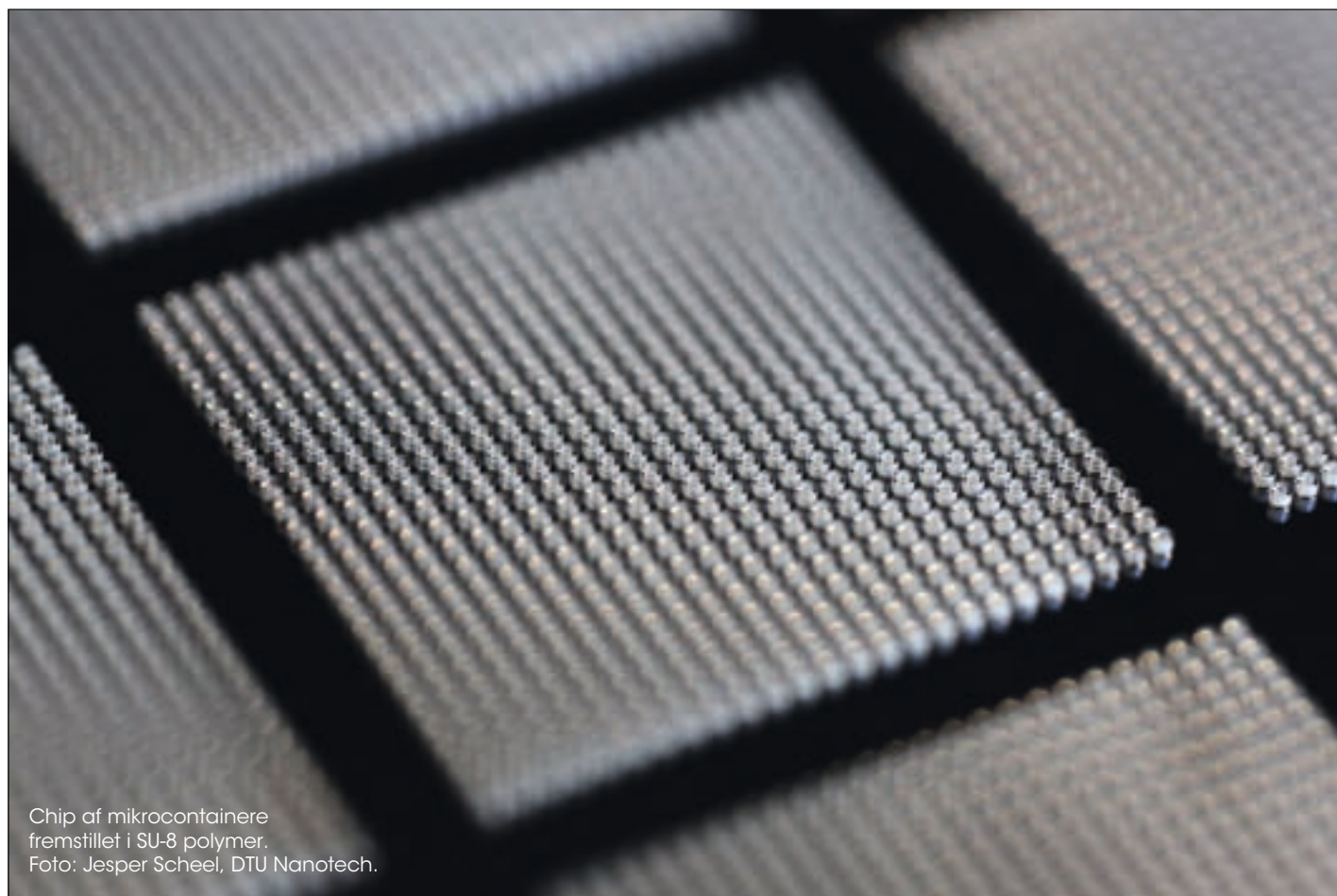




Chip af mikrocontainere
fremstillet i SU-8 polymer.
Foto: Jesper Scheel, DTU Nanotech.

Små løsninger til store udfordringer

På trods af store medicinske opfindelser i nyere tid har måden, hvorpå medicin bliver leveret, været mere eller mindre uændret. På DTU arbejder en forskningsgruppe med en vision om at kunne erstatte meget af den medicin, der i dag indtages via sprøjte, med små mikrobeholdere – såkaldte mikrocontainere til oral levering af medicin.

Af Zarmeena Abid og Line Hagner Nielsen, DTU Nanotech, Institut for Mikro- og Nanoteknologi

Hvis man har diabetes, skal man i dag stikke sig selv med en kanyle for at få sin daglige insulin. Vi kender det også fra vacciner, enten når ens børn skal have en vaccine, som en del af børnevaccinationsprogrammet, eller når vi skal ud at rejse, så skal vi til lægen og have en indsprøjtning med vaccinen. For at opnå den optimale effekt af denne vaccine, skal man til lægen gentagende

gange for at få den samme vaccine sprøjtet ind i kroppen. Det vil være til stor gavn for patienter og for samfundet, hvis flere typer medicin som f.eks. proteiner, som insulin og vacciner, kan indtages som en tablet eller kapsel, se faktaboks 1. Dette kan sjældent lade sig gøre i dag, da stofferne bliver nedbrudt i maven og desuden har svært ved at passere cellemembranen i tyndtarmen [1]. Det er derfor essentielt at have et drug delivery system, som kan beskytte medicinen i maven og måske også hjælpe med til, at stofferne nemmere kan passere membranen i tarmen.

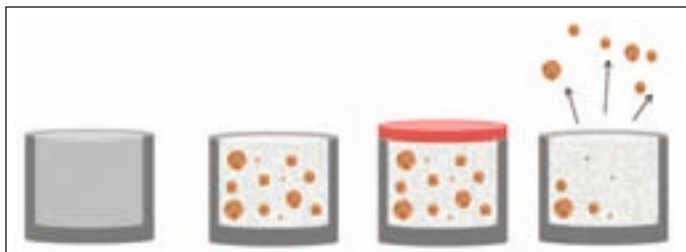
Faktaboks 1

Oral drug delivery

Den foretrukne måde at indgive medicin på er via munden. Oftest er medicinen lavet som tabletter eller kapsler, men kan også være i væskeform til oral indtagelse. Efter indtagelse af den orale medicin, skal det passere igennem maven, og det tager omtrent en time. Da pH-værdien i maven er lav (ca. 2), og der er mange enzymer, kan medicinen nemt blive ødelagt, inden den når ned til tyndtarmen, hvor langt de fleste lægemidler skal optages i blodet for at udøve deres effekt. I tyndtarmen er pH omkring 6-7 og transporttiden igennem tarmen er ca. tre timer. For at lægemidlet kan have en effekt, skal det passere cellemembranen i tarmen, og dette kan være udfordrende, især for store hydrofile molekyler, såsom proteiner, da membranen er lipofil og indeholder en masse enzymer, som også kan nedbryde lægemidlet. Derudover er tarmen belagt med et gel-lag (mukuslaget), som beskytter tarmen og som også kan besværliggøre passagen og optagelsen af lægemidlet.

Mikrocontainere

Mikrocontainere er cylindriske beholdere i mikrostørrelse, som er lukket i bunden og har et hulrum, hvor medicin kan fyldes i. Efter påfyldning af medicinen, kan mikrocontainerne lukkes med et låg. Oftest arbejdes der med pH-følsomme låg, hvilket vil sige, at lågene er intakte, når de passerer igennem mavens pH og først opløses, når mikrocontainerne rammer den højere pH i tarmen. Derefter kan medicinen komme ud af mikrocontaineren og blive optaget igennem tarmen og over i blodet, se figur 1.



Figur 1. Skematisk af mikrocontainer-konceptet med en tom cylindrisk mikrocontainer, som fyldes med medicin, og derefter pålægges et låg. Når det ønskes, kan medicinen frigives fra mikrocontaineren, ved at låget opløses.

De mikrocontainere, der bruges som et modelsystem, er lavet af den fotosensitive epoxy-polymer SU-8, og de fremstilles i renrummet på DTU ved en to-trins fotolitografi-proces [2]. Mikrocontainerne er lidt mindre end et sukkerkorn, med en indre diameter på ca. 220 μm og en højde på omkring 270 μm . De kan derfor rumme omkring 10 nL i volumen [2], se figur 2.

Faktaboks 2

Biopolymere

Polymere er kemiske forbindelser med høj molekylvægt, som kan danne et stort netværk. Biologiske polymere (biopolymere) kan dannes i biologiske organismer, men kan også laves ved kemisk syntese. Biopolymere kan være en fordel at anvende som drug delivery-system, da de kan nedbrydes i kroppen over tid og derfor er at foretrække. Polysakkarider og cellulose er eksempler på biopolymere, som anvendes meget.



Figur 2. Mikroskopi-billeder af SU-8 mikrocontainere. A) Billedet viser en tom mikrocontainer, B) som derefter fyldes med medicin, C) og til sidst pålægges det pH-følsomme låg, så medicinen kan beskyttes igennem maven og frigives i tyndtarmen.

Mikrocontainerne adskiller sig fra polymer-partikler, som er den mest traditionelle metode at indkapsle medicin på, ved, at de er større og kan fremstilles i en ensartet størrelse og form. Derudover kan medicinen kun komme ud fra én side, modsat partikler, hvor stoffet frigives fra alle sider. Studier har vist, at netop det at medicinen frigives i én bestemt retning, kan fremme absorptionen af medicinen [3]. Ydermere har vores studier vist, at mikrocontainerne graver sig ned i mukuslaget i tarmen, hvorved mikrocontainerne har længere tid til at frigive medicinen i forhold til partikler, som flyder hurtigere igennem tarmen [4].

I øjeblikket arbejdes der med design og produktion af mikrocontainerne i biopolymer, se faktaboks 2. Biopolymere har den fordel, at de kan nedbrydes i kroppen efter at have frigivet medicinen. Derudover udvikles en metode til at producere dem uden for renrummet, hvorved en mere økonomisk og skalérbar proces opnås. Biopolymer-mikrocontainerne fremstilles ved at lave et tyndt lag af biopolymer, hvorefter der bruges en maske med de ønskede dimensioner til at presse ned i polymerlaget med et givent tryk og en given temperatur. Dette efterlader polymerlaget med adskilte 3D-mikrocontainere på et underlag. Metoden bliver kaldt hot punching og er sammenlignelig med processen hot embossing [5,6]. Disse biopolymer mikrocontainere har en diameter på omkring 300 μm og er 100 μm høje.

Fylldning af mikrocontainere og påførelse af låg

Efter fremstilling af mikrocontainerne skal de fyldes med medicin. Dette kan gøres på flere måder og enten i væske- eller pulverform. Hvis mikrocontainerne fyldes med væske, er det en lidt langsommelig proces, da hver mikrocontainer skal fyldes individuelt ved f.eks. at bruge en printer og fylde patronen med en vandig opløsning af medicinen [7].

De bedst-udviklede metoder er at fylde mikrocontainerne



Pipetteservice

Akkrediteret kalibrering
Reparation • Vedligeholdelse

Gilson Center of Excellence • Certificerede teknikere • 20 års erfaring
• Alle førende fabrikater • Elektroniske certifikater • Serviceaftaler



Biolab A/S,
Sindalsvej 29, DK-8240 Risskov,
Tlf: 8621 2866 Fax: 8621 2301
E-mail: pipetteservice@biolab.dk
www.biolab.dk



Cal. Reg. Nr. 482

med medicin i pulverform. Det kan gøres ved manuelt at fylde containerne ved hjælp af en børste. Her hældes pulver ud over en chip med 625 mikrocontainere, og så bruges en børste til at fylde mikrocontainerne, og derefter anvendes en luftpistol til at blæse pulveret imellem mikrocontainerne væk [2,4], se figur 2, side 15.

En anden metode er inspireret af en embossing metode, og her påsættes en maske ovenpå en chip med mikrocontainere, så hullerne i masken passer med hulrummet i mikrocontainerne. Herefter presses chippen med masken ned i medicinen i pulverform, og derefter kan masken fjernes og mikrocontainerne er blevet fyldt [8]. Begge metoder giver ca. 2-4 µg

■ IDUN-projektet

Forskningscenteret IDUN (Intelligent Drug Delivery and sensing Using microcontainers and Nanomechanics) er ledet af professor Anja Boisen fra DTU Nanotech, og er et samarbejde mellem DTU Nanotech, DTU Compute og Institut for Farmaci, Københavns Universitet. Projektet er støttet med 86 millioner kroner fra Danmarks Grundforskningsfond og Villum Fonden og har økonomisk støtte frem til 2021. IDUN er delt i to dele, hvor den ene fokuserer på udviklingen af mikro- og nanosensorer (IDUN sensor), mens den anden del koncentrerer sig om oral drug delivery ved brug af mikrocontainere (IDUN drug).

Læs mere på <http://www.idun.dtu.dk/>.

■ MIMIO-projektet

Anja Boisen er leder af dette projekt, som startede 1. maj 2018, og er støttet med 15 millioner kroner af Novo Nordisk Fonden. Projektet vil løbe til og med 2021 og er et samarbejde med professor Tine Rask Licht på DTU Food. Dette projekt omhandler oral levering af probiotika ved brug af mikrocontainere.

Læs mere på <http://www.idun.dtu.dk/>.

medicin pr. mikrocontainer og kan bruges til alle former for medicin, og kan også anvendes til at fylde polymere ind i mikrocontainerne [9].

Når man fylder mikrocontainerne med polymer først, kan der anvendes mere sofistikerede metoder til at fylde mikrocontainerne med medicin. Én af disse metoder er CO₂-imprægnering, hvor medicinen opløses i CO₂ og trænger ind i polymeren, som på forhånd er fyldt i mikrocontainerne [9].

Efter fyldning skal der lægges et låg på den medicin-fyldte mikrocontainer. For at kunne beskytte lægemidlet igennem maven, benyttes der pH-følsomme polymere, se figur 2. Disse er kommercielt tilgængelige, og kan sprayes ovenpå den fyldte mikrocontainer. Ved at måle hvorvidt lægemidlet frigives i et medie svarende til det, der findes i maven, kan det observeres, at det pH-følsomme låg har den tilsigtede virkning. Når mikrocontainerne flyttes til et medie svarende til det i tarmen, ses en hurtig frigivelse af medicinen fra mikrocontainerne. Derved kan det konkluderes, at låget virker,



Mikrocontainerne skal i det nyeste projekt fyldes med probiotika (f.eks. mælkesyrebakterier), som også findes i eksempelvis yoghurt. Foto: Jesper Scheel, DTU Nanotech.

og vi derfor kun har frigivelse af medicin i tarmen, som vi ønsker.

Proof of concept

For at påvise om mikrocontainerne senere vil kunne anvendes til f.eks. insulin og vacciner, er de første *in vivo*-studier i rotter udført. Mikrocontainerne er blevet fyldt med små-molekylære medicinske stoffer, og derefter påført et pH-følsomt låg. Her har det vist sig, at der er en forlænget effekt af medicinen furosemid ved at bruge mikrocontainerne i forhold til en kontrol med furosemid i en kapsel, se figur 3 [4]. Desuden kan det observeres, at, ved brug af mikrocontainerne, blev en øget mængde af stoffet ketoprofen absorberet hurtigere sammenlignet med kontrollen, se figur 3 [9]. I forlængelse af disse resultater udfører vi i øjeblikket dyreforsøg for at teste, hvordan mikrocontainerne virker for proteiner, som insulin og vacciner.

Nyeste projekt

I det nyeste projekt omhandlende mikrocontainerne (MIMIO-projektet) arbejdes der på at levere probiotika (gavnige bakterier som f.eks. mælkesyrebakterier) til tarmen ved at benytte mikrocontainerne som leveringssystem. Mange mennesker lider af ubalance i tarmfloraen, og med dette projekt kan vi forhåbentligt få de gode bakterier til at gro i tarmen, så de kan udkoncurrere de bakterier, som skaber ubalance. Da vi ved, at mikrocontainerne graver sig ned i mukuslaget i tarmen, er de en god platform til denne form for levering.

E-mail:

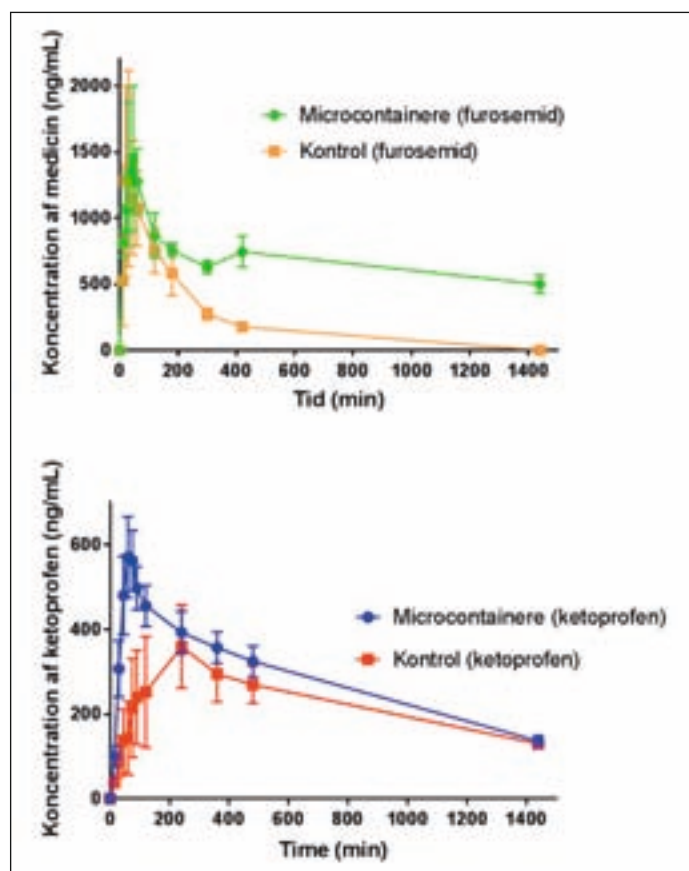
Line Hagner Nielsen: lihan@nanotech.dtu.dk



Mikrocontainerne fyldt i en kapsel, som så er klar til fremtidige dyreforsøg. Foto: Jesper Scheel, DTU Nanotech.

Referencer

1. S. Harloff-Helleberg, L. H. Nielsen and H. M. Nielsen, *J. Control. Release*, 2017, **268**, 57-71.
2. L. H. Nielsen, S. S. Keller, K. C. Gordon, A. Boisen, T. Rades and A. Müllertz, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012, **81**, 418-425.
3. H. D. Chirra, L. Shao, N. Ciccio, C. B. Fox, J. M. Wade, A. Ma and T. a. Desai, *Adv. Healthc. Mater.*, 2014, **3**, 1648-1654.
4. L. H. Nielsen, A. Melero, S. S. Keller, J. Jacobsen, T. Garrigues, T. Rades, A. Müllertz and A. Boisen, *Int. J. Pharm.*, 2016, **504**, 98-109.
5. R. S. Petersen, R. Mahshid, N. K. Andersen, S. S. Keller, H. N. Hansen and A. Boisen, *Microelectron. Eng.*, 2015, **133**, 104-109.
6. R. S. Petersen, S. S. Keller and A. Boisen, *Lab Chip*, 2015, **15**, 2576-9.
7. P. Marizza, S. S. Keller and A. Boisen, *Microelectron. Eng.*, 2013, **111**, 391-395.
8. Z. Abid, C. Gundlach, O. Durucan, C. von Halling Laier, L. H. Nielsen, A. Boisen and S. S. Keller, *Microelectron. Eng.*, 2017, **171**, 20-24.
9. C. Mazzoni, F. Tentor, S. A. Strindberg, L. H. Nielsen, S. S. Keller, T. S. Alstrøm, C. Gundlach, A. Müllertz, P. Marizza and A. Boisen, *J. Control. Release*, 2017, **268**, 343-351.



Figur 3. Effekt af medicinen, furosemid eller ketoprofen, når dette fyldes i mikrocontainerne og indgives til rotter. Det ses, at furosemid i mikrocontainerne har en forlænget virkning, mens ketoprofen i mikrocontainerne har en hurtigere effekt sammenlignet med kontroller.

Rettsch
Solutions in Milling & Sieving

The revolution in ultra-fine grinding:
The new E_{max} achieves finer and faster grinding results than any other ball mill!

SKANLAB
NEW!

Kvinderupvej 30 · 3550 Slangerup · Tlf: 4738 1014 · www.retsch.dk