

Polymerpreparat med aktiv substans för oral läkemedelsadministrering

Sofia Julin

Högskolan för elektroteknik

Kandidatarbete
Esbo 30.11.2015

Ansvarig lärare:

TkD Markus Turunen

Handledare:

DI Sanja Asikainen

Författare: Sofia Julin

Titel: Polymerpreparat med aktiv substans för oral läkemedelsadministrering

Datum: 30.11.2015

Språk: Svenska

Sidantal: 5+22

Utbildningsprogram: Bioinformationsteknologi

Ansvarslärare: TkD Markus Turunen

Handledare: DI Sanja Asikainen

Oral administrering av läkemedel är ur patientens synvinkel det mest optimala men miljön i mag- och tarmkanalen utgör ett problem för många läkemedelsmolekyler av biologiskt ursprung. I kandidatarbetet klarläggs genom litteraturstudier såväl utmaningarna med oral läkemedelsadministrering som möjligheterna att med hjälp av polymertillämpningar skydda läkemedlets aktiva substans mot förhållandena i mag- och tarmkanalen. Med tyngdpunkt på nanopartikelbaserade läkemedelssystem beskrivs polymerer lämpade för oral administrering och hur de kan inkluderas i läkemedelsformuleringen för att ge denna önskade egenskaper.

Åtskilliga vetenskapliga och prekliniska studier indikerade att nanopartikelbaserade läkemedelssystem med syntetiska och/eller naturliga polymerer som bas kan förbättra den orala biotillgängligheten för många biomolekyler. Nanopartikelbaserade läkemedelssystem möjliggör inte bara ett skydd mot miljön i mag- och tarmkanalen, utan möjliggör även en kontrollerad frigöring och ett ökat upptag av den aktiva substansen. Speciellt för polymerbaserade läkemedelssystem som är såväl bionedbrytbara som biodegraderbara förefaller det finnas goda framtidsutsikter.

Nyckelord: Oral läkemedelsadministrering, oral biotillgänglighet, nanopartikel, läkemedelssystem, polymer, kontrollerad läkemedelsadministrering

Innehållsförteckning

Sammandrag	ii
Innehållsförteckning	iii
Förkortningar och begrepp	iv
1 Inledning	1
2 Oral läkemedelsadministrering	2
2.1 Mag- och tarmkanalens anatomi och fysiologi	2
2.2 Absorption av läkemedel från mag- och tarmkanalen	3
2.3 Oral biotillgänglighet	4
3 Nanopartikelbaserade läkemedelssystem	6
3.1 Nanopartiklar	6
3.2 Frigöring av den aktiva substansen	7
3.3 Syntetiska polymertillämpningar	7
3.3.1 Polyestrar	7
3.3.2 Akrylpolymerer	9
3.4 Naturliga polymertillämpningar	10
3.4.1 Kitosan	10
4 Ytmodifiering	12
4.1 Polymertillämpningar	12
4.1.1 Polyetylen glykol (PEG)	12
4.1.2 Övriga polymertillämpningar	13
4.2 Mukoadhesiva tillämpningar	13
4.3 Enterodragering	14
5 Penetrationsförbättrare	16
6 Diskussion och avslutning	17
Referenser	18

Förkortningar och begrepp

Förkortningar

HPMCP	hydroxipropylmetylcellulosaftalat
PAA	polyakrylsyra
PACA	polyalkylcyanoakrylat
PBC	polybutylcyanoakrylat
PCL	poly- ϵ -kaprolakton
PECA	polyetylcyanoakrylat
PEG	polyetylglykol
PEO	polyetylenoxid
PGA	polyglykolsyra
PIBCA	poly(isobutylcyanoakrylat)
PLA	polylaktid
PLGA	poly(laktid-co-glykolid)
PMMA	polymetylmetakrylat
PVA	polyvinylalkohol

Begrepp

Aktiv substans	Det ämne i läkemedelsformuleringen som är biologiskt aktiv och som därmed ger den medicinska effekten
Biodegraderbar	Nedbryts i människokroppen av biologiska mekanismer till mindre beståndsdelar, nedbrytningen kan vara ett resultat av hydrolys eller enzymatisk aktivitet
Biofarmaceutika	Läkemedel vars aktiva substans är helt eller delvis av biologiskt ursprung
Biokompatibel	Förenlig med levande vävnad utan att en immunologisk reaktion uppstår
Biologisk aktivitet	Beskriver positiva eller negativa effekt som den aktiva substansen har på de kemiska och fysiologiska funktionerna för såväl celler, vävnader, organ som organismer
Biotillgänglighet	Den andel av ett intaget ämne som når blodomloppet i oförändrad form, anges som procent av den ursprungliga dosen
Hydrofil	"Vattenälskande", löser sig gärna i vatten
Hydrofob	Olöslig i vatten
Lumen	Anatomisk benämning på den inre håligheten i ett rörformat organ
Opsonisering	Den för människokroppen främmande substansen upptäcks av antikroppar som sedan producerar ämnen som gör det lättare för fagocyterna känna igen och tillintetgöra substansen
Patogen	Ett ämne som framkallar sjukdomar, typiska patogener är bakterier, virus, parasiter och svampar
Sampolymer	En polymer där polymerkedjan består av två eller flera olika monomerer
Specifik yta	Den totala ytarean per massaenhet
Zetapotential	Anger det elektrokinetiska potentialen i kolloidala system och fungerar därmed som ett mått på stabiliteten, ju högre zetapotential desto stabilare kolloid

1 Inledning

Oral administrering är idag det vanligaste sättet att systematiskt tillföra läkemedel till människokroppen. Orala läkemedel är också ur patientens synvinkel optimala, eftersom patienten själv kan ta sina läkemedel hemma. Orala läkemedel är i de flesta fall både lätta att dosera och lätta att använda samtidigt som de inte förorsakar onödiga smärtor för patienten. [1, s. 146] För orala läkemedel finns heller inte samma krav på sterilitet som för parenterala injektioner vilket underlättar såväl administreringen som produktionen [2].

Orala läkemedel upptas via mag- och tarmkanalen, vilket ställer en hel del krav på läkemedelsformuleringen. Speciellt för läkemedel med polypeptider, nukleotider och fettsyror som aktiv substans kan såväl magsäckens sura miljö som de enzymer som finns i mag- och tarmkanalen vara ett problem. Utvecklingen går dock hela tiden framåt och under de senaste decennierna har man utvecklat flera olika läkemedelssystem som gör också oral tillförsel av polypeptider, nukleotider och fettsyror möjliga.

Forskning som gjorts under det senaste åren inom det aktuella området har indikerat att läkemedelssystem i nanostorlek är de mest effektiva och den mest lovande typen av läkemedelssystem [3]. Bionedbrytbara polymerer av både syntetiskt och naturligt ursprung kan mångsidigt användas som grund i dessa läkemedelssystem. Genom att använda olika typer av polymerer är det möjligt att skapa läkemedelssystem där egenskaper såsom exempelvis hydrofobicitet och ytladdning varierar. Därtill förändras frisättningen av den aktiva substansen och den biologiska aktiviteten beroende på vilken polymer som använts. [4]

Syftet med detta kandidatarbete är att genom litteraturstudier klarlägga och ge en bild av de utmaningar som finns vid oral läkemedelsadministrering. Syftet är därtill att utreda och belysa vilka möjligheter det finns att med hjälp av polymertillämpningar skydda läkemedlets aktiva substans mot förhållandena i mag- och tarmkanalen. Kandidatarbetets tyngdpunkt ligger på de syntetiska polymertillämpningarna och speciellt på nanopartikelbaserade läkemedelssystem. Kandidatarbetet behandlar dock inte tillverkningsmetoderna för dessa polymertillämpningar. Även polymertillämpningar som används i beredningsformen av andra orsaker än för att förbättra den orala biotillgängligheten lämnas utanför granskningsområdet för kandidatarbetet.

2 Oral läkemedelsadministrering

2.1 Mag- och tarmkanalens anatomi och fysiologi

Mag- och tarmkanalen är en sammanhängande, 5 - 7 m lång, kanal som sträcker sig från munhålan till ändtarmsöppningen. Till mag- och tarmkanalen hör munnen, svalget, matstrupen, magsäcken, tunntarmen (tolvfingerarmen, tomtarmen och krumtarmen) samt tjocktarmen.[5, s. 922]. Mag- och tarmkanalens viktigaste uppgift är att bryta ner intagna födoämnen och från dem uppta nödvändiga näringsämnen, vitaminer och kofaktorer. En viktig funktion är också att mag- och tarmkanalen effektivt förhindrar upptaget av icke-önskade patogener, gifter och ospjälkta makromolekyler. [6]

Mag- och tarmkanalens vägg har från nedre delen av matstrupen till ändtarmsöppningen samma uppbyggnad bestående av fyra lager. Närmast lumen finns slemhinnan (mucosa), följt av submucosa, muscularis och serosa. Slemhinnan har tre lager, närmast mag- och tarmkanalen finns epitelvävnad, följt av stödjande bindväv (lamina propria) och ett tunt lager av glatt muskulatur (muscularis mucosae). Submucosan består av aerolär bindväv och binder ihop slemhinnan med muscularis. Submucosan innehåller också blodkärl och lymfkärl som är viktiga för upptaget av näringsämnen från mag- och tarmkanalen. Muscularis består av glatt muskulatur som i regel består av ett inre cirkulärt lager och ett yttre longitudinellt lager. Serosa är ett seriöst membran bestående av aerolär bindväv och enkelt skivepitel. [5, s. 924-925]

De flesta ämnen i mag- och tarmkanalen tas upp endera i tunntarmen eller i tjocktarmen och därför har slemhinnan i tarmen en viktig roll i det selektiva upptaget [6]. Slemhinnan i tunntarmen är rik på villi, små fingerlika utskott, som ökar ytarean för det yttre lagret av enkelskiktat cylinderepitel. Cellerna i cylinderepitelet är kraftigt hopkopplade med täta fogar (tight junctions) som förhindrar att ämnen tas upp mellan cellerna. [5, s. 924, 949-950] Den vanligaste förekommande celltypen i slemhinnans cylinderepitel är enterocyterna som har en yta bestående av mikrovilli och som är specialicerade på att ta upp och transportera näringsämnen [7]. Kombinationen av villi och mikrovilli på slemhinnans yta ökar tarmens ytarea till 300 - 400 m² och upptaget kan på så sätt effektiveras [8]. Andra förekommande celltyper i slemhinnans epitellager är bägarceller som utsöndrar slem och Peyers plack som utsöndrar det bakteriedödande enzymet lysozym [5, s. 949-950]. Peyers plack består av M-celler som tros spela en roll i transporten av partiklar, antigen och makromolekyler från tarmlumen till cellerna i immunsystemet [1, s. 150][6]

Slemmet som täcker mag- och tarmkanalen är en komplex hydrogel bestående av proteiner, kolhydrater, salter, antikroppar, bakterier och cellrester [9]. Mucinerna, som är en typ av glykoproteiner, utgör grunden för det slem som finns i mag- och tarmkanalen. Mucin är mycket hydrofilt och har förmåga att bilda en gelé som kan bestå av upp till 95 % vatten. Studier har även visat att slemmet i mag- och tarmkanalen effektivt bildar en fysisk barriär som förhindrar upptaget av små molekyler och stora proteinmolekyler.[1, s. 154]

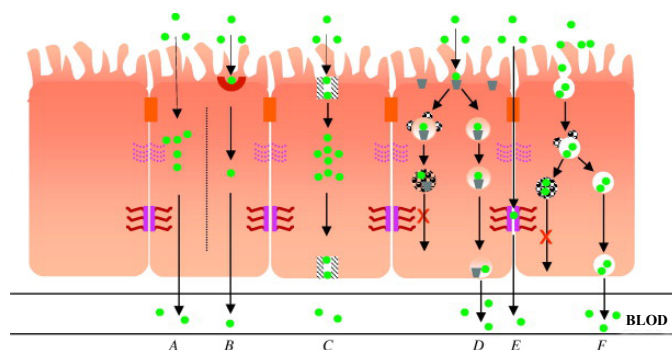
I mag- och tarmkanalen varierar pH-värdet kraftigt från mycket surt till svagt basiskt beroende på platsen och huruvida födoämnen intagits eller inte. I magsäcken är

pH-värdet 1-2 medan pH-värdet i slutet av tjocktarmen är närmare 7.5. I tunntarmen varierar pH-värdet från 4 i början av tolvfingertarmen till strax över 7 i slutet av krumtarmen. [6]

En rad enzym som effektivt bryter ned proteiner, fetter, kolhydrater och nukleinsyror finns tillgängliga i mag- och tarmkanalen. Upptill 98 % av alla proteiner som intagits oralt kommer att brytas ned till mindre peptider och aminosyror som sedan kan tas upp av tarmens enterocyter [7]. Spjälkningen av proteinerna påbörjas i magsäcken av enzymet pepsin för att sedan fortsätta i tunntarmen med hjälp av de pankreatiska enzymen trypsin, kymotrypsin, karboxypeptidas och elastas. Fetter spjälks främst i tunntarmen av pankreatiskt lipas men även till en viss del redan i munhålan och magsäcken av lingualt respektive gastriskt lipas. Nedbrytningen av kolhydrater påbörjas i munhålan av salivens amylas för att fortsätta i tunntarmen med hjälp av pankreatiskt amylas. Nukleinsyrorna bryts däremot ned i tunntarmen av enzymen ribonukleas och deoxyribonukleas. [5, s. 933, 941, 944]

2.2 Absorption av läkemedel från mag- och tarmkanalen

Läkemedel tas på samma sätt som de flesta andra ämnen upp i tunntarmen och tjocktarmen. Läkemedlen kan upptas genom epitelet i mag- och tarmkanalen, endera paracellulärt eller transcellulärt. Vid paracellulärt upptag når läkemedlet den systemiska cirkulationen via det mellanrum som finns mellan epitelcellerna medan läkemedlet vid transcellulärt upptag når den systemiska cirkulationen genom att först passera tvärsigenom epitelcellerna. [1, s. 156] I figur 1 åskådliggörs skillnaden mellan paracellulärt och transcellulärt upptag. Därtill finns också typiska transportmekanismer synliggjorda.



Figur 1: Skillnaden mellan paracellulärt och transcellulärt upptag av läkemedel i mag- och tarmkanalen samt typiska transportmekanismer. (A) Transcellulärt upptag, (B) Passiv diffusion, (C) Faciliterad transport, (D) Endocytos (Pinocytos), (E) Paracellulärt upptag och (F) Pinocytos. [10].

Läkemedel kan upptas transcellulärt genom passiv diffusion, faciliterad transport eller endocytos. Passiv diffusion sker icke-specifikt över cellmembranet medan faciliterad transport sker via specifika transportproteiner eller kanalproteiner i själva cellmembranet [6]. Både passiv diffusion och faciliterad transport genom epitelmembranet sker längs med koncentrationsgradienten och är direkt beroende av läkemedlets

fysiokemiska egenskaper. Hydrofoba läkemedel med låg molekylvikt tas i de flesta fall upp via passiv diffusion. [1, s. 157] Ifall läkemedlet är tillräckligt hydrofobt föreligger dock risken att det blir kvar i det hydrofoba dubbelskiktade cellmembranet av fosfolipider och som en följd av detta inte kommer att upptas på önskat sätt [6]. I enstaka fall kan också läkemedel upptas via endocytos och då främst via pinocytos [1, s. 157][10]. Detta är en energikrävande transportprocess i vilken det upptagna ämnet transporteras i vesiklar som bildats genom att cellmembranet avsnörts [10]. Det är främst M-cellerna i Peyers plack som har förmågan att ta upp läkemedel via endocytos men för enterocyterna är denna form av upptag marginell [1, s. 157-158].

Små hydrofila läkemedel kan vanligen inte passera cellmembranets fosfolipidlager och dessa tas därför upp paracellulärt [6]. Paracellulärt upptag av läkemedel sker med hjälp av passiv diffusion genom det mellanrum som finns mellan epitelcellerna. Den passiva diffusionen sker längs med koncentrationsgradienten och begränsas direkt av adhesionskomplex, såsom täta fogar, adherenspunkter eller desmosomer mellan epitelcellerna. [1, s. 157] Ju fler adhesionskomplex det finns mellan cellerna, desto mer begränsad är det paracellulära upptaget.

Den ytarea som finns tillgänglig för trancellulärt upptag är omfattande i jämförelse med den ytarea som är tillgänglig för paracellulärt upptag och därför är det paracellulära upptaget också begränsad ifråga om den mängd läkemedel som kan upptas per tidsenhet [11]. Beroende på läkemedlets fysiokemiska egenskaper dominerar i de flesta fall en av de ovannämnda upptagsmekanismerna. Absorptionen av läkemedlet från mag- och tarmkanalen är ofta en kombination av flera upptagsmekanismer. [1, s. 156]

2.3 Oral biotillgänglighet

Många polypeptider, nukleotider och fettsyror har relativt dålig biotillgänglighet och såväl den aktiva substansens som formuleringens fysiska och kemiska egenskaper är direkt avgörande för den orala biotillgängligheten. Den dåliga orala biotillgängligheten är i de flesta fall relaterad till de kemiska egenskaperna, enzymatisk nedbrytning eller dåligt upptag genom epitelet i mag- och tarmkanalen [12].

Proteiner och peptidnukleinsyror som administreras oralt inaktiveras ofta i den sura miljön i mag- och tarmkanalen eller bryts ned av de enzym som finns tillgängliga. Peptider och proteiner är därtill ofta hydrofila, och i jämförelse med andra läkemedelsmolekyler betydligt större, vilket försvårar diffusion genom epitelet i mag- och tarmkanalen. [10] På grund av detta är löslighet och permeabilitet två viktiga mått på den orala biotillgängligheten för aktiva substanser som tas upp via passiv diffusion [4].

Alla näringsämnen som når blodcirkulationen från mag- och tarmkanalen kommer via den portala cirkulationen redan tidigt efter upptaget att nå levern där de eventuellt ytterligare bryts ned. För läkemedel som intagits oralt kan denna så kallad förstapassagemetabolism vara fatal eftersom en fullständig nedbrytning av den aktiva substansen i levern är möjlig och den önskade effekten därmed kan utebli helt. [1, s. 152] Genom att den aktiva substansen upptas till lymfsystemet istället för blodcirkulationen undviks förstapassagemetabolismen och upptag av den aktiva substansen

via tarm-associerad lymfatisk vävnad såsom Peyers plack kan därför vara ett sätt att förbättra den orala biotillgängligheten [13]. Förstapassagemetabolismen kan också till viss del undvikas genom användning av prodroger där läkemedelsmolekylen först är i inaktiv form med sedan aktiveras när prodrogen till viss del nedbryts i levern [1, s. 152].

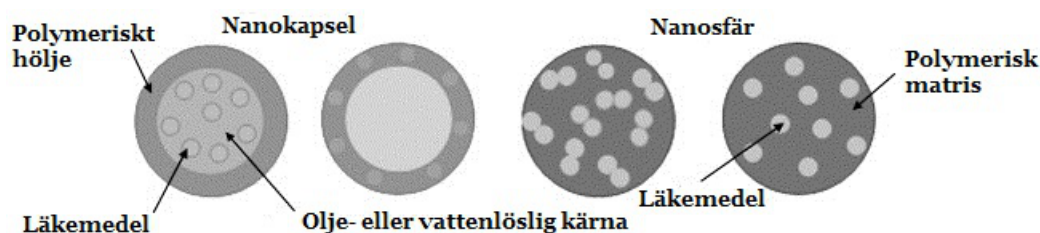
För att biofarmaceutika skall vara effektiva bör de ha tillräckligt god biotillgängligt. För att uppnå detta är någon form av modifikation av den aktiva substansen eller läkemedelsformuleringen i de flesta fall en nödvändighet. Detta kan ske på många olika sätt och flera olika strategier har framgångsrikt utvecklats. En möjlig strategi är att modifiera den aktiva substansens fysiokemiska egenskaper genom att exempelvis förändra makromolekylens lipofilitet eller motståndskraft mot enzymatisk nedbrytning. Makromolekylens biotillgänglighet kan också förbättras genom att på makromolekylen fästa kemiska strukturer som förbättrar makromolekylen förmåga att känna igen och vidfästa rätt cellreceptor. En annan fördelaktig strategi är att använda sig av någon typ av läkemedelssystem. [14] Ofta använda läkemedelssystem för att förbättra biotillgängligheten för biofarmaceutika är mikro- och nanopartikelbaserade läkemedelssystem, liposomer och andra lipofila läkemedelssystem, såsom emulsioner och miceller [3].

3 Nanopartikelbaserade läkemedelssystem

3.1 Nanopartiklar

Couvreur definierade nanopartiklar som fasta läkemedelsbärare vilka är mindre än $1\ \mu\text{m}$ och vilka kan vara både biodegraderbara och icke-biodegraderbara [15]. Mer specifikt är nanopartiklarna i storleksklassen 10 till 1000 nm [16]. Nanopartiklarna byggs för det mesta, beroende på användningsändamålet, upp av naturliga, semi-syntetiska eller syntetiska polymerer [17]. Naturliga polymerer har däremot inte i samma utsträckning använts i nanopartikelbaserade läkemedelssystem. De främsta orsakerna till detta är deras varierande kvalitet och att det ofta krävs någon form av tvärbinding vilken kan denaturera den aktiva substansen. [13]

Nanopartiklar är ett samlingsnamn som avser både nanosfärer och nanokapslar. Nanosfärerna har så kallad matrisstruktur och i nanosfärerna är den aktiva substansen endera absorberad på ytan av matrisen eller upplöst eller omsluten i själva matrisen. Nanokapslarna däremot har både ett tydligt yttre skikt av polymeriskt material och en inre kärna som kan vara vatten- eller oljebaserad. I nanokapslarna finns den aktiva substansen upplöst i den inre kärnan men det är också möjligt att den aktiva substansen är absorberad på kapselytan. [18] Skillnaden mellan nanosfärer och nanokapslar finns åskådliggjord i figur 2.



Figur 2: Skillnaden mellan nanokapslar och nanosfärer, översättning av [17].

Nanopartiklarnas egenskaper varierar och egenskaperna är direkt beroende av vilken eller vilka polymerer som använts för att bygga upp nanopartikeln. Egenskaperna är också beroende av huruvida ett stabiliseringsmedel använts, och i så fall av vilken typ och i vilken mängd. Därtill är syntetiseringsmetoden som använts direkt avgörande för de framställda nanopartiklarnas egenskaper. Viktiga egenskaper för nanopartiklar som används som läkemedelsbärare är storleken, zetapotentialen, förmågan att kapsla in den aktiva substansen och frisättningsprofilen för den aktiva substansen. [13] Nanopartiklarnas ringa storlek ger dem en stor specifik yta, vilket möjliggör såväl en ökad växelverkan med epitelens som en snabbare nedbrytning av partikeln [2]. Men noteras bör att den mängd aktiv substans som kan inkluderas också står i relation till partikelstorleken, ju mindre partikeln är desto mindre mängd aktiv substans kan inkluderas. Zetapotentialen i sin tur är ett mått på nanopartikelns stabilitet, ju högre zetapotential desto mer stabil är nanopartikeln. [13]

I fråga om lämplighet för oral administrering har nanopartikelbaserade läkemedelssystem många fördelar i jämförelse med andra läkemedelssystem. Nanopartikelbaserade läkemedelssystem kan mångsidigt användas för olika läkemedelsformuleringar

vars aktiva substans kan vara allt från syntetiska hydrofila och hydrofoba läkemedelsmolekyler till proteiner, peptider, vacciner och biologiska makromolekyler [13]. Därtill är exempelvis en fördröjd, kontrollerad och riktad frisättning av den aktiva substansen möjlig. En frisättning riktad mot specifika målstrukturer ökar den terapeutiska effekten men minskar också den mängd aktiv substans som behövs för att nå terapeutiskt svar [17]. Icke-önskade toxiska bieffekter kan på så sätt minimeras. Nanopartiklar är också jämfört med andra kolloidala nanobaserade läkemedelssystem, exempelvis liposomer och miceller, mer stabila i mag- och tarmkanalen [4].

3.2 Frigöring av den aktiva substansen

Utgående från hur det nanopartikelbaserade läkemedelssystemet är uppbyggt frigörs den aktiva substansen från läkemedelssystemet på olika sätt. Den aktiva substansen kan frigöras genom diffusion men också genom att hela det nanopartikelbaserade läkemedelssystemet bryts ned. Diffusionen kan ske endera genom polymermatrisen eller genom det yttre polymerskiktet (vid nanokapslar). Ifall läkemedelssystemet är av matristyp kan diffusionen ske genom polymeren men vanligtvis sker diffusionen genom vattenfyllda porer i själva polymermatrisen. Orsaken till detta är att proteiner och peptider ofta är både för stora och för hydrofila för att kunna transporteras genom polymerfasen. [16, 19]

Nanopartikelns storlek och mängd aktiv substans som inkluderats i nanopartikeln har betydelse för frisättningsprofilen. Större partiklar har en längre, konstant frisättning av den aktiva substansen än små partiklar. En icke-önskad frisättningstopp av den aktiva substansen tenderar dock att förekomma i början av frisättningen för större nanopartiklar. Ifall mer aktiv substans inkluderas i nanopartikeln blir frisättningen i regel snabbare men frisättningstoppen i början blir också mera påtaglig. [13]

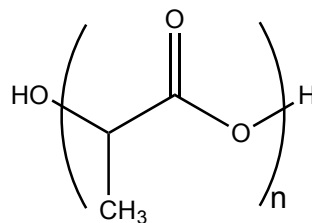
Nanopartiklar är till storleken så små att det är möjligt för dem att korsa tarmbarriären och frigöra den aktiva substansen först i blodet, lymfarna eller målorganet [20]. Studier har visat att mindre nanopartiklar (300 nm) lättare når blodomloppet via tarmbarriären än större nanopartiklar (600 nm och 1000 nm) och därför är mindre nanopartiklar lämpligare ifall man önskar en jämnare fördelning i människokroppen [21]. Nanopartikelbaserade läkemedelssystem innehållande polymerer som är olösliga i vatten, exempelvis poly(laktid-co-glykolid) (PLGA), är ofta mera stabila och har därför en större tendens att tas upp som hela partiklar än läkemedelssystem baserade på vattenlösliga polymerer. Huruvida polymeren också tas upp beror bland annat på polymerens molekylvikt, struktur och hydrofobicitet. [4]

3.3 Syntetiska polymertillämpningar

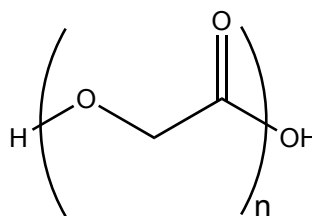
3.3.1 Polystrar

Polylaktid (PLA) och polyglykolsyra (PGA), samt deras sampolymer poly(laktid-co-glykolid) (PLGA) är tre av de mest använda polymererna i nanopartikelbaserade läkemedelssystem [13]. Angående strukturformlerna för dessa polymerer se figur 3 - 5.

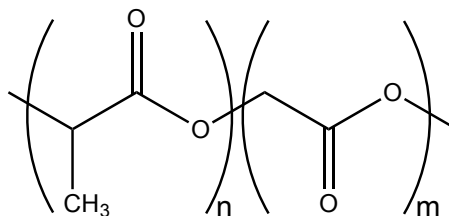
Dessa polymerer är både biodegraderbara och biokompatibla och har därför minimala toxiska bieffekter. PLA, PGA och PLGA nedbryts nämligen i människokroppen genom hydrolys till mjölksyra (PLA), glykolsyra (PGA) eller till båda dessa (PLGA). [22, 13]



Figur 3: Strukturformeln för polylaktid (PLA).



Figur 4: Strukturformeln för polyglykolsyra (PGA).



Figur 5: Strukturformeln för poly(laktid-co-glykolid) (PLGA).

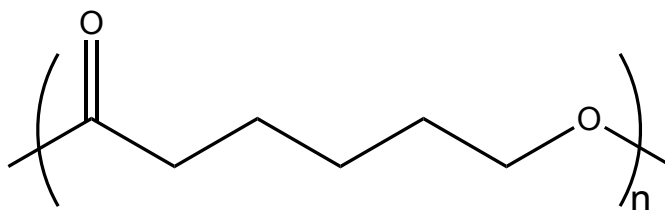
I matrisformade läkemedelssystem innehållande PLGA frigörs den aktiva substansen endera genom att den diffunderar genom matrisen eller genom att själva polymermatrisen bryts ned. Genom att variera molekylvikten och molekylviktsfördelningen för PLGA är det möjligt att reglera hur snabbt polymermatrisen bryts ned och därigenom kontrollera frisättningen av den aktiva substansen [23]. På motsvarande sätt är det också möjligt att kontrollera frisättningen genom att förändra förhållandet mellan PLA och PGA i polymermatrisen. Ökad mängd PLA ökar hydrofobiciteten, medan ökad mängd PGA i sin tur ökar hydrofiliciteten. [13]

Som tidigare nämndes behövs det ofta någon form av emulgeringsmedel för att stabilisera nanopartikelbaserade formuleringar. I nanopartiklar tillverkade av PLGA och PLA är polyvinylalkohol (PVA) det mest använda emulgeringsmedlet. Det har dock visat sig att en del av PVA blir kvar på ytan och därför påverkar nanopartikelens

fysikaliska egenskaper. Detta i sin tur påverkar hur väl nanopartikeln tas upp av cellerna. En större mängd PVA i formuleringen gör exempelvis nanopartikeln mer hydrofil till sin natur. [24] Varierad mängd PVA i formuleringen gör det därmed möjligt att tillverka nanopartiklar med olika egenskaper och olika frisättningsprofiler.

Ett återkommande problem med nanopartiklar med polymererna PLA och PLGA som bas är deras hydrofoba egenskaper och svårigheten att effektivt inkludera hydrofila läkemedelsmolekyler i formuleringen [2, 25]. Från nanopartiklar av PLA och PLGA sker även en snabb frigöring av den aktiva substansen redan tidigt i mag- och tarmkanalen [13, 25]. En möjlig lösning på det här problemet kan vara att inkludera andra polymerer i formuleringen eller att skapa en sampolymer där någon annan polymerpolymeriserats in i PLA/PLGA-homopolymeren. Genom att förutom PLGA också inkludera Hp55 (hydroxipropylmetylcellulosaftalat-55, HPMCP-55) i polymermatrisen har man lyckats producera nanosfärer där den snabba frigöringen av den aktiva substansen undvikits. Därtill har mer aktiv substans kunnat inkluderas i polymermatrisen. HPMCP är, en inom enterodragering använd, pH-känslig cellulosa som inte nedbryts i de sura förhållanden i magsäcken utan först i de mer neutrala förhållandena i tunntarmen [25].

Även poly- ϵ -kaprolakton (PCL) har använts i nanopartikelbaserade läkemedelssystem. Strukturformeln för PCL kan ses i figur 6. PCL är i likhet med ovannämnda polyestrar biodegraderbar och biokompatibel [4]. I människokroppen nedbryts PCL genom hydrolys av dess esterbindningar, en nedbrytning som är betydligt långsammare än exempelvis nedbrytningen av PLA [22]. PCL-baserade nanopartiklar lämpar sig därför i formuleringar där man önskar en långsam frisättning av läkemedlet under en längre tidsperiod.



Figur 6: Strukturformeln för poly- ϵ -kaprolakton (PCL).

PCL har i kombination med Eudragit[®] RS använts i orala nanopartikelbaserade läkemedelssystem. Eudragit[®] RS är en polykatjonisk akrylpolymer ofta använd inom enterodragering. Då insulin inkluderats i nanopartiklar av PCL och Eudragit[®] RS har insulin haft en märkbart bättre biotillgänglighet. Detta torde kunna förklaras med att ovannämnda nanopartiklar skyddar insulinet mot enzymatisk nedbrytning men också, tack vare Eudragit[®] RS, påvisar mukoadhesiva egenskaper. [26]

3.3.2 Akrylpolymerer

Nanopartiklar för oral läkemedelsadministrering har också i viss mån framställts av cyanoakrylatbaserade polymerer så som polyalkylcyanoakrylat (PACA), polyetylcyanoakrylat (PECA), polybutylcyanoakrylat (PBC) och polyisobutylcyanoakrylat

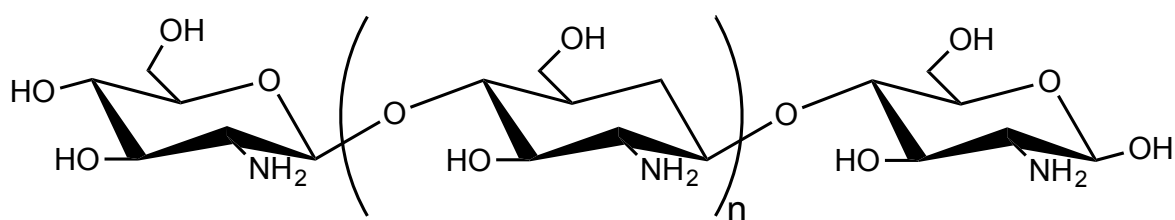
(PIBCA). Cyanoakrylatbaserade polymerer är såväl biokompatibla som biodegraderbara och kan användas i kombination med många olika aktiva substanser. [22, 27, 28] I jämförelse med polyesterbaserade nanopartiklar nedbryts nanopartiklar tillverkade av exempelvis PACA betydligt snabbare. Detta kan ses både som en fördel och en nackdel. Det som ytterligare talar emot PACA-baserade nanopartiklar är att slutprodukterna från nedbrytningen inte är lika naturliga och giftfria som de slutprodukter som fås då polyestrarna nedbryts. [27]

PACA, men även PECA, har visat sig i någon mån ha mukoadhesiva egenskaper [13]. PACA-baserade nanopartiklar har hydrofobiska egenskaper och en negativ laddning, vilket inte gör dem till optimala mukoadhesiva läkemedelssystem. En möjlig lösning på det här problemet kan vara att ytmodifiera nanopartiklarna med hydrofila polysackarider. [29]

3.4 Naturliga polymertillämpningar

3.4.1 Kitosan

Av de naturliga polymererna är kitosan och dess derivat de mest använda polymererna i nanopartikelbaserade tillämpningar för oral administrering [7]. Kitosan är en deacetylerad form av kitin och de tillgängliga primära aminerna ger kitosan lämpliga egenskaper för läkemedelsformuleringar [30]. Angående strukturformeln för kitosan se figur 7. Kitosan är en naturligt förekommande hydrofil polysackarid som är både biokompatibel och giftfri. [4, 13].



Figur 7: Strukturformeln för kitosan.

Kitosanets fysiokemiska egenskaper är direkt beroende av molekylvikten, pH-värdet och huruvida kitinet deacetylerats helt eller endast delvis [7]. Ifall deacetyleringen inte är fullständig består polymerkedjan förutom glukosamin också av N-acetyl-glukosamin [30]. Det som gör kitosan så intressant i orala polymertillämpningar är kitosanets egenskaper som möjliggör vidfästning på slemhinnan i mag- och tarmkanalen [7]. För mer information om mukoadhesion och kitosanets mukoadhesiva egenskaper se kapitel 4.2. Kitosan har därtill påvisat ökad absorption av hydrofila läkemedelsmolekyler genom att tillfälligt förändra proteinstrukturen i de täta fogarna som finns mellan epitelcellerna [29].

Även om kitosan främst väckt intresse vid ytmodifiering av polymerbaserade nanopartiklar finns det forskning som påvisar att kitosan också kan användas som grund i nanopartiklar för oral administrering. Exempelvis har vaccinet ovalbumin kunnat inkluderas i kitosanbaserade nanopartiklar. För ökad stabilitet i mag- och

tarmkanalen och för att undvika en nedbrytning av nanopartiklarna redan innan upptagning av M-cellerna i Peyers plack dragerades de kitosanbaserade nanopartiklarna med natriumalginat. [30] Nanopartiklar har även kunnat syntetiseras av en kombination av kitosan och polyakrylsyra (PAA). PAA är en giftfri, biodegraderbar och hydrofil polymer. Nedbrytningen av de syntetiserade nanopartiklarna visade sig vara kraftigt pH-beroende och hydrofila läkemedelsmolekyler kunde med relativt god framgång inkluderas i formuleringen. [31]

4 Ytmodifiering

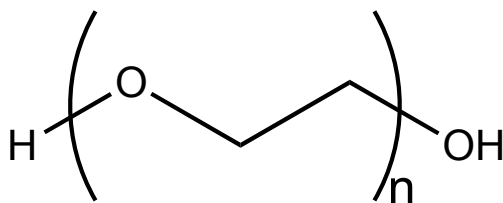
Nanopartikelns yttre yta har stor betydelse för nanopartikelns egenskaper men också för hur den aktiva substansen frigörs ur partikeln. På grund av detta spelar ytmodifiering en viktig roll då man vill förbättra funktionaliteten för nanopartikelbaserade läkemedelssystem och göra dem mer lämpliga för oral administrering. Ytmodifiering kan i princip ske på två olika sätt, endera genom att dragera nanopartiklarnas yta med en bioadhesiv polymer eller annat ytaktivt ämne eller genom att inkludera en biodegraderbar polymer i själva nanopartikelstrukturen [32].

En modifiering av nanopartiklarnas yta ger upphov till förändringar i deras zetapotential men också i deras hydrofobicitet. Det här är egenskaper som i sin tur påverkar såväl formuleringens stabilitet som förmågan att binda till slemhinnan i mag- och tarmkanalen. Även proteiners förmåga att binda till formuleringens yta beror direkt på zetapotentialen och hydrofobiciteten. [32]

4.1 Polymertillämpningar

4.1.1 Polyetylenglykol (PEG)

Vid ytmodifiering av nanopartiklar är polyetylenglykol (PEG) den mest använda syntetiska polymeren. Även högmolekylärt PEG, polyetylenoxid (PEO) har i viss mån använts vid ytmodifiering. Strukturformeln för PEG kan ses i figur 8. PEG är nonjonisk och hydrofil, samt mycket biokompatibel. [13] Användandet av PEG vid ytmodifiering grundar sig främst på dess förmåga att stabilisera formuleringen. PEG-kedjorna på nanopartikelns yta fungerar nämligen som ett steriskt skydd som förhindrar både opsonisering och makrofager att binda till nanopartikeln. [32] Detta förhindrar att nanopartikeln känns igen och elimineras av mononukleära fagocyter. Ifall nanopartikeln når blodomloppet intakt kan cirkulationstiden, tack vare ytmodifiering med PEG, förlängas och frigörelsen av den aktiva substansen blir fördröjd. [22, 13] PEG kan även mångsidigt tillsättas i formuleringen såväl under syntetiseringen av nanopartiklarna som efter syntetiseringen, vilket ytterligare ökar dess användbarhet [13].



Figur 8: Strukturformeln för polyetylenglykol (PEG).

Ytmodifiering av polyesterbaserade nanopartiklar med PEG har i flera studier visat sig öka upptaget av den aktiva substansen. Exempelvis Vila et al. [33] dragerade PLA-nanopartiklar innehållande den aktiva substansen tetanus toxoid. Vid oral administrering var upptaget av proteinet från de dragerade partiklarna märkbart bättre

än från de icke-dragerade partiklarna. Forskning har också visat att ytmodifiering med PEG kan fördröja den naturliga nedbrytningen av PLA-nanopartiklarna, en nedbrytning som sker som en följd av kontakten med det pankreatiska enzymet lipas [34]. Även för PLGA-baserade nanopartiklar kan ytmodifiering med PEG fördröja nedbrytningen i och med att PEG minskar adsorptionen av proteiner och enzymer på nanopartiklarnas yta [13].

4.1.2 Övriga polymertillämpningar

De polymerer som används för ytmodifiering är i de flesta fall hydrofila. Förutom ovannämnda PEG och PEO har också poloxamer, poloxamin, polysorbat (20, 40, 60 och 80), polysackarider och lauryleter (Brij-35) använts för ytmodifiering av nanopartiklar. [16, 22]

Både poloxamer och poloxamin är blocksampolymerer där polymerkedjan byggs upp av block av polyetylenoxid och polypropylenoxid. Poletylenoxid är till sin natur hydrofil medan polypropylenoxid till sin natur är hydrofob, vilket ger dessa blocksampolymerer såväl hydrofila som hydrofoba egenskaper. Såväl polystyrenbaserade och polymetylmetakrylatbaserade (PMMA-baserade) nanopartiklar som biodegraderbara PLGA-baserade nanopartiklar har ytdrageras med olika former av poloxamer och poloxamin [16, 35]. Ytmodifiering med exempelvis poloxamer 407 och poloxamin 908 ökade såväl nanopartikelns motståndskraft mot makrofager som cirkulationstiden i blodomloppet [35].

4.2 Mukoadhesiva tillämpningar

För att orala läkemedel skall vara effektiva är det viktigt att den aktiva substansen eller läkemedelsformuleringen kommer i kontakt med och passerar genom mag- och tarmkanalens epitelvävnad. Mukoadhesiva läkemedelssystem binder till slemhinnan i mag- och tarmkanalen, vilket åtminstone till en viss del kan förhindra att läkemedelssystemet passerar mag- och tarmkanalen utan att den aktiva substansen har frigjorts [36].

Mukoadhesiva tillämpningar kan förbättra den orala biotillgängligheten på många olika sätt. Som en följd av att läkemedelsformuleringen binder till slemhinnan ökar formuleringens kontakt också med den underliggande epitelvävnaden genom vilken läkemedelsupptaget sker. Som en följd av detta ökar även läkemedelskoncentrationen vid absorptionsstället och den aktiva substansen späds inte ut eller nedbryts i lika hög grad av sekretet i mag- och tarmkanalen. Mukoadhesiva tillämpningar ökar också läkemedelsformuleringens uppehållstid i mag- och tarmkanalen. Därtill gör mukoadhesiva tillämpningar läkemedelsupptag från specifika områden i mag- och tarmkanalen möjlig eftersom adhesionen till slemhinnan kan kontrolleras genom att använda mukoadhesiva tillämpningar med olika egenskaper. [1, s. 170-171][20]

Polymerer har framgångsrikt använts som beståndsdelar i mukoadhesiva tillämpningar. De polymerer som använts är ofta hydrofoba molekyler med funktionella grupper som har möjlighet att bilda vätebindningar. De är därtill ofta anjoniska till sin natur och har en hög molekylvikt ($> 100\ 000$ Da). [1, s. 170] Typiska syntetiska

polymerer som använts är polyakrylat och cellulosaderivat medan naturliga polymerer som använts främst är kitosan och alginat [2].

Kitosan är en av den mest använda polymeren inom de mukoadhesiva tillämpningarna. Kitosanets mukoadhesiva egenskaper beror på elektrostatiske interaktioner mellan det positivt laddade kitosanet och mucinets negativt laddade sialingrunder [29]. Kitosan har också effektivt kunnat bindas till nanopartiklar med andra polymerer som bas. Detta har ökat dess användning i olika läkemedelsformuleringar. Exempelvis har PLA-nanopartiklar som innehåller proteinet tetanus toxoid som aktiv substans framgångsrikt kunnat drageras med kitosan, något som också resulterat i en märkbart bättre upptag av proteinet än från de icke-dragerade partiklarna [33].

I en studie gjord av Bravo-Osuma et al. [29] ytmodifierades PIBCA-baserade nanopartiklar med såväl vanligt kitosan som kitosan där tiolgrupper infogats. Studien visade att båda typerna av kitosan ökade de mukoadhesiva egenskaperna för nanopartiklarna. Därtill visade det sig att också kitosanets egenskaper, såsom molekylvikt, antalet tvärbindingar i strukturen och mängd aktiva tiolgrupper på partikelytan, hade betydelse för hela partikelns mukoadhesiva egenskaper.

4.3 Enterodragering

För läkemedel med polypeptider, nukleotider och fettsyror som aktiv substans är magsäckens sura miljö och de enzymer som finns i magsäcken ofta ett problem. Det här är omständigheter som möjliggör en snabb och för tidig nedbrytning av den aktiva substansen. En möjlig, effektiv lösning på det här problemet är enterodragering. Vid enterodragering drageras formuleringen med en polymer eller polymerblandning som är resistent mot de sura förhållandena i magsäcken men som snabbt nedbryts i de neutrala eller svagt basiska förhållandena i tunntarmen [37, 38].

Enterodragering är möjlig att göra på flera olika nivåer i formuleringen, vilket gör det möjligt att effektivt kontrollera frisättningen av den aktiva substansen. Nanopartiklarna kan enterodrageras, men det är också möjligt att enterodragera beredningsformen, det vill säga kapslarna eller tablettorna som innehåller nanopartiklarna. Därtill är det möjligt att få en mycket pH-specifik nedbrytning av drageringen beroende på vilken polymer eller polymerblandning som väljs. Polymerer med fria karboxylgrupper i grundstommen har nämligen en mycket pH-specifik löslighet som är direkt beroende av antalet fria karboxylgrupper [1, s. 167]. Frisättningsprofilen är dock inte enbart beroende av vilken polymer som väljs för drageringen, även till exempel drageringens tjocklek och mängden polymer som används kan påverka frisättningen. Därtill påverkas frisättningen också av inkluderad mängd aktiv substans och dess fysiokemiska egenskaper, liksom huruvida läkemedlet intagits på tom eller full mage. [39]

Noteras bör är att enterodragering inte enbart behöver användas för att skydda den aktiva substansen mot förhållandena i magsäcken, enterodragering kan också användas för att skydda magsäcken mot den aktiva substansen. Vissa aktiva substanser kan nämligen förorsaka magirritation eller illamående ifall de frigörs för tidigt i mag- och tarmkanalen. [1, s. 166-167].

Eudragit[®] i dess olika former är en använd polymertillämpning vid enterodragering.

ring. Eudragit[®] är sampolymerer bestående av olika kombinationer av metakrylsyra och etylakrylat. Andra använda polymertillämpningar vid enterodragering är Aquateric (cellulosaacetatftalat) och Coateric (polyvinylacetatftalat). [1, s. 167]

Det finns forskning som visar att enterodragering också effektivt kan användas för nanopartikelbaserade läkemedelssystem. Sonjae et al. [37] exempelvis enterodragerade med både Eudragit[®] S100 och Eudragit[®] L100-55 hårda gelatinkapslar innehållande nanopartiklar syntetiserade av kitosan och gamma-polyglutaminsyra. Båda drageringstyperna klarade av förhållanden som simulerade den sura miljön i mag- och tarmkanalen, men Eudragit[®]-drageringen visade en snabbare nedbrytning då pH-värdet höjdes. Detta kan förklaras med att Eudragit[®] L100-55 nedbryts vid pH-värden över 5,5, medan nedbrytning av Eudragit[®] S100 sker först vid pH-värden över 7,0. Det har även visat sig vara möjligt att kombinera dessa två Eudragit[®]-typer, vilket gett en nedbrytning vid pH-värden mellan 5,5 och 7,0 beroende på förhållandet mellan de två Eudragit[®]-typerna.

5 Penetrationsförbättrare

Funktionaliteten hos nanopartikelbaserade läkemedelssystem kan förbättras genom att tillsätta penetrationsförbättrare (*permeation enhancers*) i formuleringen. Viktigt är dock att notera att penetrationsförbättrare i sig inte kan fungera som läkemedelsbärare. De utgör endast en viktig teknik för att förbättra den orala biotillgängligheten [3].

Penetrationsförbättrarnas bakomliggande mekanismer varierar men avsikten är alltid detsamma: att tillfälligt göra epitelet i mag- och tarmkanalen mera genomträngligt och därigenom öka upptaget av den aktiva substansen. Upptaget kan ökas på flera olika sätt, exempelvis genom att öka fluiditeten hos epitelmembranet, genom att lösa upp det skyddande slemlagret eller genom att minska slemlagrets viskositet. [1, s. 173] Penetrationsförbättrarna kan dock ge upphov till långvariga skador på epitelet [2] och därför är det viktigt att också ta eventuella bieffekter i beaktande då penetrationsförbättrarnas ändamålsenlighet utvärderas. Penetrationsförbättrarna ökar inte bara upptaget av den aktiva substansen utan också upptaget av giftiga ämnen [2, 40]. Långvarig rubbning av barriärfunktionen kan också leda till att vatten och joner inte transporteras över epitelmembranet på rätt sätt, något som kan ge upphov till diarré [12]. Studier har dock visat att den bakomliggande mekanismen har betydelse för penetrationsförbättrarnas toxicitet. Exempelvis verkar penetrationsförbättrare som öppnar täta fogar ha färre bieffekter än sådana penetrationsförbättrare som stör cellmembranets struktur [40].

Typiska penetrationsförbättrare är långkedjiga fettsyror, gallsalter, amfifila yaktiva ämnen, kelateringsmedel och zonula occludens toxin [38, 41]. Polyaminerna och deras derivat är andra effektiva penetrationsförbättrare som därtill heller inte förorsakar vävnadsskador [42]. Även kitosan har visat sig ha egenskaper som kan göra tarmepitelet mer genomträngligt [29]. Penetrationsförbättrarna kan inkluderas i formuleringen som hjälpämnen eller integreras via icke-specifika bindningar med det aktiva ämnet och på så sätt göra det aktiva ämnet mer hydrofobt [3]. För att penetrationsförbättrarna skall verka effektivt är det viktigt att de når mag- och tarmkanalens slemhinna samtidigt som den aktiva substansen, men också att koncentrationen av penetrationsförbättrarna är tillräcklig. Detta kan dock förorsaka problem eftersom penetrationsförbättrarna har en tendens att sprida sig i mag- och tarmkanalen och i utspädd form blir effekten sämre. [40, 42]

6 Diskussion och avslutning

Utvecklingen inom bioteknologi har under de senaste åren gått framåt och som ett resultat av detta utvecklas idag läkemedel riktade mot allt mer specifika målstrukturer i människokroppen. Ifrågavarande läkemedel har oftast en aktiv substans av biologiskt ursprung, vilket ställer helt nya krav på läkemedelsformuleringen. Därtill är oral administrering av biomolekyler, såsom proteiner och peptider, problematisk på grund av den naturliga nedbrytningen i mag- och tarmkanalen, samt det dåliga upptaget genom epitelet i tunntarmen.

Åtskilliga vetenskapliga och prekliniska studier har indikerat att nanopartikelbaserade läkemedelssystem med syntetiska och/eller naturliga polymerer som bas kan möjliggöra effektiv oral administrering av aktiv substans med biologiskt ursprung. Speciellt för polymerbaserade läkemedelssystem som är såväl bionedbrytbara som biodegraderbara finns det goda framtidsutsikter. Polymerbaserade nanopartiklar är, tack vare möjligheten att använda polymerer med olika egenskaper, mycket mångsidiga i jämförelse med andra läkemedelsformuleringar. Nanopartiklar möjliggör en kontrollerad frisättning av den aktiva substansen men förefaller också växelverka med slemhinnan i mag- och tarmkanalen, vilket kan möjliggöra en mer riktad frisättning till specifika organ och målceller.

Fortsatt forskning och utveckling av nanopartikelbaserade läkemedelssystem för oral administrering av biomolekyler är såväl ur patientens som sjukvårdens synvinkel viktig. Orala läkemedel är i de flesta fall för patienten både lätta att dosera och använda, samtidigt som de inte heller förorsakar patienten onödiga smärtor. Detta är faktorer som anses ha en positiv inverkan på hur väl patienten följer givna ordinationer (*compliance*). Orala läkemedel kan också ses som kostnadseffektiva, eftersom patienten på egen hand kan ta sina läkemedel utan regelbunden kontakt med sjukvården.

Polymerbaserade läkemedelssystem i nanostorlek har för oral administrering av biomolekyler framtidspotential men då krävs ytterligare studier och grundläggande kartläggning av eventuella negativa bieffekter. En noggrannare klarläggning av interaktionen både mellan den aktiva substansen och den övriga läkemedelsformuleringen och mellan läkemedelssystemet och cellerna är nödvändig för syntetisering av optimala nanopartiklar. För att nanopartiklarna skall vara effektiva måste det vara möjligt att inkludera tillräcklig mängd av den aktiva substansen i formuleringen samtidigt som frigöringen av den aktiva substansen skall se vid rätt tidpunkt och med önskad hastighet. En övergång från småskalig syntetisering av nanopartiklar i forskningslaboratorier till storskalig produktion inom läkemedelsindustrin medför även utmaningar av helt nya slag.

Referenser

- [1] Hillery, A. M., Lloyd, A. W. & Swarbrick, J. *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. 1. uppl. Boca Raton: CRC Press, 2001. 474 s. ISBN 0-415-27198-3.
- [2] Herrero E. P., Alonso, M. J. & Noemi, C. *Polymer-based oral peptide nanomedicines* Therapeutic delivery. Vol. 3:5. 2012. S. 657-668. DOI: 10.4155/tde.12.40.
- [3] Pinto Reis, C., Silva, S., Martinho, N. & Rosado, C. *Drug carriers for oral delivery of peptides and proteins: accomplishments and future perspectives*. Therapeutic delivery. Vol. 4:2. 2013. S. 251-265. DOI: 10.4155/tde.12.143.
- [4] Plapied, L., Duhem, N., des Rieux, A. & Pr eat, V. *Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery*. Current Opinion in Colloid & Interface Science. Vol. 16:3. 2011. S. 228-237. DOI: 10.1016/j.cocis.2010.12.005.
- [5] Tortora, G. J. & Derrickson, B. *Principles of Anatomy and Physiology*. 12. uppl. Vol. 2. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2009. 1174 s. ISBN: 978-0470-39234-8.
- [6] Daugherty, A. L. & Mrsny, R. J. *Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier Part one*. Pharmaceutical Science & Technology Today. Vol. 2:4. 1999. S. 144-151. DOI: 10.1016/S1461-5347(99)00142-X
- [7] Chen, M-E., Sonjae, K., Chen, K-J. & Sung, H-W. *A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery*. Biomaterials. Vol. 32:36. 2011. S. 9826-9838. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.087.
- [8] Schenk, M. & Mueller, C. *The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. Vol. 22:3. 2008. S. 391-409. DOI: 10.1016/j.bpg.2007.11.002.
- [9] Ensign, L. M., Cone, R. & Hanes, J. *Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers*. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 64:6. 2012. S. 557-570. DOI: 10.1016/j.addr.2011.12.009.
- [10] Gaucher, G., Satturwar, P., Jones, M-C., Furtos, A. & Leroux, J-P. *Polymeric micelles for oral drug delivery*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Vol. 76:2. 2010. S. 147-158. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.06.007.
- [11] Daugherty, A. L. & Mrsny, R. J. *Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier*. Pharmaceutical Science & Technology Today. Vol. 2:7. 1999. S. 281-287. DOI: 10.1016/S1461-5347(99)00170-4.
- [12] Sood, A. & Panchagnula, R. *Peroral Route: An Opportunity for Protein and Peptide Drug Delivery*. Chemical Reviews. Vol. 101:11. 2001. S. 3275-3303. DOI: 10.1021/cr000700m.

- [13] Hans, M. L. & Lowman, A. M. *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. Current Opinion in Solid State & Materials Science. Vol. 6:4. 2002. S. 319-327. DOI: 10.1016/S1359-0286(02)00117-1.
- [14] Morishita, M. & Peppas, N. A. *Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery?* Drug Discovery Today. Vol. 11: 19. 2006. S. 905-910. DOI: 10.1016/j.drudis.2006.08.005.
- [15] Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J. & Veiga, F. V. *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. Vol. 2:1. 2006. S. 8-21. DOI: 10.1016/j.nano.2005.12.003.
- [16] Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. & Rudzinski, W. E. *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of Controlled Release. Vol. 70:1. 2001. S. 1-20. DOI: 10.1016/S0168-3659(00)00339-4.
- [17] Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J. & Veiga, F. V. *Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. Vol. 2:2. 2006. S. 53-65. DOI: 10.1016/j.nano.2006.04.009.
- [18] Allemann, E., Leroux, J-C. & Gurny, R. *Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics*. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 34:2. 1998. S. 171-189. DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00039-8.
- [19] Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M. & Axelsson, A. *The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review*. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 415:1. 2011. S. 34-52. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.049.
- [20] Ponchel, G. & Irache, J-M. *Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract*. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 34:2. 1998. S. 191-219. DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00040-4.
- [21] He, C., Yin, L., Tang, C. & Yin, C. *Size-dependent absorption mechanism of polymeric nanoparticles for oral delivery of protein drugs*. Biomaterials. Vol. 33:33. 2012. S. 8569-8578. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.063.
- [22] Kumari, A., Yadav, S. K. & Subhash, C. Y. *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol. 75:1. 2010. S. 1-18. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
- [23] Anderson, J. M. & Shive, M. S. *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 64:1. S. 72-82. DOI: 10.1016/S0169-409X(97)00048-3.

- [24] Sahoo, S. K., Panyam, J., Prabha, S. & Labhasetwar, V. *Residual polyvinyl alcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake*. Journal of Controlled Release. Vol. 82:1. 2002. S. 105-114. DOI: 10.1016/S0168-3659(02)00127-X.
- [25] Cui, F-D., Tao, A-J., Cun, D-M., Zhang, L-Q. & Shi, K. *Preparation of Insulin Loaded PLGA-Hp55 Nanoparticles for Oral Delivery*. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 96:2. 2007. S. 421-427. DOI: 10.1002/jps.20750.
- [26] Damgé, C., Maincent, P. & Ubrich, N. *Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats*. Journal of Controlled Release. Vol. 117:2. 2007. S. 163-170. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.10.023.
- [27] Arias, J. L., Gallardo, V., Gómez-Lopera, S. A., Plaza, R.C. & Delgado, A. V. *Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core*. Journal of Controlled Release. Vol. 77:3. 2001. S. 309-321. DOI: 10.1016/S0168-3659(01)00519-3.
- [28] Fontana, G., Pitarresi, G., Tomarchio, V., Carlisi, B. & San Biagio, P. L. *Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles*. Biomaterials. Vol. 19:11. 1998. S. 1009-1017. DOI: 10.1016/S0142-9612(97)00246-9.
- [29] Bravo-Osuma, I., Vauthier, C., Farabollini, A., Palmieri, G. F. & Ponchel, G. *Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles*. Biomaterials. Vol. 28:13. 2007. S. 2233-2243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.005.
- [30] Borges, O., Borchard, G., Verhoef, J. C., de Sousa, A. & Junginger, H. E. *Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system*. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 299:1. 2005. S. 155-166. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.04.037.
- [31] Hu, Y., Jiang, X., Ding, Y., Ge, H., Yuan, Y. & Yang, C. *Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles*. Biomaterials. Vol. 23:15. 2002. S. 3193-3201. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00071-6.
- [32] des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y-J. & Pr at, V. *Nanoparticles as potential oral delivery system of proteins and vaccines: A mechanistic approach*. Journal of Controlled Release. Vol. 116:1. 2006. S. 1-27. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.08.013.
- [33] Vila, A., S nchez, A., Tob o, M., Calvo P. & Alonso, M. J. *Design of biodegradable particles for protein delivery*. Journal of Controlled Release. Vol. 78:1. 2002. S. 15-24. DOI: 10.1016/S0168-3659(01)00486-2.
- [34] Tob o, M., S nchez, A., Vila, A., Soriano, I., Evora, C., Vila-Jato, J. L. & Alonso, M. J. *The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of*

- PEG-PLA nanoparticles following oral administration.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol. 18:3. 2000. S. 315-323. DOI: 10.1016/S0927-7765(99)00157-5.
- [35] Redhead, H. M., Davis, S. S. & Illum, L. *Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation.* Journal of Controlled Release. Vol. 70:3. 2001. S. 353-363. DOI: 10.1016/S0168-3659(00)00367-9.
- [36] Yamanaka, Y. J. & Leong, K. W. *Engineering strategies to enhance nanoparticle-mediated oral delivery.* Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. Vol. 19:12. 2008. S. 1549-1570. DOI: 10.1163/156856208786440479.
- [37] Sonjae, K., Chen, Y-J., Chen, H-L., Wey, S-P., Juang, J-H., Nguyen, H-N., Hsu, C-W. & Sung, H-W. *Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(γ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery.* Biomaterials. Vol. 31:12. 2010. S. 3384-3394. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.042.
- [38] Rajeswari, T. S. *Non invasive insulins: advanced insulin therapy over this decade.* Journal of Applied Pharmaceutical Science. Vol. 1:8. 2011. S. 12-20. ISSN: 2231-3354.
- [39] Khan, M. Z. I., Prebeg, Ž. & Kurjaković, N. *A pH-dependent colon targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers I. Manipulation of drug release using Eudragit[®] L100-55 and Eudragit[®] S100 combinations.* Journal of Controlled Release. Vol. 58:2. 1999. S. 215-222. DOI: 10.1081/DDC-100101266.
- [40] Aungst, B. J. *Intestinal Permeation Enhancers.* Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 89:4. 2000. S. 429-442. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6017(200004)89:4<429::AID-JPS1>3.0.CO;2-J.
- [41] Khafagy, E-S., Morishita, M., Onuki, Y. & Takayama, K. *Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review.* Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 59:5. 2007. S. 1521-1546. DOI: 10.1016/j.addr.2007.08.019.
- [42] Makhlof, A., Werle, M., Tozuka, Y. & Takeuchi, H. *A mucoadhesive nanoparticulate system for the simultaneous delivery of macromolecules and permeation enhancers to the intestinal mucosa.* Journal of Controlled Release. Vol. 149:1. 2011. S. 81-88. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.02.001.