

# Mixed copolymer-based micelles, a promising avenue for drug delivery applications.


Angeliki Maria Gerardou<sup>1,2</sup>, Anastasia Balafouti<sup>1</sup> and Stergios Pispas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Theoretical and Physical Chemistry Institute, National Hellenic Research Foundation, Greece.

<sup>2</sup>Department of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Greece.



## Στόχος της έρευνάς μας

- Ένας μεγάλος αριθμός νέων φαρμάκων απορρίπτεται στα αρχικά στάδια της έρευνας λόγω της κακής υδατοδιαλυτότητάς τους  δημιουργείται η ανάγκη για καινοτόμα συστήματα σκευασμάτων για να γίνουν βιοδιαθέσιμες αυτές οι ενώσεις.
- Η νανοτεχνολογία φαίνεται να έχει βρει μια λύση χρησιμοποιώντας μικτά μικκύλια για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων.
- Γι'αυτό το λόγο η παρούσα μελέτη εστιάζεται στις πολυάριθμες στρατηγικές για το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση μικτών μικκυλίων καθώς και για την χορήγηση φαρμάκων που παρουσιάζουν διαφορετικούς βαθμούς διαλυτότητας.
- Διάφορες φυσικοχημικές τεχνικές χαρακτηρισμού όπως η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS, ELS), φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-Vis, φασματοσκοπία φθορισμού (FS) και φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, όπως το μέγεθος, η ομοιογένεια και το επιφανειακό φορτίο των αναδυόμενων νανοδομών σε υδατικά μέσα.

# Μεικτά μικκύλια

Τα πολυμερικά μικκύλια που προέρχονται από έναν τύπο συμπολυμερούς μπορεί να παρουσιάζουν περιορισμένες δυνατότητες. Δεδομένου ότι αυτά τα μικκύλια παρεμποδίζονται από το γεγονός ότι διαθέτουν μικρό αριθμό δομικών στοιχείων. Για να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια, ένας τρόπος είναι ο συνδυασμός αμφιφιλικών πολυμερών για την παραγωγή μικτών μικκυλίων. Υπάρχει δυνατότητα να βελτιωθούν τα υπάρχοντα χαρακτηριστικά και να ξεπεραστούν ορισμένα από τα αναδυόμενα μειονεκτήματα των συμβατικών πολυμερών μικκυλίων με λίγη έως καθόλου προσπάθεια όσον αφορά τις συνθετικές διαδικασίες.

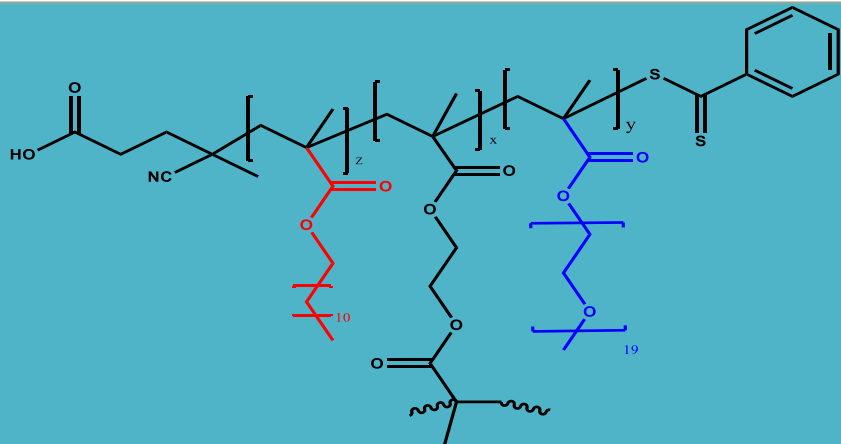
Τα μικτά μικκύλια προσφέρουν σημαντικά οφέλη:

- ❖ Στη θερμοδυναμική ενός συστήματος με τη μείωση της κρίσιμης συγκέντρωσης μικκυλίων.
- ❖ Στην ανθεκτικότητα των μικκυλίων ενισχύοντας τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, τους δεσμούς H και άλλους σταθεροποιητικούς παράγοντες.
- ❖ Στην αποτελεσματικότητα ενθυλακώσης φαρμάκων.
- ❖ Στον έλεγχο του μεγέθους των αναδυόμενων νανοσωματιδίων.
- ❖ Στην ευκολία προσθήκης πολλαπλών χαρακτηριστικών (π.χ. θερμοευαίσθητες δυνατότητες).

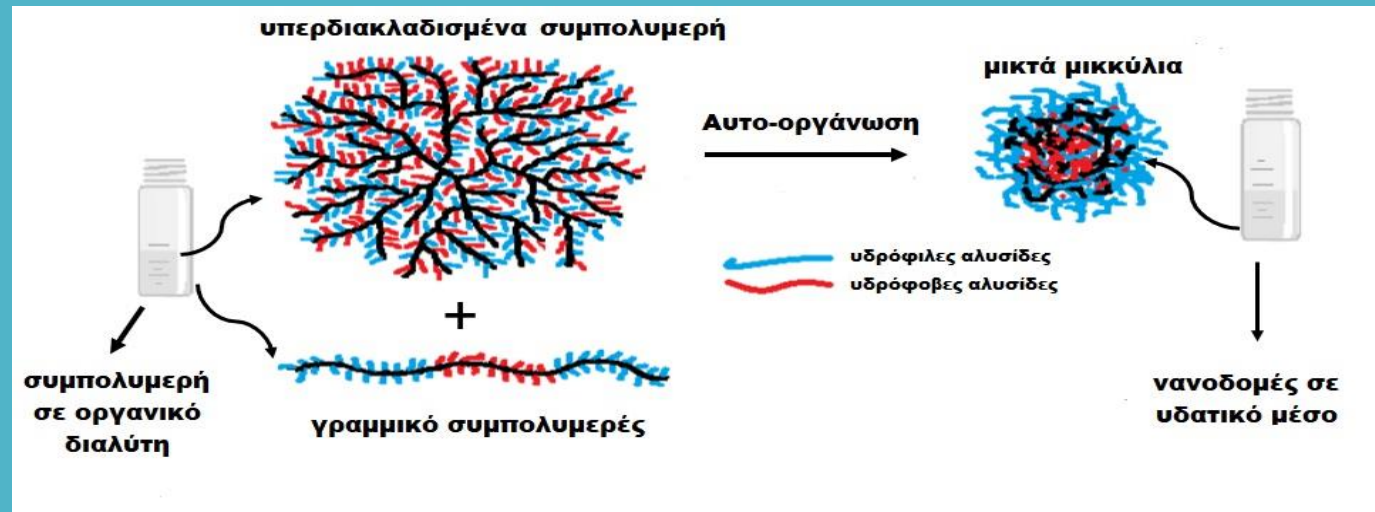
# Σύνθεση νανοδομών

Το πρωτόκολλο εξάτμισης διαλύτη παρήγαγε νανοδομές με χαμηλούς δείκτες πολυδιασποράς (PDI) και υδροδυναμική ακτίνα ( $R_h$ ) στο εύρος της νανοκλίμακας (14-21 nm). Χρησιμοποιήθηκε δυναμική σκέδαση φωτός για να ληφθούν αυτά τα ευρήματα.

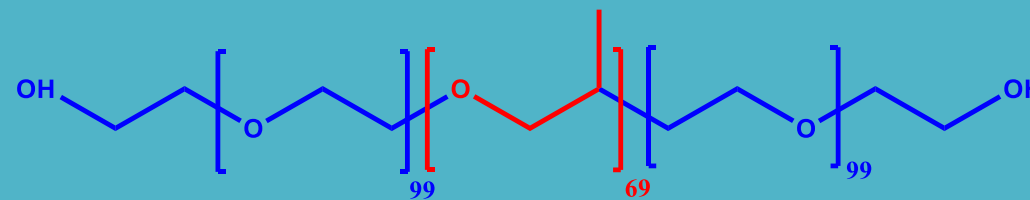
Το OEGMA και το LMA είναι βιοσυμβατά μονομερή, ενώ τα πολυμερή τους είναι ιδιαίτερα υδρόφιλα και υδρόφοβα αντίστοιχα. Το OEGMA είναι ένα ανάλογο PEG που συνήθως ερευνάται ως επίστρωση σε νανοφορείς στον τομέα της νανοτεχνολογίας.



H-[P(OEGMA-co-LMA)]



Το αμφίφιλο βιοσυμβατό θερμοευαίσθητο συμπολυμερές αποτελείται από μια επαναλαμβανόμενη μονάδα PPO στο κέντρο της και το υδρόφοβο PEO την περιβάλλει.



Pluronic F127.

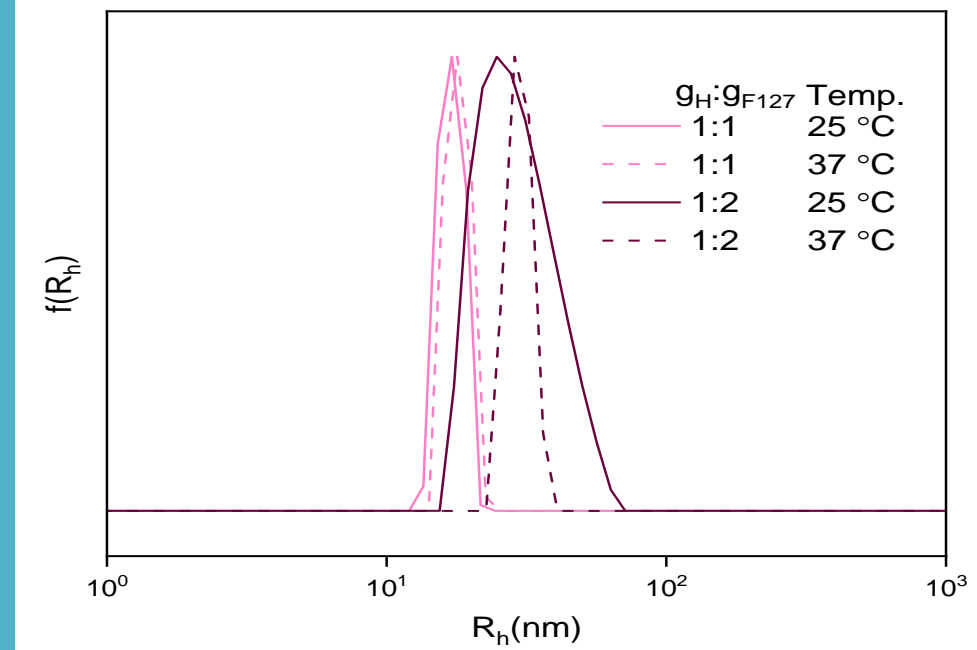
# Χαρακτηρισμός νανοδομών

Σύστημα	Z- potential (mV)
F127:H-[P(OEGMA-co-LMA)]=1	-25.3
F127:H-[P(OEGMA-co-LMA)]=2	-18.8

Ένα ελαφρώς αρνητικό επιφανειακό φορτίο μπορεί να είναι ωφέλιμο καθώς δεν προκαλεί αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες του ορού.

Τα συστήματα φαίνονται να είναι λίαν ασταθή ως προς το ζ δυναμικό τους. Η κολλοειδής σταθερότητα συνδέεται με μεγαλύτερες τιμές δυναμικού ζ. Το δυναμικό ζ χρησιμεύει ως δείκτης, αλλά δεν παρέχει την πλήρη εικόνα. Η σταθερότητα των κολλοειδών συστημάτων καθορίζεται από το άθροισμα των ελκτικών δυνάμεων και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και εξαιτίας αυτού, σταθερά κολλοειδή συστήματα με μέτριο δυναμικό ζ και αντίστροφα δεν είναι σπάνια.

Καλό παραδειγμά αποτελεί το PEGylation, η οποία είναι γνωστό ότι αυξάνει την ανθεκτικότητα των νανοσωματιδίων ενώ μειώνει το ζ δυναμικό καλύπτοντας αρνητικά φορτισμένα νανοσωματίδια.



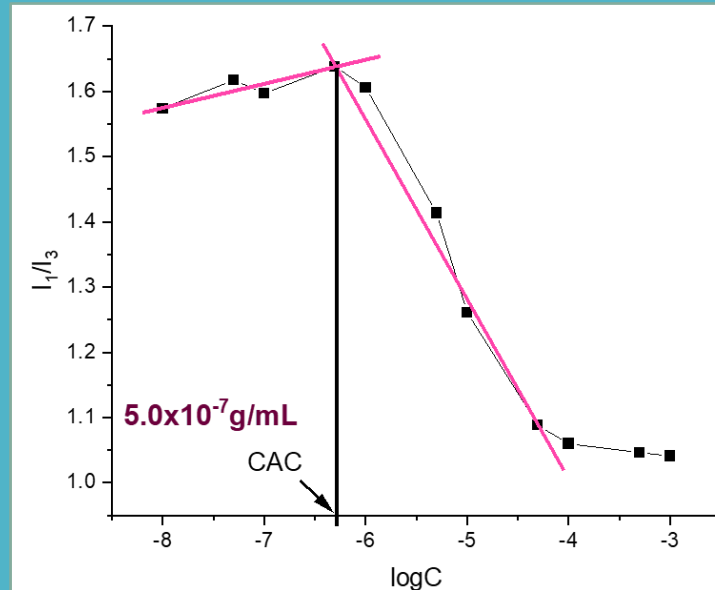
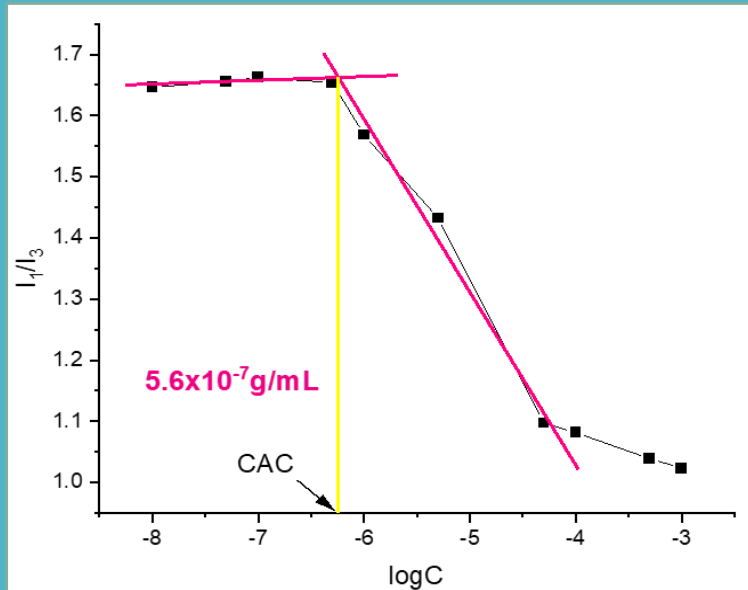
Κατανομές μεγέθους από ανάλυση DLS για τις νανοδομές H- [P(OEGMA-co-LMA)] – F127 [πρωτόκολλο εξάτμισης διαλύτη, διαλύτης: αιθανόλη].

Τα αποτελέσματα DLS για τα μικτά συστήματα συμπολυμερών, υποδεικνύουν ότι τα μικτά συσσωματώματα είναι μάλλον ομοιογενή ανεξάρτητα από την αναλογία H:F127.

Θερμοκρασία	PDI	$R_h$ (nm)	Wp(%)
H:F127 (ratio 1:1) –πρωτόκολλο εξάτμισης διαλύτη			
25°C	0.032	14	>90
37°C	0.111	14	>90
25°C	0.086	13	>90
H:F127 (ratio 1:2)-πρωτόκολλο εξάτμισης διαλύτη			
25°C	0.262	21	>90
37°C	0.108	20	>90
25°C	0.29	20	>90

# Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (CMC)

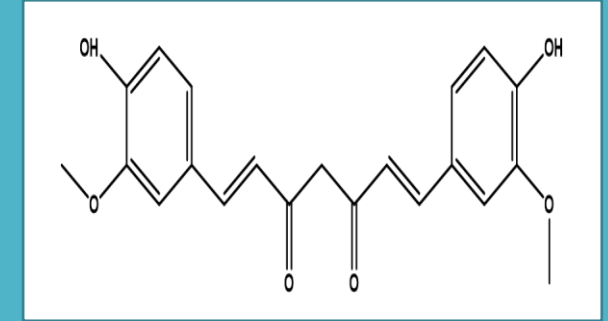
Η ικανότητα των συμπολυμερών να αυτοσυναρμολογούνται σε υδατικά μέσα αξιολογήθηκε με διερεύνηση της κρίσιμης συγκέντρωσης συσσωμάτωσης (CAC/CMC). Όταν επιτευχθεί αυτή η συγκέντρωση, ο σχηματισμός μικκυλίων σε διαλύματα είναι θερμοδυναμικά επωφελής. Αυτές οι δομές τείνουν να αποσυντίθενται όταν διανέμονται σε μεγάλους όγκους, όπως στην κυκλοφορία του αίματος. Ο μέσος όρος του όγκου του αίματος είναι κατά προσέγγιση 5 λίτρα, το οποίο και είναι προβληματικό καθώς τα μικκύλια μπορεί να αποδιαταχθούν πρόωρα στην κυκλοφορία του. Όλα τα πλεονεκτήματα των νανοφορέων, όπως η αυξημένη ικανότητα φόρτωσης φαρμάκου, η εκτεταμένη κυκλοφορία του αίματος, η ενεργός στόχευση από ευαίσθητες σε ερεθίσματα ιδιότητες κ.λπ., ενδέχεται να χαθούν από την πρόωρη απελευθέρωση φαρμάκου, προσφέροντας αποτελέσματα συγκρίσιμα με αυτά ενός συμβατικού φαρμάκου.



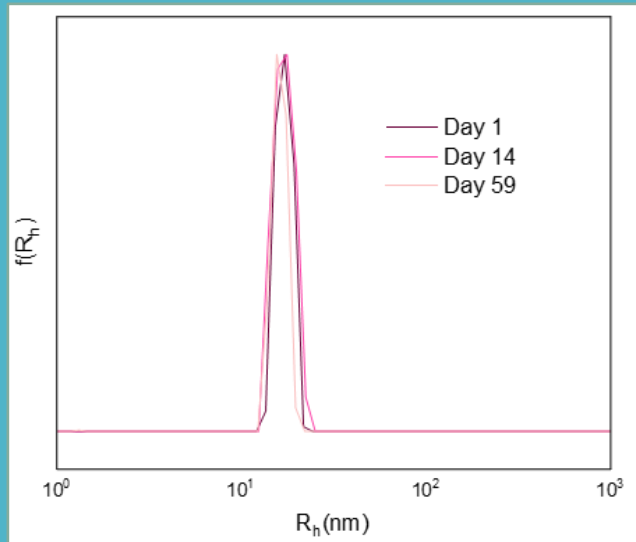
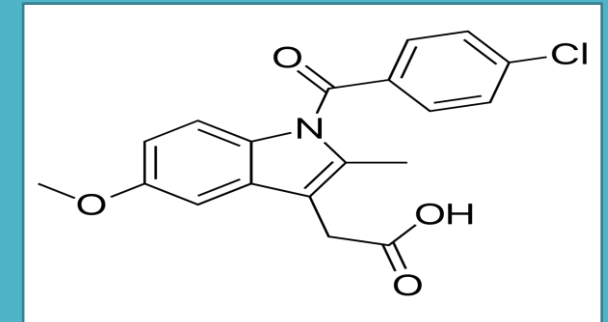
Οι τιμές και στα δύο συστήματα είναι αρκετά χαμηλές  $5,6 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$  και  $5,0 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ . Και τα δύο μικτά συστήματα — το Pluronic F127 ( $6,9 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ ) και το H-[P(OEGMA-co-LMA)] ( $2,5 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ )— ξεπέρασαν τις πρόδρομες ενώσεις τους, υποστηρίζοντας την ιδέα ότι τα μικτά συστήματα μπορεί να είναι ανώτερα από τα συμπολυμερή τους. Ένα υψηλότερο ποσοστό συμπολυμερούς Pluronic φαίνεται να έχει ευνοϊκά αποτελέσματα με τη μείωση της κρίσιμης συγκέντρωσης μικκυλίων.

Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση H-[P(OEGMA-co-LMA)]:F127=1 (αριστερά) και F127:H-[P(OEGMA-co-LMA)]=2

Η κουρκουμίνη είναι η πιο διαδεδομένη πολυφαινολική ένωση στον κουρκουμά. Μελέτες έχουν τεκμηριώσει ένα ευρύ φάσμα θεραπευτικών εφαρμογών όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δράση. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η κουρκουμίνη φαίνεται να έχει τόσο προληπτικά όσο και θεραπευτικά αποτελέσματα στον καρκίνο, την αθηροσκλήρωση, τη γήρανση και τις νευροεκφυλιστικές διαταραχές ρυθμίζοντας διάφορους μοριακούς στόχους. Πρέπει να έχουμε κατά νου ότι η διαλυτότητα της κουρκουμίνης είναι περιορισμένη. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικά περιορισμένη η βιοδιαθεσιμότητά του και απομακρύνεται ταχέως από τον οργανισμό.



Η ινδομεθακίνη είναι ένα ισχυρό μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την ανακούφιση του πόνου, του πυρετού, του οιδήματος και της δυσκαμψίας. Ωστόσο παρουσιάζει ορισμένες παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένου του ερεθισμού του γαστρεντερικού βλεννογόνου μετά από χορήγηση από το στόμα. Περίπου το 30-60% των ατόμων που λαμβάνουν τυπικές θεραπευτικές δόσεις αυτού του φαρμάκου αναπτύσσουν παρενέργειες, με το 10-20% να διακόπτουν τη θεραπεία. Σε συνδυασμό με τη μέτρια υδροφοβικότητα που παρουσιάζει η ινδομεθακίνη, είναι καλός υποψήφιος για την ενθυλακώση του σε μικτά μικύλια.



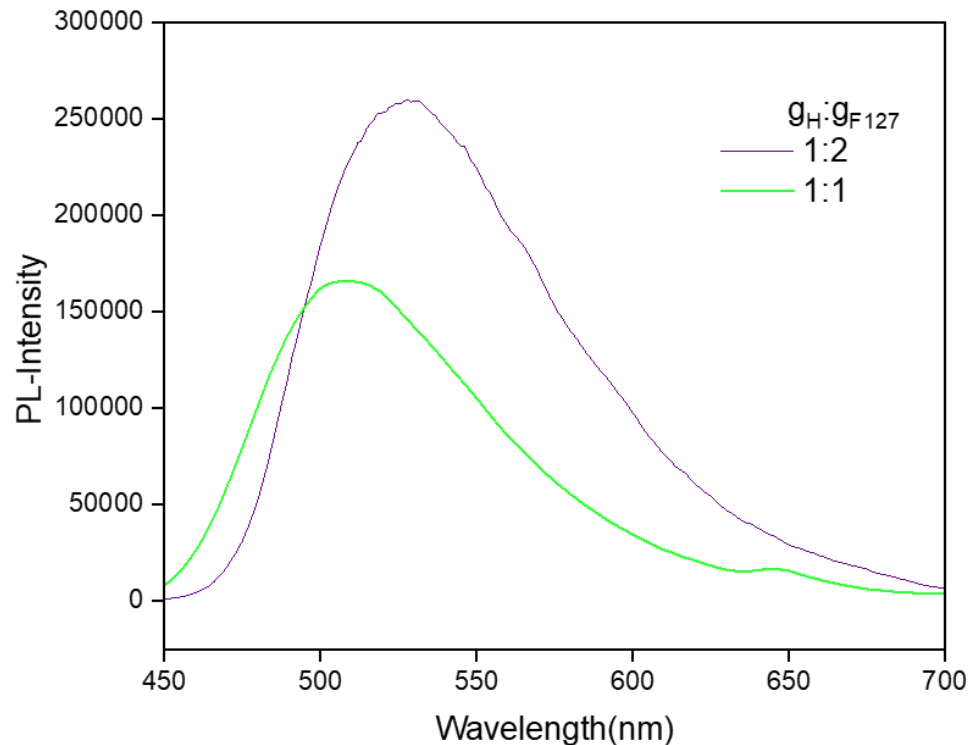
Μελέτες σταθερότητας από ανάλυση DLS των μικτών νανοδομών με κουρκουμίνη H-[P(OEGMA-co-LMA)]:F127=1 σε θερμοκρασία 25°C.

Θερμοκρασία	PDI	R <sub>h</sub> (nm)	Wp(%)
<b>H:F127 (ratio 1:1) –κουρκουμίνη- σε PBS</b>			
<b>25°C</b>	0.123	16	>90
<b>H:F127 (ratio 1:2) -κουρκουμίνη- σε PBS</b>			
<b>25°C</b>	0.06	29	>90
<b>H:F127 (ratio 1:1)-ινδομεθακίνη- σε υπερκάθαρο νερό</b>			
<b>37°C</b>	0.415	25	>90
<b>H:F127 (ratio 1:2)-ινδομεθακίνη-σε υπερκάθαρο νερό</b>			
<b>37°C</b>	0.07	24	>90
<b>H:F127 (ratio 1:1)-ινδομεθακίνη-PBS</b>			
<b>37°C</b>	0.016	31	>90
<b>H:F127 (ratio 1:2)-ινδομεθακίνη-PBS</b>			
<b>37°C</b>	0.02	19	>90

Στον πίνακα παρουσιάζονται τα πιο πρόσφατα αποτελέσματα. Η ένταξη του φαρμάκου επεφερε καλύτερα αποτελέσματα κατι ανεμενομένο λόγω υδροφοβικότητας.

# Φθορισμός νανοδομών

Η κourκουμίνη έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην βιοαπεικόνιση. Διερευνήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού για να εξακριβωθεί εάν οι ίδιες ιδιότητες φθορισμού εξακολουθούν να υφίστανται μετά την μικυλλίωση. Το μήκος κύματος διέγερσης κourκουμίνης βρίσκεται στα 405 nm. Η συγκέντρωση της κourκουμίνης στο σύστημα H-[P(OEGMA-co-LMA)]:F127=1 ήταν  $1,0 \times 10^{-4}$  g/mL και στο F127:H-[P(OEGMA-co-LMA)]=2 ήταν  $1,5 \times 10^{-4}$  g /mL. Τα ληφθέντα μικκύλια διατήρησαν τις ικανότητες φθορισμού της κourκουμίνης.

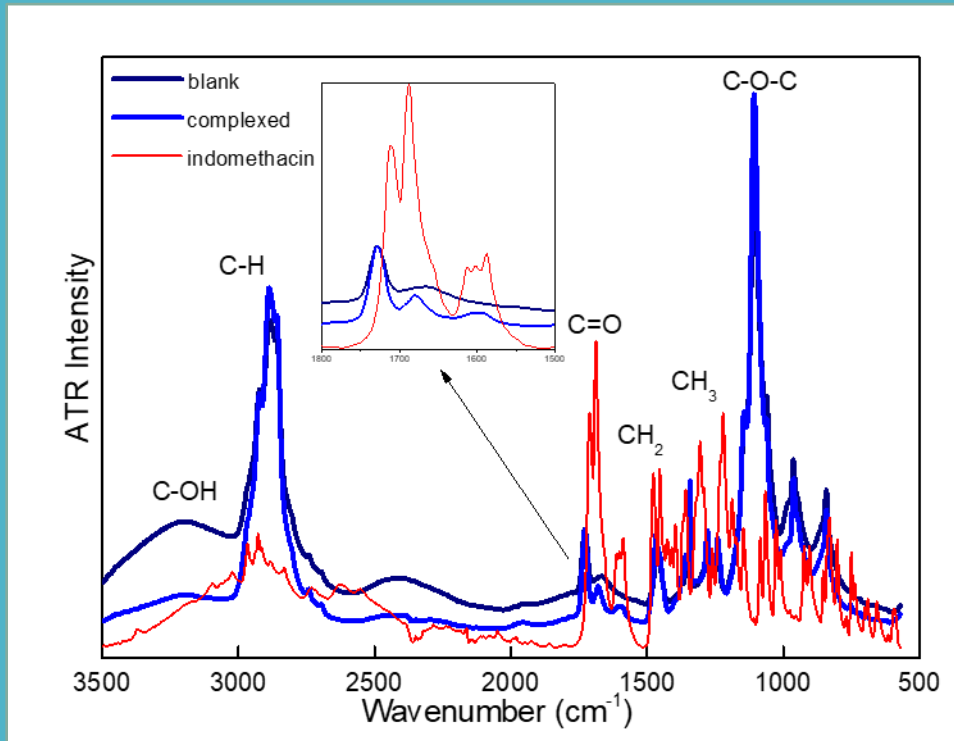


Τα αποτελέσματα αψηφούν τον κανόνα « οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παράγουν μεγαλύτερη ένταση». Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι ανάλογα με τη συγκέντρωση, οι νανοδομές αλλάζουν τη μορφή τους. Η τυπική κορυφή της κourκουμίνης σε ακετόνη είναι στα 504 nm. H-[P(OEGMA-co-LMA)]:F127=1 (κourκουμίνη 10%) παρουσιάζει μια ελαφρά μετατόπιση στα 507 nm και F127:H-[P(OEGMA-co-LMA)]=2 (κourκουμίνη 10%) μια μετατόπιση στα 527 nm. Αυτή η μετατόπιση πιθανότατα προκλήθηκε από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κourκουμίνης και των υδρόφοβων μονάδων PPO και LMA και των δύο συμπολυμερών. Συνολικά, τα ληφθέντα μικκύλια διατήρησαν τις φθορίζουσες ικανότητες της κourκουμίνης και πέτυχαν υδατοδιαλυτότητα.



## Συμπεράσματα

- Στην έρευνά μας, παρασκευάστηκαν με επιτυχία μικτοί νανοφορείς H-[P(OEGMA-co LMA)]:F127. Το πρωτόκολλο εξάτμισης διαλύτη παρήγαγε νανοφορείς με ευνοϊκά χαρακτηριστικά, όπως μικρή υδροδυναμική και χαμηλό δείκτη πολυδιασποράς. Όλες οι νανοδομές που σχηματίστηκαν χρησιμοποιώντας αυτή την απλή τεχνική δεν ξεπέρασαν τα 50 nm, καθιστώντας τις ιδανικές υποψήφιους νανοφορείς για χορήγηση φαρμάκων.
- Οι νανοφορείς με κουρκουμίνη διατήρησαν τις φυσικοχημικές ιδιότητες για τουλάχιστον 50 ημέρες.
- Τα νανοσυστήματα που περιέχουν ινδομεθακίνη απαιτούσαν περισσότερο χρόνο για να εγκατασταθούν σε μια πιο συμφέρουσα διαμόρφωση. Τα μικτά συστήματα με ινδομεθακίνη που μετρήθηκαν ήταν μεταξύ 19-31 nm, με τιμές πολυδιασποράς  $\leq 0,02$ .
- Η χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού απέδειξε ότι πράγματι τα αναδυόμενα συστήματα έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν στη βιοαπεικόνιση.



Η φασματοσκοπία IR είναι μια πολύτιμη μέθοδος για την επικύρωση της αποτελεσματικής ενθυλάκωσης της ινδομεθακίνης. Το παρακάτω γράφημα απεικονίζει τα φάσματα υπερύθρων των νανοδομών H-[P(OEGMA-co LMA)]:F127=1. Η δόνηση τάσης αιθέρα C-O-C υποδεικνύεται από την οξεία κορυφή στα 1104  $\text{cm}^{-1}$ . Η λειτουργική ομάδα του C=O που υπάρχει στην ινδομεθακίνη είναι υπεύθυνη για την οξεία κορυφή στα 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του εκδόχου και του φαρμάκου θα μπορούσαν να οφείλονται για τις διακυμάνσεις στην περιοχή από 1550 έως 1750  $\text{cm}^{-1}$ . Η κορυφή στα 2889  $\text{cm}^{-1}$  σχετίζεται με την δόνηση τάσης C-H, η οποία είναι επίσης ορατή στα φάσματα IR του Pluronic. Η δόνηση τάσης C-OH είναι υπεύθυνη για τη μεγάλη ευρεία κορυφή στα 3209  $\text{cm}^{-1}$ .

# Βιβλιογραφία

## Διαφάνεια 2:

1. Clarysse, S., Brouwers, J., Tack, J., Annaert, P. & Augustijns, P. Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: Comparison with solubility in human intestinal fluids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **43**, 260–269 (2011).
2. Liu, W. *et al.* Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *Journal of Drug Targeting* **24**, 694–702 (2016).
3. Cornelia Keck, Szymon Kobierski, Rachmat Mauludin & Rainer H. Müller. S ECON D GENERATION O F DRUG NANOCRYSTALS FOR DELIVERY O F POORLY SOLUBLE DRUGS : SMART C RYSTALS TECHNOLOGY. *D O S I S* (2008).

## Διαφάνεια 3:

1. Saxena, V. & Hussain, M. D. Polymeric Mixed Micelles for Delivery of Curcumin to Multidrug Resistant Ovarian Cancer. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **9**, 1146–1154 (2013).
2. Manjappa, A. S., Kumbhar, P. S., Patil, A. B., Disouza, J. I. & Patravale, V. B. Polymeric Mixed Micelles: Improving the Anticancer Efficacy of Single-Copolymer Micelles. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* **36**, 1–58 (2019).
3. Wakebayashi, D. *et al.* Lactose-conjugated polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system: their preparation and gene transfecting efficiency against cultured HepG2 cells. *Journal of Controlled Release* **95**, 653–664 (2004).
4. Ebrahim Attia, A. B. *et al.* Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **16**, 182–194 (2011).
5. Cagel, M. *et al.* Polymeric mixed micelles as nanomedicines: Achievements and perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **113**, 211–228 (2017).

## Διαφάνεια 4:

1. ΜΠΑΛΑΦΟΥΤΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ. Υπερδιακλαδισμένα Τυχαία Αμφίφιλα Συμπολυμερή H-[P(OEGMA-co-LMA)]:Σύνθεση, Χαρακτηρισμός, Ιδιότητες σε διαλύματα και Δυνατότητα εγκλωβισμού υδρόφοβων ενώσεων. (2021).
2. Qian, J., Xu, W., Zhang, W. & Jin, X. Preparation and characterization of biomorphic poly(l-lactide-co-β-malic acid) scaffolds. *Materials Letters* **124**, 313–317 (2014).
3. Sharma, P. K. & Bhatia, S. R. Effect of anti-inflammatories on Pluronic® F127: micellar assembly, gelation and partitioning. *International Journal of Pharmaceutics* **278**, 361–377 (2004).

## Διαφάνεια 5:

1. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **235**, 337–351 (2016).
2. Kouchakzadeh, H., Shojaosadati, S. A., Maghsoudi, A. & Vasheghani Farahani, E. Optimization of PEGylation Conditions for BSA Nanoparticles Using Response Surface Methodology. *AAPS PharmSciTech* **11**, 1206–1211 (2010).

## Διαφάνεια 6:

1. Lu, Y., Zhang, E., Yang, J. & Cao, Z. Strategies to improve micelle stability for drug delivery. *Nano Research* **11**, 4985–4998 (2018).
2. Hwang, D., Ramsey, J. D. & Kabanov, A. v. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval. *Advanced Drug Delivery Reviews* **156**, 80–118 (2020).

## Διαφάνεια 7:

1. Esatbeyoglu, T. *et al.* Curcumin-From Molecule to Biological Function. *Angewandte Chemie International Edition* **51**, 5308–5332 (2012).
2. Gyun Shin, I., Yeon Kim, S., Moo Lee, Y., Soo Cho, C. & Yong Kiel Sung. Methoxy poly(ethylene glycol)/ε-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. *Journal of Controlled Release* **51**, 1–11 (1998).

## Διαφάνεια 8:

1. Selianitis, D. & Pispas, S. P( <sc> MMA- co -HPMA </sc> )- <sc> b -POEGMA </sc> copolymers: synthesis, micelle formation in aqueous media and drug encapsulation. *Polymer International* **70**, 1508–1522 (2021).

## Διαφάνεια 9:

1. Karolewicz, B., Gajda, M., Górnjak, A., Owczarek, A. & Mucha, I. Pluronic F127 as a suitable carrier for preparing the imatinib base solid dispersions and its potential in development of a modified release dosage forms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **130**, 383–390 (2017).
2. Kafetzi, M., Pispas, S., Bao, X. & Yao, P. Amphiphilic QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA Random-Block Terpolymers as Nanocarriers for Insulin. *Biomedicines* **8**, 392 (2020).
3. Jain, D. K., Darwhekar, G., Solanki, S. S. & Sharma, R. Osmotically regulated asymmetric capsular system for sustained delivery of indomethacin. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **43**, 27–35 (2013).