

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI KAR

GYÓGYSZERTECHNOLÓGIA INTÉZET

SZAKDOLGOZAT

**CÉLZOTT HATÓANYAG-FELSZABADULÁS ÉS -TRANSPORT
NANOHORDOZÓK SEGÍTSÉGÉVEL**

Készítette:

DÉR KATALIN

gyógyszerészhallgató

Konzulens:

Sipos Péter Ph.D.

egyetemi tanársegéd

Szeged

2014

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések magyarázata	iv
2. Bevezetés	4
3. Célkitűzés	5
4. Irodalmi áttekintés	5
4.1. Nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerek	5
4.2. Csoportosítás	6
4.2.1. Lipidalapú hordozók: liposzómák	6
4.2.2. Polimer nanohordozók	10
4.2.3. Nioszómák	10
4.3. Nanoméretű hordozórendszerek vizsgálata	11
4.3.1. Rezgési spektroszkópia	11
4.3.2. Termoanalitikai vizsgálatok	12
4.3.3. Karakterizációs vizsgálatok	13
5. A pancreas	15
5.1. Pancreas carcinoma	15
5.1.1. Lehetséges szelektivitási pontok	16
5.1.2. A pancreas carcinoma kezelésének klinikai gyakorlatában megtalálható liposzómális készítmények	17
5.2. Acut pancreatitis	18
6. Kísérletes rész és értékelés	21
6.1. Komponensek	21
6.2. Modellkeverékek összetétele	23
6.3. Modellkeverékek előállítási módszere	25
6.4. Modellkeverékek DSC-vizsgálata	26
6.5. Modellkeverékek Raman spektroszkópiás vizsgálata	28
6.6. Konklúzió a modellkeverékek vizsgálatai alapján	31
6.7. A kiválasztott liposzóma készítmények előállításának menete	31
6.8. A liposzómák méretanalízise, felületi töltöttsége és a méret időbeli stabilitása	33

6.9. A liposzómák DSC-vizsgálata	35
6.10. A liposzómák Raman spektroszkópiás vizsgálata	36
6.11. Liposzómák sejtenyészen történő uptake vizsgálata	38
6.12. Liposzómák sejtenyészen történő vizsgálata – Raman kémiai térképezés	40
7. Összefoglalás	43
8. Irodalomjegyzék	44
9. Köszönetnyilvánítás	46

1. Rövidítések magyarázata

ABC-transzporter = ATP-binding cassette transzporter

AFM = atomic force microscopy, atomerő mikroszkóp

API = Active Pharmaceutical Ingredient, hatóanyag

ATP = adenosin-trifoszfát

BBB = blood-brain barrier, vér-agy gát

DLS = dynamic light scattering, dinamikus lézer-fényszórás

DSC = differential scanning calorimetry, differenciális pásztázó kalorimetria

EPR = Enhanced permeability and retention effect

FDA = Food and Drug Administration

FTEM = freeze fracture transmission electron microscopy, fagyasztva töréses elektronmikroszkópia

FT-IR = Fourier transform infrared spectroscopy

GI-traktus = gasztrointesztinális traktus

GLUT-1 = glükóz facilitált transzporter

IL-2, -6, -8 = interleukin-2, -6, -8

KIR = központi idegrendszer

MLV = Multilamellar Vesicle, multilamelláris vezikula

MOF = multi-organ failure

MVV = multilamellar vesicle, multivezikuláris vezikula

NIR = közeli infravörös spektroszkópia

NMR = mágneses magrezonancia spektroszkópia

NSEM = negative stain electron microscopy

PAT = Process Analytical Tehnology

PEG = poli(etilén-glikol)

PGA = poliglikolsav

P-gp = P-glikoprotein

PLA = politejsav

PLA₂ = foszfolipáz-A₂

QbD = Quality by Design

SEM = scanning electron microscopy

SPM = scanning probe microscopy

STM = scanning tunneling microscopy

TEM = transmission electron microscopy

TfRscFv = anti-transzferrin receptor lánc-fragmentum

TNF- α = tumor nekrozis faktor α

ULV = Unilamellar Vesicle, egyrétegű vezikula

2. Bevezetés

A nanotechnológia multidiszciplináris terület, amely funkcióval rendelkező, nanoméretű (1-100 nm) objektumok tervezését és előállítását foglalja magába. A „nano” kifejezés a nanométeres mérettartományra utal. A nanopartikulumok mérete a biomolekulák (fehérjék, receptorok, vírusok, stb) méretével vethető össze, így ezek a részecskék méretüknél fogva könnyebben bejutnak a sejtekbe [1, 2]. A nanotechnológia számos ipari és tudományos területet forradalmasított, beleértve a biotechnológiát, a gyógyszer tudományt és a félvezető-ipart; egyik ígéretes területe a nanomedicina, vagyis a nanoméretű anyagokkal történő teranosztikai módszerek használata.

A hatóanyagok kedvezőtlen tulajdonságainak (toxicitás, mellékhatások, fizikai-kémiai instabilitás, kedvezőtlen biodisztribúció, gyors metabolizmus) hatásait kiküszöbölendő számos módszer létezik: a vegyület kémiai változtatása, alternatív beviteli kapuk alkalmazása és a releváns transzport-, valamint metabolizáló folyamatok befolyásolása. A gyógyszer technológia eszköztára emellett a speciális hatóanyag hordozó-rendszerek (drug-delivery systems) képében nyújt megoldást.

A nanohordozók (farmakoszóma, etoszóma, kochleát, liposzóma, nioszóma, szilárd lipid diszperziók, dendrimerek, stb) az új gyógyszer hordozó rendszerekhez tartoznak. Segítségükkel megvalósítható a hatóanyagok térben és időben programozott felszabadulása („controlled drug release”, 3. generációs készítmények), illetve a célszervbe való szelektív bejuttatása („targeted therapeutic system”, 4. generációs készítmények) [3].

A szakdolgozat témája a pancreas tumorok és a pancreatitis kezelésére szánt nanohordozók preformulációs vizsgálata. A pancreas exocrin és endokrin mirigyként funkcionáló szerv, és rendkívül fontos szerepe van a cukorháztartás fenntartásában, illetve az emésztés folyamatában. Mind a pancreas carcinoma, mind akut gyulladásos megbetegedése elfogadhatatlanul magas mortalitással jár. A tumoros elváltozás terápiájának problémája a gyors rezisztencia kialakulása, illetve a nem megfelelő hatóanyagbevitel; az akut pancreatitisnek pedig nincs specifikus terápiája, csak tüneti

kezelése van. A Szegedi Tudományegyetemen zajló, multidiszciplináris kutatási projekt (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035) e két kórkép terápiájának fejlesztését tűzte ki célul.

A nanohordozók nagy előrelépést jelentenek az orvostudományban a személyre szabott orvoslás, a minél korábbi diagnózis felállítása és egyidejűleg a célzott hatóanyagbevitel irányába. Az ipari méretű, költséghatékony előállítás érdekében azonban nagy szükség van a QbD, PAT és Risk management elvei alapján az előállítási körülmények és a termék minőségét befolyásoló faktorok mélyre ható ismeretére. Kísérletes munkám ezzel összhangban, a célzott hatóanyagleadású liposzómák és nioszómák preformulációs vizsgálataira koncentrált.

3. Célkitűzés

A Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai Intézetében végzett tudományos diákköri munkám témája liposzómák és nioszómák preformulációs vizsgálata volt. Korábbi kísérletek alapján *in vivo* körülmények között eredményesnek bizonyult összetételek továbbfejlesztését tűztem ki célul. Első lépésként - a preformulációs szakaszban kísérlettervezési módszert alkalmazva - fókuszálva a nem biodegradábilis komponensek mennyiségének csökkentésére, elhagyására, illetve egy robusztus, reprodukálható minőségű terméket adó szintézismódszer kidolgozására.

A szakdolgozat első fele a releváns irodalmi előzményeket mutatja be röviden. Csoportosítja a leggyakrabban alkalmazott **nanohordozó típusokat**, kitérve az egyes típusok jellegzetességeire. Leírja ezen nanorészecskék jellemző vizsgálati módszereit, beleértve a **rezgési spektrometriai, termoanalitikai és fizikai-kémiai karakterizációs módszereket**. A kísérletes munka második, fő célpontjához kapcsolódóan bemutatja a hasnyálmirigy élettani funkcióját és két patológias elváltozását, az **akut pancreatitist** és a **pancreas tumort**, kitérve a konvencionális kezelésre és a legújabb terápiás lehetőségekre.

A kísérletes munka főként a nioszómák és liposzómák preformulációjával foglalkozik. A szakdolgozat második fele felsorolja az elvégzett **preformulációs vizsgálatokat**, beleértve a felhasznált anyagok rövid jellemzését és a faktoriális terv alapján elkészített modellkeverékek szerkezetvizsgálatát. Bemutatja a liposzómák szintézisére alkalmazott **lipid-film hidrálási technikát**, majd bemutatja az így előállított termék karakterizációs vizsgálatainak eredményét.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerek

A mikro- és nanohordozók kialakításának kettős célja van: csökkenteni a hatóanyagok hátrányos tulajdonságait és tartós, szabályozott vagy célzott gyógyszerleadást biztosítani [4].

A régóta használt hatóanyagok újraformulálásával csökkenthetők a mellékhatások és növelhető a compliance, következésképpen csökkennek az egészségügyi kiadások. A célzott hatóanyag-leadású nanohordozók használatával csökkenthető a dózis, amely hasznos az ép szövetekre káros és drága vegyületek esetén. További előnyük, hogy érzékeny hatóanyagok (pl. polipeptid és nukleinsav típusú molekulák) is a fiziológiás hatásoktól védve, biztonságosan eljuttathatóak a terápiás célpontig ezen az úton [1].

Több újonnan felfedezett hatóanyag a rossz vízoldékonyság, következésképpen az alacsony biohasznosíthatóság miatt nem válik gyógyszerre. A hidrofób hatóanyagok oldékonyságának növelésére alkalmasak lehetnek a micellák, amelyek hidrofób magjukba való inkorporálással szolubilizálni tudják ezeket az anyagokat [1]. A vízoldékonyság szintén javítható mikroemulzióba vitellel, vagy polimer-adduktum létrehozásával. Az egyik leggyakrabban vizsgált biodegradábilis nanohordozó típus a liposzóma, alkalmazásával jelentősen csökkenthető a mellékhatások, a toxicitás és a gyors metabolizmus [4]. A liposzómákon eredetileg a biológiai membránok viselkedését tanulmányozták, de kedvező tulajdonságai révén az 1970-es évektől kezdve, mint hatóanyag-hordozó rendszert kezdtek el vizsgálni [5]. A membrándiffúzió révén egyrészt szabályozott gyógyszerleadás biztosítható, a liposzóma felületének módosításával pedig a különböző hatóanyagok a célszövetbe vagy a célsejt környékére juttathatóak [4].

A célzott hatóanyagbevitelre gyakran a szövetek patofiziológiás elváltozásai nyújtanak lehetőséget. Így például a tumorokban és a gyulladt szövetekben nő az erek permeabilitása, mindeközben romlik a nyirokkeringés, és így nő a nanohordozó rendszerek extravazációja és visszatartása. A nanoméretű rendszerek hajlamosak a retikuloendoteliális rendszerben (a máj és a lép makrofágaiban) akkumulálódni [1].

A nagyméretű liposzómák ($> 100\text{ nm}$) részére a kapillárisfalak barriert képeznek, emiatt az intravazális térben maradnak. A liposzómákat a RES rendszer fagocitáló sejtjei (monociták, máj, lép, csontvelő fix szöveti makrofágjai) felveszik, ezek közül maximális hatékonyságú a Kupfer-sejt. A RES clearance i.v. adagolással telíthető, ezzel növekszik a biológiai féléletidő, másként a felezési keringési idő. A vérből történő eliminációt a Michaelis-Menten összefüggés írja le.

A kisméretű liposzómák ($< 100\text{ nm}$) átjutnak a máj kapillárisain is, ezáltal a májparenchyma-sejtek általi clearance is érvényesülhet (ez nem szaturálható).

A nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerekkel szemben megfogalmazott követelmények:

- biológiai kompatibilitás, összeférhetőség a fiziológiás körülményekkel
- biodegradabilitás
- az API megfelelő adagjának befogadására való alkalmasság
- stabilitás (fizikai, kémiai, mikrobiológiai)
- szabályozott hatóanyag-felszabadulás
- a hordozó ne növelje a toxicitást
- a parenterális bevitelre szánt készítmények sterilizálhatóak legyenek [4].

4.2. A nanoméretű gyógyszerhordozó rendszerek csoportosítása

4.2.1. Lipidalapú hordozók: liposzómák

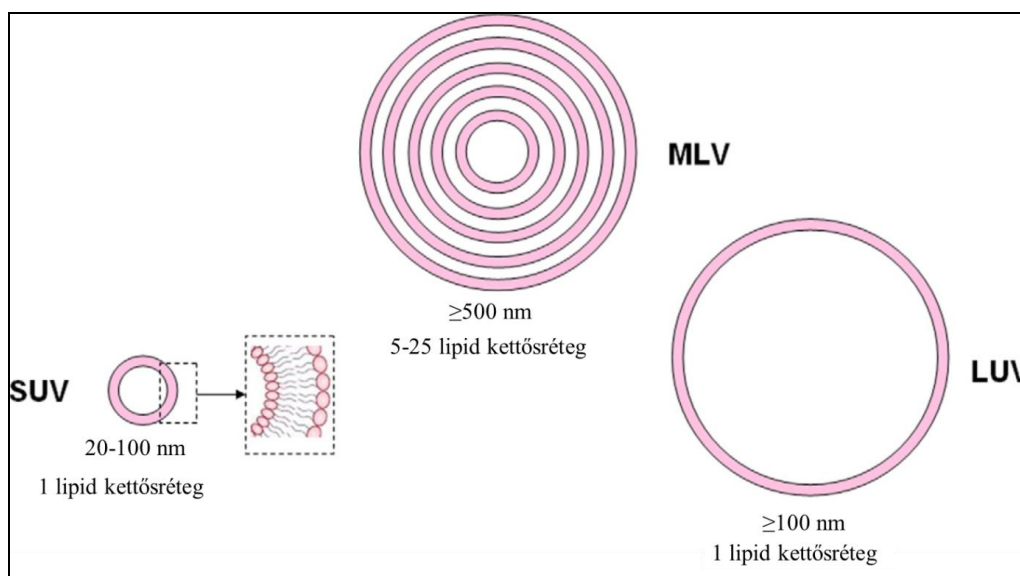
A liposzóma elnevezés a görög 'lipos' (zsír) és 'soma'(test) szavakból ered, és olyan szerkezetet jelez, amelyben egy zsíros külső burok vesz körbe egy vizes belső fázist. Az FDA definíciója szerint a liposzómák olyan mikrovezikulák, amelyek amfipatikus lipid molekulák 1 vagy több kettősrétegéből állnak és egy vagy több vizes kompartmentet zárnak közre, a liposzomás gyógyszerkészítmények pedig olyan gyógyszerkészítmények, amelyek hatóanyagot hordozó (a belső, hidrofil fázisban

oldva, vagy a lipofil karakterű lipidmembránba ágyazva) liposzómákat tartalmaznak [6].

Összehasonlítva más hatóanyag-bezáró módszerekkel (kitozán- és alginát alapú hordozók) több előnyük van, mert különböző oldékonyságú anyagok bezárására képesek, különböző módszerekkel célzott API-leadást lehet velük elérni, és ipari méretben lehet előállítani őket természetes eredetű komponensekből. A liposzómába zárt hatóanyag védve van a szabad gyököktől, a fémionoktól, a kémhatás, elektrolit-összetétel változásaitól és az enzimek hatásaitól [1].

A liposzómákat szerkezetük alapján lehet csoportosítani (**1. ábra**):

- **Multilamelláris vezikulák (MLV):** több, koncentrikus kettősrétegű membrán „héjból” állnak
- **Multivezikuláris vezikulák (MVV):** több, kisméretű, nem koncentrikusan elhelyezkedő vezikula van egy nagyobb lipid kettősrétegen belül
- **Unilamelláris vezikulák (ULV):** egy darab kettősrétegből épülnek fel [1]



1. ábra: A liposzómák csoportosítása szerkezetük alapján [1]

A *nanoliposzóma* elnevezést a nanoméretű liposzómákra használják, amelyek ugyanolyan fizikai, szerkezeti és termodinamikai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a nagyobb, kolloid vagy mikroméretű liposzómák. A liposzómák előállításához

energiabefektetés szükséges, mert a lipid-fosfolipid fázist diszpergálni kell a vizes fázisban. A liposzómák hajlamosak aggregálódásra és a koaleszcenciára (vezikulumok összeolvadása), amely a méret növekedéséhez vezethet [1].

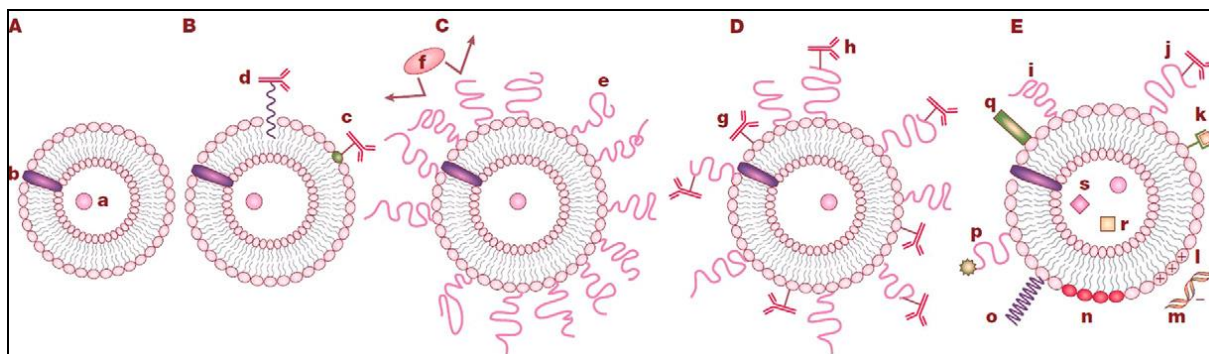
A liposzómák **felületének módosításával** lehetőség nyílik a célzott hatóanyagbevitelre:

1. a PEG-ilálás révén megnövekedett biológiai féléletidő és az EPR-effektus révén a liposzómák akumulálódnak bizonyos szövetekben
2. a felületre csatolt targetáló ligand (monoklonális antitest, vagy annak Fab fragmense, folát, transferrin) specifikusan felismeri és kötődik a sejtfelszínen lévő receptorhoz
3. a lokális viszonyokra érzékeny komponensek révén adott szövetekben széteső liposzómákat lehet előállítani (pl. pH- és hőmérsékletre szenzitív ingerérzékeny polimerekkel)
4. intracelluláris célpont esetén sejtbe penetráló peptidek segítségével lehet elérni a célzott bevitelt [7].

A hagyományos liposzómák használata limitált, mert a mononukleáris fagocita rendszer (monocyták) feladatának megfelelően hamar fölveszi őket. Kivételt jelenthet az ún. passzív targetálás módszere, ennek során a tumorszövet által átjárhatóbbá tett kapillárisfalon kis méreténél fogva a liposzóma passzív módon képes elhagyni az intravazális teret (pl. az EndoTag-1[®] készítmény). A liposzóma felületének módosításával az opszonizáció csökkenthető, így hosszabb biológiai féléletidő érhető el a véráramban. Ilyen módszer a PEG-ilálás, amelynek során PEG vagy POE származékokat kovalensen a felülethez kötnek, vagy abba beágyaznak, ennek hatására a stabilitás és a véráramban lévő féléletidő növekszik [8].

A PEG-láncok valószínűleg konformációs flexibilitásuk és vízmegkötő képességük révén taszítják az opszonizáló fehérjéket, így csökken a liposzómák felvétele a makrofágokba [7]. Prolongált keringési idejű immunoliposzómák készítése két módon történhet: az antitest beágyazásával a membránba, illetve a PEG-láncok disztális végéhez való csatolásával; ez utóbbi az antigén-antitest kötődés szempontjából előnyösebb, mivel szterikusan nem gátolt. A monoklonális antitestek magas ára miatt

egyéb targetáló molekulákat is használnak, pl. folsavat és transferrint. Tumorspecifikus célzás esetén jól alkalmazhatóak a targetáló ligandok, mert a daganatsejtek felszínén ezen receptorok gyakran nagyobb számban expresszálódnak, mint az egészséges sejteken [8].



2. ábra: Liposzómák evolúciója [9]

A **2. ábra** szemlélteti a liposzómák fejlődését az utóbbi évtizedekben. Az (A) jelű hordozó egy hagyományos liposzómát ábrázol, közbezárt terében vízóldékony hatóanyaggal (a), illetve lipidoldékony hatóanyaggal (b) a membránba ágyazva vagy szolubilizálva. A (B) jelű immunliposzóma a kettősréteg foszfolipidjeihez kovalensen kötött antitestet (c) tartalmaz. A (d) jelű antitest egy hidrofób lánc segítségével van a membránhoz horgonyozva. A megnövelt keringési idejű (stealth) liposzómákat (C) védő polimerrel (e, pl. PEG) vonják be, amely kivédi az opsonizáló ágensek (f) felülethez való kötődését. A (D) jelű immunliposzóma egyaránt hordoz targetáló antitestet, illetve védőpolimert; az antitestet a liposzóma felületéhez (g), vagy a polimer láncokhoz lehet kötni (h), ez utóbbi szterikusan előnyösebb. Az új generációs liposzómák (E) esetén a felület több módon is módosítható:

- védőpolimer (i) és targetáló ligand (j)
- diagnosztikai célú jelzés (labeling) (k)
- pozitív töltésű lipidek beágyazása, DNS-komplex képzésére képesek (m)
- ingerérzékeny polimer (o) – pl. kémiai inger hatására a kettősréteget megbontja
- sejt-penetráló peptid (p)
- vírus-eredetű elemek (q)
- mágneses részecskék (r) a mágneses liposzóma-célzáshoz

- fluoreszcens molekulák (s) a mikroszkópos analízishez [9], hatóanyag-méréséhez

4.2.2. Polimer nanohordozók

A polimerek (leggyakrabban politejsav (PLA) és poliglikolsav (PGA)) számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek (biodegradabilitás, biokompatibilitás, funkcionálizálhatóság), amelyeket nanohordozók szintézisének kihasználhatóak lehetnek. A polimer hordozóba való inkorporálás nagyobb kontrollálhatóságot jelent, pl. elérhető a hatóanyag nulladrendű kinetikával való felszabadulása. Egyes szintetikus polimerek (pl. PEG) hibrid nanohordozók előállítására is alkalmasak: a PEGilált liposzómák (stealth liposome) hosszabb keringési idővel rendelkeznek, mint a hagyományos liposzómák. A dendrimerek gazdagon elágazó makromolekulákból állnak, a hatóanyaggal komplexet képeznek vagy bezárják azt [1].

4.2.3. Nioszómák

A nemionos felületaktív anyagok kedvező áruk, stabilitásuk és könnyű tárolhatóságuk miatt a foszfolipidek alternatívái lehetnek. A nemionos felületaktív anyagból szintetizált vezikulumok a nioszómák, amelyeket az egyéb nanohordozóknál fellépő problémák (sterilizálás, ipari méretű gyártás, fizikai-kémiai stabilitás) kiküszöbölése végett fejlesztettek. Koleszterin, töltéssel rendelkező molekulák és nemionos felületaktív anyagok (pl. monoalkyl és dialkyl polyoxethylene ether) keverékéből állítják elő őket energiabefektetéssel (pl. ultrahangos diszpergálás). Hasonlóan a liposzómákhoz, képesek hidofil és hidrofób hatóanyagok bezárására, és egy- vagy többrétegű kettős szerkezetűek lehetnek. Előnyük a hosszútávú fizikai-kémiai stabilitás, költséghatékonyság, léptéknövelhető robosztus előállítás, illetve az a tény, hogy szintézisükhöz nincs szükség veszélyes szerves oldószerekre [1].

4.3. Nanoméretű hordozórendszerek vizsgálata

A termékfejlesztés nehezen tart lépést az alap kutatási és fejlesztési eredményekkel, főleg a tapasztalt fizikai stabilitási problémák és a termékminőség megjósolhatatlansága miatt. A QbD, PAT és Risk management megközelítés alapján a jövőben szükség lesz a formulálási és a gyártási folyamatok mélyebb megértésére [6].

Az FDA 2002-ben ideiglenes ajánlásgyűjteményt adott ki az ipar számára a liposzómális gyógyszerkészítményekről ('Guidance for industry on liposome drug products'). A liposzómába zárt hatóanyag eltérő farmakokinetikai profillal rendelkezik, mint a nem liposzóma alapú gyógyszerkészítményben, ezért a biztonságos alkalmazás érdekében nélkülözhetetlen a farmakokinetikai-megoszlási profil (PK/TD) megállapítása. Az ajánlás kitér arra is, hogy a nanorészecskék fizikai-kémiai tulajdonságai kritikusak a liposzómális gyógyszerkészítmények minősége és hatásossága szempontjából, ezért ezen készítmények esetében követelmény a fizikai-kémiai karakterizáció [10].

Ezek a rendszerek érzékenyek a gyártási körülmények kis változásaira is, beleértve a felhasznált lipidkomponensek minőségét és tisztaságát is. Fontos, hogy a minőséget szignifikánsan befolyásoló körülményeket azonosítani és vizsgálni szükséges már a fejlesztési fázisban. Kritikus minőségi pont a fizikai-kémiai stabilitás, ezért vizsgálni kell mind a hatóanyagot tartalmazó, mind a hatóanyagmentes liposzómákat is, valamint az *in vivo*, szervezetben megfigyelhető stabilitást is. Mivel a liposzómás készítmények jó része parenterális adagolású, a terméknek sterilnek kell lennie; a sterilizációs eljárás nagy körültekintést igényel a liposzómák fizikai és kémiai komplexitása következtében [6].

4.3.1. Rezgési spektroszkópia [11]

A rezgési spektroszkópiai módszerek a hullámhossz-tartomány szerint több típusra oszthatók fel, ezek közül a közeli infravörös (NIR) és a Raman-technika a legfontosabbak. Széles körben alkalmazható analitikai módszerek, minták egyszerű azonosításától a teljes, kvalitatív, illetve megkötésekkel kvantitatív elemzésig

használhatóak. E két módszer képes kiegészíteni egymást - általánosságban elmondható, hogy az IR-technika a poláros csoportok aszimmetrikus rezgéseire, a Raman pedig az apoláros csoportok szimmetrikus rezgéseire érzékeny.

A rezgési spektroszkópia a molekulák rezgései és az elektromágneses sugárzás közötti kölcsönhatást vizsgálja. A rezgési sávokat az intenzitásukkal, a frekvenciájukkal és az alakjukkal lehet jellemezni, amelyek az adott molekulát felépítő atomok tömegétől, geometriai elrendeződésétől és az intramolekuláris kötések erősségétől függenek. Mivel minden molekula rezgési energiája más, ezek a technikák ún. ujjlenyomat-spektrumot adnak.

A Raman és NIR spektrum vizsgálatával kvantitatív és kvalitatív információhoz juthatunk. Az AUC (csúcs alatti terület) a Lambert-Beer törvény alapján összefügg a koncentrációval (számolni kell a relatív intenzitással), a csúcsok helyzete pedig az anyagi minőségtől függ. Egy-egy karakterisztikus csúcs vagy sávtartomány megjelenése, eltűnése vagy eltolódása a funkciós csoport vagy kötőcsoport kémiai környezetének megváltozására utal. Az egyszerű mintaelőkészítés és a mérés gyorsasága révén a Raman technika alkalmas ipari folyamatok in-line ellenőrzéseinek kivitelezésére. A módszer egyik előnye, hogy nem szükséges a rezgési sávok asszignálása ahhoz, hogy a termék minőségéről információt nyerjünk; már a kapott spektrumok ujjlenyomat-tartományának egyszerű összehasonlítása elegendő hozzá.

4.3.2. Termoanalitikai vizsgálatok

A DSC (differenciális pásztázó kalorimetria) széles körben alkalmazott analitikai módszer a gyógyszertechnológiában. A gyógyszerkészítmények preformulációs vizsgálataihoz tartozik az előállítás során fellépő hőhatások (hőstressz hatására keletkező szerkezeti változások) vizsgálata.

A DSC-görbe kvalitatív és kvantitatív analízist tesz lehetővé. A liposzómák és nioszómák esetében a komponensek keverékének üvegesedési (T_g) vagy olvadási hőmérséklet-tartományáról (T_m) lehet információt nyerni. A mérési görbék minimum és maximum értékeiből a fázisátmenetek hőmérsékletértékeit kapjuk meg, a görbe

alatti terület pedig az átmenet hőigényével függ össze. Azonban nem csak a csúcsok helyzete fontos, hanem azok alakja is: ha a komponensek egyedi üvegesedési átmenetei látszódnak, jelzi, hogy arányuk nem volt megfelelő. Ideális esetben a csúcsok összeolvadnak, és a komponens-keverék egyszerre olvad és szilárdul meg.

4.3.3. Karakterizációs vizsgálatok

A liposzóma sarzsok minősége szempontjából fontos fizikai-kémiai tulajdonságok:

- morfológia (alak, felület)
- szerkezet
- felületi töltöttség eredő értéke (zeta-potenciál)
- API-tartalom (E %w/w) és bezárási hatékonyság (EE %)
- méret (átlagos hidrodinamikai átmérő és eloszlás)
- fázisátalakulási hőmérséklet
- in vitro API-leadás
- ozmotikus tulajdonságok
- fényszórás
- membrán-fluiditás [10].

A **stabilitás** (fizikai, kémiai, mikrobiológiai) nagymértékben függ a liposzómák integritásától és méreteloszlásától, mert hajlamosak a fúzióra, az aggregációra és a hatóanyag-szivárgásra. Az SUV típusú liposzómák in vitro vizes és in vivo fiziológiai körülmények között hajlamosabbak a fúzióra, mint a MLV típusú vezikulumok. A kémiai stabilitás tekintetében figyelembe kell venni, hogy a biodegradábilis lipidkomponensek hajlamosak a tárolás közbeni átalakulásra: a telítetlen zsírsavlancok oxidálódnak, illetve a telített és telítetlen zsírsavlancokat tartalmazó lipidek hajlamosak a hidrolízisre. *In vivo* stabilitást tekintve nem szabad figyelmen kívül hagyni a tényt, hogy a liposzómák interakcióba kerülhetnek a vér lipoproteinjeivel és más fehérjékkel. Ez biztonsági kockázatot is jelenthet a túl korai hatóanyag-leadás okozta hirtelen kiugróan magas vérkoncentráció révén [10].

A formulálás kritikus paramétereinek vizsgálatára számos módszert fejlesztettek ki. A dinamikus lézer-fényszórás (DLS) módszerét a nanorészecske vagy –csepp méret-análízisre használják, a mágneses magrezonancia (NMR) és az elektron paramágneses rezonancia (EPR) módszerek pedig a membrán szerkezetének és permeabilitásának vizsgálatára alkalmasak. A nanohordozók **szerkezetének, morfológiájának és méretének** analizésére elterjedten használnak elektronmikroszkópos módszereket: pl. SEM, TEM, NSEM és FTEM technikákat. Ezen módszerek előnye, hogy a minta megfelelő előkészítése után információ szerezhető arról, hogy a hatóanyag a hordozón belül milyen formában (internalizálva vagy a membránba ágyazva) helyezkedik el. Az SPM technikákhoz tartozó AFM és STM nanométeres felbontású leképezést tesz lehetővé. Előny, hogy lehetővé teszi a biológiai közegben való vizsgálatot [1].

A **méret- és méreteloszlás** befolyásolja az in vivo kinetika jellegét (tumorszövetben és a gyulladás helyén való akkumuláció) és a fizikai stabilitást. A DLS módszer kumulatív információt ad, egyszerre nagyszámú részecskéről, azonban nem ad információt az egyes részecskék alakjáról és méretéről. Az SPM és egyéb mikroszkópos technikákkal ez a probléma kiküszöbölhető, de a technika időigényes és egyszerre csak limitált számú részecske vizsgálható. A minta jellege is befolyásolja a megfelelő módszer kiválasztását, ugyanis a mikroszkópos módszer folyékony és szilárd minta vizsgálatát is megengedi, a DLS technika azonban csak folyékony közegben diszpergált részecskék mérésére alkalmas [1].

A liposzómák másik karakterisztikus tulajdonsága a felületi töltöttség, a **zeta-potenciál**. Diszperz rendszerekben a diszpergált részecskék körül adott az elektromos kettősréteg, ennek oka a felületen lévő poláris molekulák irányított elhelyezkedése vagy ionok disszociációja. A közeg áramlásakor a felülethez közeli mozdulatlan réteg és az elmozduló réteg határán elektrokinetikai potenciál (zeta-potenciál) alakul ki, amelynek alapvető szerepe van a kolloid és diszperz gyógyszerformák stabilitásában. A liposzómás készítmények esetén az előállítás, tárolás (stabilitás) és a terápiás felhasználás során is fontos szerepet tölt be a zeta-potenciál (ζ). Értéke függ a lipidkomponensektől, ill. a diszperziós közeg kémhatásától és elektrolit-összetételétől. A zeta-potenciál befolyásolja a lipidmembrán fluiditását; minél nagyobb a ζ -potenciál

értéke, annál fluidabb a membrán, és annál könnyebben lép kölcsönhatásba más molekulákkal, illetve annál könnyebben kivitelezhetőek a részecskeméret-csökkentő műveletek. Emellett a nagyobb zeta-potenciál (- 20 mV) jobb kinetikai stabilitással is jár [12].

5. A pancreas [13]

A pancreas kettős funkciójú szerv, az endokrin elválasztású Langerhans-szigetek inzulint, szomatosztatint és glukagont, míg az exokrin rész a pancreasnedvet állítja elő. Az exokrin rész acinus sejtekből és kivezető csövekből áll, és a pancreas nagyobb részét teszi ki.

A hasnyálmirigy naponta kb. 1,5 liter szekrétumot termel, amely proteolitikus (pl. tripszinogén, kimotripszinogén), lipolitikus (pl. pancreaslipáz, PLA₂), nukleotid-bontó (DNase, RNase) és szénhidrát-bontó (α -amiláz) enzimeket, valamint tripszin-inhibítort és bakteriosztatikus anyagokat tartalmaz. A proteolitikus enzimeket zimogének formájában termelik az acinussejtek (inaktív forma); ezek az enzimek (fiziológias esetben) csak a vékonybélben, az enteropeptidázok és a tripszin hatására aktiválódnak. A pancreasnedv bázikus kémhatásáért a bikarbonát (HCO₃⁻) felel, amelynek funkciója a duodenumba jutott gyomorsav semlegesítése révén az emésztőenzimek részére optimális kémhatás biztosítása.

A pancreas öt különböző mechanizmussal gátolja az önemésztődést, ezek a következők:

- a proteázok inaktív formában (zimogén) való előállítása
- a zimogének aktiválása a duodenumban zajlik
- az acinussejtek membránja átjárhatatlan a fehérjék számára
- az acinussejteken belül intracelluláris tripszininhibitor van, de a citoplazma savas kémhatása és ionösszetétele is gátolja az enzimaktivitást
- az aktivált enzimeket a sejten belül speciális proteázok és lizoszómális enzimek bontják le.

5.1. Pancreas carcinoma

A tumordiagnosztika és -terápia gyors fejlődése ellenére a hasnyálmirigy daganatos elváltozása továbbra is magas halálozási aránnyal rendelkezik. Az exokrin hasnyálmirigy adenocarcinómája a 4. vezető ráktípus az USA-ban [2]. Ennek legfőbb oka a kifejezett kemorezisztencia, a kemoterapeutikumok rövid felezési ideje és a nem megfelelő hatóanyagbevitel. További nehézséget jelent, hogy a korai tünetek gyakran hiányoznak, ezért csak a betegek 9-15%-át diagnosztizálják időben [14].

A tumorsejtekbe való célzott hatóanyagbevitel jelentősen megnövelné az alkalmazott citotoxikus szerek szelektivitását, csökkentené a mellékhatásokat és a toxicitást, és megelőzhető lenne a dózis folyamatos emelésének szükségessége. Az új kemoterápiás szerek kutatása mellett tehát az új hatóanyaghordozó-rendszerek fejlesztése is kedvező eredményeket hozhat a terápia javításában. Jelenleg több, már az FDA által elfogadott liposzóma alapú készítmény I. és II. fázisú klinikai vizsgálata zajlik *pancreas carcinoma* indikációban, pl. Lipoplatin[®] (cisplatin tartalmú SUV típusú liposzómák), Caelyx[®] (doxorubicin tartalmú SUV), EndoTAG-1[®] (paclitaxel tartalmú LUV). A diagnosztikus módszerek fejlesztésére is alkalmasak lehetnek a liposzómák, MRI kontrasztanyagot vagy fluoreszcens festékeket tartalmazó nanohordozók alkalmazásával. A jövőben e két funkció (korai diagnosztika és terápia) kombinálásával jelentős előrelépést lehetne elérni a pancreas tumor legyőzése érdekében [14].

5.1.1. Lehetséges szelektivitási pontok

Általánosságban elmondható, hogy a tumor környezete kismértékben eltér a normál szövetektől a kémhatás, hőmérséklet, az érfal permeabilitása és a szöveti nyomás tekintetében, amely lehetővé teszi kémiai vagy biológiai ingerérzékeny nanohordozók használatát. A tumorvaszkulátúra nagyszámú anionos molekulát (glikoproteineket) tartalmaz, ezért a solid tumorok elektrosztatikus úton visszatartják a kationos liposzómákat. Ezt a mechanizmust használja ki a kationos liposzómákba zárt paclitaxel készítmény, az EndoTAG-1[®] [14].

A célzott hatóanyagbevitel másik megközelítési módja (aktív targetálás) a sejtek felszínén lévő receptorok célzása. Ez történhet specifikus monoklonális antitestekkel, vagy a liposzóma membránba ágyazott endogén anyagokkal. A tumorsejtek felszínén lévő GLUT-1 transzporter (glükóz facilitált transzportere) több daganattípusban is megtalálható, és a transzporter expressziójának növekedése a malignitással van kapcsolatban. A malignus sejtek GLUT-1 transzportere felelős a glükózfelvétel nagy részéért, amely fedezi a gyorsan osztódó sejtek magas energiaigényét [15].

A pancreastumor sejteinek felszínén szintén nagyszámban fordulnak elő szomatosztatin-receptorok; *octreotiddal* történő felület-modifikálással bizonyítottan növelni lehet a hatóanyag-akkumulációt. Az anti-transzferrin receptor lánc-fragmentumot (TfRscFv) tartalmazó immunoliposzómák kombinálják a monoklonális antitestek targetáló tulajdonságait, másrészt sztérikusan stabilizáltak, így előnyös farmakokinetikai viselkedéssel rendelkeznek. A fragmentum könnyebben penetrál a daganatsejtekbe, mint az intakt antitest vagy a transzferrin molekula [14].

Érdekes lehetőséget kínál a tumorterápiában a radioszenzitizáló anyagok liposzómába való inkorporálása. Pancreastumor-szelektív immunoliposzómákkal ^{10}B atomok specifikusan a daganatsejtekbe juttathatóak, majd termikus neutron-besugárzással kombinálva szelektíven, a daganat környezetének károsítása nélkül elpusztíthatóak malignus sejtek [14].

5.1.2. A pancreas carcinoma kezelésének klinikai gyakorlatában megtalálható liposzómális készítmények [14]

A platinaszármazékok több carcinoma-típusban az elsővonalbeli szerek közé tartoznak. Jellemző mellékhatásuk a hányás, hányinger és a perifériás neurotoxicitás, és gyakran kialakul rezisztencia [16]. A rezisztencia és a mellékhatások kivédése érdekében számos ígéretes nanohordozót fejlesztettek ki, köztük liposzómákat, dendrimereket és nanocsöveket. Ilyen készítmény a Lipoplatin[®] (cisplatin tartalmú liposzóma), amely az EPR-effektus révén a tumorszövetben halmozódik fel. Ehhez hasonlóan oxaliplatin tartalmú liposzómákat is vizsgálnak (Lipoxal). Az EndoTAG-1[®]

érdekessége, hogy míg a paclitaxel, mint hatóanyag ellen gyakori a rezisztencia, a liposzómába zárt paclitaxel esetén ez a tulajdonság hiányzik. Ennek magyarázata valószínűleg az, hogy nemcsak a hatóanyag célzottan a daganatsejtbe való bejuttatása áll a hatás mögött, hanem az EndoTAG-1[®] érkárosító hatása is nagy szerepet játszik. A doxorubicin liposzómába való zárása már régóta megoldott (a Doxil[®] volt az első, FDA által engedélyezett liposzómális gyógyszerkészítmény 1995-ben [6]), és az AIDS-hez társuló Kaposi-szarkóma indikációval használják a terápiában. A Doxil[®] és Caelyx[®] készítmények PEG-ilált liposzómába zárt doxorubicint tartalmaznak, és szolid tumorok, köztük a pancreas carcinoma indikációjában klinikai vizsgálatok zajlanak. Vincristin, gemcitabin, adriamycin, irinotekán és 5-fluorouracil tartalmú liposzómális készítmények preklinikai vizsgálata is zajlik.

5.2. Acut pancreatitis

Az *akut pancreatitis* a hasnyálmirigy gyulladásos megbetegedése. Leggyakoribb oka az epeutak epekő okozta elzáródása, illetve a krónikus alkoholabúzus, de meg kell említeni az intraductális tumort is, amely obstrukció révén okoz pancreatitist. Mivel a zsírsavak toxikusak a pancreas acinus sejtjeire, hyperlipidémia is okozhat akut pancreatitist. A zsírsavak gátolják a mitokondriumok funkcióját, így csökkentve a sejt ATP-koncentrációját, amely az ATP-függő Ca-csatornák gátlásához, következetesen az intracelluláris Ca-szint növekedéséhez vezet [17]. Egyéb okok: bakteriális (*Mycoplasma*, *Legionella*) és virális fertőzés (*Cytomegalovírus*, *Coxsackie*), iatrogén (ERCP, abdominális műtét után), trauma, gyógyszer okozta (aszparagináz, azathioprin, sulfametoxazol-trimetoprim, stb) [18].

Az akut pancreatitis legfőbb tünete a hasi fájdalom, amelyet a szérum amiláz és lipáz szint emelkedése kísér. Az esetek 80%-ában a kórlefolyás enyhe, azonban a fennmaradó 20%-ban a pancreas súlyosan károsodik, és szisztémás komplikációk (sokszervi elégtelenség (MOF), parenchymás necrosis) is fellépnek. A kórkép magas mortalitással jár: egészében véve 5%, de súlyos, nekrotizáló formájánál 17%, amely fertőzés esetén 30%-ra nő [18].

Patofiziológiájának lényege a pancreas enzimek (pl. a tripszin) túl korai aktiválódása az acinus sejtekben az intracelluláris védekező mechanizmusok csökkenése miatt, ami végeredményben a hasnyálmirigy önmérsztődéséhez vezet. Az aktív tripszin aktiválja az elasztázt és a PLA₂-t, illetve a komplement és kinin útvonalakat, ezzel gyulladást indukálva. A lokális gyulladáshos mediátorok felszabadulásával (IL-2, -6, -8, TNF-α) aktiválódnak az immunsejtek; a mediátorok szintje korrelál a folyamat súlyosságával. Az erek permeabilitása nő, elősegítve ezzel az immunsejtek extravasatióját, illetve az ödéma kialakulását. A szövetkárosodást növeli a csökkent oxigénellátás és az oxidatív szabad gyökök képződése. A felszabadult mediátorok távoli szöveteket is károsíthatnak (tüdő, máj, vér-agy gát), amelyek súlyos szövödményekhez vezetnek, mint pl. akut respiratórikus distressz szindróma, vesekárosodás, stb. A lokális szövödmények közül a pancreas parenchyma nekrózis a legsúlyosabb [18].

A pancreatitis enyhe formáinak kezelése főleg kiegészítő terápiából áll (folyadékpótlás, fájdalomcsillapítás, a GI rendszer nyugalomba helyezése), de törekedni kell a kiváltó ok megszüntetésére is (pl. epekő eltávolítása). Súlyos esetben sajnos még intenzív orvosi ellátás mellett is magas a mortalitás, és ezt az elmúlt két évtizedben sem sikerült csökkenteni. Folyamatosan monitorozni kell a légző-, kardiovaszkuláris- és renális funkciókat, fontos a folyadékpótlás. Leállítják a per os táplálást, azonban ez akár komplikációhoz is vezethet, mert a táplálékmegevonás a GI-traktus nyálkahártyájának atrofijához, következetesen bél-eredetű bakteriális abdominális fertőzésekhez vezethet, amely a mortalitás legfőbb oka [19]. Bizonyítottan fertőzött nekrotizáló pancreatitis esetén antibiotikum kezelésre (imipenem, meropenem) van szükség, de az antibiotikum-profilaxis nem javítja a túlélési esélyeket [18].

Az akut pancreatitis rossz prognózist jelzi a pancreas nekrózis. Ennek megakadályozása, vagy a nekrózis apoptózissá való „átkapcsolása” jelentősen növelné a gyógyulási esélyeket. Az apoptózis (programozott sejthalál) mind fiziológiásan, mind patológiásan előfordul; lényege, hogy a sejt olyan átalakulásokon megy keresztül (összezsugorodás, DNS-leépítés), amelynek eredményeként a makrofágok

bekebelezik. A gyulladás minimális és nem jut intracelluláris anyag a környezetbe. Nekrózis csak szöveti sérülés hatására megy végbe, a sejtmembrán felszakadásával a sejtalkotó anyagok az extracelluláris térbe jutnak, amely gyulladást indukál. Az intracelluláris ATP-szint dönti el, hogy melyik folyamat megy végbe: nagyobb ATP depléciónál nagyobb eséllyel megy végbe nekrózis. Ennek oka, hogy magas ATP-koncentráció szükséges a homeosztázist fenntartó ionpumpák működtetéséhez és az apoptózist mediáló kaspáz-kaskádhoz [20].

Logikusnak tűnik tehát, hogy az intracelluláris ATP-szint növelésével meg lehetne akadályozni a nekrózist. Verma és munkatársai állatkísérletes modellen bizonyították, hogy ATP-t hordozó liposzómák segítségével sikeresen kivédhető a szívizomsejtek hipoxiás károsodása. Fiziológiás esetben az ATP intracelluláris koncentrációja 5-7 mM, de oxigén hiányában gyorsan csökken a szintje. ATP hiányában leáll az ioncsatornák működése, felborul az ionegyensúly és a sejtek kipukkadnak, ezzel tartalmukat az extracelluláris térbe juttatva. Mivel a szabad ATP a vérben gyorsan degradálódik az extracelluláris ektonukleotidázok által, illetve a molekula hidrofíl jellege miatt nehezen jut be a sejtbe, az ATP sejtekbe való bejuttatásának alternatív módja lehet a liposzómákba való integrálás. A liposzómák a hipoxiás szövetben szelektíven akkumulálódnak, és az ATP direkt sejtbe való bejuttatásán kívül a károsodott sejtmembrán „befoltozásával” is csökkentik a káros hatásokat [21].

6. Kísérletes rész

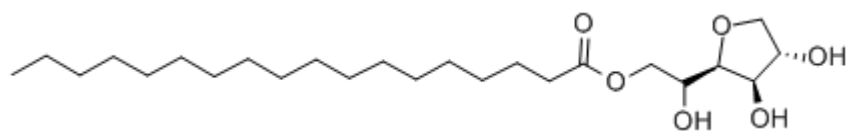
A kísérletes rész felépítése a következő:

- 6.1. komponensek ismertetése
- 6.2. összetételek táblázatos ismertetése
- 6.3 a modellkeverékek előállítási módszere
- 6.4 modellkeverékek DSC-vizsgálata
- 6.5 modellkeverékek Raman spektroszkópiás vizsgálata
- 6.6 a modellkeverékek elővizsgálatai alapján kialakult konklúzió
- 6.7 kiválasztott liposzóma készítmények előállításának menete
- 6.8. a liposzómák méretanalízise, zéta-potenciál értéke és időbeli stabilitása
- 6.9. a liposzómák DSC-vizsgálata
- 6.10. a liposzómák Raman vizsgálata
- 6.11. fluoreszcens festéket tartalmazó liposzómák sejntenyészet vizsgálata (uptake)
- 6.12. modellhatóanyagot tartalmazó liposzómák Raman kémiai térképezése

6.1. Komponensek [22, 23]

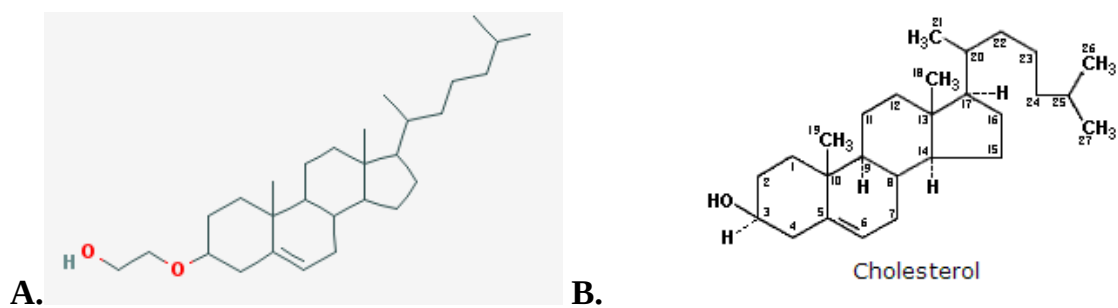
a.) Szorbitán-monooktadekanoát, a zsírsav komponens 50%-ban sztearinsav (C18:0) és 50%-ban palmitinsav (C16:0). Nemionos felületaktív anyag, nioszómák előállításához alkalmazható, nem biodegradábilis. Célunk volt a hatékony emulgeáló és micellaképző segédanyagot biodegradábilis komponensre cserélni.

Jelölése: SP-60



3. ábra: Szorbitán-monooktadekanoát [24]

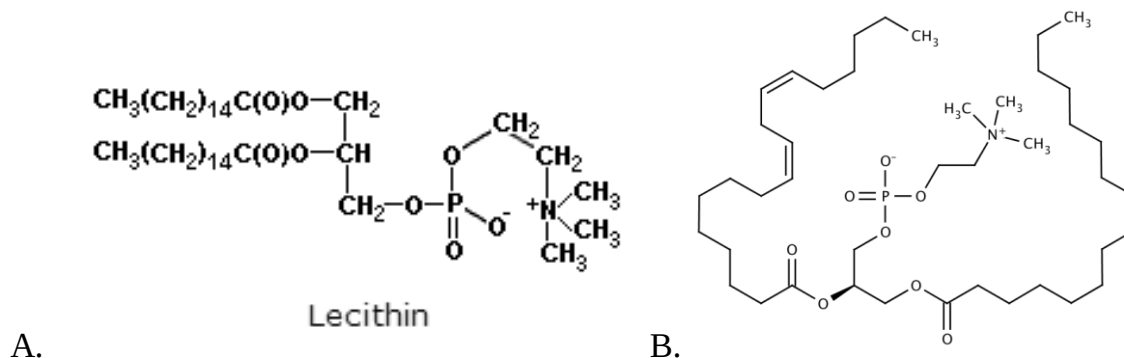
b.) Kémiai neve: polyoxyethylene-24-cholesteryl ether. Kiváló szilárdító tulajdonsággal rendelkező, emulgeáló hatású lipidkomponens. Nem biodegradábilis. Célunk volt ezen hatékony emulgeáló és micellaképző segédanyagot biodegradábilis komponensre cserélni. Jelölése: C24



4. ábra: A.: C-24 [24]; B.: Koleszterin [24]

c.) Koleszterin, szteránvázis vegyület, az emlősök sejtmembránjában fontos szerepe van, bár önmagában nem képez membránt. A lipid kettősrétegbe orientálódva poláros OH-csoportja közel helyezkedik el a foszfolipidek fej-csoportjához. A koleszterin mennyisége összefüggésben van a membrán fluiditásával. Ha a membrán több telítetlen zsírsavláncból áll (természetes lipid keverékek), azok nem illeszkednek szorosan, a membrán kevésbé rigid, és a koleszterinmolekula a lipidek közötti réseket tölti ki. Ha egy liposzóma készítéséhez ilyen lipid-keverékeket használnak, szerkezete jobban hasonlít a természetes biomembránokra [25]. Jelölése: CH

d.) **Lecithin**, kémiaiilag nem tiszta vegyület, hasonló szerkezetű anyagok keveréke. Tojássárgájából vonják ki. Jelölése: LEC.



5. ábra: A.: Lecitin [24]; B.: L- α -foszfatidil-kolin [24]

e.) **L- α -foszfatidil-kolin**, kémiai neve 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine. Tojássárgájából vonják ki. Tipikus zsírsav-összetétele: 33% palmitinsav (C16:0), 13% sztearinsav (C18:0), 31% oleinsav (C18:1), 15% linolénsav (C18:2). Jelölése: L-PC

f.) Targetáló ligandok

Targetáló ligandként glükózanalógot és aminosavat alkalmaztunk, mindkét ligand a liposzóma készítése során került a készítménybe. Biodegradábilis anyagok.

Jelölésük: Ligand GP és Ligand AA.

g.) **PEG 2000 és PEG 3000 PEG-iláló szerek**, kémiai nevük: 1,2-dipalmitoyl-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000/3000] (ammónium-só). A liposzómák felszínén védő polimer felületet alakítanak, ki, így azok képesek kikerülni az opszonizációt és prolongált keringést lehet elérni (ún. „stealth” liposzómák). Biodegradábilis anyagok. Jelölésük: P2 és P3.

6.2. Modellkeverékek összetétele

A kísérletek alapja egy korábbi TDK-munkában kifejlesztett, a vér-agy gáton in vivo körülmények között specifikusan átjutni képes nioszóma-alapú nanoméretű gyógyszerhordozó rendszer volt. Jelen kísérletes munka célja volt ezen rendszer

módosítása, a fizikai stabilitás növelése és a szintetikus komponensek biodegradábilis és biokompatibilis segédanyagokra történő cseréje.

A komponensek optimális arányát 2^3 (előkísérletek, a szakdolgozat nem tartalmazza) és 3^2 (modellkeverékek, liposzómák) típusú faktoriális terv alapján vizsgáltam. Az előkísérletek során a két változó a lecitin és az L- α -foszfatidil-kolin százalékos aránya volt a mintában.

Három **független változót** választottam (egyenként három szinten) (1. táblázat):

- X_1 : a liposzóma bilayerbe rögzített PEG-iláló szerek mennyisége (mol %)
- X_2 : a koleszterin, mint falképző, szilárdító anyag és a koleszterin-származék POE-koleszteril-éter aránya (mol %)
- X_3 : a targetáló ligand-GP mennyisége (mol %)

A **függő változók** a szemcseméret, hatóanyag-tartalom és bezárási hatékonyság paraméterek. A szakdolgozat nem tartalmazza a statisztikai értékelést, csak a kiválasztott liposzóma-összetételek jellemzőit és az *in vitro* biológiai értékmérő vizsgálatokat. A részletes statisztikai kiértékelést folyó évben összeállítani kívánt tudományos közlemény, illetve a tavaszi TDK-konferencián tartandó előadás tartalmazza.

(mol %)	X_1 P2 + P3 - tartalom	X_2 CH / C24 arány	X_3 Ligand GP-tartalom
-1	0	39 / 0	0
0	1,5	26 / 10	2,5
+1	3	13 / 20	5

1. táblázat. Kísérleti terv - modellkeverékek

A PEG-iláló szereket tartalmazó és előállított modellkeverékeket, valamint liposzómákat 2-1-től 2-9-ig sorszámoztam a 2. táblázat alapján. A Ligand-GP

segédanyaggal ellátott modellkeverékeket és liposzómákat 3-1-től 3-9-ig sorszámoztam a 3. táblázat alapján.

	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9
X ₁	-1	-1	-1	0	0	0	+1	+1	+1
X ₂	-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1

2. táblázat. PEG-iláló szereket tartalmazó és ligandmentes modellkeverékek és liposzómák sorszámozása

	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	3-7	3-8	3-9
X ₃	-1	-1	-1	0	0	0	+1	+1	+1
X ₂	-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1

3. táblázat. PEG-iláló szer mentes és ligand-GP-t tartalmazó modellkeverékek és liposzómák sorszámozása

6.3. Modellkeverékek előállítási módszere

Az első 17 db minta a komponensek összemérésével készült. Egyenként kb. 10 mg tömegű mintákat mértem be a 40 µl-es mintatartóba, amelyeket először DSC-mérésnek vettem alá, majd a felnyitott mintatartóból kivett keverékekről Raman- és NIR-spektrumokat vettem fel. A mintatartók felnyitásakor a minták homogenitását vizuálisan vizsgáltam, és mivel általában inhomogének voltak (ezt a vibrációs spektrometriás vizsgálatok is igazolták), a következő minták elkészítésénél újabb módszert használtam.

A következő szakaszban készült mintákat, a mintatartóba való bemérés után 96%-os etanolban oldottam a következő módon: a fém mintatartókat 90°C-ra melegítettem, miközben részletekben 500 µl 96%-os etanolt adtam hozzájuk. A komponensek rövid

időn belül oldódtak a forró etanolban, a szerves oldószer elpárologtatása után homogén film maradt hátra. Az így készített mintákat szintén DSC-, majd Raman-mérésnek vetettem alá.

6.4. Modellkeverékek DSC-vizsgálata

A mérések a Gyógyszertechnológiai Intézet tulajdonában lévő nagyműszerekkel történtek. A DSC-méréseket METTLER Toledo DSC készülékkel végeztem, majd a mérési eredményeket STARe szoftverrel elemeztem. A mérési protokoll a liposzóma előállítása során fellépő hőmérsékletváltozásokat utánozta, így az előkísérletek sorozatánál a műszer 20°C-ról indulva 7 °C / min fűtési sebességgel 90 °C-ra melegítette fel a mintatartót, majd azonos sebességgel hűtötte vissza a kiindulási hőmérsékletre. A ciklus még egyszer ismétlődött, így az első fűtés-hűtés során fellépő esetlegesen zavaró körülményeket (pl. párolgás miatti tömegveszteség) ki lehetett küszöbölni. A mintákat nyitott, 40 µl-es alumínium mintatartókban, Ar gáz öblítés mellett vizsgáltam.

A modellkeverék sorozatnál és a beszárított liposzómákból készült mintáknál eltérő fűtési protokollt alkalmaztam (10°C-70°C-10°C-70°C; 7 °C / min fűtési sebesség). Ennek oka az volt, hogy az előző mérési eredmények alapján nem volt szükség 70 °C fölé vizsgálandni, másrészt a liposzóma előállítása során törekedtem a szükséges hőmérséklet és idő csökkentésére.

Az 1. felfűtés a liposzóma készítési körülményeit, annak hőmérsékletét modellezi, a 2. felfűtés során pedig a késztermék liposzóma tulajdonságait modelleztem.

A **4. táblázat** tartalmazza az egyedi komponensek első és második felfűtés során megfigyelhető üvegesedési vagy olvadási hőmérsékletét, illetve a hőmérséklet-tartomány középértékét. A két endoterm csúcs közel azonos hőmérsékleten volt megfigyelhető, bomlást nem tapasztaltunk. A lecitin és az L-alfa-foszfátidilkolin nem vagy közel szobahőmérsékleten eredményezett endoterm csúcsot.

	SP-60	CH	C24	LAPC	LEC	GP	P2	P3
T_g -1.	57 °C	40 °C	50 °C	24 °C	-- °C	55 °C	55 °C	55 °C
T_g -2.	55 °C	38 °C	47 °C	28 °C	-- °C	-- °C	55 °C	52 °C

4. táblázat. Egyedi komponensek T_g hőmérsékletértékei az 1. és a 2. felfűtés során. SP-60: nemionos emulgens, CH: koleszterin, C24: koleszteril-éter, LAPC: foszfatdilikolin, LEC: lecitin, GP: targetáló ligand, P2 és P3: PEG-iláló szerek

Az **5. táblázat** tartalmazza a PEG-iláló szert tartalmazó modellkeverék sorozat DSC-vizsgálata során mért T_g hőmérsékleti értékeket. A táblázatban a független változók vonatkozó értékei is leolvashatók. A két T_g érték a 2-8 és 2-9 minták kivételével közel azonos hőmérsékleten vagy hőmérséklet-tartományban jelentkeztek, bomlást, új csúcsokat nem tapasztaltunk. Az említett 2 minta esetében a 2. felfűtés során a T_g értéke kb. 8-14 °C értékkel magasabb, ez kedvező és biztató jel, hiszen a modellkeveréket felépítő anyagok még a testhőmérséklet környékén olvadnak meg vagy kerülnek ún. üvegesedési átmenet állapotába. A biodegradábilis és biokompatibilis anyagok szerkezetüknél fogva alacsony hőmérsékleten érik el T_g és / vagy T_m értéküket. A 2. felfűtés során tapasztalható ennél magasabb hőmérsékletérték megnyugtató abból a szempontból, hogy a liposzóma várhatóan nem fog szétesni a testhőmérsékleten i.v. adagolást követően.

	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9
X₁	-1	-1	-1	0	0	0	+1	+1	+1
X₂	-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1
T_g -1.	35 °C	42 °C	40 °C	48 °C	40 °C	45 °C	-- °C	38 °C	35 °C
T_g -2.	36 °C	45 °C	45 °C	50 °C	49 °C	50 °C	51 °C	46 °C	48 °C

5. táblázat. PEG-iláló szert tartalmazó modellkeverékek T_g értékei az 1. és 2. felfűtés során

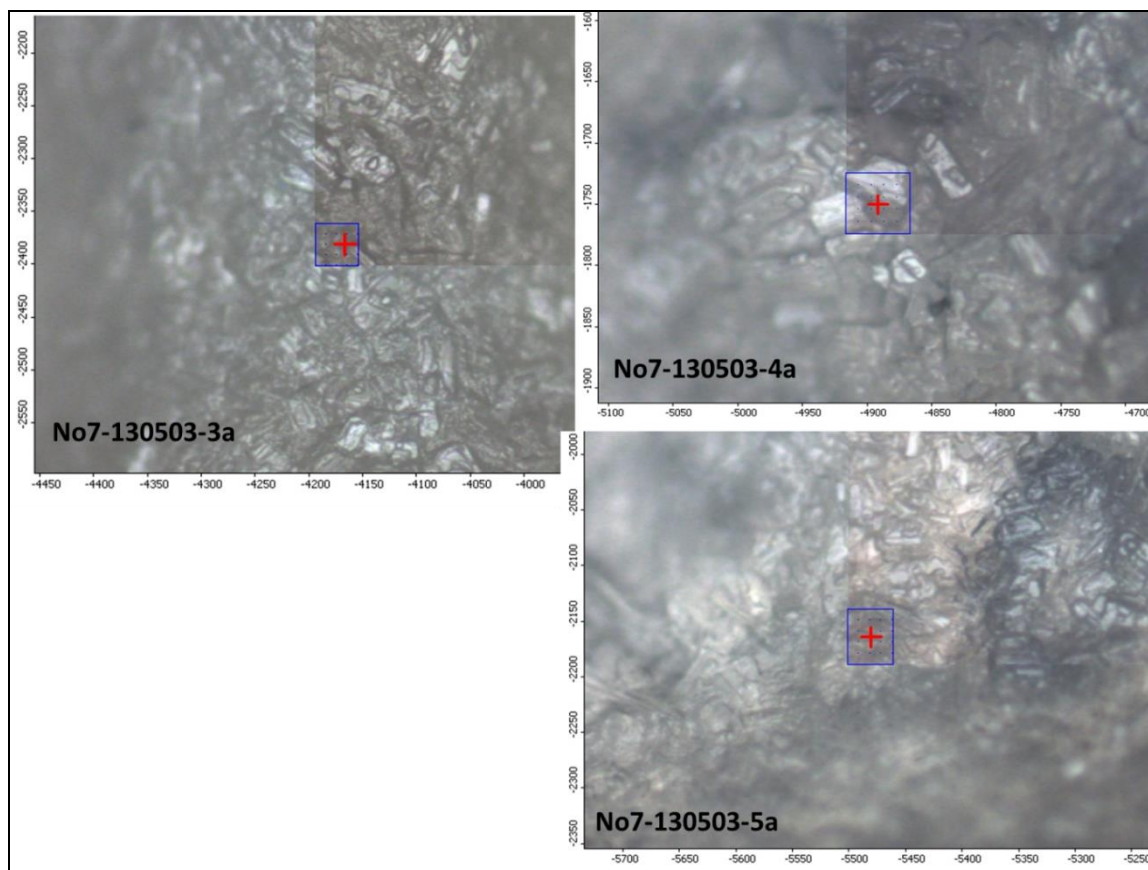
A ligand-GP segédanyagot tartalmazó modellkeverék-sorozatban a T_g értéke közel azonos volt az 1. és 2. felfűtés során minden esetben (6. táblázat). A 3-4 és 3-7 mintákat megfigyelve következtettem, hogy a koleszteril-24-éter komponens (C-24) hiányában (tehát amikor az X_2 változó a -1 szinten van) a modellkeverék nem kristályos szerkezetű, hiszen sem endoterm, sem exoterm csúcsokat nem tartalmazott a termogram. Emiatt várhatóan a 3-4 és 3-7 jelű liposzómák fizikai stabilitása nem lesz megfelelő.

	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	3-7	3-8	3-9
X_3	-1	-1	-1	0	0	0	+1	+1	+1
X_2	-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1
T_g -1.	35 °C	42 °C	40 °C	-- °C	40 °C	44 °C	-- °C	44 °C	44 °C
T_g -2.	36 °C	45 °C	45 °C	-- °C	46 °C	44 °C	-- °C	44 °C	44 °C

6. táblázat. Ligand-GP segédanyagot tartalmazó modellkeverékek T_g értékei az 1. és 2. felfűtés során

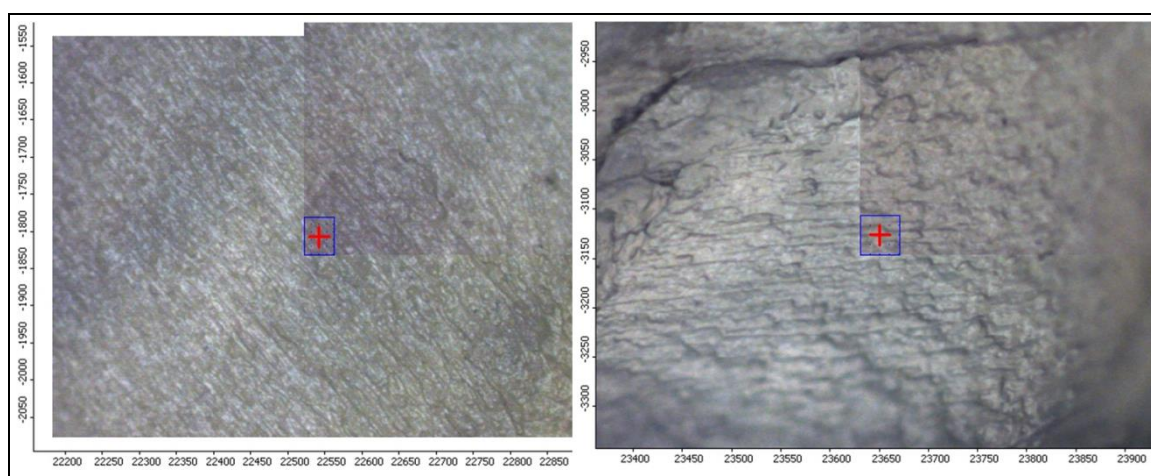
6.5. Modellkeverékek Raman spektroszkópiás vizsgálata

A minták vizsgálatát a már fentebb részletezett Raman, NIR és DSC technikákkal vizsgáltam. A Raman-méréseket DXR Raman spektrométeren végeztem. A mintákat, kivétel nélkül, a következő mérési protokollal vizsgáltam: alufóliás tárgylemezre kenve 780 nm hullámhosszon, 12 mW lézerteljesítménnyel, apertura: 50 μ m slit, spotméret: 3 μ m, 12 s exposure time ideig, 24x párhuzamos szkenneléssel, 48x háttérszkenneléssel, 3200-200 1/cm tartományban. A mérések előtt a műszerhez tartozó fénymikroszkóppal fényképet készítettem a mintáról, amely hasznos volt az inhomogenitás megállapításához.



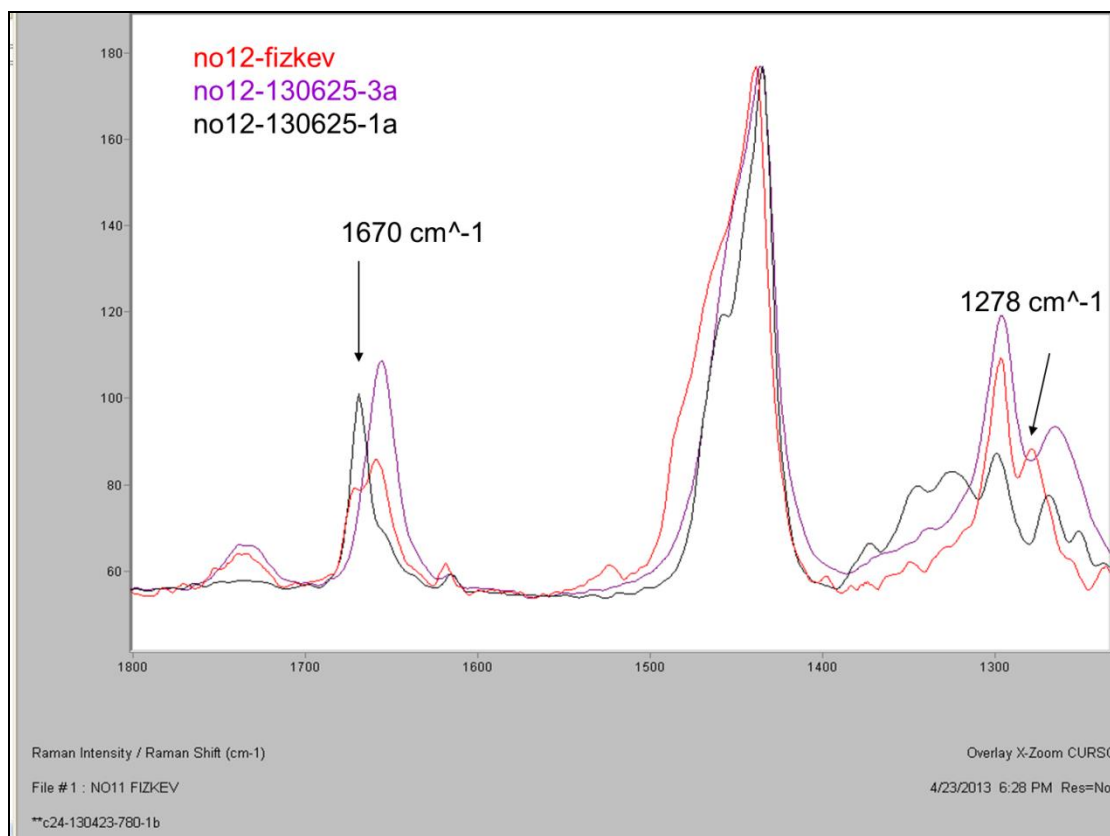
6. ábra: No.7. minta (modellkeverék 1 tagja) mikroszkópos felvétele

A **6. ábrán** látható, hogy a minta (modellkeverék sorozat) nem homogén; a három kép ugyanazon minta más-más pontján készült, több helyen jól látszódnak a (spektrum alapján koleszterin) kristályok. A **7. ábra** a modellkeverék sorozat 2-5. mintájáról készült, a felvételek alapján a minta homogén.



7. ábra: 2-5 minta (modellkeverék sorozat) Raman mikroszkópos felvétele

Ezt a felvetést a Raman-spektrumok igazolták (**8. ábra**). Azonos minták más-más pontjain a felvett spektrumok különböznek, a csúcsok asszignálása alapján pedig beazonosíthatóak a különböző komponensek.

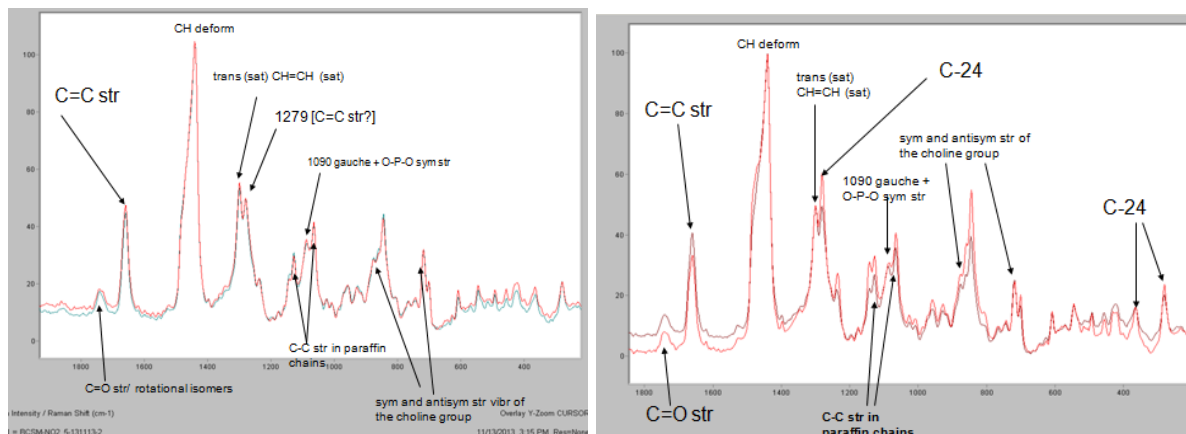


8. ábra: Raman spektrum no12 minta (előkísérlet)

A fenti spektrumon két valódi spektrum (-3a és -1a), és egy matematikai módszerekkel, a komponensek egyedi Raman spektrumaiból szerkesztett spektrum (-fizkev) részlete látható. A minták inhomogenitását a Raman-mérésekkel egyetemben az IR-felvételek is bizonyították.

Elvégeztem a modellkeverékek Raman-spektrumainak részleges asszignálását. A szerkezeti képlet alapján egyeztettem a spektrumon megfigyelhető csúcsok vagy sávok azonosítását, a **9. ábra** tartalmazza a példaként bemutatott 2-5. és 2-6. ssz. minták asszignálását. Az asszignálás rendkívül nehéz feladatnak bizonyult, hiszen nincs egzakt irodalmi előzmény vagy egyszerűen használható adatbázis. A spektrumokat összehasonlítottam, új csúcsok vagy sávok megjelenésére fókuszálva. A

modellkeverékeket tekintve új csúcsok vagy sávok nem jelentkeztek, az összetétel változtatásával párhuzamosan intenzitásbeli különbségek voltak megfigyelhetők.



9. ábra: A 2-5 és 2-6. minták Raman spektrumának asszignálása

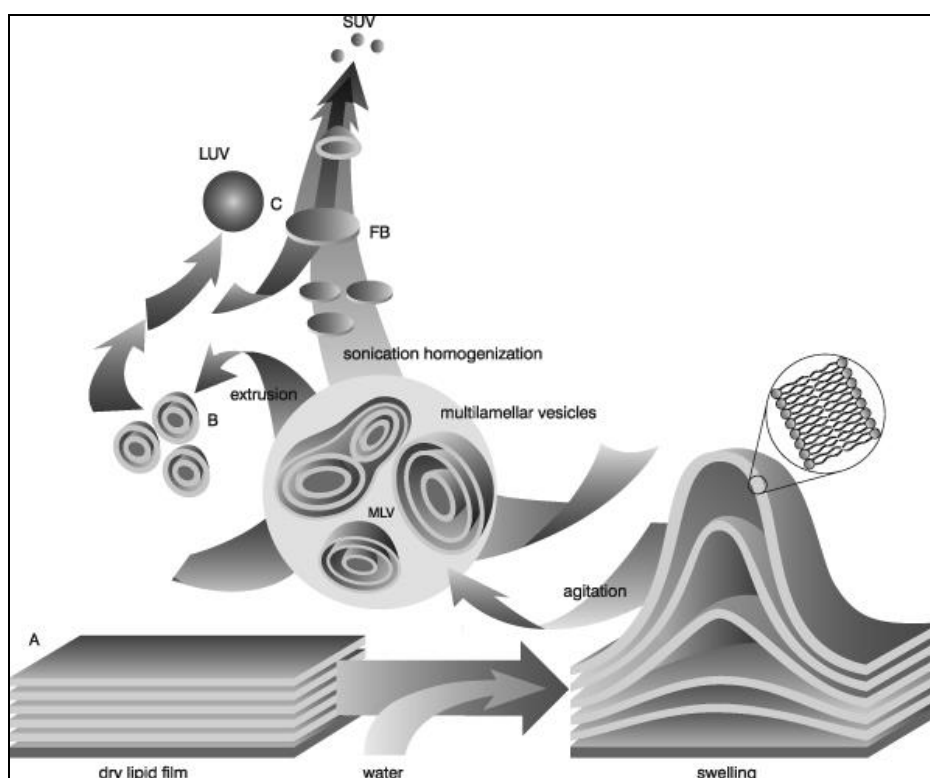
6.6. Konklúzió a modellkeverékek vizsgálata alapján

A DSC- és Raman-vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a modellkeverékeket tekintve bomlás vagy extrém rendkívüli történés nem volt tapasztalható. A magas PEG-iláló szer koncentrációt ($X_1 < -1$) és a magas ligand-GP koncentrációt ($X_3 < -1$) szem előtt tartva a 2-3, 2-6., 2-9., valamint a 3-6., 3-7., 3-8. és 3-9. sorszámú modellkeverékeket választottam ki, ezen összetételek alapján állítottam elő a hatóanyag-mentes liposzómákat.

6.7. A kiválasztott liposzóma készítmények előállításának menete

A preformulációs vizsgálatok eredményei alapján a legjobbnak ítélt összetételeket kiválasztottam, és elkészítettem a liposzóma mintákat. Előállításra több módszer is létezik, ezek közül az ún. lipid-film hidrálási módszert alkalmaztam. Ezzel a módszerrel általában LUV (large unilamellar vesicles, nagyméretű egyrétegű liposzómák) típusú liposzómákat lehet készíteni. A liposzómák végső nanoméretét a folyamat utolsó lépéseként elvégzett szűrés biztosítja.

A preformulálás első lépése a komponensek megfelelő mennyiségének bemérése volt. A szárazanyag-tartalom mintánként kb. 220 mg volt, a komponenseket analitikai mérlegen, óraüvegre mértem. A kimért komponensek 96 %-os etanollal történő gömblombikba mosása után a lombik tartalma vízfürdőn bepárlódott (65 °C). A következő szakaszban a nyomás fokozatosan csökkent (2-3 percenként 100 mbar), a gőzhőmérsékletet folyamatosan monitoroztam. Az oldószer párolgása során a gőztér hőmérséklete növekszik, ebből következtetni lehet a mintában maradt oldószer mennyiségére. A nyomás az oldószer kritikus pontjáig csökkent. A cél a minél egyenletesebb és vékonyabb lipidfilm elérése volt, emiatt a mintatérfogathoz képest nagy gömblombikot kellett választani.



10. ábra. A lipidfilm-hidrálási technika

Atmoszférikus nyomáson történt a pufferoldat (pH 6,8) adagolása a lipidfilmhez. A vízzoldékony PI fluoreszcens festék és a Raman-mérésekhez alkalmazott modellanyag ebben a hidrofíli közegben volt feloldva. A vizes közeg rétegről-rétegre bontja le a lipidfilmet, ezekből MLV típusú vezikulák alakulnak ki (**10. ábra**). A következő lépésben az MLV vezikulát extrudálással vagy ultrahangos kezeléssel (15 min) kezeltem, ezáltal LUV liposzóma keletkezett. A végső méretbeállítás

egyszerhasználatos membránszűrővel történt (pórusátmérő: 0,2 μm). Ezt követően a modell hatóanyagot tartalmazó liposzómák 17.000 1/min fordulatszám mellett 15 min műveleti idő alatt centrifugálással kiülepíthetők, így a felülúszóban lévő be nem zárt hatóanyag eltávolítható, majd a liposzóma pellet a kívánt térfogatra hígítható PBS oldattal. Az így elkészült minták zárt mintatartóban, +6 °C-on voltak tárolva.

6.8. A liposzómák méretanalízise, felületi töltöttsége és a méret időbeli stabilitása

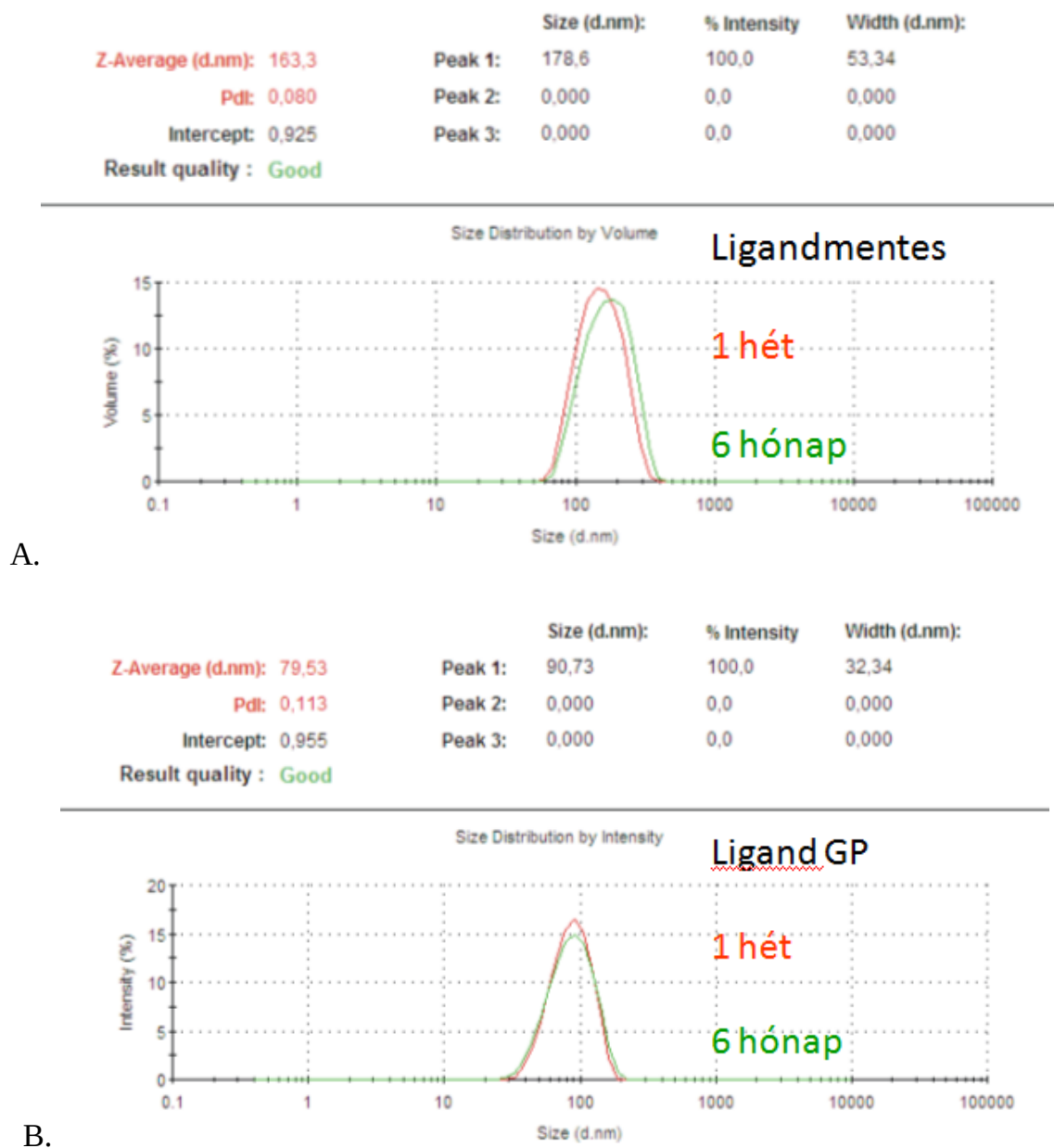
A liposzóma minták analízisét Malvern Zetasizer ZS jelű készülékkel végeztem el, (n = 9) ehhez a közeg és a liposzóma pellet optikai paramétereit lemértem refraktométerrel, megmértem a pufferoldat viszkozitását és adatbázis alapján kikerestem a dielektromos állandó értékét.

Minta sorszáma				Átlagos hidrodinamikai átmérő (nm)	Zéta-potenciál (mV)
No.	X ₁	X ₂	X ₃		
2-3	-1	+1	-	357	-0,49
2-5	0	0	-	100	-0,05
2-6	0	+1	-	65	-0,25
2-9	+1	+1	-	111	0,89
3-6	-	+1	0	61	-0,92
3-7	-	-1	+1	285	-2,43
3-8	-	0	+1	74	-11
3-9	-	+1	+1	73	0,11

7. táblázat. Kiválasztott liposzóma összetételek mérete és felületi töltöttsége

A 7. táblázat összefoglalja a liposzómák méretét és felületi töltöttségét. Az X₁ és X₃ független változók magas értékeit előtérbe helyezve a 2-3. és 3-7. minták kivételével (magas az átlagméret) valamennyi kiválasztott liposzóma összetétel alkalmasnak tűnik a további vizsgálatokhoz.

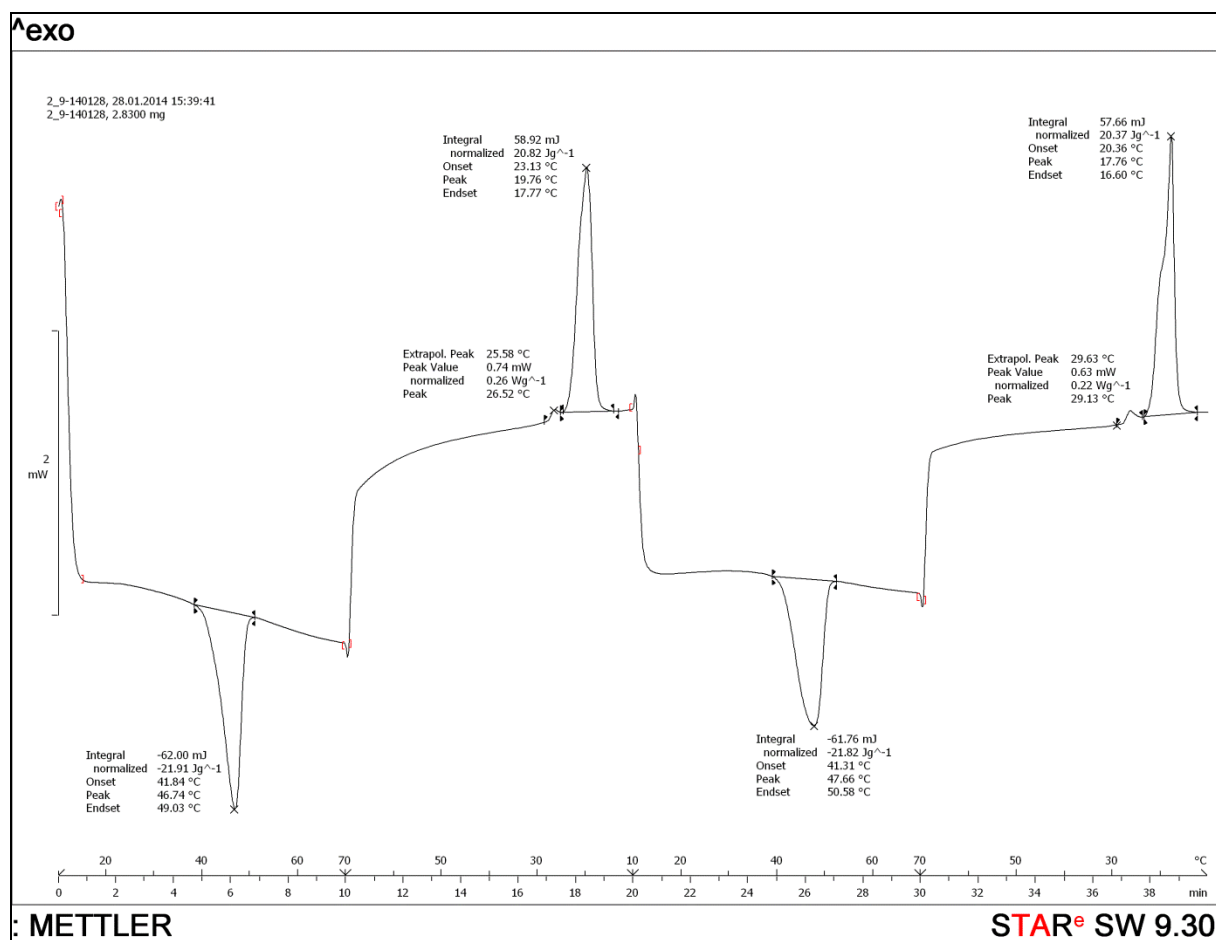
A **11. ábra** a méret időbeli stabilitását mutatja. A ligandmentes előkísérleti minták átlagos hidrodinamikai átmérője az előállítástól számított 6 hónap elteltével is ugyanazon értéket eredményezték.



11. ábra. Liposzómák méretstabilitása 1 hét és 6 hónap eltartási idő után.

6.9. A liposzómák DSC-vizsgálata

Az elkészült liposzóma-mintákat Petri-csészében szobahőmérsékleten beszárítottam. A visszamaradt félszilárd anyagot DSC-vizsgálatnak vetettem alá, amely során ugyanazt a mérési protokollt alkalmaztam, mint a modellkeverékek II. esetén. A DSC görbék alapján a 2-9 összetételű liposzóma megfelelőnek tűnt (12. ábra). A 8. táblázat alapján a termoanalitikai vizsgálat szerint a 2-9. és 3-9. ssz. mintákat választottam ki az in vitro biológiai értékmérő vizsgálatra.



12. ábra: a 2-9 liposzóma minta DSC-görbéje

Minta sorszáma				T _g – 1. felfűtési szakasz (°C)		T _g – 1. felfűtési szakasz (°C)	
No.	X ₁	X ₂	X ₃	Modellkev.	Liposzóma	Modellkev.	Liposzóma
2-3	-1	+1	-	40	38	45	38
2-5	0	0	-	40	48	49	48
2-6	0	+1	-	45	45	50	47
2-9	+1	+1	-	35	47	48	48
3-6	-	+1	0	44	44	44	45
3-7	-	-1	+1	--	--	--	--
3-8	-	0	+1	44	44	44	--
3-9	-	+1	+1	43	44	44	--

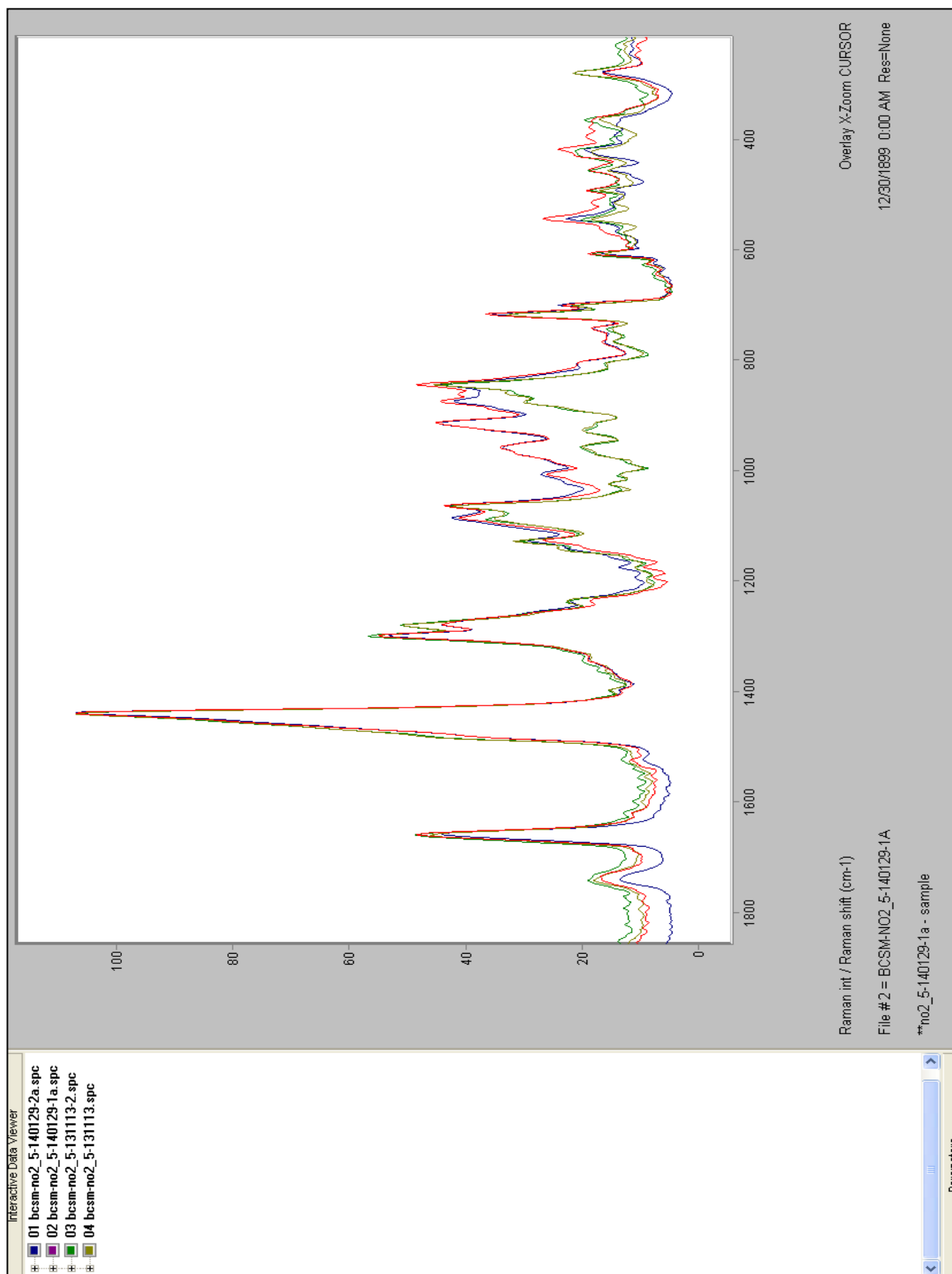
8. táblázat. Kiválasztott liposzóma összetételek és modellkeverék megfelelőik T_g értékei

6.10. A liposzómák Raman spektroszkópiás vizsgálata

A beszárított liposzóma mintákat Raman-spektroszkópiával is vizsgáltam, majd a spektrumokat GRAMS szoftverrel elemeztem. Összehasonlítva a kapott görbéket a modellkeverékek azonos spektrumjaival, azt találtam, hogy csak minimális intenzitásbeli eltérés volt az 1000-800 cm⁻¹ tartományban, amely:

1. bizonyítja a modellkeverék helyességét (azaz vizsgálatával következtethetünk a késztermék liposzóma tulajdonságaira) és
2. a liposzóma-membránban lévő gyenge másodlagos kötőerőkre utal (amely nem befolyásolja számottevően a liposzóma szerkezetét, közvetve fizikai stabilitását).

Szemléltetésképpen a 2-5-ös minta Raman-spektrumjai láthatóak, zöld színnel a modellkeverékekről, piros és kék színnel pedig a beszárított liposzómákról készült 2-2 párhuzamos mérés eredménye (**13. ábra**).



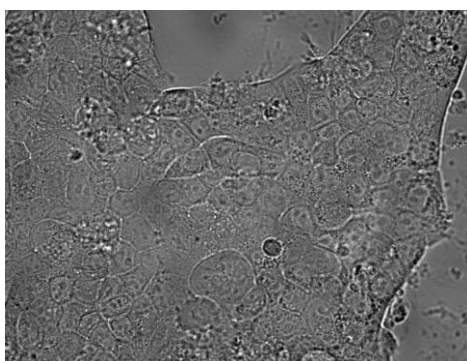
13. ábra: A 2-5 minta Raman-felvétele

6.11. Liposzómák sejttenyészetén történő uptake vizsgálata

A vizsgálatok Capan-1 sejttenyészetén történtek.

A mérés paraméterei:

in vitro Capan-1 sejttenyészet, 2-3 napos inkubáció, 80 % konfluencia, 500.000 db sejt, az inkubáció standard HEPES oldatban, szobahőmérsékleten (pH 7.4) történt. A sejtvonal Homo sapiens, kaukázusi etnicitású férfi, 40 éves, pancreas duktális adenocarcinoma sejtvonal, mikroszkópos felvétele a **14. ábrán** látható.



14. ábra. Capan-1 sejttenyészet

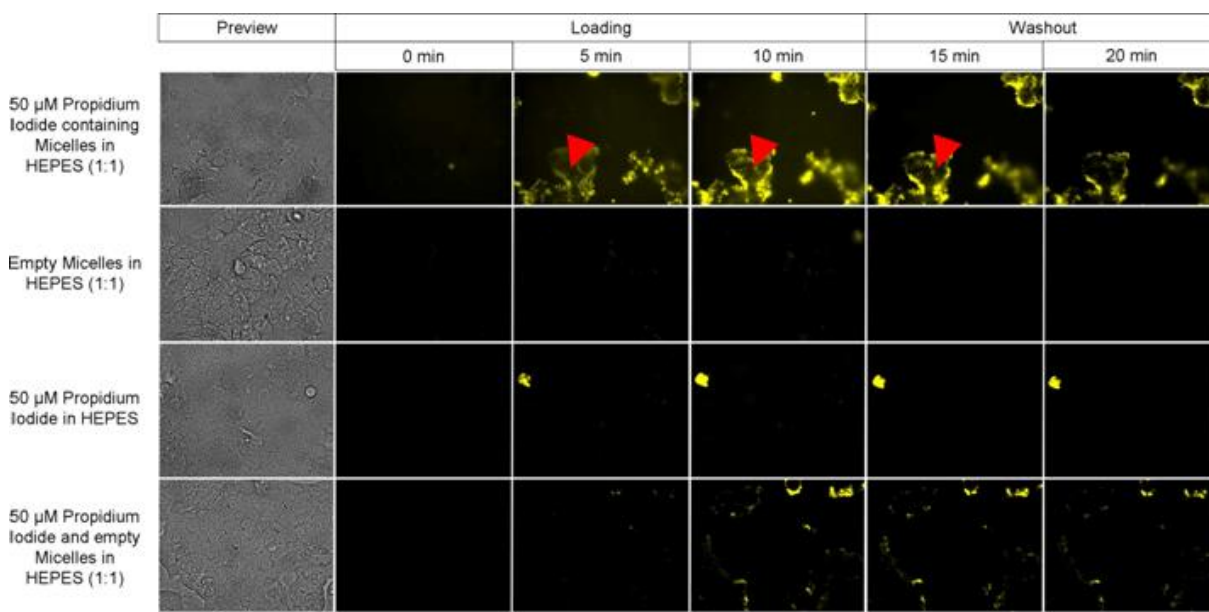
Az uptake vizsgálat során a HEPES pufferben lévő sejtekre lett felöntve a PI (propidium-jodid) fluoreszcens festékanyagot tartalmazó 2-9. jelű liposzóma (PI-koncentráció: 50 mikromol) (**15. ábra**). A propidium-jodid vízdékony festékanyag és csak az elpusztult sejtek citoplazmáját képes megfesteni, ép, egészséges sejtekbe nem jut be. A 'Loading' művelete (10 percig tart) után a sejtek felszínét friss HEPES oldattal le kell mosni, ezáltal a sejtekbe be nem jutott liposzómák eltávolíthatók. A mosás 10 percig tart, a művelet után a sárga színnel fluoreszkáló sejtekben a bezárt liposzómákat láthatjuk.

Az első sorban a PI-tartalmú liposzómák vizsgálati eredménye látható (**15. ábra**), a 20 perces művelet után a megfigyelt területen a sejtek kb. 50 %-ban tapasztaltam liposzóma bejutást.

A 2. sorban hatóanyag-mentes liposzómák felvételei láthatók, ez a minta kontrollként lett megvizsgálva, fluoreszcens jelet nem adhat.

A 3. sorban a liposzóma-mentes PI-oldat (koncentráció: 50 mikromol) felvétele látható. A megfigyelt területen csak néhány (elpusztult) sejt vette fel a fluoreszcens modell festékanyagot.

A 4. sorban a PI-oldat és a hatóanyagmentes 2-9. liposzóma elegyítésével keletkezett minta eredményei figyelhetők meg. Meglepő módon a liposzómás képesek voltak a **felületükön** megkötődött PI-ot bejuttatni a Capan-1 sejtekbe.



15. ábra. Uptake vizsgálat összefoglaló táblázatos eredményei – 2-9. liposzóma

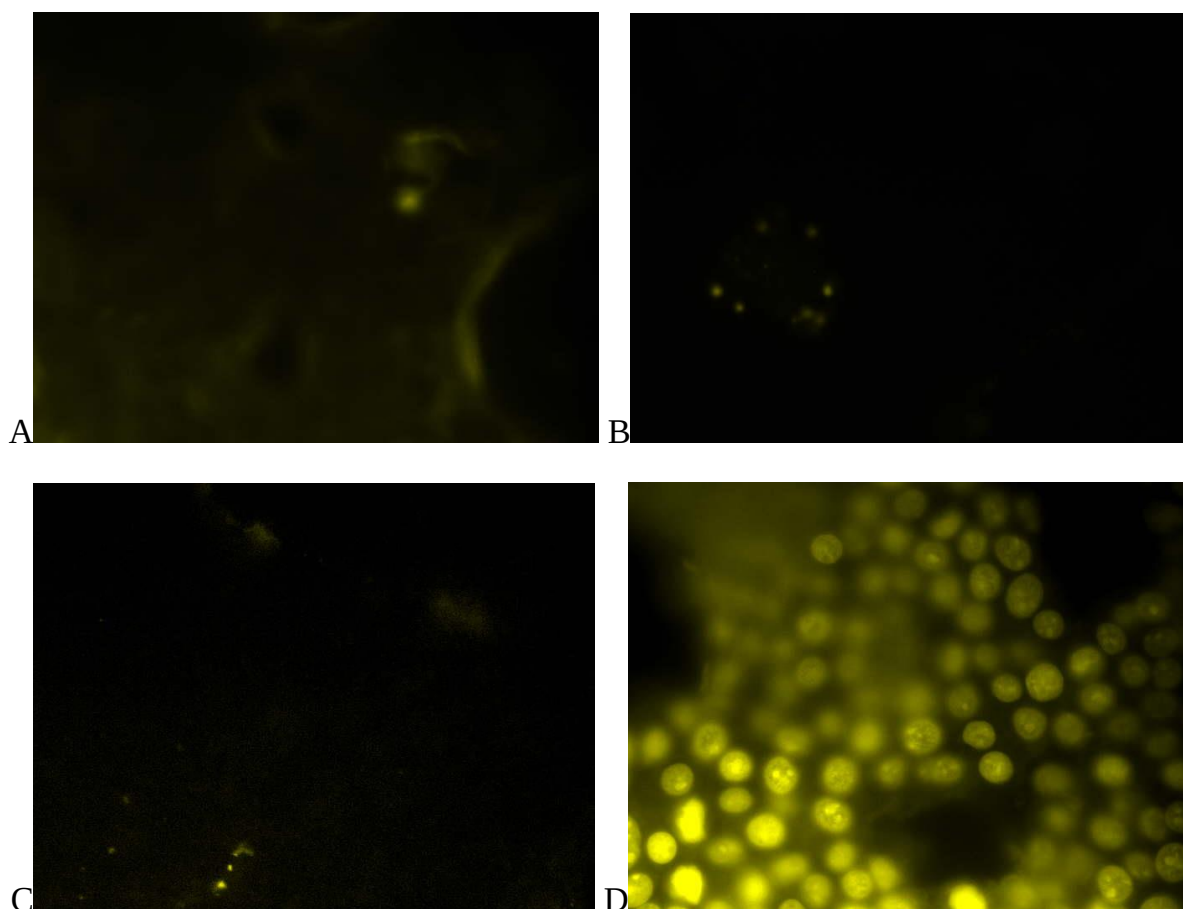
A következő uptake vizsgálatban a PI segédanyagot tartalmazó ligand-GP-tartalmú és -mentes nioszóma és liposzóma összetételeket vizsgáltam (**16. ábra**).

Az A.) felvételen a korábbi előkísérletekben alkalmazott, ligand-GP-mentes nioszóma mintákat vizsgáltam, nanohordozó felvétele nem volt megfigyelhető.

A B.) felvételen a korábbi előkísérletekben alkalmazott, ligand-GP-tartalmú nioszóma mintákat vizsgáltam, nanohordozó felvétele sajnos ebben az esetben sem volt megfigyelhető.

A C.) felvételen ligandként aminosav-származékot tartalmazó 3-9. sz. minta alapú liposzómák uptake vizsgálata történt. Az aminosav ligandot tartalmazó liposzómát csak nagyon kisszámú adenocarcinoma sejt vette fel.

A D.) felvételen a 3-9. sz. liposzóma összetétel uptake vizsgálatának eredménye látható. A HEPES pufferrel történő lemosás után megfigyelhető volt, hogy a sejtek nagy számban vették fel a biodegradábilis anyagokból felépülő és ligand-GP segédanyagot tartalmazó liposzómákat. A felvételen jól látszik a megfestett sejtmag is.



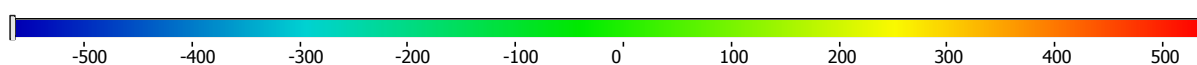
16. ábra. Uptake vizsgálat összefoglaló eredményei

6.12. Liposzómák sejtenyészeten történő vizsgálata – Raman kémiai térképezés

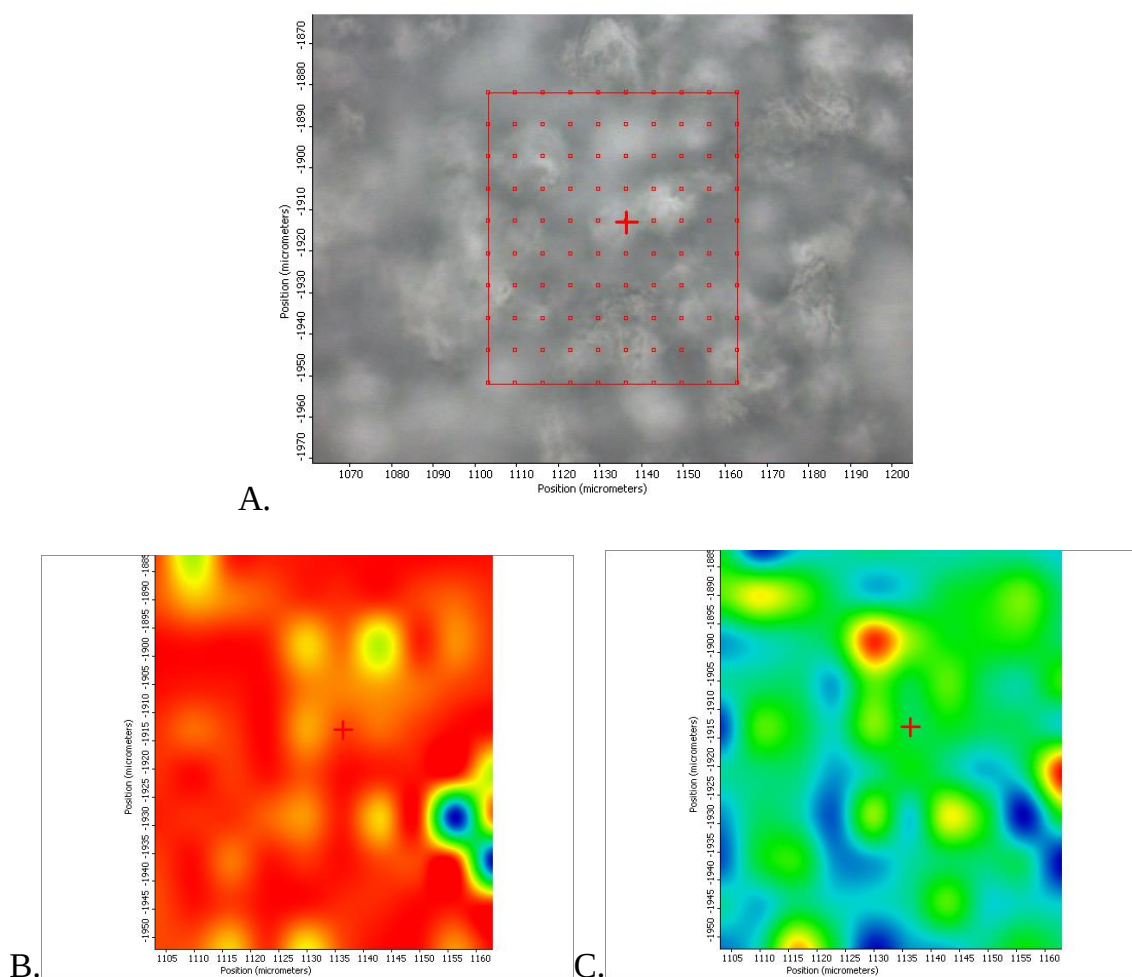
A Capan-1 sejtenyészet kémiai térképezését 3000-400 $1/\text{cm}$ tartományon végeztük. A kiválasztott sejtcsoport felületét térképeztük, majd a kapott térkép „profilozását”, vagyis egy adott komponensre történő analízisét végeztük el. A profilozás során a hatóanyag-mentes sejtek, illetve a modellanyag spektrumát

használtuk fel. A kémiai térképezésre azért volt szükség, mert az alkalmazott modell-hatóanyag nem fluoreszcens, az előbbi fejezetben alkalmazott technikával a sejtekben nem mutatható ki.

A következő ábrákon először a vizsgált sejtenyészet mikroszkópos felvétele látható (felület kb. $60 \times 60 \mu\text{m}$) (A.). A profilozás során a (B.) képen a Capan-1 sejtek, a (C.) képen a hatóanyag azonosítása, azaz térbeli elhelyezkedése látható ugyanazon a térképezett felületen. Minél **magasabb** a színhőmérséklet (sorrend: kék $\rightarrow$ zöld $\rightarrow$ sárga $\rightarrow$ piros), annál nagyobb az **adott komponens** előfordulási valószínűsége a térképezett felületen (17. ábra).



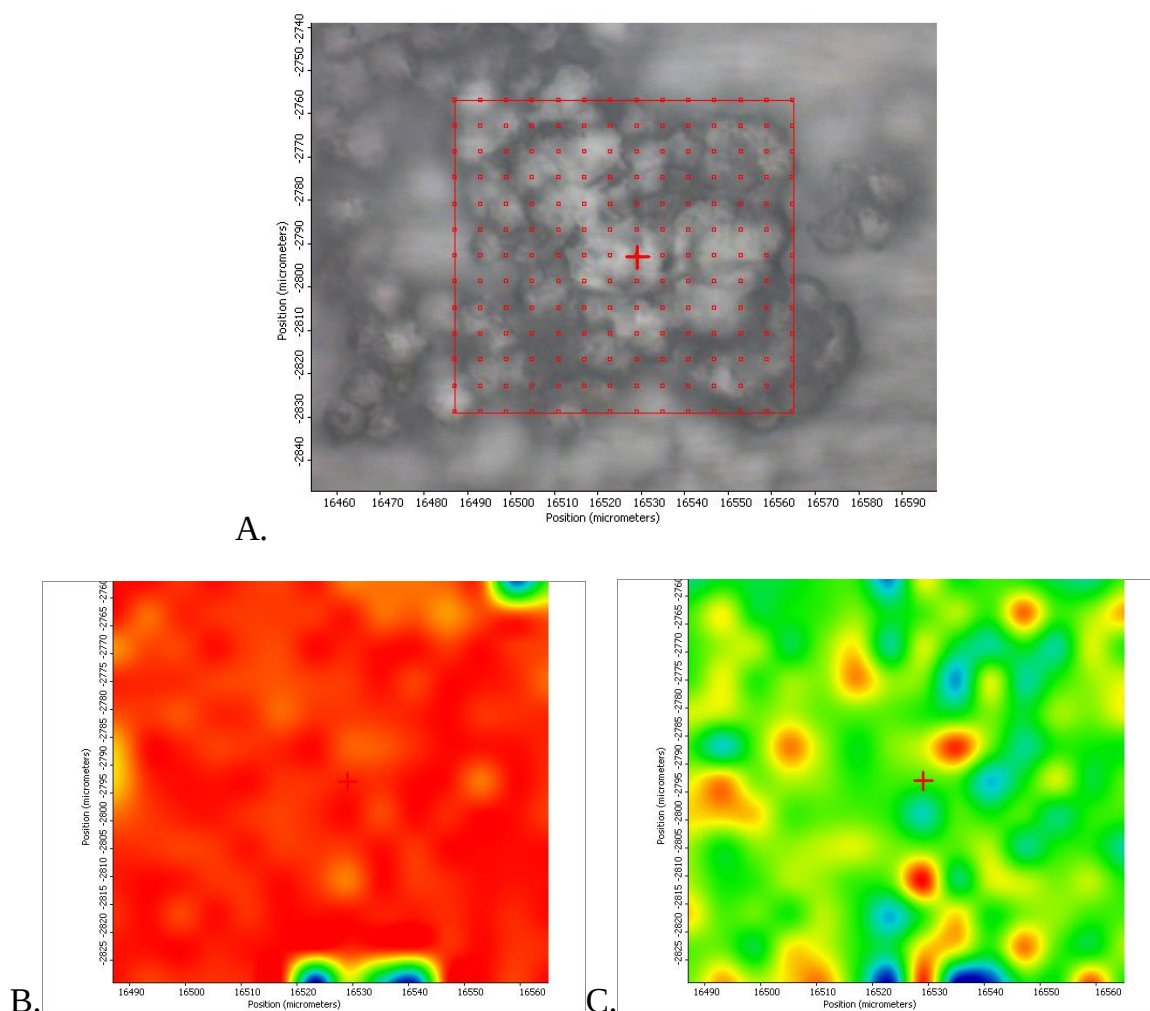
17. ábra. Színhőmérséklet a hamis színezésű Raman-térképen



18. ábra. Nioszoma minta (V2) kémiai térképezése

A vizsgálathoz modell-hatóanyagot zártam az előkísérletek során kifejlesztett nioszóma hordozórendszerekbe. A **18. ábra** C.) felvételén látható, hogy csak néhány sejtben dúsul fel a modell hatóanyag, tehát az uptake nem tekinthető sikeresnek.

A **19. ábrán** az előkísérletek során megfelelőnek bizonyult 3-9. liposzómába modell-hatóanyagot zártam, majd ezt követte az uptake vizsgálat és a kémiai térképezés. A C.) felvételen megfigyelhető, hogy több, egyenként kb. 10-50 μm átmérőjű Capan-1 sejt is felvette a liposzómákat (piros foltok), emellett a felület jelentős része sárga, illetve zöld színű, azaz alacsonyabb koncentrációban, de a többi sejtben is megtörtént a liposzómák fagocitózisa.



19. ábra. 3-9. liposzóma kémiai térképezése (L1)

7. Összefoglalás

A nanomedicina nagy ütemű térnyerésével egyre fontosabbá válik a gazdaságos termékelőállítás, amelynek egyik alappillére a Quality by Design. A QbD elvei szerint a minőséget nem belevizsgálják, hanem beletervezik a gyógyszerkészítménybe, így csökkennek a hibákból eredő plusz költségek. A termelés költségeinek csökkentéséhez szintén szorosan kapcsolódnak az in-line minőségellenőrző analitikai módszerek.

Tudományos diákköri munkám során ennek tudatában végeztem liposzómák és nioszómák preformulációs vizsgálatait. Olyan analitikai módszereket (DSC, Raman) alkalmaztam, amelyek alkalmasak lehetnek rutinszerű ipari alkalmazásra is. A nanohordozók ipari méretű előállítása még gyerekcipőben jár, ezért rendkívül fontos a minőséget szignifikánsan befolyásoló körülmények mély ismerete.

A szakdolgozat első felében bemutattam a lényeges irodalmi előzményeket. A nanohordozókat szerkezetük alapján csoportosítottam, és bemutattam a legfontosabb típusokat. Röviden összefoglaltam a hasnyálmirigy fiziológiás működését, majd leírtam két, jelenleg nem kielégítő terápiával rendelkező patológiás elváltozást, az akut pancreatitist és a pancreas tumort. Bemutattam az új gyógyszerhordozó rendszerek szerepét e két megbetegedés terápiájában.

A szakdolgozat kísérletes felében bemutattam a TDK-munkám keretében végzett preformulációs vizsgálatok eredményét, amelyek szelektíven a pancreasba jutó liposzómák előállítását célozták meg. A folyamatot végigkövettem a komponensek arányának kiválasztásától kezdve a szerkezet-vizsgálatokon keresztül a nanohordozók előállításáig, majd röviden bemutattam a végtermék karakterizációs vizsgálatainak és a in vitro Capan-1 sejtek által történő uptake eredményeinek eredményeit.

8. Irodalomjegyzék

- [1] K. Khosravi-Darani et al. *Micron* 38 (2007) 804–818.
- [2] Chitta Ranjan Patra et al. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 346–361.
- [3] Révész Piroska: Gyógyszertechnológia *JATEPress* 2009.
- [4] Erős I.: Mikro- és nanorészecskék — új gyógyszerhordozó rendszerek *Gyógyszerészet* 46. (2002) 653-657.
- [5] Dan D. Lasic *TIBTECH* 16 (1998) 307-321.
- [6] Mei-Ling Chen et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 768–777.
- [7] V.P. Torchillin et al., *The AAPS Journal* 9 (2007) 128-147.
- [8] F. Yang et al. *Cancer Treatment Reviews* 37 (2011) 633–642.
- [9] V.P. Torchilin et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 145–160.
- [10] <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070570.pdf> (2014.03.09)
- [11] P.J. Larkin, *IR and Raman Spectroscopy Elsevier* (2011)
- [12] ifj. Regdon G., *Gyógyszerészet* 46 (2002) 667-672.
- [13] Gekle et al., *Taschenlehrbuch Physiologie Thieme* (2010)
- [14] F. Yang et al., *Cancer Treatment Reviews* 37 (2011) 633–642.
- [15] H. Ito et al., *Surgery* 136 (2004) 548-556.
- [16] Gyires, Fürst: *A farmakológia alapjai Medicina* (2011)
- [17] O.H. Petersen et al., *Cell Calcium* 45 (2009) 634–642.
- [18] Frossard et al., *Lancet* 371 (2008) 143–152.

- [19] Lonovics, Varró, Gasztroenterológia. *Medicina* (2011)
- [20] S. Pandol et al., *Gastroenterology* 132, (2007) 1127–1151.
- [21] D.D. Verma et al., *J. Contr. Rel.* 108 (2005) 460– 471.
- [22] <http://www.chemindustry.com/apps/chemicals> (2014.03.09)
- [23] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/AdvancedSearchPage.do> (2014.03.09)
- [24] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (2014.03.10)
- [25] E. Kocisová et al., *Chem. Phys. Lipids* 172– 173 (2013) 1– 5.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Sipos Péternek témavezetéséért, Prof. Dr. Révész Piroskának, hogy TDK munkámat lehetővé tette intézetében, valamint köszönöm Farkas Gabriellának, hogy segítséget nyújtott a Raman- és NIR-görbék értelmezésében. Köszönet illeti Dr. Varga Katalint, akinek szakdolgozata támpontot nyújtott az irodalmi előzményekhez.

A kísérletes munka a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 projekt keretében valósult meg.

SZAKDOLGOZATI NYILATKOZAT

Alulírott DER KATALIN, a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Karának hallgatója ezennel büntetőjogi felelősségem tudatában nyilatkozom és aláírással igazolom, hogy

CÉLZOTT HATÓANYAG - FELSZABADULÁS ÉS - TRANSPORT
NANOHORDOZÓK SEGÍTSÉGÉVEL

című szakdolgozatom **saját, önálló munkám**; az abban hivatkozott nyomtatott és elektronikus szakirodalom felhasználása a szerzői jogok nemzetközi szabályainak megfelelően készült.

Tudomásul veszem, hogy szakdolgozat esetén plágiumnak számít:

- szószerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi idézet hivatkozás megjelölése nélkül;
- más publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Alulírott kijelentem, hogy a plágium fogalmát megismertem, és tudomásul veszem, hogy plágium esetén szakdolgozatom visszautasításra kerül.

Szeged, 2014 év március hó 14 nap

Der Katalin

olvasható aláírás