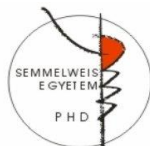


Albendazol oldódásának elősegítése  
rekonstituálható száraz nanoszuszpenzió  
formulálásával

Doktori értekezés

**Dr. Fülöp Viktor**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Antal István, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Bácskay Ildikó, egyetemi tanár

Dr. Bajdik János, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Gyires Klára, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár

Dr. Vecsernyés Miklós, egyetemi tanár

Budapest  
2020

## 1. Bevezetés

Az új gyógyszerjelölt molekulák terápiás alkalmazhatóságának egyik legnagyobb akadálya azok alacsony vízoldhatósága. A nanonizálás egy oldhatóságot elősegítő technológiai művelet, amely javíthatja az említett farmakonok biológiai hozzáférhetőségét.

A gyógyszeres nanoszuszpenziókat kétfázisú, kolloid diszperz rendszerekként definiálhatjuk, amelyekben a hatóanyagkristályok felületaktív anyagok és/vagy polimer segédanyagok segítségével nagyon finoman vannak eloszlatva a vizes diszperziós közegben. A szilárd szemcsék átlagos mérete szubmikronos, általában 200-600 nm mérettartományba eshetnek. A gyógyszeres nanoszuszpenziók alkalmazásának legfőbb előnye az oldódási sebesség és az oldhatóság javítása, aminek következménye a készítmény megnövekedett biológiai hozzáférhetősége, a stabil vérszint, a kevesebb segédanyag felhasználása miatti kevesebb mellékhatás, a hatóanyag fokozott stabilitása az oxidációval, a hidrolízissel, valamint az ülepedéssel szemben. A nanokristályok felületének módosításával lehetőség nyílik a nyújtott hatóanyagleadás és célzott terápia kialakítására. A nanokristályok rendelkeznek még egy kiemelkedő

sajátsággal, a biológiai membránokhoz történő nagyfokú adhéziós képességgel, amely elősegíti a jobb felszívódást mind a gasztrointesztinális traktusból, mint pedig a bőrön keresztül. Az energiaigényes előállítás, immunotoxicitás említhetők a technológia leggyakoribb kihívásaiként. A nanoszuszpenziók fő fizikokémiai sajátságai az átlagos részecske méret, a szemcseméret-eloszlások szélessége (diszperzitásfok, span, PDI), a kristályszerkezet, a szemcsék morfológiája és a szuszpenzió zeta-potenciálja (stabilitás). Előállításuknak két ellentétes megközelítése ismeretes, a molekulákból kiinduló, felépítő jellegű ‘bottom-up’ és a mikrorészecskékből kiinduló, aprózó ‘top-down’ technológiák. Az új rutinszerű módszerek már ötvözik a két ellentétes megközelítés előnyeit, ezek kombinációs technológiákként ismeretesek.

Az aprózó, száraz őrlés nem elég hatékony nanokristályok előállítására, ezért ilyenkor nedves őrlést alkalmaznak. Nedves őrlés során először stabilizátor polimerek és/vagy felületaktív segédanyagok segítségével makroszuszpenziót állítanak elő, melyet az őrlőberendezésbe töltenek, különböző méretű (jellemzően 0,2 mm vagy 0,4–0,6 mm átmérőjű) őrlőtestekkel (golyókkal, gyöngyökkel). A gyöngyök textúrája

legtöbbször kerámia (ittriummal vagy cériummal stabilizált cirkónium-dioxid), rozsdamentes acél vagy üveg. Az őrlőberendezés keverő mozgása biztosítja az őrlőtestek és az őrlendő makroszuszpenzió megfelelő áramlását. Ilyenkor a szilárd szemcsék felületén lévő hibahelyek mentén kezdődik az aprózódás a kristályok egymással és őrlőtestekkel való ütközések következtében.

Az albendazol (ABZ) hatóanyag egy imidazol-karbamát-észter, amelyet emésztőrendszeri és szisztémás ciszták, valamint echinococcosis, különböző férgek okozta fertőzések kezelésére használnak. A hatóanyag pH-tól függő alacsony vízdoldhatósággal és magas lipofilitással ( $\log P = 3,83$ ) rendelkezik, így a biofarmáciai osztályozási rendszer (BCS) II. osztályába sorolható. Két különböző kristály módosulata ismeretes a Form I (kereskedelmi forgalomban fellelhető) és a Form II (N,N – dimetilformamid-ból kristályosított forma). A hőmérséklettől függő oldhatósági vizsgálatok rámutattak arra, hogy a Form I jobb oldhatósággal rendelkezik a Form II-nél 25 °C-on. A 80 °C-ig domináns (metastabil) forma a Form I terápiás alkalmazása előnyös lehet, jobb vízdoldhatósága miatt.

## 2. Célkitűzések

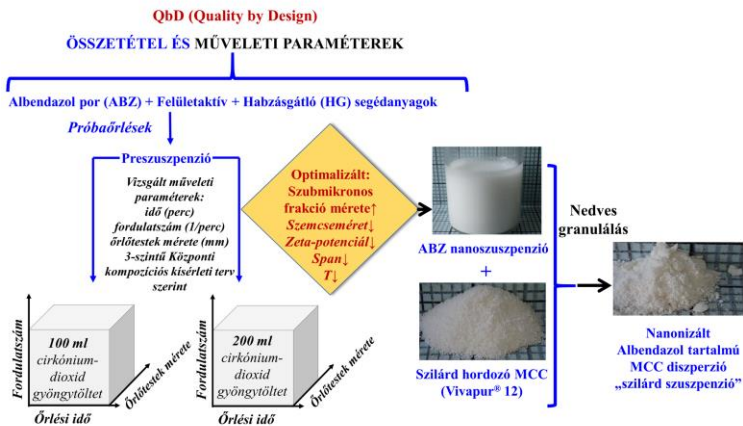
Kutatómunkámban, amely 4 fő részből áll, bemutatom egy albandazol hatóanyag tartalmú, rediszpergálható, száraz nanoszuszpenziós gyógyszerhordozó rendszer kidolgozását.

Az első részben a töltetösszetétel (felületaktív anyagok minőségének és mennyiségének, az ideális hatóanyagtöltet) kialakításával, majd a minőséget befolyásoló kritikus műveleti paraméterek (fordulatszám, őrlési idő, őrlőtestek méretének) helyes megválasztásával foglalkoztam. A kísérletek megtervezését a (DOE) módszer szerint végeztem. Az optimalizált nanoszuszpenzió hosszú távú fizikai stabilitás vizsgálata helyett, egy rövidebb 56 napos nyomon követésről számoltam be.

A második részben a stabilizálásra fókuszáltam, egy szilárd, száraz nanoszuszpenziós gyógyszerhordozó rendszer kialakításával. A transzformációhoz nedves granulálási eljárást alkalmaztam, tálcás szárítással (**1. ábra**). A nanokristályok szárított, szilárd hordozóból történő rediszpergálhatóságát többféle közegben is vizsgáltam.

A harmadik részben különböző közegekben történő in vitro kioldódás vizsgálatok, valamint termodinamikai oldhatósági vizsgálatok eredményeit összegeztem, megállapítottam a felületaktív anyagok és a részecskeméret csökkentés oldhatóságra és oldódási sebességekre gyakorolt hatásait.

Végül az utolsó részben a kiindulási anyagok és végtermékek szilárd fázisú spektroszkópiai (DSC, FT-IR, PXRD), valamint morfológiai jellemzésével foglalkoztam.



**1. ábra** Töltetösszetétel és műveleti paraméter optimalizálás ABZ tartalmú nanoszuszpenzió kidolgozására, majd stabilizálás nedves granulálással

### **3. Módszerek**

#### ***Nedves őrlési művelet***

A próba őrléseket laboratóriumi méretben, alacsony űrtartalmú (12 ml) malomdobban végeztem, magas fordulatszámokon (500 1/perc), nagy térfogatú (4,8 ml) őrlőgyöngy felhasználásával, 60 perc hosszú őrlési programokkal. A legmegfelelőbb hatóanyag koncentrációk megállapítására 1,00% (w/w)-os, 3,00% (w/w)-os és 4,00% (w/w)-os ABZ tartalmú makroszuszenziók őrlését végeztem, az előbb említett, azonos beállítások mellett. Az ideális felületaktív anyag/polimer helyes megválasztásához 0,40% (w/w)-os vizes oldatokat készítettem. A leghatékonyabban működő segédanyag optimális koncentrációját 0,30% (w/w) és 1,00% (w/w) tartományban vizsgáltam, 0,50% (w/w) koncentráció felett pedig a habzágátló dimetil-polisziloxán hatását is tanulmányoztam.

#### ***Bolygó malomban történő nedves őrlést befolyásoló kritikus műveleti paraméterek meghatározása***

Kritikus őrlési paraméterek (fordulatszám, őrlési idő, őrlőtestek mérete) 3-szintű (+1, 0, -1) központi kompozíciós kísérleti terv szerinti optimalizálása során két

különböző gyöngytöltetet (100 ml és 200 ml) alkalmaztam, amelyeket kategória faktorokként használtam a statisztikai modellekben. Az eredményeket 3D-ós felületi és megfelelőségi kontúr diagramok formájában mutatom be. A szubmikronos frakciók méreteit (%) ( $Y_1$ ), a térfogattal súlyozott átlagos szemcseméret értékeket (D [4,3]) ( $\mu\text{m}$ ) ( $Y_2$ ), a szemcseméret-eloszlások szélességeit (polidiszperziás, span) ( $Y_3$ ), a szuszpenziók zeta-potenciál értékeit (mV) ( $Y_4$ ), valamint a töltetek hőmérséklet értékeit ( $^{\circ}\text{C}$ ) ( $Y_5$ ) jelöltem meg függő változókként. A független változók közül  $X_1$  az őrlési időt szemlélteti (20, 40 és 60 perc hosszú őrlési programokat hasonlítottam össze).  $X_2$  a fordulatszámot jelezte (200, 400 és 600 1/perc fordulatszámú programokat vettem össze).  $X_3$  pedig az őrlőtestek méretét jelölte ( $d = 0.1$ ,  $d = 0.3$  and  $d = 1.0$  mm méretű cirkónium gyöngyökkel történő őrlések között vontam párhuzamot).

### ***Nano- és makroszuszenziók szilárd gyógyszerformává alakítása nedves granulálási eljárással***

A frissen készített ABZ nanoszuszenziókat és makroszuszenziókat, szilárd gyógyszerformává alakítottam, nagy szemcseméretű mikrokristályos cellulóz



(MCC) (Vivapur® 12) szilárd hordozó felhasználásával. Őrlési paraméterek: 50 ml-es malomdobban, 20 ml térfogatú  $d = 0,1$  mm méretű cirkónium gyöngyökkel, 400 1/perc fordulatszámon, 120 perc hosszú, ciklikus őrlési programok (5 perc őrlés 5 perc szünet). Az őrlött és nem őrlött szuszpenziókat az előzőleg kiszárított hordozóhoz adtam patendulában 3 perces kézi homogenizálást követően. A nedves masszát  $d = 180$   $\mu\text{m}$  fonalközi távolságú szitán áttörtem, végül tálcás szárítást alkalmaztam, szárító szekrényben, alacsony hőmérsékleten ( $40$  °C-on) 2 napon keresztül. A megfelelő dózis kialakításához az eljárást nyolcszor ismételt meg. Az őrlés nélküli albandazolt tartalmazó szuszpenzió ellőállításához diszpergálást végeztem, 400 1/perc fordulatszámon, 120 percen keresztül,  $24$  °C-on.

### ***Termodinamikai oldhatósági vizsgálatok***

A kísérletsorozat során mágneses kevertetést használtam, közepes fordulatszámon (800 1/perc)  $37$  °C-on. 24 órás homogenizálást követő 24 órás ülepitést, valamint centrifugálást követően határoztam meg a minták ABZ tartalmát UV-Vis spektrofotometriával. A meghatározásokat folyékony gyógyszerformák esetében

pH = 1,2, pH = 4,5 (foszfát-puffer) és pH = 6,8 (foszfát-puffer) kioldó közegekben végeztem. A szilárd gyógyszerformáknál pedig pH = 1,20-ben, pH = 6,50 mesterséges kérődző gyomornedvben (artificial rumen fluid, ARF) és pH = 6,80 (foszfát-pufferben).

### ***In vitro kioldódás vizsgálatok***

Az in vitro kioldódási vizsgálatokat USP apparatus 2 (lapát) üzemmódban végeztem, 75 1/perc fordulatszámon a folyékony gyógyszerformák esetében, valamint 100 1/perc fordulatszámon a granulátumokkal végzett kísérleteknél. Minden esetben  $37 \pm 0,2$  °C-on, 900 ml térfogatú kioldó közegek felhasználásával. A szuszpenziók hatóanyagleadási profiljait pH = 1,2 (200 mg-os dózisokban), pH = 4,5 foszfát-puffer (100 mg-os dózisokban) és pH = 6,8 foszfát-puffer (100 mg-os dózisokban) kioldó közegekben hasonlítottam össze.

A granulátumokét a hatóanyag porával 200 mg-os dózisokban pH = 1,2 pH = 6,50 mesterséges kérődző gyomornedvben (ARF), valamint pH = 6,8 foszfát-pufferben.

### ***Szilárd fázisú fizikokémiai vizsgálatok***

A szárítás és különböző őrlési programok hatását az albendazol polimorfijára por röntgendiffrakciós analízisek (PXRD) segítségével határoztam meg. A kiindulási albendazol por a segédanyagok és a feldolgozott granulátumok fázisátalakulásait differenciál pásztázó kalorimetriával (DSC) követtem nyomon. Összevettem továbbá a kiindulási hatóanyag porának, a felhasznált segédanyagok és feldolgozott granulátumok FT-IR spektrumait, az őrlés következtében esetleges kristályos-amorf fázisátalakulást feltételezve.

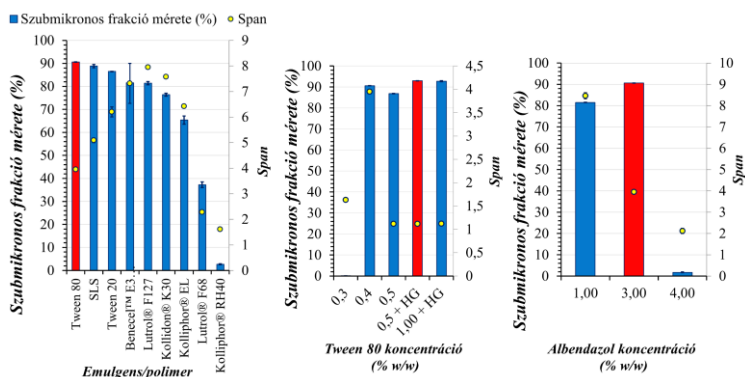
### ***Szilárd részecskék morfológiai értékelése***

Kristályos anyagok morfológiai értékelésére leggyakrabban nagy érzékenységű mikroszkópos módszereket használnak. Az őrölt és nem őrölt albendazolt tartalmazó granulátumok felületének összehasonlítására, mind a végtermékekről, mind a kiindulási anyagokról, mind pedig a fizikai keverékről atomerő mikroszkópos (AFM), valamint pásztázó elektromikroszkópos (SEM) felvételeket készítettünk, kisebb-nagyobb nagyítások alkalmazásával.

## 4. Eredmények és megbeszélés

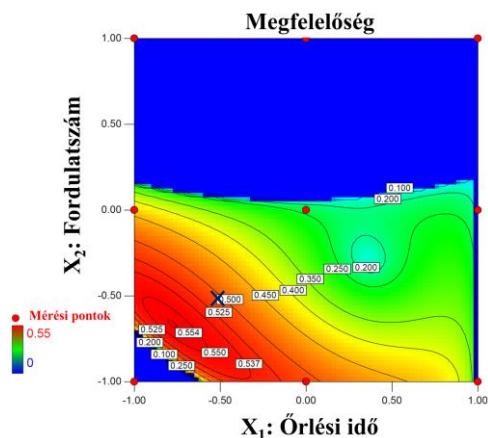
### *Nedves őrlési művelet optimalizálása*

Töltetösszetétel optimalizálás során a poliszorbát 80 bizonyult a legideálisabb felületaktív segédanyagnak 0,50% (w/w) koncentrációban. Ennél a koncentrációnál további habzsgátló dimetil-polisziloxán alkalmazása az összetételben 0,01% (v/v) koncentrációban növelte a szubmikronos ABZ kristályfrakció arányát 86,84%-ról 92,89%-ra. Az összetételben ideális hatóanyag koncentrációnak a 3,00% (w/w) ABZ por alkalmazása bizonyult, amely maximális szubmikronos frakció méretet és minimális polidiszperzitás értékeket eredményezett (2. ábra).



**2. ábra.** Töltetösszetétel optimalizálása ABZ tartalmú nanoszuszpenzió kidolgozásához

A műveleti paraméterek optimalizálása során az ABZ szemcseméret-eloszlási paraméterei, a szuszpenziók zeta-potenciáljainak abszolút értékei és az alkalmazott őrlőtestek méretei között fordított arányosság mutatkozott, kisebb mennyiségű (100 ml) cirkónium-dioxid gyöngytöltettel végzett őrléseknél. Azaz az egymással érintkező összfelületek nagysága döntően befolyásolja az őrlés hatékonyságát. Sikerült ABZ tartalmú nanoszuszpenziókat előállítani,  $d = 0,1$  mm méretű cirkónium gyöngyök segítségével, 200-434 1/perc fordulatszám és 25,6-59,4 perc hosszú műveleti idő tartományokban (**3. ábra**).

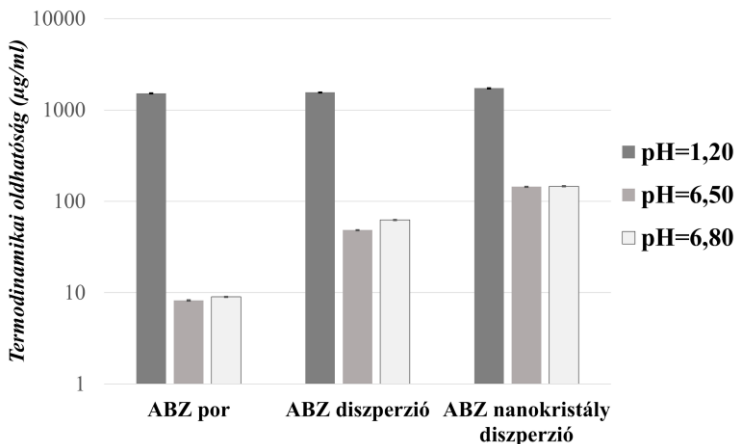


**3. ábra** Nedves őrlési művelet paraméterek optimalizálása, ahol az  $x$  jelöli az ideális beállításokat

Optimális őrlési beállításnak a 300 l/perces fordulatszámot, összesen 30 perces őrlést magában foglaló, 5 perces őrlést követő 5 perces lehülési, ismétlődő ciklusokból álló, szakaszos programot választottam. A töltet hőmérséklete a művelet végén 24,0 °C-nak bizonyult, egy minimális + 6,0 °C-os növekedést mutatott a kiindulási töltet hőmérsékletéhez képest. őrlést követően az őrölt szuszpenzió őrölttestektől való eltávolítása után a gyöngyöket a teljes töltet 33,33% (w/w) mennyiségének megfelelő felületaktív anyag és habzágátló elegyével átöblítve, megfelelő ABZ kitermelés (83,05% (w/w)) érhető el.

### ***Termodinamikai oldhatósági kísérletek***

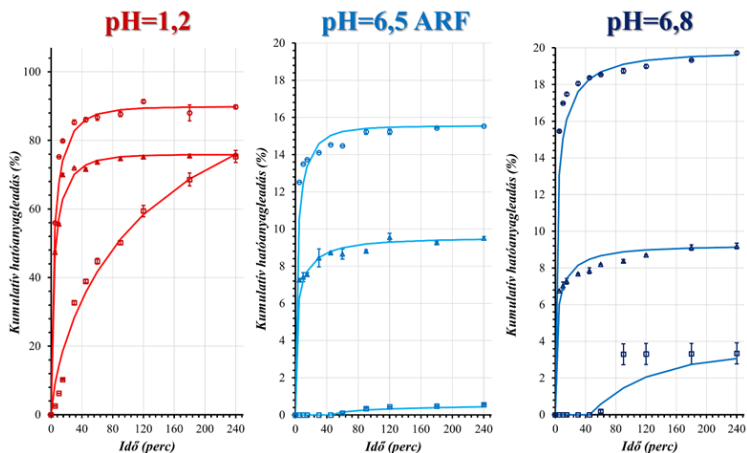
Optimalizált nanoszuszpenzió esetében maximális oldhatóság növekedést a pH = 6,80 foszfát-pufferben tapasztaltam, az őrlés 1,45-szörös növekedést eredményezett. A szilárd gyógyszerformákkal végzett hasonló kísérletek a pH = 6,50 mesterséges kóródzó gyomornedvben voltak a legeredményesebbek, ahol az őrlés hatására 1,98-szoros oldhatóság növekedés mutatkozott (**4. ábra**).



**4. ábra** Az ABZ por, az őrölt és nem őrölt albendazolt tartalmazó diszperziók átlagos termodinamikai oldhatósági értékei különböző közegekben ( $n = 3$ )

#### ***In vitro kioldódási vizsgálatok***

Optimalizált nanoszuszpenzió esetében maximális átlagos hatóanyagleadási sebességi állandót a  $\text{pH} = 1,20$  kioldó közegben számoltam, ahol az az őrlési művelet 13,50-szeres növekedést eredményezett a nem őrölt szuszpenzió kioldódási profiljával összevetve. Granulátumok vizsgálatánál a  $\text{pH} = 6,5$  mesterséges kérődző gyomornedvben tapasztaltam a legszembetűnőbb változásokat. Az őrlés hatására 43,09% átlagos hatóanyagleadás gyorsulás tapasztaltunk (**5. ábra**).



**5. ábra** Az ABZ nanokristályokat tartalmazó granulátum (○), a nem őrölt ABZ tartalmú granulátum (△) és a kiindulási ABZ por (□) kioldódási profiljainak összehasonlítása,  $n = 3$ , átlag értékek  $\pm$  SD

### Szilárd fázisú fizikokémiai vizsgálatok

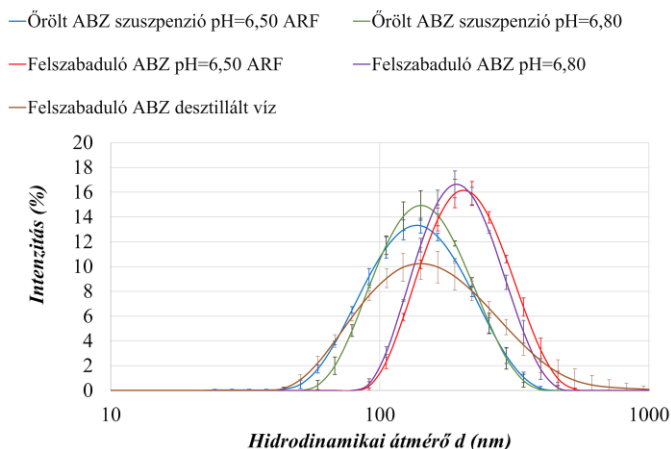
PXRD, DSC és FT-IR spektrális analízisek során azonosítottam minden összetételben az albendazol mindkét polimorf módosulatát (Form I és Form II). A DSC és FT-IR spektrális meghatározások eredményei az őrölt albendazol tartalmú formulációk további részleges kristályos-amorf átalakulásokról is beszámoltak. A PXRD vizsgálatok rávilágítottak az albendazol polimorfok Form I  $\rightarrow$  Form II átalakulására, különösen intenzív mechanikai behatással és hőterheléssel járó őrlési programok esetében, azaz  $d = 0,3$  mm méretű



gyöngytöltet, magas (600 l/perc) fordulatszámoknál, kisebb 50 ml kapacitású őrlődobba töltve.

### ***Szilárd részecskék morfológiai értékelése***

Az albendazol tartalmú granulátumok felületének AFM és SEM mikroszkópos technikákkal való érzékeny pásztázása során nem észleltünk ABZ nanokristályokat a hordozók felületén, ami feltételezte azok beépülését a mikrokristályos mátrixba. Az ABZ nanokristályok rediszpergálást követően visszanyerhetők az őrlött diszperzióból, ezért a módszer alkalmasnak tűnik a nanokristályok stabilitásának megőrzésére (**6. ábra**).



**6. ábra** A diszpergált ABZ nanoszuszpenzió és az őrlött diszperzióból felszabaduló ABZ szemcseméret-eloszlásai különböző közegekben,  $n = 5$

## 5. Következtetések

Kutatómunkám fő célkitűzése, egy albendazol hatóanyag tartalmú, rediszpergálható száraz nanoszuszpenziós gyógyszerhordozó rendszer kidolgozása volt. Az optimalizálással ellensúlyozhatók a hatóanyag nem kívánatos biofarmáciai tulajdonságai. Az ABZ oldhatósága a < 200 nm átlagos méretű kristályokat tartalmazó, őrlött diszperzióban 1,98-szorosára növekedett az őrlés nélkülivel összevetve mesterséges kóródzó gyomornedvben (ARF, pH = 6,50) és 1,33-szorosára pH = 6,8 foszfát-pufferben, alátámasztva ezzel az Ostwald-Freundlich egyenlet megállapításait.

Ugyancsak legnagyobb növekedést (43,88%) az átlagos oldódási sebességekben mesterséges kóródzó gyomornedvben (ARF, pH = 6,50) tapasztaltam az őrlött kristályokat nem tartalmazó diszperzióval összehasonlítva.

A gyógyszerhordozó rendszerből a nanokristályok rediszpergálást követően visszanyerhetők.

Az optimalizált gyógyszerhordozó rendszerben az őrlés hatására részleges kristályos-amorf átalakulás történt (DSC), a kristályos frakció pedig az ABZ mindkét

polimorf módosulatát egyaránt tartalmazta (FT-IR, PXRD).

A szakirodalom részletesen foglalkozik a polimorfok stabilitásával és a kristályos-amorf átalakulásokat indukáló tényezőkkel, az ABZ polimorfok fizikokémiai tulajdonságait is ismerjük. Külön az őrlés hatását az ABZ polimorfijára azonban még nem vizsgálták. Munkámban igyekeztem feltárni mindazokat a kritikus nedves őrlési műveleti paramétereket is, amelyek az oldhatóság szempontjából kedvezőtlen Form I  $\rightarrow$  Form II konverzió háttérében állhatnak. Összefoglalva megfogalmazható, hogy teljes átalakulás következhet be, nagyobb hőtermeléssel járó őrlőprogramok esetében. Így 20 ml-es  $d = 0,3$  mm méretű cirkónium-dioxid gyöngytöltetekenél, magasabb fordulatszámokon (600 1/perc), kisebb űrtartalmú malomdobba (50 ml) töltve, már rövid időn belül (30 perc) kifejezett Form I  $\rightarrow$  Form II konverzió detektálható.

## **6. Az értekezés témájához kapcsolódó publikációk listája**

1. Fülöp Viktor, Balogh Emese, Jakab Géza, Antal István, A nanogyógyszerek és nanotechnológia formulálási vonatkozásai I. Bevezetés, biofarmáciai szempontok, 2016 Acta Pharmaceutica Hungarica 86:2 43-52.
2. Fulop V., Jakab G, Bozo T, Toth B, Endresik D, Balogh E, Kellermayer M, Antal I, Study on the dissolution improvement of albendazole using reconstitutable dry nanosuspension formulation, 2018 European Journal of Pharmaceutical Sciences 123, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.027>
3. Fülöp, V., Jakab, G., Tóth, B., Balogh, E., Antal, I., Study on Optimization of Wet Milling Process for the Development of Albendazole Containing Nanosuspension with Improved Dissolution, 2020 Periodica Polytechnica Chemical Engineering 64(4), 401-420, <https://doi.org/10.3311/PPch.15569>