



**Szegedi Tudományegyetem**

**Gyógyszerésztudományi Kar**

**Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet**

Intézetvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó, Pharm.D., Ph.D.

A Ph.D. értekezés tézisei

**QUALITY BY DESIGN MÓDSZERTAN ALKALMAZÁSA  
LIPOSZÓMÁLIS SZÁLLÍTÓRENDSZEREK TERVEZÉSI ÉS  
FEJLESZTÉSI FOLYAMATÁBAN**

**Dr. Németh Zsófia**

okleveles gyógyszerész

Témavezető:

**Prof. Dr. Csóka Ildikó, Pharm.D., Ph.D.**

**Szeged**

**2022**

## Szegedi Tudományegyetem

### Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Hohmann Judit, D.Sc., akadémikus

### Képzési program: Gyógyszertechnológia, gyógyszerfelügyelet

Programvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó, Ph.D., tanszékvezető egyetemi tanár

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Témavezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó, Ph.D.

### Dr. Németh Zsófia

## QUALITY BY DESIGN MÓDSZERTAN ALKALMAZÁSA LIPOSZÓMÁLIS SZÁLLÍTÓRENDSZEREK TERVEZÉSI ÉS FEJLESZTÉSI FOLYAMATÁBAN

### Komplex vizsga vizsgabizottság:

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

### Bíráló bizottság:

- Elnök:** Prof. Dr. Szatmári István, D.Sc., Szegedi Tudományegyetem,  
Gyógyszerkémiai Intézet
- Opponensek:** Dr. Csóka Gabriella, Ph.D., Meditop Gyógyszeripari Kft., Pilisborosjenő  
Dr. Kovács-Kiss Dorottya, Ph.D., Richter Gedeon Nyrt., Budapest
- Titkár:** Dr. habil. Doró Péter, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Klinikai  
Gyógyszerészeti Intézet
- Tag:** Dr. habil. Szakonyi Gerda, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,  
Gyógyszeranalitikai Intézet

Szeged

2022

## 1. BEVEZETÉS

Az új tudományos és műszaki kérdéseket felvető kutatás-fejlesztési trendek, a piaci dinamika és a szabályozási követelmények miatt a gyógyszeripar összetett és dinamikus fejlődő területekkel rendelkezik. Egy termékfejlesztési eljárás elején a rendelkezésre álló gyógyszerészeti ismeretek mellett a „kielégítetlen terápiás szükségletek” átfogó áttekintése is szükséges a lehetséges terápiás célok meghatározásához. A készítményeknek meg kell felelniük a hatóanyag, a beviteli kapu és a gyógyszerforma alkotta hármas követelményeinek. Az érintettek felek elvárásait is szem előtt kell tartani: megoldást kell nyújtani a betegek számára, és egy jövedelmező tervet kell szolgáltatni gyógyszeriparnak. A szabályozási követelményeket is már a fejlesztés korai szakaszában figyelembe kell venni. A termék tulajdonságait bele kell tervezni a termékbe, és bele kell építeni a fejlesztési folyamatba, amikor egy olyan terméknek a profil-meghatározása történik, amelynek az elvárt minőséggel és funkcionalitással kell rendelkezni, ezzel is elősegítve a beteg adherenciáját. Tudatos és módszeres elemzésre és tervezésre van szükség ezeknek a bemeneti követelményeknek az értékeléséhez és a fejlesztési tervbe való beépítéséhez. Ezt biztosítja a Quality by Design (QbD) alapú megközelítés, amely már a gyógyszerkutatás-fejlesztés korai szakaszában is alkalmazható, és idő- és költséghatékony megvalósítást eredményez a kutatástól a termék piacra kerüléséig és ipari méretű gyártásig.

Az Európai Gyógyszerügynökség a liposzómákat mesterségesen előállított, egy vagy több koncentrikus lipid kettős rétegből felépülő, egy vagy több vizes kompartmentet határoló „hólyagocskákként” definiálja. Az 1965-ben Alec D. Bangham által felfedezett liposzómák sikeres nanohordozóknak bizonyultak a célzott gén- és hatóanyag-szállításban, azonban a kihívások a területen megjelenő új információk és fejlesztések számával párhuzamosan emelkednek. Bizonyos tényezők kritikusan befolyásolják a liposzómák jellemzőit. A különböző gyártási technikák eltérő anyagi tulajdonságokat (Material Attributes, MA-k, a komponensek jellemzői) és folyamatparamétereket (Process Parameters, PP-k, az előállítási folyamat beállításai) igényelnek. A liposzómák kismértékű változásai is jelentős befolyással

---

**Rövidítések:** ANOVA - varianciaanalízis; CH – koleszterin; CMAs – kritikus anyagi tulajdonságok; CPPs – kritikus folyamat paraméterek; CQAs – kritikus minőségi paraméterek; DCP – dicetil-foszfát; DLS – dinamikus fényszórásmérés; DoE - kísérletterv; DPPE-PEG<sub>2000</sub> - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfoetanolamin-N-[metoxi(polietylén-glikol)-2000]; DS – tervezési tér; DSC - differenciális pásztázó kalorimetria; DSPE-PEG<sub>3000</sub> - 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfoetanolamin-N-[metoxi(polietylén-glikol)-3000]; fizsó – fiziológiás sóoldat; FT-IR - Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia; MAs – anyagi tulajdonságok; PBS – foszfát puffer oldat; PC - L- $\alpha$ -foszfatidilkolin; Pdl – polidiszperzitási index; PEG - polietylén-glikol; PPL – foszfolipid; PPs – folyamatparaméterek; QbD - Quality by Design; QTPP - minőségi céltermék profil; RA - kockázatértékelés; SA – sztearin-amin; T<sub>c</sub> - gél-folyadék kristályos fázisátmeneti hőmérséklet; T<sub>g</sub> - üvegesedési átmeneti hőmérséklet; TGA - termogravimetriás analízis; T<sub>m</sub> - fázisátmeneti hőmérséklet; ZP – zéta-potenciál

bírnak azok végső jellemzőire, ezért beviteli kapu-specifikus kritériumok, jól meghatározott gyártási folyamat és optimális folyamatszabályozás szükséges ahhoz, hogy a termék minősége megfeleljen a minőségi követelményeknek. Mindezeket az információkat figyelembe kell venni, rendszerezni és értékelni kell egy sikeres liposzóma alapú készítmény kifejlesztéséhez. Emellett továbbra is kihívást jelent a kutatók számára a hosszútávon stabil készítmények előállítása, így a megfelelő zéta-potenciál elérése, és a liofilizált minták eredeti minőségének visszanyerése az alkalmazás előtti rehidratálás során. Az a céloknak legmegfelelőbb kompozíciók megtalálása és a legjobb eredmények elérése része a kihívásnak. Így, ahogyan azt a jelen munkában is tettük, meg kell határozni és úgy kell beállítani a liposzóma jellemzőit befolyásoló kritikus paramétereket, hogy készítmény alkalmazhatóságához szükséges paramétereket, pl. a vezikulák méretét, a polidiszperzitást, és a zéta-potenciált az adott szinten tartsák.

Szervezett és jól indokolt kísérleti tervre és munkára van szükség a nanoméretű gyógyszerhordozók fejlesztéséhez szükséges ismeretek és követelmények ötvözéséhez amennyiben a hatóanyag, a beadási mód vagy a hordozó korlátokat jelent. A QbD koncepció és a kockázat értékelés (Risk Assessment, RA) alkalmazása a liposzómák fejlesztésekor a formulálási követelmények, pl. a stabilitás rangsorolása révén elősegíti a vezikulák optimalizálását valamint tervezésük és vizsgálatuk ésszerűsítését.

A kolloid rendszerek elektrokinetikai potenciálját zéta-potenciálként (ZP) definiálják. A ZP a felületi adhéziós és stabilitási vizsgálatok során nemcsak az elektromos kettősréteget és a nanorészecskét jellemzi, hanem magát a kolloid készítményt is, információt nyújtva a nanorészecske stabilitásával, keringési idejével, fehérje kölcsönhatásaival, permeabilitásával és biokompatibilitásával kapcsolatban. A ZP nagysága előre jelzi a nanoformuláció stabilitását. A magas értékek erősen töltött részecskéket jeleznek, amelyek a taszító elektromos erők miatt megakadályozzák az aggregációt és biztosítják a rediszpergálás lehetőségét, míg alacsony ZP értékeknél koaguláció alakulhat ki. Általában az abszolút értékben 30 mV feletti ZP a jó stabilitás jelének tekinthető, és aggregáció nélküli monodiszperz rendszereket jelez. Számos tényező módosíthatja a ZP-t. A liposzóma foszfolipid (phospholipid, PPL) kettősrétegébe különböző töltést indukáló komponensek (sztearin-amin (stearilamine, SA) vagy dicetil-foszfát (dicetyl-phosphate, DCP)) beépítésével a vezikulák ZP-je módosítható, abszolút értéke, így a minták stabilitása növelhető. Az SA- és DCP-tartalmú liposzóma készítmények szakirodalmát a doktori munkában pontosan áttekintettük. Az alkalmazott arányok és az eredmények kutatásonként eltértek, ami indokolja az idő- és anyagtakarékos kísérleti tervezésen alapuló kutatás és a későbbi SA- és DCP-tartalmú liposzóma készítmények fejlesztésének fontosságát.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A Ph.D. munkám célja liposzómás készítmények fejlesztése és vizsgálata volt a RA és a QbD elvek alkalmazásával. A kutatás két főterületre bontva valósult meg. Az első rész a QbD koncepció és az RA módszertan liposzómális készítmények korai fejlesztési fázisához való adaptálása volt. Ezt a második részben a liposzómák zéta-potenciáljának megfelelő értékre történő beállítása követte a vezikulák stabilitásának megőrzése érdekében.

A kutatás első része a QbD koncepció megvalósításának első négy szakaszára összpontosított:

1. A tudástér fejlesztése és a minőségi céltermék profil (Quality, Target Product Profile, QTPP) meghatározása.
2. A kritikus minőségi paraméterek (Critical Quality Attributes, CQA-k), a potenciálisan kritikus anyagi tulajdonságok és folyamatparaméterek azonosítása.
3. Az RA végrehajtása, a kritikus anyagi tulajdonságok (Critical Material Attributes, CMA-k) és a kritikus folyamatparaméterek (Critical Process Parameters, CPP-k) megkeresése, valamint az eredmények alapján a kísérletterv (Design of Experiment, DoE) felállítása.
4. A tervezési tér (Design Space, DS) meghatározása.

A tanulmányban a lipid film hidratálás technikával előállított liposzóma készítmények követelményeit vizsgáltuk. Az általános kezdeti RA után a kiemelt kritikus paramétereket új perspektívákból vizsgáltuk egy frissített, „köztes”, hatóanyagmentes liposzómális készítményeket célzó RA-ben. Összehasonlító vizsgálatokat végeztünk, és megállapítottuk a kiválasztott CMA-k és CPP-k: a foszfatidil-kolin (phosphatidylcholine, PC) – koleszterin (cholesterol, CH) tömegarány, a polietilén-glikol kapcsolt (PEGilált) PPL-tartalom, a PEGilált PPL, a hidratáló közeg és a krioprotektánsok minősége, valamint a munkahőmérséklet liposzómák tulajdonságaira gyakorolt hatását. A készítményeket vezikulaméret, felületi töltés, termodinamikai viselkedés, kialakult szerkezet és kötések alapján jellemeztük.

A kutatómunka második részében a stabil liposzómális formulációhoz szükségessé vált ZP értékének javítása történt:

A PC, CH és a töltést indukáló SA vagy DCP optimális molarányát  $3^2$  frakcionált faktoriális tervezés szerint határoztuk meg. A liposzómális formulációknak az alábbi elsődleges kimeneteli követelményeknek kellett megfelelniük:

- 150 nm alatti vezikulaméret
- 0,30-nál kisebb vagy azzal egyenlő polidiszperzitási index (polydispersity index, PdI)
- $|\zeta|$  30 mV-nál magasabb zéta-potenciál érték

### 3. ANYGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Anyagok

A liposzómák az alábbi anyagok alkoholos oldataiból lettek előállítva az **1. ábrán** látható DoE alapján: koleszterin (CH) (Molar Chemicals Kft., Budapest, Magyarország), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfotanolamin-N-[metoxi(polietilén-glikol)-2000] (ammónia só) (DPPE-PEG<sub>2000</sub>) és 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfotanolamin-N-[metoxi(polietilén-glikol)-3000] (ammónia só) (DSPE-PEG<sub>3000</sub>) (Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA), L- $\alpha$ -foszfatidil-kolin (PC), és oktadecil-amin (=SA), vagy dihexadecil-foszfát (=DCP) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Németország). A lipidek 96%(V/V) etilalkoholban (Molar Chemicals Kft., Budapest, Magyarország) voltak oldva.

Hidratáló közegként foszfát puffer oldat pH 7,4 (PBS pH 7,4), pH 5,6 (PBS pH 5,6) és pH 4,5 (PBS pH 4,5); továbbá, fiziológias sóoldat (fizsó) pH 5,5 volt alkalmazva az alábbi anyagokból előállítva: nátrium-klorid, kálium-klorid, kálium-dihidrogén-foszfát (Molar Chemicals Kft., Budapest, Magyarország), dinátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát, és dikálium-foszfát (Spektrum-3D Kft., Debrecen, Magyarország). Liofilezéskor négy szénhidrát: D-glükóz, D-szorbit (Hungharopharma Zrt., Budapest, Magyarország), D-trehalóz és inulin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Németország) volt krioprotektánsként alkalmazva a PPL tömeg 5%-nak megfelelő mennyiségben.

#### 3.2. Módszerek

##### 3.2.1. A *Quality by Design* módszer alkalmazása

###### 3.2.1.1. *Tudástér-fejlesztés és a QTPP meghatározása*

A célzott formuláció céltermékprofiljának és minőségi kritériumainak meghatározásához tudástér-fejlesztést végeztünk a céltermékre és a gyártási folyamatra vonatkozó releváns információk összegyűjtésével.

A QTPP a termék ideális esetben elérhető minőségi jellemzőinek összefoglalása. Tartalmazza a készítmény beteg szempontjából lényeges paramétereit, a klinikai felhasználás követelményeit és a szabályozási szempontokat.

###### 3.2.1.2. *A CQA-k meghatározása*

A CQA-k azok a tényezők, amelyek kritikus hatással vannak a célzott termékminőségre (QTPP). Egy, a QTPP-ből levezetett listát jelent a termék biztonságosságával és hatékonyságával kapcsolatos jellemzőkről, beleértve azokat a fizikai, kémiai, biológiai vagy mikrobiológiai tulajdonságokat is, amelyeknek el kell érniük a megfelelő tartományt vagy határértéket a végtermék állandó minőségének biztosítása érdekében.

### **3.2.1.3. A CMA-k és a CPP-k meghatározása**

A CMA-k és a CPP-k a kiválasztott anyagokkal és a meghatározott gyártási módszerrel kapcsolatos tényezők, így befolyásolhatják a CQA-kat, ezért monitorozni, kontrollálni kell azokat, hogy a folyamat a megcélzott minőséget eredményezze.

### **3.2.1.4. Kockázatértékelés**

A QbD-vezérelt fejlesztési folyamat legfontosabb lépése az RA, amely segít azonosítani és rangsorolni a CMA-kat és a CPP-ket azok a termék CQA-ira gyakorolt hatása alapján. Az RA-t tipikusan a gyógyszerfejlesztési folyamat első lépéseként hajtják végre, és később, amikor több információ válik elérhetővé újraértékelik. Az RA folyamatához a LeanQbD szoftvert (QbD Works LLC, Fremont, CA, USA) használtuk. Az eljárás a QTPP és a CQA-k, valamint a CQA-k és a CMA-k/ CPP-k közötti, háromszintű skálán minden paraméterpárra külön-külön elvégzett interdependencia vizsgálattal kezdődött. Eredményként Pareto-diagramok készültek, amelyek bemutatják a CQA-k és a CMA-k/ CPP-k rangsorát a végtermékre (QTPP) gyakorolt lehetséges hatásuk szerint.

### **3.2.1.5. Kísérletterv**

A DoE a kezdeti RA eredményei alapján lett felépítve. Ez egy gyakorlati fejlesztési terv, amelyet az RA prioritási rangsora által kiválasztott legrelevánsabb befolyásoló tényezők (CQA-k, CMA-k, CPP-k) alapján terveznek és hajtanak végre a tervezési tér (DS) meghatározása érdekében. A tanulmányhoz készült liposzómák karakterizálási eredményeit a meglévő RA frissítéséhez használtuk fel.

Hat tényezőt választottunk ki arra a célra, hogy megvizsgáljuk a „köztes” hatóanyag-mentes liposzómális készítményekre gyakorolt hatásuk jelentőségét, és ezáltal igazoljuk CMA/ CPP-ként betöltött szerepüket: PC-CH tömegarány, PEGilált PPL tartalom, a PEGilált PPL, a hidratáló közeg és a krioprotektánsok minősége, valamint az előállítási hőmérséklet.

Az előállítási hőmérséklet és a PC-CH tömegarány hatásait hagyományos, csak PC-t és CH-t tartalmazó készítményeken tanulmányoztuk. Az ezekből a korai tanulmányokból nyert információk felhasználásával javított körülmények között (előre beállított hőmérséklet (60°C) és PPL-CH tömegarány (60:40 vagy 80:20)) vizsgáltuk a PEGilált PPL tartalom, a PEGilált PPL típusa, a hidratáló közeg és a krioprotektáns minőségének hatásait.

A liposzóma formulációk ZP-jának optimalizálása céljából két membrán-adalékanyagot, az SA-t és a DCP-t vizsgáltuk a 3<sup>2</sup> frakcionált faktoriális elrendezés szerint. A liposzómákat 60°C-on állítottam elő és 5,6 pH-jú PBS-sel hidratáltuk. A kiválasztott független változók a liposzóma komponensek: PC, CH és SA/DCP moláris mennyiségei voltak. Ezeket a kísérleti tényezőket szisztematikusan 3 szinten 9 kísérleti összeállításban változtattuk (**2. táblázat**). Elsődleges kimeneti eredményként ezeknek a független

tényezőknek a vezikulaméretre, PDI-re és a ZP értékekre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A ZP értékek esetében egy-egy kvadratikus válaszfelületet ábrázoltunk, és az összefüggéseket leíró másodrendű polinom modelleket állítottunk fel az alábbiak szerint:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_3 X_3 + \beta_{33} X_3^2, (1)$$

Ahol Y a válaszváltozó;  $\beta_0$  egy konstans;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , és  $\beta_3$  lineáris együtthatók; és  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$ , és  $\beta_{33}$  másodfokú együtthatók. A ZP válaszfelületi diagramjait az SA/DCP regressziós modellje szerint ábrázoltuk.

### **3.2.2. A liposzómák előállítási és liofilizálási folyamatai**

A liposzómákat lipid film hidratációs módszerrel állítottuk elő úgy, hogy a különböző arányban alkalmazott alkoholos lipid oldatok keverékéből (**I. ábra**) az etanolt 150 mbar nyomáson, a vizsgált hőmérsékleten vagy általánosságban 60°C-on Rotavapor<sup>®</sup> R-210/215-ben (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Svájc) 25 rpm fordulatszámom elpárologtattuk. A lipid filmet a kiválasztott hidratáló közeggel hidratáltuk. A készítményeket 30 perces ultrahangos kezelésnek vetettük alá (Elmasonic S 30 H ultrahang kád, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Németország). A liposzómákat két lépésben, vákuum membránszűréssel (Rocker 400 olajmentes vákuumszivattyú, Rocker Scientific Co., Ltd. New Taipei City, Tajvan) 0,45 µm-es (Labsystem Kft., Budapest, Magyarország), majd 0,22 µm-es membránszűrő (Ultipor<sup>®</sup>, Pall Corporation, New York, NY, USA) alkalmazásával méretformáztuk. Az előállított mintákat *in situ* vizsgáltuk vezikulaméretre, a polidiszperzitásra és a ZP-re nézve folyékony állapotban, majd a további vizsgálatokhoz liofilizáltuk -40°C-on és 0,01 atm-án (SanVac CoolSafe fagyasztva szárító berendezés, LaboGeneTM, Lillerød, Dánia). A liofilizált mintákat 2-8°C-on tároltuk.

### **3.2.3. A liposzómák karakterizálása**

#### **3.2.3.1. Vezikulaméret és zéta-potenciál meghatározás**

A folyékony liposzóma formulációk vezikulaméretét és PDI értékét dinamikus fényszórásmérés (Dynamic Light Scattering, DLS) technikával mértük. A méréseket egy 633 nm hullámhosszú lézerrel felszerelt Malvern Zetasizer Nano ZS készülékkel (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) végeztük, hajlított kapilláris zéta cellákban (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) 25°C-on. A liposzómák elfogadási kritériuma általánosságban a 200 nm alatti méret volt, az optimalizált minták esetében pedig 150 nm alatti érték. A PDI definíció szerint egy 0,00 és 1,00 közötti dimenzió nélküli szám, amely a részecskék méreteloszlásának egyenletességéről ad információt. A lipidalapú nanohordozók esetében a 0,30 és az az alatti PDI értékű formulációk fogadhatóak el. A 30 mV feletti abszolút ZP értékek jó stabilitással rendelkező készítményt jeleznek.



Előállítási hőmérséklet	PC : CH tömegarány	PEGilált PPL mennyisége	PEGilált PPL minősége	Hidratáló közeg típusa	Krioprotektáns típusa	Eredmények	
70°C	PC : CH 100 : 0			fizsó		166 ± 18 nm 0,11 ± 0,04 -8,1 ± 1,6 mV	
				fizsó		135 ± 24 nm 0,24 ± 0,02 -9,6 ± 1,3 mV	
				fizsó		149 ± 18 nm 0,25 ± 0,03 -9,3 ± 0,7 mV	
	PC : CH 90 : 10			PBS pH 5,6		172 ± 44 nm 0,24 ± 0,03 -8,9 ± 1,3 mV	
				fizsó		176 ± 30 nm 0,26 ± 0,03 -8,7 ± 1,5 mV	
				fizsó		196 ± 3 nm 0,33 ± 0,06 -4,8 ± 0,7 mV	
	PC : CH 80 : 20	PC : PEG-PPL : CH 73,3 : 6,7 : 20	DSPE-PEG <sub>3000</sub>	PBS pH 5,6	inulin	142 ± 35 nm 0,33 ± 0,04 -5,4 ± 2,7 mV	
				PBS pH 5,6	trehalóz	145 ± 15 nm 0,25 ± 0,03 -5,3 ± 2,0 mV	
				PBS pH 5,6	inulin	137 ± 42 nm 0,28 ± 0,01 -5,8 ± 1,9 mV	
	60°C	PC : CH 70 : 30			fizsó		200 ± 34 nm 0,30 ± 0,08 -8,9 ± 0,7 mV
					PBS pH 7,4	glükóz	117 ± 15 nm 0,26 ± 0,06 -1,6 ± 0,7 mV
					PBS pH 5,6	glükóz	110 ± 5 nm 0,33 ± 0,05 -2,3 ± 1,2 mV
PC : PEG-PPL : CH 40 : 20 : 40		DPPE-PEG <sub>2000</sub>		fizsó	trehalóz	103 ± 3 nm 0,29 ± 0,03 -3,2 ± 0,9 mV	
				fizsó	glükóz	104 ± 7 nm 0,29 ± 0,07 -1,3 ± 0,5 mV	
				PBS pH 7,4	glükóz	138 ± 23 nm 0,27 ± 0,07 -2,8 ± 0,6 mV	
PC : PEG-PPL : CH 50 : 10 : 40		DPPE-PEG <sub>2000</sub>		fizsó	glükóz	152 ± 44 nm 0,27 ± 0,01 -2,0 ± 1,2 mV	
				PBS pH 7,4	inulin	122 ± 7 nm 0,22 ± 0,03 -4,7 ± 1,0 mV	
				PBS pH 5,6	inulin	157 ± 40 nm 0,24 ± 0,08 -6,6 ± 0,3 mV	
PC : CH 60 : 40		PC : PEG-PPL : CH 55 : 5 : 40	DSPE-PEG <sub>3000</sub>	PBS pH 5,6	trehalóz	170 ± 35 nm 0,22 ± 0,04 -5,0 ± 0,5 mV	
				PBS pH 4,5	inulin	139 ± 12 nm 0,19 ± 0,03 -4,5 ± 0,3 mV	
				PBS pH 7,4	inulin	113 ± 6 nm 0,23 ± 0,02 -3,8 ± 0,2 mV	
50°C	PC : CH 60 : 40	PC : PEG-PPL : CH 55 : 5 : 40	DPPE-PEG <sub>2000</sub>	PBS pH 5,6	inulin	109 ± 8 nm 0,20 ± 0,02 -3,6 ± 1,1 mV	
				PBS pH 5,6	inulin	119 ± 4 nm 0,21 ± 0,00 -5,8 ± 0,9 mV	
				PBS pH 5,6	trehalóz	108 ± 11 nm 0,24 ± 0,09 -4,1 ± 4,2 mV	
	PC : CH 60 : 40	PC : PEG-PPL : CH 55 : 5 : 40	DPPE-PEG <sub>2000</sub>	fizsó	szorbit	130 ± 5 nm 0,30 ± 0,05 -4,1 ± 0,8 mV	
				fizsó	glükóz	103 ± 4 nm 0,25 ± 0,05 -2,5 ± 0,5 mV	
				PBS pH 4,5	inulin	136 ± 9 nm 0,19 ± 0,02 -6,0 ± 1,4 mV	
	PC : CH 60 : 40	PC : PEG-PPL : CH 55 : 5 : 40	DPPE-PEG <sub>2000</sub>	PBS pH 4,5		151 ± 28 nm 0,18 ± 0,07 -9,0 ± 2,4 mV	
				PBS pH 5,6		152 ± 20 nm 0,18 ± 0,08 -10,3 ± 1,8 mV	
				fizsó		154 ± 14 nm 0,24 ± 0,02 -9,6 ± 2,0 mV	

1. ábra: Összefoglaló folyamatábra a DoE-ről, amely egyesíti a vizsgált faktorokat és bemutatja az alkalmazott kombinációkat kiegészítve a liposzómák karakterizálási vizsgálatának eredményeivel.

### **3.2.3.2. Termikus viselkedés elemzése**

Az RA vizsgálatokhoz készült liposzómák termodinamikai állapotát 25-300°C tartományban differenciális pásztázó kalorimetriával (Differential Scanning Calorimetry, DSC) (TA Instruments DSC Q20, TA Instruments, New Castle, DE, USA) ellenőriztük. A lehetséges fázis ( $T_m$ ) és üvegesedési ( $T_g$ ) átmeneti hőmérsékleteket 6-10 mg fagyasztva szárított mintából határoztuk meg 10°C/perc fűtési sebesség mellett száraz nitrogéngázáramban. A termogravimetriás analízis (Thermogravimetric Analysis, TGA) során a liofilizált minták 8-10 mg-ját 25-300°C-os hőmérséklet tartományban, 10°C/perc fűtési sebességgel melegítettük és száraz nitrogéngázban vizsgáltuk Setaram Labsys TG-DTG-DTA analizátorral (SETARAM Instrumentation, Caluire, Franciaország).

A ZP optimalizáláshoz készült minták DSC méréseit Mettler-Toledo DSC 3<sup>+</sup> Stare System DSC analizátorral (Mettler-Toledo International, Inc., Columbus, OH, USA) végeztük 10-65°C tartományban 2°C/perc fűtési sebességgel 6-10 mg liofilizált mintából 150 ml/perc argonáram mellett. A TGA vizsgálatok beállítási megegyeztek az előbb leírtakkal, de a méréseket a Mettler-Toledo TGA/DSC 1 termogravimetriás analizátorral (Mettler-Toledo International, Inc., Columbus, OH, USA) végeztük. Az eredményeket a STAR<sup>e</sup> 9.30 szoftverrel (Mettler-Toledo International, Inc., Columbus, OH, USA) értékeltük ki.

### **3.2.3.3. A kémiai kötések vizsgálata**

Közép-infravörös spektroszkópiát használtunk a liposzóma komponensek között kialakuló kémiai kötésekről való információszerzésére. A liposzómák alkotóelemei közötti kölcsönhatásokat Avatar 330 Fourier-transzformációs infravörös (FT-IR) Thermo Nicolet spektrométerrel (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA) mértük. A spektrumokat a fagyasztva szárított pormintákon a 4000-400 cm<sup>-1</sup> hullámszám tartományban vettük fel 4 cm<sup>-1</sup> spektrális felbontással abszorbancia módban. A liofilizált porokból káliumbromiddal pelletekké préselve készítettük el a mintákat.

### **3.2.4. Statisztikai kiértékelés**

Az adatok elemzése és a grafikonok készítése Microsoft<sup>®</sup> Excel (Microsoft Office Professional Plus 2013, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), OriginPro<sup>®</sup> 8.6 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) és JMP<sup>®</sup> 13 szoftverrel (SAS Institute, Cary, NC, USA) történt. A varianciaanalízis (One-Way Analysis of Variance, ANOVA) statisztikai elemzést a TIBCO Statistica<sup>®</sup> 13.4 szoftverrel (Statsoft Hungary, Budapest, Magyarország) végeztük. A szignifikancia-vizsgálat során azokat a változókat tekintettük szignifikánsnak, amelyek p-értéke kisebb, mint 0,05 a 95%-os konfidencia szinten. Minden kísérletet három párhuzamossal végeztünk, és megadtuk az átlagot és standard eltérést.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK

### 4.1. Quality by Design alapú liposzóma fejlesztés

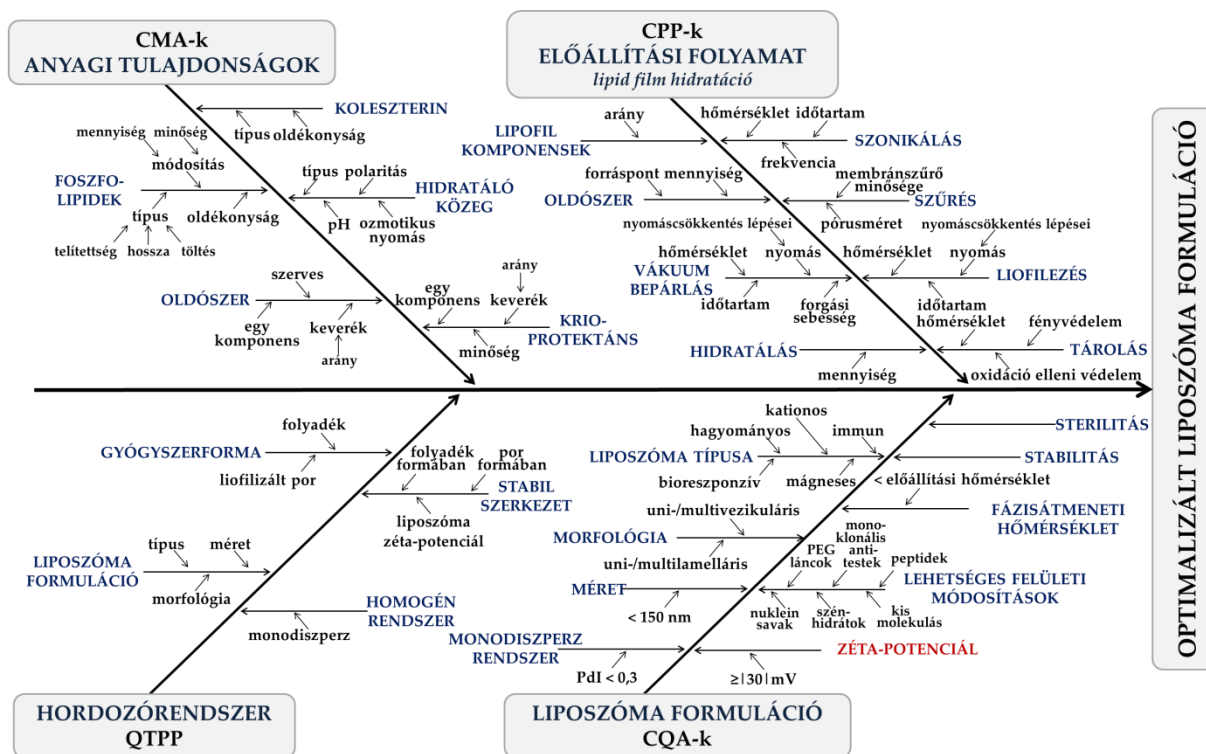
#### 4.1.1. Tudástér-fejlesztés és a QTPP meghatározása

A QbD alapú liposzóma fejlesztés első lépésében, a tudástér-fejlesztési folyamatban összegyűjtöttük azokat a tényezőket, amelyek befolyásolhatják a liposzóma termék minőségét. Egy Ishikawa diagramot állítottunk össze a liposzómákat és az előállítási folyamatot jellemző információk és az azok közötti kapcsolatok szemléltetésére (2. ábra). Az adatokat 4 csoportba soroltuk az alábbiak szerint:

- hordozórendszer: monodiszperz eloszlású, stabil liposzóma készítmény
- liposzóma formuláció: a vezikulák fizikai jellemzői
- anyagi tulajdonságok: a liposzóma komponensek és a segédanyagok
- előállítási folyamat: a lipid film hidratációs módszer lényeges lépései

Ezek a kategóriák képezték rendre a QTPP, CQA-k, CMA-k és CPP-k későbbi definícióinak alapját.

Összegyűjtöttük azokat a tényezőket, amelyek egy liposzóma készítményt jellemeznek, és megállapítottuk az általános QTPP-t. Ezt a listát konkretizáltuk a „köztes” liposzóma termékekre, ami jól alkalmazható alapot jelenthet további hordozórendszerek fejlesztéséhez. A készítmény formája folyékony formuláció és a stabil liofilizált por lehet. A 100-200 nm-es mérettartományban lévő vezikulák számos módon alkalmazhatóak.



2. ábra: Ishikawa diagram azokról a tényezőkről, amelyek befolyásolják a lipid film hidratációs módszerrel készült liposzómák minőségét.

A készítmény stabilitása befolyásolja a termék biztonságosságát, hatékonyságát és minőségi profilját. Így a hatóanyag-mentes „üres” liposzómák QTPP-jeként egy stabil, nagy unilamelláris vezikulákat tartalmazó, monodiszperz és homogén készítményt határoztunk meg. Az RA során kritikusnak talált tényezők hatására a liposzóma tulajdonságokban bekövetkezett változásokat ezeken a liposzómákon vizsgáltuk a karakterizálási tanulmányban.

#### **4.1.2. A CQA-k meghatározása**

A CQA-k alkotják azoknak a minőségi jellemzőknek a listáját, amelyek kritikus hatással vannak a QTPP-re. Az „üres”, „köztes” liposzómák CQA-iként azonosított elemek az alábbiak:

- liposzóma típusa: meghatározza a lipidek minőségét – hagyományos liposzómák
- célzott hatóanyag-bevitel kompatibilitás: a készítménynek alkalmasnak kell lennie a későbbiek során hatóanyag bezárására
- vezikulaméret: átlagos részecskeméret 100-200 nm között
- lamellaritás: unilamelláris liposzómák
- morfológia: szférikus vezikulák
- polidiszperzitási index: monodiszperz rendszer –  $PdI \leq 0,30$
- zéta-potenciál:  $\pm 30$  mV körül
- felületmódosítás: célzott hatóanyag-bevitel – hagyományos és PEGilált liposzómák
- fázisátmeneti hőmérséklet: ideális, ha az előállítási hőmérséklet magasabb, mint  $T_m$
- sterilitás: a mikrobiológiai követelményeknek való megfelelés – nem kell pirogénmentesnek lennie
- stabilitás: aggregáció nélküli vezikulák stabil fizikai és kémiai tulajdonságokkal

#### **4.1.3. A CMA-k és a CPP-k meghatározása**

Az előállítási módszer meghatározza a liposzóma formulálási folyamat CPP-it; így a lehetséges CMA-k és CPP-k vizsgálata előtt ki kell választani azt a gyártási technikát, amely lehetővé teszi a célzott CQA-kat. A tanulmányokhoz a lipid film hidratációs módszert választottuk. Az RA-során a kritikus MA-k és PP-k CMA-kká és CPP-kkké válnak.

- A liposzóma jellemzőit befolyásoló MA-k: a PPL-k és a CH-származékok minősége, a falalkotók aránya, a felületmódosítók, a lipidek fázisátmeneti hőmérséklete, az oldószer, a hidratáló közeg, a krioprotektánsok és a további adalékanyagok minősége
- PP-k amelyek befolyásolják a vezikulák tulajdonságai: az előállítási hőmérséklet, az oldószer és az hidratáló közeg mennyisége, valamint a lipid film hidratációs módszer beállításai (oldás, vákuumbepárlás, ultrahangos kezelés, szűrés, liofilizálás és tárolás)

#### 4.1.4. Kezdeti és frissített kockázatértékelés

A faktorok kritikusságát az RA-ban azonosítottuk. Az elemek egymás számára jelentett kockázatainak súlyosságát a QTPP és a CQA-k, valamint a CQA-k és a CMA-k/ CPP-k közti háromszintű interdependencia vizsgálatban határoztuk meg. A generált Pareto-diagramok illusztrálták a kritikus tényezők rangsorait. A kezdeti RA-ból kapott CMA-k és CPP-k becslött kritikusságát kísérletekben igazoltuk, és az eredményeket a frissített RA-ban hasznosítottuk.

Az „üres” hordozórendszerek esetében a hatóanyaggal kapcsolatos tényezők figyelmen kívül hagyása után a stabilitás, a célzott hatóanyag-bevitel kompatibilitás, a liposzóma típusa, a zéta-potenciál értéke, a vezikulaméret, a felületmódosítások (PEGilált PPL-ek), továbbá a monodiszperz méreteloszlást kaptuk a frissített RA alapján a „köztes” liposzóma készítményekre releváns CQA-kként

A CMA-k/ CPP-k közül a PPL- és az hatóanyag-tartalom van a legnagyobb hatással a liposzómák minőségére. A PPL-ek mellett a felületi módosítások, a CH típusa, a PC:CH arány, az összetétel  $T_m$  értéke, az előállítási hőmérséklet és a hidratáló közeg befolyásolják kritikusán a lipid film hidratációs módszerrel előállított „üres” liposzómákat. A CMA-k/ CPP-k hatása akkor elemezhető, ha egyes értékeket adott szintre állítunk be, míg a vizsgálat tárgykörébe tartozókat a DoE szerint változtatjuk.

#### 4.1.5. A liposzómák karakterizálása

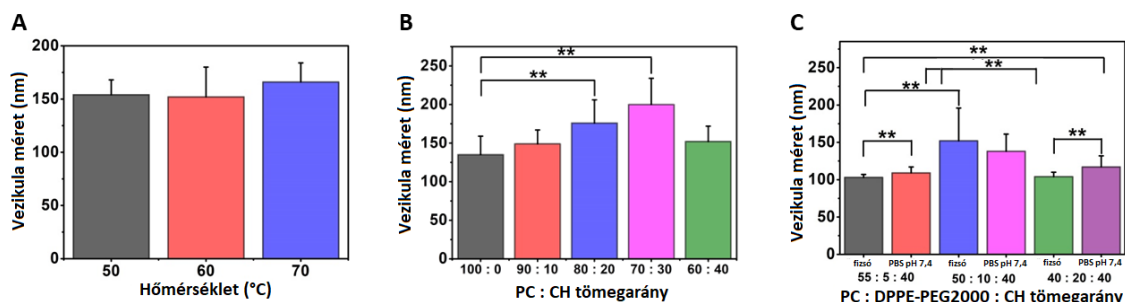
A lipid film hidratációs folyamat beállításait a korábban meghatározott stabil értékeken tartottuk, kivéve az előállítási hőmérsékletet, amelyet a további vizsgálatokhoz az eredmények alapján választottunk ki. A releváns CMA-k közül a PPL-CH arányt, a PEGilált PPL hatását, valamint a hidratáló közeg és a krioprotektáns minőségét vizsgáltuk. A CMA-kat/ CPP-ket az **1. táblázatban** bemutatott szintek és paraméterek szerint vizsgáltuk.

*Table 1. A liposzóma előállítási folyamatokban vizsgált kritikus tényezők és szintjeik.*

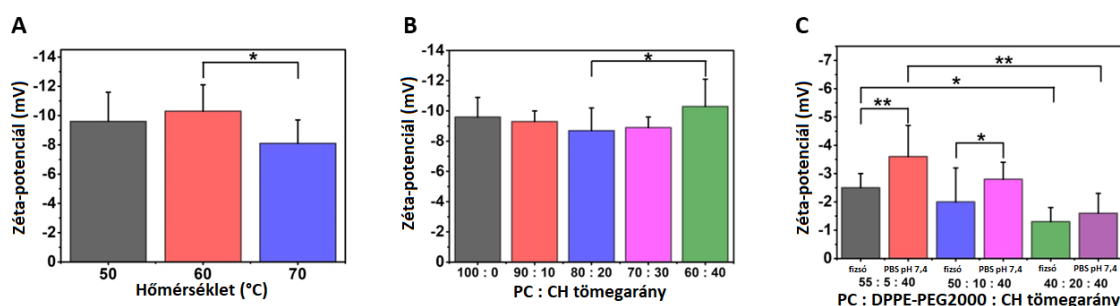
	kritikus tényezők	vizsgált szint vagy paraméter				
<b>C</b>						
<b>P</b>	munkahőmérséklet	50°C	60°C	70°C		
<b>P</b>						
	PC : CH tömegarány	60 : 40	70 : 30	80 : 20	90 : 10	100 : 0
	PEGilált PPL tartalom (w/w%)	5%	10%	10%	20%	20%
<b>C</b>	PC : PEGilált PPL : CH tömegarány	55 : 5 : 40	50 : 10 : 40	50 : 10 : 40	40 : 20 : 40	40 : 20 : 40
<b>M</b>	PEGilált PPL minősége	DPPE-PEG <sub>2000</sub>		DSPE-PEG <sub>3000</sub>		
<b>A</b>	hidratáló közeg minősége	fizsó	PBS pH 4,5	PBS pH 5,6	PBS pH 7,4	PBS pH 7,4
	krioprotektáns minősége	glükóz	szorbit	trehalóz		inulin

### 4.1.5.1. Vezikulaméret és zéta-potenciál meghatározás

A vizsgálatok eredményeit az **1. ábrán** látható DoE folyamatábrán, és a **3. és 4. ábrán** szemléltettük.



**3. ábra:** A DLS mérések eredményei a PC:CH = 60:40 különböző hőmérsékleten (50-70°C) előállított minták (A), a különböző mennyiségű (0-40%) CH-tartalmú, 60°C-on előállított, mindkét esetben fizsóval hidratált minták (B), a DPPE-PEG<sub>2000</sub>-et tartalmazó, 60°C-on előállított, fizsóval vagy PBS pH 7,4-del hidratált minták esetében.



**4. ábra:** A zéta-potenciál mérések eredményei a PC:CH = 60:40 különböző hőmérsékleten (50-70°C) előállított minták (A), a különböző mennyiségű (0-40%) CH-tartalmú, 60°C-on előállított, mindkét esetben fizsóval hidratált minták (B), a DPPE-PEG<sub>2000</sub>-et tartalmazó, 60°C-on előállított, fizsóval vagy PBS pH 7,4-del hidratált minták esetében.

#### 4.1.5.1.1. Különböző előállítási hőmérsékletek hatása

PC-CH (tömegarány: 60:40) vezikulákat állítottunk elő 50, 60 és 70°C-on. Az átlagos vezikulaméretet nem befolyásolta a hőmérsékletváltozás; az értékek 154-166 nm között adódtak, szignifikáns eltérés nélkül (**3-A ábra**). A 60°C-on készített formuláció ZP-ja szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) negatívabb volt ( $-10,3 \pm 1,8$  mV), mint a 70°C-on ( $-8,1 \pm 1,6$  mV) előállítotté, miközben nem különbözött az 50°C-on készült mintáétól ( $-9,0 \pm 2,0$  mV). (**4-A ábra**). Így a további vizsgálatokhoz a 60°C-ot választottuk előállítási hőmérsékletnek.

#### 4.1.5.1.2. Különböző arányú falalkotók alkalmazásának hatása

A különböző PPL-CH tömegarányok alkalmazásának hatását 60°C-on előállított, sóoldattal hidratált mintákon vizsgáltuk a CH-tartalmat 40%-ról nullára csökkentve. A PC:CH arány 70:30-ról 100:0-ra változtatásával a méret csökkent (**3-B ábra**). A csak PC-t tartalmazó minta vezikulái szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) kisebbek ( $135 \pm 24$  nm) voltak, mint a 20%-nyi ( $176 \pm 30$  nm) vagy 30%-nyi ( $200 \pm 34$  nm) CH-t tartalmazóaké. Kevesebb, mint 30% CH esetén a ZP értéke CH százalékos tartalmának csökkenésével csökkent (**4-B ábra**), mivel a vezikula felületén több PC volt található. A 40%-nyi CH-tartalmú minta szignifikánsan

magasabb ( $p < 0,05$ ) abszolút ZP értékeket ( $-10,3 \pm 1,8$  mV) mutatott, mint a 20%-nyi minta ( $-8,7 \pm 1,5$  mV). A membrán mechanikai szilárdságának megőrzése érdekében a további vizsgálatokat CH-tartalmú formulációkon végeztük.

#### **4.1.5.1.3. Különböző koncentrációjú PEGilált foszfolipidek hatása**

A  $60^\circ\text{C}$ -on előállított, sóoldattal és PBS-sel pH 7,4 hidratált minták tömegének 5-10-20%-át PC-ről DPPE-PEG<sub>2000</sub>-re változtattuk, hogy megvizsgáljuk a PEGilált PPL hatását. Nemlineáris összefüggést észleltünk a PPL arányok és a vezikulaméret között (**3-C ábra**). A szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) legnagyobb vezikulaméretet a PC:DPPE-PEG<sub>2000</sub>:CH = 55:10:40 tömegarányú formulációnál mértük mindkét hidratáló közeg esetében (fizsó:  $152 \pm 44$  nm; PBS pH 7,4:  $138 \pm 23$  nm). A PEGilált PPL-ek mennyiségének egy a bizonyos arányra való emelése megnöveli a vezikulák méretét; azonban a további adagolása az átlagos méretérték meredek csökkenését okozza a PEGilált PPL-alapú micellák képződése miatt. A ZP értékek szignifikánsan negatívabbak voltak az 55:5:40 arány esetében, mint 40:20:40 aránynál (fizsó:  $-2,5 \pm 0,5$  mV,  $p < 0,05$ ; PBS pH 7,4:  $-3,6 \pm 1,1$  mV,  $p < 0,01$ ). Minél nagyobb arányban került alkalmazásra a DPPE-PEG<sub>2000</sub>, annál kevésbé volt negatív volt a mért ZP érték (**4-C. ábra**).

#### **4.1.5.1.4. Különböző PEGilált foszfolipidek hatása**

A PEGilált PPL megváltoztatása DPPE-PEG<sub>2000</sub>-ről DSPE-PEG<sub>3000</sub>-re az összetételekben nem befolyásolta a készítmények ZP-ját. Szignifikáns különbség ( $p < 0,05$  mindkét esetben) csak a PC:PEG-PPL-CH = 55:5:40 arányú PBS pH 5,6-del és trehalózzal ( $107 \pm 13$  nm;  $170 \pm 38$  nm) és a 73,3:6,7:20 arányú PBS 5,6-del és inulinnal ( $145 \pm 43$  nm;  $195 \pm 4$  nm) készült minta méretében volt mérhető.

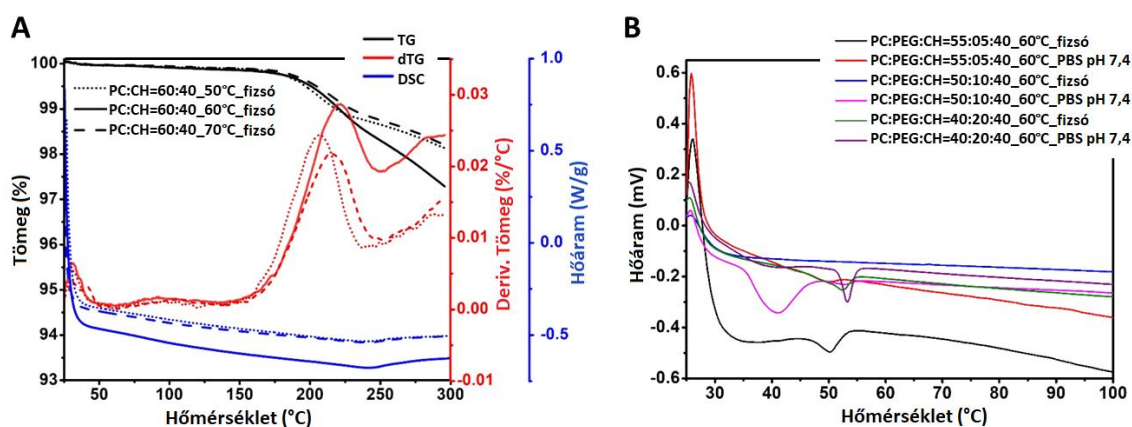
#### **4.1.5.1.5. Különböző hidratáló közeg hatása**

A hidratáló közeg minőségét (ionerősségét) a  $60^\circ\text{C}$ -on készült PC:DPPE-PEG<sub>2000</sub>:CH = 55:5:40 és 40:20:40 tömegarányú készítményeken vizsgáltuk. Minél nagyobb a hidratáló közeg ionerőssége, annál nagyobb a ZP a vezikulák körül kialakuló tömörebb ionréteg miatt. A fizsóval (pH 5,5) ( $104 \pm 7$  nm) és a PBS pH 5,6-del ( $110 \pm 5$  nm) hidratált részecskék mérete nem tért el. A PBS pH 7,4 ( $117 \pm 15$  nm) alkalmazása szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) nagyobb méretet eredményezett, mint a fiziológiás sóoldat. A legnagyobb vezikulaméretet a PBS pH 4,5 ( $136 \pm 9$  nm) esetén mértük; szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) nagyobb liposzómákat kaptunk, mint a PBS pH 7,4-del. A 40:20:40 arányban fizsó ( $-1,3 \pm 0,5$  mV) helyett PBS pH 5,6-del ( $-2,3 \pm 1,2$  mV) készített vezikulák szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) magasabb ZP-t mutattak. Szignifikánsan magasabb ZP értéket értünk el PBS pH 4,5-del ( $-6,0 \pm 1,4$  mV,  $p < 0,01$ ) és PBS pH 5,6-del ( $5,8 \pm 0,9$  mV,  $p < 0,05$ ) az 55:5:40 arány alkalmazásakor. A hidratáló közeg ionerőssége a következőképpen emelkedett: fizsó (0,15 M) < PBS pH 7,4 (0,16 M) < PBS 4,5 (0,30 M) < PBS pH 5,6 (0,40 M).

#### 4.1.5.1.6. Különböző krioprotektánsok hatása

A PPL tömegének 5%-ának megfelelő glükózt, szorbitot, trehalózt vagy inulint alkalmaztuk a különböző krioprotektánsok hatásának vizsgálatára. A tanulmányhoz a PC:DPPE-PEG<sub>2000</sub>:CH = 55:5:40 és a 40:20:40 tömegarányt alkalmaztuk. A trehalóz és a glükóz azonos méretet eredményezett (103±3 nm, 104±7 nm). A szorbit (130±5 nm) szignifikáns (p<0,01) növekedést okozott az átlagos vezikulaméretben a glükózhoz (103±4 nm) képest. A szorbit és a trehalóz alkalmazása szignifikánsan (p<0,01 mindkét esetben) növelte a ZP-t a glükóz tartalmú készítményekhez képest. A trehalózzal és az inulinnal készült minták ZP értékei között nem volt szignifikáns különbség; ez utóbbi esetben azonban a vezikulák mérete szignifikánsan (p<0,05) nagyobbak adódtak a PC:PEG-PPL:CH = 73,3:6,7:20 arányban mind a DPPE-PEG<sub>2000</sub> (rendre 137±42 nm; 145±15, nm), mind a DSPE-PEG<sub>3000</sub> (rendre 142±35 nm; 196±3 nm) esetében.

#### 4.1.5.2. Termikus viselkedés elemzése

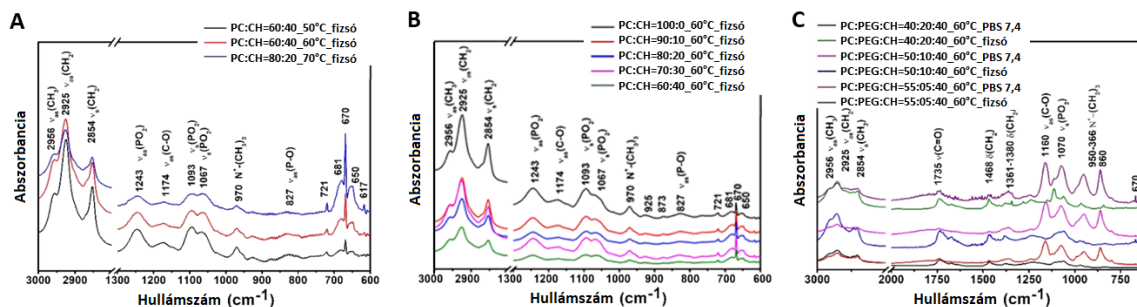


5. ábra: A különböző hőmérsékleteken (50-70°C) előállított, fizsóval hidratált PC:CH = 60:40 minták (A), valamint az 5%, 10% vagy 20% DPPE-PEG<sub>2000</sub>-tartalmú 60°C-on előállított és fizsóval vagy PBS pH 7,4-del hidratált minták termikus viselkedését bemutató TG, dTG és DSC görbék.

A DSC és TGA mérési eredmények (5-A,-B ábra) hasonlóak voltak a vizsgált esetekben. Az azonos összetételű, különböző összetételű minták gél-folyadék kristályos fázisátmeneti hőmérséklete ( $T_c$ ) ~30-33°C volt. Figyelemre méltó fázisátalakulás volt megfigyelhető a PEGilált PPL-t tartalmazó, PBS pH 7,4-del hidratált, glükózzal készült vezikuláknál a PC:DPPE-PEG<sub>2000</sub>:CH = 55:5:40 minta esetében 52°C-on, az 50:10:40 minta esetében 40°C-on, illetve a 40:20:40 minta esetében 50°C-on a csökkenő oldalnyomás miatt ahogy a PC és a DPPE-PEG<sub>2000</sub> szénhidrogén láncai egyre kevésbé illeszkedtek miközben a membrán PEGilált PPL-ben gazdagodott. A TG és dTG görbék alapján a fiziszorbeált víztartalom deszorpciója minden minta esetében 100°C körül fejeződött be. További, a molekuláris változásokat reprezentáló változást észleltünk a görbék alakjában 200-225°C-on. A 300°C-ig történő hőkezelés során a minták tömegének 2-5%-a vészett el.



### 4.1.5.3. Kémiai kötések vizsgálata



6. ábra: A különböző hőmérsékleteken (50-70°C) előállított PC:CH = 60:40 (A), a különböző mennyiségű (0-40%) CH-tartalmú, 60°C-on előállított, mindkét esetben fizsóval hidratált minták (B), és az 5%, 10% vagy 20% DPPE-PEG<sub>2000</sub>-tartalmú 60°C-on előállított és fizsóval vagy PBS pH 7,4-del hidratált minták termikus viselkedését bemutató FT-IR spektrumok.

Az FT-IR görbék (6-A,-B,-C ábra) két különálló régiót mutattak a fő komponens PC-nek megfelelően a spektrumban: ~900-600 cm<sup>-1</sup>-nél volt megfigyelhető az ujjlenyomat régió, és a 3000-2800 cm<sup>-1</sup> hullámszám tartományban a szénhidrogén láncokból származó C-H nyújtási rezgések. A spektrumok alsó hullámszámú tartománya (1800 cm<sup>-1</sup> alatt) a PPL-ek poláris fejcsoportjait reprezentálta. Az FT-IR görbék a különböző minta-előállítási hőmérsékletek ellenére konzisztensnek adódtak; a különböző hidratáló közeggel hidratált minták közötti különbségek azonban jól kimutathatók voltak. A PBS-oldatokkal hidratált liposzómákban  $\nu_{as}(\text{PO}_2)$  és  $\nu_s(\text{PO}_2)$  nyújtások jelentek meg és az eltérő ionerősségek eltéréseket okoztak a spektrumok között. A 3050-2800 cm<sup>-1</sup> tartományban más rezgésekkel való átfedéseket észleltünk.

### 4.1.6. A tervezési tér meghatározása

Az eredmények a DS kialakításához vezettek, amely olyan szabályozási előnyökkel bír, hogy ha a paraméterek módosítása a DS-en belül történik, az eltérés nem igényel módosítást a forgalomba hozatali engedély dokumentációjában. A lipid film hidratáción alapuló liposzóma előállítási eljárás paramétereivel kapcsolatban az alábbiakat figyeltük meg:

- 50-60°C közötti, a készítmény  $T_m$  értékénél magasabb előállítási hőmérséklete alkalmas a PC eredetű liposzómák készítéséhez.
- A CH-tartalom csökkentése kisebb méretű vezikulákat eredményez. A csak PC-t tartalmazó minta szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) kisebb, mint a 20-30 w/w% CH-tartalmúak.
- A PC:CH = 60:40 tömegarányval ~150 nm-es vezikulaméret és alacsony PdI érhető el.
- A ZP a CH mennyiségének csökkentésével csökken. Szignifikánsan magasabb abszolút ZP értékek érhetőek el 40%-nyi CH tartalommal, mint 20%-kal.
- A PC-tartalom egy részének PE-re vagy PE-PEG<sub>2000</sub>-re történő cseréje csökkenti a liposzómák méretét.

- A PC-tartalom 5%-ának DPPE-PEG<sub>2000</sub>-re cserélésével a 10%-nyi vagy 20%-nyi PEG-PPL alkalmazásánál szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) kisebb vezikulaméret (~100 nm) és alacsony PDI érhető el.
- Az abszolút ZP jelentősen csökken nagyobb DPPE-PEG<sub>2000</sub> arányok alkalmazásakor.
- A PEGilált PPL DPPE-PEG<sub>2000</sub>-ről DSPE-PEG<sub>3000</sub>-re történő módosítása nincs hatással a ZP-ra. Szignifikáns különbség ( $p < 0,05$ ) csak a vezikulaméretben volt tapasztalható a nagyobb PEG szám miatt.
- A fizsóval és a PBS pH 5,6-tal hidratált részecskék mérete nem tér el. A szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) legnagyobb vezikulák a PBS pH 4,5-től származnak.
- A liposzómák ZP-je a hidratáló közeg ionerősségével nő a vezikulák körül kialakuló ionréteg miatt. A PBS pH 5,6 ( $p < 0,05$ ) és pH 4,5 ( $p < 0,01$ ) alkalmazása szignifikánsan magasabb ZP-t eredményez, mint a fizsó.
- Nem tapasztalható különbség a liposzómák méretében, ha a PPL 5 w/w%-ának megfelelő trehalózt és glükózt alkalmazunk krioprotektánsként, de a szorbit használata szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) növeli az átlagos vezikulaméretet a glükózhoz képest. A PC:PEG-PPL:CH = 73,3:6,7:20 arány alkalmazásakor (mind a DPPE-PEG<sub>2000</sub>, mind a DSPE-PEG<sub>3000</sub> esetében) az inulin hozzáadása szignifikánsan nagyobb ( $p < 0,05$ ) vezikulaméretre vezet, mint a trehalózé.
- A PPL 5 w/w%-ának megfelelő szorbit vagy trehalóz hozzáadása szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) növeli a ZP-t a glükóz hatásához képest, míg a trehalózzal vagy inulinnal készült minták ZP-ja között nincsen szignifikáns különbség.

#### 4.2. A liposzómák zéta-potenciáljának beállítása

Mivel az előállított formulációk ZP-ja a stabil készítményekhez szükséges  $\pm 30$  mV alatt volt, a tanulmány második része az ennek a javítására alkalmazott módszert mutatja be.

##### 4.2.1. Faktoriális kísérletterv a zéta-potenciál optimalizálásához

A  $3^2$  frakcionált faktoriális tervet választottuk a liposzómák ZP-jának az optimalizálására. A kísérleti tervben a falalkotó lipidek (PC, CH) és a speciális adalékanyagok (SA/DCP) közötti molarányt vizsgáltuk. A mintákat lipid film hidratációs módszerrel állítottuk elő, és vizsgáltuk az elsődleges kimeneti paraméterekre: vezikulaméret, polidiszperzitási index és zéta-potenciál. A független változók vizsgált szintjeit és a kísérleti eredményeket a **2. táblázat** tartalmazza.

Az eredmények alapján polinomiális egyenleteket generáltunk a független változók függő tényezőkre gyakorolt egyedi fő és kölcsönhatási hatásainak leírására. Mivel minden formuláció vezikulamérete és a PDI-e megfelelt az elfogadási kritériumoknak, a kísérleti faktoroknak csak a ZP-ra mért hatását elemeztük.

**2 táblázat:** A  $3^2$  frakcionált faktoriális tervezés vizsgálati szintjei és válaszártékei (Az eredményeket három független párhuzamos átlag  $\pm$  szórás értékében fejeztük ki).

Kísérlet	Összetétel (mólarány)			Válasz		
	PC	CH	SA	Vezikulaméret (nm)	Polidiszperzitási index	Zéta-potenciál (mV)
1	7,5	3,5	3,0	121 $\pm$ 28	0,22 $\pm$ 0,02	+22,0 $\pm$ 7,8
2	7,5	4,5	9,0	106 $\pm$ 21	0,23 $\pm$ 0,03	+17,6 $\pm$ 3,4
3	7,5	5,5	6,0	116 $\pm$ 14	0,23 $\pm$ 0,02	+24,6 $\pm$ 1,4
4	10,0	3,5	9,0	93 $\pm$ 6	0,22 $\pm$ 0,03	+25,0 $\pm$ 3,5
5	10,0	4,5	6,0	113 $\pm$ 16	0,23 $\pm$ 0,06	+25,8 $\pm$ 3,7
6	10,0	5,5	3,0	112 $\pm$ 7	0,16 $\pm$ 0,01	+26,6 $\pm$ 2,7
7	12,5	3,5	6,0	111 $\pm$ 6	0,19 $\pm$ 0,03	+26,3 $\pm$ 1,2
8	12,5	4,5	3,0	109 $\pm$ 7	0,17 $\pm$ 0,03	+26,6 $\pm$ 0,8
9	12,5	5,5	9,0	100 $\pm$ 17	0,17 $\pm$ 0,01	+27,1 $\pm$ 2,8

Kísérlet	Összetétel (mólarány)			Válasz		
	PC	CH	DCP	Vezikulaméret (nm)	Polidiszperzitási index	Zéta-potenciál (mV)
1	7,5	3,5	3,0	98 $\pm$ 11	0,20 $\pm$ 0,03	-29,9 $\pm$ 1,6
2	7,5	4,5	9,0	82 $\pm$ 16	0,24 $\pm$ 0,02	-29,6 $\pm$ 3,4
3	7,5	5,5	6,0	108 $\pm$ 9	0,21 $\pm$ 0,04	-32,5 $\pm$ 6,5
4	10,0	3,5	9,0	87 $\pm$ 16	0,24 $\pm$ 0,03	-32,6 $\pm$ 2,7
5	10,0	4,5	6,0	93 $\pm$ 23	0,23 $\pm$ 0,03	-29,7 $\pm$ 6,2
6	10,0	5,5	3,0	119 $\pm$ 25	0,21 $\pm$ 0,07	-29,7 $\pm$ 3,3
7	12,5	3,5	6,0	95 $\pm$ 8	0,18 $\pm$ 0,03	-29,2 $\pm$ 3,2
8	12,5	4,5	3,0	104 $\pm$ 25	0,18 $\pm$ 0,02	-27,6 $\pm$ 1,3
9	12,5	5,5	9,0	105 $\pm$ 2	0,18 $\pm$ 0,02	-17,7 $\pm$ 3,1

A változók ZP (Y)-ra gyakorolt hatása az SA-tartalmú formulációk esetében a következő egyenlettel írható le:

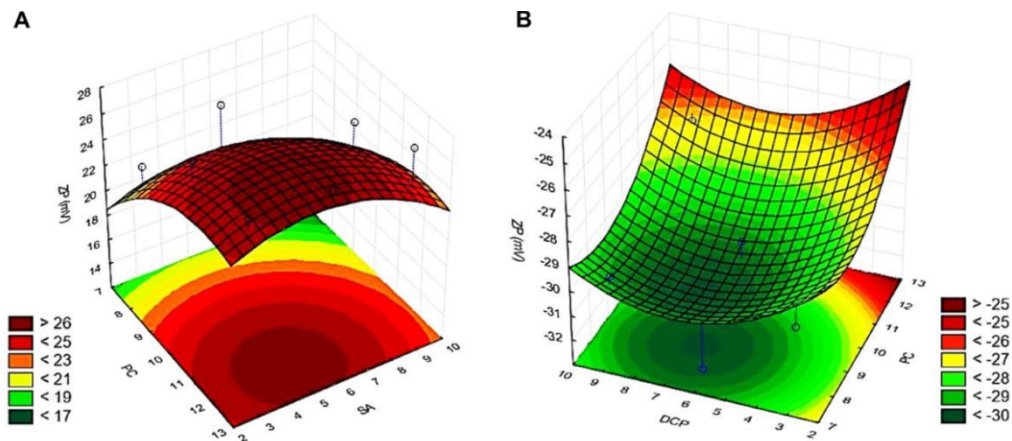
$$Y(\text{SA}) = 24,622 + 2,633x_1 + 0,883x_2 + 0,833x_3 - 0,967x_2^2 - 0,917x_3 + 0,708x_3^2 \quad (2)$$

A regressziós együttható,  $R^2=0,920$ , jó korrelációt mutatott. A PC ( $x_1$ ), a CH ( $x_2$ ) és az SA ( $x_3$ ) közötti mólaránynak nincs szignifikáns hatása a ZP-ra ( $0,05 < p$ ). A ZP a 2. egyenlet független változóinak pozitív együtthatóival ( $x_1, x_1^2, x_2, x_3^2$ ) párhuzamosan növekszik, míg a negatív együtthatók ( $x_2^2, x_3$ ) ezzel ellentétes hatást fejtenek ki. Az SA-t tartalmazó liposzómák pozitív töltéssel rendelkeznek.

Az alábbi egyenlet leírja, hogy a független tényezők hogyan befolyásolják a DCP-tartalmú formuláció ZP-ját (Y):

$$Y(\text{DCP}) = -29,833 + 1,250x_1 - 0,625x_1^2 + 0,300x_2 + 0,650x_2^2 - 0,450x_3 - 0,475x_3^2 \quad (3)$$

A magas regressziós együttható ( $R^2=0,984$ ) jó korrelációt jelez. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a PC ( $x_1$ ), a CH ( $x_2$ ) és a DCP ( $x_3$ ) mólarány értékei és a mért ZP-k között ( $0,05 < p$ ). Mivel a DCP-tartalmú liposzómák negatív töltéssel rendelkeznek, a független változók negatív együtthatói ( $x_1^2, x_3, x_3^2$ ) kedvezően hatnak a kimeneti értékekre, a pozitívak ( $x_1, x_2, x_2^2$ ) pedig csökkentik az abszolút ZP értékeket.



**7.ábra:** Független változók ZP értékre gyakorolt hatásának háromdimenziós felületi grafikonjai a  $3^2$  frakcionált faktoriális tervezésben a sztearil-amin (A) és dicetil-foszfát (B) membrán-adalékokanyagokkal készült formulációk esetében.

A ZP értékek 3D válaszfelületi diagramjait (Y(SA) – **7-A ábra** és Y(DCP) – **7-B ábra**) úgy ábrázoltuk, hogy egy változót egy adott szinten tartottunk. Mivel a regressziós modellek nem mutatnak olyan faktort, amely szignifikánsan befolyásolná a ZP értékeket, az optimális összetételeket a grafikonok által kirajzolt DS-ekről olvastuk le. Az SA-tartalmú liposzómák optimális formulációja (OPT-SA) a PC:CH:SA 12,0:5,0:5,0 mólarányából állíthatóak elő, az optimalizált DCP-liposzómák (OPT-DCP) a PC-t, CH-t és DCP-t 8,5:4,5:6,5 mólarányban tartalmazznak.

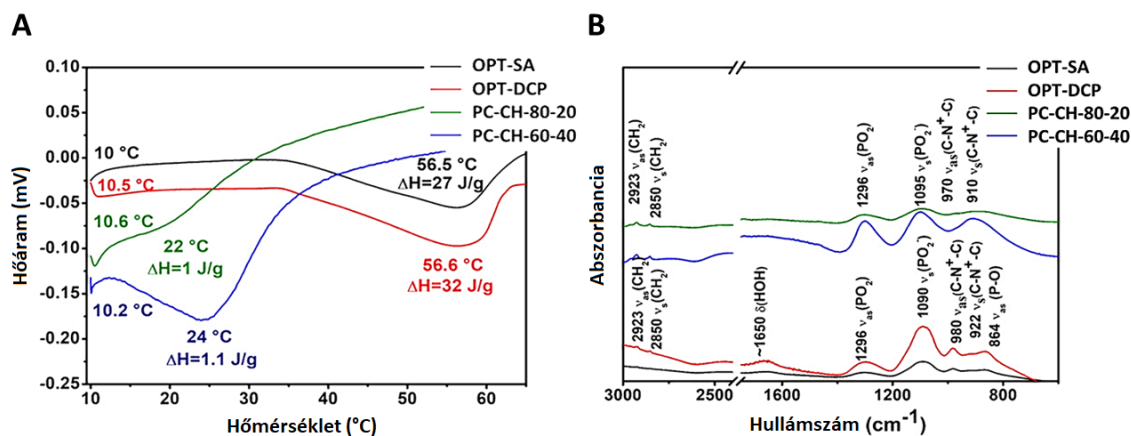
#### 4.2.2. A zéta-potenciál optimalizált formulációk karakterizálása

##### 4.2.2.1. Vezikulaméret és zéta-potenciál meghatározás

A liposzómák összes kritikus termékparamétere, mint a vezikulaméret ( $108 \pm 15$  nm;  $88 \pm 14$  nm rendre az OPT-SA és az OPT DCP minták esetében), az alacsony PDI ( $0,20 \pm 0,04$ ;  $0,21 \pm 0,02$ ) és a ZP ( $+30,1 \pm 1,2$  mV;  $-36,7 \pm 3,3$  mV) megfelelt a követelményeknek (**2. táblázat**), míg az irodalomból származó, más kutatócsoportok által alkalmazott összetételek eredményei közül csak néhány felelt meg az általunk támasztott követelményeknek. Az OPT-SA és az OPT-DCP formulációk teljesítették a stabilitást jelző ZP és a kis vezikulaméret minimális követelményeit.

A QbD-alapú liposzóma fejlesztési tanulmány bemutatta, hogy a liposzóma formulációk optimális PPL-CH aránya a PC:CH = 60:40 és 80:20 tömegarány. A PC tömegaránya az optimalizált készítményekben lényegében azonos, azaz 60 tömegegység volt, amíg csak a PC:CH tömegre vetítve 80 tömegegységet találtunk, ami jó egyezést mutat a korábbi eredményeinkkel.

A DLS méréseket és a ZP analízist először a friss mintákon végeztük el, amit egy hónapon keresztül hetente megismételtünk. A készítmények folyékony halmazállapotban két hétig stabilnak tekinthetők. A negyedik hét végére a vezikulák felszíni töltése szignifikánsan csökkent ( $p < 0,05$  OPT-SA,  $p < 0,01$  OPT-DCP esetén).



8. ábra: DSC (A) és FT-IR (B) görbék az optimalizált liposzóma mintákról és a membránadalék-mentes összetételekről: PC-CH-80-20 és PC-CH-60-40

#### 4.2.2.2. Termikus viselkedés elemzése

A DSC mérések a 10–65°C tartományban történtek. A kalorimetria eredményei (8-A ábra) azt mutatják, hogy a  $T_g$  érték az OPT-SA minta esetében 10°C, az OPT DCP minta esetében pedig 10,5°C. A membránadalékanyag-mentes összetételeknél (PC-CH) 10,6°C-ot (PC-CH-80-20) és 10,2°C-ot (PC-CH-60-40) mértünk. A  $T_m$  értékek rendre 56,5°C, 56,6°C, 22,0°C és 24,0°C voltak.

A készítmények termikus stabilitását további TGA vizsgálattal ellenőriztük a 0–300°C hőmérsékleti tartományban. A TG görbék lefutása hasonló volt. 300°C-ig az eredeti tömeg 4–6%-a veszett el két lépésben. Az első lépés 75–80°C-on a fiziszorbeált víztartalom deszorpcióját jelezte. A görbék alakjának másik változását 200–225°C-on detektáltuk, ami a szerkezetek molekuláris változásait és kémiai degradációját jelezte. A minták bomlása csak magas hőmérsékleti tartományokban fordult elő, így az optimalizált formulációk előállítására és tárolására azok a hőmérséklettel szemben stabilnak tekinthetők.

#### 4.2.2.3. Kémiai kötések vizsgálata

Az optimalizált formulációk esetében hasonló FT-IR spektrumokat vettünk fel (8-B ábra), amelyek az összetételekben a legmagasabb koncentrációban jelenlevő PC alapján két különálló régiót jeleznek. A C-H kötés nyújtási rezgéseit 3000–2800  $\text{cm}^{-1}$  között, míg az ujjlenyomat régiót ~900–600  $\text{cm}^{-1}$  között detektáltuk. Előbbi a szénhidrogén láncokból származik, míg alacsonyabb hullámszámoknál (<1800  $\text{cm}^{-1}$ ) a poláris PPL fejcsoportok rezgéseinek megfelelő kötések jelennek meg. Az SA-ra és a DCP-re utaló kötések nem voltak megkülönböztethetők, mivel a spektrális csúcsok 2900–2960, és 2850  $\text{cm}^{-1}$ -nél a DCP-t, míg 2920–2850  $\text{cm}^{-1}$ -nél az SA-ból származó rezgéseket jelezték. Így az FT-IR spektrumok nem voltak jól használhatóak ezeknek a töltést indukáló anyagoknak a kimutatására.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A Ph.D. munkám célja liposzómális készítmények Quality by Design módszertanon fejlesztése volt. A vizsgálatok során a lipid film hidratációs liposzóma-előállítási technika követelményeit vizsgáltuk. A QbD koncepciót és az RA módszertant beépítettük a liposzóma-alapú készítmények fejlesztésének korai szakaszába, és a liposzómák zéta-potenciálját a  $3^2$  frakcionált faktoriális tervezés elvét követve javítottuk a termékminőséget befolyásoló kritikus tényezőkről megszerzett ismereteket alkalmazva.

A lipid film hidratációs módszer univerzális kezdeti RA-ját követően frissített RA-t végeztünk az „üres” liposzóma-alapú hordozók minőségi követelményeivel kapcsolatban. Kísérletalapú karakterizálási vizsgálatokat végeztünk, hogy értékeljük a kiválasztott CMA-k és CPP-k liposzómák tulajdonságaira gyakorolt hatását. Az előállítási hőmérséklet, a PC-CH arány, a PEGilált PPL-tartalom, a hidratáló közeg és a krioprotektánsok minőségének változtatása szignifikáns különbségeket eredményezett a termékek minőségében. A megfigyeléseket beépítettük a frissített RA-ba és a ZP optimalizálási tanulmányba. Meghatároztuk az olyan liposzómák előállításához szükséges PC, CH és SA vagy DCP mólarányokat amelyek az előre meghatározott CQA-kkal rendelkeznek: vezikulaméret 150 nm alatt, PdI kisebb, mint 0,30 és ZP nagyobb, mint  $|30|$  mV.

### **A munka főbb eredményei és gyakorlati szempontjai:**

- Ez az első QbD-alapú vizsgálat, amely sikeresen alkalmaz frissített RA-t egy „köztes”, hatóanyag-mentes liposzómális készítmény kritikus tényezőinek meghatározására, valamint a lipid film hidratációs eljárás CMA-i és CPP-i azonosítására.
- A tanulmány bemutatta azokat a liposzóma összetételeket, amelyek először ebben a munkában lettek leírva.
- Egyes faktorok és liposzóma komponensek hatását először vagy a bemutatott összetételben először vizsgáltuk.
- Megállapításokat közöltünk a lipid film hidratációs liposzóma előállítási eljárás paramétereiről az előállítási hőmérséklet, a PC-CH arány, a PEGilált PPL-tartalom, a hidratáló közeg és a krioprotektánsok minősége tekintetében.
- Új, liposzóma-alapú hordozórendszereket fejlesztettünk ki, amelyek jellemzői megfelelnek az előre meghatározott QTPP-nek és CQA-knak, és amelyek folyékony formában min. két hétig optimális ZP-t és 150 nm alatti vezikulaméretet biztosítanak.
- A leírt PC:CH:SA = 12,0:5,0:5,0 és PC:CH:DCP = 8,5:4,5:6,5 mólarányok más lipid komponensekhez és formulálási követelményekhez adaptálhatóak.
- Az eredmények kiválóan illusztrálják a Quality by Design módszertan alkalmazásának relevanciáját és potenciálját a liposzóma kutatásban és fejlesztésben.

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. E. Pallagi, O. Jójárt-Laczkovich, **Zs. Németh**, P. Szabó-Révész, I. Csóka: Application of the QbD-based approach in the early development of liposomes for nasal administration; *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS* **562** (2019) 11-22; **Q1, IF: 4.845**
- II. **Zs. Németh**, E. Pallagi, D. G. Dobó, I. Csóka: A proposed methodology for a Risk Assessment-based liposome development process; *PHARMACEUTICS* **12** (2020) 1164; **Q1, IF: 6.321**
- III. **Zs. Németh**, E. Pallagi, D. G. Dobó, G. Kozma, Z. Kónya, I. Csóka: An updated Risk Assessment as part of the QbD-based liposome design and development; *PHARMACEUTICS* **13** (2021) 1071; **Q1, IF: 6.525**
- IV. **Zs. Németh**, I. Csóka, R. Semnani Jazani, B. Sipos, H. Haspel, G. Kozma, Z. Kónya, D. G. Dobó: Quality by Design-driven zeta potential optimization study of liposomes with charge imparting membrane additives; *PHARMACEUTICS* **14** (2022) 1798; **Q1, IF: 6.525 (2021)**

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. Jójártné Laczkovich O., Bónis E., **Németh Zs.**, Szabóné Révész P.: Liposzómák átlagos vezikulaméretének befolyásolása búzaecóra olajjal; *ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA* **88. 9-16** (2018); **Q4, IF: 0.111**
- II. **Németh Zs.**, Kiss L., Maléth J., Hegyi P., Szabóné Révész P., Jójártné Laczkovich O.: Liposzómális formulációk kutatása és fejlesztése akut pankreatitisz kezelése céljából; *ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA* **88. 215-226** (2018); **Q4, IF: 0.111**
- III. **Németh Zs.**, Pallagi E., Csóka I.: Gyógyszer technológiai és regulációs kihívások - Megállapítások a neurológiai kórképek kezelésére szánt nazális liposzómás rezveratrol-tartalmú készítmény fejlesztése kapcsán; *GYÓGYSZERÉSZET* **65** (2021) 724–734
- IV. **Zs. Németh**, E. Pallagi, D. G. Dobó, I. Csóka: How could QbD address the R&D challenges of ‘nose-to-brain’ liposomal resveratrol formulations?; *PROCEEDINGS* **78** (2021) 49
- V. D. G. Dobó, **Zs. Németh**; B. Sipos, M. Cseh, E. Pallagi, D. Berkesi, G. Kozma, Z. Kónya, I. Csóka: Pharmaceutical development and design of thermosensitive liposomes based on the QbD approach; *MOLECULES* **27** (2022) 1536; **Q1, IF: 4.927 (2021)**

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

### Verbális előadások

- I. **Zs. Németh:** A Quality by Design-based approach to developing an intranasal liposomal formulation; *Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences 2018, Pécs, Hungary (2018)*
- II. **Zs. Németh,** Dorina Gabriella Dobó, Edina Pallagi, Ildikó Csóka: Basic research methods in the development process of the liposomal formulations; *I. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged; Hungary (2019)*
- III. **Zs. Németh,** D. G. Dobó, E. Pallagi, I. Csóka: Preparation and characterization of liposomes and the importance of their compositions; *XVI. János Szentágotthai Multidisciplinary Conference and Student Competition, Pécs; Hungary (2019)*
- IV. **Zs. Németh,** E. Palagi, O. Jójárt-Laczkovich, P. Szabó-Révész, I. Csóka: A QbD-based approach to develop a nasal formulation; *2<sup>nd</sup> Young Technologists' Forum 2019, Budapest, Hungary (2019)*
- V. **Zs. Németh,** D. G. Dobó, E. Pallagi, I. Csóka: Quality by Design-based approach for liposomal development; *II. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, Hungary (2020)*
- VI. **Zs. Németh,** D. G. Dobó, E. Pallagi, I. Csóka: How can the application of Risk Assessment support the development process of liposomes?; *Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Science 2020, Pécs, Hungary (2020)*
- VII. **Zs. Németh,** D. G. Dobó, E. Pallagi, I. Csóka: Quality-focused formulation - QbD-based liposome design and development; *III. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, Hungary (2021)*
- VIII. **Zs. Németh:** How can the application of the Quality by Design approach assist the design and development process of liposomes?; *Scholars Webinar on: Drug Delivery and Nanomedicine, online (2021)*
- IX. **Németh Zs.,** Sipos B., R. Semnani Jazani, Dobó D. G.: Liposzóma alapú nano-hordozórendszerek kockázatbecslésre épülő optimalizálása; *XIV. Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, Magyarország (2021)*
- X. **Zs. Németh,** R. Semnani Jazani, B. Sipos, D. G. Dobó, E. Pallagi, I. Csóka: Risk-based optimization of liposome-based nanocarrier systems; *IV. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged, Hungary (2022)*



## Poszter előadások

- I. E. Pallagi, O. Jójárt-Laczkovich, **Zs. Németh**, P. Szabó-Révész, I. Csóka: Risk Assessment based nano-sized liposome formulation development; *12<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs and Satellite Symposium on Pharmaceutical Biotechnology, Szeged, Hungary (2018)*
- II. **Zs. Németh**, D. G. Dobó, E. Pallagi, I. Csóka: Analytical investigation techniques in the service of liposome development; *26<sup>th</sup> International Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, Hungary (2020)*
- III. **Zs. Németh**, D. G. Dobó, I. Csóka: Quality by Design-based development process for the preparation of liposomal formulations; *12<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, online (2021)*
- IV. **Zs. Németh**, R. Semnani Jazani, D. G. Dobó, I. Csóka: Factorial Design-based liposome optimization applying vesicle-modifying membrane additives; *13<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Gdansk, Poland (2021)*
- V. **Zs. Németh**, D. G. Dobó, I. Csóka: Updated Risk Assessment-based liposome design & development; *10<sup>th</sup> Anniversary pan-European Science Conference on QbD & PAT, online (2021)*

## KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ószinte köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, **Prof. Dr. Csóka Ildikónak**, a Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy az Intézetben dolgozhassak, és támogatást és szakértő útmutatást nyújtott a doktori képzésem során. . Ezúton is szeretném megköszönni **Prof. Dr. Szabóné Révész Piroskának**, az Intézet korábbi vezetőjének, hogy bízott bennem, és inspirált arra, hogy mélyebb ismereteket szerezzek a gyógyszer-nanotechnológia világáról. Szeretném megköszönni legközelebbi munkatársaim, **Dr. Pallagi Edina**, **Dr. Jójártné Laczkovich Orsolya**, **Dr. Dobó Dorina Gabriella** és **Dr. Adalbert Livia** szakmai tanácsait és mentális támogatását. Hálás köszönetemet szeretném kifejezni **Lakatosné Fekete Piroksa Ágnesnek** kiváló technikai asszisztenciájáért és személyes támogatásáért. Külön köszönettel tartozom **Dr. Reza Semnani Jazaninak** a kutatási munkában nyújtott segítségért és biztatásáért. Köszönettel tartozom szerzőtársaimnak együttműködésükért és értékes segítségükért, amely lehetővé tette ezt a kutatást. Szeretném megköszönni a **Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet minden tagjának** a segítségét és támogatását. Köszönöm **Ph.D. hallgató társaimnak**, hogy amellet, hogy egy kiváló tudású, sikeres fiatal tudományos közösséget alkottak, értékes barátságukkal is megajándékoztak. Köszönettel tartozom **tanítványaimnak** és a **Kabay János Szakkollégium tagjainak**, hogy okot adtak a folytatásra, amikor akadályokba ütköztem. Külön szeretném megköszönni és kifejezni mélységes hálámat **barátaimnak** és **családomnak**, szerető **Anyukámnak**, **húgomnak**, **Csillának**, és **páromnak**, **Areznek** állandó szeretetükért és a belém vetett szüntelen hitükért, amellyel álmaim megvalósításában motiváltak. Ez az eredmény nem jöhetett volna létre törődésük, türelmük és bátorításuk nélkül.

## ANYAGI TÁMOGATÁS

A Ph.D. munkát a **Richter Gedeon Talentum Alapítvány** támogatta.