



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii Postaci Leku i Biofarmacji

Autoreferat

**Ocena układów matrycowych jako nośników wybranych substancji leczniczych
stosowanych w terapii chorób rzadkich**

Anna Krupa

Kraków 2018

Spis treści

1. Informacje o autorze	5
1.1. Dane osobowe	5
1.2. Wykształcenie	5
1.3. Zatrudnienie w jednostkach naukowych	5
1.4. Stypendia naukowe.....	6
1.5. Doświadczenie naukowe w ośrodkach zagranicznych	6
2. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego.....	7
3. Wskazanie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę wniosku habilitacyjnego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)	10
3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	10
3.2. Cykl publikacji wchodzących w skład osiągnięcia	10
3.3. Omówienie celu i najważniejszych wyników osiągnięcia naukowego	14
3.3.1. Wprowadzenie - technologia postaci leku w dążeniu do poprawy skuteczności farmakoterapii chorób rzadkich	14
3.3.2. Cele badawcze	17
3.3.3. Omówienie wyników badań.....	18
3.3.4. Podsumowanie.....	39
3.4. Wnioski.....	40
3.5. Piśmiennictwo.....	41
4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	45
4.1. Omówienie działalności naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora	46
4.2. Omówienie działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora, która nie stanowi osiągnięcia naukowego opisanego w pkt. 3	49

1. Informacje o autorze

1.1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Anna Krupa

Miejsce pracy: Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Technologii Postaci Leku i Biofarmacji
ul. Medyczna 9
30-688 Kraków

1.2. Wykształcenie

1998-2003 Studia magisterskie na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM
w Krakowie
Kierunek: Farmacja

2003 Diplôme d'Etudes en Langue Française (DELF) 2nd Degré
Wydany przez: Ministère de l'Education Nationale,
République Française

2003 Stopień naukowy: magister farmacji
Tytuł pracy magisterskiej: *Charakterystyka wybranych substancji
pomocniczych stosowanych w technologii płynnych postaci leku*
Promotor: Dr n. farm. Tomasz Stożek z Katedry Technologii Postaci
Leku i Biofarmacji

2006 Diplôme Approfondi de Langue Française (DALF)
Wydany przez: Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche, République Française

2010 Stopień naukowy: doktor nauk farmaceutycznych
Specjalność: Technologia postaci leku
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Ocena przydatności nowych substancji
pomocniczych Pharmaburst® oraz F-Melt® do wytwarzania tabletek
rozpadających się w jamie ustnej*
Promotor: Prof. dr hab. Renata Jachowicz

1.3. Zatrudnienie w jednostkach naukowych

09.2003-09.2011 Asystent - Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny Katedra Technologii Postaci Leku
i Biofarmacji

10.2011-nadal Adiunkt - Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny Katedra Technologii Postaci Leku
i Biofarmacji

1.4. Stypendia naukowe

2005-2008 **Stypendium doktoranckie** ufundowane przez Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne Anpharm S.A. w Warszawie (grupa Servier)

1.5. Doświadczenie naukowe w ośrodkach zagranicznych

Przed uzyskaniem stopnia doktora

2003 **Program Socrates/Erasmus.** Trzymiesięczny staż naukowy
Opiekun naukowy: Prof. Bernard Bataille
Instytucja goszcząca: Laboratoire de Pharmacie Galénique,
Université de Montpellier1, Francja

Po uzyskaniu stopnia doktora

2014 **La Bourse de Mobilité Individuelle.** Dwutygodniowe stypendium
wyjazdowe ufundowane przez Ambasadę Francji w Polsce
oraz Campus France
Opiekun naukowy: Prof. Dr. Juergen Siepmann
Instytucja goszcząca: INSERM U 1008, CHU, Université de Lille2,
Francja

2014-2015 **One-to-One Mentoring.** Stypendium ufundowane przez Fundację
na rzecz Nauki Polskiej (FNP) – 4 pobyty tygodniowe
Mentor: Prof. Marc Descamps
Instytucja goszcząca: UMET, CNRS INRA, Université de Lille1, Francja

2016 **Le Conférencier Invité** - Miesięczny staż naukowy **na zaproszenie**
Université de Lille1 we Francji
Opiekun naukowy: Prof. Marc Descamps i Prof. Jean-François Willart
Instytucja goszcząca: UMET, CNRS INRA, Université de Lille1, Francja

2. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego

W 1998 r. ukończyłam I Liceum Ogólnokształcące im. Bartłomieja Nowodworskiego w Krakowie. W tym samym roku rozpoczęłam studia magisterskie na kierunku farmacja Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (CM UJ). W czasie studiów moje zainteresowania były związane z przedmiotem technologia postaci leku. Dzięki stypendium Sokrates-Erasmus na V r. studiów odbyłam trzymiesięczny staż badawczy w Laboratoire de Pharmacie Galénique, Université de Montpellier¹ we Francji kierowanym przez Pana prof. Bernard Bataille. Uczestniczyłam w badaniach nad wytwarzaniem peletek metodą ekstruzji i sferonizacji. Wyniki moich prac były częścią rozprawy doktorskiej Pani Sophie Galland, zostały zaprezentowane w formie referatu ustnego na konferencji międzynarodowej, następnie zostały opublikowane w czasopiśmie Powder Technology (Elsevier).

Po powrocie ze stypendium, w lipcu 2003 r. obroniłam z oceną celującą pracę magisterską pt. *Charakterystyka wybranych substancji pomocniczych stosowanych w technologii płynnych postaci leku* przygotowaną w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJ CM. Promotorem pracy był Pan dr n. farm. Tomasz Stożek.

Od 1 października 2003 r. zostałam zatrudniona na stanowisku asystent w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJ CM, kierowanej przez Panią prof. dr hab. Renatę Jachowicz. Moje prace badawcze dotyczyły optymalizacji wytwarzania nowej doustnej postaci leku, tj. tabletek ulegających rozpadowi w jamie ustnej. Przygotowanie pracy doktorskiej z zakresu tej tematyki ułatwiło mi stypendium doktorancie ufundowane przez firmę Anpharm S.A. w Warszawie (Grupa Servier).

Dnia 15 marca 2010 r. na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM obroniłam z wyróżnieniem rozprawę doktorską pt. *Ocena przydatności nowych substancji pomocniczych Pharmaburst® oraz F-Melt® do wytwarzania tabletek rozpadających się w jamie ustnej*. Promotorem pracy była Pani Prof. dr hab. Renata Jachowicz. Praca doktorska miała charakter interdyscyplinarny i została zrealizowana we współpracy z pięcioma krajowymi ośrodkami naukowymi. Wyniki były ponadto tematem trzech wykładów na zaproszenie firmy Syntapharm/Harke Pharma (Niemcy) wygłoszonych w Krakowie i Budapeszcie w latach 2008-2010. O ich aplikacyjnym charakterze świadczy fakt, że doświadczenia badawcze związane z nowymi metodami oceny czasu rozpadu ODT, przekazane przeze mnie w czasie tych wykładów, pomogły firmie farmaceutycznej Valeant (Rzeszów) w opracowywaniu nowej formy leku generycznego z azytromycyną (Macromax ODT/Zigilex ODT).

Przed obroną doktoratu byłam opiekunem pięciu prac magisterskich na kierunku farmacja, z których dwie zdobyły odpowiednio drugą i третią nagrodę na Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich w 2012 r.

Na tym etapie rozwoju naukowego, mój dorobek stanowiło w sumie 10 prac, w tym 5 artykułów oryginalnych, 3 poglądowe i 2 monografie o łącznym współczynniku Impact Factor 3.118 i sumie punktów MNiSW 72. Byłam współautorem 13 prac konferencyjnych, z których 6 zostało zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych.

Od 1 października 2011 r. jestem zatrudniona na stanowisku adiunkt w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJ CM kierowanej przez Panią prof. dr hab. Renatę Jachowicz. Tematem przewodnim moich prac badawczych jest optymalizacja technologii wytwarzania nowych postaci leku przeznaczonych do farmakoterapii chorób rzadkich.

W latach 2013-2017 byłam kierownikiem projektu Sonata 4 (DEC-2012/07/D/NZ7/01673) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Projekt dotyczył oceny właściwości matryc

hydrofilowych jako nośników inhibitorów fosfodiesterazy-5 w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Właściwości matryc były analizowane pod kątem ich potencjalnego zastosowania w doustnej farmakoterapii tętniczego nadciśnienia płucnego (TNP).

W 2014 r. Ambasada Francji w Polsce przyznała mi indywidualne, dwutygodniowe stypendium *La Bourse de Mobilité Individuelle*, dzięki któremu miałam możliwość nabycia praktycznych umiejętności w zakresie ekstruzji topliwej, w ramach nawiązanej przeze mnie współpracy z laboratorium INSERM U1008, CHU, Université de Lille2 we Francji, kierowanym przez Pana prof. Juergen Siepmann.

W 2014 r. nawiązałam współpracę z grupą badawczą kierowaną przez Pana prof. Marc Descamps i Pana prof. Jean-François Willart w laboratorium UMET, CNRS INRA, Université de Lille1 we Francji. Udział w programie *One-to-One Mentoring* finansowanym przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej (FNP) umożliwił mi odbycie czterech tygodniowych staży naukowych w tym laboratorium. Moim mentorem był Pan prof. Marc Descamps. Pod jego kierunkiem zapoznałam się nowoczesnymi technikami analizy fizycznej próbek farmaceutycznych, zwłaszcza modulowaną temperaturowo różnicową kalorymetrią skaningową (MDSC). W 2016 r. zostałam zaproszona przez Université de Lille1 do odbycia miesięcznego stażu naukowego w laboratorium UMET, CNRS INRA w ramach programu wizyt profesorskich dla uczonych z zagranicy - *Le Conférencier Invité*.

Od 2010 r. kierowałam 3 projektami (1 grant NCN, 2 projekty celowe) oraz byłam wykonawcą w 4 projektach (1 grant KBN, 1 grant POIG, 2 projekty statutowe).

Nawiązałam współpracę z czterema zagranicznymi ośrodkami naukowymi, tj. Budapest University of Technology and Economics, Université de Lille1, Université de Lille2, University of Southern Denmark oraz siedmioma krajowymi. Efektem tych współprac, oprócz publikacji i streszczeń konferencyjnych, jest jedna praca licencjacka (University of Southern Denmark) i jedna praca magisterska (Wydział Fizyki UJ).

Dodatkowym aspektem mojej pracy naukowej były mikroemulsje z olejem rybnym do zastosowań spożywczych. Jestem współautorem rozwiązania technologicznego, które zostało nagrodzone srebrnym medalem *Brussels Eureka!* na Międzynarodowej Wystawie Innowacji *Brussels Innova*, w Brukseli 15 listopada 2014 r. W czerwcu 2017 r., Urząd Patentowy RP udzielił patentu nr PL 227367B1 na ww. technologię.

W latach 2012-2016 wypromowałam pięciu magistrantów na kierunku farmacja i jednego na kierunku kosmetologia. Od października 2017 r., jestem promotorem pomocniczym w jednym przewodzie doktorskim.

Od 2011 r. byłam recenzentem 45 artykułów dla 13 międzynarodowych czasopism naukowych z Impact Factor oraz 5 bez Impact Factor. W lutym 2017 r. zostałam wyróżniona przez wydawnictwo Elsevier (Holandia) dyplomem *Certificate of Outstanding Contribution in Reviewing* za recenzje dla czasopisma *European Journal of Pharmaceutical Sciences* wykonane w latach 2015-2016.

Jestem członkiem 2 krajowych i 3 międzynarodowych towarzystw naukowych, m.in. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS). W latach 2015-2017 byłam recenzentem ponad 70 streszczeń zgłoszonych na doroczne zjazdy AAPS w Stanach Zjednoczonych.

Obecnie na mój dorobek naukowy obejmuje 31 prac, w tym: 1 patent krajowy, 2 zgłoszenia patentowe, 18 artykułów oryginalnych, 5 prac poglądowych, 4 monografie i 1 pracę o charakterze popularno-naukowym. Współczynnik oddziaływania Impact Factor dla całego dorobku naukowego wynosi 36.294, suma punktów MNiSW 444. Prace były cytowane 93 razy (88 razy bez autocytowań), a współczynnik Hirscha wynosi 6. Jestem współautorem 47 streszczeń konferencyjnych, w tym 29 ze zjazdów międzynarodowych. Wygłosiłam 7 referatów ustnych w języku angielskim, francuskim i polskim oraz 3 wykłady na zaproszenie.

Moje plany badawcze zakładają kontynuację prac w zakresie poprawy dostępności farmaceutycznej oraz biologicznej substancji leczniczych przy zastosowaniu nowoczesnych technologii i nośników we współpracy z krajowymi i międzynarodowymi ośrodkami naukowymi.

Dorobek naukowy w liczbach:

Sumaryczny Impact Factor dla całego dorobku naukowego:	36.294
dla osiągnięcia habilitacyjnego	24.084
pozostały dorobek	12.210
Łączna suma punktów MNiSW dla całego dorobku naukowego:	444
dla osiągnięcia habilitacyjnego	255
pozostały dorobek	189
Sumaryczna liczba publikacji z listy A:	14
przed uzyskaniem stopnia doktora	2
po uzyskaniu stopnia doktora	12
Liczba cytowań:	
wg Web of Science	93
wg Web of Science bez autocytowań	88
Index Hirscha wg Web of Science:	6
Liczba zgłoszeń patentowych:	2
Liczba udzielonych patentów:	1
Sumaryczna liczba streszczeń konferencyjnych:	47
konferencje międzynarodowe	29
konferencje krajowe	18

3. Wskazanie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę wniosku habilitacyjnego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 8 interdyscyplinarnych publikacji połączonych tematycznie o sumarycznym *Impact Factor* (IF) = 24.084 i liczbie punktów MNiSW = 255.

3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Ocena układów matrycowych jako nośników wybranych substancji leczniczych stosowanych w terapii chorób rzadkich

3.2. Cykl publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

Autor korespondencyjny został oznaczony gwiazdką.

Przy każdej publikacji podano wartość współczynnika oddziaływania IF oraz punktów MNiSW z roku wydania publikacji, jeśli nie zaznaczono inaczej.

H-1. Krupa A.*, Szlęk J., Jany B.R., Jachowicz R., 2015

Preformulation Studies on Solid Self-Emulsifying Systems in Powder Form Containing Magnesium Aluminometasilicate as Porous Carrier

AAPS PharmSciTech 16, 3, 623-635

DOI:10.1208/s12249-014-0247-z

IF₂₀₁₅ = 1.954

MNiSW₂₀₁₅ = 25

Wkład własny 85%

Opracowanie koncepcji pracy. Zaplanowanie wszystkich doświadczeń. Przygotowanie układów samoemulgujących. Wykonanie wszystkich pomiarów z wyjątkiem zdjęć SEM. Interpretacja wyników badań. Redakcja tekstu wszystkich rozdziałów w tym tabel (Tab. I-IV), rycin (Fig. 1-7) oraz streszczenia. Przygotowanie pracy do druku. Korespondencja z redaktorem czasopisma i recenzentami.

H-2. Krupa A.*, Jachowicz R., Kurek M., Figiel W., Kwiecień M., 2014

Preparation of solid self-emulsifying drug delivery systems using magnesium aluminometasilicates and fluid-bed coating process

Powder Technology 266, 329-339

DOI:10.1016/j.powtec.2014.06.043

IF₂₀₁₄ = 2.349

MNiSW₂₀₁₄ = 35

Wkład własny 80%

Opracowanie koncepcji pracy. Zaplanowanie wszystkich doświadczeń. Przygotowanie peletek. Przygotowanie płynnego układu samoemulgującego z ibuprofenem. Wykonanie powlekania peletek płynnym układem samoemulgującym. Wykonanie pomiaru zawartości wody i ibuprofenu w peletkach, wyznaczenie porowatości, wykonanie badań uwalniania i matematyczna analiza kinetyki uwalniania. Interpretacja wyników badań. Przygotowanie tekstu manuskryptu w tym wszystkich tabel (Tab. 1-5), rycin (Fig. 1-7) oraz streszczenia i streszczenia graficznego. Przygotowanie pracy do druku. Korespondencja z redaktorem czasopisma i recenzentami.

H-3. Krupa A.*, Majda D., Mozgawa W., Szlęk J., Jachowicz R., 2017

Physicochemical properties of bosentan selected PDE-5 inhibitors in the design of drugs for rare diseases

AAPS PharmSciTech 18; 1318-1331

DOI: 10.1208/s12249-016-0599-7

IF₂₀₁₆ = 2.451¹

MNiSW₂₀₁₆ = 25¹

Wkład własny 75%

Kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy. Opracowanie koncepcji pracy. Zaplanowanie wszystkich doświadczeń. Przygotowanie mieszanin substancji leczniczych. Wykonanie badań rozpuszczalności i szybkości rozpuszczania. Redakcja tekstu wszystkich rozdziałów z wyjątkiem *Molecular Structure of Drugs*. Przygotowanie tabel (Tab. II, III), wszystkich rycin (Fig. 1-11) oraz streszczenia. Przygotowanie pracy do druku. Korespondencja z redaktorem czasopisma i recenzentami.

H-4. Krupa A.*, Descamps M., Willart J.F., Jachowicz R., Danède F., 2016

High energy ball milling and supercritical carbon dioxide impregnation as co-processing methods to improve dissolution of tadalafil

European Journal of Pharmaceutical Sciences 95; 130-137

DOI:10.1016/j.ejps.2016.05.007

IF₂₀₁₆ = 3.756

MNiSW₂₀₁₆ = 35

Wkład własny 80%

Kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy. Opracowanie koncepcji pracy. Zaplanowanie wszystkich doświadczeń. Przygotowanie wszystkich próbek. Wykonanie wszystkich pomiarów z wyjątkiem analizy rentgenograficznej. Redakcja tekstu wszystkich rozdziałów (1-4), w tym przygotowanie wszystkich tabel (Tab. 1) i rycin (Fig. 1-9), streszczenia oraz streszczenia graficznego. Przygotowanie pracy do druku. Korespondencja z redaktorem czasopisma i recenzentami.

¹ Podano punktację z roku 2016 z uwagi na brak danych z roku 2017

- H-5. Krupa A.***, Descamps M., Willart J.F., Strach B., Wyska E., Jachowicz R., Danède F., **2016**
High-Energy Ball Milling as Green Process to Vitriify Tadalafil and Improve Bioavailability
Molecular Pharmaceutics 13, 11, 3891-3902
 DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00688
IF₂₀₁₆ = 4.440 **MNiSW₂₀₁₆ = 40**

Wkład własny 75%

Kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy. Opracowanie koncepcji pracy. Zaplanowanie wszystkich doświadczeń. Przygotowanie mieszanin fizycznych i stałych rozproszeń do badań *in vitro* i *in vivo*. Wykonanie wszystkich pomiarów w warunkach *in vitro* z wyjątkiem analizy rentgenograficznej. Redakcja tekstu wszystkich rozdziałów, w tym przygotowanie tabeli 2, wszystkich rycin (Fig. 1-9), streszczenia oraz streszczenia graficznego. Przygotowanie pracy do druku. Korespondencja z redaktorem czasopisma i recenzentami.

- H-6. Krupa A.***, Cantin O., Strach B., Wyska E., Tabor Z., Siepmann J., Wróbel A., Jachowicz R., **2017**
In vitro and in vivo behavior of ground tadalafil hot-melt extrudates: How the carrier material can effectively assure rapid or controlled drug release
International Journal of Pharmaceutics 528, 498-510
 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.057
IF₂₀₁₆ = 3.649² **MNiSW₂₀₁₆ = 40²**

Wkład własny 70%

Kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy. Opracowanie koncepcji pracy. Zaplanowanie wszystkich doświadczeń. Przygotowanie ekstrudatów z tadalafilą metodą ekstruzji topliwej. Wykonanie wszystkich pomiarów w warunkach *in vitro* z wyjątkiem obrazowania μ CT. Redakcja tekstu wszystkich rozdziałów w tym przygotowanie tabel 1-3 i wszystkich rycin (Fig. 1-9), streszczenia oraz streszczenia graficznego. Przygotowanie pracy do druku. Korespondencja z redaktorem czasopisma i recenzentami.

- H-7. Strach B., Wyska E., Pocięcha K., Krupa A., Jachowicz R., 2015**
Sensitive and precise HPLC method with back-extraction clean-up step for the determination of sildenafil in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study
Biomedical Chromatography 29, 10, 1559-1566
 DOI: 10.1002/bmc.3459
IF₂₀₁₅ = 1.729 **MNiSW₂₀₁₅ = 20**

Wkład własny 40%

Kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy. Opracowanie koncepcji badań. Redakcja tekstu rozdziału *Introduction*. Opracowanie części literaturowej i przygotowanie pracy do druku.

² Podano punktację z roku 2016 z uwagi na brak danych z roku 2017

H-8. Krupa A.*, Tabor Z., Tarasiuk J., Strach B., Pocięcha K., Wyska E., Wroński S., Łyszczarz E., Jachowicz R., 2018

The impact of polymers on 3D microstructure and controlled release of sildenafil citrate from hydrophilic matrices

European Journal of Pharmaceutical Sciences - *In press*

DOI: 10.1016/j.ejps.2018.04.023

IF₂₀₁₆ = 3.756³

MNiSW₂₀₁₆ = 35³

Wkład własny 70%

Kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy. Opracowanie koncepcji pracy. Zaplanowanie wszystkich doświadczeń. Przygotowanie tabletek matrycowych. Wykonanie wszystkich badań w warunkach *in vitro* z wyjątkiem obrazowania μ CT. Redakcja tekstu wszystkich rozdziałów (1-4), w tym przygotowanie wszystkich tabel (1-5), rycin (1-7), streszczenia oraz streszczenia graficznego. Przygotowanie pracy do druku. Korespondencja z redaktorem czasopisma i recenzentami.

Podsumowanie:

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego charakteryzują się następującymi wskaźnikami scjentometrycznymi:

- sumaryczny współczynnik oddziaływania IF: 24.084
- średnia wartość IF: 3.011
- sumaryczna punktacja MNiSW: 255
- średnia liczba punktów MNiSW: 32
- średni udział własny: 72%
- w 7 z 8 prac jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym

³ Podano punktację z roku 2016 z uwagi na brak danych z roku 2018

3.3. Omówienie celu i najważniejszych wyników osiągnięcia naukowego

3.3.1. Wprowadzenie - technologia postaci leku w dążeniu do poprawy skuteczności farmakoterapii chorób rzadkich

Zgodnie definicją przyjętą w Unii Europejskiej (UE), schorzenie lub choroba jest określana jako rzadka gdy dotyczy mniej niż 5 pacjentów na 10,000 osób [1-4]. Wszystkie choroby rzadkie mają charakter poważny, przewlekły i często zagrażają życiu. Dotychczas około 8,000 jednostek chorobowych zostało sklasyfikowanych jako choroby rzadkie. W Europie ten problem dotyczy ponad 30 mln pacjentów, z czego ponad połowę stanowią dzieci. W Polsce na choroby rzadkie choruje 2.3-3 mln pacjentów [2]. Wiadomo, że 80% tych chorób ma podłoże genetyczne, natomiast przyczyny ok. 20% z nich upatruje się w przebytych infekcjach wirusowych, bakteryjnych lub ekspozycji organizmu na alergeny i zanieczyszczenia środowiskowe [1-3].

Obecnie tylko 1% leków dostępnych na świecie jest przeznaczonych do terapii chorób rzadkich. Sytuację komplikuje fakt, że choroby rzadkie wymagają zwykle przewlekłej politerapii [1-4]. Analizy statystyczne opracowane przez *EvaluatePharma*® przewidują, że w 2022 r. zapotrzebowanie na preparaty przeznaczone do terapii chorób rzadkich będzie stanowiło ponad 11% światowego rynku leków [4].

Poszukiwanie nowych leków do terapii chorób rzadkich obejmuje zasadniczo dwie strategie, tj. syntezę nowych substancji leczniczych (tzw. sieroce substancje lecznicze), które są dedykowane konkretnej chorobie sieroczej oraz wskazanie nowego zastosowania dla substancji aktywnych dotychczas stosowanych w leczeniu innych jednostek chorobowych [1, 3]. Zaletą tej ostatniej strategii postępowania jest wykazane w praktyce klinicznej bezpieczeństwo stosowania.

Na przestrzeni ostatniej dekady obserwuje się zwiększone zainteresowanie optymalizacją farmakoterapii chorób rzadkich. Na mocy rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady nr 141/2000 z 16 grudnia 1999 r., w UE wprowadzono programy tzw. wyrównania szans leczenia i rozwiązań socjalnych dla pacjentów cierpiących na choroby rzadkie [3]. W Polsce od 2011 r. opracowywany jest Narodowy Plan dla Chorób Rzadkich, który w swych założeniach ma poprawić skuteczność ich leczenia [2]. Mimo to Polska zajmuje nadal jedno z ostatnich miejsc w rankingu krajów europejskich pod względem dostępności farmakoterapii. W styczniu 2018 r. na polskich listach refundacyjnych znajdowało się 26 z ponad 220 leków przeznaczonych do farmakoterapii chorób rzadkich. Dla porównania we Francji i Anglii refundowanych jest 50-60 takich leków [2].

Jedną z ogólnoustrojowych chorób rzadkich o podłożu genetycznym jest mukowiscydoza. Przyczyną tej choroby jest mutacja genu kodującego białko CFTR (*ang. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) [5, 6]. W warunkach fizjologicznych białko CFTR odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie zależnych od cAMP kanałów chlorkowych zlokalizowanych w błonie komórek wydzielania zewnętrznego. Zaburzony transport jonów chlorkowych oraz zwiększenie absorpcji jonów sodowych i wody, powoduje nadmierne zagęszczenie wydzieliny, co z kolei skutkuje zmianami patologicznymi w obrębie układu oddechowego i pokarmowego.

W pełnoobjawowej postaci mukowiscydozy, chorobie towarzyszą zapalenia oskrzeli i płuc, niewydolność zewnątrzwydzielnicza trzustki oraz niepłodność u mężczyzn. Farmakoterapia mukowiscydozy obejmuje przede wszystkim, profilaktykę i leczenie choroby oskrzelowo-płucnej, niewydolności trzustki oraz leczenie chorób towarzyszących i powikłań. W tym celu są stosowane antybiotyki, mukolityki, leki rozszerzające oskrzela i przeciwzapalne.

U chorych z progresją zmian w płucach są stosowane glikokortykosteroidy systemowe np. prednizon, który jest również podstawowym lekiem w terapii aspergilozy oskrzelowo-płucnej. Z uwagi na liczne działania niepożądane, jak np. przyrost masy ciała i rozwój insulinooporności, poszukuje się nowych leków o działaniu przeciwzapalnym, które mogłyby stanowić alternatywę dla terapii glikokortykosteroidami.

Wyniki wieloośrodkowych badań klinicznych przeprowadzonych w latach 90. wskazują, że ibuprofen podawany doustnie przez okres 2-4 lat zapobiega progresji choroby zwłaszcza w obrębie

płuc [5-7]. Największą skuteczność ibuprofenu wykazano u pacjentów z łagodnymi lub średniozaawansowanymi zmianami w płucach [7]. Zgodnie ze standardami medycznymi z 2009 r. [6], terapia ibuprofenem powinna być zalecana, a stężenie terapeutyczne leku we krwi powinno mieścić się w zakresie od 16.2 do 31.6 mg kg⁻¹ mc. Przewlekłe stosowanie dużych dawek ibuprofenu jest jednak obciążone ryzykiem np. krwawienia z przewodu pokarmowego, krwiotłucia lub/i uszkodzenia nerek [5, 6].

Pod względem właściwości fizykochemicznych, ibuprofen jest słabym kwasem (pKa = 4.91) o ograniczonej rozpuszczalności w wodzie (0.07 mg mL⁻¹). Poprawa jego rozpuszczalności przez optymalizację technologii wytwarzania finalnej postaci leku może stwarzać możliwość zwiększenia dostępności biologicznej substancji leczniczej, zmniejszenia jego dawki terapeutycznej i działań niepożądanych.

Dodatkowo w ostatnich miesiącach opublikowano wyniki badań, wskazujące na przeciwdrobnoustrojowe działanie ibuprofenu, który okazał się skuteczny w terapii zakażeń wywołanych przez bakterie Gram (-) u pacjentów z mukowiscydą [8].

Do tej pory do farmakoterapii chorób rzadkich zarejestrowano jeden preparat z ibuprofenem. Lek Pedeo jest roztworem do iniekcji (5 mg mL⁻¹), przeznaczonym do leczenia przetrwałego przewodu tętniczego (*ang. patent ductus arteriosus*) u wcześniaków [1].

Mimo pozytywnych wyników badań klinicznych, żaden spośród doustnych produktów leczniczych z ibuprofenem nie został dotychczas zarejestrowany w terapii mukowiscydozy. Według rejestru Polskiego Towarzystwa Mukowiscydozy, w Polsce na mukowiscydę choruje 1,300 pacjentów. Szacuję się jednak, że takich pacjentów może być nawet 2,000. Z uwagi na wysokie koszty (4-5,000 zł/miesiąc) i ograniczony dostęp do farmakoterapii, średnia życia polskiego pacjenta ze zdiagnozowaną mukowiscydą wynosi 35-40 lat [6]. Dla porównania w innych krajach, średnia długość życia pacjenta z mukowiscydą wynosi 50 lat [5]. Jakość i długość życia takich pacjentów determinują zmiany w układzie oddechowym. W zaawansowanej mukowiscydozie może rozwijać się m.in. tętnicze nadciśnienie płucne (TNP), które jest również chorobą rzadką [6].

TNP jest diagnozowane, gdy ciśnienie w tętnicy płucnej przekracza wartości fizjologiczne, tj. 14 mmHg [9, 10]. TNP jest ciężkim, postępującym schorzeniem, które polega na niekontrolowanej proliferacji komórek ściany tętniczek płucnych. Prowadzi to do ich zwężenia, zwiększenia oporu naczyniowego, co w konsekwencji skutkuje nadmiernym obciążeniem prawej komory serca. W miarę upływu czasu rozwija się niewydolność prawej komory, zmniejsza się przepływ krwi przez płuca. Dochodzi do zmian w krążeniu ogólnoustrojowym, co w konsekwencji prowadzi do śmierci chorego. Mimo, że TNP może rozwijać się w każdym wieku, schorzenie dotyka zwykle dzieci i ludzi młodych. Średni wiek pacjentów dorosłych nie przekracza 35 lat. Kobiety chorują dwa razy częściej niż mężczyźni. W przypadku dzieci, choroba rozwija się często po zabiegach kardiochirurgicznych [9]. TNP nie leczone prowadzi do śmierci. Czas przeżycia zależy od wieku pacjenta. U osób dorosłych wynosi do 3 lat, natomiast u dzieci do 12 miesięcy [10]. Ocenia się, że TNP dotyczy 30 mln pacjentów na całym świecie. Według danych Kliniki Wad Wrodzonych Serca w Instytucie Kardiologii w Warszawie z 2015 r., w Polsce na TNP choruje ok. 750 pacjentów, w tym 113 dzieci.

Mimo, że TNP jest chorobą nieuleczalną, wprowadzenie do lecznictwa farmakoterapii wielolekowej pozwoliło w istotny sposób poprawić jakość i przedłużyć życie pacjentom. Leczenie farmakologiczne TNP polega na jednoczesnym zastosowaniu leków z różnych grup terapeutycznych, np. leków moczopędnych, leków blokujących kanał wapniowy, przeciwzakrzepowych, prostacyklin lub ich analogów, antagonistów receptorów endotelinowych (bozentan), inhibitorów fosfodiesterazy-5 (cytrynian sildenafilu, tadalafilu) [11-17]. Leki te podawane są w postaci preparatów pozajelitowych, doustnych lub do inhalacji. Większość z nich charakteryzuje się trudną rozpuszczalnością w wodzie lub krótkim okresem biologicznego półtrwania, co rzutuje na parametry biologiczne. Wybór metody leczenia zależy od wielu czynników, m.in. dostępności terapii, stanu zaawansowania choroby oraz akceptacji leczenia przez pacjenta.

Inhibitory fosfodiesterazy-5 są najtańszymi z leków stosowanych w terapii TNP [17]. Ich działanie polega na hamowaniu rozkładu cGMP w ścianie naczyń płucnych, który ma działanie rozszerzające naczynia oraz antyproliferacyjne. Z myślą o farmakoterapii TNP zarejestrowano tabletki powlekane Revatio®, zawierające 20 mg cytrynianu syldenafile. Wymagane jest ich stosowanie trzy razy dziennie ze względu na szybki proces eliminacji syldenafile ($t_{0.5} = 4$ h). Ograniczeniem jest również dostępność wyłącznie jednej dawki preparatu, która utrudnia farmakoterapię np. pacjentów pediatrycznych i skłania do rozwoju nowych postaci leku zwłaszcza o kontrolowanym uwalnianiu syldenafile, które mogłyby poprawić współpracę pacjenta z lekarzem.

W porównaniu do syldenafile, tadalafil ma silniejsze działanie farmakologiczne, gdyż jest 9,000 razy bardziej selektywny w stosunku do PDE-5 [14]. Zmniejsza to ryzyko działań niepożądanych, wynikających z blokowania innych fosfodiesteraz. Jego działanie utrzymuje się długo, nawet do 36 h, dlatego może być podawany raz dziennie. W ostatnich latach zarejestrowano tabletki powlekane Adcirca®, zawierające 20 mg tadalafilu do terapii TNP. Mimo licznych zalet, niewątpliwą wadą tadalafilu jest wolne wchłanianie z przewodu pokarmowego ($t_{max} = 2$ h), spowodowane ograniczoną rozpuszczalnością w wodzie. Stwarza to ryzyko zmiennej dostępności biologicznej i motywuje do podejmowania prac nad poprawą rozpuszczalności, dostępności farmaceutycznej tadalafilu [18]. W tym zakresie zaproponowano dotychczas, m.in. metodę sporządzania kompleksów z cyklodekstrynami [19], stałych rozprożeń z poloksamerem, PVP, PVP/VA, glikolami polioksyetylenowymi (PEG) [20-22], osadzanie tadalafilu na nośnikach krzemianowych [23] lub przygotowanie kokryształów [24].

Skuteczność przewlekłej politerapii zależy nie tylko od właściwego doboru substancji leczniczych i zagwarantowania bezpieczeństwa ich stosowania, ale również od dostosowania postaci leku w ich formie i sposobie aplikacji do indywidualnych potrzeb pacjenta dotkniętego chorobą rzadką. Jeśli forma nie stwarza trudności w przyjmowaniu leku, wówczas znacznie zmniejsza się ryzyko nie stosowania się pacjenta do zaleceń lekarza.

Zarówno forma leku jak i sposób podania mają wpływ na dwa pierwsze z pięciu etapów (*LADME*), opisujących losy leku w ustroju. Spośród nich uwalnianie (*ang. Liberation*) i wchłanianie (*ang. Absorption*) substancji leczniczej mogą być modyfikowane przez zastosowanie odpowiednich nośników oraz procesów technologicznych.

3.3.2. Cele badawcze

Osiągnięcie naukowe, stanowiące podstawę mojego wniosku habilitacyjnego, poświęcone zostało rozwojowi układów matrycowych jako nowoczesnych platform o kontrolowanym uwalnianiu substancji leczniczych z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), inhibitorów fosfodiesterazy-5 (iPDE-5) oraz antagonistów receptorów endoteliny (ARE), stosowanych w przewlekłej farmakoterapii chorób rzadkich.

Należy oczekiwać, że zastosowanie tego typu nośników może przyczynić się do zwiększenia skuteczności terapeutycznej modelowych substancji leczniczych przez uzyskanie korzystniejszego profilu dostępności farmaceutycznej lub/i biologicznej, a co za tym idzie zmniejszenia ryzyka działań niepożądanych oraz lepszej współpracy pacjenta z lekarzem.

Przedmiotem moich zainteresowań były modyfikacje technologiczne, dotyczące:

- ibuprofenu (NLPZ) pod kątem opracowania nowych postaci leku do zapobiegania progresji mukowiscydozy [H-1, H-2],
- tadalafilu i cytrynianu syldenafilu (iPDE-5), jak również bozentanu (ARE) w celu optymalizacji farmakoterapii tętniczego nadciśnienia płucnego (TNP) [H-3 – H-8].

Cykl stanowiący osiągnięcie habilitacyjne obejmuje 8 publikacji opracowanych w latach 2014-2018.

Opisano w nich rozwiązania technologiczne, obejmujące 8 głównych zagadnień badawczych, ukierunkowanych na opracowanie doustnych postaci leku o modyfikowanym uwalnianiu, tj.:

- 1) Stałe doustne układy samoemulgujące jako nowoczesna platforma terapeutyczna, umożliwiająca poprawę rozpuszczalności ibuprofenu pod kątem zwiększenia wchłaniania, obniżenia dawki terapeutycznej i zmniejszenia ryzyka działań niepożądanych [H-1, H-2].
- 2) Analiza właściwości fizykochemicznych tadalafilu, cytrynianu syldenafilu i bozentanu pod kątem identyfikacji cech krytycznych, warunkujących możliwość opracowania nowych, złożonych produktów leczniczych do farmakoterapii TNP [H-3].
- 3) Porównanie przydatności amorficznych (polimer Soluplus®) i krystalicznych nośników (mannitol, laktitol), jak również technologii z użyciem dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym, mielenia lub ekstruzji topliwej w celu poprawy dostępności farmaceutycznej tadalafilu [H-4 - H-6].
- 4) Wyjaśnienie mechanizmu molekularnego oddziaływania tadalafilu z polimerem Soluplus® w amorficznych stałych rozproszeniach przy zastosowaniu modulowanej temperaturowo różnicowej kalorymetrii skaningowej (MDSC) [H-4, H-5].
- 5) Ocena wpływu temperatury na stabilność fizyczną amorficznych stałych rozproszeń tadalafilu przygotowanych metodą mielenia [H-5].
- 6) Obrazowanie metodą rentgenowskiej mikrotomografii komputerowej (μ CT) jako nowoczesne narzędzie do analizy mikrostruktury matryc hydrofilowych w 3D i przewidywania dostępności farmaceutycznej tadalafilu lub/i cytrynianu syldenafilu [H-6, H-8].
- 7) Ocena wpływu nośnika oraz formy krystalicznej tadalafilu na dostępność biologiczną [H-5, H-6].
- 8) Optymalizacja sporządzania tabletek matrycowych o kontrolowanym uwalnianiu cytrynianu syldenafilu z uwzględnieniem oceny ich właściwości w warunkach *in vitro* i *in vivo* [H-7, H-8].

Nowatorstwo wyników badań zawartych w ww. publikacjach polega na wykazaniu możliwości opracowania:

- (i) stałych doustnych układów samoemulgujących o kontrolowanym uwalnianiu ibuprofenu w aspekcie nowoczesnej farmakoterapii mukowiscydozy [H-1, H-2],
- (ii) złożonych preparatów do farmakoterapii TNP, stanowiących połączenie iPDE-5, np. tadalafilu lub/i cytrynianu syldenafile oraz ARE, tj. bozentanu [H-3],
- (iii) amorficznych stałych rozproszeń i krystalicznych stałych zawiesin jako nowoczesnych platform zapewniających kontrolę uwalniania i poprawę dostępności biologicznej tadalafilu w terapii TNP [H-4 - H-6],
- (iv) tabletek matrycowych o kontrolowanym uwalnianiu i zwiększonej dostępności biologicznej cytrynianu syldenafile, w tym rozwoju nowej metody ilościowego oznaczania cytrynianu syldenafile w surowicy do badań przedklinicznych w modelu szczurzym [H-7, H-8].

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu *SONATA 4* (DEC-2012/07/D/NZ7/01673), Fundację na Rzecz Nauki Polskiej w ramach programu *One-to-One Mentoring*, Ambasadę Francji w Polsce w ramach programu *La Bourse de Mobilité Individuelle*, Université de Lille1 w ramach programu *Le Conférencier Invité* oraz UJ CM w ramach dotacji statutowej (K/ZDS/001893) i celowej (K/DSC/000798).

3.3.3. Omówienie wyników badań

Stale układy samoemulgujące (ssSEDDS) jako metoda poprawy dostępności farmaceutycznej ibuprofenu [H-1, H-2]

Zaletą układów samoemulgujących jest możliwość poprawy rozpuszczalności i dostępności biologicznej trudno rozpuszczalnych substancji leczniczych [25, 26]. Sporządzanie stałych układów samoemulgujących (ssSEDDS, *ang. solid state Self-Emulsifying Drug Delivery System*) polega na przygotowaniu płynnego układu samoemulgującego, w którym rozpuszcza się lub emulguje substancję leczniczą, a następnie na zestaleniu sporządzonej płynnej formulacji, np. przez jej osadzenie na porowatym nośniku [27].

Przykładem takich nośników są syntetyczne krzemiany [27-30]. Do przygotowania stałych układów samoemulgujących o modyfikowanej szybkości rozpuszczania/uwalniania ibuprofenu (Shasun Chemicals and Drugs, Indie) użyłam amorficzne krzemiany magnezowo-glinowe o wzorze strukturalnym $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{MgO} \cdot 1.7\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ i nazwie handlowej Neusilin® (Fuji Chemical Industry, Japonia). W Japonii substancje te są również stosowane w leczeniu jako *antacida* do zapobiegania nadkwasocie żołądka [31]. Ich użycie jako nośników dla ibuprofenu może zatem ułatwić zapobieganie drażniącemu działaniu substancji leczniczej, co jest istotne zwłaszcza pod kątem przewlekłej farmakoterapii mukowiscydozy.

Do sporządzenia płynnych układów samoemulgujących użyłam Labrasol® (Gattefossé, Francja), będący płynną mieszaniną makrogolicerydów kaprylokapronianowych o właściwościach samoemulgujących. Po rozproszeniu w wodzie Labrasol® tworzy micelle, w których trudno rozpuszczalna substancja lecznicza może być solubilizowana. Dodatkowo Labrasol® upłynnia lipidy w błonach komórkowych przewodu pokarmowego, ułatwiając wchłanianie substancji leczniczej do krwiobiegu [32].

Płynny układ samoemulgujący przygotowany przez rozpuszczenie ibuprofenu w Labrasol®, adsorbowałam na porowatych rdzeniach krzemianu magnezowo-glinowego [H-1, H-2]. Przedmiotem analiz opisanych w publikacjach H-1 i H-2 były trzy rodzaje krzemianu magnezowo-glinowego dostępne w postaci gotowych granulatów, tj. Neusilin® US2, Neusilin® SG2 lub Neusilin® NS2N. Różniły

się one m.in. odczynem pH zawiesin wodnych ($\text{pH} = 6-10$), wielkością cząstek ($44-500 \mu\text{m}$), polem powierzchni właściwej ($110-300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$).

W publikacji H-1 opisałam metodę sporządzania ssSEDDS z ibuprofenem przez wymieszanie płynnego układu samoemulgującego, przygotowanego na bazie Labrsol® z porowatym nośnikiem Neusilin® US2 lub Neusilin® SG2 [H-1]. W taki sposób przygotowałam w sumie 18 formułacji ssSEDDS w formie proszkowej. Dla porównania przygotowałam 6 mieszanin fizycznych ibuprofenu z Neusilin® w proporcji 1:2; 1:4; 1:6 (bez dodatku Labrasolu®). Co istotne, z uwagi na małą lepkość Labrasolu® i dobrą rozpuszczalność ibuprofenu w tej substancji pomocniczej (150 mg mL^{-1}), nie było konieczności wprowadzenia do układu dodatkowych rozpuszczalników organicznych, co jest niewątpliwą zaletą opracowanej technologii. Wykazałam korzystny wpływ Labrasolu® na szybkość rozpuszczania ibuprofenu. Po 5 min z płynnego układu samoemulgującego w kwaśnym pH rozpuściła się od 15- do 45-krotnie większa ilość ibuprofenu niż z układów niezawierających Labrasolu®.

Stwierdziłam, że rodzaj krzemianu warunkował ilość płynnej formułacji, którą można było osadzić na nośniku w celu uzyskania ssSEDDS w postaci sypkiego proszku [H-1]. W tym aspekcie użycie Neusilin® US2 o powierzchni właściwej ok. $372 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ było korzystniejsze niż Neusilin® SG2, którego powierzchnia właściwa wynosiła $187 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

We współpracy z Akademią Górniczo-Hutniczą w Krakowie, metodą adsorpcji azotu, wykonałam analizę porowatości nośników krzemianowych przed i po osadzaniu płynnego układu samoemulgującego [H-1]. Stwierdziłam, że adsorpcja płynnego układu samoemulgującego na Neusilin® SG2 skutkowała wypełnieniem wszystkich porów, znajdujących się na powierzchni nośnika. W przypadku Neusilin® US2 wypełnione zostały wszystkie pory o wielkości poniżej $10 \mu\text{m}$ i ponad połowa porów o średnicy powyżej $10 \mu\text{m}$. We współpracy z Panem dr Benedyktem R. Jany z Wydziału Fizyki UJ, wykonałam analizę morfologii powierzchni Neusilin® i ssSEDDS techniką skaningowej mikroskopii elektronowej w niskiej próżni. Wykazałam, że w wyniku zaadsorbowania płynnego układu samoemulgującego na porowatym nośniku, następowało zmniejszenie średnicy porów [H-1]. Dyfraktogramy wyznaczone dla opracowanych, stałych układów samoemulgujących nie wykazały pików Bragg'a typowych dla krystalicznego ibuprofenu.

Stwierdziłam zwiększenie szybkości rozpuszczania ibuprofenu ze ssSEDDS w porównaniu do mieszanin fizycznych ibuprofenu z Neusilin® oraz samą substancją leczniczą, niezależnie od pH rozpuszczalnika [H-1]. Co ciekawe, użycie Neusilin® US2 o obojętnym odczynie zawiesin wodnych, miało korzystniejszy wpływ na szybkość rozpuszczania ibuprofenu (słaby kwas) niż zastosowanie jako nośnika Neusilin® SG2 o alkalicznym odczynie. Z danych piśmiennictwa wynika, że osadzanie substancji leczniczych o kwaśnym odczynie na alkalicznych nośnikach z grupy krzemianów może skutkować spowolnieniem rozpuszczania substancji leczniczej, wynikającym z silnych oddziaływań chemicznych między grupą karboksylową i np. aminową [33]. Według danych producenta, pH 4 % zawiesiny wodnej Neusilin® SG2 powinno mieścić się w zakresie od 8.5 do 10.0 [31], co wskazuje na silnie alkaliczny charakter nośnika i możliwość tworzenia silnych wiązań chemicznych z substancją leczniczą, które z kolei mogą skutkować spowolnieniem jej szybkości rozpuszczania.

Na podstawie ww. wyników wykazałam, że możliwe jest zwiększenie szybkości rozpuszczania ibuprofenu przez sporządzanie stałych układów samoemulgujących [H-1]. Przy użyciu krzemianów magnezowo-glinowych możliwe było opracowanie układów proszkowych z ibuprofenem o właściwościach samoemulgujących, dla których średni czas rozpuszczania (*ang. mean dissolution time*) wynosił 8 min przy efektywności procesu rozpuszczania (*ang. dissolution efficiency*) na poziomie ok. 40%. Szybkość rozpuszczania ibuprofenu z takich układów była uwarunkowana właściwościami fizykochemicznymi nośnika.

Zaletą opracowanej technologii jest poprawa rozpuszczalności substancji leczniczej, co potencjalnie stwarza możliwość zmniejszenia dawki terapeutycznej. Brak konieczności użycia rozpuszczalników organicznych w celu rozpuszczenia substancji leczniczej lub zmniejszenia lepkości płynnego układu samoemulgującego, eliminuje z kolei wymóg analizy pozostałości rozpuszczalników z klasy 1 i 2 wg ICH (*ang. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*).

Do wad porowatych nośników typu Neusilin® należy pylenie drobnych cząstek krzemianów, co może utrudniać zastosowanie opracowanej technologii w dużej skali. W kolejnym etapie badań nad rozwojem stałych układów samoemulgujących, opracowałam technologię sporządzania porowatych peletek na bazie krzemianów magnezowo-glinowych z dodatkiem 30, 50 lub 70% celulozy mikrokrystalicznej [H-2]. Technologia zakłada ograniczenie pylenia krzemianów przez ich granulację. Metodą ekstruzji i sferonizacji, przygotowałam dziewięć formułacji porowatych peletek *placebo*. Wykazałam przydatność krzemianów magnezowo-glinowych (Neusilin®) do ich wytwarzania tą techniką. Następnie, metodą powlekania w warstwie fluidalnej, nanosiłam płynne układy samoemulgujące z ibuprofenem na powierzchnię przygotowanych peletek. Stwierdziłam, że rodzaj krzemianu użytego do ich przygotowania miał wpływ na właściwości mechaniczne peletek i szybkość uwalniania ibuprofenu. Wprowadzenie krzemianów do matrycy peletek skutkowało od 8- do 14-krotnym zwiększeniem ilości płynnego układu samoemulgującego, który można było zaadsorbować na ich powierzchni w porównaniu do peletek celulozowych [H-2].

We współpracy z Wydziałem Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej oraz Wydziałem Geografii i Geologii UJ, dokonałam oceny morfologii, wielkości oraz kulistości peletek przed i po procesie powlekania w warstwie fluidalnej przy użyciu automatycznego systemu do mikroskopowej charakterystyki cząstek (Morphology G3, Malvern) oraz skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Wykazałam, że z uwagi na największą wytrzymałość mechaniczną, peletki na bazie Neusilin® SG2 ulegały najmniejszemu odkształceniu w procesie powlekania [H-2]. Spośród analizowanych peletek, ich średnica i kulistość zmieniały się w najmniejszym stopniu. Peletki, zawierające Neusilin® US2 lub Neusilin® NS2N, kruszyły się podczas powlekania. Utrudniało to przygotowanie peletek o właściwościach samoemulgujących i jednolitym rozkładzie wielkości cząstek [H-2].

Rodzaj krzemianu zastosowanego do przygotowania peletek miał również wpływ na profile uwalniania ibuprofenu [H-2]. Z peletek zawierających 70% Neusilin® SG2 po 30 min w buforze fosforanowym o pH = 7.2 uwalniało się ponad 80% ibuprofenu. Podobne zależności dotyczyły peletek, zawierających 70% Neusilin® US2. Przedłużone uwalnianie ibuprofenu wykazałam w przypadku peletek, zawierających 30% Neusilin® US2, 30-50% Neusilin® SG2 lub 50-70% Neusilin® NS2N.

Wyniki wskazują na możliwość modyfikacji profilu uwalniania ibuprofenu ze stałych układów samoemulgujących przez połączenie peletek przygotowanych na bazie różnych rodzajów krzemianów magnezowo-glinowych. Zastosowanie metody ekstruzji i sferonizacji do wytwarzania porowatych rdzeni, a następnie technologii powlekania w warstwie fluidalnej do ich impregnacji, stwarza możliwość użycia opracowanej technologii w dużej skali.

Identyfikacja cech krytycznych: tadalafile, cytrynianu syldenafile oraz bozentanu pod kątem opracowania nowych preparatów złożonych do farmakoterapii TNP [H-3]

Wytyczne Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego wskazują, że leczenie TNP powinno opierać się na politerapii, w której stosowane są dwie generacje leków. Do leków pierwszej generacji należą blokery kanałów wapniowych. Natomiast do leków drugiej generacji zalicza się prostanoidy, antagonistów receptorów dla endoteliny (ERA), np. bozentan oraz inhibitory fosfodiesterazy-5 (iPDE-5), tj.: syldenafil, tadalafile [11-15]. Politerapia TNP wiąże się jednak z ryzykiem pomyłek lub pominięcia dawki leku. Rozwiązaniem tego problemu może być opracowanie preparatów złożonych, które zawierają więcej niż jedną substancję leczniczą. Aplikacja jednej tabletki zamiast dwóch lub trzech ułatwia pacjentowi dostosowanie się do zaleceń terapeutycznych [34]. Obecnie preparaty złożone ułatwiają wielolekową terapię, m.in. nadciśnienia tętniczego i cukrzycy, np. peryndopryl-indapamid-amlodypina (Triplixam) lub widlagliptyna-chlorowodorek metforminy (Eucreas).

Inhibitory fosfodiesterazy-5 wykazują synergistyczne działanie z antagonistami receptorów dla endoteliny, dlatego zasadna wydaje się identyfikacja cech krytycznych substancji leczniczych pod kątem wyeliminowania ryzyka interakcji fizykochemicznych w procesie wytwarzania preparatów złożonych.

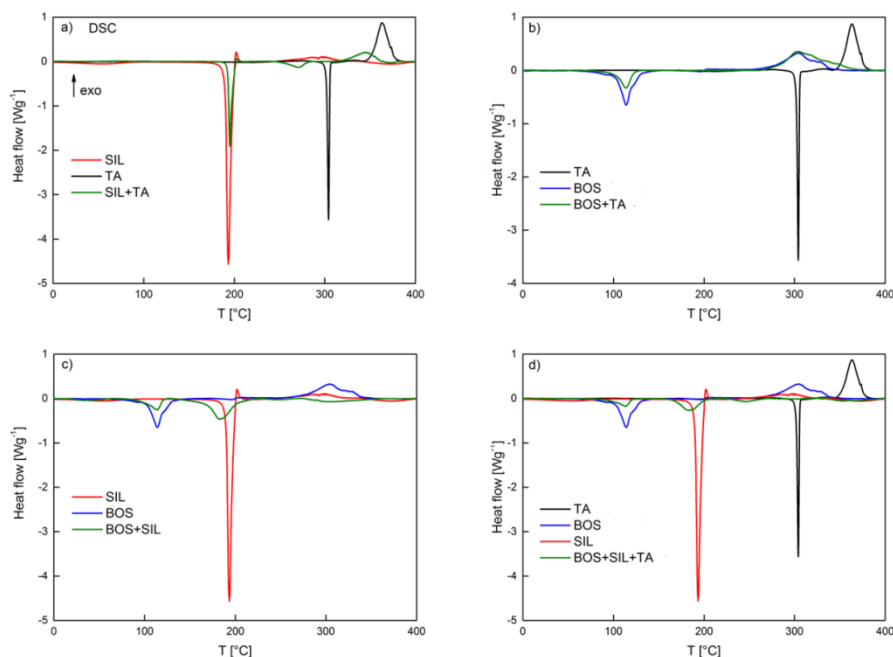
Jako modelowe substancje lecznicze z grupy inhibitorów fosfodiesterazy-5 wybrałam tadalafil (Polpharma S.A., Polska) i cytrynian syldenafilu (Polpharma S.A., Polska). Natomiast modelowym antagonistą receptorów dla endoteliny był bozentan (Polpharma S.A., Polska) [H-3].

Na podstawie analizy modelowych substancji leczniczych przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) we współpracy z Wydziałem Geografii i Geologii UJ, stwierdziłam różnice w morfologii cząstek. W przypadku bozentanu wykazałam tworzenie aglomeratów złożonych z cząstek o płytkowym i kolumnowym kształcie. Z kolei cząstki tadalafilu i cytrynianu syldenafilu miały kształt kolumnowy ale nie aglomerowały. W celu wykonania analizy rozkładu wielkości cząstek metodą dyfrakcji laserowej, nawiązałam współpracę z firmą Atest w Kielcach. Analiza wykazała, że największe cząstki miał bozentan ($D_{50} = 101.77 \mu\text{m}$). Dla porównania, wielkość cząstek tadalafilu ($D_{50} = 11.40 \mu\text{m}$) i syldenafilu ($D_{50} = 6.92 \mu\text{m}$) była odpowiednio prawie 9- i 15-krotnie mniejsza niż bozentanu [H-3].

W ramach nawiązanych przeze mnie współprac z Wydziałem Chemii UJ (DSC, TGA-QMS), Wydziałem Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie (analizy spektroskopowe FT-IR MIR, FT-IR NIR), dokonałam identyfikacji krytycznych właściwości fizykochemicznych, które warunkują możliwość opracowania nowego preparatu złożonego do terapii TNP [H-3].

Wyniki analizy termogravimetrycznej wskazują, że spośród modelowych substancji leczniczych, najwyższą temperaturą topnienia ($T_m = 299^\circ\text{C}$) charakteryzował się tadalafil. Po stopieniu następował rozkład tadalafilu, który rozpoczynał się w temp. ok. 250°C . Monohydrat bozentanu topił się w temperaturze 195°C . Dla porównania monohydrat cytrynianu syldenafilu topił się z rozkładem w nieco niższej temperaturze tj. ok. 190°C . Proces jego dehydratacji rozpoczynał się już w temp. ok. 70°C .

Termogramy wyznaczone metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) posłużyły do oceny ryzyka interakcji między modelowymi substancjami leczniczymi w układach dwu- lub trójskładnikowych (Ryc. 1). Niezależnie od rodzaju układu, wykazałam brak interakcji termodynamicznych między modelowymi substancjami leczniczymi [H-3].



Ryc. 1. Termogramy (a-c) substancji leczniczych oraz ich mieszanin fizycznych w proporcji 1:1 lub (d) 1:1:1 (g/g). SIL – cytrynian syldenafilu (kolor czerwony), TA – tadalafil (kolor czarny), BOS – bozentan (kolor niebieski). Mieszaniny oznaczono kolorem zielonym [H-3].

Uzupełnieniem badań była analiza rozpuszczalności modelowych substancji leczniczych w stanie nasycenia (temp. 37°C). W tych warunkach wykazałam ograniczoną rozpuszczalność bozentanu i tadalafilu w wodzie. Rozpuszczalność bozentanu zależała od pH i wynosiła poniżej 2 µg mL⁻¹ w kwaśnym pH, natomiast zwiększała się do 169 µg mL⁻¹ w pH = 7.2. W badaniach szybkości rozpuszczania stwierdziłam flotację hydrofobowych cząstek bozentanu. Ponadto wykazałam, że z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność bozentanu w wodzie, nie było możliwe wyznaczenie szybkości jego rozpuszczania bez dodatku solubilizatora (np. laurylosiarczan sodu). Dla porównania, mimo ograniczonej rozpuszczalności tadalafilu, jego stężenia były wyższe niż dolna granica oznaczalności metody analitycznej. Rozpuszczalność tadalafilu wyznaczona w zakresie pH od 1.2 do 7.2 mieściła się w granicach od 3.8 do 4.1 µg mL⁻¹. Największą rozpuszczalnością charakteryzował się cytrynian syldenafilu. Ze względu na amfoteryczny charakter tej soli, wartość pH rozpuszczalnika miała istotny wpływ na rozpuszczalność, która zmniejszała się w miarę zwiększania pH i wynosiła 34 mg mL⁻¹ w pH = 1.2, 7.5 mg mL⁻¹ w pH = 4.5 oraz 4.6 mg mL⁻¹ w pH = 7.2 [H-3].

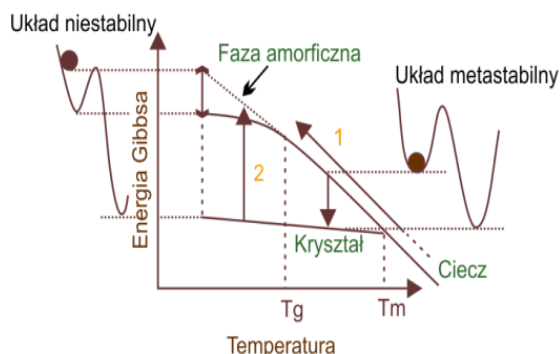
Powyższe wyniki wskazują na brak interakcji między modelowymi substancjami leczniczymi, co stwarza możliwość opracowania preparatu złożonego w przyszłości. Zróżnicowana wielkość, kształt cząstek, właściwości termiczne oraz rozpuszczalność stanowią cechy krytyczne, które w istotny sposób mogą warunkować wybór optymalnej technologii wytwarzania i właściwości finalnej postaci leku.

Ocena przydatności procesu mielenia oraz technologii z użyciem dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym jako nowych metod poprawy szybkości rozpuszczania tadalafilu [H-4, H-5]

Poprawa rozpuszczalności substancji leczniczych jest jednym z wiodących tematów prac badawczo-rozwojowych realizowanych na świecie w ostatnich latach. Szacuje się, że 70% substancji leczniczych stosowanych w lecznictwie jest trudno rozpuszczalnych w wodzie. Substancje te charakteryzuje zwykle mała i zmienna dostępność biologiczna, która może prowadzić do zmniejszenia ich skuteczności terapeutycznej [35-37].

Wyniki badań opisane w publikacji H-3 wskazują, że spośród iPDE-5, tadalafil jest trudno rozpuszczalny w wodzie ($< 5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Z uwagi na dobre przenikanie przez błony biologiczne, należy on do II klasy Systemu Klasyfikacji Biofarmaceutycznej (BCS). Dla takich substancji leczniczych, jedną z najbardziej obiecujących metod poprawy rozpuszczalności oraz szybkości rozpuszczania jest przekształcenie ich formy krystalicznej w odmianę bezpostaciową/amorficzną [36, 37].

W stanie amorficznym ciało stałe posiada największą gęstość defektów krystalicznych o różnych rozmiarach. Nie występuje uporządkowanie dalekiego zasięgu, które jest charakterystyczne dla kryształów [38-40]. W układzie dominuje natomiast uporządkowanie bliskiego zasięgu. Bliski porządek wynika z symetrii wiązań chemicznych między sąsiednimi atomami, która wymusza organizację przestrzenną najbliższych sąsiadujących ze sobą atomów. Z uwagi na to, że zasięg bliskiego uporządkowania nie przekracza zwykle 1 nm, rozpuszczalność ciał amorficznych w wodzie jest większa niż kryształów. Bliskoziębowe uporządkowanie atomów w ciele amorficznym, różni się jednak od bliskoziębowego uporządkowania, występującego gdy ciało to znajduje się w fazie ciekłej. Przyjmuje się, że faza amorficzna powstaje zwykle na skutek gwałtownego ochłodzenia cieczy poniżej temperatury topnienia, gdy zamrożona zostaje chwilowa konfiguracja atomów (Ryc. 2).



Ryc. 2. Zmiany entalpii w kryształach, cieczy (stabilnej i metastabilnej) i ciele amorficznym, pkt. 1 obrazuje tworzenie fazy amorficznej przez chłodzenie cieczy, pkt. 2 odpowiada procesowi zeszklenia cieczy stałej. T_g – temperatura przejścia fazowego, T_m – temperatura topnienia [40].

Każda niedoskonałość lub defekt w sieci krystalicznej powoduje zwiększenie zarówno energii, odpowiadającej entalpii układu w warunkach stałego ciśnienia oraz nieporządku wyrażanego jako entropia sieci krystalicznej (Ryc. 2). Z tego powodu, stan amorficzny jest stanem nierównowagowym, metastabilnym, który dąży do osiągnięcia równowagi termodynamicznej przez rekrytalizację [39].

W technologii postaci leku, w wyniku stosowania różnych procesów technologicznych, amorfizacja może dotyczyć jednej substancji leczniczej, mieszaniny kilku substancji leczniczych lub mieszaniny substancji leczniczej z substancjami pomocniczymi. W taki sposób mogą się tworzyć amorficzne stałe rozproszenia, w których substancja lecznicza znajduje się w stanie molekularnym

rozproszenia w nośniku [41]. Właściwy dobór zarówno procesu technologicznego jak i nośnika mogą warunkować stabilność formy amorficznej, dlatego optymalizacja metody amorfizacji zależy w dużej mierze od właściwości fizykochemicznych substancji leczniczej [35, 41].

W przypadku tadalafilu problemy technologiczne stwarza wysoka temperatura topnienia ($T_m = 299^\circ\text{C}$, H-3), rozkład substancji po stopieniu oraz ograniczona rozpuszczalność w wodzie ($< 5 \mu\text{g mL}^{-1}$, H-3) i rozpuszczalnikach organicznych klasy 2 i 3 wg ICH ($< 1\%$). Te cechy w znacznym stopniu ograniczają możliwość amorfizacji tadalafilu metodą stapiania lub odparowania rozpuszczalnika. Poszukuje się zatem, nowych metod amorfizacji, jak np. technologia z zastosowaniem gazów w stanie nadkrytycznym lub podejmowane są próby mechanicznej aktywacji krystalicznych cząstek substancji leczniczej w procesie mielenia. Niewątpliwą zaletą procesu mielenia jest brak konieczności użycia rozpuszczalników organicznych oraz wysokiej temperatury [42, 43]. Mielenie substancji leczniczej w temperaturze pokojowej ogranicza ryzyko rozkładu substancji termolabilnych.

W celu zagwarantowania stabilności amorficznych substancji leczniczych bierze się pod uwagę m.in. rodzaj i siłę oddziaływań między cząsteczkami, obecność zanieczyszczeń i stopień wymieszania składników na poziomie molekularnym. Jedną z metod zapobiegania rekrytalizacji amorficznej substancji leczniczej jest jej inkorporowanie do matryc sporządzonych na bazie bezpostaciowych, hydrofilowych nośników z utworzeniem szklistych roztworów (amorficznych stałych rozprożeń) [35, 39].

Czynnikiem warunkującym poprawę rozpuszczalności substancji leczniczych przez sporządzanie stabilnych szklistych roztworów jest zdolność mieszania się polimeru z substancją leczniczą. Dąży się do opracowania takich stałych rozprożeń, w których substancja lecznicza jest w sposób jednorodny wymieszana z polimerem na poziomie molekularnym. Warunkuje to największą stabilność układu [39].

Jedną z metod oceny zdolności mieszania się substancji leczniczej z polimerem jest pomiar temperatury przejścia fazowego mieszaniny. W tym celu stosuje się różnicową kalorymetrię skaningową (DSC) lub modulowaną temperaturowo różnicową kalorymetrię skaningową (MDSC). W metodzie DSC zmiana temperatury w czasie następuje w sposób liniowy. Natomiast w metodzie MDSC na liniowo zmieniającą się w czasie temperaturę, nałożono okresowo zmieniającą się temperaturę. Daje to możliwość odróżnienia przemian fazowych odwracalnych, np. przejście szkliste związane z amorfizacją, od nieodwracalnych, np. parowanie wody/roztuszczałników.

Podczas analizy stałych rozprożeń, szeroki pik endotermiczny związany z parowaniem wody związanej z polimerem może maskować inne przemiany fazowe. Przykładem takiego polimeru jest Soluplus® (kopolimer: 13% PEG 6000, 57% kaprolaktamu winylu, 30% octanu winylu, BASF, Polska), którego temperatura przejścia fazowego (T_g) wynosi ok. 70°C [44, 45]. Podczas ogrzewania w zakresie temperatur od 50 do 90°C , pojawia się pik endotermiczny, obrazujący parowanie wody luźno związanej z łańcuchami polimeru.

Z tego względu, w celu analizy właściwości termicznych stałych rozprożeń tadalafilu z Soluplus® metodą MDSC w 2014 r. nawiązałam współpracę z Panem prof. Marc Descamps i Panem prof. Jean-François Willart, kierującymi laboratorium UMET (*L'Unité Matériaux et Transformations*) w grupie CNRS INRA Uniwersytetu Lille1 w Villeneuve d'Ascq we Francji. Laboratorium UMET ma wieloletnie doświadczenie w zastosowaniu metod termicznych, zwłaszcza MDSC, do fizycznej analizy amorficznych układów farmaceutycznych. Współpracę z ww. ośrodkiem naukowym w latach 2014-2015 umożliwiło mi stypendium w ramach programu *One-to-One Mentoring* (Mentor: prof. Marc Descamps) finansowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, a następnie miesięczny staż badawczy na zaproszenie laboratorium UMET oraz Uniwersytetu Lille1 w ramach programu wizyt profesorskich dla uczonych z zagranicy *Le Conférencier Invité*, który odbyłam w 2016 r.

Przemianę fazową związaną z amorfizacją krystalicznej substancji leczniczej, połączoną z wytworzeniem amorficznego stałego rozprożenia, identyfikuje się na podstawie temperatury przejścia fazowego (T_g). Wartość tą odczytuje się z termogramu, najczęściej w połowie wysokości piku, odpowiadającego danej przemianie fazowej [39]. W przypadku amorficznych stałych rozprożeń,

termogramy wykazują jedną temperaturę przejścia fazowego, która jest zlokalizowana pomiędzy temperaturami przejść fazowych typowymi dla substancji leczniczej i nośnika. Jej obecność wskazuje na utworzenie mieszaniny jednorodnej na poziomie molekularnym (tzw. amorficzne stałe rozproszenie) [39].

W toku przeprowadzonych badań wykonałam amorfizację tadalafilu metodą mielenia w temperaturze pokojowej. Następnie, stosując technikę MDSC, stwierdziłam, że temperatura zeszklenia tadalafilu ($T_g = 145^\circ\text{C}$) jest dwukrotnie wyższa niż polimeru Soluplus® ($T_g = 70^\circ\text{C}$). W kolejnym etapie badań przygotowałam 9 dwuskładnikowych amorficznych stałych rozproszeń, zawierających od 10 do 90% tadalafilu oraz Soluplus® jako nośnik. Stałe rozproszenia zostały przygotowane również metodą mielenia w planetarnym młyńnię kulowym [H-4, H-5].

Właściwości przygotowanych stałych rozproszeń analizowałam techniką MDSC oraz XRD (rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej). Termogramy wykonane metodą MDSC wykazały obecność tylko jednej temperatury przejścia fazowego, niezależnie od proporcji tadalafil-Soluplus® [H-4, H-5]. Dla wszystkich analizowanych stałych rozproszeń charakterystyczny był jeden proces relaksacji, co świadczy o utworzeniu jednorodnego amorficznego układu, w którym oba składniki są homogenicznie wymieszane na poziomie molekularnym.

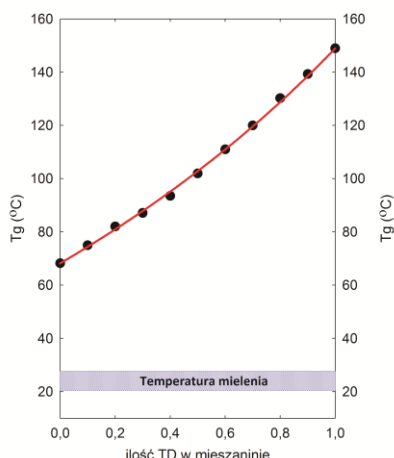
Wartość temperatury przejścia fazowego, świadcząca o utworzeniu amorficznego stałego rozproszenia zależy również od wzajemnej proporcji substancja lecznicza - nośnik. Amorficzna forma substancji leczniczej o małej masie cząsteczkowej może pełnić rolę plastyfikatora (T_g amorficznej substancji leczniczej $< T_g$ polimeru) lub 'antyplastyfikatora' dla wielkocząsteczkowego nośnika (T_g substancji leczniczej $> T_g$ polimeru). W większości amorficznych układów substancja lecznicza - nośnik, polimery są stosowane w celu zwiększenia niskiej temperatury przejścia fazowego amorficznej substancji leczniczej i w konsekwencji zwiększenia jej stabilności w warunkach przechowywania [35, 39]. W rzadkich przypadkach stwierdza się antyplastyfikujący wpływ amorficznej substancji leczniczej. Takim przykładem są amorficzne stałe rozproszenia paklitakselu w biodegradowalnych poliuretanach. Temperatura przejścia fazowego nośnika ($T_g = -42^\circ\text{C} - 49^\circ\text{C}$) jest niższa od temperatury przejścia fazowego amorficznego paklitakselu ($T_g = 150^\circ\text{C}$) [47].

Wartość temperatury przejścia fazowego (T_g) w amorficznych stałych rozproszeniach tadalafil ($T_g = 145^\circ\text{C}$) - Soluplus® ($T_g = 70^\circ\text{C}$) w zależności od składu stałego rozproszenia ilustruje Ryc. 3. Stwierdziłam, że temperatura przejścia fazowego stałego rozproszenia zwiększała się w miarę zwiększania stężenia tadalafilu w układzie na skutek 'antyplastyfikującego' działania amorficznej substancji leczniczej. Jej wartości mieściły się w granicach od 79 do 139°C i były co najmniej 50°C wyższe od wartości temperatury pokojowej (RT) [H-4, H-5]. Wysokie wartości T_g dla amorficznych stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus® wskazują na ich stabilność podczas przechowywania w temperaturze pokojowej. Przyjmuje się bowiem, że mobilność molekuł jest 'zamrożona' poniżej temperatury przejścia fazowego (T_g).

Wykazałam, że wartość T_g dla dowolnego dwuskładnikowego układu tadalafil-Soluplus® może być opisana równaniem wg Gordon-Taylor (1) [39]:

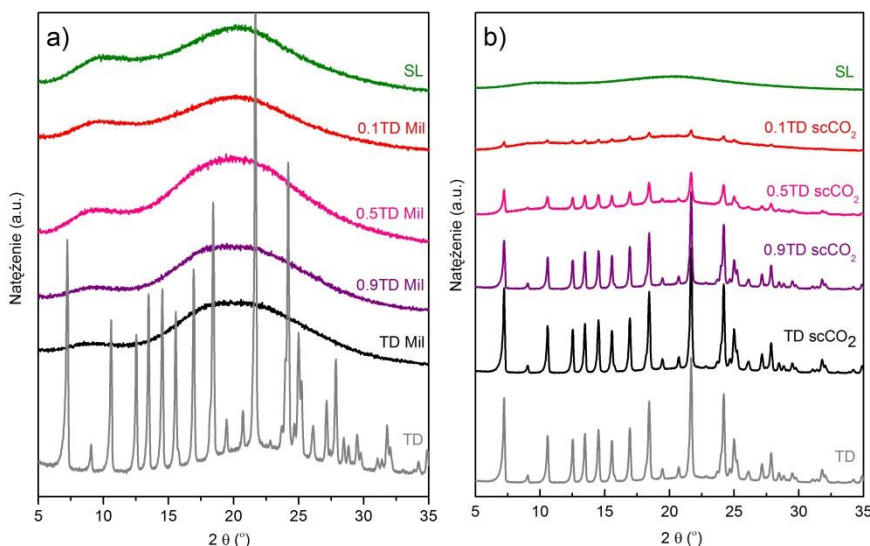
$$k = \frac{[X_{TD} \cdot T_{gTD} + k(1 - X_{TD})] \cdot T_{gSL}}{X_{TD} + k(1 - X_{TD})} \quad (1)$$

gdzie: X_{TD} - zawartość tadalafilu w układzie, T_{gTD} - temperatura przejścia fazowego tadalafilu, T_{gSL} - temperatura przejścia fazowego Soluplus®, k - współczynnik dopasowania odpowiadający nachyleniu krzywej.



Ryc. 3. Wpływ ilości taladafilu (TD) na temperaturę przejścia fazowego (T_g) stałych rozprożeń z Soluplus® sporządzonych metodą mielenia w temperaturze pokojowej. Czerwona linia obrazuje dopasowanie T_g do modelu wg Gordon-Taylor ($R^2 = 0.9985$) [H-4].

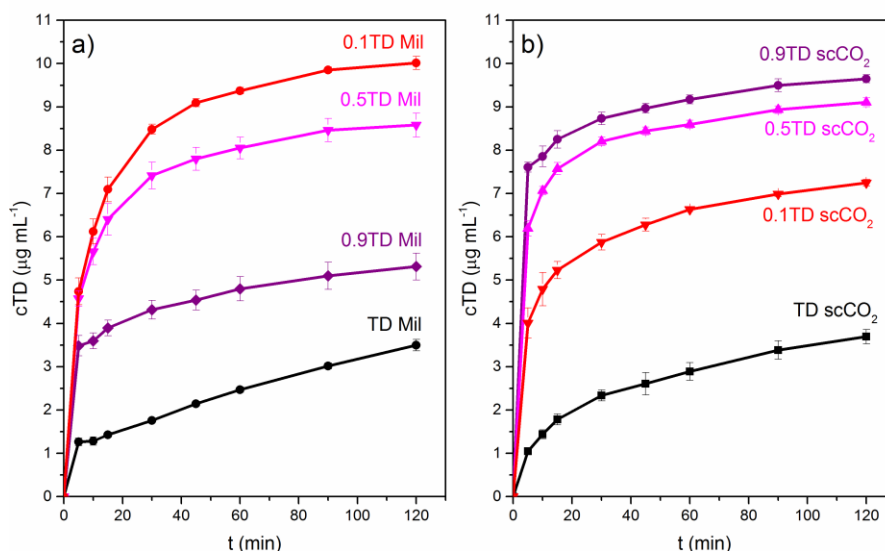
Obrazy dyfrakcyjne stałych rozprożeń przygotowanych metodą mielenia wykazały obecność 'halo' typowego dla układów amorficznych (Ryc. 4a) [H-4].



Ryc. 4. Dyfraktogramy układów proszkowych taladafil-Soluplus przygotowanych: (a) metodą mielenia (Mil), (b) technologią z użyciem dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym ($scCO_2$). TD-taladafil, 0.1TD-0.9TD stałe rozproszenia zawierające od 10 do 90% taladafilu, SL-Soluplus [H-4].

W badaniach szybkości rozpuszczania stwierdziłam, że po 2 h ilość taladafilu rozpuszczonego z amorficznych stałych rozprożeń zwiększała się w miarę zwiększania ilości Soluplus® i wynosiła odpowiednio $5.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ przy 10% zawartości polimeru, $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ gdy zawartość polimeru wynosiła

50% oraz $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ gdy polimer stanowił 90% (Ryc. 5a). Wartości te były większe niż dla mieszanin fizycznych, z których rozpuszczało się odpowiednio 4.1, 6.1 oraz $7.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ tadalafilu.



Ryc. 5. Szybkość rozpuszczania tadalafilu (TD) z układów proszkowych z Soluplus® przygotowanych: (a) metodą mielenia (Mil), (b) technologią z użyciem dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym (scCO₂). Zawartość TD w dwuskładnikowym układzie: 10% (kolor czerwony $\diamond$), 50% (kolor różowy $\circ$), 90% (kolor fioletowy ∇). Dla porównania przedstawiono sam TD poddany odpowiedniemu procesowi (kolor czarny $\square$). Warunki non-sink [H-4].

W przeciwieństwie do amorficznych stałych rozproszeń sporządzonych metodą mielenia, zastosowanie technologii z użyciem dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym (temperatura 40°C, ciśnienie 10.5-11 MPa) nie doprowadziło ani do amorfizacji tadalafilu, ani do zmieszania substancji leczniczej z polimerem na poziomie molekularnym [H-4]. W obrazie dyfrakcyjnym widoczne były piki Bragg'a charakterystyczne dla formy I krystalicznego tadalafilu, niezależnie od proporcji tadalafil:Soluplus® w układzie (Ryc. 4b). Mimo to wykazałam korzystny wpływ polimeru Soluplus® na szybkość rozpuszczania tadalafilu z dwuskładnikowych formułacji podanych działaniu dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym [H-4]. Po 2 h największa ilość tadalafilu ($9.7 \mu\text{g mL}^{-1}$) rozpuszczała się z układów, w których zawartość polimeru wynosiła 10% i zmniejszała się w miarę zwiększania ilości polimeru (Ryc. 5b).

Wyniki moich badań wskazują na możliwość poprawy rozpuszczalności tadalafilu przez sporządzanie amorficznych stałych rozproszeń metodą mielenia oraz stałych rozproszeń zawierających substancję leczniczą w formie krystalicznej, przygotowanych przy użyciu dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym [H-4]. Stwierdziłam, że forma krystaliczna tadalafilu oraz zawartość polimeru Soluplus® w układzie, warunkują szybkość rozpuszczania substancji leczniczej z opracowanych układów proszkowych [H-4, H-5].

Ocena stabilności amorficznej formy tadalafilu w stałych rozproszeniach z Soluplus® przygotowanych metodą mielenia [H-5]

W warunkach idealnych, całkowicie amorficzna cząstka odpowiada brakowi krystaliczności [39]. W rzeczywistości faza amorficzna może zawierać obszary uporządkowane o niskiej krystaliczności, które z kolei mogą spełniać rolę zarodków krystalizacji [35, 37]. Rekrytalizacja może następować na etapie wytwarzania postaci leku, jej przechowywania lub stosowania i może skutkować niekorzystnymi zmianami, m.in. w szybkości rozpuszczania/uwalniania oraz parametrach farmakokinetycznych [37].

Mimo, że w ostatnich latach opisano wiele przykładów amorfizacji trudno rozpuszczalnych substancji leczniczych metodą mielenia [42, 43, 48], amorficzne stałe rozproszenia przygotowane tą metodą są mniej stabilne pod względem fizycznym w porównaniu do układów amorficznych przygotowanych przez suszenie rozpyłowe (*ang. spray-drying*) lub hartowanie (*ang. melt-quenching*) [35]. Ograniczona stabilność mielonych formułacji może wynikać z ich niejednorodności, która skutkuje heterogenicznym procesem relaksacji lub obecnością zarodków krystalizacji, a te z kolei mogą inicjować proces rekrytalizacji fazy amorficznej. Zjawisko rekrytalizacji jest przyczyną niewielkiej liczby preparatów wprowadzonych do lecznictwa, które zawierają amorficzne formy substancji leczniczych [35, 37]. Kinetyka tego procesu zależy od wielu czynników, m.in. temperatury i wilgotności podczas przechowywania [37-39].

Przedmiotem moich badań było określenie wpływu temperatury przechowywania na stabilność fizyczną amorficznej formy tadalafilu. Amorficzne stałe rozproszenia tadalafilu w Soluplus® sporządzone metodą mielenia [H-4, H-5], przechowywałam w temp. pokojowej, 40 i 60°C przez okres od dwóch do pięciu miesięcy [H-5]. Po okresie przechowywania, ich właściwości oceniałam przy pomocy MDSC (modulowanej temperaturowo różnicowej kalorymetrii skaningowej) oraz XRD (rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej). Pomiary wykonałam we współpracy z Panem prof. Marc Descamps i Panem prof. Jean-François Willart z Université de Lille 1 we Francji.

Na podstawie termogramów i dyfraktogramów stwierdziłam, że amorficzne stałe rozproszenia umieszczone w zamkniętych opakowaniach plastikowych były stabilne przez dwa miesiące przechowywania w temperaturze pokojowej (RT) oraz w temperaturze 60°C. Wydłużenie okresu przechowywania w temperaturze pokojowej z dwóch do pięciu miesięcy nie miało negatywnego wpływu na stabilność amorficznych stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus® [H-5].

Dla porównania, ocenę stabilności wykonałam również dla amorficznego tadalafilu (bez dodatku polimeru) przygotowanego metodą mielenia. Próbkę substancji leczniczej umieszczone w otwartych aluminiowych tyglach do DSC przechowywałam przez dwa miesiące w takich samych warunkach jak opisano powyżej dla amorficznych stałych rozproszeń (RT, 60 °C). Krzywe przepływu ciepła wykazały egzotermiczny pik (oset ok. 150°C), odpowiadający rekrytalizacji amorficznego tadalafilu podczas ogrzewania, co potwierdza obecność amorficznej formy substancji leczniczej. Po okresie przechowywania w temperaturze pokojowej, egzotermiczny pik procesu rekrytalizacji był nadal widoczny ale entalpia procesu była mniejsza niż dla amorficznego tadalafilu analizowanego bezpośrednio po przygotowaniu [H-5]. Wskazuje to na rozpoczynający się proces rekrytalizacji formy amorficznej. Zwiększenie temperatury przechowywania do 60°C powodowało już znaczną rekrytalizację amorficznego tadalafilu [H-5].

Stwierdziłam, że mimo higroskopijności polimeru Soluplus®, jego obecność w stałych rozproszeniach może działać stabilizująco, zapobiegając rekrytalizacji amorficznej formy substancji leczniczej, zwłaszcza gdy formułacje są przechowywane w temperaturze pokojowej. Zwiększenie temperatury przechowywania może mieć niekorzystny wpływ na stabilność amorficznej formy tadalafilu, o czym świadczy rozpoczynający się proces jej rekrytalizacji po przechowywaniu w temp. 60°C [H-5].

Krystaliczne stałe zawiesiny jako alternatywne rozwiązanie dla amorficznych stałych rozproszeń w dążeniu do poprawy dostępności farmaceutycznej tadalafilu [H-6]

W przeciwieństwie do amorficznych stałych rozproszeń, krystaliczne stałe zawiesiny są układami stabilnymi pozbawionymi ryzyka rekrytalizacji [49]. Krystaliczny nośnik, zwykle o małej masie cząsteczkowej, otacza hydrofobowe cząstki krystalicznej substancji leczniczej i pełni funkcję substancji hydrofilizującej. Na przykładzie gryzeofulwiny, furosemidu lub spironolaktonu stwierdzono, że stałe krystaliczne zawiesiny w nośnikach z grupy alkoholi wielowodorotlenowych mają korzystny wpływ na dostępność farmaceutyczną i biologiczną tych trudno rozpuszczalnych substancji leczniczych [50].

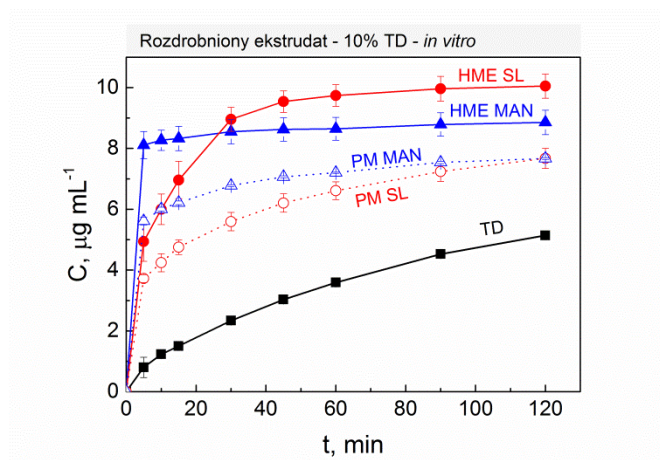
W celu opracowania krystalicznych stałych zawiesin tadalafilu w mannitolu metodą ekstruzji topliwej, nawiązałam współpracę z Panem Prof. Juergen Siepmann kierującym laboratorium INSERM U1008, CHU, Uniwersytetu Lille2 we Francji. Dzięki indywidualnemu stypendium *La Bourse de Mobilité Individuelle* ufundowanemu przez Ambasadę Francji w Polsce, w listopadzie 2014 r., odbyłam dwutygodniowy pobyt badawczy w tym laboratorium. Przygotowałam kilkanaście krystalicznych zawiesin tadalafilu w krystalicznych nośnikach z grupy alkoholi wielowodorotlenowych techniką ekstruzji topliwej. Proces ekstruzji wykonałam w dwusrubowym ($\varnothing = 16$ mm) ekstruderze laboratoryjnym Nano-16 firmy Leistritz (Nüremberg, Niemcy).

Przedmiotem publikacji H-6 jest ocena właściwości siedmiu formułacji ekstrudatów z tadalafilu, gdzie jako krystaliczne nośniki użyłam mannitol ($T_m = 166-168^\circ\text{C}$, Cargill, Włochy) i laktitol ($T_m = 146^\circ\text{C}$, Danisco, USA). Zawartość tadalafilu w ekstrudatach wynosiła 10, 20 lub 30%. Temperatura procesu ekstruzji dla układów z mannitolem mieściła się w zakresie od 140 do 160°C , natomiast z laktitolem od 110 do 130°C . Średnica otworu dyszy ekstrudera wynosiła 2 mm. Wszystkie analizowane nośniki ulegały upłynnieniu w procesie ekstruzji, podczas gdy tadalafil pozostawał niestopiony. Istotnie różna była też szybkość rekrytalizacji stopionych nośników po wytłoczeniu przez otwór ekstrudera. Mannitol krystalizował szybko, tworząc cylindryczny, porowaty ekstrudat. Laktitol krystalizował znacznie wolniej. W wyniku ekstruzji powstawała plastyczna masa zamiast cylindrycznych kształtek [H-6]. Dyfraktogramy i termogramy ekstrudatów niezależnie od proporcji substancja lecznicza-nośnik wykazały krystaliczną formę tadalafilu i nośnika. W badaniach szybkości uwalniania ($\text{pH} = 1.2$), stwierdzono natychmiastowy rozpad porowatego ekstrudatu z mannitolem w kontakcie z rozpuszczalnikiem, połączony z natychmiastowym uwolnieniem tadalafilu (ok. $9 \mu\text{g mL}^{-1}$ po 2 h).

Dla porównania przygotowałam ekstrudat zawierający tadalafil przy użyciu amorficznego polimeru Soluplus® jako nośnika. Zawartość tadalafilu w ekstrudacie wynosiła od 10 do 30%. Ekstrudaty przygotowałam przy użyciu podobnych parametrów procesu jak dla ekstrudatu z mannitolem. W tym przypadku powstał cylindryczny ekstrudat o gładkiej, nieporowatej powierzchni. Termo- i dyfraktogramy wykazały całkowitą (90% Soluplus®) lub częściową amorfizację tadalafilu (70-80% Soluplus®) w zależności od ilości użytego nośnika. Mimo, że w badaniach szybkości uwalniania ekstrudaty z Soluplus® silnie pęczniały, stężenie uwolnionego po 2 h tadalafilu było bardzo małe ($< 2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Z tego powodu ekstrudat z Soluplus® był analizowany po rozdrobnieniu ($< 100 \mu\text{m}$) [H-6]. Rozdrobnienie zwartej matrycy polimerowej miało istotny wpływ na stężenie uwolnionego z niej tadalafilu, które po 2 h wynosiło ok. $9 \mu\text{g mL}^{-1}$. Podobnie szybkość uwalniania substancji leczniczej zwiększała się w miarę zmniejszania ilości polimeru w ekstrudacie, co było związane ze skróceniem drogi dyfuzji dla rozpuszczonego tadalafilu. Jednak niezależnie od zawartości polimeru w ekstrudacie, szybkość uwalniania tadalafilu była większa niż z mieszanin fizycznych, co potwierdza korzystny wpływ obecności amorficznej formy tadalafilu w układzie na szybkość uwalniania.

Porównanie profili uwalniania tadalafilu z ekstrudatu na bazie Soluplus® z ekstrudatem zawierającym mannitol pokazuje, że mimo nieco większego stężenia tadalafilu uwolnionego z rozdrobnionych ekstrudatów polimerowych, szybkość uwalniania tadalafilu była większa z krystalicznych stałych zawiesin, tj. z ekstrudatu z mannitolem (Ryc. 6). Co więcej, ekstrudat na bazie

mannitolu po umieszczeniu w rozpuszczalniku rozpadał się natychmiast. W przeciwieństwie do ekstrudatu polimerowego, jego rozdrabnianie nie było konieczne [H-6].



Ryc. 6. Wpływ rodzaju nośnika na ilość tadalafilu uwolnionego z rozdrobnionego ekstrudatu przygotowanego metodą ekstruzji topliwnej (HME) w warunkach non-sink. HME SL – rozdrobniony amorficzny ekstrudat tadalafilu z Soluplus® (1+9), HME MAN – rozdrobniony krystaliczny ekstrudat tadalafilu z mannitolem (1+9), PM MAN – mieszanina fizyczna tadalafilu z mannitolem (1+9), PM SL – mieszanina fizyczna tadalafilu z Soluplus® (1+9), TD – tadalafil krystaliczny [H-6].

Na podstawie wyników badań uwalniania w warunkach *in vitro* stwierdziłam, że krystaliczne stałe zawiesiny (ekstrudat tadalafilu w mannitolu) mogą być ciekawym rozwiązaniem technologicznym w celu poprawy dostępności farmaceutycznej tadalafilu. Ich zaletą jest możliwość zastosowania opracowanego rozwiązania technologicznego w skali przemysłowej. Z kolei brak ryzyka rekrystalizacji podczas przechowywania gotowego produktu leczniczego stanowi o istotnej przewadze krystalicznych układów matrycowych nad amorficznymi stałymi rozproszonymi i wskazuje na aplikacyjny charakter tej technologii.

Opracowanie matryc hydrofilowych o kontrolowanym uwalnianiu cytrynianu syldenafile w warunkach *in vitro* [H-8]

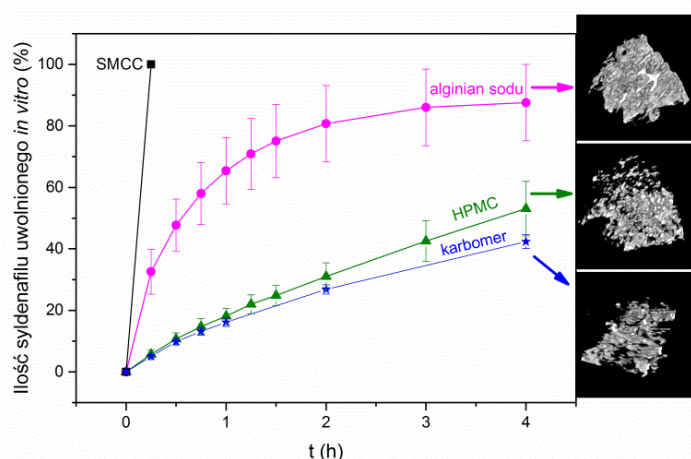
Z uwagi na ograniczoną liczbę preparatów dedykowanych farmakoterapii TNP koniecznością staje się opracowanie nowych postaci leku, które stworzyłyby możliwość indywidualizacji leczenia i przyczyniły się do poprawy współpracy pacjenta z lekarzem.

Cytrynian syldenafile podany doustnie charakteryzuje się opóźnionym działaniem (30-45 min) i krótkim okresem biologicznego półtrwania ($t_{0.5} = 4$ h), dlatego dawka leku musi być podawana kilka razy dziennie. Do tej pory zaproponowano technologie wytwarzania preparatów o przedłużonym uwalnianiu syldenafile do podawania inhalacyjnego [51] oraz dopochwowego [52]. Z uwagi na fakt, że doustna droga podania leku jest preferowana przez pacjentów, opracowałam tabletki matrycowe o kontrolowanym uwalnianiu cytrynianu syldenafile [H-8].

Przedmiotem publikacji H-8 jest charakterystyka właściwości 12 formuacji tabletek matrycowych. Tabletki o masie 30 mg zawierały 10 mg substancji leczniczej. Matrycę tabletek opracowałam na bazie polimerów takich jak: celuloza mikrokrystaliczna z dodatkiem krzemionki koloidalnej (Prosolv® SMCC HD90, JRS Pharma, Polska), hypromeloza (Metolose® 90SH, Harke Pharma, Niemcy), alginian sodu (Protanal® CR 8133, IMCD, Polska), karbomer (Carbopol® 71G NF, IMCD,

Polska), poloksamer (Kolliphor® P407, BASF, Polska). Matryce przygotowałam na bazie jednego polimeru (matryce jednoskładnikowe) lub ich mieszaniny (matryce wieloskładnikowe), złożonej z dwóch lub trzech polimerów w proporcjach 1:2, 2:1 lub 1:1:1.

W badaniach uwalniania (pH = 1.2, warunki *sink*) wykazałam, że rodzaj polimeru, z którego została wykonana matryca miał wpływ na ilość cytrynianu syldenafilu uwolnionego po 4 h oraz szybkość z jaką ten proces zachodził (Ryc. 7). Spośród hydrożelowych matryc jednoskładnikowych, najmniej syldenafilu, tj. $42.38 \pm 2.25\%$ uwalniało się po 4 h z matryc wykonanych z karbomeru. Z tabletek wykonanych z hypromelozy po 4 h uwalniało się $53.09 \pm 8.90\%$ syldenafilu, natomiast najwięcej substancji leczniczej uwalniało się z tabletek zawierających alginian sodu, tj. $87.57 \pm 12.41\%$ po 4 h (Ryc. 7) [H-8].



Ryc. 7. Wpływ rodzaju polimeru oraz mikrostruktury tabletek z cytrynianem syldenafilu na profile uwalniania (warunki *sink*). Z prawej strony ryciny zamieszczono rekonstrukcje 3D sieci porów otwartych wykonane na podstawie obrazów μ CT [H-8].

Wykazałam korzystny wpływ hypromelozy na przedłużone uwalnianie syldenafilu z dwuskładnikowych matryc, zawierających alginian sodu, z których po 15 min uwalniało się $32.55 \pm 7.27\%$ substancji leczniczej. W miarę zwiększania ilości hypromelozy, szybkość uwalniania syldenafilu zmniejszała się i po 15 min wyniosła odpowiednio $15.31 \pm 1.20\%$ oraz $9.26 \pm 1.41\%$ przy 22% i 44% dodatku tego polimeru [H-8]. Podobnie wprowadzenie hypromelozy do dwuskładnikowych matryc zawierających alginian sodu i celulozę mikrokrystaliczną zapewniało kontrolę uwalniania syldenafilu. Po 15 min ilość uwolnionego syldenafilu wynosiła $20.88 \pm 2.69\%$. Dodatkowo stwierdziłam, że wprowadzenie 22% poloksameru do matryc karbomerowych, skutkowało 2-krotnym zwiększeniem ilości syldenafilu uwolnionego po 4 h z matryc dwuskładnikowych ($80.28 \pm 2.24\%$) w porównaniu do matrycy jednoskładnikowej, przygotowanej z samego karbomeru ($42.38 \pm 2.25\%$) [H-8].

Powyższe wyniki wskazują na możliwość kontroli uwalniania cytrynianu syldenafilu z tabletek matrycowych przygotowanych na bazie jednego lub mieszaniny kilku polimerów hydrofilowych. Matematyczna analiza profili uwalniania⁴ wykonana w pierwszych 4 h badania wykazała, że średni czas uwalniania (*MDT*, *ang. mean dissolution time*) wynosił ok. 100 min dla matryc jednoskładnikowych przygotowanych z hypromelozy lub karbomeru. Podobną wartość *MDT*,

⁴ Analizę wykonałam przy użyciu programu komputerowego *KinetDS* v.3.0, opracowanego przez dr hab. Aleksandra Mendyka

stwierdziłam dla matryc dwuskładnikowych złożonych z 22% alginianu sodu i 44% HPMC, 22% SMCC i 44% HPMC oraz 22% poloksameru i 44% karbomeru. Wydajność procesu uwalniania (*DE, ang. dissolution efficiency*) mieściła się w granicach od 30 do 46% [H-8].

Rentgenowska mikrotomografia komputerowa (μ CT) jako nowoczesne narzędzie analityczne do oceny mikrostruktury matryc hydrofilowych w 3D i przewidywania mechanizmu uwalniania inhibitorów fosfodiesterazy-5 [H-6, H-8]

Szybkość uwalniania substancji leczniczej z hydrofilowej matrycy zależy od rodzaju nośnika, geometrii matrycy i szybkości jej hydratacji [53, 54]. Z kolei o szybkości hydratacji matrycy decyduje ilość i rozmieszczenie porów w jej obrębie. W materiałach porowatych wyróżnia się zasadniczo: pory otwarte (perkolujące na zewnątrz) i zamknięte (nieperkolujące). Spośród nich, ilość, krętość oraz przestrzenne rozmieszczenie porów otwartych, decydują o kinetyce hydratacji matrycy i uwalniania substancji leczniczej [54]. W matrycach o kształcie cylindrycznym, kinetyka hydratacji zależy zarówno od osiowego jak również promienistego transportu wody [55, 56].

Mimo, że istnieje wiele metod oceny porowatości, takich jak np. porozymetria rtęciowa lub adsorpcja azotu, rozróżnienie porów otwartych i zamkniętych oraz analiza ich przestrzennego rozmieszczenia w trójwymiarowej matrycy jest rzadko możliwe. Narzędziem, które umożliwia analizę mikrostruktury matryc w trzech wymiarach jest rentgenowska mikrotomografia komputerowa (μ CT, *ang. microcomputed tomography*) [57].

Technikę μ CT użyłam do badań:

- ekstrudatów z tadalafilem przygotowanych metodą ekstruzji topliwej [H-6],
- tabletek matrycowych z cytrynianem syldenafilu [H-8].

Założyłam, że ocena mikrostruktury może ułatwić zrozumienie mechanizmu uwalniania substancji leczniczej.

Obrazowanie ww. matryc metodą μ CT było możliwe dzięki nawiązanej przeze mnie interdyscyplinarnej współpracy z Panem dr Andrzejem Wróbel z Zakładu Fizyki Medycznej Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ oraz Panem dr hab. inż. Jackiem Tarasiuk z Katedry Fizyki Materii Skondensowanej Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Ponadto w celu matematycznej analizy obrazów μ CT, nawiązałam współpracę z Panem dr hab. Zbysławem Tabor, prof. PK z Zakładu Bezpieczeństwa Systemów Informatycznych Wydziału Fizyki, Matematyki i Informatyki, Instytutu Teleinformatyki, Politechniki Krakowskiej. Algorytm do oceny mikrostruktury matryc, uwzględniający analizę: procentowej zawartości porów otwartych i zamkniętych w matrycach, ich krętości oraz przestrzennego rozmieszczenia w obrębie trójwymiarowych matryc został szczegółowo opisany w publikacji H-6 i H-8.

Matryce z tadalafilem [H-6]

Wykazałam, że ekstrudaty zawierające tadalafil oraz polimer Soluplus® były nieporowate. Ich całkowita porowatość wynosiła poniżej 1.5%. Natomiast, porowatość ekstrudatów na bazie mannitolu była ponad 10-krotnie większa i mieściła się w zakresie od 21.1 do 27.4%. W przypadku ekstrudatów przygotowanych na bazie mannitolu stwierdziłam, że porów otwartych (perkolujących) było znacznie więcej niż porów zamkniętych (nieperkolujących). Natomiast w ekstrudatach z Soluplus® zależność była odwrotna, tj. porów otwartych było mniej niż porów zamkniętych. Porowatość oraz rozkład wielkości porów w ekstrudatach zależały od ilości tadalafilu w układzie. Porowatość zwiększała się, natomiast wielkość porów zmniejszała się w miarę zwiększania ilości substancji leczniczej w ekstrudacie. Wielkość porów otwartych w ekstrudatach z mannitolem, zawierających 10% tadalafilu mieściła się w granicach od 2 do 35 μ m. Natomiast ekstrudaty, zawierające 30% tadalafilu miały pory o wielkości od 2 do 9 μ m [H-6].

Parametry mikrostruktury wyznaczone metodą μ CT, a zwłaszcza ilość porów otwartych, korelowały z szybkością uwalniania tadalafilu [H-6]. Z uwagi na małą porowatość i brak porów otwartych, przez które woda mogłaby wnikać do wnętrza ekstrudatów z Soluplus®, uwalnianie tadalafilu następowało dopiero po ich rozdrobnieniu. Porowate ekstrudaty z mannitolem, rozpadały się po zwilżeniu rozpuszczalnikiem, co skutkowało natychmiastowym uwolnieniem substancji leczniczej (Ryc. 6).

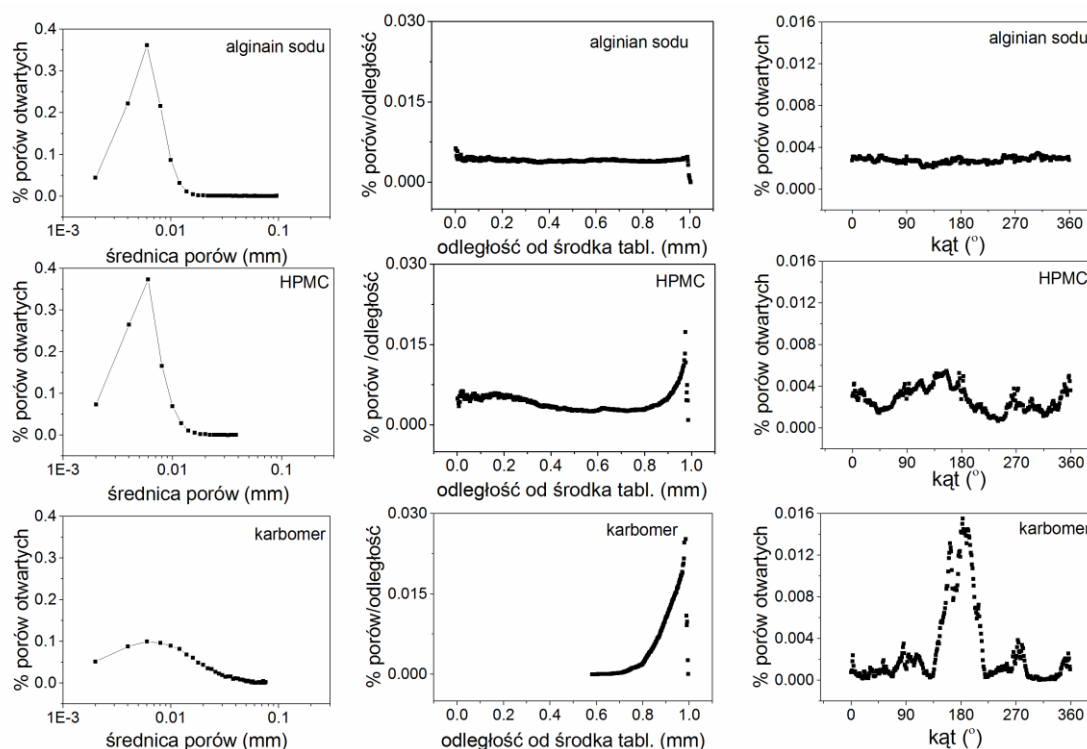
Matryce z cytrynianem syldenafilu [H-8]

Obrazowanie metodą μ CT okazało się również przydatnym narzędziem do oceny mikrostruktury matryc hydrofilowych o kontrolowanym uwalnianiu cytrynianu syldenafilu.

Rekonstrukcje trójwymiarowej sieci porów otwartych przedstawione na Ryc. 7, wskazują na korelację między szybkością uwalniania syldenafilu z hydrofilowych matryc jednoskładnikowych oraz ilością porów otwartych w układzie. Biorąc pod uwagę wyniki uwalniania syldenafilu z matryc jedno- i wieloskładnikowych złożonych z HPMC, alginianu sodu i SMCC, wykazałam korelację między ilością porów otwartych w tabletkach i średnim czasem uwalniania (*MDT, ang. mean dissolution time*) cytrynianu syldenafilu [H-8]. Współczynnik korelacji Pearson'a wynosił 0.94. Nie stwierdziłam korelacji między krętością porów otwartych i MDT.

Wykazałam natomiast, że przestrzenne rozmieszczenie porów w matrycach zależy od rodzaju polimeru (Ryc. 8) [H-8]. W matrycach alginianowych pory były rozmieszczone równomiernie w całej matrycy. W matrycach z hypromelozą pory o największej średnicy znajdowały się w dystalnych częściach tabletki, natomiast pory najmniejsze w jej środkowej części. Z kolei w matrycach karbomerowych nie było porów o średnicy poniżej 2 μ m w odległości do ok. 0.5 mm od środka tabletki. Pory znajdowały się w zewnętrznych częściach tabletek. Ich średnica zwiększała się w miarę oddalania się od środka matrycy (Ryc. 8).

Podobne zależności stwierdziłam na podstawie analizy mikrostruktury matryc wieloskładnikowych, które wykazywały właściwości mikrostruktury typowe dla poszczególnych polimerów. Rozkład liniowy oraz promienisty porów w objętości tabletek matrycowych odzwierciedlał zawartość polimeru w układzie.



Ryc. 8. Wpływ rodzaju polimeru na rozkład wielkości porów otwartych w tabletkach matrycowych o kontrolowanym uwalnianiu cytrynianu syldenafilu. Kolumna pierwsza: rozkład wielkości porów w całej objętości matrycy. Kolumna druga: rozkład wielkości porów w zależności od odległości od środka tabletki. Kolumna trzecia: radialny rozkład wielkości porów [H-8].

Wyniki badań matryc hydrofilowych z tadalafilami i cytrynianem syldenafilu wskazują, że technika obrazowania μ CT jest przydatnym narzędziem do oceny mikrostruktury w trzech wymiarach. Niewątpliwą zaletą metody jest możliwość rozróżnienia porów otwartych i zamkniętych. Wykazałam, że niezależnie od rodzaju substancji leczniczej (tadalafil lub cytrynian syldenafilu), porowatość w zakresie porów otwartych miała wpływ na profil uwalniania.

Wpływ procesu technologicznego i nośnika na farmakokinetykę inhibitorów fosfodiesterazy-5 w modelu szczurzym [H-5 - H-8]

Ze względu na korzystne oddziaływanie amorficznych i krystalicznych nośników na szybkość rozpuszczania/uwalniania tadalafilu, jak również możliwość modyfikacji uwalniania cytrynianu syldenafilu przez inkorporowanie substancji leczniczej w hydrofilowej matrycy, przeprowadziłam analizę właściwości opracowanych formuacji w warunkach *in vivo*.

We współpracy z Panią dr hab. Elżbietą Wyską, prof. UJ, kierownikiem Zakładu Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej UJ CM, wykonałam analizę farmakokinetyczną opracowanych formuacji w modelu szczurzym⁵. Parametry farmakokinetyczne takie jak: C_{max} , t_{max} , AUC, λ_z , $t_{0.5\lambda_z}$, CL/F, MRT, HaVD zostały wyznaczone po dożylnym i dożołądkowym podaniu opracowanych formuacji szczurom rasy Wistar. Dawka syldenafilu podawanego dożołądkowo wynosiła 10 mg kg⁻¹, natomiast tadalafilu 5 mg kg⁻¹. W podaniu dożylnym dawka cytrynianu syldenafilu wynosiła 5 mg kg⁻¹.

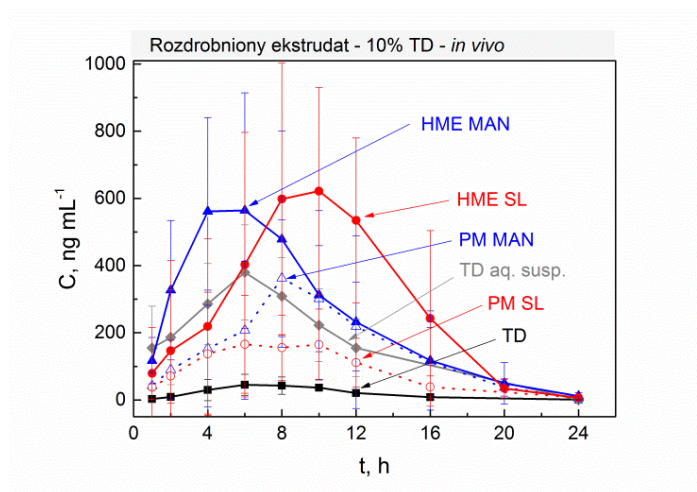
⁵ Zgoda Lokalnej Komisji Etycznej nr 129/2012

Matryce z tadalafilą przygotowane metodą ekstruzji topliwej (HME) [H-6]

Stwierdziłam, że po dożołądkowym podaniu rozdrobnionych ekstrudatów szczurom, tadalafil wchłaniał się szybko niezależnie od rodzaju użytego nośnika (mannitol lub Soluplus®). Pole powierzchni pod krzywą stężenie-czas (AUC) było większe dla ekstrudatów niż dla samej substancji leczniczej oraz mieszanin fizycznych tadalafilu z nośnikami, które nie zostały poddane procesowi ekstruzji (Ryc. 9) [H-6].

Spośród analizowanych nośników, tadalafil wchłaniał się szybciej z ekstrudatów sporządzonych przy użyciu mannitolu niż Soluplus®. Wchłanianie tadalafilu po podaniu rozdrobnionego ekstrudatu z Soluplus® było wolniejsze i dobrze korelowało z kształtem profili szybkości uwalniania wyznaczonymi w warunkach *in vitro*. Mimo to względna dostępność biologiczna tadalafilu z ekstrudatów z Soluplus® była większa niż z ekstrudatów przygotowanych na bazie mannitolu (Ryc. 9, 11). Szybsze uwalnianie tadalafilu z rozdrobnionych ekstrudatów z mannitolem niż z Soluplus® skutkowało także krótszym czasem t_{max} *in vivo*, który wynosił 5.0 ± 1.2 h w przypadku użycia dla mannitolu, natomiast 10.0 ± 1.7 h dla ekstrudatu z Soluplus® (Ryc. 6, 9).

Podobnie jak w przypadku ekstrudatów, profile szybkości uwalniania wyznaczone w warunkach *in vitro* dla mieszanin fizycznych i samego tadalafilu (Ryc. 6, H-6), znalazły potwierdzenie w wartościach parametrów farmakokinetycznych stwierdzonych w modelu szczurzym. Co ciekawe, ich wartości dla zawiesiny wodnej były nieco korzystniejsze niż dla mieszanin fizycznych. Może to sugerować, że zwilżanie hydrofobowych cząstek tadalafilu jest krytycznym etapem, który decyduje o szybkości wchłaniania substancji leczniczej.



Ryc. 9. Stężenie tadalafilu w surowicy szczurzej po dożołądkowym podaniu sproszonego ekstrudatu przygotowanego metodą ekstruzji topliwej (HME). HME SL – rozdrobniony amorficzny ekstrudat tadalafilu z Soluplus® (1+9), HME MAN – rozdrobniony krystaliczny ekstrudat tadalafilu z mannitolem (1+9), PM MAN – mieszanina fizyczna tadalafilu z mannitolem (1+9), PM SL – mieszanina fizyczna tadalafilu z Soluplus® (1+9), TD aq. susp. – zawiesina tadalafilu krystalicznego w wodzie, TD – tadalafil krystaliczny [H-6].

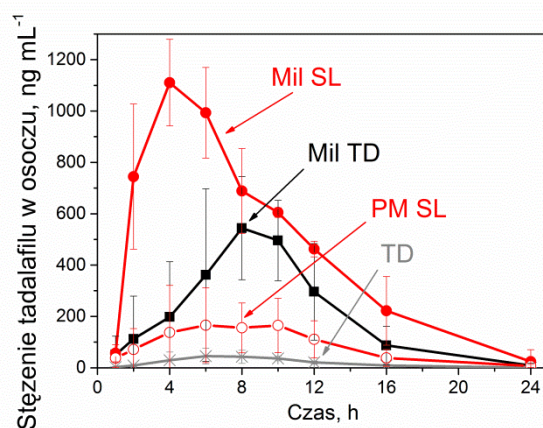
Matryce z tadalafilą przygotowane metodą mielenia (Mil) [H-5]

Wyniki analizy farmakokinetycznej wykazały korzystny wpływ amorfizacji tadalafilu w procesie mielenia na dostępność biologiczną substancji leczniczej. W modelu szczurzym, stężenie maksymalne (C_{max}) po dożołądkowym podaniu amorficznej formy substancji leczniczej było ponad 10-krotnie większe niż po podaniu tadalafilu krystalicznego (Ryc. 10).

Wykazałam korzystne oddziaływanie polimeru Soluplus® na proces wchłaniania tadalafilu. Wartość C_{max} po podaniu 10% krystalicznej mieszaniny fizycznej tadalafilu w Soluplus® była ponad 4-krotnie większa niż krystalicznej substancji leczniczej. W procesie mielenia, powstawały amorficzne stałe rozproszenia tadalafilu w Soluplus® (Ryc. 4a). Po ich dożołądkowym podaniu, stężenie maksymalne (C_{max}) było ponad 20-krotnie większe niż samej krystalicznej substancji leczniczej (Ryc. 10). Dodatkowo amorficzna substancja lecznicza podana dożołądkowo w formie stałego rozproszenia wchłaniała się 2-krotnie szybciej ($t_{max} = 4.00 \pm 0.01$ h) niż sam krystaliczny tadalafil ($t_{max} = 7.00 \pm 2.0$ h) [H-5].

Względna dostępność biologiczna tadalafilu z amorficznych formuacji przygotowanych metodą mielenia, wyznaczona względem wodnej zawiesiny podanej dożołądkowo była istotnie większa w porównaniu do układów zawierających krystaliczną substancję leczniczą i wynosiła odpowiednio 128% dla amorficznego tadalafilu oraz 289% dla amorficznego stałego rozproszenia w Soluplus®. Wartości parametrów opisujących proces eliminacji tadalafilu np. λ_z i $t_{0.5\lambda_z}$ były podobne dla wszystkich analizowanych formuacji z tadalafilą (Fig. 11, H-5).

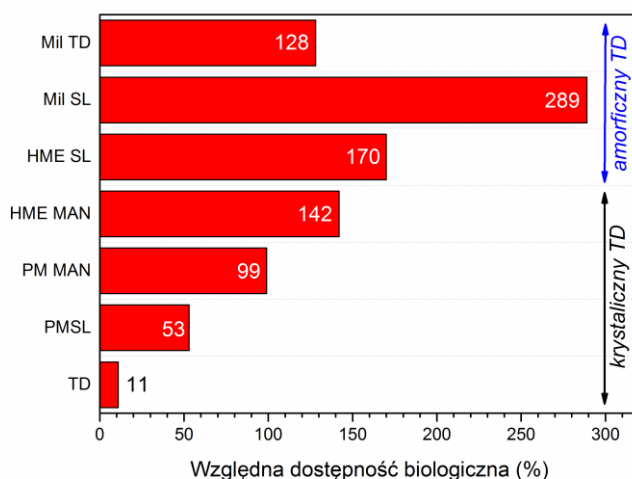
Podsumowując, najlepszymi właściwościami farmakokinetycznymi charakteryzowało się amorficzne stałe rozproszenie tadalafilu w Soluplus® w proporcji 1+9 przygotowane metodą mielenia. Szybkiemu wchłanianiu tadalafilu, towarzyszył wolny proces eliminacji. Stężenia tadalafilu były oznaczalne w surowicy szczurzej nawet po 24 h od jednorazowego, dożołądkowego podania dawki leku (Ryc. 10).



Ryc. 10. Wpływ procesu mielenia na stężenie tadalafilu w surowicy szczurzej po podaniu dożołądkowym. Mil TD – mielony amorficzny tadalafil, Mil SL – amorficzne stałe rozproszenie tadalafilu w Soluplus® (1+9) przygotowane metodą mielenia, PM SL – mieszanina fizyczna tadalafilu z Soluplus® (1+9), TD – tadalafil krystaliczny [H-4].

Porównanie wpływu formy krystalicznej tadalafilu na wartość względnej dostępności biologicznej (F_R) wskazuje, że formułacje zawierające amorficzną formę tadalafilu charakteryzowały się lepszymi właściwościami niż układy krystaliczne (Ryc. 11). Wartość tego parametru zmniejszała się w kolejności: amorficzne stałe rozproszenia w Soluplus® przygotowane metodą mielenia > amorficzny ekstrudat z Soluplus® > sam amorficzny tadalafil.

W przypadku formułacji, zawierających krystaliczny tadalafil, względna dostępność biologiczna była największa dla krystalicznych stałych zawiesin w mannitolu. Dla pozostałych formułacji, wartość parametru zmniejszała się w kolejności: mieszanina fizyczna z mannitolem > mieszanina fizyczna z Soluplus® > sam tadalafil (Ryc. 11).



Ryc. 11. Wpływ rodzaju układu proszkowego na względną dostępność biologiczną tadalafilu (TD). Mil TD – mielony amorficzny tadalafil, Mil SL – amorficzne stałe rozproszenie tadalafilu w Soluplus® (1+9) przygotowane metodą mielenia, HME SL – rozdrobniony amorficzny ekstrudat tadalafilu z Soluplus® (1+9), HME MAN – rozdrobniony krystaliczny ekstrudat tadalafilu z mannitolem (1+9), PM MAN – mieszanina fizyczna tadalafilu z mannitolem (1+9), PM SL – mieszanina fizyczna tadalafilu z Soluplus® (1+9), TD – tadalafil krystaliczny.

Matryce z cytrynianem syldenafilu [H-7; H-8]

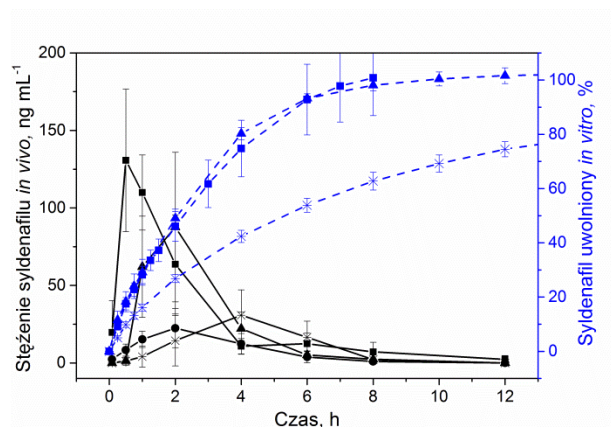
We współpracy z Panią dr hab. Elżbietą Wyską, prof. UJ z Zakładu Farmakokinetiki i Farmacji Fizycznej UJ CM, uczestniczyłam w pracach dotyczących opracowania i walidacji nowej metody ilościowego oznaczenia cytrynianu syldenafilu [H-7]. Jej zaletą jest możliwość wykonania oznaczenia przy użyciu małej objętości surowicy szczurzej (200 μ L). W metodzie tej zaproponowano ilościowe oznaczenie cytrynianu syldenafilu przy użyciu techniki HPLC z detektorem UV, poprzedzone ekstrakcją ciecz-ciecz oraz zastosowaniem paroksetyny jako standardu wewnętrznego. Granica oznaczalności syldenafilu wynosiła 10 ng mL⁻¹. Precyzja mieściła się w granicach od 2.61 do 7.33%, natomiast dokładność od 0.14 do 3.92%. Wyniki badań potwierdziły stabilność syldenafilu w surowicy szczurzej przechowywanej w temp. -20 °C i -80 °C przez dwa miesiące [H-7].

W odróżnieniu od wcześniej opracowanych metod, nowa metoda nie wymaga użycia specjalistycznych technik analitycznych typu micelarna elektrokinetyczna chromatografia (MEKC), chromatografia gazowa ze spektrometrem masowym (GC/MS) lub chromatografia cieczowa ze spektrometrem masowym (LC/MS), ani detektorów np. elektrochemicznych. Jej niewątpliwą zaletą jest również wysoka czułość, dzięki której można uzyskać wyniki mimo bardzo małej objętości próbki

tj. 0.2 mL [H-7]. Dla porównania oznaczenie syldenafilu metodą GC/MS z granicą wykrywalności 20 ng mL⁻¹, wymaga próbek o objętości dziesięciokrotnie większej, co jest często niemożliwe do uzyskania w przypadku badań na małych zwierzętach doświadczalnych. Metoda została opisana w publikacji [H-7], a następnie użyta do badań hydrofilowych matryc o kontrolowanym uwalnianiu cytrynianu syldenafilu w modelu szczurzym [H-8].

Przedmiotem badań w warunkach *in vivo* opisanych w pracy [H-8] była ocena wpływu polimeru, tj. hypromelozy i alginianu sodu lub karbomeru i poloksameru, na wchłanianie i eliminację cytrynianu syldenafilu. Stwierdziłam, że zastosowanie hypromelozy i alginianu sodu powodowało zwiększenie wartości AUC oraz C_{max} prawie 6-krotnie w porównaniu z cytrynianem syldenafilu analizowanym bez dodatku polimerów (Ryc. 12). Dodatkowo wartość t_{max} skróciła się z 2.7 ± 1.2 do 0.8 ± 0.3 h. Wykazałam również korzystny wpływ poloksameru na wchłanianie syldenafilu z układów na bazie karbomeru. Wchłanianie syldenafilu z układów zawierających sam karbomer było natomiast wydłużone (t_{max} = 5.0 ± 1.2 h) mimo, że C_{max} oraz AUC były nieznacznie większe od wartości parametrów dla samej substancji leczniczej (Ryc. 12). Dodatek poloksameru (22%) powodował prawie 3-krotne zwiększenie wartości C_{max} oraz prawie 2-krotne zwiększenie AUC [H-8].

Dostępność biologiczna cytrynianu syldenafilu wyznaczona względem syldenafilu podawanego dożołądkowo w kapsułkach bez dodatku polimerów wynosiła odpowiednio: 151, 295 oraz 373% dla układów z samym karbomerem, karbomerem i poloksamerem oraz HPMC i alginianem sodu [H-8].



Ryc. 12. Profile stężenie-czas wyznaczone w surowicy szczurzej dla cytrynianu syldenafilu podawanego dożołądkowo w postaci sproszkowanych tabletek matrycowych w dawce 10 mg kg⁻¹ (kolor czarny, linia ciągła) oraz profile uwalniania cytrynianu syldenafilu z tabletek matrycowych w pH = 1.2 w warunkach *in vitro* (kolor niebieski, linia przerywana). Matryce zawierały: karbomer (*), karbomer i poloksamer 2:1 (▲) lub HPMC i alginianu sodu 2:1 (■) w porównaniu do samego cytrynianu syldenafilu (●) [H-8].

Stwierdziłam, że wyniki badań w warunkach *in vivo* (model szczurzy), stanowiły potwierdzenie zależności wykazanych w warunkach *in vitro* (Ryc. 12). Wskazuje to na zasadność łączenia polimerów o różnych właściwościach fizykochemicznych w celu kontroli uwalniania i optymalizacji parametrów farmakokinetycznych cytrynianu syldenafilu.

3.3.4. Podsumowanie

W warunkach *in vitro*

1. Zaproponowałam metodę poprawy szybkości rozpuszczania ibuprofenu przez wytwarzanie proszkowych układów samoemulgujących przy użyciu syntetycznych krzemianów magnezowo-glinowych (Neusilin®) jako nośników [H-1].
2. Opracowałam technologię wytwarzania porowatych peletek na bazie krzemianów Neusilin® i celulozy mikrokrystalicznej metodą ekstruzji i sferonizacji [H-2].
3. Zaproponowałam technologię wytwarzania peletek o właściwościach samoemulgujących przez powlekanie porowatych rdzeni, płynnym układem samemułgującym w celu poprawy dostępności farmaceutycznej i kontroli uwalniania ibuprofenu [H-2].
4. Wykazałam możliwość opracowania preparatów złożonych do farmakoterapii TNP, będących połączeniem inhibitorów fosfodiesterazy-5 (tadafafil, cytrynian syldenafilu) z antagonistami receptorów dla endoteliny (bozentan) [H-3].
5. Zaproponowałam trzy metody poprawy dostępności farmaceutycznej tadafafilu, tj. ekstruzję topliwą, mielenie oraz technologię z użyciem dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym [H-4 - H-6].
6. Opracowałam amorficzne stałe rozproszenia tadafafilu w polimerze Soluplus® metodą mielenia oraz oceniłam ich właściwości przy użyciu nowoczesnych metod analizy fizykochemicznej, tj. MDSC, XRD, spektroskopii FT-IR, MIR, w tym określiłam wpływ temperatury na ich stabilność [H-4, H-5].
7. Opracowałam stałe krystaliczne zawiesiny tadafafilu w mannitolu jako alternatywne rozwiązanie dla amorficznych stałych rozproszeń pod kątem zwiększenia dostępności farmaceutycznej tej substancji leczniczej [H-6].
8. Opracowałam tabletki matrycowe o kontrolowanym uwalnianiu cytrynianu syldenafilu [H-8].
9. Wykazałam przydatność techniki obrazowania tomografią komputerową (μ CT) do oceny mikrostruktury matryc hydrofilowych z tadafafilem oraz cytrynianem syldenafilu w 3D, przygotowanych odpowiednio metodą ekstruzji topliwej oraz tabletkowania [H-6, H-8].
10. Stwierdziłam korelację między średnim czasem uwalniania (*ang. mean dissolution time, MDT*) cytrynianu syldenafilu oraz ilością porów otwartych/perkolujących w tabletkach matrycowych [H-8].

W warunkach *in vivo* w modelu szczurzym

11. Wykazałam, że amorfizacja samego tadafafilu oraz przygotowanie amorficznych stałych rozproszeń z amfifilowym polimerem Soluplus® umożliwia odpowiednio prawie 12-krotne i ponad 26-krotne zwiększenie względnej dostępności biologicznej tej substancji leczniczej [H-5].
12. Stwierdziłam, że względna dostępność biologiczna tadafafilu z krystalicznych stałych zawiesin w mannitolu była prawie 13-krotnie większa w porównaniu do samego tadafafilu [H-6].
13. Wykazałam korzystny wpływ polimerów, takich jak: hypromeloza, alginian sodu, karbomer, poloksamer na parametry farmakokinetyczne cytrynianu syldenafilu w modelu szczurzym [H-7, H-8].

3.4. Wnioski

W obszarze technologii sporządzania nowych postaci leku do terapii mukowiscydozy, nowatorstwo wyników polega na:

- opracowaniu technologii wytwarzania stałych układów samoemulgujących z ibuprofenem w postaci samoemulgującego proszku lub peletek przy użyciu syntetycznych krzemianów magnezowo-glinowych (Neusilin®) jako nowoczesnych, porowatych nośników dla płynnych układów samoemulgujących [H-1, H-2],
- stwierdzeniu, że dobór rodzaju Neusilin® umożliwia przygotowanie formuacji o natychmiastowym lub przedłużonym uwalnianiu ibuprofenu, co z kolei stwarza możliwość poprawy dostępności farmaceutycznej lub/i kontroli jego uwalniania [H-1, H-2].

W obszarze opracowania nowych postaci leku do terapii nadciśnienia płucnego (TNP) o nowatorskim charakterze prac świadczy:

- stwierdzenie możliwości opracowania nowych złożonych produktów leczniczych do terapii TNP na bazie tadalafilu, cytrynianu sylденаfilu lub/i bozentanu [H-3],
- wykazanie przydatności polimeru Soluplus® do poprawy rozpuszczalności tadalafilu przy zastosowaniu trzech procesów technologicznych, tj.: mielenia, technologii z użyciem gazów w stanie nadkrytycznym oraz ekstruzji topliwej [H-4 - H-6],
- opracowanie metody wytwarzania amorficznych stałych rozproczeń tadalafilu w polimerze Soluplus® i wykazanie ich stabilności podczas przechowywania, jak również korzystnego wpływu na szybkość rozpuszczania tadalafilu w warunkach *in vitro* [H-4],
- opracowanie stałych krystalicznych zawiesin tadalafilu w mannitolu, metodą ekstruzji topliwej w celu poprawy dostępności farmaceutycznej tej substancji leczniczej [H-6],
- stwierdzenie zwiększenia dostępności biologicznej tadalafilu w modelu szczurzym po dożołądkowym podaniu amorficznych stałych rozproczeń w polimerze Soluplus®, jak również krystalicznych stałych zawiesin w mannitolu [H-5, H-6],
- opracowanie tabletek matrycowych o kontrolowanym uwalnianiu cytrynianu sylденаfilu [H-8],
- opracowanie nowej metody ilościowego oznaczania sylденаfilu w surowicy szczurzej [H-7],
- określenie wpływu polimerów stosowanych do wytwarzania tabletek matrycowych na parametry farmakokinetyczne sylденаfilu w modelu szczurzym, np.: C_{max} , t_{max} , AUC, λ_z , $t_{0.5\lambda_z}$, CL/F, MRT, F_R [H-8].

3.5. Piśmiennictwo

- [1] Bochenek, T. *Leki sieroce stosowane w chorobach rzadkich – wyzwanie dla współczesnych system opieki zdrowotnej*. Nowiny Lekarskie 2013, 82, 4, 338-342.
- [2] Libura, M., Władusiuk M., Małowicka, M., Grabowska E., Gałązka-Sobotka, M., Gryglewicz, J. *Choroby Rzadkie w Polsce. Stan obecny i perspektywy*. Uczelnia Łazarskiego, Warszawa 2016.
- [3] Portal ORPHANET www.orpha.net
- [4] Orphan Drug Report 2017. EvaluatePharma® 4th Ed., February 2017, www.evaluategroup.com/orphandrug2017
- [5] Flume, P.A., O’Sullivan, P.B., Robinson, K.A., Goss, C.H., Mogayzel, P.J., Willey-Courand, D.B., Bujan, J., Finder, J., Lester, M., Quittell, L., Rosenblatt, R., Vender, R.L., Hazle, L., Sabadosa, K., Marshall, B. *Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines. Chronic Medications for Maintenance of Lung Health*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007, 76, 957-969.
- [6] Walkowiak, J., Pogorzelski, A., Sands, D., Skorupa, W., Milanowski, A., Nowakowska, A., Orlik, T., Korzeniowska-Eksterowicz, A., Lisowska, A., Cofta, S., Minarowska, A., Piotrowski, R., Popierl, A., Bartnicka, M., Walicka-Serzysko, K., Witt, M. Woś, H. *Zasady rozpoznawania i leczenia mukowiscydozy. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Mukowiscydozy 2009 Poznań – Warszawa – Rzeszów*. Standardy Medyczne/Pediatrics 2009, 6, 352-378.
- [7] Konstan, M.W., Byard, P.J., Hoppel, C.L., Davis, P.B. *Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis*. N. Engl. J. Med. 1995, 332, 848-854.
- [8] Shah, P.N., Marshall-Batty, R., Smolen, J.A., Tagaev, J.A., Chen, Q., Rodesney, C.A., Le, H.H., Gordon, V.D., Greenberg, D.E., Cannon, C.L. *Antimicrobial activity of ibuprofen against cystic fibrosis associated gram-negative pathogens*. Antimicrob. Agents Chemother. DOI: 10.1128/AAC.01574-17.
- [9] Blaise, G., Langleben, D., Hubert, B. *Pulmonary Arterial Hypertension, Pathophysiology and Anesthetic Approach*. Anesthesiology 2003, 99, 1415-1432
- [10] Halank, M., Marx, C., Hoeffken, G. *Long term survival in primary pulmonary hypertension*. Heart 2004, 90, e40.
- [11] Montani, D., Chaumais, M.C., Guignabert, C., Günther, S., Girerd, B., Jaïs, X., Algalarrondo, V., Price, L.C., Savale, L., Sitbon, O., Simonneau, G., Humbert, M. *Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension*. Pharmacol. Therapeut. 2014, 141, 172-191.
- [12] Vaidya, B., Gupta, V. *Novel therapeutic approaches for pulmonary arterial hypertension: Unique molecular targets to site-specific drug delivery*. J. Control. Rel. 2015, 211, 118-133.
- [13] Barnett, C.F., Machado, R.F. *Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension*. Vasc. Health Risk Manag. 2006, 2, 411-422.
- [14] Frey, M.K., Lang, I. *Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension*. Expert Opin. Pharmacother. 2012, 13, 747-755.
- [15] Mathier, M.A., Ishizawar, D. *Bosentan*. Expert Opin. Pharmacother. 2010, 11, 1023-1034.
- [16] Magee, A.G., Makhecha, S., Bentley, S. *Risk-benefit considerations when prescribing phosphodiesterase-5 inhibitors in children*. Expert Opin. Drug Saf. 2015, 14, 633-642.
- [17] Galiè, N., Ghofrani, H.A., Torbicki, A., Barst, R.J., Rubin, L.J., Badesch, D., Fleming, T., Parpia, T., Burgess, G., Branzi, A., Grimminger, F., Kurzyna, M., Simonneau, G. *Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension*. N. Engl. J. Med. 2005, 353, 2148-2157.
- [18] Włodarski, K., Sawicki, W., Paluch, K.J., Tajber, L., Grembecka, M., Hawelek, L., Wojnarowska, Z., Grzybowska, K., Talik, E., Paluch, M. *The influence of amorphization methods on the apparent solubility and dissolution rate of tadalafil*. Eur. J. Pharm. Sci. 2014, 62, 132-140.

- [19] Badr-Eldin, S.M., Elkheshen, S.A., Ghorab, M.M. *Inclusion complexes of tadalafil with natural and chemically modified β -cyclodextrins I. Preparation and in-vitro evaluation.* Eur. J. Pharm. Biopharm. 2008, 70, 819-827.
- [20] Kumar, R., Sevukarajan, M., Vulava, J., Pavankumar, A.G., Deepthi, Y., Manjunath, M., Anand, A. *Improvement of dissolution characteristics and bioavailability of tadalafil by solid dispersion technique using water-soluble polymers.* Int. J. Adv. Pharm. 2012, 2, 56-63.
- [21] Vyas, V., Sancheti, P., Karekar, P., Shah, M., Pore, Y. *Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407.* Acta Pharm. 2009, 59, 453-461.
- [22] Mehanna, M.M., Motawaa, A.M., Samaha, M.W. *In sight into tadalafil – block copolymer binary solid dispersion: Mechanistic investigation of dissolution enhancement.* Int. J. Pharm. 2010, 402, 78-88.
- [23] Mehanna, M.M., Motawaa, A.M., Samaha, M.W. *Tadalafil inclusion in microporous silica as effective dissolution enhancer: optimization of loading procedure and molecular state characterization.* J. Pharm. Sci. 2011, 100, 1805-1818.
- [24] Weyna, D.R., Cheney, M.L., Shan, N., Mazen, M.H., Wojtas, Ł., Zaworotko, M.J. *Crystal engineering of multiple-component organic solids: Pharmaceutical cocrystals of tadalafil with persistent hydrogen bonding motifs.* CrystEngComm 2012, 14, 2377-2380.
- [25] Chakraborty, S., Shukla, D., Mishra, B., Singh, S. *Lipid—an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability.* Eur. J. Pharm. 2009, 73, 1-15.
- [26] Pouton, C.W. *Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and self-microemulsifying drug delivery systems.* Eur. J. Pharm. Sci. 2000, S2, S93-98.
- [27] Tang, B., Cheng, G., Gu, J.C., Xu, C.H. *Development of solid selfemulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms.* Drug Discov. Today. 2008, 13, 606-612.
- [28] Aerts, C.A., Verraedt, E., Depla, A., Follens, L., Froyen, L., VanHumbbeeck, J., Augustijns, P., Van den Mooter, G., Mellaerts, R., Martens, J.A. *Potential of amorphous microporous silica for ibuprofen controlled release.* Int. J. Pharm. 2010, 397, 84-91.
- [29] Gao, L., Sun, J., Zhang, L., Wang, J., Ren, B. *Influence of different structured channels of mesoporous silicate on the controlled ibuprofen delivery.* Mater. Chem. Phys. 2012, 135, 786-797.
- [30] Agarwal, V., Siddiqui, A., Ali, H., Nazzal, S. *Dissolution and powder flow characterization of solid self-emulsified drug delivery system (SEDDS).* Int. J. Pharm. 2009, 366, 44-52.
- [31] Biuletyn Techniczny: Physico-Chemical Properties of Neusilin. Fuji Chemical industry Co., LTD. Toyama Japan 2009.
- [32] Ito Y, Kusawake T, Ishida M, Tawa R, Shibata N, Takada K. *Oral solid gentamicin preparation using emulsifier and adsorbent.* J. Control. Rel. 2005;25:23-31.
- [33] Rosenholm, J.M., Linden M. *Towards establishing structure-activity relationships for mesoporous silica in drug delivery applications.* J. Control. Rel. 2008. 128, 157-164.
- [34] Canbakan, B. *Rational approaches to the treatment of hypertension: drug therapy-monotherapy, combination, or fixed-dose combination?* Kidney Int. Suppl. 2013, 3, 349-351.
- [35] Vasconcelos, T., Marques, S., Neves, J., Sarmento, B. *Amorphous solid dispersions: Rational selection of a manufacturing process.* Adv. Drug. Dev. Rev. 2016, 100, 85-101.
- [36] Baghel, S., Cathcart, H., O'Reilly, N.J. *Polymeric amorphous solid dispersions: A review of amorphization, crystallization, stabilization, solid-state characterization, and aqueous solubilisation of Biopharmaceutical Classification System Class II drugs.* J. Pharm. Sci. 2016, 105, 2527-2544.

- [37] Brough, C., Williams III, R.O. *Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery*. Int. J. Pharm. 2013, 453, 157-166.
- [38] Hancock, B.C.; Zografi, G. *Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems*. J. Pharm. Sci. 1997, 86, 1-12.
- [39] Descamps, M. (Ed.). *Disordered Pharmaceutical Materials*. First Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, 2016.
- [40] Willart, J.F., Descamps, M. *Solid State Amorphization of Pharmaceuticals*. Mol. Pharm. 2008, 5, 905-920.
- [41] Knopp, M.M., Chourak, N., Khan, F., Wendelboe, J., Langguth, P., Rades, T., Holm, R. *Effect of polymer type and drug dose on the in vitro and in vivo behaviour of amorphous solid dispersions*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2016, 105, 106-114.
- [42] Willart, J.F., Carpentier, L., Danede, F., Descamps, M. *Solid-State Vitrification of Crystalline Griseofulvin by Mechanical Milling*. J. Pharm. Sci. 2012, 101, 1570-1577.
- [43] Descamps, M., Willart, J.F. *Perspectives on the amorphisation/milling relationship in pharmaceutical materials*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2016, 100, 51-66.
- [44] Reintjes T. (Ed.), *Solubility Enhancement with BASF Pharma Polymers, Solubilizer Compendium*, BASF SE, Lampertheim, 2011.
- [45] Linn, M., Collnot, E.M., Djuric, D., Hempel, K., Fabian, E., Kolter, K., Lehr, C.M. *Soluplus® as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs in vitro and in vivo*. Eur. J. Pharm. Sci. 2012, 45, 336-343.
- [46] Puncchova, K., Heng, J.Y.Y., Beranek, J., Stepanek, F. *Investigation of drug-polymer interaction in solid dispersions by vapour sorption methods*. Int. J. Pharm. 2014, 469, 159-167.
- [47] Guo, Q., Knight, P.T., Wu, J., Mather, P.T. *Blends of Paclitaxel with POSS-Based Biodegradable Polyurethanes: Morphology, Miscibility, and Specific Interactions*. Macromolecules. 2010, 43, 4991-4999.
- [48] Riekese, M.K., Kumineka, G., Rauber, G.S., Campos, C., Bortoluzzi, A.J., Stulzera, H.K. *HPMC as a potential enhancer of nimodipine biopharmaceutical properties via ball-milled solid dispersions*. Carbohydr. Polym. 2014, 99, 474-482.
- [49] Reitz, E., Vervaet, C., Neubert, R.H.H., Thommes, M. *Solid crystal suspensions containing griseofulvin – Preparation and bioavailability testing*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2013, 83, 193-202.
- [50] Thommes, M., Ely, D.R., Carvajal, M.T., Pinal, R. *Improvement of the dissolution rate of poorly soluble drugs by solid crystal suspensions*. Mol. Pharm. 2011, 8, 727-735.
- [51] Dalla-Bona, A.C., Stoisiek, K., Oesterheld, N., Schmehl, T., Gessler, T., Seeger, W., Beck-Broichsitter, M. *Characterization of lung-delivered in-situ forming controlled release formulations*. J. Pharm. Pharmacol. 2015, 67, 1349-1354.
- [52] Degim, T., Tugcu-Demiroz, F., Tamer-Ilbas, S. *Development of controlled release sildenafil formulations for vaginal administration*. Drug Dev. 2008, 15, 259-265.
- [53] Xiong, Q., Baychev, T.G., Jivkov, A.P. *Review of pore network modelling of porous media: Experimental characterisations, network constructions and applications to reactive transport*. J. Contam. Hydrol. 2016, 192, 101-117.
- [54] Ansari, M.A., Stepanek, F., 2008. *The effect of granule microstructure on dissolution rate*. Powder Technol. 2008, 181, 104-114.
- [55] Siepmann, J., Peppas, N.A. *Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)*. Adv. Drug Dev. Rev. 2001, 48, 139-157.

- [56] Siepmann, J., Siepmann, F. *Modeling of diffusion controlled drug delivery*. J. Control. Rel. 2012, 161, 351-362.
- [57] Markl, D., Strobel, A., Schlossnikl, R., Botker, J., Bawuah, P., Ridgway, C., Rantanen, J., Rades, T., Gane, P., Peiponen, K.E., Zeitler, A.J. *Characterisation of pore structures of pharmaceutical tablets: A review*. Int. J. Pharm. 2018, 538, 188-214.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Sumarycznie na mój dorobek składa się z 31 prac o łącznym współczynniku *Impact Factor (IF)* 36.294 i sumie punktów MNiSW 444, w tym: 18 artykułów oryginalnych, 5 poglądowych, 1 popularno-naukowy, 4 monografie, 1 patent, 2 zgłoszenia patentowe oraz 47 prac konferencyjnych (29 zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych).

- przed uzyskaniem stopnia doktora
10 prac o sumarycznym IF = 3.118, pkt. MNiSW = 72 w tym:
 - 5 artykułów oryginalnych
 - 3 artykułów poglądowych
 - 2 monografie
 oraz 13 prac konferencyjnych (6 na konferencjach międzynarodowych)
- po uzyskaniu stopnia doktora
21 prac o sumarycznym IF = 33.176, pkt. MNiSW = 372 w tym:
 - 13 artykułów oryginalnych
 - 2 artykuły poglądowe
 - 1 artykuł popularno-naukowy
 - 2 monografie
 - 1 patent
 - 2 zgłoszenia patentowe
 oraz 34 prac konferencyjnych (23 na konferencjach międzynarodowych)

Moje zainteresowania dotyczyły następujących obszarów:

Przed uzyskaniem stopnia doktora

- optymalizacja wytwarzania peletek metodą ekstruzji i sferonizacji,
- optymalizacja sporządzania tabletek ulegających rozpadowi w jamie ustnej (ODT) przez bezpośrednie tabletkowanie,
- poprawa rozpuszczalności ibuprofenu przez sporządzanie stałych rozproszeń,
- stabilizacja termiczna ibuprofenu przy użyciu krzemianu magnezowo-glinowego (Neusilin®),
- technologia wytwarzania termowrażliwych żeli, zawierających szczep *Lactobacillus* do badań mikrobiologicznych.

Po uzyskaniu stopnia doktora

- poszukiwanie nowych metod oceny czasu rozpadu ODT,
- optymalizacja technologii wytwarzania mikroemulsji spożywczych i kosmetycznych na bazie olejów naturalnych,
- modyfikowane smektyty jako potencjalne, nowe substancje pomocnicze o działaniu rozsadzającym i wypełniającym przeznaczone do bezpośredniego tabletkowania,
- technologia wytwarzania dojelitowej postaci leku zawierającej nowe substancje lecznicze o działaniu przeciwdrgawkowym i przeciwbólowym,
- rozwój technologii sporządzania nanocząstek srebra,
- nowe metody oceny mikrostruktury materiałów porowatych, np. termoporometria,
- wpływ formy krystalicznej substancji leczniczej na szybkość rozpuszczania i przenikanie przez błony biologiczne,
- kinetyka hydratacji stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus® z fazy gazowej,
- ocena interakcji substancja-lecznicza nośnik na poziomie molekularnym przy użyciu ^1H NMR w cieple stałym.

4.1. Omówienie działalności naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja działalność naukowa rozpoczęła się na piątym roku studiów na kierunku farmacja w UJ CM. Zapoczątkował ją trzymiesięczny staż badawczy w ramach programu Sokrates/Erasmus, który od kwietnia do czerwca 2003 r. odbyłam w Laboratoire de Pharmacie Galénique, Université de Montpellier¹ we Francji kierowanym przez Pana profesora Bernard Bataille. Tematem przewodnim prac badawczych, w których uczestniczyłam była optymalizacja sporządzania peletek na bazie celulozy mikrokryształicznej metodą ekstruzji i sferonizacji. Wyniki moich badań były częścią pracy doktorskiej Pani Sophie Galland, zostały upowszechnione w formie referatu ustnego oraz publikacji A-1.

- A-1. Galland S.*, Ruiz T., Delalonde M., **Krupa A.**, Bataille B.
Texturing the spherical granular system influence of the spheronisation stage
Powder Technology **2005**, 157, 156-162
IF₂₀₀₅ = 1.219 **MNiSW₂₀₀₅ = 20**

Po powrocie ze stypendium w lipcu 2003 r. obroniłam z oceną celującą pracę magisterską pt. „Charakterystyka wybranych substancji pomocniczych stosowanych w technologii płynnych postaci leku” wykonaną pod kierunkiem Pana dr Tomasza Stożka w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJ CM.

Od 1 października 2003 r. rozpoczęłam pracę jako asystent w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJ CM kierowanej przez Panią prof. dr hab. Renatę Jachowicz. Moje zainteresowania badawcze dotyczyły optymalizacji sporządzania tabletek ulegających rozpadowi w jamie ustnej (ODT), metodą bezpośredniego tabletkowania oraz nowych metod oceny czasu rozpadu. Zagadnienia te były przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej pt. „Ocena przydatności nowych substancji pomocniczych Pharmaburst® oraz F-Melt® do wytwarzania tabletek rozpadających się w jamie ustnej” obronionej z wyróżnieniem 15 marca 2010 r. Promotorem pracy doktorskiej była Pani prof. dr hab. Renata Jachowicz.

W ramach pracy doktorskiej, dokonałam oceny przydatności nowych złożonych substancji pomocniczych tj. F-Melt® typ C, F-Melt® typ M (Fuji Chemical Industry, Japonia) oraz Pharmaburst® C1 (SPI Polyols, USA) do wytwarzania ODT metodą bezpośredniego tabletkowania. Wykazałam, że wprowadzenie do masy tabletkowej substancji leczniczych o różnych właściwościach fizykochemicznych, tj. łatwo rozpuszczalnego w wodzie chlorowodoru diltiazemu, dość trudno rozpuszczalnego w wodzie diklofenaku sodu oraz praktycznie nierozpuszczalnego ibuprofenu ma istotny wpływ na ich właściwości. Opracowałam w sumie 140 formuły tabletek zawierających 50 mg, 100 mg lub 200 mg ww. substancji leczniczych. Ich właściwości fizykochemiczne oceniałam przy użyciu interdyscyplinarnych metod, m.in. porozymetrii rtęciowej, elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM), proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (XRD), różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), analizy termogravimetrycznej (TGA) oraz kwadрупolowej spektrometrii masowej (QMS). Interdyscyplinarną część tej pracy badawczej wykonałam w ramach nawiązanych przeze mnie współprac z pozawydziałowymi jednostkami m.in. Wydziałem Chemii UJ i Akademią Górniczo-Hutniczą (AGH) im. Stanisława Staszica w Krakowie.

Wykazałam, że substancje pomocnicze Pharmaburst® i F-Melt® charakteryzują się dobrymi właściwościami, kwalifikującymi je do stosowania w procesie bezpośredniego tabletkowania. Pharmaburst® charakteryzował się lepszymi właściwościami fizycznymi, tj. sypkością, ściślıwością, zdolnością do tworzenia kształtek istotnymi pod kątem wytwarzania ODT o zwiększonej zawartości substancji leczniczych. Tabletki zawierające ibuprofen lub chlorowodorek diltiazemu w dawkach 50-200 mg jak również tabletki zawierające 50-100 mg diklofenaku sodu spełniały wymagania farmakopealne. Spośród tabletek sporządzonych z F-Melt® typ C dobrymi właściwościami charakteryzowały się tabletki zawierające wszystkie modelowe substancje lecznicze w ilości 50 mg.

W przypadku użycia F-Melt® typ M tylko tabletki zawierające 50 mg diklofenaku sodu spełniały normy FP VIII.

W badaniach porozymetrycznych wykonanych we współpracy z AGH stwierdziłam, obecność większej ilości porów o wielkości poniżej 0.1 µm w tabletkach, zawierających Pharmaburst® oraz ibuprofen w ilości 200 mg, niż w przypadku tabletek z F-Melt® typ C. Wykazałam, że ułatwiało to wnikanie wody do wnętrza tabletek i skracało ich czas rozpadu.

Na podstawie wyników badań stabilności, stwierdziłam konieczność zabezpieczenia ODT, przygotowanych przy użyciu obu analizowanych złożonych substancji pomocniczych przed dostępem wilgoci. Pojemniki plastikowe bez pochłaniacza wilgoci, ani blistry wykonane z folii Alu/PVC/PVDC nie stanowiły wystarczającej bariery ochronnej.

Wyniki badań są przedmiotem publikacji D-1, D-2, E-2, E-3.

- D-1 **Krupa A.**, Jachowicz R., Wodnicka K., Pędzich Z., Mozgawa W.
Pharmaburst® and F-Melt® as a new granular excipient systems for ODTs preparation
Farmaceutski Vestnik **2008**, 59, 243-245
MNiSW₂₀₀₈ = 2
- D-2 **Krupa A.**, Jachowicz R.
Tabletki szybko rozpadające się w jamie ustnej zawierające stałe rozproszenia ibuprofenu
Farmacja Polska **2008**, 64, 5, 218-221
MNiSW₂₀₀₈ = 4
- E-2 Jachowicz R., **Krupa A.**
Tabletki ulegające rozpadowi w jamie ustnej. Kierunki badań, technologie. Cz. I
Farmacja Polska **2010**, 66, 6, 443-447
MNiSW₂₀₁₀ = 6
- E-3 **Krupa A.*** Jachowicz R.
Tabletki ulegające rozpadowi w jamie ustnej. Kierunki badań, technologie. Cz. II
Farmacja Polska **2010**, 66, 7, 521-527
MNiSW₂₀₁₀ = 6

Z uwagi na trudności w odwzorowaniu warunków panujących w jamie ustnej przy zastosowaniu aparatu farmakopealnego, poszukuje się nowych metod kontroli jakości ODT. W tym aspekcie, ograniczenia metody farmakopealnej są związane z dużą objętością rozpuszczalnika, flotacją postaci leku lub jej przywieraniem do krążków obciążających, co utrudnia stwierdzenie czy rdzeń tabletki został zwilżony. We współpracy z Panem dr Tomaszem Skórka z Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN w Krakowie, zaproponowałam użycie metody obrazowania rezonansem magnetycznym (MRI) do oceny czasu rozpadu ODT w warunkach *in vitro*. Zaletą tej metody jest możliwość śledzenia dynamiki rozpadu tabletek, co nie jest możliwe przy użyciu innych technik pomiarowych. Wykazałam również przydatność testu zwilżania oraz aparatu z tzw. ruchomym trzpieniem, opracowanym w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJ CM do pomiaru czasu rozpadu ODT. Na przykładzie tabletek *placebo* stwierdziłam korelację wyników uzyskanych przy użyciu aparatu własnej konstrukcji z wynikami analizy czasu rozpadu w jamie ustnej.

Z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność ibuprofenu w wodzie, dodatkowym aspektem badań opisanych w pracy doktorskiej była poprawa szybkości rozpuszczania tej substancji leczniczej przez sporządzanie stałych rozproszeń. Nośnikiem stałych rozproszeń była złożona substancja pomocnicza F-Melt® typ C, zawierająca wodorofosforan wapnia oraz porowaty krzemian magnezowo-glinowy (Neusilin® US2, Fuji Chemical Industry, Japonia). Stałe rozproszenia sporządziłam metodą odparowania rozpuszczalnika oraz stapiania, polegającej na zmieszaniu stopionego ibuprofenu

($T_m = 74\text{ }^{\circ}\text{C}$) z ogrzany nośnikiem (F-Melt® typ C lub Neusilin® US2). Analiza obrazów z mikroskopu polaryzacyjnego wykazała pleochroizm kryształów ibuprofenu osadzonego na F-Melt® typ C. W przypadku użycia Neusilin® US2, stwierdziłam amorfizację ibuprofenu, która znalazła potwierdzenie w termogramach wykonanych metodą DSC oraz w obrazie dyfrakcyjnym (XRD) wykonanych we współpracy z Panią dr hab. Dorotą Majdą z Wydziału Chemii UJ oraz Panią mgr Anną Łatkiewicz z Wydziału Geologii i Geografii UJ.

Opracowane stałe rozproszenia ibuprofenu miały korzystny wpływ na jego szybkość rozpuszczania. Po 60 min w kwaśnym pH rozpuszczało się ok. 80 % ibuprofenu, co stanowiło 3-krotnie większą ilość w porównaniu do samej substancji leczniczej. Zastosowanie mikroskopii ramanowskiej w ramach nawiązanej przeze mnie współpracy z Panem prof. Gyorgy Marosi z Budapest University of Technology and Economics na Węgrzech, potwierdziło jednolitość rozproszenia oraz amorfizację ibuprofenu w stałych rozproszeniach. Zadecydowało to o wprowadzeniu układów proszkowych do masy tabletkowej z Pharmaburst®. Wykazałam, że stałe rozproszenia mają korzystny wpływ na właściwości mechaniczne tabletek. Ścieralność tabletek przygotowanych przy użyciu siły zgniotu 10-15 kN wynosiła poniżej 0.4 %. Wprowadzenie stałego rozproszenia do masy tabletkowej, skutkowało zmniejszeniem porowatości tabletek z 42 do 30 % i wydłużeniem ich czasu rozpadu z 40 do 60 sek. Stałe rozproszenie miało jednak korzystny wpływ na szybkość uwalniania ibuprofenu z przygotowanych tabletek. W kwaśnym pH, po 60 min uwalniało się ponad 70 % ibuprofenu. Stwierdziłam, że zwiększenie ilości uwolnionego ibuprofenu było związane z amorfizacją ibuprofenu.

Przedmiotem analizy był również wpływ krzemianu magnezowo-glinowego (Neusilin®) na stabilność ibuprofenu podczas ogrzewania. We współpracy z Panią dr hab. Dorotą Majdą z Wydziału Chemii UJ wyjaśniłam mechanizm stabilizacji ibuprofenu przy użyciu krzemianu magnezowo-glinowego (Neusilin® US2), który jest istotny pod kątem optymalizacji procesów technologicznych prowadzonych w podwyższonej temperaturze. Stwierdziłam, że po zmieszaniu ww. składników w temperaturze pokojowej następowało tworzenie wiązań chemicznych między grupą karboksylową ibuprofenu oraz grupami hydroksylowymi krzemianu. Powstała sól charakteryzowała się mniejszą lotnością niż sam ibuprofen, co z kolei zapobiegało sublimacji ibuprofenu podczas ogrzewania. Wyniki przedstawiono w publikacji A-2.

A-2 **Krupa A.,** Majda D., Jachowicz R., Mozgawa W.
The influence of Neusilin® US2 on the thermal stability of ibuprofen
Thermochimica Acta **2010**, 509, 12-17
IF₂₀₁₀ = 1.899 **MNiSW₂₀₁₀ = 27**

Wyniki badań opisane w pracy doktorskiej były również tematem wykładów wygłoszonych w Krakowie i Budapeszcie w latach 2008-2010 na zaproszenie niemieckiej firmy Syntapharm/Harke Pharma.

W wymiarze aplikacyjnym, doświadczenia badawcze związane z nowymi metodami oceny czasu rozpadu ODT, przekazane przeze mnie w czasie wykładów wygłoszonych w Krakowie na zaproszenie firmy Harke Pharma (Niemcy), pomogły firmie farmaceutycznej Valeant (Rzeszów) w opracowywaniu nowej formy leku generycznego z azytromycyną (Macromax ODT/Zigilex ODT).

Dodatkowo w latach 2008-2009 uczestniczyłam w realizacji projektu badawczego we współpracy z Panem prof. dr hab. Piotrem Heczko i Panią prof. dr hab. Magdaleną Strus z Katedry Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego UJ CM. W ramach tej współpracy opracowałam termowrażliwe żełe ze szczepami *Lactobacillus*, które były stosowane do badań mikrobiologicznych.

4.2. Omówienie działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora, która nie stanowi osiągnięcia naukowego opisanego w pkt. 3

Po obronie pracy doktorskiej, kontynuowałam badania nad technologią wytwarzania ODT. Ich wyniki były tematem dwóch prac oryginalnych [A-3, A-4] oraz jednej poglądowej [E4], ponadto były upowszechniane w formie referatów ustnych i posterów na konferencjach międzynarodowych i krajowych.

- A-3 **Krupa A.**, Jachowicz R., Pędzich Z., Wodnicka K.
The Influence of the API Properties on the ODTs Manufacturing
AAPS PharmSciTech **2012**, 13, 4, 1120-1129
IF₂₀₁₂ = 1.584 **MNiSW₂₀₁₂ = 25**
- A-4 Brniak W., Jachowicz R., **Krupa A.**, Skórka T., Niwiński K.
Evaluation of co-processed excipients used for direct compression of orally disintegrating tablets (ODT) using novel disintegration Apparatus
Pharmaceutical Development and Technology **2013**, 18, 2, 464-74
IF₂₀₁₃ = 1.335 **MNiSW₂₀₁₃ = 20**
- E-4. Jachowicz R., Brniak W., **Krupa A.**, Jamróz W.
Tabletki ulegające rozpadowi w jamie ustnej. Kierunki badań, technologie. Część III
Farmacja Polska **2011**, 67, 11, 770-775
MNiSW₂₀₁₁ = 3

Moje zainteresowania naukowe dotyczyły również optymalizacji sporządzania mikroemulsji na bazie olejów pochodzenia naturalnego, tj. oleju awokado, oleju jojoba, oleju ze słodkich migdałów. Badania w ramach, których opracowano ok. 60 układów emulsyjnych i mikroemulsyjnych z olejami roślinnymi do zastosowań kosmetycznych były przedmiotem pracy magisterskiej Pani mgr Karoliny Gargas pt. „*Badania preformulacyjne układów mikroemulsyjnych do zastosowań kosmetycznych*” (2011), której byłam opiekunem. **Praca zdobyła drugą nagrodę na Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich w 2012 r.**

Optymalizacja wytwarzania mikroemulsji z olejem rybim do zastosowań spożywczych została podjęta w wypromowanej przeze mnie pracy magisterskiej Pani mgr Anny Górskiej pt. *Układy mikroemulsyjne na bazie olejów naturalnych* (2012). Badania realizowano we współpracy z firmą EuroPharma Alliance Sp z o.o. Po obronie pracy magisterskiej, badania kontynuowano. **Ich wynikiem było krajowe zgłoszenie patentowe nr P.404684 oraz międzynarodowe zgłoszenie patentowe opublikowane pod nr WO 2015/009181A1, których jestem współautorem. Dnia 8 czerwca 2017 r. Urząd Patentowy RP udzielił patentu nr PL 227367B1 na ww. wynalazek.**

Opracowane rozwiązanie technologiczne zostało również **nagrodzone srebrnym medalem Brussels Eureka! na Międzynarodowych Targach Innowacji w Brukseli dn. 15 listopada 2014 r.**

Dodatkowo w latach 2010-2017 uczestniczyłam w badaniach nad technologią wytwarzania:

- tabletek na bazie modyfikowanych smektytów jako nowych substancji pomocniczych o właściwościach rozsadzających i wypełniających do przygotowania tabletek ODT metodą bezpośredniego tabletkowania. Badania były prowadzone we współpracy z Panią dr hab. inż. Alicją Rapacz-Kmita z Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że montmorillonit sodowy może być stosowany jako substancja pomocnicza w procesie bezpośredniego tabletkowania. Z uwagi na silne pęcznienie w kontakcie z wodą, tabletki zawierające montmorillonit sodowy rozpadały się natychmiast, co potwierdza przydatność smektytu do wytwarzania tabletek o krótkim czasie rozpadu [D-4]

- D-4 Rapacz-Kmita A., **Krupa A.**, Jachowicz R.: **2010**
Preliminary approach to application of modified smectite clay to form tablets in direct compression proces
Materiały Ceramiczne 62, 366-368
MNiSW₂₀₁₀ = 9

- dojelitowej postaci leku dla nowej substancji aktywnej o działaniu przeciwdrgawkowym i przeciwbólowym w ramach projektu POIG nr 01.01.02-12-012/09-00
- nanocząstek srebra do podania na skórę w postaci hydrożelu. We współpracy z Panem dr inż. Markiem Wojnickim z Wydziału Metali Nieżelaznych Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie uczestniczyłam w opracowaniu technologii wytwarzania nanocząstek. Zaletą opracowanej metody było uzyskanie układu zawierającego wysokie stężenie nanocząstek o zbliżonej wielkości, które były pozbawione działania drażniącego. Procedurę sporządzania nanocząstek oraz charakterystykę ich właściwości opisano w publikacji [A-5]

- A-5 Wojnicki M., Luty-Błocho M., Kotańska M., Wytrwał M., Tokarski T., **Krupa A.**, Kołaczkowski M., Bucki A., Kobielski M.: **2018**
Novel and effective synthesis protocol of AgNPs functionalized using L-cysteine as a potential drug carrier
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 391, 123-130.
IF₂₀₁₆ = 2.558 **MNiSW₂₀₁₆ = 25**

We współpracy z Panią dr hab. Dorotą Majdą z Wydziału Chemii UJ uczestniczyłam w badaniach nad rozwojem nowych procedur badawczych przeznaczonych do charakterystyki materiałów mezoporowatych, tj. termoporometrii. W oparciu o wyników pomiarów metodą porozymetrii rtęciowej i termoporometrii, zostały opracowane równania kalibracyjne, dzięki którym możliwa jest ocena porowatości próbek, zawierających duże mezopory. Analiza rozkładu wielkości porów w takich próbkach, stanowi problem przy użyciu dotychczas stosowanych metod [A-6].

- A-6 Majda D., Ikonen T., **Krupa A.**, Lehto V.P., Makowski W.: **2018**
Application of thermoporometry for characterization of mesoporous silicon: In search for probe liquid aimed at large pores
Microporous and Mesoporous Materials 264, 1-7.
IF₂₀₁₆ = 3.615⁶ **MNiSW₂₀₁₆ = 35[‡]**

W 2015 r. nawiązałam współpracę z zespołem kierowanym przez Pana prof. Martin Brandl z Department of Physics, Chemistry and Pharmacy, University of Southern Denmark w Odense (Dania). Współpraca ma na celu analizę wpływu formy krystalicznej substancji leczniczych na szybkość rozpuszczania i przenikanie przez błony biologiczne. Jej dotychczasowym efektem jest praca licencjacka Pana Ibrahim Ahmad Moussa pt. *Dissolution-/permeation-analysis of tadalafil using side-by-side diffusion chamber* obroniona w University of Southern Denmark w 2016 r. Promotorem pracy był Pan prof. Martin Brandl.

⁶ Podano punktację z roku 2016 z uwagi na brak danych z roku 2018

Część wyników badań uzyskanych w ramach tej współpracy została zaprezentowana w formie posteru autorstwa:

Christensen M., Sironi D., Jacobsen A.C., Bauer-Brandl A., **Krupa A.**, Brandl M.

pt. *Dissolution-/permeation analysis of tadalafil using a novel extended surface in-vitro setup: Permealoo™*

na konferencji Northern Pharma Network Meeting 2018, która odbyła się w Odense (Dania) w dniach 29-31.01.2018 r.

W 2015 r. nawiązałam również współpracę z Panem dr hab. Hubertem Harańczyk z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego. Współpraca dotyczy analizy kinetyki hydratacji stałych rozproszeń z fazy gazowej oraz oceny oddziaływań substancja lecznicza-substancja pomocnicza na poziomie molekularnym przy zastosowaniu protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego ciele stałym (^1H ssNMR).

W ramach współpracy powstała praca magisterska Pana mgr Karola Kubat pt. *Własności hydratacyjne preparatów tadalafilu w osnowie polimeru Soluplus®*, która została obroniona na Wydziale Fizyki UJ w 2016 r. Promotorem pracy był Pan dr hab. Hubert Harańczyk.

