

Dr. Pál Szilárd

**Mikropelletek gyártásának optimalizálása és vizsgálata
gyógyszertechnológiai és biofarmáciai paraméterek
alapján**

Ph.D. értekezés tézisei



Témavezető:

Dr. Dévay Attila

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Gyógyszertechnológiai és Biofarmáciai Intézet

Pécs

2013

1. Bevezetés

Egy új perorális felhasználásra szánt gyógyszerkészítmény kifejlesztése során a hatóanyag-leadás abszorpciós ablakhoz való optimalizálása alapvető követelmény. Nem felszívódó hatóanyagot tartalmazó, helyi hatás kifejtésére szánt készítmények esetében azonban a hatóanyag-felszabadulás folyamatát célszerű újraértékelni. Ezekben az esetekben a Biofarmáciai Osztályozó Rendszert (BCS) nem alkalmazhatjuk változatlanul, hiszen ekkor az abszorpció ill. a permeabilitás jelentősége elhanyagolható, ugyanakkor más tényezőket figyelembe kell venni, mint pl. a nyálkahártyához való adhezivitás, a szemcsék nagy érintkezési felszíne ill. a hatóanyag-leadás ideje és profilja. Számos betegség közül a disszertáció témájaként a gasztrointesztinális kandidiázis (GIC) terápiájának optimalizálását választottam figyelembe véve a készítmény gyógyszer technológiai és biofarmáciai tulajdonságait.

A GIC terápiája során a pelletek alkalmazása számos előnnyel bír. A hatóanyag-leadást megfelelő szemcseméretük, segédanyagok és esteleges bevonószer alkalmazásával befolyásolni lehet. A pelletek alkalmazásának további előnyei a biztonságosság, hatékonyság a megfelelően reprodukálható gyomorürülés, megfelelő abszorpció, stabil plazmaszintek és a túladagolás veszélyének csökkentése révén. Mindez a teljes hatóanyag-mennyiség multipartikuláris szerkezetben való inkorporálásának következménye. Különböző szemcseméretű frakciók, eltérő vastagságú bevonatok alkalmazásával, ill. tablettává való préselésük révén számtalan optimalizálási lehetőséget rejtenek.

Pelletek előállítása céljából speciális berendezések, technológiák és segédanyagok alkalmazására van szükség. Általában a hatóanyagot és a segédanyagokat is tartalmazó finom porszemcsék nedves szférikus agglomerációjával állítjuk elő zárt rendszerű granuláló berendezésekben, pl. rotor-fluid vagy nagy nyíróerejű ill. örvényáramú műveletekkel.

Az örvényáramú berendezésben történő előállítás során a porkeverék homogenizálása, granulálás, szferonizálás és a szárítás akár szinte egy időben, az egyes folyamatokat szoros átfedéssel valósíthatjuk meg. A keletkező pelletek primer magja a kötőanyag porlasztása és a finom porszemcsék keveredésének kölcsönhatásaként jön létre.

A folyamat többváltozós, melynek során szükségeszerű meghatározni a szignifikáns műveleti paramétereket, melyek megfelelő beállításával befolyásolni tudjuk a végtermék

tulajdonságait, pl. miután az agglomerátumok a keverés és a kötőanyag egyidejű adagolása során kompaktabbá válnak, a műveleti idő kritikus paramétere lehet a gyógyszer technológiai tulajdonságok befolyásolásának.

A szakirodalomban számos esetben találhatunk utalást az örvényáramú pelletezés egyes gyártási paramétereinek vizsgálatára, azonban kevés számol be egyszerre több gyártási paraméter egyidejű vizsgálatáról és azok hatásairól a pelletek gyógyszer technológiai és biofarmáciai tulajdonságaira. A faktoriális kísérlettervezés alkalmazásával erre nyílik lehetőség, továbbá idő- és költséghatékony vizsgálatok végrehajtásával kevés számú kísérletből is modellt állíthatunk fel és optimalizálhatjuk a kutató-fejlesztő munkát.

Disszertációm tárgya az örvényáramú pelletezés előtanulmányozását követően a GIC terápiájának optimalizálása nystatin antifungális hatóanyagot tartalmazó multipartikuláris készítmény előállításával, mely a bioadhezív segédanyagainak köszönhetően tartós helyi hatást biztosít.

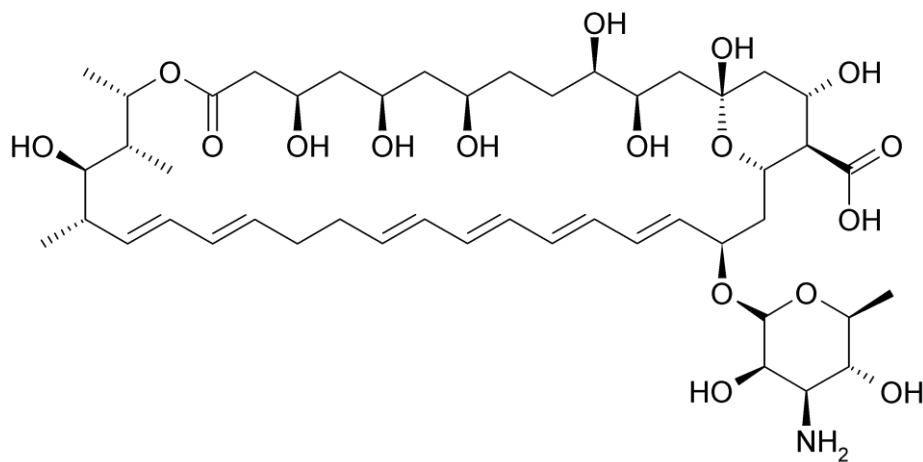
2. Célkitűzések

Munkám során célkitűzéseim a következők voltak:

- az örvényáramú pelletezés szignifikáns műveleti paramétereinek feltárása és hatásainak vizsgálata,
- diffúz reflektancia spektrum mérésének alkalmazása, mint gyors folyamatközi mérési lehetőség a pelletezés kontrollja céljából,
- az optimalizált műveleti paraméterek alkalmazása mikropelletek előállítására a GIC terápiája céljából,
- a direkt bioautográfiára alapozott mikrobiológiailag detektált hatóanyag-leadás vizsgálat (MDD) technikájának alkalmazása, az antifungális hatóanyag hatásának megfigyelése céljából,
- az MDD technika összehasonlítása más analitikai módszerrel,
- a biofarmáciai paraméterek antifungális terápia céljából történő optimalizálása,
- ajánlás kidolgozása az optimalizált GIC terápiában alkalmazott mikropelletek előállításának műveletére és összetételére.

3. Anyagok és módszerek

A polién antifungális antibiotikum, a *nisztatin* (1. ábra) (BCS IV. osztály) az egyik legfontosabb hatóanyag a kandidiázis helyi terápiájának megvalósítása során. A *nisztatin* sárga vagy enyhén sárgásbarna higroszkóp por, melyet a *Streptomyces noursei* ATCC 11455 törzsének fermentációja során nyerünk. A gasztrointesztinális rendszerből való abszorpciója elhanyagolható, ezért a mellékhatások kialakulásának valószínűsége igen csekély. Kiválasztása szinte teljes mértékben a széklettel történik.



1. ábra. A *nisztatin* szerkezeti képlete

3.1. Elővizsgálatok a nagy nyírőerejű pelletezés szignifikáns műveleti paramétereinek feltárása céljából

Számos rendelkezésre álló módszer közül az örvényáramú granulálást választottam a pelletek előállítására. A szignifikáns műveleti paraméterek meghatározása céljából elsőként teofillin modell hatóanyagot, laktózt, mikrokristályos cellulózt és etilcellulózt tartalmazó pelleteket állítottam elő, melyeket előzetesen három percig szárazon homogenizáltam.

A művelet során a granuláló folyadékként felhasznált tisztított víz mennyisége 45%-a volt a teljes porkeverék tömegének. A folyadék adagolásának teljes ideje a gyártás során konstans öt perc volt. Az előállítást követően a pelleteket 35°C-on állandó tömegig szárítottam, majd a

vizsgálatig 25°C-on 60% relatív páratartalom mellett tároltam. A pelletezés Pro-C-epT 4M8 berendezésben történt. A gyártás során két paraméter hatását vizsgáltam:

- a propellerkeverő és a
- granuláló folyadék adagolási sebességét.

Az aprító kések sebessége állandó, 2000 ford./perc sebességű volt. A kísérletek számának csökkentése céljából és a kiértékelés megkönnyítése érdekében faktoriális kísérlettervet alkalmaztam. Minden egyes minta három párhuzamos gyártás eredménye volt.

3.2. Nystatin hatóanyagot tartalmazó mikropelletek előállítása

A pelletek előállítása az előkísérletekhez hasonlóan Pro-C-epT 4M8 (Belgium, Zelzate) laborméretű örvényáramú berendezésben történt. Minden minta 5% *nisztatint*, 45% mikrokristályos cellulózt, különböző arányban jelenlévő hidrocietilcellulózt és carbomert (0-5%), mint bioadhezív segédanyagot és α -laktóz-monohidrátot, mint töltőanyagot tartalmazott. Az egyes minták tömege 100,0 g volt. A porkeverék összemérése és az 1000 ml-es pelletező edénybe való behelyezése után 3 perc homogenizálást követően elindítottam a pelletezési folyamatot. Az alkalmazott folyadék tisztított víz volt.

A minták központi kompozíciós faktorterv (I. és II. Táblázat) alkalmazásával három párhuzamos gyártás során jöttek létre. A teljes kísérletterv öt középpontot tartalmazott, három numerikus faktorral, melyek az átlag pelletátmérő (x_1), a carbomer (CPL) (x_2) és a hidroxietilcellulóz (HEC) (x_3) mennyiségei voltak öt kódolt szinten (-1,414; -1; 0; +1; +1,414). A kísérletek elemzése során a Design Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) szoftvert alkalmaztam a faktorok relatív hatásainak meghatározására 95%-os konfidencia intervallumot és $p < 0,05$ szignifikancia szintet figyelembe véve. A modellként felállított válaszfüggvények felületeit a TableCurve® 3D v. 4.0 (Systat Software Inc., London, UK) szoftver segítségével szerkesztettem meg a modellként rendelkezésre álló polinom függvény alapján.

I. Táblázat. Központi kompozíciós faktorterv két faktoriális szinten (-1;1), axiális pontokkal (-1,414;1,414) és középponttal (0)

Minta	x_1	x_2	x_3
1	1	1	-1
2	1	-1	1
3	-1	1	1
4	-1	-1	-1
5	-1,414	0	0
6	1,414	0	0
7	0	-1,414	0
8	0	1,414	0
9	0	0	-1,414
10	0	0	1,414
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

II. Táblázat. A gyártás során alkalmazott műveleti paraméterek kódolt és valós értékei

Faktorok	-1,414	-1	0	1	1,414
x_1 , átlag pellet átmérő (μm)	217,2	300,00	500,00	700,00	782,8
x_2 , CPL tartalom (g)	0,00	0,73	2,50	4,27	5,00
x_3 , HEC tartalom (g)	0,00	0,73	2,50	4,27	5,00

4. Eredmények és megbeszélésük

A GIC terápiájának egyik lehetséges megvalósítása egy helyileg optimalizáltan ható antifungális szer multipartikuláris gyógyszerkészítménybe való inkorporálása. Kísérleteimben hatóanyagként a *nisztatin* alkalmaztam, mivel erős, kontakt gombaellenes hatása minimális abszorpcióval párosul. Multipartikuláris gyógyszerformaként a mikropelletekre esett a választás relatíve nagy felszínük és a GI rendszerben való egyenletes eloszlásuknak köszönhetően. A minták gyártási eljárásaként a nagy nyíróerejű örvényáramú pelletezést választottam gyorsasága, megbízhatósága és számos műveleti paraméterének változtatási lehetősége miatt, melyek megfelelő beállításával a végtermék tulajdonságai optimalizálhatók. A sikeres GIC terápia további feltétele a szemcsék nyálkahártyán való hosszú retenciós ideje, melyet bioadhezív segédanyagok, mint pl. carbomer és hidroxietilcellulóz alkalmazásával lehet elérni. Összegezve ismereteimet és megfigyeléseimet, *nisztatin* hatóanyaggal és megfelelő bioadhezív tulajdonságokkal rendelkező mikropelletek alkalmazásával optimalizált GIC terápia érhető el.

A kutatási feladat megoldásához előzetes kísérletekre volt szükség, melyek során megállapítottam az örvényáramú berendezés azon műveleti paramétereit, amelyek a mikropelletek szemcseméret eloszlására szignifikáns hatással bírtak. Ezek a kísérletek 3-szintű lap-középpontú központi kompozíciós kísérlettervvel valósultak meg, vizsgálva a propellerkeverő és a kötőfolyadék adagolási sebességének hatását a mikropelletek gyógyszerterológiai paramétereire.

A kiértékelés során másodfokú polinom modell bizonyult megfelelőnek, mely mindkét vizsgált paraméter szignifikáns hatását kimutatta, egy nyeregfüggvényként ábrázolva a két faktor együttes hatását. Ez a kísérlet megmutatta, hogy a propellerkeverő szélső értékeinek alkalmazásakor (500 és 1000 ford./perc) és a folyadék 10-12 ml/perc sebességű adagolásakor viszonylag kicsi, 500-550 μm átlag átmérőjű pelletek keletkeznek. A pelletezés végpontját a propellerkeverő forgatónyomatékának mérése segítségével határoztuk meg. A peletek NIR méréseinek eredményeiből megfelelő matematikai transzformációt alkalmazva szintén értékes adatok nyerhetők, hiszen magas, $R=0.9842$ korrelációval lineáris összefüggést találtam a szemcseméret és a diffúz reflektancia spektrum értékek között.

Az előkísérletek eredményei szolgálták a *nisztatin* hatóanyagot tartalmazó mikropelletek előállításának alapjául.

A második gyártás-sorozat során 5 középpontot tartalmazó központi kompozíciós kísérlettervet alkalmaztam, melynek változtatott paraméterei a következők voltak:

- átlag pellet átmérő,
- CPL tartalom és
- HEC tartalom.

A vizsgált biofarmáciai és gyógyszer technológiai paraméterek:

- szemcseméret eloszlás,
- folyási sajátságok,
- törési szilárdság,
- felületi sajátságok,
- duzzadás,
- bioadhéziós tulajdonságok és
- hatóanyag-leadás spektrofotométerrel és mikrobiológiai értékmérő módszerrel vizsgálva.

Az eredmények értékelése során fontos megfigyelés volt a direkt bioautográfián alapuló mikrobiológiailag detektált kioldódás, mely szoros korrelációt mutatott a spektrofotométeres vizsgálatokkal mind a közepes kioldódási időt (MDT), mind pedig a kioldódási görbére illesztett Weibull függvény β alaki paraméterét tekintve. A mikropelletek átlag átmérőjének szélső értékei (~200 μm and ~800 μm), a szélső értékekben alkalmazott CPL és HEC tartalom (mindkét segédanyag esetében 0 és 5%) rövid kioldódási időt eredményezett. A felállított modell alapján az alaki paraméter alacsony értéke, mely szintén az optimalizálás egyik célja, a pelletek átlagméretének csökkentésével, alacsony HEC, de magas CPL tartalom mellett érhető el. A duzzadási értékeket elemezve a pellet átmérő és a CPL tartalom bizonyult szignifikánsnak. Növekvő CPL tartalom és nagyobb szemcseméret esetében a duzzadási arányszám szintén növekedett. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok a CPL és HEC azonos mennyiségben való alkalmazása esetén kimutatták a pelletek felszínét elsimító mátrix keletkezését, melyet a diffúz reflektancia vizsgálatok szintén alátámasztottak, melyet az előkísérletben való alkalmazással ellenben nem a szemcseméret, hanem a minták felületi sajátságának jellemzésére használtam fel.

4.1. GIC terápia optimalizálása

Összegezve kutatási eredményeimet és figyelembe véve az optimalizációs célokat (rövid hatóanyag-leadás, alacsony β alaki paraméter, hosszú retenciós idő, nagymértékű duzzadási arány), a Design Expert v.7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) szoftvert alkalmaztam az optimális műveleti paraméterek és összetétel megállapításához.

Az optimalizálás eredményei alapján az 550 μ m átlag átmérővel rendelkező *nisztatin* hatóanyagot, 4,25% CPL és 0,75% HEC bioadhezív segédanyagokat tartalmazó mikropelletek a sikeres GIC terápia alapját képezhetik.

A feltételezés igazolásához az optimalizált előállítottam az optimalizált összetételt tartalmazó gyógyszerkészítményt három párhuzamos gyártásban. A minták előállítása az előzetes tapasztalatok alapján történt nagy nyíróerejű örvényáramú berendezésben (Pro-C-epT 4M8 Granulator, Belgium, Zelzate). Az összetétel 5% *nisztatint* (Merck, Darmstadt, Németország), 45% α -laktóz monohidrát (DC, BDI, Zwolle, Hollandia), 45% mikrokristályos cellulózt (Avicel PH 105, FMC, Philadelphia, USA), 0,75% hidroxietilcellulózt (Hercules, Wilmington, USA) és 4,25% carbomert (Carbopol 934P, Hercules, Wilmington, USA) tartalmazott. Az alkalmazott gyógyszeranyagok minősége megfelelt a Ph.Eur.7.-nek. A teljes bemért porkeverék tömege 100,0g volt, a granuláló folyadékként alkalmazott tisztított víz 50 ml-es összmenyiségét 10 ml/perc sebességgel adagoltam 3 perces homogenizálást követően a 25°C-on történő, 5 perces tartó gyártás során. A propellerkeverő 500, az aprító kések 2000 ford./perc sebességgel működtek.

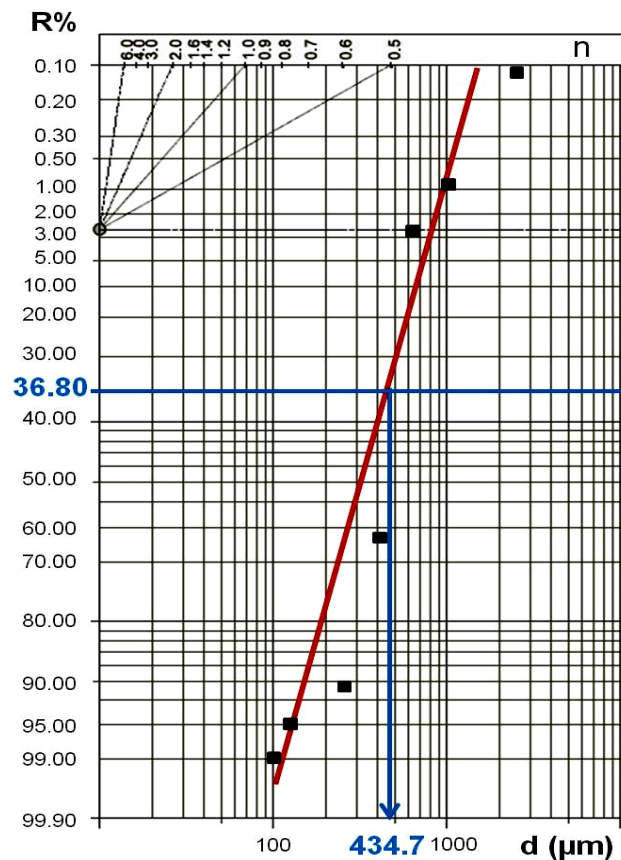
A vizsgált paraméterek a következők voltak: átlag pellet méret, közepes kioldódási idő, Weibull alaki paraméter, folyási sajátság, Carr index, Hausner faktor, kopási veszteség

Az optimalizált mikropelletek fontosabb gyógyszer technológiai és biofarmáciai paramétereit a III. táblázatban foglaltam össze.

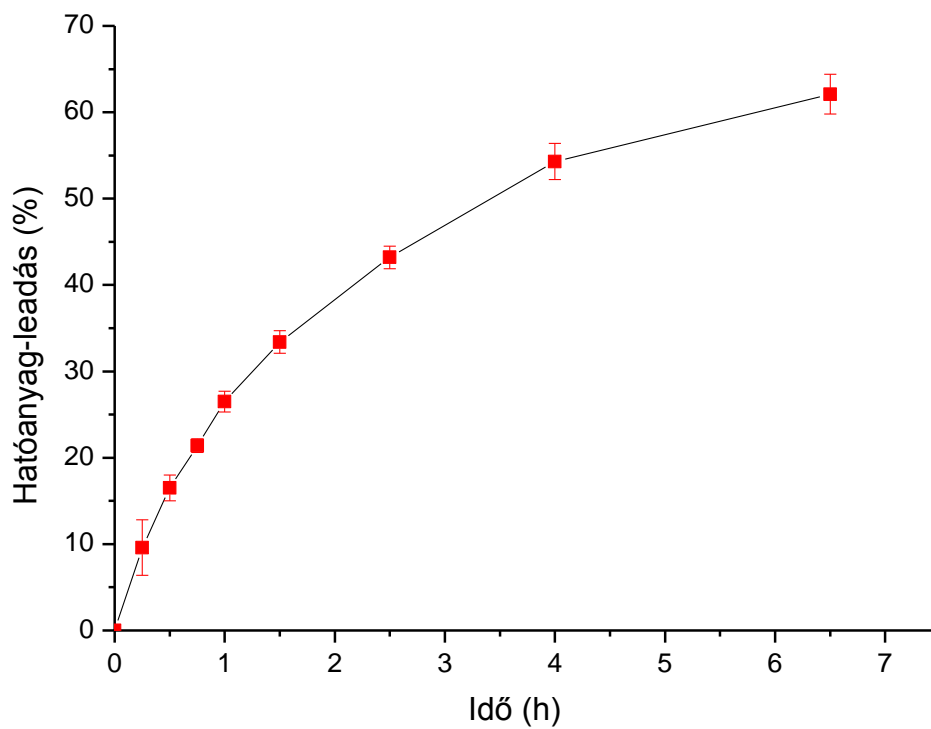
III. Táblázat. Az optimalizált mikropelletek gyógyszer technológiai és biofarmáciai sajátosságai

Tulajdonságok	Eredmény	Célérték
Átlag átmérő	564,7±23,3 μm	550 μm
τ_D	5,7±2,1perc	5-10 perc
β	0,3872±0,032	0.3-0.5
Bioadhéziós retenció	55,3±2,7 %	50-55%
Duzzadás	50,7±4,2 μm (8,8%±0,7%)	>5%
Folyási sajátosság (lejtőszög)	24,40°±3,18°	<25°
Carr index	10,71±0,23	<10
Hausner faktor	1,12±0,05	<1.25
Kopási veszteség	< 0,5%	<1%

Az optimalizált mikropelletek szemcseméret eloszlása monodiszperz. Az RRSB diagram szerint a jellemző szemcseméret (d) 36,8%-os szitamaradéknál 434,7±15,3 μm, az egyenletességi tényező $n=4,378$. A minták hatóanyag-leadását a 3. ábra szemlélteti.



2. ábra. Az optimalizált mikropelletek szemcseméretének linearizált RRSB eloszlása $R=0,9779$ korrelációval.



3. ábra. Mikropelletek hatóanyag-leadása

A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az optimalizált paraméterekkel előállított készítmény képes teljesíteni azokat a biofarmáciai és gyógyszer technológiai követelményeket, amelyek egy sikeres GIC terápia eljárását tesznek lehetővé.

5. Új eredményeim összefoglalása

Az előkísérletek és az optimalizációs kísérletek alapján a disszertációs munkám új eredményei a következők:

1. Kísérleteimben a propellerkeverő és a kötőfolyadék adagolási sebessége szignifikánsan befolyásolták a pelletek méretét nagy nyíróerejű pelletezés esetén.
2. A propellerkeverő forgatónyomaték-görbéje és a diffúz reflektancia mérések egyaránt felhasználhatók nagy nyíróerejű pelletezés folyamatközi vizsgálataira, külön kiemelve a művelet végpontjának meghatározását is.
3. A diffúz reflektancia mérések a mikropelletek felszíni sajátosságait is jellemezték, melyet SEM vizsgálatok támasztottak alá.
4. A direkt bioautográfiára alapuló mikrobiológiailag detektált kioldódás (MDD) vizsgálatok modellezték a *nisztatin* antifungális hatását.
5. Szoros korrelációt mutattam ki a spektrofotométeres hatóanyag-leadás vizsgálatok és az MDD eredményei között.
6. A kísérletek igazolták, hogy a mikropelletekben bioadhezív segédanyagokat alkalmazva (CPL és HEC) a pelletek nyálkahártyán való tartózkodási ideje szignifikánsan megnő.
7. Az optimalizálás eredményeként 50-55%-os bioadhéziós retenció és gyors kioldódás (MDT=5-10 perc) érhető CPL:HEC = 17:3 bioadhezív segédanyag-arány alkalmazásával.
8. Optimális pellet átlag átmérőnek az 550 µm-es méret bizonyult.
9. Összegezve az eredményeket a mikropelletek ajánlott optimális összetétele 550 µm-es átlag pellet méretet biztosítva a következő:
 - *nystatin* (5%)
 - *mikrokristályos cellulóz* (45%)
 - *α-laktóz-monohidrát* (45%)
 - *carbomer* (4.25%)
 - *hidroxietilcellulóz* (0.75%)

10. A nagy nyíróerejű, örvényáramú laborméretű mikropellet gyártás ajánlott optimális paramétereit:

- 1000 ml üveg pelletező edény
- 25°C-os kezdeti hőmérséklet
- 100.0 g nettó kiindulási porkeverék
- 3 perc gyártás előtti homogenizálás
- 5 min nettó pelletezési idő
- 1 perc utókeverés a teljes folyadékmennyiség adagolása után
- 24 óra szárítás a további feldolgozás előtt
- 500 ford./perc propellerkeverő sebesség
- 2000 ford./perc aprító kés sebesség
- 10ml/perc kötőfolyadék adagolási sebesség (tisztított víz)
- 50 ml teljes kötőfolyadék mennyiség

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

1. **Sz. Pál**, S. Nagy, T. Bozó, B. Kocsis, A. Dévay:
Technological and biopharmaceutical optimization of nystatin release from a multiparticulate based bioadhesive drug delivery system
European Journal of Pharmaceutical Sciences 49.2: 258-264.2013.
IF: 3.212
2. S. Nagy, B. Kocsis, **Sz. Pál**, T. Bozó, K. Mayer, A. Dévay:
Antifungális hatóanyagtartalmú bioadhezív mikropelletek vizsgálati tapasztalatai
XVI. Gyógyszer technológiai Konferencia és VIII. Gyógyszer az ezredfordulón
Konferencia, Siófok, 2010.
3. A. Dévay, B. Kocsis, **Sz. Pál**, K. Mayer, S. Nagy:
Quick detection of *Nystatin* from sustained release dosage forms using Microbiologically Detected Dissolution (MDD)
The 2nd BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, Tartu, 2007.
4. **Sz. Pál**, K. Mayer, I. Antal, A. Dévay:
Comparison of evaluation on pharmaceutical and biopharmaceutical properties of multiparticulate dosage forms using factorial design and artificial neural network
The 2nd BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, Tartu, 2007.
5. A. Dévay, K. Mayer, **Sz. Pál**, I. Antal:
Investigation on drug dissolution and particle characteristics of pellets related to manufacturing process variables of high-shear granulation
Journal of Biochemical and Biophysical Methods 69: 197-205.2006.
IF: 1.302
6. A. Dévay, S. Nagy, **Sz. Pál**:
MDD, új eljárás antibiotikumok kioldódásának vizsgálatára
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII., Budapest, 2006.
7. A. Dévay, S. Nagy, **Sz. Pál**:
Comparison of dissolution and microbiological thin layer chromatography detection of drugs containing antimicrobial drugs
5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Geneva, 2006.
8. A. Dévay, **Sz. Pál**, S. Nagy:
A mikrobiológiailag detektált kioldódási (MDD) módszer alkalmazása antifungális hatóanyag tartalom érzékeny és gyors vizsgálatára
Gyógyszerkutató Szimpózium, Debrecen, 2006.

9. A. Dévay, I. Antal, **Sz. Pál**:
Gyógyszeres mikropelletek formulálásának szempontjai
Gyógyszerkutató Szimpózium, Debrecen, 2006.
10. A. Dévay, K. Mayer, **Sz. Pál**:
Investigation of dissolution of active ingredient from micropellets
8th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, 2005.
11. A. Dévay, B. Kocsis, **Sz. Pál**, A. Bodor, K. Mayer, S. Nagy:
Application of a microbiological detection for investigation of dissolution of antibiotic
delivery systems
8th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, 2005.
12. A. Dévay, **Sz. Pál**, I. Antal:
Effect of process parameters on characteristics of *theophylline* containing pellets prepared
in high shear granulator
6th Central European Symposium on pharmaceutical technology and biotechnology,
Siófok, 2005.

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek,

Dr. Dévay Attilának

támogatásáért és folyamatos segítségéért, munkám során bátorítva a nehezebb időszakokban is, aki bevezetett engem a gyógyszer technológia és biofarmácia csodálatos világába.

Hálás vagyok a támogatásért családomnak és minden társszerzőmnek, akik segítettek munkámat. Köszönöm a PTE Gyógyszer technológiai és Biofarmáciai Intézet valamennyi munkatársának az önzetlen segítséget.