



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai Intézet

Ph.D. értekezés tézisei

**NEDVES ŐRLÉS ALKALMAZÁSA MIKRONIZÁLT ÉS NANONIZÁLT HATÓANYAGOT
TARTALMAZÓ PREDISZPERZIÓ ELŐÁLLÍTÁSÁRA NAZÁLIS GYÓGYSZERFORMA
FEJLESZTÉSE CÉLJÁBÓL**

Bartos Csilla

Gyógyszerész

Témavezetők:

Prof. Dr. Révész Piroska, MTA doktor

és

Dr. Habil. Ambrus Rita, Ph.D.

SZEGED

2016

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Gyógyszertechnológia Program
Programvezető: Prof. Dr. Révész Piroska
Gyógyszertechnológiai Intézet
*Témavezetők: Prof. Dr. Révész Piroska, MTA doktor és
Dr. Habil. Ambrus Rita*

Bartos Csilla

**NEDVES ŐRLÉS ALKALMAZÁSA MIKRONIZÁLT ÉS NANONIZÁLT HATÓANYAGOT
TARTALMAZÓ PRE-DISZPERZIÓ ELŐÁLLÍTÁSÁRA NAZÁLIS GYÓGYSZERFORMA
FEJLESZTÉSE CÉLJÁBÓL**

Szigorlati bizottság:

Elnök

Prof. Dr. Erős István, SZTE Gyógyszertechnológiai Intézet

Tagok

Dr. Vecsernyés Miklós, DE Gyógyszertechnológiai Intézet

Dr. Zupkó István, SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Bíráló bizottság:

Elnök

Prof. Dr. Hohmann Judit, SZTE Farmakognóziai Intézet

Opponensek

Dr. Fenyvesi Ferenc, DE Gyógyszertechnológiai Tanszék

Dr. Antal István, SE Gyógyszerészeti Intézet

SZEGED

2016

1. BEVEZETÉS

A hatóanyagok fizikai-kémiai és biofarmáciai sajátosságainak változtatására számos gyógyszer technológiai megoldás ismeretes (Maghsoodi et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008). A különböző szemcseméret-csökkentő technikák az integráló (felépítő) és dezintegráló (romboló) eljárások csoportjára oszthatók. Integrálás során molekuláris szintről kiindulva, kivált mikro- és nanorészecskék keletkeznek a rendszerben. Dezintegráló eljárások alkalmazásakor a részecskék szemcseméretének csökkentése energia befektetéssel, aprítás útján valósul meg (Ambrus et al., *Int. J. Pharm.*, 2009). Az őrlés, ezen belül a száraz és a nedves őrlés a dezintegráló technikák közé sorolható. Nedves őrlés során a hatóanyag vízzel vagy szerves oldószerrel készült diszperzióját kezelik. A nedves őrlés hatékonyságának biztosításához segédanyagra minden esetben szükség van, függetlenül attól, hogy mikronizálás vagy nanonizálás a cél. A segédanyag típusának megválasztása hatóanyagonként és formulálásonként változik. A stabilizáló segédanyagok elektrosztatikus vagy szterikus gátlás révén megakadályozzák a hatóanyag szemcsék agglomerációját. A nedves őrlés során keletkező prediszperzióból szárítással szilárd fázisú közti termék állítható elő (por), ugyanakkor közvetlenül felhasználható folyékony vagy félszilárd (spray vagy gél) gyógyszerforma előállítására is.

Az orr, mint alternatív gyógyszerbeviteli kapu alkalmas szisztémás hatású készítmények alkalmazására (Prommer and Thompson, *Patient. Pref. Adher.*, 2011). Intranazálisan por (Kaye et al., *J. Control. Release*, 2009), gél (Osth et al., *J. Control. Release*, 2002) és folyékony (csepp and spray) (Baumann et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012) gyógyszerformák alkalmazhatóak. Az orrspray-k esetében, az oldott állapotban lévő hatóanyag fejt ki leggyorsabban hatását. Azonban a hatóanyagok kb. 40%-a rossz vízdékonyságú (Beig et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012). A probléma kiküszöbölése prediszperzió készítésével valósítható meg, amiben a gyenge vízdékonyságú hatóanyag kívánt szemcseméret-eloszlása különböző technikák segítségével érhető el, a jó biohasznosíthatóság érdekében. A prediszperzió közvetlenül alkalmas folyékony gyógyszerforma fejlesztésére. A szisztémás hatás elérése céljából, különböző segédanyagok alkalmazása szükséges, amivel a hosszabb tartózkodási időt, mukoadhéziót (Horvát et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009), fokozott permeabilitást (Chunga et al., *Carbohydr. Polym.*, 2010) és bizonyos esetben a hatóanyag kontrollált felszabadulását biztosítani tudjuk.

Nagy kihívást jelent a gyógyszer technológia számára olyan szerves oldószer-mentes, költség- és idő-hatékony szemcseméret-csökkentő technika fejlesztése, ami megfelelő

minőségű prediszperzió készítésére alkalmas és beépíthető a gyógyszerforma előállítás folyamatába.

2. CÉLKITŰZÉS

Kutatómunkánk során célul tűztük ki új nedves őrlési technikák vizsgálatát, s azok szemcseméret-csökkentő hatásának tanulmányozását. Prediszperziók előállításával, különböző szerves oldószer-mentes technikákat hasonlítottunk össze (szonikáció és kombinált nedves őrlés) és meghatároztuk a folyamat paraméterek szemcseméretre gyakorolt hatását. Vizsgáltuk a hatóanyagok fizikai-kémiai és biofarmáciai sajátságainak változását a különböző őrlési technikák esetében. Modellanyagként gyenge vízdékonyságú, kristályos nem-szteroid gyulladásgátlókat (meloxikám-**MEL** és ibuprofen-**IBU**) választottam. Szuszpendált hatóanyagot tartalmazó intranazális spray formákat fejlesztettünk és különböző vizsgálatoknak vetettük alá.

A kísérletes munka lépései tehát a következők voltak:

- i. Szonikus kavitáció, mint szerves oldószer-mentes, statikus nedves őrlési technika alkalmazása szemcseméret csökkentés céljából (elővizsgálatok: IBU és MEL).
- ii. A statikus és a dinamikus szonikáció szemcseméret-csökkentő hatásának összehasonlítása, faktoriális kísérleti terv alapján (MEL).
- iii. Bolygómalom és gyöngymalomhoz való gyöngyök kombinációjának alkalmazása, mikronizált és nanonizált MEL-t tartalmazó prediszperziók előállítására.
- iv. Intranazális gyógyszerforma fejlesztése közvetlenül az elkészített, mikronizált és nanonizált hatóanyagot tartalmazó prediszperziókból; a spray formák vizsgálata.
- v. Javaslattétel innovatív intranazális gyógyszerforma előállítására, fájdalom-kezelés céljából, kontrollált hatóanyag-felszabadulás biztosításával.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

MEL: EGIS Gyógyszergyár (Budapest, Magyarország); IBU: Aldrich Chemie (Deisenhofen, Németország); poly(vinylpyrrolidone) K-25 (**PVP**): ISP Customer Service GmbH (Köln, Németország); Poloxamer^R és Solutol^R: BASF (Ludwigshafen, Németország); Tween 80^R

(**Tween**): Hungaropharma (Budapest, Magyarország); poly(vinyl alcohol) 4-98 (**PVA**) ($M_w \sim 27,000$) és nátrium-hialuronát (**HA**) ($M_r = 1,400$ kDa): Richter Gedeon Nyrt. (Budapest, Magyarország); mucin (II. típusú sertés gyomor mucin): Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis MO, US).

3.2. Módszerek

3.2.1. Termékek előállítása különböző nedves őrlési technikákkal

3.2.1.1. Elővizsgálatok statikus szonikációval az IBU és a MEL szemcseméretének csökkentése céljából

A minták előállítására nagy intenzitású ultrahangot (Hielscher UP 200S, 200W, Németország) alkalmaztunk. A kezelést szobahőmérsékleten vagy jeges hűtés mellett (18 °C) végeztük. Az amplitúdót 30 és 70 % között változtattuk. 10, 20, illetve 30 perces szonikációt végeztünk. Az összetétel meghatározásához különböző segédanyagokat (PVP, Poloxamer, Tween, Solutol) alkalmaztunk (Bartos et al., *Farmacia*, 2014).

3.2.1.2. A statikus és dinamikus szonikáció szemcseméret csökkentő hatásának összehasonlítása

A két módszer összehasonlítása során hatóanyagként a MEL-t választottuk. Minden minta esetében diszperziós közegként 0,5%-os PVP oldatot alkalmaztunk. A minták előállítására nagy intenzitású ultrahangot (Hielscher UP 200S, 200W, Németország) használtunk. A statikus és dinamikus szonikáció összehasonlítása kétszintű részleges faktoriális kísérleti terv alapján történt. Az eljárási paraméterek az 1. táblázatban láthatók.

1. táblázat Vizsgált paraméterek a statikus és dinamikus szonikáció esetében

	Statikus szonikáció	Dinamikus szonikáció
Térfogat (ml)	25; 100	100
Pozíció*	0,25; 0,75	0,25
Pumpa sebesség (rpm)	-	50; 100
MEL koncentráció (mg/ml)	2; 18	2; 18
Hőmérséklet (°C)	0; 36	0; 36
Amplitúdó (%)	30; 70	30; 70
Idő (perc)	10; 30	10; 30

*Pozíció 0,25: a teljes folyadéktest 1/4-éig merül a szonotród
Pozíció 0,75: a teljes folyadéktest 3/4-éig merül a szonotród

3.2.1.3. Prediszperzió előállítása kombinált nedves őrléssel

A MEL szemcseméretét bolygómalomban (Retsch PM 100 MA, Retsch GmbH, Németország) csökkentettük, őrlést elősegítő anyagként a gyöngymalom 0,3 mm átmérőjű cirkónium-dioxid (ZrO_2) gyöngyeit alkalmazva. Az őrlést 90 percen át végeztük, 10-percenkénti mintavétellel. Vizsgáltuk az őrlés időtartamának és a gyöngyök tömegének (0, 10, 20, 50 és 150 g) szemcseméretre gyakorolt hatását. A kapott termékek szemcseméretét közvetlenül a prediszperzióból határoztuk meg.

3.2.1.4. Prediszperzió előállítása nazális gyógyszerforma fejlesztéséhez

Az elővizsgálatok alapján a mikronizált- és nanonizált MEL-t tartalmazó prediszperziókat kombinált nedves őrléssel állítottuk elő PVA-5,6 pH-jú foszfát-puffert (2,5%) alkalmazva diszperziós közegként, biztosítva ezáltal a nazális körülményeknek megfelelő közeget. A keletkezett oldatban 2,0 g MEL-t szuszpendáltunk. A szuszpenziót 400-as fordulatszámon 10 és 50 percig őrlöttük, ZrO_2 gyöngyöket alkalmazva őrlőanyagként.

3.2.1.5. Nazális gyógyszerforma előállítása

A nazális gyógyszerformákat közvetlenül a prediszperziókból állítottuk elő. A prediszperziók 3,0 ml-ét foszfát-pufferrel hígítottuk abból a célból, hogy a spray végső koncentrációja a hatóanyagra nézve 1 mg/ml legyen. Minden minta esetében 0,15 g HA került hozzáadásra, így a végső gyógyszerforma 5 mg/ml koncentrációjú HA-t tartalmazott. A spray-eket 24 órán át hűtőben, 8 °C-os hőmérsékleten tároltuk. A szuszpendált MEL-t tartalmazó intranazális spray-eket adott protokoll szerint vizsgáltuk.

3.2.2. Szilárd fázisú termékek fizikai-kémiai vizsgálatai

A különböző nedves őrléssel előállított prediszperziókat megszárítottuk, a szilárd fázisú termékek fizikai-kémiai vizsgálata céljából.

3.2.2.1. Szemcseméret-megoszlás és fajlagos felület meghatározás

A MEL szemcseméretét és méreteloszlását lézer diffrakciós módszerrel, Malvern Mastersizer 2000 készülékkel (Malvern Instruments, Worcestershire, Egyesült Királyság) határoztuk meg. A D10, D50, D90 értékeket térfogat szerinti méretanalízissel határoztuk meg. A fajlagos felület a szemcseméret megoszlás eredményeiből volt származtatva.

3.2.2.2. Elektronmikroszkópos felvételek (SEM)

Szárítást követően a szilárd minták morfológiai jellemzése pásztázó elektronmikroszkóppal történt (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán).

3.2.2.3. Porrontgendiffrakciós vizsgálatok (XRPD)

A hatóanyag kristályos jellegét porrontgen diffrakciós vizsgálattal határoztuk meg (Miniflex II Rigaku porrontgen diffraktométer, Rigaku Co. Tokyo, Japán).

A kombinált módszer esetében a szárított mintákban a csúcsterületek csökkenését alapul véve, a MEL kristályosságát szemi-kvantitatíve határoztuk meg.

3.2.2.4. Differenciál pásztázó kalorimetriás mérések (DSC)

A termékek termoanalitikai sajátságait Mettler Toledo STAR® termoanalitikai készülékkel (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) határoztuk meg. 2-5 mg mintát vizsgáltunk, 25-300 °C-os hőmérséklet tartományban.

3.2.2.5. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR)

FT-IR méréseket Bio-Rad Digilab Division FTS-65A / 896 FT-IR spektrométerrel (Bio-Rad Digilab Division FTS-65A/869, Filadelfia, Egyesült Államok) végeztük.

3.2.3. Nazális gyógyszerforma fejlesztéséhez előállított prediszperziók vizsgálata

3.2.3.1. MEL oldékonyságának vizsgálata a prediszperziókban

A prediszperziókat 25 °C-on 24 órán át mágneses keverővel kevertettük, majd 0,1 µm-es fecskendőszűrőn leszűrtük (FilterBio PES Syringe Filter) (Labex Ltd., Budapest, Magyarország). A feloldódott hatóanyag mennyiségét spektrofotometriásan határoztuk meg (Unicam UV/VIS) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Egyesült Államok) ($n = 3$). Meghatároztuk a nazális spray-k kémhatását is (Orion 3 star pH-meter), (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Egyesült Államok).

3.2.3.2. A prediszperziók tárolhatósági idejének meghatározása

A prediszperziókat zárt üvegekben, szobahőmérsékleten tároltuk (25 ± 1 °C) 3 napig. A MEL szemcseméret-eloszlását a készítés napján, illetve a következő 3 napban minden nap ellenőriztük.

3.2.4. Nazális gyógyszerformák vizsgálata

A gyógyszerformák kémhatása minden spray esetében meghatározásra került (Orion 3 star pH-meter), (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Egyesült Államok).

3.2.4.1. Reológiai és mukoadhéziós vizsgálatok

A reológiai vizsgálatokat Physica MCR101 Rheometer-rel végeztük (Anton Paar GmbH, Ausztria). Frekvenciafüggő oszcillációs teszt segítségével határoztuk meg a minták viszkoelasztikus sajátságait. A minták folyásgörbáját ugyancsak meghatároztuk.

A MEL szemcseméretének mukoadhézióra gyakorolt hatását is vizsgáltuk. A mukoadhéziót a polimer és a mucin közötti reológiai szinergizmus alapján határoztuk meg. A szinergizmus paramétert (bioadhezív viszkozitás komponens, η_b) számolással állapítottuk meg (Bartos et al., *Int. J. Pharm.*, 2015B).

3.2.4.2. In vitro diffúziós vizsgálatok

A vizsgálatokat vertikális Franz diffúziós cellával végeztük (Hanson Microette Topical and Transdermal Diffusion Cell and Autosampling System) (Hanson Research, Chatsworth CA, Egyesült Államok) Az átdiffundált MEL koncentrációját spektrofotometriásan mértük (Unicam UV/VIS) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Egyesült Államok). A hatóanyag flux (J) és permeabilitási koefficiens értékeit (K_p) is meghatároztuk. A donor fázisban maradt MEL-tartalom meghatározásához a membrán szimulált nazális folyadékkal volt impregnálva (Jug and Bećirević-Laćan, *Comb. Chem. High T. Scr.*, 2007). A donor fázisban maradt MEL mennyisége Agilent 1260 RP-HPLC-vel került meghatározásra.

3.2.4.3. In vivo vizsgálatok

Az *in vivo* vizsgálatokat 160-180 g tömegű hím Sprague–Dawley patkányokon végeztük. 60 μ g MEL-t tartalmazó nazális spray került beadásra az állatok jobb orrlyukába pipetta segítségével ($n = 5$). A beadást követő 5., 15., 30. és 60. percben történt a vérvétel a patkányok farok-vénájából. A vér-mintákban lévő MEL mennyisége Agilent 1260 HPLC-vel volt detektálva. A farmakokinetikai paraméterek PK Solver 2.0 szoftver segítségével kerültek meghatározásra (Zhang et al., *Comput. Meth. Prog. Bio.*, 2010).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A statikus szonikációval végzett elővizsgálatok eredményei

Az elővizsgálatok során a statikus szonikus kavitáció (az ultrahang hullámok által kialakított gőzbuborékok kollapszusa) szemcseméret csökkentő hatását vizsgáltuk az IBU és a MEL esetében. A legjelentősebb méretcsökkenést mindkét hatóanyag esetében jeges hűtést alkalmazva, 70%-os amplitúdóval (a legnagyobb energia befektetés) tudtam elérni. Az amplitúdó növelése során (30→70%) a jeges hűtés megvédte a szuszpenziókat a jelentős hőmérséklet emelkedéstől. A szonikáció idejének növelése (10→20 perc) meghatározóbb volt a méretcsökkenés szempontjából, mint a megnövelt amplitúdó és a jeges hűtés kombinációja. Az idő további növelése (20→30 perc) a szemcseméret szempontjából nem volt releváns, egyik hatóanyag esetében sem.

Az összetétel vizsgálata során négy különböző segédanyag szemcseméretre gyakorolt stabilizáló hatását tanulmányoztuk. A kísérlet során a szuszpenziókban a MEL koncentrációja minden esetben 300 mg/ml volt, a szonikációt fix paraméterekkel végeztük, független változóként jeges fürdőt, 70 %-os amplitúdót és 20 perces kezelést alkalmazva. Az IBU esetében a legkisebb szemcseméretet Poloxamer segítségével értük el ($D_{50} \sim 11 \mu\text{m}$), míg a MEL-nél a PVP bizonyult a leghatékonyabb segédanyagnak ($D_{50} = 4 \mu\text{m}$). A segédanyagok koncentrációjának csökkentése nem eredményezett számottevő szemcseméret változást.

4.2. Statikus és dinamikus szonikáció összehasonlítása

Az elővizsgálatok után, összehasonlítottuk a statikus és a dinamikus szonikáció szemcseméret csökkentő hatását. Dinamikus szonikáció során a mintát a kezelés alatt folyamatosan cirkuláltattuk, perisztaltikus pumpa segítségével. A szonikációt legjelentősebb mértékben befolyásoló paramétereket faktoriális kísérleti terv alapján határoztuk meg. A hosszú ideig tartó kezelés (30 perc), a nagy amplitúdó (70%), a magasabb hőmérséklet (36 °C) és a kisebb hatóanyag koncentráció (2 mg/ml) fontos szerepet játszottak a szemcseméret csökkentésben (2. és 3. táblázat).

2. táblázat Statikus szonikáció eredményei

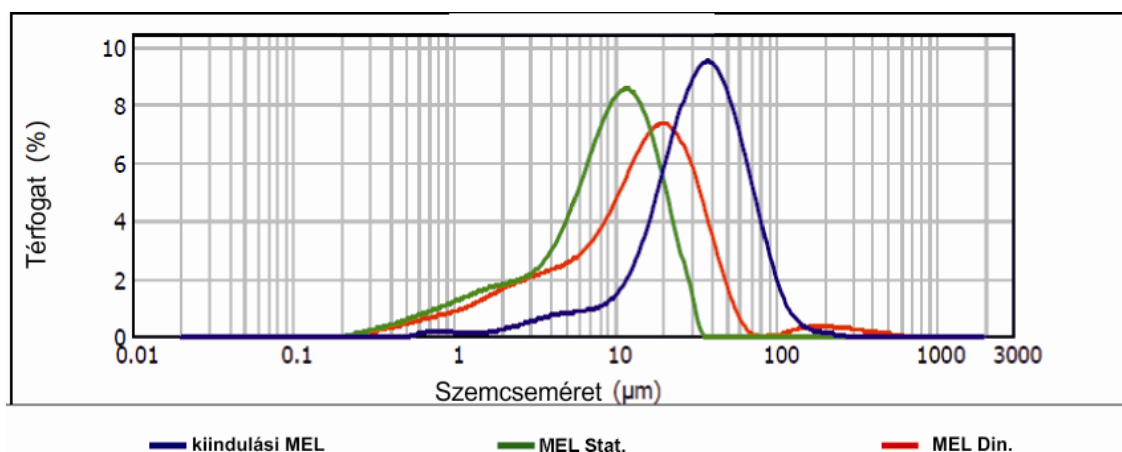
Térfogat (ml)	Szonotród pozíció	Koncentráció (mg/ml)	Hőmérséklet (°C)	Amplitúdó (%)	Idő (perc)	D10 (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)
-	-	-	-	-	-	10,82	34,03	75,81
25	0,75	2	36	70	30	1,51	10,16	19,53
100	0,75	2	0	30	30	4,81	23,07	46,88
25	0,25	2	0	70	10	2,75	18,45	42,87
100	0,25	2	36	30	10	5,92	26,52	53,39
25	0,75	18	36	30	10	3,95	19,62	41,51
100	0,75	18	0	70	10	5,19	24,16	46,98
25	0,25	18	0	30	30	3,53	17,12	29,22
100	0,25	18	36	70	30	7,19	20,83	36,62

3. táblázat Dinamikus szonikáció eredményei

Pumpa sebesség (fordulatszám)	Koncentráció (mg/ml)	Hőmérséklet (°C)	Amplitúdó (%)	Idő (perc)	D10 (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)
-	-	-	-	-	10,82	34,03	75,81
50	2	36	70	30	2,20	14,60	35,02
50	2	0	30	30	4,56	24,22	47,05
100	2	0	70	10	5,70	26,90	51,92
100	2	36	30	10	5,90	26,15	52,20
50	18	36	30	10	4,40	22,69	53,54
50	18	0	70	10	6,27	23,54	46,77
100	18	0	30	30	9,06	29,31	45,58
100	18	36	70	30	2,87	16,73	38,03

4.2.1. Szemcseméret-megoszlás és fajlagos felület

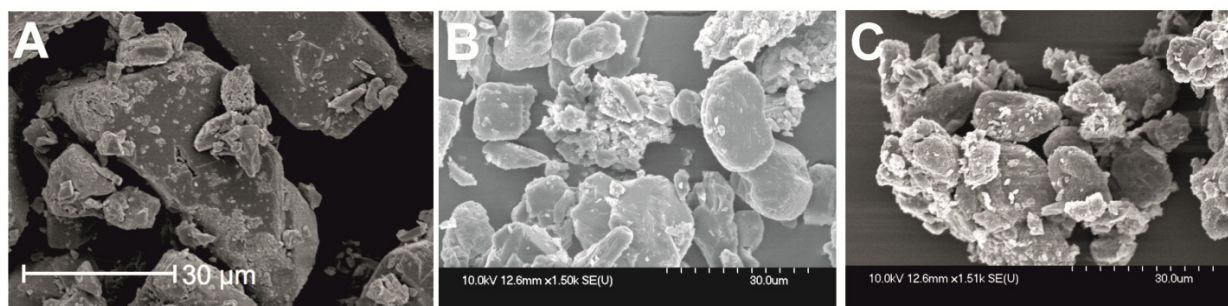
A kiválasztott prediszperziókban a MEL szemcseméret-megoszlását és fajlagos felületét határoztuk meg (1. ábra). A fajlagos felület mindkét módszer esetében nőtt a kiindulási hatóanyagok felületéhez képest. A statikus szonikáció (**MEL Stat.**) a dinamikkal szemben (**MEL Din.**) kisebb szemcseméretet eredményezett.



1. ábra Kiindulási MEL és szonikált MEL szemcseméret-eloszlása a prediszperziókban

4.2.2. Morfológiai sajátosságok

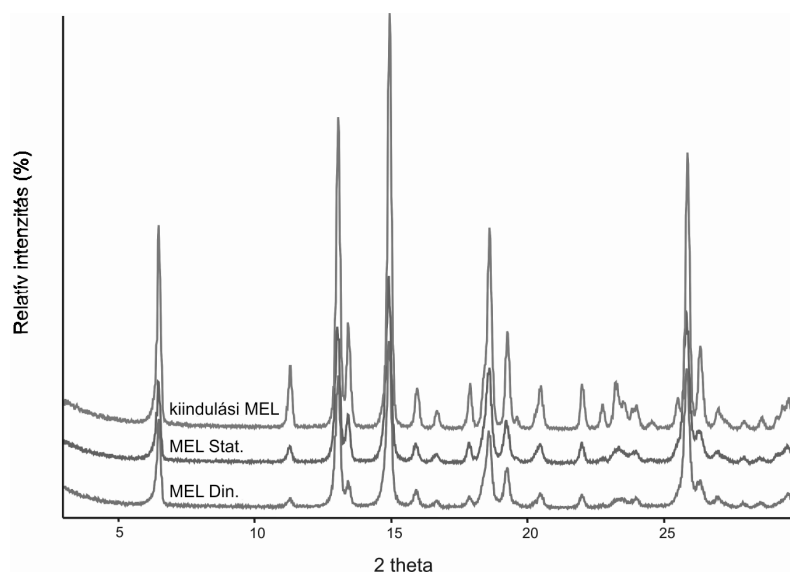
Az elektronmikroszkópos képek alapján megállapítható, hogy a kiindulási MEL kristályai nagy, hasáb alakúak. A szilárd fázisú termékek kristályai mikrométer tartományba eső részecskék, mindkét módszer esetében szabálytalan alakúak, egyenetlen felszínűek, a felületi oldódás miatt lekerekedés figyelhető meg a kezelést és szárítást követően (2. ábra).



2. ábra A kiindulási MEL (A), a statikus (B) és dinamikus (C) szonikáció szilárd fázisú termékeinek elektronmikroszkópos felvételei

4.2.3. Porróntgendiffrakciós felvételek

A porróntgen-diffrakciós vizsgálatok a szárított minták kristályos jellegét bizonyítják, mivel a karakterisztikus csúcsok (13,22, 15,06, 26,46 és 26,67 2θ) a kiindulási anyagnál és a szárított termékekben is megjelennek (3. ábra). Szonikáció során a MEL kristályos maradt mindkét típusú kezelést követően. A szonikációval előállított mintákban viszont a csúcsok intenzitása kisebb a kiindulási MEL csúcsaihoz képest, ami a méretcsökkenéssel magyarázható.



3. ábra A kiindulási MEL és a szonikált szárított termékek porróntgen felvételei

4.2.4. DSC felvételek

A szilárd fázisú minták görbéin mindkét módszerrel kezelt hatóanyag esetében jól meghatározott endoterm csúcs látható (MEL Stat.: 258,62 °C és MEL Din.: 259,81 °C), amivel a MEL kezelést követő kristályos jellege bizonyítható. A termékekben a hatóanyag olvadáspontja nem tér el jelentős mértékben a kiindulási MEL olvadáspontjához képest (259,11 °C). A kristályossági fok nem csökkent jelentős mértékben egyik kezelés következtében sem.

4.2.5. Kémiai stabilitás (FT-IR)

Az FT-IR vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a kezelés során bomlás nem történt, sem a statikus, sem a dinamikus módszer esetében. A kezeltlen anyagnál megjelenő karakterisztikus csúcsok láthatók a két termék esetében is (3289,76, 1550,04, 1530,36, 1346,73, 1265,88 és 1184,90 1/cm-nél).

4.3. A kombinált nedves őrlés elővizsgálatainak eredményei

4.3.1. Kombinált nedves őrléssel végzett elővizsgálatok eredményei

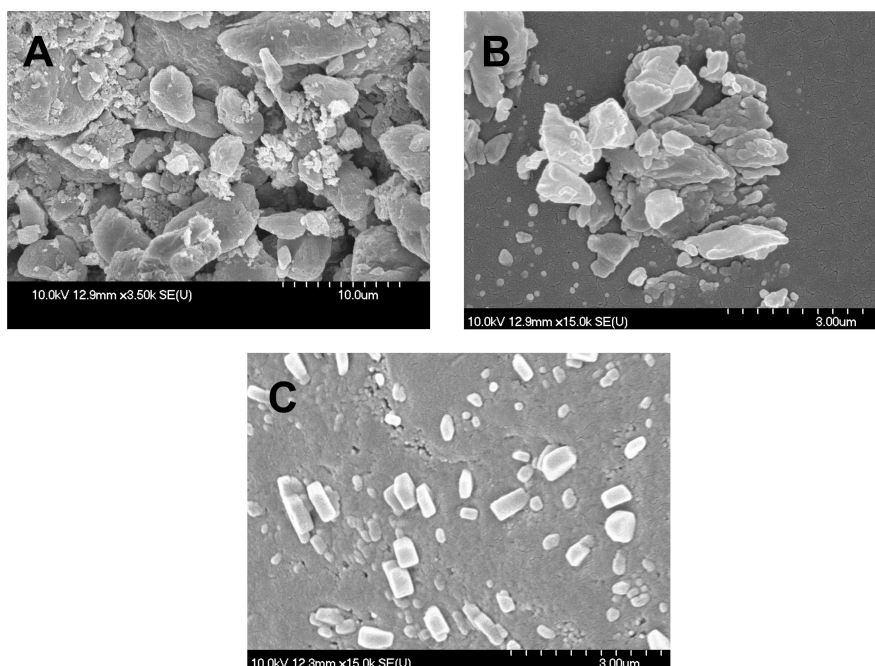
Az elővizsgálatok során a bolygómalom és a gyöngymalom kombinációjának szemcseméretre gyakorolt hatását vizsgáltuk a MEL esetében. Segédanyag jelenlétében (PVA), állandó fordulatszámon (400 rpm) az őrlési idő, az alkalmazott gyöngytömeg és a segédanyag koncentráció szemcseméretre gyakorolt hatását tanulmányoztuk. A minták szemcseméretmegoszlása az őrlést követően a 4. táblázatban látható. Az őrlési időtől függően mikronizált (10 perc, $D_{50} = 1,625 \mu\text{m}$) és nanonizált (50 perc, $D_{50} = 0,126 \mu\text{m}$) termék állítható elő. A leghatékonyabb őrlést 20 g gyöngy alkalmazásakor érték el, a gyöngytömeg további növelése nem fokozta az őrlés hatékonyságát. A nagyobb koncentrációjú segédanyag alkalmazása (2,5%) elengedhetetlen volt a részecskék aggregációjának megakadályozásához.

4. táblázat MEL szemcseméret-megoszlása különböző gyöngytömegek esetén (0, 10 vagy 20 g), 2,5%-os PVA-oldatot alkalmazva diszperziós közegként

Őrlési idő (perc)	Gyöngy nélkül			10 g gyöngy			20 g gyöngy		
	D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)	D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)	D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)
0	11,40	34,26	73,59	11,40	34,26	73,59	11,40	34,26	73,59
10	10,199	26,616	52,668	0,255	2,934	10,940	0,115	1,625	5,669
20	9,239	25,285	55,202	0,108	1,254	4,775	0,070	0,151	1,951
30	11,207	28,768	54,147	0,080	0,151	2,156	0,068	0,140	1,223
40	8,585	23,848	45,489	0,069	0,146	1,667	0,070	0,135	0,729
50	7,871	24,025	50,346	0,068	0,143	1,280	0,072	0,126	0,271
60	5,203	14,269	27,548	0,068	0,141	1,082	0,069	0,129	0,295
70	5,161	15,047	29,542	0,067	0,135	0,618	0,070	0,131	0,292
80	8,966	25,478	47,930	0,067	0,135	0,538	0,068	0,127	0,288
90	5,805	17,627	34,196	0,069	0,132	0,317	0,068	0,126	0,277

4.3.2. Morfológiai sajátosságok

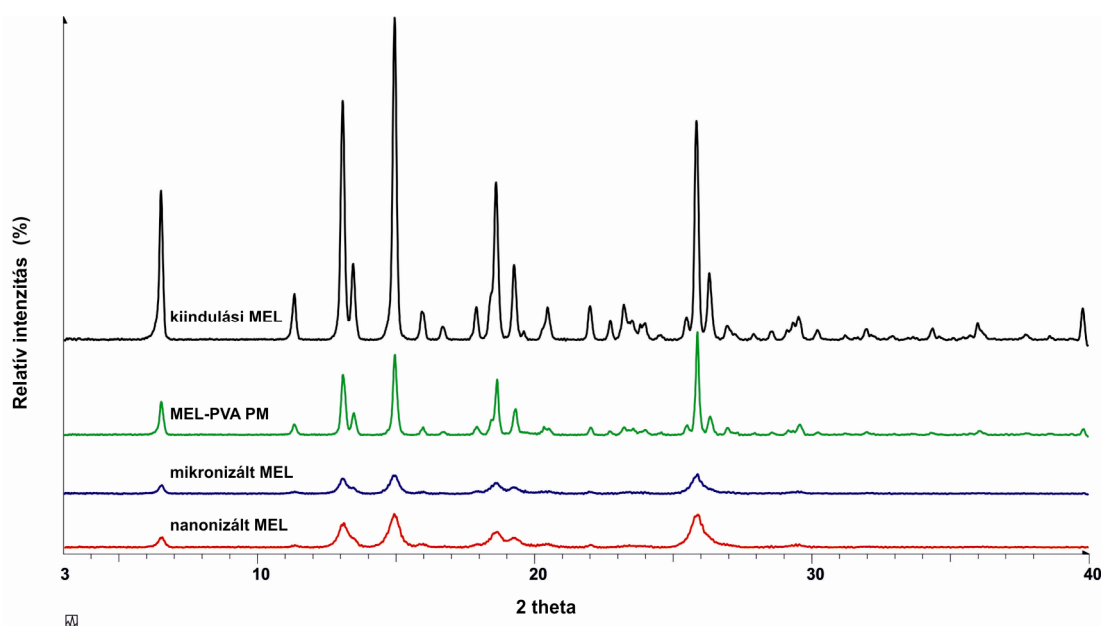
Az elektronmikroszkópos képek alapján látható (4. ábra), hogy a mikronizált (D50 = 1,625 μm) MEL-t tartalmazó szilárd fázisú termék kristályai szabálytalan alakúak, egyenetlen felszínűek és nanoméretű hatóanyag aggregátumokat is tartalmaz. A nanonizált MEL-t tartalmazó szárított pre-diszperzió kristályai (D50 = 126 nm) az őrlésnek köszönhetően szabályos alakúak, egyenletes felszínűek.



4. ábra A kiindulási MEL (A) és a mikronizált- (B) és nanonizált MEL-t (C) tartalmazó szárított termékek elektronmikroszkópos felvételei

4.3.3. Porróntgendiffrakciós felvételek

A porróntgen-diffrakciós felvételeken a MEL karakterisztikus csúcsainak intenzitása a PVA-val készült fizikai keverék (MEL-PVA PM) esetében csökkent, ami a PVA jelenlétével magyarázható. A szárított mintákban lévő MEL kristályosságát szemi-quantitatíve határoztuk meg, 2 karakterisztikus csúcs (5,99 és 18,25 2 θ) alatti terület csökkenésének átlagából. A hatóanyag kristályossága lecsökkent az őrlés hatására, kb. 33%-a maradt kristályos mind a mikronizált, mind a nanonizált hatóanyagot tartalmazó termék esetében (5. ábra).



5. ábra A kiindulási MEL, a MEL-PVA PM és a mikronizált- és a nanonizált MEL-t tartalmazó szárított termékek porróntgen felvételei

4.3.4. DSC felvételek

A kiindulási MEL görbén jól meghatározott endoterm csúcs látható (259,11 °C), amely intenzitása a fizikai keverék (MEL-PVA PM) (256,57 °C) esetében a PVA hatására lecsökken. A szilárd fázisú termékek görbén további intenzitás-csökkenés és a csúcs kiszélesedése figyelhető meg, ami a MEL kristályosságának csökkenésével magyarázható. A MEL olvadáspontja a mikronizált termék esetében 239,81 °C (10 perc), a nanonizált esetben pedig 240,08 °C (50 perc) volt.

4.4. Intranazális gyógyszerforma vizsgálata

4.4.1. Prediszperziók vizsgálata

4.4.1.1. MEL oldékonyságának vizsgálata a prediszperziókban

A szemcseméret csökkenés oldékonyságra (oldékonyság: $6,4 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$) gyakorolt hatását 25°C -on, és pH 5,6 kémhatáson vizsgáltuk. A mikronizálás nem eredményezett oldékonyságbeli változást (oldékonyság: $6,6 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$). A nanonizált MEL esetében tapasztalt oldékonyság növekedés (oldékonyság: $9,3 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$) nem jelentős a gyógyszerforma szempontjából.

4.4.1.2. A prediszperziók tárolhatósági idejének meghatározása

A vizsgálat során a prediszperzió elkészítésétől számított 24 órán belül nem tapasztaltam aggregációt (mikro MEL prediszperzió: $D_{90} = 6,462 \mu\text{m}$; nano MEL prediszperzió: $D_{90} = 0,270 \mu\text{m}$). A második napon aggregátumok voltak jelen mindkét rendszerben (mikro MEL prediszperzió: $D_{90} = 1035,340 \mu\text{m}$; nano MEL prediszperzió: $D_{90} = 695,767 \mu\text{m}$), ezek száma és mérete megnőtt a tárolás harmadik napjára. Megállapítottuk, hogy a prediszperziókat 24 órán belül fel kell használni.

4.4.2. Nazális spray formák vizsgálata

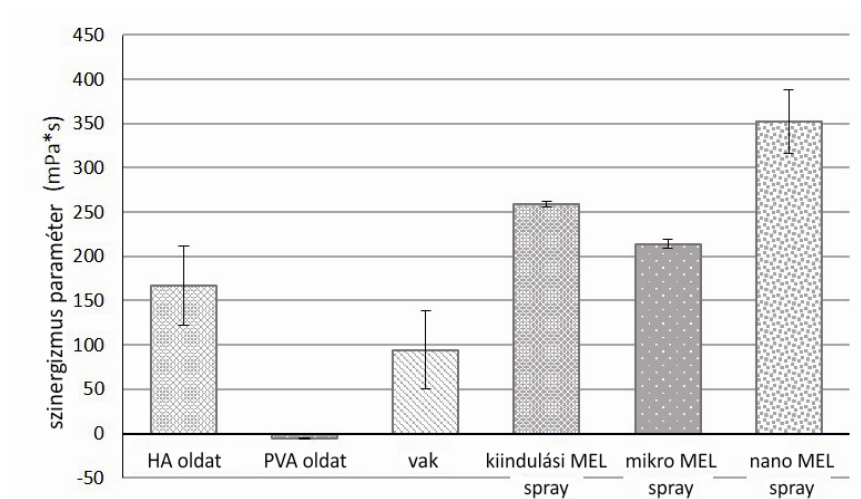
A nazális spray-k kémhatása nem változott meg jelentős mértékben a HA hozzáadását követően (pH 5.5) a prediszperziók kémhatásához képest (pH 5.6).

4.4.2.1. Reológia és mukoadhézió

A spray-k viszkoelasztikus sajátságait frekvenciafüggő oszcillációs teszt segítségével határoztuk meg. A hialuronát tartalmú gélekre jellemző „kereszt kötött pontok” a görbéken nem láthatóak (Berkó et al., *Eur. Polym. J.*, 2013). A G' és G'' aránya (egymáshoz viszonyított értéke) a minták szol állapotát bizonyítja, ami a formák kémhatásával (pH = 5.6) és az alacsony HA koncentrációval magyarázható. Az egyes minták folyásgörbéi nem mutattak jelentős eltérést egymáshoz viszonyítva. A MEL jelenléte, illetve eltérő szemcsemérete a készítmények viszkozitását nem befolyásolta.

A mukoadhéziós vizsgálatok során a mintákat mucinnal kevertük össze (5% mucin tartalom) és a reológiai szinergizmust jellemző paramétert (η_b) határoztuk meg. Vizsgáltuk a mukoadhéziót a PVA nélküli HA-oldat, a HA nélküli PVA oldat, a HA-t és PVA-t egyaránt tartalmazó oldat (vak) és a három különböző szemcseméretű MEL-t tartalmazó termék (kiindulási MEL spray, mikro MEL spray, nano MEL spray) esetében. Az eredmények

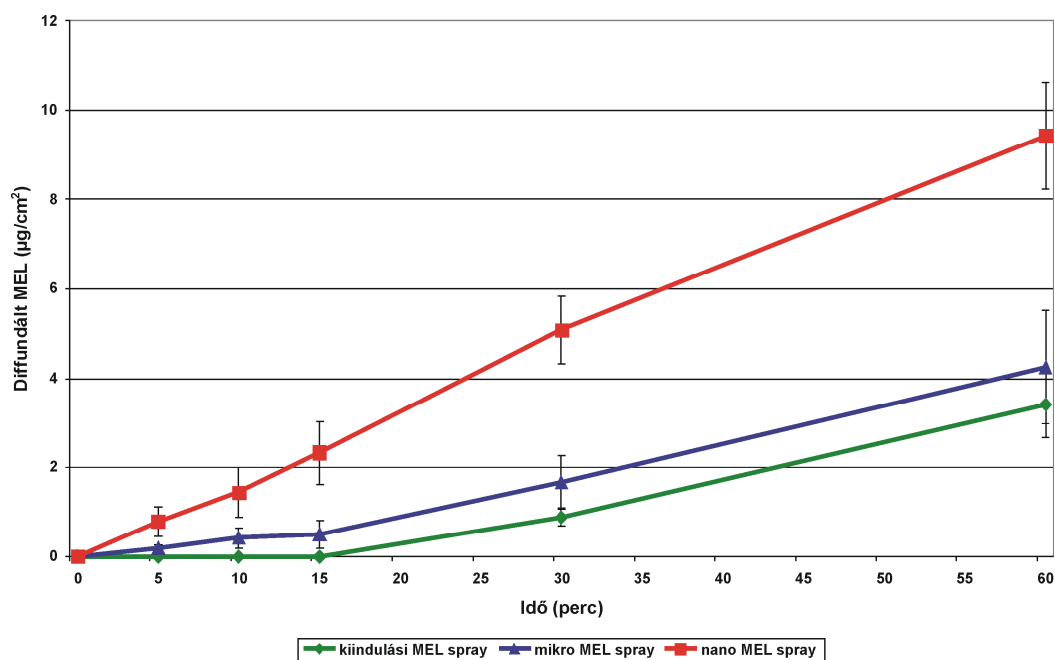
alapján megállapítható (6. ábra), hogy a nanonizált MEL-t tartalmazó minta esetében a mukoadhézió a kétszeresére nőtt a hatóanyagot nem tartalmazó oldathoz képest. Ez egyrészt a nanoméretű részecskék felülethez való megnövekedett adhéziójával magyarázható (Müller et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2011), másrészt a nanorészecskék mérete a polimer molekulák mérettartományába esik, ezáltal olyan struktúra jön létre, amely a mukoadhéziót tovább növeli.



6. ábra Számított reológiai szinergizmus paraméterek a HA-oldat, PVA-oldat, HA-PVA oldat és a különböző szemcseméretű MEL-t tartalmazó spray-k esetében

4.4.2.2. *In vitro* diffúziós vizsgálatok eredményei

Megállapítottuk, hogy a különböző szemcseméretű MEL-t tartalmazó termékek közül a nanonizált hatóanyagot tartalmazóból volt a legjelentősebb a hatóanyag diffúziója, ami a kis szemcseméretnek köszönhető gyors oldódással magyarázható (7. ábra). A nanonizált MEL-t tartalmazó mintából a diffúzió már az első 5 percben megfigyelhető. A flux (**J**) és a permeabilitási koefficiens (**K_p**) értékek jelentős mértékben megnövekedtek a nanonizált hatóanyagot tartalmazó spray esetében (5. táblázat). A donor fázisban maradt MEL mennyisége a spray-k esetében a MEL szemcseméret-eloszlásával volt összefüggésben.



7. ábra A MEL *in vitro* diffúziója a különböző szemcseméretű hatóanyagot tartalmazó spray formák esetében

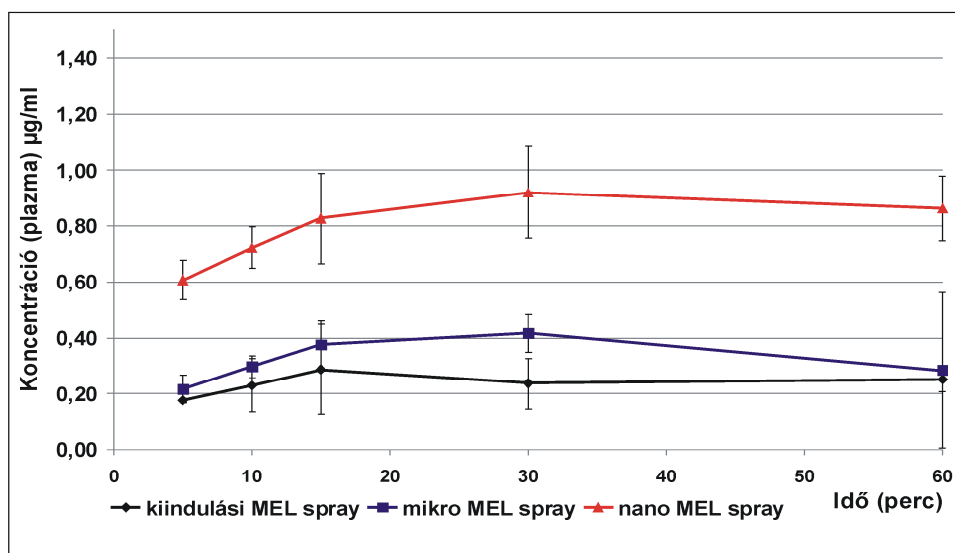
5. táblázat A különböző szemcseméretű MEL-t tartalmazó spray-k flux és permeabilitási koefficiens értékei

	J (µg/cm ² /h)	K_p (cm/h)
kiindulási MEL spray	3,41	0,00341
mikro MEL spray	4,25	0,00425
nano MEL spray	9,43	0,00943

4.4.2.3. *In vivo* vizsgálatok eredményei

A vizsgálat eredményei ugyancsak összefüggésben vannak a MEL szemcseméretével és a nanonizált hatóanyag gyorsabb oldódásával. A plazmakoncentráció-növekedés lassú a beadást követő első 30 percben mindhárom, különböző szemcseméretű MEL-t tartalmazó spray esetében, viszont a nanonizált hatóanyagot tartalmazó készítmény plazmakoncentrációja háromszor nagyobb, mint a mikronizáltat tartalmazó készítményé (8. ábra). A szabályozott hatóanyag-leadás a szemcseméretből adódó megnövekedett adhézióval és a jól strukturált rendszer létrehozásával magyarázható.

A számolt AUC (görbe alatti terület) értékek is hasonló összefüggést mutatnak, a szemcseméret csökkenéssel az AUC érték nő.



8. ábra A plazmakoncentráció változása az idő függvényében a különböző szemcseméretű MEL-t tartalmazó nazális spray-k adagolását követően

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk fő célja különböző nedves őrlési eljárások vizsgálata és optimalizálása volt. Az eredmények alapján elmondható, hogy a nedves őrlési technikák alkalmasak szemcseméret-csökkentésre és prediszperzió, mint közti termék előállítására, ami közvetlenül felhasználható folyékony gyógyszerforma előállítására. Nanoszuszpenziók intranazális alkalmazása új kihívást jelent a gyógyszer technológusok számára.

i. A szonikus kavitáció (az ultrahang hullámok által kialakított gőzbuborékok összeroskadása) szemcseméret-csökkentő hatását tanulmányoztuk. Az elővizsgálatok során a statikus szonikációt vizsgáltuk az IBU és a MEL esetében, optimalizáltuk az eljárási paramétereket és az összetételt (hőmérséklet, amplitúdó, szonikációs idő és segédanyag típusa/mennyisége). A hatóanyagok kiindulási szemcseméretéhez képest (IBU: $D_{50} = 153 \mu\text{m}$ and MEL: $D_{50} = 85 \mu\text{m}$) a kavitáció hatására szemcseméret-csökkenést tapasztaltunk (IBU: $D_{50} = 25 \mu\text{m}$ and MEL: $D_{50} = 14 \mu\text{m}$), de további méret-csökkentéshez segédanyagra volt szükség (IBU–Poloxamer: $D_{50} = 11 \mu\text{m}$; MEL–PVP: $D_{50} = 4 \mu\text{m}$). Megállapítottuk, hogy statikus szonikációval, segédanyag jelenlétében a vizsgált hatóanyagok esetében mikrométer tartományba csökkenthető azok szemcsemérete.

ii. A statikus és a dinamikus szonikáció (szonikálás közben duplafalú áramlási cellában folyamatosan cirkuláltatott minta) összehasonlításánál az eljárási paramétereket faktoriális kísérleti terv alapján optimalizáltuk. A hosszú szonikációs idő (30 perc), nagy amplitúdó

(70%), magas hőmérséklet (36 °C) és az alacsony hatóanyag-koncentráció (2 mg/ml) fontos szerepet játszott a szemcseméret-csökkentés szempontjából. Az optimalizált paraméterekkel előállított mintákban a MEL morfológiai sajátosságai változtak. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a szonikáció kerekded, mikroméretű részecskéket eredményezett. A porröntgen-diffrakciós felvételek és a DSC vizsgálatok viszont igazolták, hogy a hatóanyag kristályos szerkezete a kezelés hatására nem változott meg. Az FT-IR eredmények arról tanúskodtak, hogy a szonikáció során bomlás nem történt. Megállapítottuk, hogy mindkét módszer alkalmas szemcseméret csökkentésre. A statikus szonikáció azonban nem méretnövelhető, ezért kis mennyiségű minta előállítására javasolható pl. preklinikai vizsgálatokhoz. Dinamikus szonikációval nagyobb mennyiségű minta kezelhető, a módszer standardizálható, méretnövelhető.

iii. A kombinált nedves őrlési eljárást a MEL esetében vizsgáltuk (őrlés bolygómalomban, őrlőanyagként a gyöngymalom 0,3 mm átmérőjű ZrO_2 gyöngyeit alkalmazva). Segédanyag jelenlétében, állandó fordulatszámon az őrlési időnek, a gyöngytömegnek és a segédanyag koncentrációnak szemcseméret-csökkentő hatását tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy az őrlési időtől függően mikronizált (10 perc) és nanonizált (50 perc) hatóanyagot tartalmazó prediszperzió állítható elő. A vizsgált minták esetében a gyöngytömeget 20 g fölé növelve az őrlés hatékonysága nem változott. A PVA koncentrációjának csökkentése nem védte meg a MEL részecskéket az aggregációtól. Az elektronmikroszkópos képek alapján megállapítható, hogy a mikronizált hatóanyag nanoméretű szemcsék aggregátumát is tartalmazza ($D_{50} = 1,625 \mu m$), a nanonizált hatóanyag ($D_{50} = 126 nm$) pedig szabályos, sima felületű kristályokból áll. A porröntgendiffrakciós és DSC felvételek alapján elmondható, hogy a kezelés során a hatóanyag kristályossági foka lecsökkent (kb. 33%-a maradt kristályos). A kombinált technika alkalmas folyékony (prediszperzió) és (szárítást követően) szilárd fázisú közti termék előállítására, mely további gyógyszerforma fejlesztésére alkalmas.

iv. A vizsgált technikák közül a kombinált őrlés volt alkalmas mikronizálásra és nanonizálásra egyaránt, ezért az optimalizált eljárási paraméterekkel, az ornyálkahártyának megfelelő kémhatáson (pH 5,6) mikronizált és nanonizált MEL-t tartalmazó prediszperziót készítettünk, majd mukoadhezív sajátosságú anyag (HA) hozzáadásával folyékony nazális gyógyszerformát állítottunk elő. A szemcseméret nanoméret-tartományba csökkentése megnövekedett telítési oldhatóságot, nagyobb oldódási sebességet és fokozott felülethez való adhéziót eredményezett, összehasonlítva a mikronizált hatóanyagot tartalmazó

prediszperzióval. Az AUC értékek és a MEL fajlagos felülete között lineáris korrelációt állapítottunk meg. Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján elmondható, hogy a hosszabb tartózkodási idő és a nanonizált MEL homogén eloszlása a mesterséges membránon és az ornyálkahártyán fokozott diffúziót, nagyobb AUC értéket eredményezett. A nanonizált MEL-t tartalmazó prediszperzió alkalmas lehet innovatív gyógyszerforma előállítására, ezáltal új irányvonalat teremtve a fájdalom kezelésében.

v. Megállapítható, hogy a nedves őrlés alkalmas prediszperzió előállítására, amelyből közvetlenül gyógyszerforma fejleszthető. A szonikáció elsősorban a hatóanyagok mikronizálására alkalmas, azonban diszperziós közeg igénye nagy, ezért kevésbé ajánlott közti termék előállítására. A szonotród kopásából eredő fémszennyezés jelenléte a mintában nem zárható ki.

Ezzel ellentétben, a kisebb diszperziós közeg-igényű kombinált nedves őrlés nagyobb hatékonyságú és kifejezetten ajánlott különböző szemcsméretű hatóanyagot tartalmazó prediszperziók előállítására, amelyből szemcseméret-függő kontrollált hatóanyag felszabadulású intranazális terápiás rendszer fejleszthető.

Nanoszuszpenzió alkalmazása a nazális gyógyszerforma fejlesztésben új irányvonalat jelent a gyógyszertechnológiában. Nem szteroid gyulladáscsökkentő-tartalmú intranazális rendszerekről az irodalomban kevés adat áll rendelkezésre (pl. ketorolak-trometamin tartalmú oldat, Li et al., *Int. J. Pharm.*, 2015). Szabadalom került beadásra, amiben a MEL-t oldat formában alkalmazták intranazálisan (Castile et al., World Intellectual Property Organization patent WO 2005021041, 2005), azonban nazálisan alkalmazott MEL-tartalmú nanoszuszpenzióról nincs elérhető publikáció.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

1. Csilla Bartos, Rita Ambrus, Péter Sipos, Mária Budai-Szűcs, Erzsébet Csányi, Róbert Gáspár, Árpád Márki, Adrienn B. Seres, Anita Sztojkov-Ivanov, Tamás Horváth, Piroska Szabó-Révész

Study of sodium hyaluronate-based intranasal formulations containing micro- or nanosized meloxicam particles

Int. J. Pharm. 491 198-207 (2015) IF: 3,650

2. Csilla Bartos, Ákos Kukovecz, Rita Ambrus, Gabriella Farkas, Norbert Radacsi, Piroska Szabó-Révész

Comparison of static and dynamic sonication as process intensification for particle size reduction using a factorial design

Chem. Eng. Process. 87 26-34 (2015) IF: 2,071

3. Bartos Csilla, Ambrus Rita, Szabóné Révész Piroska

Szonikus kavitáció alkalmazása hatóanyag szemcseméretének csökkentésére

Acta Pharm. Hung. 84 131-137 (2014) IF: -

4. Cs. Bartos, P. Szabó-Révész, R. Ambrus

Optimization of technological parameters by acoustic cavitation to achieve particle size reduction

Farmacia Nr.1, 2014 IF: 1,005

5. Levente Kürti, Róbert Gáspár, Árpád Márki, Emese Kápolna, Alexandra Bocsik, Szilvia Veszélka, **Csilla Bartos,** Rita Ambrus, Monika Vastag, Mária A. Deli, Piroska Szabó-Révész
In vitro and *in vivo* characterization of meloxicam nanoparticles designed for nasal administration

Eur. J. Pharm. Sci. 50 86-92 (2013) IF: 3,350

6. Ambrus R., Bartos Cs., Szabóné Révész P.

Eljárási paraméterek optimalizálása szonikus kavitáció alkalmazásával hatóanyag szemcseméret csökkentése céljából

Acta Pharm. Hung. 81 51-58 (2011) IF: -

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Tamás Horváth, Csilla Bartos, Alexandra Bocsik et al.

Cytotoxicity of different excipients on RPMI 2650 human nasal epithelial cells

Acta Chim. Slov. (under revision)

2. Bartos Csilla, Kata Mihály

Szabadkai gyógyszertárak története, 1780-2011

Bácsország, 2013.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ ELŐADÁS KIVONATOK

1. Csilla Bartos, Rita Ambrus, Mária Budai-Szücs, Péter Sipos, Róbert Gáspár, Árpád Márki, Piroska Szabó-Révész

Formulation and characterization of nasal gel containing nanonized meloxicam. *5th International Conference on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems, 16-18 March 2015, Dubai, UAE* (poszter előadás)

2. Cs. Bartos, P. Szabó-Révész, T. Horváth, R. Ambrus

Application of acoustic cavitation in order to prepare nasal formulation. *10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 18-20 September 2014, Portorož, Slovenia* (poszter előadás)

3. P. Szabó-Révész, T. Horváth, **Cs. Bartos,** R. Ambrus

In vitro study of permeability of nanonized meloxicam from different nasal formulations by Side-Bi-Side™ horizontal cell model. *10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 18-20 September 2014, Portorož, Slovenia* (szóbeli előadás)

4. Horváth Tamás, Bartos Csilla, Szabóné Révész Piroska, Ambrus Rita

Nazális gyógyszerformák hatóanyagának permeabilitás vizsgálata módosított horizontális cella alkalmazásával. *XV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, 2014. április 10-12., Budapest* (poszter előadás)

5. Csilla Bartos, Ákos Kukovecz, Rita Ambrus, Piroska Szabó-Révész

Optimization of technological parameters of static and dynamic sonications, using a factorial design, in order to achieve particle size reduction. *9th World Meeting on Pharmaceutics,*

Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 31 March-3 April 2014, Lisbon, Portugal
(poszter előadás)

6. Bartos Csilla és Ambrus Rita

Statikus és dinamikus szonikáció szemcseméret-csökkentő hatásának összehasonlítása faktoriális kísérleti terv alapján

XI. Clauder Ottó emléktverseny

Budapest, 2013. október (szóbeli előadás)

7. Bartos Cs., T. Horváth, R. Ambrus, P. Szabó-Révész

In vitro permeability studies for nasal drug delivery using „side-bi-side” horizontal cell model. *FROM MEDICINE TO BIONICS, 1st European Ph.D. Conference, 13-15 June 2013, Budapest* (poszter előadás)

8. Bartos, Cs., P. Szabó-Révész, R. Ambrus.

Effects of the technological parameters of acoustic cavitation on the particle size reduction. *9th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 20-22 November 2012, Dubrovnik, Croatia* (poszter előadás)

Köszönetnyilvánítás

A kutatást a Richter Gedeon Nyrt., a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0047 és a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0060 azonosítószámú projekt támogatta.

