

Doktori (PhD) értekezés

**Biokompatibilis polimer alapú,  
kemoterapeutikumokat tartalmazó  
gyógyszerhordozó nanorészecskék**

DOI:10.18136/PE.2023.863

**Babos György**

Témavezető: Dr. Feczkó Tivadar  
**tudományos főmunkatárs**



**Pannon Egyetem**

**Mérnöki Kar**

**Veszprém**

**2023.**



Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem  
Vegyészmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskolája keretében  
Anyagtudományok és technológiák tudományágban

Írta: Babos György  
Témavezető: Dr. Feczko Tivadar

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....  
témavezető

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: ..... igen /nem

.....  
bíráló

Bíráló neve: ..... igen /nem

.....  
bíráló

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján .....%-ot ért el.

Kelt.: Veszprém,

.....  
Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

Kelt.: Veszprém,

.....  
EDHT elnöke

## Tartalomjegyzék

Rövidítések .....	6
Kivonat .....	7
Abstract.....	8
Zusammenfassung .....	9
1. Bevezetés.....	10
1.1 Rosszindulatú daganatok és kezelési lehetőségek .....	10
1.2 Célkitűzés.....	11
1.3 Gyógyszerhordozó nanorészecskék történeti áttekintése és típusai.....	12
1.4 Gyógyszerhordozó anyagok .....	14
1.5 Felületmódosítás .....	18
1.6 Általánosan használt technikák nanorészecskék előállítására.....	20
1.7 Képződő nanorészecskék tulajdonságaira ható tényezők .....	22
1.8 Sorafenib és doxorubicin mikrokapszulázása .....	28
2. Gyógyszerhordozó nanorészecskék előállítása .....	30
2.1 Felhasznált anyagok:.....	30
2.2 PVA alapú nanorészecskék előállítása .....	31
2.3 PLGA, PEG-illát PLGA és iRGD peptiddel felületmódosított PEG-PLGA alapú nanorészecskék előállítása .....	32
2.4 PHB alapú nanorészecskék előállítása.....	34
3. Gyógyszerhordozó részecskék fizikai, kémiai tulajdonságainak és biológiai viselkedésének vizsgálata .....	36
3.1 Méret, méreteloszlás és morfológia .....	36
3.2 Elektrokinetikai potenciál ( $\zeta$ -potenciál).....	40
3.3 Stabilitás.....	41
3.4 Hozam, hatóanyagtartalom és kapszulázási hatások .....	42
3.5 Leadási kinetika .....	47
3.6 Sejtek nanorészecske felvétele.....	48

3.7	Biokompatibilitás, citotoxicitás .....	49
4.	Eredmények.....	52
4.1	PVA alapú nanorészecskék vizsgálata.....	52
4.1	PVA-5 polimerből készült sorafenib tartalmú nanorészecskék fizikai és kémiai tulajdonságai .....	52
4.2	PLGA és PEG-ilált PLGA alapú nanorészecskék vizsgálata .....	58
4.3	PHB alapú nanorészecskék vizsgálata .....	70
	Összefoglalás .....	83
	Tézispontok .....	85
	Tézisek alapjául szolgáló cikkek: .....	86
	Egyéb a dolgozat témájához kapcsolódó publikációk:.....	86
	Irodalomjegyzék .....	88
	Ábrajegyzék.....	99
	Táblázatok jegyzéke .....	101
	Köszönetnyilvánítás .....	102

## Rövidítések

PLGA – poli(tejsav–glikolsav) kopolimer

PVA – polivinil-alkohol

PHB – polihidroxi-butirát

PEG – polietilén-glikol

DCM – diklór-metán

PBS – foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat

DLS – dinamikus fényszórás

SDS – nátrium-dodecil-szulfát

UV-vis spektrofotometria– UV-látható spektrofotometria

HPLC – nagynyomású folyadékkromatográfia

UPLC – ultranagy nyomású folyadékkromatográfia

EDC – 1-etil-3(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimid

NHS – N-hidroxi-szukcinimid

MTT – 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid

Mw – molekulatömeg

CMC – kritikus micella koncentráció

TG – termogravimetria

DSC – differenciális pásztázó kalorimetria

MSEGA – fejlődő gáz tömegspektrometria

## Kivonat

A rosszindulatú daganatok hagyományos, kemoterápiás kezelését súlyos mellékhatások kísérhetik, illetve a rákellenes hatóanyag ellen rezisztencia alakulhat ki a tumorsejtekben. Ennek kiküszöbölésére az alkalmazott kemoterapeutikumokat nanorészecskékbe kapszulázva, gyógyszerhordozó rendszerként, célzott módon lehet a tumoros szövetbe juttatni. A hatóanyag-leadás szabályozható és tervezhető, segítségével a kioldódás a célszövetben valósítható meg. A hagyományos, szisztémás adagoláshoz képest jelentős dóziscsökkentés érhető el ily módon, így nagymértékben visszaszoríthatók a nemkívánatos mellékhatások. Több, eltérő hatásmechanizmusú szer együttes alkalmazásával a rezisztencia kialakulásának elmaradása remélhető.

Különböző biodegradábilis polimerek segítségével nanorészecskéket készítettem poli(tejsav-glikolsav) kopolimerből (PLGA), polihidroxi-alkanoát (PHB) származékokból, poli(vinil-alkohol)-ból (PVA), melyekbe doxorubicin és sorafenib kemoterápiás hatóanyagokat mikrokapszuláztam. A nanorészecskék felületét különböző anyagokkal (másodrendű kötések: poloxamerek, polivinil-alkohol, kovalens kötéssel kapcsolás: polietilén-glikol) módosítottam a nagyobb stabilitás és a hosszabb vérkeringésben elérhető felezési idő érdekében. A dinamikus fényszórásmérés, UV-vis spektrofotometria és folyadékkromatográfia tanúsága szerint a nanorészecskék mérete 177,2 – 271,2 nm közé esett, polidiszperzitásuk mértéke megfelelően alacsony lett ( $PDI < 0,1$ ), a polimer hozama 20 – 85 %, a kemoterapeutikumok kapszulázási hatékonysága pedig elérte a 45,2 – 88,0 %-ot, míg az összes mikrokapszulázott hatóanyag-tartalom a szakirodalomban szereplő példákat sok esetben meghaladva 8,8-11,0 %-ot tett ki. Vizsgáltam a gyógyszerek nanorészecskékből való kioldódásának sebességét, mely nagymértékben függött az alkalmazott polimer hordozóanyag minőségétől és koncentrációjától. A kísérletek során sikerült nyújtott idejű kioldódást elérni.

A gyógyszerhordozó rendszer hatékonyságát vizsgáltam élő sejt kultúrákon, mértem rákos sejtek (HT-29 és HepG2 sejt vonalakon) nanorészecske felvételét felületmódosítás előtt és után, illetve a nanorészecskékből kioldódó kemoterapeutikumok citotoxikus hatását az eredetivel megegyező mennyiségű szabad gyógyszervegyülethez képest.

## **Abstract**

Conventional chemotherapy for malignancies may be accompanied by severe side effects and the development of resistance in the tumor cells to the anticancer agent. To overcome this, the chemotherapeutic agents can be microencapsulated in nanoparticles resulting in a drug delivery system that may be capable of targeting the tumor tissue. The release of the drug can be controlled and designed to realize the dissolution in the target tissue. Significant dose reduction compared to conventional systemic administration can be achieved in this way, thus significantly reducing undesirable side effects. When several agents with different mechanisms of action are used together, it is expected that the resistance will not develop.

Using various biodegradable polymers, I prepared nanoparticles from poly (lactic acid-glycolic acid) copolymer (PLGA), polyhydroxyalkanoate (PHB) derivatives and polyvinyl alcohol (PVA) to microencapsulate doxorubicin and sorafenib chemotherapeutic agents. The surface of the nanoparticles was modified with different materials (poloxamers, polyvinyl alcohol, polyethylene glycols) for improved stability and longer circulating half-life. Dynamic light scattering measurement, UV-vis spectrophotometry and liquid chromatography indicated that the size of the nanoparticles ranged between 171.2 and 271.2 nm, the degree of polydispersity became sufficiently low ( $PdI < 0.1$ ), the polymer yield was 20 - 85%, the encapsulation efficiency of chemotherapeutic agents reached 45.2-88.0%, while the total microencapsulated drug content accounted for 8.8-11.0%. I investigated the dissolution rate of drugs from nanoparticles, which was dependent on the quality and the concentration of applied polymer.

The efficacy of the drug delivery system was investigated in living cell cultures by measuring the uptake of nanoparticles by cancer cells (HT-29 and HepG2 cell lines) before and after surface modification, and the cytotoxic effect of chemotherapeutic agents released from nanoparticles was studied compared to the same concentration of pure drug.



## Zusammenfassung

Die konventionelle Chemotherapie von malignen Tumoren kann von schweren Nebenwirkungen begleitet sein und zur Entwicklung von Resistenz der Tumorzellen gegenüber dem Antikrebsmittel führen. Um dies zu überwinden, können die chemotherapeutischen Wirkstoffe in Nanopartikel mikroverkapselt werden, um ein Arzneimittelabgabesystem zu schaffen, das möglicherweise in der Lage ist, das Tumorgewebe gezielt anzusteuern. Die Freisetzung des Arzneimittels kann kontrolliert werden und darauf ausgelegt sein, sich im Zielgewebe aufzulösen. Auf diese Weise kann eine signifikante Dosisreduktion im Vergleich zur konventionellen systemischen Verabreichung erreicht werden, wodurch unerwünschte Nebenwirkungen signifikant reduziert werden können. Wenn mehrere Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen gemeinsam eingesetzt werden, wird erwartet, dass keine Resistenz entwickelt wird.

Ich habe Nanopartikel aus verschiedenen biologisch abbaubaren Polymeren (Poly (Milchsäure-Glykolsäure) Copolymer (PLGA), Polyhydroxyalkanoat (PHB)-Derivate und Polyvinylalkohol (PVA)) hergestellt, um die chemotherapeutischen Wirkstoffe Doxorubicin und Sorafenib mikroverkapseln zu können. Die Oberfläche der Nanopartikel wurde mit verschiedenen Materialien (Poloxamere, Polyvinylalkohol, Polyethylenglykole) modifiziert, um die Stabilität und die längere zirkulierende Halbwertszeit zu verbessern. Dynamische Lichtstreuungsmessung, UV-Vis-Spektrophotometrie und Flüssigchromatographie zeigten, dass die Größe der Nanopartikel zwischen 171,2 und 271,2 nm lag, der Grad der Polydispersität ausreichend niedrig war ( $PdI < 0,1$ ), der Polymerausbeute zwischen 20 und 85% lag, die Verkapselungseffizienz der chemotherapeutischen Wirkstoffe zwischen 45,2 und 88,0% lag und der Gesamtgehalt der mikroverkapselten Wirkstoffe zwischen 8,8 und 11,0% lag. Ich untersuchte die Löslichkeitsrate der Wirkstoffe aus den Nanopartikeln, die von der Qualität und Konzentration des eingesetzten Polymers abhängig war.

Die Wirksamkeit des Arzneimittelabgabesystems wurde in lebenden Zellkulturen untersucht, indem die Aufnahme der Nanopartikel durch Krebszellen (HT-29 und HepG2-Zelllinien) vor und nach der Oberflächenmodifikation gemessen und der zytotoxische Effekt der aus den Nanopartikeln freigesetzten chemotherapeutischen Wirkstoffe im Vergleich zur gleichen Konzentration des reinen Wirkstoffs untersucht wurde.

# 1. Bevezetés

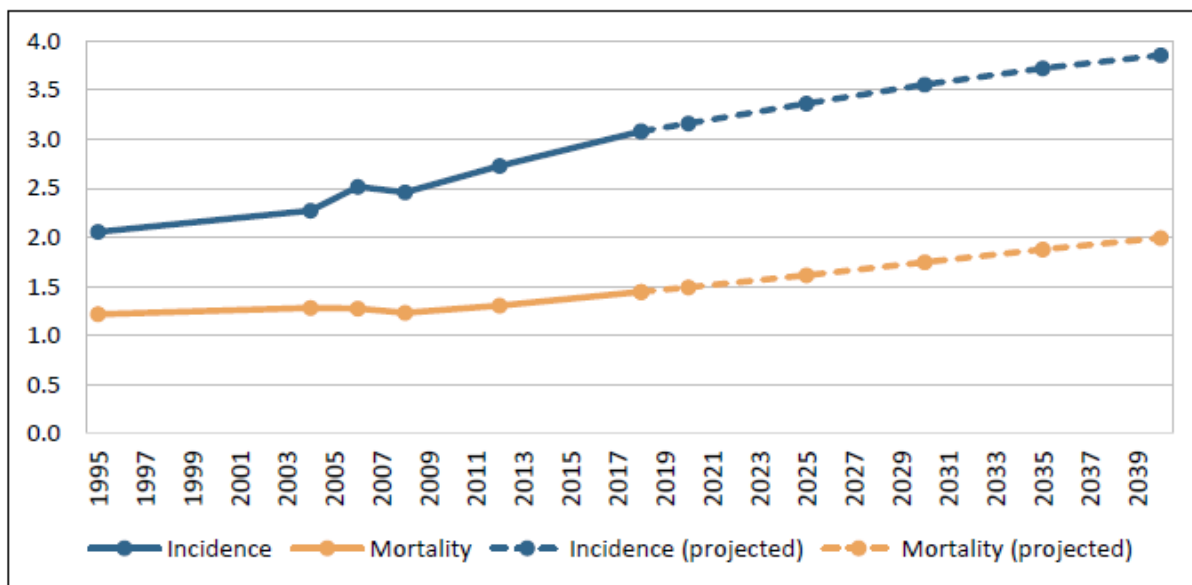
## 1.1 Rosszindulatú daganatok és kezelési lehetőségek

A rák kóros, szabályozatlan sejtszaporulattal járó, súlyos, gyakran halálos betegségek gyűjtőneve. Az így kialakuló rosszindulatú daganatok sokféle tünetet okoznak attól függően, hogy a daganat hol helyezkedik el, mely szövetet károsítja. A tumoros elváltozás világszerte az egyik legjelentősebb halálok, az összes eset mintegy 26 százalékát teszi ki. Magyarországon az Eurostat adatai szerint 2016-ban 100.000 lakosra 345 rosszindulatú daganat okozta haláleset jutott, mely az Európai Unióban a legrosszabb érték (az EU átlag 257) [1]. Az EU területén a megbetegedések száma az előrejelzések szerint emelkedni fog, bár bizakodásra ad okot, hogy a megbetegedések és a halálozások száma közötti eltérés fokozatosan nő (**1. ábra**). A rákos betegségek több mint száz változata ismert, azonban közös jellemzőjük a kontrollálatlan sejtszaporodás, a biológiai szövetekbe, szerveinkbe való beépülés. A rosszindulatú tumoros elváltozás tekinthető voltaképp genetikai eredetű jelátviteli (szignál transzdukció) zavarnak. A szervezet általi szabályozás elvesztését a sejtekben történő mutációk okozzák. A mutációk oka lehet belső (spontán mutáció) vagy külső (indukált mutáció). A spontán mutációk a DNS szintézise és az átkereszteződés során fellépő genetikai hibák, valamint a tautomer átváltozások által okozott mutációk is a DNS replikációhoz kapcsolódnak. Az indukált mutációk oka lehet fizikai vagy kémiai természetű. Ha ezek hatására a sejtben levő onkogének és tumor szuppresszor gének egyensúlya megbomlik, a normál sejtciklus felborul a sejtet folytonos osztódásra kényszerítve. A programozott sejthalál (apoptózis) elmaradásával a hibásan működő sejt életben marad. Immunrendszerünk ezeket a kórosan elváltozott sejteket felismeri és eliminálja (egy egészséges emberben is folyamatosan keletkeznek tumorsejtek). Azonban az immunrendszer működése nem tökéletes. Adódhat olyan mutáció, amelyet nem ismer fel, így a kóros sejtburjánzás megindulhat. Rosszindulatú primer daganat alakul ki, mely áttétet (metasztázist) képezhet.

A rákos megbetegedések kezelése általában történhet sebészeti úton, radio-, immun- vagy kemoterápia útján, csontvelő-átültetéssel illetve ezek kombinációjával. A kemoterápia citotoxikus vagy citosztatikus hatású gyógyszerek használatát jelenti, melyek a gyorsan szaporodó sejteket elpusztítják. Azonban nemcsak a tumorsejtek ilyenek, hanem a hajhagymák, az ivarszervek és a vérképző szervek sejtjei is. Ezek pusztulása okozza a kemoterápia

mellékhatásait: hajhullás, hányinger, vérszegénység, fertőzésekre való hajlam, vérzékenység stb. Ezenkívül az adott hatóanyag ellen a tumorsejtben rezisztencia alakulhat ki.

A Svéd Egészséggazdaságtani Intézet (IHE) szerint [2] a tumoros megbetegedések enyhén növekvő tendenciát mutatnak, így továbbra is jelentős igény van a terület további kutatására, korszerűbb gyógyszerek és fejlettebb módszerek alkalmazására. A hatékonyság növelésére, a mellékhatások mérséklésére, valamint a gyógyszerrezisztencia kialakulása elleni harcban várhatunk segítséget a célzott terápiáktól.



1. ábra: A rák előfordulása és a halálozások száma (millió esetben) Európában, 1995-2018 között és előrejelzés 2020-2040 közötti időszakra

## 1.2 Célkitűzés

A PhD munkám célja célzott terápia megvalósításához használható gyógyszerhordozó rendszerek létrehozása kemoterapeutikumok mikrokapszulázásával. A rosszindulatú daganatok hagyományos, kemoterápiás kezelését súlyos mellékhatások kísérhetik, illetve a használt rákellenes hatóanyag ellen rezisztencia alakulhat ki a tumorsejtekben. Ennek kiküszöbölésére az alkalmazott kemoterapeutikumokat nanorészecskébe kapszulázva, gyógyszerhordozó rendszerként, célzott módon lehet a tumoros szövetbe juttatni. A hatóanyag-leadás szabályozható, tervezhető, segítségével a kioldódás a célszövetben valósítható meg. A hagyományos, szisztémás adagoláshoz képest jelentős dóziscsökkentés érhető el ily módon, így nagymértékben visszaszoríthatók a nemkívánatos mellékhatások. Több, eltérő hatásmechanizmusú szer együttes alkalmazásával a rezisztencia kialakulásának elmaradása remélhető.

Munkám során alkalmazott hatóanyagok a doxorubicin és a sorafenib, melyek citotoxikus illetve citosztatikus szerek: pl. tüdő, petefészek, vese, hasnyálmirigy illetve primer májrák kezelésére használatosak. A hatóanyagokat tartalmazó nanorészecskék fizikai-kémiai paramétereit (méret, polidiszperzitás, hatóanyag-tartalom, stb.) és biológiai hatásait vizsgáltam. A munkám során különböző biodegradálható polimereket használtam, melyekből a kívánt célnak megfelelő nanorészecskéket hoztam létre. A gyógyszerhordozó rendszerben a hordozó polimer biokompatibilitása és a kapszulázott hatóanyagoknak az eredeti molekulákhoz hasonló citotoxikus hatása alapkövetelmény.

Már a hagyományos, kismolekulás hatóanyagok preklinikai vizsgálata is meglehetősen összetett folyamat. Nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerek vizsgálata további kihívások elé állítja a szakembereket. A nanorészecskék az élő szervezetben is sajátos módon viselkednek, méretük és nagy fajlagos felületük miatt toxikológiai szempontból további paraméterek ellenőrzése szükséges, illetve egyes vizsgálatok kivitelezése eltérő módszereket igényel, melyekkel az ún. nanotoxikológia foglalkozik. A disszertációm további célja az előállított gyógyszerhordozó rendszerek minél sokrétűbb analitikai vizsgálata, illetve a „hagyományos” toxikológia eszköztárának kibővítése, alkalmassá tétele nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerek vizsgálatához.

### **1.3 Gyógyszerhordozó nanorészecskék történeti áttekintése és típusai**

#### **1.3.1 Történeti áttekintés**

A gyógyszerek, hatóanyagok szervezetbe, majd a célszervbe juttatása már a kezdetek óta problémákat vet fel az orvostudomány, de főleg a daganatellenes kemoterapeutikumok vonatkozásában. Számos kezelés jár számottevő mellékhatásokkal, illetve sok hatóanyag rosszul szívódik fel vagy túlságosan drága, és nem mindenki jut hozzá. Ezen problémák kiküszöbölésében segíthetnek a gyógyszerhordozóként funkcionalizált nanorészecskék.

A nanorészecskék fejlesztésével foglalkozó tudományág az ún. részecskemérnökség, melynek célja a megfelelő méret, a struktúra, és a felület létrehozása, optimális funkcionális tulajdonságok eléréséhez. A nanorészecskék gondolata először Paul Ehrlich fejében vetődött fel 1954-ben [8], míg a tényleges kutatások az 1960-as években kezdtek el foglalkozni a gyógyszerformulálás ezen típusával. Poliakril mikrogyöngyöket az évtized végére Khanna és Speiser [9,10] először vakcinációs célból (pl. tetanusz, diftéria) állított elő. Eredetileg ezeket a védőoltásokat többszöri alkalommal adják be a megfelelő védettség kialakítása céljából, míg szabályozott hatóanyagleadás segítségével egy oltás is elegendő lehet.

A (bio)nanotechnológia segítségével a gyógyszerhordozó rendszer finomhangolható. Mérete, a tömbfázisban levő anyaghoz viszonyított sokkal jelentősebb fajlagos felülete és annak sokrétű módosíthatósága alkalmassá teszi a tumoros szövetek szelektív megközelítését, a ráksejtek specifikus támadását, a hatóanyag stabil szuszpenzióban tartását, ezzel az oldhatósági problémák kiküszöbölését, oldódást segítő (de szintén mellékhatásokkal rendelkező) segédanyagok (pl. Cremophor) elhagyását.

Nanorészecskék alatt a mikrokapszulázás területén a szubmikronos átmérőjű részecskéket értjük, habár a kolloidkémia szabályai szerint eredeti definíció szerint a <150 nm tartományt jelenti. A parenterális beviteli módokon alkalmazott nanorészecskék esetén az 50-200 nm mérettartomány a preferált, ugyanis ez alatt a mérethatár alatt a vesében és lépben kiszűrődhetnek [3], míg 200-350 nm-es tartomány felett az immunrendszer falósejtjei (retikuloendoteliális rendszer) bekebelezik, így hatástalanítják azokat (fagocitózis, pinocitózis) [4]. Könnyen belátható, hogy a részecskék mérettartománya elsődleges jelentőségű. Optimális esetben eljuthatnak oda, ahova nagyobb szerkezeti egységek nem (pl. a vér-agy gáton át), vagy éppen hogy nem jutnak el oda, ahova a kismolekulájú kemoterapeutikumok igen: az egészséges sejtekbe. Ennek elérésére passzív és aktív célzási technikák vethetők be.

A humán célú felhasználása ezen rendszereknek hozzájárulhat a személyre szabott gyógyszerelés megvalósításához, mivel a nanorészecskék tulajdonságai nagy mértékben változtathatók az előállítási paramétereik optimális megválasztásával. Hasonló előny a hatóanyagok szabályozott leadása az idő függvényében, így az adagolás optimalizálása és gyakoriságának csökkenthetősége. A rendszereink viselkedése modellszámításokkal tervezhető [5]. A polimer nanorészecskék hatóanyagleadási profiljai három fázisra oszthatók: az első szakasz felel meg a „burst” effektusnak, ez tulajdonképpen egy gyors lemosódás a felületről, amelyet lassabb felszabadulás követ - a hatóanyag diffúziója a vízzel telt pórusokon és a polimer mátrixon keresztül -, végül a polimer mátrix eróziójának következtében ennek sebességétől függő mértékben szabadul fel a maradék hatóanyag [6, 7].

Mivel a hatóanyag nem közvetlenül kerül a szervezetbe, a hatása sem azonnali. Ehhez először ki kell „szabadulnia” a nanorészecske hordozórendszerből. Ehhez a hordozó polimerből/egységéből ki kell diffundálnia (micella, liposzóma vagy mag-héj szerkezetű részecske esetén) vagy a hordozóanyag bomlása következtében válik elérhetővé. Ez a típustól függően savas/lúgos hidrolízis vagy enzimkatalizált reakció. A hatóanyag felszabadulásának profilja a hordozó minőségének megválasztásával illetve felületi tulajdonságainak beállításával szabályozható.

## 1.4 Gyógyszerhordozó anyagok

A gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése az utóbbi évtizedekben rendkívüli mértékben felgyorsult, a felügyelő hatóságok által kiadott engedélyek igazolták a termékek széles skálájának hatékonyságát. Ezen gyógyszerhordozó nanorészecskéket több módon csoportosíthatjuk. Felépülhetnek szervetlen, pl. szilika [63], magnetit [64], hidroxipatit [65] nanorészecskékből, kvantum dotokból (Pt, Au) [66] vagy szerves alapú hordozó anyagból, pl. politejsav [67], kitozán [68] stb.

Jelenleg a szerves hordozóanyagú gyógyszerhordozó nanorészecskéket elterjedten biodegradábilis polimerekből, mint pl. politejsavból [21], politejsav–glikolsav kopolimeréből [22] és polikaprolaktonból [23] állítják elő. A polimer molekulák végei módosíthatók polietilén-glikol (PEG) molekulákkal az ún. PEG-ilálás során [24,25]. A PEG-ilálás által fokozható a nanorészecskék stabilitása, növelhető a vérkeringésben töltött idejük, ezáltal magasabb biohasznosulás érhető el, illetve az immunrendszer fagocita sejtjei elől azok elrejtethők [26]. A poli(3-hidroxi)-butirát (PHB) eredetileg biológiailag lebontható csomagolásként vizsgált anyag [27-29]. A PHB jellemzője a nagyfokú kristályosság, viszonylag magas olvadáspont és elegendő hidrolitikus stabilitás. Ezek a tulajdonságok lehetővé teszik, hogy biomedikai célokra használják [30]. Kopolimerjei/kompozitjai csontimplantátumokban használhatók [31,32], azonban az elmúlt évtizedben a PHB-alapú nanorészecskék ígéretes gyógyszerhordozó rendszereknek is bizonyultak. Nemcsak biológiailag lebonthatók, hanem biológiailag felszívódó anyagok, ami azt jelenti, hogy természetes úton eltávolíthatók a szervezetből szűrésen vagy anyagcsereutakon keresztül [33]. A lebomlás az észterkötések hidrolízisével történik enzimatis módon. A PHB nanorészecskéket és az alacsony molekulatömegű polimer fragmentumokat fagocitálhatják a makrofágok és lebonthatják intracellulárisan. Bomlásterméke, a 3-hidroxi-vajsav fiziológiailag jelen van az emberi vérben [34], ezért megfelelő származékai nem rendelkeznek akut citotoxicitással. [35] A PHB -k szintetizálhatók természetes (mikrobiális) vagy szintetikus úton [36]. A természetesen előállított izotaktikus PHB egyik fő hátránya a nagyfokú kristályossága. A természetes és szintetikus PHB -ket így különféle anyagokkal konjugálták, például PEG [34], poli-( $\epsilon$ -kaprolakton) [30], poli (2-(dimetilamino) etil-metakrilát) [37] és kitozán [38]. A poli-(3-hidroxi-butirát)/poli-(3-hidroxi-valeriát) (PHBV) kopolimer széles körben tanulmányozott alapanyag implantátumok előállításához, mesterséges szövetek gyártásához és az olyan gyógyszerek célzott szervezetbe juttatásához, mint pl. a kemoterapeutikumok [34]. A PHB gyógyszeradagolási lehetőségeit bővíti antimikrobiális [39], géntranszfer [37] és helyi gyógyszeradagolást lehetővé tevő

alkalmazásuk [40]. Gyógyszerhordozó rendszer állítható elő a különböző, pontosan beállítható C/OH arányokkal rendelkező és ezért eltérő polaritású vinil-alkohol vegyületekből [41-43].

A fentiekben számos példával mutattam be, hogy számos anyagból hozhatók létre nanorészecskék, melyek a továbbiakban még finomhangolhatók pl. felületmódosítással. Ez a nagyszámú létrehozható gyógyszerhordozó rendszer lehet az alapja az ún. személyre szabott gyógyszerelésnek („personalized medicine”) az általános kemoterápia kiváltására.

Az első forgalomba hozott termékek között volt a liposzómába mikrokapszulázott doxorubicin (mellrák, hólyagrák, Kaposi-szarkóma, limfómák ellen használatos kemoterapeutikum), amelyet többek között Doxil márkaneven forgalmazznak. [17]. Szintén PEG-ilált liposzóma alapú, jelenleg is klinikai alkalmazásban levő kemoterápiás gyógyszer az Onivyde metasztatikus hasnyálmirigyrák kezelésére [69]. Módosított vírusvektorra épülő kontsrukció a Rexin G, mely ritka ráktípusok (pl. perifériás ideghüvely daganat) esetén ígéretes gyógyszer, jelenleg klinikai fázis III teszteken vizsgálják [18]. Albumin fehérjékhez kötött paklitaxel hatóanyagot fejlesztettek áttétes emlőrák kezelésére Abraxane néven [19]. A biológiailag lebontható polimer alapú depók további lehetőségeket nyitottak meg a kemoterápia fejlesztésében. [20]. Lipid alapú nanohordozóra épül a Pfizer Comirnaty néven forgalmazott Sars-Cov-19 koronavírus elleni mRNS vakcinája, melynek gyors kifejlesztését a nanoformátumú készítmények több évtizedre visszanyúló fejlesztése alatt összegyűlt tapasztalatok segítették [70].

#### 1.4.1 Nanorészecskék előállításai lehetőségei és szerkezeti típusai



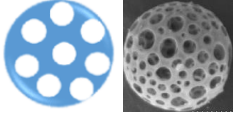

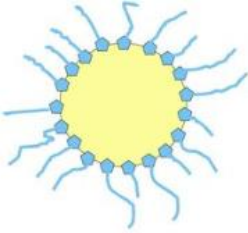
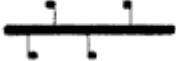
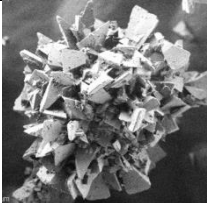
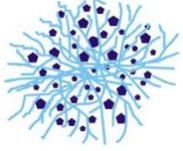

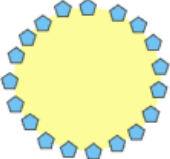
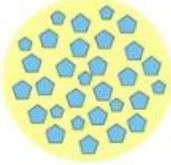
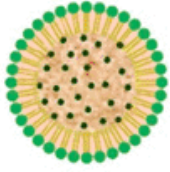
A nanorészecskék létrehozására számos módszer fejlesztettek ki, a legfőbb eljárásokat az **1. táblázatban** ismertetem:

Egyszerű emulzió/szolvens evaporáció	Egyszerű emulzió/szolvens extrakció	Egyszerű emulzió/szolvens diffúzió
Összetett emulzió/szolvens evaporáció	Összetett emulzió/szolvens extrakció	Összetett emulzió/szolvens diffúzió
Nanoprecipitáció	Injektálásos diszpergálás	Gázfázisú szintézis
Kisózás	Szférikus agglomeráció	Szuperkritikus oldószeres módszerek
Szilárd/olaj/olaj szuszpenzió	Fázisszeparáció, koacerváció	Őrlés
Porlasztva szárítás	Porlasztva fagyasztás	Mikrofluidizálás

*1. táblázat: Nanorészecskék létrehozására szolgáló technikák. A gyakorlati munkám során a kiemelt technikákkal dolgoztam.*



A fenti technikákkal létrehozott nanorészecskék szerkezeti felépítésük alapján a **2. táblázat** szerint csoportosíthatók:

Homogén (anyagukban egynemű) nano/mikrogömbök		Mag/héj (core/shell) szerkezetű kompozit nano/mikrogömbök	
Porózus nano/mikrogömbök		Liposzómák	
Felületmódosított nano/mikrogömbök		Polimer-hatóanyag konjugátumok	
Agglomerált nano/mikrogömbök (szférikus agglomerátumok)		Dendrites struktúrák	
Filmbevonatú nano/mikrogömbök		Kisebb részecskékkel borított mikrogömbök	
Mátrix struktúrájú nano/mikrogömbök (zárványok)		Szilárd lipid nanorészecskék	

2. táblázat: Nanorészecskék főbb típusai szerkezeti felépítés szerint

## 1.5 Felületmódosítás

A nanorészecskék egyik fontos fizikai tulajdonsága a nagy fajlagos felületük. Ez a felület a kívánt cél függvényében módosítható. Cél lehet a stabilitás biztosítása, a keringésben jellemző féléletidő nyújtása vagy a célszövetbe jutás fokozása (átjutás a sejtmembránon vagy a vér-agy gáton). A megfelelő felületmódosítás védelmet nyújt a hordozó polimer túl korai kémiai és biológiai degradációja ellen.

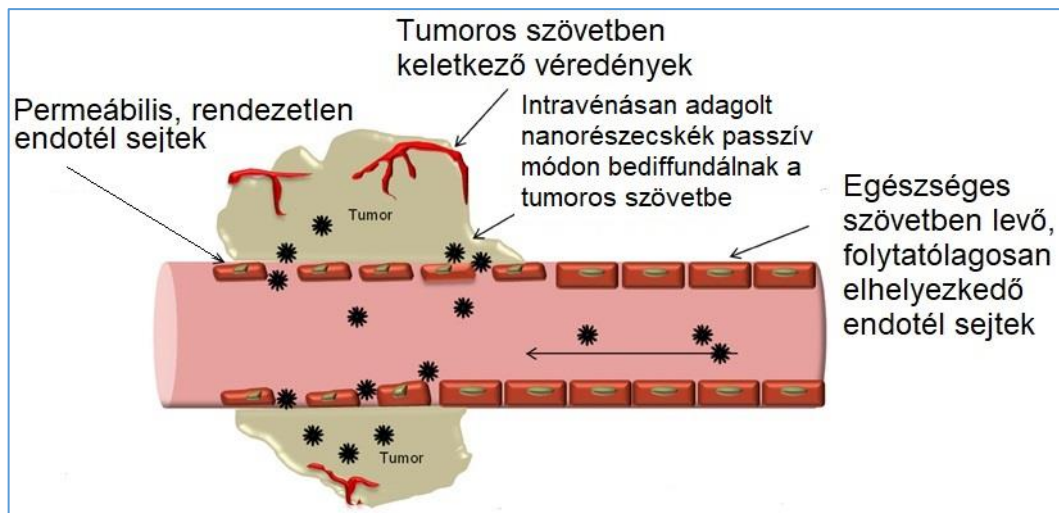
Jelentős probléma továbbá, hogy biológiai közegekben (pl. vérben) található plazma-proteinek megkötődhetnek a részecskéken (opszonizáció), melynek következtében a falósejtek könnyebben megtalálják és bekebelezik azokat. Így a részecskék felületén bekövetkező fehérjeadszorpció elleni védelem (így az immunválasz elkerülése) kiemelt fontosságú.

A fentiek biztosítása érdekében olyan védőréteget hozunk létre, amely megakadályozza a részecskék aggregációját a diszperzióban. Ez lehet sztérikus, elektrosztatikus vagy elektrosztérikus stabilizálás.

Az egyik leggyakrabban választott molekula a már említett PEG. További struktúrákat is köthetünk kémiaailag a nanorészecske felületére, pl. a célszövetbe, tumorsejtbe való bejutás esélyét növelő ún. tumor penetrációs peptideket (pl. iRGD), vagy receptor ligandumokat (pl. transferrin, folsav).

A nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerek legfőbb előnye, hogy az anyagi minőség, a méret és a felület precíz beállításával a patológiás szövet célozható. E szempontból passzív és aktív célzást különböztetünk meg.

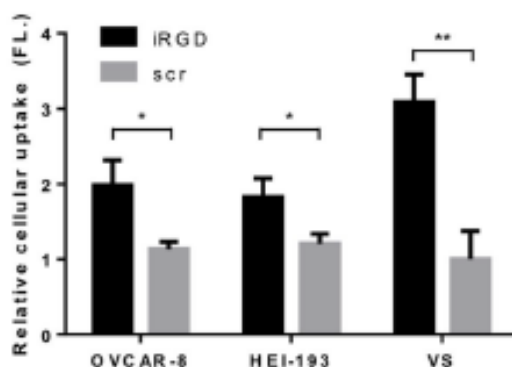
Passzív célzás során a nanorészecske mérete lényeges tényező. A gyógyszerhordozó rendszer a hagyományos kemoterapeutikumokkal analóg módon a szervezetbe kerül, azonban amíg a kismolekulájú hatóanyagok az egészséges sejtekbe is bejuthatnak, addig az ezekhez képest nagy méretű nanorészecskék oda nem, csak a sejtek közötti réseken képesek behatolni a szövetbe. Ez a perforált szöveti felépítés (**2. ábra**) tumoros sejtek sajátossága, hiszen kontrollálatlan, nagy sebességű proliferációjuk során nem rendeződnek egységes szövetbe. A rések (gap-ek) mérettartománya jellemzően kb. 170-200 nm-es nagyságrendű. A nanorészecskék ilyen módon való szelektív akkumulációját a tumoros szövetekben megnövekedett permeabilitási és retenciós hatásnak hívjuk (angolul „enhanced permeability and retention”, EPR-effect) [71].



2. ábra: EPR effektus jelentősége passzív célzás során

Aktív célzás esetében olyan molekulával látják el a nanorészecskét, amely specifikusan képes kötődni a kívánt helyen, mely lehet adott szervre vagy konkrét tumorsejtre jellemző receptor; pl. a transferrin ligandum kötődése a transferrin receptorra vagy az iRGD oligopeptid kötődése transzmembrán receptorokhoz. Az iRGD (aminosavszekvenciája: CRGDKGPDC) egy három lépéses folyamat során kötődik specifikusan a tumorsejtek felszínéhez. Első lépésben az  $\alpha V\beta 3$  és  $\alpha V\beta 5$  integrinekhez kapcsolódik, mely a tumor endotél sejteken abnormálisan nagy mennyiségben fejeződik ki. Ekkor egy proteáz enzim számára támadhatóvá válik a peptid C-terminális végén levő CendR motívum (R/KXXR/K). A hasítás után a CendR motívum már képes kötődni a neuropilin-1 receptorokhoz, melyek minden sejten megtalálhatók, és feladatuk aktiválni egy endocitotikus/exocitotikus transzport útvonalat [57]. Stankovic és munkatársai kimutatták, hogy az iRGD-t célzó nanorészecskék sejtek általi felvétele jelentősen magasabb volt, mint a nem célzott nanorészecskéké, körülbelül kétszerese

az immortalizált sejtvonalakban és több mint háromszorosa a humán primer vestibularis schwannoma sejtek esetén, ahogyan az a **3. ábrán** látható. [44].



3. ábra: iRGD célzott nanorészecskék (iRGD, fekete sávok) sejtfelvételének mennyiségi meghatározása a kontroll nanorészecskékhez (scr, szürke sávok) képest OVCAR-8 sejtekben, HEI-193 sejtekben és humán VS tenyészetekben. A hibásávok a standard eltérést jelentik

### 1.6 Általánosan használt technikák nanorészecskék előállítására

Nanoprecipitációs technikát először Fessi és mtsai alkalmaztak 1989-ben [13], mely során először egy kis térfogatú, vízzel elegyedő szerves oldószerben oldottak hordozó polimert és gyógyszerhatóanyagot, majd nagy térfogatú, emulgeátort illetve felületaktív anyagot tartalmazó vízhez adták az oldatot. A szerves oldószer elpárolgása után a hatóanyagot tartalmazó, nano méretű részecskék nanoprecipitáció útján kiváltak. Schulman és mtsai [14] hozták létre az első mikroemulziókat, mely során vízben oldhatatlan anyagokból tudtak kolloidális méretű kapszulákat készíteni. Felhasználásuk változatos területeken terjedt el, mint pl. a kozmetikai ipar, kenőanyagok fejlesztése, élelmiszeripar, mezőgazdaság, környezetvédelmi kármentesítés, remediáció, felülettisztítás, égéstechnika, mikropórusos anyagok szintézise stb. [15]. A gyógyszeriparban az emulziós technika sikeresen alkalmazható hidrofób anyagok mikrokapszulázására. A munkafolyamat során vízzel nem elegyedő szerves oldószerben oldották a hordozó polimert és a kapszulázni kívánt hatóanyagot, majd emulgeátort tartalmazó vizes oldatban mechanikai hatás, erőteljes keverés, pl. ultrahang segítségével hoztak létre kolloid szuszpenziót. A szerves oldószer elpárolgása után diszperziós formában kinyerhetők a hatóanyagtartalmú nanorészecskék. Hidrofil anyagok esetén további fejlesztés volt szükséges: az összetett emulziós módszer első alkalmazása Matsumoto nevéhez fűződik [16]. Összetett emulzió esetében először egy ún. belső fázist hozunk létre hidrofil hatóanyag kis térfogatú vizes

oldata és vízzel nem elegyedő szerves oldószer-polimer oldat nagyobb térfogata ill. ultrahang segítségével, majd egy külső, nagy térfogatú, emulgeátort tartalmazó vizes oldatban ismét ultrahang segítségével diszpergáljuk a belső (szerves) fázist.

A hagyományos, kismolekulájú gyógyszermolekulák rendkívül eltérő kémiai tulajdonságokkal (polaritás, oldhatóság különböző oldószerekben és eltérő kémhatású körülmények közt) rendelkezhetnek. Kettő nagyban eltérő oldhatósági jellemzőkkel rendelkező molekulához nehéz olyan körülményeket találni, amelyben mindkét hatóanyag hasonlóan viselkedik, ráadásul a nanorészecskék előállítására során alkalmazható oldószer szára is korlátozza a lehetőségeket.

### *1.6.1 Nanoprecipitáció*

Nanoprecipitációs eljárás során két fázis érintkezik egymással. Az egyik egy viszonylag nagy térfogatú vizes fázis, mely stabilizátor (emulgeátor) anyagot tartalmaz. A másik fázis egy vízzel elegyedő szerves fázis, mely a kapszulázandó hatóanyagot és a kapszulázó polimert foglalja magába. Szerves oldószerként leggyakrabban acetont használnak, de szóba jöhet etil-alkohol, tetrahidrofurán, dimetil-formamid vagy más illékony, vízzel elegyedő oldószer is. Lényeges, hogy csak vízzel elegyedő oldószer használható, melyeknél a diffúzió sebessége elég gyors a spontán emulzió kialakításához. A folyamat során a szerves fázist a vizes fázisba injektálva a polimer oldószer fokozatosan kiszorul majd folyamatos kevertetés közben elpárolog, így a polimer kicsapódik, és eközben a hatóanyag a polimer mátrixba épül be. A folyamat során oldószercsere történik, mely hatására (megfelelő körülmények között) nanométeres mérettartományba eső részecskék spontán keletkeznek. Az eljárás jól reprodukálható, robosztus módszer és nem szükségesek hozzá bonyolult és drága berendezések. Szükség esetén megoldható a méretnövelés is. A paraméterek gondos beállításával befolyásolható a részecskeméret, ami rendkívül fontos egy gyógyszerformula megtervezésénél. [55, 60]

### *1.6.2 O/V egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatás*

A vonatkozó szakirodalomban legelterjedtebben használt módszer az egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatásos technika. Az így készült nanorészecskék szerkezete általában porózusabb, mint a nanoprecipitációval előállított termékeké, amit célszerű a hatóanyag kioldódási idejének tervezésénél figyelembe venni.

Hasonlóan a nanoprecipitációhoz, itt is egy vizes és egy szerves fázist alkalmaznak, azonban a módszernél a szerves oldószer vízzel nem elegyedik. A technikával leginkább hidrofób molekulájú hatóanyagok kapszulázhatók. Az O/V egyszerű emulziós módszer során a polimert

és a kapszulázandó hatóanyagot feloldják vízzel nem elegyedő, illékony szerves oldószerben, például diklór-metánban, kloroformban vagy etil-acetátban. Ezt a szerves oldatot nagy mennyiségű, stabilizátort tartalmazó vizes fázishoz keverik és emulgeálják pl. ultrahang segítségével (szonikálás). A kapott emulzióból a szerves oldószert elpárologtatják és ennek eredményeképp egy vizes szuszpenziót kapnak. [56,60,72]

### *1.6.3 V/O/V összetett emulzió-oldószer elpárologtatás*

Hidrofil vegyületek kapszulázására alkalmas eljárás, melynek során V/O/V (víz-az-olajban-a-vízben) rendszereket állítanak elő. Az alkalmazott hatóanyagot a viszonylag kis térfogatú vizes fázisban feloldják, majd az oldatot intenzív kevertetés (pl. szonikálás) mellett a polimert tartalmazó, vízzel nem elegyedő szerves oldatba (pl. diklór-metán vagy etil-acetát) emulgeálják. Az így létrejött emulziót viszonylag nagy térfogatú, stabilizátort tartalmazó vizes fázisba keverik, és ezáltal létrejön az összetett emulzió. A szerves oldószer elpárolgása után a vízoldható hatóanyag polimer mátrixban lévő vizes diszperziója jön létre. A módszer jól reprodukálható, viszonylag olcsó technika mikrométeres illetve szubmikronos mérettartományba eső részecskék előállítására is.

A technika alkalmazható több, különböző kémiai karakterű, eltérő oldhatóságú hatóanyag szimultán mikrokapszulázásához is, ahol többféle oldószerre (pl. víz és vízzel nem elegyedő szerves) lehet szükségünk. [56,60,72]

### **1.7 Képződő nanorészecskék tulajdonságaira ható tényezők**

A hagyományos, kis molekulájú hatóanyagokkal ellentétben a kolloid méretű, tömbfázisban levő gyógyszerhordozó rendszerek mérete, méreteloszlása, belső szerkezete, felületük morfológiája valamint a hatóanyagtartalom megfelelő körülmények között a rendeltetési célnak megfelelően finomhangolható. Ezen tulajdonságokra ható tényezők:

- az előállításához felhasznált anyagok
- az előállítási paraméterek
- preparálási eszközök beállításai

Az egyes lehetőségeket Ming Li és mtsai [73] nyomán **3. táblázat** foglaltam össze.

<b>Anyagok megválasztása</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polimer</li> <li>• Oldószer</li> <li>• Hatóanyag</li> <li>• Emulgeátor</li> <li>• Segédanyagok</li> </ul>
<b>Paraméterek megválasztása</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Szerves fázis viszkozitása</li> <li>• Szerves fázisban levő polimer koncentrációja</li> <li>• Vizes fázisban levő emulgeátor koncentrációja</li> <li>• Szerves fázis és vizes fázis térfogatának aránya</li> </ul>
<b>Eszközök beállításai</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edény, reaktor és a kevertető geometriája</li> <li>• Keverés intenzitása</li> <li>• Hőmérséklet</li> <li>• Nyomás</li> </ul>

3. táblázat: Nanorészecskék fizikai tulajdonságait befolyásoló tényezők

### *Anyagok megválasztása*

#### 1.) Polimerek megválasztása:

Fő követelmény a hordozó polimerek biokompatibilitása, mely azt jelenti, hogy az anyag a szervezet által fiziológiásan tolerálható, nem vált ki helyi vagy szisztémás immunválaszt. A polimer biodegradábilis, ha természetes, a szervezetben is előforduló monomerekre bomlik le, pl. enzimatis útön. Degradábilis egy polimer, ha lebomlik monomerekre, azonban egyéb módon, pl. hidrolízis útján. Biokompatibilis és biodegradábilis anyagok a már fent említett politejsav-glikolsav kopolimerek, illetve a poliészterek, mint a polihidroxi-alkanoátok, pl. a polihidroxi-butirát, mely enzimatis útön vajsav monomerekre bomlik. Biokompatibilis, de csak degradábilis polimer az etil-cellulóz. Elterjedt beviteli út az orális adagolás, mely így eljut a gasztrointesztinális rendszerig [74]. Nem bomlik le pl. a poli(metil-metakrilát). A belőle készült mikrogömböket széles körben használják csontcement anyagként olyan antibiotikumokban, amelyek csontfertőzések (például osteomyelitis) kezelésére szolgálnak [75].

Az egyes polimerek lebomlása nem csak a célbajuttatás, hanem a hatóanyag kioldódási profil szempontjából is fontos. E célból szükség esetén kopolimereket használnak, melyekkel a hordozó anyag tulajdonságai a követelményeknek megfelelően finomhangolhatók.

A molekulaláncok hossza a polimerben általában nem egy egzakt érték, hanem egy természetes eloszlással rendelkező sokaság, így a molekulatömeg a molekulaláncok átlagos tömegével jellemezhető. A polimerek a kívánt átlagos molekulatömegben kerülnek előállításra, így a felhasznált lánc hossz mérete megválasztható és megválasztandó: a hosszabb láncok lebomlása a szervezetben több időt vesz igénybe. A polimer láncok kémiai összetétele és polaritása is hatással van a gyógyszerhordozó rendszer szerkezetére, fizikai és kémiai tulajdonságaira, kioldódási profiljára és féléletidejére.

## 2.) Oldószer megválasztása:

Alapkövetelmény az oldószerrel szemben, hogy képes legyen oldani a választott polimert, azonban a vizes közegben a fő tömegének az oldhatósága elhanyagolható legyen. Legyen illékony, a forráspontja legyen alacsony, és lehetőleg a toxicitása minimális legyen. Régebben gyakran használtak kloroformot, de éppen ennek toxicitása miatt manapság a diklór-metán használata a jellemző, bár ez a vegyület is bizonyított állati rákkeltő, így a kiváltására történő törekvés elterjedt. Az etil-acetát oldószer megfelelő lehet, melynek viszont hátránya hogy vízzel jelentékeny mértékben elegyedik, így használata ronthatja a hozamot [76]. Speciális esetekben [77] etil-formiát is használható.

## 3.) Hatóanyag megválasztása:

A hatóanyag természetesen a kezelni kívánt betegség függvényében kerül megválasztásra. Azonban a hatóanyag formátuma befolyásolhatja az előállítás folyamatát vagy a keletkezett nanorészecskék szerkezetét. Az egyes hatóanyagoknak sokszor van vízoldható (pl. doxorubicin-hidroklorid só) és vízoldhatatlan (pl. bázikus doxorubicin ill. sorafenib-tozilát) változata, melyeket a tervezésnél figyelembe kell venni.

Az előállítás során hozzáadott hatóanyag bizonyos mértékig – a hordozó polimer kapacitásáig – növeli a termék hatóanyagtartalmát. A túl sok hatóanyag azonban csökkentheti a kapszulázási hatékonyságot: a hordozó anyag limitált mértékben képes



kapszulázni a hatóanyagot. A magas hatóanyagtartalom pórusos szerkezetet és szabálytalanabb alakot eredményezhet [91]. A pórusokon keresztül kidiffundál a hatóanyag egy része, ez az oka a veszteségnek.

#### 4.) Emulgeátor megválasztása:

Az emulgeátor felületaktív anyag, befolyásolja a vizes fázis felületi feszültségét, elkerüli az emulzióban levő cseppek összeolvadását, aggregációját és stabilizálja az emulziót. A megfelelő felületaktív anyagnak meghatározott méretet és kis méreteloszlást kell biztosítania a nanorészecskéknek, garantálva a kiszámíthatóbb és stabilabb célzást és gyógyszerfelszabadulást.

Az emulgeátor típusának és koncentrációjának kiválasztása előtt fontos ismerni a két nem elegyedő fázis polaritását, az előállítani kívánt nanorészecskék méretét és azok morfológiájának igényét.

A felületaktív anyagok amfifil molekulák. Különböző típusaikat használhatjuk:

- Nem ionos felületaktív anyag pl. a poloxamerek, a polivinil-alkohol [81], a poliszorbátok [82] és szorbitán-észterek [83].
- Anionos felületaktív anyag a nátrium-dodecil-szulfát (SDS).
- Kationos felületaktív anyag a cetil-trimetil-ammónium-klorid.

Az emulgeátor koncentrációjának növelésével a kritikus micella koncentráció (CMC) határáig csökkenthető a létrejövő nanorészecskék mérete, azonban a hozam és a kapszulázási hatékonyság csökkenhet a bekövetkező magasabb oldékonyság miatt.

#### 5.) Segédanyagok:

Egyes esetekben segédoldószer használata szükséges, pl. ha a hatóanyag nem jól oldódik a polimerhez választandó oldószerben, ilyen esetben kis mennyiségű hozzáadott vízzel oldható oldószer, pl. metanol, etanol vagy aceton használatos elterjedten [78].

Porogén (porozitást elősegítő) segédanyagokra lehet szükség, ha gyorsítani kívánjuk a polimer lebomlását illetve a hatóanyag kioldódását. Ilyen anyag a hexán, mely nem oldja a PLGA típusú polimereket, miközben pórusokat képez a PLGA mikrogömbök belsejében [79]. Pórusos felépítést tesz lehetővé keresztmetszékben levő dextrans is [80].

Magasabb teljesítményű kevertetés mellett problémát jelenthet a felületaktív anyagok használata miatt a habképződés. Ennek kivédésére habzásgátlókat használhatunk, mint pl. a különböző szilikonok [84].

### Paraméterek megválasztása

#### 1.) Szerves fázis viszkozitása:

Növekvő viszkozitás nagyobb részecskeméretet eredményez [85]. Calderbank empirikus egyenlete alapján az összefüggés:

$$d_{32} = A \left( \frac{\mu_d}{\mu_c} \right)^{0,25}; \text{ ahol:}$$

$d_{32}$  = átlagos részecskeméret

$\mu_d$  = szerves fázis viszkozitása

$\mu_c$  = vizes fázis viszkozitása\*

\*A vizes fázis viszkozitása általában nagy részaránya miatt a vízéhez van közel.

#### 2.) Szerves fázisban levő polimer koncentrációja:

Magasabb polimer koncentráció nagyobb viszkozitást így nagyobb részecskeméretet eredményez [86]. A nagyobb polimerláncok szintén növelik a viszkozitást. A magasabb viszkozitás javítja a kapszulázási hatékonyságot [82,86].

#### 3.) Vizes fázisban levő emulgeátor koncentrációja:

Magasabb koncentrációban levő emulgeátor kisebb részecskeméretet eredményez (a már említett CMC-ig). A túl magas koncentráció azonban a polimer oldhatóságának fokozását, illetve a hatóanyag kimosódását idézheti elő.

#### 4.) Szerves fázis és vizes fázis térfogatának aránya:

A nagyobb vizes fázis/szerves fázis arány általában kisebb részecskeméretet eredményez.

Jól látható tehát hogy számos paraméter – melyek egymást is befolyásolják – beállítása szükséges a kívánt gyógyszerhordozó struktúra létrehozásához. Ezeket Ming Li és mtsai [73] nyomán a **4. táblázatban** foglaltam össze:

	Faktorok	Forrás	Hatás a nanorészecskék tulajdonságaira		
			Méret	Morfológia	Kapszulázási hatékonyság
<b>Paraméter növelése</b>	Szerves fázis viszkozitása	[82,86]	Nagyobb átmérő	Simább felület	Magasabb kapszulázási hatékonyság, lassabb hatóanyag-leadás
	Szerves és vizes fázis aránya	[86,87,88,90]	Kisebb átmérő vagy nincs hatás		Magasabb kapszulázási hatékonyság
	Hatóanyag mennyisége a szerves fázisban	[91]		Porózusabb és szabálytalanabb alak	
	Felületaktív anyag koncentrációja	[88,89,92]	Kisebb átmérő		
	Porogén koncentrációja	[82]	Kisebb átmérő	Durvább felszín nagyobb pórusokkal	Nincs hatás
<b>Működési kondíciók</b>	Kevertetés mértéke	[86,89,93,94]	Kisebb átmérő, szűkebb méreteloszlás		
	Hőmérséklet emelése	[91,95]	Nagyobb átmérő	Durvább felszín	Alacsonyabb kapszulázási hatékonyság
	Csökkentett nyomás (légtörny nyomáshoz képest)	[96,97,98]	Kisebb átmérő vagy nincs hatás	Simább felszín	Magasabb és alacsonyabb kapszulázási hatékonyság is szerepel a szakirodalomban; lassabb hatóanyag-leadás

4. táblázat: Különböző előállítási paraméterek hatása a nanorészecskék szerkezetére

## *Eszközök beállításai*

### 1.) Edény, reaktor és a kevertető geometriája:

Általánosságban elmondható, hogy a reaktor geometriája, a terelőlapátok száma, elhelyezkedése, valamint átmérőjük aránya a reaktor átmérőjéhez képest kisebb részecskeméretet eredményez [99].

### 2.) Keverés intenzitása:

Intenzívebb keverés, illetve szonikálás kisebb részecskeméretet eredményez [93].

### 3.) Hőmérséklet és nyomás:

A hőmérséklet emelésével és a nyomás csökkentésével elősegíthető a szerves oldószer elpárolgása, azonban hátránya, hogy magasabb hőmérsékleten a hőérzékeny hatóanyag bomlásnak indulhat. Továbbá a polimer is degradálódhat, melynek következtében csökken a hozam. A polidiszperzitási index a hőmérséklet esetében emelkedhet. A részecskék felülete magasabb hőmérsékleten durvábbá válhat [95]. Amennyiben csak a nyomást csökkentjük, a kapszulázási hatékonyság növekszik, a felület pedig simább lesz [96]. A nyomás csökkentése tehát a legtöbb esetben kívánatos, azonban vigyázni kell, hogy a szerves oldószer forráspontját ne csökkentjük az eljárás hőmérséklete alá, hiszen forrásba kezdene, és a forrásban kialakuló buborékok rongálják az emulziócseppeket.

## **1.8 Sorafenib és doxorubicin mikrokapszulázása**

Az előző fejezetekben bemutatam több különböző, napjainkban már klinikai használatban ill. klinikai fázis II-III. vizsgálat alatt álló nanoterapeutikumot. Ezek legtöbbje egy adott, korábban már hatásosnak bizonyult és engedélyezett hatóanyagot tartalmaz. A szakirodalomban olvasható ezen felül, hogy több hatóanyagot tartalmazó készítmények is fejlesztés alatt állnak. Malarvizhi és mtsai [58] transferrin célzású, mag-héj szerkezetű nanorészecskéket állítottak elő doxorubicin és sorafenib kemoterapeutikumok szabályozott célba juttatására, hepatocelluláris karcinóma (primer májrák) kezelésére. A különböző kémiai karakterű hatóanyagok mikrokapszulázását a következőképpen oldották meg: a doxorubicin egy polivinil-alkohol alapú maggal, míg a sorafenib egy humán szérum albumin alapú héjszerkezettel képezte a nanorészecskéket, melyet sorozatos, egymás utáni fagyasztás-olvasztás/koacervációs módszerrel hoztak létre. Az így elkészült polimerben a doxorubicin (mely általánosságban a tumorsejtek 75%-át képes eliminálni) DNS interkaláció útján fejt ki hatását, míg a sorafenib az angiogenezist gátolja onkogén jelátviteli folyamatokat gátolva. A

tumorsejtek célzását a gyógyszerhordozó nanorészecske felületén levő transferrin glikoprotein ligandumok segítik. A transferrinnek a vas szállításában van szerepe, a máj állítja elő. Vashiányos állapotban általában emelkedett transferrin szint mérhető. A fejlesztett nanoterapeutikum a primer májrák sejtjein levő transferrin receptorokhoz képes specifikusan kapcsolódni. A hatóanyagok együttes hatására in vitro körülmények között 92%-os hatékonysággal pusztultak el a HepG2 májráksejtek, főleg vashiányos állapotban. A vizsgálatokat 3D szferoid tumor modelleken is elvégezték ígéretes eredménnyel.

Zhang és mtsai [59] szintén készítettek doxorubicin és sorafenib hatóanyagokat együttesen tartalmazó nanorészecskéket hepatocelluláris karcinóma kezelésére. A patológiás szövet célzását ebben az esetben iRGD tumor célzó peptiddel kívánták elérni. Mag/héj összetételű, lipid-polimer hibrid nanorészecskébe kapszulázták a hatóanyagokat. A doxorubicint a folyamat előtt trietil-aminnal bázikus formává alakították. A polimer alapú maghoz PLGA-t, míg a lipid alapú héjhoz PEG-ilált 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfoetanolamin-N-maleimidet használtak. Citotoxicitás teszteket végeztek HepG2 sejtvonalon: a szabad formában levő gyógyszerekhez képest az iRGD nélküli nanorészecskék mérsékeltabb hatást mutattak (ennek magyarázata, hogy a hatóanyag kioldódásához idő kell), az iRGD peptiddel felületmódosított nanorészecskék könnyebben jutottak be a tumorsejtekbe, és az eredeti gyógyszereknél is kifejezettebb citotoxikus hatást mutattak (ennek oka lehet az iRGD miatti erőteljesebb adhézió a sejtekhez, illetve a könnyebb bejutás a sejtekbe, melyről a későbbiekben ejtek szót).

A fenti készítmények azonban azóta sem jelentek meg sem a klinikai gyakorlatban, sem fázis I-IV. vizsgálatokban. Ennek összetett okai lehetnek: a bonyolult előállítási folyamat, a minőségbiztosítás, a jogszabályi környezet, stb. Valószínűsíthető még, hogy a jelenlegi gazdasági realitások még nem teszik lehetővé hasonló készítmények ipari léptékű előállítását és így használatát.

## 2. Gyógyszerhordozó nanorészecskék előállítása

### 2.1 Felhasznált anyagok:

1,2-diklór-metán (Spektrum 3D)

1-etil-3(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimid (EDC) (Sigma Aldrich)

3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (MTT) (Sigma Aldrich)

Aceton (Sigma-Aldrich)

AminoPEG mPEG Mw 5000 (Nanocs Inc. New York, USA)

Cianin-5-amin (Lumiprobe GmbH, Németország)

Dimetil-szulfoxid (Merck Kft.)

Doxorubicin-hidroklorid só (Active Biochem, Hong Kong)

Etil-alkohol 96% (Sigma-Aldrich)

Fluoreszcein nátrium só (Sigma Aldrich)

Foszfát-puffer só, tabletta formátum (PBS), (Sigma-Aldrich)

Jégecet (VWR)

Kalcein (Sigma Aldrich)

Kálium-dihidrogén-foszfát (Merck Kft.)

Nátrium-azid (Sigma-Aldrich)

Nátrium-dodecil-szulfát (SDS) (Sigma Aldrich)

Nátrium-hidrogén-foszfát (Merck Kft.)

n-hexán (VWR)

N-hidroxi-szukcinimid (NHS) (Sigma Aldrich)

Poli(tejsav-glikolsav) (PLGA) polimer: Resomer RG 752H (tejsav:glikolsav arány: 75:25), (Evonik, Németország)

Polietilén-glikol-poli(tejsav-glikolsav) (PEG-PLGA) kopolimer: Resomer RGP d 5055 (PEG tartalom: 3-7% (m/m), (Evonik, Németország)

Polivinil-alkohol, 30-70 kDa, 87-90 % hidrolizált (Sigma-Aldrich)

Poloxamer Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich)

Resomer RG 502H (tejsav:glikolsav arány: 50:50), (Evonik, Németország)

RPMI-1640 tápoldat (Sigma-Aldrich)

Sorafenib (Active Biochem, Hong Kong)

Bovín szérum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)

Tetrafluor-ecetsav (Sigma Aldrich)

Tetrahidro-furán (Sigma Aldrich)

Toluol (VWR)

Trietil-amin (TEA) (Sigma-Aldrich)

Tripszin-EDTA (Sigma-Aldrich)


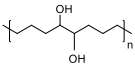
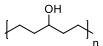
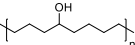
Tween 80 (Sigma Aldrich)

A felhasznált vegyszerek analitikai tisztaságúak.

A vérplazmát az Veszprémi Területi Vérellátótól kaptuk, amit további kezelés nélkül használtunk.

## 2.2 PVA alapú nanorészecskék előállítása

A Természettudományi Kutatóközpont Anyag- és Környezetkémiai Intézetében a Zöld Kémia Kutatócsoport metatézis reakciókkal jól definiált szerkezetű PVA polimereket hozott létre eltérő tulajdonságokkal, különböző felhasználási lehetőségek kutatása céljából, melyeket a **4. ábrán** szemléltetnek [41]. A szintetizált polimerek közül az előzetes hatóanyagleadási vizsgálatokban a PVA-5 a 2. leghosszabb hatóanyagleadással rendelkezett [116]. A PVA jelű polimer túl gyorsan felszabadította a hatóanyagot a jó vízdékonysága miatt, míg a másik két polimer esetében nem találtunk a hatóanyagokkal közös oldószert olyan hőmérséklettartományban, ami a hatóanyagokra nem jelenthet veszélyt. Ezek alapján kiválasztottam a PVA-5 jelű polimert. Nanoprecipitációs módszerrel készítettem gyógyszerhordozó nanorészecskéket. A folyamat során első lépésben 1 ml 10 mg/ml PVA-5 polimer oldatot készítettem etil-alkohol oldószerral, melyhez 0,1 ml 10 mg/ml koncentrációjú sorafenib-aceton oldatot adtam hozzá. Kevertetés után egy adagban, pillanatszerűen adtam hozzá 10 ml 1%-os PVA (Mw: 40-70 kDa), Pluronic F-68 vagy Tween 80 oldatához. A szerves fázist egy éjszaka alatt mágneses kevertetés mellett légköri nyomáson és szobahőmérsékleten elpárologtattam. Hatóanyag nélküli (vak) nanorészecskéket is készítettem hasonló módon, Pluronic F-68 felületaktív stabilizátor alkalmazásával. A további vizsgálatokhoz a fent ismertetett módon, de a kapszulázó polimert kihagyva a rendszerből sorafenib kristályokat hoztam létre. A nanorészecske diszperziót Hermle Z216 MK (Germany) mikrocentrifugában 15,000 rpm fordulatszámon 20 percen át centrifugáltam és mostam 1 ml MilliQ vízben és újradiszpergáltam pipettával.

Name	C/O ratio	Structure	Mw	D	T <sub>g</sub> [°C]
PVA	2		2000	-	85
PVA 4	4		-*	1.3	34.4
PVA 5	5		1340	1.3	-**
PVA 8	8		6500	5.7	6.8

4. ábra: Metatézis reakcióval előállított, eltérő tulajdonságú poli-(vinil-alkohol) molekulák szerkezete és tulajdonságai

### 2.3 PLGA, PEG-ilált PLGA és iRGD peptiddel felületmódosított PEG-PLGA alapú nanorészecskék előállítása

Célunk olyan nanorészecskék szintetizálása volt, amelyek kis méretük és magas polimer hozamuk mellett magas kapszulázási hatékonysággal tartalmaznak doxorubicint és sorafenibet. Bár a különböző PLGA kopolimerek nagyon gyakran alkalmazott hordozóanyagok, ismereteim szerint együtt kapszulázva sorafenib és doxorubicin tartalmú PLGA és PEG-PLGA nanoterápiás szerek eddig nem készültek. Ez a tény nem meglepő, mert a két gyógyszermolekula oldhatósága lényegesen eltér egymástól; ennél fogva nem könnyű feladat bevonni őket egyfajta polimerből álló mátrixba. A szakirodalmi felmérés szerint ilyen célra általában hibrid nanorendszereket használnak. A kísérleti részben leírt feltételeket kiterjedt folyamatoptimalizáló kísérletek után választottam ki, amelyek a nanoprecipitációs illetve egyszerű emulziós módszereket is magukban foglalták. Mindazonáltal ezeket az eljárásokat itt nem ismertetem részletesen, mivel az a vizsgálatok korai szakaszában bebizonyosodott, hogy nem alkalmasak aktív hatóanyagaim hatékony együttes kapszulázásra. A nanoprecipitációhoz a hatóanyagok és a kapszulázó polimer együttes oldószerére lenne szükség; így a doxorubicin-HCl-t szabad bázissá alakítottam át trimetil-amin segítségével [45] a kapszulázási eljárás előtt. A sómentes doxorubicint azonban nem lehetett teljesen a nanoprecipitációhoz alkalmas oldószerekkel (etanol, aceton, THF) feloldani, így a folyamat nem eredményezte a kívánt kapszulázódást. Az egyszerű emulziós módszer során a doxorubicin-hidroklorid sómentesítése az emulgeálás során történt; azonban a doxorubicin kapszulázási hatékonysága ebben az esetben túl alacsony volt. Mivel a doxorubicin oldhatósága a pH növekedésével csökken, az összetett emulzió - oldószer elpárologtatásos technika megfelelő eszköz lehet a doxorubicin hatékony mikrokapszulázására egy 7-nél magasabb pH-jú vizes fázisban [46]. Ebben az esetben elsőként a doxorubicin a belső vizes fázisba kerül. Mivel a sorafenib lipofil gyógyszer, a



polimerrel együtt oldható a közbülső, szerves fázisban. Az összetett emulzió – oldószer elpárolgatásos módszert az alábbiakban ismertetem.

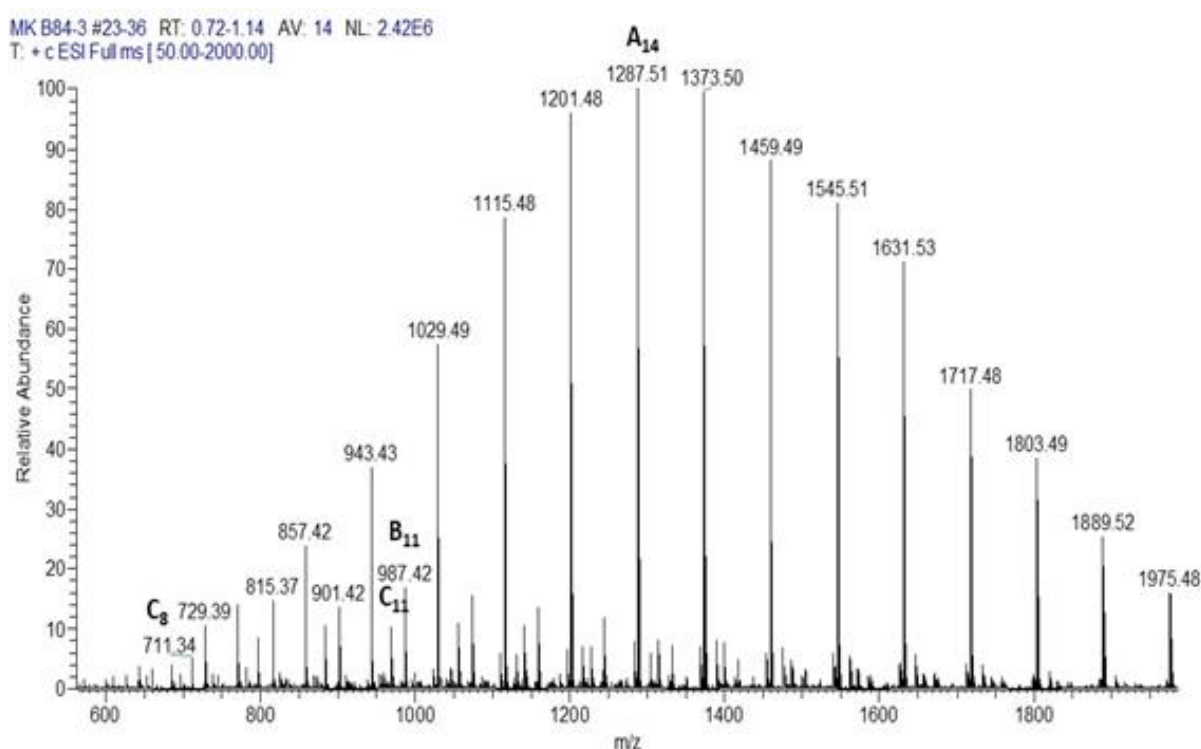
A kettős hatóanyagú nanorészecskék előállításához az összetett emulzió/oldószer elpárolgatásos technikát találtam megfelelőnek (V/O/V). Röviden, a belső vizes fázis 0,2 ml 0,5 %-os (m/V) doxorubicin-HCl só desztillált vízben oldva. A belső szerves fázis 1 ml diklórmetánhoz hozzáadott 0,1 ml 10 mg/ml koncentrációjú sorafenib tartalmú acetonos oldatot és 20 mg kapszulázó polimert (Resomer RG 752H, Resomer RG 502H vagy Resomer RGP d5055) tartalmazott. Az első emulgeálást ultrahangos kezeléssel (Sonics Vibra Cell VCX 130, 130 W) végeztem 30%-os amplitúdóval 30 másodpercig. Ezután az elkészített víz az olajban emulziót a külső vizes fázisba pipettáztam, amely 1 % (m/V) polivinil-alkoholt ( $M_w=40-70$  kDa)(PVA) tartalmazott 5 ml foszfát pufferben (pH = 8 értéken). A V/O/V emulziót újabb, 50%-os amplitúdójú, 60 másodpercig tartó ultrahangos kezeléssel hoztam létre. A szerves oldószereket mágneses keveréssel 3 órán át atmoszférikus nyomáson, szobahőmérsékleten párologtattam el. A nanorészecskéket Hermle Z216 MK mikrocentrifugával (Németország) centrifugáltam 15.000 fordulat/perc sebességgel 20 percig, háromszor mostam desztillált vízben, majd foszfáttal pufferolt izotóniás sóoldatban (PBS, pH 7,4) újra diszpergáltam.

Az aktív célzású (hatóanyag nélküli) vak nanorészecskék elkészítéséhez 20,0 mg PLGA 702/H és 20,0 mg RGP d5055 PEG-PLGA kapszulázó polimert oldottam fel 1 ml DCM-ban. Ezt O/V egyszerű emulzió-oldószer elpárolgatásos technikával, 6 ml 0,5/1,0/1,5/2,0 %-os PVA oldatban emulgeáltam (60 sec, 60%-os szonikálás). Légköri nyomáson és szobahőmérsékleten mágneses keverő segítségével elpárolgattam a DCM oldószert. Mértém a kapott nanorészecskék méretét és hozamát, kiválasztottam az optimális eljárást további minták készítéséhez.

A választott nanorészecske szuszpenzió (1%-os PVA oldattal készült) felületéhez ezután karbodiimides kapcsolással iRGD tumor penetrációs peptidet illetve cianin-5-amin fluoreszcens festéket kötöttem. Ennek során 50 mg EDC-t + 50 mg NHS-t oldottam 0,5 ml PBS-ben. Az aktiváláshoz a polimer tömegének 10%-val megegyező mennyiségű EDC+NHS-t adtam a nanorészecske szuszpenzióhoz. Az aktiválási idő 60 perc volt kevertetés (Bio RS-24 mini-Rotator, Biosan, Lettország) mellett, majd egyszeri mosás után a polimer tömegének 1%-val megegyező tömegű iRGD hozzáadásával (iRGD oldat PBS-ben) módosítottam a felületet.

## 2.4 PHB alapú nanorészecskék előállítása

Lengyel partnereink kutatóintézetétől (Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences, Poland) kapott polimerrel kezdtem hozzá új típusú nanorészecskék fejlesztéséhez. A Kawalec és mtsai [113] által létrehozott polihidroxi-butirát (PHB) vegyületek különböző átlagos molekulatömegű változatait ( $M_w = 600$  g/mol, 1300 g/mol, 1800 g/mol, 2200 g/mol) és PEG-ilált PHB vegyületeket teszteltem nanoprecipitációs és emulziós módszerek alkalmazásával. A felhasznált PHB polimer molekulaösszetételét a **5. ábrán** mutatom be.



5. ábra: 1500 Da átlagos molekuláris tömegű PHB polimer összetételének eloszlása tömegspektrometriás teljes ion kromatogramon (TIC)

A nanoprecipitációs módszer alkalmazásához a doxorubicin-hidroklorid sót előzetesen bázikus só formává alakítottam: 10 mg doxorubicin-hidrokloridot 0,2 ml DMSO-ban 1:3 moláris arányban hozzáadott trietil-aminnal reagáltattam egy éjszakán át mágneses keverővel kevertetve.

Nanoprecipitáció során 15 mg polimert oldottam 1,0 ml acetonban, majd hozzáadtam 100  $\mu$ l 10 mg/ml koncentrációjú sorfenib-aceton oldatot, valamint 20  $\mu$ l 50 mg/ml koncentrációjú bázikus doxorubicin oldatot. A kapott elegyet 15 ml 0,5% (m/V) PVA és 0,5% (m/V) Pluronic-

F68 oldatokba injektáltam pillanatszerűen. A szerves oldószert mágneses keverés közben egy éjszakán át szobahőmérsékleten és légköri nyomáson párologtattam el elszívófülkében.

Emulzióképzéses technikát alkalmazva 20 mg PHB-t 1,0 ml DCM-ban oldottam, majd 0,5 mg bázikus doxorubicint tartalmazó DMSO oldatot és 1,5 mg sorafenibet tartalmazó acetont tartalmazó oldatot adtam hozzá. Lezárt főzőpohárban mágneses kevertetéssel homogenizáltam az elegyet. A képződött szerves fázist hozzáadtam 6 ml 0,5% (m/V) PVA vizes oldatához. Az emulgeálást ultrahang (Sonics Vibra Cell VCX 130, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA) segítségével végeztem 50%-os amplitúdóval 60 másodpercig. A szerves oldószereket mágneses keverés közben 4 órán át hagytam párologni légköri nyomáson és szobahőmérsékleten elszívófülkében, ennyi idő alatt az összes szerves oldószer távozott a rendszerből.

A nanorészecske diszperziókat Hermle Z216 MK (Gosheim, Németország) centrifugával 15000 fordulat/perc sebességgel 20 percen át centrifugáltam és mostam, majd újra diszpergáltam, a műveletet kétszer megismételtem, végül PBS oldatba vettem vissza. A műveletek során MilliQ tisztaságú vizet használtam.

Az emulziós technikával létrehozott nanorészecskékből készítettem PEG-ilált változatot is. Ennek során 10 mg/ml koncentrációjú PHB alapú nanorészecske szuszpenziót centrifugáltam, mostam és újradiszpergáltam 1 ml MilliQ vízben. A szuszpenzióhoz 0,2 ml, 50-szeres moláris feleslegben levő EDC és NHS oldatot adtam és 60 percig Eppendorf csőben, forgatás [Bio RS-24 mini-Rotator, Biosan, Lettország] mellett inkubáltam 25 °C hőmérsékleten. Ezután a szuszpenziót centrifugáltam és mostam MilliQ vízben. A karbodiimides reakció során aktivált felületű nanorészecskéket 2 ml 20-szoros moláris feleslegben aminos-PEG-et tartalmazó PBS oldatban (pH 7,4) diszpergáltam, majd 60 percig ismét 25 °C-on Eppendorf-csőben kevertettem. A reakció után centrifugálás, mosás és diszpergálás következett három alkalommal, egyszer MilliQ vízben, majd a végén PBS oldatban diszpergálva.

A 600 g/mol és 1300 g/mol átlagos molekulatömegű vegyületek esetében rendkívül alacsony (<25%) hozamokat sikerült elérni mind a nanoprecipitációs, mind az emulziós módszer segítségével, mely a polimerek viszonylag nagy vízoldhatóságával magyarázható. Az  $M_w = 1800$  g/mol esetében a hozam kedvezőbb, azonban a hatóanyagokkal töltött részecskék kapszulázási hatékonysága alacsony vagy kimutatási határ alatti volt, egyes esetekben a polidiszperzitás index haladta meg jelentősen a kívánt értéket. Az adatok összegzése után a 2200 g/mol átlagos molekulatömegű polimert választottam ki további kísérleteim elvégzésére.

### 3. Gyógyszerhordozó részecskék fizikai, kémiai tulajdonságainak és biológiai viselkedésének vizsgálata

#### 3.1 Méret, méreteloszlás és morfológia

Dinamikus fényszórásmérés

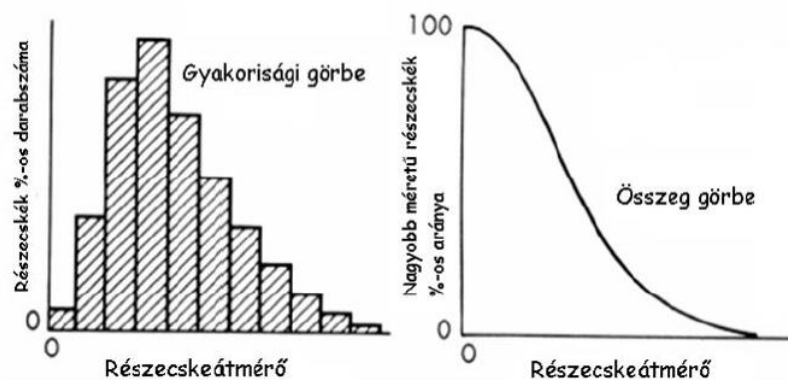
A kolloid rendszerek jellegzetes tulajdonsága a látható fény szórása, melynek feltétele ezen nanorészecskék méretének és a látható fény hullámhosszának összemérhető léptéke, törésmutató különbség a közeg és a kolloidok közt, azaz optikai inhomogenitásuk. A legkisebb részecskék fényszórását Rayleigh, a több száz nm-es részecskékét Mie, míg a makromolekulás oldatokét Debye-szórásnak nevezzük.

A mintát adott hullámhosszú (esetemben Malvern Nano ZS típusú készülékkel, **6. ábra**) 633 nm hullámhosszúságú lézerfényel világítjuk meg, melynek hullámhossza közelíti a részecskék mérettartományát, így Rayleigh-szórás lép fel. A detektor a szórt fény intenzitását és annak időbeli változását követi, amelyből diffúzióállandót (tulajdonképpen diffúziós együttható eloszlást) majd részecskeméretet határoz meg. A részecskék hidratált állapotban vannak, így valójában hidrodinamikai átmérőt kapunk eredményül, amely mindig nagyobb lesz, mint a tényleges méret, „száraz” állapotban (pl. elektronmikroszkóppal).

DLS méréshez néhány paraméter ismerete szükséges: a diszperziós közeg és viszkozitása, hőmérséklete, törésmutatója), a diszpergált anyag minősége, törésmutatója (Rayleigh szórás esetén elhanyagolható), abszorpciós tényezője, illetve az analízishez használt modellfüggvény. Polidiszperz rendszerek mérettartománya pontosabban jellemezhető az ún. méreteloszlási függvényekkel. Ezeknek két típusát különböztetjük meg: differenciális (gyakorisági) és integrális (összeggörbe) méreteloszlási függvényt. Az előbbit gyakorisági, míg utóbbit összeggörbének is hívják (**7. ábra**).



6. ábra: Malvern NanoZS készülék részecskeméret meghatározáshoz



7. ábra: Méreteloszlási függvények: gyakorisági és összeggörbe (Forrás: Hórvölgyi Zoltán: A nanotechnológia kolloidkémiai alapjai)

Méréseim során a nanorészecskék hidrodinamikai méretét és az ún. összeggörbéket adtam meg. A nanorészecskék tényleges mérete (valamint stabilitása, elemösszetétele) elektronmikroszkópos mérésekkel tovább pontosítható. A vizsgálathoz a **8. ábrán** látható FEI Apreo S pásztázó elektronmikroszkópot (A) valamint FEI Talos F200 HR-TEM transzmissziós elektronmikroszkópot (B,C) használtam (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).



A



B



C

8. ábra: FEI Apreo S SEM (A) és FEI Talos F200 TEM (B,C) elektronmikroszkópok a Pannon Egyetemen

A szabad szemmel nem látható objektumok megfigyelésére eredetileg fénymikroszkópokat használtak. Fényforrásuk látható fényt bocsát ki, aminek a hullámhossztartománya 400–700 nm. Egy ilyen mikroszkóp felbontóképességét a feloldási határ ( $d_{\min}$ ) értékével jellemezhetjük, ahol a feloldási határ az a legkisebb távolság, amelyet a mikroszkóp két különálló képpontként képez le (feloldható minimális távolság). Egy mikroszkóp felbontóképessége (feloldóképessége) alapvetően a minta megvilágítására használt elektromágneses sugár hullámhosszának a függvénye (Abbe-képlet). A hagyományos fénymikroszkóp esetében a felbontóképesség javításának éppen az szab határt, hogy a legrövidebb hullámhosszú, de még a látható tartományba eső, képalkotásra felhasználható fény – kékesibolya,  $\lambda=440$  nm – alkalmazásakor a  $d_{\min}$  értéke körülbelül a hullámhossz fele, azaz 200–220 nm. Ez azt jelenti, hogy egy metszeten a 200 nm-nél közelebb lévő tárgyponatok a fénymikroszkópban a legnagyobb nagyítással sem különíthetők el egymástól, a mikroszkóp ugyanis azokat egy pontba képezi le. A sejttani dimenziókban és főleg a kolloidtartományban való vizsgálódáshoz azonban ennél sokkal jobb feloldóképességre van szükség. Jobb felbontást elérhetünk úgy, hogy – a levegőhöz képest – növeljük a tárgy és az objektív közötti közeg törésmutatóját (pl.

immerziós olaj használatával). Amennyiben még nagyobb felbontásra lenne szükségünk, a látható fénynél rövidebb hullámhosszú sugárzást kell használnunk. Ilyen például az elektronsugár, amelynek hullámhossza az elektronok sebességével (a rájuk ható  $U$  gyorsító feszültséggel) fordítottan arányos. Minél nagyobb tehát az elektronok sebessége, annál rövidebb a hullámhosszuk ( $\lambda$ ); ezzel viszont egyenesen arányosan csökken a feloldási határ ( $d_{\min}$ ) értéke. Egy korszerű elektronmikroszkóp esetében ez az érték több nagyságrenddel kisebb a fénymikroszkópénál ( $d_{\min} = 0,1\text{--}0,2$  nm, azaz  $1\text{--}2$  Å), ami értelemszerűen nagyságrendekkel jobb felbontást tesz lehetővé.

Az elektronmikroszkópok különböző fajtáit működésük alapján csoportosíthatjuk:

- a.) Metszetek átvilágítására szolgál a transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)
- b.) Felületek letapogatására a pásztázó elektronmikroszkóp (SEM)
- c.) Anyagösszetétel megállapítására analitikai mikroszkópia (AEM)
- d.) Egyes modern mai mikroszkópokat több módon is lehet működtetni, pl. pásztázó vagy átvilágító üzemmódban is (STEM)

Az egyes technikákhoz különböző, speciális mintaelőkészítési eljárások tartoznak. Transzmissziós elektronmikroszkóphoz olyan vékony metszetet kell készítenünk, amin az elektronsugár képes áthatolni. Az előkészítés főként biológiai minták esetén hosszadalmas és bonyolult. Teendőink a fixálás, víztelenítés, majd beágyazás és a blokk „kifaragása”.

Pásztázó elektronmikroszkópnál sok esetben felületkezelés szükséges. Amennyiben mintánk nem elektromos vezető, elektronok halmozódnak fel rajta (abszorbeált áram). Ez a felhalmozott töltés torzítja a képet. Ha a minta eleve vezető, akkor elég a mintatartóhoz rögzíteni egy vezető ragasztóval földelve. Ha a mintánk rossz vezető (pl. biológiai minták), felületét vékony vezető réteggel kell bevonni, ami lehet pl. arany vagy szén, amit párologtatással (gőzöléssel) vihetünk a felszínére.

Ezen mikroszkóprendszerek vákuumban üzemelnek, hűtésükről gondoskodni kell. Egyes újabb típusok alacsony nyomáson is üzemeltethetőek, és sokszor mintaelőkészítést sem igényelnek. Méréseim során polimer mintákkal dolgoztam, melyek nem túl jó vezetők, azonban az esetek többségében elégségesnek bizonyult a vizsgálatokat felgőzölés nélkül folytatni. Mintaelőkészítés során a szuszpenziókat minimum 3 alkalommal centrifugáltam és mostan Milliq minőségű ioncserélt vízben, majd hozamtól függően 2-10-szeresére hígítottam, a mintatartó gridre cseppentettem és szobahőmérsékleten, illetve infra- vagy wolfram izzós lámpa alatt szárítottam.

### 3.2 Elektrokinetikai potenciál ( $\zeta$ -potenciál)

A hidratált részecskéket ún. elektromos kettősréteg veszi körül, a felületükön levő ionok illetve az ellenionok a diszperziós közeg oldaláról. A felületen felhalmozódott töltésekből kialakuló réteg bizonyos kiterjedéssel rendelkezik, mely tulajdonságai eltérnek a tömbfázis tulajdonságaitól. A DLS mérésnél említett hidrodinamikai méret alatt a részecskét és a hozzá kapcsolódó, vele együtt mozgó kettősréteget értjük. A kettős réteget és a tömbfázist elválasztó határvonalat hasadási síknak nevezzük.

A mikrofázisok diszperziós közegben való mozgásának (elektromos áram hatására, lásd elektroforézis) eredményeképpen a felületükön kialakult elektromos kettősréteg elhasad, és éles potenciálkülönbség lép fel. A részecskék mozgásának sebessége meghatározható a lézer-Doppler-effektus alapján, melyből számítható a  $\zeta$ -potenciál [mV].

Az elektroforézissel történő meghatározás során vizsgáljuk a részecske elektroforetikus mozgékonyágát ( $u_{el}$ ), amely a részecske egységnyi elektromos térerőre bekövetkező mozgási sebességét mutatja ( $v/E$ ). Ebből a  $\zeta$ -potenciál a

$$\zeta = q u_{el} (\eta/\epsilon), \text{ ahol}$$

$q$ : az elektromos kettősréteg vastagságától és a részecske méretétől függő paraméter, értéke  $1 < q < 1,5$  (gömb alakú részecskénél 1,5)

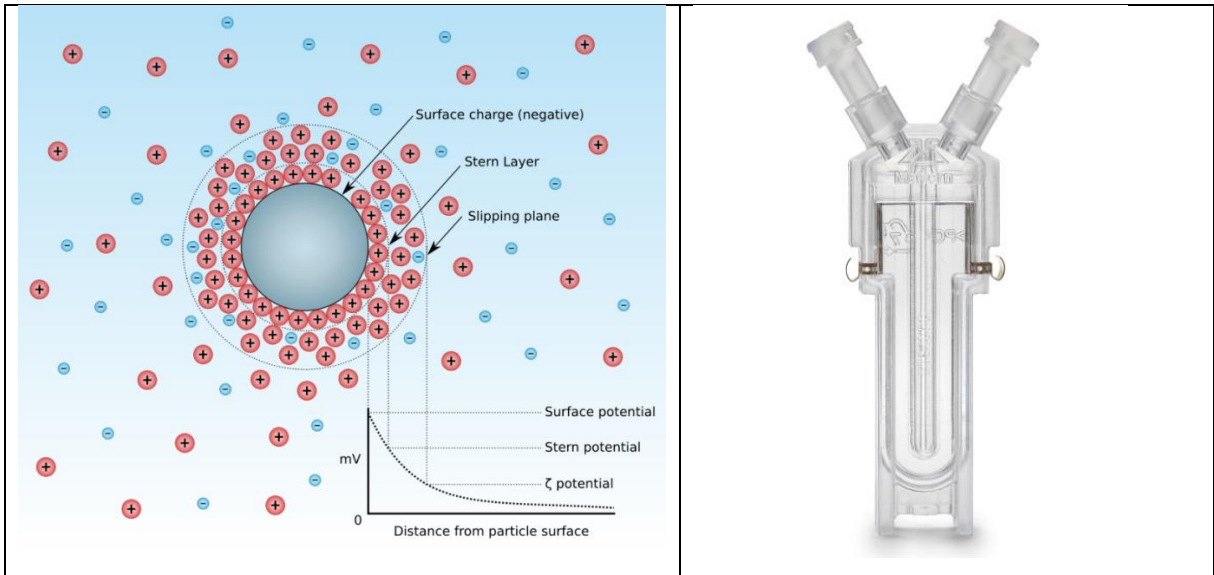
$\eta$ : a közeg dinamikai viszkozitása

(Smochulowski, Hückel és Henry munkássága alapján)

$\epsilon$ : a diszperziós közeg abszolút elektromos permittivitása

A méréshez szükséges mérőcellát és az elektromos kettősréteg vázlatos rajzát a **9. ábrán** mutatom be.





9. ábra: Az elektromos kettősréteg (forrás: Wikipedia) és a zeta-potenciál méréséhez használatos mérőcella

### 3.3 Stabilitás

Vizes közegű diszperziók aggregatív állandóságát a Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek (DLVO)-elmélet szerint az elektromos kettősréteg taszítása és a diszperziós vonzás szabja meg. Elektromos kettősréteg taszítás akkor lép fel, ha a részecskék „ütközéseik” során átlapolódnak, töltéseloszlásuk megváltozik. Kölcsönhatásuk az ún. párkölcsönhatás. A párpotenciál ( $V_R$ , taszító kölcsönhatási energia) a

$$V_R = 2\pi\epsilon\alpha(\Psi_{St})^2\exp[-\kappa H]$$

egyenlettel számolható, ahol:

H: részecske-részecske felületek távolsága

$\Psi_{St}$ : a Stern-potenciál, melyet a gyakorlatban a  $\zeta$ -potenciál értékével helyettesítünk

$\kappa$ : a reciprok Debye-Hückel paraméter (az ellenionok töménységétől és a töltésszámtól, valamint a hőmérséklettől függ)

Az elektromos kettősréteg taszítási potenciál tehát exponenciálisan nő a részecskék távolságának csökkenésével.

Diszperziós vonzás: a mikrofázisokat alkotó atomok illetve molekulák között megnyilvánuló másodrendű vonzó kölcsönhatásokból (van der Waals) származik.

$$V_A = -(A_H\alpha/12H)$$

A DLVO-elmélet szerint a két mikrofázis közötti eredő kölcsönhatási energia ( $V_T$ ) megegyezik az elektromos kettősréteg taszító és a diszperziós vonzó kölcsönhatási energiák összegével:

$$V_T = V_R + V_A$$

A párkölcsönhatásokból aztán következtethetünk az egész rendszer stabilitására. Az egyes kölcsönhatási energiák távolságfüggése különböző, ezért összegzésükkel a részecske-részecske távolság függvényen minimumok és maximumok léphetnek fel. Amennyiben a maximum (taszító) érték számottevően nagyobb, kinetikailag stabil szolról beszélünk.

Az aggregációt alapvetően háromféle (felületmódosító) módszerrel akadályozhatjuk meg. A nanorészecskéken nagy mennyiségű és azonos előjelű töltéseket alakítunk ki, ez az elektrosztatikus stabilizálás. Ha a részecskék felületét töltés nélküli makromolekulákkal (pl. dextrán) borítjuk, sztérikusan stabilizáljuk azokat. A kettő kombinációja az elektrosztérikus stabilizálás, pl. karboxilát csoportot tartalmazó amfifil molekulák, elektromos kettősréteget kialakítva (pl. olajsav, polielektrolitok).

Az esetleges aggregációra következtethetünk a mért (alacsony abszolút értékű)  $\zeta$ -potenciál és az (idő függvényében) növekvő hidrodinamikai átmérő értékekből. Amennyiben ilyet nem tapasztalunk, a rendszerünk stabil.

### **3.4 Hozam, hatóanyagtartalom és kapszulázási határfok**

Az elért *hozamot* gravimetriás vizsgálattal határoztam meg mosás és centrifugálás után. Az elkészített mintából 2 ml nanorészecske szuszpenziót pontos tömegének meghatározása után három alkalommal centrifugáltam és mostam, az utolsó centrifugálás után mosás és diszpergálás nélkül szárítószekrényben, 40 °C hőmérsékleten szárítottam, majd kihűlés után analitikai mérlegen mértem. A mért értéket az eredetileg bemért anyag tömeghez viszonyítottam.

A hatóanyag *kapszulázási határfoka* alatt az előállított nanorészecskébe mikrokapszulázott gyógyszerhatóanyag arányát értjük a rendszerhez adott összes hatóanyag mennyiségéhez képest. A kapszulázási hatékonyságot több különböző módon is mértem, így anyagmérleget tudtam összeállítani. Az egyes módszereket a **5. táblázatban** foglaltam össze.

	A nanorészecske feloldható oldószerben vagy oldószer elegyben	A nanorészecske nem oldható fel
Egy hatóanyagot vizsgáltam	UV-vis spektrofotometria	UV-vis spektrofotometria felülúszóból
Több hatóanyagot vizsgáltam	HPLC-UV	HPLC-UV felülúszóból

5. táblázat: Kapszulázási hatékonyság vizsgálati módszerei

Amennyiben lehetséges volt, UV-vis spektrofotometriával határoztam meg a kapszulázási hatékonyságot. A meghatározás a következő módokon végezhető:

- a.) A mintaelőkészítés során a mintát 3 alkalommal centrifugáltam és mostam MilliQ vízben, majd feloldottam a polimer:hatóanyag rendszer közös oldószerében (pl. DMSO, THF). Megfelelő hígítás után spektrofotométerrel a hatóanyag-koncentráció meghatározható.
- b.) Amennyiben nincs közös oldószer, úgy az első centrifugálás utáni felülúszóból mértem a veszteséget, ezt levonva az eredeti hatóanyagmennyiségből megkaptam a gyógyszerhordozó rendszerbe került mennyiséget. Hátránya a felülúszóban levő nagy mennyiségű felületaktív szer, ennek cut-off értéke felett lehet a mérést kivitelezni. (Vizsgálataim során általában nem okozott problémát.)
- c.) Több hatóanyagot tartalmazó rendszer vizsgálata nehézkessé válhat, ha a hatóanyagok abszorbancia spektrumai átlapolnak egymással. Ilyenkor folyadékkromatográfiás vizsgálatot célszerű végezni. HPLC segítségével elválaszthatjuk a vizsgálandó komponenseket, továbbá a polimer okozta esetleges elnyelést, háttérzajt. További megoldandó probléma a megfelelő cut-off értékkel rendelkező eluens megtalálása egy ilyen összetett rendszerhez: a megfelelő elúció mellett fontos, hogy a hatóanyagok és a polimer se csapódjon ki a kromatográfiás oszlopon, hiszen tönkretethetné azt, ezért javasolt a védőoszlopok használata.
- d.) HPLC vizsgálat is folytatható felülúszóból, de figyelembe kell venni, hogy a nagy mennyiségű felületaktív segédanyag megrövidítheti kolonnáink élettartamát. UPLC használata nem javasolt, azokon az oszlopokon nem képesek átjutni a makromolekulás felületaktív ill. emulgeáló szerek.

Minden esetben fontos vizsgálni elektronmikroszkóppal, hogy a kapszulázás sikeres volt-e és a hatóanyag nem mikrokristályos formátumban, a nanorészecskéken kívül vált ki.

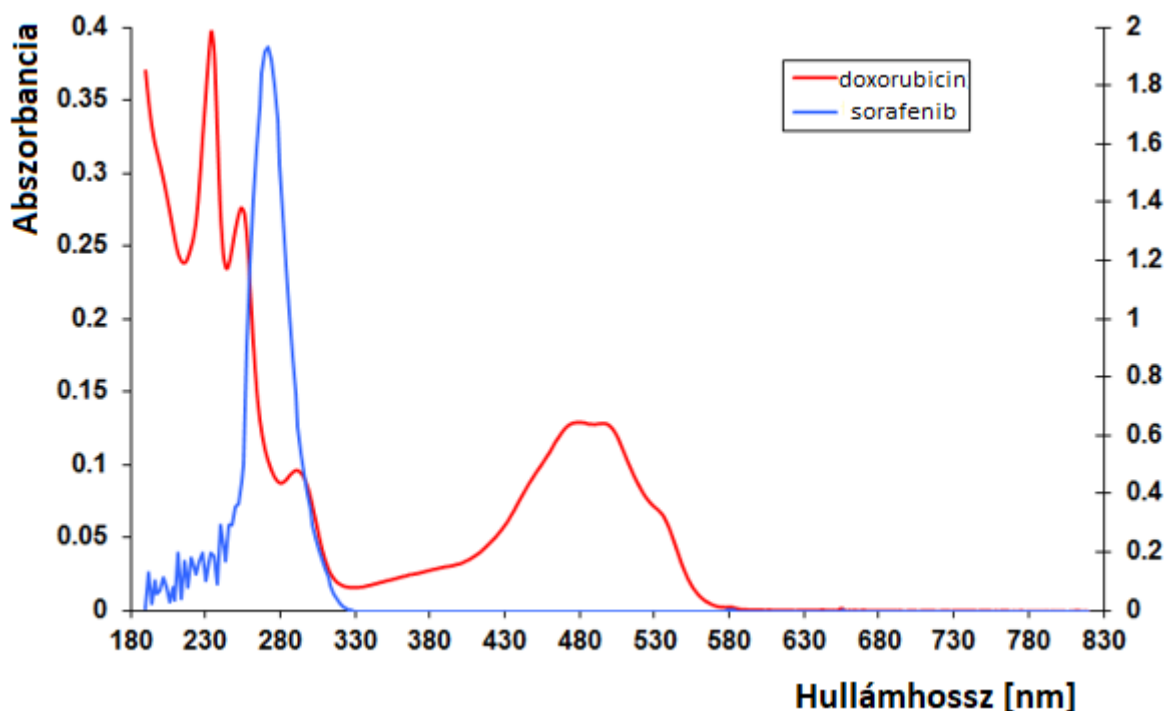
A kapszulázási hatások számítása:

$$\%EE = (\text{hatóanyag}[\text{összes}] - \text{hatóanyag}[\text{felülűszó}]) / \text{hatóanyag}[\text{összes}] * 100$$

UV-vis spektrofotometria esetén az ultraibolya- és látható tartományba eső sugárzás elnyelése a molekulák kötőelektronjainak gerjesztését eredményezi. Segítségével UV-ban abszorbeáló funkciókat tartalmazó vagy színes vegyület mennyiségi meghatározása végezhető el. A kromofór csoportokat tartalmazó molekulák elektronspektruma összetett, mivel az elektronátmenetekre rezgési átmenetek szuperponálódnak, így széles abszorpciós sávok jelennek meg. Az energiaelnyelési folyamatban a kötő elektronok vesznek részt, illetve amelyek nem kötő elektronként bizonyos atomokhoz (pl. oxigén, kén, halogének, nitrogén) közel helyezkednek el. Megfelelően mérhető ( $\lambda=200-700$  nm) tartományba a nem kötő elektron  $\rightarrow \pi^*$  és a  $\pi \rightarrow \pi^*$  energiaátmenetek tartoznak (pl. a szigma kötések gerjesztése túl nagy energiaváltozással jár,  $\lambda < 125$  nm). Célszerű figyelembe venni, hogy a nem kötő  $\rightarrow \pi^*$  átmenetek az oldószer polaritásának növekedésével a rövidebb hullámhosszok felé tolódnak el (kék-eltolódás), ami víz/etil-alkohol esetében akár 30 nm is lehet (kalibrációs görbét azonos közegben kell felvenni!). Ennek oka a nem kötő elektronpár solvatációja, amely a nem kötő orbitál energiaszintjét csökkenti (előbbi példában az oldószer protonjai a nem kötő elektronpárral hidrogén-híd kötést létesítenek). Kísérleteim során különböző oldószereket használtam (víz, etil-alkohol, dimetil-szulfoxid, tetrahydrofuran).

A Lambert-Beer törvény érvényességi határain belül az abszorbancia additív tulajdonság, amely a vizsgált hullámhossznál az egymás mellett előforduló komponensek abszorbanciáinak összegeként adódik. Több hatóanyag esetén előfordulhat, hogy az abszorbancia-hullámhossz görbék átlapolnak, így mindkét hatóanyag koncentrációja külön-külön nem vagy csak nehézkesen határozható meg. Ilyen a doxorubicin és a sorafenib vizsgálata: míg a sorafenib

hatóanyagnak kizárólag UV tartományban van elnyelése, a doxorubicin UV és látható tartományban is elnyel, ahogy azt a **10. ábra** is mutatja.



10. ábra: Két hatóanyag abszorbancia-hullámhossz értékeinek átlapolása

Kalibrációs egyenest vettem fel a doxorubicinre  $\lambda=270$  nm és  $\lambda=480$  nm hullámhosszokon. Az előkészített mintában először a doxorubicin mennyiségét mértem a látható tartományban. A koncentrációt ismerve a doxorubicin elnyelése  $\lambda=270$  nm-en számolható, majd a sorafenib abszorpcióját is tartalmazó mért értékből levonható. A Lambert-Beer törvényt felhasználva a maradék a sorafenib hatóanyag elnyelése  $\lambda=270$  nm-en.

$$A = \varepsilon * c * l, \text{ illetve } A = (\varepsilon_1 * c_1 + \varepsilon_2 * c_2) * l$$

Kapszulázási hatások számításához szintén 2 ml nanorészecske szuszpenziót centrifugáltam, mostam és újradiszpergáltam három alkalommal, majd dimetil-szulfoxiddal (DMSO) feloldottam. Kalibrációs egyenes felvétele után spektrofotométerrel (T80 spektrofotométer, PG Instruments, Leicestershire, UK) és folyadékkromatográfal (Young Lin YL 9100, YL Instruments Co., Ltd., Gyeonggi-do, Korea) végeztem a hatóanyag mennyiségi meghatározását. A hatóanyagtartalom a kapszulázott hatóanyag tömegének valamint a számított hozammal létrehozott nanorészecskék nettó tömegének a hányadosa.

$$\left(\frac{m}{m}\right) \% \text{ hatóanyag} = \frac{m(\text{kapszulázott hatóanyag})}{m(\text{létrehozott nanokompozit})} * 100$$

A folyadékkromatográfias vizsgálat során az elúciót az alábbi, **6. táblázat** szerint állítottam be:

Idő (min)	Metanol (%)	0,1 % tetrafluor- ecetsav/víz (%)
0,0	30,0	70,0
5,0	30,0	70,0
8,00	40,0	60,0
11,00	50,0	50,0
14,00	60,0	40,0
17,00	70,0	30,0
20,00	80,0	20,0
23,00	90,0	10,0
27,00	100,0	0,0
30,00	100,0	0,0
35,00	30,0	70,0

6. táblázat: Doxorubicin és sorafenib HPLC vizsgálatához alkalmazott elúciós gradiens értékei

A vizsgálathoz Kinetex C18 oszlopot (150mm x 4.6 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) használtam, injektálási standardként piroxicam vegyületet alkalmaztam. Az elúció 1 ml/min áramlási sebességgel folyt.

A termékek előállítása, a gyártástechnológia hatékonysága költségek tekintetében egyáltalán nem elhanyagolható, ami alól a gyógyszeripar sem kivétel. A gyógyszerek ára a magas hozzáadott tudás és az előállításukat illető szigorú minőségbiztosítási követelmények miatt magas. Fokozottan igaz ez az összetettebb készítményeket, pl. gyógyszerhordozó rendszereket illetően, melyek több hatóanyagot, különleges polimereket és egyéb segédanyagokat (pl. felületmódosításkor kapcsolt molekulák) tartalmaznak, melyek külön-külön is drága termékek. Pl. a sorafenib, mint viszonylag új multikináz inhibitor klinikai alkalmazását korlátozza a magas ára [61, 62]. Ezen okból kifolyólag a hozam és a kapszulázási hatékonyság kiemelkedően fontos paraméterek a gyógyszerhordozó rendszer előállításának gazdasági szempontú vizsgálatában.

### 3.5 Leadási kinetika

A hatóanyagok szervezetbe kerülésével és mozgásával a farmakokinetika foglalkozik. A hagyományos gyógyszerek LADME (felszabadulás, felszívódás, disztribúció, metabolizmus és exkréció) jellemzőitől a gyógyszerhordozó rendszer tulajdonságai jelentősen eltérnek. A hagyományos készítmények disztribúciója a szervezetbe kerülve azonnal megindul, a biológiailag aktív molekulák eljutnak a szervekbe. Mikrokapszulázott hatóanyagoknál, szabályozott célbajuttatás esetén a hatóanyag a nanorészecskében marad amíg a célszervhez nem ér, és ott meghatározott ütemben adja le hatóanyagát. A hatóanyagleadás tervezhető, mely történhet a hordozó polimer anyagi minőségének – és így lebomlási idejének – megválasztásával, de léteznek rezponzív anyagok, melyek hő- vagy elektromágneses stimulus hatására adják le hatóanyagukat.

Modellezhető a leadás pl. PBS pufferben, fiziológias sóoldatban, savas karakterű pufferoldatban (mely a tumorok mikrokörnyezetét imitálja) vagy vérplazmában. A kísérletek során savas pufferben (ecetsav-acetát puffer, pH = 5,5) és vérplazmában (pH = 7,4) vizsgáltam a nanorészecskék hatóanyag-leadását. A kezdeti  $t_0$  időpontban, majd meghatározott időnként ( $t = 15$  min, 30 min, 60 min, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h) 0,5 ml mintát vettem a vizsgált közegből. A mintákat centrifugálással, mosással kétszer tisztítottam, majd DMSO-ban történő feloldást követően folyadékkromatográfias módszerrel elemeztem a hatóanyag-tartalmukat. Így a kísérlet során még fel nem szabadult hatóanyag mennyiségét kaptam meg, kiküszöbölve a vérplazma közeg esetleges zavaró hatásait, illetve a felszabadult hatóanyag mintaelőkészítés során elszenvedett lehetséges veszteségeit. A mérés után ábrázoltam a  $t_0 - t_{72h}$  időintervallumban számított hatóanyag-tartalmat, az egyes mérési pontok értékeit  $t_0$ -hoz képest százalékosan.

A hatóanyag gyógyszerhordozó rendszerből történő kijutása három fő fázisra különíthető el. A kezdeti lemosódást („burst effect”) követi a polimer mátrix degradációja, majd az ún. lassú diffúziós fázis, mely komponenseket Lucero és mtsai [6] a következő egyenlettel írják le:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \theta_b[1 - \exp(-k_b t)] + \theta_r \left\{ \frac{\exp[k_r(t - t_{max})]}{1 + \exp[k_r(t - t_{max})]} \right\} + \theta_d \left[ 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 n^2 D_c t}{r_1^2}\right) \right] \quad (1)$$

Korsmeyer szerint továbbá

$$\theta_d = k t n \quad (2)$$

ahol „k” a diffúziós kinetikai sebességi állandó, amelyet a gyógyszer-felszabadulási rendszer geometriai és szerkezeti tulajdonságai határoznak meg, „n” pedig a diffúziós kitevő [112].

Ha az (1) egyenletet behelyettesítjük a (2) egyenletbe, akkor az alábbiakat kapjuk:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \theta_b[1 - \exp(-k_b t)] + \theta_r \left\{ \frac{\exp[k_r(t - t_{max})]}{1 + \exp[k_r(t - t_{max})]} \right\} + k_d t^n \quad (3)$$

ahol „k<sub>b</sub>” a kezdeti kioldódási állandó, „θ<sub>b</sub>” a kezdeti lemosódás hozzájárulása a hatóanyag teljes tömegéhez, „k<sub>r</sub>” a mátrix lebomlás-relaxációs állandó, „k<sub>d</sub>” a diffúziós kinetikai állandó és „t<sub>max</sub>” az az idő, amíg elérjük a maximális hatóanyag-felszabadulási sebességet, vagy az az idő, amíg a polimer lebomlásából elérjük az 50%-os felszabadulást.

### 3.6 Sejtek nanorészecske felvétele

A nanorészecskék létrehozása és fizikai-kémiai jellemzése után azok biológiai hatásának vizsgálata következett. A nanorészecskék sejtek általi felvételét (fagocitózis útján) vizsgáltam áramlási citometria segítségével. A vizsgálat lényege, hogy a nanorészecskéket fluoreszcens festékkel (cianin-5-amin) jelöltem, a teszt során élő sejteket kalcein festékkel festettem meg, az áramlási citométer pedig különválogatta a csak kalceint illetve a cianin-5-amint is tartalmazó sejteket. Ennek során a nanorészecskéket az alap polimer karboxil- illetve hidroxilcsoportjain keresztül karbodiimid kötéssel fluoreszcensen jelöltem. Ehhez 0,5 ml nanorészecske szuszpenziót (2 mg/ml) PBS-ben (pH 7,4) összekevertem 0,1 ml PBS (pH 7,4) oldattal, mely 1 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimidet (EDC) és 1 mg N-hidroxiszukcinimidet (NHS) tartalmazott. A mintákat 60 percig 25°C hőmérsékleten inkubáltam, majd centrifugáltam és mostam MilliQ vízzel. Végül 0,5 ml PBS-ben (pH 7,4) visszadiszpergáltam. Az így nyert,



karbodiimididdel aktivált nanorészecskékhez 0,02 ml PBS-ben oldott, 1 mg/ml koncentrációjú cianin-5-amin fluoreszcens festéket adtam, és ismét 1 órán keresztül 25°C-on inkubáltam. Végül a mintát centrifugáltam (Hermle Z216 MK, Németország) 15000 rpm fordulatszámon 20 percen keresztül, a mosást 3x ismételttem, a harmadik után 0,5 ml PBS-ben diszpergáltam fel. Ugyanakkor a PLGA nanorészecskéken sokkal több a kötőhely a karbodiimididdel megvalósított kapcsoláshoz, és így az azonos mértékű jelölés nehezen képzelhető el. Ezért minden vizsgálathoz saját vak mintát használtunk, hogy az eredmények összehasonlíthatók legyenek. Azonban így az egyes gyógyszerhordozó polimer nanorészecskék eredményeit csak a saját vak nanorészecskéjükkel lehet összehasonlítani. A teszthez 24 cellás plate-et használtam, mindegyikbe Bürker-kamrás sejtszámlálást követően  $2 \times 10^5$  db sejtet mértem be 8 csatornás pipettával és 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam azokat. A vizsgálataim során HT-29, HCT-116 és Hep G2 sejtvonalakat használtam fel. Negatív kontrollként nanorészecskével nem kezelt sejteket használtam. A nanorészecskékkel kezelt sejtekhez cellánként 100 µg nanorészecskét (vak PLGA és PEG-PLGA illetve hatóanyagot tartalmazó PLGA és PEG-PLGA) mértem be, majd ismét 24 órás inkubálás következett. Ezután PBS oldattal mostam a cellákat, eltávolítva a sejtbe nem jutott nanorészecskéket. A sejteket tripszin-EDTA oldattal szedtem fel, majd végül 2% bovin szérum albumin (BSA) tartalmú PBS-ben mostam azokat. A mintákat előkészítés után BD FACSAria III Cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, US) és Gallios (Beckman Coulter, Pasadena, CA, US) áramlási citométerekkel vizsgáltam, mely a megfelelő hullámhosszú lézersugárással gerjesztett sejtek által felvett részecskékhez kötött fluoreszcens csoportokat felismerve kiválogatta a jelölt sejteket. A gerjesztési és a kibocsátási hullámhossz megválasztásakor figyelembe kell venni, hogy a doxorubicin egy antraciklin-glikozid típusú citotoxikum, amelyben a kondenzált gyűrűrendszer fluoreszcenciája zavarhatja a mérést. Ennek megfelelően az általunk használt citométerekben levő 3 lézer és 9 detektor megfelelő kombinációjának megválasztása szükséges minden egyes méréshez.

### **3.7 Biokompatibilitás, citotoxicitás**

Mesterséges vagy természetes, az emberi szervezettől idegen anyagok szervezetbe juttatása kockázatot jelenthet. Az anyagok toxicitása akut vagy krónikus mérgezést, illetve erőteljes immunválaszt válthat ki. Biokompatibilis egy anyag, ha szervezetbe juttatása után kedvező viselkedést mutat, összeférhetősége a szervezettel zavartalan marad, mint pl. a poli(metil-metakrilát). Ennek oka lehet az adott anyag inert mivolta, illetve ha a polimert alkotó monomerek – melyekre hidrolitikus vagy enzimatis úton esik szét a polimer – természetes

módon előfordulnak az emberi szervezetben (pl. politejsav/tejsav), és így a metabolizmusuk végbemegy.

A gyógyszerként a szervezetbe kerülő (pl. intravénásan) anyag az előállítás közegétől nagyban eltérő (fiziológiás) körülmények közé kerül (eltérő kémiai környezet, hőmérséklet, pH, ellenionok, fehérjék, immunrendszer makrofág sejtei stb.). Kívánatos, hogy a hordozó rendszerünk csak a rendeltetése szerint viselkedjen (adott sebességű hatóanyagleadás), ne aggregálódjon ill. egyéb nem tervezett változásokon ne menjen át. Ehhez a készített nanorészecskéket tesztelni kell biokompatibilitás, hemokompatibilitás (pl. fiziológiás sóoldat, vagy vérplazmában való tesztelés) és toxicitás szempontjából.

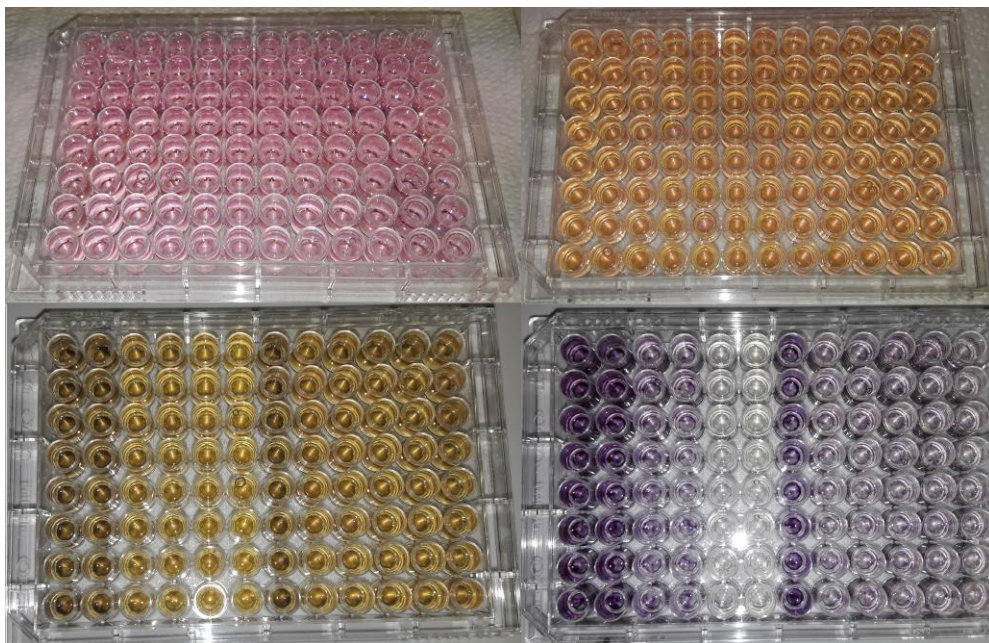
Az MTT kolorimetriás viabilitás teszt alapja, hogy az élő sejtekben működő mitokondriális szukcinát-dehidrogenáz enzim a sárga színű MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid) reagenst a tetrazólium gyűrű felnyílása mellett lila formazán vegyületté redukálja. A sejten belül keletkező kristályok detergenssel (pl. DMSO vagy ún. lizáló oldat: 99,4 ml DMSO, 0,6 ml cc. ecetsav, 10g SDS) történő szolubilizálását követően a 620 nm-es referencia hullámhossz mellett 540 nm-en mért optikai denzitás (OD) jele arányos az élősejtek számával (a  $10^3$  -  $10^6$  sejt/kamra tartományban). A gyógyszerhatóanyagok citotoxikus hatásának meghatározásához egy 96 kamrájú steril tenyésztőlemezre ültettem ki kamránként  $10^4$  sejtet. A vizsgálatokhoz szintén HT-29, HCT-116 illetve Hep G2 sejt vonalakat használtam. Ezeket 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> bevezetése mellett 24 órán keresztül előinkubáltam, időt hagyva ezzel a sejtek kitapadására és adaptálódására.

Ezt követően az abszolút kontroll, vak DMSO oldat, gyógyszerhatóanyagok, vak nanorészecskék és a hatóanyagokat tartalmazó nanorészecskék megfelelő töménységű oldataival/diszperzióival további 48 órán keresztül inkubáltam a kitapadt sejteket. Koncentrációnként min. 6 párhuzamos mérést végeztem. Az expozíció után a sejtekről eltávolítottam a tápfolyadékot, szükség esetén a sejteket friss tápfolyadékkal mostam. Ezt követően a megmaradt térfogat 10%-ának megfelelő mennyiségű MTT reagenst tartalmazó PBS-t adtam a sejtekhez. A gyártó ajánlásait követve 2-4 órás sötétben történő inkubáció után a képződött formazán kristályokat lizáltam, opcionálisan 20 perces 350 rpm-en történő rázatás mellett. Végül minden cellában fotométerrel vagy ELISA readerrel végeztem az abszorbancia mérést. Valamennyi mérési eredményből kivontam a sejtmentes tápfolyadéokra meghatározott referencia értékeket, majd a minták eredményeit a negatív kontrollok átlag értékére vonatkoztattam.

A teszt menete:

- 1) 96 cellás plate előkészítése, sejtek letapasztása: passzálás során a sejtuszuspenzióból élő sejtek elkülönítése, centrifugálás, sejt számlálás Bürker-kamrában vagy áramlási citometriával.
- 2) Megfelelő sejtkoncentrációjú oldat elkészítése (10000 sejt/cella) és bemérése a cellákba
- 3) 48h inkubálás; 37°C, 5%-os CO<sub>2</sub> atmoszféra, az eredményességéről, borítottságról mikroszkóp alatt meggyőződünk; 24 óra után +100 µl friss tápoldatot adtunk hozzá
- 4) Közegcsere (200 µl friss tápoldat), hatóanyagok és kontroll hozzáadása
- 5) 48h inkubálás; 37 °C, 5%-os CO<sub>2</sub> atmoszféra (24h után +100 µl friss tápoldat/csere)
- 6) Közegcsere (200 µl tápoldat), MTT reagens hozzáadása (20 µl; 5 mg/ml) [25mg/5ml PBS pH=7,4; utóbbit gyári tablettából készítettem)
- 7) 2-4 óra inkubálás sötétben
- 8) Közeg eltávolítása, szolubilizálás (5-30 perc, opcionálisan rázatás)
- 9) Szükség esetén hígítás, mérés fotométeren (200→500 µl-re hígítottam és fotometriásan mértem 590 nm hullámhosszon), a referencia cella/küvetta a lizáló oldatot tartalmazza.

A főbb lépések színváltozását a **11. ábra** illusztrálja.



*11. ábra: MTT teszt lépései*

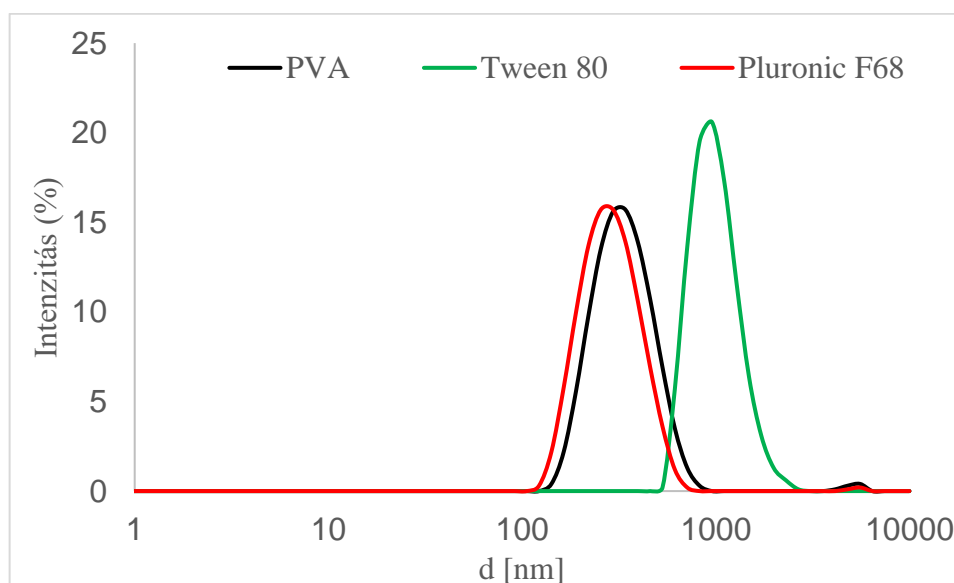
A vizsgálathoz Robonik Readwell Touch (Navi Mumbai, India) és Thermo Scientific Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Bio-Science Kft, Budapest, Magyarország) típusú készüléket használtam.

## 4. Eredmények

### 4.1 PVA alapú nanorészecskék vizsgálata

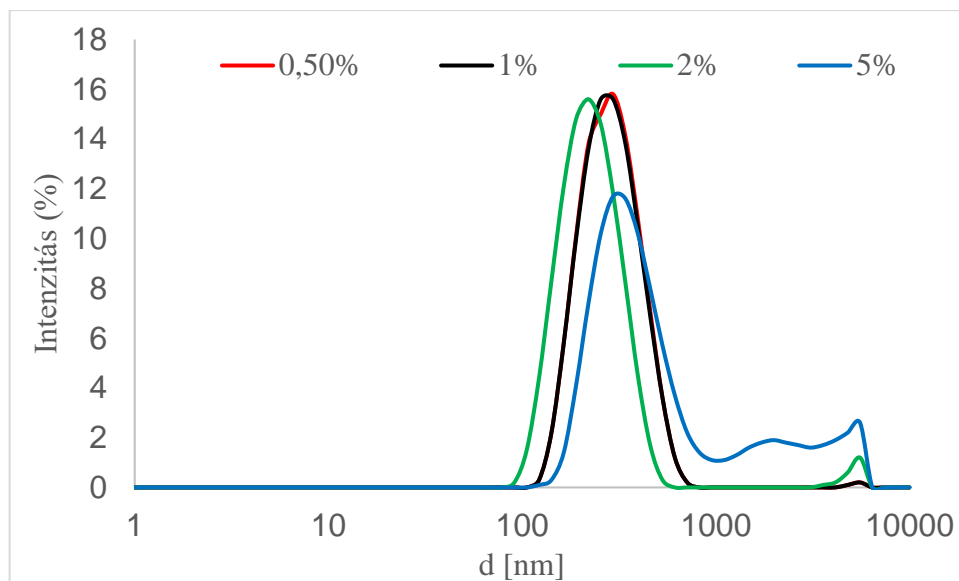
#### 4.1 PVA-5 polimerből készült sorafenib tartalmú nanorészecskék fizikai és kémiai tulajdonságai

A PVA-5 típusú polimeralapanyagból nano méretű gyógyszerhordozó részecskék előállítását nanoprecipitációs módszerrel végeztem (lásd 2.2. fejezet). Három különböző emulgeálószerrel, a PVA-t, a Tween 80-at és a Pluronic F68-at vizsgáltam az előállítási folyamat során. A nanoprecipitációs eljárásban a Tween 80 emulgeátor nagy méretű nanorészecskéket eredményezett. Bár a PVA felületaktív anyag alkalmazása is szubmikron méretű nanorészecskéket eredményezett, a legkisebb méretű nanorészecskéket Pluronic F68 használatával állítottam elő (**12. ábra**), így a továbbiakban ezt használtam.



12. ábra: PVA alapú nanorészecskék méreteloszlása PVA, Tween 80 és Pluronic F-68 tartalmú emulgeátor közegben

Az előállítási folyamat optimalizálása során a Pluronic F68 koncentrációját a vizes fázisban 0,5-5,0% tartományban változtattam, hogy megtaláljam az optimális emulgeálószer-koncentrációt. A méretben 2%-os felületaktív anyag koncentrációnál találtam egy minimum értéket (**13. ábra**), azonban a méreteloszlásban egy kis csúcs látható a mikronos mérettartományban. Ezt tükrözi a 0,2-nél nagyobb PDI érték is (**7. táblázat**), amely a nanorészecskék vagy a külön kicsapódott sorafenib részecskék agglomerációjának tulajdonítható.



13. ábra: Különböző koncentrációjú PF-68 közegben előállított PVA alapú nanorészecskék méreteloszlása

A **7. táblázat** alapján megállapítható, hogy az 1%-os Pluronic F68 koncentráció optimális a nanorészecske előállításához ebben az eljárásban. A nanorészecskék morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal követtem nyomon, amely többnyire szubmikron méretű részecskék képződését jelezte a dinamikus fényszórási módszerrel végzett mérési eredményekkel összhangban.

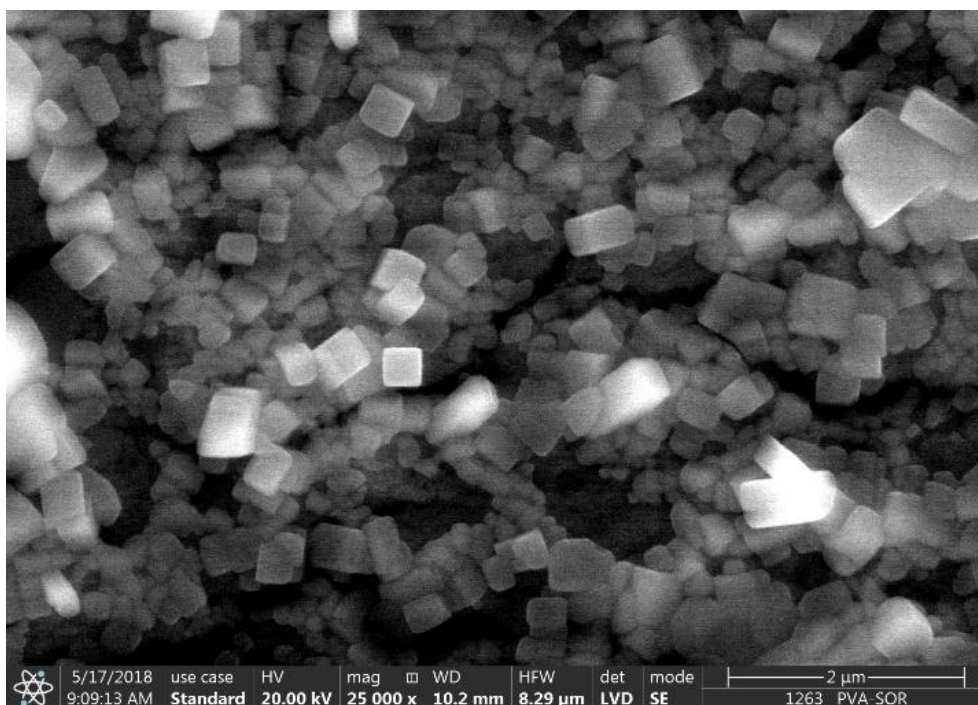
Emulgeátor koncentráció (%)	Intenzitás szerinti eloszlás (nm)	PDI	Zeta-potenciál (mV)
0,5	306,1	0,179	- 0,18
1	271,2	0,142	- 0,45
2	225,2	0,216	- 0,53
5	430,0	0,376	- 0,92

7. táblázat: Intenzitás szerinti méreteloszlás, PDI és zeta-potenciál értékek különböző összetételű Pluronic F68 emulgeátor közegben létrehozott nanorészecskék esetén

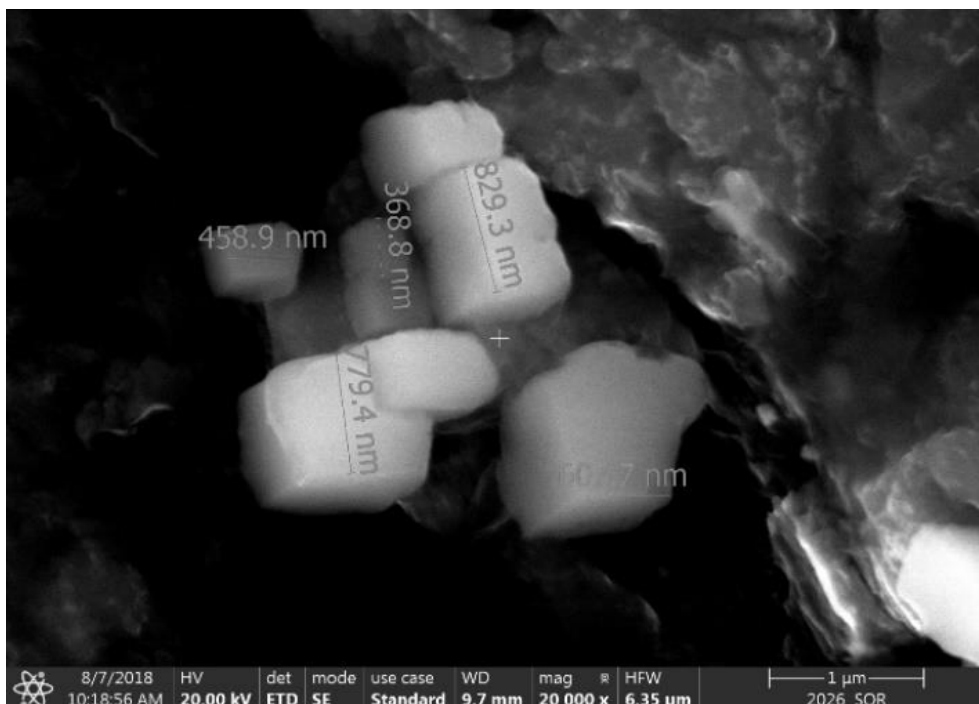
Érdekes módon a részecskék többsége köbös alakot mutatott (**14. A ábra**), ami meglehetősen szokatlan a polimer nanorészecskék között [101,102,103]. Ellenőrzésképp a kísérletet végrehajtottam azonos körülmények között, a PVA-5 polimer elhagyásával is. Ekkor a sorafenib ugyan köbös kristályokat is termelt (**14. B ábra**), de ezek mérete lényegesen nagyobb volt, átlagosan 1,45  $\mu\text{m}$  átmérőjű, míg a polimert és a sorafenibet egyaránt tartalmazó kompozitok átlagos mérete optimálisan 225-271 nm volt. Ez azt jelenti, hogy meglepő módon

a polimer nanorészecskék is felvették a sorafenib kristályok alakját, azonban jelentősen csökkentett méretben.

A



B



14. ábra: PVA-5 kapszulázó polimerrel készült, köbös alakú, sorafenib tartalmú nanorészecskék (A) és sorafenib kristályok (B).

A kapszulázási hatékonyság 2%-os Pluronic F68 koncentrációnál érte el a maximumot (8. táblázat), és mivel a nanorészecskék hozama nem változott jelentősen az emulgeálószer-

koncentráció növelésével, a hatóanyagtartalom is ennél a felületaktív anyag koncentrációnál volt a legmagasabb (12,0%). A kapszulázott hatóanyag aránya jelentősen csökkent, amikor az emulgeálószer-koncentráció 5%-ra emelkedett, ami a sorafenib magas emulgeálószer-koncentráció miatti megnövekedett oldhatóságával magyarázható. A PVA-5-sorafenib nanorészecskék zeta-potenciál értéke (**7. táblázat**) MilliQ vízben nem utalt elektrosztatikus stabilizálásra. A nanorészecske szuszpenziók azonban nem mutattak aggregációt az emulgeálószer oldatában egy nap alatt vagy a vérplazmában a kibocsátási vizsgálat során, ami a nem ionos emulgeátor szterikus stabilizálásával magyarázható.

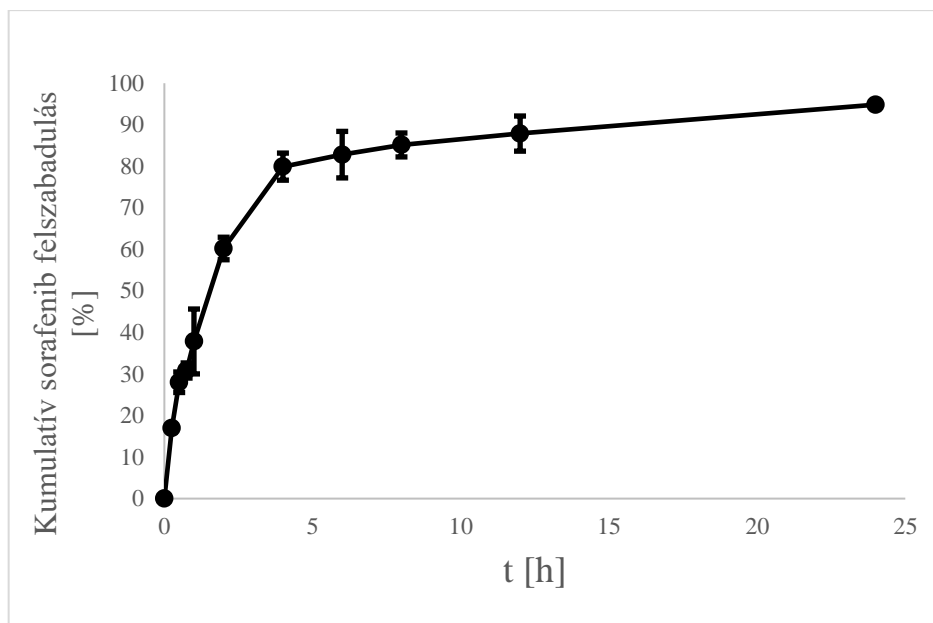
Emulgeátor koncentráció (%)	Kapszulázási hatékonyság (%)	Hozam (%)	Hatóanyagtartalom (%)
0,5	52,2	70,4	6,8
1	82,1	69,4	10,7
2	93,6	71,1	12,0
5	74,7	68,9	9,9

8. táblázat: Kapszulázási hatékonyság, hozam és hatóanyagtartalom az emulgeátor szer összetételének függvényében

#### 4.1.1 A PVA-5-sorafenib nanorészecskék bioreleváns gyógyszerfelszabadulása.

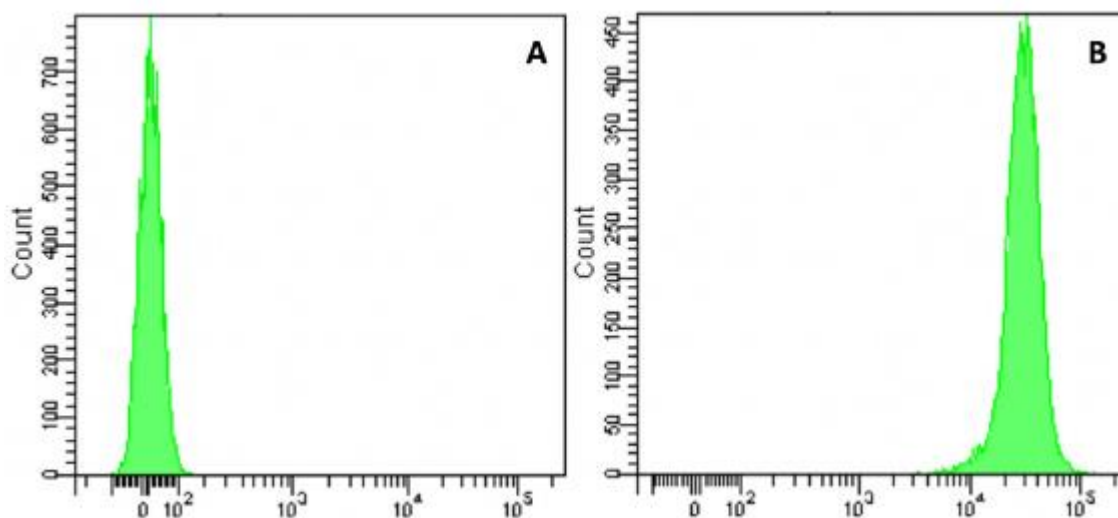
Az előállított nanorészecskék sorafenib felszabadulását bioreleváns körülmények között vizsgáltam humán vérplazmában. A nanorészecskékből egy napon belül viszonylag gyorsan szabadult fel a hatóanyag (**15. ábra**). A gyors kioldódás magyarázata lehet, hogy a vérplazma közeg sok olyan fehérjét tartalmaz (albuminok), amelyek felületaktív anyagként is viselkedhetnek, így a szolubilizáció révén felgyorsíthatják a sorafenib oldódását. Bizonyított, hogy a szérumfehérjék hajlamosak kölcsönhatásba lépni a sorafenibbal [100].





15. ábra: Sorafenib kioldódása PVA alapú nanorészecskékből

4.1.3 A PVA-5-sorafenib nanorészecskék karcinóma sejtek általi felvétele és citotoxicitása  
 HT-29 adenokarcinóma sejtekkel vizsgáltam a tumorsejtek általi nanorészecske felvételt. A vizsgálatok során a 24 órás inkubációs idő alatt az összes sejt elnyelte a fluoreszcensen jelölt, sorafenibbel töltött PVA-5 nanorészecskéket (16. ábra). A két hisztogramot összehasonlítva látható, hogy a csúcsok között nincs átfedés, ami azt jelenti, hogy a jelölt nanorészecskékkel való inkubáció után minden sejt tartalmazta a fluoreszcens festéket.



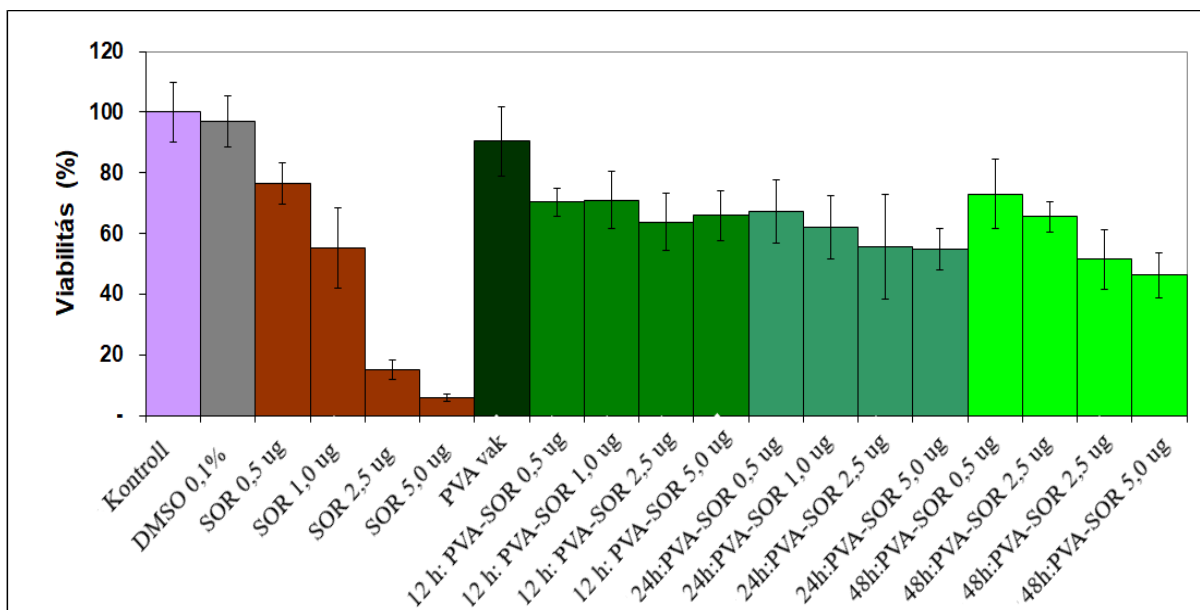
16. ábra: Áramlási citométerrel mért fluoreszcens intenzitás kontroll (A) és fluoreszcens festékkel jelölt nanorészecskékkel kezelt (B) sejteken.



#### 4.1.4 Citotoxicitási vizsgálatok

A citotoxicitási teszteket szintén HT-29 adenokarcinóma sejteken végeztem, különböző hatóanyag-koncentrációk alkalmazásával. Sorafenib oldatot adtam a sejtekhez DMSO oldatban (a DMSO közös oldószere mind a polimer hordozónak, mind a gyógyszerhatóanyagnak), ezért az azonos koncentrációjú (a tápközeg térfogatára vonatkoztatva 0,5%) DMSO hatását is vizsgáltam, és azt találtam, hogy nem fejtett ki szignifikáns toxikus hatást.

A hatóanyag nélküli üres PVA-5 nanorészecskék sem csökkentették jelentékeny módon a sejtek életképességét a nem kezelt sejtekhez képest (negatív kontroll). A várakozásoknak megfelelően a sorafenib oldat és a nanorészecskék is koncentrációfüggő citotoxicitást mutattak. A nanorészecskék esetében azonban az életképesség kisebb mértékben csökkent, valószínűleg a hatóanyag elhúzódo felszabadulása miatt. A toxikus hatás 48 óra elteltével kifejezettebb lett. Bár kioldódási vizsgálatok alapján az összes gyógyszer egy napon belül felszabadul, a rendelkezésre álló gyógyszerkoncentráció néhány órán keresztül lényegesen alacsonyabb lehetett, mint a sorafenib oldat esetében. A sejtek általi felvétel sebessége is befolyásolhatta a nanorészecskék citotoxicitását, melyet a **17. ábrán** mutatok be.



17. ábra: Sorafenib és PVA alapú, sorafenib tartalmú nanorészecskék citotoxikus hatása

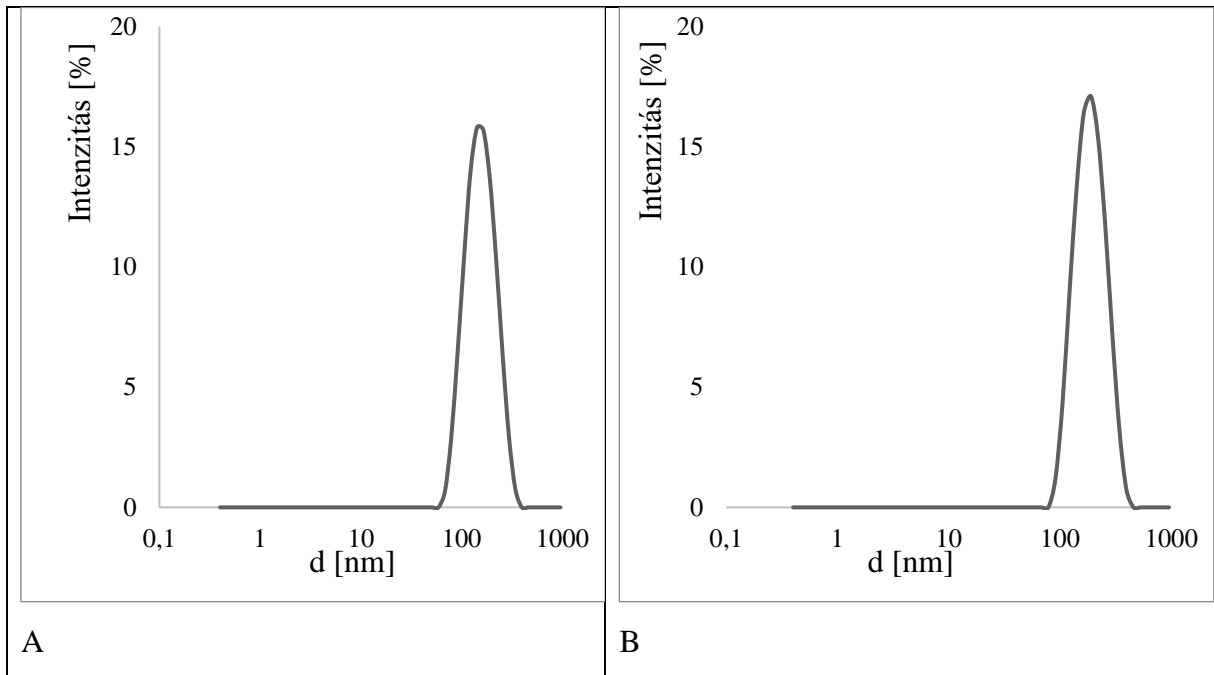
## 4.2 PLGA és PEG-ilált PLGA alapú nanorészecskék vizsgálata

### 4.2.1 Méret, hozam, gyógyszerkapszulázási hatékonyság és hatóanyag-tartalom

A 10 nm-nél kisebb részecskék a vesén keresztül gyorsan kiürülnek [47], míg a kb. 300 nm-nél nagyobb átmérőjű nanorészecskék immunválaszt válthatnak ki: a retikuloendoteliális rendszer (RES) falósejtjei könnyen felismerik és eltávolítják a vérkeringésből [48]. Így a 10 és 300 nm közötti nanorészecskéknek van esélyük a patológiás angiogenezis következtében perforált érrendszerből a tumor mikrokörnyezetébe jutni. Ezért lehetőleg 250 nm-nél kisebb méretű és negatív felületi töltésű nanorészecskék előállítását tűztem ki célul, mely a töltése révén a fehérje adszorpciót is gátolja. Alacsony molekulatömegű PLGA polimerekkel, mint például a Resomer RG 502H és a Resomer RG 752H, a tipikus elérhető részecskeméretetek 60-200 nm [49]. Bár a Resomer RG 502H PLGA lényegesen nagyobb kapszulázási hatékonyságot biztosított, mint a Resomer RG 752H PLGA, mérete (164,6 nm) és polidiszperzitási indexe (PDI) (0,203) szignifikánsan nagyobb volt a Resomer RG 752H PLGA polimerrel elérhető értékeknél (**9. táblázat**). A viszonylag magas PDI a nagyobb részecskék jelenlétét jelezte, amelyek aggregációval, valamint az oldószer elpárolgása során a hatóanyag polimertől elkülönülten fellépő kicsapódásával képződnek, amit a méreteloszlások is alátámasztanak (**18. ábra**). Ilyen magas PDI értékeket is találtunk előzetes nanoprecipitációs kísérleteinkben, illetve például Lin és mtsai. kísérleteiben, akik PLGA-sorafenib nanorészecskéket készítettek nanoprecipitációval (PDI 0,21–0,35) [50].

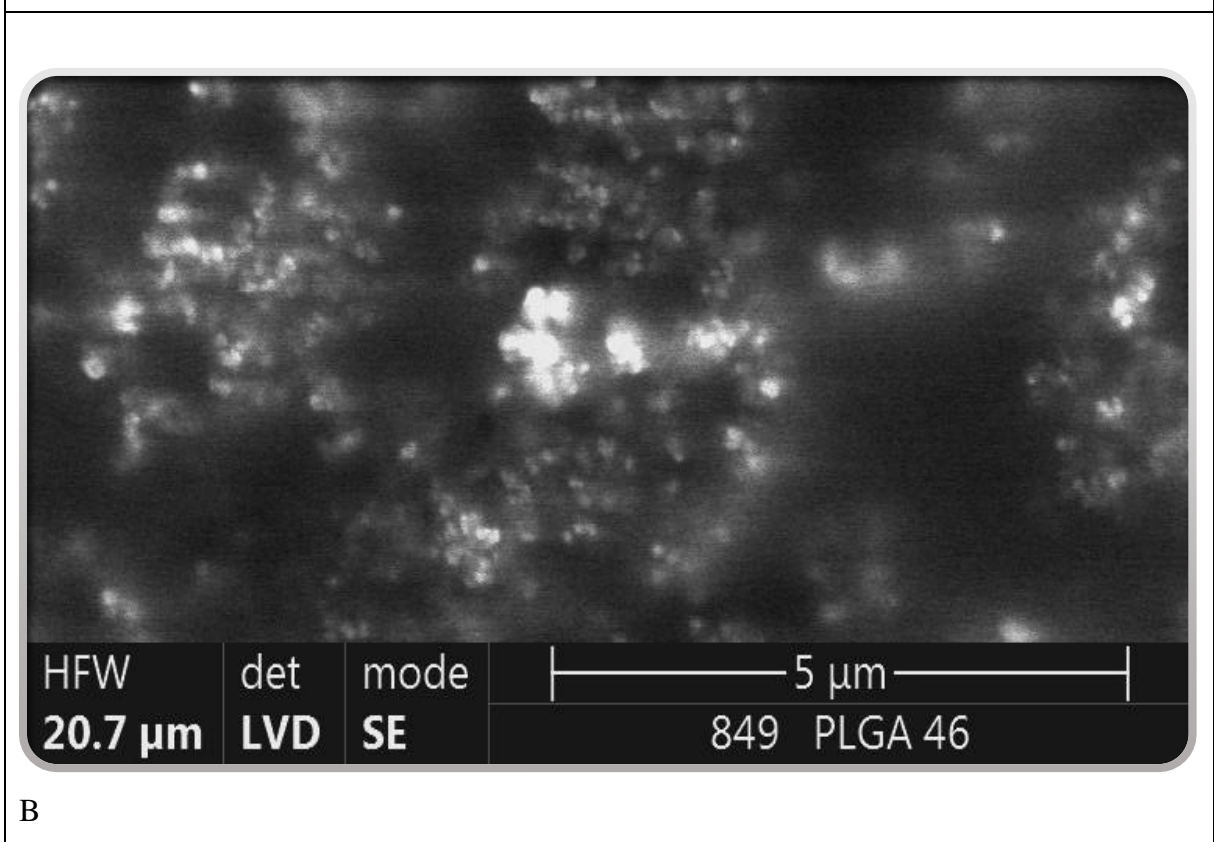
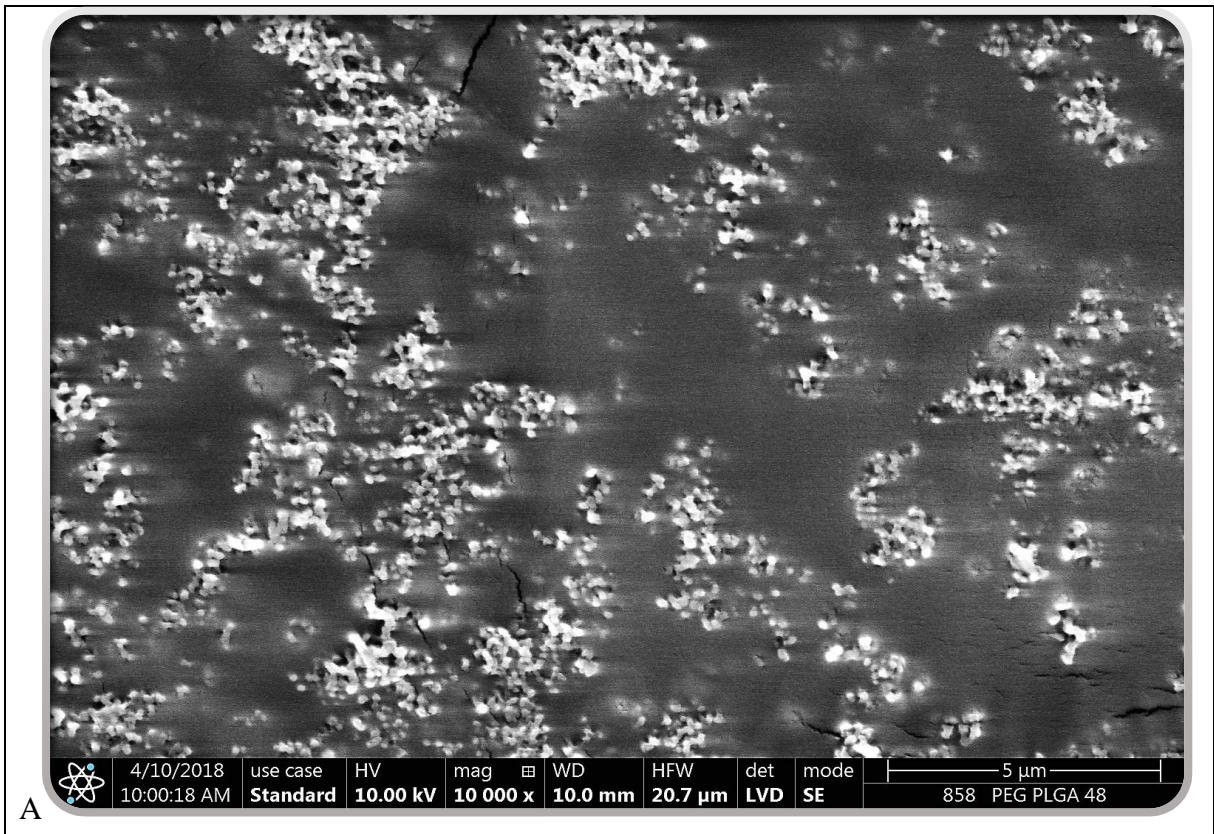
Polimer:	PLGA RG 502H	PLGA RG 752H	PEG-PLGA
Hozam [%]	70,0	49,7	75,3
Hidrodinamikai átmérő [nm]	164,6	142,4	177,2
Polidiszperzitási index (PDI)	0,203	0,123	0,076
Zeta-potenciál	-	-17,6	-18,8
Kapszulázási hatékonyság (DOX) [%]	74	52	69
Kapszulázási hatékonyság (SOR) [%]	67	55	88
DOX tartalom [%]	4,81	4,76	4,17
SOR tartalom [%]	4,35	5,03	5,31

9. táblázat: Doxorubicin (DOX) és sorafenib (SOR) nanorészecskék hozama, mérete, polidiszperzitási indexe (PDI), kapszulázási hatékonysága és hatóanyag-tartalma



18. ábra: Hatóanyagokat tartalmazó PLGA 752H (A) és Resomer RGP d 5055 PEG-ilált PLGA (B) nanorészecskék méreteloszlása

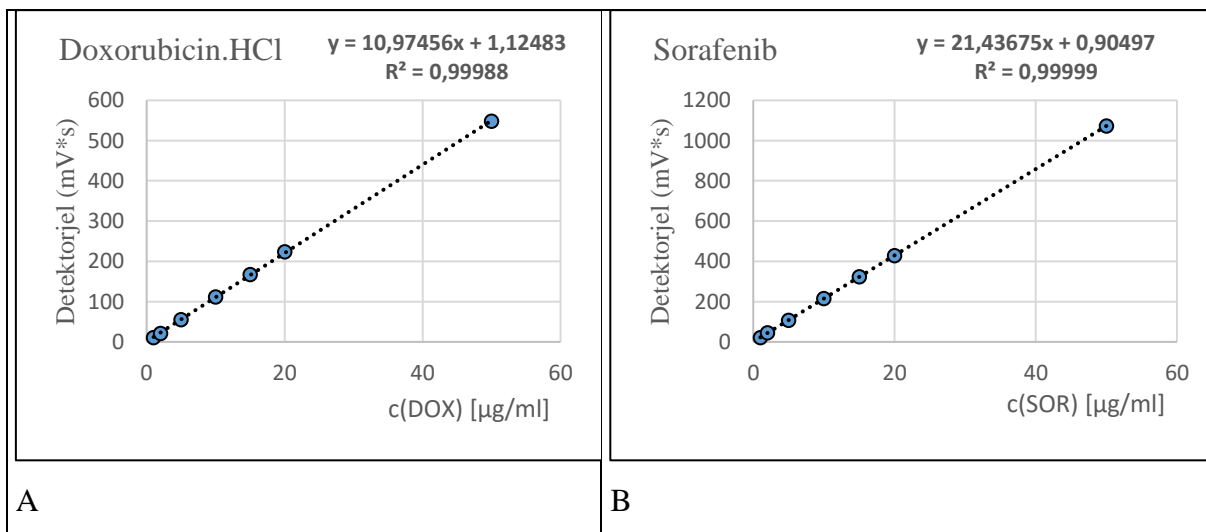
A nanorészecskékről készült SEM felvételek (**19. ábra**) lényegesen kisebb nanorészecskékre utaltak, mint a dinamikai fényszórásméréssel (DLS) kapott eredmények (**9. táblázat**). Ez a jelenség általánosnak mondható, mivel a DLS módszer a nanorészecskék hidrodinamikai átmérőjét méri, miközben a SEM felvétel száraz állapotban mutatja azokat. Nem zárható ki, hogy egyes kisebb részecskék aggregációja előfordult, ami a DLS vizsgálat során nagyobb méretre is utalhat. Zeta-potenciál mérés során a kétféle nanorészecske zeta-potenciál értékei között nem találtam számottevő eltérést: -17,6 mV (PLGA) és -18,8 mV (PEG-PLGA) eredményeket mértem.



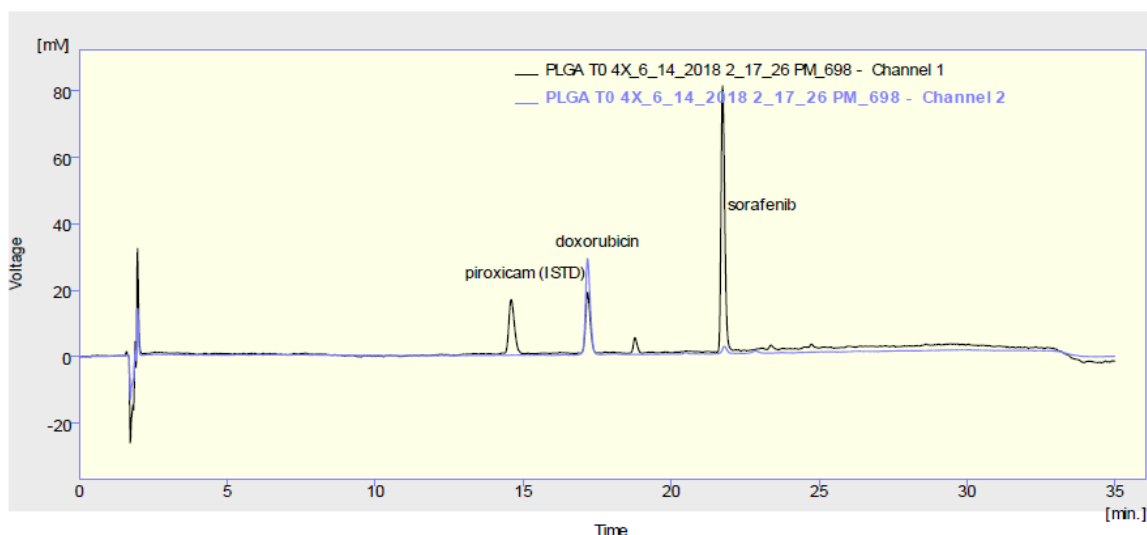
19. ábra: Hatóanyagot tartalmazó PLGA (A) és PEG-PLGA (B) alapú nanorészecskékről készült SEM felvételek

Kapszulázási hatékonyság és hatóanyag-tartalom meghatározásához először UV-vis spektrofotometriát alkalmaztunk. A sorafenib hatóanyag az UV tartományban mutat jelentős elnyelést ( $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ ), a doxorubicin koncentrációja pedig mérhető a látható tartományban ( $\lambda_{\max} = 480 \text{ nm}$ ). Azonban a doxorubicin szintén mutat elnyelést ugyanabban az UV-tartományban ahol a sorafenib, ezért a méréseket a 2.4. fejezetben írtak szerint lehet kivitelezni. Nagy mintaszámok esetén a módszer nehézkes, így a továbbiakban folyadékkromatográfiás módszert alkalmaztam mindkét hatóanyag koncentrációjának meghatározásához. A folyadékkromatográf (Young Lin YL 9100, YL Instruments Co., Ltd., Gyeonggi-do, Korea) UV-vis detektora két hullámhosszra állítható be egyidejűleg, így a sorafenib koncentrációt 280 nm hullámhosszon mértem, míg a doxorubicint 480 nm-en analizáltam. A mérőgörbéket a **20. ábra** tartalmazza. Belső (injektálási) standardként piroxicam nevű gyógyszerhatóanyagot használtam, melynek UV tartományban van elnyelése. A belső standard vegyületként használt piroxicam (1. csúcs) retenciós ideje ( $t_R$ ) 14,58 min, míg a doxorubicin-hidroklorid (2. csúcs)  $t_R = 17,13 \text{ min}$  és a sorafenib (3. csúcs)  $t_R = 21,68 \text{ min}$  retenciós idővel ért át a folyadékkromatográfiás oszlopon.

A jellemző kromatogramot a **21. ábrán** mutatom be.



20. ábra: Doxorubicin (A) és sorafenib (B) kalibrációs görbéje HPLC-UV-vis mérés során



21. ábra: PLGA alapú, doxorubicin és sorafenib hatóanyagtartalmú oldat HPLC analízisekor kapott kromatogram. A fekete vonal (channel 1) az UV detektor, a kék vonal a látható tartományban levő értékeket mutatja.

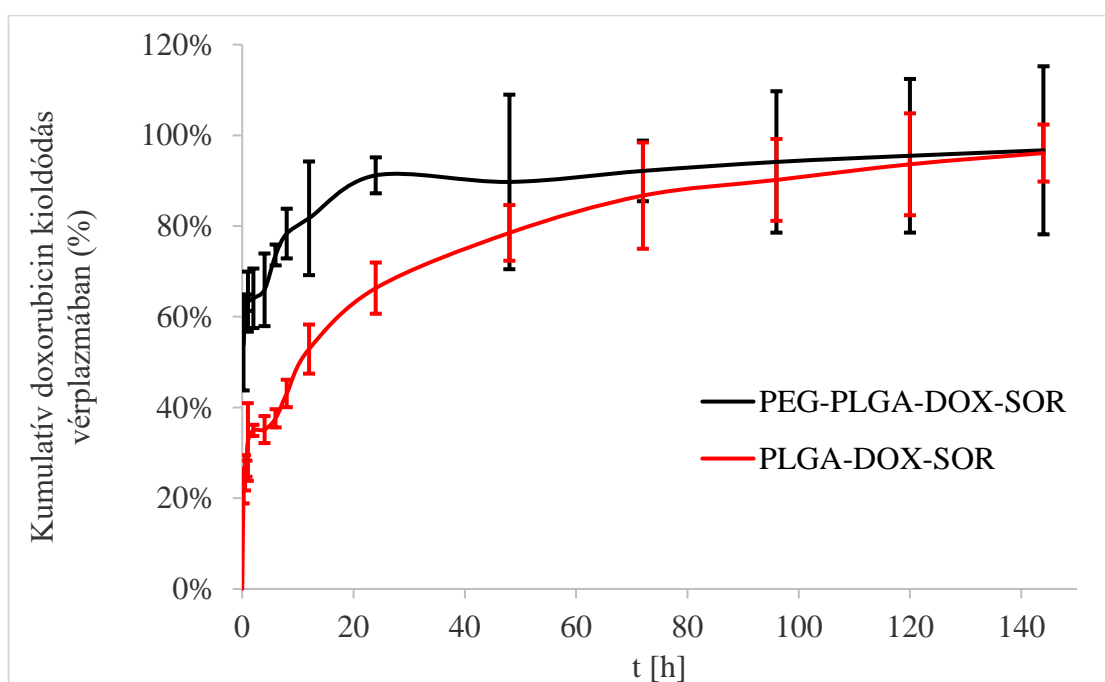
A legmagasabb polimer hozamot (75,3%) és a sorafenib kapszulázásának hatékonyságát (88%) a PEG-PLGA polimer érte el (**9. táblázat**). Doxorubicin kapszulázási hatékonysága is kielégítő (69,0%). Egyértelmű összefüggés figyelhető meg, még hozzá minél nagyobb a hozam, annál nagyobb a kapszulázott hatóanyag mennyisége a termékben: 4,81% (m/m), 4,76% (m/m) ill. 4,17% (m/m) a doxorubicin, 4,35% (m/m), 5,03% (m/m) ill. 5,31% (m/m) a sorafenib tartalom sorjában Resomer RG 502H PLGA, a Resomer RG 752H PLGA, illetve PEG-PLGA kopolimerek esetében.

Mennyiségileg hasonló kapszulázási hatékonyság értékek találhatóak a nanomedicinák szakirodalmában: Malarvizhi és mtsai 2,4% (sorafenib) ill. 3,0% (doxorubicin) [58], Perveen és mtsai 9,9% (epirubicin) [114], Pieper és mtsai 6,66% ill. 5,09% (doxorubicin) [115] értékeket érték el, 10% feletti értékeket az általam használt technikákkal készült nanorészecskék szakirodalmában nem találtam.

#### 4.2.2 Kioldódási vizsgálatok

Az előzetes vizsgálatok során azt találtam, hogy a Resomer RG 752H PLGA felszabadulási profilja sokkal előnyösebb, mint a Resomer RG 502H PLGA-é, mert a Resomer RG 502H PLGA nagy kezdeti hatóanyag lemosódást mutatott, majd a felszabadulási sebesség a továbbiakban mérsékelt volt. Így Resomer RG 752H és a PEG-PLGA kopolimer alapú nanorészecskéket vizsgáltam bioreleváns körülmények között a gyógyszerfelszabadulás szempontjából. A sorafenib és a doxorubicin felszabadulásának mértékét HPLC-vel, közvetett módon határoztam meg. A 2.4. fejezetben leírt módon a nanorészecskéket a kísérleti közeghez

(ecetsavas puffer ill. vérplazma) adtam, majd előre meghatározott időpontokban mintákat vettem belőle és a már leírt módon előkészítettem azokat HPLC analízisre. A HPLC analízissel követtem nyomon, hogy a nanorészecskékben levő hatóanyag mekkora hányada oldódik ki az idő függvényében a kísérleti közegbe. A vett mintákból a bennük levő még nem lebomlott nanorészecskékben levő hatóanyagot határoztam meg, majd ezt viszonyítottam a kezdeti hatóanyag mennyiséghez. A kettő közti különbség jelentette a már kioldódott hányadot. Vérplazmában a vízben oldódó doxorubicin-hidroklorid gyógyszer esetében a hidrofilebb PEG-PLGA hordozóból gyorsabb kezdeti lemosódást (burst effect) figyeltem meg, mint a PLGA alapú nanorészecskékénél: míg a PEG-PLGA-nál  $54\pm 10\%$ -os kezdeti értéket mértem, addig a PLGA-nál  $23\pm 4\%$  volt tapasztalható (**22. ábra**).



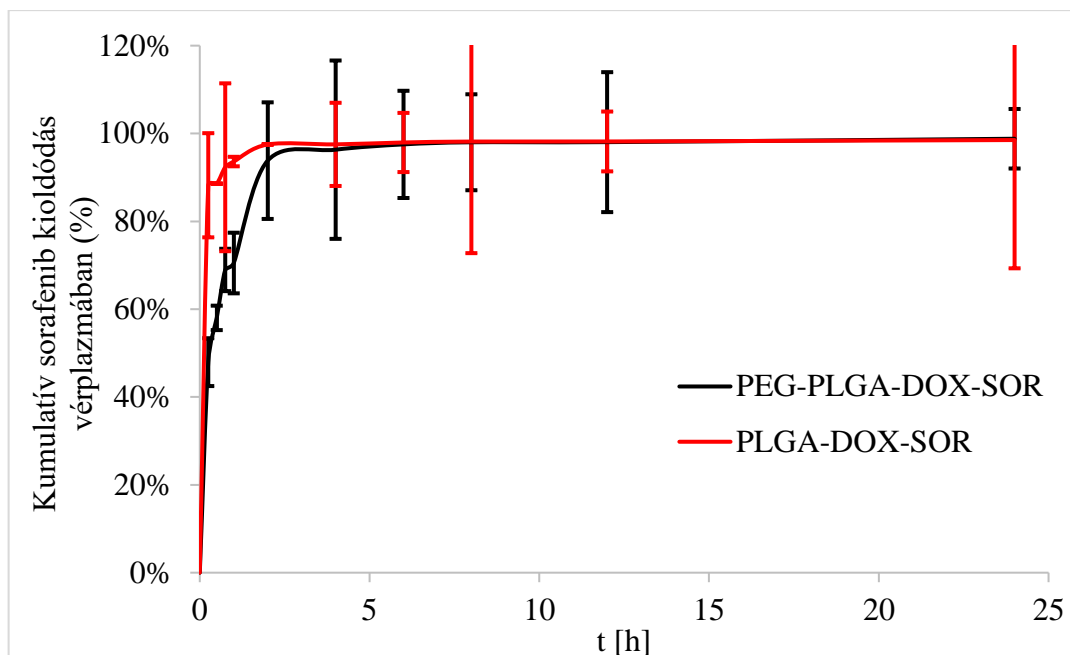
22. ábra: Doxorubicin kioldódása vérplazmában PLGA és PEG-PLGA nanorészecskékből

A kezdeti lemosódás után mindkét típusú nanorészecske esetében nyújtott, egyenletes felszabadulás volt tapasztalható a vizsgálat végéig (1 hét), mely alatt a doxorubicin szinte teljes mennyisége ( $96\pm 6\%$  PLGA és  $97\pm 19\%$  PEG-PLGA hordozó esetén) kioldódott.

A sorafenib hatóanyag sokkal gyorsabban szabadult fel mindkét hordozóból (**23. ábra**)

A kezdeti lemosódás a PLGA és PEG-PLGA esetében is jóval erőteljesebb volt:  $88\pm 12\%$ , illetve  $48\pm 5\%$ . A kezdeti lemosódás elsősorban a részecske előállítás során a felületre került és ott gyengén kötött (adszorbeálódott) hatóanyag gyors felszabadulásának az eredménye. A várakozásunk az lett volna, hogy a hidrophil doxorubicin az előállítás során a hidrofilebb PEG-ilált nanorészecskék esetén kevésbé kerül a felületre.





23. ábra: Sorafenib kioldódása vérplazmában PLGA és PEG-PLGA nanorészecskékből

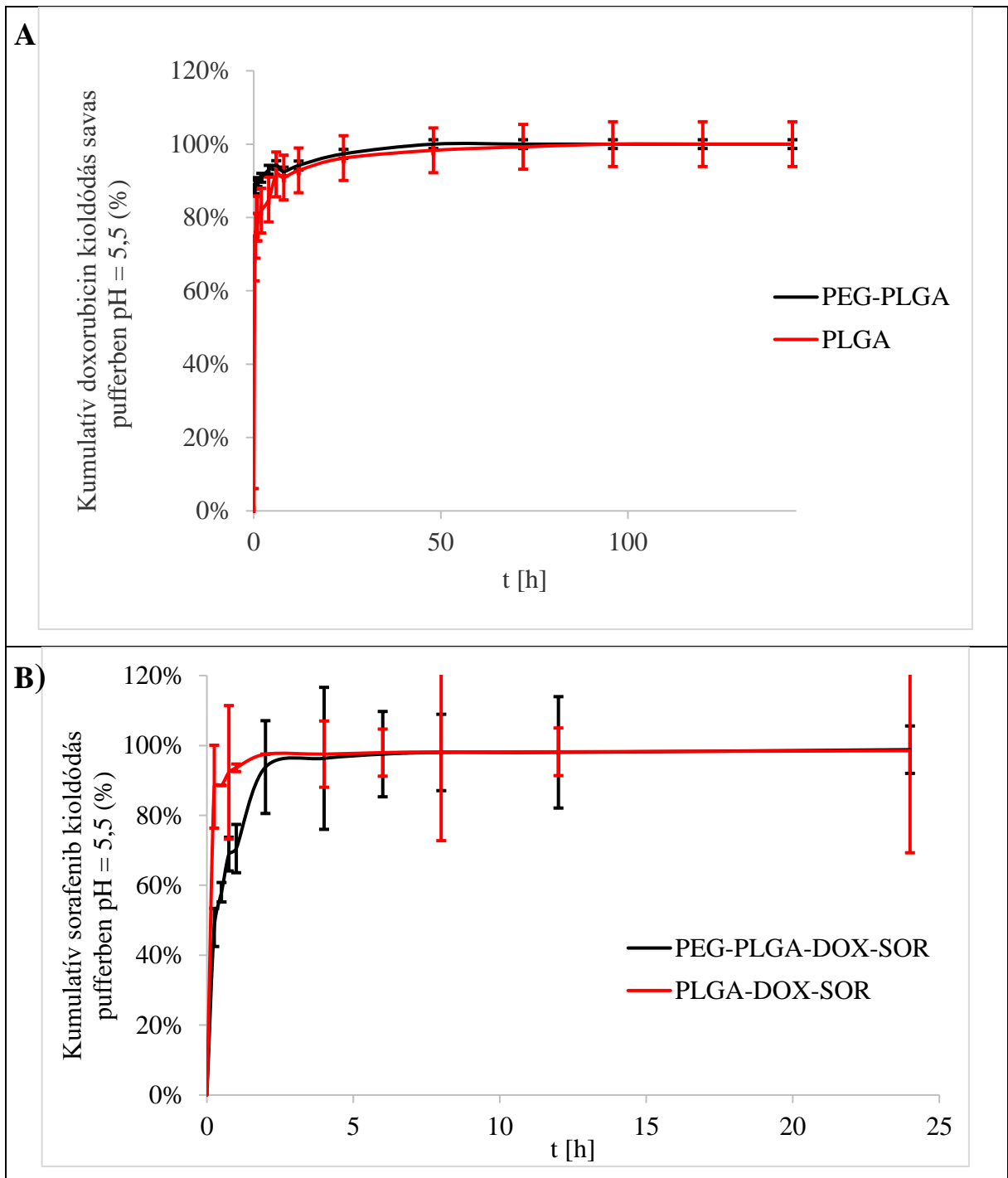
Mivel az előállítás során az összetett emulziós módszer során a belső vizes fázisban oldott doxorubicinnek át kell diffundálnia a szerves fázison ahhoz, hogy kijusson a külső vizes fázisba, így a szerves oldat viszkozitása nyilvánvalóan fontos szerepet játszik a hatóanyag átdiffundálásában. A RGP d 5055 PEG-PLGA viszkozitása 0.93 dl/g, míg a Resomer RG 752H viszkozitása csak 0.14–0.22 dl/g.

A polimerek glikolid és a laktid arányának megválasztása különböző összetételekben lehetővé teszi a kristályossági fok szabályozását. Amikor a kristályos poli-glikolsavat kopolimerizálják a poli-tejsavval, a kristályosság foka csökken; következésképpen a hidratációs sebesség és a hidrolízis fokozottabb lesz. Így a kopolimer lebomlási ideje összefügg a felhasznált monomerek arányával. Általában minél magasabb a glikolid tartalom, annál gyorsabb a lebomlás [51]. A Resomer RG 752H polimerben, amelyet mátrixként használtam, a laktid:glikolid arány 75:25; ezért lassabb felszabadulásra számítottam, különösen a sorafenib esetében. A rendkívül gyors sorafenib felszabadulás valószínű oka, hogy a doxorubicin miatt beépüléskor a sorafenib nagy része a nanorészecskék felületén csapódott ki, ahonnan a sorafenib és a szérumban albumin erős kölcsönhatása miatt könnyen leoldódott a vérplazmába [52].

A hatóanyagok felszabadulását savas körülmények között is vizsgáltam, mivel a tumor mikrokozonyzata savas kémhatású [53]. A savas pufferben a felszabadulási jellemzőket éppen ellentétesnek találtuk az emberi vérplazmában tapasztaltakhoz képest. A doxorubicin 1 napon belül felszabadult mindkét kapszulázó polimer esetében (24. ábra). A sorafenib felszabadulása 6 nap elteltével fejeződött be. A PEG-PLGA hordozó lényegesen gyorsabb felszabadulást tett



lehetővé a PLGA hordozóhoz képest, különösen a sorafenib esetében. A sorafenib esetén szintén a várakozással ellentétben, a polárisabb hordozó mutatott lassabb hatóanyagfelszabadulást. Mivel ennek a kapszulázási hatékonysága és a sorafenib tartalma is lényegesen magasabb volt, mint a vizsgált PLGA polimereké, ezért azt gondoljuk, hogy talán a jóval magasabb polimer viszkozitás ez esetben is szerepet játszott abban, hogy kevesebb hatóanyag került a hordozó felületre és lényegesen több diszpergálódott a polimerben.



24. ábra: Doxorubicin (A) és sorafenib (B) kioldódása savas pufferben PLGA és PEG-PLGA nanorészecskékből

#### 4.2.3 Sejtek nanorészecske felvétele

Áramlási citometriát használtam HT-29 humán adenokarcinóma sejtvonal in vitro nanorészecske felvételének tanulmányozására. A 3.6. fejezetben leírt módszer szerint cianin-5-aminnal konjugált nanorészecskékkel való 1 napos inkubálás után citométerrel (BD FACSAria III Cell sorter, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) az összes élő sejtet különválogattam miközben mértem a fluoreszcens intenzitást. Csak a sejtek által felvett nanorészecskék mennyisége között volt különbség, melynek mértékét a fluoreszcens intenzitásértékek különbsége fejez ki. Lényegesen nagyobb mennyiségben vették fel a PEG-PLGA-ból készített nanorészecskéket a HT-29 sejtek, mint a PLGA-val készített nanorészecskéket. Az eredményeket a **10. táblázat** szemlélteti. Említésre méltó, hogy a gyógyszer tartalmú nanorészecskéket lényegesen nagyobb mértékben vették fel a sejtek, mint a vak nanorészecskéket, mely jelenség a nanorészecskék különböző felületi jellemzőinek következménye lehet.

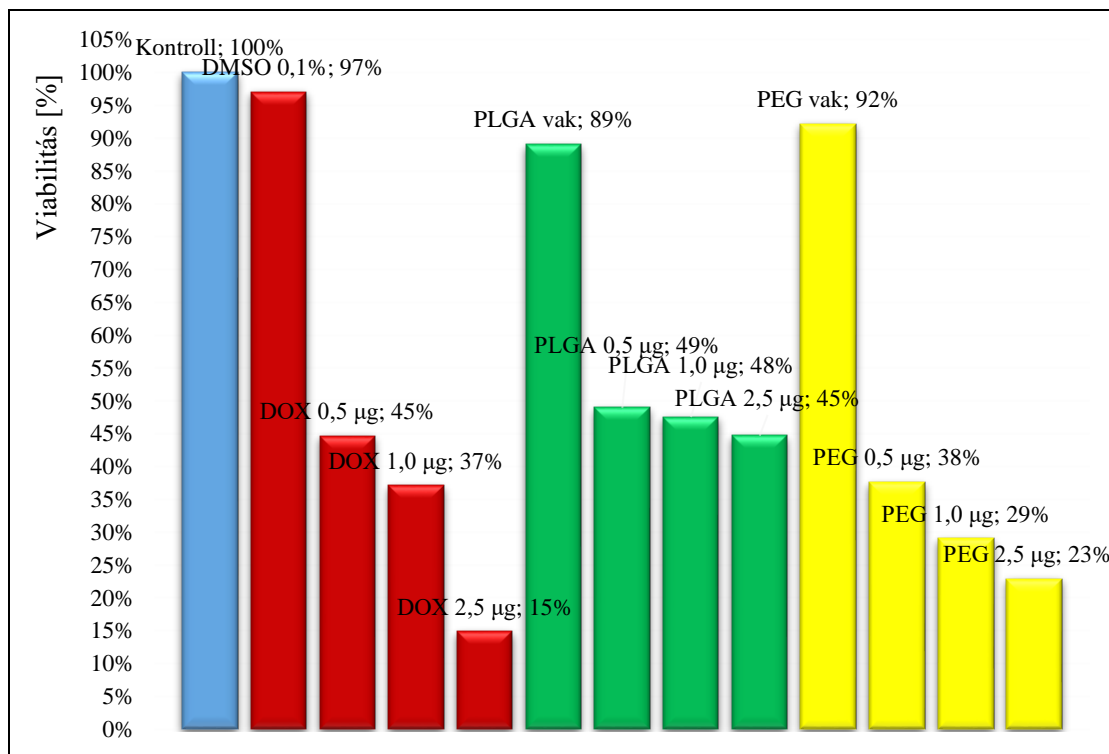
	Kontroll	PLGA vak	PLGA-DOX-SOR	PEG-PLGA vak	PEG-PLGA-DOX-SOR
fluoreszcens intenzitás átlag	22	17105	22243	21846	45765
szórás (%)	4,5	1,7	30	3,9	24,8

10. táblázat: Fluoreszcens intenzitás értékek HT-29 sejtek által felvett doxorubicint és sorafenibet tartalmazó és vak poli(tejsav-glikolsav) (PLGA) és polietilén-glikol-poli(tejsav-glikolsav) (PEG-PLGA) nanorészecskékkel.

#### 4.2.4 Citotoxicitás vizsgálata

Az oldatban eredeti formában lévő hatóanyagok és nanorészecskébe mikrokapszulázott hatóanyagok citotoxikus hatásának meghatározása szintén HT-29 sejtvonalon történt MTT teszt segítségével. A hatóanyag tartalmat a **8. táblázatban** található összetételek alapján, doxorubicinre nézve számítottam ki és adagoltam, PLGA hordozó esetén 1 µg DOX-ra 1,05 µg SOR jut, PEG-PLGA hordozó esetén 1 µg DOX-ra 1,27 µg SOR hatóanyaggal számolhatunk. A **25. ábrán** látható módon a sejtek életképesek maradtak a negatív kontroll esetén, illetve a DMSO-val és a vak nanorészecskékkel kezelt cellákban. A növekvő doxorubicin és sorafenib koncentráció 15%-ra csökkentette az életben maradt sejtek számát. A gyógyszer tartalmú PLGA nanorészecskék mérsékelt koncentráció-függő citotoxicitást okoztak mindhárom

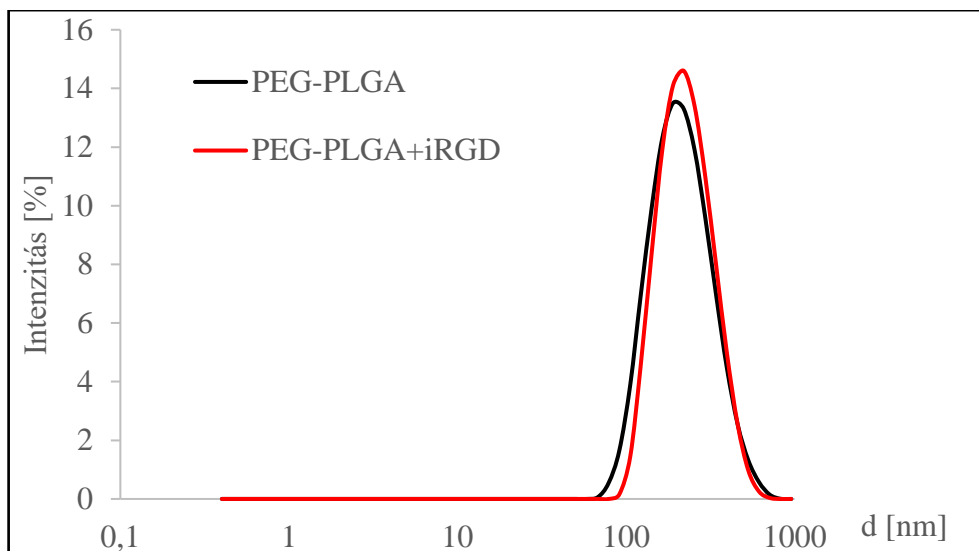
koncentrációsinten (viabilitás: 49-45%). A gyógyszerrel töltött PEG-PLGA nanorészecskék lényegesen (38-23%) nagyobb mértékben csökkentették a sejtek életképességét. A PEG-PLGA nanorészecskéknél mért magasabb toxicitás összhangban van a PLGA nanorészecskékhez képest tapasztalt gyorsabb gyógyszer kioldódással.



25. ábra: HT-29 tumorsejtek viabilitása MTT teszttel különböző mennyiségű hatóanyagot tartalmazó oldat (jelölés: DOX), -PLGA nanorészecske és -PEG-PLGA nanorészecske hatására.

#### 4.2.5 iRGD peptiddel felületmódosított PEG-PLGA alapú nanorészecskék vizsgálata

A korábbiakban létrehozott PEG-PLGA gyógyszerhordozó nanorészecskék iRGD-vel való felületkezelése után részecskeméret vizsgálatára került sor. Az eredeti eljárás során létrehozott átlagos átmérő 197,4 nm, míg a felületmódosított átmérő 225,2 nm-re növekedett, melyet a **26. ábrán** mutatok be.



26. ábra: PLGA és iRGD peptiddel felületmódosított PLGA nanorészecskék méreteloszlása

Sejtes vizsgálatokhoz négyféle mintát készítettem. Kontrollként kezeletlen HCT-116 sejtvonalból származó sejteket alkalmaztam. A nanorészecskékből azonos mennyiséget felületkezelttem cianin-5-amin festékkel illetve cianin-5-amin festékkel és iRGD peptiddel. Erre azért volt szükség, mert a fluoreszcens jelölés ugyanazon karbodiimides módszerrel zajlik, mint a peptidek kémiai kapcsolása, és elkerülendő, hogy egyik molekula a másikat kiszorítsa. A felületmódosításhoz a felhasznált polimeren levő, sztöchiometriailag számolható kötőhelyek mennyiségéhez képest mindkét komponensből feleannyi mol reagenst használtam, így feltételezve, hogy nem megy át a felület telítődésbe. A mérések során a **11. táblázat** szerinti eredményeket kaptam.

<b>Minta:</b>	<b>Nanorészecskéket felvett tumorsejtek [%]</b>
Kontroll	0
NP+Cy5 (100 µg)	5,5
NP+Cy5+iRGD (100 µg)	6,7
NP+Cy5+iRGD (200 µg)	11,9

11. táblázat: Fluoreszcensen jelölt nanorészecskéket felvett HCT-116 tumorsejtek aránya

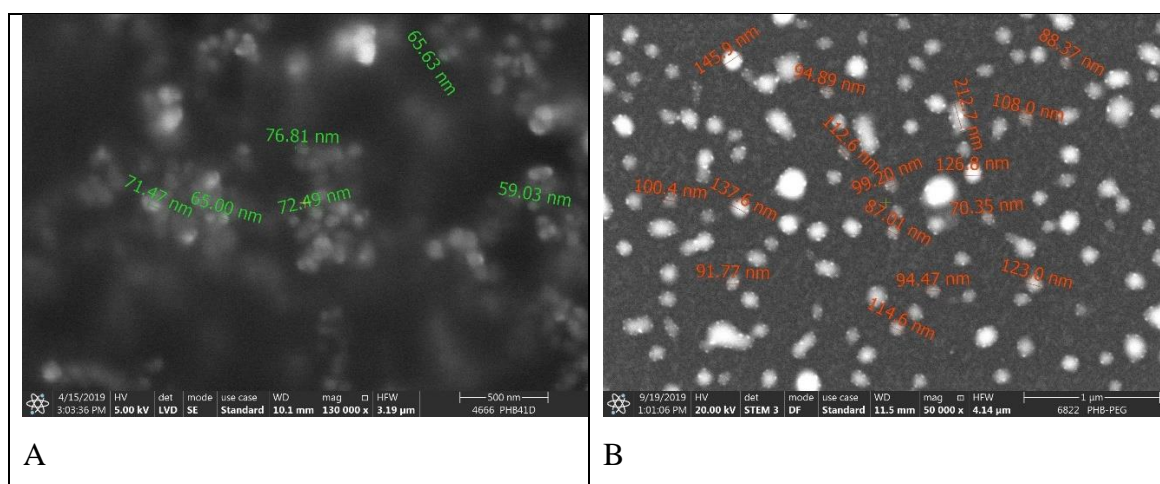
Az eredmények alapján az iRGD-vel felületmódosított nanorészecskéket a kontrollhoz képest nagyobb arányban vették fel a tumorsejtek.

Összességében megállapítható, hogy az eredeti eljárás további felületkezeléssel módosított változata is alkalmas gyógyszerhordozó nanorészecskék létrehozására, melyek fokozott mértékben képesek bejutni a tumorsejtek belsejébe.

### 4.3 PHB alapú nanorészecskék vizsgálata

#### 4.3.1 Méret és morfológia

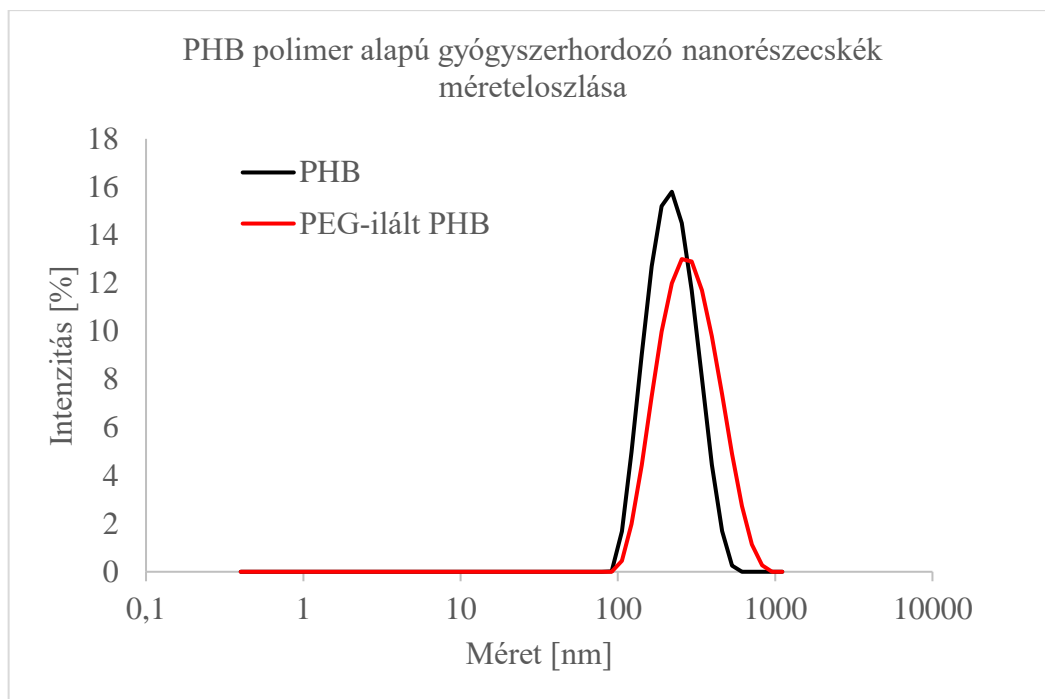
Sorafenib és doxorubicin rákellenes hatóanyagokat tartalmazó nanorészecskéket egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatásos módszerrel állítottam elő PHB kapszulázó polimer felhasználásával. A PHB-vel létrehozott nanorészecskék utólagos PEG-ilálását is vizsgáltam. Szkenning elektronmikroszkópos felvételeken mind a nem PEG-ilált (**27. A ábra**), mind a PEG-ilált (**27. B ábra**) nanorészecskék többnyire gömb alakúnak mutatkoztak. A nem PEG-ilált nanorészecskék kissé, míg a PEG-iláltak egyáltalán nem aggregálódtak.



27. ábra: PHB (A) és PEG-PHB (B) nanorészecskék valós mérete SEM felvételen

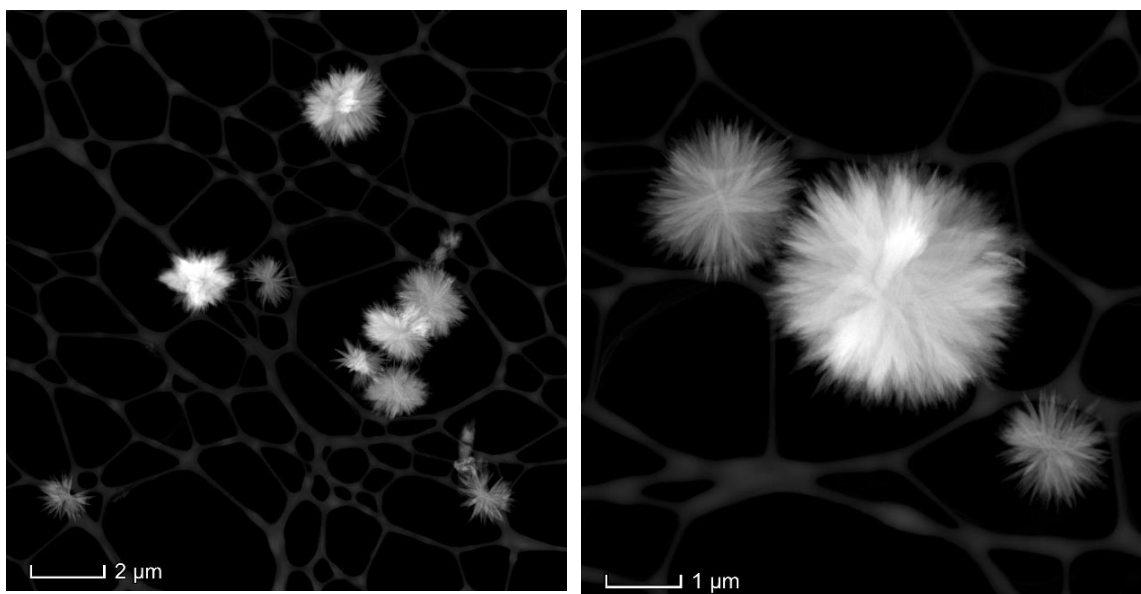
A PHB-sorafenib-doxorubicin nanorészecskék átlagos (hidrodinamikai) mérete  $199,3 \pm 6,5$  nm volt, monodiszperz eloszlás mellett (**28. ábra**) és alacsony PDI értékkel ( $0,071 \pm 0,016$ ). A PEG molekulákkal történő konjugáció  $250,5 \pm 5,2$  nm-re (PDI  $0,155 \pm 0,017$ ) növelte a részecskék méretét. A PEG-ilált PHB-sorafenib-doxorubicin nanorészecskék továbbra is a polimer nanorészecskék elvárt mérettartományában maradtak [54].

Az előállított nanorészecskék vizsgálatánál mindig fontos kideríteni, hogy a mért hatóanyagtartalom ténylegesen a gyógyszerhordozó rendszer mátrixában került kapszulázásra, vagy csak a nanorészecskék mellett helyezkedik el pl. kristályos struktúrákban. Ennek ellenőrzésére egyrészt a méreteloszlás vizsgálata szolgál, amely nem gömb alakú részecskék esetében téves információt szolgáltat, pl. pálcika alakú részecskék hosszát és szélességét mérve két nagy méretfrakciót jeleníthet meg.



28. ábra: PHB és PEG-ilált PHB nanorészecskék méreteloszlási diagramja

Egy másik lehetséges elemzési módszer az elektronmikroszkópos vizsgálat, amely ugyan nem a teljes sokaságra, de reprezentatív minta esetén megbízható információt szolgáltat. Harmadik eljárásként végrehajtottam a kísérletet kapszulázó polimer hozzáadása nélkül, de az eredeti paraméterekkel, és elektronmikroszkóp alatt vizsgáltam a hatóanyagok viselkedését. A doxorubicin oldat formájában távozott a rendszerből, a sorafenib viszont a **29. ábrán** látható módon néhány mikrométeres kristályokat képzett.



29. ábra: Sorafenib kristályok a kapszulázó polimer nélkül

#### 4.3.2 Hozam, kapszulázási hatékonyság, hatóanyagtartalom

Az olyan fontos paraméterek, mint a hatóanyagtartalom és a kapszulázási hatékonyság jelzik a gyógyszerhordozó rendszer minőségét és az előállítás gazdaságosságát. A vizsgálat során a sorafenibet és doxorubicint tartalmazó PHB nanorészecskék magas hozamot és kapszulázási hatékonyságot mutattak mindkét gyógyszer esetében, amelyek a PEG-ilálási lépések során kis mértékben csökkentek (**12. táblázat**). A doxorubicin hatóanyagtartalom szignifikánsan alacsonyabb volt a sorafenibhez viszonyítva, ennek oka, hogy a doxorubicin kisebb tömegben (0,5 mg vs. 1,5 mg sorafenib) került felhasználásra az előállítási folyamatban a sorafenibhez képest. A PEG-ilálás nem befolyásolta a kapszulázott doxorubicin mennyiségét. A nanorészecskék sorafenib tartalma enyhén csökkent, valószínűleg a hatóanyag-felszabadulási kísérletekben is tapasztalt módon a nanorészecskék felületén adszorbeált sorafenib egy része mosódott le. (lásd 3.3 fejezet).

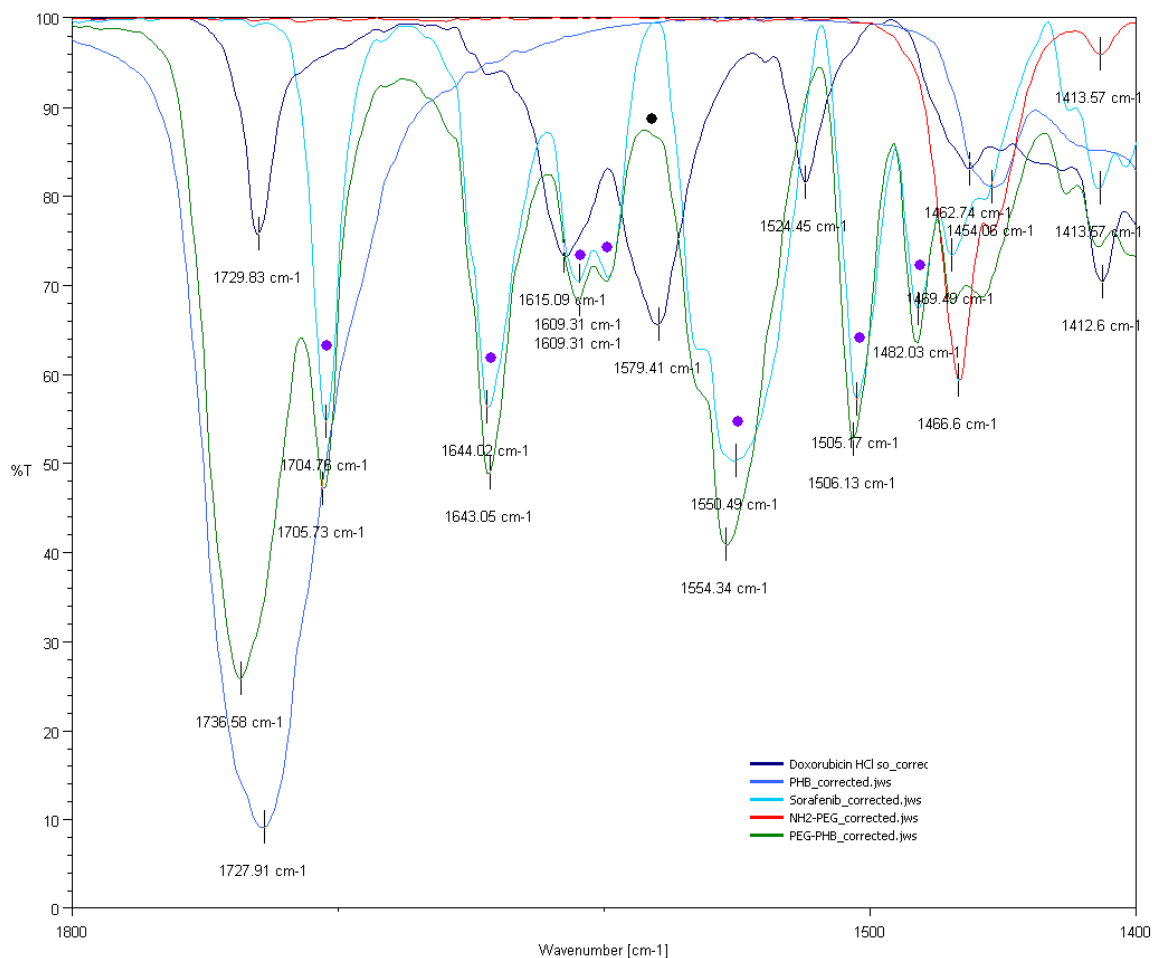
	PHB nanorészecskék	PEG-ilált PHB
Hozam (% w/w)	66,9 ± 1,3	55,4 ± 1,4
Kapsz. hat. (DOX) (% w/w)	77 ± 3,7	64 ± 4,1
Kapsz. hat. (SOR) (% w/w)	84 ± 2,5	70 ± 1,2
DOX tartalom (% w/w)	2,6	2,6
SOR tartalom (% w/w)	8,4	7,7

12. táblázat: PHB és PEG-PHB nanorészecskék hozama, hatóanyag kapszulázási hatékonysága, illetve hatóanyagtartalma

#### 4.3.3 FT-IR vizsgálatok

A két rákellenes komponens (doxorubicin, sorafenib) jelenléte a gyógyszerrel töltött PHB nanorészecskékben Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával az 1400-1800 cm<sup>-1</sup> tartományban ábrázolt spektrumában is azonosítható (**30. ábra**).



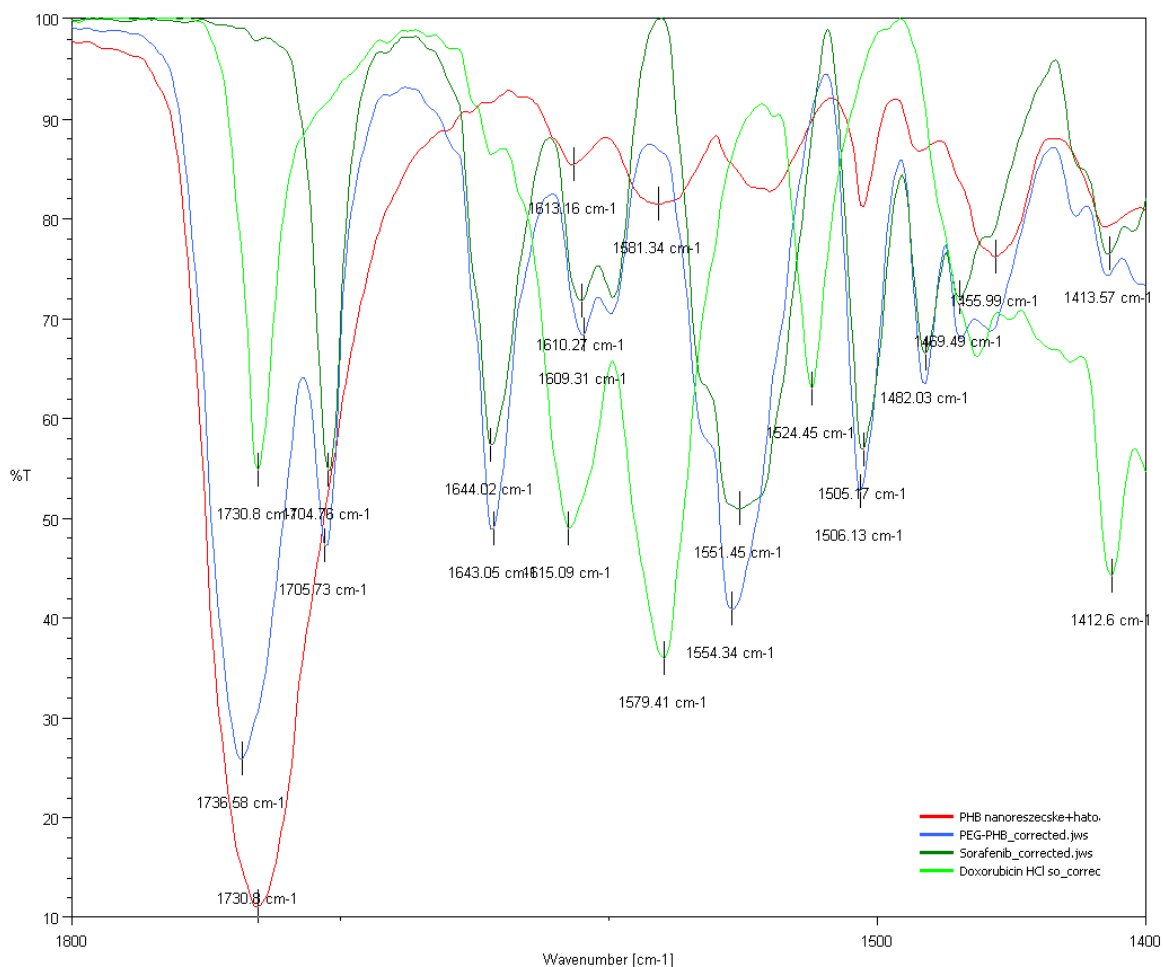


30. ábra: PHB részecskék FTIR vizsgálata

A doxorubicin PHB nanorészecskékben való jelenlétének legegyszerűbb bizonyítéka az 1580  $\text{cm}^{-1}$  körüli abszorpciós sáv (a doxorubicin-HCl só spektrumában 1579  $\text{cm}^{-1}$  és a PHB nanorészecskék spektrumában 1581  $\text{cm}^{-1}$ ), ami megfelel az aminocsoport ollózó rezgésének (sem a polimernek, sem a sorafenibnek nincs abszorpciós sávja ebben a régióban) [104,105]. Az 1430-1625  $\text{cm}^{-1}$  régióban számos aromás nyújtó C=C rezgés van jelen, az átfedések miatt ezek a sávok az összetett minta spektrumában is észrevehetőek. A sorafenib jelenlétét igazolja az 1505  $\text{cm}^{-1}$ -nél lévő abszorpciós sáv, amely a diszubsztituált piridingyűrűnek felel meg (a C=N kötés feszítő rezgése) [106].

Míg a PHB nanorészecskék esetében mindkét gyógyszer jelenlétét bizonyos specifikus abszorpciós sávok alapján igazoltuk, a PEG-illát PHB nanorészecskék esetében a sorafenibre jellemző abszorpciós sávok domináltak az összehasonlításban (31. ábra). A sorafenib abszorpciós sávjai (világoskék) jelennek meg a gyógyszert tartalmazó összetett minta (zöld) spektrumában: 1705  $\text{cm}^{-1}$ , 1643  $\text{cm}^{-1}$ , 1609  $\text{cm}^{-1}$ , 1554  $\text{cm}^{-1}$ , 1506  $\text{cm}^{-1}$  és 1482  $\text{cm}^{-1}$ -nél. Az

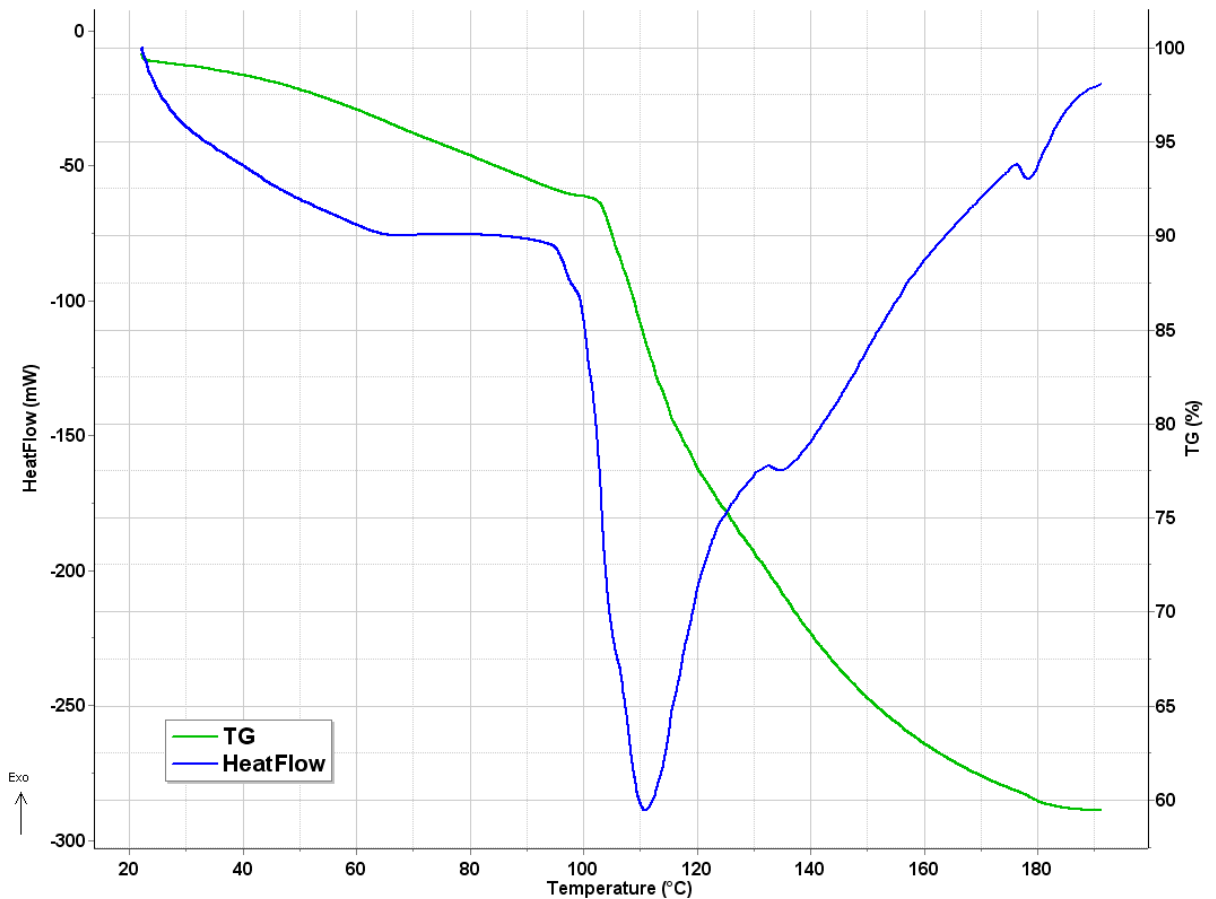
FTIR eredmények alapján nincs nyilvánvaló bizonyíték a doxorubicin jelenlétére a PEG-ilált PHB-ben.



31. ábra: PEG-PHB részecskék FTIR vizsgálata

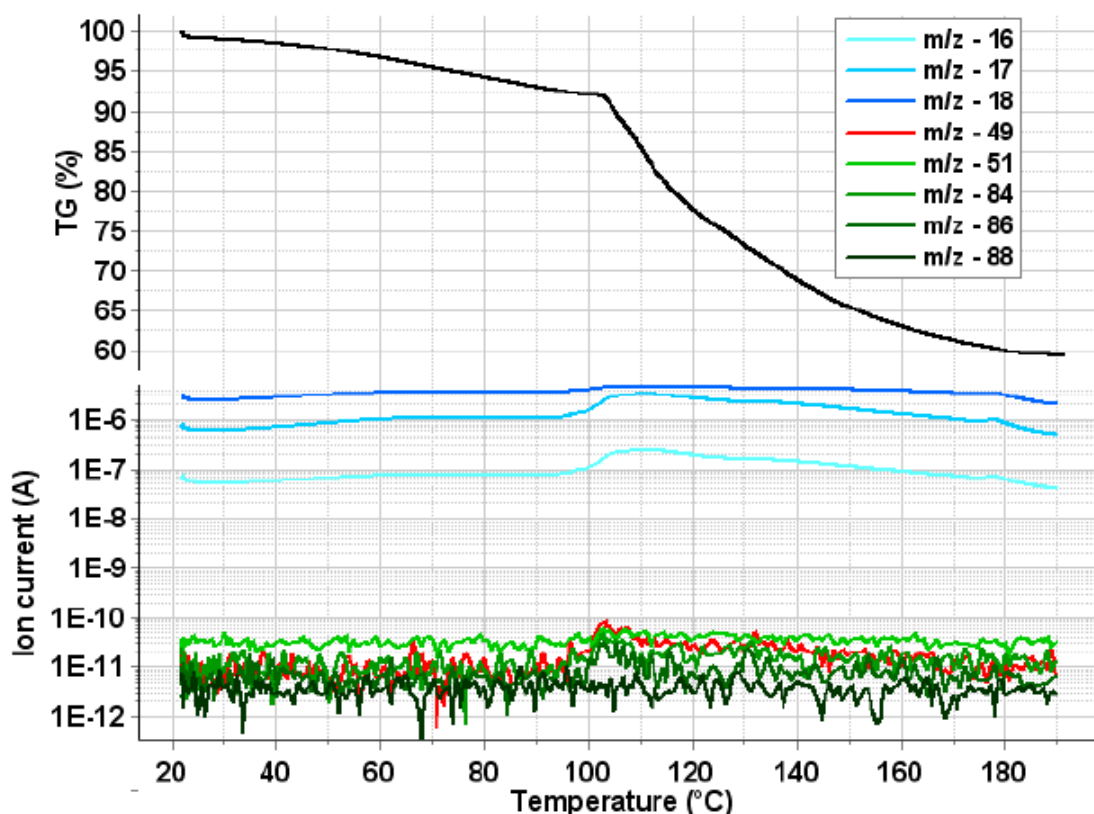
#### 4.3.4 Termoanalízis

A PHB polimer mintában az előállítási folyamatból származó maradék DCM jelenlétét termogravimetriás-differenciális pásztázó kalorimetriával és tömegspektrometriás fejlődő gáz analízissel (TG-DSC-MSEGA) vizsgáltuk 20-190 °C hőmérséklet-intervallumban. A **32. ábrán** a tömegvesztés (TG) és a kalorimetrikus (Heat Flow) detektorjeleket a hőmérséklet függvényében ábrázoltam. Látható, hogy a mérés kezdetétől 98,7 °C-ig 7,9%-os tömegvesztés lép fel, amely kis és széles endotermával jár. 98,7 °C felett a mérés végéig további 32,7%-os tömegvesztés következik be. A sokkal élesebb, de egyben széles endoterma (extrapolált kezdeti hőmérséklet: 100,2 °C; csúcs maximum hőmérséklet: 111,1 °C) két kis szatellitcsúcsával, 135,5 °C-on és 178,4 °C-on, a víz elpárolgásának felel meg, amint azt az MSEGA is megerősítette.



32. ábra: PHB nanorészecskék TG-DSC vizsgálata

A tömegspektrometriás fejlődő gázanalízis eredményeit a tömegvesztés görbével (TG) együtt a **33. ábra** mutatja. Az első tömegvesztési lépés során a felületen gyengén kötött víz deszorbeálódik, amit az  $m/z$  18, 17, ill. 16 ionáram görbék mutatnak. 100 °C felett a polimer láncok belsejében felfogott (erősebben kötött) víz szabadul fel. Ezt valószínűsíti, hogy a szakirodalom szerint a PHB termikus bomlása jóval magasabb hőmérsékleten (jóval 200 °C felett) indul meg [107,108,109], így a második lépésben felszabaduló víz nem származhat a polimer hőbomlásából. A mérések során az MSEGGA nem mutatott ki számottevő mennyiségű diklór-metánt a kifejlődött illékony anyagokban (a DCM jellemző fragmensionjai:  $m/z$  88, 86, 84, 51 és 49, melyek a **33. ábra** alsó részén láthatók).

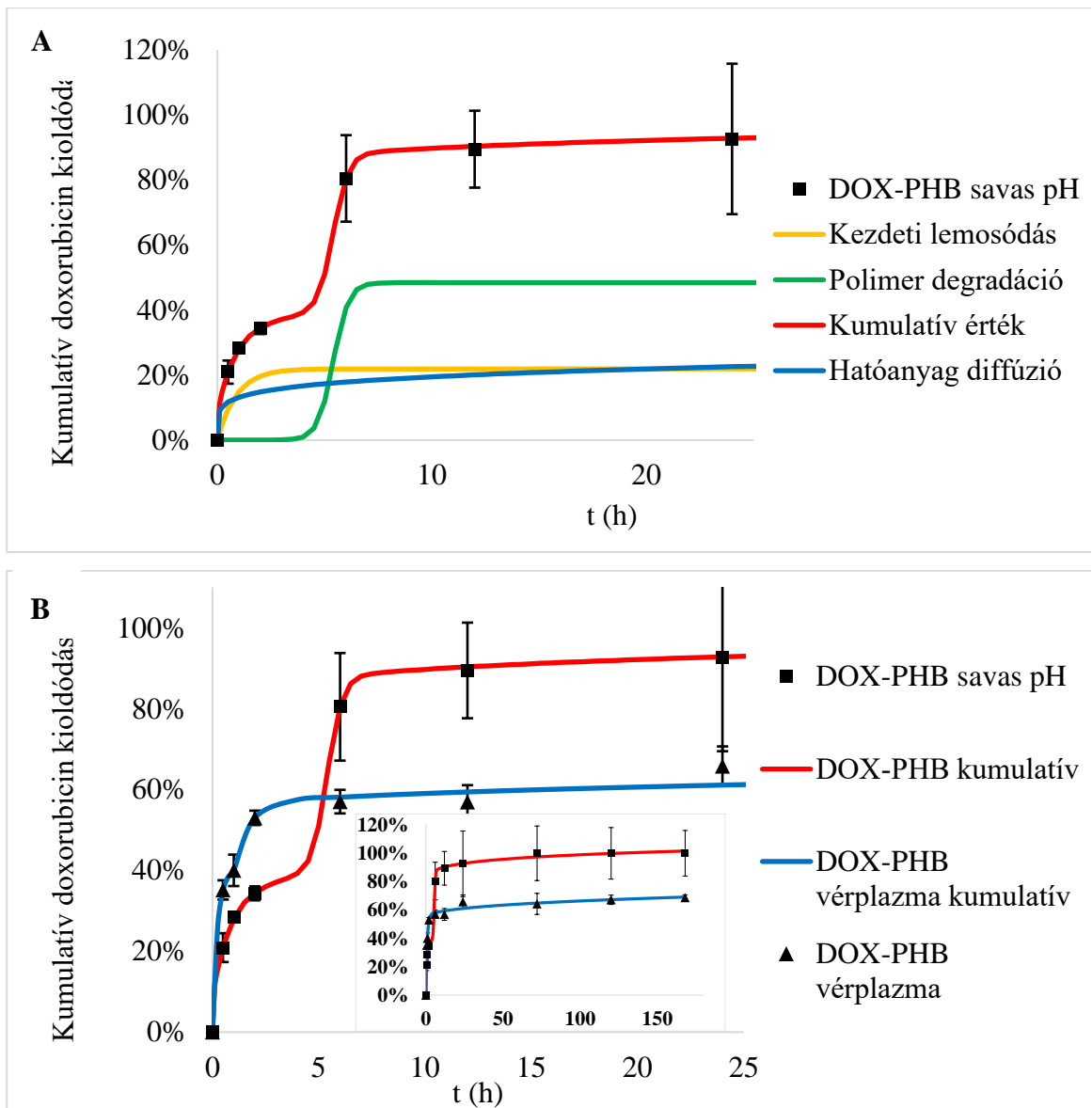


33. ábra: PHB nanorészecskék MSEGA vizsgálata

#### 4.3.5 PHB nanorészecskék gyógyszerleadási kinetikájának vizsgálata

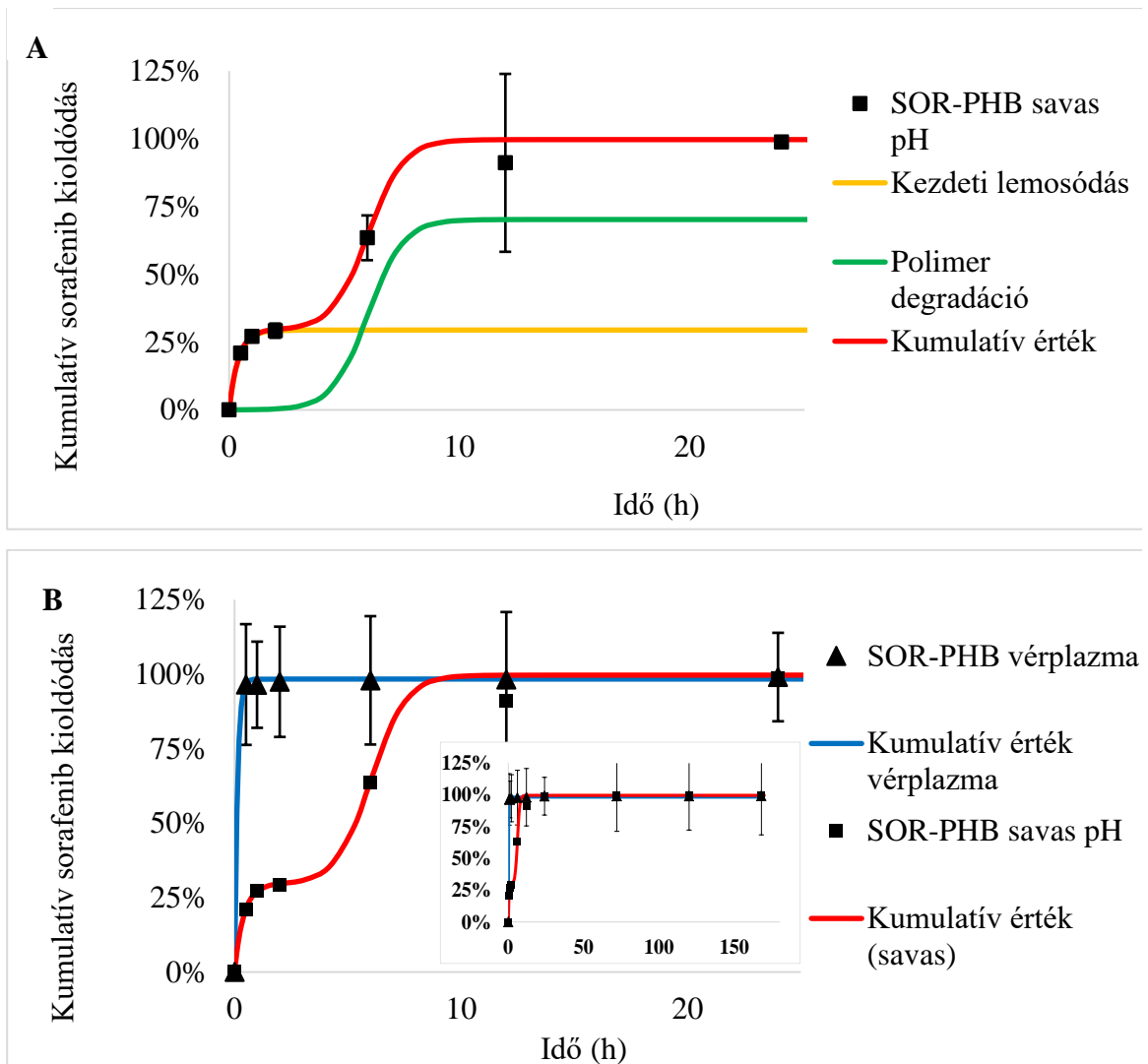
A doxorubicin felszabadulása a PHB polimerből komplex kinetikai folyamattal értelmezhető. A **34. A ábra** az első 24 óra mért értékeit mutatja savas környezetben (tumor mikrokörnyezet) az illesztett háromfázisú görbékkel (piros), mely a következő három függvényre bontható: kezdeti lemosódástból (sárga), polimer degradációja során felszabaduló (zöld) és a lassú diffúzióból származó (kék) hatóanyag leadást leíró komponensek. A modellezett kioldási profil (piros vonal) e komponensek kombinálásával rajzolható meg, amely harmonikusan illeszkedik a mért pontokhoz.

A doxorubicin kioldódási profiljait savas és vérplazma közegekben hasonlítottuk össze (**34. B ábra**). A plazmában történő doxorubicin felszabadulás szintén a háromfázisú modellt követi, azonban a kezdeti lemosódás erőteljesebb, míg a második hatás a polimer lebomlása miatt lényegesen korábban, de kisebb mértékben mutatható ki a savashoz viszonyítva. A modellezett kioldási profil (kék vonal) is jól illeszkedik a mért értékekhez. A doxorubicin kezdeti burst 22% és 38%, míg a  $t_{max}$  értékek 5,4 óra és 1,7 óra voltak a savas közegben és a vérplazmában.



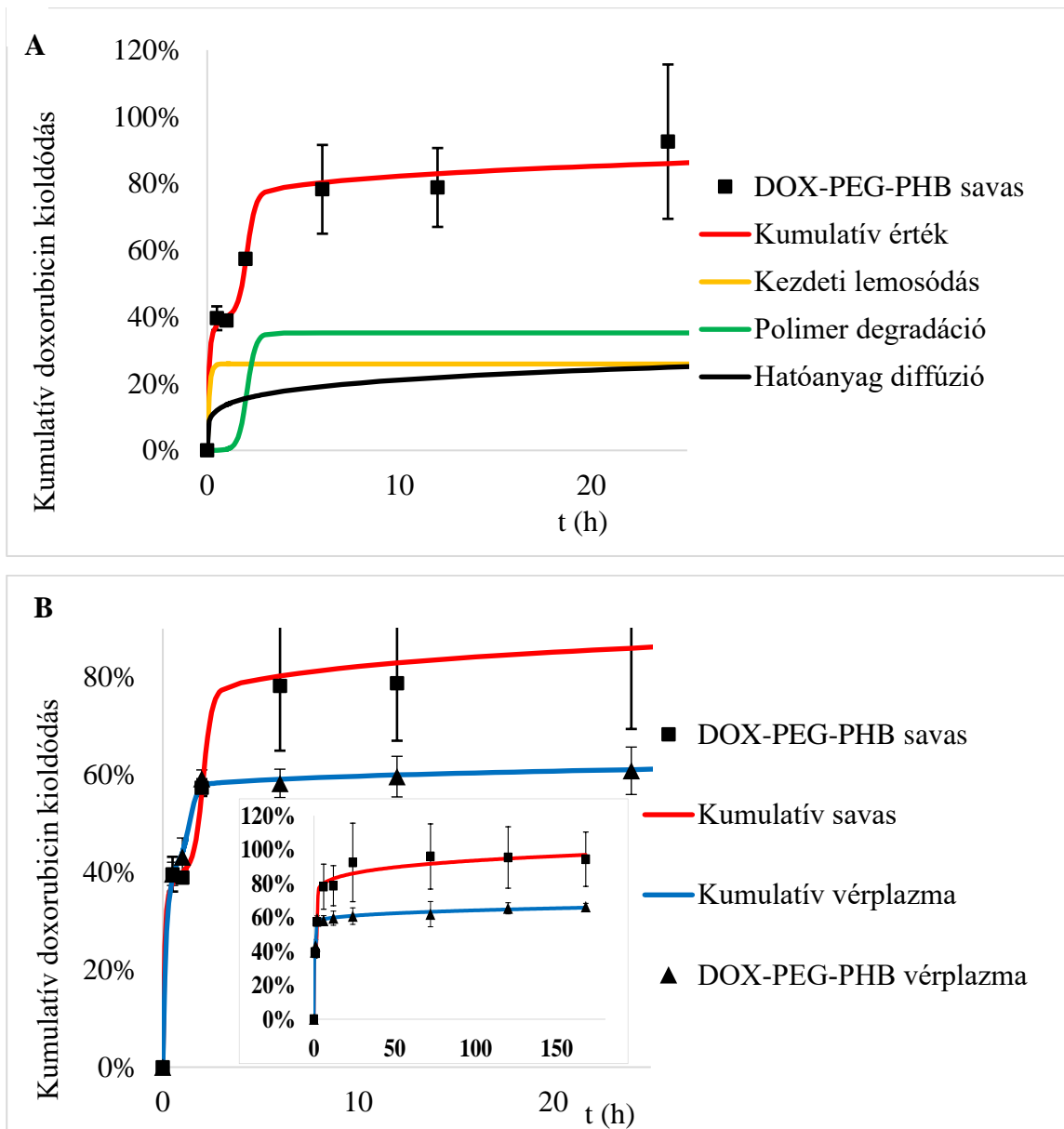
34. ábra: Doxorubicin kioldódásának vizsgálata PHB nanorészecskékből

A sorafenib kioldódása a PHB polimerből a vérplazmában) olyan gyors, hogy a telítés közvetlenül a kezdeti lemosódás után következik be (35. A ábra). Savas közegben (35. B ábra) a kezdeti lemosódás szignifikánsan alacsonyabb (29%), ezt követi a polimer lebomlási fázisa, bár a harmadik lassú fázis előtt a hatóanyag teljes mennyisége 24 órán belül felszabadul.



35. ábra: Sorafenib kioldódásának vizsgálata PHB nanorészecskékből

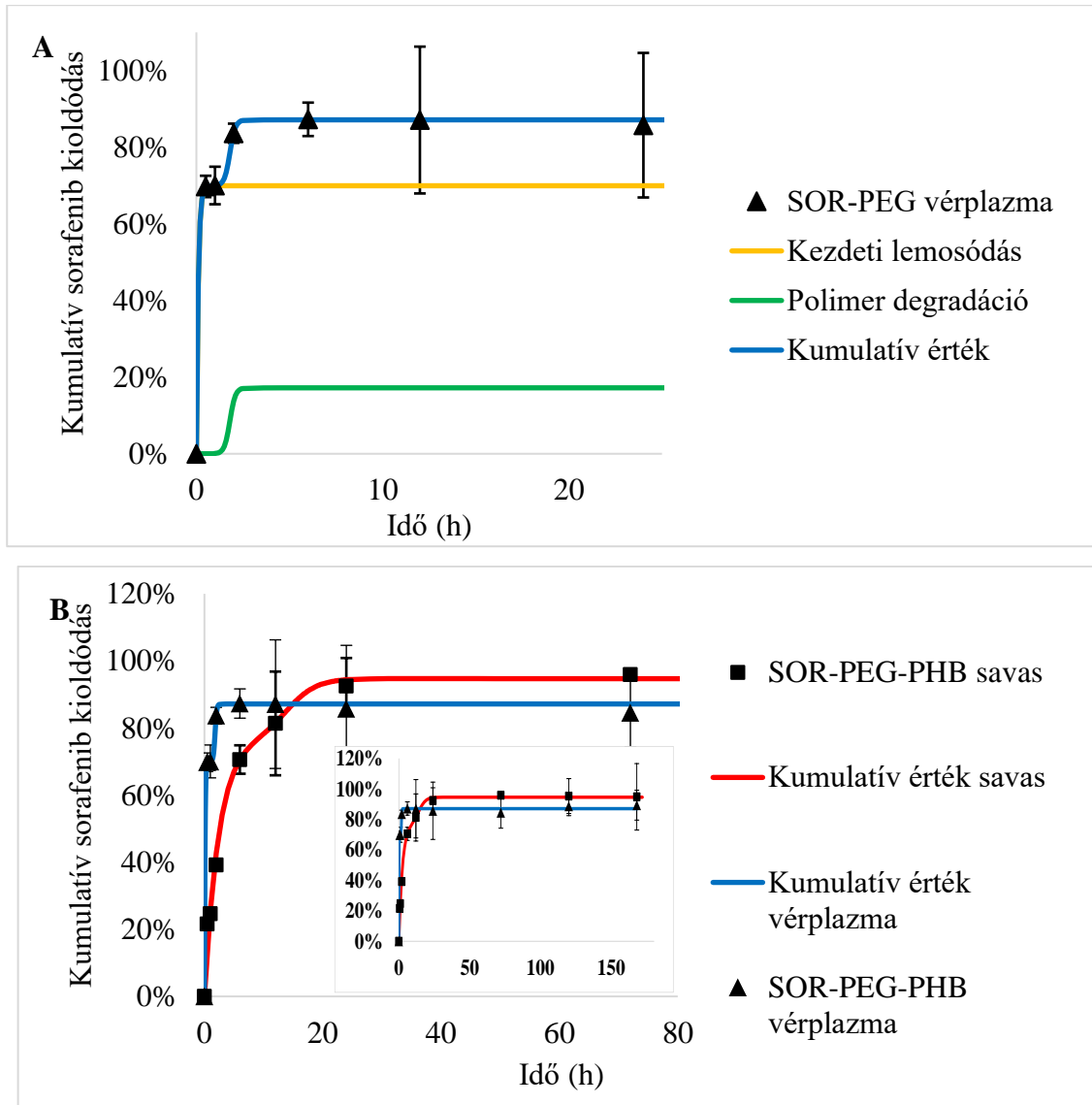
A PEG-ilált PHB polimerből a doxorubicin felszabadulása szintén háromfázisú leadási profillal jellemezhető, hasonlóan a PHB nanorészecskékhöz (36. A ábra). A  $t_{max}$  kisebb a plazmában (36. B ábra), mint a savas közegben. A sorafenib esetében kétfázisú profil azonosítható mind a plazmában, mind a savban egy kezdeti gyors lemosódással, amelyet a polimer bomlása követett (37. A és B ábra).



36. ábra: Doxorubicin kioldódásának vizsgálata PEG-PHB nanorészecskékből

Összehasonlítva a hatóanyagok polimerek szerinti felszabadulását, látható, hogy a doxorubicin kezdeti kioldódása valamivel gyorsabb mindkét közegben a PEG-ilált PHB-ből, mint a PHB-ből, míg a  $t_{max}$  értékek kisebbek a PEG-ilált PHB-nél, mint a PHB-nél ugyanabban a közegben (13. táblázat). Ez utóbbi tény bizonyítja, hogy a PEG-ilált PHB lebomlása által kiváltott felszabadulás mindkét közegben gyorsabb, mint a PHB esetén. A 47. oldalon ismertetett (3) egyenlet megoszlási kitevője ('n') csak a doxorubicin felszabadulása esetén számítható ki. Savas közegben szignifikánsan kisebb értékkel mutat pH-függést, mint plazmában, azonban a polimer típusa ezt érdemben nem befolyásolta. Ha 'n'  $\leq 0,43$ , a transzport leírható a Fick-féle diffúzióval [110]. Hasonló korreláció figyelhető meg a diffúziós kinetikai állandó („ $k_d$ ”) esetén is. A „ $t_{max}$ ”-

mal jellemezhető polimer lebomlásból származó gyógyszerkioldódás lényegesen kisebb volt a vérplazmában, ami a lebomlás következtében kisebb felszabadulást jelez, mint savas körülmények között. A „ $t_{max}$ ” alacsony értéke a PLGA-ra általam kapott értékhez (4.2 fejezet) képest az alacsony PHB molekulatömeggel magyarázható, amely a felgyorsult polimer lebomlásban fejeződik ki [111].



37. ábra: Sorafenib kumulatív felszabadulása PEG-ilált PHB nanorészecskékből vérplazmában (háromszögek) és savas közegben (négyzetek) mérve. A modellezett felszabadulási kinetika savban a kezdeti lemosódásból (sárga vonal) és a polimer bomlásából (zöld vonal) épül fel (A), az illesztett kioldódási profilok a plazmában (kék) és a vérplazmában (piros) láthatók (B).



	$\Theta_b$	$k_b$ (1/h)	$\Theta_r$	$k_r$ (1/h)	$t_{max}$ (h)	$k_d$	$n$
PHB-DOX (savas)	0,22	1,1	0,48	2,8	5,4	0,132	0,17
PHB-DOX (vérplazma)	0,38	4,36	0,16	4,5	1,7	0,022	0,38
PEG-PHB-DOX (savas)	0,26	9,6	0,35	4,4	2,1	0,137	0,19
PEG-PHB-DOX (vérplazma)	0,40	5,5	0,16	>5,0	1,4	0,019	0,33
PHB-SOR (savas)	0,29	2,5	0,70	>1,3	6,0	-	-
PHB-SOR (vérplazma)	0,98	7,9	-	-	-	-	-
PEG-PHB-SOR (savas)	0,76	0,4	0,18	0,4	14,0	-	-
PEG-PHB-SOR (vérplazma)	0,70	>10,0	0,17	6,8	1,8	-	-

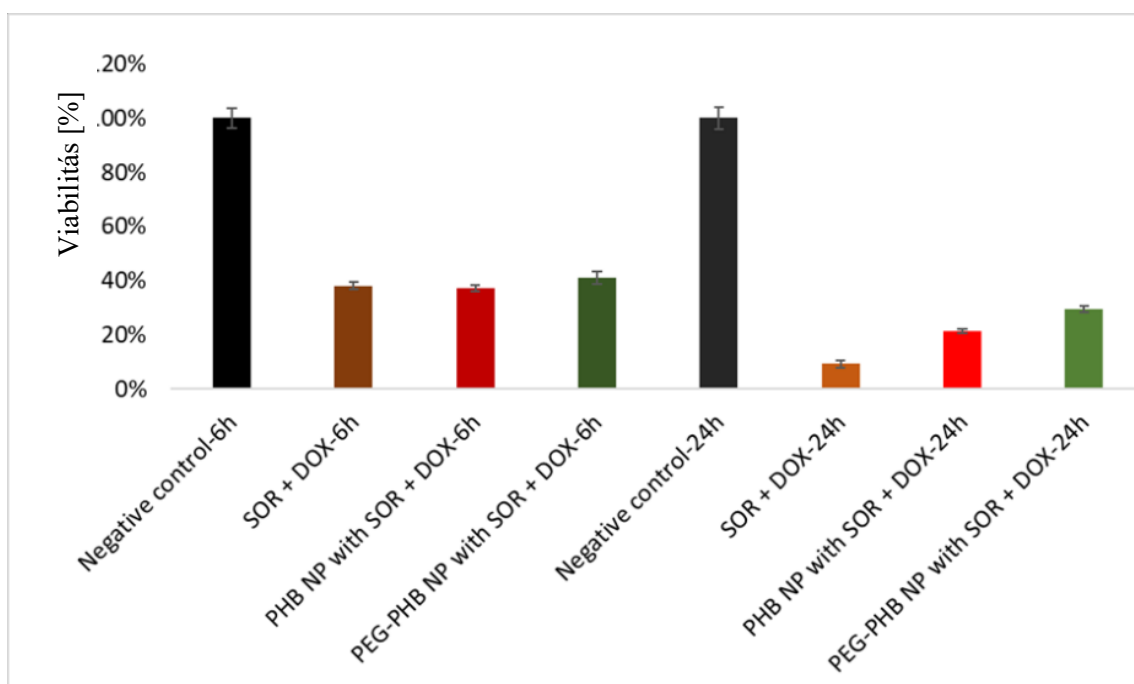
13. táblázat: A gyógyszerfelszabadulási mechanizmusok kinetikai paramétereit, ahol „ $n$ ” a diffúziós kitevő, „ $k_b$ ” a kezdeti burst állandó, „ $k_r$ ” a kezdeti felszabadulás hozzájárulása a hatóanyag teljes tömegéhez, a „ $k_r$ ” a degradációs-relaxációs állandó sebessége, a „ $k_d$ ” a diffúziós kinetikai állandó, a „ $t_{max}$ ” pedig a maximális gyógyszerfelszabadulási sebesség eléréséhez szükséges degradációs idő.

Összefoglalva a doxorubicin felszabadulását a vérplazmában jelentősen késleltette a hordozó polimer. A sorafenib felszabadulása sokkal gyorsabb volt savban, mint a vérplazmában, ami előnyös a daganat savas környezetébe várható szállításra tekintettel. Vérplazmában a kettős hatóanyagot tartalmazó PHB nanorészecskék azonban kezdetben gyakorlatilag az összes sorafenib hatóanyagot kiengedték, míg a PEG-PHB a kezdeti lemosódást csökkentette. A sorafenib erős affinitása a plazmafehérjékhez magyarázza a felgyorsult felszabadulását a vérplazmában, ráadásul a nagy kezdeti lemosódásból is arra lehet következtetni, hogy nagy része előállításakor a nanorészecskék felületén kötődött meg [6].

A nanoterapeutikumaimban levő doxorubicin a vérplazmában a kezdeti kioldódást követően a második és harmadik fázisban az elvárásnak megfelelően viselkedett, míg savas körülmények között a polimer mátrix nagymértékű hidratációja és a hatóanyag gyors kioldódása ment végbe.

#### 4.3.6 Citotoxicitási vizsgálat

A hatóanyagokat tartalmazó nanorészecskék citotoxicitását HCT-116 vastagbélrák sejtvonalon vizsgáltam, 6 és 24 órás inkubáció után. Oldatban (DMSO) levő tiszta hatóanyagok és ezen gyógyszerekkel töltött nanorészecskék hatását mértem a kontrollhoz képest. A nanorészecskék és a tiszta hatóanyagok közös oldószerének, a kis mennyiségben a sejtekhez adott DMSO-nak a toxicitását is vizsgáltam az oldott gyógyszerekéhez képest, hogy a gyógyszerek hatásáról egyéb befolyástól mentes képet kapjak, míg a kezeletlen sejteket referenciaként használtam (**38. ábra**). A PHB polimer nem toxikus tulajdonságait bizonyították korábban [36], mindenesetre mivel az általam használt PHB polimereket eddig még nem használták gyógyszerhordozóként, ezért szükség volt ezek citotoxicitási vizsgálataira. Az eredmények azt mutatták, hogy a hatóanyagot tartalmazó PHB és PEG-ilált PHB nanorészecskék a gyógyszerek oldatához hasonlóan viselkedtek 6 óra elteltével. 24 óra után a toxikus hatás még kifejezettebb lett, bár a nanorészecskék citotoxikus hatása elmaradt a tiszta hatóanyagok hatásától.



38. ábra PHB és PEG-PHB alapú nanorészecskék citotoxikológiai vizsgálata

## Összefoglalás

Kutatásaim során kemoterápiás hatóanyagok mellékhatásainak ill. a tumorsejtekben az egyes hatóanyagok ellen kialakuló rezisztencia kialakulásának kiküszöbölése érdekében különböző polimereket felhasználva biokompatibilis és biodegradábilis gyógyszerhordozó nanorészecskéket készítettem. A személyre szabott terápia kívánalmainak megfelelően különböző anyagokból, különböző részecskeméretekből és eltérő hatóanyagtartalommal rendelkező gyógyszerhordozó rendszerek létrehozása volt a cél.

Metatézissel előállított, jól definiált szerkezetű, vízben nem oldódó PVA polimerbe mikrokapszuláztam sorafenib hatóanyagot magas kapszulázási hatékonysággal és hatóanyagtartalommal. Vizsgáltam a nanorészecskék tumorsejtek általi felvételét, mely kedvező eredményt mutatott. Citotoxicitási teszteken a kapszulázott hatóanyag az eredeti, tiszta hatóanyaghoz hasonló hatékonyságot mutatott.

Hagyományos PLGA és PEG-ilált PLGA polimerekkel állítottam elő először sorafenib és doxorubicin hatóanyagokat együttesen tartalmazó polimer nanorészecskéket. A hatóanyagtartalom leadása doxorubicin esetében az elvárásoknak megfelelő ütemben ment végbe, míg sorafenib esetében, vérplazma közegben a hordozó mátrix csak visszafogott ütemben lassította a gyógyszer felszabadulását. HT-29 sejtvonalon végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a PEG-ilált PLGA alapú hordozókat a tumorsejtek jelentősen nagyobb arányban vették fel. A citotoxicitási tesztek alapján mindkét típusú gyógyszerhordozó rendszer koncentrációarányos hatást mutatott, de a PEG-ilált változat esetén lényegesen kifejezettebb volt a hatás.

A PEG-ilált PLGA alapú nanorészecskék felületét iRGD tumor penetrációs peptiddel módosítottam, majd vizsgáltam a fizikai-kémiai paraméterek változását, illetve a biológiai hatásokat. A nanorészecskék mérete a várakozásnak megfelelő mértékben emelkedett, azonban így is 22%-kal nagyobb arányban vették fel a tumorsejtek a módosított nanorészecskéket.

PHB alapú polimerből állítottam elő doxorubicint és sorafenibet együttesen tartalmazó gyógyszerhordozó nanorészecskéket magas hatóanyagtartalommal. A gyógyszer felszabadulási profilját kinetikai folyamattal írtam le.

A PHB alapú nanorészecskéket PEG-iláltam, majd vizsgáltam a felületmódosítás fizikai, kémiai és biológiai hatásait. A nanorészecskék mérete kis mértékben növekedett, hatóanyagleadásuk azonban lassult. A PEG-ilált nanorészecskék a hagyományos változathoz képest fokozott citotoxicitással rendelkeztek.

A nanorészecskék méretének, összetételének, szerkezetének vizsgálatához dinamikus fényszórásmérés, lézer-doppler elektroforézis, fotometria, folyadékkromatográfia, termogravimetria, infravörös spektroszkópia, tömegspektrometria-fejlődő gáz analízis területén volt szükséges méréseket folytatnom., illetve a biológiai hatások vizsgálatához MTT tesztekét folytattam le. Fentiekből könnyen belátható, hogy a nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerek vizsgálata nagyban eltér a hagyományos gyógyszerhatóanyagok elemzésétől.

## Tézispontok

1. Jól definiált szerkezetű, metatézissel előállított, vízben rosszul oldódó polivinil-alkohol polimerrel először mikrokapszuláztam sorafenib hatóanyagot magas kapszulázási hatékonysággal (93,6 %) és hatóanyagtartalommal (12,0 %). Az így előállított nanorészecskéket a ráksejtek jó hatékonysággal bekebelezték, és koncentrációfüggő citotoxicitást mutattak HT-29 adenokarcinóma sejteken. (S2)
2. Biodegradábilis poli(tejsav-glikolsav) (PLGA) és PEG-ilált PLGA polimerekkel először állítottam elő sorafenib és doxorubicin hatóanyagokat együttesen tartalmazó polimer nanorészecskéket. A nanorészecskék vérplazmában doxorubicin esetén 1 héten át elnyújtott hatóanyaleadást, míg a tumorra jellemző savas pH esetén gyors hatóanyagfelszabadulást mutattak. A sorafenib hatóanyag a PLGA nanorészecskéből vérplazmában gyorsan felszabadult, míg a PEG-ilált PLGA lassította a felszabadulását. Savas közegben mind a kétféle hordozó polimerben lassult a sorafenib felszabadulása. HT-29 adenokarcinóma sejtek lényegesen nagyobb mennyiségben vették fel a PEG-PLGA-ból, mint a PLGA-ból készített nanorészecskéket. Ez magyarázza, hogy bár mind a két hordozóból koncentrációfüggő citotoxicitást tapasztaltam, de a PEG-PLGA gyógyszerhordozó nanorészecskék hatékonyabbnak bizonyultak a HT-29 adenokarcinóma sejteken végzett citotoxicitás vizsgálatban. (S1)
3. PEG-ilált PLGA gyógyszerhordozó nanorészecskék iRGD tumor penetrációs peptiddel való sikeres felületkezelését dinamikus fényszórással végzett részecskeméret vizsgálattal igazoltam, melynek során a 197,4 nm átlagos hidrodinamikai átmérőjű részecskék mérete 225,2 nm-re növekedett. Az iRGD-vel felületmódosított részecskéket HCT-116 vastagbélrák sejtek 22 %-kal nagyobb arányban vették fel a felületkezelésen át nem esett nanorészecskékhez képest. (S1)
4. Elsőként állítottam elő polihidroxi-butirát (PHB) hordozó polimerrel sorafenib és doxorubicin rákellenes szereket együttesen tartalmazó monodiszperz gyógyszerhordozó nanorészecskéket magas kapszulázási hatékonysággal. A doxorubicin felszabadulását háromfázisú kinetikai folyamattal írtam le, mely a kezdeti lemosódásból, a polimer degradációból, végül a lassú diffúzióból tevődik össze. A sorafenib gyorsabban, kétfázisú folyamatban szabadult fel a polimerből: a kezdeti lemosódást a polimer degradáció követte. (S3)
5. A sorafenib és doxorubicin hatóanyagokat tartalmazó PHB nanorészecskék PEG-ilálásával az élő szervezet makrofágjai számára nehezebben felismerhető monodiszperz

gyógyszerhordozó nanoanyagot állítottam elő. A doxorubicin hatóanyag felszabadulása a nanorészecskékből ez esetben is háromfázisú kinetikával volt jellemezhető, azonban mind a vérplazmában, mind a tumorra jellemző savas közegben a PHB-tal készített nanorészecskéknél nagyobb kioldódási sebességgel. A PHB nanorészecskékből a sorafenib rendkívül gyorsan oldódott ki, amit a nanorészecskék PEG-ílálása lassított. A PEG-íllt PHB nanorészecskék fokozott citotoxicitással rendelkeztek HCT-116 vastagbélrák sejtvonalon. (S3)

### **Tézisek alapjául szolgáló cikkek:**

S1. Babos. G., Biró. E., Meiczinger. M., Feczkó. T. (2018). Dual Drug Delivery of Sorafenib and Doxorubicin from PLGA and PEG-PLGA Polymeric Nanoparticles. *Polymers*. 10(8). 895. Q1 (IF: 3,672)

S2. Feczkó T. Merza G. Babos G. et al. Preparation of cubic-shaped sorafenib-loaded nanocomposite using well-defined poly(vinyl alcohol alt-propenylene) copolymer. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;562:333-341. D1 (IF: 4,793)

S3. György Babos, Joanna Rydz, Michal Kawalec, Magdalena Klim, Andrea Fodor-Kardos, László Trif, Tivadar Feczkó: Poly(3-Hydroxybutyrate)-Based Nanoparticles for Sorafenib and Doxorubicin Anticancer Drug. *International Journal of Molecular Science*, 2020; 21 (19), 7312 D1 (IF: 5,819)

### **Egyéb a dolgozat témájához kapcsolódó publikációk:**

S4. Izolda Kántor, Diana Aparaschivei, Anamaria Todea, Emese Biró, György Babos, Dóra Szerényi, Balázs Kakasi, Francisc Péter, Eugen Şişu, Tivadar Feczkó: Biocatalytic synthesis of poly [ $\epsilon$ -caprolactone-co-(12-hydroxystearate)] copolymer for sorafenib nanoformulation useful in drug delivery, *Catalysis Today*, 2021, 366, 195-201. Q1, (IF: 6,565)

S5. Izolda Kántor, Diana Dreavă, Anamaria Todea, Francisc Péter, Zoltán May, Emese Biró, György Babos, Tivadar Feczkó: Co-Entrapment of Sorafenib and Cisplatin Drugs and iRGD Tumour Homing Peptide by Poly [ $\epsilon$ -caprolactone-co-(12-hydroxystearate)] Copolymer. *Biomedicines*, 2022, 10, 43. Q1, (IF: 4,757)

- S6. Miklós Jakab, Margit Enisz-Bódogh, Kristóf Kovács, Eszter Keil, György Babos, Tivadar Feczko: Structure and properties of bovine bone-glass ceramic composite scaffolds. *Processing and Application of Ceramics* 15 [4] (2021). Q3 (IF: 1,51)
- S7. Iulia Păușescu, Izolda Kántor, György Babos, Zoltán May, Andrea Fodor-Kardos, Zsombor Miskolczy, László Biczók, Francisc Péter, Mihai Medeleanu, Tivadar Feczko: Halochromic behavior and anticancer effect of new synthetic anthocyanidins complexed with  $\beta$ -cyclodextrin derivatives. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 8103. D1 (IF: 6,208)

## Irodalomjegyzék

1. Eurostat adatok, 2016 <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/EDN-20200204-1?inheritRedirect=true&redirect=/eurostat/news/whats-new>  
(2021. 11. 13. 14:24)
2. Comparator report on cancer in Europe 2019, IHE (Svéd Egészséggazdaságtani Intézet) [https://ihe.se/wp-content/uploads/2020/10/IHE-Report-2019\\_7\\_.pdf](https://ihe.se/wp-content/uploads/2020/10/IHE-Report-2019_7_.pdf)
3. Hak Soo Choi, Wenhao Liu, Preeti Misra, Eiichi Tanaka, John P. Zimmer, Binil Itty Ipe, Mounji G. Bawendi, John V. Frangioni: Renal Clearance of Nanoparticles, *Nature Biotechnology*, 2007. 25(10): 1165–1170.
4. Heather Herd Gustafson, Dolly Holt-Casper, David W. Grainger and Hamidreza Ghandehari: Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem, *Nano Today*, 2015. 10(4), 487-510.
5. Hiroshi Suzuki, Daisuke Nakai, Takeshi Seita, Yuichi Sugiyama: Design of a drug delivery system for targeting based on pharmacokinetic consideration, *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996. 19(3), 335-357.
6. Lucero-Acuña, A.; Guzmán, R. Nanoparticle encapsulation and controlled release of a hydrophobic kinase inhibitor: Three stage mathematical modeling and parametric analysis. *Int. J. Pharm.* 2015, 494, 249–257.
7. Lucero-Acuña, A.; Gutiérrez-Valenzuela, C.; Esquivel, R.; Guzmán-Zamudio, R. Mathematical modeling and parametrical analysis of the temperature dependency of control drug release from biodegradable nanoparticles. *RSC Adv.* 2019, 9, 8728–8739.
8. Jörg Kreuter: Nanoparticles—a historical perspective, *International Journal of Pharmaceutics* 331 (2007) 1–10.
9. Khanna, S.C., Speiser, P., 1969. Epoxy resin beads as a pharmaceutical dosage form I: Methods of preparation. *J. Pharm. Sci.* 58, 1114–1117.
10. Khanna, S.C., Jecklin, T., Speiser, P., 1970. Bead polymerisation technique for sustained release dosage form. *J. Pharm. Sci.* 59, 614–618.
11. Birrenbach, G., 1973. Über Mizellpolymerisate, mögliche Einschlussverbindungen (Nanokapseln) und deren Eignung als Adjuvantien. Dissertation ETH Zürich, Nr. 5071.



12. Birrenbach, G., Speiser, P.P., 1976. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J. Pharm. Sci.* 65, 1763–1766.
13. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.-P., Ammoury, N., Benita, S.: Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharmaceutics* 55 (1989) R1–R4
14. Jack H. Schulman, Walter Stoeckenius, and Leon M. Prince: Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy, *J. Phys. Chem.* 1959, 63, 10, 1677–1680, doi.org/10.1021/j150580a027
15. V. Chhabra, M. L. Free, P. K. Kang, S. E. Truesdail, D.O. Shah: Microemulsions as an emerging technology, *Tenside Surf. Det.* 34 (1997) 3
16. S. Matsumoto, M. Kohda: The viscosity of W/O/W emulsions: An attempt to estimate the water permeation coefficient of the oil layer from the viscosity changes in diluted systems on aging under osmotic pressure gradients, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 73, Issue 1, January 1980, Pages 13-2
17. Ockenfels, H. M., Brockmeyer, N. H., Hengge, U. & Goos, M. Cutaneous angiosarcoma: a novel therapy with liposomal doxorubicin? *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 6, 71–75 (1996).
18. Chawla, S. P. et al. A Phase I-II Study Using Rexin-G Tumor-Targeted Retrovector Encoding a Dominant-Negative Cyclin G1 Inhibitor for Advanced Pancreatic Cancer. *Mol. Ther. - Oncolytics* 12, 56–67 (2019).
19. Miele, E., Spinelli, G. P., Miele, E., Tomao, F. & Tomao, S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J. Nanomedicine* 4, 99–105 (2009).
20. Barbara Haley, M.D., Eugene Frenkel, M.D. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 26 (2008) 57–64
21. Calzoni, E. et al. Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies. *J. Funct. Biomater.* 10, (2019).
22. Feczko, T. et al. Theranostic Sorafenib-Loaded Polymeric Nanocarriers Manufactured by Enhanced Gadolinium Conjugation Techniques. *Pharmaceutics* 11, (2019).
23. Espinoza, S. et al. Poly-ε-caprolactone (PCL), a promising polymer for pharmaceutical and biomedical applications: Focus on nanomedicine in cancer. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 69, 85–126 (2019).

24. Babos, G., Biró, E., Meiczinger, M. & Feczko, T. Dual Drug Delivery of Sorafenib and Doxorubicin from PLGA and PEG-PLGA Polymeric Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 10, 895 (2018).
25. Guo, J. et al. An injectable thermosensitive hydrogel self-supported by nanoparticles of PEGylated amino-modified PCL for enhanced local tumor chemotherapy. *Soft Matter* 16, 5750–5758 (2020).
26. Dozier, J. K. & Distefano, M. D. Site-specific pegylation of therapeutic proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 25831–25864 (2015).
27. Cherpinski, A., Gozutok, M., Sasmazel, H. T., Torres-Giner, S. & Lagaron, J. M. Electrospun Oxygen Scavenging Films of Poly(3-hydroxybutyrate) Containing Palladium Nanoparticles for Active Packaging Applications. *Nanomater. (Basel, Switzerland)* 8, 469 (2018).
28. Lin, X. et al. Biodegradable polyhydroxybutyrate/poly- $\epsilon$ -caprolactone fibrous membranes modified by silica composite hydrogel for super hydrophobic and outstanding antibacterial application. *J. Ind. Eng. Chem.* 63, (2018).
29. Panaitescu, D. M. et al. Poly(3-hydroxybutyrate) modified by nanocellulose and plasma treatment for packaging applications. *Polymers (Basel)*. 10, 1–24 (2018).
30. Kai, D. et al. Strong and biocompatible lignin /poly (3-hydroxybutyrate) composite nanofibers. *Compos. Sci. Technol.* 158, 26–33 (2018)
31. Degli Esposti, M., Chiellini, F., Bondioli, F., Morselli, D. & Fabbri, P. Highly porous PHB-based bioactive scaffolds for bone tissue engineering by in situ synthesis of hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 100, 286–296 (2019).
32. Krucińska, I. et al. Biological properties of low-toxicity PLGA and PLGA/PHB fibrous nanocomposite implants for osseous tissue regeneration. Part I: evaluation of potential biotoxicity. *Molecules* 22, (2017).
33. Zhao, J., Weng, G., Li, J., Zhu, J. & Zhao, J. Polyester-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Mater. Sci. & Eng. C, Mater. Biol. Appl.* 92, 983–994 (2018).
34. Abdelwahab, M., Salahuddin, N., Gaber, M. & Mousa, M. Poly(3-hydroxybutyrate)/polyethylene glycol-NiO nanocomposite for NOR delivery: Antibacterial activity and cytotoxic effect against cancer cell lines. *Int. J. Biol. Macromol.* 114, 717–727 (2018).
35. Barouti, G., Jaffredo, C. G. & Guillaume, S. M. Advances in drug delivery systems based on synthetic poly(hydroxybutyrate) (co)polymers. *Prog. Polym. Sci.* 73, 1–31 (2017).

36. Zawidlak-Wegrzyńska, B. et al. Synthesis and antiproliferative properties of ibuprofen-oligo(3-hydroxybutyrate) conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 1833–1842 (2010).
37. Loh, X. J., Ong, S. J., Tung, Y. T. & Choo, H. T. Incorporation of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] into Cationic Copolymers Based on Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) to Improve Gene Delivery. *Macromol. Biosci.* 13, 1092–1099 (2013).
38. Silva, T. G. da et al. Mass Variation Rate, in Acidic Environment, of Polyhydroxybutyrate and Chitosan matrices with Potential Application as Controlled Drug Delivery System. *Mater. Res.* 22, (2019).
39. Perveen, K., Masood, F. & Hameed, A. Preparation, characterization and evaluation of antibacterial properties of epirubicin loaded PHB and PHBV nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 144, 259–266 (2020).
40. Kawalec, M. et al. Traces do matter - Purity of 4-methyl-2-oxetanone and its effect on anionic ring-opening polymerization as evidenced by phosphazene superbases catalysis. *React. Funct. Polym.* 72, 509–520 (2012).
41. Tuba, R., Al-Hashimi, M., Bazzi, H.S., Grubbs, R.H., 2014. One-pot synthesis of poly(vinyl alcohol) (PVA) copolymers via ruthenium catalyzed equilibrium ring-opening metathesis polymerization of hydroxyl functionalized cyclopentene. *Macromolecules* 47, 8190–8195.
42. Tuba, R., Balogh, J., Hlil, A., Barłóg, M., Al-Hashimi, M., Bazzi, H.S., 2016. Synthesis of recyclable tire additives via equilibrium ring-opening metathesis polymerization. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 6090–6094.
43. Feczko T, Merza G, Babos G, et al, Preparation of cubic-shaped sorafenib-loaded nanocomposite using well-defined poly(vinyl alcohol alt-propenylene) copolymer, *International Journal of Pharmaceutics*, 2019;562(March):333-341.
44. Ren Yin, Stankovic, Konstantina M, Bhatia Sangeeta N, Landegger Lukas D, Sagers Jessica E: Tumor-Penetrating Delivery of siRNA against TNF $\alpha$  to Human Vestibular Schwannomas. *Scientific Reports*, 2017 7 (1)
45. Yang, Q.; Tan, L.; He, C.; Liu, B.; Xu, Y.; Zhu, Z.; Shao, Z.; Gong, B.; Shen, Y.-M. Redox-responsive micelles self-assembled from dynamic covalent block copolymer for intracellular drug delivery. *Acta Biomater.* 2015,17, 193–200.
46. Khemani, M.; Sharon, M.; Sharon, M. pH Dependent Encapsulation of Doxorubicin in PLGA. *Ann. Biol. Res.* 2012, 3, 4414–4419.

47. Fox, M.E.; Szoka, F.C.; Frechet, J.M.J. Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer: The Importance of Molecular Architecture. *Acc. Chem. Res.* 2009, 42, 1141–1151.
48. Kobayashi, H.; Watanabe, R.; Choyke, P.L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics* 2013, 4, 81–89.
49. Halayqa, M.; Domanska, U. PLGA Biodegradable nanoparticles containing perphenazine or chlorpromazine hydrochloride: Effect of formulation and release. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 23909–23923.
50. Lin, T.T.; Gao, D.Y.; Liu, Y.C.; Sung, Y.C.; Wan, D.; Liu, J.Y.; Chiang, T.; Wang, L.; Chen, Y. Development and characterization of sorafenib-loaded PLGA nanoparticles for the systemic treatment of liver fibrosis. *J. Control. Release* 2016, 221, 62–70.
51. Park, T.G.; Lu, W.; Crotts, G. Importance of in vitro experimental conditions on protein release kinetics, stability and polymer degradation in protein encapsulated poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) microspheres. *J. Control. Release* 1995, 33, 211–222.
52. Shi, J.H.; Chen, J.; Wang, J.; Zhu, Y.Y.; Wang, Q. Binding interaction of sorafenib with bovine serum albumin: Spectroscopic methodologies and molecular docking. *Spectrochim. Acta Part A* 2015, 149, 630–637.
53. Yin, T.; Liu, J.; Zhao, Z.; Zhao, Y.; Dong, L.; Yang, M.; Zhou, J.; Huo, M. Redox sensitive hyaluronic acid-decorated graphene oxide for photothermally controlled tumor-cytoplasm-selective rapid drug delivery. *Adv. Funct. Mater.* 2017, 14, 1604620.
54. Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts.* (John Wiley & Sons Ltd, 2001).
55. Karim Miladi, Sana Sfar, Hatem Fessi and Abdelhamid Elaissari: Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications, *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*, Chapter 2. Springer International Publishing Switzerland, 2016.
56. V. Chhabra, M.L. Free, P.K. Kang, S.E. Truesdail, D.O. Shah: Microemulsions as an emerging technology. *Tenside surf. Det.* 34. (1997) 3
57. Erkki Ruoslahti: Tumor Penetrating Peptides for Improved Drug Delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016. 110-111, 3-12.
58. G. L. Malarvizhi, A. P. Retnakumari, S. Nair, and M. Koyakutty, “Transferrin targeted core-shell nanomedicine for combinatorial delivery of doxorubicin and sorafenib against hepatocellular carcinoma,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 10, no. 8, pp. 1649–1659, 2014.

59. Jinming Zhang, Jie Hu, Hon Fai Chan, Melissa Skibba, Guang Liang, Meiwan Chen: iRGD decorated lipid-polymer hybrid nanoparticles for targeted co-delivery of doxorubicin and sorafenib to enhance anti-hepatocellular carcinoma efficacy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12 (2016) 1303–1311
60. C.E. Mora-Huertasa, H. Fessi, A. Elaissari: Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385 (2010) 113–142
61. Nidhi Gupta, Rohan K. Verma, Shankar Prinja and Radha K. Dhiman: Cost-effectiveness of Sorafenib for Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma in India. *J Clin Exp Hepatol.* 2019 Jul-Aug; 9(4): 468–475. doi:10.1016/j.jceh.2018.10.003
62. Jung-Chen, HoMeng-Lun, HsiehPo-Heng, ChuangVivian, Chia-Rong, Hsieh: Cost-Effectiveness of Sorafenib Monotherapy and Selected Combination Therapy with Sorafenib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Value in Health Regional Issues*, volume 15, P120-126, MAY 01, 2018
63. Söptei Balázs: Gyógyszerhatóanyag hordozó szilika nanorészecskék előállítás és jellemzése, MSc szakdolgozat, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, 2011.
64. Ildikó Y. Tóth, Gábor Veress, Márta Szekeres, Erzsébet Illés, Etelka Tombácz: Magnetic hyaluronate hydrogels: preparation and characterization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2015. 380, 175-180.
65. Sofia Lara-Ochoa, Wendy Ortega-Lara, Carlos Enrique Guerrero-Beltrán: Hydroxyapatite Nanoparticles in Drug Delivery: Physicochemistry and Applications. *Pharmaceutics* 2021, 13, 1642. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101642>
66. Hutter E, Maysinger D. Gold nanoparticles and quantum dots for bioimaging. *Microsc Res Tech.* 2011 Jul;74(7):592-604. doi: 10.1002/jemt.20928. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20830812.
67. Lee BK, Yun Y, Park K. PLA micro- and nano-particles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Dec 15;107:176-191. doi: 10.1016/j.addr.2016.05.020. Epub 2016 Jun 1. PMID: 27262925; PMCID: PMC5133193.
68. Garg U, Chauhan S, Nagaich U, Jain N. Current Advances in Chitosan Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting. *Adv Pharm Bull.* 2019 Jun;9(2):195-204. doi: 10.15171/apb.2019.023. Epub 2019 Jun 1. PMID: 31380245; PMCID: PMC6664124.

69. Zhang H. Onivyde for the therapy of multiple solid tumors. *Onco Targets Ther.* 2016 May 20;9:3001-7. doi: 10.2147/OTT.S105587. PMID: 27284250; PMCID: PMC4881920.
70. Semple, S.C.; Leone, R.;Barbosa, C.J.; Tam, Y.K.; Lin, P.J.C. Lipid Nanoparticle Delivery Systems to Enable mRNA-Based Therapeutics. *Pharmaceutics* 2022, 14, 398.
71. Nichols, Joseph W.; Bae, You Han (September 2014). "EPR: Evidence and fallacy". *Journal of Controlled Release.* 190: 451–464. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.057
72. Lagreca, E., Onesto, V., Di Natale, C. et al. Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery. *Prog Biomater* 9, 153–174 (2020).
73. Ming Li, Olivier Rouaud, Denis Poncelet: Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics* 363 (2008) 26–39
74. Fatome, M., Courteille, F., Laval, J.D., Roman, V., 1987. Radioprotective activity of ethylcellulose microspheres containing WR 2721, after oral administration. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 52, 21–29.
75. Stallmann, H.P., Faber, C., Bronckers, A.L., Amerongen, A.V.N., Wuisman, P.I., 2006. In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile *BMC. Musculoskelet. Disord.* 7, 18.
76. Freytag, T., Dashevsky, A., Tillman, L., Hardee, G.E., Bodmeier, R., 2000. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *J. Contr. Rel.* 69, 197–207.
77. Sah, H., 2000. Ethyl formate—alternative dispersed solvent useful in preparing PLGA microspheres. *Int. J. Pharm.* 195, 103–113.
78. Luan, X., Skupin, M., Siepmann, J., Bodmeier, R., 2006. Key parameters affecting the initial release (burst) and encapsulation efficiency of peptidecontaining poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Int. J. Pharm.* 324, 168–175.
79. Spenlehauer, G., Veillard, M., Benoit, J.P., 1986. Formation and characterization of cisplatin loaded poly(d,l-lactide) microspheres for chemoembolization. *J. Pharm. Sci.* 75, 750.
80. Watts, P.J., Davies, M.C., Melia, C.D., 1990. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. *Int. J. Pharm.* 7, 235–250.

81. André-Abrant, A., Taverdet, J.-L., Jay, J., 2001. Microencapsulation par évaporation de solvant. *Eur. Polym. J.* 37, 955–967.
82. Yang, C.Y., Tsay, S.Y., Tsiang, R.C.C., 2000a. An enhanced process for encapsulating aspirin in ethylcellulose microcapsules by solvent evaporation in an O/W emulsion. *J. Microencap.* 17, 269–277.
83. Jalil, R., Nixon, J.R., 1990. Microencapsulation using poly(dl-lactic acid)I: effect of preparative variables on the microcapsule characteristics and release kinetics. *J. Microencap.* 7, 229–244.
84. Torres, D., Boado, L., Blanco, D., Vila-Jato, J.L., 1998. Comparison between aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods for microencapsulation of drug-resin complexes. *Int. J. Pharm.* 173, 171–182.
85. Calderbank, P.H., 1958. Physical rate processes in industrial fermentation. Part I: The interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 36, 443–463.
86. André-Abrant, A., Taverdet, J.-L., Jay, J., 2001. Microencapsulation par évaporation de solvant. *Eur. Polym. J.* 37, 955–967.
87. Jeffery, H., Davis, S.S., O'Hagan, D.T., 1991. Preparation and degradation of poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Contr. Rel.* 77, 169–175.
88. Jeffery, H., Davis, S.S., O'Hagan, D.T., 1993. The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles: II. The entrapment of amodel protein using a (water-in-oil)-inwater emulsion solvent evaporation technique. *Pharm. Res.* 10, 417–423.
89. Yang, Y.Y., Chung, T.S., Ng, N.P., 2001. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials* 22, 231–241.
90. Jeyanthi, R., Mehta, R.C., Thanoo, B.C., Deluca, P.P., 1997. Effect of processing parameters on the properties of peptide-containing PLGA microspheres. *J. Microencap.* 14, 163–174.
91. Witschi, C., Doelker, E., 1998. Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *J. Contr. Rel.* 51, 327–341.
92. Sansdrap, P., Moës, A.J., 1993. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres. *Int. J. Pharm.* 98, 157–164.

93. Gabor, F., Ertl, B., Wirth, M., Mallinger, R., 1999. Ketoprofen-poly(d,l-lactico-glycolic acid) microspheres: influence of manufacturing parameters and type of polymer on the release characteristics. *J. Microencap.* 16, 1–12.
94. Mateovic, T., Kriznar, B., Bogataj, M., Mrhar, A., 2002. The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres. *J. Microencap.* 19, 29–36.
95. Freitas, S., Merkle, H.P., Gander, B., 2004. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J. Contr. Rel.* 102, 313–332.
96. Izumikawa, S., Yoshioka, S., Aso, Y., Takeda, Y., 1991. Preparation of poly(l-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate. *J. Contr. Rel.* 15, 133–140.
97. Li, W.-I., Anderson, K.W., Mehta, R.C., Deluca, P.P., 1995b. Prediction of solvent removal profile and effect on properties for peptide-loaded PLGA microspheres prepared by solvent extraction/evaporation method. *J. Contr. Rel.* 37, 199–214.
98. Chung, T.-W., Huang, Y.-Y., Liu, Y.-Z., 2001. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLA microspheres. *Int. J. Pharm.* 212, 161–169.
99. Maa, Y.F., Hsu, C., 1996. Microencapsulation reactor scale-up by dimensional analysis. *J. Microencap.* 13, 53–66.
100. Shi, J.H., Chen, J., Wang, J., Zhu, Y.Y., Wang, Q., 2015. Binding interaction of sorafenib with bovine serum albumin: Spectroscopic methodologies and molecular docking. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 149, 630–637.
101. El-Enin, H.A., AL-Shanbari, A.H., 2018. Nanostructured liquid crystalline formulation as a remarkable new drug delivery system of anti-epileptic drugs for treating children patients. *Saudi Pharm. J.*
102. Karami, Z., Hamidi, M., 2016. Cubosomes: Remarkable drug delivery potential. *Drug Discov. Today* 21, 789–801.
103. Salah, S., Mahmoud, A.A., Kamel, A.O., 2017. Etodolac transdermal cubosomes for the treatment of rheumatoid arthritis: ex vivo permeation and in vivo pharmacokinetic studies. *Drug Deliv.* 24, 846–856.
104. Das, G.; Nicastrì, A.; Coluccio, M.L.; Gentile, F.; Candeloro, P.; Cojoc, G.; Liberale, C.; De Angelis, F.; Di Fabrizio, E. FT-IR, Raman, RRS measurements and DFT calculation for doxorubicin. *Microsc. Res. Tech.* 2010, 73, 991–995.



105. Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts*, 3rd ed.; JohnWiley&Sons Ltd.Hoboken, NJ, USA, 2001; ISBN 0-471-85298-8.
106. Elsayed, M.M.; Mostafa, M.E.; Alaaeldin, E.; Sarhan, H.A.; Shaykoon, M.S.; Allam, S.; Ahmed, A.R.; Elsadek, B.E. Design And Characterisation Of Novel Sorafenib-Loaded Carbon NanotubesWith Distinct Tumour-Suppressive Activity In Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Nanomed.* 2019, 14, 8445–8467.
107. Jaki'c, M.; Stipanelov Vrande'ci'c, N.; Erceg, M. Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene oxide) blends: Thermogravimetric and kinetic analysis. *Eur. Polym. J.* 2016, 81, 376–385.
108. Vahabi, H.; Michely, L.; Moradkhani, G.; Akbari, V.; Cochez, M.; Vagner, C.; Renard, E.; Saeb, M.R.; Langlois, V. Thermal Stability and Flammability Behavior of Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Based Composites. *Materials* 2019, 12, 2239.
109. Vogel, C.; Morita, S.; Sato, H.; Noda, I.; Ozaki, Y.; Siesler, H.W. Thermal Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) in Nitrogen and Oxygen Studied by Thermogravimetric–Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 2007, 61, 755–764.
110. Soares, P.I.P.; Sousa, A.I.; Silva, J.C.; Ferreira, I.M.M.; Novo, C.M.M.; Borges, J.P. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: Optimization and modelling. *Carbohydr. Polym.* 2016, 147, 304–312.
111. Tod, M.; Mir, O.; Bancelin, N.; Coriat, R.; Thomas-Schoemann, A.; Taieb, F.; Boudou-Rouquette, P.; Ropert, S.; Michels, J.; Abbas, H.; et al. Functional and clinical evidence of the influence of sorafenib binding to albumin on sorafenib disposition in adult cancer patients. *Pharm. Res.* 2011, 28, 3199–3207.
112. Korsmeyer, R.W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 1983, 15, 25–35.
113. Michał Michalak, Adam A. Marek, Jan Zawadiak, Michał Kawalec, Piotr Kurcok: Synthesis of PHB-based carrier for drug delivery systems with pH-controlled release. *Eur. Polym. J.* (2013) 4149–4156.
114. Kousar Perveen, Farha Masood, Abdul Hameed: Preparation, characterization and evaluation of antibacterial properties of epirubicin loaded PHB and PHBV nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* (2018) S0141-8130(19)36775-3
115. Sebastian Piepera, Klaus Langer: Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles - a systematic evaluation of preparation techniques and parameters. *Mater. Today: Proc.* 4 (2017) S188–S192

116. Tivadar Feczkó, Gabriella Merza, György Babos, Bernadett Varga, Eszter Gyetvai, László Trif, Ervin Kovács, Robert Tuba: Preparation of cubic-shaped sorafenib-loaded nanocomposite using welldefined poly(vinyl alcohol alt-propenylene) copolymer. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;562(March):333-341.

## Ábrajegyzék

1. ábra: A rák előfordulása és a halálozások száma (millió esetben) Európában, 1995-2018 között és előrejelzés 2020-2040 közötti időszakra .....	11
2. ábra: EPR effektus jelentősége passzív célzás során.....	19
3. ábra: iRGD célzott nanorészecskék (iRGD, fekete sávok) sejtfelvételének mennyiségi meghatározása .....	20
4. ábra: Metatézis reakcióval előállított, eltérő tulajdonságú poli-(vinil-alkohol) molekulák szerkezete és tulajdonságai.....	31
5. ábra: 1500 Da átlagos molekuláris tömegű PHB polimer összetételének eloszlása .....	34
6. ábra: Malvern NanoZS készülék részecskeméret meghatározáshoz .....	37
7. ábra: Méreteloszlási függvények: gyakorisági és összeggörbe .....	37
8. ábra: FEI Apreo S SEM (A) és FEI Talos F200 TEM (B,C) elektronmikroszkópok .....	38
9. ábra: Az elektromos kettősréteg és a zeta-potenciál méréséhez használatos mérőcella.....	41
10. ábra: Két hatóanyag abszorbancia-hullámhossz értékeinek átlapolása .....	42
11. ábra: MTT teszt lépései .....	51
12. ábra: PVA alapú nanorészecskék méreteloszlása.....	52
13. ábra: Különböző összetételű PF-68 közegben előállított PVA alapú nanorészecskék méreteloszlása.....	53
14. ábra: PVA-5 kapszulázó polimerrel készült, köbös alakú, sorafenib tartalmú nanorészecskék (A) és sorafenib kristályok (B).....	54
15. ábra: Sorafenib kioldódása PVA alapú nanorészecskékből .....	56
16. ábra: Áramlási citométerrel mért fluoreszcens intenzitás.....	56
17. ábra: Sorafenib és PVA alapú, sorafenib tartalmú nanorészecskék citotoxikus hatása .....	57
18. ábra: Hatóanyagokat tartalmazó PLGA 752H (A) és Resomer RGP d 5055 PEG-ilált PLGA (B) nanorészecskék méreteloszlása.....	59
19. ábra: Hatóanyagot tartalmazó PLGA (A) és PEG-PLGA (B) alapú nanorészecskékről készült SEM felvételek.....	60
20. ábra: Doxorubicin (A) és sorafenib (B) mérőgörbéje HPLC-UV-vis mérés során .....	61
21. ábra: PLGA alapú, doxorubicin és sorafenib hatóanyagtartalmú oldat HPLC analízisekor kapott kromatogram .....	62
22. ábra: Doxorubicin kioldódása vérplazmában PLGA és PEG-PLGA nanorészecskékből ..	63
23. ábra: Sorafenib kioldódása vérplazmában PLGA és PEG-PLGA nanorészecskékből.....	64

24. ábra: Doxorubicin (A) és sorafenib (B) kioldódása savas pufferben PLGA és PEG-PLGA nanorészecskékből.....	65
25. ábra: HT-29 tumorsejtek viabilitása MTT teszttel különböző mennyiségű hatóanyagot tartalmazó oldat (jelölés: DOX), -PLGA nanorészecske és -PEG-PLGA nanorészecske hatására. ....	67
26. ábra: PLGA és iRGD peptiddel felületmódosított nanorészecskék méreteloszlása .....	68
27. ábra: PHB (A) és PEG-PHB (B) nanorészecskék valós mérete SEM felvételen .....	70
28. ábra: PHB és PEG-ilált PHB nanorészecskék méreteloszlási diagramja .....	71
29. ábra: Sorafenib kristályok a kapszulázó polimer nélkül.....	71
30. ábra: PHB részecskék FTIR vizsgálata .....	73
31. ábra: PEG-PHB részecskék FTIR vizsgálata.....	74
32. ábra: PHB nanorészecskék TG-DSC vizsgálata.....	75
33. ábra: PHB nanorészecskék MSEGGA vizsgálata .....	76
34. ábra: Doxorubicin kioldódásának vizsgálata PHB nanorészecskékből.....	77
35. ábra: Sorafenib kioldódásának vizsgálata PHB nanorészecskékből .....	78
36. ábra: Doxorubicin kioldódásának vizsgálata PEG-PHB nanorészecskékből.....	79
37. ábra: Sorafenib kumulatív felszabadulása PEG-ilált PHB nanorészecskékből vérplazmában (háromszögek) és savas közegben (négyzetek) mérve. ....	80
38. ábra PHB és PEG-PHB alapú nanorészecskék citotoxikológiai vizsgálata .....	82

## Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: Nanorészecskék létrehozására szolgáló technikák. ....	16
2. táblázat: Nanorészecskék főbb típusai szerkezeti felépítés szerint .....	17
3. táblázat: Nanorészecskék fizikai tulajdonságait befolyásoló tényezők.....	23
4. táblázat: Különböző előállítási paraméterek hatása a nanorészecskék szerkezetére .....	27
5. táblázat: Kapszulázási hatékonyság vizsgálati módszerei.....	43
6. táblázat: Doxorubicin és sorafenib HPLC vizsgálatához alkalmazott elúciós gradiens értékei .....	46
7. táblázat: Intenzitás szerinti méreteloszlás, PDI és zeta-potenciál értékek különböző összetételű PF-68 emulgeátor közegben.....	53
8. táblázat: Kapszulázási hatékonyság, hozam és hatóanyag-tartalom .....	55
9. táblázat: Doxorubicin (DOX) és sorafenib (SOR) nanorészecskék hozama, mérete, polidiszperzitási indexe (PDI), kapszulázási hatékonysága és hatóanyag-tartalma .....	58
10. táblázat: Fluoreszcens intenzitás értékek PEG-PLGA nanorészecskék HT-29 sejtek általi felvétele esetén .....	66
11. táblázat: Fluoreszcensen jelölt nanorészecskéket felvett HCT-116 tumorsejtek aránya....	58
12. táblázat: PHB és PEG-PHB nanorészecskék hozama, hatóanyag kapszulázási hatékonysága és hatóanyag-tartalma.....	72
13. táblázat: A gyógyszerfelszabadulási mechanizmusok kinetikai paramétereit.....	81

## **Köszönetnyilvánítás**

Doktori disszertációmért köszönetemet fejezem ki elsőként témavezetőmnek, Dr. Feczko Tivadarnak, szakmai iránymutatása és támogatása nélkül a dolgozat nem készülhetett volna el. Hálával tartozom Fodorné Kardos Andreának és a Természettudományi Kutatóközpont, Anyag- és Környezetkémiai Intézet, Funkcionális Nanorészecskék Kutatócsoportnak a szakmai támogatásért.

Köszönöm Dr. Járvás Gábornak, hogy engedélyezte a kísérleteimet a Pannon Egyetem, Transzlációs Glikomika Kutatócsoport laboratóriumában és Szerényi Dórinak a segítségét a sejttenyésztésben.

A gyógyszerhordozó nanorészecskék nem készülhettek volna el a Dr. Tuba Róbert (TTK, Zöld Kémia Kutatócsoport) és a Joanna Rydz, illetve Michal Kawalec (Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences) által készített polimerek nélkül.

Külön köszönöm Dr. Vitai Mártának a tanácsait, valamint egyes eszközök és sejtvonalak biztosítását.

Végül, de nem utolsósorban nem tudok elég hálás lenni szüleimnek, akik mindvégig támogattak, húgomnak, aki életben tartotta helyettem a macskát és Évinek, aki átsegített és biztatott a nehezebb időszakokban.