

Nano-és mikroszálás gyógyszerhordozó rendszerek formulálása és a szálás struktúra topikális, terápiás alkalmazhatóságának *in vitro* és *in vivo* vizsgálata

Doktori tézisek

Sebe István

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zelkó Romána az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Budai Livia, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D., habil egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, D.Sc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Homonnay Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2017

BEVEZETÉS

A generikus és originális gyógyszerfejlesztés aktuális gyógyszertechnológiai kihívásai közül kiemelendő a rosszul oldódó hatóanyagok oldhatóságának növelése, valamint a célzott és szabályozott hatóanyag-leadás iparilag és klinikai szempontból is reprodukálható, stabil és tervezhető megvalósítása. A kombinatorikus kémia kifejlődése sokat lendített a hatóanyagok szintjén a fejlesztés terápiás hatékonysága szempontjából megfelelő irányok kiválasztásában, de mindez továbbra sem tehermentesítette a gyógyszerforma fejlesztő technológusát az oldhatóság problémája alól, amelynek megoldása a generikus gyógyszerfejlesztés során is kvázi originális fejlesztői munkát igényel. A kihívásokra megoldást kereső innovatív, nem konvencionális gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése során a polimer alapú formulációs technikákat, valamint az előállított készítmények tulajdonságainak feltárásához a hatóanyag-segédanyag rendszer fizikai, fizikai-kémiai és biológiai paramétereit egyaránt vizsgálni kell. Optimalizálni és méret növelni szükséges az alkalmazott technológiát. A felhasznált polimer, hatóanyag és formulációs technika viszonylatában ismernünk és vizsgálnunk kell az előállított rendszer mikro-és makroszerkezeti sajátosságait, amelyek segítségével a készítményt jellemző egyéb mérési eredményekkel szemben felállított összefüggések megmutathatják a fejlesztés terápiás értékét, ipari implementálhatóságát és újszerűségét. Ezek birtokában lehet csak elkezdni a gyógyszeripari, klinikai irányelveknek és hatósági követelményeknek megfelelő továbbfejlesztést, optimalizálást.

A kutatás fázisába sorolható innovatív gyógyszerhordozó rendszerek formulálására alkalmas technikák közül a különböző metodikával előállított nano- és mikroszálás struktúrák gyógyszerészeti és orvosbiológiai alkalmazása a gyakorlati és ipari megvalósíthatóság küszöbén áll. A szálás rendszerek tulajdonságai a fejlesztésben széles mozgásteret biztosítanak. Ezek alapján olyan készítmények kialakítására is nyílik lehetőség, amelyek a rosszul oldódó hatóanyagok oldhatóságának és esetleges biohasznosulásának növelésével, az alkalmazandó dózis csökkentésével vagy meglévő kémiai entitások újrapozícionálásával a kialakított struktúrával együtt valódi gyógyszerkészítmények részét képezhetik a jövőben. Megvalósítható a szálás struktúra - szöveti regenerációt serkentő hatását kihasználva - sebgyógyulást segítő, felszívódó kötszerek és topikális készítmények formájában történő felhasználása is.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- gyógyszerkönyvi polimerek felhasználásával a laboratóriumi rotációs szálképzési technika műszaki optimalizálását morfológiailag egységes szerkezetű minták előállításához,
- a polimer gélek rotációs szálképző képességének, alapvető fizikai-kémiai feltételeinek megismerésén és műszeres monitorozásán keresztül, az előállított szálas struktúra mikro-és makroszerkezeti jellemzését,
- antibakteriális hatóanyag mikroszála történő beépítését és *in vitro* vizsgálatát,
- a mikroszálas polimer struktúra-előállítás újszerű metodikájának (kontakt szálhúzás) és technikai feltételeinek kidolgozását,
- hatóanyag tartalmú polimer mikroszála tablettává formulálását és kioldódásának vizsgálatát,
- elektrosztatikus úton előállított, APO (*All Peptide Optimized*) polipeptidet, mint új kémiai entitást tartalmazó nanoszála, sebfedő készítmény antibakteriális és szöveti regenerációra gyakorolt hatásának *in vitro* és *in vivo* vizsgálatát,
- többrétegű, kolisztin-szulfát antibiotikum tartalmú nanoszála sebfedő rendszer kialakítását,
- az előállított többrétegű topikális készítmény szabályozott és nyújtott hatóanyag-felszabadulásának vizsgálatát egyedi kialakítású kioldó cella segítségével,
- a többrétegű topikális készítmény antibakteriális és sebgyógyulásra gyakorolt hatásának vizsgálatát, terápiás alkalmazhatóságát,
- a többrétegű topikális készítmény hatóanyag-felszabadulásának matematikai modellezését.

MÓDSZEREK

Hidrogélek előállítása

A centrifugális szálképzés optimalizációját célzó kísérleteim során a szálképző PVP polimer alapú géleket víz-alkohol különböző arányú elegyének (98 %-os etanol és desztillált víz) felhasználásával készítettem. Antibakteriális hatóanyagként povidon-jód komplexet használtam, amelyet az oldószerként is szolgáló Braunol (7,5 m/m % povidon-jód komplex) hozzáadásával juttattam a rendszerbe.

A mikroszálás szövedék tablettázása az azonos összetételű szabadfilmek összehasonlításban történt. A B₁₂-vitamin modell hatóanyag 5 mg/ml koncentrációjú törzsoldata egyúttal a polimerek oldószereként is szolgált.

További kísérleteimhez 15 m/m % PVA (Mowiol[®] 18-88) tartalmú gélekből állítottam elő nanoszálás mintákat. Az alap gél egyik részletében kolisztin-szulfátot, míg a másik részében A3-APO polipeptidet oldottam fel az összes oldott anyagra nézve 2 m/m %-nak megfelelő mennyiségben.

Mikroszálás szövedék előállítása egyedi tervezésű rotációs feltétellel

A mikroszálakat egyedi tervezésű rotációs feltétellel állítottam elő. Későbbi kísérleteimhez saját tervezésű és a korábbi készülékhez képest módosított geometriájú rotációs alkatrészt használtam, amelynek hasznos belső térfogata 30 ml. Az alumíniumból és poliamidból készített forgástest falán 0,3 mm átmérőjű furatok találhatók. A minták előállításakor a fordulatszámot 3500 RPM értékre állítottam, ami ezekben az esetekben 411 relatív centrifugális erőnek felelt meg (RCF, *Relative Centrifugal Force*). A keletkező szálakat 5 cm átmérőjű, 18 cm hosszúságú és 200 RPM fordulatszámmal forgó hengeres kollektorral gyűjtöttem.

Mikronizálás és tablettázás

A hatóanyag tartalmú szálás rendszerek feldolgozhatóságának, tablettázhatóságának vizsgálatához a mikroszálakat először két lépésben, két különböző berendezés segítségével mikronizáltam. Az öntött filmek mikronizálása szintén két lépésben, de ugyanazon készülékben történt. A művelet előtt a mintákat 1,5 órán át szárítottam Binder ED53UL típusú szárítószekrényben, 50°C-ra beállított hőmérsékleten

a technológiai művelethez szükséges megfelelő nedvességtartalom eléréséhez. A szárított mikroszálakat Stefan UMC5 típusú készülékkel aprítottam kisebb részekre 2000 RPM fordulatszámon és 10 perces üzemidő alkalmazásával. A második mikronizálási lépéshez a mintát vibrációs golyós malomba vittem át. A filmek őrlését a fent említett típusú vibrációs malommal hajtottam végre első lépésben 8 db, 10 mm átmérőjű, míg a második lépésben 30 db, 5 mm átmérőjű golyó használatával. A vibrációs mikronizálás egységesen 900 RPM-nek megfelelő frekvencián, 15 percig tartott mindegyik minta esetében. A filmeket előzetesen dörzsmozsárban kisebb lemezekre törtem össze. A tablettázás előtti utolsó műveleti lépéshez, további segédanyagok hozzáadásával elkészítettem a véghomogenizátumokat. Az egymástól összetétel arányaiban eltérő tablettákat direktpréseléssel készítettem excenteres tablettázó géppel (Diaf, Slagesle, Dánia). A matricafurat beállítását úgy változtattam, hogy ~500 mg tömegű tablettákat kapjak. A folyamat során két alkalommal végeztem szitálást Endecotts® típusú szitával, először a mikronizálás után közvetlenül (szitálás átmérője: 1,25 mm), majd a fizikai keverék két lépésben történő homogenizálási műveletének egyes szakaszai között.

Multirétegű, nanoszálal sebfező rendszer előállítás

A hatóanyag tartalmú, többrétegű rendszereket elektrosztatikus eljárással, PVA gélek felhasználásával állítottam elő. A multirétegű sebfező készítmény alapjául a szálképzés eredményeként közvetlenül keletkező nanoszálal PVA szálpaplan (CEL: *Colistin sulfate-loaded Electrospun Layer*, AEL: *APO-loaded Electrospun Layer*), valamint hatóanyag mentes változatának utólagos hőkezelésével készített membrán szolgált (MEL: *Membrane Electrospun Layer*).

Mikroszálal szövetek előállítás saját fejlesztésű kontakt szálhúzó berendezéssel

A polimer alapú mikroszálal előállításának saját kidolgozású, újszerű metodikáját a P1400283 ügyiratszámú szabadalmi leírás és a 2015.08.28-án megjelent Szabadalmi Közlöny és Védjegyterjesítő 120. évfolyamának 16. száma részletezi.

Optikai, digitális mikroszkópos felvételek készítése

A szálakról és szálal mintákról készített optikai felvételeket egy 20-200-szoros nagyítási léptékű, digitális mikroszkóppal készítettem (Digimicro 2.0 Scale, DNT[®], Németország).

Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek készítése

A mintákról készült többes nagyítású felvételeket (1000-10000-szeres) pásztázó elektronmikroszkóppal készítettem (SEM; JEOL 6380LVa, Tokyo, Japán). A képek segítségével meghatároztam az individuális szálak átlagos szálvastagságát és a szálak közötti átlagos távolságot.

Szálképző hidrogél optimalizálásának reológiai alapú követése

A centrifugális szálképzéshez készített PVP 30 tartalmú gélek polimer-oldószer arányának optimalizálását dinamikus viszkozitás meghatározásának segítségével követtem. A mérések Kinexus Pro (Malvern Instruments Ltd, Egyesült Királyság) készülékkel történtek, 25 °C-on ($\pm 0,1$ °C).

Szálal szövetek mechanikai tűrőképességének jellemzése szakítószilárdság alapján

Az előállított szálalplanok mechanikai tűrőképességét az anyag szakítószilárdságának meghatározásával vizsgáltam. A méréseket Zwick Z005 (Zwick Roell GmbH, Ulm, Németország) készüléken végeztem szobahőmérsékleten. A szakítószilárdság értékeket és a véletlenszerűen orientált szálal szövetek Young modulusait az alábbi egyenlet (E1) segítségével számítottam ki:

$$\sigma \left(Pa; \frac{N}{m^2} \right) = \frac{F_{max}(N) \cdot \rho \left(\frac{kg}{m^3} \right)}{TEX \left(\frac{kg}{m} \right)} \quad (E1)$$

ahol F_{max} a maximális erő, ρ a szálal átlagos sűrűsége, TEX a lineáris sűrűség (W/L , ahol W a szálal tömege, L a szálal hossza).

Pozitronannihilációs élettartam spektroszkópiai mérések

A kísérleti munkáim során előállított szilárd minták mikroszerkezeti vizsgálatához az anyagot jellemző szabad térfogatokat és a szabad térfogatok anyagon belüli eloszlását pozitronannihilációs élettartam spektroszkópiával mértem. Pozitron forrásként úgynevezett hordozómentes, $3 \cdot 10^5$ Bq aktivitású szilárd $^{22}\text{NaCl}$ forrást alkalmaztam. A diszkrét élettartamokat RESOLUTION programmal nyertem ki az összesített három párhuzamos spektrum adataiból, míg az élettartamok eloszlásának kiértékelése MELT programmal történt.

Mikroszál alapú tabletta kioldódás vizsgálata

A szabadfilm, valamint szálas alapú, B₁₂-vitamin tartalmú tabletták kioldódás vizsgálatát *Hanson SR8 PLUS* típusú kioldókészülékben, 'offline' üzemmódban végeztem. A kioldódást 37°C-on, 50 RPM keverési sebességgel, lapátos keverővel hajtottam végre.

B₁₂-vitamin kvantitatív meghatározása HPLC-UV műszeres technikával

A PVP30 polimer alapú tabletták kioldódásakor vett minták B₁₂-vitamin tartalmának mennyiségi meghatározása HPLC-UV (Agilent 1050 HPLC, Santa Clara, Kanada) folyadékkromatográfiás technikával történt. Az elválasztás során gradiens elúciót alkalmaztam 1 ml/perc áramlási sebességgel, ahol az 'A' eluens 0,05 V/V% koncentrációjú trifluoecetsavas, MilliQ készülékkel (Merck, Billerica, MA) előállított desztillált vizes oldat volt, míg a 'B' eluens acetonitril. A detektálás hullámhossza 362 nm, míg a csúcshőmérséklet 0,053 perc volt.

Topikális felszívódást modellező hatóanyag felszabadulás vizsgálata egyedi tervezésű kioldócellában

A többrétegű, kolisztin szulfát tartalmú sebfedő rendszerek kumulatív kioldódás vizsgálatát külön erre a célra elkészített kioldó cella segítségével végeztem. A vizsgálatkor a mintákat az eszköz tetején található, kör alapterületű és a sebfelszín jelképező folyadék-kontakt nyílására helyeztem, amelyet szilikon réteggel bevont üveglappal zártam le. Az edényzetet a kioldóközegként alkalmazott pH=6,8 vizes puffer

oldattal. Az oldatot 25 °C-ra (± 2 °C) temperáltam és mágneses keverő segítségével 50 RPM fordulatszámon kevertetem. Az 1; 3; 5; 7; 10; 13; 16; 20; 25; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240 perces mintavételi időpontokban 1 ml mintákat vettem.

Kolisztin-szulfát kvantitatív meghatározása UPLC-MS műszeres technikával

A többrétegű sebfedő rendszer vizsgálatokor vett mintákból a kolisztin szulfát mennyiségi meghatározása Waters Acquity UPLC H-Class folyadékkromatográfiás rendszerrel. A detektálás a kvalitatív meghatározáshoz 1156, míg a kvantitatív meghatározáshoz 381.1 és 578,5 értékeken, egyedi ion detektálási módban (*Single Ion Monitoring*) történt 10 pont / másodperc mintavételi aránnyal történt.

Agar-diffúziós inhibíció vizsgálat az antibakteriális kapacitás jellemzésére

A jódtartalmú mikroszálal szövetedékek antibakteriális hatásának vizsgálatához az alábbi baktériumtörzseket használtam: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 30013, *Escherichia coli* ATCC 25922. A mérést azonos polimer összetételű, de hatóanyagot nem tartalmazó lapkákkal és azonos összetételű, jódot, valamint jódot nem tartalmazó gélekkel összehasonlításban végeztem el. Az egységes tömegű és korong formájú mintákat és a géleket az egyes baktériumtörzsek 0,5 McFarland koncentrációjú oldatával előkészített Mueller-Hinton agar, míg a *Staphylococcus aureus* és *Streptococcus pyogenes* baktériumok esetében 5 % juhvérrrel kiegészített Mueller-Hinton agar táptalajokra (Biomérieux, Budapest, Hungary) helyeztem és 37 °C-on inkubáltam egy éjszakán át (CLSI, 2005). A kolisztin szulfát tartalmú nanoszálal réteg inhibíciós képességét három különböző baktériumtörzsen vizsgáltam: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, MDR *Acinetobacter baumannii*. A többrétegű sebfedő készítmények antibakteriális kapacitásának meghatározását úgy végeztem, hogy ugyanazon mintát óránként új táptalajra helyeztem át, összesen 6 órán keresztül.

Csíraszám számlálás kinetikai vizsgálathoz

A jódtartalmú mikroszálaskorongok, hatóanyag-leadás kinetikájával összefüggésben mutatott antibakteriális aktivitását úgynevezett ölési görbék (CLSI, 2005) felvételén keresztül határoztam meg. A vizsgálathoz $7,6 \log_{10}$ CFU/ml kezdeti koncentrációjú *Streptococcus pyogenes* ATCC 30013 baktériumtörzset használtam. A csíraszám számlálását 1, 3, 6, 12 és 25 órás inkubációs idő elteltével végeztem el a kioltott táptalajok 24 órás, 37 °C-os inkubálása után.

Dorzális biopszia modell alkalmazása CD1 típusú egereken

Az A3-APO monomer és kolisztin szulfát tartalmú ($11,8 \pm 0,4 \mu\text{g}$) sebfedő készítmények antibakteriális és sebgyógyulást segítő hatásának *in vivo* vizsgálatához összesen 36 db CD1 és C57/BL/6 típusú egeret használtam. Az állatok hátán a bőrszövetet 8 mm átmérőjű területen eltávolítottam a kezelés előtt közvetlenül (dorzális bőrbíopszia).

A sebfedő ráhelyezése előtt 20 db eger sérült szöveti területét $10 \mu\text{l}$ *Acinetobacter baumannii* baktériumtörzs 10^9 CFU koncentrációjú foszfát puffer oldatával fertőztem be. Az így létrehozott fertőzött és nem fertőzött csoportok egyedei lettek további kisebb csoportokra felosztva a kísérlethez. A sebfedő tapaszokat a kezelés negyedik napján távolítottam el.

Testfelszíni termoanalízis hőkamerával a szöveti regeneráció követésére

Az állatkísérletben részt vett egerek sebeitől kétirányú testfelszíni hőmérséklet profilt készítettem FLIR A325sc típusú hőérzékes kamerával és FLIR Research IR Max szoftver segítségével.

Egyszerűsített szövettani vizsgálat

Az *in vivo* kísérletbe bevont állatok sebeit a kezelés után kimetszéssel távolítottuk el a szövettani vizsgálathoz. A hematoxilinnel és eozinnal festett minták mikroszkópos vizsgálata kamerával felszerelt Zeiss mikroszkóppal történt.

Kioltás szöveti homogenizátumból

Az egerekből kimetszett sebek bakteriális fertőzöttségének meghatározásához a sebekből készült homogenizátum Mueller-Hinton táptalajon került kioltásra, 24 órás inkubációs idővel.

A hatóanyag kioldódás matematikai modellezése

A többrétegű, membránokból (MEL, *Membrane Electrospun Layer*) és az elgélesedő, kolisztin szulfát tartalmú rétegekből (CEL, *Colistin sulfate-loaded Electrospun Layer*) felépülő sebfedő rendszer kumulált hatóanyag-felszabadulásakor a kioldótartályban kialakuló hatóanyag koncentráció időtől függő változását határoztam meg.

Weibull kioldódási modell

A kioldódási görbék kinetikai paramétereinek meghatározására számos modellfüggvény használatos. Különböző alakú kioldódási görbék matematikai leírására a Weibull-féle eloszlás függvény alkalmaztam **(E2)**:

$$M_t = M_\infty \left(1 - e^{-\frac{(t-t_0)^\beta}{\tau_d}} \right) \quad \text{(E2)}$$

ahol M_t a t időpontig leadott hatóanyag-mennyiség, M_∞ a maximálisan leadható hatóanyag-mennyiség. A függvény alaki paraméterét β , a késleltetési időt t_0 és a közepes kioldódási időt (ahol a hatóanyag mennyiségének 63,2 %-a kioldódott) τ_d jelöli az egyenletben.

Végeselem modellezés (FEM)

A többrétegű sebfedő rendszer CEL és MEL rétegeinek alternáló elrendezésénél végbemenő hatóanyag diffúziójának numerikus elemzése a műszaki számításokhoz kifejlesztett végeselem módszerrel (FEM, *Finite Element Method*) történt. A végeselem módszer a peremfeltételes parciális differenciálegyenletek olyan variációs elvű megoldása, ahol a keresett függvényt a tartományt lefedő véges elemeken, elemenként külön-külön létrehozott egyszerűbb függvényekkel helyettesítjük.

EREDMÉNYEK

Az értekezés új tudományos eredményei

- A mikroszálak, mint potenciális gyógyszerhordozó rendszerek megfelelő minőségű és reprodukálható előállítására kifejlesztettük a centrifugális szálképző feltét laborméretű, egyszerűen kezelhető műszaki kivitelét [1, 2].
- A műszaki tervek szerint legyártott centrifugális feltét felhasználásával optimalizáltam a PVP polimer alapú mikroszálak előállítását, amelynek részeként vizsgáltam a víz-etanol oldószerkeverék és polimer koncentráció szálképzésre gyakorolt hatását [1]. A kiindulási szálképző oldatok dinamikus viszkozitásának vizsgálatával meghatároztam a megfelelő morfológiájú szálak gyártásához tartozó specifikációkat, amiket pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) mérésekkel támasztottam alá. A legyártott minták PALS műszeres vizsgálataival feltérképeztem a polimer struktúra jellemző szupramolekuláris viszonyait és a hatóanyag-tároló kapacitásra nézve prediktív szabadterfogatokat. A PALS eredmények felhasználásával megállapítottam a szálak nedvességtartalma és mechanikai tűrőképessége közötti összefüggéseket. A felsorolt vizsgálatok során kapott eredmények és megállapítások a PVP alapú mikroszálak felhasználásának megtervezéséhez adnak globális háttérrel.
- Az oldat fázisból kiinduló szálképzés előállításának újszerű és előnyös megoldásainak keresése eredményeként kidolgoztam a kontakt szálhúzó berendezés működő, műszaki kivitelét, amely a szálképző fésű periodikus, kontakt-metodikájú mozgása révén hoz létre mikrométer átmérőjű szálakat. A párhuzamosan, valamint egymásra merőlegesen orientálódó szálak négyzet formájú szálaplanként választhatók le az elektrosztatikus kollektorról. Az eszköz működését a P1400283 ügyiratszámú szabadalom írja le részletesen.

- A hatóanyag-tartalmú szálak valódi, az ipari gyógyszer technológia szempontjából releváns alkalmazhatóságának egyik lehetséges módja a nano-és mikroszálak további feldolgozásán keresztül előállítható tableta vagy kapszula formulálása. Ezen felhasználhatóság kérdését megvizsgálendő B₁₂-vitamin modellhatóanyagot tartalmazó PVP mikroszálakat készítettem és mikronizáltam, majd a szakirodalomban először közölt, egyszerűsített gyártási művelet mentén haladva, további segédanyagok hozzáadásával tablettákat készítettem belőle. Vizsgáltam a véghomogenizátum direktpréselésével előállított tabletták kioldódását [2]. A mikronizált mikroszálás fázis termék PALS műszeres mérésével vizsgáltam a mikronizálás szálak struktúrára és szupramolekuláris viszonyaira gyakorolt hatását azzal a céllal, hogy bizonyítsam a technológiai művelet anyagi rendszerre gyakorolt, nem destruktív hatását és a struktúra tablettázásra való alkalmasságát.
- A polimer szálak másik potenciális felhasználási területe a létrehozott rendszerek közvetlen formában történő gyógyszerészeti és orvosbiológiai alkalmazása, ahol a hatóanyag felszabadulásának és kívánt terápiás indikációjában elért hatékonyságának vizsgálata az elsődleges cél. Ezekben az esetekben a szálképző gél összetétele, az előállítás módja és a kialakuló anyagi rendszer fizikai-kémia tulajdonságai a főbb meghatározói a kioldódás vagy felszabadulás kinetikájának és a készítmény egyéb tulajdonságainak. Egy ilyen, antibakteriális kezelést célzó közvetlen alkalmazás vizsgálatára povidon-jód komplex tartalmú mikroszálás szálpaplanokat állítottam elő és *in vitro* mikrobiológiai mérésekkel vizsgáltuk a rendszer antibakteriális kapacitását, illetve ezzel összefüggésben a szálakat jellemző mikroszerkezeti tulajdonságokat [3].
- A közvetlen felhasználás lehetőségeinek további feltérképezésével olyan PVA alapú, elektrosztatikus szálképzés útján előállított nanoszálak monorétegeket készítettem, amelyek alternáló elrendezésével a hatóanyag diffúziókontrollált, szabályozható és a kezelni kívánt területen a hatóanyag közel állandó koncentrációja érhető el. A létrehozott multirétegű sebfedő rendszer tervezhető kinetikájú kioldódásának vizsgálatára és optimalizálására *in vitro*, *in silico*

és *in vivo* vizsgálati módszereket használtam fel [4, 5]. A lokálisan alkalmazandó topikális készítménybe a multirezisztens baktériumokkal szemben hatásos kolisztin szulfát hatóanyagot és a kísérleteink alapján a szöveti regenerációt is segítő APO monomer molekulát építettem be és vizsgáltam a kapott formulációk hatékonyságát. A készítmény felépítését és működését a P1600505/19 ügyiratszámú szabadalom is részletezi.

- A multirétegű sebfedő készítmény hatóanyag-felszabadulásának és teljesítőképességének anyagi rendszer megközelítésű vizsgálathoz egyedi kialakítású kioldó cellát készítettem [5].

KÖVETKEZTETÉSEK

Az eredmények gyakorlati jelentősége és alkalmazhatósága

A nano-és mikroszálak alkalmazása számtalan bizonyított előnnyel járhat, mivel képes lehet egyes hatóanyagok kedvezőtlen fizikai-kémiai tulajdonságainak javítására, amorf-szilárd diszperziók és szilárd oldatok kialakítására. Ezek együttesen egy lehetséges megoldást nyújthatnak az említett vegyületek oldhatósági és oldódási problémáinak megoldására és új gyógyszerhordozó rendszerek, gyógyszerformák kialakítására, terápiás hatékonyságuk biztosítására.

Legyen szó nanométer, vagy mikrométer átmérőjű szálak előállítására potenciálisan alkalmas technikákról, fontos kritérium annak biztosítása, hogy a kísérletekhez, fejlesztéshez és a jövőben talán az ipari méretű gyártáshoz is rendelkezésre álló eszköz olyan műszaki kivitelezésű legyen, amellyel hatékonyan optimalizálható és reprodukálhatóan jó minőségben gyártható, méretnövelhető a kívánt szál formára. Csak így biztosítható a kutatások azon iránya is, amivel egyre közelebb kerülhetünk a tényleges gyakorlati megvalósításhoz. A rotációs szálképzés a mikroszálak egy ilyen lehetséges és ígéretes módszere. A szál fázis termék vagy végtermék minőségének biztosítását követően kaphatunk csak hitelt érdemlő vizsgálati eredményeket a rendszer gyógyszerhordozókénti működéséről és terápiás hatékonyságáról.

A kutatások és akár az ipari szintű preformulációs vizsgálatok terén a PALS műszeres technikának valódi jelentősége van, mert segítségével beleláthatunk a polimer mátrix

szupramolekuláris környezetébe és azok változásainak már korai fázisú követésével a kioldódásról, stabilitásról, kompatibilitásról és öregedésről kaphatunk értékes információkat. Mindezekkel idő és fejlesztési költség takarítható meg az iparban, valamint segíti a fejlesztés helyes irányának kiválasztását.

A polimer szálak tablettázhatósága szintén fundamentális kérdés, ahol a szálak további feldolgozása során fontos megőrizni az eredeti mikroszerkezeti állapotot azért, hogy a fázis termék stabil formában továbbvihető legyen és a megfelelő kinetikájú kioldódást célzó egyéb technológiai műveletek hatását ne torzítsák.

A hatóanyag-tartalmú szálak szövetek közvetlen, topikális alkalmazása egy nagyon ígéretes felhasználási mód. A sebek gyógyulásban, rezisztens baktériumok ellen alkalmazott és szisztémásan megterhelő, szűk terápiás ablakú antibiotikumokkal történő kezelésében, de általánosságban is a multirétegű sebfedő készítmény egy az adagolási igény figyelembevételével tervezhető rendszer, ahol a hatóanyag-felszabadulás kinetikája változtatható. Biztosítható a hatóanyag hosszú tartózkodási ideje a kezelni kívánt területen, miközben gyorsítja a seb gyógyulását. Az ilyen jellegű készítmények *in vitro* hatóanyag-felszabadulásának vizsgálatára a dolgozatban leírt egyedi tervezésű kioldó cellát egy prediktív adatokat szolgáltató eszköznek és módszernek tartom.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

1. Sebe I, Ostorhazi E, Bodai Zs, Eke Zs, Szakacs J, Kovacs NK, Zelkó R. (2017) In vitro and in silico characterization of fibrous scaffolds comprising alternate colistin sulfate-loaded and heat-treated polyvinyl alcohol nanofibrous sheets. *Int J Pharm*, 523: 151-158.
2. Sebe I, Ostorhazi E, Fekete A, Kovacs NK, Zelko R, Kovalszky I, Li W, Wade JD, Szabo D, Otvos L Jr. (2016) Polyvinyl alcohol nanofiber formulation of the designer antimicrobial peptide APO sterilizes *Acinetobacter baumannii*-infected skin wounds in mice. *Amino Acids*, 48: 203-211.
3. Sebe I, Bodai Zs, Eke Zs, Kállai-Szabó B, Szabó P, Zelkó R. (2015) Comparison of directly compressed vitamin B12 tablets prepared from micronized rotary-spun microfibers and cast films. *Drug Dev Ind Pharm*, 41: 1438-1442.
4. Sebe I, Kállai-Szabó B, Kovács NK, Szabadi E, Zelkó R. (2015) Micro- and macrostructural characterization of polyvinylpyrrolidone rotary-spun fibers. *Drug Dev Ind Pharm*, 41: 1829-1834.
5. Sebe I, Szabó B, Nagy ZsK, Szabó D, Zsidai L, Kocsis B, Zelkó R. (2013) Polymer structure and antimicrobial activity of polyvinylpyrrolidone-based iodine nanofibers prepared with high-speed rotary spinning technique. *Int J Pharm*, 458: 99-103.

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények

1. Sipos E, Szabó ZI, Rédei E, Szabó P, Sebe I, Zelkó R. (2016) Preparation and characterization of nanofibrous sheets for enhanced oral dissolution of neбивolol hydrochloride. *J Pharmaceut Biomed*, 129: 224-228.
2. Csoban Zs, Kallai-Szabo B, Kallai-Szabo N, Sebe I, Gordon P, Antal I. (2015) Improvement of mechanical properties of pellet containing tablets by thermal treatment. *Int J Pharm*, 496: 489-496.
3. Krüger-Szabó A, Aigner Z, Balogh E, Sebe I, Zelkó R, Antal I. (2015) Microstructural analysis of the fast gelling freeze-dried sodium hyaluronate. *J Pharmaceut Biomed*, 104: 12-16.
4. Szabó P, Sebe I, Stiedl B, Kállai-Szabó B, Zelkó R. (2015) Tracking of crystalline-amorphous transition of carvedilol in rotary spun microfibers and their formulation to orodispersible tablets for in vitro dissolution enhancement. *J Pharmaceut Biomed*, 115: 359-367.
5. Kállai-Szabó B, Sinka M, Stiedl B, Sebe I, Antal I, Zelkó R. (2014) Tracking of the solubility enhancement and drug release stability of melt extrudates containing mebendazole. *J Drug Devliv Sci Tec*, 24: 514-518.
6. Szabó P, Kállai-Szabó B, Kállai-Szabó N, Sebe I, Zelkó R. (2014) Preparation of hydroxypropyl cellulose microfibers by high speed rotary spinning and the prediction of fiber forming properties of hydroxypropyl cellulose gels by texture analysis. *Cellulose*, 21: 4419-4427.
7. Szabó P, Kállai-Szabó B, Sebe I, Zelkó R. (2014) Preformulation study of fiber formation and formulation of drug-loaded microfiber based orodispersible tablets for in vitro dissolution enhancement. *Int J Pharm*, 477: 643-649.

8. Szabó B, Sebe I, Kállai N, Süvegh K, Zelkó R. (2013) Comparison of the micro- and macrostructural characteristics of biopolymer cast films. *Eur Polym J*, 49: 2422-2425.
9. Kovács G, Varga D, Sebe I, Hajdú M, Szabó P, Ostorházi E, Antal I. (2015) Korszerű tartósítási módszer fejlesztése magisztrálisan előállítható műkönyhöz. *Acta Pharm Hung*, 85: 139-144.

Összefoglaló közlemények

1. Sebe I, Szabó P, Kállai-Szabó B, Zelkó R. (2015) Incorporating small molecules or biologics into nanofibres for optimized drug release: A review. *Int J Pharm*, 494: 516-530.
2. Sebe I, Kállai-Szabó B, Zelkó R, Szabó D. (2014) Polymers and Formulation Strategies of Nanofibrous Systems for Drug Delivery Application and Tissue Engineering. *Curr Med Chem*, 22: 604-617.
3. Sebe I, Szabó B, Zelkó R. (2012) A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia és gyógyszerészeti alkalmazása. *Acta Pharm Hung*, 82: 23-32.
4. Sebe I, Szabó B, Zelkó R. (2012) Természetes alapú gyógyszerészeti polimerek, kémiai módosításuk lehetőségei és a módosított segédanyagok alkalmazhatósága. *Acta Pharm Hung*, 82: 138-154.
5. Sebe I, Petzke M, Zelkó R, Szabó B. (2013) Nano- és mikroszálás rendszerek előállítása és gyógyszerészeti alkalmazásuk lehetőségei I. *Acta Pharm Hung*, 83: 96-104.