

Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva

Lovrić, Jasmina; Hafner, Anita; Radiković, Maja; Juretić, Marina; Duerrigl, Marjana; Perina Lakoš, Gordana; Pepić, Ivan

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2015, 71, 355 - 384**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:912337>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva

JASMINA LÓVRIĆ¹, ANITA HAFNER¹, MAJA RADIKOVIĆ¹, MARINA JURETIĆ¹,
MARJANA DÜRRIGL², GORANA PERINA LAKOŠ³, IVAN PEPIĆ^{1,4}

¹Zavod za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu

²Istraživanje i razvoj, PLIVA Hrvatska d.o.o.

³Odjel za odobravanje lijekova, Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED)

⁴Centar za primjenjenu farmaciju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu

UVOD

Nanokristali djelatne tvari pripadaju skupini suvremenih terapijskih nanosustava kojima se nastoje poboljšati farmaceutsko-tehnološka (primjerice topljivost, fizička i kemijska stabilnost) i/ili biofarmaceutska (primjerice permeabilnost i bioraspoloživost) svojstva djelatne tvari. Tehnologija nanokristala počinje se intenzivnije razvijati i primjenjivati u području farmaceutike devedesetih godina prošlog stoljeća, a prvi je proizvod izrađen takvom tehnologijom odobren za primjenu već u 2000. godini. Od tada do danas odobren je relativno veliki broj nanolijekova izrađenih tehnologijom nanokristala, u usporedbi s relativno malim ukupnim brojem terapijskih nanosustava koji su odobreni za primjenu. Odobreni lijekovi primjenjuju se isključivo oralnim i parenteralnim putovima, iako najnovija ispitivanja daju naznake da se u sljedećem periodu mogu očekivati i lijekovi u obliku nanokristala namijenjeni parenteralnim putovima primjene (primjerice, za pulmonalnu, dermalnu, oftalmičku primjenu). Lijekovi u obliku nanokristala za oralnu primjenu na području EU izrađeni su najčešće kao suhi oralni farmaceutski oblici (tablete, kapsule), uz iznimku jednog lijeka koji je na američkom tržištu u obliku oralne nanosuspencije (Megace ES). Parenteralni lijekovi u obliku nanokristala za sada su isključivo namijenjeni intramuskularnoj primjeni u obliku nanosuspencije koja se *ex tempore* pripravlja iz liofiliziranog oblika nanokristala lijeka ili se radi o gotovoj nanosuspenciji napunjenoj u štrcaljku. Takvi pripravnici su malog volumena s visokim udjelom djelatne tvari, a što je velika prednost pri takvom načinu primjene. O terapijskoj učinkovitosti djelatne

tvari u obliku nanokristala svjedoči činjenica da je na području EU odobreno 5 nanolijekova (oralna primjena: 3; parenteralna primjena: 2), dok je na području SAD-a odobreno ukupno 11 nanolijekova (oralna primjena: 9; parenteralna primjena: 2) koji su izrađeni tehnologijom nanokristala.

Općenito su glavni nedostaci terapijskih nanosustava relativno nisko uklapanje djelatne tvari, složeni i specifični postupci izrade i često nedovoljno ispitan sigurnosni profil sirovina i/ili nanosustava koji služe kao nosači djelatne tvari. Uklapanje djelatne tvari odnosi se na udjel djelatne tvari koja je vezana na i/ili dispergirana/otopljena u nanonosaju, najčešće polimernoj ili lipidnoj nanočestici/nanovezikuli. Takvi nanonosaji s uklopljenom djelatnom tvari često se pripremaju složenim laboratorijskim postupcima koje je često nemoguće prilagoditi industrijskom mjerilu proizvodnje zbog procesnih i/ili ekonomskih problema. Sigurnosni profil sirovina od kojih su izrađeni nanonosaji poseban je nedostatak. Pri dizajnu određenog nanonosaja (često) se za specifičnu djelatnu tvar sintetizira nova sirovina čija su fizičko-kemijska svojstva »krojena« u svrhu izrade nanonosaja željenih svojstava (veličine i svojstava površine; uklapanja i oslobađanja djelatne tvari). Međutim, sigurnosni profil takve novosintetizirane sirovine potrebno je toksikološki ispitati, a što je vrlo često neprihvatljivo za farmaceutsku industriju jer je za takva ispitivanja potrebno uložiti znatna financijska sredstva uz značajan utrošak vremena.

Glavni je farmaceutsko-tehnološki izazov povezan s teško topljivim djelatnim tvarima razviti vrlo jednostavan farmaceutski oblik koji će zadovoljavajuće povećati topljivost lijeka, odnosno poboljšati njegovu bioraspoloživost uz smanjenje učestalosti nuspojava. Upravo tehnologija nanokristala u velikoj mjeri osigurava prevladavanje opisanih nedostataka i u tome svijetlu ne čudi niti relativno veliki broj lijekova koji su izrađeni primjenom takve tehnologije. U odnosu na druge terapijske nanosustave, gdje je omjer djelatne tvari prema drugim sirovinama koje čine nanonosaj nepovoljan zbog niskog uklapanja, nanokristali djelatne tvari građeni su gotovo u potpunosti od djelatne tvari, dok samo mali dio takvih nanosustava čine pomoćne tvari (stabilizatori) koji su odobreni za izradu lijekova. Uz vrlo mali udio sigurnih pomoćnih tvari, izrada lijeka korištenjem nanokristala djelatne tvari jednostavno se prilagođava laboratorijskom i industrijskom mjerilu (10 mg – 500 kg) i osigurava relativno brzi razvoj konačnog farmaceutskog oblika.

NAČELA IZBORA DJELATNIH TVARI ZA OBRADU TEHNOLOGIJOM NANOKRISTALA

Biofarmaceutska klasifikacija djelatnih tvari

Načela izbora djelatnih tvari za obradu tehnologijom nanokristala osnivaju se na predviđanju koraka koji ograničava bioraspoloživost djelatne tvari pri određenom putu primjene. Najveći iskorak učinjen je na području oralne primjene za koju je

razvijen biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari (engl. *Biopharmaceutics Classification System*; BCS) prema kojem su djelatne tvari klasificirane u četiri biofarmaceutske skupine na osnovu topljivosti i permeabilnosti; I. BCS skupina (dobro topljive, dobro permeabilne); II. BCS skupina (slabo topljive, dobro permeabilne); III. BCS skupina (dobro topljive, slabo permeabilne); IV. BCS skupina (slabo topljive, slabo permeabilne). Djelatna tvar se smatra dobro topljivom ako se najveća doza djelatne tvari otapa u ≤ 250 mL vodenog medija u pH području 1,2–6,8 pri 37 °C. Djelatna tvar se smatra dobro permeabilnom ako je obim intestinalne apsorpcije ≥ 90 %. Za procjenu obima intestinalne apsorpcije moguće je koristiti *in vitro* (primjerice, Caco-2 ili MDCK stanične linije) i *ex vivo* modele intestinalnih barijera. Dozni broj (D_0) djelatne tvari označava omjer između koncentracije djelatne tvari u 250 mL vodenog medija i topljivosti djelatne tvari u vodi. Kada je $D_0 \leq 1$, tada se djelatna tvar smatra dobro topljivom; kada je $D_0 > 1$ djelatna tvar je slabo topljiva. LogP služi za osnovno razvrstavanje djelatnih tvari prema permeabilnosti. Djelatne tvari s vrijednostima LogP većima od LogP metoprolola (LogP 1,72) smatraju se dobro permeabilnim. BCS je prihvaćen od strane regulatornih tijela (Europske agencije za lijekove – EMA; Američke agencije za hranu i lijekove – FDA; Svjetske zdravstvene organizacije – WHO) u postavljanju bioekvivalencijskih standarda za odobravanje oralnih pripravaka trenutnog oslobađanja djelatne tvari. Bioekvivalenciju većine odobrenih oralnih pripravaka trenutnog oslobađanja djelatne tvari moguće je pouzdano procijeniti relativno jednostavnim *in vitro* ispitivanjima, naspram dugotrajnih i skupih kliničkih ispitivanja. WHO je proširila navedenu primjenu na određene djelatne tvari II. BCS skupine, dok WHO i EMA odobravaju BCS primjenu za neke djelatne tvari III. BCS skupine (1).

Istodobno, od 1995. kada je BCS objavljen (2) učinjena su značajna poboljšanja u ranim fazama razvoja farmaceutskog oblika lijeka. Općenito, djelatne tvari I. i III. BCS skupine zahtijevaju relativno jednostavniji formulacijski pristup, dok je formulacijski pristup za djelatne tvari II. i IV. BCS skupine znatno složeniji (3). BCS je moguće u gruboj procjeni koristiti i pri razvoju farmaceutskih oblika za različite neparenteralne putove primjene djelatne tvari, a pri tome uvažavajući specifičnosti svakog pojedinačnog puta primjene (4).

Za slabo topljive i dobro permeabilne djelatne tvari II. BCS skupine koriste se različiti farmaceutsko-tehnološki pristupi poboljšanja topljivosti; primjerice, prilagodba kristalnog oblika djelatne tvari (priprava topljivijih kristalnih polimorfa, kristalnih soli ili kokristala), prilagodba pH oblika, izrada farmaceutskih oblika trenutnog oslobađanja djelatne tvari uz dodatak solubilizatora, izrada farmaceutskih oblika koji se osnivaju na lipidima (npr. samoemulgirajući sustavi, meke kapsule s uljnom otopinom ili suspenzijom djelatne tvari), prevođenje djelatne tvari u amorfnu stanje, uklapanje djelatne tvari u ciklodekstrinske komplekse. Nadalje, vrlo značajan pristup

poboljšanja topljivosti II. BCS skupine je smanjenje veličine čestica djelatne tvari. Mikronizacija je postupak koji se rutinski primjenjuje u farmaceutskoj industriji i kojim se veličina čestica djelatne tvari smanjuje do raspona veličina 1–50 μm , korištenjem mlinova s čekićima te kugličnih ili mlaznih mlinova. Postupkom mikronizacije u određenoj se mjeri povećava brzina otapanja teško topljive djelatne tvari, ali je učinak na njezinu bioraspoloživost često ograničen. U novije vrijeme veličinu čestica teško topljive djelatne tvari moguće je smanjiti do nanometarskog raspona dimenzija (< 1000 nm) različitim postupcima nanonizacije, a tako obrađene djelatne tvari nazivamo nanokristalima. U pravilu je postupcima nanonizacije moguće izraditi i produkt u amorfnom stanju pri čemu se tada naglašava da se radi o amorfnim nanočesticama djelatne tvari. Ipak, termin nanokristali djelatne tvari je više uvriježen, a iz konteksta je moguće zaključiti radi li se o nanokristalima djelatne tvari ili o amorfnim nanočesticama djelatne tvari (3, 5).

Razvojno-formulacijska klasifikacija djelatnih tvari

Korištenje BCS klasifikacije u razvoju farmaceutskog oblika djelatne tvari ponekad previše pojednostavljuje složenu prirodu biofarmaceutskih svojstava djelatne tvari i nedovoljno uzima u obzir specifične biorelevantne uvjete na mjestu apsorpcije. Slabo topljive djelatne tvari ponekad imaju toliku nisku topljivost da je brzina njihovog otapanja, čak i s površine vrlo malih nanokristala (< 100 nm), izrazito spora. U tom slučaju nije moguće postići dovoljno visoku koncentraciju djelatne tvari na mjestu apsorpcije niti zadovoljavajuću apsorpciju, a dodatni čimbenici (npr. efluksni transporteri i/ili metabolički enzimi na mjestu apsorpcije) dodatno smanjuju apsorpciju. Zbog toga je razvijen novi sustav koji djelatne tvari klasificira u nešto drugačije kategorije, ovisno o tome je li bioraspoloživost djelatne tvari ograničena brzinom otapanja, topljivošću ili permeabilnošću. Takva se klasifikacija naziva razvojno-formulacijska klasifikacija (engl. *Developability Classification System*; DCS), a djelatne tvari unutar II. BCS skupine klasificira na one čija je bioraspoloživost ograničena brzinom otapanja (DCS IIa) i one čija je bioraspoloživost ograničena topljivošću (DCS IIb). Bioraspoloživost djelatnih tvari IIb. DCS skupine moguće je povećati tehnikama povećanja topljivosti, najčešće solubilizacijom, ciklodekstrinskom kompleksacijom ili prilagodbom kristalnog oblika djelatne tvari. Za djelatne tvari IIa. DCS skupine bioraspoloživost je u izravnoj korelaciji s brzinom otapanja *in vivo*. Frakcija primijenjene doze koja se otopi na mjestu apsorpcije vrlo se brzo apsorbira pa je bioraspoloživost takvih djelatnih tvari moguće poboljšati farmaceutsko-tehnološkim tehnikama povećanja brzine otapanja, odnosno prilagodbom kristalnog oblika djelatne tvari (primjerice, korištenjem tehnike sušenja raspršivanjem ili ekstruzije taljenjem) i/ili obradom djelatne tvari korištenjem tehnologije nanokristala (6–7).

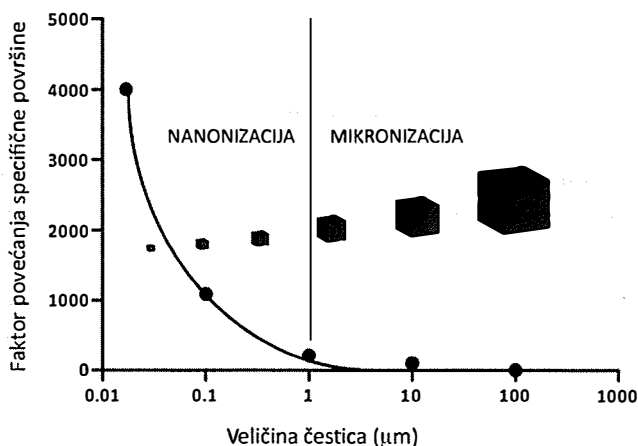
FIZIČKO-KEMIJSKA SVOJSTVA NANOKRISTALA DJELATNE TVARI

Brzina otapanja krutina u otapalu dc_x/dt može se opisati Noyes-Whitneyjevom jednadžbom:

$$\frac{dc_x}{dt} = k \times A \times (c_s - c_x)$$

gdje je k konstanta brzine otapanja (tzv. intrinzička konstanta koja uključuje viskoznost otopine; što je veća viskoznost manja je brzina otapanja), A specifična površina krutine koja se otapa, c_s topljivost krutine, a c_x koncentracija djelatne tvari u otopini u vremenu t . Iz Noyes-Whitneyjeve jednadžbe moguće je opaziti da će se umjereno topljiva tvar otapati sporije od lako topljive te da se pred kraj procesa otapanja značajno usporava otapanje (8).

Smanjivanjem veličine čestica krutine djelatne tvari povećava se broj čestica i specifična površina krutine, dok se istodobno smanjuje promjer čestica krutine (slika 1).



Slika 1. Povećanje specifične površine praškastog materijala pri smanjenju veličine čestica krutine djelatne tvari do nanometarskih dimenzija (9).

Smanjivanjem veličine jedne makročestice krutine djelatne tvari promjera 100 μm na promjer od 10 μm standardnim postupkom mikronizacije, u sustavu od jedne makročestice nastaje 1000 mikročestica pri čemu se istodobno 10 puta povećava specifična površina krutine djelatne tvari. Međutim, ako se umjesto postupka mikronizacije primijeni postupak nanonizacije i veličina jedne makročestice promjera 100 μm smanji do veličine od 200 nm, tada u sustavu od jedne makročestice nastaje 125 000 000 nanočestica pri čemu se istodobno 5 000 puta povećava specifična površina krutine djelatne tvari, a promjer čestice smanjuje 500 puta (10). Iz Noyes-Whitneyjeve jednadžbe je jasno da je brzina otapanja krutine djelatne tvari to veća što je

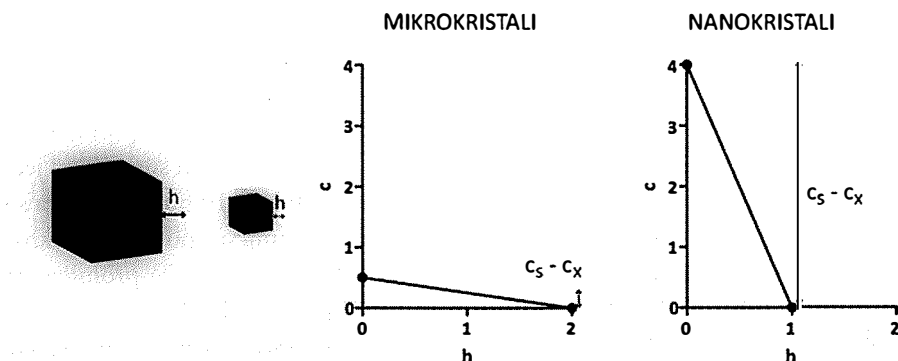
veća specifična površina krutine s koje se odvija proces otapanja. S obzirom na vrlo veliku razliku u specifičnoj površini krutine mikronizirane i nanonizirane djelatne tvari, moguće je *a priori* pretpostaviti značajno veću brzinu otapanja nanonizirane krutine djelatne tvari u odnosu na mikroniziranu krutinu iste djelatne tvari. Tako značajno povećanje specifične površine krutine djelatne tvari vrlo povoljno utječe i na njezina biofarmaceutska svojstva (adhezivnost i vrijeme zadržavanja na mjestu apsorpcije te varijacije u bioraspoloživosti nakon oralne primjene), a koja će također biti opisana u ovom radu.

Drugo važno fizičko-kemijsko svojstvo krutine djelatne tvari usitnjene do nanometarskih dimenzija je smanjenje debljine stacionarnog difuzijskog sloja otapala h oko nanokristala u usporedbi s mikro- i makrokristalima krutine djelatne tvari. Naime, Noyes-Whitneyjeva jednadžba izvedena je na osnovu predodžbe da oko čestice krutine postoji tanki stacionarni difuzijski sloj otapala u kojem koncentracija otopljenе djelatne tvari linearno opada od najveće na površini čestice c_s do najmanje c_x na udaljenosti h od površine pri čemu je konstanta brzine otapanja k definirana omjerom prividnog koeficijenta difuzije tvari u otapalu D i debljinom stacionarnog difuzijskog sloja otapala h . Prema tome Noyes-Whitneyjevu jednadžbu moguće je pisati i u obliku:

$$\frac{dc_x}{dt} = A \times D \times \left(\frac{c_s - c_x}{h} \right)$$

Smanjena debljina stacionarnog difuzijskog sloja otapala h oko nanokristala rezultira značajnim povećanjem koncentracijskog gradijenta pri procesu otapanja nanokristala djelatne tvari, odnosno $(c_s - c_x/h)_{\text{nanokristala}} \gg (c_s - c_x/h)_{\text{mikrokristala}}$ (11), a što je zorno prikazano slikom 2.

Treće važno fizičko-kemijsko svojstvo krutine djelatne tvari usitnjene do nanometarskih dimenzija je povećanje topljivosti c_s . Topljivost je općenito definirana kao konstantna vrijednost pojedine tvari u određenom otapalu pri stalnoj temperaturi.



Slika 2. Smanjena debljina stacionarnog difuzijskog sloja otapala h i povećan koncentracijski gradijent $(c_s - c_x/h)$ (9).

Međutim, usitnjavanjem takve tvari do nanometarskog raspona dimenzija njezina topljivost se povećava, a što je moguće objasniti Ostwald-Freundlichovom jednačinom koja opisuje odnos između topljivosti krute tvari i njezine veličine čestica:

$$\log \frac{c_s}{c_x} = \frac{2\sigma V}{2,303RT \rho r}$$

gdje je c_s topljivost krutine, c_x koncentracija otopine u vremenu t , σ površinska napetost na graničnoj površini čvrsto/tekuće, V molarni volumen čestica krutine, R opća plinska konstanta, T termodinamička temperatura, ρ gustoća krutine, r polumjer čestica krutine. Iz Ostwald-Freundlichove jednačine je jasno da se smanjenjem veličine čestica krutine (r) povećava njezina topljivost (c_s). Pored ovisnosti o veličini čestica krutine, topljivost tvari također se mijenja ovisno o strukturi kristalne rešetke tvari, odnosno energiji kristalne rešetke. Topljivost se kristalnih polimorfa povećava s povećanjem energije kristalne rešetke i smanjenjem njihovog tališta. Istodobno, tvari u amorfnom stanju karakterizirane su boljom topljivošću u odnosu na tvari u kristaliničnom stanju jer je slobodna energija kristalnog oblika uvijek manja od slobodne energije amornog oblika (12).

U konačnici je moguće zaključiti da je povećanje brzine otapanja nanokristala djelatne tvari (dc_x/dt) posljedica velike specifične površine (A), poboljšane topljivosti (c_s) i relativno male debljine stacionarnog difuzijskog sloja otapala (h), odnosno povećanog koncentracijskog gradijenta ($c_s - c_x/h$), a što je sve razvidno iz Noyes-Whitneyjeve jednačine otapanja krutina.

FARMACEUTSKO-TEHNOLOŠKI POSTUPCI OBRADE DJELATNIH TVARI U OBLIK NANOKRISTALA

Metode izrade nanokristala djelatne tvari

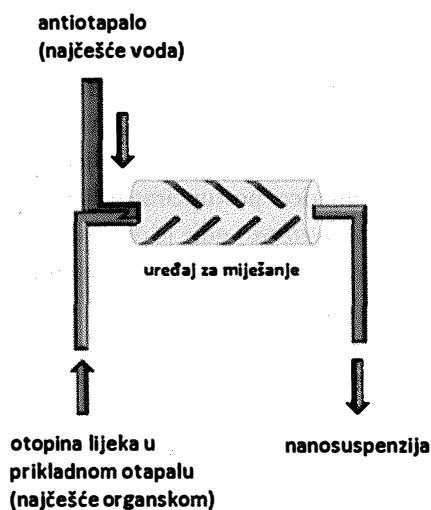
Farmaceutsko-tehnološke metode izrade nanokristala djelatne tvari moguće je podijeliti u dvije glavne skupine: (i) metode smanjenja veličine čestica (engl. *top-down methods*) gdje je ishodna krutina djelatne tvari sastavljena od čestica većih dimenzija koje je potrebno smanjiti (primjerice, postupcima mljevenja); (ii) metode povećanja veličine čestica (engl. *bottom-up methods*) gdje je djelatna tvar molekularno otopljen u prikladnom otapalu, a povećavanje veličine čestica do nanometarskog raspona dimenzija postiže se najčešće taloženjem uz antiotapalo.

Metode povećanja veličine čestica djelatne tvari

Izrada nanokristala djelatne tvari metodom taloženja relativno je jednostavna metoda nakon što se odrede uvjeti taloženja. Metoda se sastoji u izradi otopine djelatne tvari u otapalu u kojem je takvu djelatnu tvar moguće relativno dobro otopiti, a najčešće je riječ o različitim organskim otapalima. Nakon toga se otopina djelatne

tvari miješa s antiotapalom. Antiotapalo se mora miješati s otapalom u kojem je otopljena djelatna tvar, ali djelatna tvar ne smije biti topljiva u antiotapalu. Kao antiotapala najčešće se koriste voda, etanol ili aceton. Miješanje otopine djelatne tvari i antiotapala provodi se u uređajima za miješanje koji se osnivaju na rotaciji, mlaznom miješanju (engl. *liquid jets*) ili višekanalnom vrtložnom miješanju (engl. *multi-inlet vortex mixing*). U superzasićenoj otopini djelatne tvari u smjesi otapala i antiotapala vrlo brzo nastupa nukleacija, odnosno stvaraju se najmanji kristalni entiteti (jezgre). Miješanjem se ubrzava molekulska difuzija djelatne tvari i prijenos mase u sustavu, a energija dovedena u sustav pri takvom tehnološkom postupku (primjerice, brzina miješanja, vrijeme soniciranja/ultrasoniciranja) značajno utječu na procese nukleacije i daljnjeg rasta kristala, a pored ostalih uvjeta taloženja (primjerice, koncentracija djelatne tvari u otapalu, volumni odnos antiotapala prema otopini djelatne tvari, temperatura, dodatak stabilizatora). Taloženje djelatne tvari moguće je izazvati i superkritičnim fluidima (primjerice, superkritičnim ugljikovim dioksidom), ultrazvučnim valovima, kontroliranim uklanjanjem otapala i kemijskim reakcijama acidobazne neutralizacije. Metodama taloženja moguće je izraditi kristalne ili amorfne nanočestice djelatne tvari. Amorfne nanočestice djelatne tvari izradene zaštićenom tehnologijom Nanomorph™ (sada Soliqs/Abbvie; prije Knoll/BASF) imaju bolju topljivost i značajno veću brzinu otapanja u usporedbi s kristalničnim nanočesticama iste djelatne tvari. Nedostatak amornih nanočestica djelatne tvari je sklonost djelomičnoj ili potpunoj rekristalizaciji, a što se negativno odražava na njezinu bioraspoloživost (13–14).

Glavni su nedostaci izrade nanokristala metodom taloženja složenost kontrole takvog postupka i uspostavljanje uvjeta kontroliranog taloženja te mogućnost zaostajanja



Slika 3. Shematski prikaz postupka izrade nanokristala djelatne tvari metodom taloženja(15).

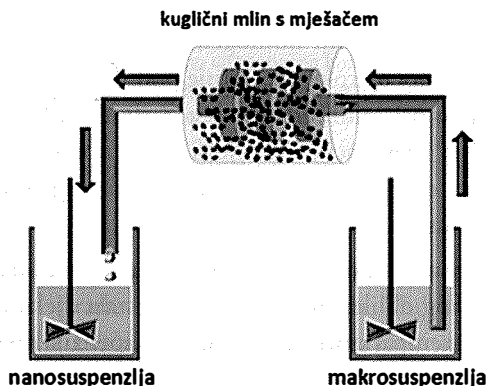
male količine organskog otapala u konačnom pripravku. Trenutno nema odobrenih lijekova koji se osnivaju na ovoj tehnologiji izrade nanokristala djelatne tvari. Premda je ova metoda izrade nanokristala relativno jednostavna, prilagođavanje laboratorijskih uvjeta taloženja industrijskom mjerilu za sada ostaje neriješen problem. Primjerice, brzina taloženja djelatne tvari prilično je različita u uvjetima laboratorijskog mjera (npr. kada se radi s volumenima od 1 L) u usporedbi s brzinom taloženja pri industrijskoj proizvodnji (npr. u spremnicima od 1000 L); miješanje je otopine djelatne tvari s antiotapalom znatno brže u manjim volumenima, a što uvelike utječe na kontrolu procesa taloženja te veličinu i raspodjelu veličina čestica konačne nanosuspenzije (15).

Metode smanjenja veličine čestica djelatne tvari

Metoda vlažnog mljevenja

Vlažno mljevenje (engl. *wet milling*) najviše je korištena metoda izrade nanokristala djelatne tvari u farmaceutskoj industriji. U najjednostavnijoj opciji koristi se postupak niskoenergetskog vlažnog mljevenja (engl. *low energy wet ball milling*). Sustav se puni djelatnom tvari u mikroniziranom obliku koja je dispergirana u disperzijskom sredstvu uz dodatak najmanje jednog stabilizatora. Mljevenjem (pomoću kuglica i mješača) djeluje se smičnim naprezanjem na velike čestice suspendirane djelatne tvari. Proces ovisi o čvrstoći čestica djelatne tvari, utrošku energije, vremenu mljevenja i koncentraciji stabilizatora. Potrebno je 3–4 ciklusa mljevenja kako bi se smanjila veličina čestica na prosječno 500 nm. S ciljem smanjenja udjela čestica > 1 μm za npr. parenteralnu primjenu potrebno je najčešće 6–10 ciklusa mljevenja (7, 15).

Alternativa opisanom postupku je visokoenergetsko vlažno mljevenje (engl. *high energy wet ball milling*) koje je zbog manjeg utroška vremena industrijski prikladnije, a NanoCrystal® tehnologija (NanoSystems/élan) temelji se na ovom principu. Danas



Slika 4. Shematski prikaz postupka izrade nanokristala djelatne tvari metodom vlažnog mljevenja (15).

je visokoenergetsko vlažno mljevenje standardni postupak proizvodnje nanosuspenzije djelatne tvari. Suspenzija djelatne tvari se pomoću crpke potiskuje iz spremišne komore u komoru za mljevenje. Tijekom relativno kratkog perioda čestice djelatne tvari izlažu se utjecaju visoke energije. Smanjenje je veličine čestica djelatne tvari rezultat djelovanja sila smicanja i tlaka unutar komore za mljevenje. Visokoenergetski mlinovi zahtijevaju poseban materijal za mljevenje koji mora biti kompatibilan s drugim komponentama uređaja. Korištenje kuglica od cirkonijeva oksida može rezultirati onečišćenjem nanosuspenzije djelatne tvari zbog abrazije kuglica i/ili drugih dijelova uređaja. Zbog toga se kao materijal za mljevenje koriste kuglice načinjene od visoko umreženog polistirena izrazito elastičnih svojstva. Komercijalni se NanoCrystal® proces izvodi korištenjem specijaliziranog PolyMill™ materijala (polistirenske kuglice promjera 0,5 mm).

Prilagodljivost uzorku vjerojatno je najveća prednost opisanih postupaka mljevenja. Gotovo se svaka djelatna tvar može usitniti do nanometarskog raspona dimenzija korištenjem vlažnog mljevenja. Ipak, gustoća cirkonijevog oksida od kojega su često izgrađene kuglice materijala za mljevenje je 6 g/cm^3 što povećava težinu industrijske izvedbe uređaja za vlažno mljevenje. Nadalje, 70 % volumena spremnika uređaja za vlažno mljevenje napunjeno je materijalom za mljevenje, dok samo 30 % volumena ostaje raspoloživo za suspenziju djelatne tvari, a što prilično ograničava kapacitet ovog postupka u industrijskom smislu (7, 15–16).

Metoda visokotlačnog homogeniziranja

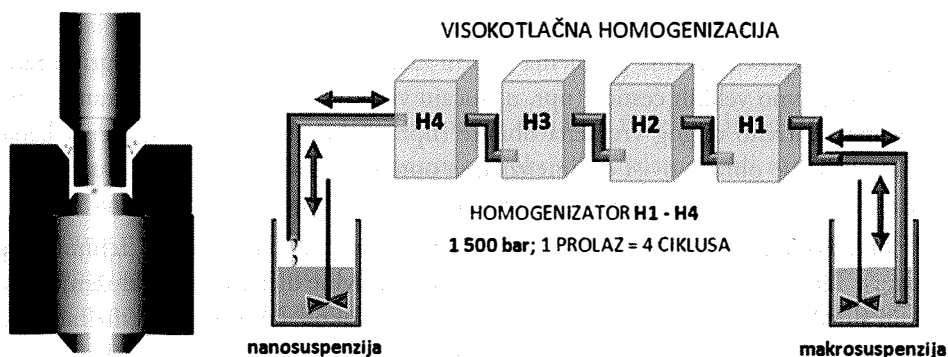
Metoda visokotlačnog homogeniziranja sljedeći je važan postupak proizvodnje nanokristala djelatne tvari. Tri su osnovne tehnologije obuhvaćene takvom metodom: mikrofluidizacija (IDD-P™ tehnologija) (SkyePharma Canada), homogenizacija na principu klipa i uskog otvora (eng. piston gap homogenization) u vodenom (DissoCubes® tehnologija) (SkyePharma) ili nevodenom mediju (Nanopure® tehnologija) (PharmaSol).

Tehnologija mikrofluidiziranja podrazumijeva proces smanjenja veličine čestica koji je temeljen na parno-mlaznom homogeniziranju (eng. jet steam homogenization). Djelatna se tvar pomoću crpke protiskuje pod tlakom od 1700 bar kroz sustav mikrofluidizatora. U komori mikrofluidizatora Z ili Y tipa čestice djelatne tvari se uslijed kolizije, smicanja i kavitacije smanjuju do nanometarskih dimenzija. Zbog relativno malog utroška energije, za uspješnu nanonizaciju potrebno je 50 ili više mikrofluidizacijskih ciklusa (11).

Tehnologija temeljena na korištenju klipa i uskog otvora naziva se DissoCubes™ tehnologija zbog kubičnog oblika izrađenih nanokristala djelatne tvari. Takvom tehnologijom se pri sobnoj temperaturi izrađuje nanosuspenzija djelatne tvari u vodenoj sredini. Princip je izrade relativno jednostavan i sličan vlažnom mljevenju. Ishodna djelatna tvar se predobrađuje visokoturažnim miješanjem. Potom suspenzija djelatne

tvori prolazi nekoliko visokotlačnih homogenizacijskih ciklusa, a najčešće se homogenizira suspenzija djelatne tvari s udjelom disperzne faze 10–20 %. Tlak obično postupno raste od 10 % do 100 % kako bi se izbjeglo začepljenje uskog otvora homogenizatora (5–20 μm), a s istim ciljem se provodi i preobrada suspenzije. Primijenjeni tlak iznosi između 1000 i 2000 bar (Möschwitzer, 2013). Ako se proces odvija pri sobnoj temperaturi, stvaraju se mjehuri uslijed vrenja vode. Mjehuri implodiraju nakon prolaska suspenzije kroz uski otvor, a tim procesom stvaranja i implodiranja mjehura smanjuje se veličina čestica djelatne tvari zbog kavitacije. Za smanjenje su veličine čestica također odgovorne sile smičnog naprezanja i kolizija čestica (11).

Nanopure[®] tehnologija razvijena je 1999. godine u Berlinu (PharmaSol). Homogeniziranje se osniva na principu klipa i uskog otvora, ali proces se odvija u nevedenom ili mediju sa smanjenim udjelom vode, čime je smanjena mogućnost hidrolize djelatne tvari. Proces se odvija pri nižim tlakovima i temperaturama zbog čega je izbjegnuta kavitacija, a sile smičnog naprezanja i kolizija čestica dovoljne su za zadovoljavajuće smanjenje veličine. Niže temperature omogućuju obradu termolabilnih uzoraka (11).



Slika 5. Shematski prikaz postupka izrade nanokristala djelatne tvari metodom visokotlačnog homogeniziranja na principu klipa i uskog otvora: suspenzija čestica djelatne tvari prolazi kroz mali otvor ($\approx 5 \mu\text{m}$) pod tlakom ($\approx 1500 \text{ bar}$), jake sile smicanja i vrtložni protok smanjuju veličinu čestica djelatne tvari do nanometarskih dimenzija; shematski su prikazana četiri serijski spojena visokotlačna homogenizatora pri čemu se jednim prolazom obavljaju četiri homogenizacijska ciklusa, a što skraćuje vrijeme izrade; primjerice, ako se koristi komercijalno dostupan homogenizator kapaciteta 1 000 kg/h za obradu jedne tone nanosuspenzije potrebno je utrošiti 20 sati, odnosno provesti 20 homogenizacijskih ciklusa; dok se u slučaju povezivanja 4 takva homogenizatora u seriju vrijeme obrade nanosuspenzije skraćuje na 5 sati (12, 15).

Metoda visokotlačnog homogeniziranja primjenjuje se u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji za izradu liposoma i emulzija. Multifunktionalnost relativno skupe opreme predstavlja značajnu prednost, a farmaceutsko-tehnološki oblik definira tip korištenog homogenizatora. Dodatni čimbenici koji određuju procesne uvjete su vrsta i čvrstoća ishodne sirovine te maksimalni tlak koji uređaj može postići (veći

tlak osigurava brže usitnjavanje). Mogućnosti onečišćenja produkta izrađenog visokotlačnim homogeniziranjem uslijed abrazije materijala uređaja znatno su manje u usporedbi s produktom koji je izrađen vlažnim mljevenjem. Iako se koriste uglavnom čelični dijelovi, zabilježena onečišćenja gotovo su zanemariva. Usporedna su ispitivanja pokazala da je nanosuspenzija nakon 20 prolaska kroz homogenizator uz tlak od 1500 bar onečišćena s manje od 1 ppm željeza. Abrazija materijala opreme moguća je u slučajevima kada se obrađuje izrazito tvrd materijal u homogenizatorima koji rade na principu klipa i uskog otvora. Vrh je vijka homogenizatora relativno male površine u usporedbi s volumenom suspenzije koja prolazi kroz uski otvor. Zbog toga moderni homogenizatori imaju vijke s keramičkim vrhovima koji mogu izdržati procesne uvjete.

Za razliku od vlažnog mljevenja, učinkovitost smanjenja veličine čestica visokotlačnim homogeniziranjem više ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima djelatne tvari, a raspodjela je veličina čestica izrađenog produkta varijabilnija. Moguće je općenito reći da je visokotlačna homogenizacija metoda izbora za relativno meke sirovine koje bi imale tendenciju razmazivanja u slučaju obrade nekom drugom metodom, primjerice vlažnim mljevenjem (7, 16).

Kombinirani postupci

S ciljem prevladavanja problema u vidu začepjenja dijelova uređaja pri obradi sirovina relativno velikih čestica (npr. u slučaju visokotlačnog homogeniziranja) i/ili problema relativno dugog vremena obrade (npr. u slučaju vlažnog mljevenja kada ukupno vrijeme obrade ovisi o dimenzijama opreme i značajno se povećava u proizvodnji velikih serija), razvijene su kombinirane tehnologije.

Prvi kombinirani postupak zaštićen je pod nazivom NanoEdge™ tehnologija (Baxter). Takva tehnologija uključuje predobradu sirovine djelatne tvari taloženjem, a potom slijedi postupak smanjenja veličine čestica visokotlačnim homogeniziranjem. Veliki je nedostatak takvog postupka prisutnost nevodenog medija u konačnoj nanosuspenziji. Nevodeno se otapalo može ponašati kao suotapalo i tako nepovoljno utjecati na stabilnost konačnog oblika. U većini je slučajeva nevodeno otapalo potrebno ukloniti kako bi se izbjegao problem Ostwaldovog zrenja nanosuspenzije. S ciljem rješavanja ovog problema, razvijeni su alternativni kombinirani postupci koji su zaštićeni pod nazivom smartCrystal® tehnologija (Soliqs/Abbvie). Tehnologija obuhvaća predobradu sirovine sušenjem raspršivanjem (H42 postupak), taloženjem (H69 postupak), liofilizacijom (H96 postupak) ili vlažnim mljevenjem (CT postupak), a nakon čega slijedi glavni postupak visokotlačnog homogeniziranja (HPH postupak). Primjerice, uklanjanjem organskog otapala sušenjem raspršivanjem izrađuje se fini početni materijal koji se visokotlačnim homogeniziranjem učinkovito usitnjava isključivo u vodenom disperzijskom sredstvu. Predobrada sirovine postupkom liofilizacije prikladna je za termolabilne materijale ili kad je potrebno izraditi vrlo male čestice nanokristala skupe djelatne tvari. Takvi pristupi znatno skraćuju vrijeme glavnog

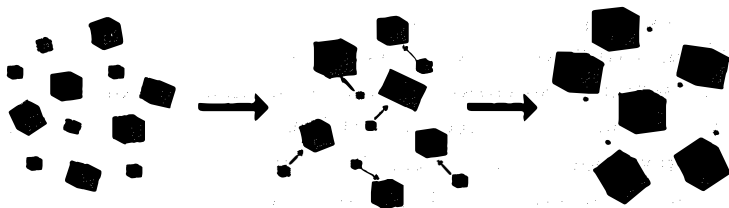
postupka visokotlačnog homogeniziranja, a izrađena nanosuspenzija je poboljšane fizičke stabilnosti i sadrži čestice manje od 100 nm. Budući da je takav pristup relativno nov, nisu u potpunosti poznati čimbenici koji utječu na poboljšanje smanjenja veličine čestica, ali čini se da prilagodba kristalnog oblika djelatne tvari i/ili prevodnje djelatne tvari u amorfno stanje imaju ključnu ulogu. Treba imati na umu da svaki dodatni procesni korak pridonosi složenosti postupka obrade djelatne tvari i tako značajno povećava troškove proizvodnje. Zbog toga se kombinirani postupci koriste samo ako nije moguće primijeniti relativno rutinske postupke kao što su vlažno mljevenje ili visokotlačno homogeniziranje (7, 14, 16).

Poboljšanje stabilnosti nanosuspenzije djelatne tvari

Postupcima nanoniziranja krutine djelatne tvari značajno se povećava specifična površina takve sirovine pri čemu je granična površina čvrsto/tekuće kao i slobodna Gibbsova energija nanosuspenzije značajno povećana. Uslijed toga nanosuspenzije su termodinamički nestabilni sustavi s izraženom tendencijom stvaranja nakupina primarnih nanokristala (aglomerata) ili rasta kristala. Upravo su glavna ograničenja primjene tehnologije nanokristala u farmaceutskoj industriji povezana uz probleme stabilnosti izrađene nanosuspenzije djelatne tvari. Ostwaldov mehanizam zrenja nanosuspenzije i aglomeracija nanokristala djelatne tvari glavni su uzročnici nestabilnosti nanosuspenzije.

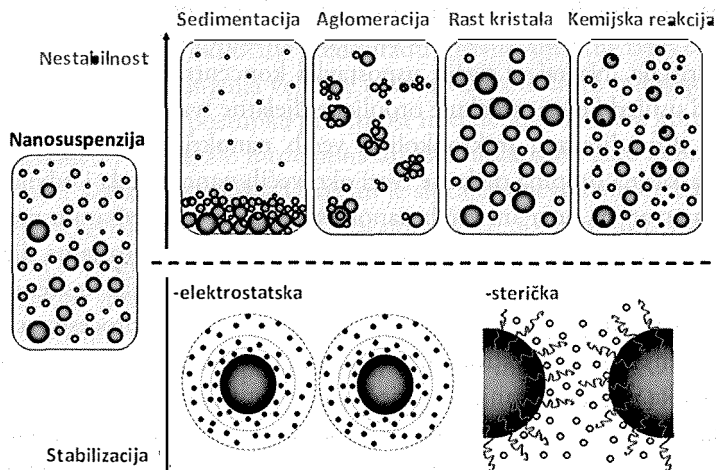
Problemi stabilnosti nanosuspenzija djelatne tvari pri izradi i čuvanju

Kada su u nanosuspenziji prisutni nanokristali djelatne tvari različitih veličina unutar nanometarskog raspona dimenzija, manji nanokristali se otapaju brže i bolje u odnosu na veće nanokristale. Zbog toga je oko manjih nanokristala veća koncentracija otopljene djelatne tvari u odnosu na koncentraciju otopljene djelatne tvari oko većih nanokristala. Na taj se način uspostavlja koncentracijski gradijent otopljene djelatne tvari uslijed kojeg molekule otopljene djelatne tvari iz mikrookoline manjih nanokristala difundiraju u mikrookolinu većih nanokristala. Uslijed tog procesa stvara se prezasićena otopina djelatne tvari oko većih nanokristala i odvija se kristalizacija djelatne tvari na površini većih nanokristala (slika 6). Opisanim mehanizmom povećava se veličina nanokristala u polidisperznim nanosuspenzijama djelatne tvari koji se naziva Ostwaldov mehanizam zrenja nanosuspenzije. Takvo zrenje može biti izraženo već pri samoj izradi nanosuspenzija (primjerice, procesna učinkovitost metoda smanjenja veličine čestica može biti značajno smanjena) ili tijekom skladištenja takvih oblika. Ograničavanje ili sprječavanje Ostwaldovog zrenja nanosuspenzije važan je aspekt razvoja nanosuspenzijskih farmaceutskih oblika. Opisani problem moguće je riješiti korištenjem stabilizatora, izradom relativno homogenih nanosuspenzija ili izradom suhih farmaceutskih oblika postupcima liofilizacije ili sušenja raspršivanjem, a koji se neposredno prije primjene (*ex tempore*) prevode u nanosuspenzije (17).



Slika 6. Shematski prikaz Ostwaldovog mehanizma zrenja nanosuspenzije; polidisperzna nanosuspenzija sadrži nanokristale djelatne tvari različitih veličina unutar nanometarskog raspona, manji nanokristali se bolje i brže otapaju u odnosu na veće nanokristale pa se uspostavlja koncentracijski gradijent zbog kojega otopljena djelatna tvar difundira i taloži se na površini većih nanokristala djelatne tvari, a što u konačnici rezultira povećanjem veličine čestica nanosuspenzijama (18).

Drugi uobičajeni problemi stabilnosti nanosuspenzija odnose se na procese aglomeracije, taloženja i kemijske razgradnje nanokristala djelatne tvari (slika 7). Flokulacija nanosuspenzija rezultat je privlačnih međudjelovanja čestica nanokristala pri čemu nastaju aglomerati nanokristala. Najčešće je posljedica složenih zbijanja koja su usko povezana sa svojstvima površine nanokristala, prirodom korištenog stabilizatora i načinima međudjelovanja. Flokulacija je najčešće posljedica nakupljanja čestica nanokristala uslijed adsorpcije stabilizatora na površinu nanokristala i/ili neutraliziranja naboja na površini nanokristala. Taloženje nanosuspenzije krajnji je slučaj njezine fizičke nestabilnosti. U trenutku kada sila gravitacije aglomerata nanokristala nadvlada silu uzgona disperzijskog sredstva nastupa taloženje disperzne nanosuspenzijske faze. Takvo taloženje je u pravilu ireverzibilne prirode, a nastali talog nije moguće redispersirati (17).



Slika 7. Shematski prikaz mogućih procesa koji rezultiraju fizičkom (aglomeracija, taloženje, rast kristala Ostwaldovim mehanizmom zrenja nanosuspenzije) i kemijskom (razgradnja djelatne tvari) nestabilnošću djelatne tvari u obliku nanosuspenzije, kao i načina povećanja stabilnosti nanokristala mehanizmima ionske ili steričke stabilizacije (19).

Premda se u novije vrijeme razvijaju postupci izrade nanosuspenzije djelatne tvari u nevodenoj sredini, većinom današnjih postupaka izrađuju se vodene ili nanosuspenzije u smjesi vodenog i nevodenog disperzijskog sredstva. U takvoj sredini kemijske reakcije razgradnje djelatne tvari, prvenstveno foto/hidrolizom i (foto)oksidacijom, predstavljaju značajan problem kojim je kemijska stabilnost i rok valjanosti djelatne tvari ograničen. Rješenje je navedenih problema izrada nanosuspenzija vrlo visokog udjela nanokristala djelatne tvari ili izrada suhih nanosuspenzija. U određenim slučajevima postupci oblaganja nanokristala djelatne tvari sredstvima za stabiliziranje pridonose povećanju kemijske stabilnosti nanosuspenzija (primjerice, u slučaju obloženih nanokristala omeprazola, kvercetina i kurkumina) jer su molekule djelatne tvari unutar nanokristalne čestice zaštićene od utjecaja vodene sredine slojem stabilizatora adsorbiranog na površini nanokristala (17).

Oblaganje sredstvima za stabiliziranje

S ciljem povećanja stabilnosti nanosuspenzija, nanokristali djelatne tvari oblažu se sredstvima za stabiliziranje. Najčešće se koriste površinski aktivne tvari (PAT) koje povećavaju stabilnost nanosuspenzija elektrostatskom stabilizacijom ili polimerni stabilizatori koji povećavaju stabilnost nanosuspenzija steričkom stabilizacijom. Izbor prikladne vrste te omjera stabilizatora i nanokristala djelatne tvari u sustavu kritični su čimbenici postizanja učinkovite stabilizacije nanosuspenzija. Sredstva za stabiliziranje koriste se u relativno malim udjelima pri izradi nanosuspenzija; u slučaju nanokristala djelatne tvari veličine 500 nm, debljina adsorpcijskog sloja stabilizatora je u rasponu 2–10 nm pri čemu taj sloj čini svega 6 % volumena nanokristala djelatne tvari (20).

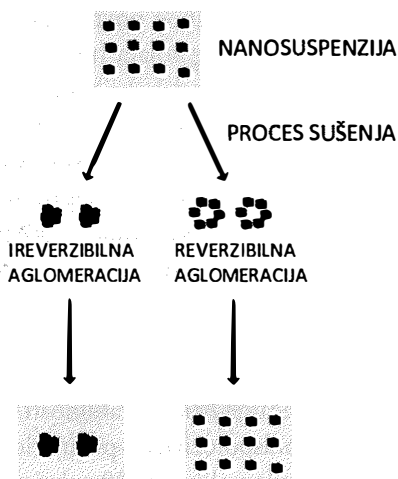
Za nanokristale djelatne tvari neutralnog površinskog naboja često se predlaže korištenje anionskih PAT poput natrijevog kolata (nimodipin, ciklosporin), natrijevog deoksikolata i natrijevog lauril sulfata (celekoksib, probukol, herpetrin). S ciljem elektrostatske stabilizacije nanokristala koriste se i lecitini kao amfolitski stabilizatori (itakonazol). Od neionskih PAT kao stabilizatori su ispitivani derivati celuloze (npr. HPMC: karbamazepin, hidrokortizon, fenofibrat, naproksen, griseofulvin, nimodipin), polivinil alkohol (PVA: nitrendipin, fenofibrat), polivinil pirolidon (PVP K30: celekoksib; PVP K17 i PVP K12: probukol, karbamazepin), polisorbati (npr. polisorbati 80: tarazepid, amfotericin B, hesperetin, celekoksib, fenofibrat) i poloksameri (poloksamer 188: omeprazol, askularin, tarazepid, amfotericin B, itakonazol, hesperetin, fenofibrat; poloksamer 407: paklitaksel). Od funkcionalnih stabilizatora (tj. stabilizatora koji pored učinka povećanja fizičke stabilnosti nanokristala djelatne tvari pridonose i poboljšanju njihove bioraspodivnosti, primjerice inhibicijom P-glikoproteina) ispitivani su vitamin E polietilen glikol 1000 sukcinat (TGPS 1000: paklitaksel, baikalin, NVS-102) i kopolimeri aminokiselina (naproksen). Uspješna stabilizacija nanosuspenzija često se postiže oblaganjem nanokristala smjesom navedenih sredstava za stabiliziranje (5, 20). Najnovija ispitivanja pokazuju mogućnost uspješne

stabilizacije nanokristala atorvastatina korištenjem kitozana niske molekulske mase kao istodobnog elektrostatskog i steričkog stabilizatora (21). Iz gornjeg popisa je razvidno da su sredstva za stabiliziranje nanokristala pretežno pomoćne tvari odobrene za izradu lijekova u farmaceutskoj industriji.

Izrada suhog oblika nanokristala djelatne tvari

Izrada suhog oblika nanokristala djelatne tvari vrlo je česti način povećanja fizičke i kemijske stabilnosti konačnog pripravka tijekom skladištenja. Pored toga, suhi oblici lijekova više su prihvaćeni od bolesnika. Uobičajene metode izrade suhih oblika su sušenje smrzavanjem – liofilizacija (engl. *freeze-drying*) i sušenje raspršivanjem (engl. *spray-drying*). Sušenje raspršivanjem je više korištena metoda industrijske izrade suhih praškastih oblika nanokristala djelatne tvari zbog manjeg utroška vremena i energije te zbog manjeg sadržaja ostatne vlage u suhom obliku u usporedbi s metodom sušenja smrzavanjem. Istodobno, sušenje smrzavanjem metoda je izbora za termoosjetljive djelatne tvari. Nakon postupka sušenja praškasti se produkt izrađuje standardnim farmaceutsko-tehnološkim postupcima; primjerice, izrada sterilnih suhih injekcijskih oblika, praška inhalata, tableta i kapsula (17, 22).

Aglomeracija čestica nanokristala djelatne tvari neizbježna je tijekom izrade suhih praškastih oblika postupcima sušenja (slika 8). U nanosuspenzijskom obliku velika površinska energija nanokristala je uravnotežena elektrostatskim i/ili steričkim učinkom stabilizatora adsorbiranog na površini čestica nanokristala. Uklanjanjem vodenog disperzijskog sredstva učinak stabilizatora izostaje i nastupa proces aglomeracije nanokristala.



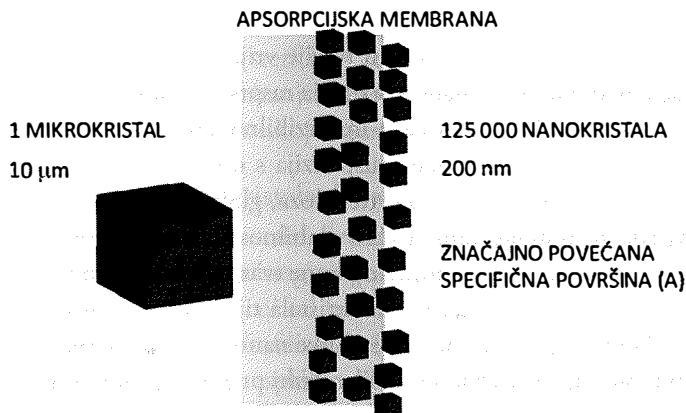
Slika 8. Aglomeriranje nanokristala djelatne tvari pri izradi suhih farmaceutskih oblika; reverzibilni aglomerati nanokristala djelatne tvari rekonstitucijom u vodenom disperzijskom sredstvu oblikuju nanosuspenciju pojedinačnih nanokristala, dok ireverzibilne aglomerate nanokristala djelatne tvari nije moguće zadovoljavajuće redispergirati (22).

Aglomeriranje nanokristala potrebno je u što većoj mjeri spriječiti pri izradi suhih oblika postupcima sušenja. Primjerice, u novije vrijeme razvijena je metoda elektro-sušenja raspršivanjem kojom se nanosuspenzija raspršuje pomoću elektrohodinamske sile, a brzi proces sušenja sprječava ireverzibilno aglomeriranje nanokristala. Pri sušenju smrzavanjem izrađuje se nanosuspenzija s dodatkom kriozaštitnih sredstava (primjerice, manitol, laktoza, saharoza, trehaloza, glukoza) koji sprječavaju aglomeriranje nanokristala te poboljšavaju fizičku stabilnost i svojstva rekonstitucije suhog oblika. Brzina smrzavanja i omjer udjela djelatne tvari prema udjelu kriozaštitnog sredstva također utječu na aglomeriranje nanokristala tijekom postupka sušenja smrzavanjem (17, 22). Problemi povezani uz suhe oblike nanokristala djelatne tvari povezani su s mogućnostima promjene kristalnog oblika. Suhi praškasti produkti u amorfnom stanju bolje su topljivi i veće su brzine otapanja u odnosu na suhe praškaste produkte u kristalnom obliku. Ipak, amorfni praškasti produkti su termodinamički manje stabilni sustavi koji teže promjeni u kristalni oblik povećane termodinamičke stabilnosti, a što u određenoj mjeri ograničava rok valjanosti takvih pripravaka. Promjena amornog u kristalni oblik izravno se odražava na topljivost suhog farmaceutskog oblika, profil oslobađanja te konačno na djelotvornost i sigurnost primjene lijeka (17).

SPECIFIČNA BIOFARMACEUTSKA SVOJSTVA DJELATNE TVARI U OBLIKU NANOKRISTALA

Adhezivnost

Poboljšanje adhezivnosti djelatne tvari u obliku nanokristala posljedica je značajnog povećanja broja čestica nanokristala i njihove specifične površine postupcima nanoniziranja. Već je spomenuto da se smanjenjem veličine jedne čestice djelatne tvari veličine 100 μm postupkom nanoniziranja izrađuje 125 000 000 čestica veličine 200 nm pri čemu se specifična površina uzorka povećava 5 000 puta. Takav iznimno veliki broj malih čestica nanokristala značajno bolje prijanja na površinu membrane preko koje se djelatna tvar apsorbira. U odnosu prema jednom kontaktu čestice djelatne tvari veličine 100 μm , smanjenjem veličine čestice djelatne tvari do 200 nm ostvaruje se 125 000 000 kontakata s apsorpcijskom membranom (slika 9). Općenito su predložene 4 glavne teorije koje nastoje objasniti poboljšanu adhezivnost nanočestica na apsorpcijskoj membrani, a koje su u određenoj mjeri primjenjive i na nanokristale djelatne tvari; elektrostatska teorija (međudjelovanja površine nanočestice i apsorpcijske membrane osnivaju se na elektrostatskim privlačnim silama), adsorpcijska teorija (međudjelovanja površine nanočestica i apsorpcijske membrane osnivaju se na privlačnim vodikovim i van der Waalsovim vezama), difuzijska teorija (međudjelovanja površine nanočestice i apsorpcijske membrane osnivaju se molekulskom ispreplitanju polimernih lanaca površine nanočestice i proteina apsorpcijske membrane), teorija zarobljavanja (engl. *trapping theory*) (osniva se na produljenom zadržavanju nanočestica na neravnoj površini apsorpcijske membrane) (22–23).



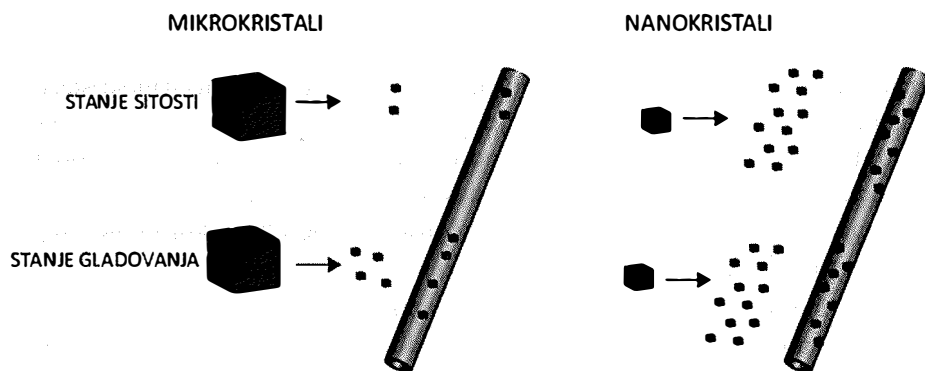
Slika 8. Aglomeriranje nanokristala djelatne tvari pri izradi suhih farmaceutskih oblika; reverzibilni aglomerati nanokristala djelatne tvari rekonstitucijom u vodenom disperzijskom sredstvu oblikuju nanosuspenziju pojedinačnih nanokristala, dok ireverzibilne aglomerate nanokristala djelatne tvari nije moguće zadovoljavajuće redispersirati (22).

Poboljšana svojstva adhezivnosti nanokristala djelatne tvari značajno utječu na njezina druga biofarmaceutska svojstva (primjerice, produljeno zadržavanje na apsorpcijskoj membrani, povećani obim apsorpcije, poboljšanu bioraspoloživost), posebno u slučaju oralnog i ne-parenteralnih načina primjene (primjerice, dermalne, pulmonalne, oftalmičke) gdje se djelatna tvar u primjerenom farmaceutskom obliku primjenjuje izravno na membranu preko koje se odvija njezina apsorpcija (10). Uklapanjem nanokristala djelatne tvari u gelove mukoadhezivnih svojstava ili oblaganjem nanokristala mukoadhezivnim polimerima moguće je dodatno poboljšati svojstva njihove adhezivnosti na apsorpcijskoj membrani (22).

Apsorpcija

Poboljšana apsorpcija djelatne tvari u obliku nanokristala posljedica je njihove povećane topljivosti (c_s), brzine otapanja (dc_x/dt) na mjestu apsorpcije te prethodno objašnjenih svojstava poboljšane adhezivnosti na apsorpcijskoj membrani. Zbog povećane topljivosti i brzine otapanja značajno se povećava koncentracijski gradijent otopljene djelatne tvari između odjeljka gdje se djelatna tvar otapa i odjeljka u koji djelatna tvar stiže nakon prijenosa kroz apsorpcijsku membranu. Najbrža apsorpcija postiže se u probavnom sustavu zbog volumena medija raspoloživog za otapanje nanokristala djelatne tvari (7, 22). Nakon pojedinih ne-parenteralnih načina primjene nanokristala djelatne tvari gdje je volumen medija raspoloživ za otapanje relativno ograničen (primjerice nakon *im.* primjene) moguće je pretpostaviti sporije otapanje i postizanje produljenog učinka djelatne tvari. To su slučajevi u kojima je moguće očekivati produljeni učinak djelatne tvari u obliku nanokristala, a koji je, pored ostalih specifičnosti pojedinog mjesta primjene, u najvećoj mjeri određen volumenom medija koji je raspoloživ za otapanje (18).

Fiziološke uvjete unutar pojedinih dijelova probavnog sustava značajno mijenja hrana; primjerice, u želucu se uz hranu odgađa njegovo pražnjenje, povećava pH, izlučivanje želučane kiseline i pepsina, motilitet, volumen želučanih sokova; u tankom se crijevu uz hranu povećava koncentracija žučnih kiselina, probavnih enzima (lipaza, amilaza i proteaza) te crijevni protok krvi, motilitet i osmolarnost, a smanjuje ukupni raspoloživi volumen probavnih sokova (24). Upravo se zbog utjecaja hrane na fiziologiju pojedinih dijelova probavnog sustava uz hranu mijenja brzina otapanja teško topljivih djelatnih tvari koje nisu u obliku nanokristala. Općenito je moguće primijetiti da se brzina otapanja povećava jer navedeni procesi probave hrane (naročito masne hrane) povoljno utječu na brzinu otapanja teško topljivih djelatnih tvari, odnosno povećavaju brzinu i obim apsorpcije. Upravo je iz takvih razloga potrebna posebna pozornost pri izdavanju lijekova i savjetovanju bolesnika u slučajevima kada je lijek potrebno primijeniti uz hranu. Naime, poznato je značajno smanjenje bioraspoloživosti i djelotvornosti lijeka u slučajevima kada se takve djelatne tvari primijene bez hrane, a što je posebno značajno za djelatne tvari uske terapijske širine. Suprotno tome, kada se veličina čestica djelatne tvari smanji do nanometarskog raspona dimenzija povećava se njezina topljivost i brzina otapanja do te mjere da hrana i s njom povezane fiziološke promjene probavnog sustava nemaju gotovo nikakav utjecaj. Drugim riječima, nanokristali djelatne tvari se jednako dobro i brzo otapaju u lumenu probavnog sustava neovisno o tome radi li se o stanju gladovanja ili sitosti, odnosno tehnologija nanokristala u potpunosti eliminira utjecaj hrane na apsorpciju teško topljivih djelatnih tvari nakon oralne primjene (slika 10). U literaturi se često navodi primjer fenofibrata kojemu je obim apsorpcije 30–50 % u stanju gladovanja i 60–90 % u stanju sitosti. Nakon što se čestice fenofibrata usitne do nanometarskog raspona dimenzija potpuno se eliminira utjecaj hrane na njegovu apsorpciju nakon oralne primjene. Istodobno, primjenom tehnologije nanokristala povećava se ujednačenost



Slika 10. Brzina oralne apsorpcije mikroniziranih čestica teško topljive djelatne tvari određena je njihovom brzinom otapanja u stanju gladovanja i sitosti (A). Brzina oralne apsorpcije nanokristala teško topljive djelatne tvari određena je njihovom brzinom prijenosa preko apsorpcijske membrane neovisno o stanju gladovanja i sitosti (B) (23).

raspodjele nanokristala djelatne tvari u tekućinama probavnog sustava nakon dezintegracije farmaceutskog oblika (primjerice tablete ili kapsule) i tako se izbjegava uspostavljanje velikih lokalnih koncentracija djelatne tvari, a što značajno pridonosi smanjenju mogućnosti nadražaja sluznice probavnog sustava (11, 22–23).

Bioraspoloživost

Kao posljedica prethodno opisanih fizičko-kemijskih (povećana topljivost, brzina otapanja i specifična površina) i biofarmaceutskih (poboljšana svojstva adhezivnosti, eliminacija utjecaja hrane na apsorpciju iz probavnog sustava) značajki djelatne tvari u obliku nanokristala, bioraspoloživost je takve djelatne tvari značajno poboljšana u usporedbi s djelatnom tvari u mikrometarskom ili većem rasponu dimenzija. Dobar primjer je danazol, teško topljivi inhibitor gonadotropnog hormona. Apsolutna je bioraspoloživost mikrosuspenzije danazola (200 mg, 10 μm) svega 5,2 %, dok je apsolutna bioraspoloživost danazola u obliku nanosuspenzije (200 mg, 169 nm) 82,3 %. Istodobno, mijenjaju se i drugi farmakokinetički parametri nanosuspenzije danazola; skraćuje se vrijeme potrebno za postizanje vršnih koncentracija djelatne tvari (T_{max}) i 15 puta se povećava vršna koncentracija djelatne tvari u plazmi (C_{max}). Tako velike razlike u farmakokinetičkim parametrima upućuju na mogućnost značajnog smanjenja doze danazola oblikovanog u nanosuspenziju u odnosu na mikrosuspenziju danazola (10, 23).

Djelotvornost

Ispitivanje učinka teško topljivih djelatnih tvari koje su svrstrane u II. i/ili IV. BCS skupinu u uvjetima *in vitro* često je otežano zbog problema njihove topljivosti. Najčešće se problematična topljivost djelatne tvari rješava otapanjem djelatne tvari u smjesi vodenog i organskog otapala u kojoj je djelatna tvar znatno topljivija. Međutim, korištenje organskog otapala je veliki problem kada se rezultati ispitivanja *in vitro* nastoje potvrditi ispitivanjima *in vivo*. Učinak organskog otapala na rezultate ispitivanja na *in vivo* modelu ne bi trebalo zanemariti, a izostavljanje organskog otapala pri *in vivo* ispitivanjima najčešće rezultira taloženjem djelatne tvari zbog njezine ograničene topljivosti u fiziološkim tekućinama. Upravo tehnologija nanokristala osigurava rješenje navedenih problema tijekom ranih faza istraživanja i razvoja novih djelatnih tvari. Naime, nanoniziranjem novosintetiziranog praškastog teško topljivog produkta postiže se topljivost koja je zadovoljavajuća za različita probirna *in vitro* ispitivanja i za *in vivo* ispitivanja njegovog učinka, a bez potrebe za korištenjem organskih otapala (23).

Brojnim *in vivo* ispitivanjima opažena su poboljšanja lokalne ili sistemske učinkovitosti nanonizirane djelatne tvari u usporedbi sa standardno usitnjenom djelatnom tvari. Primjerice, zbog poboljšanih svojstava adhezivnosti nanokristala antimikrobne djelatne tvari, nakon oralne primjene poboljšava joj se lokalni antimikrobni učinak zbog izravnog međudjelovanja s uzročnicima infekcije smještenim u sluznici

probavnog sustava. Opažena poboljšanja sistemskog učinka nanokristala djelatne tvari najčešće su posljedica poboljšanih farmakokinetičkih svojstava. Kako se nanokristali djelatne tvari bolje apsorbiraju i postižu znatno veću bioraspoloživost, tako je moguće očekivati i poboljšanje bioraspoloživosti u oboljelom tkivu i s tim povezano poboljšanje terapijskog učinka. Primjerice, oralnom primjenom nanosuspenzije amfotericina B za 28,6 % smanjuje se broj mikroorganizama u jetri korištenjem eksperimentalnog modela infekcije na mišu, dok broj mikroorganizama u jetri ostaje nepromijenjen primjenom oralne suspenzije amfotericina B standardnog raspona veličine čestica (20, 23). Ipak, razvoj nanokristala djelatne tvari s ciljanim učinkom još uvijek je u relativno ranoj fazi i pretpostavlja se da je potrebno pričekati još određeno vrijeme do odobravanja takvog lijeka.

TERAPIJSKA PRIMJENA DJELATNE TVARI U OBLIKU NANOKRISTALA

Oralna primjena djelatne tvari u obliku nanokristala na području Europske unije

Izrada nanokristala djelatne tvari namijenjene oralnoj primjeni općenito je dobar pristup u slučajevima niske ili varijabilne bioraspoloživosti (posebno kada su razlike u bioraspoloživosti posljedica utjecaja hrane), primjene relativno velike doze i odgođenog učinka djelatne tvari (12).

Prvi je lijek s nanokristalima djelatne tvari (Rapamune[®]) odobren za primjenu 2000. godine (tablica 1). Proizvođač lijeka je američka tvrtka Wyeth koja je od 2009. godine u vlasništvu tvrtke Pfizer. Nanonizirana djelatna tvar je sirolimus, koji se uglavnom primjenjuje u kombinaciji s ciklosporinom ili kortikosteroidima za sprječavanje odbacivanja transplantiranog bubrega. U kardiologiji se koristi zbog antiproliferativnog učinka za sprječavanje restenoze uzrokovane hiperplazijom unutarnje vaskulature nakon ugradnje stenta. Rapamune[®] je dostupan u obliku tableta mase 370 mg s vrlo malim udjelom nanokristala sirolimusa (1–2 mg). Upravo je smanjenje veličine čestica sirolimusa do nanometarskog raspona dimenzija omogućilo izradu suhog oralnog oblika lijeka jer problemi farmaceutsko-tehnološke prirode ne dozvoljavaju izradu tableta s većim udjelom sirolimusa. Nanokristali sirolimusa oslobađaju se iz tablete u obliku vrlo fine nanosuspenzije. Bioraspoloživost sirolimusa iz tableta Rapamune[®] 21% je veća od bioraspoloživosti oralne suspenzije sirolimusa standardnog raspona veličine čestica. Ostale prednosti tableta Rapamune[®] u odnosu na oralnu suspenziju sirolimusa su poboljšanje suradljivosti bolesnika zbog jednostavnijeg doziranja, čuvanja pri sobnoj temperaturi i produljenog roka valjanosti u odnosu na oralnu suspenziju (7, 11, 16, 20, 22).

Sljedeći je lijek Emend[®] koji je odobren 2003. godine, a proizvođač je nizozemska tvrtka Merck Sharp & Dohme B.V. (tablica 1). Djelatna je tvar aprepitant nanometarskog raspona dimenzija izrađena u obliku tvrdih želatinskih kapsula. Primjenjuje

se u prevenciji postoperativne mučnine i povraćanja u odraslih te prevenciji mučnine i povraćanja povezanih s emetogenom kemoterapijom raka. Apsorbira se u gornjem dijelu probavnog sustava. Značajno povećanje površine postupkom nanoniziranja rezultira brzim otapanjem, brzom apsorpcijom i poboljšanom bioraspoloživošću uz eliminaciju utjecaja hrane na bioraspoloživost nakon oralne primjene. Tablete izrađene od mikroniziranog aprepitanta sadrže prevelike doze djelatne tvari zbog kojih je zabilježena povećana učestalost nuspojava (vrtočlavlja uslijed induciranih serotonin-skih receptora) (7, 11, 16, 20, 22).

Tricor[®] je FDA odobrila 2004. godine. Proizvođač za europsko tržište je francuska tvrtka Recipharm. Djelatna je tvar fenofibrat u obliku nanokristala (tablica 1).

Tablica 1. Lijekovi za oralnu primjenu odobreni na području Europske unije koji su proizvedeni s djelatnom tvari u obliku nanokristala (25–26).

Djelatna tvar	Glavna indikacija	Farmaceutski oblik	Zaštićeni naziv lijeka (Proizvođač*)	Postupak odobravanja u EU**
Sirolimus	Odbacivanje presatka, presađivanje bubrega	Tableta	Rapamune [®] (Pfizer Ireland Pharmaceuticals, Dublin, IE)	CP: – MAH: Pfizer Ltd, Tadworth, UK
Fenofibrat	Hiperkolesterolemija	Tableta	Tricor [®] / Lypanthyl [®] / Lipidil [®] (Recipharm, Fontaine, FR)	MRP: – RMS: DE – CMS: AT, BE, CZ, FI, FR, EL, ES, HU, IE, IT, LU, PL, SK – MAH u RMS: Abbott Arzneimittel GmbH, Wiesbaden, DE – NP: HR
Aprepitant	Postoperativna mučnina i povraćanje, povraćanje, rak	Kapsula	Emend [®] (Merck Sharp and Dohme BV, Haarlem, NL)	CP: – MAH: Merck Sharp and Dohme, Hoddesdon, UK

Napomene: *Proizvođač odgovoran za puštanje serije lijeka u promet naveden u uputi o lijeku odobrenoj u EU; **izvor podataka EMA, HMA, nacionalna regulatorna tijela

Kratice: AT, Austrija; BE, Belgija; CMS, država sudionica u postupku (*concerned member state*); CP, centralizirani postupak; CZ, Češka; DE, Njemačka; EL, Grčka; EMA, Europska agencija za lijekove (*European Medicines Agency*); ES, Španjolska; FI, Finska; FR, Francuska; HMA, *Heads of Medicines Agencies*; HR, Hrvatska; HU, Mađarska; IE, Irska; IT, Italija; LU, Luksemburg; MAH, nositelj odobrenja za stavljanje lijeka u promet (*marketing authorisation holder*); MRP, postupak međusobnog priznavanja (*mutual recognition procedure*); NL, Nizozemska; NP, nacionalni postupak; PL, Poljska; RMS, referentna država članica (*reference member state*); SK, Slovačka; UK, Ujedinjeno Kraljevstvo

Tricor® je indiciran u odraslih bolesnika s primarnom hiperkolesterolemijom ili miješanom dislipidemijom (Fredrickson IIa i IIb tipa) jer povećava razinu kolesterola lipoproteina visoke gustoće, a snižava razinu triglicerida, kolesterola lipoproteina niske gustoće, ukupnog kolesterola i apolipoproteina B. Apsorpcija iz lumena crijeva i bioraspoloživost nenanoniziranih oblika fenofibrata generalno ovise o utjecaju hrane; uz hranu se apsorpcija povećava za 35 % u odnosu na apsorpciju bez hrane. Izradom lijeka s nanokristalima fenofibrata eliminira se utjecaj hrane na apsorpciju i bioraspoloživost. Tehnologija nanokristala omogućuje smanjenje doze fenofibrata; primjerice pojedinačna doza od 145 mg nanokristala fenofibrata (obložena tableta) bioekvivalentna je s dozom od 160 mg mikroniziranog fenofibrata (obložena tableta) i dozom od 200 mg fenofibrata (kapsula) standardnog raspona veličine čestica (7, 11, 16, 20, 22).

Parenteralna primjena djelatne tvari u obliku nanokristala na području Europske unije

Lijekovi za parenteralnu primjenu koji se osnivaju na tehnologiji nanokristala u današnje su vrijeme namijenjeni isključivo *im.* primjeni, dok za sada u terapijskoj primjeni nema lijekova za *iv.* ili *sc.* primjenu (18).

Prvi lijek (Xeplion®/ Janssen Pharmaceutica NV) za *im.* primjenu odobren je 2009. godine, a sadrži nanonizirani paliperidon palmitat izrađen zaštićenom NanoCrystal® tehnologijom koji se primjenjuje u obliku nanosuspencije koja je napunjena u štrcaljku (tablica 2). Nakon primjene nanosuspencija paliperidon palmitata pokazuje produljeno oslobađanje i učinak. Niska viskoznost i mali injekcijski volumen koji je posljedica visokog udjela nanonizirane djelatne tvari (0,25–1,5 mL) nanosuspencije smanjuju lokalnu bol pri primjeni, a što je inače česta nuspojava takvog načina primjene lijeka (7, 16, 18, 20, 22).

Drugi je lijek na europskom tržištu Zypadhera® (Lilly Pharma Fertigung und Distribution GmbH & Co) koja sadrži nanokristalni oblik olanzapina, antipsihotika širokog spektra djelovanja (tablica 2). Radi se o nanosuspenciji s produljenim oslobađanjem namijenjenoj *im.* injekcijskoj primjeni koja se *ex tempore* izrađuje iz liofilizata nanokristala olanzapina i sredstva za dispergiranje (voda, Na-karboksimetilceluloza, manitol, polisorbitat 80). Koristi se kao terapija održavanja u odraslih bolesnika sa shizofrenijom koji su odgovarajuće stabilizirani oralnim oblikom olanzapina tijekom liječenja akutne faze (7, 16, 18, 20, 22).

Nanosuspencije djelatne tvari za *iv.* primjenu intenzivno se razvijaju i ispituju. U brojnim slučajevima *iv.* nanosuspencije djelatne tvari bolje su podnošljive u usporedbi s *iv.* otopinama djelatne tvari. Postupci sterilne izrade nanosuspencija za parenteralnu primjenu kompatibilni su sa standardnim industrijskim linijama za izradu sterilnih proizvoda; primjerice, aseptička izrada, sterilna filtracija, toplinski postupci sterilizacije ili sterilizacija gama-zračenjem (7, 18).

Tablica 2. Lijekovi za parenteralnu primjenu odobreni na području Europske unije koji su proizvedeni s djelatnom tvari u obliku nanokristala (25–26).

Djelatna tvar	Glavna indikacija	Farmaceutski oblik	Zaštićeni naziv lijeka (Proizvođač*)	Postupak odobranja u EU**
Olanzapin	Shizofrenija	Prašak i otapalo za suspenziju za injekciju s produljenim oslobađanjem (im.)	Zypadhera® (Lilly Pharma Fertigung und Distribution GmbH & Co. KG, Gießen, DE)	CP: – MAH: Eli Lilly Nederland BV, Houten, NL
Paliperidon	Shizofrenija	Suspenzija za injekciju s produljenim oslobađanjem (im.)	Xeplion® (Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, BE)	CP: – MAH: Janssen-Cilag International NV, Beerse, BE

Napomene: *Proizvođač odgovoran za puštanje serije lijeka u promet naveden u uputi o lijeku odobrenoj u EU; **izvor podataka EMA, HMA, nacionalna regulatorna tijela

Kratice: BE, Belgija; CP, centralizirani postupak; DE, Njemačka; EMA, Europska agencija za lijekove (European Medicines Agency); HMA, Heads of Medicines Agencies; MAH, nositelj odobrenja za stavljanje lijeka u promet (Marketing Authorisation Holder); NL, Nizozemska.

Ovisno o veličini, kristalnom ili amorfnom stanju te topljivosti i brzini otapanja nanokristala djelatne tvari općenito je moguće postići farmakokinetički profil koji je jednak ili različit od farmakokinetičkog profila otopine iste djelatne tvari. U slučaju trenutnog otapanja nanokristala djelatne tvari (< 200 nm) u sistemskoj cirkulaciji nakon *iv.* primjene farmakokinetički profil je jednak farmakokinetičkom profilu *iv.* primijenjene otopine djelatne tvari, a takvi su pripravci prikladni kada je potrebno postići brzi učinak. U slučaju nanosuspenzija potrebno je primijeniti znatno manji volumen (< 10 mL) zbog velikog udjela nanonizirane djelatne tvari (£ 10 %) u usporedbi s primjenom relativno velikih volumena otopine iste djelatne tvari (od 100 mL pa sve do čak i nekoliko litara). Istodobno, određene teško topljive djelatne tvari moguće je primijeniti u zadovoljavajuće malom volumenu u obliku injekcijskih otopina, ali je za njihovu izradu potrebno koristiti relativno velike udjele sredstava za povećanje topljivosti (primjerice, solubilizacija paklitaksela pomoću Cremophora EL ili kompleksacija itakonazola pomoću hidroksipropil- β -ciklodekstrina). Upravo su sredstva za povećanje topljivosti povezana s nuspojavama takvih lijekova, primjerice anafilaktički šok (Cremophor EL) ili nefrotoksičnost (hidroksipropil- β -ciklodekstrin). Navedene nedostatke odobrenih lijekova moguće je prevladati izradom nanosuspenzija za parenteralnu primjenu takvih djelatnih tvari pri čemu je moguće koristiti stabilizatore boljeg sigurnosnog parenteralnog profila (npr. polisorbit 80 ili poloksamer 188). U slučaju produljenog otapanja nanokristala djelatne tvari (>200 nm / <2000 nm) u sistemskoj cirkulaciji nakon *iv.* primjene farmakokinetički profil je različit od

farmakokinetičkog profila nakon *iv.* primijenjene otopine djelatne tvari; smanjuju se vrijednosti vršne koncentracije djelatne tvari u plazmi (C_{max}), dok se vrijednosti pri-vidnog volumena raspodjele (V_d) i vremena polueliminacije ($T_{1/2}$) povećavaju. Pret-postavlja se da bi se takvim nanosuspenzijama djelatne tvari mogao postići produljeni i/ili ciljani učinak te bi se djelatna tvar mogla nakupljati u organima bogatim mono-nuklearnim fagocitnim sustavom (jetra, slezena, pluća) i da bi takve nanosuspenzije mogle biti primjerene za liječenje bolesti povezane s makrofagima (infekcije, autoimune bolesti krvi, reumatoidni artritis) (7, 18).

Stabilnost djelatne tvari u obliku nanokristala potrebno je ispitati u skladu sa specifičnim biorelevantim uvjetima svakog pojedinačnog puta primjene. Tako primjerice, *iv.* primijenjeni nanokristali djelatne tvari moraju zadržati bitne značajke njihove fizičke stabilnosti jednako kao i zadovoljavajuća svojstva njihove strukturne cjelovitosti s ciljem osiguravanja produljenog zadržavanja u sistemskoj cirkulaciji i povećane izloženosti djelatnoj tvari (AUC) u usporedbi s jednakim parametrima nakon *iv.* primjene standardnog farmaceutskog oblika djelatne tvari. Glavni čimbenici koji utječu na biofarmaceutska svojstva nanokristala djelatne tvari nakon *iv.* primjene uključuju: udio, veličinu i raspodjelu veličine, oblik te površinski naboj i hidrofilno-hidrofobna svojstva površine čestica nanokristala. Istodobno, važni su i parametri povezani s načinom *iv.* primjene, poput brzine infuzije. Površinski naboj i hidrofilno-hidrofobna svojstva površine čestica nanokristala najčešći su uzročnici nestabilnosti takvog farmaceutskog oblika u sistemskoj cirkulaciji. Naime, nakon infuzijske primjene mijenjaju se uvjeti pH i ionske jakosti sredine u kojoj se nalaze nanokristali djelatne tvari, a koji značajno utječu na površinski naboj (zeta-potencijal) čestica nanokristala. Izražene promjene površinskog naboja čestica nanokristala djelatne tvari mogu rezultirati njihovom aglomeracijom (17).

Ne-parenteralna primjena djelatne tvari u obliku nanokristala

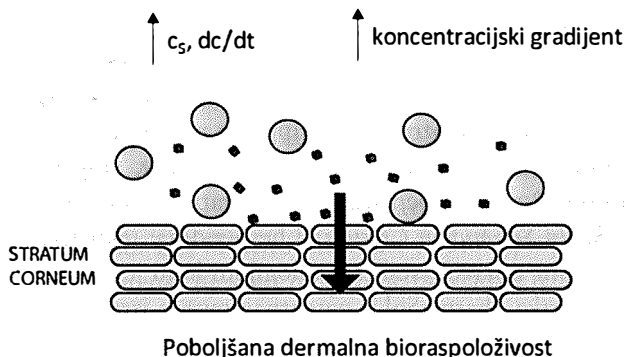
Izrada lijekova s djelatnom tvari u obliku nanokristala pristup je koji je moguće primijeniti u različitim ne-parenteralnim načinima primjene lijeka; primjerice, dermalnoj (27), pulmonalnoj (28), oftalmičkoj (29) ili bukalnoj (30) primjeni.

Dermalna primjena djelatne tvari u obliku nanokristala

Dermalna primjena djelatne tvari u obliku nanokristala u današnje se vrijeme odnosi isključivo na dermatokozmetičke pripravke u koje su uklopljeni nanokristali teško topljivih biljnih antioksidansa (primjerice, rutina, apigenina i hesperidina) (16). Tržišno dostupni nanosuspenzijski koncentracije biljnih tvari (5 %, *m/m*) (primjerice, rutina: *Rutin Submicron Crystals* ili hesperidina: *smartCrystal-lemon extract*) izrađeni su zaštićenom smartCrystal® tehnologijom koju je zaštitila njemačka tvrtka PharmaSol. Inače, tvrtka PharmaSol je patentna prava za izradu nanokristala djelatne tvari u području farmaceutike prodala američkoj tvrtki Abbvie, a zadržala je patentna prava za izradu nanokristala u proizvodnji pripravaka koji nisu u području farmaceutike, uključujući tako i dermatokozmetičke pripravke.

Komercijalno dostupni nanosuspenzijski koncentracije biljnih tvari uklapaju se u gel ili emulzijske podloge tipa ulje u vodi jednostavnim dispergiranjem u završnoj fazi izrade. Dopušteno razrjeđenje nanosuspenzijskog koncentrata je najviše 50 puta (primjerice, najčešće se koristi 2 g koncentrata i 98 g podloge) jer koncentracija nanokristala u konačnom pripravku mora biti 5–10 puta veća od njihove topljivosti (31).

Prvi je dermatokozmetički proizvod s nanokristalima biljne tvari dostupan od 2007. godine u obliku kreme za lice s nanokristalima rutina; linija Juvedical švicarskog proizvođača JUVENA (Shegokar i Müller, 2010). Takav inovativni dermatokozmetički pripravak ispitan je *in vivo* u odnosu na pripravak koji sadrži topljivi derivat rutina – rutin glikozid određivanjem njihove antioksidacijske djelotvornosti (zaštita od UV zračenja, povećanje zaštitnog faktora). Iako je udio nanokristala rutina u inovativnom pripravku 500 puta manji u odnosu na udio rutin glikozida u standardnom pripravku, postignut je 2 puta veći zaštitni faktor inovativnog pripravka. Kada se uzme u obzir da se s 500 puta manjom dozom postiže dvostruko bolji učinak, moguće je zaključiti da nanokristali rutina imaju 1000 puta veću djelotvornost u odnosu na rutin glikozid. Naime, nanokristali rutina stvaraju prezasićenu otopinu u vodenoj fazi emulzijske podloge, dok depo čine neotopljeni nanokristali rutina u podlozi. Zbog izraženog koncentracijskog gradijenta otopljenog rutina od površine prema dubljim slojevima kože osigurana je učinkovita dermalna apsorpcija rutina (slika 11). Zbog depoa neotopljenih nanokristala rutina postiže se produljeni učinak. Sljedeći dermatokozmetički pripravak koji, među ostalim tehnologijama, koristi i tehnologiju nanokristala dostupan je na tržištu od 2009. godine, a sadrži uklopljene nanokristale hesperidina (Platinum Rare / La Prairie) (31). U novije vrijeme sve je više komercijalno dostupnih nanosuspenzijskih koncentrata koje je moguće koristiti u izradi dermatokozmetičkih pripravaka, a jednako tako moguće je očekivati sve više inovativnih dermatokozmetičkih pripravaka unaprijeđene vrijednosti na osnovu tehnologije nanokristala.



Slika 11. Shematski prikaz poboljšavanja dermalne bioraspodjelivosti nakon primjene nanokristala djelatne tvari (15).

Pulmonalna primjena djelatne tvari u obliku nanokristala

Djelatnu tvar u obliku nanokristala moguće je primijeniti u pluća u obliku vodene nanosuspenzije djelatne tvari pomoću atomizatora (nanokristali djelatne tvari primjenjuju se u pluća u obliku malih kapljica aerosola kojega stvara atomizator) ili u obliku nanokristala djelatne tvari koji su dispergirani u prašku inhalata (nanokristali lijeka raspršeni su u nosaču prikladnom za primjenu u pluća, a prašak s nanokristalima udiše se pomoću konvencionalnih inhalatora) (7, 16, 18, 20, 22). Pored brojnih prednosti nanokristala djelatne tvari u području pulmonalne primjene, opažaju se mnoge poteškoće u vidu složene izrade inhalatora, veličine kapljica aerosola, svojstava oblika, inhalacijske sposobnosti bolesnika te anatomije respiratornih organa. Također je problematično korištenje stabilizatora kako se ne bi ugrozila sigurnost primjene pripravka (23).

Najveći iskorak u području pulmonalne primjene učinjen je s nanokristalima budezonida izrađenih u obliku nanosuspenzije postupkom visokotlačnog homogeniziranja. Takva nanosuspenzija budezonida stabilna je 1 godinu pri sobnoj temperaturi, a za postizanje takve stabilnosti korišteni su lecitin za elektrostatsku stabilizaciju i tiloksapol za steričku stabilizaciju. Nanosuspenzija je namijenjena lokalnoj terapiji astme jer je budezonid kortikosteroid jakog lokalnog protuupalnog djelovanja. Kliničkim ispitivanjem u zdravih ispitanika utvrđena je djelotvornost i sigurnost pulmonalne primjene nanokristala budezonida (18). Nakon primjene u pluća nanokristali budenozida u obliku atomiziranih kapljica aerosola smanjuju gubitak djelatne tvari u gornjim dijelovima dišnog sustava u usporedbi s mikrokristalima djelatne tvari koji se odlažu na stražnjoj strani usta i grla. To je posebno važno za kortikosteroidne lijekove koji se primjenjuju u pluća. Njihovo odlaganje u takvim područjima dišnog sustava moguće uzrokuje lokalnu imunosupresiju i nuspojave, kao što su gljivične infekcije usne šupljine i disfoniju, a što je sve moguće prevladati korištenjem tehnologije nanokristala (23).

Oftalmička primjena djelatne tvari u obliku nanokristala

Većina se oftalmičkih oboljenja prednjeg segmenta oka liječi topikalnom primjenom kapi za oko u obliku otopina ili mikrosuspenzija. Bioraspoloživost je klasičnih kapi za oko relativno mala zbog brzog gubitka djelatne tvari s površine oka i relativne nepermeabilnosti rožnice. Učestala primjena lijeka je nužna kako bi se postigao terapijski učinak, što u konačnici rezultira lošom suradljivošću bolesnika i/ili sistemskim nuspojavama. Dosadašnja su ispitivanja pokazala da je korištenjem tehnologije nanokristala moguće u određenoj mjeri prevladati probleme oftalmičke primjene. Oftalmička djelatna tvar usitnjena do nanometarskog raspona dimenzija i primijenjena u obliku oftalmičke nanosuspenzije pokazuje smanjenu iritaciju površine oka, suzenje i uklanjanje iz prekornealnog područja. Poboljšana topljivost i brzina otapanja potiču prijenos djelatne tvari iz suzne tekućine u tkiva oka. Adhezivnost nanokristala djelatne tvari značajno produljuje vrijeme kontakta s površinom

oka što unaprjeđuje biofarmaceutska (primjerice, produljeno zadržavanje na površini oka) i farmakokinetička (primjerice, povećan obim apsorpcije i bioraspoloživost djelatne tvari u oku) svojstva. S ciljem dodatnog poboljšanja svojstava adhezivnosti nanokristali djelatne tvari mogu se uklopiti u oftalmičke mukoadhezivne podloge (29, 32–33).

Drug nanocrystals: physicochemical, pharmaceutical, biopharmaceutical and therapeutic properties

by J. Lovrić, A. Hafner, M. Radiković, M. Juretić,
M. Dürriegl, G. Perina Lakoš, I. Pepić

Abstract

Nanosizing is one of the most important drug delivery platform approaches for the commercial development of poorly soluble drug molecules. Reducing the particle size of the drug to a nano-scale leads to an increased surface area-to-volume ratio, increased dissolution velocity and adhesiveness, and improved in vivo performance of poorly soluble drugs. The commercialized large scale productions of drug nanocrystals such as top down (NanoCrystal[®], Dissocubes[®], Nanopure[®]) and combination (NanoEdge[™], smartCrystal[®]) technologies are presented and discussed. The unique physicochemical and biopharmaceutical properties of drug nanocrystals ensure a wide variety of their therapeutic applications. Drug nanocrystals formulated into convenient pharmaceutical dosage forms are suitable for oral, parenteral, pulmonary, dermal and ocular administration. Thus far, 3 oral nanocrystal medicinal product and 2 parenteral nanocrystal medicinal product are available for therapeutic use in the European Union. (University of Zagreb, Department of Pharmaceutical Technology/ Centre for Applied Pharmacy; Medicines Authorisation Division, Agency for Medicinal Products and Medical Devices of Croatia; Generics Research and Development, PLIVA Croatia Ltd.)

1. Lobenberg R, Amidon GL, Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50, 3–12.
2. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, and Crison JR, A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification – the Correlation of in-Vitro Drug Product Dissolution and in-Vivo Bioavailability. *Pharmaceut Res*, 1995, 12, 413–420.
3. Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. *Int J Pharm*, 2011, 420, 1–10.
4. Loch C, Zakelj S, Kristl A, Nagel S, Guthoff R, Weitschies W, Seidlitz A. Determination of permeability coefficients of ophthalmic drugs through different layers of porcine, rabbit and bovine eyes. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47, 131–8.

5. Chen H, Khemtong C, Yang X, Chang X, Gao J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discov Today*, 2011, 16, 354–60.
6. Butler JM, Dressman JB. The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J Pharm Sci*, 2010, 99, 4940–54.
7. Moschwitz JP. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int J Pharm*, 2013, 453, 142–56.
8. Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. 1998, Zagreb: Školska knjiga.
9. Mauludin R, Muller RH, Keck CM. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *Int J Pharm*, 2009, 370, 202–209.
10. Muller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals-special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 78, 1–9.
11. Junghanns JUAH, Muller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomed*, 2008, 3, 295–309.
12. Gao L, Zhang DR, Chen MH. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J Nanopart Res*, 2008, 10, 845–862.
13. Sinha B, Muller RH, Moschwitz JP. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: formulations and factors affecting particle size. *Int J Pharm*, 2013, 453, 126–41.
14. Liu P. Nanocrystal formulation for poorly soluble drugs. Nanocrystal formulation for poorly soluble drugs, University of Helsinki, 2013, Doctoral Thesis.
15. Muller RH, Shegokar R, Gohla S, Keck CM. Nanocrystals: Production, Cellular Drug Delivery, Current and Future Products, in *Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications*, A. Prokop, Editor. 2011, Springer Science+Business Media: Berlin. p. 411–432.
16. Shegokar R, Muller RH. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm*, 2010, 399, 129–139.
17. Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J Control Release*, 2013, 172, 1126–41.
18. Sun B, Yeo Y. Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 2012, 16, 295–301.
19. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63, 456–69.
20. Pawar VK, Singh Y, Meher JG, Gupta S, Chourasia MK. Engineered nanocrystal technology: in-vivo fate, targeting and applications in drug delivery. *J Control Release*, 2014, 183, 51–66.
21. Kurakula M, El-Helw A, Sobahi TR, Abdelaal MY. Chitosan based atorvastatin nanocrystals: effect of cationic charge on particle size, formulation stability, and in-vivo efficacy. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10, 321–34.
22. Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Zhou L, Li X, Wang F. Application of drug nanocrystal technologies on oral drug delivery of poorly soluble drugs. *Pharm Res*, 2013, 30, 307–24.
23. Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Zhou L, Li X. Drug nanocrystals: In vivo performances. *J Control Release*, 2012, 160, 418–30.
24. Varum FJO, Hatton GB, Basit AW. Food, physiology and drug delivery. *Int J Pharm*, 2013, 457, 446–460.

25. Hafner A, Lovric J, Lakos GP, Pepic I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int J Nanomed*, 2014, 9, 1005–1023.
26. Perina Lakoš G. Registracija i primjena nanoterapeutika u Europskoj uniji. Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Sveučilište u Zagrebu, 2014, Specijalistički rad.
27. Mishra PR, Al Shaal L, Muller RH, Keck CM. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *Int J Pharm*, 2009, 371, 182–9.
28. Shrewsbury SB, Bosco AP, Uster PS. Pharmacokinetics of a novel submicron budesonide dispersion for nebulized delivery in asthma. *Int J Pharm*, 2009, 365, 12–7.
29. Tuomela A, Liu P, Puranen J, Ronkko S, Laaksonen T, Kalesnykas G, Oksala O, Ilkka J, Laru J, Jarvinen K, Hirvonen J, Peltonen L. Brinzolamide nanocrystal formulations for ophthalmic delivery: reduction of elevated intraocular pressure in vivo. *Int J Pharm*, 2014, 467, 34–41.
30. Rao S, Song Y, Peddie F, Evans AM. Particle size reduction to the nanometer range: a promising approach to improve buccal absorption of poorly water-soluble drugs. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6, 1245–51.
31. Chen R. Tailor-made antioxidative nanocrystals: production and in vitro efficacy. Department of Biology, Chemistry and Pharmacy, Freie Universität Berlin, 2013, Doctoral Thesis.
32. Kassem MA, Abdel Rahman AA, Ghorab MM, Ahmed MB, Khalil RM. Nanosuspension as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drugs. *Int J Pharm*, 2007, 340, 126–33.
33. Pignatello R, Ricupero N, Bucolo C, Maugeri F, Maltese A, Puglisi G. Preparation and characterization of eudragit retard nanosuspensions for the ocular delivery of clorimene. *AAPS PharmSciTech*, 2006, 7, E27.

Primljeno 27. ožujka 2015.