



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

A Ph.D. értekezés tézisei

**MELOXIKÁM-KÁLIUM-MONOHIDRÁTOT TARTALMAZÓ, CIKLODEXTRIN-ALAPÚ
NAZÁLIS POROK FORMULÁLÁSA PORLASZTVA SZÁRÍTÁSSAL**

dr. Varga Patricia Orsolya

gyógyszerész

Témavezetők:

Dr. Balla-Bartos Csilla Ph.D.

és

Prof. Dr. Ambrus Rita D.Sc.

SZEGED

2025

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Vezető: Prof. Dr. Hohmann Judit D.Sc., akadémikus
Gyógyszertechnológia Program
Programvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó Ph.D., tanszékvezető egyetemi tanár
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Témavezetők: Dr. Balla-Bartos Csilla Ph.D. és Prof. Dr. Ambrus Rita D.Sc.

dr. Varga Patricia Orsolya

**MELOXIKÁM-KÁLIUM-MONOHIDRÁTOT TARTALMAZÓ, CIKLODEXTRIN-ALAPÚ
NAZÁLIS POROK FORMULÁLÁSA PORLASZTVA SZÁRÍTÁSSAL**

Komplexvizsga-bizottság:

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

Bíráló Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Szakonyi Zsolt, D.Sc., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerkémiai
Intézet
Opponensek: Dr. Váradi Judit, Ph.D., Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar,
Gyógyszertechnológiai Tanszék
Dr. Szőcs Levente, Ph.D., EUROAPI, Budapest
Titkár: Dr. Szakonyi Gerda, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszeranalitikai
Intézet
Tag: Dr. Sztojkov-Ivanov Anita, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet,

SZEGED

2025

1. BEVEZETÉS

Az orr ígéretes, nem-invazív hatóanyag-beviteli kapunak tekinthető, mivel gazdag érhalózzal rendelkezik, gyors hatáskezdet biztosít és lehetővé teszi a *first-pass* metabolizmus elkerülését. Ez elősegítheti a gyógyszerek közvetlen bejutását a szisztémás keringésbe, növelve ezzel a terápiás hatékonyságot. A hatóanyagok orron keresztüli bejuttatása azonban olyan kihívásokkal jár, mint a gyógyszerek elégtelen permeációja az orrnyálkahártyán keresztül, valamint a készítmények gyors kiürülése az orrüregből a mukociliáris clearance következtében. Ezen akadályok leküzdése innovatív stratégiákat igényel.

A ciklodextrinek különös jelentőséggel bírnak a gyógyszeriparban, mivel képesek különféle hatóanyagokkal komplexeket képezni, ezzel javítva az oldhatóságukat és a stabilitásukat, ami fokozott felszívódást eredményezhet. Emellett kölcsönhatásba léphetnek biológiai membránokkal, befolyásolva a sejtmembrán fluiditását és az epitelsejtek közötti *tight junction*-öket, ezáltal elősegítve a gyógyszer-molekulák a nyálkahártyán keresztüli permeációját.

Habár a ciklodextrinek fokozzák a felszívódást, a készítmények gyors kiürülése az orrüregből továbbra is jelentős kihívás. A probléma kezelésére vízdoldható polimerek bevonásának hatását vizsgáltuk. A polimerek növelhetik a készítmény lokális viszkozitását, mukoadhéziót biztosíthatnak, ezáltal meghosszabbítva az orrüregben való tartózkodási időt.

A porlasztva szárítással előállított szilárd nazális készítmények a folyékonyakhoz képest jobb tapadást mutatnak. Emellett a formulálás során nincs szükség tartósítószerre, a porlasztva szárítással elért finom részecskeméret pedig biztosítja a gyógyszer optimális depozícióját és felszívódását az orrüregben. A nem-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID-k) szisztémás bejuttatása az orron keresztül kevésbé kutatott terület a potenciális előnyök ellenére (gyors fájdalomcsillapító hatás, kiegészítés az opioid terápiaiban).

Az irodalomban még legjobb tudomásunk alapján nem található tanulmány olyan orrporokról, amelyekben ciklodextrinek és vízdoldható polimereket kombinálnak NSAID-k szisztémás keringésbe juttatásának javítása érdekében. Jelen Ph.D. munka célja a különböző ciklodextrinek és vízdoldékony polimerek kombinációinak alkalmazhatóságát vizsgálni, potenciálisan hozzájárulva a szilárd nazális gyógyszerformák fejlesztéséhez.

Rövidítések: ALI – levegő-folyadék határfelület; BCD – β -ciklodextrin; CD – ciklodextrin; CNS – központi idegrendszer; COX – ciklooxygenáz; DSC – pásztázó kalorimetria; FT-IR – Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia; HA – nátrium hialuronát; HPBCD – hidroxipropil- β -cyclodextrin; HPLC – nagyteljesítményű folyadékkromatográfia; HPMC – hidroxipropil-metilcellulóz; ICH – International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; LDH – laktát-dehidrogenáz; MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfopenil)-2H-tetrazólium; MXP – meloxikám kálium; NSAID – nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatóanyag; PBS – foszfátpuffer; PM – fizikai keverék; PVA – polivinil-alkohol; QABCD – kvaterner ammónium β -ciklodextrin; SBECd – szulfobutiléter- β -cyclodextrin nátrium sója; SEM – pásztázó elektronmikroszkópia; SNES – szimulált nazális elektrolitoldat; XRPD – Porrtöntgen diffraktometria

2. CÉLKITŰZÉSEK

Ph.D. munkám célja egy NSAID, meloxicám-kálium (MXP) monohidrát, valamint különböző segédanyagok felhasználásával szilárd nazális gyógyszerformák előállítása volt. A kutatás során a következő lépések végrehajtását terveztük:

I. A szakirodalom átfogó áttekintését terveztük a szilárd nazális gyógyszerformák főbb jellemzőinek, előállítási technikáinak és az alkalmazandó segédanyagokkal szembeni követelményeknek a meghatározása érdekében.

II. Az irodalmi áttekintést követően előállítása módszerként a nano-porlasztva szárítást választottuk, annak érdekében, hogy $<5\ \mu\text{m}$ átmérőjű részecskéket hozzunk létre. Az előállított minták esetén alapvető fizikai-kémiai karakterizálást terveztük elvégezni. A vizsgálatok középpontjában a részecskeméret és morfológia, kristályosság, termikus viselkedés, valamint a potenciálisan kialakuló másodlagos kölcsönhatások elemzése állt, annak érdekében, hogy feltárjuk az alkalmazott előállítási eljárás hatását a porok tulajdonságaira.

III. A minták *in vitro* tulajdonságainak – így a mukoadhézió, a hatóanyag kioldódás és permeáció – vizsgálatát terveztük annak érdekében, hogy megfigyeljük az alkalmazott segédanyagok hatását, és hogy kijelölhessünk termékeket további stabilitási és sejtkultúra-vizsgálatokhoz.

IV. Célunk volt továbbá, hogy a kiválasztott készítményeket gyorsított stabilitásvizsgálatnak vessük alá az *International Council for Harmonization* (ICH) Q1A irányelveinek megfelelően. A stabilitásvizsgálatok eredményei az *in vitro* mérésekkel együtt szolgáltak a további, nazálisan releváns sejtkultúra-vizsgálatokhoz szükséges mintaválasztás alapjául.

V. Emellett célunk az alkalmazott ciklodextrinek és MXP nem toxikus koncentrációinak meghatározása volt. Továbbá a kiválasztott készítmények nem toxikus koncentrációit is értékelni kívántuk, hogy a permeációs vizsgálatokat biztonságosan el lehessen végezni.

VI. RPMI 2650 sejtek alkalmazásával vizsgálni kívántuk az MXP permeációját a sima hatóanyag esetén és a kiválasztott készítményekből, hogy megfigyeljük, a ciklodextrinek rendelkeznek-e permeáció fokozó hatással.

VII. Végül az alkalmazott segédanyagok – különböző ciklodextrinek és vízdoldható polimerek – hatását kívántuk értékelni a minták tulajdonságaira és nazális alkalmazhatóságukra.

Végső soron a doktori munka elsődleges célja az volt, hogy hozzájáruljon a jövőbeli orrporok fejlesztéséhez, új ismereteket nyújtva az MXP-t, ciklodextrinek és vízdoldható polimereket tartalmazó készítmények tulajdonságairól és viselkedéséről.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

3.1.1. Hatóanyagok

Hatóanyagként meloxicám-kálium (MXP) monohidrátot (Egis Zrt., Budapest, Magyarország) alkalmaztunk. A 4-féle ciklodextrin (CD), β -ciklodextrin (BCD), (2-hidroxi)-propil- β -ciklodextrin (HPBCD), szulfobutil- β -ciklodextrin nátriumsó (SBECD, DS~6) és (2-hidroxi-3-N,N,N-trimetilamino)propil- β -ciklodextrin-klorid (QABCD, DS~2.7) a Cyclolab Zrt.-től (Budapest, Magyarország) került beszerzésre. 2-féle polimer, hialuronsav (nátrium sója) (HA) (Contipro Biotech (Dolní Dobrouč, Csehország) és poli(vinilalkohol) (PVA) (Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis MO, US) kerültek felhasználásra.

3.2. Módszerek

3.2.1. A porlasztva szárított minták előállítása

A termékek előállításához BÜCHI Nano Spray Dryer B-90 HP (BÜCHI Labortechnik AG, Svájc) használtunk. A porlasztva szárításhoz használt oldatok előállítása MXP és CD (BCD/HPBCD/SBECD/QABCD) 1:1 mol/mol arányának 10 ml desztillált vízben való feloldásával történt a polimermentes mintákhoz. A polimer-tartalmú oldatok még a fent említett vegyületeken kívül 1 mg/ml PVA-t vagy 0,5 mg/ml HA-t tartalmaztak. A porlasztva szárítás a következő paraméterekkel történt: bemenő levegő hőmérséklete: 80 °C; sűrített levegő áramlása: 130 l h⁻¹, pumpa sebesség: 20%; aspirátor: 100%.

Referenciaként fizikai keverékeket (PM) készítettünk, ugyanazokat az arányokat fenntartva, mint amelyeket a porlasztva szárított oldatokban használtunk. A komponenseket Turbula keverővel (Turbula WAB, Systems Schatz, Muttensz, Svájc) 50 fordulat/perc sebességgel 10 percig kevertük.

3.2.2. Fizikai-kémiai karakterizálás

3.2.2.1. Lézer diffrakciós vizsgálat

A porlasztott minták részecskeméret eloszlását Malvern lézer diffraktométerrel vizsgáltuk (Malvern Mastersizer Scirocco 2000; Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Egyesült Királyság). Az analízis során diszperziós közegként levegőt használtunk, amelynek nyomását 2 barra állítottuk be. Körülbelül 1 g-ját vizsgáltuk a mintáknak, minden minta mérésére háromszor került sor. A részecskeméretet a D(0,5) értékkel jellemeztük, amely azt az átmérőt jelzi, amely alatt a részecskék térfogatának 50%-a található.

3.2.2.2. Pásztázó elektronmikroszkópiás mérés (SEM)

A szemcsék felszíni karakterisztikájának, alakjának és méretének vizsgálatát SEM-mel (Hitachi S-4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán) végeztük. A vizsgálni kívánt porokat arany-

palládium bevonattal láttuk el, és 10 kV elektromos feszültség és 10 μ A áramerősség mellett argonatmoszférában vizsgáltuk őket.

3.2.2.3. Porróntgen diffraktometriás vizsgálat (XRPD)

A PM-ek és a porlasztva szárított termékek kristályosságát Bruker D8 Advance diffraktométerrel (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország) vizsgáltuk Cu K α sugárzással ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) 40 kV-on és 40 mA-en. Az adatok gyűjtése 3-40° 2 θ szög tartományon belül 0,1 másodpercenként 0,007° lépésközzel történt egy VANTEC-1 detektorral. DIFFRAC.EVA szoftverrel végeztük a manipulációkat: K α 2-vel történő korrigálás, alapvonal korrekció, diffraktogram alatti terület simítása.

3.2.2.4. Differenciális pásztázó kalorimetriás mérés (DSC)

A termoanalízis végrehajtásához Mettler Toledo DSC 821^e (Németország) berendezést használtunk. Körülbelül 2–5 mg mintát perforált alumínium mintatartóba mérve 25 °C-ról 300 °C-ra melegítettünk 10 °C·min⁻¹ felfűtési sebesség alkalmazásával állandó, 150 ml·min⁻¹ sebességű argonáram mellett. A DSC-görbékét STAR^e programmal (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) értékeltük ki.

3.2.2.5. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiás mérés (FT-IR)

Az FT-IR méréseket az MXP és a segédanyagok között esetlegesen kialakult kölcsönhatások vizsgálatára alkalmaztuk. A spektrumokat egy AVATAR330 spektrométerrel (Thermo Nicolet, Unicam Magyarország Kft., Budapest, Magyarország) rögzítettük 400-4000 cm⁻¹ intervallumon, 2 cm⁻¹ optikai felbontás mellett. A mintákból őrlés után 0,15 g KBr használatával 10 t préserőt alkalmazva pasztillákat préseltük, ezen pasztillákon áthaladó infravörös sugárzás abszorbanciáját mértük. A detektált spektrumok kiértékeléséhez és ábrázolásához a SpectraGryph szoftvert használtuk.

3.2.3. In vitro mérések

3.2.3.1. Texture analyser mérés

A készítmények tapadását TA-XT Plus Texture Analyser (Metron Ltd., Budapest) műszerrel vizsgáltuk, 1 cm átmérőjű hengeres szonda és 5 kg-os mérőcella alkalmazásával. A mérések előtt a mintákból (95 $\pm$ 5 mg) pasztillákat állítottunk elő Specac hidraulikus préssel (Specac Inc., Orpington, Egyesült Királyság), 10 kN nyomóerőt alkalmazva 10 másodpercig, 13 mm présátmérő mellett. A kapott pasztillákat a hengeres szondához rögzítettük, majd 2500 mN előterheléssel 3 percig hoztuk őket érintkezésbe a mesterséges nyálkahártya-réteggel. Ezt követően a szondát 2,5 mm·min⁻¹ sebességgel emeltük fel a minták nyálkahártyáról való leválasztása céljából, miközben rögzítettük az erő-út görbét, amely alapján meghatároztuk a maximális leválási erőt és a tapadási munkát. Utóbbi az erő-út diagram görbe alatti területe alapján került kiszámításra. A mesterséges nyálkahártyát szűrőpapír segítségével alakítottuk ki,

amelyet 40 µl 8% (m/m) koncentrációjú, szimulált nazális elektrolit oldattal (SNES) készült mucin-diszperzióval nedvesítettünk. Kontrollméréseket mucint nem tartalmazó SNES-sel nedvesített szűrőpapírokon végeztünk. A statisztikai kiértékeléshez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk, Tukey-féle *post hoc* teszttel Minitab szoftver segítségével. A $p \leq 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

3.2.3.2. Hatóanyag kioldódási vizsgálat nazális körülményeket modellezve

A mintákból felszabaduló hatóanyag mennyiségét 5 percen keresztül, 364 nm hullámhosszon, *in-line* módon monitoroztuk, 0,75 mg MXP-t tartalmazó porok 50 ml SNES-hez adásával. A rendszert $32 \pm 0,5$ °C-on temperáltuk folyamatos, 100 rpm keverési sebesség mellett. Az eredményeket egy AvaLight DH-S-BAL spektrofotométerrel (Avantes, Apeldoorn, Hollandia) rögzítettük, amely egy optikai szálon keresztül egy AvaSpec-2048L transzmissziós immerziós szondához (Avantes) volt csatlakoztatva.

3.2.3.3. Permeációs vizsgálat mesterséges nyálkahártyán keresztül

Az MXP *in vitro* diffúziójának tesztelésére, illetve az ígéretes minták kiválasztására további sejtvonalon végzett vizsgálatokhoz egy módosított horizontális diffúziós cellát alkalmaztunk nazális körülményeket szimulálva. A készülék két kamrából állt – egy donor és egy akceptor fázisból –, amelyeket egy mesterséges membrán választott el egymástól. A donor fázis 9 ml SNES-t tartalmazott, amely a nazális folyadékot modellezte, míg az akceptor fázis 9 ml foszfátpufferoldatot (pH 7,4) tartalmazott a vér pH-jának szimulálására. Mindkét fázist 32 °C-on temperáltuk (Thermo Haake C10-P5, Sigma Aldrich Co.), és 300 rpm sebességgel kevertettük mágneses keverővel a légáramlás és a csillók szimulálására. A lipofil nyálkahártya modellezésére a vizsgálat előtt egy 0,45 µm pórusátmérőjű WhatmanTM regenerált cellulóz membránt áztattunk 30 percig izopropil-mirisztátban. A mérés kezdetén 7,5 mg MXP-t tartalmazó mintát adtunk a donor fázishoz. Az akceptor fázisból előre meghatározott időközönként mintát vettünk, és meghatároztuk a diffundált MXP kumulatív mennyiségét. Statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk Fisher-féle *post hoc* teszttel Minitab statisztikai szoftver segítségével. A $p \leq 0,05$ szintet tekintettük szignifikánsnak.

3.2.4. Gyorsított stabilitásvizsgálat

A kiválasztott minták stabilitását gyorsított stabilitási vizsgálati körülmények között értékeltük az ICH Q1A (R2) irányelvnek megfelelően. A porokat hidroxipropil-metil-cellulóz (HPMC) kapszulákba töltöttük, majd Binder KBF 240 (Binder GmbH, Tuttlingen, Németország) klímakamrába helyeztük másodlagos csomagolás nélkül 40 ± 2 °C hőmérsékleten és $75 \pm 5\%$ relatív páratartalom mellett. Egy hónap elteltével a készítményeket ismét elemeztük morfológiájuk, kristályosságuk és hatóanyag-tartalmuk szempontjából. A stabilitásvizsgálat eredményei hozzájárultak a további sejtes vizsgálatokhoz történő mintakiválasztáshoz.

3.2.5. Sejtes vizsgálatok

3.2.5.1. Toxicitás vizsgálat RPMI 2650 sejteken

Az RPMI 2650 sejtek életképességének értékelésére a CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay-t (Promega GmbH, Mannheim, Németország) alkalmaztuk. A sejteket tenyésztettük, majd 5×10^4 sejt/lyuk sűrűségben 96 lyukú sejttenyésztő lemezekbe oltottuk, és konfluenciáig fenntartottuk. A mintákat – MXP, BCD, SBECD, QABCD önmagában és BCD-MXP-PVA-SD, SBECD-MXP-PVA-SD, QABCD-MXP-PVA-SD formulációk – különböző koncentrációkban adtuk a sejtekhez: a CD-eket 5, 2,5 és 1 mM koncentrációban, MXP-t 125, 95, 65 és 25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban, valamint a formulációkat 125, 95 és 65 $\mu\text{g/ml}$ MXP-t tartalmazó koncentrációban. A sejteket az oldatokkal 1 órán át 37°C-on inkubáltuk. A kezelést követően Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldattal mostuk, majd az MTS reagenssel inkubáltuk 2 órán keresztül, 37 °C-on a sejteket. Az abszorbanciát 491 nm hullámhosszon mértük UV/VIS mikrotiter lemezolvasóval.

A membránintegritás értékelésére a laktát-dehidrogenáz (LDH) felszabadulását kvantifikáltuk a CytoTox-ONE[™] Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega GmbH, Mannheim, Németország) segítségével. A fluoreszcencia mérése 560 nm gerjesztési hullámhosszon (emissziós hullámhossz: 590 nm) történt mikrotiter lemezolvasóval. A kezeletlen sejtek negatív kontrollként, a lizált sejtek pedig pozitív kontrollként szolgáltak. A pontosság biztosítása érdekében minden mért értékből kivontuk a háttérjelzést. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk Dunnett-teszttel Minitab statisztikai szoftver segítségével. A $p \leq 0,05$ szintet tekintettük szignifikánsnak.

3.2.5.2. Hatóanyag permeáció vizsgálata nazális RPMI 2650 sejtes modellen

A kiválasztott PVA-tartalmú formulációkból történő MXP diffúziót RPMI 2650 epiteliális sejtvonallal levegő–folyadék határfelületen (ALI) kialakított sejtkultúra-modellen vizsgáltuk. A modell létrehozásához RPMI 2650 sejteket oltottunk 50000 sejt/ $0,33 \text{ cm}^2$ sűrűségben Transwell[™] 3 μm pórusmérőjű polikarbonát membrános sejttenyésztő betétekre. A sejteket 8 napon keresztül folyadékkal fedett állapotban tenyésztettük, a tápközeget (MEM, kiegészítve 10% FBS-sel, 1% Penstrep-pel és 1% nem esszenciális aminosavval) 2–3 naponta cserélve. Ezt követően, a 8. nap után a betéteket ALI körülmények közé helyeztük, és további 2–3 hétig tenyésztettük a sejtek teljes differenciálódásának biztosítása érdekében.

A permeációs teszthez a BCD-MXP-PVA-SD, SBECD-MXP-PVA-SD és QABCD-MXP-PVA-SD mintákat foszfátpuffer oldatban (PBS, pH 7,4) oldottuk fel úgy, hogy a nem-toxikus MXP koncentrációt kapjuk. Ugyanezt a koncentrációját teszteltük a sima MXP-nek kontrollként. A Transwell[™]-ek bazolaterális kompartmentjéhez 600 μL PBS-t (pH 7,4), majd az apikális kompartmenthez 100 μL -nyi mintaoldatot adtunk. Bizonyos időközönként (5, 10,

15, 30, 45 és 60 percnél) mintavételezés történt a bazolaterális oldalról, hogy meghatározhassuk a sejteken átjutott MXP mennyiségét. Az apikális oldalról 60 perc után szintén visszagyűjtöttük az oldatot, hogy meghatározhassuk a hatóanyagtartalom-csökkenés mértékét. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk Fisher *post hoc* teszttel Minitab statisztikai szoftver segítségével. A $p \leq 0,05$ szintet tekintettük szignifikánsnak.

3.2.6. MXP kvantifikálása nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC)

Az MXP mennyiségének meghatározására Agilent 1260 HPLC-t (Agilent Technologies, San Diego, Egyesült Államok) használtunk. A mozgófázis PBS-ből (pH=2,8) és metanolból állt 42:58 (% v/v) arányban. Az elválasztáshoz Kinetex® EVO 5 μm C18 100 Å oszlopot (150 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) használtunk. A minták injektálási térfogata 10 μL volt, az elválasztást izokratikus módszerrel végeztük, 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ áramlási sebességgel 6 percig 30 °C-on. Az MXP mennyiségét 364 nm-en, diódasoros detektorral határoztuk meg. Az adatokat a ChemStation B.04.03 szoftverrel (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) értékeltük ki.

4. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Az előállított minták fizikai-kémiai karakterizálása

4.1.1. Részecskeméret és morfológia

A részecskeméretet lézer diffrakcióval határoztuk meg. Az átlagos szemcseméret 1,89 és 3,05 μm között volt (1. Táblázat).

1. Táblázat: A minták D(0.5) értékei

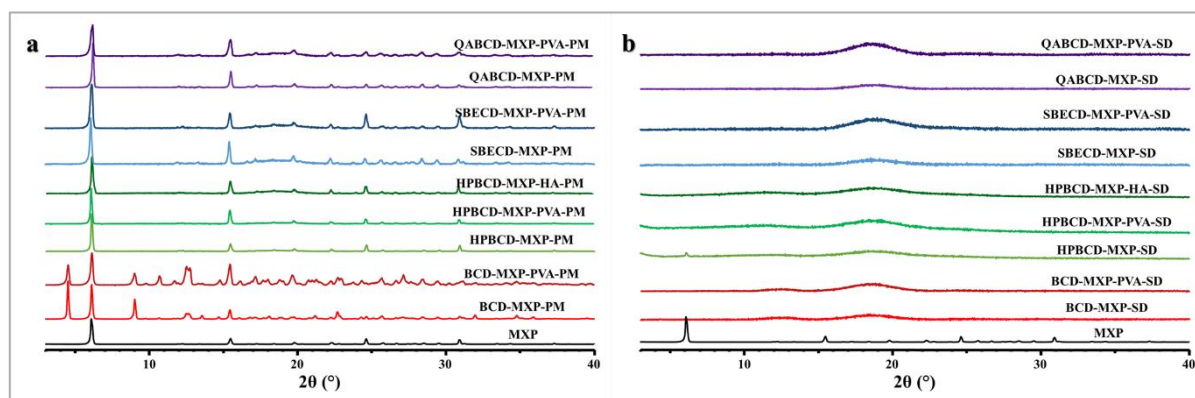
Minta	D(0.5) (μm)
BCD-MXP-SD	1,89 $\pm$ 0,09
BCD-MXP-PVA-SD	1,97 $\pm$ 0,06
HPBCD-MXP-SD	2,72 $\pm$ 0,09
HPBCD-MXP-PVA-SD	2,58 $\pm$ 0,21
HPBCD-MXP-HA-SD	3,05 $\pm$ 0,15
SBECD-MXP-SD	2,21 $\pm$ 0,06
SBECD-MXP-PVA-SD	2,14 $\pm$ 0,03
QABCD-MXP-SD	2,10 $\pm$ 0,03
QABCD-MXP-PVA-SD	1,89 $\pm$ 0,06

A SEM vizsgálatok alapján a porlasztva szárított minták mind egyformán szférikus alakú és sima felszínű szemcsékből álltak, néhány szubmikronos mérettartományba eső részecske is megfigyelhető volt a felvételeken.

4.1.2. Minták kristályossága

A porlasztva szárított minták és a PM-ek kristályosságát XRPD-vel vizsgáltuk, a diffraktogramokat az 1. ábra mutatja. Minden PM-ben az alapvetően kristályos MXP csúcsai 6,1, 15,5 és 24,6° 2 θ értékeknél voltak megfigyelhetők. A BCD jellegzetes csúcsai 4,5, 9,0, 10,7 és 12,5°-nál jelentek meg szintén a kristályosságát jelezve. A szubsztituált CD-k és a polimerek diffrakciós mintázata nem volt kimutatható, ami amorf állapotukra utal.

A porlasztva szárított mintákban az összes korábban megfigyelt csúcs eltűnt, ami az összes eredetileg kristályos anyag teljes amorfizációjára utal, szilárd diszperziókat kaptunk. Ez valószínűleg az előállítási folyamatnak köszönhető: porlasztva szárítással gyakran amorf termék keletkezik.



1. ábra: (a) PM-ek és (b) porlasztva szárított minták diffraktogramjai

4.1.3 A minták termikus tulajdonsága

DSC-t alkalmaztunk mind a porlasztva szárított minták, mind a PM-ek termikus viselkedésének vizsgálatára. A PM-ekben az MXP 160-170 °C körül jelentkező olvadáspontja eltűnt a porlasztva szárított minták termogramjairól, és a bomlási csúcsa is eltolódott, kiszélesedett és csökkent, ami az MXP amorfizációját jelzi a készítményekben. A DSC eredményei megerősítették az XRPD eredményeit.

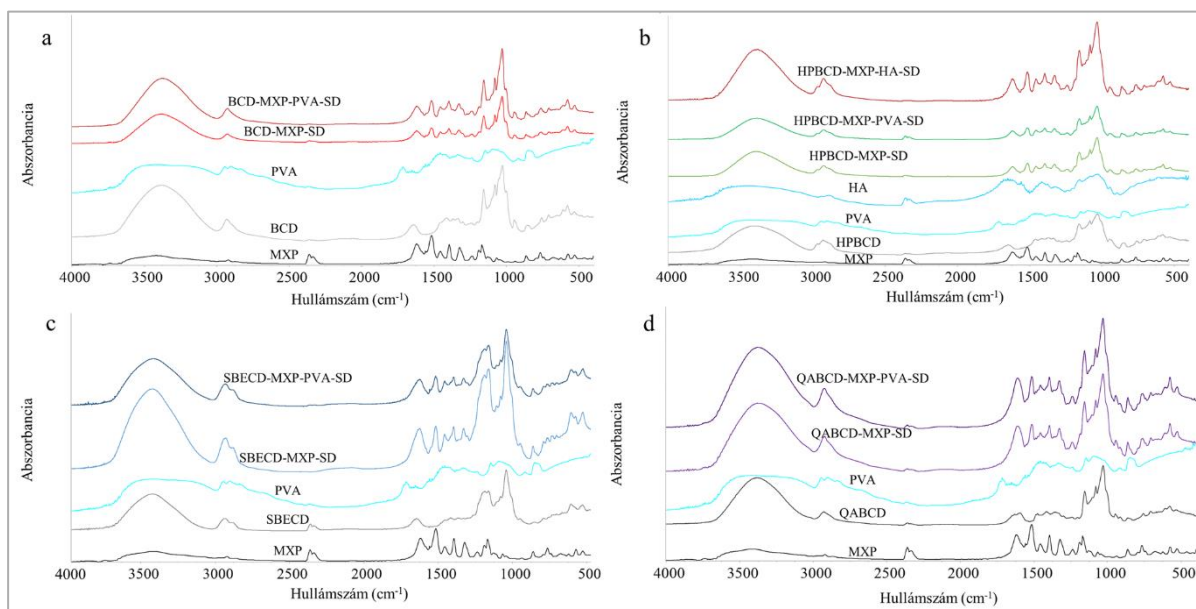
4.1.4. Másodlagos kölcsönhatások a formulációkban

FT-IR mérést alkalmaztunk a segédanyagok és a hatóanyag között feltehetően kialakuló másodlagos kölcsönhatások vizsgálatára. Az az előállított porlasztva szárított mintákat az alapanyagokkal hasonlítottuk össze, a spektrumokat a 2. ábra mutatja.

Az amid kötésből származó C=O csúcs az MXP-ben 1618 cm⁻¹-nél jelent meg. A CD-k spektrumában az O–H nyújtórezgés rendelt csúcs a 3790–3000 cm⁻¹ hullámszámtartományban volt megfigyelhető, az O–H hajlítórezgés csúcsa pedig 1640 cm⁻¹, 1653 cm⁻¹, 1647 cm⁻¹ és 1598 cm⁻¹-nél jelent meg BCD, HPBCD, SBECD és QABCD esetén.

A porlasztva szárított készítményekben egy összeolvadt, eltolódott éles csúcs jelent meg az 1650–1550 cm⁻¹ hullámszámtartományban. Minden BCD- és HPBCD-tartalmú készítmény esetén ez 1616 cm⁻¹-nél, az SBECD-tartalmú készítmények esetén pedig 1623 cm⁻¹-nél volt

megfigyelhető. Ez a hatóanyag és a segédanyagok között potenciálisan kialakult hidrogénkötésre utal. A megfigyelt eltolódás a PVA és a HA jelenlététől függetlenül bekövetkezett, hatásuk valószínűleg a minták alacsony polimertartalma miatt nem érvényesült. A QABCD-tartalmú készítmények spektrumában nem figyeltünk meg változást, ami másodlagos kölcsönhatások hiányára utal, ez a mérési módszer azonban nem képes kimutatni az MXP és a QABCD között a készítményben esetleg kialakult elektrosztatikus kölcsönhatást.



2. ábra: Az alapanyagok és (a) BCD-alapú minták, (b) HPBCD- alapú minták, (c) SBECD- alapú minták és (d) QABCD- alapú minták FT-IR spektrumai

4.2. *In vitro* mérések

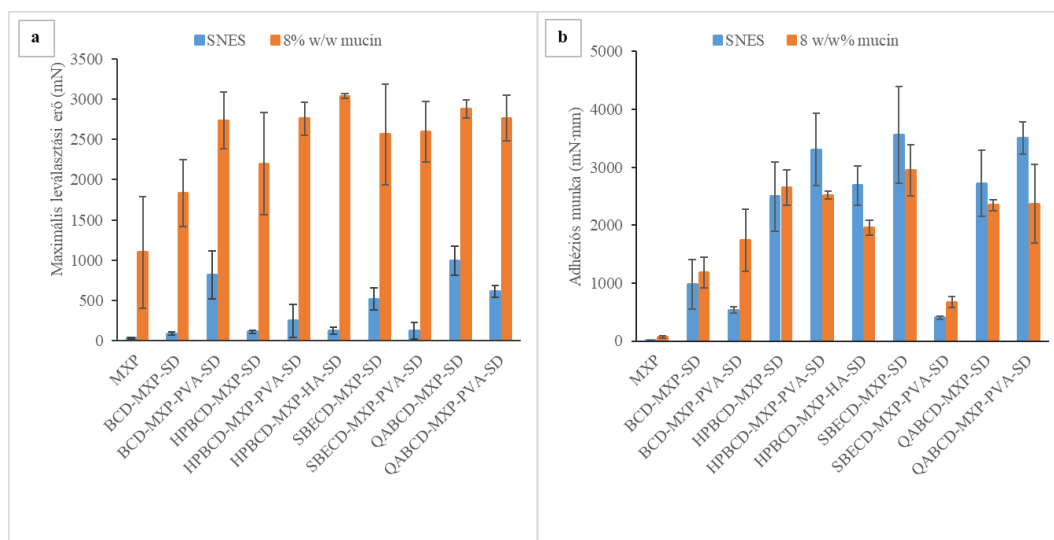
4.2.1. *In vitro* mukoadhéziós teszt

A porok ornyálkahártya felületéhez való tapadásának modellezésére és tesztelésére egy texture analyser-t alkalmaztunk. A következtetéseket a rögzített maximális leválasztási erő és adhéziós munka értékei alapján vontuk le, amelyeket a 3. ábra mutat be. A maximális leválasztási erőt vizsgálva a mucinnal való érintkezéskor minden mintatípusnál szignifikánsan magasabb értékeket mértünk a SNES-sel való érintkezéshez képest. Továbbá, mucin jelenlétében minden CD-alapú minta szignifikánsan különbözött a kiindulási MXP-től, kivéve a BCD-MXP-SD-t. A polimertartalom nem befolyásolta a csúcserőt, sem a PVA, sem a HA nem mutatott szignifikáns hatást. A CD-k jelenléte szükséges volt ezen kölcsönhatások kialakulásához, kivéve a BCD-t, míg ugyanez a polimerek esetében nem volt egyértelműen kijelenthető.

Ami az adhéziós munkát illeti, a legtöbb esetben nem mutattunk ki szignifikáns különbséget a mucinnal és a SNES-sel érintkező minták között. A mért értékek azonban hasonlóan magasak voltak, mint a Kiss *et al.* által orrban történő alkalmazásra előállított és vizsgált mukoadhéziós cisztein-kitozán konjugátum esetében. Az adhéziós munka a polimer láncok és a mucin fizikai összefonódását, valamint a másodlagos kölcsönhatások erősségét tükrözi. Esetünkben a

kimutatott magas adhézios munkaértékek oka valószínűleg a minták vízfelvétele volt. Feltehetően a porok a szűrőpapírral való érintkezés közben történő nedvesedése és duzzadása után a folyadék gyorsan beáramlott a pasztillák kapillárisain keresztül. Ez a folyamat valószínűleg a mesterséges nyálkahártya felszínének kiszáradását eredményezte, ezáltal erős fizikai tapadást létrehozva a mucin jelenlététől függetlenül. Megfigyelésünk arra utal, hogy a minták kezdetben jelentős tapadási szilárdságot mutathatnak az ornyálkahártyán, mielőtt feloldódnának.

Összefoglalva, a CD-k jelenléte – a BCD kivételével – szükséges volt a mucinnal való másodlagos kölcsönhatások kialakulásához, továbbá a porok erős tapadást mutathatnak a nyálkahártyával való kezdeti érintkezésükkor. Bár jelen vizsgálat nem erősítette meg a polimerek mukoadhezív szerepét, a nazális készítményekben való alkalmazásuk megnövekedett viszkozitást biztosíthat a beadásuk helyén, potenciálisan lassítva a mukociliáris clearance-t.

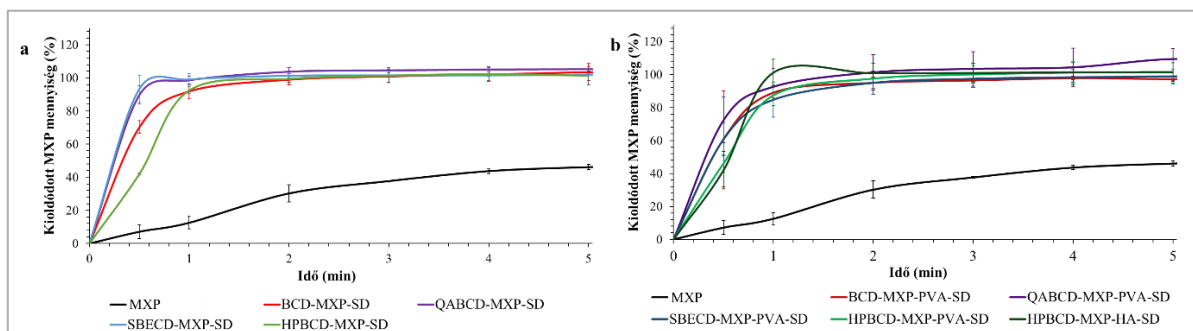


3. ábra: (a) maximális leválasztási erő és (b) adhézios munka értékek

4.2.2. *In vitro* hatóanyag kioldódás vizsgálat

A mintákból történő MXP kioldódást *in-line* módon, nazális körülményeket szimulálva követtük nyomon, az eredményeket a 4. ábra mutatja. A referenciaként használt kiindulási MXP szignifikánsan lassabb kioldódást mutatott, mint bármely más formuláció, mindössze 46%-a volt kimutatható az oldatban 5 perc elteltével. Ezzel szemben az összes porlasztva szárított mintából szinte teljesen kioldódott a hatóanyag az első percen belül. Az alkalmazott polimereknek nem volt hatása a kioldódás sebességére. A tapasztalt gyors MXP kioldódás több tényezőnek tulajdonítható, beleértve az alacsony részecskeméretet, az MXP amorfizációját a termékekben és a vízben jól oldódó CD-k jelenlétét, amelyek javíthatják a készítmények nedvesedését. Mivel a hatóanyag ornyálkahártyán keresztüli felszívódásához szükséges, hogy

az feloldódjon a nyákban, a gyorsabb oldódás a létrejövő magasabb koncentrációgradiens miatt megnövekedett biohasznosuláshoz vezethet.



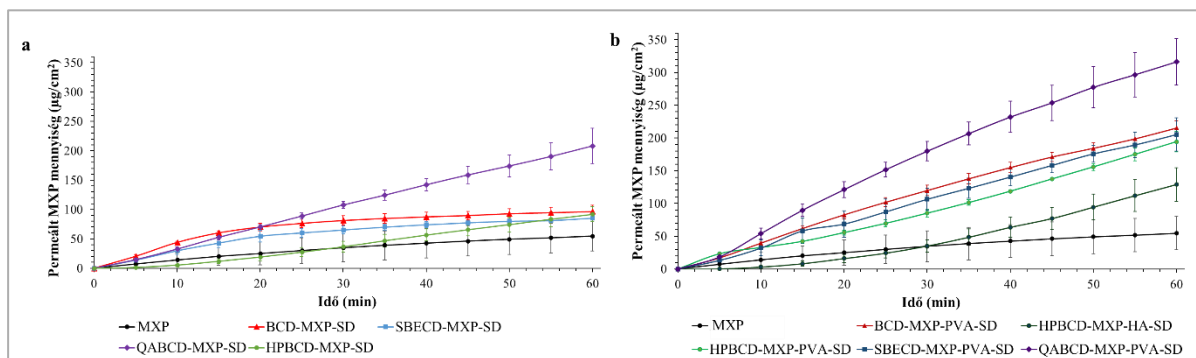
4. ábra: *In vitro* MXP felszabadulás a (a) polimermentes és (b) polimertartalmú formulációkból

4.2.3. *In vitro* permeációs vizsgálat mesterséges nyálkahártyát alkalmazva

A minták *in vitro* diffúziójának tesztelése egy horizontális diffúziós modellel történt mesterséges nyálkahártyát alkalmazva. Az eredményeket az 5. ábra szemlélteti. Referenciaként a kiindulási MXP-t alkalmaztuk, amelyből $54,6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ diffundált az akceptorfázisba 1 óra alatt. A polimermentes minták közül a kationos QABCD-alapú készítményből volt megfigyelhető a legnagyobb mértékű hatóanyag permeáció, szignifikánsan nagyobb, mint a kiindulási MXP-ből és a másik három készítményből. Továbbá, a BCD-MXP-SD, a HPBCD-MXP-SD és az SBECD-MXP-SD hasonló diffúziós értékeket mutatott.

A polimert tartalmazó mintákat tekintve a HA-tartalom kedvezőnek tűnt a HPBCD-alapú mintában, szignifikánsan magasabb permeációs sebességet mutatott a kiindulási MXP-hez és a polimermentes mintákhoz képest, de szignifikánsan alacsonyabbat, mint a PVA-t tartalmazó minták. PVA jelenlétében az összes CD-alapú készítmény jelentősen megnövekedett permeációs sebességet mutatott. A QABCD-MXP-PVA-SD kiemelkedő diffúziós sebességet mutatott. A BCD, HPBCD és SBECD alapú PVA-tartalmú formulációk közel ugyanolyan diffúziós eredményt produkáltak, mint a PVA-mentes QABCD-MXP-SD. A kapott eredmények rávilágítanak mind a CD típusának, mind a PVA jelenlétének az MXP permeációjára gyakorolt hatására.

A QABCD szignifikánsan fokozta az MXP permeációját a BCD-hez, HPBCD-hez és SBECD-hez képest. Hipotézisünk szerint a kialakulhatott elektrosztatikus kölcsönhatások hozzájárulhattak a jobb permeációhoz: oldódáskor az MXP káliumionokká és meloxikám anionná disszociál, utóbbi kölcsönhatásba léphet a QABCD kationos részeivel. Ez a kölcsönhatás valószínűleg szerepet játszik a megfigyelt diffúziónövekedésben. Összességében a PVA kivétel nélkül kedvező hatást mutatott a permeált gyógyszer mennyiségre minden esetben szimulált nazális körülmények között, felülmúlta a HA-t. A további kísérletekhez a PVA-tartalmú mintákat választottuk ki, hogy megvizsgáljuk a stabilitásukat és a CD-k potenciális permeációt fokozó tulajdonságait nazális sejtvonalat alkalmazva.

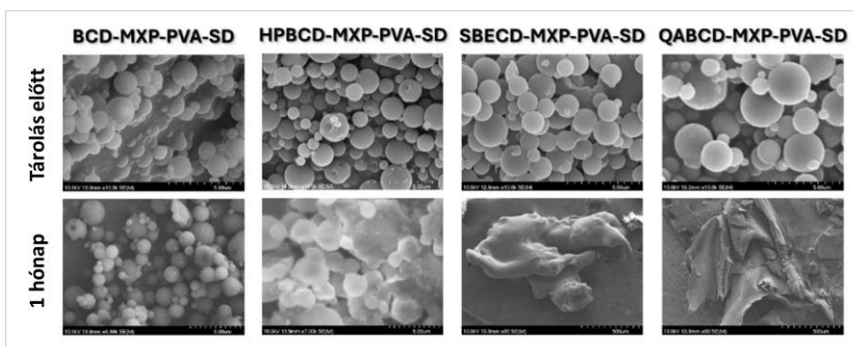


5. ábra: *In vitro* MXP diffúzió a (a) polimermentes és (b) polimertartalmú formulációkból

4.3. PVA-tartalmú minták gyorsított stabilitásvizsgálata

4.3.1. Részecskék morfológiája

A morfológiát SEM-mel figyeltük meg, a felvételek a 6. ábrán láthatók. Amint azt korábban említettük, a porlasztva szárítás szférikus, sima felületű részecskéket eredményezett, átlagos részecskeméretük körülbelül 2 µm volt. 1 hónapos tárolás után a morfológiában mintánként különböző mértékű változásokat észleltünk. A BCD-alapú formuláció részecskéi ugyanolyanok maradtak, míg a HPBCD-MXP-PVA-SD részecskéi között aggregátumképződés kezdődött. A legdrasztikusabb változás a két töltéssel rendelkező CD-tartalmú minta esetén történt: az önálló részecskék eltűntek, összefolyt, üvegszerű tömbök keletkeztek. A megfigyelt változások valószínűleg a magas páratartalmú környezet következményei voltak.



6. ábra: SEM felvételek a PVA-tartalmú minták tárolás előtti és 1 hónapos tárolást követő állapotukról

4.3.2. Fizikai-kémiai stabilitás

A minták diffraktogramjai alapján a porlasztva szárítás eredményeként a kiindulási formulációk amorfak voltak, és 1 hónapos tárolás után egyik minta sem mutatott visszakristályosodásra utaló jeleket. Ez a PVA, illetve az amorf CD-k jelenlétének tulajdonítható. A minták termikus viselkedését is vizsgáltuk, a két semleges CD-alapú minta termogramjában nem volt változás, míg az SBECD- és QABCD-alapú minták termogramján 1 hónap elteltével új endoterm csúcsok jelentek meg, valószínűleg ezen formulációk vízfelvétele miatt.

4.3.3. A minták hatóanyagtartalom változása

A minták hatóanyagtartalmát is követtük a stabilitásvizsgálat során, az eredmények statisztikai összehasonlítását 2 mintás t-próbával végeztük el. 1 hónap elteltével a BCD-MXP-PVA-SD és

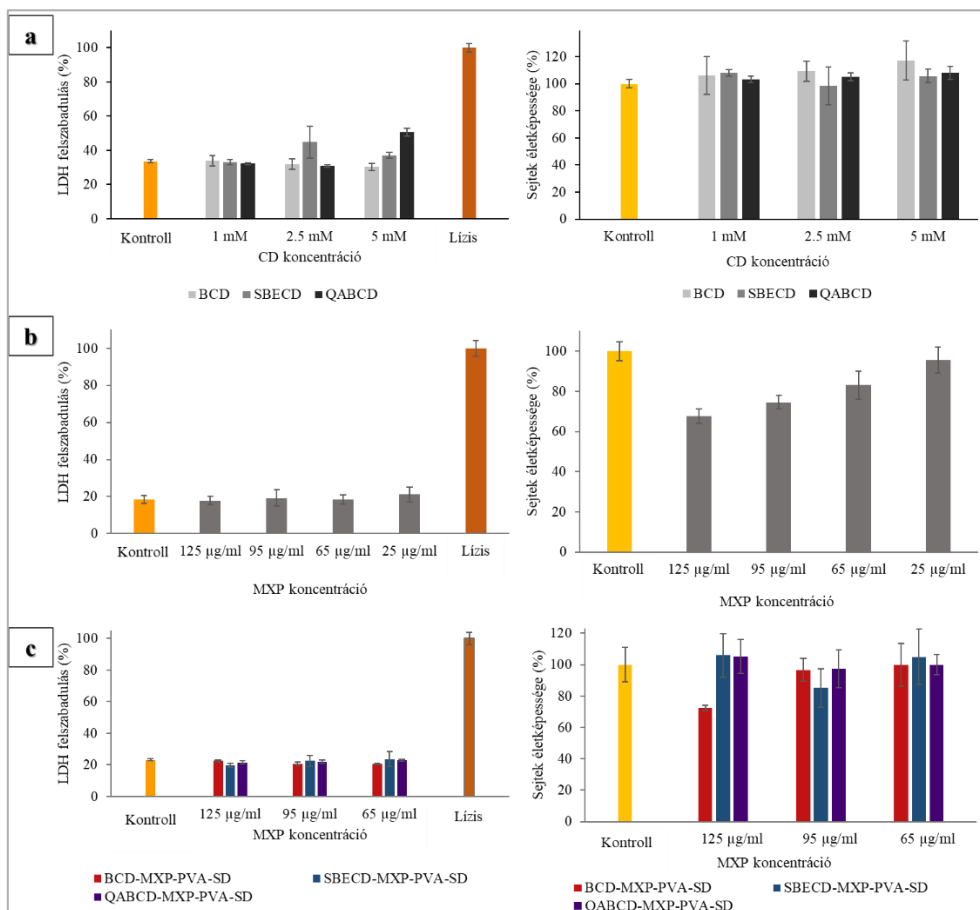
az SBECD-MXP-PVA-SD minták MXP-tartalma szignifikánsan kisebb volt a „tárolás előtti” állapotukhoz képest. Hatóanyagtartalmuk csökkenésének mértéke meghaladta az ICH Q1A (R2) által meghatározott 5%-os elfogadási határt. A tapasztalt csökkenés valószínűleg a hatóanyag bomlásának volt köszönhető.

4.4. Sejtes vizsgálatok

4.4.1. A minták in vitro toxicitása RPMI 2650 sejteken

A továbbiakban a sejttalapú mérések során a CD-ket és MXP-t önmagukban, valamint a BCD-MXP-PVA-SD, SBECD-MXP-PVA-SD és QABCD-MXP-PVA-SD formulációkat teszteltük. Nem toxikus koncentrációikat a membrán integritására és a sejtek életképességére gyakorolt hatásuk alapján határoztuk meg 1 órás inkubáció után, nazális RPMI 2650 sejteken. Amint a 8. ábrán látható, a CD-k önmagukban nem befolyásolták a sejtek életképességét, míg koncentrációfüggő hatást mutattak a membrán integritására. A BCD nem zavarta a membrán integritást a vizsgált koncentrációtartományban, míg az SBECD és a QABCD az LDH felszabadulásának jelentős növekedését okozta a sejtkontrollhoz képest 1 mM, illetve 2,5 mM koncentráció felett. Eredményeink alapján a BCD-t az RPMI 2650 sejtek jobban tolerálták, mint a QABCD-t és az SBECD-t. Utóbbi CD-k citotoxikus hatását RPMI 2650 sejteken még nem vizsgálták. Az eddigi irodalmi adatok szerint a CD-k toxikus hatása korrelál a koleszterin extrakciós kapacitásukkal.

A kiindulási MXP és a tesztelt PVA-tartalmú formulációk egyike sem okozott szignifikáns növekedést az LDH felszabadulásában a tesztelt koncentrációtartományban a sejtkontrollhoz képest. Ezzel szemben a sejtleletképességi vizsgálatok szignifikáns csökkenést mutattak a csak MXP-t tartalmazó oldatok tesztelése során 125-25 µg/ml-es koncentráció tartományban, kivéve a 25 µg/ml-t. Ugyanakkor, csak a 125 µg/ml koncentrációjú oldat hatására csökkent 68%-ra a sejtek életképessége. A porlasztva szárított minták esetében csak a 125 µg/ml MXP-tartalmú BCD-MXP-PVA-SD oldat eredményezte az életképesség szignifikáns csökkenését 72±2%-ra, sem az SBECD-MXP-PVA-SD, sem a QABCD-MXP-PVA-SD nem közelítette meg a 70%-os küszöbértéket. A CD-k potenciálisan védelmet nyújthatnak a hatóanyagok toxikus hatása ellen. A további kísérletekhez 95 µg/ml MXP koncentrációt választottunk annak érdekében, hogy a készítmények esetleges toxicitása ne torzítsa a permeabilitási vizsgálatok eredményeit, és az adatok összehasonlíthatók maradjanak.

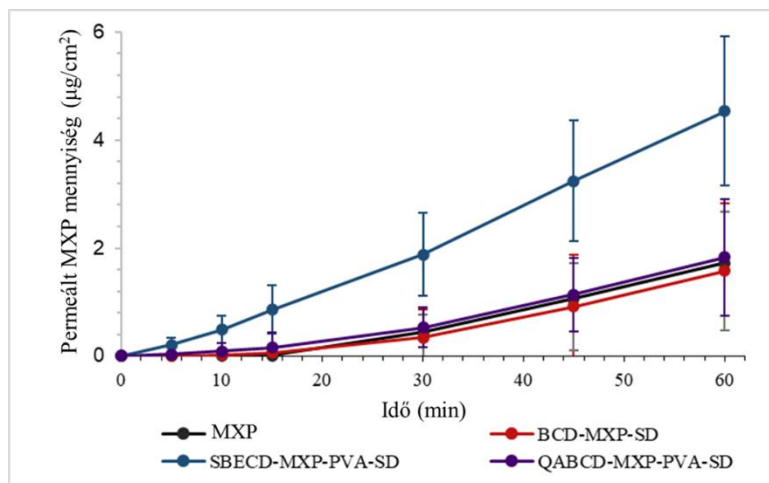


8. ábra: (a) CD-ek, (b) MXP és a (c) formulációk hatása az LDH felszabadulásra és a sejtek életképességére (%)

4.4.2. *In vitro* permeációs vizsgálat RPMI 2650 sejteken

A permeációs vizsgálatban 95 µg/ml MXP-koncentrációjú oldatokat alkalmaztunk mind a kiindulási hatóanyag, mind a PVA-tartalmú készítmények esetén. Az eredményeket a 9. ábra és a 2. táblázat szemlélteti. A minták közül az SBECD-MXP-PVA-SD 4,5 µg/cm² permeációt ért el, ami szignifikánsan meghaladta az összes többi formulációét és a tiszta hatóanyagét, utóbbiak hasonlóan alacsony értéket mutattak. 60 perc elteltével a legmagasabb MXP koncentrációt az apikális kompartmentben a csak hatóanyagot tartalmazó oldat esetében detektáltuk. Hozzáképest a QABCD-alapú és a BCD-alapú minták oldataiban szignifikánsan csökkent a hatóanyagtartalom, míg az SBECD-tartalmú formuláció oldata eredményezte a legalacsonyabb MXP-koncentrációt az apikális oldalon, ami szignifikánsan különbözött minden más mintától.

Megállapítható, hogy a vizsgált sejtvonalon a kísérlet időtartama alatt kizárólag a negatív töltésű SBECD jelenléte fokozta a hatóanyag permeációját. A CD-kről ismert, hogy permeációt fokozó hatásuk két tényező együttes következménye: egyrészt javítják a hatóanyagok oldhatóságát és ezáltal nagyobb mennyiségnek van lehetősége felszívódni, másrészt kölcsönhatásba lépnek a biológiai membránokkal



9. ábra: RPMI 2650 sejteken permeált MXP mennyiség

2. táblázat MXP mennyiség az apikális és bazolaterális kompartmentben 1 óra után

	MXP mennyiség az apikális kompartmentben 60 min után (%)	Permeált MXP mennyiség 60 min után (%)
MXP	79,6 ± 1,2	5,4 ± 2,9
BCD-MXP-PVA-SD	71,5 ± 1,0	5,5 ± 3,8
SBECD-MXP-PVA-SD	63,3 ± 0,6	15,8 ± 4,8
QABCD-MXP-PVA-SD	74,7 ± 4,8	6,4 ± 3,7

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Ezen PhD munka során MXP-tartalmú nazális porokat állítottunk elő, a főbb következtetések a következő pontokban foglalhatók össze:

I. Az irodalmi áttekintés alapján úgy döntöttünk, hogy segédanyagokként különböző BCD-ket és vízdékony polimereket alkalmazunk, valamint előállítási technikaként nano-porlasztva szárítást választottunk. A cél olyan orrporok előállítása volt, amelyek hatóanyagként egy szabadalmaztatott, de eddig forgalomba nem hozott NSAID-t, MXP-t tartalmaztak.

II. Az alkalmazott előállítási módszerrel amorf mikrorészecskéket állítottunk elő, amelyek szférikus morfológiával és sima felülettel rendelkeztek. Az eredetileg kristályos anyagok, köztük az MXP, a porlasztva szárítás következtében amorfizálódtak. A CD-k és az MXP közötti másodlagos kölcsönhatások kialakulását igazoltuk, kivéve a QABCD-alapú minták esetében; ugyanakkor a meloxicám-anion és a kationos QABCD közötti esetlegesen kialakult elektrosztatikus kölcsönhatás FT-IR-rel nem volt detektálható.

III. Az in vitro mukoadhéziós teszt során több megfigyelést tettünk. (1) A csúcserő minden esetben szignifikánsan magasabb volt a kiindulási MXP-hez képest a mucinnal érintkező minták esetén, kivéve a BCD esetében. Ez arra utal, hogy a CD-k jelenléte hozzájárult a minták és a mucin közötti másodlagos kölcsönhatások kialakulásához. (2) A porok erős adhéziót

mutattak, ami feltehetően dehidratáló hatásuk következménye volt, és *in vivo* is erős tapadás várható. (3) A CD-k típusa ezen mérés alapján nem befolyásolta a formulációk adhézióját. (4) Nem találtunk bizonyítékot arra, hogy a polimerek jelenléte bármilyen hatást gyakorolt volna, sem a másodlagos kölcsönhatásokra, sem az adhézió erősségére.

Az MXP *in vitro* kioldódása orrüregi körülmények között szignifikánsan gyorsult a formulálás hatására. A hatóanyag 1 percen belül teljes mértékben felszabadult minden mintából, ellentétben a referencia MXP-vel. Ez feltehetően a kialakult amorf szilárd diszperzióknak és az alacsony részecskeméretnek volt köszönhető. Az alkalmazott előállítási módszer és segédanyagok kombinációja alkalmas volt gyors hatóanyag felszabadulással rendelkező nazális porok előállítására.

Az eredmények alapján az MXP kioldódása nem volt sebességmeghatározó lépés az MXP mesterséges nyálkahártyán történő *in vitro* permeációja során. Mind a CD típusa, mind a polimer típusa befolyásolta a permeáció sebességét. A kationos QABCD PVA jelenlétében minden más mintánál gyorsabb kinetikával rendelkezett, PVA nélkül is hasonló permeációs sebességet mutatott, mint a többi, PVA-t tartalmazó minta, feltehetően a meloxikám-anion és a kationos QABCD közötti elektrosztatikus vonzóerők kialakulása miatt. A HA szintén javította az MXP permeációját, bár a PVA-hoz képest jelentősen kisebb hatással rendelkezett, a PVA minden minta esetén javította az MXP passzív diffúzióját, ezért a PVA-t tartalmazó mintákat választottuk a stabilitásvizsgálatokhoz.

IV. A gyorsított stabilitási vizsgálat vegyes eredményeket és következtetéseket hozott, legjobban teljesítő formuláció kiválasztása nem volt lehetséges. Morfológiai szempontból a BCD-MXP-PVA-SD mutatta a legkedvezőbb eredményeket. Az amorf állapot minden mintánál fennmaradt, a szilárd diszperziót a PVA és a CD-k stabilizálták, ugyanakkor a BCD- és SBECD-alapú mintáknál hatóanyagtartalom-csökkenést észleltünk. A megfigyelt változások a vizsgálati körülmények hatásának tulajdoníthatók. A szubsztituált CD-k higroszkópos sajátsággal rendelkeznek és az ezen anyagokat tartalmazó minták esetén igazolódott is a magas vízmegkötő képesség. A sejtes vizsgálatok a BCD-MXP-PVA-SD, SBECD-MXP-PVA-SD és QABCD-MXP-PVA-SD formulációkkal folytatódtak.

V. A toxikológiai vizsgálatok – amelyeket legjobb tudomásunk szerint az irodalomban elsőként végeztünk el a töltéssel rendelkező CD-kkel és az MXP-vel RPMI 2650 sejtvonalon – azt mutatták, hogy míg a CD-k a sejtek LDH-felszabadulását, addig az MXP a sejtek életképességére hatott koncentrációfüggő módon. A BCD az alkalmazott koncentrációtartományban nem okozott szignifikáns változást az LDH-felszabadulásban a sejt kontrollhoz viszonyítva, míg az SBECD 2,5 mM, valamint a QABCD 5 mM koncentrációja szignifikáns emelkedést eredményezett. A referencia MXP esetében a sejtek életképessége 125

µg/ml koncentrációnál 70% alá esett, amely a nem-citotoxikus hatás elfogadott határértékének számít.

A formulációkat tekintve csak a BCD-MXP-PVA-SD 125 µg/ml MXP-koncentrációjú oldata esetén történt szignifikáns csökkenés a sejtek életképességében (72%-ra), míg az összes többi formuláció magasabb életképességi értékeket mutatott. Ez arra utal, hogy az alkalmazott CD-k védőhatást fejthettek ki a sejtekre magasabb MXP-koncentrációk mellett is. Annak érdekében, hogy a további permeációs vizsgálatok eredményeit egyik formuláció esetén se befolyásolja a formulációk esetleges toxikus hatása, a permeációs vizsgálatokat a 95 µg/ml MXP-koncentrációjú oldatokkal végeztük.

VI. Az MXP permeációs vizsgálatához ALI-kultúrában növesztett RPMI 2650 sejteket alkalmaztuk elsőként a szakirodalomban annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az alkalmazott BCD-k (natív és származékok) esetleges permeációt fokozó hatását orrüregi körülmények között *in vitro*. A CD-k permeációfokozó hatásának kiértékeléséhez mértük az MXP mennyiségét mind az apikális, mind a bazolaterális kompartmentben. Az eredmények szerint csak az SBECD gyakorolt szignifikáns hatást a hatóanyag diffúziójára.

VII. Összefoglalva az eredményeket, a porlasztva szárítási folyamat amorf szilárd diszperziókat eredményezett. A CD-k – típusuktól függetlenül –, a termékek amorf szerkezete és alacsony átlagos szemcsemérete hozzájárultak a hatóanyag gyors kioldódásához. MXP-CD másodlagos kölcsönhatásokat detektáltunk a formulációkban, kivéve a QABCD esetében, amely feltehetően elektrosztatikus kölcsönhatást alakított ki a hatóanyaggal. A mukoadhéziós vizsgálat során a CD-k szintén hozzájárultak a mucinnal kialakuló másodlagos kölcsönhatásokhoz, de a CD típusa alapján nem voltak a minták differenciálhatóak. Az API mesterséges membránon keresztül való permeációja – polimert nem tartalmazó mintákat vizsgálva – csak a QABCD jelenlétében javult. Emellett megfigyeltük, hogy a nagy vízdékonyságú BCD-származékok hajlamosak voltak a környezeti nedvesség megkötésére, amely miatt morfológiájuk megváltozott a gyorsított stabilitási vizsgálat során. Az RPMI 2650 sejteken való tolerálhatóság sorrendje a következő volt: BCD > QABCD > SBECD. Az MXP permeációt fokozó hatását a sejteken csak az SBECD esetében sikerült igazolni.

Egyik polimer (PVA, HA) esetében sem sikerült bizonyítani az MXP oldódási sebességét és a minták adhézióját befolyásoló hatását. Ugyanakkor a PVA fokozta a mesterséges nyálkahártyán keresztüli permeációt, a HA szintén javította a hatóanyag diffúzióját, azonban hatása jelentősen elmaradt a PVA-étól.

Az MXP formulálását BCD-k és vízdékonny polimerek kombinációjának segítségével az irodalomban először e doktori munkában történt. Továbbá az SBECD, QABCD, MXP és az említett formulációk koncentrációfüggő citotoxikus hatásának vizsgálata az RPMI 2650 orrsejt-

vonalon korábban szintén nem szerepelt a szakirodalomban. Emellett az MXP permeációs vizsgálatát különféle BCD-k és PVA jelenlétében szintén elsőként végeztük el az irodalomban ALI-kultúrában növesztett RPMI 2650 nazális sejt-vonalon. Noha az SBECD-MXP-PVA-SD nem bizonyult a legjobban teljesítő formulációnak sem a hatóanyag mesterséges membránon való diffúziója, sem a stabilitás szempontjából, az MXP fokozott permeációját az orrsejt-vonalon csak ennél a mintánál mutattuk ki. Az SBECD és a PVA kombinációja jó alapot adhat egy új nazális poralapú formuláció számára, amely gyors hatóanyag-felszabadulással és potenciálisan fokozott biohasznosulással rendelkezhet. Ugyanakkor a stabilitási problémák megoldásához a formuláció további optimalizálása, valamint impermeábilis csomagolás alkalmazása szükséges.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- 1) Patrícia Varga, Rita Ambrus, Piroska Szabó-Révész, Dávid Kókai, Katalin Burián, Zsolt Bella, Ferenc Fenyvesi, Csilla Bartos; Physico-Chemical, In Vitro and Ex Vivo Characterization of Meloxicam Potassium-Cyclodextrin Nanospheres; *Pharmaceutics*; *Pharmaceutics*; 2021, 13, 1833, DOI: 10.3390/pharmaceutics13111883, impact factor: 6.441 (2021), Q1 (2021)
- 2) Patrícia Varga, Csilla Bartos, Rita Ambrus; Stability testing of cyclodextrin-based meloxicam potassium containing nanospheres intended for nasal administration; *Acta Pharmaceutica Hungarica*; 2023, 93, 57-62, DOI: 10.33892/aph.2023.93.57-62, impact factor: -, Q4 (2023)
- 3) Patrícia Varga, Anett Németh, Scarlett Zeiringer, Eva Roblegg, Mária Budai-Szűcs, Csilla Balla-Bartos, Rita Ambrus; Formulation and investigation of differently charged β -cyclodextrin-based meloxicam potassium containing nasal powders; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2024, 202, 106879, DOI: 10.1016/j.ejps.2024.106879, impact factor: 5.147 (2024), Q1 (2024)

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- 1) Csilla Bartos, Patrícia Varga, Piroska Szabó-Révész, Rita Ambrus; Physico-chemical and in vitro characterization of chitosan-based microspheres intended for nasal administration; *Pharmaceutics*, 2021 13(5), 608. DOI: 10.3390/pharmaceutics13050608, impact factor: 6.4 (2021), Q1 (2021)
- 2) Edit Benke, Patrícia Varga, Piroska Szabó-Révész, Rita Ambrus; Stability and in vitro aerodynamic studies of inhalation powders containing ciprofloxacin hydrochloride applying different DPI capsule types; *Pharmaceutics*, 2021, 13(5), 689, DOI: 10.3390/pharmaceutics13050689, impact factor: 6.4 (2021), Q1 (2021)
- 3) Csilla Bartos, Piroska Szabó-Révész, Tamás Horváth, Patrícia Varga, Rita Ambrus; Comparison of modern in vitro permeability methods with the aim of investigation nasal dosage forms; *Pharmaceutics*, 2021, 13(6), 846. DOI: 10.3390/pharmaceutics13060846, impact factor: 6.4 (2021), Q1 (2021)
- 4) Areen Alshweiat, Patrícia Varga, Ildikó Csóka, Anett Németh, Csilla Bartos, Rita Ambrus; Preparation and characterization of smartcrystals for dissolution enhancement of poorly water-soluble niflumic acid; *Farmacia*, 2023, 71(3). DOI: 10.31925/farmacia.2023.3.7, impact factor: 1.4, Q2 (2023)

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

Verbális előadások

- 1) Varga P., Ambrus R., Balla-Bartos Cs.: Nazális bevitel céljából előállított meloxicám-kálium tartalmú nanoszférák vizsgálata, MKE Kristályosítási és Gyógyszerformulálási Szakosztály 13. Kerekasztal Konferenciája (2021)
- 2) Varga P., Németh A.: Különböző töltéssel rendelkező β -ciklodextrin alapú meloxicám-kálium-tartalmú nazális porok vizsgálata, XV. Clauder Ottó Emlékverseny (2023)
- 3) Varga P., Balla-Bartos Cs., Ambrus R.: Meloxicám-kálium tartalmú nazális porok stabilitásvizsgálata, XXVI. Tavaszi Szél Konferencia, Pécs (2023)
- 4) Varga P., Németh A., Budai-Szücs M., Balla-Bartos Cs., Ambrus R.: Evaluation of different β -cyclodextrins- and polymer-containing nasal powders, VI. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, Szeged (2024)
- 5) Ambrus R., Varga P., Németh A., Balla-Bartos Cs., Csóka I.: Application of Cyclodextrins in Traditional and Alternative Drug Formulations; Case Studies, Conference on Pharmacology, Pharmacokinetics & Innovation (HUPHAR 2024), Mátraháza (2024)

Poszter előadások

- 1) Varga P., Balla-Bartos Cs., Ambrus R.: Investigation Of Meloxicam Potassium Containing Nanoparticles For Intranasal Administration, 9th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Ljubljana (2022)
- 2) Motzwickler-Németh A., Varga P., Budai-Szücs M., Csóka I. Investigation of the nasal applicability of different charged cyclodextrin-based meloxicam potassium containing particles, EUROCD 2023 7th European Cyclodextrin Conference, Budapest (2023)
- 3) Varga P., Balla-Bartos Cs., Ambrus R.: Stability testing of cyclodextrin-based meloxicam potassium containing nasal powders, EUROCD 2023 7th European Cyclodextrin Conference, Budapest (2023)
- 4) Varga P., Balla-Bartos Cs., Ambrus R.: Accelerated stability study of differently charged β -cyclodextrin-PVA based nasal powders, Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVII. and EUFEPS Annual Meeting 2024, Debrecen (2024)

A munkát az Emberi Erőforrások Minisztériuma TKP 2020, 2.2.1-15-2016-00007 és GINOP-2.3.2-15-2016-00060 pályázatok, továbbá az NKFI OTKA K_146148 és a TKP2021-EGA-32 projektek támogatták, melyeket a Kulturális és Innovációs Minisztérium a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból támogatott. A munka az ÚNKP-22-3-SZTE-163 és az ÚNKP-23-3-SZTE-196 Új Nemzeti Kiválóság Programok támogatásával készült, melyeket a Kulturális és Innovációs Minisztérium a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított.

Köszönettel tartozom Csóka Ildikó Professzor Asszonynak, amiért lehetővé tette számomra, hogy PhD tanulmányaimat a Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézetben folytassam.

Hálás vagyok témavezetőimnek, Ambrus Rita Professzor Asszonynak és Dr. Balla-Bartos Csillának az útmutatásukért, értékes meglátásaikkal és tanácsaikkal hozzájárultak munkám színvonalának emeléséhez. Nagyra értékelem társszerzőim munkáját, különösen Motzwickler-Németh Anettét, aki a megfelelő kérdéseket tette fel a megfelelő időben. Külön köszönet illeti a Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet technikusait a segítségükért. Szeretném kiemelni Eva Roblegg Professzor Asszonyt is, aki lehetővé tette, hogy 3 hónapra csatlakozzak a kutatócsoportjához Grazban, és bevezetett a sejtes kísérletek rejtelseibe.

Hálás vagyok a barátságokért, amelyeket tanulmányaim során kötöttem, és a személyes és szakmai fejlődés lehetőségéért.

Köszönöm barátaim és családom érzelmi támogatását, akik végig mellettem álltak, és átsegítettek a legmélyebb pontokon is.

Végül szeretném megköszönni férjemnek, Dr. Kiss Tamásnak a végtelen és feltétel nélküli szeretetét. Nem lettem volna képes ugyanazokat a dolgokat elérni, ha nem bátorított volna állandóan a komfortzónámból való kilépésre.