



Pannon Egyetem  
Vegyésmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskola

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

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Készítette:  
**Kántor Izolda**

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

**Dr. May Zoltán**  
*tudományos főmunkatárs*

2023

## Bevezetés és célkitűzés

A nanokészítmények fontos szerepet játszhatnak a rákellenes gyógyszeres terápiák hatékonyságának növelésében. A hatóanyagot tartalmazó nanohordozók a tiszta kemoterápiás szerekhez képest számos hátrányt kiküszöbölhetnek, mint például a korlátozott biológiai hozzáférhetőség, a gyógyszerrezisztencia és a mellékhatások. Az ellenőrzött és célzott hatóanyagszállító rendszerek egyik ígéretes csoportja a polimer alapú nanorészecskék, amelyek diffúzióval és lebomlással képesek felszabadítani a hatóanyagot. A poliészterek és poliamidok enzimkatalizált folyamatokkal történő *in vitro* szintézisét az elmúlt évtizedekben fejlesztették ki zöld alternatívaként biológiailag lebomló, szintetikus polimerek előállítására különböző alkalmazásokkal, például nanorészecske méretű hordozókkal gyógyszer szállításhoz. A poliészter-amidokat sokkal kevésbé tanulmányozták ebben a tekintetben, bár feltételezhető előnyük az amid-részek által okozott megnövekedett mechanikai és termikus ellenállás.

A PhD munkám célja olyan rákellenes hatóanyagokat tartalmazó nanorészecskék előállítása,

amelyek hatékony, tartós és célzott gyógyszerhordozó rendszereknek bizonyulnak. Fontos szempont volt nemcsak az alkalmazott hatóanyagok megtalálása, hanem a megfelelő hordozóanyagok kiválasztása is. Így a jól ismert sorafenib és a széles spektrumú ciszplatin használata mellett céлом volt egy természetes alapú, de szintetikus előállított antocianidin hatóanyag vizsgálata. Az antocianidinek antioxidáns és rákellenes hatása már jól ismert, ellenben ezen vegyületek nanoléptékű használata, főleg célzott rákterápiára még új vonalnak számít. A megfelelő biodegradábilis és biokompatibilis hordozó polimerek megtalálása érdekében olyan új típusú hordozókat vizsgáltam, amelyeket zöld úton, biokatalízissel állítottak elő és ezidáig nem alkalmaztak gyógyszerhordozó célra.

Munkám fő célja a 12-hidroxi-sztearinsav- $\epsilon$ -kaprolakton kopolimer és a 16-hidroxi-hexadékansav polimerek mikrokapszulázási és felületmódosítási lehetőségeinek vizsgálata sorafenib és ciszplatin hatóanyagokkal, valamint az esetleges kettős hatóanyagú rendszerek előállítása és vizsgálata. Célul tűztem ki az iRGD tumor penetrációs peptid alkalmazását a

nanorészecskékkel együtt fizikai és/vagy kémiai kötéssel. Vizsgáltam még új típusú rákellenes hatású antocianidinek molekuláris kapszulázását ciklodextrin származékokkal és a keletkező komplexek mikrokapszulázását a választott polimerekkel. Céлом volt a nanorészecskék előállításának módszerének optimalizálása a megfelelő részecskeméret elérése és a kapszulázási hatékonyság javítása érdekében, valamint a nanorészecskék tesztelése hatóanyag-leadási és citotoxicitási tesztekben, felkészítve az esetleges *in vivo* vizsgálatokra.

## **Kísérleti és vizsgálati módszerek**

A szintetizált biokompatibilis és biodegradábilis 12-hidroxi-sztearinsav- $\epsilon$ -kaprolakton és 16-hidroxi-hexadekánsav- $\epsilon$ -kaprolaktám kopolimerekkel sorafenib, ciszplatin és szintetikus antocianidin rákellenes vegyületeket mikrokapszuláztam. A nanorészecskéket emulziós-oldószer elpárologtatási módszerrel állítottam elő optimalizálva a módszereket a részecskeméretre és a kapszulázási hatékonyságra. A kifejlesztett nanoterapeutikumok ígéretes hatóanyag-felszabadulási profilt és citotoxikus hatást mutattak *in vitro* HepG2

hepatocelluláris karcinóma sejtekben. Munkám során a szinergikus hatás reményében kettős hatóanyagtartalmú polimer nanorészecskéket is előállítottam jó termelési hozammal, egy továbbfejlesztett kettős emulziós-oldószer elpárologtatási módszerrel. A ciszplatín beépülésének növelésére marha szérum albumin (BSA) modellvegyületet alkalmaztam; majd sikeresen helyettesítettem egy iRGD tumor penetrációs peptiddel, amely a nanorészecskék célzási funkcióját biztosíthatja. A kettős hatóanyagú rendszer hatékonyságát citotoxicitási teszttel igazoltam HepG2 sejtvonalon. Az új szintetikus antocianidineket *in vitro* vizsgáltam, mint lehetséges citosztatikus vegyületek HCT116 és HepG2 rákos sejtek ellen. Továbbá vizsgáltam a két legaktívabb vegyület halokróm tulajdonságait, amelyek befolyásolhatják a biológiai aktivitást, és molekuláris kapszulázásnak vettem alá  $\beta$ -ciklodextrin-származékokban, hogy növeljem a vízben való oldhatóságukat és biológiai hozzáférhetőségüket.

A nanorészecskék tulajdonságainak vizsgálata során a részecskék hidrodinamikai méretét dinamikus fényszórás módszerével, illetve stabilitásukat lézer-

Doppler-elektroforézis eljárással mértem, Zetasizer Nano ZS műszert alkalmazva. Morfológiai vizsgálatához pásztázó, valamint transzmissziós elektronmikroszkópot használtam. A kapszulázási hatékonyságok mérésére UV-vis spektrofotométert és induktív csatolású plazmával működő optikai emissziós spektrofotométert (ICP-OES) használtam. Az előállítási hozamot gravimetriásan határoztam meg. *In vitro* hatóanyag-leadási vizsgálatokat vérplazmában (pH = 7,4) és savas pufferoldatban (Na-acetát-ecetsavas puffer, pH = 5,5) végeztem, modellezve a tumor mikrokozonyetét. *In vitro* citotoxicitást MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid) viabilitás teszttel végeztem HepG2 és HCT116 emberi rákos sejtvonalakon.

## **Új tudományos eredmények**

1. a) Először készítettem az új típusú, biokatalízissal előállított, biológiailag lebontható, biokompatibilis 12-hidroxi-sztearinsav- $\epsilon$ -kaprolakton kopolimerből (12CL) potenciális gyógyszerhordozó nanorészecskéket optimalizált egyszerű emulzió-oldószer elpárologtatás módszerével, injekciós gyógyszer-

formátumhoz megfelelő mérettel ( $219 \pm 5,2$  nm, hidrodinamikai méret) és monodiszperz (polidiszperzitási index:  $0,168 \pm 0,018$ ) méreteloszlással.

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

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

b) Citotoxicitási teszttel igazoltam a kettős hatóanyaghordozó rendszer hatékonyságát. A két rákellenes hatóanyagot tartalmazó 12CL polimer nanorészecskék statisztikailag igazoltan, szignifikánsan nagyobb citotoxicitást mutattak HepG2 sejtvonalon, mint a tiszta hatóanyagok. A polimer nanorészecskék Na-acetát

pufferben (pH=5,5) a sorafenib esetében nyújtott hatóanyagleadást biztosítottak a vérplazmában tapasztalható képest. (S2)

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

b) Sikeresen mikrokapszuláztam a biodegradábilis és biokompatibilis poliészter-amid kopolimerbe (16CM) a sorafenib (SOR) hatóanyagot megfelelő kapszulázási hatékonysággal (55%) és előállítási hozammal (71%). In vitro leadási tesztekkel vizsgáltam a nanorészecskékből történő hatóanyag felszabadulást. Savas közegben a kezdeti hatóanyag-lemosódás 8%-kal mérséklődött DCC keresztkötő ágens vagy Span 20 emulgeátor használatával, valamint

vérplazmában a részecskék PEGilálása 11%-kal csökkentette a kezdeti „burst” hatást. (S4)

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

## **Tézisek alapjául szolgáló publikációk**

S1. Kántor, I.; Aparaschivei, D.; Todea, A.; Biró, E.; Babos, Gy.; Szerényi, D.; Kakasi, B.; Péter, F.; Şişu, E.; Feczkó, T. Biocatalytic synthesis of poly[ $\epsilon$ -caprolactone-co-(12-hydroxystearate)] copolymer for

sorafenib nanoformulation useful in drug delivery. *Catal. Today* **2021**, *366*, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.05.005>. Q1, IF: 6,562.

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

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

S4. Benea, I.C.; Kántor, I.; Todea, A.; Pellis, A.; Bîtcă, I.; Nagy, L.; Kéki, S.; Dreavă, D.M.; Péter, F.; Feczkó, T. Biocatalytic synthesis of new polyestaramides from  $\epsilon$ -caprolactam and hydroxy acids: Structural

characterization, biodegradability, and suitability as drug nanocarriers. *React. Funct. Polym.* **2023**, 191, 105702. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105702>. Q1, IF: 5,1.

*Konferencia előadás:*

Kántor, I.; Aparaschivei, D.; Todea, A.; Péter, F.; May, Z.; Biró, E.; Feczkó, T. Co-entrapment of sorafenib and cisplatin in poly[ $\epsilon$ -caprolactone-co-(12-hydroxystearate)] copolymer for dual drug delivery application. The 1st International Electronic Conference on Biomedicine, 2021.06.01-26., online

