

**Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku



Marta Szekalska

Ocena możliwości zastosowania mikrosfer
alginianowych jako nośników modelowych
substancji leczniczych

Rozprawa doktorska
w dziedzinie nauk farmaceutycznych

Białystok 2017 r.

1. Streszczenie

Alginian sodu to naturalny, anionowy polimer polisacharydowy, który ze względu na zdolność do pęcznienia, żelowania i mukoadhezji może służyć do opracowywania nowoczesnych postaci leków – mikrocząstek. Pomimo dostępności wielu preparatów zawierających w swoim składzie alginian sodu, wielokompartментowe postacie o właściwościach mukoadhezyjnych wytworzone z udziałem alginianów nie zostały wprowadzone na rynek farmaceutyczny.

Przedmiotem prowadzonych badań była ocena możliwości zastosowania alginianu sodu jako nośnika powszechnie stosowanych substancji leczniczych – metronidazolu, chlorowodoru ranitydyny i chlorowodoru metforminy. Z uwagi na konieczność zapewnienia wysokiego stężenia metronidazolu w żołądku w procesie eradykacji *Helicobacter pylori*, wchłanianie w górnym odcinku przewodu pokarmowego i krótki okres półtrwania chlorowodoru metforminy oraz degradację w jelitach chlorowodoru ranitydyny, zasadne wydało się opracowanie formułacji umożliwiających przedłużenie przebywania tych substancji leczniczych w żołądku. W przypadku metronidazolu uwzględniono także podanie dopochwowe otrzymanych mikrosfer alginianowych. Dodatkowo, ze względu na aktywność hipoglikemiczną alginianu sodu, dokonano oceny wpływu polimeru na działanie chlorowodoru metforminy.

Mikrosfery otrzymano metodą suszenia rozpyłowego – techniką stosowaną zarówno w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej zapewniającą kontrolę procesu i powtarzalność produkcji. W przypadku każdej substancji leczniczej badania rozpoczęto od eksperymentalnego ustalenia optymalnych parametrów procesu suszenia rozpyłowego. W kolejnym etapie dokonano doboru stężenia roztworów alginianu sodu oraz stosunku zawartości substancji leczniczej do zawartości polimeru. W przypadku chlorowodoru metforminy, w celu przedłużenia profilu uwalniania substancji leczniczej, przeprowadzono modyfikację struktury alginianu sodu poprzez sieciowanie chitozanem.

W kolejnym etapie wszystkie otrzymane mikrosfery poddano badaniom jakości, które obejmowały analizę mikroskopową, ocenę zawartości substancji leczniczej, potencjału Zeta, dostępności farmaceutycznej, właściwości pęczniących oraz ocenę oddziaływań pomiędzy wykorzystanymi składnikami metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej. Ważnym punktem analizy mikrosfer była ocena właściwości mukoadhezyjnych, którą wykonano wykorzystując analizator tekstury TA.XT Plus

i trzy modele warstwy adhezyjnej – dysk z żelatyny, żel z mucyny oraz błonę śluzową żołądka lub pochwy świni.

Istotny element badań stanowiła ocena wpływu alginianu sodu na aktywność hipoglikemiczną chlorowodoru metforminy. W tym celu przeprowadzono analizę absorpcji glukozy przez komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, która jest procesem złożonym, kontrolowanym przez transportery (Hxts) o mechanizmie działania podobnym do ludzkich białek (GLUTs). Określono również wpływ alginianu sodu na aktywność α -amylazy – enzymu katalizującego hydrolizę skrobi do oligosacharydów. Zahamowanie α -amylazy prowadzi do zmniejszenia wahań stężenia glukozy po posiłkach w wyniku redukcji trawienia węglowodanów, co jest ważnym aspektem leczenia cukrzycy typu 2. Na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* stwierdzono, że alginian sodu nasilał aktywność hipoglikemiczną chlorowodoru metforminy. W celu weryfikacji otrzymanych wyników przeprowadzono badania *in vivo* z wykorzystaniem modelu cukrzycy typu 2 u szczurów. Zwierzęta z wyindukowaną hiperglikemią otrzymywały doustnie niesieciowane alginianowe mikrosfery placebo, niesieciowane alginianowe mikrosfery zawierające chlorowodorek metforminy, sieciowane chitozanem alginianowe mikrosfery zawierające chlorowodorek metforminy oraz sproszkowaną tabletkę o niemodyfikowanym uwalnianiu zawierającą chlorowodorek metforminy. Wykazano, że zaprojektowane alginianowe mikrosfery zapewniły przedłużone uwalnianie substancji leczniczej i poprawę parametrów farmakokinetycznych (niższe C_{max} i wyższe t_{max}) w porównaniu z tabletką o niemodyfikowanym uwalnianiu wykorzystaną jako kontrola. Badania *in vivo* potwierdziły aktywność hipoglikemiczną polimeru. W celu określenia potencjalnego działania toksycznego alginianowych mikrosfer zmodyfikowanych poprzez sieciowanie chitozanem oceniono śmiertelność, zachowanie i masę ciała zwierząt, a po zakończonym eksperymencie przeprowadzono analizę histopatologiczną trzustki, wątroby i nerek. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono nie tylko brak toksyczności sieciowanych chitozanem alginianowych mikrosfer zawierających chlorowodorek metforminy, ale także redukcję zmian degeneracyjnych powstałych w przebiegu indukowanej hiperglikemii u szczurów.

Wytypowane formułacje mikrocząstek posłużyły do otrzymania twardych kapsulek żelatynowych. Najbardziej przedłużony profil uwalniania uzyskano w przypadku kapsulek zawierających mikrosfery z metronidazolem oraz mikrosfery sieciowane chitozanem z chlorowodorkiem metforminy. Kapsułki zawierające mikrosfery z

łatwo rozpuszczalnym chlorowodorkiem ranitydyny i chlorowodorkiem metforminy w niewystarczającym stopniu przedłużyły dostępność farmaceutyczną substancji leczniczych.

Wykonane mikrosfery oraz kapsułki z mikrosferami poddano badaniom trwałości w warunkach testu przyspieszonego starzenia ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i $75\% \text{ RH} \pm 5\%$) po 14, 30 i 180 dniach przechowywania. W przypadku mikrosfer oraz kapsułek zawierających mikrosfery z metronidazolem i chlorowodorkiem metforminy nie zaobserwowano istotnych zmian, natomiast na powierzchni kapsułek żelatynowych z mikrosferami zawierającymi chlorowodorek ranitydyny już po miesiącu przechowywania w warunkach $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i $75\% \pm 5\% \text{ RH}$ pojawił się brązowy produkt rozkładu.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że alginian sodu może być wykorzystany do otrzymywania mukoadhezyjnych mikrosfer w procesie suszenia rozpyłowego. Ocena możliwości modyfikacji struktury alginianu za pomocą czynników sieciujących z różnych grup stanowi obiecujący kierunek badań nad zastosowaniem polimeru w technologii postaci leku.

2. Streszczenie w języku angielskim

Sodium alginate is a natural, anionic, polysaccharide polymer, which possesses ability to swell, gel and mucoadhesion and might be used to design new drug dosage forms – microparticles. Although there are many products containing sodium alginate, multi unit systems with mucoadhesive properties based on alginates are not available on the pharmaceutical market.

The aim of this study was to evaluate the possibility of sodium alginate application as a carrier of commonly used drugs – metronidazole, ranitidine hydrochloride and metformin hydrochloride. Considering the urgency to ensure a high concentration of metronidazole in the stomach in the process of *Helicobacter pylori* eradication, absorption in the upper gastrointestinal tract and a short biological half-life of metformin hydrochloride and intestinal degradation of ranitidine hydrochloride, it seemed reasonable to develop formulations for the prolonged residence time of these substances in the stomach. In case of metronidazole, aspects of vaginal administration were also studied. As sodium alginate possesses hypoglycemic activity, its influence on metformin hydrochloride activity was also evaluated.

The microspheres were obtained by the spray drying – a technique used both in laboratory and industrial scale, providing a precise control of the process parameters and production recurrence. In the first step, based on the preliminary studies, optimal parameters of the spray drying process were selected. Afterwards, the concentrations of sodium alginate solutions and drug to polymer ratio were chosen. In order to prolong metformin hydrochloride release profile, the modification of sodium alginate structure by cross-linking process with chitosan was conducted.

In the next step, the quality of all obtained microspheres was tested by the microscopic analysis, evaluation of drug loading, Zeta potential, drug release profile, swelling properties and evaluation of physical state by differential scanning calorimetry. Additionally, the microspheres mucoadhesive properties with using texture analyzer TA.XT Plus and three models of adhesive layer – gelatin disc, mucin gel and porcine gastric or vaginal mucosa were evaluated.

The important part of this research was the evaluation of sodium alginate influence on metformin hydrochloride hypoglycemic activity. For this purpose, the analysis of glucose uptake by *Saccharomyces cerevisiae* cells, which is a complex process controlled by transporters (Hxts) with action mechanism similar to human proteins (GLUTs) was performed. The influence of sodium alginate on α -amylase activity – enzyme catalyzing the hydrolysis of starch to oligosaccharides was also determined. α -Amylase inhibition reduces postprandial blood glucose fluctuations as a result of carbohydrates digestion inhibition, which is an important aspect in the type 2 diabetes treatment. The *in vitro* studies indicated that sodium alginate enhanced the hypoglycemic activity of metformin hydrochloride. To verify the obtained data, *in vivo* tests in animal model of type 2 diabetes in rats were performed. Animals with hyperglycemia

were treated with non cross-linked alginate microspheres placebo, non cross-linked alginate microspheres with metformin hydrochloride, chitosan cross-linked alginate microspheres with metformin hydrochloride and powdered commercially available non-modified release tablet with metformin hydrochloride. It was shown that designed alginate microspheres provided sustained release of the drug and improved the pharmacokinetic parameters (lower $C_{\max}$ and higher $t_{\max}$ were observed) compared to the non-modified release tablet, which was used as a control. *In vivo* studies confirmed the hypoglycemic activity of the polymer. In order to evaluate the potential toxicity of chitosan cross-linked alginate microspheres assessment of mortality, behaviour, body weight of the animals and histopathological studies of pancreas, liver and kidney after the end of experiment were performed. The obtained data suggest that chitosan cross-linked alginate microspheres containing metformin hydrochloride were characterized by no toxicity and reduced the degenerative changes caused by hyperglycemia in rats.

The selected microspheres formulations were applied to obtain hard gelatin capsules. It was observed that the most sustained release profiles were received from capsules containing alginate microspheres with metronidazole or chitosan cross-linked alginate microspheres with metformin hydrochloride. Capsules containing microspheres with freely soluble ranitidine hydrochloride and metformin hydrochloride insufficiently extended the dissolution profiles of drugs.

Accelerated stability tests of microspheres and capsules containing microspheres after 14, 30 and 180 days of storage at $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $75\% \text{ RH} \pm 5\%$ were performed. No significant changes of microspheres and capsules containing microspheres with metronidazole and metformin hydrochloride were observed, however on the surface of gelatin capsules containing microspheres with ranitidine hydrochloride after one month of storage at $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $75\% \pm 5\% \text{ RH}$, a brown degradation product appeared.

The obtained data suggest that sodium alginate may be used for the preparation of the mucoadhesive microspheres by the spray drying. The estimation of ability in the alginate structure modification using cross-linking agents from various groups appears to be a promising direction of research into the use of polymer in pharmaceutical technology.