

DOKTORI PhD ÉRTEKEZÉS

Kántor Izolda

Pannon Egyetem
2023



Pannon Egyetem

Vegyészmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskola

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**HAGYOMÁNYOS KEMOTERÁPIÁS SZEREK ÉS
SZINTETIKUS ANTOCIANIDIN RÁKELLENES
HATÓANYAGOK MIKROKAPSZULÁZÁSA
BIOKATALÍZISSEL ELŐÁLLÍTOTT POLIMEREKKEL**

DOI: 10.18136/PE.2024.877

Készítette:

Kántor Izolda

Témavezetők:

Dr. Feczko Tivadar

tudományos főmunkatárs

Dr. May Zoltán

tudományos főmunkatárs

Veszprém

2023

Hagyományos kemoterápiás szerek és szintetikus antocianidin rákellenes hatóanyagok mikrokapszulázása biokatalízissel előállított polimerekkel

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

Anyagtudományok és technológiák tudományágban

Írta: Kántor Izolda

Témavezetők: Dr. Feczkó Tivadar, Dr. May Zoltán

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
Dr. Feczkó Tivadar Dr. May Zoltán
(témavezetők)

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....
(bíráló)

Bíráló neve: igen /nem

.....
(bíráló)

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

Veszprém,

.....
(a Bíráló Bizottság elnöke)

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

Veszprém,

.....
(az EDHT elnöke)

Kivonat

A nanokészítmények fontos szerepet játszhatnak a rákellenes gyógyszeres terápiák hatékonyságának növelésében. A hatóanyagot tartalmazó nanohordozók a tiszta kemoterápiás szerekhez képest számos hátrányt kiküszöbölhetnek, mint például a korlátozott biológiai hozzáférhetőség, a gyógyszerrezisztencia és a mellékhatások. Az ellenőrzött és célzott hatóanyagszállító rendszerek egyik ígéretes csoportja a polimer alapú nanorészecskék, amelyek diffúzióval és lebomlással képesek felszabadítani a hatóanyagot. A poliészterek és poliamidok enzimkatalizált folyamatokkal történő *in vitro* szintézisét az elmúlt évtizedekben fejlesztették ki zöld alternatívaként biológiailag lebomló, szintetikus polimerek előállítására különböző alkalmazásokkal, például nanorészecske méretű hordozókkal gyógyszer szállításhoz. A poliészter-amidokat sokkal kevésbé tanulmányozták ebben a tekintetben, bár feltételezhető előnyük az amid-részek által okozott megnövekedett mechanikai és termikus ellenállás. A szintetizált biokompatibilis és biodegradábilis 12-hidroxi-sztearinsav- ϵ -kaprolakton és 16-hidroxi-hexadekánsav- ϵ -kaprolaktám kopolimerekkel a szerző sorafenib, ciszplatin és szintetikus antocianidin rákellenes vegyületeket mikrokapszulázott. A nanorészecskéket emulziós-oldószer elpárologtatási módszerrel állította elő, optimalizálva a módszereket a részecskeméretre és a kapszulázási hatékonyságra. A kifejlesztett nanoterapeutikumok ígéretes hatóanyag-felszabadulási profilt és citotoxikus hatást mutattak *in vitro* HepG2 hepatocelluláris karcinóma sejtekben. A szerző, munkája során a szinergikus hatás reményében kettős hatóanyagtartalmú polimer nanorészecskéket is előállított jó termelési hozammal, egy továbbfejlesztett kettős emulziós-oldószer elpárologtatási módszerrel. A ciszplatin beépülésének növelésére szarvasmarha szérum albumin (BSA) modellvegyületet alkalmazott; majd sikeresen helyettesítette azt iRGD tumor penetrációs peptiddel, amely a nanorészecske célzási funkcióját biztosíthatja. A kettős hatóanyagú rendszer hatékonyságát citotoxicitási teszttel igazolta HepG2 sejtvonalon. Az új szintetikus antocianidineket *in vitro* vizsgálta, mint lehetséges citosztatikus vegyületek, HCT116 és HepG2 rákos sejtek ellen. Továbbá vizsgálta a két legaktívabb vegyület halokróm tulajdonságait, amelyek befolyásolhatják a biológiai aktivitást, és molekuláris kapszulázásnak vetette alá β -ciklodextrin-származékokban, hogy növelje a vízben való oldhatóságukat és biológiai hozzáférhetőségüket.

Abstract

Nanoformulations have a significant potential to advance anticancer drug therapies. Compared to pure chemotherapeutics, drug-loaded nanocarriers have been able to overcome many challenges, such as limited bioavailability, multiple drug resistance and adverse effects. Polymer-based nanoparticles are a potential class of targeted and controlled drug delivery devices, because they can maintain the release of the active agent through diffusion and their degradation. In recent years, a green approach of producing biodegradable synthetic polymers with a variety of uses, including nanoparticle-sized carriers for drug administration, has been developed. Polyesteramides were significantly less investigated in this area, although having the potential benefit of higher mechanical and thermal resistance given by amide moiety. The synthesized biocompatible and biodegradable ϵ -caprolactone-12-hydroxystearic acid and ϵ -caprolactam-16-hydroxyhexadecanoic acid copolymers were used as new encapsulating agents for the production of polymeric nanoparticles containing sorafenib, cisplatin or anthocyanidin. The nanoparticles formed by emulsion-solvent evaporation method demonstrated a promising drug release profile and *in vitro* cytotoxic efficacy on HepG2 hepatocellular cells. In the expectation of a synergistic effect, polymer nanoparticles with dual active ingredients were produced, using an improved double emulsion-solvent evaporation method, achieving a good production yield. To increase the incorporation of cisplatin, the bovine serum albumin (BSA) model compound was used, which was successfully replaced with the iRGD tumor penetration peptide that can provide the targeting function of the nanoparticles. The efficacy of the dual drug system was demonstrated by cytotoxicity test on HepG2 cell line. The potential cytostatic properties of the novel anthocyanidin derivatives against HCT116 and HepG2 cancer cells were examined *in vitro*. Additionally, the halochromic properties of the two most active compounds were investigated, that may affect the biological activity. In order to enhance their solubility in water and bioavailability, these two substances were molecularly enclosed in β -cyclodextrin derivatives.

Kurzfassung

Nanoformulierungen haben ein erhebliches Potenzial für die Weiterentwicklung von Krebsmedikamenten. Im Vergleich zu reinen Chemotherapeutika konnten wirkstoffbeladene Nanoträger viele Herausforderungen meistern, wie z. B. begrenzte Bioverfügbarkeit, mehrfache Arzneimittelresistenz und Nebenwirkungen. Polymerbasierte Nanopartikel sind eine potenzielle Klasse von Geräten zur gezielten und kontrollierten Verabreichung von Medikamenten, da sie die Freisetzung des Wirkstoffs durch Diffusion und deren Abbau aufrechterhalten können. In den letzten Jahren wurde ein umweltfreundlicher Ansatz zur Herstellung biologisch abbaubarer synthetischer Polymere mit vielfältigen Einsatzmöglichkeiten, einschließlich nanopartikelgroßer Träger für die Arzneimittelverabreichung, entwickelt. Polyesteramide wurden in diesem Bereich deutlich weniger untersucht, obwohl sie aufgrund der Amideinheit den potenziellen Vorteil einer höheren mechanischen und thermischen Beständigkeit aufweisen. Die synthetisierten biokompatiblen und biologisch abbaubaren ϵ -Caprolacton-12-hydroxystearinsäure und ϵ -Caprolactam-16-hydroxyhexadecansäure-Copolymere wurden als neue Verkapselungsmittel für die Herstellung von polymeren Nanopartikeln verwendet, die Sorafenib, Cisplatin und Anthocyanidine enthalten. Die Nanopartikel hergestellt durch die Methode der Emulsions-Lösungsmittel-Verdampfung zeigten ein vielversprechendes Wirkstofffreisetzungsprofil und eine in vitro zytotoxische Wirksamkeit auf den hepatozellulären HepG2-Zellen. In Erwartung eines synergistischen Effekts wurden Polymernanopartikel mit dualen Wirkstoffen mithilfe einer verbesserten Methode der doppelten Emulsion-Lösungsmittel-Verdampfung hergestellt und eine gute Produktionsausbeute erzielt. Um den Einbau von Cisplatin zu erhöhen, wurde eine Modellverbindung aus Rinderserumalbumin (BSA) verwendet, die erfolgreich durch ein iRGD-Tumorpenetrationspeptid ersetzt wurde, das die Targeting-Funktion von Nanopartikeln übernehmen kann. Die Wirksamkeit des dualen Wirkstoffsystems wurde durch einen Zytotoxizitätstest an der HepG2-Zelllinie nachgewiesen. Die potentiellen zytostatischen Eigenschaften der neuartigen Anthocyanidine-Derivate gegen HCT116- und HepG2-Krebszellen wurden in vitro untersucht. Darüber hinaus wurden die halochromen Eigenschaften der beiden aktivsten Verbindungen untersucht, die die biologische Aktivität beeinflussen können. Um ihre Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit zu erhöhen, wurden diese beiden Substanzen molekular in β -Cyclodextrin-Derivate eingeschlossen.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	I
Ábrajegyzék	II
Táblázatjegyzék	V
1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	1
2.1 Gyógyszerhordozók típusai.....	1
2.2 Gyógyszerhordozó anyagok.....	6
2.2.1 Polimer alapú hordozóanyagok	6
2.2.2 Ciklodextrinek	9
2.3 Hatóanyagok ismertetése	12
2.3.1 Sorafenib.....	12
2.3.2 Ciszplatin.....	13
2.3.3 Antociánok	14
2.4 Mikrokapszulázási technikák részecskék előállítására	16
2.4.1 Emulzió-oldószer elpárologtatás módszerei.....	17
2.4.2 Inklúziós komplexek előállítása	18
2.5 Szabályozott és célzott gyógyszeradagolás.....	20
2.5.1 Passzív célzás	22
2.5.2 Aktív célzás	23
2.5.3 Szabályozott hatóanyagleadás	24
2.6 Célkitűzések	26
3. Kísérleti rész	28
3.1 Felhasznált anyagok	28
3.2 Polimer hordozók.....	29
3.2.1. 12-hidroxi-sztearinsav- ϵ -kaprolakton kopolimer	29

Tartalomjegyzék

3.2.2 16-hidroxi-hexadekánsav- ϵ -kaprolaktám kopolimer.....	29
3.3 Előállítási módszerek	30
3.3.1 Sorafenibtartalmú részecskék előállítása.....	30
3.3.1.1 Mikrokapszulázás 12CL polimerrel.....	30
3.3.1.2 Mikrokapszulázás 16CM polimerrel	30
3.3.2 Sorafenib- és ciszplatintartalmú részecskék előállítása.....	31
3.3.3 Az iRGD tumor penetrációs peptid mikrokapszulázása.....	31
3.3.4 Az antocianidinek molekuláris kapszulázása	32
3.3.5 Antocianidin inklúziós komplexek mikrokapszulázása	32
3.4 A részecskék felületmódosítása	33
3.5 Részecskék jellemzése	33
3.5.1 Szemcseméret-elemzés.....	33
3.5.1.1 Dinamikus fényszórás módszere	33
3.5.1.2 Elektrokinetikai potenciál (ζ -potenciál) és stabilitás	34
3.5.1.3 Morfológia	35
3.5.2 Előállítási hozam	35
3.5.3 Kapszulázási hatékonyság	35
3.5.3.1 Sorafenib kapszulázási hatékonyságának meghatározása	35
3.5.3.2 Ciszplatin kapszulázási hatékonyságának mérése	36
3.5.3.3 A szarvasmarha szérum albumin tartalmának meghatározása kolorimetriásan	36
3.5.3.4 Az iRGD-tartalom meghatározása.....	37
3.5.3.5 Antocianidin kapszulázási hatékonysága.....	37
3.5.3.6 Hatóanyagtartalom.....	37
3.5.4 Hatóanyagleadás	38
3.5.5 In vitro citotoxicitás.....	38
3.5.5.1 Sejtvonalak.....	38
3.5.5.2 MTT viabilitás teszt.....	38

Tartalomjegyzék

3.6 Szintetikus antocianidinek halokróm tulajdonságainak spektroszkópai vizsgálata	39
3.7 Adatfeldolgozás.....	39
4. Eredmények és értékelésük.....	41
4.1 Sorafenib mikrokapszulázása 12CL polimerrel	41
4.1.1 A módszer optimalizálása és a részecskék jellemzése	41
4.1.2 Hatóanyagleadás	44
4.1.3 Citotoxicitás.....	45
4.2. Sorafenib és ciszplatin együttes mikrokapszulázása 12CL polimerrel	46
4.2.1 Módszer-optimalizálás BSA mikrokapszulázásával	46
4.2.2 Kettős hatóanyagú rendszer vizsgálata.....	47
4.2.3 Sorafenib és ciszplatin szimultán mikrokapszulázása iRGD peptiddel	50
4.2.4 Hatóanyagleadás vizsgálata.....	53
4.2.5 Citotoxicitási teszt	54
4.3 Sorafenib mikrokapszulázása 16CM polimerrel	56
4.3.1 Az előállítási módszer optimalizálása	56
4.3.2 Hatóanyagleadás vizsgálat.....	61
4.3.3 A hatóanyag-kioldási profil javítása	62
4.4 Szintetikus antocianidinek vizsgálata	64
4.4.1 Az új, szintetikus antocianidinek citotoxicitás-vizsgálata.....	66
4.4.2 Antocianidinek molekuláris kapszulázása és oldhatósági vizsgálata.....	70
4.4.3 Az antocianidinek halokróm tulajdonságainak vizsgálata	71
4.4.4 Flavilium-ciklodextrin komplexek citotoxicitása.....	74
4.4.5 Antocianidin komplexek mikrokapszulázása	76
5. Összefoglalás	80
Tézispontok.....	81
Thesis	82
Tézisek alapjául szolgáló cikkek	84

Tartalomjegyzék

Bibliográfia	85
Köszönetnyilvánítás.....	99
Mellékletek	100

Rövidítések jegyzéke

12CL	12-hidroxi-sztearinsav- ε-kaprolakton kopolimer	NMR o/v	mágneses magrezonancia olaj-víz arány
16CM	16-hidroxi-hexadekánsav- ε-kaprolaktám kopolimer	PCL PBS	poli-ε-kaprolakton izotóniás foszfát-puffer oldat
12HSA	12-hidroxi-sztearinsav	PDI	polidiszperzitási index
ANOVA	varianciaanalízis	PEG	polietilén-glikol
BSA	szarvasmarha szérum albumin	PLA	politejsav
CD	ciklodextrin	PLGA	poli(tejsav-glikolsav) kopolimer
CN	antcianidin	PVA	poli(vinil-alkohol)
CIS	ciszplatin	RAMEB	random metilezett β-ciklodextrin
DCC	N,N'-diciklohexil-karbodiimid	RES	retikuloendoteliális rendszer
DCM	diklór-metán	SBECD	szulfobutil-éter-β-ciklodextrin
DLS	dinamikus fényszórás	SDS	nátrium-dodecil-szulfát
DL	hatóanyagtartalom	SEM	pásztázó elektronmikroszkóp
DMSO	dimetil-szulfoxid	SLN	szilárd lipid nanorészecske
ECL	ε-kaprolakton	SOR	sorafenib
ECM	ε-kaprolaktám	SPAN20	szorbitán-monolaurát
EDC	1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)- karbodiimid	SPAN80	szorbitán-monooleát
FCS	magzati borjú szérum	S/TEM	pásztázó/transzmissziós elektronmikroszkóp
FDA	Élelmiszer- és Gyógy- szerfelügyelet (USA)	THF	tetrahidrofurán
FT-IR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia	UV-VIS	UV-látható spektrofotometria
HCC	hepatocelluláris karcinóma	Z-avg v/o	intenzitás szerinti átlagméret víz-olaj emulzió
HLB	hidrofil-lipofil egyensúly	v/o/v	víz-olaj-víz emulzió
HPBCD	hidroxipropil-β-ciklodextrin		
ICP-OES	induktív csatolású plazma- optikai emissziós spektrométer		
MPS	mononukleáris fagocita rendszer		
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5- difenil-tetrazólium-bromid		
Mw	molekulatömeg		
NHS	N-hidroxi-szukcinimid		

Ábrajegyzék

1. ábra. A nanoanyagok legfontosabb tulajdonságai és farmakokinetikai paraméterekre gyakorolt hatásaik.....	2
2. ábra. A nanorészecskék széles spektruma.	1
3. ábra. A létrehozott nanoterápiás platformok és különböző nanogyógyászati termékek illusztrációja.	2
4. ábra. Főbb szerves nanohordozók szerkezetei: liposzóma (A) és szolid lipid nanorészecske (B).....	3
5. ábra. Főbb szerves nanohordozók szerkezetei: dendrimer (A) és polimer micella (B).....	4
6. ábra. A nanokapszulák és nanogömbök szerkezetének, valamint a hatóanyag lehetséges elhelyezkedésének ábrázolása.	5
7. ábra. Az α -, β - és γ -ciklodextrinek kémiai szerkezete és üregméretei.	10
8. ábra. A sorafenib szerkezete.	12
9. ábra. A ciszplatin és származékainak szerkezetei: (A) ciszplatin, (B) karboplatin és (C) oxaliplatin.....	13
10. ábra. Az antocianidinek alapváza.	15
11. ábra. A ciklodextrin és a vendégmolekula kölcsönhatásai.	20
12. ábra. Passzív célzás az EPR hatás révén és aktív célzás a nanorészecskék felületén levő sejtspecifikus ligandumokkal.	22
13. ábra. Különböző hatóanyag-felszabadulási mechanizmusok a nanohordozókban..	26
14. ábra. Összetett emulziós-oldószer elpárologtatás módszere a SORiRGDCIS minta előállítására, valamint a fő előállítási paraméterek.	32
15. ábra. ECL és 12HSA kopoliészterek és homopoliészterek szintézisének reakciósémája, ahol n - 12HSA ismétlődő egységeinek és m – ECL ismétlődő egységeinek száma a polimerekben.....	41
16. ábra. SOR-tartalmú 12CL részecskék méreteloszlása a PVA emulgeálószer koncentrációjának függvényében.	42
17. ábra. A részecskék méreteloszlása különböző SOR-koncentrációk mellett, a kezdeti polimer mennyiségéhez viszonyítva.....	43
18. ábra. SOR-tartalmú 12CL nanorészecskék S/TEM képe fém mintatartó rácson. ...	44
19. ábra. Az optimalizált egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatás módszer sémája..	44

20. ábra. Kumulatív SOR felszabadulás a 12CL részecskékből, acetát pufferben (pH = 5,5).	45
21. ábra. SOR-tartalmú 12CL részecskék citotoxicitása növekvő SOR-koncentráció mellett, HepG2 sejteken vizsgálva.	45
22. ábra. A 12CL polimer BSA-val történő aktiválásának reakciósémája diciklohexil-karbodiimid (DCC) keresztkötő ágenszt alkalmazva.	48
23. ábra. A BSA-t tartalmazó 12CL nanorészecskék méreteloszlása DCC jelenlétében (piros vonal) és vak minta esetében (zöld vonal).	49
24. ábra. iRGD-tartalmú kettős hatóanyagú nanorészecskék SEM képei (méretarány: (A) 1 µm, (B) 500 nm).	51
25. ábra. Kettős hatóanyaggal és iRGD-vel előállított nanorészecskék méreteloszlása DCC-vel (piros vonal) és anélkül (zöld vonal).	52
26. ábra. A sorafenib kumulatív felszabadulása a kettős hatóanyagtartalmú 12CL polimerből nátrium-acetát pufferben (pH = 5,5) és vérplazmában (pH = 7,4).	53
27. ábra. HepG2 sejteken tanulmányozott kettős hatóanyagú 12CL nanorészecskék (SORiRGDCIS) és tiszta-hatóanyagok citotoxicitása a CIS és SOR koncentráció függvényében.	56
28. ábra. A négy választott minta méreteloszlása dinamikus fényszórás módszerével mérve.	58
29. ábra. A legjobb paraméterekkel rendelkező három SOR-tartalmú minta méreteloszlás görbéi.	61
30. ábra. A 16CM14SOR2 minta SEM képe.	61
31. ábra. A sorafenib kumulatív felszabadulása a 16CM14SOR2 nanorészecskékből.	62
32. ábra. A sorafenib kumulatív felszabadulása a különböző adalékanyagokkal előállított nanorészecskékből, összehasonlítva az adalékmentes 16CM14SOR2 nanorészecskékkel, Na-acetát pufferben (pH = 5,5).	63
33. ábra. A sorafenib kumulatív felszabadulása a különböző adalékanyagokkal előállított nanorészecskékből, összehasonlítva az adalékmentes 16CM14SOR2 nanorészecskékkel, vérplazmában (pH = 7,4).	64
34. ábra. Az szintetikus antocianidinek szintézisének reakciósémája.	65
35. ábra. A HCT116 sejtek életképessége (%) a flavilium-koncentráció függvényében (1–8: a flavilium származékok sorszáma a 16-os táblázat alapján).	66
36. ábra. A HepG2 sejtek életképessége (%) a flavilium-koncentráció függvényében (1–8: a flavilium származékok sorszáma a 16-os táblázat alapján).	67

37. ábra. Az antocianidin- β -ciklodextrin vizes komplexek fotói. (Balról-jobbra: 5-SBECD, 5-RAMEB, 7-RAMEB, 7-SBECD, 5-HPBCD, 7-HPBCD).	70
38. ábra. Az antocianidin- β -ciklodextrin vizes komplexek legjobb kombinációinak fotói (A, B).	71
39. ábra. Az antocianidin formák pH függő változása.	71
40. ábra. Az 5. (A) és 7. (B) vegyületek UV-VIS spektrumai különböző pH értékeken, az elkészítés után 30 perccel mérve.....	72
41. ábra. Az 5. (A) és 7. (B) vegyületek abszorpciós spektrumai követlenül a minták előkészítése után vízben (fekete vonal), SBECD-vizes oldatban (piros vonal) és az utóbbiak spektruma 3 óra elteltével (kék vonal).	73
42. ábra. A HepG2 sejtek viabilitása (%) az 5. (A) és 7. (B) vegyületek és a ciklodextrin komplexük koncentrációi, valamint a SBECD és RAMEB függvényében.	74
43. ábra. 12CLCN2.1CD3 minták méreteloszlás görbéi.	77
44. ábra. 16CMCN2.1CD3 minták méreteloszlás görbéi.	79

Táblázatjegyzék

1. táblázat. A ciklodextrinek különböző típusainak jellemzői.	11
2. táblázat. A polimer koncentráció hatása a nanorészecskék méretére.	42
3. táblázat. SOR-t tartalmazó 12CL részecskék mérete és kapszulázási hatékonysága az alkalmazott hatóanyag-koncentráció függvényében.	43
4. táblázat. A nanorészecske-előállítási módszer optimalizálása BSA mikrokapszulázással.	47
5. táblázat. A hatóanyagok mikrokapszulázása 1:5 o/v arány, 1% (m/V) PVA és 0,5 mg BSA használatával.	48
6. táblázat. A BSA mikrokapszulázása 12 CL polimerrel DCC alkalmazásával.	49
7. táblázat. A SOR és CIS hatóanyagok szimultán mikrokapszulázása BSA és DCC segédanyagokkal, 1:5 o/v arány, 1% (m/V) 12CL-koncentráció és 1% (m/V) PVA alkalmazásával.	50
8. táblázat. Az iRGD peptid mikrokapszulázása DCC-vel, 1:5 o/v arány, 1% (m/V) 12CL-koncentráció és 1% (m/V) PVA felhasználásával.	50
9. táblázat. A hatóanyagok és az iRGD penetrációs peptid mikrokapszulázása 12CL hordozóval.	52
10. táblázat. Különböző koncentrációjú csoportok egyszempontos ANOVA/Kruskal-Wallis analízise (C – ciszplatin, S – sorafenib és CS – ciszplatin-sorafenib kettős részecskerendszer).	55
11. táblázat. A nanorészecskék tulajdonságai a módszer optimalizálása során, 0,5% (m/V) polimer koncentráció alkalmazásával.	57
12. táblázat. A nanorészecskék tulajdonságai a módszer optimalizálása során, 1% (m/V) polimer koncentráció alkalmazásával.	57
13. táblázat. Az optimalizálás során választott négy minta jellemzői.	58
14. táblázat. A SOR mikrokapszulázása a mennyiségének változtatásával.	59
15. táblázat. 0,5 és 1 mg SOR-tartalmú részecskék vak mintákkal összehasonlítva.	60
16. táblázat. A keletkezett nyolc flavilium kation származék és tisztaságuk.	65
17. táblázat. A két különböző koncentrációnál (C1 – 50 µg/ml, C2 – 25 µg/ml) végzett t-teszt / Welch féle t-teszt / Mann-Whitney U-teszt, mindkét sejtvonalon.	68

18. táblázat. Egyszempontú ANOVA / Kruskal-Wallis teszt a különböző koncentrációknál, mindkét sejtvonalon (C1 – 50 µg/ml, C2 – 25 µg/ml, C3 – 10 µg/ml).....	69
19. táblázat. Egyszempontú ANOVA / Kruskal-Wallis teszt a különböző koncentrációjú komplexált mintákkal (C1 – 50 µg/ml, C2 – 25 µg/ml, C3 – 10 µg/ml), HepG2 sejteken.	75
20. táblázat. Különböző antocianidin (5, 7) koncentrációval (C1 – 50 µg/ml, C2 – 25 µg/ml, C3 – 10 µg/ml) végzett t-teszt / Welch féle t-teszt / Mann-Whitney U-teszt, a komplexált társaikkal (5+SBECD, 7+RAMEB) való összehasonlításra, HepG2 sejtvonalon.....	75
21. táblázat. CN2.1 antocianidin-CD3 ciklodextrin komplex 12CL polimerrel végzett mikrokapszulázásának előállítási paraméterei.	77
22. táblázat. 12CLCN2.1CD3 minták tulajdonságai.	78
23. táblázat. CN2.1 antocianidin-CD3 ciklodextrin komplex 16CM polimerrel végzett mikrokapszulázásának előállítási paraméterei.	78
24. táblázat. 16CMCN2.1CD3 minták tulajdonságai.	79

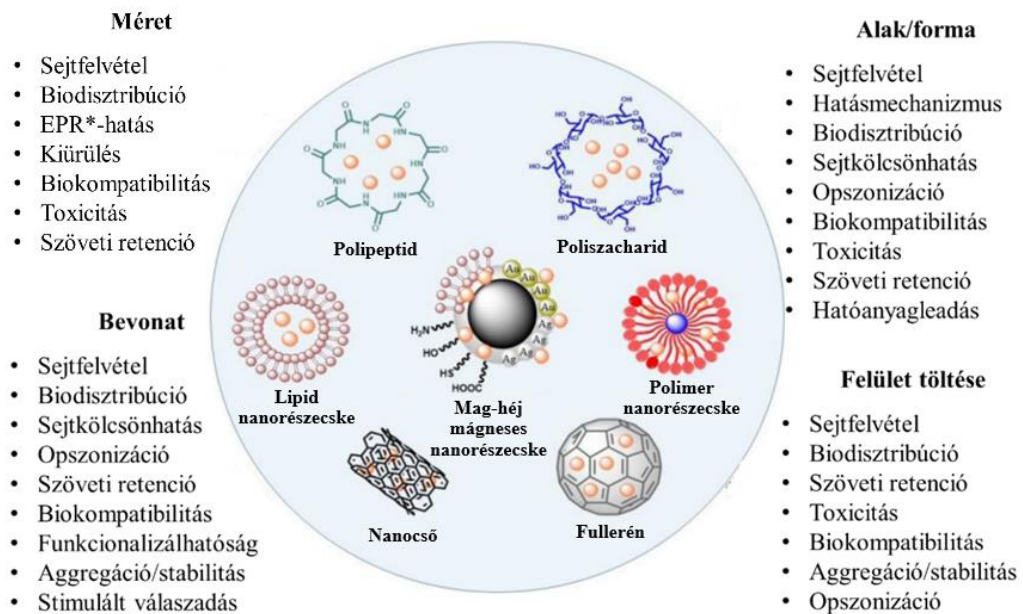
1. Bevezetés

A nanomedicina a gyógyszeripar egyik legjobban fejlődő ága, olyan nanotechnológiaként definiálható, amely nanoméretű anyagokat von be az egészségügyi- és orvosi-alkalmazásokba. Ennek a technológiának a fejlődése innovációt jelentett különböző orvosi területeken, beleértve a szabályozott és célzott hatóanyagleadást, a biomarkereket, a molekuláris képalkotást és a bioérzékelést. A nanogyógyászati termékek lehetőséget kínálnak kifinomult célzási stratégiák és multifunkcionalitás megvalósítására [Wicki et al., 2015]. A nanoméretű eszközök koncepciója biológiailag lebomló, önszerveződő nanorészecskék kifejlesztéséhez is vezetett, amelyeket rákellenes gyógyszerek és képalkotó kontrasztanyagok szervezeten belüli célzott szállítására terveztek. Bár a kolloidkémiai definíció szerint a nanorészecskék <100 nm méretűek, a mikrokapszulázás szakirodalmában általánosan elfogadott ezt a kifejezést a szubmikronos átmérőjű részecskékre alkalmazni (Yokoyama T. 2018). A nanorészecskék méretük miatt leküzdhetik a sejtes és fiziológiai akadályokat. Az ilyen „intelligens”, multifunkcionális eszközök jelentik az onkológia gyakorlati fejlődését, lehetővé téve a betegség korai diagnosztizálását és célzott terápiáját [Cancino-Bernardi et al., 2017].

A rák kezelés jelenlegi problémái közé tartozik az alacsony specifitás. A legtöbb rákellenes szer nem tesz különbséget a normál és rákos sejtek között, szisztémás toxicitást és káros mellékhatásokat okozva. Továbbá a gyógyszer gyors kiürülése és biológiai lebomlása, valamint a korlátozott célzása szintén problémát jelent, ezért a célzott szállítás és irányított hatóanyagleadás rendkívül fontos a rákterápia jelenlegi korlátainak leküzdése érdekében [Sinha et al., 2006]. A nanorészecskék segíthetnek leküzdni a rákellenes gyógyszerek oldhatóságával és kémiai stabilitásával kapcsolatos problémákat. A rossz vízoldhatóság korlátozza ezen vegyületek biológiai hozzáférhetőségét. A rosszul oldódó gyógyszerhatóanyagok felvétele és szállítása növelhető ezeknek a vegyületeknek hidrofil nanohordozókba való beágyazásával, ugyanakkor ez növelheti a kémiai stabilitásukat. Továbbá, a nanohordozók képesek megvédeni a rákellenes vegyületeket a biológiai lebomlástól vagy kiválasztódástól, ezáltal befolyásolva farmakokinetikai profiljukat [Williams et al., 2013]. A nanohordozók jellemzői (**1. ábra**), mint a méret, a nagy fajlagos felület, a hatóanyag-felszabadulási profil és finomhangolhatóságuk a célzás érdekében, lehetővé teszik azok számára, hogy hatékonyan bejussanak a célszövetbe és

1. Bevezetés

irányított módon szabadítsák fel a szállított hatóanyagokat, ezáltal növelve terápiás hatásukat [Esfahani et al., 2018, Raval et al., 2019, Mazumdar et al., 2021].



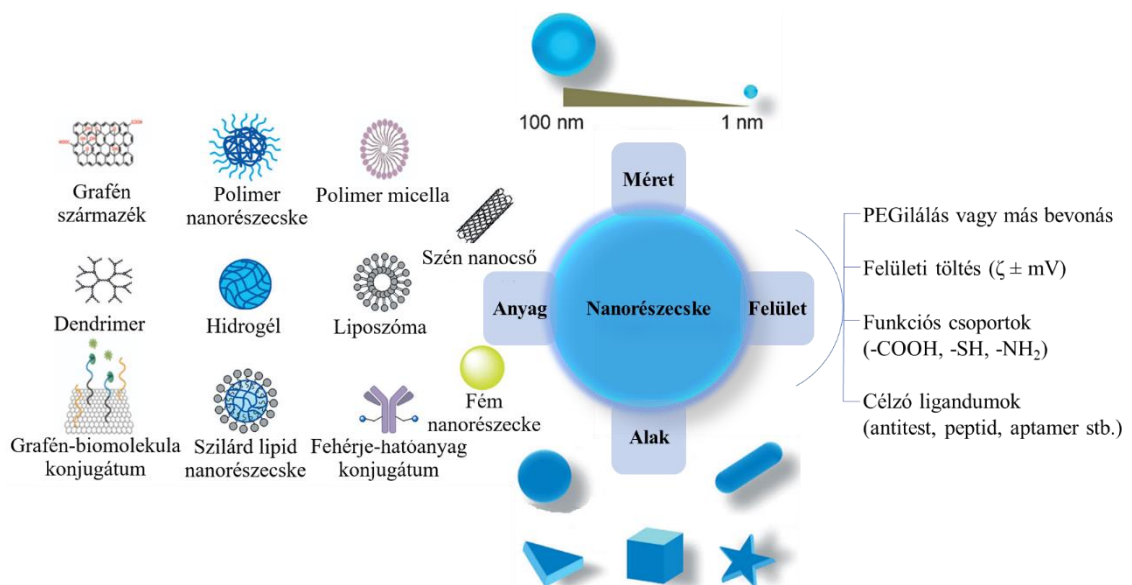
1. ábra. A nanoanyagok legfontosabb tulajdonságai és farmakokinetikai paraméterekre gyakorolt hatásai [Piktel et al., 2016].

*EPR – fokozott permeabilitási és retenció hatás (angolul „enhanced permeability and retention”).

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Gyógyszerhordozók típusai

A nanohordozók olyan orvosbiológiai anyagok, amelyeket terápiás és diagnosztikai célból előállított molekulák befogadására és szállítására fejlesztettek ki, a kis gyógyszermolekuláktól, peptidektől, fehérjéktől kezdve a genetikában is fontos szerepet játszó molekuláig. Összetételük széles spektrumú lehet, különböző morfológiai variációkkal, továbbá felületi kémiájuk módosítható (**2. ábra**), ezáltal növelve a hatóanyagtartalmat és szállítási kapacitásukat [Seo et al., 2017].



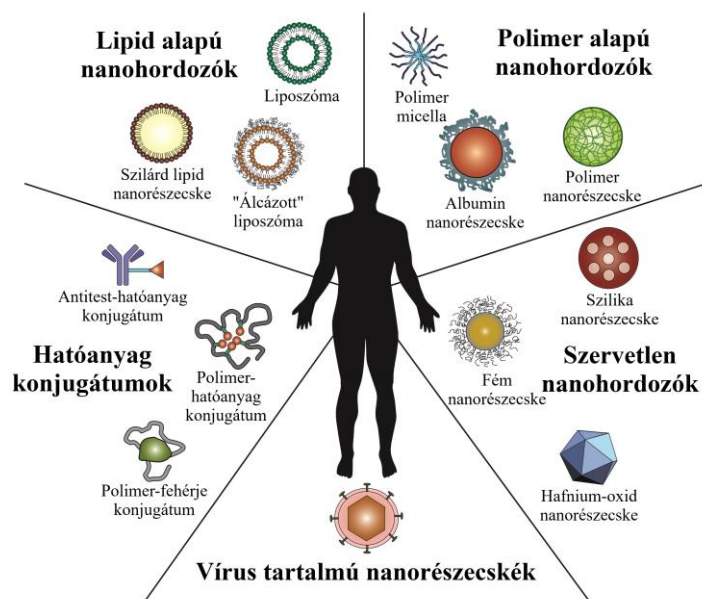
2. ábra. A nanorészecskék széles spektruma [Sun et al., 2014].

A rák kezelésben számos innovatív gyógyszerhordozó rendszert alkalmaznak, leginkább szintetikus polimereken, fehérjéken, lipideken, szerves és szervetlen részecskéken alapuló nanoanyagok skáláját. A hagyományos kemoterapeutikumokkal szemben a hordozóba történő nanoméretű gyógyszer kapszulázás számos előnnyel jár, mint például a véráramban történő lebomlás elleni védelem, jobb gyógyszeroldhatóság, fokozott gyógyszerstabilitás, célzott gyógyszeradagolás, csökkentett toxikus mellékhatások, valamint jobb farmakokinetikai és farmakodinamikai gyógyszer tulajdonságok.

A kemoterápiában használt nanohordozók alapvetően három fő csoportba sorolhatók, amelyeket célzott vagy nem célzott gyógyszeradagolásra terveztek: 1) szerves

2. Irodalmi áttekintés

molekulákból felépülő hordozók; 2) szerves elemekből (általában fémekből) létrehozott, mint például kvantumpontok, szén nanocsövek, réteges kettős hidroxidok, mezopórusos szilícium-dioxid és mágneses nanorészecskék, továbbá 3) szerves és szerves-hibrid nanohordozók. A szerves nanohordozók liposzómákból, lipidekből, dendrimerekből, micellákból, emulziókból és szintetikus polimerekből állnak (**3. ábra**) [Senapati et al., 2018]. Mivel a dolgozatomban szerves hordozókat alkalmaztam, röviden áttekintem ezeknek a főbb típusait.



3. ábra. A létrehozott nanoterápiás platformok és különböző nanogyógyászati termékek illusztrációja [Wicki et al., 2015].

(*Journal of Controlled Release 2015:200 138–157 – Eredeti kiadó, Elsevier engedélyével felhasználva.*)

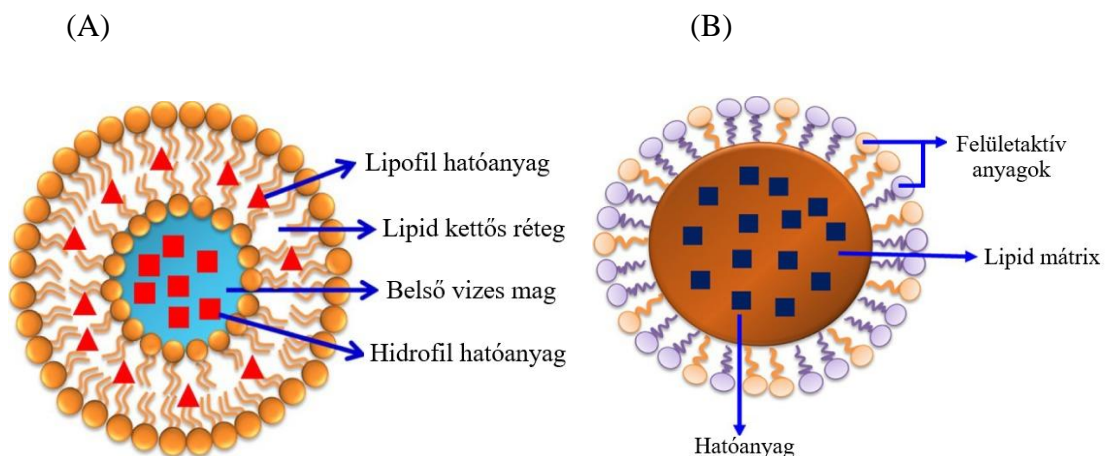
Liposzómák

A liposzómák (**4.A ábra**) vízben oldhatatlan poláris lipidek koncentrikus, zárt kettős rétegei, amelyek a sejtmembrán fontos szerkezeti összetevői. A liposzómák amfifil jellegűek, mivel hidrofób és hidrofil komponensekből állnak, amelyek önszerveződése adja a kétrétegű szerkezetet [Malam et al., 2009]. Ezek az anyagok számos előnnyel rendelkeznek, mint például a felületi tulajdonságaik könnyen módosíthatók és a méretük pontosan szabályozható. Szerves anyagok lévén, a liposzómák általában biokompatibilisek. Hátrányuk a gyenge stabilitásuk, alacsony hatóanyagtartalmuk és rossz felszabadulási profiljuk [Noble et al., 2014].

2. Irodalmi áttekintés

Szilárd lipid nanorészecske

A szilárd lipid nanorészecskék (SLN) nanoméretű (50–1000 nm), kolloid gyógyszerhordozók (**4.B ábra**), amelyeket már az 1990-es évek elején kifejlesztettek. Előállításukhoz mono-, di- és triglicerideket, szabad zsírsavakat, zsíralkoholokat, viaszokat és szteroidokat használnak. Az SLN-k meglehetősen hasonlóak a nanoemulziókhoz, különbség, hogy a nanoemulziókban szobahőmérsékleten folyékony lipideket (olajokat) használnak. Az SLN-k összetételétől (lipid, hatóanyag és felületaktív anyag) és az előállítási körülményektől (meleg vagy hideg homogenizálás) függően a hatóanyag vagy homogén módon dispergálható az SLN-k lipidmátrixában (szilárd oldat/homogén mátrix modell), beépítve a lipidmagot körülvevő héjba (gyógyszerrel dúsított héjmodell), vagy beépíthető a lipidhéjjal körülvett magba (gyógyszerrel dúsított magmodell) [ud Din et al., 2017].



4. ábra. Főbb szerves nanohordozók szerkezetei: liposzóma (A) és szolid lipid nanorészecske (B) [ud Din et al., 2017].

(*International Journal of Nanomedicine 2017:12 7291–7309 – Eredeti kiadó, Dove Medical Press Ltd. engedélyével felhasználva.*)

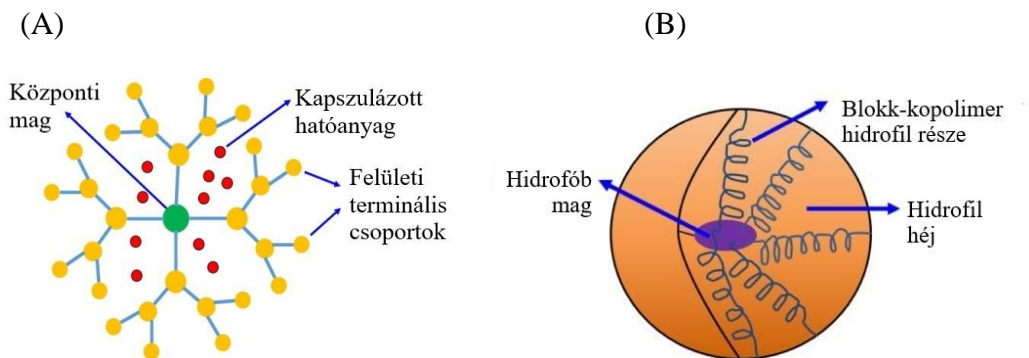
Dendrimerek

A dendrimerek gömb alakú, szintetikus szerkezetek (**5.A ábra**). Ezek egy magmolekulából állnak, amelyek faszzerű kiterjesztésekre ágaznak szét, funkcionálizáláshoz rendelkezésre álló végekkel. Átmérőjüket tekintve a dendrimerek a legkisebb nanorészecske-rendszerek, amelyek sugara 2,5 és 8 nm között van. A dendrimerszintézis során szabályozható az elágazás jellege, a dendrimer molekulatömege és funkcionálizálhatósága. A terápiás vegyületek a funkciós csoportokon keresztül kapcsolódhatnak az ágakhoz, kitölthetik az ágak közötti üres tereket, vagy a hidrofób vegyületek beágyazhatók a magba [Abbasi et al., 2014, Kaminskas et al., 2011].

2. Irodalmi áttekintés

Polimer micellák

A polimer micellák nanoméretű (10–100 nm) kolloid részecskék, amelyek szintetikus amfifil di- vagy triblokk kopolimerek vizes környezetben történő önszerveződésével jönnek létre [Zhu & Liao, 2015]. Mivel amfifil jellegűek, így hidrofób és hidrofil szegmenseket egyaránt tartalmaznak (**5.B ábra**). Ezek a blokk-kopolimerek vizes környezetnek kitéve, bizonyos koncentráció felett (kritikus micella koncentráció) micellákat képeznek. A blokk-kopolimer hidrofób szegmense alkotja a micella magját, míg a hidrofil szegmens a micellák héját képezi. Ezért a részecskék mag-héj szerkezetűek, hidrofób maggal és hidrofil héjjal. A részecskék hidrofób magja lehetővé teszi a hidrofób hatóanyagok befogását és szabályozza a részecskék hatóanyagleadási tulajdonságait. A részecskék hidrofil héja azonban a mag stabilizálására szolgál, biztosítja a részecskék oldhatóságát vizes környezetben [Biswas et al., 2016].

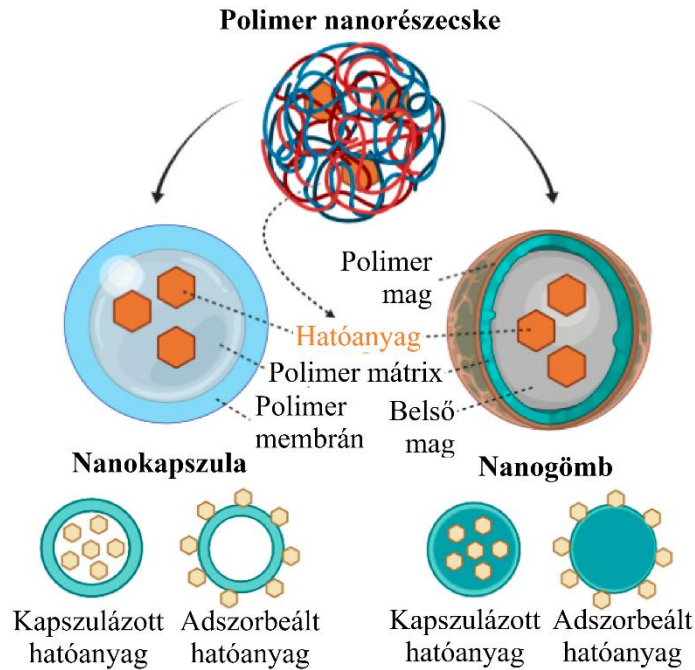


5. ábra. Főbb szerves nanohordozók szerkezetei: dendrimer (A) és polimer micella (B) [ud Din et al., 2017].

(*International Journal of Nanomedicine* 2017;12 7291–7309 – *Eredeti kiadó, Dove Medical Press Ltd. engedélyével felhasználva.*)

Polimer nanorészecskék

Az elmúlt néhány évtizedben a polimerek nagy figyelmet kaptak a gyógyszerhatóanyag szállítás területén, mivel számos vonzó tulajdonságot kínálnak a hatóanyag hordozásban. A polimer nanorészecskék szilárd, nanoméretű (10–1000 nm) kolloid részecskék, amelyek biokompatibilis polimerekből állnak [Mallakpour & Behranvand, 2016]. Szerkezeti felépítésük alapján lehetnek nanogömbök (mátrix típus) vagy nanokapszulák (tartály típus). A nanogömbök a hatóanyagot a polimer mátrixba zárják, míg a nanokapszulák esetében a hatóanyagot szilárd polimer membránnal zárt olaj vagy víz folyékony magban oldják/diszpergálják. Mindkét típusú polimer nanorészecske (mátrix vagy kapszula) esetében lehetséges a hatóanyag adszorpciója vagy kémiai konjugációja a nanorészecske felületére (**6. ábra**) [Sharma M. 2019].



6. ábra. A nanokapszulák és nanogömbök szerkezetének, valamint a hatóanyag lehetséges elhelyezkedésének ábrázolása [Zielińska et al., 2020].

Ígéretes olyan mesterséges és funkcionális nanorészecskék előállítása, amelyek terápiás szereket (például sorafenib és ciszplatin) és diagnosztizálásra alkalmas kontrasztanyagokat is tartalmaznak [Feczko et al., 2019]. Klinikai vizsgálatok során jelentős eredményeket jegyeztek fel, különösen a rák és mikrobiális fertőzések kezelése esetében [Moghimi et al., 2011]. Jelenleg számos klinikailag jóváhagyott nanoméretű anyag van, amelyek ígéretes nanorészecske gyógyszerhordozó rendszereknek bizonyulnak, valamint kevesebb mellékhatást és hatékony terápiás szinteket mutatnak. Egyik legfontosabb közülük az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelete (FDA) által már 1995-ben jóváhagyott Doxil. Ez a készítmény petefészekrák és szarkóma kezelésére használatos doxorubicint hordozó PEGilált liposzómákat tartalmaz. Egy másik példa az FDA által jóváhagyott sikeres formulára az Abraxane, amely albuminhoz kötött paklitaxel, a metasztatikus mellrák, tüdőrák és hasnyálmirigyrák kezelésére [Cole & Holland, 2015].

2.2 Gyógyszerhordozó anyagok

2.2.1 Polimer alapú hordozóanyagok

A polimer nanorészecskéket már régóta használják elsődleges komponensként a mindennapi bevonatokban, festékekben és ragasztókban. Újabban olyan orvosbiológiai területeken is vizsgálják az alkalmazásukat, mint a bioképződés, a gyógyszerhatóanyag szállítás és a diagnosztika [Mallakpour & Behranvand, 2016]. A polimer nanorészecskék az elmúlt években jelentős érdeklődést váltottak ki a hatóanyagszállításban kis méretükből adódó tulajdonságaik miatt. Előnyei közé tartozik a szabályozott felszabadulás potenciális felhasználása, a biológiai aktivitással rendelkező gyógyszerek és más molekulák védelme a környezeti hatásokkal szemben, a biológiai hozzáférhetőségük és a terápiás index javítása. A polimer nanorészecskék változó hatóanyagszállítási képességekkel is rendelkeznek [Zielińska et al., 2020]. A hatóanyag molekulák beágyazhatók a magba, diszpergálódhatnak a polimer mátrixban, kémiaiilag konjugálhatók a polimerhez vagy kötődhetnek a részecske felületéhez. Ezek lehetővé teszik hidrofób és hidrofil vegyületek, valamint különböző molekulatömegű kapszulázandó vegyületek, például kis molekulák, biológiai makromolekulák, fehérjék és vakcinák szállítását, ideálissá téve a részecskéket több komponens szállítására [Afsharzadeh et al., 2018]. Az olyan tulajdonságok változtatásával, mint az összetétel, stabilitás és felületi töltés, pontosan szabályozható ezeknek a rendszereknek a hatékonysága és felszabadulási kinetikája. Felületük könnyen módosítható a további célzáshoz, lehetővé téve, hogy gyógyszereket, fehérjéket és genetikai anyagokat juttassanak a célzott szövetekbe, ami hasznossá teszi ezeket a rendszereket a rákgyógyászatban, a génterápiában és a diagnosztikában. A polimer nanorészecskék hátrányai közé tartozik azonban a részecske-aggregáció és a toxicitás fokozott kockázata [Mitchell et al., 2021].

A polimer nanorészecskék természetes vagy szintetikus anyagokból, valamint monomerekből vagy előformázott polimerekből szintetizálhatók. A természetes polimerek (szénhidrátok/fehérjék) általában hidrofilek, gyógyszerhordozóként használt gyakori formáik a kitozán, a zselatin, az alginát és az albumin. Eddig csak egy fehérjealapú nanorészecske kapott engedélyt a klinikai teszteken, az albumin hordozóhoz kötött paklitaxel (Abraxane néven), nem-kissejtes tüdőrák, mellrák és hasnyálmirigyrák kezelésére. A szintetikus kopolimerek sokoldalú és finomhangolható anyagok, amelyek

2. Irodalmi áttekintés

gyógyszerhordozó rendszerek (nanorészecskék, micellák, vezikuláris poliszómák, polimer-gyógyszer konjugátumok és dendrimerek) előállításának alapjai. Előnyük, hogy rövid idejű vagy akár néhány hétig tartó nyújtott hatóanyag-felszabadulást is eredményezhetnek összehasonlítva a természetes polimerek viszonylag rövidebb kioldódási idejével [Prabhu et al., 2015]. A szintetikus polimerek kétféleképpen lehetnek: biodegradálhatók és biológiailag nem lebonthatók. A politejsav (PLA), a poli- ϵ -kaprolakton (PCL) és a poli(tejsav-glikolsav) kopolimere (PLGA) biológiailag lebomló polimerek, és a PLGA-t indometacin, Spantide II és ketoprofen transzdermális szállítására használják. A poliakrilátok biológiailag nem lebomló polimerek, amelyeket gyógyszerek dermális és transzdermális szállítására használtak, de a biológiailag lebomló polimerekhez képest kisebb mértékben [Sharma M. 2019].

A PLGA az egyik legsikeresebben kifejlesztett biokompatibilis és biológiailag lebomló polimer, amely képes növelni a rosszul oldódó molekulák vízoldhatóságát, csökkenteni azok lebomlásának esélyét és javítva a biológiai hozzáférhetőségüket. A szerkezetben biológiailag lebomló monomerekre hidrolizál, amelyeket végül a citromsavciklus eltávolít. A PLGA-t az FDA jóváhagyta gyógyszerkészítményekben gyógyszerhatóanyag szállító rendszerként való felhasználására. A PLGA nanorészecskék azonban gyorsan kiürülnek a mononukleáris fagocita rendszer (MPS) sejtjei által. A nanorészecskék hidrophil polimerrel, például polietilén-glikollal (PEG-gel) történő bevonása szterikusan stabilizálja a részecskéket, gátolja az MPS általi felismerésüket, ami hosszabb keringési időt eredményez a plazmában, hosszabb felezési idővel [Zakharova et al., 2017].

A PLA az FDA által engedélyezett biológiailag lebomló polimerek egyik legnépszerűbb tagja, amelyet enzimek vagy gombák természetes módon lebonthatnak komposztban vagy talajban. A citromsavciklus során a PLA vízzé és szén-dioxiddá alakul. A PLA-t gyenge hidrophilitás jellemzi, amely kopolimerizációval jelentősen javítható. A paklitaxel klinikailag jóváhagyott micellás készítménye, a Genexol-PM mPEG-PLA-t tartalmaz micellaképző polimerként. Egy nemrégiben végzett preklinikai vizsgálatban mPEG-PLA és E-vitamin TPGS vegyes micella-formulát fejlesztettek ki a paklitaxel szállítására, hogy növeljék a Genexol-PM hatékonyságát a többszörös hatóanyagrezisztens tumorok ellen [Biswas et al., 2016].

A PCL egy biológiailag lebomló poliészter, melyet széles körben alkalmaznak az orvosi biológiában élő szövetek mesterséges előállítására és a szabályozott hatóanyag-szállításban egyaránt. Ezek az alkalmazások azonban továbbra is korlátozottak a magas

2. Irodalmi áttekintés

hidrofobicitás, a lassú lebomlási sebesség és lassú hatóanyag-kibocsátási tulajdonságok miatt [Malikmammadov et al., 2018]. Ezeknek a hátrányoknak a leküzdése érdekében számos makromolekuláris szerkezetet és összetételt javasoltak, beleértve az ϵ -kaprolakton (ECL) kopolimerjeit különböző komonomerekkel [Dong et al., 2001] és kapcsolt PCL kopolimerekkel [Al Samad et al., 2016]. Bár a PCL kopolimerjeinek előállítását főként kémiai katalízissel végzik, ón-oktanoát katalizátorokat alkalmazva [Woodruff et al., 2010], a biokatalízis értékes alternatívaként jelent meg az elmúlt évtizedekben [Labet et al., 2009, Shoda et al., 2016]. A lipázok messze a legfontosabb enzimek, amelyeket a „zöld” polimerek szintéziséhez használnak, különösen alifás poliészterek, mint PCL és ECL kopolimerek előállítására [Kobayashi S., 2015, Debuissy et al., 2018]. Azonban más enzimek is, mint például a kutinázok is szelektivitást mutattak a poliészterezési reakciók tekintetében [Hunsen et al., 2007, Ferrario et al., 2016].

A PCL-alapú nanorészecske gyógyszerhordozók különböző módszerekkel állíthatók elő, a kapszulázó polimer és a hatóanyag tulajdonságaitól függően (pl. oldhatóság). Széles körben alkalmazzák a nanoprecipitáció [Manjili et al., 2018, Abriata et al., 2019], emulzió-oldószer elpárologtatás (egyszerű és összetett) [Alex et al., 2016, Piazza et al., 2018] és a dialízis [Ning et al., 2018] módszereket. A polimer összetétele, molekulatömege, a hőmérséklet és a pH jelentősen befolyásolja a PCL-alapú nanoterapeutikumok lebomlási sebességét [Grossen et al., 2017]. A PCL-t az FDA jóváhagyta, mint biokompatibilis és nem toxikus anyag [Sun et al., 2006, Byun et al., 2014], azonban nanogyógyszerek tekintetében fontos szerepet játszanak a citotoxicitásban olyan további tényezők, mint a részecskeméret, a morfológia és a felületi jellemzők, ezért minden új készítményt ajánlatos megvizsgálni.

A PEGilált PCL (PEG-PCL) az amfifil poliészter polimerek egy másik osztálya, széles körben használt kopolimer a rákellenes gyógyszerek kapszulázására. Az amfifil tulajdonság és az előállítás egyszerűsége ideális jelöltté teszi az injekciós gyógyszer szállító rendszerek számára. Jó biokompatibilitást, biológiai lebonthatóságot és alacsony toxicitási profilt mutat [Biswas et al., 2016]. Az elmúlt években a PEG-PCL-t széles körben alkalmazták kemoterápiás és fotodinámiás terápiás szerek együttes szállítására. Peng és munkatársai [Peng et al., 2008] az általuk szintetizált klór magvú metoxi-polietilén-glikol és PCL kettős blokk-kopolimerbe paklitaxelt kapszuláztak. A nanostruktúra célja mind a kemoterápiás, mind a fényérzékeny szer együttes szállítása. A PEG-PCL micelláris nanorészecskéket aktív célzásra alkalmazták a rákot célzó ligandumok felszíni rögzítésével. Li és munkatársai [Li et al., 2014] csillag alakú folát-

2. Irodalmi áttekintés

PEG-PCL kopolimert szintetizáltak, amelybe doxorubicint kapszuláltak az emlőrák célzott kezelésére. A PEG-lánc végét folsav konjugálásával módosították. A folát receptorok túltermelőnek az emlő- és petefészekrák daganataiban, ezért lehetséges a gyógyszer irányított célba juttatása a folsav-konjugált PEG-PLA hordozó által. Egyes munkákban a sorafenib hatóanyag mikrokapszulázását polimerizációval előállított PEG-PCL kopolimerek felhasználásával végezték [Gan et al., 2018, Tang et al., 2018].

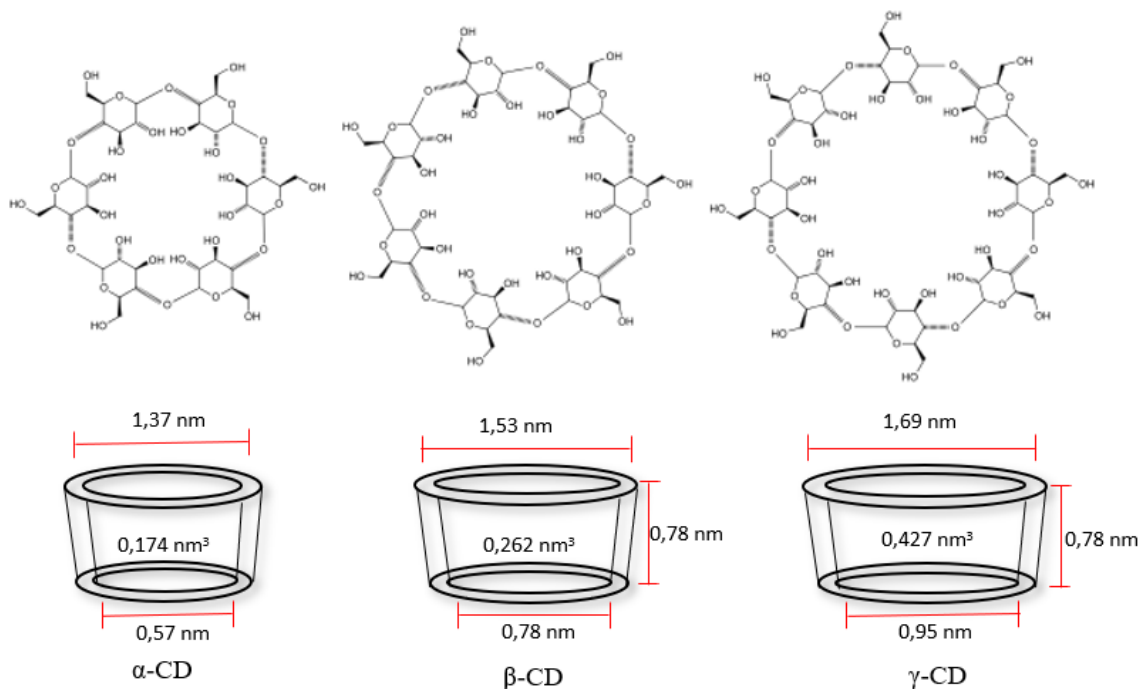
A közelmúltban szerkezetileg különböző hidroxizsírsavakat kopolimerizáltak ECL-lel immobilizált lipázokkal, ami alacsonyabb molekulatömeget eredményezett a kémiai katalízishez képest [Todea et al., 2018]. A hidroxizsírsavak fontos bioalapú vegyületek, képesek részt venni olyan különböző polimerizációs reakciókban, amelyek homopolimer zsírsavészterekhez (angolul „estolides”) [Todea et al., 2015] vagy kopolimer szerkezetű elasztomerekhez vezetnek [Ebata et al., 2008]. Különösen a 12-hidroxi-sztearinsav (12HSA) állítható elő könnyen a ricinolsav hidrogénezésével, amely vegyület, különböző polimerek bioalapú nyersanyagának is tekinthető. Az enzimátikus katalízissel szintetizált poliészterek és poliészter-amidok az elmúlt időszakban különös érdeklődést váltottak ki, mint hatóanyagszállító platformok, különösen a rákellenes kezelésekben [Hevilla et al., 2021]. Todea és munkatársai [Todea et al., 2018] különböző hidrolázokat vizsgáltak ECL és 12HSA kopolimerek „zöld” szintézise érdekében, melyek potenciális nanoméretű gyógyszerhordozókként használhatóak. Folytatásként, új poliészter-amidokat állítottak elő biokatalitikus szintézissel, ϵ -kaprolaktám (ECM) és négy különböző funkciójú hidroxisav felhasználásával [Benea et al., 2023]. Ezek a biokatalízissel előállított kopolimerek képezik a doktori munkám során használt főbb gyógyszerhatóanyag hordozókat.

2.2.2 Ciklodextrinek

A ciklodextrinek keményítőtőből, baktériumok általi enzimátikus lebontásból származó ciklikus oligoszacharidok, amelyek glükózegységekből állnak és fizikokémiaiilag stabil molekulák. A leggyakoribb természetes ciklodextrinek hat, hét és nyolc D-glükopiranoz egységgel rendelkeznek, és α -, β - és γ -ciklodextrinnek nevezik azokat, melyek a gyűrűméret és az oldhatóság tekintetében különböznek egymástól (**7. ábra**) [Jambhekar & Breen, 2016]. A kúp alakú ciklodextrinek sokoldalú tulajdonsággal bírnak, mivel a faluk hidrofil, míg a központi üregük hidrofób jellegű. Ez a jelleg teszi lehetővé, hogy a ciklodextrinek apoláris vendégmolekulákat építsenek be az üreg részbe, míg a külső fal oldhatóbbá vagy diszpergálhatóbbá teszi azokat a vízfázisban, zárvány-

2. Irodalmi áttekintés

komplexeit (inklúziós komplexek) képezve [Capelezzo et al., 2018, Chakraborty et al., 2010]. Ezek a komplexek javíthatják a vendégmolekulák stabilitását és oldhatóságát, ugyanakkor a ciklodextrinek védelmet nyújthatnak az oxidatív- és hő-károsodásokkal szemben is. A ciklodextrinek használata napjainkban széles körben elterjedt, különösen a gyógyszer-készítményekben, a kozmetikumokban és az élelmiszerekben [Cid-Samamed et al., 2022, Fernandes et al., 2014].



7. ábra. Az α -, β - és γ -ciklodextrinek kémiai szerkezete és üregméretei [Fuenmayor et al., 2021].

Mivel a ciklodextrinek keményítő alapú, természetes és nem mérgező anyagok, ezért különösen alkalmazhatóak illóolajok, íz- és illatanyagok molekuláris kapszulázására. A natív ciklodextrinek vizes oldhatósága azonban viszonylag alacsony, így vízoldhatóságuk növelése és alkalmazásuk kiterjesztése érdekében a ciklodextrineket kémiaiilag módosították [Yildiz et al., 2018]. Bár már 120 éve ismertek, a ciklodextrinek leginkább az 1980-as években robbantak be ipari alkalmazásokban. Ezt követte a három „natív” változat (α -, β - és γ -ciklodextrin) ipari gyártása, amelyeket már 1984-ben nagy tisztaságú formákban gyártottak, jelentősen csökkentve az árakat, óriási mértékben hozzájárulva fejlődésükhöz, legfőképpen a β -ciklodextrinéhez [Crini G., 2014]. A ciklodextrinek közül a β -ciklodextrint használják a leggyakrabban, mivel apoláris ürege 100-400 g/mol közötti molekulatömegű molekulákat képes befogadni, ami a legtöbb szóba jöhető molekula molekulatömeg-tartománya, ugyanakkor jó hatóanyag-

2. Irodalmi áttekintés

megkötőképesség jellemzi ezeket a ciklodextrineket. Különböző hidrophil, hidrophób és ionos származékokat fejlesztettek ki (**1. táblázat**) és használtak fel gyógyszerek fizikai-kémiai és gyógyászati tulajdonságainak javítására, valamint a természetes ciklodextrinek befogadási kapacitásának fejlesztésére [Gidwani & Vyas, 2015]. A β -ciklodextrinek hidrophil származékát, a szulfobutil-éter- β -ciklodextrint (SBECD), és a lipofil származékát, a random metilezett β -ciklodextrint (RAMEB) előnyben részesítik nem-toxikus jellegük és nagy kötőképességük miatt [Fenyvesi et al., 2020].

1. táblázat. A ciklodextrinek különböző típusainak jellemzői (Gidwani & Vyas, 2015).

	Oldhatóság (mg/ml)	Mw (Da)
Természetes ciklodextrinek		
α -ciklodextrin	145	972
β -ciklodextrin	18,5	1135
γ -ciklodextrin	232	1297
Ciklodextrin-származékok		
Hidroxipropil- β -ciklodextrin	≥ 600	1400
Szulfobutil-éter- β -ciklodextrin	≥ 500	2163
Random metilezett β -ciklodextrin	≥ 500	1312
Hidroxipropil- γ -ciklodextrin	≥ 500	1576
Polimerizált ciklodextrinek		
Epiklorohidrin- β -ciklodextrin	> 500	112000
Karboxi-metil epiklorohidrin- β -ciklodextrin	> 250	2000000-15000000

Egy II. fázisú klinikai vizsgálatban ciklodextrin nanorészecskéket alkalmaztak a kamptotecin hordozójaként, előrehaladott szolid tumoros betegeknél. A CRLX 101 (korábban IT-101) készítmény kevesebb mellékhatást mutatott, mint a szabad kamptotecin, és a teljes válaszarány 64% volt [Weiss et al., 2013]. Mark E. Davis [Davis M.E., 2009] β -ciklodextrin tartalmú polimer nanorészecske szállító rendszerről számolt be a kis interferáló RNS (angolul rövidítve „siRNS”) szisztémás alkalmazására szolid tumoros betegeknél. Ezenkívül ezt a szállító rendszert úgy tervezték, hogy aktívan célozza meg a rákos sejteket a nanorészecske külső felületére kötött transzferin fehérjék által, amelyek erősen kötődnek a rákos sejtekben túlexpresszáldó transzferin receptorokhoz. Song és munkatársai [Song et al., 2016] β -ciklodextrin-poli(N-izopropil-akrilamid) csillag alakú polimert szintetizáltak paklitaxel nanohordozóként, a hatóanyag vízoldhatóságának növelése és hőérzékeny szállítása céljából. A polimer képes volt szupramolekuláris önszerveződő zárványkomplexeket létrehozni a hatóanyaggal, gazda-

2. Irodalmi áttekintés

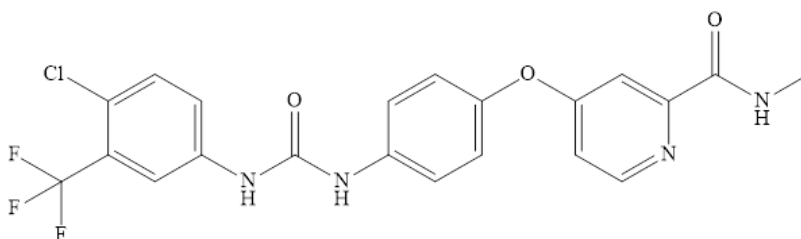
vendég kölcsönhatás révén, szobahőmérsékleten. Testhőmérsékleten a poli(N-izopropil-akrilamid) szegmensek fázisátmenete nanorészecskék képződését indukálta, ami nagymértékben fokozta a polimer-gyógyszerkomplex sejtfelvételét, ami a paklitaxel hatékony hőérzékeny szállítását eredményezte.

2.3 Hatóanyagok ismertetése

2.3.1 Sorafenib

A májrák a hatodik leggyakoribb ráktípus a világon és halálozási rátája a második helyen áll az összes ráktípus közül. A májrák leggyakoribb megjelenése a hepatocelluláris karcinóma (HCC) [Tang & Li, 2019]. A közepes és előrehaladott stádiumban levő betegeknél megfontolható kezelések a kemoembolizáció és a gyógyszeres kezelés. Egy évtizeden keresztül a sorafenib volt az egyetlen rendelkezésre álló standard kezelés az előrehaladott HCC kezelésére. Jelenleg hat szisztémás terápiás szert engedélyeztek a III. fázisú klinikai vizsgálatokon, melyek közül a sorafenib továbbra is a leghatékonyabbnak bizonyult [Llovet et al., 2021].

A sorafenib egy multikináz inhibitor gyógyszer (**8. ábra**), amelyet a hepatocelluláris karcinóma mellett vese- és pajzsmirigyrák kezelésére alkalmaznak. *In vitro* vizsgálatok arról számoltak be, hogy a sorafenib tirozin-kináz gátlása révén csökkentheti a tumorsejtek proliferációját és angiogenezisét [Gbolahan et al., 2017]. A sorafenib nem specifikus felvétele az egészséges szövetekben magas toxicitáshoz és súlyos mellékhatásokhoz vezet. Ennek egyik oka a gyógyszer magas lipofilitása, amely rossz biológiai hozzáférhetőséget eredményez [Heidarinasab et al., 2016], így nagy dózisok használata szükséges. Továbbá sok HCC-s betegnél már a kezelés elején kialakuló sorafenib rezisztenciáról számoltak be. Ezeknek a hátrányoknak a kiküszöbölése érdekében a jelenlegi rákterápia kutatások a nanohordozó alapú sorafenib célzott bejuttatását és szabályozott felszabadulását kiemelt helyen kezelik.



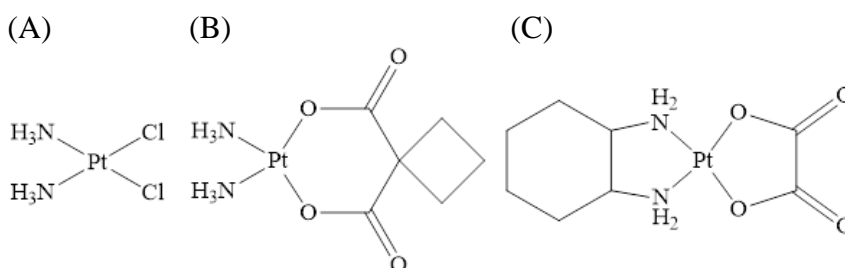
8. ábra. A sorafenib szerkezete.

2. Irodalmi áttekintés

A sorafenib erős hidrofób jellege és nagy lipidaffinitása biztosíthatja hatékony kapszulázását különféle hordozókba. Ezért sokféle anyagot és formát használtak a sorafenib szállítási stratégiáinak kidolgozására. Ugyanakkor különböző típusú ingerekre reagáló sorafenib nanohordozó rendszereket is készítettek és részletesen tanulmányoztak, amelyek célja a specifikus tumor célozhatóság és a tumor mikrokörnyezeti válaszáinak javítása. Ezen intelligens nanoformulák mellett a sorafenib és más tumorelles szerek kombinált nanorendszereinek sorozatát is előállították, és megállapították, hogy jelentősen fokozott terápiás hatást mutatnak a tumorelles hatások együttes mechanizmusa alapján. A sorafenib nanohordozó rendszerek azonban még korai szakaszban vannak és alkalmazásuk még mindig számos kihívással néz szembe. Ezért a további vizsgálatoknak nagyobb figyelmet kell fordítaniuk a nanohordozók biztonsági és hatékonysági kérdéseire, amelyek jelentősen elősegítenék a sorafenib nanoformulák gyógyszerpiacra történő bevezetését (Chen et al., 2021).

2.3.2 Ciszplatin

A platina alapú rákellenes szerek egyike a nagy sikertörténeteknek a gyógyászati szerves kémia területén. Három platinatartalmú gyógyszert engedélyeztek világszerte az emberi rák kezelésére, a ciszplatin, a karboplatin és az oxaliplatin (**9. ábra**). Annak ellenére, hogy közel 40 évvel ezelőtt vezették be a piacra, a platina komplexek továbbra is a legszélesebb körben használt rákellenes kemoterápiás szerek közé tartoznak. A platina gyógyszerek sikerének egyik figyelemre méltó jele az a tény, hogy a ciszplatin a hererákos betegek kezelési rendjébe történő bevezetése óta a betegség gyógyulási aránya meghaladta a 95% -ot [Johnstone et al., 2016].



9. ábra. A ciszplatin és származékainak szerkezetei: (A) ciszplatin, (B) karboplatin és (C) oxaliplatin.

A ciszplatin az egyik legszélesebb körben használt és leghatékonyabb rákellenes gyógyszer. Széles spektrummal rendelkezik számos daganat kezelésére, beleértve a szarkómákat, karcinómákat, máj-, tüdő-, petefészek- és méhnyakrákot [Alam et al.,

2. Irodalmi áttekintés

2014]. A ciszplatint intravénásan alkalmazzák és a rákos sejtek DNS-javítását és DNS-replikációját gátolja, ezáltal negatívan befolyásolja a sejtek növekedését. A rákellenes hatás elérése érdekében a hatóanyagnak be kell jutnia a sejtekbe és el kell érnie a sejtmagot. Amint a ciszplatin belép a sejtbe, a molekula aktiválódik. Ez az aktiválás a ciszplatin klorid ionjainak vízmolekulákra való cserélődésének eredménye, amely folyamat gyorsan végbemegy a citoplazma vízben gazdag környezetében, és amely erősen elektrofil molekula képződését eredményezi. Egy ilyen elektrofil molekula már könnyen elérhet egyéb nukleofil szerkezetet, elsősorban fehérjék szulfhidrilcsoportjait és nitrogénatomokat a nukleinsavakon, térhálós szerkezeteket kialakítva, amelyek ellenállnak a DNS-javító mechanizmusoknak [Romani A.M.P., 2022]. Azonban a gyógyszer nem szelektív eloszlása a normál- és tumorszövetek között növeli a dóziskorlátozó mellékhatásokat, beleértve az akut vesekárosodást és a krónikus neurotoxicitást. Ezenkívül a rákos sejtek ciszplatinnal szembeni kezdeti vagy szerzett rezisztenciája jelentősen növeli a kezelések sikertelenségét. Ezért egy biztonságosabb és hatékonyabb ciszplatin terápiára van szükség [Ding et al., 2017].

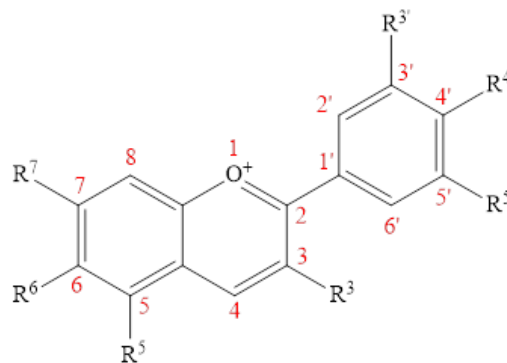
Az elmúlt néhány évtizedben a nanorészecske alapú gyógyszerhatóanyag szállító rendszerek a hatékonyabb rákterápia eszközévé váltak. A nanorészecske gyógyszerhordozó rendszereket úgy tervezték, hogy kihasználják a fokozott permeabilitási és retenciós (EPR) hatást. Számos hordozót alkalmaztak a platina alapú gyógyszerek hatóanyagszállításának megkönnyítésére. A ciszplatin szabályozott felszabadulása egy intelligens szállítási platformról csökkentheti az akut toxicitást, míg a nanoméretű kapszulázás további előnyökkel járhat, mint például a tumorszövethez való fokozott adszorpció, a hosszabb plazmakeringési idő, valamint a gyógyszermolekulák védelme a korai lebomlástól és kiürüléstől. Ezen nanorészecskék némelyike ígéretes preklinikai eredményeket mutatott, és néhány klinikai vizsgálati fázisba lépett [Duan et al., 2016, Jeong et al., 2018].

2.3.3 Antociánok

Az antociánok különböző színű pigmentek, amelyek többnyire a növényekben vannak jelen, főleg a vörös, lila és kék színű virágokban és gyümölcsökben találhatóak meg. Színük vörösről kékre változhat a pH függvényében. Az antociánok flavonoid szerkezettel rendelkeznek, pozitív töltést hordozva az oxigénatomon. Az antociánok aglikonjai, az antocianidinek, a flaviliumion származékjai, amelyekben bizonyos hidrogénatomok hidroxil csoporttal vagy metoxi csoporttal vannak szubsztituálva (10.

2. Irodalmi áttekintés

ábra, R3-R7 szubsztituensek). [Li et al., 2021]. Ezek a vegyületek potenciális élelmiszer-adalékanyagok, emellett különböző betegségek megelőzésére/kezelésére alkalmazzák, mivel antidiabetikus, rákellenes, gyulladáscsökkentő és antimikrobiális hatást mutatnak [Oliveira et al., 2016, Khoo et al., 2017, Lin et al., 2017]. Az antociánok rendkívül érzékenyek a környezeti feltételekre, például a hőmérsékletre, a pH-ra, a fényre és az oxigénre. Gyenge stabilitásuk miatt alaposan vizsgálták a kapszulázási lehetőségüket a biológiai hozzáférhetőségük javítása és a megfelelő közegben történő felszabadulásuk szabályozása érdekében [Mohammadinejad & Kurek, 2021].



10. ábra. Az antocianidinek alapváza.

Számos természetes eredetű vegyület kemoterápiás és kemopreventív hatása jól ismert, és a rákterápiában használatosak fokozott specifitású és hatékonyságú, új gyógyszerek kifejlesztésére [Lichota & Gwozdinski, 2018, Pathak et al., 2022]. Így ezen a területen végzett kutatások hatékony megközelítéseknek bizonyultak az egyedi szerkezettel és hatásmechanizmussal rendelkező biológiailag aktív vegyületek felfedezésére [Cragg & Pezzuto, 2016]. A természetes eredetű vegyületek széles választéka közül az antociánok és származékai ígéretes rákellenes szerek [de Arruda Nascimento et al., 2022]. Jól ismert, hogy az antocianidinek flavilium kation formája csak erősen savas közegben stabil, míg a pH növekedésével kinoid bázis és hemiketál (hidratációval) is képződik egyensúlyi reakciókban. Ezt követően a hemiketál központi gyűrűje kinyílhat, cisz-kalkont formálva, amely további izomerizáció során transz-kalkonná alakulhat (lásd **39. ábra**) [Gago et al., 2014]. A kalkonok citotoxikus, rákellenes, gyulladáscsökkentő és antimikrobiális aktivitású természetes anyagok fontos csoportját képviselik. A kalkonszármazékok szintézisét fontos útnak tekintették az emberi tumorsejtek elleni, új citotoxikus hatású vegyületek fejlesztési irányának, [Rao et al., 2004] és a vizsgálatok során kiderült, hogy a metoxilált kalkon származékok citotoxikus aktivitást mutattak a különböző rákos sejtvonalakkal szemben [Bandgar et al., 2010].

2. Irodalmi áttekintés

Mottaghipisheh és munkatársai [Mottaghipisheh et al., 2022] számos preklinikai és klinikai tanulmányt gyűjtöttek össze az antociánok rákkezelésben betöltött szerepeiről. Sorrenti és munkatársai [Sorrenti et al., 2015] megerősítették, hogy az antociánok apoptózist és szuppressziót indukálhatnak a prosztaták sejtproliferációjában. Medic és munkatársai [Medic et al., 2019] szakirodalmi áttekintést tett közzé a vastagbélrák megelőzéséről, antociánok segítségével, míg Charapelli és munkatársai kimutatták, hogy az antociántartalmú lila burgonya kivonatok gátolják a vastagbél tumor-képződést [Charepalli et al., 2015]. A cianidin a veserák sejtekre gyakorolt jelentős gátló hatásáról Liu és munkatársai számoltak be [Liu et al., 2018]. Ezenkívül az antociánok modulátor szerepet játszanak a különböző tumorsejtek növekedési faktorainak expressziójában [Uivarosi et al., 2019]. Anwar és munkatársai [Anwar et al., 2016] a bogyós gyümölcsökből származó antociánokat lehetséges kemoterápiás szerként említették, vastagbélrák kezelésére. Asadi és munkatársai [Asadi et al., 2017] az édesburgonyából származó antociánok rákellenes hatásáról számolt be egerekben végzett kísérletek alapján, bél-adenomákat megelőzve.

2.4 Mikrokapszulázási technikák részecskék előállítására

A mikrokapszulázás egy bővülő stratégia az aktív komponensek mikro- vagy nanoméretű beépítésére vagy diszperziójára hordozó szerkezetekbe. A nanorészecskék előállítására szolgáló megfelelő módszer kiválasztása a hordozó és a kapszulázandó gyógyszerhatóanyag fizikai-kémiai jellegétől függ. A nanorészecskék különféle anyagokból, például fehérjékből, poliszacharidokból és szintetikus polimerekből állíthatók elő. A mátrixanyagok kiválasztása számos tényezőtől függ, többek között:

- a biodegradabilitás mértékétől,
- a kívánt hatóanyag-felszabadulási profiltól,
- a hatóanyag sajátos tulajdonságaitól (vízoldhatóság és stabilitás),
- a szükséges nanorészecske mérettől,
- a felületi jellemzőktől (töltés és permeabilitás).

A polimer nanorészecskék előállítására szolgáló módszereket általában három nagy csoportba soroljuk: 1) a meglévő polimerek diszperzióján, 2) ionos gélképzésen vagy

2. Irodalmi áttekintés

hidrofil polimerek koacervációján és 3) monomerek polimerizációján alapuló módszerek. A nanorészecskék előállítására vonatkozó szakirodalomban azonban más módszereket is leírtak, mint például a szuperkritikus folyadéktechnológiát, a részecskék létrehozását nem nedvesítő közegben, valamint mikro- és nanokapszulázást gazdamolekulákkal. Számos polimer diszperzió alapuló technika van (egyszerű és összetett emulzió-oldószer elpárologtatás/extrakció, koacerváció, porlasztva szárítás, kisózás, emulzió-diffúzió, precipitáció), melynek alapja egy biodegradábilis polimer diszperziója, biológiailag lebontható nanorészecskék előállítása érdekében [Bhatia S., 2016]. A nanokapszulázást, zárványkomplexek (inklúziós komplexek) kialakítása által, egyszerű és hatékony alternatívaként emelték ki, amely lehetséges előnyökkel jár a vendégmolekulák fokozott stabilitása, oldhatósága és biológiai hozzáférhetősége szempontjából. A továbbiakban a doktori munkám során használt módszereket fejtem ki bővebben.

2.4.1 Emulzió-oldószer elpárologtatás módszerei

Az oldószer elpárologtatás módszere az egyik leggyakrabban használt módszer a polimer nanorészecskék előállítására. Az egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatás technikát általában hidrofób hatóanyagot tartalmazó részecskék szintézisére alkalmazzák. Ez a módszer két lépésből áll: az első a polimer oldat vizes fázisba történő emulgeálása, a második pedig a polimer oldószer elpárologtatása, amely a polimer kicsapódását eredményezi. Az eljárás a polimer és a hidrofób hatóanyag oldhatóságán alapul, mivel mind a polimert, mind a hidrofób hatóanyagot szerves oldószerben (pl. diklór-metán, kloroform vagy etil-acetát) oldják [Nasir et al., 2014]. A polimerből és a hatóanyag oldatból nyert keveréket ezután vizes oldatban emulgeálják, ami felületaktív anyagot vagy emulgeálószerrel tartalmazhat (például polivinil-alkohol (PVA)), így képződik az olaj a vízben (o/v) emulzió. Az emulgeálószeres fontos szerepet játszanak a mikrorészecskeszintézishez szükséges emulzió kiválasztásában. Ha az emulgeálószer olajban oldódik, akkor előnyben részesíti a v/o típusú emulziót, és fordítva. Miután a stabil emulzió kialakult, a szerves oldószer folyamatos keveréssel vagy a nyomás csökkentésével elpárologtatják. A nanorészecskék mérettartományát befolyásolja a stabilizátor koncentrációja és típusa, a polimer koncentrációja és a homogenizátor sebessége. Ultrahangos kezelés vagy nagy sebességű homogenizálás gyakran alkalmazható a kis részecskeméret elérése érdekében [Cheaburu-Yilmaz et al., 2019].

Az egyszerű emulzió és oldószer elpárologtatáson alapuló módszerek többségét a hidrofil hatóanyagok gyenge kapszulázási lehetősége jellemzi, ezért a hidrofil molekula

2. Irodalmi áttekintés

mikrokapszulázásához összetett emulziós technikát alkalmaznak. Az o/v egyszerű emulzióval ellentétben, amely alkalmas lipofil molekulák, például szteroidok kapszulázására, az összetett emulziós eljárást (pl. víz-az-olajban-a-vízben (v/o/v) módszer) általában hidrophil biomolekulák és gyógyszerek, például peptidok, fehérjék és antigének (vakcinák) mikrokapszulázására használják. Bár a v/o/v összetett emulziók létrehozására különböző technikák léteznek (pl. egylépcsős emulgeálási módszer, kétlépcsős emulgeálási módszer, fázis inverziós módszer), az orvosbiológiai alkalmazások mikrorészecske-szintézise elsősorban a kétlépcsős módszerre összpontosít a kiváló hatóanyagtartalom elérhetősége miatt. Egy tipikus v/o/v összetett emulzió egy háromfázisú rendszer. Az eljárás során a polimert szerves oldószerben oldják (olajfázis), majd kis térfogatú (100-500 μ l) vizes fázist (belső vizes fázis) adnak hozzá. A belső vizes fázis tartalmazhatja a hidrophil hatóanyagot. Ezt a két fázist erőteljes homogenizálásnak vagy ultrahangos kezelésnek vetik alá, létrehozva a víz az olajban (v/o) elsődleges emulziót. Ezt az elsődleges v/o emulziót ezután emulgeálószerrel (pl. PVA) tartalmazó nagyobb mennyiségű vizes oldathoz (külső vizes fázis) adják, és tovább homogenizálják, víz-olaj-víz (v/o/v) emulziót formálva. Az oldószerrel szintén párologtatás útján távolítják el, és a nanorészecskék pl. nagy sebességű centrifugálással izolálhatók. Ebben a módszerben elsősorban a beépítendő hidrophil hatóanyag mennyisége, az alkalmazott stabilizátor koncentrációja, a polimer koncentrációja, valamint a vizes fázis térfogata, mint paraméterek azok, amelyek befolyásolják a nanorészecskék jellemzőit [Suri et al., 2013].

2.4.2 Inklúziós komplexek előállítása

Az inklúziós komplexeket úgy definiálják, mint egy ligandum (kapszulázott bioaktív anyag) és egy szubsztrát (fedőanyag) szupramolekuláris társulásait, melyeket főként hidrogénkötések, Van der Waals-erők vagy hidrofób kölcsönhatások hoznak létre, illetve tartanak össze. Ezt a módszert leginkább kisméretű és nagy illékonyságú vegyületek komplexálására használják, mint például vitaminok és illóolajok, jelentősen javítva stabilitásukat. Erre a célra csak néhány komponens használható szubsztrátként, mint amilyen a β -ciklodextrin és a β -laktoglobulin, melyek nagy stabilitást és kapszulázási hozamot biztosítanak a kapszulázott anyagnak [Fuenmayor et al., 2021]. Ezenkívül a ciklodextrinek nemcsak mikrorészecskéket, hanem nanorészecskéket is képezhetnek: nanogömböket, nanorészecskéket, nanorudakat és más nanostruktúrákat [Arserim-Uçar D.K., 2020]. A ciklodextrinek inklúziós komplexeinek előállítására

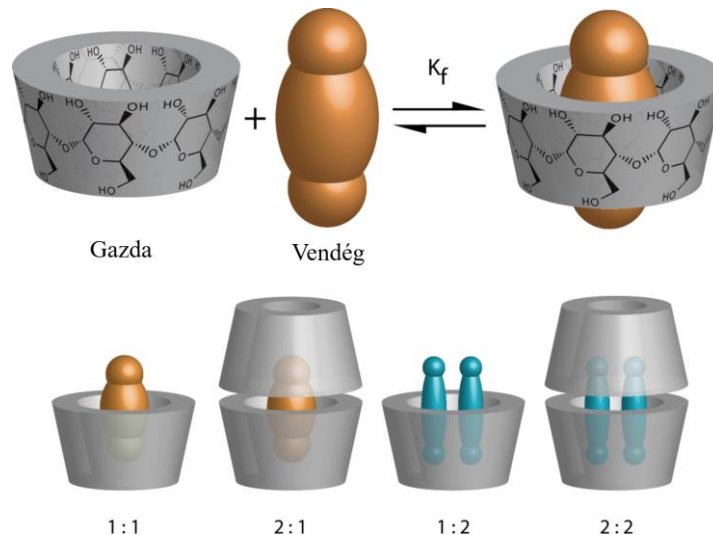
2. Irodalmi áttekintés

sokféle módszer létezik, ezek közül kiemelhetők: a kicsapatás, a dagasztás, a szuperkritikus szén-dioxid, az őrlés, a mikrohullámú besugárzás és a porlasztva szárítás módszerei [Cid-Samamed et al., 2022].

Az inklúziós komplexképződés a ciklodextrinek csonka kúp geometriájának, valamint hidrofób jellegű központjuknak és hidrofil jellegű külső felületüknek köszönhető. Ez lehetővé teszi olyan molekulák kapszulázását, amelyek képesek azonos vagy kisebb méretű üreget elfoglalni. Ez a kölcsönhatás a ciklodextrint gazdavegyületté, a belső molekulát pedig vendégvegyületté alakítja. A ciklodextrin hidrofób központja gyenge kölcsönhatásokat alakít a belsejében maradó apoláris molekulákkal, míg külseje vizes közegben oldhatóbbá vagy diszpergálhatóbbá teszi azt, ami nagy jelentőséggel bír a rossz vízoldhatóságú molekulák védelme szempontjából. Ezt az eljárást széles körben alkalmazzák a gyógyászatban, az élelmiszeriparban vagy akár a kozmetikumokban is [Lobo et al., 2018].

A vizes oldatban levő ciklodextrinek számos gyógyszerrel képesek zárványkomplexeket képezni azáltal, hogy központi üregükbe gyógyszermolekulát fogadnak be, vagy gyakrabban csak a terápiás rész lipofil részét, különböző sztöchiometriával (**11. ábra**). A komplexképződés során nem képződnek és nem szakadnak fel kovalens kötések, és a komplexben levő gyógyszermolekulák (kötött forma) gyors dinamikus egyensúlyban vannak az oldatban levő molekulákkal (szabad forma). A komplexképződés másik kulcsfontosságú tényezője a kiválasztott ciklodextrin és a gyógyszermolekula különböző komponensei közötti termodinamikai kölcsönhatás. A komplexképződés feltétele a reaktánsok megfelelő energetikai viszonyai, szabadentalpiájuk kedvező irányban történő változása, amely a gyógyszermolekula ciklodextrin üregébe való beépülésének hajtóereje. Mivel az inklúziós komplexek képződése a szabad és ciklodextrin molekulák, valamint a bioaktív vegyületek közötti egyensúly eredménye, ezért néhány tényező befolyásolhatja az inklúziós komplex képződését, mint például a ciklodextrin típusa, az üreg mérete, a pH és az ionizációs állapot, a hőmérséklet és az előállítás módja [Jambhekar & Breen, 2016].

2. Irodalmi áttekintés



11. ábra. A ciklodextrin és a vendégmolekula kölcsönhatásai [Crini G., 2014].

Kalogeropoulos és munkatársai [Kalogeropoulos et al., 2010] kimutatták, hogy az általuk vizsgált gyógynövénykivonat β -ciklodextrinnel való bevonása megvédte a kivonatot a termikus lebomlástól. Vilanova és Solans [Vilanova & Solans, 2015] az A-vitamin-palmitát vízben való oldhatóságának és stabilitásának jelentős növekedését figyelték meg, ami arra utal, hogy a β -ciklodextrinek inklúziós komplexei megoldást jelenthetnek a felületaktív anyagoktól mentes emulziókra a kapszulázott szerek biológiai hozzáférhetőségének növelése érdekében. Fernandes és munkatársai [Fernandes et al., 2018] bizonyították a β -ciklodextrin hővédő képességét. A szerzők szerint az antocianint tartalmazó β -ciklodextrin potenciális hordozója és stabilizátora lehet annak. Fenyvesi és munkatársai [Fenyvesi et al., 2020] krizin-ciklodextrin komplexeket készítettek, és a β -ciklodextrin származékok által komplexált krizin jobb oldhatóságáról és permeabilitásáról számoltak be.

2.5 Szabályozott és célzott gyógyszeradagolás

A hagyományos gyógyszeradagolás hátránya, hogy a szervezet immunrendszere gyorsan felismeri és eltávolítja az idegen anyagot, mielőtt az elérné a célszöveteket, és mivel nemcsak a célszervbe jut, dózist növelni kell a kívánt terápiás szint elérése érdekében, így akár súlyos mellékhatásokat okozhat. A nanoméretű gyógyszerhordozók számos előnnyel rendelkeznek a hagyományos kemoterápiás gyógyszerekkel szemben. Védettebbek a véráramban történő lebomlással szemben, jobb gyógyszeroldékonyság és

2. Irodalmi áttekintés

jobb gyógyszerstabilitás jellemzi azokat [Senapati et al., 2018]. Szabályozott és célzott gyógyszeradagolással csökkenthető a gyógyszer-toxicitás, a káros mellékhatások és a beadott dózisok mennyisége. Ezen kívül ezek a rendszerek hosszabb ideig, ideális esetben egy meghatározott kezelési időtartamig képesek gyógyszermolekulákat szállítani [Rizvi & Saleh, 2018]. Ezért a szabályozott és célzott hatóanyagszállító rendszerek fejlesztése elengedhetetlenné vált, különösen az elmúlt két évtizedben, amikor számos nanorészecske-rendszert fejlesztettek ki a hatékony és szabályozott gyógyszeradagolás érdekében [Kaur & Singh, 2014]. Az ilyen rendszerek egyik típusa a doktori munkám során is alkalmazott polimer alapú nanorészecskék, amelyek diffúzióval és lebomlással képesek fenntartani a hatóanyag nyújtott felszabadulását. A polimer nanorészecskék jobb stabilitást, homogénebb részecskeméretet, jobb gyógyszerkeringési időt és kontrolláltabb gyógyszerleadást mutatnak a micellákhoz és liposzómákhoz képest [ud Din et al., 2017].

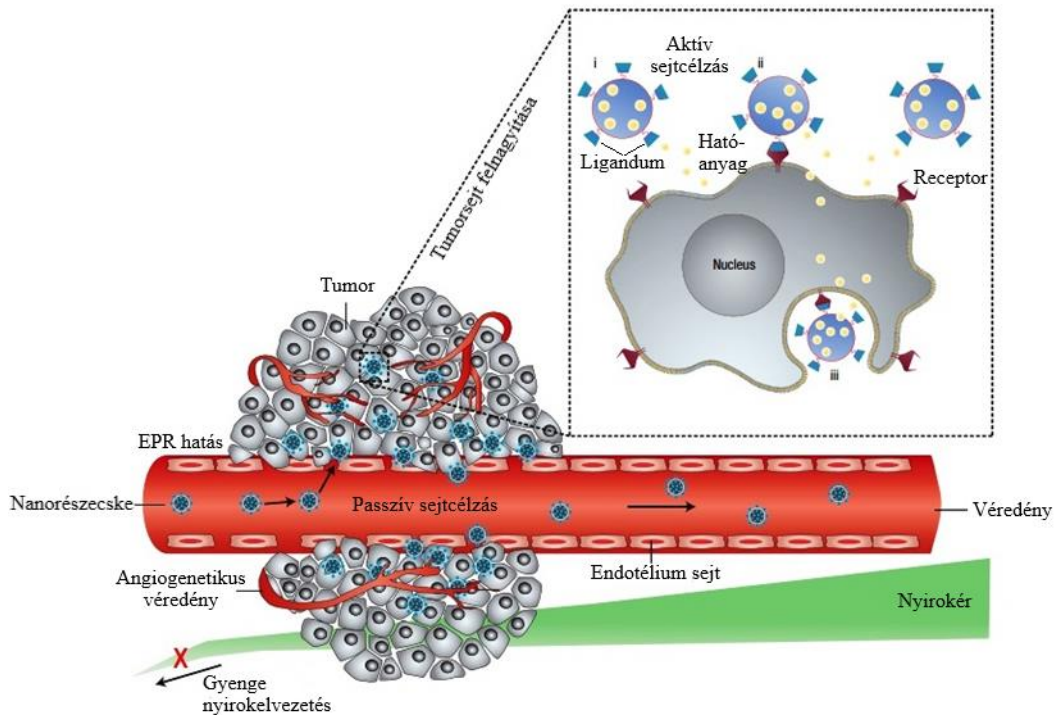
A rák diagnosztizálásában/kezelésében a legfontosabb kihívások az olyan gyógyszer- és génszállító rendszerek tervezésében rejlenek, amelyek képesek kifejezetten a beteg sejteket célozni anélkül, hogy befolyásolnák a normális, egészséges sejteket/szöveteket. Ez egyrészt a rákellenes szereknek a tumor mikrokozonyzatába és a tumorsejtekbe történő hatékony bejuttatásával érhető el [Mussi & Torchilin, 2013]. Másrészt, a formázott nanorészecskéknek több fiziológiai és biológiai akadályon kell áthaladniuk. Szállítórendszerként való használatuk követelményeket támaszt méretükkel, biokompatibilitásukkal és felületi kémiájukkal szemben a nem specifikus kölcsönhatások megelőzése és a célpontokhoz való specifikus kötődés bevezetése érdekében. Ezeknek a nanohordozóknak képesnek kell lenniük:

- a stabilitásra, amíg eléri a tumor mikrokozonyzatát,
- a RES és az MPS elkerülésére,
- a tumor intersticiális folyadékába való bejutására nyomás által,
- az akkumulációra a tumor mikrokozonyzatában,
- az aktív helyszín elérésére,
- kizárólag a célzott sejtekkel való kapcsolat létrehozására.

Az aktív/passzív célzás (**12. ábra**) ideális megoldás arra, hogy elősegítse a nanorészecskék felhalmozódását az aktív helyen. A részecskék általi célzott hatóanyagszállítást elsősorban azok felületi funkcionálizációja, fizikai-kémiai

2. Irodalmi áttekintés

tulajdonságai és a tumor mikrokozonyezetének patofiziológiai jellemzői szabályozzák [Omidí & Barar, 2014].



12. ábra. Passzív célzás az EPR hatás révén és aktív célzás a nanorészecskék felületén levő sejt-specifikus ligandumokkal [Peer et al., 2007].

(*Nature Nanotechnology* 2007;2 751–760 – Eredeti kiadó, Springer Nature. engedélyével felhasználva.)

2.5.1 Passzív célzás

Ma már bizonyított tény, hogy bizonyos körülmények között (daganatokra jellemző gyulladás/hipoxia) az erek endotéliuma átteresztőbbé válik, mint egészséges állapotban. Hipoxia esetén a gyorsan növekvő daganatok új ereket építenek, vagy elnyelik a meglévőket. A daganatokban levő ereket az EPR hatás (fokozott permeabilitás és retenciós hatás) jellemzi a rendellenes és szivárgó architektúra miatt, ezáltal lehetővé téve a nanohordozók számára, hogy az endotélium-gát átlépése után belépjenek az intersticiális térbe. Továbbá a normál nyirokvezetés hiánya a szolid tumorokban hozzájárul a nanorészecskék retenciójához. A rákos endotélium sejtek közötti rések mérete nagyon változatos lehet, 200–800 nm közötti, ellentétben a normál endotélium sejtekkel, amelyeknek pórusai 5–10 nm-es réseket tartalmaznak [Zhu & Liao et al., 2015].

Ez a "passzív" daganatcélzás, mely a hordozó jellemzőire (méret, keringési idő) és a tumor biológiájára (érrendszer, szivárgás stb.) támaszkodik, azonban nem használja a specifikus szövet- vagy szervkötődést lehetővé tevő ligandumokat. Az EPR hatás

2. Irodalmi áttekintés

jelenségének a megértése hozzájárult a megfelelő tumorcélzó gyógyszershállító rendszerek fejlesztéséhez. Ezen koncepción alapul a forgalomba hozott Doxil/Caelyx, amelyet ma már sikeresen alkalmaznak a klinikákon.

Bár az újonnan kialakult daganatok szivárgása befolyásolja a nanomedicina permeációját, hozzájárul a magas intersticiális nyomáshoz, amely képes gátolni a gyógyszerhordozók felhalmozódását a tumorban. A heterogén vérellátás miatt a tumorsejtek is szabálytalanul növekedhetnek. Amelyek az erek közelében vannak, gyorsabban szaporodnak, mint azok, amelyek a tumormagban vannak, és kevesebb tápanyagot és oxigént kapnak. Ez magyarázza a nagy daganatok magjában található hipoxiás/nekrotikus területeket, és gyakran lehetetlen, hogy a nanogyógyszerek elérjék ezeket a területeket. Ráadásul a daganatok központi területén lévő erek a magas intersticiális nyomás miatt nem szivárognak annyira, mint amire számítani lehet. A magas intersticiális nyomás nemcsak konvekcióval gátolja a gyógyszer bejutását, hanem összenyomja az újonnan kialakult ereket is [Kobayashi et al., 2013].

2.5.2 Aktív célzás

A passzív célzás előnyei ellenére egyes daganatokat nehéz megközelíteni az EPR hatás hiánya miatt, ugyanakkor egy daganatban is változó permeabilitás uralkodhat. E korlátok leküzdése érdekében a nanorészecskéket próbálták úgy tervezni, hogy specifikusan kötődjenek (aktív célzás). Az aktív célzás esszenciális a gyógyszerek, gének és teranosztikumok eljuttatásában a tumoros helyre, elkerülve a normál szöveteket, ezáltal növelve a terápiás hatékonyságot és korlátozva a mellékhatásokat. Az aktív célzás képes jelentősen növelni a célsejtbe juttatott gyógyszer mennyiségét a hagyományosan alkalmazott gyógyszerekhez vagy a passzívan célzott nanorendszerekhez képest. Az aktív célzás során a tumorsejteket vagy a tumor mikrokörnyezetét/érrendszerét célozzák. Ezt úgy érik el, hogy a nanohordozó felületéhez ligandumokat rögzítenek, amelyek a tumorsejtekben túlexpresszált receptorokhoz kötődnek. Ez a stratégia javítja a nanohordozók affinitását a rákos sejtek felszínéhez, és ezáltal fokozza a gyógyszer penetrációját [Attia et al., 2019]. Ilyen célokra ligandumok széles skáláját használták, beleértve a kis molekulákat, mint például a folsavat és a szénhidrátokat, vagy makromolekulákat, mint például peptideket, fehérjéket, antitesteket, növekedési faktorokat, aptamereket és oligonukleotidokat. Az aktív célzás során a ligandumok elérhetősége mellett fontos optimalizálni azok sűrűségét is, hogy ne csak a magas célzási hatékonyság, hanem az optimális internalizáció is biztosítva legyen [Wicki et al., 2015].

2. Irodalmi áttekintés

A kis szerves molekulák a leggyakrabban alkalmazott célzók a viszonylag könnyű, stabil és szabályozható konjugációjuk miatt. A biotint (H-vitamin) széles körben használják nanorészecskékkel való konjugációra. A folsav (B9-vitamin) nagy affinitással rendelkezik az endogén folát receptorokkal szemben, ezért számos olyan vizsgálatot végeztek, amelyek olyan ráktípusok megcélzására irányultak, ahol a folsavreceptorok erősen expresszálódnak [Rizvi & Saleh, 2018]. Egy igen fontos aktív célzó szer az iRGD tumor penetrációs peptid. Az iRGD egy bifunkcionális ligandum, amely tumor-behatoló (RGD) és szövet-behatoló (CendR) szekvenst is tartalmaz. Az iRGD elsősorban a rákos sejtek által túltermelt integrin receptorokhoz kötődik, egy „átjárót” aktiválva a rákos sejteken keresztül, jelentősen elősegítve a kapszulázott gyógyszerek tumorokba történő szállítását, ezáltal növelve a hatóanyag célba jutását. Még érdekesebb, hogy a nanogyógyszerek tumorokba történő fokozott szállítását a peptiddel való kovalens konjugáció mellett az iRGD-vel történő együttes kapszulázással is elérhető [Gao et al., 2017, Zhong et al., 2019].

2.5.3 Szabályozott hatóanyagleadás

A nanorészecskék méretét és felületi tulajdonságait vizsgálták a biológiai hozzáférhetőség optimalizálása, a kiürülés csökkentése és a stabilitás növelése érdekében. Ezeknek a jellemzőknek a szabályozásával lehetővé vált, hogy a gyógyszer a test olyan szöveteibe kerüljön, amelyek korábban nem voltak elérhetők. Ennek a gyakorlatnak azonban nincs jelentősége, ha a gyógyszer ezután nem tud felszabadulni a nanorészecske mátrixból. A hatóanyag-felszabadulás szabályozásának egyik elsődleges célja, hogy a gyógyszer koncentrációját a vérben a terápiás tartományon belül tartsa. Ezért ideális lenne olyan gyógyszerhordozók kifejlesztése, amelyeket ritkábban kell a betegnek szedni és szabályozott hatóanyag-felszabadulást biztosítanak.

A gyógyszer felszabadulása a nanorészecske alapú formulából olyan tényezőktől függ, mint a részecske típusa, összetétele, előállítási módja, a pH, a hőmérséklet, a gyógyszer oldhatósága, a felülethez kötött vagy adszorbeált gyógyszer deszorpciója, a gyógyszer diffúziója a nanorészecske mátrixon keresztül, a nanorészecske mátrix eróziója, valamint az eróziós és diffúziós folyamatok kombinációja. A hordozókból történő hatóanyag-felszabadulás alapvetően négy kategóriába sorolható (**13. ábra**): 1) diffúziós, 2) oldószerhatás, 3) kémiai és 4) stimulált felszabadulás [Son et al., 2017].

2. Irodalmi áttekintés

Diffúzió-szabályozott felszabadulás

A diffúzió-szabályozott hatóanyag-felszabadulás kapszulaszerű rendszerekben történik, ahol a hatóanyag oldva vagy diszpergálva van egy magban. A gyógyszer diffúzióját a membránon keresztül a koncentrációgradiens okozza. A mátrix típusú nanoszemcsék diffúzió-szabályozott felszabadulási profillal is rendelkeznek, ahol a hatóanyagmolekulák egyenletesen oszlanak el a polimer mátrixban. A mátrix típusú rendszerek nem rendelkeznek membránokkal, amelyek akadályozhatják a diffúziót. Így az ilyen rendszerek általában magas kezdeti felszabadulást mutatnak, de idővel a felszabadulási sebesség csökken, mivel a gyógyszermolekula diffúziós távolsága a hordozón belül növekszik.

Oldószer-szabályozott felszabadulás

Az oldószerrel szabályozott felszabadulás magában foglalja az ozmózis- és duzzadás-szabályozott felszabadulást. Az ozmózis-szabályozott felszabadulás olyan hordozóban történik, amely félig áteresztő polimer membránnal van ellátva, és a víz az alacsony hatóanyag-koncentrációjú részből a hordozó közepére áramlik, ahol magas a hatóanyag-koncentráció. Ennek a mechanizmusnak az eredményeként a gyógyszerfelszabadulás egy koncentrációgradiens mentén történik, amelyet folyamatosan fenntartanak a membránok.

Kémiai-szabályozott felszabadulás

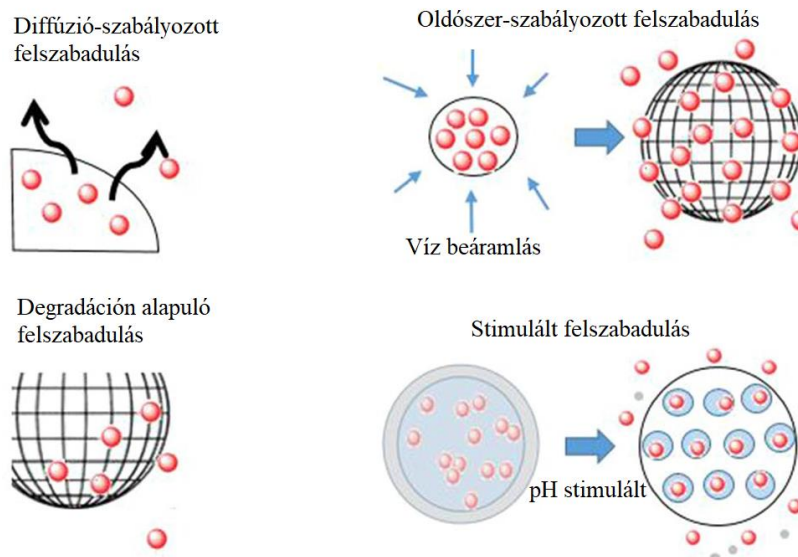
A gyógyszerhordozók megváltoztatják szerkezetüket, amikor biológiai környezetnek vannak kitéve. Ezek általában olyan, biológiailag lebomló polimerekből készülnek, mint a poliészterek, poliamidok és poliszacharidok, amelyek a természetes biológiai folyamatok eredményeként lebomlanak a szervezetben, felszabadítva a hordozott hatóanyagot. A biológiai lebomlás két típusát különböztetik meg, a polimer mátrix erózióját és a felület erózióját. A polimerekből, például PLGA-ból, PLA-ból vagy PCL-ből álló mátrix egyidejű lebomláson megy keresztül. A polimerek lebomlása tovább gyorsul a felületi erózióval [Adepu & Ramakrishna, 2021].

Stimulált felszabadulás

A stimulációra reagáló nanohordozókból származó gyógyszerek felszabadulását olyan ingerek szabályozzák, mint a hőmérséklet, a pH, az ionerősség, az ultrahang, az elektromosság vagy a mágneses mezők. Az ilyen hordozókat célzott, specifikus

2. Irodalmi áttekintés

gyógyszeradagolásban vizsgálták, mivel lehetséges a stimuláció lokalizálása. A pH-érzékeny linkerekhez kapcsolódó nanohordozókat helyspecifikus gyógyszerhatóanyag szállító hordozóként fejlesztették ki a szolid tumorok enyhén savas pH-ját kihasználva. A hőérzékeny hatóanyagszállító rendszerekben a polimer fázisátmeneti hőjét felhasználva szabadul fel a hatóanyagmolekula [Mi P., 2020].



13. ábra. Különböző hatóanyag-felszabadulási mechanizmusok a nanohordozókban [Son et al., 2017].

(*Journal of Pharmaceutical Investigation* 2017;47 287–296 – *Eredeti kiadó, Springer Nature. engedélyével felhasználva.*)

2.6 Célkitűzések

A PhD munkám célja olyan rákellenes hatóanyagokat tartalmazó nanorészecskék előállításának, amelyek hatékony, tartós és célzott gyógyszerhordozó rendszereknek bizonyulnak. A nanoléptékű gyógyszerhordozással irányított és szabályozott hatóanyagleadás valósítható meg, ezáltal a hatóanyagok célzottan a rákos szövetekbe juttathatók, csökkentve annak kioldódását, csökkentve a nemkívánatos mellékhatásokat és növelve a kemoterapeutikumok hatékonyságát.

Fontos szempont volt nemcsak az alkalmazott hatóanyagok megtalálása, hanem a megfelelő hordozóanyagok kiválasztása is. Munkám során törekedtem olyan hatóanyagok és hordozóanyagok használatára, amelyek egy része már jól ismert, másik része viszont újdonságnak számít a szakirodalomban. Így a jól ismert sorafenib és a széles spektrumú ciszplatin használata mellett, célt volt egy természetes alapú, de

2. Irodalmi áttekintés

szintetikus előállított antocianidin hatóanyag vizsgálata. Az antocianidinek antioxidáns és rákellenes hatása már jól ismert, ellenben ezen vegyületek nanoléptékű használata, főleg célzott rákterápiákra, még új vonalnak számít. A megfelelő biodegradábilis és biokompatibilis hordozó polimerek megtalálása érdekében olyan új típusú hordozókat vizsgáltam, amelyeket zöld úton, biokatalízissel állítottak elő és ezidáig nem alkalmaztak gyógyszerhordozó célra.

Munkám fő célja a 12-hidroxi-sztearinsav- ϵ -kaprolakton kopolimer és a 16-hidroxi-hexadekánsav polimerek mikrokapszulázási és felületmódosítási lehetőségeinek vizsgálata sorafenib és ciszplatin hatóanyagokkal, valamint az esetleges kettős hatóanyagú rendszerek előállítása és vizsgálata. Célul tűztem ki az iRGD tumor penetrációs peptid alkalmazását a nanorészecskékkel együtt fizikai és/vagy kémiai kötással. Vizsgáltam még új típusú rákellenes hatású antocianidinek molekuláris kapszulázását ciklodextrin származékokkal és a keletkező komplexek mikrokapszulázását 12-hidroxi-sztearinsav- ϵ -kaprolakton kopolimer és 16-hidroxi-hexadekánsav polimerekkel.

A gyógyszerhordozó rendszer biokompatibilitása alapkövetelmény. A nanoméretű gyógyszerek a hagyományostól eltérő, egyedi tulajdonságokkal rendelkező rendszerek, ami leginkább méretüknek és nagy fajlagos felületüknek köszönhető. Céлом volt a nanorészecskék előállítási módszerének optimalizálása a megfelelő részecskeméret elérése és a kapszulázási hatékonyság javítása érdekében, valamint a nanorészecskék tesztelése hatóanyagleadási és citotoxicitási tesztekben, hogy hatóanyag-hordozó rendszereim hatékonyságát fiziológiai körülmények között és sejtek szintjén is megvizsgáljam *in vitro*, felkészítve az esetleges *in vivo* vizsgálatokra.

3. Kísérleti rész

3.1 Felhasznált anyagok

1,2-diklór-metán (Molar Chemicals Kft., Magyarország)
1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid (Sigma-Aldrich, USA)
3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (Sigma-Aldrich, USA)
Aceton (Sigma-Aldrich, USA)
Amino PEG (mPEG-NH₂, M_w = 5000 Da, Nanocs Inc., USA)
Szarvasmarha szérum albumin (Thermo Fischer Scientific, USA)
Bórsav (> 99,5, Sigma Aldrich, Németország)
Ciszplatin (99,99%, Acros Organics, Belgium)
Citromsav (> 99,5, Sigma Aldrich, Németország)
Dimetil-szulfoxid (99%, VWR International S.A.S., Franciaország)
Dulbecco módosított tápoldat (DMEM, Sigma-Aldrich, USA)
Magzati borjú szérum (Thermo Fischer Scientific, USA)
Izotóniás foszfát-puffer tableta (Sigma-Aldrich, USA)
Hidroxi-propil-β-ciklodextrin (Cyclolab, Magyarország)
iRGD peptid (GenScript USA Inc., USA)
Jégecet (100%-os ecetsav, VWR International S.A.S., Franciaország)
mikro-BCA kit (Thermo Fischer Scientific, USA)
Nátrium-acetát (vízmentes, Sigma-Aldrich, USA)
Nátrium-azid (Sigma-Aldrich, USA)
Nátrium-dodecil-szulfát (Sigma-Aldrich, USA)
Nátrium-foszfát (96%, Sigma-Aldrich, Németország)
N-hidroxi-szukcinimid (Sigma-Aldrich, USA)
N,N'-diciklohexil-karbodiimid (Sigma-Aldrich, USA)
Polivinil-alkohol (M_w = 30-70 kDa, 87-90% hidrolizált, Sigma-Aldrich, USA)
Random metilezett β-ciklodextrin (Cyclolab, Magyarország)
RPMI-1640 tápoldat (Sigma-Aldrich, USA)
Salétromsav 68–70% (Scharlab, Spanyolország)
Sorafenib (Active Biochem, China)
Sósav 37% (VWR International S.A.S., Franciaország)

3. Kísérleti rész

Szorbitán-monolaurát (Span® 20, Sigma-Aldrich, USA)

Szorbitán-monooleát (Span® 80, Sigma-Aldrich, USA)

Szulfobutil-éter- β -ciklodextrin (Cyclolab, Magyarország)

Tetrahidrofurán (99%, VWR International S.A.S., Franciaország)

Tripszin-EDTA (Sigma-Aldrich, USA)

Vérplazma (Veszprémi Területi Vérellátó központ)

3.2 Polimer hordozók

3.2.1. 12-hidroxi-sztearinsav- ϵ -kaprolakton kopolimer

A polimert partnereink, a Temesvári „Politehnica” Egyetem (University Politehnica Timișoara, Faculty of Industrial Chemistry and Environmental Engineering) biokatalízis csoportjának kutatói szintetizálták. Anamaria Todea és munkatársai [Todea et al., 2018] elsőként írták le az ϵ -kaprolakton enzimkatalizált (különböző lipáz és hidroláz enzimek használatával) kopolimerizációját különböző hidroxi-zsírsavakkal. Az általam használt biológiai alapú 12-hidroxi-sztearinsav- ϵ -kaprolakton kopolimer (12CL) egy új, ígéretesnek bizonyuló anyag az orvosbiológiai alkalmazásokban, elsősorban az irányított és célzott hatóanyagtranszportban.

3.2.2 16-hidroxi-hexadekánsav- ϵ -kaprolaktám kopolimer

Az új típusú poliészter-amid polimert szintén a fent említett kutatócsoportban szintetizálták. A „zöld” szintézis során lipáz katalizált reakcióban polimerizálták a 16-hidroxi-hexadekánsavat és az ϵ -kaprolaktámot [Benea et al., 2023]. Ilyen reakciórendszerekről még nem számoltak be a szakirodalomban a poliészter-amidok előállítására. A poliészter-amidok, a poliészterekhez hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, mi több, a poliamidokat fokozott biológiai lebonthatóság és fokozott robusztusság jellemzi. Az előállított és általam szintén felhasznált 16-hidroxi-hexadekánsav- ϵ -kaprolaktám kopolimer (16CM) szintén korábban nem vizsgált potenciális gyógyszerhordozóanyag.

3.3 Előállítási módszerek

3.3.1 Sorafenibtartalmú részecskék előállítása

3.3.1.1 Mikrokapszulázás 12CL polimerrel

A sorafenib mikrokapszulázására az egyszerű emulzió–oldószer elpárologtatás módszerét alkalmaztam a hatóanyag hidrofób jellege miatt. A szerves fázis készítéséhez 20-40 mg kapszulázó polimert 1-2 ml DCM-ben oldottam fel. A szerves fázishoz 0,2 ml 1%-os (m/V) SOR acetonos oldatát adtam. A vizes fázist 0,5-1% (m/V) PVA vizes oldata alkotta. A szerves-vizes fázis aránya 1:2 és 1:4 között változott.

A vizes fázis szerves fázishoz való hozzáadását követően a két fázist emulgeáltam ultrahangos készülékkel (Heat System Ultrasonics Inc., Sonicator Cell Disruptor Model W 220 F, USA és Hielscher Ultrasonic Processor UP200St, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Németország) 6-os intenzitási szinten vagy 30% amplitudón, 30 másodpercig. A szerves oldószereket légköri nyomáson és szobahőmérsékleten mágneses keveréssel 3 órán át kevertetve párologtattam el. A nanorészecskéket kétszer mostam centrifugálással (Hermle Labortechnik, Wehingen, Németország,) 21380 g gyorsulással 20 percig, majd MilliQ vízben újradiszpergáltam.

Hatóanyagmentes (vak) részecskéket is készítettem a fent leírtak alapján, kihagyva a SOR-oldatot a folyamatból. A módszert részletes optimalizálásnak vettem alá a fő előállítási paraméterek változtatásával, melyet az eredmények részben taglalok.

3.3.1.2 Mikrokapszulázás 16CM polimerrel

A 16CM polimer részecskéket az egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatás módszerével állítottam elő. A szerves fázis 5 vagy 10 mg kapszulázó polimerből állt, amelyet a kívánt polimerkoncentrációtól függően 1 ml DCM-be oldottam fel. A vizes fázis 0,5% vagy 1% (m/V) PVA vizes oldatából állt. A két fázis arányát 1:2 és 1:5 (o/v) között módosítottam és ultrahanggal emulgeáltam (Hielscher UP200St, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Németország) 50%-os amplitudón, 60 másodpercig. A szerves oldószereket mágneses kevertetéssel párologtattam el. További felhasználásuk előtt az előző pontban említett mosási eljárást alkalmaztam.

Hatóanyagmentes részecskékről készült részletes tanulmány után mikrokapszuláztam a SOR hatóanyagot az optimális paramétereket használva. Az aktív anyagot THF-ben oldottam, 20 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítve. A megfelelő

3. Kísérleti rész

mennyiségű (0,5-3 mg) hatóanyagot tartalmazó aliquot részt a szerves fázishoz adtam, és optimalizáltam a hatóanyagtartalmú részecskék előállítási módszerét.

3.3.2 Sorafenib- és ciszplatintartalmú részecskék előállítása

A kettős hatóanyagú rendszer előállítása érdekében az összetett emulzió–oldószer elpárologtatás módszerét alkalmaztam, hatóanyagaim eltérő, hidrofób-hidrofil (SOR-CIS) jellege miatt. Alapvetően a szerves fázisom 10 mg 12CL kapszulázó polimerből állt, 1 ml DCM-ben oldva. A SOR hatóanyag acetonos oldatban került a szerves fázisba, különböző mennyiségekben (0,5–1 mg). A belső vizes fázis (300 µl) tartalmazta a 0,5 és 1 mg CIS vizes oldatát.

Első lépésben a belső vizes fázist a szerves fázishoz kevertem és ultrahangos kezeléssel emulgeáltam egy Hielscher UP200St (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Németország) ultrahangos processzorral, 30%-os amplitudóval 30 másodpercig. Ezután a létrejött emulziót egy viszonylag nagy térfogatú, felületaktív anyagot tartalmazó, külső vizes fázisba (5 ml PVA 1% (m/V)) pipettáztam és ismét ultrahanggal homogenizáltam, 50%-os amplitudón 60 másodpercig. A szerves oldószeret mágneses keveréssel 3 órán át kevertetve párologtattam el, légköri nyomáson és szobahőmérsékleten. A nanorészecskéket felhasználásuk előtt kétszer mostam centrifugálással (Hermle Labortechnik, Wehingen, Németország,) 21380 g gyorsulással 20 percig, majd MilliQ vízben újradiszpergáltam.

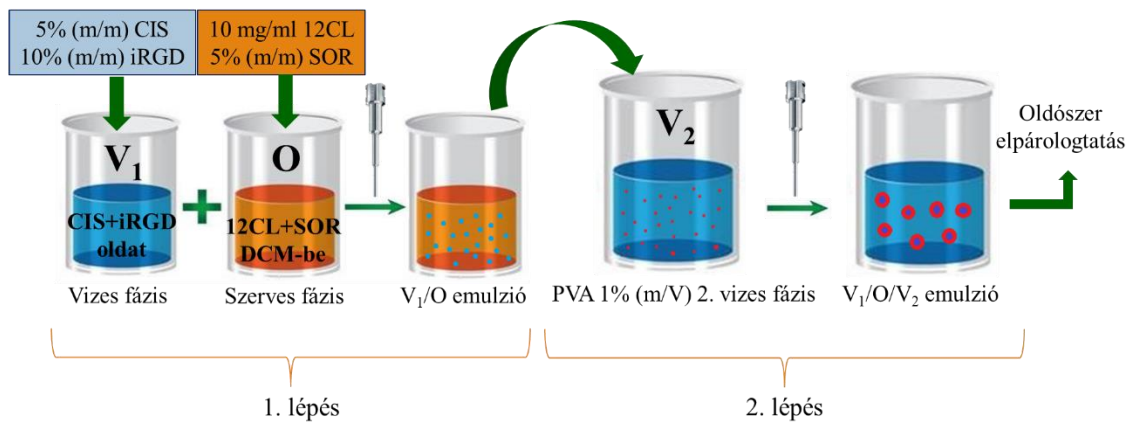
Vak részecskék is készültek, ugyanakkor a kapszulázási hatékonyság növelése érdekében különböző keresztkötő ágenseket és adalékanyagot használtam a részecskék előállítása során: EDC, DCC keresztkötő ágenseket és BSA fehérjét. A DCC a szerves fázisba került, a BSA a belső vizes fázisba és az EDC alkalmazását mindkét vizes fázisban megvizsgáltam. A módszert szintén optimalizáltam a fő előállítási paraméterek változtatásával.

3.3.3 Az iRGD tumor penetrációs peptid mikrokapszulázása

Az iRGD peptid mikrokapszulázása során a 3.3.2 alpontban leírt, összetett emulzió–oldószer elpárologtatás módszerét alkalmaztam. Az említett pontban leírt BSA egyrészt a hatóanyag kapszulázási hatékonyságát növelhette, másrészt modellanyagként szolgált. A célzófehérjék hozzáadása a hordozó rendszerhez történhet kötéssel a részecske felületére vagy akár mikrokapszulázással is a hordozóba. Így miután elegendő információt gyűjtöttem az emulziós módszerről, a BSA fehérjét iRGD peptidre váltottam

3. Kísérleti rész

a mikrokapszulázási folyamatban (**14. ábra**). Az optimális előállítási paramétereket és anyagmennyiségeket részletesen az eredmények részben szemléltetem.



14. ábra. Összetett emulziós-oldószer elpárolgatás módszere a SORiRGDCIS minta előállítására, valamint a fő előállítási paraméterek.

3.3.4 Az antocianidinek molekuláris kapszulázása

A kiválasztott szintetikus antocianidinek (CN) molekuláris kapszulázását ciklodextrinekkal (CD) végeztem. Mindkét CN kombinációját vizsgáltam 3 féle β -ciklodextrin-származékkal: 2-hidroxi-propil- β -ciklodextrin (HPBCD), random metilezett β -ciklodextrin (RAMEB) és szulfobutil-éter- β -ciklodextrin (SBECD) származékokkal.

A kísérlet során 10-10 mg CN-t oldottam 1 ml 10%-os (m/V) CD vizes oldatában és mágneses keverőn kevertetem 1 éjszakán át. Követtem a komplexek viselkedését és oldhatósági tesztekkel végeztem gravimetriás meghatározással. Viszonyításnak 1%-os (m/V) CN vizes oldatokat készítettem.

3.3.5 Antocianidin inklúziós komplexek mikrokapszulázása

A kiválasztott antocianidin-ciklodextrin inklúziós komplex mikrokapszulázásra az összetett emulzió-oldószer elpárolgatás módszerét használtam. A szerves fázist a 12CL és 16CM polimerek 1%-os (m/V) DCM-es oldata alkotta. A belső vizes fázis (0,1 ml) tartalmazta az inklúziós komplexet 0,5-1 mg antocianidin hatóanyag mennyiséggel, különböző vizes mátrixokban (0,01M HCl, MilliQ, PVA 1% (m/V)). A külső vizes fázis 5 ml PVA 1%-os oldatából állt. A részecskeszuszpenzió létrehozására a 3.3.2 alpontban leírt ultrahangozási és oldószer elpárolgatási paramétereket alkalmaztam.

3.4 A részecskék felületmódosítása

A részecskék hatóanyagleadási profiljának javítása érdekében különböző adalékanyagokat és felületkezelést alkalmaztam. A 3.3.1.2 alpontban leírt előállítási módszerben a szerves fázist kiegészítettem 2 mg DCC, 1 mg szorbitán-monolaurát (SPAN20) és 1 mg szorbitán-monooleát (SPAN80) hozzáadásával, külön-külön, követve az optimalizált előállítási paramétereket. Ugyanakkor egy-egy mintán PEGilálást is végeztem, az amino-PEG *in situ* hozzáadása és a részecske előállítás utáni felületmódosítás (PEGilálás) révén. Az *in situ* módszer esetében a hordozó polimer tömegével megegyező 10 mg amino-PEG-et a vizes fázishoz kevertem.

Részecske előállítás utáni PEG-iláció során a nanorészecske szuszpenziót centrifugáltam és mostam MilliQ vízben, majd 1 ml MilliQ vízben újradiszpergáltam. A szuszpenzióhoz 0,2 ml EDC+NHS vizes oldatát adtam, a polimer koncentrációjához viszonyítva 50x moláris feleslegben tartalmazva az EDC+NHS-t. Eppendorf csőben 25 °C-on 30 percig rázatva inkubáltam. Újabb mosás után az aktivált felületű nanorészecskéket újradiszpergáltam 2 ml PBS-oldatban, amely 20-szoros moláris feleslegben tartalmazott amino-PEG-et és további inkubáció következett másnapig. A nanorészecskéket a további felhasználásuk előtt háromszor mostam és PBS-oldatba vettem vissza.

3.5 Részecskék jellemzése

3.5.1 Szemcseméret-elemzés

3.5.1.1 Dinamikus fényszórás módszere

A dinamikus fényszórást (DLS), amelyet foton-korrelációs spektroszkópiának (PCS) vagy kvázi-rugalmas fényszórásnak is neveznek, kolloid szuszpenziót alkotó részecskék méretének meghatározására használják. A DLS módszere a részecskék hidrodinamikai méretét méri a kolloid oldaton áthaladó lézerefény által előidézett fényszórás segítségével, és az idő függvényében elemzi a szórt fény intenzitásának változását. A részecskék Brown-mozgása korrelál a hidrodinamikai átmérőjükkel. A műszer olyan korrelációs függvényt használ, amely matematikailag írja le a részecskeméretet és az időfüggő fényszórási kapacitást a Stokes-Einstein egyenlet

3. Kísérleti rész

segítségével [Lim et al., 2013]. A DLS módszere kolloid rendszerek részecskeméretének meghatározása mellett a készítmények stabilitásának tanulmányozására, valamint aggregáció és agglomeráció jelenlétének kimutatására is szolgál [Raval et al., 2018].

Méréseim során a nanorészecskék hidrodinamikai méretét Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) műszer segítségével határoztam meg, amely HeNe lézert és 173°-os szögben visszaszóró detektort tartalmaz. A nanorészecskék méretét intenzitás szerinti átlagméretükkel (Z-avg) és polidiszperzitási indexükkel (PDI) jellemeztem. A DLS-ben használt Z-avg-t összegzett átlagnak is nevezik, amely az egyik legstabilabb elsődleges paraméter. A Z-avg intenzitás alapú számított érték. Az összegzett átlagok elemzése során generált autokorrelációs függvények alapján az értékek számítása az ISO 13321 és ISO 22412 nemzetközi szabványokban definiáltak szerint történik. A DLS esetén a polidiszperzitás jellemzésére a PDI-t használják, amely szintén egy számított paraméter. Ez az index a DLS mérés során használt autokorrelációs függvényből származó szám, amely leírja a szemcseméreték feltételezett Gauss-eloszlás szélességét. A PDI egy dimenzió nélküli szám és az eloszlás kiszámítása az ISO 13321:1996 E és ISO 22412:2008 standardok alapján történik. A PDI 0,05-nél kisebb értékei ritkán láthatóak, kivéve az erősen monodiszperz standardok esetében és a 0,7-nél nagyobb értékek jelzik, hogy a minta nagyon széles méreteloszlású, és valószínűleg nem alkalmas a DLS technikára [<https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/whitepapers/wp111214dlstermsdefined>].

3.5.1.2 Elektrokinetikai potenciál (ζ -potenciál) és stabilitás

Az elektrokinetikai potenciál (ζ -potenciál) szintén a fényszórás módszerével mérhető paraméter, amely a lézer-Doppler-elektroforézis mérésén alapszik. A ζ -potenciál a diszperziós közeg és a részecskék felületénél lévő folyadékréteg potenciálkülönbségét jelenti. A részecskéket körülvevő elektromos kettősréteg azonos és ellentétes töltésű ionokból áll. Ennek a rétegnek az összetétele dinamikus és számos tényezőtől függően változik (például pH, ionerősség, koncentráció). Elektromos mező hatására a töltött részecskék az ellentétes elektródok felé mozognak. Elektroforézis során egy feltételezett hasadási sík keletkezik a mozgó részecskék és a diszperziós közeg között, potenciálkülönbséget létrehozva, amelyből matematikailag számolható a ζ -potenciál.

A ζ -potenciál adatok egyik legnépszerűbb felhasználása a kolloid rendszerek elektrosztatikai stabilitásának jellemzése. A nanorészecske diszperziókat rendkívül

3. Kísérleti rész

instabilnak ($\pm 0-10$ mV), viszonylag stabilnak ($\pm 10-20$ mV), mérsékelten stabilnak ($\pm 20-30$ mV) és rendkívül stabilnak ($> \pm 30$ mV) minősítik [Bhattacharjee S, 2016].

A ζ -potenciál meghatározására a fent említett Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) műszert használtam a minták mosása után azokat MilliQ vízben visszadiszpergálva. A mintákat eldobható műanyag (polikarbonát) küvetákban mértem, amelyek beépített aranyozott réz elektródokkal és hajlított kapilláris csővel (kb. 0,75 ml minta befogadására) rendelkeztek.

3.5.1.3 Morfológia

A nanorészecskék morfológiáját FEI Apreo S pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM, Thermofischer, Waltham MA, USA) és FEI Talos F200XG2 pásztázó/transzmissziós elektronmikroszkóppal (S/TEM, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) vizsgáltam. Mintaelőkészítésként a mintákat 3-szor mostam centrifugálással és 10-50-szeresére hígítottam, majd szobahőmérsékleten mintatartóra szárítottam. A SEM mérés alumínium mintatartókon, a S/TEM mérés réz grideken történt.

3.5.2 Előállítási hozam

A nanorészecskék előállítási hozamát gravimetriásan határoztam meg. 0,5 ml nanorészecske szuszpenziót centrifugálással kétszer mostam, majd az így kapott pelletet tömegállandóságig szárítószekrényben 40 °C-on szárítottam. A kapott értéket a kiindulási anyag tömegéhez viszonyítottam.

3.5.3 Kapszulázási hatékonyság

3.5.3.1 Sorafenib kapszulázási hatékonyságának meghatározása

A SOR kapszulázási hatékonyságának meghatározása érdekében a 0,5 ml centrifugált szuszpenzióból kapott nanorészecskéket 1 ml DMSO-ban oldottam. Az oldatok abszorbanciáját spektrofotometriásan (Biochrom 4060, Pharmacia LKB, Cambridge, UK és ATI Unicam UV4-100, Unicam Instruments Ltd., Cambridge, UK) mértem, 271 nm maximális elnyelési hullámhosszon. Az oldatokat hígítottam, hogy a hatóanyag a kalibrációs tartományban (1,25 – 20 $\mu\text{g/ml}$) kimutatható legyen. A hatóanyag kapszulázási hatékonyságát (EE, angolul „encapsulation efficiency”) a következőképpen számítottam ki:

3. Kísérleti rész

$$EE (\%) = (\text{hatóanyag [részecskében]} / \text{hatóanyag [összes]}) \times 100$$

Meghatározás előtt kalibrációs görbét vettem fel DMSO-ban a SOR mennyiségének meghatározása céljából, 271 nm hullámhosszon és 1,25 – 20 µg/ml koncentráció tartományban.

3.5.3.2 *Cisplatin kapszulázási hatékonyságának mérése*

A cisplatin (CIS) kapszulázási hatékonyságának meghatározásához a részecskék platinatartalmát atomemissziós spektroszkópiás módszerrel mértem, ICP-OES (Spectro Genesis, SPECTRO Analytical Instruments GmbH, Kleve, Németország) készüléket használva. A műszer szimultán detektálású (polikromátoros), axiális plazmamegfigyelést alkalmazó spektrométer. A kalibráláshoz többelemes standard oldatot használtam (Teknolab Sorbent AB., Kungsbacka, Svédország). A minták előkészítésére savas feltárást alkalmaztam. A mérési módszernek megfelelően a nanorészecskéket 2 ml 68-70%-os HNO₃ és 1 ml 37%-os HCl elegyben forraltam a szervesanyag-tartalom roncsolása és a Pt-tartalom kioldódása érdekében. A feltárást követően a mintákat MilliQ vízzel hígítottam, hogy a koncentrációjuk a kalibrációs tartományba essen. A kapszulázási hatékonyság számítására a 3.5.3.1 alpontban leírt képletet használtam.

3.5.3.3 *A szarvasmarha szérum albumin tartalmának meghatározása kolorimetriásan*

A mikrokapszulázott BSA mennyiségét kolorimetriásan határoztam meg, mikro BCA módszert alkalmazva. A mikro BCA kit (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) oldatban lévő fehérjekoncentráció meghatározására szolgál. A mikro BCA fehérje teszt egy kétkomponensű, nagy pontosságú meghatározási módszer, amely rendkívüli nagy érzékenységgel (0,5 µg/ml–1,5 mg/ml) és szelektivitással rendelkezik más kolorimetriás fehérjetartalom meghatározó módszerekhez képest [Thermo Fisher Scientific].

A teszt két jól ismert reakción alapszik, redukción és komplexképzésen. Először a fehérjében levő peptidkötések lúgos közegben redukálják a Cu(II)-ionokat Cu(I)-ionokra. A redukált rézionok mennyisége arányos az oldatban levő fehérje mennyiségével, melyek lila komplexet képeznek [2,2'-bikinolin]-4,4'-dikarbonsavval (angolul „bicinchoninic acid”, BCA), amely 562 nm hullámhosszon mutat maximális elnyelést [Smith et al., 1985].

3. Kísérleti rész

A BSA-tartalmat felülúszóból mértem 0,5 ml nanorészecske szuszpenzió centrifugálása után. A szuszpenzió térfogatával megegyező mennyiségű mikro BCA reagenst adtam a felülúszóhoz és az elegyet 1 órán át 60 °C-on inkubáltam. Szobahőmérsékletre történő hűtés után az abszorbanciát ATI Unicam UV4-100 spektrofotométerrel (Unicam Instruments Ltd., Cambridge, UK) mértem 562 nm hullámhosszon. A BSA-koncentrációt az előzetesen felvett kalibráló egyenes egyenlete alapján számoltam.

3.5.3.4 Az iRGD-tartalom meghatározása

Az iRGD tumor penetrációs peptid kapszulázási hatékonyságát a 3.5.3.2 alpontban leírt ICP-OES módszerrel határoztam meg felülúszóból, mérve a minták kéntartalmát. Mintaelőkészítés során 1-1 ml felülúszót bepároltam, majd 1 ml HNO₃ (68-70%) és 1 ml HCl (37%) eleggyel forraltam és 5 ml végső térfogatra hígítottam. Referenciaanyagként a tiszta iRGD vizes oldatát és a ciszteint alkalmaztam.

3.5.3.5 Antocianidin kapszulázási hatékonysága

A mintákban levő szintetikus antocianidin (CN)-tartalmat 1 ml felülúszóból fotometriásan (Unicam Instruments Ltd., Cambridge, UK) mértem. Fontos volt a minták stabilitásának megőrzése, így pH értéküket 2-re állítottam 50 µl 0,01N HCl hozzáadásával és az abszorbanciát rögtön mértem. A későbbiekben definiált 5-ös szintetikus antocianidin maximális elnyelési hullámhossza savas PVA (1% (m/V)) mátrixban 475 nm volt. A felülúszóban lévő antocianidin koncentrációját kalibráció elvégzése után a kapott egyenes egyenletéből számítottam és viszonyítottam a kiindulási anyagmennyiséghez, majd százalékosan adtam meg.

3.5.3.6 Hatóanyagtartalom

A részecskék hatóanyagtartalmát (DL, angolul „Drug loading”) a kapszulázási hatékonyságok és hozamértékek figyelembevételével a következő képlet alapján számoltam:

$$DL (\%) = (\text{hatóanyag [részecskében]} / \text{részecsketömeg [összes]}) \times 100$$

3. Kísérleti rész

3.5.4 Hatóanyagleadás

A nanorészecskék hatóanyagleadását a tumorok mikrokozonyezetét modellező savas pufferoldatban (Na-acetát-ecetsav puffer, pH = 5,5) és vérplazmában (pH = 7,4) vizsgáltam. A 0,5 ml nanorészecske szuszpenziót 4,5 ml pufferrel, illetve vérplazmával egészítettem ki átlátszatlan 5ml-es Eppendorf csövekben. Mindkét közeg esetében három párhuzamos mintát készítettem. A mintákat 37 °C-on (1000 fordulat/perc) inkubáltam egy Hettich Benelux MKR-13 termomixert (Hettich Benelux Laboratory Equipment, Geldermalsen, Hollandia) használva, 3-7 napon keresztül. Meghatározott időnként (t_0 , $t = 15$ perc, 30 perc, 1 óra, 2 óra, 4 óra, 6 óra, 8 óra, 12 óra, 1 nap, 2 nap, 3 nap, 4 nap, 5 nap, 6 nap) mintarészeket vettem és centrifugálás/mosás után a pelleteket DMSO-ban oldva spektrofotometriásan mértem a SOR-tartalmukat. A CIS-tartalom meghatározása során a platinatartalmat a felülúszóból mértem a 3.5.3.2 alpontban leírt mérési és mintakezelési módszert alkalmazva. A mért értékeket a t_0 időponthoz viszonyítottam, megkapva a közegbe leadott hatóanyag-koncentrációját.

3.5.5 *In vitro* citotoxicitás

3.5.5.1 Sejtvonalak

A HepG2 emberi májkarcinómát és a HCT116 emberi vastagbélrák sejtvonalakat az Országos Onkológiai Intézettől (Budapest, Magyarország) kaptuk. A HepG2 sejtek növesztése 10% FCS és 100 U/ml penicillint tartalmazó DMEM tápoldatban, míg a HCT116 sejteké RPMI-1640 közegben történt, 5% CO₂-t tartalmazó, párasított légkörben, 37 °C-on. Használatuk előtt a sejteket tripszinizáltuk, újrassuszpendáltuk és előtenyésztettük.

3.5.5.2 MTT viabilitás teszt

A nanorészecskék *in vitro* citotoxicitását MTT-teszttel vizsgáltam. Az MTT vizsgálatot a sejtek metabolikus aktivitásának mérésére használják, mint a sejtek életképességének, proliferációjának és citotoxicitásának mutatóját. Ez a kolorimetriás vizsgálat egy sárga tetrazólium-só, az MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid), lila formazán kristályokká történő redukálásán alapul. Az életképes sejtek olyan mitokondriális dehidrogenáz enzimeket tartalmaznak, amelyek az MTT-t oldhatatlan formazánná redukálják. Lizáló oldat segítségével a kristályok szolubilizálhatóak és a színes oldatok abszorbanciája 500-600 nm tartományban

3. Kísérleti rész

mérhető. Minél sötétebb egy oldat, annál több az életképes, metabolikusan aktív sejtek száma [Stockert et al., 2018].

A sejteket 96 kamrájú tenyésztőlemezekre ültettem. 24 órás előinkubálás után 100 µl friss, 10% FCS-t tartalmazó DMEM tápoldatot adtam hozzájuk és újabb 24 órás inkubálás után a közeget friss DMEM-oldatra cseréltem, amely már tartalmazta a vak- vagy gyógyszerhordozó-részecskéket. A 24 órás inkubálást, tápoldat csere és újabb 24 órás inkubálás követte. Ezután 20 µl/cella MTT reagenst (5 mg/ml PBS-oldatban) adtam hozzá, a 200 µl/cella tápoldatot kiegészítve. 2 óra inkubálás után a keletkezett formazán kristályokat lizáló oldattal (DMSO, 1% ecetsav, 10% SDS) szolubilizáltam. Az abszorbanciát 490 nm-en egy VictorX3 readerrel (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) vagy 570 nm-en egy Thermo Scientific Multiscan Sky readeren (Bio-science Kft., Budapest, Magyarország) mértem.

A lemezekre a különböző koncentrációjú hatóanyagot tartalmazó részecskék mellett, negatív kontroll („kezeletlen” sejtek), vak DMSO oldat, tiszta hatóanyagok és vak nanorészecskék is kerültek. Az életképes sejtek százalékos arányát a negatív kontrollhoz viszonyítva számoltam ki. A vak nanorészecske szuszpenzió és a tiszta hatóanyagok pozitív kontrollként szolgáltak. Az adatokat nyolc párhuzamos mérésből származó átlag- és szórásértékek jellemzik.

3.6 Szintetikus antocianidinek halokróom tulajdonságainak spektroszkópiai vizsgálata

A kiválasztott antocianidinek vagy flaviliumion származékok halokróom tulajdonságait spektroszkópiás vizsgálattal határoztam meg. Egy korábban leírt eljárás szerint [Carmody W.R., 1961] pufferoldatokat készítettem, bórsav (0,2 M), citromsav (0,005 M) és nátrium-foszfát (0,1 M) felhasználásával, 2–12 pH tartományt lefedve. Az antocianidinek UV-VIS spektrumait az idő és a pH-érték függvényében mértem.

3.7 Adatfeldolgozás

A citotoxicitási adatok statisztikai elemzéséhez és összevetéséhez kétmintás t-tesztet és egyszempontos varianciaanalízist (angolul „one-way ANOVA”) végeztem és

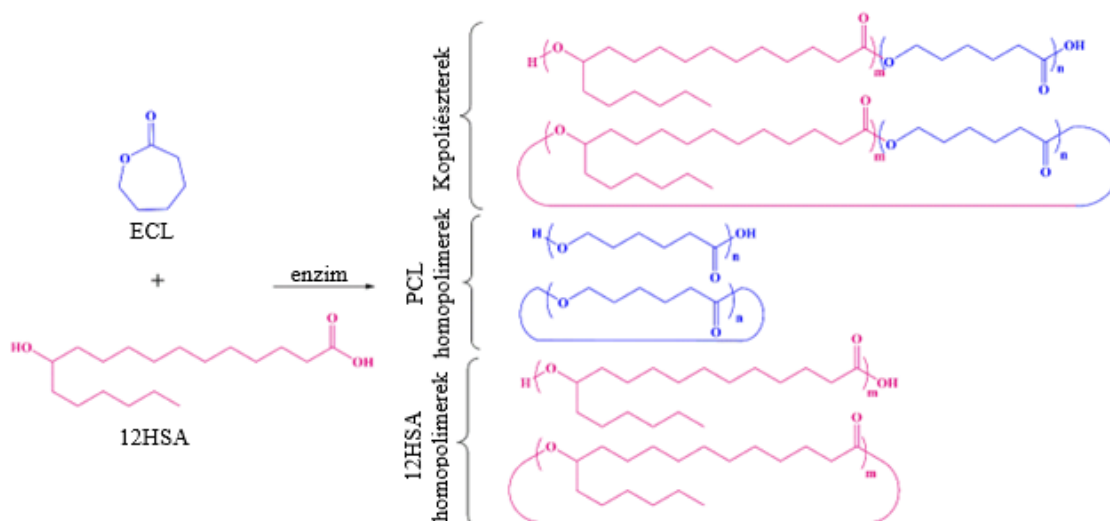
3. Kísérleti rész

ellenőriztem a tesztekhez szükséges feltételek teljesülését. Az adatokat kettő, három vagy négy csoportra osztottam a koncentráció szinteknek megfelelően és vizsgáltam a sokaságok normál eloszlását Shapiro-Wilk teszttel és a varianciák homogenitását F-teszttel és Bartlett teszttel. Néhány esetben, amikor az adatok nem mutattak normál eloszlást vagy a varianciák nem voltak egyenlőek, a nem-parametrikus tesztek (Welch féle t-teszt, Mann-Whitney U-teszt, Kruskal-Wallis teszt) alkalmaztam, hogy összehasonlítsam az egyes csoportok átlagértékeit. Amikor az egyszempontos ANOVA vagy a Kruskal-Wallis teszt szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget adott az átlagértékek között, akkor a megfelelő post-hoc (Tukey-HSD vagy Kruskal-Nemenyi) tesztet használtam, hogy azonosítsam a valódi különbséget (kisebb/nagyobb) az átlagpárok között. A statisztikai elemzésekre R szoftvert (verzió 3.4.0) használtam.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 Sorafenib mikrokapszulázása 12CL polimerrel

Irodalmi adatokból ismert [Raman et al., 2005, Liu et al., 2016], hogy a nagyobb molekulatömeg általában lassabb hatóanyag-felszabadulást és nagyobb kapszulázási hatékonyságot eredményez, ezért a Todea és munkatársai [Todea et al., 2018] által létrehozott oligoészterek közül a nanorészecskék előállítására a legnagyobb molekulatömegű 12-hidroxi-sztrearinsav- ϵ -kapolakton (12CL) kopolimert használtam. Az 12CL polimer alkaláz enzimmatalizált szintézisből származik (**15. ábra**), melynek átlagos molekulatömege $M_w = 1850$ g/mol, polimerizációs foka 17 és a relatív homopolimertartalma nem haladta meg a 30%-ot.



15. ábra. ECL és 12HSA kopoliészterek és homopoliészterek szintézisének reakciósémája, ahol n - 12HSA ismétlődő egységeinek és m - ECL ismétlődő egységeinek száma a polimerekben.

4.1.1 A módszer optimalizálása és a részecskék jellemzése

A sorafenib 12CL kopolimerbe mikrokapszulázására az egyszerű emulzió-oldószer elpárologatás módszerét alkalmaztam (lásd 3.3.1.1 fejezet), és az optimalizálása során vizsgáltam a legfontosabb előállítási paraméterek, mint például az emulgeálószer koncentrációja, az olaj- és vizesfázisok (o/v) aránya, valamint a kezdeti hatóanyag- és polimer-koncentráció hatásait a részecskék méretére és a kapszulázási hatékonyságra.

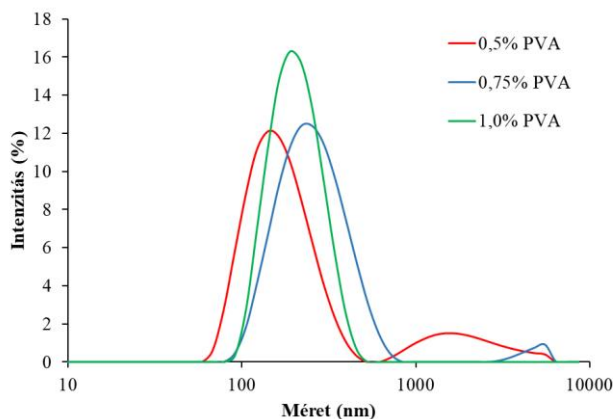
4. Eredmények és értékelésük

Az emulgeálószer koncentrációjának megválasztása során 0,5% vagy 0,75% (m/V) PVA koncentráció túl alacsonynak bizonyult, mivel DLS mérés során a mikronos mérettartományban is detektáltam részecskéket (**16. ábra**). Ezt tükrözik a túl magas PDI ($> 0,2$) értékek is, jelezve a nanorészecskék vagy a kicsapódott hatóanyag egy részének aggregációját. Azonban, 1% (m/V) PVA koncentráció mellett a megfelelő kapszulázó polimer és SOR-koncentráció kiválasztása monodiszperz méreteloszlást biztosított, $< 0,2$ PDI értékekkel (**2. táblázat**).

Az 1:2 olaj/víz arány (o/v) optimálisnak bizonyult az alkalmazott szonikálási erősség mellett, mivel a nagyobb arány (1:4) alkalmazása esetén a részecskehozam jelentősen romlott ($< 50\%$), az 1:2 arány esetében elért $74 \pm 4,0\%$ -hoz viszonyítva. Így a kapszulázó polimer és a SOR-koncentrációját 1% (m/V) PVA-koncentráció és 1:2 o/v arány mellett optimalizáltam. A kopolimer koncentrációjának 10 mg/ml-ről 20 mg/ml-re történő változtatása növelte a nanorészecskék méretét, bár a PDI továbbra is megfelelően alacsony maradt (**2. táblázat**).

2. táblázat. A polimer koncentráció hatása a nanorészecskék méretére.

Polimer konc. (mg/ml)	Z-avg (nm)	PDI
10	$223 \pm 7,10$	$0,175 \pm 0,024$
20	$254 \pm 16,1$	$0,177 \pm 0,012$



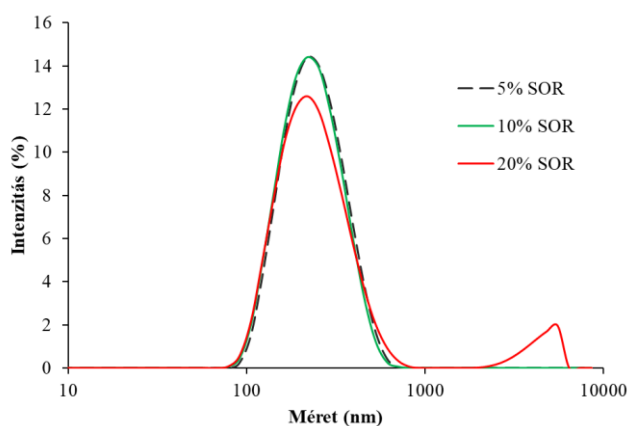
16. ábra. SOR-tartalmú 12CL részecskék méreteloszlása a PVA emulgeálószer koncentrációjának függvényében.

Érdekes módon a polimer koncentráció befolyásolta a nanorészecskék ζ -potenciálját is. Az alacsonyabb polimer mennyiséggel előállított részecskék nagyobb ζ -potenciállal rendelkeztek (10 mg/ml: $-18,1 \pm 2,9$ mV, 20 mg/ml: $-9,2 \pm 1,3$ mV), ami nagyobb stabilitásra utal. A magasabb potenciálérték a képződött nanorészecskék felületén lévő hatóanyag mennyiségével magyarázható. Mindazonáltal meg kell jegyezni,

4. Eredmények és értékelésük

hogya a PVA nem ionos felületaktív anyag, és mint sztérikus stabilizátor, nagyobb stabilizáló hatással rendelkezhet, amelyet nem lehet mérni ζ -potenciál elemzéssel.

A kapszulázandó hatóanyag mennyiségét a mátrixpolimer koncentrációjával összefüggésben vizsgáltam, mivel a hidrofób hatóanyag és a polimer megfelelő aránya fontos a homogén diszperzió kialakulásában. A SOR-koncentráció növelése 5%-ról 10%-ra (a polimer koncentrációjához képest) nem okozott számottevő méretváltozást, azonban 20%-os hatóanyag-koncentráció esetén a PDI jelentősen növekedett (**3. táblázat**), jelezve az aktív anyag kicsapódását, amelyet a méreteloszlásban is megfigyeltem (**17. ábra**).



17. ábra. A részecskék méreteloszlása különböző SOR-koncentrációk mellett, a kezdeti polimer mennyiségéhez viszonyítva.

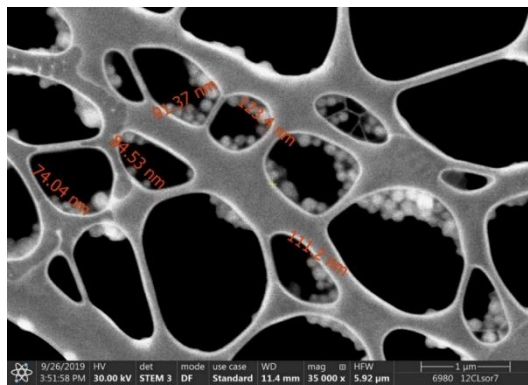
A SOR arányának 5%-ról 10%-ra való növelése a 12CL kopolimerhez képest nem befolyásolta a kapszulázási hatékonyságot, míg a további 20%-ra való emelés látszólag jelentősen növelte azt (**3. táblázat**), habár az előbb említett negatív hatás jelentkezett a méreteloszlásban, ami nem kívánatos. Azonban a kicsapódott aktív anyag nem választható el a szubmikron méretű polimer részecskéktől, így az a kapszulázási hatékonyság értéket felfelé meghamisíthatja, ezzel magyarázható a kapszulázási hatékonyság növekedése.

3. táblázat. SOR-t tartalmazó 12CL részecskék mérete és kapszulázási hatékonysága az alkalmazott hatóanyag-koncentráció függvényében.

SOR konc. (%)	5	10	20
Z-avg (nm)	223 ± 5,0	219 ± 5,2	241 ± 3,2
PDI	0,172 ± 0,019	0,168 ± 0,029	0,288 ± 0,018
Kapszulázási hatékonyság (%)	61,5 ± 6,7	64,1 ± 8,5	72,7 ± 7,7
Hatóanyagtartalom (%)	5,0	8,8	17,2

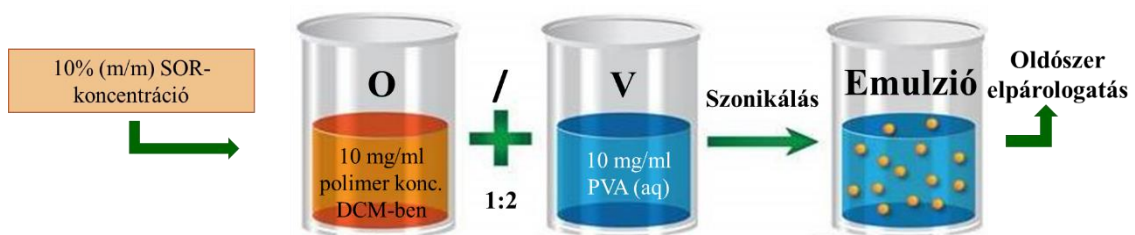
4. Eredmények és értékelésük

Fontos vizsgálni, hogy a mikrokapszulázott hatóanyag ténylegesen a polimer mátrixába került vagy a részecskéken kívül helyezkedik el. Ennek vizsgálatára az egyik módszer a méreteloszlás elemzése, a másik lehetséges módszer az elektronmikroszkópos felvétel készítése. A S/TEM felvételen látszik (**18. ábra**), hogy az optimális paraméterekkel előállított nanorészecskék sokkal kisebb méretűek, mint ami a dinamikus fényszórás eredményeiből következik, mivel az utóbbi a hidrodinamikai méretet szolgáltatja, ami általában nagyobb, mint a száraz méret. A nanorészecskék, a várakozásoknak megfelelően gömb alakúak lettek.



18. ábra. SOR-tartalmú 12CL nanorészecskék S/TEM képe fém mintatartó rácson.

Összességében a SOR-tartalmú 12CL nanorészecskék előállítására szolgáló egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatás módszer sémáját és az optimális előállítási paramétereket a **19. ábra** tartalmazza. A továbbiakban végzett hatóanyag-felszabadulási- és citotoxicitási-tesztekhez az optimalizált előállítási paraméterekkel készült nanorészecskéket használtam.



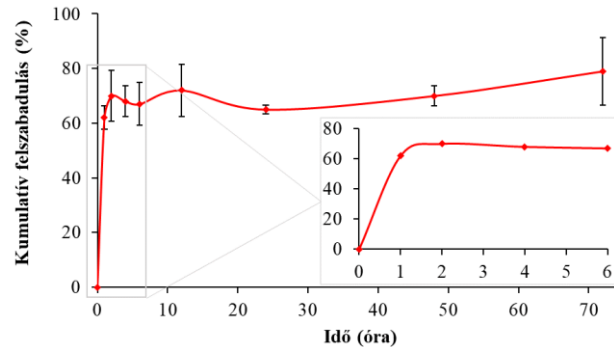
19. ábra. Az optimalizált egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatás módszer sémája.

4.1.2 Hatóanyagleadás

Az optimalizált paraméterekkel előállított nanorészecskék SOR felszabadulását savas pufferben (pH = 5,5) és vérplazmában (pH = 7,4) teszteltem. A savas puffer a tumor mikrokörnyezetének imitálására szolgált. Ebben a kezdeti lemosódás mértéke $62 \pm 4,3\%$

4. Eredmények és értékelésük

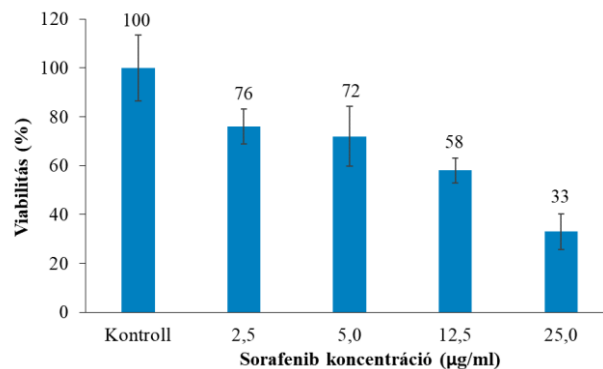
volt, amelyet egy tartós hatóanyag-felszabadulás követett. A 72 órás vizsgálat alatt a hatóanyag teljes mennyiségének $79 \pm 12,3\%$ -a szabadult fel (**20. ábra**). Az eredmények viszonylag nagy ingadozása a SOR adszorpciójára utalhat a polimer mátrix lebomlásának valamelyik fázisában. A vérplazmában a leadás gyakorlatilag azonnali volt. A hatóanyag több mint 90%-a felszabadult a kezdeti lemosódási szakaszban, amely feltehetőleg a plazmafehérjék hatóanyaggal szembeni erős affinitásával magyarázható.



20. ábra. Kumulatív SOR felszabadulás a 12CL részecskékből, acetát pufferben (pH = 5,5).

4.1.3 Citotoxicitás

In vitro citotoxicitást MTT sejtvitalitási teszttel elemeztem emberi májrák sejtvonalon. Vizsgáltam a hatóanyagot tartalmazó nanorészecskék hatékonyságát HepG2 HCC sejtekkel szemben. A vak részecskék nem mutattak számottevő citotoxicitást, így a polimer biokompatibilisnek mondható. A nanorészecskék koncentrációfüggő citotoxicitást mutattak (**21. ábra**), és a legmagasabb koncentrációjú részecskék (25 µg/ml a sejtközegben) hasonló toxicitást ($33,2 \pm 5,7\%$ viabilitás) mutattak, mint a tiszta hatóanyag ($37,8 \pm 2,4\%$) ugyanabban a sejtben.



21. ábra. SOR-tartalmú 12CL részecskék citotoxicitása növekvő SOR-koncentráció mellett, HepG2 sejteken vizsgálva.

4.2. Sorafenib és ciszplatin együttes mikrokapszulázása 12CL polimerrel

A kettős hatóanyagú rendszer előállítására az összetett emulzió-oldószer elpárologtatás módszerét használtam, a 3.3.2 alfejezetben leírtak alapján. A kapszulázási hatékonyság növelése érdekében mikrokapszulázáskor különböző adalékanyagokat alkalmaztam, úgymint a BSA fehérje, EDC és DCC keresztkötő ágensek. A fehérjék nanorészecskékbe történő mikrokapszulázását manapság széles körben alkalmazzák, mivel felszabadulási kinetikájuk szabályozható, a fehérjék másodlagos szerkezete megőrizhető, emellett a fehérjemolekulán található gyógyszerkötő helyek nagy száma miatt jelentős mennyiségű gyógyszer építhető be a részecskemátrixba [Martinez et al., 2017]. A szarvasmarha szérum albumint széles körben használják gyógyszerhordozó anyagként, amely számos előnnyel rendelkezik, hiszen biológiailag lebontható, nem toxikus, valamint a tumoros szövetekkel szemben kettős célzási képessége van [Wang et al., 2021].

4.2.1 Módszer-optimalizálás BSA mikrokapszulázásával

A módszer optimalizálását szintén a fő előállítási paraméterek változtatásával végeztem, emellett kezdetben vizsgáltam a BSA mikrokapszulázási lehetőségeit is. A **4. táblázat** tartalmazza az optimalizálási adatokat a fő előállítási paraméterekkel és a részecskék méreteloszlásával. Az első minta esetén (12CLBSA1) megfigyelhető, hogy 0,5% (m/V) PVA kevésnek bizonyult a megfelelő méretű részecskék előállítása érdekében, így a további kísérletekben 1% (m/V) PVA oldatot használtam.

Köztudott az olaj-vizes fázis arány fontos szerepe a részecskeméretre nézve. Kis méretű nanorészecskéket 1:3 és 1:5 arányú rendszerekben sikerült előállítanom. Az 1:3 arány megfelelő volt a 12CLBSA2 és 12CLBSA4 minták esetében, azonban magas polidiszperzitást mutattak, jelezve, hogy más paraméterek fontosabb hatást gyakoroltak a méretre. A túl magas polimerkoncentráció (2%) túl viszkózus szerves fázist adott, melynek következménye a nagy, aggregált részecskék a 12CLBSA3 minta esetében. EDC használatakor a BSA mennyisége jelentősen befolyásolta a méretet (12CLBSA9 és 12CLBSA10), feltehetőleg EDC jelenlétében a nagyobb mennyiségű BSA már nagyobb részben adszorbeálódik a részecskék felületére. A felszínen levő aktív csoportok nagyobb száma lehetővé tette a fokozott keresztkötés-képződést és ezáltal a nanorészecskék

4. Eredmények és értékelésük

aggregációját. Összességében 0,5 mg BSA mikrokapszulázása 10 mg 12CL polimerbe, 1:5 o/v arány és 1%-os (m/V) PVA emulgeálószer alkalmazását találtam optimálisnak a tervezett méretű és polidiszperzitású nanorészecskék (12CLBSA6) előállításához.

4. táblázat. A nanorészecske-előállítási módszer optimalizálása BSA mikrokapszulázással.

Minta	o/v	Polimer (%, m/V)	PVA (%, m/V)	BSA (mg)	EDC (mg)	Z-avg (nm)	PDI
12CLBSA1	1:2	1	0,5	1	-	476,6 ± 9,3	0,450 ± 0,018
12CLBSA2	1:3	1	1	1	-	241,3 ± 5,8	0,341 ± 0,004
12CLBSA3	1:3	2	1	1	-	481,9 ± 39,6	0,692 ± 0,022
12CLBSA4	1:3	1	1	0,5	-	232,3 ± 10,2	0,360 ± 0,051
12CLBSA5	1:5	1	1	1	-	269,9 ± 7,8	0,355 ± 0,019
12CLBSA6	1:5	1	1	0,5	-	245,5 ± 3,1	0,275 ± 0,007
12CLBSA7	1:4	1	1	1	-	301,2 ± 7,6	0,461 ± 0,018
12CLBSA8	1:4	1	1	0,5	-	338,8 ± 11,6	0,568 ± 0,035
12CLBSA9	1:5	1	1	1	1	438,5 ± 25,1	0,810 ± 0,121
12CLBSA10	1:5	1	1	0,5	1	250,7 ± 8,3	0,353 ± 0,038
12CLVak	1:5	1	1	-	-	215,2 ± 1,4	0,222 ± 0,011

4.2.2 Kettős hatóanyagú rendszer vizsgálata

Az EDC keresztkötő reagenssel és az NHS stabilizátorral valósítottam meg a BSA polimer mátrixhoz való kötődését, aminek eredményeképpen a PDI értékek növekedtek (lásd **4. táblázat**, 12CLBSA10). A SOR és CIS hatóanyagok együttes mikrokapszulázását ezzel a megoldással összetett emulziós módszert alkalmazva hajtottam végre.

Az EDC-vel való keresztkötés hatását a SOR, CIS vagy mindkét hatóanyag kapszulázási hatékonyságára BSA jelenlétében vizsgáltam. A kapott minták méreteloszlása többnyire széles volt (**5. táblázat**), kivéve két mintát (12CLBSASORCIS2 és 12CLBSACIS3), ahol körülbelül 200 nm-es részecskeméretet és nagyon szűk méreteloszlást értem el. Ezekben a mintákban azonban a képződő polimer szuszpenzió hozama túl alacsony volt. Az EDC-vel való kapcsolat növelte a

4. Eredmények és értékelésük

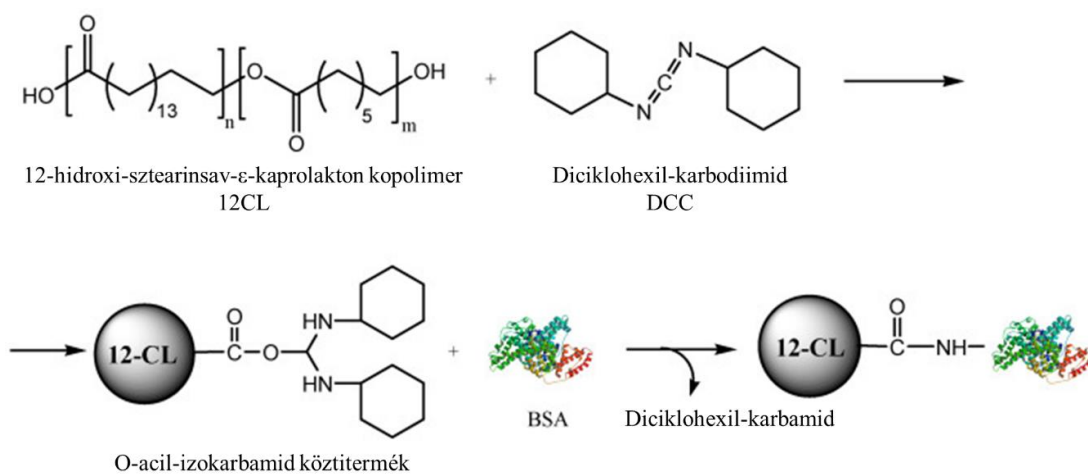
nanorészecskék vízdoldhatóságát, amely a hozam erőteljes csökkenésében mutatkozott meg.

5. táblázat. A hatóanyagok mikrokapszulázása 1:5 o/v arány, 1% (m/V) PVA és 0,5 mg BSA használatával.

Minta	SOR (mg)	CIS (mg)	EDC (mg)	Z-avg (nm)	PDI
12CLBSASOR1	1	-	-	223,4 ± 2,4	0,243 ± 0,008
12CLBSASOR2 ^a	1	-	1	274,4 ± 8,6	0,582 ± 0,018
12CLBSASOR3 ^b	1	-	1	212,3 ± 0,8	0,258 ± 0,028
12CLBSASORCIS1	0,5	0,5	-	239,6 ± 3,7	0,378 ± 0,014
12CLBSASORCIS2 ^a	0,5	0,5	1	196,1 ± 1,7	0,081 ± 0,013
12CLBSASORCIS3 ^b	0,5	0,5	1	249,3 ± 8,1	0,362 ± 0,021
12CLBSACIS1	-	1	-	252,2 ± 15,0	0,413 ± 0,020
12CLBSACIS2 ^a	-	1	1	246,3 ± 27,2	0,397 ± 0,070
12CLBSACIS3 ^b	-	1	1	188,9 ± 2,0	0,091 ± 0,008

^a EDC a belső vizes fázishoz adva. ^b EDC a külső vizes fázishoz adva.

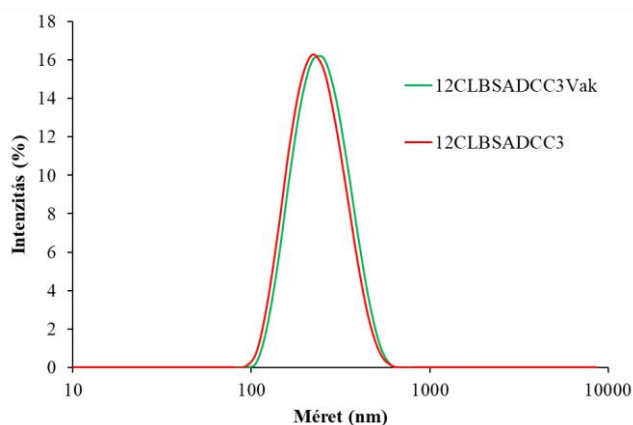
EDC-vel kapcsolt polimer részecskék vízdékonyságának megakadályozására a következő kísérletekben egy vízben oldhatatlan keresztkötő ágenszt, a DCC alkalmazását vizsgáltam meg. A mintákat ugyanazokkal az előállítási paraméterekkel készítettem, mint az EDC-s mintákat. A DCC keresztkötési mechanizmusa hasonló az EDC-hez, a polimerhez kapcsolódva létrejön egy O-acil-izourea intermedier, amely kovalensen köt a BSA fehérje primer aminocsoportjával amidkötést képezve (**22. ábra**). A BSA, mint kapszulázási segédanyag, a későbbiekben helyettesíthető egy másik fehérjével vagy peptiddel. Megemlítendő, hogy a BSA-nak a polimerhez való kapcsolódásában a hidrogénkötéseknek és hidrofób kölcsönhatásoknak is jelentős szerepe van.



22. ábra. A 12CL polimer BSA-val történő aktiválásának reakciósémája diciklohexil-karbodiimid (DCC) keresztkötő ágenszt alkalmazva.

4. Eredmények és értékelésük

DCC használatával EDC helyett sikerült elkerülni a részecskék vízdékonnyá válását és a kapszulázási hatékonyság 82%-ra nőtt, amikor 2 mg DCC-t használtam (**6. táblázat**). Az eredmények azt mutatják, hogy a DCC használata előnyös volt a BSA mikrokapszulázására és az eljárás kisméretű, monodiszperz eloszlású részecskéket eredményezett (**23. ábra**) magas kapszulázási hatékonysággal.



23. ábra. A BSA-t tartalmazó 12CL nanorészecskék méreteloszlása DCC jelenlétében (piros vonal) és vak minta esetében (zöld vonal).

6. táblázat. A BSA mikrokapszulázása 12 CL polimerrel DCC alkalmazásával.

Minta	BSA (mg)	DCC (mg)	Z-avg (nm)	PDI	Kapsz.hat. BSA (%)	Hozam (%)
12CLBSADCC1	0,5	1	217,6 ± 2,0	0,129 ± 0,014	71	-
12CLBSADCC2	0,5	2	225,9 ± 2,2	0,115 ± 0,015	73	46
12CLBSADCC3	1	2	219,7 ± 1,7	0,121 ± 0,011	82	46
12CLBSADCCVak	-	2	233,4 ± 1,4	0,136 ± 0,020	-	47

A két hatóanyag együttes mikrokapszulázását végül a korábban leírt módszer alapján végeztem, DCC-t alkalmazva. A **7. táblázat**-ban látható, hogy a DCC felhasználása (12CLBSACISH5) növelte az előállítási hozamot és kismértékben növelte a kapszulázási hatékonyságot is, a DCC nélküli mintához (12CLBSACISH4) viszonyítva. Összességében megállapítható, hogy mindkét hatóanyag mikrokapszulázása sikeresen megtörtént 12CL hordozó polimer és BSA segédanyag használatával, ahol a fehérjének a szerepe a részecskén levő kötőhelyek megsokszorozása volt.

4. Eredmények és értékelésük

7. táblázat. A SOR és CIS hatóanyagok szimultán mikrokapszulázása BSA és DCC segédanyagokkal, 1:5 o/v arány, 1% (m/V) 12CL-koncentráció és 1% (m/V) PVA alkalmazásával.

Minta	12CLBSACISH4	12CLBSACISH5V*	12CLBSACISH5
CIS (mg)	0,5	-	0,5
DCC (mg)	-	2	2
Z-avg (nm)	204,6 ± 1,1	212,9 ± 2,4	209,8 ± 3,0
PDI	0,250 ± 0,014	0,171 ± 0,019	0,209 ± 0,015
Kapsz.hat CIS (%)	24	-	28
DL CIS (%)	2,1	-	1,4
Hozam (%)	40	39	61

*12CLBSACISH5V – Vak minta

4.2.3 Sorafenib és ciszplatin szimultán mikrokapszulázása iRGD peptiddel

Miután elegendő információt gyűjtöttem a BSA fehérjét használó összetett emulziós folyamatról, a két hatóanyagot szimultán mikrokapszuláztam a 12CL polimerbe és a BSA-t az iRGD tumor penetrációs peptidre cseréltem. A hatóanyagmentes részecskék megfelelő méretet és polidiszperzitást mutattak (**8. táblázat**). A nagyobb mennyiségű iRGD (DCCRGD2) nagyobb részecskehozamot (59%) eredményezett, míg a részecskék mérete és polidiszperzitása nem változott jelentősen. Ennek oka feltehetően, hogy a mikrokapszulázott iRGD nagyobb mennyisége több aktív csoportot tartalmazott, amelyek a kapszulázó 12CL polimert keresztkötötték. Ezért a 12CL kopolimer vízdékonyabb összetevői (kisebb molekulatömegű oligomerek) oldódását részben gátolta az iRGD-vel való keresztkötés.

8. táblázat. Az iRGD peptid mikrokapszulázása DCC-vel, 1:5 o/v arány, 1% (m/V) 12CL-koncentráció és 1% (m/V) PVA felhasználásával.

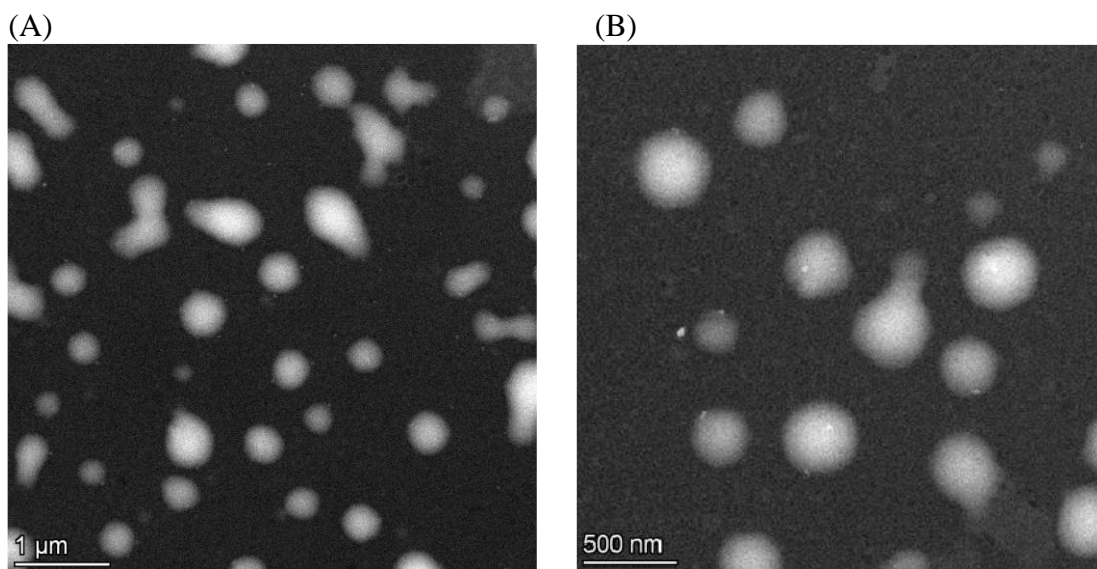
Minta	iRGD (mg)	Z-avg (nm)	PDI	ζ-potenciál (mV)	Hozam (%)
DCCRGD Vak	-	210,8 ± 1,6	0,119 ± 0,019	-11,00	59
DCCRGD1	0,5	223,7 ± 3,0	0,143 ± 0,030	-11,20	49
DCCRGD2	1	218,8 ± 0,9	0,158 ± 0,014	-11,80	59

A hatóanyagok mikrokapszulázási folyamata előtt a ciszplatin hidrolizáltam. Az iRGD vizes oldatával kevertetem egy éjszakán át, hogy elősegítsem a kötődést. Ennek az eljárásnak az oka, hogy egy nagyobb konjugált molekula hatékonyabban kapszulázható az összetett emulzió-oldószer elpárologtatás módszerével, mint a tiszta

4. Eredmények és értékelésük

hatóanyag, amely kis molekulának számít. A hatóanyag kapszulázási hatékonysága növelhető, emellett az iRGD célzószerként is szolgálhat a gyógyszeradagolás során. Ugyanakkor a CIS hidrolízise javíthatja a rákellenes hatást is, mivel a hidrolízisnek fontos szerepe van a rákellenes hatásmechanizmusban [Du et al., 2012].

A hatóanyagok iRGD-vel történő mikrokapszulázása megfelelő részecskeméretű és polidiszperzitású nanogömböket eredményezett (**24. ábra, 9. táblázat**). Sajnos az elektronmikroszkópos képalkotás nem volt könnyű feladat, valószínűleg a polimer nanorészecskék gyengébb mechanikai stabilitása miatt, ezért az SEM képek homályosak voltak (**24. ábra**), és egyes részecskék elfolyósodtak az elektronsugár alatt. A DLS által szolgáltatott hidrodinamikai méretadatok 206 nm és 221 nm közötti Z-avg értékeket mutattak. Babu és munkatársai [Babu et al., 2017] a paklitaxelt és a ciszplatint PLGA-kitozán hordozóval mikrokapszulázták emulzió-oldószer elpárologtatás módszerével iRGD-t használva adalékanyagként, és hasonló (~200 nm) átlagos részecskeméretet kaptak.



24. ábra. iRGD-tartalmú kettős hatóanyagú nanorészecskék SEM képei (méretarány: (A) 1 μm , (B) 500 nm).

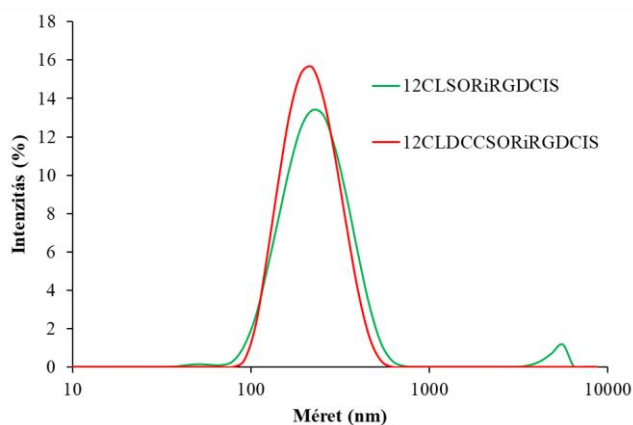
A kapszulázási hatékonyság 54–55%, illetve 23–25% volt a SOR és a CIS esetében. A SORiRGDCIS minta ciszplatintartalma $1,6 \pm 0,3\%$ -nak adódott. A DCC alkalmazása nem javította a hatóanyagok kapszulázási hatékonyságait, amelyek gyakorlatilag változatlanok maradtak. Meglepő módon az iRGD peptid kapszulázási hatékonysága jelentősen csökkent DCC jelenlétében (**9. táblázat**). Mint korábban említettem, a DCC-vel való kapcsolat amidkötések képződésével jár, bár az iRGD polimerhez való kötődése

4. Eredmények és értékelésük

hidrogénkötéssel és apoláris csoportok közötti hidrofób kölcsönhatásokkal is végbemehet. Úgy látszik, hogy az iRGD, egy 9 aminosavból álló ciklikus peptid esetében, a kovalens kötés kisebb mennyiségű kapcsolt peptidet eredményezett, ami szintén akadályozhatta a többi kapcsolódási lehetőséget. Ugyanakkor a DCC-vel előállított részecskék mérete kissé csökkent (**25. ábra**) és a méreteloszlásuk is monodiszperz lett, amit a PDI értékek is mutatnak (**9. táblázat**).

9. táblázat. A hatóanyagok és az iRGD penetrációs peptid mikrokapszulázása 12CL hordozóval.

Minta	iRGDVak	SORiRGDCIS	DCCSORiRGDCIS
Z-avg (nm)	220,6 ± 4,2	220,8 ± 2,5	205,9 ± 2,8
PDI	0,256 ± 0,016	0,221 ± 0,021	0,148 ± 0,012
ζ-potenciál (mV)	-9,42	-10,0	-11,8
Hozam (%)	63 ± 12	65 ± 11	74 ± 13
Kapsz.hat. SOR (%)	-	54 ± 1,0	55 ± 2,8
DL SOR (%)	-	3,5	2,7
Kapsz.hat. CIS (%)	-	25 ± 1,0	23 ± 2,1
DL CIS (%)	-	1,6	1,1
Kapsz.hat. iRGD (%)	-	42 ± 3,0	29 ± 3,1



25. ábra. Kettős hatóanyaggal és iRGD-vel előállított nanorészecskék méreteloszlása DCC-vel (piros vonal) és anélkül (zöld vonal).

A hatóanyagok együttes mikrokapszulázása nem változtatta meg a nanorészecskék ζ-potenciálját. Mivel a hatóanyagok (nem az iRGD) mikrokapszulázása volt a fő cél, ezek az eredmények azt mutatják, hogy mindkét vizsgált változat ugyanolyan hatékonysággal használható, lehetővé téve a folyamat speciális követelményeinek megfelelő kiválasztását.

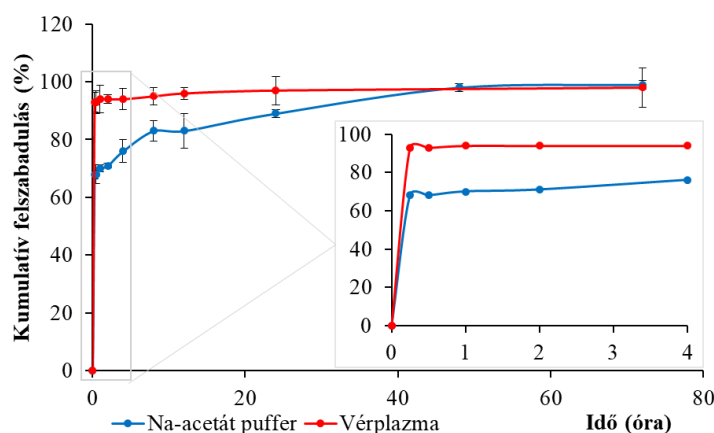
A rendelkezésre álló szakirodalmi adatok szerint Tian és munkatársai [Tian et al., 2017] a paklitaxelt és ciszplatint PLGA hordozóval mikrokapszulázták, nanoprecipitációs

4. Eredmények és értékelésük

módszerrel. A hatóanyagtartalom a ciszplatina nézve $1,9 \pm 0,1\%$ volt az egy hatóanyagú rendszer esetében és $1,7 \pm 0,1\%$ a kettős hatóanyagú rendszerben. Callari és munkatársai [Callari et al., 2014] a ciszplatint konjugálták PLGA-amino PEG nanorészecskékkkel, amelyek hatóanyagtartalma 0,5-1% volt. Moreno és munkatársai [Moreno et al., 2008] 11,2%, valamint Jayasuriya és Darr [Jayasuriya & Darr, 2013] 30% kapszulázási hatékonyságot értek el, mindketten ciszplatint kapszulázva az összetett emulziós módszerrel. Az előbb említett eredményekhez képest jelen vizsgálatom eredményei hasonló szinteket ért el a ciszplatina esetében, 1,6%-os hatóanyagtartalmat és maximum 25%-os kapszulázási hatékonyságot. Megjegyzendő, hogy sorafenib és ciszplatina együttes mikrokapszulázásáról biokonjugált rendszerekben ezidáig nem számoltak be.

4.2.4 Hatóanyagleadás vizsgálata

A nanorészecskék *in vitro* gyógyszerkibocsátását bioreleváns körülmények között vizsgáltam vérplazmában és savas nátrium-acetát pufferben, utánozva a tumor mikro környezetét. A felszabadulási vizsgálathoz a legjobb kapszulázási tulajdonságokat mutató biokonjugátumot (SORiRGDCIS minta) használtam. A SOR kezdeti lemosódása (angolul „burst effect”) nátrium-acetát pufferoldatban $68 \pm 1,5\%$ volt, ezután a hatóanyag nyújtott felszabadulása következett be a polimer lebomlása és a diffúzió miatt. A 72 órás vizsgálat során a teljes hatóanyag $99\% \pm 1,5\%$ -a szabadult fel (**26. ábra**). A vérplazmában a sorafenib $93\% \pm 3,4\%$ -a szabadult fel a kezdeti burst fázisban. A ciszplatina esetében a hatóanyag több mint 90%-a kioldódott a kezdeti lemosódási szakaszban, mindkét közeg esetében.



26. ábra. A sorafenib kumulatív felszabadulása a kettős hatóanyagtartalmú 12CL polimerből nátrium-acetát pufferben (pH = 5,5) és vérplazmában (pH = 7,4).

4. Eredmények és értékelésük

Avgoustakis és munkatársai [Avgoustakis et al., 2002], valamint Moreno és munkatársai [Moreno et al., 2008] hasonló ciszplatin felszabadulási profilt írtak le, gyors kezdeti felszabadulással. A ciszplatin a sejtek által történő felvétel után aktivitást mutat a vizes közeg hatására. Az egyik klorid iont lassú folyamatban vízmolekula helyettesíti, vizes komplexet (*cis*-[PtCl(NH₃)₂(H₂O)]⁺) létrehozva, majd kötődik a citozin-guanin (C-G) DNS bázispárhoz. A ciszplatin elsősorban a guanin nukleobázishoz kötődik [Johnstone et al., 2016]. A magas burst hatás a hatóanyag plazmafehérjékhez való erős affinitásával magyarázható, ezen kívül a ciszplatin nagy része valószínűleg adszorbeálódik a nanorészecskék felületére. A vízben jól oldódó ciszplatin polimer nanorészecskékbe való mikrokapszulázása más kutatócsoportok számára is nagy kihívást jelentett [Moreno et al., 2008, Avgoustakis et al., 2002]. Egy másik rákellenes szerrel való együttes kapszulázása növeli a nehézségeket, bár jelentős szinergikus hatást adhat a nanorészecske-rendszernek. A tapasztalt, különösen magas kezdeti lemosódás azonban káros lehet, ha a hatóanyagok a célhelytől távol szabadulnak fel. Ezért egy ilyen nanorendszer esetében a célszervhez közeli beadási útvonal javasolt, amelynek segítenie kell a súlyos mellékhatások elkerülését. Ezen kívül az iRGD tumor penetrációs peptid bevonása hozzájárulhat a nanorészecskék hatékony célzásához a tumorsejtekhez.

4.2.5 Citotoxicitási teszt

A kettős hatóanyagot tartalmazó nanorészecskék (SORiRGDCIS minta) hatékonyságát *in vitro* citotoxicitási teszttel vizsgáltam HepG2 sejteket felhasználva. Negatív kontrollként a kezeletlen sejtek szolgáltak, míg a 12CL vak mintát és a tiszta hatóanyagokat tartalmazó oldatokat pozitív kontrollként használtam (**27. ábra**). A nanorészecskék koncentrációfüggő citotoxicitást mutattak. A kettős hatóanyagú rendszer a legtöbb koncentrációnál hatékonyabb volt, mint a tiszta hatóanyagú oldatok, ami a viabilitási értékekből látható. A legmagasabb CIS-koncentráció mellett a sejtek életképessége $55\% \pm 8\%$ volt, míg az együtt kapszulázott CIS-SOR részecskéknél az életképesség szignifikánsan, $36\% \pm 7\%$ -ra csökkent. Adott koncentrációknál (2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25,0 µg/ml), a három hatóanyag-rendszer átlagos életképességének statisztikai összehasonlítását a **10. táblázat**-ban szemléltetem. Minden egyes csoport esetében a tiszta ciszplatin szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb viabilitási értékeket mutatott, mint a kettős hatóanyagú rendszer. Szignifikánsnak ($p < 0,05$) mondható különbség volt a sorafenib és a kettős hatóanyag-rendszer között az 5,0 µg/ml és a 12,5 µg/ml csoportokban. Egyedül a legmagasabb koncentrációjú csoportban (25,0

4. Eredmények és értékelésük

µg/ml) mondható el a CIS és SOR viabilitás értékeknek a szignifikáns ($p < 0,05$) különbsége, ahol a sorafenib erősebb citotoxikus hatást mutatott, mint a ciszplatin.

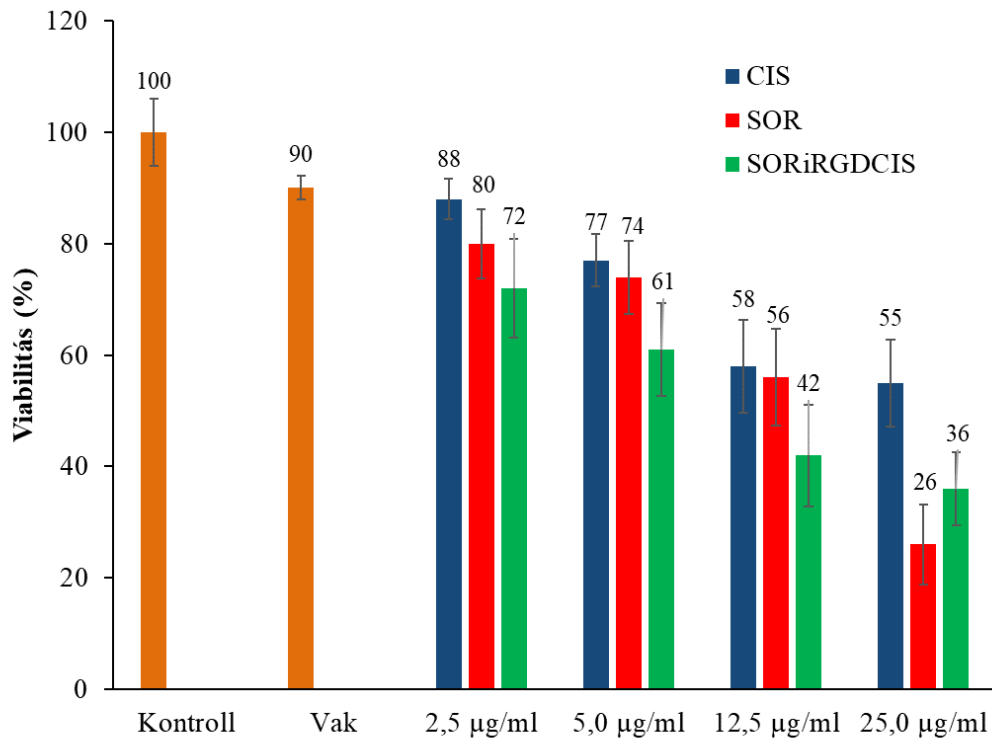
Meg kell jegyezni, hogy a legmagasabb sorafenib koncentrációnál az életképes sejtek hatékonyabban redukálódtak, valószínűleg azért, mert ebben a koncentrációban a nanorészecskék gyógyszerkibocsátása is befolyásolhatja a toxicitást, mivel a tiszta hatóanyag azonnal rendelkezésre áll a sejtek számára, míg a nanorészecskék késleltethetik a gyógyszer elérhetőségét. Élő rendszerben azonban előnyös lehet a nanorészecskék alkalmazása, mivel nem adják le a teljes hatóanyagot az egészséges szövetekben, így hatékony célzás esetén pedig képesek a kemoterápiás szerek jelentős részét a tumorsejtekbe szállítani.

10. táblázat. Különböző koncentrációjú csoportok egyszempontos ANOVA/Kruskal-Wallis analízise (C – ciszplatin, S – sorafenib és CS – ciszplatin-sorafenib kettős részecskerendszer).

Konc. csoport	Normalitás (Shapiro-Wilk)	Homoszkedaszticitás (Bartlett)	ANOVA/Kruskal-Wallis	Post-hoc (Tukey/Nemenyi)
2,5 µg/ml	C: $p = 0,440$ S: $p = 0,630$ CS: $p = 0,694$	$p = 0,219$	$F = 7,922$ $df = 2,$ $p < 0,01^{**}$	C-CS: $p < 0,01^{**}$
5,0 µg/ml	C: $p = 0,296$ S: $p = 0,374$ CS: $p = 0,027$	$p = 0,158$	Chi-sq = 13,03 $df = 2$ $p < 0,01^{**}$	C-CS: $p < 0,01^{**}$ S-CS: $p < 0,05^*$
12,5 µg/ml	C: $p = 0,041$ S: $p = 0,307$ CS: $p = 0,350$	$p = 0,466$	Chi-sq = 14,25 $df = 2$ $p < 0,001^{***}$	C-CS: $p < 0,01^{**}$ S-CS: $p < 0,01^{**}$
25,0 µg/ml	C: $p = 0,048$ S: $p = 0,227$ CS: $p = 0,829$	$p = 0,321$	Chi-sq = 18,12 $df = 2$ $p < 0,001^{***}$	C-S: $p < 0,05^*$ C-CS: $p < 0,001^{***}$

*, **, *** p érték szignifikancia tartományai: * (0,01-0,05), ** (0,001-0,01), *** [0-0,001].

4. Eredmények és értékelésük



27. ábra. HepG2 sejteken tanulmányozott kettős hatóanyagú 12CL nanorészecskék (SORiRGDCIS) és tiszta hatóanyagok citotoxicitása a CIS és SOR koncentráció függvényében.

4.3 Sorafenib mikrokapszulázása 16CM polimerrel

4.3.1 Az előállítási módszer optimalizálása

Az egyszerű emulzió–oldószer elpárolgatás módszerét a legfontosabb folyamatparaméterek változtatásával optimalizáltam. A változó paraméterek hatásait követtem a méret és az előállítási hozam módosulásain.

A **11. táblázat**-ban látható, hogy 0,5% (m/V) polimer koncentráció és 0,5% vagy 1% (m/V) PVA felületaktív anyag használata viszonylag jó szemcseméretet és méreteloszlást eredményezett. Kivételt képeztek a 16CM1 és 16CM2 minták, ahol az 1:2 (o/v) és 1:3 (o/v) arányok túl nagy és túl polidiszperz részecskéket ($Z\text{-avg} > 230$ nm és $PDI > 0,170$) eredményeztek, amelyek aggregálódtak a magas polimer koncentráció és az alacsony PVA-koncentráció miatt. Ebben a csoportban (0,5%, m/V PVA-val készültek) a részecskék átlagméreteinek és a polidiszperzitási indexeinek a csökkenése figyelhető meg a növekvő o/v aránnyal, bár az előállítási hozam csökkenő tendenciát mutatott a polimer oldódása miatt a megnövelt emulgeálószer hatására.

4. Eredmények és értékelésük

11. táblázat. A nanorészecskék tulajdonságai a módszer optimalizálása során, 0,5% (m/V) polimer koncentráció alkalmazásával.

Minta	Polimer (%)	o/v	PVA (%)	Z-avg (nm)	PDI	Hozam (%)
16CM1	0,5	1:2	0,5	293,0 ± 2,4	0,257 ± 0,024	71
16CM2	0,5	1:3	0,5	234,8 ± 2,4	0,176 ± 0,012	67
16CM3	0,5	1:4	0,5	209,6 ± 2,3	0,140 ± 0,023	35
16CM4	0,5	1:5	0,5	193,3 ± 2,4	0,116 ± 0,009	26
16CM5	0,5	1:2	1	209,5 ± 1,7	0,150 ± 0,015	71
16CM6	0,5	1:3	1	180,3 ± 1,8	0,120 ± 0,025	30
16CM7	0,5	1:4	1	189,9 ± 3,0	0,112 ± 0,023	35
16CM8	0,5	1:5	1	194,4 ± 1,9	0,112 ± 0,028	54

Vizsgálva az 1% (m/V) polimer koncentrációjú mintákat (**12. táblázat**), monodiszperz méreteloszlást tapasztaltam, az első két minta kivételével (16CM1 és 16CM2), ahol a PDI meghaladta a 0,150-es értéket, hasonlóan a 0,5% (m/V) polimer koncentrációkhoz a fentebb leírtak alapján. Elmondható egy átlagos méret és polidiszperzitási index csökkenés az 1%-os (m/V) polimer koncentrációval rendelkező minták esetében is, azonban az 1%-os (m/V) PVA-oldat használatakor a méreteloszlás csökkenése nem volt annyira hangsúlyos egyik polimer koncentrációnál (0,5% és 1%) sem.

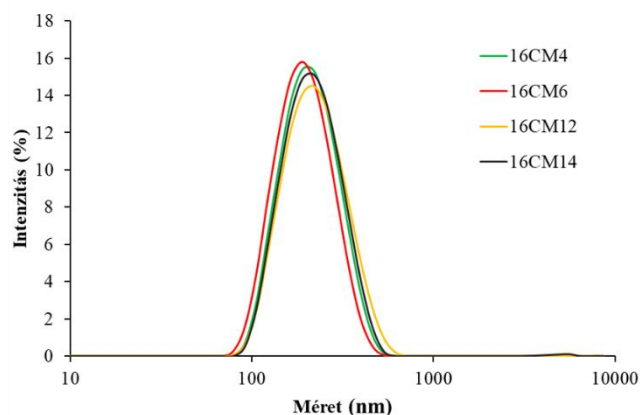
12. táblázat. A nanorészecskék tulajdonságai a módszer optimalizálása során, 1% (m/V) polimer koncentráció alkalmazásával.

Minta	Polimer (%)	o/v	PVA (%)	Z-avg (nm)	PDI	Hozam (%)
16CM9	1	1:2	0,5	395,2 ± 12	0,366 ± 0,021	82
16CM10	1	1:3	0,5	249,8 ± 1,8	0,184 ± 0,023	73
16CM11	1	1:4	0,5	225,2 ± 1,5	0,134 ± 0,029	81
16CM12	1	1:5	0,5	207,0 ± 1,5	0,135 ± 0,006	56
16CM13	1	1:2	1	227,7 ± 1,8	0,148 ± 0,016	72
16CM14	1	1:3	1	200,6 ± 0,9	0,117 ± 0,022	67
16CM15	1	1:4	1	210,3 ± 3,4	0,126 ± 0,031	63
16CM16	1	1:5	1	218,7 ± 1,6	0,132 ± 0,017	59

Céлом volt a megfelelő szemcseméret (≤ 200 nm) és méreteloszlás ($PDI < 0,150$) elérése, ezért minden csoportból kiválasztottam egy-egy mintát a kívánt paraméterekkel. A kiválasztott mintákat (16CM4, 16CM6, 16CM12, 16CM14) használtam a hatóanyag hatékonyabb kapszulázási és a részecskék hatóanyag-felszabadítási vizsgálatai során. Következésképpen elmondható, hogy kisméretű nanorészecskék állíthatók elő 1:3 o/v

4. Eredmények és értékelésük

arány, 1% (m/V) PVA használatával, valamint 1:5 o/v arány és 0,5%-os (m/V) PVA koncentrációval. Ezt a négy mintát mosás utáni méret és méreteloszlással (**28. ábra**), valamint a minták elektrosztatikai stabilitását jelző ζ -potenciállal is jellemeztem (**13. táblázat**).



28. ábra. A négy választott minta méreteloszlása dinamikus fényszórás módszerével mérve.

13. táblázat. Az optimalizálás során választott négy minta jellemzői.

Minta	Z-avg (nm)	PDI	Z-avg (nm) (m. u*)	PDI (m. u*)	ζ -potenciál (mV)	Hozam (%)
16CM4	193,3 ± 2,4	0,116 ± 0,009	254,3 ± 1,1	0,108 ± 0,009	-10,7 ± 0,3	26
16CM6	180,3 ± 1,8	0,120 ± 0,025	247,9 ± 2,1	0,103 ± 0,016	-12,6 ± 0,1	30
16CM12	207,0 ± 1,5	0,135 ± 0,006	272,9 ± 3,9	0,098 ± 0,026	-10,4 ± 0,1	56
16CM14	200,6 ± 0,9	0,117 ± 0,022	257,1 ± 2,1	0,114 ± 0,013	-10,1 ± 0,0	67

* m. u – mosás után

A SOR hatóanyagot a négy kiválasztott vak minta optimalizált előkészítési paramétereit követve építettem be a 16CM polimerbe. A megfelelő hatóanyag mennyiséget tartalmazó nanorészecskék előállításához a SOR mennyiségét 0,5-3 mg között változtattam és a szerves fázishoz adagoltam. Az előállított részecskéket intenzitás szerinti átlag méret, méreteloszlás, kapszulázási hatékonyság, előállítási hozam és ζ -potenciál értékekkel jellemeztem. A **14. táblázat** tartalmazza a hatóanyag mennyiség változtatásának részletes kísérleti paramétereit. A polimer koncentrációhoz viszonyított minimum 20%-os hatóanyag-koncentrációval készített minták minden esetben túl nagyméretű és magas polidiszperzitással rendelkező részecskéket eredményeztek, jelezve

4. Eredmények és értékelésük

a hatóanyag mátrixon kívüli kicsapódását. Ezek a minták nem voltak megfelelőek a további vizsgálatokra. A fennmaradó mintákat (0,5 és 1 mg SOR-ral készültek) használtam fel a további mérésekhez, a kapszulázási hatékonyság, a hozam és a ζ -potenciál meghatározására.

14. táblázat. A SOR mikrokapszulázása a mennyiségének változtatásával.

Minta	Polimer (%)	o/v	PVA (%)	SOR (mg)	Z-avg (nm)	PDI
16CM4SOR1	0,5	1:5	0,5	0,5	194,6 ± 1,36	0,109 ± 0,016
16CM4SOR2	0,5	1:5	0,5	1	204,1 ± 2,05	0,259 ± 0,022
16CM4SOR3	0,5	1:5	0,5	2	779,9 ± 391	0,871 ± 0,382
16CM4SOR4	0,5	1:5	0,5	3	578,2 ± 178	0,818 ± 0,220
16CM6SOR1	0,5	1:3	1	0,5	179,4 ± 1,81	0,107 ± 0,011
16CM6SOR2	0,5	1:3	1	1	177,0 ± 2,41	0,084 ± 0,023
16CM6SOR3	0,5	1:3	1	2	360,2 ± 81,5	0,657 ± 0,192
16CM6SOR4	0,5	1:3	1	3	916,0 ± 445	0,944 ± 0,328
16CM12SOR1	1	1:5	0,5	0,5	227,3 ± 2,20	0,136 ± 0,011
16CM12SOR2	1	1:5	0,5	1	205,6 ± 1,48	0,132 ± 0,027
16CM12SOR3	1	1:5	0,5	2	236,0 ± 91,0	0,297 ± 0,016
16CM12SOR4	1	1:5	0,5	3	221,0 ± 56,4	0,241 ± 0,102
16CM14SOR1	1	1:3	1	0,5	206,4 ± 2,72	0,111 ± 0,028
16CM14SOR2	1	1:3	1	1	198,1 ± 2,47	0,125 ± 0,023
16CM14SOR3	1	1:3	1	2	287,9 ± 103	0,534 ± 0,203
16CM14SOR4	1	1:3	1	3	332,4 ± 123	0,628 ± 0,207

Annak ellenére, hogy mindegyik 0,5 mg és 1 mg sorafenibet tartalmazó minta kisméretű és szűk méreteloszlású volt, az előállítási hozam és a kapszulázási hatékonyság nem minden esetben bizonyult megfelelőnek (**15. táblázat**). Az 50% alatti előállítási hozammal és kapszulázási hatékonysággal rendelkező mintákat kizártam a további *in*

4. Eredmények és értékelésük

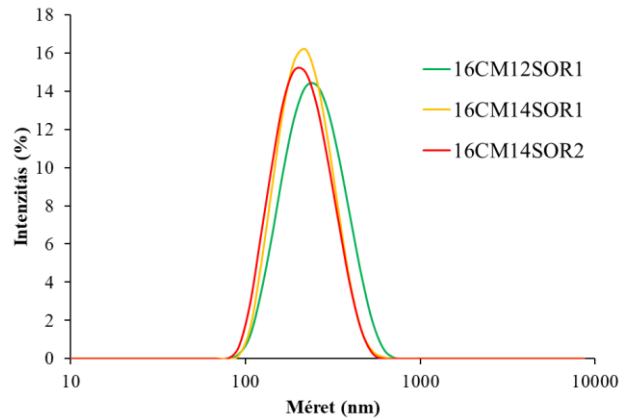
vitro gyógyszerhatóanyag-felszabadulási vizsgálatokból. A 16CM12SOR1, 16CM14SOR1 és 16CM14SOR2 minták esetében nagyon jó előállítási hozamot mértem (71-76%), ugyanakkor a kapszulázási hatékonyság kissé alacsonynak, de megfelelőnek bizonyult (55-62%). Figyelembe véve a részecskeméretet (**29. ábra**) és a stabilitást, a 16CM14SOR2 minta rendelkezett a legjobb paraméterekkel a további hatóanyagleadás vizsgálatához.

15. táblázat. 0,5 és 1 mg SOR-tartalmú részecskék vak mintákkal összehasonlítva.

Minta	Z-avg (nm)	PDI	Z-avg (nm) (m.u*)	PDI (m. u*)	ζ-potenciál (mV)	Hozam (%)	Kapsz. hat. (%)	DL (%)
16CM4	193,3 ± 2,4	0,116 ± 0,009	254,3 ± 1,1	0,108 ± 0,009	-10,7 ± 0,3	26	-	-
16CM4SOR1	194,6 ± 1,4	0,109 ± 0,016	241,1 ± 58	0,116 ± 0,353	-14,9 ± 0,7	32	32	9,1
16CM4SOR2	204,1 ± 2,1	0,259 ± 0,022	342,2 ± 16	0,434 ± 0,042	-20,9 ± 0,6	39	80	34,2
16CM6	180,3 ± 1,8	0,120 ± 0,025	247,9 ± 2,1	0,103 ± 0,016	-12,6 ± 0,1	30	-	-
16CM6SOR1	179,4 ± 1,8	0,107 ± 0,011	221,9 ± 3,1	0,089 ± 0,026	-17,1 ± 0,3	48	41	7,8
16CM6SOR2	177,0 ± 2,4	0,084 ± 0,023	216,3 ± 3,5	0,155 ± 0,044	-15,5 ± 0,6	40	59	24,6
16CM12	207,0 ± 1,5	0,135 ± 0,006	272,9 ± 3,9	0,098 ± 0,026	-10,4 ± 0,1	56	-	-
16CM12SOR1	227,3 ± 2,2	0,136 ± 0,011	266,7 ± 2,2	0,142 ± 0,011	-14,0 ± 0,7	76	62	3,9
16CM12SOR2	205,6 ± 1,4	0,132 ± 0,027	264,8 ± 2,9	0,176 ± 0,020	-9,23 ± 0,2	42	77	16,7
16CM14	200,6 ± 0,9	0,117 ± 0,022	257,1 ± 2,1	0,114 ± 0,013	-10,1 ± 0,0	67	-	-
16CM14SOR1	206,4 ± 2,7	0,111 ± 0,028	244,7 ± 2,5	0,087 ± 0,022	-10,5 ± 0,6	71	58	3,9
16CM14SOR2	198,1 ± 2,5	0,125 ± 0,023	237,0 ± 3,3	0,113 ± 0,035	-15,0 ± 0,0	71	55	7,0

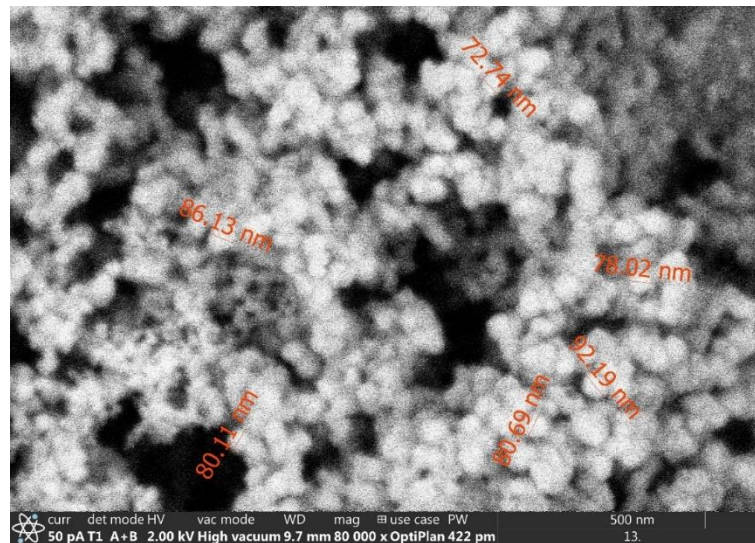
* m. u – mosás után

4. Eredmények és értékelésük



29. ábra. A legjobb paraméterekkel rendelkező három SOR-tartalmú minta méreteloszlás görbéi.

A 16CM14SOR2 minta dinamikus fényszórás módszerével mért hidrodinamikai mérete és méreteloszlása mellett vizsgáltam a nanorészecskék morfológiáját is. Az SEM felvételek homályosak lettek, valószínűleg a polimer részecskék gyenge mechanikai stabilitása miatt, ennek ellenére jól látható a részecskék gömb alakja és mérete (< 100 nm), ami körülbelül a hidrodinamikai méret fele (**30. ábra**).



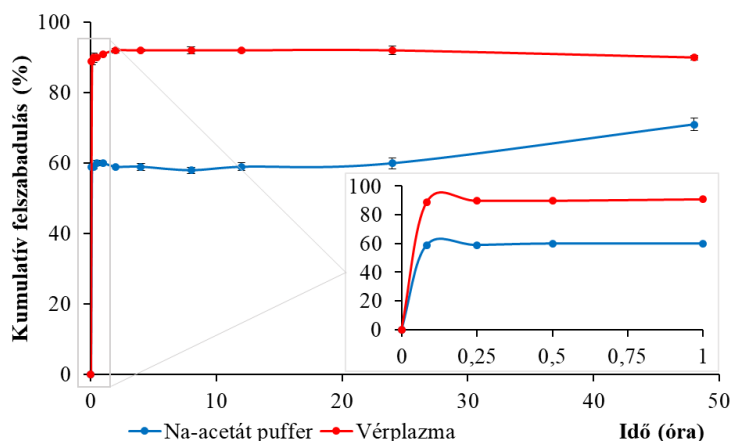
30. ábra. A 16CM14SOR2 minta SEM képe.

4.3.2 Hatóanyagleadás vizsgálat

A hatóanyagot tartalmazó nanorészecskék *in vitro* gyógyszerkibocsátását bioreleváns körülmények között vizsgáltam vérplazmában (pH = 7,4) és savas nátrium-acetát pufferben (pH = 5,5), modellezve a tumor mikrokörnyezetét. A sorafenib kezdeti kimosódása nátrium-acetát pufferoldatban $59 \pm 0,6\%$ volt, ezután a hatóanyag késleltetett felszabadulása következett be a polimer lebomlása és a diffúziós hatás miatt. A vizsgálat

4. Eredmények és értékelésük

során a hatóanyag teljes mennyiségének a $71 \pm 1,8\%$ -a szabadult fel. A vérplazmában a hatóanyag $89 \pm 1,0\%$ -a kioldódott a kezdeti burst fázisban (**31. ábra**). A magas kezdeti kioldódások a hatóanyagnak a plazmafehérjékhez való nagy affinitásával, valamint a polimer mátrix felületére történő adszorpciójával magyarázhatók.



31. ábra. A sorafenib kumulatív felszabadulása a 16CM14SOR2 nanorészecskékből.

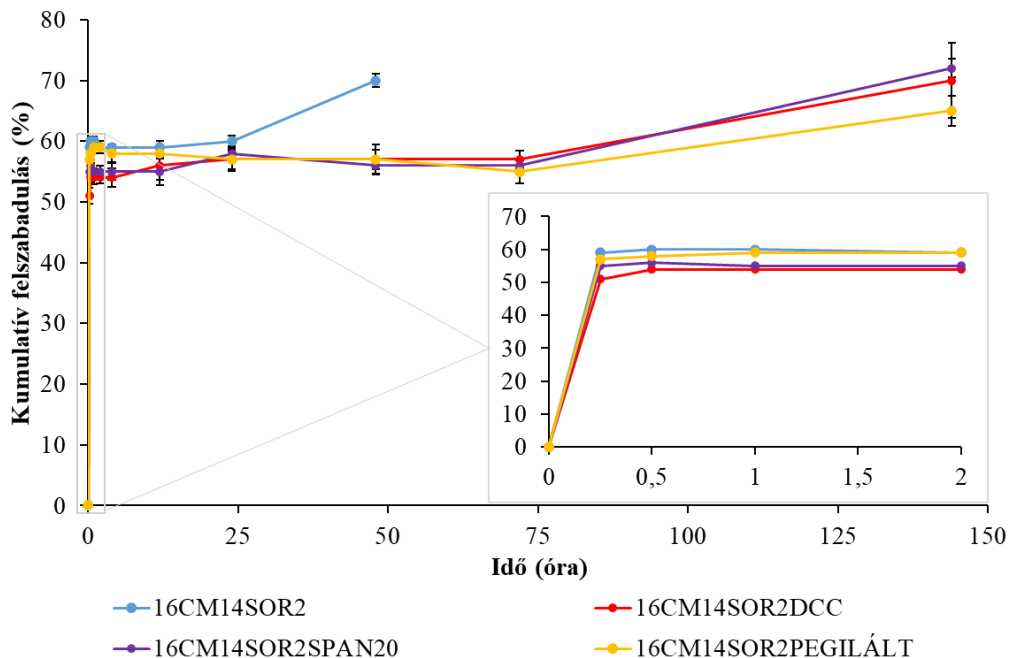
4.3.3 A hatóanyag-kioldósági profil javítása

Annak érdekében, hogy a hatóanyag lassabb felszabadulását érjem el mindkét közegben, a sorafenibet tartalmazó 16CM polimerből felépülő nanorészecskéket különböző adalékanyagokkal állítottam elő. Ezek a keresztkötést létrehozó DCC, valamint a felületaktív SPAN20 és SPAN80 vegyületek voltak. Feltételezésem szerint az alacsonyabb hidrofíli-lipofíli egyensúly ($HLB_{SPAN20} = 8,6$; $HLB_{SPAN80} = 4,3$) a hatóanyag jobb diszperzióját okozza a polimer mátrixban, ezáltal csökkentve a keletkező nanorészecskében a hatóanyag felületre kerülését. Ideális esetben a sorafenib kissé hidrofíllé, a polimer pedig kissé lipofíllé válik, növelve az oldhatóságot és megtartva a hatóanyagot. A nanorészecskék PEGilálását kétféle módszerrel végeztem el, a 3.4 alpontban leírtak alapján. A PEG "elfedheti" a részecskéket az immunrendszer elől, ezáltal növelve a keringési időt a véráramban, megvédve a részecskéket a lebomlástól, lassítva a hatóanyag felszabadulását.

A **32. ábrán** szemléltetem a módosított recepttel előállított három mintának a kumulatív leadási profilját, (16CM14SOR2DCC, 16CM14SOR2SPAN20 és részecske előállítás után PEGilált minta: 16CM14SOR2PEGILÁLT jelöléssel) az adalékanyagmentes mintával szemben. Na-acetát pufferben számottevően kevesebb kezdeti kioldódást mutatott a DCC-t tartalmazó minta (16CM14SOR2DCC), $51 \pm 1,4\%$ -

4. Eredmények és értékelésük

os kezdeti burst volt tapasztalható, ami 8%-kal alacsonyabb volt, mint az adalékanyagok nélküli minta (16CM14SOR2) kezdeti leadása. A SPAN80-at tartalmazó és az *in situ* PEGilált (16CM14SOR2PEG) minta nem mutatott számottevő leadás-javulást. A DCC keresztkötővel előállított és a SPAN20 emulgeátort tartalmazó mintákat lassabb és hatékonyabb hatóanyag-felszabadulás jellemezte. A 16CM14SOR2 minta az első 2 nap során leadta a hatóanyag teljes mennyiségének $71 \pm 1,8\%$ -át, míg a DCC-vel és SPAN20 emulgeátorral készített minták a kezdeti mérsékelt hatóanyag-felszabadulás után 6 nap alatt szabadították fel hozzávetőleg ugyanazt a mennyiséget. Az **M1. melléklet** tartalmazza a mintánkénti kumulatív leadásgörbéket.

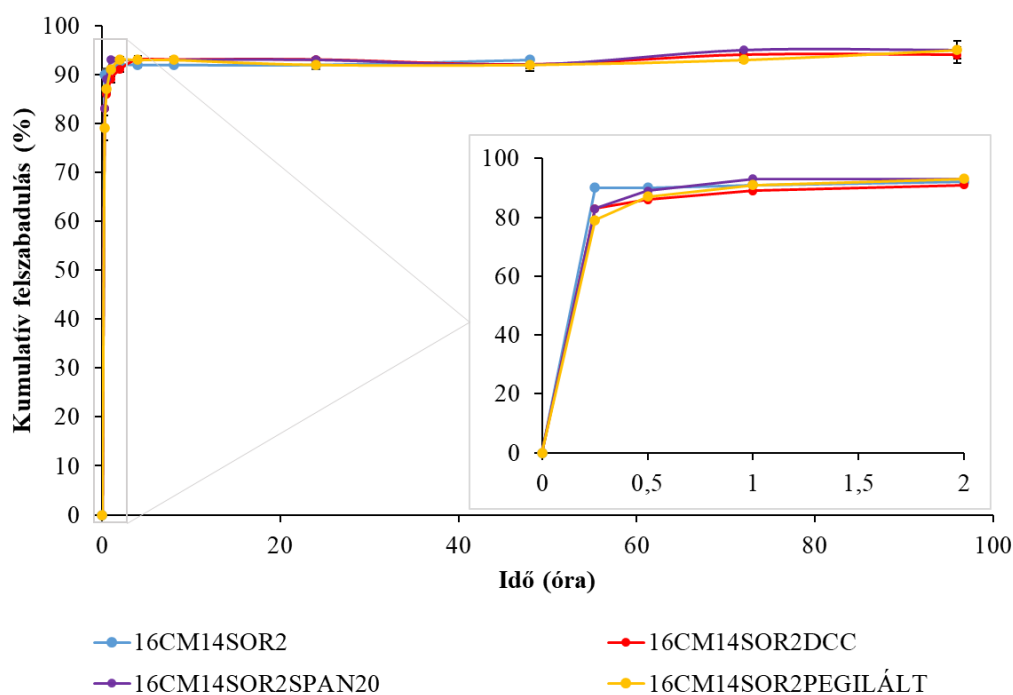


32. ábra. A sorafenib kumulatív felszabadulása a különböző adalékanyagokkal előállított nanorészecskékből, összehasonlítva az adalékmentes 16CM14SOR2 nanorészecskékkal, Na-acetát pufferben (pH = 5,5).

A vérplazma egy nagyon összetett rendszer és főleg a plazmafehérjék miatt a leadási profilok általában gyorsabb kioldódást és leadást mutatnak, mint a savas pufferes rendszerek. Alapul véve ezt a tapasztalatot, a további plazmás kísérleteimben csak azokat a mintákat használtam, amelyek javulást mutattak az acetátos pufferben. A vérplazmában a felszabadulási profil javulása hangsúlyosabb volt (**33. ábra**). A részecske előállítás után PEGilált minta (16CM14SOR2PEGILÁLT) esetében a kezdeti burst fázisban a sorafenib $79 \pm 2,5\%$ -a szabadult fel. A tiszta hatóanyagú mintához (16CM14SOR2) képest ez a mennyiség 11%-kal kevesebb volt. A segédanyagmentes minta

4. Eredmények és értékelésük

(16CM14SOR2) gyakorlatilag azonnal leadta a hatóanyag túlnyomó részét, míg a DCC-vel és amino PEG-gel előállított minták 1 óra elteltével érték el a 90-91% -os hatóanyag-felszabadulást. A mintánkénti kumulatív felszabadulást az **M2. melléklet** tartalmazza. Következtetésképpen elmondható, hogy a nanorészecskék PEGilálása pozitív hatást mutatott a felszabadulási profilra mindkét közegben. Mindezen tények tudatában a külső PEGilálással alacsonyabb kezdeti lemosódást és tartós felszabadulást értem el, főleg a vérplazma rendszerében.



33. ábra. A sorafenib kumulatív felszabadulása a különböző adalékanyagokkal előállított nanorészecskékből, összehasonlítva az adalékmentes 16CM14SOR2 nanorészecskékkel, vérplazmában (pH = 7,4).

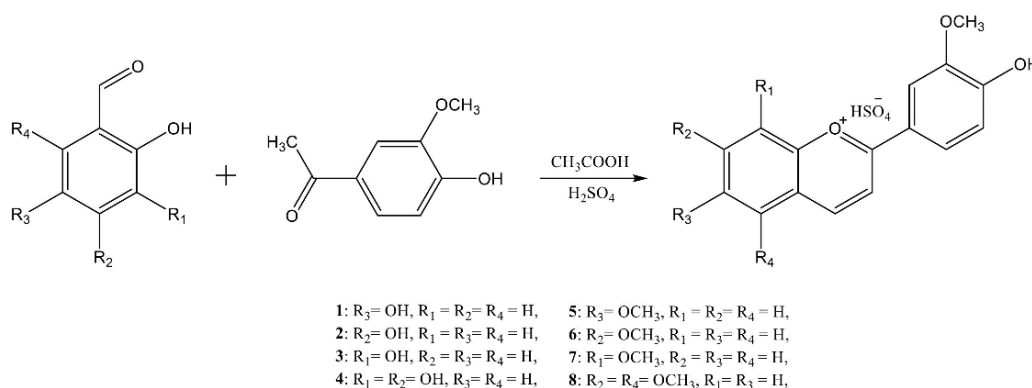
4.4 Szintetikus antocianidinek vizsgálata

A természetes eredetű antocianidinek kationos flavilium szerkezetében lévő szubsztituensek és azok helyzete határozza meg ezen anyagok tulajdonságait, beleértve a szint, a stabilitást és a biológiai aktivitást, amelyeket főként a gyűrű hidroxilezése és O-metilációs foka szabályoz. A szomszédos hidroxilcsoportok jelenléte a gyűrűben hátrányosnak tekinthető a stabilitás szempontjából, növelve az oxidációs hajlamot [Alappat & Alappat, 2020]. Figyelembe véve az antociánok koncentrált formában történő elválasztásának technológiai nehézségeit, az új antocianidinek szintézisét fontos

4. Eredmények és értékelésük

eszköznek tekintették az új funkciók hozzáadásához, valamint a stabilitás és a biológiai aktivitás javításához. Bár a leggyakoribb szintetikus módszer egy szubsztituált acetofenon aromás aldehiddel való reakciója savas katalízis során, más lehetséges útvonalokról is beszámoltak, pl. természetes benzopiránok kiindulási anyagként való felhasználásáról [Kraus & Geraskin, 2016].

A szintetikus antocianidineket szintén a temesvári kutató partnereink szintetizálták. A szintézis a szakirodalomban leírt [Calogero et al., 2013] 4'-hidroxi-3',5'-dimetoxi-acetofenon és a megfelelő 2-hidroxi-benzaldehid sav-katalizált kondenzációs reakciójával történt (**34. ábra**). A vegyületek hidrogén-szulfát sók formájában keletkeztek és tisztaságukat NMR elemzések alapján számították ki (**16. táblázat**). Ezek az értékek minden vegyület esetében 94%-nál nagyobbak voltak, ezért további tisztításuk nem volt szükséges. Vizsgálatukra további spektroszkópai elemzéseket végeztek (FT-IR, UV-VIS és NMR) és a szerkezetvizsgálatok a kívánt termékek képződését mutatták.



34. ábra. Az szintetikus antocianidinek szintézisének reakciósémája.

16. táblázat. A keletkezett nyolc flavilium kation származék és tisztaságuk.

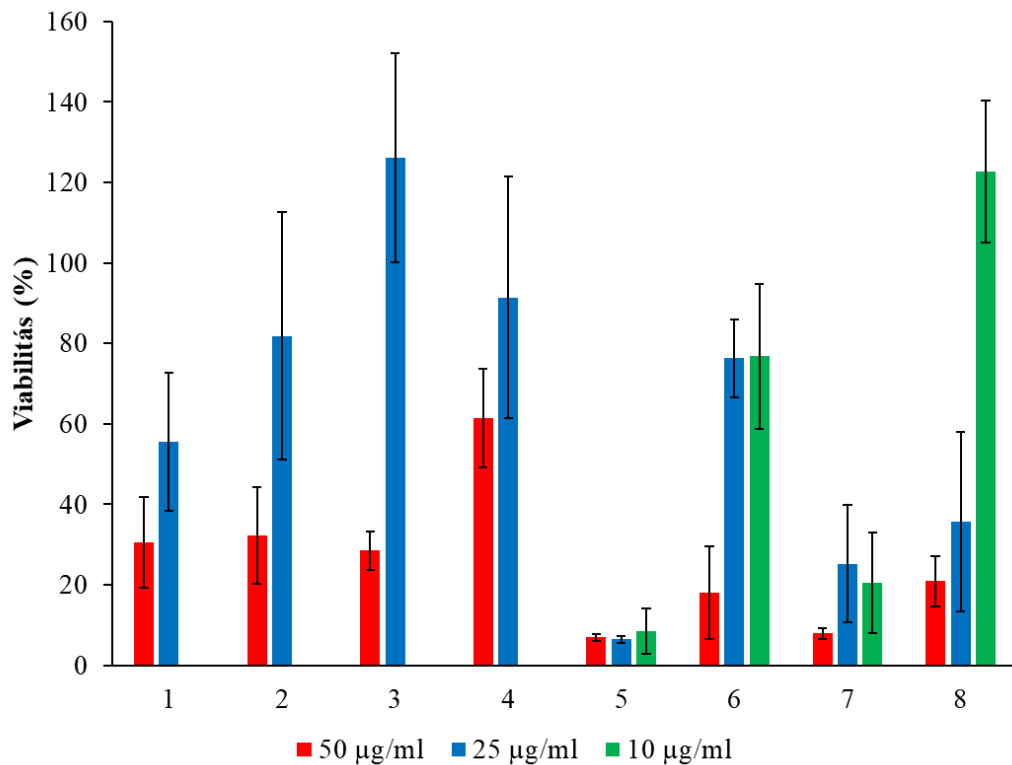
Szám	Keletkezett antocianidinek	Tisztaság (%)
1	6-hidroxi-4'-hidroxi-3'-metoxi-flavilium hidrogén-szulfát	98,6
2	7-hidroxi-4'-hidroxi-3'-metoxi-flavilium hidrogén-szulfát	99,5
3	8-hidroxi-4'-hidroxi-3'-metoxi-flavilium hidrogén-szulfát	95,9
4	7,8-dihidroxi-4'-hidroxi-3'-metoxi-flavilium hidrogén-szulfát	95,7
5	6-metoxi-4'-hidroxi-3'-metoxi-flavilium hidrogén-szulfát	94,6
6	7-metoxi-4'-hidroxi-3'-metoxi-flavilium hidrogén-szulfát	97,1
7	8-metoxi-4'-hidroxi-3'-metoxi-flavilium hidrogén-szulfát	94,1
8	5,7-dimetoxi-4'-hidroxi-3'-metoxi-flavilium hidrogén-szulfát	94,4

4. Eredmények és értékelésük

4.4.1 Az új, szintetikus antocianidinek citotoxicitás-vizsgálata

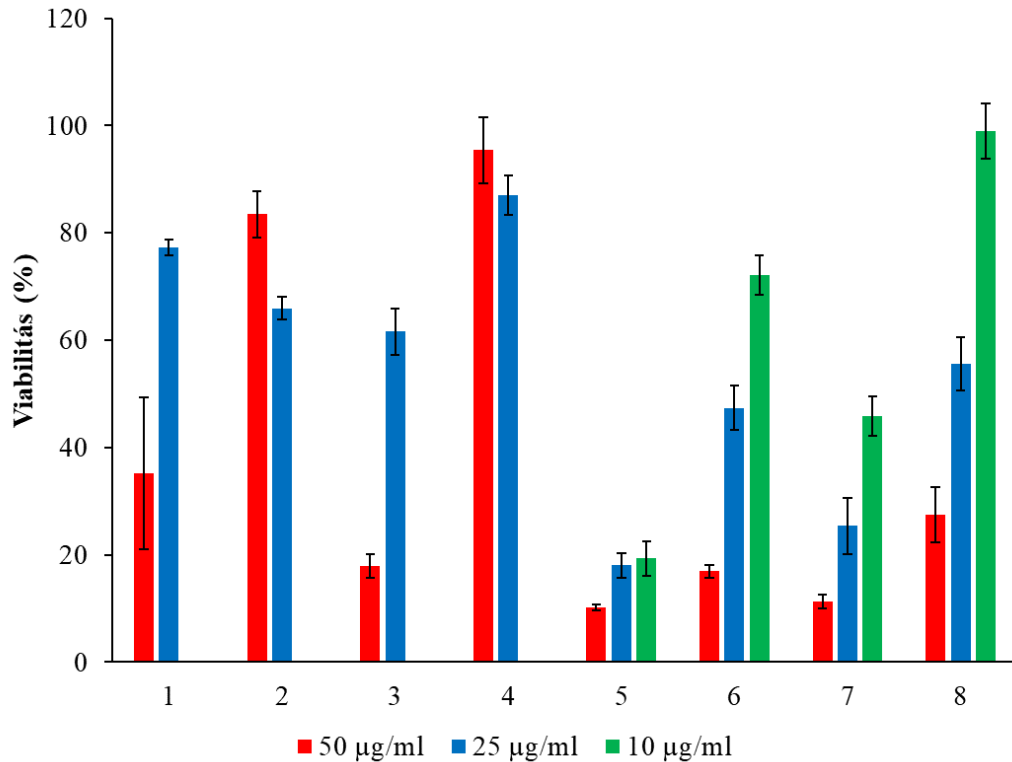
Az új flavilium kation származékok különböző koncentrációjának citotoxicitását HepG2 és HCT116 rákos sejtvonalakon vizsgáltam. Az eredmények értékelésekor a jobb átláthatóság érdekében a származékok jelölésére a **16. táblázat**-ban levő számozást alkalmaztam.

A legmagasabb hatóanyag-koncentrációnál (50 µg/ml) a legtöbb flavilium hatékonyan gátolta a rákos sejtek növekedését (**35. és 36. ábra**). Kizárólag a 4-es vegyület nem mutatott gátló hatást egyik tumorsejtben sem, és a 2-es vegyületnek csak a HCT116 sejteken volt citotoxikus hatása. Felezve a hatóanyag-koncentrációt (25 µg/ml), az 5., 7. és 8. vegyületek mindkét sejtvonalban gátolták a sejtnövekedést, a 6-os pedig jelentős hatást gyakorolt a HepG2 sejtekre. Az 5. és 7. vegyületek a legalacsonyabb koncentrációban (10 µg/ml) is hatékony citotoxikus szerekeknek bizonyultak mindkét sejtvonalon.



35. ábra. A HCT116 sejtek életképessége (%) a flavilium-koncentráció függvényében (1–8: a flavilium származékok sorszáma a 16-os táblázat alapján).

4. Eredmények és értékelésük



36. ábra. A HepG2 sejtek életképessége (%) a flavilium-koncentráció függvényében (1–8: a flavilium származékok sorszáma a 16-os táblázat alapján).

Az új flavilium származékokat lényegében két fő csoportra lehet osztani, aszerint, hogy az alapszerkezetbe milyen szubsztituensek kerültek: 1) egy vagy két hidroxilcsoporttal szubsztituáltak és 2) egy vagy két metoxicsoporttal helyettesítettek. Nyilvánvaló, hogy a rákellenes hatás ezeknek a funkciós csoportoknak a molekulában való jelenlétéhez és helyzetéhez kapcsolódik, a sejtnövekedés gátlása erősebb, ha a szubsztituens metoxicsoport volt. Az is könnyen megfigyelhető, hogy sem két metoxi szubsztituens (8. vegyület), sem két hidroxil szubsztituens (4. vegyület) nem volt előnyös a rákellenes hatás szempontjából, függetlenül attól, hogy HCT116 sejteket vagy HepG2 sejteket vizsgáltam. Ami a monoszubsztitúció helyzetét illeti (lásd **34. ábra**), a 6-os (5. vegyület, R₃) és 8-as (7. vegyület, R₁) pozíciók kedveztek a citotoxikus hatásnak, mindkét sejtvonalon, a 7-es pozícióval (6. vegyület, R₂) szemben, amikor a szubsztituens metoxi csoport volt. A legjobb eredményeket az 5-ös vegyület adta, több mint 90%-os citotoxicitással a HCT116-os sejteken és több mint 80%-os citotoxikus hatást ért el a HepG2 sejteken a legkisebb hatóanyag-koncentrációban.

Az 1–4. flavilium származékok esetében a két magasabb koncentrációjú csoport (25 µg/ml és 50 µg/ml) viabilitási átlagoknak a statisztikai összehasonlítása mindkét

4. Eredmények és értékelésük

sejtvonalban szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket mutatott (**17. táblázat**). A flavilium származékok magasabb koncentrációja hatékonyabb volt, mint az alacsonyabb.

17. táblázat. A két különböző koncentrációnál (C1 – 50 $\mu\text{g/ml}$, C2 – 25 $\mu\text{g/ml}$) végzett t-teszt / Welch féle t-teszt / Mann-Whitney U-teszt, mindkét sejtvonalon.

Sejtvonal	Antocianidin	Normalitás (Shapiro-Wilk)	F-teszt	t-teszt/Welch t-teszt/Mann-Whitney U-teszt
HCT116	1	C1: $p = 0,326$ C2: $p = 0,685$	F = 0,44, num df = 7, denom df = 7, $p = 0,295$	t = -3,21, df = 14, $p < 0,01^{**}$
	2	C1: $p = 0,331$ C2: $p = 0,989$	F = 0,88, num df = 7, denom df = 6, $p = 0,864$	t = -5,64, df = 13, $p < 0,001^{***}$
	3	C1: $p = 0,223$ C2: $p = 0,484$	F = 0,20, num df = 7, denom df = 7, $p = 0,056$	t = -24,1, df = 13, $p < 0,001^{***}$
	4	C1: $p = 0,771$ C2: $p = 0,969$	F = 0,39, num df = 7, denom df = 6, $p = 0,242$	t = -4,36, df = 13, $p < 0,001^{***}$
HepG2	1	C1: $p = 0,356$ C2: $p = 0,999$	F = 88,3, num df = 7, denom df = 7, $p < 0,001^{***}$	t = -7,81, df = 16, $p < 0,001^{***}$
	2	C1: $p = 0,446$ C2: $p = 0,067$	F = 4,32, num df = 7, denom df = 7, $p = 0,072$	t = 9,55, df = 14, $p < 0,001^{***}$
	3	C1: $p = 0,696$ C2: $p = 0,386$	F = 0,25, num df = 7, denom df = 7, $p = 0,091$	t = -24,1, df = 14, $p < 0,001^{***}$
	4	C1: $p = 0,627$ C2: $p = 0,442$	F = 2,81, num df = 7, denom df = 7, $p = 0,196$	t = 3,14, df = 14, $p < 0,01^{**}$

*, **, *** p érték szignifikancia tartományai: * (0,01-0,05], ** (0,001-0,01], *** [0-0,001].

A **18. táblázat** tartalmazza az 5–8. vegyületek statisztikai összehasonlítását minden koncentrációnál, mindkét sejtvonalban. A HCT116 sejteken levő 5-ös vegyület esetében nem volt szignifikáns ($p < 0,05$) különbség a hozzáadott mennyiségek között, minden koncentráció ugyanazt a hatékony citotoxicitást mutatta. A HepG2 sejtekben azonban a

4. Eredmények és értékelésük

citotoxicitás szignifikánsan ($p < 0,05$) különbözött a 25 $\mu\text{g/ml}$ –50 $\mu\text{g/ml}$ és a 10 $\mu\text{g/ml}$ –50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációk tekintetében. A 6. és 7. vegyület esetében szignifikáns különbségeket figyeltem meg a HCT116 sejtek 25 $\mu\text{g/ml}$ –50 $\mu\text{g/ml}$ és 10 $\mu\text{g/ml}$ –50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációi, valamint a HepG2 sejtekben a 10 $\mu\text{g/ml}$ –25 $\mu\text{g/ml}$ és a 10 $\mu\text{g/ml}$ –50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációk között. A HepG2 sejteken levő 8-as antocianidin esetében a hozzáadott mennyiségek csökkentésével szignifikánsan csökkenő citotoxicitási hatást mutattam ki.

18. táblázat. Egyszempontú ANOVA / Kruskal-Wallis teszt a különböző koncentrációknál, mindkét sejtvonalon (C1 – 50 $\mu\text{g/ml}$, C2 – 25 $\mu\text{g/ml}$, C3 – 10 $\mu\text{g/ml}$).

Sejt-vonal	Anto-cianidin	Normalitás (Shapiro-Wilk)	Homoszke-daszticitás (Bartlett)	ANOVA/ Kruskal-Wallis	Post-hoc (Tukey/Nemenyi)
HCT116	5	C1: $p = 0,266$	$p < 0,05^*$	Chi-sq = 5,12	No diff.
		C2: $p = 0,275$		df = 2	
		C3: $p = 0,663$		$p > 0,05$	
	6	C1: $p = 0,171$	$p = 0,241$	F = 43,40	C1-C2: $p < 0,001^{***}$ C1-C3: $p < 0,001^{***}$
		C2: $p = 0,409$		df = 2	
		C3: $p = 0,373$		$p < 0,001^{***}$	
	7	C1: $p = 0,566$	$p < 0,001^{***}$	Chi-sq = 14,7	C1-C2: $p < 0,01^{**}$ C1-C3: $p < 0,01^{**}$
		C2: $p = 0,196$		df = 2	
C3: $p = 0,119$		$p < 0,01^{**}$			
8	C1: $p = 0,074$	$p < 0,05^*$	Chi-sq = 15,5	C1-C3: $p < 0,001^{***}$ C2-C3: $p < 0,01^{**}$	
	C2: $p = 0,084$		df = 2		
	C3: $p = 0,689$		$p < 0,001^{***}$		
HepG2	5	C1: $p = 0,753$	$p < 0,05^*$	Chi-sq = 14,7	C1-C2: $p < 0,01^{**}$ C1-C3: $p < 0,01^{**}$
		C2: $p = 0,024$		df = 2	
		C3: $p = 0,866$		$p < 0,001^{***}$	
	6	C1: $p = 0,342$	$p < 0,001^{***}$	Chi-sq = 19,6	C1-C2: $p < 0,001^{***}$ C2-C3: $p < 0,05^*$
		C2: $p = 0,624$		df = 2	
		C3: $p = 0,110$		$p < 0,001^{***}$	
	7	C1: $p = 0,272$	$p < 0,001^{***}$	Chi-sq = 18,6	C1-C3: $p < 0,001^{***}$ C2-C3: $p < 0,05^*$
		C2: $p = 0,947$		df = 2	
C3: $p = 0,959$		$p < 0,001^{***}$			
8	C1: $p = 0,560$	$p = 0,993$	F = 346,1	C1-C2: $p < 0,001^{***}$ C1-C3: $p < 0,001^{***}$ C2-C3: $p < 0,001^{***}$	
	C2: $p = 0,858$		df = 2		
	C3: $p = 0,887$		$p < 0,001^{***}$		

*, **, *** p érték szignifikancia tartományai: * (0,01-0,05], ** (0,001-0,01], *** [0-0,001].

Az antocianidinek, kalkonok és tautomerizációs formáik citotoxikus hatása ismert. Bandgar és munkatársai kimutatták a 2,4-dimetoxi- és 2,4,5-trimetoxi-kalkonszármazékok rákellenes hatását az emberi rákos sejteken [Bandgar et al., 2010], de a szubsztituens pozíciójának rákellenes hatásáról a szintetikus antocianidinek esetében még nem számoltak be. Ezen eredmények alapján az 5. és 7. vegyületeket választottam további vizsgálatokra, amelyek még alacsony koncentrációban is konzisztens rákellenes

4. Eredmények és értékelésük

hatást mutattak, ciklodextrin származékokkal történő inklúziós komplexek kialakítása céljából, valamint halokróm és citotoxikus tulajdonságuk felderítésére.

4.4.2 Antocianidinek molekuláris kapszulázása és oldhatósági vizsgálata

A két kiválasztott szintetikus antocianidin molekuláris kapszulázását ciklodextrinokkal végeztem el. Ezt a módszert leginkább kisméretű és nagy illékonyságú vegyületek komplexálására használják. A ciklodextrinek, mint makrociklusos oligoszacharidok fő technológiai előnyei, amelyek a szerkezeti változatosságukban rejlenek, a vízben oldódó bioaktív molekulák oldhatóságának és biológiai hozzáférhetőségének javítása, emellett megvédik a vendégmolekulákat a káros külső hatásoktól [Loftsson et al., 2005, Poorghorban et al., 2015]. Ahmad és munkatársai [Ahmad et al., 2018] β -glükán és β -ciklodextrin részecskébe kapszulázott antociánok hatékonyan szabályozott felszabadulásáról számoltak be. A bevont részecskék ellenállóbbak voltak a gyomornedvekkel szemben, és biológiai hozzáférhetőségük megnövekedett. Továbbá az eredmények megnövekedett fenoltartalmat és antioxidáns aktivitást mutattak a bevonóanyagok védő hatása miatt.

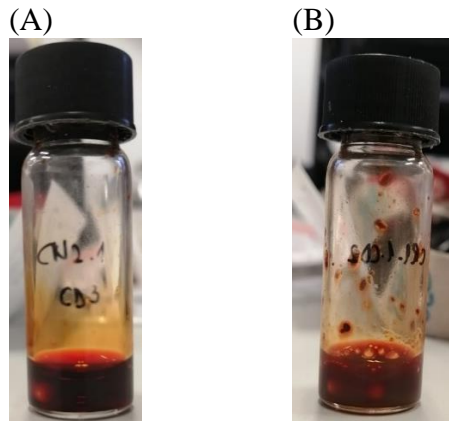
Az inklúziós komplexek létrehozása során mindkét antocianidint háromféle β -ciklodextrin származékkal vizsgáltam, a 3.3.4 fejezetben leírtak alapján (**37. ábra**).



37. ábra. Az antocianidin- β -ciklodextrin vizes komplexek fotói.
(Balról-jobbra: 5-SBECD, 5-RAMEB, 7-RAMEB, 7-SBECD, 5-HPBCD, 7-HPBCD).

A legjobb kombinációt az 5. vegyület a szulfobutil- β -ciklodextrinnel adta, amikor a komplex homogén oldatot alkotott és nem jellemezte kicsapódás (**38.A ábra**). A 7. vegyület a random metilezett β -ciklodextrinnel mutatta a legjobb komplexképződést. A komplexációt kezdetben enyhe kicsapódás jellemezte (**38.B ábra**), amely idővel feloldódott. Ezzel a módszerrel sikerült növelnem a két flavilium származék oldhatóságát 6,3 mg/ml-ről 9,2 mg/ml-re (5) és 2,3 mg/ml-ről 9,4 mg/ml-re (7).

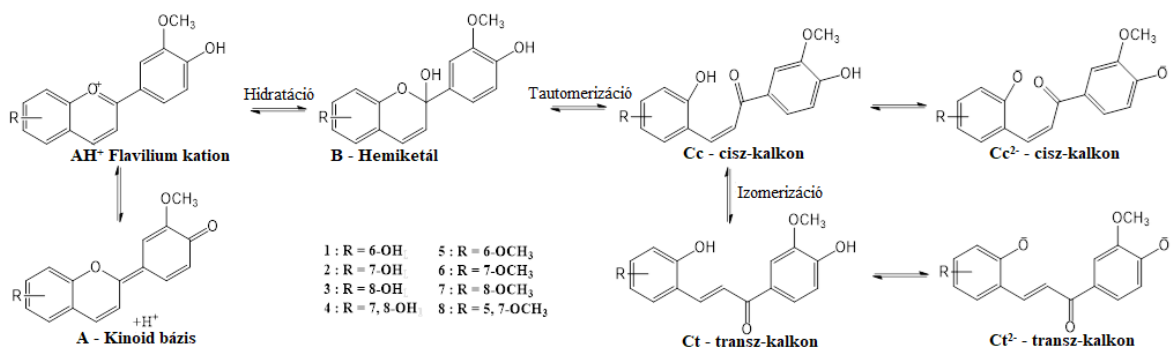
4. Eredmények és értékelésük



38. ábra. Az antocianidin- β -ciklodextrin vizes komplexek legjobb kombinációinak fotói (A, B).

4.4.3 Az antocianidinek halokróm tulajdonságainak vizsgálata

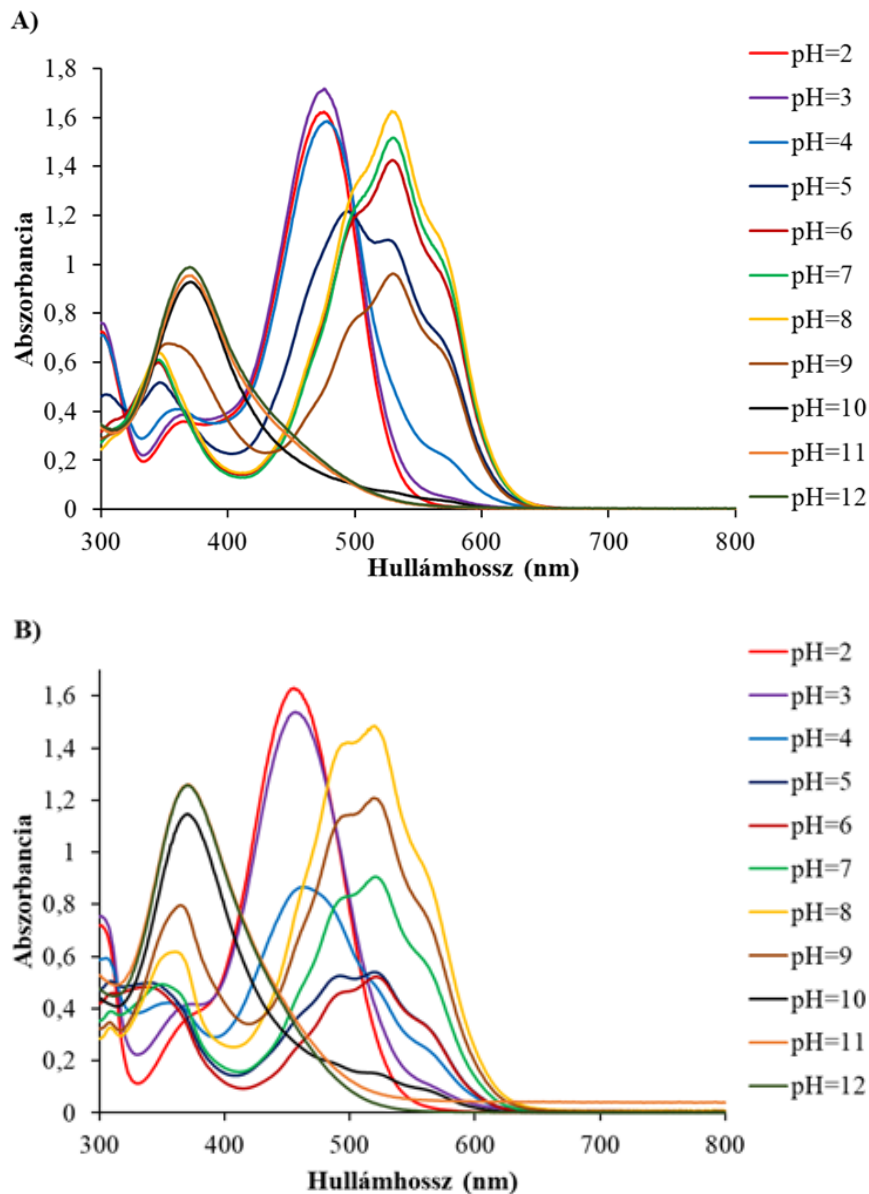
A 39. ábra a szintetizált antocianidinek feltételezett pH-függő egyensúlyi formáit mutatja be a szakirodalmi adatok alapján [Cruz et al., 2022]. Általánosan elfogadott, hogy a flavilium sók gyors deprotonációval kinoid bázissá (A) alakíthatók. Párhuzamos hemiketál (B) képződés is előfordul víz nukleofil addíciójával és protonvesztással egyidőben [Brouillard & Dubois, 1977, Brouillard & Delaporte, 1977]. Az utóbbi forma cisz-kalkonná (Cc) izomerizálódik, amely tovább izomerizálódik transz-kalkonná (Ct) [Cruz et al., 2022, Pina et al., 2012]. Mindezek a formák reverzibilis reakciókban keletkeznek.



39. ábra. Az antocianidin formák pH függő változása.

Az 5. és 7. vegyületek halokróm tulajdonságait spektrofotometriásan követtem 2-12 pH tartományban az idő függvényében is. A különböző egyensúlyi formák jelenlétét a pH változtatása során az eltérő abszorpciós maximumok bizonyították (40. ábra).

4. Eredmények és értékelésük



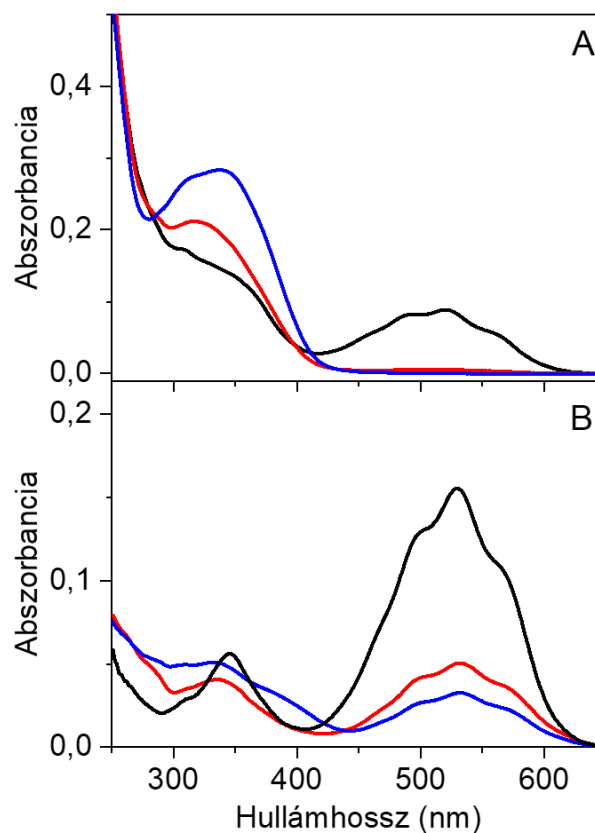
40. ábra. Az 5. (A) és 7. (B) vegyületek UV-VIS spektrumai különböző pH értékeken, az elkészítés után 30 perccel mérve.

Különböző időpontokban felvett UV-VIS spektrumok alapján (**M3. melléklet** és **M4. melléklet**) elmondható, hogy az 5-ös vegyület flavilium kation formáját időbeli stabilitás jellemezte 3-as pH érték alatt, a 7-es antocianidin ezt a stabilitást 2-es pH alatt mutatta. Abszorpciós maximumuk 478 nm-en (5-ös vegyület) és 456 nm-en (7-es vegyület) jelent meg (**40. ábra**). A kinoid bázisok 530 nm-nél (5) és 520 nm-nél (7) jelentek meg, 4 feletti (5) és 3 feletti (7) pH értékeknél. A kinoid bázisok viszonylag stabilak voltak 5–10 pH tartományban, 24 órán keresztül, ugyanakkor a pH növelése csökkentette időbeli stabilitásukat. Az 5–9 (5) és 7–9 (7) pH értékek között, 370 (5) és 360 nm-nél (7) megjelenő abszorpciós sávok megfelelhetnek a cisz-kalkon formáknak.

4. Eredmények és értékelésük

Magasabb pH értékeknél a transz-kalkon formák jelentek meg és 11 feletti pH-n megtörtént a deprotonációjuk, amelyeket a spektrumokban megjelenő vállak (5-ös vegyület: 460 nm és 7-es vegyület: 450 nm) jeleztek.

A szulfobutil-éter- β -ciklodextrin (SBECD) és a random metilezett β -ciklodextrin (RAMEB) hatását vízben tanulmányoztam, melynek pH-ja 5,6 volt. Ilyen körülmények között mindkét alapvegyület a flaviliumion deprotonált formájává alakult, 420–620 nm tartományban jellegzetes abszorpciót mutatva. Szulfobutil-éter- β -ciklodextrin jelenlétében a 7-es vegyület esetén ez az abszorpciós sáv majdnem eltűnt és 317 nm-en abszorpciós csúcs jelent meg (**41.A ábra**).



41. ábra. Az 5. (A) és 7. (B) vegyületek abszorpciós spektrumai követlenül a minták előkészítése után vízben (fekete vonal), SBECD-vizes oldatban (piros vonal) és az utóbbiak spektruma 3 óra elteltével (kék vonal).

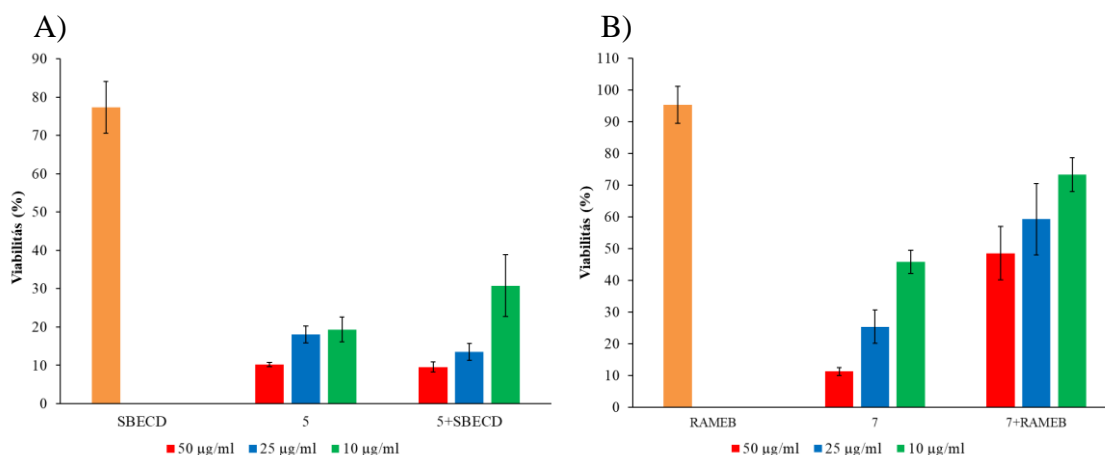
A változásokból arra lehet következtetni, hogy a cisz-kalkon SBECD-hez való preferenciális kötődése a kinoid bázis és cisz-kalkon közti háromlépcsős egyensúlyt a cisz-kalkon képződése felé tolja el. Egy korábbi tanulmány, amely a szerkezetileg hasonló antocián (7- β -D-glükopiranoziloxi-4'-hidroxi-flavilium) komplexképződését tanulmányozta SBECD-vel, hasonló eredményekről számolt be, kimutatva a cisz-kalkon forma nagy affinitását a gazda-makrociklushoz [Mendoza et al., 2017]. A spektrum

4. Eredmények és értékelésük

jelentős változását figyeltem meg, amikor a SBECD-t tartalmazó komplexet 3 órán át sötétben tároltam. A változásokat feltehetőleg a cisz-kalkon lassú izomerizációja okozta a termodinamikailag stabilabb transz-kalkonná, amely valószínűleg szintén képes a SBECD általi befogásra. Hasonló viselkedést figyeltem meg az 5-ös vegyület esetében, habár SBECD jelenlétében a kinoid bázis szignifikáns abszorbanciát mutatott, még 3 óra elteltével is (**41.B ábra**). A spektrális változások alig különböztek, amikor a RAMEB volt a gazda-molekula a SBECD helyett, ami arra utal, hogy a makrociklus töltése kis szerepet játszik a komplexképzésben.

4.4.4 Flavilium-ciklodextrin komplexek citotoxicitása

Az inklúziós komplexek kialakulása és a vizsgált szintetikus antocianidinek termodinamikai egyensúlyának a kalkonok felé történő eltolódása alapján, amint azt az előző részben bemutattam, a kiválasztott flavilium komplexek SBECD és RAMEB ciklodextrin származékokkal való *in vitro* citotoxicitását HepG2 sejtekben is vizsgáltam (**42. ábra**). A SBECD-t az 5-ös molekuláris kapszulázásához (5+SBECD) és a RAMEB-t a 7-hez (7+RAMEB) választottam, mivel a komplexképzés során a vízben való oldhatóság növekedett, amint azt a 4.4.2 fejezetben leírtam. A 7. vegyület RAMEB-bel való komplexképzése jelentősen csökkentette citotoxikus hatását (**42.B ábra**), azonban a SBECD nem változtatta meg számottevően az 5. antocianidin citotoxicitását (**42.A ábra**).



42. ábra. A HepG2 sejtek viabilitása (%) az 5. (A) és 7. (B) vegyületek és a ciklodextrin komplexük koncentrációi, valamint a SBECD és RAMEB függvényében.

A komplexált minták (5+SBECD, 7+RAMEB) statisztikai vizsgálata során, szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) mutattak az 50 µg/ml és a 10 µg/ml (5 + SBECD), valamint a 25 µg/ml és a 10 µg/ml (7 + RAMEB) koncentrációk (**19. táblázat**).

4. Eredmények és értékelésük

Szignifikáns különbségeket ($p < 0,01$) figyeltem meg a flavilium származékok komplexált társaikkal való összehasonlításakor, különböző koncentrációknál vizsgálva ezeket (**20. táblázat**).

19. táblázat. Egyszempontú ANOVA / Kruskal-Wallis teszt a különböző koncentrációjú komplexált mintákkal (C1 – 50 $\mu\text{g/ml}$, C2 – 25 $\mu\text{g/ml}$, C3 – 10 $\mu\text{g/ml}$), HepG2 sejteken.

Minta	Normalitás (Shapiro-Wilk)	Homoszke-daszticitás (Bartlett)	ANOVA/ Kruskal-Wallis	Post-hoc (Tukey/ Nemenyi)
5+SBECD	C1: $p = 0,956$ C2: $p = 0,709$ C3: $p = 0,967$	$p < 0,001^{***}$	Chi-sq = 19,23 df = 2 $p < 0,001^{***}$	C1-C3: $p < 0,001^{***}$
7+RAMEB	C1: $p = 0,342$ C2: $p = 0,386$ C3: $p = 0,246$	$p = 0,193$	F = 14,44 df = 2 $p < 0,001^{***}$	C1-C3: $p < 0,001^{***}$ C2-C3: $p < 0,05^*$

*, **, *** p érték szignifikancia tartományai: * (0,01-0,05], ** (0,001-0,01], *** [0-0,001].

20. táblázat. Különböző antocianidin (5, 7) koncentrációval (C1 – 50 $\mu\text{g/ml}$, C2 – 25 $\mu\text{g/ml}$, C3 – 10 $\mu\text{g/ml}$) végzett t-teszt / Welch féle t-teszt / Mann-Whitney U-teszt, a komplexált társaikkal (5+SBECD, 7+RAMEB) való összehasonlításra, HepG2 sejtvonalon.

Konc. Csoport	Minta	Normalitás (Shapiro-Wilk)	F-teszt	t-teszt/Welch t-teszt/Mann-Whitney U-teszt
C1	5 – 5+SBECD	5: $p = 0,753$ 5+SBECD: $p = 0,956$	F = 1,17, num df = 7, denom df = 6, $p = 0,861$	t = 3,84, df = 13, $p < 0,01^{**}$
C2	5 – 5+SBECD	5: $p = 0,240$ 5+SBECD: $p = 0,709$	F = 0,98, num df = 7, denom df = 7, $p = 0,982$	t = 3,81, df = 14, $p < 0,01^{**}$
C3	5 – 5+SBECD	5: $p = 0,866$ 5+SBECD: $p = 0,967$	F = 0,05, num df = 6, denom df = 7, $p < 0,01^{**}$	t = -3,97, df = 7,8, $p < 0,01^{**}$
C1	7 – 7+RAMEB	7: $p < 0,01^{**}$ 7+RAMEB: $p = 0,674$	F = 0,07, num df = 7, denom df = 6, $p < 0,01^{**}$	W = 0, $p < 0,01^{**}$
C2	7 – 7+RAMEB	7: $p = 0,947$ 7+RAMEB: $p = 0,992$	F = 0,60, num df = 7, denom df = 6, $p = 0,523$	t = -11,3, df = 13, $p < 0,001^{***}$
C3	7 – 7+RAMEB	7: $p = 0,960$ 7+RAMEB: $p = 0,246$	F = 0,47, num df = 7, denom df = 7, $p = 0,340$	t = -11,2, df = 14, $p < 0,001^{***}$

*, **, *** p érték szignifikancia tartományai: * (0,01-0,05], ** (0,001-0,01], *** [0-0,001].

4. Eredmények és értékelésük

Következésképpen, a nyolc vizsgált flavilium származék közül az 5-ös mutatta a leghatékonyabb rákellenes hatást, mely a vízben oldódó ciklodextrinnel (SBECD) való komplexálás után is megőrizte hatását. A semleges és enyhén bázikus pH-értékeknél, akárcsak a vérplazma pH értéke (7,4 körüli), a quinoid bázis, a hemiketal és a cisz- és transz-kalkon formák domináltak a rendszerben jelenlévő antocianidin molekulák multiállapotából. Relatív eloszlásuk a flavilium kation szubsztitúciós mintázatától is függ [Basílio & Pina, 2016]. A vizsgált szintetikus antocianidinek esetében az abszorpciós spektrumok azt mutatták, hogy a vízdoldható ciklodextrin (SBECD) és az 5-ös vegyület zárványkomplexében, amely a legfontosabb rákellenes hatást mutatta, a kinoid bázis jelentős mennyiségben volt jelen a cisz- és transz-kalkonokkal együtt. Nyilvánvaló, hogy mind az inklúziós komplex kialakulása, mind a citosztatikus hatás a formák közötti komplex egyensúly eredménye, amelyet a metoxi-csoport szubsztituens helyzete is befolyásolt a flavilium kationban. Gago és munkatársai [Gago et al., 2017] kiváló tanulmánya alapján feltételezhetem, hogy a vegyületeim esetében is a SBECD származékkal való komplexképződés során az egyensúly a transz-kalkon forma felé tolódik el, így a rákellenes aktivitás ennek a formának köszönhető.

4.4.5 Antocianidin komplexek mikrokapszulázása

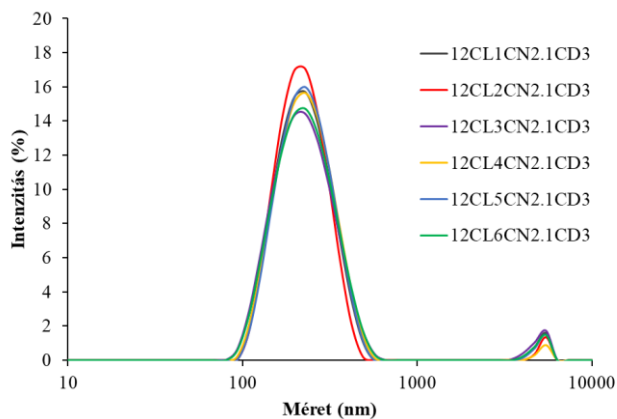
Eddigi vizsgálati eredmények alapján az 5-ös vegyület SBECD-vel való inklúziós komplexét választottam polimer hordozóba történő mikrokapszulázására. Az antocianidinek alapvetően kisméretű molekulák. A komplexképződéssel növeltem a molekula méretét, így lehetővé téve az összetett emulzió-oldószer elpárologtatás módszer alkalmazását. A komplex mikrokapszulázása a 3.3.5 alpontban leírtak alapján történt, a kétféle polimerbe (12CL és 16CM) és a továbbiakban CN2.1 jelölést adtam az 5-ös vegyületnek, valamint CD3 jelölést a SBECD-nek. Vizsgáltam a komplex kapszulázási lehetőségét és a megfelelő méret és kapszulázási hatékonyság elérése érdekében módosítottam a belső vizes fázis mátrixán, valamint a hatóanyag mennyiségét 0,5 és 1 mg között változtattam. A könnyebb átláthatóság érdekében a **21. táblázat**-ban szemléltetem az előállítási körülményeket és paramétereiket a 12CL polimerrel történő mikrokapszulázás esetében.

4. Eredmények és értékelésük

21. táblázat. CN2.1 antocianidin-CD3 ciklodextrin komplex 12CL polimerrel végzett mikrokapszulázásának előállítási paraméterei.

Minta	Polimer	Polimer konc. (mg/ml)	CN konc. (mg/ml)	CD konc. (mg/ml)	Belső vizes fázis	Külső vizes fázis
12CL1CN2.1CD3	12CL	10	5	100	0,01M HCl	PVA 1%
12CL2CN2.1CD3	12CL	10	10	100	0,01M HCl	PVA 1%
12CL3CN2.1CD3	12CL	10	5	100	MilliQ	PVA 1%
12CL4CN2.1CD3	12CL	10	10	100	MilliQ	PVA 1%
12CL5CN2.1CD3	12CL	10	5	100	PVA 1%	PVA 1%
12CL6CN2.1CD3	12CL	10	10	100	PVA 1%	PVA 1%

A 12CL polimer esetén megfelelő méretet értem el, viszonylag széles méreteloszlással (**22. táblázat**). Mindegyik minta esetében a méreteloszlás görbén mikrorészecskékre utaló csúcs jelent meg, amely aggregációt jelez (**43. ábra**). Feltételezésem szerint a feleslegben levő ciklodextrin okozhatja a plusz csúcs megjelenését. Figyelembe véve a kapszulázási hatékonyságokat (**22. táblázat**), elmondható, hogy a savas közeg nem kedvezett a hatóanyag beágyazásának, a savas belső fázissal készült minták adták a legalacsonyabb kapszulázási hatékonyságot. A PVA belső vizes fázissal készült minták mutatták a legmagasabb kapszulázási hatékonyság értékeket (67% és 55%).



43. ábra. 12CLCN2.1CD3 minták méreteloszlás görbéi.

4. Eredmények és értékelésük

22. táblázat. 12CLCN2.1CD3 minták tulajdonságai.

Minta	Z-avg (nm)	PDI	Kapsz.hat. (%)	DL (%)	Hozam (%)
12CL1CN2.1CD3	229,1 ± 4,0	0,242 ± 0,006	48	2,3	68
12CL2CN2.1CD3	230,3 ± 2,4	0,255 ± 0,020	39	4,0	46
12CL3CN2.1CD3	227,3 ± 3,3	0,239 ± 0,019	53	2,9	58
12CL4CN2.1CD3	225,3 ± 1,2	0,206 ± 0,017	48	5,4	42
12CL5CN2.1CD3	231,4 ± 2,2	0,239 ± 0,010	67	3,4	64
12CL6CN2.1CD3	227,4 ± 2,8	0,231 ± 0,011	55	5,1	51

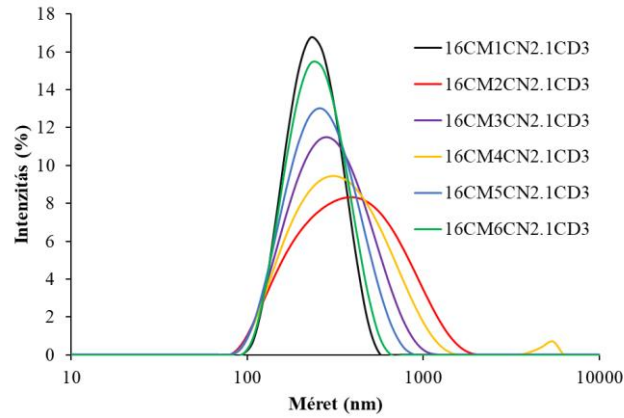
Az antocianidin-ciklodextrin komplexek 16CM polimerrel történő mikrokapszulázása során a 12CL polimerrel történő mikrokapszulázáshoz hasonló körülményeket és paramétereket alkalmaztam (**23. táblázat**).

23. táblázat. CN2.1 antocianidin-CD3 ciklodextrin komplex 16CM polimerrel végzett mikrokapszulázásának előállítási paraméterei.

Minta	Polimer	Polimer konc. (mg/ml)	CN konc. (mg/ml)	CD konc. (mg/ml)	Belső vizes fázis	Külső vizes fázis
16CM1CN2.1CD3	16CM	10	5	100	0,01M HCl	PVA 1%
16CM2CN2.1CD3	16CM	10	10	100	0,01M HCl	PVA 1%
16CM3CN2.1CD3	16CM	10	5	100	MilliQ	PVA 1%
16CM4CN2.1CD3	16CM	10	10	100	MilliQ	PVA 1%
16CM5CN2.1CD3	16CM	10	5	100	PVA 1%	PVA 1%
16CM6CN2.1CD3	16CM	10	10	100	PVA 1%	PVA 1%

A 16CM polimerrel készült minták esetében érdekes módon a legkisebb méretet, szűk méreteloszlással a 0,5 mg CN-t savas közegben tartalmazó minta (16CM1CN2.1CD3) adta (**44. ábra**). Az előállítási hozam és a kapszulázási hatékonyság 59%-ot és 51%-ot ért el. A belső PVA-s fázis ebben a csoportban megfelelő méretet adott szűk méreteloszlással, ellenben az előállítási hozam és a kapszulázási hatékonyság jelentősen csökkent (**24. táblázat**).

4. Eredmények és értékelésük



44. ábra. 16CMCN2.1CD3 minták méreteloszlás görbéi.

24. táblázat. 16CMCN2.1CD3 minták tulajdonságai.

Minta	Z-avg (nm)	PDI	Kapsz.hat. (%)	DL (%)	Hozam (%)
16CM1CN2.1CD3	225,1 ± 2,3	0,091 ± 0,019	51	2,8	59
16CM2CN2.1CD3	327,0 ± 3,8	0,277 ± 0,016	54	5,4	48
16CM3CN2.1CD3	266,4 ± 0,6	0,212 ± 0,015	55	3,0	60
16CM4CN2.1CD3	298,7 ± 1,8	0,255 ± 0,014	61	5,6	52
16CM5CN2.1CD3	243,5 ± 4,6	0,157 ± 0,010	51	3,4	48
16CM6CN2.1CD3	230,8 ± 1,7	0,114 ± 0,011	49	5,8	40

A fent leírt előkísérletek és pozitív eredmények alapján elmondható, hogy az antocianidin-ciklodextrin inklúziós komplexek mikrokapszulázása lehetségesnek bizonyul a két biokatalitikusan előállított polimerbe. Az előállítási módszer optimalizálása és a részecskék részletesebb vizsgálata további kutatások tárgya.

5. Összefoglalás

A PhD munkám során biokatalízissel előállított, biodegradábilis és biokompatibilis poliészter és polészteramid kopolimereket vizsgáltam, amelyek hatékony, tartós és célzott rákellenes gyógyszerhordozó rendszereknek bizonyulnak. Optimalizáltam az emulzió-oldószer elpárologtatás módszereket a megfelelő méretű és kapszulázási hatékonyságú nanorészecske rendszerek létrehozása érdekében.

Sikeresen mikrokapszuláztam a SOR rákellenes hatóanyagot a 12CL polimerbe magas kapszulázási hatékonyságot és megfelelő méretet elérve. Vizsgáltam a hatóanyagleadási profilját *in vitro* tesztek során és a részecskék citotoxikus hatását HepG2 HCC sejteken. A részecskék nyújtott hatóanyagleadást mutattak és koncentrációfüggő, hatékony toxicitást a vizsgált sejteken. További kísérleteimben sikeresen mikrokapszuláztam a SOR hatóanyagot 16CM polimerbe. A hatóanyagleadási teszt során a nanorészecskék gyors hatóanyag-felszabadulást mutattak mind a savas, mind a semleges közegben. Ennek szabályozása érdekében különböző adalékanyagok segítségével állítottam elő a nanorészecskéket és vizsgáltam a hatóanyagleadási profiljukat. Mindkét közegre elmondható egy általános nyújtottabb hatóanyagleadási hatás, ugyanakkor a DCC használata és a PEGilálási eljárás jelentősen javított a SOR kezdeti lemosódási szakaszán.

Tanulmányoztam az optimalizált összetett emulzió-oldószer elpárologtatás módszerével készült 12CL polimerbe csomagolt kettős hatóanyagú rendszert. A SOR-t és CIS-t mikrokapszuláztam és konjugáltam egyazon hordozóval, mivel a hatásukat szinergikusan szerettem volna növelni. A kapszulázási hatékonyság növelése érdekében BSA modellanyagot mikrokapszuláztam és keresztkötéssel kapcsoltam DCC használatával, emellett az iRGD tumor penetrációs peptid kapszulázásának lehetőségét is vizsgáltam a BSA helyettesítésével. A kettős hatóanyagú rendszerem szignifikánsan nagyobb citotoxicitást mutatott, mint a tiszta hatóanyagok, melyeket statisztikai tesztekkel is alátámasztottam.

Új, szintetikus előállított rákellenes antocianidin vegyületek molekuláris kapszulázását végeztem β -ciklodextrin származékokkal, amely során sikeresen növeltem a vegyületek oldhatóságát. Megvizsgáltam a szintetikus antocianidinek és inklúziós komplexeik halokróm tulajdonságait, megállapítva a rákellenes hatásért felelős tautomer forma jelenlétét. A CN2.1CD3 inklúziós komplexet sikeresen mikrokapszuláztam 12CL és 16CM polimerekbe.

Tézispontok

1. a) Először készítettem az új típusú, biokatalízissel előállított, biológiailag lebontható, biokompatibilis 12-hidroxi-sztearinsav- ϵ -kaprolakton kopolimerből (12CL) potenciális gyógyszerhordozó nanorészecskéket optimalizált egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatás módszerével, injekciós gyógyszerformátumhoz megfelelő mérettel ($219 \pm 5,2$ nm, hidrodinamikai méret) és monodiszperz (polidiszperzitási index: $0,168 \pm 0,018$) méreteloszlással.

b) Sikeresen mikrokapszuláztam sorafenib (SOR) hatóanyagot magas kapszulázási hatékonysággal (72,7%) a biodegradábilis és biokompatibilis kopolimerbe (12CL). Az így előállított nanorészecskék nagyon hatékonyak voltak a HepG2 HCC sejtekkel szemben. (S1)

2. a) Elsőként mikrokapszuláztam 12CL kopolimerrel sorafenib és ciszplatin kemoterapeutikumokat, kettős hatóanyagtartalmú polimer nanorészecskéket létrehozva, optimalizált összetett emulzió-oldószer elpárologtatás módszerrel N,N'-diciklohexil-karbodiimides (DCC) kapcsolást és iRGD tumor penetrációs peptidet alkalmazva. A DCC szignifikánsan javította a kapszulázási hatékonyságot.

b) Citotoxicitási teszttel igazoltam a kettős hatóanyag-hordozó rendszer hatékonyságát. A két rákellenes hatóanyagot tartalmazó 12CL polimer nanorészecskék statisztikailag igazoltan, szignifikánsan nagyobb citotoxicitást mutattak HepG2 sejtvonalon, mint a tiszta hatóanyagok. A polimer nanorészecskék Na-acetát pufferben (pH=5,5) a sorafenib esetében nyújtott hatóanyagleadást biztosítottak a vérplazmában tapasztalható képest. (S2)

3. a) Az új típusú, biokatalízissel előállított, biológiailag lebontható és biokompatibilis 16-hidroxi-hexadekánsav- ϵ -kaprolaktám kopolimerből (16CM) első alkalommal hoztam létre potenciális gyógyszerhordozó nanorészecskéket optimalizált egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatás módszerével, injekciós gyógyszerformátumhoz megfelelő mérettel (180–200 nm, hidrodinamikai méret) és monodiszperz (PDI: 0,116–0,135) méreteloszlással.

b) Sikeresen mikrokapszuláztam a biodegradábilis és biokompatibilis poliészteramid kopolimerbe (16CM) a sorafenib (SOR) hatóanyagot megfelelő kapszulázási hatékonysággal (55%) és előállítási hozammal (71%). *In vitro* leadási tesztekkel vizsgáltam a nanorészecskékből történő hatóanyag felszabadulást. Savas közegben a

kezdeti hatóanyag-lemosódás 8%-kal mérséklődött DCC keresztkötő ágens vagy Span 20 emulgeátor használatával, valamint vérplazmában a részecskék PEGilálása 11%-kal csökkentette a kezdeti „burst” hatást. (S4)

4. Elsőként állítottam elő új típusú, biokatalitikusan szintetizált antocianidin vegyületekből (6-metoxi-4'-hidroxi-3'-metoxi-flavilium hidrogén-szulfát - CN2.1 és 8-metoxi-4'-hidroxi-3'-metoxi-flavilium hidrogén-szulfát - CR1.1) β -ciklodextrin származékokkal inklúziós komplexeket. A komplexálással sikeresen növeltem az antocianidinek vízoldhatóságát (CN2.1: 6,3 mg/ml \rightarrow 9,2 mg/ml, CR1.1: 2,3 mg/ml \rightarrow 9,4 mg/ml). A ciklodextrinrel komplexált vegyületek megőrizték citotoxikus hatásukat HepG2 ráksejteken. A CN2.1 szulfobutil-éter- β -ciklodextrinnel alkotott inklúziós komplexét megfelelő mérettel és kapszulázási hatékonysággal mikrokapszuláztam 12CL és 16CM polimerekbe. (S3)

Thesis

1. a) For the first time, I prepared new types of potential drug carrier nanoparticles from the biodegradable and biocompatible ϵ -caprolactone-12-hydroxystearic acid copolymer (12CL) produced by biocatalysis using optimized single emulsion-solvent evaporation method, with a suitable size for injectable drug format (219 ± 5.2 nm, hydrodynamic size) and monodisperse (polydispersity index: 0.168 ± 0.018) size distribution.

b) Sorafenib (SOR) was microencapsulated with high encapsulation efficiency (72.7%) by the biodegradable and biocompatible copolymer. The nanoparticles produced in this way were highly effective against HepG2 HCC cells and showed promising prolonged drug delivery in an *in vitro* model environment. (S1)

2. a) I produced polymer nanoparticles containing sorafenib and cisplatin from 12CL copolymers for the first time, using optimized double emulsion-solvent evaporation method using N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) coupling and iRGD tumor penetration peptide. DCC significantly improved the encapsulation efficiency and the stability of the carrier system.

b) The effectiveness of the dual drug delivery system was confirmed by cytotoxicity test. The polymeric nanoparticles containing two anticancer agents were statistically proven to exhibit significantly higher cytotoxicity on HepG2 cell lines than the pure active

ingredients. The polymeric nanoparticles provided sustained release in Na-acetate buffer (pH=5.5) for sorafenib (S2) compared to that found in blood plasma. (S2)

3. a) I prepared new types of potential drug carrier nanoparticles from the biodegradable and biocompatible 16-hydroxyhexadecanoic acid- ϵ -caprolactam copolymer (16CM) for the first time produced by biocatalysis using optimized simple emulsion-solvent evaporation method, with a suitable size for injectable drug format (180–200 nm, hydrodynamic size) and monodisperse (PDI: 0.116–0.135) size distribution.

b) I successfully microencapsulated sorafenib (SOR) into the biodegradable and biocompatible polyesteramide copolymer with adequate encapsulation efficiency (55%) and production yield (71%). The drug release was investigated in *in vitro* release tests. In acidic media, the initial drug release was reduced by 8% using DCC crosslinking agent or Span20 emulsifier, and PEGylation of particles improved the initial burst effect by 11% in blood plasma. (S4)

4. I was the first who produced inclusion complexes with β -cyclodextrin derivatives from new types of biocatalytically synthesized anthocyanidine compounds (6-Methoxy-4'-hydroxy-3'-methoxyflavylium hydrogensulfate marked as CN2.1 and 8-Methoxy-4'-hydroxy-3'-methoxyflavylium hydrogensulfat marked as CR1.1). I successfully increased the water solubility of anthocyanidins (CN2.1: 6.3 mg/ml \rightarrow 9.2 mg/ml, CR1.1: 2.3 mg/ml \rightarrow 9.4 mg/ml) by complexation. The compounds complexed with cyclodextrins retained their cytotoxic effects on HepG2 cancer cells. The inclusion complex of CN2.1 with sulfobutylether- β -cyclodextrin was microencapsulated in 12CL and 16CM polymers with appropriate size and encapsulation efficiency. (S3)

Tézisek alapjául szolgáló cikkek

S1. Kántor, I.; Aparaschivei, D.; Todea, A.; Biró, E.; Babos, Gy.; Szerényi, D.; Kakasi, B.; Péter, F.; Şişu, E.; Feczkó, T. Biocatalytic synthesis of poly[ϵ -caprolactone-co-(12-hydroxystearate)] copolymer for sorafenib nanoformulation useful in drug delivery. *Catal. Today* **2021**, 366, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.05.005>. Q1, IF: 6,562.

S2. Kántor, I.; Dreavă, D.; Todea, A.; Péter, F.; May, Z.; Biró, E.; Babos, Gy.; Feczkó, T. Co-Entrapment of Sorafenib and Cisplatin Drugs and iRGD Tumour Homing Peptide by Poly[ϵ -caprolactone-co-(12-hydroxystearate)] Copolymer. *Biomedicines* **2022**, 10, 43. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010043>. Q1, IF 4,7.

S3. Păușescu, I.; Kántor, I.; Babos, Gy.; May, Z.; Fodor-Kardos, A.; Miskolczy, Zs.; Biczók, L.; Péter, F.; Medeleanu, M.; Feczkó, T. Halochromic Behavior and Anticancer Effect of New Synthetic Anthocyanidins Complexed with β -Cyclodextrin Derivatives. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 8103. <https://doi.org/10.3390/ijms23158103>. Q1, IF 5,6.

S4. Benea, I.C.; Kántor, I.; Todea, A.; Pellis, A.; Bîtcă, I.; Nagy, L.; Kéki, S.; Dreavă, D.M.; Péter, F.; Feczkó, T. Biocatalytic synthesis of new polyesteramides from ϵ -caprolactam and hydroxy acids: Structural characterization, biodegradability, and suitability as drug nanocarriers. *React. Funct. Polym.* **2023**, 191, 105702. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105702>. Q1, IF: 5,1.

Bibliográfia

- Abbasi, E.; Aval, S.F.; Akbarzadeh, A.; Milani, M.; Nasrabadi, H.T.; Joo, S.W.; Hanifehpour, Y.; Nejati-Koshki, K.; Pashaei-Asl, R. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 247. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247>
- Abriata, J.P.; Turatti, R.C.; Luiz, M.T.; Raspantini, G.L.; Tofani, L.B.; do Amaral, R.L.F.; Swiech, K.; Marcato, P.D.; Marchetti, J.M. Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.* **2019**, *96*, 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.035>
- Adepu, S.; Ramakrishna, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* **2021**, *26*, 5905. <http://doi.org/10.3390/molecules26195905>
- Afsharzadeh, M.; Hashemi, M.; Mokhtarzadeh, A.; Abnous, K.; Ramezani, M. Recent advances in co-delivery systems based on polymeric nanoparticle for cancer treatment. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, 1095–1110. <http://doi.org/10.1080/21691401.2017.1376675>
- Ahmad, M.; Ashraf, B.; Gani, A.; Gani, A. Microencapsulation of saffron anthocyanins using β glucan and β cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behaviour & antioxidant potential during in-vitro digestion. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 435 – 442. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.122>
- Al Samad, A.; Bethry, A.; Koziolová, E.; Netopilík, M.; Etrych, T.; Bakkour, Y.; Coudane, J.; El Omar, F.; Nottelet, B. PCL–PEG graft copolymers with tunable amphiphilicity as efficient drug delivery systems. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 6228–6239. <https://doi.org/10.1039/C6TB01841F>
- Alam, N.; Khare, V.; Dubey, R.; Saneja, A.; Kushwaha, M.; Singh, G.; Sharma, N.; Chandan, B.; Gupta, P.N. Biodegradable polymeric system for cisplatin delivery: Development, in vitro characterization and investigation of toxicity profile. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *38*, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.043>
- Alappat, B.; Alappat, J. Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics. *Molecules* **2020**, *25*, 5500. <https://doi.org/10.3390/molecules25235500>
- Alex, A.T.; Joseph, A.; Shavi, G.; Rao, J.V.; Udupa, N. Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 2144–2153. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.948643>
- Anwar, S.; Fratantonio, D.; Ferrari, D.; Saija, A.; Cimino, F.; Speciale, A. Berry anthocyanins reduce proliferation of human colorectal carcinoma cells by inducing caspase-3 activation and p21 upregulation. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 1397–1403. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5397>
- Arserim-Uçar, D.K. Chapter 7 - Nanocontainers for food safety. In *Smart Nanocontainers*; Nguyen-Tri, P.; Do, T.O.; Nguyen, T.A. Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 105–117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816770-0.00007-1>

Bibliográfia

- Asadi, K.; Ferguson, L.R.; Philpott, M.; Karunasinghe, N. Cancer-preventive properties of an anthocyanin-enriched sweet potato in the APC^{MIN} mouse model. *J. Cancer Prev.* **2017**, *22*, 135–146. <https://doi.org/10.15430/JCP.2017.22.3.135>
- Attia, M.F.; Anton, N.; Wallyn, J.; Omran, Z.; Vandamme, T.F. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, *71*, 1185–1198. <https://doi.org/10.1111/jphp.13098>
- Avgoustakis, K.; Beletsi, A.; Panagi, Z.; Klepetsanis, P.; Karydas, A.G.; Ithakissios, D.S. PLGA–mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J. Control. Release* **2002**, *79*, 123–135. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00530-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00530-2)
- Babu, A.; Amreddy, N.; Muralidharan, R.; Pathuri, G.; Gali, H.; Zhao, Y.D.; Munshi, A.; Ramesh, R. Chemodrug delivery using integrin-targeted PLGA-Chitosan nanoparticle for lung cancer therapy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14674. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15012-5>
- Bandgar, B.P.; Gawande, S.S.; Bodade, R.G.; Totre, J.V.; Khobragade, C.N. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1364–1370. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.11.066>
- Basílio, N.; Pina, F. Chemistry and photochemistry of anthocyanins and related compounds: A thermodynamic and kinetic approach. *Molecules* **2016**, *21*, 1502. <https://doi.org/10.3390/molecules21111502>
- Benea, I.C.; Kántor, I.; Todea, A.; Pellis, A.; Bîtcă, I.; Nagy, L.; Kéki, S.; Dreavă, D.M.; Péter, F.; Feczko, T. Biocatalytic synthesis of new polyesteramides from ϵ -caprolactam and hydroxy acids: Structural characterization, biodegradability, and suitability as drug nanocarriers. *React. Funct. Polym.* **2023**, *191*, 105702. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105702>
- Bhatia, S. Chapter 2 – Nanoparticles Types, Classification, Characterization, fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In *Natural Polymer Drug Delivery Systems*; Springer, Switzerland, 2016; pp. 33–93. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3>
- Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential – What they are and what they are not?. *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Biswas, S.; Kumari, P.; Lakhani, P.M.; Ghosh, B. Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *83*, 184–202. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.031>
- Brouillard, R.; Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8461–8468. <https://doi.org/10.1021/ja00468a015>

Bibliografía

- Brouillard, R.; Duboius, J.-E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 1359–1364. <https://doi.org/10.1021/ja00447a012>
- Byun, J.Y.; Youn, Y.-S.; Lee, Y.-J.; Choi, Y.-H.; Woo, S.-Y.; Kang, J.L. Interaction of Apoptotic Cells with Macrophages Upregulates COX-2/PGE₂ and HGF Expression via a Positive Feedback Loop. *Mediators Inflamm.* **2014**, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/463524>
- Callari, M.; Aldrich-Wright, J.R.; de Souza, P.L.; Stenzel, M.H. Polymers with platinum drugs and other macromolecular metal complexes for cancer treatment. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, 39, 1614–1643. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.05.002>
- Calogero, G.; Sinopoli, A.; Citro, I.; Di Marco, G.; Petrov, V.; Diniz, A.M.; Parola, A.J.; Pina, F. Synthetic analogues of anthocyanins as sensitizers for dye-sensitized solar cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, 12, 883–894. <https://doi.org/10.1039/c3pp25347c>
- Cancino-Bernardi, J.; Marangoni, V.S.; Zucolotto, V. Nanomedicine. In *Nanoscience and its Applications*; Da Róz, A.L.; Ferreira, M.; de Lima Leite, F.; Oliveira, O.N. Eds.; William Andrew Publishing, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017, pp. 71–92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0.00003-X>
- Capelezzo, A.P.; Mohr, L.C.; Delcanton, F.; de Mello, J.M.M.; Fiori, M.A. β -Cyclodextrins as encapsulating agents of essential oils. In *Cyclodextrin – A Versatile Ingredient*; Arora, P.; Dhingra, N. Eds.; IntechOpen: London, UK, 2018; pp. 169–200. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73568>
- Carmody, W.R. Easily prepared wide range buffer series. *J. Chem. Educ.* **1961**, 38, 559–560. <https://doi.org/10.1021/ed038p559>
- Chakraborty, S.; Basu, S.; Lahiri, A.; Basak, S. Inclusion of chrysin in β -cyclodextrin nanocavity and its effect on antioxidant potential of chrysin: A spectroscopic and molecular modeling approach. *J. Mol. Struct.* **2010**, 977, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.05.030>
- Charepalli, V.; Reddivari, L.; Radhakrishnan, S.; Vadde, R.; Agarwal, R.; Vanamala, J.K.P. Anthocyanin-containing purple-fleshed potatoes suppress colon tumorigenesis via elimination of colon cancer stem cells. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, 26, 1641–1649. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.005>
- Cheaburu-Yilmaz, C.N.; Karasulu, H.Y.; Yilmaz, O. Chapter 13 - Nanoscaled Dispersed Systems Used in Drug-Delivery Applications. In *Polymeric Nanomaterials in Nanotherapeutics*; Vasile, C. Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 437–468. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00607-9>
- Chen, F.; Fang, Y.; Chen, X.; Deng, R.; Zhang, Y.; Shao, J. Recent advances of sorafenib nanoformulations for cancer therapy: Smart nanosystem and combination therapy. *Asian J. Pharm. Sci.* **2021**, 16, 318–336. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.07.003>

Bibliográfia

- Cid-Samamed, A.; Rakmai, J.; Mejuto, J.C.; Simal-Gandara, J.; Astray, G. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chem.* **2022**, 384, 132467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132467>
- Cole, J.T.; Holland, N.B. Multifunctional nanoparticles for use in theranostic applications. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2015**, 5, 295–309. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0218-2>
- Cragg, G.M.; Pezzuto, J.M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Med. Princ. Pract.* **2016**, 25, 41–59. <https://doi.org/10.1159/000443404>
- Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 10940–10975. <https://doi.org/10.1021/cr500081p>
- Cruz, L.; Basílio, N.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Pina, F. Natural and synthetic flavylum-based dyes: The chemistry behind the color. *Chem. Rev.* **2022**, 122, 1416–1481. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00399>
- Davis, M.E. The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol. Pharm.* **2009**, 6, 659–668. <http://doi.org/10.1021/mp900015y>
- de Arruda Nascimento, E.; de Lima Coutinho, L.; da Silva, C.J.; de Lima, V.L.A.G.; dos Santos Aguiar, J. In vitro anticancer properties of anthocyanins: A systematic review. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2022**, 1877, 188748. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188748>
- Debuissy, T.; Pollet, E.; Avérous, L. Biotic and Abiotic Synthesis of Renewable Aliphatic Polyesters from Short Building Blocks Obtained from Biotechnology. *ChemSusChem*, **2018**, 11, 3836–3870. <https://doi.org/10.1002/cssc.201801700>
- Ding, Y.; Zhai, K.; Pei, P.; Lin, Y.; Ma, Y.; Zhu, H.; Shao, M.; Yang, X.; Tao, W. Encapsulation of cisplatin in a pegylated calcium phosphate nanoparticle (CPNP) for enhanced cytotoxicity to cancerous cells. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 493, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.01.032>
- Dong, C.M.; Qiu, K.Y.; Gu, Z.W.; Feng, X.D. Synthesis of star-shaped poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(DL-lactic acid-alt-glycolic acid) with multifunctional initiator and stannous octoate catalyst. *Macromolecules* **2001**, 34, 4691–1696. <http://doi.org/10.1021/ma010005w>
- Du, Y.; Zhang, N.; Cui, M.; Liu, Z.; Liu, S. Investigation on the hydrolysis of the anticancer drug cisplatin by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 26, 2832–2836. <https://doi.org/10.1002/rcm.6408>

Bibliográfia

- Duan, X.; He, C.; Kron, S.J.; Lin, W. Nanoparticle formulations of cisplatin for cancer therapy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *8*, 776–791. <https://doi.org/10.1002/wnan.1390>
- Ebata, H.; Toshima, K.; Matsumura, S. Lipase-Catalyzed Synthesis and Properties of Poly[(12-hydroxydodecanoate)-*co*-(12-hydroxystearate)] Directed towards Novel Green and Sustainable Elastomers. *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 38–45. <https://doi.org/10.1002/mabi.200700134>
- Esfahani, D.R.; Tangen, K.M.; Sadeh, M.; Seksenyan, A.; Neisewander, B.L.; Mehta, A.I.; Linninger, A.A. Chapter 9 – Systems engineers’ role in biomedical research. Convection-enhanced drug delivery. In *Computer Aided Chemical Engineering*; Manca, D. Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 42, pp. 271–302. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63964-6.00009-X>
- Feczko, T.; Piiper, A.; Pleli, T.; Schmithals, C.; Denk, D.; Hehlhans, S.; Rödel, F.; Vogl, T.J.; Wacker, M.G. Theranostic Sorafenib-Loaded Polymeric Nanocarriers Manufactured by Enhanced Gadolinium Conjugation Techniques. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 489. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100489>
- Fenyvesi, F.; Nguyen, T.L.P.; Haimhoffer, Á.; Ruzsnyák, Á.; Vasvári, G.; Bácskay, I.; Vecsernyés, M.; Ignat, S.R.; Dinescu, S.; Costache, M.; Ciceu, A.; Hermenean, A.; Váradi, J. Cyclodextrin complexation improves the solubility and Caco-2 permeability of chrysin. *Materials* **2020**, *13*, 3618. <https://doi.org/10.3390/ma13163618>
- Fernandes, A.; Ivanova, G.; Brás, N.F.; Mateus, N.; Ramos, M.J.; Rangel, M.; de Freitas, V. Structural characterization of inclusion complexes between cyanidin-3-O-glucoside and β -cyclodextrin. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *102*, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.037>
- Fernandes, A.; Rocha, M.A.A.; Santos, L.M.N.B.F.; Brás, J.; Oliveira, J.; Mateus, N.; de Freitas, V. Blackberry anthocyanins: β -Cyclodextrin fortification for thermal and gastrointestinal stabilization. *Food Chem.* **2018**, *245*, 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.109>
- Ferrario, V.; Pellis, A.; Cespugli, M.; Guebitz, G.M.; Gardossi, L. Nature Inspired Solutions for Polymers: Will Cutinase Enzymes Make Polyesters and Polyamides Greener? *Catalysts* **2016**, *6*, 205. <https://doi.org/10.3390/catal6120205>
- Fuenmayor, C.A.; Baron-Cangrejo, O.G.; Salgado-Rivera, P.A. Encapsulation of carotenoids as food colorants via formation of cyclodextrin inclusion complexes: A review. *Polysaccharides* **2021**, *2*, 454–476. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2020028>
- Gago, S.; Basílio, N.; Fernandes, A.; Freitas, V.; Quintas, A.; Pina, F. Photochromism of the complex between 4'-(2-hydroxyethoxy)-7-hydroxyflavylium and β -cyclodextrin, studied by ^1H NMR, UV–Vis, continuous irradiation and circular dichroism. *Dyes Pigment.* **2014**, *110*, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2014.04.038>

Bibliografía

- Gago, S.; Basílio, N.; Quintas, A.; Pina, F. Effect of β -cyclodextrin on the multistate species distribution of 3-methoxy-4',7-dihydroxyflavylium. Discrimination of the two hemiketal enantiomers. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 6346–6358. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04892>
- Gan, H.; Chen, L.; Sui, X.; Wu, B.; Zou, S.; Li, A.; Zhang, Y.; Liu, X.; Wang, D.; Cai, S.; Liu, X.; Liang, Y.; Tang, X. Enhanced delivery of sorafenib with anti-GPC3 antibody-conjugated TPGS-*b*-PCL/Pluronic P123 polymeric nanoparticles for targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.* **2018**, *91*, 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.011>
- Gao, F.; Zhang, J.; Fu, C.; Xie, X.; Peng, F.; You, J.; Tang, H.; Wang, Z.; Li, P.; Chen, J. iRGD-modified lipid-polymer hybrid nanoparticles loaded with isoliquiritigenin to enhance anti-breast cancer effect and tumor-targeting ability. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 4147–4162. <https://doi.org/10.2147/IJN.S134148>
- Gbolahan, O.B.; Schacht, M.A.; Beckley, E.W.; LaRoche, T.P.; O'Neil, B.H.; Pyko, M. Locoregional and systemic therapy for hepatocellular carcinoma. *J. Gastrointest. Oncol.* **2017**, *8*, 215–228. <http://doi.org/10.21037/jgo.2017.03.13>
- Gidwani, B.; Vyas, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 198268. <http://doi.org/10.1155/2015/198268>
- Grossen, P.; Witzigmann, D.; Sieber, S.; Huwyler, J. PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application. *J. Control. Release* **2017**, *260*, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.028>
- Heidarinasab, A.; Panahi, H.A.; Faramarzi, M.; Farjadian, F. Synthesis of thermosensitive magnetic nanocarrier for controlled sorafenib delivery. *Mater. Sci. Eng. C.* **2016**, *67*, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.036>
- Hevilla, V.; Sonseca, A.; Echeverría, C.; Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Enzymatic synthesis of polyesters and their bioapplications: Recent advances and perspectives. *Macromol. Biosci.* **2021**, *21*, 2100156. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100156>
- Hunsen, M.; Azim, A.; Mang, H.; Wallner, S.R.; Ronkvist, A.; Xie, W.; Gross, R.A. *Macromolecules* **2007**, *40*, 148–150. <https://doi.org/10.1021/ma062095g>
- Jambhekar, S.S.; Breen, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.017>
- Jayasuriya, A.C.; Darr, A.J. Controlled release of cisplatin and cancer cell apoptosis with cisplatin encapsulated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *J. Biomed. Sci. Eng.* **2013**, *6*, 586–592. <http://doi.org/10.4236/jbise.2013.65074>
- Jeong, Y.H.; Shin, H.W.; Kwon, J.Y.; Lee, S.M. Cisplatin-Encapsulated Polymeric Nanoparticles with Molecular Geometry-Regulated Colloidal Properties and

Bibliográfia

- Controlled Drug Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, 10, 23617–23629. <http://doi.org/10.1021/acsami.8b06905>
- Johnstone, T.C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S.J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 3436–3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>
- Kalogeropoulos, N.; Yannakopoulou, K.; Gioxari, A.; Chiou, A.; Makris, D.P. Polyphenol characterization and encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. *LWT – Food Sci. Technol.* **2010**, 43, 882–889. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.016>
- Kaminskas, L.M.; Boyd, B.J.; Porter, C.J.H. Dendrimer pharmacokinetics: the effect of size, structure and surface characteristics on ADME properties. *Nanomedicine*, **2011**, 6, 1063–1084. <http://doi.org/10.2217/nmm.11.67>
- Kántor, I.; Aparaschivei, D.; Todea, A.; Biró, E.; Babos, Gy.; Szerényi, D.; Kakasi, B.; Péter, F.; Şişu, E.; Feczkó, T. Biocatalytic synthesis of poly[ϵ -caprolactone-co-(12-hydroxystearate)] copolymer for sorafenib nanoformulation useful in drug delivery. *Catal. Today* **2021**, 366, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.05.005>
- Kántor, I.; Dreavă, D.; Todea, A.; Péter, F.; May, Z.; Biró, E.; Babos, Gy.; Feczkó, T. Co-Entrapment of Sorafenib and Cisplatin Drugs and iRGD Tumour Homing Peptide by Poly[ϵ -caprolactone-co-(12-hydroxystearate)] Copolymer. *Biomedicines* **2022**, 10, 43. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010043>
- Kaur, I.P.; Singh, H. Nanostructured drug delivery for better management of tuberculosis. *J. Control. Release* **2014**, 184, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.009>
- Khoo, H.E.; Azlan, A.; Tang, S.T.; Lim, S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* **2017**, 61, 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- 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. <http://doi.org/10.7150/thno.7193>
- Kobayashi, S. Enzymatic ring-opening polymerization and polycondensation for the green synthesis of polyesters. *Polym. Adv. Technol.* **2015**, 26, 677–686. <https://doi.org/10.1002/pat.3564>
- Kraus, G.A.; Geraskin, I.M. Synthetic anthocyanidins from natural benzopyrans. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, 11, 1649–1650. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601101106>
- Labet, M.; Thielemans, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 3484–3504. <https://doi.org/10.1039/B820162P>
- Li, B.; Wang, L.; Bai, W.; Chen, W.; Chen, F.; Shu, C. Scope and Progress on Anthocyanins. In *Anthocyanins*; Springer: Singapore, 2021, pp. 2–17. https://doi.org/10.1007/978-981-16-7055-8_1

Bibliográfia

- Li, Y.L.; Van Cong, N.; Hsieh, M.F. Endocytosis Pathways of the Folate Tethered Star-Shaped PEG-PCL Micelles in Cancer Cell Lines. *Polymers* **2014**, *6*, 634–650. <https://doi.org/10.3390/polym6030634>
- Lichota, A.; Gwozdziński, K. Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3533. <https://doi.org/10.3390/ijms19113533>
- Lim, J.; Yeap, S.P.; Che, H.X.; Low, S.C. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*, 381. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-381>
- Lin, B.W.; Gong, C.C.; Song, H.F.; Cui, Y.Y. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1226–1243. <https://doi.org/10.1111/bph.13627>
- Liu, R.; Wang, Y.; Ma, Y.; Wu, Y.; Guo, Y.; Xu, L. Effects of the molecular weight of PLGA on degradation and drug release *in vitro* from an mPEG-PLGA nanocarrier. *Chem. Res. Chin. Univ.* **2016**, *32*, 848–853. <https://doi.org/10.1007/s40242-016-6155-x>
- Liu, X.; Zhang, D.; Hao, Y.; Liu, Q.; Wu, Y.; Liu, X.; Luo, J.; Zhou, T.; Sun, B.; Luo, X.; Xu, J.; Wang, Q.; Yang, Z.; Li, L. Cyanidin curtails renal cell carcinoma tumorigenesis. *Cell Physiol. Biochem.* **2018**, *46*, 2517–2531. <https://doi.org/10.1159/000489658>
- Llovet, J.M.; Kelley, R.K.; Villaneuva, A.; Singal, A.G.; Pikarsky, E.; Roayaie, S.; Lencioni, R.; Koike, K.; Zucman-Rossi, J.; Finn, R.S. Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2021**, *7*, 6. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Lobo, F.A.T.; Silva, V.; Domingues, J.; Rodrigues, S.; Coasta, V.; Falcão, D.; de Lima Araújo, K.G. Inclusion complexes of yellow bell pepper pigments with β -cyclodextrin: preparation, characterisation and application as food natural colorant. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 2665–2671. <http://doi.org/10.1002/jsfa.8760>
- Loftsson, T.; Hreinsdóttir, D.; Másson, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.* **2005**, *302*, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.042>
- Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A.M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.08.004>
- Malikmammadov, E.; Tanir, T.E.; Kiziltay, A.; Hasirci, V.; Hasirci, N. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *J. Biomat. Sci., Polym. Ed.* **2018**, *29*, 863–893. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1394711>
- Mallakpour, S.; Behranvand, V. Polymeric nanoparticles: Recent development in synthesis and application. *EXPRESS Polym. Lett.* **2016**, *10*, 895–913. <http://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.84>

Bibliográfia

- Malvern Panalytical, Dynamic light scattering – common terms defined. <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/whitepapers/wp111214dlstermsdefined>
- Manjili, H.K.; Malvandi, H.; Mousavi, M.S.; Attari, E.; Danafar, H. *In vitro* and *in vivo* delivery of artemisinin loaded PCL–PEG–PCL micelles and its pharmacokinetic study. *Artif. Cell Nanomed. B.* **2018**, *46*, 926–936. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1347880>
- Martinez, N.Y.; Andrade, P.F.; Durán, N.; Cavalitto, S. Development of double emulsion nanoparticles for the encapsulation of bovine serum albumin. *Colloids Surf. B* **2017**, *158*, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.033>
- Mazumdar, S.; Chitkara, D.; Mittal, A. Exploration and insights into the cellular internalization and intracellular fate of amphiphilic polymeric nanocarriers. *Acta Pharm. Sin.* **2021**, *11*, 903–924. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.019>
- Medic, N.; Tramer, F.; Passamonti, S. Anthocyanins in colorectal cancer prevention. A systematic review of the literature in search of molecular oncotargets. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 675. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00675>
- Mendoza, J.; Basílio, N.; Dangles, O.; Mora, N.; Al Bittar, S.; Pina, F. Binding of the five multistate species of the anthocyanin analog 7- β -D-glucopyranosyloxy-4'-hydroxyflavylium to the β -cyclodextrin derivative captisol. *Dyes Pigment.* **2017**, *143*, 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.04.061>
- Mi, P.; Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, tumor imaging, therapy and theranostics. *Theranostics* **2020**, *10*, 4557–4588. <http://doi.org/10.7150/thno.38069>
- Mitchell, M.J.; Billingsley, M.M.; Haley, R.M.; Wechsler, M.E.; Peppas, N.A.; Langer, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Moghimi, S.M.; Peer, D.; Langer, R. Reshaping the Future of Nanopharmaceuticals: Ad Iudicium. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8454–8458. <https://doi.org/10.1021/nn2038252>
- Mohammadinejad, S.; Kurek, M.A. Microencapsulation of anthocyanins—Critical review of techniques and wall materials. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3936. <https://doi.org/10.3390/app11093936>
- Moreno, D.; Tros de Ilarduya, C.; Bandrés, E.; Buñuales, M.; Azcona, M.; García-Foncillas, J.; Garrido, M.J. Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.006>
- Mottaghipisheh, J.; Doustimotlagh, A.H.; Irajie, C.; Tanideh, N.; Barzegar, A.; Irajie, A. The promising therapeutic and preventive properties of nthocyanidins/anthocyanins on prostate cancer. *Cells* **2022**, *11*, 1070. <https://doi.org/10.3390/cells11071070>

Bibliográfia

- Mussi, S.V.; Torchilin, V.P. Recent trends in the use of lipidic nanoparticles as pharmaceutical carriers for cancer therapy and diagnostics. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 5201–5209. <http://doi.org/10.1039/c3tb20990c>
- Nasir, A.; Kausar, A.; Younus, A. A Review on Preparation, Properties and Applications of Polymeric Nanoparticle-Based Materials. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **2015**, *54*, 325–341. <https://doi.org/10.1080/03602559.2014.958780>
- Ning, W.; Shang, P.; Wu, J.; Shi, X.; Liu, S. Novel Amphiphilic, Biodegradable, Biocompatible, Thermo-Responsive ABA Triblock Copolymers Based on PCL and PEG Analogues via a Combination of ROP and RAFT: Synthesis, Characterization, and Sustained Drug Release from Self-Assembled Micelles. *Polymers* **2018**, *10*, 214. <https://doi.org/10.3390/polym10020214>
- Noble, G.T.; Stefanick, J.F.; Ashley, J.D.; Kiziltepe, T.; Bilgicer, B. Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends Biotechnol.* **2014**, *32*, 32–45. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.007>
- Oliveira, H.; Wu, N.; Zhang, Q.; Wang, J.; Oliveira, J.; de Freitas, V.; Mateus, N.; He, J.; Fernandes, I. Bioavailability studies and anticancer properties of malvidin based anthocyanins, pyranoanthocyanins and non-oxonium derivatives. *Food Funct.* **2016**, *7*, 2462–2468. <https://doi.org/10.1039/C6FO00445H>
- Omidi, Y.; Barar, J. Targeting tumor microenvironment: crossing tumor interstitial fluid by multifunctional nanomedicines. *Bioimpacts* **2014**, *4*, 55–67. <http://doi.org/10.5681/bi.2014.021>
- Păușescu, I.; Kántor, I.; Babos, Gy.; May, Z.; Fodor-Kardos, A.; Miskolczy, Zs.; Biczók, L.; Péter, F.; Medeleanu, M.; Feczko, T. Halochromic Behavior and Anticancer Effect of New Synthetic Anthocyanidins Complexed with β -Cyclodextrin Derivatives. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8103. <https://doi.org/10.3390/ijms23158103>
- Pathak, K.; Pathak, M.P.; Saikia, R.; Gogoi, U.; Sahariah, J.J.; Zothantluanga, J.H.; Samanta, A.; Das, A. Cancer chemotherapy via natural bioactive compounds. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2022**, *19*, 4–23. <http://doi.org/10.2174/1570163819666220331095744>
- Peer, D.; Karp, J.M.; Hong, S.; Farokhzad, O.C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>
- Peng, C.L.; Shieh, M.J.; Tsai, M.H.; Chang, C.C.; Lai, P.S. Self-assembled star-shaped chlorin-core poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) diblock copolymer micelles for dual chemo-photodynamic therapies. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3599–3608. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.018>
- Piazza, R.D.; Brandt, J.V.; Gobo, G.G.; Tedesco, A.C.; Primo, F.L.; Marques, R.F.C.; Jafelici Jr, M. mPEG-co-PCL nanoparticles: The influence of hydrophobic segment on methotrexate drug delivery. *Colloid Surface A.* **2018**, *555*, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.06.076>

Bibliográfia

- Pierce™ BCA Protein Assay Kit, [Pierce™ BCA Protein Assay Kit \(thermofisher.com\)](https://www.thermofisher.com)
- Piktel, E.; Niemirowicz, K.; Wątek, M.; Wollny, T.; Deptula, P.; Bucki, R. Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. *J. Nanobiotechnology* **2016**, 14, 39. <http://doi.org/10.1186/s12951-016-0193-x>
- Pina, F.; Petrov, V.; Laia, C.A.T. Photochromism of flavylum systems. An overview of a versatile multistate system. *Dyes Pigment.* **2012**, 92, 877–889. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2011.03.033>
- Poorghorban, M.; Das, U.; Alidi, O.; Chitanda, J.M.; Michel, D.; Dimmock, J.; Verrall, R.; Grochulski, P.; Badea, I. Characterization of the host-guest complex of curcumin analog with β -cyclodextrin and β -cyclodextrin-gemini surfactant and evaluation of its anticancer activity. *Int. J. Nanomed.* **2015**, 10, 503–315.
- Prabhu, R.H.; Patravale, V.B.; Joshi, M.D. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *Int J Nanomedicine* **2015**, 10, 1001–1018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S56932>
- Raman, C.; Berkland, C.; Kim, K.; Pack, D.W. Modeling small-molecule release from PLG microspheres: effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution. *J. Control. Release* **2005**, 103, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.012>
- Rao, Y.K.; Fang, S.H.; Tzeng, Y.M. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: Modulation of human cell cycle phase distribution. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 2679–2686. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.014>
- Raval, N.; Khunt, D.; Misra, M. Microemulsion based delivery of Triamcinolone acetone to posterior segment of eye using Chitosan and butter oil as permeation enhancer: An in vitro and in vivo investigation. *J. Microencapsul.* **2018**, 35, 62–77. <https://doi.org/10.1080/02652048.2018.1425750>
- Raval, N.; Maheshwari, R.; Kalyane, D.; Youngren-Ortiz, S.R.; Chougule, M.B.; Tekade, R.K. Chapter 10 - Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. Tekade, R.K. Ed.; Academic Press, 2019; pp. 369–400. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-03215-6>
- Rizvi, S.A.A.; Saleh, A.M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm. J.* **2018**, 26, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>
- Romani, A.M.P. Cisplatin in cancer treatment. *Biochem. Pharmacol.* **2022**, 206, 115323. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115323>
- Senapati, S.; Mahanta, A.K.; Kumar, S.; Maiti, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Sig. Transduct. Target. Ther.* **2018**, 3, 7. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>

Bibliografía

- Seo, S.-J.; Chen, M.; Wang, H.; Kang, M.S.; Leong, K.W.; Kim, H.-W. Extra- and intracellular fate of nanocarriers under dynamic interactions with biology. *Nanotoday* **2017**, *14*, 84–99. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.04.011>
- Sharma, M. Transdermal and Intravenous Nano Drug Delivery Systems: Present and Future. In *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*; Mohapatra, S.S.; Ranjan, S.; Dasgupta, N.; Mishra, R.K.; Thomas, S. Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019, pp. 499–550. <http://doi.org/10.1016/b978-0-12-814029-1>
- Shoda, S.; Uyama, H.; Kadokawa, J.; Kimura, S.; Kobayashi, S. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2307–2413. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00472>
- Sinha, R.; Kim, G.J.; Nie, S.; Shin, D.M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1909–1917. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0141>
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Son, G.H.; Lee, B.J.; Cho, C.W. Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. *J. Pharm. Investig.* **2017**, *47*, 287–296. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0320-1>
- Song, X.; Wen, Y.; Zhu, J.L.; Zhao, F.; Zhang, Z.X.; Li, J. Thermoresponsive Delivery of Paclitaxel by β -Cyclodextrin-Based Poly(N-isopropylacrylamide) Star Polymer via Inclusion Complexation. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3957–3963. <http://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01344>
- Sorrenti, V.; Vanella, L.; Acquaviva, R.; Cardile, V.; Giofrè, S.; Di Giacomo, C. Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2015**, *47*, 1303–1310. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3130>
- Stockert, J.C.; Horobin, R.W.; Colombo, L.L.; Blázquez-Castro, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.* **2018**, *120*, 159–167. <http://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
- Sun, H.; Mei, L.; Song, C.; Cui, X.; Wang, P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials* **2006**, *27*, 1735–1740. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.019>
- Sun, T.; Zhang, Y.S.; Pang, B.; Hyun, D.C.; Yang, M.; Xia, Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 12320–12364. <http://doi.org/10.1002/anie.201403036>
- Suri, S.; Rusan, G.; Winter, J.; Schmidt, C.E. Chapter I.2.19 Microparticles and nanoparticles. In *Biomaterial Science* (Third Edition); Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.;

Bibliografía

- Schoen, F.J.; Lemons, J.E. Eds.; Academic Press, 2013; pp. 360–388. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00034-6>
- Tang, S.; Li, Y. Sorafenib-Loaded Ligand-Functionalized Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles for Enhanced Therapeutic Effect Against Liver Cancer. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, 19, 6866–6871. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16936>
- Tang, X.; Lyu, Y.; Xie, D.; Li, A.; Liang, Y.; Zheng, D. Therapeutic Effect of Sorafenib-Loaded TPGS-b-PCL Nanoparticles on Liver Cancer. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2018**, 14, 396–403. <https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2529>
- Tian, J.; Min, Y.; Rodgers, Z.; Man Au, K.; Hagan, C.T.; Zhang, M.; Roche, K.; Yang, F.; Wagner, K.; Wang, A.Z. Co-delivery of paclitaxel and cisplatin with biocompatible PLGA–PEG nanoparticles enhances chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer models. *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5, 6049–6057. <https://doi.org/10.1039/C7TB01370A>
- Todea, A.; Aparaschivei, D.; Badea, V.; Boeriu, C.G.; Peter, F. Biocatalytic Route for the Synthesis of Oligoesters of Hydroxy-Fatty acids and ϵ -Caprolactone. *Biotechnol. J.* **2018**, 13, 1700629. <https://doi.org/10.1002/biot.201700629>
- Todea, A.; Otten, L.G.; Frissen, A.E.; Arends, I.W.C.E.; Peter, F.; Boeriu, C.G. Selectivity of lipases for estolides synthesis. *Pure Appl. Chem.* **2015**, 85, 51–58. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-0716>
- ud Din, F.; Aman, W.; Ullah, I.; Quershi, O.S.; Mustapha, O.; Shafique, S.; Zeb, A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *Int. J. Nanomed.* **2017**, 12, 7291–7309. <https://doi.org/10.2147/IJN.S146315>
- Uivarosi, V.; Munteanu, A.C.; Sharma, A.; Singh Tuli, H. Metal complexation and patent studies of flavonoid. In *Current Aspects of Flavonoids: Their Role in Cancer Treatment*; Singh Tuli, H. Ed.; Springer: Singapore, 2019; pp. 39–89. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5874-6_4
- Vilanova, N.; Solans, C. Vitamin A Palmitate– β -cyclodextrin inclusion complexes: Characterization, protection and emulsification properties. *Food Chem.* **2015**, 175, 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.015>
- Wang, Y.; Chen, S.; Yang, X.; Zhang, S.; Cui, C. Preparation optimization of bovine serum albumin nanoparticles and its application for siRNA delivery. *Drug Des. Dev. Ther.* **2021**, 15, 1531–1547. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S299479>
- Weiss, G.J.; Chao, J.; Neidhart, J.D.; Ramanathan, R.K.; Bassett, D.; Neidhart, J.A.; et al. First-in-human phase 1/2a trial of CRLX101, a cyclodextrin-containing polymer-camptothecin nanopharmaceutical in patients with advanced solid tumor malignancies. *Invest. New Drugs* **2013**, 31, 989–1000. <http://doi.org/10.1007/s10637-012-9921-8>
- Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Control. Release* **2015**, 200, 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>

Bibliográfia

- Williams, H.D.; Trevaskis, N.L.; Charman, S.A.; Shanker, R.M.; Charman, W.N.; Pouton, C.W.; Porter, C.J.H. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 315–499. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005660>
- Woodruff, M.A.; Hutmacher, D.W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
- Yildiz, Z.I.; Celebioglu, A.; Kilic, M.E.; Durgun, E.; Uyar, T. Menthol/cyclodextrin inclusion complex nanofibers: Enhanced water-solubility and high-temperature stability of menthol. *J. Food Eng.* **2018**, *224*, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.020>
- Yokoyama, T. Chapter 1 - Basic Properties and Measuring Methods of Nanoparticles. In *Nanoparticle Technology Handbook*; Naito, M., Yokoyama, T., Hosokawa, K., Nogi, K. Eds.; third edition, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 3–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64110-6.00001-9>.
- Zakharova, L.; Pashirova, T.; Kashapov, R.; Gabdrakhmanov, D.; Sinyashin, O. Chapter 24 - Drug delivery mediated by confined nanosystems: structure-activity relations and factors responsible for the efficacy of formulations. In *Nanostructures for Drug Delivery*; Andronescu, E.; Grumezescu, A.M. Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 749–806. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46143-6.00024-5>
- Zhong, Y.; Su, T.; Shi, Q.; Feng, Y.; Tao, Z.; Huang, Q.; Li, L.; Hu, L.; Li, S.; Tan, H.; Liu, S.; Yang, H. Co-Administration Of iRGD Enhances Tumor-Targeted Delivery And Anti-Tumor Effects Of Paclitaxel-Loaded PLGA Nanoparticles For Colorectal Cancer Treatment. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 8543–8560. <https://doi.org/10.2147/IJN.S219820>
- Zhu, Y.; Liao, L. Applications of nanoparticles for anticancer drug delivery: A review. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15*, 4753–4773. <http://doi.org/10.1166/jnn.2015.10298>
- Zielińska, A.; Carreiró, F.; Oliveira, A.M.; Neves, A.; Pires, B.; Nagasamy Venkatesh, D.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Eder, P.; Silva, A.M.; Santini, A.; Souto, E.B. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* **2020**, *25*, 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>

Köszönetnyilvánítás

Hálámat és köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Dr. Feczko Tivadarnak, a Funkcionális Nanorészecskék Kutatócsoport vezetőjének és Dr. May Zoltánnak, a Plazmakémiai Kutatócsoport tudományos főmunkatársának, akik lehetővé tették számomra PhD tanulmányom elvégzését. Tanulmányaim és kutatómunkám során folyamatos szakmai tanácsokkal, útmutatásokkal segítettek. Emellett külön köszönöm velem szemben tanúsított türelmüket, biztatásukat, megértésüket és legfőképp emberségüket. Példamutató emberi és szakmai magatartással szolgáltak.

Külön köszönöm a közös munka során a rengeteg szakmai segítséget, magyarázatot és baráti támogatást Babos György és Dr. Biró Emese kutatótársaimnak. Köszönöm Mirankó Mirella kolléganóm önzetlen segítségét, legfőképpen az egyetemi ügyintézés terén.

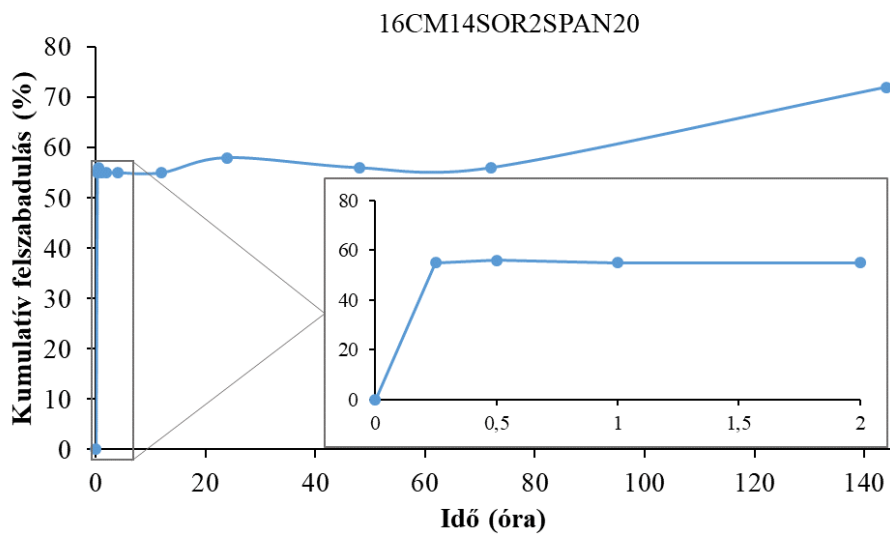
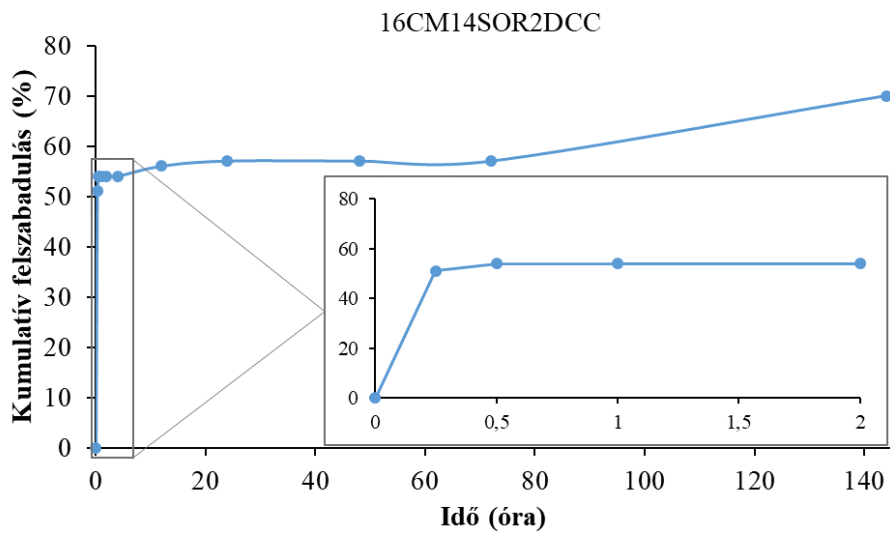
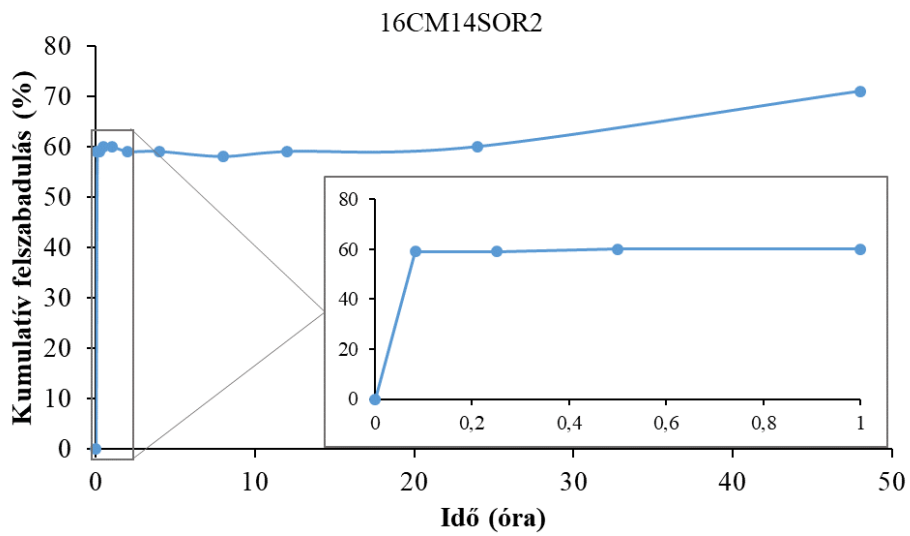
Köszönettel tartozom a Természettudományi Kutatóközpont, Anyag- és Környezetkémiai Intézet, Plazmakémiai Kutatócsoport oszlopos tagjainak, név szerint: Dr. May Zoltánnak, Dr. Szentmihályi Klárának, Dr. Bódis Eszternek, Dr. Keszler Anna Máriának, Prodán Miklósnak, a mérhetetlen kedvességükért, támogatásukért, biztatásukért és bizalmukért. Budapestre való érkezésem óta felkaroltak és önzetlenül segítettek.

Köszönöm a Természettudományi Kutatóközpontnak, valamint az MTA fiatal kutatói programjának, hogy tanulmányaimat finanszírozta és kutatóhelyet biztosított.

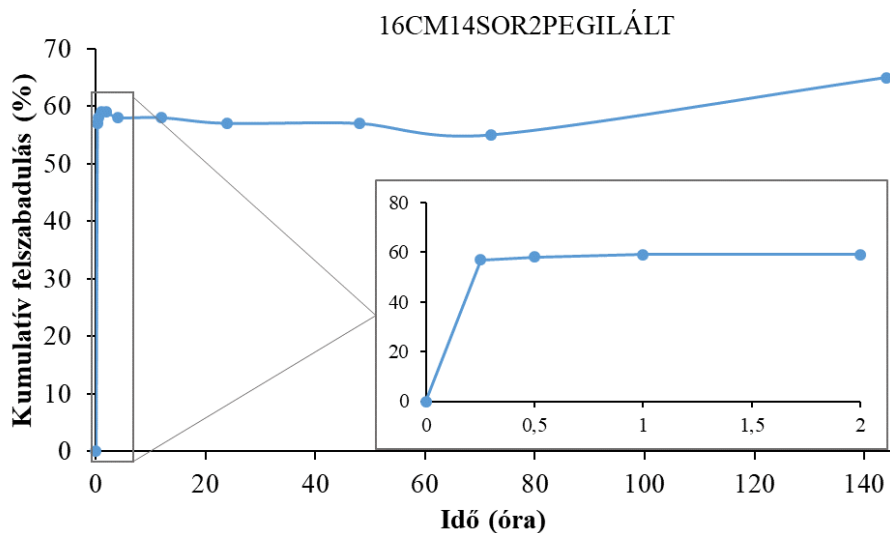
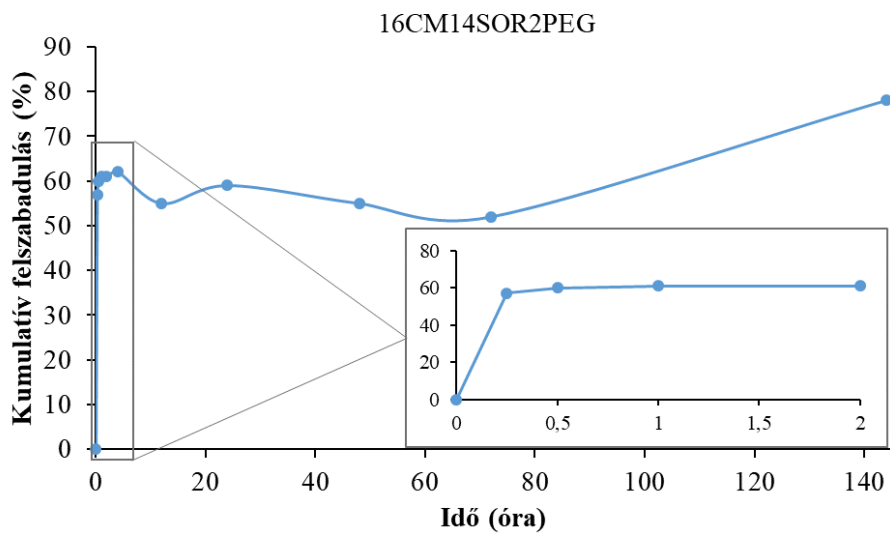
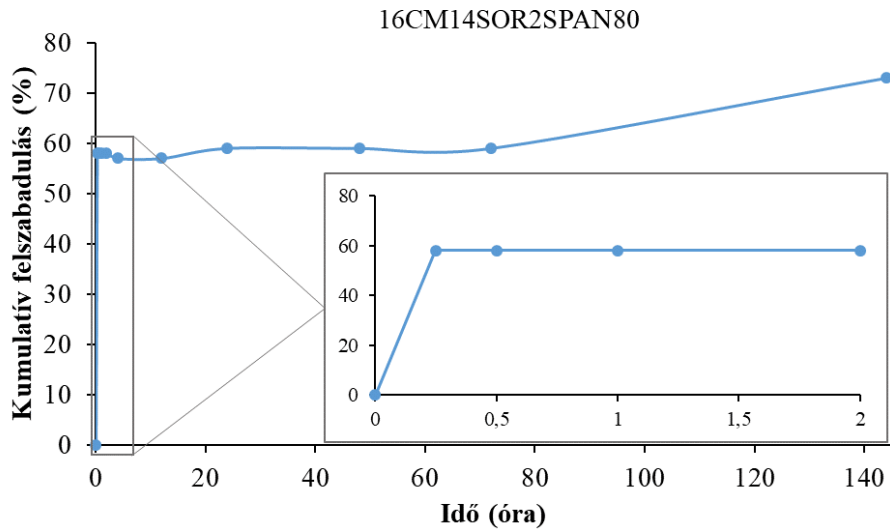
Külön köszönöm Dr. Péter Ferenc egyetemi tanárnak, a Temesvári Műszaki Egyetem Biokatalízis Kutatócsoport vezetőjének a szakmai segítséget és a közös munkát.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönettel tartozom mindazoknak, akik segítettek, támogattak, legfőképp családomnak és barátaimnak, akik a távolból is támogattak, biztattak és erőt adtak, hogy szembenézzek a kihívásokkal és nehézségekkel.

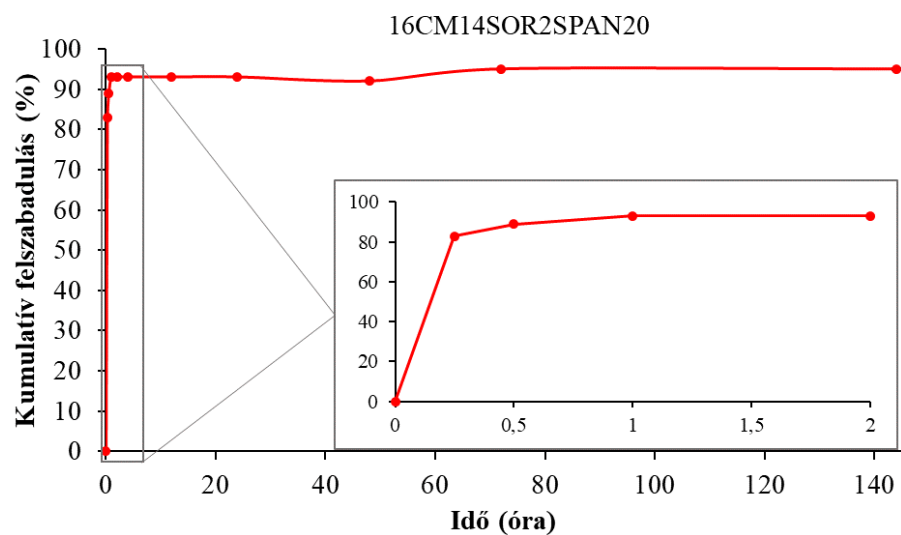
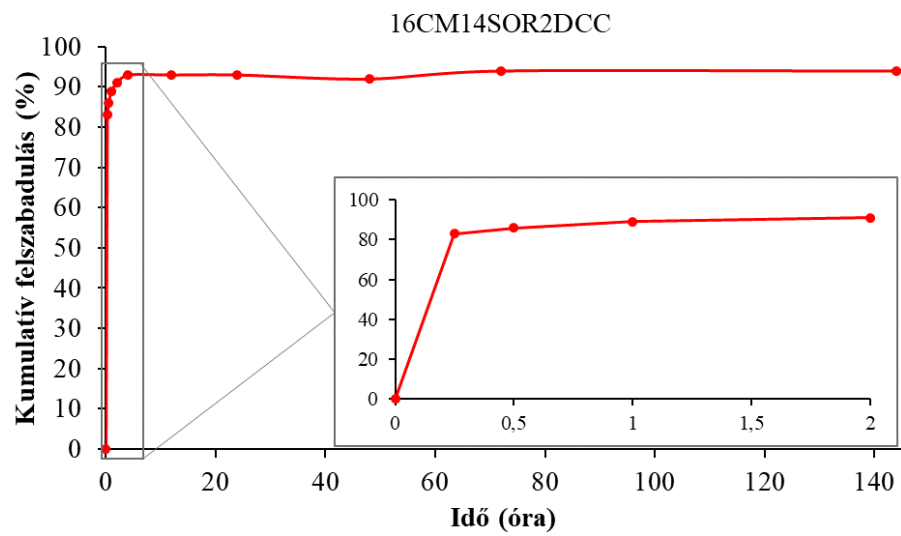
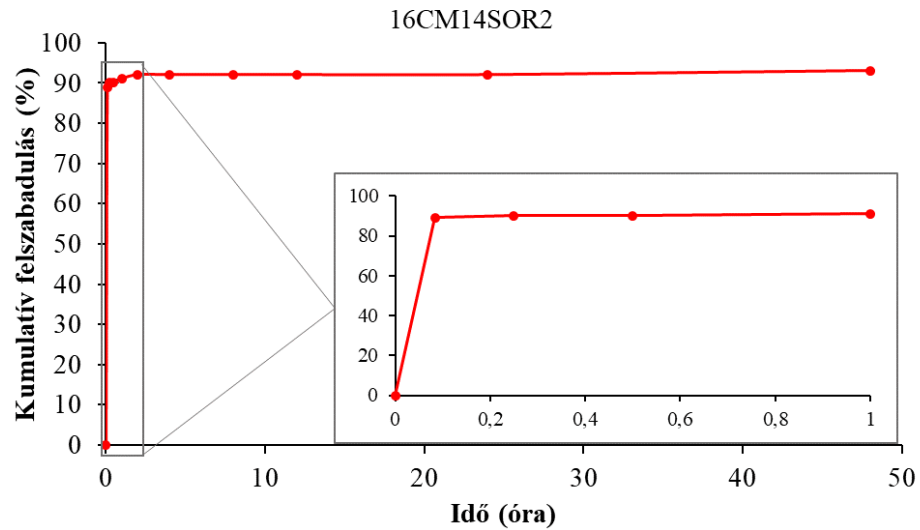
Mellékletek



M1. melléklet. A sorafenib kumulatív felszabadulása a különböző adalékanyagokkal előállított és mentes 16CM14SOR2 nanorészecskékből, Na-acetát pufferben (pH = 5,5).

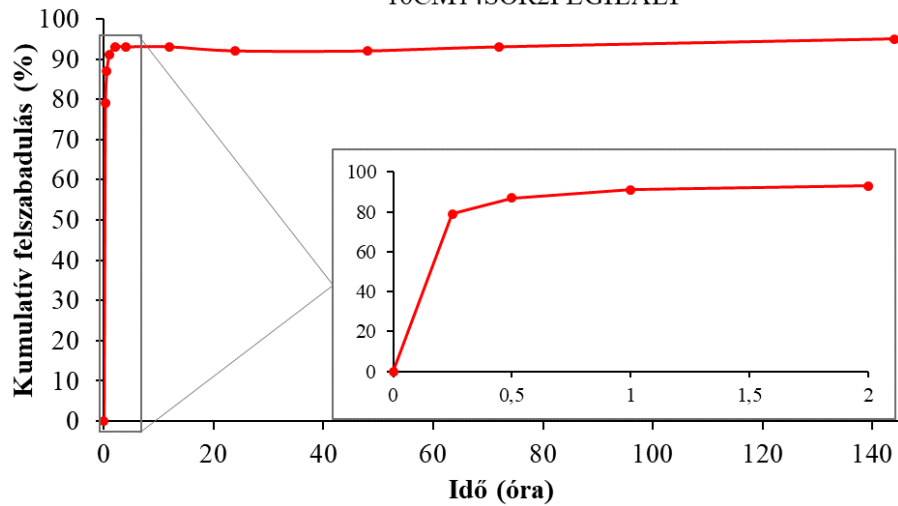


M1. melléklet (folytatás). A sorafenib kumulatív felszabadulása a különböző adalékanyagokkal előállított és mentes 16CM14SOR2 nanorészecskékből, Na-acetát pufferben (pH = 5,5).

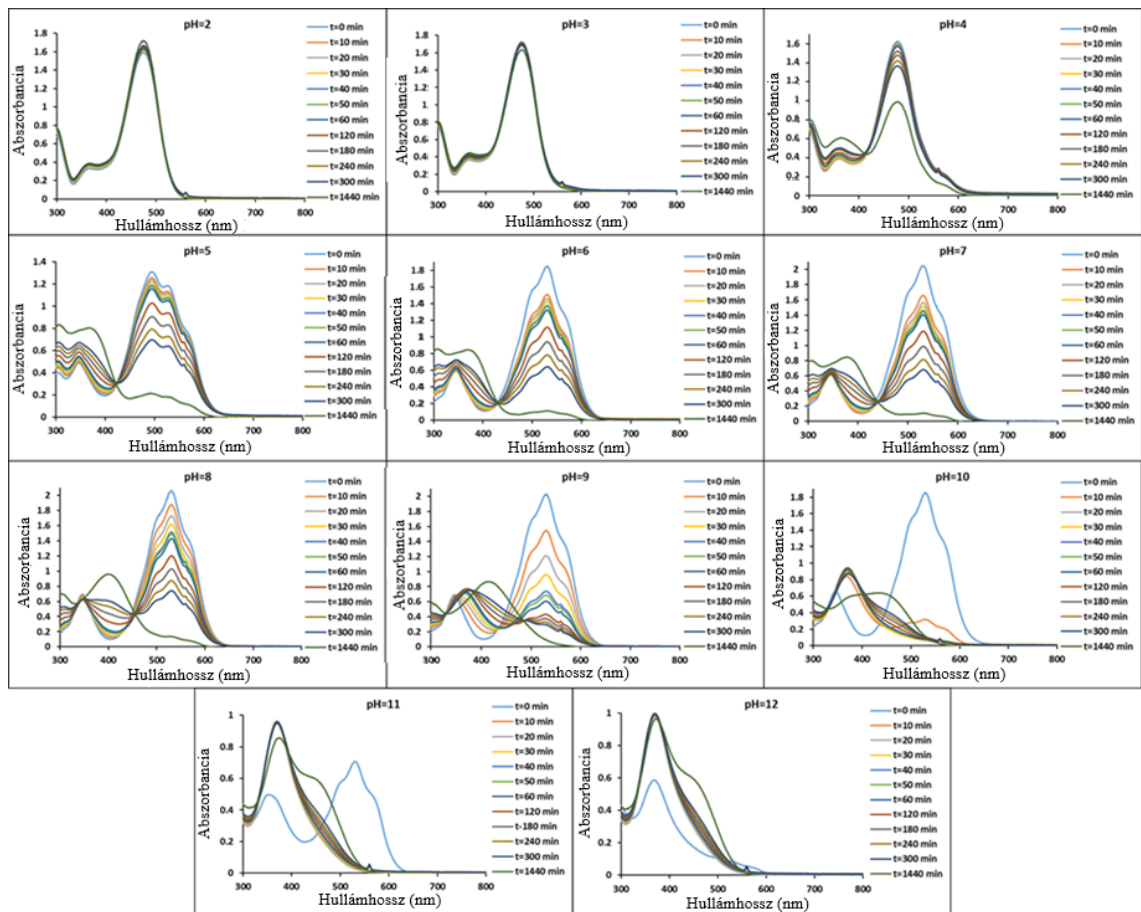


M2. melléklet. A sorafenib kumulatív felszabadulása a különböző adalékanyagokkal előállított és mentes 16CM14SOR2 nanorészecskékből, vérplazmában (pH = 7,4).

16CM14SOR2PEGILÁLT

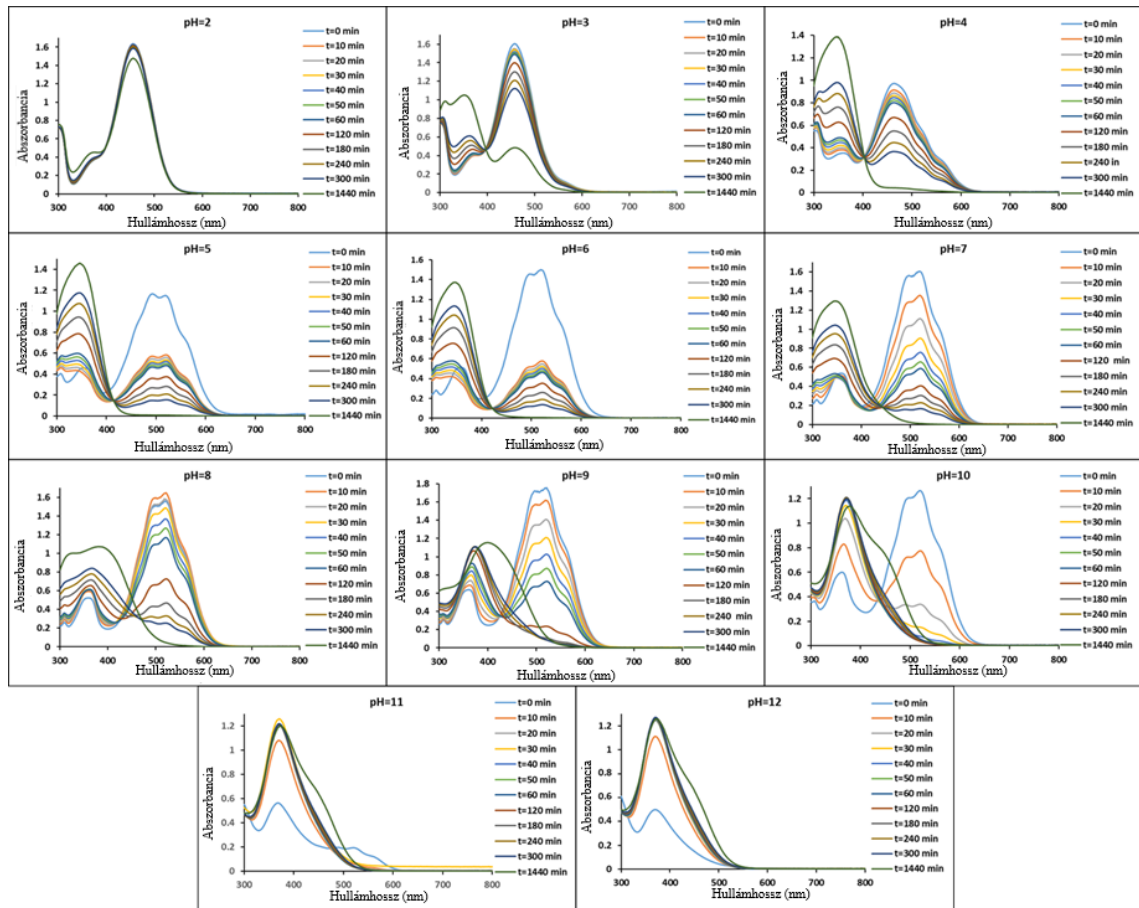


M2. melléklet (folytatás). A sorafenib kumulatív felszabadulása a különböző adalékanyagokkal előállított és mentes 16CM14SOR2 nanorészecskékből, vérplazmában (pH = 7,4).



M3. melléklet. Az 5-ös szintetikus antociánidin időfüggő UV-VIS spektrumai pH=2-12 tartományban.

Mellékletek



M4. melléklet. A 7-es szintetikus antocianidin vegyület időfüggő UV-VIS spektrumai pH=2-12 tartományban.