

VÁLASZ

Prof. Dr. Zelkó Romána, az MTA kémia tudományok doktorának

„Szemcseméretcsökkentő eljárások a modern gyógyszerfejlesztésben; nazális és pulmonális hatóanyagbevitel” című, az MTA doktora fokozat elnyerésére benyújtott, értekezésem bírálatára

Hálásan köszönöm Zelkó Romána Professzor Asszony részletes, építő jellegű bírálatát. Köszönöm a tézispontok elfogadását, a dolgozattal kapcsolatos pozitív értékelését, dicsérő megjegyzéseit. Örömmre szolgált, hogy a munka gyakorlati jelentőségét is kihangsúlyozta, nevezetesen a kutatómunka lehetővé teheti ismert hatóanyagok reformulálását, ami hozzáadott-értéket képviselő „nem invazív” adagolású készítmények fejlesztésében nyilvánul meg.

A kritikai észrevételekre és szakmai kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

Reflektálás a kritikai észrevételekre

- Helyesírási, nyelvhelyességi hibák előfordulnak ugyan, de a megértést nem befolyásolják.

Köszönöm Opponensem kritikai észrevételeit, amelyek a nyelvhelyességi hibákra vonatkoznak. Nagyon sajnálom, hogy legnagyobb igyekezetem ellenére is maradtak elírások.

- A disszertáció tartalmazza a fontosabb fogalmak magyarázatát, amelyből hiányolom az alternatív energiaforrásokkal megvalósítható nanokristályosítási módszerek (elektroporlasztás, hideg plazma szintézis) magyarázatát.

Egyetértek az észrevétellel, magam is gondolkoztam további fogalmak magyarázatának leírásán, ám a formai korlátok miatt, 1 oldal terjedelmet nem meghaladva, a legfontosabbnak ítélt 10 -15 fogalom megadása mellett döntöttem. A nevesített *alternatív energiaforrásokkal megvalósítható nanokristályosítási módszerek* bemutatására az irodalmi összefoglaló 3.1.2 részében került sor, ahol a 23-24. oldalakon részletes magyarázattal és grafikai ábrákkal (7. ábra A, B, C) szemléltetem ezen technológiák megvalósításának módját hatóanyagok szemcseméretcsökkentése céljából.

A jelzett fogalmak rövid leírása a következő:

Elektroporlasztás: elektromos áram alkalmazásával, potenciálkülönbségen alapuló folyadék-diszpergálás, ami az oldószer elpárolgatása után a hatóanyag nanoprecipitálódását eredményezi.

Hideg plazma szintézis: reaktorkamrába történő porlasztást követően a plazma felmelegíti és elektrosztatikusan feltölti a cseppeket, ami az oldószer fokozott elpárolgását és a cseppek Coulomb-robbanását eredményezi. Az oldószer teljes elpárolgása után a feltöltött hatóanyagkristályok a földelt reaktorfalon összegyűlnek, ahol elveszítik felületi töltésüket.

- ***A felhasznált szerves oldószerek csak felsorolásra kerültek, azok minőségéről nem közöl információt (lsd. 4.2. fejezet).*** Professzor Asszony megjegyzésére az oldószerek minőségét illetően az alábbi kiegészítést teszem:

Szerves oldószerek: etanol – Ph.Eur. 11,1 96 %; metanol-analitikai reagens, HPLC tisztaságú; acetone - analitikai reagens; etil-acetát HPLC tisztaságú $\geq 99,7\%$, benzil-alkohol $\geq 99\%$, FCC, FG, triacetin- 99%, FCC, FG (Sigma Aldrich, Magyarország/VWR International Kft., Magyarország)

- ***A 9. táblázatban nem szerepel, hogy melyik polimer adatait tartalmazza.***

A 9. táblázatban bemutatott eredmények bolygómalomban, a golyók által kifejtett nagy erejű ütközésből adódó, az őrlendő anyagnak átadott ún. kumulatív őrlési energiát mutatják. Ebből adódóan a kumulatív őrlési energia a vizsgált polimerek (PVP, PEG) anyagi minőségétől nem, de azok tömegétől (hatóanyag, segédanyag arányától) függ (Burgio–Rojac model, *Burgio et al. 1991*). Vizsgáltuk, hogy a polimer mennyisége, a malom fordulatszáma/az ütközési frekvencia hogyan befolyásolja a kumulatív őrlési energiát. Ez az általunk megadott kumulatív energia esetén, a teljes őrlés alatt az egy gramm tömegű őrleményre vonatkoztatott érték. Ezt követte az őrlési paraméterek optimalizálása. Figyelembe vettük a következőket: az őrlőgolyók és őrlődény anyagi minősége (sűrűség), átmérője, őrlőtégely belső átmérője, az őrlődény fordulatszáma, forgástengelyek közötti távolság és a bemért mintamennyiség (*Kozma G. et al 2016*).

-Burgio N et al. Alloying of the Fe-Zr system - Correlation between Input Energy and End-Products, *Nuovo Cimento. Dell. 1991. 13, 459-476.*

-Kozma G. et al. Experimental validation of the Burgio–Rojac model of planetary ball milling by the length control of multiwall carbon nanotubes, *Carbon 2016. 105, 615-621*

- ***A T8 tézispontban az alternatív energiaforrások a hagyományos kristályosító eljárások után kerültek felsorolásra.***

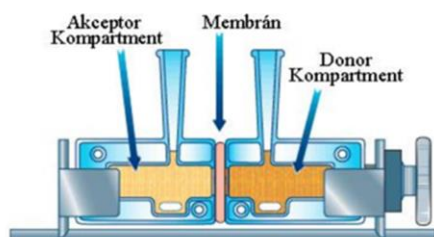
A T8 tézispontban a félreérthető sorrendiséget az alábbiak szerint korrigálom: alternatív energiaforrások (nanoprecipitáció, elektrosztatikus tér, nagyfeszültségű hideg plazma szintézis, illetve elektromágneses sugárzás által indukált oldószer evaporáció) új lehetőségként alkalmazhatóak hatóanyagok szemcseméretcsökkentése céljából, összehasonlítva a hagyományos kristályosító eljárásokkal.

Reflektálás a szakmai kérdésekre

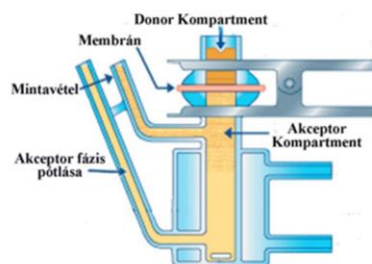
1. Milyen előnye van a horizontális diffúziós készülék alkalmazásának a vertikálissal szemben? A gravitáció vertikális diffúziót segítő hatásának kiküszöbölése relevánsnak tekinthető-e a nazális és pulmonális alkalmazás szempontjából?

A horizontális és a vertikális diffúziós készülékek, a cellák elrendezésén túl, több szempontból is különböznek egymástól (lásd ábra és táblázat).

A, Horizontális elrendezésű diffúziós cella



B, Vertikális elrendezésű diffúziós cella



	Side-bi-Side™ cella (Crown Glass, USA)	Franz cella (Hanson Research Co., USA)
Akceptor-donor elhelyezkedése	horizontális	vertikális
Membránfelület nagysága	0,69 cm ²	1,8 cm ²
Donor rész térfogata	3 ml	0,3 ml
Akceptor rész térfogata	3 ml	7 ml
Minta bevétel helye	Donor kompartmentbe	Közvetlenül a membránra

Diffúziós cellák összehasonlítása

A Side-bi-Side™ horizontális cella feltétlen előnye az, hogy alkalmas kis térfogatban elsősorban por és spray alapú készítmények diffúziós vizsgálatára: jól reprodukálható eredményeket ad, kis szórással; egyszerű a minta előkészítése és a mintavétel; könnyen összeszerelhető, tisztítása egyszerű. A módszer elsősorban orrporok, inhalációs porok és spray-k vizsgálatához javasolható. Előnyt jelent a donor fázis kevertetése a hatóanyag eloszlása szempontjából (hatóanyag szuszpendált formában). Gél forma esetében a Side-bi-Side™ készülékkel nem biztosítható pl. a gél egyenletes eloszlása a donor fázisban, így ilyen esetben a Franz-cellával végzett vizsgálat javasolható (Shiow-Fern JJ. et al 2010).

A kérdés második felére válaszolva, úgy gondolom, hogy a gravitáció vertikális diffúziót segítő hatásának kiküszöbölése relevánsnak tekinthető a nazális és a pulmonális alkalmazás szempontjából. A horizontális geometriai elrendezés, illetve az általunk beállított vizsgálati körülmények is ezt igazolták (Bartos Cs. et al. 2021, Henriques P et al. 2023).

-Shiow-Fern, J.J. et al. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies, AAPS Pharm. Sci. Tech. 2010. 11, 1432-1441

-Bartos Cs. Ambrus R et al. Comparison of Modern In Vitro Permeability Methods with the Aim of Investigation Nasal Dosage Forms, Pharmaceutics 2021. 13, 846

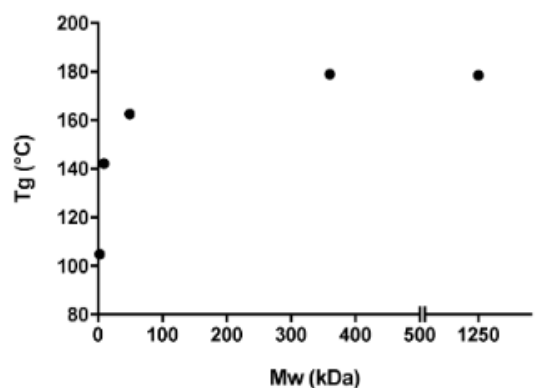
-Henriques P. et al. Amorphous nasal powder advanced performance: in vitro/ex vivo studies and correlation with in vivo pharmacokinetics, J. Pharm. Inv. 2023. 53 723-742

2. A száraz ko-örlés milyen hőmérsékleten és páratartalomon történt? Változott-e a minta hőmérséklete az örlés során? A kisebb molekulatömegű PVP esetén elképzelhető-e az üvegszerű-gumirugalmas átalakulás az örlés során, amely rontja az örlés hatékonyságát?

Köszönöm Professzor Asszony kérdését. A bolygóműves malmokban, száraz örlés esetén, a nagy sebességgel mozgó golyók finom porrá őrlik a különböző anyagokat, amely folyamat a rendszer hőmérsékletének emelkedéséhez vezethet. Esetünkben az örlés előtti 20-25 °C-os hőmérséklet 40-45 °C-ra emelkedett az örlést követően, illetve 38 % RH-ról 44 % RH-ra növekedett a páratartalom 2 h és 400 rpm alkalmazásával. A méréseket Traceable Pen típusú eszközzel (VWR International, Magyarország) mértük.

Az általunk használt kis molekulatömegű PVP-k (K25: 34 kDa, C30: 58 kDa) vízdékonyak, amorf sajátságúak, T_g értékük 100 °C felett van. A PVP-k higroszkóposak, azért emelkedik az RH, felmelegszik a minta (20-25-ről 40-45 °C fokra). Az örlési hőmérséklet és a T_g érték alapján a PVP polimer esetében olvadás, üvegesedés és termikus bomlás nem volt igazolható. Ezek a sajátságok nem rontják, inkább segítik a szemcseméretcsökkentést és megakadályozzák az aggregációt, tehát stabilizálóként is működnek, ebből adódóan az örlés hatékonyságát kedvezően befolyásolják. Arra vonatkozó szakirodalmi adatot, hogy „kisebb molekulatömegű PVP esetén elképzelhető-e az üvegszerű-gumirugalmas átalakulás az örlés során, amely rontja az örlés hatékonyságát” nem találtam.

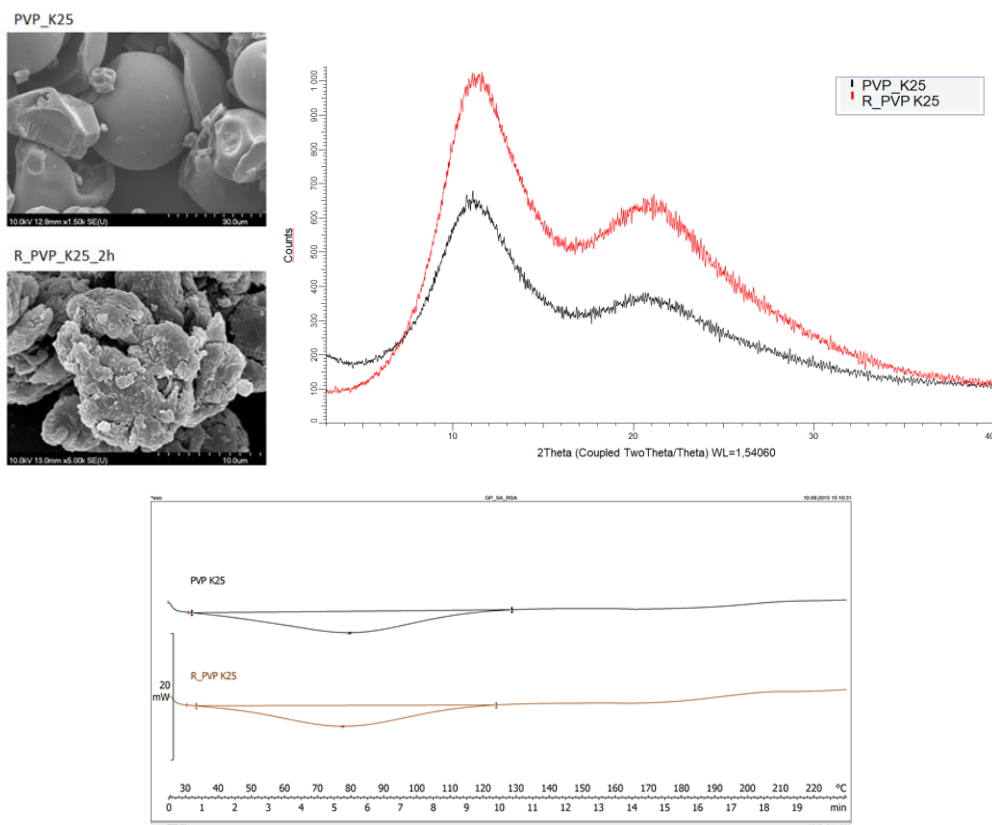
Kapcsolódóan megjegyzem, hogy szakirodalmi adatok jól mutatják a PVP molekulatömegének és üvegesedési hőmérsékletének összefüggését (ábra), ami a polimer kiválasztásánál fontos szempont lehet.



PVP molekulatömegének befolyása az üvegesedési hőmérsékletre (Asgreen C. et al. 2020)

A ko-örlő anyagok esetében előkísérleteket végeztünk. 2 órán keresztül őrültük (R) 400 rpm-en, majd a termékeket mikrometriai és szerkezeti (méret, morfológia, FT-IR, XRPD, DSC) értékelésnek vetettük alá.

A kiindulási PVP-K25 részecskéi mellett, hogy meglehetősen nagyok (kb. 30 μm), sima felületűek és közel szférikus alakúak, míg az őrölt mintákban a szemcsék mérete 10 μm körül van és felületük egyenetlen. Az FT-IR spektrum, XRPD diffraktogram és DSC görbék alapján a PVP amorf sajátsága megtartott (lásd a lenti ábrákat).



PVP K25 polimer őrlés előtti és utáni habitusának és szerkezetének jellemzése

-Asgreen C et al Influence of the Polymer Glass Transition Temperature and Molecular Weight on Drug Amorphization Kinetics Using Ball Milling, *Pharmaceutics* 2020. 12(6):483

3. Mivel magyarázza a meloxicám pH-függő kioldódási profilját eltérő koncentrációjú PVA jelenlétében?

A hatóanyag oldhatósága és oldódási sebessége számos tényezőtől függ (pH, ionizációs fok, szolubilizáló szerek, hőmérséklet, szemcseméret és kristályszerkezet) (Csicsák D 2023).

A vizsgált pH értékek közül a meloxicám oldhatósága a gyomor pH-nak megfelelő 1,2-en volt a legrosszabb, itt mindössze 1,6 µg/ml. Az oldhatóság a pH emelésével jelentősen növekszik. A bél átlagos pH értékének megfelelő 7,4-es közegben 0,933 mg/ml, azaz több mint 500-szorosára nőtt, amely biztosítja az orális dózis kioldódását és a bélből való felszívódását valószínűsíti.

Oldhatósági adatok

pH	meloxicám ($D_{0,9} = 93 \mu\text{m}$)	
	mért pH	S (mg/ml)
1,2	1,12	0,0016 ± 0,0002
7,4	7,32	0,933 ± 0,054
desztillált víz	5,98	0,040 ± 0,004

A meloxicám pH-függő kioldódási profilját eltérő koncentrációjú PVA jelenlétében az értekezés 62. oldalán a 20. ábra szemlélteti. A kombinált nedves ko-őrlés esetén az alkalmazott PVA koncentrációja hatással van a meloxicám szemcseméret-eloszlására, a részecskék elektrokinetikai sajátságára, stabilitására, kristályosságra, ezáltal a hatóanyagfelszabadulásra (Horváth T. 2016). Mesterséges gyomornedvben (pH 1,2) a kezeletlen, nagy szemcseméretű hatóanyag 17 %-a, míg mesterséges bélmedvben (pH 7,4) 65 %-ban oldódott ki. A 18. táblázatban bemutatott részecskeméret-eloszlással magyarázható, hogy míg a 0,75% PVA tartalom mikronizált szemcséket, 16% és 75%-os hatóanyag-felszabadulást eredményezett, addig a 0,25 és 0,5 %-os PVA tartalommal nanorészecskék állíthatóak elő. Ez utóbbi esetében a megnövekedett fajlagos felület 40% illetve 85-100%-os kioldódást eredményezett a kioldóközegek pH-jától függően.

-Horváth T, Ambrus R et al, Effect of solubility enhancement on nasal absorption of meloxicam, European Journal of Pharmaceutical Sciences 9 5(2016) 96–102

-Csicsák D., Ambrus R. et al The Effect of the Particle Size Reduction on the Biorelevant Solubility and Dissolution of Poorly Soluble Drugs with Different Acid-Base Character, Pharmaceutics. 15 (2023) 13;15(1):278

4. A racém loratadinból történő nanoszuszpenzió előállítása módosíthatja-e a hatóanyag kiralitását, hatásosabb enantioszelektív dezloratadint eredményezve?

A loratadin hatóanyag esetén, hagyományos értelemben vett racemizáció előfordulása nem valószínűsíthető a centrális kiralitású szénatom(ok) hiánya miatt. Ugyanakkor a szakirodalomban megtalálható a loratadin N-oxidációjával kialakuló helikálisan királis vegyületek enantioszelektív szintézisével foglalkozó publikáció. Ebben bizonyításra került, hogy a származékok az anyavegyülethez képest hasonló, ezen belül a (-) enantiomerek magasabb H1-antihisztamin hatással rendelkeznek. Továbbá leírták, hogy a loratadin esetében dinamikus átalakulás történik a két felírható helikális enantiomer között, melyek nem elválaszthatóak (Stone EA. et al 2020).

-Stone EA. et al. Asymmetric Catalysis upon Helically Chiral Loratadine Analogues Unveils Enantiomer-Dependent Antihistamine Activity J. Am. Chem. Soc. 2020. 142, 12690–12698

5. Mivel magyarázható, hogy a hatóanyagok nanonizálása termodinamikai oldhatóságuk jelentős növekedése mellett a permeabilitásuk növekedéséhez is vezetett? Melyik alkalmazott segédanyagnál volt elérhető a legjobb hatóanyag-permeabilitás?

Az *Ostwald–Freundlich* illetve *Noyes–Whitney* egyenletek támasztják alá a szubmikronos szemcsék esetében (magnövekedett fajlagos felülete által) a telítési oldhatóság és oldódási sebesség növekedésének lehetőségét. A *Prandtl-egyenlet* szerint a csökkent részecskeméret a diffúziós távolság csökkenéséhez és ennek következtében magnövekedett oldódási sebességhez vezet, amint azt a *Noyes–Whitney* egyenlet is leírja.

A nanorészecskék nyálkahártyán keresztüli permeabilitása a *Stokes–Einstein egyenlettel* előrejelezhető:

$$P = \frac{kT}{6\eta\pi r h}$$

ahol „P” a permeabilitás, az „r” a nanorészecske sugara, „h” a nyálkaréteg vastagsága, „η” a nyálkaréteg viszkozitása, „k” a Boltzmann-állandó és „T” az abszolút hőmérséklet (*Einstein A 1905*).

A bélfalhoz való tapadás mértéke szintén elősegíti a jobb biológiai hozzáférhetőséget azáltal, hogy a nanorészecskék nyálkahártya-adhéziója meghosszabbítja a tartózkodási időt (növekedett koncentráció gradiens) és az érintkezési időt a gasztro-intesztinális traktusban. A magnövekedett oldódási sebesség és a telítési oldhatóság rövid idő alatt nagyobb hatóanyag koncentrációt eredményezhet a tüdőben/orrnyálkahártyán, ami nagyobb helyi gyógyszer szintet eredményez az abszorpció helyen. A nyálkahártya felületén való hosszabb tartózkodási idő nemcsak csökkenti a hatóanyag csillók általi mozgásából származó veszteségét, hanem hozzájárul a nagyobb mértékű felszívódáshoz is (*Ponchel G 1997*).

Az alkalmazott segédanyagok közül kiemelném a PVP és PVA polimereket, a funkciójuk elsősorban a szemcseméret stabilizálása, aggregációgátlás, szolubilizálás, ezáltal az oldódási sebesség és permeabilitás fokozása. Emellett a nazális formulációk összetétel-tervezésénél az α-ciklodextrin illetve a hialuronsav járult még hozzá a diffúzió javításához.

-Einstein, A. On the movement of small particles suspended in stationary liquids required by the molecular-kinetic theory of heat Ann. Phys. 1905, 17, 549– 5601 Annalen der Physik 1905.

-Ponchel et al. 1997 Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract Eur J Pharm Biopharm Volume 44, 25-31.

Ismételten megköszönöm Prof. Dr. Zelkó Románának, hogy áttekintette és elbírálta értekezésemet. Köszönöm elismerő szavait, megtisztelt azzal, hogy két évtizedes szakmai eredményeimet kimagasló munkaként értékelte, valamint napjaink gyógyszerfejlesztése szempontjából igen hasznosnak találta és javasolta számomra a sikeres védést követően az MTA doktori fokozat odaítélését.

Tisztelettel kérem ezúton az opponensi véleményre adott válaszaim elfogadását.



Szeged, 2024. február 29.

Dr. Ambrus Rita