

Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Farmaceutyczny



mgr farm. Adrian Szewczyk

**Wykorzystanie mezoporowatych materiałów krzemionkowych
w badaniach preformulacyjnych nad stałym nośnikiem substancji
przeciwbakteryjnej**

**Praca wykonana w
Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

**Promotor pracy:
dr hab. n. farm. Magdalena Prokopowicz**

Gdańsk, 2021

Streszczenie

Zapalenia kości i szpiku (*osteomyelitis*) wywołane infekcją bakteryjną stanowią poważny, choć dotychczas medialnie niezauważany, problem systemu opieki zdrowotnej. Na przestrzeni ostatnich 40 lat zapadalność na *osteomyelitis* wzrosła trzykrotnie. W praktyce klinicznej przewlekłe stany zapalne kości i szpiku wywołane zakażeniem bakteryjnym leczy się chirurgicznie z jednoczesnym wdrożeniem długotrwałej antybiotykoterapii parenteralnej. W celu wywołania pożądanego efektu terapeutycznego takie leczenie wymaga często stosowania wysokich dawek antybiotyku, co znacząco zwiększa ryzyko wystąpienia działań niepożądanych i generuje dodatkowe koszty w systemie opieki zdrowotnej. Dlatego też coraz więcej uwagi poświęca się nowoczesnej terapii *osteomyelitis* polegającej na dostarczeniu antybiotyków bezpośrednio do tkanki kostnej za pomocą implantowanych nośników substancji leczniczych. W takiej strategii implant pełni dwie funkcje: nośnika substancji leczniczej o modyfikowanym, przedłużonym profilu uwalniania oraz materiału kościozastępczego, który w procesie biomineralizacji regeneruje powstałe ubytki kostne.

Celem prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badań było otrzymanie dwufunkcyjnego nośnika substancji przeciwbakteryjnej na bazie mezoporowatych materiałów krzemionkowych. Otrzymana w badaniach preformulacyjnych postać farmaceutyczna sferycznych granulatów – peletek – powinna charakteryzować się: przedłużonym profilem uwalniania substancji leczniczej w badaniach dostępności farmaceutycznej oraz potencjałem mineralizacyjnym w płynie symulującym ludzkie osocze.

W pierwszym etapie badań otrzymano w procesie zol-żel mezoporowate materiały krzemionkowe typu SBA-15 i MCM-41 w postaci proszków. Chemiczną modyfikację powierzchni materiału krzemionkowego SBA-15 grupami 3-aminopropylowymi przeprowadzono metodą zaszczepiania (*graftingu*) w środowisku bezwodnego toluenu. Na podstawie przeprowadzonych badań fizykochemicznych potwierdzono uporządkowaną strukturę porowatą zsyntezowanych materiałów.

Adsorpcję modelowych substancji leczniczych – cefazoliny sodowej i chlorowodoru doksycykliny – przeprowadzono metodą adsorpcji ze stężonych roztworów antybiotyków. Na podstawie otrzymanych wyników określono mechanizm i kinetykę adsorpcji cefazoliny sodowej na mezoporowatym materiale krzemionkowym o zmodyfikowanej grupami 3-aminopropylowymi powierzchni. Stwierdzono, iż wraz ze wzrostem liczby cykli adsorpcji mechanizm adsorpcji antybiotyku zmieniał się począwszy od wytworzenia monowarstwy adsorpcyjnej (zgodnie z modelem Langmuira), poprzez adsorpcję wielowarstwową (zgodnie

z modelem Freundlicha), po wypełnienie mezoporów cząsteczkami antybiotyku (zgodnie z modelem Dubinina-Radushkevicha). Ustalano, że szybkość adsorpcji cefazoliny sodowej na materiale krzemionkowym SBA-15 charakteryzuje kinetyka pseudodrugiego rzędu.

W kolejnym etapie badań mezoporowatym materiałom krzemionkowym z zaadsorbowanymi antybiotykami nadano postać peletek w procesie technologicznym granulacji na mokro, ekstruzji i sferonizacji. W ramach przeprowadzonych prac badawczych udało się wytworzyć peletki, w których połączono dwa materiały o odmiennych właściwościach i zastosowaniu: mezoporowaty materiał krzemionkowy (funkcja przedłużonego uwalniania zaadsorbowanego antybiotyku) oraz biomateriał o wysokich właściwościach mineralizacyjnych (funkcja regenerowania ubytków kostnych). Jako biomateriał o wysokich właściwościach mineralizacyjnych użyto odpowiednio: hydroksyapatyt z deficytem wapnia, kompozyt krzemionkowo-hydroksyapatytowy lub bioszkło o składzie jakościowym $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. Jako lepiszczy użyto etanolowe roztwory etylocelulozy z dodatkiem polidimetylosiloksanu.

Otrzymane peletki charakteryzowały się satysfakcjonującymi właściwościami mechanicznymi, które zapewniły możliwość przeprowadzania dalszych badań w płynach akceptorowych bez ryzyka rozpadu. Na podstawie przeprowadzonych badań preformulacyjnych *in vitro* potwierdzono, iż otrzymane peletki: charakteryzują się przedłużonym uwalnianiem substancji leczniczej w badaniu dostępności farmaceutycznej; zachowują aktywność przeciwbakteryjną względem szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); są cytokompatybilne względem linii komórkowej ludzkich osteoblastów hFOB 1.19, a także wykazują potencjał mineralizacyjny w kontakcie z płynem symulującym ludzkie osocze.

Przeprowadzone badania zweryfikowały potencjał aplikacyjny otrzymanych peletek jako implantu kostnego, przyczyniając się do wzrostu zainteresowania taką postacią leku obok cementów kostnych, rusztowań i kompozytów. W ramach doktoratu stworzono rzetelną bazę wyników wstępnych otrzymanych na podstawie badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro*. Wyniki te umożliwiają dalszy rozwój proponowanej postaci leku w warunkach *in vivo* oraz ewentualną komercjalizację w pełni scharakteryzowanego, bezpiecznego implantu kostnego na bazie mezoporowatych materiałów krzemionkowych.

Abstract

The inflammation of bone and bone marrow (*osteomyelitis*), caused by bacterial infection, constitutes a serious, difficult to treat group of diseases in health care system that is not sufficiently highlighted in media. For last 40 years, the incidence of *osteomyelitis* has triplicated. In clinical practise, chronic *osteomyelitis* caused by bacterial infection is treated surgically with simultaneous implementation of long-term parenteral antibiotic therapy. In order to achieve the desired therapeutic effect, such treatment often requires the use of high doses of the antibiotics; thus, significantly increases the risk of side effects and generates additional costs in the health care system. Therefore, more and more attention has been paid to modern therapy of *osteomyelitis* which consists in delivering antibiotics directly to the bone tissue by using implantable bone drug delivery systems. In such strategy, the implanted drug delivery system provides two functions: a drug carrier with a modified, prolonged release profile and a bone substitute which regenerates the bone defects *via* biomineralization.

The aim of the performed studies was to obtain a bifunctional bone drug delivery system based on mesoporous silica materials. The designed in preformulation studies pharmaceutical form of spherical granules – pellets – should be characterised by both the prolonged drug release in pharmaceutical availability tests and the mineralisation potential in simulated body fluid.

First, mesoporous silica materials SBA-15 and MCM-41, in the form of powders, were obtained by using sol-gel method. The surface chemical modification of silica material SBA-15 with 3-aminopropyl groups was carried out by grafting method in the anhydrous toluene. The ordered porous structure of the synthesised materials was confirmed based on physicochemical analysis.

The adsorption of model drugs: cefazolin sodium and doxycycline hydrochloride onto mesoporous silica materials was carried out using adsorption from concentrated antibiotic solutions. Based on the obtained results, the mechanism and kinetics of cefazolin sodium adsorption onto the 3-aminopropyl-surface-modified mesoporous silica material were determined. It was found that with an increase in the number of adsorption cycles, the adsorption mechanism of the antibiotic changed from the formation of an adsorption monolayer (according to the Langmuir model), through multilayer adsorption (according to the Freundlich model), to the final filling of mesopores with antibiotic molecules (according to the Dubinin-Radushkevich model). Additionally, the adsorption rate of cefazolin sodium onto the mesoporous silica material was characterised by pseudo-second order kinetics.

Next, mesoporous silica powders with adsorbed antibiotics were transformed into the form of pellets using a wet granulation, extrusion, and spheronisation technological process. During the pelletization process, two materials with different properties and applications were combined: a mesoporous silica material (function of prolonged release of adsorbed antibiotics) and a biomaterial with high mineralisation properties (function of bone defects regeneration). The following were used as biomaterials with high mineralisation properties: calcium-deficient hydroxyapatite, silica-hydroxyapatite composite or bioglass with a qualitative composition of $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. Ethanolic solutions of ethyl cellulose with addition of polydimethylsiloxane were used as a binder.

The obtained pellets were characterised by satisfactory mechanical properties, which ensured their further testing in acceptor fluids without the risk of pellets disintegration. Based on the *in vitro* preformulation studies, it was confirmed that the obtained pellets were characterised by prolonged drug release during the pharmaceutical availability test; they retained the antimicrobial activity against the reference strain *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); they were cytocompatible towards the human osteoblast cell line hFOB 1.19, and showed the mineralisation potential after immersion in simulated body fluid.

The conducted studies verified the application potential of the obtained pellets as implantable bone drug delivery system, increasing the interest of such pharmaceutical form in addition to bone cements, scaffolds, and composites. During the PhD studies, a reliable base of preliminary *in vitro* results has been created, which enables both the further development of the proposed bone drug delivery system under *in vivo* conditions and the potential commercialisation of a fully characterised, safe bone implant based on mesoporous silica materials.