

Nanovezels voor drug delivery van slecht oplosbare medicijnen

Simon De Meyer
Universiteit Gent
simdmeye.DeMeyer@UGent.be

Michiel Platteeuw
Universiteit Gent
Michiel.Platteeuw@UGent.be

Olmo Frateur
Universiteit Gent
Olmo.Frateur@UGent.be

Sofie Verschraegen
Universiteit Gent
Sofie.Verschraegen@UGent.be

ABSTRACT

Om een ziekte te bestrijden via orale medicatie, moet het actieve farmaceutische bestandsdeel (API) van het gebruikte medicijn oplosbaar zijn in de waterige omgeving van het menselijk lichaam. Bepaalde, dikwijls veelbelovende, API's zijn echter slecht oplosbaar, wat vaak te wijten is aan de kristalliniteit van het API. In dit project werd de solvent elektrospintechniek aangewend om het kristallijne API in amorfe toestand te brengen als *solid dispersion* (SD). Uit verschillende analyses bleek dat de wateroplosbaarheid van het medicijn hierdoor drastisch verbetert. Het elektrospinnenproces is daardoor een potentieel veelbelovende techniek voor de verwerking van doeltreffende API's in de farmaceutische industrie.

Trefwoorden

nanovezels, actief farmaceutisch ingrediënt, solvent elektrospinnen, *solid dispersion*, flubendazol, polyvinylpyrrolidon

INTRODUCTIE

Bij ziekte verkiest de patiënt typisch oraal inneembare medicatie boven *e.g.* een injectie [1]. Deze orale medicatie bestaat, naast verschillende additieven, uit het actief farmaceutisch ingrediënt of API. Dit API is veruit het belangrijkste ingrediënt aangezien het instaat voor de genezing [2]. Veel onderzoek gaat naar de ontwikkeling van nieuwe API's. Een belangrijke implicatie treedt echter vaak op tijdens de formulatie van deze nieuwe API's, waarbij het API verwerkt moet worden tot oraal toedienbare medicatie, *e.g.* pil of tablet. Om de oorzaak van de ziekte te kunnen bestrijden, moet het API namelijk opgenomen worden in het menselijk lichaam. Bij orale medicatie gaat het om het oplossen van het API in de waterige omgeving van het menselijk lichaam, *e.g.* in de maag. Veel ontwikkelde API's zijn echter zeer slecht oplosbaar in waterige omgeving, waardoor ze niet verder ontwikkeld worden en hun potentieel verloren gaat.

'Permission to make digital or hard copies of all or part of this work for personal or classroom use is granted under the conditions of the Creative Commons Attribution-Share Alike (CC BY-SA) license and that copies bear this notice and the full citation on the first page'

SRC 2018, November 9, 2018, The Netherlands.

De reden voor de slechte oplosbaarheid is vaak de hoge graad van kristallisatie van het API die niet kan omzeild worden tijdens de formulatie en/of de daaropvolgende opslag van het medicijn. Een mogelijke oplossing om de verdere ontwikkeling van deze kristallijne API's toch mogelijk te maken, is het vinden van een strategie om het API in amorfe toestand te brengen én te houden respectievelijk tijdens en na de formulatie. Een gekende methode hiervoor is het creëren van een amorfe *solid dispersion* (SD), waarbij het API in amorfe toestand fijn verdeeld wordt binnen een polymeermatrix [3]. Er zijn reeds verschillende technieken, *e.g.* *hot melt extrusion*, die zich op dit principe baseren. Hoewel deze technieken erin slagen het API in amorfe toestand te brengen, zijn ze echter beperkt in toepasbaarheid omdat de gecreëerde SD's niet langdurig stabiel blijken te zijn. Deze technieken zijn met andere woorden niet in staat om de rekristallisatie van het API tegen te gaan, waardoor het medicijn niet doeltreffend meer is. Daarenboven zijn niet alle API's bestand tegen de procescondities, *e.g.* een hoge temperatuur, van deze beschikbare technieken [4], [5]. In dit project wordt daarom solvent elektrospinnen vooropgesteld als een alternatieve techniek om amorfe SD's te bereiden. Solvent elektrospinnen is een éénstapsproces om nanovezelmaterialen te produceren dat bovendien kostenefficiënt en eenvoudig opschaalbaar is. Aan de hand van verschillende analyses wordt aangetoond dat het API in de geproduceerde SD's amorf is én blijft, waardoor de wateroplosbaarheid van het API aanzienlijk verbetert op zowel korte als lange termijn.

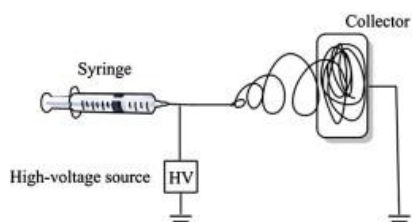
SOLVENT ELEKTROSPINNEN: DE SLEUTEL TOT AMORFE API SOLID DISPERSIONS

De kristallijne aard van verschillende API's is te wijten aan sterke intermoleculaire interacties, wat oplossing in waterig milieu erg bemoeilijkt. Kristallisatie kan echter omzeild worden door het API op te lossen in een gepast solvent en vervolgens te dispergeren en te immobiliseren in een matrix, waarbij fysische interacties ontstaan tussen het API en de matrix. Dankzij de homogene dispersiteit en de combinatie van immobilisatie en interactie krijgt het API niet de kans om intermoleculair te interageren en bijgevolg te rekristalliseren, waardoor het in de amorfe toestand blijft. Dit is exact de bedoeling bij het creëren van een amorfe *solid dispersion* (SD) via het solvent elektrospinnenproces.

Solvent elektrospinnen is een gekende en veelgebruikte techniek om met behulp van elektrostatische kracht nanovezels (NF) te produceren (Figuur 1). Tijdens het

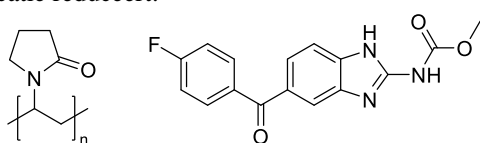
proces wordt een polymeeroplossing aan een constant debiet door een naald gepompt. Tussen de tip van de naald en de gearde collector wordt een elektrisch veld aangelegd. Wanneer de aangelegde spanning de oppervlaktespanning van de oplossing overwint, wordt de druppel aan de naaldtip aangetrokken tot de collector. Onder gepaste procescondities treedt een hoge verstreking op wat in combinatie met solventverdamming leidt tot het vormen van NF die willekeurig worden afgezet op de collector in de vorm van een membraan [6], [7]. De hoge snelheid van solventverdamming, eigen aan dit proces, wordt verondersteld van cruciaal belang te zijn voor de immobilisatie van amorf API in de polymeer NF-matrix.

De afgezette NF worden typisch gekarakteriseerd door een diameter kleiner dan 500 nm. Dankzij deze fijne diameter hebben de geproduceerde NF-membranen enkele uitzonderlijke eigenschappen, zoals een hoge porositeit, wat leidt tot een hoge oppervlakte tot volumeverhouding. Deze eigenschap zou de oplosbaarheid van het API positief kunnen beïnvloeden.



Figuur 1: Schematische voorstelling van een solvent elektrospinningopstelling [8]

Als polymeermatrix werd binnen dit project gewerkt met polyvinylpyrrolidon (PVP) (Figuur 2, links), aangezien dit polymeer reeds is goedgekeurd als hulpstof in farmaceutische middelen. Het aangewende API is flubendazol (FBDZ) (Figuur 2, rechts). FBDZ is een anti-parasitair API dat in de farmaceutische wereld model staat voor sterk kristallijne API's met slechte wateroplosbaarheid. Bijgevolg is dit project een *proof of concept*. Door het potentieel van solvent elektrospinnen te onderzoeken als alternatieve techniek voor het vormen van een stabiele, amorf SD van FBDZ onder de vorm van NF (NF-SD), met als gevolg een opmerkelijk verbeterde wateroplosbaarheid, ligt de weg open voor gelijkaardige formulaties van andere kristallijne API's. Het doel van dit project is dan ook om een zo hoog mogelijke concentratie FBDZ in de NF-SD te doperen, waarbij de PVP-FBDZ oplossing nog verspinbaar blijft én het FBDZ zich in een stabiele, amorf toestand bevindt. Dit is niet evident aangezien een hogere dopering leidt tot een hogere kans op intermoleculaire interacties tussen de FBDZ eenheden onderling, wat op zijn beurt aanleiding kan geven tot aggregatie en rekristallisatie. Een hoge dopering is echter gewenst aangezien dit het formaat van de uiteindelijke orale medicatie reduceert.



Figuur 2: Structuurformules van PVP (links) en FBDZ (rechts).

Voor het bereiden van de NF-SD werden PVP en FBDZ in verschillende concentraties simultaan opgelost in een gemeenschappelijk solvent. Voor elke PVP-FBDZ oplossing werd de viscositeit bepaald, aangezien deze een belangrijke invloed heeft op de stabiliteit van het

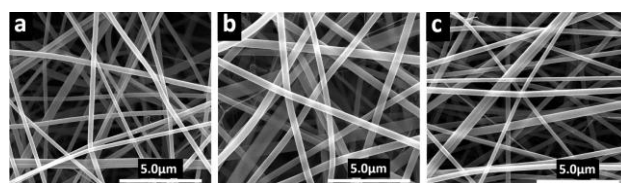
elektrospinningproces en de uiteindelijke vezelmorfologie. De oplossing werd vervolgens versponnen tot een NF-membraan, wat de verwezenlijking is van de amorf SD. Vervolgens werden de bekomen NF-SD's gekarakteriseerd om zowel hun fysische als farmaceutische eigenschappen te bepalen en het potentieel van NF als *drug delivery* systeem te onderzoeken.

KARAKTERISATIE VAN DE NANOVEZELMEMBRANEN

SEM

De vezelmorfologie en NF-diameter van de geproduceerde NF-SD's werden geanalyseerd aan de hand van scannende elektronenmicroscopie (SEM). NF gesponnen vanuit PVP oplossingen zonder FBDZ tonen duidelijk de invloed van de polymeerconcentratie en bijgevolg de viscositeit van de oplossing aan (figuur 3). Een minimale polymeerconcentratie (7,5wt%) is vereist om voldoende ketenverstrengelingen te creëren, waardoor uniforme NF kunnen gevormd worden tijdens het verstreken gedurende het elektrospinningproces. De lage polymeerconcentratie (7,5wt%) geeft aanleiding tot een relatief lage viscositeit (~920 cP) en bijgevolg een relatief lage vezeldiameter (~260 nm) (figuur 3, a). Wanneer de concentratie opgedreven wordt tot 10wt%, stijgt de viscositeit aanzienlijk (~2960 cP). Dit geeft dan ook aanleiding tot dikkere NF (~450 nm) (figuur 3, b). Deze bevindingen zijn conform met de literatuur [10].

Het toevoegen van FBDZ aan de PVP-oplossingen heeft weinig tot geen invloed op de stabiliteit van het proces, de viscositeit van de oplossing en de vezeldiameter (figuur 3, a en c). Opnieuw worden uniforme vezels verkregen met diameters van 200-400 nm en 350-650 nm voor respectievelijk 7,5wt% en 10wt% polymeerconcentraties.

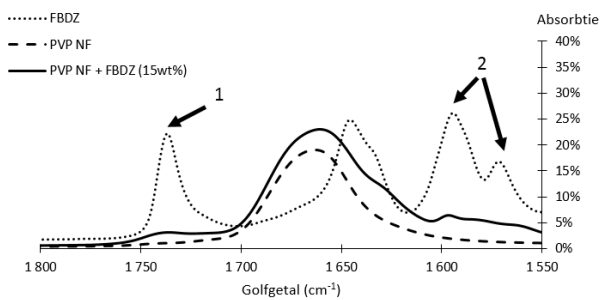


Figuur 3: SEM beelden van NF gesponnen uit oplossingen met 7,5wt% PVP zonder FBDZ (a), 10wt% PVP zonder FBDZ (b) en 7,5wt% PVP gedopeerd met 15wt% FBDZ (c).

Op basis van de diameter van de NF lijken de vezels gebaseerd op een 7,5wt% PVP-oplossing veelbelovender, aangezien wordt verondersteld dat dunnere NF een betere oplosbaarheid zullen vertonen dankzij hun hogere specifieke oppervlakte. Bovendien laat een lagere polymeerconcentratie een hogere FBDZ-dopering toe. Deze hypothese wordt verder onderzocht tijdens de oplosbaarheidstesten.

IR-spectroscopie

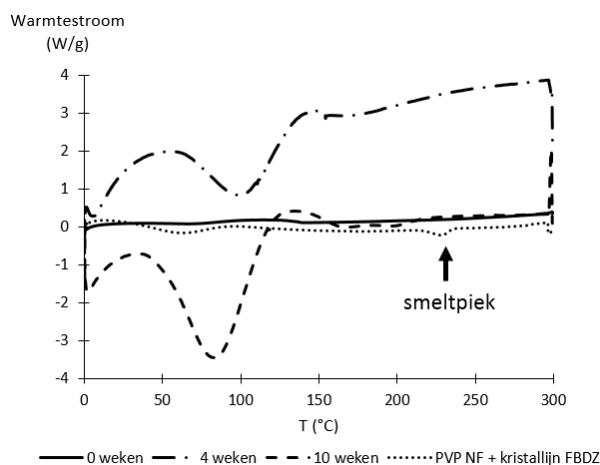
Infrarood (IR) spectroscopie werd aangewend om aan te tonen dat er effectief FBDZ in de NF aanwezig is. Hierbij werd het absorptiespectrum van zuiver FBDZ en zuiver PVP vergeleken met de gesponnen NF zoals te zien in figuur 4. Uit de figuur kan duidelijk opgemaakt worden dat het spectrum van de NF is samengesteld uit de spectra van FBDZ en PVP wat de aanwezigheid van FBDZ in de NF bevestigt. Het is belangrijk om op te merken dat met IR enkel kan worden aangetoond dat er FBDZ aanwezig is en niet in welke toestand (kristallijn of amorf) het FBDZ zich bevindt. Dit komt omdat de IR-spectra van amorf en kristallijn FBDZ nauwelijks van elkaar verschillen. Een andere analysetechniek moet soelaas bieden.



Figuur 4: IR absorptiespectra van zuiver FBDZ, zuivere PVP-NF en FBDZ-gedopeerde NF (PVP + FBDZ). De FBDZ-gedopeerde NF vertonen pieken die eigen zijn aan het absorptiespectrum van zuiver FBDZ. 1: CO stretch afkomstig van het gesatureerde ester in de carbamaat groep (1736 cm⁻¹), 2: NH-buiging afkomstig van de secundaire amines (1550-1620 cm⁻¹).

DSC/MTDSC

Om de al dan niet amorfe toestand en de stabiliteit van deze toestand te onderzoeken, worden de geproduceerde NF-SD's onderworpen aan (temperatuur gemoduleerde) differentiële scannende calorimetrie ((MT)DSC). Deze techniek laat toe om fasetransities in de NF-SD's waar te nemen ten gevolge van temperatuurveranderingen. De aanwezigheid van een endotherme, eerste orde transitie wijst met andere woorden onverbiddeijk op het smelten van (ongewenst) kristallijn FBDZ. Zoals te zien in , is er echter geen smeltpiek aanwezig, wat erop wijst dat FBDZ aanwezig is in amorfe toestand en dit voor een FBDZ-concentratie van 15wt%. Deze amorfe toestand blijft behouden voor ten minste 10 weken onder niet-geconditioneerde kamercondities, wat de stabiliteit van de amorfe toestand bevestigt. Voor FBDZ-concentraties van 25wt% werd een stabiliteit aangetoond van ten minste 8 weken.



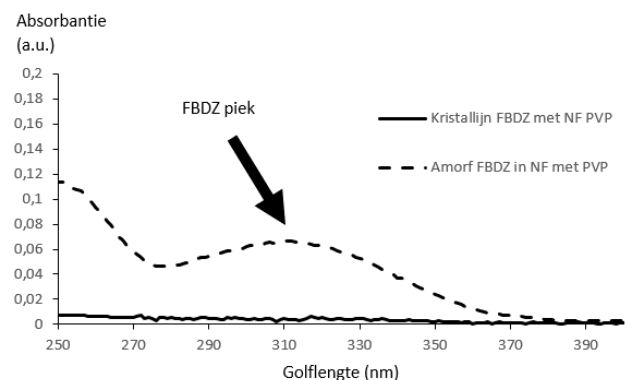
Figuur 5: DSC curves van zuiver FBDZ en van gedopeerde NF met 15wt% FBDZ na 0, 4 en 10 weken. Het is duidelijk dat de endotherme smeltpiek die te zien is voor een minimale hoeveelheid (<5wt%) FBDZ niet voorkomt bij de FBDZ-gedopeerde NF, wat wijst op de aanwezigheid van de amorfe toestand met een stabiliteit van ten minste 10 weken. De brede endotherme piek tussen 50°C en 100°C kan worden toegeschreven aan het verdampen van water opgenomen door de NF tijdens opslag onder niet-geconditioneerde kamercondities.

Oplosbaarheidstesten

De farmaceutische oplosbaarheidstest is een belangrijke test om het potentieel van NF-SD's als drug delivery systeem aan te tonen. Hierbij wordt nagegaan of de oplosbaarheid van het FBDZ in waterig milieu effectief is toegenomen als gevolg van de incorporatie in een amorfe SD onder de vorm van NF.

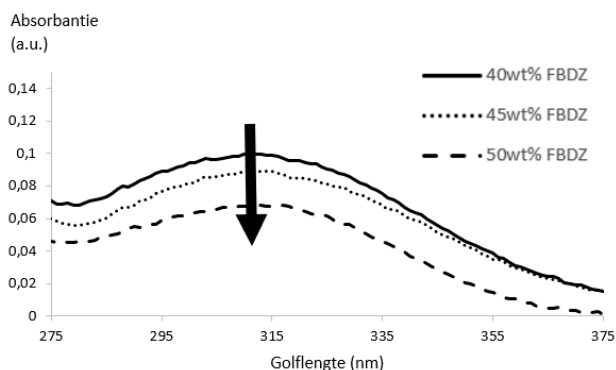
De geproduceerde membranen worden hiervoor in een waterige oplossing gebracht, waarvan op een vast aantal tijdstippen een sample wordt genomen. Tijdens de test lost het membraan op dankzij de wateroplosbaarheid van PVP. Op deze manier kan het amorfe FBDZ vrijgegeven worden. Aangezien FBDZ optisch actief is, kan UV-VIS spectrofotometrie aangewend worden om te bepalen of er effectief FBDZ in de waterige oplossing aanwezig is, wat een verbeterde oplosbaarheid van het API impliceert in vergelijking met zijn kristallijne tegenhanger.

De UV-VIS spectra van samples uit waterige oplossing waarin kristallijn FBDZ werd aangebracht, vertonen nul-absorbantie, wat de onoplosbaarheid van kristallijn FBDZ bevestigt (Figuur). Wanneer deze UV-VIS spectra vergeleken worden met deze van samples uit waterige oplossing waarin een NF-SD aangebracht werd, kan duidelijk een brede piek rond 310 nm waargenomen worden in het geval van de NF-SD. Deze piek neemt bovendien toe in absorbantie met de tijd. Aangezien PVP-NF zonder FBDZ geen piek vertonen op 310 nm, kan aangenomen worden dat deze piek afkomstig is van opgelost, amorf FBDZ. De intensiteitstoename met de tijd impliceert dat steeds meer FBDZ vrijkomt terwijl de NF-SD oplost. Deze resultaten tonen kwalitatief aan dat de incorporatie van FBDZ in een amorfe SD onder de vorm van NF tot een verhoogde oplosbaarheid van het API leidt. Er dient opgemerkt te worden dat de piek op 250 nm te wijten is aan PVP en solvent-residu van het elektrospinnenproces.



Figuur 6: UV-VIS spectra van kristallijn poedervormig FBDZ dat samen met zuiver PVP-NF in waterige oplossing is gebracht (continue lijn) en van FBDZ-gedopeerde NF (10wt% PVP en 45wt% FBDZ) dat in waterig milieu is gebracht (stippellijn). Het is duidelijk dat de NF-SD rond 310 nm een hogere absorbantie vertoont dan het kristallijn FBDZ, wat wijst op een verbeterende oplosbaarheid wanneer FBDZ in amorfe toestand geïncorporeerd wordt in een NF-SD.

De hoeveelheid vrijgegeven FBDZ in waterige omgeving varieert echter bij verschillende FBDZ-concentraties gedopeerd in de NF. Er kan geconcludeerd worden dat er minder FBDZ vrijgesteld wordt bij hogere doperingen (Figuur). Een mogelijke verklaring voor deze trend is de verhoogde hydrofobiciteit van de NF-membranen als gevolg van een hoger gehalte aan fluor-groepen, dewelke inherent deel uitmaken van de FBDZ-moleculen. Deze verhoogde hydrofobiciteit bemoeilijkt de bevochtiging van de membranen, wat het oplosproces van de NF vertraagt en bijgevolg ook het FBDZ trager vrijgegeven wordt. Verder onderzoek is hier nodig om de FBDZ-PVP interacties volledig te karakteriseren zodat de vrijgave van het API verder geoptimaliseerd kan worden.



Figuur 7: UV-VIS spectra van gedopeerde NF met verschillende doperingen aan FBDZ. Het is duidelijk dat er een sterk verschil in opgelost FBDZ is (factor 1,5 tussen 40 en 50wt% FBDZ). Dit is hoogstwaarschijnlijk het gevolg van een toenemende hydrofobiciteit als gevolg van de stijgende FBDZ dopering.

CONCLUSIE

In dit project werd getest of via de solvent elektrospinteknik amorfes SD's onder de vorm van NF kunnen geproduceerd worden met het sterk kristallijne FBDZ teneinde de wateroplosbaarheid en bijgevolg medische doeltreffendheid van dit API te verhogen. Een specifieke polymeerconcentratie was vereist om voldoende ketenverstrengelingen te vormen die aanleiding gaven tot een stabiel elektrospinningsproces met uniforme, dunne NF tot gevolg. Alle PVP-FBDZ oplossingen bleken vlot verspinbaar en een hoge FBDZ-dopering werd bereikt zonder een limitatie te vormen voor het elektrospinningsproces. Er werd aangetoond dat FBDZ effectief aanwezig was in de NF-SD's en dat het zich in amorfes toestand bevond. Deze amorfes toestand werd bovendien voor een langdurige periode (minstens 8 weken) in ongecontroleerde atmosfeer behouden voor concentraties van ten minste 25wt% FBDZ. Deze stabiliteit kan verder verbeterd worden indien opslag plaatsvindt in een ruimte met gecontroleerde vochtigheid en temperatuur. Uit UV-VIS spectroscopie kon duidelijk geconcludeerd worden dat FBDZ geïncorporeerd in NF-SD's tot 10 maal beter oplost in waterig milieu, wat in sterk contrast staat tot kristallijn FBDZ.

Uit dit project kan verder besloten worden dat er nog veel voer is voor verder onderzoek aangezien het oplosproces een zekere complexiteit vertoonde. Er werd namelijk aangetoond dat bij hogere FBDZ-concentraties rekening moet gehouden worden met de hydrofobiciteit van het membraan. Er zal dus verder onderzoek nodig zijn om de maximale dopering te vinden die een langdurige stabiliteit van de amorfes toestand combineert met optimale oplosbaarheid. In toekomstig onderzoek kan *high performance liquid chromatography* (HPLC) aangewend worden om kwantitatieve interpretatie van de oplosbaarheidstesten mogelijk te maken. Verder moet ook getest worden of het aanwezige solvent-residu na het elektrospinningsproces de gezondheidsnormen al dan niet overschrijdt en of deze kan vermeden worden met eventuele nabehandelingen zoals bv. het drogen van de NF in een vacuumoven. Naast deze bedenkingen kunnen ook nog andere polymeren geschikt voor farmaceutische doeleinden aangewend worden voor de productie van NF-SD's via solvent elektrospinnen om zo de meest optimale matrixcondities voor deze toepassing te creëren.

Alhoewel verder onderzoek dus zeker vereist is, heeft dit project als *proof of concept* duidelijk aangetoond dat een kristallijn API met hoog farmaceutisch potentieel, zoals FBDZ, dankzij een alternatieve formulatietechniek, nl. solvent elektrospinnen, niet meer gedoemd is om verworpen te worden. Via het solvent elektrospinnen kan een SD geproduceerd worden waarin FBDZ in amorfes toestand aanwezig is en langdurig blijft. Hierdoor wordt de oplosbaarheid in waterig milieu van het API aanzienlijk verhoogd waardoor de NF aangewend kunnen worden als een doeltreffend oraal *drug delivery* systeem. Daarmee opent dit project de deuren om verder onderzoek te verrichten naar de verwerking van nog vele andere slecht oplosbare, kristallijne API's met deze veelbelovende formulatietechniek, wat een grote meerwaarde kan zijn voor farmaceutisch onderzoek.

ROL VAN DE STUDENTEN

Dit onderzoek kadert in het Vakoverschrijdend Project van studenten derde bachelor in de ingenieurswetenschappen Chemische Technologie en Materiaalkunde aan de Universiteit Gent. De promotor van dit project is prof. dr. ir. Karen De Clerck. Het onderzoek werd begeleid door ir. Jana Becelaere en ir. Ella Schoolaert. Het uitvoeren van de experimenten en het verwerken van de resultaten om relevante conclusies te verkrijgen werd evenwichtig verdeeld over de vier studenten.

REFERENTIELIJST

- [1] T. Vigh *et al.*, "Oral bioavailability enhancement of flubendazole by developing nanofibrous solid dosage forms," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 43, no. 7, pp. 1126–1133, 2017.
- [2] S. J. Yaffe and J. V. Aranda, *Neonatal and pediatric pharmacology: therapeutic principles in practice*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [3] G. Van Den Mooter, "The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate," 2012.
- [4] M. A. Repka *et al.*, "Melt extrusion with poorly soluble drugs – An integrated review."
- [5] A. Paudel, Z. A. Worku, J. Meeus, S. Guns, and G. Van Den Mooter, "Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations," *Int. J. Pharm.*, vol. 453, pp. 253–284, 2013.
- [6] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, "Electrospinning of nanofibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 96, no. 2, pp. 557–569, Apr. 2005.
- [7] A. Frenot and I. S. Chronakis, "Polymer nanofibers assembled by electrospinning," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 8, no. 1, pp. 64–75, Mar. 2003.
- [8] X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, and X. Jing, "Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications," *J. Control. Release*, vol. 185, pp. 12–21, Jul. 2014.
- [9] S.-H. Tan, R. Inai, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process," *Polymer (Guildf.)*, vol. 46, no. 16, pp. 6128–6134, Jul. 2005.
- [10] A. Greiner and J. H. Wendorff, "Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 46, no. 30, pp. 5670–5703, Jul. 2007.