

Biodegradábilis kolloid részecskék előállítása és alkalmazása hatóanyag bevételre

Szakdolgozat
Kémia Alapszak

HANYECZ NOÉMI

Témavezető: Dr. Kiss Éva, egyetemi tanár
Konzulens: Gyulai Gergő, tudományos segédmunkatárs



Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Kémiai Intézet
Fizikai Kémiai Tanszék
Budapest, 2014

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Kiss Éva egyetemi tanárnak, akihez bármikor fordulhattam a kérdéseimmel, fáradhatatlanul segítette munkámat és megismertetett a tudományos kutatás szépségeivel és érdekességeivel.

Köszönöm Dr. Gilányi Tibor egyetemi tanárnak, a Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratórium vezetőjének, hogy lehetővé tette a laboratóriumban végzett munkámat.

Köszönettel tartozom Gyulai Gergőnek, aki nagy türelemmel és szakértemével volt a segítségemre. Sokszor látott el hasznos tanácsokkal.

Továbbá köszönöm az ELTE Határfelületi- és Nanorendszerek Laboratórium minden dolgozójának a példaértékű segítséget, különösen Hórvölgyi Zoltánné Pető Idának, aki kedvességével és szaktudásával szintén hozzájárult a munkámhoz.

Köszönöm Dr. Bősze Szilvia tudományos főmunkatársnak, hogy a mérésekhez rendelkezésemre bocsátotta az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban tervezett és szintetizált hatóanyag jelölteket.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Előállítási módszerek	4
2.2. Polimer gyógyszerhordozó, PLGA	7
2.3. A tuberkulózis	8
3. Célkitűzés	10
4. Kísérleti rész	11
4.1. Felhasznált anyagok	11
4.2. TB5 család, mint hatóanyagjelölt molekulák	11
4.3. Mintakészítés	12
4.4. Vizsgálati módszerek.....	15
4.4.1. Hatóanyag tartalom és kapszulázási hatékonyság	15
4.4.2. Dinamikus fényszórás mérés	15
4.4.3. Az oldhatóság vizsgálata	17
4.4.4. Elektrokinetikai potenciál meghatározása	17
4.4.5. Liofilizálás	19
5. Eredmények és értékelésük	20
5.1. Hatóanyag meghatározás és kapszulázási hatékonyság	20
5.2. Részecske méret	24
5.3. Az oldhatóság hatása a hatóanyag tartalomra és a kapszulázási hatékonyságra ..	25
5.4. Elektrokinetikai potenciál meghatározása	26
6. Összefoglalás	29
7. Summary	30
8. Irodalomjegyzék	31

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben jelentős szerepet kapott a biológiai úton lebomló polimerek alkalmazása a gyógyászatban, mivel minimális toxicitás és kiemelkedően jó biokompatibilitás jellemző rájuk. Megoldást jelent a daganatos megbetegedések ellen, mivel a molekula méretének szabályozhatóságával irányított és elnyújtott hatóanyag leadásra képesek, ami azt jelenti, hogy a célszervbe tudják juttatni a hatóanyagot, ezzel is kímélve a szervezetet [1]. A korábbi hatékony gyógyszereknél problémát jelentett a megfelelő dózisban való alkalmazhatóság a toxikus mellékhatások miatt. A biodegradábilis polimer nanorészecskék éppen ebben különböznek elődjeiktől. Képesek elnyújtott és irányított hatóanyag leadásra, ami csökkenti a kezelés gyakoriságát, ezáltal kevésbé megterhelő az emberi szervezet számára. Sajnos napjainkban még a legtöbb gyógyszer nem képes erre, ezáltal nagyobb mennyiségben kell a hatóanyagot a szervezetbe juttatni, hogy a célszervhez megfelelő koncentrációban jusson el [2].

A biokompatibilitás elengedhetetlen tulajdonsága egy gyógyszerhordozó rendszernek. Ez azt jelenti, hogy a szervezetben nem vált ki gyulladáskeltő, mérgező hatást vagy immunológiai válaszreakciókat. Gyógyszerhordozó rendszereknek általában természetes vagy szintetikus polimereket választanak. Ezek egyik típusa a kolloid részecskék, melyek mérete a nanométeres tartományba esik. A nanorészecskék előnye, hogy a sejtfelvétel 15-250-szerese a mikrométer méretű részecskékhez képest, és kis méretének köszönhetően nem zárja el a legvékonyabb hajszálereket sem [3].

Többféle polimert is kipróbáltak már ilyen célokra, de a legalkalmasabbnak a politejsav (PLA) és a poliglikolsav (PGA), illetve a tejsav és glikolsav kopolimer (PLGA) bizonyult. Legfőbb előnye, hogy biokompatibilis, nem toxikus, mivel tejsavra és glikolsavra hidrolizál, melyek metabolizálhatók a szervezetben. Az ilyen polimerek különböző hatóanyagok, fehérjék és hormonok szállítására is alkalmasak [4,5].

A polimer nanorészecskék szerkezete többféle lehet. Vannak nanogömbök és kapszulaszerűek, melyeknek a belsejében található a hatóanyag, de lehetnek mátrixszerűek, melyeknél a hatóanyag a mátrix anyagban található. Előállításuk történhet nanoprecipitációs eljárással, mellyel a nanométeres mérettartományba eső részecskék hozhatók létre [1].

A szaklaboratóriumi munkám során nanoprecipitációval foglalkoztam és ezzel a módszerrel próbáltam meg elérni többféle hatóanyag kapszulázását.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Előállítási módszerek

Nanoprecipitáció

A nanoprecipitációs módszert Fessi és munkatársai fejlesztették ki a '80-as évek végén és '90-es évek elején nanorészecskék előállítására, mely egy könnyen kivitelezhető, egyszerű és jól reprodukálható eljárás a nanométeres mérettartományba eső részecskék előállítására [6].

Nanoprecipitáció során két fázis érintkezik egymással, egy vizes, mely a stabilizátort tartalmazza és egy vízzel elegyedő szerves fázis, mely a kapszulázandó hatóanyagot és a polimert foglalja magába. Szerves oldószerként az acetont használják legáltalánosabban, mivel párologtatással könnyen eltávolítható és hivatalosan is engedélyezett oldószer a gyógyszerészeti alkalmazásokban [7]. Nanoprecipitáció során csak vízzel elegyedő oldószerrel használható, melyeknél a diffúzió sebesség elég gyors a spontán emulzió kialakításához [8]. A folyamat úgy játszódik le, hogy a szerves fázist a vizes fázisba adagolva az elegyítés során a polimer oldószere fokozatosan kiszorul, a polimer kicsapódik, és eközben a hatóanyag a polimer belsejébe kerül. Tulajdonképpen egy oldószercsere történik, mely során nanométeres mérettartományba eső részecskék spontán keletkeznek. Az így készült részecskék jól reprodukálhatók. Robosztus módszer és nem szükséges hozzá bonyolult és drága berendezés [1]. Megoldható általa a méretnövelés is, vagyis meghatározott részecskeméret érhető el és elkerülhető a toxikus oldószerrel használata, ami felettébb fontos egy gyógyszer formula megtervezésénél.

Nem rég kifejlesztettek egy mikrofluidikai eljárást is a PLGA nanorészecskék „nagyüzemi” előállítására, hogy nagy mennyiségben hozzanak létre kontrollálható és reprodukálható fizikai-kémiai tulajdonságú nanorészecskéket, ellentétben a tömbfázisbeli szintézisekkel. A módszer minél nagyobb kitermelésének elérésével foglalkozik Jong-Min Lim és kutatócsoportja [9].

Több kutatócsoport foglalkozik a nanoprecipitációval előállított hatóanyag-hordozók fejlesztésével, az egyik cél a minél nagyobb kapszulázási hatékonyság és hatóanyag-tartalom elérése. Több különböző polimerrel is működik az eljárás, azonban a gyakorlatban ez leszűkül a leggyakrabban alkalmazott PLA-ra és a PLGA-ra [1]. A különböző méretű részecskék előállítása végett változtatták a rendszer paramétereit, így például az oldószer, a stabilizátor és a polimer fajtáját és mennyiségét. Polimerként PLGA-t, PCL-t (polikaprolakton), PCA-t (policianoakrilát) stb., stabilizátorként Pluronic F68-at, dextran-t, Tween 20-at, illetve PVA-t

(polivinilalkohol) használtak. A különböző komponensek kombinálásával 100-560 nm-ig terjedő mérettartományba eső részecskéket állítottak elő [6].

Meglepően kevés cikk született egy lényeges témával, mégpedig az előállított nanorészecskék sterilizálásával kapcsolatban. Ez elsősorban a parenterális alkalmazás során lényeges szempont. Ha ily módon szeretnénk alkalmazni, mindenképpen meg kell felelnie a gyógyszerkönyvben előírtaknak. Meglehetősen nehéz alkalmas módszert találni rá, mivel autoklávot használva az észter kötést tartalmazó részecskék hidrolízis útján degradálódhatnak. Hőérzékeny polimerek lévén még tovább csökken a választható technikák száma. Így esett a választás a 0,22 µm-es pórusméretű membránnal való steril szűrésre, mivel a jóval kisebb méretű (200 nm alatt) nanorészecskék a szűrőn átjutnak, míg a nem kívánatos organizmusok azon fenn akadnak. Ez a módszer kiválóan alkalmas kémiai és termikus érzékeny polimerek részecskék sterilizálására, mivel nincs káros hatása a polimerre, vagy a hatóanyagra. Ezen felül egyszerű, gyors és hatékony eljárás a sterilizálásra [10]. Ebből a szempontból is fontos, hogy meghatározott méretű részecskéket tudjanak előállítani.

Emulziós módszer

Az emulziós módszer a legnagyobb irodalmi háttérrel rendelkező és leginkább alkalmazott technika ebben a témakörben. Abban különbözik a nanoprecipitációtól, hogy a folyamat során vízzel nem elegyedő oldószert alkalmaznak szerves fázisként, és nagyobb (mikro mérettartományba eső) részecskék állíthatók elő. Ezáltal más a lebomlási és a hatóanyag felszabadulási ideje, a szerkezete pórusosabb. Ezzel a módszerrel is különböző vegyületek „csomagolhatók” a polimer részecskébe [6].

Hasonlóan a nanoprecipitációhoz, itt is egy vizes és egy szerves fázis érintkezik egymással. Az egyszerű emulziós módszer során a polimert és a kapszulázandó hatóanyagot feloldják egy vízzel nem elegyedő, illékony szerves oldószerben, például diklórmétánban, etilacetátban vagy kloroformban. Ezt a szerves oldatot nagy mennyiségű, stabilizátort tartalmazó vizes fázishoz keverik. A kapott emulziót a szerves oldószer elpárologtatása céljából kevertetik, és ennek eredményeképp egy vizes szuszpenziót kapnak. Ezzel a technikával leginkább a hidrofób molekulák kapszulázása valósítható meg.

Az emulziós módszerek másik csoportja a dupla emulziós eljárás, mely során V/O/V (víz-az-olajban-a-vízben) rendszereket állítanak elő, mellyel a hidrofil vegyületek kapszulázása oldható meg. Az alkalmazott hatóanyagot a vizes fázisban feloldják, majd az oldatot intenzív kevertetés mellett a polimert tartalmazó, vízzel nem elegyedő szerves oldatba emulgeálják. Az így létrejött emulziót nagy mennyiségű stabilizátort tartalmazó vizes fázisba keverik, és

ezáltal létre jön a kettős emulzió. A szerves oldószer elpárologtatása után megkapják a vízoldható hatóanyag polimer mátrixban lévő vizes diszperzióját [6,11,17].

T. Niwa munkája során 1,2-1,5 μm mérettartományba eső részecskéket állított elő intenzív kevertetés és nagynyomású homogenizátor segítségével hidrofil és hidrofób hatóanyag molekulák kapszulázásakor. A gyengén vízoldható (hidrofób) molekula esetében kloroformos rendszert használva szerves fázisként, és PLGA (50:50)-t polimerként, 2,48%-os hatóanyagtartalmat ért el [12].

A módszer jól reprodukálható, viszonylag olcsó technika mikrométeres mérettartományba eső részecskék előállítására.

Kisózásos módszer

A kisózásos módszer mind az emulziós mind a nanoprecipitációs technika egy részlépése lehet, mely során elektrolitot adnak a vizes fázishoz, ezáltal a szerves oldószer kicsapódik.

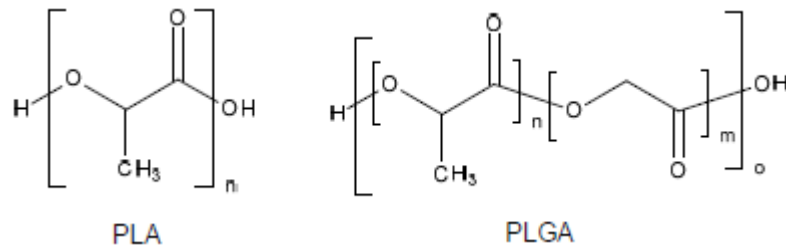
Ibrahim MgCl_2 -ot használt aceton kisózására, és így ért el nanoméretű részecskéket. Megállapította, hogy a két fázis elegyítése során a keverési sebesség változtatásával vagy a polimer koncentrációjának módosításával különböző részecske méret érhető el [13].

Allémann, Ibrahimhoz hasonlóan a rendszer paramétereit változtatta, mint például homogenizálást, keverési sebességet, polimer típusát és koncentrációját, így kapott 170-900 nm-ig változó nanorészecskéket, szűk részecske méreteloszlással. PVA-t (polivinilalkohol) tartalmazó, elektrolittal vagy nem-elektrolittal telített vizes oldatot adott a polimert tartalmazó szerves fázishoz folyamatos kevertetés mellett. A telített vizes fázis meggátolta a szerves oldószer keveredését a vízzel, ez a kisózásos lépés. Kiszózó ágensként MgCl_2 -ot és Mg-acetátot használt [14,15].

A módszer előnye, hogy nem használ felületaktív anyagot és klórozott oldószert, ezzel is csökkentve a toxicitás lehetőségét, a kapott termék könnyen rediszpergálható [6].

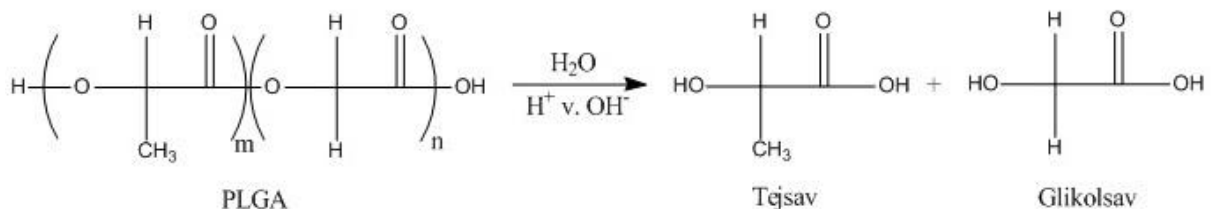
2.2 Polimer gyógyszerhordozó, PLGA

Leggyakrabban alkalmazott polimer gyógyszerhordozó a PLA (politejsav) és PGA (poliglikolsav) kopolimerizációjával létrehozott PLGA (tejsav és glikolsav kopolimere).



1.ábra A politejsav (PLA) és a tejsav-glikolsav kopolimere (PLGA)

Kiváló biokompatibilitása, mechanikai szilárdsága és biológiai úton való lebonthatósága miatt vált ennyire népszerűvé [16]. Polikondenzációval és gyűrű-nyitós polimerizációval is szintetizálható vegyület. Degradációja során tejsav és glikolsav keletkezik, ami a szervezet számára nem toxikus. Fontos megérteni a degradáció mechanizmusát, hiszen ez által valósul meg az elnyújtott hatóanyag leadás. Kétféle módon degradálódhat a molekula; tömbfázisbeli és felületi erozió által, mely során a polimerben található észter kötés hidrolízise (2. ábra) következik be. A szervezetben enzim katalizált hidrolízis útján bomlik le tejsavra és glikolsavra [17]. A hatóanyag leadásnál fontos paraméter a polimer részecske mérete és alakja, ami biztosítja az egységes hatóanyag leadást, ezért törekszenek minél szűkebb méreteloszlású részecskék előállítására. A nanoméretű gyógyszerhordozókat különböző módon lehet a szervezetbe juttatni, például: orálisan, intravénásan és parenterálisan [18].

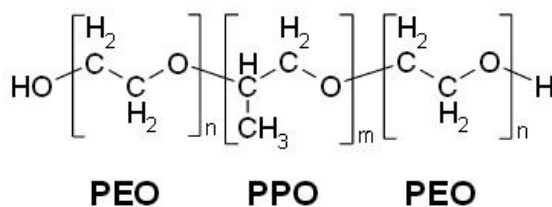


2.ábra A PLGA hidrolízise

Másik fontos paraméter az előállított nanorészecske polaritása, mivel a PLGA részecske felülete túlságosan hidrofób, ha bekerül a szervezetbe, a fehérje adszorpció miatt rövid úton kiürül onnan. Ennek elkerülésére, módosítani kell a polimer felületét, mely eredményeképp már kevésbé lesz hidrofób. A hosszú keringési idő lehetővé teszi, hogy a nanorészecske

eljusson a célzott szervbe, és ott megfelelő koncentrációban leadja a hatóanyagot. A PLGA töltésének megváltoztatásával is kedvezőbb keringési időt érhetünk el. A nanorészecske felületét polietilén-glikol (PEG) réteggel lehet borítani. Általa minimalizálódik a fehérje adszorpció, ezáltal növekszik a véráramban eltöltött idő, csökken a hatóanyag káros mellékhatása, mellőzni lehet a toxikus segédoldószereket, és így megnövekszik a célzott hatóanyag leadási képesség [16,19,20].

A Pluronic[®] márkanéven forgalmazott PEO-PPO-PEO poli(etilén-oxid)-poli(propilén-oxid)-poli(etilén-oxid)-dal (3. ábra) eredményesen lehet a felületmódosítást megvalósítani. Az amfifil karaktere miatt felületaktív tulajdonságot mutat, emiatt használhatják hidrofób felületek bioanyagok stabilizálására. A PEO-PPO-PEO blokk kopolimerben lévő hidrofób szegmens a molekulát a polimer felszínéhez rögzíti. A hidrofil PEO láncok hidrofil jellegűvé változtatják a nanorészecskét azáltal, hogy a diszperziós közegbe hatolnak [21].



3.ábra Pluronicok általános összetétele

2.4 A tuberkulózis

A tuberkulózis, más néven gümőkór, vagy tbc évszázadok óta hatalmas pusztítást végző bakteriális fertőzés, melyet a *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) baktérium okoz. Leggyakrabban a tüdőt támadja meg, de a központi idegrendszerben is károsodást okozhat. Általában a nem megfelelő higiéniai körülmények idézik elő, és sajnos a Föld lakosságának közel egyharmada fertőzött a baktériummal. Évente közel másfél millió ember halálát okozza [22,23].

Kezelésére először szteptomocint (STM) használtak, majd ezt felváltotta az izoniazid (INH) nevű hatóanyag. Kezdetben a kezelési idő rendkívül hosszú volt, majd a folyamatos fejlesztéseknek hála végül már csak 6 hónapra csökkent ez az időtartam. A kezelés során felvetődik egy igen komoly probléma, miszerint a *Mtb*, miután a makrofágok bekebelezik, képes gátolni a gazdasejt bizonyos funkcióit, és ott hosszú ideig életképes marad [19,24].

Többféle antituberkulotikum létezik, és ezek kombinálásával hatékonyan gyógyítható a tbc. Ugyanakkor rezisztens és multirezisztens törzsek fejlődtek ki, melyekre az eddigi

gyógyszerek hatástalanok. A halálesetek 13%-át a multirezisztens törzsek okozzák. Éppen ezért szükségessé vált további hatóanyagok felfedezése és kifejlesztése.

A hatóanyagok fejlesztésének egyik lehetősége, hogy a már ismert tulajdonságú vegyületeket baktériumhoz célzottan kötődő molekuláris részekkel, peptidszekvenciákkal konjugálják, amivel fokozható a specifikusságuk és a sejtfelvételük [19].

Az elmúlt évtizedben nagy jelentőségre szert tevő biodegradábilis polimer nanorészecske alapú hordozó rendszerek alkalmasnak bizonyulhatnak az antituberkulotikumok szállítására. Átaluk megvalósítható az elnyújtott hatóanyag leadás és a célszervhez megfelelő koncentrációban történő eljuttatása a hatóanyagoknak, mely csökkenti a kezelés gyakoriságát, ezzel csökkentve az esetleges káros mellékhatásokat [20,22].

Az Eötvös Lóránd Tudományegyetem Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratórium kutatócsoportja sikeresen kapszulázott PLGA nanorészecskébe INH-t és INH-konjugált turberkulózis elleni hatóanyagokat, mellyel INH-ra nézve 0,5%-os, INH-konjugáltra nézve 43%-os hatóanyagtartalmat értek el [20].

3. Célkitűzés

A TB5 családba tartozó három új antituberkulotikum hatóanyag jelölt molekula PLGA nanorészecskékbe történő kapszulázására teszek kísérletet. A választott hatóanyagok a TB501, TB503 és a TB517, melyeket az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban szintetizáltak. Ezek a molekulák *in vitro* kísérletekben hatásosnak bizonyultak *Mycobacterium tuberculosis* ellen.

A kolloidális gyógyszerhordozó rendszereket nanoprecipitációs módszerrel tervezek készíteni, mivel ezt a módszert az ELTE Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriumában már sikeresen alkalmazták hasonló célokra. Az előállított gyógyszerhordozó méretének és felületi tulajdonságainak jellemzésére dinamikus fényszóródás mérést, valamint elektrokinetikai potenciál mérést alkalmazok.

Keresem a megoldást, amivel növekedés érhető el a gyógyszerészeti szempontból két fontos paraméterben, a hatóanyagtartalomban és a kapszulázási hatékonyságban. A célom az, hogy megismerjem hatóanyag molekulák polaritása és a kapszulázhatóságuk közötti kapcsolatot. A tapasztalatok alapján módosítom a nanoprecipitáció körülményeit úgy, hogy a PLGA nanorészecskék hatóanyagtartalmában növekedést érjek el.

Próbálok magyarázatot találni a kis hatóanyagtartalomra az oldhatósággal való összefüggés alapján.

Ezekből információt kapok a részecske méretére, hatóanyagtartalmára, végül pedig a gyógyszerhordozó elektrokinetikai potenciáljának változásából következtetek a hatóanyag térbeni helyzetére.

4. Kísérleti rész

4.1 Felhasznált anyagok

Nanorészecskék előállítására, hatóanyag meghatározására:

PLGA 50/50, tejsav/glikolsav kopolimer 50% tejsav és 50% glikolsav arány, $M=40\,000\text{--}75\,000$ Da, Sigma-Aldrich, Németország

Pluronic[®] F127, $M_w=12600$ g/mol, PEO-PPO-PEO blokk kopolimer 101/45/101 monomer arány, BASF Hungaria Kft., Magyarország

Aceton 99,95% a.r., Molar Chemicals Kft., Magyarország

NaCl tisztaság: > 99,8 % a.r., Sigma-Aldrich a.r., Németország

TB5 hatóanyag csoport, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Kétszer desztillált víz, vezetőképessége < 5mS, felületi feszültsége > 72 mN/m^{23°C-n}

Üvegeszközök tisztításához:

hidrogén-peroxid:kénsav frissen készített 1:2 térfogatarányú elegyét használtam.

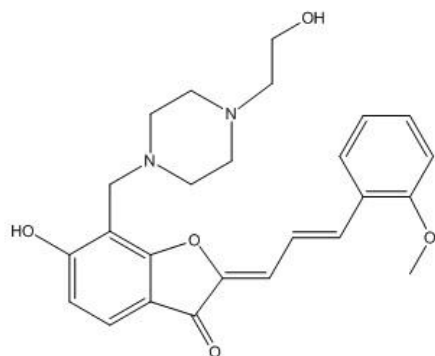
Hidrogén-peroxid 30% technikai Molar Chemicals Kft., Magyarország

Kénsav 96% laboratóriumi célra Molar Chemicals Kft., Magyarország

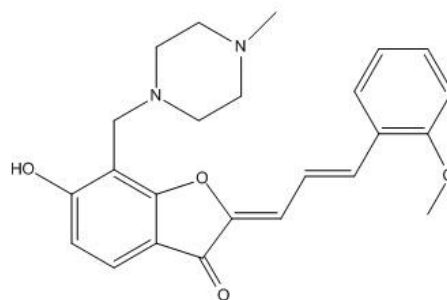
4.2 TB5 család, mint hatóanyag jelölt molekulák

Három hatóanyag jelöltet (TB501, TB503, TB517) (4. és 5. ábra) választottam ki a kísérletek céljából. Ezeket az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport szintetizálta, és bocsátotta rendelkezésemre. Ez a három hatóanyag molekula az úgynevezett *in silico* módszer alapján született meg, mely azt jelenti, hogy számítógépes algoritmusok alapján megjósolható, hogy melyek azok a vegyületcsaládok, amik egy adott cél baktérium életfunkcióihoz nélkülözhetetlen enzimet képesek blokkolni [19].

A molekulák bizonyos paramétereit számítógépes programok alapján határoztam meg. Ilyen tényező az oktanol/víz megoszlási hányados ($\log P$), melyet a Molinspiration nevű online programmal becsültem meg. Ennek az értékét fontos tudnunk, mivel ez a gyógyszerkémiaiában a gyógyszerek szerkezetbeni sorsát alapvetően meghatározó lipofilitás számszerű jellemzésére szolgál [25]. A hatóanyagok antituberkulotikus hatását kísérletileg határozták meg, melyet minimális inhibíciós koncentráció (MIC) értékkel jellemeztek.



4. ábra TB501 szerkezeti képlete



5. ábra TB503 szerkezeti képlete

Hatóanyag neve	log <i>P</i>	MIC μg/ml
TB501	2,776	20
TB503	3,407	>100
TB517	1,559	>100

1. táblázat A hatóanyagok log*P* és MIC értéke

A hatóanyagok bakteriosztatikus hatásának kvantitatív jellemzésére a minimális inhibíciós koncentrációt használják. Minimum Inhibitory Concentration-MIC: az a minimális antibakteriális koncentráció, melynél a mikroorganizmusnak látható növekedését nem észleljük egy éjszakán át történő inkubálás után [26].

4.3 Mintakészítés

I. Oldatkészítés

A nanoprecipitáció során egy vizes és egy szerves fázis elegyedik egymással, a víz kicsapószerként is funkcionál. A vizes fázis tartalmazza a stabilizátorként alkalmazott felületaktív anyagot, a Pluronic® F127-et, a szerves fázis pedig a polimerként használt PLGA (50:50)-et és a hatóanyagot. A kísérlet során változtattam a vizes és a szerves fázis arányát, szerves fázisként acetont használtam, rögzített stabilizátor és a PLGA koncentráció mellett.

A hatóanyagot és polimerként alkalmazott PLGA (50:50)-et acetonban oldottam fel.

minta	vizes fázis		szerves fázis					térfogatarány (szerves:vizes) /ml
	térfogat /ml	F127 /mg	térfogat /ml	PLGA / mg	TB501 / mg	TB503 / mg	TB5017 / mg	
1.	15	15	1,5	15	0,94	0,89	1,22	1:10
1.a			1,5	15	0,92 *	-	-	
2.	4,5	4,5	1,5	15	1,76	1,74	2,3	1:3
3.	4,5	4,5	1,5	15	-	7,57	-	1:3
4.	15	-	1,5	15	-	-	-	1:10

* Az 1.a esetben a hatóanyag mellé 15 mg F127-et mértünk be a szerves fázisba

2. táblázat Az előállított gyógyszerhordozó részecskék paraméterei.

Három recept alapján dolgoztam, melyekben fokozatosan növeltük a bevitt hatóanyag tömegét, és változtattam a szerves és vizes fázis arányát.

Az első recept során kísérletet tettem arra is, hogy ha a Pluronic[®] F127-et a szerves fázisban a hatóanyaggal együtt oldom, milyen hatással van a nanorészecskék stabilitására, illetve észlelhető-e bármiféle különbség.

Egy másik kísérlet azt a célt szolgálta, hogy megmutassa, szükség van-e a stabilizátorra. Ennek adatait az 2. táblázat utolsó sora tartalmazza.

II. Elegyítés

Azt követően, hogy az anyagok feloldódtak a megfelelő fázisokban, a két oldatot elegyítettem. A stabilizátort tartalmazó vizes fázist 20 ml-es szcintillációs üvegbe mértem, keverőbabát raktam bele, majd a tömegét lemértük négy tizedes pontosságú mérlegen. Ezután a vizes fázist mágneses keverőre helyeztem és 500 fordulat/perc-es kevertetés mellett, Hamilton fecskendő automata adagolóval 3 µl/s sebességgel beleengedtem a hatóanyagot és a PLGA (50:50)-et tartalmazó acetonos oldatot.

III. Tisztítás

Az acetonos oldatot elszívófülke alatt mágneses keverővel kevertettem, míg az aceton el nem párologott. Az aceton elpárologtatása után az esetleg elpárologott vizet pótoltam.

Ezután a vizes szuszpenziót 15 ml-es centrifugacsőbe öntöttem, és 6000 g-n 10 percig centrifugáltam, hogy az esetleg aggregálódott polimer részecskéket és a kicsapódott hatóanyagot elkülönítsem a nanoszuszpenziótól. A kiülepedett résztől elválasztottam a felülúszót és szétosztottam megfelelő számú kisebb, 2 ml-es centrifugacsövekbe. Ezeket háromszor centrifugáltam 12000 g-n, 23°C-on, 20 percig, majd a felülúszókat eltávolítottam

és kétszer desztillált vízzel rediszpergáltam a részecskéket, ezáltal a közeget fokozatosan kétszer desztillált vízre cseréltem. A többszörös tisztítás során minimum 10^4 -szeresére hígult a nanorészecskéket tartalmazó szuszpenzió közege. A kész vizes nanoszuszpenziókat egyesítettem, ezután dinamikus fényszóródásméréssel méretmeghatározást végeztem. Megmértem a részecskék zeta-potenciálját és a nanoszuszpenzió egy részét liofilizáltam.

4.4 Vizsgálati módszerek

4.4.1 Hatóanyagtartalom és kapszulázási hatékonyság

A PLGA nanorészecskék hatóanyagtartalmát UV-látható spektrofotometriás módszerrel határoztam meg. A méréseket Analytic Jena Specord 40 nevű UV-látható spektrofotométerrel végeztem. Az alkalmazott hatóanyagot acetonban oldva különböző koncentrációjú oldatokat készítve kalibráló oldatsorozatot készítettem.

A mérés első lépéseként felvettem a tiszta aceton abszorpciós spektrumát referenciaként, majd a különböző koncentrációjú hatóanyag oldatok spektrumait. Az első tájékozódó mérés után megállapítottam a maximális elnyelés helyét. Ez alapján 340–450 nm tartományban felvettem az abszorpciós spektrumokat, és meghatározott abszorpciós csúcsok értékeire kalibráló egyenest szerkesztettem. A kalibrálást mind három hatóanyag molekulánál elvégeztem. Minden egyes mintánál három párhuzamos mérést végeztem 25°C-on.

A liofilizált nanoszuszpenzió adott mennyiségét (1 mg) 1 ml acetonban oldottam, és az előzőleg meghatározott kalibráló-egyenest segítségével a hatóanyag koncentrációját fotometriásan megmértem. Ebből kiszámítottam a PLGA nanorészecske hatóanyagtartalmát.

A kapszulázási hatékonyság megmutatja, hogy a rendszerbe bevitt hatóanyag hány százalékát sikerült a PLGA részecskebe juttatni, melyet a liofilizált szuszpenzió tömegéből, a hatóanyagtartalomból és a bemért hatóanyag mennyiségből számítottam ki.

A hatóanyagtartalmat és a kapszulázási hatékonyságot az alábbi összefüggések alapján számoltam ki.

$$\text{kapszulázási hatékonyság} = \frac{m(\text{hatóanyag a nanorészecskékben})}{m(\text{összes bevitt hatóanyag})}$$

$$\text{hatóanyagtartalom} = \frac{m(\text{hatóanyag a részecskékben})}{m(\text{PLGA nanorészecske})}$$

4.4.2 Dinamikus fényszórás mérés

A PLGA nanorészecskék hidrodinamikai átmérőjét és méreteloszlásra utaló polidiszperzitást dinamikus fényszóródás méréssel határoztam meg. A mérést Brookhaven dinamikus fényszóródás mérő berendezéssel (5. ábra) végeztem [27].

A műszer alkalmas dinamikus és sztatikus fényszóródás mérésére. Lehetővé teszi polimer rendszerek általános jellemzését. Mozgásban lévő részecskék esetében a Doppler-effektus következtében a szórt fény intenzitásának fluktuációját észleljük, mivel a részecskékről szóródó fény interferenciájának mértéke folyamatosan változik. Az intenzitás fluktuációjának elemzését a térerő autokorrelációs függvény által végezzük el:

$$g(\tau) = A \exp(-\Gamma \tau),$$

ahol τ a korrelációs idő, $1/\Gamma$ pedig a relaxációs idő. $\Gamma = Dq^2$, ahol D a kollektív diffúziós állandó, q pedig a szórási vektor:

$$q = 4\pi n / \lambda \sin(\theta/2),$$

ahol n a közeg törésmutatója, λ a lézer fényforrás hullámhossza, θ a szórási szög.

Ha a részecskék gömb alakúak és a fény intenzitásának fluktuációja csakis translációs diffúzió következménye, akkor méretük az Einstein-Stokes egyenlet alapján számítható:

$$D_0 = k_B T / 3\pi\eta d,$$

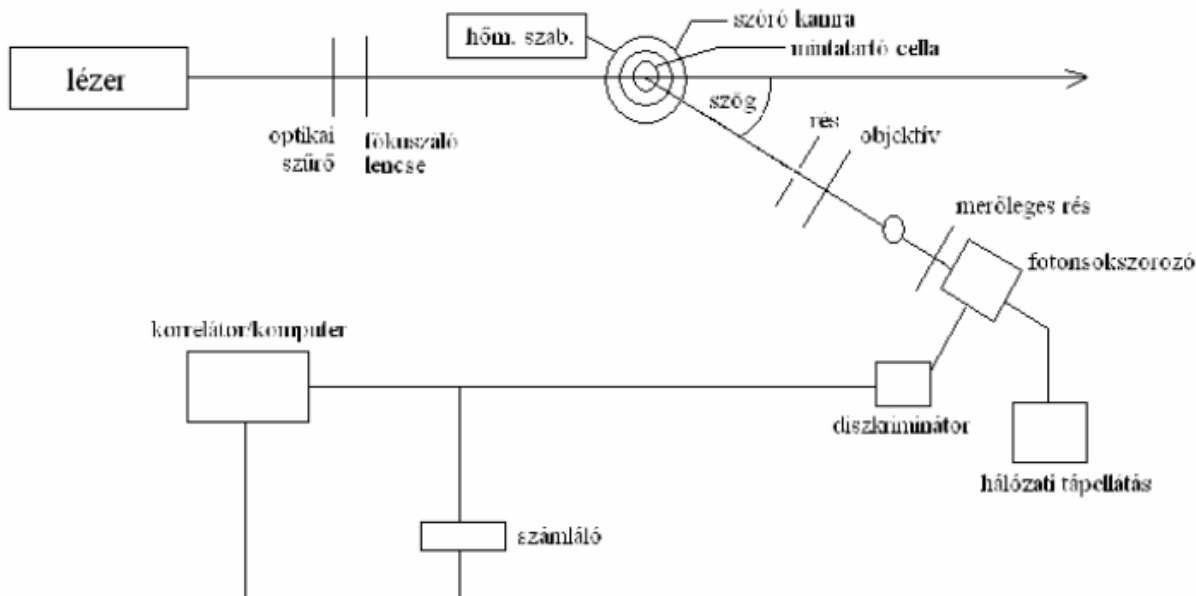
ahol k a Boltzmann-állandó, T a hőmérséklet, η a közeg viszkozitása, d a részecske átmérője [27].

A hidrodinamikai átmérő meghatározásán kívül információt kapunk a méreteloszlás szélességére is a polidiszperzitás index (PD) meghatározásával.

$$PD = (\sigma/d)^2,$$

ahol σ a standard deviáció és d az átlagos részecske átmérő [19].

A méréseket 90°-os szórási szögnél, 488 nm-en, 25°C-on vizes közegben tízszeres hígítás mellett végeztem. A részecskeméret és polidiszperzitás index meghatározása a tisztított nanoszuszpenzióval történt, mintánként három párhuzamos méréssel.



6.ábra A fényszóródásmérő berendezés elvi rajza^[27]

4.4.3 Az oldhatóság vizsgálata

A TB503 hatóanyag jelölt molekulának vízben való oldhatóságának meghatározására adott mennyiségű hatóanyagot vízben feloldottam, majd különböző koncentrációjú oldatsorozatokat készítettem és megmértem az abszorbanciájukat. Első lépésként felvettem egy kétszer desztillált vizes referencia abszorbanciát, majd megmértem az oldatokat. Az első tájékozódó mérés után megállapítottam a maximális elnyelés hullámhosszát (416 nm). Majd a kiválasztott hullámhossztartományban folytattam a meghatározásokat. Az oldatokat felkeverve és ülepedés után is megmértem.

A méréseket Analytic Jena Specord 40 nevű UV-látható spektrofotométerrel végeztem.

4.4.4 Elektrokinetikai potenciál meghatározása

A szilárd és a folyadék fázis egymáshoz viszonyított elmozdulásakor egy vékony folyadék réteg a szilárd részecskével együtt mozdul el. A szilárd részecskékkel együtt illetve

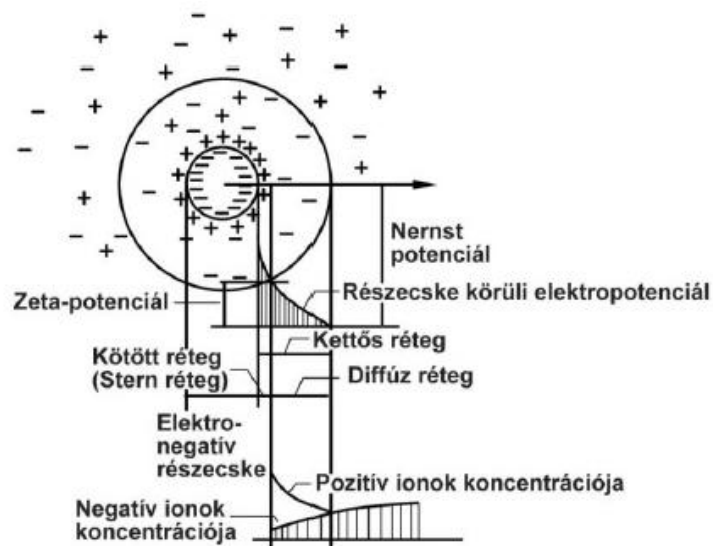
az attól függetlenül mozgó folyadékrétegek határán mérhető potenciál az ún. zeta-potenciál [27].

A lézer Doppler elektroforézis során a felületi töltéssel rendelkező kolloid részecskék mozgékonyosságát határozzuk meg a Doppler-effektust kihasználva. A fény szóródik a mozgásban lévő részecse felületéről és így a frekvenciája eltolódik. Ezt az eltolódást interferometrikus módszerrel tudjuk mérni. A gyakorlatban koherens lézerpár nyalábot használunk, melyek a forrásból származnak. A töltött részecskéhez érve a szóródó nyaláb eltérül, a másik nyaláb viszont változatlanul átmegy a cellán. A cellát elhagyva a két nyaláb keresztezi egymás útját. A töltött részecskék mobilitása a következő összefüggés alapján számítható:

$$u_e = v_e / E ,$$

ahol u_e az elektroforetikus mozgékonyosság, E egységnyi elektromos térerő, v_e pedig a vonatkoztatott mozgási sebesség. Az elektroforetikus mozgékonyáságból az elektrokinetikai potenciál kiszámítható [19,27].

A kísérleteket Malvern Zetasizer NanoZ típusú készülékkel végeztem. A mintákat NaCl oldattal beállított állandó, 2 mM-os ionerősség mellett 25°C-on vizsgáltam. Mintánként három párhuzamos mérést végeztünk.



7. ábra a Zeta-potenciál^[28]

4.4.5 Liofilizálás

A minták tartósítására liofilizálást alkalmaztam. A liofilizálás vagy más néven fagyasztva szárítás, tartósításra szolgáló víztelenítés. A folyamat során először megfagyasztják a víztelenítendő anyagot, majd vákuumot idéznek elő (csökkentik a nyomást). A folyamat során a részecskék szerkezete nem sérül, ezért alkalmas a koloidális gyógyszerhordozó rendszerek tartósítására. Ezzel a módszerrel a nanorészecskék fizikai-kémiai tulajdonságainak megőrizhetőek, és megfelelő stabilizálás esetén a részecskék rediszpergálhatóak is.

5. Eredmények és értékelésük

5.1 Hatóanyag meghatározás és kapszulázási hatékonyság

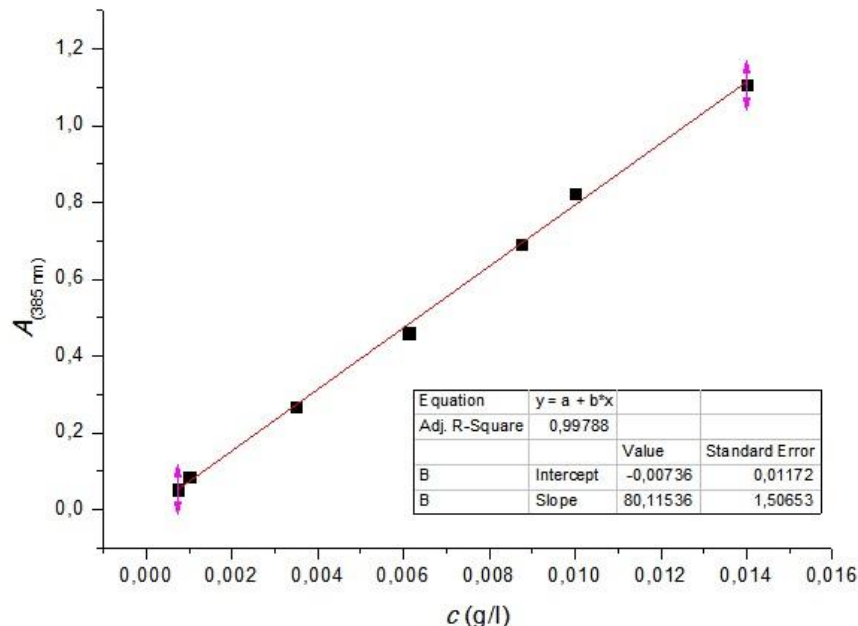
Mivel a fő célom a hatóanyagok PLGA gyógyszerhordozóba való foglalása volt, az előállított nanorészecskék meghatározott hatóanyagtartalmát és kapszulázási hatékonyságát összefoglalva mutatom be a 4. táblázatban.

E két paraméter meghatározásához az egyes hatóanyagokra kapott maximális elnyelésnél felvett kalibrációs görbéket használtam. A maximális elnyeléseket a különböző hatóanyag molekulák esetén a 3. táblázat mutatja.

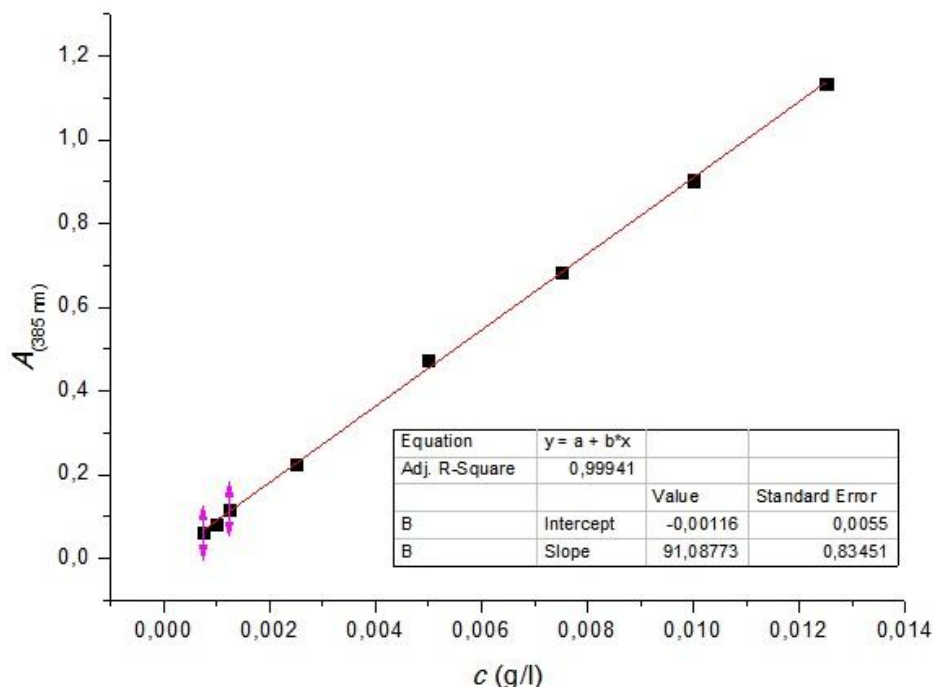
Hatóanyag neve	λ_{\max} / nm
TB501	385
TB503	385
TB517	387

3. táblázat A három hatóanyag molekula spektrumból megkapott elnyelési maximum

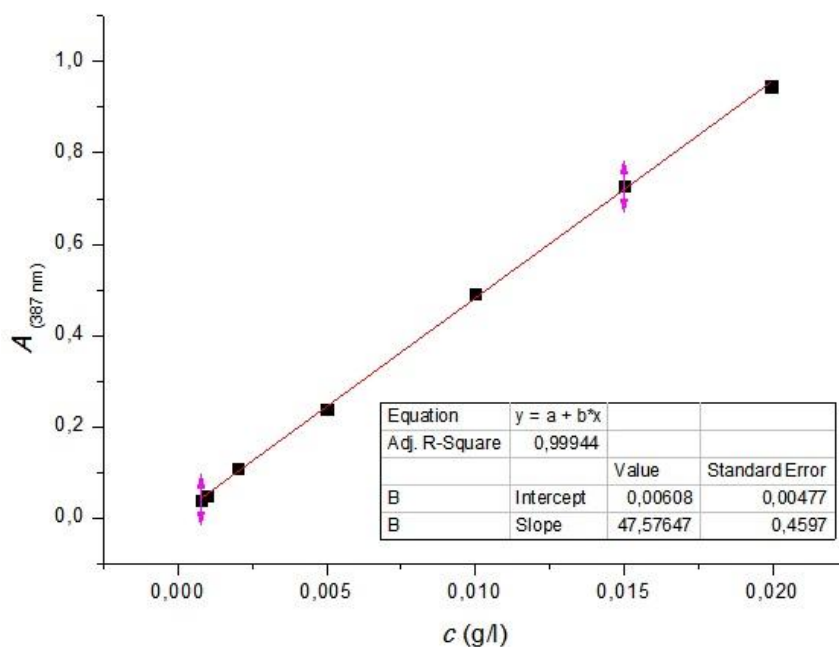
A hatóanyagok kalibrációs egyenesei a 8., 9. és a 10. ábrákon láthatóak.



8. ábra A TB501 acetonos oldatának abszorbanciája a koncentráció függvényében

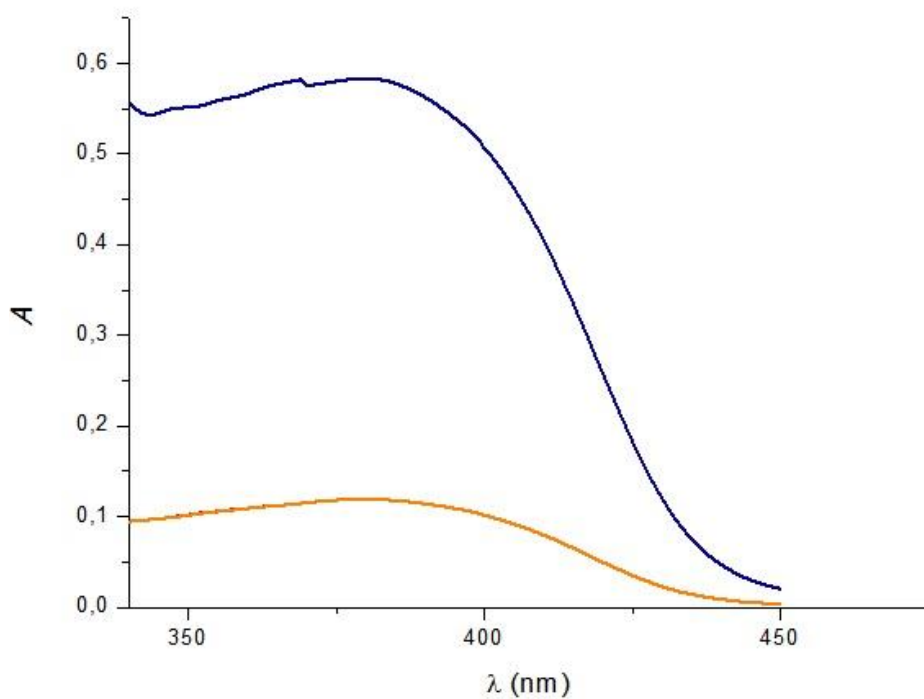


9. ábra TB503 acetonos oldatának abszorbanciája a koncentráció függvényében

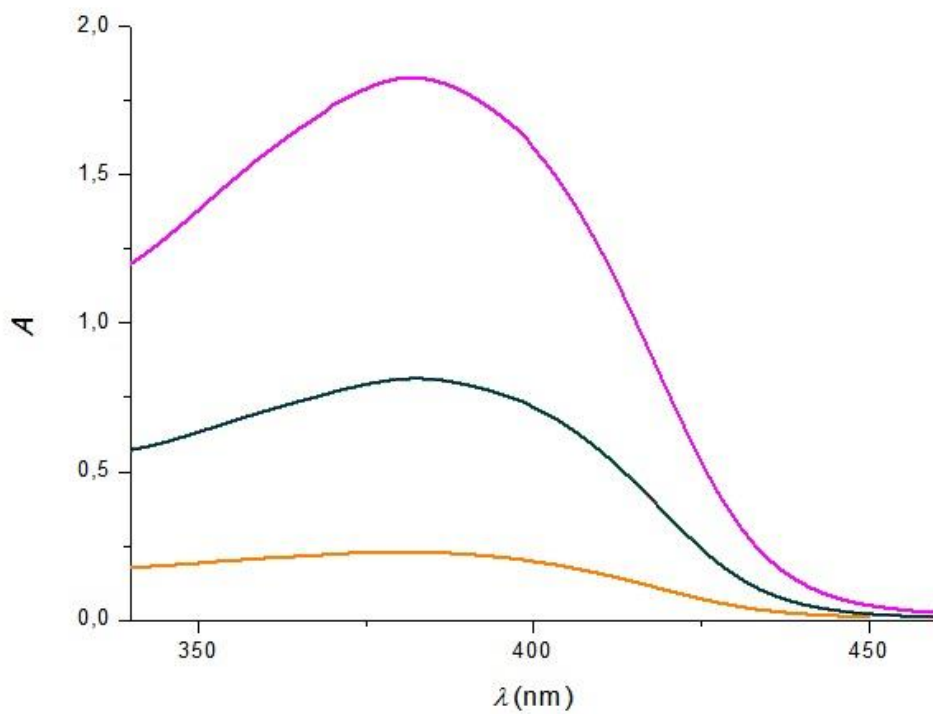


10. ábra TB517 acetonos oldatának abszorbanciája a koncentráció függvényében

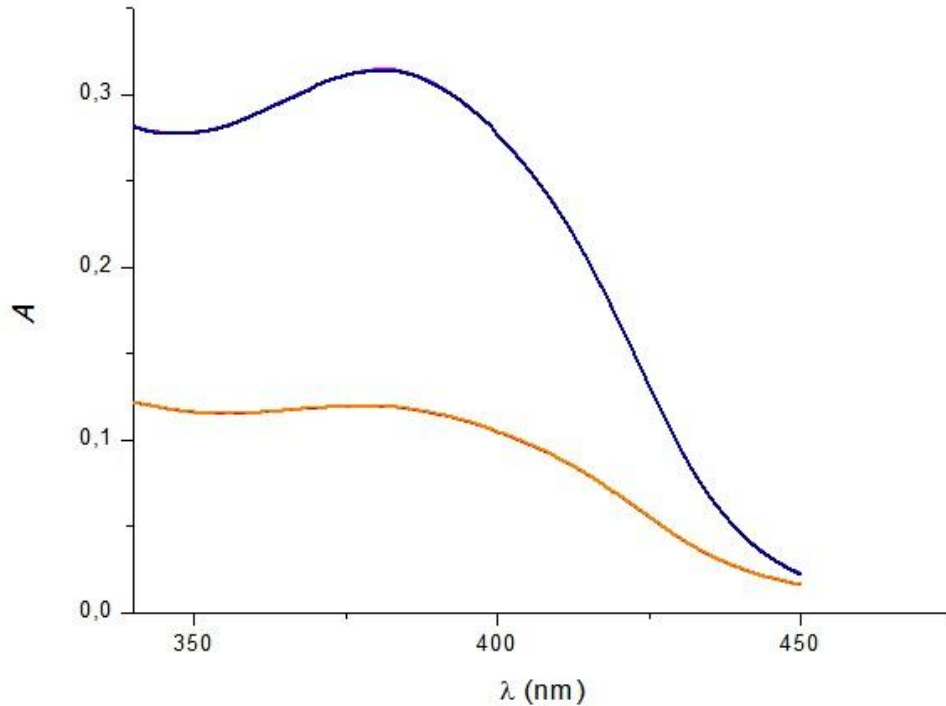
Az egyes feloldott minták spektruma a választott hullámhossz tartományban a 11., 12. és 13. ábrán látható. A három hatóanyag megnövekedett elnyelési spektruma azt mutatja, hogy növekvő mennyiségű hatóanyagot sikerül a nanorészecskékbe juttatni a kísérleti paraméterek változtatásával.



11. ábra TB501 hatóanyagtartalma az 1. és 2. minta készítési módszer alapján készült PLGA nanorészecskékben



12. ábra TB503 hatóanyagtartalma az 1., 2. és 3., minta készítési módszer alapján készült PLGA nanorészecskékben



13.ábra TB517 hatóanyag tartalma az 1. és 2. minta készítési módszer alapján készült PLGA nanorészecskékben

Az első minta készítési módszer esetén mind a hatóanyagtartalom mind a kapszulázási hatékonyság értékek igen kicsik (4. táblázat). A hatóanyagtartalom még a 0,3%-ot sem érte el. A 2. minták készítése során alkalmazott változtatás, kisebb szerves/vizes fázisarány, kétszeres hatóanyag mennyiség a várt javulást eredményezte, a még mindig kicsi hatóanyagtartalom 3-4-szeresére növekedett.

A három hatóanyag közül a legnagyobb, 1% körüli hatóanyagtartalmat mutató TB503 esetében további módosítást végeztem az előállítás paramétereiben, ami további, ezúttal 2-szeresre növekedett hatóanyagtartalmat eredményezett. Ez a változtatás a bemért hatóanyag tömegének 8,5-szeresére való növelése volt (figyelemre méltó, hogy ez nem csökkentette jelentősen a kapszulázási hatékonyságot).

További jellemzője még az előállított hatóanyag hordozóknak, hogy a kapszulázási hatékonyság alacsony, 1-2% körüli érték. Ha a preparáció során a nem kapszulázott hatóanyagot kinyerjük és újra felhasználjuk, az javíthat az eljárás sikerességén.

Fontos összefüggés látható a három anyag kapszulázási hatékonysága és a molekulák becsült $\log P$ értéke között. Mindegyik minta készítési módszerénél érvényes az, hogy a nagyobb $\log P$ -vel rendelkező TB hatóanyagok jobban kapszulázhatóak a PLGA nanorészecskékbe.

	1. minta		2. minta		3. minta		log P
	HT (%)	KT (%)	HT (%)	KH (%)	HT (%)	KH (%)	
TB501	0,14	0,60	0,7	1,9	-	-	2,776
TB501*	0,12	0,52	-	-	-	-	
TB503	0,24	1,16	0,9	1,84	2	1,26	3,407
TB517	0,2	0,45	0,6	1,58	-	-	1,559

4. táblázat Hatóanyagtartalom (HT %), kapszulázási hatékonyság (KT %) és log P értékek a három hatóanyag és különböző mintakészítési paraméterek esetén

A 4. táblázat adatai alapján azt is megállapíthatjuk, hogy az F127 stabilizátor hatóanyag mellé való bemérése szemmel láthatóan nem befolyásolta a hatóanyagtartalmat vagy a kapszulázási hatékonyságot. Másik észrevétel a 4. számú minta alapján, hogy stabilizátor nélkül a minta rövid időn belül aggregálódott.

5.2 Részecske méret

A hatóanyagtartalmú PLGA részecskéknek meghatároztam az átlagos méretét és a polidiszperzitását. A DLS (Dynamic Light Scattering) mérések eredményét az 5. táblázat foglalja össze.

Hatóanyag neve	1. minta d / nm	PD	2. minta d / nm	PD	3. minta d / nm	PD
TB501	133	0,09	128	0,17	-	-
TB501*	136	0,08	-	-	-	-
TB503	136	0,08	127	0,12	130	0,16
TB517	135	0,09	116	0,12	-	-

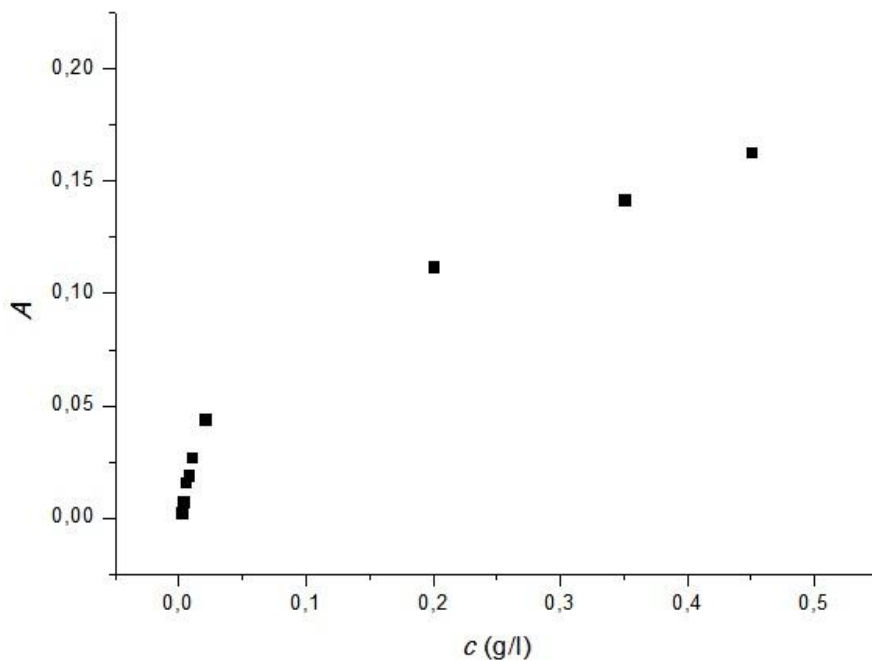
5. táblázat A hatóanyagotartalmazó PLGA részecskék átlagos átmértője (d) és polidiszperzitás indexe (PD)

A nanoprecipitációval előállítható részecskék mérete 135 nm körüli érték, néhány nm-es ingadozással. Ebből látszik, hogy reprodukálhatóan lehet a nanorészecskéket előállítani. A különböző hatóanyag bemérések esetén azt tapasztaltam, hogy a hatóanyag jelenléte nem befolyásolja a hatóanyag nélküli polimer nanorészecskék méreteit. A polidiszperzitás értékek alapján megállapítható, hogy mindegyik rendszer szűk méreteloszlású.

A tüdőbe közvetlenül 100-200 nm közötti részecskék juthatnak csak be, így a mért adatok megfelelnek ezen elvárásoknak.

5.3 Az oldhatóság hatása a hatóanyagtartalomra és a kapszulázási hatékonyságra

Az egyik lehetséges oka annak, hogy kis hatóanyag tartalmú PLGA részecskéket kaptam, a hatóanyag vízben való oldhatósága lehet. A TB501, TB503 és TB517 a becsült $\log P$ értékük szerint (4. ábra) hidrofób jellegű anyagok, de bizonyos mértékben oldódhatnak a vízben is. Tekintve a hatóanyag kis mennyiségét és a vizes fázis térfogatát, ez befolyásolhatja a megoszlását a PLGA és a vizes fázis között. Ezért megpróbáltam a TB503-as molekulára meghatározni a vízben való oldhatóságát. Ehhez széles koncentráció tartományban (0,0015 g/l - 0,2 g/l) készítettünk oldatokat, és mértük az abszorbanciájukat. Körülbelül 0,2 g/l-től volt látható az oldat alján kiülepedett hatóanyag.



14. ábra A TB503 oldhatóságának mérése

Ezeket a rendszereket felkeverve és ülepités után is megmértük. A 14. ábrán az ülepitett rendszerek elnyelése van feltüntetve.

Az abszorbancia koncentráció függéséből és a rendszer megfigyeléséből azt állapíthatjuk meg, hogy a TB503 vízben való oldhatósága körülbelül 0,1 g/l.

Minta	$V_{\text{vizes fázis}}$ / ml	$m_{\text{TB503,bemért}}$ / mg	$C_{\text{TB503,vizes fázis}}$ / g/l
1.	15	0,89	0,059
2.	4,5	1,74	0,387
3.	4,5	7,57	1,68

6. ábra TB503 bemérés és koncentráció a vizes fázisban a három mintakészítés esetén

Amint a 6. táblázat mutatja, az 1. minta esetében a rendszerbe bevitt TB503 fel tud oldódni a jelenlevő vizes fázisban, így érthető a PLGA nanorészecskék rendkívül kicsi, 0,24%-os hatóanyagtartalma. A 2. és 3. minta esetében már meghaladja a bevitt TB503 mennyisége a vízben való oldhatóságot, és valóban növekedett is a kapszulázódás mértéke 4- illetve 8-szorosára (4. táblázat), bár nem olyan nagymértékben, mint ami a bevitt hatóanyag mennyiségéből következhetne. A nem kapszulázódott hatóanyag egy része feltehetően kicsapódott a vizes fázisban, és a tisztítási lépések során távolítottam el.

Ahhoz tehát, hogy növelni tudjuk a PLGA nanorészecske hatóanyagtartalmát – egyrészt tekintettel kell lennünk a vízben való oldhatóságra, másrészt elő kell segíteni a hatóanyag PLGA-val való kölcsönhatását. Az adott három TB vegyület hidrofóbításának és kapszulázhatóságának összehasonlításából arra következtetünk, hogy ennek módja a molekula hidrofóbításának növelése. Ez például alkil lánc konjugálásával, vagy komplexálással megvalósítható.

5.4 Elektrokinetikai potenciál meghatározása

Az előállított nanorészecskék felületi töltését az elektroforetikus mobilitás méréssel vizsgáltam. A 7. táblázatban az előállított hatóanyagot tartalmazó PLGA nanorészecskék elektroforetikus mobilitását (μ_e) és az abból számolt zeta-potenciálját (ζ) tüntettem fel.

	1. minta előállítási módszer				2. minta előállítási módszer				3. minta előállítási módszer			
	HT (%)	KH (%)	$\mu_e \cdot 10^8 /$ $m^2V^{-1}s^{-1}$	$\zeta /$ mV	HT (%)	KH (%)	$\mu_e \cdot 10^8 /$ $m^2V^{-1}s^{-1}$	$\zeta /$ mV	HT (%)	KH (%)	$\mu_e \cdot 10^8 /$ $m^2V^{-1}s^{-1}$	$\zeta /$ mV
TB501	0,14	0,60	-1,744	-22,2	0,70	1,90	-0,909	-11,6	-	-	-	-
TB501*	0,12	0,52	-1,805	-23	-	-	-	-	-	-	-	-
TB503	0,24	1,16	-1,729	-22,1	0,90	1,84	-1,01	-12,9	2,00	1,26	-0,645	-8,23
TB5017	0,20	0,45	-1,36	-17,3	0,60	1,58	-0,768	-9,81	-	-	-	-

7. táblázat Az előállított részecskék elektroforetikus mobilitásal (μ_e), zeta-potenciálja (ζ)

A 7. táblázat értékei alapján megállapíthatjuk, hogy a hatóanyag tartalom növelésével és a vizes fázis térfogatának csökkentésével (1.-től 3. minta előállítási módszerig) az elektroforetikus mobilitásból számított zeta-potenciál értékek mindhárom hatóanyag molekula kapszulázása során kisebb negatív értéket vesznek fel. Ebből arra következtetünk, hogy a PLGA részecske felületi töltése a TB molekula adszorpciója miatt változott meg.

A hatóanyag molekulák tercier-amin csoportokat tartalmaznak, melyek pH 5-ös közegben protonálódnak. Az eredetileg a PLGA láncvégei miatt nagyobb negatív zeta-potenciált mutató részecskék felületén megkötődő pozitív töltésű hatóanyag molekulák a zeta-potenciál eltolódását eredményezik.

A hatóanyagok zeta-potenciál értékei közti hasonlóság (1. minta előállítási módszer TB501 és TB503 között) és különbség (1. minta előállítási módszer TB501/TB503 és TB517 között) (7. táblázat) a töltésekkel magyarázható. A TB501 és TB503 hasonló értéke két szabad pozitív töltésének, míg a TB517 eltérő értéke a molekula négy pozitív töltést mutató csoportjának tulajdonítható.

A molekulák becsült méretének ismeretében számítást végeztem arra, hogy az adott hatóanyagokból milyen mennyiség felel meg a PLGA részecske monomolekulás borítottságának. Egyetlen PLGA részecske a számításhoz felhasznált adatai a 8. táblázatban láthatóak.

1 PLGA részecske adatai	
átmérője (nm)	136
térfogata (nm ³)	1317090
felszíne (nm ²)	58107
tömege (ng)	1,58*10 ⁻⁶

8. táblázat Egy darab PLGA nanorészecske adatai

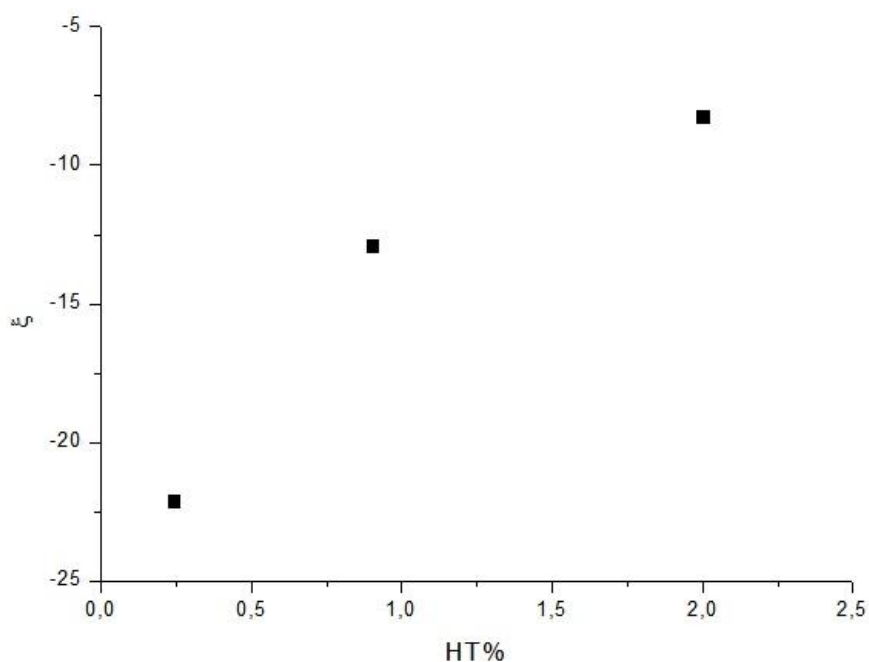
	1. minta előállítási módszer		2. minta előállítási módszer		3. minta előállítási módszer	
	<i>n</i> / mol	<i>A</i> / nm ²	<i>n</i> / mol	<i>A</i> / nm ²	<i>n</i> / mol	<i>A</i> / nm ²
TB501	5,067*10 ⁻²¹	5492	2,386*10 ⁻²⁰	25862	-	-
TB503	9,324*10 ⁻²¹	10107	3,498*10 ⁻²⁰	37917	7,77*10 ⁻²²	84224
TB517	5,460*10 ⁻²¹	3288	1,69*10 ⁻²⁰	29592	-	-

9. táblázat A hatóanyag molekulák anyagmennyisége (*n*) és az adszorpciós réteggént számított helyigénye (*A*) egy PLGA nanorészecskére vonatkoztatva

A ChemDraw nevű program segítségével meghatároztam a TB vegyületekre egy molekula méretét, és ebből az általa elfoglalt területet. Ez a TB501 és TB503 esetén $1,8 \text{ nm}^2$ -nek, míg a TB517 molekula esetén 3 nm^2 adódott. Az adott hatóanyag tartalom alapján kiszámítottam, mekkora felületet foglalna el a PLGA részecske felületén adszorválódva az egyes mintáknál a hatóanyag, feltételezve, hogy a PLGA belsejébe nem záródott.

A 9. táblázat adatai azt mutatják, hogy a monomolekulás réteggént elképzelt hatóanyag helyigény csak a 3. minta készítési eljárással kapszulázott TB503 haladja meg a PLGA részecske felületének nagyságát. Ez a TB503 anyag 3 mintája. Ezek alapján elmondható, hogy ebben az esetben a TB503 hatóanyag a PLGA részecske belsejébe biztosan került.

Ezt a következtetést a 15. ábra is alátámasztja, ahol a hatóanyagtartalom függvényében ábrázoltuk a zeta-potenciált.



15. ábra A zeta-potenciál a hatóanyag tartalom (HT%) függvényében TB503 esetén

A zeta-potenciál változása az 1% hatóanyagtartalomnál, a nagyobb mértékű felületi megkötődés miatt még jelentős. A további 2%-ra növekedett hatóanyagtartalomnál a kisebb mértékű a felülettel kapcsolatos változás. Ez tehát arra utal, hogy a 3. mintánál már a PLGA nanorészecske belsejébe is került kapszulázott hatóanyag.

Szakedolgozat összefoglaló

Biodegradábilis kolloid részecskék előállítása és alkalmazása hatóanyag bevitelre

Hanyecz Noémi, kémia alapszakos hallgató

ELTE TTK Kémiai Intézet, Fizikai Kémiai Tanszék

Témavezető: **Dr. Kiss Éva**, egyetemi tanár
ELTE, Fizikai Kémiai Tanszék
Konzulens: **Gyulai Gergő**, tudományos segédmunkatárs
ELTE, Fizikai Kémiai Tanszék

Szakedolgozati munkám során hatóanyag jelölt molekulák nanoprecipitációs módszerrel előállított, PLGA alapú, kolloidális gyógyszerhordozóba történő kapszulázásával foglalkoztam. A hatóanyag három, *Mycobacterium tuberculosis* ellen hatásos molekula volt: TB501, TB503, TB517.

Meghatároztam az előállított gyógyszerhordozó PLGA részecskék gyógyszerészeti paramétereit, a hatóanyagtartalmat és a kapszulázhatósági hatékonyságot, valamint méret- és zeta-potenciál meghatározással jellemeztem a rendszereket. A dinamikus fényszórással mért átlagos átmérő 130 nm-nek adódott, ami abba az előnyös mérettartományba esik, amely rendszerek tetszőleges módon adagolhatóak.

Összefüggést találtam a három anyag kapszulázhatósága és a $\log P$ -vel jellemzett hidrofobitása között, bár mindhárom molekula esetében kicsi volt a hatóanyagtartalom és a kapszulázhatósági hatékonyság is. Ezek növelése érdekében módosítottam a nanoprecipitáció körülményeit. A módosítás a szerves/vizes fázis térfogatarányának növelése, valamint a hatóanyag szerves fázisbeli koncentrációjának növelése volt. Ezzel a TB503 hatóanyagjelölt esetében négyszeres, majd további kétszeres növekedést értem el a PLGA nanorészecskék hatóanyagtartalmában.

Bemutattam, hogy a sikeres hatóanyagtartalom növekedés a (közepesen) hidrofób hatóanyagok vízben való oldhatóságával van összefüggésben. A mennyiségi viszonyok és a zeta-potenciál értékek elemzéséből azt a következtetést tudtam levonni, hogy a hatóanyag részben adszorpcióval a felülethez kötődik, részben a nanorészecske belsejében helyezkedik el.

A mérési eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a nanoprecipitációval előállított PLGA részecskékbe történő kapszulázhatóság növelhető az optimális előállítási paraméterek megtalálásával, de feltehetően tovább javíthat, ha a molekula hidrofób jellege is növekszik.

Summary

Preparation of biodegradable colloid nanoparticles and use as drug delivery systems

Ms Noémi Hanyecz, BSc student in Chemistry

Place of diploma work: Physical Chemistry Department, Institute of Chemistry, Eötvös Loránd University, Budapest

Place of defense: Physical Chemistry Department

Supervisor(s): **Dr. Éva Kiss**, professor of chemistry
Physical Chemistry Department, ELTE

Consulent: **Gergő Gyulai**, assistant research fellow
Physical Chemistry Department, ELTE

In the course of my thesis work I prepared PLGA based drug loaded nanoparticles using the nanoprecipitation method. Three drugs candidates were chosen because of their effectiveness against *Mycobacterium tuberculosis*: TB501, TB503, TB517.

I determined the pharmacological parameters, the drug content and the encapsulation efficiency of the prepared PLGA particles. I also characterized the particles by their size, size distribution and zeta-potential. The hydrodynamic diameter of the particles was around 135 nm, an ideal size range for all kind of administration.

A connection was found between the drug content of the particles and the hydrophobicity of the molecules characterized by their $\log P$. Relatively low encapsulation parameters were obtained for all three drug molecules. To increase the drug content and encapsulation efficiency the formulation conditions have been modified. The changes involved the increase of the organic/aqueous phase ratio and the concentration of the drug in the organic phase. In the case of TB503 an eightfold increase in drug content was achieved.

I demonstrated that the improvement of the drug content is incorporated with the water solubility of the relatively hydrophobic drugs. Taking into consideration the quantities of the drug, the size of the particles and their zeta-potential values, it was concluded that the drug molecules are partially present on the surface of the PLGA nanoparticles, but are also partially incorporated into the polymer matrix.

According to the results it was possible to improve the encapsulation of the drug candidates into PLGA particles prepared with the nanoprecipitation method by changing the formulation conditions. The similar result could be also achieved by increasing the hydrophobicity of the drug.

Irodalomjegyzék

- [1] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, W. E. *J Controll Release* **2001**;70 1-20
- [2] I. Bertóti, Gy. Marosi, A. Tóth, Műszaki felülettudomány és orvosbiológiai alkalmazásai, B+V (medical&technical) Lap- és Könyvkiadó Kft Budapest
- [3] H. Xie, J. W. Smith *Journal Nanobiotechnology* **2010** 8:18
- [4] D.K. Sahana, G. Mittal, V. Bardwaj, M.N.V. Ravi Kumar *J Pharm Sci* **2008** 97 4
- [5] R. Dinarvand, N. Sepehri, S. Manoochehri, H. Rouhani, F. Atyabi *Int. J. Nanomedicine* **2011** 6 877–895
- [6] J. P. Rao, K. E. Geckeler *Progress in Polymer Science* **2011** 36 887-913
- [7] S. Schubert, J. T. Delaney, Jr and U. S. Schubert *Soft Matter*, **2011** 7 1581–1588
- [8] N. Zafar, H. Fessi, A. Elaïssari *Int J Phar* **2014** 461 351– 366
- [9] J-M. Lim, N.Bertrand, P. M. Valencia, M. Rhee, R. Langer, S. Jon, O. C. Farokhzad, R. Karnik *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2014** 10 2 401-409
- [10] Y. N. Konan, R. Gurny , E. Allémann *Int J Pharm* **2002** 233 239–252
- [11] T. Trimaille, C. Pichot, A. Elaïssari, H. Fessi, S. Brianç, T. Delair *Colloid Polym Sci* **2003** 281 1184-1190
- [12] T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou, Y. Kawashima *J Cont Rel*, **1993** 25 89-98
- [13] H. Ibrahim, C. Bindschaedler, E. Doelker, P. Buri and R. Gurny *Int J Pharm*, **1992** 87 239-246
- [14] E. Allémann, R. Gurny, E. Doelker, *Int J Pharm* **1992** 87 247-253
- [15] E. Allémann, J-C. Leroux, R. Gurny, E. Doelker, *Pharm Res* **1993** 10 12
- [16] H. Sah, L. A Thoma, G. C. Wood *Int J Nanomedicine* **2013**; 8 747-765
- [17] J. M. Anderson*, M. S. Shive *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997** 28 5–24
- [18] H. K. Makadia, S. J. Siegel *Polymers* **2011** 3 1377-1397.
- [19] G. Gyulai Doktori Értekezés Polimer tartalmú felületi nanostruktúrák előállítása és jellemzése, valamint gyógyszerhordozóként való alkalmazási lehetősége **2014**
- [20] É. Kiss, D. Schnöller, K. Pribranská, K. Hill, Cs. B. Péntes, K. Horváti, Sz. Bősze *J Disp Sci Tech* **2011** 32:12 1728-1734
- [21] K. Pribranská *Szakedolgozat* Kolloidális gyógyszerhordozó előállítása nanoprecipitációval **2010**
- [22] T. J. de Faria, M. Roman, [...],A. Báfica *Antimicrob Agents Chemoter* **2012** 65(5):2259

- [24] <http://hu.wikipedia.org/wiki/G%C3%BCm%C5%91k%C3%B3r> (2014.04.15)
- [25] Gyógyszerész kémia gyakorlatok Semmelweis Kiadó, Budapest 2005
- [26] http://en.wikipedia.org/wiki/Minimum_inhibitory_concentration (2014.04.30)
- [27] A. Borsos *Tudományos Diákköri Dolgozat* Elektromosan töltött polimer nanogél részecskék vizsgálata **2007**
- [28] K. Barkács, J. Bartholy, T. Kiss Keve, R. Pongrácz, M. Reskóné Nagy, I. Salma, P. Sohár, B. Tóth *Környezetkémia* Typotex Kiadó **2012**
- [29] A. Dobrádi *Tudományos Diákköri Dolgozat* Gyógyszerhordozó nanorészecskék előállítása és vizsgálata **2012**