



Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Ph.D. értekezés tézisei

**KOMBINÁLT NEDVES ŐRLÉSES ELJÁRÁS OPTIMALIZÁLÁSA
NANOSZUSZPENZIÓ ELŐÁLLÍTÁSA CÉLJÁBÓL, VALAMINT A TERMÉK
FELÜLETAKTÍV ANYAG-MENTES SZILÁRD FORMÁVÁ ALAKÍTÁSA, A
STABILITÁS ÉS A BIOHASZNOSÍTHATÓSÁG NÖVELÉSE ÉRDEKÉBEN**

Bartos Csaba

Gyógyszerész

Témavezető:

Prof. Dr. Révész Piroska, MTA doktor

SZEGED

2019

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Gyógyszertechnológia Program

Programvezető: Dr. Csóka Ildikó tanszékvezető egyetemi docens

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Témavezető: Prof. Dr. Révész Piroska, MTA doktor

Bartos Csaba

**KOMBINÁLT NEDVES ŐRLÉSES ELJÁRÁS OPTIMALIZÁLÁSA
NANOSZUSZPENZIÓ ELŐÁLLÍTÁSA CÉLJÁBÓL, VALAMINT A TERMÉK
FELÜLETAKTÍV ANYAG-MENTES SZILÁRD FORMÁVÁ ALAKÍTÁSA, A
STABILITÁS ÉS A BIOHASZNOSÍTHATÓSÁG NÖVELÉSE ÉRDEKÉBEN**

Szigorlati bizottság

Elnök: Dr. Csóka Ildikó, SZTE Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Tagok: Prof. Dr. Zupkó István, SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet
Dr. Kovács-Kiss Dorottya Ph.D., Richter Gedeon Nyrt., Budapest

Bíráló bizottság

Elnök: Prof. Dr. Hohmann Judit akadémikus, SZTE Farmakognóziai Intézet
Opponensek: Dr. Fenyvesi Ferenc Ph.D., DE Gyógyszertechnológiai Intézet
Dr. Nagy K. Zsombor BME Szerves Kémiai és Technológiai Tanszék.
Tagok: Dr. Völgyi Gergely Ph.D., SE Gyógyszerkémiai Intézet
Dr. Szakonyi Gerda Ph.D., SZTE Gyógyszeranalitikai Intézet

SZEGED

2019

1. BEVEZETÉS

A szemcseméret csökkentése széles körben alkalmazott eljárás mikro- és nanorészecskék előállítására, rossz vízdékonyságú hatóanyagok fajlagos felületének növelésére, ezáltal a kioldódási profil javítására (Shegokar et al., *Int. J. Pharm.*, 2010). Dezintegráló eljárások alkalmazásakor a részecskék szemcseméretének csökkentése energia befektetéssel, aprítás útján valósul meg. Az őrlés egy általánosan alkalmazott eljárás mikro- és nanorészecskék előállítására. Az őrlésnek számos típusa ismert; megkülönböztetünk száraz- és nedvesőrlést (Dahiya, *B. Pharm. Sci.*, 2017).

A nedves őrlés mikronizálásra (Pomázi et al., *Eur. Polym. J.*, 2013) és nanonizálásra is alkalmas eljárás (Bilgili et al., *Chem. Eng. Sci.*, 2006, Loh et al., *Asian J. Pharm. Sci.*, 2015). Az ún. media milling elterjedt őrlési típus a pigment-, fotó- és mágnesiparban. A gyógyszeriparban a legismertebb ide tartozó technológiát az "Elan Pharma International Ltd. (Dublin) fejlesztette NanoCrystal® néven, amivel hosszú időt- és nagy energiát igénylő folyamat valósítható meg (Junghanns et al., *Int. J. Nanomed.*, 2008). A bolygómalom egy nagy energiájú őrlőberendezés. Működés közben a tégely a saját, valamint egy tárcsa tengelye körül forog, így valósítva meg a bolygómozgást (Broseghini et al., *J. Eur. Ceram. Soc.*, 2016). A Retsch javaslatot tett a bolygómalom és az őrlőgyöngyök kombinációjára, ami alkalmas nanoméretű diszperzió ún. nanoszuszpenzió előállítására (Retsch GmbH, Haan, Germany).

A nanoszuszpenzió a nanorészecskék kolloid diszperziójaként definiálható (<500 nm), amely különböző eljárásokkal állítható elő és eltérő segédanyagokkal stabilizálható (Müller et al., *Int. J. Pharm.*, 1998). A nanoszuszpenzió alkalmazható folyékony gyógyszerformaként is, viszont ebben az esetben további segédanyagok, pl. viszkozitás növelő, ízjavító, felületaktív anyag, tartósítószer hozzáadása szükséges. Mindenesetre a nanoszuszpenzió stabilizálása nem kis kihívás a fejlesztőknek. A stabilizálás ellenére a nanoszuszpenziók eltartási ideje rövid és azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy bizonyos betegcsoportok (idősek és gyerekek) nem szívesen fogadják el ezt a formát, illetve a tenzid(ek) jelenléte sem kívánatos. Az instabilitás és a tenzid probléma egyik megoldása lehet a „száraz” szuszpenzió előállítása, amit alkalmazás előtt kell „rekonstruálni” (Fülöp et al. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2018). A vizes rediszpergáláshoz azonban szükség van a felületaktív anyag jelenlétére is. A másik lehetőség, ami mindkét problémára megoldására nyújthat, az a nanoszuszpenzió közvetlen szilárd fázisú terméké transzformálása, majd gyógyszerformává (por, tableta, kapszula) formulálása.

Ez a munka bemutatja a hatóanyagok nanonizálásával összefüggő kombinált nedves őrléses technológiát, a nanorészecskék stabilizálását felületaktív anyag jelenléte nélkül, valamint a termékek biológiai hasznosíthatóságát.

2. CÉLKITŰZÉS

A Ph.D. munka célja a nedves őrlés tanulmányozása volt, amely során a bolygómalmot kombináltuk a gyöngymalom technológiájával. Célul tűztük ki az eljárási paraméterek optimalizálását, a folyamat robusztusságának előrevetítését, valamint a poli(vinil-alkohol (PVA) mennyiségének optimalizálását. A PVA-nak, mint védő polimernek kettős feladata volt, részben az őrlés hatékonyságának növelése (előkezelés nélküli, felületaktív mentes minták őrlése), részben pedig a meloxikám (Mel) tartalmú nanoszuszpenzió, mint intermedier stabilizálása. A vizsgált formulációk alkalmazhatóságát *in vitro* sejtvonalas vizsgálatoknak vetettük alá.

A munka további célja volt stabil, felületaktív anyag-mentes termék előállítás a Mel tartalmú optimalizált összetételű nanoszuszpenzió szilárd formává való alakításával. Kritikus termékparaméternek a hatóanyag szemcseméret-eloszlását ($d(0.9) < 500$ nm), az őrlés hatására változó kristályossági fok stabilizálását, és a szilárd fázisú termék gyomorból történő gyors felszívódásával a biohasznosíthatóság fokozását tekintettük. A Mel nanorészecskék gyors oldódási sebessége nagy szaturációs koncentrációt eredményez, s ennek következménye a gyors felszívódás. A nanoszuszpenzió szilárd formává való átalakítását fluidizálással és liofilezéssel valósítottuk meg.

A kísérletes munka főbb lépései a következők voltak:

- i. A kombinált nedves őrlés kritikus folyamat paramétereinek optimalizálása (a prediszperzió és a gyöngyök aránya, őrlési idő, fordulatszám), Mel tartalmú nanoszuszpenzió, mint közti termék előállítása.
- ii. A PVA mennyiségének az őrlés hatékonyságára, a szemcseméret-eloszlásra és a Mel kristályossági fokára gyakorolt hatásának tanulmányozása a nanoszuszpenzióban.
- iii. *In vitro* kioldódási teszt és sejtenyészetes vizsgálatok elvégzése (sejtéletképesség és permeabilitás) a PVA mennyiségének optimalizálása céljából.
- iv. A kombinált nedves őrlési eljárás robusztusságának tanulmányozása a Mel mennyiségének meghatározásához és az őrlött termék kristályossági fokának tervezéséhez.
- v. A felületaktív anyag nélküli Mel tartalmú nanoszuszpenzió szilárd fázisú terméké alakítása fluidizálással és liofilezéssel, valamint a termék stabilitásának (szemcseméret, kristályosság) és a Mel *in vitro* felszabadulásának vizsgálata.

vi. A termék biohasznosíthatóságának tanulmányozása, *in vivo* állatkísérletek alkalmazásával.

3. MATERIALS AND METHODS

Mel: EGIS Gyógyszergyár (Budapest, Magyarország); poly(vinyl alcohol) 4-98 (**PVA**) ($M_w \sim 27,000$): Richter Gedeon Nyrt. (Budapest, Magyarország) Zirkónium oxid (ZrO_2) gyöngy (0,30 mm): Netsch (Netsch GmbH, Selb, Németország). Mikrokrisztályos cellulóz (MCC) (Avicel[®] PH 101, FMC Biopolymer, Philadelphia, Egyesült Államok); D-(+)-trehalóz-dihidrát: Roth GmbH + Co. KG. (Karlsruhe, Németország).

3.1. A termék előállítása

A mintákat 50 ml-es acél tégelyben őrlöttük Retsch PM 100 bolygómalommal (Retsch PM 100 MA, Retsch GmbH, Germany), 0,3 mm ZrO_2 őrlőtestek jelenlétében. A prediszperzió-őrölttest arány (m/m): 1:0.5, 1:1, 1:2 and 1:4; az őrlési idő: 10, 30 and 50 min. Ezen változó paraméterek esetében a PVA koncentrációja 2,5% (m/m), a fordulatszám 400 ford/perc. Következő lépésként egy háromszintes kísérlettervben optimalizáltuk az őrlési időt (10, 30 és 50 perc) és a fordulatszámot (200, 350 és 500 ford/perc), mint független változókat.

3.2. A PVA koncentráció optimalizálása

Az eljárásparaméterek optimalizálása után a megfelelő PVA koncentrációt határoztuk meg. Különböző mennyiségű PVA-t tartalmazó oldattal (2.5-7.5%) állítottunk elő prediszperziókat.

3.3. Az eljárás robusztusságának vizsgálata

Nyolc mintát készítettünk, 0,5 és 4,0 g közötti Mel mennyiséggel, 0,5 g léptékkal. Minden esetben a fenti kísérlet során használt 5%-os PVA oldattal egészítettük ki az összetételt 20 g-ra.

3.4. A nanoszuszpenziók szilárd formává alakítása: fluidizáció (fluidMel), liofilizálás (lyoMel)

A fluidizálás során Avicel PH 101-t alkalmaztunk hordozóként a Strea-1 készülékben (Niro Aeromatic, Bubendorf, Svájc). A fagyasztva szárítást Scanvac CoolSafe 100-9 Pro (LaboGene ApS, Lyngø, Dánia) fagyasztva szárító készülékben végeztük.

3.5 Szemcseméret-eloszlás meghatározása.

A kiindulási Mel- és a nanoszuszpenzió (nanoMel) szemcseméret-eloszlását lézerdiffrakciós módszerrel mértük meg (Malvern Mastersizer S 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Egyesült Királyság). A szilárd fázisú termékek esetében (fluidMel and lyoMel) a szemcseméretet

elektronmikroszkópos felvételek (SEM) alapján határoztuk meg (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Tokyo, Japán). A nanoMel és lyoMel minták Z-átlag szemcseméretét s a polidiszperzitási indexét (PDI) pedig Malvern Zeta Nano ZS (Malvern Instruments Ltd) műszerrel vizsgáltuk.

3.6. Elektronmikroszkópos felvételek (SEM)

A minták morfológiai jellemzése pásztázó elektronmikroszkóppal történt (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán).

3.7. Porróntgendiffrakciós vizsgálatok (XRPD)

A Mel kristályossági fokát porróntgen diffrakciós vizsgálattal ellenőriztük (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország).

3.8. Stabilitási vizsgálatok

A szilárd termékeket (fluidMel and lyoMel) hat hónapig szobahőmérsékleten (23 ± 2 °C, $45 \pm 5\%$ rel páratart.) tároltuk. Ezt követően összehasonlítottuk a tárolt és a friss minták szemcseméretét és kristályossági fokát.

3.9. Differenciál pásztázó kalorimetriás mérések (DSC)

A termékek termoanalitikai sajátságait Mettler Toledo DSC 821e készülékkel és STARe szoftver segítségével (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) határoztuk meg.

3.9. Raman spektroszkópia

A spektroszkópiai vizsgálatokat Thermo Fisher DXR Dispersive Raman (Thermo Fisher Sco. Inc., Waltham, MA, Egyesült Államok) készülékkel végeztük el.

3.10. Zeta potenciál mérések

A nanoMel és lyoMel zeta potenciálját Malvern Zeta Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Egyesült Királyság) határoztuk meg.

3.11. Reológiai mérések

A folyékony minták reológiai sajátságainak az őrlés során esetlegesen bekövetkező változásait Physica MCR101 reométerrel (Anton Paar, Austria, Graz) vizsgáltuk.

3.12. *In vitro* kioldódási vizsgálatok

A Mel kioldódási vizsgálatát keverőlapátos módszerrel végeztük (USP kioldó készülék, type II Pharma Test, Heinburg, Germany). A hatóanyagtartalmat spektrofotométerrel mértük (ATI-UNICAM UV/VIS Spectrophotometer, Cambridge, UK) 362 nm (mesterséges gyomornedv) 364 nm (mesterséges bélmedv) hullámhosszokon.

3.13. *In vitro* sejtvonalas vizsgálatok

Caco-2 bél-epithél sejtek az ATCC-től (cat.no. HTB-37) származnak. A sejteket Dulbecco's Módosított Eagle's közegében (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, Egyesült Államok) 10% marha magzatszérum (Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Németország) és 50 µg/ml gentamycin jelenlétében tenyésztettük, klímakamrában 5 % CO₂ gáz alkalmazásával, 37°C hőmérsékleten.

A sejt életképességi vizsgálatok impedancia méréssel történt. Az impedanciát 10 kHz-en mértük RTCA SP berendezéssel (RTCA-SP készülék, ACEA Biosciences, San Diego, CA, Egyesült Államok).

A Mel permeabilitási adatait a TEER értékek másnapenkénti mérésével ellenőriztük, EVOM volt-ohmméterrel (World Precision Instruments, Sarasota, FL, Egyesült Államok), Az értékeket a rétegfelületek területéhez viszonyítottuk.

3.14. *In vivo* vizsgálatok

Az *in vivo* vizsgálatokat 240-260 g tömegű hím Sprague–Dawley patkányokon végeztük. 300 µg/kg Mel-t tartalmazó, 0,5 ml térfogatú mintát adtunk be gyomorszondán keresztül ($n = 6$). A minták analitikai elemzése LC-MS-MS technikával történt.

Az eredmények alapján *in vitro*–*in vivo* korrelációt (IVIVC) számoltunk Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Egyesült Államok) és Statistica for Windows (StatSoft GmbH, Hamburg, Németország) alkalmazásával.

4. TÉZISEK / EREDMÉNYEK

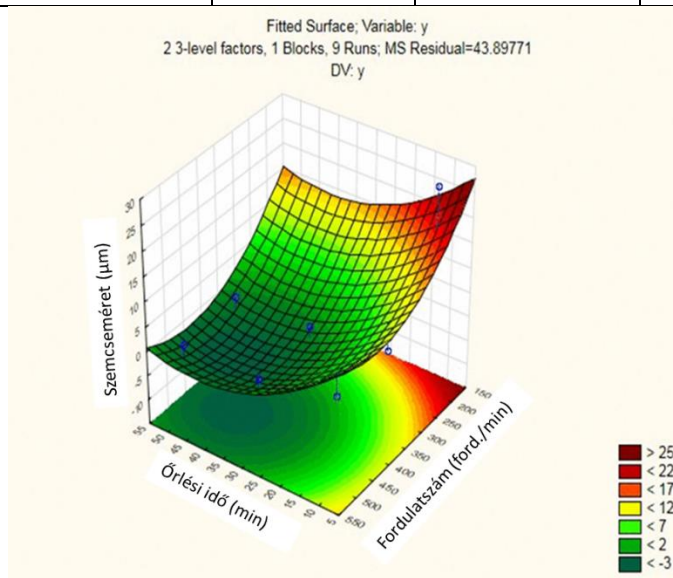
i) Kombinált nedves őrléses eljárás kritikus paramétereinek optimalizálása

A bolygómalom és a gyöngymalomban használt őrlőtestek kombinációjával olyan nedves őrléses eljárást optimalizáltunk, amely alkalmas a modell NSAID hatóanyag (jelen esetben a Mel) nanonizálására ($d(0.9) < 500$ nm). Az eredmények alapján, kritikus eljárási paraméternek tekintjük a

prediszperzió-gyöngy arányt, ami az optimalizáció során 1:1 (m/m) adódott, továbbá az őrlő tégely fordulatszámát (437 rpm) és az őrlési időt (43 perc). Az eljárás hatékonyságát jól mutatja a 200-szoros szemcseméret csökkenés (1. táblázat), ami a prediszperziók előőrlése és felületaktív anyag nélkül, PVA jelenlétében valósult meg (1. ábra).

1. táblázat. Mel szemcsemérete (d(0.5)) különböző gyöngymennyiség, és őrlési idő után (kiindulási Mel d(0.5): $34,260 \pm 4,860 \mu\text{m}$)

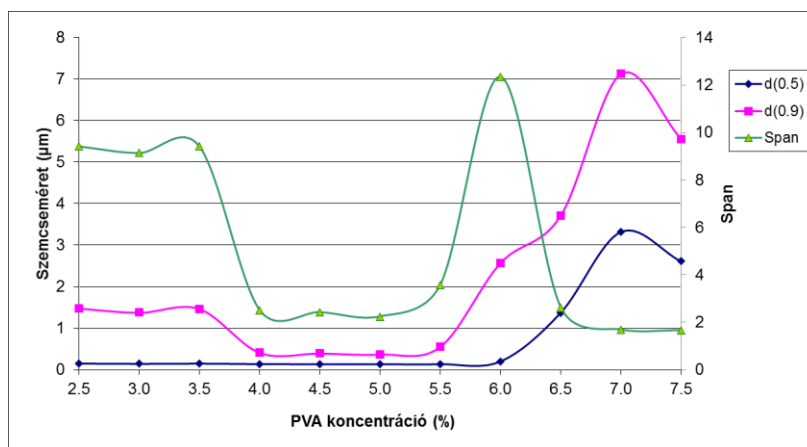
	Prediszperzió / őrlőtest arány (m/m)			
	1:0.5	1:1	1:2	1:4
	Szemcseméret (μm)			
10 min	4,015±0,06	2,426±0,029	2,383±0,016	0,149±0,03
30 min	0,293±0,008	0,145±0,007	0,190±0,003	0,137±0,006
50 min	0,202±0,003	0,140±0,004	0,140±0,002	0,130±0,004



1. ábra. A szemcseméret változásának 3D leképezése az őrlési idő és a fordulatszám függvényében faktoriális kísérlet során.

ii. PVA mennyiségének optimalizálása az őrlési hatékonyság, a szemcseméret eloszlás és a kristályossági fok függvényében.

A PVA mennyisége szintén kritikus paraméternek adódott, mivel alapvetően befolyásolta az őrlés hatékonyságát, s ezzel párhuzamosan a termék paramétereit is. Megállapítottuk, hogy kis PVA koncentráció esetén (< 4%) az őrlés hatékonysága nem megfelelő, kevésbé érvényesül a gyöngyök ütközési/törési hatása. Nagy PVA koncentrációnál (> 5%) szintén csökken a hatékonyság, mivel a szemcsék felületén képződő polimer film gátolja azok fragmentálódását. Figyelembe véve az eredményeket, 5% PVA tartalom bizonyosult megfelelőnek a kívánt szemcseméret kritérium eléréséhez ($d(0.9) < 500 \text{ nm}$) (2. ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy a PVA koncentrációja hatással van a diszperziók viszkozitására, a Mel szemcseméret eloszlására és a részecskék elektrokinetikai sajátságára (2. táblázat), valamint a termék stabilitására.

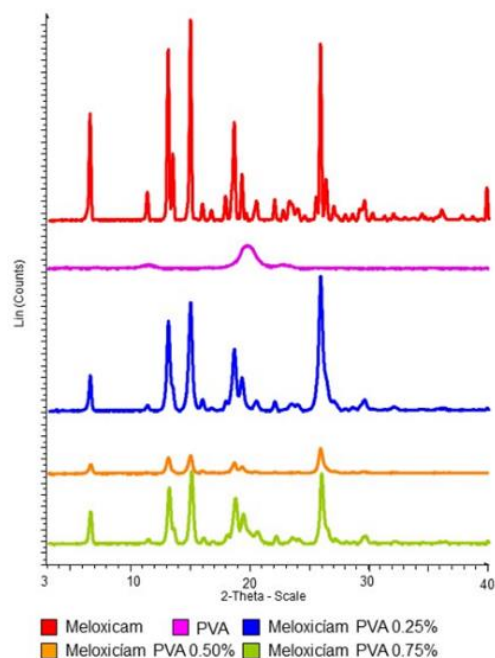


2. ábra. PVA koncentrációjának befolyása a szemcseméret eloszlásra, valamint a SPAM értékre

2. táblázat. A hígított termékek Zeta potenciál értékének változása a PVA koncentráció függvényében, és a Mel szemcseméret eloszlása a termékekben (\pm SD)

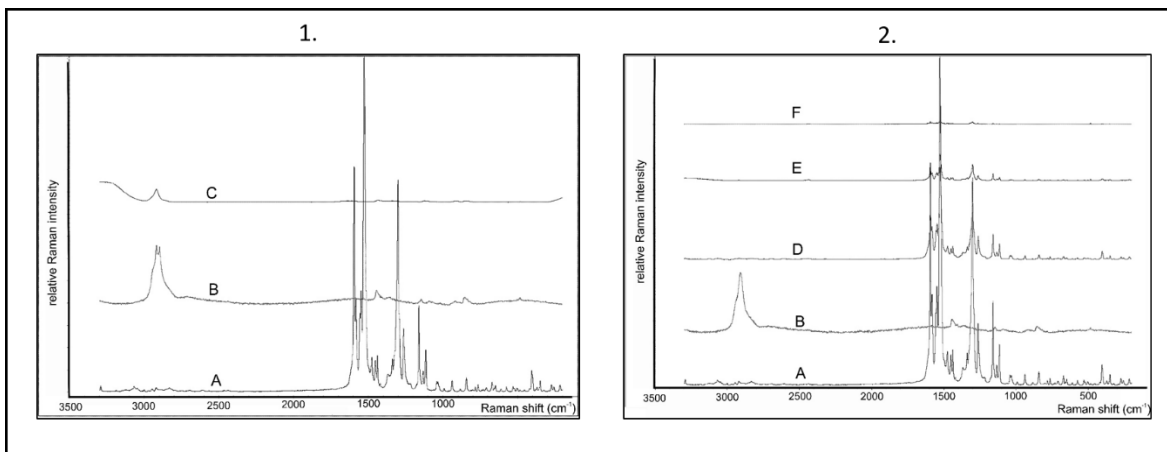
Minták	Szemcseméret eloszlás			Zeta potenciál (mV)
	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)	
	Szemcseméret (μm)			
Mel PVA 0%	2,508 \pm 1,1	5,762 \pm 2,7	135,640 \pm 12,9	-30,7
Mel PVA 0,25%	0,070 \pm 0,001	0,150 \pm 0,009	1,478 \pm 0,04	-20,9
Mel PVA 0,50%	0,067 \pm 0,001	0,130 \pm 0,005	0,371 \pm 0,01	-16,1
Mel PVA 0,75%	1,235 \pm 0,006	2,611 \pm 0,018	5,560 \pm 0,07	-15,7

A PVA mennyisége nagymértékben befolyásolta a Mel kristályossági fokát is. Az XRPD vizsgálatok azt mutatták, hogy a kis (2,5%) és nagy koncentrációban (7,5%) alkalmazott PVA nem eredményezett kielégítő szemcseméret-csökkenést, s ezzel összhangban a Mel kristályossági fokának csökkenése is elmaradt az 5,0 % PVA koncentrációnál meghatározottól (3. ábra). 2,5% PVA-t tartalmazó minta esetében 75,82%-ra, 7,5% PVA alkalmazásakor pedig 51,44%-ra csökkent a kristályossági fok. Ezen eredmények kapcsolatban állnak az őrlési hatékonysággal. Az 5% PVA tartalmú termék kristályossági foka a legkisebb (13,43%), ugyanakkor ez a koncentráció eredményezte a leghatékonyabb őrlést.



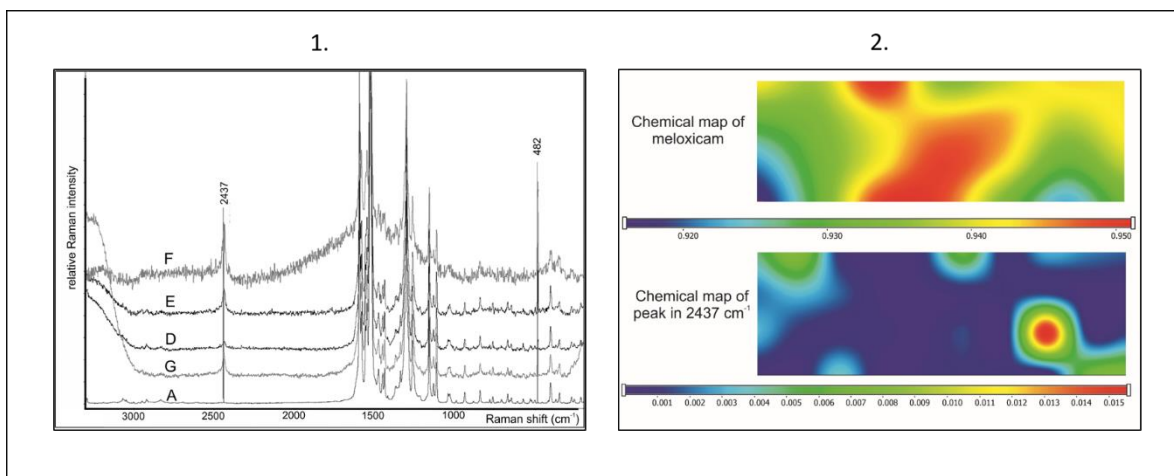
3. ábra. A kiindulási Mel, PVA és a szárított diszperziók röntgendiffraktogramja

A RAMAN vizsgálatok azt mutatták, hogy őrlés során a Mel nem bomlott és nem volt kimutatható interakció a hatóanyag és a PVA között (4. ábra). A RAMAN térképezés pedig a Mel homogén eloszlását igazolta a különböző PVA tartalmú diszperziókban (5. ábra). Tehát felületaktív anyag nélkül is megtartották a szemcsék az egyediségüket.



4. ábra. Raman spektroszkópiás vizsgálatok során mért spektrumok: 1. A: a kiindulási Mel s B: a kiindulási PVA, C: a 0,50% PVA tartalmú termék. 2. a kiindulási anyagok (Mel, PVA) és a termékek összehasonlítása,

D: 1% Mel és 0,25 % PVA tartalmú termékek, E: 1% Mel és 0,50% PVA tartalmú minták, F: 1% Mel és 0,75% PVA tartalmú termékek.

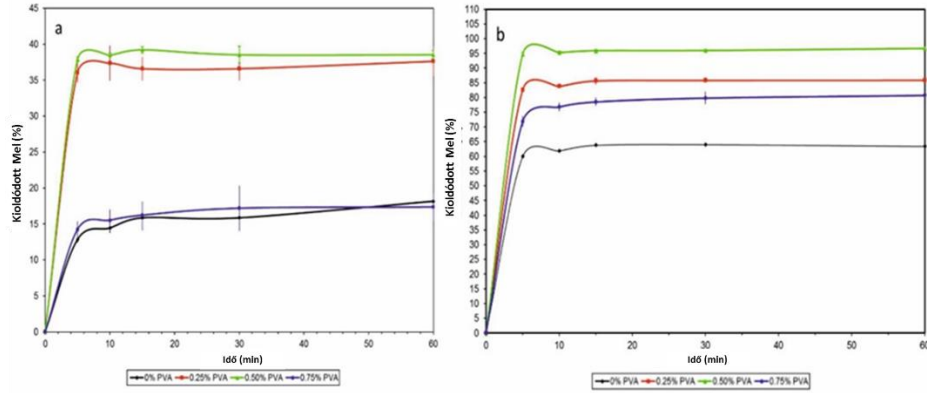


5. ábra. Raman spektroszkópiás vizsgálatok során mért spektrumok: 1. A kiindulási Mel összehasonlítása az őrlött termékekkel, A: kiindulási Mel spektrum, D: 0,25% PVA tart. minta, E: 0,50% PVA tartalmú minta, F: 0,75% PVA tartalmú termék, G: PVA mentes őrlött minta, 2. kémiai leképezése az optimális PVA tartalmú diszperzióknak (1% Mel and 0.50% PVA) és a szárított terméknek 2437 cm⁻¹-en.

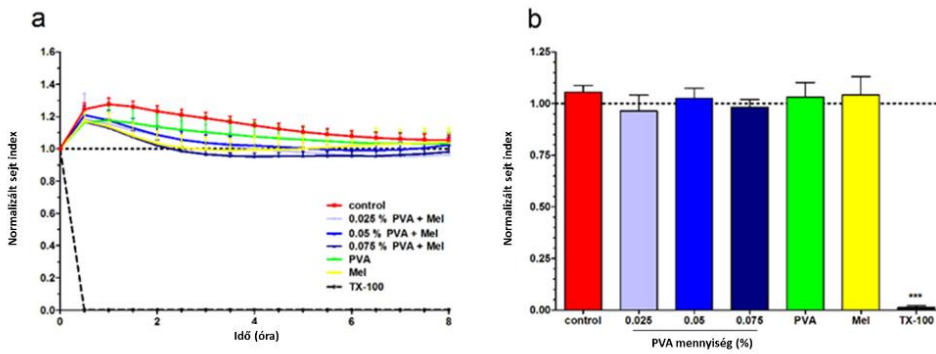
Összegzésként tehát elmondható, hogy az optimalizált eljárási paraméterekkel (lásd i) pont) előállított tömény nanoszuszpenzió, a 10-szeres hígítást követően (1,0 % Mel és 0,5 % PVA) teljesítette a kitűzött célt a Mel szemcseméret eloszlását tekintve (d(0.1) 0,067µm, d(0.5) 0,130µm, d(0.9) 0,371 µm). Az őrléssel azonban jelentősen csökkent a MEL kristályossági foka, de a hatóanyag kémiai bomlást nem szenvedett. Az így előállított nanoszuszpenzió (nanoMel), mint közti termék, két hét eltarthatóságot (stabilitást) mutatott.

iii. In vitro kioldódási teszt és sejtenyészetes vizsgálatok elvégzése a PVA mennyiségének ellenőrzésére

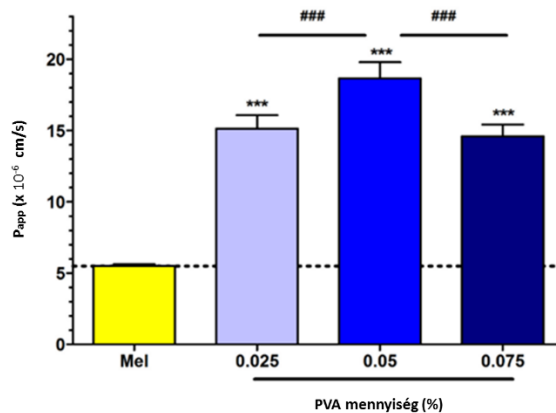
Az *in vitro* kioldódási vizsgálatok azt mutatták, hogy a Mel szemcsemérete és kristályossági foka egymással összefüggő és a kioldódási profilra nagy hatást gyakorló paraméterek (6. ábra). A humán Caco-2 sejtvonalon végzett vizsgálatok pedig a Mel penetrációjának szignifikáns javulását igazolták a PVA-t tartalmazó minták esetében, a segédanyag mentes termékhez viszonyítva, toxikus hatás nélkül (7. ábra). A legjobb penetrációs tulajdonsággal a 0,05 % PVA tartalmú minta rendelkezett, ami megfelel az optimalizált összetételű, 0,50 % PVA-t tartalmazó mintával (8. ábra).



6. ábra. A PVA mennyiségének befolyása a Mel *in vitro* kioldódási sebességére mesterséges gyomornedvben (a)- és mesterséges bélnedvben (b)



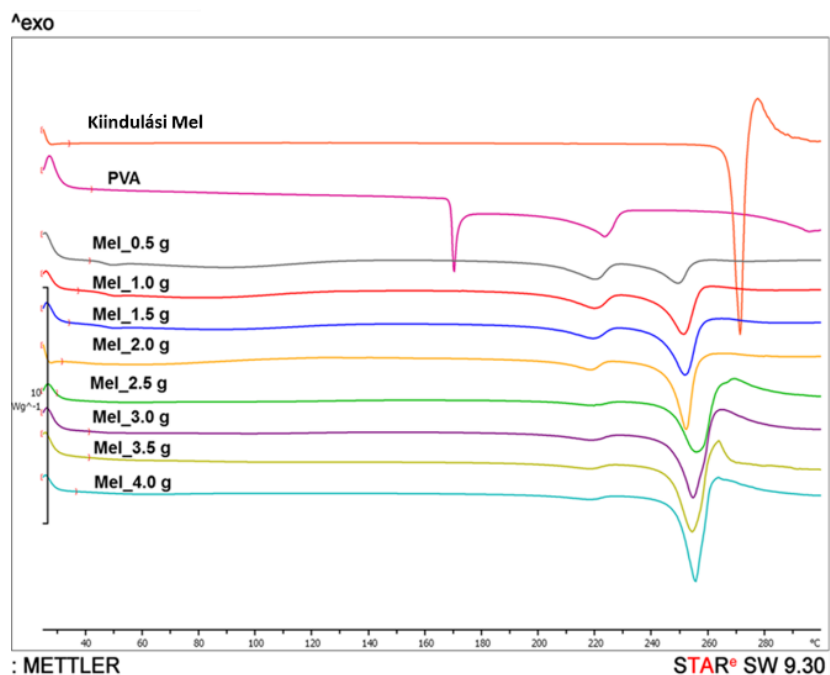
7. ábra. Sejt toxicitási kinetika eredmények (a) és a nyolcórás kezelést követően mért értékek (b) Caco-2 bél-epithél sejteken, impedancia alapján



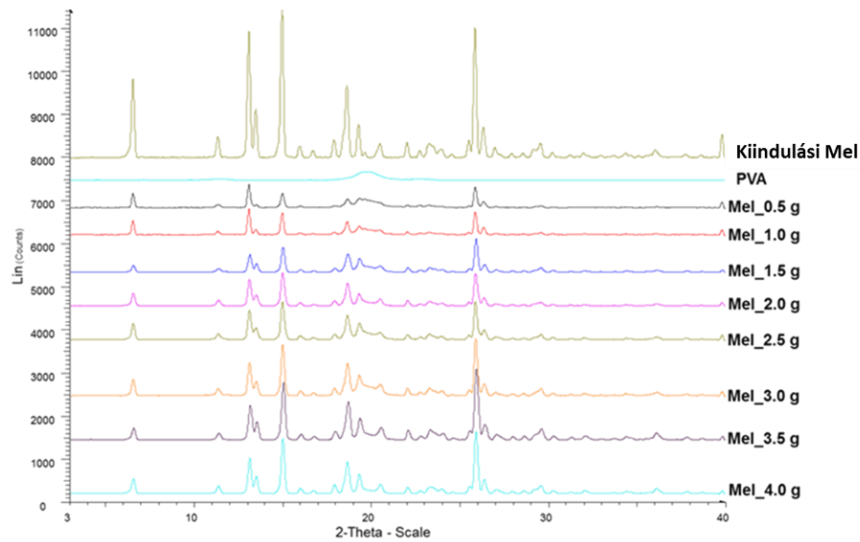
8. ábra. A Mel egy óra után mért permeabilitás értékei human Caco-2 sejteken

iv. A kombinált nedves őrléses eljárás robusztusságának vizsgálata

A kutatás céljai között szerepelt a kombinált nedves őrlés robusztusságának tanulmányozása, nevezetesen a hatóanyag mennyiségének csökkentése és növelése az adott rendszerben, az optimalizált értékhez viszonyítva (10,0 % Mel = 2,0 g Mel), valamint ennek befolyása a Mel kristályossági fokára, (DSC és XRPD vizsgálatok). A vizsgálatok során szoros összefüggést találtunk a Mel tartalom és annak kristályossága között. A Mel mennyiségének növelésével nőtt a kristályossági fok. Megállapítottuk, hogy a célul kitűzött szemcseméret eléréséhez a Mel mennyisége a kiindulási 10%-ról 17,5%-ra (m/m) növelhető, ezzel a PVA koncentráció pedig 5% és 4,58% között változik. Ebben a koncentráció tartományban a Mel kristályossági fok 20 és 45% intervallumban van. A DSC és XRPD mérések nem mutattak szignifikáns különbséget 95%-os konfidenciaszinten (9. és 10. ábra), ami azt is mutatja, hogy a DSC vizsgálatok ebben a kristályossági fok tartományban biztonságosan alkalmazhatóak.



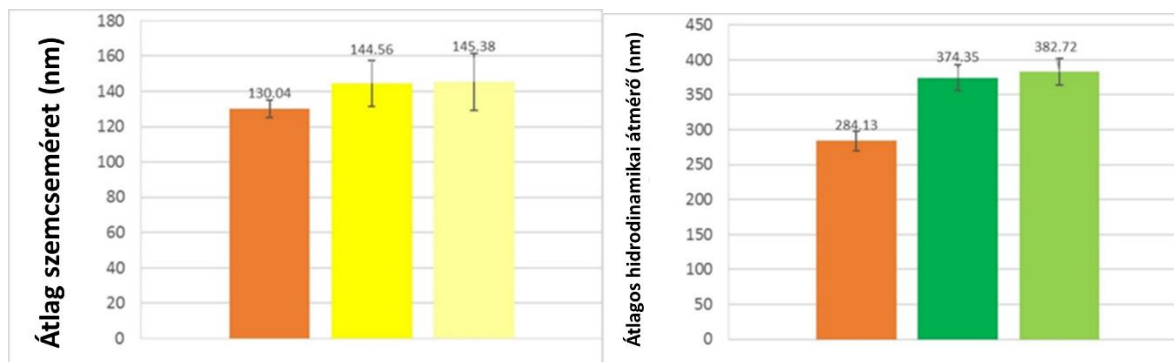
9. ábra. A kiindulási hatóanyag és a különböző Mel tartalmú minták DSC görbéje



10. ábra. A kiindulási hatóanyag és a különböző Mel tartalmú minták XRPD görbéje

v. *A tenzidmentes nanoMel minta szilárd fázisú formává alakítása fluidizációval és fagyasztva szárítással*

A nanoMel jelzésű nanoszuszpenzióban (1% Mel és 0,5% PVA) a Mel átlagos szemcsemérete tehát $130,04 \pm 5$ nm, kristályossági foka pedig 13,43 %-nak adódott. A kéthetes tárolási idő egyértelműen azt mutatta, hogy a terméket stabilizálni kell annak érdekében, hogy az őrlésnél adódott/beállított kritikus paramétereket biztosítani tudjuk. Erre a nanoszuszpenzió szilárd fázisú terméké váló átalakítása jelentett megoldást. Ennek megvalósítására először a fluidizációs eljárást alkalmaztuk, amely során MCC-t használtunk segédanyagként. A gyors transzformálási eljárásnak köszönhetően a termék kritikus paraméterei nem változtak szignifikánsan. A másik lehetőség a fagyasztva szárítás volt, ami egy időigényesebb folyamat. A szárítás alatt a hordozóanyag (trehalóz) amorfizálódása és a Mel részleges szemcseméret-növekedése és rekrisztallizációja ment végbe. Ezzel összhangban, az átlagos szemcseméret szignifikánsan nőtt ((Z-átlag: 284 nm-ről 374 nm-re) és a kristályossági fok növekedés értéke pedig elérte a 36,54 %-t. A hat hónapos szobahőmérsékleten történő tárolási idő során szignifikáns változás nem következett be a termékekben (11. ábra, 3. táblázat).



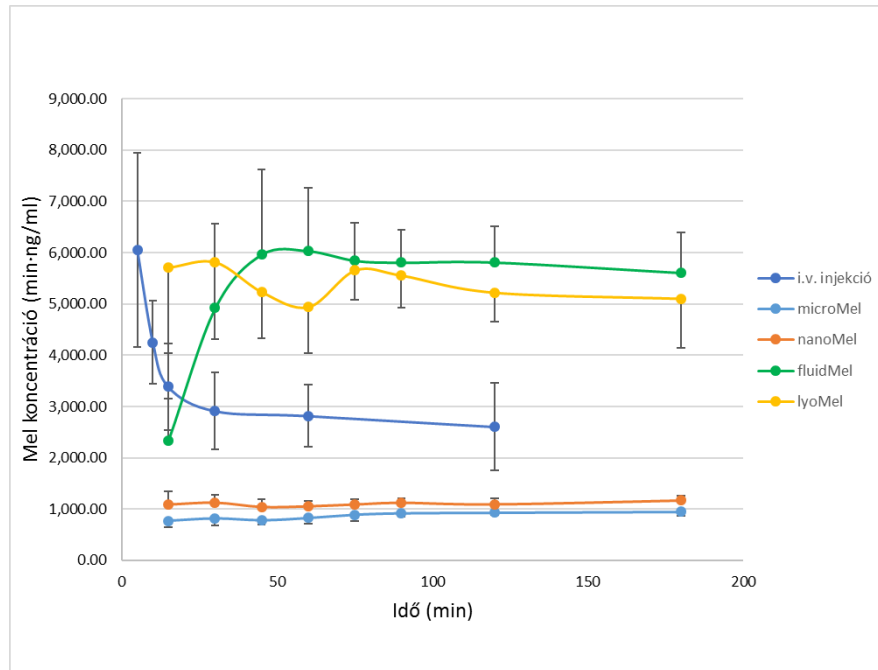
11. ábra. Balról jobbra: A nanoMel (lézer diffrakciós mérés), a friss fluidMel és a tárolt fluidMel átlagos szemcsemérete (SEM felvétel alapján becsült), valamint a nanoMel, friss és tárolt lyoMel mintáknak Z átlag értékei (Zeta nano ZS)

3. táblázat. A Mel entalpia értékei (DSC), illetve az olvadási entalpiaértékek alapján számolt kristályossági fokok.

Minta	Entalpia (J/g)	Kristályossági fok (%)	A tárolt minták kristályossági foka (%)
nanoMel	12,24	13,43	-
fluidMel	11,83	12,98	13,02
lyoMel	36,54	40,11	40,16

vi. A termékek biohasznosíthatósága

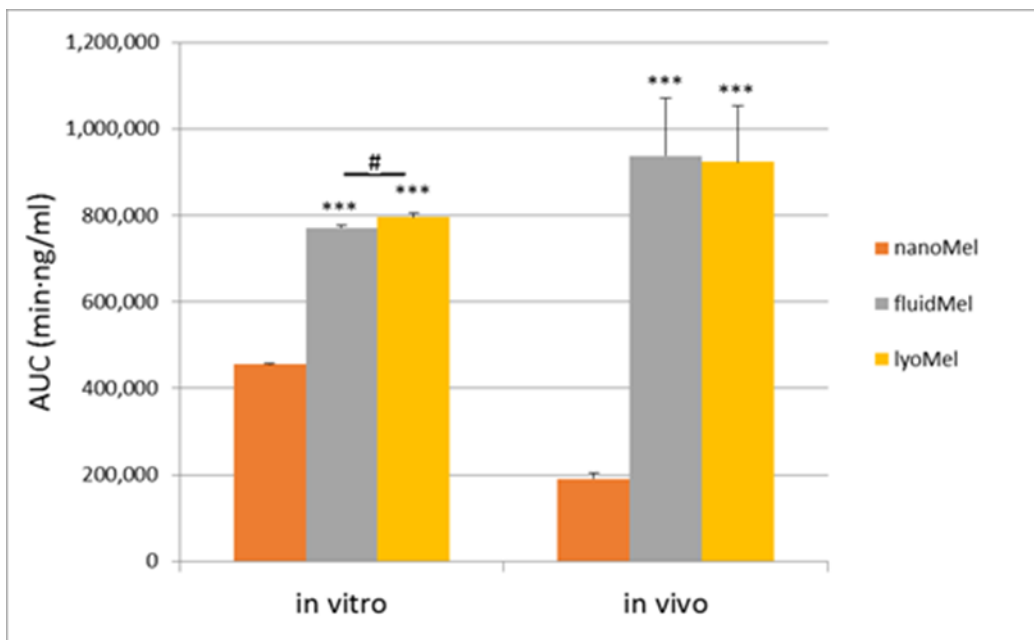
A tenzid mentes Mel tartalmú termékek biohasznosíthatóságát *in vivo* állatkísérletekkel igazoltuk. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a nanonizált Mel a szilárd termékekből (fluidMel, lyoMel) gyorsan felszívódik a gyomor barrieren keresztül, passzív transzcelluláris transzport segítségével. A szilárd termékek Mel tartalma, az elméleti értékhez viszonyítva 95 %-nak adódott, ami teljes mennyiségében feloldódott és felszívódott. A fluidMel és lyoMel minták esetében a biohasznosulás a nanoMel értékének ötszöröse volt, szájon át történő bevitel esetében. Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok közötti szoros korreláció a Mel nanoszemcsék hordozó felületéről történő gyors oldódása (fluidMel), és a telítési koncentráció gyors elérését igazolják, mind mesterséges gyomornedvben, mind pedig az állat gyomrában (12. ábra, 4. táblázat, 13. ábra).



12. ábra. A minták vérszintgörbéi a patkányoknak történő beadást követően. A készítmények szájon át (nanoMel, fluidMel and lyoMel) és iv injekció formájában kerültek applikálásra 300 µg/kg koncentrációban, az állat tömegére számolt dózisban

4. táblázat. A patkányok plazmájában mért hatóanyag koncentrációk a megadott időpontokban, és a számolt relatív biohasznosulási értékek. A biohasznosulást a nanoMel értékéhez viszonyítottuk

Minta	C _{15min} (nM)	C _{120min} (nM)	AUC _{vér} (min·ng/ml)	Relatív biohasznosulás (%)
nanoMel	1,090.02	1,123.31	190,584.52	100.00
fluidMel	2,338.44	5,811.33	945,834.99	496.28
lyoMel	5,712.98	5,219.52	923,117.95	484.36
IV injekció	C _{5min} 6,059.07	2,607.80	377,528.01	-



13. ábra. IVIV korreláció. Megjegyzés: A feltüntetett értékek átlag \pm SD. Statisztikailag szignifikáns különbségek: *** $p < 0.001$, a nanoMel mintához viszonyítva, külön az *in vitro* és *in vivo* eredményeket tekintve; # $p < 0.05$ a megjelölt oszlopok esetében.

A kutató munka új megállapításai

A kombinált nedves őrlés alkalmas eljárásnak ígérkezik a hatóanyagok nanonizálására, ami egy lépésben, előőrlés és felületaktív anyag alkalmazása nélkül eredményezi a kívánt szemcseméretű terméket. Kutatási eredményeim újdonságát az őrlési paraméterek- és a PVA mennyiségének optimalizálása jelenti a Mel adott szemcseméretének eléréséhez (őrlés hatékonysága), a nanoszuszpenzió (nanoMel), mint közti termék egy lépésben történő előállításához (innovatív technológia).

Az őrlés robusztusságának meghatározásához figyelembe kell venni, hogy az őrlő gyöngyök mennyisége csökkenthető a hatóanyag mennyiségének növelésével, valamint ezzel a hatóanyag kristályossága is szabályozható. Ebben az esetben a DSC módszer javasolt a kristályossági fok meghatározására, mivel a nagy amorf tartalom esetében ez a módszer biztonságosan alkalmazható.

A nanoszuszpenzió szilárd formává történő transzformálása új lehetőséget jelent a nanorészecskék stabilizálására (szemcseméret, kristályossági fok), továbbá lehetővé teszi felületaktív anyag alkalmazása nélkül is kiváló biohasznosulású szilárd fázisú termék előállítását (por, tablettá, kapszula), ami fontos szempont bizonyos betegcsoportok esetében a gyors fájdalomcsillapítás elérése céljából (innovatív termék).

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ KÖZLEMÉNYEK:

1. Bartos C, Szabó-Révész P, Bartos Cs, Katona G, Jójárt-Laczkovich O, Ambrus R. The effect of an optimized wet milling technology on the crystallinity, morphology and dissolution properties of micro- and nanonized meloxicam. *Molecules* 21 (2016) 507-518.

IF: 3.098 Q1

2. Bartos Cs, Jójárt-Laczkovich O, Katona G, Budai-Szűcs M, Ambrus R, Bocsik A, Gróf I, Deli M A, Szabó-Révész P. Optimization of a combined wet milling process in order to produce poly(vinyl alcohol) stabilized nanosuspension. *Drug. Des. Dev. Ther.* 12 (2018) 1567-1580.

IF: 2.935 Q1

3. Bartos Cs, Jójárt-Laczkovich O, Regdon G Jr, Szabó-Révész P. Robustness testing of milling process, analyzing the particle size distribution and crystallinity of the milled samples. *J. Therm. Anal. Cal.* (2019) DOI: 10.1007/s10973-019-08395-2

IF: 2.209 Q2

4. Bartos Cs, Ambrus R, Katona G, Gáspár R, Márki Á, Ducza E, Ivanov A, Tömösi F, Janáky T, Szabó-Révész P. Transformation of meloxicam containing nanosuspension into surfactant-free solid compositions to increase the product stability and drug bioavailability for rapid analgesia. *Drug Des. Dev. Ther.* (accepted for publication)

IF: 3.208 Q1

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

Bartos C, Ambrus R, Bartos Cs, Szabó-Révész P. Preparation and comparison of methacrylate copolymer-based microparticles for intranasal application. *Acta Pharmaceutica Hungarica* (2019)

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ ELŐADÁSKIVONATOK:

Bartos Cs, Szabó-Révész P, Jójárt-Laczkovich O. Optimization of particle size of meloxicam with combined wet milling process. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 2016 szeptember 22-24, Belgrád, Szerbia.

Bartos Cs, Jójárt-Laczkovich O, Szabó-Révész P. Comparison study of nanonized meloxicam and its potassium salt containing peroral dosage form with fast release. 7th BBBB International Conference, 2017 október 5-7, Balatonfüred, Magyarország.

Bartos Cs, Regdon G jr., Jójárt-Laczkovich, O, Szabó-Révész, P. Scaling up of a combined wet milling process. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 2018 szeptember 20-22, Szeged, Magyarország.

Bartos, Cs, Szabó-Révész, Piroska: Formulation of a solid oral drug delivery systems containing nanosuspension produced by combined wet milling technique. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science. p. 23. 2019 január 31, Szeged, Magyarország.

Bartos Cs, Ambrus R, Szabó-Révész P. Transformation of nanosuspension as an intermediate product into solid dosage forms to improve the drug bioavailability. 3rd European Conference on Pharmaceutics, 2019 március 25-26, Bologna, Olaszország.

Köszönetnyilvánítás:

A kutatást a *Richter Gedeon Talentum Alapítvány, Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország* támogatta.

A kutatást a *Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal és a Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország* GINOP 2.2.1 15-2016-00007 azonosítószerű projektje támogatta.

A kutatást az *Emberi Erőforrások Minisztériuma, Magyarország* 20391 3/2018/FEKUSTRAT azonosítószerű projektje támogatta.