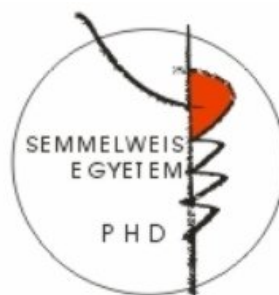


# Rossz vízoldhatóságú antifungális szer formulációja nanorendszerek segítségével

Doktori tézisek

**Dr. Füredi Petra**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszerésztudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Klebovich Imre, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Újhelyi Gabriella, Ph.D., egyetemi docens  
Kovácsné Dr. Balogh Judit, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Takácsné Dr. Novák Krisztina, D.Sc egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Lemberkovich Éva, D.Sc, egyetemi tanár

Budapest  
2017

## Bevezetés

A gyógyszertechnológusok számára mai napig kihívást jelent a rossz vízoldhatóságú hatóanyagok formulációja, ezért mindig újabb és újabb segédanyagokat, eljárásokat fejlesztenek a probléma megoldására. A hagyományos technikákon - pH beállításon, komplexképzésen - alapuló módszerek mellett, a nanotechnológia jelent meg az elmúlt évtizedben, mint lehetséges új oldhatóság növelő eljárás.

Számos modern kolloid nanohordozót fejlesztettek ki mostanáig, amelyek képesek kompenzálni a gyógyszermolekulák rossz fizikai-kémiai tulajdonságait. Az egyik ilyen kolloid nanohordozó, a humán szérum albumin (HSA) alapú nanorendszer, ami egyre nagyobb figyelmet kap, biokompatibilis tulajdonsága miatt. A szérumfehérjék változatos szerkezetű hatóanyag molekulákat képesek felszínükön megkötni ezzel befolyásolva a gyógyszermolekula hatásosságát és megoszlását a szövetekben, ezért egyre gyakrabban alkalmazzák ezeket a fehérjéket, különösképpen a HSA fehérjét, gyógyszerhordozó rendszerekként. A HSA képes elősegíteni folyékony gyógyszerformák fejlesztését akár rossz oldhatósággal rendelkező gyógyszermolekulák esetén is azáltal, hogy *in vitro* körülmények között is képes vízoldható komplexet képezni számos hatóanyaggal. A keletkezett fehérje-hatóanyag komplex nem csak jobb oldhatósággal rendelkezik, hanem célzott terápia is megvalósítható általa.

A lipid alapú nanorészecskék ugyancsak alkalmazhatóak rossz vízoldhatóságú hatóanyagok szállító rendszerekként. Ezek a néhány nanométeres lipid nanorészecskék nagy felülettel és hidrofób belső maggal rendelkeznek, ezért képesek a felszínükön és lipid magjukban nagy mennyiségű, rossz vízoldhatóságú hatóanyagot kötni és bezárva tartani, javítva ezzel a farmakon oldhatóságát és biohasznosulását. A bezárt hatóanyag (például: ketokonazol, baikalin, tobramicin) számára a lipid mag védelmet nyújthat a kémiai bomlással és az enzimatis lebonnással szemben, biztosítva ezzel a folyamatos, nyújtott hatóanyagleadást, vagy akár mérsékelni tudja a gyógyszermolekula nem kívánatos mellékhatásait is. Lipid nanorészecskék alapját képezhetik számos orális, parenterális, dermális vagy szemészeti gyógyszerkészítménynek is.

## Célkitűzés

Doktori munkám során célul tűztem ki, hogy egy rossz vízoldhatóságú antifungális szerből olyan nanorendszert formuláljak, amely alapját képezheti egy folyékony gyógyszerforma kifejlesztésének. A választott modell hatóanyagom a vorikonazol (VCZ), egy triazol származék, amelyet az egyre gyakoribb szisztémás és topikális gombás fertőzések kezelésére alkalmaznak. Kutatómunkám fontos célja volt, hogy olyan nanorendszert állítsak elő, amely a humán szervezet által jól tolerálható, kevesebb mellékhatással bíró segédanyagokból épül fel.

Kísérletes munkám során az alábbiakat tűztem ki célul:

- 1) Albumin nanorendszerek fejlesztését és az előállítás kritikus paramétereinek vizsgálatát tűztem ki célul. Kutatómunkám során a szerves: vizes fázis-aránynak illetve a hatóanyag koncentrációjának a keletkezett HSA nanorészecskék karakterére gyakorolt hatását terveztem vizsgálni. . A nagy nyomású homogenizálás során alkalmazott nyomás és ciklus szám hatását terveztem továbbá tanulmányozni az előállított nanorészecskék méretére, méreteloszlására, hatóanyag tartalmára és hatóanyagleadó képességére.
- 2) Célul tűztem ki lipid alapú nanorendszer fejlesztését nagy nyomású homogenizátor segítségével, majd az előállítás kritikus paramétereinek meghatározását és optimalizálását vorikonazol tartalmú lipid nanorészecskére. Az előállított lipid nanorészecskéket a következők szerint terveztem karakterizálni: részecskeméret, részecskeméret-eloszlás, bezárási határfok. További céлом volt, hogy megtaláljam az optimális lipidet és lipid mennyiséget vorikonazol tartalmú lipid nanorészecske formulálásához.
- 3) Céлом volt végül a fejlesztett nanorendszerek terápiás alkalmazhatóságának elemzése.

## Módszerek

### Vorikonazol tartalmú albumin nanorészecske formulálása Nab<sup>®</sup> technológiával

Albumin nanorészecskéket Nab<sup>®</sup> technológiával állítottam elő. Különböző szerves oldószert illetve szerves:vizes fázisarányt alkalmaztam az előállítás során. Különböző, analitikai pontossággal mért hatóanyag mennyiséget (10, 15, 20, 50 mg) oldottam 1 ml szerves oldószerben (kloroform, izooktanol). A HSA-ból 2 és 3%-os oldatokat készítettem vízzel. Ezt követően a szerves oldószeres fázist elegyítettem a HSA tartalmú vizes fázissal különböző arányban (1:10; 1:15) majd Homorex (Brogli & Co. AG., Svájc) keverő segítségével 3 percen keresztül 80 rpm-mel előhomogenizáltam. Avestin Emulsiflex B15 (Avestin, Németország) típusú nagy nyomású homogenizátorral végeztem el a nanorendszer formulálását különböző homogenizálási nyomás és homogenizálási ciklus szám alkalmazásával. Az oldatkészítések során felhasznált szerves fázist végül liofilizálással távolítottam el.

Az előállított albumin nanorendszert elsősorban a részecskék mérete és méreteloszlása szerint karakterizáltam. A méréseket Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Nagy Britannia) készüléken végeztem el.

A bezárt vorikonazol koncentrációját egy fehérjekicsapáson alapuló minta előkészítés után saját fejlesztésű HPLC-UV módszer segítségével határoztam meg, mellyel a hatóanyag szelektíven meghatározható a triptofán mellett. A vorikonazol elválasztását Agilent 1100-as HPLC készülékkel végeztem el fordított fázisú oszlop (Agilent C18, 4,6 mm x 150 mm, 5 µm) használatával, szobahőmérsékleten. Izokratikus elúció (70% ACN: 30% 0.05 M nátrium-hidrogénfoszfát puffer) mellett 10 µl injektált mintatérfogatot alkalmazva 0,7 ml/perc áramlási sebességnél 254 nm-en detektáltam a vorikonazolt.

Az albumin és a vorikonazol kölcsönhatását differenciál pásztázó kalorimetriás vizsgálat segítségével analizáltam. Az albumin nanopartikulumok *in vivo* hatóanyagleadó képességét *in vitro* dinamikus dialízis segítségével prediktáltam.

## Vorikonazol tartalmú szilárd lipid nanorészecskék (SLN) formulálásához felhasznált módszerek

Alacsony, 2,68%-ék felületaktív anyag koncentráció alkalmazásával, nagy nyomású homogenizátor segítségével állítottam elő lipid alapú nanorészecskéket. Célom az volt, hogy a felületaktív anyag koncentrációja a végtermékben ne korlátozza annak felhasználási területét, így akár parenterális, vagy szemészeti készítmény fejlesztésére is alkalmas legyen.

Első lépésként a preemulzió elkészítéséhez a választott lipideket (sztearinsav, Witepsol<sup>®</sup> W35, Compritol 888 ATO) megolvasztottam. A végső lipid típust a részecskeméret és eloszlás meghatározása után választottam ki. Az olvadt lipid mennyiségéhez (0,25, 0,50, 0,75 g), ami összhangban van az irodalomban használt mennyiséggel (1-10%), hozzáadtam a vorikonazol (50, 100, 150 mg) mennyiségét. Ezután a felületaktív anyagot tartalmazó etanol oldatot öntöttem hozzá, majd állandó keverés mellett kis részletekben az azonos hőmérsékletű 20 ml ioncserélt vizet. A képződő emulziót Ultra-Turrax homogenizáló (IKA<sup>®</sup> Works Inc., Németország) segítségével 3 percen keresztül 20,000 rpm-mel homogenizáltam. A nanorészecskék kialakítását 600 bar nyomáson végeztem el. A homogenizálási ciklusok számának (3-5) hatását vizsgáltam a képződött nanorészecskék méreteloszlására.

A szilárd lipid nanorészecskék részecskeméret meghatározását a lézeres fényszórás mérésén alapuló Malvern Zetasizer Nano ZS készüléken végeztem el.

A szilárd minták differenciál pásztázó kalorimetriás és Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiás vizsgálatával a segédanyag és a hatóanyag, illetve a hatóanyag és a lipid nanorendszer kölcsönhatását határoztam meg.

A lipid nanorészecskék által bezárt mennyiséget indirekt módon határoztam meg. 30 kDa pórusméretű ultracentrifuga filter segítségével 0,5 ml hígítatlan mintát centrifugáltam le 10 percen keresztül 12,000 g-vel. A centrifugált minta szűrlete tartalmazta azt a hatóanyag mennyiséget, ami a szabad formában van jelen. Ezt a szabad hatóanyag mennyiséget a leírt HPLC-UV módszerrel mértem meg.

A lipid nanorészecskék *in vitro* hatóanyagleadó képességet dializáló zsák alkalmazásával vizsgáltam, a kioldódott hatóanyag mennyiségét pedig a már ismertetett HPLC-UV módszerrel határoztam meg. A formulált nanorészecskék antifungális aktivitását két gomba törzs (*C. glabrata*, *A. flavus*) ellen a papír diffúziós módszer segítségével bizonyítottam.

## Eredmények

### A Nab<sup>®</sup> technológia alkalmazásával kapott eredmények értékelő megbeszélése

A számos, albumin nanorészecske előállítására alkalmas eljárás közül a Nab<sup>®</sup> technológiára azért esett a választásom, mert már létezik a gyakorlatban ezen alapuló üzemi gyógyszergyártás. Eredményeim között nagy hangsúllyal szerepel a HPH optimalizálásának folyamata, ami a technológia egyik alapköve.

Miután az albumin alapú nanorendszerek elsődleges alkalmazási helye az érpálya, a részecskék átmérőjének az 50-150 nm-es tartományba kell esnie. A 150 nm-nél nagyobb részecskeátmérő a trombocita aggregálódás veszélyét hordozza magában, az 50 nm –nél kisebb részecskék pedig, a beadást követően, még a szisztémás hatás kialakulása előtt eliminálódnak az érpályából. Azért, hogy a fejlesztett vorikonazol nanorészecskék akár parenterális alkalmazásra is kerülhessenek, a fent leírt részecskeméret határokat kívántam tartani. Így azt a szerves oldószert, a kloroformot, választottam, amivel sikerült a kívánt részecskeméret tartományt elérni. A homogenizálási ciklusok hatását vizsgálva a PDI értékre megállapítható, hogy 6 homogenizálási ciklus után, albumin alapú nanorendszerek esetén a PDI érték már alig változik. A homogenizálás során alkalmazott nyomás növekedésének hatását vizsgálva a részecskeméretre megállapítható, hogy a PDI érték kevésbé érzékeny a hatóanyag kiindulási koncentrációjának változására, továbbá kisebb részecskeméretet eredményez. Vizsgálataim eredményeként a nagy nyomású homogenizálás optimalizált körülményeinek 1800 bar homogenizálási nyomást és a 6 homogenizálási ciklust választottam.

Azok után, hogy kidolgoztam a nagy nyomású homogenizálás optimális paramétereit, a kiindulási elegy összetételére koncentráltam. Célként tűztem ki, hogy a lehető legmagasabb bezárási hatásfok értéket kapjam úgy, hogy a formulált nanorendszer részecskemérete és eloszlása megfeleljen az albumin nanorészecskék esetén elfogadott határértékeknek. A nanorészecskék másik kritikus paramétere a méreteloszlásuk mérőszáma, a PDI, ami minél kisebb, annál kedvezőbb, hiszen annál szűkebb tartományban mozog a részecskeméret. Nincsen rá általánosan elfogadott határérték, mert a nanorészecskék fajtái szerint különböző értékek tekinthetőek elfogadottnak. Általában monodiszperz rendszernek, tehát keskeny méreteloszlás tartománnyal rendelkezőnek tekintjük a mintát, ha a PDI érték 0,3 alatt van.

Magasabb bezárási hatásfok értéket a nagyobb kiindulási koncentráció alkalmazásával értem el, azonban a képződött nanorendszer részecskeméretét és eloszlását kedvezőtlenül

befolyásolta a magasabb kiindulási hatóanyag koncentráció. Ha a vorikonazol mennyisége ötszörösére nőtt, a bezárási határfok csak kevesebb, mint a kétszeresére emelkedett. Ez arra enged következtetni, hogy egy adott HSA koncentráció esetén maximált a bezárható hatóanyag mennyisége. Ugyanakkor, a HSA koncentrációjának növelésével a nanorészecskék átlagos mérete is nőni fog. A HSA 3%-ban történő alkalmazása esetén a fehérje felületaktív tulajdonsága miatt már az előhomogenizálás során habot képzett, ami megnehezítette a reprodukálható mintabevitelt, bizonytalanságot okozva a minta hatóanyag tartalmát illetően. Ezért választottam ideálisnak a 2%-os HSA koncentrációt. A részecskeméret értéke az 1:15 szerves:vizes fázis arány esetén esett bele a kívánt 50-150 nm-es tartományba. A kiindulási hatóanyag koncentráció növelésével, ugyan növelhető a bezárási határfok értéke, de nem olyan mértékben, mint ahogy a PDI érték hátrányosan változik.

DSC görbék felvétele után megállapítható, hogy a hatóanyag és az albumin nem fizikai keveréket alkot a nanorészecske formában, hiszen a fizikai keverékükhöz képest nincs jelen a hatóanyagra jellemző csúcs. A vorikonazol az albuminhoz kötődik, és nincs jelen a kristályos forma jellegzetes csúcsa, ami arra utalhat, hogy a hatóanyag és a HSA között a nagy nyomású homogenizálás hatására nem csak fizikai kölcsönhatás alakul ki.

A kialakult kapcsolat az albumin és a vorikonazol között nem irreverzibilis folyamat eredménye, hiszen a kioldódás vizsgálat megerősítette, hogy a formulált hatóanyag hordozó nanorendszer egy óra alatt képes a vorikonazol mennyiségének 50%-át leadni.

#### A formulált VCZ tartalmú lipid nanorészecskék eredményeinek a megbeszélése

A lipid nanorészecskék formulálása szintén a nagy nyomású homogenizátor segítségével történt, hasonló megfontolásból, mint az albumin nanorendszer esetén. Az irodalmi adatokra támaszkodva 600 bar nyomásértéken végeztem el a lipid nanorészecskék formulálását. Az előállított lipid nanorészecskék PDI értéke csökken, ha a HPH homogenizálási ciklusainak a számát 3-ról 5-re változtattam. Ez vezetett ahhoz, hogy a homogenizálási ciklusok optimális számát 5-nek találtam.

A HPH körülményeinek meghatározása után a megfelelő lipid kiválasztása következett. Nemcsak a homogenizálási paramétereknek van hatása a kialakult részecskék méretére, hanem az alkalmazott lipid típusának is. Először is a hatóanyag nélküli lipid nanorészecskéket vizsgáltam a választott három lipid (sztearinsav, Compritol® 888 ATO, Witepsol® W35) esetén. Az általam alkalmazott felületaktív anyag mennyiség esetén HPH technikával nem sikerült 0.5 µm-nél kisebb nanorészecskéket előállítani Compritol® 888 ATO használatával, továbbá a keletkezett nanodiszperzió PDI értéke több volt 0.8-nál. Witepsol®

W35 alkalmazása során minden lipid koncentráció esetén 300 nm-nél kisebb részecskeméretű nanorendszer keletkezett kedvezőbb PDI értékkel, ellentétben a másik két lipid esetén kapott eredményekkel.

A bezárási hatások eléréséhez nem szükséges magasabb lipid koncentrációt alkalmazni, mert nem növelte a bezárt hatóanyag százalékos mennyiségét. A hatóanyag koncentrációjának kétszeresére növelése a bezárási hatások értékét 10 %-kal növeli meg, azonban a magasabb lipid- és hatóanyag mennyiség használata kedvezőtlenül befolyásolja a nanorendszer karakterét, nő a PDI értéke.

A lipid nanohordozó optimális összetételének a 0,25 g Witepsol® W35 és 50 mg vorikonazol tartalmú kiindulási mennyiségeket választottam, ahol a részecskék átlagos mérete  $182 \pm 4,1$  nm és PDI értéke  $0,269 \pm 0,01$ . A bezárt hatóanyag mennyisége közel 80%-os, ami 3,94 mg/ml-es hatóanyag koncentrációnak felel meg. Ez a formuláció 40,2-szeresére növeli a vorikonazol vízoldhatóságát.

A DSC termogramok illetve az FTIR spektrumok felvételével megerősítést nyert, hogy a vorikonazol feltehetően a lipid nanorészecskékhez kapcsolódva található meg a rendszerben, és a HPH során a kémiai szerkezete nem változik meg.

Az *in vitro* kioldódás vizsgálat bizonyította, hogy a bezárt vorikonazol képes felszabadulni a lipid nanorészecskéből. Az első 5 óra után a hatóanyag közel 50%-a kioldódik, ami nagy jelentőséggel bír a terápiás hatás kiváltásában.

Az *in vitro* antimikotikus vizsgálat megerősítette, hogy a VCZ-SLN formulációból kiszabadul a hatóanyag, amely képes az *A. flavus* és *C. glabra* szaporodását gátolni és ezt az alkalmazott lipid mennyisége nem befolyásolta.



## Következtetések

Értekezésemben bemutatom egy rossz vízoldhatóságú antimikotikus hatóanyag nanorendszerekbe történő formulálását. Ehhez két típusú nanorendszert választottam, egy fehérje és egy lipid alapút.

Sikerült a választott hatóanyagot, a vorikonazolt a Nab<sup>®</sup> technológia alkalmazásával humán szérum albumin nanorészecskékbe zárni. Sikerült a nagy nyomású homogenizálás paramétereit optimálni vorikonazol tartalmú albumin nanorészecskék formulálására. Így 6 homogenizálási ciklus alkalmazásával 1800 bar nyomáson az előállított albumin nanorészecske az optimált kiindulási elegy összetétel mellett  $81,2 \pm 1$  nm átlagos részecskeméretet eredményezett, aminek alacsony volt a polidiszperzitás index értéke. Az albumin nanorészecske karakterizálása során kapott eredményekből látható, hogy a vorikonazol tartalmú albumin nanorendszer nem csupán egy fizikai keverék. A használt HPLC-UV elválasztás segítségével a hatóanyag szelektíven meghatározható a triptofán mellett, így a módszer alkalmas mind a bezárási hatásfok mind a hatóanyagleadó képesség vizsgálatára. Az *in vitro* hatóanyagleadás vizsgálatával megerősíthető, hogy a hatóanyag és az albumin között reverzibilis kapcsolat alakul ki, ami képes a hatóanyagot vizes oldatban tartani. Az optimált eljárással létrehozott VCZ tartalmú albumin nanorészecske több, mint kétszeresére növelte a vorikonazol oldékonyságát vizes közegben.

Az oldékonyság további növelése érdekében új, lipid alapú nanorendszert sikerült formulálni nagynyomású homogenizátor alkalmazásával. 5 homogenizálási ciklus, 600 bar nyomás és Witepsol<sup>®</sup> W35 lipid alkalmazásával sikerült SLN-eket előállítani. Az optimált hatóanyag- és lipidtartalmú SLN alacsony PDI értékkel rendelkezett, mutatva ezzel a rendszer homogén méreteloszlását. A lipid nanorészecske formulálásával a hatóanyag oldékonysága több mint 40-szeresére növekedett. Bár a bezárt hatóanyag mennyisége 80 % és az oldékonyság növekedés jelentős mértékű, de még ezzel együtt is távol esik a szisztémásan alkalmazható terápiás koncentrációtól (Vfend injekció 10 mg/ml).

Az antimikotikus aktivitás vizsgálat eredménye igazolta, hogy lokális alkalmazás esetén a hatóanyag koncentráció (3,94 mg/ml) biztosítja a vorikonazol fungicid hatását annak ellenére, hogy a bezárt hatóanyag koncentrációja a szisztémás hatás kiváltásához szükséges értéket nem éri el. A vorikonazol tartalmú lipid nanorészecskék alapját képezhetik egy új, antifungális hatóanyag tartalmú topikális készítmény, például szemcsepp fejlesztésének.

## Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények jegyzéke

1. Petra Füredi, Kristóf Kovács, Krisztina Ludanyi, István Antal, Imre Klebovich, (2016),  
*Development and characterization of voriconazole loaded nanoparticles for parenteral delivery,*  
Int. J. Pharm., 510: 159-163.  
**(IF.: 3.994 (2015))**
2. Petra Füredi, Zsófia Edit Pápay, Kristóf Kovács, Borbála Dalmadi Kiss, Krisztina Ludányi, István Antal, Imre Klebovich, (2017),  
*Development and characterization of the voriconazole loaded lipid-based nanoparticles,*  
J. Pharm. Biomed. Anal., 132: 184-189.  
**(IF.: 3.169 (2015))**

### Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények jegyzéke

1. Kovacs Kristóf, Jayanna Prashanth K., Dukea Anna, Winnera Brittany, Negritoa Melaeni, Angalakurthia Siva, Yub Jorn C.C., Füredi Petra, Ludányi Krisztina, Sipos Péter, Rockwoodc Gary A. , Petrikovics Ilona (2016)  
*A Lipid Base Formulation for Intramuscular Administration of a Novel Sulfur Donor for Cyanide Antagonism*  
Curr. Drug Deliv. 13: pp. 1351-1357  
**(IF.: 1.446 (2015))**
2. Pápai Katalin, Füredi Petra, Budai Marianna, Mike Zsolt, Ludányi Krisztina, Antal István, Klebovich Imre, (2009),  
*Diétás étkezés hatása a ciprofloxacín biohasznosulására – in vitro vizsgálat,*  
Gyógyszerészet, 53: S85-S86.
3. Füredi Petra, Pápai Katalin, Budai Marianna, Ludányi Krisztina, Antal István, Klebovich Imre, (2009),  
*Fluorokinolonok in vivo étel-interakciós vizsgálatai,*  
Acta Pharm. Hung., 79: 81-87.