



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

PhD értekezés tézisei

Az Analytical Quality by Design (AQbD) megközelítés alkalmazása *in vitro* felszabadulási
teszt (IVRT) módszerfejlesztésnél félszilárd topikális készítmények esetén

Szoleczky Réka

Témavezetők:

Dr. habil. Budai-Szűcs Mária Ph.D.,

Dr. habil. Kovács Anita Ph.D.

Szeged

2024

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Vezető: Prof. Dr. Hohmann Judit, akadémikus
Képzési program: Gyógyszertechnológia
Programvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Témavezetők:

Dr. habil. Budai-Szűcs Mária Ph.D.,

Dr. habil. Kovács Anita Ph.D.

Szoleczky Réka

Az Analytical Quality by Design (AQbD) megközelítés alkalmazása *in vitro* release teszt (IVRT) módszerfejlesztésnél félszilárd topikális készítmények

Komplexvizsga-bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Szabó-Révész Piroska D.Sc., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Tagok:

Dr. habil. Aigner Zoltán Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és
Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Dr. habil. Fenyvesi Ferenc, Ph.D., Debreceni Egyetem, Gyógyszertechnológiai Tanszék

Bíráló bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Szatmári István, PhD., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerkémiai intézet

Opponensek: Dr. Kállai-Szabó Nikolett, Ph.D., Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészeti
Intézet

Dr. Széchenyi Aleksandar, Ph.D., Pécsi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai és
Biofarmáciai Intézet

Tagok: Dr. Mária Matuz, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Klinikai Gyógyszerészeti
Intézet

Dr. Szakonyi Gerda, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszeranalitikai Intézet

SZEGED

2024

1. BEVEZETÉS

A félszilárd gyógyszerhordozó rendszer sikerének biztosítása érdekében elengedhetetlen megérteni és megismerni a készítmény hatás mechanizmusát és a felszívódásának helyét. A permeációs folyamat a hatóanyag (API) felszabadulásával, a liberációval kezdődik. Az API ezt követően penetrál a stratum corneum-ba illetve a további bőrrétegekbe. Ezt követően a hatóanyag megoszlik az epidermiszben, illetve kifejtheti a hatását a kívánt helyen. A hatóanyag egyensúlyi felszabadulási sebességét félszilárd formulációból *in vitro* felszabadulási tesztekkel (IVRT) lehet jellemezni. Az IVRT egy jól bevált technika a félszilárd gyógyszerformák elemzésére, viszont a változtatás az IVRT módszer paramétereiben eltérést okozhat a mért felszabadulási sebességben. Az API felszabadulási sebessége/visszatartása a lokálisan alkalmazott készítményekben kritikus tényezőnek tekintendő a kívánt hatás kialakításában. Egy új vagy generikus félszilárd termék korai fejlesztési fázisában az IVRT különösen hasznos a termék mikrostruktúrájában lévő változások hatásainak kimutatására, mivel ezek befolyásolhatják az API biohasznosulását.

Az International Council for Harmonization (ICH) Q8 (R2) iránymutatása a gyógyszerfejlesztésről a Quality by Design (QbD) megközelítést úgy határozza meg, mint „egy szisztematikus fejlesztési megközelítés, amely előre meghatározott célokkal kezdődik, a termék- és folyamatmegértésre, valamint a folyamatirányításra helyezi a hangsúlyt, és tudományos alapokon és kockázatmenedzsmenten nyugszik”. A gyógyszerfejlesztés célja olyan termék tervezése és gyártása, amely következetesen megfelel az elvárt követelményeknek. A minőséget nem lehet a termékbe teszteléssel kialakítani, azt a fejlesztési folyamat során kell a termékbe építeni. Az Analytical Quality by Design (AQbD) koncepció a QbD kiterjesztése. Fő célja egy robusztus, célra megfelelő és jól ismert módszer kidolgozása, amely a tervezett teljesítményt nyújtja életciklusa során. Az AQbD elvek alkalmazásával az analitikai módszerek fejlesztése során analitikai oldalról biztosítható az új és generikus termékek minősége. Továbbá ezen elvek alkalmazása gyógyszertermék megbízhatóságát is javíthatja, így fontos szerepet játszhat a betegbiztonságban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Dolgozatom célja az AQbD alapú IVRT módszerfejlesztés gyakorlati megvalósítása, illetve ezen koncepció felhasználásával a különböző IVRT készülékek összehasonlítása. Az első AQbD iránymutatásokat 2022-ben tették közzé, addig csak a QbD ICH Q8-Q11 iránymutatások álltak rendelkezésre a gyógyszerkészítmény fejlesztéshez.

1. Ph.D. munkám első részében a QbD koncepció alkalmazása volt a cél az IVRT módszerfejlesztés korai szakaszaiban a United States Pharmacopeia (USP) IV-es készülékével (félszilárd adapterrel). Ezt az alábbi lépések szerint kívántam megvalósítani:

- ✓ bemutatni az AQbD koncepciót és annak megvalósítását az IVRT analitikai módszerfejlesztés korai szakaszában;
- ✓ meghatározni az Analitikai Célprofil (ATP) és a Kritikus Módszerjellemzőket (CMAA-kat);
- ✓ azonosítani és összegyűjteni a (Kritikus) Módszerparamétereket (MP-eket) Ishikawa diagram segítségével;
- ✓ kezdeti kockázatértékelést végezni és a CMAA-k és (C)MP-k közötti ok-okozati összefüggések alapján priorizálni a paramétereket, valamint csökkenteni a lehetséges kritikus paraméterek számát a Hibamód-és hatáselemzés (FMEA) segítségével (meghatározni az *in vitro* gyógyszerfelszabadulási vizsgálatok magas kockázatú paramétereit);
- ✓ 2^3 teljes faktoriális kísérleti tervezés alkalmazása a független tényezők (CMP-k) lehetséges hatásának feltérképezésére;
- ✓ FMEA táblázat frissítése faktorok hatásának elővizsgálatát követően.

2. 2022-ben megjelent a USP <1220> általános fejezet, majd 2023-ban elérhetővé vált az ICH Q14 iránymutatás az analitikai eljárások fejlesztéséről, és az ICH Q2(R2) az analitikai eljárások validálásáról, amelyeket a Committee for Human Medicinal Product (CHMP) fogadott el. Az új ICH Q14 és a felülvizsgált ICH Q2(R2) dokumentumok együtt körvonalazzák az analitikai fejlesztési eljárást és annak validálását az analitikai életciklus menedzsment megközelítéshez. Ph.D. munkám második részében az ICH Q14 iránymutatás és a USP <1220> általános fejezetben foglaltak megvalósítását tűztem ki célul, melyet az alábbi lépésekben terveztem megvalósítani:

- ✓ ATP meghatározása nemzetközi ajánlások segítségével az IVRT vizsgálatokhoz;
- ✓ négy IVRT készülék összehasonlítása az ATP segítségével;
- ✓ saját mérési eredményeink összehasonlítása az irodalomban található adatokkal;
- ✓ megfelelő IVRT készülék kiválasztása az analitikai módszer fejlesztéséhez.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Diklofenák-nátrium krém és hidrogél

Az IVRT vizsgálatokhoz diklofenák-nátrium krémet és hidrogélt használtunk mintaterméként, mindkét magisztrális félszilárd terméket laboratóriumunkban állítottuk elő. A diklofenák-nátriumot tartalmazó topikális hidrogél mátrixa tisztított vizet, HPMC-t (hidroxipropil-metil-cellulóz) és propilénglikolt tartalmazott. A diklofenákot tartalmazó krém segédanyagai a tisztított víz, cetosztearil-alkohol, ricinusolaj, poliszorbát 60, metilparabén és fehér vazelin voltak. Diklofenák-nátrium só hatóanyag a Molar Chemicals Kft.-től került beszerzésre (Halásztelek, Magyarország). A hipromellózt, a poliszorbát 60-at, a ricinusolajat, a fehér petrolátumot, a cetosztearil-alkoholt, a metil-parabént és a propilénglikolt a Hungaropharma Kft. biztosította (Budapest, Magyarország).

3.2. IVRT és ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (UHPLC) mérésekhez

A nátrium-kloridot, a dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrátot és a nátrium-hidroxidot a Molar Chemicals Kft.-től szereztük be. (Halásztelek, Magyarország). A kálium-dihidrogén-foszfátot a Thomasker cégtől (Budapest, Magyarország) vásároltuk. A felhasznált vizet ELGA PURELAB Chorus 1-gyel tisztítottuk és ionmentesítettük (ELGA LabWater Headquarters, Lane End, Egyesült Királyság). Az ortofoszforsavat a Merck-től (Darmstadt, Németország) szerezzük be. A metanolt a Honeywell részvénytársaságtól került beszerzésre. (Charlotte, NC, USA). Az IVRT teszt receptor közege 7,4 pH-jú foszfát puffer volt (PBS), pH 6,9 PBS, pH 7,9 PBS, pH 7,4 PBS + NaCl, és pH 7,4 PBS–NaCl. Az IVRT méréshez szintetikus (nitrocellulóz és cellulóz-acetát keveréke) 25 mm (0,22 μ m pórusméret), 47 mm (0,22 μ m pórusméret), 47 mm átmérőjű ME membránt (pórusméret 0,45 μ m), és 25 mm-es poliéterszulfon (PES) membránt (0,45 μ m pórusméret) alkalmaztunk. Az ME membránt a Labex Kft. biztosította. (Budapest,

Magyarország), a Millipore PES membránt a Merck (Darmstadt, Németország) szállította. Minden IVRT mérés előtt a membránokat 30 percig áztattuk a receptor közegben.

3.3. Statikus vertikális diffúziós cella (Franz cella)

A 6 db cellából álló (diffúziós felület: 1,767 cm²) és automatikus mintavevővel (Hanson Microette Autosampler System) felszerelt vertikális diffúziós cellarendszert (Teledyne Hanson Co., Chatsworth, CA, USA) használtuk az *in vitro* gyógyszerfelszabadulás modellezésére diklofenák-nátrium tartalmú, helyileg alkalmazható hidrogél és krém esetén. Körülbelül 320 mg gyógyszerkészítményt helyeztünk a 25 mm átmérőjű, 0,22 µm pórusméretű cellulóz membránra (Labex Ltd., Budapest, Magyarország). A receptor közegnek 7 ml, pH 7,4 ± 0,05 vagy pH 7,9 ± 0,05 PBS értékű puffert választottunk, és 32 ± 0.5°C-on tartottuk a mérések során. A keverési sebességet 400 rpm-re állítottuk be. Az akceptor fázisból (800 µL) mintákat gyűjtöttünk 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 és 360 perckor, majd UHPLC-vel elemeztük. A pótközeg térfogata 1,1 ml pH 7,4 PBS vagy pH 7,9 PBS volt.

3.4. USP II készülék alámerülőcellával (USP II)

Az USP II kioldókészüléket (Vision® G2 Elite 8, Teledyne Hanson Co., Chatsworth, CA, USA) 0.53 ml-es alámerülőcellával használtuk (Teledyne Hanson Co., Chatsworth, CA, USA). A cellát (B modell) az USP <1724> általános fejezete mutatja be. Az 1.77 cm² membránfelületű, diklofenák krémet vagy hidrogélt tartalmazó alámerülőcellát (a minta mérete: 600-700 mg) 150 ml-es lapolajjú edénybe helyeztük. A 150 ml-es, pH 7.4 PBS vagy pH 7.9 PBS receptor közeget 32,0 ± 0,5 °C-ra temperáltuk. A mini forgólapátos keverőket 250 fordulat/perc sebességre állítottuk be. Az akceptor közegből 1,0 ml-es mintákat vettünk 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 és 360 perc elteltével. Közegpótlás nem történt, ezt az IVRT eredmények számításánál figyelembe vettük.

3.5. USP IV készülék: Átfolyócella félszilárd adapterrel

Az USP IV készüléket (Sotax CE7 smart CY 7 dugattyús pumpával, Sotax Corporation, USA) félszilárd adapterrel (diffúziós felület: 1,54 cm²) használtunk a diklofenák-nátrium topikális hidrogélből történő *in vitro* gyógyszerfelszabadulás modellezésére. A félszilárd adaptereket (különböző méretekből elérhetők: 400 µL, 800 µL és 1200 µL) topikális készítményekkel

töltöttük meg, majd a membránokat (pórusméret 0,45 vagy 0,22 μm) a csavaros adapterhez illesztettük és összecsavartuk. Az adaptereket a membránnal lefelé fordítva a 22,6 mm-es tablettacellákba helyeztük, amelyeket előzőleg üvegyöngyökkel (1 mm-es üvegyöngyök) töltöttük meg. A USP IV készüléket "nyitott" konfigurációban használtuk. A receptor közegeket levegőmentesítettük, az áramlási sebesség 2 mL/min, 4 mL/min vagy 8 mL/min volt. A teszhőmérsékletet $32 \pm 0,5$ °C-ra állítottuk be. A mintavétel (Sotax C 615 frakciógyűjtő, Sotax Corporation, USA) 30, 60, 120, 180, 240, 300 és 360 percnél, illetve 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 és 360 percnél történt. Az IVRT módszer fejlesztéséhez 400 μL és 1200 μL -es térfogatú félszilárd adaptereket használtunk.

3.6. Átfolyócellás diffúziós készülék (FTDC)

A laboratóriumban egyedi kialakítású és dugattyús fecskendővel felszerelt átfolyó diffúziós cella, egy nyitott rendszerű diffúziós cella, amely alkalmas *in vitro* diffúzió és bőrpenetráció mérésére is. Ez a készülék csak egy mérési blokkot tartalmaz, egy spirális diffúziós cellát, amelynek térfogata 875 μL , és egy időben csak egy mérést tesz lehetővé. A készülék szivárgásmentes összeszereléséhez 0,22 μm pórusméretű, 15,5 mm átmérőjű és 1,76 cm^2 diffúziós felületű ME membránt (Labex Ltd., Budapest, Magyarország) használtunk a mérések kivitelezése során. Az IVRT-t 6 órán keresztül végeztük, és a mintát manuálisan gyűjtöttük a pH 7,4 PBS receptor folyadékból 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 és 360 percnél. A minták hatóanyagtartalmát UHPLC-vel mértünk. A membrán alatti áramlási sebességet 2 mL/perc és 4 mL/perc értékre állítottuk be, a rendszer hőmérsékletét pedig 32 °C-on temperáltuk.

3.7. Ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias módszer leírása

A diklofenák-nátrium koncentrációját egy Waters Acquity I-Class UHPLC rendszerrel határoztuk meg, amely fotodióda (PDA) detektorral volt felszerelve. A detektálást 240 nm-en végeztük. A kromatográfias elválasztást egy Acquity UPLC BEH (etilén-híd hibrid) UHPLC oszlop (2,1 mm x 50 mm, 1,7 μm , 130Å, Waters Corporation, Milford, MA, USA) segítségével végeztük. Az oszlophőmérsékletet 40°C-on tartottuk, a mozgófázis metanol és kálium-dihidrogén-foszfát puffer keveréke volt (pH 2,5; 20 mM) (36/64 v/v). A kálium-dihidrogén-foszfát puffert 0,22 μm -es szűrőn szűrtük át. A futási idő 3 perc volt. Az áramlási sebességnek

0,45 mL/percet állítottunk be. A kalibrációhoz az injektált térfogat 2 μ L volt, de az IVRT minták mérése során különböző injektálási térfogatokat használtunk a minták diklofenák-nátrium koncentrációjától függően. Minden *in vitro* felszabadulási vizsgálatnál a kalibrálást a 4-100 μ g/ml koncentráció-tartományban határoztuk meg ($R^2 \geq 0,995$).

3.8. Az analitikai célprofil (ATP), a kritikus módszerjellemezők (CMAA-k) és a kritikus módszerparaméterek (CMP) megállapítása

IVRT mérésekhez az analitikai módszerfejlesztés kezdeti szakasza az ATP (analitikai célprofil) kialakításával kezdődött. Az ATP meghatározása szerint: „az ATP tartalmazza a tervezett cél leírását, a termék mérendő jellemzőinek (attribútumainak) megfelelő részleteit és a releváns teljesítményjellemzőket a kapcsolódó teljesítménykritériumokkal együtt”. Az ATP-nek magában kell foglalnia az analit és a termék meghatározását, beleértve olyan részleteket, mint az adagolási forma, hatáserősség, mátrix komponensek és az alkalmazás módja. Illetve olyan szempontokat, mint a tartomány, elfogadható torzítás és precizitás (a megengedett legnagyobb kombinált torzítás vagy a cél mérési bizonytalanság). A cél mérési bizonytalanság (TMU) a jelentendő eredmény maximálisan elfogadható bizonytalansága, amelyet az analitikai eljárásnak el kell érnie. „Miután meghatározták az elfogadható valószínűségét annak, hogy helytelen döntés születhet, és meghatároztak egy döntési szabályt, a célzott mérési bizonytalanságot megadják.” Korábbi módszerfejlesztési ismereteink és adataink alapján a CMAA-k (kritikus módszerjellemezők) az ATP-ből származtathatók. A CMAA-k a módszer teljesítményének azon elemei, amelyeket mérni és/vagy értékelni kell annak érdekében, hogy a kívánt adatok rendelkezésre álljanak. A CMAA-k analógok a gyógyszerfejlesztés kritikus minőségi jellemzőivel (CQA-k). A CMAA-k meghatározása után az összes módszerparaméter (MP) szisztematikusan összegyűjthető egy Ishikawa-diagram segítségével. Ennek a módszernek a célja az összes befolyásoló tényező összegyűjtése, majd az MP-k kategorizálása és vizuális ábrázolása.

3.9. Hibamód és hatáselemzési módszer (FMEA) alkalmazása

A kockázati mátrix-szal becsülhetjük a MP-k hatását és kockázatát a módszer teljesítményére vonatkozóan. Az FMEA (hibamód-és hatáselemzés) eredményei a kockázati prioritási számok (RPN-ek). Az RPN-ek az előfordulás (O), a súlyosság (S) és az észlelhetőség (D) szorzataként

számítható ki. O a hiba bekövetkezése vagy egy esemény bekövetkezésének valószínűsége. S a súlyosság skála, amely alapulhat azon a hatáson, amelyet a variabilitás forrásai gyakorolnak az analitikai eljárás mérésére (az ATP kritériumainak való megfelelés képessége). Az észlelhetőség a D, vagyis az, hogy mennyire könnyű a hibát észrevenni. A kockázatokat 1-től 29 RPN-ig alacsony, 30-tól 59 RPN-ig a közepes, 60-tól 125-ig RPN-ig pedig a magas kategóriába soroljuk. Azok az MP-k, amelyek közepes vagy magas kockázatúak, kritikus módszerparamétereknek tekinthetők.

3.10. Kísérlettervezés (DoE) IVRT módszerhez

A kísérlettervezés (DoE) egy modellezési eszköz, amely a gyógyszerfejlesztési folyamatot befolyásoló tényezők közötti lehetséges kölcsönhatások értékelésére szolgál, és ezáltal a végtermék minőségét befolyásolja. A kritikus módszerparamétereket (CMP-eket) független változókként és a kritikus módszerjellemzőket (CMAA-kat) függő változókként kell megválasztani a faktoriális tervezési folyamat során. Az FMEA és az előzetes kísérletek után egy 2^3 teljes faktoriális tervezést hajtottunk végre egy diklofenák-nátrium hidrogél formuláció IVRT módszerének optimalizálására.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Első kísérleti rész

4.1.1. Az ATP definiálása és a CMAA-k meghatározása

A preformuláció készítményfejlesztésének támogatása az analitikai oldalról megfelelő analitikai módszerekkel lehetséges, amelyek garantálják a termék megfelelő minőségét. Ennek megfelelően az IVRT-nek érzékenynek kell lennie a formulációk változásaira és módosításaira, és az analitikai méréseknek pontosan és precízen kell meghatározni a hatóanyag mennyiségét az IVRT mintákban. Ennek okán meghatároztuk ezen célokat az ATP-ben (1. táblázat), majd az ATP-kből származtattuk a CMAA-kat (2. táblázat). Az ATP lesz a mérvadó az analitikai technológia kiválasztásánál, esetünkben az UHPLC, amely egy megbízható és széles körben használt technika, és képes kielégíteni az ATP követelményeit.

1. táblázat A diklofenák-nátrium topikális gél analitikai célprofilja.

ATP elem	Cél
Célminta (termék neve)	1%-os diklofenák-nátrium topikális gél
Hatóanyag neve	Diklofenák-nátrium
Hatáserősség	1 % (10 mg/g)
Adagolási formák	Hidrogél
Az adagolás módja	Topikális
Mátrix	Propilén-glikol (50 %), HPMC (1,5%), tisztított víz (47,5%)
Csomagolás	Műanyag tubus
Hatósági előírások	ICH, EMA (European Medicines Agency), FDA (Food and Drug Administration)
Felszabadulás / <i>In vitro</i> felszabadulás teszt	A felszabadulási teszteknek érzékenyeknek kell lenniük az összetevők és a folyamatparaméterek lényeges változásaira. Megfelelő felszabadulási hatékonyság, felszabadulási profil és reprodukálhatóság. Megfelel a szabályozási követelményeknek. Pontosság $RSD \leq 10 \%$ (6 párhuzamos).
Analitikai mérések	Analitikai mérések: Az eljárásnak képesnek kell lennie a diklofenák-nátrium mennyiségi meghatározására az IVRT-mintákban a névleges koncentráció 25–200 %-a közötti tartományban, 2,0 %-os pontossággal.

2. táblázat A diklofenák-nátrium topikális gél kritikus módszerjellemzői.

CMAa paraméterek	Cél	Indoklás
Felszabadulási hatékonyság 6 óra alatt Felszabadulási profil jellemzése	$Q(6\text{ h}) \geq 70\%$ 6 időpontot kell rögzíteni a gyógyszer felszabadulási profil lineáris szakaszán	Az IVRT alapvető eszköz a hatóanyag felszabadulást befolyásoló formulációs tényezők azonosítására, hatékony módszer a gyártási tételek közötti változások és stabilitási vizsgálatok nyomon követésére a fejlesztés során. Ezt a kritériumot egy a helyi alkalmazású termékek minőségéről és egyenértékűségéről szóló, jelenleg draft verziójú iránymutatás írja le.
A 6 párhuzamos minta adott mintavételi pontjában felszabadult hatóanyag mennyiségének relatív szórása (RSD%)	$RSD \leq 10\%$ (6 párhuzamos)	Az RSD % érték 10% alatti, ami az IVRT módszer jó reprodukálhatóságának jelzésére szolgál.
Torzítatlanság	98-102 % között	UHPLC mérés esetén, a várható érték meghatározás gyenge pontja a torzítatlanság.
A kromatográfiás rendszer rendszeralkalmassági tesztje	USP tányérszám: $N \geq 3000$	Szükséges egy olyan kromatográfiás rendszer, amelyben az API megfelelően elválik a mátrix komponensektől. A tányérszám alapvető hatással van a mérési hiba mértékére, mivel befolyásolja a csúcs integrálhatóságát. Ezért a kromatográfiás módszernek alkalmasnak kell lennie az API kimutatására az IVRT mintákban a névleges koncentráció 25%-ánál.

4.1.2. A módszerparamétereinek (MPs) azonosítása az Ishikawa diagram segítségével

A meglévő tudásunk alapján a következő lépésként szisztematikusan összegyűjtöttük az összes olyan MP-t, amely az IVRT módszerünkre hatással lehet. Ehhez az Ishikawa diagramot használtuk, mint kockázatelemző eszközt, hogy azonosítsuk azokat a lehetséges változókat, amelyek hatással lehetnek a CMAA-kra. Az Ishikawa diagram segítségével több mint 100 módszerparamétert azonosítottunk, melyeknek hatásuk lehet a módszer teljesítményére ezáltal a módszer minőségére.

4.1.3. Kezdeti kockázatértékelés FMEA használatával (MP-k hatása a CMAA-kra)

Az FMEA elemzés során az MP-k CMAA-kra gyakorolt lehetséges hatását vizsgáltuk. Az elemzést az összes MP esetében egyesével végeztük el. A kockázatértékelés legfőbb célja a legmagasabb kockázati prioritási számokat (RPN) kapó, potenciális kritikus módszerparaméterek (CMP-k) azonosítása volt. Ezeket az előkísérletek során vizsgáljuk. Az irodalmi adatok és a korábbi módszerfejlesztési tapasztalataink alapján, az FMEA segítségével azonosított legmagasabb kockázati értéket mutató ($RPN \geq 60$) kritikus módszerparaméterek: az ozmolalitás, a közeg pH-értéke, a membrántípus, az áramlási sebesség, a minta tömege (a SSA térfogata), az egyes cellák egyedi áramlási sebessége, az API% és a termék összetétele. Az előkísérletek során csak a legmagasabb pontszámú paraméterek hatását vizsgáltuk a CMAA-kra egymástól függetlenül.

4.1.4. 2^3 teljes faktoriális kísérleti terv az IVRT-módszerhez

A magas kockázatú kritikus módszerparamétereket (CMP-k) független változókként, míg a kritikus módszerjellemezőket (CMAA-k) függő változókként kell kiválasztani a faktoriális kísérlettervezési folyamatban. Az előzetes kísérletek alapján az áramlási sebességet nem találtuk kritikusnak, de korábbi tapasztalataink alapján a minta térfogata és az áramlási sebesség együttes hatása már kritikus lehet, ezért az áramlási sebességet független változóként vizsgáltuk a faktoriális kísérleti tervben. Az áramlási sebességet (X1), az SSA térfogatát (X2) és a közeg pH-értékét (X3) független változóként, míg az *in vitro* felszabadulási mértéket (IVRR) (Y1) és a 6 óra alatti felszabadulási hatékonyságot (Y2) függő változónak választottuk. Az előzetes kísérletek alapján az áramlási sebesség (mL/min) nem bizonyult CMP-nek, bár a fő hatásokon kívül kétszeres és/vagy háromszoros interakciók is jelentősek lehetnek. A 2^3 teljes faktoriális

statisztikai elemzés eredményei alapján ($n = 5$ elemzésenként) a fő paraméterek közül az X2 (az SSA térfogata) és az X3 (pH) volt jelentős hatással ($p < 0,05$) az Y1-re (IVRR). Másrészt, a statisztikai elemzés azt mutatja, hogy csak egy fő tényező, az X2 (az SSA térfogata) gyakorol jelentős hatást ($p < 0,05$) a 6 óra alatti felszabadulási hatékonyságra (Y2). A többi tényezőnek nem volt jelentős hatása az Y2-re.

4.1.5. Az 1. kísérleti rész összefoglalása

Ph.D. tanulmányom első részében bemutattam, hogyan alkalmazható az AQbD koncepció az IVRT módszerfejlesztés korai szakaszaiban a USP IV készülék esetében. Az ATP meghatározása és a CMAA-k kiválasztása után (legalább a hatóanyag 70%-ának felszabadulása 6 óra alatt, hat időpont a hatóanyag felszabadulási profil lineáris részében, és a 6 edényből számított felszabadult mennyiség relatív szórása legfeljebb 10%) egy kezdeti kockázatértékelést végeztünk Ishikawa-diagram segítségével több, mint 100 módszerparamétert azonosítottunk, amelyek befolyásolhatják a módszer teljesítményét és az eredmények minőségét. Az FMEA-t használtuk a lehetséges paraméterek számának nyolc tényezőre történő csökkentésére, melyek: az ozmolalitás, a közeg pH-ja, membrántípus, áramlási sebesség, minta tömege (SSA térfogata), az egyes cellák áramlási sebessége, API% és a termék összetétele. Az előkísérletek során ezeknek a paramétereknek a CMAA-kra gyakorolt hatását egymástól függetlenül vizsgáltuk. Ezeket a CMP-eket (a közeg pH-ja és a termék minta tömege) független változóként vettük figyelembe a teljes faktoriális kísérlettervezés során.

A 2^3 teljes faktoriális kísérlettervezést alkalmaztunk az IVRR és a 6 óra alatti felszabadulási hatékonyság értékelésére. A vizsgálat után a kockázatokat az eredmények alapján újraértékeltek, és rögzítésre kerültek az aktualizált FMEA táblázatban, így szűkítve a módszerparamétereket CMP-kre. Eredményeink alapján a termék mennyisége és a pH egyértelműen kritikus paraméterekként kerültek meghatározásra az AQbD megközelítés alkalmazása során. A diklofenák-nátrium legalább 70%-os felszabadulása a hidrogéltől (minden párhuzamos minta esetén) 6 órán belül minden tesztelési körülmény között megfelelő volt, így megfelelt az ATP követelményeinek. Az ATP képes kielégíteni az EMA irányelv (a topikális termékek minőségi és egyenértékűségi irányelvtervezete) kritériumait. Másrészt az USP IV. készülék működési módja lehetővé teszi több mintavételi időpont alkalmazását annak érdekében, hogy teljesüljön a „6 időpontot kell rögzíteni a gyógyszer felszabadulási profil

lineáris szakaszán” kritérium. Kísérleteink első részének eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a nemzetközi irányelveknek megfelelő, robusztus IVRT-tesztet lehet kidolgozni az USP IV-es készülékkal, de minden esetben elemezni kell a közeg pH-értékének és a minta tömegének hatását az IVRT-eredményekre.

4.2. Második kísérleti rész

4.2.1. ATP definiálása az IVRT-hez

A topikális diklofenák-nátrium hidrogél és krém IVRT módszer fejlesztéséhez definiáltunk egy ATP-t (3. táblázat), az ICH Q14 irányelv és a USP <1220> általános irányelvei szerint. Az analitikai módszer kifejlesztésének célja a diklofenák-nátrium hatóanyag mennyiségi meghatározása volt egy IVRT minőségellenőrzési (QC) vizsgálatához. A hatáserősségek 1% és 2% voltak. Feltételezve a normális eloszlást, a célmérési bizonytalanság (TMU) (σ) kiszámítása a következő képlettel írható le:

$$\sigma = \frac{x - \mu}{z} = \frac{77\% - 70\%}{1,65} = 4,24\%, \quad \text{if } Q_{utolsó} = 70\% \quad (1)$$

ahol x is a pontosság felső specifikációs határértéke (esetünkben 110%, tehát $Q_{utolsó}$ 70% esetén, x értéke 77%), μ a várható érték (100%), és z a kiterjesztési tényező (szimmetrikus, 90% konfidencia intervallum esetén 1.65). Az IVRT-készülék kiválasztása és a kezdeti analitikai ellenőrzési stratégia (ACS) kialakítása után az 1. szakasz végén meg kell győződni arról, hogy a kidolgozott analitikai eljárás jelentendő értékei megfelelnek az ATP-kritériumoknak.

3. táblázat A diklofenák-nátriumot tartalmazó krém és hidrogél IVRT ATP-je.

Jellemző(attribútum)	Cél	Indoklás
Torzítatlanság A módszer pontossága (az IVRT utolsó mintavételi pontján mérve)	90–110% RSD (%) az utolsó időpontokban \leq 10%	Az eljárásnak képesnek kell lennie pontosan meghatározni a diklofenák-nátrium mennyiségét az IVRT mintákban a névleges koncentráció 50%-ától 120%-áig terjedő tartományban, biztosítva, hogy a mérések \pm 4,24%-on belül esnek a valós értékhez képest 90%-os valószínűséggel.
Linearitás	$R^2 \geq 0,97$	
Tartomány	$\pm 20\%$ a megadott tartományon belül	
Az IVRT-kísérlet végén felszabaduló kumulatív mennyiség	$Q_{\text{utolsó}} \geq 70\%$	Az IVRT időtartamának elegendőnek kell lennie a felszabadulási profil jellemzéséhez, hat időpontban gyűjtött adatokkal a hatóanyag felszabadulási profiljának lineáris szakaszában. Ideális esetben a felvitt diklofenák-nátrium legalább 70%-ának fel kell szabadulnia.
Robusztusság	Átlagos meredekség ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-0.5}$) a pH 7,4 és pH 7,9 közeggel, illetve 2 ml/perc és 4 ml/perc közeggel végzett IVRT-futtatás átlagos meredekségének \pm 15%-on belül kell lennie.	A diklofenák-nátrium IVRR átlagos meredeksége, amelyet pH 7,4 és pH 7,9 közeggel és/vagy 2 mL/min és 4 mL/min áramlási sebességgel (2*6 mérés) mértünk, nem térhet el több mint 15%-kal a névleges módszerparaméter beállításoktól.

Az alapvető fontosságú ATP meghatározása után, amely tartalmazza a releváns teljesítményjellemzőket és a kapcsolódó teljesítménykritériumokat, a második lépés az IVRT-módszer fejlesztéséhez szükséges kezdeti technológia kiválasztása volt.

4.2.2. Az IVRT technológia kiválasztása

Esetünkben, laboratóriumunkban többféle analitikai technológia állt rendelkezésre az IVRT-hez, négy IVRT-technológia közül választhattunk (statikus vertikális diffúziós cella, USP II készülék alámerülő cellával, USP IV készülék félszilárd adapterrel és átfolyócellás diffúziós készülék). Az UHPLC mérési technikát választottuk az IVRT minták méréséhez, mivel az UV spektrofotometriás analitikai módszer nem alkalmazható az UV aktív mátrix komponens zavarása miatt. Ha a termék fejlesztése és az analitikai módszer fejlesztése párhuzamosan halad, rengeteg mérési adat áll rendelkezésre az analitikai technológia kiválasztásához. Esetünkben minimális előzetes ismeret állt rendelkezésre a diklofenák-nátrium *in vitro* felszabadulási sebességéről a hidrogél és krém mátrixból. Az USP II alámerülő cella, a USP IV félszilárd adapterrel és a statikus vertikális diffúziós cella (Franz cella) IVRT módszer paraméterei megfelelnek a sink condition kritériumának, de az FTDC nem. A sink condition feltétel esetében, bár meg kell jegyezni, hogy a receptor fázis térfogata a legtöbb esetben egy alapvető készülék tulajdonság, esetünkben csak az FTDC nem tudta teljesíteni ezt a feltételt. Mindazonáltal az FTDC (és a USP IV SSA-val) esetében a friss receptor közeg folyamatos cseréjének fenntartása könnyebben biztosítja a megfelelő sink condition feltételeket a kísérlet során. Mindkét átfolyó cellás készüléket nyitott konfigurációban alkalmaztuk.

4.2.3. A diklofenák-nátriumot tartalmazó krém és hidrogél *in vitro* vizsgálati eredményei

Az 1% és 2% diklofenák-nátriumot is tartalmazó krémeket és hidrogélt a kezdeti mérésekhez használt „szokásos” IVRT paraméterekkel mértük, mind a négy készülék esetében 7,4 pH-jú PBS-t (koszolvens vagy felületaktív anyag nélkül) alkalmazva. Az eredmények a 4. táblázatban és az 5. táblázatban láthatók.

4. táblázat Az 1%-os és 2%-os diklofenák krém előre meghatározott elfogadási kritériumai és eredményei az IVRT módszer kiválasztásánál.

Készülék	Jellemző	Cél	1%-os diklofenák krém eredményei		2%-os diklofenák krém eredményei	
Franz cella	Módszer pontossága	RSD (%) az utolsó időpontban $\leq 10\%$	2,83	sikeres	4,06	sikeres
USP II, alámerülő cella			4,50	sikeres	5,36	sikeres
USP IV, SSA			2,44	sikeres	1,91	sikeres
FTDC			16,10	sikertelen	13,94	sikertelen
Franz cella	Az IVRT-kísérlet végén felszabaduló kumulatív mennyiség	$Q_{\text{final}} \geq 70\%$	49,29	sikertelen	61,30	sikertelen
USP II, alámerülő cella			26,10	sikertelen	38,00	sikertelen
USP IV, SSA			30,02	sikertelen	25,62	sikertelen
FTDC			56,64	sikertelen	42,96	sikertelen
Franz cella	Torzítatlanság	90–110%	96,58	sikeres	-	-
USP II, alámerülő cella			100,94	sikeres	-	-
USP IV, SSA			99,04	sikeres	-	-
Franz cella	Robusztusság (pH)	A pH 7.4 és pH 7.9 közeggel végzett IVRT-futtatás átlagos meredekségének $\pm 15\%$ -on belül kell lennie.	-13,85	sikeres	-0,68	sikeres
USP II, alámerülő cella			-4,26	sikeres	-2,94	sikeres
USP IV, SSA			-15,93	sikertelen	9,81	sikeres
USP IV, SSA	Robusztusság (áramlási sebesség)	A 2 ml/perc és 4 ml/perc áramlási sebességű IVRT-futtatás átlagos meredekségének $\pm 15\%$ -on belül kell lennie.	-6,55	sikeres	-0,15	sikeres
FTDC			-49,67	sikertelen	-20,58	sikertelen

5. táblázat Az 1%-os és 2%-os diklofenák hidrogél előre meghatározott elfogadási kritériumai és eredményei az IVRT módszer kiválasztásánál.

Készülék	Jellemző	Cél	1%-os diklofenák gél eredményei		2%-os diklofenák gél eredményei	
Franz cella	Módszer pontossága	RSD (%) az utolsó időpontban $\leq 10\%$	3,74	sikeres	3,00	sikeres
USP II, alámerülő cella			4,43	sikeres	7,78	sikeres
USP IV, SSA			1,40	sikeres	0,88	sikeres
FTDC			6,32	sikeres	2,11	sikeres
Franz cella	Az IVRT-kísérlet végén felszabaduló kumulatív mennyiség	$Q_{\text{final}} \geq 70\%$	92,40	sikeres	91,74	sikeres
USP II, alámerülő cella			86,47	sikeres	86,86	sikeres
USP IV, SSA			94,23	sikeres	100,57	sikeres
FTDC			104,61	sikeres	98,74	sikeres
Franz cella	Torzítatlanság	90–110%	94,64	sikeres	-	-
USP II, alámerülő cella			102,00	sikeres	-	-
USP IV, SSA			97,08	sikeres	-	-
Franz cella	Robusztusság (pH)	A pH 7.4 és pH 7.9 közeggel végzett IVRT-futtatás átlagos meredekségének $\pm 15\%$ -on belül kell lennie.	-4,31	sikeres	-3,57	sikeres
USP II, alámerülő cella			4,62	sikeres	8,85	sikeres
USP IV, SSA			6,24	sikeres	-9,49	sikeres
USP IV, SSA	Robusztusság (áramlási sebesség)	A 2 ml/perc és 4 ml/perc áramlási sebességű IVRT-futtatás átlagos meredekségének $\pm 15\%$ -on belül kell lennie.	-0,48	sikeres	-8,90	sikeres
FTDC			-6,31	sikeres	-23,93	sikertelen

4.2.4. A 2. kísérleti rész összefoglalása

A doktori tanulmányom második részében négy IVRT készüléket hasonlítottunk össze (statikus vertikális diffúziós cella, USP II készülék alámerülő cellával, USP IV készülék félszilárd adapterrel és átfolyócellás diffúziós készülék) az ATP segítségével. Az új ICH Q14 irányelvet és a USP <1220> általános fejezetet azért alkalmaztuk, hogy meghatározzunk egy ATP-t az IVRT-hez. A diklofenák-nátriumot tartalmazó krém előzetes IVRT kísérleteinek eredményei azt mutatták, hogy a diklofenák-nátrium felszabadulása a krém mátrixból lassú volt mind a négy

készülékkel mérve és az ATP-ben leírt $Q_{utolsó} \geq 70\%$ kritérium nem teljesült egyik esetén sem. Ezért az IVRT mérést krém esetén legalább 12 órán keresztül kellene végezni. Az USP II alámerülő cella és a USP IV SSA megfelelőek voltak a diklofenák-nátrium hidrogél és krém mérésére. Eredményeink alapján az USP II alámerülő cellás készülék a legjobb választás egy analitikai IVRT módszer kifejlesztésére a diklofenák-nátrium krémhez, és az USP II merülőcellás készülék és/vagy a USP IV SSA a legjobb a diklofenák-nátrium hidrogél esetén.

5. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Doktori munkám célja az AQbD koncepció gyakorlati megvalósítása volt az IVRT fejlesztés és a készülékválasztás korai szakaszában. Doktori munkám során az alábbi eredményeket értem el:

- ✓ Sikeresen alkalmaztam az AQbD koncepciót az IVRT analitikai módszerfejlesztés korai szakaszában.
- ✓ Meghatároztam az analitikai célprofil (ATP) és a kritikus módszerjellemzőket (CMAa-kat) IVRT esetén.
- ✓ Az Ishikawa-diagram segítségével azonosítottam és összegyűjtöttem az IVRT (kritikus) módszerparamétereit (MP).
- ✓ Kezdeti kockázatértékelést végeztem és kritikusság alapján rangsoroltam a CMAa és (C)MP paramétereket, és csökkentettem az IVRT lehetséges kritikus paramétereinek számát.
- ✓ Az IVRT-vizsgálatokra vonatkozó nemzetközi ajánlások segítségével célértékeket határoztam meg az ATP-ben, a négy IVRT-berendezés összehasonlításához.
- ✓ Kísérleteink alapján kiválasztásra került a félszilárd készítmények fejlesztése esetén megfelelő IVRT-készülék egy analitikai eljárás kifejlesztéséhez.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

KÖZELMÉNYEK

- I. **Réka Szoleczky**, Mária Budai-Szűcs, Erzsébet Csányi, Szilvia Berkó, Péter Tonka-Nagy, Ildikó Csóka, Anita Kovács
Analytical Quality by Design (AQbD) Approach to the Development of In Vitro Release Test for Topical Hydrogel
Pharmaceutics, 14(4), 707 (2022), Q1, IF: 5.40
- II. **Réka Szoleczky**, Anita Kovács, Szilvia Berkó and Mária Budai-Szűcs
An Analytical Target Profile for the Development of an In Vitro Release Test Method and Apparatus Selection in the Case of Semisolid Topical Formulations
Pharmaceutics, 16(3), 313 (2024), Q1, 4.90*

ELŐADÁSOK

- I. **Szoleczky Réka**; Budai-Szűcs Mária; Kovács Anita: Analytical Quality by Design (AQbD) approach to the development of in vitro release test for topical hydrogel. IV. *Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science; Szeged, Hungary, January 19-21, 2022.*