



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Tudományos Diákköri Dolgozat

2014

**Antipszichotikumok formulálása és *in vitro* analitikai
vizsgálati módszerei**

Készítette: Borbás Enikő

Témavezetők: Dr. Nagy Zsombor Kristóf

Dr. Marosi György

Dr. Balogh György Tibor

Konzulens: Müller Judit

Tartalomjegyzék

Bevezető	4
Szakirodalmi áttekintés	5
Szájnyálkahártyán alkalmazott gyógyszerkészítményekről általában.....	5
Szájnyálkahártyán alkalmazott gyógyszerkészítmények jelentősége az antipszichotikumok körében.....	5
Rossz vízoldhatóságú hatóanyagok a gyógyszerkutatásban, és ezek formulálási stratégiái .	6
A fajlagos felület szerepe	6
Amorfizáció, mint oldhatóság-növelési stratégia	8
Az elektrosztatikus szálképzés	8
A technológia fejlődésének történeti áttekintése	8
Az elektrosztatikus szálképzés, mint technológia.....	9
Az elektrosztatikus szálképzést befolyásoló paraméterek:	10
Ciklodextrinek mint gyógyszer-segédanyagok	11
Ciklodextrinek hatása a permeabilitásra	12
In vitro kioldódás vizsgálati módszerek áttekintése.....	13
A kioldódás vizsgálatok céljai, és előrejelzési képességeinek határai.....	13
Permeabilitás vizsgálatokról általában	16
A PAMPA vizsgálat változtatható paraméterei:.....	17
Az in vitro kioldódás-felszívódás szimultán modellezésének jelentősége a gyógyszerformulálásban	17
Felhasznált anyagok és módszerek	19
Felhasznált anyagok	19
Hatóanyagok	19
Risperidon.....	19
Aripiprazol.....	19
Ciklodextrin származékok.....	20
Szálképző polimerek	20
Egyéb segédanyagok:.....	21
Elektrosztatikus szálképzés.....	22
Film öntés.....	23
Pásztázó elektronmikroszkóp (Scanning electron microscopy SEM).....	23
Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC)	23
Röntgen diffrakció.....	23
In vitro kioldódás vizsgálat fecskendőben.....	24
PAMPA vizsgálat	25

A PAMPA mérés menete tiszta hatóanyag vizsgálata esetén	26
PAMPA mérés menete készítmények vizsgálata esetén:	27
In vitro kioldódás-felszívódás vizsgálatok	28
Célkitűzés	29
Aripiprazol tartalmú készítmény formálása elektrosztatikus szálképzéssel	31
<i>A kiindulási polimer oldat és a szálképzés paramétereinek optimalálása</i>	31
Amorfizáció vizsgálata DSC-vel:	33
Porröntgen vizsgálatok:	33
Kioldódás vizsgálatok	34
Szimultán kioldódás-felszívódás vizsgálatok	36
Risperidon tartalmú készítmények	42
Risperidon tartalmú készítmény formálása elektrosztatikus szálképzéssel és film öntéssel	42
Amorfizáció vizsgálata DSC-vel és porröntgen diffrakcióval:	42
Kioldódás vizsgálatok	43
Nagy áteresztőképességű formuláció kiválasztási/szűrési stratégia PAMPA segítségével:	45
Risperidon készítmények PAMPA vizsgálata	47
Szimultán kioldódás-felszívódás vizsgálatok μ flux feltétellel	48
Készítmények rangsorolása <i>in vitro</i> analitikai vizsgálataik alapján	52
Konklúzió	54
Irodalomjegyzék	56

Bevezető

A gyógyszeripar fejlődésének két fő mozgatórugója a betegek gyógyulásának elősegítése és a profit realizálása. A két rész aránya és viszonya vitatható, de a kettősség megléte adott. Ugyancsak bipolaritás jellemzi a skizofréniával és mániás depresszióval küzdő betegeket is, akik között számos csodálatos elme ingadozott az örület és zsenialitás határán.

Napjainkra a pszichés betegségek jól ismertté váltak és kezelésük több módszere elfogadott. Azonban továbbra is kihívás a gyógyszer technológia számára, hogy a rossz vízoldhatóságú antipszichotikumok formulását oly módon oldja meg, hogy azoknak biohasznosulása maximális legyen, és elfogadható gyógymódot biztosítson a hagyományos gyógyszeres kezelést visszautasító betegek számára is. Ezért szájnyalakártyán azonnal oldódó gyógyszerforma elkészítését tűztük ki célul.

Mindenknek a formulációs célnak a megvalósításához munkám során az oldószeres elektrosztatikus nanoszálképzést, mint készítménygyártási technológiát kívántam használni. A ciklodextrin tartalmú készítménymátrix alkalmazásával pedig a ciklodextrinek komplexképző, és így módon oldhatóság növelő tulajdonságát használtam ki.

Ezen formulációknál elengedhetetlen a hatóanyag gyors kioldódása és felszívódása. Azonban a gyógyszerkönyv mindössze a kioldódás vizsgálatok elvégzését írja elő, melyből a hatóanyagok biohasznosulására vonatkozóan nem vonhatunk le egyértelmű következtetéseket, hisz a kioldódást segítő adalékok: ciklodextrinek, polimerek negatív és pozitív irányba egyaránt képesek befolyásolni a biológiai membránokon keresztül történő transzportfolyamatokat. Így vizsgálataink tárgyát képezte a gyógyszerformulációk kioldódásának és szimultán felszívódásának in vitro modellezése is.

Szakirodalmi áttekintés

Szájnyálkahártyán alkalmazott gyógyszerkészítményekről általában

A szájnyálkahártyán alkalmazott gyógyszerkészítmények számos formája kapható a forgalomban, ilyenek a topikális (helyi) hatást biztosító száj- és toroköblítők, fogínypaszták vannak fogászati készítmények is, valamint a szisztémás hatást biztosító nyelvatti spray-k, a bukkális és szublingvális tabletták és a szájnyálkahártyához tapadó készítmények is¹.

Ez a hatóanyagbeviteli út azért rendkívül előnyös a szisztémás hatás elérésére, mert a bukkális, illetve szublingvális szöveteken át felszívódva a hatóanyag a *vena cava superior*-on (nagy véna felső szakasza) keresztül rögtön a szisztémás keringésbe kerül, elkerülve ezzel az elsődleges hepatikus átáramlást (máj átáramlás). Ennek a gyors hatás kifejtésében van szerepe, melyet például a szívbetegek kezelésében alkalmazott nitroglicerinnel tartalmú nyelvatti spray-k² esetében használ ki a gyógyászat. A gyors hatáson túl, a máj elkerülése azért is előnyös, mivel így a hatóanyag elsődleges metabolizmusa nem megy végbe, és ennek köszönhetően annak jelentős része hasznosul, miközben a májat is kevésbé károsítja. Emellett a gasztrointesztinális traktus pH változásaitól, és enzimikus bontó folyamataitól is megkímélhetjük ezúton a gyógyszermolekulát.

Összegzésül elmondható, hogy a biohasznosulása a hatóanyagnak jelentősen nagyobb ezen az úton, mint a gasztrointesztinális traktus más részeiről való felszívódáskor^{3, 4, 5, 6}. Természetesen ez alacsonyabb dózisok alkalmazását is lehetővé teszi, mely a beteg máját kevésbé károsítja, és a terápia költségeit is jelentősen csökkenti.

Szájnyálkahártyán alkalmazott gyógyszerkészítmények jelentősége az antipszichotikumok körében

A beteg együttműködés a mentális betegségekben szenvedők esetében erősen megkérdőjelezhető. A betegek nem ismerik fel, hogy kezelésre van szükségük, így ellenszegülnek az orvosi javaslatoknak, a felírt gyógyszer szedését megtagadják^{7, 8}. A leginkább elterjedt gyógyszerformák a tabletták bevitelét a beteg könnyen szabotálni tudja, szájjüregében elrejtetheti, majd később kiköpheti. A biztos kezelés érdekében, így gyakran a fájdalmas, invazív injekciók alkalmazását választják az orvosok. Ennek megfelelően a forgalomban lévő készítményekkel a fájdalommentes kezelés még nem minden esetben megoldott. Ezzel ellentétben jó alternatívát nyújthatnak a szájnyálkahártyán azonnal

megtapadó és felszívódó, gyors hatóanyag leadó készítmények, melynek előállításával kutatómunkám során foglalkoztam.

Rossz vízoldhatóságú hatóanyagok a gyógyszerkutatásban, és ezek formulálási stratégiái

A gyógyszerjelölt molekulák két fő fizikai-kémiai paramétere az oldhatósága és a permeabilitása, így e két jellemző alapján történik a Biofarmáciai Osztályozási Rendszerbe sorolásuk (Biopharmaceutical Classification System, BCS).⁹

- I. Osztály: jó oldhatóság, nagy permeabilitás
- II. Osztály: rossz oldhatóság, nagy permeabilitás
- III. Osztály: jó oldhatóság, kis permeabilitás
- IV. Osztály: rossz oldhatóság, kis permeabilitás

A jó oldhatóság kritériuma, hogy 250ml folyadékban (1-7,5-közötti pH tartományban) gyógyszermolekula legnagyobb dózisa is feloldható legyen, míg a permeabilitás jóságát a humán felszívódási érték 90% feletti értéke jelenti.¹⁰

Az utóbbi évtizedekben az originális kutatásban jelentős kihívásként merült fel, hogy gyógyszerjelölt molekulák többsége - egy 2006-os felmérés szerint a vegyületek 57%-a¹¹ - rossz vízoldhatósággal és nagy permeabilitással rendelkezik (BCSII), míg a forgalomban lévő gyógyszerhatóanyagok 31%-a is ebbe az osztályba sorolható¹¹. Ezen túlmenően becslések szerint az originális fejlesztésben lévő molekulák 80-90%-a tartozik ide.

A felfedező kutatás során a molekula kémiai átalakításával (vízoldható sók képzése, oldható profarmakon előállítása, poláris csoportok beépítése) próbálják javítani az oldhatóságát, azonban ez nem mindig célravezető, hiszen ezzel számos más fizikai-kémiai paraméter ($\log P$, olvadáspont is változhat), illetve hatástani változásokat is eredményezhet. Így gyakran a költséges és időigényes kémiai változtatások helyett gyógyszertechnológiai megoldások alkalmazása a legkedvezőbb megoldás.

A fajlagos felület szerepe

A molekulaszerkezet változtatását nem igénylő oldhatóság, illetve a kioldódást javító gyógyszerészeti módszerek fizikai-kémiai megértésében nyújt segítséget a Noyes-Whitney egyenlet¹²:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D \times A \times (C_s - C_t)}{h \times V}$$

ahol

dC/dt az oldódás sebessége,

D az anyag diffúziós állandója,

A az oldódás számára hozzáférhető felület,

C_s a hatóanyag oldhatósága az oldószerben,

C_t a hatóanyag koncentrációja a közegben t időpontban,

h a diffúziós határreteg vastagsága az oldandó anyagok határfelületének közvetlen közelében,

V a kioldó közeg térfogata.

Eszerint az oldódás sebessége egyenesen arányos az oldódás számára hozzáférhető felülettel, azaz a fajlagos felülettel. Ebből következően a fajlagos felület növelése a kioldódási sebesség növelésének egy kiváló stratégiája lehet. A fajlagos felület növelése a részecskeméret csökkentésével érhető el. A BCSII osztályú hatóanyagoknál ezt a gyógyszeripari gyakorlatban leggyakrabban mikronizálással érik el. Ezen technológiánál fontos megjegyezni, hogy a részecskék méreteloszlásának szűk tartományba kell esnie, hogy a kioldódás görbék reprodukálhatóak maradjanak, az oldódási tulajdonságaik ne változzanak.

A felületnövelés stratégiáját igazolja az Ostwald-Freundlich egyenlet is:

$$\ln \frac{S(r)}{S(r = \infty)} = \frac{2 \times M \times \gamma}{r \times \rho \times RT}$$

Ahol

$S(r)$: az r effektív sugarú, illetve $S(r = \infty)$ a makroszkópikus méretű részecskéhez tartozó oldhatóság

γ : felületi feszültség,

M : oldott anyag moláris tömege,

r : görbületi sugár (részecske effektív mérete),

R : egyetemes gázállandó,

T : abszolút hőmérséklet,

ρ : oldott anyag sűrűsége.

A részecske sugarának csökkentésével az egyenlet bal oldalán lévő kifejezés értéke nő, ami azt jelenti, hogy a részecske oldhatósága növekszik. Ebből következően a részecskesugár csökkentése pedig az oldhatóság növekedésével jár, ami elsősorban a szubmikronos tartományba válik jelentőssé. Így BCSII besorolású hatóanyagok esetén egyértelműen kedvező hatása van a részecskeméret csökkentésének.

Amorfizáció, mint oldhatóság-növelési stratégia

A szilárd anyagok lehetnek kristályos vagy amorf állapotban. A kristályos szerkezet hosszú távú rendezettséggel jellemezhető, míg az amorf formát a rendezetlenség, legfeljebb rövid távú rendezettség jellemzi¹³. Egy vegyület amorf formája az összes szilárd módosulata közül a legmagasabb energiaszintet képviselő forma, amiből következik, hogy ez a legkevésbé stabil módosulat¹⁴. Az amorf forma magas energiaszintjének egy lehetséges magyarázata, hogy a kristályos formával ellentétben, ebben az esetben hiányoznak a kristályrácsot összetartó erők. Így az amorf hatóanyag oldása közben nem kell befektetni a kristályrács felbontásához szükséges energiát. Ebből következően rendkívüli a jelentőségük a gyógyszerformulálásban rossz vízoldhatóságú hatóanyagok esetén, hisz az amorf forma termodinamikai oldhatósága a legnagyobb¹⁵. Bár oldhatósága alapján a legkedvezőbb az volna, ha a hatóanyagot amorf formában gyártanák, stabilitási problémák felmerülhetnek tárolás során. Gyakran alkalmazott megoldás, hogy a kristályos hatóanyag előállítását követően valamely formulációs technológia segítségével amorfizálják a vegyületet. Ilyen technológiák például a liofilizálás, a porlasztva szárítás, és az elektrosztatikus szálképzés is¹⁶. A kristályosodás gátlására ezért sok esetben alkalmaznak polimer segédanyagokat.

Az elektrosztatikus szálképzés

A technológia fejlődésének történeti áttekintése

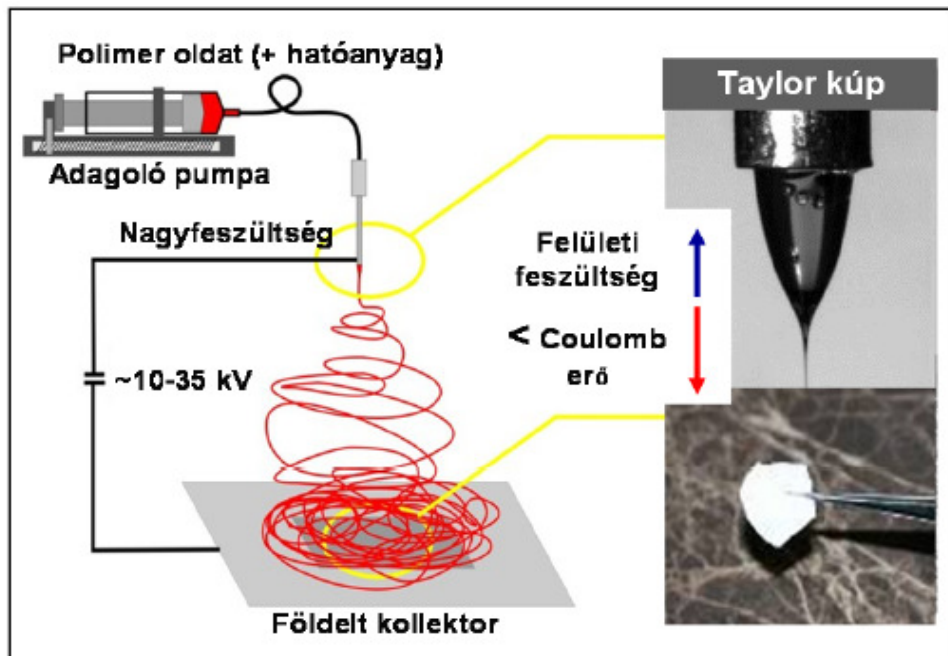
Az elektrosztatikus szálképzést, mint technológiát alig több mint egy évszázada szabadalmaztatta John F. Cooley (1899). Bár a fizikai jelenség matematikai leírását már az 1910-es években elkezdte Zeleny¹⁷, első ipari felhasználásra csak húsz évvel később került sor Anton Formhals munkásságának köszönhetően. Formhals a textil iparban alkalmazta ezt a technológiát a fonalgyártásban. A XX. század derekán hadiipari alkalmazást is nyert a Szovjet Unió területén, ahol ultrafinom szűrőket gyártottak gázmaszkokba elektrosztatikus szálképzéssel. Később egy amerikai szűrőgyártó (Donaldson) használta ezt a technológiát

levegőszűrők gyártására. Az utóbbi évek újdonsága, hogy forgalomba került az első elektroszálképzett nanoszál alapú kompozitból készült horgásbot¹⁸.

A gyógyászatban elsőként sebfehérítés céljából alkalmazták ezt a technológiát¹⁹. Azonban harmincévnyi kutatás után, ma már CE jelöléssel forgalomba kerülhetett az első szervezetbe beültethető érhelyettesítő szövet, melyet elektrosztatikus szálképzéssel gyártanak²⁰.

Az elektrosztatikus szálképzés, mint technológia

Az eljárás során polimer oldatot vagy olvadékot²¹ adagolnak egy fém tű hegyére, mely nagy feszültségre (10-35kV) van töltve. Ezzel a tűheggyel szemben egy földelt gyűjtő található, mely legegyszerűbb esetben egy fém lemez. Így egy elektromos erőteret hozunk létre a tű és a gyűjtő között. A polimer oldat vagy olvadék a nagy feszültség hatására feltöltődik, és a folyadék a tű hegyén kúp alakot képez, melyet a jelenséget tanulmányozó kutatóról Taylor-kúpnek neveztek el. Amikor a folyadék kúpra ható Coulomb erő nagysága meghaladja a felületi feszültségét, akkor spirális pályán folyadéksugár indul el a tűhegyről a földelt gyűjtő felé. Amíg a folyadéksugár eléri a kollektort, a gyors felületnövekedés miatt a polimer oldat oldószere elpárolog, így módon a gyűjtőn szilárd halmazállapotú nem szőtt szöveteket kapunk. (1.ábra)



1. ábra: az elektrosztatikus szálképzés sematikus rajza

Az elektrosztatikus szálképzést befolyásoló paraméterek:

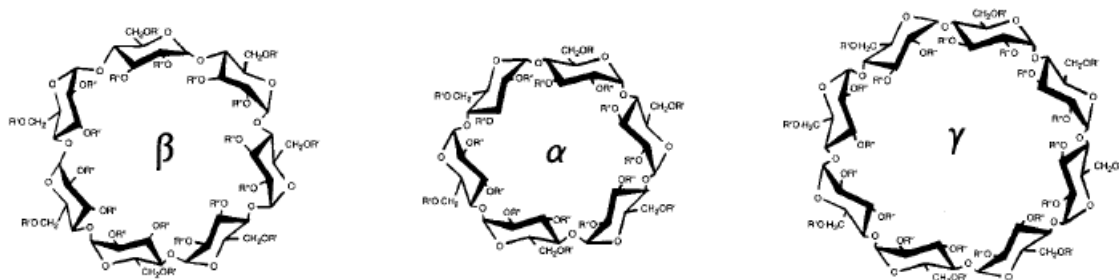
A szálképzést befolyásoló paramétereket három nagyobb csoportra oszthatjuk: az oldat, a folyamat, és a környezeti paraméterekre.²² Az oldat paraméterei közül nagy jelentőséggel bír a polimer koncentráció. Amennyiben a polimer koncentráció túl kicsi, a szálképzés helyett elektrosztatikus porlasztás valósul meg, ami azt jelenti, hogy gömb alakú részecskék gyűlnek a kollektoron. Ha töményebb oldatot készítünk a szálképzés már megvalósul, azonban apró gyöngyök (angolszász irodalomban bead), dudorok jelennek meg a szálaikon. Még tovább emelve a koncentrációt a szálaik kisimulnak,^{23,24,25} míg túl tömény oldat esetén hélix- alakú szalagok jönnek létre.²⁶ A polimer molekulatömege is jelentősen befolyásolhatja a szálaik morfológiáját. Megfigyelések szerint a koncentráció állandóan tartása mellett, ha a molekulatömeget csökkentik, a rendszerben több dudor alakul ki a szálaikon.²⁷ A viszkozitás is meghatározó lehet a polimer oldat esetén, azonban ez a paraméter összefüggésben van a koncentrációval és a molekulatömeggel is. Túl alacsony viszkozitás gyöngyökkel párosult szálaik kialakulásához vezet.²⁸ Az oldat paramétereihez tartozik még a felületi feszültség és a felületi töltéssűrűség is, melyek változtatásában az oldószerválasztásnak lehet nagy szerepe. Az oldószernek ezen felül elég illékonynak is kell lennie ahhoz, hogy pillanatszerűen elpárologjon, míg a polimer szál a gyűjtőre ér. Így legtöbb esetben alacsony forráspontú szerves oldószerek használata a kedvező, azonban vízzoldható polimerek esetén víz is alkalmazható, ez esetben szerves koszolvens használata előnyös lehet, mely az illékonyt javítja. (lásd : Aripiprazol kísérleti rész).

A folyamat paramétereihez tartozik az alkalmazott feszültség a tűhegy és a gyűjtő között. Ahhoz, hogy a szálképzés végbemenjen egy bizonyos küszöbfeszültség elérése szükséges, azonban az e feletti feszültségváltoztatás hatása a szálak átmérőjére vitatott a szakirodalomban²⁹. Az adagolás sebességének is nagy hatása lehet a szálmorfológiára, általánosságban elmondható, hogy a lassabb adagolás simább, vékonyabb szálaikat eredményez, mint a gyorsabb.³⁰ A gyűjtő és a tűhegy közötti távolság ugyancsak képes befolyásolni a technológiát, ezt a távolságot teszik meg a nanoszálak a gyűjtőig, és ezalatt az oldószernek maradéktalanul el kell párolognia ahhoz, hogy szilárd és ép terméket kaphassunk a kollektoron.

Környezeti paraméterekként a hőmérséklet és a páratartalom merülhet fel, mint zavaró tényező.^{31, 32}

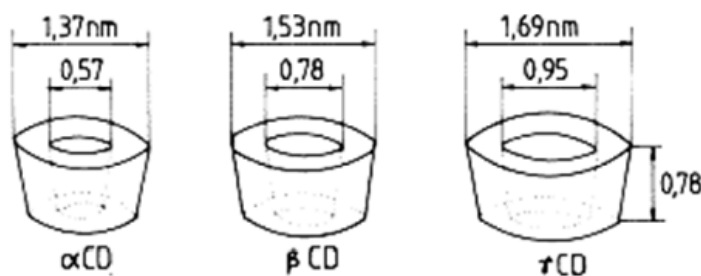
Ciklodextrinek mint gyógyszer-segédanyagok

A ciklodextrinek ciklikus oligiszacharidok, melyek D-glükóz egységekből α -(1,4)-glikozid kötésekkel keresztül épülnek fel. A D-glükóz egységek száma (6, 7, vagy 8) szerint α , β és γ -ciklodextrinekről beszélünk. A gyűrűk térben kónusz (csonkakúp) alakúak, melynek belsejében apoláris üreg található. A gyűrűtagszámtól függően az üreg mérete is változik. (3.ábra) A CD-k ezen apoláris üregükben képesek molekularészeket, vagy teljes molekulákat komplexálni.



2.ábra

A natív ciklodextrinek glükopiranoz egységenként két szekunder és egy primer hidroxil csoportot tartalmaznak, melyek a gyűrűket kívülről hidrofíllá teszik. Szubsztitúció révén ezek a csoportok módosíthatóak, így szerkezeti, fizikai-kémiai tulajdonságaik finomhangolhatóak.



3.ábra

A CD-k apoláris üregüknek köszönhetően képesek zárványkomplexek kialakítására, melyek oldhatósága többszöröse lehet a vendégmolekula oldhatóságának.³³ Ezen tulajdonságuk miatt a gyógyszerformulálás területén széles körben alkalmazzák a BCS II és BCS IV-es osztályú

gyógyszerhatóanyagok oldhatóságának javítása céljából. Gyógyszerkönyvben bejegyzett szubsztituált ciklodextrinek a hidroxipropil- β -ciklodextrin (HP- β -CD) és a szulfobutil-éter- β -ciklodextrin (SBE- β -CD).

Magyar kutatók korábban már vizsgálták az Aripiprazol formálását zárványkomplekként ciklodextrinekkel³⁴. Az oldhatósági izoterma meghatározásakor a szulfobutil-éter- β -CD-t találták leghatékonyabb oldhatóságnövelőnek.

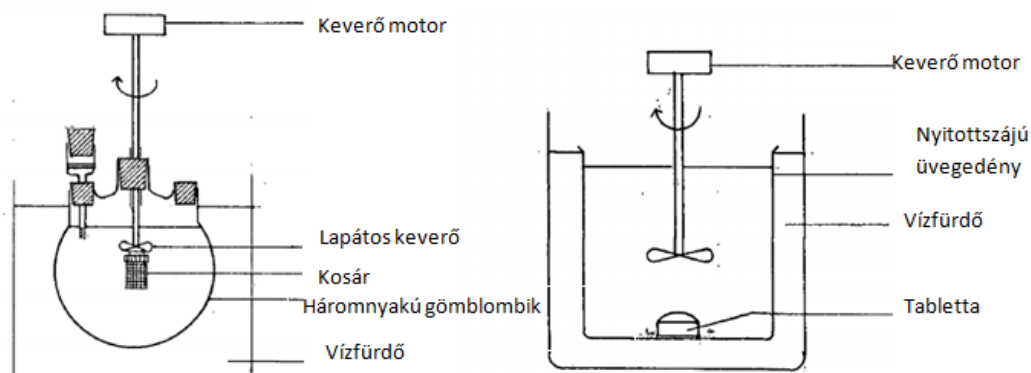
Risperidon antipszichotikus hatású hatóanyag formulálására szintén több kísérletet tettek annak érdekében, hogy nazális alkalmazása is lehetővé váljon. Ezen készítmények fejlesztése során a hatóanyagot hidroxipropil- β -ciklodextrinnel komplexálták, és a ciklodextrin valamint a vendégmolekula közt a legerősebb komplexképzési állandót pH=6.0-on mérték³⁵. Azonban ettől a pH-tól 2 pH egységgel bármely irányban eltérve már drasztikus csökkenés látszik a komplexált molekulák számát tekintve. Ebből az vonható le következtetésként, hogy a Risperidon ciklodextrines formulációját sokkal előnyösebb lehet bukkális úton adagolni a betegeknek, hiszen a szájüreg pH-ja 6,8 körüli, míg a megszokott *per os* adagolás során a gyomorba jutva 1-2 pH-n a komplexálás hatékonysága ennek csak töredéke lehet.

Ciklodextrinek hatása a permeabilitásra

A ciklodextrin hatása a permeabilitásra igencsak vitatott. A progeszteron esetében egyértelműen kimutatták *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel is, hogy a ciklodextrin jelenléte bár az oldhatóságot jelentősen növeli, a permeabilitást lerontja.³⁶ Ezzel ellentétben más szakirodalmi források a ciklodextrinek a felszívódási jellemzőkre gyakorolt pozitív hatásáról számolnak be³⁷. Ezen jelenség mechanizmusát a kutatók már régóta vizsgálják. Egyik lehetséges magyarázat, hogy a zárványkomplex a lipofil membránhoz szállítja a vendégmolekulát, ahol az ciklodextrin nélkül át tud jutni a biológiai membránon, melynek integritása lecsökkent annak köszönhetően, hogy a benne lévő koleszterint és szfingomielint a ciklodextrinek komplexálni képesek.³⁸ Egy másik elmélet szerint azonban a ciklodextrinek permeabilitást csökkentő és növelő hatása egyaránt magyarázható a “nem kevert vízfázis” elmélettel.³⁹ Eszerint, a CD-knek csak akkor lehet permeabilitás növelő hatása, ha “nem kevert vízfázis” alakul ki a membrán és a vizes tömbfázis között, mely a permeáció limitáló tényezője. Amennyiben ez a feltétel teljesül, a ciklodextrin-hatóanyagarány fogja meghatározni, hogy a felszívódásra pozitívan vagy negatívan hat a CD, ugyanis egy bizonyos kritikus CD koncentráció felett a hatóanyag biohasznosulása leromlik.

***In vitro* kioldódás vizsgálati módszerek áttekintése**

Az első kioldódás vizsgálat Noyes és Whitney nevéhez kötődik, melynek eredményeképpen született a róluk elnevezett egyenlet (lásd:1.képlet). A kioldódás vizsgálatokra alkalmas kioldó készülékek lényegében a tabletták szétesés vizsgálatát végző készülékekből fejlődtek ki.⁴⁰ 1960-1970 között fejlesztette ki Searl és Pernarowski a kosaras módszert (4.ábra) és Levy és Hayes a lapátos keverős módszert (4.ábra).



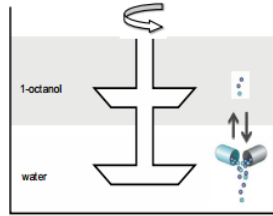
4.ábra: kosaras és lapátos keverős kioldó készülék

A mai USP (U.S. Pharmacopeial Convention) szabványban mind a hagyományosnak mondható lapátos, és a kosaras kioldó készülék, mind az újabb változatok is megtalálhatók. A gyors, a késleltetett és a nyújtott hatóanyagleadású szilárd gyógyszerformákra a szabvány a kosaras, lapátos és cilinderes technikát, míg a transzdermális gyógyszerkészítmények tesztelésére egyéb speciális forgó korongos elrendezéseket javasol.

A kioldódás vizsgálatok céljai, és előrejelzési képességeinek határai

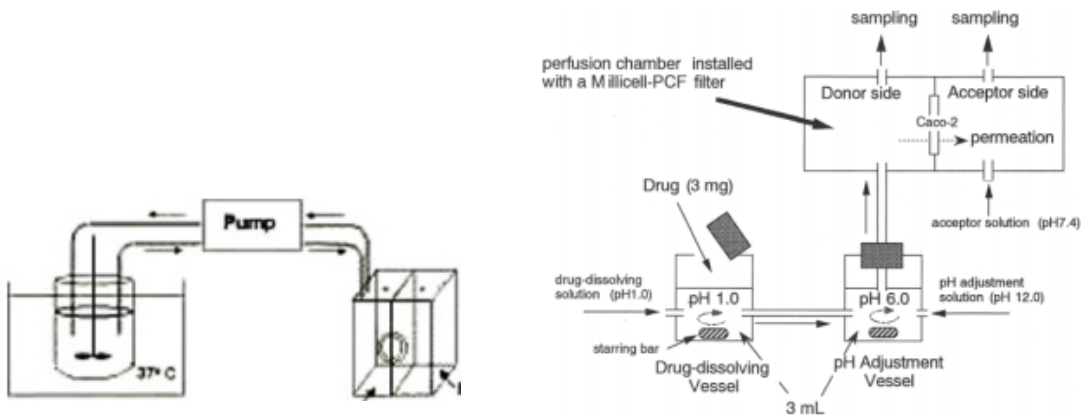
A kioldódás vizsgálatokat két alapvető célból végezhetik. Az egyik gyakorlatias ok a mérések szükségességére a minőség ellenőrzés. A manapság egyre szigorodó gyógyszeripari előírások miatt szükség van arra, hogy a tabletták hatóanyagtartalma, szétesési ideje, és kioldódás görbéjét is ellenőrizzék. Emellett szintén a minőségbiztosításban tölt be fontos szerepet a tabletták stabilitásvizsgálata, melynek során bizonyos időtartamig tárolt minták minőségét ellenőrzik az eredeti és a tárolt minták kioldódásgörbéinek összehasonlításával. Nemcsak ugyanazon termék időbeli változásainak nyomonkövetésére, de ugyanazt a hatóanyagot tartalmazó különböző készítménymátrixú termékek bioekvivalencia vizsgálatára is alkalmazzák.⁴¹ Ezeket a vizsgálatokat tehát mind a minőségellenőrzés alá sorolhatjuk.

Egy másik fontos célja a kioldódás vizsgálatok elvégzésének, hogy a kioldódási görbéből a hatóanyag szervezetbeli viselkedésére tudjunk következtetni. Az *in vitro* és *in vivo* (IVIVC) eredmények kapcsolata azonban közel sem egyértelmű, és kevéssé általánosítható. Ebből fakadóan is szükség van a gyártásban alkalmazott ugyan egyszerű, és jól reprodukálható, de biorelevanciáját tekintve megkérdőjelezhető kioldódás vizsgálatok átgondolására.⁴² Elsőként említhetjük, hogy a kioldóközeg az emberi szervezetben meg sem közelíti a 900 ml-t, ami a legtöbb előírásban szerepel,⁴³ és a rendelkezésre álló közegek sem egy térben, hanem kis üregekben helyezkednek el.⁴⁴ Megfontolandó a kioldóközeg megválasztása is, hiszen a pufferek széles választéka áll rendelkezésünkre⁴⁵. Vizsgálhatjuk standard gyomor és bélnedvben (Simulated Gastric Fluid (SGF), Simulated Intestinal Fluid (SIF)), mely tartalmazhat enzimeket is, vízben, illetve felületaktív anyagokat tartalmazó közegben is. Emellett az éheztetett és az étkezés utáni állapotot modellező (FaSSIF, FeSSIF) pufferek használata is lehetséges. Ezen különböző pufferekben oldva a hatóanyagot a kioldódás görbékben jelentős eltérések mutatkoznak⁴⁶. Azonban nemcsak egy kioldóközeg megválasztása lehet kérdéses, hanem az is, hogy a szervezetben pH gradienssel is találkozunk a gyógyszermolekula, mely az oldhatóságát jelentősen befolyásolhatja, esetleges bomlását is okozhatja, ezért a legújabb kioldókészülékek már pH változtatásra is képesek.⁴⁷ Összességében a mai kioldó rendszerekről elmondható, hogy bár a tabletta szétesés és kioldódás jól reprodukálhatóan vizsgálható velük, és a pH gradiens alkalmazása, illetve az ételek és italok hatásának vizsgálata még fejlesztések tárgya, a felszívódást, a szilárd anyag transzfert és a kiürülést a szervezetből ezek a módszerek nem veszik figyelembe.⁴⁸ Ezen problémák megoldására számos javaslat született. Elsőként a felszívódás figyelembevételére helyeződött a hangsúly. A legegyszerűbb, mégis jelentős *in vitro-in vivo* korreláció javulást eredményező elrendezés a kioldó közeg fölé rétegzett n-oktanol volt.⁴⁹ A tabletta először feloldódott a kioldóközegben, majd a hatóanyag átoldódott a n-oktanolos fázisba, ezzel modellezve a membránba történő felszívódást. Ezen módszer analitikája azonban nehézkes, mivel a n-oktanol és a vizes fázis intenzív kevertetés hatására könnyen emulziót képez egymással.



5.ábra: víz – n-oktanol kétfázisú kioldó készülék

A kioldódás és felszívódás szimultán modellezésére, mely sejtes vizsgálatot is magába foglal, már 1999-ben voltak elképzelései Mark J. Ginskinek. Az ő rendszere a kioldó készüléket egy pumpa segítségével kötötte össze egy Caco-2 cellával (7.ábra), mely egy élő sejtes permeabilitás vizsgálatra alkalmas modellrendszer.⁵⁰ Ennél bonyolultabb elképzelések is születtek melyek a pH gradienst és a felszívódást is figyelembe vették, mint Kobayashi (8.ábra) elképzelése.⁵¹ Talán a legfuturisztikusabb elképzelés Paul A. Dickinsoné, aki az egész emberi gasztrointesztinális traktust kívánja csőrendszerben féligáteresztő membránok segítségével modellezni.⁵²

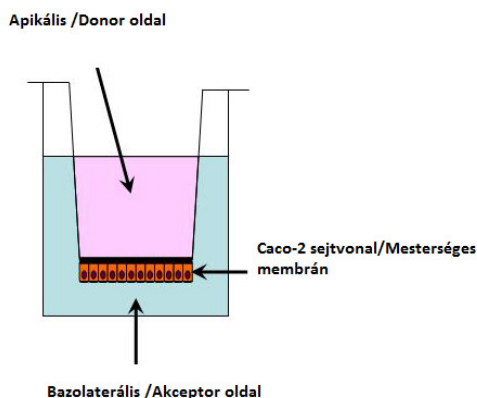


7. ábra: kioldó-Caco-2 összekötött rendszer 8. ábra: Kobayashi elképzelése

Meg kell azonban találnunk az egyensúlyt a reprodukálható, könnyen kivitelezhető kioldódás vizsgálatok és a bioreleváns mérések között, hisz minél több biológiai jelenséget igyekszünk egyszerre vizsgálni, a mérés annál kevésbé lesz megismételhető és analitikailag követhető. Egy ilyen racionális kompromisszum a Caco-2 sejtes vizsgálat helyett mesterséges membránok alkalmazása, azaz PAMPA (Paralell Artificial Membrane Permeability Assay) vizsgálatok kivitelezése.

Permeabilitás vizsgálatokról általában

A permeabilitásból, mint fizikai-kémiai paraméterből lehet leginkább a gyógyszermolekulák későbbi *in vivo* felszívódási tulajdonságaira következtetni. Ebből fakadóan a gyógyszerkutatás korai fázisában alkalmazzák a permeabilitás vizsgálatokat a gyógyszerjelölt molekulák szűrésére. Bár többféle sejtes és nem-sejtes vizsgálat került kidolgozásra (MDCK, Franz-diffúziós cella) manapság a Caco-2 és PAMPA vizsgálatok használata a legelterjedtebb.



9. ábra: Caco-2/ PAMPA vizsgálatok sematikus ábrája

A permeabilitás vizsgálatok sematikus elrendezése a 9. ábrán látható. Az apikális vagy donor oldalon a vizsgálandó hatóanyag oldata található az adott felszívódási körülményre jellemző pH-jú pufferben, ami szájnyálkahártya esetében az emberi nyálát modellező 6,8-as pH-jú puffert jelent. A bazolaterális/akceptor oldal az emberi véráramot jelképezi, így itt 7,4-es pH-jú foszfát puffert alkalmaznak. A két oldal között Caco-2 vizsgálat esetén human adenokarcinóma sejtréteget helyeznek el, míg PAMPA vizsgálat esetében egy mesterséges PVDF lapra felvitt apoláris szerves oldószer (n-dodekán, n-hexadekán) vagy lipidek szerves oldószeres oldata szolgál membránként. A PAMPA vizsgálatok membránjai tehát nem tartalmaznak aktív transzportereket, melyek segítenék vagy gátolnák a gyógyszermolekulák felszívódását. Ebből adódóan csak és kizárólag a passzív transzporttal történő felszívódást képesek modellezni. Ez azonban a szájnyálkahártyán át történő transzportfolyamatok vizsgálata esetében általában nem jár információvesztéssel, hiszen a bukkális felszívódás során a passzív transzport dominál az aktív felett.⁵³ A PAMPA vizsgálatok analitikai követhetősége, reprodukálhatósága, költség és időigénye is mind emellett a mérési módszer mellett szólnak, de döntő érv lehet mellette a vizsgálatok nagy áteresztőképessége is, hiszen ez a mérés 96 lyukú mérőtálcán végezhető és teljes egészében automatizálható.

A PAMPA vizsgálat változtatható paraméterei:

Ezen technika során a membrán összetétele könnyedén változtatható. A kezdetben alkalmazott tiszta szerves oldószerekhez képest, ma már szövetspecifikus lipidösszetételek alkalmazására is van példa,⁵⁴ mely ennél a technikánál is jól jelzi, hogy a bioreleváns mérési körülmények biztosítása felé próbálnak elmozdulni a kutatók. Emellett úgynevezett “sink” körülmények alkalmazása is ezt a törekvést segíti, ami lehet a pH gradiens, a donor és akceptor oldal közötti térfogatkülönbség, kevertetés, vagy az akceptor oldalon a hatóanyag oldhatóságát növelő felületaktív anyagok vagy szérum-albumin használata.⁵⁵

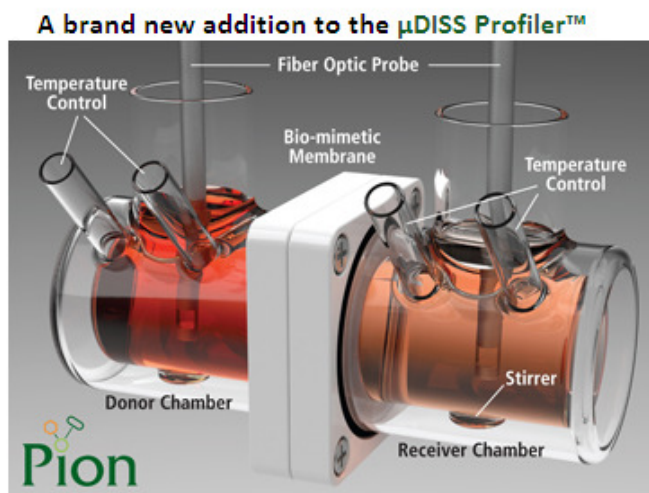
A mérőtálcák inkubálási ideje és hőmérséklete is fontos változtatható körülmény,⁵⁶ a vizsgálataink során 37°C-on, az emberi test hőmérsékletén, 4 órás inkubálási idő mellett mértünk.

Az in vitro kioldódás-felszívódás szimultán modellezésének jelentősége a gyógyszerformulálásban

A kioldódás-felszívódás modellezés háttérében tehát a biorelevancia keresése áll, mint fő, elméleti mozgatórugó, azonban a gyakorlatban gyakran előforduló gyógyszerformula rangsorolási nehézségre is megoldást nyújthat azáltal, hogy a készítmények között bioreleváns különbséget tesz. Ilyen eset például a készítmények kioldása során instabil túltelített oldatok létrejötte, melyekből a hatóanyag kicsapódása könnyen megtörténhet hagyományos *in vitro* kioldódás vizsgálat során, míg *in vivo* vizsgálatnál a felszívódás jelentősen csökkentheti a túltelítettséget, így a kicsapódás valószínűségét. Ezért olyan *in vitro* kioldódás-felszívódás vizsgáló módszer alkalmazása nagyon hasznos volna, mely tudja kezelni ezt a gyakorlati kihívást. E kihíváson túlmenően a készítmények mátrixa tartalmazhat olyan segédanyagokat, melyek az oldhatóságon kívül a permeabilitásra is hatással vannak. Ilyenek lehetnek polimerek és az oldhatóságnövelő adalékként gyakran alkalmazott ciklodextrinek is (lásd ciklodextrinek hatása a permeabilitásra). Emellett a hatóanyag ionizáltsága az adott pH-jú környezetben is jelentősen befolyásolja a hatóanyag permeabilitását, ugyanis a hatóanyagok neutrális formája rendelkezik a legjobb permeabilitással⁵⁷, az ionizált forma csak nehezen jut át a lipofil membránokon. Amennyiben a mátrix ciklodextrint is tartalmaz, a hatóanyag ionizáltsága hatással lehet a ciklodextrin-hatóanyag komplex stabilitására. Attól függően, hogy az ionos forma képes-e másodrendű kölcsönhatások létesítésére a ciklodextrinnel, stabilizálhatja a komplexet, vagy éppen

ellenkező esetben a töltéssel rendelkező hatóanyag affinitása csökkenhet a ciklodextrin lipofil üregéhez, azaz destabilizálja a komplexet.⁵⁸

Ilyen összetett formulációk vizsgálatánál, összehasonlításánál, tehát valóban nélkülözhetetlen kioldódás és felszívódás szimultán modellezése. Ez a vizsgálat a formulációfejlesztés terén kiemelkedően nagy segítséget nyújthat a kutatók számára a készítménymátrix optimálása során.⁵⁹



10.ábra: Pion μflux feltét

A készítményfejlesztés területén felmerülő igényre válaszul született meg a 10. ábrán látható készülék, mely mindössze 2013 végén került bemutatásra, és feltétként alkalmazható a Pion cég kis volumenű automata kioldó készülékéhez (μdissolution profiler). A temperálható köpennyel rendelkező két üvegből készült cella, a donor és az akceptor cella, melyek között egy mesterséges membrán helyezkedik el. A donor oldal alkalmas tabletták, vagy egyéb gyógyszerformák elhelyezésére, melyekből a kioldódott hatóanyag koncentrációját, illetve az átjutott hatóanyag hányadát UV szondával lehet detektálni.

Felhasznált anyagok és módszerek

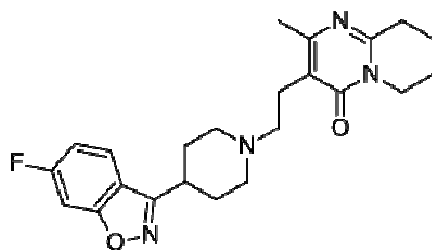
Felhasznált anyagok

Hatóanyagok

Munkám során antipszichotikumok formulálásával foglalkoztam, melyeket mániás depresszió és skizofrénia kezelésére alkalmaznak a gyógyászatban.

Risperidon

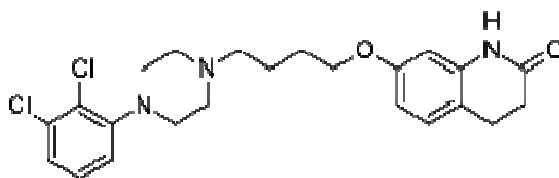
1994 óta Risperdal néven forgalmazott hatóanyag, mely egy második generációs atipikus antipszichotikum.



11.ábra: Risperidon szerkezeti képlete

Aripiprazol

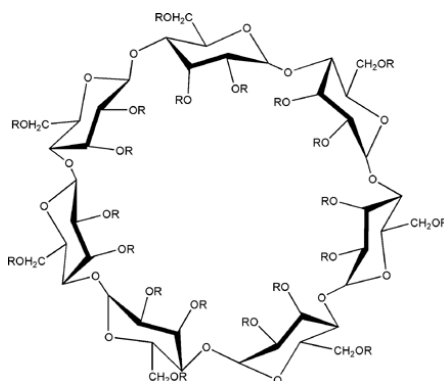
2002 óta kapható a forgalomban tabletta és injekció formájában is, az amerikai piacon óriási bevételre szert tett hatóanyag.



12.ábra: Aripiprazol szerkezeti képlete

Ciklodextrin származékok

Munkám során a gyógyszerkönyvben is engedélyezett komplexképzőket használtam: a szulfobutil-éter- β -ciklodextrint az Aripiprazol, és a hidroxipropil- β -ciklodextrint a Risperidon formulálása céljából.

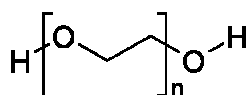


13.ábra: szulfobutil-éter- β -ciklodextrin ($R=-(CH_2)_4SO_3Na$),
hidroxipropil- β -ciklodextrin ($R=-CH_2-CH_2-CH(OH)-CH_3$) szerkezeti képlete

Szálképző polimerek

A szálképző polimer kiválasztásakor elsődleges szempont, hogy oldódjon abban a vizes közegben, amiben a készítményt a beteg alkalmazza, és ezen felül oldódnia kell az elektrosztatikus szálképzéshez használt segédoldószerben is, ami a hatóanyagból és a polimerből homogén oldatot képes készíteni. Munkám során az Aripiprazol hatóanyaghoz poli-etilén-oxidot, míg a Risperidonhoz poli-vinil-pirrolidont alkalmaztam, melyek gyógyszerkönyvi polimerek.

Poli-etilén-oxid(PEO)



14.ábra: poli-etilén-oxid szerkezeti képlete

A 13.ábrán látható szerkezetű polimereket molekulatömegtől függően nevezhetjük poli-etilén-oxidnak vagy poli-etilén-glikolnak. 20 000 g/mol feletti molekulatömeg esetén poli-

etilén oxidról beszélünk. Kísérleteim során 1, 2, 4, és 7 millió g/mol-os molekulatömegű PEO-t használtam fel. Ez a polimer jó vízdoldhatóságú, valamint etanolban is oldódik, így az elektrosztatikus szálképzés során etanol-víz 1:2 arányú elegyében oldottam fel.

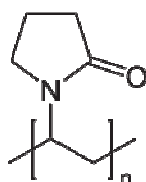
PEO fizikai tulajdonságai:

Megjelenése: fehér, porszerű

Üvegesedési hőmérséklet: -53-45 °C

Olvadáspont: 66-75°C

Poli-vinil-pirrolidon(PVP)



15.ábra: poli-vinil-pirrolidon szerkezeti képlete

A Risperidon formulálása során PVP K90 típusú polimert használtam, mely jó vízdoldhatóságú és etanolban is kiválóan oldódik. Így a szálképzés segédoldószereként abszolút etanolt alkalmaztam.

PVP K90 fizikai tulajdonságai:

Megjelenése: fehér, porszerű

Üvegesedési hőmérséklet: ~150 °C

Olvadáspont: 225 °C

Egyéb segédanyagok:

Citromsav

A citromsav gyógyszerek ízfedésére gyakran használt gyógyszerkönyvi adalék, melyet munkám során az Aripiprazol tartalmú kényítmény pH-jának csökkentésére használtam, kihasználva a hatóanyag oldhatóságának pH függését.

Elektrosztatikus szálképzés

Az elektrosztatikus szálképzéshez először a homogén polimer oldatot készítettem el, mely a polimert, a hatóanyagot és a ciklodextrint tartalmazta.

Minta neve	hatóanyag tartalom%	polimer tartalom%	CD tartalom %	citromsav tartalom%	oldószer
ARP/PEO/SBECD	4,5	0,75	89	2	EtOH/víz
Risp/PVP/HPBCD	10	2,5	34	0	EtOH
Risp/PVP	10	2,5	0	0	EtOH
Risp/HPBCD	10	0	90	0	EtOH

1.táblázat: Polimer oldatok összetétele(hatóanyag, CD és citromsav tartalom a mátrix szilárdanyag taralmára vonatkoztatva m/m%-ban, a polimer tartalom az oldószerre vonatkoztatott V/V%-ban)

Ezután a polimer oldatot fecskendőbe töltöttem, amiből egy digitális szivattyú adagolta folyamatosan a nagyfeszültségre kötött tűhegyre gumi csövön keresztül. A szivattyú adagolási sebessége fokozatmentesen 0,1 ml/h változtatható. A nagy feszültséget a NT-35 típusú (MA2000, Nagykanizsa) tápegység biztosította. Kollektor gyanánt egy alumínium fóliával letakart fém lapot használtam, melynek távolságával a térerősséget a tűhegy és a gyűjtő között változtattam. 15-50 cm között változtattam ezt a távolságot figyelembe véve, hogy a távolság növelésével az oldószernek több ideje marad az elpárolgásra, ez vizes, nehezen illó polimer oldat használata esetén a termelést jelentősen befolyásolhatja.

A fehér, vattaszerű termék az alufóliáról könnyen eltávolítható volt csipesz és spatula segítségével.



16.ábra: Elektrosztatikus szálképző berendezés

Film öntés

A polimer oldatot elkészítettem, majd szilikon öntőformába öntöttem és 24 órán keresztül szárítószekrényben 60°C-on tároltam, amíg az oldószer el nem párologott és szilárd polimer filmet kaptam. Ezt a szilikon formából kivéve dörzsmozsárban porítottam.

Minta neve	hatóanyag tartalom%	polimer tartalom%	CD tartalom%	oldószer
Risp/PVP/HPBCD	10	2,5	34	EtOH

2.táblázat: kiindulási polimer oldat összetétele (hatóanyag és CD tartalom a mátrix szilárdanyag taralmára vonatkoztatva m/m%-ban, a polimer tartalom az oldószerre vonatkoztatott V/V%-ban)

Pásztázó elektronmikroszkóp (Scanning electron microscopy SEM)

A vizsgálat előtt a mintákat kétoldalú szén-ragasztóval réz tuskókhoz rögzítettem, majd JEOL 1200 típusú berendezéssel aranyoztam, amire azért volt szükség, hogy a minták felületéről a töltés könnyen elvezetődjön, így tisztább kép készíthető. JEOL JSM-6380LA típusú pásztázó elektronmikroszkóppal készítettem a felvételeket az elektrosztatikusan szálképzett mintáimról miközben 15 kV gyorsító feszültséget és 10 mm-es mintatávolság alkalmaztam nagy vákuumban.

Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC)

Setaram DSC92 típusú differenciál pásztázó kaloriméterrel végeztem el az elektrosztatikusan szálképzett minták és azok alkotóinak vizsgálatát. A bemérések 10-20 mg között változtak. A hőmérsékletprogram 25°C és 200°C közötti fűtést biztosított, nitrogén atmoszférában, 10°C/perc fűtési sebesség mellett.

Röntgen diffrakció

PANalytical (Amelo, the Netherlands) X'pert ProMDP Röntgen diffraktométerrel végeztem a méréseket, mely Cu-K" besugárzást (1.542 Å) és Ni szűrőt használ. A feszültség 40 kV, míg az áramerősség 30mA volt a mérések során. A minták 2° és 42° 2θ között kerültek vizsgálatra.

In vitro kioldódás vizsgálat fecskendőben



17.ábra: kis volumenű, fecskendős kioldó

Bukkális készítmények kioldódását a USP szabvány szerinti 900 ml-es kioldókban nem lehet biorelevánsnak nevezni. Tekintettel a szájüregben termelődő emberi nyál kis volumenére a kioldó edény méretét is kisebbre választottam meg. A méréseket egyszerhasználatos műanyag fecskendőben végeztem, melyhez 0,45 μm pórusátmérőjű fecskendőszűrőt használtam. A fecskendőbe analitikai mérlegen bemért készítményt 5ml kioldóközegben mágnesmaggal kevertetem szobahőmérsékleten. A mintavétel során a fecskendőből 1 csepp mintát vettem, melynek 50 μl -ét hígítottam 3ml-re 0,1 M-os sósav oldattal, és UV spektrofotometrikusan meghatároztam az oldat koncentrációját. A mintavételt 1,2,5,10,15,20,30,40,50 és 60 perc eltelte után végeztem. Kioldóközegként a gyógyszerkönyvi 6,8-as pH-jú puffertől eltértem az eredményekben részletezett okok miatt. Így az alábbi összetételű 6,8-as pH-jú puffert használtam a kísérleteim során.

6,8-as puffer összetétele:

0,025mol/L KH_2PO_4

0,0112 mol/L NaOH

PAMPA vizsgálat



18.ábra: PAMPA mérőtálcák

Felhasznált anyagok:

96-cellás polipropilén mérőtálca (Agilent Technologies, Denmark)

96-cellás polikarbonát alapú, szűrő donor-tálca (MultiscreenTM-IP, MAIPN4510, pórusméret 0,45 μ m; Millipore)

96-cellás teflon akceptor tálca (Multiscreen Acceptor Plate, MSSACCEPTOR; Millipore)

Laboreszközök, mérőberendezések:

mérőtálca-rázó inkubátor (Heidolph Titramax 1000)

Eppendorf többcsatornás automata pipetta

LC/UV(DAD) (Agilent[®] 1100 RR-LC)

UV-mérőtálca olvasó

Puffer oldatok és membránösszetétel

A donor oldalon 6,8-as pH-jú foszfát puffert alkalmaztam (azonos összetételűt a kioldódás vizsgálatokhoz), mely az emberi nyál pH-jával egyezik meg, míg a fogadó/akceptor oldalon az emberi vér pH-jának megfelelő pH 7,4-es gyógyszerkönyvi foszfát puffert (1 l ioncserélt víz + 1 tasak izotóniásan kiegyensúlyozott foszfát puffer (PBS) só keveréket (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4; Sigma Aldrich Kft., 028K8214)) alkalmaztam. A két oldal között egy 0,45 μ m pórusátmérőjű hidrofób PVDF membrán található, amelyre apoláros oldószert és/vagy lipidek keverékét vittem fel, melynek összetételét változtattam a kísérleteim során, megkeresve a bukkális felszívódás modellezésére leginkább alkalmas összetételt, mellyel a további méréseket végeztem.

Membrán alkotók(mg/ml dodekán)	n-dodekán	Gasztrointesztinális lipidösszetétel	Szövetspecifikus összetétel ⁶⁰
Foszfatidilkolin	0	26,67	8
Koleszterin	0	13,33	10,33
Palmitinsav	0	0	4
Glikozilceramid	0	0	6
Szfingomielin	0	0	3,33
Foszfatidilinozitol	0	0	0,83
Foszfatidiletanolamin	0	0	7,5

1. táblázat: Membrán összetételek

Kromatográfiás mérés körülményei

Kromatográfiás készülék: Agilent® 1100 RR-LC21

Kolonna: Chromolith® fast Gradient RP-18e (50 mm x 2 mm; 3 µm)

Eluensek: A: 0,1 % TFA víz, B: 0,1 % acetonitril:víz = 95:5 (v /v)

Gradiens program: 0-0,3 min 5-15 % B; 0,3-1,8 min 15-100 % B; 1,8-2,4 min 100 % B, 2,4-2,5 min 100-5 % B

Ekvibrációs idő: 0,5 min

Áramlási sebesség: 1,8 ml/min

Kolonnatér hőmérséklete: 40 °C

Injektált térfogat: 1,5-3 µl

Detektálás: Diódasoros UV-vis detektálás

220 nm, 254 nm

A PAMPA mérés menete tiszta hatóanyag vizsgálata esetén

Donor oldat készítése:

A mérendő hatóanyagokból 10 mM-os DMSO-os törzsoldatot készítettem, melyeket 6,8-as pH-jú pufferrel 500mM-osra hígítottam 96-cellás mérőtálcán. Ezt a cellánként 300 µl folyadékot tartalmazó mérőtálcát 60 percig szobahőmérsékleten rázattam, majd leszűrtem.

Lipid oldat készítése: (amennyiben szükséges)

A analitikai mérlegen bemért lipideket n-dodekánban oldottam figyelve arra, hogy a bemérés közben ne olvadjanak ki, hiszen ez sikertelenné teheti az oldatkészítést, ezért a homogenizálást is jeges fürdőben végeztem ultrahang segítségével. Az így elkészült lipid oldatból vagy bizonyos esetekben tiszta n-dodekánból 5 µl-t pipettáztam a donor mérőtálca

minden cellájának PVDF membánfelületére. Majd 150 µl donor oldatot pipettáztam az átnedvesedett membránra, míg 300 µl 7,4-es pH-jú puffert adagoltam minden egyes fogadó (akceptor) oldali mérőcellába. Ezután donor és akceptor tálcákat összeillesztettem, és nedves papírral lefedtem, hogy a 37°C-on 4 órán át történő inkubálás alatt meggátoljam a donor oldat túlzott párolgását.

Az inkubálási idő elteltével a tálcákat szétszedtem és az oldatokat HPLC mintaadagolójában is használható tálcákra átpipettáztam, és a koncentrációkat HPLC -DAD vagy UV- mérőtálca olvasóval határoztam meg.

Permeabilitás számítása:

$$P_e = -\frac{2.303 V_D}{A(t - \tau_{ss})} \left(\frac{1}{1 + r_a} \right) \cdot \log_{10} \left[-r_a + \left(\frac{1 + r_a}{1 - R} \right) \cdot \frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right]$$

$$r_a = \left(\frac{V_D}{V_A} \right) \frac{P_e^{(A \rightarrow D)}}{P_e^{(D \rightarrow A)}} = \frac{r_V P_e^{(A \rightarrow D)}}{P_e^{(D \rightarrow A)}}$$

ahol

$V_{d/a}$ = donor/akceptor térfogata(µl)

A= membrán felülete(cm²)

T= inkubálási idő(sec)

R= membránretenció

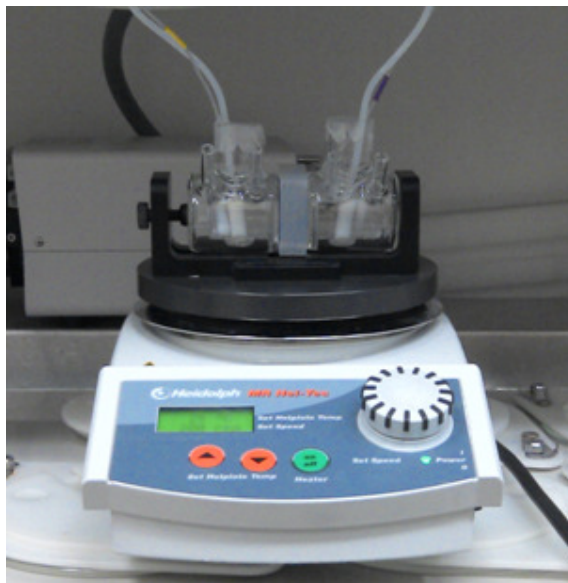
$C_{D/A}$ =donor/akceptor koncentrációja(amit a kromatogram görbe alatti területével közelítettünk)

τ_{ss} = az egyensúly beállításához szükséges idő

PAMPA mérés menete készítmények vizsgálata esetén:

A készítményeket 20 ml 6,8-as pH-jú pufferben oldottam és rázatással, illetve ultrahangos fürdőben oldatot, illetve néhány esetben szuszpenziót készítettem belőle, melynek névleges koncentrációja 500 µM volt. Ez a Risperidon esetén a hatóanyag 4mg-os dózisának felel meg. Ezt az oldatot, illetve szuszpenziót szűrés nélkül alkalmaztam a donor oldalon. A mérés további kivitelezése nem tért el a tiszta hatóanyagok esetén alkalmazottaktól.

In vitro kioldódás-felszívódás vizsgálatok



18.ábra: Pion µflux feltét

A készülék eredeti kialakításán változtatva a detektáláshoz nem UV szondát, hanem átfolyós küvettás UV-spektrofotométert használtam, mely csőrendszerben szállítja a folyadékot a feltétől a küvettáig. A csőrendszer végén 1µm pórusátmérőjű szűrőket alkalmaztam. A keverést pedig digitális kijelzőjű mágneses keverőn végeztem. A képen látható módon a feltét kompatibilis volt a Pharma Test 900 ml-es kioldókészülékkel.

Mérés menete:

A 8,55 cm² területű PVDF membránra 75µl dodekánt pipettáztam, majd a két oldalára illesztettem a donor és akceptor oldali üvegcellát és mindezt egy műanyag keretbe fogattam be. Ezt követően a donor és a fogadó oldalt a megfelelő pufferekkel feltöltöttem(20ml). A készülékbe behelyeztem a mágneses keverőbabákat és a mintavevő csőrendszer szűrővel ellátott végeit. 200 rpm-es kevertetés mellett a vizsgálandó mintát a donor oldali pufferbe tettem, és 1,5 órán át 2 majd 5 percenként automata mintavevő segítségével vizsgáltam az oldatok koncentrációját, előzetes kalibráció alapján. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztem.

Pufferek: A donor oldalon a nyálra fejlesztett 6,8-es pH-jú puffert , míg az akceptor oldalon (pH sink) puffert alkalmaztam.

Célkitűzés

Antipszichotikumok, mint az Aripiprazol és a Risperidon, esetén - amennyiben a beteg nem hajlandó együttműködni a kezelő orvossal - tableta helyett injekció formát alkalmaznak, ami viszont a tiltakozó betegnek fájdalmat okozhat. A megoldást a szájban azonnal oldódó készítmények jelenthetik, melyek a szájüregbe juttatás után nem távolíthatók el, így biztos és fájdalommentes kezelést tesznek lehetővé. A terápiás cél eléréséhez azonban ezeket a hatóanyagokat a száj pH-jának megfelelő 6,8-as pH-n kell oldhatóvá tenni. Azonban a tiszta hatóanyag vízoldhatósága a Risperidon esetén 171 mg/L, míg az Aripiprazol esetén 7,77mg/L,⁶¹ így mindkét hatóanyag a BCSII osztályba, a rossz vízoldhatóságú, de jó permeabilitású hatóanyagok sorába tartozik. Szintén mindkét hatóanyagról elmondható, hogy gyenge bázis (Risperidon $pK_a=8,76$ ⁶¹, Aripiprazol $pK_a=6,9$ ⁶²), ebből következően az oldhatóságuk az alacsonyabb pH tartományok felé növekszik. Ezért is nagyobb kihívás ezen hatóanyagokat az emberi nyál közel semleges pH-ján oldhatóvá tenné, mint a gyomor savas közegében.

Az Aripiprazol antipszichotikum esetén technológiai célunk volt, hogy a BCS II osztályba tartozó, rossz vízoldhatóságú hatóanyagot képessé tegyük gyors kioldódásra ciklodextrin hordozó mátrix és elektrosztatikus szálképzés kombinálásával. Mindezt úgy megvalósítva, hogy a szálképző polimer tartalmát az esetleges retardizáló hatás csökkentése érdekében minimalizáljuk a termékben. Ezzel azt kívántuk elérni, hogy az önmagában nem szálképző ciklodextrin határozza meg a termék oldódási jellemzőit. A kifejlesztendő készítmény amorfizációját, kioldódását, stabilitását és szimultán *in vitro* kioldódását-felszívódását is vizsgálni kívántuk.

A Risperidon formulálása során több, már kipróbált összetételű mátrixot alkalmaztunk, és ez esetben is célunk volt *in vitro* kioldódás, permeabilitás és szimultán kioldódás-felszívódás vizsgálatokkal a különböző összetételű készítmények között különbséget tenni. További célunk volt nagy áteresztőképességű vizsgálatokat használni a formulációk tesztelésére, melynek a gyógyszeripari állatkísérletek előkészítésénél lehet nagy jelentősége, hisz a toxikológiai tesztelés során egy hatóanyagból formuláció fejlesztésre igen limitált idő áll rendelkezésre, így általában standard formulációkat alkalmaznak minden hatóanyagra, melyek hatékonyságában hatóanyagonként jelentős eltérések lehetnek. Ha egy egyszerű és gyors *in vitro* méréssel sikerül különbséget tenni a formulációk között, akkor elegendő, csak

a legjobb eredményt szolgáltatót állatoknak beadni, ilyen módon sokkal kevesebb állatkísérlet szükséges és a toxikológiai vizsgálatok költsége is jelentősen csökken.

Aripiprazol tartalmú készítmény formálása elektrosztatikus szálképzéssel

A kiindulási polimer oldat és a szálképzés paramétereinek optimalálása

A szálképzés során célul tűztük ki a legalacsonyabb polimer koncentráció megtalálását, amellyel még valóban nano- illetve mikroszálas termék állítható elő. Ugyanis a polimer koncentráció túlzott csökkentése esetén már a polimer szálak helyett cseppek érkeznek a gyűjtőre, ekkor elektroporlasztásról beszélünk. Ezen folyamat során is amorfizálódik a hatóanyag és felület növekedés következik be, azonban a termék későbbi feldolgozása szempontjából a szálképzett anyag könnyebben kezelhető, bukkális készítményeknél külön előnyös, hogy a gyűjtőről leszedve méretre vágható a lapka, mely rögtön nyelvre helyezhető így további formálást (tablettázást) nem igényel.

A szálképzési hibaként, a kissé alacsony polimer koncentráció okozhat a szálakon kitüremkedéseket, melyeket a szakirodalom gyöngyöknek (bead) nevez.

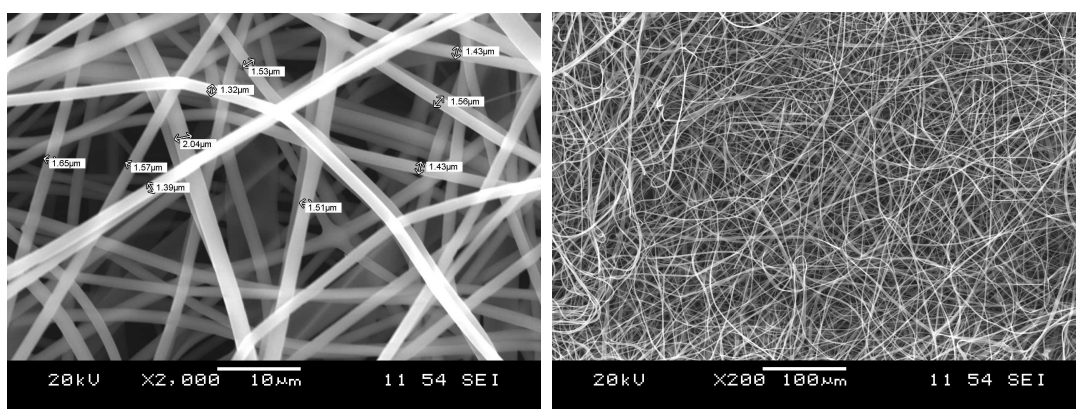
A polimer koncentrációt és a PEO molekulatömegét változtatva optimaltam a terméként nyert nem szőtt szövedék szálait. Igencsak érzékeny rendszert a legkisebb változtatásokra is a termelés drasztikus megváltozásával reagált. 1 , 2, 4 és 7 millió g/mol-os molekulatömegű PEO-val is kísérleteztem, azonban a legkisebb molekulatömegű túl kis viszkozitású, míg a legnagyobb molekulatömegű túlságosa nagy viszkozitású polimer oldatot eredményezett, így a nem sikerült szálas terméket begyűjtenem. A polimer koncentráció változtatásánál két koncentrációt a 0,5 %-ost, és a 0,75%-ost próbáltam ki, azonban 0,5 %- nál még nem valósult meg a szálképzés, míg 0,75%- nál már gyöngy nélküli szálas terméket kaptam.

A szálképzés megvalósulását erősen befolyásolta az oldószer minősége és a gyűjtő távolsága, valamint az alkalmazott feszültség. Az etanol:víz 1:1 arányú keverékét választottam oldószernek, mivel a hatóanyag etanolban, míg a CD és a PEO vízben oldódik jól. Fizikai keverékből ugyan tisztán vizes oldat is készíthető, azonban ott fellépett az a probléma, hogy a víz nem tudott teljes mértékben elpárologni a szálképzés közben, így a gyűjtőre érkező nedves termék, már jó vízdoldhatósága miatt feloldódott a gyűjtőn. Ez azt eredményezte, hogy idővel a termék mennyisége a gyűjtőn nem nőtt, hanem jelentősen csökkent. Még etanol-víz oldószer mellett is nagy gyűjtőtávolságra volt szükség (40-50 cm), hogy az oldószernek a folyamat közben legyen ideje elpárologni.

A hatóanyag és a ciklodextrin molaránya a készítményben 1:4, a ciklodextrin nagy moláris tömege miatt ez azt eredményezi, hogy a mátrix tömegének 89%-át a CD teszi ki, és így a hatóanyag koncentrációja alacsony (4,5%) a termékben. A nagyon alacsony hatóanyag koncentráció hátrányos lehet, hiszen akkor jelentős mennyiségű készítményt kell a betegnek lenyelnie, vagy a szájüregében tartania. Azonban az Aripirazole 5 mg-os dózisa esetén 112,5 mg készítményre van szükség, ami még egyáltalán nem okoz kellemetlenséget.

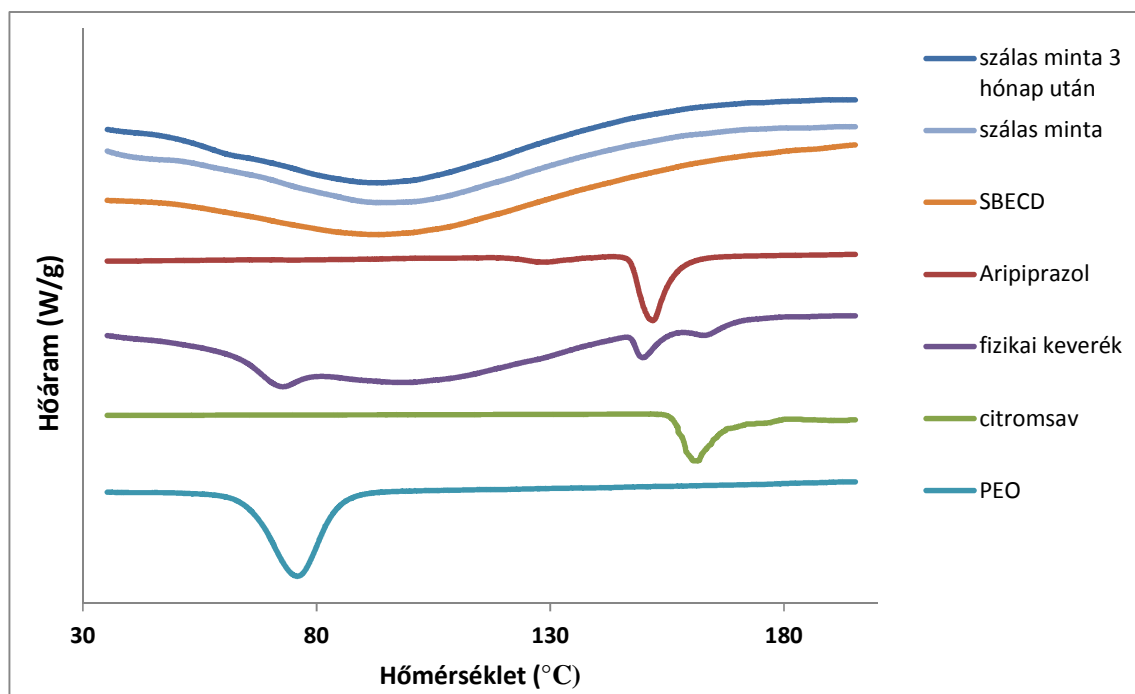
A készítménymátrixban kis mennyiségű citromsav használatára is szükség volt. A hatóanyag gyenge bázis ($pK_a=6,9$), ebből következően az oldhatósága a pH csökkenésével jelentősen növekszik. Ezt kihasználva gyógyszerkönyvi segédanyagot, a citromsavat alkalmaztuk, mely a készítmény alkalmazásakor helyileg csökkenti a nyál pH-ját és ezzel is segíti a hatóanyag oldatba kerülését. A másik igen fontos előnye a citromsavnak, hogy csak a pH csökkentésével érhető el, hogy desztillált vízben a fizikai keverék feloldódjon és polimer oldat készüljön belőle. Emellett a szájnyálkahártyán alkalmazott készítmények szempontjából is előnyös a citromsav használata, hiszen hatóanyagok keserű ízének elfedésre kiválóan alkalmas.

Ilyen anyagok és körülmények felhasználásával sikerült előállítanom gyöngy mentes polimer szálakat, melyről pásztázó elektronmikroszkóppal felvételt készítettem. A szálak átmérője szűk méreteloszlást mutat, 900-1500 nm közötti.



19.ábra: ARP/PEO/SBECd

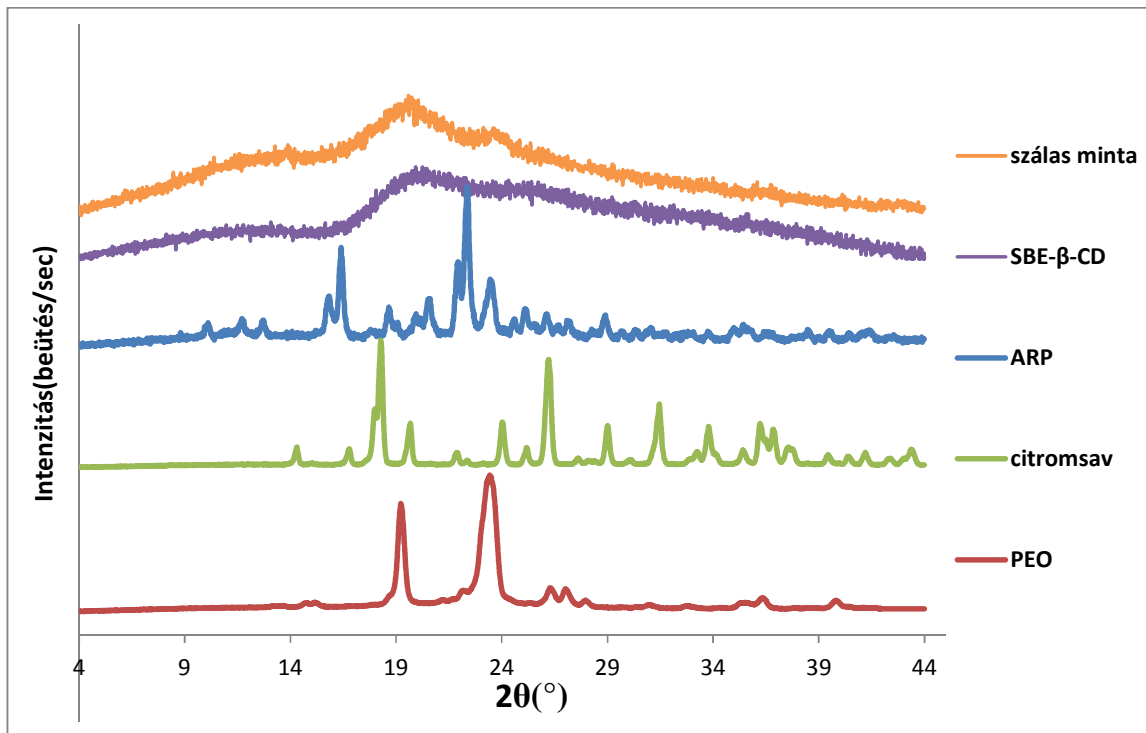
Amorfizáció vizsgálata DSC-vel:



20.ábra: DSC termogram

A szálképzett terméket differenciál pásztázó kalorimetriával vizsgáltam. A termogrammon látható, hogy a szálas termék görbájén nincs élés endoterm csúcs, ami arra utal, hogy nem tartalmaz kristályos anyagot, vagyis a szálképzés során az amorfizáció maradéktalanul végbement nemcsak a hatóanyag, hanem a polimer és a citromsav esetében is. A szálképzett termék görbéje a ciklodextrinéhez hasonlít leginkább, jelentős vízvesztésre enged következtetni. Az is megfigyelhető, hogy ezzel szemben a fizikai keverék görbájén megfigyelhető a polimer, a hatóanyag, és a citromsav csúcsa is. 3 hónap szobahőmérsékleten történő tárolás után a minta nem kristályosodott, megőrizte amorf állapotát.

Porröntgen vizsgálatok:



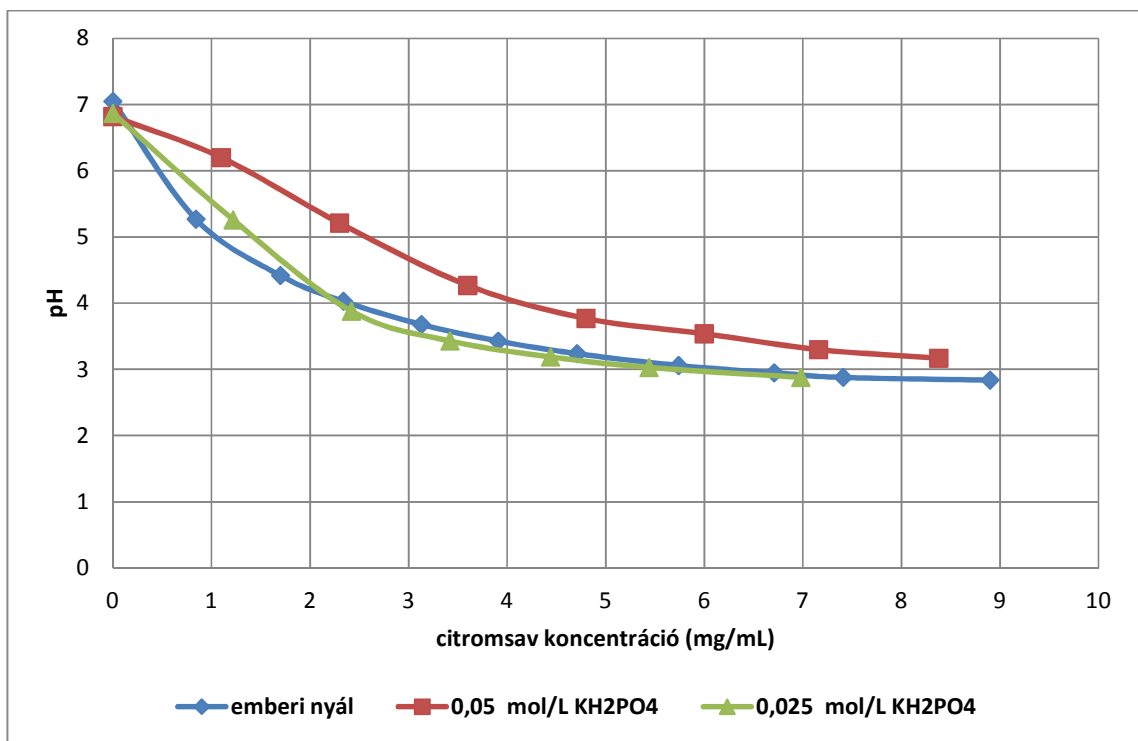
21.ábra: Röntgen diffraktogram

A szálas minta diffraktogramjából hiányoznak a kristályos polimer, hatóanyag és a citromsav éles csúcsai, ami megerősíti a DSC vizsgálatok eredményeit, azaz eszerint is sikerült szálképzéssel amorf terméket előállítani.

Kioldódás vizsgálatok

Elővizsgálatok: megfelelő kioldóközeg megtalálása

Bár az ARP oldhatósága alacsonyabb pH tartományokban magasabb, és ezen oknál fogva az emberi nyál pH-jának csökkentése előnyös lehet, azonban a túl savas közeg a betegnek kellemetlen érzést okozhat, illetve figyelembe kell vennünk, hogy a savas tartományokban a hatóanyag ionizálódhat, mely hátráltathatja az átjutását a biológiai membránokon. Ezért vizsgáltam a készítmény citromsav tartalmának hatását a nyál pH-jára. Ehhez azonban szükségem volt olyan kioldóközegre, melynek nemcsak a pH-ja, hanem a pufferkapacitása is megegyezik az emberi nyáléval. Ezért citromsavval titráltam nyálat, illetve különböző KH_2PO_4 koncentrációjú 6,8-as pH-jú puffereket, melyek közül pufferkapacitását tekintve a nyálra leginkább hasonlót választottam kísérleteim kioldóközegéül.

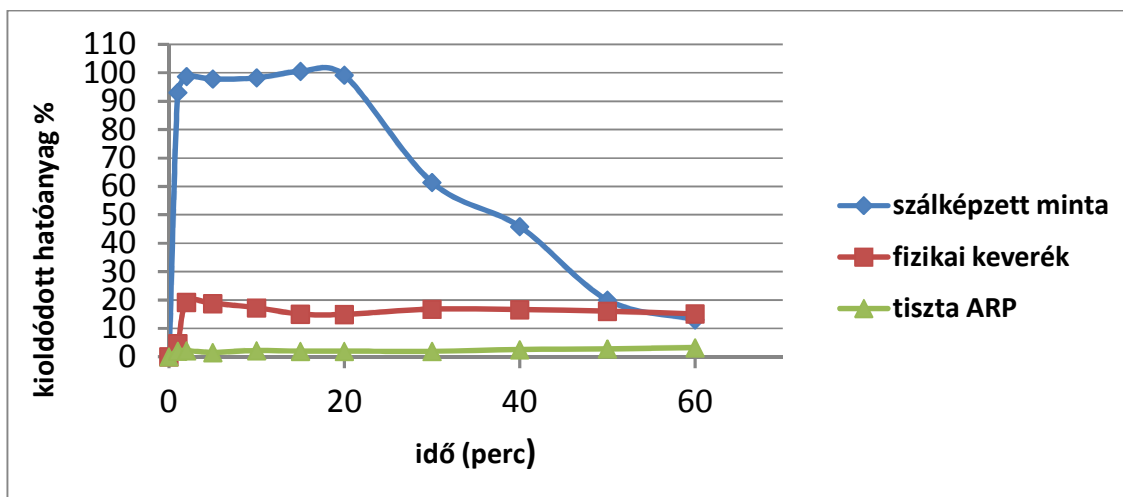


22.ábra: citromsavas titrálás

Kioldódási vizsgálatok eredményei:

A fejlesztett készítményünk szempontjából döntő jelentőségű kioldódás vizsgálatokat az általános gyógyszerkönyvi módszerhez képest (900 ml) jelentősen csökkentett térfogatban végeztem (5 ml) a hatóanyag 5 mg-os dóziséval a valós alkalmazás minél jobb közelítése érdekében. A vizsgálat végén mértem az oldat pH-ját, mely 5,5 volt. A diagramból látható, hogy a szálképzett minta kioldódása pillanatszerű és 100%-os volt, ami két nagyságrendnyi koncentráció javulást jelent a tiszta hatóanyaghoz képest. Ez azt jelenti, hogy sikerült elérnünk, hogy a PEO retard hatása 0,75%-os polimer koncentrációnál (etanol-víz oldószerre vonatkoztatott koncentráció) már ne érvényesüljön.

A tiszta hatóanyaghoz képest már a fizikai keverék kioldódása is egy nagyságrenddel jobb volt. A szálképzett minta esetén túltelített oldat képződése miatt 20 perc után a hatóanyag kicsapódása volt megfigyelhető. Ismételt méréseknél a kicsapódás más-más időpontokban jelentkezett, de mindig 20 percen túl.



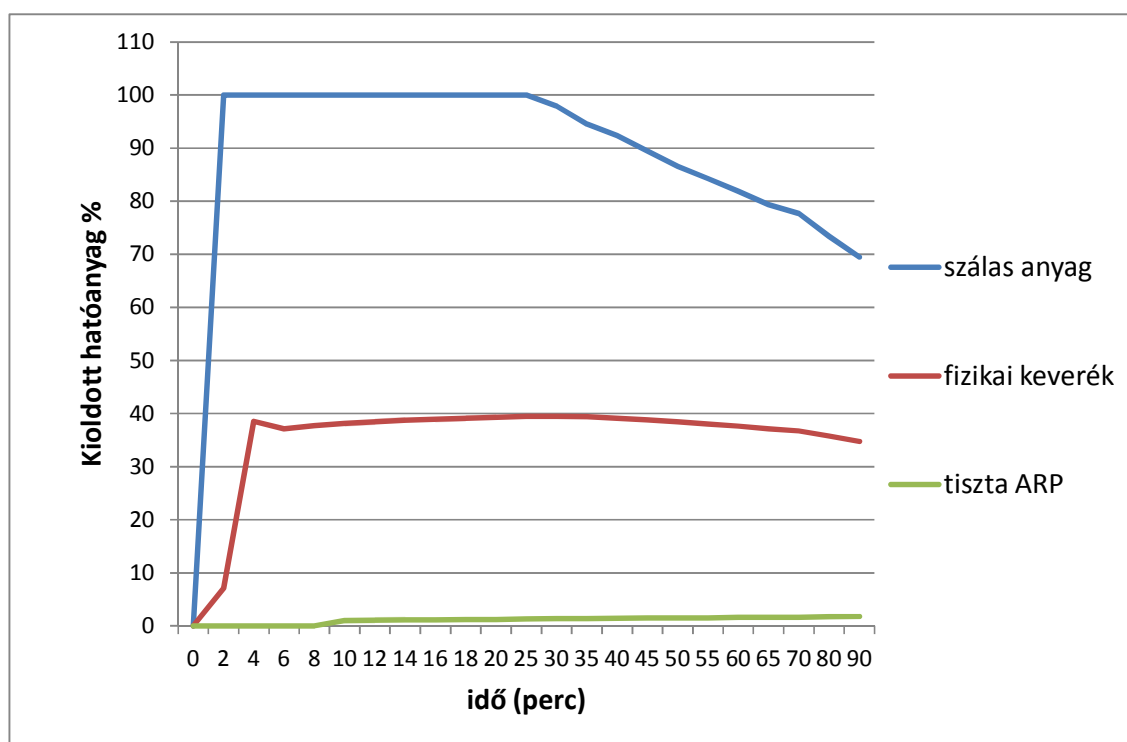
23.ábra: ARP szálképzett minta, fizikai keverék és tiszta hatóanyag kioldódása pH=6,8-on

A kicsapódás jelensége biológiai membrán jelenlétében nem feltétlenül kövekezik be, hiszen a túltelített oldat hatóanyag feleslege a membránon át távozhat a rendszerből. Ezen felül a készítmény ciklodextrint jelentős mértékben tartalmaz, melynek pozitív hatása lehet a hatóanyag felszívódására nézve⁶³. Viszont a citromsav miatt a pH a kioldóközegben 5,5, mely pH-n a hatóanyag molekulák többsége ionizált állapotban van, és mint már korábban említést tettem róla, a hatóanyag ionizáltsága ronthatja annak felszívódási tulajdonságait. A poli-oxi-etilén típusú vegyületek mukoadhezív tulajdonságuk miatt különösen alkalmasak bukkális film készítésére, azonban bizonyos esetekben permeabilitás rontó tulajdonságáról is beszámoltak.⁶⁴ Mindez indokolja, hogy a készítményt vizsgáljuk szimultán kioldódás-felszívódás modellező rendszerben. .

Szimultán kioldódás-felszívódás vizsgálatok

A μ flux feltét kis volumene miatt (10-20 ml egy üvegcella) különösen alkalmas bukkális készítmények vizsgálatára, ennek ellenére szakirodalomban ilyen irányú felhasználása még nem ismert. A készítményeket 1-1,5 órás időtartamban vizsgáltuk a feltéttel, mivel a bukkális készítmények szempontjából ennél hosszabb időtartam nem releváns, legtöbb készítmény maximum 30 percig tartózkodik a szájnyálkahártyán. A bukkális felszívódás modellezéséhez a mesterséges membrán összetételét a szájnyálkahártyának megfelelően választottam meg, melyről a későbbiekben részletesen beszámolok. Ezen PAMPA vizsgálatoknál a lipideket nem tartalmazó n-dodekán használata adta a legjobb korrelációt a sertés ex vivo mérési eredményekkel. Ezért a μ flux feltéttel végzett kísérletek során dodekánt alkalmaztam.

A donor oldali kioldódás görbékről hasonló megállapításokat tehetünk, mint az előző diagramon. A szálas minta azonnal és teljes mértékben kioldódik, a fizikai keverék szintén gyorsan eléri maximumát, majd 30 percnél a szálas anyag, 40 perc eltelte után pedig a fizikai keverék oldata csapódik ki. Azonban ez a kicsapódás lényegesen lassabb folyamat, mint a kioldódás vizsgálat során. A fizikai keverék esetén a maximális koncentráció duplája a kioldódásnál tapasztaltnak, illetve a szálas minta a kicsapódása lassabb folyamat, mintha nem lenne jelen a dodekános membrán. Ez a jelenség felveti a kérdést, hogy mi is csapódik ki a donor oldalon. Ugyanis meglehet, hogy a nem ionizált hatóanyag forma csapódik ki, ami azt jelenti, hogy a nem ionizált formának a donor oldatban két lehetősége van, vagy kicsapódik vagy a membránon át felszívódik. Így ez a két folyamat egymás versenytársa lehet, amivel magyarázható, hogy a kicsapódás a μ flux mérés esetén lassabb, hiszen a felszívódás is egy lehetőség a hatóanyagnak, így csökkenti annak koncentrációját a donor oldalon. Ennek az elméletnek a bizonyításához további vizsgálatokat szükségesek, hiszen megvan a lehetősége annak, hogy a dodekán enyhe oldhatóságnövelő hatása okozza ezt a jelenséget.



24.ábra: Donor oldali kioldódott hatóanyag %-a 20 mg hatóanyagtartalom esetén (20 ml-ben)

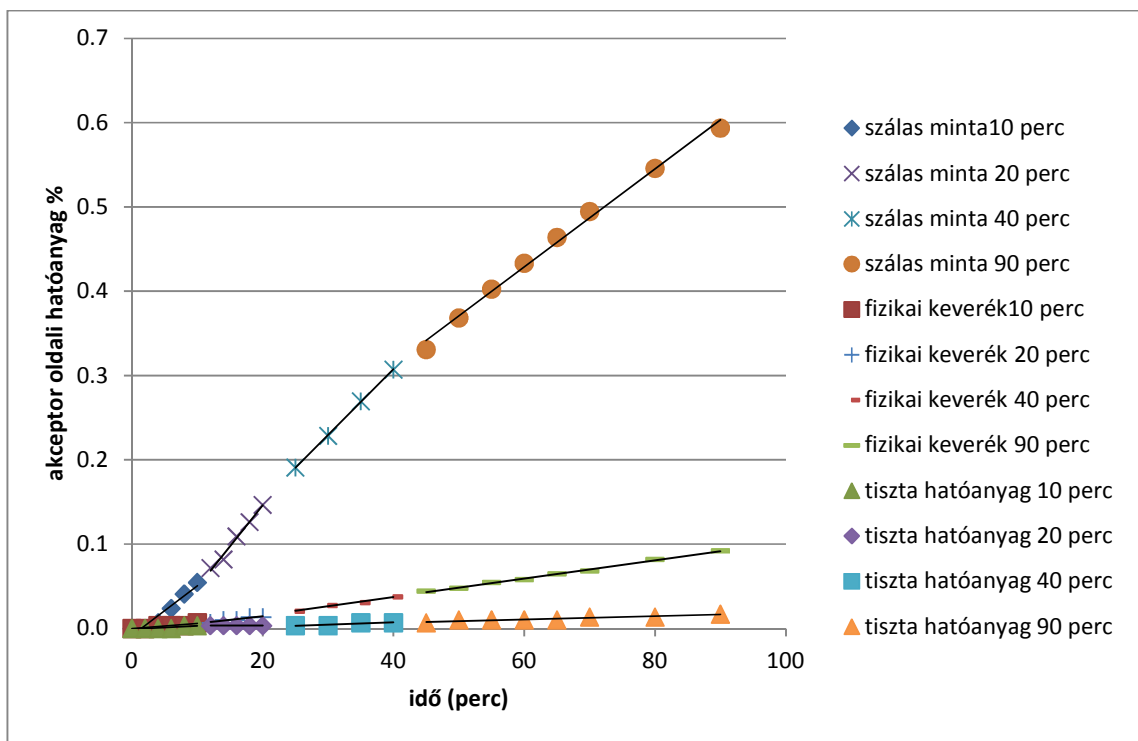
Az akceptor oldali hatóanyagkoncentrációt figyelve láthatjuk (25.ábra), hogy a tiszta hatóanyag nem ment át a membránon 90 perc alatt, illetve az első detekálási határérték feletti

koncentrációt 90 percnél volt mérhető. Ezt az időintervallumot, mely alatt az első jól detektálható hatóanyagmolekulák átérnek a membránon, minden készítményre meghatároztuk. A szálas mintának mindössze 6 percre volt szüksége, hogy átjusson a membránon, a fizikai keveréknek ennél jóval több idő, 25 perc kellett ehhez, míg a tiszta hatóanyag a bioreleváns időtartamban nem képes a mesterséges gát legyőzésére.

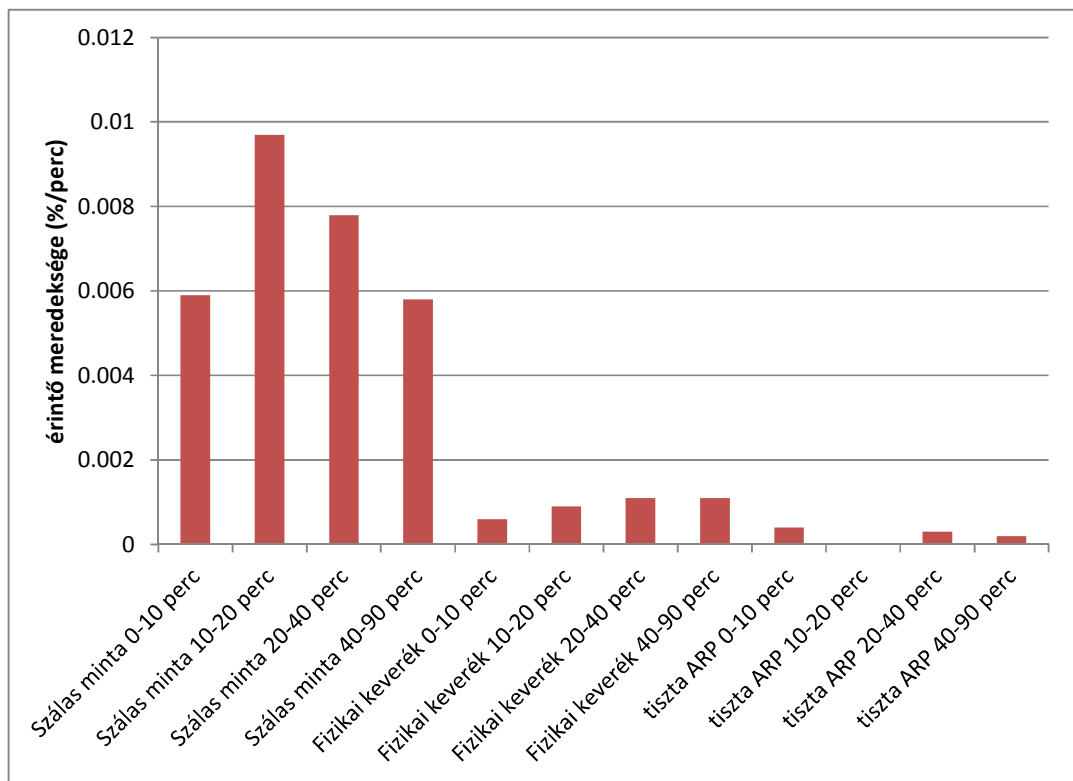
A donor oldali koncentrációnak jelentős hatása van arra nézve, hogy az akceptor oldali koncentráció hogyan alakul. Ennek a jellemzésére a fluxus kiszámítása a legszemléletesebb.⁶⁵

$$J(t) = \frac{dm}{A \cdot dt} = P_e \cdot c(t)$$

Ahol $J(t)$ = a fluxus, m = anyagmennyiség (mol), t =idő(s), A =membrán felülete (cm^2), $c(t)$ = donor oldali koncentráció(mol/cm^3) , P_e = effektív permeabilitás (cm/s). A mérés során a membránfelület állandó, $8,55 \text{ cm}^2$, míg a dm/dt hányados az akceptor oldali hatóanyagkoncentráció időfüggvényének deriváltjával, érintőjének meredekségével egyenesen arányos. Ezeket fel is tüntettem táblázatos formában, méghozzá időben négy szakaszra bontottam fel a görbéket. Jól látható, hogy az érintő meredeksége, azaz a fluxus a szálas minta 10-20 perc közötti szakaszán a legnagyobb, hiszen itt a donor oldali koncentráció már 100%. Ugyan már a második perctől teljes a kioldódás a donor oldalon, ez a fluxusban csak időkéssel jelenik meg, hiszen a membránnak először telítődnie kell hatóanyagmolekulákkal mielőtt az akceptor oldali puffer a membránból azokat átoldani képes. Ez az időbeli késés jól megfigyelhető a szálas minta kicsapódásakor is, ami 30 percnél már észlelhető a donor oldalon, míg ez a koncentrációcsökkenés a fluxuscsökkenésben az akceptor oldalon mindössze 40 perc után nyilvánul meg. A fizikai keverék esetében megfigyelhető, hogy az alacsonyabb donor oldali koncentráció miatt, a szálas anyaghoz képest az átjutás is sokkal lassabb, illetve a donor oldali koncentrációváltozásra is lassabban reagál a fogadó oldal, hiszen a 25 percig az akceptor oldalon nem detektálható hatóanyag, illetve a 40 percnél elkezdődő lassú kicsapódás, az akceptor oldali fluxusban nem okoz 90 percig sem számottevő változást.



25.ábra: Akceptor oldali oldott hatóanyag%



26.diagram: fluxussal arányos mennyiség, az érintő meredeksége

Az akceptor oldali koncentráció görbékből tehát láthatjuk, hogy a szálas minta jelentősen nagyobb felszívódást generál, mint a tiszta hatóanyag, vagy akár a fizikai keverék. Azonban, ha szét szeretnénk választani a mátrixhatását a felszívódásra, illetve oldhatóság limitáló hatását, akkor érdemes lehet a donor és akceptor oldali görbék integráljainak tiszta hatóanyaghoz való viszonyítása. Azaz képezzünk egy hányadost (integrálhányados IH) minden készítményre a koncentrációgörbéjének integrálértékéből, vagyis görbe alatti területéből (AUC) a tiszta hatóanyagra vonatkoztatva.

$$IH_{donor} = \frac{AUC \text{ készítmény donor}}{AUC \text{ tiszta hatóanyag donor}}$$

$$IH_{akceptor} = \frac{AUC \text{ készítmény akceptor}}{AUC \text{ tiszta hatóanyag akceptor}}$$

Ezen értékeket kiszámítva látszik(4.táblázat), hogy a szálas minta kioldódása 81-szeresére növekedett a tiszta hatóanyaghoz képest. Az akceptor oldali koncentrációk között is jelentős, 39-szeres különbség van, ami így is csak fele akkora koncentrációnövekedést jelent, mint a donor oldalé. A fizikai keverék esetén a kioldódásnál tapasztalt növekmény lényegesen kisebb, mint a szálas minta esetén, és az akceptor oldal koncentrációnövekménye is alul marad a donor oldaléhoz képest. Mindebből látható, hogy nemcsak a donor oldali koncentrációnak, hanem a készítménymátrixnak is jelentős hatása van a membránon való átjutásra, és az akceptor oldali koncentráció kialakításában.

	szálas anyag		fizikai keverék	
	donor	akceptor	donor	akceptor
IH	81	39	32	5

4.táblázat: Integrálhányadosok szálas mintára és fizikai keverékre

Mivel a donor oldali koncentráció nem az egyedüli faktor, ami befolyásolhatja a felszívódást, hanem ennél a készítménynél a citromsav ionizálja a molekulát, így ionizált formában a membránon való passzív diffúzió már nehezekebb, illetve a polimer is gátolja a hatóanyagtranszportot. Ezen faktorok negatív, a ciklodextrinek jelenléte, illetve a tiszta hatóanyaghoz képest elért jelentős donor oldali koncentráció növekedés pozitív hatásának eredőjeként végül a tiszta hatóanyaghoz képest 39-szeres javulást ért el az akceptor oldali koncentráció (AUC), mely érték számottevő biohasznosulás növekedést jelez előre. Valamint

az is jól látható, hogy a szálal termék gyors és teljes oldódása arányaiban jobban növelte a felszívódást, mint a fizikai keveréknél tapasztalt kioldódásjavulás a tiszta hatóanyaghoz képest.

Összegzésül elmondható, hogy az Aripirazol kifinomult és innovatív formulálási technikák nélkül gyógyhatás kifejtésére bukkális úton teljes mértékben alkalmatlan molekula, hiszen a bioreleváns időtartamban (60-90 perc) képtelen átjutni az apoláris gátat jelentő membránon. Míg az oldhatósági problémákat leküzdve, a felszívódás biztosítható és a biohasznosulás javítható, mellyel a készítmény gyors és fájdalommentes terápiát nyújthat súlyos mentális betegségekben szenvedőknek.

Risperidon tartalmú készítmények

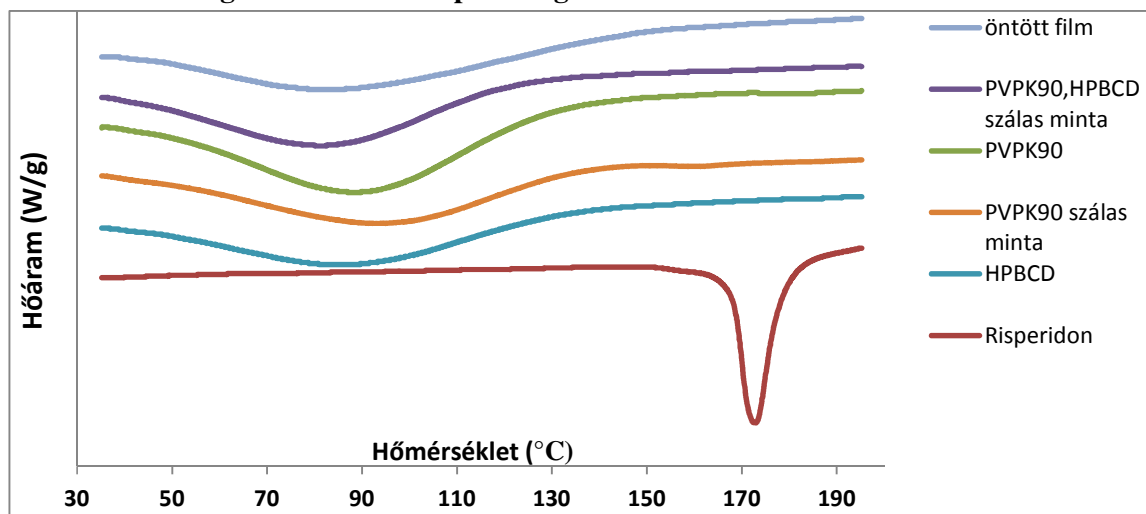
Risperidon tartalmú készítmény formálása elektrosztatikus szálképzéssel és film öntéssel

Ahogy már a célkitűzésben említettem ezen hatóanyagnál a készítménymátrix, már más hatóanyagnál kipróbált összetételű volt. Így az előállítás során csak a gyűjtőtávolságot, a feszültséget, és az adagolási sebességet kellett változtatni ahhoz, hogy a szálképzés jó termeléssel, gyöngymentes nanoszálakat létrehozva megvalósuljon. A mátrixok kiválasztásánál szempont volt, hogy legyen köztük egy csak ciklodextrint, egy csak polimert és egy CD-t és polimert is tartalmazó, illetve nemcsak nanoszálképzett, hanem öntöttfilm is vizsgálatra került, melynek összetétele a szálképzett mintáéval megegyező volt. A fentiekben már említést tettem arról, hogy a szakirodalomban a Risperidon komplexképzése jól ismert HP- β -CD-vel, így ezzel a CD-vel készültek formulációk. A HP- β -CD-nek a szálképzés szempontjából előnyös tulajdonsága a SBE- β -CD-vel szemben, hogy a CD polimer nélkül, önmagában is szálképezhető, így csak hatóanyag és ciklodextrin tartalmú szálképzett anyag is előállítható.⁶⁶

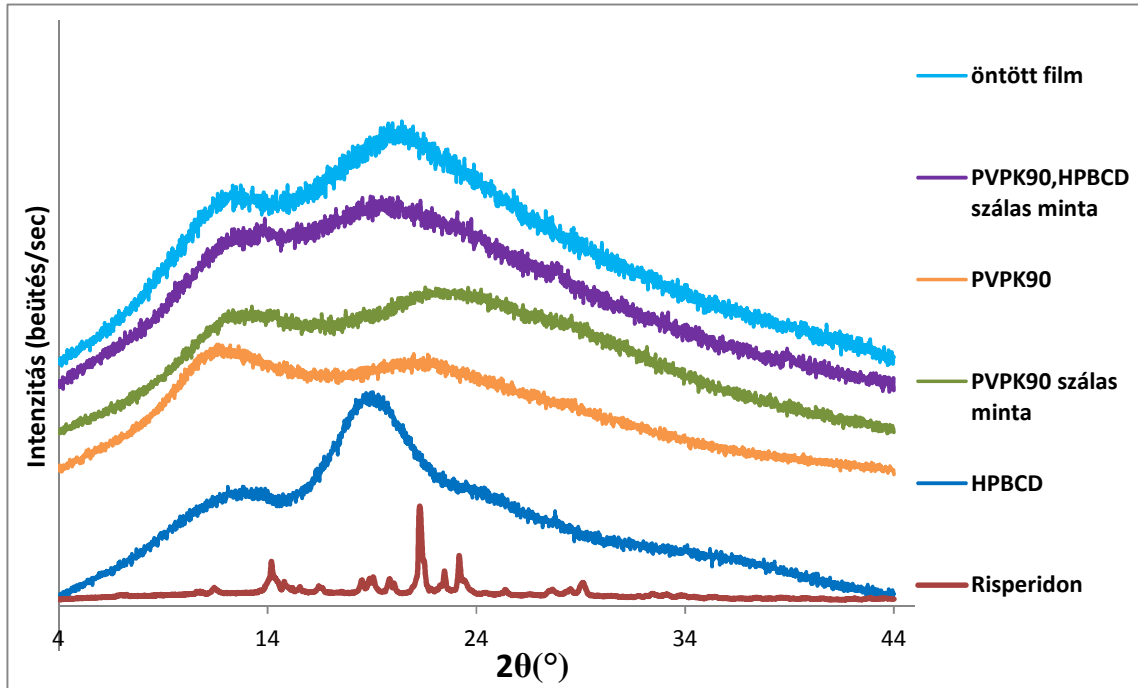
A gyártás során a csak PVPK90-et, illetve a polimert és CD is tartalmazó oldat elektrosztatikus szálképzése során szép, gyöngymentes szálakat kaptam.

Ezzel szemben a csak HP- β -CD és hatóanyagot tartalmazó oldatot, csak nagyon alacsony termeléssel sikerült szálképeznem, így ezt a formulációt a továbbiakban nem vizsgáltam.

Amorfizáció vizsgálata DSC-vel és porröntgen diffrakcióval:



27. ábra: DSC termogram



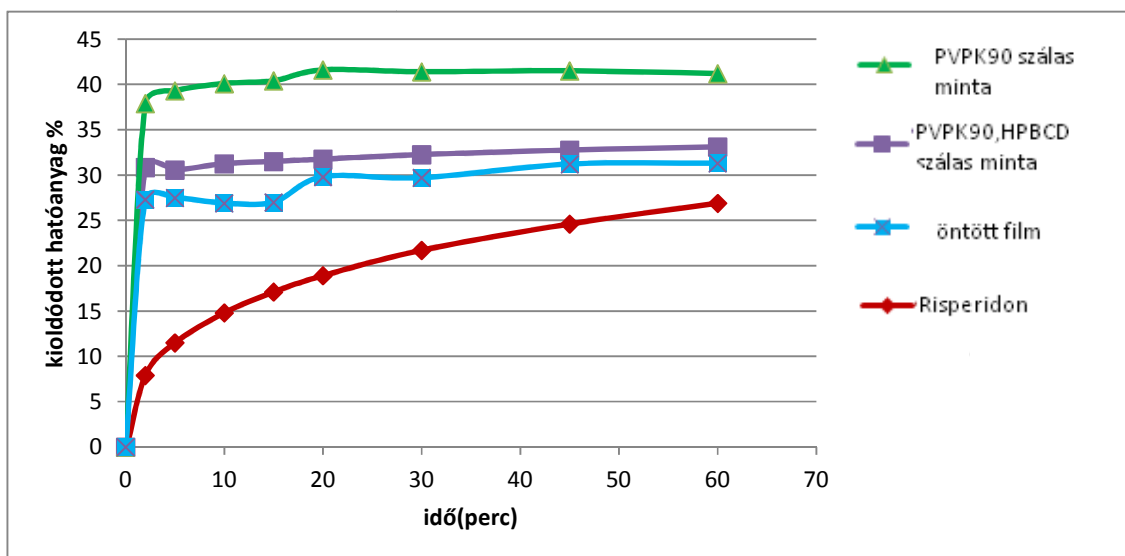
28.ábra: röntgen diffraktogram

A termogramból és diffraktogramból látható, hogy a csak PVP K90, és a PVP-t és HP- β -CD-t is tartalmazó elektrosztatikusan szálképzett készítmények egyike sem tartalmaz a kristályos hatóanyagra jellemző csúcsot, tehát a szálképzés során az amorfizáció végbement. A PVP-t és CD-t is tartalmazó öntött film szintén amorf állapotban tartalmazta a hatóanyagot.

Kioldódás vizsgálatok

Az öntött filmet, a két szálás anyagot és a tiszta hatóanyagot 20 ml 6,8-as pH-jú pufferben oldottam ki szobahőmérsékleten kevertetve. A kioldódás görbéből látható, hogy a PVP K90-nel szálképzett mintának a legmagasabb az oldott hatóanyag koncentrációja a pufferben. A második helyen a ciklodextrint is tartalmazó szálás anyag áll, míg ezen diagram alapján az öntött film tűnik a legkevésbé jó formulációnak. Bár elmondható, hogy az öntött film és az

ugyanolyan összetételű szálás minta közti a különbség nem jelentős.



29.ábra: Risperidon készítmények és tiszta hatóanyag kioldódása

Bár összességében elmondható, hogy egyik készítményből sem oldódik ki a hatóanyag 100%-ig, csak kis mértékű javulást sikerült elérni a tiszta hatóanyaghoz képest. Ez a tapasztalat rámutat arra, hogy standard mátrixok alkalmazása sokszor nem a legeredményesebb, ezért is van nagy jelentősége és emellett időigénye is egy rossz vízoldhatóságú hatóanyag piacra kerülése előtt a jó készítményforma és összetétel megtalálásának.

Nagy áteresztőképességű formuláció kiválasztási/szűrési stratégia PAMPA segítségével:

Előkísérletek: membránösszetétel optimalálása

Mivel bukkális készítmények vizsgálata volt az elképzelés mesterséges membránon keresztül, ezért elsősorban a szájnyálkahártyát legjobban modellező n-dodekán-lipid keverék megtalálása volt a célunk. Ehhez referenciaként sertés *ex vivo* mérési eredményeket használtunk fel⁶⁷, és három különböző összetételű membránt, tisztán n-dodekánt, a gasztrointesztinális lipideket tartalmazó, illetve a szövetspecifikus összetételű lipidkeveréket hasonlítottam össze. Az összehasonlításhoz 11 modellvegyületet használtam, melyeknek PAMPÁ-val mért $\log P_e$ értékeit vetettem össze az *ex vivo* kísérletekben meghatározott $\log K_p$ értékekkel.

Modell vegyületek	Dodekán $\log P_e$	GI lipid $\log P_e$	Szövetspecifikus $\log P_e$	$\log K_p$
Bupivacain	-4,82	-4,77	-4,77	-4,77
Nimesulid	-4,28	-4,20	-4,24	-4,52
Propranolol	-5,01	-5,08	-4,89	-4,85
Naproxen	-5,75	-5,44	-5,12	-5,42
Verapamil	-5,01	-4,89	-4,94	-4,60
Antipyrin	-5,84	-5,65	-5,90	-5,27
Amitriptylin	-5,22	-4,98	-5,27	-4,89
Diltiazem	-4,88	-4,83	-4,84	-5,14
Metoprolol	-6,28	-6,21	-5,18	-5,89
Lidocain	-4,85	-4,81	-4,84	-4,77
Caffein	-5,65	-5,67	-5,49	-5,05

4. táblázat: 11 modellvegyület mért $\log P_e$ értékei 3 különböző membránösszetétel mellett, $\log K_p$ referencia

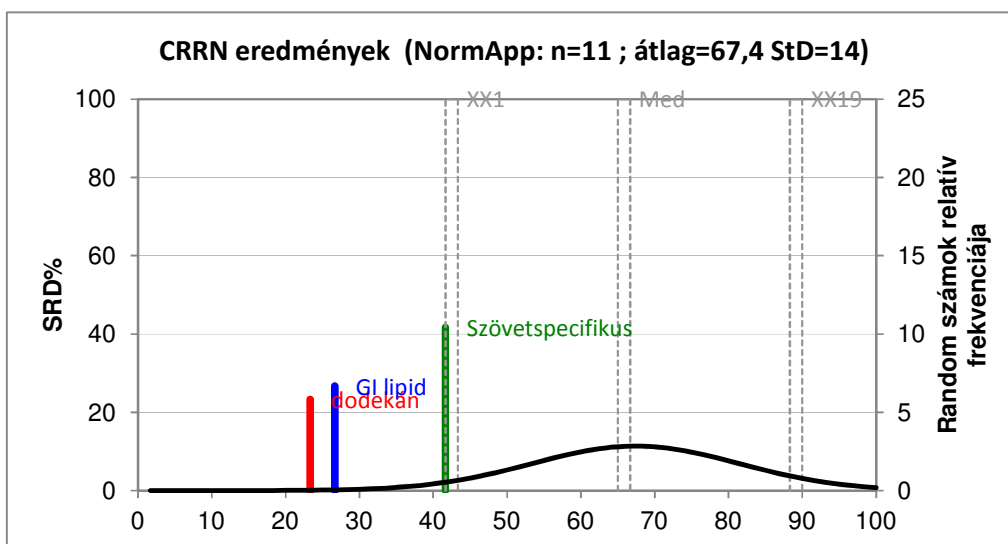
Az eredmények elemzéséhez egy nem-paraméteres statisztikai próbát, a “Sum of Ranking Differences” (SRD)⁶⁸ módszert alkalmaztam. Ez a próba mindegyik membránösszetétellel mért mérésen belül a mért $\log P_e$ értékek szerint sorrendbe állítja a vegyületeket. Az *ex vivo* mérések eredménye, a $\log K_p$ szerinti sorrend pedig a referencia sorrend. Ezután a szerint,

hogy az egyes sorrendek, hány ponton térnek el a referenciától, rangot kapnak. Értelmszerűen a legkisebb rangszámú modell hasonlít leginkább a referenciára.

n-dodekán	GI lipid	Szövetspecifikus lipid
rang	rang	rang
14	16	25

5. táblázat: membránösszetételek rangszámai

A módszer továbbá arra is képes, hogy random generált számsorok esetén megállapítsa, mekkora a valószínűsége annak, hogy ugyanazt az eredményt kapjuk sorrendiséget tekintve, mint a mérési eredményeink alapján. Ez a valószínűség mindhárom esetben 5% alatti érték. (mindhárom oszlop a diagramon XX1 —től balra található)

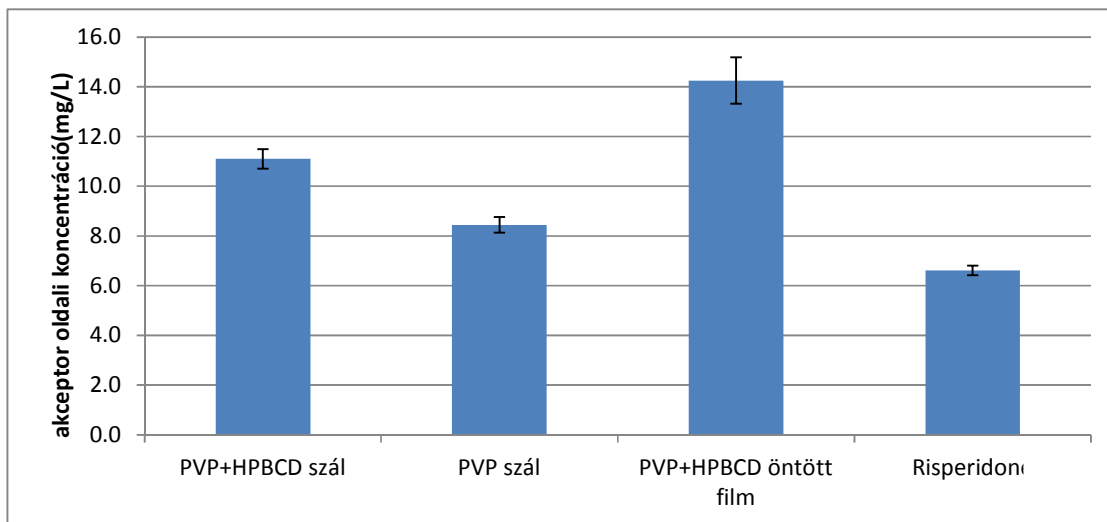


30.ábra: Comparison of Ranks by Random numbers(CRRN), azaz a rangok összehasonlítása random számokkal

Ez alapján elmondható, hogy a tisztán n-dodekát tartalmazó membránhoz köthető modell hasonlít leginkább a referenciához, ezért további kísérletekhez ezt a rendszert alkalmaztam. A szövetspecifikus membránösszetétel valószínűsíthetően, azért tért el jelentősen a referenciától, mert hét membránalkotó n-dodekánban való oldása, homogenizálása már technikai nehézségekbe ütközik.

Risperidon készítmények PAMPA vizsgálata

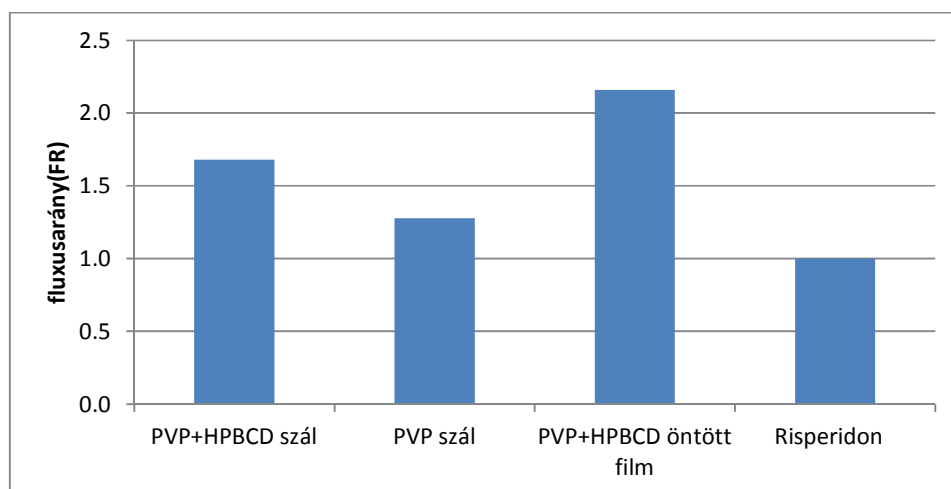
A fentiekben már megfogalmaztam, hogy célom volt gyors és egyszerű kiértékelésű mérési módszerrel eldönteni, hogy várhatóan melyik Risperidon formulációnak lesz a legnagyobb a biohasznosulása. Ehhez a kioldódás és permeabilitás vizsgálatokat összekötő, új technikát⁶⁹ alkalmaztam, mely során a hatóanyagot tartalmazó készítmény puffer oldatát vagy szuszpenzióját a PAMPA mérőtálca donor oldalára pipettázom. Mivel a készítmények hatóanyagtartalma a kiinduláskor megegyező (ettől természetesen a pufferben az oldott Risperidon koncentráció jelentősen különbözhet), így elegendő csak az akceptor oldali inkubálás utáni végkoncentrációk összehasonlítása ahhoz, hogy eldönthessük, melyik készítmény a legígéretesebb.



32. ábra: akceptor oldali koncentráció a készítmények és a tiszta hatóanyag esetén

A diagrammon három párhuzamos mérés eredményei kerültek ábrázolásra, melyből láthatjuk, hogy mindhárom készítmény esetén több hatóanyag-molekula képes átjutni a membránon, mint a tiszta hatóanyagból.

Ahhoz, hogy a tiszta hatóanyaghoz való viszonyítás szemléletesebb legyen, definiáltak egy fluxus arány, FR-el jelölt⁷⁰ mennyiséget, mely a készítmény és a tiszta hatóanyag akceptor oldali koncentrációjának hányadosa. Amennyiben az FR érték egynél kisebb, akkor a készítménymátrixból kevesebb, amennyiben FR egyenlő eggyel, akkor azonos, illetve ha FR nagyobb, mint egy, akkor több hatóanyagmolekula jut át a membránon, mint a tiszta hatóanyag vizsgálata esetén.



33. ábra: készítmények fluxusaránya (FR)

Tehát a fluxusarány kiszámítása után is láthatjuk, hogy bár mindhárom készítmény javítja a Risperidon felszívódását, a PVP-t és HP- β -CD-t is tartalmazó öntött film kiemelkedik a készítmények közül. Ez az eredmény igen csak meglepő, hiszen a kioldódás vizsgálatok során ez a formuláció mutatkozott a legkevésbé jónak. Sőt azt láthatjuk, hogy a készítmények sorrendje épp megváltozott. Hiszen a kioldódás során legmagasabb hatóanyag-koncentrációt elért PVP szál as anyag a PAMPA vizsgálatok során mindössze csekély javulást mutatott a tiszta Risperidonhoz képest.

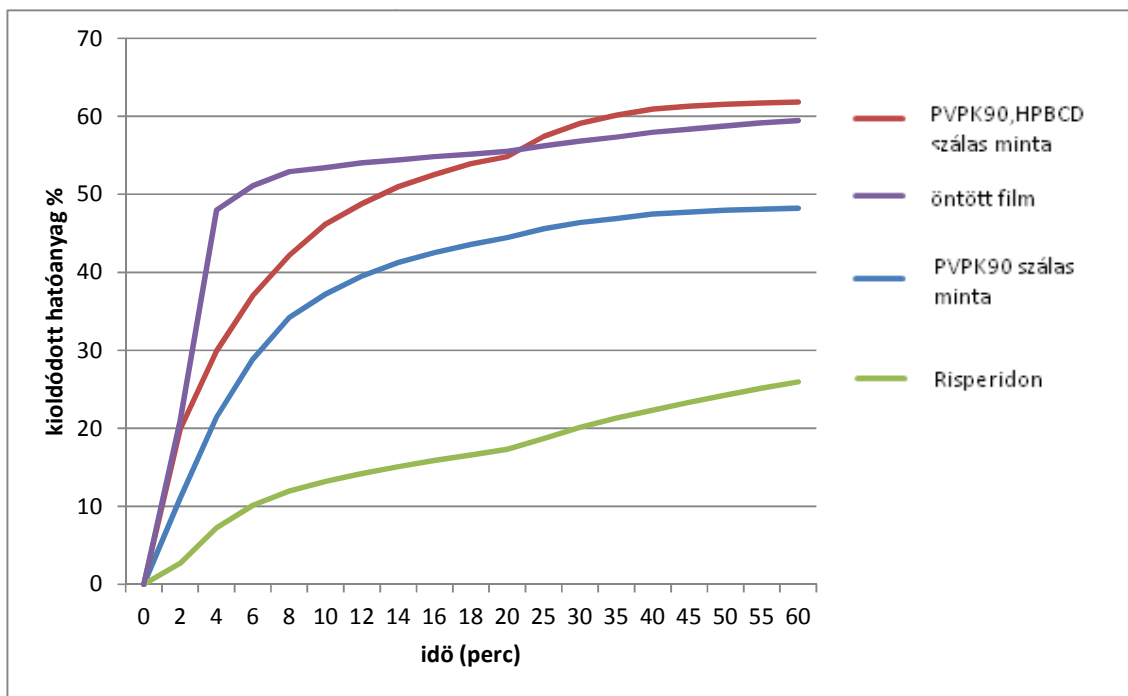
Ezen eredményekből is látható, hogy a gyógyszerkönyvi kioldódás vizsgálatok nem feltétlenül adnak megbízható információt arra nézve, hogy melyik készítménymátrixot érdemes választani egy-egy vegyület esetén.

Ahhoz, hogy a készítmények kioldódás-felszívódás kinetikájáról részletesebb információt nyerhessünk, a már bemutatott μ flux feltétellel vizsgáltam meg őket.

Szimultán kioldódás-felszívódás vizsgálatok μ flux feltétellel

A donor oldali koncentrációk a diagrammon látható módon alakultak. A készítmények körülbelül egy óra után érték el a maximális hatóanyagkoncentrációjukat, ezzel szemben a tiszta hatóanyag lassan, de folyamatosan nőtt a mérés időtartama alatt. A kioldódás vizsgálatoknál is hasonló megállapítást tehetünk, azonban ott a készítmények már 10 perc alatt elérték a telítési szakaszukat. Ahogy az Aripiprazol vizsgálatát esetén megállapítottam, hogy a hatóanyag kicsapódása lényegesen lassabb volt a μ flux feltét donor oldalán, mint a

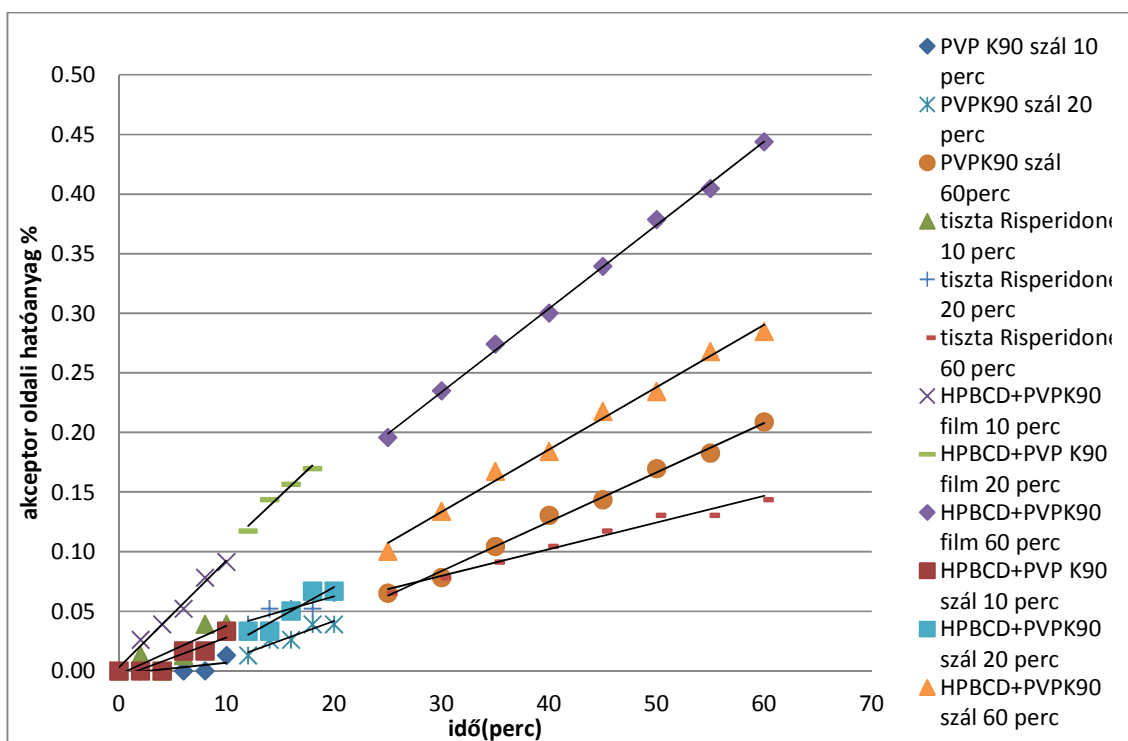
kioldódás vizsgálat során úgy itt pedig az látható, hogy a koncentráció folyamatosan, lassan növekszik a hagyományos kioldódás vizsgálat eredményeivel ellentétben.



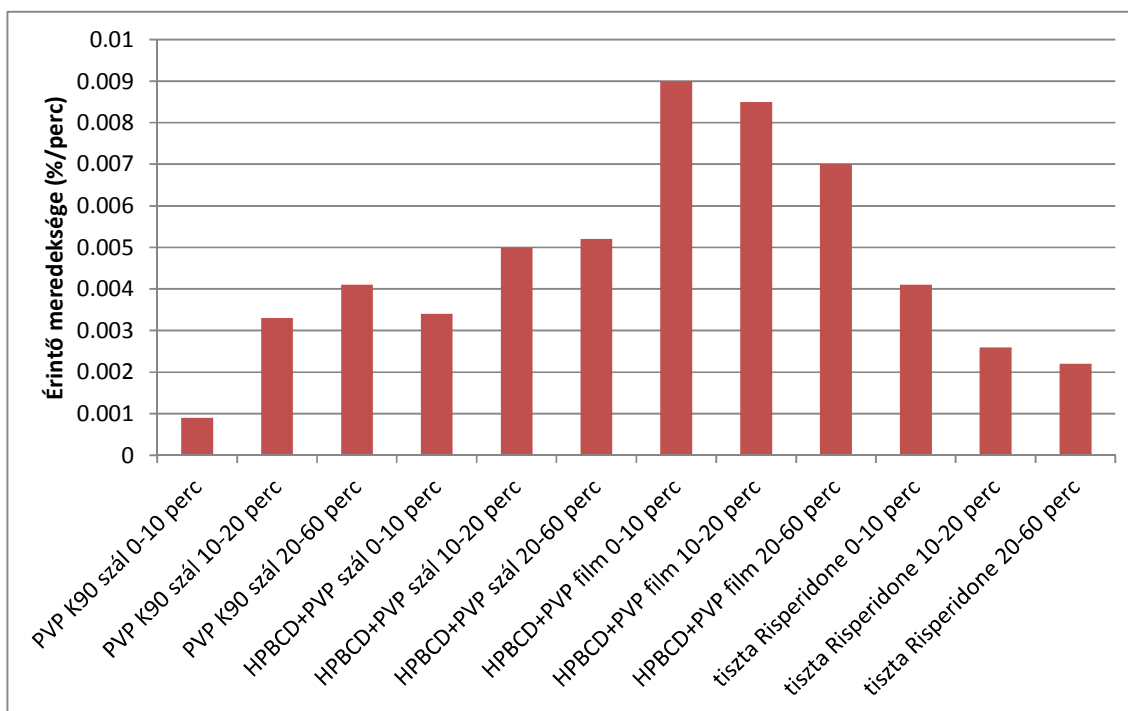
34.ábra: donor oldali kioldódott hatóanyag % (4 mg-os dózis esetén)

Itt is megfigyelhető (34.ábra), hogy az azonos összetételű öntött film és elektrosztatikusan szálképzett minta kioldódása között (főleg integrál értékben) nincs nagy különbség.

A donor oldali koncentráció hatását az akceptor oldali koncentrációra (35.ábra) ismét csak a fluxussal tudjuk jellemezni. A fluxussal egyenesen arányos mennyiség az akceptor oldali koncentrációfüggvény érintőjének meredeksége, melyet diagramban fel is tüntettem az időben 3 szakaszra bontva a görbéket (36.ábra).



35.ábra: Akceptor oldali oldott hatóanyag % a kezdeti és telítési szakaszban



36.ábra: A készítmények és a tiszta hatóanyag akceptor oldali koncentráció görbéinek érintőinek meredeksége, mely a fluxussal arányos mennyiség

Ebből az látható, hogy a legnagyobb fluxus az öntött film mérésének kezdeti szakaszában van, majd a későbbiekben az öntött filmnél a fluxus csökken, ugyanez tapasztalható a tiszta hatóanyag esetében is. Ezzel ellentétben a szálas anyagoknál, ahogy a donor oldali koncentráció nő, úgy a fluxus is növekszik. Ha fluxus mellett megvizsgáljuk azt az időtartamot, ami alatt az akceptor oldalon detektálási határ fölé kerül a hatóanyagkoncentráció, akkor magyarázatot kaphatunk az öntött film kiemelkedően jó eredményeire. Az öntött filmből már 2 perc után detektálható hatóanyag a fogadó oldalon, míg az ugyanolyan összetételű szálas anyagból 10 perc, a csak PVP-t tartalmazó szálas mintából 14 perc, a tiszta hatóanyagból pedig 8 perc után. Ezekből a mérési eredményekből az következik, hogy a film illetve a tiszta hatóanyag esetén a membrán pár perc alatt telítődik hatóanyaggal, mely képes rögtön az akceptor oldalra is áttoldódni. Ennek a gyors telítődésnek azonban lehetséges oka az, hogy az öntött film bár nem oldódik ki jobban a donor oldalon, mint a szálas anyag, de a film pufferben egyes feloldatlan darabkái a kevertetés miatt a membránba csapódnak, és abba beoldódva pillanatszerűen telítik a membránt. A tiszta hatóanyag esetében ez a hatóanyag szemcsékkel ugyanígy lehetséges. Természetesen ennél a magyarázatnál felmerül a kérdés, hogy ez miért nem történhet meg ugyanúgy a szálas mintákkal, illetve a tiszta hatóanyag esetén ezt miért nem tapasztaltuk az Aripiprazol mérése során is. Erre a készítmények és a tiszta hatóanyagok nedvesíthetősége, illetve a méréstechnika adhat választ. Ugyanis a készülékbe először a donor oldali puffer került és csak azt követően a készítmény vagy a tiszta hatóanyag. Ez azt jelenti, hogy addig a szálas minta a puffer tetején úszott, amíg be nem oldódott, ezzel szemben az öntött film jobb nedvesíthetősége⁷⁰ miatt rögtön elsüllyedt a pufferben, így a keverőmag könnyedén a membrán felé lökhetett filmdarabkákat. Ezzel szemben tiszta Aripiprazol esetén ez a jelenség a hatóanyag rendkívül rossz nedvesíthetősége miatt nem mutatkozott, mivel a hatóanyag pora a folyadékfelszínen úszott. Ezt a jelenséget, ha nem vesszük figyelembe félrevezető lehet, azonban fontos felismerés, ami segíthet újabb mérési elrendezések kitalálásában, vagy ezen µflux feltét további fejlesztésében. Ilyen elképzelés a dodekános membrán elé helyezett hidrofíli segédmembrán, melyen csak az oldott hatóanyag képes átjutni a szilárd szemcsék, filmdarabkák nem.

Levonható az a következtetés is, hogy nanoszálas minták mérésére mai formájában is kiválóan alkalmas a feltét, hiszen ebben az esetben csak a valóban kioldódott hatóanyagmolekulák képesek átjutni a membránon, ahogy ez a biológiai környezetben is csak így lehetséges.

Összegzésül elmondható, hogy a donor oldali koncentráció, bár láthatóan befolyásolja az akceptor oldalon detektált mennyiséget és az is látható, hogy a kezdeti nagyobb donor koncentrációk az akceptor oldalon is jobban érvényesülnek, ezen kívül a készítménymátrixnak összetevőinek is van hatása a membránon történő átjutásra, hiszen CD tartalmú készítmények egyértelműen jobb eredményt produkáltak, mint a CD nélküli, mind a donor mind pedig az akceptor oldali koncentrációt tekintve, annak ellenére, hogy a hagyományos kioldódás vizsgálatok során a ciklodextrin nélküli készítmény mutatkozott ígéretesebbnek. Ezen eredményekből látható tehát, hogy valóban a ciklodextrinek jótékony hatását tapasztaltuk a biohasznosulásra. Ez az eredmény jól korrelál az irodalomban azon megállapításokkal, melyek szerint sejtes Caco-2-es vizsgálatoknál a hatóanyagok felszívódását pozitívan befolyásolta a ciklodextrin jelenléte.⁷¹

Készítmények rangsorolása *in vitro* analitikai vizsgálataik alapján

Három féle Risperidon tartalmú készítményt vizsgáltam *in vitro* körülmények között kioldódás, PAMPA és μ flux feltétellel történő méréssel. Amikor mind a három vizsgálati módszer eredményeinek fényében rangsoroltam a készítményeket, akkor a következő táblázathoz jutottam (5.táblázat).

	kioldódás szerinti rangsor	PAMPA szerinti rangsor	μ flux akceptor koncentrációja szerinti rangsor
Risperidon	4	4	4
PVP,HPBCD szálas minta	2	2	2
PVP szálas minta	1	3	3
PVP,HPBCD öntött film	3	1	1

5.táblázat: készítmények rangsora *in vitro* viselkedésük alapján

Látható, hogy bármely *in vitro* módszerrel a tiszta hatóanyagnál jobb kioldódású, illetve felszívódási tulajdonságú készítményeket sikerült előállítani. Pozitívként elmondható, hogy a PAMPA és a μ flux feltételek végzett mérések, ugyanazt a sorrendiséget állapították meg a készítmények között. Tehát az egyszerű és gyors PAMPA vizsgálatokkal megállapított sorrendet alátámasztja a dinamikus mérést, és online koncentrációmeghatározást lehetővé tevő μ flux feltétellel készült mérésorozat. A sorrendiségnél természetesen meg kell jegyezni,

hogy bár a PAMPA és a mikroflux mérés során is az öntött film bizonyult a leghatékonyabbnak, eltérése az ugyanolyan összetételű nanoszáltól vélhetően a korábban leírtmembránba oldódási effektus miatt lehetséges, amit a későbbiekben tovább kívánunk vizsgálni, illetve megoldási javaslatainkat a mérési elrendezésre(hidrofil segéghmembrán) a gyakorlatba megpróbáljuk átültetni.

A kioldódás vizsgálat jelentősen eltérő sorrendet állított fel a permeabilitás vizsgálatokhoz képest, hiszen a PVP tartalmú szál a kioldódás során magasabb koncentrációjú Risperidon oldatot tudott létrehozni, mint a CD-t is tartalmazó készítmények, ennek ellenére a μ fluxxal történt mérések során a membránon való átjutása a hatóanyagnak kisebb volt. Amely eredmény arra hívja fel a figyelmet, hogy nem elegendő a gyógyszerkönyvnek megfelelő vizsgálatok elvégzése ahhoz, hogy az egyes gyógyszerformulációk további fejlesztéséről dönthessünk, hiszen amennyiben a kioldódás mellett szimultán folyamatként a felszívódást is modellezzük, egészen más eredményre juthatunk. Ez az eredmény pedig formulációfejlesztés során más döntéseket meghozatalához vezethet.

Konklúzió

Munkám során sikerült megvalósítanom BCSII osztályba sorolt antipszichotikumok formulálását bukkális készítményként, mely a mentális betegségekkel küzdők számára nyújthat biztos és fájdalommentes kezelési formát. Ezzel a terápiás kitűzött célt sikerült megvalósítanom. Emellett elértem a kitűzött gyógyszer technológiai célt is, amely az volt, hogy a BCS II osztályba tartozó, rossz vízoldhatóságú hatóanyagot gyors kioldódásra tegyem alkalmassá ciklodextrin hordozó mátrix és elektrosztatikus szálképzés kombinálásával. Mindezt úgy sikerült megvalósítanom, hogy a szálképző polimer tartalmat - az esetleges retardizáló hatás csökkentése érdekében - minimalizáltam a termékben. Ezzel elértem, hogy az önmagában nem szálképző ciklodextrin határozza meg a termék oldódási jellemzőit.

Ezen felül a készítmények *in vitro* analitikai vizsgálatainak fejlesztésében is részt vettem, optimalva egy bukkális membrán modellt. Elsőként alkalmaztam öntött film és nanoszálás készítmények mérésére PAMPA vizsgálatot, mely a gyógyszerkutatás korai fázisában alkalmazott nagy áteresztőképességű permeabilitás szűrő vizsgálat adaptálását jelentette a gyógyszer technológia területére. Nemcsak a nanoszálás és öntött film készítmények vizsgálatában új ez a technika, hanem más készítmények esetében is, hiszen mindössze 2013 őszén tett említést róla a Pion cég, hogy ebben az irányban kutatásokat végez.

Sikeresen határoztam meg két antipszichotikum kioldódási- és felszívódási kinetikáját μ flux kioldódás-felszívódás szimultán mérési módszer segítségével, mely módszerről tudományos folyóiratban még nem jelent meg publikáció. Megállapítottam, hogy a μ flux feltét használatával a hagyományosan alkalmazott kioldódási vizsgálatokhoz képest jóval szofisztikáltabb összehasonlítás tehető különböző formulációk között, amivel a készítmények *in vivo* viselkedése jobban előrejelezhető. A μ flux feltét ugyanis a formulációk szűrésén túlmenően alkalmas kioldódás és felszívódás szimultán modellezésére, lehetővé téve a két folyamat kinetikai leírását

Az eredményeim alátámasztják, hogy a formulációfejlesztésben szükség van a kioldódás vizsgálatokon túlmutató módszerekre is. Olyanokra, amelyek alkalmasak a formulációk gyors és bioreleváns szűrésére, segítve ezáltal a gyógyszer technológusok munkáját. A gyors formulációszűrésre nemcsak a végleges gyógyszerforma fejlesztése, vagy a generikumok gyártása során lehet szükség, hanem már a gyógyszerkutatás korai fázisában az

állatkísérleteknél is szükséges információt nyújthat arról, hogy mely formuláció beadása javasolt. Az állatkísérletek száma így jelentősen csökkenthető.

Irodalomjegyzék

- ¹ Hatályos Gyógyszerkönyv (Ph.Hg.VIII)
- ² Parker, John O., Karen A. Vankoughnett, and Bernice Farrell. "Nitroglycerin lingual spray: clinical efficacy and dose-response relation." *The American journal of cardiology* 57.1 (1986): 1-5.
- ³ Aungst, Bruce J., and Nancy J. Rogers. "Comparison of the effects of various transmucosal absorption promoters on buccal insulin delivery." *International journal of pharmaceutics* 53.3 (1989): 227-235.
- ⁴ Siegel, I. A., and H. P. Gordon. "Surfactant-induced increases of permeability of rat oral mucosa to non-electrolytes in vivo." *Archives of oral biology* 30.1 (1985): 43-47.
- ⁵ Salamat-Miller, Nazila, Montakarn Chittchang, and Thomas P. Johnston. "The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery." *Advanced drug delivery reviews* 57.11 (2005): 1666-1691.
- ⁶ N.K. Jain, Controlled and novel drug delivery. Page No: 65-75; 371-377.
- ⁷ Simpson, Scot H., et al. "A meta-analysis of the association between adherence to drug therapy and mortality." *Bmj* 333.7557 (2006): 15.
- ⁸ Stimson GV (1974) Obeyng doctor's orders: a view from the other side. *Soc Sci Med* 8:97–104
- ⁹ Amidon, Gordon L., et al. "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability." *Pharmaceutical research* 12.3 (1995): 413-420.
- ¹⁰ <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDE/ucm128219.htm>
- ¹¹ Ku, M. Sherry. "Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development." *The AAPS journal* 10.1 (2008): 208-212.
- ¹² The rate of solution of solid substances in their own solutions (Noyes and Whitney, 1897)
- ¹³ Bernstein, Joel. *Polymorphism in molecular crystals*. Vol. 14. Oxford University Press, 2007.
- ¹⁴ Bernstein, Joel. *Polymorphism in molecular crystals*. Vol. 14. Oxford University Press, 2007.
- ¹⁵ Hancock, Bruno C., and Michael Parks. "What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals?." *Pharmaceutical research* 17.4 (2000): 397-404.
- ¹⁶ Keserű György Miklós: A gyógyszerkutatás kémiája

-
- ¹⁷ Zeleny, John. "The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces." *Physical Review* 3.2 (1914): 69.
- ¹⁸ Kilwell™
- ¹⁹ Martin and Cockshott 1974
- ²⁰ AVflo™ Vascular Access Graft by Nicast
- ²¹ Nagy, Zsombor Kristóf, et al. "Solvent-free melt electrospinning for preparation of fast dissolving drug delivery system and comparison with solvent-based electrospun and melt extruded systems." *Journal of pharmaceutical sciences* 102.2 (2013): 508-517.
- ²² Li, Zhenyu, and Ce Wang. *One-dimensional Nanostructures: Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*. Springer, 2013.
- ²³ Eda, Goki, and Satya Shivkumar. "Bead-to-fiber transition in electrospun polystyrene." *Journal of applied polymer science* 106.1 (2007): 475-487.
- ²⁴ Fong, H., I. Chun, and D. H. Reneker. "Beaded nanofibers formed during electrospinning." *Polymer* 40.16 (1999): 4585-4592.
- ²⁵ Lee, K. H., et al. "The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers." *Polymer* 44.14 (2003): 4029-4034.
- ²⁶ Yang, Qingbiao, et al. "Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly (vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning." *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 42.20 (2004): 3721-3726.
- ²⁷ Koski, A., K. Yim, and S. Shivkumar. "Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning." *Materials Letters* 58.3 (2004): 493-497
- ²⁸ Sukigara, Sachiko, et al. "Regeneration of *Bombyx mori* silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties." *Polymer* 44.19 (2003): 5721-5727.
- ²⁹ Yördem, O. S., Melih Papila, and Yusuf Z. Menciloğlu. "Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology." *Materials & design* 29.1 (2008): 34-44.
- ³⁰ Buchko, Christopher J., et al. "Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films." *Polymer* 40.26 (1999): 7397-7407.
- ³¹ Mit-upatham, Chidchanok, Manit Nithitanakul, and Pitt Supaphol. "Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter." *Macromolecular Chemistry and Physics* 205.17 (2004): 2327-2338.

-
- ³² Casper, Cheryl L., et al. "Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process." *Macromolecules* 37.2 (2004): 573-578.
- ³³ Challa, Rajeswari, et al. "Cyclodextrins in drug delivery: an updated review." *Aaps Pharmscitech* 6.2 (2005): E329-E357.
- ³⁴ Nyúl Katalin Diplomamunka 2013
- ³⁵ The pH-dependent complexation between Risperidon and hydroxypropyl- β -cyclodextrin, M. Jug $\&$ I. Kos $\&$ M. Bec'irevic'-Lac'an, *J Incl Phenom Macrocycl Chem* (2009) 64:163–171
- ³⁶ Dahan, Arik, et al. "The solubility–permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone." *Journal of pharmaceutical sciences* 99.6 (2010): 2739-2749.
- ³⁷ Fenyvesi, Ferenc, et al. "Randomly methylated β -cyclodextrin derivatives enhance taxol permeability through human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayer." *Journal of pharmaceutical sciences* 100.11 (2011): 4734-4744.
- ³⁸ Challa, Rajeswari, et al. "Cyclodextrins in drug delivery: an updated review." *Aaps Pharmscitech* 6.2 (2005): E329-E357
- ³⁹ Loftsson, Thorsteinn, and Marcus E. Brewster. "Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63.9 (2011): 1119-1135.
- ⁴⁰ Gershberg, Solomon, and Ferdinand D. Stoll. "Apparatus, for tablet disintegration, and for shaking-out extractions." *Journal of the American Pharmaceutical Association* 35.9 (1946): 284-287.
- ⁴¹ https://www.aaps.org/uploadedFiles/Content/Sections_and_Groups/Focus_Groups/GraySA.pdf
- ⁴² <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/AdvisoryCommitteeForPharmaceuticalScienceandClinicalPharmacology/UCM315763.pdf>
- ⁴³ Mudie, Deanna M., Gordon L. Amidon, and Gregory E. Amidon. "Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing." *Molecular pharmaceuticals* 7.5 (2010): 1388-1405.
- ⁴⁴ Schiller et al. *Aliment Pharmacol .Ther.* 22:971-979 (2005).

-
- ⁴⁵ Marques, Margareth RC, Raimar Loebenberg, and May Almukainzi. "Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing." *Dissolution Technol* 18.3 (2011): 15-28.
- ⁴⁶ Zoeller, Thomas, and Sandra Klein. "Simplified biorelevant media for screening dissolution performance of poorly soluble drugs." *Dissolution Technol* 14.4 (2007): 8-13.
- ⁴⁷ <http://www.pion-inc.com/Products/uDISPENSER/en>
- ⁴⁸ <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/AdvisoryCommitteeforPharmaceuticalScienceandClinicalPharmacology/UCM315763.pdf>
- ⁴⁹ Grundy, John S., et al. "Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. I. Description of a two-phase in vitro dissolution test." *Journal of controlled release* 48.1 (1997): 1-8.
- ⁵⁰ Ginski, Mark J., Rajneesh Taneja, and James E. Polli. "Prediction of dissolution-absorption relationships from a continuous dissolution/Caco-2 system." *AAPS PharmSci* 1.2 (1999): 27-38.,
- ⁵¹ Kobayashi, Michiya, et al. "Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract." *International journal of pharmaceutics* 221.1 (2001): 87-94.
- ⁵² Dickinson, Paul A., et al. "An investigation into the utility of a multi-compartmental, dynamic, system of the upper gastrointestinal tract to support formulation development and establish bioequivalence of poorly soluble drugs." *The AAPS journal* 14.2 (2012): 196-205.
- ⁵³ Patel, Viralkumar F., Fang Liu, and Marc B. Brown. "Advances in oral transmucosal drug delivery." *Journal of controlled release* 153.2 (2011): 106-116.
- ⁵⁴ Balogh, György T., Judit Müller, and Árpád Könczöl. "pH-gradient PAMPA-based< i> in vitro</i> model assay for drug-induced phospholipidosis in early stage of drug discovery." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 49.1 (2013): 81-89.
- ⁵⁵ Avdeef, Alex. *Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state*. John Wiley & Sons, 2012.
- ⁵⁶ Vizserálek, Gábor, et al. "PAMPA study of the temperature effect on permeability." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 53 (2014): 45-49.
- ⁵⁷ Kraemer, Stefanie D., et al. "Lipid-Bilayer Permeation of Drug-Like Compounds." *Chemistry & biodiversity* 6.11 (2009): 1900-1916.
- ⁵⁸ A protonálódás hatása a ciklodextrinek zárványkomplexek stabilitására (Csernák Orsolya doktori értekezés)

-
- ⁵⁹ <http://ams.body1.com/pion/downloads/AAPS%202013%20W5300%20uFLUX1.pdf>
- ⁶¹ <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00734>
- ⁶² <http://www.drugbank.ca/drugs/>
- ⁶⁴ Patel, Viralkumar F., Fang Liu, and Marc B. Brown. "Modeling the oral cavity: in vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems." *Journal of controlled release* 161.3 (2012): 746-756.
- ⁶³ Loftsson, Thorsteinn, and Mar Masson. "Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice." *International Journal of Pharmaceutics* 225.1 (2001): 15-30. <http://ams.body1.com/pion/downloads/AAPS%202013%20W5247%20HT%20Formulation%20Screening.pdf>
- ⁶⁴ Yamashita, Shinji, et al. "Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 10.3 (2000): 195-204.
- ⁶⁵ Avdeef, Alex. *Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state*. John Wiley & Sons, 2012.
- ⁶⁶ Vigh, Tamás, et al. "Polymer-free and polyvinylpyrrolidone-based electrospun solid dosage forms for drug dissolution enhancement." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 49.4 (2013): 595-602.
- ⁶⁷ Kokate, Amit, et al. "In silico prediction of drug permeability across buccal mucosa." *Pharmaceutical research* 26.5 (2009): 1130-1139.
- ⁶⁸ Héberger, Károly, and Klára Kollár-Hunek. "Sum of ranking differences for method discrimination and its validation: comparison of ranks with random numbers." *Journal of Chemometrics* 25.4 (2011): 151-158.
- ⁶⁹ <http://ams.body1.com/pion/downloads/AAPS%202013%20W5247%20HT%20Formulation%20Screening.pdf>
- ⁷⁰ Nagy, Zsombor Kristóf, et al. "Solvent-free melt electrospinning for preparation of fast dissolving drug delivery system and comparison with solvent-based electrospun and melt extruded systems." *Journal of pharmaceutical sciences* 102.2 (2013): 508-517.
- ⁷¹ Fenyvesi, Ferenc, et al. "Randomly methylated β -cyclodextrin derivatives enhance taxol permeability through human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayer." *Journal of pharmaceutical sciences* 100.11 (2011): 4734-4744.
