



BIOPOLIMER ALAPÚ NANORENDSZEREK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA

Doktori (PhD) értekezés tézisei

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOPOLYMER-BASED NANOSYSTEMS

PhD thesis

Bodnár Magdolna

Témavezető:
Dr. Borbély János
egyetemi docens

Debreceni Egyetem
Kolloid- és Környezetkémiai Tanszék
Debrecen, 2008.

1. Bevezetés és célkitűzések

Napjaink dinamikusan fejlődő tudományterülete a nanotudomány. Egyre növekvő figyelem övezi a nanoanyagokat, a nanotechnológiát. Életünk különböző területein találkozunk a nanoanyagokkal foglalkozó tudományos kutatások vívmányaival, az informatikától az orvostudományig, az élelmiszeripartól a gyógyszeriparig.

Napjainkban azokat a részecskéket tartjuk nanorészecskéknek, amelyek mérete egy vagy több dimenzióban 100 nm alatt van. A nanorészecskék újszerű tulajdonságokat hordoznak, amelyek megjelenése általában egy kritikus méret alatt jelentkezik, mely méret 100 nm. A nano- és nem nanorészecskék között nem húzható éles határ. Az újszerű, általában mérettől függő tulajdonságok megjelenése anyagi minőség függvénye is, ezért a mérethatár 100 nm-től jóval nagyobb, ill. kisebb is lehet.

A tudomány, a technika fejlődésével növekvő igény mutatkozik a mikro-, majd nanorendszerek tervezésére, létrehozására. Ezzel párhuzamosan, a környezettudatos magatartás kialakulásával a bioanyagokból, biopolimerekből előállítható rendszerek kifejlesztése került előtérbe. Tudományos értelemben a bioanyag jelentése széleskörű, értelmezése tudományterülettől is függ.

Napjaink biopolimerekre épülő kutatásainak egyik alapvető célja olyan nanorendszerek létrehozása, amelyek nagy hatékonysággal használhatók gén, illetve gyógyszer-hatóanyagok célba juttatására, szabályozott kioldódására, valamint szövetregenerálásra. Tudományos értékük abban rejlik, hogy biokompatibilis rendszerek, nem váltanak ki immunreakciót a szervezetben, és biodegradábilisak, azaz biológiai úton lebonthatók.

A funkciós csoportokkal rendelkező biopolimerek alkalmasak lehetnek arra, hogy fizikai, illetve kémiai módosítással, térhálósítással nanoméretű részecskéket alkossanak. Ezen elgondolás alapján választottuk az aminocsoportokkal rendelkező kitozánt, valamint a karboxilcsoportokkal rendelkező hialuronsavat és a poli- γ -glutaminsavat nanorészecskék előállítására. A kitozán egy megújuló természetes anyagnak, a kitinnek származéka; biokompatibilis, biodegradábilis biopolimer. A hialuronsav olyan bioanyag, melyet az élő szervezetek termelnek, megtalálható az

ízületi folyadékban, extracelluláris mátrixban, szintén biokompatibilis és biodegradábilis biopolimer. A poli- γ -glutaminsav extracelluláris poliaminosav, mely biotechnológiai úton nagy tisztasággal állítható elő.

Kutatásaink során célul tűztük a kitozánból, ill. a hialuronsavból származó, vizes közegben stabilis nanorészecskék előállítását. Vizes közegben, vízdoldható karbodiimid felhasználásával, savamidkötés kialakítása révén intramolekulárisan kívántuk térhálósítani a kitozánt, és a hialuronsavat nanorészecskék kialakítása céljából.

Céljaink között szerepelt a térhálós nanorészecskék részletes vizsgálata, a keletkező rendszerek szerkezetének, méretének, oldatbeli viselkedésének tanulmányozása. Összefüggéseket kívántunk feltárni a poliszacharidok molekulatömege, a térhálósítás mértéke, valamint a térhálós részecskék tulajdonságai között azért, hogy értékes információkat nyerhessünk a nanorészecskék alkalmazhatóságáról.

További céljaink között szerepelt olyan nanorészecskék előállítása vizes közegben, amelyek a kitozán és a hialuronsav, illetve a kitozán és a poli- γ -glutaminsav biopolimerek ionos kölcsönhatáson alapuló önrendeződésével jönnek létre. Célul tűztük ki a nanorészecskék részletes vizsgálatát, és a részecskék tulajdonságait befolyásoló tényezők feltárását, hogy optimalizálni tudjuk az önrendeződő nanorendszerek tulajdonságait a részecskék széleskörű biológiai felhasználása végett.

2. Vizsgálati és szintézis módszerek

2. 1. Felhasznált anyagok és szintézismódszerek

A kitozánt dikarbonsavakkal (borostyánkősav, almasav, borkősav, poli-(etilén glikol)bisz(karboximetil)éter), és trikarbonsavval (citromsav), a hialuronsavat 2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin)-nal térhálósítottuk. A reakciókat vizes közegben végeztük, szobahőmérsékleten, vízdoldató 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid metiljodid reaktáns jelenlétében.

A kis molekulatömegű kitozánt oxidatív degradációval állítottuk elő szobahőmérsékleten, a hialuronsav savas hidrolízisét magas hőmérsékleten (70°C) hajtottuk végre.

A polielektrolitok önrendeződése révén létrejövő nanorészecskék előállítása szobahőmérsékleten, vizes közegben (pH = 3,0) történt a polielektrolitok vizes oldatainak összeöntésével.

2. 2. Alkalmazott műszeres módszerek

A poliszacharidok térhálósodásának mértékét, valamint a térhálós nanorészecskék szerkezetét NMR spektroszkópiával vizsgáltuk, ^1H -NMR és ^{13}C -NMR spektrumok, valamint ^1H - ^1H korrelációs (COSY), és ^1H - ^{13}C HETCOR kétdimenziós mérések felhasználásával.

A részecskék hidrodinamikai átmérőjét dinamikus fényszórás fotometriával határoztuk meg, a mérési eredményeket NNLS (non negative constrained least squares/legkisebb négyzetek) módszerrel értékeltük ki.

A száradt, szilárd állapotú részecskék vizuális megjelenítéséhez, valamint azok méretének meghatározásához transzmissziós elektronmikroszkópiát használtunk.

A részecskéket tartalmazó vizes kolloid rendszerek transzmittancia értékeit Unicam SP 1800 fotométerrel határoztuk meg, $\lambda = 480$ nm, illetve $\lambda = 500$ nm hullámhosszon, optikailag homogén kvarcküvetében.

Az elektroforetikus mozgékonyságot, -mobilitást Brookhaven ZetaPALS zeta potenciálmérő készülékkel végeztük, a nanorészecskék mobilitását 1,0 mM-os KCl inert elektrolit jelenlétében határoztuk meg.

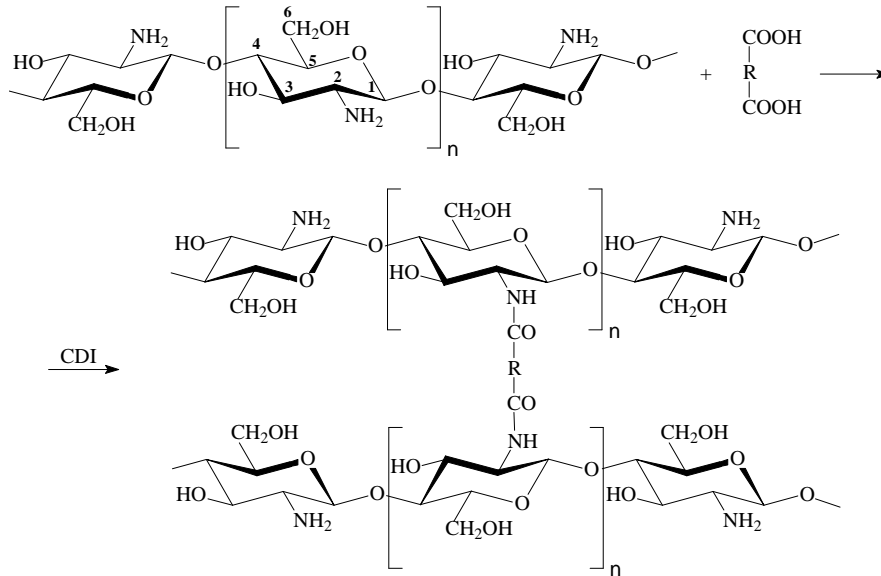
3. Új tudományos eredmények

Nanorészecskék előállítása és vizsgálata a kitozán térhálósításával

3. 1. Megvalósítottuk a kitozán intramolekuláris térhálósítását többértékű karbonsavakkal, vizes közegben, vízoldható karbodiimid felhasználásával.

A kitozán többértékű karbonsavakkal (borostyánkőssavval, almasavval, borkőssavval, citromsavval, poli-(etilén-glikol)bisz(karboximetil)éterrel) végrehajtott térhálósítása során a kitozán aminocsoportjai reagálnak a térhálósító karboxilcsoportjaival, és kondenzációs reakcióban savamid-kereszt-kötés alakul ki. Megállapítottuk, hogy a peptidszintézisek révén ismertté vált technika hatékonyan alkalmazható a kitozán módosítására, térhálósítására, savamidkötés kialakításával. Megvizsgáltuk a képződött

térhálós nanorészecskék tulajdonságait: szerkezetét, a térhálóság mértékét, oldatbeli viselkedését, méretét duzzadt és száraz állapotban.



1. ábra A kitozán térhálósításának sémája

3.2. Megállapítottuk, hogy a térhálós kitozán nanorészecskék méretét a közeg pH-ja befolyásolja, és sem a térhálósítás mértékétől, sem a térhálósító hidrofил jellegétől nem függ.

Meghatároztuk a térhálós kitozán nanorészecskék effektív átmérőit, melyek 290 nm és 340 nm között voltak vizes közegben, és 60 nm – 300 nm között változtak szilárd állapotban. Megállapítottuk, hogy adott pH esetén a nanorészecskék méretét nem befolyásolta jelentős mértékben sem a térhálósítás aránya, sem a térhálósító hidrofил jellegének változása. A közeg pH-jának változtatása során azonban a térhálósító minősége különböző részecskeméret-változást okoz.

Megállapítottuk, hogy a térhálósítás mértéke, a térhálósító hidrofил jellege és a közeg pH-ja befolyásolja a térhálós kitozán nanorészecskéket tartalmazó vizes rendszerek transzmittanciáját.

3.3. Megállapítottuk, hogy a kitozán molekulatömegének csökkenésével hatékonyan csökkenthető a térhálós nanorészecskék mérete.

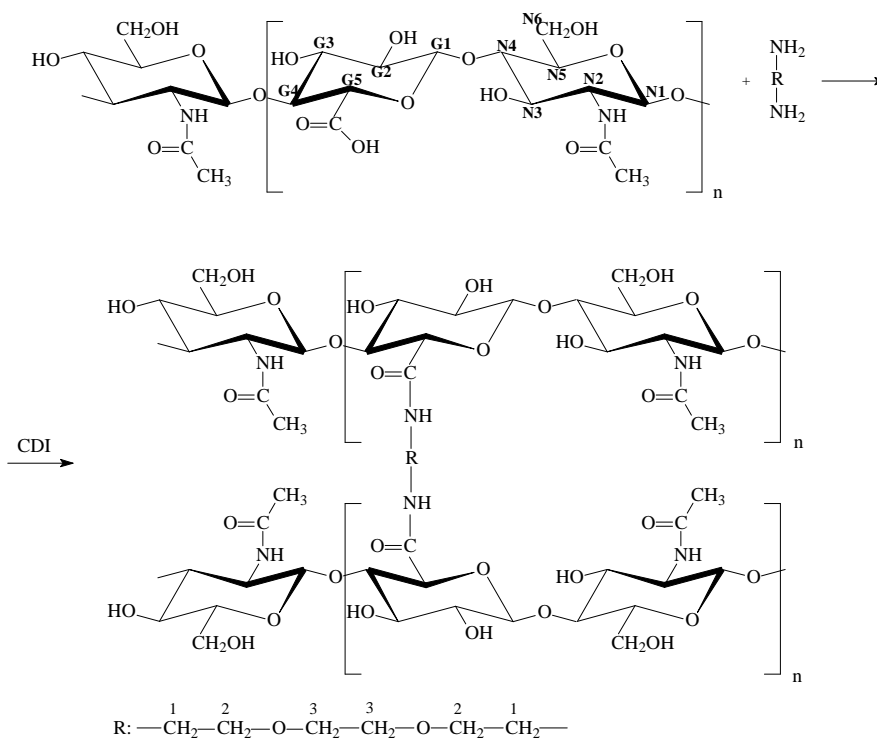
Különböző molekulatömegű kitozánokat állítottunk elő oxidatív degradációval. Megvizsgáltuk a kitozán molekulatömegének hatását a képződő nanorészecskék

tulajdonságaira. Megállapítottuk, hogy a kitozán molekulatömegétől függetlenül a térhálós részecskék méreteloszlása bimodális. A kisebb méretű részecskék túlsúlya mellett nagyobb méretű részecskék is előfordulnak minden esetben. Meghatároztuk a kisebb méretű térhálós részecskék effektív hidrodinamikai átmérőjét, ami a kitozán molekulatömegétől függően 50 nm és 120 nm között változott. Degradált kitozánból kiindulva sikerült 100 nm alatti effektív hidrodinamikai átmérőjű, valódi nanorészecskéket előállítani.

Nanorészecskék előállítása és vizsgálata a hialuronsav térhálósításával

3.4 Megvalósítottuk a hialuronsav intramolekuláris térhálósítását a 2,2'(etiléndioxi)bisz(etilamin)-nal, vizes közegben, vízoldható karbodiimid felhasználásával.

A térhálósítás során a hialuronsav karboxilcsoportjai reagálnak a térhálósító 2,2'(etiléndioxi)bisz(etilamin) aminocsoportjaival, és savamid keresztkötés alakul ki. Megmutattuk, hogy a peptidszintézisek révén ismertté vált technika hatékonyan alkalmazható a hialuronsav módosítására, térhálósítására savamid kötés kialakításával.



2. ábra A hialuronsav térhálósításának sémája

Megvizsgáltuk a képződött térhálós nanorészecskék tulajdonságait: szerkezetét, a térhálósság mértékét, oldatbeli viselkedését, méretét duzzadt és száraz állapotban. Megállapítottuk, hogy a nanorészecskéket tartalmazó vizes rendszerek opálösszeállása, transzmittancia értéke független a hialuronsav molekulatömegétől és a közeg pH-jától, a térhálósítás mértéke határozza meg.

3.5. Megmutattuk, hogy a térhálós hialuronsav nanorészecskék mérete hatékonyan csökkenthető a hialuronsav molekulatömegének csökkentésével és a térhálósítás mértékének növelésével.

Különböző molekulatömegű hialuronsavakat állítottunk elő savas hidrolízissel. Megvizsgáltuk a térhálós hialuronsav nanorészecskék méretét a hialuronsav molekulatömegének és a térhálósítás mértékének függvényében. A fényszórás fotometriai mérések alapján megállapítottuk, hogy bimodális eloszlásban, intra- és intermolekuláris kötések is létrejönnek a hialuronsav térhálósítása során. A szám szerinti megoszlást alapul véve azonban a nagy méretű részecskék elhanyagolhatók. Meghatároztuk a hialuronsav nanorészecskék effektív hidrodinamikai átmérő adatait, melyek 30 nm és 180 nm között változtak vizes közegben, és 150 nm alatt voltak szilárd állapotban.

Nanorészecskék előállítása és vizsgálata polielektrolitok önrendeződésével

3.6. Megállapítottuk, hogy a kitozán és a hialuronsav önrendeződésével létrejövő részecskék instabilisek és nagyméretűek

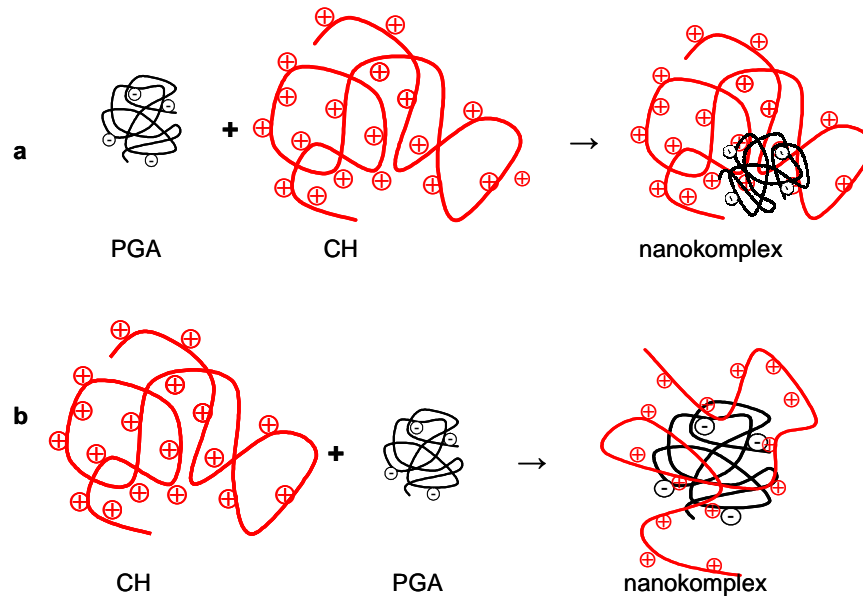
Nanorészecskéket állítottunk elő a kitozán és a hialuronsav önrendeződésével vizes közegben (pH = 3,0), szobahőmérsékleten, a polielektrolit oldatok összeöntésével. Nagyobb polielektrolit-koncentrációk mellett csapadékkiválást tapasztaltunk. Megmutattuk, hogy kis polielektrolit-koncentrációk mellett is a két poliszacharid önrendeződése nagyméretű, és széles méreteloszlású rendszerek létrejöttét eredményezi. Mindkét polielektrolit poliszacharid, melyben a gyűrűk konformációja miatt a szabad rotáció gátolt, ami kihatással lehet a létrejövő rendszer stabilitására, méretére.

3.7. Megállapítottuk, hogy a rossz oldhatóságú kitozán szabad aminocsoportjai stabilizálják a kitozán – poli- γ -glutaminsav önrendeződő nanorészecskéket.

Nanorészecskéket állítottunk elő a kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződésével vizes közegben (pH = 3,0), szobahőmérsékleten, a polielektrolit oldatok összeöntésével. A polielektrolitok funkciócsoportjai között kialakuló ionos kölcsönhatás hidofil nanorendszerek létrejöttét eredményezi a polimerek önrendeződésével. Megállapítottuk, hogy a rossz oldhatóságú kitozán szabad aminocsoportjai stabilizálják a kialakult nanorészecskéket, mivel abban az esetben, ha a létrejövő ion-ion kölcsönhatás után nem maradnak szabad aminocsoportok, a kitozánnal együtt a kialakult nanorendszer is instabillá válik és kicsapódik – nagyobb polielektrolit-koncentrációk mellett.

3.8. Megállapítottuk, hogy a biopolimerek aránya, az összeöntés sorrendje, valamint a közeg pH-ja befolyásolja az önrendeződő kitozán – poli- γ -glutaminsav nanorészecskék hidrodinamikai méretét és a részecskéket tartalmazó vizes rendszerek stabilitását.

Megvizsgáltuk a képződött nanorészecskék tulajdonságait: oldatbeli viselkedését, méretét duzzadt és száraz állapotban, elektroforetikus mobilitását. Megállapítottuk, hogy a biopolimerek aránya, az összeöntés sorrendje, valamint a közeg pH-ja határozza meg nanorészecskéket tartalmazó vizes rendszerek opálosságát. Meghatároztuk az önrendeződő nanorészecskék effektív hidrodinamikai átmérőjét, melyet a polielektrolitok aránya, az összeöntés sorrendje, és a közeg pH-ja mellett a sóhatás és a polielektrolitok koncentrációja is befolyásolja, ami igazolja a polimolekuláris önrendeződés kialakulását: a polielektrolitok koncentrációjával csökken az egyes részecskéket alkotó makromolekulák száma. Megmutattuk, hogy a kialakult nanorészecskék felületi töltöttségét döntő mértékben a kitozán szabad aminocsoportjai határozzák meg. Azon pH érték fölött, ahol a nanorészecske felületi töltöttsége negatív, a rendszer instabilissá válik. Megállapítottuk, hogy a kialakult nanorészecskéket a kitozán protonált aminocsoportjai stabilizálják. Amennyiben a pH-emelés hatására a kitozán aminocsoportjai teljes mértékben deprotonálódnak, a részecskék aggregálódnak és kicsapódnak.



3. ábra

A PGA és a kitozán lineáris láncai között kialakuló önrendeződés vázlatos rajza

(a: PGA-hoz öntve a kitozánt, b: a kitozánhoz öntve a PGA-t, pH = 3,0)

4. Az eredmények várható gyakorlati alkalmazása

Kutatásaink során a nanorészecskéket biokompatibilis, biodegradábilis biopolimerekből állítottunk elő.

A pórusos nanorészecskék kovalens térhálósítással, amidkötés kialakításával, biokompatibilis térhálósítók alkalmazásával keletkeztek. A részecskék – szerkezetükből adódóan – alkalmasak lehetnek hatóanyagok szabályozott kibocsátására. A biopolimerek molekulatömegével, illetve a térhálósítás mértékének változtatásával a nanorészecskék mérete, pórushálózata a felhasználási igények szerint változtatható.

A biopolimerek kedvező biológiai tulajdonsága sérülhet a keresztkötések kialakításával. A probléma kiküszöbölése érdekében olyan önrendeződő részecskéket állítottunk elő, amelyekben a biopolimerek megtartják biokompatibilitásukat, biodegradábilisukat. Az általunk előállított kitozán – poli- γ -glutaminsav önrendeződő nanorészecskék alkalmasak lehetnek DNS szállítására, mindamellett biodegradábilisek.

Előzetes eredményeinkre alapozva *in vitro* és *in vivo* kísérleteket végzünk, melyek során szeretnénk bizonyítani az előállított nanorendszerek biokompatibilitását, majd a szállítóeszközként való optimális felhasználhatóság szempontjából módosítjuk a nanorészecskéket.

1. Introduction and objectives

Nanoscience is a dynamically developing area. Results of scientific research, based on nanomaterials, can affect a variety of aspects, which include informatics, the food industry and medicine to name just three.

Particles below 100 nm in one of more dimensions are regarded as nanoparticles. They possess novel properties. These properties relate to the size, but also, of course, depend on the material composition.

There is increasing interest in designing sub-micron and nanosystems. In therapeutics there is particular interest in developing such systems composed of biopolymers. These systems would have the advantages of being biocompatible, non-immunogenic and biodegradable. Potential applications of these carriers and implants would be gene- and targeted drug-delivery and tissue engineering.

Biopolymers with reactive functional groups possess the potential to form nano-sized particles by physical or chemical modifications, and cross-linking reactions. In the present studies, chitosan, hyaluronic acid and poly- γ -glutamic acid were chosen to prepare nanoparticles. Chitosan is a polyamine, a renewable natural polysaccharide, biocompatible and biodegradable and is prepared from chitin. Hyaluronic acid is a polycarboxylic acid is a biocompatible and biodegradable biomaterial and is one of the major components of the extracellular matrix of connective tissues. Hyaluronic acid is present in synovial fluid of joints, in the vitreous body, in the umbilical cord and in scaffolding that comprises cartilage. Poly- γ -glutamic acid is an extracellular polyamino acid with functional carboxyl groups, a biocompatible, biodegradable biopolymer and can be prepared by bacterial fermentation.

The aim of this work was to create stable nanoparticles based on chitosan and hyaluronic acid in aqueous media. We wanted to cross-link chitosan and hyaluronic acid intramolecularly by using water soluble carbodiimid as coupling agent to produce amide linkages.

One of our objectives was to analyze the structure of the nanoparticles, determine their size and study the solubility of these particulate systems. We wanted to explore the relationship between the molecular weight of polysaccharides and the ratio of cross-linking, in order to assess their suitability for commercial applications.

An additional aim of our work was to create self-assembled nanoparticles, i.e. lacking covalent cross-linkers between chitosan and hyaluronic acid, as well as between chitosan and poly- γ -glutamic acid. In other words, these particles would be cross-linked by ion-ion interactions between functional groups of these biopolymers. We wanted to study the properties of these nanoparticles, determine the factors influencing the properties of nanoparticles, and optimize the properties of nanoparticles for potential biological-therapeutic applications.

2. Experimental section

2. 1. Applied materials and experimental methods

Cross-linked chitosan nanoparticles were prepared by the carbodiimide technique. Dicarboxylic acids (tartaric acid, succinic acid, malic acid, poly-(ethylene glycol)bis(carboxymethyl)ether), and tricarboxylic acid (citric acid) were used as cross-linking agents. Hyaluronic acid was cross-linked with 2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylamine). Cross-linking reactions were performed in aqueous media, at ambient temperature. Water soluble 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (CDI) was applied as a condensation agent.

Low molecular weight chitosan was prepared by oxidative degradation with NaNO_2 at ambient temperature. Acidic hydrolysis of hyaluronic acid was performed at high temperature (70°C).

Nanoparticles based on self-assembly of polyelectrolytes were produced at room temperature, in aqueous media (pH = 3.0), by mixing aqueous solutions of polyelectrolytes.

2. 2. Instrumentation

The cross-linked polysaccharide systems were analyzed structurally with NMR spectroscopy. ^1H , ^1H - ^1H COSY and ^1H - ^{13}C HETCOR NMR spectra were obtained on

a Bruker AM500 MHz instrument. Ratio of cross-linking was calculated based on the integral values of signal using ^1H NMR spectra.

Hydrodynamic diameter of cross-linked nanoparticles was determined by dynamic laser light scattering. The average hydrodynamic diameters were calculated by NNLS (Non Negative Least Squares) method.

Transmission electron microscopy was used to characterize the size and morphology of the dried nanoparticles.

Transmittance values of aqueous solutions containing nanoparticles were measured with a Unicam SP 1800 Ultraviolet Spectrophotometer at operating wavelengths of $\lambda = 480$ nm or $\lambda = 500$ nm in optically homogeneous quartz cuvettes.

Electrophoretic mobility of the nanoparticles was measured in the presence of 1.0 mM KCl at 25 °C in an AQ-517 cell with ZetaPALS (Brookhaven) apparatus.

3. Results

Preparation and characterization of cross-linked chitosan nanoparticles

3. 1. Intramolecular cross-linking of chitosan with di- and tricarboxylic acids as cross-linking agents was performed in aqueous media, using water soluble carbodiimide.

Cross-linking modification of chitosan was performed by reacting polyvalent carboxylic acids (tartaric-, malic-, succinic- and citric acids as well as poly(ethylene glycol)bis(carboxymethyl)ether) to form amide bonds from amino groups of the chitosan polysaccharide and carboxyl groups of the cross-linkers. It was demonstrated that the carbodiimide technique can be applied efficiently to form amide bonds for cross-linking modification of chitosan polysaccharide.

The following properties of cross-linked nanoparticles were investigated: structure, ratio of cross-linking, solution properties and the size in swollen and dried states.

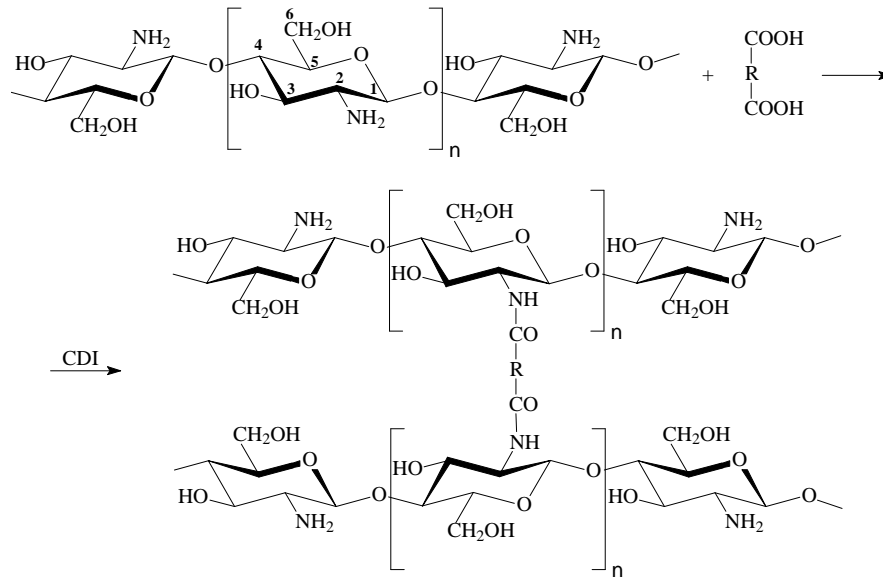


Figure 1. Schematic representation of the synthesis of cross-linked chitosan.

3.2. It was established that (i) the size of the cross-linked chitosan nanoparticles depended on the pH of the solution, (ii) was independent of the ratio of cross-linking and (iii) the hydrophilic character of the cross-linker influences particle size.

Hydrodynamic diameter of cross-linked chitosan nanoparticles was shown to vary between 290 nm and 340 nm in aqueous media, and in the range of 60 nm and 300 nm in the dried state. It was concluded, that the ratio of cross-linking and the hydrophilic character of cross-linker were not major factors at a fixed pH which influenced the size of nanoparticles significantly. However, when the pH was changed, the particle size was affected by the particular cross-linker used.

It was further determined that the ratio of cross-linking, the hydrophilic character of cross-linker and the pH of the solution affect the transmittance of aqueous systems containing cross-linked chitosan nanoparticles.

3.3. It was established that the size of cross-linked nanoparticles can be reduced by decreasing the molecular weight of chitosan.

Chitosans of different molecular weights (55 kDa, 100 kDa, 190 kDa) were prepared by oxidative degradation. The influence of molecular weight on the properties of the chitosan nanoparticles was investigated. It was established that the size-distribution of nanoparticles is bimodal and is independent of the molecular weight of chitosan.

Smaller particles were dominant based on the distribution by number, but the larger particles were observed in all cases. The effective hydrodynamic diameters of smaller cross-linked nanoparticles was determined, and depending on the molecular weight of the chitosan, was found to vary between 50 nm and 120 nm. Small, real nano-sized particles were prepared successfully from degraded chitosans with 100 nm effective hydrodynamic diameter.

Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles

3.4 Intramolecular cross-linking of hyaluronic acid was accomplished with 2,2'(ethylenedioxy)bis(ethylamine) as a cross-linking agent in aqueous media using water soluble carbodiimide.

In the course of the cross-linking process, the carboxylic groups of hyaluronic acid react with the amino groups of the cross-linker to produce cross-linked amide bonds.

Thus, it was shown that the carbodiimide technique can be applied efficiently to form amide bonds for cross-linking modification of the hyaluronic acid polysaccharide.

The following properties of cross-linked hyaluronic acid nanoparticles were investigated: structure, ratio of cross-linking, solution properties and their size in the swollen and dried states. It was concluded that the opalescence and the transmittance values of aqueous systems containing nanoparticles were independent of the molecular weight of hyaluronic acid and the pH of the medium, but the cross-linking ratio did influence these properties.

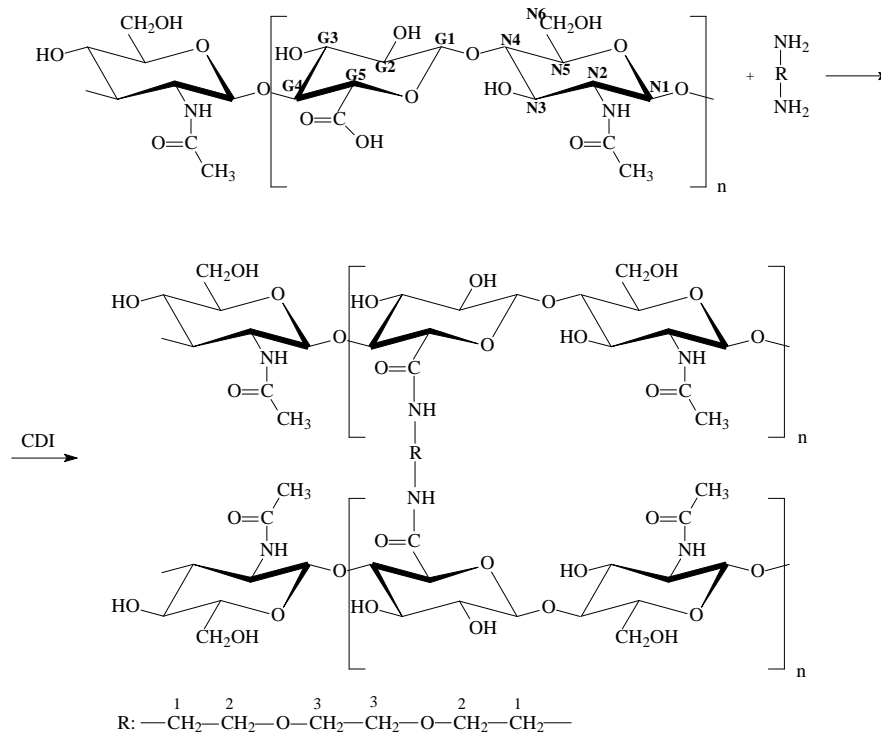


Figure 2. Schematic representation of synthesis of cross-linked hyaluronic acid

3.5. It was established that the size of cross-linked hyaluronan nanoparticles can be reduced by decreasing the molecular weight of hyaluronic acid and by increasing the ratio of cross-linking.

Hyaluronic acids with different molecular weights (50 kDa, 100 kDa, 210 kDa) were prepared by acidic hydrolysis. The influence of molecular weight of hyaluronic acid and the ratio of cross-linking on the size of the particle was investigated. Based on the results of laser light scattering measurements it was determined that intermolecular and intramolecular cross-linking can occur in the course of cross-linking of hyaluronic acid, which appears in the bimodal size distribution. The number of large particles is negligible comparing to the small particles based on the size distribution by number. Effective hydrodynamic diameters of hyaluronan nanoparticles were found to vary between 30 nm and 180 nm in aqueous media and less than 150 nm in the dried state.

Preparation of nanoparticles by self-assembly of polyelectrolytes

3.6. It was concluded, that the self-assembled nanosystems prepared from chitosan and hyaluronic acid are instable with large size.

Self-assembled nanoparticles were prepared from chitosan and hyaluronic acid polysaccharides in aqueous media (pH = 3.0), at room temperature by mixing polyelectrolyte solutions. Precipitation was observed by using polyelectrolyte solutions at high concentrations. It was shown that self-assembly of these biopolymers results in huge particles with broad size distribution independent of the concentration of polyelectrolytes. It was concluded that because both of these polyelectrolytes are polysaccharides, the interactions between the polymers are much less favorable than was observed to occur between chitosan and PGA (see below).

3.7. It was concluded, that the residual amino groups of poorly soluble chitosan stabilize the self-assembled nanoparticles prepared from chitosan and poly- γ -glutamic acid.

Self-assembled nanoparticles were prepared from chitosan and poly- γ -glutamic acid in aqueous media (pH = 3.0), at ambient temperature by mixing the polyelectrolyte solutions. Hydrophilic nanoparticles can be obtained by self-assembly of biopolymers based on the ion-ion interactions between functional groups of polyelectrolytes. It was concluded that the residual amino groups of the poorly soluble chitosan stabilize the prepared particulate systems, otherwise in case of all amino groups of chitosan were bound, the self-assembled nanosystem precipitated using high polyelectrolyte concentrations.

3.8. It was determined that the ratio of biopolymers, order of addition and the pH of medium influence the hydrodynamic size and over-all morphology of the self-assembled chitosan – poly- γ -glutamic acid nanoparticles and the stability of aqueous colloid systems.

Properties of nanoparticles were investigated: solution properties, size in swollen and dried state, electrophoretic mobility. It was observed that the ratio of biopolymers, order of addition and the pH of the solution affect the opalescence of aqueous systems

containing nanoparticles. It was also observed that the effective hydrodynamic diameter of self-assembled nanoparticles can be influenced by the ratio of polyelectrolytes, order of addition, salt effect, pH of the solution and the concentration of polyelectrolytes. These results confirmed that in the process of polymolecular self-assembly the number of macromolecules that compose the particles decreased by decreasing the concentration of polyelectrolytes. Furthermore, it appeared that the residual amino groups of chitosan affect the surface charge of nanoparticles appreciably. At higher pH values, when the nanoparticles were negatively charged, the system precipitated. It was concluded, that the protonated amino groups of chitosan stabilized the prepared nanoparticles. Therefore, by increasing the pH, the amino groups of chitosan completely deprotonated, causing the particles to aggregate and to precipitate.

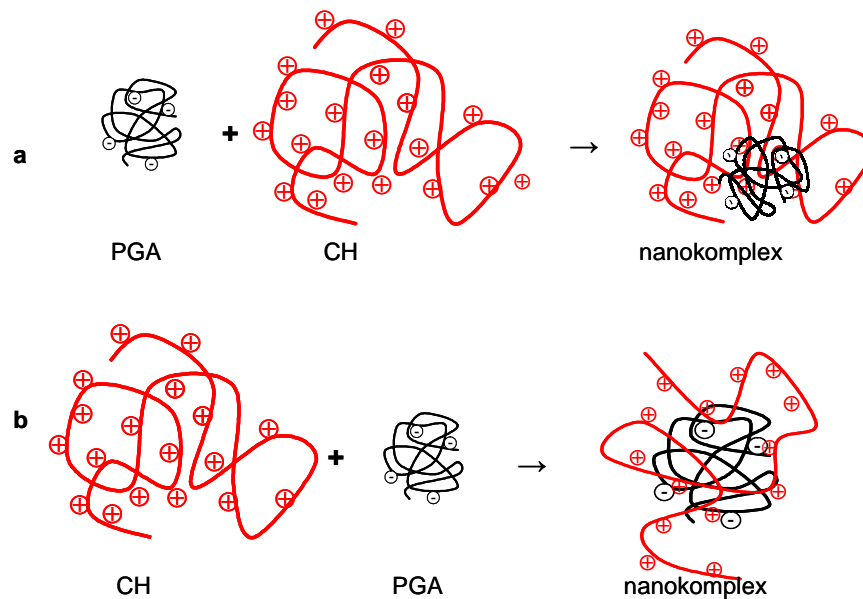


Figure 3. Schematic representation of the complex formation between the linear chains of PGA and chitosan.

(a: chitosan solution was added to the PGA solution, b: PGA solution was added to the chitosan solution, pH = 3.0)

4. The potential practical application of our results

In these studies, nanoparticles were prepared from biocompatible, biodegradable biopolymers. Porous nanoparticles were prepared by using biocompatible covalent cross-linkers to produce amide bonds. The nanoparticles – proceeding from the structure – can be applied for controlled drug release. Porosity and size of nanoparticles can be adjusted by changing the molecular weight of starting biopolymers and the ratio of cross-linking.

In vivo degradation of such covalent cross-linked biopolymers can result in unpredictable fragments. To overcome this problem self-assembled, ionically cross-linked particles were prepared. Self-assembled nanoparticles prepared from chitosan and poly- γ -glutamic acid can be used for siRNA and DNA delivery. *In vitro* and *in vivo* experiments can confirm the non-toxic and biocompatible properties of particles, which are necessary steps to establish the application of these nanoparticles as drug and nucleic acid delivery systems.

5. Tudományos közlemények és konferencia-részvételek (Publications)

5.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények (Publications connected to this thesis):

1. Magdolna Bodnár, John F. Hartmann, János Borbély
Nanoparticles from Chitosan
Polymer Preprints **2004**, 45(2),307-308.
2. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles from Chitosan
Macromolecular Symposia **2005**, 227, 321-326.
IF: 0,913
3. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanoparticles
Biomacromolecules **2005**, 6, 2521-2527.
IF: 3,618
4. Bodnár Magdolna, Daróczy Lajos, Borbély János
Térhálós kitozán nanorészecskék előállítása és jellemzése
Műanyag és Gumi, **2005**, 42(8), 316-319.
5. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Synthesis and Study of Cross-Linked Chitosan-N-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles
Biomacromolecules **2006**, 7(11), 3030-3036.
IF: 3,618 (2005)
6. Magdolna Bodnar, Lajos Daroczi, John F. Hartmann, Janos Borbely
Synthesis and study of crosslinked chitosan-N-poly(ethylene glycol) nanoparticles
Polymer Preprints **2006**, 47(1), 460-461.
7. Istvan Hajdu, Magdolna Bodnár, Genovéva Filipcsei, John F. Hartmann, Lajos Daróczy, Miklós Zrínyi, János Borbély
Nanoparticles Prepared by Self-assembly of Chitosan and Poly- γ -glutamic Acid
Colloid and Polymer Science **2007**, (közlés alatt)
IF: 1,263 (2005)
8. Magdolna Bodnar, Istvan Hajdu, Genoveva Filipcsei, Lajos Daroczi, John F.Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles Prepared by Self-assembly of Chitosan and Poly-gamma-glutamic acid
Nanotech Conference Publications **2007**, (2), 143-146.

5.2. Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia-részvételek (*Lectures and posters connected to this thesis*):

1. Bodnár Magdolna, Borók Imre, Borbély János
Poliszacharidok módosítása
IX. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, Románia, November 14-16 2003.
(előadás/lecture)
2. Fleischer Radu Judit Éva, Novák Levente, Rente Tünde, Bodnár Magdolna, Borbély János
Biopolimerek módosítása nanostruktúra kialakítása céljából
IX. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, Románia, November 14-16 2003.
(előadás/lecture)
3. Üveges Andrea, Bodnár Magdolna, Borbély János
Makromolekulás nanorendszerek előállítása
Mechanoplast I. Országos Doktorandusz Konferencia, Budapest, Június 10 2004.
(előadás/lecture)
4. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles from chitosan
17th Polymer Networks Group Meeting, Bethesda, MD, USA, August 15-19 2004.
(poszter/poster)
5. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles from chitosan
228th ACS National Meeting, Philadelphia, USA, August 22-26 2004.
(poszter/poster)
6. Bodnár Magdolna, Borbély János
Nanorészecskék előállítása kitozánból
IX. Szemcseméret-analitikai, Környezetvédelmi és Portechnológiai Szimpózium, Balatonfüred, Szeptember 5-7 2004.
(poszter/poster)
7. Magdolna Bodnar, Melinda Szaloki, Veres Adrienn, Imre Borok, Janos Borbely
Synthesis of polymeric nanoparticles
2nd European Students Conference on Physical, Organic, and Polymer Chemistry, Bécs, Ausztria, September 15-17 2004.
(előadás/lecture)
8. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles from chitosan
2nd European Students Conference on Physical, Organic, and Polymer Chemistry, Bécs, Ausztria, September 15-17 2004.
(poszter/poster)

9. Magdolna Bodnar, Janos Borbely
Chitosan-based crosslinked nanoparticles
International Symposium on Polymer Conetworks, Gels and Membranes, Budapest, September 11-13 2005.
(poszter/poster)
10. Magdolna Bodnar, Lajos Daroczi, John F. Hartmann, Janos Borbely
Synthesis and study of crosslinked chitosan-N-poly(ethylene glycol) nanoparticles
231st ACS National Meeting, Atlanta, USA, March 24-29 2006.
(poszter/poster)
11. Magdolna Bodnar, AL Kjřniksen, John F. Hartmann, B Nystrřm, Janos Borbely
Preparation and characterization of chitosan nanoparticles crosslinked with poly(ethylene glycol)
8th International Hydrocolloids Conference, Trondheim, Norway, June 18-22 2006.
(előadás/lecture)
12. Tunde Rente, Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Hyaluronic acid-based crosslinked nanoparticles
8th International Hydrocolloids Conference, Trondheim, Norway, June 18-22 2006.
(előadás/lecture)
13. M. Bodnar, I. Hajdu, G. Filipcsei, L. Daroczi, J. F. Hartmann, J. Borbely
Nanoparticles Prepared by Self-assembly of Chitosan and Poly- γ -glutamic Acid
NSTI Nanotechnology Conference, Nanotech, Santa Clara, CA, USA, May 20-24 2007.
(poszter/poster)
14. Magdolna Bodnar, Istvan Hajdu, Genoveva Filipcsei, John F. Hartmann, Tamara Minko, Janos Borbely
Formation and characterization of polyelectrolyte complexes based on self-assembly of chitosan and poly- γ -glutamic acid
EPF, Portoroz, Slovenia, July 2-6 2007.
(előadás/lecture)
15. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Preparation and Characterization of Chitosan-based Nanoparticles
9th Conference on Colloid Chemistry, Siófok, Október 3-5 2007.
(előadás/lecture)

5.3. Egyéb publikációs tevékenység (*Publications not connected to this thesis*):

1. Bodnár Magdolna, Culpepper Matthew, Borók Imre, Daróczi Lajos, Borbély János
Foszfinszármaszékot tartalmazó makromolekuláris kolloidok előállítás emulzióban
Műanyag és Gumi, **2003**, 40(8), 268-271.
2. Tóth Zoltán, Bodnár Magdolna
Kísérletek a kémia tankönyvekben
Iskolakultúra, **2004**, 14 (1), 106-112.
3. Magdolna Bodnar, Mohamed Fawzi, Janos Borbely
Nanoparticles Formed by Poly-gamma-glutamic acid and Lead Ion Complexation
Polymer Preprints, **2006**, 94, 402-403.
4. Magdolna Bodnar, Anna-Lena Kjoniksen, John F. Hartmann, Lajos Daroczi, Bo Nystrom, Janos Borbely
Nanoparticles Formed by Complexation of Poly-gamma-glutamic Acid with lead Ions
Nanotech Conference Publications **2007**, (1), 309-312.
5. Magdolna Bodnár, Anna-Lena Kjøniksen, Reka Molnar, John F. Hartmann, Lajos Daróczi, Bo Nyström, János Borbély
Nanoparticles formed by complexation of poly-gamma-glutamic acid with lead ions
Journal of Hazardous Materials, **2007** (közlés alatt)
IF: 1,544 (2005)
6. Magdolna Bodnar, Tamara Minko, John F. Hartmann, Janos Borbely
Fluorescent Nanoparticles Based on Chitosan
Nanotech Conference Publications **2007**, (2), 279-282.

5.4. Egyéb konferencia-részvétel (*Lectures and posters not connected to this thesis*):

1. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Preparation of core-shell nanoparticles from chitosan
Polymer Gels and Networks, Prága, Csehország, July 10-14 2005.
(poszter/poster)
2. Magdolna Bodnar, Mohamed Fawzi, John F. Hartmann, Janos Borbely
Nanoparticles formed by poly-gamma-glutamic acid and lead ion complexation
231st ACS National Meeting, Atlanta, USA, March 24-29 2006.
(poszter/poster)

3. Andrea Üveges, Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely
Polymeric nanoparticles by crosslinking polymerization
231st ACS National Meeting, Atlanta, USA, March 24-29 2006.
(poszter/poster)
4. M. Bodnar, A.-L. Kjønksen, J. F. Hartmann, L. Daroczi, B. Nyström, J. Borbely
Nanoparticles Formed by Complexation of Poly- γ -glutamic Acid and Lead Ions
NSTI Nanotechnology Conference, Nanotech, Santa Clara, CA, USA, May 20-24 2007.
(poszter/poster)
5. M. Bodnar, T. Minko, J. F. Hartmann, J. Borbely
Fluorescent Nanoparticles Based on Chitosan
NSTI Nanotechnology Conference, Nanotech, Santa Clara, CA, USA, May 20-24 2007.
(poszter/poster)
6. Zsolt Keresztessy, Magdolna Bodnar, Elizabeth Ber, Istvan Hajdu, Min Zhang, John F. Hartmann, Tamara Minko, Janos Borbely
Self-Assembling Nanoparticles for Targeted Drug Delivery
9th Conference on Colloid Chemistry, Siófok, Október 3-5 2007.
(előadás/lecture)
7. Istvan Hajdu, Magdolna Bodnar, Dezső Kazup, Zsolt Keresztessy, John F. Hartmann, Janos Borbely
Self-Assembled Nanoparticles for Intracellular DNA Delivery
9th Conference on Colloid Chemistry, Siófok, Október 3-5 2007.
(poszter/poster)

5.5. Szabadalom (Patents)

1. Janos Borbely, Magdolna Bodnar
Nanoparticles from Chitosan
U. S. Patent, Serial No. 11,091,940 (Filed: March 28, 2005)
2. Janos Borbely, Magdolna Bodnar, Reka Melinda Molnar, Ildiko Schriffertne Denyicska
Pb²⁺ ion Binding by Cross-linked Polyacid-Based Nanoparticles
U. S. Patent, Serial No. 60/737,606 (Filed: November 17, 2005)
3. Janos Borbely, Magdolna Bodnar, Istvan Hajdu, John F. Hartmann
Polymeric Nanoparticles by Ion-Ion Interactions
U. S. Patent, Serial No. 60/833,672 (Filed: July 27, 2006)

4. Janos Borbely, Magdolna Bodnar, Tunde Rente, Ildiko Schriffertne Denyicska
Hyaluronic Acid-Based Cross-linked Nanoparticles
U. S. Patent, Serial No. 11/645,094 (Filed: December 22, 2006)