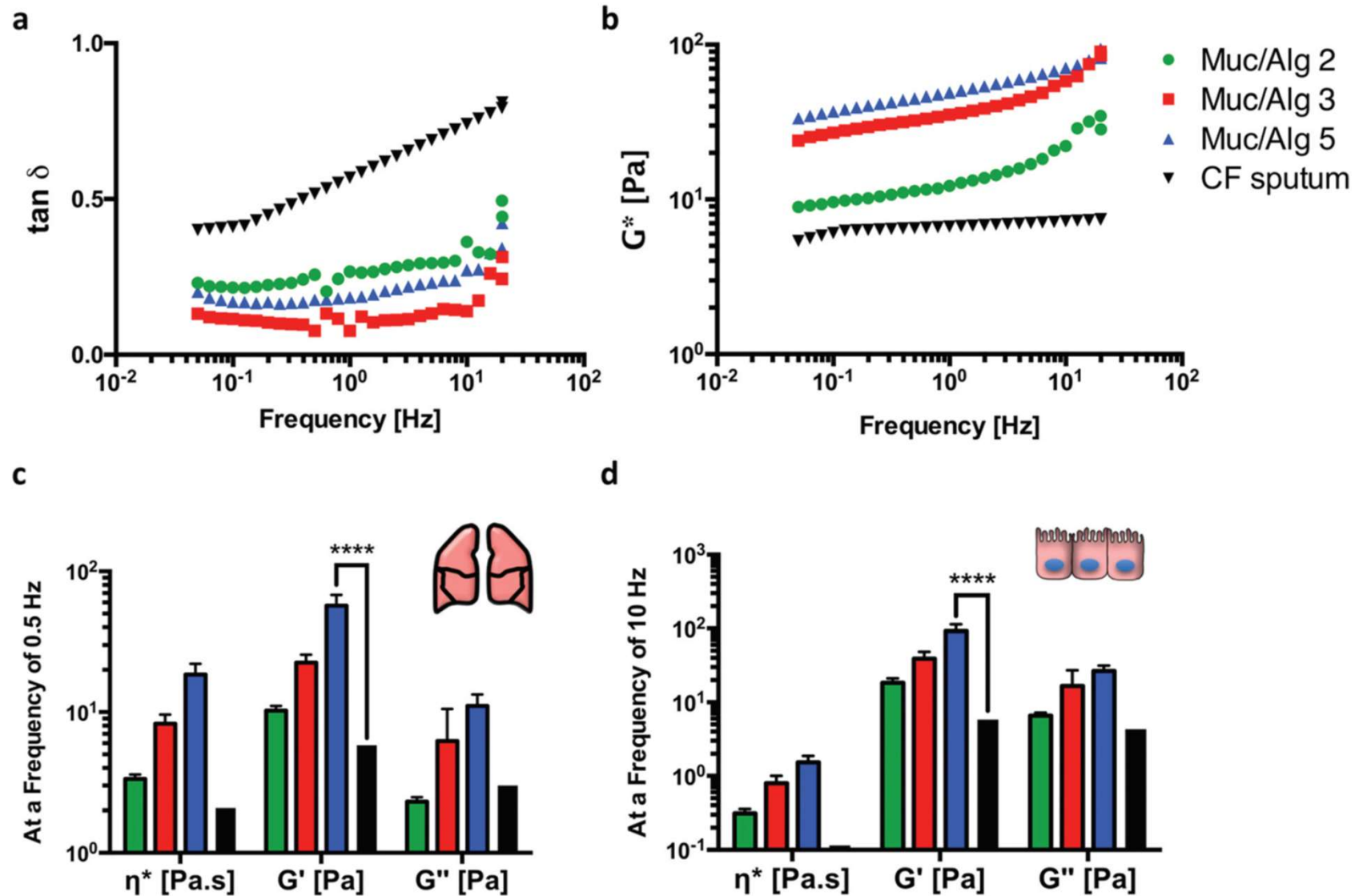
- Mesterséges, egykomponensű modellek
Tisztítás, mucin kinyerése után: standardizálható, kereskedelmi forgalomban is kapható komponensek
Hátrány: egyéb komponensek (lipidek) hiánya, nincs gélképző képesség

- Mesterséges, többkomponensű modellek



Sardelli L, Pacheco DP, Ziccarelli A, Tunesi M, Caspani O, Fusari A, et al. Towards bioinspired in vitro models of intestinal mucus. RSC Advances 2019;9:15887-99.

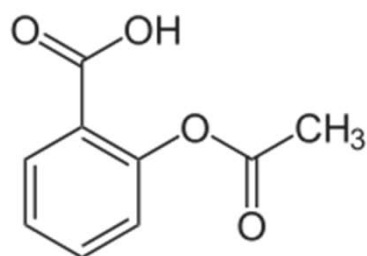
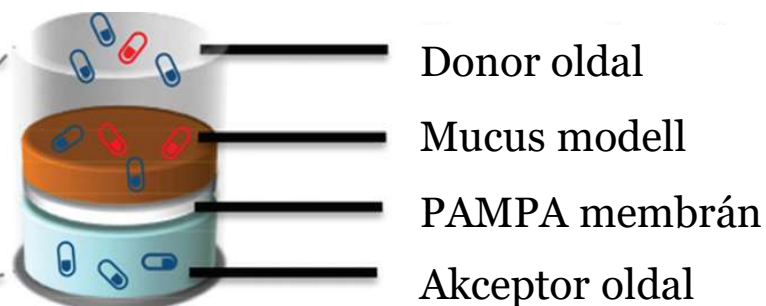
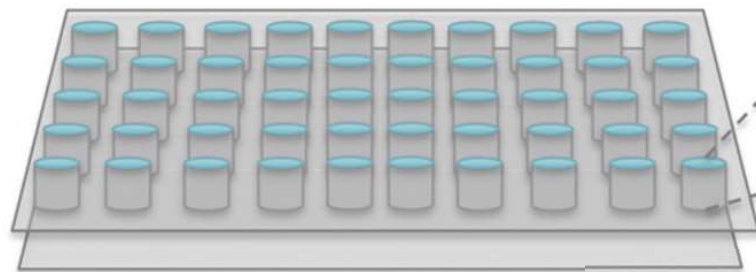
Összetett nyálkahártya modell (tüdő)



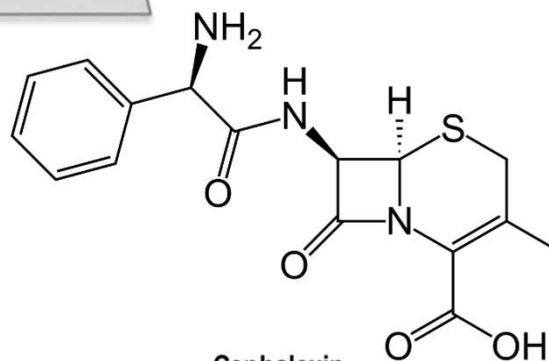
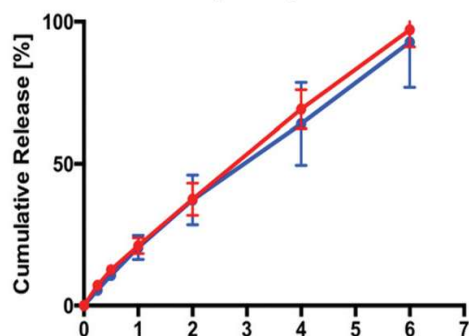
Pacheco DP, Butnarasu CS, Briatico Vangosa F, Pastorino L, Visai L, Visentin S, et al. Disassembling the complexity of mucus barriers to develop a fast screening tool for early drug discovery. *Journal of Materials Chemistry B* 2019;7:4940-52. 44/47

Nyálkahártya modell és permeabilitás

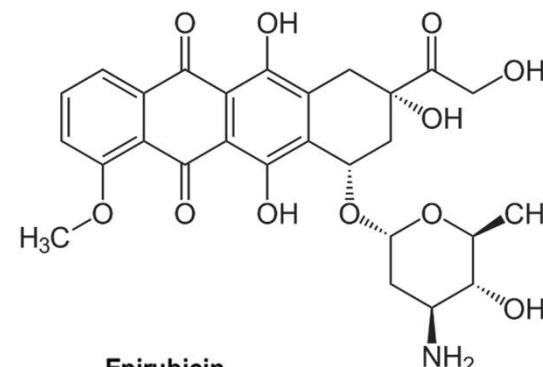
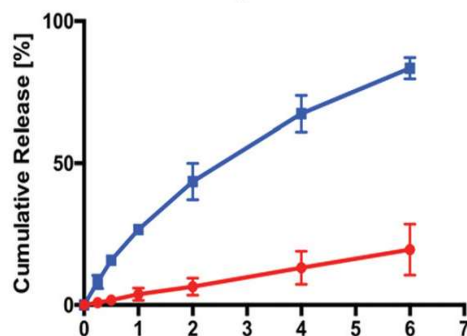
PAMPA: parallel artificial membrane permeability assay



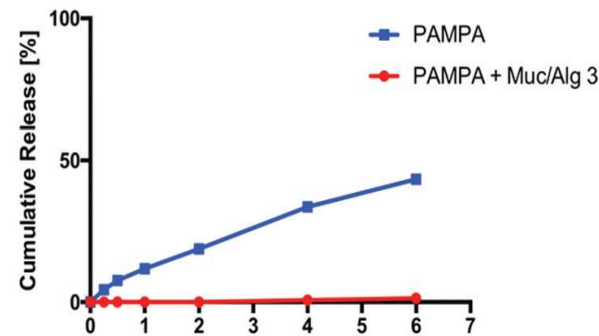
Acetylsalicylic Acid



Cephalexin



Epirubicin



Pacheco DP, Butnarasu CS, Briatico Vangosa F, Pastorino L, Visai L, Visentin S, et al. Disassembling the complexity of mucus barriers to develop a fast screening tool for early drug discovery. *Journal of Materials Chemistry B* 2019;7:4940-52.

Összefoglalás

- Mukoadhezív készítményekkel a gyógyszerformák tartózkodási ideje a szervezet számos területén elnyújtható (nazális, GI, szemészeti, vaginális stb.)
- A mukoadhézió komplex folyamatát különböző elmélet és mechanizmusok írják le, ezek kombinációja ad teljes képet, a különböző gyógyszerformák esetén különböző mechanizmusok dominálnak
- In vivo mukoadhéziós mérések helyett ex vivo kísérletek jellemzőek a korai fejlesztésben, nagy az érdeklődés az in vitro modellek irányában
- Jövő: in situ gélesedő, adhezív készítmények; összetett, de egyben jól reprodukálható és az in vivo mérésekkel jól korreláló adhezív szubsztrátok

Köszönöm a figyelmet!

