Apigenin-tartalmú multipartikuláris hatóanyagleadó rendszerek formulálási lehetőségei

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Pápay Zsófia Edit

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Antal István, Ph.D., egyetemi docens
Konzulens: Bertalanné Dr. Balogh Emese, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Alberti-Dér Ágnes, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Kovácsné Dr. Bácskay Ildikó Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tekes Kornélia Ph.D., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóthfalusi László Ph.D., egyetemi docens
Dr. Újhelyi Gabriella Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2016

BEVEZETÉS

Napjainkban már tudományosan is igazolták azt az epidemiológiai megfigyelést, miszerint zöldségek, gyümölcsök és gyógynövények fogyasztásával számos degeneratív betegség kialakulása megelőzhető. Ilyen kóros elváltozásoknak számít például a krónikus gyulladás, a szív- és érrendszeri, valamint a daganatos megbetegedések, melyek kialakulásában a káros szabadgyökök felhalmozódásának is nagy szerepe van. Ezért a bioaktív hatóanyagokkal rendelkező növények, főként antioxidáns kapacitásuknak köszönhetően, jótékony hatással vannak az emberi szervezetre. Az egyik figyelemre méltó bioaktív flavonoid az *apigenin*, mely képes gátolni a reaktív oxigéngyököket és csökkenteni a krónikus gyulladást. Ezáltal megakadályozza kardiovaszkuláris betegségek és a tumorok kialakulását, továbbá sejtekben jelátviteli utak befolyásolásával antikarcinogén hatású.

Az utóbbi évekre visszatekintve azt tapasztalhatjuk, hogy az orvostudományban új szemlélet alakult ki, miszerint a betegségek kialakulásának megelőzésére nagyobb hangsúlyt fektetnek. Előtérbe kerültek olyan növényi alapú, gyógyhatású készítmények, melyek a megelőzésen kívül, a kezelésben vagy az utókezelésben is hatékonyan alkalmazhatóak. Ezért a gyógyszerkutatás és -fejlesztés figyelme is a *fitokomponensek* felé irányult, mert kiváló hatékonyságuk mellett, a mellékhatások kialakulásának csekély kockázata áll fenn. Továbbá fontos szempont, hogy gyártásuk költséghatékonyabb lehet, hiszen egy új, szintetikus úton előállított hatóanyag fejlesztése rendkívül időigényes és drága folyamat.

A szintetikus gyógyszermolekulákhoz hasonlóan, a bioaktív tulajdonságú anyagok esetében is a vízoldhatóság és a permeabilitás szerepe meghatározó jelentőségű a hatás kialakulása szempontjából. A készítményfejlesztés során elegedhetetlenül fontos a megfelelő kioldódás és felszívódás, tehát a szükséges koncentráció biztosítása a hatás helyén. Az apigenint alacsony vízoldhatósága és magas permeabilitása következtében a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) II. osztályába sorolták, ezért formulálásának egyik kiemelt célja vízoldékonyságának javítása. Mivel a gyógyszeripar folyamatos igénye az egyre újabb és hatékonyabb gyógyszertechnológiai eljárások fejlesztése, egy magas apigenin tartalmú, akár célzott hatóanyag-leadást biztosító *innovatív készítmény* kifejlesztése nagymértékben hozzájárulhat a gyógyszeres terápia sikeréhez.

CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során több célkitűzést is tettem arra törekedve, hogy apigenin számára egy megfelelő gyógyszerhordozó rendszert alakítsak ki, mely lehetővé tenné gyógykészítményként történő forgalmazását.

- *Analitikai módszer kidolgozása* az apigenin szelektív mérésére növényi kivonatban és a készítményekben.
- Apigenin *oldékonyságának növelése alap és származék ciklodextrinekkel* különböző fiziológiás pH értékeken. Továbbá a létrejött zárványkomplexek sztöchiometriájának és stabilitási állandójának meghatározása fázis-oldhatósági vizsgálatok segítségével, valamint a komplexek antioxidáns hatásának vizsgálata.
- Multipatrikuláris hordozórendszer kialakítása az apigenin számára. Inert pelletmagra történő fluidizációs rétegzéses eljárás optimalizálását követően, különböző fiziológiás pH értéken oldódó polimerrel történő bevonás kritikus paramétereinek kísérletes úton történő meghatározása, folyamatának nyomonkövetése FT-IR és NIR készülékekkel.
- Az így elkészült *módosított hatóanyagleadású pelletek* fizikai paramétereinek vizsgálata, mint szemcsealak, szemcseméret eloszlás és törési szilárdság, valamint az apigenin kioldódásának vizsgálata *in vitro*.
- Célul tűztem ki magas apigenin tartalmú *nanorészecskék* előállítását biodegradábilis szérum albumin fehérjéből, majd a részecskeméret, a zéta potenciál és a bezárási hatásfok meghatározását. Továbbá fluoreszcencia vizsgálatokkal az apigenin kötődését a fehérjéhez.
- Ezt követően a nanorészecskék porlasztva szárítása segédanyag nélkül, tradícionális (hordozó alapú) és új típusú (hordozómentes) segédanyagokkal, majd a készítmények *in vitro* aerodinamikai tulajdonságainak mérése kaszkád impaktorral.

MÓDSZEREK

Oldékonyság növelés ciklodextrinekkel

A fázisoldhatósági vizsgálatokat desztillált vízben (pH 5,7) és fiziológiás pH értékeken vizsgáltam (pH 1,0 és 6,8), kivitelezésében Higuchi és Connors által leírt módszert követtem. Részletesen, 2 ml különböző pH-jú és koncentrációjú ciklodextrin oldatokhoz

(C_{CD}=1,0–50,0 mM) nagy feleslegben apigenint (Api, 5 mg) adtam. Ezt követően az mintákat 30 másodpercig vortexeltem, majd 25 °C-on, sötét helyen tartottam védve az esetleges bomlástól. Az egyensúly beállta után, a fel nem oldódott apigenint centrifugálással és szűréssel (0,45 µm) távolítottam el. Az apigenin mennyiségét HPLC-UV módszerrel (Agilent 1100, Agilent Technologies Inc., USA) határoztam meg, a méréseket három párhuzamos mintával is elvégeztem.

Az Api-CD komplexek stabilitási állandóinak ($K_{1:1}$) kiszámításához a fázis oldhatósági vizsgálatok eredményei alapján a 3. egyenletet használtam fel, feltételezve, hogy a komplexképződés 1:1 arányú:

$$[\mathrm{Api}]+[\mathrm{CD}]\leftrightarrow[\mathrm{Api\text{-}CD}] \quad (1)$$

$$K_{1:1}=\frac{[\mathrm{ApiCD}]}{[\mathrm{Api}][\mathrm{CD}]} \quad (2)$$

$$K_{1:1}=\frac{\mathrm{slope}}{\mathrm{intercept}(1\text{-}\mathrm{slope})} \quad (3)$$

Bioaktív hatóanyagok rétegzése inert pelletmagra és filmbevonás

Az magas apigenin tartalmú növényi kivonatból vákuum bepárlással eltávolítottam az etanolt, majd fagyasztva szárítással a további folyadékot (Finn-Aqua Lyovac GT3, Németország). A porózus terméket az előre elkészített vízoldékony HPMC (Pharmacoat® 606; 2,0 %, m/m) kötőanyag oldatában feloldottam, majd inert MCC pelletmagra rétegeztem fluidizációs porlasztásos módszerrel (Aeromatic Strea I, Aeromatic-Fielder AG, Svájc). Ugyanezzel az eljárással rétegeztem tiszta apigenint neutrális magokra, folyamatos kevertetéssel. A fluidizációs eljárás paramétereit **I. táblázatban** tüntettem fel. A növényi kivonattal történő rétegzés során a kívánt apigenin tartalom körülbelül 5 mg /1 g pellet, a csak apigenint tartalmazó terméknél 20 mg/1 g pellet volt. Az így kapott magas bioaktív hatóanyag tartalmú pelleteket a továbbiakban két részre osztottam. Az egyik részt Eudragit® L 30 D-55, a másik részt Eudragit® FS 30 D filmbevonatokkal láttam el a fent említett készülékkel, szintén fluidizációs alsó porlasztásos módszerrel. A művelet paraméterei szintén az **I. táblázatban** láthatók. A bevonó diszperziókban a filmképző polimer koncentrációja mindkét esetben 25,8 % m/m volt. A lágyítószer az Eudragit® L 30 D-55 esetében 10%, m/m, az Eudragit® FS 30 D esetében 5%, m/m volt. Az antiadhéziós segédanyagként használt mikronizált talkum (<10 µm) mindkét esetben 50%, m/m volt a száraz polimer tartalomra vonatkoztatva. A filmképző polimereket 5%, m/m; 10%, m/m és

15%, m/m – os mennyiségben porlaszottam a magokra, hogy meghatározzam a minimálisan szükséges mennyiséget a megfelelő hatóanyag leadáshoz.

I. TÁBLÁZAT FLUIDIZÁCIÓS ELJÁRÁS PARAMÉTEREI

Paraméterek	**Hatóanyagrétegzés**	**Filmbevonás**	
		Eudragit® L 30	Eudragit® FS 30
Töltettömeg (g)	300	150	150
Fúvóka átmérője (mm)	1,2	1,2	1,2
Belépő levegő hőmérséklete (°C)	45-47	39-41	28-31
Kilépő levegő hőmérséklete (°C)	35-39	34-36	25-26
Porlasztó levegő nyomása (bar)	0,8	0,8	0,8
Fluid levegő áramlási sebessége (m^3/h)	80-120	80-100	80-100
Adagolási sebesség (g/perc)	5-7	5-10	2-4
Szárítás hőmérséklete (°C)	45	45	30
Szárítás ideje (perc)	15	15	15

Albumin nanopartikulumok előállítása és porlasztva szárítása

Az albumin (BSA) nanopartikulumokat módosított NAB technológiával állítottam elő. Külön oldottam fel 1000 mg albumint 50 ml desztillált vízben és 100 mg apigenin 3 ml kloroformban ultrahang segítségével. Ezt követően a jeges hűtés mellett 4x5 percig ultrahangoztam a mintákat 2 perces intervallumokat tartva, hogy a leülepedő nagyobb részecskéket is homogenizáljam (MSE Soniprep 150 Ultrasonic Processor, MSE Limited, Anglia). Ezt követően a kloroformotot rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el és szűrést követően (0,45µm) vizsgáltam nanorészecskéket. Az így előállított részecskéket segédanyag nélkül, laktóz monohidráttal (1,1 g) és L-leucinnal (0,99 g) porlasztva szárítottam Büchi 290 Mini Spray Dryer (BÜCHI Labortechnik AG, Svájc) porlasztva szárító berendezéssel. Az optimalizált műveleti paramétereket a **II. táblázatban** foglaltam össze. A porlasztva szárítást követően a kész terméket a készülékből jól zárható mintatartóba tettem és vákuum alatt tároltam a további felhasználásig.

II. TÁBLÁZAT PORLASZTVA SZÁRÍTÁS PARAMÉTEREI

Paraméterek	Beállítások
Fúvóka átmérője (mm)	0,1
Belépő levegő hőmérséklete (°C)	120
Kilépő levegő hőmérséklete (°C)	65-70
Szárító levegő áramlási sebessége (l/h)	600
Porlasztó levegő áramlási sebessége (m^3/h)	35
Adagolási sebesség (ml/perc)	5

Antioxidáns hatás vizsgálata

Az antioxidáns hatás vizsgálatokhoz kereskedelmi forgalomban kapható, lila színű stabil szabadgyökök használtam. A szabadgyök és az antioxidáns közötti reakciót színváltozás mutatja, mely spektrálisan mérhető 517 nm-en. A méréshez Hatano és társai által leírt módszer alkalmaztam, kisebb változtatásokkal. Hígítási sort készítve (0,01-0,1 mM) a DPPH• törzsoldatból kalibrációs egyenest vettem fel, ábrázolva a koncentráció és az abszorbancia értékeket (R^2> 0.999). A továbbiakban ennek segítségével határoztam meg a mintákban el nem reagált DPPH• pontos koncentrációját. Az antioxidáns hatást a gátolt szabadgyök %-os mennyiségével fejeztem (I, %) ki a 4. egyenletet alkalmazva, ahol az A_0 a kezdeti DPPH• törzsoldat abszorbanciáját és az A_S a minta abszorbanciáját jelöli.

$$I\ (\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \qquad (4)$$

Standardként 0,1 mg/ml apigenin törzsoldatot használtam fel. A reakció pontos időtartamának meghatározására 15 percenként mértem az abszorbancia értékét, amíg azok nem változtak tovább. Így megállapítottam, hogy 60 perc szükséges a végpont eléréséhez. A segédanyagok esetleges befolyásoló hatása miatt, minden anyagra külön is elvégeztem a vizsgálatot, három párhuzamos mintával.

EREDMÉNYEK

Oldékonyság növelés ciklodextrinekkel

- Elsőként vizsgáltam az Api-CD zárványkomplex képződését fiziológiás pH értékeken és széles koncentráció tartományban. A különböző Api-CD zárványkomplexekhez tartozó fázisoldhatósági függvények alapján

megállapítható, hogy a komplexképződés a HP-β-CD és a SBE-β-CD esetében 1:1 sztöchiometrájú Ezzel szemben a γ-CD és a RM-β-CD esetében a pozitív izoterma magasabb komplexképződésre utal (pl.: 1:2 Api:CD).

- A közeg pH-ja, az ionerőssége, az apigenin molekula ionizáltsági foka és a másodlagos kötőerők létrejötte jelentősen befolyásolja a komplexképzési hajlamot.
- RM-β-CD-nel mintegy 150 szeres oldékonyságnövelés érhető el pH 6,8 értékű közegben (~0,230 mg/ml).
- Spektroszkópiai mérések azt igazolják, hogy az apigenin molekula kromofór része a ciklodextrinek üregében helyezkedik el és másodlagos kötőerők is szerepet játszanak a zárványkomplex kialakulásában.
- Api-CD zárványkomplexek erősebb szabadgyökfogó hatással rendelkeznek, mely a nagyobb apigenin koncentráció és a feltehetően megnövekedett H-donor aktivitás eredménye.

Módosított hatóanyag-leadás multipartikuláris pelletekkel

- Optimalizáltam a fluidizációs eljárással történő rétegzést (apigenin és a magas apigenin tartalmú növényi kivonat), valmint az Eudragit® L és Eudragit® FS polimerekkel történő bevonást.
- Igazoltam, hogy a mikrokristályos cellulóz inert pelletmag alkalmas hordozója lehet az apigenin és az apigenin tartalmú növényi kivonat számára is (~20 mg/1 g pellet és ~5 mg/1 g pellet).
- Kedvező fizikai paraméterekkel rendelkeznek egyaránt a rétegzett és a bevont magok, mind a szemcsealak, szemcseméret eloszlás és a mechanikai tulajdonságok tekintetében, valamint a kedvező gördülékenységi adatok jó kapszulázhatóságra utalnak.
- Bevonat nélküli pelletekről azonnali apigenin kioldódás valósul meg az inert pellet felületéről a közeg pH-jától függetlenül.
- 10% (m/m) Eudragit® L 30 és 15% (m/m) Eudragit® FS 30 filmképző polimer bevonat képes biztosítani a megfelelő hatóanyagleadást.
- A növényi kivonatban található, vízben jól oldódó apigenin glikozidok kioldódási profilja gyorsabb, mindkét polimer esetében a vízben rosszul oldódó apigenin aglikonhoz képest.
- Az antioxidáns hatás vizsgálata alátámasztja mindkét készítmény hatékonyságát *in vitro*.

Célzott hatóanyag-leadás nanorészecskékkel

- Magas bezárási hatásfok (82,61 ± 4,56 %), kedvező méret (376 ± 7,824 nm) és zéta potenciál (-19,20 ± 0,818 mV) értékek következtében a szérum albumin alkalmas biodegradábilis hordozónak bizonyult az apigenin számára (~1,7 mg/ml).
- Elsőként igazoltam fluoreszencia vizsgálatokkal, hogy az apigenin az albumin fehérje II A szubdomén kötőhelyénél helyezkedik el a nanorészecsékben.
- Porlasztva szárítást követően mindhárom szérum albumin készítmény alacsony nedvességtartalmú és optimális aerodinamikai tulajdonságokkal rendelkezik *in vitro*. Tehát a részecskék segédanyag nélkül is megfelelő paraméterekkel rendelkeznek a pulmonáris hatóanyag bevitelhez, melyet a felhasznált segédanyagok közül a L-leucin hatékonyabban segített elő (~2 mg/ dózis).
- Az apigenin az antioxidáns hatását albumin nanorészecskékbe zárva is megtartotta.

KÖVETKEZTETÉSEK

A biológiai forrásból származó molekulák gyógyszerhordozó rendszerekbe történő formulálása jelentős kihívást jelent. Munkám során egy innovatív készítmény kifejlesztésére törekedve a rossz vízoldékonysággal rendelkező apigenin flavonoid számára ciklodextrin zárványkomplexeket állítottam elő. Arra a következtetésre jutottam, hogy a származék ciklodextrinek jelentősebb mértékben képesek megnövelni az apigenin vízoldékonyságát, mint az alap ciklodextrinek. Az komplexképződésnek következtében jelentősen nőtt az apigenin antioxidáns hatása, mely a megnövekedett vízoldékonyságának és H-donor aktivitásának is köszönhető.

Orális adagolásra szánt, különböző bevonattal rendelkező, ezáltal helyspecifikus hatóanyagleadást biztosító apigenin-tartalmú multipartikuláris pelleteket is előállítottam. Optimalizáltam a kivonási eljárást, magas apigenin tartalmú növényi extraktumot (*Petroselinum crispum*) is felhasználtam a formulálás során, így biztosítva az egyéb komponenseknek köszönhetően kialakult erősebb antioxidáns hatást. A készítmény magasabb hatóanyagtartalmának köszönhetően a táplálkozással bejuttatható apigenin mennyiség többszörösét tenné lehetővé, helyi és szisztémás hatást is kifejtve.

Alternatív pulmonális adagolás számára olyan száraz porinhalációs rendszert állítottam elő, ahol hordozórendszerként szérum albumin biodegradábilis fehérjét használtam fel. Az *in vitro* optimális aerodinamikai tulajdonságokkal rendelkező nanorészecskék segítségével akár segédanyag nélkül is megvalósítható a célzott hatóanyagleadás. Az apigenin antioxidáns hatását nem befolyásolta a formulálás.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Értekezéshez kapcsolódó közlemények

Könyvfejezet

1. Pápay ZsE, Balogh E, Zariwala GM, Somavarapu S, Antal I. *Drug Delivery Approaches for Apigenin: A Review.* In Nilus M Stacks (szerk.), *Apigenin and Naringenin: Natural Sources, Pharmacology and Role in Cancer Prevention.* Nova Science Publishers, Hauppauge, 2015: 1-20. (ISBN:978-1-63463-987-3)

Folyóirat közlemények

2. Pápay ZsE, Kállai-Szabó N, Ludányi K, Klebovich I, Antal I. (2016) *Development of oral site-specific pellets containing flavonoid extract with antioxidant activity*. Eur J Pharm Sci, 95: 161-169.
3. Pápay ZsE, Kállai-Szabó N, Balogh E, Ludányi K, Klebovich I, Antal I. (2016) *Controlled release oral delivery of apigenin containing pellets with antioxidant activity.* Curr Drug Deliv, 13: 1-10.
4. Pápay ZsE, Sebestyén Z, Ludányi K, Kállai N, Balogh E, Kósa A, Somavarapu S, Böddi B, Antal I. (2016) *Comparative evaluation of the effect of cyclodextrins and pH on aqueous solubility of apigenin*. J Pharm Biomed Anal, 117: 210-216.
5. Pápay ZsE, Sornsute A, Merchant Z, Antal I, Somavarapu S. (2014) *Rossz vízoldhatóságú flavonoidok oldékonyság növelésének lehetőségei.* Gyógyszerészet 87: (Suppl.1) S113.
6. Pápay ZsE, Antal I. (2014) *Study on the antioxidant activity during the formulation of biological active ingredient.* ESJ, 3: 252-257.
7. Pápay ZsE, Kósa A, Boldizsár I, Ruszkai Á, Balogh E, Klebovich I, Antal I. (2012) *Petroselinum crispum kivonatának gyógyszerészeti vonatkozásai és formulálási lehetőségei.* Acta Pharm Hung, 82: 3-14.

Értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

8. Füredi P, Pápay ZsE, Kovács K, Dalmadi Kiss B, Ludányi K, Antal I, Klebovich I. (2016) *Development and characterization of the voriconazole loaded lipid-based nanoparticles*. J Pharm Biomed Anal, 132: 184–189.
9. Antal I, Budai M, Dávid Á, Kállai N, Klebovich I, Ludányi K, Marton S, Mike-Kaszás N, Pápay ZsE, Plachy J, Sebestyén Z. *Kémiai ellenőrző vizsgálatok a gyógyszertechnológiában: Egyetemi jegyzet IV. éves gyógyszerészhallgatók részére.* Antal István, Klebovich Imre, Ludányi Krisztina (szerk.), Semmelweis Kiadó, Budapest, 2012: 169. (ISBN:9789633312582)