



**REGIONAL CENTRE
OF ADVANCED TECHNOLOGIES
AND MATERIALS**

Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů



MAGNETICKÉ NANOČÁSTICE PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE

Kubínek R.¹, Havrdová M.¹, Marková Z.², Poláková, K.², Tuček J. ²

¹Katedra experimentální fyziky, PŘF UP v Olomouci

²Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, PŘF UP v Olomouci

XXXVI. Dny lékařské biofyziky, Lázně Bělohrad květen 2013

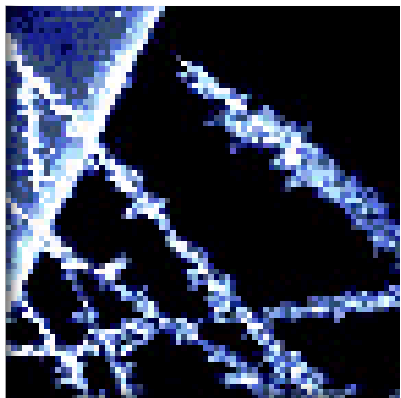


Typy nanostruktur

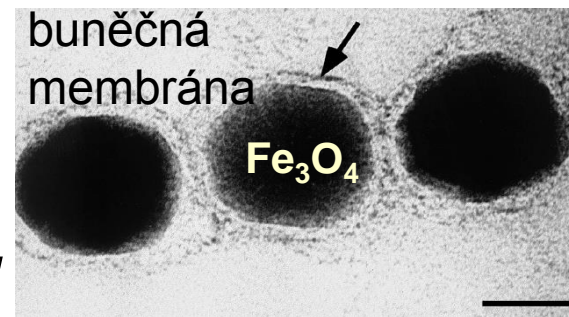


Nanostruktury

→ **Objekty, u nichž alespoň jeden rozměr < 100 nm**



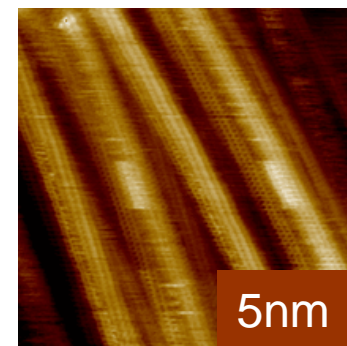
nanoprášky



← **nanovláknna a nanodráty**

povrchově modifikované nanočástice

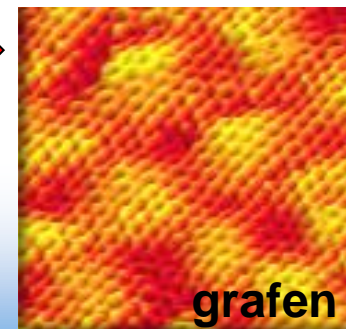
nanutrubičky →



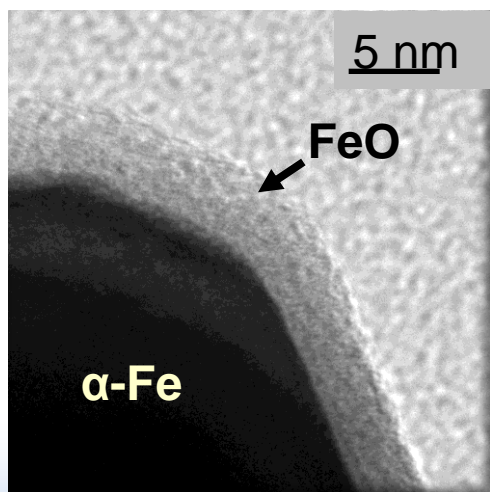
nanokompozity

nanofilmy a nanovrstvy →

← **„core-shell“ nanočástice**

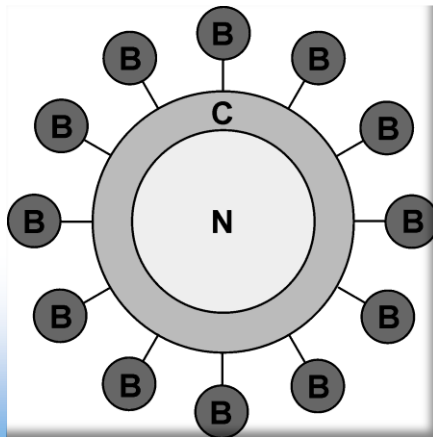


koloidní částice

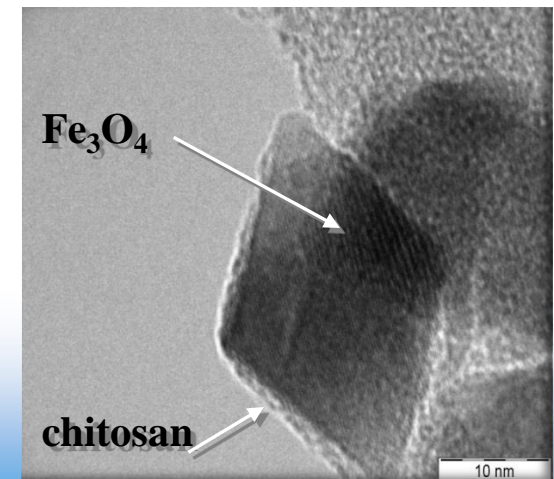


Požadavky na magnetické nanočástice pro biomedicínské aplikace -

- **magnetické jádro:** chemická stabilita, biokompatibilita, možnost přirozeného odbourání v organismu, dostatečná plocha povrchu, vhodné magnetické vlastnosti (velká saturační magnetizace, superparamagnetismus), vhodná krystalická struktura, vhodný rozměr částic (10-100 nm; < 10 nm...průnik buněčnou stěnou; > 100 nm...rychlé pohlcení lymfatickým systémem), úzká velikostní distribuce
- **funkcionalizující slupka:** biokompatibilita, možnost odbourání, ochrana magnetického jádra před chemickou transformací, ochrana před aglomerací, vhodný chemický charakter (nabídka vhodných funkčních skupin) pro sekundární navázání funkčních bioaktivních molekul (léčiva – cílený magnetický transport léčiv, DNA – genové manipulace, magnetické značení a separace buněk)

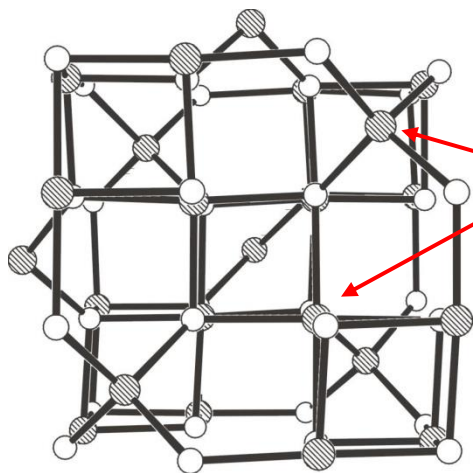


N – Nanočástice (magnetický nosič)
C – funkcionalizující slupka
B – bioaktivní látka



Magnetická jádra

Fe₃O₄ (magnetit), γ-Fe₂O₃ (maghemit) – kubická spinelová struktura, ferrimagnetismus, superparamagnetismus



$P4_132$

$a=8.351 \text{ \AA}$

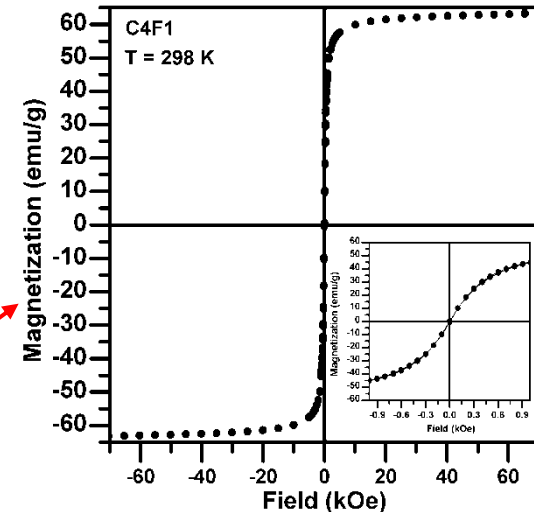
Tetraedrické A pozice

Oktaedrické B pozice

$\text{Fe}^A(\text{Fe}_{5/3}\text{vac}_{1/3})^B\text{O}_4 = \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

$\text{Fe}(\text{III})^A[\text{Fe}(\text{II})\text{Fe}(\text{III})]^B\text{O}_4 = \text{Fe}_3\text{O}_4$

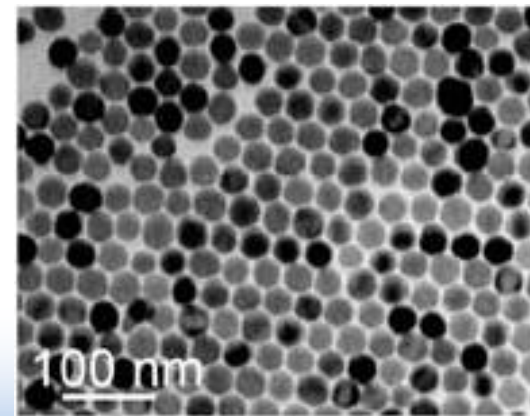
- velká saturační magnetizace
dosažitelná v nízkých vnějších
polích



Ideální syntetický postup: možnost řídit velikost a morfologii částic (plochu povrchu, magnetické vlastnosti) volbou reakčních podmínek při zachování monodispersního charakteru (úzké velikostní distribuce)

Nejčastější metody syntézy:

koprecipitace, teplotní dekompozice, mikroemulsní techniky, hydrotermální syntézy, sonochemické syntézy

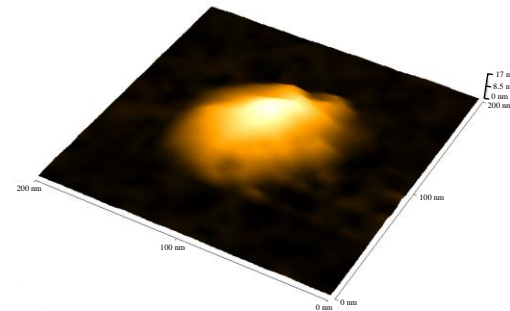


Nanočástice Fe₃O₄ povlakované kyselinou stearovou

Funkcionalizující povrchové slupky

Příklady funkcionalizujících biokompatibilních látek:

- **Syntetické polymery:** polyethylenglykol (PEG), polyvinylalkohol (PVA), polyvinyl pyrrolidon (PVP)
- **Přírodní polymery:** dextran, chitosan, želatina
- **Mastné kyseliny:** kyselina palmitová, stearová, olejová

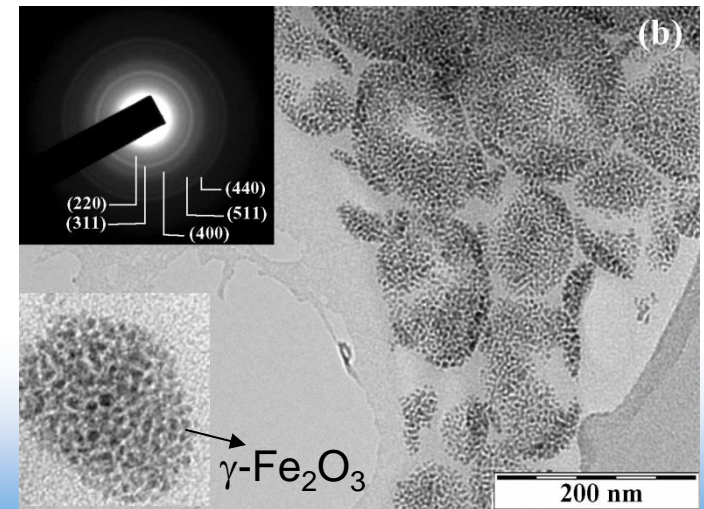
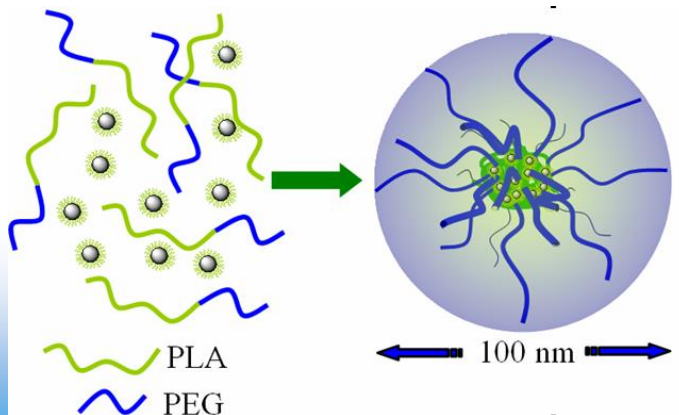


Funkcionalizace

- postprocesní
- jednostupňová

Charakter interakce jádro-slupka:

- interakce
- nevazebná fyzikální (sorpční)
 - kovalentní interakce

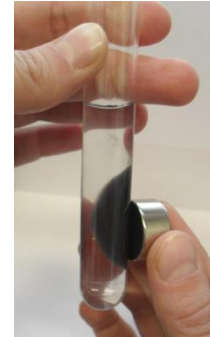


Mag (magnetit- Fe_3O_4) nanočástice

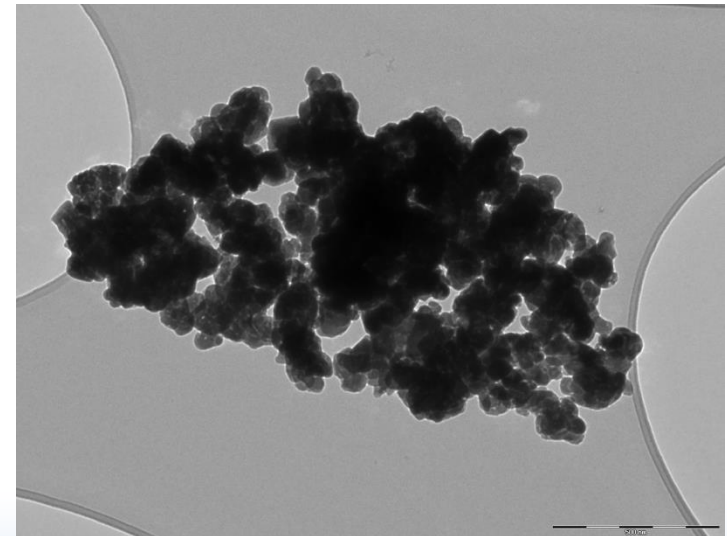
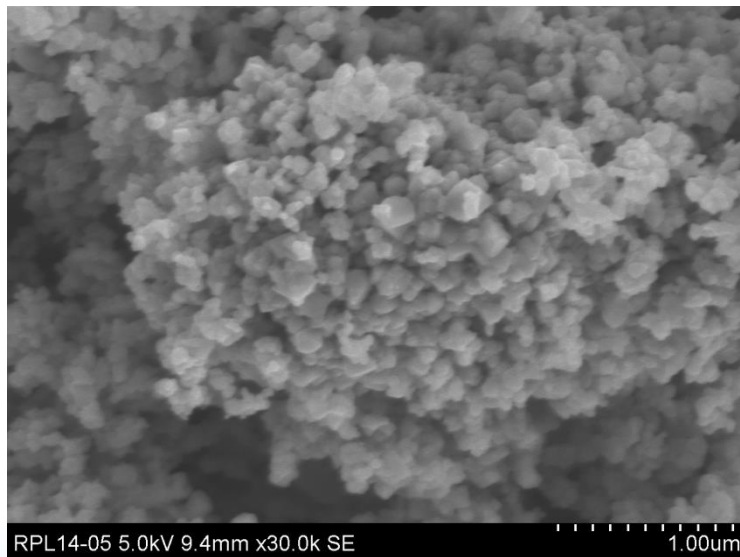
Magnetické jádro: magnetit (Fe_3O_4), připraven termickou syntézou z pevné fáze

Fyzikálně-chemická charakteristika:

- velikost: 30-50 nm
- Agregace v mikrometrovém měřítku
- Rychlá magnetická separace v magnetickém poli
- Specifická plocha povrchu: $15 \text{ m}^2/\text{g}$
- Prášková forma nebo disperze v roztoku



Obrázek magnetické separace Mag nanočástic (několik sekund)



Snímek Mag nanočástic ve skenovacím a transmisním elektronovém mikroskopu

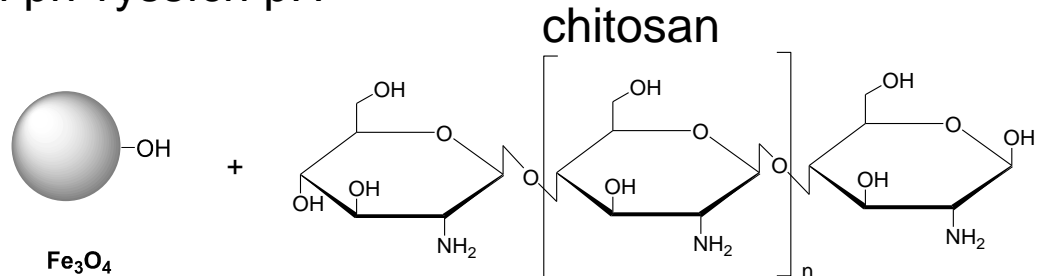
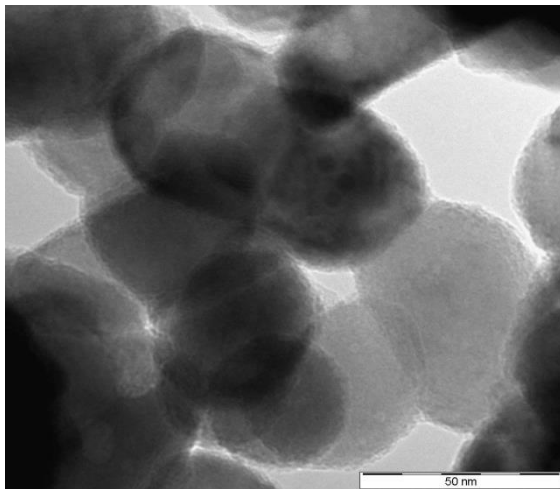


Funkcionalizace povrchu Mag nanočástic pro bioaplikace

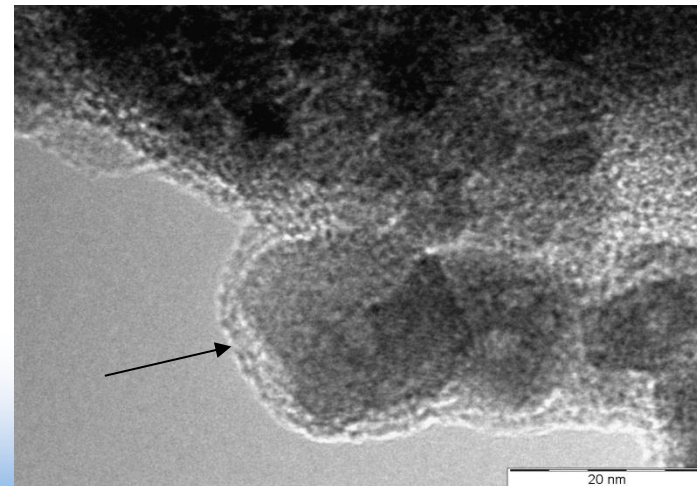


Mag/chitosan (adsorpce chitosanu – volné funkční skupiny pro konjugaci biologicky aktivních látek -NH₂, -OH)

Upozornění: chitosan je rozpustný pod pH 6.5, proto je doporučován chitosan pro experimenty s Mag nanočásticemi při vyšších pH



Schema Mag nanočástic a struktury chitosanu



TEM obrázky funkcionalizovaných Mag nanočástic chitosanem. Šipka ukazuje 2 nm slupku chitosanu



Funkcionalizace povrchu Mag nanočástic pro bioaplikace



Mag/NH₂ – kovalentně vázaná povrchová slupka TEOS (Tetraetyl ortosilikát) a APTES (3-Aminopropyl trietoxysilan) s funkční skupinou NH₂ (35 nmol na 1 mg nanočástic)

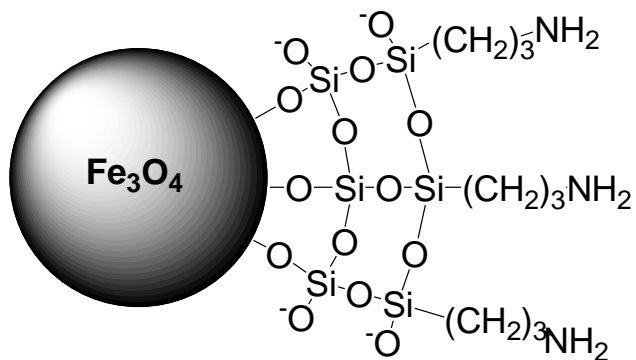
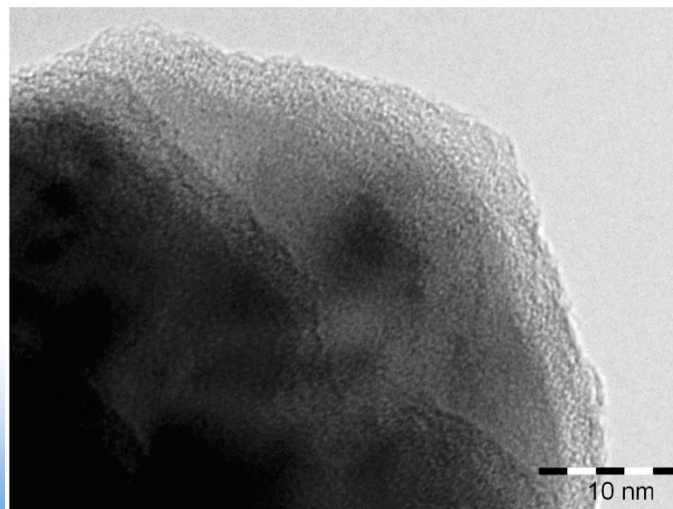
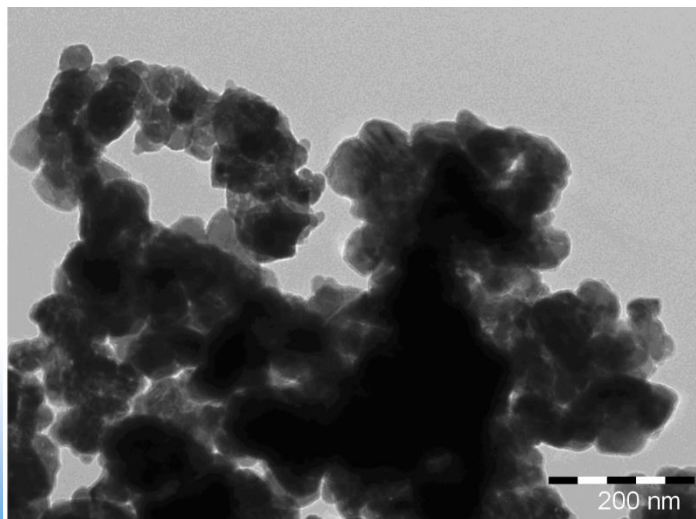


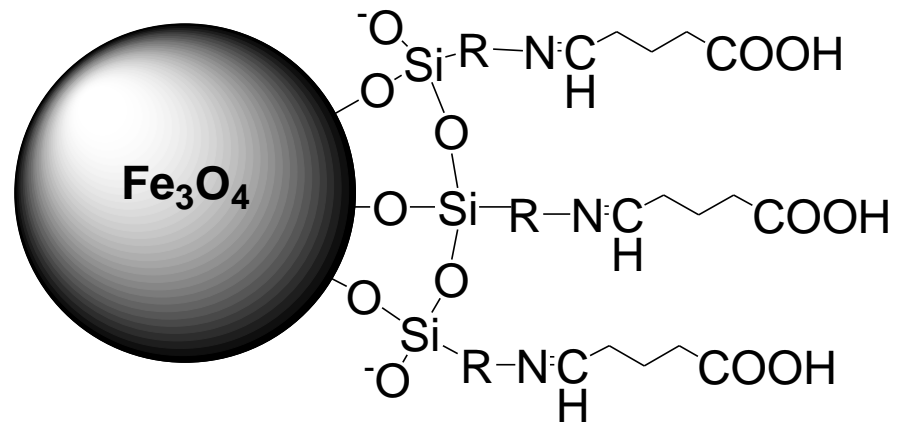
Schéma Mag nanočástic pokrytých TEOS a APTES

TEM obrázky Mag nanočástic funkcionalizovaných TEOS a APTES (3-4 nm amorfnní fáze na povrchu nanočástice)



Funkcionalizace povrchu Mag nanočástic pro bioaplikace

Mag/ COOH



*Schéma funkcionalizovaných Mag nanočástic s COOH
funkční skupinou*



Funkcionalizace povrchu Mag nanočástic pro bioaplikace



Mag/celulóza (částice magnetitu zapouzdřené ve slupce celulózy s vysokou hustotou volných -OH funkčních skupin na povrchu).

Přednosti:

- dlouhodobá stabilita ve vodních suspenzích různých pH
- odolnost vysokým tlakům
- rychlá magnetická separace
- velikost kapslí volitelná od 50 do 300 μm
- možnost modifikace povrchu skupinami -COOH, -CHO a $-\text{SO}_3$

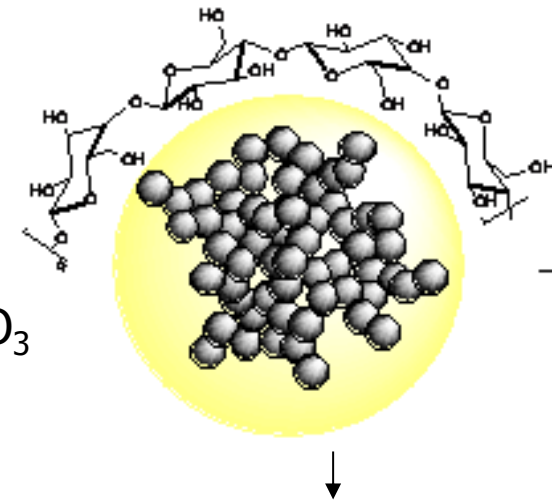
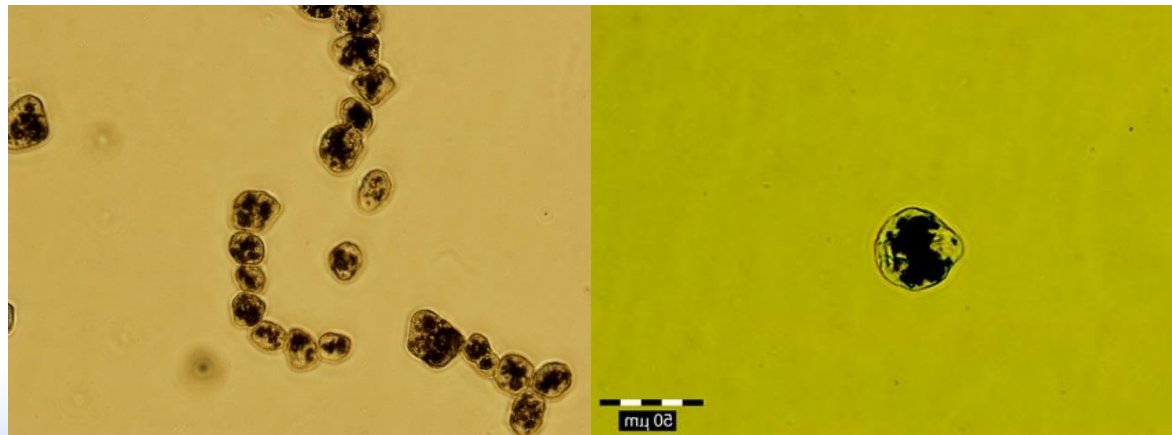


Schéma a optický obrázek magnetických mikrokapslí s povrchovou slupkou celulózy





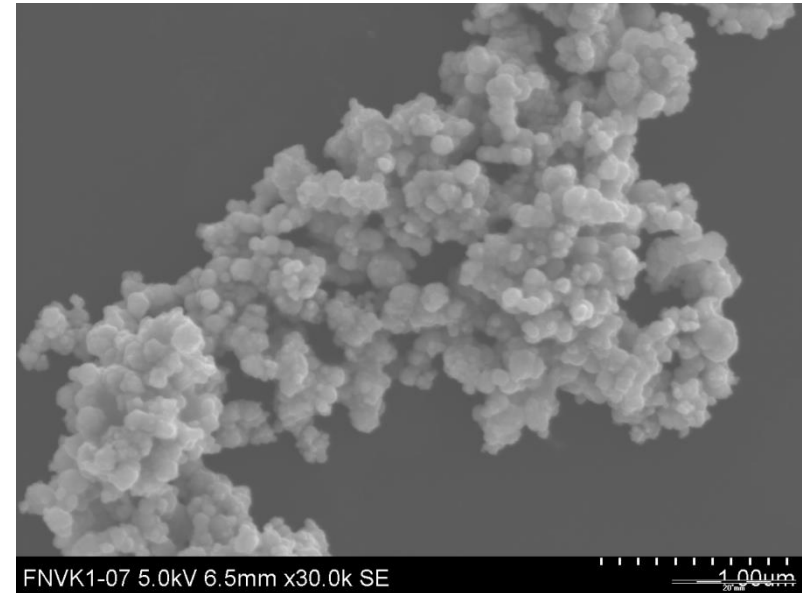
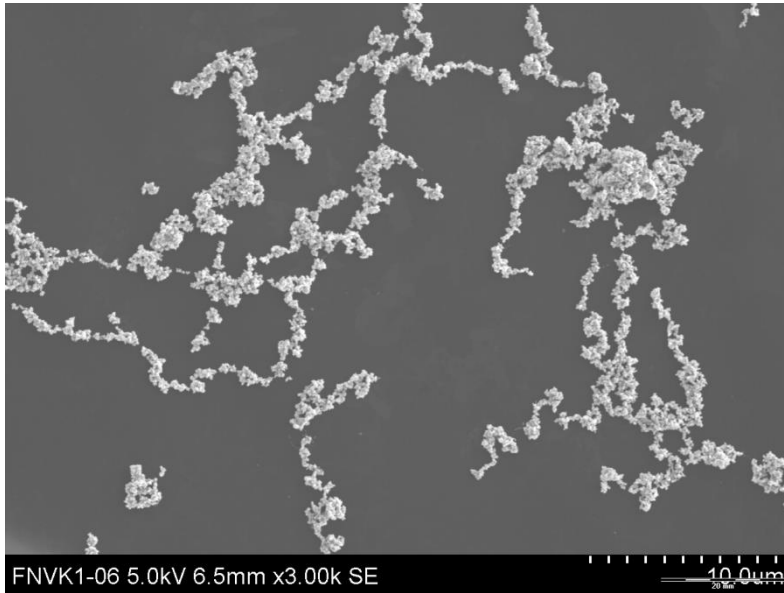
Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)



- magnetické jádro: ferrimagnetická spinelová kubická symetrie,
- oranžový prášek
- stabilní disperze ve vodě
- koloidní charakter
- velikost: 20-50 nm



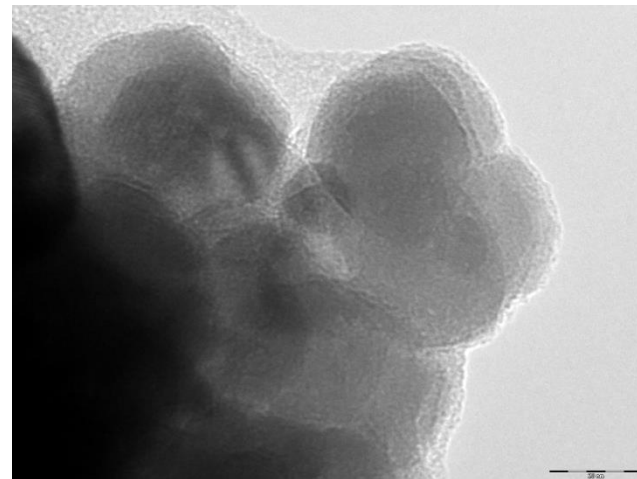
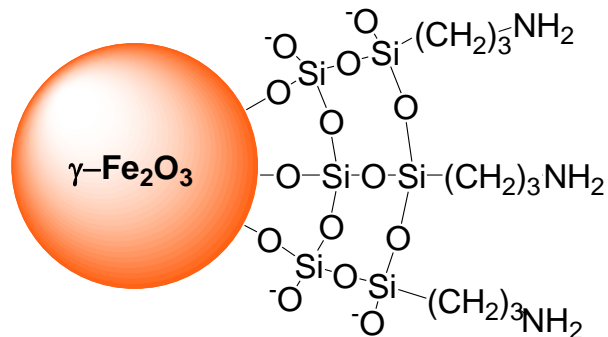
Snímek maghemitové suspenze v kapalině



SEM obrázek maghemitových nanočástic

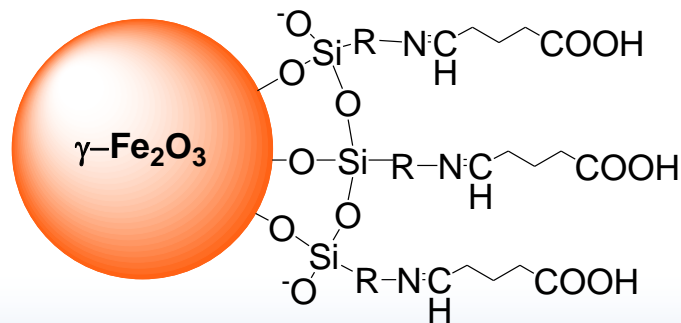
Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$): funkcionalizace povrchu nanočástic pro bioaplikace

Maghemit/NH₂

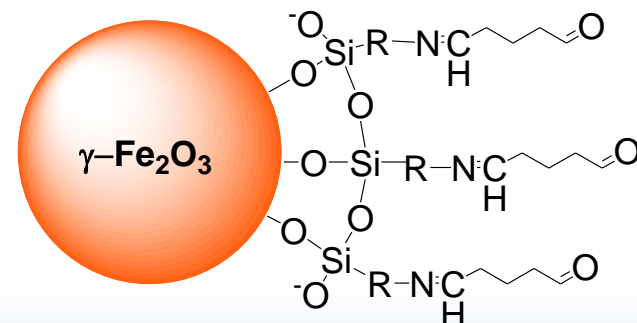


TEM obrázek nanočástic magnetitu funkcionalizovaných TEOS a APTES s volnou -NH_2 funkční skupinou na povrchu

Maghemit/COOH



Maghemit/CHO





Komplexní charakterizace magnetických nanočástic

Velikostní, morfologická a povrchová charakterizace

TEM (Jeol 200 kV), Titan (FEI 300 kV), SEM Hitachi SU 6600 Mikroskopie atomárních sil (včetně MFM), BET měření plochy povrchu, DLS měření velikostní distribuce částic, analýza povrchu metodou kontaktního úhlu, měření zeta-potenciálu

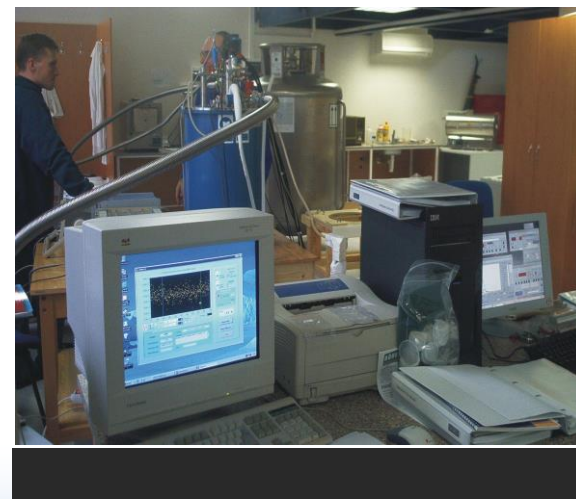


Chemická, strukturní a magnetická charakterizace, interakce jádro-slupka

XRD, XRF, EPR, IČ, Ramanova spektroskopie, Mössbauerova spektroskopie (1.5-1200 K, 10T), SQUID magnetická měření (2-300 K, 10 T), hmotnostní spektrometrie, NMR...

Termická stabilita

TG, DTA, DSC, termomagnetická měření



Nutnost kombinace přístupů anorganické, organické, fyzikální, materiálové chemie, biochemie, lékařské chemie, fyziky pevné fáze...

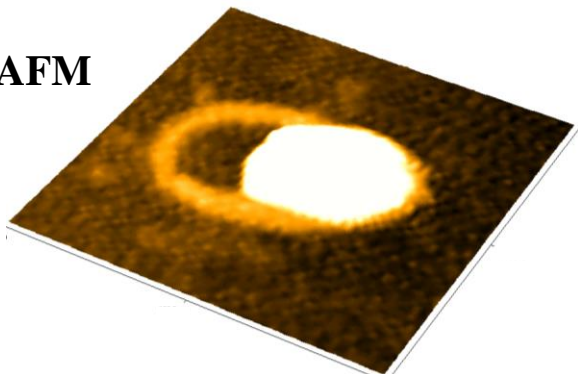


Problémy při charakterizaci nanočástic

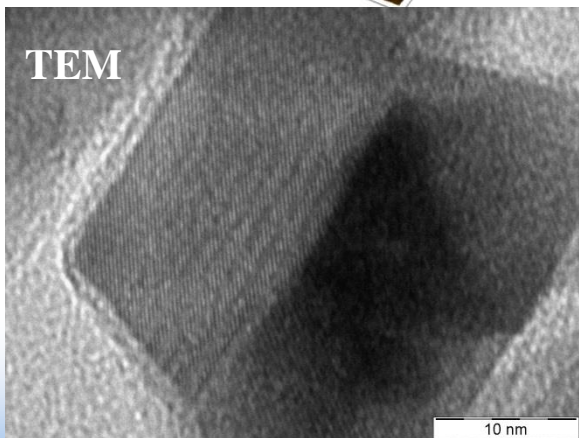
Posouzení úspěšnosti povrchové modifikace nanočástic

(Úplné obalení částice? Obalení částic vs. obalení aglomerátů? Obalení všech částic?)

AFM



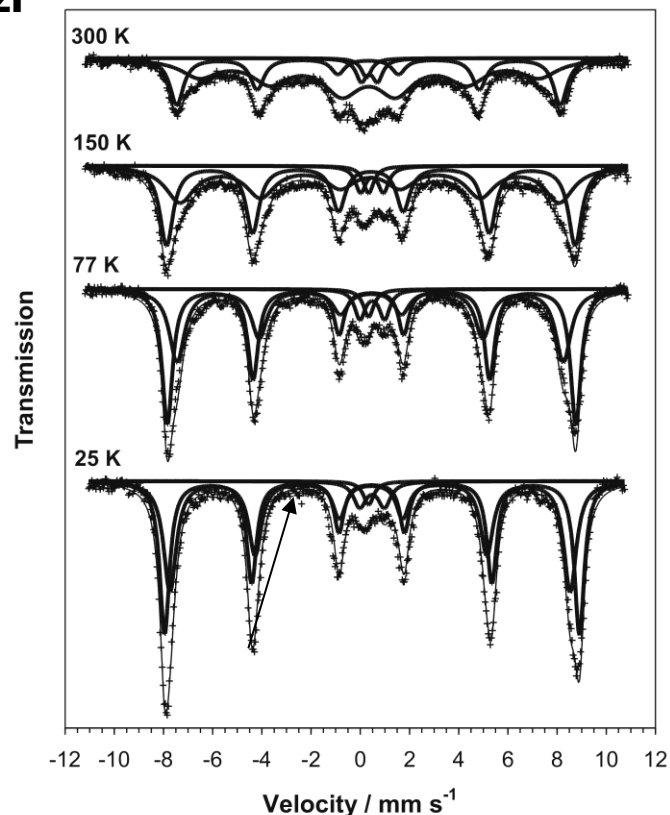
TEM



Magnetit-chitosan

Posouzení charakteru interakce jádro-slučka

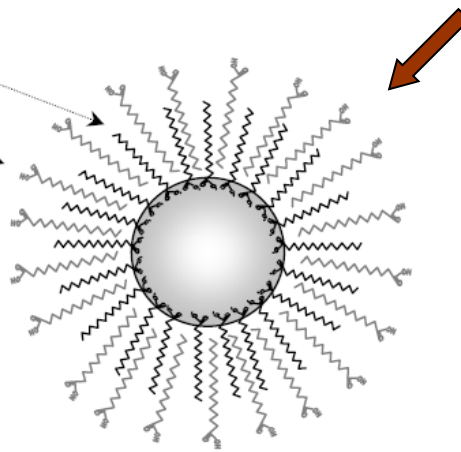
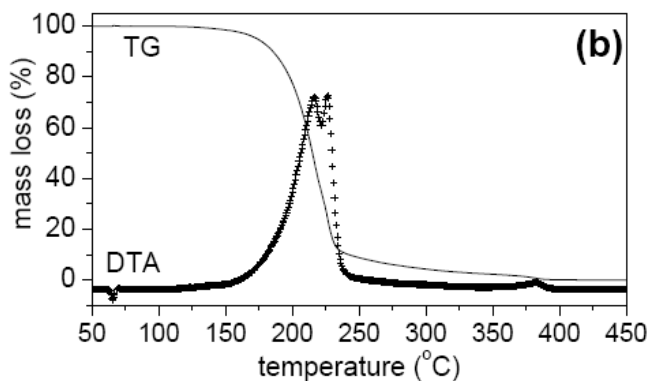
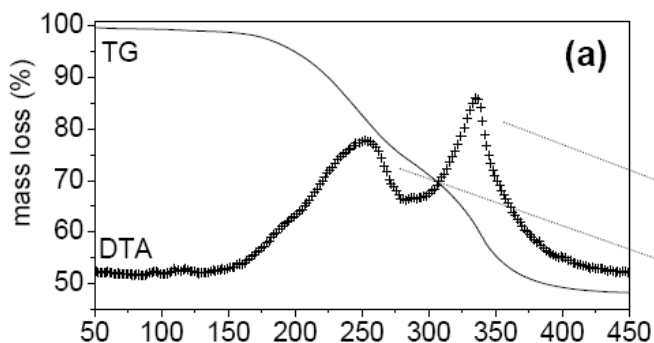
Změna magnetických vlastností atomů Fe, která jsou ve vazebné interakci s obalující org. fází



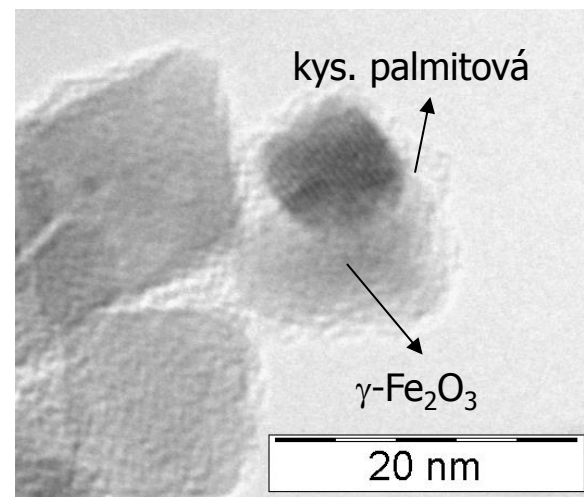
Mössbauerova spektra nanokompozitu maghemit-kyselina palmitová

Problémy při charakterizaci nanočástic

Změna fyzikálně-chemických vlastností magnetického jádra i modifikující slupky v kompozitní formě



Dvouvrstvý charakter modifikující slupky: vazebná interakce + sorpční interakce



Porovnání TG/DTA křivek nanočástic $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funkcionalizovaných kyselinou palmitovou (a) a volné kyseliny palmitové na vzduchu (b)

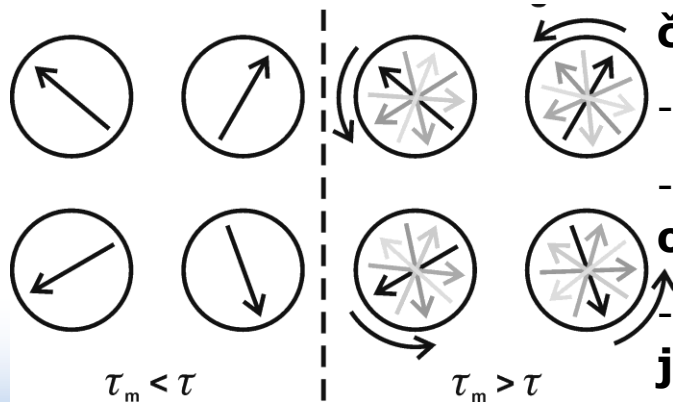
Přehled možností využití magnetických nanočástic v medicíně a bioaplikacích

- **superparamagnetické nanočástice pro zvýšení MRI kontrastu**
- **cílený transport léčiv s využitím magnetických nosičů**
- **léčba nádorových onemocnění metodou magnetické hypertermie**
- **magnetické značení buněk - biomagnetické separace**

Magnetický materiál – nositel magnetického momentu – vektor magnetizace, který fluktuuje mezi dvěma význačnými směry s dobou relaxace τ

Superparamagnetismus (SP)

Feromagn. stav SP stav



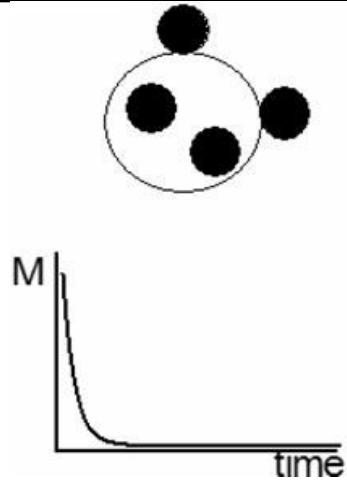
- Doba relaxace závisí na teplotě a velikosti (objemu) částic

- Při kritickém rozměru částic (10-30 nm) nastává: $\tau < \tau_m$

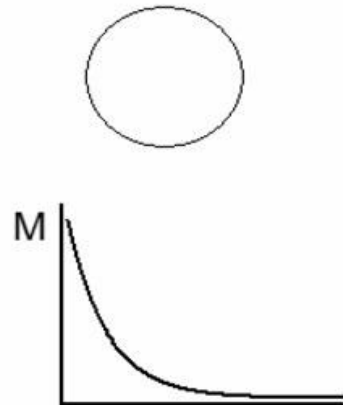
- systém se nachází v SP stavu – vykazuje velmi rychlou odezvu na vnější magnetické pole

- možnost dosažení více magnetických skenů za jednotku času

Superparamagnetické nanočástice pro MRI



Změna magnetizace v čase u buňky modifikované SPIO



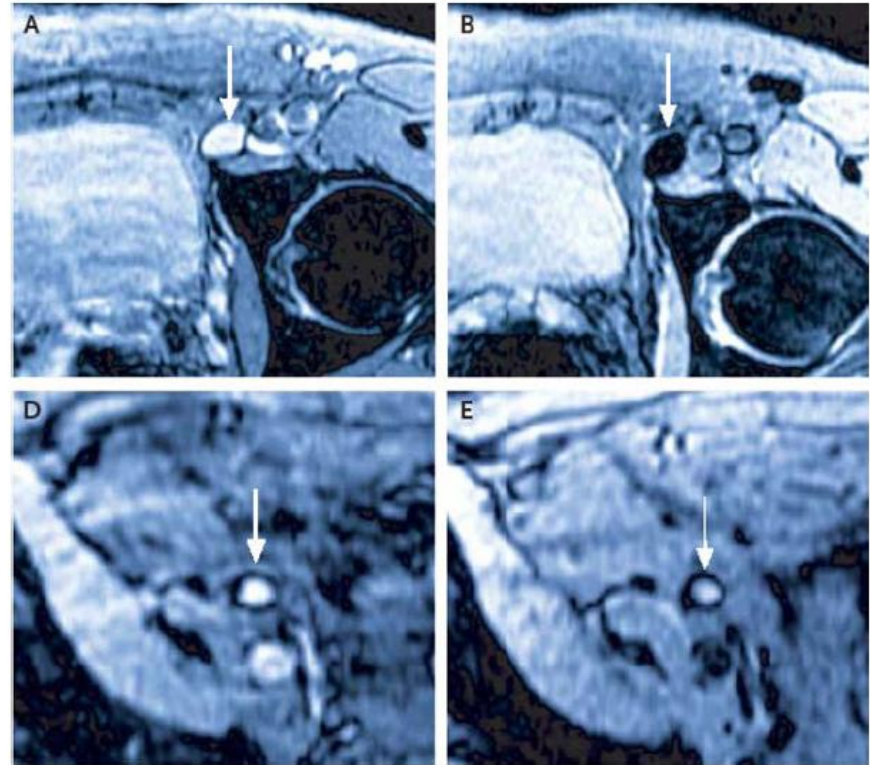
Změna magnetizace v čase u nemodifikované buňky



SP nanočástice ve vnějším magnetickém poli



SP nanočástice bez přítomnosti vnějšního magnetického pole



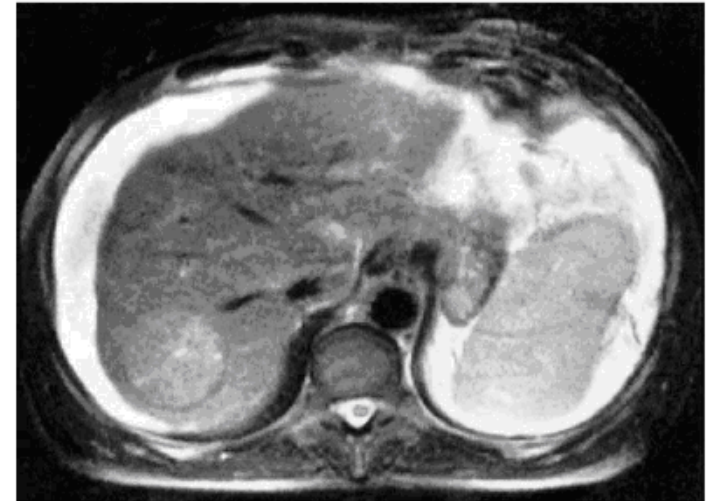
MRI snímky lymfatických uzlin zdravého pacienta bez aplikace SPIO (A) a po aplikaci SPIO (B)

MRI snímky pacienta s nádorem lymfatických uzlin u bez aplikace SPIO (D) a po aplikaci SPIO (E)

Superparamagnetické nanočástice pro MRI

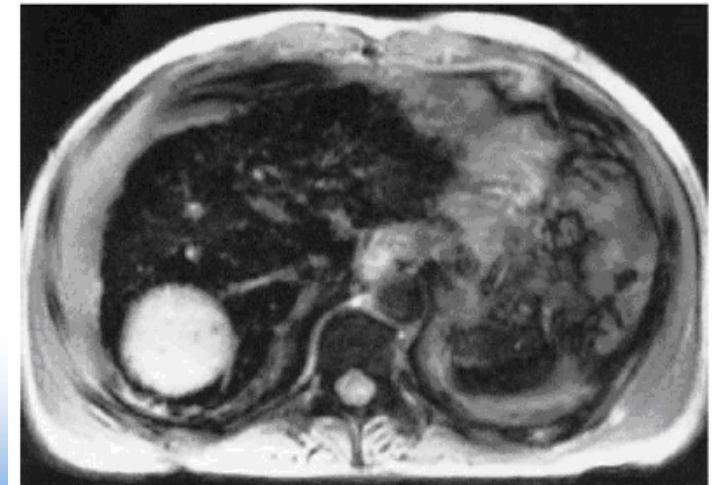
**MRI snímky pacienta
postiženého cirhózou a
karcinomem jater
(transverzální řez)**

bez použití SPIO nanočástic



(a)

s použitím SPIO nanočástic



(c)

Cílený transport léčiv – *in vivo*

Cíl: zvýšit účinnost transportu léčiv, redukovat toxicitu a vedlejší účinky léčiv

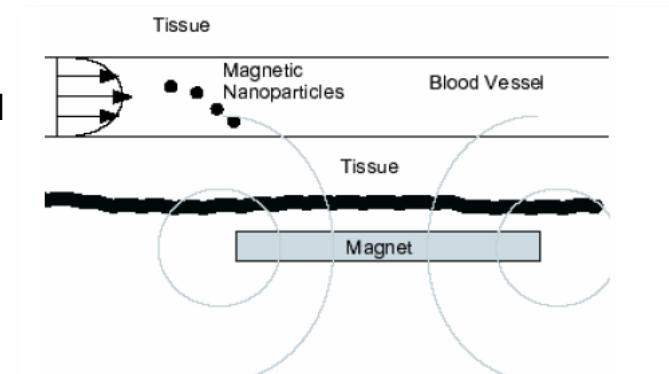
Magnetický nosič označí a doručí lék pouze na postižené místo

Redukce distribuce cytotoxických látek v systému a tím redukce vedlejších účinků

Redukce potřebné dávky léku a přesná lokalizace cíle působení léku

Mechanismus:

- komplex (lék/mag.nosič) injekčně vpraven do krevního řečiště,
- aplikace silného vnějšího magnetického pole a zajištění dostatečné koncentrace látky na specifickém místě, kde se uvolní lék z magnetické částice (enzymaticky, změnou fyziologických podmínek-pH, teplota, osmolalita) a je specifickými ligandy odebrán nádorovou buňkou

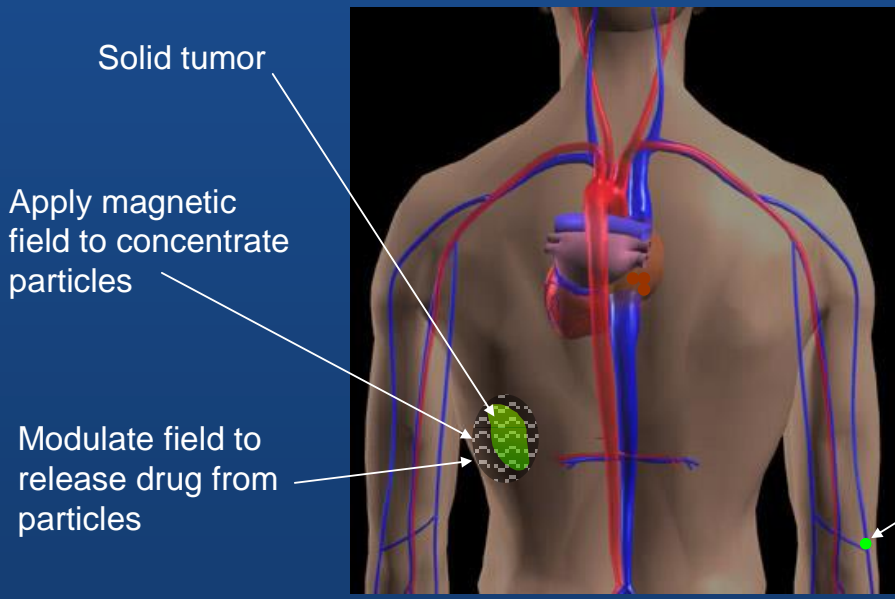




Podstata aplikace

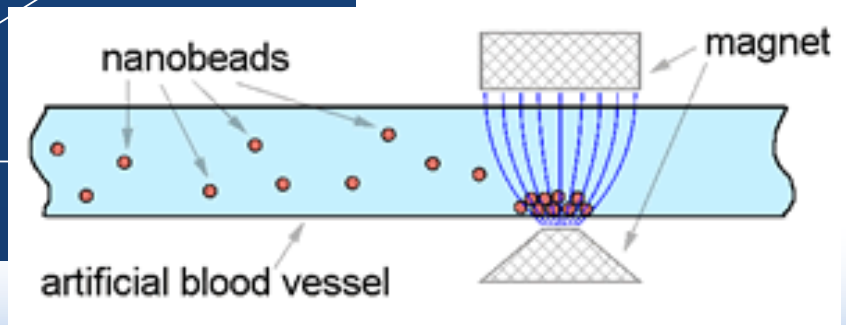


Guided Drug Delivery



Other options for targeting:
1 - Direct injection into tumor site
2 - Coating NMP with antibodies to target tumor

Inject NMPs IV,
NMP will circulate through the blood stream

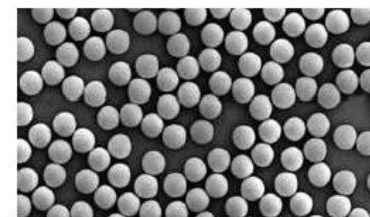
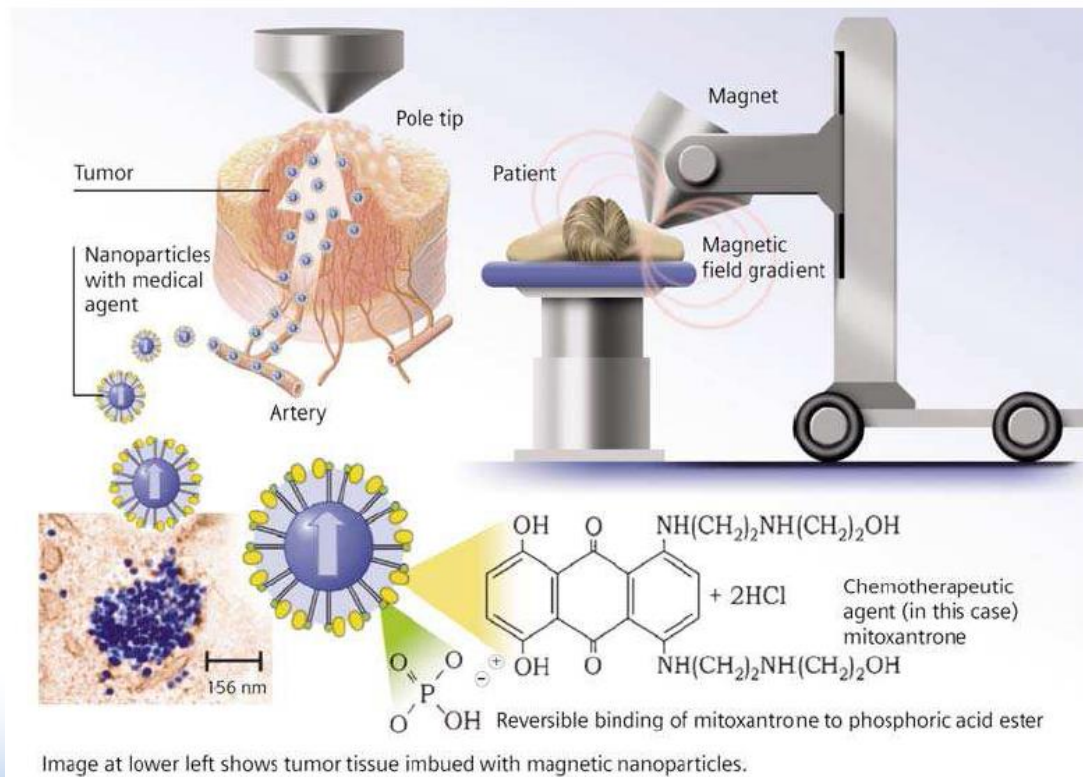


Biophan Technologies, Inc.

Lokální chemoterapie s magnetickými nanočásticemi

Magnetické nanočástice jako nosič pro transport chemoterapeutik selektivně do místa nádoru. Nanočástice byly podány intraarteriálně blízko vaskulárního systému

Section for Experimental Oncology and Nanomedicine University Hospital Erlangen



Dynabeads®, MiltenyiBiotec®





Současný stav, klinické testy, problémy aplikace



- **první klinické experimenty:** Lübbe et al. Cancer Res. 56, 4686, 1996.

Do studie zahrnuto 14 pacientů s pokročilými tumory; u většiny pacientů dosaženo výrazně lepších výsledků ve srovnání s klasickou aplikací; jako léčivo použít *epidoxorubicin*. Magnetické nanočástice byly povlakovány specifickým škrobovým polymerem na konci modifikovaným aniontovými fosforečnanovými skupinami, tudíž byla umožněna kationtová vazba s kladně nabitými aminosacharidy epirubicinu. Vytvořená iontová vazba měla reverzibilní charakter s možností desorpce léčiva s využitím jistých fyziologických parametrů (osmolalita, pH, teplota). Magnetická indukce použitého magnetického pole 0.8 T, pole umístěno blízko nádorového místa.

- **problémy aplikace:**

- **vlastnosti ferrofluidní kapaliny:** velikost částic, povrchové charakteristiky částic, koncentrace a objem ferrofluidní tekutiny, reversibilita a síla vazby mezi léčivem a povrchem ferrofluidní částice, desorpční charakteristiky

- **vlastnosti magnetického pole:** geometrie a intenzita magnetického pole, doba aplikace magnetického pole

- **fyziologické parametry:** rychlost cirkulace krve, krevní objem, velikost a lokace nádoru, cévní obsah tumoru, průtok krve tumoru atd...

Léčba nádorových onemocnění metodou magnetické hypertermie

Použití: jako podpůrná protinádorová léčba k chemoterapii, radioterapii a chirurgické terapii

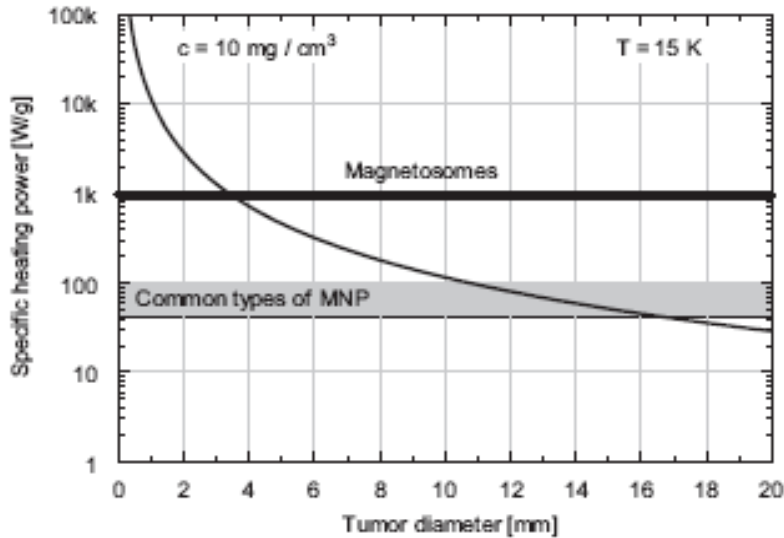
Princip:

- jestliže je magnetická nanočástice vystavena účinku střídavého magnetického pole, je produkováno teplo v důsledku magnetických hysterezních ztrát, Neelovy relaxace a Brownovy relaxace
- magnetická částice se stává účinným zdrojem tepla a je schopna vyvolat nekrózu nádorové tkáně (nádorové buňky nad 42 °C, provozní režim hypertermie 42- 46 °C)
- výhoda – nedochází k poškození ostatních buněk

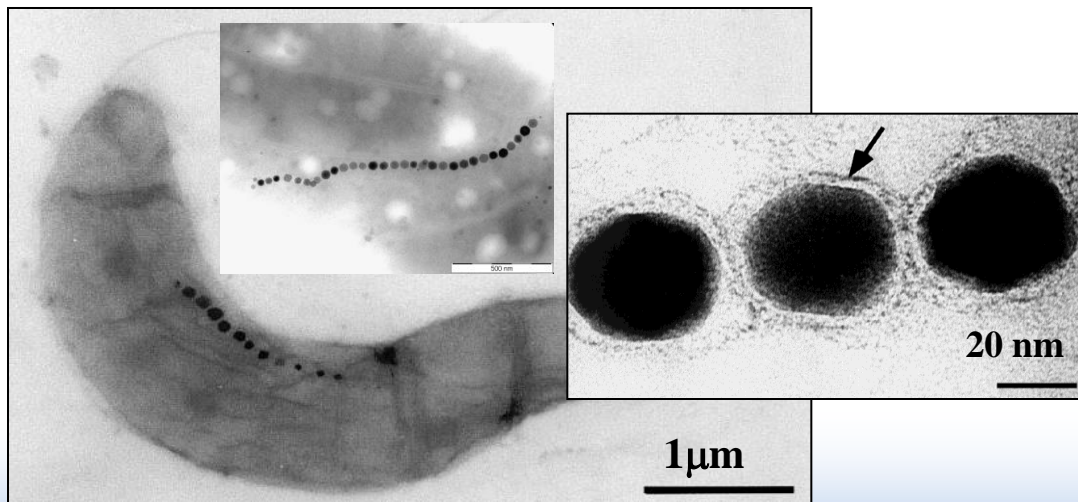
Problémy:

- klíčový parametr – specifická tepelná energie (SHP – Specific Heating Power) je nízký pro účinnou léčbu zejména malých nádorů a obecně závislý jak na vlastnostech pole tak na vlastnostech částic
- klíčové parametry střídavého magnetického pole - amplituda, frekvence; optimální hodnoty pro syntetické nanočástice s nejvyšší SHP (100W/g):
 $H=10\text{kA/m}$, $f=500\text{kHz}$
- vliv vlastností částic: rozměr, morfologie, distribuce velikostí, charakter a tloušťka povrchové slupky, stupeň aglomerace částic

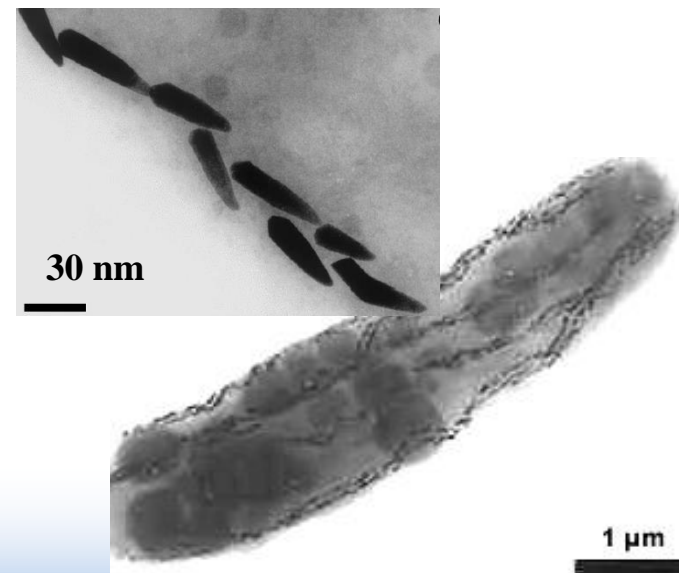
Cesty ke zvýšení SHP



**Použití magnetosomů –
magnetických nanočástic Fe_3O_4
obalených buněčnou membránou
produkovaných
magnetotaktickými bakteriemi
= ideálně monodisperzní systém
neinteragujících částic**



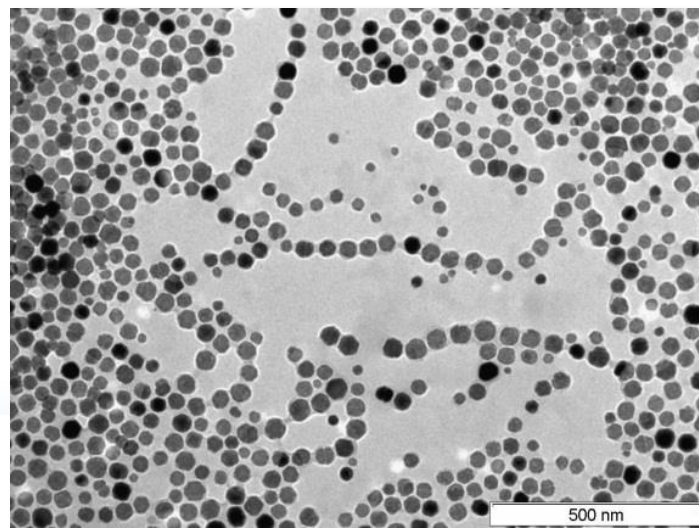
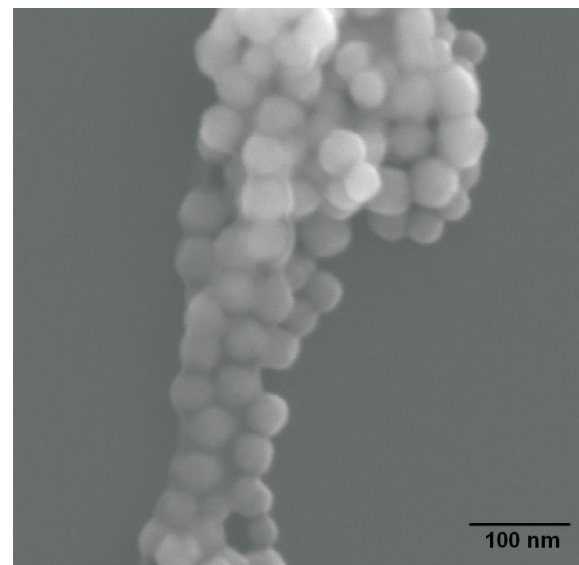
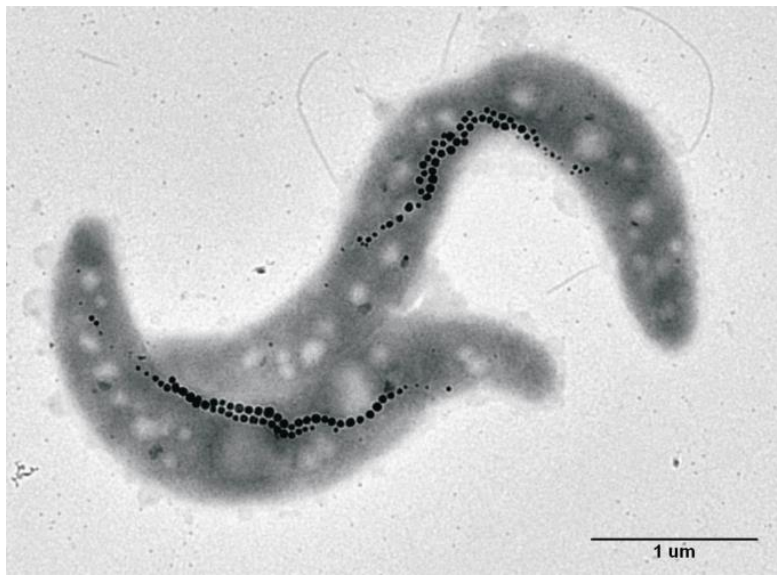
Magnetospirillum gryphiwaldense



Magnetospirillum bavaricum



Magnetosomy – biogenní magnetické nanočástice Fe_3O_4



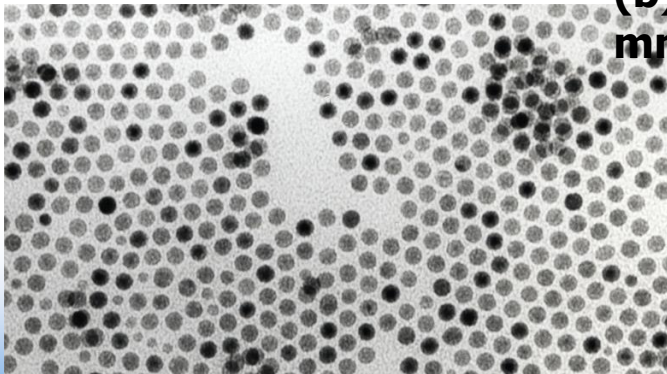
Současný stav, perspektivy hypertermie

1. fáze klinických testů 2005, v současnosti 2. fáze testování u karcinomů prostaty a maligních nádorů na mozku

Proč nanočástice?

- nanočástice absorbují vysokoenergetické oscilující magn. pole
- díky velké ploše povrchu jsou schopny vytvořit velký počet vazebných míst s nádorovými buňkami
- mohou proniknout hluboko do nádorem postižené tkáně
- nanočástice s odpovídajícím adaptabilním chemickým povlakem:
 - (a) nejsou po dostatečně dlouhou dobu identifikovány jako cizí tělesa imunitním systémem
 - (b) jsou absorbovány nádorovými buňkami v dostatečném množství

První prototyp systému pro MFH terapii (s využitím Magnetické Fluidní Hypertermie) - Hyperthermiesysteme GmbH, Berlin, později MagForce, Germany – Prof. Jordan



preparát MFL AS M01 - částice Fe_3O_4 (10-15 nm) povlakované aminosilanem



17 miliard nanočástic v 1 ml fluidní kapaliny

Další příklady bioaplikací magnetických nanočástic – biomagnetická separace – *in vitro*

separace biologické části z nativního prostředí za využití magnetického pole

Dvoukrokový proces :

1) označení požadované biologické oblasti magnetickými nanočásticemi

2) separace mg. označené oblasti pomocí magnetického separačního zařízení

Magnetické nanočástice - povrchová slupka (biokompatibilní molekuly) - na ty jsou navázány (protilátky, makromolekuly, hormony)- ty se vážou na daný antigen biologické oblasti- vysoce přesný proces označení buněk

- Takto magneticky označený materiál je odseparován z nativního prostředí pomocí magnetického pole

Imunomagnetická stanovení (magnetické částice jsou použity pro separaci cílového analytu)

Magnetoimunostanovení (magnetické částice slouží jako detekovatelné značky- náhrada enzymů, radioizotopů)

Komerční magnetický separátor

CliniMACS (Miltenyi Biotec, Germany)

Příklady využití :

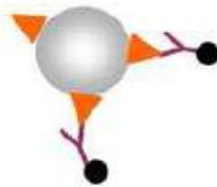
Selekce vzácných nádorových krevních buněk,
separace malého množství označených buněk,
detekce parazitů malárie v krvi, identifikace DNA



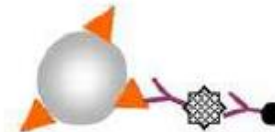
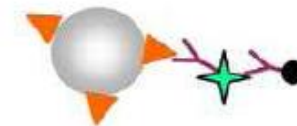
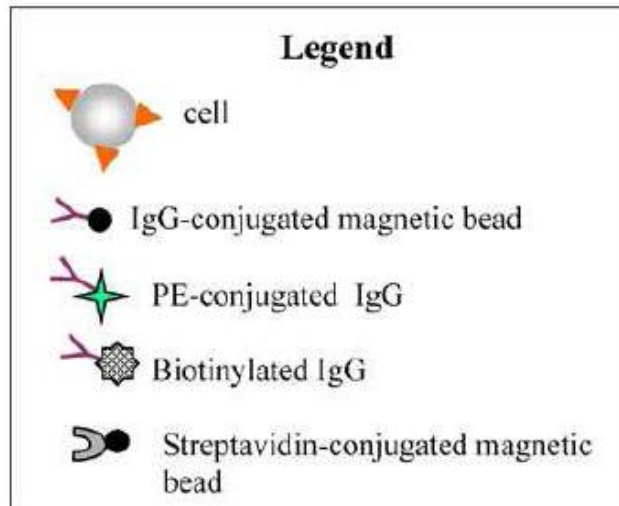
Přímé a nepřímé značení buněk

Selektivní navázání magnetických nanočástic na cílové buňky, většinou interakce navázané specifické protilátky a příslušných epitopů, případně interakce navázaného lektinu a sacharidové struktury

Direct magnetic cell labeling



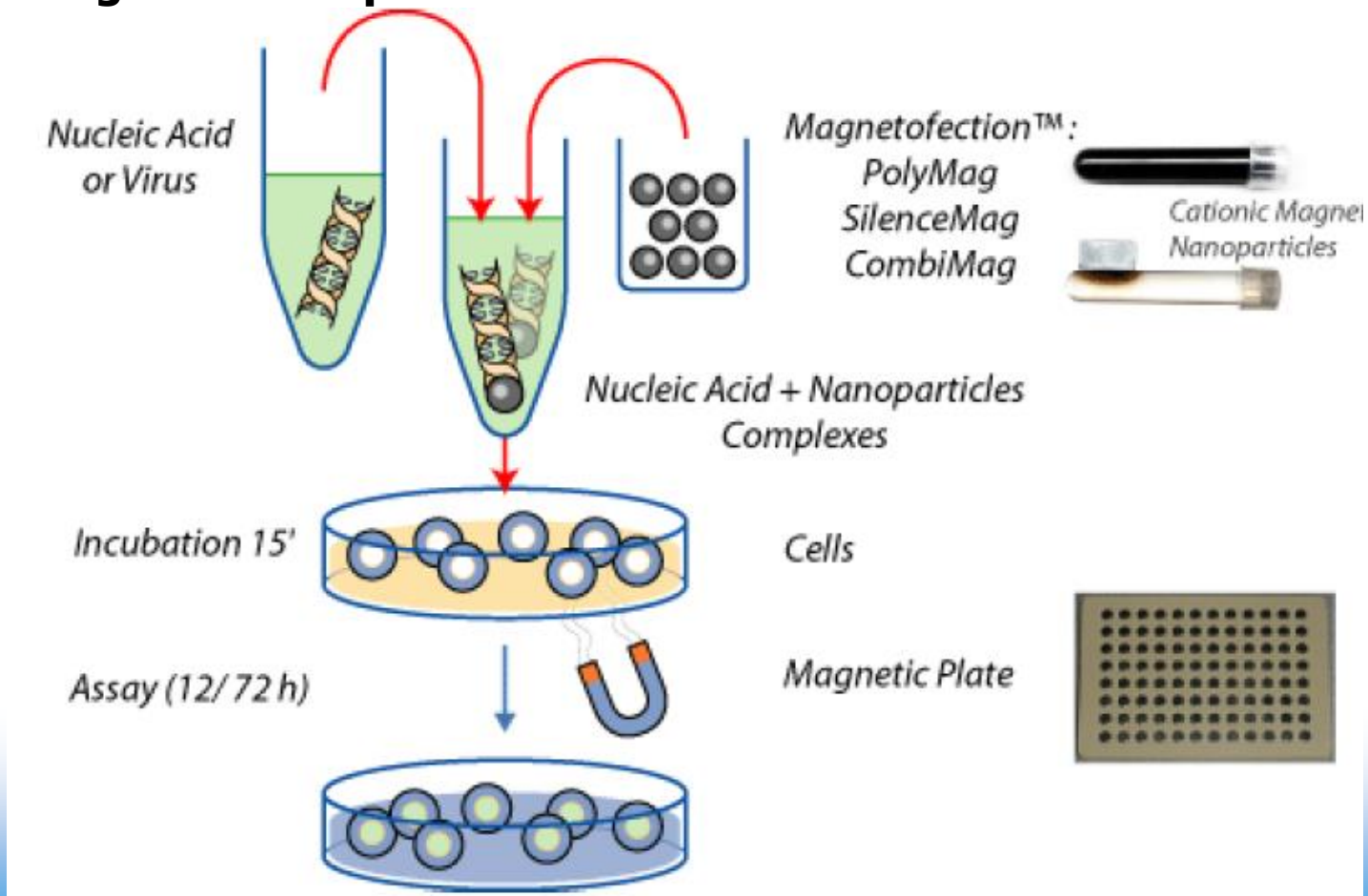
Indirect magnetic cell labeling



Magnetofekce



- Vazba DNA na magnetické nanočástice, pokryté kladně nabitými molekulami
- Vytvořené komplexy jsou poté transportovány do buněk, za pomoci vnějšího magnetického pole





Konjugace protilátek

Markéta Havrdová – projekt KONTAKT



Použité nanočástice:

AM-SPION – nový typ superparamagnetických nanočástic oxidu železa o velikosti 96 nm. Maghemitové jádro je pokryto poly (acryl-co-maleic) kyselinou s karboxylovou skupinou na povrchu nanočástice

Konjugace povrchu nanočástic s protilátkou

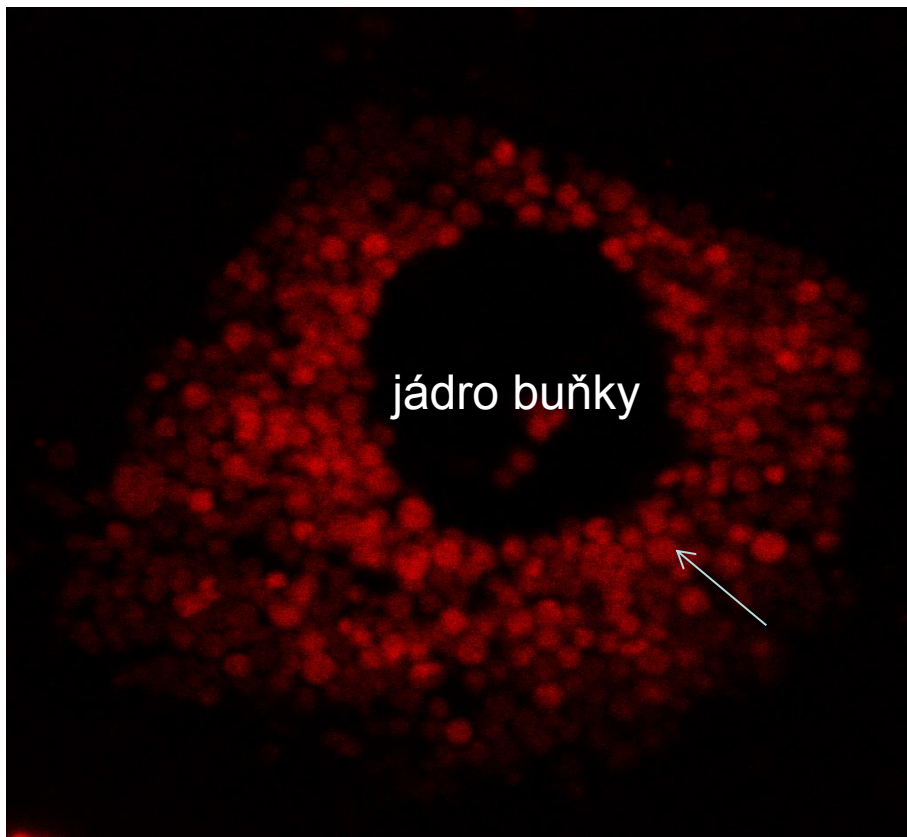
Pro konjugaci byl použit koloidní roztok SPIO nanočástic s polyklonální protilátkou (Adenosine A1-R (H-40), St. Cruz).

Pomocí metody „Bradford assay“ byla stanovena koncentrace vyvázané protilátky v mg/ml nanočástic

Značení buněk

Protilátkou konjugované nanočástice, smíchané s buněčným médiem, byly inkubovány s vasa vasorum endoteliálními buňkami (VVEC) po 2 dny. Jako kontrola byly použity VVE buňky inkubované s nekonjugovanými AM SPIO nanočásticemi.

Konfokální mikroskopie



Mikroskopická analýza

Pro sledování specifické interakce Ab-SPIO nanočástic s adenosinovými receptory byl použit laserový skenovací konfokální mikroskop.

Před pozorováním buněk byly komplexy Ab-SPION značeny fluorescenční značkou se sekundární protilátkou (Alexa-Fluor 594, Invitrogen).

Červená fluorescence klastrů nanočástic značených sekundární protilátkou. Jádro buňky je obklopené SPIO nanočásticemi vázanými na membránové adenosinové (A1) receptory.



Děkuji za pozornost