



Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

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

A Ph.D. értekezés tézisei

**MELOXIKÁM TARTALMÚ NAZÁLIS POLIMER MICELLÁK
FEJLESZTÉSE ÉS VIZSGÁLATAI A QUALITY BY DESIGN
MÓDSZERTAN ALAPJÁN**

Dr. Sipos Bence

okleveles gyógyszerész

Témavezető:

Dr. Katona Gábor, Ph.D.

Szeged

2023

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: Dr. Katona Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Sipos Bence

**MELOXIKÁM TARTALMÚ NAZÁLIS POLIMER MICELLÁK
FEJLESZTÉSE ÉS VIZSGÁLATAI A QUALITY BY DESIGN
MÓDSZERTAN ALAPJÁN**

Komplex vizsga vizsgabizottság:

- Elnök:** Prof. Dr. Szabóné Révész Piroska, D.Sc., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
- Tagok:** Dr. Csóka Gabriella, Ph.D., Meditop Gyógyszeripari Kft.,
Pilisborosjenő
- Dr. habil. Budai-Szűcs Mária, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Bírálni bizottság:

- Elnök:** Dr. habil. Csupor Dezső, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Klinikai
Gyógyszerészeti Intézet
- Opponensek:** Juhászné Dr. Csapó Edit, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Fizikai
Kémiai és Anyagtudományi Tanszék
- Dr. Spaits Tamás, Ph.D., Egis Gyógyszergyár Zrt., Kőrmend
- Titkár:** Dr. habil. Vasas Andrea, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Farmakognóziái Intézet
- Tag:** Dr. habil. Szakonyi Gerda, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszeranalitikai Intézet

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ANOVA	Varianciaanalízis
AUC	Görbe alatti terület
BBB	Vér-agy gát
CCD	Töltés-csatolt eszköz
Cl	Clearance
CMA	Kritikus anyagi paraméter
CPP	Kritikus gyártási paraméter
CQA	Kritikus minőségi paraméter
D _H	Átlagos hidrodinamikai átmérő
DLS	Dinamikus fényszórás
EE	Bezárási hatékonyság
EMA	Európai Gyógyszerügynökség
HPLC	Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
ICH	Nemzetközi Harmonizációs Konferencia
IN	Intranazális
IV	Intravénás
J	Fluxus
K _e	Eliminációs állandó
K _p	Permeabilitási együttható
LC-MS/MS	Folyadékkromatográfia tandem tömegspektrometriával
MHLW	Japán Egészségügyi, Munkaügyi és Jóléti Minisztérium
MRT	Átlagos tartózkodási idő
MWCO	Molekulatömeg <i>cut-off</i> értéke
MX	Meloxicám
NaOH	Nátrium-hidroxid
P _{app}	Látszólagos permeabilitási együttható
PBS	Foszfáttal puffereelt sóoldat
PdI	Polidiszperzitási index
PEG	Polietilén-glikol
QbD	Quality by Design
QTPP	Céltermék minőségi profil
SD	Szórás
SNES	Szimulált nazális elektrolitoldat
SP	Soluplus [®]
t _{1/2}	Felezési idő

1. BEVEZETÉS

A korszerű gyógyszerhordozók fejlesztését számos tényező igényli, csakúgy, mint a folyamatosan növekvő betegelvárások, a már forgalomban lévő hatóanyagok kedvezőtlen fizikai-kémiai tulajdonságai és a gyógyszeripari kihívások a feldolgozhatóság terén. Ez különösképpen igaz a nano gyógyszerhordozó rendszerekre, mint például a polimer micellákra, amelyek, mint nanohordozók képesek a szervezet nehezen elérhető területeire bejuttatni a hatóanyagokat (pl. központi idegrendszer) és kiváltani farmakodinámiai hatásukat.

A gyógyszerfelügyeleti elvárások és limitációk a nanomedicinális készítményeket is érintik. Fontos, hogy strukturált és megfelelő tervezéssel rendelkező kutatás-fejlesztési folyamatokat kell végrehajtani, amelyek igazodnak a hatályos irányelvekhez. Azonban a nanohordozókra vonatkozó előírások nem specifikusok, és inkább csak a vizsgálni kívánt paramétert, mint a termékleírásra szolgáló eszközt definiálják, mintsem a vizsgálatához szükséges módszertant. Ezért minőségfejlesztési technikákat kell alkalmazni már a fejlesztés korai stádiumban is. Ahhoz, hogy megfelelő minőséggel, biztonságos alkalmazással és hatékonysággal rendelkezzen a készítmény, a *Quality by Design* (QbD) vezérelt kockázatbecslési eljárások megoldást jelenthetnek. Így az általános nanorészecske sajátságok mellett figyelembe kell venni a beviteli kaput, a felépítő ko-polimer fizikai-kémiai sajátságait, magát a hatóanyag jellegét és a kívánt farmakokinetikai profilt.

Ezek alapján elvárás, hogy az alacsony molekulatömegű hatóanyagokkal töltött polimer micellák, amelyek a központi idegrendszerbe történő hatóanyag depozíciót tűzik ki célul, ezen szemlélet alapján legyenek fejlesztve. A nazális gyógyszerbevitel kihívásaira a polimer micellák képesek megoldást szolgáltatni, mivel nagymértékű szolubilizáció kiváltására képesek, így gyors hatóanyag-leadást tudunk velük elérni. Összehasonlítva más nanohordozókkal, a polimer micellák nagyobb stabilitással jellemezhetőek, különösen a polietilén-glikol oldalláncokkal felvértezettek. A megfelelő stabilitás pedig kulcsfontosságú a hatóanyag célszervbe történő juttatása esetén.

A polimer micellák számos klinikai igényt tudnak ezáltal kielégíteni, és szemben állnak azzal a problémával, hogy megannyi potenciálisan hatékony hatóanyag megbukik a klinikai vizsgálatokon a megfelelő hordozó hiányában. Továbbá az invazív eljárásokat is el lehet kerülni azáltal, hogy a beteg számára kényelmes adagolási módok is megvalósulhatnak. Azonban ahhoz, hogy e végcélok megvalósuljanak, úgy a klinikai és ipari elvárásokon alapuló, minőségirányított fejlesztési folyamatoknak érvényben kell lenniük a terápiásan optimális beviteli kapun történő hatóanyag adminisztráció kiválasztása során.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen Ph.D. munka egy nazálisan alkalmazható, korszerű, innovatív meloxicám tartalmú polimer micella nanohordozó fejlesztését tűzte ki, amely minőség-orientált fejlesztési és vizsgálati folyamat eredményeként képes a központi idegrendszerbe magasabb hatóanyag koncentrációt bejuttatni, szemben a forgalomban lévő készítményekkel. Az értéknövelt farmakokinetikai profil eléréséhez szükséges a megfelelő kolloidikai és részecsketulajdonságok megléte, amelyek a fokozott vízdékonyságból adódó gyors hatóanyag-leadási és permeabilitási profilhoz vezetnek. Ezáltal a kutatás az alábbi célkitűzéseknek megfelelően zajlott:

- I. Korábbi munkánkat alapul véve tudástér fejlesztést követően egy kockázatbecslési eljárás kivitelezése a kiválasztott hatóanyaggal, segédanyagokkal és beviteli kapuval kapcsolatban. A *QbD* alapú módszertan alkalmazása és adaptációja, amely kiválóan alkalmazható preklinikai kutatás-fejlesztési folyamatokban.
- II. A magas kockázati faktorok figyelembevételével az előállítási folyamatot és az összetétel optimalizálása faktoriális kísérlettervezéssel, az optimális összetétel kolloidális és részecsketulajdonságainak meghatározása, valamint a nazális gyógyszerforma követelmények pl. ozmolalitás, viszkozitás vizsgálata.
- III. A vízdékonyság növekedés kvalitatív és kvantitatív jellemzőinek mérése és leírása, továbbá hosszú távú fizikai stabilitás vizsgálatot végrehajtása és értékelése.
- IV. A nazális gyógyszerforma vizsgálatok elvégzése a hatóanyag útját lekövetve, különös tekintettel az *in vitro* hatóanyag-leadásra és *in vitro* mukoadhéziós jellegre. *In vitro* citotoxicitás és permeabilitás meghatározása RPMI 2650 nazális epitél sejtvonalon, továbbá *ex vivo* humán ornyálkahártyán keresztül történő permeabilitás vizsgálata.
- V. Végezetül, *in vivo* farmakokinetika leírása és a kapcsolat paraméterek kiszámítása. A preklinikai vizsgálatok harmonizációja, korreláció feltérképezése az *in vitro*, *ex vivo* és az *in vivo* vizsgálatok között.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált anyagok

Modell hatóanyagként a meloxikámot (MX) (4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil) - 2H-1,2-benzotiazin-3-karboxamid-1,1-dioxid) választottuk (EGIS Gyógyszergyár Zrt., Budapest, Magyarország). Polimer micella képző ko-polimerként Soluplus[®] (SP) (BASF GmbH, Hanover, Németország) került kiválasztása. Szerves oldószerként 96 %-os etanol (Merck Kft., Budapest, Magyarország) került alkalmazásra. A mikrokristályos nátrium-hidroxid (NaOH), a krioprotektáns D-trehalóz dihidrát (D-Tre), a szimulált nazális elektrolit oldat (SNES) és a foszfát puffereelt sóoldat (PBS) komponensei a Sigma-Aldrich Co., Kft., Budapest, Magyarország által kerültek beszerzésre. A SNES összetétele az alábbi: 8,77 g/l nátrium-klorid (NaCl), 2,98 g/l kálium-klorid (KCl), 0,59 g/l vízmentes kalcium-klorid (CaCl₂). A PBS 7,4 pH értékű volt, melyet dinátrium-hidrogén-foszfát (Na₂HPO₄) és kálium-dihidrogén-foszfát (KH₂PO₄) sók alkották. A formuláció és a mérések során a tisztított vizet a Millipore Milli-Q[®] (Merck Kft., Budapest, Magyarország) Gradient Water Purification System reverz ozmózis elven működő víztisztító készülék segítségével szűrtük. Minden egyéb vegyszer szintén a Sigma-Aldrich Co., Kft. által került beszerzésre amennyiben másképp nincs indikálva.

3.2. Quality by Design alapú kockázatbecslés

A QbD egy tudás- és kockázatbecslés központú minőségfejlesztési módszertant foglal magában, így kvalitatív és kvantitatív faktorok összegyűjtése szükséges. A kockázatbecsléshez a LeanQbD[®] (QbD Works LLC, Fremont, CA, Amerikai Egyesült Államok) szoftver került alkalmazásra. Először interdependencia alapon történt a kölcsönösségi viszony meghatározása a céltermék minőség profilja (QTPP) és a kritikus minőségi paraméterek (CQA) között, majd a CQA elemek és a kritikus anyagi (CMA) és gyártási paraméterek (CPP) között. Ehhez egy háromszintes skálát alkalmaztunk, és minden kapcsolatot „Magas” (M), „Közepes („K”) és Alacsony („A”) jelzőkkel illettünk. Ezt követően előfordulási valószínűség, azaz probabilitás alapján számszerűsítettük a kockázati tényezőket és egy rangsort tudtunk ezáltal felállítani. A kiszámított súlyossági fokok százalékosan kerültek megadásra, amelyek az interdependencia alapú kockázatbecslési mátrixok keretein belül kerültek bemutatásra.

3.3. Meloxikám tartalmú polimer micellák előállítása

Első lépésként 15 mg MX-t 10 ml etanol és 3 ml NaOH oldószer elegyében oldottuk folyamatos kevertetés mellett (750 rpm, 25 °C). Ezt követően a keletkező MX oldatban 100 mg SP-t oldottunk. 1 óra inkubáció után a szerves oldószer rotációs vákuumbepárlással (Büchi R-

210 (Büchi, Flawil, Svájc) eltávolítottuk, így egy polimer filmet kapva a gömblombikban. A bepárlási hőmérséklet 50 °C volt és a nyomás értéket folyamatosan csökkentettük 1000 mbar értékről 100 mbar nyomásig 50 mbar/perc sebességgel. Ezt követően 10 – 15 perces szárítás történt 100 mbar nyomáson és 50 °C-on. A hidratáció 6 ml tisztított vízzel történt, majd a pH értéket 5,6 és 7,4 közé állítottuk be megfelelően a nazális tartománynak. Ezt követően az oldatot 1-1 ml alikvotokra osztottuk, majd fagyasztva szárítottuk 5 m/m% D-Tre hozzáadásával (ScanVac CoolSafe 100-9 (Labogene, ApS, Lyngø, Dánia)). Első lépésként megfagyasztottuk a mintákat – 40 °C-on 12 órán keresztül 0,013 mbar nyomás mellett, majd 3 órán keresztül utószárítottuk 25 °C-on. A fagyasztva szárított mintákat közvetlen a további vizsgálatok előtt 1 ml tisztított vízzel visszaoldottuk, így az MX nominális koncentrációja 2,5 mg/ml volt (SP-MX formuláció). Minden beállított paraméter egy 3-faktoros, 3-szintes Box-Behnken faktoriális kísérlettervezést követően került meghatározásra.

3.4. *Micella karakterizáció*

3.4.1. *Az ex tempore rediszpergált termék karakterizációja*

Az átlagos hidrodinamikai átmérő (D_H) és a polidiszperzitási index (PdI) a dinamikus fényszórás (DLS) elvén került meghatározásra (Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Egyesült Királyság)). A formulációk zéta potenciál értéke (ζ) szintén ezen készülék segítségével volt mérve. A formulációkat 1 ml tisztított vízben oldottuk, majd 25 °C-on, 1,720 refraktív index mellett mértük kapilláris üvegeküvetékben. Három párhuzamos mérést végeztünk és azokat átlagoltuk.

A porampullák rekonstitúciós idejét 1 ml vízben mértük folyamatos keverés mellett (100 rpm, 25 °C), amíg egy tiszta oldatot nem kaptunk. A rediszpergált oldat pH értékét a WTW[®] inoLab[®] pH 7110 (Thermo Fisher Scientific, Budapest, Magyarország) kézi, automatikus pH mérő eszközzel mértük. Az ozmolalitást automata ozmóméter (Knauer Semi-micro Osmometer, Berlin, Germany) segítségével mértük. A viszkozitás méréseket 35 °C-on viteleztük ki RheoStress 1 HAAKE instrument (Kalrsuhe, Germany) eszközzel, kúpmez geometriai beállítással (sugár: 49,9 mm, szög: 1°, rés: 0,052 mm). A látszólagos viszkozitást 0,01 – 100 s⁻¹ nyírési sebesség közötti söpréssel határoztuk meg. Három párhuzamos mérést végeztünk és azokat átlagoltuk.

3.4.2. *Termodinamikai oldhatóság meghatározása*

Az kiindulási MX hatóanyag és az SP-MX formuláció termodinamikai oldhatóságát 3 különböző értéken vizsgáltuk szimulálva a tárolási, a nazális és a vérben található pH és

hőmérséklet viszonyokat. Az alábbi folyadékokban került meghatározásra az oldhatósági érték: tisztított vízben (pH 6,4, 25 °C), SNES-ben (pH 5,6, 35°C) és PBS-ben (pH 7,4, 37 °C). A vizsgálathoz 1-1 ml folyadékokot használtunk, majd szemmel látható telítettséget követően 72 órán keresztül 100 rpm állandó keverési sebességgel inkubáltuk a rendszereket. Ezt követően a szuszpenziókat 0,22 µm pórus átmérőjű poliéter-szulfon membránszűrőn keresztül megszűrtük és meghatároztuk az oldott hatóanyag tartalmát. Három párhuzamos mérést végeztünk és azokat átlagoltuk.

3.4.3. Bezárási hatékonyság meghatározása

A bezárási hatékonyság (EE) meghatározásához az indirekt módszert alkalmaztuk. A polimer micellákat centrifugálás segítségével elkülönítettük a Hermle Z323 K magas teljesítményű, hűthető centrifuga (Hermle AG, Gosheim, Németország) alkalmazásával 17500 rpm fordulatszám és 4 °C hőmérséklet beállításával 45 percen keresztül. A felülúszóból történt a mennyiségi meghatározás három párhuzamos mérés során és az alábbi képlet segítségével határoztuk meg a bezárási hatékonyságot:

$$EE(\%) = \frac{MX_{kiindulási} (mg) - MX_{felülúszó} (mg)}{MX_{kiindulási} (mg)} \cdot 100 \quad (1)$$

3.4.4. Nedvesedési sajátságok és polaritás meghatározása

A formuláció nedvesedésének megvizsgálásához kontakt nedvesedési peremszög mérésen alapuló módszert alkalmaztunk (DataPhysics OCA 20, DataPhysics Inc., GmbH, Filderstadt, Németország). A mérések során 0,10 gramm fagyasztva szárított por került kimérésre majd 1 tonna préselő mellett pasztillákat préseltünk Specac[®] hidraulikus prészerszám (Specac Inc., Fort Washington, PA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével. Az érintkezési szög mérésére használt folyékony közeg a bidesztillált víz (a poláris komponens határfelületi feszültsége (γ_i^p) = 50.2 mN/m, az apoláros komponens határfelületi feszültsége (γ_i^d) = 22.6 mN/m) és dijód-metán (γ_i^p = 1.8 mN/m, γ_i^d = 49 mN/m) került felhasználásra. A préselt minták érintkezési szögeit Wu módszerével határoztuk meg. A szilárd felületi szabadenergia a poláris (γ_i^p) és az apoláris (γ_i^d) komponensek összege a Wu egyenlet alkalmazásával került kiszámításra (2. Egyenlet):

$$(1 + \cos\Theta)\gamma_1 = \frac{4(\gamma_s^d\gamma_1^d)}{\gamma_s^d\gamma_1^d} + \frac{4(\gamma_s^p\gamma_1^p)}{\gamma_s^p\gamma_1^p} \quad (2)$$

Ahol Θ a kontakt nedvesedési peremszög szög, γ_s a szilárd felület szabadenergiája és γ_1 a folyadék felületi feszültsége.

A százalékos polaritás a γ^p és γ értékekből az alábbi egyenlet alapján számítható ki:

$$\text{Polaritás (\%)} = \frac{\gamma^p}{\gamma} \cdot 100 \quad (3)$$

3.4.5. Raman spektroszkópiás vizsgálat

A polimer micellák Raman spektroszkópiai mérésére a Thermo Fisher DXR konfokális Raman mikroszkóp (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) eszköz került használatra, melyet egy töltés-csatolt eszköz (CCD) kamerával és 780 nm-en működő dióda lézerral szereltek fel. A Raman méréseket 12 mW lézertejesítménnyel, 25 μm -es optikai réstávolsággal végeztük. Az értékeléshez használt Raman spektrumok 2 s beállított expozíciós idővel, 6 s felvételi idővel és összesen 32 spektrum átlagolásával készült a 3500 – 200 cm^{-1} spektrumtartományban kozmikus sugárzás és fluoreszcencia korrekciókkal. A Raman spektrumokat normalizáltuk, hogy kiküszöböljük a mért területek közötti intenzitás eltérést.

3.5. Hosszú távú fizikai stabilitás vizsgálata

A fagyasztva szárított szilárd termék fizikai stabilitásának meghatározásához az ICH Q1A irányelvnek megfelelően hosszú távú stabilitási vizsgálatot végeztünk hűtőszekrényben történő tárolással 12 hónapig, 5 ± 3 °C-on. Minden hónapban egy porampullát feloldottunk tisztított vízben, majd a DLS módszer segítségével meghatároztuk a D_H és PDI értékeket. Három párhuzamos mérést végeztünk.

3.6. Nazális alkalmazhatósági vizsgálatok

3.6.1. In vitro hatóanyag-leadás vizsgálata

Az SP-MX formuláció hatóanyag-leadás vizsgálatára módosított forgólapátos módszert (Hanson SR8 Plus (Teledyne Hanson Research, Chatsworth, CA, Amerikai Egyesült Államok) alkalmaztuk, referenciaként a kiindulási MX hatóanyagleadási profilját használtuk, amelyet 0,1 m/v%-os nátrium-hialuronát (molekulatömeg 1400 kDa) oldatban szuszpendáltunk. A vizsgálathoz 1-1 ml oldatot és szuszpenziót dialízis zsákba töltöttünk (Spectra/Por® Dialízis membrán, MWCO: 12-14 kDa (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, Amerikai Egyesült Államok)), kioldóközegként 100 ml SNES-t alkalmaztunk és a mérést 35 °C-on végeztük. Három párhuzamos mérést végeztünk.

3.6.2. *In vitro* sejteletképességi és permeabilitási vizsgálat humán RPMI 2650 sejtvonalon

Az *in vitro* sejtvonalas vizsgálatokhoz humán orrhámsejteket (RPMI 2650; ATCC cat. no. CCL 30) használtunk. A permeabilitás mérésére a hámsejteket humán vaszkuláris endothel sejtekkel együtt tenyésztettük, hogy fiziológiásan megfelelőbb gátat hozzunk létre, reprezentálva az orrhámot és a nyálkahártya alatti vaszkuláris endotéliumot. Az élő gátképző sejtek sejtkárosodásának és/vagy védelmének nyomon követésére és a tapadó sejtek életképességének számszerűsítésére valós idejű sejtelektronikus érzékelési technikát alkalmaztunk. A sejtrétegek impedanciájának regisztrálásához RTCA-SP készüléket (ACEA Biosciences, Amerikai Egyesült Államok) használtunk. A regisztráció 10 percenként történt, és a sejtindexet a következőképpen határoztuk meg: $(R_n - R_b)/15$, ahol R_n a sejteket tartalmazó fal sejtelektród impedanciája, R_b pedig a háttér impedancia. A 96 lyukú és beépített aranyelektrodákkal ellátott E-lemezeket 0,2 m/v%-os zselatinnal vontuk be, és 20 percre az inkubátorba helyeztük. Az inkubálás után a zselatint eltávolítottuk, és 50 μ l táptalajt helyeztünk minden lyukba. Az adagolt RPMI 2650 sejtuszuspenzió sűrűsége 2×10^4 sejt/lyuk volt. Amikor a sejtek elérték az egyenletes növekedési fázist, az SP-MX formuláció és az azt felépítő komponensek oldatai kerültek felhelyezésre. Az oldatokat a sejttenyésztő tápközegben állítottuk elő.

A permeabilitás mérésére RPMI 2650 sejteket tenyésztettünk 12 lyukú lemezekre helyezett inszerteken (Transwell, polikarbonát membrán, 3 μ m pórusméret, 1.12 cm^2 , Corning Costar Co., MA, Amerikai Egyesült Államok) endotél sejtek jelenlétében 5 napig. Az együtt tenyésztett modell elkészítéséhez endotél sejteket passzáltunk (1×10^5 sejt/ cm^2) alacsony növekedési faktorról bevont, Matrigelt (BD Biosciences, NJ, Amerikai Egyesült Államok) tartalmazó szövettenyésztő inszertek alsó oldalára és orrhámsejteket oltottunk be (2×10^5 sejt/ cm^2) a patkányfarkok kollagénnel bevont membránok felső oldalához. A permeabilitási kísérletekhez 1,5 ml Ringer-Hepes puffert helyeztünk el az akceptor rekeszekben. A donor rekeszbe 0,5 ml MX szuszpenzió vagy SP-MX micelláris oldat került. A lemezeket vízszintes rázógépen (120 fordulat/perc) tartottuk a vizsgálatok során, amely 60 percig tartott. Mindkét kompartmentből mintákat gyűjtöttünk, majd a meloxikám koncentrációt meghatároztuk. A látszólagos permeabilitási együttható kiszámítása során az alábbi tényezők kerültek számításba: az akceptor fázis koncentrációváltozása 60 percen belül ($\Delta[C]_A$), a donor kompartment koncentrációja a kiindulási időpontban ($[C]_D$), az akceptor kompartment térfogata (V_A ; 1,5 ml) és a felszín (A ; 1,1 cm^2) (4. Egyenlet).

$$P_{\text{app}} \left(\frac{\text{cm}}{\text{s}} \right) = \frac{\Delta[C]_A \times V_A}{A \times [C]^D \times \Delta t} \quad (4)$$

A permeabilitás mérésére 2,5 mg/ml MX szuszpenzió és SP-MX formuláció került felhasználásra, valamint a 10x-es hígításuk is Ringer-Hepes pufferben.

3.6.3. *Ex vivo nazális permeabilitás vizsgálata*

A nazális passzív diffúzió *ex vivo* körülmények közötti vizsgálatát módosított, Side-Bi-Side® típusú horizontális diffúziós cellán keresztül hajtottuk végre. Az MX szuszpenzió és az SP-MX készítmény diffúzióját metszett humán orrnyálkahártyán keresztül teszteltük. A kísérletek a Szegedi Tudományegyetem intézményei etikai bizottságának jóváhagyásával (ETT-TUKEB:IV/3880-1/2021/EKU) történtek. Az orrnyálkahártyát 0,785 cm² diffúziós felülettel a donor és az akceptor kompartment közé helyeztük. A donor fázist úgy állítottuk elő, hogy 1 ml készítményt felhígítottunk 8 ml SNES-sel, míg az akceptor fázis 9 ml 7,4 pH értékű PBS volt, szimulálva a nazális körülményeket. A kamrák hőmérsékletét fűtőcirkulátorral (ThermoHaake C 10-P5, Sigma-Aldrich Co., Kft., Budapest, Magyarország) 35 ± 0.5 °C-ra szabályoztuk. A kompartmentek folyamatos keverés alatt álltak 100 rpm fordulatszámmal. Az akceptor fázisból előre meghatározott időpontokban 100 µl-es alikvotokat vettünk, és azonnal visszapótoltuk. A fluxust (J) az orrnyálkahártyán átdiffundált hatóanyag mennyiségéből (m_t), a felszínből (A) és a mintavételi időből (t) számítottuk ki (5. Egyenlet). A permeabilitási együtthatót (K_p) a fluxus és a donor fázis kiindulási koncentrációjának (C_d) hányadosaként definiáltuk (6. Egyenlet).

$$J = \frac{m_t}{A \times t} \quad (5)$$

$$K_p = \frac{J}{C_d} \quad (6)$$

3.6.4. *In vivo farmakokinetika vizsgálata*

Az állatkísérleteket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (AKTB) jóváhagyásával végeztük (engedély száma: IV/1247/2017). Az állatok kezelése az Európai Közösségek Tanácsának irányelvei (2010/63/EU) és az 1998. évi XXVIII. törvény az állatok védelméről és kíméletéről alapján történtek. A kísérlet során 160 – 180 g testtömegű, hím Sprague Dawley patkányokat használtunk fel, melyek jobb orrlyukába 60 µg MX dózist tartalmazó SP-MX formulációt pipettáztunk (n=24). Előre meghatározott időpontokban (5, 15, 30, 60, 120, 240 perc) a patkányok vérért (izoflurán érzéstelenítés alatt) heparinizált csövekbe gyűjtöttünk

szívpunkcióval. Ezután az állatokat lefejeztük, az agyszöveteket eltávolítottuk, jéghideg PBS-ben öblítettük majd tömegmérést követően az analitikáig – 80°C-on tároltuk.

A farmakokinetikai paraméterek meghatározását a PK Solver 2.0 szoftverrel végeztük a mért agyi és plazmaadatok nem kompartmentális elemzésével. Az idő – koncentráció görbékből a görbe alatti területeket lineáris trapezoid illesztésen alapuló módszerrel határoztuk meg ($n=4$).

3.7. *A meloxicám mennyiségi analízise*

Méréseink során az MX koncentrációjának számszerűsítésére nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát alkalmaztunk (Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, Amerikai Egyesült Államok)). Az állófázis egy Kinetex[®] EVO C18 oszlop volt (5 μ m, 150 mm x 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok)). Az elválasztáshoz kétlépéses gradiens elúciót alkalmaztunk, eluensként 0,065 M KH₂PO₄ oldatot (pH 2,8) és metanolt használtunk. A kromatogramok detektálása 355 \pm 4 nm hullámhosszon, UV-Vis diódasoros detektorral történt. Az adatokat ChemStation B.04.03 szoftverrel (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Amerikai Egyesült Államok) értékeltük ki.

Az MX kvantitatív analízisét az *in vivo* vizsgálatokhoz a Waters Acquity I-Class UPLC[™] rendszerrel (Waters, Manchester, Egyesült Királyság) végeztük, Q Exactive[™] Plus Orbitrap tömegspektrométerhez (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok) csatlakoztatva, fűtött ESI ionforrással feleszerelve. Belső standardként piroxikámot használtunk. A gradiens kromatográfiás elválasztást szobahőmérsékleten Acquity BEH C18 oszlopon (50 mm x 2,1 mm; részecskeméret: 1,7 μ m) végeztük, amelyet C18 védőoszloppal (2 x 2 mm, Phenomenex, Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok) védtünk. Eluensként 0,1%-os vizes hangyasav oldatot és hangyasavas acetonitrilt alkalmaztunk. A tömegspektrométert pozitív üzemmódban használtuk a fűtött ESI forrás alábbi paramétereivel: permetezési feszültség – 3,5 kV, kapilláris hőmérséklet – 256 °C, segédgáz fűtőelem hőmérséklete – 406 °C, köpenygáz áramlási sebessége – 47,5 l/h, segédgáz áramlási sebessége 2,25 l/h és S-lencse rádió frekvenciás szintje 50,0. *Parallel reaction monitoring* módot használtunk a számszerűsítéshez a következő átmenetek monitorozásával: m/z 352 \rightarrow 115 MX és m/z 332 \rightarrow 95 piroxikám esetében. Az adatgyűjtés és feldolgozás Xcalibur és Quan Browser (4.5.474.0 verzió) szoftverrel (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok) történt.

4. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

4.1. *Quality by Design alapú kockázatbecslés*

A QbD alapú fejlesztések első részeként egy megfelelő tudástér kialakítása a kulcsfontosságú lépés, majd ezt követően az összegyűjtött paraméterek kritikai elemzését kockázatbecsléssel kell végrehajtani. Kutatómunkánk során korábban beszámoltunk egy általános tudástér-fejlesztésről a polimer micellákról, ahol számos irodalmi adatot elemeztünk, hogy megtaláljuk az összes olyan változót, amely befolyásolja ennek a specifikus nanohordozó rendszernek a minőségét, biztonságos alkalmazhatóságát és hatékonyságát. Megállapításaink során az Európai Gyógyszerügynökség direktíváira is hagyatkoztunk, és összegyűjtésre kerültek a QTPP, CQA, CMA és CPP elemek. Az azonosítást követően interdependencia alapon kölcsönösségi viszonyokat határoztunk meg a QTPP és CQA elemek között, majd azok súlyossági fokát számoltuk ki szoftveresen és jellemeztük százalékosan (1. Ábra).

QTPP \ CQA	Indikáció	Populáció	Beviteli kapu	Hatás helye	Felszívódási profil	Leadási profil	Nanohordozó	Súlyossági fok (%)
Micella mérete	KÖZEPES	ALACSONY	MAGAS	MAGAS	MAGAS	MAGAS	MAGAS	21,84
Segédanyagok	ALACSONY	ALACSONY	KÖZEPES	KÖZEPES	MAGAS	MAGAS	MAGAS	17,51
Oldékonyosság	KÖZEPES	ALACSONY	MAGAS	KÖZEPES	MAGAS	MAGAS	MAGAS	11,49
Hatóanyag leadás ideje	ALACSONY	ALACSONY	MAGAS	KÖZEPES	KÖZEPES	MAGAS	MAGAS	8,92
Permeabilitás mértéke	MAGAS	ALACSONY	MAGAS	MAGAS	MAGAS	KÖZEPES	KÖZEPES	8,49
Bezárási hatékonyság	KÖZEPES	ALACSONY	KÖZEPES	KÖZEPES	MAGAS	MAGAS	KÖZEPES	8,03
Nedvesedés	KÖZEPES	ALACSONY	KÖZEPES	KÖZEPES	MAGAS	MAGAS	KÖZEPES	6,26
Szerkezet	ALACSONY	ALACSONY	KÖZEPES	ALACSONY	KÖZEPES	KÖZEPES	KÖZEPES	5,75
Fizikai megjelenés	ALACSONY	ALACSONY	KÖZEPES	MAGAS	KÖZEPES	KÖZEPES	ALACSONY	5,06
Stabilitás	ALACSONY	ALACSONY	ALACSONY	ALACSONY	KÖZEPES	ALACSONY	ALACSONY	3,77
Toxicitás	ALACSONY	ALACSONY	KÖZEPES	ALACSONY	ALACSONY	ALACSONY	ALACSONY	2,88

1. Ábra. A QTPP és CQA elemek közötti kölcsönös függőség értékelése. Minden kapcsolat magas/közepes/alacsony relációval van jellemezve. Az utolsó oszlop a CQA elemek súlyossági fokát mutatja százalékos arányban az összesített súlyossági fokokhoz képest.

Az első interdependencia értékelés azt mutatta, hogy a részecskék jellemzői sokkal, magasabb kockázattal jellemezhetőek, mint az orrüregen keresztüli adminisztrációhoz kapcsolódó tényezők. Ez a későbbiekben nagymértékben alátámasztásra került, hiszen a faktoriális kísérlettervezés során e tényezőket vettük figyelembe, mint függő faktorok. Minőségi kritériumként lefektettük, hogy a részecskeméret 10 és 200 nm között legyen és a méret eloszlása monodiszperz legyen. A segédanyagok, mint például az SP, előre

meghatározott volt, így annak ellenére, hogy a kockázat magas, meghatározott minőségi vonatkozásokkal rendelkezik, mennyiségileg azonban optimalizálni kell. Az első oszlop listáján szereplő CQA elemek a későbbiek során megvizsgálásra kerültek. A következő lépés annak meghatározása volt, hogy mely CMA/ CPP elemek jellemezhetőek magas kockázati értékekkel a CQA elemekkel szemben, mely értékelés a 2. ábrán látható.

CMA/ CPP CQA	Összetétel	Keverési idő	Rotációs nyomás	Rotációs hőmérséklet	Rotációs sebesség
Micella mérete	MAGAS	MAGAS	KÖZEPES	KÖZEPES	KÖZEPES
Segédanyagok	MAGAS	KÖZEPES	ALACSONY	KÖZEPES	ALACSONY
Oldékonyosság	MAGAS	MAGAS	MAGAS	KÖZEPES	KÖZEPES
Hatóanyag leadás ideje	MAGAS	KÖZEPES	ALACSONY	ALACSONY	KÖZEPES
Permeabilitás mértéke	MAGAS	KÖZEPES	KÖZEPES	KÖZEPES	KÖZEPES
Bezárási hatékonyság	MAGAS	MAGAS	KÖZEPES	KÖZEPES	ALACSONY
Nedvesedés	MAGAS	KÖZEPES	KÖZEPES	KÖZEPES	ALACSONY
Szerkezet	MAGAS	ALACSONY	ALACSONY	KÖZEPES	ALACSONY
Fizikai megjelenés	KÖZEPES	KÖZEPES	ALACSONY	ALACSONY	KÖZEPES
Stabilitás	MAGAS	ALACSONY	ALACSONY	ALACSONY	ALACSONY
Toxicitás	KÖZEPES	KÖZEPES	ALACSONY	ALACSONY	ALACSONY
Súlyossági fok (%)	47,78	21,88	15,39	7,82	7,13

2. Ábra. A CQA és CMA/ CPP elemek közötti kölcsönös függőség értékelése. Minden kapcsolat magas/közepes/ alacsony relációval van jellemezve. Az utolsó sor a CMA/ CPP elemek súlyossági fokát mutatja százalékos arányban az összesített súlyossági fokokhoz képest.

Az optimalizált polimer micellák kialakítását célzó vékonyréteg film hidratációs módszernél meghatározott kockázatbecslés értékelése alapján kiderült, hogy az idő mellett a készítmény összetétele alkotja a legmagasabb kockázati tényezőt. Ezért későbbiekben az egyes segédanyagok összetételét a faktoriális kísérlettervezés részeként választottuk ki, mint független faktorok. Az MX koncentrációját előre definiáltuk 2,5 mg/ml értékre. A keverési időt nem állítottuk be az optimalizálási folyamat előtt, mivel a térfogatok az oldószeres extrakciót megelőzően változtak. A kritérium az volt, hogy megfelelő kivonás után láthatóan száraz legyen.

4.2. Micella karakterizáció

4.2.1. Az ex tempore diszpergált termék karakterizációja

A Box-Behnken faktoriális kísérlettervezéssel végzett optimalizálás után a vízben rediszpergált nazális készítmény karakterizálását végeztük el. A mért átlagos hidrodinamikai átmérő (D_H) értéke $111,6 \pm 3,0$ nm volt, ami optimális és a polimer micellákra jellemző

részecskeméret tartományban (10 és 200 nm között) található. Ez a részecskeméret csökkentés a nanokapszulázási technikák közé sorolható, ahol a csökkenést további segédanyagok, például a vizsgálatunkban alkalmazott SP ko-polimer segítségével érik el. Nemcsak a megnövelt oldhatóságú és felületű nanorészecskék előnyeit hordozza magával, hanem az építő ko-polimer előnyös tulajdonságai is felszínre kerülnek. Mivel az SP micellák hidrofil koronája polietilén-glikol, így növeli a stabilitását a keringésben és a biológiai eloszlás során. Ezenkívül megnövelné a vérben történő tartózkodási időt is, anélkül, hogy lebomlana, ezáltal meghosszabbítva a hatékony kezelési időt. A micellaméret mellett annak az eloszlása is kulcsfontosságú paraméter. A PDI a micellaméret eloszlásra utal, amely az SP-MX készítmény esetében $0,114 \pm 0,06$ volt. A 0,3 alatti PDI értékek monodiszperznek minősülnek, ezért készítményünk megfelelt ennek a kritériumnak. Nemcsak a nanohordozó kolloid szerkezetére és tulajdonságaira van hatással, hanem a hatóanyag felszabadulási és permeációs profiljára is. Az egyenletes hatóanyag-leadás és permeáció csak akkor lehetséges, ha a készítmény monodiszperz, mivel a polidiszperz eloszlás esetén a változó szemcseméret eltérő kinetikai profilokat vonz maga után. A zéta potenciál a folyékony halmazállapotú kolloid rendszer felületi töltési tulajdonságaira utal. Az SP-MX készítmény esetében a mért zéta potenciál $-25,2 \pm 0,4$ mV volt. Ez egy viszonylag magas abszolút érték, amely megakadályozza a nanorészecskék aggregációját a köztük lévő taszítóerők lévén. A negatív felületi töltésű vagy töltés nélküli polimer micellák az ornyálkahártyán keresztül penetrálódó hordozók közé tartoznak, ahol a nyálkaréteg lehetővé teszi a micelláris hordozó felszívódását transzcitózissal vagy paracelluláris transzporttal.

A fagyasztva szárított SP-MX formuláció rekonstitúciós ideje 2 s volt, ami jóval meghaladja az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur. 10) követelményeit, amely szerint a fagyasztva szárított porampulláknak megfelelő oldószer hozzáadása után 3 percen belül fel kell oldódnia teljesen. Az orr fiziológiás pH-ja 5,6 és 7,4 között van, ami lehetővé teszi a normál csilló működést. Ebben az enyhén savas környezetben is kifejti kedvező hatásait a lizozim, amely egy természetes antimikrobiális enzim az orrüregben. Az SP-MX készítmény pH értéke 6,49 volt, ami megfelel a kritériumoknak. A nazális készítmények általában izotóniásak (kb. 290 mOsmol/l), de az izotóniától való eltérés is előnyös lehet. A hipertóniás oldatok zsugorodást okozhatnak a hámsejtrétegben és gátolhatják a normális csilló aktivitást. Esetünkben hipotóniás oldatot (240 ± 12 mOsmol/l) kaptunk, ami növelheti a hatóanyag felszívódását. A készítmény viszkozitása $32,5 \pm 0,28$ mPas volt, ami elég alacsony ahhoz, hogy orrsprayként történő alkalmazása is megvalósuljon, valamint ne okozzon diffúziós gátat.

4.2.2. A termodinamikai oldhatóság és a bezárási hatékonyság meghatározása

Az SP-MX készítmény termodinamikai oldhatóságát a kiindulási MX-hez viszonyítva telítési módszerrel határoztuk meg 3 különböző pH és hőmérsékletviszonylatban, amelyek reprezentálják az orrüregi, a tárolási és a vérkeringésben jelenlévő kondíciókat. A számított oldhatósági tényezőket az 1. táblázatban láthatjuk az indirekt módszerrel meghatározott bezárási hatékonyság értéke mellett. Látható, hogy jelentősen növelte a micellaképződés a hatóanyag vízzoldékonyságát, amely a magas bezárási hatékonyságnak és a nano mérettartománynak köszönhető.

1. Táblázat. SP-MX termodinamikai oldhatósága (S_{tot}) szemben a kiindulási MX hatóanyaggal (S_w), valamint a bezárási hatékonyság (EE). Az adatok átlagot és szórást jelölnek ($n = 3$).

pH	S_w (mg/l)	S_{tot} (mg/l)	EE (%)
5,6	$6,92 \pm 0,19$	$5419,7 \pm 1,284$	$89,4 \pm 2,7$
6,4	$6,99 \pm 0,45$	$5527,0 \pm 1,197$	$92,1 \pm 1,5$
7,4	$7,09 \pm 0,33$	$5775,9 \pm 0,789$	$89,9 \pm 3,6$

4.2.3. Nedvesedési sajátságok és polaritás számítása

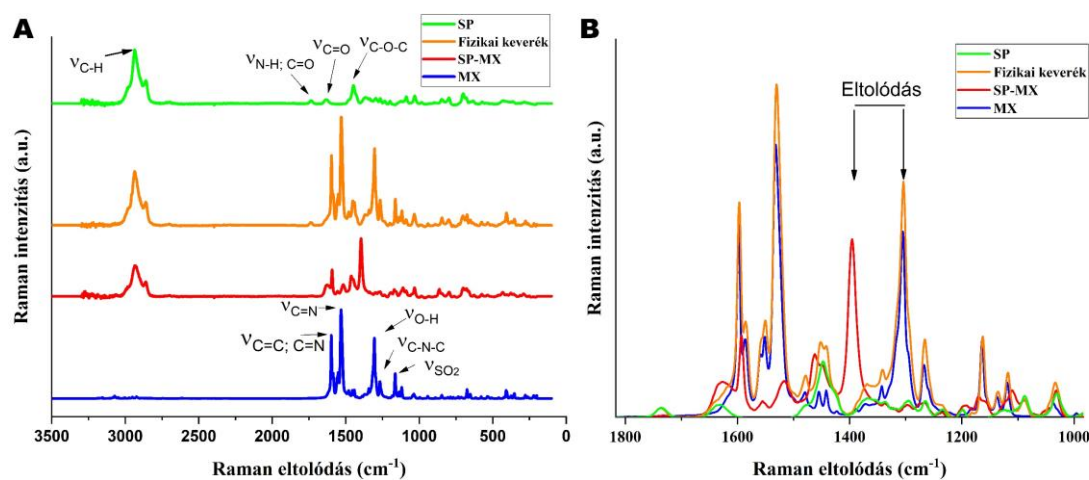
A nedvesedési sajátságok vizsgálata és pozitív értékelése kiemelkedően fontos, ha a cél egy vízben gyorsan diszpergálódó termék kifejlesztése. Az MX vízzel szembeni érintkezési szöge nagy, ami nagy hidrofóbitást mutat, míg az SP polimer micellaképző ko-polimer és az SP-MX formuláció viszonylag alacsony érintkezési szöggel rendelkezik (2. Táblázat). A számított polaritásértékek is azt igazolják, hogy az MX nanohordozóval történő szolubilizálását követően a polaritás növekedése tapasztalható. A polaritás növekedés oka lehet a készítményben lévő poláris D-Tre nagy térfogat- és tömegaránya, valamint az SP-nek a magas polaritása. A magas polaritás és bezárási hatékonyság magyarázza a rövid időn belül történő rekonstitúciót és a megnövekedett termodinamikai oldhatóságot is.

2. Táblázat. Az SP-MX készítmény érintkezési szögei, számított felületi szabadenergiái és polaritása a kiindulási MX és SP ko-polimerhez képest. Az érintkezési szögek adatai átlagot és szórást jelölnek ($n = 3$).

Minta	$\Theta_{\text{víz}} [^\circ]$	$\Theta_{\text{dijód-metán}} [^\circ]$	$\gamma^d [\text{mN m}^{-1}]$	$\gamma^p [\text{mN m}^{-1}]$	$\gamma [\text{mN m}^{-1}]$	Polaritás (%)
MX	$75,3 \pm 5,2$	$16,2 \pm 3,3$	44,7	9,3	54,0	17,1
SP	$33,4 \pm 0,3$	$16,4 \pm 0,0$	44,02	29,20	73,22	39,6
SP-MX	$11,3 \pm 0,5$	$23,4 \pm 0,1$	42,08	37,13	79,21	47,0

4.2.4. Raman spektroszkópiás vizsgálat

A kiindulási MX, SP, a fizikai keverék az SP-MX formuláció Raman spektrumai a 3. ábrán láthatóak. A benzotiazin aromás gyűrű rezgése 1598 cm^{-1} -nél található az MX spektrumában, amely a CH_2 hajlítási rezgéséből származik, valamint $\text{C}=\text{C}$ és $\text{C}=\text{N}$ csoportok nyújtórezgéséből. Egy éles csúcs is található magas intenzitással 1532 cm^{-1} -nél, ami a molekula tiazol gyűrűjében lévő $\text{C}=\text{N}$ nyújtórezgését jelzi. Néhány további karakterisztikus csoport az alábbi csúcsoknál található: 1305 cm^{-1} (ν_{OH}), 1267 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-N-C}}$) és 1164 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-S}}$). Az SP-MX összetételében eltolódás található: az 1305 cm^{-1} -nél elhelyezkedő sáv a deprotonáció következtében magasabb energiaértékre került 1394 cm^{-1} -nél. A fenolos OH deprotonálódása miatti új csúcs megjelenése megváltoztatta a $\text{C}=\text{C}$ és C-N kötések rezgőmozgását. Ez a 89 cm^{-1} egységgel történő eltolódás a 6-tagú heteroatomhoz kapcsolódó OH csoportot tükrözi, amely részt vesz az SP-vel kialakuló hidrogénkötésben.



3. Ábra. (A) Az MX, SP, a fizikai keverék és az SP-MX készítmény Raman spektrumai és (B) a szerkezeti változást szemléltető metszett spektrumrészletek.

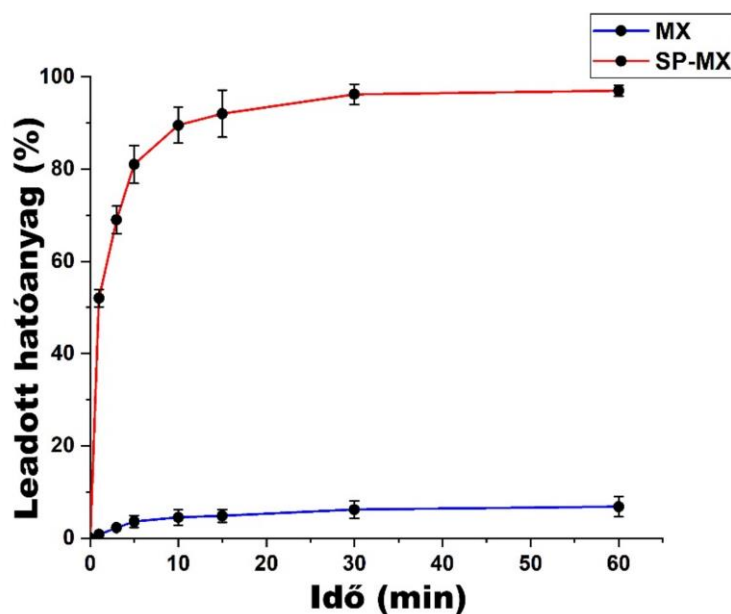
4.3. Hosszú távű fizikai stabilitás vizsgálata

A szilárd halmazállapotú fizikai stabilitás vizsgálatára egy hosszú távű stabilitási vizsgálatot végeztünk 12 hónapon keresztül. Mivel a fő cél egy *ex tempore* rediszpergálható nazális készítmény fejlesztése volt, így minden hónapban a fagyasztva szárított formuláció egy részét tisztított vízben oldottuk, majd DLS méréseket végeztünk. A fő kritikus paraméterek, tehát a D_H és PdI értékek változását vizsgáltuk és az abszolút változás kiszámításához a frissen készítmény mért értékét levontuk a végső, 12. havi mérési pontból. A D_H 3,31 nm-rel, a PdI 0,016-tal nőtt 12 hónapos tárolás után. Az eredmények azt is igazolják, hogy az 5 m/m%-ban alkalmazott D-Tre megfelelő választás volt, mint krioprotektáns segédanyag.

4.4. Nazális alkalmazhatósági vizsgálatok

4.4.1. *In vitro* hatóanyag-leadás vizsgálata

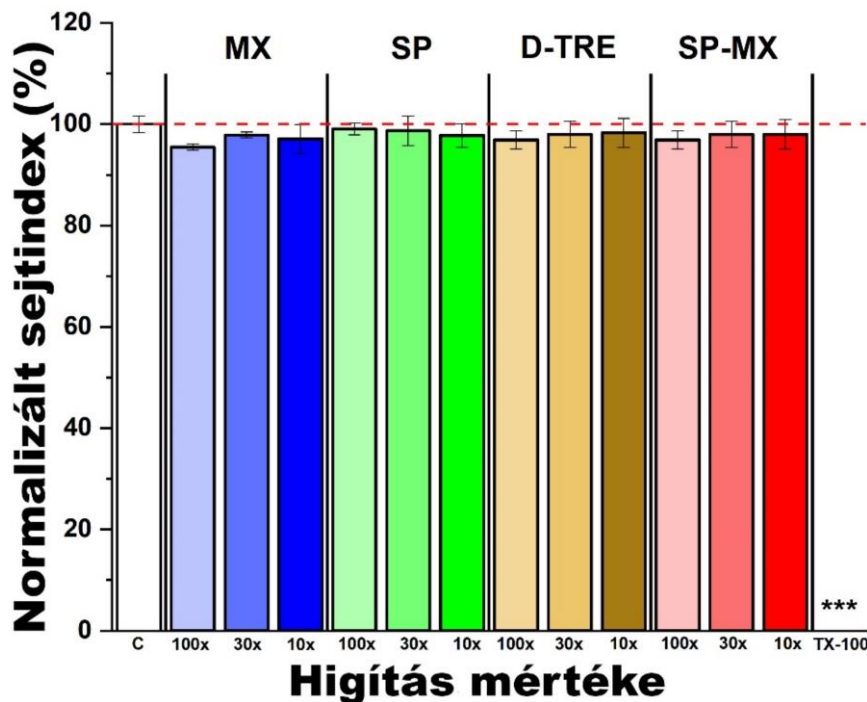
Az *in vitro* hatóanyag-leadás vizsgálatot szimulált nazális körülmények között végeztük. Az SP-MX készítmény nagyobb hatóanyag felszabadulása a megnövekedett szolubilizált koncentrációra vezethető vissza, amely megegyezik az MX termodinamikai oldhatóságával a készítményben a kiindulási MX-hez képest. Az első 15-20 percben a gyors hatóanyag-leadású rendszerekre jellemző *burst* effektus tapasztalható (4. Ábra). Ez kritikus az orrüregen keresztüli adminisztráció esetén, mivel az általános tartózkodási idő hozzávetőlegesen kevesebb, mint 20 perc. Ezért az SP-MX készítmény megfelelt ennek a kritériumnak.



4. Ábra. Az SP-MX formuláció *in vitro* hatóanyag-leadási görbéje a kiindulási MX szuszpenzióhoz viszonyítva, dialízis zsákban (MWCO: 12-14 kDa) mérve. Minden adat átlagot és szórást jelöl ($n = 3$).

4.4.2. *In vitro* sejtleletképeségi és permeabilitási vizsgálat humán RPMI 2650 sejtvonalon

A sejtleletképeségi vizsgálat bebizonyította, hogy az SP-MX készítmény összes komponense és maga az SP-MX nem toxikus a vizsgált humán RPMI 2650 sejtvonalon. Ezt megerősíti az SP kedvező biztonsági profilja, mivel klinikai vizsgálatok bebizonyították, hogy 114 mg/ttkg SP biztonságosnak tekinthető. Az 5. ábra a normalizált sejttindexet mutatja a pozitív kontroll fizioológiás sóoldathoz és a negatív kontroll Triton-X 100 detergenshez viszonyítva. Ez is bizonyítja a polimer micellaképző ko-polimerek felsőbbrendűségét a klasszikus felületaktív anyagokkal szemben, mivel kisebb valószínűséggel okoznak irritációt és toxicitást.

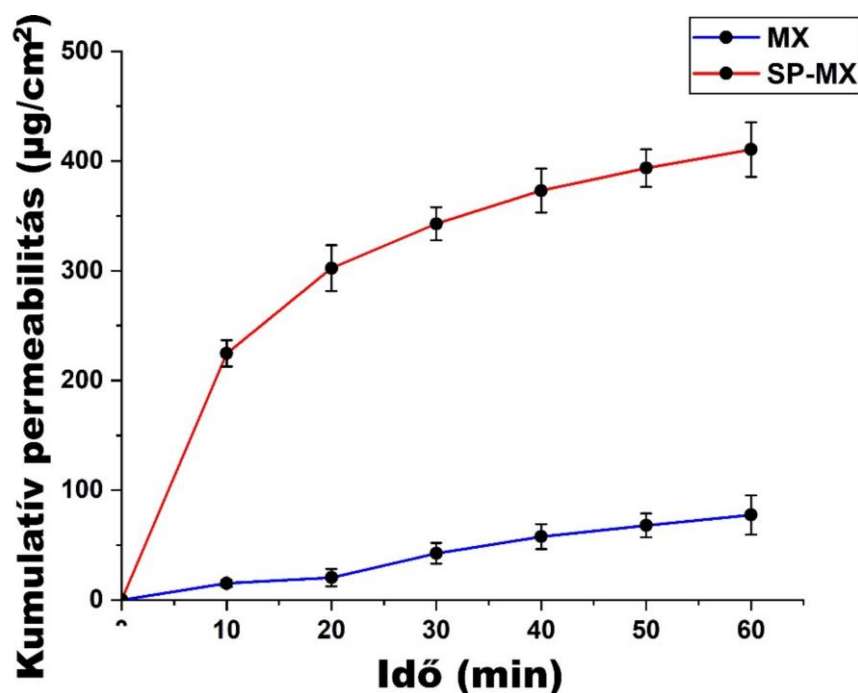


5. Ábra. Az RPMI 2650 nazális epitélium sejtek sejtéletképessége az SP-MX és a komponenseivel történő kezelése után. Az értékeket a kontrollcsoport százalékában és átlagban szórással ($n = 6-12$) adjuk meg. Statisztikai elemzés: ANOVA, majd Dunett-teszt segítségével történt (***) $p < 0.01$.

Az MX permeabilitása a nazális modellen keresztül körülbelül ötszörös növekedést mutatott a kiindulási MX-hez képest az 1 órás kezelés után. Az MX P_{app} értéke $8,265 \times 10^{-6}$ cm/s, míg az SP-MX készítmény esetében $5,1116 \times 10^{-5}$ cm/s volt. Ezt a szignifikánsan magasabb (***) látszólagos permeabilitási együttható értékeket a nano részecskemérettel és a vízdékonyság növekedésével lehet magyarázni, valamint nem elhanyagolható a SP permeabilitást fokozó hatása is.

4.4.3. *Ex vivo* nazális permeabilitás vizsgálata

Ex vivo permeabilitás méréseket végeztünk az SP-MX készítmény passzív diffúziós tendenciájának leírására a kiindulási MX-hez képest. Az alikvot mennyiségek HPLC-vel történő kvantifikálása után kiszámítottuk a kumulatív permeabilitást, és az idő függvényében ábrázoltuk, ahogy az a 6. ábrán látható.

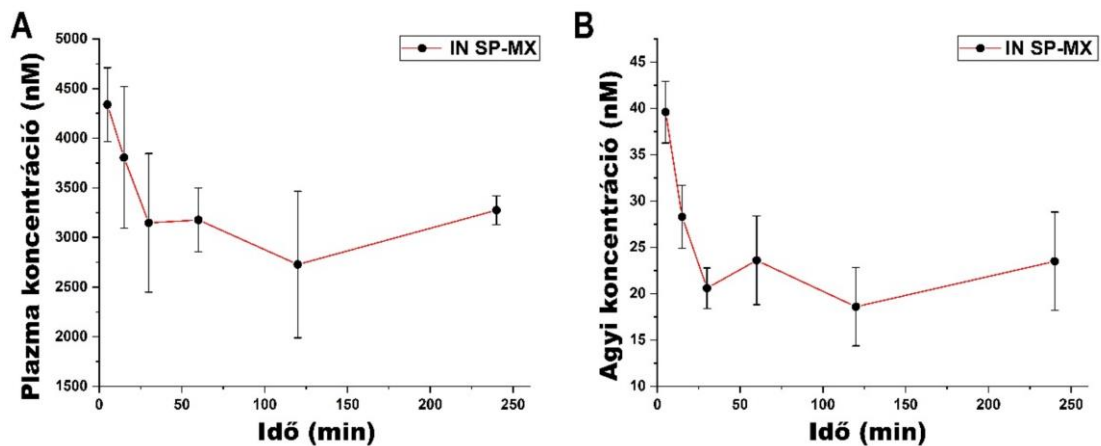


6. Ábra. A humán ornyálkahártyán keresztül végzett *ex vivo* kvantitatív permeabilitás mérés eredménye egy Side-bi-Side[®] típusú horizontális diffúziós cellában. Az SP-MX kumulatív permeabilitása az MX-hez viszonyítva az idő függvényeként került ábrázolásra. Minden adat átlagot és szórást jelöl ($n = 3$).

A magasabb kumulatív permeabilitási értékek a készítmény gyors és nagyfokú hatóanyag-leadásából erednek, szemben az alacsony permeációs tendenciával jellemezhető kiindulási MX esetében. A nano mérettartomány elősegíti a hatóanyagok nyálkahártya-gáton való átjutását, ahogy eredményeink ezt igazolják. A mérés első 15-20 percében *burst* típusú hatóanyag-permeációt tapasztalhatunk, hasonlóan a leadási vizsgálatainkhoz. Ez is bizonyítja, hogy a mérsékelt mukoadhézió nem befolyásolja ezt a kívánt célt. Mivel a *burst* típusú leadás és permeáció is ugyanannyi idő jelentkezik, nem várható az azonnali felszívódást gátló késleltetési idő. A számított permeabilitási együttható 0,493 cm/h és a számított fluxus a végső időpontban 410,54 µg/cm² az SP-MX készítmény esetében. Ezek az értékek szignifikánsan magasabbak a referencia kezdeti MX-hez képest, ahol e paraméterek 0,068 cm/h és 77,491 µg/cm² voltak (**, $p < 0,001$ mindkét esetben).

4.4.4. *In vivo* farmakokinetika vizsgálata

In vivo farmakokinetikai vizsgálatot hajtottunk végre a nazálisan beadott formuláció plazma és agyi kinetikájának leírására. A plazma és agyi koncentrációkat LC-MS/MS módszerrel határoztuk meg. A kapott koncentráció – idő görbék a 7. ábrán találhatóak.



7. Ábra. Sprague Dawley patkányokon végzett *in vivo* mérések eredményei az SP-MX készítmény intranazális beadása után. (A) A plazmakoncentráció szintjei és (B) az MX agyi koncentrációsintjei. Az adatok átlagot és szórást jelölnek ($n = 4$).

Referenciaadatként kutatócsoportunk korábbi intranazális (IN) és intravénás (IV) használtuk fel az eredményeink diszkussziója során. A plazmaszintek nem érték el az IV beadott referencia szintjét, ami egyértelműsíti a beadás helye közötti különbségeket. Az agyi koncentráció azonban meghaladja a korábbi eredményeinket. Korábban fizikai módszerekkel történő részecskeméret csökkentési technikákat alkalmaztak meloxicám esetében, ahol a porlasztva szárított termékek agyi koncentrációját vizsgálták IN és IV beadást követően. Esetükben az elért MX koncentráció kevesebb volt, mint 1 nM mind IN, mind pedig IV beadást követően. A magasabb AUC értékek szintűgy indikálják, hogy magasabb koncentrációt értünk el az agyban az SP-MX formuláció esetében. A porlasztva szárított korábbi formuláció kb. $35 \text{ nM} \times \text{min}$ értéket vett fel, míg a mi esetünkben ez kb. $50000 \text{ nM} \times \text{min}$ volt. A nanohordozók felsőbbrendűsége a klasszikus, csak fizikai méretcsökkentési technikákkal szemben tehát bebizonyosodott. Amint azt korábban említettünk, az *in vitro* és *ex vivo* vizsgálataink során, az IN beadást követően *burst* típusú leadást és permeációt tapasztalhatunk. Ez itt is megjelenik az agyi koncentrációk tekintetében, hiszen az első maximum 5 percnél jelentkezik. Ezt követi egy második maximum 60 percnél, ami jelezheti a vérkeringésből a vér-agy gáton keresztüli transzportot, hiszen késleltetési időt is tapasztaltunk. A hatás gyors kezdete jelzi azonban a direkt útvonal jelenlétét is. A végső időpontban enyhe növekedés figyelhető meg, ami azt jelenti, hogy elhúzódó hatást is várhatunk. Az alátámasztó farmakokinetikai paraméterek a 3. Táblázatban találhatóak.

3. Táblázat. Az IN beadott SP-MX készítmény számított farmakokinetikai paraméterei. Minden adat átlagot és szórást jelöl ($n = 4$). Rövidítések: K_e – eliminációs sebességi állandó; $t_{1/2}$ – felezési idő; AUC_{0-t} – görbe alatti terület értéke 0 és a mérés időtartama (t) között; $AUC_{0-\infty}$ - görbe alatti terület 0 és végtelen időpont között; Cl – Clearance; MRT – átlagos tartózkodási idő.

Farmakokinetikai paraméter	Plazma	Agy
K_e (min^{-1})	$0,00091 \pm 2,2 \cdot 10^{-4}$	$0,00132 \pm 3,6 \cdot 10^{-5}$
$t_{1/2}$ (h)	$804,143 \pm 22,362$	$525,174 \pm 14,378$
AUC_{0-t} ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)	$811,228 \pm 12,281$	$5,263 \pm 0,051$
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)	$5115,035 \pm 124,78$	$22,991 \pm 0,674$
Cl ($\mu\text{g/kg}/(\text{nmol/ml})/\text{min}$)	$7,6 \cdot 10^{-5} \pm 1,6 \cdot 10^{-5}$	$0,0163 \pm 4,8 \cdot 10^{-4}$
MRT (min)	$1197,25 \pm 315,44$	$796,337 \pm 23,17$

A számítások alapján az agy AUC értékei szignifikánsan magasabbak, mint a korábban említett porlasztva szárított készítményeknél, ahol csak fizikai szemcseméret csökkentési módszereket alkalmaztak. A készítmény Clearance és MRT értékei lassú eliminációt jeleznek. Ez magyarázható azzal, hogy a polimer micella külső héja polietilén-glikolból tevődik össze, amely jelentősen növelheti a tartózkodási idő és a keringési stabilitást. Amint azt korábban említettük, a negatív zéta potenciál elősegíti az ornyálkahártyán keresztüli hordozóval együtt történő felszívódás lehetőségét. Ez a gyors felszívódás pedig előkapuja annak, hogy direkt úton is, axonális transzporttal bejusson a hatóanyag a központi idegrendszerbe. Ezt alátámasztották az *in vitro* sejtvonalas és *ex vivo* nazális gyógyszerforma vizsgálataink is.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Mivel a forgalomban lévő hatóanyagok rossz fizikai-kémiai tulajdonságai korlátozzák a neurodegeneratív betegségek hatékony kezelését, a polimer micellák, mint intelligens hordozórendszerek képesek megbirkózni ezekkel a kihívásokkal, valamint javítani tudják a betegadherenciát az intranazális adminisztráció révén. Kutatási céljainkkal összhangban létrehoztunk egy értéknövelt formulációt és egy megoldási lehetőséget QbD módszertan alapján, amely a központi idegrendszerbe képes hatóanyagot effektív módon bejuttatni. A fő következtetések a következő pontokban foglalhatóak össze:

- I. Sikeresen meghatároztuk a termék minőségét, biztonságosságát és hatékonyságát befolyásoló kritikus tényezőket. Ennek bizonyítására egy kétlépcsős kockázatbecslést hajtottunk végre, amely interdependencia és probabilitás alapján történt.
- II. A faktoriális kísérlettervezés eredményei alapján a tervezési teret értékeltük és a polimer micellák megfelelően alacsony, 111,6 nm-es micellamérettel és – 25,2 mV zéta potenciál értékkel stabil, monodiszperz karakterisztikával jellemezhetőek. Az SP-MX készítmény megfelelt az *ex tempore* diszpergálható, fagyasztva szárított porok kritériumainak. A pH érték illeszkedik az orr pH tartományához. A készítmény viszkozitása alapján alkalmas orrspray szórófejen keresztül történő alkalmazásra is, és hipotóniás jellege lehetővé teszi a hatóanyag gyors felszívódását.
- III. Magas bezárási hatékonyságot értünk el, kb. 90%-ot, ami hozzájárult a nagymértékű vízdoldékonyság növekedéséhez a kiindulási MX-hez képest. A készítmény fizikai stabilitása kielégítő, mivel az MX és a micellaképző ko-polimer, az SP között hidrogénkötéseket véltünk felfedezni.
- IV. *In vitro* hatóanyag-leadási vizsgálat bebizonyította, hogy az SP-MX készítménnyel gyors felszabadulás érhető el. Az *in vitro* sejtleletképeségi vizsgálatok alapján biztonságosan alkalmazható a készítmény és fokozott permeációt mutat, csakúgy, mint *ex vivo* nazális permeációs vizsgálataink során.
- V. *In vivo* körülmények között vizsgálva bebizonyosodott, hogy a fő célt sikerült elérni és egy olyan hordozót fejlesztettünk, amely képes effektív koncentrációban hatóanyag juttatni a központi idegrendszerbe. Kutatócsoportunk korábbi munkáira hivatkozva fény derült továbbá a nanokapszulázási módszerek fölényére a klasszikus fizikai módszerekkel végzett részecskeméret-csökkentéssel szemben.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Sipos, B.**, Szabó – Révész, P., Csóka, I., Pallagi, E., Dobó, D. G., Bélteky, P., Kónya, Z., Deák, Á., Janovák, L., Katona, G. (2020). Quality by Design based formulation study of meloxicam-loaded polymeric micelles for intranasal administration. *Pharmaceutics*, 12(8), 697. **(Q1, IF: 6.321, Idézettség: 30)**
- II. **Sipos, B.**, Katona, G., Csóka, I. (2021). A systematic, knowledge space-based proposal on quality by design-driven polymeric micelle development. *Pharmaceutics*, 13(5), 702. **(Q1, IF: 6.525, Idézettség: 8)**
- III. **Sipos, B.**, Katona, G. (2022). Innovatív polimer alapú nanohordozók a központi idegrendszer betegségeinek kezelésére. *Gyógyszerészet*, 66, 182 – 188.
- IV. **Sipos, B.**, Bella, Z., Gróf, I., Veszélka, S., Deli, A.M., Szűcs, F.K., Sztojkov – Ivanov, A., Ducza, E., Gáspár, R., Kecskeméti, G., Janáky, T., Volk, B., Budai – Szűcs, M., Ambrus, R., Szabó-Révész, P., Csóka, I., Katona, G. (2023). Soluplus® promotes efficient transport of meloxicam to the central nervous system via nasal administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 632, 122594 **(D1, IF: 6.510, Idézettség: -)**

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- I. Katona, G., **Sipos, B.**, Budai – Szűcs, M., Balogh, G.T., Veszélka, S., Gróf, I., Deli, M.A., Volk, B., Szabó – Révész, P., Csóka, I. (2021). Development of in situ gelling meloxicam – human serum albumin nanoparticle formulation for nose – to – brain application. *Pharmaceutics*, 13(5), 646. **(Q1, IF: 6.525, Idézettség: 10)**
- II. Sabir, F., Katona, G., Ismail R., **Sipos, B.**, Ambrus, R., Csóka, I. (2021). Development and characterization of N-propyl gallate encapsulated solid lipid nanoparticles – loaded hydrogel for intranasal delivery. *Pharmaceutics*, 14(7), 696. **(Q1, IF: 5.215, Idézettség: 7)**
- III. **Sipos, B.**, Csóka, I., Budai – Szűcs, M., Kozma, G., Berkesi, D., Kónya, Z., Balogh, G.T., Katona, G. (2021). Development of dexamethasone – loaded mixed polymeric micelles for nasal delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 166, 105960. **(Q1, IF: 5.112, Idézettség: 7)**
- IV. Katona, G., **Sipos, B.**, Ambrus, R., Csóka, I., Szabó – Révész, P. (2022). Characterizing the drug – release enhancement effect of surfactants on megestrol-acetate – loaded granules. *Pharmaceutics*, 15(2), 113. **(Q1, IF: 5.215, Idézettség: 2)**

- V. Dobó, D.G., Németh, Z., **Sipos, B.**, Cseh, M., Pallagi, E., Berkesi, D., Kozma, G., Kónya, Z., Csóka, I. (2022). Pharmaceutical development and design of thermosensitive liposomes based on the QbD approach. *Molecules*, 27(5), 1536. **(Q1, IF: 4.927, Idézettség: 1)**
- VI. Katona, G., Sabir, F., **Sipos, B.**, Naveed, M., Schelz, Z., Zupkó, I., Csóka, I. (2022). Development of lomustine and n-propyl gallate co-encapsulated liposomes for targeting glioblastoma multiforme via intranasal administration. *Pharmaceutics*, 14(3), 631. **(Q1, IF: 6.525, Idézettség: 3)**
- VII. **Sipos, B.**, Csóka, I., Ambrus, R., Schelz, Z., Zupkó, I., Balogh, G.T., Katona, G. (2022). Spray-dried indomethacin – loaded polymeric micelles for the improvement of intestinal drug release and permeability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 174, 106200. **(Q1, IF: 5.112, Idézettség: 3)**
- VIII. **Sipos, B.**, Csóka, I., Szivacski, N., Budai – Szűcs, M., Schelz, Z., Zupkó, I., Szabó – Révész, P., Volk, B., Katona, G. (2022). Mucoadhesive meloxicam – loaded nanoemulsions: development, characterization and nasal applicability studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106229. **(Q1, IF: 5.112, Idézettség: 4)**
- IX. Németh, Z., Csóka, I., Semnani Jazani, R., **Sipos, B.**, Haspel, H., Kozma, G., Kónya, Z., Dobó, D.G. (2022). Quality by Design – driven zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives. *Pharmaceutics*, 14(9), 1798. **(Q1, IF: 6.525, Idézettség: 1)**
- X. Katona, G., **Sipos, B.**, Csóka, I. (2022). Risk assessment – based optimization favours the development of albumin nanoparticles with proper characteristics prior to drug loading. *Pharmaceutics*, 14(10), 2036. **(Q1, IF: 6.525, Idézettség: 1)**
- XI. **Sipos, B.**, Budai – Szűcs, M., Kókai, D., Orosz, L., Burián, K., Csorba, A., Nagy, Z.Z., Balogh, G.T., Csóka, I., Katona, G. (2022). Erythromycin – loaded polymeric micelles: in situ gel development, in vitro and ex vivo ocular investigations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 180, 81 – 90. **(Q1, IF:5.589, Idézettség: 2)**
- XII. Mardikasari, S.A., **Sipos, B.**, Csóka, I., Katona, G. (2022). Nasal route for antibiotics delivery: advances, challenges and future opportunities applying the quality by design concepts. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 103887. **(Q1, IF: 5.062, Idézettség: -)**
- XIII. **Sipos, B.**, Katona, G. (2022). Lipid- és fehérjealapú nanomedicinális készítmények a daganatterápiában *Gyógyszerészet*, 66, 633-637

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

A) Szóbeli előadások

- I. **Sipos, B.**, Katona, G. (2019). NSAID tartalmú polimer micellák formulációja és vizsgálata, *XXII. Tavaszi Szél Konferencia*
- II. **Sipos B.**, Ambrus, R., Csóka, I., Szabó-Révész, P., Katona, G. (2019). Meloxicám tartalmú polimer micellák formulációja és vizsgálata, *XLII. Kémiai Előadói Napok*
- III. **Sipos, B.**, Csóka, I., Katona, G. (2020). Formulation and investigation of amphiphilic graft co-polymer based polymeric micelles, *Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences*
- IV. **Sipos, B.**, Katona, G., Csóka, I. (2021). Nose-to-brain applicability of Meloxicam-loaded Soluplus polymeric micelles, *III. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science*
- V. **Sipos, B.**, Katona, G., Csóka, I. (2022). Reflection on the regulatory status quo of polymeric micelles as innovative nanocarriers, *Figon & EUFEPS European Medicines Day*

B) Poszter prezentációk

- I. **Sipos, B.**, Szabó-Révész, P., Katona, G. (2018). Formulation and investigation of amphiphilic graft co-polymer based polymeric micelles, *12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs*
- II. Katona, G., **Sipos, B.**, Ambrus, R., Csóka, I., Szabó-Révész, P. (2019). Formulation and characterization of Soluplus[®] based polymeric micelles, *3rd European Conference on Pharmaceutics*
- III. **Sipos, B.**, Ambrus, R., Pallagi, E., Szabó-Révész, P., Csóka, I., Katona, G. (2020). Quality by Design: a novel regulatory approach used in the development of nasal polymeric micelles, *Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences 2020*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Csóka Ildikó** tanszékvezetőnek, hogy minőségi körülményeket teremt meg a kutatómunka elvégzése érdekében az SZTE GYTK Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézetben. Külön köszönöm, hogy segített megtanulni kritikusan gondolkozni – kérdést feltenni és innovatív megoldásokat találni a mindennapokban. Szeretném megköszönni **Szabóné Prof. Dr. Révész Piroskának**, hogy szakmai útmutatásával segítette a jelen tézis témáját alkotó kutatómunka elvégzését.

A legnagyobb köszönet a témavezetőmet, **Dr. Katona Gábort** illeti, aki éveken keresztül szüntelen munkával segítette a kutatómunkám célba érését. Külön örömmel tölt el, hogy igaz barátomnak szólíthatom és bebizonyosodott, hogy az őszinte közös munkával nagy sikereket lehet elérni. Köszönöm, hogy mindig mellettem álltál mind a nehéz, mind pedig a jobb időkben egyaránt.

Szeretném megköszönni **Dr. Ambrus Ritának**, hogy szakmailag és logisztikailag segített megteremteni azt a környezetet, ahol a mindennapos munkát tudom végezni. Az egyik legnagyobb segítséget **Feczóné Boda Erika** adta, akivel az első perctől kezdve együtt dolgoztunk a laboratóriumban és minden pillanatra jó szívvel emlékezek vissza, valamint a legvidámabb pillanatok hozzá kapcsolódnak. Köszönet illeti **Balázs Ágnes**t, aki mindennapos tevékenysége során végzi azon adminisztrációs és logisztikai tevékenységet, amely nélkül nem lennének működőképesek a kutatómunka elvégzése során.

Köszönet illeti minden munkatársamat és kooperációs partnerem, akik nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Külön köszönet illeti **Dr. Budai-Szűcs Máriát**, aki a legtöbbet segített nekem szakmailag az Intézetben belül. Külön köszönöm **Dr. Dobó Dorina Gabriellának** és **Kovács Klárának**, hogy mérések elvégzésében segédkeztek nekem az évek során.

Hálás vagyok barátaimnak, külön kiemelve **Dr. Csepregi Szabinát**, **Dr. Falusi Fannit** és **Dr. Party Petrát**. A legemlékezetesebb pillanataim hozzájuk kapcsolódnak és megmutatták, hogy milyen az igazi, önzetlen barátság. A leghálásabb **családomnak és bátyámnak** vagyok, akik számos dolgot feláldoztak a saját életükből azért, hogy elvégezhessem a tanulmányaimat, amit sosem fogok tudni nekik megköszönni.