

Segédanyagok oldhatóságra és permeabilitásra gyakorolt hatásának vizsgálata kis-térfogatú *in vitro* módszerekkel

Doktori értekezés

Bárdos Vivien

Gyógyszertudományok és Egészségügyi Technológiák Tagozat

Semmelweis Egyetem



Témavezető: Takácsné Dr. Novák Krisztina, D.Sc., professor emerita
Dr. Angi Réka, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Berkó Szilvia, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kállai-Szabó Nikolett, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsgabizottság elnöke:

Dr. Antal István, Ph.D., egyetemi tanár, dékán

Komplex vizsgabizottsági tagok:

Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Rozmer Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2025

1 BEVEZETÉS

Gyógyszeres terápiák során a hatóanyagok szervezetbe juttatása több adagolási kapun keresztül valósulhat meg (parenterális, orális, transzdermális, inhalációs), ugyanakkor a klinikai gyakorlatban mindmáig az orális (*per os*) alkalmazás tekinthető preferáltnak. Legnagyobb előnye a non-invazív jellege, a költséghatékonysága és a könnyű alkalmazhatósága, amelyek együttesen kiemelkedő beteg-adherenciát eredményeznek

Orális adagolás esetén a hatóanyagok szervezeten belüli sorsát a LADME-folyamatok írják le. A hatóanyag a gasztrointesztinális traktusban feloldódik, majd az intesztinális epitheliumon át felszívódik; ez a lépés többnyire passzív diffúzióval történik. Ezt követően a szisztémás keringéssel eloszlik, és a farmakodinámiai hatás akkor valósul meg, ha a biológiailag aktív (szabad) frakció koncentrációja a hatáshelyen eléri a szükséges küszöbértéket.

Az orális mellett, a transzdermális gyógyszerbevitel is jelentős klinikai szerepet tölt be a gyógyszeres terápiákban. Ebben az esetben a *stratum corneum*, a bőr legkülső rétege jelenti a felszívódás legfőbb akadályát. A hatóanyag molekulamérete és lipofilisége kulcsfontosságú paraméterek, mivel ezek közvetlenül befolyásolják a membránon való áthaladást.

Az eddigiek alapján belátható, hogy akár orális, akár transzdermális bevitelről van szó, a felszívódás kulcslépései az oldódás és a permeáció; ezért a fizikai-kémiai jellemzők – különösen az oldhatóság és a permeabilitás – meghatározóak a biohasznosulás szempontjából. Ezen paraméterek fontosságát hangsúlyozza az is, hogy *Amidon* és *mt sai*, e két paraméter alapján sorolta a hatóanyagokat a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) 4 csoportjába. Így elmondható, hogy vizsgálatuk már a gyógyszerkutatás és a formulációfejlesztés korai szakaszában is elengedhetetlen.

A jelenleg forgalomban lévő készítmények esetén a hatóanyagok közel 40%-a, míg a kutatási fázisban lévő gyógyszerjelölt molekulák 70-90%-a a BCS II (jó permeabilitás, de rossz oldhatóság) vagy BCS IV (mind a permeabilitás, mind az oldhatóság alacsony) osztályába tartozik, így alapvetően rossz vízoldhatósággal rendelkezik. A megközelítések döntően fizikai jellegűek – ide sorolható a részecskeméret-csökkentés (mikronizáció, nanonizáció), az amorfizálás és a szilárd diszperziók előállítása, a zárvány komplexképzés (pl. ciklodextrinekkel), a ko-kristályok kialakítása, valamint a szolubilizálószeres és lipid-alapú rendszerek (pl. SEDDS/SMEDDS) alkalmazása. Kémiai úton történő beavatkozásként említhető a sóképzés vagy a prodrug-képzés, amelyek a hatóanyag fizikai-kémiai profilját módosítva járulhatnak hozzá a jobb oldhatósághoz és biohasznosuláshoz. Ezekhez a technikákhoz elengedhetetlen a különböző formulációs segédanyagok alkalmazása, mint a polimerek, ciklodextrinek, felületaktív anyagok. Ugyanakkor fontos figyelembe venni, hogy az alkalmazott segédanyagok nemcsak az oldhatóságra gyakorolhatnak hatást, hanem a permeabilitásra is.

Először *Dahan és mtsai* vizsgálták az oldhatóság és permeabilitás közötti kapcsolatot segédanyag jelenlétében, melynek eredményeként megállapították, hogy a két paraméter fordított arányosságot mutat. Ez a jelenség a „*solubility-permeability interplay*”, amely mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között észlelhető. A formulációban alkalmazott segédanyagok a permeabilitásban bekövetkező csökkenést különböző mechanizmusok – mint a szabad frakció csökkentése – révén érhetik el. Így a formulációfejlesztés során elengedhetetlen ennek a két fizikai-kémiai tulajdonságnak az együttes vizsgálata az alkalmazott segédanyagok függvényében, hogy az oldhatóság javulás ne járjon szignifikánsan csökkenő permeabilitással.

A termodinamikai oldhatóság, az a maximális koncentráció, melyet a hatóanyag elérhet adott közegben és hőmérsékleten, amikor az oldatban és a szilárd fázisban lévő anyag egyensúlyt tart. Mérésére a telítéssel rázóüvekes (saturated shake-flask, SSF) módszer tekinthető arany-standardnak. A passzív permeabilitás *in vitro* meghatározására a PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) módszert széleskörben alkalmazzák. A PAMPA rendszer két 96-lyukú lemezből (donor és akceptor) és a köztük lévő mesterséges lipid membránból áll. Sejtes rendszerekhez (Caco2) viszonyítva a módszer nagy áteresztőképességet, jó reprodukálhatóságot és költséghatékonyságot kínál, ám csak a passzív diffúzió vizsgálatára alkalmas. Az utóbbi években számos – a kioldódást és a permeabilitást egyidejűleg meghatározó – módszer és eszköz került kifejlesztésre, melyek alkalmazása lehetővé teszi a „*solubility-permeability interplay*” pontosabb feltérképezését, és hozzájárulhat a biohasznosulás előrejelzésének javításához.

2 CÉLKITŰZÉSEK

A munkám célja farmakokinetikai szempontból két fontos fizikai-kémiai paraméter – a termodinamikai oldhatóság és a permeabilitás – vizsgálata volt, különböző formulációs segédanyagok jelenlétében orális és transzdermális adagolás esetén. További célom volt egy átfogó elemzés elvégzése a két vizsgált fizikai-kémiai paraméter közötti kapcsolat tisztázására különböző körülmények között, ezáltal támogatva a formulációfejlesztés folyamatát:

- Különböző oldószerek transzdermális felszívódásra gyakorolt hatásának vizsgálata
 - A HT Skin-PAMPA módszer szűrőeszközként való alkalmazhatóságának vizsgálata apoláris molekulák és eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező, a kozmetikai iparban gyakran használt oldószerek és oldószer elegyek esetén, feniletil-rezorcint (PER) alkalmazva modellanyagként.
 - Új, egyszerű módszer kidolgozása a membrán integritásának vizsgálatára, amely képes igazolni a mérés során a membrán intaktságát és így a passzív diffúzió pontos modellezését.
 - Franz cella segítségével *ex vivo* sertésfülön végzett permeabilitás adatok meghatározása és a PAMPA eredményekkel való összevetése, a legjobb korrelációt biztosító permeabilitási paraméter meghatározásának érdekében.
- A segédanyagok oldhatóságra és GI permeabilitásra gyakorolt hatásának, valamint a köztük lévő összefüggéseknek vizsgálata
 - Kilenc, orális készítményekben alkalmazott segédanyag hatásának átfogó vizsgálata a pH, az alkalmazott koncentrációjuk és a modellvegyületek (karbamazepin, naproxén, pimobendán) sav-bázis karakterének függvényében a termodinamikai oldhatóságra és a gasztrointesztinális permeabilitásra.
 - A mérési eredményekből kapott adatbázis felhasználása a vizsgált segédanyagok oldhatóságot és permeabilitást befolyásoló hatásának vizsgálatához. A vizsgált paraméterek közötti összefüggések alapján az az optimális segédanyag-választás támogatása.

3 MÓDSZEREK

Skin-PAMPA membránintegritás vizsgálata

A membránintegritás vizsgálatához a Skin-PAMPA plate-eket 24 órával a mérés kezdete előtt hidratáltuk. Ezt követően minden cellát feltöltöttünk a mérés során alkalmazott oldószerekkel vagy oldószer elegyekkel, majd 7 óráig inkubáltuk a lemezt. Az inkubációs idő leteltével az oldószereket eltávolítottuk, majd egy hagyományos mérést végeztünk piroxikám referenciaanyaggal.

Skin-PAMPA permeabilitás vizsgálatok

A PER permeabilitás vizsgálataihoz használt Skin-PAMPA lemezeket 24 órával a mérés kivitelezése előtt hidratáltuk. A hatóanyagot a vizsgált oldószerekben oldva a donor oldalra pipettáztuk, az akceptor oldal a vérkeringést modellező pH=7,4 Prisma puffert tartalmazott. A méréseket $32 \pm 0,5$ °C hőmérsékleten végeztük. A mérés során hét mintavételi pont (7,5, 15, 30, 60, 120, 240 és 360 min) volt, mely után az akceptor fázist friss pufferrel póoltuk.

Sertésfülön végzett penetrációs vizsgálatok

A bőrminta vastagságát 700 és 1200 μm közé állítottuk be. A bőr integritását Delfin készülékkel vizsgáltuk. A PER helyi alkalmazása után a mérés 16 órán át tartott, óránkénti mintavétellel, $32 \pm 0,5$ °C hőmérsékleten.

PER közelítő és termodinamikai oldhatóságának meghatározása

Az oldhatóság meghatározásához szükséges méréseket a 105.-ös OECD vizsgálati irányelvek alapján kiviteleztek 32°C -on. A közelítő oldhatóságot azon oldószer térfogataként adtuk meg, melyben 1 óra elteltével teljes oldódást figyeltünk meg.

A termodinamikai oldhatóság meghatározásához a mintákat a közelítő oldhatósági mérések alapján készítettük el, majd 14 000 fordulat/ perc sebességgel centrifugáltuk, hogy a mérés előtt biztosítsuk a részecskék kicsapódását. A koncentráció meghatározása LC/MS/MS módszerrel történt.

Skin-PAMPA és a sertésfülön végzett mérések kiértékelése

A Skin-PAMPA esetén a fluxust (J) a permeabilitás-idő görbe meredekségéből számítottuk ki 0 és 30 perc között. A görbe alatti területet (AUC) a permeabilitási profil integrációjával kaptuk meg OriginPro v.2019b szoftvert használva.

A sertésfülön végzett mérések során a penetrációt jellemző paraméterek (permeabilitási állandó, K_p , és a fluxus) meghatározásához az egységnyi bőrfelületen összesen permeált anyagmennyiséget (Q_t , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) az idő (h) függvényében ábrázoltuk a GraphPad PrismT v.7 szoftver segítségével.

Egyensúlyi oldhatóság meghatározása

A modellanyagok (karbamazepin, naproxén, pimobendán) egyensúlyi oldhatóságának meghatározására a standardizált telítéssel-rázótölcséres eljárást alkalmaztuk. A vizsgálatokat $37 \pm 0,5$ °C-os hőmérsékleten végeztük 3 különböző pH-jú (pH=3,0, 5,0 és 6,5) Britton-Robinson pufferben. 1 órával a mérés kezdete után a pH-t ellenőriztük és ha szükséges volt, visszaállítottuk. Az oldatok koncentrációjának meghatározása UV spektrofotometriás detektálással történt. Minden vizsgált közegben három párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

GIT-PAMPA mérések

A mérések során STIRWELL™ PAMPA plate-eket használtunk, GIT-lipidkeveréket alkalmazva membránként. A méréseket $37 \pm 0,5$ °C hőmérsékleten végeztük, pH=7,4 HEPES-1% SLS puffert alkalmazva akceptorként. A nem kevert vizes réteg vastagságát a vizsgálat során 60 µm-re állítottuk be a cellákban történő keveréssel. Az oldatok koncentrációjának meghatározása UV spektrofotometriás detektálással történt.

Az oldhatóság és permeabilitás adatok elemzése

Az egyes vizsgálatok során a permeabilitási és oldhatósági értékek összehasonlítását varianciaanalízissel végeztük, amelyhez az általános lineáris modellt, valamint kontraszt-összehasonlítási módszert alkalmaztunk. Az elemzést minden vizsgált pH-értéken elvégeztük.

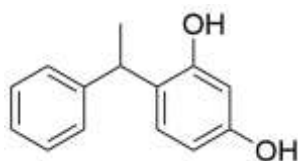
Részecskeméret vizsgálatok

A termodinamikai oldhatóság végén a modellanyagok részecskeméretét és méreteloszlását lézerdiffraktometriás módszerrel határoztuk meg. A részecskeméret-meghatározásokat 25 ± 1 °C hőmérsékleten végeztük Mastersizer 2000 készülékkel. A mérési megbízhatóság növelése érdekében minden mintát három ismétlésben vizsgáltunk, egyenként 10 másodperces mérési időt alkalmazva.

4 EREDMÉNYEK

• *Különböző oldószerek transzdermális felszívódásra gyakorolt hatásának vizsgálata*

A bőr barrier funkciója mellett, potenciális beviteli kaput is biztosít. Ennek következtében a transzdermális felszívódás vizsgálatának és fejlesztésének mind a gyógyszer-, mind a kozmetikai iparban jelentős szerepe van. A bőr modellezésére számos rendszert fejlesztettek, melyek egyike a nagyáteresztőképességű Skin-PAMPA módszer. Munkám során célul tűztem ki, hogy a módszer alkalmazhatóságát vizsgáljam különböző polaritású oldószerek esetén. Erre modellanyagként a feniletil-rezorcin (PER) választottuk, ami lipofilitása ($\log P=2,98$) és molekulamérete alapján megfelelő a transzdermális használatra (1. ábra).



1. Ábra: Feniletil-rezorcin (PER) szerkezeti képlete

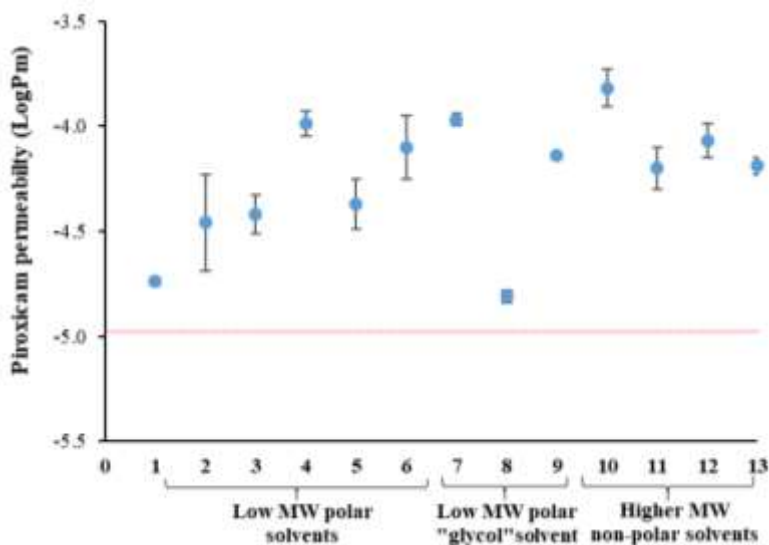
Az 1. táblázat tartalmazza a vizsgálat során alkalmazott 13 oldószert ill. oldószer elegyet, melyek közt mind poláros, mind nem-poláros oldószerek megtalálhatók.

1.Táblázat: A vizsgált oldószerek

Oldószer csoport	Kód	Oldószer	Oldószerek molekulatömege (MW)
Alacsony-MW poláris oldószerek	S1	Víz	18,0
	S2	Etanol	46,1
	S3	Glicerín	92,1
	S4	Dimetilizoszorbid	174,2
	S5	Víz/etanol – 80:20 (w/w)	n.a.
	S6	Víz/dimetilizoszorbid – 90:10 (w/w)	n.a.
Alacsony-MW poláris “glikol típusú” oldószerek	S7	Propilén-glikol	76,1
	S8	Víz:propilén-glikol – 80:20 (w/w)	n.a.
	S9	Víz/propilén-glikol/etanol – 10:30:60 (w/w/w)	n.a.
Magas-MW nem-poláris oldószerek	S10	Kaprónsav trigliceridek	554,8/470,7
	S11	Oktil-dodekanol	298,6
	S12	Barackmag olaj	n.a.
	S13	Kukorica olaj	n.a.

Első lépésként a membrán integritásának vizsgálatára dolgoztunk ki egy egyszerű módszert. Ennek során a membránokat előkezeltük a vizsgált oldószerekkel, majd ismert permeabilitású

referenciaanyaggal (piroxikám) egy hagyományos mérést végeztünk, melynek eredményét az 2. ábra szemlélteti. A membrán intaktságát az eredmények alacsony szórásával tudtuk alátámasztani.



2. Ábra: Skin-PAMPA membránintegritás vizsgálatának eredménye

A mérések során a PER-t „infinite” dózisban alkalmaztuk, hogy a megfelelő koncentráció gradiens biztosítva legyen a teljes mérési idő során. A permeabilitásra jellemző paramétereket (fluxus (J), permeált anyagmennyiség, AUC, membrán permeabilitási állandó ($\log P_m$)) a permeált anyagmennyiség vs. idő görbe felhasználásával kaptuk meg. A fluxus számításához lineáris regresszió analízist végeztünk, melyhez a permeált anyagmennyiség vs. idő görbe első 3 pontját (7,5; 15 és 30 min) használtuk. A Skin-PAMPA membránján történő permeabilitásra jellemző paramétereket a 2. táblázat foglalja össze.

2.Táblázat: Skin-PAMPA permeabilitási paraméterek

Kód	C_D [mg/mL]	J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$]	Lag idő [min]	Permeált anyagmennyiség (6 h) [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	C_D -ra normalizált AUC [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	$\log P_m$
S1	1	$72,38 \pm 7,83$	1,4	$169,2 \pm 4,48$	647,1	$-1,12 \pm 0,06$
S2	500	$12033 \pm 252,0$	0,0	13575 ± 1710	104,6	$-1,62 \pm 0,01$
S3	5	$137,4 \pm 21,64$	5,5	$869,2 \pm 112,5$	491,3	$-1,57 \pm 0,07$
S4	70	$208,6 \pm 53,00$	3,6	$1342 \pm 298,2$	55,2	$-2,54 \pm 0,13$
S5	10	$589,2 \pm 25,21$	0,9	$1662 \pm 168,7$	568,5	$-1,23 \pm 0,03$

S6	1	76,41 ± 15,20	0,0	174,6 ± 21,69	550,7	-1,13 ± 0,07
S7	500	2118 ± 501,8	3,8	11142 ± 729,6	69,1	-2,38 ± 0,11
S8	10	569,7 ± 4,82	1,1	1772 ± 98,08	595,2	-1,24 ± 0,01
S9	500	10846 ± 326,7	1,4	14926 ± 2431	114,1	-1,66 ± 0,01
S10	70	376,6 ± 33,58	3,0	748,9 ± 91,94	38,2	-2,27 ± 0,04
S11	1	7,18 ± 1,60	3,9	18,91 ± 0,40	64,5	-2,16 ± 0,08
S12	1	2,45 ± 0,57	3,3	13,42 ± 1,90	36,7	-2,63 ± 0,07
S13	1	3,26 ± 0,41	1,4	12,93 ± 1,30	38,6	-2,48 ± 0,06

Az oldószereket a $\log P_m$ értékek alapján 3 csoportba tudtuk kategorizálni.

Az első csoportba a magas permeabilitást ($\log P_m > -1,25$) biztosító oldószerek kerültek, ide tartozott a víz (S1) és víz tartalmú oldószer keverékek (S5, S6, S8). Ugyanakkor a PER oldhatósága korlátozott ezekben az oldószerekben (1-10 mg/mL).

A második csoport közepes permeabilitás értékeket ($\log P_m -1,5$ és $-2,3$ között) mutat. Az ide tartozó oldószerek 2 csoportba oszthatók: (I.) a magas molekulatömegű, nem-poláris oldószerek (S10, S11) és (II.) a kis molekulatömegű, poláris alkoholok, illetve az ezeket magas koncentrációban tartalmazó oldószerkeverékek (S2, S3, S9).

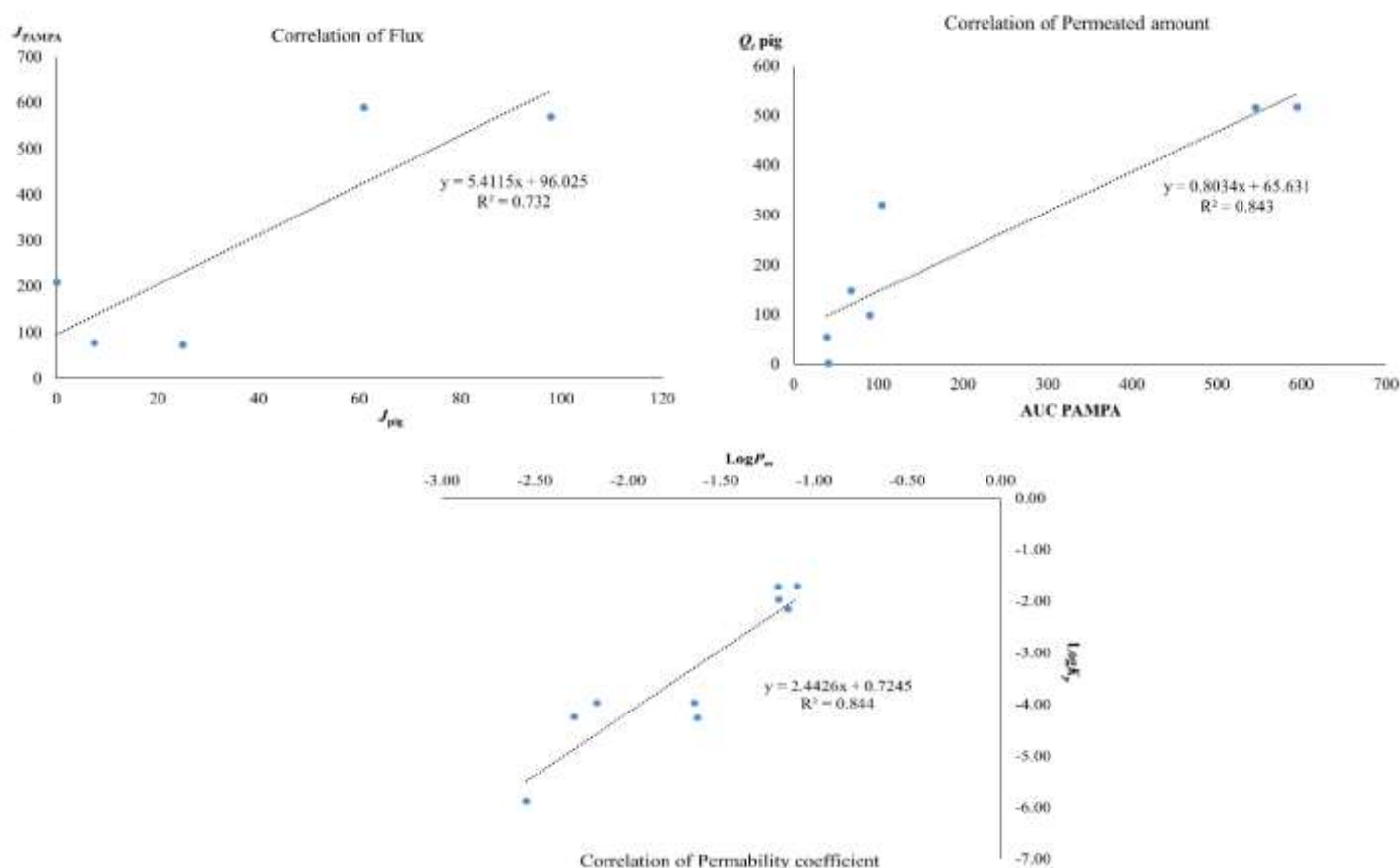
A harmadik csoportba az alacsony permeabilitást ($\log P_m < -2,4$) eredményező oldószerek kerültek. Ez a csoport is két alcsoportra osztható: (I.) az alacsony molekulatömegű szerves oldószerek, mint a dimetil-izoszorbid (S4) és a propilénglikol (S7), amelyekben a PER oldhatósága magas (75 és 500 mg/mL), és (II.) a nagyobb molekulatömegű, nem-poláris oldószerek, mint a barackmag-, és kukoricaolaj (S12, S13), ezekben a PER oldhatósága alacsony, ~1mg/mL.

Kilenc oldószer esetén sertésfülből származó bőrmintán is végeztünk permeabilitási vizsgálatokat Franz-cellát alkalmazva, melyek eredményét a 3. táblázat foglalja össze.

3.Táblázat: Sertésfűl bőrön vizsgált permeáció paraméterei

Kód	C_D [mg.mL ⁻¹]	J [μg.cm ⁻² .h ⁻¹]	Permeált anyagmennyiség (16 h) [μg.cm ⁻²]	$\log K_p$
S1	1	25 ± 9,6	261 ± 100	-1,71 ± 0,32
S2	368	20 ± 15	98 ± 67	-4,26 ± 0,51
S4	60	0,08 ± 0,024	1,09 ± 0,39	-5,88 ± 0,19
S5	8	61 ± 18	515 ± 203	-1,97 ± 0,34
S6	1	7,5 ± 3	100 ± 37	-2,16 ± 0,26
S7	350	20 ± 17,6	147 ± 120	-4,24 ± 0,81
S8	51	98 ± 50	516 ± 109	-1,72 ± 0,34
S9	373	40 ± 15	320 ± 149	-3,97 ± 0,24
S10	75	8 ± 3,5	54 ± 34	-3,97 ± 0,29

A kapott adatokat korreláltattuk a Skin-PAMPA mérési eredményekkel. A korrelációkat a 3. ábra szemlélteti.



3. Ábra: A Skin-PAMPA és a sertésfülön végzett permeációs vizsgálatok korrelációja

A fluxus esetén megállapítható, hogy az eredmények a Skin-PAMPA esetén minden vizsgált oldószer esetén magasabbak. Ez azzal magyarázható, hogy a Skin-PAMPA egy kevésbé komplex membránnal rendelkezik, mint a sertésbőr minták. A fluxus vizsgálata eredményezte a legalacsonyabb korrelációt ($R^2=0,732$) a két módszer között, továbbá volt négy kilógó adat (S2, S7, S9, S10), amely oldószeres esetén a Skin-PAMPA 3 nagyságrenddel magasabb fluxust jelzett, mint a sertésfűl minták eredményei.

A következő két vizsgált paraméter (permeált anyagmennyiség és a permeabilitási koefficiens) már normalizálva van a kiindulási donor koncentrációra, így pontosabb korrelációt kaptunk. A permeált anyagmennyiséget a permeabilitási görbe integrálásával számítottuk, melyet a Skin-PAMPA esetén a görbe alatti területtel (AUC_{PAMPA}), míg a sertésfűl minták esetén a meghatározott idő alatt permeált anyagmennyiséggel ($Q_{t,pig\ skin}$) fejeztük ki. Pontosabb korrelációt ($R^2=0,843$) eredményezett, mint a fluxus vizsgálata, ugyanakkor ebben az esetben is volt két kiugró adat (S1 és S6), ahol közel 1,5-szeres különbség van a mért értékekben.

A legjobb korrelációt ($R^2=0,844$) a permeabilitási koefficiensek logaritmusának (Skin-PAMPA esetén a $\log P_m$, míg a sertésbőrön végzett vizsgálatok esetén a $\log K_p$) összehasonlításakor kaptuk. Továbbá, ebben az esetben minden mérési adat szerepel a korrelációs egyenletben, kiugró adat nem volt.

• ***A segédanyagok oldhatóságra és GI permeabilitásra gyakorolt hatásának, valamint a köztük lévő összefüggéseknek a vizsgálata***

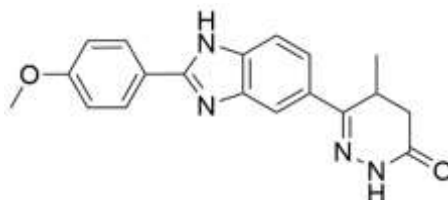
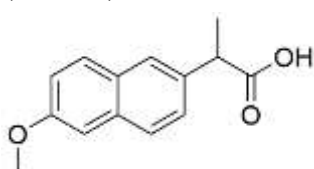
A szakirodalom kiemelt jelentőséget tulajdonít a különböző segédanyagok által okozott „solubility-permeability interplay”-nek, ugyanakkor a legtöbb vizsgálat egy specifikus hatóanyag és segédanyag kölcsönhatására fókuszál. A munkám célja egy átfogó vizsgálat kivitelezése volt, mely figyelembe veszi a molekulák sav-bázis karakterét, a pH befolyásoló hatását és a vizsgált segédanyagok különböző koncentrációit. A munkám során kilenc - főleg orális készítményekben előforduló – segédanyag termodinamikai oldhatóságra és gasztrointesztinális permeabilitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk (4. táblázat). A segédanyagok kiválasztása során a fő szempont volt, hogy a forgalomban lévő készítményekben használt leggyakoribb segédanyag kategóriákat vizsgáljuk. Így a kísérleti elrendezés tartalmazott töltőanyagokat (laktóz, mannit, szorbit), inklúziós komplex képzésére alkalmas ciklodextrineket (HP β CD, SBE β CD), nem-ionos (Tween 80) és ionos (SLS) tenzideket, és polimereket (PVP-K25 és PVPVA 64) (4. táblázat).

4.Táblázat: Vizsgált segédanyagok

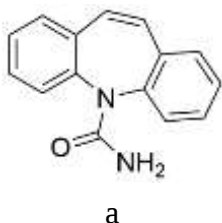
Segédanyag típusa	Vizsgált segédanyagok
Töltőanyagok	Laktóz Szorbit Mannit
Ciklodextrinek	HP β CD SBE β CD
Felületaktív anyagok	Tween 80 SLS
Polimerek	PVP-K25 PVPVA 64

Modell anyagként, három különböző sav-bázis karakterrel rendelkező vegyületet választottunk: a karbamazepint (CAR), mint semleges, a naproxént (NAP), mint savas és a pimobendánt (PIMO), mint bázikus molekulát (4. ábra). A munkánk során

három bioreleváns pH
értéket (pH=3,0,



pH=5,0 és pH=6,5) és három segédanyag koncentrációt (1:0,5; 1:1; 1:3) vizsgáltunk.



4. Ábra: (a) Karbamazepin, (b) naproxén, (c) pimobendán szerkezeti képlete

A módszerrel b termodinamikai oldhatóság c értékeket az SSF határoztuk meg. A mérések során a

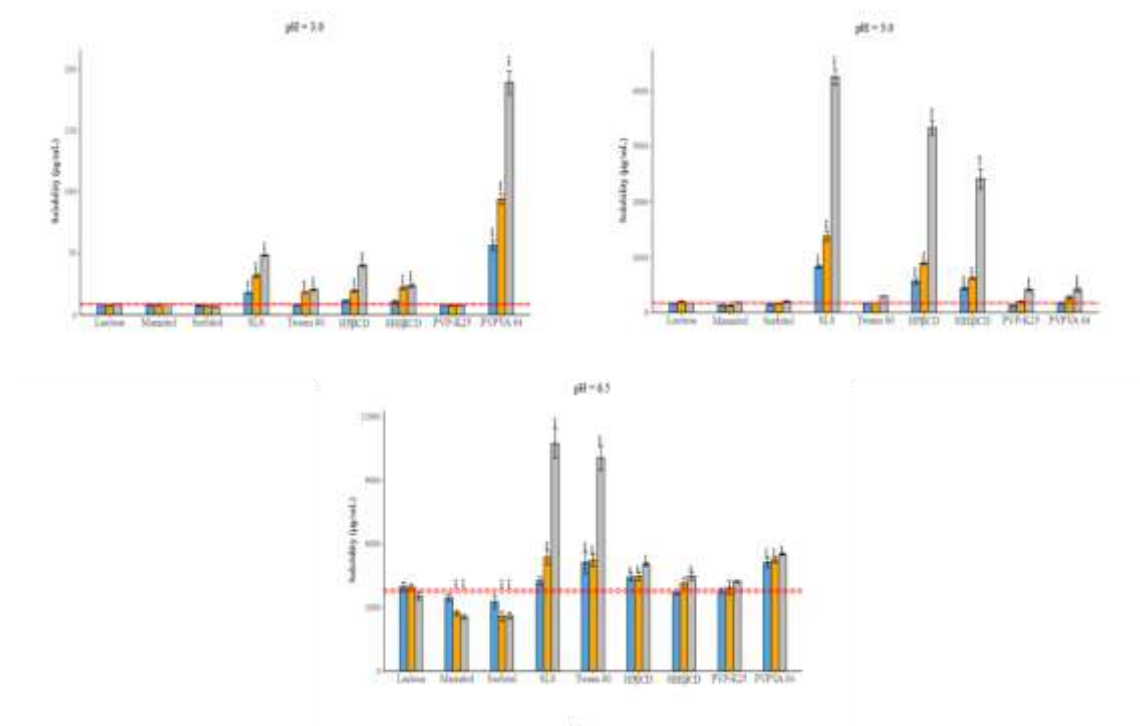
segédanyagok jelenléte nélkül végzett méréseket használtuk referenciaként, melyet az 5. táblázat foglal össze.

5.Táblázat: A termodinamikai oldhatóság referencia értékei

	Termodinamikai oldhatóság (µg/mL)		
	pH=3,0	pH=5,0	pH=6,5
CAR	n.a.	n.a.	292,04±4,88
NAP	8,45±0,41	171,97±7,48	3791,55±63,07
PIMO	11,46±0,30	0,85±0,04	0,28±0,01

A CAR-t csak egy pH értéken mértük, mivel semleges molekulaként oldhatósága független a környezet pH-jától. A CAR esetén a töltőanyagok nem azonos módon befolyásolták az oldhatóságot. Míg a mannit és a laktóz alkalmazásakor enyhe növekedés figyelhető meg, addig a szorbit esetén inkább csökkenés a jellemző. A legnagyobb oldhatóság növekedéshez az SLS vezetett (~4x-es), míg a ciklodextrinek ~1,5-2x-es növekedést eredményeztek, ezen belül a HPβCD hatása kifejezettebb volt, mint a SBEβCD-é. E vegyületnél a polimerek nem okoztak szignifikáns változást.

A NAP esetén megállapítható, hogy a segédanyagok hatását nagyban befolyásolja a molekula ionizáltsági állapota. A NAP oldhatóság adatait az 5. ábra szemlélteti. A cukoralkoholok oldhatóság csökkentő hatása kifejezettebb az ionos forma koncentrációjának növekedésével. Míg ezen molekula esetén is az SLS okozza a legnagyobb oldhatóság javulást, egy esetet kivéve: pH=3,0 értéknél a PVPVA 64 közel 20x-os oldhatóság növekedést idézett elő. A ciklodextrinek közül a HPβCD hatása ezen molekula esetén is jelentősebb, mint a SBEβCD-é.



5. Ábra: A segédanyagok hatása a NAP oldhatóságára 3 tömegarányánál pH=3,0; pH=5,0 és pH=6,5 BRB pufferben (oszlopok: kék: 1:0,5, narancs 1:1, szürke 1:3 API: segédanyag arány; piros vonal: referencia oldhatóság érték; piros szaggatott vonal: hibaszávok 95% konfidencia intervallum); p értékek a következők *** <0,001, ** 0,01-0,001, * 0,01-0,05

A PIMO esetén is pH-függés tapasztalható. Míg a laktóz nem okoz szignifikáns változást, addig a mannit és a szorbit az alkalmazott pH-tól függően eltérő hatást gyakorol, ami ebben az esetben is az ionos forma jelenlétében jelentősebb. Míg a legtöbb esetben az SLS okozta a legjelentősebb oldhatóság javulást, addig pH=3,0-nál, ahol a kationos forma dominál közel 30%-os csökkenéshez vezetett, valószínűsíthetően egy rosszul oldódó laurilszulfátsó kialakulásának következtében. A ciklodextrinek esetén a HPβCD hatása ezen molekulánál is jelentősebb, mint a SBEβCD-é. A polimerek közül a PVPA 64 oldhatóságnövelő hatása nagyobb, mint a PVP-K25-é, különösen a semleges forma jelenléte esetén.

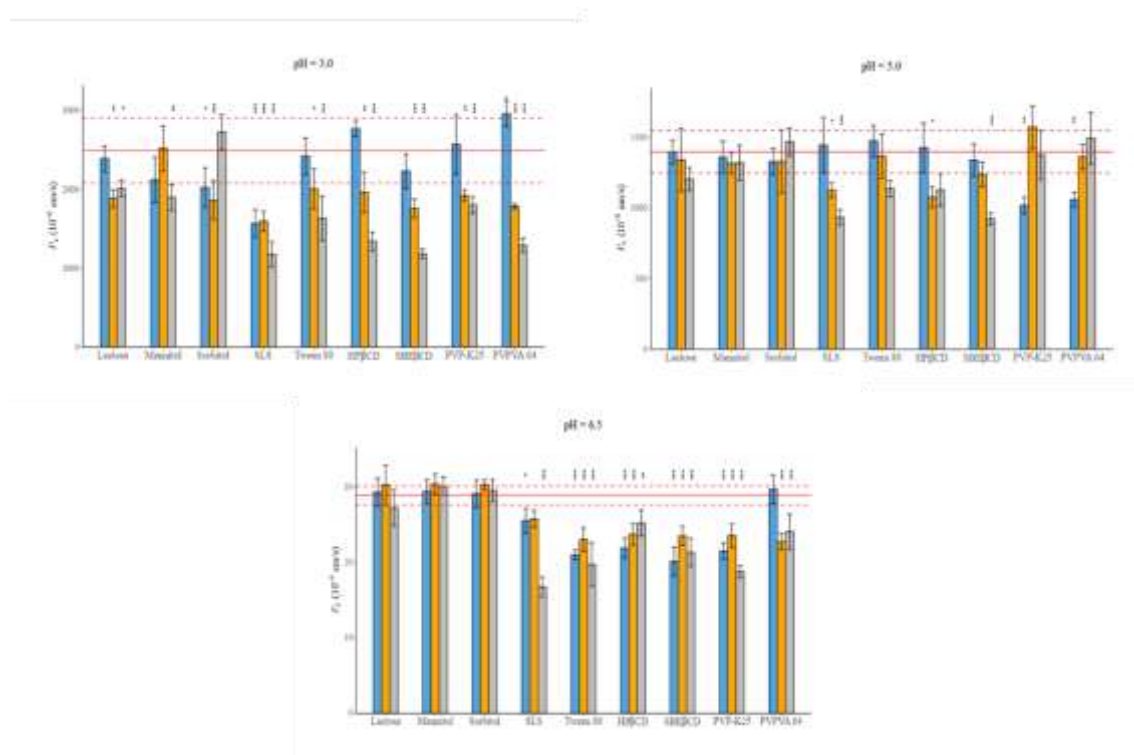
A permeabilitás méréseket PAMPA módszerrel végeztük és hasonlóan az oldhatóság mérésekhez itt is a segédanyag nélküli értékek szolgáltak referenciaként, melyet a 6. táblázat tartalmaz.

6.Táblázat: A permeabilitás mérések referencia értékei

	Effektív membránpermeabilitás (10^{-6} cm/s)		
	pH=3.0	pH=5.0	pH=6.5
CAR	n.a.	n.a.	261.38±16.20
NAP	997.62±46.95	496.82±32.41	28.92±1.61
PIMO	12.00±1.42	274.82±16.13	339.67±20.26

Az oldhatóság mérésekhez hasonlóan a CAR esetén csak egy pH értéken történtek mérések. Míg a töltőanyagok nem befolyásolták a membránpermeabilitást, addig a többi segédanyag csökkenést okozott, ám a csökkenés mértéke nem minden esetben mutat egyértelmű koncentráció függést. A legjelentősebb csökkenést az SLS alkalmazása során tapasztaltuk.

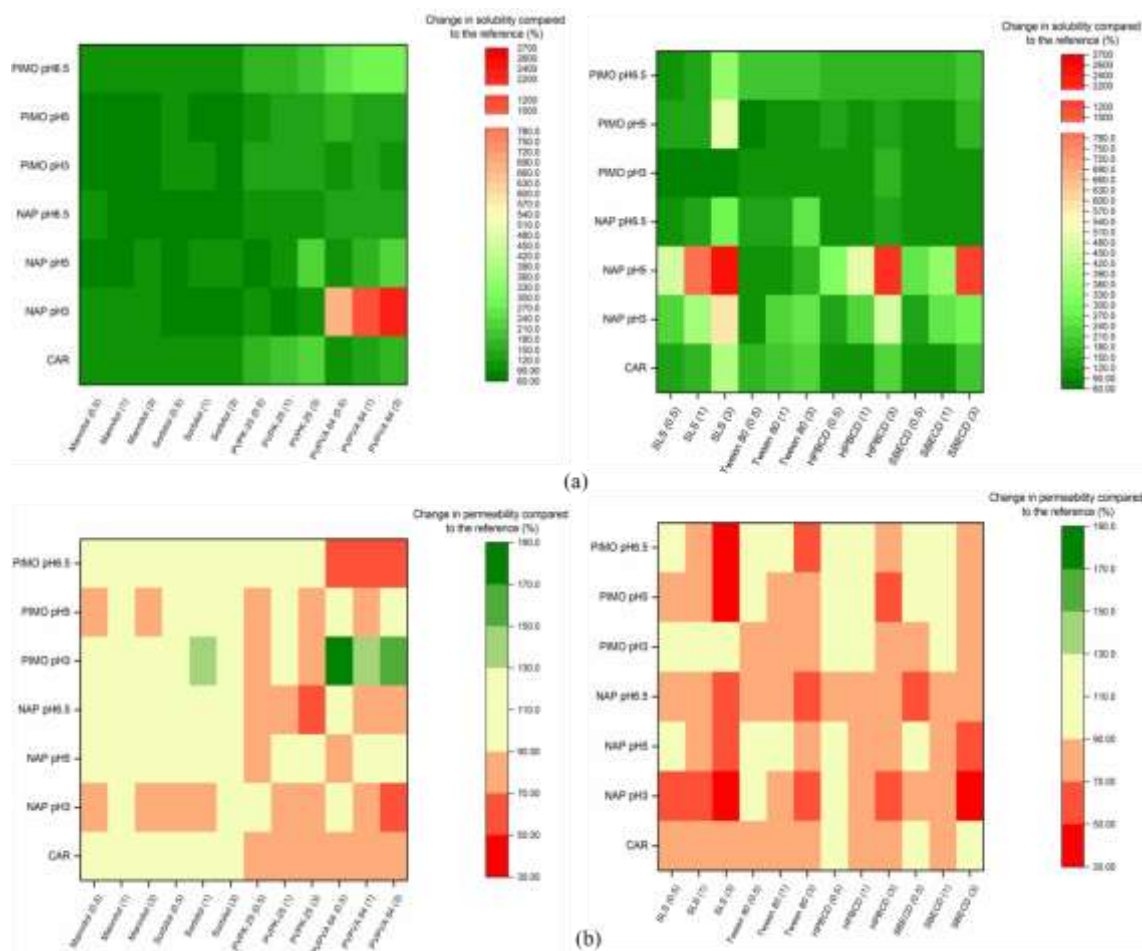
A NAP esetén a laktóz nem okoz számottevő különbséget, míg a cukoralkoholok permeabilitás csökkenést eredményeznek, ami jelentősebb a semleges forma jelenlétében. Hasonló tendencia figyelhető meg a polimerek esetén, ahol a PVP-K25 ~30%, míg a PVPVA64 ~50%-os permeabilitás csökkenést eredményez a neutrális forma jelenlétében. Az ionos forma növekedésével a PVP-K25 hatása hasonló, míg a PVPVA 64 esetében ez a hatás kevésbé lesz kifejezett (~20%). Ugyanakkor, míg az oldhatóság javításban a HP β CD hatása kifejezettebb, addig a permeabilitást a SBE β CD csökkentette nagyobb mértékben. Az oldhatósághoz hasonlóan az SLS érte el a legnagyobb változást, ami közel 50%-os permeabilitás csökkenéshez vezetett. A NAP permeabilitás adatait a 6. ábra szemlélteti.



6. Ábra: A segédanyagok hatása a NAP permeabilitására 3 tömegarányánál pH=3,0; pH=5,0 és pH=6,5 BRB pufferben (oszlopok: kék: 1:0,5, narancs 1:1, szürke 1:3 API: segédanyag arány; piros vonal: referencia permeabilitás érték; piros szaggatott vonal: hibaszávok 95% konfidencia intervallum); p értékek a következők *** <0,001, ** 0,01-0,001, * 0,01-0,05

A PIMO esetén hasonló tendenciák vannak, mint a NAP-nél. A laktóz nem okoz számottevő változást, míg a cukoralkoholok ionizáltsági állapottól függően befolyásolják a permeabilitást is. A PVP-K25 esetén kisebb befolyásoló hatás érvényesül, mint a PVPVA 64-et alkalmazva. Ez utóbbinál további érdekesség, hogy amikor az ionos forma jelenléte dominál, akkor ~1,5x-ös permeabilitás javulás, míg pH=6,5-ös közegben, ahol a molekula 99%-a semleges formában van, ugyanilyen mértékű permeabilitás csökkenés jelentkezett. A PIMO esetén a HP β CD permeabilitás csökkentő hatása jelentősebb, mint a SBE β CD-é. A legtöbb kísérleti elrendezésben az SLS eredményezte a legnagyobb permeabilitás csökkenést, kivétel a pH=3,0 pufferben, ahol nem okozott szignifikáns változást, ami jó összhangot mutat az oldhatóság mérésekkel.

A 7. ábra bemutatja a különböző segédanyagok oldhatóságra és permeabilitásra gyakorolt hatását a referenciához viszonyítva, százalékban kifejezve. Mivel a laktóz hatása elhanyagolható volt, így nem szerepel az ábrán



7. Ábra: (a) Az oldhatóságban bekövetkező változás százalékban kifejezve (b) a permeabilitásban bekövetkező változás százalékban kifejezve

A cukoralkoholok esetén jelentősebb hatás az ionos forma jelenlétében volt észlelhető. Ennek oka lehet egyrészt a hidrotrop tulajdonságuk, másrészt növelhetik a H-hidak erősségét a vízmolekulák között. A ciklodextrinek esetén a HP β CD szolubilizáló hatása kifejezettebb, mint a SBE β CD-é. Ebben szerepe lehet mind a molekula méretének – a kisebb méretű molekulák jobban illeszkedhetnek a HP β CD üregébe - mind a molekula töltésének – a SBE β CD negatív töltésének köszönhetően felléphetnek elektrosztatikus kölcsönhatások. A permeabilitás esetén az alacsonyabb segédanyag koncentrációk nem okoznak szignifikáns változást, de magasabb koncentráció esetén az oldhatóság növekedésnek megfelelően csökkenést eredményeznek a szabad frakció csökkentése révén. A Tween 80 szolubilizáló hatása alacsonyabb az SLS-hez viszonyítva, ennek egyik oka lehet a nagyobb molekula mérete és aggregációra való hajlama. Ennek következtében permeabilitás csökkentő hatása is alacsonyabb (~20-25%), mint az SLS-é (~60%). A polimerek esetén a PVPVA 64 hatása kifejezettebb, mint a PVP-K25-é, kivéve a CAR esetén. A PVPVA 64 jobb hatására magyarázatot adhat kopolimer szerkezete, a hidrofób vinil-acetát csoportok amfifil karaktert kölcsönöznek a molekulának, ami micella képzésre is hajlamossá teheti. Az oldhatósághoz hasonlóan a permeabilitás változás is ionizáltsági állapottól függ. A PIMO esetén az ionos forma jelenlétében a PVP-K25 hatása kifejezettebb, míg a semleges forma esetén ez fordítva tapasztalható. Ebben az esetben a két polimer koncentráció függő hatása nem egyértelmű. A NAP esetén is a semleges forma esetén tapasztalható erőteljesebb befolyásoló hatás.

5 KÖVETKEZTETÉSEK

1. Igazoltam a Skin-PAMPA technika, mint szűrő módszer alkalmazhatóságát különböző polaritású oldószerek és oldószerkeverégek permeabilitásra gyakorolt hatásának vizsgálatok során apoláris hatóanyagok esetén. Ennek alapján sikeresen igazoltam, hogy a módszer képes a kozmetikában rutinszerűen alkalmazott oldószerek okozta permeabilitás különbségek megfelelő kimutatására. [I]
2. Új, egyszerű membránintegritás vizsgálati módszert dolgoztam ki, mely során megállapítást nyert, hogy a referenciavegyülettel mért permeabilitás értékek szórásából következtetni lehet membránintegritás meglétére. [I]
3. Az *in vitro* Skin-PAMPA módszerrel kapott eredményeket a sertésfülön végzett *ex vivo* Franz-cellás eredményekkel korreláltatva megállapítottam, hogy a $\log P_m$ mutatta a legerősebb kapcsolatot, prediktív értéket, és a vizsgálati tartományban koncentráció-függetlennek bizonyult. [I]
4. Elsőként végeztem átfogó vizsgálatot három különböző sav-bázis tulajdonságú hatóanyag termodinamikai oldhatóságának és GI permeabilitásának tanulmányozására kilenc gyógyszeriparban használt formulációs segédanyag jelenlétében (töltőanyagok, CD-k, felületaktív anyagok, polimerek), három bioreleváns pH-n. A validált módszerekkel kapott adatbázis jó alapot szolgáltat a két fizikai-kémiai paraméter esetében az ionizáltsági állapot és a segédanyagkoncentráció befolyásoló hatásának vizsgálatára. [II]
5. Igazoltam, hogy az ionizálható modellanyagok esetében az oldhatóság és a permeabilitás pH-függése fennmarad a segédanyagok jelenlétében is. Hatásuk alapján a segédanyagok három csoportba sorolhatók (nincs szignifikáns hatásuk; szignifikáns, de csekély mértékű hatásuk van; erős befolyásoló szereppel bírnak). [II]
6. Vizsgálataim sikeresen igazolták a „*solubility-permeability interplay*” (SPI) fennállását minden vizsgált segédanyagnál. A töltőanyagok sem az oldhatóságot, sem a permeabilitást nem befolyásolták, ami az SPI meglétét támasztja alá. A CD-k, felületaktív anyagok és a polimerek pedig jelentős oldhatóság növekedést és permeabilitás csökkenést idéztek elő. Eredményeink rámutatnak arra, hogy a formulációfejlesztés során az oldhatóság mellett a permeabilitás folyamatos vizsgálatára is szükség van, azaz támogatják az ADDF (*absorption driven drug formulation*) stratégiát. [II]

6 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Tézisek alapjául szolgáló közlemények

- I. Sinkó B.; Bárdos V.; Vesztergombi D.; Kádár S.; Malcsiner P.; Moustie A.; Jouy C.; Takács-Novák K.; Grégoire S. Use of an in vitro skin parallel artificial membrane assay (Skin-PAMPA) as a screening tool to compare transdermal permeability of model compound 4-phenylethyl-resorcinol dissolved in different solvents. *Pharmaceutics* **2021**, *13*(11), 1758.
- II. Bárdos V.; Szolláth R.; Tőzsér P.; Mirzahosseini A.; Sinkó B.; Angi R.; Takács-Novák K.: Study of the influence of pharmaceutical excipients on the solubility and permeability of BCS class II drugs. *Sci. Pharm.* **2025**, *93*(2), 19.

Egyéb közlemények

- III. Csicsák D.; Szolláth R.; Kádár S.; Ambrus R.; Bartos C.; Balogh E.; Antal I.; Köteles I., Tőzsér P.; Bárdos V.; Horváth P.; Borbás E.; Takács-Novák K.; Sinkó B.; Völgyi G.: The effect of the particle size reduction on the biorelevant solubility and dissolution of poorly soluble drugs with different acid-base character. *Pharmaceutics* **2023**, *15*(1), 278.
- IV. Angi R.; Kalóczkai A. J.; Kovács A.; Marton A.; Bárdos V.; Dormán P.; Katona G.; Agócs A.; Csorba A., Nagy Z. Zs.; Vincze A.; Balogh G. T.: Harnessing cyclodextrins for enhanced ocular delivery of carotenoid derivatives: from development to ex vivo characterization. *Carbohydr. Polym. Tech. Appl.* **2025**, *9*, 100718.
- V. Szolláth R.; Bárdos V.; Stifter-Mursits M.; Angi R.; Mazák K.: Effects of Different Centrifugation Parameters on Equilibrium Solubility Measurements. *Methods Protoc.* **2025**, *8*, 116.
- VI. Takácsné Novák K.; Bárdos V.: A COPD kezelésében alkalmazott hosszú hatású hörgtágítók gyógyszerészi kémiai áttekintése. *Gyógyszerészet* **2020**, *64*, 8-14.