



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

A Ph.D. értekezés tézisei

**INNOVATÍV, DOPAMIN PREKURZORT TARTALMAZÓ MIKRONIZÁLT POROK
FORMULÁLÁSA QUALITY BY DESIGN MEGKÖZELÍTÉS ALAPJÁN**

Kiss Tamás

Okleveles vegyész

Témavezetők:

Dr. Katona Gábor Ph.D.

és

Dr. habil Ambrus Rita Ph.D.

SZEGED

2022

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Vezető: Prof. Dr. Hohmann Judit, akadémikus

Gyógyszertechnológia Program
Programvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó, tanszékvezető egyetemi tanár

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Témavezetők: Dr. Katona Gábor Ph.D. és Dr. habil Ambrus Rita Ph.D.

Kiss Tamás

INNOVATÍV, DOPAMIN PREKURZORT TARTALMAZÓ MIKRONIZÁLT POROK FORMULÁLÁSA QUALITY BY DESIGN MEGKÖZELÍTÉS ALAPJÁN

Komplexvizsga-bizottság:

- Elnök:** Prof. Dr. Szabóné Révész Piroska D.Sc., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
- Tagok:** Prof. Dr. Bácskay Ildikó Ph.D., Debreceni Egyetem, Gyógyszertechnológiai
Tanszék
Dr. habil Aigner Zoltán Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Bíráló Bizottság:

- Elnök:** Dr. Szatmári István D.Sc., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerkémiai
Intézet
- Opponensek:** Juhászné Dr. Csapó Edit Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Fizikai Kémiai és
Anyagtudományi Tanszék
Vidáné Dr. Erdő Franciska Ph.D., Pázmány Péter Katolikus Egyetem,
Információs Technológiai és Bionikai Kar
- Titkár:** Dr. Schelz Zsuzsanna Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerhatástani
és Biofarmáciai Intézet
- Tag:** Dr. habil Vasas Andrea Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Farmakognóziai
Intézet

SZEGED

2022

1. BEVEZETÉS

A Parkinson-kór (PK) terápiájában elsődlegesen dopamin prekursorokat, mint például levodopát (LD) és levodopa metilészter hidrokloridot (LDME) alkalmaznak. Az LDME a perifériás keringésben hajlamos LD-vé alakulni, amely a vér-agy gáton keresztül a központi idegrendszerbe juthat, ahol dopaminná alakul, így kompenzálva a PK-ra jellemző dopaminhiányt, ami a tünetek a javulásához vezet. Az LD-tartalmú per os készítmények a gyógyászatban elterjedtek, de intesztinális gél és pulmonális por is megtalálható a gyógyszerkincsben. A per os LD bevitele mellékhatásokhoz, ún. *off* periódusokhoz vezet, amelyek három fő típusba sorolhatók: *delayed on*, *wearing off* és *no on* periódus. Mivel ezek eltérő farmakokinetikai okok miatt alakulnak ki, eltérő formulációs stratégiákat igényelnek.

Az újszerű, innovatív gyógyszerformák, mint például a mikrorészecskék egyre széleskörűbben alkalmazottak, mivel a hatóanyag-felszabadulás szabályozása révén előnyösebb farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkezhetnek a hagyományos gyógyszerformákhoz képest. A hatóanyag és a segédanyag együttes őrlése előnyös, mivel a mikrorészecskék őrlőgolyóként csökkenthetik egymás szemcseméretét. A mezopórusos szilikába (MPS) gyógyszermolekulák tölthetők, amely következtében a hatóanyag felszabadulása a mátrix felületi tulajdonságaival és az adszorbeált anyag-mátrix kölcsönhatásokkal szabályozható.

Az alternatív beviteli kapuk (intranazális, pulmonális) jelentősége napjainkban egyre növekszik. Az intranazális készítmények nagyobb biohasznosulást biztosíthatnak a per os bevételhez képest a hepatikus first-pass hatás elkerülése, a gyors onset és a nagymértékű vaszkularizáció miatt. Ugyanakkor figyelembe kell venni a hatóanyag rövid tartózkodási idejét, a hidrofíll hatóanyagok alacsony permeabilitását, a stabilitási problémákat és az orr térfogata miatt korlátozottan bevihető dózist. A legtöbb felmerülő problémát részben vagy egészben kezelni lehet mikronizált orrpor használatával folyékony gyógyszerformák helyett. Dopamin prekursor hatóanyag intranazális bevitele a per os kezelés melletti krízisterápiás kiegészítő kezelésként alkalmazható a *delayed on* periódusok csökkentésére. A per os gyógyszerformák korlátai jól ismertek, azonban egy dopamin prodrug-tartalmú, elnyújtott hatóanyag-leadással rendelkező formuláció segíthet csökkenteni a *wearing off* periódusokat.

Rövidítések: α -CD – α -ciklodextrin; CH – Kitozán; CMA – Kritikus Anyagi Tulajdonság (Critical Material Attribute); CPP – Kritikus Folyamatparaméter (Critical Process Parameter); CQA – Kritikus Minőségi Paraméter (Critical Quality Attribute); DSC – Differenciális pásztázó kalorimetria; HPLC – Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia; HPMC – Hidroxipropil-metilcellulóz; LD – Levodopa; LDME – Levodopa metilészter hidroklorid/levodopa hidroklorid; MAN – D-mannit; MPS – Mezopórusos szilika; NaHA – Nátrium-hialuronát; PK – Parkinson-kór; PVA – Polivinil-alkohol; PVP – Polivinil-pirrolidon; QbD – Quality by Design; QTPP – Céltermék Minőségprofilja (Quality Target Product Profile); RA – Kockázatbecslés (Risk Assessment); SEM – Pásztázó elektronmikroszkóp; SYL-0 – Syloid® XDP 3050; SYL-1 – 10 mM TMCS-vel hidrofobizált SYL-0; SYL-2 – 20 mM TMCS-vel hidrofobizált SYL-0; SYL – SYL-0, SYL-1 és SYL-2 összefoglaló rövidítése; TMCS – Trimetilkloroszilán; XRPD – Poröntgen diffraktometria

2. CÉLKITŰZÉSEK

A Ph.D. munkám célja újszerű, innovatív, dopamin prodrugot (LD, LDME) tartalmazó mikronizált nazális és per os gyógyszerformák előállítása, illetve a hatóanyag-felszabadulás szabályozása volt. Célul tűztük ki olyan formulációk előállítását, amelyek a hagyományos per os, LD-tartalmú készítmények helyettesítőiként vagy kiegészítőiként szolgálhatnak. A kutatómunkát a következők szerint terveztük felépíteni:

I) Részletes szakirodalmi áttekintést terveztünk végezni annak feltárására, hogy milyen lehetőségek adódhatnak a dopamin prodrug-tartalmú készítmények alternatív és hagyományos bevitele terén.

II) Az LD-t és az LDME-t tartalmazó mikronizált rendszerek esetére a Cétermék Minőségprofilját (QTPP), a Kritikus Minőségi Paramétereket (CQA-k), a Kritikus Folyamatparamétereket (CPP-k)/Kritikus Anyagi Tulajdonságokat (CMA-k) szerettük volna meghatározni Quality by Design (QbD)-alapú kockázatbecslési (RA) eljárás segítségével a szakirodalom és az előkísérletek adatai alapján. Az RA eredményei alapján célunk volt olyan CPP/CMA-kat választani kísérleti terveket készítéséhez, hogy a nazális LD-tartalmú és a per os LDME-tartalmú készítmények tulajdonságai hatékonyan optimalizálhatók és kontroll alatt tarthatók legyenek.

III) Az orrporokat kétkomponensű porkeverékek (LD és egy nazális körülmények között előnyös tulajdonságokkal rendelkező segédanyag) ko-örlésével terveztük elkészíteni egy kísérleti terv alapján a fizikai-kémiai és gyógyszertechnológiai tulajdonságok optimalizálása céljából. További cél volt a termékek sorrendjének megállapítása. Azonnali felszabadulással rendelkező, stabilis készítményeket szerettünk volna előállítani, amelyek várhatóan az orrnyálkahártyán megtapadnak.

IV) Továbbá célul tűztük ki LDME-tartalmú hidrofobizált MPS-ek előállítását. A munka e részében nulladrendű kinetikával és nyújtott hatóanyagleadással rendelkező stabilis készítményeket terveztünk formulálni a QbD-alapon elkészített kísérleti terv segítségével. Emellett vizsgálni kívántuk a MPS-be történő a hidrofobizáció és a hatóanyag-töltés hatását a fizikai-kémiai tulajdonságokra, a stabilitásra és az *in vitro* hatóanyag-felszabadulásra. Terveink között szerepelt a kikristályosodott hatóanyag tulajdonságainak vizsgálata esetleges polimorfok felfedezése céljából.

V) Az optimalizálási folyamat eredményeinek értékelése után olyan optimalizált nazális és orális készítményeket kívántunk javasolni, amelyek potenciálisan képesek csökkenteni az LD farmakokinetikájával összefüggő *delayed on*, illetve a *wearing off* periódusokat.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

3.1.1. Hatóanyagok

A levodopát (LD) Hungaropharma Zrt.-től (Budapest, Magyarország), a levodopa metilészter hidrokloridot/melevodopa hidrokloridot (LDME) a Merck Ltd.-től (Darmstadt, Németország) szereztük be.

3.1.2. Segédanyagok és egyéb anyagok

A kitozánt ($M_w = 3800 - 20000$ Da) (CH), az α -ciklodextrint (α -CD), a METHOCEL™ K4M hidroxipropil-metilcellulóz (HPMC), a polivinilpirrolidon K25-t (PVP), a polivinil-alkoholt ($M_w \approx 24000$ Da) (PVA) és a D-mannitot (MAN) szintén Merck Ltd.-től vásároltuk (Darmstadt, Németország). A nátrium-hialuronátot (NaHA) ($M_w = 1400$ kDa) a Richter Gedeon Nyrt. (Budapest, Magyarország), a Syloid® XDP 3050-t (SYL-0) a Grace Materials Technologies (Grace GmbH, Worms, Németország) biztosította számunkra.

Az MPS hidrofobizálásához és töltéséhez használt *n*-hexán és trimetilklórszilán (TMCS), illetve a pufferkészítéshez használt sósav, nátrium-dihidrogén-foszfát, kálium-dihidrogén-foszfát és 85 w/w%-os ortofoszforsav-oldat szintén a Merck Ltd.-től (Darmstadt, Németország) lett megvásárolva. A nátrium-hidroxidot és a metanolt a VWR International Ltd.-től (Radnor, PA, USA) szereztük be.

3.2. Módszerek

3.2.1. A QbD-alapú megközelítés alkalmazása formulációfejlesztéshez

A QbD-alapú gyógyszerfejlesztés első lépése a céltermék QTPP-jének meghatározása. Ezek a termék terápiás felhasználás szempontjából fontos tulajdonságai (indikáció, hatásosság, biztonság, beadási mód, sterilitás, stabilitás stb.). Ezt közvetlenül befolyásolják a termékek CQA-i, azaz a termék fizikai, kémiai és mikrobiológiai tulajdonságai, amelyek egy bizonyos tartományban megfelelőek az alkalmazás szempontjából. A következő lépést az ún. tudástér kialakítása jelenti, amely folyamat során meghatározhatók azok a kritikus tényezők (CPP-k és CMA-k), amelyek döntően befolyásolják gyártási folyamatunkat, illetve a termékek tulajdonságait. A sikeres tudástérfejlesztés után a CPP/CMA-k módosításával a folyamat megfelelően optimalizálható, így az optimalizált termék megfelelő CQA-kkal fog rendelkezni. Az RA során az adott kockázat súlyosságát, előfordulását vagy bizonytalanságát is figyelembe vesszük, hogy a QTPP-t közvetlenül befolyásoló CQA-k, illetve a CQA-kat közvetlenül befolyásoló CPP/CMA-k között prioritási sorrendet állítsunk fel, hiszen a CPP-k/CMA-k-at tudjuk közvetlenül kontroll alatt tartani, így azokkal tudjuk közvetetten befolyásolni QTPP-t. A tudástérfejlesztéshez és az RA-hoz számos minőségi eszköz használható, mint például

Ishikawa-diagram, folyamatábra, döntési fa, Pareto-diagram stb. A QbD-alapú megközelítés nazális és per os adagolású készítmények esetében egyaránt alkalmazható.

3.2.2. LD-tartalmú kétkomponensű porkeverék előállítása ko-örléssel

2,00 g LD-segédanyag kétkomponensű keveréket ko-örltünk (1. táblázat) egy bolygóműves golyósmalomban (Retsch PM-100 MA, Retsch GmbH, Haan, Németország) maximum 90 percig 10 db rozsdamentes acélgolyó (8 mm átmérő) segítségével egy 50 ml térfogatú örlőedényben. Az átlagos szemcseméretet lézerdiffrakciós módszerrel (Malvern Mastersizer Scirocco 2000; Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Egyesült Királyság) határoztuk meg. Elsősorban azon LD:segédanyag termékek lettek kiválasztva további analízisre, amelyek teljesítették a szemcseméretre vonatkozó követelményeket, emellett előnyösnek tekintettük a nagymértékű amorfizációt, hiszen magasabb kioldódásra számíthatunk azon termék esetében, amelyben a hatóanyag nagyobb mértékben amorf. Az optimalizáció célja elsősorban az 5-45 μm átlagos szemcseméret (D_{50}) elérése volt. A ko-örlés következtében LD-segédanyag mikrorészecskék keletkeztek és a mechanikai behatások miatt másodrendű kölcsönhatások kialakulására adódott lehetőség a komponensek között.

1. táblázat. A kétkomponensű nazális porokban használt segédanyagok, illetve az előállítás során alkalmazott kísérletterv

Segédanyag	LD:segédanyag tömegarány	Örlési idő (min)	Forgási sebesség (rpm)
CH	50:50	60	300
NaHA	66,67:33,33	90	400
α -CD		15	
HPMC	30:70	30	
PVP	50:50	45	400
PVA	70:30	60	
MAN			

3.2.3. A MPS hidrofobizációja

A szakirodalomban szereplő eredmények szerint a víz kulcsszerepet játszik a szililezési reakciókban, ezért a szilika felületén adszorbeált víztartalmat a reakció előtt standardizálni kellett. Ezt egy klímakamra segítségével végeztük el (KKS TOP+, Wodzisław Śląski, Lengyelország), a minta legalább 3 napig 40 °C-on and 75 %-os relatív páratartalom volt kezelve azért, hogy beálljon az adszorpció egyensúly. A hidrofobizációs reakció 25 °C-on zajlott. 200 mg SYL-0-t diszpergáltunk 20,0 ml *n*-hexánban egy előzetesen hidrofobizált, 40

ml térfogatú kupakos üvegcsében. Ezután 10, illetve 20 mM TMCS-t adtunk a diszperzióhoz (eredmény: 10 mM esetében SYL-1 – közepes nedvesítés; 20 mM esetében SYL-2 – alacsony nedvesítés). A reakcióelegyet mágneses keverőbot segítségével 700 rpm sebességgel kevertettünk 2 órán keresztül, majd a szilárd részecskéket 0,45 µm pórusmérettel rendelkező regenerált cellulózmembránon (Whatman™, GE Healthcare Sciences, Egyesült Királyság) történő szűréssel és 3×15 ml *n*-hexánnal történő mosással kinyertük.

3.2.4. A MPS-ba történő inkorporáció

A szilikába töltést egy BÜCHI Rotavapor R-125 rotációs vákuumbepárló készülékkel (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Svájc) végeztük. LDME-ből kimértünk adott mennyiséget ($m_{LDME} = 25,0$ vagy 62,5 vagy 100 mg), majd egy bepárló lombikban lévő 5,00 ml térfogatú metanolban feloldottuk. Ezek után diszpergáltuk a 3^2 teljes faktoriális kísérlettervnek megfelelő mennyiségű SYL-t (2. táblázat). Az LDME és a diszergált SYL tömegének összege 500 mg volt minden esetben. A metanolt 50 °C-on és 135 mbar nyomáson pároltuk be, a bepárló lombik forgatási sebessége 120 rpm volt. A forgatás miatt a diszperzió homogén maradt a folyamat során. A keletkező száraz port mélyhűtőben (-20 °C) tároltuk.

A kísérleteinkhez referenciaként használt fizikai keverékeket úgy készítettünk, hogy az LDME-t és az adott SYL-t összekevertük és homogenizáltuk Turbula® keverőben (Turbula System Schatz; Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Bazel, Svájc) 60 rpm forgatási sebességgel 10 percig.

2. táblázat. LDME-vel töltött SYL készítéséhez az RA alapján összeállított 3^2 teljes faktoriális kísérletterv

CTMCS (mM)	LDME:SYL tömegarány	Rövidítés: SYL-X-Y
0	5,00:95,0	SYL-0-5
	12,5:87,5	SYL-0-12.5
	20,0:80,0	SYL-0-20
10	5,00:95,0	SYL-1-5
	12,5:87,5	SYL-1-12.5
	20,0:80,0	SYL-1-20
20	5,00:95,0	SYL-2-5
	12,5:87,5	SYL-2-12.5
	20,0:80,0	SYL-2-20

3.2.5. Szemcseméret meghatározása lézerdiffrakciós módszerrel

A ko-őrölt termékek és a kiindulási anyagok átlagos szemcseméretét (D_{50}) Malvern lézerdiffraktométer (Malvern Mastersizer Scirocco 2000; Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Egyesült Királyság) segítségével mértük.

3.2.6. Porróntgen diffraktometria (XRPD)

A porróntgen-diffraktogramokat Bruker D8 Advance diffraktométerrel (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország) vettük fel, anód: Cu ($K\alpha$, $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), detektor: VANTEC-1 volt. A mintákat 40 kV feszültségen és 40 mA áramerősségen pásztáztuk. A szög tartomány $3-40^\circ$, illetve $5-40^\circ$ (2θ), a lépésköz $0,0007^\circ$, a lépésideje pedig $0,1 \text{ s}$ volt. A mintákat kvarc mintatartóra helyeztük, szobahőmérsékleten és környezeti relatív páratartalom mellett mértük. A $K\alpha_2$ sugárzást a diffraktogramból eltávolítottuk, háttérkorrekciót, simítást és a kiértékelést a DIFFRACTPLUS EVA szoftver segítségével végeztük.

3.2.7. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A termékek morfológiáját Hitachi S4700 pásztázó elektronmikroszkóppal (Hitachi Scientific Ltd., Tokió, Japán) 10 kV gyorsító feszültség és $10 \mu\text{A}$ áramerősség alkalmazásával vizsgáltuk. Nagyvákuumú elpárolgatóban arany-palládium réteget porlasztottunk a mintákra (90 s).

3.2.8. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR)

A minták ($0,15 \text{ g}$ KBr pasztillában homogenizálva) közép-IR spektrumát a $400-4000 \text{ cm}^{-1}$ hullámszámtartományon AVATAR 330 FT-IR spektrométerrel (Thermo Nicolet, Unicam Hungary Kft., Budapest, Magyarország) vettük fel. A spektrális felbontás 2 cm^{-1} volt, a mérés 128-szor lett megismételve. A spektrális elemzéshez az OriginPro 8.6 szoftvert (OriginLab Corporation, Northampton, USA) használtuk. A mintát tartalmazó KBr pasztillákat egy Specac® hidraulikus prés gépben (Specac Inc., Orpington, Egyesült Királyság) 10 t nyomás alá helyeztünk, a pasztillák átmérője 13 mm volt. A spektrumokat hidrofobizációs reakció, illetve a hatóanyag-segédanyag közötti másodlagos kölcsönhatások vizsgálatára használtuk.

3.2.9. Peremszögmérés

A MPS-ek látszólagos peremszögét (Θ) OCA 20 Optikai Peremszögmérő Rendszerrel (Dataphysics, Filderstadt, Németország) mértük. A port 3 tonna nyomás alatt az imént említett Specac® készülék segítségével préseltük, ezek után a pasztillák peremszögét 25°C -on kétszer desztillált vízzel határoztuk meg. A vízcseppek térfogata $4,3 \mu\text{l}$ volt.

3.2.10. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

$3-5 \text{ mg}$ mintákat Mettler-Toledo DSC-821e berendezéssel (Greifensee, Svájc) mértük. A mintákat alumíniumból készült mintatartóba helyeztük, majd $25-350^\circ\text{C}$ hőmérséklettartományon vizsgáltunk, a fűtési sebesség $10^\circ\text{C}/\text{perc}$ volt. Minden eredményt normalizáltunk a mintatömegre. A DSC görbéket a STAR® szoftverrel értékeltük ki.

3.2.11. In vitro kioldódási vizsgálatok

Az orrporok kioldódási vizsgálatait a nazális környezetnek megfelelő körülmények között ($30-32^\circ\text{C}$, $\text{pH}=5,60$) végeztük folytonos kevergetés mellett. A kioldóközeg térfogatát 50 ml -re állítottuk be, majd 5 ml mintát vételeztünk előre meghatározott időpontokban ($5, 10, 15, 30$

perc), majd azonnal megszürtük (Minisart SRP 25, Sartorius, Göttingen, Németország; pórusméret: 0,2 μm) és a benne lévő oldott hatóanyag mennyiségét spektrofotometriásan mértük (PerkinElmer, Lambda 20 spektrofotométer, Dreieich, Németország). A kivett minta térfogatát 5 ml friss kioldóközeggel pótoltuk, végül meghatároztuk a hígítás figyelembevételével az LD profilját és kinetikáját a különböző kétkomponensű keverékekből. A SYL-tartalmú minták esetében a kioldódási vizsgálatokat Hanson SR8 Plus kioldókészülékben (Hanson Research, CA, USA) végeztük 100 ml pH=6,8 foszfátpufferben, 37 °C-on, amely körülmények a vékonybélben található környezetnek feleltek meg. A lapátok keverési sebességét 100 rpm-re állítottuk be. Előre meghatározott időpontokban (5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 percnél) 3 ml mintát vettünk, és a térfogatot 3 ml friss kioldóközeggel pótoltuk. A kétkomponensű rendszerből (amely LDME-vel töltött SYL-t tartalmazott) 90 mg-ot kemény zselatin kapszulába (capsula operculata 00, Molar Chemicals, Budapest, Magyarország) töltöttünk a mérés előtt. A kapszulát cellulóz dialíziscsőbe (Merck Ltd, Darmstadt, Németország) helyeztük.

Meghatároztuk a termékek kioldódási kinetikáját. Megvizsgáltuk a mérési pontok illeszkedését nulladrendű, elsőrendű, Higuchi, Korsmeyer-Peppas és Hixson-Crowell kinetikára. A legmagasabb R^2 értékkel rendelkező illesztéshez tartozó kinetikát tekintettük a kioldódás kinetikájának adott termék esetében.

A kioldódások leírhatók egy telítési görbével, így általánosságban a következő egyenlet használható:

$$\frac{m_{\text{kioldódott hatóanyag}}}{m_{\text{hatóanyagtartalom}}} = \frac{a * t}{1 + b * t}$$

Ahol a t idő (min), az a (1/min) és b (1/min) *paramétereket* keressük, amelyekkel az egyenlet a lehető legszorosabban illeszkedik a mért pontokra. Az előnye ennek az egyenletnek, hogy kinetikafüggetlen, illetve az eredmények akkor sem torzulnak, ha nem 100 % a kioldódott hatóanyag mennyisége.

Ha $t \rightarrow 0$:

$$\lim_{t \rightarrow 0} \frac{a * t}{1 + b * t} = a * t = \frac{m_{\text{kezdeti kioldódott hatóanyag}}}{m_{\text{hatóanyagtartalom}}}$$

Azaz, az egyenlet egyszerűsödik és látható, hogy az a *paraméter* a kezdeti kioldódási sebességnek felel meg.

3.2.12. Nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerek

- *Az LD mennyiségi meghatározása:* Az LD kvantifikálása diódasoros detektorral felszerelt 1100 HPLC Agilent Series (Agilent Technologies, San Diego, CA, USA) készülékkel történt. Izokratikus módszert alkalmaztunk, Merck Millipore® (Merck Kft., Darmstadt, Németország)

által gyártott C18 oszlopot (LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 Å, pórusméret 5 µm) használtunk. Az eluens foszfát puffer (pH=2,4):metanol=50:50 (v/v) elegy volt, az LD-t 280 nm hullámhosszon kvantifikáltuk.

- Az LDME mennyiségi meghatározása: Az LDME kvantifikálása diódasoros detektorral felszerelt 1260 HPLC Agilent rendszerű (Agilent Technologies, San Diego, CA, USA) berendezéssel történt. A mozgófázis acetát puffer (pH=5,0):metanol=90:10 (v/v) volt. A mérésekhez Chrome-Clone™ 5 µm C18 100 Å oszlopot (150 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) alkalmaztunk, amelyhez egy C18 előtétkolonnához volt csatlakoztatva, a kvantifikáláshoz 280 nm hullámhosszat használtunk.

3.2.13. Stabilitási vizsgálatok

Az LDME-tartalmú per os porok stabilitását különféle körülmények között vizsgáltuk: a 0 °C felett a várható instabilitása miatt -20 °C hőmérsékleten, illetve 40 °C-on, 75 %-os relatív páratartalom mellett (gyorsított stabilitási vizsgálat az ICH Q1A (R2) irányelvei alapján). Ezenfelül az LD-tartalmú orrporok gyorsított stabilitási vizsgálatát is elvégeztük. A gyorsított stabilitási mérések során a hőmérsékletet és a páratartalmat KKS TOP+ klímakamra (POL-EKO-APARATURA, Wodzisław Śląski, Lengyelország) segítségével szabályoztuk. A stabilitási vizsgálatok 3 hónapon keresztül tartottak.

A kémiai stabilitási mérések kiértékeléséhez három párhuzamos mérést végeztünk.

3.2.14. Az eredmények statisztikai kiértékelése

Egy adott jelenséget szignifikánsnak tekintettünk abban az esetben, ha $p < 0,05$ volt.

A SYL-ek érintkezési szögét és a stabilitási vizsgálatokat 2 mintás t-próbával értékeltük Minitab 17 statisztikai szoftver (Minitab Ltd, Egyesült Királyság) segítségével. Emellett a termékek egyedi *in vitro* kioldási eredményeinek statisztikai összehasonlítását a Tukey HSD teszt segítségével végeztük el ($n=3$).

A kioldódási eredményekből kapott *a paraméter* értékei alapján a négyzetes válaszfelszínhez és a polinomiális modell elkészítéséhez a TIBCO Statistica® 13.4 (Statsoft Hungary, Budapest, Magyarország) szoftvert használtuk. A változók és a kölcsönhatások holisztikus hatásuk alapján történő befolyását varianciaanalízis (ANOVA) segítségével értékeltük ($p < 0,05$).

4. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK

4.1. LD-tartalmú orrporok előállítása

4.1.1. Kísérleti terv felépítése QbD megközelítés alapján

Mivel az LD-tartalmú orrporok képesek lehetnek csökkenteni a PD *off* periódusait a kezelés során, ezért a tudástérfejlesztés a potenciális kockázatok és az orrporok hatékonyságát befolyásoló tényezők feltérképezésére irányult. Az eljárás részeként az első lépésben a

QTPP-t határoztuk meg, amely következőket foglalta magában: beviteli kapu (intranazális), adagolási forma (mikronizált vagy nano-in-mikro részecskékből álló orrpor), terápiás javallat (szisztémás hatás elérése alacsony onsettel), fizikai stabilitás, termék szemcsmérete, kioldódási profil. Ezt követően a következő CQA-kat választottuk ki, amelyek: a termék nedvesíthetősége, a hatóanyag kristályossága, az azonnali hatóanyag-felszabadulás, oldhatóság és az átlagos részecskeméret és a stabilitás voltak. A következő lépésben a közvetlenül szabályozható CPP/CMA-kat határoztuk meg, amelyek a következők voltak: a hatóanyag:segédanyag arány, a hatóanyag kezdeti részecskemérete, a forgási sebesség és az őrlési idő.

Az irodalmi eredmények és a korábbi tapasztalatok alapján az RA azt mutatta, hogy a termékek jellemzésénél elsősorban az átlagos részecskeméretet, a kémiai stabilitást, az API kristályosságát és a felszabadulási sebességet kell figyelembe venni, mivel ezek a CQA-k vannak a legnagyobb hatással a termékek QTPP-jére a készítmények tulajdonságainak értékelésénél (kísérleti terv kimeneti paraméterei). Emellett a hatóanyag:segédanyag arány (CPP) tűnt a legfontosabb bemeneti paraméternek a termékek tulajdonságai szempontjából. Az LD kezdeti részecskeméret-eloszlását egy kereskedelmi forgalomban kapható termékkel standardizáltuk. Az RA azt mutatta, hogy az őrlési idő és a forgási sebesség várhatóan hasonló hatással lesz a tulajdonságokra. A munka első lépésében egy előkísérletet végeztünk, hogy információt gyűjtsünk a kétkomponensű orrporok ko-őrléssel történő előállításáról: az LD:segédanyag tömegarányt, a forgási sebességet és az őrlési időt szisztematikusan változtattuk két mukoadhezív segédanyag (CH és NaHA) felhasználásával (1. táblázat).

Ezek után további kétkomponensű nazális porokat formuláltunk különböző segédanyagokkal (α -CD, HPMC, PVP, PVA, MAN), amelyeket nazálisan már alkalmaztak és közismertek a jótékony hatásaikról.

4.1.2. A ko-őrölt nazális termékek fizikai-kémiai tulajdonságai

A termékek elsődleges optimalizálását a D₅₀ értékek és az amorfizáció alapján végeztük el. A ko-őrlés eredményeként a porkeverék átlagos részecskemérete drasztikusan csökkent, és a hatóanyag részben amorf lett, azonban a segédanyagok eltérő hatékonysággal befolyásolták az LD kristályosságát. A CH és az NaHA esetében nagyfokú amorfizációs mértéket mértünk, a polimerek nagyarányú (50:50 tömegarány) használata esetén. Amikor a kétkomponensű keverékeket 400 rpm fordulatszámon őrlöttük együtt, a CH- és NaHA-tartalmú porok kristályossági indexe 90 perc után magasabb volt a 60 perchez képest, ami részleges rekristallizációra utal ebben az időintervallumban. E folyamat elkerülése érdekében az őrlési időt a többi kétkomponensű keverék (α -CD-, HPMC-, PVP-, PVA-, MAN-tartalmú) esetében 60 percen maximalizáltuk. Emellett a 400 rpm fordulatszámot előnyben részesítettük a 300 rpm-mel szemben a magasabb amorfizációs fok miatt a többi (α -CD-t, HPMC-t, PVP-t, PVA-

t, MAN-t tartalmazó) termékénél, így esetükben az őrlési időt, valamint a hatóanyag:segédanyag arányt változtattuk az optimalizáció során. A PVA-tartalmú porok D_{50} értéke $45\text{ }\mu\text{m}$ -nél nagyobb maradt, azaz nem felelt meg az orrporokkal szemben definiált követelményeknek. A többi segédanyag esetében volt olyan formuláció, amely az elvárt tartományban volt. Az optimalizált termékek fizikai tulajdonságait a 3. táblázatban gyűjtöttük össze.

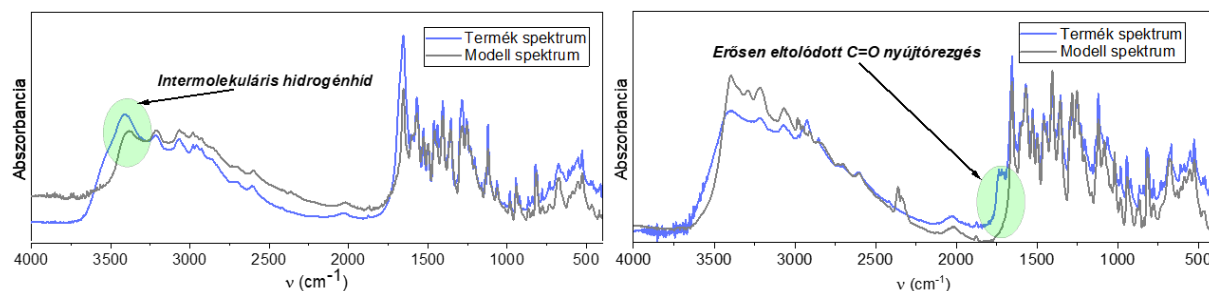
3. táblázat. Az optimalizált termékek ko-őrlésének paraméterei, a termékek és az adott segédanyag D_{50} értéke, valamint az észlelt másodlagos kölcsönhatások.

Termék: LD:segédanyag	D_{50} , kiindulási segédanyag (μm)	Optimalizált paraméterek			Termékek tulajdonságai	
		Tömegarány	Őrlési idő (min)	Forgási sebesség (rpm)	D_{50} , formuláció (μm)	Észlelt másodlagos kölcsönhatások
LD:CH	170,8	50:50	60	400	21,67	NEM
LD:NaHA	166,3	50:50	60	400	13,07	NEM
LD: α -CD	34,5	70:30	15	400	6,71	NEM
LD:HPMC	221,2	70:30	60	400	13,72	NEM
LD:PVP	66,1	50:50	30	400	7,67	IGEN
LD:PVA	2092,3	50:50	45	400	67,02	NEM
LD:MAN	104,5	50:50	60	400	8,90	IGEN

4.1.3. Másodlagos kölcsönhatások az LD és a segédanyagok között

A hatóanyag-segédanyag közötti másodlagos kölcsönhatásokat két nazális por esetében figyeltük meg (1. ábra):

- LD:PVP=50:50: a 3387 cm^{-1} -nél lévő csúcs az LD fenolos hidroxilcsoportjaként asszignálható, amely 3406 cm^{-1} hullámszámmra tolódott és kiszélesedett az adszorbeált víztartalom (vízklaszterek) miatt.
- Az LD:MAN=50:50 termék esetében a termék spektrumán egy jól látható, erősen eltolódott ($\Delta\nu=69\text{ cm}^{-1}$) csúcs jelent meg 1725 cm^{-1} hullámszámnál, amely valószínűleg az LD karboxilátjának C=O aszimmetrikus nyújtórezgéséhez tartozik, a spektrumon észlelt eltolódás a komponensek közötti intermolekuláris kölcsönhatás miatt történhetett meg.



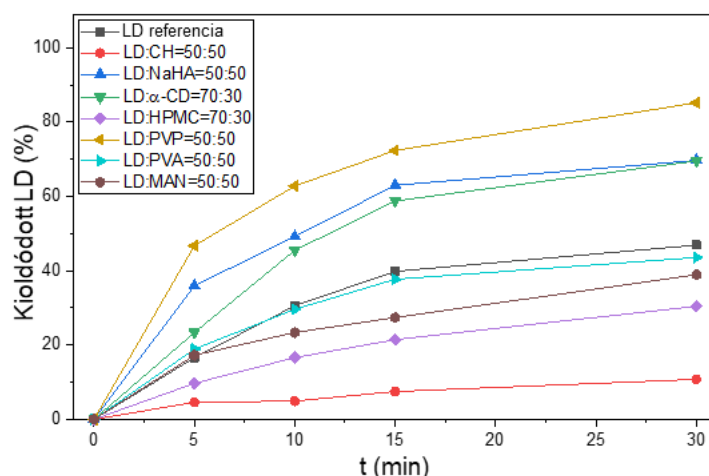
1. ábra. Az LD:PVP=50:50 (A) és az LD:MAN=50:50 (B) modell és mért spektruma

4.1.4. Rövid távú stabilitási vizsgálatok

40 °C, 75 %-os relatív páratartalom mellett történő tárolás következtében az LD:CH=50:50, az LD:PVA=50:50 és az LD:PVP=50:50 mintákban 2 hónap után a hatóanyagtartalom szignifikáns csökkenést mutatott ($p < 0,05$), amelynek az oka a polimerek vízmegkötő képessége lehetett. Az adszorbeált víz hatására az LD bomlást szenvedhetett. A többi minta és a referencia kiindulási LD-por esetében nem mértünk szignifikáns csökkenést ($p > 0,05$), így azok a 3 hónapos tárolási periódusban stabilisnak tekinthetők. Ezen eredmények alapján kijelenthető, hogy az LD a CH-val, a PVA-val és a PVP-vel inkompatibilis, hiszen a hatóanyag kémiai stabilitása ezen anyagok jelenlétében a referencia kiindulási LD-porhoz képest csökkent

4.1.5. A nazális porok *in vitro* kioldódása

Célul tűztük ki olyan orrpor előállítását, amely kioldódási sebessége gyorsabb, mint az LD-é, amely követelményt az LD:PVP=50:50, az LD:NaHA=50:50 és az LD: α -CD=70:30 kioldódása teljesített, a többi termék azonban lassabbnak bizonyult (2. ábra). Bár az LD:PVP=50:50 esetében volt a legnagyobb a felszabadulási sebesség, kémiaiag nem volt stabilis, ezért nem használható orrporként.



2. ábra. Az LD-tartalmú termékek és a referencia LD por kioldódási profilja

Az LD:MAN=50:50 termék lassú oldódási sebessége feltételezésünk szerint a ható- és a segédanyag közötti másodlagos kölcsönhatásoknak tudható be. Mivel az LD alapvetően viszonylag magas oldódási sebességgel rendelkezik, a MAN lassabb kioldódása akadályozhatja a hatóanyag felszabadulását. Az LD:HMPc=70:30 és az LD:CH=50:50 termékek akkor lennének használhatók, ha a készítmény képes lenne hosszabb ideig az ornyálkahártyához tapadni. Azonban, ha elnyújtott hatóanyagleadással rendelkeznek, ezek a porok nem alkalmasak a PK *delayed on* periódusainak kezelésére.

Összességében az LD:NaHA=50:50 és az LD: α -CD=70:30 tűntek megfelelőnek, hiszen stabilisak voltak és azonnali hatóanyag-felszabadulást tettek lehetővé, így várhatóan gyors onsettel fognak rendelkezni.

4.2. LDME-tartalmú hidrofobizált MPS-k előállítás per os bevitel céljából

4.2.1. Kísérleti terv felépítése QbD megközelítés alapján

Célul tűztük ki LDME-tartalmú MPS porok formulálását per os bevitel céljából, előrehaladott Parkinson-kórban szenvedő betegek számára, ebből kifolyólag a QTPP a következő volt: hatékonyság (terápiás hatékonyság), stabilis vérszint (előrehaladott Parkinson-kór), indikáció (elnyújtott hatóanyagleadás), beviteli kapu (per os), célzott betegpopuláció (előrehaladott Parkinson-kórban szenvedő betegek), adagolási forma (por kapszulában).

Ezt követően a következő CQA-kat választottuk ki, amelyek a fizikai stabilitás, a kémiai stabilitás, a nyújtott hatóanyagleadás, a hatóanyag homogenitása és a nedvesedési tulajdonságok voltak. A következő lépésben a CPP-eket és a CMA-kat vizsgáltuk, az előállítás két lépését azonosítottuk: 1) SYL hidrofobizáció: a rendszer víztartalma, TMCS-koncentráció, reakcióidő, reakcióhőmérséklet és relatív páratartalom. 2) SYL-töltés: a vákuumbepárlás során alkalmazott hőmérséklet, a vákuumbepárlás során alkalmazott vákuum, az oldószer típusa, az oldószer térfogata, a SYL pórustérfogata és az LDME:SYL arány.

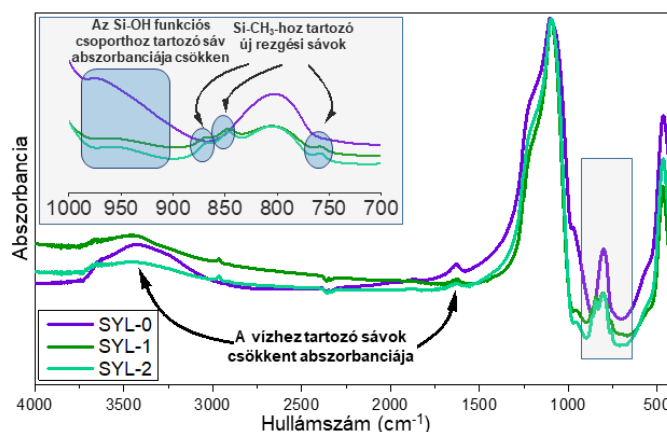
4.2.2. A SYL-0 hidrofobizálása

Az alkalmazott TMCS koncentráció növelése a vízzel mért peremszöget csökkentette (4. táblázat).

4. táblázat. A SYL-0 és a hidrofobizált származékai (SYL-1 és SYL-2) vízzel mért peremszöge

MPS	Θ_{H_2O} (°)
SYL-0	0
SYL-1	$66,86 \pm 7,16$
SYL-2	$120,49 \pm 2,78$

A $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ funkciós csoportok jelenlétét a hidrofobizált SYL-1 és SYL-2 mintákban közép-IR spektrumok segítségével ellenőriztük. A segédanyag kémiai módosítását követően egyértelmű különbségeket észleltünk a SYL-0-hoz képest (3. ábra).

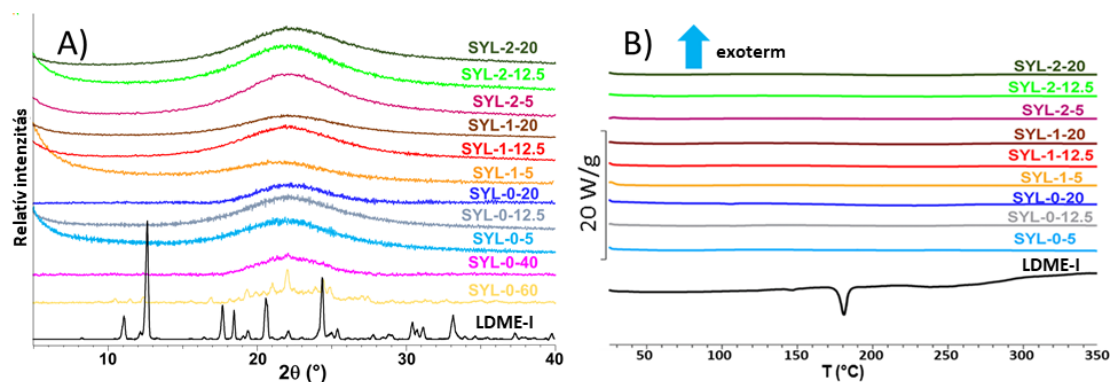


3. ábra. A SYL-0, SYL-1 és SYL-2 közép-IR spektruma; a $700\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ tartományt kiemelve

A 972 cm^{-1} -nél lévő rezgési sáv intenzitása a szilanol (-Si-OH) funkciós csoportok nyújtási rezgéseirez rendelhető, e sáv intenzitása a hidrofobizálás után csökkent, ami a szilanolcsoport-sűrűség csökkenésére utal. Az új funkciós csoportok jelenlétét a felületmódosított származékokban legfőképp a $865\text{--}750\text{ cm}^{-1}$ közötti spektrumtartományban (a 759 , 850 és 865 cm^{-1} hullámszámnál) újonnan megjelenő csúcsok jelezték, amelyek a -Si-CH₃ rezgéseként asszignálhatók. Ezenfelül az 1633 és 3435 cm^{-1} hullámszámnál található sávok az adszorbeált vízmolekulák rezgéseirez rendelhetők, ezek intenzitása csökkent a SYL-1 és SYL-2 esetében csökkent, mert a hidrofób származékok kevesebb vizet voltak képesek megkötni.

4.2.3. Az LDME betöltése a SYL mezopórusaiba

A szakirodalomban részletesen leírt mechanizmusok szerint hatóanyag MPS-be történő sikeres inkorporációja esetén amorf állapotú lesz, azonban túlzott mennyiség alkalmazása esetén a mezopórusos hordozó külső felületén kristályosodhat ki. Az LDME 20 w/w%-os vagy annál kisebb mennyiségben történő alkalmazásakor a hatóanyag a mezopórusokban adszorbeálódott (4. ábra), amit a diffraktogramok és a DSC görbék bizonyítottak. 40 és 60 w/w% hatóanyag esetén („SYL-0-40” és „SYL-0-60” jelű minták a 4./A ábrán) azonban a diffraktogramokon megjelentek jellegzetes kristályos csúcsok, ami arra utalt, hogy nem volt 100 %-os hatékonyságú a mezopórusokba való töltés. A 2θ értékek azonban eltértek a kiindulási LDME-től (LDME-I), ami valószínűleg egy új, ismeretlen polimorf kialakulására utalt.



4. ábra. A termékek és a referencia diffraktogramjai (A) és a DSC görbéi (B).

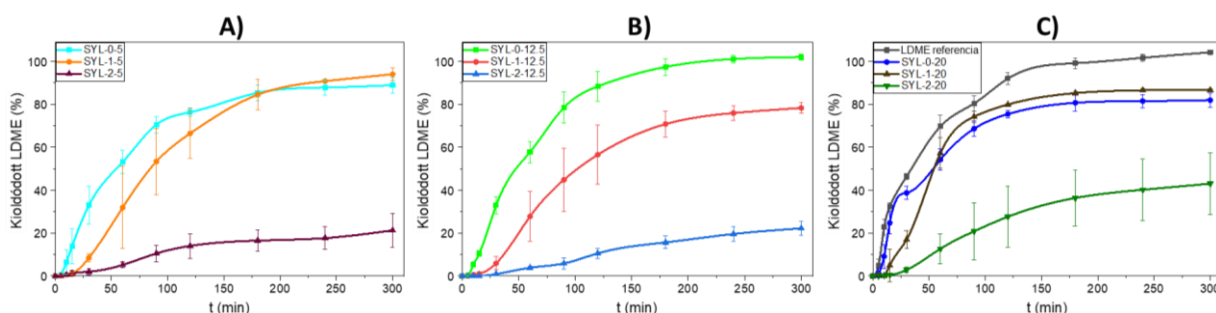
4.2.4. Rövid távú stabilitási vizsgálatok

A SYL-LDME kétkomponensű porok kémiai stabilitása megfelelő volt a mélyhűtőben (-20 °C) történő tároláskor, a hatóanyagtartalom azonban 40 °C -on és 75 %-os relatív páratartalom mellett szignifikánsan csökkent, ami azt jelzi, hogy az LDME-tartalmú készítményeket valószínűsíthetően nem lehet szobahőmérsékleten tárolni hosszabb távon. A SYL-0-20 diffraktogramján 3 hónapos, -20 °C -on történő tárolás után alacsony intenzitású éles csúcsok jelentek meg, ami arra utal, hogy a hatóanyag 20 tömegszázalékos aránya elég magas a

részleges rekrisztallizációhoz, tehát 20 w/w% LDME-t tartalmazó SYL-ek fizikai-kémiai tulajdonságai és ebből következően a kioldódási profilja megváltozhat a tárolás során.

4.2.5. *In vitro* kioldódás az LDME-vel töltött mezopórusos SYL formulációkból

Általános tendenciaként elmondható, hogy az LDME kioldódási sebessége valóban függött a SYL nedvesedésétől. Az *in vitro* kioldódási vizsgálatok azt mutatták, hogy a SYL hidrofobicitásának növekedése csökkenti a hatóanyag kioldódási sebességét. Az azonos mennyiségű LDME-t tartalmazó SYL-2-tartalmú formulációk jelentősen lassabb hatóanyagleadással rendelkeztek a SYL-0- és SYL-1-tartalmú készítményekhez képest, azonban a 20 w/w%-os LDME-tartalmú készítmények esetében a különbség kisebb volt (5. ábra). A SYL-2-tartalmú és a többi formuláció közötti különbség a SYL-2 rosszabb vizes nedvesedésével magyarázható a többi SYL-hez viszonyítva.



5. ábra. Az 5 w/w%-os (A), 12,5 w/w%-os (B) és 20 w/w%-os LDME-tartalmú termékek és a referencia LDME (C) *in vitro* kioldódási profilja

Meghatároztuk az *in vitro* kioldódás kinetikáját. A referencia LDME, a SYL-0-20, SYL-1-20 és SYL-2-20 termékek esetében elsőrendű kinetikát figyeltünk meg, feltehetően a viszonylag magas töltöttség miatt. A SYL-0-5, SYL-0-12.5, SYL-1-5 és SYL-1-12.5 termékekből történő kioldódás során mért pontok a legszorosabban a Hixson-Crowell-moddal illeszkedtek. A SYL-2-5 és a SYL-2-12.5 nulladrendű kinetikát mutatott, ami a formulációfejlesztésünk egyik fő célja volt, mivel várhatóan ezek a termékek lesznek képesek egyenletes vérszintet biztosítani. A független és a függő változók (*a paraméter*) közötti kapcsolat meghatározására egy polinomiális egyenletet állítottunk fel. Az eredeti egyenletből eltávolítottuk a két legkevésbé szignifikáns tagot ($-9,1 \cdot 10^{-5} x^2$; $2,33 \cdot 10^{-4} x y^2$), így a következő egyenletet kaptuk, amely definiálta, hogy az *a paraméter* hogyan függ a 3^2 teljes faktoriális kísérletterv bemeneti paramétereitől:

$$a \text{ paraméter} = 9,423 \cdot 10^{-3} - 7,818 \cdot 10^{-3} x + 1,921 \cdot 10^{-3} y - 1,271 \cdot 10^{-3} y^2 - 6,55 \cdot 10^{-4} x y + 8,15 \cdot 10^{-3} x^2 y - 6,23 \cdot 10^{-4} x^2 y^2$$

ahol *x* megfelel a TMCS koncentrációnak; *y* pedig az LDME w/w%-nak az LDME és a SYL a bepárláshoz történő összemérésakor. Az egyenlet statisztikai paraméterei a következők voltak:

$R^2 = 0,93381$, korrigált $R^2 = 0,91395$, átlagos négyzetes maradék = 0,0000044. Az egyenlet azon tagjait, amelyek szignifikánsan befolyásolják az *a paramétert*, félkövérrel kiemeltük. Az eredmények azt mutatták, hogy az LDME w/w%-os aránya pozitív szignifikáns hatással és negatív négyzetes hatással volt az *a paraméterre*, eközben a hidrofobicitási mérték növekedése (a TMCS koncentráció növekedése) jelentősen és szignifikánsan csökkentette a kioldódási sebességet. A Tukey HSD-tesztek szerint a SYL-0-20 kivételével minden egyes termékből szignifikánsan lassabban szabadult fel a hatóanyag, mint az LDME-referencia esetében.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A Ph.D. munkám során új, innovatív dopamin prodrugot (LD, LDME) tartalmazó mikronizált nazális és per os gyógyszerformák előállításával és a hatóanyag-felszabadulás szabályozásával foglalkoztam, az eredmények a következő pontokban foglalhatók össze:

I) A munka során dopamin prodrug-tartalmú porokat formuláltunk. A szakirodalomban csak kevés tanulmány foglalkozik az LD-tartalmú orrpor előállításával, a potenciális előnyök ellenére, minthogy a hatóanyag szilárd formában stabilisabb, nagyobb dózisok alkalmazhatók, nagyobb tartózkodási idő és gyorsabb felszívódási sebesség érhető el általa. Másrészt, legjobb tudomásunk szerint ezen eredmények előtt más kutatócsoport nem vizsgálta, hogy hidrofobizált MPS-be töltött LDME kioldódási sebessége elnyújtható-e, pedig ez megoldást jelenthetne a *wearing off* periódusok számának csökkentésére.

II) A részletes irodalmi áttekintés adatait és a kutatócsoport korábbi, e területen végzett kísérleteit felhasználva a QbD megközelítés segítségével meghatároztuk a QTPP-t a CQA-kat és a CPP/CMA-kat. A QTPP-CQA-k, illetve a CQA-k-CPP/CMA-k közötti kölcsönös függőség alapján kísérleti tervek állítottunk össze: a leginkább befolyásoló CPP/CMA-ket felhasználva a készítmények kritikus tulajdonságait optimalizáltuk és ellenőrzés alatt tartottuk.

III) Az LD-tartalmú orrporokat az LD és egy segédanyag ko-örlésével állítottuk elő. Az elsődleges optimalizálásukat az átlagos részecskeméret alapján végeztük. Egy adott segédanyag esetében legalább egy olyan LD:segédanyag arány volt, amely megfelelt az átlagos részecskeméret követelményeinek (kivéve a PVA-tartalmú minták). Emellett a ko-örlés minden esetben 60 percig amorfizációt eredményezett, azonban számos termékek esetében 60-90 perc között részleges rekristallizáció következett be. Az LD:PVP=50:50 és LD:MAN=50:50 esetében intermolekuláris másodrendű kölcsönhatásokat detektáltunk a komponensek között, amelyek befolyásolhatták az *in vitro* kioldódási eredményeket. Az LD:CH=50:50, az LD:PVA=50:50 és az LD:PVP=50:50 porok kémiai stabilitása nem volt megfelelő 40 °C-on, 75 %-os relatív páratartalom mellett, mivel 2 hónapos tárolás után az LD-tartalom szignifikáns csökkenést mutatott, tehát ezen segédanyagok inkompatibilisek voltak az LD-vel. Ugyanakkor

a többi termék és a referencia esetében az LD stabilis volt 3 hónapon keresztül. Az LD:PVP=50:50, az LD:NaHA=50:50 és az LD: α -CD=70:30 *in vitro* kioldódási sebessége gyorsabb volt, mint a referencia LD poré. Az eredmények szerint a vizsgált segédanyagok közül az NaHA és az α -CD kompatibilis az LD-vel orrporokban, mivel ezen segédanyagok alkalmazása előnyösen hatott a tulajdonságokra.

IV) Az MPS-t TMCS-vel hidrofobizáltuk, a felületmódosítás mértékét peremszögmérés és FT-IR segítségével igazoltuk. Ezután az LDME-t rotációs vákuumbepárlós módszerrel töltöttük a mezopórusokba. A hidrofobizáció mértékét és a töltési arányt optimalizáltuk, hogy olyan stabilis termékeket hozzunk létre, amelyek egyenletes vérszintet biztosíthatnak per os adagolás esetén. A termékek 40 °C-on, 75 %-os relatív páratartalom mellett nem, de a fagyasztóban (-20 °C) történő tárolás során kémiaiilag stabilisnak bizonyultak. A SYL-0-20 kivételével -20 °C-on fizikailag is stabilisak voltak, a SYL-0-20 esetében megindult az LDME rekrisztallizációja. Amikor az LDME aránya túl magas volt a töltési lépés során, rekrisztallizálódott, és a diffraktogramokon új csúcsok jelentek meg, amelyek nem egyeztek a kezdeti LDME (LDME-I) csúcsaival, ami valószínűleg egy új polimorf kialakulására utalt. A SYL-2-5 és SYL-2-12.5 termékek tekinthetők az optimalizált formulációknak, mivel -20 °C-on stabilisak voltak, nulladrendű kioldódási kinetikával és elnyújtott hatóanyagleadással rendelkeztek.

V) A kioldódási profil és a fizikai-kémiai tulajdonságok alapján az elnyújtott hatóanyagleadással rendelkező per os termékekkel (SYL-2-5 és SYL-2-12.5) csökkenthetők a *wearing off* periódusok, az azonnali felszabadulással rendelkező orrporok (LD:NaHA=50:50 és LD: α -CD=50:50) pedig alkalmasak lehetnek a *delayed on* periódusok kezelésére.

A munka főbb új eredményei és gyakorlati szempontjai:

- ✓ Az LD-tartalmú nazális porok és az LDME-vel töltött, per os hidrofobizált MPS-ek várható hatékonyságát befolyásoló faktorok meghatározása QbD megközelítés segítségével.
- ✓ LD-tartalmú nazális porokat formuláltunk és optimalizáltunk a PD *delayed on* periódusainak kezelése céljából. Az LD kompatibilisnek bizonyult az α -CD-vel és az NaHA-val, mivel az ezeket tartalmazó kétkomponensű porok kémiaiilag stabilisak voltak és azonnali hatóanyagleadással mutattak. Új információkat szereztünk az LD-segédanyag inkompatibilitásokról is.
- ✓ Az LDME-t irodalomban elsőként inkorporáltuk hidrofobizált MPS pórusrendszerébe. A hidrofobizáció mértékét és a töltési arányt optimalizáltuk, hogy stabilis formulációt állítsunk elő, amely elnyújtott hatóanyagleadást és nulladrendű kinetikát mutat. Ezek a termékek potenciálisan alkalmasak lehetnek a *wearing off* periódusok kezelésére.
- ✓ Feltehetően az LDME új polimorfját fedeztük fel, ami ipari szempontból kulcsfontosságú.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Bartos Cs., Pallagi E., Szabó-Révész P., Ambrus R., Katona G., **Kiss T.**, Rahimi M., Csóka I. (2018) Formulation of levodopa-containing dry powder for nasal delivery applying the quality-by-design approach. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 123 475-483. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.061>. – IF: 3,532 (2018-ban); Q1
2. **Kiss T.**, Alapi T., Varga G., Bartos C., Ambrus R., Szabó-Révész P., Katona, G. (2019) Interaction studies between levodopa and different excipients to develop coground binary mixtures for intranasal application. JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 108(8), 2552-2560. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.03.005>. - IF: 2,997 (2019-ben); Q1
3. **Kiss T.**, Katona G., Ambrus R. (2021) Crystallization and physicochemical investigation of melevodopa hydrochloride, a commercially available antiparkinsonian active substance. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA, 91(2) 34-52. <https://doi.org/10.33892/aph.2021.91.45-52>. - IF: – ; Q4
4. **Kiss T.**, Katona G., Mérai L., Janovák L., Deák Á., Kozma G., Kónya Z., Ambrus R. (2021). Development of a Hydrophobicity-Controlled Delivery System Containing Levodopa Methyl Ester Hydrochloride Loaded into a Mesoporous Silica. PHARMACEUTICS, 13(7), 1039. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071039>. – IF: 6,321 (2020-ban); Q1

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Baji Á., **Kiss T.**, Wölfling J., Kovács D., Igaz N., Gopisetty M. K., Kiricsi M., Frank, É. (2017). Multicomponent access to androstano-arylpyrimidines under microwave conditions and evaluation of their anti-cancer activity in vitro. JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 172, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.06.001>. – IF: 4,095 (2017-ben); Q1
2. Ambrus R., Szabó-Révész P., **Kiss T.**, Nagy E., Szűcs T., Smausz T., Hopp B. (2020). Application of a suitable particle engineering technique by pulsed laser ablation in liquid (PLAL) to modify the physicochemical properties of poorly soluble drugs. JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY, 57, 101727. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101727>. – IF: 3,981 (2020-ban); Q2
3. Katona G., Balogh G. T., Dargó G., Gáspár R., Márki Á., Ducza E., Sztojkov-Ivanov A., Tömösi F., Kecskeméti G., Janáky T., **Kiss T.**, Ambrus R., Pallagi E., Szabó-Révész P., Csóka, I. (2020). Development of meloxicam-human serum albumin nanoparticles for nose-to-brain delivery via application of a quality by design approach. PHARMACEUTICS, 12(2), 97. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020097>. IF: 6,321 (2020-ban); Q1

4. Gieszinger P., **Kiss T.**, Szabó-Révész P., Ambrus R. (2021). The Development of an In Vitro Horizontal Diffusion Cell to Monitor Nasal Powder Penetration Inline. PHARMACEUTICS, 13(6), 809. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060809>. IF: 6,321 (2020-ban); Q1

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

Verbális előadások

1. **Kiss T.**, Ambrus R. - Preparation and investigation of levodopa-containing powders for alternative administration. I. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged (2019) p. 8., 1 p.
2. **Kiss T.**, Ambrus R. – Treatment of the off-periods of Parkinson’s disease with levodopa and its derivative. II. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged (2020) p. 40. 1 p.
3. **Kiss T.**, Gieszinger P., Szabó-Révész P., Ambrus R. The investigation of the in vitro penetration of 3 types of model API using modified horizontal diffusion cells, ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA (0001-6659): 90(2-3). Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVI., Debrecen (2020) pp. 92-93. 2 p.
4. **Kiss T.**, Katona G., Mérai L., Janovák L., Szabó-Révész P., Ambrus R. Release Control of Levodopa methyl ester hydrochloride by loading into modified silica. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences, Pécs (2020) p.38. 1 p.
5. Ambrus R., Bartos Cs., Katona G., **Kiss T.**, Aigner Z., Szabó-Révész P. – Cyclodextrins in traditional and alternative drug formulations. Proceedings of The 1st International Electronic Conference on Pharmaceutics, online (2020) pp. 8912-8918. 7 p.
6. **Kiss T.**, Katona G., Ambrus R. – Modifying the release of an antiparkinsonian drug by using mesoporous carrier. III. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged (2021) p. 15. 1 p.

Poszter előadások

1. Bartos Cs., Szabó-Révész P., Rahimi M., Katona G., **Kiss T.**, Ambrus R. – Application of dry milling technique in order to prepare intranasal powder with nanonized levodopa. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA (0001-6659): 87(3-4) Paper P2B-7. 7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Balatonfüred (2017)
2. Katona G., **Kiss T.**, Jójárt-Laczkovich O., Szabó-Révész P., Bartos Cs. – Preformulation studies of levodopa containing nasal powders prepared by dry-milling. 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada (2018) p. 155. 1 p.
3. **Kiss T.**, Alapi T., Varga G., Szabó-Révész P., Katona G. – Physicochemical examination of co-milled levodopa containing nasal powders. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA

(0001-6659): 88(3) Paper P3/6. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs, Szeged (2018) pp. 135-136. 2 p.

4. **Kiss T.**, Katona G., Szabó-Révész P., Ambrus R. – Optimization of co-grinding procedure to prepare levodopa-containing binary nasal powders. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences, Pécs (2018) p.10. 1 p.

5. **Kiss T.**, Katona G., Ambrus R. Polymorph screening of an antiparkinsonian drug. EUFEPS Annual Meeting 2021, online (2021) pp. 87-88. 2 p.

6. **Kiss T.**, Katona G., Mérai L., Janovák L., Ambrus R. Investigation of surface modified mesoporous silicas loaded with an antiparkinsonian active substance. 13th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Gdańsk (2021) p. 113. 1 p.

A munka az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA) K134334 számú programja, a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítvány (Budapest), az Emberi Erőforrások Minisztérium ÚNKP-17-4-I-SZTE-3 és az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-3-SZTE-316 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

A munka megvalósulásához az Emberi Erőforrások Minisztériuma 20391-3/2018/FEKUSTRAT kódszámú programja, az EFOP 3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 kódszámú projekt, a Téaterületi Kiválósági Program (TKP-2020) alap, GINOP-2.3.2.-15-2016-00060 és a GINOP-2.2.1-15-2016-00007 kódszámú projekt támogatása is nagymértékben hozzájárult. A Syloid® XDP 3050-t Grace Materials Technologies (Grace GmbH, Worms, Németország) biztosította.

Prof. Dr. Szabóné Révész Piroskának szeretném megköszönni a szakmai mentorálást és azt, hogy lehetőséget teremtett, hogy még M.Sc. hallgatóként elkezdhessek a kutatócsoportnál dolgozni, Prof. Dr. Csóka Ildikónak pedig hálás vagyok, hogy intézetvezetőként megteremtette a lehetőséget arra, hogy Ph.D. hallgatóként megfelelő körülmények között végezhessem a munkámat.

Hálás vagyok a témavezetőimnek, Dr. habil Ambrus Ritának és Dr. Katona Gábornak, illetve a társszerzőimnek a támogatásukért, amelynek köszönhetően mind emberileg, mind szakmailag fejlődhettem a Ph.D. tanulmányaim során. A társszerzők közül szeretném kiemelni Dr. Bartos Csillát, akinek sokat köszönhetek, aki – habár hivatalosan nem volt a témavezetőm – rengeteget segített és támogatott. Ezenkívül hálás vagyok az asszisztensektől kapott rengeteg segítségre, akik közül szeretném kiemelni Lakatosné Fekete Piroskát mindig megkönnyítette a feladataimat az önzetlen segítségével.

Különösen hálás vagyok a családomnak, a barátaimnak és a barátnőmnek a tanulmányaim során mutatott támogatásukért, amely megadott minden alapot ahhoz, hogy ide juthassak.