

# Nagy sebességű rotációs szálképzéssel előállított hidroxipropil cellulóz mikroszálak szerepe a rosszul oldódó vegyületek formulálásában

Doktori tézisek

**Dr. Szabó Péter**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zelkó Romána, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kovácsné Bácskay Ildikó, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Takácsné Dr. Novák Krisztina, D.Sc.,  
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Révész Piroska, D.Sc., egyetemi tanár  
Dr. Budai Lívía, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest  
2016

## Bevezetés

Napjainkban a gyógyszerfejlesztés számára az egyik legnagyobb kihívást a kedvezőtlen fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező gyógyszerjelölt molekulák növekvő hányada jelenti. Az új kismolekulás gyógyszerek csaknem 70 %-a, míg a már forgalomba hozott kismolekulás gyógyszerek 30 %-a a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) 2. osztályába tartozik, tehát rossz vízoldhatósággal és jó membrán permeabilitással jellemezhető. A jelenség egyrészt a nagy átteresztőképességű szűrővizsgálatok elterjedésére, másrészt a hatásosság fokozása és az ADME (abszorpció, disztribúció, metabolizmus, exkréción) tulajdonságok optimalálása közötti megborult egyensúlyra vezethető vissza. A rossz vízoldhatóság legjelentősebb biofarmáciai következménye az alacsony orális biohasznosíthatóság, ugyanakkor a dozírozási problémák, a magas interindividuílis variabilitás, a csökkent beteg-együtműködés is a következmények között említhető.

A gyógyszertechnológiában már évtizedek óta fontos kérdésként tartják számon ezt a jelenséget, melynek orvoslására nagyszámú tudományos közlemény jelent meg ezidáig. Habár a kémiai módszerek, mint a pH-beállítás, sóképzés, komplexképzés vagy a 'prodrug'-stratégia jelentős figyelmet kaptak, a fizikai módszerek is nagy népszerűségnek örvendenek. A fizikai módszerek fő irányvonalait a részecskeméret csökkentés, az amorf hatóanyag diszperziók és a szilárd oldatok jelentik. Az Ostwald-Freundlich egyenletnek megfelelően, a részecskeméret csökkentése csak akkor használható ki oldhatóság növelési céllal, ha a részecskék sugara 1  $\mu\text{m}$  alatti mérettartományba esik.

Az amorf hatóanyag diszperziók olyan többkomponensű rendszerek, melyek egy amorf állapotú hatóanyagból és egy hordozóból állnak. Utóbbi rendszerint egy polimer, melyben a hatóanyag amorf csoportosulásokban található meg. Az ilyen rendszerek a hatóanyagot metastabil állapotban tartalmazzák, melynek látszólagos oldhatósága meghaladja a kiindulási anyag valódi oldhatóságát.

A szilárd oldatok olyan oldatok, melyek szilárd oldószerből és szilárd oldott anyagból állnak. Ez azt jelenti, hogy az oldott anyag molekulárisan diszpergált állapotban található meg, ezáltal egy homogén amorf fázist képezve. Ezek a formulációk az amorf gyógyszerformák csúcsának tekinthetők, mivel az elérhető legnagyobb mértékben hasznosítják a részecskeméret csökkentés és az amorf átalakulás előnyeit.

Az utóbbi évtizedekben a polimer alapú mikro- és nanoszálak egyre nagyobb népszerűsége tette szert gyógyszerészeti célú felhasználásukban rejlő ígéretes lehetőségek miatt. Ezek a rendszerek számos olyan előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, mint a nagy fajlagos felület, a nagy porozitás, a hatóanyag kristályos-amorf átalakulásának lehetősége és az extracelluláris mátrixhoz hasonló struktúra. A polimer alapú szálak alkalmasak szöveti regenerációban történő felhasználásra, szabályozott hatóanyag leadású rendszerek létrehozására, valamint rosszul oldódó anyagok oldhatóságának és oldódási sebességének növelésére.

Mikro-és nanoszálak előállítására többféle módszer is ismert a szakirodalomban. A legszélesebb körben elterjedt eljárás az elektrosztatikus szálképzés, melyben a szálképződés a túvel ellátott fecskendőbe töltött mintára kapcsolt magas feszültség hatására indul meg. További módszerek, úgy, mint a pneumatikus szálképzés vagy a nagy sebességű rotációs szálképzés szintén gyakran használatosak. A nagy sebességű rotációs szálképzés során egy viszkoelasztikus polimer oldatot vagy olvadékot egy forgó rezervoárba töltenek, melynek falán két apró lyuk található átellenesen. A rotációs rezervoárt egy motor segítségével hajtják meg, és megfelelően nagy fordulatszám esetén a kialakuló centrifugális erő elég nagy ahhoz, hogy legyőzze a kapilláris erőket, így a minta a lyukakon keresztül elhagyja a forgó fejet. Végül a megnyúló polimer szál az intenzív párolgás vagy hűlés következtében megszilárdul. A folyamat hajtóerején kívül, a másik legnagyobb különbség az elektrosztatikus szálképzéshez viszonyítva, hogy ez a módszer koncentráltabb polimer oldatokat igényel.

## **Célkitűzések**

Munkám célkitűzései az alábbiak voltak:

- Új, a nagy sebességű rotációs szálképzésben mindeztidáig nem alkalmazott gyógyszerészeti polimer, a hidroxipropil cellulóz (HPC) kiválasztása mikroszálak előállításához.
- Preformulációs vizsgálatok elvégzése két különböző átlagos molekulatömegű HPC-vel, annak érdekében, hogy meghatározzam a kritikus és optimális szálképző koncentrációkat. Az állomány, illetve reológiai jellemzők hatásának vizsgálata a száljellemzőkre.

- A HPC kedvező oldódási tulajdonságait kihasználva (egyaránt oldódik vízben és etanolban) hatóanyag tartalmú szálak előállítása a BCS 2. osztályba tartozó hatóanyagok felhasználásával.
- A hatóanyag tartalmú mikroszálak fizikai-kémiai és szupramolekuláris jellemzése, különös tekintettel a hatóanyag kristályos-amorf állapotára.
- Szilárd, egyadagos gyógyszerformának; szájban diszpergálódó tablettának a formulációja feldolgozott, hatóanyag tartalmú mikroszálakból a hatóanyag kioldódásának javítására, továbbá a szálak orális alkalmazásában rejlő lehetőségek megvilágítására.
- A hatóanyag tartalmú szálak gyorsított stabilitási vizsgálata, a szálak fizikai-kémiai stabilitásának nyomon követése stressz körülmények között.

## Módszerek

A szálképzéshez két különböző molekulatömegű hidroxipropil cellulózt (HPC) (Klucel<sup>®</sup> EXF Pharm,  $M_w$  80 000; és ELF Pharm,  $M_w$  40 000) választottam. A preformulációs vizsgálatokhoz a két polimerből vizes géleket készítettem szobahőmérsékleten. A Klucel<sup>®</sup> EXF alapú gélek 38-52 m/m % közötti koncentráció tartományban, míg a Klucel<sup>®</sup> ELF gélek 42-60 m/m % közötti koncentráció tartományban készültek, 2 m/m %-os léptékkel. Az így előállított géleket használtam nagysebességű rotációs szálképzéshez (fordulatszám: 10 500 rpm), valamint a gélek állományelemzését is elvégeztem (CT3 texture analyzer, Brookfield Engineering Laboratories). A textúra elemzés során az adhezivitás meghatározásához a gélbe merülő, majd az alaphelyzetbe visszatérő mérőfej mozgása során az erő-elmozdulás görbék rögzítésére került sor. Az adhezivitás az erő-elmozdulás görbe teljes negatív területe. A szál morfológia tanulmányozása optikai transzmissziós és reflexiós mikroszkóp segítségével történt (Bresser LCD Micro típusú; és Nikon SMZ 1000 típusú optikai mikroszkóp). Az átlagos szálátmérőn kívül a százalékos kitermelést is meghatároztam. A százalékos kitermelés számítása a következő egyenlet alapján történt:

$$\text{Kitermelés \%} = \frac{m_{\text{szál}}}{m_{\text{gél}} \cdot c_{\text{polimer}}} \cdot 100 \quad (1)$$

ahol  $m_{\text{szál}}$  az  $m_{\text{gél}}$  tömegű és  $c_{\text{polimer}}$  koncentrációjú gélből képződő szál tömegét jelöli.

A preformulációs vizsgálat célja a kritikus és optimális szállképzési koncentrációk megállapítása volt.

A modell hatóanyag és karvedilol tartalmú mikroszálak előállítása 50 m/m %-os Klucel® ELF Pharm gélekből történt. A 100 mg/ml hatóanyag tartalmú törzsoldatok citromsav-monohidrátot (modell hatóanyag esetén: 60 mg/ml, karvedilol esetén: 52 mg/ml koncentrációban) tartalmaztak hidrotrop oldásközvetítő anyagként, az oldószer pedig hidroalkoholos oldószerkelet volt.

A hatóanyag tartalmú mikroszálak morfológiai jellemzéséhez optikai és pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket készítettem (Bresser LCD Micro típusú optikai mikroszkóp, Amray 1830-D4 pásztázó elektron mikroszkóp). Az átlagos szálátmérő meghatározása mellett, az átlagos hatóanyag tartalom mérésére is sor került UV-Vis spektrofotometriás módszer segítségével (Agilent 8453 UV-Vis spektrofotométer a modell hatóanyag esetén és Jasco 530 UV-Vis spektrofotométer a karvedilol esetén; 0,1 M sósav oldatban). A modell hatóanyag tartalmú mikroszálak esetén a röntgen diffrakciós mintázatok (X'Pert Pro diffraktométer) és orto-pozitronium életidők (pozitron annihilációs élettartam spektroszkópiái (PALS, BaF2 /XP2020Q detektor és Ortec® elektronika) meghatározását végeztem el. A karvedilol tartalmú mikroszálakat röntgendiffrakciós, termoanalitikai (differenciál pásztázó kaloriméter, Seiko Exstar 6000/6200), FTIR (Jasco FT/IR-4200 spektrofotométer) és pozitron annihilációs élettartam spektroszkópiái mérésnek vetettem alá.

A szilárd, egyadagos gyógyszerforma előállításához a szálak feldolgozására volt szükség; így öröltem (Gorenje SMK 150B), majd szitáltam (320 µm névleges fonalköz távolságú szitaháló) a hatóanyag tartalmú mikroszálakat. Az örölt anyagok részecskeméretét lézer diffrakciós módszerrel állapítottam meg (LA-950V2 Horiba Co.), és a részecskeméret eloszlás szélességét jellemző span értékeket a 2. egyenlet alapján számítottam ki:

$$Span = \frac{D_{90\%} - D_{10\%}}{D_{50\%}} \quad (2)$$

ahol  $D_{10\%}$ ,  $D_{50\%}$  és  $D_{90\%}$  a részecskeméretet jelölik a kumulatív részecskeméret görbén 10, 50 és 90%-nál. Minden minta esetén öt párhuzamos mérés történt.

Ezt követően az örölt mikroszálakból konvencionális tablettázási segédanyagok felhasználásával készítettem porkeveréket a tablettázáshoz, melyet Turbulával (T2F

modell; Willey A Bachofen AG) homogenizáltam egy hengeres tárolóban (paraméterek: 23 rpm, 30 percig). A szájbán széteső tabletták segédanyagai a következők voltak: mikrokristályos cellulóz (Vivapur<sup>®</sup> 102 MCC; töltőanyag és dezintegráns), mannitol (Mannogem<sup>®</sup> EZ, a modell hatóanyag esetén; töltőanyag), porlasztva szárított laktózonohidrátt (Flowlac<sup>®</sup> 100, a karvedilol esetén; töltőanyag), őrölt polietilén-glikol 1500 (Macrogol 1500, a modell hatóanyag esetén; lubrikáns), magnézium-sztearát (Ph.Eur., a karvedilol esetén; lubrikáns), őrölt citromsav-monohidrátt és nátrium-hidrogénkarbonát ekvimoláris keveréke (Ph. Eur.; pezsgő összetevő), és kroszkarmellóznátrium (Vivasol<sup>®</sup>, szuperdezintegráns).

A 10 mg hatóanyag tartalmú szájbán diszpergálódó tablettákat közvetlen préssel állítottam elő egy 13,5 mm átmérőjű, kör alakú konkáv présszerszámmal felszerelt excenteres tablettázógép segítségével (Diaf TM20).

A tablettá gyógyszerforma vizsgálata során a törési szilárdság (8M, Dr. Schleuniger Pharmatron), friabilitás (Erweka friabilátor, TAP) és in vitro szétesési idő (Erweka szétesési idő vizsgáló ZT 4; 900 ml, 37±2 °C-os demineralizált vizet használva) került meghatározásra a gyógyszerkönyvi előírásoknak megfelelően.

A szájbán széteső tabletták in vitro kioldódását Hanson SR8-Plus (Hanson Research) kioldódás vizsgáló készülékben mértem, forgó lapátos üzemmódban (forgási sebesség: 50 rpm) 37±1 °C-on. Kioldóközegként 500 ml pH 1,0 sósav oldatot (Ph.Eur 8.), pH 4,5 foszfát puffert (Ph. Eur. 8.) és pH 6,8 foszfát puffert (Ph. Eur. 8.) használtam.

A minták hatóanyag tartalmát UV-Vis spektrofotometriás módszerrel mértem meg (Agilent 8453 UV-Vis a modell hatóanyag esetén, és Jasco 530 UV-Vis spektrofotométer a karvedilol esetén).

A kioldódási profilok matematikai összehasonlítására a különbözőségi ( $f_1$ ) és hasonlósági ( $f_2$ ) faktorokat a következő összefüggések alapján számítottam ki:

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \times 100 \quad (3)$$

$$f_2 = 50 \times \log \left( \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2}{n}}} \right) \quad (4)$$

ahol  $n$  a mintavételi időpontok száma,  $R_t$  a referencia mintából kioldódott százalékos hatóanyag mennyiség (a referencia a kontrollként alkalmazott préselt fizikai keverék),  $T_t$  a teszt készítményből (mikroszál alapú formuláció) kioldódott százalékos hatóanyag mennyiség a  $t$  időpontban.

A lezárt üvegekbe helyezett frissen előállított mikroszálakat stabilitásvizsgáló kamrában (Sanyo típus 022) tároltam  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ -on és  $75 \pm 5\%$  relatív páratartalom mellett 4 hétig. A stabilitásvizsgálati mintákat differenciál pásztázó kaloriméter, röntgen diffraktométer, ATR-FTIR spektrométer és pozitron annihilációs élettartam spektroszkópiai mérések segítségével vizsgáltam.

## Új tudományos eredmények

- A szakirodalomban megjelent közlemények alapos áttekintése alapján elmondható, hogy ez volt az első alkalom, hogy a két különböző molekulatömegű HPC (Klucel<sup>®</sup> EXF and ELF) nagy sebességű rotációs szálképzésben történő alkalmazhatóságát igazolták.
- Új kísérleti elrendezést vezettem be a nagy sebességű rotációs szálképzés preformulációs vizsgálataiba. A módszer alkalmas utánozni a szálképzési folyamat során a viszkoelasztikus megnyúlást, így összefüggést tatáltam a szálképzési tulajdonság és a gélek adhezivitása között, mely szerint az alacsonyabb adhezivitas értékek kedvezőbbek a szálképzés szempontjából. Az új, szálképzésben alkalmazható állományelemzési módszert elsőként ismertettem a szakirodalomban.
- A vizsgált HPC gélek adhezivitas görbéinek sajátos lefutása a polimer koncentrációfüggő folyadékkristályos szerkezetével hozható összefüggésbe, melyet szakirodalmi adatok is alátámasztanak.
- A szálképzés monitorozását, azaz a kritikus minimum, -maximum, valamint az optimális szálképző koncentráció meghatározását könnyen lehetővé tette az optikai mikroszkópos mérésnek, a kitermelés nyomon követésének, valamint az állományelemzésnek a kombinációja.
- Elsőként állítottam elő BCS 2. osztályba tartozó hatóanyag tartalmú szálakat nagy sebességű rotációs szálképzéssel egy új megközelítést alkalmazva. A hatóanyagot

oldott állapotban tartalmazó polimer gélek nagy sebességű rotációs szálképzése amorf hatóanyagot tartalmazó és szupramolekulárisan rendezett szálak képződését eredményezte.

- A szálképzést sikerült káros szerves oldószer alkalmazása nélkül megvalósítani. A hatóanyagok gyenge bázikus és oldódási tulajdonságát hidroalkoholos oldószerkelet és citromsav alkalmazásával sikerült megkerülni.
- Elsőként mutattam meg, hogy a nagysebességű rotációs szálképzéssel előállított szálak szálas szerkezete megmarad forgóképes őrlést követően.
- Elsőként állítottam elő őrlött mikroszál alapú, megfelelő mechanikai és dezintegrációs tulajdonságokkal rendelkező szájból széteső tablettákat. Az őrlött mikroszálak konvencionális tablettázási segédanyagokkal történő homogenizálása lehetővé tette a tabletták közvetlen préseléssel történő előállítását.
- A mikroszál alapú szájból széteső tabletták pH független (a 1,0-6,8 közötti pH tartományban), gyors és teljes hatóanyag leadással rendelkeztek. A megfigyelt kioldódási tulajdonságokat a mikroszálak nagy fajlagos felületével, a hatóanyag amorf állapotával, a polimer-hatóanyag komplexben található citromsav mikrokörnyezeti pH módosító hatásával, valamint a tabletták gyors dezintegrációjával lehet magyarázni.
- Elsőként végeztem gyorsított stabilitás vizsgálatot hatóanyag tartalmú, nagy sebességű rotációs szálképzéssel előállított szálakkal. A hatóanyag tartalmú mikroszálak fizikai-kémiai stabilitását számos tényező befolyásolja és egy komoly kihívásnak tekinthető. A karvedilol tartalmú mikroszálak jó stressz tűrő kapacitással rendelkeztek, habár mindezek ellenére részleges hatóanyag kikristályosodás megfigyelhető volt a stabilitási vizsgálat végén.



## **Következtetések**

A polimer alapú mikroszálak számos gyógyszerészetileg előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, ezért a különféle gyógyszerformák formulálásában történő alkalmazhatóságuk már régóta a kutatás homlokterében áll. Munkámban két különböző molekulatömegű hidroxipropil cellulóz nagy sebességű rotációs szálképzésben történő alkalmazhatóságát mutattam be a preformulációs vizsgálatok elvégzésével. Megmutattam, hogy az adhezivitás mérésnek, a morfológiai jellemzésnek és a kitermelés nyomon követésének kombinációja alkalmas a kritikus és optimális szálképző koncentrációk meghatározására. Hatóanyag tartalmú szálakat állítottam elő és bebizonyítottam, hogy a szálképzés folyamán a polimer láncok szupramolekulárisan rendeződnek és a hatóanyag kristályos-amorf átalakuláson megy keresztül. Mikroszál alapú szájjal szétválasztó tablettákat készítettem, melyek gyors, teljes és pH-független kioldódási profillal jellemezhetőek. A gyorsított stabilitási vizsgálatok alapján elmondható, hogy a karvedilol tartalmú szálak jó stressz tűréssel rendelkeznek, annak ellenére, hogy az intenzív környezeti hatások következtében részleges hatóanyag kikristályosodás történt.

## Saját publikációk

### Disszertációhoz kapcsolható közlemények

1. **Szabó, P.**, Kállai-Szabó, B., Kállai-Szabó, N., Sebe, I., Zelkó, R. (2014) Preparation of hydroxypropyl cellulose microfibers by high-speed rotary spinning and prediction of the fiber-forming properties of hydroxypropyl cellulose gels by texture analysis. *Cellulose*, 21: 4419-4427.
2. **Szabó, P.**, Kállai-Szabó, B., Sebe, I., Zelkó, R. (2014) Preformulation study of fiber formation and formulation of drug-loaded microfiber based orodispersible tablets for in vitro dissolution enhancement. *International Journal of Pharmaceutics*, 477: 643-649.
3. **Szabó, P.**, Sebe, I., Stiedl, B., Kállai-Szabó, B., Zelkó, R. (2015) Tracking of crystalline-amorphous transition of carvedilol in rotary spun microfibers and their formulation to orodispersible tablets for in vitro dissolution enhancement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115: 359-367.
4. **Szabó, P.**, Zelkó, R. (2015) Formulation and Stability Aspects of Nanosized Solid Drug Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Design*, 21: 3148-3157.

### Egyéb közlemények

1. Sebe, I., Bodai, Z., Eke, Z., Kállai-Szabó, B., **Szabó, P.**, Zelkó, R. (2014) Comparison of directly compressed vitamin B12 tablets prepared from micronized rotary-spun microfibers and cast films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1-5.
2. Sebe, I., **Szabó, P.**, Kállai-Szabó, B., Zelkó, R. (2015) Incorporating small molecules or biologics into nanofibers for optimized drug release: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 494: 516-530.
3. **Szabó, P.**, Zelkó, R. (2015) Gyógyszerek vér-agy gáton történő átjuttatásának korszerű technológiai lehetőségei. *Gyógyszerészet* 5: 259-263.

4. **Szabó, P.**, Kovács-Kiss, D., Zelkó, R. (2015) Nőgyógyászati célra szánt, hormontartalmú implantátumok fejlesztési lehetőségeinek áttekintése: irodalmi áttekintés. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 4: 131-138.
5. Kovács, G., Varga, D., Sebe, I., Hajdú, M., **Szabó, P.**, Ostorházi, E., Antal, I. Korszerű tartósítási módszer fejlesztése magisztrálisan előállítható műkönnyhöz. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 4: 139-143.