

Az mRNS-alapú génterápia dermatológiai alkalmazásának lehetőségei: fényvédelem újragondolva

Dermatological application of mRNA-based gene therapy: Protection from UV-radiation-caused damages

BOROS GÁBOR¹, MIKO EDIT DR.¹, HORKAY IRÉN DR.¹, KARIKÓ KATALIN DR.²,
EMRI GABRIELLA DR.¹, REMENYIK ÉVA DR.¹

Debreceni Egyetem, Orvosi – és Egészségtudományi Centrum, Bőrgyógyászati Klinika, Debrecen¹
University of Pennsylvania, Department of Neurosurgery, Philadelphia²

ÖSSZEFOGLALÁS

A világszerte növekvő számban jelentkező UV sugárzás okozta betegségek új megelőző és terápiás stratégia kifejlesztését indokolják. Az UVB által előidézett leggyakoribb DNS léziók a ciklobután pirimidin dimerek (CPD), amelyek apoptózishoz, immunosuppresszióhoz, mutációhoz, ezáltal bőrbetegségek kialakulásához vezethetnek. Az életlenül fontos fehérjék *in vitro*-szintetizált mRNS által történő expresszálása nagy terápiás lehetőséggel bír. Ennek az új génterápiás technológiának az alkalmazásával sikerült funkcionálisan aktív CPD-specifikus fotoliáz fehérjét kifejezni humán keratinocitákban. Ezen tanulmány összefoglalja, hogy az *in vitro*-szintetizált mRNS milyen fontos és előnyös eszköze lehet a modern terápiás eljárásoknak.

SUMMARY

Increasing worldwide prevalence of UV irradiation-induced diseases warrants development of novel preventive and therapeutic strategies. The most common UVB-caused DNA lesion is cyclobutane pyrimidine dimer (CPD), which triggers skin diseases by inducing apoptosis, immunosuppression and mutation. *In vitro*-synthesized mRNA coding for physiologically important proteins has great therapeutic potential. Applying this novel mRNA-based gene therapy method, we could achieve functional CPD-specific photolyase production in cultured human keratinocytes. The present study demonstrates that *in vitro*-synthesized mRNA is an effective tool for modern therapeutic applications.

Kulcsszavak:
mRNS terápia - fotoliáz - fényvédelem -
UVB - ciklobután pirimidin
dimerek

Key words:
mRNA therapy - photolyase -
photoprotection - UVB - cyclobutane
pyrimidine dimer

1. Az mRNS-alapú génterápia előnyei és nehézségei

A géntranszfer technológia nagy fejlődésen ment keresztül az utóbbi időben. A különböző génterápiára irányuló eljárások közül az mRNS használata tűnik a legalkalmasabbnak a terápiás fehérjék expresszálására, enzimdefektusok javítására, vakcina készítmények kifejlesztésére. Mindezt a virális vektor- és plazmid DNS-alapú géntranszfer módszerekkel szembeni előnyös tulajdonságai teszik lehetővé (1). Sokkal biztonságosabb, mert nem integrálódik a genomba, kizárólag a kódolt fehérje gyors és hatékony szintézise történik meg a citoplazmában, továbbá tranziensen transzfekálható primer és nem osztódó sejtekbe is. Ezen kívül az mRNS-nek funkciója betöltéséhez nincs szükség sejtmagi lokalizációra, transzkripcióra (2, 3). Az említett előnyös tu-

lajdonságok ellenére az *in vitro*-szintetizált mRNS sikeres *in vivo* alkalmazása korlátozott, hiszen különböző RNS szenzorok aktiválása révén erős immunválasz-reakciókhoz vezet. Ezen szenzorok legismertebb képviselői a Toll-like receptorok (TLR3, TLR7, TLR8), RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1), IFIT1 és IFIT5 (interferon-induced protein with tetratricopeptid repeats 1 és 5), valamint a PKR (protein kinase RNA-activated) (4, 5). További problémát jelent, hogy a labilis szerkezete sem teszi alkalmassá klinikumban való felhasználását, génterápiás alkalmazását. Ezidáig az exogén mRNS terápiás lehetőségeinek kutatása elsősorban a daganatellenes immunterápiára irányult, ahol antigént kódoló mRNS-t vittek be immunsejtekbe *ex vivo* (6). Az mRNS stabilitásának növelésével – az 5' végén található

„sapka” struktúra kémiai módosításával, valamint a 3' véghez kötött hosszabb poli (A) „farok” használatával – ígéretesebb terápiás célú felhasználásra nyílt esély (6). Azonban, ezen módosítások ellenére is, az *in vitro*-szintetizált mRNS nukleázokkal szembeni érzékenysége magas fokú, transzlációs hatékonysága pedig alacsony maradt, ráadásul a nemkívánatos mellékhatások továbbra is jelentkeztek (7, 8). Az mRNS-alapú géntranszfer technológia *in vivo* alkalmazásával kapcsolatban *Karikó és mtsai.* tudományos munkája hozott áttörést. Az mRNS szerkezetébe uridin helyett egy, a természetben is előforduló módosított nukleozidot, pszeudouridint építettek be. A pszeudouridin-módosítással sokkal hatékonyabb fehérje transzlációt értek el a nem módosított, vagy más kémiai módosítást tartalmazó mRNS-hez képest. A beépített pszeudouridin növelte az mRNS stabilitását, míg immunogenitását jelentősen csökkentette (9). Ezeket az előnyöket felhasználva *Warren és mtsai.* a transzkripció faktorok expresszáálásához keratinociták indukálható pluripotens sejtekké (iPSC, induced pluripotent stem cells) történő de-differenciálása, míg *Wang és mtsai.* egerekben indukált tüdődaganat növekedésének gátlása céljából használt pszeudouridint- és 5-metilcitidint-tartalmazó RNS-eket (10, 11). *Kormann és mtsai* más módosítású uridint épített be az *in vitro*-szintetizált mRNS-be, amely a surfactant protein B (SP-B) fehérjét kódolta, majd aeroszol technikával SP-B deficiens egerek tüdejébe juttatta, ami magas túlélési rátát eredményezett (12). Ugyanez a munkacsoport az allergia okozta asztma kezelésére is ígéretes terápiás alkalmazást fejlesztett ki módosított FOXP3 mRNS segítségével (13). Ezekben a közleményekben használt *in vitro*-szintetizált mRNS-ek már jelentős mértékben fokozták a kódolt fehérjék kifejeződését, viszont az RNS-szenzorok aktivitása még mindig detektálható volt. *Karikó és mtsai.* 2011-ben közölt munkájában demonstrálta, hogy az *in vitro*-szintetizált, pszeudouridin-módosított mRNS HPLC (high-performance liquid chromatography) segítségével történő tisztítása teljes mértékben megszünteti az mRNS immunogén természetét (14), és nanogrammmennyiségű mRNS használata is elegendőnek bizonyult szignifikáns biológiai hatás eléréséhez egerekben (15). Eritropoetin fehérjét kódoló mRNS-t intraperitoneálisan juttatott egerekbe és majmokba, amelyek vérében még a negyedik napon is kimutatta a kódolt fehérjét, amely funkcionálisan aktív volt (15). A pszeudouridin-módosítás és HPLC tisztítás együttes alkalmazásának köszönhetően nemcsak az mRNS immunogenitását sikerült kiküszöbölni, de a kódolt fehérje elleni neutralizáló antitestek sem termelődtek (15). Az mRNS-alapú terápia embereken való alkalmazása természetesen még várat magára, de eddigi ismereteink új távlatokat nyithatnak a modern, mRNS-alapú készítmények kifejlesztésében és egyre közelebb visznek minket a klinikumban való használatuk megvalósításához.

2. UV-sugárzást követő DNS károsodás és reparáció

A pszeudouridin-módosított, HPLC-tisztított mRNS nagy szerepet játszhat a bőrbetegségek megelőzésében és terápiájában is. Patogenetikai szempontból a bőrt érő egyik legáltalánosabb környezeti tényező a napfény ult-

raibolya sugárzása, amelynek biológiai hatásai hullámhossztól függően eltérőek (16). Az UVB-sugárzás (280-320 nm) a DNS-ben közvetlenül elnyelődve ciklobután pirimidin dimereket (CPD) és 6-4-pirimidin-pirimidon (6-4 PP) fotoproduktumokat indukál (17). Mivel az UV-irradiáció hatására nagyobb számban keletkezik CPD, mint 6-4 PP, lassabban javítódik és nagyobb a mutagenitása is, jelentős szerepe van a sugárzás okozta károsodásokban (18, 19). A CPD-k a legkárosabb és leggyakoribb UVB- okozta DNS-léziók közé tartoznak, nagymértékben hozzájárulnak az UV sugárzásnak kitett bőrben bekövetkező akut válaszreakciókhoz (napégés, apoptózis, hiperplázia) (20-23). Hosszan tartó jelenlétük gyulladós folyamatok indukálásához, immunszuppresszióhoz, illetve mutációhoz, ezáltal bőrbetegségek kialakulásához vezethet (24-26). Az UVB káros hatásaival szemben a méhlepényes emlősök, így az ember is, kizárólag a nukleotid reparációs rendszer (NER) működésére számíthat (27-29). A NER bonyolult és komplex mechanizmusának eredményeképpen az UVB által okozott CPD-k javítása több napig is eltarthat (30). Az UVB-indukált DNS léziók javítását a fotoliáz fehérjék is képesek elvégezni. Ezek olyan DNS javító enzimek, amelyek egy gyors, fényfüggő reakcióban (fotoreaktiváció) képesek a DNS szekvencia megváltoztatása nélkül specifikusan felismerni és kijavítani a fotoproduktumokat (31, 32). Ezek az enzimek azonban hiányoznak a méhlepényes emlősökből (33).

3. Nukleozid-módosított fotoliáz mRNS *in vitro* vizsgálatai és alkalmazásának lehetőségei a bőr sejteiben

Munkacsoportunk a fentebb leírt pszeudouridin-módosított, HPLC-tisztított mRNS-alapú génterápiás módszert olyan kísérleti rendszerben tesztelte, ahol az mRNS a fotoliáz fehérjét kódoló génszekvenciát tartalmazta. A *Potorous tridactylus* fotoliáz génjét kódoló mRNS-t kollaboráció keretében *Karikó Katalin* laboratóriuma *in vitro*-transzkripcióval hozta létre. A szekvencia kodon-optimalizálásával, az mRNS pszeudouridin-módosításával, hosszú poly(A) farok és cap1 struktúra kialakításával, valamint az mRNS HPLC tisztításával összességében magas transzlációs hatékonyságot, és biológiai stabilitást sikerült elérni, amit a DE OEC Bőrgyógyászati Klinika kutatócsoportja igazolt (34). Kísérleteink első fázisában kimutattuk, hogy a transzfektált, majd fotoreaktivált humán keratinocitákban a CPD-k száma több mint 60%-kal csökkent a fotoliáz aktivációjához szükséges energiaforrást nélkülöző sejtekhez képest, ami bizonyította, hogy a transzlált fehérje funkcionálisan is aktív. A fotoreaktiváció szignifikánsan csökkentette az UVB dózis antiproliferatív hatását (34). A fotoliáz mRNS keratinocitákba juttatása alkalmasnak tűnik az UVB-indukálta CPD léziók eltávolítására humán keratinocitákban, ami előrevetíti alkalmazási lehetőségét a bőrdaganatok megelőzésében. A CPD-fotoliáz expresszááló sejtek kiváló modellrendszerként is szolgálnak az UVB sugárzás okozta hatásmechanizmusok vizsgálatára, mivel lehetővé teszik a CPD függő és független UVB hatások elkülönítését. Munkacsoportunk erre irányuló vizsgálatait folyamatban van-

nak. Ismert, hogy a NER genetikailag meghatározott eltérései (Xeroderma pigmentosum, Cockayne's szindróma, trichothiodisztrófia), erős UV-fényérzékenységgel és a bőrdaganatok kialakulására való fokozott hajlammal járnak (35, 36). A fotoliáz mRNS *in vivo* alkalmazásának bevezetése új fényvédelmi stratégiát jelenthet, amely az akut napfénykárosodás és bőrdaganatok kialakulásának kockázatát csökkentheti, ezáltal a NER mutációi következtében kialakuló betegségekben szenvedők részére új, hosszantartó fényvédelmi eszközzé válhat. A módosított fotoliáz mRNS *in vivo* bőrsejtekbe juttatásának a kidolgozása új utat nyithatna más fehérjét kódoló mRNS-alapú terápia megvalósítására is. A különböző bőrbetegségekhez kapcsolt, specifikus fehérjéket kódoló mRNS-ek alkalmazása így ígéretes terápiás eszköz lehet olyan betegségek gyógyításában is, mint az epidermolysis bullosa, Marfan-szindróma, Duchenne-betegség vagy tüdő emphysema. Napjainkban a bőrön át történő anyagbevitel intradermális injekcióval, mikrotűkkel vagy génpuskával történik. Az eljárások közül a legkevésbé invazív természetű a mikrotűk rendelkeznek, amelyek elég hosszúak ahhoz, hogy a bőr felső rétegén áthatoljanak, de még ne okozzanak nagy fájdalmat (37, 38). Ezen technikák további hátránya, hogy a bőr mélyebb rétegeibe hatolnak, míg az általunk kívánt hatás eléréséhez a fotoliáz fehérjét kódoló mRNS molekulákat a bőr epidermiszének bazális membrán vagy e fölötti rétegek sejtjeihez kellene eljuttatni, hiszen ezek a sejtek az UVB-sugárzás fő targetjei. A nukleozid-módosított mRNS széleskörű preventív és terápiás alkalmazásához olyan módszert kell kifejleszteni, amely a *stratum corneum* barrier funkciójának kiküszöböléséhez nem igényel ilyen drasztikus eljárásokat.

A kézirat az OTKA 105872 és a TÁMOP-4.2.2A-11/11/KONV-2012-0031 azonosító számú kutatási pályázat támogatásával készült

IRODALOM

- Schott J. W., Galla M., Godinho T.: Viral and non-viral approaches for transient delivery of mRNA and proteins. *Curr Gene Ther* (2011) 11(5), 382-398.
- Tavernier G., Andries O., Demeester J.: mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *J Control Release* (2011) 150(3), 238-247.
- Kuhn A. N., Beibetaert T., Simon P.: mRNA as a versatile tool for exogenous protein expression. *Curr Gene Ther* (2012) 12(5), 347-361.
- Kawai T., Akira S.: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* (2010) 11(5), 373-384.
- Brennan K., Bowie A. G.: Activation of host pattern recognition receptors by viruses. *Curr Opin Microbiol* (2010) 13(4), 503-507.
- Kreiter S., Diken M., Selmi A.: Tumor vaccination using messenger RNA: prospects of a future therapy. *Curr Opin Immunol* (2011) 23(3), 399-406.
- Kariko K., Ni H., Capodici J.: mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* (2004) 279(13), 12542-12550.
- Diebold S. S., Kaisho T., Hemmi H.: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* (2004) 303(5663), 1529-1531.
- Kariko K., Muramatsu H., Welsh F. A.: Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther* (2008) 16(11), 1833-1840.
- Warren L., Manos P. D., Ahfeldt T.: Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* (2010) 7(5), 618-630.
- Wang Y., Su H. H., Yang Y.: Systemic delivery of modified mRNA encoding herpes simplex virus 1 thymidine kinase for targeted cancer gene therapy. *Mol Ther* (2013) 21(2), 358-367.
- Kormann M. S., Hasenpusch G., Aneja M. K.: Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol* (2011) 29(2), 154-157.
- Mays L. E., Ammon-Treiber S., Mothes B.: Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism. *J Clin Invest* (2013) 123(3), 1216-1228.
- Kariko K., Muramatsu H., Ludwig J.: Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res* (2011) 39(21), e142.
- Kariko K., Muramatsu H., Keller J. M.: Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol Ther* (2012) 20(5), 948-953.
- Matsumura Y., Ananthaswamy H. N.: Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* (2004) 195(3), 298-308.
- Cadet J., Anselmino C., Douki T.: Photochemistry of nucleic acids in cells. *J Photochem Photobiol B* (1992) 15(4), 277-298.
- Mitchell D. L.: The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem Photobiol* (1988) 48(1), 51-57.
- Sage E.: Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem Photobiol* (1993) 57(1), 163-174.
- Ueda M., Matsunaga T., Bito T.: Higher cyclobutane pyrimidine dimer and (6-4) photoproduct yields in epidermis of normal humans with increased sensitivity to ultraviolet B radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* (1996) 12(1), 22-26.
- Kunisada M., Kumimoto H., Ishizaki K.: Narrow-band UVB induces more carcinogenic skin tumors than broad-band UVB through the formation of cyclobutane pyrimidine dimer. *J Invest Dermatol* (2007) 127(12), 2865-2871.
- Lo H. L., Nakajima S., Ma L.: Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. *BMC Cancer* (2005) 5, 135.
- Marrot L., Meunier J. R.: Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* (2008) 58(5 Suppl 2), S139-148.
- Protic-Sabljić M., Tuteja N., Munson P. J.: UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. *Mol Cell Biol* (1986) 6(10), 3349-3356.
- Emri G., Wenzl E., Van Erp P.: Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. *J Invest Dermatol* (2000) 115(3), 435-440.
- You Y. H., Lee D. H., Yoon J. H.: Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem* (2001) 276(48), 44688-44694.
- Mullenders L. H., Hazekamp-van Dokkum A. M., Kalle W. H.: UV-induced photolesions, their repair and mutations. *Mutat Res* (1993) 299(3-4), 271-276.
- Hoeijmakers J. H.: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* (2001) 411(6835), 366-374.
- Nouspikel T.: DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* (2009) 66(6), 994-1009.
- Nishinaga M., Kurata R., Onishi K.: Establishment of a microplate-formatted cell-based immunoassay for rapid analysis of nucleotide excision repair ability in human primary cells. *Photochem Photobiol* (2012) 88(2), 356-362.

Clobex® sampon
500 mikrogramm/g klobetazol-propionát



GYÓGYÍTÓ HAJMOSÁS

A HAJAS FEJBŐR PSORIASIS
AKUT ÉS FENNTARTÓ KEZELÉSÉBEN



Rövidített alkalmazási előírás:

Clobex 500 mikrogramm/g sampon. Egy gramm sampon 500 mikrogramm klobetazol-propionátot tartalmaz. Terápiás javallat: A hajás fejbőr mérsékelt fokú psoriasisának helyi kezelése felnőtteknél. **Adagolás és alkalmazás:** Külsőleg, kizárólag a fejbőrön alkalmazható. A Clobex 500 mikrogramm/g sampon közvetlenül a száraz hajás fejbőrré kell felvinni, és bemasszírozni naponta egyszer, figyelmet fordítva arra, hogy az érintett területekre mindenhova jusson. Egy fél evőkanálnak megfelelő mennyiség (kb. 75 ml) alkalmanként elegendő a teljes hajás fejbőrré. A felvitelt követően kezelt kell mosni, és 15 percen keresztül hagyni kell hatni a sampont anélkül, hogy befedné a fejbőrt. Ezt követően le kell öblíteni és igény szerint haját lehet mosni az általános samponnal. Napl rendszerességgel 4 héten át ajánlott a sampon alkalmazása. **Ellenjavallatok:** a készítmény hatóanyagával vagy bármely segédanyagával szembeni túlérzékenység; bakteriális, vírusos bőrbetegségek (varicella, herpes simplex, herpes zoster), gombás vagy parazita okozta fertőzések bőrbetegségek és specifikus bőrbetegségek esetén. Nem szabad alkalmazni a szem körül, fekélyes sebekben, és két év alatti gyermekeknél. **Terhesség:** Clobex 500 mikrogramm/g sampon a terhesség ideje alatt nem szabad alkalmazni, csak akkor, ha erre egyértelműen szükség van. **Szoptatás:** A Clobex 500 mikrogramm/g sampon nem szabad felírni szoptató nők számára, hacsak nem egyértelműen indokolt. **Nem kívánatos hatások, mellékhatások:** gyakori mellékhatás (> 1/100 - < 1/10) a bőr diszkomfort érzése, akne/folliculitis, szemek csipő/égető érzése. Nem gyakori mellékhatások (< 1/1000 - < 1/10): lokális irritáció, pruritus, urticaria, telangiektasia, bőr atrophia. Kizárólag orvosi rendelvényhez kötött gyógyszer (V). OGYI engedély szám: OGYI-T-20383/02. Alkalmazási előírás dátuma: 2013. április 4. Kérjük, olvassa el a teljes alkalmazási előírást TB támogatás-normatív, 25%. Támogatás összege: 625 Ft. Térítési díj: 1875 Ft. Bruttó fogyasztói ár: 2500 Ft. Az aktuális árákról, kérjük, tájékozódjon a www.oep.hu oldalon! Közgyógyellátás terhére felírható gyógyszer. Amennyiben gyógyszerünkkel kapcsolatban mellékhatás lépne fel, kérjük, késedelem nélkül az alábbi e-mail címen jelentse be: pharmacovigilance@ewopharma.hu

Forgalomba hozatali engedély jogosultja:

GALDERMA
Committed to the future.

Galderma International
Tour Europlaza - La Défense 4,
20 avenue André Prothin, 92927 La Défense
Cedex, Franciaország
EW0/CLOBEX/2013/06
A dokumentum lezárásának ideje: 2013. 09. 24.

Magyarországi forgalmazó:



Ewopharma AG Magyarországi Képviselete
1021 Budapest, Budakeszi út 73/F.
Tel: +361-200-4650 Fax: +36-1-398-0316.
Honlap: www.ewopharma.hu
E-mail: info@ewopharma.hu

31. *Sinha R. P., Hader D. P.:* UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* (2002) *1*(4), 225-236.
32. *Hearst J. E.:* The structure of photolyase: using photon energy for DNA repair. *Science* (1995) *268*(5219), 1858-1859.
33. *Li Y. F., Kim S. T., Sancar A.:* Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993) *90*(10), 4389-4393.
34. *Boros G., Miko E., Muramatsu H.:* Transfection of pseudouridine-modified mRNA encoding CPD-photolyase leads to repair of DNA damage in human keratinocytes: a new approach with future therapeutic potential. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2013.
35. *Hoeijmakers J. H.:* Nucleotide excision repair. II: From yeast to mammals. *Trends Genet* (1993) *9*(6), 211-217.
36. *de Boer J., Hoeijmakers J. H.:* Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* (2000) *21*(3), 453-460.
37. *Kim Y. C., Jarrahan C., Zehrung D.:* Delivery systems for intradermal vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* (2012) *351*, 77-112.
38. *Tuan-Mahmood T. M., McCrudden M. T., Torrisi B. M.:* Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2013.

Érkezett: 2013. 05. 24

Közlésre elfogadva: 2013. 09. 30.