

## 1. MOGUĆNOSTI PRIMENE NANOTEHNOLOGIJE U FARMACIJI

### 1.1 INOVIRANJE PROIZVODNOG PROGRAMA U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI

Postoji stalna potreba, izazov i nove mogućnosti za farmaceutsku industriju usled:

- intenzivnih istraživanja u oblasti medicinskih i biomedicinskih nauka,
- brzog naučno – tehnološkog razvoja,
- velikog broja obolelih od masovnih nezaraznih i zaraznih bolesti,
- pojave novih oboljenja i potreba za iznalazenjem novih terapijskih rešenja,
- stvaranja profita...

Farmaceutska industrija teži proizvodnji kvalitetnih, efikasnih i bezbednih farmaceutskih proizvoda. Pod terapijskom inovacijom se podrazumeva terapija pri kojoj nova supstanca pokazuje klinički značajnu prednost u odnosu na postojeću, definisanu terapiju (novi način aplikacije, tehnološki oblik, kombinacija itd.).

Cilj je biti “korak ispred” konkurencije i imati prednost u odnosu na postojeće preparate na tržištu, što omogućava i veći profit.

### 1.2 UVOĐENJE NOVOG LEKA NA TRŽIŠTE

Prosečna vrednost razvoja novog leka je iznosila:

- 1987. - 318 miliona \$
- 2001. - 802 miliona \$
- 2006. - 1,318 milijardi \$
- 2006. - 1,2 milijardi \$ (biološki lek)

U današnje vreme postoji potreba za sve većim zahtevima regulatornih tela, sve komplikovanim naučnim ispitivanjima i sve su složeniji ciljevi u lečenju bolesti.

Farmaceutska industrija troši 17,4% od ukupne prodaje na R&D. U fazi ispitivanja i razvoja je 2010.godine bilo 2950 supstanci, a 1999.godine 1800 supstanci. 2009. godine pušteno je na tržište 34 nova leka (SAD).

#### *Faze razvoja novog leka*

**Prekliničke studije** traju obično do 6 godina, vrše se toksikološka i druga ispitivanja bezbednosti, *in vitro* i na životinjama; potrebno je odobrenje vlasti za primenu kod ljudi.

**Faza 1:** procenjuje se efikasnost i bezbednost leka, određuje doziranje, utvrđuju neželjeni efekti na malim grupama (20-80) dobrovoljaca – zdrave muške osobe, traje oko 2 godine.

**Faza 2:** i dalje se prati bezbednost i određuje efikasnost, velike grupe pacijenata (100 – 500), traje oko 3 godine.

**Faza 3:** potvrđuje se efikasnost, prate se neželjeni efekti i upoređuje se novi lek sa lekom koji se standardno koristi u terapiji, ispitivanja se vrše na 1000-5000 i više osoba, traje oko 4 godine.

**Razvoj novog leka traje 10-15 godina.** Nakon toga, vrši se aplikacija za novi lek kod regulatornih organa (FDA SAD ili EMEA EU).

Rezultati istraživanja u farmaceutskoj industriji su pokazala interesantan podatak da **10.000** supstanci uđe u ispitivanja, **250** uđu u fazu prekliničkih ispitivanja, **5** dođe do kliničke provere, a **1- 2** bude odobreno kao lek za puštanje na tržište!

### 1.3 POST-MARKETINŠKE STUDIJE

Studije **faze 4** su kliničke studije koje se vrše na zahtev ili uz saglasnost proizvođača, započinju nakon dobijanja dozvole za puštanje leka u promet. Izuzetno su važne, jer obezbeđuju dodatne informacije o bezbednosti, efikasnosti i optimalnoj upotrebi (dodatne informacije o interakcijama lek-lek, lek-hrana, primena kod gerijatrijske, pedijatrijske populacije itd.). Tokom 1980.-ih i 1990.-ih godina su bile relativno retke, sada su obavezne.

Moguće je povlačenje leka sa tržišta ako se pokaže da negativni efekti leka prevazilaze pozitivne (Vioxx<sup>®</sup> 1999-2004).

### 1.4 „BREND LEKOVI”

To su inovativni, ali i izuzetno skupi lekovi koji daju nove mogućnosti lečenja.

Pojam “*Market exclusivity*” – monopol originatora na tržištu, sam originator određuje cenu leka, koja daleko prevazilazi realnu vrednost.

Inovativna farmaceutska industrija (originatori) proizvodi mali broj lekova koji godišnje stvaraju ogroman prihod za investiranje u nove lekove, oni će zameniti lekove kojima ističe patentna zaštita ili ekskluzivitet i koji su meta generičke konkurencije.

### 1.5 „GENERIČKI LEK”

Generički lek ima isti kvalitativni i kvantitativni sastav aktivne supstance, isti farmaceutski oblik i istu bioraspoloživost kao lek originatora (brend-lek). Lansira se na tržište pošto istekne patentna ili neka druga zaštita originatora (brend-proizvođača). (*Directive 2004/27/EC*)

Generički lekovi su pouzdani, bezbedni, poznati su neželjeni efekti tako da postoji minimalni rizik!

Za proizvođače koji ne mogu da razvijaju brend-lekove ovo je velika šansa.

Cene generičkih lekova su niže za 50-90% zbog:

- znatno nižih troškova R&D (dokazana bezbednost i efikasnost),
- manjih troškova za promociju proizvoda,
- velike konkurencija među proizvođačima generičkih lekova.

Na ime tako ostvarenih ušteda, zdravstveni sistemi obezbeđuju skupe lekove i druge troškove lečenja.

### 1.6 BIOLOŠKI LEKOVI

Biološki lekovi se izrađuju od živog materijala, genetskim inženjeringom ili rekombinantnom DNK tehnologijom.

To su proizvodi čije su aktivne supstance dobijene iz bioloških izvora. Konvencionalni lekovi na bazi malih molekula izrađuju se uglavnom kao proizvodi organske hemijske industrije.

Monoklonska antitela (vrsta bioloških lekova) predstavljaju veliki potencijal za različite indikacije, kod bolesti za koje do danas nije bilo leka. Biološki lekovi omogućavaju ciljano dejstvo na uzrok bolesti, u smislu prevencije ili lečenja, često predstavljaju prvu dostupnu terapiju ili imaju značajnu prednost u odnosu na klasične lekove.

Stvaranje blokbafter-leka je sve teže, postoje brojni konkurentski proizvodi. Godišnji rast prihoda ukupne prodaje blokbaftera je u periodu od 2002. – 2005. godine iznosio 9,0%, a u periodu od 2005. – 2008. godine je bio 1,6%!

Da bi prihodi rasli po stopi od 10%, trebalo bi da farmaceutske kompanije godišnje lansiraju 2-3 nova leka na tržište. Procenjuje se da brendirani farmaceutski proizvodi gube između 15-30% njihovog udela na tržištu sa pojavljivanjem prve generičke paralele, a između 75-90% kod uvođenja sledećeg paralelnog leka. Gubitak je i do 80% vrednosti već prve godine po isticanju patenta! Model blokbaftera, sada vraća svega 5% od uložene vrednosti. **Samo 1 od 6 novih lekova** će vratiti više nego što je uloženo u njegov razvoj!

Poslednjih godina, veliki broj brendiranih proizvoda je izgubio patentnu zaštitu i pojavile su se brojne generičke paralele. Pfizer-ova 3 blokbafter leka, koja su ostvarivala zaradu od 18 milijardi \$ u 2003. godini izgubiće patentnu zaštitu do 2011. godine.

Zdravstveni fondovi i osiguravajuća društva u sve većoj meri navode lekare i farmaceute da propisuju/nabavljaju jeftinije generičke lekove, postoje javne kampanje za povećanje svesti o značaju generičkih proizvoda za ekonomiju zdravstvenog sistema.

**U SAD 2008. godine generika je činila 65% lekova propisanih na recept, ali samo 20% od ukupnih troškova za lekove!**

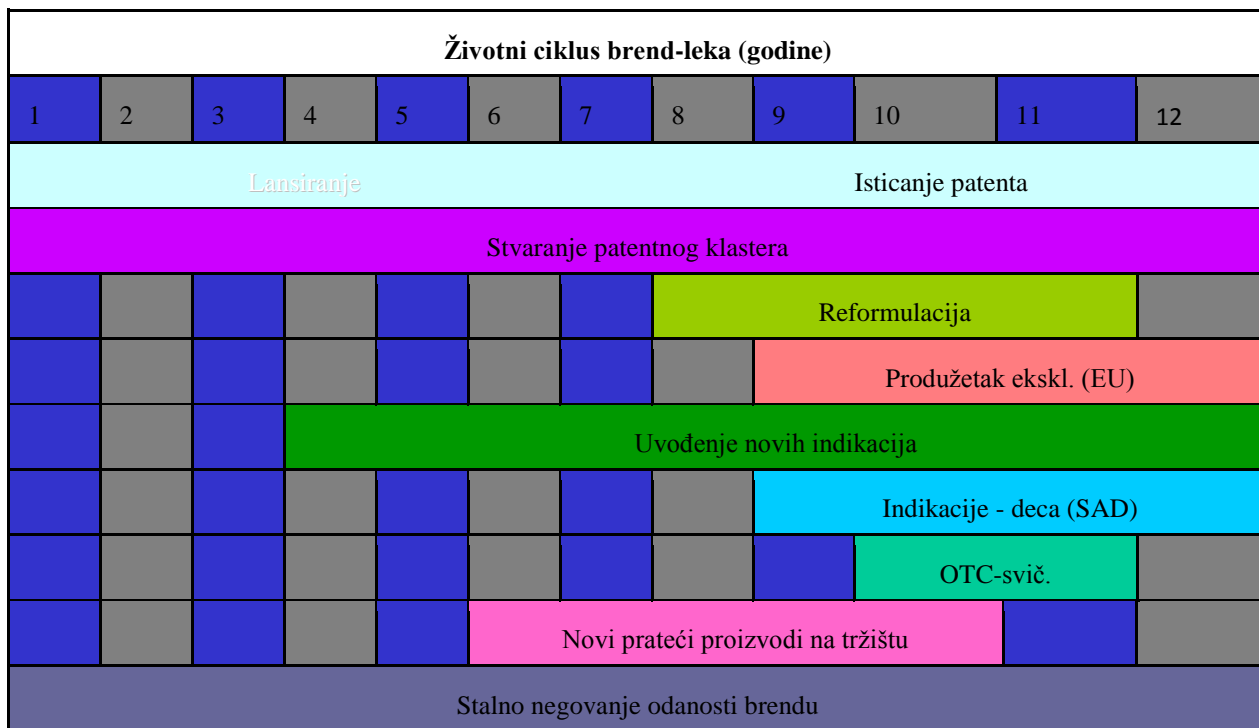
Udeo generičkih lekova na tržištu je 2000. godine iznosio 49%, a 2009. je iznosio 74%.

## 1.7 UPRAVLJANJE “ŽIVOTNIM CIKLUSOM LEKA”

Ključno strateško sredstvo za farmaceutske kompanije su prihodi od postojećih proizvoda na konkurentskom i stagnirajućem tržištu. Do 2015. godine, farmaceutska industrija će izgubiti ekskluzivitet za 40% aktivnih supstanci sa patentnom zaštitom. Broj brend-lekova će se smanjiti sa 80% na 20%. Smanjena je produktivnost sektora za istraživanje i razvoj. Cilj je postići maksimalan profit iz postojećih proizvoda!

Dužina ekskluzivnosti jednog leka na tržištu, pre nego se pojavi novi lek iz iste grupe, značajno se smanjila:

- 1968. godine lansiran je Inderal<sup>®</sup>, koji je punih 10 godina imao ekskluzivnost na tržištu,
- Diflucan<sup>®</sup> je lansiran 1990. godine i imao je ekskluzivnost samo 2 godine,
- Inviase<sup>®</sup>, lansiran 1995. godine, manje od 1 godine!



**Slika 1.** Integrisano planiranje odbrane brenda od generike.

Efektivni život patenta za farmaceutske proizvode je 11,7 godina (PhRMA).

### 1.8 STRATEGIJE REFORMULACIJE LEKA

Reformulacijom leka (novi oblik postojećeg proizvoda), u SAD se može produžiti ekskluzivitet do 3 godine, a u EU 1 godinu. Proizvođači generičkih lekova specijalizuju se za *drug-delivery* tehnologije. Generički lek može imati patent za formulaciju. Pokušaji da se stvaranjem kombinovanog proizvoda od 2 blokastera produži ekskluzivitet se uglavnom obara na sudu.

*Farmaceutsko tržište 2010. godine*

Faktori koji su uticali na farmaceutsko tržište i karakteristike farmaceutskog tržišta:

- ekonomska kriza – uticaj na propisivanje lekova,
- predviđanja: vrednost globalnog farmaceutskog tržišta će sledeće godine porasti za 5-7% i dostići 880 milijardi \$,
- različit tempo oporavka i razlike u rastu vrednosti tržišta,
- rast zavisi od vrednosti budžeta zdravstva u svakoj zemlji i raspoloživosti javnih i privatnih fondova,
- najveće farmaceutsko tržište – SAD će rasti za 3-5% u 2011.
- Kina trenutno 3. po veličini farmaceutsko tržište, očekivani rast u 2011. godini 25-27%,
- Najrazvijenije zemlje: rast između 1-7% .

*Globalno farmaceutsko tržište – očekivanja u 2011. godini*

Ističu patenti i ekskluzivitet na tržištu za mnoge *brand*-lekove, predviđa se dominacija generičkih lekova. Potpuna zamena skupih *brand*-lekova mnogo jeftinijim generičkim preparatima biće završena 2012. godine.

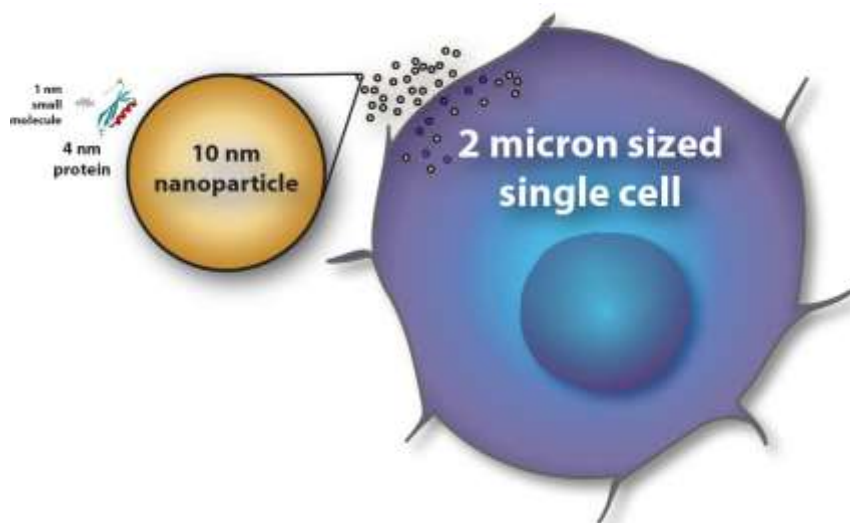
Za nekoliko terapijskih oblasti očekuju se nove, inovativne terapijske mogućnosti do kraja 2011. godine (potencijalni *blockbuster* lekovi):

- prevencija moždanog udara,
- lečenje melanoma,
- hepatitisa C,
- multiple skleroze i
- raka dojke.

## 2. NANOTEHNOLOGIJE I NANOMEDICINA

**Nanotehnologija** predstavlja dizajn, karakterizaciju, proizvodnju i aplikaciju struktura, sprava ili sistema kontrolisanom manipulacijom veličine i oblika na nanometarskoj skali (atomska, molekulska i makromolekularna skala) koja daje strukture, sprave ili sisteme sa najmanje jednom novom-superiornom karakteristikom ili svojstvom. Nacionalna inicijativa za nanotehnologije SAD (NNI) definiše nanotehnologiju kao «razumevanje i kontrolu materije u dimenzijama između 1-100 nm, gde jedinstveni fenomeni otvaraju nove mogućnosti primene, omogućavajući izradu sprava (*devices*) na nano-nivou.

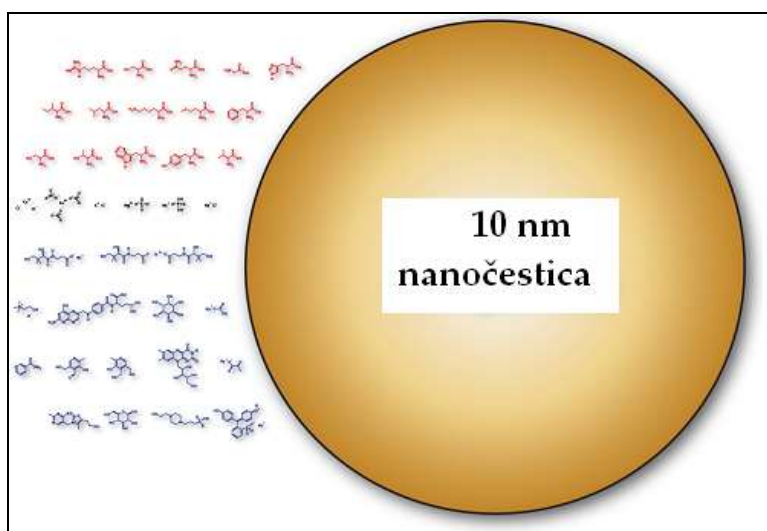
Nanotehnologija je multidisciplinarna oblast, konvergencija osnovnih nauka i primenjenih disciplina kao što su biofizika, molekularna biologija i biotehnika. Nanomaterijali se definišu kao čestice koje imaju bar jednu dimenziju manju od 100 nm, što je veličina prosečnog virusa. Mogu se definisati i kao objekti nano-dimenzija koje je izradio čovek, a koji poseduju specifična svojstva koja nastaju upravo na osnovu njihovih nano-dimenzija. Nanočestice se ne ponašaju ni kao čvrsti, tečni niti gasoviti materijali i ne podležu zakonima Njutnove, već kvantne fizike. Čestice ovih materijala pokazuju drugačija svojstva od čestica istog materijala – supstance, ali većih dimenzija, one se razlikuju po boji, električnim, magnetnim, mehaničkim i drugim svojstvima. Otuda i njihove specifične karakteristike, u smislu provodljivosti, reaktivnosti, optičke osetljivosti itd.



**Slika 2.** U poređenju sa dimenzijama i zapreminom ćelije sisara, izrađenom od proteina, nukleinskih kiselina i drugih malih do velikih molekula, 10nm-ska čestica je 1000 puta manja, a proteini i mali molekuli su veoma sitni.

Uvođenje skenirajuće tunel-mikroskopije - STM (*scanning tunneling microscopy*, engl.), ranih 1980-ih godina, omogućilo je manipulaciju pojedinačnim atomima, a zatim doprinelo i otkriću i razvoju fulerena C<sub>60</sub>, karbonskih nanotuba i nanokristalnih kvantnih tačaka - QDs (*quantum dots*, engl.). Od tada, snažan razvoj materijala nano-dimenzija i njihove primene, osavremenio je i unapredio mnoge naučno-tehnološke discipline, a među njima svakako i medicinu, farmaciju, kozmetologiju i stomatologiju.

U odnosu na organske i neorganske molekule, čestice veličine 10 nm su pravi džinovi (Slika 3).



**Slika 3.** Veličina molekula aminokiselina (crveno), neorganskih soli (u četvrtom redu, crno) i vitamina i drugih malih organskih molekula (plavo) u odnosu na česticu od 10 nm.

Nanotehnologija je ostvarila snažan uticaj u raznim oblastima medicine, uključujući kardiologiju, oftamologiju, endokrinologiju, onkologiju, pulmologiju, imunologiju i sl. kao i u visoko specijalizovanim oblastima kao što su isporuke gena, targetiranje mozga, tumora, i formulisanje oralne vakcine. Nanotehnologija stvara inteligentne sisteme, uređaje i materijale za bolje farmaceutske aplikacije i predstavlja najznačajniju tehnološku podršku individualno prilagođenoj terapiji i personalizovanoj medicini.

Nanomedicina predstavlja medicinsku primenu različitih materijala i aparata - uređaja (*devices*, engl.) nano-dimenzija u proceni, očuvanju i poboljšanju zdravlja i opšte dobrobiti. Ona manipuliše atomima ili molekulima čije se dimenzije kreću od 1-100 nm. Čestice ovih dimenzija pokazuju potpuno drugačija fizičko-hemijska svojstva, jer prevladavaju zakoni kvantne fizike. Nanomedicina koristi prednosti formulacija sa nanomaterijalima da bi se postiglo optimalno oslobađanje leka i da bi se olakšalo neinvazivno snimanje (*imaging*, engl.). Pored nanomaterijala koji su trenutno najviše u upotrebi, kao što su fulereni i nanočestice, nanomedicina koristi i biomolekule i nanoelektronske biosenzore da bi stvorila terapijska i dijagnostička sredstva. Iako nose jedno zajedničko ime, nanomedicina označava beskonačan broj različitih mogućnosti u dijagnostici i lečenju. Različiti sistemi za oslobađanje leka na nano-nivou mogu se izraditi od bezbrojnih kombinacija nanomaterijala i

molekula, tako da deluju kod pojedinačnog pacijenta, na specifičnom mestu – tkivu pomoću specijalnog vezivanja za površinu molekula nosača – liganda. Sve veći broj takvih formulacija ima multifunkcionalne osobine – istovremeno leči oslobađanjem lekovite supstance i prikuplja dijagnostičke podatke. Očekuje se da će do 2015. godine, više od polovine svih novootkrivenih lekova i tehnologija otpuštanja leka biti bazirano na nanotehnologiji.

### 3. NANOFARMACIJA

#### 3.1 MOGUĆNOSTI I DOMETI NANOFARMACIJE

Aktuelno stanje farmaceutske industrije je usmerenost prema istraživanjima u oblasti nanotehnologije, jer je razvijanje novih hemijskih entiteta veoma dugotrajan i skup posao. Za 23 najprofitabilnija farmaceutska proizvoda – leka istekla je patentna zaštita 2008. godine što će dovesti do gubitka prihoda od 46 milijardi dolara do 2011. godine. Pored toga, većina lekova u sadašnjem obliku će vrlo brzo biti isključena iz upotrebe jer stvara velike gubitke. Zato većina istraživanja u farmaceutskoj industriji teži da koristi novije tehnologije za razvoj lekova u cilju smanjenja ili prevazilaženja nedostataka kao što su visoka toksičnost, nestabilnost u biološkom okruženju, loša bioraspoloživost i niske terapijske koncentracije na mestu delovanja.

Primena nanotehnologije u farmaciji pruža mogućnost primene inteligentnih sistema otpuštanja lekova, što je dragocena alternativa konvencionalnom načinu doziranja. Za ove nano-inteligentne sisteme potrebno je malo ulaganja, a očekuje se da donesu veliku dobit obezbeđenjem patentne zaštite novih sistema za kontrolisano oslobađanje leka (DDS - *drug delivery sistem*, engl.) postojećih lekovitih molekula kao i lekova koji će biti uskoro patentirani.

Novi modeli otpuštanja lekova koriste niz prednosti nanotehnologije. Mogućnosti farmaceutske nanotehnologije su veoma široke: od pametnih materijala za inženjering tkiva do inteligentnih alata za otpuštanje lekova i dijagnostiku, a u skorije vreme i veštačka crvena krvna zrnca. Trenutno, nanotehnologije se u farmaciji primenjuju za razvoj nanomedicine, inženjering tkiva, izradu nanorobota, napredne dijagnostičke metode, kao nosilac dijagnostičkih i terapijskih agenasa i kao biosenzor, biomarker, uređaji za obradu slika, implantata, u tehnologiji bioaktivnih površina itd. Veliki broj nanosistema, koji su do danas ispitani i koriste se u farmaciji su: lipozomi, dendrimeri, metalne nanočestice, polimerne nanočestice, ugljenične nanotube, kvantne tačke, nanovlakna itd.

Zahvaljujući uspešnom proboju novih terapijskih oblika na bazi nanotehnologija, FDA je odobrio istraživačke aplikacije novih lekova za tretman nekoliko oblika karcinoma. Trenutno su za više od 400 lekova na bazi nanotehnologija, uglavnom za lečenje malignih bolesti, u toku klinička ispitivanja.

#### 3.2 FARMACEUTSKA NANOTEHNOLOGIJA

Farmaceutska nanotehnologija – nanofarmacija, predstavlja primenu nauke o nanočesticama u farmaciji i obuhvata nanomaterijale, lekove, dijagnostičke uređaje, razne vrste snimanja i biosenzore. Ona je najinovativnije i visokospecijalizovano polje, koje će omogućiti preokret u farmaceutskoj industriji u bliskoj budućnosti. Farmaceutska nanotehnologija je obezbedila finu dijagnostiku i fokusirano lečenje bolesti na molekularnom nivou, ona pomaže u otkrivanju

antigena koji se vezuju za bolesti kao što su rak, dijabetes, neurodegenerativne bolesti, kao i za otkrivanje mikroorganizama i virusa koji izazivaju infekcije.

Farmaceutska industrija koristi neke od proizvoda bionanotehnologije i razvija nove oblike lekova - nanolekove i njihove komponente, kao što su:

1. aditivi, koji treba da poprave rastvorljivost i biodostupnost slabo rastvorljivih lekova,
2. nosači za otpuštanje lekova, koji treba da poboljšaju postojanost leka u cirkulaciji i ciljano delovanje na specifične ćelije,
3. nosači koji treba da omoguće kontrolisano oslobađanje leka i
4. adjuvansi za otpuštanje vakcina, kontrastna dijagnostička sredstva i sisteme za oslobađanje leka.

Poslednjih godina, posebno težište nanofarmacije je razvoj, odnosno izrada (*engineering*, engl.) novih modela aplikacije. Nove mogućnosti otpuštanja lekovitih supstanci i formulisanje preparata pomoću nanotehnologija predstavljaju prekretnicu i budućnost u lečenju. Savremeni sistemi za otpuštanje lekova - DDS olakšali su pristup lekovite supstance u tačno određena tkiva. Primenom nanotehnologija, mete postaju specifične organele unutar pojedinačnih ćelija. Ovi materijali imaju mogućnosti da prevaziđu probleme rastvorljivosti i stabilnosti, obezbede otpuštanje leka u željeno tkivo, postavljanje dijagnoze *in vivo* snimanjem, itd. To je otvorilo prostor za razvoj industrije vredne milijardu dolara, tako da se očekuje da će u narednih 10 godina tržište biti preplavljeno nanotehnološki osmišljenim lekovima.

DDS zasnovani na nanotehnologijama omogućavaju efikasniju upotrebu lekova zahvaljujući dužem vremenu opstanka u cirkulaciji, većoj tolerabilnosti, specifičnom delovanju na obolelom mestu, a sve to je posebno značajno za krajnje efekte lečenja. Budućnost ovih sistema je u njihovoj funkcionalizaciji, razvoju specifičnih nosača izbora koji obezbeđuju višestruke terapijske efekte i najveći mogući stepen personalizacije leka.

Iako po definiciji, nanotehnološki materijali imaju dimenzije između 1-100nm, veličine pojedinačnih čestica koje su testirane za ciljano oslobađanje lekovitih i dijagnostičkih agenasa mogu biti od 2-1000 nm. Međutim, čestice veće od 200 nm mogu aktivirati humani sistem komplementa, a zatim biti odstranjene iz krvi pomoću Kupferovih ćelija. Takođe, filtracijom u slezini zaustavljaju se čestice dimenzija većih od samih otvora (200-250 nm), a filtracijom u jetri (kroz otvore u endotelnom sinusu) zaustavljaju se čestice veće od 150 nm. Pored toga, kapilari u tumorskom tkivu retko imaju dijametar veći od 300 nm. Zbog svega toga, istraživanja i formulacija preparata orijentisani su uglavnom na čestice manje od 200 nm. Spoljašnja površina čestica u najnovijim nanoformulacijama je izmenjena inkorporiranjem različitih liganda u membrane (npr. specifičnih antigena, antitela i receptorskih liganda) da bi olakšala ciljano otpuštanje aktivne supstance na željeno mesto u organizmu.

Slabo rastvorljive aktivne supstance u lekovima ili kozmetičkim preparatima, imaju problem biodostupnosti na željenom mestu delovanja, naročito ako su istovremeno slabo rastvorljive i u vodenom i u nevodnom (organskom) medijumu. U većini slučajeva, slabo rastvorljive aktivne supstance su lipofilne i molekuli imaju dobru permeabilnost kroz lipofilne membrane. Slaba rastvorljivost generalno je povezana sa malom brzinom rastvaranja, tako da kada nekoliko rastvorenih molekula prođe kroz membranu, rastvorljivost kristala aktivne supstance nije dovoljno brza da zameni molekule koji su prošli kroz membranu. Ograničavajući faktor u resorpciji takvih lekova je upravo brzina rastvaranja. To su tzv. lekovi klase II u sistemu biofarmaceutske klasifikacije (BCS). Jedan od načina da se prevaziđe ovaj problem je izrada nanokristala.



Izuzetno sitne, nanočestice koje predstavljaju nosače lekova pokazuju vrlo brzo otpuštanje lekovite supstance (što je značajno kada treba postići visoke doze leka u organizmu) i sposobnost penetracije u ciljano tkivo. Nanonosači lekova čije su dimenzije manje od 200 nm mogu proći filtriranje u plućima i slezini i olakšati leku napuštanje krvnog suda u tumorsko tkivo ili proći različite fiziološke barijere, što znači bolju dostupnost leka i više pogodnosti. Morfološki različite nanočestice imaju različitu površinu, anizotropiju i druga svojstva, što im daje dodatne pogodnosti za primenu u medicini i farmaciji. Nanočestice različitog oblika – štapićastog, kupastog, cilindričnog, vlaknastog i u obliku filma se mogu koristiti za različite aplikacije: jednolične zlato/srebro nanokupe mogu se smatrati potencijalnim kandidatima za katalizu, adsorpciju i kontrolisano oslobađanje leka; funkcionalizovane karbonske nanotube su efikasne nanokapsule za otpuštanje leka, višeslojni filmovi nano-dimenzija koji uključuju polielektrolite i biomakromolekule, kao što su DNK ili polipeptidi pogodni su za nove tehnologije u proizvodnji hrane, otpuštanju lekova i za medicinska sredstva itd.

Iako su neka polja primene nanotehnologije u farmaciji pod znakom pitanja, postoje oblasti gde ona mnogo obećava. Posebno, nanoformulacije mogu eliminisati potrebu za čestom primenom leka, što poboljšava komplijansu pacijenta i daje bolje rezultate terapije.

### 3.3 NANOČESTICE U NANOFARMACIJI

Nanočestice se međusobno značajno razlikuju:

- po veličini (od nekoliko desetina nanometara – dendrimeri, čestice zlata ili oksida gvožđa, do nekoliko stotina nanometara, kao što su lipozomi i nanoškolkje od zlata, pa i do 1-2  $\mu\text{m}$ ,
- po obliku – od klasičnih sfera do kupastih, diskoidnih, sferoidnih, cilindričnih i sličnih oblika i
- po fizičko-hemijskim svojstvima površine: neke čestice su obložene funkcionalnim grupama i poseduju specifično pozitivno (amino-grupa) ili negativno elektrostatičko naelektrisanje (karboksilna grupa), ili „ukrašene” polimernim vezivnim sredstvima, kao što je PEG ili biološki aktivnim molekulima, kao što su antitela, peptidi, aptameri i ligandi.

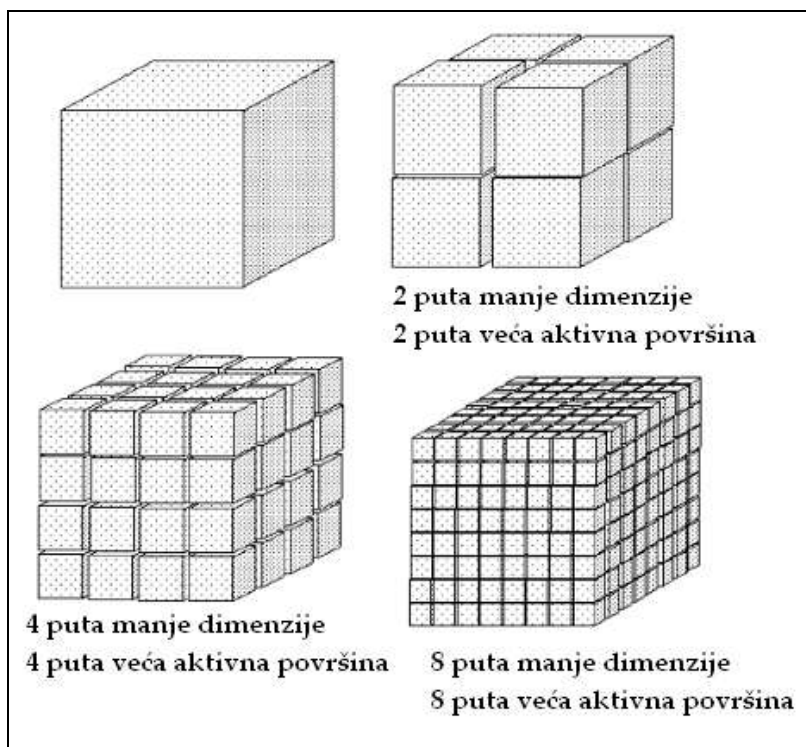
Pre sinteze nanočestica, potrebno je imati u vidu osnovne postulate:

1. farmaceutske strukture se kreću kroz organizam tražeći svoju metu,
2. to su biokompatibilna sredstva koje ne smeju ugroziti pacijenta i
3. kontrastna sredstva se koriste u eksternom biomedicinskom sistemu snimanja.

Smanjenje veličine je fundamentalna operacija koja ima važnu primenu u farmaciji. Ona poboljšava rastvorljivost i bioraspoloživost, smanjuje toksičnost, proširuje distribuciju i pruža bolje mogućnosti za formulisanje lekova. U većini slučajeva, smanjenje veličine ograničeno je na mikronski opseg, pri čemu se dobijaju farmaceutske forme kao što su prahovi, emulzije, suspenzije itd. Lekovi izrađeni od čestica nanometarskih veličina imaju poboljšane performanse koje se iskazuju u raznim oblicima. Prednosti nanovelicina u farmaceutskoj tehnologiji uključuju:

- (i) povećanje aktivne površine (Slika 5),
- (ii) poboljšanje rastvorljivosti,
- (iii) povećanje raspadljivosti,

- (iv) povećavanje oralne biorasploživosti
- (v) brži početak terapijskog delovanja,
- (vi) potrebne su manje doze,
- (vii) smanjenje varijabilnosti u snabdevanju i
- (viii) smanjenje varijabilnosti između pacijenata.



**Slika 5.** Promena veličine aktivne površine sa smanjenjem dimenzija čestica

Nanočestice se mogu izrađivati na više načina: mlevenjem ili homogenizacijom pod visokim pritiskom velikih čestica kristala, kontrolisanom precipitacijom i kombinacijom mikroprecipitacije i homogenizacije.

Kada se izrađuju lekovi za humanu upotrebu od labilnih supstanci, najčešće se koristi *freeze-drying* postupak. Ovaj postupak se može koristiti i za izradu nanočestica koje sadrže makromolekule i stabilizujuće nosače kao što su PAM (površinski aktivne materije – tenzidi), pufere, šećere itd. Pre samog *freeze-drying* postupka, mogu se primeniti tehnike kao što su emulgovanje, kristalizacija, isoljavanje ili precipitacija da bi se obezbedila kontrola dijametra čestica koje se tada dobijaju. Ovi postupci ne samo da obezbeđuju kontrolu veličine čestica, već mogu uticati i na morfologiju, internu strukturu, «punjenje» lekom, efikasnost enkapsulacije leka, kao i kinetiku otpuštanja. Razumevanje odnosa između fizičko-hemijskih parametara i svojstava nanočestica, omogućilo bi izradu nanočestica sa željenim fizičkim i hemijskim svojstvima za otpuštanje leka u ciljane ćelije ili organe u organizmu.

### 3.4. FIZIČKO-HEMIJSKE KARAKTERISTIKE NANOČESTICA

Farmakokinetika nanočestica, njihovo prodiranje u ćeliju *in vivo*, sposobnost da prođu biološke prepreke, u velikoj meri zavise od njihovih fizičkohemijskih svojstava, kao što su hidrodinamska veličina, oblik, naelektrisanje i druga svojstva površine. Ova svojstva su određena vrstom, strukturom i orijentacijom materijala koji formiraju nanočesticu. U svakoj fazi izrade, veličina, naelektrisanje, hidrofobnost, oblik i orijentacija sastojaka nanočestice se moraju razmatrati da bi se postigla željena fizičkohemijska svojstva nanočestice.

#### **Hidrodinamska veličina**

Biodistribucija nanočestice u velikoj meri zavisi od njenih fizičkohemijskih karakteristika. Hidrodinamska veličina, npr. pomaže kontrolu koncentracije nanočestice u krvnim sudovima, utiče na mehanizam klirensa-eliminacije iz organizma, određuje permeabilnost nanočestica i napuštanje krvotoka. Utvrđeno je da sferne čestice manjih dimenzija imaju veći stepen difuzije, povećavajući koncentraciju nanočestice u centralnom delu krvnog suda. Na taj način umanjuju mogućnost interakcije sa endotelnim ćelijama, odnosno produžavaju vreme boravka u cirkulaciji. Čestice dimenzija manjih od 20 nm, izlučuju se preko bubrega, a čestice srednjih dimenzija (30-150 nm) se akumuliraju u kostnoj srži, srcu, bubrezima i želucu, a velike (150-300 nm) se mogu naći u jetri i slezini. Na taj način, dimenzije čestica generalno određuju mehanizme eliminacije iz organizma, dok ostali fizički parametri istovremeno određuju mobilnost nanočestice. Zlatne nanočestice veličine od 15-50 nm mogu da prođu kroz BBB, a veće nanočestice, dimenzija 100 – 200 nm ne. Ipak, poznato je da permeabilnost BBB zavisi od svih pomenutih fizičkohemijskih svojstava i dimenzija nanočestica ne može u potpunosti određivati propustljivost BBB za nanočesticu.

#### **Oblik**

Nanočestice anizotropnog oblika mogu izbeći bioeliminaciju bolje od sfernih čestica. Povećanje odnosa dužina-širina nanostrukture daje i duže vreme opstanka u cirkulaciji, *in vivo*. Metalne nanočestice sa velikim *aspect ratio* imaju slično, produženo vreme u cirkulaciji *in vivo* u odnosu na sferne čestice.

#### **Površinska svojstva**

Naelektrisanje i hidrofobnost nanočestice utiču na njenu biodistribuciju ograničavanjem ili povećavanjem interakcija čestica sa adaptivnim imunim sistemom, plazma proteinima, ekstracelularnim matriksom i ćelijama koje nisu željena meta. Da bi se ograničila interakcija sa domaćinom, zahvaljujući specijalnom dizajniranju površine dobija se tzv. Stelt efekat – nevidljivost za odbranu domaćina. Za oblaganje površine obično se koristi hidrofilni polietilen glikol (PEG), koji smanjuje potencijal za opsonizaciju preko sterne repulzije, produžavajući tako vreme boravka u cirkulaciji.

#### **Sistemska (intravaskularna) primena nanočestica**

Svaki organizam pokazuje specifične karakteristike:

1. Vrsta i ozbiljnost prepreka (barijera) za nanočestice u cirkulaciji, specifične su za samu bolest i svakog pojedinog pacijenta.
2. Prolazak čestica kroz cirkulaciju zavisi od veličine, oblika i svojstava površine čestica.
3. Prepoznavanje ciljanog tkiva i odgovor abnormalnih ćelija na primenjeni lek su visoko specifični za pacijenta i zavise od građe krvnih sudova, lokalnih hemodinamskih uslova, nivoa ekspresije specifičnih vaskularnih i ekstravaskularnih receptora, vrste bolesti, lokalizacije obolelog tkiva u organizmu itd.

### **Barijere u organizmu**

Osnovu odbrambenog sistema organizma čini serija «bioloških barijera» koje sprečavaju prodor stranih tela u unutrašnjost, kao i njihovo lociranje na željenom mestu. Strana tela su i lekovi koji se primenjuju u obliku injekcija ili kontrastna sredstva. Ove barijere mogu da oslabe funkciju nanočestica tako što sprečavaju njihovo kretanje, izazivaju njihove fizičke promene ili pokreću negativni odgovor domaćina aktiviranjem biohemijske signalizacije.

Nakon intravaskularne aplikacije, nanočestice dolaze u direktan kontakt sa krvlju, heterogenim rastvorom velike jonske jačine, koji može izazvati aglomeraciju nanočestica, jer menja njihova magnetna svojstva i izaziva njihovo izolovanje. Pored toga, dok su u krvotoku, nanočestice mogu nespecifično reagovati sa plazma proteinima (koji onda pokreću adaptivni imuni sistem), ekstracelularnim matriksom i površinom ćelije koja nije željena meta. U svakom navedenom slučaju, nanočestica je u opasnosti da se veže ili da je preuzmu ćelije pre nego što dođe do ciljanog tkiva.

Pored toga što moraju da se prilagode uslovima unutar krvnih sudova, nanočestice moraju prevazići različita ograničenja anatomske dimenzije, koja onemogućavaju pristup nanočestice željenom tkivu (npr. ekstravazacija nanočestica čija meta je limfa iz krvnog suda). Ova ograničenja u smislu dimenzije čestica, posebno su striktna kada su u pitanju određeni organi, kao što su mozak ili bubrezi. Endotelne i potporne astrocitne ćelije ograničavaju nivo pinocitoze u mozgu i stvaraju tesnu vezu između ćelija na međupovršini između krvi i mozga. To čini strukturnu i metaboličku barijeru koja se naziva krvno-moždana ili hemo-encefalna barijera (BBB, *blood brain barrier*, engl.). Jedino nanočestice imaju dovoljno male dimenzije i odgovarajuća fizičko-hemijska svojstva, tako da mogu da prođu ovu prepreku.

Biološke barijere nisu karakteristične samo za međućelijski prostor. Upravo su unutarćelijske barijere osnovni uzrok zbog koga mnogi lekovi ili sistemi za otpuštanje lekova nemaju uspeha, a sistemi nanočestica nisu izuzeci. Kada se nanočestica specifična za određenu ćeliju veže za njenu membranu, ona biva uvučena u unutrašnjost ćelije procesom endocitoze preko receptora, zatim se transportuje unutar ćelije preko endozomalnih odeljaka za obradu i uništavanje acidifikacijom endozoma. Većina ovih endozoma se onda prebacuje u lizosome, gde hidrolitičkim i enzimskim reakcijama dolazi do kompletne metaboličke razgradnje makromolekula. Mnogi lekovi, kao što su DNK i siRNK, su osetljivi na razlaganje u lizozomima, zbog čega postaju neaktivni nakon ćelijske obrade. Da bi izbegli ovu sudbinu, nosači se specijalno obrađuju kako bi se olakšalo uklanjanje endozoma pre dolaska lizozoma. Nanočestice koje pokazuju sposobnost uklanjanja endozoma i dalje mogu naići na neku dodatnu barijeru, kao što je npr. membrana jedra, kao što se očekuje kod efikasne genske terapije. Svaka od ovih prepreka

pokazuje specifične zahteve prilikom dizajniranja sistema nosača i oni se moraju ispoštovati kod izrade jezgra i omotača nanočestice.

### 3.4. TARGETIRANJE, MULTIFUNKCIONALNOST, MODIFIKOVANJE POVRŠINE

Oslobađanje lekovite supstance u organizmu, nailazi na brojne prepreke, kao što su: ciljanje - targetiranje specifičnog mesta, poboljšan klirens, selektivnost i permeabilnost bioloških membrana, prisustvo metaboličkih enzima i degradacija u endozomima/lizozomima.

Sistemska (intravaskularna) primena nanočestica koristi se u terapijske i dijagnostičke svrhe. Nanočestice deluju na mestu čvrste tumorske mase, upaljenom delu sistema krvnih sudova, ili bilo gde unutar organizma gde se umnožavaju nenormalne ćelije. Pre nego što dospeju do ciljanog mesta, ove nanočestice moraju da prođu čitav niz prepreka, koje teže da ih izdvoje, svare i/ili izbace iz organizma, kao i svako drugo strano telo. Kada se radi o targetiranju tumorskog tkiva, takve fiziološke barijere mogu biti:

- obiman i privremeno heterogen protok krvi, s obzirom na hiper-propustljive, šupljikaste krvne sudove i nedostatak funkcionalnog limfnog sistema,
- povišen intersticijelni pritisak tečnosti koji može smanjiti transport slobodnih molekula kroz krvne sudove i intersticijelni prostor u ekstracelularnom matriksu,
- jako zamršen ekstracelularni matriks koji i sam predstavlja dodatnu barijeru za otpuštanje i transport lekova.

Pored toga, dodatnu smetnju predstavljaju i biološke barijere, kao što su:

- retikulo-endotelni sistem (RES) – fagociti, specijalizovane ćelije koje oblažu jetru, slezinu, kostnu srž i limfno tkivo, one prepoznaju strane molekule i uklanjaju ih iz cirkulacije i
- nedovoljna ekspresija receptora na membrani ciljanih ćelija, zbog čega je otežano njeno specifično prepoznavanje terapijskim molekulima ili kontrastima za snimanje.

Treba naglasiti da je vrsta i ozbiljnost prepreke specifična za samu bolest i svakog pojedinog pacijenta.

Na putu kroz cirkulaciju do ciljanog mesta delovanja, javljaju se problemi koji mnogo zavise od veličine, oblika i svojstava površine čestica. Takođe, konačno prepoznavanje ciljanog tkiva i odgovor abnormalnih ćelija na primenjeni lek, su visoko specifični za pacijenta i zavise od građe krvnih sudova, lokalnih hemodinamskih uslova, nivoa ekspresije specifičnih vaskularnih i ekstravaskularnih receptora, vrste bolesti, lokalizacije obolelog tkiva u organizmu itd.

### 3.5. BEZBEDNOST NANOMATERIJALA

Farmaceutska nanotehnologija je omogućila finu dijagnostiku i fokusirano lečenje bolesti. Međutim, neka etička, naučna, društvena i regulatorna pitanja predstavljaju različite izazove u praktičnoj primeni farmaceutskih nanotehnologija. Povećani zdravstveni rizik povezan sa primenom preparata na bazi farmaceutske nanotehnologije uključuje citotoksičnost, translokaciju do neželjene ćelije/tkiva, akutnu i hroničnu toksičnost, kao i neka nepoznata, nepredvidiva i nedefinisana pitanja bezbednosti i uticaja nanomaterijala na životnu sredinu i biokompatibilnost. Etička pitanja su takođe veoma značajna kod određivanja upotrebnih vrednosti nanotehnoloških otkrića. Za sada ne postoje specifične direktive za regulisanje

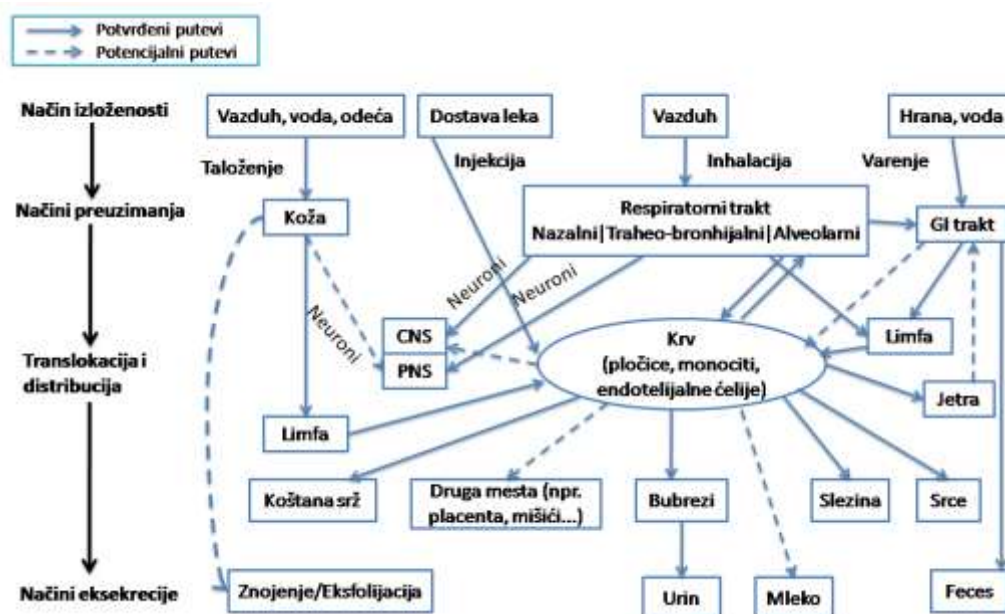
lekova zasnovanih na proizvodima nanotehnologije. Sve ovo je razlog potrebe da se što pre reguliše pitanje proizvoda baziranih na nanotehnologijama, posebno onih koji imaju masovnu primenu i/ili primenu u medicini. Regulatorna bi morala da obuhvati:

- lekove – biološke, veterinarske i OTC (*over the counter*, engl., koji se izdaju bez lekarskog recepta) lekove
- medicinska sredstva, uključujući i dijagnostička sredstva,
- dijetetske suplemente,
- kozmetičke preparate,
- hranu i i dodatke hrani.

Karakterizacija, bezbednost i uticaj na životnu sredinu su tri osnovna elementa koja treba da budu regulisana.

### 3.6 TOKSIČNOST NANOČESTICA

Iako se otvaraju beskrajne mogućnosti, sa nanočesticama treba biti veoma oprezan. Za sada, utvrđeni su i objašnjeni mnogi putevi preuzimanja i premeštanja čestica, ali ima i mnogo onih koji su samo hipotetički i tek ih treba istraživati (Slika 6). Nanočestice iz okruženja dospevaju u organizam preko kože, inhalacijom, ingestijom, preko konjunktive oka i mukoznih membrana. Treba imati na umu da se nanočestice mogu taložiti u plućima i izbeći eliminaciju fagocitnom aktivnošću ili mikrocilijarne mehanizme uklanjanja.



**Slika 6.** Putevi preuzimanja i premeštanja nanočestica

Osnovni faktor preko koga se procenjuje mogući rizik od upotrebe proizvoda sa nanočesticama (osim u lekovima, ima ih i u kozmetičkim proizvodima - za kožu, kosu i negu usta i zuba – paste za zube, u hrani itd.) je njihovo moguće preuzimanje iz okruženja, odnosno prodiranje nanomaterijala u humani organizam, kao i njegova dalja sudbina u smislu akumuliranja u organima, uticaja na metabolizam, ekskreciju itd. U tom smislu postoji jasna razlika između rastvorljivih i/ili biorazgradljivih nanočestica, koje se raspadaju nakon aplikacije na osnovne molekule (npr. lipozomi, mikroemulzije, nanoemulzije) i

nerastvorljivih i/ili bioperzistentnih nanočestica (npr.  $\text{TiO}_2$ , fulereni, kvantne tačke i drugi). Primarni uzrok problema su upravo nerastvorljive čestice. Ako se one nađu u cirkulaciji, moguće je i njihovo premeštanje/transport, pa čak i akumulacija u sekundarnim ciljanim organima, a to postaje veoma opasno ako se primena ponavlja više puta. Pored toga, nerastvorljive čestice predstavljaju i veliko opterećenje za bezbednost okoline, zbog čega je potrebno vršiti analizu kompletnog životnog ciklusa, odnosno lanca ishrane u prirodi.

Nanomaterijali mogu penetrirati do ćelijske membrane, kretati se cirkulacijom kroz organizam, odlagati se na ciljanom organu izazivajući oštećenje tkiva, mogu se vezivati za DNK, proteine i različite receptore, putovati do svakog tkiva (ne bi bilo moguće u uobičajenim uslovima). Nanočestice koje se inhaliraju, mogu se taložiti na plućima i izazvati alergijske reakcije. Karbonske nanočestice koje su deo aerozagađenja, fuleren, karbonske nanotube i druge, najverovatnije izazivaju „azbestni” tip bolesti nakon dugotrajne inhalacije. Derivati fulerena mogu izazvati kidanje lanca nukleotida u molekulu DNK, uglavnom na mestu guanina.

Povećanu toksičnost za organe za disanje utvrđenu kod miševa i pacova, pokazale su karbonske nanotube, kada se porede sa ugljenikovim crnilom (*carbon black*) i karbonilne čestice gvožđa. Ove sićušne čestice lako penetriraju u kožu i prolaze hemato-encefalnu barijeru, što dovodi do nekoliko novih potencijalnih oblika trovanja. Zato se moraju sprovesti ozbiljna istraživanja toksičnih efekata ovih materijala. Potencijalni problemi bezbednosti nanomaterijala posledica su njihovog sastava – većina je izrađena od metala, metalnih oksida, neorganskih materijala i polimera koji nisu biorazgradljivi. Ovi materijali se mogu trajno odlagati u biološka tkiva, a mogu se i premeštati u glavne organe, što predstavlja ozbiljnu pretnju zdravlju.

### 3.7 TOKSIKOLOŠKI EFEKTI NANOMATERIJALA

Toksikološki efekti nanomaterijala se mogu pojednostavljeno prikazati sa 8 događaja, mada su to vrlo složeni mehanizmi i procesi koji još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.

1. ROS produkti, kao što su superoksid anjon ( $\text{O}_2^-$ ) i hidroksil ( $\text{OH}$ ), unutra ili van ćelije mogu biti ključni faktori za toksikološke efekte nanomaterijala. Integritet ćelijske membrane, neophodan za opstanak ćelije biće ugrožen ROS-ma koje stvaraju nanočestice manje od ćelije.

2. Kada se nanočestice prošire u organizmu, one stvaraju ROS produkte,

3. Rastvorljivost čestica utiče na funkciju ćelijske membrane posle širenja nanočestica,

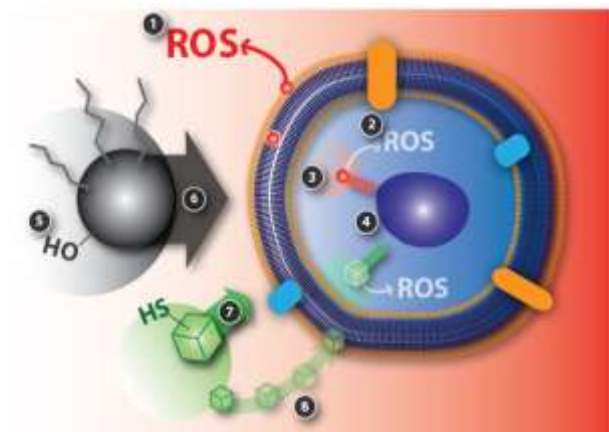
4. Moguće je mehaničko oštećenje ćelijskih struktura kao što su lisosom, endoplazmatski retikulum ili jedro,

5. Različite funkcionalne grupe i elektronske strukture na površini, koje potiču od različitih nanomaterijala određuju nivo interakcija između nanočestica i njihovog okruženja,

6. Dimenzija čestice ima važnu ulogu, velike čestice mogu izazvati trajno oštećenje na ćelijskoj membrani, a male čestice mogu proći kroz membranu i načiniti štetu unutar ćelije,

7. Čestice koje nisu u obliku sfere, mogu imati drugačije biološke efekte u poređenju sa sfernim nanočesticama,

8. Svojstva rastvorljivosti nanomaterijala van ćelije mogu uticati na ćeliju na različite načine.



**Slika 7.** Interakcija ćelije i nanočestice.

### **Opasnosti za okruženje**

Najvažniji faktor za potencijalnu nanotoksičnost je nedostatak biorazgradljivosti mnogih nanomaterijala. Nakupljanje ovih čestica u okruženju predstavljaju ozbiljan problem, kroz proces kruženja u prirodi dospevaju i u humani organizam. Već sada se zna da fulereni i karbonske nanotube imaju takav efekat. Prečišćavanje morske vode u posebnim postrojenjima, procesom sedimentacije: nanočestice, pod normalnim uslovima, nikada neće biti u sedimentu, te nikada neće ni biti odstranjene iz vode. Potreban je poseban proces za prečišćavanje vode od nanočestica, npr. kontrolisanom flokulacijom pomoću netoksičnih flokulanata.

Izveštaj Evropske komisija o stanju zaštite zdravlja i potrošača 2008. ističe se da trenutno ne postoji dovoljno informacija o:

- utvrđivanju rizika,
- proceni izloženosti,
- preuzimanju iz okruženja (uključujući i obolelu ili oštećenu kožu),
- ulozi fizičko-hemijskih parametara nanočestica na apsorpciju i transport kroz membrane u digestivnom traktu i plućima,
- ulozi fizičko-hemijskih parametara nanočestica u cirkulaciji (biokinetika i akumulacija u sekundarne ciljane organe),
- mogućí efekti na zdravlje (osetljivije kategorije stanovništva),
- premeštanje nanočestica preko placentu u fetus itd.

Konvencionalne metode za procenu rizika odgovaraju za biorazgradljive, ali ne i za bioperzistentne nanočestice.

Nano-lekovi koje je odobrio FDA SAD



	Naziv leka	Indikacije	Način primene	Datum odobrenja
Lipozomske forme	Doxil®	Citostatik	i.v.	17.11.1995.
	Abelcet®	Antimikotik	i.v.	20.11.1995.
	Daunoome®	Citostatik	i.v.	8.4.1996.
	...	...	...	...
Nanokristalne forme	Visudyne®	Fototerapija za makularnu degeneraciju oka	i.v.	12.4.2000.
	Rapamune®	Imunosupresiv	Oralno	22.8.2002.
	Emend®	Antiemetik	Oralno	26.3.2003.
	Tricor®	antihiperholesterolemiki	Oralno	5.11.2004.
	Triglide®	Antitrigliceridemik antiiperholesterolemiki	Oralno	7.5.2005.
...	...	...	...	
Ostalo	Feridex®	Kontrast za MRI	i.v.	30.8.1995.
	Estrasorb®	Vazomotorni simptomi kod menopauze	Transdermalno	9.10.2003.
	Abraxane®	Metastatski rak dojke	i.v.	7.1.2005.

## Literatura

[1] Milena Papić - Obradović, Suzana Miljković, Lidija Matija, Jelena Munćan, Đuro Koruga, Osnove NanoMedicine, DonVas/Nauka, Beograd, 2009.