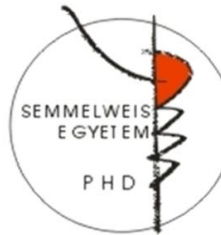


B₁₂ vitamin tartalmú, bukkális gyógyszerhordozó rendszer formulálása, mikro- és makroszerkezetének vizsgálata

Doktori tézisek

Szabó Barnabás

Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Révész Piroska, egyetemi tanár, D.Sc.

Dr. Stampf György, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ludányi Krisztina, egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Homonnay Zoltán, egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest

2012

Bevezetés

A vészes vérszegénység (*anaemia perniciosa*) gyakori oka a B₁₂ vitamin (cianokobalamin) hiánya. A terápiás gyakorlatban az izomba adott (intramuszkuláris, i.m.) injekciós formát alkalmazzák a vitamin rossz orális biohasznosulása miatt. A B₁₂ vitamin szükséges napi dózisa mindössze 0,4-2,8 µg, az egészséges emberi máj ráadásul 2 évre elegendő mennyiséget is képes tárolni belőle.

A cianokobalamin nagy (M=1355,7 g/mol) molekulatömege ellenére tanulmányok bizonyítják, hogy képes passzív diffúzióval átjutni a nyálkahártyák membránjain, amely lehetővé teszi a hatóanyag neminvazív alkalmazását.

Rossz biohasznosulása és jó oldhatósága miatt a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BSC) 3. osztályába tartozik, így olyan formulációban alkalmazható sikeresen, amely elegendő időt biztosít a hatóanyag számára a membránon való átjutáshoz.

A bukkális gyógyszerformák alkalmazása számos előnnyel jár, mivel a nyálkahártya erekkel gazdagon átszőtt és permeábilis, a farmakon alkalmas szisztémás kezelésre is. Ez igen kedvező, mert az innen felszívódott hatóanyag kikerüli a májat, valamint az emésztőrendszer bontó enzimejei sem hatnak rá. Megfelelően bioadhezív polimerek alkalmazásával a formulák a száj nyálkahártyájához tapaszthatók, így segítve a membránon át történő hatóanyag-felszívódást.

A gyógyszerformák alkalmazhatóságát a mikro- és makroszerkezetük együttesen határozzák meg. A kis mintaigényű, univerzális mikroszerkezet vizsgálati módszerek alkalmazása mind a formulálás mind a készítmény

vizsgálata során hatékony eszköz a széleskörűen alkalmazott makroszerkezeti módszerek (szilárdság, hatóanyag-leadási kinetika) kiegészítésére.

Célkitűzés

Munkám célkitűzései a következők voltak:

- B₁₂ hatóanyag tartalmú bukkális filmek formulálása,
- a megfelelő segédanyag-rendszer kiválasztása a bukkális film formulációhoz,
- a segédanyagok optimális arányának megállapítása,
- az előállított filmek mikro- és makroszerkezete közötti összefüggések keresése,
- a polimer-arány, a film előállítási módjának és a tárolás hatásának vizsgálata a hatóanyag-leadás *in vitro* kioldódási profiljára,
- a bukkális modellmembránon történő hatóanyagátjutás igazolása.

Módszerek

A B₁₂ vitamin modell hatóanyagból nátrium-alginát (SA) és Carbopol 71 G (CP, poliakrilsav-származék) polimerek felhasználásával, öntéses és fagyasztva szárításos technikával állítottam elő bukkális filmet, illetve ostyát.

A minták infravörös spektrumait FTIR 4200 (Type A) (Jasco International Co. Ltd, Tokyo, Japan) készüléssel, gyengített totálreflexiós (ATR Pro-470H) mérőfejjel a kiindulási anyagok esetében porfeltéttel, filmeknél, ostyáknál pedig elasztikus mintához alkalmas feltéttel végeztem, 300-4000 cm⁻¹ mérési tartományban, 4cm⁻¹ spektrális felbontással.

A hidrogélek viszkozitását AR 2000 Rotational Rheometer típusú reométerrel (TA Instruments, New Castle, USA), 40 mm átmérőjű forgó mérőfejjel, 7,409-74,09/s közötti forgási sebességgel, kémhatásukat "pH 210 Microprocessor pH Meter" (Hanna Instruments, USA) típusú kombinált üvegelektrodos pH-mérő műszerrel határoztam meg.

A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópiás (PALS) méréseket kb. 3x10⁵ Bq aktivitású, két Kapton fólia közé csomagolt, hordozómentes ²²NaCl forrással, BaF₂ szcintillációs detektorokkal, gyors-gyors koincidenciakörrel kapcsolt Ortec elektronikával, 3600 s mérési idővel végeztem, a hidrogélek esetében egyedi mérési elrendezéssel. Az adatokat Resolution programmal értékeltem ki. A Doppler-szélesedés (DB) értékeket folyékony N₂-nel hűtött, nagy tisztaságú germánium detektorral (HPGe), Tennelec elektronikával, 10⁶ mérési pontot tartalmazó méréssel határoztam meg. Az energia-felbontás 1,1 keV volt az 511 keV-os csúcsnál.

Az öntött és a liofilizált filmek szilárdságát TA.XT[®]plus (Stable Micro System Ltd., UK) 5000 g-os mérési cellájú állományelemzővel, egyedileg

gyártott, de a gyári feltétellel geometriailag azonos, 8 mm belső átmérőjű feltétellel és 5 mm átmérőjű henger alakú, rozsdamentes acél kutaccsal, valamint Brookfield LFRAC3-4500 típusú (Brookfield Eng. Lab. Inc., USA), 0 - 4500 g-os mérési tartományú állományelemző készülékkel, gyári film-rögzítő feltétellel (Brookfield TA-FS Film Support Fixture, belső átmérő: 10 mm) és TA-8 (6,35 mm átmérőjű, gömb alakú, rozsdamentes acél) kutaccsal mértem. A kiértékelést mindkét módszernél a:

$$\text{törési szilárdság} \left[\frac{N}{mm^2} \right] = \frac{\text{töréshez szükséges erő} [N]}{\text{minta alapterülete} [mm^2]}$$

képlet alapján végeztem.

Az in vitro kioldódás vizsgálatokat Hanson SR-8 Plus kioldódás vizsgáló fürdőben, 3-3 párhuzamos méréssel, USP-2 (lapátos) módszerrel, 50/perc (50 RPM) keverési sebességgel, $37 \pm 0,5$ °C hőmérsékletre temperált, 300 ml térfogatú, pH=6,8-as gyógyszerkönyvi (Ph. Hg. VIII.) foszfát puffert alkalmazva végeztem. A kioldódott hatóanyag mennyiségének meghatározását HPLC-MS módszerrel, Agilent Infinity 1260 folyadékkromatográfival, Agilent 6460 Triple Quad tömegspektrométerrel végeztem, 30 µl minta injektálásával, 0,5 ml/perc áramlási sebességű, 90% ioncserélt vízben 0,1 mol/dm³ HCOOH és 10% acetonitrilt tartalmazó mozgófázissal, 50 mm hosszú, 2,1 mm belső átmérőjű, 3,5 µm szemcseméretű, 25 °C-os oszloptérben elhelyezett, C18 Poroshell 120EC kromatográfias oszlopon. Az ionizálás detektálás Jet Stream elektropray ionforrással, a detektálás MRM módszerrel, pozitív ionizációs módban, $m/z = 678,5$ ($[M/2+H]^+$) prekursor ionnal, $m/z = 146,9$ termék ionnal történt.

A kioldódási görbéket a Korsmeyer-Peppas (K&P) kinetikai modellel, az alábbi egyenlet alapján értékeltem:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n$$

ahol M_t és M_∞ a kioldódott hatóanyag összegzett (kumulatív) mennyisége t időpillanatban és a végtelen időpontban (amely a teljes hatóanyag-mennyiséget jelenti), a k a sebességi állandó, amely a hatóanyag-polimer rendszer szerkezetétől és geometriájától függ, az n pedig a hatóanyag-leadás transzport-mechanizmusát jellemző állandó.

Eredmények

- Neminvazív mikroszerkezet vizsgáló módszerek (FTIR és PALS) kombinációjával értékeltük a B₁₂ és a hordozó polimerek, másodlagos kölcsönhatásokat érintő, a gyógyszerforma stabilitását befolyásoló interakcióit. A rokon szerkezetű Carbopol polimerek közül a két módszer lehetőséget biztosított, a bukkális formulációhoz előnyös, gyorsan nedvesedő és a mukoadhezivitást biztosító típus kiválasztására [1].
- A SA-CP kompozitoknál meghatározott arány biztosított homogén filmet, ennek meghatározására, a gél-film átmenet vizsgálatára a valós idejű PALS mérést alkalmaztam, először a szakirodalomban [3].
- Vizsgáltam a homogén, öntéses és liofilizált filmek felhasználás szempontjából meghatározó, mikro- és makroszerkezeti tulajdonságait. Megállapítottam, hogy a mikro- és makroszerkezeti tulajdonságok együtt változtak az összetétel függvényében. A mikroszerkezet vizsgáló módszerek alátámasztották az anomális makroszerkezeti viselkedést mutató összetétel azonos alap-, de eltérő szupramolekuláris szerkezetét.
- A CP mennyiségének, a tárolás időtartamának növelése, valamint a liofilizálás csökkentette a hatóanyag felszabadulás sebességét. A

hatóanyagleadás sebességének változásai (a K&P-modell alapján értékelve) a mikroszerkezeti vizsgáló módszerek eredményeivel összhangban voltak.

Következtetések

SA-CP különböző arányú keverékeiből sikerült öntéses és fagyasztva szárítás eljárással bukkális filmet formulálni. A formuláció potenciálisan alkalmas lehet a választott modellhatóanyag, a vízdékony B₁₂, terápiás dózisú bevitelére.

A készítmény-fejlesztés, a kockázatértékelés szempontjából kritikus, lépéseiben – kompatibilitás, stabilitás – a hagyományos szerkezetvizsgáló módszerek számára láthatatlan szabadterfogat-változás követésével, a dolgozatban alkalmazott PALS és a hozzá kapcsolódó technikák, egyedülálló módszernek bizonyultak.

A PALS technikával kapott mérési eredmények összefüggését elemezve a mechanikai tulajdonságokkal, kezelés, tárolás hatására bekövetkező változásokkal, kioldódási profilokkal, megállapítható, hogy a PALS hasznos módszere lenne a gyógyszerforma-fejlesztésnek, annak szinte valamennyi fázisában.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

1. Szabó B, Süvegh K, Zelkó R. (2011) Effect of storage on microstructural changes of Carbopol polymers tracked by the combination of positron annihilation lifetime spectroscopy and FT-IR spectroscopy. *Int J Pharm*, 416: 160-163.

2. Szabó B, Hetényi G, Majoros K, Miszori V, Kállai N, Zelkó R. (2011) Bukkális hatóanyag-leadó rendszerek formulálásának és ex vivo vizsgálatának lehetőségei. *Acta Pharm Hung*, 81: 165-172.

3. Szabó B, Süvegh K, Zelkó R. (2012) Real-time positron annihilation lifetime spectroscopy for the detection of the hydrocolloid gel-film transition of polymers. *Polym Test*, 31: 546-549.

4. Sebe I, Szabó B, Zelkó R. (2012) A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia és gyógyszerészeti alkalmazása. *Acta Pharm Hung*, 82: 23-32.

5. Kállai N, Sebestyén Z, Szabó B, Simon V, Antal I, Zelkó R. (2012) Intraorális gyógyszerformák fejlesztési lehetőségei. *Acta Pharm Hung*, 82: 95-104.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó, teljes terjedelemben megjelent kongresszusi előadások

6. Szabó B, Molnár M, Süvegh K, Zelkó R. (2011) Tracking of the microwave induced supramolecular structural changes of polymers with positron annihilation lifetime spectroscopy. *Eur J Pharm Sci*, 44: (S1) 196-197.

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó folyóiratban megjelent közlemények

7. Vajdai A, **Szabó B**, Süvegh K, Zelkó R, Újhelyi G. (2012) Tracking of the viability of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteria population in polyvinylalcohol nanofiber webs by positron annihilation lifetime spectroscopy. *Int J Pharm*, 429: 135-137.

8. Télessy IG, Balogh J, **Szabó B**, Csemesz F, Zelkó R. (2012) Kinetic stability of all-in-one parenteral nutrition admixtures in the presence of high dose Ca²⁺ additive under clinical application circumstances. *Nutr. J.* 11: 32.

9. Szabó A, **Szabó B**, Balogh E, Zelkó R, Antal I. (2012) Módosított hatóanyagleadású intraartikuláris készítmények. *Acta Pharm Hung*, 82: 69-74.