

# Razvoj naprednih in situ gelirajućih sustava za nazalnu primjenu donepezila

---

**Perkušić, Mirna**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:519475>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-09**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Mirna Perkušić

**RAZVOJ NAPREDNIH *IN SITU*  
GELIRAJUĆIH SUSTAVA ZA NAZALNU  
PRIMJENU DONEPEZILA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Mirna Perkušić

**RAZVOJ NAPREDNIH *IN SITU*  
GELIRAJUĆIH SUSTAVA ZA NAZALNU  
PRIMJENU DONEPEZILA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Anita Hafner

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mirna Perkušić

**DEVELOPMENT OF ADVANCED *IN SITU*  
GELLING SYSTEMS FOR NASAL  
DONEPEZIL DELIVERY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. Anita Hafner, Ph.D.

Zagreb, 2023



Doktorski rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anite Hafner. Dio eksperimenata proveden je u tvrtki JGL d. d. i na Zavodu za farmaceutiku i biofarmaceutiku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Kielu (*Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Pharmazeutisches Institut, Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie*). Doktorsko istraživanje provedeno je u sklopu uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod naslovom „Optimiranje depozicije raspršenih *in situ* gelirajućih i praškastih terapijskih sustava u nosnoj šupljini“, voditeljice prof. dr. sc. Anite Hafner (UIP-2017-05-4592), te u sklopu projekta „Razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ (DOK-2020-01-2473) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

## ZAHVALE/ACKNOWLEDGEMENTS

*Za početak, najveće hvala upućujem mentorici, prof. dr. sc. Aniti Hafner. Beskrajno hvala na pruženoj prilici, na svim upućenim savjetima (poslovnim i privatnim), na ogromnom strpljenju, toploj riječi i prijateljskom pristupu. Uz Vaše vodstvo, svaki problem se elegantno riješio i pritom se mnogo toga naučilo. Hvala na ugodnim beskofeinskim kavama i svim naučenim poslovicama. Grijeh je gubiti vrijeme, ali sve je to u redu dok smo u zoni udarca!*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Jeleni Filipović-Grčić na podršci, vedrom pristupu i prilici da radim na prekrasnom Zavodu za farmaceutsku tehnologiju. Hvala svim kolegama sa Zavoda na toploj riječi kad je najviše trebalo, na ugodnim razgovorima i na svim čokoladama i keksićima u kuhinjici. Kolegama iz ureda posebno hvala na svim zabavnim trenutcima koji su uljepšali i najtmurnije dane.*

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Ivi Ugrini i dr. sc. Dragi Špoljariću na pomoći oko statističke analize rezultata te prof. dr. sc. Gordani Matijašić na provedbi pretražne elektronske mikroskopije.*

*Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Cvijeti Jakobišić Brala na ogromnoj pomoći i strpljivom pristupu oko HPLC analize. Također hvala svim djelatnicima Zavoda za fizikalnu kemiju koji su me uvijek dočekali uz toplu riječ i osmijeh.*

*Hvala prof. dr. sc. Regini Scherließ, te doktorandima Marie Trenkel i Cord Kühnlu što su nas ugostili u kišnom ali simpatičnom Kielu, i prenijeli nam svoja bogata znanja o testu iritacije sluznice puža golaća.*

*Veliko hvala Maši Safundžić Kučuk na pomoći s analizom veličine raspršenih kapljica.*

*A mojoj mini mentorici, doktorki Lauri Nižić Nodilo, hvala na svim nutritivnim obrocima prije izlazaka, na 'pomoći' oko jednostavnih matematičkih operacija, na pjevanju hitova po zelenom valu, na bijelim kavama i skeniranju kodova. Vjerujem da je prijateljstvo s tobom jedna od bitnijih stvari u vezi ovog doktorata.*

*Hvala kolegi s 'godine', Josipu Ljubici Džezu, što je ustoličio radio Sljeme u labosu. Al' se zahajca atmosfera kad smo u cajtnotu kekekeke!*

*Cijeloj asistentskoj ekipi s FBF-a, znanstvenicima i ženama u znanosti, hvala na svim kvizovima, domenicama, game-nightovima, glow in the darkovima i pump up the jamovima.*

*Hvala svim mojim prijateljima i cijeloj mojoj obitelji, što me beskrajno uveseljavaju i čine život ljepšim.*

*Hvala Borni na ljubavi i podršci. Od sad pa na dalje, zauvijek tvoj i Bebonjčev dr. sc. Color Picker.*

*Hvala mom bratu Vici što me cijeli život podržava, nasmijava i uveseljava.*

*I za kraj, mama i tata, volim vas, ničeg od ovog ne bi bilo da nema vaše ljubavi. I hvala što ste me naučili voziti bicikl, da nije bilo toga, sve bi ovo potrajalo mnogo duže.*

## SAŽETAK

Alzheimerova bolest (AB) je kronični i progresivni neurodegenerativni poremećaj. Liječenje AB-a trenutno podrazumijeva simptomatsko liječenje demencije pomoću reverzibilnih inhibitora kolinesteraze. U tu skupinu ubraja se donepezil, lijek prvog izbora za AB. Trenutno je donepezil uglavnom dostupan u obliku oralnih tableta, a takav način primjene ima određene nedostatke, poput gastrointestinalnih nuspojava i loše bioraspoloživosti donepezila u mozgu uslijed slabog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Jedan od mogućih načina zaobilaska krvno-moždane barijere je nazalna primjena lijekova. Nazalna primjena omogućava izravnu dostavu lijeka u mozak prvenstveno putem olfaktornog područja i u manjoj mjeri putem respiratornog područja nosne šupljine. Učinkovitost nazalno primijenjenog lijeka uvelike ovisi o profilu nazalne depozicije u ciljano područje, vremenu zadržavanja na mjestu primjene te utjecaju farmaceutskog oblika na oslobađanje lijeka i barijerna svojstva sluznice. U ovom radu razvijeni su napredni *in situ* gelirajući sustavi za nazalnu primjenu donepezila: praškasti *in situ* gelirajući sustav – kitozansko-manitolske mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem korištenjem ultrazvučne sapnice; i tekući *in situ* gelirajući sustav - termoosjetljiva otopina donepezila, kitozana i  $\beta$ -glicerofosfata. Primjenom statističkog dizajna eksperimenta omogućeno je fino ugađanje formulacijskih, procesnih i/ili parametara primjene s ciljem optimiranja ključnih svojstava *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom. Oba razvijena nazalna sustava pokazuju odgovarajući sadržaj donepezila te optimalna reološka svojstva i svojstva raspršivanja, uključujući veličinu čestica/kapljica prikladnu za nazalnu primjenu. Formulacije su optimirane i s obzirom na profil nazalne depozicije, osiguravajući dostavu visokog postotka doze lijeka u olfaktorno područje. Razvijeni farmaceutski oblici pokazuju i poželjna biofarmaceutska svojstva, uključujući biokompatibilnost, mukoadhezivnost, neiritabilnost, produljeno oslobađanje i povećani permeacijski potencijal donepezila, te su zadovoljavajućeg profila stabilnosti. Zaključno, vodeći se načelima kakvoće utemeljene kroz dizajn, razvijeni su napredni *in situ* gelirajući sustavi za nazalnu primjenu donepezila s ugrađenim potencijalom izravne dostave lijeka iz nosne šupljine u mozak. Komplementarni razvoj praškastog i tekućeg sustava omogućio je njihovu usporedbu te predstavlja čvrst temelj za buduća farmakokinetička *in vivo* ispitivanja na animalnim modelima.

Ključne riječi: donepezil, nazalna depozicija, olfaktorno područje, sušenje raspršivanjem, ultrazvučna sapnica, *in situ* gelirajući sustav, kitozan

## SUMMARY

**Introduction:** Alzheimer's disease is a chronic and progressive neurodegenerative disease characterised by memory loss, decline in thinking skills and eventually the ability to carry out daily routine tasks. The main symptom of Alzheimer's disease is dementia. Alzheimer's disease is the most common form of dementia and may contribute to 60 – 70 % of all dementia cases. Currently, the available therapy for Alzheimer's disease is symptomatic treatment. The first drug of choice for the symptomatic treatment of dementia is acetylcholinesterase inhibitor donepezil, which is currently available predominantly in oral solid dosage forms. Donepezil oral delivery is related to several drawbacks such as first pass metabolism, gastrointestinal adverse effects, and low brain delivery efficiency due to low blood-brain barrier penetration. A viable alternative of bypassing the blood-brain barrier is nasal drug administration. Nasal route of administration enables local and systemic drug delivery. Moreover, it is an attractive route of administration for neurological drugs that can be delivered directly from the nasal cavity to the brain, thus circumventing the blood-brain barrier. For efficient delivery of neurological drugs, it is necessary to ensure drug deposition in the olfactory region. The olfactory region of the nasal cavity uniquely provides direct contact of neurons with the external environment, which allows drugs to be directly transported to the brain *via* the olfactory nerve. Also, to a lesser extent, direct nose-to-brain delivery is enabled *via* the trigeminal nerve located in the olfactory and respiratory region of the nasal cavity. Neural nasal drug delivery is characterised by a rapid onset of action, low enzymatic activity and bypass of the gastrointestinal system. The main challenges of nasal drug delivery are related to the complex geometry of the nasal cavity which makes it difficult to deliver the drug to the target area. In addition, the olfactory region is located along the dorsal roof of the nasal cavity and is hindered by the nasal valve, which is the region of the highest airflow resistance. Also, another factor that interferes with the efficient therapeutic outcome of the nasally applied drug is mucociliary clearance. Mucociliary clearance limits the contact time between the drug and the mucosal surface, leading to limited availability of the drug at the site of action. In order to overcome the mentioned obstacles, advanced liquid and powder *in situ* gelling systems are being developed. Liquid *in situ* gelling systems are easy-to-produce platforms that are easily sprayed as a solution and after the deposition at the nasal mucosa they undergo a sol-gel transition in response to certain physiological stimuli (temperature, pH, ionic concentration). Gel formed at the nasal mucosa prolongs retention time and consequently increases drug absorption and bioavailability. Nasal powder *in situ* gelling systems swell in contact with the

nasal mucosa and form a gel, thus prolonging residence time at the site of deposition. Nasal powders offer improved stability profile and increased drug concentration at the nasal mucosa. Also, powders recently demonstrated a higher potential to ensure effective drug olfactory deposition. The most commonly used method for the preparation of nasal powders is spray drying. The aim of this study was to develop powder and liquid *in situ* gelling systems with biopharmaceutical properties and nasal deposition profile suitable for direct nose-to-brain delivery of donepezil. A statistical design of experiments was used to optimise the formulation, process and/or administration parameters with respect to the key properties of the *in situ* gelling systems, including nasal deposition profile. The potential of the developed formulations for efficient and safe delivery of donepezil *via* the olfactory route was compared.

**Methods:** A statistical design of the experiments (DoE) was implemented for the optimisation of the formulation, process and/or administration parameters, with regard to formulation drug content, physicochemical properties and targeted nasal deposition within the 3D-printed nasal cavity model. For the proper selection of appropriate excipients and in order to set suitable design space, thorough preliminary studies were performed. An advanced powder platform for donepezil nose-to-brain delivery was prepared by spray drying of donepezil, chitosan and mannitol aqueous solution. During the spray drying process, ultrasonic nozzle was used to atomise the feed solution in order to fulfill size-related requests for nasal aerosol particles. Donepezil powder formulations were characterised in terms of: drug content, particle size distribution, residual moisture content, swelling properties, flow properties, spray cone angle and *in vitro* nasal deposition profile. An advanced *in situ* gelling liquid system was prepared as a chitosan-based donepezil loaded thermogelling solution using  $\beta$ -glycerophosphate as a gelling agent. Donepezil thermoresponsive liquid formulations were characterised in terms of: pH, zero-shear viscosity, gelation time and temperature, spray cone angle, droplet size distribution and *in vitro* nasal deposition profile. DoE matrix revealed the optimised leading formulation (both for powder and liquid *in situ* gelling formulations) that was further characterised in terms of stability, *in vitro* release (using automated Franz diffusion cells system), *in vitro* biocompatibility and permeability (using Calu-3 cells), *ex vivo* mucoadhesion (using porcine nasal mucosa), and *in vivo* irritability (using slug mucosal irritation assay).

**Results:** Donepezil loaded chitosan/mannitol microspheres as dry powder delivery platform were successfully developed. DoE elucidated how formulation, process and/or administration parameters affected crucial properties of donepezil dry powder platform, in particular its nasal deposition profile. Spray drying process resulted in high process yield. Donepezil loaded

microspheres obtained by DoE were characterised by appropriate drug content, residual moisture content below 10 % and favourable swelling. Fine tuned process and formulation parameters resulted in the production of powders with adequate flow properties (Hausner ratio ranged between  $1.15 \pm 0.06$  and  $1.30 \pm 0.09$ ), appropriate spray cone angle ( $22.5 \pm 0.2$  to  $28.3 \pm 0.9$  °) and a great majority of particles larger than 10 µm ( $D_{v10}$  ranged between  $6.7 \pm 0.4$  –  $11.6 \pm 0.4$  µm). According to the regulatory guidelines for nasal products, the majority of nasal aerosolised particles must be above 10 µm. In this work, the specified criteria was met by using the ultrasonic nozzle in the spray drying process. Several microsphere samples prepared within the DoE matrix resulted in  $D_{v10}$  above 10 µm, confirming the suitability of the ultrasonic nozzle approach to comply with size-related criteria for nasal aerosol particles. Obtained physicochemical properties of the donepezil dry powder platform, coupled with appropriate administration parameters, ensured targeted nasal deposition upon aerosolization. Optimised drug deposition profile resulted in high percentage of the applied dose ( $65.5 \pm 0.2$  %) deposited in the olfactory region. Quality by Design (QbD) approach enabled the selection of the leading donepezil loaded chitosan/mannitol microspheres. The leading formulation showed adequate morphology: microspheres were uniform in size, characterised by spherical shape and smooth surface. Also, the leading donepezil powder formulation showed prominent mucoadhesive properties, prolonged drug release (total drug release in 3 h) and permeation-enhancing properties by reversible opening of tight junctions due to the presence of chitosan and mannitol in the formulation. Biocompatibility was assessed using Calu-3 cell monolayer. Using slug mucosal irritation assay, suitable irritability profile was confirmed: the leading formulation showed no statistical difference in mucus production compared to the negative control. Comprehensive characterisation of the leading donepezil loaded chitosan/mannitol microspheres proved that the formulation fulfilled the needs for efficient brain-targeted delivery.

Liquid *in situ* gelling system for donepezil nose-to-brain delivery was successfully developed as a thermosensitive solution of donepezil, chitosan and β-glycerophosphate. Namely, in the presence of β-glycerophosphate, chitosan-based formulations exhibit thermogelling properties at the temperature of the nasal mucosa. By varying the aforementioned formulation parameters, thermogelling donepezil formulation was optimised regarding formulation viscosity, gelling and spray properties, as well as its nasal deposition profile within the 3D-printed nasal cavity model. DoE matrix generated moderate viscous solutions ( $35.03 \pm 0.82$  -  $232.21 \pm 2.30$  mPa s) that exhibited gelation at the temperature of the nasal mucosa (gelation time ranged between

0.0 ± 0.0 and 14.9 ± 0.2 min; and temperature of instant gelation ranged between 32.2 ± 0.9 and 39.9 ± 0.1 °C). Also, donepezil-loaded thermogelling formulations were characterised by appropriate spray properties (spray cone angle: 15.1 ± 0.3 and 26.6 ± 1.2°; the majority of aerosolised droplets above 10 µm:  $D_{v10}$  ranged between 23.6 ± 1.4 and 72.3 ± 3.2 µm). All observed properties were largely influenced by the concentration of donepezil and chitosan in the system. By coupling administration and formulation parameters, the applied DoE resulted in the olfactory deposition reaching a remarkably high 71.8 ± 0.8 % of the applied dose. Nasal deposition studies revealed the potential of the strategy employed to deliver the effective donepezil dose to the targeted region of the nasal cavity. Guided by the QbD principles, leading donepezil liquid *in situ* gelling formulation was identified. For the optimised formulation no cytotoxic effect was observed at the Calu-3 cell line. In addition, the formulation exhibited prolonged drug release ( $t_{1/2}$  about 90 min), suitable mucoadhesive properties and prominent permeation enhancing effect in relation to the corresponding donepezil solution. Donepezil-loaded chitosan-based thermogelling formulation showed a potential for safe nasal delivery, demonstrated by an acceptable irritability profile obtained in the slug mucosal irritation assay.

Both powder and liquid donepezil *in situ* gelling systems were proven to be easy-to-produce platforms, with suitable stability profiles. Furthermore, both formulations showed optimal physicochemical and biopharmaceutical properties which are of great importance for an efficient donepezil nose-to-brain delivery. Indeed, nasal deposition studies revealed a high olfactory deposition for both systems. The comprehensive complementary approach is beneficial from a patient point of view, where patients have a choice of choosing the preferred type of formulation and thus maximise adherence to the therapy.

**Conclusion:** DoE approach enabled the development of donepezil nasal formulations with built-in quality attributes in a cost and time-saving manner. By fine tuning of the formulation, process and/or administration parameters, the manufacturing process resulted in final powder and liquid advanced donepezil *in situ* gelling formulation of desirable properties. High olfactory deposition for both systems indicates the formulation potential to achieve its desired therapeutic outcome in the central nervous system. The systematic and overall approach to the development of the advanced donepezil nasal systems proposed within this work showed encouraging results that can be a starting point for extending the study to an appropriate *in vivo* model for final proof-of-concept.

**Keywords:** donepezil, nasal deposition, olfactory region, spray drying, ultrasonic nozzle, *in situ* gelling system, chitosan



# SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
1.1	Alzheimerova bolest .....	2
1.1.1	Farmakološka terapija AB-a.....	3
1.1.2	Donepezil.....	4
1.2	Dostava lijekova u središnji živčani sustav .....	5
1.3	Nazalna primjena lijekova .....	8
1.3.1	Anatomija i fiziologija nosne šupljine .....	8
1.3.2	Dostava lijekova iz nosne šupljine u mozak .....	12
1.3.2.1	Olfaktorni put .....	12
1.3.2.2	Trigeminalni put .....	14
1.3.2.3	Sistemska put .....	14
1.3.3	Izazovi u izravnoj dostavi lijeka iz nosne šupljine u SŽS.....	15
1.4	<i>In situ</i> gelirajući sustavi za nazalnu primjenu .....	16
1.4.1	Praškasti <i>in situ</i> gelirajući sustavi.....	16
1.4.1.1	Sastav praškastih sustava .....	17
1.4.1.1.1	Kitozan .....	17
1.4.1.2	Tečenje prašaka .....	19
1.4.1.3	Veličina čestica.....	21
1.4.1.4	Morfologija prašaka .....	21
1.4.1.5	Sadržaj vlage .....	21
1.4.1.6	Metode izrade praškastih sustava .....	22
1.4.1.6.1	Sušenje raspršivanjem.....	22
1.4.1.6.1.1	Ultrazvučna sapnica.....	24
1.4.2	Tekući <i>in situ</i> gelirajući sustavi .....	26
1.4.2.1	Geliranje potaknuto povećanjem temperature.....	26

1.4.2.1.1	Termoosjetljivi <i>in situ</i> gelirajući sustavi kitozana .....	27
1.4.2.2	Reološka svojstva .....	28
1.4.2.2.1	Viskoznost .....	28
1.4.2.2.2	Viskoelastičnost sustava.....	28
1.4.2.3	Veličina raspršenih kapljica .....	29
1.4.3	Zajednička karakterizacija praškastih i tekućih <i>in situ</i> gelirajućih sustava za nazalnu primjenu.....	30
1.4.3.1	Oblik i geometrija raspršenog oblaka .....	30
1.4.3.2	Ispitivanje oslobađanja lijeka <i>in vitro</i> .....	31
1.4.3.3	Ispitivanje nazalne depozicije <i>in vitro</i> .....	31
1.4.3.4	Biofarmaceutska ispitivanja <i>in vitro/ex vivo</i> .....	34
1.4.3.5	Predviđanje iritacijskog potencijala putem testa iritacije puža golaća .....	37
2	OBRAZLOŽENJE TEME .....	39
3	MATERIJALI I METODE.....	42
3.1	MATERIJALI.....	43
3.2	METODE .....	44
3.2.1	Mikrosfere kao praškasti <i>in situ</i> gelirajući sustavi s donepezilom .....	44
3.2.1.1	Preliminarna istraživanja u razvoju mikrosfera s donepezilom .....	44
3.2.1.2	Statistički dizajn eksperimenata u razvoju mikrosfera s donepezilom .....	45
3.2.1.3	Priprema mikrosfera s donepezilom .....	47
3.2.1.4	Određivanje sadržaja donepezila u mikrosferama .....	48
3.2.1.5	Određivanje raspodjele veličina mikrosfera s donepezilom .....	49
3.2.1.6	Određivanje sadržaja ostatne vlage u mikrosferama s donepezilom .....	49
3.2.1.7	Ispitivanje bubrenja mikrosfera s donepezilom.....	49
3.2.1.8	Ispitivanje svojstava tečenja mikrosfera s donepezilom.....	50
3.2.1.9	Određivanje kuta raspršenja mikrosfera s donepezilom.....	51
3.2.1.10	Određivanje profila nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom <i>in vitro</i>	

3.2.2	Termoosjetljive otopine kao tekući <i>in situ</i> gelirajući sustavi s donepezilom....	54
3.2.2.1	Preliminarna istraživanja termoosjetljivih otopina donepezila .....	54
3.2.2.2	Statistički dizajn eksperimenata u razvoju termoosjetljivih otopina donepezila	55
3.2.2.3	Priprema termoosjetljivih otopina donepezila.....	56
3.2.2.4	Određivanje koncentracije donepezila u termoosjetljivim otopinama .....	57
3.2.2.5	Reološka karakterizacija termoosjetljivih otopina donepezila .....	57
3.2.2.5.1	Određivanje viskoznosti u mirovanju .....	58
3.2.2.5.2	Test promjene amplitude .....	58
3.2.2.5.3	Test vremena geliranja .....	59
3.2.2.5.4	Test promjene temperature .....	59
3.2.2.6	Određivanje raspodjele veličina raspršenih kapljica termoosjetljivih otopina donepezila	59
3.2.2.7	Određivanje kuta raspršenja termoosjetljivih otopina donepezila.....	60
3.2.2.8	Određivanje profila nazalne depozicije termoosjetljivih otopina donepezila <i>in vitro</i>	60
3.2.3	Detaljna karakterizacija vodećeg praškastog i tekućeg <i>in situ</i> gelirajućeg sustava s donepezilom .....	61
3.2.3.1	Ispitivanje profila oslobađanja donepezila <i>in vitro</i> .....	61
3.2.3.2	Ispitivanje mukoadhezivnosti <i>ex vivo</i> .....	63
3.2.3.3	Ispitivanje biokompatibilnosti i permeabilnosti <i>in vitro</i> .....	66
3.2.3.3.1	Uvjeti uzgoja stanica .....	66
3.2.3.3.2	Ispitivanje biokompatibilnosti <i>in vitro</i> .....	67
3.2.3.3.3	Ispitivanje permeabilnosti <i>in vitro</i> .....	68
3.2.3.4	Test iritacije sluznice puža golaća <i>in vivo</i> .....	70
3.2.3.5	Ispitivanje morfoloških svojstava praškastih sustava s donepezilom.....	71
3.2.3.6	Ispitivanje stabilnosti .....	72
3.2.4	Kvantitativno određivanje donepezila .....	72

3.2.5	Statistička obrada rezultata.....	73
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	74
4.1	Razvoj mikrosfera kao praškastog <i>in situ</i> gelirajućeg sustava s donepezilom.....	75
4.1.1	Rezultati preliminarnih istraživanja u razvoju mikrosfera s donepezilom.....	76
4.1.2	DoE – Optimizacija mikrosfera s donepezilom za nazalnu primjenu.....	82
4.1.2.1	Iskorištenje procesa pripreme mikrosfera s donepezilom sušenjem raspršivanjem .....	88
4.1.2.2	Sadržaj vlage u mikrosferama s donepezilom .....	88
4.1.2.3	Stupanj bubrenja mikrosfera s donepezilom .....	88
4.1.2.4	Raspodjela veličina mikrosfera s donepezilom .....	89
4.1.2.5	Svojstva tečenja mikrosfera s donepezilom .....	90
4.1.2.6	Kut raspršenja mikrosfera s donepezilom .....	91
4.1.2.7	Profil nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom <i>in vitro</i> .....	92
4.1.2.7.1	Olfaktorna depozicija mikrosfera s donepezilom .....	93
4.1.2.7.2	Turbinatna depozicija mikrosfera s donepezilom.....	94
4.1.3	Odabir vodećih mikrosfera s donepezilom.....	96
4.1.4	Detaljna karakterizacija vodećih mikrosfera s donepezilom.....	97
4.1.4.1	Morfologija vodećih mikrosfera s donepezilom.....	97
4.1.4.2	Profil oslobađanja donepezila iz vodećih mikrosfera <i>in vitro</i> .....	98
4.1.4.3	Mukoadezivnost vodećih mikrosfera s donepezilom <i>ex vivo</i> .....	100
4.1.4.4	Biokompatibilnost vodećih mikrosfera s donepezilom <i>in vitro</i> .....	102
4.1.4.5	Permeabilnost donepezila iz vodećih mikrosfera <i>in vitro</i> .....	103
4.1.4.6	Iritacija sluznice puža golaća nakon izlaganja vodećim mikrosferama s donepezilom <i>in vivo</i> .....	107
4.1.4.7	Stabilnost vodećih mikrosfera s donepezilom.....	110
4.2	Razvoj termoosjetljive otopine kao tekućeg <i>in situ</i> gelirajućeg sustava s donepezilom	

4.2.1	Rezultati preliminarnih istraživanja u razvoju termoosjetljive otopine donepezila	113
4.2.2	DoE – Optimizacija termoosjetljive otopine donepezila za nazalnu primjenu	117
4.2.2.1	Reološka svojstva i svojstva raspršenja termoosjetljive otopine donepezila	122
4.2.2.1.1	Regressijski modeli.....	123
4.2.2.1.2	Utjecaj koncentracije kitozana.....	124
4.2.2.1.3	Utjecaj koncentracije donepezila .....	125
4.2.2.2	Profil nazalne depozicije termoosjetljive otopine donepezila <i>in vitro</i> .....	126
4.2.2.2.1	Olfaktorna depozicija termoosjetljive otopine donepezila .....	126
4.2.2.2.2	Turbinatna depozicija termoosjetljive otopine donepezila.....	128
4.2.3	Odabir vodeće termoosjetljive otopine donepezila.....	130
4.2.4	Detaljna karakterizacija vodeće termoosjetljive otopine donepezila.....	130
4.2.4.1	Profil oslobađanja donepezila iz vodeće termoosjetljive otopine <i>in vitro</i>	130
4.2.4.2	Mukoadhezivnost vodeće termoosjetljive otopine donepezila <i>ex vivo</i> ....	133
4.2.4.3	Biokompatibilnost vodeće termoosjetljive otopine donepezila <i>in vitro</i> ..	135
4.2.4.4	Permeabilnost donepezila iz vodeće termoosjetljive otopine <i>in vitro</i> .....	136
4.2.4.5	Iritacija sluznice puža golaća nakon izlaganja vodećoj termoosjetljivoj otopini donepezila <i>in vivo</i> .....	139
4.2.4.6	Stabilnost vodeće termoosjetljive otopine donepezila .....	140
4.3	Usporedba vodećeg praškastog i tekućeg <i>in situ</i> gelirajućeg sustava s donepezilom	141
5	ZAKLJUČCI .....	144
5.1	Kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom kao praškasti <i>in situ</i> gelirajući sustavi .....	145
5.2	Termoosjetljiva otopina donepezila kao tekući <i>in situ</i> gelirajući sustav .....	145
5.3	Prednosti primijenjenog pristupa u razvoju naprednih <i>in situ</i> gelirajućih sustava s donepezilom .....	146

6	LITERATURA .....	147
7	ŽIVOTOPIS.....	217

## POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

®	registrirani trgovački znak
°	stupanj
°C	celzijev stupanj
3D	trodimenzionalni
3R	koncept poboljšanja, smanjenja i zamjene uporabe laboratorijskih životinja (engl. <i>refinement, reduction and replacement</i> )
A	apsorbancija
Å	angstrem
A549	humana stanična linija adenokarcinoma bazalnog epitela alveola
AAH	kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu (engl. <i>angle of administration from the horizontal plane</i> )
AB	Alzheimerova bolest
ALI	engl. <i>air-liquid interface</i>
AUC	površina ispod krivulje (engl. <i>area under curve</i> )
BAC	bezalkonijev klorid
BBB	krvno-moždana barijera (engl. <i>blood-brain barrier</i> )
BEAS-2B	humana stanična linija epitela pluća
BW	masa puža (engl. <i>body weight</i> )
<i>c</i>	koncentracija
Caco-2	humana stanična linija adenokarcinoma kolona
Calu-3	humana stanična linija adenokarcinoma pluća
CFD	računalna simulacija dinamike fluida (engl. <i>computational fluid dynamics</i> )
CMA	kritična svojstva sastavnica (engl. <i>critical material attributes</i> )
CP	vrijeme kontakta (engl. <i>contact period</i> )
CP50	mjerni sustav stožac-ploča (engl. <i>cone plate</i> )
CPP	kritični procesni parametri (engl. <i>critical process parameters</i> )
CQA	kritična svojstva kvalitete (engl. <i>critical quality attributes</i> )
CSF	cerebrospinalna tekućina (engl. <i>cerebrospinal fluid</i> )
CT	računalna tomografija (engl. <i>computed tomography</i> )
D	donepezil
D/C	kitozanske mikrosfere s donepezilom
D/C/M	kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom
Da	dalton
DC	sadržaj lijeka (engl. <i>drug content</i> )

D-C- $\beta$ -GP	termoosjetljiva otopina donepezila, kitozana i $\beta$ -glicerofosfata
$D_{\max}$	maksimalni promjer raspršenog oblaka spreja
DMEM-F12	Dulbeccov medij za uzgoj stanica (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )
$D_{\min}$	minimalni promjer raspršenog oblaka spreja
DoE	statistički dizajn eksperimenata (engl. <i>design of experiments</i> )
$dQ/dt$	brzina difuzije (fluks)
$D_{v10}, D_{v50}, D_{v90}$	volumni promjeri, promjer čestica od kojeg manje čestice zauzimaju navedeni postotak ukupnog volumena uzorka
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EMA	Europska agencija za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i> )
$f_2$	faktor sličnosti
FBS	fetalni goveđi serum (engl. <i>foetal bovine serum</i> )
FDA	Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. <i>US Food and Drug Administration</i> )
FDM	tehnologija taložnog očvršćivanja (engl. <i>fused deposition modeling</i> )
$F_{\max}$	maksimalna sila
FPS	postavka peristaltičke pumpe za dovođenje uzorka (engl. <i>feed pump setting</i> )
g	gram
$G'$	modul pohrane (engl. <i>storage modulus</i> )
$G''$	modul gubitka (engl. <i>loss modulus</i> )
GRAS	tvari prepoznate kao sigurne za korištenje (engl. <i>generally recognized as safe</i> )
h	sat
HBSS	Hankova uravnotežena otopina soli (engl. <i>Hank's balanced salt solution</i> )
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-1-etansulfonska kiselina
HMW	visokomolekulski kitozan (engl. <i>high molecular weight chitosan</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HR	Hausnerov omjer (engl. <i>Hausner ratio</i> )
ICH	Međunarodna konferencija o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju humanih lijekova (engl. <i>International Conference on Harmonisation</i> )
IFR	protok udahnutog zraka (engl. <i>inspiratory flow rate</i> )
J	džul
L	litra
LDH	laktat dehidrogenaza



LMW	niskomolekulski kitozan (engl. <i>low molecular weight chitosan</i> )
LOD	limit detekcije (engl. <i>limit of detection</i> )
LOQ	limit kvantifikacije (engl. <i>limit of quantification</i> )
LVE	linearno viskoelastično područje (engl. <i>linear viscoelastic range</i> )
<i>m</i>	masa
m	metar
M	manitol
MC	sadržaj vlage (engl. <i>moisture content</i> )
MDR-MDCKII	epitelne stanice bubrega psa s izraženim genom za višestruku otpornost stanica (engl. <i>multi drug resistance genes – Madin-Darby canine kidney</i> )
min	minuta
MMW	srednjemolekulski kitozan (engl. <i>medium molecular weight chitosan</i> )
MRI	snimka dobivena magnetskom rezonancijom (engl. <i>magnetic resonance imaging</i> )
Ms	prosijani manitol
Msd	manitol sušen raspršivanjem
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NFT	neurofibrilarna petlja (engl. <i>neurofibrillary tangle</i> )
NICE	Nacionalni institut za zdravlje i kliničku izvrsnost (engl. <i>National Institute for Health and Clinical Excellence</i> )
NK	negativna kontrola
NMDA	N-metil-D-aspartat
O	otopina
OD	olfaktorna depozicija
Pa	paskal
$P_{app}$	prividni koeficijent permeabilnosti (engl. <i>apparent permeability coefficient</i> )
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
pH	vrijednost pH, negativni logaritam množinske koncentracije vodikovih iona u otopini
Ph. Eur.	Europska farmakopeja
$pK_a$	negativni logaritam kiselinske disocijacijske konstante
PP50	mjerni sustav paralelnih ploča (engl. <i>parallel plate</i> )
PRESS	predviđeni zbroj kvadrata rezidualne pogreške (engl. <i>predicted residual error sum of squares</i> )
$Q$	udio oslobođenog lijeka u jedinici vremena
QbD	kakvoća utemeljena kroz dizajn (engl. <i>Quality by Design</i> )

QTPP	ključni cilj razvoja formulacije (engl. <i>quality target product profile</i> )
R	polumjer
R <sup>2</sup>	koeficijent determinacije
rad	radijan
RMSE	korijen srednje kvadratne pogreške (engl. <i>root mean square error</i> )
RPMI-2650	humana stanična linija adenokarcinoma septuma
RSD	relativna standardna devijacija
RT	vrijeme mirovanja (engl. <i>resting time</i> )
s	sekunda
SCA	kut raspršenja (engl. <i>spray cone angle</i> )
SD	standardna devijacija
SEM	pretražna elektronska mikroskopija (engl. <i>scanning electron microscopy</i> )
SIB	osjećaj bockanja, svrbeži i žarenja (engl. <i>stinging, itching and burning sensation</i> )
SMI	test iritacije sluznice puža golaća (engl. <i>slug mucosal irritation</i> )
SNF	simulirani nosni fluid
span	raspon veličina kapljica
SŽS	središnji živčani sustav
t	vrijeme
t <sub>1/2</sub>	vrijeme potrebno za oslobađanje 50 % lijeka uklopljenog u farmaceutski oblik
TD	turbinatna depozicija
TEER	transepitelni električni otpor (engl. <i>transepithelial electrical resistance</i> )
t <sub>GEL</sub>	vrijeme geliranja
T <sub>GEL</sub>	temperatura geliranja
T <sub>in</sub>	temperatura ulaznog zraka
TJ	tijesni spojevi (engl. <i>tight junctions</i> )
TKF	tekuća kontrolna formulacija
TM	ukupna izlučena sluz (engl. <i>total mucus production</i> )
TVF	tekuća vodeća formulacija
UDSP	monodozirni nazalni uređaj UDS Powder (engl. <i>Unit Dose System Powder</i> )
V	volumen
V <sub>SNF</sub>	volumen SNF-a apsorbiranog po miligramu kitozana u praškastom uzorku
W <sub>ad</sub>	maksimalni rad adhezije
WST	topljiva tetrazolijeva sol (engl. <i>water-soluble tetrazolium salt</i> )
β-GP	dinatrijev β-glicerofosfat pentahidrat

$\eta_0$

viskoznost u mirovanju

# **1 UVOD**

## 1.1 Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) jedan je od najraširenijih neurodegenerativnih poremećaja u svijetu. Glavni simptom AB-a je demencija. Prema izvještaju Svjetske zdravstvene organizacije za 2022. godinu na svijetu trenutno 55 milijuna ljudi pati od simptoma demencije, a zbog ubrzanog starenja populacije broj oboljelih bi do 2050. mogao narasti na 139 milijuna (1). Demencija je svrstana u sedmi po redu uzrok smrtnosti u svijetu (2), a procijenjeno je da trenutno u Republici Hrvatskoj oko 100 000 ljudi pati od simptoma demencije (3). AB uzrokuje 60 – 70 % svih slučajeva demencije (1).

Kod pacijenata s AB-om uočava se postupno slabljenje kognitivnih funkcija. Postupni pad spoznajnih funkcija pacijenta popraćen je psihičkim simptomima i fizičkim propadanjem, što dovodi do nepokretnosti pacijenta i, u konačnici, do potrebe za cjelodnevnom skrbi i nadzorom (4). Uzrok smrti najčešće je malnutricija, sekundarne infekcije, plućna embolija ili srčane bolesti (3). Tijek AB-a dijeli se na tri stadija: blagi, umjereni i teški stadij. Kod blagog stadija održana je funkcionalnost u izvršavanju svakodnevnih aktivnosti, no javljaju se gubitak recentnog pamćenja, smanjenje koncentracije i poteškoće pri kompleksnim kognitivnim funkcijama. U pacijenata u umjerenom stadiju bolesti zamjetno je značajnije oštećenje kognitivnih funkcija: pacijentima je povremeno potrebna tuđa pomoć i nadzor, vidljive su promjene u ponašanju, pacijenti su dezorijentirani i često pate od nesanice. Pacijenti u teškom stadiju bolesti su u potpunosti ovisni o tuđoj skrbi, najčešće su nepokretni i podložni su sekundarnim infekcijama (5). Čimbenici rizika za razvoj AB-a su: pozitivna obiteljska anamneza, uznapredovala životna dob, ženski spol, faktori rizika za cerebrovaskularne bolesti (povišeni krvni tlak, šećerna bolest, pretilost, pušenje) te slaba intelektualna aktivnost za vrijeme života (6).

Patofiziološki procesi AB-a uključuju nakupljanje  $\beta$ -amiloidnih plakova i hiperfosforiliranih  $\tau$  proteina (7).  $\beta$ -amiloidni proteini nastaju proteolizom amiloidnih prekursorskih proteina, te nakupljanjem tvore senilne plakove. Povećani broj i međusobno ispreplitanje plakova toksično djeluju na sinapsu i neurone te rezultiraju staničnom smrću neurona, gubitkom sinapsi i posljedičnim manjkom neurotransmitera (7).

U fiziološkim uvjetima,  $\tau$  protein nije hiperfosforiliran i kao takav je sastavni dio mikrotubula aksona koji je bitan za normalno funkcioniranje neurona. Abnormalna hiperfosforilacija  $\tau$  proteina rezultira njegovim nakupljanjem u unutarstaničnim agregatima zvanim neurofibrilarnim petljama (engl. *neurofibrillary tangles*, NFT) (8). Uloga NFT-a u

neurodegenerativnom procesu nije do kraja razjašnjena: smatra se da pretjerana fosforilacija povećava aktivnost glija stanica što rezultira neuroupalnim procesima i propadanjem neurona (9).

Oba patofiziološka procesa uzrokuju gubitak sinapsi što rezultira oštećenjem kognitivnih funkcija AB pacijenata (10). Navedene patološke promjene prvo se pojavljuju u bazalnom dijelu prednjeg mozga. Taj dio mozga je glavno mjesto proizvodnje neurotransmitera acetilkolina i time primarni izvor kolinergičke inervacije moždane kore, hipokampusa i amigdale. Navedena područja imaju ključnu ulogu u obradi informacija, pamćenju i održavanju pažnje (11). Oštećenje kognitivnih funkcija AB pacijenata proizlazi iz kolinergičkog deficita uzrokovanog neurodegenerativnim promjenama frontalnih regija mozga (12). Stvaranje senilnih plakova i NFT-a rezultira povećanom ekspresijom enzima acetilkolinesteraze, tako dodatno smanjujući količinu acetilkolina u sinapsi (13).

### **1.1.1 Farmakološka terapija AB-a**

Lijekovi za liječenje AB-a dijele se na dvije skupine: lijekovi koji liječe simptome bolesti i lijekovi koji mijenjaju tijek bolesti (14). U lijekove koji mijenjaju tijek bolesti ubrajaju se aducanumab i lecanemab, monoklonska antitijela koja smanjuju broj  $\beta$ -amiloidnih plakova (15). Trenutno su ti lijekovi dozvoljeni za uporabu samo na području Sjedinjenih Američkih Država. Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *US Food and Drug Administration*, FDA) je odobrila korištenje aducanumaba u lipnju 2021. (16), a lecanemaba u siječnju 2023. godine (17).

Lijekovi koji se koriste u liječenju simptoma AB-a usmjereni su na povećanje kolinergične aktivnosti, upravo zbog oštećenja kolinergičnog sustava i deficita acetilkolina. Simptomatska terapija ima za cilj poboljšati kognitivne funkcije pacijenta i ublažiti simptome demencije. Simptomatsko liječenje preporučljivo je započeti u što ranijim fazama bolesti (15).

U liječenju kognitivnih simptoma AB-a razlikuju se dvije vrste lijekova: inhibitori acetilkolinesteraze i antagonist N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora. Inhibitori acetilkolinesteraze povećavaju razinu acetilkolina u sinapsi te na taj način povećavaju kolinergičnu aktivnost te poboljšavaju pamćenje i pažnju pacijenata.

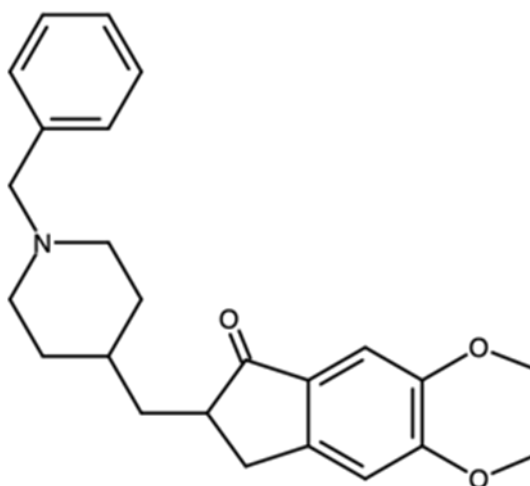
U AB-u je povećana aktivnost NMDA receptora, što dovodi do povišenih razina neurotransmitera glutamata. Povišene razine glutamata rezultiraju disfunkcijom neurona i u konačnici staničnom smrću neurona. Memantin kao nekompetitivni antagonist NMDA

receptora modulira učinke povišenih razina glutamata, te na taj način djeluje neuroprotektivno (18).

Smjernice Nacionalnog instituta za zdravstvo i kliničku izvrsnost (engl. *National Institute for Health and Clinical Excellence*, NICE) preporučuju inhibitore acetilkolinesteraze kao prvu liniju za liječenje blagog i umjerenog AB-a (19). Terapija inhibitorima acetilkolinesteraze usporava progresiju bolesti te produljuje razdoblje do potpune ovisnosti bolesnika o skrbi. U tu skupinu lijekova ubrajaju se donepezil, galantamin i rivastigmin, a u Hrvatskoj su odobreni donepezil i rivastigmin (15,20). Prema hrvatskim smjericama primjene antidementnih lijekova u liječenju AB-a, prva linija terapije je lijek donepezil (21). U slučaju lošeg terapijskog odgovora na donepezil, pacijentu se propisuje rivastigmin. Liječenje memantinom preporučeno je u slučaju težeg stadija bolesti ili u slučaju lošeg terapijskog ishoda inhibitorima acetilkolinesteraze (22).

### 1.1.2 Donepezil

Donepezil (Slika 1.) je selektivni i nekompetitivni inhibitor acetilkolinesteraze. Donepezil se preko anionskog veznog mjesta na indolnom prstenu veže na enzim, te mu na taj način smanjuje aktivnost (23). Inhibicijom acetilkolinesteraze povećava koncentraciju acetilkolina u sinapsi, te stimulira kolinergičnu transmisiju zaduženu za kognitivne funkcije učenja i pamćenja (24).



**Slika 1.** Kemijska struktura donepezila. Slika je izrađena pomoću programa Marvin JS (ChemAxon Ltd., Mađarska).

Osim inhibicije acetilkolinesteraze, ispituje se i mogući utjecaj donepezila na smanjenje nakupljanja  $\beta$ -amiloidnih plakova, smanjenje koncentracije izvanstaničnog glutamata,

povećanje prokrvljenosti cerebralnog korteksa, ublažavanje posljedica oksidativnog stresa i povećanje broja nikotinskih receptora u moždanoj kori i hipokampusu (25). Zbog spomenutih neuroprotektivnih učinaka, istražuje se uloga donepezila u terapiji Downovog sindroma, shizofrenije, poremećaja govora u djece s autizmom te u terapiji poremećaja spavanja (26–28).

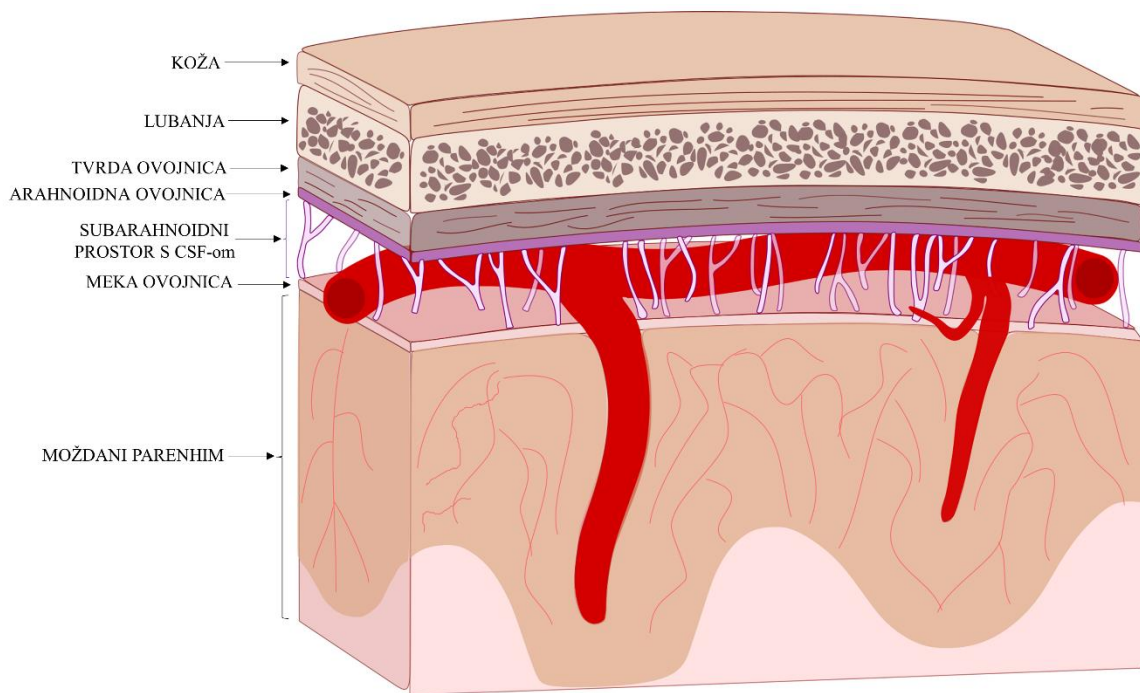
Iako je transdermalni flaster s donepezilom odobren 2022. od strane FDA (29), donepezil se u većini slučajeva primjenjuje oralno. U Hrvatskoj su za uporabu dostupne filmom obložene tablete i raspadljive tablete za usta (20). Zbog relativno dugog vremena polueliminacije (70 – 80 h), donepezil se primjenjuje jedan put dnevno (23). Liječenje počinje dnevnom dozom od 5 mg, a nakon mjesec dana terapije i procjene stanja bolesnika, doza se može povećati na 10 mg (22). Moguće je povećati dozu na 23 mg dnevno u pacijenata kod kojih je utvrđen teški stadij bolesti, te kod kojih se nakon tri mjeseca terapije u dozi 10 mg simptomi ne poboljšavaju (30).

Donepezil se općenito dobro podnosi (31), a nuspojave koje se javljaju su kolinergične prirode i uključuju: gastrointestinalne smetnje (proljevi, zatvor, mučninu, povraćanje, bolove u abdomenu), grčeve u mišićima, umor i nesanicu (20). Budući da je terapija donepezilom dugotrajna, a intenzivnije nuspojave javljaju se primjenom većih doza, one mogu značajno smanjiti kvalitetu života te utjecati na suradljivost pacijenata (32). Nadalje, oralnom primjenom donepezila postiže se mala bioraspoloživost lijeka u mozgu, jer lijek mora proći kroz kompleksni i čvrsto postavljeni sustav zaštitnih barijera mozga da bi došao na ciljano mjesto djelovanja (14,33).

## **1.2 Dostava lijekova u središnji živčani sustav**

Dostava lijekova u središnji živčani sustav (SŽS) otežana je uslijed brojnih zaštita i barijera (34,35). Mozak je od oštećenja zaštićen lubanjom, a leđna moždina kralježnicom. Osim lubanje, mozak štite i tri zaštitne moždane ovojnice: tvrda ovojnica (lat. *dura mater*), arahnoidna ovojnica (lat. *arahnoidna mater*) i meka ovojnica (lat. *pia mater*) (Slika 2.) (36).

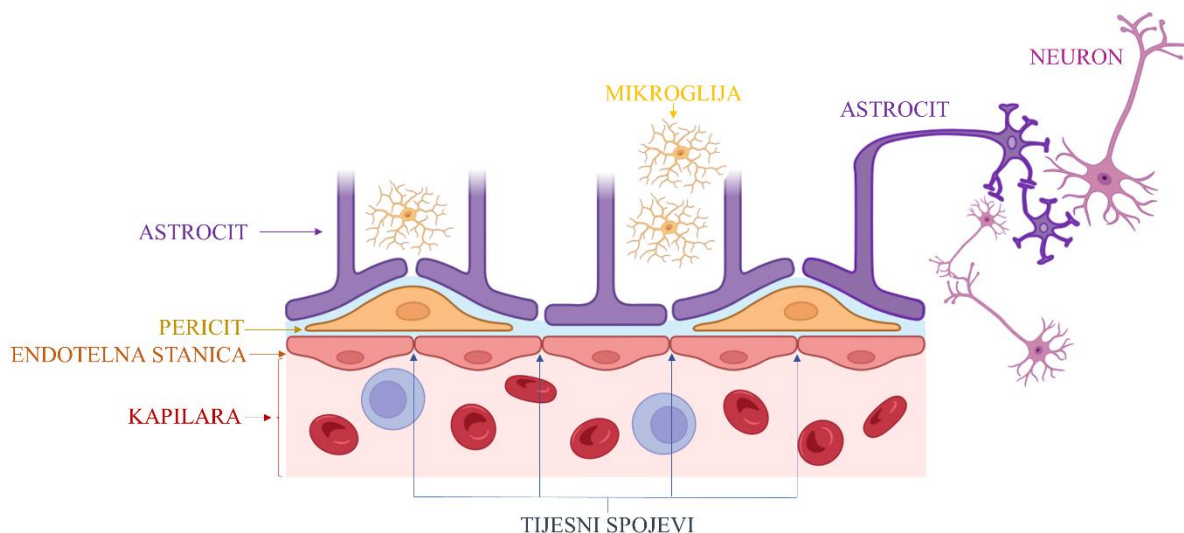




**Slika 2.** Zaštitne barijere mozga: tvrda ovojnica, arahnoidna ovojnica i meka ovojnica, uz prikaz subarahnooidnog prostora s cerebrospinalnom tekućinom (engl. *cerebrospinal fluid*, CSF). Slika je izrađena po uzoru na Ampie i McGavern (2022) te Djupesland i sur. (2014) (35,37) pomoću programa Inkscape (Inkscape.com, SAD).

Između arahnoidne i meke ovojnice nalazi se subarahnooidni prostor koji je ispunjen cerebrospinalnom tekućinom (engl. *cerebrospinal fluid*, CSF) (38). Dvije fiziološke barijere odvajaju mozak od sistemske cirkulacije: krvno-moždana barijera (engl. *blood-brain barrier*, BBB) i barijera između krvi i CSF-a (34). Treba naglasiti da mjera prolaska tvari iz CSF-a u krv nije mjera propustljivosti BBB-a: tvari iz CSF-a lako prelaze u krv, ali će teško iz krvi prijeći u moždani parenhim. To dokazuje i transepitelni električni otpor tih barijera: za barijeru između krvi i CSF-a on iznosi  $26 \Omega \text{ cm}^2$ , a za BBB iznosi  $8000 \Omega \text{ cm}^2$  (39).

BBB je prva barijera između promjenjivog okoliša krvi i SŽS-a. Ta čvrsta membranska barijera sačinjena je endotelnih stanica kapilara koje su međusobno spojene vrlo čvrstim tijesnim spojevima (engl. *tight junctions*, TJ) u svrhu održanja integriteta mikrokrvožilja mozga. Osim kapilara, neurovaskularnu jedinicu BBB-a čine periciti, astrociti, neuroni i stanice mikroglije (Slika 3.) (40).



**Slika 3.** Neurovaskularna jedinica krvno-moždane barijere. Slika je izrađena po uzoru na Chen i Liu (2012) (41) pomoću programa BioRender (BioRender.com, Kanada) i Inkscape (Inkscape.com, SAD).

BBB regulira homeostazu SŽS-a strogo kontrolirajući prijelaz malih endogenih i egzogenih tvari iz krvi u mozak: propušta tvari koje su potrebne za obavljanje fizioloških metaboličkih funkcija, a sprječava prolaz potencijalno štetnih tvari koje se nalaze u krvi (40). Selektivni prolaz egzogenih tvari dokazuje i činjenica da 98 % lijekova koji su male molekule ne prolazi kroz BBB, a za lijekove koji su makromolekule taj postotak iznosi 100 % (34). Upravo zbog velike selektivnosti BBB-a za veliki broj bolesti SŽS-a ne postoji učinkovita farmakoterapija (14). Nepostojanje učinkovite farmakoterapije nije nužno zbog nedostatka odgovarajućih lijekova: za brojne neurološke bolesti poznati su patofiziološki mehanizmi i postoje odgovarajući lijekovi, no molekule tih lijekova ne mogu proći BBB u količini dovoljnoj za postizanje učinkovite terapijske koncentracije. U slučaju oralne i parenteralne primjene neuroloških lijekova, potrebno je primijeniti relativno veliku dozu lijeka kako bi se postigla učinkovita koncentracija lijeka u SŽS-u, no s velikim dozama javljaju se i sistemske nuspojave (14).

Iz svega navedenog, razvidno je da BBB ima ključnu ulogu u zaštiti mozga, no također predstavlja veliku prepreku u liječenju bolesti SŽS-a. Zbog toga se istražuju i razvijaju nove metode i tehnologije koje omogućuju učinkovito premošćivanje BBB-a u svrhu liječenja neuroloških bolesti.

Invazivni načini dostave lijeka u SŽS uključuju intratekalni, intraventrikularni i intracerebralni put primjene (34). Glavno ograničenje takve primjene leži upravo u njezinoj invazivnosti, ali i mogućnosti razvoja ozbiljnih nuspojava (42). Brojne su strategije unaprjeđenja neinvazivnih načina dostave lijeka u SŽS. Primjerice, kemijskom modifikacijom lijeka, tvorbom prolijeka i konjugata lijek-protutijelo ili lijek-ligand, razvojem novih terapijskih (nano)sustava, uključujući inovativne liposomske i polimerne terapijske sustave s pospješivačima apsorpcije, moguće je poboljšati transport lijeka kroz BBB (paracelularnim, transcelularnim ili aktivnim prijenosom) u moždani parenhim (40). Unaprijeđenim transportom osigurana je učinkovita terapijska koncentracija na ciljanoj mjestu djelovanja lijeka (34,40). Jedan od načina dostave lijeka u SŽS je potpuni zaobilazak restriktivnog BBB-a, odnosno izravna dostava lijeka u mozak, što je moguće postići nazalnom primjenom lijeka.

### **1.3 Nazalna primjena lijekova**

Nazalna primjena uobičajen je način primjene lijekova za liječenje lokalnih oboljenja nosne sluznice i paranazalnih sinusa, poput alergijskog rinitisa i sinusitisa (43). Osim u svrhu lokalnog djelovanja, nazalna primjena predstavlja i alternativni put sistemske dostave lijeka uslijed velike prokrvljenosti i velike apsorpcijske površine nosne sluznice. Takav način primjene osigurava brzu apsorpciju i početak djelovanja lijeka te zaobilazanje probavnog sustava i metabolizma prvog prolaska kroz jetru (43).

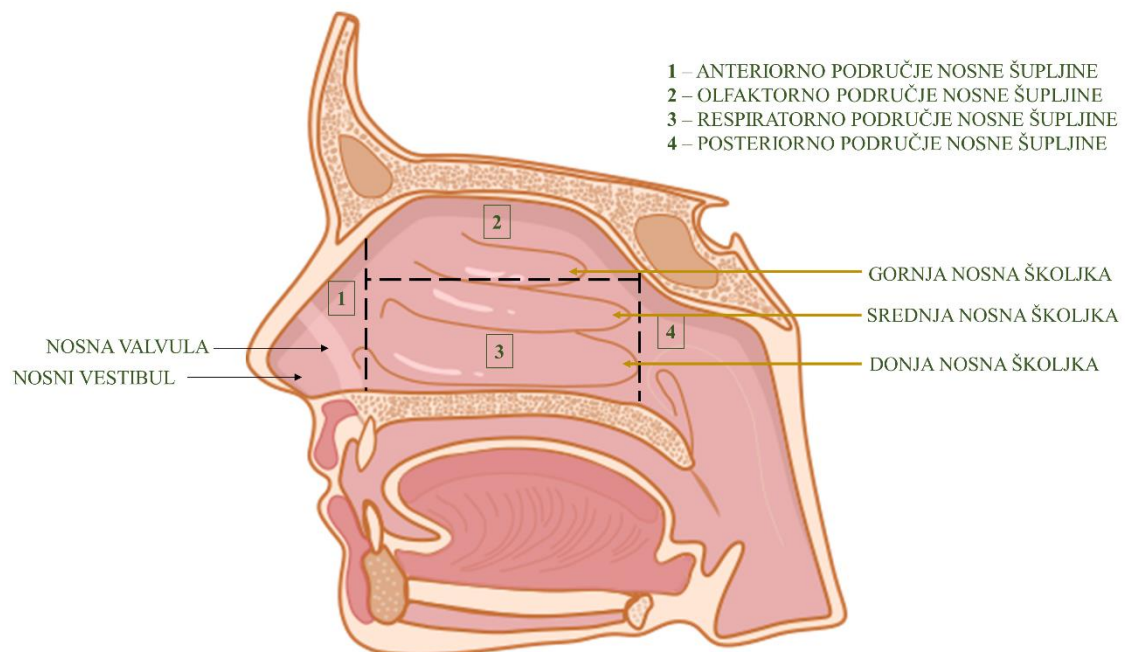
Nadalje, nazalnom primjenom moguća je i izravna dostava lijekova u SŽS (44). Krov nosne šupljine nalazi se u neposrednoj blizini mozga (baze lubanje) te sadrži ogranke olfaktornog i trigeminalnog živca koji prodiru u mozak (37). Ovim načinom primjene, zaobilazi se BBB jer je dostava lijekova osigurana putem navedenih živaca nosne šupljine (44). Nazalna primjena neuroloških lijekova jednostavna je i neinvazivna, što u konačnici rezultira povećanom suradljivošću pacijenta te poboljšanim terapijskim ishodom (45). Za razumijevanje puta prijenosa lijekova iz nosne šupljine u mozak, bitno je poznavati specifične anatomske i histološke značajke nosne šupljine.

#### **1.3.1 Anatomija i fiziologija nosne šupljine**

Nos je početni dio respiratornog trakta. Osim respiratornih funkcija, te vlaženja, grijanja i čišćenja udahnutog zraka, nos je odgovoran i za osjet njuha (46). Pojam „nos“ obuhvaća tri anatomske cjeline: vanjski nos, nosnu šupljinu i paranazalne sinuse (47). Nos je nosnom pregradom, ili septumom, podijeljen na dvije polovice – lijevu i desnu stranu. Vanjski nos je piramidalna struktura smještena u sredini lica, sačinjena od nosne kosti i hrskavice.

Korijen nosa je mjesto gdje vanjski nos prelazi u liniju čela, a baza nosa je dio vanjskog nosa koji je okrenut prema gornjoj usni. Na bazi nosa nalaze se dva otvora – nosnice (48).

Nosna šupljina dugačka je 12 – 14 cm, visoka otprilike 5 cm, a proteže se od krova usne šupljine do baze lubanje. Ukupni volumen iznosi od 15 do 20 mL, a ukupna površina nosne šupljine je 150 do 200 cm<sup>2</sup> (49). Nosna šupljina dijeli se na nosni vestibul te pravu nosnu šupljinu koju čine respiratorno i olfaktorno područje, te posteriorno područje (48). Područja nosne šupljine prikazana su na Slici 4.



**Slika 4.** Anatomska područja nosne šupljine. Slika je izrađena po uzoru na Lee i Minko (2021) (49) pomoću programa InkScape (InkScape.com, SAD).

Nosni vestibul smješten je neposredno iza nosnica, te se zato naziva i predvorje nosa. Područje nosnog vestibula naziva se anteriornim područjem nosne šupljine. Vestibul je prekriven skvamoznim netrepetljivim epitelom i sadrži nosne dlačice koje imaju ulogu zadržavanja većih čestica pri udisaju (47,48). Epitel nosnog vestibula je slabo prokrvljen i slabo permeabilan te ovo područje nije pogodno za apsorpciju lijekova (50,51). Na granici između nosnog vestibula i prave nosne šupljine nalazi se nosna valvula (Slika 4.). Nosna valvula je mjesto najvećeg suženja u nosnoj šupljini (površina presjeka iznosi 0,5 – 0,6 cm<sup>2</sup>) te predstavlja mjesto najvećeg otpora strujanju zraka (52). Nosna valvula ima važnu fiziološku ulogu u nosu. Pri udisaju, zrak kroz nosnice i vestibul struji laminarno, ali zbog suženja nosne valvule strujanje zraka postaje turbulentno. Turbulentnim strujanjem udahnuti zrak se u nosnoj šupljini

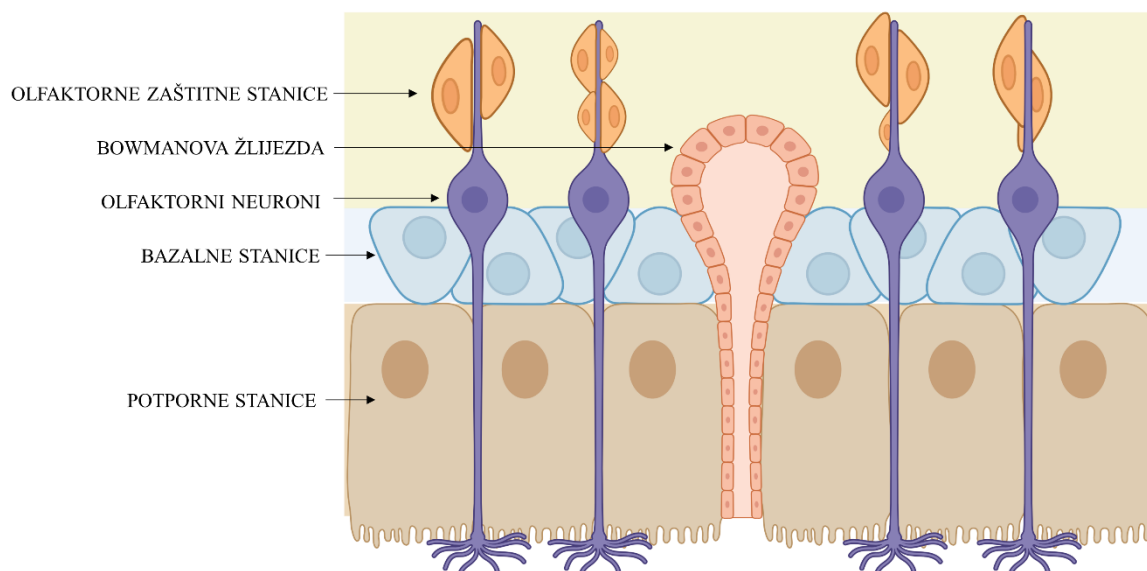
sudara s brojnim preprekama (nosne školjke, septum) te čestice u udahnutom zraku postaju tromije i ostaju zarobljene u sloju sluzi na površini sluznice. Na taj način nosna valvula sprječava prolazak čestica u niže dijelove respiratornog trakta (37). Također, prilikom izdisaja, suženje nosne valvule usporava izdisajni zrak, produljujući vrijeme za izmjenu plinova u alveolama pluća te omogućavajući zadržavanje tekućine i topline zraka koji se izdiše (53). Mali površinski presjek nosne valvule predstavlja ograničenje učinkovitoj dostavi lijekova u ciljano područje nosne šupljine (54).

Prava nosna šupljina započinje na mjestu nosne valvule, a završava nosnim lijevcima koji su otvori nosne šupljine prema ždrijelu - nazofarinks (55). Područje nazofarinksa naziva se posteriornim područjem nosne šupljine. Lateralnu stijenku nosne šuplje čine tri nosne školjke, odnosno turbine: gornja, srednja i donja (Slika 4.). To područje često se naziva turbinatnim područjem. Nosne školjke stvaraju otpor protoku udahnutog zraka te čine strujanje zraka turbulentnim (37,46).

Respiratorno područje zauzima većinu površine nosne šupljine (80 – 90 %), a anatomska ga definiraju područja prekrivena respiratornom sluznicom: donja i veći dio srednje nosne školjke, te pripadajući dio nosnog septuma (49,56). Iznimna prokrvljenost respiratorne sluznice čini ga značajnim mjestom za sistemsku apsorpciju nazalno primijenjenog lijeka (57). Respiratornu sluznicu čine četiri vrste stanica: bazalne stanice, vrčaste stanice, cilindrične stanice bez trepetljiki i cilindrične stanice s trepetljikama (cilijama) (58). Vrčaste stanice izlučuju sluz koja prekriva površinu respiratorne sluznice. Sluz ima ulogu zaustavljanja prolaza egzogenih tvari iz udahnutog zraka (veće čestice prašine, iritansi, bakterije) prema nižim dijelovima respiratornog sustava (58). Treperenje cilija pokreće sluz i zarobljene čestice prema ždrijelu, odnoseći tako tvari potencijalno štetne za respiratorni trakt u probavni sustav. Ovaj mehanizam naziva se mukocilijarni mehanizam čišćenja. Cilije pomiču sloj sluzi brzinom od  $5 \text{ mm min}^{-1}$ , što znači da se sluz koja prekriva sluznicu zamijeni svakih 12 do 20 minuta (59,60). Sluz čine voda (95 %), elektroliti, serumski proteini, imunoglobulini i lipidi (2 %) te glikoproteini mucini (3 %) (49). Mucini u svojem sastavu imaju veliki udio sijalinske kiseline i sulfatnih skupina, što ih čini negativno nabijenima pri pH sluznice nosa (5,5 – 6,5). Negativni naboj uzrokuje elektrostatsko odbijanje unutar i između polimernih lanaca što čini sluz elastičnom i viskoznom (61). Respiratorno područje inervirano je trigeminalnim živcem (37).

Olfaktorno ili njušno područje smješteno je na samom krovu nosne šupljine i čine ga gornja nosna školjka s malim dijelom srednje nosne školjke te pripadajući segment septuma

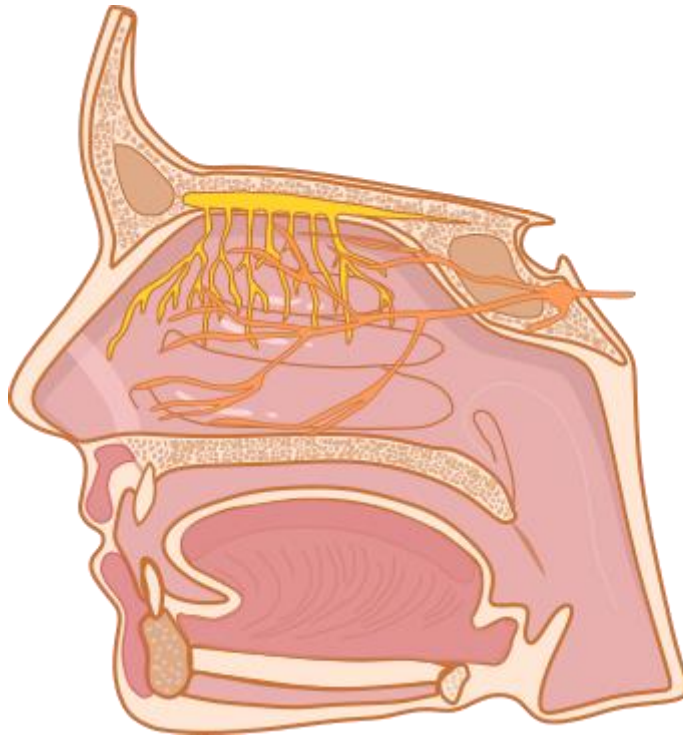
(62,63). Kod čovjeka, olfaktorno područje zauzima 10 % (površina je između 2 i 10 cm<sup>2</sup>), dok primjerice kod glodavaca zauzima čak 50 % površine nosne šupljine (64). Olfaktorno područje prekriveno je olfaktornom sluznicom koju čine: olfaktorni senzorni neuroni, specijalizirane zaštitne stanice, potporne (sustentakularne) stanice, bazalne stanice i Bowmanove žlijezde (Slika 5.) (50).



**Slika 5.** Građa olfaktorne sluznice. Slika je izrađena po uzoru na Lindsay i sur. (2020) (65) pomoću programa BioRender (BioRender.com, Kanada).

Olfaktorni neuroni su nemijelinizirani neuroni, okruženi olfaktornim zaštitnim stanicama (engl. *olfactory ensheathing cells*), čiji aksoni čine snopove koji se skupljaju u olfaktorni bulbus (engl. *olfactory bulb*) (50). Olfaktorni živac, odnosno olfaktorni neuroni, jedini su dio SŽS-a koji je u neposrednom kontaktu s okolišem, što je od ključne važnosti za izravnu dostavu lijekova u mozak putem nosne šupljine (37). Zbog velike izloženosti okolišnim čimbenicima (mikroorganizmima i egzogenim toksinima iz udahnutog zraka), olfaktorni neuroni imaju kratak životni vijek, te se obnavljaju svakih mjesec dana. Novi olfaktorni neuroni diferenciraju iz bazalnih stanica prisutnih u olfaktornoj sluznici (49). Olfaktorne cilije (njušne dlačice) prisutne su s mukozne strane olfaktornih stanica. Njušne dlačice reagiraju na mirisne podražaje iz okoline te putem olfaktornog živca prenose signal u mozak (64). Potporne ili sustentakularne stanice imaju karakteristike epitelnih i neuronskih stanica. Kako olfaktorne zaštitne stanice omataju aksone olfaktornih neurona, tako potporne stanice omataju dendrite olfaktornih neurona te ih na taj način štite (50). Bowmanove žlijezde smještene u olfaktornom epitelu zadužene su za lučenje sluzi (49). Osim olfaktornim živcem, olfaktorno područje inervirano je

i trigeminalnim živcem (37). Lateralni prikaz glave na kojem su istaknuti olfaktorni i trigeminalni živac prikazan je na Slici 6.



**Slika 6.** Lateralni prikaz glave (lica) s olfaktornim (žuto) i trigeminalnim (narančasto) živcem. Slika je izrađena po uzoru na Djupesland i sur. (2014) (37) pomoću programa InkScape (InkScape.com, SAD).

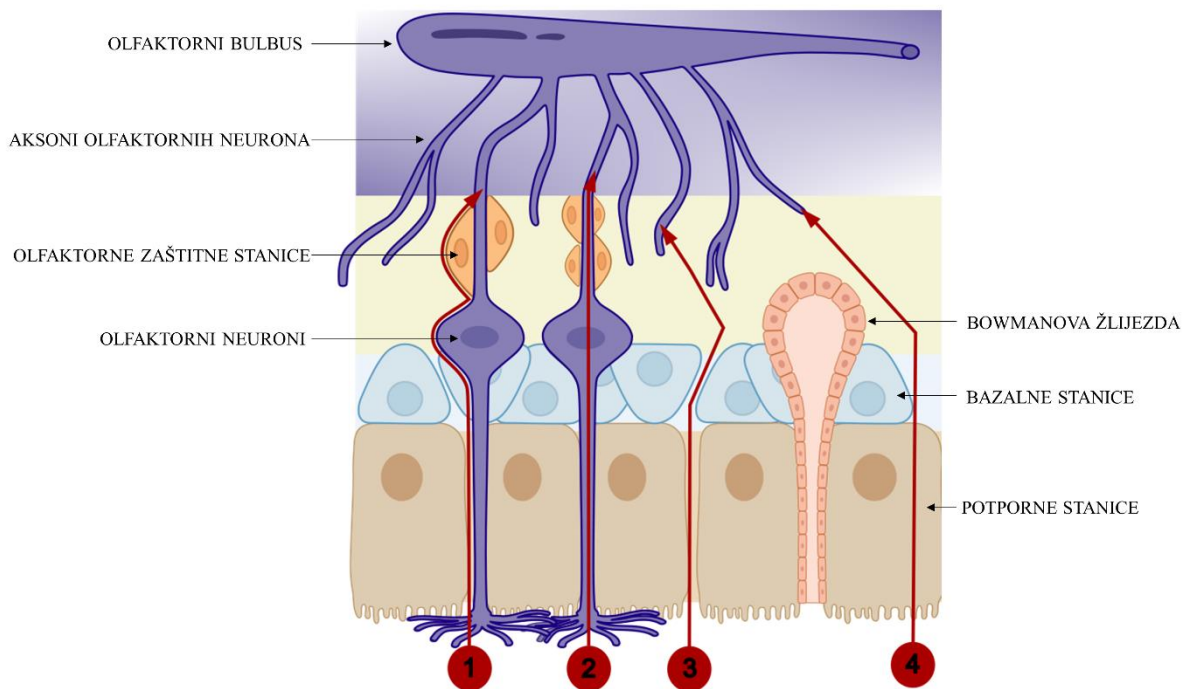
### **1.3.2 Dostava lijekova iz nosne šupljine u mozak**

Potencijal izravne dostave lijekova iz nosne šupljine u SŽS i dalje nije do kraja istražen. Veliki broj istraživanja navodi da se izravna dostava lijeka u mozak odvija prvenstveno olfaktornim, a u manjoj mjeri i trigeminalnim i sistemskim putem. Treba naglasiti da transport lijekova u SŽS nije ograničen na jedan modalitet, već se smatra da se odvija kombinacijom ova tri puta (49).

#### **1.3.2.1 Olfaktorni put**

Dostava lijekova u SŽS putem olfaktorne sluznice može se odvijati perineuralnim, intraneuralnim, paracelularnim i transcelularnim putem (58) (Slika 7.).





**Slika 7.** Mogući putovi izravne dostave lijeka u mozak putem olfaktorne sluznice. 1 – perineuralni put; 2 – intraneuralni put; 3 – paracelularni put; 4 – transcelularni put. Slika je izrađena po uzoru na Lindsay i sur. (2020) (65) i Lee i Minko (2021) (49) pomoću programa BioRender (BioRender.com, Kanada) i InkScape (InkScape.com, SAD).

Perineuralni put uključuje apsorpciju lijeka kroz međustanične veze između olfaktornih neurona i potpornih stanica. Lijek ovim putem dopijeva do membrane bazalnih stanica, i tu kroz TJ ulazi u olfaktorni bulbus. TJ čine proteinski kompleksi koji omogućavaju kontakt i razmjenu molekula i iona između susjednih stanica. Proteini TJ-a (okludin i klaudin) protežu se u međustanični prostor te tamo čine proteinsku mrežu s hidrofobnim središtem veličine 5 do 6 nm (66). Veličina proteinskog procjepa TJ-a ograničava prolaz većim molekulama lijeka. No, zbog česte obnove olfaktornih neurona iz bazalnih stanica, veličina TJ-a ipak nije glavni čimbenik ograničavanja prolaska molekulama lijeka. Naime, kako se olfaktorni neuroni obnavljaju svakih 30 dana, u tom procesu nastupa kašnjenje u formiranju TJ-a, ili čak potpuni izostanak TJ-a. Zamjena neurona rezultira stvaranjem procjepa veličine do 58 nm, omogućavajući prolaz molekulama lijeka veće molekulske mase (67).

Intraneuralni put uključuje prijenos kroz olfaktorni neuron. Lijek endocitozom ulazi u neuron i transportom kroz akson dopijeva do olfaktornog bulbusa, te se egzocitozom naknadno oslobađa izravno u mozak (50). Ovaj način prijenosa je izrazito dug: smatra se da ovim putem lijeku treba 24 h da dosegne SŽS (14). Budući da mnoge studije pokazuju brzu



raspodjelu lijeka u SŽS nakon nazalne primjene, vjeruje se da intraneuralni put nije dominantan u izravnoj dostavi lijeka u SŽS (49).

Paracelularni put uključuje prolaz lijeka između potpornih stanica kroz TJ i svojstven je malim hidrofilnim molekulama (68). Transcelularni put uključuje transport kroz potporne stanice olfaktorne sluznice te uključuje pasivni transport i transport posredovan receptorima. Taj način prijenosa svojstven je malim hidrofobnim molekulama (49).

### **1.3.2.2 Trigeminalni put**

Trigeminalni živac je peti moždani živac koji inervira i olfaktorno i respiratorno područje nosne šupljine. Trigeminalni živac izlazi iz mozga u području mosta moždanog debla (*pons*) i na bazi lubanje oblikuje trigeminalni ganglij. Tu se grana na tri živca: živac oka, živac gornje čeljusti i živac donje čeljusti, a samo su živac oka i živac gornje čeljusti uključeni u izravni prijenos lijeka iz nosne šupljine u mozak (50). Mehanizam izravnog prijenosa lijeka uključuje slične procese kao i kod olfaktornog puta, a prijenos lijeka odvija se kombinacijom različitih putova. Lijek do mozga stiže preko trigeminalnog ganglija i ponsa (49). Budući da je olfaktorno područje nosne šupljine bogato inervirano ograncima i olfaktornog i trigeminalnog živca (živca oka), dostava lijekova u to područje od iznimne je važnosti za izravnu dostavu u mozak olfaktornim i trigeminalnim putem. Zbog inerviranosti respiratornog područja isključivo trigeminalnim živcem gornje čeljusti, dostava lijekova u ovo područje manje pridonosi izravnoj dostavi u SŽS (37). Potencijal izravne dostave lijekova u mozak putem olfaktornog područja dokazan je na animalnim modelima: depozicija lijeka u olfaktorno područje nosne šupljine rezultira dvostruko većom koncentracijom lijeka u mozgu štakora u odnosu na depoziciju u respiratornom području (69–71).

### **1.3.2.3 Sistemski put**

Lijek dostavljen u respiratorno područje može se sistemski apsorbirati zbog velike površine, dobre prokrvljenosti i permeabilnosti respiratorne sluznice, te indirektnim putem sistemskom i limfatičkom cirkulacijom doseći mozak (58). S obzirom da sistemski put do mozga uključuje transcelularni prolaz BBB-a, primjenjiv je samo za male lipofilne molekule (68). Istodobno, sistemska raspoloživost lijeka nakon apsorpcije preko respiratorne sluznice povezana je i s mogućnošću razvoja sistemskih nuspojava, stoga je za izravnu dostavu lijeka u mozak ciljana apsorpcija preko olfaktornog područja (72).

### 1.3.3 Izazovi u izravnoj dostavi lijeka iz nosne šupljine u SŽS

Iako izravna dostava lijeka iz nosne šupljine u mozak pruža mnoge prednosti (zaobilazak BBB-a, izostanak sistemskih nuspojava, jednostavan i neinvazivan način primjene, povećana suradljivost pacijenta), također predstavlja i mnoge izazove (73).

Ciljana dostava lijeka u SŽS otežana je složenom geometrijom nosne šupljine. Za opisanu neuralnu dostavu ključna je depozicija lijeka u olfaktornom području. Navedeno područje nalazi se iza nosne valvule, mjesta najvećeg suženja u nosnoj šupljini (37). Istraživanja pokazuju da značajan postotak doze lijeka može zaostati u anteriornoj regiji nosa uslijed neprilagođene veličine čestica, neprikladnog načina primjene ili korištenja neprikladnog nazalnog raspršivača (74,75). Također, olfaktorno područje smješteno je u najgornjem dijelu nosne šupljine (na gornjoj nosnoj školjci, malom dijelu srednje nosne školjke i pripadajućem dijelu septuma (63)), što ga čini teško dostupnim za ciljanu dostavu lijeka (75). Nedostupnost olfaktornog područja, ali i brojne zaštitne barijere mozga, rezultiraju činjenicom da samo 1 % primijenjene doze dosegne SŽS nakon nazalne primjene (14,76).

Ograničavajući faktor nazalne primjene lijeka je i mukocilijarni mehanizam čišćenja koji predstavlja precizno koordinirani proces čišćenja nosne sluznice od potencijalno štetnih tvari. No, u vidu dostave lijekova on predstavlja ograničavajući faktor koji skraćuje vrijeme kontakta lijeka i nosne sluznice. Relativno brza eliminacija lijeka s nosne sluznice uslijed mukocilijarnog čišćenja u konačnici smanjuje bioraspoloživost lijeka (54). Lijek bi se na nosnoj sluznici trebao zadržati dovoljno dugo da prođe kroz sloj sluzi i dospije do nazalnog epitela (49).

Dodatna ograničenja nazalne primjene lijekova su slaba permeacija kroz nosnu sluznicu te moguća enzimska razgradnja lijeka na nosnoj sluznici (68). Također treba uzeti u obzir da je volumen nosne šupljine relativno malen te da je po pojedinačnom potisku u nosnu šupljinu moguće dostaviti maksimalno 100 – 200  $\mu$ L tekuće formulacije, odnosno od 10 do 25 mg praškaste formulacije, što omogućuje primjenu relativno malih doza lijeka (14). Nazalna formulacija mora biti biokompatibilna, stabilna, neiritabilna, odgovarajućeg pH, odgovarajuće viskoznosti i osmolalnosti (77). Uz to, formulacija mora pridonijeti ciljanoj dostavi lijeka u točno određeno područje nosne šupljine kako bi se ostvario željeni terapijski učinak (78).

Mogućnosti nadilaženja navedenih ograničenja i udovoljavanja postavljenim zahtjevima za nazalne proizvode leže u razvoju naprednih mukoadhezivnih farmaceutskih oblika. Napredni farmaceutski oblici karakterizirani su produljenim vremenom zadržavanja na mjestu

primjene, prilagođenim oslobađanjem djelatne tvari, a dostava lijeka u područje od interesa u nosnoj šupljini postiže se optimiranjem formulacijskih, procesnih i/ili parametara primjene u ranim fazama razvoja formulacije.

#### 1.4 *In situ* gelirajući sustavi za nazalnu primjenu

*In situ* gelirajući sustavi za nazalnu primjenu su inovativni tekući ili praškasti farmaceutski oblici koji geliraju na mjestu primjene zbog čega usporavaju mukocilijarno čišćenje i omogućuju dulji kontakt lijeka s ciljanim područjem. To mogu biti polimerne otopine koje geliraju u dodiru s nosnom sluznicom zbog njezinih fizioloških svojstava (temperatura, pH, koncentracija iona), ali mogu biti i praškasti polimerni sustavi koji bubre u kontaktu s nosnom sluznicom i na taj način stvaraju gel (79,80). Kombinacija *in situ* gelirajućih polimera s mukoadhezivnim agensima dodatno produljuje vrijeme kontakta s nosnom sluznicom (81).

##### 1.4.1 Praškasti *in situ* gelirajući sustavi

Praškesti farmaceutski oblik ima bolji profil mikrobiološke i kemijske stabilnosti u odnosu na tekući farmaceutski oblik. Također, praškasti sustav jednostavniji je za rukovanje i skladištenje, omogućuje uklapanje veće doze lijeka te osigurava veću koncentraciju i dulje zadržavanje lijeka na nosnoj sluznici (80). Zbog navedenih svojstva praškasti sustav za nazalnu primjenu ima rjeđi režim doziranja što može rezultirati povećanom suradljivošću pacijenata (80).

Unatoč brojnim prednostima praškastih sustava u odnosu na tekuće nazalne oblike, trenutno na tržištu postoji samo nekoliko prašaka za nazalnu primjenu: Rhinocort<sup>®</sup> (budezonid), Teijin Rhinocort<sup>®</sup> (beklometazon dipropionat) i Erizas<sup>®</sup> (deksametazon cipeclilat) – namijenjeni za topikalno liječenje rinitisa; Onzetra Xsail<sup>®</sup> (sumatriptan) za liječenje napada migrene i Baqsimi<sup>™</sup> (glukagon) namijenjen liječenju teške hipoglikemije (80,82). U Hrvatskoj je odobren samo lijek Baqsimi<sup>™</sup> koji ima sistemsko djelovanje (83). Onzetra Xsail<sup>®</sup> je medicinski proizvod koji je dizajniran za depoziciju u gornjim i dubljim dijelovima nosne šupljine s ciljem izravne dostave lijeka u mozak. Prašak sumatriptana karakteriziran je bržom i opsežnijom apsorpcijom u odnosu na nazalni tekući sprej sumatriptana (84).

Uklapanje donepezila u praškasti sustav do sada nije istraživano. Oblikovanje donepezila u takav sustav opravdano je dosadašnjim saznanjima o potencijalu prašaka za ciljanu olfaktornu depoziciju (80). Sposobnost prašaka da povećaju dostavu lijeka u mozak dokazana je i *in vivo* ispitivanjima u životinja (85,86).

#### 1.4.1.1 Sastav praškastih sustava

Prašcasti sustavi mogu sadržavati samo djelatnu tvar. No, ukoliko se djelatna tvar primjenjuje nazalno u iznimno maloj dozi ili ima nepovoljna farmaceutsko-tehnološka i/ili biofarmaceutska svojstva (primjerice, nepovoljna svojstva tečenja i raspršivanja, mala permeabilnost i/ili bioraspoloživost), u formulaciju se dodaju pomoćne tvari (82). Najčešće korištene pomoćne tvari za pripravu nazalnih praškastih sustava su punila, inertni nosači, *in situ* gelirajući i/ili mukoadhezivni polimeri te pospješivači apsorpcije (82).

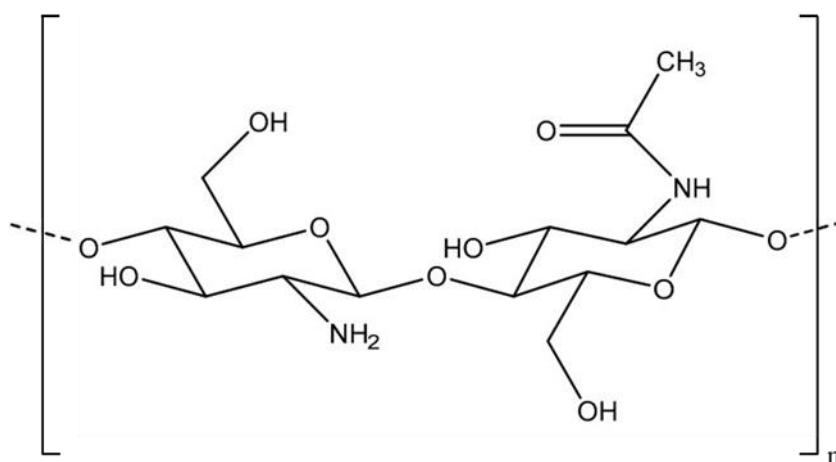
Kao punila se najčešće koriste laktoza i manitol. Punila osiguravaju točnost doziranja ukoliko je potrebno dostaviti malu dozu lijeka. Nadalje, neprikladna veličina čestica ili nepovoljna svojstva tečenja praškastog sustava mogu se prilagoditi dodatkom odgovarajućeg punila kao inertnog nosača. Smjesu biokompatibilnog inertnog nosača (veličine čestica prilagođene za nazalnu primjenu) i djelatne tvari (čista djelatna tvar, mikročestice djelatne tvari pripravljene sušenjem raspršivanjem ili polimerni praškasti sustav s uklopljenom djelatnom tvari) je moguće pripremiti korištenjem mješalica prašaka (82,87). *In situ* gelirajući i/ili mukoadhezivni polimeri, poput alginata, kitozana ili derivata celuloze, u kontaktu s nazalnom sluznicom bubre, te stvaraju gel (80). Stvaranjem polučvrstog sustava gela na mjestu primjene usporava se mukocilijarno čišćenje i produljuje se zadržavanje ljekovitog oblika na nosnoj sluznici (88). Za lijekove slabe permeabilnosti u formulaciju je potrebno uključiti pospješivač apsorpcije, poput alkilsaharida, kitozana ili niskometoksiliranog pektina (89).

Donepezil u obliku hidroklorida je hidrofilni lijek male molekulske mase te se kao takav slabo apsorbira kroz nosnu sluznicu (90). Kako bi se pospješila nazalna apsorpcija lijeka, u formulaciju donepezila potrebno je uključiti pospješivač apsorpcije. Prema literaturnim izvorima, jedan od najčešće korištenih pospješivača apsorpcije je prirodni polisaharid kitozan (91).

##### 1.4.1.1.1 Kitozan

Kitozan je biokompatibilni, biorazgradljivi i netoksični kationski polisaharid sastavljen od jedinica glukozamina i N-acetilglukozamina koji su međusobno povezani (1,4)- $\beta$ -glikozidnom vezom (Slika 8.) (92). Zbog neškodljivosti i sigurne uporabe kitozan je svrstan u GRAS (engl. *generally recognized as safe*) pomoćne tvari te se široko primjenjuje u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. U farmaceutskoj industriji se zbog svojih antimikrobnih svojstava koristi u oblogama za rane (93,94). Također, intenzivno se istražuje njegova primjena u vaginalnim, dermalnim, oftalmičkim i nazalnim terapijskim sustavima (91,95–97).

Kitozan se dobiva djelomičnom deacetilacijom hitina, a o stupnju deacetilacije, molekulskoj masi i kemijskim modifikacijama polimernog lanca kitozana ovise njegova fizičko-kemijska svojstva (91). Kitozan je netopljiv u neutralnom i bazičnom, a topljiv u kiselom mediju ( $pK_a$  vrijednost kitozana iznosi 6,1 – 7,3). Pri pH vrijednostima nižim od  $pK_a$  amino skupine glikozamina su protonirane. Kitozan je pri pH sluznice nosa (5,5 – 6,5) pozitivno nabijen te ulazi u interakciju s negativno nabijenom sluznicom nosa, te na taj način osigurava mukoadhezivni karakter nazalne formulacije (98). Osim putem elektrostatske interakcije, mukoadhezivnost kitozana ostvaruje se i putem vodikovih veza te hidrofobnih interakcija (99).



**Slika 8.** Kemijska struktura kitozana. Slika je izrađena pomoću programa Marvin JS (ChemAxon Ltd., Mađarska).

Kitozan djeluje i kao pospešivač apsorpcije otvaranjem TJ-a. Kao što je već opisano u poglavlju 1.3.2.1, TJ se sastoji od transmembranskih proteina okcludina i klaudina, i molekule spojne adhezije (engl. *junctional adhesion molecule*). Struktura i funkcija TJ-a regulirani su brojnim kaskadnim procesima, koji u svojoj podlozi imaju procese fosforilacije i defosforilacije (91). Yeh i suradnici dokazali su da kitozan uzrokuje prolazno otvaranje TJ-a potičući redistribuciju klaudina (100). Ukratko, kitozan preko pozitivne amino skupine reagira s negativno nabijenim transmembranskim proteinskim receptorima – integrinima, uzrokujući grupiranje integrina. Grupiranje integrina pokreće unutarstanične kaskadne reakcije koje rezultiraju translokacijom klaudina sa stanične membrane u citosol. Redistribucija klaudina iz TJ-a u unutarstanični prostor rezultira slabljenjem i narušavanjem strukture TJ-a i upravo taj proces naziva se *otvaranje TJ-a* (100,101). Lizosomalna razgradnja klaudina u endosomu

potiče transkripciju gena za kladine, a time i ponovno stvaranje i obnavljanje TJ-a. Bitno je naglasiti da je kitozanom posredovan proces otvaranja TJ-a reverzibilan (100).

Upravo zbog dvojakog djelovanja (mukoadezivni agens i pospješivač apsorpcije), opravdano je korištenje kitozana u nazalnim pripravcima za izravnu dostavu lijeka u mozak. U literaturi je opisano korištenje kitozana u izradi nazalnih otopina (102,103), suspenzija (104), *in situ* gelirajućih sustava (105,106), mikroemulzija (107), nanočestica (108,109) i praškastih sustava (110,111), a sve s ciljem poboljšane izravne dostave uklopljenog lijeka u mozak.

Trenutno na tržištu ne postoji odobreni nazalni pripravak koji sadrži kitozan (112). Zbog svojeg prirodnog porijekla, kitozan u ljudi može izazvati alergijske reakcije. Također, treba uzeti u obzir i moguću enzimsku razgradnju kitozana na podjedinice N-acetilglukozamina (113). Nazalni pripravak morfina Rylomine<sup>TM</sup> koji sadrži kitozan trenutno je u fazi II kliničkih ispitivanja u ljudi u Europskoj uniji i fazi III kliničkih ispitivanja u SAD-u. Navedena ispitivanja pomoći će u otkrivanju potencijalnih neočekivanih učinaka kitozana u ljudi, a komercijalizacija Rylomina<sup>TM</sup> utemeljit će put sigurnog korištenja budućih nazalnih pripravaka s kitozanom (112).

#### 1.4.1.2 Tečenje prašaka

Tečenje (reologija) prašaka je sposobnost gibanja čestica praška u odnosu na druge čestice ili u odnosu na stijenke spremnika u kojem se praškasti sustav nalazi (82). Sposobnost slobodnog tečenja prašaka ili proticanja kroz određene kanale i otvore ovisi o veličini i obliku čestica, gustoći praška, morfologiji praškastih čestica, te o sadržaju vlage (114). Upravo o tečenju praška ovisi točnost i reproducibilnost doziranja.

Kohezijske (privlačne sile između samih praškastih čestica) i adhezijske sile (privlačne sile između čestica prašaka i drugih površina, primjerice spremnika) u praškastom uzorku utječu na tečenje prašaka. Fenomeni kohezije i adhezije proizlaze iz nespecifičnih van der Waalsovih sila. Usitnjavanjem čestica, privlačne sile među česticama rastu te prašak uslijed prevelike kohezivnosti ima lošija svojstva tečenja (115). Također, uslijed intenzivnih adhezijskih sila, prašak zaostaje po stijenkama nazalnog uređaja te će isporučena doza biti nereproducibilna. Isto može rezultirati i promjenjivim profilom depozicije u nosnoj šupljini (82).

Europska farmakopeja propisuje četiri metode u ispitivanju tečenja prašaka: određivanje nasipnog kuta (engl. *angle of repose*), određivanje indeksa kompresibilnosti

(Carrov indeks), određivanje Hausnerovog omjera i određivanje brzine istjecanja praška kroz otvor (Ph. Eur. 11). Tečenje prašaka može se utvrditi i korištenjem reometra za praškaste uzorke (116). Prema rasponu vrijednosti nasipnog kuta, Carrovog indeksa i Hausnerovog omjera Europska farmakopeja karakterizira praške u razrede od vrlo, vrlo lošeg tečenja do izvrsnog tečenja.

Hausnerov omjer se izračunava iz omjera nasipne gustoće prije protresivanja ( $\rho_{\text{tapped}}$ ) i nasipne gustoće nakon protresivanja ( $\rho_{\text{bulk}}$ ) (117). Izračunavanje Hausnerovog omjera je indirektna metoda određivanja svojstava tečenja i rezultati uvelike ovise o načinu izvedbe testa (broju protresivanja, masi praška i promjeru korištenog cilindra). Unatoč tome i činjenici da su dobiveni rezultati relativne numeričke vrijednosti, Hausnerov omjer može poslužiti kao dobar pokazatelj svojstava tečenja (116). Razredi svojstava tečenja prema vrijednostima Hausnerovog omjera dani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Razredi svojstava tečenja prema vrijednostima Hausnerovog omjera.

Hausnerov omjer	Tečenje
1,00 – 1,11	izvrsno
1,12 – 1,18	dobro
1,19 – 1,25	zadovoljavajuće
1,26 – 1,34	prolazno
1,35 – 1,45	loše
1,46 – 1,59	vrlo loše
> 1,60	vrlo, vrlo loše

Veliki udio malih čestica ili nepravilna i naborana površina čestica (često kod polimernih mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem) uzrokuju loša svojstva tečenja praškastih sustava, zbog prevelike adhezije ili prevelikog trenja među česticama (116,118). Često se prašak nepovoljnih svojstava tečenja miješa s inertnim praškom dobrih svojstava tečenja. Pri tome male i/ili neparavilne/naborane čestice adheriraju na čestice inertnog nosača te se svojstva tečenja optimiraju (118). Također, pomnim odabirom formulacijskih i procesnih parametara sušenja raspršivanjem mogu se pripremiti mikročestice željene veličine i morfologije koje će rezultirati prikladnim svojstvima tečenja (82).

### 1.4.1.3 Veličina čestica

Veličina čestica predstavlja ključni atribut nazalnog praškastog sustava. Poseban utjecaj na depoziciju u nosnoj šupljini ima upravo veličina čestica u raspršenom aerosolu. Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) daje propise za proizvode za nazalnu primjenu koji zahtijevaju potpunu karakterizaciju proizvoda uzimajući u obzir veličinu čestica te navode zahtjev da glavna čestica u raspršenom aerosolu ima promjer veći od 10  $\mu\text{m}$  (119). Čestice manje od 10  $\mu\text{m}$  imaju loša svojstva tečenja i pokazuju rizik dostave u pluća (120). S druge strane, prevelike čestice ne pokazuju potencijal ciljane depozicije iza nosne valvule te zaostaju u anteriornom području nosne šupljine (121). Predviđeni raspon veličina čestica praškastih sustava za nazalnu depoziciju iznosi od 10 do 45  $\mu\text{m}$  (80), iako neka ispitivanja navode i gornju granicu veličine čestica od 150  $\mu\text{m}$  (122). Prema dostupnim izvorima, ciljana olfaktorna depozicija postiže se upravo ukoliko je glavna čestica veća od 10  $\mu\text{m}$  (123,124). Najčešće korištena metoda određivanja veličine čestica je metoda laserske difrakcije (125), a koriste se još i metode mikroskopiranja, sijanja, sedimentacije te metoda područja električnog raspoznavanja (engl. *electrical sensing zone*) i masena spektrometrija vremena leta (126,127).

### 1.4.1.4 Morfologija prašaka

Morfologija čestica praškastog sustava utječe na interakcije između čestica, a posljedično i na reološka svojstva, brzinu oslobađanja lijeka i iritabilnost terapijskog sustava na nosnoj sluznici (128,129). Također, morfologija čestica može imati utjecaj i na profil depozicije i mukoadhezivnost praškastog sustava (80,130,131). Jurišić Dukovski i sur. (131) pokazali su da pektinske mikročestice s deksametazonom, nepravilne i naborane površine, posjeduju jača mukoadhezivna svojstva od sferičnih čestica glatke površine. Morfologija prašaka najčešće se određuje uz pomoć optičkog ili elektronskog mikroskopa (132).

### 1.4.1.5 Sadržaj vlage

Sadržaj vlage u praškastom sustavu ovisi o metodi pripreme, higroskopsnosti pojedinih sastavnica i o uvjetima čuvanja (133). Vlaga u praškastom uzorku može utjecati na fizičku, kemijsku i mikrobiološku stabilnost praška, te uzrokovati povećanu kohezivnost među česticama, što može negativno utjecati na tečenje prašaka (114). U praškastom uzorku sadržaj vlage se najčešće određuje termogravimetrijskom analizom (134).



#### 1.4.1.6 Metode izrade praškastih sustava

Metode izrade praškastih sustava za nazalnu primjenu dijele se na metode smanjenja veličine čestica (engl. *top-down*) i metode povećanja veličine čestica (engl. *bottom-up*). *Top-down* metode uključuju smanjenje čestica izvorne sirovine pomoću mehaničke energije, primjerice procesom mljevenja. *Bottom-up* metode uključuju sušenje raspršivanjem, liofilizaciju ili sušenje smrzavanjem, te sušenje raspršivanjem sa superkritičnim fluidom (82). Za pripremu praškastih sustava željenih svojstava najčešće se koristi jednostavna i brza tehnika sušenja raspršivanjem.

##### 1.4.1.6.1 Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem je jednostavna i reproducibilna tehnika kojom se tekući sustav (otopina, emulzija ili suspenzija) prevodi u suhi praškasti produkt (135). Tekući uzorak se peristaltičkom pumpom dovodi do sapnice gdje se raspršuje u sitne kapljice koje se suše u struji vrućeg medija za sušenje (135). U komori za sušenje otapalo isparava iz raspršene kapljice, a suhi praškasti produkt odvaja se iz struje medija za sušenje u ciklonu i potom se skuplja u za to predviđenu posudu. Sušenje raspršivanjem je proces koji se odvija u jednom koraku te se zbog svoje jednostavnosti lako prevodi iz laboratorijskog na industrijsko mjerilo (136). Sušenje se može provoditi u otvorenom (engl. *open loop*) ili zatvorenom (engl. *closed loop*) ciklusu, a odabir ciklusa ovisi o tipu otapala u raspršivanom sustavu. Vodene otopine suše se u otvorenom ciklusu. Medij za sušenje (najčešće zrak) se nakon prolaska kroz komoru za sušenje vraća u atmosferu. U zatvorenom ciklusu suše se sustavi koji sadržavaju organsko otapalo. Na taj način sprječava se oslobađanje organskih otapala u atmosferu i mogućnost eksplozije u kontaktu s kisikom. Kao medij za sušenje koriste se inertni plinovi, najčešće dušik. U zatvorenom ciklusu se organsko otapalo ukapljava pomoću kondenzora te se može ponovno koristiti, što pridonosi ekonomičnosti procesa (135).

Optimiranjem formulacijskih i procesnih parametara moguće je razviti praškaste sustave željene veličine i morfologije čestica te odgovarajućeg sadržaja ostatne vlage (137). Formulacijski parametri uključuju sastav otopine/emulzije/suspenzije za sušenje (djelatna tvar, pomoćne tvari i otapala), o kojem u konačnici ovise i svojstva praškastog produkta.

Sušenje raspršivanjem se najčešće provodi na otopinama. U tom slučaju, sve tvari trebaju biti dobro topljive u odabranom otapalu (135). Pomoćne tvari u pravilu uključuju polimere, pa produkt sušenja predstavljaju polimerne mikročestice s uklopljenom djelatnom

tvari. Polimerni matriks stabilizira amorfnu djelatnu tvar te osigurava kontrolirano oslobađanje i apsorpciju (82).

Odabrane vrsta i koncentracija sastavnica otopine za sušenje utječu na veličinu, morfologiju i sadržaj vlage čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem, a posljedično ta svojstva utječu na profil depozicije i biofarmaceutska svojstva praškastog produkta (82). Primjerice, polimeri veće molekulske mase povećavaju viskoznost otopine za sušenje, a viskozija otopina u procesu atomizacije daje veće kapljice i posljedično veće čestice (138).

Povećanjem koncentracije otopljenih tvari u otopini za sušenje mogu se pripremiti čestice većeg promjera. Veća koncentracija otopljenih tvari znači manji volumen otapala u raspršenoj kapljici, što rezultira bržim isparavanjem otapala čineći u konačnici česticu poroznijom, manje gustoće i većeg volumena (135). S ciljem optimiranja svojstava čestica suhog produkta, često se u otopinu za sušenje dodaju dobro topljiva punila, poput manitola ili laktoze (80). Punila u konačnici poboljšavaju svojstva tečenja, profil nazalne depozicije i sadržaj vlage u konačnom praškastom produktu. Hidrofilna punila (laktoza, manitol, sorbitol) utječu i na brzinu oslobađanja i apsorpciju djelatne tvari putem nosne sluznice (80). Priprema otopine za sušenje u koju su odmah dodana punila pokazuje prednosti u odnosu na naknadno fizičko miješanje praškastog produkta s punilima (139). Naime, u fizičkim smjesama praškastih mikročestica i punila potrebno je pratiti stabilnost i homogenost tijekom skladištenja.

Procesni parametri također mogu značajno utjecati na svojstva praškastog produkta. Prilikom procesa sušenja raspršivanjem u obzir treba uzeti vrstu i smjer strujanja medija za sušenje, rad aspiratora, ulaznu temperaturu, brzinu dovođenja uzorka do sapnice te vrstu i način rada atomizatora (135). Utjecaj procesnih parametara na svojstva praškastog produkta prikazan je u Tablici 2. (140).

**Tablica 2.** Utjecaj procesnih parametara na svojstva praškastog produkta pripremljenog metodom sušenja raspršivanjem.

Parametar	Ulazna temperatura ↑	Rad aspiratora/Protok medija za sušenje ↑	Brzina dovođenja tekućeg uzorka ↑
Sadržaj vlage	↓	↑	↑
Veličina čestica	-	↓	↑
Iskorištenje procesa	↑	↑	↑ ili ↓

Atomizacija je proces raspršivanja otopine za sušenje u sitne kapljice koje se suše u struji medija za sušenje. Odabrani način atomizacije tekućeg uzorka uvelike utječe na svojstva praškastog produkta. Atomizacija se provodi pomoću sapnice. U tehnici sušenja raspršivanjem koriste se četiri sapnice: rotacijska, hidraulična, pneumatska i ultrazvučna, od kojih je najčešće korištena bifluidna sapnica koja se svrstava u pneumatske sapnice (135,141). Odabir sapnice najviše ovisi o svojstvima otopine za sušenje (viskoznost otopine i koncentracija dispergiranih tvari) i energiji koju je potrebno uložiti da bi proces atomizacije bio uspješan. Povećanje rada sapnice rezultira manjim kapljicama i posljedično manjim česticama. Kao što je već naglašeno, odabir sapnice utječe na svojstva praškastog sustava, pa pri njezinom odabiru treba imati na umu željena svojstva konačnog praškastog produkta (142).

U poglavlju 1.4.1.3. opisano je da veličina čestica ima značajan utjecaj na nazalnu depoziciju, a ciljana nazalna depozicija ključ je postizanja punog terapijskog potencijala nazalno primijenjenog lijeka (78). Vezano uz odobravanje proizvoda za nazalnu primjenu, zahtjeva se da glavna aerosoliziranih čestica ima promjer veći od 10  $\mu\text{m}$  (143). Dosad u literaturi nije zabilježeno da su sušenjem raspršivanjem pripravljene čestice za nazalnu primjenu koje raspodjelom veličina zadovoljavaju navedeni zahtjev. Udovoljavanje postavljenom kriteriju u dosadašnjim istraživanjima postignuto je naknadnom aglomeracijom čestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem (123) ili adhezijom na inertne nosače prikladne veličine (144). Međutim, takvi pristupi imaju određena ograničenja, poput upitnosti stupnja adhezije i kohezije te stabilnosti i homogenosti navedenih smjesa.

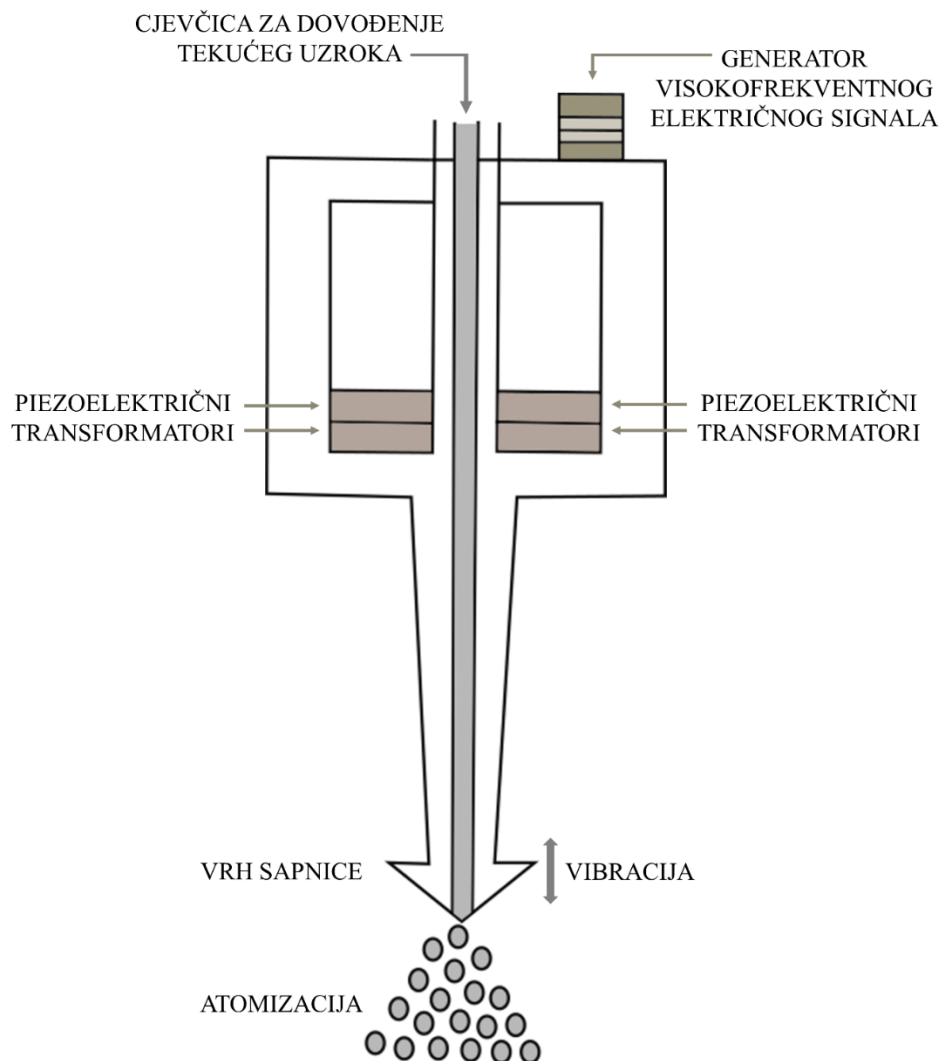
Potencijalni način dobivanja praškastog sustava za nazalnu primjenu u kojem glavna čestica ima promjer veći od 10  $\mu\text{m}$  je korištenje ultrazvučne sapnice pri procesu sušenja raspršivanjem.

#### **1.4.1.6.1.1 Ultrazvučna sapnica**

Princip rada ultrazvučne sapnice je sljedeći: generator proizvodi visokofrekventni električni signal koji se dvjema elektrodama prenosi na piezoelektrične transformatore, koji prevode električnu energiju u mehaničku energiju – vibraciju (145). Vibracija se prenosi do vrha sapnice gdje se vibracijska energija prenosi na otopinu za sušenje. Pod utjecajem vibracija tekući uzorak raspršuje se u sitne kapljice (146). Dijelovi ultrazvučne sapnice su prikazani na Slici 9.

U usporedbi s uobičajeno korištenom bifluidnom sapnicom, ultrazvučna sapnica proizvodi kapljice većeg promjera, što u konačnici rezultira većim česticama praškastog

produkta (135). Kapljice generirane ultrazvučnom sapnicom su uniformne veličine, a ovisno o procesnim parametrima i svojstvima otopine za sušenje mogu se pripraviti suhe čestice veličine od 5 do 1000  $\mu\text{m}$  (135). Procesni parametri koje je poželjno optimirati pri radu s ultrazvučnom sapnicom su frekvencija i snaga ultrazvučne sapnice. Frekvencija ultrazvučne sapnice uvelike utječe na veličinu kapljica. Veća frekvencija povećava broj vibracija, a veći broj vibracija rezultira manjim kapljicama (146). Veća snaga sapnice rezultira većim kapljicama. Naime, s povećanjem snage povećava se i vibracijska amplituda koja u konačnici povećava volumen atomizirane tekućine. Što je volumen tekućine koji se atomizira veći, veće su i proizvedene kapljice (146).



**Slika 9.** Shematski prikaz ultrazvučne sapnice. Slika je izrađena po uzoru na Ziaee i sur. (2019) (135) pomoću programa InkScape (InkScape.com, SAD).

Ultrazvučna sapnica ima mogućnost samočišćenja što znači da je rizik od začepljenja sapnice vrlo mali. Nadalje, kapljice proizvedene pomoću ultrazvučne sapnice imaju malu brzinu i dulje se zadržavaju u komori za sušenje dajući praškasti produkt smanjenog sadržaja vlage (142). Ultrazvučna sapnica prenosi manje mehaničkog stresa na uzorak prilikom procesa atomizacije u odnosu na bifluidnu sapnicu, što treba uzeti u obzir prilikom sušenja osjetljivih sastavnica, poput bioloških molekula (147).

#### **1.4.2 Tekući *in situ* gelirajući sustavi**

Konvencionalne otopine i suspenzije najzastupljeniji su oblici lijekova za nazalnu primjenu (82). Novija istraživanja usmjerena su na razvoj naprednih tekućih oblika poput *in situ* gelirajućih sustava temeljenih na gelirajućim polimerima. Tekući *in situ* gelirajući sustavi u kontaktu s nosnom sluznicom prelaze iz sol u gel stanje pod utjecajem fizioloških faktora kao što su temperatura, pH ili prisustvo iona u nosnom fluidu. Takvi sustavi omogućuju jednostavnu primjenu u obliku spreja i točnost primijenjene doze, te zahvaljujući geliranju u kontaktu sa sluznicom, osiguravaju produljeno zadržavanje na nosnoj sluznici, kontrolirano oslobađanje lijeka te povećanu bioraspoloživost (79). Koncentracija gelirajućeg polimera pri kojoj se formira gel željenih reoloških svojstava ovisi o drugim formulacijskim parametrima i mehanizmu geliranja u nosnoj šupljini (148).

##### **1.4.2.1 Geliranje potaknuto povećanjem temperature**

Termoosjetljivi *in situ* gelirajući sustavi su tekućine koje pod utjecajem promjene temperature prelaze u stanje gela. Geliranje potaknuto povećanjem temperature odvija se na sljedeći način: porastom temperature raste entropija sustava, povećava se dehidracija, a posljedično i hidrofobne interakcije između polimernih lanaca što rezultira stvaranjem 3D polimerne mreže (149). Temperatura geliranja je temperatura pri kojoj sustav prelazi iz sol u gel stanje. Razvoj termoosjetljivih *in situ* gelirajućih sustava za nazalnu primjenu uključuje optimiranje formulacijskih parametara s ciljem osiguranja geliranja pri temperaturi nosne sluznice, 33 – 35 °C (150). Ako je temperatura geliranja manja od 33 °C, sustav bi mogao gelirati u spremniku što bi otežalo njegovo jednoliko raspršivanje. Ukoliko je temperatura geliranja iznad 35 °C, izostat će proces geliranja na nosnoj sluznici što će rezultirati curenjem i izostankom produljenog zadržavanja u nosnoj šupljini (151).

U oblikovanju terapijskog sustava za nazalnu primjenu korisno je razmatrati pomoćne tvari s više uloga. Smanjeni broj sastavnica u farmaceutskom obliku smanjuje rizik inkompatibilnosti sastavnica, povećava stabilnost, a smanjuje i potencijal moguće iritacije na

nosnoj sluznici (152,153). U poglavlju 1.4.1.1.1. kitozan je istaknut kao mukoadhezivni polimer koji također ima mogućnost i pospješivanja apsorpcije. Uz navedena svojstva, kombinacijom kitozana i poliol fosfata moguće je pripremiti termoosjetljivu *in situ* gelirajuću formulaciju.

#### 1.4.2.1.1 Termoosjetljivi *in situ* gelirajući sustavi kitozana

Kitozan kao samostalna sastavnica ne gelira u ovisnosti o temperaturi (154). Dodatkom poliol fosfata ( $\alpha/\beta$ -glicerofosfata, glukoza-1-fosfata, glukoza-6-fosfata) u otopinu kitozana nastaje sustav koji gelira povišenjem temperature (155). Iako i drugi poliol fosfati s otopinom kitozana pokazuju temperaturno ovisna gelirajuća svojstva,  $\beta$ -glicerofosfat je najčešće korišten zbog najpovoljnijih gelirajućih svojstava i najveće stabilnosti sustava (154).

Chenite i suradnici (156) su 2000. godine razvili sustav kitozana i  $\beta$ -glicerofosfata koji gelira pri temperaturi od 37 °C. Od tada su brojna ispitivanja provedena s ciljem razjašnjavanja mehanizma geliranja i unapređenja sustava. Istraživana je njegova primjena u *in situ* gelirajućim oblicima za oralnu, intravensku, pulmonalnu, nazalnu, oftalmičku i vaginalnu primjenu, te u oblogama za cijeljenje rana i tkivnom inženjerstvu (157,158).

Kitozan je topljiv u kiselom vodenom mediju te u takvom okruženju ima pozitivan naboj zbog protonirane amino skupine. Povećanjem pH otopine, kitozan se taloži uslijed neutralizacije amino skupina i nedovoljnog odbijanja polimernih lanaca. Dodavanje  $\beta$ -glicerofosfata povećava pH sustava, no njegov dodatak ipak ne uzorkuje taloženje kitozana. Naime, ukoliko se otopina  $\beta$ -glicerofosfata doda otopini kitozana pri sniženim temperaturama, poliolna komponenta služi kao zaštitni hidracijski omotač između kitozanskih lanaca, te tako sprječava taloženje kitozana (155).

Temperaturno osjetljivi mehanizam geliranja uključuje složene interakcije između kitozana,  $\beta$ -glicerofosfata i molekula vode, uključujući: (i) elektrostatske interakcije između amino grupe kitozana i fosfatne grupe  $\beta$ -glicerofosfata, (ii) vodikove veze između kitozanskih lanaca zbog neutralizacije amino skupina povećanjem pH i (iii) hidrofobne interakcije između molekula kitozana (157). Upravo zbog ispreplitanja različitih interakcija koje se odvijaju tijekom sol/gel prijelaza, razni faktori mogu utjecati na temperaturu i vrijeme geliranja kitozansko- $\beta$ -glicerofosfatnog sustava. Na proces stvaranja 3D polimerne mreže gela utječu pH, molekulska masa, stupanj deacetilacije i koncentracija kitozana, kiselina korištena pri otapanju kitozana, koncentracija  $\beta$ -glicerofosfata, te omjer koncentracija kitozana i  $\beta$ -glicerofosfata (154). Kao što je naglašeno, sustav mora gelirati pri temperaturi nosne sluznice,

ali isto tako ključno je da sustav gelira dovoljno brzo, kako bi se spriječilo otjecanje s ciljanog mjesta primjene (154). Za optimiranje svojstava geliranja, potrebno je provesti opsežna preliminarna formulacijska ispitivanja.

#### **1.4.2.2 Reološka svojstva**

Praćenjem reoloških svojstava (svojstava tečenja) *in situ* gelirajućih sustava moguće je predvidjeti ponašanje sustava prilikom raspršivanja te u kontaktu s nosnom sluznicom. Također, moguće je pratiti i stabilnost sustava (148). Sofisticirano određivanje reoloških svojstava danas se najčešće provodi korištenjem reometra. Rotacijskim testovima određuju se viskoznost u mirovanju i krivulja tečenja sustava, dok se oscilacijski testovi poput testova promjene amplitude, vremena i temperature geliranja provode u svrhu detaljnije reološke karakterizacije (formiranje i svojstva gela) (148,149).

##### **1.4.2.2.1 Viskoznost**

Viskoznost ( $\eta$ ) je svojstvo tvari da se opire tečenju, a definirana je kao omjer smičnog naprezanja (engl. *shear stress*) i brzine smicanja (engl. *shear rate*) pri određenoj temperaturi (159). Za Newtonovske sustave viskoznost je neovisna o brzini smicanja, dok se kod ne-Newtonovskih sustava viskoznost mijenja s promjenom brzine smicanja. Ukoliko se povećanjem brzine smicanja viskoznost smanjuje, riječ je o pseudoplastičnim sustavima (159). Ako se nakon prestanka djelovanja sile struktura sustava obnavlja, te se vrijednost viskoznosti poveća do razine početne vrijednosti ta pojava naziva se tiksotropija. Poželjno je da tekući *in situ* gelirajući sustavi pokazuju pseudoplastična i tiksotropna svojstva. Pseudoplastičnost sustava omogućuje jednostavno raspršivanje uzorka nazalnim raspršivačem. Mehanička energija smicanja raspršuje tekućinu u fine kapljice prikladne veličine za postizanje učinkovite nazalne depozicije (152,160). Sustavi veće viskoznosti pokazuju potencijal usporavanja mukocilijarnog klirensa i produljivanja vremena zadržavanja na nosnoj sluznici (161). Postupak raspršivanja nazalnim raspršivačem korelira s brzinom smicanja od oko  $10^5 \text{ s}^{-1}$ , što omogućuje raspršivanje sustava veće viskoznosti (162). Viskoznost sustava uvelike utječe na svojstva spreja, koja u konačnici imaju značajan utjecaj na profil depozicije u nosnoj šupljini (163).

##### **1.4.2.2.2 Viskoelastičnost sustava**

Tekući *in situ* gelirajući sustavi pokazuju svojstva idealno viskoznih tekućina (viskozna komponenta) ali i svojstva idealno elastičnih tijela (elastična komponenta) (149). Takvi sustavi

nazivaju se viskoelastičnim sustavima. Elastična komponenta sustava opisana je modulom pohrane (engl. *storage modulus*,  $G'$ ) i govori o energiji koja je pohranjena u sustav prilikom deformacije. Viskozna komponenta opisana je modulom gubitka (engl. *loss modulus*,  $G''$ ), i govori o energiji koja se gubi iz sustava u procesu deformacije. Ukoliko se sustav više ponaša kao krutina,  $G'$  je veći od  $G''$  te se takav sustav naziva viskoelastičnom krutinom. Ukoliko se sustav više ponaša kao tekućina,  $G''$  je veći od  $G'$  i sustav je viskoelastična tekućina (162). Gel pokazuje svojstva viskoelastične krutine. Točka geliranja definirana je kao točka pri kojoj se krivulje  $G'$  i  $G''$  sijeku, odnosno gdje je  $G' = G''$  (155). Viskoelastičnost sustava ispituje se oscilacijskim testovima na reometru. U slučaju termoosjetljivih sustava, oscilacijski testovi koji se provode u svrhu ispitivanja svojstava geliranja su test vremena geliranja i test promjene temperature (149).

Kao što je opisano u poglavlju 1.4.2.1.1., tekući *in situ* gelirajući sustav za nazalnu primjenu mora posjedovati svojstva brzog geliranja na nosnoj sluznici. Vrijeme geliranja određuje se oscilacijskim testom vremena geliranja (engl. *time sweep test*). U navedenom testu prati se ovisnost  $G'$  i  $G''$  o vremenu, pri fiziološkoj temperaturi nosne sluznice. Test se provodi pri konstantnim postavkama smične deformacije, kutne frekvencije i temperature. U testu treba biti odabrana ona smična deformacija pri kojoj se struktura sustava ne narušava, odnosno pri kojoj se vrijednosti modula  $G'$  i  $G''$  ne mijenjaju. Iz tog razloga, prije testa vremena geliranja potrebno je provesti oscilacijski test promjene amplitude (engl. *amplitude sweep test*) pri kojem se prati ovisnost  $G'$  i  $G''$  o amplitudi odnosno smičnoj deformaciji. Iz navedenog testa moguće je odrediti raspon smičnih deformacija pri kojima se vrijednosti modula  $G'$  i  $G''$  ne mijenjaju. Taj raspon naziva se linearno viskoelastično područje (engl. *linear viscoelastic range*, LVE). Stoga, test vremena geliranja treba provesti pri konstantnoj smičnoj deformaciji iz LVE područja.

Test promjene temperature (engl. *temperature sweep test*) je oscilacijski test pri kojem se prati ovisnost  $G'$  i  $G''$  o temperaturi. Test se provodi pri konstantnoj smičnoj deformaciji iz LVE područja i pri konstantnoj kutnoj frekvenciji. Iz točke u kojoj se sijeku krivulje  $G'$  i  $G''$  očitava se temperatura pri kojoj sustav trenutno gelira (164).

### 1.4.2.3 Veličina raspršenih kapljica

Kao i kod veličine čestica praškastih sustava, veličina raspršenih kapljica nazalnih tekućih sustava ima značajan utjecaj na profil depozicije u nosnoj šupljini (163). Kriterij EMA-e iz poglavlja 1.4.1.3. u kojem je navedeno da glavovina aerosoliziranih čestica nazalnog



proizvoda mora imati promjer veći od 10  $\mu\text{m}$  vrijedi i za raspršene kapljice tekućeg nazalnog spreja (119). Prevelike kapljice zaostaju u anteriornom dijelu nosne šupljine i nemaju mogućnost ciljane depozicije u olfaktornom i respiratornom području odakle bi bila omogućena izravna dostava lijeka u mozak (165). Također, bitno je da su raspršene kapljice uskog raspona veličina. Raspon veličina kapljica (engl. *span*) definiran je formulom  $(D_{v90} - D_{v10} / D_{v50})$  (166). Volumni promjeri  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$  najčešće se koriste pri izražavanju raspodjele veličina čestica. Navedeni promjeri govore o volumnom postotku udjela čestica (10, 50 i 90 %) koje su manje od istaknutog promjera, u odnosu na ukupni volumen svih čestica u uzorku. Primjerice, ako  $D_{v10}$  iznosi 10  $\mu\text{m}$ , čestice manje od 10  $\mu\text{m}$  čine 10 % ukupnog volumena svih čestica u ispitivanom uzorku (98).

Uski raspon veličina kapljica pogoduje ciljanoj depoziciji jer takve kapljice imaju ujednačeni smjer kretanja, koji uz odgovarajuće parametre primjene ima potencijal ciljane dostave u željeno područje nosne šupljine (78,167).

### **1.4.3 Zajednička karakterizacija praškastih i tekućih *in situ* gelirajućih sustava za nazalnu primjenu**

#### **1.4.3.1 Oblik i geometrija raspršenog oblaka**

U sklopu *in vitro* karakterizacije nazalnog proizvoda za primjenu raspršivanjem, EMA i FDA preporučuju ispitivanje oblika i geometrije raspršenog oblaka, kao parametara sa značajnim utjecajem na depoziciju u nosnoj šupljini (143,163). Oblik raspršenog oblaka odnosi se na maksimalni promjer oblaka ( $D_{\text{max}}$ ), minimalni promjer oblaka ( $D_{\text{min}}$ ) te omjer  $D_{\text{max}}$  i  $D_{\text{min}}$  ( $D_{\text{max}}/D_{\text{min}}$ ) koji predstavlja ovalnost raspršenog oblaka. Geometrija oblaka uključuje karakterizaciju kuta raspršenja i širine raspršenog oblaka (168). Oblik i geometrija raspršenog oblaka ovise o svojstvima formulacije (primjerice viskoznost i napetost površine), korištenom nazalnom uređaju (dizajn pumpice i oblik aktuatora) te načinu raspršivanja (snaga potiska pacijenta) (143,169).

Kut raspršenja ima značajan utjecaj na depoziciju u nosnoj šupljini (168–170). Uži kut raspršenja pogoduje usmjerenjanoj depoziciji iza nosne valvule (161). Uži kut podrazumijeva širenje raspršenog oblaka na manju površinu u nosnoj šupljini, što može biti od interesa kad se cilja točno određeno područje nosa, primjerice olfaktorno područje (75,123). No, treba imati na umu da preuski kutovi raspršenja pacijentima mogu izazvati nelagodu prilikom primjene (163).

Određivanje oblika i geometrije raspršenog oblaka provodi se pomoću tehnike velike brzine snimanja (engl. *high-speed imaging*) i pomoću tehnike velike brzine snimanja laserom (engl. *high-speed laser imaging*). Snimljeni materijal naknadno se analizira (169).

#### **1.4.3.2 Ispitivanje oslobađanja lijeka *in vitro***

Ispitivanje oslobađanja lijeka *in vitro* neizostavan je vid karakterizacije u razvoju farmaceutskog oblika. Profil *in vitro* oslobađanja lijeka iz polimernog matriksa *in situ* gelirajućeg sustava ovisi o viskoznosti, pH, čvrstoći i izbubrenosti gela (171). Oblik, veličina i volumen pora 3D polimerne mreže gela određuju brzinu difuzije lijeka kroz matriks gela. Polimerna mreža gela omogućava kontrolirano i produljeno oslobađanje lijeka. Profil *in vitro* oslobađanja lijeka mora biti usklađen s očekivanim vremenom zadržavanja formulacije na nosnoj sluznici (vezano uz mukocilijarni mehanizam čišćenja i mukoadhezivna svojstva formulacije), kako bi lijek koji se kroz dulji vremenski period oslobađa iz gel matriksa uspješno dosegao nosnu sluznicu (79,172).

Za ispitivanje oslobađanja lijeka iz nazalnih oblika koriste se standardizirane (farmakopejske) i nestandardizirane metode. Najčešće korištene farmakopejske aparature su aparatura s rotirajućom košaricom, aparatura s rotirajućom lopaticom, aparatura s protočnom ćelijom i vertikalna Franzova difuzijska ćelija. Također se koristi i imerzijska ćelija. Nestandardizirane metode koriste se kad se dokaže njihova superiornost u odnosu na farmakopejske metode. Najčešće korištena nestandardizirana metoda ispitivanja oslobađanja lijeka iz nazalnih oblika je metoda s vrećicom za dijalizu (173).

Vertikalna Franzova difuzijska ćelija prikladna je za ispitivanje *in vitro* oslobađanja lijeka iz praškastih i tekućih sustava. U donorski odjeljak nanosi se ispitivani uzorak, a uklopljeni lijek se preko polupropusne membrane oslobađa u receptorski odjeljak ispunjen medijem za ispitivanje oslobađanja, čime se simuliraju uvjeti *in vivo* (144,174,175).

#### **1.4.3.3 Ispitivanje nazalne depozicije *in vitro***

Nazalna depozicija ključni je čimbenik terapijske učinkovitosti nazalno primijenjenog lijeka. Kao što je opisano u poglavlju 1.3.2., za izravnu isporuku neurološkog lijeka u mozak, potrebno je osigurati depoziciju formulacije prvenstveno u olfaktornoj regiji nosne šupljine. Upravo iz tog razloga, u razvoju nazalnih lijekova dizajniranih s ciljem izravne dostave lijeka u SŽS neophodna su ispitivanja profila nazalne depozicije (161).

Profil nazalne depozicije moguće je ispitati *in vivo* studijama na laboratorijskim životinjama. No, zbog velikih anatomskih razlika, dobivene rezultate teško je ekstrapolirati na nosnu šupljinu čovjeka (176). Kao što je već istaknuto, olfaktorno područje u čovjeka čini tek 10 % površine nosne šupljine, dok u štakora čini 50 %, a u psa čak 77 % ukupne površine nosne šupljine (177).

Profil nazalne depozicije *in vitro* ispituje se korištenjem anatomske ispravne modela nosne šupljine čovjeka. Takav pristup primjenjuje se za procjenu terapijskog potencijala novih nazalnih farmaceutskih oblika u ranoj fazi razvoja (161). *In vitro* ispitivanja nazalne depozicije daju informaciju o kvalitativnom i kvantitativnom aspektu depozicije. Modeli omogućuju usporedbe različitih formulacija, različitih nazalnih uređaja te različitih parametara primjene. Također, njima se može predvidjeti utjecaj anatomskih značajki nosne šupljine na terapijski ishod (98). Zbog svoje jednostavnosti i niske cijene, *in vitro* ispitivanja depozicije na modelima nosne šupljine neobilazan su korak u procjeni učinkovitosti nazalnog lijeka prije konačnih kliničkih ispitivanja u ljudi (178).

U svrhu što boljeg oponašanja svojstava nosne šupljine *in vivo*, modeli za ispitivanje nazalne depozicije izrađuju se od mekih i fleksibilnih materijala. Također, površina modela može se obložiti stanicama ili umjetnom sluzi u svrhu što vjernije imitacije površine nosne sluznice (179). Simuliranje vlažne nosne sluznice moguće je postići premazivanjem modela tankim slojem gela (primjerice Sar-Gelom<sup>®</sup> koji ima i ulogu vizualizacije depozicije) ili smjesama tekućina (87,168). Vlaženje površine modela pomaže i pri fiksiranju čestica/kapljica koje bi u suprotnom teže ostvarile kontakt s hidrofobnim materijalom modela (170).

Modeli za ispitivanje nazalne depozicije dijele se na komercijalno dostupne modele, 3D-printane modele i računalne simulacije dinamike fluida (engl. *computational fluid dynamics*; CFD). Kod komercijalno dostupnih modela prednost je što više studija koristi model iste anatomije, te je dobivene rezultate moguće uspoređivati ovisno o variranim parametrima primjene i svojstvima formulacije. CFD simulacije uzimaju kompjutoriziranu tomografsku (engl. *computed tomography*, CT) snimku ili snimku dobivenu magnetskom rezonancijom (engl. *magnetic resonance imaging*, MRI) na temelju koje u računalnom programu simuliraju nosnu šupljinu te pomoću matematičkih modela oponašaju parametre primjene i protoka zraka, ali čak i uvjete u nosnoj šupljini (temperatura, vlažnost). Dobiveni rezultati predviđaju depoziciju nazalno primijenjenog lijeka uzimajući u obzir više relevantnih faktora (180).

3D printani modeli također se temelje na CT ili MRI snimkama glave pacijenata iz kojih se reproduciraju anatomske ispravne fizičke modele koji detaljno oponašaju nosnu šupljinu. Tehnike 3D printanja omogućuju raznoliki odabir materijala te izradu modela koji imaju mogućnost rastavljanja na pojedine regije (u svrhu kvantitativne analize depozicije). Velika rezolucija printanja omogućuje vjerno i detaljno rekreiranje nosne šupljine čovjeka. Najčešće korištene tehnike pri izradi 3D modela nosne šupljine su tehnologija taložnog očvršćivanja (engl. *fused deposition modeling*, FDM), stereolitografska metoda, postupak spajanja praha u komori (engl. *powder bed fusion*) i metoda direktnog tiskanja (engl. *material jetting*) (161). Pri izradi 3D printanog modela treba težiti visokoj rezoluciji, reproducibilnosti i jednostavnosti izrade, a korišteni materijali trebali bi biti inertni kako bi se eliminirale greške u kvantifikaciji lijeka (161).

Budući da na profil nazalne depozicije utječu formulacijski čimbenici (veličina raspršenih kapljica/čestica, reološka svojstva), izvedba nazalnog uređaja (početna brzina raspršenih čestica, kut raspršivanja) i čimbenici povezani s pacijentom (kut primjene, brzina protoka zraka pri udisaju, snaga potiska), profil nazalne depozicije moguće je predvidjeti uzimajući u obzir sve relevantne čimbenike, te njihove moguće interakcije.

Formulacijski čimbenici i njihov utjecaj na nazalnu depoziciju raspravljani su u prethodnim poglavljima. Parametri primjene s utjecajem na nazalnu depoziciju uključuju položaj glave pacijenta, kut primjene u odnosu na horizontalnu i vertikalnu ravninu, dubinu umetanja nazalnog uređaja u nosnicu te protok udahnutog zraka (71,162,163,174,175).

Položaj glave '*unatrag*' pogoduje nazalnoj depoziciji iza nosne valvule, u gornja područja nosne šupljine. Također na taj način sprječava se moguće istjecanje formulacije kroz nosnice (167). Kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu značajno utječe na nazalnu depoziciju. Dokazano je da se učinkovitija dostava u turbinatno područje postiže pri manjim kutovima primjene u odnosu na horizontalnu ravninu (165,170,181). Kut primjene u odnosu na vertikalnu ravninu može utjecati na depoziciju u turbinatnom području jer se povećanjem navedenog kuta uređaj usmjerava od septuma prema nosnim školjkama turbinatnog područja (181). Kundoor i Dalby (167) promatrali su umetanje nazalnog uređaja u nosnicu na dubinu od 0, 2,5, 5, 10 i 15 mm, te su dokazali da umetanje nazalnog uređaja što dublje u nosnicu povećava nazalnu depoziciju iza nosne valvule. Općenito, veći kutovi (u odnosu na horizontalnu ravninu) pogoduju olfaktornoj depoziciji (167,181,182). Pregledom literature može se zaključiti da utjecaj protoka udahnutog zraka na nazalnu depoziciju može biti

varijabilan. Guo i suradnici (170) zaključili su da protok zraka od 10 L/min pogoduje depoziciji u gornjim dijelovima nosne šupljine, dok daljni porast protoka na 20 L/min uzrokuje prevelike turbulencije, te remeti usmjerenu depoziciju. Kod praškastih sustava smanjenje protoka udahnutog zraka pogoduje turbinatnoj i olfaktornoj depoziciji (87,144,183), dok kod tekućih sustava udah pogoduje depoziciji iza nosne valvule (148). Kod nekih istraživanja uočeno je da protok udahnutog zraka uopće ne utječe na nazalnu depoziciju što je olakotna okolnost pacijentima koji prilikom primjene ne moraju paziti na koordinaciju udaha i primjene lijeka (78,165,169,184).

Iz svega navedenog vidljivo je da parametri primjene značajno utječu na nazalnu depoziciju, a samim time i na učinak nazalno primijenjenog lijeka. U razvoju formulacije neophodno je proučavati utjecaj parametra primjene na ishod nazalne depozicije te sve zaključene spoznaje treba jasno predočiti pacijentima u preciznim uputama o lijeku.

Ciljana depozicija u područje od interesa zahtjevan je zadatak zbog kompleksne geometrije nosne šupljine. Osim kompleksne anatomije, nosna šupljina odlikuje se i brojnim fiziološkim posebnostima (98,161). Trenutno ne postoji model nosne šupljine koji bi simulirao sve anatomske i fiziološke uvjete, te je samim time predstavljen izazov u korelaciji *in vitro* rezultata sa situacijom *in vivo*. Također, zbog velikih anatomske razlika između pojedinaca (185), rezultate s jednog modela nosne šupljine nemoguće je ekstrapolirati na cijelu populaciju. Treba naglasiti i da *in vitro* ispitivanje nazalne depozicije u olfaktornom području daje informaciju koliko je lijeka dospjelo do olfaktornog područja, no ne govori o prijenosu lijeka kroz nazalnu sluznicu ni o bioraspoloživosti lijeka u mozgu (161).

#### **1.4.3.4 Biofarmaceutska ispitivanja *in vitro/ex vivo***

U sveobuhvatnom razvoju *in situ* gelirajućih sustava provode se i biofarmaceutska *in vitro/ex vivo* ispitivanja biokompatibilnosti, permeabilnosti i mukoadhezivnosti (98).

Ispitivanje citotoksičnosti nazalnih formulacija provodi se korištenjem primarnih nazalnih epitelnih stanica (MucilAir® (186)) i imortaliziranih staničnih linija: RPMI-2650 (187), Caco-2 (131), Calu-3 (175), A549 (188) i BEAS-2B (189). Najčešće korišteni *in vitro* testovi za ispitivanje biokompatibilnosti su: MTT test (175), test vezanja neutralne crvene boje (engl. *neutral red test*, (190)), test laktat dehidrogenaze (LDH test, (191)), mjerenje unutarstaničnih kisikovih reaktivnih spojeva (191), test topljive tetrazolijeve soli (engl. *water-soluble tetrazolium salt*, WST test, (192)) i određivanje ATP-a metodom luminiscencije (193).

Ispitivanja permeabilnosti temelje se na *ex vivo* metodama (korištenjem nazalne sluznice) i *in vitro* metodama (korištenjem staničnih modela). Integritet barijere korištene u ispitivanjima permeabilnosti se tijekom eksperimenta provjerava mjerenjem transepitelnog električnog otpora (engl. *transepithelial electrical resistance*, TEER) (98).

*Ex vivo* modeli korišteni za ispitivanje permeabilnosti podrazumijevaju izolaciju nosne sluznice iz životinjskog ili ljudskog donora (194). Uslijed ograničene mogućnosti korištenja nosne sluznice čovjeka, najčešće se koriste nosne sluznice izolirane iz životinja: zeca (195), ovce (196), jarca (197), teleta (198) i svinje (175). Sluznica se izolira iz glave životinje koja se nabavlja iz lokalne klaonice odmah nakon žrtvovanja. Svim spomenutim animalnim sluznicama dokazana je morfološka i histološka sličnost s nosnom sluznicom čovjeka (98). Izolirana sluznica fiksira se na Franzovu difuzijsku ćeliju, između donorskog i receptorskog odjeljka tako da je mukozna strana okrenuta prema donoru. Debljina sluznice (obično do 200 µm) treba biti izmjerena i zabilježena jer o njoj ovisi brzina difuzije lijeka. Receptorski medij treba biti fiziološki relevantan, temperiran na temperaturu nosne sluznice (34 °C), a prilikom ispitivanja permeabilnosti trebaju vrijediti uvjeti osigurane topljivosti (98).

Korištenjem *ex vivo* metoda, osim informacija o permeabilnosti, mogu se dobiti informacije i o histološkoj kompatibilnosti. Naime, po završetku testa permeabilnosti moguće je provesti histološku analizu korištene sluznice te utvrditi eventualni nastanak nekroze tkiva (98). Iako se primjenom *ex vivo* metoda mogu donijeti zaključci o permeaciji lijeka i kompatibilnosti formulacije, uslijed razlika između vrsta, *ex vivo/in vivo* ekstrapolacija rezultata često je kompleksna i komplicirana. Također, životinjska tkiva unutar iste vrste, ali različitih eksperimenata se često razlikuju u debljini i enzimskoj aktivnosti.

Modeli za ispitivanje *in vitro* permeabilnosti koji su se pokazali reproducibilnijim i vjerodostojnijim su standardizirani stanični modeli (98). Standardizirani *in vitro* stanični modeli oponašaju fiziološka svojstva nosne sluznice te su jednostavni za održavanje i uzgoj u kontroliranim uvjetima. Također, korištenje staničnih modela je relativno jeftino jer pruža mogućnost ispitivanja kompatibilnosti i permeabilnosti velikog broja uzoraka u kratkom vremenu (199,200).

Najčešće korištene stanične linije u biofarmaceutskoj karakterizaciji nazalnih formulacija su RPMI-2650 i Calu-3 (98,201).

RPMI-2650 je humana imortalizirana stanična linija dobivena iz anaplastičnih pločastih stanica karcinoma septuma. Ta stanična linija pokazuje visoku stabilnost prilikom uzgoja, a u

odnosu na nosnu sluznicu *in vivo* pokazuje sličnost u vidu proizvodnje sluzi (98,187). No, RPMI-2650 stanična linija ne posjeduje cilije i nema mogućnost višeslojnog rasta stanica (98). Također, transepitelni električni otpor RPMI-2650 stanične linije je relativno nizak, što rezultira činjenicom da je epitel poprilično propustan te ne oponaša permeabilnost sluznice nosa *in vivo* (201).

Calu-3 stanična linija je imortalizirana stanična linija izolirana iz adenokarcinoma pluća čovjeka. Stanice Calu-3 linije posjeduju cilije i proizvode sluz. Također, stanični monosloj Calu-3 stanične linije posjeduje TJ što rezultira transepitalnim električnim otporom sličnim kao i u nazalne sluznice *in vivo*. Navedene morfološke sličnosti s nazalnom sluznicom čine Calu-3 staničnu liniju prikladnim modelom epitela sluznice nosa. Iz navedenih razloga Calu-3 stanična linija koristi se za ispitivanje citotoksičnosti (175,202,203) i permeabilnosti (204–206) nazalnih formulacija, a dokazano je da rezultati ispitivanja permeabilnosti lijeka na tom staničnom modelu dobro koreliraju s farmakokinetičkim ispitivanjima *in vivo* (205).

Iako korištenje staničnih modela pruža brojne prednosti u ispitivanjima biokompatibilnosti i permeabilnosti, oni ne mogu u potpunosti simulirati složenost biološke barijere i rast stanica *in vivo* (200,207).

Mukoadhezivnost nazalnih *in situ* gelirajućih sustava ispituje se korištenjem modela s mucinima, modela s nazalnom sluznicom te pomoću reoloških testova.

U literaturi se nalaze primjeri impregniranja mucina na filter papir ili staklenu površinu, na koje se zatim nanosi formulacija. Iznad filter papira s nanesenom formulacijom moguće je primijeniti strujanje zraka koje simulira strujanje udahnutog zraka u nosu, te vizualno ili kvantitativnim ispiranjem odrediti koliko je formulacije zaostalo na filter papiru (124). Moguća je i izvedba pri kojoj se smjesa mucina i agara nanosi na staklenu površinu, te navedena smjesa gelira. Formulacija se nanosi na agarsko-mucinske diskove, cijeli disk s formulacijom postavlja se u određeni nagib te se mjeri pomak formulacije u ovisnosti o vremenu. Što je formulacija mukoadhezivnija, manji će biti njezin pomak od početne točke (98,129).

Postoji nekoliko modela ispitivanja mukoadhezivnosti korištenjem nazalne sluznice. Prvo, nazalna sluznica (najčešće nazalna sluznica ovce, svinje ili jarca) je fiksirana na površinu koja stoji pod određenim nagibom. Formulacija se nanese na najvišu točku, i zatim se sluznica ispire puferom. Pufer se sakuplja i u njemu se određuje količina lijeka. Iz razlike količine lijeka nanesenog na sluznicu i lijeka nađenog u eluatu određuje se količina lijeka zaostalog na sluznici (208).

Najčešća metoda ispitivanja mukoadhezivnosti na nosnoj sluznici provodi se upotrebom analizatora teksture. Analizator teksture je uređaj kojim se ispituje mukoadhezivnost, a sastoji se od pomične sonde na koju se nanosi sluznica i nepomičnog postolja na koje se nanosi uzorak (98). Pomična sonda se predefiniranom silom spušta na mukoadhezivni uzorak te ostvaruje kontakt s uzorkom. Sluznica i uzorak ostaju u kontaktu određeno vrijeme, a zatim se mjeri sila potrebana za odvajanje sluznice nosa od mukoadhezivnog uzorka. Analizator teksture široko se primjenjuje u ispitivanju mukoadhezivnosti nazalnih pripravaka (124,131,144,175,197). Za ispitivanje mukoadhezivnosti često se koristi nazalna sluznica svinje, zbog fiziološke i histološke sličnosti s ljudskom sluznicom (209).

Reološko ispitivanje mukoadhezivnosti temelji se na praćenju viskoznosti formulacije nakon miješanja s (umjetnom) nosnom sluzi. Ukoliko formulacija posjeduje mukoadhezivna svojstva, zapaža se porast viskoznosti (98).

#### **1.4.3.5 Predviđanje iritacijskog potencijala putem testa iritacije puža golaća**

Zbog bliskog kontakta s osjetljivom nosnom sluznicom, nazalni pripravci u pacijenata mogu izazvati iritacije. Iritacije nosne sluznice nakon nazalne primjene lijeka pacijenti opisuju kao osjećaj bockanja, svrbeži i žarenja (engl. *stinging, itching and burning sensation*, SIB) (129,210). Kako bi se osigurala neškodljivost uporabe, ključno je ispitati iritabilnost u ranoj fazi razvoja nazalnog farmaceutskog oblika (210). U skladu s konceptom poboljšanja, smanjenja i zamjene uporabe laboratorijskih životinja (koncept „3R“ – engl. *refinement, reduction and replacement*) Adriaens i Remon su 1999. godine razvili test iritacije sluznice puža golaća (211). Zamjena laboratorijskih životinja „nižim vrstama“ (beskralježnjacima, biljkama, mikroorganizmima) predložena je kao jeftinija i jednostavnija alternativa: navedeni organizmi nisu obuhvaćeni pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (211).

Test iritacije sluznice puža golaća je jednostavan, jeftin i pouzdan test u kojem se puž golać vrste *Arion lusitanicus* izlaže nazalnom farmaceutskom obliku te se prati količina sluzi koju puž izluči nakon točno određenog vremenskog perioda. Ukoliko formulacija djeluje iritirajuće, puž luči sluz, smanjuje mu se masa, a epitel sluznice puža se oštećuje. Kroz oštećeno tkivo se u sluz oslobađaju određeni proteini i enzimi (laktat dehidrogenaza, alkalna fosfataza), te se njihovim praćenjem u sluzi također dobiva informacija o iritacijskom potencijalu ispitivane formulacije (212).



Lenoir i suradnici (210) proveli su istraživanje iritacijskog potencijala otopina natrijevog klorida različite osmolalnosti pomoću testa iritacije puža golaća i u kliničkoj studiji u ljudi (engl. *human nose irritation test*), te pokazali da se test iritacije sluznice puža golaća može koristiti u procjeni iritacijskog potencijala nazalnih formulacija u ljudi. Naime, dokazana je korelacija između sluzi izlučene u testu iritacije sluznice puža golaća i osjećaja nelagode koju su ispitanici osjetili prilikom korištenja ispitivanih otopina. Uspoređujući rezultate ispitivanja testa iritacije sluznice puža golaća s osjećajem izazvane nelagode u ljudi, postavljeni su razredi iritacijskog potencijala nazalne formulacije gdje je određenoj količini izlučene sluzi pridružen odgovarajući iritacijski potencijal formulacije. Razredi iritacijskog potencijala podijeljeni su na: bez nelagode, blaga nelagoda, umjerena nelagoda i izrazita nelagoda.

Nazalni farmaceutski oblici u svom sastavu mogu sadržavati razne ekscipijense: pospješivače apsorpcije, punila, nosače, mukoadhezivne polimere i konzervanse. Brojne sastavnice farmaceutskog oblika mogu utjecati na pH i osmolalnost, a sve to u konačnici može djelovati iritirajuće na nosnu sluznicu. Budući da određene bolesti zahtijevaju dugotrajno liječenje, a među njima je i Alzheimerova bolest, iritacijski potencijal nazalne formulacije treba rano prepoznati, a zatim smanjiti ili u potpunosti otkloniti, kako bi se omogućila kronična primjena i povećala suradljivost pacijenata.

## **2 OBRAZLOŽENJE TEME**

Alzheimerova bolest (AB) jedan je od najraširenijih kroničnih poremećaja središnjeg živčanog sustava u svijetu. Globalna učestalost AB-a dramatično raste sa starenjem svjetske populacije. Svjetska zdravstvena organizacija prognozira da bi broj oboljelih do 2050. mogao narasti na 139 milijuna, što AB svrstava u ozbiljni globalni javnozdravstveni problem. Liječenje AB-a trenutno podrazumijeva simptomatsko liječenje demencije pomoću reverzibilnih inhibitora kolinesteraze. U tu skupinu ubraja se donepezil, lijek prvog izbora za AB koji je trenutno uglavnom dostupan u oblicima za oralnu primjenu. Oralna primjena donepezila karakterizirana je određenim nedostatcima, poput gastrointestinalnih nuspojava i male bioraspoloživosti donepezila u mozgu zbog slabog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Međutim, nazalna primjena donepezila može osigurati brojne prednosti pred njegovom oralnom primjenom, uključujući zaobilazak krvno-moždane barijere i metabolizma prvim prolaskom kroz jetru te brzo postizanje učinkovitih koncentracija u ciljnom tkivu. Naime, nazalna primjena neuroloških lijekova ističe se kao neinvazivni put primjene s ciljem izravne dostave lijeka u mozak koja se temelji na činjenici da egzogene tvari zaobilaze krvno-moždanu barijeru kroz neuronske putove olfaktornog i trigeminalnog živca.

Ciljana dostava lijeka u područje nosne šupljine inervirano olfaktornim i trigeminalnim živcem otežana je zbog složene geometrije nosne šupljine. Također, mukocilijarni mehanizam čišćenja uklanja formulaciju iz nosne šupljine i smanjuje joj vrijeme kontakta sa sluznicom, što u konačnici rezultira smanjenom isporukom lijeka u mozak. Mogućnosti nadilaženja tih ograničenja leže u razvoju inovativnih *in situ* gelirajućih i mukoadhezivnih farmaceutskih oblika koji produljuju vrijeme zadržavanja formulacije na mjestu primjene, te u optimiranju depozicije u nosnoj šupljini već u ranim fazama razvoja formulacije.

Cilj ovog doktorskog rada bio je razviti nazalni *in situ* gelirajući praškasti i tekući sustav s donepezilom, prikladnih biofarmaceutskih svojstava i profila depozicije za izravnu dostavu uklopljenog lijeka iz nosne šupljine u mozak. Detaljna karakterizacija omogućuje procjenu potencijala razvijenog terapijskog sustava za izravnu dostavu lijeka u mozak i postizanja terapijskog učinka u središnjem živčanom sustavu. Stoga su specifični ciljevi ovog doktorskog rada:

#### 1. Priprava i karakterizacija:

- praškastih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom metodom sušenja raspršivanjem korištenjem ultrazvučne sapnice,
- tekućih termoosjetljivih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom;

2. Optimiranje *in situ* gelirajućeg praškastog i tekućeg sustava s donepezilom s obzirom na:

- uspješnost uklapanja/sadržaj lijeka,
- prikladnost za nazalnu primjenu raspršivanjem,
- raspodjelu veličina čestica/kapljica,
- biofarmaceutska svojstva vezana uz mjesto primjene uključujući svojstva geliranja, *in vitro* mukoadhezivnost, profil oslobađanja lijeka, profil iritabilnosti, biokompatibilnost i permeabilnost,
- profil nazalne depozicije.

3. Usporedba optimiranih tekućih i praškastih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom s obzirom na fizičko-kemijska svojstva, stabilnost, svojstva raspršivanja, potencijal zadržavanja na mjestu primjene, oslobađanje i permeaciju lijeka, iritabilnost, te uspješnost ciljane depozicije u olfaktornom području nosne šupljine.

### **3 MATERIJALI I METODE**

### 3.1 MATERIJALI

Materijali potrebni za izradu praškastih i tekućih sustava s donepezilom navedeni su u Tablici 3. Kao djelatna tvar u oba tipa sustava korišten je donepezilklorid (dalje u tekstu donepezil; Carbosynth Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo). Praškasti i tekući sustavi razlikovali su se u odabiru pomoćnih tvari (Tablica 3.).

**Tablica 3.** Materijali korišteni za izradu praškastih i tekućih sustava s donepezilom za nazalnu primjenu.

	Praškasti sustavi	Tekući sustavi
<b>Djelatna tvar</b>	donepezilklorid (dalje u tekstu donepezil; Carbosynth Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)	
<b>Pomoćne tvari</b>	D-manitol (dalje u tekstu manitol; Lach-Ner, Češka)	dinatrijev $\beta$ -glicerofosfat pentahidrat (dalje u tekstu $\beta$ -GP; Biosynth s.r.o., Slovačka)
	laktoza GranuLac <sup>®</sup> 200 (Meggle, Njemačka)	
	niskomolekulski kitozan (engl. <i>low molecular weight chitosan</i> , LMW, molekulska masa 50 – 190 kDa, stupanj deacetilacije 75–85 %; Sigma-Adrich Chemie, Njemačka)	
	srednjemolekulski kitozan (engl. <i>medium molecular weight chitosan</i> , MMW, molekulska masa 190 – 310 kDa, stupanj deacetilacije 75–85 %; Sigma-Adrich Chemie, Njemačka)	
visokomolekulski kitozan (engl. <i>high molecular weight chitosan</i> , HMW, molekulska masa 310 – 375 kDa, stupanj deacetilacije >75 %; Sigma-Adrich Chemie, Njemačka)		

Simulirani nosni fluid (engl. *simulated nasal fluid*, SNF) pripremljen je otapanjem sljedećih krutina u pročišćenoj vodi: NaCl (Kemig, Hrvatska) pri koncentraciji od 150 mM, KCl (Kemig, Hrvatska) pri koncentraciji od 40 mM, te  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Njemačka) pri koncentraciji od 5,3 mM (213).

Hankova uravnotežena otopina soli (engl. *Hank's balanced salt solution*, HBSS) pH vrijednosti 6,0 ili 7,0 pripravljena je kao vodena otopina sljedećih krutina: KCl (5,4 mM),  $\text{NaHCO}_3$  (4,2 mM), NaCl (136,9 mM), D-glukoza monohidrata (5,6 mM), sve tvari nabavljene

od Kemig, Hrvatska;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,4 mM; Kemika, Hrvatska),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (0,3 mM; Fluka Chemie AG, Švicarska) i  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (5,3 mM) (Sigma-Aldrich, Njemačka). Koncentracija 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-1-etansulfonske kiseline (HEPES, nabavljena od Sigma-Aldrich, Njemačka) bila je 20 mM. Vrijednost pH HBSS pufera podešena je dodatkom klorovodične kiseline (1 M; Kemika, Hrvatska).

Sve ostale tvari korištene u ovom istraživanju bile su visoke čistoće i nabavljene su od Kemike, Hrvatska.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Mikrosfere kao praškasti *in situ* gelirajući sustavi s donepezilom

#### 3.2.1.1 Preliminarna istraživanja u razvoju mikrosfera s donepezilom

Sušenje raspršivanjem prepoznato je kao metoda izbora za pripremu mikrosfera kao praškastog *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom. Opsežna preliminarna istraživanja provedena su s ciljem odabira odgovarajućih pomoćnih tvari i njihovih koncentracija u raspršivanim otopinama. Kao pomoćne tvari korišteni su kitozani različite molekulske mase, te laktoza ili manitol kao punilo. Preliminarni praškasti sustavi su mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem preliminarnih otopina, metodom opisanom u poglavlju 3.2.1.3. Sastav preliminarnih otopina te parametri sušenja raspršivanjem prikazani su u Tablici 4. Prilikom procesa izrade svih preliminarnih uzoraka sušenje je provedeno u otvorenoj petlji. Kao medij za sušenje korišten je zrak, aspirator je bio postavljen na 100 % kapaciteta, snaga ultrazvučne sapnice iznosila je 65 %, a tlak komprimiranog zraka bio je podešen na 5 bara.

**Tablica 4.** Sastav preliminarnih otopina za sušenje te procesni parametri korišteni pri izradi preliminarnih mikrosfera s donepezilom.

Uzorak	Koncentracija donepezila (% , <i>m/V</i> )	Koncentracija i tip kitozana (% , <i>m/V</i> )	Koncentracija manitola (% , <i>m/V</i> )	Koncentracija laktoze (% , <i>m/V</i> )	$T_{in}$ (°C)	FPS (%)
1	0,050	1,0 (LMW)	-	-	160	10
2	0,050	1,0 (LMW)	-	-	140	10
3	0,050	1,0 (LMW)	1,0	-	140	10
4	0,050	1,0 (LMW)	-	1,0	140	10
5	0,075	1,5 (LMW)	1,5	-	140	10
6	0,075	1,5 (LMW)	-	1,5	140	10
7	0,115	1,5 (LMW)	3,0	-	140	10
8	0,115	1,5 (LMW)	-	3,0	140	10
9	0,115	1,5 (LMW)	3,0	-	120	10

10	0,115	1,5 (LMW)	3,0	-	120	15
11	0,115	1,5 (LMW)	3,0	-	140	15
12	0,231	1,5 (LMW)	3,0	-	120	10
13	0,231	1,5 (LMW)	6,0	-	120	10
14	0,400	1,5 (LMW)	6,0	-	110	10
15	0,400	1,0 (HMW)	4,0	-	120	10
16	0,400	1,0 (MMW)	4,0	-	120	10
17	0,400	1,0 (LMW)	4,0	-	120	10
18	0,400	1,0 (HMW)	6,0	-	120	10
19	0,400	1,0 (MMW)	6,0	-	120	10
20	0,400	1,0 (LMW)	6,0	-	120	10

$T_{in}$  - temperatura ulaznog zraka; FPS (engl. *feed pump setting*) - postavka peristaltičke pumpe za dovođenje uzorka; LMW – niskomolekulski kitozan; MMW – srednjemolekulski kitozan; HMW – visokomolekulski kitozan.

Variranjem formulacijskih i procesnih parametara tijekom preliminarnih istraživanja ispitivana je njihova prikladnost za proces sušenja raspršivanjem i utjecaj na ciljana svojstva mikrosfera s donepezilom namijenjenih za nazalnu primjenu. Kriteriji postavljanja granica pojedinih parametara bili su: mogućnost dobivanja suhog produkta sušenjem raspršivanjem, iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem, svojstva tečenja te veličina čestica prašaka, odnosno mikrosfera. Metode korištene za karakterizaciju preliminarnih mikrosfera su opisane u poglavljima 3.2.1.5. i 3.2.1.8.

Također, tijekom preliminarnih istraživanja određene su i razine parametara primjene mikrosfera s donepezilom koje su kasnije uključene u eksperimentalni dizajn. Parametri primjene (kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu i protok udahnutog zraka) uključeni u preliminarna istraživanja definirani su temeljem literaturnih navoda (123,167,181,214,215).

### 3.2.1.2 Statistički dizajn eksperimenata u razvoju mikrosfera s donepezilom

Statistički dizajn eksperimenata (engl. *Design of experminets*, DoE) korišten je s ciljem optimiranja procesnih i formulacijskih parametara, te parametara primjene mikrosfera s donepezilom. Vodeći se QbD načelima, dva formulacijska (koncentracija donepezila i manitola u raspršivanim otopinama) i dva procesna parametra (temperatura ulaznog zraka ( $T_{in}$ ) i postavka peristaltičke pumpe za dovođenje uzorka do sapnice (engl. *feed pump setting*, FPS)), te dva parametra primjene (protok udahnutog zraka (engl. *inspiratory flow rate*, IFR) i kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu (engl. *angle of administration from the horizontal plane*, AAH)) varirani su kroz DoE, koji je sadržavao 17 različitih eksperimenata. Razine svih parametara korištenih u sklopu DoE-a određene su tijekom preliminarnih ispitivanja, i navedene su u Tablici 5.



**Tablica 5.** Razine parametara variranih u sklopu DoE-a pri razvoju mikrosfera s donepezilom kao praškastog sustava za nazalnu primjenu.

Parametar	Gornja razina (+1)	Srednja razina (0)	Donja razina (-1)
Koncentracija donepezila (% <i>, m/V</i> )	0,4000	0,2575	0,1150
Koncentracija manitola (% <i>, m/V</i> )	6,0	4,5	3,0
$T_{in}$ (°C)	140	125	110
FPS (%)	15,0	12,5	10,0
AAH (°)	60	45	30
IFR (L min <sup>-1</sup> )	20	10	0

$T_{in}$  - temperatura ulaznog zraka; FPS - postavka peristaltičke pumpe za dovođenje uzorka do sapnice; AAH – kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu; IFR – protok udahnutog zraka.

U izradi svih mikrosfera korišten je niskomolekulski kitozan. Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem, sadržaj lijeka u mikrosferama, veličina mikrosfera, sadržaj ostatne vlage, svojstva tečenja i svojstva bubrenja mikrosfera, kut raspršenja, te profil depozicije u ciljnim regijama nosne šupljine promatrani su kao odgovori DoE-a. Matrica DoE-a izrađena je pomoću statističkog softvera JMP 14.0 (JMP®, verzija 14.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2007), te je prikazana u Tablici 6.

**Tablica 6.** Matrica DoE-a za izradu mikrosfera s donepezilom kao praškastih sustava za nazalnu primjenu.

Uzorak	Koncentracija donepezila (% <i>, m/V</i> )	Koncentracija manitola (% <i>, m/V</i> )	$T_{in}$ (°C)	FPS (%)	AAH (°)	IFR (L min <sup>-1</sup> )
1	0,1150	6,0	125	10,0	30	20
2	0,4000	3,0	125	15,0	60	0
3	0,4000	3,0	110	12,5	60	20
4	0,4000	6,0	110	10,0	45	20
5	0,1150	3,0	110	15,0	30	20
6	0,1150	3,0	140	15,0	45	0
7	0,4000	3,0	140	10,0	30	10
8	0,2575	6,0	140	15,0	60	20
9	0,2575	4,5	125	12,5	45	10
10	0,1150	4,5	110	10,0	60	0
11	0,4000	6,0	140	10,0	60	0
12	0,1150	6,0	110	15,0	60	10
13	0,4000	4,5	140	15,0	30	20
14	0,1150	3,0	140	10,0	60	20

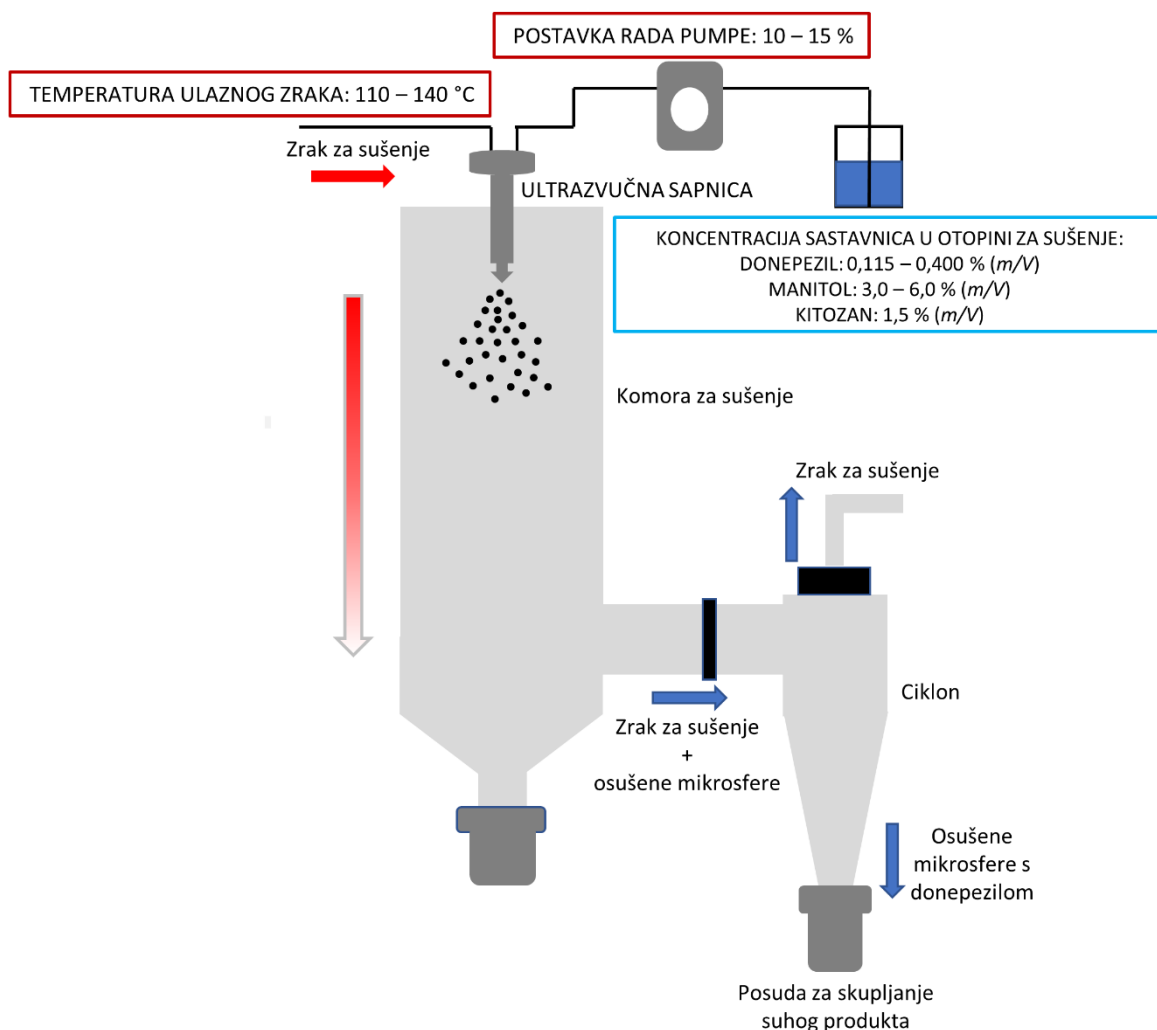
15	0,4000	6,0	110	15,0	30	0
16	0,2575	3,0	110	10,0	30	0
17	0,1150	6,0	140	12,5	30	0

Sve otopine za sušenje sadržavale su niskomolekulski kitozan pri koncentraciji od 1,5 % ( $m/V$ ).  $T_{in}$  - temperatura ulaznog zraka; FPS - postavka peristaltičke pumpe za dovođenje uzorka do sapnice; AAH – kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu; IFR – protok udahnutog zraka.

### 3.2.1.3 Priprema mikrosfera s donepezilom

Mikrosfere s donepezilom pripravljene su metodom sušenja raspršivanjem vodene otopine donepezila, niskomolekulskog kitozana (dalje u tekstu kitozan) i manitola. Koncentrirana otopina kitozana (2 %,  $m/V$ ) pripravljena je otapanjem kitozana u 0,5 % ( $V/V$ ) octenoj kiselini uz 24-satno miješanje na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Pripremljena otopina kitozana pomiješana je s vodenom otopinom donepezila i manitola prikladnih koncentracija, kako bi se pripremile otopine za sušenje raspršivanjem definirane DoE-om, sa završnim koncentracijama donepezila i manitola u otopinama za sušenje prikazanim u Tablici 6. Koncentracija kitozana u svim otopinama za sušenje iznosila je 1,5 % ( $m/V$ ).

Mikrosfere s donepezilom pripravljene su sušenjem raspršivanjem DoE otopina pomoću uređaja Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Švicarska), opremljenog ultrazvučnom sapnicom (Büchi, Švicarska). Kao medij za sušenje korišten je zrak, a sušenje je provedeno u otvorenoj petlji. Tijekom sušenja svih uzoraka aspirator je bio postavljen na 100 % kapaciteta, snaga ultrazvučne sapnice iznosila je 65 %, a tlak komprimiranog zraka bio je podešen na 5 bara. Dva procesna parametra varirana su u sklopu DoE-a: ulazna temperatura zraka varirana je između 110 i 140 °C, a brzina pumpe za dovođenje uzorka do sapnice varirana je između 10 i 15 % (Tablica 6., Slika 10.). Iskorištenje postupka sušenja raspršivanjem izračunato je kao omjer mase dobivenih mikrosfera i mase krutih sastavnica formulacije (donepezila, kitozana i manitola) korištenih za pripremu otopine za sušenje, te izraženo u postotku.



**Slika 10.** Shematski prikaz pripreve mikrosfera s donepezilom postupkom sušenja raspršivanjem. Procesni parametri uokvireni su crvenom bojom, a formulacijski plavom bojom.

### 3.2.1.4 Određivanje sadržaja donepezila u mikrosferama

Sadržaj donepezila u mikrosferama određen je nakon dispergiranja 10 mg praškastog uzorka u pročišćenoj vodi. Disperzija je ostavljena u ultrazvučnoj kupelji 2 h (Bandelin, Sonorex digiplus, Njemačka), te je nakon ultrasoniciranja miješana na magnetskoj miješalici 24 h. Disperzije su prije analize profiltrirane kroz polietersulfonsku membranu veličine pora 0,20  $\mu\text{m}$  (Chromafil® Xtra PES-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka). Sadržaj donepezila u pripremljenim uzorcima određen je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) prema postupku

opisanom u poglavlju 3.2.4. Sadržaj donepezila u mikrosferama (engl. *drug content*, DC (%)) izračunat je kao maseni postotni udio lijeka u mikrosferama ( $m/m$ ) prema jednadžbi (1):

$$DC (\%) = \frac{\text{masa uklopljenog lijeka}}{\text{ispitivana masa mikrosfera}} \times 100 \quad (1)$$

Mjerenja su provedena u triplikatu.

### 3.2.1.5 Određivanje raspodjele veličina mikrosfera s donepezilom

Veličina mikrosfera određena je metodom laserske difrakcije koristeći uređaj Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija) opremljen s Hydro SV ćelijom (Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija). Žarišna duljina leće iznosila je 300 mm. Određena masa mikrosfera (otprilike 5 mg) dispergirana je u 10 mL 96 % etanola ( $V/V$ ), te je pripremljena disperzija sonicirana do postizanja homogene suspenzije mikrosfera. Prije mjerenja napravljeno je pozadinsko očitavanje. Suspenzija mikrosfera dodavana je u Hydro SV ćeliju s magnetskim mješačem sve do zatamnjenja od 10 do 20 %. Rezultati su izraženi volumnim promjerima  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$ , a sva mjerenja su provedena u pentaplikatu.

### 3.2.1.6 Određivanje sadržaja ostatne vlage u mikrosferama s donepezilom

Sadržaj vlage u mikrosferama s donepezilom određen je termogravimetrijskom metodom koristeći uređaj TA Instruments Q500 (TA Instruments, SAD). Približno 5 mg praškastog uzorka zagrijavano je od 25 do 150 °C, pri brzini zagrijavanja 10 °C min<sup>-1</sup>, u atmosferi dušika protoka 25 mL min<sup>-1</sup>. Sadržaj vlage (engl. *moisture content*, MC(%)) izračunat je pomoću jednadžbe (2):

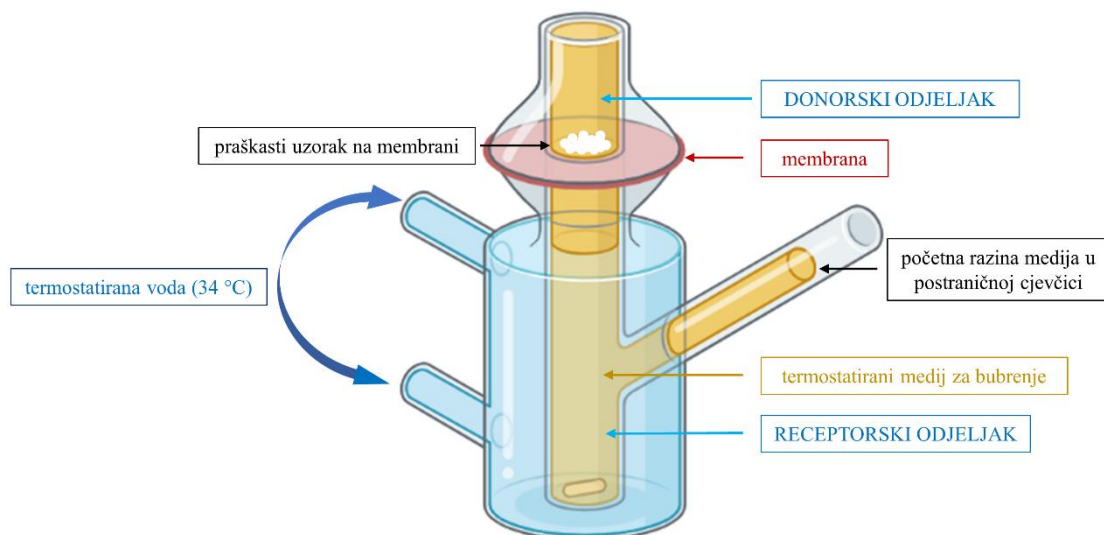
$$MC (\%) = \frac{m_0 - m_e}{m_0} \times 100 \quad (2)$$

pri čemu  $m_0$  označava masu praškastog uzorka na početku eksperimenta, a  $m_e$  masu uzorka na kraju eksperimenta. Analiza je provedena u triplikatu.

### 3.2.1.7 Ispitivanje bubrenja mikrosfera s donepezilom

Stupanj bubrenja mikrosfera s donepezilom u SNF-u određen je indirektnom volumetrijskom metodom pomoću Franzove difuzijske ćelije (144,216). Točno izvagana masa mikrosfera (10 mg) prenesena je na poliamidnu membranu (veličina pora 0,45 μm; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka) tako da u jednolikom sloju prekriva čitavu membranu. Nakon što je receptorski odjeljak Franzove difuzijske ćelije ispunjen medijem za bubrenje (SNF termostatiran pri 34 °C), membrana s mikrosferama postavljena je između receptorskog

i donorskog odjeljka (Slika 11.). Budući da mikrosfere bubre u kontaktu sa SNF-om, te apsorbiraju istoimenu medij, razina SNF-a u postraničnoj cjevčici Franzove difuzijske ćelije u vremenu se smanjuje.

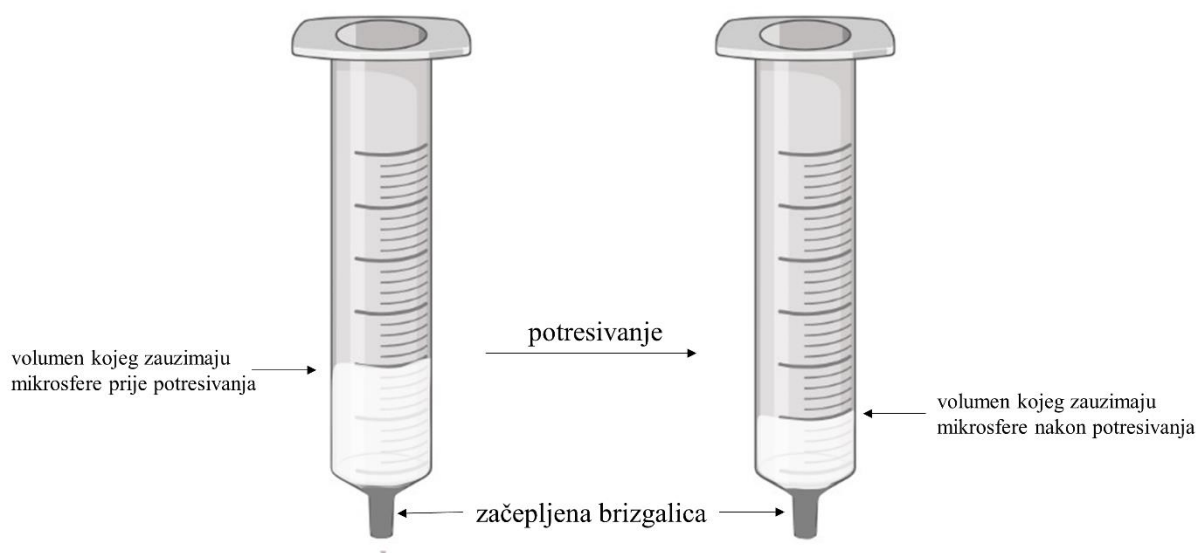


**Slika 11.** Prikaz ispitivanja svojstava bubrenja mikrosfera s donepezilom. Ilustracija je napravljena pomoću programa BioRender (BioRender.com, Kanada).

U razmacima od 3 min, razina medija u postraničnoj cjevčici nadopunjavana je do početne razine svježim medijem, koristeći graduiranu brizgalicu nominalnog volumena od 500  $\mu\text{L}$  (Hamilton, Švicarska). Svi nadopunjeni volumeni su zabilježeni i zbrojeni na kraju eksperimenta. Ispitivanje bubrenja provedeno je u trajanju od 30 min, a stupanj bubrenja mikrosfera izražen je kao volumen SNF-a apsorbiranog po miligramu kitozana u praškastom uzorku. Svaki uzorak ispitan je u triplikatu.

### 3.2.1.8 Ispitivanje svojstava tečenja mikrosfera s donepezilom

Svojstva tečenja mikrosfera ispitana su indirektnom metodom prema Nižić Nodilo i sur. (144). Ukratko, točna masa od 300 mg mikrosfera prebačena je u začepljenu plastičnu brizgalicu volumena 5 mL, te je zabilježen volumen kojeg zauzimaju mikrosfere (volumen prije potresivanja). Nakon toga, brizgalica s mikrosferama potresivana je sve dok volumen kojeg zauzimaju mikrosfere nije ostao konstantan unatoč daljnjem potresivanju (volumen nakon potresivanja; Slika 12.).



**Slika 12.** Metoda određivanja svojstva tečenja mikrosfera. Ilustracija je napravljena pomoću programa BioRender (BioRender.com, Kanada).

Iz mase mikrosfera u brizgalici te volumena prije i nakon potresivanja izračunata je nasipna gustoća prije i nakon potresivanja. Hausnerov omjer kao mjera svojstava tečenja mikrosfera izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{Hausnerov omjer} = \frac{\text{nasipna gustoća nakon potresivanja}}{\text{nasipna gustoća prije potresivanja}} \quad (3)$$

Mjerenje je provedeno u triplikatu.

### 3.2.1.9 Određivanje kuta raspršenja mikrosfera s donpezilom

Pri određivanju kuta raspršenja, praškasti uzorak je raspršen naspram tamne pozadine (144) (Slika 13.) korištenjem nazalnog monodozirnog uređaja UDS Powder (engl. *Unit Dose System Powder*, dalje u tekstu UDSP; Aptar Pharma Group, Francuska), ljubazno doniranog od Aptar Pharma grupacije. Raspršeni oblak praškastog uzorka snimljen je u obliku video zapisa pomoću VEO4K kamere (Vision Research Inc, SAD) s postavkom 1000 sličica u sekundi. Slika kuta ekstrahirana je iz video zapisa te je kut analiziran pomoću virtualnog kutomjera. Svaki uzorak analiziran je u triplikatu.

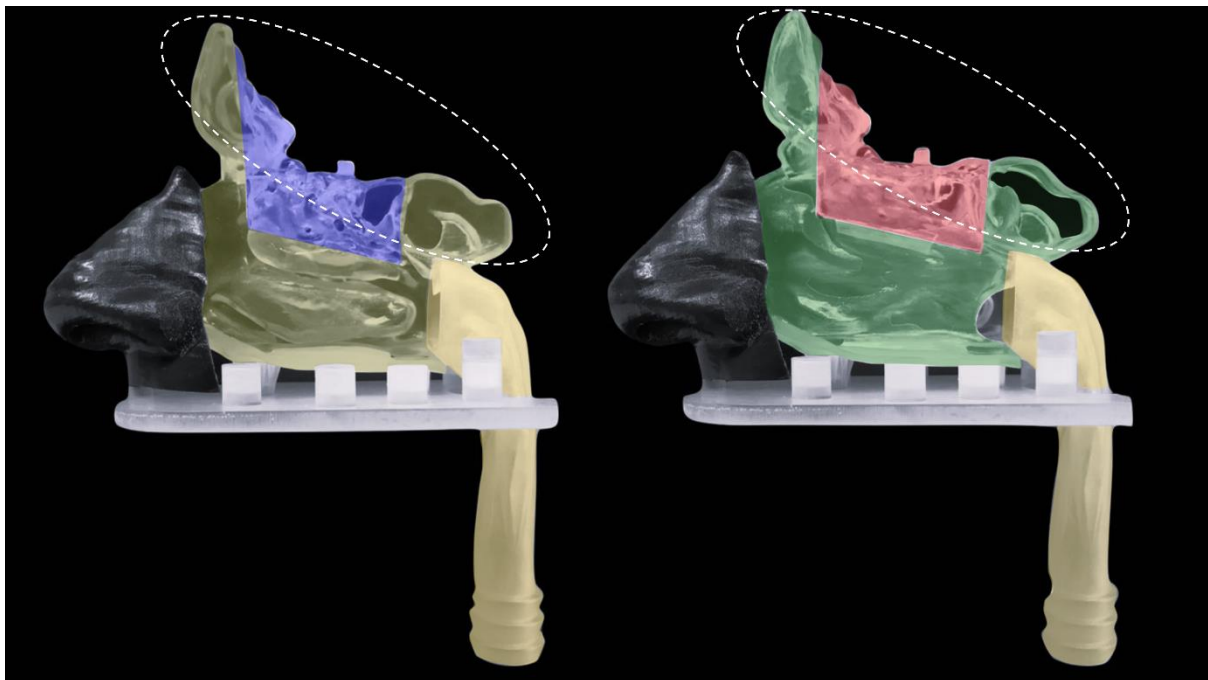


**Slika 13.** Fotografija raspršivanja praška iz monodozirnog uređaja UDS Powder naspram tamne pozadine.

#### **3.2.1.10 Određivanje profila nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom *in vitro***

Profil nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom ispitan je pomoću modela nosne šupljine, uz simuliranje protoka zraka pri disanju. Model nosne šupljine izrađen je tehnikom 3D printanja prema CT snimci glave 62-godišnjeg pacijenta, u okviru uspostavnog istraživačkog projekta sufinanciranog od strane Hrvatske zaklade za znanost naslova „Optimiranje depozicije raspršenih *in situ* gelirajućih i praškastih terapijskih sustava u nosnoj šupljini“ (UIP-2017-05-4592), voditeljice prof. dr. sc. Anite Hafner. 3D printani model nosne šupljine izrađen je u skladu s načelima Helsinške deklaracije, prema planu istraživanja odobrenom od strane Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice (predmet EP-9941/19-3) i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa 643-02/19-01/02, ur. broj 251-62-03-19-43). Model ima

moгуćnost rastavljanja na pojedine regije nosne šupljine: anteriornu regiju, turbinatnu regiju s odvojivim olfaktornim segmentom, septum s odvojivim olfaktornim segmentom, te posteriornu regiju s dijelom na koji je moguće spojiti respiratornu pumpu s ciljem simuliranja disanja (Slika 14.). Turbinatna regija, septum i odvojivi olfaktorni segmenti isprintani su zajedno s paranazalnim sinusima koji se otvaraju u nosnu šupljinu. Sve dijelovi modela isprintani su od transparentne rigidne plastike Accura ClearVue, osim anterirone regije koja je isprintana od crnog fleksibilnog materijala (Digital-Material FLX 9850, 60 ShoreA TangoBlackPlus i VeroWhitePlus). Fleksibilni materijal odabran je s ciljem simuliranja mekane hrskavice vanjskog nosa. Model je prvi put korišten u istraživanju Nižić Nodilo i sur. gdje je detaljno opisana njegova izrada (144).



**Slika 14.** Prikaz 3D printanog modela nosne šupljine s mogućnošću rastavljanja na: anteriornu regiju (crno), turbinatnu regiju (maslinasto zeleno) s odvojivim olfaktornim segmentom (plavo), septum (zeleno) s odvojivim olfaktornim segmentom (crveno), te posteriornu regiju (žuto). Turbinatna regija, septum i odvojivi olfaktorni segmenti isprintani su zajedno s paranazalnim sinusima (zaokruženo na slici) koji se otvaraju u nosnu šupljinu.

Prilikom ispitivanja profila depozicije, model je bio postavljen na postolje i obložen parafilmom, kako bi se spriječio gubitak čestica prašaka izvan modela. U svrhu simuliranja disanja, model je spojen na respiratornu pumpu (Respiratory Pump Model 613, Harvard Apparatus, SAD). Protok udahnutog zraka u dizajnu eksperimenta variran je u rasponu od  $0 \text{ L min}^{-1}$  (postavka bez udisaja – zadržani dah) do  $20 \text{ L min}^{-1}$  (postavka pumpe koja predstavlja



umjereno duboki udah (87)). Volumetrijski protok zraka postavljen pomoću respiratorne pumpe provjeren je nazalnim mjerачem inspiracijskog protoka In-Check Nasal (Clement Clarke International Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo). Točna masa praškastog uzorka (15 mg) izvagana je u UDSP uređaj koji je potom umetnut u desnu nosnicu do dubine od 10 mm, dok je lijeva nosnica bila začepljena prilikom aktivacije uređaja (169). Nakon aktivacije uređaja, svaki segment 3D printanog modela nosne šupljine je kvantitativno ispran, a sadržaj donepezila u eluatima svake pojedine regije određen je HPLC metodom opisanom u poglavlju 3.2.4. Količina lijeka dostavljenog u svaku pojedinu regiju izražena je kao postotak ukupne doze primijenjene u model jednom aktivacijom UDSP uređaja. Ukupna doza primijenjena u model određena je gravimetrijski: vaganjem uređaja prije i nakon aktivacije. Depozicija svakog pojedinog praškastog uzorka ispitana je u duplikatu.

### **3.2.2 Termoosjetljive otopine kao tekući *in situ* gelirajući sustavi s donepezilom**

#### **3.2.2.1 Preliminarna istraživanja termoosjetljivih otopina donepezila**

Temeljita preliminarna istraživanja provedena su s ciljem odabira odgovarajućih formulacijskih parametara i parametara primjene te njihovih razina kao ulaznih podataka za izradu DoE-a u razvoju tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu donepezila. Uzorci u preliminarnim ispitivanjima pripremljeni su prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.3. Za pripravu preliminarnih sustava s donepezilom (0,30 – 0,60 mg mL<sup>-1</sup>) korišteni su kitozani LMW, MMW i HMW, u rasponu koncentracija 3,08 – 12,31 mg mL<sup>-1</sup>, te β-GP kao gelirajuće sredstvo, u rasponu koncentracija 176,00 – 200,00 mg mL<sup>-1</sup>. Preliminarne formulacije prikazane su u Tablici 7. Kriteriji isključivanja uključivali su: uočeno taloženje u sustavu, neprikladno vrijeme ili temperatura geliranja i nepovoljna svojstva raspršivanja sustava (definirana kutom raspršenja i raspodjelom veličina kapljica). Metode korištene pri karakterizaciji preliminarnih termoosjetljivih otopina donepezila opisane su u poglavljima 3.2.2.5. – 3.2.2.8.

Parametri primjene korišteni u ispitivanju profila nazalne depozicije preliminarnih tekućih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom odabrani su prema relevantnim literaturnim izvorima ispitivanja nazalne depozicije u *in vitro* modelima (167,169,181). Ispitivanje profila nazalne depozicije opisano je u poglavlju 3.2.2.8.

**Tablica 7.** Sastav preliminarnih uzoraka u razvoju *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom za nazalnu primjenu.

Uzorak	Koncentracija donepezila (mg mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija i tip kitozana (mg mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija β-GP-a (mg mL <sup>-1</sup> )
1	0,30	6,15 (LMW)	188,00
2	0,40	6,15 (LMW)	188,00
3	0,50	6,15 (LMW)	188,00
4	0,60	6,15 (LMW)	188,00
5	0,30	6,15 (MMW)	188,00
6	0,40	6,15 (MMW)	188,00
7	0,50	6,15 (MMW)	188,00
8	0,60	6,15 (MMW)	188,00
9	0,30	6,15 (HMW)	188,00
10	0,40	6,15 (HMW)	188,00
11	0,50	6,15 (HMW)	188,00
12	0,60	6,15 (HMW)	188,00
13	0,30	6,15 (LMW)	176,00
14	0,30	6,15 (LMW)	200,00
15	0,30	3,08 (LMW)	188,00
16	0,30	7,69 (LMW)	188,00
17	0,30	9,23 (LMW)	188,00
18	0,30	12,31 (LMW)	188,00
19	0,40	3,08 (LMW)	188,00
20	0,40	7,69 (LMW)	188,00
21	0,40	9,23 (LMW)	188,00
22	0,40	12,31 (LMW)	188,00
23	0,50	3,08 (LMW)	188,00
24	0,50	7,69 (LMW)	188,00
25	0,50	9,23 (LMW)	188,00
26	0,50	12,31 (LMW)	188,00

LMW - niskomolekulski kitozan (engl. *low molecular weight chitosan*), MMW - srednjemolekulski kitozan (engl. *medium molecular weight chitosan*), HMW - visokomolekulski kitozan (engl. *high molecular weight chitosan*),

### 3.2.2.2 Statistički dizajn eksperimenata u razvoju termoosjetljivih otopina donepezila

QbD načela ugrađena su u razvoj termoosjetljive otopine donepezila. Za izradu navedene formulacije odabran je kitozan niskomolekulske mase (ranije označen kao kitozan). Korišten je DoE s ciljem optimiranja formulacijskih i parametara primjene za učinkovitu izravnu dostavu lijeka iz nosne šupljine u mozak. U okviru DoE-a varirana su dva formulacijska parametra (koncentracija donepezila i kitozana), te dva parametra primjene (protok udahnutog zraka (IFR) i kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu (AAH)). Pomoću statističkog softvera JMP 14.0 (JMP<sup>®</sup>, verzija 14.0, SAS Institute Inc., Cary, NC,

1989-2007) izrađen je DoE koji je sadržavao 17 različitih eksperimenata, a razine formulacijskih i parametara primjene prikazane su u Tablici 8.

**Tablica 8.** Razine parametara variranih u sklopu DoE-a pri razvoju tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom za nazalnu primjenu.

Parametar	Gornja razina (+1)	Srednja razina (0)	Donja razina (-1)
Koncentracija donepezila (mg mL <sup>-1</sup> )	0,50	0,40	0,30
Koncentracija kitozana (mg mL <sup>-1</sup> )	9,23	7,69	6,15
AAH (°)	75	60	45
IFR (L min <sup>-1</sup> )	30	15	0

AAH – kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu; IFR – protok udahnutog zraka.

Kao DoE odgovori, ispitivana su sljedeća svojstva pripremljenih termoosjetljivih otopina donepezila: vrijeme i temperatura geliranja, viskoznost u mirovanju, raspodjela veličina raspršenih kapljica, kut raspršenja i profil depozicije u ciljanim regijama nosne šupljine *in vitro*.

### 3.2.2.3 Priprema termoosjetljivih otopina donepezila

Termoosjetljive otopine donepezila za nazalnu primjenu pripravljene su od kitozana (gelirajuća tvar) i  $\beta$ -GP-a (gelirajuće sredstvo) prema Gholizadeh i sur. (152). Prvo, koncentrirane otopine kitozana (1,0, 1,25 i 1,5 %, *m/V*) pripremljene su otapanjem kitozana u 0,5 % (*V/V*) octenoj kiselini, uz 24-satno miješanje na magnetskoj miješalici. Određena masa donepezila otopljen je u prikladnoj otopini kitozana, te je otopina lijeka i kitozana ohlađena u ledenoj kupelji na 4 °C. Pripremljena koncentrirana otopina  $\beta$ -GP-a (490 mg mL<sup>-1</sup>) također je ohlađena na 4 °C, te je kap po kap dodavana ohlađenoj otopini donepezila i kitozana (D-C). Otopina D-C i otopina  $\beta$ -GP-a pomiješane su u volumnom omjeru 1,6:1. Konačne koncentracije donepezila i kitozana u formulacijama pripremljenim prema DoE-u prikazane su u Tablici 9. Koncentracija  $\beta$ -GP-a u svim DoE uzorcima iznosila je 188 mg mL<sup>-1</sup>. Vrijednost pH pripremljenih formulacija izmjerena je pomoću pH-metra S47 SevenMulti (Mettler Toledo, Švicarska).

**Tablica 9.** Matrica DoE-a za izradu termoosjetljivih otopina donepezila za nazalnu primjenu.

Uzorak	Koncentracija donepezila (mg mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija kitozana (mg mL <sup>-1</sup> )	AAH (°)	IFR (L min <sup>-1</sup> )
1	0,30	6,15	75	0
2	0,30	6,15	45	30
3	0,30	6,15	75	30
4	0,30	7,69	45	0
5	0,30	9,23	75	0
6	0,30	9,23	45	15
7	0,30	9,23	60	30
8	0,40	6,15	45	0
9	0,40	7,69	60	15
10	0,40	9,23	75	30
11	0,50	6,15	60	0
12	0,50	6,15	75	15
13	0,50	6,15	45	30
14	0,50	7,69	75	30
15	0,50	9,23	45	0
16	0,50	9,23	75	0
17	0,50	9,23	45	30

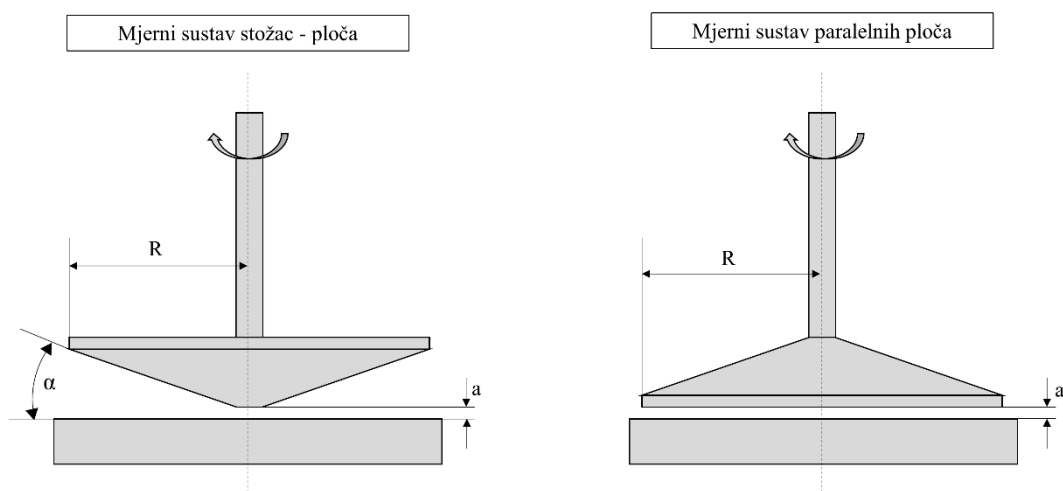
Koncentracija  $\beta$ -GP-a u svim DoE uzorcima iznosila je 188 mg mL<sup>-1</sup>. AAH – kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu; IFR – protok udahnutog zraka.

#### 3.2.2.4 Određivanje koncentracije donepezila u termoosjetljivim otopinama

Koncentracija donepezila u formulacijama pripremljenim prema DoE-u određena je HPLC metodom koja je opisana u poglavlju 3.2.4. Alikvot pripravljene termoosjetljive otopine donepezila je razrijeđen točno određenom količinom pročišćene vode. Razrijeđeni uzorak je prije analize profiltriran kroz polietersulfonski filter veličina pora 0,2  $\mu$ m (Chromafil® Xtra PES-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka), te je kromatografskom metodom određena koncentracija lijeka u uzorku. Sve analize provedene su u triplicatu.

#### 3.2.2.5 Reološka karakterizacija termoosjetljivih otopina donepezila

Reološka karakterizacija termoosjetljivih otopina donepezila provedena je na modularnom kompaktnom reometru serije MCR 102 (Anton Paar GmbH, Austrija) opremljenom s Peltierovim sustavom kontrole temperature. Rotacijska mjerenja provedena su koristeći mjerni sustav stožac – ploča, odnosno mjerno tijelo CP50 (engl. *cone plate*, promjera 50 mm i nagiba 1 °), dok su oscilacijska mjerenja provedena koristeći sustav paralelnih ploča, odnosno mjerno tijelo PP50 (engl. *parallel plate*, promjera 50 mm) (Slika 15.). Za obradu reograma korišten je softver RheoCompass™, verzija Light 1.23.403 (Anton Paar GmbH, Austrija). Sva reološka mjerenja su provedena u triplicatu.



**Slika 15.** Prikaz mjernog sustava stožac – ploča (lijevo) i mjernog sustava paralelnih ploča (desno).  $a$  – udaljenost mjernog tijela od mjerne ploče;  $R$  – polumjer mjernog tijela;  $\alpha$  –kut koji stožac mjernog tijela zatvara s mjernom pločom.

### 3.2.2.5.1 Određivanje viskoznosti u mirovanju

Viskoznost u mirovanju (engl. *zero-shear viscosity*,  $\eta_0$ ) formulacija određena je pomoću rotacijskog testa puzanja (engl. *creep test*) pri 25 °C. U testu je korišteno mjerno tijelo CP-50, s postavkom udaljenosti mjernog tijela od mjerne ploče na 0,102 mm. Nakon nanošenja na mjernu ploču, uzorak je ostavljen u mirovanju 3 min, te je nakon toga pokrenut test. Testom u trajanju od 5 min ispitana je ovisnost smične deformacije o vremenu. Tijekom testa primjenjivano je konstantno smično naprezanje od 0,1 Pa (148). Viskoznost uzorka pri mirovanju izračunata je pomoću softvera RheoCompass<sup>TM</sup>.

### 3.2.2.5.2 Test promjene amplitude

Test promjene amplitude (engl. *amplitude sweep test*) proveden je s ciljem definiranja linearnog viskoelastičnog područja (engl. *linear viscoelastic range* LVE), odnosno smične deformacije pri kojoj će se izvoditi test vremena geliranja i test promjene temperature. Test promjene amplitude prati ovisnost  $G'$  i  $G''$  o amplitudi odnosno smičnoj deformaciji ( $\gamma$ ). U testu je korišteno mjerno tijelo PP-50, s postavkom udaljenosti mjernog tijela od mjerne ploče na 0,500 mm. Raspon amplituda iznosio je od 0,1 do 100 %, kutna frekvencija podešena je na 6,28 rad s<sup>-1</sup>, a temperatura pri kojoj je izveden test bila je 34 °C.

### 3.2.2.5.3 Test vremena geliranja

Vrijeme geliranja (engl. *gelation time*,  $t_{GEL}$ ) definirano je kao vrijeme potrebno za prijelaz uzorka iz tekućeg (sol) u čvrsto (gel) stanje (sol-gel prijelaz). Oscilacijski vremenski test korišten je za određivanje  $t_{GEL}$ , pri čemu su modul pohrane ( $G'$ ) i modul gubitka ( $G''$ ) praćeni u ovisnosti o vremenu. U testu vremena geliranja korišteno je mjerno tijelo PP50, a test je proveden pri temperaturi od 34 °C, što odgovara temperaturi nosne sluznice (98). Udaljenost mjernog tijela od mjerne ploče iznosila je 0,500 mm, smična deformacija bila je postavljena na 1 % (vrijednost iz LVE područja odabrana nakon provedenog testa promjene amplitude), a kutna frekvencija bila je 6,28 rad s<sup>-1</sup>. Sjecište krivulja  $G'$  i  $G''$  označeno je kao točka faznog prijelaza uzorka iz sol u gel stanje, iz koje se može odrediti vrijeme geliranja uzorka pri temperaturi od 34 °C (155).

### 3.2.2.5.4 Test promjene temperature

Oscilacijski test promjene temperature korišten je za određivanje temperature pri kojoj uzorak prelazi iz sol u gel stanje (engl. *gelation temperature*,  $T_{GEL}$ ). Krivulje  $G'$  i  $G''$  praćene su u ovisnosti o temperaturi u rasponu od 20 °C do 40 °C. Porast temperature tijekom testa iznosio je 1 °C u minuti. Korišteno je mjerno tijelo PP50, a razmak mjernog tijela od mjerne ploče podešen je na 0,500 mm. Kutna frekvencija iznosila je 6,28 rad s<sup>-1</sup>, a smična deformacija postavljena je na 1 % (vrijednost iz LVE područja odabrana nakon provedenog testa promjene amplitude). Temperatura pri kojoj se sijeku krivulje  $G'$  i  $G''$  zabilježena je kao temperatura geliranja termoosjetljive otopine donepezila (164).

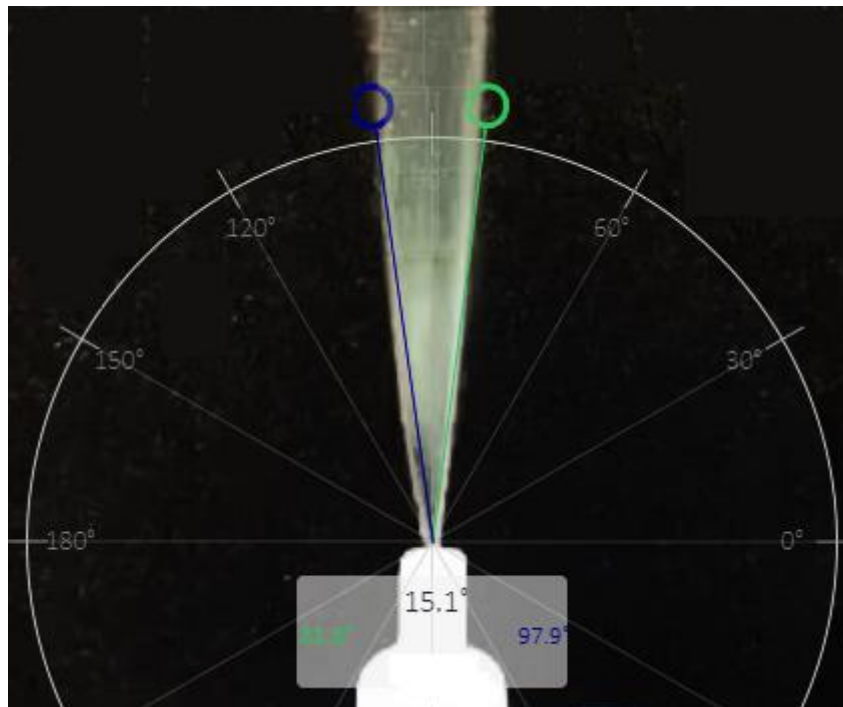
### 3.2.2.6 Određivanje raspodjele veličina raspršenih kapljica termoosjetljivih otopina donepezila

Raspodjela veličina raspršenih kapljica (engl. *droplet size distribution*, DSD) određena je metodom laserske difrakcije pomoću uređaja Malvern Spraytec (Malvern Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo). Uzorci su ručno raspršivani VP7 raspršivačem namijenjenim za nazalnu primjenu (Aptar Pharma Group, Francuska), ljubazno doniranim od Aptar Pharma grupacije. Korišteni VP7 raspršivač opremljen je 232 NE aktuatorom, te u takvoj postavci volumen po potisku iznosi 100 μL. Prije samog mjerenja, VP7 raspršivač pripremljen je raspršivanjem nekoliko doza u zrak, kako bi se prilikom mjerenja osigurala ujednačenost raspršene doze. Prilikom mjerenja uzorci su ručno raspršivani, s vrhom bočice namještenim 3 cm ispod laserske mjerne zone. Fokalna udaljenost od leće iznosila je 300 mm. Mjerenja su provedena u triplicatu. Rezultati su analizirani pomoću Malvern Spraytec 3.20 softvera

(Malvern Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo), te su izraženi volumnim promjerima  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$ , a izračunat je i indeks polidisperznosti (engl. *span*) prema izrazu  $(D_{v90} - D_{v10})/D_{v50}$  (217).

### 3.2.2.7 Određivanje kuta raspršenja termoosjetljivih otopina donepezila

Termoosjetljiva otopina donepezila raspršena je VP7 raspršivačem naspram tamne pozadine (Slika 16.). Postupak određivanja kuta raspršenja jednak je kao i kod praškastih sustava (poglavlje 3.2.1.9.), samo u slučaju tekućih uzoraka postavka kamere za snimanje video zapisa raspršenog oblaka iznosila je 120 sličica u sekundi. Svi uzorci analizirani su u triplikatu.



**Slika 16.** Određivanje kuta raspršenja tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom pomoću virtualnog kutomjera.

### 3.2.2.8 Određivanje profila nazalne depozicije termoosjetljivih otopina donepezila *in vitro*

Profil nazalne depozicije termoosjetljivih otopina donepezila ispitan je na 3D printanom modelu opisanom u poglavlju 3.2.1.10. (Slika 14.). Respiratorna pumpa (Respiratory Pump Model 613, Harvard Apparatus, SAD) spojena je na model s ciljem simuliranja udaha od  $0 \text{ L min}^{-1}$  (zadržan udah),  $15 \text{ L min}^{-1}$  (udah u stanju mirovanja) (218) i  $30 \text{ L min}^{-1}$  (umjereno duboki udah) (148). Protok postavljen respiratornom pumpom provjeren je nazalnim mjerućem inspiracijskog protoka In-Check Nasal (Clement Clarke International Ltd.,

Ujedinjeno Kraljevstvo). Prije aktivacije nazalnog raspršivača, model je premazan indikatorskom pastom Sar-Gel<sup>®</sup> (Arkema, Francuska) u jednoličnom tankom sloju, te je svaka premazana regija izvagana na analitičkoj vagi (preciznost 0,01 mg). Indikatorska Sar-Gel<sup>®</sup> pasta omogućava vizualizaciju profila depozicije: pasta u kontaktu s vodom postaje ljubičasta. Uzorci su u model raspršeni pomoću VP7 nazalnog uređaja, koji je prilikom ispitivanja nazalne depozicije umetnut u desnu nosnicu, na dubinu od 5 mm. Prilikom aktivacije VP7 raspršivača, lijeva nosnica je bila začepljena (169).

Udio doze dostavljen u svaku pojedinu regiju nosne šupljine modela određen je gravimetrijski: nakon raspršivanja doze u model, regije premazane Sar-Gel<sup>®</sup> pastom su izvagane, a količina formulacije dostavljene u pojedinu regiju izračunata je kao razlika mase pojedine regije prije i nakon aktivacije VP7 raspršivača u model, te je izražena kao postotak primijenjene doze. Doza primijenjena u model određena je vaganjem uređaja prije i nakon aktivacije. Ispitivanje profila depozicije za svaki pojedini uzorak provedeno je u duplikatu.

### **3.2.3 Detaljna karakterizacija vodećeg praškastog i tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom**

Vodeća praškasta i tekuća *in situ* gelirajuća formulacija detaljno je karakterizirana s obzirom na biofarmaceutska svojstva uključujući oslobađanje donepezila *in vitro*, mukoadhezivnost *ex vivo*, biokompatibilnost i permeabilnost *in vitro*, te profil stabilnosti. Vodećim formulacijama ispitan je i potencijal iritabilnosti *in vivo*, koristeći test iritacije sluznice puža golaća. Vodećoj praškastoj formulaciji ispitana su i morfološka svojstva mikrosfera.

#### **3.2.3.1 Ispitivanje profila oslobađanja donepezila *in vitro***

Ispitivanje *in vitro* oslobađanja donepezila iz vodeće praškaste i tekuće *in situ* gelirajuće formulacije provedeno je na automatiziranom sustavu Franzovih difuzijskih ćelija Phoenix<sup>™</sup> RDS (Teledyne Hanson, SAD) (Slika 17.).

Uređaj za *in vitro* ispitivanje oslobađanja djelatne tvari s automatiziranim uzorkovanjem opremljen je Peltierovim termoblokom u koji je moguće umetnuti šest Franzovih difuzijskih ćelija s nominalnim volumenom receptorskog odjeljka od 15 mL.





**Slika 17.** Automatizirani sustav Franzovih difuzijskih ćelija Phoenix™ RDS (Teledyne Hanson, SAD).

Pri ispitivanju oslobađanja donepezila iz *in situ* gelirajućih formulacija, receptorski odjeljak Franzovih difuzijskih ćelija bio je ispunjen SNF-om i termostatiran pri 34 °C. Sadržaj receptorskog odjeljka konstantno je miješan pomoću magnetskog mješača. U određenim vremenskim intervalima, 200 µL medija uzorkovano je iz receptorskog odjeljka kroz postraničnu cjevčicu Franzove difuzijske ćelije te je uzorkovani medij zamijenjen istom količinom svježeg termostatiranog SNF-a.

U slučaju ispitivanja oslobađanja donepezila iz praškastih formulacija, količina praškastog uzorka koja sadrži 1 mg donepezila izvagana je izravno na poliamidnu membranu veličine pora 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka), tako da prašak jednoliko prekriva cijelu površinu membrane. Membrana s uzorkom umetnuta je između donorskog i receptorskog odjeljka, a donorski odjeljak zaštićen je staklenim šeširićem tijekom čitavog eksperimenta radi sprječavanja isparavanja. Trajanje eksperimenta iznosilo je 8 h. Kao kontrolni uzorci korišteni su: kitozanske mikrosfere s donepezilom bez manitola (omjer donepezila i kitozana jednak kao i u vodećem praškastom uzorku), te čisti donepezil u obliku praška.

U slučaju ispitivanja oslobađanja donepezila iz (termoosjetljivih) otopina, 500 µL ispitivanog tekućeg uzorka otpipetirano je izravno na membranu postavljenu između

donorskog i receptorskog odjeljka (membrana prethodno kondicionirana u termostatiranom SNF-u u trajanju od 15 min), pomoću pipete za viskozne uzorke Multipette® E3 (Eppendorf, Njemačka) s propipetom ViscoTip® (Eppendorf, Njemačka). Donorski odjeljak prekriven je staklenim šeširićem za vrijeme trajanja ispitivanja radi sprječavanja isparavanja. Trajanje eksperimenta iznosilo je 5 h. Kao kontrolni uzroci korišteni su: termoosjetljiva otopina donepezila s udjelom kitozana različitim od onog u vodećoj formulaciji te vodena otopina donepezila s koncentracijom lijeka kao u vodećoj formulaciji.

Sadržaj oslobođenog donepezila u uzorkovanim uzorcima određen je HPLC metodom opisanom u poglavlju 3.2.4. Sadržaj lijeka u donorskom odjeljku na kraju eksperimenta također je kvantitativno određen. Oslobođanje lijeka iz svih ispitanih uzoraka analizirano je u triplicatu.

Ispitana je i kinetika oslobađanja lijeka iz vodećih formulacija korištenjem sljedećih jednadžbi (93,219,220):

- kinetika nultog reda (jednadžba 4);

$$\frac{c_t}{c_\infty} = k_{c0} \times t \quad (4)$$

- kinetika prvog reda (jednadžba 5);

$$\log \frac{c_t}{c_\infty} = k_c \times t \quad (5)$$

- Higuchijev model (jednadžba 6);

$$\frac{c_t}{c_\infty} = k_{CH} \times \sqrt{t} \quad (6)$$

gdje  $c_t/c_\infty$  predstavlja frakciju oslobođenog lijeka u vremenu  $t$ , a  $k_{c0}$ ,  $k_c$  i  $k_{CH}$  predstavljaju konstante oslobađanja lijeka za svaki pojedini model (redom za kinetiku nultog reda, prvog reda i kinetiku prema Higuchiju). Za svaki model određen je koeficijent determinacije ( $R^2$ ), te je prema njemu zaključeno koji model najbolje opisuje oslobađanje lijeka.

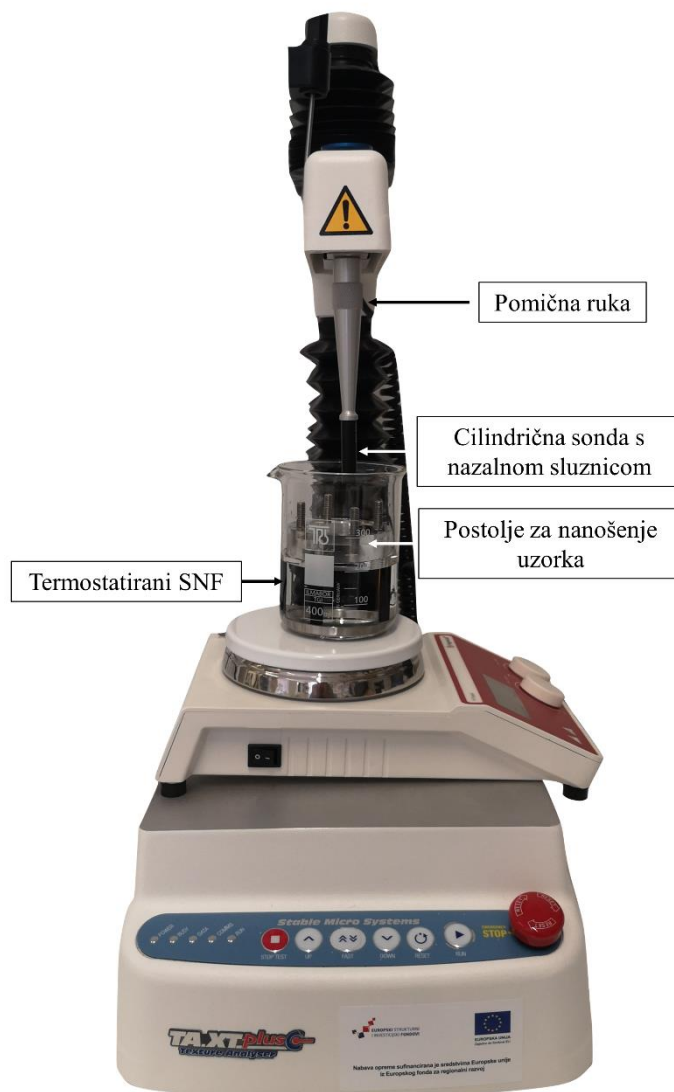
### 3.2.3.2 Ispitivanje mukoadhezivnosti *ex vivo*

Mukoadhezivnost vodeće praškaste i tekuće *in situ* gelirajuće formulacije s donepezilom ispitana su pomoću TA.XT Plus analizatora teksture (Stable Micro Systems, Ujedinjeno Kraljevstvo) opremljenog nastavkom za ispitivanje mukoadhezivnosti koji uključuje cilindričnu sondu promjera 10 mm i postolje na koje se nanosi uzorak.

Nazalna sluznica svinje korištena je za ispitivanje mukoadhezivnosti pripremljenih formulacija. Sluznica je izolirana iz glave svinje prema Fachel i sur. (221), a svinjska glava je nabavljena iz lokalne klaonice. Za provođenje ispitivanja koja uključuju korištenje nazalne sluznice svinje dobiveno je odobrenje Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ukratko, glava svinje je prepolovljena longitudinalnim presjekom duž septuma. Nakon reza, nazalna sluznica je izolirana iz nosne šupljine te je čuvana pri temperaturi -20 °C do korištenja. Prije eksperimenta, sluznica je izrezana u diskove promjera 10 mm koji su cijanoakrilatnim ljepilom zalijepljeni na cilindričnu sondu teksturnog analizatora. Nakon nanošenja sluznice na sondu, sluznica je namočena s 50 µL SNF-a (termostatiranog pri 34 °C), te je ostavljena u mirovanju 30 s prije početka pokusa. Tijekom pokusa, platforma na koju se nanosi uzorak je fiksirana kako bi bila nepomična, te je termostatirana u SNF-u pri 34 °C. Ispitivanje mukoadhezivnosti prikazano je na Slici 18. Prilikom ispitivanja mukoadhezivnosti praškastih i tekućih formulacija kao negativna kontrola korišten je filter papir.

U slučaju ispitivanja mukoadhezivnosti praškastih formulacija donepezila, točna masa ispitivanog praškastog uzorka (5 mg) izvagana je na platformu teksturnog analizatora, navlažena s 40 µL SNF-a termostatiranog pri 34 °C, te su takvi prašci ostavljeni stajati 30 s prije eksperimenta. Korišteni su isti kontrolni uzorci kao i prilikom ispitivanja *in vitro* oslobađanja donepezila iz vodećeg praškastog uzorka.

U slučaju ispitivanja mukoadhezivnosti (termoosjetljivih) otopina donepezila, 100 µL ispitivanog uzorka otpipetirano je izravno na nepomičnu platformu teksturnog analizatora pomoću pipete za viskozne uzorke Multipette<sup>®</sup> E3 (Eppendorf, Njemačka) s propipetom ViscoTip<sup>®</sup> (Eppendorf, Njemačka), te je uzorak mirovao 30 s prije početka mjerenja. Korišteni su isti kontrolni uzorci kao i prilikom ispitivanja *in vitro* oslobađanja donepezila iz vodećeg tekućeg uzorka.



**Slika 18.** Ispitivanje mukoadhezivnosti vodećih *in situ* gelirajućih formulacija s donepezilom korištenjem nazalne sluznice svinje nalijepljene na cilindričnu sondu i postolja s nanijetim uzorkom. SNF – simulirani nosni fluid (engl. *simulated nasal fluid*).

Postavke testa za ispitivanje mukoadhezivnosti praškastih i tekućih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom navedene su u Tablici 10.

Test ispitivanja mukoadhezivnosti mjeri maksimalnu silu ( $F_{\max}$ ) i rad adhezije ( $W_{\text{ad}}$ ) potreban za odvajanje sluznice nosa svinje od mukoadhezivnog uzorka. Računalni softver Exponent Connect (Stable Micro Systems, Ujedinjeno Kraljevstvo) nakon izvedenog testa daje podatke o  $F_{\max}$  i površini ispod krivulje ( $A$ ) ovisnosti sile o udaljenosti koju prijeđe sonda u testu. Rad adhezije ( $W_{\text{ad}}$ ) izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$W_{adh} = A \times 0,1 \times 1000 \quad (7)$$

gdje množitelj 0,1 predstavlja konverziju jedinice vremena u jedinicu udaljenosti (brzina sonde 0,1 mm s<sup>-1</sup>), a množitelj 1000 je prisutan u jednadžbi kako bi jedinica izraženog rada bila u mikrodžulima (μJ) (144). Ispitivanja svih uzoraka provedena su u triplikatu.

**Tablica 10.** Postavke testa za ispitivanje mukoadhezivnosti praškastih i tekućih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom.

Parametar	Prašcasti uzorak	Tekući uzorak
Brzina spuštanja sonde prije testa (mm s <sup>-1</sup> )	0,5	0,5
Brzina podizanja sonde za vrijeme testa (mm s <sup>-1</sup> )	0,1	0,1
Brzina podizanja sonde nakon testa (mm s <sup>-1</sup> )	0,1	0,1
Vrijeme kontakta sonde i uzorka (s)	30	120
Primijenjena sila sonde na uzorak (N)	0,1	0,1

### 3.2.3.3 Ispitivanje biokompatibilnosti i permeabilnosti *in vitro*

Biokompatibilnost i permeabilnost vodeće praškaste i tekuće *in situ* gelirajuće formulacije s donepezilom ispitane su na humanoj staničnoj liniji adenokarcinoma pluća - Calu-3 staničnoj liniji (ATCC® HTB-55™; ATCC, SAD).

#### 3.2.3.3.1 Uvjeti uzgoja stanica

Za uzgoj Calu-3 stanične linije korišten je Dulbeccov medij za uzgoj stanica (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium* – DMEM-F12; Sigma Aldrich, SAD) koji je obogaćen fetalnim goveđim serumom u koncentraciji od 10 %, *V/V*, (engl. *foetal bovine serum*, FBS; Sigma Aldrich, SAD) i smjesom antibiotika penicilina i streptomocina u koncentraciji od 1 %, *V/V* (Lonza, Švicarska). Stanice su uzgajane u inkubatoru (Sanyo CO<sub>2</sub>, Japan) pri 37 °C, 95 % relativne vlažnosti zraka i u atmosferi 5 % CO<sub>2</sub>. Stanični hranidbeni medij mijenjan je svakih 48 h. Nakon postizanja 70-90 % konfluentnosti, stanice su presađene u novu tikvicu. Konfluentnost staničnog sloja promatrana je invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka). Smjesa tripsina (0,25 %, *V/V*; Capricorn Scientific GmbH, Njemačka) i EDTA (0,02 %, *V/V*; Sigma Aldrich, SAD) u fosfatnom puferu pH 7,4 (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS; Lonza, Švicarska) korištena je za odjeljivanje stanica od podloge. HBSS pufer korišten prilikom ispitivanja biokompatibilnosti i permeabilnosti praškastih uzoraka bio

je pH vrijednosti 6,0, a pH HBSS pufera prilikom ispitivanja biokompatibilnosti i permeabilnosti tekućih uzoraka bio je 7,0.

### 3.2.3.3.2 Ispitivanje biokompatibilnosti *in vitro*

Za ispitivanje biokompatibilnosti pripremljenih uzoraka korišten je MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid] kolorimetrijski test za ispitivanje metaboličke aktivnosti stanica. MTT reagens pripremljen je otapanjem MTT-a u PBS-u u koncentraciji 2,5 mg mL<sup>-1</sup>, te je ta otopina razrijeđena staničnim medijem DMEM-F12 do koncentracije MTT-a od 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Calu-3 stanice nasađene su na ploču s 96 jažica (Corning Costar Inc, SAD) pri koncentraciji 4 × 10<sup>4</sup> stanica po jažici. Nakon 48 h (vrijeme potrebno za postizanje konfluentnog staničnog sloja u jažici), stanični medij je odsisan, a svaka jažica isprana je HBSS puferom. Stanice su izložene pripremljenim uzrocima u trajanju od 2 h, pri 37 °C. Jažice inkubirane u čistom HBSS puferu služile su kao negativna kontrola. Nakon dva sata, uzorci su odsisani, stanice su isprane HBSS-om u dva obroka od 100 μL pufera. Isprane jažice izložene su pripremljenom MTT reagensu (100 μL po jažici) u trajanju od 2 h, pri 37 °C. Nakon dvosatne inkubacije, reagens je uklonjen, a jažicama je dodano 100 μL izopropanola kako bi se otopili stvoreni kristalići formazana. Količina stvorenog formazana određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 570 nm, pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Multilabel counter VICTOR<sup>3</sup>, PerkinElmer, SAD). Vijabilnost stanica izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{Vijabilnost (\%)} = \frac{A_{\text{uzorka}} - A_{\text{izopropanol}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{izopropanol}}} \times 100 \quad (8)$$

pri čemu  $A_{\text{uzorka}}$  predstavlja apsorbanciju otopine kristala formazana nastalih u stanicama izloženim ispitivanim formulacijama,  $A_{\text{kontrola}}$  predstavlja apsorbanciju otopine kristala formazana nastalih u jažicama izloženim čistom HBSS puferu, a  $A_{\text{izopropanol}}$  je apsorbancija čistog izopropanola. Sva ispitivanja provedena su u triplikatu.

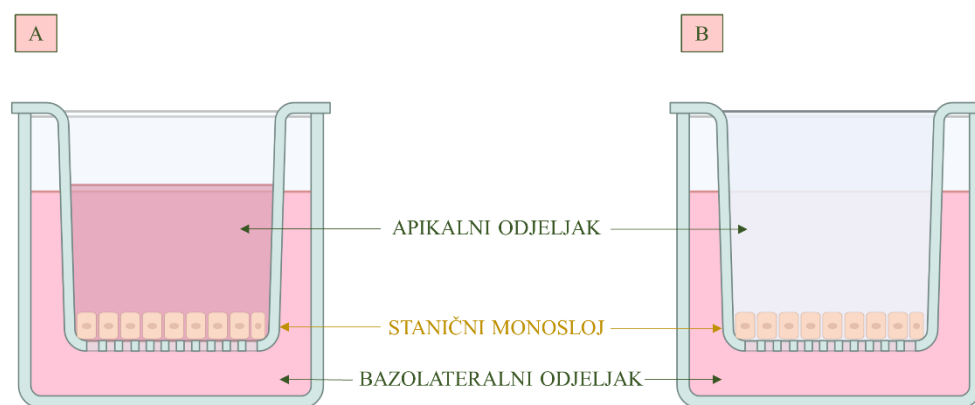
Za ispitivanje biokompatibilnosti, vodeći praškasti uzorak dispergirani su u HBSS puferu. Koncentracije donepezila, kitozana i manitola u pripremljenim uzorcima bile su u rasponu redom: 3 – 11 μg mL<sup>-1</sup>, 10 – 40 μg mL<sup>-1</sup> i 40 – 160 μg mL<sup>-1</sup>. Kao kontrolni uzorci korištene su vodene otopine manitola i donepezila u odgovarajućim koncentracijama.

Za ispitivanje biokompatibilnosti, vodeći tekući uzorak razrijeđen je HBSS puferom u volumnom omjeru 1:1. Koncentracije donepezila, kitozana i β-GP-a u tako razrijeđenom uzorku iznosile su redom 0,15 mg mL<sup>-1</sup>, 4,62 mg mL<sup>-1</sup> i 94,00 mg mL<sup>-1</sup>. Kao kontrolni uzorci

korištene su vodene otopine donepezila u rasponu koncentracija 0,05 – 0,25 mg mL<sup>-1</sup>, te vodena otopina β-GP-a koncentracije 94,00 mg mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.3.3.3 Ispitivanje permeabilnosti *in vitro*

U svrhu ispitivanja permeabilnosti, Calu-3 stanice nasadene su na Transwell® ploče s 12 jažica (Corning Costar Inc., SAD). Jažice sadržavaju polikarbonatnu membranu (veličina pora 0,4 μm) između apikalnog (donorskog) i bazolateralnog (receptorskog) odjeljka, a površina jažice iznosi 1,12 cm<sup>2</sup>. Stanice su nasadene na apikalnu membranu pri koncentraciji 5,5×10<sup>5</sup> stanica po membrani te inkubirane uz dodatak 500 μl staničnog medija u apikalni i 1500 μl staničnog medija u bazolateralni odjeljak (Slika 19.; A). Nakon 48 h, uzgoj stanica je nastavljen u ALI (engl. *air-liquid interface*) uvjetima: stanični medij odsisan je iz donorskog odjeljka, te su stanice s apikalne strane ostavljene rasti izložene zraku, dok je u receptorskom odjeljku stanični medij (u volumenu od 800 μL) mijenjan svaka dva dana (Slika 19.; B).



**Slika 19.** Prikaz jažice na Transwell® ploči. A – rast stanica sa staničnim medijem u apikalnom i bazolateralnom odjeljku; B – rast stanica u ALI (engl. *air-liquid interface*) uvjetima uzgoja, gdje su stanice u apikalnom odjeljku izložene zraku. Ilustracija je napravljena pomoću programa BioRender (BioRender.com, Kanada).

Rast stanica i integritet staničnog monosloja praćeni su mjerenjem transepitelnog električnog otpora (engl. *transepithelial electrical resistance*, TEER). TEER je svakodnevno mjeren pomoću epitelnog volt/ohm metra EVOM opremljenog štapićastom STX-2 elektrodom (WPI Inc., SAD). Ustaljivanje TEER vrijednosti označava postizanje potpune konfluentnosti staničnog monosloja - obično 12. - 14. dan od izlaganja apikalnog odjeljka zraku. Nakon postizanja ustaljene TEER vrijednosti, ispitana je permeabilnost donepezila iz pripremljenih formulacija kroz Calu-3 stanični monosloj u medij bazolateralnog odjeljka.

Prije ispitivanja permeabilnosti, receptorski medij je odsisan, te su su jažice isprane HBSS puferom. U donorski odjeljak otpipetirano je 500  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka, a u receptorski 1500  $\mu\text{L}$  HBSS pufera. Jažice inkubirane s HBSS puferom u apikalnom odjeljku poslužile su kao negativna kontrola. Ploča s uzorcima i negativnim kontrolama inkubirana je u trajanju od 2 sata, pri 37 °C, uz kontinuirano miješanje pri 50 okretaja po minuti na orbitalnoj tresilici. Uzorkovanje receptorskog odjeljka (500  $\mu\text{L}$ ) provedeno je u točno definiranim vremenskim točkama: 20, 40, 60, 80, 100 i 120 minuta od početka eksperimenta. Nakon svakog uzorkovanja, receptorski medij nadopunjen je istim volumenom svježeg HBSS pufera termostatanog pri 37 °C. Alikvoti receptorskog medija uzorkovani u točno određenim vremenskim točkama, te donorski odjeljak na kraju eksperimenta analizirani su na sadržaj donepezila HPLC metodom opisanom u poglavlju 3.2.4. Prividni koeficijent permeabilnosti (engl. *apparent permeability coefficient*,  $P_{\text{app}}$ ) izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0} \quad (9)$$

pri čemu  $dQ/dt$  predstavlja brzinu difuzije (fluks),  $A$  površinu jažice, a  $C_0$  je početna koncentracija lijeka u donorskom odjeljku.

TEER vrijednosti Calu-3 staničnog monosloja mjerene se na početku ispitivanja, te 30, 70 i 120 minuta nakon početka eksperimenta. Nakon završetka ispitivanja permeabilnosti, uzroci i HBSS pufer odsisani su iz receptorskog, odnosno donorskog odjeljka. Apikalni odjeljak ostao je izložen zraku, a u receptorski odjeljak dodano je 800  $\mu\text{L}$  svježeg staničnog medija, te je Transwell ploča inkubirana 24 h u staničnom inkubatoru u uvjetima opisanim u poglavlju 3.2.3.3.1. Po isteku 24 h inkubacije, izmjerene su TEER vrijednosti stanica na Transwell ploči, kako bi se provjerila očuvanost staničnog monosloja nakon provedenog pokusa permeabilnosti. Također, stanicama je ispitana i vijabilnost prema postupku prethodno opisanom u poglavlju 3.2.3.3.2., uz manje promjene protokola s obzirom da su u ovom slučaju stanice nasađene na Transwell® ploču (144). Ukratko, stanični medij odsisan je iz apikalnog i bazolateralnog odjeljka, te je u svaki odjeljak dodano 700  $\mu\text{L}$  svježe pripremljenog MTT reagensa (0,5 mg mL<sup>-1</sup> u DMEM-F12 staničnom mediju). Stanice su inkubirane s reagensom 2 h, pri 37 °C, a potom je reagens odsisan. U svaki pojedini donorski i receptorski odjeljak dodano je 700  $\mu\text{L}$  izopropanola, kako bi se otopili nastali kristalići formazana. Apsorbancija nastalih otopina formazana izmjerena je spektrofotometrijski pomoću čitača mikrotitarskih pločica (1420 Multilabel counter VICTOR<sup>3</sup>, PerkinElmer, SAD), a vijabilnost stanica određena je prema jednadžbi 8.



Za ispitivanje permeabilnosti, vodeći praškasti uzorak dispergirani su u HBSS puferu. Koncentracije donepezila, kitozana i manitola u pripremljenoj disperziji redom su iznosile  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Kao kontrolni uzorci korišteni su vodena otopina donepezila i manitola te vodena otopina donepezila u odgovarajućim koncentracijama.

Za ispitivanje permeabilnosti, vodeći tekući uzorak razrijeđen je HBSS puferom u volumnom omjeru 1:1. Kao kontrolni uzorci korišteni su vodena otopina donepezila koncentracije  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  i otopina donepezila u hiperosmotskom HBSS puferu (koncentracija donepezila iznosila je  $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Osmolalnost hiperosmotskog HBSS-a bila je jednaka osmolalnosti vodeće formulacije razrijeđene s HBSS-om u omjeru 1:1.

Hiperosmotski HBSS pufer pripremljen je prema Soni i suradnici (222): 12 g NaCl dodano je u 1 L pripremljenog HBSS pufera ( $\text{pH}=7,0$ ), što rezultira koncentracijom NaCl od 2 % ( $m/V$ ).

Osmolalnost svih uzoraka korištenih u ispitivanju izmjerena je pomoću osmometra OsmoTECH® Single-Sample Micro (Advanced Instruments, SAD).

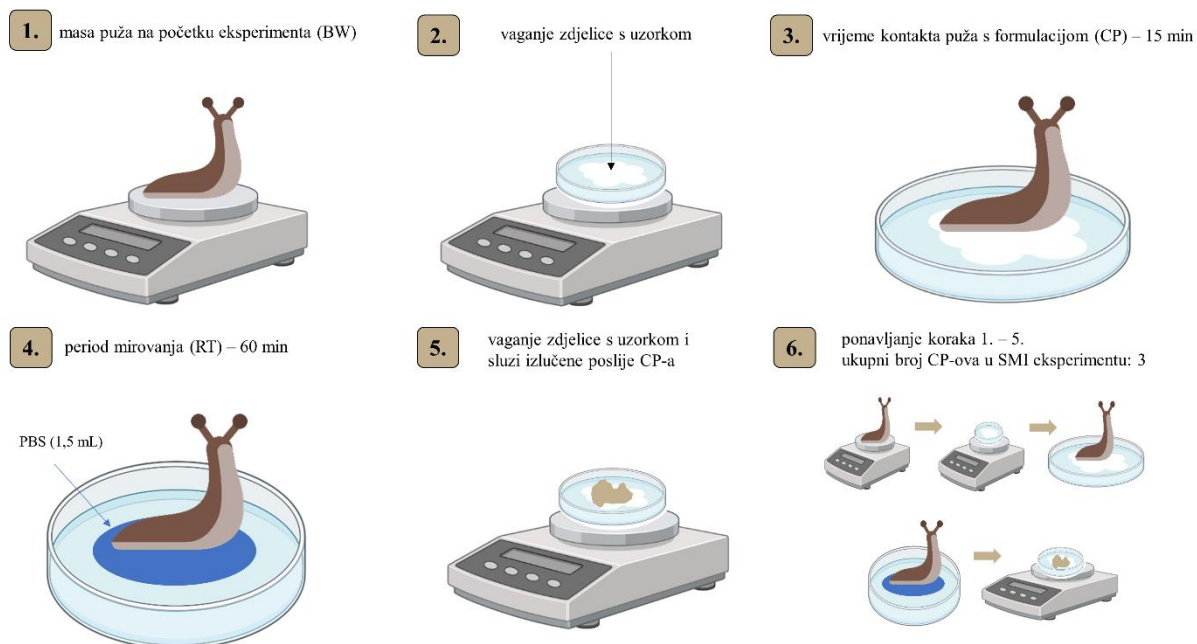
Ispitivanje permeabilnosti za svaki uzorak provedeno je u triplicatu.

#### **3.2.3.4 Test iritacije sluznice puža golaća *in vivo***

Test iritacije sluznice puža golaća (engl. *slug mucosal irritation*, SMI) proveden je s ciljem ispitivanja potencijala iritabilnosti praškastih i tekućih *in situ* gelirajućih formulacija na nosnoj sluznici. U testu su korišteni puževi vrste *Arion lusitanicus*, a protokol je proveden prema Trenkel i Scherließ (129). SMI test proveden je na Zavodu za farmaceutiku i biofarmaceutiku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Kielu (*Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Pharmazeutisches Institut, Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie*). Puževi golaći su prikupljeni u prirodi, te su preneseni u laboratorij gdje su održavani do trenutka kad im je masa bila između 3 i 6 g. Samo puževi koji su postigli navedenu masu korišteni su u SMI testu.

Prije eksperimenta, puževi su izvagani, te je zabilježena masa svakog pojedinačnog puža (engl. *body weight*, BW). Ispitivani uzorak (aliquot od  $100 \mu\text{L}$  ispitivanog tekućeg uzorka, odnosno masa od 50 mg ispitivanog praškastog uzorka) prenesen je u čistu Petrijevu zdjelicu, te je zabilježena masa uzorka i zdjelice. Puževi su postavljeni na uzorak u Petrijevoj zdjelici te je vrijeme kontakta puža s formulacijom iznosilo 15 min (engl. *contact period*, CP). Nakon isteka vremena prvog CP-a, puževi su premješteni u čistu Petrijevu zdjelicu sa 1,5 mL PBS-a, te su mirovali 60 min (engl. *resting time*, RT). Tijekom RT-a, Petrijeva zdjelica s uzorkom i

izlučenom sluzi poslije prvog CP-a je izvagana, te je zabilježena masa. Po isteku prvog RT-a, cijeli postupak ponovljen je još dva puta: ukupni broj CP-ova bio je tri. Postupak SMI testa prikazan je na slici 20.



**Slika 20.** Postupak testa iritacije sluznice puža golaća. Ilustracija je napravljena pomoću programa BioRender (BioRender.com, Kanada).

Ukupna izlučena sluz (engl. *total mucus production*, TM) nakon tri CP-a izražena je kao postotak početne mase puža (BW (engl. *body weight*, izražen u gramima), a izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$TM (\%) = \frac{M}{BW} \times 100\% \quad (10)$$

pri čemu je  $M$  ukupna masa izlučene sluzi u sva tri CP-a (izražena u gramima).

Isti postupak primijenjen je i za negativnu i pozitivnu kontrolu. Kao negativna kontrola korišten je PBS (100  $\mu$ L; nema iritacije), a kao pozitivna kontrola korištena je 1 % ( $m/V$ ) otopina benzalkonijevog klorida (BAC) (100  $\mu$ L; maksimalna iritacija). Za svaki uzorak, ispitivanje je provedeno u triplikatu, a za svaki replikat korišten je zaseban puž.

### 3.2.3.5 Ispitivanje morfoloških svojstava praškastih sustava s donepezilom

Morfologija praškastih sustava s donepezilom ispitana je pretražnom elektronskom mikroskopijom (engl. *scanning electron microscopy*, SEM) pomoću mikroskopa Tescan Vega

3 (Tescan, Češka). Praškasti uzorci postavljeni su na metalno postolje pomoću obostrano ljepljive trake. Prije analize, uzorci su napareni zlatom i paladijem pod tlakom od 0,01 mbar u inertnoj atmosferi argona koristeći naparivač Quorum SC 7620.

### 3.2.3.6 Ispitivanje stabilnosti

Ispitivanje stabilnosti vodećih *in situ* gelirajućih formulacija donepezila provedeno je u stabilitetnim vremenskim točkama 180 dana za praškasti uzorak, te 30 i 90 dana za tekući uzorak. Formulacije su tijekom vremena čuvane u dobro zatvorenom spremniku, pri temperaturi  $5 \pm 3$  °C. Vodeće formulacije su u spomenutim vremenskim točkama analizirane s obzirom na sadržaj lijeka, raspodjelu veličina čestica/raspršenih kapljica, svojstva tečenja, *in vitro* oslobađanje donepezila, te je praškastim sustavima određen i sadržaj vlage. Rezultati karakterizacije u određenim vremenskim točkama su uspoređeni s rezultatima analiza izvedenih odmah nakon pripreme vodećih formulacija.

### 3.2.4 Kvantitativno određivanje donepezila

Kvantitativno određivanje donepezila provedeno je pomoću HPLC metode prema Pappa i sur. (223), uz manje promjene originalne metode. HPLC analiza donepezila provedena je na kromatografskom sustavu za analizu 1260 Infinity II LC System (Agilent Technologies, SAD) koji se sastoji od automatskog injektora, uređaja za kontrolu tlaka, pumpe, sustava za obradu otapala koji uklanja otopljene plinove (engl. *degasser*), UV-VIS detektora i pećnice za kolonu. OpenLab softver (Agilent Technologies, SAD) korišten je prilikom obrade kromatograma. Kromatografsko odvajanje provedeno je na Kinetex C18 koloni ( $250 \times 4,6$  mm, veličina čestica  $2,6 \mu\text{m}$ ,  $100 \text{ \AA}$ ; Phenomenex, SAD). Mobilna faza sastojala se od 0,02 M fosfatnog pufera (pH=2,7), metanola i trietilamina u omjeru 50:50:0,5 (V/V/V). Fosfatni pufer korišten za izradu mobilne faze pripremljen je otapanjem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  u ultračistoj vodi, a pH je podešen dodatkom fosforne kiseline (0,1 M) uz pomoć pH-metra S47 SevenMulti (Mettler Toledo, Švicarska). Prije analize, mobilna faza je profiltrirana kroz  $0,2 \mu\text{m}$  filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka) na uređaju za ultrafiltraciju Büchi Rotavapor R-200 (Büchi, Švicarska) pri sniženom tlaku. Analiza je provedena pri sobnoj temperaturi, pri protoku mobilne faze od  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , volumen injektiranja iznosio je  $20 \mu\text{L}$ , a vrijeme analize 8 min. Donepezil je detektiran pri valnoj duljini od 268 nm, pri retencijskom vremenu 5 min. Provedena HPLC metoda kvantitativnog određivanja donepezila validirana je u skladu sa smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju humanih lijekova (engl. *International Conference on Harmonisation*, ICH): ICH

smjernica Q2 (R1) (224). Metoda je validirana s obzirom na linearnost, područje linearnosti, ponovljivost, preciznost, limit detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) i limit kvantifikacije (engl. *limit of quantification*).

### 3.2.5 Statistička obrada rezultata

Rezultati karakterizacije tekućih i praškastih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom su statistički obrađeni analizom varijance s jednim promjenjivim faktorom (engl. *one-way ANOVA*) s post hoc testom Tukey, uz granicu statističke značajnosti  $p < 0,05$ . Statistička analiza rezultata provedena je koristeći statistički program JMP® (JMP, SAS Institute, SAD). Faktor sličnosti  $f_2$  (engl. *similarity factor*) korišten je za usporedbu dvaju profila *in vitro* oslobađanja lijeka. Ukoliko je  $f_2$  faktor bio veći od 50, profili oslobađanja lijeka smatrani su sličnima (225,226).

## **4 REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1 Razvoj mikrosfera kao praškastog *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom

Ciljana dostava u područje od interesa predstavlja ključni faktor za postizanje učinkovitog terapijskog ishoda nazalno primijenjenog lijeka. U slučaju neuroloških lijekova, potrebno je osigurati dostavu lijeka prvenstveno u olfaktorno područje nosne šupljine. Praškasti terapijski sustavi za nazalnu primjenu pokazuju iznimni potencijal za ciljanu olfaktornu depoziciju (80), a u postizanju navedenog cilja pokazali su se nadmoćnijim u odnosu na tekuće formulacije (182,227). Sposobnost prašaka da povećaju dostavu lijeka u mozak dokazana je i *in vivo* ispitivanjima u životinja (85,86,228–230). Također, praškasti sustavi pokazuju i druge prednosti u odnosu na tekuće ljeikovite oblike: imaju bolji profil stabilnosti te je tako smanjena potreba za korištenjem konzervansa, pokazuju produljeno zadržavanje i osiguravaju veću koncentraciju lijeka na nosnoj sluznici. Prilikom primjene praškastih sustava potrebna je manja koordinacija između udaha i potiska što je olakotna okolnost za pacijente (80,231).

Jedan od ciljeva ovog doktorskog rada bio je razviti napredni praškasti *in situ* gelirajući sustav s donepezilom jednostavnom tehnikom sušenja raspršivanjem. Finim ugađanjem procesnih i formulacijskih parametara moguće je u jednom koraku pripremiti praškaste mikrosfere željene morfologije i veličine te povoljnih svojstava tečenja, koji će rezultirati depozicijom u području od interesa. S ciljem učinkovite dostave u mozak, mikrosfere s donepezilom trebaju imati primjerena svojstva bubrenja i mukoadhezije, osigurati produljeno oslobađanje lijeka na sluznici nosa te povećati permeacijski potencijal lijeka.

Kako bi se postigli svi navedeni kriteriji, u ovom radu su kao pomoćne tvari u izradi mikrosfera s donepezilom odabrani niskomolekulski kitozan i manitol. Kitozan je biokompatibilni polimer koji pokazuje mukoadhezivna svojstva te svojstva bubrenja. Također, kitozan djeluje kao pospješivač apsorpcije reverzibilnim otvaranjem TJ-a i na taj način potiče paracelularni transport hidrofilnih lijekova (u ovom slučaju donepezilklorida) (232). Paracelularni transport hidrofilnih lijekova može dodatno pojačati prisustvo dobro topljivog i osmotski aktivnog nosača manitola (129). Kombiniranjem ekscipijensa male i velike molekulske mase u praškastom sustavu mogu se postići ciljana veličina i morfologija praškastih čestica (233).

Ključ za postizanje terapijskog učinka nazalno primijenjenog donepezila je njegova ciljana depozicija primarno u olfaktorno područje nosne šupljine, što je preduvjet za izravnu dostavu donepezila u mozak. Za postizanje optimalnog profila depozicije u nosnoj šupljini treba uzeti u obzir procesne i formulacijske parametre korištene pri samoj izradi terapijskog

sustava (168) kao i parametre primjene lijeka (181). S obzirom na veliki broj čimbenika, u razvoju novog lijeka za nazalnu primjenu sve se više koristi koncept kakvoće utemeljene kroz dizajn (engl. *Quality by Design*, QbD) (81,124). QbD se temelji na znanstvenim spoznajama i upravljanju rizicima kvalitete. Sustavni pristup razvoju lijeka omogućuje smanjenje troškova i poboljšanje učinkovitosti, a u konačnici se dobiva proizvod visoke kvalitete i sigurnosti (81,234). QbD pristup u razvoju lijeka preporučen je i od strane FDA-a i ICH-a, tako da se QbD danas uvelike koristi u razvoju naprednih farmaceutskih oblika, posebice u razvoju praškastih sustava pripremljenih sušenjem raspršivanjem (135,144,235,236). Jedna od ključnih stavki QbD-a je dubinsko razumijevanje procesa razvoja novog farmaceutskog oblika. Takav pristup zahtijeva dobro definirane ciljeve, detaljno razumijevanje procesa proizvodnje i vješto upravljanje rizicima (234).

Imajući na umu QbD načela, razvoj mikrosfera kao naprednog praškastog *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom proveden je koristeći statistički dizajn eksperimenata (DoE). Primjenom DoE-a provedeno je precizno ugađanje procesnih i formulacijskih parametara, te parametara primjene, za optimiranje svojstava mikrosfera i ciljanu dostavu lijeka u olfaktorno područje nosne šupljine. Među eksperimentima DoE-a, izabrane su mikrosfere s najvećim terapijskim potencijalom koje su detaljnom biofarmaceutskom karakterizacijom ispitane s obzirom na profil oslobađanja donepezila *in vitro*, mukoadhezivnost *ex vivo*, biokompatibilnost i permeabilnost *in vitro*, te profil iritabilnosti *in vivo* - metodom testa iritacije sluznice puža golaća. Stabilnost vodećih mikrosfera s donepezilom praćena je kroz period od šest mjeseci.

#### **4.1.1 Rezultati preliminarnih istraživanja u razvoju mikrosfera s donepezilom**

Sušenje raspršivanjem je jednostavna i reproducibilna tehnika kojom je moguće variranjem procesnih i formulacijskih parametara pripremiti mikrosfere željenih svojstava. S obzirom na široki raspon parametara koje je moguće varirati, potrebno je provesti opsežna preliminarna ispitivanja koja će pokazati koji parametri imaju utjecaj na proizvodni proces i svojstva praškastog produkta. U prethodnom poglavlju komentirano je da se pri razvoju praškastih sustava sušenih raspršivanjem često koristi DoE. Kako bi se DoE-om producirale mikrosfere željenih svojstava i kako bi DoE-a omogućio ispravno zaključivanje o utjecaju variranih parametara na svojstva konačnog produkta, potrebno je odabrati formulacijske i procesne parametre koje je vrijedno razmatrati u DoE-u. Nakon odabira parametara potrebno im je postaviti odgovarajuće granice jer dobro postavljeni ulazni podaci jamče fino optimiranje svojstava praškastog produkta (98).

Preliminarne otopine za sušenje sadržavale su donepezil, kitozan niske, srednje ili visoke molekulske mase, te laktozu ili manitol kao punilo. Kitozan je odabran kao mukoadhezivni polimer i pospješivač apsorpcije donepezila, a laktoza i manitol su odabrani kao punila dobrih svojstava tečenja kojima se postiže lakše punjenje dozirnog uređaja i reproducibilnije doziranje (pripravak se ne lijepi za stijenke uređaja) (118). Budući da su sve preliminarne otopine pripravljene u vodi, sve su sušene u otvorenoj petlji, a kao medij za sušenje korišten je zrak. Aspirator je prilikom sušenja preliminarnih otopina bio postavljen na 100 % kapaciteta, a snaga ultrazvučne sapnice iznosila je 65 %. Konstantna snaga sapnice odabrana je u preliminarnim ispitivanjima, s obzirom da pri snazi nižoj od 65 % sapnica nije atomizirala otopinu za sušenje, a pri snazi većoj od 65 % sapnica se zagrijavala iznad temperature dozvoljene za njezin rad.

U Tablici 11. navedeni su formulacijski i procesni parametri varirani tijekom pripreme preliminarnih mikrosfera, te rezultati njihove karakterizacije na temelju kojih su postavljene granice za DoE. Po završetku pripreme preliminarnih mikrosfera zabilježeno je iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem, a pripremljenim mikrosferama određeni su raspodjela veličina čestica i svojstva tečenja.

Prvo su pripremljene kitozanske mikrosfere s donepezilom, sušenjem raspršivanjem otopine kitozana LMW (1 %,  $m/V$ ) i donepezila (0,05 %,  $m/V$ ) (preliminarni uzorci 1 i 2). Pripravljene kitozanske mikrosfere s donepezilom nisu zadovoljile kriterij vezan uz veličinu čestica (glavnina čestica treba imati promjer veći od 10  $\mu\text{m}$ ). Također, kitozanske mikrosfere pokazale su skromna svojstva tečenja (Tablica 11.). U izradu daljnjih preliminaranih mikrosfera uz donepezil i kitozan uvršteno je punilo – laktoza ili manitol. Laktoza i manitol se često koriste kao punila ili nosači, prepoznati su kao GRAS pomoćne tvari, te je njihovo korištenje u farmaceutskim oblicima odobreno od strane FDA-a i EMA-e (139). Optimiranje koncentracije donepezila (0,05 do 0,115 %,  $m/V$ ), kitozana LMW (1,0 do 1,5 %,  $m/V$ ) te laktoze i manitola (1,0 do 3,0 %,  $m/V$ ) u sušenim otopinama izvedeno je pri konstantnim procesnim parametrima ( $T_{\text{in}} -140\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; FPS – 10 %; preliminarni uzorci 3 – 8; Tablica 11.). Promatrajući formulacijske parametre i veličinu čestica preliminaranih uzoraka 3 – 8, razvidno je da je s povećanjem koncentracije sastavnica u otopini za sušenje rasla i veličina čestica. Povećanjem koncentracije krutina (posebice polimera) u otopini za sušenje povećava se viskoznost otopine, a viskoznije otopine na sapnici produciraju veće kapljice koje rezultiraju praškastim česticama većeg promjera (135). Porast veličine čestica izraženiji je kod mikrosfera koje sadrže manitol u odnosu na mikrosfere koje sadrže laktozu. Manitol je većeg stupnja kristaličnosti od laktoze te



prilikom procesa sušenja kapljice brzo kristalizira na površini kapljice. Otapalo ostaje zarobljeno u unutrašnjosti kapljice i postupno isparava kroz kristaličnu ljusku što u konačnici rezultira poroznim česticama većeg promjera (237). Također, laktoza u vodenim otopinama pokazuje veću topljivost od manitola što znači da je difuzija molekula otopljene tvari brža od radijalnog skupljanja kapljice. Praškaste čestice proizvedene u ovom slučaju su gusto pakirane i neporozne, s manjim promjerom (237). Nadalje, čestice koje sadrže manitol imaju bolja svojstva tečenja. Objašnjenje leži u higroskopnosti punila: manitol je manje higroskopan od laktoze, te čestice s manitolom imaju manji sadržaj vlage. Uslijed manje vlažnosti praškastog produkta, manje su i kohezijske sile između čestica praška te on bolje teče (118,144). Zbog primjerenije veličine čestica te boljih svojstava tečenja, manitol je odabran kao punilo za pripravu daljnjih preliminarnih mikrosfera s donepezilom. Upotreba manitola u odnosu na laktozu preferirana je i u pogledu veće stabilnosti manitola koji ne sadrži reducirajuću skupinu, a laktoza može izazvati i neželjene reakcije u pacijenata koji pokazuju intoleranciju na navedeni šećer (118).

Nakon odabira manitola kao punila, nastavljeno je vrednovanje procesnih parametara uz sljedeće postavke formulacijskih parametara (koncentracija donepezila 0,115 – 0,231 % ( $m/V$ ), koncentracija kitozana LMW 1,5 %, ( $m/V$ ) i koncentracija manitola 3,0 % ( $m/V$ ); preliminarni uzorci 9 – 12, Tablica 11.). Uočen je porast veličine čestica snižavanjem temperature ulaznog zraka te povećanjem brzine dotoka uzorka do sapnice. Zaključeno je da su navedene granice procesnih i formulacijskih parametara (koncentracija donepezila 0,115 – 0,231 % ( $m/V$ ), koncentracija manitola 3 % ( $m/V$ ), konstantna koncentracija LMW kitozana 1,5 % ( $m/V$ ),  $T_{in}$ : 120 - 140 °C; FPS: 10 - 15 %) prikladne za postavljanje DoE-a, s ciljem finog ugađanja veličine čestica i svojstava tečenja kitozansko-manitolskih mikrosfera.

S ciljem dodatnog povećanja veličine čestica, imajući na umu ciljanu vrijednost  $D_{v10} > 10 \mu\text{m}$ , dodatno je povećana koncentracija manitola na 6,0 % ( $m/V$ ), te je snižena temperatura ulaznog zraka na 110 °C (preliminarni uzorci 13 i 14, Tablica 11.). Temperatura niža od 110 °C nije primjerena za proces sušenja ispitivanih otopina. Uzorak 14 predstavlja uzorak u kojem glavnina čestica ima promjer veći od 10  $\mu\text{m}$  ( $D_{v10} = 12,2 \pm 0,53 \mu\text{m}$ ). Unatoč odgovarajućoj veličini čestica, svojstva tečenja kategorizirana kao „zadovoljavajuća“, ostavljaju dodatni prostor za optimiranje uzorka. Zaključno, odabrane su postavke procesnih parametara ( $T_{in}$ : 110 - 140 °C, FPS: 10 - 15 %) i formulacijskih parametara (koncentracija donepezila 0,115 – 0,4 % ( $m/V$ ) te koncentracija manitola 3,0 – 6,0 % ( $m/V$ )) za izradu DoE-a u razvoju kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom, pripravljenih sušenjem raspršivanjem. Prema

dostupnim literaturnim navodima vezanim uz izravnu dostavu donepezila iz nosne šupljine u SŽS (104) te uzimajući u obzir masu praška koja se po potisku UDSP uređaja dostavi u nosnu šupljinu (15 mg), može se zaključiti da je teorijski sadržaj donepezila u preliminarnim mikrosferama dostatan za nazalnu dostavu učinkovite doze donepezila.

Nakon odabira prikladnih procesnih i formulacijskih parametara za proces sušenja, ispitano je i koja je vrsta kitozana najprikladnija za proizvodnju mikrosfera s kitozanom (preliminarni uzorci 15 – 20, Tablica 11.). Sušenje raspršivanjem navedenih uzoraka provedeno je pri  $T_{in}$  od 120 °C i FPS od 10 %. Sušenjem otopina koje su sadržavale MMW i HMW kitozan, pri temperaturi ulaznog zraka nižoj od 120 °C, te pri postavci pumpe većoj od 10 %, nije bilo moguće dobiti praškasti produkt. Također, pri  $T_{in}$  od 120 °C i FPS od 10 %, nije bilo moguće atomizirati otopine koje su sadržavale kitozan MMW i HMW pri koncentraciji većoj od 1 % ( $m/V$ ). Slijedom navedenog, koncentracija kitozana u svim pripremljenim otopinama iznosila je 1 % ( $m/V$ ), koncentracija donepezila 0,400 % ( $m/V$ ), a varirana je koncentracija manitola. Iz podataka u Tablici 11. za uzorke 15 – 20 razvidno je da je s porastom molekulske mase kitozana rasla i veličina čestica. Povećanjem molekulske mase kitozana raste viskoznost otopina za sušenje pa se atomizacijom proizvode veće kapljice i naknadno se sušenjem dobivaju veće čestice (135,238). Također, s povećanjem koncentracije manitola u otopini raste veličina čestica. Porastom molekulske mase kitozana povećava se Hausnerov omjer, odnosno svojstva tečenja postaju lošija. Utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva tečenja može se objasniti činjenicom da mikrosfere pripravljene s LMW kitozanom generiraju sferične čestice glatkih površina koje lakše teku (138). Pri sušenju raspršivanjem otopina koje su sadržavale LMW kitozan zabilježeno je i bolje iskorištenje procesa.

Uz činjenicu da mikrosfere pripravljene s LMW kitozanom pokazuju bolja svojstva tečenja, te da otopine za sušenje koje sadrže LMW kitozan ostavljaju više prostora za variranje procesnih i formulacijskih parametara, za dizajn eksperimenta u razvoju kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom odabran je LMW kitozan (dalje u tekstu kitozan).

Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem preliminarnih uzoraka bilo je u rasponu od 36,8 do 76,9 % (Tablica 11.). Najmanje iskorištenje vidljivo je kod otopina koje su sadržavale HMW kitozan. Sušenje raspršivanjem ostalih preliminarnih uzoraka rezultiralo je visokim iskorištenjem što upućuje na dobro postavljene procesne i formulacijske parametre koji će se dalje razmatrati u DoE-u.

**Tablica 11.** Sastav preliminarnih otopina za sušenje te procesni parametri korišteni pri izradi preliminarnih mikrosfera s donepezilom metodom sušenja raspršivanjem.

Uzorak	Koncentracija donepezila (% , <i>m/V</i> )	Koncentracija i tip kitozana (% , <i>m/V</i> )	Koncentracija manitola (% , <i>m/V</i> )	Koncentracija laktose (% , <i>m/V</i> )	$T_{in}$ (°C)	FPS (%)	Iskorištenje (%)	HR/Tečenje	$D_v10$ (µm)	$D_v50$ (µm)	$D_v90$ (µm)
1	0,050	1,0 (LMW)	-	-	160	10	75,6	1,26 ± 0,01 (prolazno)	4,7 ± 0,0	10,2 ± 0,0	23,9 ± 0,4
2	0,050	1,0 (LMW)	-	-	140	10	76,9	1,25 ± 0,01 (zadovoljavajuće)	4,6 ± 0,0	9,65 ± 0,0	22,6 ± 0,5
3	0,050	1,0 (LMW)	1,0	-	140	10	62,6	1,16 ± 0,06 (dobro)	5,1 ± 0,0	12,3 ± 0,0	36,3 ± 0,2
4	0,050	1,0 (LMW)	-	1,0	140	10	70,9	1,22 ± 0,05 (zadovoljavajuće)	5,2 ± 0,1	10,5 ± 0,1	24,1 ± 0,1
5	0,075	1,5 (LMW)	1,5	-	140	10	71,7	1,17 ± 0,04 (dobro)	6,0 ± 0,1	12,5 ± 0,1	54,9 ± 6,6
6	0,075	1,5 (LMW)	-	1,5	140	10	77,7	1,23 ± 0,05 (zadovoljavajuće)	5,5 ± 0,0	11,8 ± 0,0	33,9 ± 0,7
7	0,115	1,5 (LMW)	3,0	-	140	10	65,0	1,18 ± 0,01 (zadovoljavajuće)	6,7 ± 0,2	26,6 ± 1,2	70,6 ± 2,7
8	0,115	1,5 (LMW)	-	3,0	140	10	76,6	1,24 ± 0,01 (zadovoljavajuće)	5,4 ± 0,0	12,0 ± 0,1	32,7 ± 0,5
9	0,115	1,5 (LMW)	3,0	-	120	10	72,6	1,21 ± 0,05 (zadovoljavajuće)	6,0 ± 0,1	25,2 ± 0,14	60,7 ± 0,8
10	0,115	1,5 (LMW)	3,0	-	120	15	56,2	1,28 ± 0,05 (prolazno)	8,6 ± 0,9	28,7 ± 0,5	62,3 ± 0,4
11	0,115	1,5 (LMW)	3,0	-	140	15	54,8	1,26 ± 0,06 (moguće)	5,7 ± 0,0	21,6 ± 0,3	90,1 ± 1,6
12	0,231	1,5 (LMW)	3,0	-	120	10	60,0	1,23 ± 0,03 (zadovoljavajuće)	8,2 ± 1,0	28,8 ± 1,0	62,8 ± 0,6
13	0,231	1,5 (LMW)	6,0	-	120	10	74,4	1,20 ± 0,04 (zadovoljavajuće)	9,0 ± 1,0	29,3 ± 1,1	60,2 ± 0,9

14	0,400	1,5 (LMW)	6,0	-	110	10	58,5	1,24 ± 0,04 (zadovoljavajuće)	12,2 ± 0,5	32,3 ± 0,7	72,1 ± 0,7
15	0,400	1,0 (HMW)	4,0	-	120	10	55,9	1,25 ± 0,01 (zadovoljavajuće)	7,5 ± 0,1	27,9 ± 0,3	73,9 ± 3,0
16	0,400	1,0 (MMW)	4,0	-	120	10	65,2	1,22 ± 0,06 (zadovoljavajuće)	7,1 ± 0,1	23,2 ± 0,2	65,5 ± 0,3
17	0,400	1,0 (LMW)	4,0	-	120	10	67,1	1,17 ± 0,01 (dobro)	6,9 ± 0,1	23,5 ± 0,5	62,1 ± 5,4
18	0,400	1,0 (HMW)	6,0	-	120	10	36,8	1,24 ± 0,01 (zadovoljavajuće)	12,0 ± 0,9	28,8 ± 1,0	72,7 ± 1,5
19	0,400	1,0 (MMW)	6,0	-	120	10	55,4	1,22 ± 0,05 (zadovoljavajuće)	11,2 ± 1,1	28,0 ± 1,1	62,5 ± 1,4
20	0,400	1,0 (LMW)	6,0	-	120	10	59,4	1,17 ± 0,05 (dobro)	11,0 ± 0,7	27,5 ± 1,5	61,5 ± 1,9

$T_{in}$  - temperatura ulaznog zraka; FPS (engl. *feed pump setting*) - postavka peristaltičke pumpe za dovođenje uzorka; LMW – niskomolekulski kitozan; MMW – srednjemolekulski kitozan; HMW – visokomolekulski kitozan; HR – Hausnerov omjer (engl. *Hausner ratio*)

#### 4.1.2 DoE – Optimizacija mikrosfera s donepezilom za nazalnu primjenu

Napredni farmaceutski oblici često zahtijevaju kompleksne procese proizvodnje s mnogo značajnih varijabli koje utječu na ključna svojstva finalnog produkta. U ovom istraživanju, vodeći se QbD načelima u razvoju kitozansko-manitolskih mikrosfera kao *in situ* gelirajućeg praškastog sustava s donepezilom, definirani su: (i) ključni cilj razvoja formulacije (engl. *quality target product profile*, QTPP) – razvoj mikrosfera s donepezilom koje pokazuju potencijal za izravnu dostavu lijeka iz nosne šupljine u mozak; (ii) kritična svojstva kvalitete (engl. *critical quality attributes*, CQA) – iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem, sadržaj vlage, stupanj bubrenja, raspodjela veličina mikrosfera, svojstva tečenja, kut raspršenja i profil nazalne depozicije *in vitro*; (iii) kritični procesni parametri (engl. *critical process parameters*, CPP) - temperatura ulaznog zraka, postavka peristaltičke pumpe za dovođenje uzorka do sapnice; kut primjene i protok udahnutog zraka; (iv) kritična svojstva sastavnica (engl. *critical material attributes*, CMA) – vrsta i koncentracija sastavnica te njihovi međusobni omjeri (239). CMA i CPP su definirani u preliminarnim istraživanjima, a CQA su analizirani u sklopu DoE-a.

U okviru DoE-a generirano je 17 različitih eksperimenata pri čemu su varirana dva formulacijska (koncentracija donepezila i manitola u raspršivanim otopinama) i dva procesna parametra ( $T_{in}$  i FPS), te dva parametra primjene (AAH i IFR). Rezultati provedene karakterizacije kitozansko-manitolskih mikrosfera pripremljenih prema DoE-u prikazani su u Tablici 12.

Rezultati karakterizacije (odgovori DoE-a) su statistički obrađeni pomoću statističkog softvera JMP®. Prije statističke obrade podataka, kovarijante eksperimentalnog dizajna su standardizirane na jedinični interval [-1, 1] (240). Regresijski modeli, odnosno regresijske jednadžbe generirane u sklopu DoE-a, prikazane su u prethodno navedenim standardiziranim kovarijantama. Regresijski modeli daju informaciju kako nezavisne varijable (varirani parametri) utječu na promatrane odgovore; tj. hoće li variranje parametara rezultirati statistički značajnim razlikama u promatranim odgovorima. Koeficijent determinacije  $R^2$  je mjera korisnosti modela. Što je  $R^2$  bliži 1 to je veća snaga modela, odnosno bolja je predikcija zavisne varijable (241).

U generiranim regresijskim modelima varijable koje imaju statistički značajan utjecaj na promatrani odgovor ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom. Regresijski modeli generirani za promatrane odgovore DoE-a, te pripadajući parametri regresije navedeni su u Tablici 13.

Regresijski parametri dobiveni statističkom analizom pokazuju visoku prediktivnu moć generiranih modela. Dokazano je da svi varirani parametri statistički značajno utječu na promatrane odgovore (zasebno ili u interakciji) što opravdava razmatranje njihovog utjecaja na ključna svojstva naprednog farmaceutskog oblika donepezila. Pomoću generiranih regresijskih modela dobiva se informacija kako finim ugađanjem variranih parametara dobiti mikrosfere željenih svojstava. Također, DoE u konačnici omogućuje dublje razumijevanje utjecaja formulacijskih i procesnih parametara te parametara primjene na potencijal ciljane dostave lijeka iz nosne šupljine u SŽS.

**Tablica 12.** Rezultati DoE karakterizacije kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom. Karakterizacija u okviru DoE eksperimenata uključuje: iskorištenje procesa, sadržaj donepezila u mikrosferama (engl. *drug content*, DC), raspodjelu veličina mikrosfera ( $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$ ), sadržaj vlage (engl. *moisture content*, MC), stupanj bubrenja ( $V_{SNF}$  - volumen SNF-a apsorbiranog po miligramu kitozana u praškastom uzorku), Hausnerov omjer (engl. *Hausner ratio* (HR)), kut raspršenja (engl. *spray cone angle*, SCA), olfaktornu depoziciju (depozicija u odvojivim olfaktornim segmentima turbinatne regije i septuma modela nosne šupljine; OD) i turbinatnu depoziciju (depozicija u turbinatnoj regiji bez odvojivog olfaktornog segmenta modela nosne šupljine; TD).

	D%	M%	$T_{in}$	FPS	AAH*	IFR*	Iskorištenje	DC	$D_{v10}$	$D_{v50}$	$D_{v90}$	MC	$V_{SNF}$	HR	SCA	OD	TD
	(m/V)	(m/V)	(°C)	(%)	(°)	(L min <sup>-1</sup> )	(%)	(%)	(µm)	(µm)	(µm)	(%)	(mL µg <sup>-1</sup> )	(°)	(°)	(%)	(%)
1	0,1150	6,0	125	10,0	30	20	68,0	1,44±0,01	9,9±1,0	33,3±1,1	67,9±0,8	5,2±1,2	58,5±2,9	1,21±0,01	25,1±0,4	28,5±2,3	47,6±6,8
2	0,4000	3,0	125	15,0	60	0	55,8	7,87±0,02	8,4±0,3	29,9±0,5	70,8±0,9	6,6±0,4	60,8±2,7	1,30±0,00	28,3±0,9	30,4±6,5	27,3±0,1
3	0,4000	3,0	110	12,5	60	20	52,2	7,90±0,04	9,6±0,1	24,7±0,5	46,9±0,3	6,7±0,4	29,6±2,2	1,30±0,09	26,1±0,4	31,0±19,2	19,4±5,8
4	0,4000	6,0	110	10,0	45	20	54,4	4,96±0,02	9,5±1,0	35,7±1,6	72,7±1,1	6,1±1,5	53,0±3,8	1,22±0,10	23,9±0,5	56,0±1,4	27,2±0,5
5	0,1150	3,0	110	15,0	30	20	49,6	2,35±0,08	10,9±0,1	23,9±0,1	43,1±0,2	9,3±0,3	42,1±1,0	1,32±0,07	27,8±1,2	52,3±0,4	22,1±0,1
6	0,1150	3,0	140	15,0	45	0	55,3	2,44±0,03	9,2±0,0	20,9±0,1	40,3±0,7	7,9±1,0	41,6±2,7	1,25±0,00	25,7±0,3	51,6±4,3	29,5±4,6
7	0,4000	3,0	140	10,0	30	10	70,5	7,72±0,21	6,7±0,4	28,4±0,5	58,5±1,2	5,1±0,1	32,8±3,0	1,22±0,05	23,7±0,2	38,8±0,7	36,4±0,1
8	0,2575	6,0	140	15,0	60	20	55,1	3,29±0,18	8,5±0,9	29,6±1,7	60,4±1,9	4,4±0,1	56,9±0,9	1,20±0,00	25,1±0,2	32,0±0,6	27,2±0,6
9	0,2575	4,5	125	12,5	45	10	55,8	4,21±0,21	9,7±0,0	25,7±0,0	55,8±0,3	6,1±0,1	31,0±1,1	1,27±0,06	25,5±0,2	44,1±1,0	33,0±1,3
10	0,1150	4,5	110	10,0	60	0	59,1	1,82±0,07	10,0±0,0	22,7±0,1	42,5±0,1	6,9±0,1	36,9±2,7	1,29±0,10	24,7±0,3	37,4±1,9	26,9±6,8

11	0,4000	6,0	140	10,0	60	0	66,0	4,94±0,13	9,9±1,4	31,7±1,0	61,9±1,6	3,8±0,3	58,0±4,3	1,15±0,06	24,7±0,7	32,5±6,0	23,7±0,1
12	0,1150	6,0	110	15,0	60	10	55,7	1,54±0,04	10,1±1,9	31,1±2,4	63,3±3,6	5,8±0,1	49,4±5,0	1,20±0,00	22,5±0,2	13,9±1,9	21,1±0,0
13	0,4000	4,5	140	15,0	30	20	55,7	6,08±0,34	7,8±0,2	31,4±0,2	65,2±1,4	4,7±0,1	43,9±2,4	1,19±0,02	24,3±0,4	36,0±1,0	24,5±0,5
14	0,1150	3,0	140	10,0	60	20	60,4	2,56±0,10	8,4±0,1	17,1±0,1	34,1±0,2	8,7±0,6	52,0±1,7	1,26±0,10	25,5±0,5	29,3±7,8	29,6±11,4
15	0,4000	6,0	110	15,0	30	0	47,2	5,14±0,15	11,6±0,4	29,0±1,2	63,5±1,1	5,2±0,2	51,1±0,9	1,23±0,06	27,6±0,9	65,5±0,2	20,5±0,5
16	0,2575	3,0	110	10,0	30	0	55,4	5,27±0,06	9,5±0,1	20,5±0,2	37,3±1,1	8,8±0,1	27,7±2,8	1,30±0,05	25,7±0,6	56,9±5,1	28,0±5,9
17	0,1150	6,0	140	12,5	30	0	60,6	1,52±0,03	7,0±0,4	27,4±0,9	58,5±1,8	3,9±0,4	67,0±0,7	1,19±0,02	23,5±0,4	39,2±1,7	45,1±7,1

D (%) - koncentracija donepezila u otopini za sušenje; M (%) - koncentracija manitola u otopini za sušenje;  $T_{in}$  - temperatura ulaznog zraka; FPS (engl. *feed pump setting*) - postavka peristaltičke pumpe za dovođenje uzorka; AAH – kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu; IFR – protok udahnutog zraka.

\* Parametri se odnose samo na olfaktornu i turbinatnu depoziciju.

Vrijednosti prikazane u tablici su srednje vrijednosti ± standardna devijacija, n = 3, osim u slučaju olfaktorne i turbinatne depozicije gdje je n = 2.



**Tablica 13.** Regresijski modeli generirani u sklopu DoE-a za promatrane odgovore: iskorištenje procesa, sadržaj vlage (engl. *moisture content*, MC), stupanj bubrenja ( $V_{SNF}$  - volumen SNF-a apsorbiranog po miligramu kitozana u praškastom uzorku), raspodjela veličina mikrosfera ( $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$ ), Hausnerov omjer (engl. *Hausner ratio* (HR)), kut raspršenja (engl. *spray cone angle*, SCA), olfaktorna depozicija (depozicija u odvojivim olfaktornim segmentima turbinatne regije i septuma modela nosne šupljine; OD) i turbinatna depozicija (depozicija u turbinatnoj regiji bez odvojivog olfaktornog segmenta modela nosne šupljine; TD).

Promatrani DoE odgovor	Regresijski model	Regresijski parametri			
		R <sup>2</sup>	RMSE	PRESS R <sup>2</sup>	PRESS RMSE
Iskorištenje procesa (%)	$Iskorištenje = 58,42^* + 3,57 \times T_{in}^* - 4,24 \times FP^*S - 1,2 \times T_{in} \times FPS - 3,34 \times T_{in}^2 + 2,16 \times FPS^2$	0,78	3,38	0,51	4,16
MC (%)	$MC = 6,19^* - 0,68 \times D^* - 1,34 \times M^* - 0,74 \times T_{in}^* + 0,64 \times D \times M^*$	0,95	0,45	0,89	0,54
$V_{SNF}$	$V_{SNF} = 33,53 - 1,31 \times D + 7,66 \times M^* + 4,46 \times T_{in}^* + 1,92 \times FPS + 15,88 \times M^{2*} + 5,61 \times D \times FPS^* - 4,61 \times M \times FPS^*$	0,85	6,22	0,41	9,00
Raspodjela veličina mikrosfera (μm)	$D_{v10} = 9,21^* - 0,13 \times D + 0,28 \times M - 0,98 \times T_{in}^* + 0,18 \times FPS + 0,65 \times D \times M^* - 0,26 \times T_{in} \times FPS^*$	0,80	0,73	0,34	1,01
	$D_{v50} = 24,43^* + 2,46 \times D^* + 3,75 \times M^* + 0,46 \times FPS - 2,26 \times D \times M - 2,02 \times M \times FPS + 3,41 \times FPS^2$	0,92	1,80	0,77	2,35
	$D_{v90} = 59,72^* + 6,41 \times D^* + 8,37 \times M^* + 0,69 \times T_{in} + 7,65 \times D^2 - 12,84 \times T_{in}^{2*}$	0,84	5,87	0,62	7,30
HR	$HR = 1,24^* - 0,04 \times M^* - 0,03 \times T_{in}^*$	0,84	0,02	0,77	0,02
SCA (°)	$SCA = 26,91^* + 0,27 \times D - 0,74 \times M^* - 0,41 \times T_{in} + 0,57 \times FPS + 0,91 \times D \times M^* + 0,49 \times M \times T_{in} - 1,98 \times T_{in}^{2*}$	0,75	1,04	0,06	1,47
OD (%)	$OD = 39,73^* + 2,71 \times D - 1,62 \times M - 3,83 \times T_{in}^* - 7,91 \times AAH^* - 3,46 \times IFR^* + 8,15 \times D \times M^* - 3,78 \times D \times T_{in}^*$	0,91	5,36	0,67	7,29
TD (%)	$TD = 34,24^* - 3,06 \times D^* + 1,44 \times M + 3,63 \times T_{in}^* - 3,37 \times FPS^* - 3,5 \times AAH^* - 2,58 \times D \times M^* - 6,65 \times T_{in}^{2*}$	0,92	2,98	0,72	4,10

D (%) - koncentracija donepezila u otopini za sušenje; M (%) - koncentracija manitola u otopini za sušenje;  $T_{in}$  - temperatura ulaznog zraka; FPS (engl. *feed pump setting*) - postavka peristaltičke pumpe za dovođenje uzorka; AAH – kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu; IFR – protok udahnutog zraka.

R<sup>2</sup> = koeficijent determinacije, RMSE = korijen srednje kvadratne pogreške (engl. *root mean square error*), PRESS = predviđeni zbroj kvadrata rezidualne pogreške (engl. *predicted residual error sum of squares*)

\*Statistički značajni parametri (zasebno ili u interakciji;  $p < 0,05$ )

Rezultati provedenih ispitivanja upućuju na pažljivo postavljen proces sušenja raspršivanjem visokog iskorištenja koji je rezultirao mikrosferama sa svojstvima prikladnim za nazalnu primjenu. Naime, kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom karakterizirane su odgovarajućim svojstvima tečenja i raspodjelom veličina čestica koja pokazuje potencijal za ciljanu depoziciju u olfaktornom području nosne šupljine, uz zadovoljavajući stupanj bubrenja i prikladan sadržaj vlage. Sadržaj donepezila u mikrosferama iznosio je između  $1,44 \pm 0,00$  i  $7,90 \pm 0,00$  % (Tablica 12.). Sadržaj donepezila određen je HPLC metodom koja je opisana u poglavlju 3.2.4., a parametri validacije navedeni su u Tablici 14.

**Tablica 14.** Validacijski parametri HPLC metode za određivanje sadržaja donepezila.

<b>Područje linearosti</b>					
$1 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$					
<b>Linearnost</b>					
Jednadžba pravca			Koeficijent determinacije ( $R^2$ )		
$y = 31,918x - 30,131$			0,9996		
<b>Preciznost</b>					
Ponovljivost (RSD %, n = 3)			Međupreciznost (RSD %, n = 3)		
x (niska)	x (srednja)	x (visoka)	x (niska)	x (srednja)	x (visoka)
$10 \mu\text{g mL}^{-1}$	$50 \mu\text{g mL}^{-1}$	$90 \mu\text{g mL}^{-1}$	$10 \mu\text{g mL}^{-1}$	$50 \mu\text{g mL}^{-1}$	$90 \mu\text{g mL}^{-1}$
0,1	0,1	0,0	2,6	1,0	4,7
<b>Točnost</b>					
srednja vrijednost analitičkog povrata (engl. <i>recovery</i> ) (%) $\pm$ SD, n = 3					
x (niska)		x (srednja)		x (visoka)	
( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ )		( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ )		( $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	
$97,9 \pm 0,1$		$98,1 \pm 0,1$		$98,8 \pm 0,0$	
<b>Osjetljivost</b>					
LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
0,95			2,88		

x – koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); y – površina ispod krivulje (engl. *area under curve* (AUC)); izražena u mAU); RSD (%) – relativna standardna devijacija; SD – standardna devijacija; LOD - limit detekcije (engl. *limit of detection*), LOQ - limit kvantifikacije (engl. *limit of quantification*).

#### **4.1.2.1 Iskorištenje procesa pripreme mikrosfera s donepezilom sušenjem raspršivanjem**

Visoko iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem pri pripravi kitozansko-manitoljskih mikrosfera s donepezilom u skladu je s iskorištenjima slično postavljenih procesa (147,242,243). Iskorištenje procesa raste s porastom temperature ulaznog zraka i smanjuje se s bržim dotokom uzorka do sapnice (Tablica 13.), što je očekivani trend često zabilježen i u drugim studijama (244,245). Visoka ulazna temperatura uzrokuje brzo stvaranje suhe ovojnice oko kapljice čime je minimizirano lijepljenje produkta za stijenke uređaja uslijed vlažnosti produkta. Također, brzo dovođenje uzorka do sapnice rezultira vlažnim produktom što smanjuje iskorištenje procesa (135).

#### **4.1.2.2 Sadržaj vlage u mikrosferama s donepezilom**

U svim pripremljenim kitozansko-manitoljskim mikrosferama s donepezilom sadržaj vlage iznosio je manje od 10 % (Tablica 12.), što je prikladan sadržaj vlage za polimerne mikrosfere dobivene sušenjem raspršivanjem (144,246). Porast koncentracije donepezila i manitola u otopini za sušenje, te porast temperature ulaznog zraka u procesu sušenja raspršivanjem rezultirali su smanjenjem vlažnosti praškastog produkta (Tablica 13.). S povećanjem koncentracije otopljenih krutina u otopini za sušenje smanjuje se ukupna količina vode koju treba otpariti u procesu sušenja, što rezultira i smanjenim sadržajem vlage u konačnom produktu (135). Manitol je poznat kao nosač/punilo niske higroskopnosti i u kombinaciji s higroskopnim polimerom kitozanom utječe na vlagu konačnog produkta (247). Iz ovog razloga, bitno je precizno podesiti omjer kitozana i manitola, kako bi se u konačnici dobio produkt željenih svojstava s obzirom na vlažnost. S povećanjem ulazne temperature zraka povećava se količina topline u mediju za sušenje, proces sušenja je učinkovitiji, te manje vlage zaostaje u mikrosferama (93,137).

#### **4.1.2.3 Stupanj bubrenja mikrosfera s donepezilom**

Zadovoljavajući stupanj bubrenja polimernih mikrosfera nužan je za osiguranje prikladne mukoadhezivnosti i produljenog profila oslobađanja lijeka iz izbubrenog polimernog matriksa (93). Regresijski model generiran za stupanj bubrenja kitozansko-manitoljskih mikrosfera s donepezilom pokazuje statistički značajan linearni i kvadratni utjecaj koncentracije manitola u sušenoj otopini (Tablica 13.). Povećani stupanj bubrenja uočen je za mikrosfere pripravljene sušenjem otopina u kojima je koncentracija manitola bila veća od 4 % ( $m/V$ ). Navedeni utjecaj može se objasniti visokom topljivošću i osmotskom aktivnošću manitola, čime se povećava vlaženje i bubrenje praškastog matriksa (129,144). Povećanjem

temperature ulaznog zraka povećao se stupanj bubrenja kitozansko-manitoljskih mikrosfera. Naime, viša ulazna temperatura rezultira manjim sadržajem vlage, a manji sadržaj vlage povećava kapacitet mikrosfera da apsorbiraju SNF i bubre (93).

#### 4.1.2.4 Raspodjela veličina mikrosfera s donepezilom

Veličina čestica ima značajan utjecaj na nazalnu depoziciju, a preciznim variranjem procesnih i formulacijskih parametara u procesu sušenja raspršivanjem moguće je optimirati veličinu čestica praškastog produkta (78). Smjernice regulatornih agencija zahtijevaju da glavina aerosoliziranih čestica ima promjer veći od 10  $\mu\text{m}$  (143). U dosadašnjim primjerima, navedeni zahtjev ispunjen je naknadnom aglomeracijom čestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem (123) ili adhezijom na čestice inertnog nosača prikladne veličine (144). No, navedene metode mogu biti vezane uz probleme deaglomeracije te segregacije i nehomogenosti smjesa prašaka. S ciljem generiranja praškastog produkta u kojem glavina aerosoliziranih čestica ima promjer veći od 10  $\mu\text{m}$  u ovom radu pri procesu sušenja raspršivanjem korištena je ultrazvučna sapnica. Ultrazvučna sapnica pomoću visokofrekventnog električnog signala proizvodi kapljice većeg promjera i duljeg zadržavanja u komori za sušenje, što u konačnici rezultira većim česticama (135).

Volumni promjeri pripremljenih kitozansko-manitoljskih mikrosfera,  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$ , ispitani kao DoE odgovori, iznosili su redom:  $6,7 \pm 0,4 - 11,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ,  $17,1 \pm 0,1 - 35,7 \pm 1,6 \mu\text{m}$  i  $34,1 \pm 0,2 - 72,7 \pm 1,1 \mu\text{m}$  (Tablica 12.). Za sva tri promatrana volumna promjera regresijski modeli karakterizirani su visokom vrijednošću  $R^2$  (Tablica 13.). Iz regresijskih jednadžbi vidljivo je da je s porastom koncentracije donepezila i manitola u sušenoj otopini rasla i veličina čestica suhog produkta. Povećani udio krutina u otopini za sušenje smanjuje količinu otapala koje treba ispariti u procesu sušenja. Sa smanjenjem količine otapala skraćuje se i vrijeme potrebno za njegovo isparavanje te se brzo formiraju porozne čestice većeg promjera. Također, s povećanjem koncentracije suhe tvari (posebice polimera) u otopini za sušenje, povećava se i viskoznost otopine. Atomizacijom viskoznijih otopina generiraju se veće kapljice, pa sušenje u konačnici rezultira većim praškastim česticama (135). Uočen je značajni utjecaj postavke rada pumpe u procesu sušenja raspršivanjem na volumne promjere  $D_{v10}$  i  $D_{v50}$ : s povećanjem brzine dotoka uzorka do sapnice rasli su i volumni promjeri  $D_{v10}$  i  $D_{v50}$ . Pri većoj brzini dotoka uzorka do sapnice, u jediničnom vremenu atomizira se veći volumen otopine za sušenje istom raspoloživom energijom, što rezultira generiranjem većih kapljica, i posljedično većih čestica suhog produkta (137). Takav utjecaj nije uočen i kod  $D_{v90}$ , gdje

koncentracije donepezila i manitola ipak imaju najveći utjecaj na veličinu čestica. Smanjenje ulazne temperature zraka rezultiralo je značajnim smanjenjem  $D_{v10}$ , što može upućivati na zaključak da je proces sušenja utjecao na aglomeraciju najmanjih čestica. Naime, prethodno je raspravljeno da smanjenjem ulazne temperature raste sadržaj vlage praškastog produkta, a povećana vlaga može pridonijeti koheziji i aglomeraciji sitnih čestica što je mogući razlog povećanja volumnog promjera  $D_{v10}$  (248).

U ovom radu predstavljen je inovativni način pripreme mikrosfera za nazalnu primjenu u kojem glavna čestica ima promjer veći od 10  $\mu\text{m}$ , koji uključuje korištenje ultrazvučne sapnice pri procesu sušenja raspršivanjem. U jednom koraku su jednostavnim postupkom pripravljene mikrosfere željene veličine čestica, osiguravajući homogenost i stabilnost praškastog produkta. Iz Tablice 12. razvidno je da je čak nekoliko DoE eksperimenata udovoljilo kriteriju vezanom uz veličinu čestica. Provedenim istraživanjem potvrđeno je da je korištenje ultrazvučne sapnice prikladno pri razvoju praškastih sustava za nazalnu primjenu.

#### **4.1.2.5 Svojstva tečenja mikrosfera s donepezilom**

Svojstva tečenja farmaceutskih prašaka izrazito su bitna za pravilno i reproducibilno doziranje lijeka. Prema izračunatim vrijednostima Hausnerovog omjera moguće je donijeti zaključke o svojstvima tečenja praškastih mikrosfera. Za DoE uzorke Hausnerov omjer iznosio je od  $1,15 \pm 0,06$  do  $1,30 \pm 0,09$  (Tablica 12.). Prema Europskoj farmakopeji i Tablici 1. kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom svrstane su u kategorije prolaznog, zadovoljavajućeg i dobrog tečenja. Iako se Hausnerov omjer ne može jednostavno koristiti u predviđanju ponašanja prašaka koji slobodno ne teku (primjerice prašci pripremljeni sušenjem raspršivanjem), ipak se određivanjem Hausnerovog omjera mogu donijeti zaključci o ovisnosti svojstava tečenja o formulacijskim i procesnim parametrima (116).

Iz generiranog regresijskog modela (Tablica 13.) razvidno je da s porastom koncentracije manitola u sušenoj otopini, vrijednost Hausnerovog omjera opada (247). Općenito, mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem koje u sebi sadrže visoki postotak ionskog polimera često pokazuju izrazitu kohezivnost i loša svojstva tečenja (80). No, dodatkom pomoćne tvari dobrih svojstava tečenja, u ovom slučaju manitola, moguće je optimirati svojstva tečenja konačnog praškastog produkta. Također, povećanje udjela manitola u mikrosferama rezultiralo je i povećanjem veličine čestica, što također smanjuje kohezivnost i poboljšava reološka svojstva praška (249). Povećanje temperature ulaznog zraka također je poboljšalo svojstva tečenja. Veća ulazna temperatura rezultira prašcima manjeg sadržaja vlage,

što pogoduje tečenju prašaka (250). Također, u poglavlju 4.1.2.2. zaključeno je da je povećana koncentracija manitola u sušenim otopinama također rezultirala manjom vlažnošću praškastog produkta, što ponovno ima povoljni utjecaj na svojstva tečenja.

#### 4.1.2.6 Kut raspršenja mikrosfera s donepezilom

Optimirani kut raspršenja praškastog uzorka pogoduje ciljanoj depoziciji u nosnoj šupljini (163,168,169). Kut raspršenja za kitozanosko-manitolske mikrosfere s donepezilom u ovom radu iznosio je  $22,5 \pm 0,2^\circ$  -  $28,3 \pm 0,9^\circ$  (Tablica 12.). Kut raspršenja određen je nakon raspršivanja uzorka iz UDSP uređaja (Slika 21.), te je izmjeren virtualnim kutomjerom.



**Slika 21.** Slika ekstrahirana iz video zapisa raspršivanja uzorka mikrosfera DoE 15 iz UDSP uređaja. Uz dozvolu Elseviera preuzeto i prilagođeno iz Perkušić i sur. (2022) (251).

Iz regresijskog modela razvidno je da koncentracija manitola u sušenoj otopini ima statistički značajan utjecaj na kut raspršenja pripremljenih mikrosfera. Navedeni utjecaj može se objasniti povećanjem veličine mikrosfera uslijed povećanja koncentracije manitola u sušenim otopinama. I u praškastim i tekućim nazalnim sustavima se s povećanjem veličine čestica/kapljica smanjuje kut raspršenja, što pridonosi ciljanoj depoziciji u područje iza nosne valvule, mjesta najvećeg suženja u nosnoj šupljini (144,148). Iz regresijske jednadžbe za kut raspršenja razvidan je i značajan utjecaj koncentracije donepezila i manitola u inetrakciji, ali i kvadratni utjecaj temperature ulaznog zraka, što potvrđuje činjenicu da na promatrane odgovore utječu i procesni i formulacijski parametri, te je opravdano korištenje statističkog

dizajna eksperimenata koji objašnjava kompleksne utjecaje varijabli na svojstva praškastog produkta.

#### **4.1.2.7 Profil nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom *in vitro***

Kao što je već naglašeno u prethodnim poglavljima, ciljana depozicija u područje od interesa ključ je za postizanje terapijske učinkovitosti nazalno primijenjenog lijeka (77,144). Opsežna istraživanja provode se s ciljem razvoja naprednih tehnoloških platformi koje mogu poboljšati izravnu dostavu nazalno primijenjenog neurološkog lijeka u mozak, s obzirom da bi uspjeh u tom području značio prekretnicu u liječenju neuroloških bolesti. Izravna dostava lijeka u mozak uvjetovana je depozicijom lijeka u olfaktorno područje nosne šupljine iz kojeg se transport u SŽS odvija putem olfaktornog i trigeminalnog živca (252). Iako u manjoj mjeri, izravna dostava lijeka u mozak omogućena je i ograncima trigeminalnog živca koji se protežu kroz respiratorno područje nosne šupljine (37,253). No, depozicijom lijeka u respiratornom području nosne šupljine omogućava se i opsežnija sistemska apsorpcija lijeka, uslijed velike površine i prokrvljenosti nosne sluznice (253), što povećava mogućnost razvoja sistemskih nuspojava.

U ovom radu za ispitivanje profila nazalne depozicije *in vitro* korišten je 3D printani model nosne šupljine zdrave osobe prikazan na Slici 14. Takav model odabran je zbog činjenice da upalne bolesti nosne sluznice, poput rinitisa i rinosinuitisa, mogu utjecati na profil nazalne depozicije, no takva patofiziološka obilježja nosne šupljine nisu svojstvena AB pacijentima (254–256). Duljina nosne šupljine i najmanja površina poprečnog presjeka nosne valvule modela nosa prema populacijskim parametrima pripadaju u 'normativni' razred veličina nosne šupljine, što znači da je veličina modela reprezentativna za veći dio populacije (144,257). Multisekcionalni model omogućuje generiranje podataka o parcijalnoj depoziciji u područjima od interesa.

U svrhu simulacije udaha pacijenta, model je spojen na respiratornu pumpu za simulaciju protoka udahnutog zraka od  $0 \text{ L min}^{-1}$  (postavka bez udisaja – zadržani dah) do  $20 \text{ L min}^{-1}$  (postavka pumpe koja predstavlja umjereno duboki udah (87)). Eksperiment je proveden umetanjem UDSP uređaja u desnu nosnicu, dok je lijeva nosnica bila začepljena prilikom aktivacije uređaja. Zatvaranje jedne nosnice prilikom primjene nazalnog lijeka preporučeno je od strane FDA-a i EMA-e (169). U ovom radu nazalni raspršivač UDSP odabran je kao uređaj za raspršivanje mikrosfera s donepezilom jer pokazuje iznimni potencijal za ciljanu olfaktornu depoziciju praškastih sustava (123).

Olfaktorna depozicija (depozicija u odvojivim olfaktornim segmentima turbinatne regije i septuma modela nosne šupljine) i turbinatna depozicija (depozicija u turbinatnoj regiji bez odvojivog olfaktornog segmenta modela nosne šupljine) kitozansko-manitoljskih mikrosfera s donepezilom praćene su kao DoE odgovori u ovisnosti o variranim formulacijskim i procesnim parametrima, te parametrima primjene.

#### 4.1.2.7.1 Olfaktorna depozicija mikrosfera s donepezilom

Postotak doze lijeka dostavljen u olfaktorno područje raspršivanjem kitozansko-manitoljskih mikrosfera s donepezilom u model nosne šupljine kretao se između  $13,9 \pm 1,9$  i  $65,5 \pm 0,2$  % (Tablica 12.). Generirani regresijski model karakteriziran je visokom prediktivnom moći te daje jasan uvid u utjecaj variranih parametara na profil olfaktorne depozicije.

Oba promatrana parametra primjene značajno su utjecala na profil olfaktorne depozicije. Smanjenjem AAH od  $60^\circ$  do  $30^\circ$  te smanjenjem IFR-a od  $20 \text{ L min}^{-1}$  do  $0 \text{ L min}^{-1}$  značajno je rastao postotak donepezila koji je dostavljen u olfaktornu regiju. Općenito, u dosadašnjim istraživanjima o nazalnoj depoziciji dokazano je da visoki kutovi primjene u odnosu na horizontalnu ravninu pogoduju depoziciji tekućih nazalnih sustava u gornja područja nosne šupljine, tj. u olfaktornu regiju (167,215). No, u ovom radu zabilježen je upravo suprotan trend: smanjenjem AAH-a raste olfaktorna depozicija. Jedan od rezultata pokazuje izrazito visoki postotak lijeka u olfaktornoj regiji (čak 65,5 % od ukupne primijenjene doze) pri kutu primjene od  $30^\circ$ . Opisani trend može se pripisati aerodinamičkim svojstvima praškastog uzorka, ali i mehanizmu kojim UDSP uređaj raspršuje uzorak. U radu Salade i suradnika (123) pripremljeni su liposomski praškasti sustavi grelina za izravnu dostavu lijeka u SŽS, a prilikom ispitivanja profila nazalne depozicije raspršeni su u model pomoću UDSP uređaja. Pri parametrima primjene AAH od  $45^\circ$  i IFR od  $0 \text{ L min}^{-1}$ , 52 % primijenjene doze dostavljeno je u olfaktornu regiju 3D printanog modela nosne šupljine. Navedeni rezultat usporediv je s rezultatima olfaktorne depozicije postignutim u ovom radu, što dokazuje da kombinacija parametara primjene i odabir nazalnog uređaja mogu značajno utjecati na učinkovitost ciljane nazalne depozicije.

Porast protoka udahnutog zraka rezultirao je smanjenjem postotka doze donepezila dostavljene u olfaktornu regiju (Tablica 13.). Naime, pojačana inspiracija utječe na smjer kretanja praškastog uzorka na način da 'vuče' praškaste čestice prema posteriornoj regiji nosne šupljine. S pojačanim udahom raste rizik da čestice dosegnu nazo-farinks i budu progutane, te



ne ispune svoj terapijski učinak očekivan dostavom u nosnu šupljinu. Također, čestice na taj način mogu uzrokovati neugodni okus u ustima i negativno utjecati na suradljivost pacijenta (161). Potencijalna primjena mikrosfera s donepezilom u postavci 'bez udaha' povoljna je i iz perspektive pacijenta, ali i pacijentova skrbnika (ukoliko pacijent nije u stanju sam primijeniti lijek) jer ne zahtijeva koordinaciju potiska uređaja i udaha (144).

Osim parametara primjene, regresijski model za olfaktornu depoziciju pokazuje utjecaj formulacijskih i procesnih parametara na profil depozicije. Smanjenje temperature ulaznog zraka u procesu sušenja raspršivanjem rezultiralo je povećanjem olfaktorne depozicije. Ovaj utjecaj može se objasniti na dva načina. Smanjenjem ulazne temperature u procesu sušenja, rastao je volumni promjer  $D_v10$ , što pogoduje ciljanoj depoziciji praškastih mikrosfera (123). Također, smanjenjem temperature rastao je i sadržaj vlage u mikrosferama što potiče aglomeraciju najmanjih čestica, što ponovno utječe na aerodinamička svojstva prašaka i potencijal za njihovu depoziciju u olfaktorno područje nosne šupljine (123). Smanjenjem temperature ulaznog zraka smanjena je frakcija čestica manjih od 10  $\mu\text{m}$  koje imaju tendenciju odlaganja u posteriornim regijama nosne šupljine što rezultira gubitkom lijeka u probavni ili dišni trakt (123). Uočen je i utjecaj formulacijskih parametara u interakciji (koncentracije donepezila i manitola) na olfaktornu depoziciju. Ovakav utjecaj je očekivan s obzirom da je navedena kombinacija parametara utjecala i na kut raspršenja i  $D_v10$ , a ti odgovori uvelike utječu na profil nazalne depozicije (163).

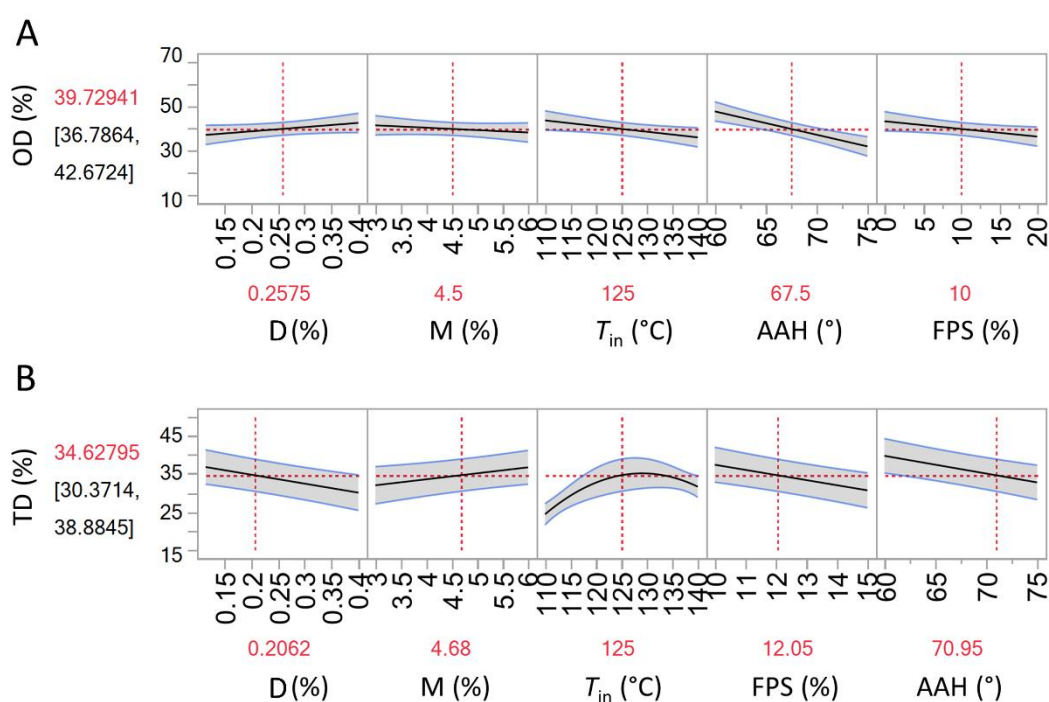
#### **4.1.2.7.2 Turbinatna depozicija mikrosfera s donepezilom**

Postotak doze lijeka dostavljen u turbinatno područje (bez odvojivog olfaktornog segmenta) raspršivanjem kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom u model nosne šupljine bio je između  $19,4 \pm 5,8$  i  $47,6 \pm 6,8$  % (Tablica 12.). Visoka prediktivna moć generiranog regresijskog modela za turbinatnu depoziciju razvidna je iz regresijskih parametara koji su prikazani u Tablici 13.

Suprotno olfaktornoj depoziciji, smanjenje AAH-a rezultiralo je smanjenjem turbinatne depozicije. Kvadratni utjecaj temperature ulaznog zraka pokazuje kompleksni utjecaj tog procesnog parametra na turbinatnu depoziciju. Formulacijski parametri (koncentracije donepezila i manitola) i temperatura ulaznog zraka kao procesni parametar, pokazuju obrnuti trend utjecaja na turbinatnu i olfaktornu depoziciju. Ovakav komplementarni utjecaj promatranih parametara na olfaktornu i turbinatnu depoziciju povoljan je u vidu dostave lijeka u SŽS jer se s povećanjem olfaktorne depozicije smanjuje turbinatna depozicija. To pokazuje

moćnost potenciranja dostave lijeka u mozak, uz istodobno izbjegavanje pretjerane sistemske apsorpcije i razvoja nuspojava.

Zaključno, profil nazalne depozicije kitozansko-manitoljskih mikrosfera s donepezilom uvelike ovisi o formulacijskim i procesnim parametrima te o parametrima primjene (Slika 22.). QbD načela primijenjena u razvoju kitozansko-manitoljskih mikrosfera s donepezilom omogućila su razumijevanje odnosa formulacijskih/procesnih parametara u kombinaciji s tehnikama primjene i profila nazalne depozicije. Sveobuhvatni pristup rezultirao je izrazito visokim postotkom lijeka dostavljenim u olfaktornu regiju nosne šupljine, što je jedan od istaknutijih rezultata vezanih uz olfaktornu depoziciju pronađen u literaturi.



**Slika 21.** Predikacija olfaktorne depozicije (depozicija u odvojivim olfaktornim segmentima turbinatne regije i septuma modela nosne šupljine, OD; A) i turbinatne depozicije (depozicija u turbinatnoj regiji bez odvojivog olfaktornog segmenta modela nosne šupljine, TD; B) kitozansko-manitoljskih mikrosfera s donepezilom u odnosu na variranu koncentraciju donepezila (D), manitola (M), temperaturu ulaznog zraka ( $T_{in}$ ); postavku peristaltičke pumpe za dovođenje uzorka (FPS) i kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu (AAH). Vrijednosti u zagradama odnose se na interval pouzdanosti od 95 %. Uz dozvolu Elseviera preuzeto iz Perkušić i sur. (2022) (251).

### 4.1.3 Odabir vodećih mikrosfera s donepezilom

Primjena DoE-a u razvoju kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom omogućila je identifikaciju uzorka s optimiranim svojstvima ključnim za nazalnu primjenu. Naime, vodeće kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom (D/C/M) odabrane su s obzirom na volumni promjer  $D_{v10}$  (ključni parametar veličine čestica za ciljanu nazalnu depoziciju (163)) i postotak lijeka dostavljen u olfaktorno područje (ključni preduvjet za dostavu lijeka u mozak putem nosne šupljine). Vodeće mikrosfere pripravljene su sušenjem raspršivanjem otopine donepezila, kitozana i manitola, koncentracije redom od 0,4 % ( $m/V$ ), 1,5 % ( $m/V$ ) i 6,0 % ( $m/V$ ), pri procesnim parametrima  $T_{in}$  110 °C i FPS 15 %. Volumni promjer  $D_{v10}$  vodećih mikrosfera iznosio je  $11,62 \pm 0,41 \mu\text{m}$ , a pri parametrima primjene AAH 30 ° i IFR 0 L min<sup>-1</sup> postignuta je najveća olfaktorna depozicija, s čak  $65,5 \pm 0,2 \%$  doze lijeka dostavljene u navedeno područje. Proces sušenja vodećeg D/C/M uzorka rezultirao je umjerenim iskorištenjem procesa (47,2 %) što se može objasniti uvjetima izvođenja eksperimenta u laboratorijskom mjerilu. Naime, aparatura korištena u laboratorijskom mjerilu često rezultira nižim iskorištenjem u usporedbi s industrijskim mjerilom. Naime, komora za sušenje u laboratorijskom mjerilu može biti nedovoljno široka i dugačka za učinkovito sušenje razreda najvećih kapljica proizvedenih pri najvećem protoku sušenja otopine i najmanjoj temperaturi, što može rezultirati lijepljenjem neosušenih kapljica za stijenke uređaja (258). Bitno je za napomenuti da je konačni sadržaj vlage u osušenom produktu prikladan ( $5,2 \pm 0,2 \%$ ) što ipak potvrđuje učinkovito sušenje. D/C/M mikrosfere pokazuju zadovoljavajuća svojstva tečenja i prikladna svojstva bubrenja.

Utjecaj manitola na svojstva vodećih D/C/M mikrosfera utvrđen je usporedbom s mikrosferama koje sadrže samo kitozan i donepezil (D/C) u istom masenom omjeru kao i u vodećem uzorku. Razlike između D/C/M i D/C mikrosfera su očigledne: volumni udio čestica koje su veće od 10  $\mu\text{m}$  za D/C/M mikrosfere iznosi  $93,3 \pm 0,4 \%$ , a za D/C mikrosfere  $58,0 \pm 1,6 \%$  (Tablica 15.). D/C/M mikrosfere imaju zadovoljavajuća svojstva tečenja (Hausnerov omjer iznosi  $1,23 \pm 0,06$ ), a D/C mikrosfere loša svojstva tečenja (Hausnerov omjer iznosi  $1,35 \pm 0,02$ ) (Tablica 15.). Također, manitol u vodećem uzorku poboljšava svojstva bubrenja:  $V_{SNF}$  (volumen SNF-a apsorbiran po miligramu kitozana) iznosio je  $51,1 \pm 0,9 \mu\text{L mg}^{-1}$ , a za D/C mikrosfere  $V_{SNF}$  je  $35,7 \pm 4,7 \mu\text{L mg}^{-1}$  (Tablica 15.). Zaključno, dodatak manitola u matriks D/C uzorka rezultirao je poboljšanjem svojstava mikrosfera, bitnih za učinkovitu dostavu donepezila iz nosne šupljine u SŽS.

**Tablica 15.** Razlike između kitozansko-manitolskih i kitozanskih mikrosfera donepezila pripravljenih sušenjem raspršivanjem.

Uzorak	> 10 $\mu\text{m}$ (%)	HR	$V_{\text{SNF}}$ ( $\mu\text{L mg}^{-1}$ )
D/C/M	93,3 $\pm$ 0,4	1,23 $\pm$ 0,06	51,1 $\pm$ 0,9
D/C	58,0 $\pm$ 1,6	1,35 $\pm$ 0,02	35,7 $\pm$ 4,7

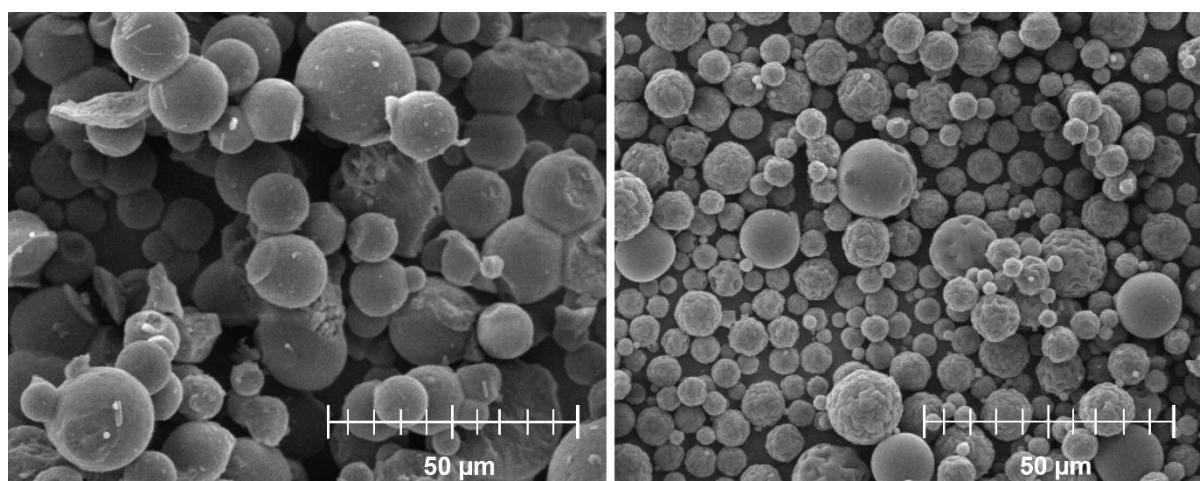
D/C/M-vodeće kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom, D/C-kitozanske mikrosfere pri istom masenom omjeru donepezila i kitozana kao i u vodećem uzorku i pripravljene sušenjem raspršivanjem pri procesnim parametrima kao i za vodeće mikrosfere. > 10  $\mu\text{m}$  - volumni udio čestica koje su veće od 10  $\mu\text{m}$ ; HR - Hausnerov omjer (engl. *Hausner ratio*);  $V_{\text{SNF}}$  - stupanj bubrenja izražen kao volumen SNF-a apsorbiran po miligramu kitozana. Vrijednosti prikazane u tablici su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, n = 3.

#### 4.1.4 Detaljna karakterizacija vodećih mikrosfera s donepezilom

##### 4.1.4.1 Morfologija vodećih mikrosfera s donepezilom

Morfologija mikrosfera izrazito je bitna za tečenje prašaka, a može utjecati i na profil oslobađanja lijeka te profil iritabilnosti terapijskog sustava na nosnoj sluznici (128,129).

SEM mikrografija D/C/M mikrosfera potvrdila je veličinu čestica koja je određena metodom laserske difrakcije (Slika 22.; lijevo). SEM analizom dokazano je da su D/C/M mikrosfere uniformne veličine, sferičnog oblika i glatke površine. Takva morfologija praška osigurava prikladno tečenje. Usporedbe radi, D/C mikrosfere su manje veličine i naborane površine (Slika 22.; desno). Iz SEM mikrografija razvidno je da je dodatak manitola povoljno utjecao na veličinu čestica, te, dijelom i zbog glađe površine mikrosfera, na svojstva tečenja.



**Slika 22.** SEM mikrografija vodećih kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom (D/C/M; lijevo) i kitozanskih mikrosfera pri istom masenom omjeru donepezila i kitozana kao

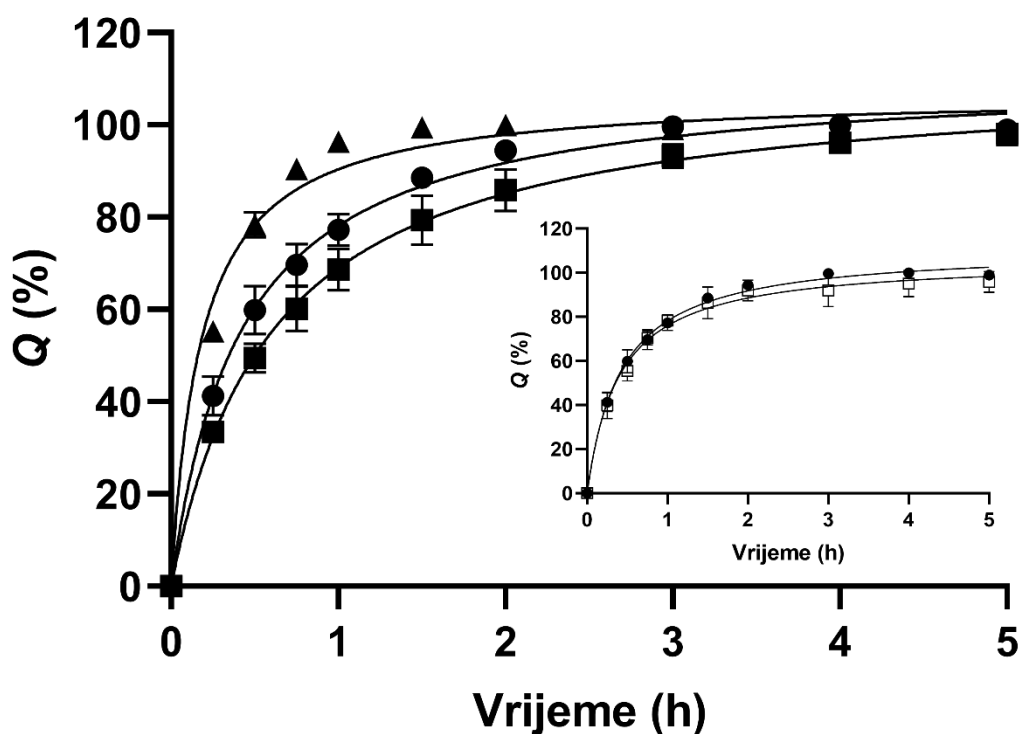
i u vodećem uzorku (D/C; desno). Uz dozvolu Elseviera preuzeto iz Perkušić i sur. (2022) (251).

#### **4.1.4.2 Profil oslobađanja donepezila iz vodećih mikrosfera *in vitro***

*In vitro* ispitivanje oslobađanja lijeka iz praškastog uzorka na vertikalnim Franzovim difuzijskim ćelijama omogućava sporo hidratiziranje praška i postupno geliranje praškastog *in situ* gelirajućeg sustava. Uzorak se postavlja na kondicioniranu membranu koja je u dodiru s receptorskim medijem za oslobađanje, te se na taj način simulira vlažna okolina nosne sluznice (173).

Eksperiment *in vitro* oslobađanja donepezila iz D/C/M mikrosfera proveden je pri uvjetima osigurane topljivosti. Profil oslobađanja lijeka iz D/C/M mikrosfera uspoređen je s *in vitro* profilom oslobađanja lijeka iz D/C mikrosfera i čistog praška donepezila. Profili oslobađanja navedenih uzoraka prikazani su na Slici 23.

Vizualnim promatranjem mikrosfera za vrijeme eksperimenta *in vitro* oslobađanja, zamijećeno je da na membrani mikrosfere bubre u dodiru sa SNF-om i stvaraju gel. U usporedbi s praškom donepezila, i D/C/M i D/C mikrosfere osiguravaju produljeno oslobađanje lijeka. U slučaju D/C mikrosfera ukupna doza lijeka oslobodila se za 5 sati, a u slučaju D/C/M mikrosfera zabilježeno je brže oslobađanje, te se ukupna doza oslobodila za 3 h. Razlika između profila oslobađanja donepezila iz D/C/M i D/C mikrosfera u usporedbi s praškom donepezila dokazana je  $f_2$  faktorom sličnosti:  $f_2$  između D/C/M mikrosfera i praška donepezila iznosio je 45,6, a  $f_2$  između D/C uzorka i praška donepezila iznosio je 40,5. Profili se ne smatraju sličnima ukoliko je  $f_2$  faktor manji od 50.



**Slika 23.** *In vitro* profili oslobađanja donepezila iz vodećih kitozansko-manitolskih mikrosfera (D/C/M; krug) i odgovarajućih kitozanskih mikrosfera (D/C; kvadrat), u usporedbi s praškom donepezila (trokut). Umetnuti graf: *in vitro* profili oslobađanja donepezila iz D/C/M mikrosfera u stabilitetnim točkama: 0 dana (puni krug) i 180 dana (prazni kvadrat).  $Q$  (%) predstavlja kumulativni postotni udio oslobođenog lijeka u promatranom vremenu. Vrijednosti prikazane na grafu su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija,  $n = 3$ .

Manitol je osmotski aktivna tvar koja potencira vlaženje i bubrenje polimernog matriksa D/C/M mikrosfera (80). Utjecaj manitola na matriks D/C/M mikrosfera dokazan je ispitivanjem stupnja bubrenja: volumen SNF-a apsorbiran po miligramu kitozana za D/C/M mikrosfere iznosi  $51,1 \pm 0,9 \mu\text{L mg}^{-1}$ , a za odgovarajuće D/C mikrosfere  $35,7 \pm 4,7 \mu\text{L mg}^{-1}$ . No, zanimljivo je komentirati da unatoč različitom sastavu i posljedično različitom stupnju bubrenja,  $f_2$  faktor između D/C/M i D/C mikrosfera iznosi 67,7, što znači da su profili oslobađanja slični. Može se zaključiti da i jedan i drugi matriks bubrenjem stvaraju gel koji omogućava produljeno oslobađanje lijeka na sluznici nosa.

Zabilježeno produljeno oslobađanje donepezila iz D/C/M mikrosfera može povoljno utjecati na bioraspoloživost lijeka nakon nazalne primjene. Polimerni matriks vodećeg uzorka osigurao je potpuno oslobađanje doze lijeka u očekivanom vremenu zadržavanja praška na nosnoj sluznici (80,183,259). Treba obratiti pozornost na krivulju oslobađanja u početku eksperimenta: u prvih 15 minuta oslobođeno je čak 40 % uklopljenog lijeka. Takvo naglo početno oslobađanje može osigurati visoku koncentraciju lijeka na nosnoj sluznici što rezultira brзом apsorpcijom i brzim postizanjem terapijskog učinka (80,144,259). Kombinacija naglog oslobađanja netom nakon depozicije lijeka u nosnoj šupljini te produljenog oslobađanja u vremenu zadržavanja na nosnoj sluznici povoljna je s obzirom na ciljani učinak lijeka.

Iz podataka o koeficijentu determinacije ( $R^2$ ) prikazanih u Tablici 16. razvidno je da Higuchijeva kinetika najbolje opisuje oslobađanje donepezila iz D/C/M mikrosfera, što je u skladu s ranijim literaturnim navodima koji se odnose na oslobađanje djelatne tvari iz kitozanskih mikrosfera pripravljenih sušenjem raspršivanjem (93,260). Kod Higuchijeve kinetike, oslobađanje lijeka prati Fickov zakon difuzije gdje je brzina oslobađanja određena bubrenjem polimernog matriksa i brzinom difuzije lijeka kroz izbubreni matriks (219,220).

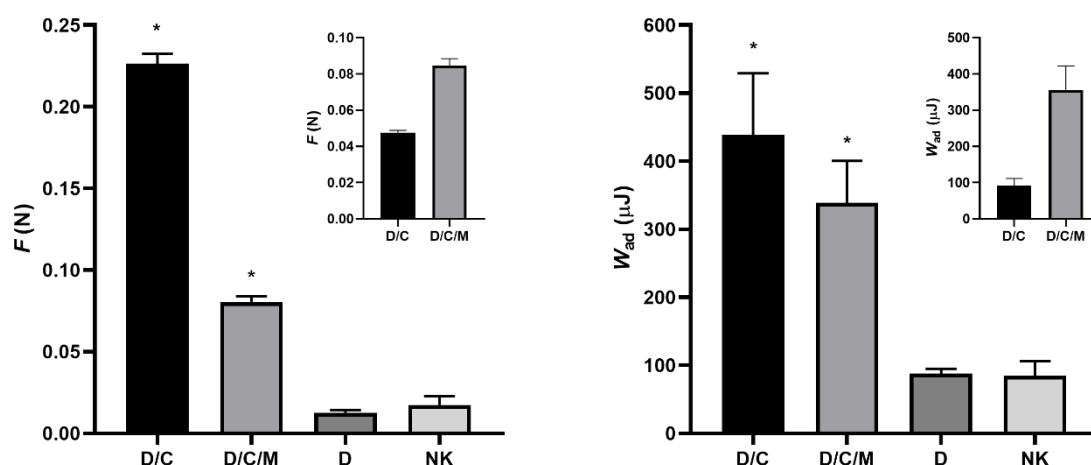
**Tablica 16.** Rezultati analize prikladnosti kinetike nultog reda, kinetike prvog reda i Higuchijeve kinetike za opisivanje oslobađanje donepezila iz vodećih kitozansko-manitoljskih mikrosfera (D/C/M) i pripadajući faktori determinacije ( $R^2$ ).

Kinetika	Jednadžbe koje opisuju oslobađanje lijeka	$R^2$
Nulti red	$y = 0,2764x + 0,3523$	0,7041
Prvi red	$y = 0,1186x - 0,2890$	0,7247
Higuchijeva kinetika	$y = 0,5856x + 0,1184$	0,9356

#### 4.1.4.3 Mukoadhezivnost vodećih mikrosfera s donepezilom *ex vivo*

Razvoj naprednih nazalnih mukoadhezivnih sustava predstavlja obećavajuću strategiju prevladanja brzog uklanjanja formulacije s nosne sluznice uslijed mukocilijarnog klirensa te osiguranja produljenog zadržavanja na sluznici nosa s ciljem povećanja potencijala izravne dostave lijeka u mozak (14,33,261,262). U ovom radu mukoadhezivnost D/C/M mikrosfera ispitana je korištenjem analizatora teksture *ex vivo* metodom na nazalnoj sluznici svinje. Nazalna sluznica svinje često je korišten model u ispitivanju mukoadhezivnosti nazalnih pripravaka, zahvaljujući sličnosti s humanom nazalnom sluznicom (144,209,263).

Izražena mukoadhezivnost D/C/M mikrosfera očekivana je s obzirom da mikrosfere u svom sastavu sadrže mukoadhezivni polimer kitozan. S ciljem određivanja utjecaja manitola na mukoadhezivnost vodećih mikrosfera, provedena je usporedba mukoadhezivnosti D/C/M i D/C mikrosfera. Mukoadhezivnost mikrosfera uspoređena je i s mukoadhezivnošću praška donepezila (D). Kao negativna kontrola (NK) korišten je filter papir. Mukoadhezivnost je iskazana kao maksimalna sila ( $F_{\max}$ ) i rad adhezije ( $W_{\text{ad}}$ ) potreban za odvajanje praškastog uzorka od sluznice nosa svinje. Rezultati su prikazani na Slici 24.



**Slika 24.** Maksimalna sila ( $F_{\max}$ ; lijevo) i rad adhezije ( $W_{\text{ad}}$ ; desno) potreban za odvajanje sluznice nosa svinje od: vodećih kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom (D/C/M) i odgovarajućih kitozanskih mikrosfera s donepezilom (D/C), praška donepezila (D) i negativne kontrole (NK). Umetnuti graf: maksimalna sila ( $F_{\max}$ ; lijevo) i rad ( $W_{\text{ad}}$ ; desno) potrebni za odvajanje sluznice nosa svinje od D/C/M i D/C mikrosfera, izraženi po miligramu kitozana. Vrijednosti prikazane na grafu su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija,  $n = 3$ . \* - statistički značajne razlike u  $F_{\max}$  i  $W_{\text{ad}}$  u odnosu na prašak donepezila i negativnu kontrolu.

Za odvajanje D/C/M mikrosfera od nosne sluznice svinje bili su potrebni osam puta veći  $F_{\max}$  i četiri puta veći  $W_{\text{ad}}$  nego u slučaju praška donepezila. Za odvajanje D/C mikrosfera od nosne sluznice bili su potrebni 2,9 puta veći  $F_{\max}$  i 1,3 puta veći  $W_{\text{ad}}$  u odnosu na D/C/M mikrosfere, što je i očekivano, s obzirom na veći udio mukoadhezivnog polimera kitozana u D/C mikrosferama.

Kao što je već komentirano u poglavlju 1.4.1.1.1., kitozan je mukoadhezivni polimer koji bubri u kontaktu s nosnim fluidom. Pri pH sluznice nosa kitozan je pozitivno nabijen te pokazuje mukoadhezivna svojstva kroz elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim

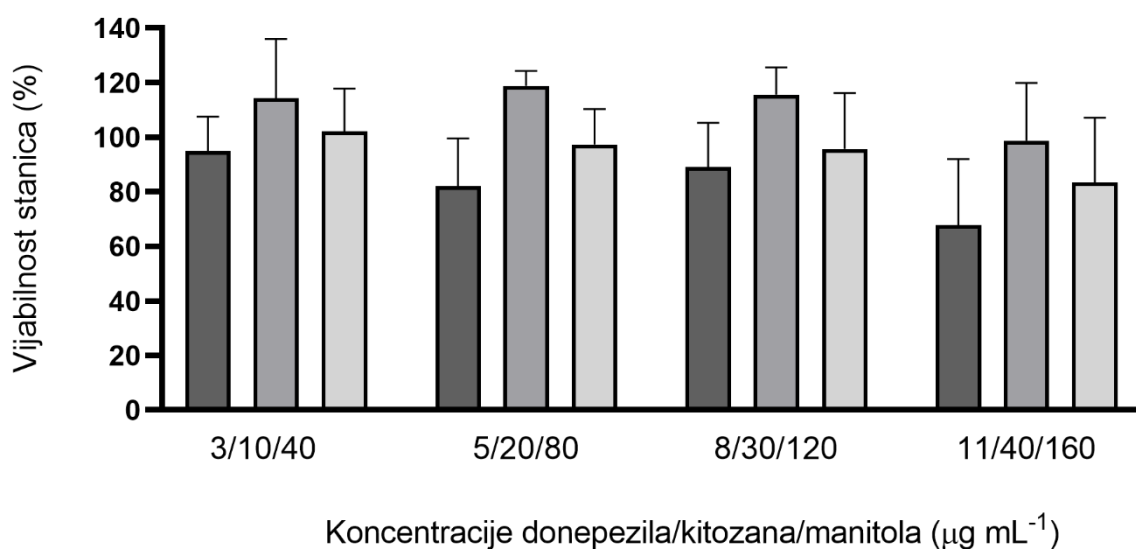


mucinima prisutnima u nosnoj sluzi. Osim putem elektrostatske interakcije, kitozan djeluje kao mukoadhezivni agens i putem vodikovih veza i hidrofobnih interakcija s mucinom (99,264). U kontekstu polimernih mikrosfera, vlaženje i bubrenje polimernog matriksa olakšava interakciju lanaca kitozana i mucina, čime se još dodatno pojačava mukoadhezivnost kitozana (265).

S ciljem određivanja utjecaja manitola na mukoadhezivna svojstva D/C/M mikrosfera,  $F_{\max}$  i  $W_{\text{ad}}$  izraženi su po miligramu kitozana u praškastom matriksu (Slika 24.; umetci). Takvim pristupom uočeno je da manitol povećava mukoadhezivna svojstva kitozana. Naime, uslijed osmotske aktivnosti manitola, izražena su svojstva bubrenja D/C/M mikrosfera, a izubreni matriks omogućava bolju interakciju kitozana i mucina. Može se zaključiti da je osim dodatka mukoadhezivnog polimera u formulaciju, vrijedno razmotriti i dodatak pomoćne tvari koja naglašava mukoadhezivni učinak polimera. Opisanim razmatranjem ponovno je dokazan povoljni utjecaj dodatka manitola u kitozanski matriks mikrosfera, ovaj put u pogledu poboljšanja mukoadhezivnih svojstava praškastog *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom.

#### 4.1.4.4 Biokompatibilnost vodećih mikrosfera s donepezilom *in vitro*

Biokompatibilnost D/C/M mikrosfera ispitana je korištenjem Calu-3 staničnog modela. Uzorci su pripremljeni tako da su D/C/M mikrosfere dispergirane u HBSS puferu (pH=6,0). Dispergirana je točno određena količina vodećih mikrosfera pri kojoj je koncentracija kitozana u disperziji iznosila 10 do 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Kao kontrolni uzorci korištene su otopine manitola i donepezila u HBSS puferu (pH = 6,0) u koncentracijama istim kao i u odgovarajućim D/C/M disperzijama. Rezultati vijabilnosti tretiranih stanica prikazani su na Slici 25.



**Slika 25.** Utjecaj disperzije vodećih kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom (D/C/M) u HBSS puferu (pH=6,0) (■), otopine donepezila u HBSS puferu (pH=6,0) (■) i otopine manitola u HBSS puferu (pH=6,0) (■) na vijabilnost Calu-3 stanica, praćenu MTT testom. U pripremljenim uzorcima koncentracije donepezila, kitozana i manitola bile su u rasponima redom: 3-11  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 10-40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 40-160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Vrijednosti prikazane na grafu su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, n = 3.

Svi kontrolni uzorci kompatibilni su s Calu-3 staničnim modelom u svim testiranim koncentracijama. Stanice izložene disperzijama D/C/M mikrosfera pri koncentraciji kitozana od 10 do 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  zadržale su vijabilnost stanica iznad 90 % u odnosu na negativnu kontrolu (stanice izložene čistom HBSS puferu (pH = 6,0)). Vijabilnost stanica izloženih disperziji mikrosfera pri koncentraciji kitozana od 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  iznosila je manje od 70 % u odnosu na negativnu kontrolu.

Kitozan je poznat kao biokompatibilni polimer te se zbog te činjenice široko primjenjuje u biomedicini (266). No, pri  $\text{pH} < \text{pK}_a$  kitozana, on je pozitivno nabijen te ulazi u interakciju s negativno nabijenom površinom stanica. Navedena elektrostatska interakcija može izazvati smanjenje vijabilnosti stanica *in vitro*. Općenito, *in vitro* stanični modeli podložniji su citotoksičnom učinku jer model u jažici predstavlja samo mali fragment strukture i funkcije ljudskog tkiva. Iz tog razloga, niski rezultati vijabilnosti stanica *in vitro* ne moraju nužno značiti nekompatibilnost formulacija s tkivima *in vivo*. *In vitro* ispitivanje biokompatibilnosti često se provodi kako bi se odredile koncentracije/razrjeđenja terapijskog sustava pri kojima je moguće provesti *in vitro* ispitivanje permeabilnosti bez narušavanja vijabilnosti stanica (226,267). Dobro postavljen pokus *in vitro* permeabilnosti može dati važnu informaciju o permeacijskom potencijalu lijeka, no ukoliko su ispitivane formulacije citotoksične, narušava se integritet stanične barijere te eksperiment može rezultirati pogrešnim zaključcima.

Zaključno na ispitivanje *in vitro* biokompatibilnosti, za ispitivanje permeabilnosti donepezila iz D/C/M mikrosfera odabrana je disperzija D/C/M mikrosfera u HBSS-u (pH=6,0), pri koncentraciji kitozana od 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **4.1.4.5 Permeabilnost donepezila iz vodećih mikrosfera *in vitro***

*In vitro* permeabilnost donepezila iz D/C/M mikrosfera ispitana je koristeći Calu-3 stanični monosloj koji je uzgojen u ALI uvjetima rasta. Calu-3 je humana stanična linija adenokarcinoma pluća koja se koristi kao prikladni *in vitro* model epitela nazalne sluznice jer

pokazuje morfološke sličnosti s epitelom nazalne sluznice *in vivo*. Naime, Calu-3 stanice posjeduju cilije, luče sluz i pokazuju sličan integritet barijere (144,268,269). Zbog svih navedenih sličnosti Calu-3 stanični model često se koristi pri ispitivanju permeabilnosti naprednih nazalnih sustava koji su namijenjeni za izravnu dostavu lijeka u SŽS (123,204,270,271).

U ovom radu ispitana je permeabilnost donepezila iz D/C/M mikrosfera. D/C/M mikrosfere dispergirane su u HBSS puferu (pH = 6,0) te su koncentracije donepezila, kitozana i manitola u pripremljenoj disperziji iznosile redom 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . S ciljem ispitivanja utjecaja polimernog matriksa D/C/M mikrosfera na permeaciju donepezila, ispitana je i permeabilnost donepezila iz sljedećih kontrolnih uzoraka: D/C mikrosfera dispergiranih u HBSS puferu (pH = 6,0), otopine donepezila i manitola u HBSS puferu (pH = 6,0) te otopine donepezila u HBSS puferu (pH = 6,0). U svim kontrolnim uzorcima koncentracija donepezila iznosila je 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , koncentracija kitozana iznosila je 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a koncentracija manitola bila je 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{\text{app}}$ ) donepezila kroz Calu-3 stanični monosloj i osmolalnost pripremljenih uzoraka prikazani su u Tablici 17.

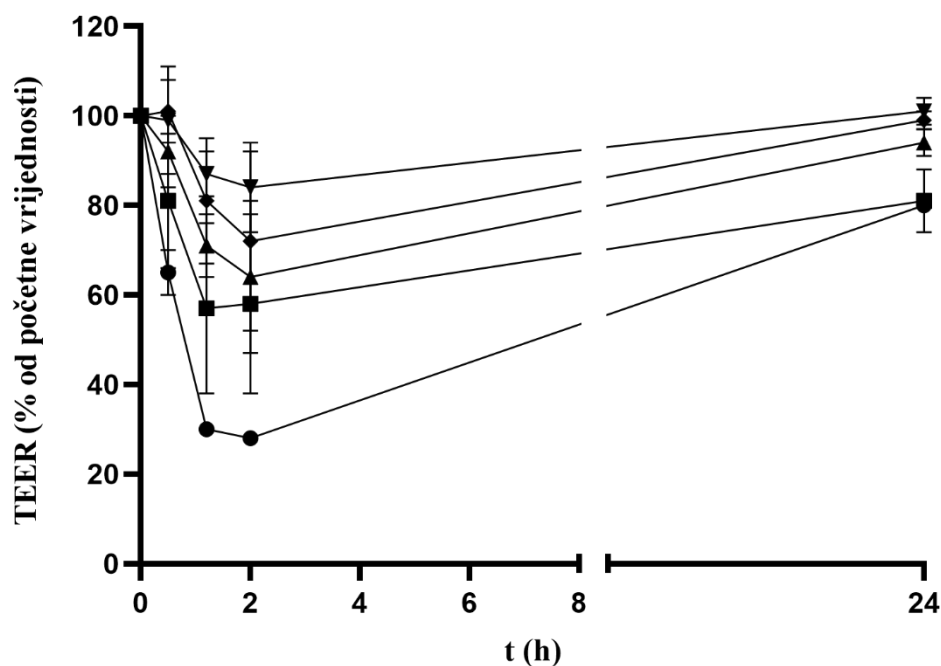
**Tablica 17.** Osmolalnost i prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{\text{app}}$ ) donepezila kroz Calu-3 stanični monosloj za uzorke: disperzija vodećih kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom (D/C/M), suspenzija kitozanskih mikrosfera s donepezilom (D/C), otopina donepezila i manitola (D/M), otopina donepezila (D); svi uzorci pripremljeni su u HBSS puferu (pH=6,0) pri koncentracijama donepezila, kitozana i manitola redom 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Uzorak	Osmolalnost (mOsm $\text{kg}^{-1}$ )	$P_{\text{app}}$ ( $10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ )	Atenuacijski faktor
D/C/M	348 $\pm$ 1	4,15 $\pm$ 0,44	1,16
D/C	323 $\pm$ 1	4,66 $\pm$ 0,15	1,30
D/M	322 $\pm$ 1	3,64 $\pm$ 0,27	1,01
D	321 $\pm$ 1	3,59 $\pm$ 0,53	-
HBSS (pH=6,0)	324 $\pm$ 3	-	-

Atenuacijski faktor izračunat je dijeljenjem  $P_{\text{app}}$  vrijednosti za donepezil iz D/C/M odnosno D/C mikrosfera ili D/M otopine s  $P_{\text{app}}$  vrijednošću za donepezil iz otopine donepezila (D) (144). Vrijednosti prikazane u tablici su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija,  $n = 3$ .

$P_{app}$  vrijednosti određene u ovom istraživanju sličnog su reda veličine kao vrijednosti dobivene u ranijim ispitivanjima za permeaciju donepezila kroz druge biološke barijere: BBB stanični model (272), epitelne stanice bubrega psa s izraženim genom za višestruku otpornost stanica (engl. *multi drug resistance genes – Madin-Darby canine kidney*, MDR-MDCKII (273)) i sintetsku membranu Permeapad<sup>®</sup> (274).  $P_{app}$  vrijednosti iz navedenih studija i ovog rada upućuju na lijek s izraženim permeacijskim potencijalom (275). Uspoređujući međusobno  $P_{app}$  vrijednosti iz Tablice 17., može se zaključiti da je permeacija donepezila povećana uklapanjem u D/C/M i D/C mikrosfere u odnosu na otopinu donepezila (atenuacijski faktor za D/C/M i D/C mikrosfere u odnosu na otopinu lijeka iznosi redom 1,16 i 1,30). Uzimajući u obzir produljeno oslobađanje lijeka iz D/C/M i D/C mikrosfera (Slika 23.) može se zaključiti da je permeacijski potencijal donepezila iz navedenih mikrosfera još i veći: naime, uslijed produljenog oslobađanja lijeka iz mikrosfera, samo je oslobođena frakcija lijeka dostupna za prijelaz kroz Calu-3 stanični monosloj, dok je kod otopine cijela doza lijeka odmah raspoloživa za permeaciju (276). Povećani permeacijski potencijal lijeka iz mikrosfera može se objasniti prisustvom pospješivača apsorpcije kitozana i osmotski aktivnog manitola koji reverzibilno otvaraju TJ te tako potenciraju paracelularni transport hidrofilnog lijeka (277,278).

Slabljenje barijernog integriteta staničnog monosloja razvidno je iz pada TEER vrijednosti za vrijeme trajanja eksperimenta (Slika 26.). Pad TEER-a upućuje na otvaranje TJ-a u prisustvu kitozana i manitola. Reverzibilni učinak kitozana i manitola na TEER dokazan je porastom TEER-a do 81 % početne vrijednosti, u 24-satnom razdoblju od početka eksperimenta (Slika 26.), čime je pokazana i očuvanost staničnog monosloja nakon provedenog pokusa permeabilnosti. Biokompatibilnost ispitivanih uzoraka potvrđena je i MTT testom vijabilnosti Calu-3 staničnog monosloja, izvedenim na Transwell<sup>®</sup> ploči nakon provedenog testa permeabilnosti (144). Vijabilnost Calu-3 staničnog monosloja nakon izlaganja uzorcima D/C/M, D/C, D/M, D i negativnoj kontroli (HBSS (pH = 6,0)) iznosila ju redom:  $106,3 \pm 0,3$  %,  $115,8 \pm 5,9$  %,  $101,9 \pm 13,0$  %,  $105,1 \pm 13,9$  % i  $109,0 \pm 4,3$  %.



**Slika 26.** Transepitelni električni otpor (TEER) Calu-3 staničnog monosloja praćen tijekom i nakon *in vitro* ispitivanja permeabilnosti za sljedeće uzorke: vodeće kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom (D/C/M; krug), kitozanske mikrosfere s donepezilom (D/C; kvadrat), otopinu donepezila i manitola (D/M; trokut), otopinu donepezila (D; obrnuti trokut), HBSS pufer (pH=6,0) (romb). Svi uzorci su pripremljeni u HBSS puferu (pH=6,0) pri koncentraciji donepezila, kitozana i manitola redom od  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Vrijednosti prikazane na slici su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija,  $n = 3$ .

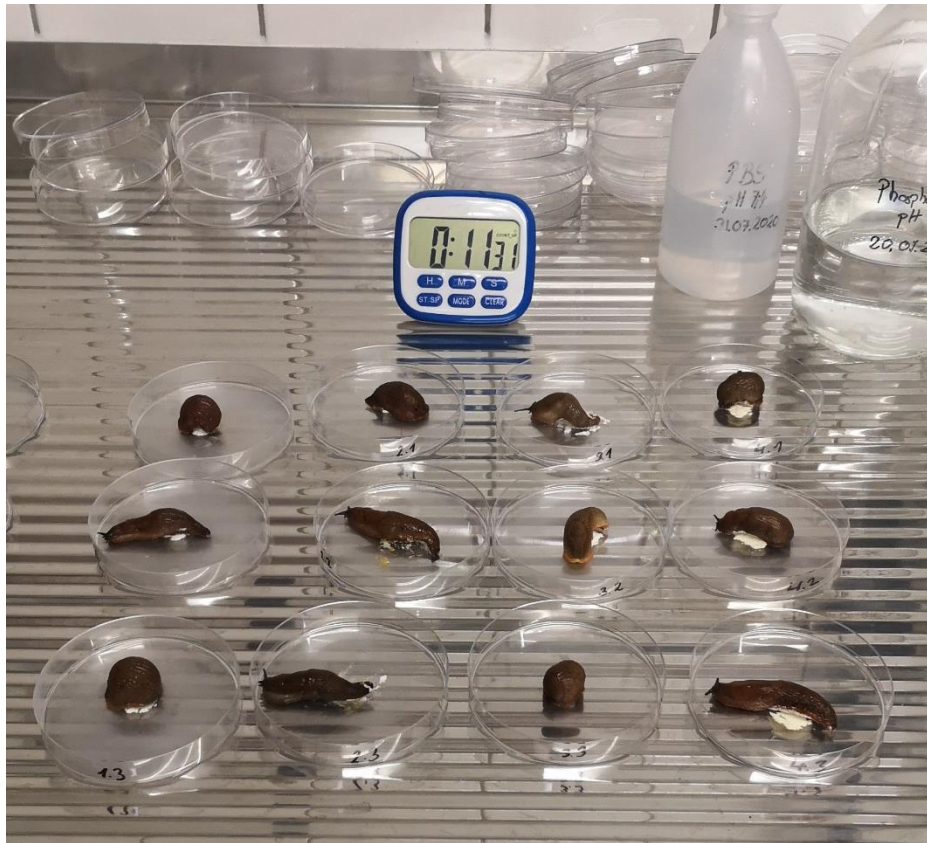
Izraženi permeacijski potencijal donepezila iz D/C/M mikrosfera može se objasniti i bubrenjem polimernog matriksa zbog manitola: izbubreni matriks omogućava bolji kontakt izbubrenog terapijskog sustava s epitelnom barijerom te je tako zajamčen veći koncentracijski gradijent na mjestu apsorpcije (131). Zaključno, veća  $P_{\text{app}}$  vrijednost za donepezil iz D/C/M mikrosfera u odnosu na donepezil iz otopine, u kombinaciji s prethodno dokazanim produljenim oslobađanjem lijeka i mukoadhezivnim svojstvima mikrosfera, pokazuju veliki potencijal za povećanu permeaciju donepezila kroz nosnu sluznicu *in vivo*.

#### 4.1.4.6 Iritacija sluznice puža golaća nakon izlaganja vodećim mikrosferama s donepezilom *in vivo*

U sveobuhvatnom pristupu razvoju naprednog nazalnog sustava često se zanemaruje činjenica da nazalni prašci na osjetljivoj sluznici nosa mogu izazvati iritacije i osjećaj nelagode (129). Nelagodu pacijenti osjećaju kao osjete bockanja, svrbeži i žarenja u nosu, a ovakve nuspojave teško je dokazati *in vitro* ispitivanjima. Adriaens i Remon razvili su *in vivo* test ispitivanja iritacijskog potencijala nazalne formulacije na pužu golaću vrste *Arion lusitanicus*. Predviđanje iritacijskog potencijala temelji se na količini izlučene sluzi nakon izlaganja puža formulaciji: ukoliko formulacija djeluje iritirajuće puž luči više sluzi te se može donijeti zaključak da bi formulacija na sluznici nosa čovjeka mogla izazvati nelagodu (211,212).

Utvrđivanje iritacijskog potencijala D/C/M mikrosfera provedeno je prema protokolu iz poglavlja 3.2.3.4. (Slika 27.) (129). Iritacijski potencijal praškaste formulacije može biti povezan sa sastavom, veličinom i morfologijom praškastih čestica (129). S ciljem razmatranja navedenih čimbenika s utjecajem na profil iritabilnosti praškastog sustava, osim vodećih kitozansko-manitolskih mikrosfera s donepezilom (D/C/M), testom iritacije sluznice puža golaća ispitani su i sljedeći uzorci:

- kitozanske mikrosfere s donepezilom pripravljene sušenjem raspršivanjem - D/C
- kitozanske mikrosfere s donepezilom pripravljene sušenjem raspršivanjem te adherirane na prosijani manitol (Ms (engl. *mannitol sieved*), veličina prosijanih čestica 45 – 63  $\mu\text{m}$ ) – D/C/Ms
- kitozanske mikrosfere s donepezilom pripravljene sušenjem raspšrivanjem te adherirane na manitol sušen raspršivanjem (Msd (engl. *mannitol spray-dried*)– D/C/Msd
- negativna kontrola - PBS (pH=7,4)
- pozitivna kontrola – 1 %-tna (*m/V*) otopina benzalkonijevog klorida u pročišćenoj vodi (BAC)



**Slika 27.** Utvrđivanje iritacijskog potencijala praškastih uzoraka pomoću testa irtacije sluznice puža golaća *in vivo*.

U svim praškastim uzorcima omjer donepezila, kitozana i manitola bio je jednak kao i kod D/C/M mikrosfera. D/C mikrosfere su na prosijani manitol i manitol sušen raspršivanjem adherirane miješanjem pomoću Turbula<sup>®</sup> mješača prašaka (WAB grupacija, Švicarska). Miješanje prašaka trajalo je 10 minuta pri 70 rpm-a. Uzorcima pripremljenim sušenjem raspršivanjem određena je veličina čestica metodom laserske difrakcije koja je opisana u poglavlju 3.2.1.5. SEM analiza provedena je na svim ispitanim uzorcima, prema postupku koji je opisan u poglavlju 3.2.3.5.

Rezultati testa iritacije sluznice puža golaća i pripadajuća veličina čestica praškastih uzoraka prikazani su u Tablici 18.

Svi uzorci se, prema ukupnoj količini izlučene sluzi, statistički značajno razlikuju od pozitivne kontrole ( $p < 0,05$ ), otopine BAC-a koja izaziva ozbiljnu nelagodu (210), dok je statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu (pufer PBS koji ne izaziva osjećaj nelagode u nosu) uočena samo za D/C mikrosfere. Može se zaključiti da D/C/M mikrosfere te D/C/Ms i D/C/Msd smjese prašaka imaju prihvatljiv profil iritabilnosti, budući da se ne

razlikuju značajno od negativne kontrole. Proces pripreme praškastog uzorka (sušenje raspršivanjem i adheriranje mikrosfera na nosač – čestice manitola) nije značajno utjecao na profil iritabilnosti. Obje metode pripreme rezultirale su česticama primjerene veličine i morfologije (Tablica 18., Slika 28.) te posljedično niskog potencijala za iritacijski učinak na sluznici nosa.

**Tablica 18.** Ukupna izlučena sluz (engl. *total mucus*, TM) u testu iritacije sluznice puža golaća i veličina čestica ispitanih praškastih sustava.

Uzorak	TM (%)	$D_{v10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{v50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{v90}$ ( $\mu\text{m}$ )
D/C/M	$5,04 \pm 1,43$	$11,6 \pm 0,4$	$29,0 \pm 1,2$	$63,5 \pm 1,1$
D/C	$8,19 \pm 1,79$	$4,6 \pm 0,0$	$9,7 \pm 0,0$	$22,6 \pm 0,5$
D/C/Ms	$5,49 \pm 2,44$	-	-	-
Msd	-	$9,2 \pm 1,6$	$24,5 \pm 3,9$	$63,4 \pm 0,8$
D/C/Msd	$5,91 \pm 1,08$	-	-	-
PBS	$0,48 \pm 1,50$	-	-	-
BAC	$17,64 \pm 4,33$	-	-	-

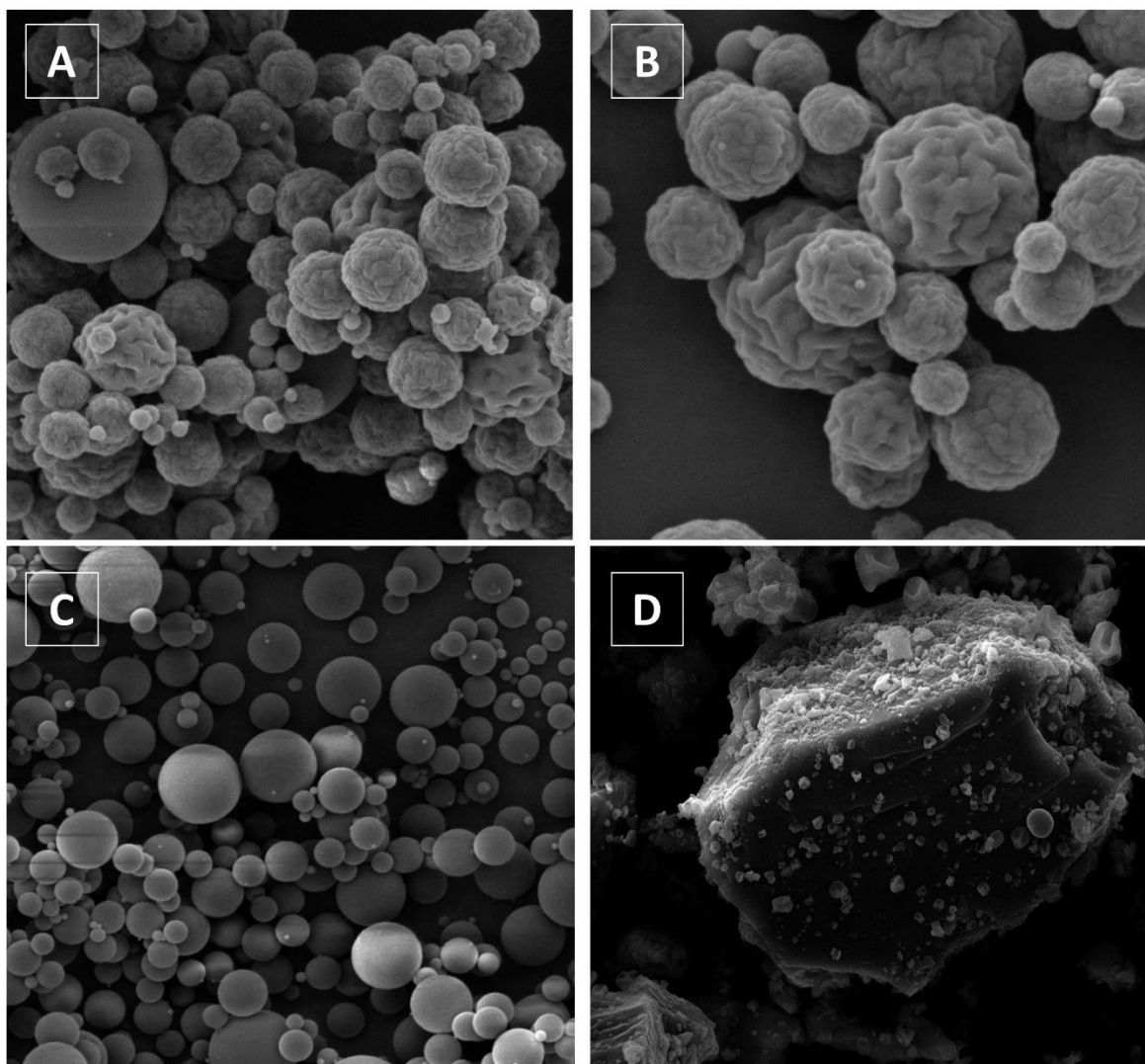
D/C/M - vodeće kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom; D/C – kitozanske mikrosfere s donepezilom; D/C/Ms - kitozanske mikrosfere s donepezilom i adherirane na prosijani manitol; D/C/Msd - kitozanske mikrosfere s donepezilom i adherirane na manitol sušen raspršivanjem PBS - fosfatni pufer pH 7,4; BAC 1 %-tna (*m/V*) otopina benzalkonijevog klorida.  $D_{v10}$  - volumni promjer (10 % čestica u uzorku je manje od istaknutog promjera). Vrijednosti prikazane u tablici su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija,  $n = 3$ .

Povećana proizvodnja sluzi nakon izlaganja puža D/C mikrosferama može se dvojako objasniti. Prvo, očigledna je razlika u veličini čestica između D/C mikrosfera i ostalih ispitanih uzoraka. Drugo, D/C mikrosfere imaju naboranu površinu, dok su ostale čestice glatke površine (morfologija D/C/M mikrosfera prikazana je na Slici 22.a, a morfologija D/C mikrosfera te D/C/Ms i D/C/Msd smjesa prašaka prikazana je na Slici 28.). Naborana površina i veliki udio sitnih čestica u uzorku D/C potencijalni su razlozi povećane proizvodnje sluzi u testu iritacije sluznice puža golaća, koja upućuje na moguću iritaciju sluznice nosa.

Iz svega navedenog, može se zaključiti da su D/C/M mikrosfere karakterizirane prikladnim profilom iritabilnosti. Pažljivi odabir proizvodnog postupka i sastavnica praškastog sustava rezultirao je sferičnim česticama glatke površine i primjerene veličine za planiranu



primjenu. Izostanak nelagode pri nazalnoj primjeni lijeka bitna je stavka s utjecajem na suradljivost pacijenta, pogotovo pri kroničnoj terapiji potrebnoj u AB-u.



**Slika 28.** SEM mikrografije kitozanskih mikrosfera s donepezilom (D/C; A - povećanje 2000×, B - povećanje 5000×); kitozanskih mikrosfera s donepezilom i adheriranih na prosijani manitol (D/C/Msd; C - povećanje 2000×); kitozanskih mikrosfera s donepezilom i adheriranih na manitol sušen raspršivanjem (D/C/Ms; D – povećanje 2000×).

#### 4.1.4.7 Stabilnost vodećih mikrosfera s donepezilom

Ispitivanje stabilnosti D/C/M mikrosfera provedeno je u vremenskom razdoblju od šest mjeseci. Praškasti uzorak je skladišten u dobro zatvorenom spremniku, pri temperaturi  $5 \pm 3$  °C. Nakon 180 dana mikrosferama je ispitan sadržaj donepezila, raspodjela veličina čestica, sadržaj vlage, svojstva tečenja te *in vitro* profil oslobađanja donepezila. Rezultati karakterizacije D/C/M mikrosfera nakon 180 dana nisu se značajno razlikovali od rezultata

karakterizacije odmah nakon priprave (Tablica 19.). Dobiveni rezultati upućuju na prikladan profil stabilnosti praškastog uzorka. Faktor  $f_2$  za utvrđivanje sličnosti između profila oslobađanja donepezila nije pokazao razliku između oslobađanja lijeka iz D/C/M mikrosfera netom nakon priprave te nakon skladištenja u razdoblju od 180 dana (Tablica 19., Slika 23.; umetak).

**Tablica 19.** Rezultati ispitivanja stabilnosti vodećih kitozansko-manitoljskih mikrosfera s donepezilom (D/C/M). Uzorci su skladišteni 180 dana pri temperaturi  $5 \pm 3$  °C.

Promatrani parametar	Stabilitetna točka:	
	0 dana	180 dana
DC (%)	$5,1 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,1$
$D_{v10}$ (µm)	$11,6 \pm 0,4$	$11,5 \pm 0,3$
$D_{v50}$ (µm)	$29,0 \pm 1,2$	$31,2 \pm 0,1$
$D_{v90}$ (µm)	$63,5 \pm 1,1$	$74,3 \pm 0,3$
< 10 µm	$6,7 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,5$
MC (%)	$5,2 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,3$
HR	$1,23 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,06$
$f_2$	-	71,6

DC - sadržaj donepezila u vodećim kitozansko-manitoljskim mikrosferama (engl. *drug content*);  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$  - parametri raspodjele veličina mikrosfera; < 10 µm - volumni udio čestica koje su manje od 10 µm; MC - sadržaj vlage (engl. *moisture content*); HR - Hausnerov omjer (engl. *Hausner ratio*),  $f_2$  - faktor sličnosti profila oslobađanja donepezila *in vitro* iz vodećih kitozansko-manitoljskih mikrosfera nakon 180 dana skladištenja u usporedbi s profilom oslobađanja donepezila *in vitro* odmah nakon priprave. Vrijednosti prikazane u tablici su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, n = 3, osim za faktor  $f_2$ .

## 4.2 Razvoj termoosjetljive otopine kao tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom

U vidu izravne dostave lijekova u SŽS putem nosne šupljine intenzivno se istražuju napredni farmaceutski oblici koji imaju sposobnost produljenog zadržavanja na mjestu primjene, osiguravaju povećanu stabilnost i permeaciju djelatne tvari kroz nosnu sluznicu, te pružaju potencijal ciljane depozicije u području od interesa (77,98,253). Tekući *in situ* gelirajući sustavi ističu se kao napredne platforme koje mogu udovoljiti navedenim zahtjevima te ostvariti ciljanu dostavu lijekova u SŽS (151,253). Uvrštavanjem mukoadhezivnih polimera, pospješivača apsorpcije i/ili nanonosača u tekuću *in situ* gelirajuću formulaciju moguće je unaprijediti vrijeme zadržavanja na mjestu primjene, oslobađanje lijeka iz farmaceutskog oblika te profil apsorpcije lijeka (279). Konvencionalne tekuće *in situ* gelirajuće sustave odlikuje jednostavnost izrade te se iz istog razloga proces proizvodnje lako prevodi iz laboratorijskog na industrijsko mjerilo (engl. *scale-up*). U procesu izrade se relativno lako optimiraju važna svojstva nazalnog oblika, kao što su viskoznost i kut raspršenja. O tim svojstvima ovisi učinkovitost dostave lijeka u ciljnu regiju nosne šupljine, ali i rizik od curenja iz nosne šupljine i razvoja neugodnog okusa u ustima, o čemu ovisi suradljivost pacijenata (161,280).

U literaturi su opisani do sada istraživani tekući oblici za nazalnu primjenu donepezila. S ciljem poboljšane izravne dostave u mozak, istraživano je formuliranje/uklapanje donepezila u nanosuspencije (104), nanoemulzije (33), liposome (262,281), lipidne nanočestice (261), *in situ* gelirajuće sustave (282) i mikroemulzije (283). No, bitno je naglasiti da navedenim formulacijama nije ispitan profil nazalne depozicije, što je ključno za predviđanje terapijskog ishoda nazalnih lijekova dizajniranih za ciljanu depoziciju u olfaktorno područje.

Jedan od ciljeva ovog doktorskog rada bio je razviti napredni tekući *in situ* gelirajući sustav s donepezilom čija su biofarmaceutska svojstva i profil nazalne depozicije prilagođeni izravnoj dostavi donepezila iz nosne šupljine u SŽS. Kao što je opisano u poglavlju 1.4.2., takvi tekući sustavi se jednostavno primjenjuju raspršivanjem, a zatim geliraju na sluznici nosa osiguravajući produljeno zadržavanje na mjestu primjene (151). Potiče se razvoj *in situ* gelirajućih sustava kod kojih *in situ* gelirajući polimeri pridonose i mukoadhezivnom karakteru te produljenom oslobađanju lijeka, a sve s ciljem povećanog opsega apsorpcije i bioraspoloživosti primijenjenog lijeka (284).

U ovom radu kao polimer izbora u razvoju *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom korišten je kitozan, mukoadhezivni polimer i pospješivač apsorpcije, koji u prisustvu  $\beta$ -GP-a gelira pri temperaturi nosne sluznice, 33 – 35 °C (150). Dosad u literaturi nije zabilježen razvoj *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom koji sadrži kitozan. Gu i suradnici (282) razvili su termoosjetljivu formulaciju donepezila s poloksamerima kao termoosjetljivim polimerima. Navedena studija uključivala je karakterizaciju formulacije u razvoju s obzirom na svojstva geliranja, oslobađanje lijeka *in vitro* i farmakokinetiku *in vivo* na animalnom modelu štakora. U ovom doktorskom radu predstavljen je sveobuhvatni pristup razvoju nazalne formulacije uzimajući u obzir sve zahtjeve za učinkovitu dostavu nazalno primijenjenog lijeka iz nosne šupljine u mozak. U tom smislu, u ovom radu istraživana tekuća *in situ* gelirajuća formulacija donepezila optimirana je s obzirom na stabilnost, svojstva spreja, gelirajuća svojstva, profil oslobađanja lijeka iz farmaceutskog oblika, mukoadhezivnost, biokompatibilnost, permeabilnost i profil nazalne depozicije. Potencijal temperaturno osjetljivog sustava kitozana i  $\beta$ -GP-a dosad je istraživan u razvoju formulacija za različite putove primjene (157,164,285,286), dok je njegova primjenjivost u farmaceutskim oblicima za nazalnu primjenu oskudno istraživana (152,196). U ovom radu razvijena je termoosjetljiva otopina donepezila kao *in situ* gelirajući sustav temeljen na kitozanu i  $\beta$ -GP-u, koja je biokompatibilna, neiritabilana i sigurna za korištenje, te osigurava depoziciju u ciljanom području nosne šupljine.

#### **4.2.1 Rezultati preliminarnih istraživanja u razvoju termoosjetljive otopine donepezila**

Složeni zadatak povezivanja svojstava termoosjetljive otopine donepezila s ključnim ciljem usmjerene depozicije u ciljano područje nosne šupljine postignut je korištenjem statističkog dizajna eksperimenta (DoE-a). Ovakav pristup omogućava razvoj nazalnih pripravaka s ugrađenom kvalitetom uz uštedu uloženi sredstava i vremena (234). U svrhu odabira odgovarajućih formulacijskih i parametara primjene te njihovih razina, provedena su temeljita preliminarna istraživanja. Odabir ulaznih podataka za izradu DoE-a ključan je kako bi se u konačnici fino ugodila željena svojstva nazalnog pripravka donepezila (98).

Koncentracija donepezila u preliminarnim otopinama bila je u rasponu od 0,3 do 0,6 mg mL<sup>-1</sup>, što je u skladu s dostupnim literaturnim navodima koji istražuju dostavu donepezila u SŽS putem nosne šupljine (104). Kako bi nazalno primijenjeni lijek ostvario željeni učinak u SŽS-u, doza koja mora biti dostavljena u olfaktorno područje nosne šupljine mora iznositi 0,01 – 1 % oralne doze (287). Uzimajući u obzir uobičajeni dozirni volumen nazalnog

raspršivača (100 µL), navedeni raspon koncentracije donepezila u preliminarnim tekućim uzorcima osigurava isporuku 0,6 – 1,2 % oralne doze donepezila od 5 mg, odnosno 0,3 – 0,6 % oralne doze donepezila od 10 mg, po potisku. Koliki će udio isporučene doze doseći olfaktornu regiju svakako ovisi i o parametrima nazalne primjene.

Početna koncentracija β-GP-a u preliminarnim uzorcima iznosila je 188 mg mL<sup>-1</sup>. Navedena koncentracija odabrana je prema rasponu koncentracija β-GP-a u sličnim sustavima (152,164,288). Dokazano je da molekulska masa kitozana ima značajan utjecaj na svojstva geliranja sustava kitozana i β-GP-a (157): povećanjem molekulske mase kitozana skraćuje se vrijeme geliranja sustava (152,289,290). U ovom radu u pripremi preliminarnih uzoraka korištena su tri tipa kitozana koja se razlikuju prema molekulskoj masi ( LMW, MMW i HMW; Tablica 3.). Pri koncentraciji kitozana od 6,15 mg mL<sup>-1</sup> u formulacijama koje su sadržavale MMW kitozan, odnosno HMW kitozan, uočeno je taloženje ili su formulacije pokazale nepovoljna svojstva raspršivanja, definirana kutom raspršenja i raspodjelom veličina kapljica (Tablica 20. i 21.). Pri koncentraciji kitozana nižoj od 6,15 mg mL<sup>-1</sup> sustavi nisu gelirali u relevantnom rasponu temperature i vremena geliranja.

**Tablica 20.** Odabir vrste kitozana za razvoj termoosjetljive otopine donepezila: promatranje taloženja sustava.

Koncentracija kitozana 6,15 mg mL <sup>-1</sup>	Koncentracija β-GP-a 188,00 mg mL <sup>-1</sup>			
	Koncentracija donepezila (mg mL <sup>-1</sup> )			
Tip kitozana	0,30	0,40	0,50	0,60
LMW	bistra otopina	bistra otopina	bistra otopina	taloženje
MMW	bistra otopina	taloženje	taloženje	taloženje
HMW	bistra otopina	taloženje	taloženje	taloženje

Sustavi s MMW, odnosno HMW kitozanom, karakterizirani su nepovoljnim svojstvima raspršenja u vidu preuskog kuta raspršenja i veličine raspršenih kapljica neprikladnih za nazalnu primjenu. Iz tog razloga, za daljnja preliminarna ispitivanja odabran je LMW kitozan. Kao što se može vidjeti iz Tablice 20., sustavi s LMW kitozanom su bistre otopine u rasponu koncentracije donepezila od 0,3 do 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, a pri koncentraciji donepezila od 0,3 mg mL<sup>-1</sup> pokazali su prikladna svojstva geliranja i raspršivanja.

**Tablica 21.** Odabir tipa kitozana za razvoj termoosjetljive otopine donepezila: ispitivanje termogelirajućih svojstava te svojstava raspršenja.

Koncentracija kitozana 6,15 mg mL <sup>-1</sup>	Koncentracija $\beta$ -GP-a 188,00 mg mL <sup>-1</sup>	
	Koncentracija donepezila 0,30 mg mL <sup>-1</sup>	
Tip kitozana	Geliranje pri 34 °C	Svojstva raspršenja
LMW	trenutno	prikladna
MMW	1,33 min	neprikladna
HMW	trenutno	neprikladna

U idućem koraku pripremljeni su preliminarni tekući uzorci pri navedenim koncentracijama donepezila i LMW kitozana (redom 0,3 mg mL<sup>-1</sup> i 6,15 mg mL<sup>-1</sup>), uz variranje koncentracije  $\beta$ -GP-a (Tablica 22.). Uočeno je da i mali pomaci u koncentraciji  $\beta$ -GP-a uzrokuju promjene u termogelirajućim svojstvima formulacije (154). Naime, pri koncentraciji manjoj od 188 mg mL<sup>-1</sup> sustav nije gelirao pri temperaturi nosne sluznice, dok je pri koncentraciji većoj od 188 mg mL<sup>-1</sup> sustav gelirao već pri sobnoj temperaturi. Odabrani raspon koncentracija  $\beta$ -GP-a razmatran je u ranijim ispitivanjima sličnih sustava uz primjenu statističkog dizajna eksperimenta (291,292). Može se pretpostaviti da su uočene promjene u termogelirajućim svojstvima pripremljenih otopina već uslijed malih pomaka u koncentraciji  $\beta$ -GP-a vrlo vjerojatno posljedica vrste i koncentracije lijeka uklopljenog u sustav. U konačnici, za DoE je definirana konstantna koncentracija  $\beta$ -GP-a od 188 mg mL<sup>-1</sup>.

**Tablica 22.** Odabir koncentracije  $\beta$ -GP-a za razvoj termoosjetljive otopine donepezila

Koncentracija $\beta$ -GP-a (mg mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija LMW kitozana 6,15 mg mL <sup>-1</sup>
	Koncentracija donepezila 0,30 mg mL <sup>-1</sup>
	Gelirajuća svojstva
176,00	ne gelira pri temperaturi nosne sluznice
188,00	prikladna termogelirajuća svojstva
200,00	gelira već pri sobnoj temperaturi

Nakon odabira koncentracije  $\beta$ -GP-a i tipa kitozana, bilo je potrebno odrediti koncentracije LMW kitozana i donepezila prikladne za razvoj termoosjetljive otopine donepezila. Pri koncentracijama LMW kitozana u rasponu od 3,08 do 12,31 mg mL<sup>-1</sup> i donepezila u rasponu od 0,3 – 0,5 mg mL<sup>-1</sup> svi pripremljeni sustavi predstavljali su bistre otopine (Tablica 23.). Temeljem njihove daljnje karakterizacije u vidu termogelirajućih svojstava te svojstava raspršenja (Tablica 24.), za razvoj termoosjetljive otopine donepezila odabrane su koncentracije LMW kitozana u rasponu 6,15 – 9,23 mg mL<sup>-1</sup>, te koncentracije donepezila u rasponu 0,3 – 0,5 mg mL<sup>-1</sup>.

**Tablica 23.** Odabir koncentracije LMW kitozana i donepezila za razvoj termoosjetljive otopine donepezila: promatranje taloženja u sustavu.

Koncentracija LMW kitozana (mg mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija $\beta$ -GP-a 188,00 mg mL <sup>-1</sup>		
	Koncentracija donepezila (mg mL <sup>-1</sup> )		
	0,30	0,40	0,50
3,08	bistra otopina	bistra otopina	bistra otopina
6,15	bistra otopina	bistra otopina	bistra otopina
7,69	bistra otopina	bistra otopina	bistra otopina
9,23	bistra otopina	bistra otopina	bistra otopina
12,31	bistra otopina	bistra otopina	bistra otopina

Kao što je komentirano u poglavlju 1.4.3.3., parametri primjene nazalnog lijeka (kut primjene i protok udahnutog zraka) imaju značajan utjecaj na profil nazalne depozicije. Prema relevantnim literaturnim izvorima, za *in vitro* ispitivanje nazalne depozicije preliminarnih termoosjetljivih otopina donepezila odabrani su AAH od 30 do 75 °, te IFR od 0 do 30 L min<sup>-1</sup> (75,148,167,169,181). Preliminarna ispitivanja nazalne depozicije *in vitro* provedena su s termoosjetljivom otopinom donepezila pripremljenim pri koncentraciji donepezila, LMW kitozana i  $\beta$ -GP-a redom od 0,3 mg mL<sup>-1</sup>, 9,23 mg mL<sup>-1</sup> i 188,00 mg mL<sup>-1</sup>. Rezultati su prikazani u Tablici 25. U preliminarnim ispitivanjima kut od 30 ° pokazao se neprikladnim, te kao takav nije uključen u daljnja ispitivanja.

**Tablica 24.** Odabir koncentracije LMW kitozana i donepezila za razvoj termoosjetljive otopine donepezila: ispitivanje termogelirajućih svojstava te svojstava raspršenja.

Koncentracija LMW kitozana (mg mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija β-GP-a 188,00 mg mL <sup>-1</sup>		
	Koncentracija donepezila (mg mL <sup>-1</sup> )		
	0,30	0,40	0,50
	Gelirajuća svojstva i svojstva raspršivanja		
3,08	prikladna svojstva raspršivanja / ne gelira pri temperaturi nosne sluznice		
6,15	prikladna svojstva raspršivanja / prikladna termogelirajuća svojstva		
7,69	prikladna svojstva raspršivanja / prikladna termogelirajuća svojstva		
9,23	prikladna svojstva raspršivanja / prikladna termogelirajuća svojstva		
12,31	prikladna svojstva raspršivanja / gelira već pri sobnoj temperaturi		

**Tablica 25.** Rezultati ispitivanja nazalne depozicije preliminarne termoosjetljive otopine donepezila *in vitro*, pripravljene pri koncentraciji donepezila, LMW kitozana i β-GP-a redom od 0,3 mg mL<sup>-1</sup>, 9,23 mg mL<sup>-1</sup> i 188,00 mg mL<sup>-1</sup>.

Parametri primjene (AAH/IFR)	Depozicija u olfaktornoj regiji (%)
75 °/ 0 L min <sup>-1</sup>	70,3 ± 1,3
60 °/ 0 L min <sup>-1</sup>	42,6 ± 0,6
45 °/ 0 L min <sup>-1</sup>	4,0 ± 2,0
30 °/ 0 L min <sup>-1</sup>	0,0 ± 0,0
75 °/ 30 L min <sup>-1</sup>	47,9 ± 9,3

AAH – kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu; IFR – protok udahnutog zraka.

Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n = 2).

#### 4.2.2 DoE – Optimizacija termoosjetljive otopine donepezila za nazalnu primjenu

Razvoj i optimiranje svojstava termoosjetljive otopine donepezila kao tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu, uspješno su provedeni uz pomoć DoE-a. DoE je



sadržavao 17 različitih eksperimenata u okviru kojeg su varirana dva formulacijska parametra (koncentracija donepezila i kitozana), te dva parametra primjene (IFR i AAH).

Koncentracija donepezila u svim pripremljenim uzorcima bila je između  $0,29 \pm 0,00$  i  $0,52 \pm 0,02$  mg mL<sup>-1</sup> (Tablica 26.), čime je dokazano potpuno otapanje donepezila uz kitozan i  $\beta$ -GP, te je osigurana prikladna doza donepezila za isporuku u SŽS nakon nazalne primjene (104). Svim uzorcima u sklopu DoE-a izmjeren je i pH koji je iznosio  $7,02 \pm 0,00$  –  $7,35 \pm 0,00$  (Tablica 26.). Izmjerene pH vrijednosti su očekivane s obzirom na bazičnost  $\beta$ -GP sustava (152), a izmjereni raspon pH vrijednosti prikladan je za nazalnu primjenu (293,294).

Kao DoE odgovori, ispitivana su reološka svojstva pripremljenih termoosjetljivih otopina donepezila (vrijeme i temperatura geliranja, viskoznost u mirovanju), svojstva raspršivanja (kut raspršenja i raspodjela veličina raspršenih kapljica) te olfaktorna i turbinatna depozicija u modelu nosne šupljine. Rezultati DoE karakterizacije termoosjetljivih otopina donepezila prikazani su u Tablici 26.

Primjenom DoE-a generirani su visoko prediktivni regresijski modeli koji omogućuju razlučivanje parametara s utjecajem na promatrane odgovore i optimiranje parametara prema željenim svojstvima termoosjetljive otopine donepezila. Optimiranje svojstava termoosjetljive otopine donepezila provodi se s ključnim ciljem učinkovite dostave donepezila u SŽS. Generirani regresijski modeli su jednadžbe standardizirane na jedinični interval [-1, 1], a varijable jednadžbe su parametri varirani u sklopu DoE-a (295). U regresijskim jednadžbama varijable koje imaju statistički značajan utjecaj na promatrani odgovor ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom. Regresijski modeli generirani za reološka svojstva te svojstva raspršenja navedeni su u Tablici 27. Regresijski modeli koji tumače kako varirani parametri utječu na olfaktornu i turbinatnu depoziciju prikazani su u poglavlju 4.2.2.2.

**Tablica 26.** Rezultati DoE karakterizacije termoosjetljivih otopina donepezila koji uključuju: koncentraciju lijeka (C), pH, viskoznost u mirovanju ( $\eta_0$ ), temperaturu geliranja ( $T_{GEL}$ ), vrijeme geliranja ( $t_{GEL}$ ), kut raspršenja (engl. *spray cone angle*, SCA), veličinu raspršenih kapljica ( $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$ ) i raspon veličina kapljica (span), olfaktornu depoziciju (depozicija u odvojivim olfaktornim segmentima turbinatne regije i septuma modela nosne šupljine; OD) i turbinatnu depoziciju (depozicija u turbinatnoj regiji bez odvojivog olfaktornog segmenta modela nosne šupljine; TD).

	$c_D$ (mg mL <sup>-1</sup> )	$c_C$ (mg mL <sup>-1</sup> )	IFR* (L min <sup>-1</sup> )	AAH* (°)	C (mg mL <sup>-1</sup> )	pH	$\eta_0$ (mPa s)	$T_{GEL}$ (°)	$t_{GEL}$ (min)	SCA (°)	$D_{v10}$ ( $\mu$ m)	$D_{v50}$ ( $\mu$ m)	$D_{v90}$ ( $\mu$ m)	Span	OD (%)	TD (%)
1	0,30	6,15	0	75	0,30±0,00	7,35±0,00	35,26±1,11	34,2±0,3	1,3±0,7	26,6±1,2	23,6±1,4	6,6±4,8	140,0±7,1	1,9±0,1	65,9±1,6	11,4±1,6
2	0,30	6,15	30	45	0,29±0,00	7,28±0,01	36,49±0,03	33,8±0,4	1,2±0,6	24,9±0,2	26,5±1,3	71,1±9,4	153,5±7,8	1,8±0,0	1,9±1,0	62,7±1,0
3	0,30	6,15	30	75	0,30±0,00	7,24±0,00	35,03±0,82	34,9±0,6	1,0±0,4	25,5±0,7	29,1±2,8	87,0±10,2	184,2±14,9	1,8±0,1	28,3±1,6	60,3±1,6
4	0,30	7,69	0	45	0,31±0,02	7,12±0,02	88,30±1,81	34,2±0,8	1,2±1,0	19,6±0,1	39,2±6,3	120,5±13,2	240,1±19,7	1,7±0,1	3,5±3,3	38,3±3,3
5	0,30	9,23	0	75	0,30±0,00	7,02±0,00	206,3±1,46	33,7±0,1	0,0±0,0	15,5±0,4	69,8±3,7	161,1±5,2	309,7±10,9	1,5±0,0	71,8±0,8	10,5±0,8
6	0,30	9,23	15	45	0,30±0,00	7,06±0,01	194,2±5,27	32,2±0,9	0,0±0,0	16,4±1,6	42,5±4,1	115,2±4,5	226,5±7,1	1,6±0,1	10,6±0,1	63,8±0,1
7	0,30	9,23	30	60	0,30±0,00	7,03±0,01	201,5±0,46	33,4±1,0	0,0±0,0	15,6±0,2	46,8±1,4	129,5±1,5	255,3±1,7	1,6±0,0	21,4±0,3	40,3±0,3
8	0,40	6,15	0	45	0,42±0,02	7,15±0,00	37,08±0,24	36,9±0,2	5,1±0,4	23,1±0,6	25,9±2,3	72,8±9,7	154,8±17,0	1,8±0,0	7,9±3,3	65,1±3,3
9	0,40	7,69	15	60	0,41±0,01	7,09±0,00	90,02±0,38	36,3±0,6	3,2±0,3	19,6±0,3	45,0±8,9	129,3±15,6	250,9±25,9	1,6±0,1	29,4±3,9	49,2±3,9
10	0,40	9,23	30	75	0,40±0,00	7,06±0,01	225,5±3,33	33,7±0,2	0,1±0,2	15,5±0,4	72,0±3,3	166,2±7,6	315,2±17,9	1,5±0,0	35,0±3,4	41,4±3,4
11	0,50	6,15	0	60	0,50±0,00	7,11±0,00	39,7±1,45	39,9±0,1	13,9±0,9	23,3±0,2	23,8±0,9	61,7±4,3	137,2±7,3	1,8±0,0	31,4±5,0	31,7±5,0
12	0,50	6,15	15	75	0,50±0,00	7,21±0,03	39,29±0,59	38,0±0,3	14,3±1,2	23,2±1,1	26,5±1,1	66,3±4,3	141,6±7,3	1,7±0,0	45,6±1,3	26,6±1,3
13	0,50	6,15	30	45	0,49±0,00	7,15±0,00	37,67±0,55	39,2±0,5	14,9±0,2	23,0±0,4	26,7±1,0	68,4±2,6	145,4±4,2	1,7±0,0	6,8±0,3	31,5±0,3
14	0,50	7,69	30	75	0,52±0,02	7,07±0,01	91,15±0,87	38,5±0,1	11,2±0,0	18,7±0,7	47,3±7,3	133,4±11,6	258,2±16,7	1,6±0,1	25,5±5,7	32,9±5,7
15	0,50	9,23	0	45	0,50±0,01	7,03±0,02	209,1±2,98	35,3±0,4	4,4±1,0	16,1±1,0	70,9±14	162,3±18,3	306,1±31,0	1,5±0,1	1,9±2,1	60,2±2,1
16	0,50	9,23	0	75	0,50±0,01	7,04±0,00	232,21±2,3	35,7±0,1	2,1±0,4	15,1±0,3	72,3±3,2	167,6±6,3	320,6±15,2	1,5±0,0	22,9±4,7	42,5±4,7
17	0,50	9,23	30	45	0,49±0,00	7,06±0,01	218,45±2,3	35,5±1,6	4,2±0,3	15,6±0,7	61,7±3,8	150,1±7,6	286,6±5,3	1,5±0,0	6,1±1,2	63,9±1,2

$c_D$  - koncentracija donepezila;  $c_C$  - koncentracija kitozana; AAH – kut primjene u odnosu na horizontalnu ravninu; IFR – protok udahnutog zraka.

\* Parameteri se odnose samo na olfaktornu i turbinatnu depoziciju.

Vrijednosti prikazane u tablici su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija,  $n = 3$ , osim u slučaju olfaktorne i turbinatne depozicije gdje je  $n = 2$ .

#### 4.2.2.1 Reološka svojstva i svojstva raspršenja termoosjetljive otopine donepezila

Reološka svojstva termoosjetljivih otopina donepezila proučena u ovom radu su viskoznost u mirovanju i termogelirajuća svojstva (vrijeme i temperatura geliranja). Viskoznost utječe na mogućnost raspršivanja formulacije, kut raspršenja i veličinu raspršenih kapljica, pa prema tome posredno utječe i na profil nazalne depozicije (161). Optimalna termogelirajuća svojstva uključuju trenutno geliranje sustava pri temperaturi nosne sluznice, s ciljem osiguravanja produljenog zadržavanja na mjestu primjene (149).

Viskoznost u mirovanju termoosjetljivih otopina donepezila karakteriziranih u sklopu DoE-a iznosila je između  $35,03 \pm 0,82$  i  $232,21 \pm 2,30$  mPa s (Tablica 26.). Navedeni raspon viskoznosti prikladan je za primjenu raspršivanjem (161). Svi DoE uzorci gelirali su pri temperaturi nosne sluznice ( $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a vrijeme geliranja bilo je u rasponu od  $0,0 \pm 0,0$  do  $14,9 \pm 0,2$  min (Tablica 26.). Sva zabilježena vremena geliranja kraća su od vremena koje je potrebno da se procesom mukocilijarnog čišćenja obnovi sloj sluzi na nosnoj sluznici, koje iznosi 20 minuta (296). Ukoliko sustavi pokazuju vrijeme geliranja koje je kraće od procesa mukocilijarnog čišćenja, formulacije imaju potencijal produljenog zadržavanja na nosnoj sluznici. U okviru DoE-a prepoznate su formulacije koje trenutno geliraju pri temperaturi nosne sluznice, što je bio jedan od glavnih ciljeva u razvoju termoosjetljivog tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom.

Kao što je i očekivano, dulje vrijeme geliranja pri  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$  povezano je i s većom temperaturom pri kojoj uzorak trenutno prelazi iz sol u gel stanje ( $T_{\text{GEL}}$ ). Tako je  $T_{\text{GEL}}$  za ispitivane termoosjetljive otopine donepezila bila je između  $32,2 \pm 0,9$  i  $39,9 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Tablica 26.).

Kut raspršenja važan je faktor koji utječe na profil nazalne depozicije, a samim time i na učinkovitost nazalno primijenjenog lijeka (163). Kut raspršenja termoosjetljivih otopina donepezila generiranih DoE-om iznosio je od  $15,1 \pm 0,3$  do  $26,6 \pm 1,2\text{ }^{\circ}$  (Tablica 26.). Zabilježeni kutovi raspršenja relativno su uski, a upravo su takvi kutovi preferirani u vidu ciljane i usmjerene nazalne depozicije u područje od interesa (75,98). Kao što je istaknuto u poglavlju 1.3.1., olfaktorno područje smješteno je na samom krovu nosne šupljine, te predstavlja 5 – 10 % ukupne površine nosne šupljine (163). Ukoliko je kut raspršenja dovoljno uzak, veća je vjerojatnost da će raspršene kapljice spreja doseći olfaktorno područje, ukoliko se primjena takvih sprejeva kombinira s precizno optimiranim parametrima primjene koji usmjeravaju sprej u gornje područje nosne šupljine. Bitno je napomenuti da osim o kutu

raspršenja, uspješnost depozicije u olfaktornom području nosne šupljine ovisi i o veličini raspršenih kapljica te brzini kapljica prilikom raspršivanja iz nazalnog raspršivača (78).

Veličina raspršenih kapljica termoosjetljivih otopina donepezila u sklopu DoE-a određena je metodom laserske difrakcije, a rezultati su izraženi volumnim promjerima  $D_v10$ ,  $D_v50$  i  $D_v90$ . Izmjerene vrijednosti za  $D_v10$ ,  $D_v50$  i  $D_v90$  iznosile su redom  $23,6 \pm 1,4 - 72,3 \pm 3,2 \mu\text{m}$ ,  $61,6 \pm 4,8 - 167,6 \pm 6,3 \mu\text{m}$  i  $137,2 \pm 7,3 - 320,6 \pm 15,2 \mu\text{m}$ . Izmjerene vrijednosti u skladu su s regulatornim zahtjevima u kojima je naveden kriterij da glavnina aerosoliziranih čestica nazalnog proizvoda mora imati promjer veći od  $10 \mu\text{m}$  (143,217). Raspon veličina raspršenih kapljica (engl. *span*) ispitan u sklopu DoE-a bio je između  $1,45 \pm 0,06$  i  $1,89 \pm 0,06$ . Ukoliko je raspon veličina raspršenih kapljica manji od 2,0, sustav je monodisperzan (166). Raspršene kapljice užeg raspona veličina imaju veći potencijal depozicije u ciljanom području nosne šupljine (primjerice olfaktornom području) od kapljica šireg raspona veličina. Naime, aerosolizirane čestice s užim rasponom veličina kapljica nakon raspršivanja imaju konzistentan smjer kretanja i manja je vjerojatnost da će se depozicija kapljica odviti inercijskim taloženjem. Inercijsko taloženje čestica/kapljica odnosno njihova depozicija uslijed tromosti često je uzrok neravnomjernog profila depozicije u nosnoj šupljini (78,167,170).

#### 4.2.2.1.1 Regresijski modeli

Regresijski modeli generirani u sklopu DoE-a daju informaciju kako varirani parametri utječu na promatrane odgovore: u ovom slučaju kako koncentracije donepezila i kitozana utječu na viskoznost u mirovanju, vrijeme i temperaturu geliranja, kut raspršenja i veličinu raspršenih kapljica termoosjetljivih otopina donepezila. Generirani regresijski modeli pokazuju visoku prediktivnu moć što je vidljivo iz visokih vrijednosti koeficijenta determinacije  $R^2$  (Tablica 27.). Iz generiranih regresijskih modela vidljivo je da na sve promatrane odgovore statistički značajno utječu koncentracija i donepezila i kitozana (zasebno i/ili u interakciji), čime je opravdano da su u DoE-u razmatrane kao varijable. Regresijski modeli generirani u sklopu DoE-a prikazani su u Tablici 27.

**Tablica 27.** Regresijski modeli generirani u sklopu DoE-a za promatrane odgovore: viskoznost u mirovanju ( $\eta_0$ ), temperatura geliranja ( $T_{\text{GEL}}$ ), vrijeme geliranja ( $t_{\text{GEL}}$ ), kut raspršenja (engl. *spray cone angle*, SCA) i veličina raspršenih kapljica ( $D_v10$ ,  $D_v50$  i  $D_v90$ ) termoosjetljivih otopina donepezila

Promatrani DoE odgovor	Regresijski model	Regresijski parametri			
		R <sup>2</sup>	RMSE	PRESS R <sup>2</sup>	PRESS RMSE
Viskoznost u mirovanju	$\eta_0 = 93,50^* + 5,01 \times c_D^* + 87,63 \times c_C^* + 3,97 \times c_D \times c_C - 5,52 \times c_D^{2*} + 36,08 \times c_C^{2*}$	1,00	6,79	0,99	8,53
Vrijeme geliranja	$t_{GEL} = 3,60^* + 4,31 \times c_D^* - 2,92 \times c_C^* - 2,41 \times c_D \times c_C^* + 2,41 \times c_D^{2*} - 1,19 \times c_C^{2*}$	0,99	0,72	0,97	0,91
Temperatura geliranja	$T_{GEL} (^{\circ}) = 35,61^* + 1,84 \times c_D^* - 1,24 \times c_C^*$	0,87	0,86	0,80	0,96
Kut raspršenja	$SCA(^{\circ}) = 19,02^* - 0,65 \times c_D^* - 4,27 \times c_C^* + 0,57 \times c_D \times c_C^* + 0,43 \times c_D^2 + 0,58 \times c_C^2$	0,99	0,59	0,96	0,76
Raspodjela veličina raspršenih kapljica	$D_{v,10} (\mu m) = 43,82^* + 3,69 \times c_D + 18,14 \times c_C^* + 4,00 \times c_D \times c_C + 0,32 \times c_C^2$	0,89	7,25	0,78	8,45
	$D_{v,50} (\mu m) = 127,74^* + 4,56 \times c_D + 40,22 \times c_C^* + 8,12 \times c_D \times c_C^* - 17,69 \times c_C^{2*}$	0,93	12,70	0,86	14,87
	$D_{v,90} (\mu m) = 249,71^* - 6,17 \times c_D + 68,80 \times c_C^* + 14,60 \times c_D \times c_C^* - 29,94 \times c_C^2$	0,92	22,51	0,84	26,41

$c_D$  - koncentracija donepezila;  $c_C$  - koncentracija kitozana

R<sup>2</sup> = koeficijent determinacije, RMSE = korijen srednje kvadratne pogreške (engl. *root mean square error*), PRESS = predviđeni zbroj kvadrata rezidualne pogreške (engl. *predicted residual error sum of squares*)

\*Statistički značajni parametri (zasebno ili u interakciji;  $p < 0,05$ )

#### 4.2.2.1.2 Utjecaj koncentracije kitozana

Koncentracija kitozana pokazuje linearan ili kvadratni utjecaj na viskoznost u mirovanju, vrijeme i temperaturu geliranja, kut raspršenja i veličinu raspršenih kapljica termoosjetljivih otopina donepezila (Tablica 27.).

Povećanjem koncentracije kitozana u termoosjetljivoj otopini raste i viskoznost otopine u mirovanju. Porast koncentracije kitozana rezultira zaplitanjem polimernih lanaca kitozana što im ograničava kretanje te posljedično viskoznost sustava raste (297). S druge strane, povećanje koncentracije kitozana rezultira kraćim vremenom geliranja i nižom temperaturom geliranja. Uslijed zaplitanja polimernih lanaca, potrebno je manje topline za stvaranje trodimenzionalne mreže gela (157,298). No treba napomenuti da previsoka koncentracija kitozana može usporiti proces geliranja: previsoka viskoznost sustava uslijed visoke koncentracije kitozana može omesti stvaranje privlačnih sila između kitozana i  $\beta$ -GP-a, čime je stvaranje trodimenzionalne strukture gela otežano (154). Iz svega navedenog može se zaključiti da je raspon koncentracije kitozana postavljen u preliminarnim istraživanjima

izrazito bitna stavka za postizanje željenih termogelirajućih osobina DoE otopina donepezila. Također, zahvaljujući prikladnim ulaznim vrijednostima koncentracije kitozana unutar DoE-a, generirani su visoko prediktivni regresijski modeli utjecaja koncentracije kitozana na reološka svojstva termoosjetljivih otopina donepezila.

S povećanjem koncentracije kitozana opaženo je smanjenje kuta raspršenja i porast veličine raspršenih kapljica termoosjetljivih otopina donepezila. Razlog tome leži u povećanju viskoznosti otopina (168–170). Povećana viskoznost otopina usporava brzinu kapljica prilikom izlaska iz nazalnog raspršivača. Iz tog razloga, raspršene kapljice se ne raspoređuju u širinu i oblikuju uski kut raspršenja (165,168). Visoke vrijednosti viskoznosti otopina rezultiraju i povećanom veličinom raspršenih kapljica u procesu aerosolizacije (167). Veće kapljice se raspoređuju u uski kut raspršenja, a uži smjer kretanja rezultira depozicijom u ciljanom području u koje je putanja spreja usmjerena (170).

#### **4.2.2.1.3 Utjecaj koncentracije donepezila**

Regresijski modeli generirani u sklopu DoE-a pokazali su značajan utjecaj koncentracije donepezila na promatrana reološka svojstva te svojstva raspršivanja termoosjetljivih otopina donepezila. Koncentracija donepezila je na promatrane odgovore utjecala kao samostalni parametar i/ili u interakciji s parametrom koncentracije kitozana (Tablica 27.).

S porastom koncentracije donepezila opažen je porast viskoznosti u termoosjetljivih otopina donepezila. Naime, molekule donepezila u termoosjetljivim otopinama povećavaju steričko odbijanje kitozanskih lanaca u polimernoj mreži kitozana, povećavajući na taj način viskoznost sustava (299). Iz istog razloga, povećanje koncentracije donepezila rezultira i smanjenjem kuta raspršenja, usko vezanog za viskoznost sustava.

Porast koncentracije donepezila u termoosjetljivom otopini rezultira duljim vremenom geliranja i povećanjem temperature geliranja. Kao što je prethodno objašnjeno, dodatak lijeka povećava viskoznost sustava kitozana i  $\beta$ -GP-a. Prodiranje topline kroz viskozniji sustav je otežano (299). Budući da je toplina neophodna za stvaranje trodimenzionalne mreže gela, geliranje viskoznijih sustava je usporeno.

Dodatak soli (u ovom slučaju donepezilklorida) u termoosjetljivu otopinu donepezila smanjuje  $pK_a$   $\beta$ -GP-a što posljedično rezultira povećanim stupnjem ionizacije kitozana. Ukoliko je kitozan jače ioniziran, onemogućeno je povezivanje kitozana i  $\beta$ -GP-a koje je

ključno za stvaranje trodimenzionalnog matriksa gela, kao što je objašnjeno u poglavlju 1.4.2.1.1. (300).

Iz Tablice 27. vidljivo je da koncentracija donepezila u interakciji s koncentracijom kitozana utječe na vrijeme geliranja termoosjetljivih otopina donepezila. Takav utjecaj može se objasniti pretpostavkom da donepezil utječe na steričko odbijanje polimernih lanaca, ali intenzitet steričkog odbijanja ovisi o koncentraciji kitozana u sustavu (300–302).

#### **4.2.2.2 Profil nazalne depozicije termoosjetljive otopine donepezila *in vitro***

U posljednjem desetljeću znatno je porastao broj istraživanja koja se bave izravnom dostavom lijeka iz nosne šupljine u mozak (161). Unatoč naprednim tehnologijama i platformama koje su razvijene s ciljem poboljšanja dostave nazalnih lijekova u SŽS, glavna prepreka i dalje ostaje kako dostaviti lijek u teško dostupno područje olfaktorne regije. Upravo je dostava neuroloških lijekova u spomenuto područje nezaobilazni preduvjet za njihov terapijski učinak u SŽS-u. Iako u manjoj mjeri, dostava lijekova u SŽS odvija se i putem trigeminalnog živca, pa depozicija lijeka u respiratornom području nosne šupljine može pridonijeti izravnoj dostavi u SŽS (37,303,304).

Tijekom razvoja farmaceutskog oblika lijeka za nazalnu primjenu ključno je u ranoj fazi uključiti ispitivanja profila nazalne depozicije (161). U ovom radu za tu svrhu korišten je 3D printani model nosne šupljine zdrave osobe, korišten i za ispitivanje nazalne depozicije mikrosfera s donepezilom *in vitro*. S ciljem simuliranja udaha pacijenta, model je spojen na respiratornu pumpu. Simulirana su tri različita protoka disanja: bez udisaja ( $0 \text{ L min}^{-1}$ ), udah u mirovanju ( $15 \text{ L min}^{-1}$ ) i umjereno duboki udah ( $30 \text{ L min}^{-1}$ ) (218,305,306). Pri ispitivanju profila depozicije, formulacije su raspršivane u desnu nosnicu, dok je lijeva nosnica bila začepljena. Takav način primjene uobičajen je za nazalne sprejeve. Naime, zatvaranje jedne nosnice povećava brzinu raspršenih kapljica, te se povećava potencijal kapljica da prođu nosnu valvulu (169). Termoosjetljive otopine donepezila pripremljene u sklopu DoE-a su u model nosne šupljine raspršivani VP7 nazalnim raspršivačem, koji je primjenjivan i u drugim istraživanjima nazalnih sprejeva (167,307).

##### **4.2.2.2.1 Olfaktorna depozicija termoosjetljive otopine donepezila**

Kao što je ranije pojašnjeno, olfaktorna regija nosne šupljine obuhvaća gornju nosnu školjku, gornji dio srednje nosne školjke i pripadajući segment nosnog septuma (Slika 29.).





**Slika 29.** Prikaz olfaktornog područja u korištenom 3D printanom modelu. Plavo - gornja nosna školjka i gornji dio srednje nosne školjke; crveno - pripadajući segment nosnog septuma (uz dozvolu MDPI-a preuzeto iz Perkušić i sur. (2023) (308)).

Profil depozicije termoosjetljive otopine donepezila u olfaktornoj regiji 3D printanog modela nosne šupljine ispitan je pri svim kombinacijama formulacijskih i parametara primjene definiranih DoE-om (17 eksperimenata DoE-a; Tablica 26.). Postotak doze lijeka dostavljen u olfaktorno područje modela nosne šupljine (OD (%)) bio je između  $1,9 \pm 2,1$  i  $71,8 \pm 0,8$  % (Tablica 26.). Generirani regresijski model pokazao je visoku prediktivnu moć ( $R^2 = 0,89$ , RMSE 8,83, Press  $R^2$  0,59, Press RMSE 13,25) te je prikazan sljedećom jednadžbom:

$$\begin{aligned} \text{OD (\%)} = & 24,46 - 4,51 \times c_D - 5,74 \times \text{IFR}^* + 18,31 \times \text{AAH}^* + 4,48 \times c_D \times \text{IFR} - \\ & 4,38 \times c_D \times \text{AAH} - 4,63 \times \text{IFR} \times \text{AAH} \end{aligned} \quad (11)$$

Varirani formulacijski parametri nisu značajno utjecali na profil depozicije u olfaktorno područje. S druge strane, oba parametra primjene (AAH i IFR) značajno su utjecala na olfaktornu depoziciju, kao što je vidljivo iz jednadžbe 11. Povećanjem kuta primjene (od  $45^\circ$  do  $75^\circ$ ) raste postotak lijeka koji doseže olfaktornu regiju. Ovakav trend u skladu je s literaturnim izvorima: za tekuće nazalne sustave veliki kutovi primjene u odnosu na horizontalnu ravninu pospješuju ciljanu depoziciju iza nosne valvule i raspršene kapljice imaju mogućnost doseći olfaktorno područje (167). Takva zapažanja dokazana su i u ovom radu.

Najveći postotak raspršene doze lijeka, čak  $71,8 \pm 0,8$  %, dostavljen je u olfaktornu regiju pod najvećim AAH-om od  $75^\circ$ . Time je dokazano da je kut primjene lijeka ključan parametar u ciljanoj depoziciji nazalnih sprejeva u olfaktorno područje nosne šupljine.

Iz jednadžbe 11. vidljivo je da se povećanjem IFR-a smanjuje olfaktorna depozicija. Zapaženi utjecaj može se objasniti strujanjem zraka u nosnoj šupljini pri umjerenom udisaju. Naime, pri umjerenom udisaju većina zraka prolazi kroz respiratornu regiju, točnije kroz područje donje i srednje nosne školjke, dok protok zraka kroz olfaktornu regiju ostaje nepromijenjen u odnosu na primjenu uz zadržavanje daha (309). U prethodnom ulomku vidljivo je da se uz pomno odabrani kut primjene formulacija može usmjeriti, odnosno *naciljati*, u olfaktorno područje. No umjereni udah može preusmjeriti formulaciju u respiratorno područje, čime manji postotak primijenjene doze dopijeva u olfaktorno područje. Iz svega navedenog, razvidno je da IFR od  $0 \text{ L min}^{-1}$ , odnosno primjena uz zadržavanje daha, najviše pogoduje olfaktornoj depoziciji. Primjena uz zadržavanje daha povoljnija je i iz perspektive pacijenta jer nije potrebno koordinirati udah i potisak nazalnog raspršivača. Takva pojednostavljena primjena rezultira manjom varijabilnošću primijenjene doze, povećanom suradljivošću i povoljnijim ishodom liječenja (144).

Kao što je istaknuto u poglavlju 4.2.1., da bi nazalno primijenjeni neurološki lijek postigao svoj terapijski učinak u SŽS-u, u olfaktorno područje nosne šupljine mora biti isporučeno  $0,01 - 1$  % oralne doze lijeka (287). U ovom radu navedeni zahtjev je ispunjen: uzimajući u obzir eksperiment s najvećom olfaktornom depozicijom, po jednom potisku u olfaktorno područje isporučeno je  $0,4$  % oralne doze od  $5 \text{ mg}$ , odnosno  $0,2$  % oralne doze od  $10 \text{ mg}$  donepezila (310). Može se zaključiti da je pomoću eksperimentalnog dizajna, uz pažljivo odabrane formulacijske parametre i parametre primjene, generirana formulacija koja ima potencijal dostave donepezila u olfaktorno područje u dovoljno visokoj dozi za terapijski učinak. Također, dnevna doza donepezila koju pacijent treba nazalno primijeniti je manja u odnosu na oralnu, čime se smanjuje sistemska izloženost, a time i mogućnost razvoja nuspojava.

#### **4.2.2.2 Turbinatna depozicija termoosjetljive otopine donepezila**

Postotak doze lijeka dostavljen u turbinatno područje (bez odvojivog olfaktornog segmenta) modela nosne šupljine bio je u rasponu od  $10,5 \pm 0,8$  do  $65,1 \pm 3,3$  % (Tablica 26.). Generirani regresijski model pokazao je visoku prediktivnu moć ( $R^2 = 0,86$ , RMSE  $9,41$ , Press  $R^2$   $0,39$ , Press RMSE  $13,49$ ) te je prikazan sljedećom jednadžbom:

$$TD (\%) = 52.41 + 0.14 \times c_D + 2.38 \times c_C + 5.24 \times IFR - 11.42 \times AAH^* + 8.81 \times c_D \times c_C^* - 6.77 \times c_D \times IFR^* - 11.33 \times IFR^2 + 5.18 \times IFR \times AAH \quad (12)$$

Kao i kod olfaktorne depozicije, uočen je značajan utjecaj kuta primjene na turbinatnu depoziciju. No, učinak je suprotan: smanjenjem AAH-a turbinatna depozicija je rasla. Takav utjecaj kuta primjene na turbinatnu depoziciju opisan je u literaturi (148,175,311). Iz svega je razvidno da veći kutovi primjene termoosjetljive otopine donepezila pogoduju učinkovitoj i sigurnoj dostavi donepezila u SŽS, ciljajući olfaktorno područje uz smanjenje turbinatne depozicije. Kao što je istaknuto kod praškastih sustava s donepezilom takav profil depozicije pokazuje mogućnost potenciranja dostave lijeka u mozak, uz istodobno izbjegavanje pretjerane sistemske apsorpcije putem respiratorne sluznice i razvoja nuspojava.

IFR ima kvadratni utjecaj na turbinatnu depoziciju (jednadžba 12.). IFR od 15 L min<sup>-1</sup> pogoduje turbinatnoj depoziciji što je u skladu s prethodno spomenutom činjenicom da pri umjerenom udahu većina udahnutog zraka struji kroz respiratorno područje (309). No, pri udahu od 30 L min<sup>-1</sup> uočava se smanjena turbinatna depozicija. Pri snažnijem udahu, raspršene kapljice ne zadržavaju smjer kretanja, odvajaju se od osnovne putanje i neravnomjerno se odlažu unutar nosne šupljine uslijed inercije (75). Iz jednadžbe 12. razvidno je da IFR i koncentracija donepezila u interakciji imaju značajan utjecaj na turbinatnu depoziciju. Time je dokazan zajednički utjecaj formulacijskih i parametara primjene na svojstva spreja, koja u konačnici utječu na nazalnu depoziciju.

I formulacijski parametri (koncentracija donepezila i kitozana) u interakciji imaju utjecaj na turbinatnu depoziciju. U prethodnim poglavljima dokazano je da spomenuti formulacijski parametri utječu na viskoznost otopine, veličinu raspršenih kapljica i kut raspršenja. Može se zaključiti da pomno odabrani formulacijski parametri rezultiraju željenim svojstvima spreja, a takav nazalni sprej, uz precizno odabrane parametre primjene ima izraženi potencijal za ciljanu depoziciju iza nosne valvule (165).

Zaključno, QbD načela koja su implementirana u razvoj termoosjetljive otopine donepezila rezultirala su formulacijama s poželjnim svojstvima spreja uz visoki postotak primijenjene doze dostavljene u olfaktorno područje. Pretraživanjem relevantne literature nije zabilježen podatak o ovako visokom postotku lijeka u olfaktornom području nakon nazalne primjene. Pažljivi odabir sastavnica i njihovih koncentracija, uparen s preciznim parametrima

primjene, rezultirao je naprednom termoosjetljivom platformom s iznimnim potencijalom dostave donepezila u mozak.

### 4.2.3 Odabir vodeće termoosjetljive otopine donepezila

Variranjem formulacijskih i parametara primjene u okviru DoE-a generirano je 17 različitih eksperimenata, te je među njima odabrana termoosjetljive otopina donepezila s optimalnim reološkim svojstvima, svojstvima raspršivanja i profilom nazalne depozicije u područje od interesa. Vodeći se QbD načelima, vodeća termoosjetljive otopina donepezila odabrana je s obzirom je li ostvarila ključni cilj razvoja formulacije (engl. *quality target product profile*, QTPP) – razvoj *in situ* gelirajuće otopine za sigurnu primjenu i učinkovitu dostavu donepezila u SŽS. Prilikom razvoja formulacije praćena su: (i) kritična svojstva kvalitete (engl. *critical quality attributes*, CQA) – svojstva raspršivanja, termogelirajuća svojstva, profil nazalne depozicije; i (ii) kritična svojstva sastavnica (engl. *critical material attributes*, CMA) – vrsta i koncentracija sastavnica (234).

Opisanim pristupom odabrana je vodeća termoosjetljiva otopina donepezila (tekuća vodeća formulacija, TVF), pripravljena pri koncentraciji donepezila, kitozana i  $\beta$ -GP-a redom od  $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $188 \text{ mg mL}^{-1}$ . TVF je karakteriziran trenutnim geliranjem pri temperaturi nosne sluznice, a primjenom TVF-a u model nosne šupljine pri AAH od  $75^\circ$  uz zadržavanje daha, postignuta je učinkovita olfaktorna depozicija, s čak  $71,8 \pm 0,8 \%$  primijenjene doze dostavljene u olfaktorno područje. Viskoznost u mirovanju TVF-a bila je  $206,37 \pm 1,46 \text{ mPa s}$ , kut raspršenja  $15,5 \pm 0,4^\circ$  te je veličina raspršenih kapljica bila prikladna za nazalnu primjenu. Sva navedena svojstva TVF-a odgovaraju ciljanoj dostavi nazalnog lijeka u SŽS, te je ostvaren QTPP. Nakon odabira TVF-a, formulacija je dalje podvrgnuta opsežnoj biofarmaceutskoj karakterizaciji s ciljem procjene ponašanja na nosnoj sluznici.

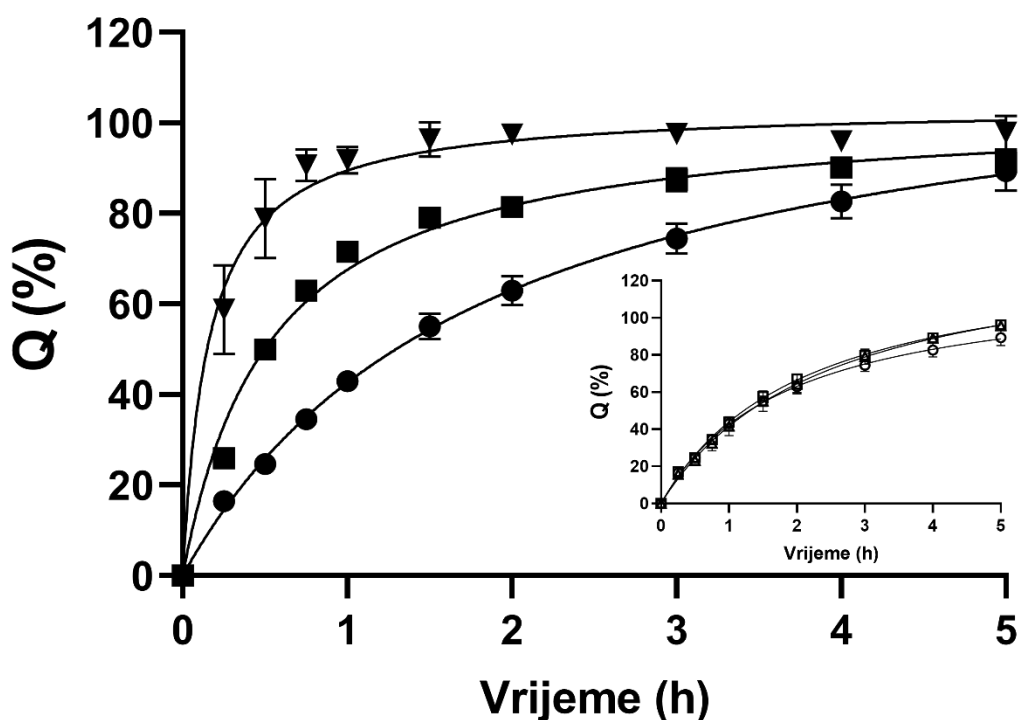
### 4.2.4 Detaljna karakterizacija vodeće termoosjetljive otopine donepezila

#### 4.2.4.1 Profil oslobađanja donepezila iz vodeće termoosjetljive otopine *in vitro*

Oslobađanje lijeka kroz matriks polimernog hidrogela ovisi o svojstvima bubrenja gela, viskoznosti, pH, bioraspadljivosti i umreženosti gela (171). Difuzija lijeka kroz matriks gela određena je oblikom, volumenom i veličinom pora gela (172).

Ispitivanje profila oslobađanja donepezila *in vitro* provedeno je pri uvjetima osigurane topljivosti koristeći automatizirani sustav Franzovih difuzijskih ćelija. Profil oslobađanja donepezila iz TVF-a uspoređen je s profilom oslobađanja iz dvaju kontrolnih uzoraka: (i)

termoosjetljive otopine s udjelom kitozana različitim od onog u TVF-u – kontrolni uzorak TKF (tekuća kontrolna formulacija); (ii) vodene otopine donepezila iste koncentracije kao u TVF-u. Koncentracija kitozana u TVF-u iznosila je  $9,23 \text{ mg mL}^{-1}$ , a kod kontrolnog uzorka  $6,15 \text{ mg mL}^{-1}$ . SNF je korišten kao fiziološki relevantan medij za oslobađanje. S ciljem što vjernijeg simuliranja uvjeta na nosnoj sluznici, membrane koje odvajaju donor od receptora su prije eksperimenta 15 minuta kondicionirane u SNF-u pri  $34^\circ$  (312). Profili oslobađanja lijeka iz ispitivanih uzoraka prikazani su na Slici 30.



**Slika 30.** *In vitro* profili oslobađanja donepezila iz vodeće termoosjetljive otopine donepezila (TVF; krug) i kontrolne termoosjetljive otopine donepezila (TKF; kvadrat), u usporedbi s difuzijom iz otopine donepezila (obrnuti trokut). Umetnuti graf: *in vitro* profili oslobađanja donepezila iz TVF-a u stabilitetnim točkama: 0 dana (prazni krug), 30 dana (prazni trokut), 90 dana (prazni kvadrat).  $Q$  (%) predstavlja kumulativni postotni udio oslobodenog lijeka u promatranom vremenu. Vrijednosti prikazane na grafu su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija,  $n = 3$ .

Oslobađanje lijeka iz ispitivanih formulacija praćeno je kroz period od pet sati. Uočeno je da se donepezil najbrže oslobađa iz otopine, zatim iz kontrolnog uzorka TKF-a, a najsporije iz TVF-a (Slika 30.). Faktor sličnosti  $f_2$  korišten je za usporedbu dvaju profila *in vitro*

oslobađanja donepezila iz analiziranih uzoraka. Sličnost nije dokazana niti za jedan par uzoraka:  $f_2$  između TVF-a i TKF-a iznosio je 36,3;  $f_2$  između TVF i otopine iznosio je 21,4;  $f_2$  između kontrolnog uzorka i otopine iznosio je 35,4. Profili se smatraju sličnima ukoliko je  $f_2$  faktor veći od 50.

I TVF i kontrolni uzorak TKF geliraju pri 34 °C. Stvaranje gel matriksa uzrokuje produljeno oslobađanje lijeka iz TVF-a i TKF-a, u odnosu na difuziju lijeka iz otopine. U prvih 45 minuta, iz otopine lijeka u receptorski medij difundira  $90,6 \pm 3,5$  % lijeka, dok se iz TKF-a i TVF-a redom oslobodi  $62,9 \pm 1,0$  % odnosno  $32,5 \pm 4,0$  % donepezila u prvih 45 minuta.

Struktura i viskoznost gela određuju brzinu oslobađanja uklopljenog lijeka (173,312). Upravo zbog ove činjenice, TVF i kontrolni uzorak TKF pokazuju različite profile oslobađanja lijeka. Naime, TVF i TKF razlikuju se u koncentraciji kitozana u sustavu, a samim time i u viskoznosti formulacije, vremenu geliranja, te čvrstoći i strukturi gela. TVF trenutno gelira pri fiziološkoj temperaturi sluznice nosa što znači da se lijek od samog početka eksperimenta oslobađa iz viskoznog matriksa gela. Kontrolni uzorak TKF pri fiziološkoj temperaturi sluznice nosa gelira nakon 1,0 do 1,3 min (Tablica 26.) iz čega se može zaključiti da se pri početku eksperimenta lijek oslobađa iz formulacije u obliku otopine, a tek nakon navedenog vremena lijek se oslobađa iz gel matriksa. To je uzrok povećanog početnog oslobađanja lijeka iz TKF-a:  $62,9 \pm 1,0$  % u prvih 45 minuta u odnosu na  $32,5 \pm 4,0$  % iz TVF-a. Zaključno, uslijed povećane viskoznosti sustava i trenutnog stvaranja gela pri 34 °C, difuzija lijeka kroz pore gel matriksa je otežana te TVF pokazuje sporiji profil oslobađanja lijeka (151,196,313). Oslobađanje donepezila iz TVF-a odgovara učinkovito dizajniranom terapijskom sustavu; u četiri sata eksperimenta oslobođeno je 80 % uklopljenog lijeka. Sličan *in vitro* profil oslobađanja zabilježen je i kod tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava fentanila, temeljenog na PecSys tehnologiji (*in situ* gelirajući sustavi koji sadrže pektin kao gelirajući polimer) (314). PecSys tehnologija temelj je PecFent spreja za nos koji se koristi za liječenje probijajuće boli u bolesnika s karcinomom. To je jedini *in situ* gelirajući sustav za nazalnu primjenu odobren u EU (315). Odobrenje ovakve formulacije od regulatornih tijela veliki je korak naprijed za daljnje istraživanje i razvoj *in situ* gelirajućih nazalnih formulacija s produljenim zadržavanjem na mjestu primjene i prilagođenim oslobađanjem lijeka iz farmaceutskog oblika.

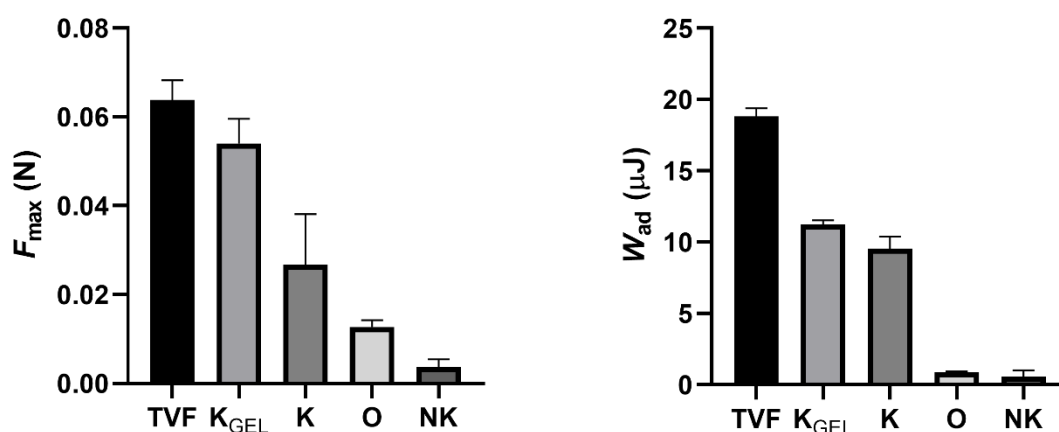
Produljeno oslobađanje lijeka iz TVF-a, upareno s mukoadhezivnim svojstvima formulacije koja će biti raspravljena u sljedećem poglavlju, povećava potencijal odabrane formulacije za osiguranje terapijskog učinka uklopljenog lijeka.

#### 4.2.4.2 Mukoadhezivnost vodeće termoosjetljive otopine donepezila *ex vivo*

Produljeno zadržavanje farmaceutskog oblika na nosnoj sluznici ključan je preduvjet za postizanje terapijskog učinka uklopljenog lijeka. Produljeno zadržavanje na mjestu primjene može se postići mehanizmom *in situ* geliranja na nosnoj sluznici, ali i dodatkom mukoadhezivnih polimera u formulaciju (79). Mukoadhezivni polimeri ulaze u interakcije sa sluznim pokrivačem nosne šupljine, smanjuju mukocilijarni klirens i povećavaju afinitet za nosnu sluznicu, a sve bez značajnijeg narušavanja funkcije cilija (316).

Mukoadhezivnost TVF-a ispitana je pomoću analizatora teksture, koristeći nazalnu sluznicu svinje, zbog fiziološke i histološke sličnosti s nosnom sluznicom čovjeka (209). U ispitivanju su korišteni sljedeći kontrolni uzorci (i) termoosjetljiva otopina donepezila s udjelom kitozana različitim od onog u TVF-u (TKF; vrijeme geliranja iznosi između 1,0 i 1,3 min (Tablica 26.)); (ii) vodena otopina donepezila iste koncentracije kao u TVF-u – otopina (O). Mukoadhezivnost kontrolnog uzorka TKF ispitana je pri sljedećim uvjetima: (i) pri istim uvjetima ispitivanja kao i za ostale tekuće uzorke (Tablica 10.) – pri takvim postavkama testa, sol-gel prijelaz TKF-a nastupa u zadnjoj trećini vremena ispitivanja - uzorak označen kao K); (ii) pri postavkama testa iz Tablice 10., ali uz produljenje vremena termostatiranja na dvije minute kako bi pri početku ispitivanja formulacija bila u gel stanju - uzorak označen kao K<sub>GEL</sub>. Filter papir je korišten kao negativna kontrola (NK). Rezultati ispitivanja mukoadhezivnosti prikazani su na Slici 31.

Najveća mukoadhezivnost uočena je za TVF uzorak. Za odvajanje TVF formulacije od sluznice potrebna je pet puta veći  $F_{\max}$  i 20 puta veći  $W_{\text{ad}}$  u odnosu na otopinu lijeka. U usporedbi s kontrolnom formulacijom K, za odvajanje TVF formulacije od sluznice svinje potrebna je 2,4 puta veći  $F_{\max}$  i dva puta veći  $W_{\text{ad}}$ . Dobiveni rezultati pokazuju izražena mukoadhezivna svojstva TVF-a u odnosu na otopinu lijeka te u odnosu na kontrolnu formulaciju pripravljenu pri manjoj koncentraciji kitozana.



**Slika 31.** Maksimalna sila ( $F_{max}$ ; lijevo) i rad adhezije ( $W_{ad}$ ; desno) potreban za odvajanje sluznice nosa svinje od: TVF (vodeće termoosjetljive otopine), kontrolne termoosjetljive otopine (K), kontrolne termoosjetljive otopine nakon geliranja ( $K_{GEL}$ ), otopine donepezila (O) i negativne kontrole (NK). Vrijednosti prikazane na grafu su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija,  $n = 3$ .

S ciljem vrednovanja utjecaja same koncentracije kitozana na mukoadhezivna svojstva formulacije, osim kontrolnog uzorka koji gelira u zadnjoj trećini mjerenja (K), ispitana je i mukoadhezivnost kontrolnog uzorka koji je u stanju gela od samog početka mjerenja ( $K_{GEL}$ ). Uspoređujući rezultate mukoadhezivnosti između uzoraka K i  $K_{GEL}$ , razvidno je da se maksimalne sile odvajanja uzoraka od sluznice značajno razlikuju ( $p = 0,019$ ). Može se zaključiti da sol-gel prijelaz utječe na mukoadhezivna svojstva formulacije: formulacija u obliku gela ima jače izražena mukoadhezivna svojstva. Također, kada se usporede rezultati TVF i  $K_{GEL}$  formulacije, uočava se značajna razlika u  $W_{ad}$  između dvaju uzoraka ( $p < 0,001$ ). Iako su obje formulacije od početka mjerenja u stanju gela, različita koncentracija kitozana u uzorcima rezultira različitim mukoadhezivnim svojstvima.

Kitozan djeluje kao mukoadhezivni agens putem elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenih amino skupina kitozana i negativno nabijenih skupina mucina nosne sluznice (317). Valja naglasiti da je vodeća formulacija po svojem kiselo-baznom statusu neutralna ( $pH = 7,02$ ). Pri tom  $pH$  amino skupine kitozana su samo djelomično protonirane. Postotak ioniziranosti kitozana moguće je izračunati pomoću Henderson-Hasselbalchove jednadžbe (318). Uzimajući u obzir  $pH$  formulacije i  $pK_a$  kitozana ( $pK_a = 6,5$  (319)) postotak ioniziranosti kitozana u vodećoj termoosjetljivoj otopini donepezila iznosi 23,1 %. Prema tome, može se zaključiti da je elektrostatska interakcija kitozana s mucinom umjerenog intenziteta i



predstavlja samo jedan od mukoadhezivnih mehanizama kitozana. Također, umjerena ioniziranost kitozana može pridonijeti poboljšanoj toleranciji kitozanskih sustava na osjetljivoj sluznici nosa (286,320).

Iako su elektrostatske interakcije kitozana s mucinom umjerenog inteziteta, formulacija s većim udjelom kitozana (TVF) pokazuje bolja mukoadhezivna svojstva od formulacije s manjom koncentracijom kitozana ( $K_{GEL}$ ). Objašnjenje leži u činjenici da mukoadhezivnost kitozana, osim iz elektrostatskih interakcija, proizlazi i iz vodikovih veza i hidrofobnih interakcija s mucinom (99). Uslijed svih spomenutih mehanizama, formulacija s većim udjelom kitozana pokazuje izraženija mukoadhezivna svojstva. Zaključno, pažljivim odabirom mukoadhezivnog polimera i njegove koncentracije moguće je optimirati mukoadhezivna svojstva s ciljem produljenog zadržavanja na sluznici nosa.

#### **4.2.4.3 Biokompatibilnost vodeće termoosjetljive otopine donepezila *in vitro***

Pomoćne tvari korištene za izradu termoosjetljive otopine donepezila prepoznate su kao sigurne za nazalnu primjenu – samostalno ili u kombinaciji (149,164,196). Kao što je komentirano u poglavlju 1.4.1.1.1., kitozan je netoksični i biokompatibilni polimer (266), a  $\beta$ -GP tvar fiziološki prisutna u ljudskom tijelu. FDA je odobrio uporabu  $\beta$ -GP-a u parenteralnim pripravcima za nadomjestak fosfata (154).

Biokompatibilnost TVF-a ispitana je na Calu-3 humanoj staničnoj liniji. TVF uzorak razrijeđen je HBSS puferom (pH=7,0) u volumnom omjeru 1:1. Koncentracije donepezila, kitozana i  $\beta$ -GP-a u tako razrijeđenom uzorku iznosile su redom 0,15 mg mL<sup>-1</sup>, 4,62 mg mL<sup>-1</sup> i 94,00 mg mL<sup>-1</sup>. Kao kontrolni uzorci korištene su otopine donepezila u HBSS puferu (pH=7,0) u rasponu koncentracija 0,05 – 0,25 mg mL<sup>-1</sup>, te otopina  $\beta$ -GP-a u HBSS puferu (pH=7,0) koncentracije 94,00 mg mL<sup>-1</sup>. HBSS pufer (pH=7,0) korišten je kao negativna kontrola.

Prema protokolu za ispitivanje biokompatibilnosti, stanice su inkubirane pri 37 °C. Navedena temperatura inkubiranja potaknula je stvaranje gela termoosjetljivog TVF-a u jažicama. Ni za jedan od ispitivanih uzoraka nije zabilježen citotoksični učinak, odnosno vijabilnost stanica u odnosu na negativnu kontrolu iznosila je iznad 80 % (202) ( $86,0 \pm 1,4$  % za TVF,  $86,4 \pm 2,5$  % za otopinu donepezila koncentracije 0,05 mg mL<sup>-1</sup> (oznaka O<sub>0,05</sub>),  $99,1 \pm 9,9$  % za otopinu donepezila koncentracije 0,25 mg mL<sup>-1</sup> (oznaka O<sub>0,25</sub>) i  $95,7 \pm 9,7$  % za otopinu  $\beta$ -GP-a koncentracije 94,00 mg mL<sup>-1</sup> (oznaka  $\beta$ -GP).

Pozitivno nabijene skupine kitozana stupaju u interakciju s negativno nabijenom membranom stanica i ta interakcija može rezultirati smanjenom vijabilnošću stanica (91). No, u poglavlju 4.2.4.2., objašnjeno je da pri pH vodeće termoosjetljive otopine donepezila kitozan nije u potpunosti protoniran. Niži stupanj ioniziranosti kitozana pri neutralnijem pH povećava biokompatibilnost kitozanskih sustava (320,321).

Rezultati *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti TVF-a pokazuju da vodeća termoosjetljiva otopina donepezila ne pokazuje citotoksična svojstva. Odabrane koncentracije sastavnica TVF-a prikladne su za daljnje ispitivanje *in vitro* permeabilnosti na Calu-3 staničnoj liniji.

#### **4.2.4.4 Permeabilnost donepezila iz vodeće termoosjetljive otopine *in vitro***

Permeabilnost TVF-a ispitana je na Calu-3 staničnoj liniji uzgojenoj na Transwell® ploči u ALI uvjetima rasta. Calu-3 stanični monosloj simulira uvjete epitela nazalne sluznice *in vivo*. Naime, Calu-3 stanice proizvode sluz, barijerna i morfološka svojstva su im slična epitelu nazalne sluznice, a korištenje Calu-3 stanične linije preferirano je i zbog visoke reproducibilnosti i homogenosti staničnog materijala (201,268).

U ovom istraživanju permeacijski potencijal TVF-a uspoređen je s izoosmotskom i hiperosmotskom otopinom donepezila. Taj odabir uzoraka napravljen je s ciljem diferenciranja utjecaja kitozana od utjecaja hiperosmolalnosti vodeće formulacije na profil permeabilnosti.

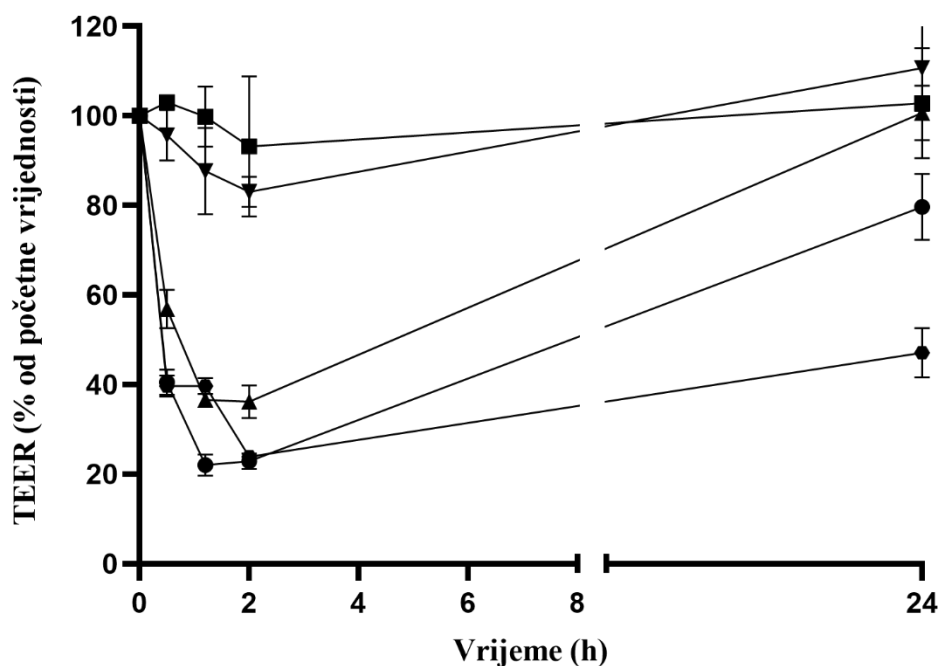
TVF uzorak razrijeđen je HBSS puferom (pH=7,0) u volumnom omjeru 1:1, te je koncentracija donepezila u tako razrijeđenom uzorku iznosila 0,15 mg mL<sup>-1</sup>, a osmolalnost je iznosila 750 ± 3 mOsm/kg. Kao kontrolni uzorci korišteni su: (i) otopina donepezila u HBSS puferu (pH=7,0) koncentracije donepezila 0,25 mg mL<sup>-1</sup> i osmolalnosti 340 ± 1 mOsm/kg (oznaka O<sub>D</sub> izoosmotski); (ii) otopina donepezila u hiperosmotskom HBSS puferu (pH=7,0) koncentracije donepezila 0,15 mg mL<sup>-1</sup> i osmolalnosti 745 ± 9 mOsm/kg (oznaka O<sub>D</sub> hiperosmotski). Ispitivanje permeabilnosti provedeno je pri uvjetima osigurane topljivosti. Donepezil u obliku hidroklorida je hidrofilni lijek koji prelazi membranu pasivnim paracelularnim transportom, a u slučaju takvog transporta koncentracija lijeka u donorskom odjeljku nema utjecaj na koeficijent permeabilnosti lijeka (322,323). TEER je mjeran tijekom trajanja čitavog eksperimenta i nakon 24 h, s ciljem provjere očuvanosti barijerne funkcije staničnog monosloja. Rezultati *in vitro* ispitivanja permeabilnosti prikazani su u Tablici 28.

**Tablica 28.** Osmolalnost i prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) donepezila kroz Calu-3 stanični monosloj za uzorke: TVF (vodeća termoosjetljiva otopina donepezila razrijeđena HBSS puferom (pH=7,0) u volumnom omjeru 1:1), O<sub>D</sub> hiperosmotski (otopina donepezila u hiperosmotskom HBSS puferu (pH=7,0) koncentracije 0,15 mg mL<sup>-1</sup>), O<sub>D</sub> izoosmotski (otopina donepezila u HBSS puferu (pH=7,0) koncentracije 0,25 mg mL<sup>-1</sup>) i HBSS (pH=7,0).

Uzorak	Osmolalnost (mOsm kg <sup>-1</sup> )	$P_{app}$ (10 <sup>-5</sup> cm s <sup>-1</sup> )	Atenuacijski faktor
TVF	750 ± 3	4,96 ± 0,84	1,47
O <sub>D</sub> hiperosmotski	745 ± 9	3,31 ± 2,60	0,98
O <sub>D</sub> izoosmotski	340 ± 1	3,38 ± 3,23	-
HBSS (pH=7,0)	312 ± 2	-	-

Atenuacijski faktor izračunat je dijeljenjem  $P_{app}$  vrijednosti za donepezil iz TVF uzroka s  $P_{app}$  vrijednosti za donepezil iz izoosmotske otopine, odnosno dijeljenjem  $P_{app}$  vrijednosti za donepezil iz O<sub>D</sub> hiperosmotskog uzroka s  $P_{app}$  vrijednosti za donepezil iz izoosmotske otopine (144). Vrijednosti prikazane u tablici su srednje vrijednosti ± standardna devijacija, n = 3.

$P_{app}$  vrijednost za donepezil iz TVF-a je 1,47 puta veća od  $P_{app}$  vrijednosti za donepezil iz izoosmotske otopine, čime je dokazan pozitivan učinak ispitivane formulacije na permeaciju donepezila. Uzimajući u obzir produljeno oslobađanje lijeka iz TVF-a (Slika 30.) može se zaključiti da je permeacijski potencijal vodeće formulacije i veći nego što je izračunato putem atenuacijskog faktora. Naime, u slučaju TVF-a samo je oslobođena frakcija lijeka bila dostupna za prijelaz iz donorskog u receptorski odjeljak, dok je kod otopine cijela doza lijeka u donoru odmah raspoloživa za permeaciju kroz stanični monosloj (276). Uočeni pozitivan učinak TVF-a može se objasniti i padom TEER vrijednosti Calu-3 staničnog monosloja tijekom ispitivanja permeabilnosti (Slika 32.). Pad TEER-a upućuje na oslabljena barijerna svojstva staničnog monosloja (otvaranje TJ-a) čime je potaknut paracelularni transport hidrofilnog oblika donepezila.



**Slika 32.** Transepitelni električni otpor (TEER) Calu-3 staničnog monosloja praćen tijekom i nakon *in vitro* ispitivanja permeabilnosti za sljedeće uzorke: vodeću termoosjetljivu otopinu donepezila razrijeđenu s HBSS puferom (pH=7,0) u volumnom omjeru 1:1 (krug), otopinu donepezila u hiperosmotskom HBSS puferu (pH=7,0) koncentracije 0,15 mg mL<sup>-1</sup> (trokut), otopinu donepezila u HBSS puferu (pH=7,0) koncentracije 0,25 mg mL<sup>-1</sup> (kvadrat) i HBSS pufer pH=7,0 (obrnuti trokut). Vrijednosti prikazane na slici su srednje vrijednosti ± standardna devijacija, n = 3.

Reverzibilni efekt narušavanja barijere staničnog monosloja dokazan je mjerenjem TEER-a 24 h od početka eksperimenta, pri čemu je utvrđena regeneracija TEER-a na 80 ± 7 % vrijednosti izmjerene na početku ispitivanja. Biokompatibilnost ispitanih uzoraka potvrđena je i MTT testom izvedenim na Transwell® ploči (144): vijabilnost Calu-3 staničnog monosloja nakon izlaganja uzorcima TVF, O<sub>D</sub> hiperosmotski, O<sub>D</sub> izoosmotski u odnosu na negativnu kontrolu (HBSS (pH = 7,0)) iznosile su redom: 93,9 ± 4,4 %, 86,4 ± 2,5 %, 99,1 ± 9,9 %.

Reverzibilni pad TEER-a prilikom izlaganja stanica ispitivanim uzorcima može se objasniti otvaranjem TJ-a. TJ se reverzibilno otvaraju uslijed kombiniranog utjecaja kitozana i hiperosmotskog efekta formulacije. Mehanizam otvaranja TJ-a nakon izlaganja kitozanu objašnjen je u poglavlju 1.4.1.1.1. Hiperosmotski uvjeti također uzrokuju porast prijenosa lijeka preko modela epitelne barijere reverzibilno otvarajući TJ (39). Budući da je veći pad u

TEER vrijednostima vidljiv kod TVF-a u odnosu na hiperosmotsku otopinu donepezila, može se zaključiti da je poboljšanje permeacije nakon izlaganja TVF-u posljedica istodobnog učinka kitozana i hiperosmotskih uvjeta. Zanimljivo je primijetiti da se  $P_{app}$  vrijednosti između izoosmotske i hiperosmotske otopine donepezila znatno ne razlikuju, čime je dodatno naglašena uloga kitozana kao pospješivača apsorpcije. To dodatno opravdava uvrštavanje kitozana u tekuću *in situ* gelirajuću formulaciju. Kitozan u vodećoj formulaciji djeluje kao gelirajući polimer, mukoadhezivni agens, a u ovom poglavlju dokazana je i njegova uloga u poboljšanju permeacije lijeka.

#### 4.2.4.5 Iritacija sluznice puža golaća nakon izlaganja vodećoj termoosjetljivoj otopini donepezila *in vivo*

Usljed bliskog kontakta nazalne formulacije s osjetljivom nosnom sluznicom, pacijenti nakon primjene nazalnog pripravka znaju osjećati određenu vrstu nelagode koju opisuju kao osjećaje bockanja, svrbeži i žarenja. Takvi nelagodni osjeti mogu znatno utjecati na suradljivost pacijenta, a samim time i na terapijski ishod (210). Zbog navedenog razloga, ključno je utvrditi iritacijski potencijal u ranim fazama razvoja nazalne formulacije.

Kao i kod mikrosfera s donepezilom, za utvrđivanje iritacijskog potencijala TVF-a, proveden je test iritacije sluznice puža golaća prema protokolu iz poglavlja 3.2.3.4. (129). Količina ukupne izlučene sluzi nakon izlaganja puževa TVF-u uspoređena je s izlučenom sluzi nakon izlaganja puževa negativnoj i pozitivnoj kontroli. Kao negativna kontrola korišten je uzorak koji ne uzrokuje iritaciju (PBS (pH=7,4)), a za pozitivnu kontrolu odabran je uzorak koji izaziva maksimalnu iritaciju (1%-tna (*m/V*) otopina benzalkonijevog klorida). Rezultati provedenog testa iritacije sluznice puža golaća prikazani su u Tablici 29.

**Tablica 29.** Ukupna izlučena sluz nakon tri kontaktna perioda izražena kao postotak početne mase puža.

Uzorak	Ukupna izlučena sluz -TM (%)
TVF	6,64 ± 1,04
PBS – negativna kontrola	0,48 ± 1,50
BAC 1 % ( <i>m/V</i> ) – pozitivna kontrola	17,64 ± 4,33

TVF – vodeća termoosjetljiva otopina donepezila; PBS - fosfatni pufer pH 7,4; BAC 1 %-tna (*m/V*) otopina benzalkonijevog klorida. Vrijednosti prikazane u tablici su srednje vrijednosti ± standardna devijacija, n = 3.

TM (%) za TVF je 2,7 puta niži od TM-a za 1 % (*m/V*) BAC otopinu, koja je marker za iznimnu nelagodu (324). Rezultati TM-a za TVF u ovom radu usporedivi su s ranije dobivenim rezultatima za prosijani manitol (veličina čestica 32 – 90  $\mu\text{m}$ ;  $\text{TM} = 6,30 \pm 0,61$  %) u testu koji je proveden prema istom protokolu (129). U spomenutoj studiji proizvodnja sluzi nakon izlaganja prosijanom manitolu objašnjena je veličinom čestica i osmotskim efektom ispitivanog nosača.

Iritacijski potencijal nazalne formulacije može ovisiti o pH, odabranim pomoćnim tvarima i osmolalnosti formulacije (210). Iako je u studiji Trenkel i Scherließ (129) prašak karboksimetil kitozana izazvao pojačano lučenje sluzi ( $\text{TM} = 17,52 \pm 0,63\%$ ), TVF uzorak, koji u svom sastavu sadrži kitozan, u testu iritacije sluznice puža golaća nije rezultirao tako viskom iznosom TM-a. Moguće objašnjenje leži u činjenici da je pH vrijednost TVF-a neutralna, odnosno kitozan nije u potpunosti protoniran, što pridonosi poboljšanoj tolerabilnosti formulacije u testu iritacije sluznice puža golaća.

Termoosjetljivi sustavi kitozana i poliol fosfata u literaturi su najčešće karakterizirani kao hiperosmotski sustavi, a takvi sustavi mogu djelovati iritirajuće na nosnu sluznicu (154,196,325). Lenoir i suradnici (210) usporedili su rezultate testa iritacije sluznice puža golaća s rezultatima testa iritabilnosti otopina natrijevog klorida različite osmolalnosti u kliničkoj studiji u ljudi. U navedenoj studiji, jedna od ispitivanih otopina bila je 2,6 % (*m/V*) otopina natrijevog klorida čija je osmolalnost bila usporediva s osmolalnošću TVF-a u ovom radu. Nakon 5 min izlaganja 2,6 % (*m/V*) nazalnoj otopini natrijevog klorida, 54 % ispitanika nije osjećalo nelagodu, dok je 41,5 % ispitanika osjećalo blagu nelagodu. Nakon 10 min izlaganja navedenoj otopini, čak 79 % ispitanika nije osjećalo nikakvu nelagodu u nosu. Ti podaci ukazuju na nisku iritabilnost TVF-a unatoč hiperosmolalnosti. Iz svega navedenog može se zaključiti da je TVF prihvatljivog profila iritabilnosti te da je siguran za nazalnu uporabu.

#### **4.2.4.6 Stabilnost vodeće termoosjetljive otopine donepezila**

Ispitivanje stabilnosti TVF-a provedeno je u vremenskom razdoblju od tri mjeseca. Formulacije su skladištene u dobro zatvorenom spremniku, pri temperaturi  $5 \pm 3$  °C. U stabilitetnim vremenskim točkama 0, 30 i 90 dana TVF je analiziran s obzirom na sadržaj donepezila, reološka i gelirajuća svojstva, svojstva raspršenja te *in vitro* profil oslobađanja donepezila. Rezultati karakterizacije u vremenskim točkama 30 i 90 dana nisu se značajno razlikovali od rezultata analiza izvedenih odmah nakon pripreme vodeće formulacije (Tablica

30.). Faktor  $f_2$  za utvrđivanje sličnosti između profila oslobađanja nije pokazao razliku između oslobađanja lijeka iz TVF-a nakon skladištenja u razdoblju od 0, 30 i 90 dana (Tablica 30., Slika 30.; umetak).

**Tablica 30.** Rezultati ispitivanja stabilnosti vodećeg termoosjetljive otopine donepezila (TVF). Uzorci su skladišteni 90 dana pri temperaturi  $5 \pm 3$  °C.

Promatrani parametar	Stabilitetna točka:	Stabilitetna točka:	Stabilitetna točka:
	0 dana	30 dana	90 dana
C (mg mL <sup>-1</sup> )	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,01
$\eta_0$ (mPa s)	206,37 ± 1,46	192,28 ± 11,57	211,02 ± 6,53
$T_{GEL}$ (°)	33,7 ± 0,1	33,9 ± 0,3	34,9 ± 0,1
$t_{GEL}$ (min)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
$D_{v10}$ (µm)	69,8 ± 3,7	74,6 ± 6,0	70,2 ± 1,4
$D_{v50}$ (µm)	161,1 ± 5,2	167,2 ± 4,5	166,5 ± 2,6
$D_{v90}$ (µm)	309,7 ± 10,9	313,1 ± 3,9	317,4 ± 7,7
Span	1,5 ± 0,0	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,0
SCA (°)	15,5 ± 0,4	15,6 ± 0,2	15,8 ± 0,1
$f_2$	-	72,7	70,2

C = koncentracija lijeka;  $\eta_0$  = viskoznost u mirovanju;  $T_{GEL}$  = temperatura geliranja;  $t_{GEL}$  = vrijeme geliranja;  $D_{v10}$ ;  $D_{v50}$  and  $D_{v90}$  = veličina raspširenih kapljica; raspon veličina kapljica (Span); SCA = kut raspršenja;  $f_2$  = faktor sličnosti profila oslobađanja donepezila *in vitro* iz vodeće formulacije nakon 30 i 90 dana skladištenja u usporedbi s profilom oslobađanja donepezila *in vitro* iz vodeće formulacije odmah nakon priprave. Vrijednosti prikazane u tablici su srednje vrijednosti ± standardna devijacija, n = 3; osim za  $f_2$  faktor.

#### 4.3 Usporedba vodećeg praškastog i tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom

U ovom radu razvijena su dva različita inovativna farmaceutska oblika donepezila za nazalnu primjenu: praškasti *in situ* gelirajući sustav – kitozansko-manitolske mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem korištenjem ultrazvučne sapnice, i tekući *in situ* gelirajući sustav, pripravljen kao termoosjetljiva otopina donepezila, kitozana i  $\beta$ -glicerofosfata. Jedan od glavnih ciljeva bio je statističkim dizajnom eksperimenata odabrati vodeće formulacije optimiranih svojstava i usporediti ih s obzirom na svojstva raspršivanja, stabilnost, potencijal zadržavanja na mjestu primjene, oslobađanje i permeaciju lijeka, te uspješnost ciljane depozicije u olfaktornom području nosne šupljine. Primijenjeni komplementarni pristup razvoju praškastog i tekućeg terapijskog sustava koristan je i iz perspektive pacijenta:

mogućnost izbora farmaceutskog oblika pogoduje suradljivosti i poboljšanju ishoda liječenja. Zanimljivo je za napomenuti da iako farmaceutski prašci pokazuju brojne prednosti u odnosu na tekuće farmaceutske oblike, većina pacijenata i dalje preferira tekuće nazalne formulacije (80,82). Razlog tome dijelom leži u činjenici da su nazalni proizvodi trenutno prisutni na tržištu i dalje većinom tekući oblici (kapi, sprejevi), što utječe na formiranje stava pacijenata (82). Izbor farmaceutskog oblika prema vlastitoj preferenciji osobito je bitan kod pacijenata s AB-om jer je adherencija bolesnika izravno povezana s tolerabilnošću terapijskog sustava (326).

Općenito, usporedba praškastih i tekućih nazalnih farmaceutskih oblika česta je tema u relevantnoj literaturi (98,161). No, u ovom radu prvi put je predstavljena usporedba praškastog i tekućeg farmaceutskog oblika istog lijeka posebice iz aspekta profila nazalne depozicije, ključnog preduvjeta za izravnu dostavu lijeka iz nosne šupljine u mozak.

Za obje tehnološke platforme odabran je jednostavan i reproducibilan način pripreme koji se lako prevodi na industrijsko mjerilo. Oba razvijena sustava zadovoljavajućeg su profila stabilnosti. Nadalje, pokazuju prikladna fizičko-kemijska svojstva i svojstva raspršivanja te povoljne biofarmaceutske karakteristike uključujući produljeno oslobađanje i povećani permeacijski potencijal donepezila, biokompatibilnost, mukoadhezivnost i neiritabilnost.

S oba *in situ* gelirajuća sustava postignuta je visoka učinkovitost dostave donepezila u olfaktorno područje modela nosne šupljine. Budući da je za ispitivanje profila nazalne depozicije korišten isti model nosne šupljine, rezultati se mogu izravno uspoređivati. Primjenom termoosjetljive otopine donepezila kao tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava, 71,8 % doze lijeka dostavljeno je u olfaktorno područje, dok je primjena kitozansko-manitoljskih mikrosfera kao praškastog *in situ* gelirajućeg sustava rezultirala dostavom 65,5 % doze u isto područje. Kod oba sustava uočen je značajan utjecaj parametara primjene na profil nazalne depozicije. Najveća učinkovitost olfaktorne dostave praškastog sustava postignuta je pri primjeni bez udaha i pri malom kutu primjene u odnosu na horizontalnu ravninu. Najveća učinkovitost olfaktorne dostave tekućeg sustava također je postignuta pri primjeni uz postavku zadržanog daha, ali pri velikom kutu primjene u odnosu na horizontalnu ravninu. Različiti utjecaj parametara primjene može se pripisati različitim aerodinamičkim svojstvima raspršenih kapljica i suhih čestica. Iz ovog primjera vidljivo je da je ispitivanje profila nazalne depozicije važan korak u razvoju nazalnog farmaceutskog oblika. Ovim radom također je pokazano da profil nazalne depozicije uvelike ovisi i o svojstvima nazalnog farmaceutskog oblika i o načinu primjene, te ih je potrebno istodobno razmatrati u ranoj fazi razvoja oblika lijeka.



Zaključno, pomoću DoE-a, uz pažljivo odabrane formulacijske, procesne i parametre primjene, uspješno su razvijeni praškasti i tekući *in situ* gelirajući sustavi s donepezilom, prikladnih biofarmaceutskih svojstava i ugrađenog potencijala dostave lijeka u olfaktorno područje u dovoljno visokoj dozi za ostvarenje terapijskog učinka. Optimirane formulacije predstavljaju dobru polazišnu točku za buduća *in vivo* ispitivanja na animalnim modelima, koja će omogućiti vrednovanje razvijenih platformi određivanjem biorasploživosti donepezila u mozgu.

## **5 ZAKLJUČCI**

## 5.1 Kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom kao praškasti *in situ* gelirajući sustavi

Prašasti *in situ* gelirajući sustav, kitozansko-manitolske mikrosfere s donepezilom, uspješno su pripravljene sušenjem raspršivanjem korištenjem ultrazvučne sapnice. Opsežnim preliminarnim ispitivanjima dobro su postavljeni ulazni parametri za DoE jer su finim ugađanjem formulacijskih, procesnih i parametara primjene pripravljene mikrosfere s donepezilom poželjnih svojstava za nazalnu primjenu.

Proces sušenja raspršivanjem rezultirao je visokim iskorištenjem (47,2 – 70,5 %) što upućuje na precizno optimiran proces proizvodnje praškastog produkta. Mikrosfere s donepezilom karakterizirane su prikladnim sadržajem lijeka, sadržajem vlage manjim od 10 % te zadovoljavajućim svojstvima bubrenja. Korištenjem ultrazvučne sapnice u procesu sušenja raspršivanjem ostvaren je ključni cilj udovoljavanja regulatornom zahtjevu da glavna čestica ima promjer veći od 10  $\mu\text{m}$  ( $D_{v10}$  bio je u rasponu od  $6,7 \pm 0,4$  i  $11,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ). Preciznim podešavanjem formulacijskih i procesnih parametara pripravljene su mikrosfere s donepezilom prikladnih svojstava tečenja (Hausnerov omjer iznosi je  $1,15 \pm 0,06$  -  $1,30 \pm 0,09$ ) te relativno uskog kuta raspršenja ( $22,5 \pm 0,2$  –  $28,3 \pm 0,9^\circ$ ) što pogoduje usmjerenj depoziciji u područje od interesa. Uparivanje optimiranih fizičko-kemijskih svojstva mikrosfera s pomno odabranim parametrima primjene rezultiralo je učinkovitom depozicijom lijeka u ciljanom području nosne šupljine. Za mikrosfere volumnog promjera  $D_{v10}$  od  $11,62 \pm 0,41 \mu\text{m}$ , pri kutu primjene od  $30^\circ$  u odnosu na horizontalnu ravninu uz zadržavanje udaha, čak  $65,5 \pm 0,2 \%$  primijenjene doze lijeka dostavljeno je u olfaktorno područje. Navedena formulacija odabrana je kao vodeća, s obzirom na utvrđeni potencijal za izravnu dostavu lijeka u SŽS. Vodeća formulacija pokazala je zadovoljavajući profil stabilnosti tijekom skladištenja u razdoblju od 180 dana pri  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ . Također, vodeće mikrosfere, kao sferične čestice glatke površine, prikladne su morfologije za nazalnu primjenu. Biofarmaceutskim ispitivanjima *in vitro/ex vivo* utvrđeni su biokompatibilnost i mukoadhezivnost vodeće formulacije, produljeno oslobađanje lijeka i povećani permeacijski potencijal donepezila. *In vivo* testom iritacije sluznice puža golaća ustanovljen je niski profil iritabilnosti vodeće formulacije.

## 5.2 Termoosjetljiva otopina donepezila kao tekući *in situ* gelirajući sustav

Tekući *in situ* gelirajući sustav s donepezilom – termoosjetljiva otopina donepezila, kitozana i  $\beta$ -GP-a, uspješno je pripremljen jednostavnom metodom otapanja sastavnica u prigodnom otapalu. Za razvoj termoosjetljive otopine donepezila primjenom DoE-a, temeljem

rezultata preliminarnih ispitivanja odabran je kitozan niske molekulske mase, postavljena je konstantna koncentracija  $\beta$ -GP-a te su precizno definirani rasponi variranja koncentracija kitozana i donepezila te parametara primjene.

Termoosjetljive otopine donepezila generirane DoE-om su umjereno viskozne otopine ( $35,03 \pm 0,82 - 232,21 \pm 2,30$  mPa s) koje su pri temperaturi nosne sluznice gelirale u vremenu između  $0,0 \pm 0,0$  i  $14,9 \pm 0,2$  min. Temperatura geliranja DoE uzoraka bila je u rasponu od  $32,2 \pm 0,9$  do  $39,9 \pm 0,1$  °C. Termoosjetljive otopine donepezila karakterizirane su uskim kutom raspršenja ( $15,1 \pm 0,3 - 26,6 \pm 1,2$  °) i veličinom raspršenih kapljica prikladnom za nazalnu primjenu ( $D_{v,10}$ :  $23,6 \pm 1,4 - 72,3 \pm 3,2$   $\mu$ m), što su karakteristike spreja koje pogoduju ciljanoj olfaktornoj depoziciji. Ispitivana reološka svojstva i svojstva spreja ovisila su o koncentraciji donepezila i kitozana. Za uzorak viskoznosti od  $206,37 \pm 1,46$  mPa s, kuta raspršenja od  $15,5 \pm 0,4$ ° i trenutnog geliranja na nosnoj sluznici, postignuta je visoka olfaktorna depozicija od  $71,8 \pm 0,8$  %, te je navedena formulacija prepoznata kao vodeća. Vodeća termoosjetljiva otopina donepezila pokazala se stabilnom tijekom skladištenja u periodu od 90 dana pri  $5 \pm 3$  °C. Karakterizirana je i povoljnim biofarmaceutskim svojstvima uključujući produljeno oslobađanje i povećani permeacijski potencijal donepezila, biokompatibilnost, izraženu mukoadhezivnost i neiritabilnost. Sva navedena opažanja pokazuju potencijal za izravnu dostavu uklopljenog donepezila iz nosne šupljine u mozak.

### **5.3 Prednosti primijenjenog pristupa u razvoju naprednih *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom**

Sveobuhvatnim pristupom razvoju naprednog praškastog i tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava s donepezilom omogućeno je razumijevanje kritičnih procesnih i formulacijskih parametara te parametara primjene s utjecajem na svojstva sustava i profil depozicije u ciljanom području nosne šupljine, što je od ključnog značaja za ostvarivanje terapijskog učinka donepezila u središnjem živčanom sustavu.

Temeljem provedene *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* karakterizacije ustanovljen je usporediv potencijal razvijenog praškastog i tekućeg *in situ* gelirajućeg sustava za učinkovitu i sigurnu dostavu donepezila iz nosne šupljine u središnji živčani sustav, što predstavlja čvrst temelj za potvrdu koncepta budućim farmakokinetičkim studijama *in vivo*. Usporedivost razvijenih platformi korisna je i iz perspektive pacijenta, s obzirom da mogućnost izbora farmaceutskog oblika pogoduje pridržavanju terapiji.

## **6 LITERATURA**

1. World Alzheimer Report 2022: Life after diagnosis: Navigating treatment, care and support. [pristupljeno: 15. lipanj 2023.]; Preuzeto s: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2022/>
2. Dementia. [pristupljeno: 15. lipanj 2023.]. Preuzeto s: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
3. Alzheimer HLZ. [pristupljeno: 15. lipanj 2023.]. Hrvatsko društvo za Alzheimerovu bolest i psihijatriju starije životne dobi. Preuzeto s: <https://alzheimer.hlz.hr/>
4. Borovečki F. Rana dijagnoza Alzheimerove bolesti. *Medicus*. 2019;28(1 Neurologija):23–23.
5. Alzheimer's Disease and Dementia. [pristupljeno: 15. lipanj 2023.]. Stages of Alzheimer's. Preuzeto s: <https://alz.org/alzheimers-dementia/stages>
6. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15056.
7. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers* 2021;7(1):1–21.
8. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, et al. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* 2016;6(1):6.
9. Ohm DT, Fought AJ, Martersteck A, Coventry C, Sridhar J, Gefen T, et al. Accumulation of neurofibrillary tangles and activated microglia is associated with lower neuron densities in the aphasic variant of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2020;31(1):189–204.
10. Colom-Cadena M, Spires-Jones T, Zetterberg H, Blennow K, Caggiano A, DeKosky ST, et al. The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2020;12:21.
11. Martinez JL, Zammit MD, West NR, Christian BT, Bhattacharyya A. Basal Forebrain Cholinergic Neurons: Linking Down Syndrome and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2021. [pristupljeno: 15. lipanj 2023.];13. Preuzeto s: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2021.703876>
12. Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol* 2002;68(3):209–45.
13. García-Ayllón MS, Small DH, Avila J, Saez-Valero J. Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and  $\beta$ -Amyloid. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2011. [pristupljeno: 15. lipanj 2023.];4. Preuzeto s: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2011.00022>
14. Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Antimisiaris SG, Chougule MB, Shoyele SA, et al. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J Control Release* 2018;281:139–77.

15. Alzheimer's Disease and Dementia. [pristupljeno: 19. lipanj 2023.]. Medications for Memory, Cognition and Dementia-Related Behaviors. Preuzeto s: <https://alz.org/alzheimers-dementia/treatments/medications-for-memory>
16. Dhillon S. Aducanumab: First Approval. *Drugs* 2021;81(12):1437–43.
17. Commissioner O of the. FDA. FDA; 2023 [pristupljeno:19. lipanj 2023.]. FDA Grants Accelerated Approval for Alzheimer's Disease Treatment. Preuzeto s: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-disease-treatment>
18. Cacabelos R, Takeda M, Winblad B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 1999;14(1):3–47.
19. Overview | Dementia: assessment, management and support for people living with dementia and their carers | Guidance | NICE. NICE; 2018 [pristupljeno: 15. lipanj 2023.]. Preuzeto s: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng97>
20. HALMED. .: HALMED. [citirano 19. lipanj 2023.]. Baza lijekova | Lijekovi .: HALMED. Dostupno na: <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>
21. Vitezić D, Mimica N. Smjernice primjene antidementnih lijekova u liječenju Alzheimerove bolesti. *Klinička farmakologija, drugo, promijenjeno i dopunjeno izdanje*. 2014;456–61.
22. Overview | Donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease | Guidance | NICE. NICE; 2011 [pristupljeno: 15. lipanj 2023.]. Preuzeto s: <https://www.nice.org.uk/guidance/ta217>
23. Sugimoto H, Ogura H, Arai Y, Limura Y, Yamanishi Y. Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *Jpn J Pharmacol* 2002;89(1):7–20.
24. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018;141(7):1917–33.
25. Jacobson SA, Sabbagh MN. Donepezil: potential neuroprotective and disease-modifying effects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4(10):1363–9.
26. Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol* 2013;11(3):315–35.
27. Moraes W dos S, Poyares DR, Guillemainault C, Ramos LR, Bertolucci PHF, Tufik S. The effect of donepezil on sleep and REM sleep EEG in patients with Alzheimer disease: a double-blind placebo-controlled study. *Sleep* 2006;29(2):199–205.
28. de Oliveira LC, de Paula Faria D. Pharmacological Approaches to the Treatment of Dementia in Down Syndrome: A Systematic Review of Randomized Clinical Studies. *Molecules* 2022;27(10):3244.

29. ADLARITY®. [pristupljeno: 17. ožujak 2023.]. ADLARITY® (donepezil transdermal system). Preuzeto s: <https://www.adlarity.com/>
30. Adlimoghaddam A, Neuendorff M, Roy B, Albeni BC. A review of clinical treatment considerations of donepezil in severe Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 2018;24(10):876–88.
31. Donepezil za osobe s demencijom uzrokovanom Alzheimerovom bolešću. [pristupljeno: 19. lipanj 2023.]. Preuzeto s: [https://www.cochrane.org/hr/CD001190/DEMENTIA\\_donepezil-za-osobe-s-demencijom-uzrokovanom-alzheimerovom-bolescu](https://www.cochrane.org/hr/CD001190/DEMENTIA_donepezil-za-osobe-s-demencijom-uzrokovanom-alzheimerovom-bolescu)
32. Zhao ZQ, Chen BZ, Zhang XP, Zheng H, Guo XD. An Update on the Routes for the Delivery of Donepezil. *Mol Pharmaceutics* 2021;18(7):2482–94.
33. Espinoza LC, Silva-Abreu M, Clares B, Rodríguez-Lagunas MJ, Halbaut L, Cañas MA, et al. Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil. *Pharmaceutics* 2019;11(2):E64.
34. Pardridge WM. A Historical Review of Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2022;14(6):1283.
35. Ampie L, McGavern DB. Immunological defense of CNS barriers against infections. *Immunity* 2022;55(5):781–99.
36. Greenberg RW, Lane EL, Cinnamon J, Farmer P, Hyman RA. The cranial meninges: anatomic considerations. *Semin Ultrasound CT MR* 1994;15(6):454–65.
37. Djupesland PG, Messina JC, Mahmoud RA. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Ther Deliv* 2014;5(6):709–33.
38. Hossain S, Akaike T, Chowdhury EH. Current approaches for drug delivery to central nervous system. *Curr Drug Deliv* 2010;7(5):389–97.
39. Pardridge WM. CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2016;13(7):963–75.
40. Wong KH, Riaz MK, Xie Y, Zhang X, Liu Q, Chen H, et al. Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci* 2019;20(2):381.
41. Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 201.;64(7):640–65.
42. Jug M, Bećirević-Laćan M. Transport lijekova iz nosne šupljine u mozak. *Farmaceutski glasnik* 2007;63(11):649–58.
43. Djupesland PG. Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective-a review. *Drug Deliv Transl Res* 2013;3(1):42–62.



44. Giunchedi P, Gavini E, Bonferoni MC. Nose-to-Brain Delivery. *Pharmaceutics* 2020;12(2):E138.
45. Jeong SH, Jang JH, Lee YB. Drug delivery to the brain via the nasal route of administration: exploration of key targets and major consideration factors. *J Pharm Investig* 2023;53(1):119–52.
46. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 12th Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier Ltd.; 2011.
47. Paulsen J, Wachke F, urednici. *Sobotta Atlas of Human Anatomy: Head, Neck and Neuroanatomy*. 15th Ed. Munich: Urban & Fischer, Elsevier GmbH; 2010.
48. Keros P, Pećina M. *Temelji anatomije čovjeka*. Zagreb: Medicinska naklada; 1992.
49. Lee D, Minko T. Nanotherapeutics for Nose-to-Brain Drug Delivery: An Approach to Bypass the Blood Brain Barrier. *Pharmaceutics* 2021;13(12):2049.
50. Gänger S, Schindowski K. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics* 2018;10(3):E116.
51. Shang Y, Inthavong K, Qiu D, Singh N, He F, Tu J. Prediction of nasal spray drug absorption influenced by mucociliary clearance. *PLoS One* 2021;16(1):e0246007.
52. Patel RG. Nasal Anatomy and Function. *Facial Plast Surg* 2017;33(1):3–8.
53. Sahin-Yilmaz A, Naclerio RM. Anatomy and physiology of the upper airway. *Proc Am Thorac Soc* 2011;8(1):31–9.
54. Trevino J, Quispe R, Khan F, Novak V. Non-Invasive Strategies for Nose-to-Brain Drug Delivery. *J Clin Trials* 2020;10(7):439.
55. Jalšovec D. *Sustavna i topografska anatomija čovjeka*. 1. izd. Zagreb: Školska knjiga d.d.; 2005.
56. Krinke GJ, Weber K. Chapter 2.3 - Histology. U: Hedrich HJ, urednik. *The Laboratory Mouse (Second Edition)*. Boston: Academic Press; 2012 [pristupljeno: 14. rujan 2023.]. str. 161–92. Preuzeto s: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123820082000088>
57. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64(7):614–28.
58. Bourganis V, Kammona O, Alexopoulos A, Kiparissides C. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* 2018;128:337–62.
59. Merkus FW, Verhoef JC, Schipper NG, Martin E. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;29(1–2):13–38.

60. Berillo D, Zharkinbekov Z, Kim Y, Raziyeva K, Temirkhanova K, Saparov A. Stimuli-Responsive Polymers for Transdermal, Transmucosal and Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2021;13(12):2050.
61. Zanin M, Baviskar P, Webster R, Webby R. The interaction between respiratory pathogens and mucus. *Cell host & microbe* 2016;19(2):159.
62. Scherzad A, Hagen R, Hackenberg S. Current Understanding of Nasal Epithelial Cell Mis-Differentiation. *J Inflamm Res* 2019;12:309–17.
63. Choi R, Goldstein BJ. Olfactory epithelium: Cells, clinical disorders, and insights from an adult stem cell niche. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2018;3(1):35–42.
64. Maigler F, Ladel S, Flamm J, Gänger S, Kurpiers B, Kiderlen S, et al. Selective CNS Targeting and Distribution with a Refined Region-Specific Intranasal Delivery Technique via the Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics* 2021;13(11):1904.
65. Lindsay SL, McCanney GA, Willison AG, Barnett SC. Multi-target approaches to CNS repair: olfactory mucosa-derived cells and heparan sulfates. *Nat Rev Neurol* 2020;16(4):229–40.
66. Brunner J, Ragupathy S, Borchard G. Target specific tight junction modulators. *Adv Drug Deliv Rev* 2021;171:266–88.
67. Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci* 2018;195:44–52.
68. Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci* 2000;11(1):1–18.
69. Charlton ST, Davis SS, Illum L. Nasal administration of an angiotensin antagonist in the rat model: effect of bioadhesive formulations on the distribution of drugs to the systemic and central nervous systems. *Int J Pharm* 2007;338(1–2):94–103.
70. Charlton ST, Whetstone J, Fayinka ST, Read KD, Illum L, Davis SS. Evaluation of direct transport pathways of glycine receptor antagonists and an angiotensin antagonist from the nasal cavity to the central nervous system in the rat model. *Pharm Res* 2008.;25(7):1531–43.
71. Si XA, Xi J, Kim J, Zhou Y, Zhong H. Modeling of release position and ventilation effects on olfactory aerosol drug delivery. *Respir Physiol Neurobiol* 2013;186(1):22–32.
72. Shringarpure M, Gharat S, Momin M, Omri A. Management of epileptic disorders using nanotechnology-based strategies for nose-to-brain drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2021;18(2):169–85.
73. Pardeshi CV, Belgamwar VS. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv* 2013;10(7):957–72.
74. Hosseini S, Wei X, Wilkins JV, Fergusson CP, Mohammadi R, Vorona G, et al. In Vitro Measurement of Regional Nasal Drug Delivery with Flonase,<sup>®</sup> Flonase<sup>®</sup> Sensimist,<sup>™</sup>

- and MAD Nasal<sup>TM</sup> in Anatomically Correct Nasal Airway Replicas of Pediatric and Adult Human Subjects. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2019;32(6):374–85.
75. Xi J, Yuan JE, Zhang Y, Nevorski D, Wang Z, Zhou Y. Visualization and Quantification of Nasal and Olfactory Deposition in a Sectional Adult Nasal Airway Cast. *Pharm Res* 2016;33(6):1527–41.
  76. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci* 2010;99(4):1654–73.
  77. Scherließ R. Nasal formulations for drug administration and characterization of nasal preparations in drug delivery. *Therapeutic Delivery* 2020;11(3):183–91.
  78. Gao M, Shen X, Mao S. Factors influencing drug deposition in the nasal cavity upon delivery via nasal sprays. *J Pharm Investig* 2020;50(3):251–9.
  79. Karavasili C, Fatouros DG. Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery. *Drug Discov Today* 2016;21(1):157–66.
  80. Tiozzo Fasiolo L, Manniello MD, Tratta E, Buttini F, Rossi A, Sonvico F, et al. Opportunity and challenges of nasal powders: Drug formulation and delivery. *Eur J Pharm Sci* 2018;113:2–17.
  81. Cunha S, Forbes B, Sousa Lobo JM, Silva AC. Improving Drug Delivery for Alzheimer’s Disease Through Nose-to-Brain Delivery Using Nanoemulsions, Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and in situ Hydrogels. *Int J Nanomedicine* 2021;16:4373–90.
  82. Henriques P, Fortuna A, Doktorovová S. Spray dried powders for nasal delivery: Process and formulation considerations. *Eur J Pharm Biopharm* 2022;176:1–20.
  83. HALMED. [pristupljeno: 02. srpanj 2023.]. Baqsimi - Baza lijekova | Lijekovi : HALMED. Preuzeto s: <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Baqsimi/15716/>
  84. Martin V, Hoekman J, Aurora SK, Shrewsbury SB. Nasal Delivery of Acute Medications for Migraine: The Upper Versus Lower Nasal Space. *J Clin Med* 2021;10(11):2468.
  85. Giuliani A, Balducci AG, Zironi E, Colombo G, Bortolotti F, Lorenzini L, et al. In vivo nose-to-brain delivery of the hydrophilic antiviral ribavirin by microparticle agglomerates. *Drug Deliv* 2018;25(1):376–87.
  86. Rassa G, Soddu E, Cossu M, Brundu A, Cerri G, Marchetti N, et al. Solid microparticles based on chitosan or methyl- $\beta$ -cyclodextrin: a first formulative approach to increase the nose-to-brain transport of deferoxamine mesylate. *J Control Release* 2015;201:68–77.
  87. Trows S, Scherließ R. Carrier-based dry powder formulation for nasal delivery of vaccines utilizing BSA as model drug. *Powder Technology* 2016;292:223–31.
  88. Ugwoke MI, Agu RU, Verbeke N, Kinget R. Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57(11):1640–65.

89. Illum L. Nasal drug delivery - recent developments and future prospects. *J Control Release* 2012;161(2):254–63.
90. Kaur A, Nigam K, Bhatnagar I, Sukhpal H, Awasthy S, Shankar S, et al. Treatment of Alzheimer's diseases using donepezil nanoemulsion: an intranasal approach. *Drug Deliv Transl Res* 2020;10(6):1862–75.
91. Casettari L, Illum L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *J Control Release* 2014;190:189–200.
92. Kaur G, Goyal J, Behera PK, Devi S, Singh SK, Garg V, et al. Unraveling the role of chitosan for nasal drug delivery systems: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2023;5:100316.
93. Romić MD, Klarić MŠ, Lovrić J, Pepić I, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J, et al. Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as in situ forming hydrogel: An innovative antimicrobial wound dressing. *Eur J Pharm Biopharm* 2016;107:67–79.
94. Shim S, Yoo HS. The Application of Mucoadhesive Chitosan Nanoparticles in Nasal Drug Delivery. *Marine Drugs* 2020;18(12):605.
95. Araujo VHS, de Souza MPC, Carvalho GC, Duarte JL, Chorilli M. Chitosan-based systems aimed at local application for vaginal infections. *Carbohydrate Polymers* 2021;261:117919.
96. Silva MM, Calado R, Marto J, Bettencourt A, Almeida AJ, Gonçalves LMD. Chitosan Nanoparticles as a Mucoadhesive Drug Delivery System for Ocular Administration. *Mar Drugs* 2017;15(12):370.
97. Ma J, Wang Y, Lu R. Mechanism and Application of Chitosan and Its Derivatives in Promoting Permeation in Transdermal Drug Delivery Systems: A Review. *Pharmaceuticals* 2022;15(4):459.
98. Salade L, Wauthoz N, Goole J, Amighi K. How to characterize a nasal product. The state of the art of in vitro and ex vivo specific methods. *Int J Pharm* 2019;561:47–65.
99. M. Ways TM, Lau WM, Khutoryanskiy VV. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers* 2018;10(3):267.
100. Yeh TH, Hsu LW, Tseng MT, Lee PL, Sonjae K, Ho YC, et al. Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. *Biomaterials* 2011;32(26):6164–73.
101. Hsu LW, Lee PL, Chen CT, Mi FL, Juang JH, Hwang SM, et al. Elucidating the signaling mechanism of an epithelial tight-junction opening induced by chitosan. *Biomaterials* 2012;33(26):6254–63.
102. Manda P, Hargett JK, Vaka SRK, Repka MA, Murthy SN. Delivery of cefotaxime to the brain via intranasal administration. *Drug Dev Ind Pharm* 2011;37(11):1306–10.
103. Vaka SRK, Murthy SN, Balaji A, Repka MA. Delivery of Brain Derived Neurotrophic Factor via Nose to Brain Pathway. *Pharmaceutical research* 2012;29(2):441.

104. Bhavna, Md S, Ali M, Ali R, Bhatnagar A, Baboota S, et al. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: In vitro and in vivo safety evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules* 2014;67:418–25.
105. Khan S, Patil K, Bobade N, Yeole P, Gaikwad R. Formulation of intranasal mucoadhesive temperature-mediated in situ gel containing ropinirole and evaluation of brain targeting efficiency in rats. *J Drug Target* 2010;18(3):223–34.
106. Perez AP, Mundiña-Weilenmann C, Romero EL, Morilla MJ. Increased brain radioactivity by intranasal 32P-labeled siRNA dendriplexes within in situ-forming mucoadhesive gels. *Int J Nanomedicine* 2012;7:1373–85.
107. Bshara H, Osman R, Mansour S, El-Shamy AEHA. Chitosan and cyclodextrin in intranasal microemulsion for improved brain bupirone hydrochloride pharmacokinetics in rats. *Carbohydr Polym* 2014;99:297–305.
108. Haque S, Md S, Fazil M, Kumar M, Sahni JK, Ali J, et al. Venlafaxine loaded chitosan NPs for brain targeting: pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Carbohydr Polym* 2012;89(1):72–9.
109. Md S, Khan RA, Mustafa G, Chuttani K, Baboota S, Sahni JK, et al. Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: pharmacodynamic, pharmacokinetic and scintigraphy study in mice model. *Eur J Pharm Sci* 2013;48(3):393–405.
110. Sun Y, Shi K, Wan F, Cui F de. Methotrexate-loaded microspheres for nose to brain delivery: in vitro/in vivo evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2012;22(2):167–74.
111. Rassu G, Soddu E, Cossu M, Gavini E, Giunchedi P, Dalpiaz A. Particulate formulations based on chitosan for nose-to-brain delivery of drugs. A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2016.;32:77–87.
112. Oh JW, Shin J, Chun S, Muthu M, Gopal J. Evaluating the Anticarcinogenic Activity of Surface Modified/Functionalized Nanochitosan: The Emerging Trends and Endeavors. *Polymers* 2021;13(18):3138.
113. Watts P, Smith A, Hinchcliffe M. ChiSys® as a Chitosan-Based Delivery Platform for Nasal Vaccination. *U: Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals: Biology, Challenges and Strategies*. 2014. str. 499–516.
114. Kalman H. Effect of moisture content on flowability: Angle of repose, tilting angle, and Hausner ratio. *Powder Technology* 2021;393:582–96.
115. Taylor KMG, Aulton ME, urednici. *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. 6th ed. Churchill Livingstone;
116. Jüptner A, Scherließ R. Spray Dried Formulations for Inhalation-Meaningful Characterisation of Powder Properties. *Pharmaceutics* 2019;12(1):14.

117. Kaialy W, Martin GP, Ticehurst MD, Momin MN, Nokhodchi A. The enhanced aerosol performance of salbutamol from dry powders containing engineered mannitol as excipient. *Int J Pharm* 2010;392(1–2):178–88.
118. Hertel N, Birk G, Scherließ R. Particle engineered mannitol for carrier-based inhalation - A serious alternative? *Int J Pharm* 2020;577:118901.
119. EMA. European Medicines Agency. 2018 [pristupljeno: 03. svibanj 2022.]. Pharmaceutical quality of inhalation and nasal products. Preuzeto s: <https://www.ema.europa.eu/en/pharmaceutical-quality-inhalation-nasal-products>
120. Buttini F, Colombo P, Rossi A, Sonvico F, Colombo G. Particles and powders: tools of innovation for non-invasive drug administration. *J Control Release* 2012;161(2):693–702.
121. Newman SP, Pitcairn GR, Dalby RN. Drug delivery to the nasal cavity: in vitro and in vivo assessment. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2004;21(1):21–66.
122. Marx D, Williams G, Birkhoff M, Marx D, Williams G, Birkhoff M. Intranasal Drug Administration — An Attractive Delivery Route for Some Drugs. U: *Drug Discovery and Development - From Molecules to Medicine*. IntechOpen; 2015 [pristupljeno: 05. srpanj 2023.]. Preuzeto s: <https://www.intechopen.com/chapters/48052>
123. Salade L, Wauthoz N, Vermeersch M, Amighi K, Goole J. Chitosan-coated liposome dry-powder formulations loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2018;129:257–66.
124. Yarragudi SB, Richter R, Lee H, Walker GF, Clarkson AN, Kumar H, et al. Formulation of olfactory-targeted microparticles with tamarind seed polysaccharide to improve nose-to-brain transport of drugs. *Carbohydr Polym* 2017;163:216–26.
125. Pozzoli M, Rogueda P, Zhu B, Smith T, Young PM, Traini D, et al. Dry powder nasal drug delivery: challenges, opportunities and a study of the commercial Teijin Puvlizer Rhinocort device and formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2016;42(10):1660–8.
126. Etzler FM, Sanderson MS. Particle Size Analysis: A comparative study of various methods. *Particle & Particle Systems Characterization* 1995;12(5):217–24.
127. Zeng XM. Particulate Analysis – Particle Size. U: *Solid State Characterization of Pharmaceuticals*. John Wiley & Sons, Ltd; 2011 [pristupljeno: 13. rujanj 2023.]. str. 387–425. Preuzeto s: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470656792.ch11>
128. Vehring R. Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. *Pharm Res* 2008;25(5):999–1022.
129. Trenkel M, Scherließ R. Nasal Powder Formulations: In-Vitro Characterisation of the Impact of Powders on Nasal Residence Time and Sensory Effects. *Pharmaceutics*. 2021;13(3):385.
130. Spray dried powders for nasal application - Influence of particle morphology and filling process on aerosol generation. DDL. [pristupljeno: 04. srpanj 2023.]. Preuzeto s:

<https://ddl-conference.com/ddl2018/conference-papers/spray-dried-powders-for-nasal-application-influence-of-particle-morphology-and-filling-process-on-aerosol-generation/>

131. Jurišić Dukovski B, Mrak L, Winnicka K, Szekalska M, Juretić M, Filipović-Grčić J, et al. Spray-dried nanoparticle-loaded pectin microspheres for dexamethasone nasal delivery. *Drying Technology* 2019;37(15):1915–25.
132. Nouri A, Sola A. Powder morphology in thermal spraying. *Journal of Advanced Manufacturing and Processing* 2019;1(3):e10020.
133. Wang Z, Wang H, Vehring R. Leucine enhances the dispersibility of trehalose-containing spray-dried powders on exposure to a high-humidity environment. *Int J Pharm* 2021;601:120561.
134. Bottom R. *Thermogravimetric Analysis. U: Principles and Applications of Thermal Analysis*. John Wiley & Sons, Ltd; 2008 [pristupljeno: 15. srpanj 2023.]. str. 87–118. Preuzeto s: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470697702.ch3>
135. Ziaee A, Albadarin AB, Padrela L, Femmer T, O'Reilly E, Walker G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *Eur J Pharm Sci* 2019;127:300–18.
136. de Souza Lima R, Ré MI, Arlabosse P. Drying droplet as a template for solid formation: A review. *Powder Technology* 2020;359:161–71.
137. Singh A, Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;100:27–50.
138. Sun Y, Cui F, Shi K, Wang J, Niu M, Ma R. The effect of chitosan molecular weight on the characteristics of spray-dried methotrexate-loaded chitosan microspheres for nasal administration. *Drug Dev Ind Pharm* 2009;35(3):379–86.
139. Ferdynand MS, Nokhodchi A. Co-spraying of carriers (mannitol-lactose) as a method to improve aerosolization performance of salbutamol sulfate dry powder inhaler. *Drug Deliv Transl Res* 2020;10(5):1418–27.
140. *Spray-Drying Basic theory & applications* | Buchi.com. [pristupljeno: 05. srpanj 2023.]. Preuzeto s: <https://www.buchi.com/en/knowledge/applications/spray-drying-basic-theory-applications>
141. Hede PD, Bach P, Jensen AD. Two-fluid spray atomisation and pneumatic nozzles for fluid bed coating/agglomeration purposes: A review. *Chemical Engineering Science* 2008;63(14):3821–42.
142. Miller D, Ellenberger D, Gil M. *Spray-Drying Technology. U: AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series* 2016. str. 437–525.
143. Trows S, Wuchner K, Spycher R, Steckel H. Analytical challenges and regulatory requirements for nasal drug products in europe and the u.s. *Pharmaceutics* 2014;6(2):195–219.

144. Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Amidžić Klarić D, Jakobušić Brala C, Perkušić M, et al. A Dry Powder Platform for Nose-to-Brain Delivery of Dexamethasone: Formulation Development and Nasal Deposition Studies. *Pharmaceutics* 2021;13(6):795.
145. O’Sullivan JJ, Norwood EA, O’Mahony JA, Kelly AL. Atomisation technologies used in spray drying in the dairy industry: A review. *Journal of Food Engineering* 2019;243:57–69.
146. Khaire RA, Gogate PR. Novel approaches based on ultrasound for spray drying of food and bioactive compounds. *Drying Technology* 2021;39(12):1832–53.
147. Ziaee A, Albadarin AB, Padrela L, Ung MT, Femmer T, Walker G, i ostali. A rational approach towards spray drying of biopharmaceuticals: The case of lysozyme. *Powder Technology* 2020;366:206–15.
148. Nižić L, Ugrina I, Špoljarić D, Saršon V, Kučuk MS, Pepić I, et al. Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition. *Int J Pharm* 2019;563:445–56.
149. Kolawole OM, Cook MT. In situ gelling drug delivery systems for topical drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2023;184:36–49.
150. Foxman EF, Storer JA, Fitzgerald ME, Wasik BR, Hou L, Zhao H, et al. Temperature-dependent innate defense against the common cold virus limits viral replication at warm temperature in mouse airway cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(3):827–32.
151. Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Dubey SK, Puri A, Gupta U, et al. Stimuli-responsive In situ gelling system for nose-to-brain drug delivery. *J Control Release* 2020;327:235–65.
152. Gholizadeh H, Cheng S, Pozzoli M, Messerotti E, Traini D, Young P, et al. Smart thermosensitive chitosan hydrogel for nasal delivery of ibuprofen to treat neurological disorders. *Expert Opin Drug Deliv* 2019;16(4):453–66.
153. Duan X, Mao S. New strategies to improve the intranasal absorption of insulin. *Drug Discov Today* 2010;15(11–12):416–27.
154. Supper S, Anton N, Seidel N, Riemenschnitter M, Curdy C, Vandamme T. Thermosensitive chitosan/glycerophosphate-based hydrogel and its derivatives in pharmaceutical and biomedical applications. *Expert Opin Drug Deliv* 2014;11(2):249–67.
155. Supper S, Anton N, Seidel N, Riemenschnitter M, Schoch C, Vandamme T. Rheological study of chitosan/polyol-phosphate systems: influence of the polyol part on the thermo-induced gelation mechanism. *Langmuir* 2013;29(32):10229–37.
156. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials.* 2000;21(21):2155–61.
157. Zhou HY, Jiang LJ, Cao PP, Li JB, Chen XG. Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. *Carbohydr Polym* 2015;117:524–36.



158. Rahmanian-Devin P, Baradaran Rahimi V, Askari VR. Thermosensitive Chitosan- $\beta$ -Glycerophosphate Hydrogels as Targeted Drug Delivery Systems: An Overview on Preparation and Their Applications. *Adv Pharmacol Pharm Sci* 2021;2021:6640893.
159. Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. *Farmaceutika*. Zagreb: Školska knjiga d.d.; 1998.
160. Dayal P, Shaik MS, Singh M. Evaluation of different parameters that affect droplet-size distribution from nasal sprays using the Malvern Spraytec. *J Pharm Sci* 2004;93(7):1725–42.
161. Deruyver L, Rigaut C, Lambert P, Haut B, Goole J. The importance of pre-formulation studies and of 3D-printed nasal casts in the success of a pharmaceutical product intended for nose-to-brain delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2021;175:113826.
162. Mezger T. *The Rheology Handbook For users of rotational and oscillatory rheometers*. 2nd ed. Hanover: Vincentz Network; 2006.
163. Maaz A, Blagbrough IS, De Bank PA. In Vitro Evaluation of Nasal Aerosol Depositions: An Insight for Direct Nose to Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2021;13(7):1079.
164. Kolawole OM, Lau WM, Khutoryanskiy VV. Chitosan/ $\beta$ -glycerophosphate in situ gelling mucoadhesive systems for intravesical delivery of mitomycin-C. *International Journal of Pharmaceutics: X* 2019;1:100007.
165. Foo MY, Cheng YS, Su WC, Donovan MD. The influence of spray properties on intranasal deposition. *J Aerosol Med* 2007;20(4):495–508.
166. Party P, Bartos C, Farkas Á, Szabó-Révész P, Ambrus R. Formulation and In Vitro and In Silico Characterization of „Nano-in-Micro“ Dry Powder Inhalers Containing Meloxicam. *Pharmaceutics* 2021;13(2):211.
167. Kundoor V, Dalby RN. Effect of formulation- and administration-related variables on deposition pattern of nasal spray pumps evaluated using a nasal cast. *Pharm Res* 2011;28(8):1895–904.
168. Pu Y, Goodey AP, Fang X, Jacob K. A Comparison of the Deposition Patterns of Different Nasal Spray Formulations Using a Nasal Cast. *Aerosol Science and Technology* 2014;48(9):930–8.
169. Moraga-Espinoza D, Warnken Z, Moore A, Williams RO, Smyth HDC. A modified USP induction port to characterize nasal spray plume geometry and predict turbinate deposition under flow. *Int J Pharm* 2018;548(1):305–13.
170. Guo Y, Laube B, Dalby R. The effect of formulation variables and breathing patterns on the site of nasal deposition in an anatomically correct model. *Pharm Res* 2005;22(11):1871–8.
171. Raja IS, Fathima NN. Porosity and dielectric properties as tools to predict drug release trends from hydrogels. *Springerplus* 2014;3:393.

172. Varghese JS, Chellappa N, Fathima NN. Gelatin-carrageenan hydrogels: role of pore size distribution on drug delivery process. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;113:346–51.
173. Jug M, Hafner A, Lovrić J, Kregar ML, Pepić I, Vanić Ž, et al. An overview of in vitro dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. *J Pharm Biomed Anal* 2018.;147:350–66.
174. Balzus B, Colombo M, Sahle FF, Zoubari G, Staufenbiel S, Bodmeier R. Comparison of different in vitro release methods used to investigate nanocarriers intended for dermal application. *Int J Pharm* 2016;513(1–2):247–54.
175. Nižić Nodilo L, Perkušić M, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Amidžić Klarić D, i ostali. In situ gelling nanosuspension as an advanced platform for fluticasone propionate nasal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2022;175:27–42.
176. Dong J, Shang Y, Inthavong K, Tu J, Chen R, Bai R, et al. From the Cover: Comparative Numerical Modeling of Inhaled Nanoparticle Deposition in Human and Rat Nasal Cavities. *Toxicological Sciences* 2016;152(2):284–96.
177. Illum L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 2003;87(1–3):187–98.
178. Djupesland PG, Messina JC, Mahmoud RA. Role of nasal casts for in vitro evaluation of nasal drug delivery and quantitative evaluation of various nasal casts. *Ther Deliv* 2020;11(8):485–95.
179. Forbes B, Bommer R, Goole J, Hellfritzsich M, De Kruijf W, Lambert P, et al. A consensus research agenda for optimising nasal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2020;17(2):127–32.
180. Wang DY, Lee HP, Gordon BR. Impacts of Fluid Dynamics Simulation in Study of Nasal Airflow Physiology and Pathophysiology in Realistic Human Three-Dimensional Nose Models. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2012;5(4):181–7.
181. Warnken ZN, Smyth HDC, Davis DA, Weitman S, Kuhn JG, Williams RO. Personalized Medicine in Nasal Delivery: The Use of Patient-Specific Administration Parameters To Improve Nasal Drug Targeting Using 3D-Printed Nasal Replica Casts. *Mol Pharm* 2018;15(4):1392–402.
182. Xi J, Wang Z, Nevorski D, White T, Zhou Y. Nasal and Olfactory Deposition with Normal and Bidirectional Intranasal Delivery Techniques: In Vitro Tests and Numerical Simulations. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2017;30(2):118–31.
183. Nižić L, Potaš J, Winnicka K, Szekalska M, Erak I, Gretić M, et al. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres. *Eur J Pharm Sci* 2020;141:105115.
184. Kundoor V, Dalby RN. Assessment of nasal spray deposition pattern in a silicone human nose model using a color-based method. *Pharm Res* 2010;27(1):30–6.

185. Papadopoulou AM, Chrysikos D, Samolis A, Tsakotos G, Troupis T. Anatomical Variations of the Nasal Cavities and Paranasal Sinuses: A Systematic Review. *Cureus*. 13(1):e12727.
186. Movia D, Di Cristo L, Alnemari R, McCarthy JE, Moustououi H, Lamy de la Chapelle M, i ostali. The curious case of how mimicking physiological complexity in in vitro models of the human respiratory system influences the inflammatory responses. A preliminary study focused on gold nanoparticles. *Journal of Interdisciplinary Nanomedicine* 2017;2(2):110–30.
187. Sibinovska N, Žakelj S, Kristan K. Suitability of RPMI 2650 cell models for nasal drug permeability prediction. *Eur J Pharm Biopharm* 2019;145:85–95.
188. Sinani G, Sessevmez M, Koray Gök M, Özgümüş S, Okyar A, Oya Alpar H, et al. Nasal vaccination with poly( $\beta$ -amino ester)-poly(d,l-lactide-co-glycolide) hybrid nanoparticles. *Int J Pharm* 2017;529(1–2):1–14.
189. Kim SJ, Kim CW. Development and Characterization of Sodium Hyaluronate Microparticle-Based Sustained Release Formulation of Recombinant Human Growth Hormone Prepared by Spray-Drying. *J Pharm Sci* 2016;105(2):613–22.
190. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008;3(7):1125–31.
191. Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol* 2009;29(1):69–78.
192. Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability. [pristupljeno: 04. rujana 2023.]. Preuzeto s: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-reagent-wst-1>
193. Cree IA, Andreotti PE. Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines. *Toxicology in Vitro* 1997;11(5):553–6.
194. Pandey P, Cabot PJ, Wallwork B, Panizza BJ, Parekh HS. Formulation, functional evaluation and ex vivo performance of thermoresponsive soluble gels - A platform for therapeutic delivery to mucosal sinus tissue. *Eur J Pharm Sci* 2017;96:499–507.
195. Colombo G, Bortolotti F, Chiapponi V, Buttini F, Sonvico F, Invernizzi R, et al. Nasal powders of thalidomide for local treatment of nose bleeding in persons affected by hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Int J Pharm* 2016;514(1):229–37.
196. Naik A, Nair H. Formulation and evaluation of thermosensitive biogels for nose to brain delivery of doxepin. *Biomed Res Int* 2014;2014:847547.
197. Basu S, Maity S. Preparation and Characterisation of Mucoadhesive Nasal Gel of Venlafaxine Hydrochloride for Treatment of Anxiety Disorders. *Indian J Pharm Sci* 2012;74(5):428–33.

198. Antunes Viegas D, Rodrigues M, Francisco J, Falcão A, Alves G, Santos AO. Development and application of an ex vivo fosphenytoin nasal bioconversion/permeability evaluation method. *Eur J Pharm Sci* 2016;89:61–72.
199. Kim DD. In Vitro Cellular Models for Nasal Drug Absorption Studies. U: Ehrhardt C, Kim KJ, urednici. *Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models*. Boston, MA: Springer US; 2008 [pristupljeno: 04. rujan 2023.]. str. 216–34. (Biotechnology: Pharmaceutical Aspects). Preuzeto s: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74901-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74901-3_9)
200. Boyuklieva R, Zagorchev P, Pilicheva B. Computational, In Vitro, and In Vivo Models for Nose-to-Brain Drug Delivery Studies. *Biomedicines* 2023;11(8):2198.
201. Sibinovska N, Žakelj S, Trontelj J, Kristan K. Applicability of RPMI 2650 and Calu-3 Cell Models for Evaluation of Nasal Formulations. *Pharmaceutics* 2022;14(2):369.
202. Scherließ R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics* 2011;411(1):98–105.
203. Ihekwereme C, Esimone C, Shao D, Agu RU. Preliminary Studies on Validation of Calu-3 Cell Line as a Model for Screening Respiratory Mucosa Irritation and Toxicity. *Pharmaceutics* 2014;6(2):268–80.
204. Salade L, Wauthoz N, Deleu M, Vermeersch M, De Vriese C, Amighi K, et al. Development of coated liposomes loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery for the treatment of cachexia. *Int J Nanomedicine* 2017;12:8531–43.
205. Sibinovska N, Božič D, Bošković Ribarski M, Kristan K. Prediction of pharmacokinetic studies outcome for locally acting nasal sprays by using different in vitro methods. *Int J Pharm* 2021;601:120569.
206. Teijeiro-Osorio D, Remuñán-López C, Alonso MJ. New generation of hybrid poly/oligosaccharide nanoparticles as carriers for the nasal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules* 2009;10(2):243–9.
207. Fitzgerald KA, Malhotra M, Curtin CM, O’ Brien FJ, O’ Driscoll CM. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J Control Release* 2015;215:39–54.
208. Kulkarni AD, Bari DB, Surana SJ, Pardeshi CV. In vitro, ex vivo and in vivo performance of chitosan-based spray-dried nasal mucoadhesive microspheres of diltiazem hydrochloride. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2016;Complete(31):108–17.
209. Yang J, Dai L, Yu Q, Yang Q. Histological and anatomical structure of the nasal cavity of Bama minipigs. Kincaid AE, urednik. *PLoS ONE* 2017;12(3):e0173902.
210. Lenoir J, Bachert C, Remon JP, Adriaens E. The Slug Mucosal Irritation (SMI) assay: a tool for the evaluation of nasal discomfort. *Toxicol In Vitro* 2013;27(6):1954–61.
211. Adriaens E, Remon JP. Gastropods as an evaluation tool for screening the irritating potency of absorption enhancers and drugs. *Pharm Res* 1999;16(8):1240–4.

212. Adriaens E, Remon JP. Mucosal irritation potential of personal lubricants relates to product osmolality as detected by the slug mucosal irritation assay. *Sex Transm Dis* 2008;35(5):512–6.
213. Martinac A, Filipović-Grčić J, Voinovich D, Perissutti B, Franceschinis E. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2005;291(1):69–77.
214. Sosnowski TR, Rapiejko P, Sova J, Dobrowolska K. Impact of physicochemical properties of nasal spray products on drug deposition and transport in the pediatric nasal cavity model. *Int J Pharm* 2020;574:118911.
215. Xi J, Kim J, Si XA, Corley RA, Zhou Y. Modeling of inertial deposition in scaled models of rat and human nasal airways: Towards in vitro regional dosimetry in small animals. *Journal of Aerosol Science* 2016;99:78–93.
216. Martinac A, Filipović-Grčić J, Perissutti B, Voinovich D, Pavelić Z. Spray-dried chitosan/ethylcellulose microspheres for nasal drug delivery: swelling study and evaluation of in vitro drug release properties. *J Microencapsul* 2005;22(5):549–61.
217. Research C for DE and. U.S. Food and Drug Administration. FDA; 2020 [pristupljeno: 15. ožujak 2023.]. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Nasal Aerosols and Nasal Sprays for Local Action. Preuzeto s: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioavailability-and-bioequivalence-studies-nasal-aerosols-and-nasal-sprays-local-action>
218. Schroeter JD, Tewksbury EW, Wong BA, Kimbell JS. Experimental measurements and computational predictions of regional particle deposition in a sectional nasal model. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2015;28(1):20–9.
219. Bao Q, Zou Y, Wang Y, Kozak D, Choi S, Burgess DJ. Drug release testing of long-acting intrauterine systems. *J Control Release* 2019;316:349–58.
220. Schliecker G, Schmidt C, Fuchs S, Ehinger A, Sandow J, Kissel T. In vitro and in vivo correlation of buserelin release from biodegradable implants using statistical moment analysis. *J Control Release* 2004;94(1):25–37.
221. Fachel FNS, Medeiros-Neves B, Dal Prá M, Schuh RS, Veras KS, Bassani VL, et al. Box-Behnken design optimization of mucoadhesive chitosan-coated nanoemulsions for rosmarinic acid nasal delivery-In vitro studies. *Carbohydr Polym* 2018;199:572–82.
222. Soni V, Pandey V, Tiwari R, Asati S, Tekade RK. Chapter 13 - Design and Evaluation of Ophthalmic Delivery Formulations. U: Tekade RK, urednik. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Academic Press; 2019 [pristupljeno: 15. ožujak 2023.]. str. 473–538. (Advances in Pharmaceutical Product Development and Research). Preuzeto s: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128179093000133>
223. Pappa H, Farrú R, Vilanova PO, Palacios M, Pizzorno MT. A new HPLC method to determine Donepezil hydrochloride in tablets. *J Pharm Biomed Anal* 2002;27(1–2):177–82.

224. EMA. European Medicines Agency. 2018 [pristupčjeno: 01. travanj 2023.]. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline. Preuzeto s: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
225. Nippe S, Preuße C, General S. Evaluation of the in vitro release and pharmacokinetics of parenteral injectable formulations for steroids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2013;83(2):253–65.
226. Blažević F, Milekić T, Romić MD, Juretić M, Pepić I, Filipović-Grčić J, et al. Nanoparticle-mediated interplay of chitosan and melatonin for improved wound epithelialisation. *Carbohydr Polym* 2016;146:445–54.
227. Xi J, Wang Z, Si XA, Zhou Y. Nasal dilation effects on olfactory deposition in unilateral and bi-directional deliveries: In vitro tests and numerical modeling. *Eur J Pharm Sci* 2018;118:113–23.
228. Belgamwar VS, Patel HS, Joshi AS, Agrawal A, Surana SJ, Tekade AR. Design and development of nasal mucoadhesive microspheres containing tramadol HCl for CNS targeting. *Drug Deliv* 2011;18(5):353–60.
229. Rassu G, Ferraro L, Pavan B, Giunchedi P, Gavini E, Dalpiaz A. The Role of Combined Penetration Enhancers in Nasal Microspheres on In Vivo Drug Bioavailability. *Pharmaceutics* 2018;10(4):206.
230. Gavini E, Rassu G, Ferraro L, Beggiano S, Alhalaweh A, Velaga S, et al. Influence of polymeric microcarriers on the in vivo intranasal uptake of an anti-migraine drug for brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;83(2):174–83.
231. Tanaka A, Furubayashi T, Tomisaki M, Kawakami M, Kimura S, Inoue D, et al. Nasal drug absorption from powder formulations: The effect of three types of hydroxypropyl cellulose (HPC). *Eur J Pharm Sci* 2017;96:284–9.
232. Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2012;81(3):463–9.
233. Sou T, Forbes RT, Gray J, Prankerd RJ, Kaminskas LM, McIntosh MP, et al. Designing a multi-component spray-dried formulation platform for pulmonary delivery of biopharmaceuticals: The use of polyol, disaccharide, polysaccharide and synthetic polymer to modify solid-state properties for glassy stabilisation. *Powder Technology* 2016;287:248–55.
234. Grangeia HB, Silva C, Simões SP, Reis MS. Quality by design in pharmaceutical manufacturing: A systematic review of current status, challenges and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm* 2020;147:19–37.
235. Zhang C, Yang L, Wan F, Bera H, Cun D, Rantanen J, et al. Quality by design thinking in the development of long-acting injectable PLGA/PLA-based microspheres for peptide and protein drug delivery. *Int J Pharm* 2020;585:119441.
236. Focaroli S, Mah PT, Hastedt JE, Gitlin I, Oscarson S, Fahy JV, et al. A Design of Experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the

- production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery. *Int J Pharm* 2019;562:228–40.
237. Almansour K, Alfagih IM, Ali R, Elsayed MMA. Inhalable microparticles containing terbinafine for management of pulmonary fungal infections: Spray drying process engineering using lactose vs. mannitol as excipients. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2020;60:101991.
238. Ngan LTK, Wang SL, Hiep ĐM, Luong PM, Vui NT, Đinh TM, et al. Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity. *Res Chem Intermed* 2014;40(6):2165–75.
239. EMA. European Medicines Agency. 2018 [pristupčjeno: 29. kolovoz 2023.]. ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development - Scientific guideline. Preuzeto s: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q8-r2-pharmaceutical-development-scientific-guideline>
240. Goos P, Bradley J. *Optimal Design of Experiments*. 1st ed. Wiley; 2011.
241. Chicco D, Warrens MJ, Jurman G. The coefficient of determination R-squared is more informative than SMAPE, MAE, MAPE, MSE and RMSE in regression analysis evaluation. *PeerJ Comput Sci* 2021;7:e623.
242. Szekalska M, Wróblewska M, Sosnowska K, Winnicka K. Influence of Sodium Alginate on Hypoglycemic Activity of Metformin Hydrochloride in the Microspheres Obtained by the Spray Drying. *International Journal of Polymer Science* 2016;2016:e8635408.
243. Uyen NTT, Hamid ZAA, Tram NXT, Ahmad N. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review. *Int J Biol Macromol* 2020;153:1035–46.
244. Wolska E. Fine powder of lipid microparticles – spray drying process development and optimization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2021;64:102640.
245. Bordón MG, Alasino NPX, Martínez V, Gauna Peter R, Iturralde R, Ribotta PD, et al. Influence of the spray drying operating conditions on the estimated drying kinetics of emulsion single droplets and the properties of microencapsulated chia oil. *Powder Technology* 2021;383:302–17.
246. Shahin HI, Vinjamuri BP, Mahmoud AA, Shamma RN, Mansour SM, Ammar HO, et al. Design and evaluation of novel inhalable sildenafil citrate spray-dried microparticles for pulmonary arterial hypertension. *Journal of Controlled Release* 2019;302:126–39.
247. Patil S, Pandit A, Godbole A, Dandekar P, Jain R. Chitosan based co-processed excipient for improved tableting. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2021;2:100071.
248. Both EM, Boom RM, Schutyser MAI. Particle morphology and powder properties during spray drying of maltodextrin and whey protein mixtures. *Powder Technology* 2020;363:519–24.
249. Liu LX, Marziano I, Bentham AC, Litster JD, White ET, Howes T. Effect of particle properties on the flowability of ibuprofen powders. *Int J Pharm* 2008;362(1–2):109–17.

250. Sandler N, Reiche K, Heinämäki J, Yliruusi J. Effect of Moisture on Powder Flow Properties of Theophylline. *Pharmaceutics* 2010;2(3):275–90.
251. Perkušić M, Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Pepić I, et al. Tailoring functional spray-dried powder platform for efficient donepezil nose-to-brain delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2022;624:122038.
252. Wingrove J, Swedrowska M, Scherließ R, Parry M, Ramjeeawon M, Taylor D, et al. Characterisation of nasal devices for delivery of insulin to the brain and evaluation in humans using functional magnetic resonance imaging. *J Control Release* 2019;302:140–7.
253. Laffleur F, Bauer B. Progress in nasal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 2021;607:120994.
254. Le Guellec S, Ehrmann S, Vecellio L. In vitro - in vivo correlation of intranasal drug deposition. *Adv Drug Deliv Rev* 2021;170:340–52.
255. Möller W, Schuschnig U, Celik G, Münzing W, Bartenstein P, Häussinger K, et al. Topical drug delivery in chronic rhinosinusitis patients before and after sinus surgery using pulsating aerosols. *PLoS One* 2013;8(9):e74991.
256. Yasue M, Sugiura S, Uchida Y, Otake H, Teranishi M, Sakurai T, et al. Prevalence of Sinusitis Detected by Magnetic Resonance Imaging in Subjects with Dementia or Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 2015;12(10):1006–11.
257. Djupesland PG, Messina JC, Mahmoud RA. Role of nasal casts for in vitro evaluation of nasal drug delivery and quantitative evaluation of various nasal casts. *Ther Deliv* 2020;11(8):485–95.
258. Li X, Guo Q, Zheng X, Kong X, Shi S, Chen L, et al. Preparation of honokiol-loaded chitosan microparticles via spray-drying method intended for pulmonary delivery. *Drug Deliv* 2009;16(3):160–6.
259. Soane RJ, Hinchcliffe M, Davis SS, Illum L. Clearance characteristics of chitosan based formulations in the sheep nasal cavity. *Int J Pharm* 2001;217(1–2):183–91.
260. Liu C, Desai KGH, Tang X, Chen X. Drug Release Kinetics of Spray-Dried Chitosan Microspheres. *Drying Technology* 2006;24(6):769–76.
261. Akel H, Csóka I, Ambrus R, Bocsik A, Gróf I, Mészáros M, et al. In Vitro Comparative Study of Solid Lipid and PLGA Nanoparticles Designed to Facilitate Nose-to-Brain Delivery of Insulin. *International Journal of Molecular Sciences* 2021.;22(24):13258.
262. de Souza IFF, Dos Santos TQ, Placido RV, Mangerona BA, Carvalho FC, Boralli VB, et al. The liquid crystalline phase behaviour of a nasal formulation modifies the brain disposition of donepezil in rats in the treatment of Alzheimer's disease. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2021;203:111721.
263. Ladel S, Schlossbauer P, Flamm J, Luksch H, Mizaikoff B, Schindowski K. Improved In Vitro Model for Intranasal Mucosal Drug Delivery: Primary Olfactory and Respiratory



- Epithelial Cells Compared with the Permanent Nasal Cell Line RPMI 2650. *Pharmaceutics* 2019;11(8):367.
264. Bravo-Osuna I, Vauthier C, Farabollini A, Palmieri GF, Ponchel G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials* 2007;28(13):2233–43.
265. Guerini M, Condrò G, Perugini P. Evaluation of the Mucoadhesive Properties of Chitosan-Based Microstructured Lipid Carrier (CH-MLC). *Pharmaceutics* 2022;14(1):170.
266. Kou SG, Peters L, Mucalo M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. *Carbohydr Polym* 2022;282:119132.
267. Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grcić J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm* 2009;381(2):205–13.
268. Sibinovska N, Žakelj S, Roškar R, Kristan K. Suitability and functional characterization of two Calu-3 cell models for prediction of drug permeability across the airway epithelial barrier. *Int J Pharm* 2020;585:119484.
269. Ong HX, Traini D, Young PM. Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line. *Expert Opin Drug Deliv* 2013;10(9):1287–302.
270. Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Amidžić Klarić D, Jakobušić Brala C, Perkušić M, et al. A Dry Powder Platform for Nose-to-Brain Delivery of Dexamethasone: Formulation Development and Nasal Deposition Studies. *Pharmaceutics* 2021;13(6):795.
271. Zhang L, Du SY, Lu Y, Liu C, Tian ZH, Yang C, et al. Puerarin transport across a Calu-3 cell monolayer – an in vitro model of nasal mucosa permeability and the influence of paeoniflorin and menthol. *Drug Des Devel Ther* 2016;10:2227–37.
272. Veszelka S, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, Gróf I, Mészáros M, et al. Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Front Mol Neurosci* 2018;11:166.
273. Di L, Kerns EH, Bezar IF, Petusky SL, Huang Y. Comparison of blood-brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *J Pharm Sci* 2009;98(6):1980–91.
274. di Cagno M, Bibi HA, Bauer-Brandl A. New biomimetic barrier Permeapad™ for efficient investigation of passive permeability of drugs. *Eur J Pharm Sci* 2015;73:29–34.
275. Furubayashi T, Inoue D, Nishiyama N, Tanaka A, Yutani R, Kimura S, et al. Comparison of Various Cell Lines and Three-Dimensional Mucociliary Tissue Model Systems to Estimate Drug Permeability Using an In Vitro Transport Study to Predict Nasal Drug Absorption in Rats. *Pharmaceutics* 2020;12(1):79.
276. Ventura CA, Tommasini S, Crupi E, Giannone I, Cardile V, Musumeci T, et al. Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: interaction with

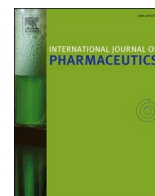
- biomembrane models and in vitro permeation studies. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;68(2):235–44.
277. Munir M, Kett VL, Dunne NJ, McCarthy HO. Development of a Spray-Dried Formulation of Peptide-DNA Nanoparticles into a Dry Powder for Pulmonary Delivery Using Factorial Design. *Pharm Res* 202.;39(6):1215–32.
278. Sinsuebpol C, Chatchawalsaisin J, Kulvanich P. Preparation and in vivo absorption evaluation of spray dried powders containing salmon calcitonin loaded chitosan nanoparticles for pulmonary delivery. *Drug Des Devel Ther* 2013;7:861–73.
279. Formica ML, Real DA, Picchio ML, Catlin E, Donnelly RF, Paredes AJ. On a highway to the brain: A review on nose-to-brain drug delivery using nanoparticles. *Applied Materials Today* 2022;29:101631.
280. Pandey V, Gadeval A, Asati S, Jain P, Jain N, Roy RK, et al. Formulation strategies for nose-to-brain delivery of therapeutic molecules. *U Elsevier*; 2020 [pristupljeno: 12. ožujak 2023.]. str. 291–332. Preuzeto s: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128144879000077>
281. Al Asmari AK, Ullah Z, Tariq M, Fatani A. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of intranasally administered liposomal formulation of donepezil. *Drug Des Devel Ther* 2016;10:205–15.
282. Gu F, Fan H, Cong Z, Li S, Wang Y, Wu C. Preparation, characterization, and in vivo pharmacokinetics of thermosensitive in situ nasal gel of donepezil hydrochloride. *Acta Pharm* 2020;70(3):411–22.
283. Espinoza LC, Vacacela M, Clares B, Garcia ML, Fabrega MJ, Calpena AC. Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer's Disease: in vitro and ex vivo Characterization. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2018;17(1):43–53.
284. Kaur P, Garg T, Rath G, Goyal AK. In situ nasal gel drug delivery: A novel approach for brain targeting through the mucosal membrane. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2016;44(4):1167–76.
285. Ghasemi Tahrir F, Ganji F, Mani AR, Khodaverdi E. In vitro and in vivo evaluation of thermosensitive chitosan hydrogel for sustained release of insulin. *Drug Deliv*. 2016;23(3):1038–46.
286. Szymańska E, Sosnowska K, Milyk W, Rusak M, Basa A, Winnicka K. The Effect of  $\beta$ -Glycerophosphate Crosslinking on Chitosan Cytotoxicity and Properties of Hydrogels for Vaginal Application. *Polymers* 2015;7(11):2223–44.
287. Erdő F, Bors LA, Farkas D, Bajza Á, Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Res Bull* 2018;143:155–70.
288. Gholizadeh H, Messerotti E, Pozzoli M, Cheng S, Traini D, Young P, i ostali. Application of a Thermosensitive In Situ Gel of Chitosan-Based Nasal Spray Loaded with Tranexamic Acid for Localised Treatment of Nasal Wounds. *AAPS PharmSciTech* 2019;20(7):299.

289. Aliaghaie M, Mirzadeh H, Dashtimoghadam E, Taranejoo S. Investigation of gelation mechanism of an injectable hydrogel based on chitosan by rheological measurements for a drug delivery application. *Soft Matter* 2012;8(27):7128–37.
290. Zhou HY, Chen XG, Kong M, Liu CS, Cha DS, Kennedy JF. Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system. *Carbohydrate Polymers* 2008;73(2):265–73.
291. Zhou JF, Duan L, Wang YX, Wang CL, Tian ML, Qi XJ, et al. Design, characterization of Resveratrol-Thermosensitive Hydrogel System (Res-THS) and evaluation of its anti-depressant effect via intranasal administration. *Materials & Design*. 2022;216:110597.
292. Peng Y, Li J, Li J, Fei Y, Dong J, Pan W. Optimization of thermosensitive chitosan hydrogels for the sustained delivery of venlafaxine hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics*;441(1):482–90.
293. Needham D. The pH Dependence of Niclosamide Solubility, Dissolution, and Morphology: Motivation for Potentially Universal Mucin-Penetrating Nasal and Throat Sprays for COVID19, its Variants and other Viral Infections. *Pharm Res* 2022.;39(1):115–41.
294. Chusakul S, Warathanasin S, Suksangpanya N, Phannaso C, Ruxrungtham S, Snidvongs K, et al. Comparison of buffered and nonbuffered nasal saline irrigations in treating allergic rhinitis. *Laryngoscope* 2013;123(1):53–6.
295. Wiley.com. [pristupljeno: 15. ožujak 2023.]. Optimal Design of Experiments: A Case Study Approach | Wiley. Preuzeto s: [https://www.wiley.com/en-us/Optimal/Design\\_of\\_Experiments-p-9780470744611](https://www.wiley.com/en-us/Optimal/Design_of_Experiments-p-9780470744611)
296. Ghadiri M, Young PM, Traini D. Strategies to Enhance Drug Absorption via Nasal and Pulmonary Routes. *Pharmaceutics* 2019;11(3):113.
297. do Amaral Sobral PJ, Gebremariam G, Drudi F, De Aguiar Saldanha Pinheiro AC, Romani S, Rocculi P, et al. Rheological and Viscoelastic Properties of Chitosan Solutions Prepared with Different Chitosan or Acetic Acid Concentrations. *Foods* 2022;11(17):2692.
298. Cho J, Heuzey MC, Bégin A, Carreau PJ. Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry. *Food Hydrocolloids* 2006;20(6):936–45.
299. Coutu JM, Fatimi A, Berrahmoune S, Soulez G, Lerouge S. A new radiopaque embolizing agent for the treatment of endoleaks after endovascular repair: influence of contrast agent on chitosan thermogel properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013;101(1):153–61.
300. Lavertu M, Filion D, Buschmann MD. Heat-induced transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate produces chitosan precipitation and gelation. *Biomacromolecules* 2008;9(2):640–50.

301. Fillion D, Lavertu M, Buschmann MD. Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems. *Biomacromolecules* 2007;8(10):3224–34.
302. Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Del Fante C, et al. Thermosensitive eyedrops containing platelet lysate for the treatment of corneal ulcers. *Int J Pharm* 2012;426(1–2):1–6.
303. Johnson NJ, Hanson LR, Frey WH. Trigeminal pathways deliver a low molecular weight drug from the nose to the brain and orofacial structures. *Mol Pharm* 2010;7(3):884–93.
304. Martins PP, Smyth HDC, Cui Z. Strategies to facilitate or block nose-to-brain drug delivery. *Int J Pharm* 2019;570:118635.
305. Issakhov A, Mardieyeva A, Zhandaulet Y, Abylkassymova A. Numerical study of air flow in the human respiratory system with rhinitis. *Case Studies in Thermal Engineering* 2021;26:101079.
306. Xi J, Si X, Kim JW, Berlinski A. Simulation of airflow and aerosol deposition in the nasal cavity of a 5-year-old child. *Journal of Aerosol Science* 2011;42(3):156–73.
307. Grmaš J, Stare K, Božič D, Injac R, Dreu R. Elucidation of Formulation and Delivery Device-Related Effects on In Vitro Performance of Nasal Spray with Implication to Rational Product Specification Identification. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2017;30(4):230–46.
308. Perkušić M, Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Pepić I, et al. Chitosan-Based Thermogelling System for Nose-to-Brain Donepezil Delivery: Optimising Formulation Properties and Nasal Deposition Profile. *Pharmaceutics* 2023;15(6):1660.
309. Tian L, Shang Y, Chen R, Bai R, Chen C, Inthavong K, et al. Correlation of regional deposition dosage for inhaled nanoparticles in human and rat olfactory. *Particle and Fibre Toxicology* 2019;16(1):6.
310. Sutthapitaksakul L, Dass C, Sriamornsak P. Donepezil—an updated review of challenges in dosage form design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2021;63:102549.
311. Chen JZ, Kiaee M, Martin AR, Finlay WH. In vitro assessment of an idealized nose for nasal spray testing: Comparison with regional deposition in realistic nasal replicas. *Int J Pharm* 2020;582:119341.
312. Patel S, Koradia H, Parikh R. Design and development of intranasal in situ gelling system of Midazolam hydrochloride using 32 full factorial design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2015;30:154–62.
313. Shelke S, Shahi S, Jalalpure S, Dhamecha D. Poloxamer 407-based intranasal thermoreversible gel of zolmitriptan-loaded nanoethosomes: formulation, optimization, evaluation and permeation studies. *J Liposome Res* 2016;26(4):313–23.

314. Watts P, Smith A. PecSys: in situ gelling system for optimised nasal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2009;6(5):543–52.
315. EMA. European Medicines Agency. 2018 [pristupljeno: 25. kolovoz 2023.]. PecFent. Preuzeto s: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/pecfent>
316. Patil M. Chapter 7 - Mucoadhesion as a strategy to enhance the direct nose-to-brain drug delivery. U: Pardeshi CV, Souto EB, urednici. *Direct Nose-to-Brain Drug Delivery*. Academic Press; 2021 [pristupljeno: 15. ožujak 2023.]. str. 115–56. Preuzeto s: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128225226000072>
317. Popescu R, Ghica MV, Dinu-Pîrvu CE, Anuța V, Lupuliasa D, Popa L. New Opportunity to Formulate Intranasal Vaccines and Drug Delivery Systems Based on Chitosan. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21(14):5016.
318. Dowd FJ. 2 - Pharmacokinetics: The Absorption, Distribution, and Fate of Drugs\*\*The author wishes to recognize Dr. John A. Yagiela for his past contributions to this chapter. U: Dowd FJ, Johnson BS, Mariotti AJ, urednici. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry (Seventh Edition)*. Mosby; 2017 [pristupljeno: 11. svibanj 2023.]. str. 15–43. Preuzeto s: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323393072000023>
319. Abouelmagd SA, Ku YJ, Yeo Y. Low molecular weight chitosan-coated polymeric nanoparticles for sustained and pH-sensitive delivery of paclitaxel. *J Drug Target* 2015;23(0):725–35.
320. Kudsova L, Lawrence MJ. A comparison of the effect of chitosan and chitosan-coated vesicles on monolayer integrity and permeability across Caco-2 and 16HBE14o-cells. *J Pharm Sci* 2008;97(9):3998–4010.
321. Casettari L, Vllasaliu D, Mantovani G, Howdle SM, Stolnik S, Illum L. Effect of PEGylation on the Toxicity and Permeability Enhancement of Chitosan. *Biomacromolecules* 2010;11(11):2854–65.
322. Fredlund L, Winiwarter S, Hilgendorf C. In Vitro Intrinsic Permeability: A Transporter-Independent Measure of Caco-2 Cell Permeability in Drug Design and Development. *Mol Pharm* 2017;14(5):1601–9.
323. Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur J Pharm Sci* 2006;27(1):80–90.
324. Lenoir J, Adriaens E, Remon JP. New aspects of the Slug Mucosal Irritation assay: predicting nasal stinging, itching and burning sensations. *J Appl Toxicol* 2011;31(7):640–8.
325. Ahmadi R, de Bruijn JD. Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 2008;86(3):824–32.
326. Borah B, Sacco P, Zarotsky V. Predictors of adherence among Alzheimer's disease patients receiving oral therapy. *Current Medical Research and Opinion* 2010;26(8):1957–65.





## Tailoring functional spray-dried powder platform for efficient donepezil nose-to-brain delivery

Mirna Perkušić<sup>a</sup>, Laura Nižić Nodilo<sup>a</sup>, Ivo Ugrina<sup>b</sup>, Drago Špoljarić<sup>c</sup>, Cvijeta Jakobušić Brala<sup>a</sup>, Ivan Pepić<sup>a</sup>, Jasmina Lovrić<sup>a</sup>, Gordana Matijašić<sup>d</sup>, Matija Gretić<sup>e</sup>, Dijana Zadravec<sup>f</sup>, Livije Kalogjera<sup>g</sup>, Anita Hafner<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia

<sup>b</sup> Intellomics Ltd, Split, Croatia

<sup>c</sup> Visage Technologies d.o.o., Zagreb, Croatia

<sup>d</sup> University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Zagreb, Croatia

<sup>e</sup> Genera, Inc., Part of Dechra Pharmaceuticals PLC Group, Rakov Potok, Croatia

<sup>f</sup> Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Sestre milosrdnice University Hospital Center, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>g</sup> ENT Department, Zagreb School of Medicine, Sestre milosrdnice University Hospital Center, Zagreb, Croatia

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Spray-drying  
Ultrasonic nozzle  
Nose-to-brain powder delivery  
Donepezil  
Olfactory deposition

### ABSTRACT

Shortcomings of oral donepezil administration in the treatment of Alzheimer's disease have paved the way for ongoing investigations towards more efficient and safe donepezil nose-to-brain delivery. Herein we present the development of advantageous powder platform for donepezil nose-to-brain delivery, coupling careful design of chitosan and mannitol-based carrier matrix with spray-drying technology advantages and early consideration of adequate nasal administration mode, employing QbD approach. Unprecedentedly, ultrasonic nozzle was used to atomise the drying feed in response to size-related requirements for nasal aerosol particles. The optimised spray-drying process resulted in free-flowable dry powder with a great majority of particles larger than 10 µm, ensuring localised nasal deposition upon aerosolization, as evidenced by using 3D-printed nasal cavity model. QbD approach coupling formulation, process and administration parameters enabled optimisation of drug deposition profile reaching tremendously high 65.5 % of the applied dose deposited in the olfactory region. The leading formulation exhibited favourable swelling, mucoadhesion, drug release and permeation-enhancing properties, suiting the needs for efficient brain-targeted delivery. Results of *in vitro* biocompatibility and physico-chemical stability studies confirmed the leading formulation potential for safe and efficient donepezil nose-to-brain delivery. The obtained results encourage extending the study to an appropriate *in vivo* model needed for the final proof-of-concept.

### 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive cognitive decline, memory loss, and deterioration of the ability for carrying out daily routine activities. It poses a significant burden to AD patient, family, caregivers, community and the healthcare system as a whole, enlarging with AD's rising prevalence related to population aging (2020). There are four to date approved pharmacological symptomatic therapies (Akel et al., 2021), among which acetylcholinesterase (AChE) inhibitor donepezil, applicable in all stages of disease (mild, moderate and severe AD (Sutthapitaksakul et al., 2021;

Birks and Harvey, 2018)) presents one of the most commonly prescribed. Currently, donepezil is available in oral solid dosage forms of different strength and/or release profile. However, donepezil oral delivery is related to several drawbacks such as first pass metabolism, gastrointestinal adverse effects, systemic bioavailability and related adverse effects as well as low brain delivery efficiency (Sutthapitaksakul et al., 2021; Espinoza et al., 2019; Ruangritchankul et al., 2021; al Asmari et al., 2016). As a viable alternative, avoiding donepezil systemic absorption and bypassing blood-brain barrier, nasal administration of donepezil may provide its efficient and direct delivery to the brain via olfactory nerve that innervates olfactory mucosa, and, to a lesser extent,

\* Corresponding author at: A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia.

E-mail address: [anita.hafner@pharma.unizg.hr](mailto:anita.hafner@pharma.unizg.hr) (A. Hafner).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122038>

Received 29 April 2022; Received in revised form 1 July 2022; Accepted 18 July 2022

Available online 20 July 2022

0378-5173/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

trigeminal nerve that innervates nasal respiratory and olfactory mucosa (Akel et al., 2021).

To date, multiple formulation strategies have been employed to enhance donepezil nose-to-brain delivery including donepezil nano-suspensions (Bhavna et al., 2014), donepezil loaded liposomes (al Asmari et al., 2016; de Souza et al., 2021), nanoemulsions (Espinoza et al., 2019), lipid nanoparticles (Akel et al., 2021), microemulsions (Espinoza et al., 2018) and *in situ* hydrogels, all presented as liquid formulations. These strategies were shown to increase donepezil brain bioavailability owing to altering its solubility/permeation profile. However, they were not evaluated in terms of nasal deposition within the targeted regions of the nasal cavity, which represents an inevitable milestone towards effective nasal therapy (Scherließ, 2020; Nizić Nodilo et al., 2021).

In this work we present the development of powder platform for donepezil nose-to-brain delivery. Generally, nasal powders offer significant advantages over liquid formulations, such as improved stability excluding use of preservatives, prolonged nasal retention, increased drug concentration at nasal mucosa and less co-ordination required from the patient (Tiozzo Fasiolo et al., 2018; Tanaka et al., 2017). State of the art in the field of nose-to-brain delivery supports the idea to formulate donepezil into nasal powder with controllable deposition profile and inherent ability to promote its nasal absorption (Giuliani et al., 2018; Rassu et al., 2015; Belgamwar et al., 2011; Rassu et al., 2018; Gavini et al., 2013; Salade et al., 2018). Powders recently demonstrated higher potential to ensure effective drug olfactory deposition (Salade et al., 2018) compared to nebulized liquid formulations (Xi et al., 2018; Xi et al., 2017). The ability of powders to increase nose-to-brain drug delivery has been evidenced in animal studies (Giuliani et al., 2018; Rassu et al., 2015; Belgamwar et al., 2011; Rassu et al., 2018; Gavini et al., 2013).

Spray-drying, as a single-step, fast and scalable drying technology, receives great attention as a nasal powder preparation method (Tiozzo Fasiolo et al., 2019). Proper selection of excipients and fine tuning of formulation and process parameters represent the way for optimising dry particle size and morphology, which is of particular importance for sprayable nasal powders (Nizić Nodilo et al., 2021; Nespi et al., 2022). Spherical morphology of particles, attainable with spray-drying process, is opportune to potentiate dry powder flow properties. Current regulatory guidelines for localised nasal aerosol delivery indicate the request for the vast majority of the particles to be larger than 10 µm (Agency, 2006). So far, to the best of our knowledge, there are no literature reports on nasal spray-dried powders fulfilling the indicated request except for those including spray-dried particle agglomeration (Salade et al., 2018; Tiozzo Fasiolo et al., 2019; Tiozzo Fasiolo et al., 2021) (measurable in nasal device-emitted powder aerosol in relation to developed powder particle size distribution) or adhesion to inert carriers of adequate size range (Nizić Nodilo et al., 2021; Trows and Scherließ, 2016; Nizić et al., October 2019). However, such approaches refer to concerns regarding the level of particle cohesion/adhesion forces as well as homogeneity and physical stability of the powder mixtures.

The aim of this study was to develop donepezil dry powder delivery platform by setting the spray-drying formulation and process parameters to generate free-flowable spherical particles fitting the requested size range and ensuring localised nasal deposition upon aerosolization, primarily in olfactory region, while exhibiting adequate swelling, mucoadhesion, drug release profile and permeation enhancing effect, altogether suiting the needs for efficient brain targeted delivery. For the first time, ultrasonic nozzle was used to atomise the drying feed in response to size-related requirements for nasal aerosol particles. Chitosan and mannitol were used as excipients with complementary biopharmaceutical and matrix forming properties. Chitosan is a well-known biocompatible, swellable and mucoadhesive polymer with the ability of tight junctions reversible opening and potentiating paracellular transport of hydrophilic compounds (Bernkop-Schnürch and Dünnhaupt, 2012), expected to be supported also by the presence of highly soluble

and osmotically active mannitol (Trenkel and Scherließ, 2021). Combining large and small molecular weight excipients as dry product matrix constituents enabled quality by design (QbD) driven particle size and morphology optimisation. QbD approach is widely promoted by Food and Drug Administration (FDA) and International Conference on Harmonization (ICH) (Grangeia et al., 2020), hence it is commonly used in the development of innovative pharmaceutical formulations, particularly spray-dried powders (Nizić Nodilo et al., 2021; Zhang et al., 2020; Ziaee et al., 2018; Focaroli et al., 2019; Pallagi et al., 2015). QbD approach in the field of drug delivery system development promotes the idea that the control of the quality, efficacy and safety should be built in the formulation development from the beginning. It emphasises product and process understanding and enables process control. Such an approach requires well-described objectives, deep process understanding and proper risk management. Defining the key elements of QbD, such as critical product quality profile, critical quality attributes, critical process parameters and critical material attributes enables structured and systematic development of an innovative drug delivery platform in a cost- and time-saving manner (Grangeia et al., 2020). Statistical design of experiments (DoE) enabled coupling formulation, process and/or administration parameters to optimise all aspects of donepezil nasal delivery *via* dry powder platform, in particular its nasal deposition profile. In-depth biopharmaceutical characterisation of the leading formulation including *in vitro* release, mucoadhesion, biocompatibility, permeability and stability studies was employed to provide an overall assessment of developed formulation potential in donepezil nose-to-brain delivery.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The donepezil hydrochloride (further denoted as DH) was purchased from Carbosynth Ltd (UK). Low molecular weight chitosan (molecular weight 50–190 kDa, 75–85 % deacetylated; further denoted as chitosan) was obtained from Sigma-Aldrich (Germany). Mannitol was purchased from VWR International Ltd, UK. Simulated nasal fluid (SNF) was prepared by dissolving following solids in distilled water: NaCl (150.0 mM; Kemig, Croatia), KCl (40.0 mM; Kemig, Croatia) and CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (5.3 mM; Sigma-Aldrich, Germany). For *in vitro* cell biocompatibility and permeability studies Hank's balanced salt solution with 5.3 mM Ca<sup>2+</sup> was prepared by dissolving KCl (5.4 mM), NaHCO<sub>3</sub> (4.2 mM), NaCl (136.9 mM), D-glucose monohydrate (5.6 mM), all purchased from Kemig, Croatia, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.4 mM; Kemika, Croatia), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.3 mM; Fluka Chemie AG, Switzerland) and CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (5.3 mM) (Sigma-Aldrich, Germany) in distilled water. N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) was purchased from Sigma-Aldrich (Germany). All other chemicals or solvents used in study were of analytical grade and purchased from Kemika (Croatia).

### 2.2. Design of experiments (DoE)

The statistical design of experiments was used to test and optimize the process, formulation and administration parameters for effective preparation of the spray-dried powder platform suitable for DH nasal delivery. In this study, following QbD elements have been identified: (i) quality target product profile (QTPP): development of DH nasal powder formulation improving its direct nose-to-brain delivery; (ii) critical quality attributes (CQA): process yield, moisture content, swelling ability and particle size distribution of the microspheres, powder flow properties, spray cone angle and nasal deposition profile; (iii) critical process parameters (CPP): inlet temperature, sample feed rate (parameters related to spray-drying process), angle of administration and inspiratory flow rate (parameters related to nasal administration of powder spray); critical material attributes (CMA): concentration and type of constituents, as well as their ratio (ICH Q18(R2), 2009). Namely,



using QbD principles, two formulation (concentration of DH and mannitol in the spray-drying feed), two process (inlet air temperature and feed pump setting) and two administration (inspiratory flow rate and angle of administration from the horizontal plane) parameters were selected for the custom experimental design developed with JMP 14.0 statistical software (JMP®, Version 14.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2007). Lower and upper limits for parameters interval (Table 1) were defined after thorough preliminary studies. Spray-drying process yield, drug content (DC), particle size distribution, moisture content (MC), flow and swelling properties, spray cone angle as well as deposition in the turbinate and olfactory region of the nasal cavity were investigated as responses.

### 2.3. Preparation of DH loaded microspheres

DH loaded microspheres were prepared by spray-drying the aqueous solutions that contained DH, chitosan and mannitol. First, a concentrated chitosan solution (2.0 %, w/w) was prepared by dissolving chitosan in 0.5 % acetic acid at room temperature under stirring conditions for 24 h. Prepared chitosan solution was mixed with the appropriate DH and mannitol aqueous solution to obtain the final solute concentrations previously set in experimental design sequences (Table 1). The final concentration of chitosan in spray-dried solution was 1.5 % (w/w) for all DoE samples.

DH loaded microspheres were prepared by spray-drying using Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Switzerland) equipped with an ultrasonic nozzle (Büchi, Switzerland). Three of the process parameters were constant: aspirator rate at 100 %, compressed airflow at 5 bar, and power of the ultrasonic nozzle at 65 %. As set in DoE, inlet air temperature and feed pump setting varied between 110 and 140 °C and 10 and 15 %, respectively. All drying studies were conducted in open loop mode, using air as a drying gas. The spray-drying process yield of each experiment was calculated as the ratio between the amount of spray-dried microspheres and the total amount of initial solid content in the DH-chitosan-mannitol spray-dried solutions.

### 2.4. Determination of microsphere DH content

DH content in the powder systems was determined after the destruction of the microspheres in purified water. Microspheres (10 mg) were dispersed in distilled water. The mixture was left in an ultrasonic bath for 2 h and then stirred for 24 h. Dispersion was filtered (0.2 µm) and analysed for DH content by the high performance liquid chromatography (HPLC) method described in section 2.11.

Drug content (DC) was determined using the Eq. (1):

$$DC (\%) = \frac{Q_a}{Q_m} \times 100 \quad (1)$$

where  $Q_m$  is the examined amount of microspheres. All measurements were performed in triplicate.

**Table 1**

Parameters considered in the experimental design and their levels.

Parameter	High (+1)	Medium (0)	Low (-1)
Donepezil hydrochloride (DH) concentration (% w/w)	0.4000	0.2575	0.1150
Mannitol (M) concentration (% w/w)	6.0	4.5	3.0
Inlet temperature, $T_m$ (°C)	140	125	110
Feed pump setting, FPS (%)	15.0	12.5	10.0
Angle of administration from the horizontal plane, AAH (°)	60	45	30
Inspiratory flow rate, IFR (L min <sup>-1</sup> )	20	10	0

### 2.5. Particle size distribution measurement

The particle size distribution was determined by laser diffraction method using the Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, UK), with 300 mm focal length. The device is equipped with a Hydro SV sample cell with a magnetic stirrer. Approximately 5 mg of microspheres were dispersed in about 10 mL of ethanol (96 %) and sonicated in an ultrasonic bath to form a homogeneous suspension. Prior to the measurement, a background reading was made. Suspension of microspheres was added to the Hydro SV cell until 10–20 % obscuration. The samples were equilibrated for 10 s before starting the measurement. Each sample was analysed in pentaplicate. The results are expressed as volume diameters  $D_{v,10}$ ,  $D_{v,50}$  and  $D_{v,90}$ .

### 2.6. Moisture content determination

The moisture content in the DH loaded microspheres was analysed by thermogravimetric analysis using TA Instruments Q500 (TA Instruments, USA). Approximately 5 mg of powder sample was heated from 25 °C to 150 °C at a rate of 10 °C min<sup>-1</sup> under dynamic nitrogen atmosphere. Moisture content was determined as follows:

$$MC (\%) = \frac{m_0 - m_e}{m_0} \times 100 \quad (2)$$

where  $m_0$  and  $m_e$  are the weighted amount of the powder at the beginning and the end of experiment, respectively. Each formulation was analysed in triplicate.

### 2.7. Swelling studies

The degree of swelling of DH loaded microspheres in the SNF was determined by the indirect method using Franz diffusion cells (Nizić Nodilo et al., 2021; Nizić et al., October 2019; Martinac et al., 2005). The receptor chamber of Franz diffusion cell was filled up with SNF thermostated at 34 °C. Exact amount of microspheres (10 mg) was weighed directly on the polyamide membrane with 0.45 µm pore size (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany). Microspheres covered the membrane surface evenly. Due to SNF uptake of the DH loaded microspheres, the initial level of SNF lowered in time, which was visible at the sampling port of the cell. The receptor chamber was filled with fresh medium at predetermined time intervals up to the initial level, using graduated microliter syringe (Hamilton, Switzerland). The refilling of the receptor chamber at the sampling port was done using graduated microliter syringe with nominal volume of 500 µL. The degree of swelling of formulations was expressed as a volume of the SNF uptaken per milligram of the chitosan in 30 min swelling process. Each formulation was tested in triplicate.

### 2.8. Powder flow properties

Flow properties were determined by an indirect method previously described by our research group (12). Briefly, after recording the volume of 300 mg microspheres in a 5 mL syringe (bulk volume), the syringe was tapped until there was no change in volume of the powder (around 100 times). New powder volume was recorded (tapped volume). Hausner ratio was calculated using the following equation:

$$\text{Hausner ratio} = \frac{\text{Tapped density}}{\text{Bulk density}} \quad (3)$$

### 2.9. Spray cone angle determination

Spray cone angle was determined after spraying the powder samples against a dark background (12). Fifteen milligrams of DH loaded microspheres were weighed in an Unidose Powder System (UDSP) nasal device (kindly provided by AptarGroup Inc., France). The emitted plume

was recorded using a camera VEO4K (Vision Research Inc, USA) of 1000 frames per second and afterward analysed by a virtual protractor. Each sample was analysed in triplicate.

## 2.10. Assessment of the deposition profile within the nasal cavity *in vitro*

Nasal deposition pattern was studied using multi-sectional nasal cavity model previously developed by our group based on anonymised Computer Tomography (CT) scan of a 62-year old patient, acquired from Sestre milosrdnice University Hospital Center database (12). Development of nasal cavity model based on a CT scan of a patient was carried out following the rules of the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Ethics Committee of Sestre milosrdnice University Hospital Center (Project identification code: EP-9941/19-3) and Ethics Committee of University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (Class: 643-02/19-01/02; Registry number: 251-62-03-19-43). Separate sections of the nasal cavity model that could be disassembled are: anterior region, turbinate region with detachable olfactory segment, septum with detachable olfactory segment and posterior/nasopharynx with connector for respiratory pump, used to simulate breathing conditions. The model also includes paranasal sinuses with openings into the nasal cavity. For proper assembly and alignment of the model segments bar pins with 6.4 and 2.0 mm and 6.0 and 4.0 mm height and transverse coupling were used.

For nasal deposition profile studies of DH loaded microspheres, the nasal cavity model was placed on a stand and coupled to Respiratory Pump Model 613 (Harvard Apparatus, USA) which simulated breathing at inspiratory flow rate in range from 0 L min<sup>-1</sup> (no breathing) to 20 L min<sup>-1</sup> (representing moderately deep inspiration) (Trows and Scherließ, 2016). Inspiratory flow meter In-Check Nasal (Clement Clarke International Ltd., UK) was used to check inspiratory flow rate set by the respiratory pump. The UDSP device filled with investigated powder was introduced in the right nostril of the model at a depth of 10 mm, at actuation angle  $\theta$  from the vertical plane, and 30°, 45° and 60° from the horizontal plane. During the actuation of the UDSP device into the right nostril, left nostril was blocked. The UDSP device is designed to address the nose-to-brain pathway, specially targeting the olfactory region of the nasal cavity (Salade et al., 2018). After spraying the powder formulation into the model, each segment of the nasal cavity was thoroughly rinsed with distilled water and fractional spray deposition pattern was quantified by HPLC method, described in section 2.11. Drug deposited in each region was expressed in relation to total dose. For each sample, nasal deposition profile studies were done in duplicate.

## 2.11. Quantitative determination of DH

Quantitative determination of DH was performed by HPLC method according to Pappa et al. (Pappa et al., 2002), with minor modifications. The chromatographic system consisted of an autosampler, system controller, pump, degasser, an UV-VIS detector and a column oven, all Series 200 (PerkinElmer, USA). TotalChrome Navigator software for data processing was used for all chromatographic analyses. Chromatographic separation was achieved on Kinetex C18 (100 × 4.6 mm, 2.6- $\mu$ m particle size) reverse-phase column with suitable guard column, both obtained by Phenomenex (Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of 0.02 M buffer phosphate (pH 2.7), methanol, and triethylamine in a ratio of (50:50:0.5). Analysis was performed at room temperature at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> and an 8 min run time. The injection volume was 20  $\mu$ L and detection wavelength was at 268 nm. The retention time of DH was 5 min.

## 2.12. In-depth characterisation of leading DH loaded microspheres

Leading DH loaded microspheres were further analysed in terms of delivered powder weight uniformity, particle morphology, biopharmaceutical properties including *in vitro* DH release profile,

mucoadhesiveness, biocompatibility and permeability, and stability profile. Corresponding chitosan microspheres were prepared by spray-drying procedure described in section 2.3. at inlet temperature of 140 °C with DH to chitosan weight ratio equal to that in leading DH formulation, and were used as control where appropriate.

### 2.12.1. Delivered powder weight uniformity test

UDSP device was filled with 15 mg of leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres and triggered in volumetric flask. Emitted powder quantity was determined gravimetrically (Salade et al., 2018). The test was performed 10 times.

### 2.12.2. Scanning electron microscopy

The morphological and surface characterization of the microspheres was performed by scanning electron microscopy, using a Tescan Vega 3 microscope (Czech Republic), operating at an acceleration voltage of 10 kV. The powder samples were placed on a metal stub using a double-sided adhesive tape and were coated with a thin layer of gold and palladium applying a Quorum SC7620 sputter coater (Emitech, London, UK) under 0.01 mbar vacuum and inert argon atmosphere.

### 2.12.3. *In vitro* release studies

*In vitro* release studies were performed using an automated Franz diffusion cells testing system Phoenix™ RDS (Teledyne Hanson, USA). The system is equipped with Peltier heating block in which six Franz diffusion cells (nominal volume of 16 mL) can be easily inserted. The cells were filled with the SNF and the system was thermostated at 34 °C, under constant stirring. Sink conditions were provided during the whole experiment. The amount of powder containing 1 mg of DH was weighed directly on the polyamide membrane with 0.45  $\mu$ m pore size (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany), covering evenly the membrane surface. At predetermined time intervals during a total of 8 h, aliquots of 200  $\mu$ L were drawn from the receptor chamber and replaced with fresh SNF. DH content in withdrawn samples was determined using a previously developed HPLC method, described in the section 2.11. The content of the drug that remained in the donor compartment was also analysed. Each experiment was performed in triplicate.

Drug release kinetics was evaluated and the ideal kinetic model was estimated using the following equations (Duvnjak Romić et al., 2016; Bao et al., 2019; Schliecker et al., 2004):

Zero order kinetics (Eq. (4));

$$\frac{c_t}{c_\infty} = k_{c0} \times t \quad (4)$$

First order kinetics (Eq. (5));

$$\log \frac{c_t}{c_\infty} = k_c \times t \quad (5)$$

Higuchi model (Eq. (6));

$$c_t/c_\infty = k_{CH} \times \sqrt{t} \quad (6)$$

where  $c_t/c_\infty$ ,  $k_{c0}$ ,  $k_c$  and  $k_{CH}$  are drug release fractions and drug release constants of each model, respectively. For each model the coefficient of determination ( $R^2$ ) was used as an indicator of the best fitting. To elucidate the transport mechanisms, the release curve was fitted to the following Korsmeyer-Peppas equation (Equation (7)) (Korsmeyer et al., 1983):

$$c_t/c_\infty = k_{CKP} \times t^{n_c} \quad (7)$$

where  $k_{CKP}$  represents the kinetic constant and  $n_c$  is the diffusion exponent for drug release. The diffusion exponents indicate transport mechanism; if  $n_c \leq 0.45$ , Fickian diffusion is indicated,  $0.45 < n_c < 0.89$  indicates non-Fickian diffusion, while  $n_c \geq 0.89$  indicates Case-2 release (Duvnjak Romić et al., 2016).

#### 2.12.4. *In vitro* mucoadhesion test

Mucoadhesive properties of DH loaded microspheres were evaluated using TA.XT Plus Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK) equipped with the mucoadhesion rig, using the method previously described by our research group (12). Nasal mucosa was obtained from a local slaughterhouse and removed from porcine heads according to Fachel et al. (Fachel et al., 2018). Heads were divided in half by an incision along septum, and afterward nasal mucosa was thoroughly isolated and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use. During the mucoadhesion experiments, nasal mucosa was cut into 10 mm diameter disks and attached to the upper probe of the texture analyser with cyanoacrylate glue. The exact amount of microspheres (5 mg) was weighted directly onto the lower platform of the mucoadhesion rig. Prior to the experiments, powders were moisturized with 40  $\mu\text{L}$  of SNF thermostated at  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 s. The measurement settings were as follows: pre-test speed  $0.5\text{ mm s}^{-1}$ , test speed  $0.1\text{ mm s}^{-1}$ , contact time 30 s, applied force 0.1 N and post-test speed  $0.1\text{ mm s}^{-1}$ . The maximum detachment force ( $F_{max}$ ) and the work of adhesion ( $W_{ad}$ ; area under the force distance curve) (12) were used to describe the mucoadhesive characteristics.

#### 2.12.5. Cell culture conditions

Calu-3 cell line (ATCC® HTB-55™; ATCC, USA) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-F12) cell culture medium (Sigma Aldrich, USA) containing penicilin/streptomycin (1 % v/v; Lonza, Switzerland) and foetal bovine serum (FBS; 1 % v/v; Sigma Aldrich, USA). The cell cultures were held in the incubator (Sanyo CO<sub>2</sub>, Japan) at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 95 % relative humidity, in an atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>. The medium was changed every 48 h. When cells reached 70–90 % confluence, they were passaged in ratios from 1:3 to 1:6. Trypsin/EDTA mixture (0.25 %/0.02 % in phosphate-buffered saline, PBS, Lonza, Switzerland; respectively) was used for the cells detachment from the flasks.

#### 2.12.6. *In vitro* biocompatibility studies

Calu-3 cells were seeded onto 96 well plates (Corning Costar, USA) at a density of  $4 \times 10^4$  cells per well. After 48 h of culturing, cells were used for biocompatibility studies and biocompatibility was determined by colorimetric MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, USA) assay. MTT reagent was prepared by dissolving MTT in PBS to achieve the concentration of  $2.5\text{ mg mL}^{-1}$ . The prepared solution was further diluted with DMEM-F12 to the final concentration of  $0.5\text{ mg mL}^{-1}$ .

Selected microspheres were homogeneously dispersed in Hank's balanced salt solution (HBSS) with  $5.3\text{ mM Ca}^{2+}$ , buffered with  $30\text{ mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)}$  at pH 6.0 (further denoted as HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0)), resulting in DH, chitosan and mannitol concentration in range of  $3\text{--}11\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $10\text{--}40\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  and  $40\text{--}160\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Cells incubated in HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0) were used as a negative control. The cell culture medium was withdrawn prior to the treatment, and cells were washed with HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0). The cells were then exposed to the prepared dispersions of DH loaded microspheres and controls (corresponding mannitol and donepezil solutions) for 2 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After 2 h of treatment, formulations were removed from the wells and cells were rinsed twice with HBSS- $\text{Ca}^{2+}$  (pH = 6.0). 100  $\mu\text{L}$  of prepared MTT solution was added to each well and in those conditions, cells were incubated for 2 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After the medium was removed, the cells were lysed and the formazan crystals were dissolved by adding 100  $\mu\text{L}$  isopropanol per well. The amount of produced formazan was measured spectrophotometrically at 570 nm by 1420 Multilabel counter VICTOR3 (Perkin Elmer, USA), using the following equation for cell viability (Eq. (8)):

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{ipr}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{ipr}}} \times 100 \quad (8)$$

where  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of a formazan crystals' solution

formed in cells treated with tested samples,  $A_{\text{ipr}}$  is the absorbance of pure isopropanol and  $A_{\text{control}}$  is the absorbance of a solution of formazan crystals formed in cells treated only with HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0).

#### 2.12.7. *In vitro* permeability through epithelial model barrier

*In vitro* permeability studies of DH were performed using Calu-3 cell monolayer according to procedure described by Nizić Nodilo et al. (12). Calu-3 epithelial cells were seeded onto the polycarbonate 12-well Transwell® inserts, with  $0.4\text{ }\mu\text{m}$  mean pore size,  $1.12\text{ cm}^2$  surface area (Corning Costar Inc., USA) at a density of  $5.5 \times 10^5$  cells per well. Cell culturing was performed at the cell culture medium volume of 0.5 mL and 1.5 mL in the apical and basolateral compartment, respectively. After 48 h, the medium from the apical compartment was removed and cells were cultured at the air–liquid interface with 800  $\mu\text{L}$  of culture medium in the basolateral compartment. The cell culture medium in basolateral compartment was changed every 48 h and 24 h prior to the permeability experiment. The transepithelial electrical resistance (TEER) of the monolayers was measured using epithelial volt/ohm meter EVOM equipped with STX-2 chopstick electrode (WPI Inc., USA). The cells were grown on Transwell® membranes for 12–14 days, until the plateau of TEER values was reached (above  $1000\text{ }\Omega\text{ cm}^2$ ). Permeability studies were carried out in HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0). Tested samples included leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres suspension and the following set of control samples: DH loaded chitosan microsphere suspension, DH/mannitol solution and DH solution, all prepared in HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0), at DH and/or chitosan concentration of  $8\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  and  $30\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Prior to the experiment, the monolayers were washed with HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0), after which HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0) was placed into the apical and basolateral compartments. The cells were then incubated for 20 min. At the beginning of the experiment, the apical compartment was emptied and 500  $\mu\text{L}$  of the test sample was added. Samples (500  $\mu\text{L}$ ) were taken from the basolateral compartment at regular time intervals over 120 min and replaced with the same volume of fresh buffer. During the permeability experiment, cells were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 50 rpm on a horizontal orbital shaker. At the end of the experiment, the sample remaining in the apical compartment was also collected. All experiments were conducted in triplicate at pH 6.0,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 % CO<sub>2</sub> and 95 % relative humidity. HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0) was used as negative control for TEER values and cell viability. Osmolality of all test samples was measured using OsmoTECH® Single-Sample Micro-Osmometer (Advanced Instruments, USA). The TEER values were measured before, during and after the permeation experiments to check the cell layer integrity. Samples were analysed for DH content by HPLC method, described in the section 2.11. The apparent permeability coefficient ( $P_{\text{app}}$ ) was calculated according to the Eq. (9):

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0} \quad (9)$$

where  $dQ/dt$  is the permeability rate,  $A$  is the surface area of the permeation barrier and  $C_0$  is the initial concentration of DH in the apical compartment (44).  $C_0$  was calculated by dividing DH amount contained within the tested amount of microspheres with the volume of HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0) in which the microspheres were suspended. For DH/mannitol solution and DH solution,  $C_0$  was calculated by dividing DH amount dissolved in HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0) by the volume of solvent used.

The biocompatibility of the formulations by MTT assay was also examined on Calu-3 cell monolayer grown on Transwell® plates 24 h after the permeability assay as described previously by our research group (12).

#### 2.12.8. Stability studies

Stability studies of the leading DH loaded microspheres were performed upon six-month storage in an airtight container at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The particle size distribution, EE, DL, flow properties, MC and *in vitro* drug

release profile were measured and compared to the initial results determined immediately after microsphere preparation. All measurements were performed in triplicate.

### 2.13. Statistical analysis

For statistical analyses related to DoE, calculations were performed using JMP 14.0 software (JMP®, Version 14.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2007), with  $p < 0.05$  set as the minimal level of significance. Comparison of *in vitro* release profiles was performed by calculating the similarity factor ( $f_2$ ), as described previously (Nippe et al., 2013). The mean cumulative amount of drug released of the two formulations were compared at each time point. The release profiles were considered similar when  $f_2$  greater than 50 (Blažević et al., 2016). Mucoadhesiveness data were analysed with GraphPad Prism (trial version), employing a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's *post hoc* test.

## 3. Results and discussion

The goal of this study was to develop DH dry powder delivery platform based on chitosan and mannitol, tailored in terms of particle size, aerosolisation properties, nasal deposition profile and behaviour in contact with nasal fluid/mucosa to suit the needs for efficient brain targeted delivery. Chitosan/mannitol spray-dried microspheres were

previously investigated for pulmonary delivery, targeting particle aerodynamic diameter below 5  $\mu\text{m}$  (Li et al., 2009; Razavi Rohani et al., 2014). However, no reports on chitosan/mannitol matrix and particle adjustments for specific requirements of nasal administration route have been reported so far.

### 3.1. Design of experiments: Analysis of the results

QbD approach employed in this work enabled fine tuning of formulation, process and administration parameters with the aim to optimise nasal delivery of DH. Responses in DoE and its results are listed in Table 2. Prior to statistical analysis of the results, covariates were normalized to unitless interval  $[-1,1]$ , as is ordinary in the experimental design modelling (Goos and Jones, 2011). Equations in the rest of the text and supplementary materials are presented in standardised covariates. Regression modelling approach uncovered parameters with the greatest impact on the responses, as well as their interactions. Statistically significant parameters (individual and in interaction;  $p < 0.05$ ) within regression model equations for investigated DoE responses are marked with asterisk.

Values of basic responses including spray-drying yield (47.2 % to 70.5 %), residual moisture content ( $3.8 \pm 0.3$  % to  $9.3 \pm 0.3$  %), and swelling of the microspheres (expressed by volume of SNF absorbed per milligram of chitosan;  $27.7 \pm 2.8$   $\mu\text{g/ml}$  to  $67.0 \pm 0.7$   $\mu\text{g/ml}$ ) (Table 2) reflect well conducted spray-drying process and dry powder

**Table 2**

Sample sequence from design of experiment and corresponding spray-drying process yield, microspheres drug content (DC), particle size distribution ( $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  and  $D_{v90}$ ), residual moisture content (MC), swelling properties expressed as volume of SNF ( $V_{\text{SNF}}$ ) absorbed per mg of chitosan in the swelling process, Hausner ratio (HR), spray cone angle (CA), olfactory deposition (OD) and turbinate deposition (TD).

	DH% (w/w)	M% (w/w)	$T_{\text{in}}$ (°C)	FPS (%)	AAH * (°)	IFR* (L $\text{min}^{-1}$ )	Yield (%)	DC (%)	$D_{v10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{v50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{v90}$ ( $\mu\text{m}$ )	MC (%)	$V_{\text{SNF}}$ ( $\mu\text{L}$ $\text{mg}^{-1}$ )	HR	CA (°)	OD (%)	TD (%)
1	0.1150	6.0	125	10.0	30	20	68.0	1.44 ± 0.01	9.9 ± 1.0	33.3 ± 1.1	67.9 ± 0.8	5.2 ± 1.2	58.5 ± 2.9	1.21 ± 0.01	25.1 ± 0.4	28.5 ± 2.3	47.6 ± 6.8
2	0.4000	3.0	125	15.0	60	0	55.8	7.87 ± 0.02	8.4 ± 0.3	29.9 ± 0.5	70.8 ± 0.9	6.6 ± 0.4	60.8 ± 2.7	1.30 ± 0.00	28.3 ± 0.9	30.4 ± 6.5	27.3 ± 0.1
3	0.4000	3.0	110	12.5	60	20	52.2	7.90 ± 0.04	9.6 ± 0.1	24.7 ± 0.5	46.9 ± 0.3	6.7 ± 0.4	29.6 ± 2.2	1.30 ± 0.09	26.1 ± 0.4	31.0 ± 19.2	19.4 ± 5.8
4	0.4000	6.0	110	10.0	45	20	54.4	4.96 ± 0.02	9.5 ± 1.0	35.7 ± 1.6	72.7 ± 1.1	6.1 ± 1.5	53.0 ± 3.8	1.22 ± 0.10	23.9 ± 0.5	56.0 ± 1.4	27.2 ± 0.5
5	0.1150	3.0	110	15.0	30	20	49.6	2.35 ± 0.08	10.9 ± 0.1	23.9 ± 0.1	43.1 ± 0.2	9.3 ± 0.3	42.1 ± 1.0	1.32 ± 0.07	27.8 ± 1.2	52.3 ± 0.4	22.1 ± 0.1
6	0.1150	3.0	140	15.0	45	0	55.3	2.44 ± 0.03	9.2 ± 0.0	20.9 ± 0.1	40.3 ± 0.7	7.9 ± 1.0	41.6 ± 2.7	1.25 ± 0.00	25.7 ± 0.3	51.6 ± 4.3	29.5 ± 4.6
7	0.4000	3.0	140	10.0	30	10	70.5	7.72 ± 0.21	6.7 ± 0.4	28.4 ± 0.5	58.5 ± 1.2	5.1 ± 0.1	32.8 ± 3.0	1.22 ± 0.05	23.7 ± 0.2	38.8 ± 0.7	36.4 ± 0.1
8	0.2575	6.0	140	15.0	60	20	55.1	3.29 ± 0.18	8.5 ± 0.9	29.6 ± 1.7	60.4 ± 1.9	4.4 ± 0.1	56.9 ± 0.9	1.20 ± 0.00	25.1 ± 0.2	32.0 ± 0.6	27.2 ± 0.6
9	0.2575	4.5	125	12.5	45	10	55.8	4.21 ± 0.21	9.7 ± 0.0	25.7 ± 0.0	55.8 ± 0.3	6.1 ± 0.1	31.0 ± 1.1	1.27 ± 0.06	25.5 ± 0.2	44.1 ± 1.0	33.0 ± 1.3
10	0.1150	4.5	110	10.0	60	0	59.1	1.82 ± 0.07	10.0 ± 0.0	22.7 ± 0.1	42.5 ± 0.1	6.9 ± 0.1	36.9 ± 2.7	1.29 ± 0.10	24.7 ± 0.3	37.4 ± 1.9	26.9 ± 6.8
11	0.4000	6.0	140	10.0	60	0	66.0	4.94 ± 0.13	9.9 ± 1.4	31.7 ± 1.0	61.9 ± 1.6	3.8 ± 0.3	58.0 ± 4.3	1.15 ± 0.06	24.7 ± 0.7	32.5 ± 6.0	23.7 ± 0.1
12	0.1150	6.0	110	15.0	60	10	55.7	1.54 ± 0.04	10.1 ± 1.9	31.1 ± 2.4	63.3 ± 3.6	5.8 ± 0.1	49.4 ± 5.0	1.20 ± 0.00	22.5 ± 0.2	13.9 ± 1.9	21.1 ± 0.0
13	0.4000	4.5	140	15.0	30	20	55.7	6.08 ± 0.34	7.8 ± 0.2	31.4 ± 0.2	65.2 ± 1.4	4.7 ± 0.1	43.9 ± 2.4	1.19 ± 0.02	24.3 ± 0.4	36.0 ± 1.0	24.5 ± 0.5
14	0.1150	3.0	140	10.0	60	20	60.4	2.56 ± 0.10	8.4 ± 0.1	17.1 ± 0.1	34.1 ± 0.2	8.7 ± 0.6	52.0 ± 1.7	1.26 ± 0.10	25.5 ± 0.5	29.3 ± 7.8	29.6 ± 11.4
15	0.4000	6.0	110	15.0	30	0	47.2	5.14 ± 0.15	11.6 ± 0.4	29.0 ± 1.2	63.5 ± 1.1	5.2 ± 0.2	51.1 ± 0.9	1.23 ± 0.06	27.6 ± 0.9	65.5 ± 0.2	20.5 ± 0.5
16	0.2575	3.0	110	10.0	30	0	55.4	5.27 ± 0.06	9.5 ± 0.1	20.5 ± 0.2	37.3 ± 1.1	8.8 ± 0.1	27.7 ± 2.8	1.30 ± 0.05	25.7 ± 0.6	56.9 ± 5.1	28.0 ± 5.9
17	0.1150	6.0	140	12.5	30	0	60.6	1.52 ± 0.03	7.0 ± 0.4	27.4 ± 0.9	58.5 ± 1.8	3.9 ± 0.4	67.0 ± 0.7	1.19 ± 0.02	23.5 ± 0.4	39.2 ± 1.7	45.1 ± 7.1

DH = donepezil hydrochloride concentration in the spray-drying solution; M = mannitol concentration in the spray-drying solution;  $T_{\text{in}}$  = inlet temperature; FPS = feed pump setting; AAH = administration angle in relation to horizontal plane; IFR = inspiratory flow rate.

\* Parameters related only to olfactory and turbinate deposition. Values for the responses are mean ± SD,  $n = 3$ , except for  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  and  $D_{v90}$  where  $n = 5$ , and OD and TD where  $n = 2$ .



characteristics suitable for nasal delivery. Yields obtained within this work were in line with the range previously reported for spray-drying process (Szekalska et al., 2016; Uyen et al., 2020). Microsphere moisture content in all samples was below 10 %, which is deemed adequate for polymer-based spray-dried powders (Nizić Nodilo et al., 2021; Shahn et al., December 2018). Observed swelling behaviour of the microspheres is a prerequisite for mucoadhesion and drug release from the polymeric matrix (Duvnjak Romić et al., 2016; Wu et al., 2020).

DoE modelling revealed commonly observed effects of formulation and process parameters on the abovementioned responses as presented in the supplementary materials (Table S1). Results obtained confirmed the suitability of parameters' levels employed for the production of dry powder delivery platform with DH drug content ranging from 1.44 % ± 0.00 % to 7.90 % ± 0.00 %.

Furthermore, DoE modelling was performed on the key responses related to powder behavior upon aerosolization including particle size, Hausner ratio, spray cone angle and deposition profile. Results obtained are presented in detail below.

### 3.1.1. Particle size

Mean volume diameters  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  and  $D_{v90}$  were in the range 6.7 ± 0.4 – 11.6 ± 0.4 μm, 17.1 ± 0.1 – 35.7 ± 1.6 μm, and 34.1 ± 0.2 – 72.7 ± 1.1 μm, respectively (Table 2). Obtained regression models exhibited a good fit for  $D_{v10}$  (R-squared 0.80, RMSE 0.73, PRESS R-squared 0.34 and PRESS RMSE 1.01),  $D_{v50}$  (R-squared 0.92, RMSE 1.80, PRESS R-squared 0.77 and PRESS RMSE 2.35) and  $D_{v90}$  (R-squared 0.84, RMSE 5.87, PRESS R-squared 0.62 and PRESS RMSE 7.30) and are presented with the following equations (Eqs. (11)–(13)):

$$D_{v10} = 9.21 - 0.13 \times DH + 0.28 \times M - 0.98 \times T_{in}^* + 0.18 \times FPS + 0.65 \times DH \times M^* - 0.26 \times T_{in} \times FPS \quad (11)$$

$$D_{v50} = 24.43 + 2.46 \times DH^* + 3.75 \times M^* + 0.46 \times FPS - 2.26 \times DH \times M^* - 2.02 \times M \times FPS^* + 3.41 \times FPS^{2*} \quad (12)$$

$$D_{v90} = 59.72 + 6.41 \times DH^* + 8.37 \times M^* + 0.69 \times T_{in} + 7.65 \times DH^2 - 12.84 \times T_{in}^{2*} \quad (13)$$

It was shown that the  $D_{v50}$  and  $D_{v90}$  significantly increased with the increase in DH and mannitol concentration in feed solution. In case of  $D_{v10}$  and  $D_{v50}$ , significant influence of interaction between DH and mannitol concentration was observed. Namely, increase in DH concentration led to significant increase in  $D_{v10}$  and  $D_{v50}$ , at the highest and the lowest mannitol concentration in the drying feed, respectively. Generally, higher solids content in the feed solution leads to lower content of the solvent that needs to be evaporated during the drying process. Furthermore, depending on the solute properties, higher concentrations of components in the feed solution may result in higher solution viscosity, leading to formation of larger droplets at the nozzle and resulting in larger dry particle size (Ziaee et al., November 2018).  $D_{v10}$  and  $D_{v50}$  increased with the increase in feed pump setting, which was expected due to the higher flow rate generated by higher pump setting, resulting in less effective atomisation and formation of larger droplets and leading to increase in particle diameter (Singh and van den Mooter, 2016). Such an effect was not observed for  $D_{v90}$ , where feed solids concentration showed the most significant influence. Finally, decrease in inlet temperature led to significant increase in  $D_{v10}$  which may be the indicator of the influence of the drying rate on the smallest particles agglomeration. Namely, decrease in inlet temperature led to increased moisture content within microsphere matrix (Table S1). Increased moisture content could contribute to cohesion/agglomeration of the smallest particles, characterised by large total surface area (Both et al., 2020).

According to EMA guidelines for nasal products, volume diameter of majority of nasal spray particles must be above 10 μm (Agency, 2006).  $D_{v10}$  of several microsphere samples prepared within DoE was above 10 μm, complying with the aforementioned criterion.

### 3.1.2. Hausner ratio

Hausner ratio (HR) for the prepared microspheres ranged between 1.15 ± 0.06 and 1.30 ± 0.09 (Table 2). The model obtained by the regression analysis exhibited a good fit (R-squared 0.84, RMSE 0.02, PRESS R-squared 0.77 and PRESS RMSE 0.02) and is given by the following equation (Equation (14)):

$$HR = 1.24 - 0.04 \times M^* - 0.03 \times T_{in}^* \quad (14)$$

Hausner ratio was shown to decrease with the increase in mannitol concentration in the spray-drying feed (Patil et al., 2021). Spray-dried microspheres with high ionic polymer content are characterised by high cohesiveness, which results in higher Hausner ratio, i.e. poorer flow properties (13). Higher mannitol to chitosan ratio was shown to result in larger particle size, which might have contributed to powder flowability (Liu et al., 2008). The negative effect of inlet temperature on Hausner ratio is probably related to dry powder moisture content. Higher inlet temperature resulted in lower microspheres moisture content, linked with improved flow properties (Sandler et al., 2010). Higher mannitol content within chitosan/mannitol microsphere matrix was also related to lower residual moisture, which might have contributed to the powder flowability.

The range of Hausner ratio obtained within the DoE characterises the microspheres' flow properties from passable to good, according to European Pharmacopoeia (Ph. Eur. Commission, 2021). Even though Hausner ratio may not be used for precise prediction of behaviour of non-freely flowable powder (e.g., spray-dried powder), it may show a trend in flow properties (12).

### 3.1.3. Spray cone angle

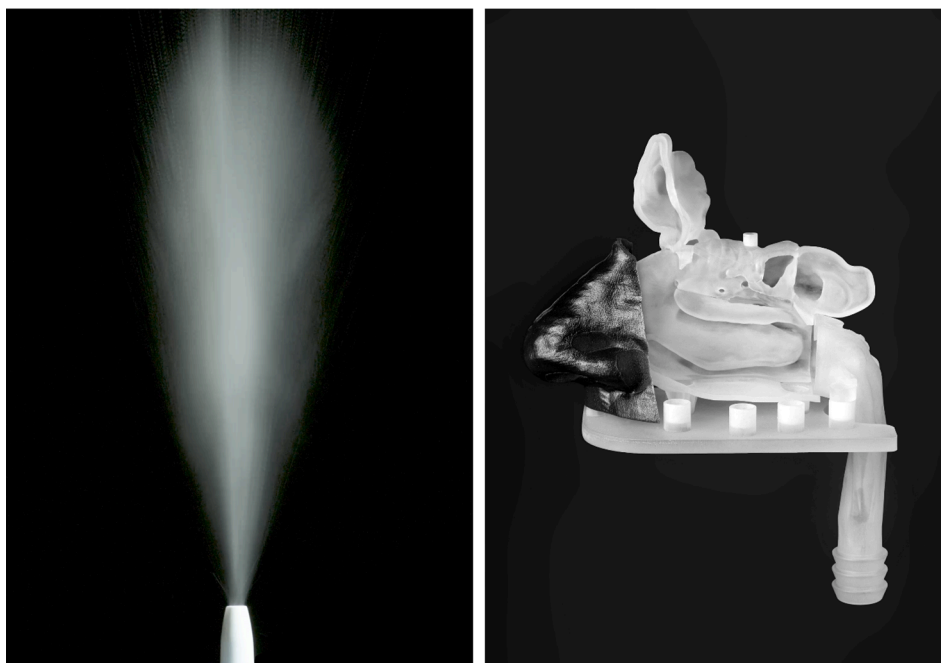
Spray cone angle of DoE-defined donepezil powder formulations ranged between 22.5 ± 0.2° and 28.3 ± 0.9° (Table 2; Fig. 1, left). Model obtained from regression modelling exhibited a good fit (R squared 0.75, RMSE 1.04, Press R-squared 0.06 and Press RMSE 1.47). The Equation (15) presents the obtained model:

$$CA = 26.91 + 0.27 \times DH - 0.74 \times M^* - 0.41 \times T_{in} + 0.57 \times FPS + 0.91 \times DH \times M^* + 0.49 \times M \times T_{in} - 1.98 \times T_{in}^{2*} \quad (15)$$

The regression model comprises all individual formulation and process parameters among which the effect of concentration of mannitol in the spray-drying feed on spray cone angle of the dry powder was found to be statistically significant. The increase in mannitol concentration was shown to decrease the spray cone angle. This observation may be explained by positive effect of mannitol concentration on the dry powder particle size. It was already reported for both, liquid and powder formulations, that aerosolised samples with larger droplet/particle size were characterised by more narrow spray cone angle (Nizić Nodilo et al., 2021; Nizić et al., 2019). Such an effect is advantageous since smaller spray cone angles enable more efficient drug delivery to the targeted nasal regions located beyond the nasal valve, the smallest cross-sectional area within the nasal cavity (12). Interaction between formulation parameters (DH and mannitol concentration) and quadratic effect of drying temperature were also recognised as parameters with significant effect on the spray cone angle, revealing the complexity of investigated parameters' impact on the response in question.

### 3.1.4. Nasal deposition profile of donepezil microspheres

Drug deposition within the targeted region of nasal cavity represents one of the mandatory milestones in achievement of effective nasal therapy (Scherliep, 2020; Nizić Nodilo et al., 2021). In cases when direct



**Fig. 1.** Spray plume angle of DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DoE-defined sample 15; left) aerosolised by Aptar UDSP nasal device (left) and multi-sectional 3D printed nasal cavity model based on CT scan of a 62-year old patient used for nasal deposition studies (right).

nose-to-brain drug delivery is intended, the formulation deposition in the olfactory region of the nasal cavity must be potentiated (Wingrove et al., September 2018). Olfactory pathway presents the dominant route in direct nose-to-brain drug delivery, while trigeminal pathway may contribute in this regard (Laffleur and Bauer, 2021). Namely, filaments of the olfactory nerve penetrate the olfactory mucosa allowing direct contact with the environment. Trigeminal nerve endings innervating respiratory and olfactory mucosa do not penetrate the mucosal surface and can be reached by active substances after crossing the mucosa (Djupesland et al., 2014). In addition, drug deposition in the respiratory region also potentiates systemic absorption due to the high vascularisation and large surface area of respiratory mucosa (Laffleur and Bauer, 2021). Systemically absorbed and circulating drug may reach the brain crossing blood–brain barrier, however, at the same time it may elicit systemic side effects which are to be attenuated with this route of delivery.

In this work, deposition studies were performed using a multi-sectional nasal cavity model developed based on the CT scan of a patient with healthy nasal airways passages (Fig. 1, right), with length of a nasal cavity and smallest vertical cross-sectional areas (valve region) fitting into the ‘normative’ mean range (Nižić Nodilo et al., 2021; Djupesland and Mahmoud, 2020). Simulation of breath airflow was obtained by connecting the model to the respiratory pump. Formulation administration into 3D model was performed using spray device designed for nasal powder delivery targeting the upper part of the nasal cavity (Salade et al., 2018).

**3.1.4.1. Deposition in the olfactory region.** Drug deposition in the olfactory region (superior turbinate with small portion of the middle turbinate and the corresponding segment of the nasal septum (Choi and Goldstein, 2018), and respiratory region (the rest of turbinates innervated by trigeminal nerve and septum that are covered by respiratory epithelium) was monitored in relation to formulation, process and administration parameters given in Table 2.

Fraction of the administered dose deposited in the olfactory region for all DoE runs ranged between  $13.9 \pm 1.9$  and  $65.5 \pm 0.2$  % (Table 2).

Model obtained from the regression modelling exhibited a good fit (R-squared 0.91, RMSE 5.36, Press R-squared 0.67 and Press RMSE 7.29)

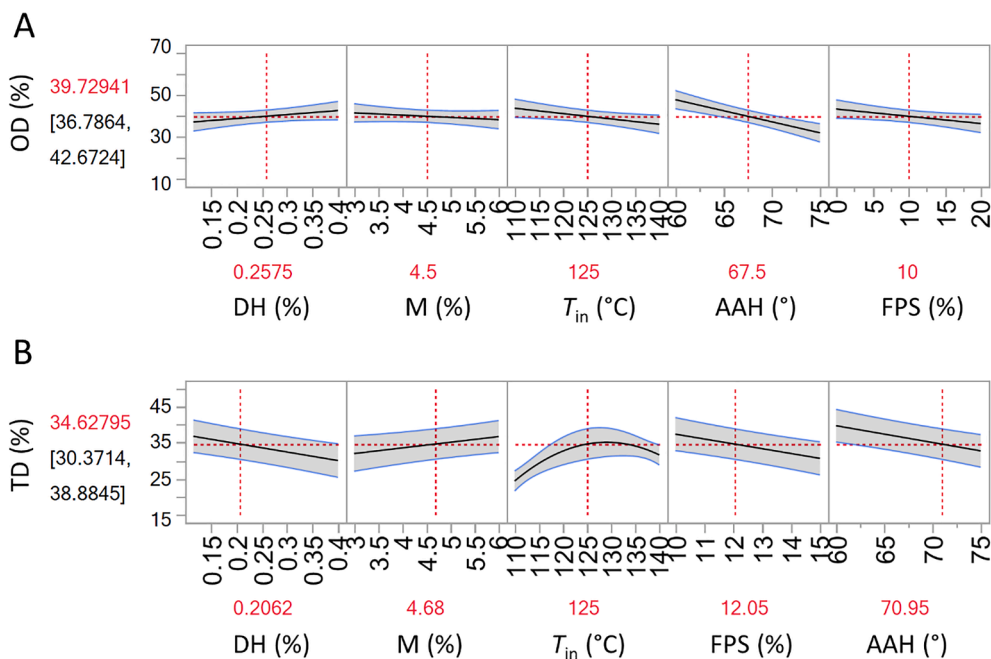
and is given by the Fig. 2A and Eq. (16):

$$OD = 39.73 + 2.71 \times DH - 1.62 \times M - 3.83 \times T_{in} - 7.91 \times AAH^* - 3.46 \times IFR + 8.15 \times DH \times M^* - 3.78 \times DH \times T_{in} \quad (16)$$

Both inspected administration parameters exerted significant influence on olfactory deposition. Decrease in angle of administration from horizontal plane within the range of  $60^\circ$  to  $30^\circ$  and decrease in inspiratory airflow in the range of  $60 \text{ L min}^{-1}$  to  $0 \text{ L min}^{-1}$  resulted in increase in fraction of the dose deposited in the olfactory region. In the literature, orientation of  $60^\circ - 75^\circ$  from the horizontal direction has been reported as favourable in studies on nasal olfactory deposition of liquid formulations (Xi et al., 2016; Kundoor and Dalby, 2011). However, administration of donepezil formulation at relatively low angles from horizontal plane seems to result in tremendously efficient powder olfactory deposition yielding 65.5 % of the administered dose, which may be ascribed to specific powder-related aerodynamic properties and performance of the spray pump used in this study. For the comparison, Salade et al. (Salade et al., 2018) used the same device for deposition studies of chitosan-coated liposome dry-powder formulations loaded with ghrelin aimed at nose-to-brain delivery and attained deposition of 52 % of the administered dose within the olfactory region of 3D nasal cavity model, at administration angle of  $45^\circ$  and breath hold, with no inspection of influence of formulation parameters on nasal deposition profile.

Within this work, increase in the inspiratory airflow was shown to reduce the olfactory deposition as inspiration force changed the pathway of the particles dragging them towards posterior parts of the nasal cavity. In addition, drug administration at breath hold is advantageous as it raises patient compliance avoiding problems with coordination of breathing with powder actuation and problems with the production of adequately deep breath while administering drug nasally.

Apart from administration parameters, the comprehensive approach to deposition studies revealed significant influence of formulation and process parameters on the formulation deposition profile. Thus, decrease in drying temperature was shown to increase the formulation olfactory deposition. This observation might be explained by two



**Fig. 2.** Prediction of olfactory (OD; A) and total turbinate (TD; B) deposition of DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DoE-defined sample 15) in relation to donepezil (DH) and mannitol (M) concentration, inlet temperature ( $T_{in}$ ), feed pump setting (FPS) and angle of administration from the horizontal plane (AAH). Values in brackets refer to 95 % confidence interval.

distinct phenomena. As already explained, decrease in temperature induced increase in  $D_v10$ , which could increase efficacy of powder deposition within the nasal cavity. In addition, decrease in temperature led to increased residual moisture content which might have promoted small particle aggregation and powder deposition within olfactory region (Salade et al., 2018). Interaction between formulation parameters (DH and mannitol concentration) exhibited the most pronounced effect on formulation olfactory deposition. This effect was expected since the same parameters' interaction influenced significantly spray cone angle and  $D_v10$  directly affecting formulation nasal deposition profile.

**3.1.4.2. Deposition in the turbinate region.** Fraction of the administered dose deposited in the turbinate region for all DoE runs ranged between  $19.4 \pm 5.8$  and  $47.6 \pm 6.8$  % (Table 2).

Model obtained from the regression modelling exhibited a good fit (R-squared 0.92, RMSE 2.98, Press R-squared 0.72 and Press RMSE 4.10) and is given by the Fig. 2B and Equation (17):

$$TD = 34.24 - 3.06 \times DH^* + 1.44 \times M + 3.63 \times T_{in}^* - 3.37 \times FPS^* - 3.5 \times AAH^* - 2.58 \times DH \times M^* - 6.65 \times T_{in}^{2*} \quad (17)$$

The regression modelling revealed the same relationship between turbinate deposition and parameters of administration as observed in case of olfactory deposition modelling. Quadratic effect of drying temperature indicated its complex influence on the turbinate deposition. Individual formulation and process parameters including DH concentration, mannitol concentration and drying temperature, as well as interaction between DH and mannitol concentration, all showed influence trend opposite to that observed in olfactory deposition modelling, confirming complementarity between olfactory and turbinate deposition efficiency. Thus, the combination of DoE parameters resulting in the highest olfactory deposition (65.5 %) resulted also in one of the lowest turbinate deposition (20.5 %) presenting optimal profile concerning direct nose-to-brain delivery and avoiding extensive systemic absorption.

Conclusively, the nasal deposition profile of DH loaded microspheres was shown to be closely related to the formulation properties that

determine its spraying behaviour and to the mode/settings of its administration. The obtained results confirmed the need for coupling formulation, process and administration parameters employing the QbD approach to optimise nasal deposition pattern in relation to the treated condition. Resultant olfactory targeting efficiency went well beyond current state of the art in the field of nose-to-brain delivery.

### 3.2. Selection of the leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DH/C/M)

DoE matrix design and regression modelling revealed and elucidated the main formulation, process and/or administration parameters determining the analysed responses including powder particle and bulk properties as well as behaviour upon aerosolization, as discussed above. The selection of the leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DH/C/M) and corresponding mode of administration was performed based on the  $D_v10$  as the key parameter for localised nasal deposition, and the olfactory deposition, recognized for its importance in nose-to-brain delivery. Thus, spray-drying of aqueous solution of DH (0.4 %, w/w), mannitol (6.0 %, w/w) and chitosan (1.5 %, w/w) at inlet temperature of 110 °C and feed pump setting of 15 % was identified as optimal, resulting in leading DH loaded microspheres with the largest  $D_v10$  ( $11.62 \pm 0.41$   $\mu\text{m}$ ) and the highest olfactory deposition ( $65.5 \pm 0.2$  % of the applied dose), when applied at angle from horizontal plane of 30° and at air flow of 0 L  $\text{min}^{-1}$ . The selected formulation and process parameters resulted in moderate process yield (47.2 %). It may be explained by the drying chamber of laboratory-scale apparatus not sufficiently long and wide when compared to industrial scale spray-driers (Li et al., 2009), to completely dry the largest droplets obtained at the highest feed pump setting at the lowest inlet temperature, resulting in class of moistened particles adhering to the walls of the drying chamber (Salade et al., 2018). However, the residual moisture within the obtained dry product ( $5.2 \pm 0.2$  %) confirmed the satisfactory drying process. Moreover, leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres showed fair flow properties, highly positive particle surface charge and pronounced swelling ability expressed by volume of absorbed SNF per milligram of chitosan. The contribution of mannitol in



the leading microspheres' matrix is evident from the comparison with corresponding DH loaded chitosan microspheres (DH/C; prepared at the same DH to chitosan weight ratio as DH/C/M microspheres) in relevant parameters such as: sample volume comprising particles larger than 10  $\mu\text{m}$  ( $93.3 \pm 0.4\%$  vs  $58.0 \pm 1.6\%$ , respectively); Hausner ratio ( $1.23 \pm 0.06$  vs  $1.35 \pm 0.02$ , respectively); and volume of absorbed SNF per milligram of chitosan in the swelling process ( $51.1 \pm 0.9 \mu\text{L mg}^{-1}$  vs  $35.7 \pm 4.7 \mu\text{L mg}^{-1}$ , respectively).

The highest DH concentration (0.4 %, w/w) in the selected spray-drying feed is beneficial since it resulted in microspheres with the highest drug content enabling delivery of adequate DH dose in the powder quantity appropriate for nasal administration. Furthermore, developed powder delivery by UDSF device was characterised by high efficiency ( $99.1 \pm 1.2\%$  of theoretical powder weight) and great uniformity of emitted powder quantity, with very low coefficient of variation (CV = 1.2 %) (20).

### 3.3. In-depth characterisation of the DH/C/M microspheres

#### 3.3.1. Morphology of the DH/C/M microspheres

SEM micrograph of the DH/C/M microspheres confirmed the particle size range obtained by laser light scattering method (Fig. 3, left). Microspheres were relatively uniform in size, spherical in shape with smooth surface, thus presenting adequate morphology to ensure targeted powder flowability. SEM micrograph of corresponding DH loaded chitosan microspheres (DH/C) presented for comparison, revealed smaller particle size and wrinkled microsphere surface (Fig. 3, right), clearly indicating the benefits of mannitol incorporation in the microsphere matrix with respect to requested particle size range and surface appearance.

#### 3.3.2. DH *in vitro* release profile

The *in vitro* release profile of donepezil from DH/C/M microspheres in SNF was determined under sink conditions using automated Franz diffusion system. The DH/C/M microspheres potential to modulate DH release was assessed in relation to corresponding chitosan microspheres (DH/C), and pure DH powder (Fig. 4). The employed method enabled polymeric matrix hydration and swelling at semipermeable membrane placed between the powder sample and receptor medium, simulating hydrating conditions at nasal mucosa *in vivo* (Jug et al., 2018). It was observed that microspheres swelled absorbing SNF, turning into gel which retained its structure till the completion of *in vitro* release study. Both, chitosan and chitosan/mannitol microspheres provided prolonged DH release in comparison to pure DH powder, with total drug release attained after 5 and 3 h, respectively. The observed dissimilarity of DH release profiles from DH/C/M and DH/C microspheres in relation to pure DH powder dissolution profile was confirmed by  $f_2$  similarity criteria ( $f_2 = 45.6$  and  $40.5$  for DH/C/M vs DH and DH/C vs DH, respectively). The presence of osmotically active mannitol in the DH/C/

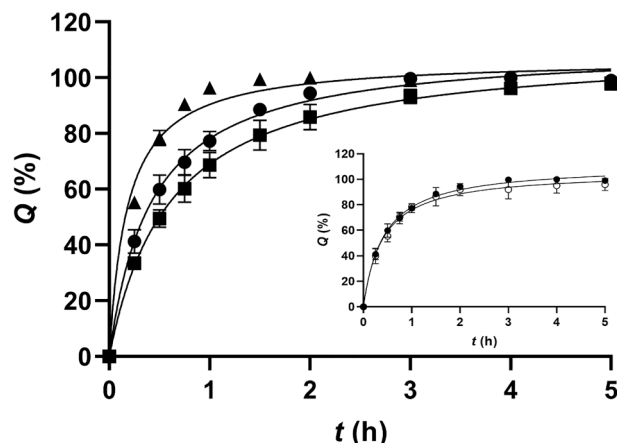


Fig. 4. *In vitro* release profile of DH from leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DH/C/M; circle) and corresponding DH loaded chitosan microspheres (DH/C; square) compared to dissolution of pure DH powder (triangle). Graph insert: *In vitro* release profile of DH from DH/C/M immediately after spray-drying (filled circle) and upon 6-month storage at 4 °C (empty circle). Q represents cumulative percentage of DH released at time t. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD, n = 3.

M microspheres potentiated the wetting (13) and swelling of the polymeric matrix (volume of SNF absorbed per milligram of chitosan was  $51.1 \pm 0.9 \mu\text{L mg}^{-1}$  and  $35.7 \pm 4.7 \mu\text{L mg}^{-1}$  for DH/C/M and DH/C, respectively). However, the observed acceleration of drug diffusion through the gel swollen structure was found not to be significant ( $f_2 = 67.7$  for DH/C/M vs DH/C). The resultant release profile is highly beneficial ensuring prolonged but complete drug release within the expected retention time of the powder formulation at the nasal mucosa (Tiozzo Fasiolo et al., 2018; Nizić et al., October 2019; Soane et al., 2001). Moreover, initial burst release (about 40 % of the contained dose released in 15 min) bears the potential to initially provide high drug concentration at the nasal mucosa, favouring absorption and fast achievement of therapeutic drug concentration at the action site (Nizić Nodilo et al., 2021; Tiozzo Fasiolo et al., 2018; Soane et al., 2001).

Table 3

Fitting data for *in vitro* DH release profile from leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DH/C/M).

Model	Linear equation	R <sup>2</sup>
Zero order	$y = 0.2764x + 0.3523$	0.7041
First order	$y = 0.1186x - 0.2890$	0.7247
Higuchi	$y = 0.5856x + 0.1184$	0.9356
Korsmeyer-Peppas	$y = 0.3558x - 0.1328$	0.9604

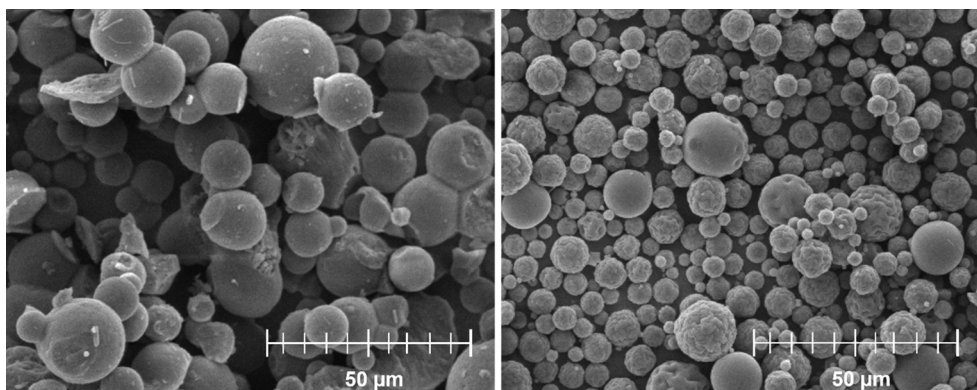


Fig. 3. SEM micrographs of leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DH/C/M; left) and corresponding DH loaded chitosan microspheres (DH/C; right).



Table 3 shows that the best-fit release kinetic data with the highest values of determination coefficients were shown by Higuchi and Korsmeyer-Peppas models, as previously reported for chitosan-based spray-dried systems (Duvnjak Romić et al., 2016; Liu et al., 2006). The release mechanism of DH from DH/C/M microspheres indicates Fickian diffusion, with release controlled by diffusion and swelling ( $n_c = 0.3558$ ) (Bao et al., 2019; Schliecker et al., 2004).

### 3.3.3. Mucoadhesion of DH/C/M microspheres

Development of a mucoadhesive drug delivery system is a promising strategy to overcome rapid nasal clearance (Agrawal et al., 2018) and to achieve enhanced DH brain delivery (Akel et al., 2021; Espinoza et al., 2019; de Souza et al., 2021). Herein we investigated mucoadhesive properties of the microspheres using excised nasal porcine mucosa, which is a frequently used model replacing human nasal mucosa in such studies (Nžić Nodilo et al., 2021; Ladel et al., 2019; Yang et al., 2017). Mucoadhesive properties of the DH/C/M microspheres were expected to be provided by the presence of chitosan as a mucoadhesive polymer within the microsphere matrix. In order to evaluate the influence of mannitol on mucoadhesive properties, DH/C/M microspheres were compared with corresponding chitosan microspheres (DH/C) in this regard. Mucoadhesion of powders was expressed as maximum detachment force and work of adhesion. The obtained results are presented in Fig. 5.

DH/C/M microspheres showed prominent mucoadhesive properties, with 8-fold higher maximum detachment force and 4-fold higher work of adhesion in relation to pure drug powder. DH/C microspheres presented 2.9-fold higher maximum detachment force and 1.3-fold higher work of adhesion in relation to the DH/C/M microspheres, which was expected due to their higher chitosan content.

Chitosan is a well-known mucoadhesive polymer that swells in the contact with nasal fluid. Being positively charged at physiological pH of the nasal mucosa it electrostatically interacts with negatively charged components of mucus and epithelial surfaces providing mucoadhesive properties. Apart from electrostatic interaction, mucoadhesive interactions between chitosan and mucin also involve hydrogen bonding and hydrophobic interaction (Bravo-Osuna et al., 2007; Ways et al., 2018). In addition, hydration and swelling extent of the polymeric matrix determines the potential for chitosan and mucin chain interpenetration, thus initiating the process of mucoadhesion (Guerini et al., 2022).

In order to evaluate the effect of mannitol on the chitosan mucoadhesive properties, maximum detachment force and work of adhesion for the examined microsphere samples were expressed per milligram of

chitosan within the microsphere matrix (Fig. 5, insert). Such an approach revealed that the presence of mannitol increased chitosan mucoadhesive properties which may be explained by promoted chitosan swelling owing to mannitol osmotic activity within the microsphere matrix.

### 3.3.4. In vitro biocompatibility of DH/C/M microspheres

The biocompatibility of DH/C/M was assessed *in vitro* using human airway epithelial Calu-3 cell line. The viability of cells exposed to microspheres suspended in HBSS-Ca<sup>2+</sup>/HEPES (pH = 6.0) at chitosan concentration ranging from 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  to 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and corresponding control samples (DH and mannitol solutions) is presented in Fig. 6. All control samples were well tolerated by Calu-3 cells at the tested concentration range. Cells exposed to microsphere suspensions prepared at chitosan concentration from 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  to 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  retained viability above 90 % in relation to negative control (cells exposed to HBSS-Ca<sup>2+</sup>/HEPES; pH = 6.0). Microsphere suspension prepared at chitosan concentration of 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  induced decrease in cell viability to 67 % in relation to negative control. Chitosan is well-known biocompatible material for various types of biomedical applications (Kou, 2022). However, its positive surface charge at pH below pKa and interaction with negatively charged cell surface may induce reduction in cell viability *in vitro*. Namely, *in vitro* cell models are generally more susceptible to cytotoxicity, as they represent only a limited fragment of the structure and function of human tissues.

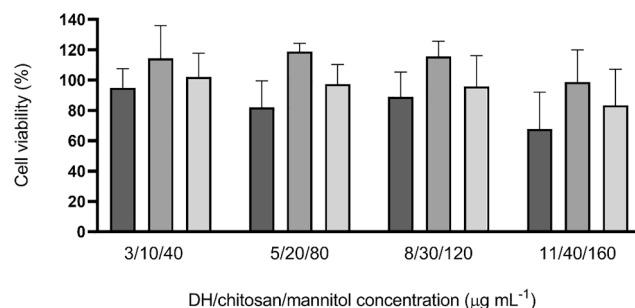


Fig. 6. Influence of leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres suspension (■), DH solution (■) and mannitol solution (□) prepared at DH, chitosan and/or mannitol concentration in the range of 3–11  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 10–40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 40–160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, in HBSS-Ca<sup>2+</sup>/HEPES (pH = 6.0), on the viability of Calu-3 cells (MTT assay). Data are expressed as mean  $\pm$  SD, n = 3.

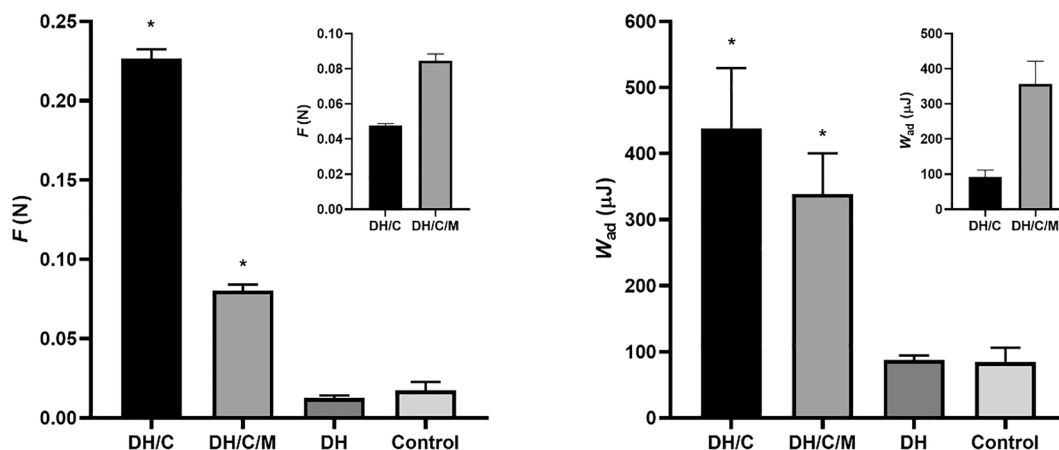


Fig. 5. Maximum detachment force ( $F$ ; left) and work of adhesion ( $W_{ad}$ ; right) of leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DH/C/M), corresponding DH loaded chitosan microspheres (DH/C) compared to pure DH powder (DH) and control (filter paper). Graph insert: Maximum detachment force ( $F$ ; left) and work of adhesion ( $W_{ad}$ ; right) of DH/C/M and DH/C microspheres expressed per milligram of chitosan. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD, n = 3. \*-statistically significant difference in  $F$  and  $W_{ad}$  with respect to corresponding control,  $p < 0.05$ .

Therefore, *in vitro* biocompatibility studies may serve as an indicator of safe concentrations at which further cell-based characterisation methods like *in vitro* permeability assay, can be securely performed (Hafner et al., 2009; Blažević et al., 2016).

Based on results obtained in biocompatibility studies, microsphere suspension in HBSS-Ca<sup>2+</sup>/HEPES (pH = 6.0) prepared at chitosan concentration of 30 µg mL<sup>-1</sup> was selected for the permeability studies.

### 3.3.5. *In vitro* DH permeability

DH permeability studies were performed using Calu-3 cell monolayer grown at air-liquid interface, adequately modelling the nasal epithelial barrier in terms of monolayer ultrastructure, mucus production and barrier integrity (Nizić Nodilo et al., 2021; Sibinovska et al., 2020; Ong et al., 2013). Calu-3 cell model potential has already been exploited for the screening of innovative nasal formulations intended for nose-to-brain drug delivery (Nizić Nodilo et al., 2021; Salade et al., 2018; Salade et al., 2017; Zhang et al., 2016), providing high reproducibility and genetic homogeneity, inherent to immortalised cell lines (Sibinovska et al., 2020).

In this study Calu-3 cell monolayer was used to evaluate the influence of chitosan/mannitol microspheres on DH permeability across the epithelial barrier. To differentiate between the effect of DH carrier components on cell layer integrity/permeability, apart from the DH/C/M microspheres suspension, the following set of control samples was used: DH/C microspheres suspension, DH/mannitol solution and DH solution, all prepared in HBSS-Ca<sup>2+</sup>/HEPES (pH = 6.0), at DH, chitosan and/or mannitol concentration of 8 µg mL<sup>-1</sup>, 30 µg mL<sup>-1</sup> and 120 µg mL<sup>-1</sup>, respectively. All tested samples are presented in Table 4, showing their osmolality values.

The  $P_{app}$  value of DH from the solution across Calu-3 cell monolayer evaluated in this study is of the same order of magnitude as values obtained by other authors for donepezil or DH in permeability studies across other biological barrier models, like BBB cell model (Veszelka et al., 2018);

MDR-MDCKII cell model (Di et al., 2008) and synthetic membrane Permeapad (di Cagno et al., 2015), all of which present the features of well permeable drug (Furubayashi et al., 2020). The  $P_{app}$  values of DH from DH/C/M and DH/C microspheres showed scarce trend towards higher DH permeation in relation to DH solution (with attenuation factor of 1.16 and 1.30, respectively). Nonetheless, it may be concluded that DH incorporation in chitosan-based microspheres potentiated its permeation across Calu-3 monolayer, considering that only the released drug is available for permeation, in contrast to drug solutions in which total drug dose is instantly available for crossing the cell monolayer (Ventura et al., 2008). The microsphere-related permeation enhancing effect may be explained by the observed Calu-3 monolayer TEER decrease induced by the presence of positively charged chitosan and osmotically active mannitol that reversibly opened intercellular tight junctions promoting paracellular transport of hydrophilic DH. The reversible nature of TEER decreasing effect was confirmed by the increase in TEER up to 81 % of the initial value, as measured 22 h upon

**Table 4**

Osmolality and DH apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) across Calu-3 monolayer for the suspension of leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DH/C/M), suspension of corresponding DH loaded chitosan microspheres (DH/C), DH/mannitol solution (DH-M) and DH solution (DH), all prepared in HBSS-Ca<sup>2+</sup>/HEPES (pH = 6).

Tested sample	Osmolality (mOsm kg <sup>-1</sup> )	$P_{app}$ (10 <sup>-5</sup> cm s <sup>-1</sup> )	Attenuation factor
DH/C/M	348 ± 1	4.15 ± 0.44	1.16
DH/C	323 ± 1	4.66 ± 0.15	1.30
DH-M	322 ± 1	3.64 ± 0.27	1.01
DH	321 ± 1	3.59 ± 0.53	-
HBSS-Ca <sup>2+</sup> /HEPES (pH = 6)	324 ± 3	-	-

Values are mean ± SD, n = 3.

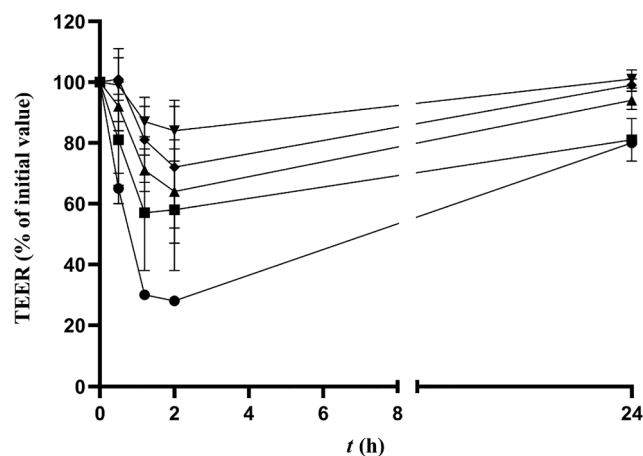
removing the tested chitosan containing samples from the cells (Fig. 7). Biocompatibility of the tested samples was confirmed by fully retained metabolic activity compared to cells exposed to HBSS-Ca<sup>2+</sup>/HEPES (pH = 6) and high extent of TEER recovery 22 h after permeability studies. Microsphere permeation enhancing effect could also be ascribed to mucoadhesion of swollen chitosan-based matrix that seemed to provide more intimate contact with the epithelial barrier and higher concentration gradient at the site of absorption (Jurišić Dukovski et al., 2019). Conclusively, rendering the high DH  $P_{app}$  value comparable to that of solution in conjunction with prolonged drug release and mucoadhesive properties (which cannot be encompassed by static permeability model used), chitosan/mannitol microspheres showed the potential to increase overall DH permeation across the nasal epithelium *in vivo* (Nizić Nodilo, 2021).

### 3.3.6. Stability of DH/C/M microspheres

Physico-chemical stability of DH/C/M microspheres was monitored over a period of 6 months. The formulation was stored in an impermeable container at 4 °C and inspected for drug content, particle size distribution, moisture content, flow properties and drug release profile. No significant change in inspected properties after 6-month storage at described conditions was observed, revealing suitable formulation stability profile (Table 5). Using  $f_2$  as criteria for estimation of similarity between *in vitro* release profiles revealed no significant difference between release profiles of DH/C/M determined immediately after spray-drying and upon 6 month-storage ( $f_2 = 71.6$ ; Fig. 4, insert).

## 4. Conclusion

Within this work, a spray-dried DH powder delivery platform with 93.3 % of volume of the sample comprising particles larger than 10 µm was successfully developed. Chitosan and mannitol were used as excipients with complementary biopharmaceutical and matrix forming properties. Chitosan swelling, mucoadhesion and permeation enhancing performance were optimized by incorporation of highly soluble and osmotically active mannitol within the microsphere matrix. The nasal deposition profile of DH loaded microspheres was shown to be closely related to the formulation properties that determine its spraying behaviour and to the mode/settings of its administration. QbD approach



**Fig. 7.** Trans-epithelial electric resistance (TEER) values of Calu-3 cell monolayer during the study of DH permeability from leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DH/C/M) suspension (circle), corresponding DH loaded chitosan microspheres (DH/C) suspension (square), DH/mannitol solution (triangle), DH solution (reverse triangle) and HBSS-Ca<sup>2+</sup>/HEPES (pH = 6; rhombus), expressed as a percentage of TEER values before permeability study. All tested suspensions and solutions were prepared in HBSS-Ca<sup>2+</sup>/HEPES (pH = 6) at DH, chitosan and/or mannitol concentration of 8, 30 and 120 µg mL<sup>-1</sup>, respectively. Data are expressed as mean ± SD, n = 3.

**Table 5**

Six-month stability data for leading DH loaded chitosan/mannitol microspheres (DH/C/M).

Inspected properties	Immediately after spray-drying	Upon 6-month storage at 4 °C
DC (%)	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.1
$D_{v10}$ (µm)	11.6 ± 0.4	11.5 ± 0.3
$D_{v50}$ (µm)	29.0 ± 1.2	31.2 ± 0.1
$D_{v90}$ (µm)	63.5 ± 1.1	74.3 ± 0.3
< 10 µm	6.7 ± 0.4	6.8 ± 0.5
MC (%)	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.3
HR	1.23 ± 0.06	1.24 ± 0.06
$k_H$ (h <sup>-1/2</sup> )	0.5856	0.5546

DC = microspheres drug loading;  $D_{v10}$ ;  $D_{v50}$  and  $D_{v90}$  = particle volume size distribution; MC = residual moisture content; HR = Hausner ratio;  $k_H$  = Higuchi rate constant.

Values are mean ± SD, n = 3, except for  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$ ,  $D_{v90}$  and < 10 µm, where n = 5.

combining formulation, process and administration parameters in the deposition studies resulted in olfactory targeting efficiency (65.5 % of the applied dose) that was well beyond current state of the art in the field of nose-to-brain delivery. Results on *in vitro* biocompatibility and physico-chemical stability studies confirmed the leading formulation potential for safe and efficient donepezil nose-to-brain delivery. The obtained results can serve as a starting point for appropriate *in vivo* studies needed for the final proof-of-concept.

#### CRedit authorship contribution statement

**Mirna Perkušić:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Laura Nizić Nodilo:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing. **Ivo Ugrina:** Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Drago Špoljarić:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Cvijeta Jakobušić Brala:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing. **Ivan Pepić:** Methodology, Investigation, Data curation, Resources, Writing – review & editing. **Jasmina Lovrić:** Methodology, Investigation, Data curation, Resources, Writing – review & editing. **Gordana Matijasić:** Investigation, Writing – review & editing. **Matija Gretić:** Investigation, Writing – review & editing. **Dijana Zdravec:** Methodology, Resources, Writing – review & editing. **Livije Kalogjera:** Methodology, Resources, Writing – review & editing. **Anita Hafner:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by Croatian Science Foundation under the project UIP-2017-05-4592, European Social Fund under the

Croatian Science Foundation project DOK-2020-01-2473 and Strengthening the scientific research and innovation capacities of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb (FarmInova; project number KK.01.1.1.02.0021), financed from the European Regional Development Fund, Operational Program Competitiveness and Cohesion for the period 2014–2020. The authors would like to thank AptarGroup Inc for providing us with the UDSP-device used for nasal deposition studies.

#### Institutional review board statement

Development of nasal cavity model based on a CT scan of a patient was carried out following the rules of the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Ethics Committee of Sestre milosrdnice University Hospital Center (Project identification code: EP-9941/19-3) and Ethics Committee of University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (Class: 643-02/19-01/02; Registry number: 251-62-03-19-43).

#### Informed consent statement

The patient gave informed consent for inclusion before exporting data for the reconstruction of the nasal cavity and 3D printing.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122038>.

#### References

- European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP): Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products. 2006. p. 27.
- Agrawal, M., Saraf, S., Saraf, S., Antimisiaris, S.G., Chougule, M.B., Shoyele, S.A., et al., 2018. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J. Control. Release* 281 (April), 139–177. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.011>.
- Akel, H., Ismail, R., Katona, G., Sabir, F., Ambrus, R., Csóka, I., 2021. A comparison study of lipid and polymeric nanoparticles in the nasal delivery of meloxicam: formulation, characterization, and *in vitro* evaluation. *Int. J. Pharm.* 604 (February) <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120724>.
- 2020 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia* 16(3) (2020) 391–460. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>.
- Asmari al, A.K., Ullah, Z., Tariq, M., Fatani, A., 2016. Preparation, characterization, and *in vivo* evaluation of intranasally administered liposomal formulation of donepezil. *Drug Des. Dev. Ther.* 10, 205–215. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S93937>.
- Bao, Q., Zou, Y., Wang, Y., Kozak, D., Choi, S., Burgess, D.J., 2019. Drug release testing of long-acting intrauterine systems. *J. Control. Release* 316, 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.015>.
- Belgamwar, V.S., Patel, H.S., Joshi, A.S., Agrawal, A., Surana, S.J., Tekade, A.R., 2011. Design and development of nasal mucoadhesive microspheres containing tramadol HCl for CNS targeting. *Drug Delivery* 18 (5), 353–360. <https://doi.org/10.3109/10717544.2011.557787>.
- Bernkop-Schnürch, A., Dünnhaupt, S., 2012. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81 (3), 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.04.007>.
- Bhavna, M.S., Ali, M., Ali, R., Bhatnagar, A., Baboota, S., et al., 2014. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: *In vitro* and *in vivo* safety evaluation. *Int. J. Biol. Macromol.* 67, 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.022>.
- Birks, J., Harvey, R., 2018. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *Cochrane Database Syst. Rev.* 6 <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001190.pub3.www.cochranelibrary.com>.
- Blažević, F., Milekić, T., Duvnjak Romić, M., Juretić, M., Pepić, I., Filipović-Grčić, J., et al., 2016. Nanoparticle-mediated interplay of chitosan and melatonin for improved wound epithelialisation. *Carbohydr. Polym.* 146, 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.074>.
- Both, E.M., Boom, R.M., Schutyser, M.A.I., 2020. Particle morphology and powder properties during spray drying of maltodextrin and whey protein mixtures. *Powder Technol.* 363, 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.01.001>.
- Bravo-Osuna, I., Vauthier, C., Farabollini, A., Palmieri, G.F., Ponchel, G., 2007. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials* 28 (13), 2233–2243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.005>.





- Choi, R., Goldstein, B.J., 2018. Olfactory epithelium: cells, clinical disorders, and insights from an adult stem cell niche. *Laryngoscope Investigative Otolaryngol.* 3, 35–42. <https://doi.org/10.1002/lto.2135>.
- de Souza, I.F.F., dos Santos, T.Q., Placido, R.V., Mangerona, B.A., Carvalho, F.C., Boralli, V.B., et al., 2021. The liquid crystalline phase behaviour of a nasal formulation modifies the brain disposition of donepezil in rats in the treatment of Alzheimer's disease. *Colloids Surf., B* 203 (February). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111721>.
- di Cagno, M., Bibi, H.A., Bauer-Brandl, A., 2015. New biomimetic barrier Permeapad™ for efficient investigation of passive permeability of drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 73, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.019>.
- Di, L., Kerns, E.H., Bezar, I.F., Petusky, S.L., Huang, Y., 2008. Comparison of Blood-Brain Barrier Permeability Assays. In *Situ Brain Perfusion, MDRI-MDCKII and PAMPA-BBB. Drug Discovery Interface.* 98 (6), 1980–1991.
- Djupesland, P.G., Mahmoud, R.A., 2011. Role of nasal casts for in vitro evaluation of nasal drug delivery and quantitative evaluation of various nasal casts 11 485–495.
- Djupesland, P.G., Messina, J.C., Mahmoud, R.A., 2014. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: An anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Therapeutic Delivery.* 5 (6), 709–733. <https://doi.org/10.4155/tde.14.41>.
- Duvnjak Romić, M., Šegvić Klarić, M., Lovrić, J., Pepić, I., Cetina-Čizmek, B., Filipović-Grčić, J., et al., 2016. Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as in situ forming hydrogel: an innovative antimicrobial wound dressing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 107, 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.013>.
- Espinoza, L.C., Vacacela, M., Clares, B., Garcia, M.L., Fabrega, M.J., Calpena, A.C., 2018. Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer's Disease: in vitro and ex vivo Characterization. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* 17 (1), 43–53. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180104122347>.
- Espinoza, L.C., Silva-Abreu, M., Clares, B., Rodríguez-Lagunas, M.J., Halbaut, L., Cañas, M.A., et al., 2019. Formulation strategies to improve nose-to-brain delivery of donepezil. *Pharmaceutics* 11 (2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020064>.
- Fachel, F.N.S., Medeiros-Neves, B., Dal Prá, M., Schuh, R.S., Veras, K.S., Bassani, V.L., et al., 2018. Box-Behnken design optimization of mucoadhesive chitosan-coated nanoemulsions for rosmarinic acid nasal delivery—In vitro studies. *Carbohydr. Polym.* 199, 572–582. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.054>.
- Focaroli, S., Mah, P.T., Hastedt, J.E., Gitlin, I., Oscarson, S., Fahy, J.V., et al., 2019. A Design of Experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.* 562 (March), 228–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.004>.
- Furubayashi, T., Inoue, D., Nishiyama, N., Tanaka, A., Yutani, R., Kimura, S., et al., 2020. Comparison of various cell lines and three-dimensional mucociliary tissue model systems to estimate drug permeability using an in vitro transport study to predict nasal drug absorption in rats. *Pharmaceutics* 12 (1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010079>.
- Gavini, E., Rassu, G., Ferraro, L., Beggiano, S., Alhalaweh, A., Velaga, S., et al., 2013. Influence of polymeric microcarriers on the in vivo intranasal uptake of an anti-migraine drug for brain targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83 (2), 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.010>.
- Giuliani, A., Balducci, A.G., Zironi, E., Colombo, G., Bortolotti, F., Lorenzini, L., et al., 2018. In vivo nose-to-brain delivery of the hydrophilic antiviral ribavirin by microparticle agglomerates. *Drug Delivery* 25 (1), 376–387. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1428242>.
- Goos, P., Jones, B., 2011. *Optimal Design of Experiments.* 1st ed.
- Grangeia, H.B., Silva, C., Simões, S.P., Reis, M.S., 2020. Quality by design in pharmaceutical manufacturing: a systematic review of current status, challenges and future perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 147, 19–37. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.007>.
- Guerini, M., Condrò, G., Perugini, P., 2022. Evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan-based microstructured lipid carrier (CH-MLC). *Pharmaceutics* 14 (1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010170>.
- Hafner, A., Lovrić, J., Voinovich, D., Filipović-Grčić, J., 2009. Melatonin-loaded lecithin / chitosan nanoparticles: physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 381, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.001>.
- ICH Q18(R2). International Conference on Harmonization (ICH). Guidance for industry: Q8(R2) Pharmaceutical Development. 2009.
- Jug, M., Hafner, A., Lovrić, J., Lusina Kregar, M., Pepić, I., Vanić, Ž., et al., 2018. An overview of in vitro dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147, 350–366. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.072>.
- Jurišić Dukovski, B., Mrak, L., Winnicka, K., Szekalska, M., Juretić, M., Filipović-Grčić, J., et al., 2019. Spray-dried nanoparticle-loaded pectin microspheres for dexamethasone nasal delivery. *Drying Technol.* 1–11. <https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1545783>.
- Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A., 1983. Mechanisms of potassium chloride release from compressed, hydrophilic, polymeric matrices: Effect of entrapped air. *J. Pharm. Sci.* 72 (10), 1189–1191. <https://doi.org/10.1002/jps.2600721021>.
- Kou, S. (Gabriel), 2022. Peters L, Mucalo M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. *Carbohydrate Polym.* 282 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119132>.
- Kundoor, V., Dalby, R.N., 2011. Effect of formulation- and administration-related variables on deposition pattern of nasal spray pumps evaluated using a nasal cast. *Pharm. Res.* 28 (8), 1895–1904. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0417-6>.
- Ladel, S., Schlossbauer, P., Flamm, J., Luksch, H., Mizaikoff, B., Schindowski, K., 2019. Improved in vitro model for intranasal mucosal drug delivery: Primary olfactory and respiratory epithelial cells compared with the permanent Nasal cell line RPMI 2650. *Pharmaceutics* 11 (8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080367>.
- Laffleur, F., Bauer, B., 2021. Progress in nasal drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 607 (July), 120994. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120994>.
- Li, X., Guo, Q., Zheng, X., Kong, X., Shi, S., Chen, L., et al., 2009. Preparation of honokiol-loaded chitosan microparticles via spray-drying method intended for pulmonary delivery. *Drug Delivery* 16 (3), 160–166. <https://doi.org/10.1080/10717540902738341>.
- Liu, C., Desai, K.G.H., Tang, X., Chen, X., 2006. Drug release kinetics of spray-dried chitosan microspheres. *Drying Technol.* 24 (6), 769–776. <https://doi.org/10.1080/03602550600685325>.
- Liu, L.X., Marziano, I., Bentham, A.C., Litster, J.D., White, E.T., Howes, T., 2008. Effect of particle properties on the flowability of ibuprofen powders. *Int. J. Pharm.* 362 (1–2), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.06.023>.
- Martinac, A., Filipović-Grčić, J., Perissutti, B., Voinovich, D., Pavelić, Ž., 2005. Spray-dried chitosan/ethylcellulose microspheres for nasal drug delivery: Swelling study and evaluation of in vitro drug release properties. *J. Microencapsul.* 22 (5), 549–561. <https://doi.org/10.1080/02652040500098960>.
- Nespi, M., Kuhn, R., Yen, C.W., Lubach, J.W., Leung, D., 2022. Optimization of spray-drying parameters for formulation development at preclinical scale. *AAPS PharmSciTech.* 23 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1208/s12249-021-02160-1>.
- Nippe, S., Preußner, C., General, S., 2013. Evaluation of the in vitro release and pharmacokinetics of parenteral injectable formulations for steroids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83 (2), 253–265. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.09.006>.
- Nizić Nodilo, L., Ugrina, I., Špoljarić, D., Amidžić Klarić, D., Jakobišić Brala, C., Perkušić, M., et al., 2021. A dry powder platform for nose-to-brain delivery of dexamethasone: Formulation development and nasal deposition studies. *Pharmaceutics* 13 (6), 1–30. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060795>.
- Nizić, L., Ugrina, I., Špoljarić, D., Sarson, V., Safundžić Kućuk, M., Pepić, I., et al., 2019. Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition. *Int. J. Pharm.* 563 (March), 445–456. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.015>.
- Nizić, L., Potaj, J., Winnicka, K., Szekalska, M., Erak, I., Gretić, M., et al., October 2019. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2020 (141), 105115. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105115>.
- Ong, H.X., Traini, D., Young, P.M., 2013. Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line. *Expert Opinion Drug Delivery* 10 (9), 1287–1302. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.805743>.
- Pallagi, E., Ambrus, R., Szabó-Révész, P., Csóka, I., 2015. Adaptation of the quality by design concept in early pharmaceutical development of an intranasal nanosized formulation. *Int. J. Pharm.* 491 (1–2), 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.018>.
- Pappa, H., Farrí, R., Vilanova, P.O., Palacios, M., Pizzorno, M.T., 2002. A new HPLC method to determine Donepezil hydrochloride in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (1–2), 177–182. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00499-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00499-X).
- Patil, S., Pandit, A., Godbole, A., Dandekar, P., Jain, R., 2021. Chitosan based co-processed excipient for improved tableting. *Carbohydrate Polym. Technologies Applications* 2 (April), 100071. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100071>.
- Ph. Eur. Commission. *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition.* <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition> [Accessed 1st December 2021].
- Rassu, G., Soddu, E., Cossu, M., Brundu, A., Cerri, G., Marchetti, N., et al., 2015. Solid microparticles based on chitosan or methyl-β-cyclodextrin: a first formulative approach to increase the nose-to-brain transport of dexamethasone mesylate. *J. Control. Release* 201, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.01.025>.
- Rassu, G., Ferraro, L., Pavan, B., Giunchedi, P., Gavini, E., Dalpiaz, A., 2018. The role of combined penetration enhancers in nasal microspheres on in vivo drug bioavailability. *Pharmaceutics* 10 (4), 8–10. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040206>.
- Razavi Rohani, S.S., Abnous, K., Tafaghodi, M., 2014. Preparation and characterization of spray-dried powders intended for pulmonary delivery of Insulin with regard to the selection of excipients. *Int. J. Pharm.* 465 (1–2), 464–478. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.02.030>.
- Ruangritchankul, S., Chantharit, P., Srisuma, S., Gray, L.C., 2021. Adverse drug reactions of acetylcholinesterase inhibitors in older people living with dementia: A comprehensive literature review. *Ther. Clin. Risk Manag.* 17, 927–949. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S323387>.
- Salade, L., Wauthoz, N., Deleu, M., Vermeersch, M., de Vriese, C., Amighi, K., et al., 2017. Development of coated liposomes loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery for the treatment of cachexia. *Int. J. Nanomed.* 12, 8531–8543. <https://doi.org/10.2147/IJN.S147650>.
- Salade, L., Wauthoz, N., Vermeersch, M., Amighi, K., Goole, J., 2018. Chitosan-coated liposome dry-powder formulations loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 129 (June), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.011>.
- Sandler, N., Reiche, K., Heinämäki, J., Yliruusi, J., 2010. Effect of moisture on powder flow properties of theophylline. *Pharmaceutics* 2 (3), 275–290. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics2030275>.



- Scherließ, R., 2020. Nasal formulations for drug administration and characterization of nasal preparations in drug delivery. *Therapeutic Delivery* 11 (3), 183–191. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0086>.
- Schliecker, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Ehinger, A., Sandow, J., Kissel, T., 2004. In vitro and in vivo correlation of buserelin release from biodegradable implants using statistical moment analysis. *J. Control. Release* 94 (1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.003>.
- Shahin, H.I., Vinjamuri, B.P., Mahmoud, A.A., Shamma, R.N., Mansour, S.M., Ammar, H. O., et al., 2018. Design and evaluation of novel inhalable sildenafil citrate spray-dried microparticles for pulmonary arterial hypertension. *J. Control. Release* 2019 (302), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.03.029>.
- Sibinovska, N., Žakelj, S., Roškar, R., Kristan, K., 2020. Suitability and functional characterization of two Calu-3 cell models for prediction of drug permeability across the airway epithelial barrier. *Int. J. Pharm.* 585 (March), 119484 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119484>.
- Singh, A., van den Mooter, G., 2016. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 100, 27–50. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.010>.
- Soane, R.J., Hinchcliffe, M., Davis, S.S., Illum, L., 2001. Clearance characteristics of chitosan based formulations in the sheep nasal cavity. *Int. J. Pharm.* 217 (1–2), 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00602-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00602-0).
- Sutthapitaksakul, L., Dass, C.R., Sriamornsak, P., 2021. Donepezil—an updated review of challenges in dosage form design. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 63 (March) <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102549>.
- Szekalska, M., Wroblewska, M., Sosnowska, K., Winnicka, K., 2016. Influence of sodium alginate on hypoglycemic activity of metformin hydrochloride in the microspheres obtained by the spray drying. *Int. J. Polymer Sci.* 2016 <https://doi.org/10.1155/2016/8635408>.
- Tanaka, A., Furubayashi, T., Tomisaki, M., Kawakami, M., Kimura, S., Inoue, D., et al., 2017. Nasal drug absorption from powder formulations: The effect of three types of hydroxypropyl cellulose (HPC). *Eur. J. Pharm. Sci.* 96, 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.028>.
- Tiozzo Fasiolo, L., Manniello, M.D., Tratta, E., Buttini, F., Rossi, A., Sonvico, F., et al., 2018. Opportunity and challenges of nasal powders: drug formulation and delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 113 (May), 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.027>.
- Tiozzo Fasiolo, L., Manniello, M.D., Bortolotti, F., Buttini, F., Rossi, A., Sonvico, F., et al., 2019. Anti-inflammatory flurbiprofen nasal powders for nose-to-brain delivery in Alzheimer's disease. *J. Drug Target.* 27 (9), 984–994. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2019.1574300>.
- Tiozzo Fasiolo, L., Manniello, M.D., Banella, S., Napoli, L., Bortolotti, F., Quarta, E., et al., 2021. Flurbiprofen sodium microparticles and soft pellets for nose-to-brain delivery: Serum and brain levels in rats after nasal insufflation. *Int. J. Pharm.* 605 (March), 120827 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120827>.
- Trenkel, M., Scherließ, R., 2021. Nasal powder formulations: in-vitro characterisation of the impact of powders on nasal residence time and sensory effects. *Pharmaceutics* 13 (3), 385.
- Trows, S., Scherließ, R., 2016. Carrier-based dry powder formulation for nasal delivery of vaccines utilizing BSA as model drug. *Powder Technol.* 292, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.01.042>.
- Uyen, N.T.T., Hamid, Z.A.A., Tram, N.X.T., Ahmad, N., 2020. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: a review. *Int. J. Biol. Macromol.* 153, 1035–1046. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.233>.
- Ventura, C.A., Tommasini, S., Crupi, E., Giannone, I., Cardile, V., Musumeci, T., et al., 2008. Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: interaction with biomembrane models and in vitro permeation studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.05.011>.
- Veszelka, S., Tóth, A., Walter, F.R., Tóth, A.E., Gróf, I., Mészáros, M., et al., 2018. Comparison of a rat primary cell-based blood-brain barrier model with epithelial and brain endothelial cell lines: Gene expression and drug transport. *Front. Mol. Neurosci.* 11 (May), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00166>.
- Ways, T.M.M., Lau, W.M., Khutoryanskiy, V.V., 2018. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. *Polymers* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/polym10030267>.
- Wingrove, J., Swedrowska, M., Scherließ, R., Parry, M., Ramjeeawon, M., Taylor, D., et al., September 2018. Characterisation of nasal devices for delivery of insulin to the brain and evaluation in humans using functional magnetic resonance imaging. *J. Control. Release* 2019 (302), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.03.032>.
- Wu, Y., Zhang, W., Huang, J., Luo, Z., Li, J., Wang, L., et al., 2020. Mucoadhesive improvement of alginate microspheres as potential gastroretentive delivery carrier by blending with Bletilla striata polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* 156, 1191–1201. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.156>.
- Xi, J., Wang, Z., Nevorski, D., White, T., Zhou, Y., 2016. Nasal and olfactory deposition with normal and bidirectional intranasal delivery techniques. In vitro tests and numerical simulations. *J. Aerosol Med. Pulmonary Drug Delivery.* <https://doi.org/10.1089/jamp.2016.1295>.
- Xi, J., Wang, Z., Nevorski, D., White, T., Zhou, Y., 2017. Nasal and olfactory deposition with normal and bidirectional intranasal delivery techniques. In vitro tests and numerical simulations. *J. Aerosol Med. Pulmonary Drug Delivery* 30 (2), 118–131. <https://doi.org/10.1089/jamp.2016.1295>.
- Xi, J., Wang, Z., Si, X.A., Zhou, Y., 2018. Nasal dilation effects on olfactory deposition in unilateral and bi-directional deliveries: In vitro tests and numerical modeling. *Eur. J. Pharm. Sci.* 118, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.03.027>.
- Yang, J., Dai, L., Yu, Q., Yang, Q., 2017. Histological and anatomical structure of the nasal cavity of Bama minipigs. *PLoS ONE* 12 (3), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173902>.
- Zhang, L., Du, S.Y., Lu, Y., Liu, C., Tian, Z.H., Yang, C., et al., 2016. Puerarin transport across a Calu-3 cell monolayer – an in vitro model of nasal mucosa permeability and the influence of paeoniflorin and menthol. *Drug Design, Development Ther.* 10, 2227–2237. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S110247>.
- Zhang, C., Yang, L., Wan, F., Bera, H., Cun, D., Rantanen, J., et al., 2020. Quality by design thinking in the development of long-acting injectable PLGA/PLA-based microspheres for peptide and protein drug delivery. *Int. J. Pharm.* 585, 119441 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119441>.
- Ziaee, A., Albadarin, A.B., Padrela, L., Femmer, T., O'Reilly, E., Walker, G., November 2018. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: critical parameters and experimental process optimization approaches. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2019 (127), 300–318. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.10.026>.

## Article

# Chitosan-Based Thermogelling System for Nose-to-Brain Donepezil Delivery: Optimising Formulation Properties and Nasal Deposition Profile

Mirna Perkušić<sup>1</sup>, Laura Nižić Nodilo<sup>1</sup> , Ivo Ugrina<sup>2</sup> , Drago Špoljarić<sup>3</sup>, Cvijeta Jakobušić Brala<sup>4</sup> , Ivan Pepić<sup>1</sup>, Jasmina Lovrić<sup>1</sup>, Maša Safundžić Kučuk<sup>5</sup>, Marie Trenkel<sup>6</sup>, Regina Scherließ<sup>6,7</sup> , Dijana Zadravec<sup>8</sup>, Livije Kalogjera<sup>9</sup> and Anita Hafner<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Technology, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, 10000 Zagreb, Croatia; mperkusic@pharma.hr (M.P.); lnizic@pharma.hr (L.N.N.); ipedic@pharma.hr (I.P.); jlovric@pharma.hr (J.L.)
- <sup>2</sup> Intellomics Ltd., 21000 Split, Croatia; ivo.ugrina@intellomics.com
- <sup>3</sup> Visage Technologies d.o.o., 10000 Zagreb, Croatia; dspoljaric@gmail.com
- <sup>4</sup> Department of Physical Chemistry, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, 10000 Zagreb, Croatia; cjakobus@pharma.hr
- <sup>5</sup> Jadran-Galenski Laboratorij d.d., 51000 Rijeka, Croatia; masa.safundzic@jglpharma.com
- <sup>6</sup> Department of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Kiel University, 24118 Kiel, Germany; mtrenkel@pharmazie.uni-kiel.de (M.T.); rscherliess@pharmazie.uni-kiel.de (R.S.)
- <sup>7</sup> Priority Research Area Kiel Nano, Surface and Interface Sciences (KiNSIS), Kiel University, 24118 Kiel, Germany
- <sup>8</sup> Department of Diagnostic and Interventional Radiology, University Hospital Center Sestre Milosrdnice, University of Zagreb School of Dental Medicine, 10000 Zagreb, Croatia; zadravec@sfzg.hr
- <sup>9</sup> ORL/HNS Department, University Hospital Center Sestre Milosrdnice, Zagreb School of Medicine, 10000 Zagreb, Croatia; kalogjera@sfzg.hr
- \* Correspondence: anita.hafner@pharma.unizg.hr



**Citation:** Perkušić, M.; Nižić Nodilo, L.; Ugrina, I.; Špoljarić, D.; Jakobušić Brala, C.; Pepić, I.; Lovrić, J.; Safundžić Kučuk, M.; Trenkel, M.; Scherließ, R.; et al. Chitosan-Based Thermogelling System for Nose-to-Brain Donepezil Delivery: Optimising Formulation Properties and Nasal Deposition Profile. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1660. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061660>

Academic Editor: Heejun Park

Received: 17 April 2023

Revised: 16 May 2023

Accepted: 1 June 2023

Published: 5 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Donepezil nasal delivery strategies are being continuously investigated for advancing therapy in Alzheimer’s disease. The aim of this study was to develop a chitosan-based, donepezil-loaded thermogelling formulation tailored to meet all the requirements for efficient nose-to-brain delivery. A statistical design of the experiments was implemented for the optimisation of the formulation and/or administration parameters, with regard to formulation viscosity, gelling and spray properties, as well as its targeted nasal deposition within the 3D-printed nasal cavity model. The optimised formulation was further characterised in terms of stability, in vitro release, in vitro biocompatibility and permeability (using Calu-3 cells), ex vivo mucoadhesion (using porcine nasal mucosa), and in vivo irritability (using slug mucosal irritation assay). The applied research design resulted in the development of a sprayable donepezil delivery platform characterised by instant gelation at 34 °C and olfactory deposition reaching a remarkably high 71.8% of the applied dose. The optimised formulation showed prolonged drug release ( $t_{1/2}$  about 90 min), mucoadhesive behaviour, and reversible permeation enhancement, with a 20-fold increase in adhesion and a 1.5-fold increase in the apparent permeability coefficient in relation to the corresponding donepezil solution. The slug mucosal irritation assay demonstrated an acceptable irritability profile, indicating its potential for safe nasal delivery. It can be concluded that the developed thermogelling formulation showed great promise as an efficient donepezil brain-targeted delivery system. Furthermore, the formulation is worth investigating in vivo for final feasibility confirmation.

**Keywords:** donepezil; chitosan; nose-to-brain delivery; thermoresponsive in situ gelling system; 3D nasal cavity model; olfactory deposition

## 1. Introduction

Nasal drug delivery offers distinct advantages in brain-targeted therapy of neurologic disorders. Olfactory and trigeminal nerves innervating the olfactory and/or respiratory mucosa enable the direct transport of nasally administered drugs to the brain, bypassing the blood–brain barrier [1]. Nevertheless, the described potential is still scarcely utilised. The demands for a major step forward include the development of functional drug delivery systems and efficient drug deposition in specific nasal regions of interest [2]. Generally, research on the development of nasal delivery systems has addressed the issues of limited drug solubility, permeability, stability, and nasal residence time [3–5]. The potential of advanced delivery platforms of simple production and easy scale-up, such as in situ gelling liquid systems, is of particular interest [3,6]. These systems can incorporate mucoadhesive polymers, drug permeation enhancers, and/or nanocarriers, thus optimising nasal retention time, drug release, and absorption profile [7]. Formulation-related viscosity and/or reduced volume of administration may improve patient compliance, diminishing the potential for discomfort related to formulation run-off to the throat and unpleasant aftertaste [2,8].

Lately, drug delivery to the targeted region of the nasal cavity has become an inevitable milestone towards effective nasal therapy [4], and it emerged as one of the key elements in nasal product development [9]. Recently, our research team pioneered and extensively investigated the issue of coupling formulation and administration parameters employing the quality-by-design (QbD) approach to optimise the nasal deposition pattern in vitro in relation to the specific disease in adults [10]. Such an approach has been shown to hold great promise in promoting targeted nasal drug delivery [11,12].

Targeted nasal delivery can be considered a viable option for advancing drug therapy in Alzheimer's disease [13]. Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder impairing memory, thinking, and behaviour, with rising prevalence corresponding to population ageing [14]. It is one of the leading indications of the demand for drug delivery strategies that overcome the blood–brain barrier [15]. Currently, donepezil is the first-line treatment in patients with mild to moderate Alzheimer's disease, which is available predominantly in oral solid dosage forms [16]. Donepezil oral delivery has several limitations including first-pass metabolism, gastrointestinal and peripheral adverse effects, and low brain bioavailability [17]. On the contrary, the nasal administration of donepezil offers the potential for its efficient and direct central nervous system delivery, reduced systemic bioavailability, and a lower risk of adverse effects [18]. The recognised advantages of nasal donepezil delivery have led to the development of several liquid pharmaceutical platforms including donepezil nanosuspension [19], donepezil-loaded liposomes [20,21], nanoemulsion [22], lipid nanoparticles [23], microemulsion [24], and in situ gel [17], improving donepezil solubility and/or its permeation profile and enhancing its brain bioavailability, as evidenced in animal models in vivo. However, no studies on their possible application mode in humans and deposition pattern within the nasal cavity have been performed.

The idea behind our study was to develop a donepezil-loaded advanced liquid formulation and harmonize its biopharmaceutical performance and nasal deposition profile while meeting all requirements for efficient brain-targeted delivery and keeping the formulating process simple.

In situ gelling thermoresponsive polymer/drug solutions bear the potential to fulfil the above-mentioned requirements. They present easy-to-produce and scale-up formulations that can be readily applied as sprays while ensuring prolonged residence time in the nasal cavity upon gelation triggered by nasal physiological temperature [6]. Ideally, gel-forming constituents could contribute to a sustained drug release and interact with biological barriers to increase drug absorption, altogether resulting in increased bioavailability of the nasally applied drug [25].

Chitosan is a cationic linear polysaccharide widely applied as a mucoadhesive agent and absorption enhancer in nasal formulations [26]. Moreover, chitosan can yield thermoresponsive physical gels in the presence of  $\beta$ -glycerophosphate [27]. An almost neutral

aqueous solution of chitosan and  $\beta$ -glycerophosphate demonstrates a strong rise in the storage modulus upon heating [6].

The aim of this study was to develop the chitosan-based donepezil-loaded thermoresponsive in situ gelling system, considering all aspects of donepezil nasal delivery, including formulation stability, sprayability, gelation temperature and time, drug release profile, interaction with the biological barrier, and, in particular, nasal deposition pattern, which was included as a required complementary indicator of the brain-targeting potential in humans and studied using the model of the healthy adult nasal cavity.

To the best of our best knowledge, this is the first report on the development of a chitosan-based thermoresponsive system for nasal delivery of donepezil. Previously, only Gu et al. [17] reported the development of a thermogelling nasal donepezil system. In that study, two types of poloxamers were used as the thermogelling agent. The systems were characterised in terms of gelation properties, in vitro release, and in vivo pharmacokinetics in rats, and formulation potential to increase donepezil brain bioavailability was confirmed. Compared with the aforementioned study, the innovation in our approach refers to a comprehensive research design that allows an integrated formulation development, taking into account all features of the nasal delivery, including the challenges of brain targeting in humans.

The complex task of correlating the in situ gelling formulation properties and nasal deposition profile with formulation and/or nasal administration parameters was accomplished by employing a statistical design of experiments.

Thorough biopharmaceutical characterisation of the leading formulation, including studies on stability, in vitro release, in vitro biocompatibility and permeability (using Calu-3 cells), ex vivo mucoadhesion (using excised nasal mucosa), and in vivo irritability (using slug mucosal irritation assay), was performed to evaluate the overall potential of the developed formulation in donepezil nose-to-brain delivery.

Finally, the results on the nasal deposition of the leading in situ gelling formulation will be compared with the results obtained previously with optimised donepezil powder formulation [12] to account for the differences in accessibility of the olfactory region using two distinct formulation approaches.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Donepezil hydrochloride (further denoted as DH) was obtained from Carbosynth Ltd. (Compton, UK).  $\beta$ -glycerophosphoric acid disodium salt pentahydrate (denoted as  $\beta$ -glycerophosphate, BGP, further in the text) was purchased from Biosynth Ltd. (Bratislava, Slovakia). Low-molecular-weight chitosan (molecular weight 50–190 kDa, with 75–85% degree of deacetylation; further denoted as chitosan, C), medium-molecular-weight chitosan (molecular weight 190–310 kDa, with 75–85% degree of deacetylation), and high-molecular-weight chitosan (molecular weight 310–375 kDa, with >75% degree of deacetylation) were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Simulated nasal fluid (SNF) was prepared as an aqueous solution by dissolving the following solids: NaCl (150.0 mM; Kemig, Zagreb, Croatia), KCl (40.0 mM; Kemig, Zagreb, Croatia), and  $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$  (5.3 mM; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) [10]. Hank's balanced salt solution (HBSS; pH = 7.0) was prepared by dissolving the following in distilled water: KCl (5.4 mM),  $\text{NaHCO}_3$  (4.2 mM), NaCl (136.9 mM), and D-glucose monohydrate (5.6 mM), all purchased from Kemig, Zagreb, Croatia;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.4 mM; Kemika, Zagreb, Croatia);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (0.3 mM; Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland); N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES; 30.0 mM; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany); and  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (1.3 mM; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). The mixture was used for in vitro cell biocompatibility and permeability studies. Sar-gel<sup>®</sup> (Arkema, Colombes, France) was used for the determination of the fractional deposition pattern. All other chemicals or solvents used in the study were of analytical grade and purchased from Kemika (Zagreb, Croatia).



## 2.2. Preliminary Studies

Thorough preliminary studies were performed to select suitable excipients and appropriate settings of upper and lower limits of the in situ gelling formulation and administration parameters.

Preliminary samples were prepared according to the protocol described in Section 2.4. using chitosans of different molecular weight and different constituent concentrations as presented in the Supplementary Materials, Tables S2–S6.

Exclusion criteria included observed precipitation, inappropriate gelation time or temperature, and poor sprayability (determined as spray cone angle or droplet size distribution). Finally, administration parameters most common in the relevant literature were preliminarily tested within the design space of formulation parameters. The methods applied are described in Sections 2.6.2–2.8.

## 2.3. Design of Experiments (DoE)

Quality by design (QbD) principles were built into the donepezil–chitosan– $\beta$ -glycerophosphate (DH-C-BGP) in situ gelling system development process. This approach was used for optimising formulation and administration parameters to achieve efficient DH nasal delivery. Two formulation (the concentration of DH and C) and two administration (the inspiratory flow rate and angle of administration from the horizontal plane) parameters were incorporated in the definite screening design developed with JMP 14.0 statistical software (JMP<sup>®</sup>, Version 14.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1989–2007). Settings of the parameters in the experimental design are listed in Table 1.

**Table 1.** Settings of the parameters considered in the experimental design.

Parameter	High (+1)	Medium (0)	Low (−1)
Donepezil hydrochloride (DH) concentration (mg mL <sup>−1</sup> )	0.50	0.40	0.30
Chitosan (C) concentration (mg mL <sup>−1</sup> )	9.23	7.69	6.15
Angle of administration from the horizontal plane, AAH (°)	75	60	45
Inspiratory flow rate, IFR (L min <sup>−1</sup> )	30	15	0

Gelation properties (i.e., gelation time and temperature), zero-shear viscosity, droplet size distribution, spray cone angle, and deposition in the turbinate and olfactory region of the nasal cavity were investigated as responses. The statistical software JMP 14.0 (JMP<sup>®</sup>, Version 14.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1989–2007) was used to perform data analysis.

## 2.4. Preparation of the DH-C-BGP In Situ Gelling Formulation

DH-C-BGP nasal formulations were prepared according to Gholizadeh et al. [28], with slight modifications. First, concentrated C solutions (1.0%, 1.5%, and 2.0%, *w/w*) were prepared by dissolving chitosan in 0.5% (*v/v*) acetic acid at room temperature, under stirring conditions for 24 h. Then, an appropriate amount of DH was dissolved in a C solution. A concentrated BGP solution (49%, *w/w*) was prepared by dissolving BGP in water at room temperature. At 4 °C (in an ice bath), the concentrated BGP solution was added dropwise to the DH-C solution, followed by 10 min of mixing. DH-C and BGP solutions were mixed in a 1.6:1 volume ratio. Final DH and C concentrations are listed in Table 2. The concentration of BGP in all DoE samples was 188 mg mL<sup>−1</sup>. The pH value of all samples was also measured, using a S47 SevenMulti pH meter (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland).

## 2.5. Determination of DH Concentration in the DH-C-BGP Formulations

The DH concentrations in the prepared DoE samples were assessed via the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, as detailed in Section 2.10. An

aliquot of the DH-C-BGP sample was diluted with purified water. The diluted sample was filtered (0.2  $\mu\text{m}$  pore size, Chromafil<sup>®</sup> Xtra PES-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), and then the drug concentration in the sample was determined. Measurements for each sample were performed in triplicate.

## 2.6. Rheological Characterisation

Rheological characteristics of the prepared DH-C-BGP formulations were assessed using a Modular Compact Rheometer MCR 102 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria). The temperature on the rheometer was assured via a Peltier temperature control system. Oscillatory rheological tests were performed using a parallel plate (PP50; diameter 50 mm) and rotational rheological tests were performed using a cone plate (CP50; diameter 50 mm, cone slope 1°). Software RheoCompass<sup>™</sup> Light Version 1.23.403 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) was used for the data analysis.

### 2.6.1. Zero-Shear Viscosity Determination

A rotational creep test, using a CP50 measuring system, was applied to determine zero-shear viscosity ( $\eta_0$ ) of the prepared formulations, at 25 °C. The zero gap was set at 0.102 mm. Before the test, the sample was left on the lower plate to equilibrate at 25 °C for 3 min. During the test time of 5 min, a shear stress of 0.1 Pa was applied to the sample, and the shear strain was recorded as a function of time. Zero-shear viscosity was computed using RheoCompass software, fitting the shear stress vs. data on the shear rate and calculating the regression on the creep measuring data within the three retardation points [10]. Each sample was analysed in triplicate.

### 2.6.2. Measurement of Gelation Temperature

In order to determine the sol–gel transition point, an oscillatory temperature test was used. A PP50 measuring system was used and the test recorded the changes in storage ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) over a temperature range from 20 °C to 40 °C. The gap was set at 0.500 mm, the angular frequency was fixed at 6.28  $\text{rad s}^{-1}$ , and the applied strain was 1%. The intersection of  $G'$  and  $G''$  curves was recorded as the gelation temperature— $T_{\text{GEL}}$  [29]. All measurements were performed in triplicate.

### 2.6.3. Measurement of Gelation Time

The time needed for the formulation to undergo sol–gel transition was determined using an oscillatory time test. A PP50 measuring system was used and the test was performed at 34 °C—the temperature of the nasal cavity [5]. Variations in  $G'$  and  $G''$  were monitored as a function of time. The zero gap was fixed at 0.500 mm. The measurement was performed at an angular frequency of 6.28  $\text{rad s}^{-1}$  and 1% strain. The cross point of  $G'$  and  $G''$  curves was recorded as the time needed for the formulation to transit from the liquid to the gel state ( $t_{\text{GEL}}$ ) [30]. Each formulation was analysed in triplicate.

## 2.7. Droplet Size Distribution (DSD)

Droplet size distribution (DSD) was determined via a Malvern Spraytec unit (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK) via a laser diffraction technique. Samples were loaded into a VP7 spray pump equipped with a 232 NE actuator (dosing volume of 100  $\mu\text{L}$ ), kindly provided by AptarGroup Inc., Le Neubourg, France. Prior to the test, the spray pump was primed several times by discarding the actuations as waste. For the measurement, the tip of the device was placed 3 cm below the laser diffraction measurement zone. The focal distance from the lens was 300 mm. Each test was performed manually, in triplicate. The results were expressed as volume diameters  $D_{v,10}$ ,  $D_{v,50}$ , and  $D_{v,90}$ . Span, defined as  $(D_{v,90} - D_{v,10})/D_{v,50}$ , was also calculated [31]. The analysis of the results was performed via Malvern Spraytec 3.20 software (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK).

### 2.8. Spray Cone Angle Determination (SCA)

Spray cone angle (SCA) was determined by spraying the samples from the VP7 spray pump equipped with the 232 NE actuator (AptarGroup Inc., Le Neubourg, France) against the dark background. A Panasonic Lumix DMC-FZ1000 camera was used to record the spray plume under a set-up of 120 frames per second. The recorded spray plume was analysed using a virtual protractor. Each formulation was analysed in triplicate.

### 2.9. Assessment of the Deposition Pattern in the Nasal Cavity In Vitro

Nasal deposition pattern studies were performed using a multi-sectional 3D-printed nasal cast. The development of the nasal cavity model had been previously performed by our research group using anonymised Multislice Computer Tomography (CT) scan data of a 62-year-old patient [32], obtained from the Sestre milosrdnice University Hospital Center database. The protocol was carried out following the rules of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Sestre milosrdnice University Hospital Center (Project identification code: EP-9941/19-3) and the Ethics Committee of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (Class: 643-02/19-01/02; Registry number: 251-62-03-19-43). The model was made via stereolithography process using 3D Systems<sup>®</sup> ProX 800 (3D Systems, Inc., Rock Hill, SC, USA). Transparent rigid plastic Accura ClearVue was used to print the septum and the olfactory, respiratory, and posterior regions of the model. The anterior region was printed in a flexible material (Digital-Material FLX 9850, 60 ShoreA TangoBlackPlus and VeroWhitePlus) using a Stratasys Connex 350 printer (Stratasys Ltd., Rehovot, Israel) [32]. In order to observe a fractional deposition pattern, the model was divided into different regions of the nasal cavity: anterior region, turbinate region and septum—both with detachable olfactory fragments, and a posterior region (nasopharynx) with a connecting part for the respiratory pump. The model also contains the paranasal sinuses. The proper assembly and alignment of the model parts were ensured using bar pins, measuring 6.4 and 2.0 mm in diameter and 6.0 and 4.0 mm in height, and transverse coupling.

The fractional nasal deposition pattern was assessed by placing the 3D-printed nasal cast on a stand in order to properly connect the model to a respiratory pump (model 613; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). The respiratory pump was used to simulate breathing conditions in a range from 15 L min<sup>-1</sup> (rest breathing) to 30 L min<sup>-1</sup> (deep moderate breathing condition) [10]. The inspiration flow rate set by the respiratory pump was checked via the inspiratory flow meter (In-Check Nasal; Clement Clarke International Ltd., Harlow, UK). Prior to the administration of the sample, the model was uniformly coated with a thin layer of a Sar-gel<sup>®</sup> indicator paste (Arkema, Colombes, France) in order to visualise the deposition pattern and prevent the formulation from dripping. The Sar-gel<sup>®</sup> paste turns purple when in contact with the formulation. The formulation was administered into the model using a VP7 spray pump, equipped with the 232 NE actuator. The spray pump was inserted into the right nostril, at a depth of 5 mm, and the device was actuated at an angle 0° from the vertical plane, and 45°, 60°, and 75° from the horizontal plane, while the left nostril was blocked. The fractional spray deposition pattern was determined gravimetrically: each region of the right side of the model was weighed before and after formulation administration, using an electronic balance (precision 0.01 mg; Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) [11]. The assessment of the deposition pattern was performed in duplicate for each run of the experimental design.

### 2.10. HPLC Method for Quantitative Determination of DH

The quantitative determination of DH was performed via the HPLC method using a 1260 Infinity II LC System consisting of an auto-sampling system, controller unit, degasser, UV-VIS detector and column oven (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). OpenLab software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used to process the data of all chromatographic analyses. The chromatographic separation was carried out using a Kinetex C18 (250 × 4.6 mm, 2.6 µm particle size) reverse-phase column with a suitable guard

column, both obtained by Phenomenex (Torrance, CA, USA). The method was performed according to Pappa et al. [33], with a few minor adjustments. Briefly, the mobile phase was prepared by mixing 0.02 M buffer phosphate (pH 2.7), methanol, and triethylamine in a volume ratio of 50:50:0.5. The flow rate was set at 1.0 mL min<sup>-1</sup> and the injection volume at 20 µL. The analysis was performed at 25 °C. The detection wavelength was 268 nm. The run time was 7 min and the DH retention time was 5 min. The above-described method was validated based on the International Conference on Harmonization (ICH) guideline Q2 (R1) [34]. The validation of the method was carried out for linearity, range of linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision, the limit of detection (LOD), and the limit of quantification (LOQ) (Table S1). All measured concentration values were within the range of linearity of the method (Table S1).

### 2.11. In-Depth Characterisation of the Leading DH-C-BGP Formulation

The leading DH-C-BGP formulation (LF) was further characterised in terms of in vitro DH release profile, mucoadhesiveness, biocompatibility, and permeability. The stability profile was also assessed. The slug mucosal irritation assay was performed in order to predict the formulation's potential to cause nasal discomfort.

#### 2.11.1. In Vitro Release Studies

The automated Franz diffusion cell testing system Phoenix<sup>TM</sup> RDS (Teledyne Hanson, Chatsworth, CA, USA) was used to determine the DH in vitro release profile from the LF. The Phoenix RDS platform consists of six vertical diffusion cells (volume of the receptor compartment: 15 mL) placed in the Peltier heating and stirring block. The cells were filled with SNF and the system was thermostated at 34 °C under a constant stirring of 500 rpm. A polyamide membrane with a pore size of 0.45 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany) was placed between the donor and acceptor compartment. Prior to the experiment, the membranes were conditioned in SNF for 15 min. The selected samples (500 µL) were pipetted into the donor compartment using a Multipette<sup>®</sup> E3 (Eppendorf, Hamburg, Germany) equipped with 1 mL ViscoTip<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, Germany). At predetermined time intervals, aliquots of 200 µL were drawn from the receptor compartment and replaced with fresh SNF, also heated to 34 °C. The total time of the experiment was 5 h and, during that time, the sink conditions were assured. The DH content in the collected samples was determined via the HPLC method, as detailed in Section 2.10. Donor compartments were also tested for DH content. All release experiments were performed in triplicate.

#### 2.11.2. In Vitro Mucoadhesion Test

Mucoadhesive properties of the LF were tested using a porcine nasal mucosa, obtained from a local slaughterhouse. The nasal mucosa was isolated from porcine heads by splitting the heads in half by longitudinal incision, and then the mucosa was separated from the septum and conchae [35]. Prior to the experiments, the mucosa was kept at -20 °C. A texture analyser TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Godalming, UK), equipped with a mucoadhesion rig, was used to test the mucoadhesiveness of the LF; this method was previously developed by our research group [11]. Prior to the experiment, the mucosa was soaked in SNF for approximately 30 s at 34 °C. Then, the mucosa was cut into a 10 mm diameter disk and adhered to the upper probe using cyanoacrylate glue. A selected sample (100 µL) was pipetted onto the lower platform (using Multipette<sup>®</sup> E3 (Eppendorf, Hamburg, Germany)) and thermostated at 34 °C for 30 s. The experimental parameters used were: pre-test, test, and post-test speeds of 0.5 mm s<sup>-1</sup>, 0.1 mm s<sup>-1</sup>, and 0.1 mm s<sup>-1</sup>, respectively, with a contact time of 120 s and applied force of 0.1 N. Mucoadhesive properties were expressed as the maximum detachment force ( $F_{max}$ ) and the work of adhesion ( $W_{adh}$ ) [32]. The sample from the DoE with a chitosan concentration different from the leading concentration (control formulation—CF) and corresponding aqueous DH solution were used as controls. Filter paper soaked in SNF served as a negative control. Each sample was tested in triplicate.

### 2.11.3. Cell Culture Conditions

In order to examine in vitro biocompatibility and permeability of the formulations, Calu-3 cell line (ATCC<sup>®</sup> HTB-55TM, ATCC, Manassas, VA, USA) was used. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-F12) cell culture medium (Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA) containing penicillin/streptomycin (1% *v/v*; Lonza, Basel, Switzerland) and fetal bovine serum (FBS; 1% *v/v*, Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA). The cell cultures were maintained at 95% humidity and 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> (Sanyo CO<sub>2</sub> incubator, Osaka, Japan). The medium was changed every 2 days, and the cells were passaged when they reached 70–90% confluence, according to the ATCC recommended protocol. The detachment of the cells from the flasks was performed using a mixture of trypsin (0.25%) and EDTA (0.02%) solutions in phosphate-buffered saline (PBS; Lonza, Basel, Switzerland).

### 2.11.4. In Vitro Biocompatibility Study

The Calu-3 cells were seeded into 96-well plates (Corning Costar, Corning, NY, USA) at a density of  $4 \times 10^4$  cells per well and allowed to reach confluence over 48 h. Biocompatibility was assessed using an MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) colorimetric test.

Before the experiment, the cell culture medium from the wells was withdrawn, and the cells were washed with HBSS/HEPES (pH = 7.0) and treated with the prepared samples. The leading formulation was mixed with HBSS/HEPES (pH = 7.0) in a volume ratio 1:1. The LF-HBSS/HEPES (pH = 7.0) mixture resulted in DH, C, and BGP concentrations of 0.15 mg mL<sup>-1</sup>, 4.62 mg mL<sup>-1</sup>, and 94.00 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. The cells incubated in HBSS/HEPES (pH = 7.0) were used as a negative control. The DH solution in HBSS/HEPES (pH = 7.0) (DH concentration ranging between 0.05 and 0.25 mg mL<sup>-1</sup>) and the BGP solution in HBSS/HEPES (pH = 7.0) (94.00 mg mL<sup>-1</sup>) served as controls. The cells were incubated with the prepared samples for 2 h at 37 °C. Afterwards, the samples were removed from the wells, and the wells were rinsed twice with HBSS/HEPES (pH = 7.0), followed by adding 100 µL of prepared MTT reagent in each well. The MTT reagent was prepared by dissolving MTT in PBS (MTT concentration of 2.5 mg mL<sup>-1</sup>), and then the solution was further diluted with DMEM-F12 to a final MTT concentration of 0.5 mg mL<sup>-1</sup>. The cells were incubated with MTT reagent for 2 h at 37 °C. After the incubation, the reagent was removed. Isopropanol (100 µL per well) was added to lyse the cells and to dissolve the formazan crystals. The amount of formazan product was determined using a spectrophotometer 1420 Multilabel counter VICTOR3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA, at 570 nm. Cell viability was calculated using the following equation:

$$\text{Viability (\%)} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{ipr}}}{A_{\text{c}} - A_{\text{ipr}}} \times 100 \quad (1)$$

where  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of the formazan crystal solution formed in cells treated with tested samples,  $A_{\text{ipr}}$  is the absorbance of pure isopropanol, and  $A_{\text{control}}$  is the absorbance of a solution of formazan crystals formed in cells treated only with HBSS/HEPES (pH = 7.0).

### 2.11.5. In Vitro Permeability through the Epithelial Model Barrier

The Calu-3 epithelial cells were seeded into polycarbonate 12-well Transwell<sup>®</sup> inserts, with 0.4 µm mean pore size, and 1.12 cm<sup>2</sup> surface area (Corning Costar Inc., Corning, NY, USA) at a density of  $5.5 \times 10^5$  cells per well in order to test in vitro permeability [32]. The volume of the cell culture medium in the apical and basolateral compartment was 0.5 mL and 1.5 mL, respectively. After an incubation period of 48 h, the medium from the apical compartment was aspirated and the cells were cultured at the air–liquid interface, with 800 µL of the culture medium in the basolateral compartment. The media in the basolateral compartment was replaced with a fresh medium every 48 h. The cells were grown for 14 days until a plateau in transepithelial electri-



cal resistance (TEER) was reached (above  $1000 \Omega \text{ cm}^2$ ). An epithelial volt/ohm meter EVOM with STX-2 chopstick electrode (WPI Inc., Sarasota, FL, USA) was used to measure the TEER of the cell monolayers. Permeability studies included the following samples: (i) LF mixed with HBSS/HEPES (pH = 7.0) in a volume ratio of 1:1; (ii) solution of DH in HBSS/HEPES (pH = 7.0) (DH concentration =  $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ ); (iii) DH solution in hyperosmotic HBSS/HEPES (pH = 7.0) (DH concentration =  $0.15 \text{ mg mL}^{-1}$ ); and (iv) HBSS/HEPES (pH = 7.0) as the negative control. Osmolality of the hyperosmotic HBSS/HEPES (pH = 7.0) was equal to the leading formulation–HBSS/HEPES (pH = 7.0) mixture. The hyperosmotic HBSS/HEPES (pH = 7.0) was prepared according to Soni et al. [36]. An amount of 12 g of NaCl was added to 1 L of the prepared HBSS/HEPES (pH = 7.0), resulting in 2% NaCl ( $w/v$ ) in the final hypertonic HBSS/HEPES (pH = 7.0) solution. Osmolality measurements were performed with an OsmoTECH<sup>®</sup> Single-Sample Micro-Osmometer (Advanced Instruments, Norwood, MA, USA).

Before the experiment, the cells were washed with HBSS/HEPES (pH = 7.0) and, afterwards, the HBSS/HEPES (pH = 7.0) was pipetted into apical and basolateral compartments and the plate was incubated at  $37^\circ \text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , for 20 min. After the incubation, TEER was measured at the beginning of the permeability experiment. The HBSS/HEPES (pH = 7.0) was removed from the wells and 500  $\mu\text{L}$  of each sample was added to the apical compartment. Each sample was tested in triplicate. Over the period of 120 min, 500  $\mu\text{L}$  of the sample from the basolateral compartment was taken every 20 min and replaced with fresh HBSS/HEPES (pH = 7.0). All samples collected during the experiment, including the samples from the donor compartment at the 120 min final point of the experiment, were analysed for DH content using the HPLC method described in Section 2.10. In order to check cells' monolayer integrity, TEER values were recorded during and upon completion of the experiments. During the permeability test, cells were incubated at  $37^\circ \text{C}$  and 50 rpm on a horizontal orbital shaker. The apparent permeability coefficient ( $P_{\text{app}}$ ) was calculated according to the following equation:

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0} \quad (2)$$

where  $dQ/dt$  is the permeability rate,  $A$  is the surface area of the permeation barrier, and  $C_0$  is the initial concentration of DH in the apical compartment [27].

The attenuation factor was calculated as the ratio between the  $P_{\text{app}}$  value of the LF or the DH solution in the hyperosmolar HBSS/HEPES (pH = 7.0) and the  $P_{\text{app}}$  value of the DH solution in the HBSS/HEPES (pH = 7.0) [12].

#### 2.11.6. Slug Mucosal Irritation Assay

The slug mucosal irritation (SMI) assay was used to evaluate the potential of the leading formulation to cause irritation on the nasal mucosa. The SMI was performed according to Trenkel et Scherließ [37]. Briefly, slugs of the species *Arion lusitanicus* were collected by wild harvesting. Prior to the experiment, the specimens were kept under laboratory conditions. The SMI assay was performed only with slugs with a body weight between 3 and 6 g. Slugs were weighed (BW) at the beginning of the experiment. An aliquot (100  $\mu\text{L}$ ) of the tested sample was transferred into a Petri dish and the mass of the dish and the sample was recorded. Slugs were placed on the liquid formulation for a contact period (CP) of 15 min. After the time of the first contact period expired, the slugs were placed on 1.5 mL of PBS in another dish, for a resting time of 60 min. During the resting time, the dish with the liquid formulation and the mucus produced after the first CP was weighed and recorded. This procedure was repeated two more times, so the total number of CPs was three. Total mucus production (TM) after three CPs was calculated according to the equation:

$$TM (\%) = \Sigma M \frac{(Mucus \text{ per } CP, g)}{BW, g} \times 100\% \quad (3)$$

The same procedure was applied for negative control (100  $\mu$ L of PBS) and positive control (100  $\mu$ L of 1% (*w/v*) benzalkonium chloride (BAC) solution). Experiments were performed in triplicate. For each replicate, a separate slug was used.

#### 2.11.7. Stability Studies

Stability studies of the LF were performed in time points of 30 and 90 days. The liquid was kept in an airtight container, at  $5 \pm 3$  °C, which is the envisaged storage temperature for the product. The drug concentration, rheological properties, SCA, and in vitro drug release profile were measured and compared with the initial results, recorded right after the preparation of the leading sample. All experiments were performed in triplicate.

#### 2.12. Statistical Analysis

JMP 14.0 software (JMP<sup>®</sup>, Version 14.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1989–2007) was used to perform statistical analysis related to DoE, with  $p < 0.05$  set as the minimal level of significance. Mucoadhesive properties were analysed using GraphPad Prism (trial version, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey's post hoc test. The similarity factor ( $f_2$ ) was used to assert the similarity between in vitro release profiles [38]. The profiles were considered similar when the  $f_2$  factor was greater than 50 [39].

### 3. Results and Discussion

The aim of this research was to develop a thermosensitive in situ gelling platform for efficient nose-to-brain delivery of DH. Thermosensitive hydrogels based on C-BGP have been studied for various purposes [29,40–42], but there are only a few studies aimed at the development of a C-BGP in situ gelling system for nasal delivery [28,43]. In this work, we focused on the development of a nasal C-BGP formulation that is safe, biocompatible, non-irritable, and efficient regarding delivery of DH to the brain.

A nasal in situ gelling DH formulation was developed with the aim to produce a platform that is easily administered as a spray but turns to gel at the temperature of the nasal mucosa, 33–35 °C [44]. The sol–gel transition results in prolonged residence time of the formulation at the mucosal surface, owing to reduced mucociliary clearance [45].

Chitosan (C) is a non-toxic, biocompatible, biodegradable, and bioadhesive polymer with penetration-enhancing properties [30]. On its own, chitosan does not exhibit thermosensitive properties. However, by mixing the chitosan with a polyol-phosphate, such as BGP, the C-BGP platform undergoes a sol–gel transition at the temperature of the nasal cavity. At room temperature,  $\beta$ -glycerophosphate interacts with the positively charged chitosan amine groups, keeping chitosan chains in the solution by forming a water-protective shield despite increasing the pH of the solution. The mechanism of thermoreversible sol–gel transition includes a loss of electrostatic repulsion, ionic crosslinking, hydrogen bonding, and hydrophobic interaction [6].

#### 3.1. Selection of the Formulation and Administration Parameters for DH-Loaded In Situ Gelling Systems

In this study, the development of a DH-loaded in situ gelling formulation was performed employing a statistical design of experiments. Such an approach potentiates the development of a DH thermogelling delivery platform with built-in quality, maximizing the cost and time savings [46]. In order to set the appropriate design space, thorough preliminary studies were conducted to select the constituents and their concentrations, fulfilling the requirements for nasal delivery [5].

Donepezil concentration range in the preliminary studies ( $0.3\text{--}0.6\text{ mg mL}^{-1}$ ; Table S2) was in line with the relevant references concerning donepezil nose-to-brain delivery [19]. Taking into account the dosing volume of  $100\text{ }\mu\text{L}$ , the indicated concentration range provides delivering the dose per actuation equal to  $0.6\text{--}1.2\%$  (or  $0.3\text{--}0.6\%$ ) of 5 (or 10) mg oral daily dose. The aforementioned fraction of the donepezil daily oral dose is considered appropriate to achieve its therapeutic potential via direct nose-to-brain delivery [47].

The starting BGP concentration was set at  $188\text{ mg mL}^{-1}$  (Table S2), which is within the range usually reported for such systems [28,29,48]. In previous studies, the molecular weight of chitosan was shown to have a significant impact on thermogelling properties of the chitosan–BGP systems [41]. More particularly, it was observed that the increase in chitosan molecular weight resulted in faster system gelation [28,49,50]. In this study, DH-loaded systems prepared with the medium and high molecular weight chitosans at the gelation-promoting concentration ( $6.15\text{ mg mL}^{-1}$ ) showed precipitation or poor sprayability (Tables S2 and S3), while at lower chitosan concentrations, the systems did not exhibit gelling properties. On the contrary, the chitosans of low molecular weight provided appropriate spray and gelation properties at the relevant range of DH concentrations (Table S3).

In the next step, a DH-loaded system (DH concentration  $0.3\text{ mg mL}^{-1}$ ) prepared with the low-molecular-weight chitosan (C concentration  $6.15\text{ mg mL}^{-1}$ ) was selected for the BGP concentration optimization. Based on the results obtained (Table S4), a fixed concentration of BGP was set. Namely, even a small shift in gelling agent concentration caused a great difference in the formulation's thermogelling properties [51]. Ranges in the BGP concentrations were previously reported in experimental designs for the development of similar systems [52,53]. However, susceptibility to the BGP concentration in this study may be related to the difference in the incorporated drug type and concentration.

The final step revealed concentration ranges for both the DH and the low molecular weight chitosan, defining the design space for formulation optimisation in relation to the studied responses (Tables S5 and S6).

It was previously shown that the angles of administration and inspiratory flow exhibit a pronounced impact on the nasal deposition pattern. According to the literature sources, administration parameters including the angle of administration from the horizontal plane ranging from  $30$  to  $75^\circ$  and inspiratory flow from  $0$  to  $30\text{ L min}^{-1}$  were assessed in the preliminary deposition studies [10,54–57]. Only the angle of administration of  $30^\circ$  was discarded as inappropriate for targeted nasal delivery of tested formulations. Other parameters were included in the statistical design of experiments as presented in Table 1.

### 3.2. Design of Experiments: Optimisation of DH-C-BGP Formulation

The design of the experiments was successfully incorporated into the DH-C-BGP formulation development. The DoE generated 17 runs varying in formulation (DH and C concentration) and/or administration parameters (horizontal angle of administration and inspiratory flow rate). The design matrix is presented in Table 2.

The DH concentration in the prepared DoE samples ranged between  $0.29 \pm 0.00$  and  $0.52 \pm 0.02\text{ mg mL}^{-1}$  (Table 2), providing complete DH dissolution in C-BGP systems and adequate DH dose with respect to nasal delivery [19]. The value of pH for all prepared samples ranged between  $7.02 \pm 0.00$  and  $7.35 \pm 0.00$  (Table 2). The observed pH values were expected due to the basic values of BGP systems [28] and are acceptable for nasal administration [58,59].

Within the DoE, the formulation of rheological and thermogelling properties (gelation time and temperature, and zero-shear viscosity), spray characteristics (droplet size distribution and spray cone angle), as well as olfactory and turbinate deposition assessed in the nasal cavity model were analysed as responses. The obtained results are presented in Table 2.



Regression modelling was applied to enlighten which formulation parameters (and their interactions) had the most influence on the responses and to select the parameter settings that resulted in the most convenient response values. Regression modelling equations are presented in standardised covariates that are normalised to unitless intervals  $[-1, 1]$ , an approach common in experimental design modelling [60]. Within the regression model equation, all statistically significant parameters ( $p < 0.05$ ) are noted with an asterisk. The regression models and the analysis for the formulation of rheological, thermogelling, and spray properties as DoE responses are presented in Table 3. Nasal deposition modelling in relation to the formulation and administration parameters will be discussed in a separate section. Prediction profilers are presented in Figures S1–S7.

### 3.2.1. Formulation of Rheological, Thermogelling, and Spray Properties within the DoE Space

DH-C-BGP formulations prepared according to the design matrix were moderately viscous solutions with zero-shear viscosity ranging between  $35.03 \pm 0.82$  and  $232.21 \pm 2.30$  mPa s. The observed range of the viscosity values is appropriate for simple administration by spraying [2]. In addition, DH-C-BGP systems exhibit shear-thinning behaviour [28], which implies a decrease in viscosity at the applied aerosolisation shear stress.

All DoE samples gelled at the physiological temperature of the nasal mucosa ( $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) with the gelation time ( $t_{\text{GEL}}$ ) ranging between  $0.0 \pm 0.0$  and  $14.9 \pm 0.2$  min (Table 2), which is below the time of nasal mucus turnover (approximately 20 min) [61]. As expected, the increase in gelation time at  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$  was coupled with the increase in the temperature of the instant gelation ( $T_{\text{GEL}}$ ), which ranged from  $32.2 \pm 0.9$  to  $39.9 \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  within the DoE space. Nonetheless, DoE settings revealed the potential for optimising this crucial formulation property to undergo instant gelation at the temperature of the nasal mucosa.

The spray cone angle (SCA) of the prepared DoE samples was between  $15.1 \pm 0.3$  and  $26.6 \pm 1.2^{\circ}$  (Table 2). The SCA is an important factor that affects nasal deposition and, therefore, the efficacy of a nasally administered drug. The narrow spray cone angles obtained in this study favour targeted nasal deposition [5,57]. The olfactory region of the nasal cavity is a small area (representing  $\sim 5\text{--}7\%$  of the nasal epithelial surface area) located at the roof of the nasal cavity [62]. It is more likely that the nasal spray will reach the olfactory region if it is concentrated in a narrow plume. Apart from SCA, it is important to note that the deposition in the olfactory region is also affected by the droplet size distribution and the velocity of the applied spray [63].

For all DoE samples, values for  $D_v10$ ,  $D_v50$ , and  $D_v90$  were as follows  $23.6 \pm 1.4\text{--}72.3 \pm 3.2\text{ }\mu\text{m}$ ,  $61.6 \pm 4.8\text{--}167.6 \pm 6.3\text{ }\mu\text{m}$ , and  $137.2 \pm 7.3\text{--}320.6 \pm 15.2\text{ }\mu\text{m}$ , respectively (Table 2). The measured DSD values are in accordance with regulatory requirements for nasal sprays (the vast majority of droplets being larger than 10 microns) [31,64]. The span ranged from  $1.45 \pm 0.06$  to  $1.89 \pm 0.06$  (Table 2). A span smaller than 2.0 indicates a monodisperse system with narrow size distribution [65]. Droplets with a narrow size distribution are more likely to deposit uniformly to the targeted area (e.g., olfactory region) in comparison with droplets with a broad size distribution. This could be explained by the fact that droplets with a narrow size distribution have more consistent aerodynamic behaviour and are less likely to undergo deposition by inertial impaction, which can cause uneven deposition in the nasal cavity [56,63,66].

**Table 2.** Sample sequence from the design of the experiment and the corresponding DC (drug concentration), pH, zero-shear viscosity ( $\eta_0$ ), gelation temperature ( $T_{GEL}$ ), gelation time ( $t_{GEL}$ ), spray cone angle (SCA), droplet size distribution ( $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$ , and  $D_{v90}$ ) and span, olfactory deposition (OD), and turbinate deposition (TD).

	$c_{DH}$ (mg mL <sup>-1</sup> )	$c_C$ (mg mL <sup>-1</sup> )	IFR * (L min <sup>-1</sup> )	AAH * (°)	DC (mg mL <sup>-1</sup> )	pH	$\eta_0$ (mPa s)	$T_{GEL}$ (°)	$t_{GEL}$ (min)	SCA (°)	$D_{v10}$ ( $\mu$ m)	$D_{v50}$ ( $\mu$ m)	$D_{v90}$ ( $\mu$ m)	Span	OD (%)	TD (%)
1	0.30	6.15	0	75	0.30 ± 0.00	7.35 ± 0.00	35.26 ± 1.11	34.2 ± 0.3	1.3 ± 0.7	26.6 ± 1.2	23.6 ± 1.4	61.6 ± 4.8	140.0 ± 7.1	1.9 ± 0.1	65.9 ± 1.6	11.4 ± 1.6
2	0.30	6.15	30	45	0.29 ± 0.00	7.28 ± 0.01	36.49 ± 0.03	33.8 ± 0.4	1.2 ± 0.6	24.9 ± 0.2	26.5 ± 1.3	71.1 ± 9.4	153.5 ± 17.8	1.8 ± 0.0	1.9 ± 1.0	62.7 ± 1.0
3	0.30	6.15	30	75	0.30 ± 0.00	7.24 ± 0.00	35.03 ± 0.82	34.9 ± 0.6	1.0 ± 0.4	25.5 ± 0.7	29.1 ± 2.8	87.0 ± 10.2	184.2 ± 14.9	1.8 ± 0.1	28.3 ± 1.6	60.3 ± 1.6
4	0.30	7.69	0	45	0.31 ± 0.02	7.12 ± 0.02	88.30 ± 1.81	34.2 ± 0.8	1.2 ± 1.0	19.6 ± 0.1	39.2 ± 6.3	120.5 ± 13.2	240.1 ± 19.7	1.7 ± 0.1	3.5 ± 3.3	38.3 ± 3.3
5	0.30	9.23	0	75	0.30 ± 0.00	7.02 ± 0.00	206.37 ± 1.46	33.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	15.5 ± 0.4	69.8 ± 3.7	161.1 ± 5.2	309.7 ± 10.9	1.5 ± 0.0	71.8 ± 0.8	10.5 ± 0.8
6	0.30	9.23	15	45	0.30 ± 0.00	7.06 ± 0.01	194.28 ± 5.27	32.2 ± 0.9	0.0 ± 0.0	16.4 ± 1.6	42.5 ± 4.1	115.2 ± 4.5	226.5 ± 7.1	1.6 ± 0.1	10.6 ± 0.1	63.8 ± 0.1
7	0.30	9.23	30	60	0.30 ± 0.00	7.03 ± 0.01	201.55 ± 0.46	33.4 ± 1.0	0.0 ± 0.0	15.6 ± 0.2	46.8 ± 1.4	129.5 ± 1.5	255.3 ± 1.7	1.6 ± 0.0	21.4 ± 0.3	40.3 ± 0.3
8	0.40	6.15	0	45	0.42 ± 0.02	7.15 ± 0.00	37.08 ± 0.24	36.9 ± 0.2	5.1 ± 0.4	23.1 ± 0.6	25.9 ± 2.3	72.8 ± 9.7	154.8 ± 17.0	1.8 ± 0.0	7.9 ± 3.3	65.1 ± 3.3
9	0.40	7.69	15	60	0.41 ± 0.01	7.09 ± 0.00	90.02 ± 0.38	36.3 ± 0.6	3.2 ± 0.3	19.6 ± 0.3	45.0 ± 8.9	129.3 ± 15.6	250.9 ± 25.9	1.6 ± 0.1	29.4 ± 3.9	49.2 ± 3.9
10	0.40	9.23	30	75	0.40 ± 0.00	7.06 ± 0.01	225.58 ± 3.33	33.7 ± 0.2	0.1 ± 0.2	15.5 ± 0.4	72.0 ± 3.3	166.2 ± 7.6	315.2 ± 17.9	1.5 ± 0.0	35.0 ± 3.4	41.4 ± 3.4
11	0.50	6.15	0	60	0.50 ± 0.00	7.11 ± 0.00	39.70 ± 1.45	39.9 ± 0.1	13.9 ± 0.9	23.3 ± 0.2	23.8 ± 0.9	61.7 ± 4.3	137.2 ± 7.3	1.8 ± 0.0	31.4 ± 5.0	31.7 ± 5.0
12	0.50	6.15	15	75	0.50 ± 0.00	7.21 ± 0.03	39.29 ± 0.59	38.0 ± 0.3	14.3 ± 1.2	23.2 ± 1.1	26.5 ± 1.1	66.3 ± 4.3	141.6 ± 7.3	1.7 ± 0.0	45.6 ± 1.3	26.6 ± 1.3
13	0.50	6.15	30	45	0.49 ± 0.00	7.15 ± 0.00	37.67 ± 0.55	39.2 ± 0.5	14.9 ± 0.2	23.0 ± 0.4	26.7 ± 1.0	68.4 ± 2.6	145.4 ± 4.2	1.7 ± 0.0	6.8 ± 0.3	31.5 ± 0.3
14	0.50	7.69	30	75	0.52 ± 0.02	7.07 ± 0.01	91.15 ± 0.87	38.5 ± 0.1	11.2 ± 0.0	18.7 ± 0.7	47.3 ± 7.3	133.4 ± 11.6	258.2 ± 16.7	1.6 ± 0.1	25.5 ± 5.7	32.9 ± 5.7
15	0.50	9.23	0	45	0.50 ± 0.01	7.03 ± 0.02	209.01 ± 2.98	35.3 ± 0.4	4.4 ± 1.0	16.1 ± 1.0	70.9 ± 14.0	162.3 ± 18.3	306.1 ± 31.0	1.5 ± 0.1	1.9 ± 2.1	60.2 ± 2.1
16	0.50	9.23	0	75	0.50 ± 0.01	7.04 ± 0.00	232.21 ± 2.30	35.7 ± 0.1	2.1 ± 0.4	15.1 ± 0.3	72.3 ± 3.2	167.6 ± 6.3	320.6 ± 15.2	1.5 ± 0.0	22.9 ± 4.7	42.5 ± 4.7
17	0.50	9.23	30	45	0.49 ± 0.00	7.06 ± 0.01	218.45 ± 2.33	35.5 ± 1.6	4.2 ± 0.3	15.6 ± 0.7	61.7 ± 3.8	150.1 ± 7.6	286.6 ± 15.3	1.5 ± 0.0	6.1 ± 1.2	63.9 ± 1.2

$c_{DH}$  = donepezil hydrochloride concentration;  $c_C$  = chitosan concentration in the spray-drying solution; IFR = inspiratory flow rate; and AAH = administration angle in relation to horizontal plane. All samples were prepared at a BGP concentration of 188.00 mg mL<sup>-1</sup>. \* Administration parameters related to the deposition studies. Values for the responses are mean ± SD, n = 3, except OD and TD where n = 2.

### Regression Modelling

The statistical analysis of the regression models for zero-shear viscosity, gelation time and temperature, spray cone angle, and volume diameters or spray droplets revealed a good fit (Table 3). Each of the aforementioned responses was significantly influenced by DH and CH concentrations (apart or in interaction), confirming the rationale for their consideration as DoE variables.

### Impact of Chitosan Concentration

Chitosan concentration revealed linear and/or quadratic impacts on the zero-shear viscosity, gelation time, gelation temperature, spray cone angle, and droplet size distribution (Table 3).

An increase in chitosan concentration led to increased zero-shear viscosity, owing to the entanglement of the polymer chains that led to the limited movement of individual chains and the rise in zero-shear viscosity [67]. At the same time, the increase in C concentration decreased gelation time and temperature, which is in accordance with the literature [41,68]. Namely, due to the entanglements of the polymeric chains, less heat is needed to create a 3D gel network. However, too high a concentration of chitosan can slow down the gelation process. Due to the high chitosan concentration, the solution becomes highly viscous, and the attraction between the chitosan amino groups and the BGP phosphate groups is hindered [51]. In conclusion, setting the right interval of chitosan concentration in the preliminary studies was crucial to obtain valid regression modelling for gelation properties.

The increase in C concentration resulted in a spray cone angle decrease and spray droplet size increase, both of which are related to increased solution viscosity [55,66,69]. Namely, the increased viscosity of the nasal spray led to the decrease in the velocity of the spray droplets as they exited the nozzle. Thereupon, the droplets of the spray spread out less and formed a narrower spray cone angle [69,70]. The increased viscosity resulted in the production of larger droplets in the aerosolisation process [56]. Larger droplets tend to travel in a narrower direction and will ultimately be deposited in the narrower area into which they are directed [66].

### Impact of DH Concentration

DH concentration exhibited a significant influence on the monitored rheological thermogelling and spray properties, as a single parameter and/or in combination with the C concentration (Table 3). The increase in DH concentration led to the increase in zero-shear viscosity. This effect can be explained by the presence of DH molecules in the chitosan network that increased the steric repulsion between the polymer chains, increasing the system viscosity [71]. The same reason could be behind the decrease in the spray cone angle that occurred with the increase in DH concentration.

The rising DH concentration in the C-BGP thermosensitive platform increased the gelation time and temperature. As explained above, the addition of the drug in the system increased the viscosity, and the diffusion of the heat was reduced [71]. Moreover, the addition of salt decreased the pKa of the BGP and consequently led to the chitosan's higher degree of ionisation; hence, more heat was needed for gel formation [72].

The interaction between the DH and C concentrations within the derived regression model for the gelation time (Table 3) could be explained by the presumption that the DH affected the steric repulsions between the polymer chains to an extent that was dependent on the C concentration in the system [72–74].

**Table 3.** The results of the statistical analysis on zero-shear viscosity, gelation time, gelation temperature, spray cone angle, and droplet size distribution within the DoE.

Common DoE Response	Regression Model	Regression Analysis			
		R <sup>2</sup>	RMSE	PRESS R <sup>2</sup>	PRESS RMSE
Zero-shear viscosity	$\eta_0 = 93.50 * + 5.01 \times c_{DH} * + 87.63 \times c_C * + 3.97 \times c_{DH} \times c_C - 5.52 \times c_{DH}^2 * + 36.08 \times c_C^2 *$	1.00	6.79	0.99	8.53
Gelation time	$t_{GEL} = 3.60 * + 4.31 \times c_{DH} * - 2.92 \times c_C * - 2.41 \times c_{DH} \times c_C * + 2.41 \times c_{DH}^2 * - 1.19 \times c_C^2 *$	0.99	0.72	0.97	0.91
Gelation temperature	$T_{GEL} (^{\circ}) = 35.61 * + 1.84 \times c_{DH} * - 1.24 \times c_C *$	0.87	0.86	0.80	0.96
Spray cone angle	$SCA(^{\circ}) = 19.02 * - 0.65 \times c_{DH} * - 4.27 \times c_C * + 0.57 \times c_{DH} \times c_C * + 0.43 \times c_{DH}^2 + 0.58 \times c_C^2$	0.99	0.59	0.96	0.76
Droplet size distribution	$D_{V10} (\mu m) = 43.82 * + 3.69 \times c_{DH} + 18.14 \times c_C * + 4.00 \times c_{DH} \times c_C + 0.32 \times c_C^2$	0.89	7.25	0.78	8.45
	$D_{V50} (\mu m) = 127.74 * + 4.56 \times c_{DH} + 40.22 \times c_C * + 8.12 \times c_{DH} \times c_C * - 17.69 \times c_C^2 *$	0.93	12.70	0.86	14.87
	$D_{V90} (\mu m) = 249.71 * - 6.17 \times c_{DH} + 68.80 \times c_C * + 14.60 \times c_{DH} \times c_C * - 29.94 \times c_C^2$	0.92	22.51	0.84	26.41

$c_{DH}$  = donepezil hydrochloride concentration;  $c_C$  = chitosan concentration in the spray-drying solution. R<sup>2</sup> = the coefficient of determination; RMSE = root mean square error; and PRESS = predicted residual error sum of squares. \* Statistically significant parameters (individual and in interaction;  $p < 0.05$ ).

### 3.2.2. Nasal Deposition of DH-C-BGP Formulations

A growing number of studies that are tackling nose-to-brain delivery of drugs have emerged over the past decade [2]. However, the question of how to deliver drugs to the small, hindered area of the olfactory zone still remains a major obstacle. For neurological drugs to manifest their optimal therapeutic effect, the goal is to achieve high drug concentrations in the previously mentioned area. Apart from targeting the olfactory region, a direct delivery to the brain is enabled through the trigeminal nerve innervating both the olfactory and respiratory mucosa [75–77].

To ensure the targeted delivery of the nasal drug, deposition studies should be implemented in the early phase of formulation development [2]. In this work, nasal deposition studies were performed using a multi-sectional 3D-printed model based on the CT scan of a patient with healthy airway passages. Inflammatory disorders, such as rhinitis or rhinosinusitis, may influence the nasal deposition pattern [9,78]. However, they are not common for patients with Alzheimer’s disease [79]. Hence, a healthy phenotype of the nasal cavity is chosen for this study. The smallest vertical cross-sectional areas (valve region) and the length of the nasal cavity fit into the ‘normative range’ [32,80]. The model was connected to the respiratory pump to simulate three breathing patterns: no breathing, rest breathing, and deep moderate breathing [81–83]. One nostril was closed during the actuation [55]. For the nasal device, we used an Aptar’s VP7 pump, which was previously also used in other studies [56,84].

#### Deposition in the Olfactory Region

The olfactory region corresponds to the upper turbinate with a small fragment of the middle turbinate and the corresponding part of the nasal septum (Figure 1). The respiratory region is presented by the rest of the turbinates and septum, lined with respiratory epithelium, and innervated by the trigeminal nerve [32].

The olfactory deposition pattern in the 3D-printed nasal cast used in this study was monitored for all DoE samples differing in formulation and administration parameters, and the results ranged from  $1.9 \pm 2.1$  to  $71.8 \pm 0.8\%$  (Table 2). Regression modelling produced a model that showed a good fit (R-squared 0.89, RMSE 8.83, Press R-squared 0.59 and Press RMSE 13.25), represented in the following equation:

$$OD (\%) = 24.46 - 4.51 \times c_{DH} - 5.74 \times IFR * + 18.31 \times AAH * + 4.48 \times c_{DH} \times IFR - 4.38 \times c_{DH} \times AAH - 4.63 \times IFR \times AAH \quad (4)$$



**Figure 1.** The olfactory region of the 3D-printed nasal cast: superior turbinate with a small portion of the middle turbinate (**left**, in blue) and corresponding segment of the nasal septum (**right**, in red).

The formulation parameters showed no significant influence on the deposition in the olfactory region. However, the equation above indicates that both administration parameters (AAH and IFR) have a significant influence on the olfactory deposition. The increase in the angle of administration from the horizontal plane (from  $45^\circ$  to  $75^\circ$ ) increased the fraction of the drug deposited in the olfactory region. For liquid systems, high angles of administration have the potential to pass the nasal valve and aim for the olfactory region [56]. Indeed, in our study, the highest olfactory deposition was achieved at the highest angle of administration (at  $75^\circ$ ), which is equal to  $71.8 \pm 0.8\%$  of the administered dose, proving the assumption that the angle of administration is the critical factor for targeted olfactory deposition of nasal liquid sprays.

The inspiratory flow rate was shown to decrease the olfactory deposition (Equation (4)). This could be due to the pattern of airflow during low to moderate breathing conditions. According to Tian et al. [85], during the moderate breathing flow, most air flows through the turbinate region (middle and inferior meatus), while airflow in the olfactory region stays very low to unchanged. It can be assumed that breathing and airflow steer the formulation from its original direction to the turbinate region and, as a result, a smaller fraction of the drug is deposited in the olfactory region. From the patient's perspective, a 'breath hold' condition is preferred during the administration: less coordination between breathing and actuation leads to lower variability, and thus patient adherence to the therapy is facilitated [12,32].

For nasally administered neurological drugs, 0.01–1% of the orally applied dose needs to be delivered by nose-to-brain direct pathways to achieve its therapeutic potential [47]. In this study, the highest olfactory deposition attained by single-dose actuation represents 0.4% or 0.2% of oral daily dose (5 mg/10 mg) prescribed for the treatment of Alzheimer's patients [86]. It is evident that the drug concentration set by the experimental design, coupled with an appropriate mode of administration, resulted in effective drug dosing. In addition, by nasal administration, the daily dose of donepezil can be reduced, which leads to reduced systemic bioavailability, with the potential to minimise side effects.

#### Deposition in the Turbinate Region

The fraction of the deposited dose in the turbinate region for all DoE samples ranged between  $10.5 \pm 0.8$  and  $65.1 \pm 3.3\%$  (Table 2). The model retrieved from the regression modelling showed a good fit (R-squared 0.86, RMSE 9.41, Press R-squared 0.39 and Press RMSE 13.49) and is presented in the following equation:

$$\text{TD (\%)} = 52.41 + 0.14 \times c_{\text{DH}} + 2.38 \times c_{\text{C}} + 5.24 \times \text{IFR} - 11.42 \times \text{AAH}^* + 8.81 \times c_{\text{DH}} \times c_{\text{C}}^* - 6.77 \times c_{\text{DH}} \times \text{IFR}^* - 11.33 \times \text{IFR}^2 + 5.18 \times \text{IFR} \times \text{AAH} \quad (5)$$

The administration angle measured from the horizontal plane had a significant impact on the turbinate deposition. It can be observed that the decrease in AAH led to an increase in the turbinate deposition. This effect has already been described in the literature [10,11,87], and it is explained by the fact that low angles, coupled with appropriate formulation parameters, have a great potential for delivering the formulation to the turbinate region, surpassing the nasal valve.

The inspiratory flow rate exhibited a quadratic effect on the turbinate deposition. A flow rate of 15 L min<sup>-1</sup> showed a positive influence, which can be explained by the rise in air flow through the turbinate region [85]. The spray is carried by the airflow and the deposition is the result of convection. However, at 30 L min<sup>-1</sup> airflow, a decrease in turbinate deposition was evident. At high airflows, liquid escapes the streamline and it is deposited by impaction [57]. The observed interaction between the DH concentration and the inspiratory flow rate indicates the combined impact of the formulation and administration parameters on spray aerodynamic properties.

The interaction between the formulation parameters (donepezil and chitosan concentrations) showed a positive effect on the turbinate deposition, which can be related to the observed positive effect on solution viscosity and DSD. These characteristics, coupled with appropriate administration parameters, provided a greater potential for deposition beyond the nasal valve [70].

In conclusion, by using QbD methodology, we paved the way for the targeted drug delivery, resulting in an astoundingly high-dose fraction deposited in the olfactory region. So far, to the best of our knowledge, no studies have reported a fractional deposition pattern this high. The precise selection of components and their concentrations, followed by carefully selected administration parameters, resulted in an optimal DH nose-to-brain delivery. DH incorporated into a developed in situ gelling C-BGP platform showed great potential to achieve its therapeutic effect by a simple mode of nasal administration.

### 3.3. Selection of the Leading DH-C-BGP In Situ Gelling Formulation

The design of the experiments, combining formulation and administration parameters, was used to identify the optimal DH-C-BGP in situ gelling formulation for nasal DH delivery. Guided by QbD principles and based on the identified quality target product profile (QTPP—development of thermosensitive DH-C-BGP platform for safe and efficient nose-to-brain delivery) during the formulation development, we assessed: the quality target product profile, critical quality attributes (CQA—spray characteristics: zero-shear viscosity, DSD, and plume geometry), thermogelling properties (gelation time and temperature), and nasal deposition profile and critical material attributes (CMA—concentration and type of compounds) [46].

The applied approach enabled the identification of the leading formulation, consisting of 0.3 mg mL<sup>-1</sup> DH, 9.23 mg mL<sup>-1</sup> C, and 188 mg mL<sup>-1</sup> BGP (denoted as LF). The LF exhibited immediate gelling at the temperature of the nasal mucosa, and combined with a 75° administration angle measured from the horizontal plane at breath hold, resulted in the highest olfactory deposition (71.8 ± 0.8% of the applied dose). The selected formulation was characterised by a zero-shear viscosity of 206.37 ± 1.46 mPa s, a narrow plume angle (15.5 ± 0.4°), and an appropriate range of droplet sizes; all characteristics that are preferred for targeted olfactory deposition. The LF was further subjected to thorough biopharmaceutical characterisation to account for its performance in contact with the nasal mucosa.

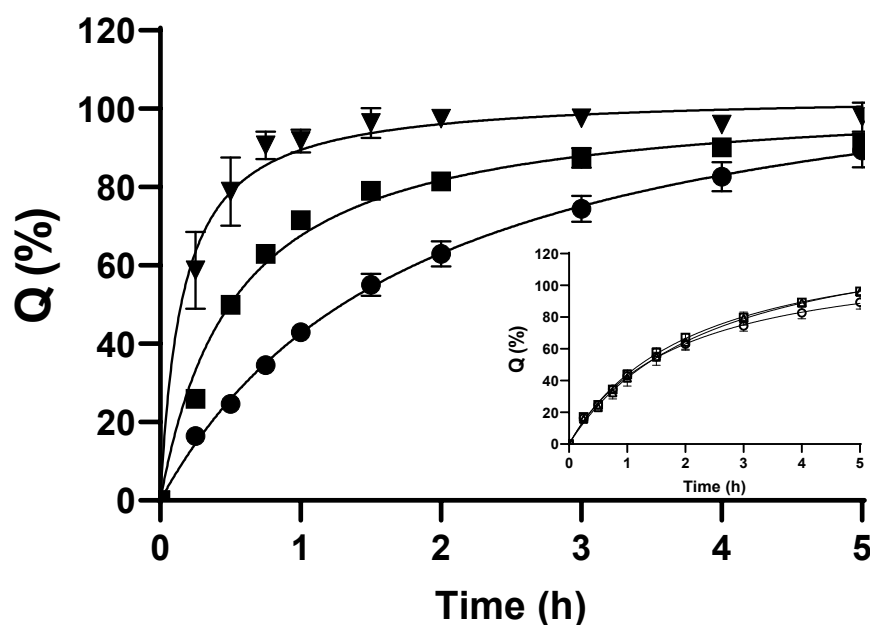


### 3.4. In-Depth Characterisation of the Leading DH-C-BGP Formulation (LF)

#### 3.4.1. DH In Vitro Release Profile

In vitro release studies were performed under sink conditions using an automated Franz diffusion system. The DH release profile from the LF was compared with two control samples: (i) the DH-C-BGP in situ gelling system differing from the LF in C concentration (control formulation—CF; chitosan concentrations in the leading and control samples were 9.23 and 6.15 mg mL<sup>-1</sup>, respectively) and (ii) the corresponding aqueous DH solution. SNF was used as a physiologically relevant acceptor medium. In order to stimulate the conditions at the nasal mucosa, the membranes placed between the donor and acceptor compartments were soaked in SNF for 15 min prior to the experiment, at 34 °C [88]. In vitro release profiles of the tested samples are presented in Figure 2.

The drug release behaviour was studied over a 5 h period. It was observed that the DH release rate decreased in the following order: DH solution > CF > LF. The dissimilarity of all compared DH release profiles was confirmed using an  $f_2$  similarity criteria ( $f_2 = 36.3$  for the LF vs. the CF,  $f_2 = 21.4$  for the LF vs. the DH solution, and  $f_2 = 35.4$  for the CF vs. the DH solution).



**Figure 2.** In vitro release profiles from the leading DH-C-BGP formulation (LF—circle) and the corresponding DH-C-BGP control formulation (CF—square) compared with the dissolution of the DH solution (reverse triangle). Graph insert: in vitro release profile of the LF immediately after preparation (empty circle), upon 30 days of storage (empty triangle), and upon 90 days of storage (empty square). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

Both the LF and the CF formed a gel at 34 °C. During the formation of the gel, its structure and viscosity determine the drug diffusion rate through the gel matrix and its release from the formulation [88,89]. Indeed, both thermosensitive formulations showed prolonged release ( $32.5 \pm 4.0\%$  and  $62.9 \pm 1.0\%$  in 45 min for the LF and the CF, respectively) in comparison with the DH solution ( $90.6 \pm 3.5\%$  of the drug released in 45 min).

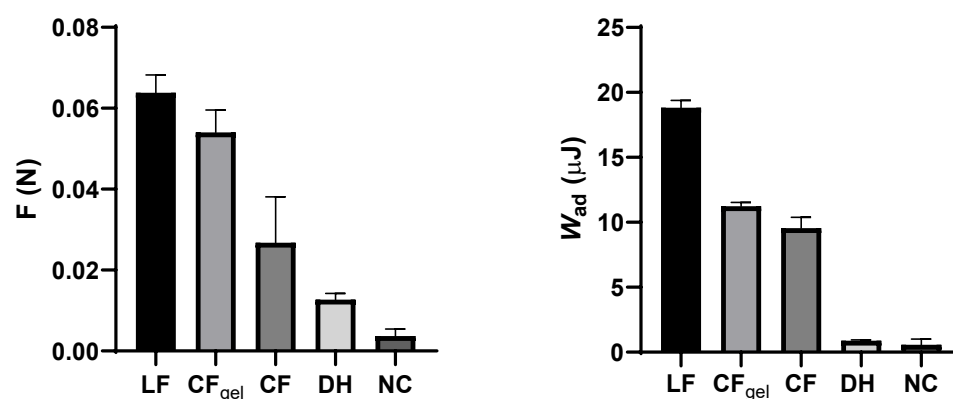
Due to different C concentrations and, consequently, different gelling times and viscosities, distinct release profiles for the LF and the CF were observed. The lower initial burst of DH from the LF can be explained by the fact that it exhibited instant gelation at 34 °C (i.e., the drug is entrapped in the gel from the beginning of the experiment), while the CF turned to gel after 1.0–1.3 min of exposure to 34 °C (Table 2). The overall slower drug release profile observed for the LF can be ascribed to higher viscosity and diffusion resistance of the gel prepared at higher chitosan concentrations [6,43,90]. The resultant

sustained and efficient drug release, when coupled with prolonged residence time at the deposition site, bears the potential to increase drug absorption and bioavailability at the action site.

### 3.4.2. Mucoadhesion

Increasing nasal residence time is a crucial task for an efficient nasal drug delivery. It can be achieved by the sol–gel transition of the formulation in contact with the nasal mucosa and is also promoted by the use of mucoadhesive agents. These agents interact with mucins in the mucus layer, decreasing mucociliary clearance and improving formulation mucosal affinity [91].

A mucoadhesion study of the LF was carried out using nasal porcine mucosa, on account of its physiological and histological similarity to human mucosa [92]. The following control samples were employed: (i) control formulation—CF (gelation time at 34 °C of the CF is 1.0–1.3 min (Table 2); and (ii) corresponding aqueous DH solution (DH). Mucoadhesion of the CF was determined: (i) under the described test conditions applied for all samples (sol–gel transition of the CF appeared in the last third of the testing time), and employing longer thermostating (2 min) to ensure gelation before the start of the test ( $CF_{gel}$ ). Filter paper served as a negative control (NC). The obtained results are presented in Figure 3.



**Figure 3.** Maximum detachment force ( $F$ ; left) and work of adhesion ( $W_{ad}$ ; right) of the leading DH-C-BGP formulation (LF), the control DH-C-BGP formulation (CF), the control DH-C-BGP formulation after gelation ( $CF_{gel}$ ), the DH aqueous solution (DH), and filter paper as the negative control (NC). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

The LF showed prominent mucoadhesive properties, with a five-fold higher maximum detachment force and a 20-fold higher work of adhesion in relation to the drug solution. The LF presented a 2.4-fold higher maximum detachment force and 2.0-fold higher work of adhesion in relation to the CF formulation. The obtained results indicate a largely improved nasal retention potential of the LF in relation to the DH simple solution and an impact of gelation time and chitosan concentration on its mucoadhesive performance. To differentiate between these two effects,  $CF_{gel}$  was also analysed for its mucoadhesive properties. Comparing the results for the CF and the  $CF_{gel}$ , it was observed that the sol–gel transition contributed significantly to the detachment force ( $p = 0.019$ ). At the same time, the comparison of the leading and control gelled formulations (LF and  $CF_{gel}$ ) suggested a significant influence of chitosan concentration on the work of adhesion ( $p < 0.001$ ).

The chitosan's mechanism of mucoadhesion is a result of electrostatic interaction between positively charged amino groups of chitosan and negatively charged mucins of the nasal mucosa [93]. It is important to note that the pH of the leading formulation is about neutral (pH = 7.02). At this pH, amino groups of chitosan are not fully protonated and the percentage of chitosan ionisation at the pH of the formulation can be calculated according to the Henderson–Hasselbalch equation [94]. Considering the pKa of chitosan (pKa = 6.5 [95]),



the percentage of ionisation of chitosan in the DH-C-BGP is 23.1%. Nonetheless, a moderate electrostatic interaction might contribute to a better mucosal tolerability of chitosan [42,96].

Chitosan also interacts with mucin through other attractive forces—hydrogen bonding and hydrophobic interaction [97]. Higher values of detachment force and work of adhesion for formulations with higher chitosan concentrations can be explained by all the above-mentioned mechanisms of chitosan mucoadhesiveness.

#### 3.4.3. In Vitro Biocompatibility

Excipients used in the formulation of DH thermosensitive gelling systems are known to be safe—applied individually or in combination [27,29,43]. As stated earlier, chitosan is a non-toxic and biocompatible polymer [98] and BGP is a substance naturally present in the human body that is also approved by the Food and Drug Administration (FDA) as a parenteral phosphate supplement [51].

The human airway epithelial Calu-3 cell line was used to evaluate the biocompatibility of the LF. The LF was diluted with HBSS/HEPES (pH = 7.0) in a 1:1 volume ratio, resulting in DH, C, and BGP concentrations of 0.15 mg mL<sup>-1</sup>, 4.62 mg mL<sup>-1</sup>, and 94.00 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. The DH solution (0.05 and 0.25 mg mL<sup>-1</sup>) and BGP solution (94.00 mg mL<sup>-1</sup>) served as controls. Pure HBSS/HEPES (pH = 7.0) served as a negative control. The cells' incubation temperature (37 °C) induced the gel formation of the leading formulation. No cytotoxic effect was observed in any of the tested formulations. The viability of the Calu-3 cells was above 80% in relation to the control (86.0 ± 1.4% for the LF; 86.4 ± 2.5% and 99.1 ± 9.9% for 0.05 mg mL<sup>-1</sup> and 0.25 mg mL<sup>-1</sup> for the DH solutions, respectively; and 95.7 ± 9.7% for the BGP solution). At the pH of the leading formulation, chitosan is not fully protonated, as discussed in Section 3.4.2. Positive amino groups of chitosan interact with negatively charged cell membranes and this interaction can lead to a reduction in cell viability. However, a lower extent of chitosan protonation at a higher pH, or shielding the positive charges on the chitosan molecule, can result in a decreased chitosan cytotoxicity [96,99]. The obtained results showed appropriate biocompatibility of the LF at the Calu-3 cell model. The selected compound concentrations are recognised to be optimal for further permeability studies.

#### 3.4.4. In Vitro DH Permeability

Permeability studies were performed using Calu-3 cells grown at an air-liquid interface. Calu-3 cells form monolayers that adequately simulate the nasal epithelial barrier considering its ultrastructure, mucus production, and barrier properties [100], while providing benefits of immortalised cell lines including high reproducibility and genetic homogeneity [101]. Recently, the Calu-3 cell model was successfully used by our group to screen chitosan-based powder formulations intended for DH nose-to-brain delivery [12].

In this work, the permeability study was designed to screen the permeation enhancing potential of the LF compared with the DH solution and to differentiate between the effect of chitosan and hyperosmotic conditions on monolayer integrity and the DH permeation profile. Thus, the following samples were tested on Calu-3 cell monolayers: (i) the LF mixed with HBSS/HEPES (pH = 7.0) in a ratio of 1:1, *v/v* (final DH concentration 0.15 mg mL<sup>-1</sup>; osmolality 750 ± 3 mOsm/kg), and (ii) the DH solution in hyperosmolar HBSS/HEPES (pH = 7.0) (DH concentration 0.15 mg mL<sup>-1</sup>; osmolality 745 ± 9 mOsm/kg) and DH solution in HBSS/HEPES (pH = 7.0) (DH concentration 0.25 mg mL<sup>-1</sup>; osmolality 340 ± 1 mOsm/kg). The permeability study was performed under sink conditions, and assuming predominant passive paracellular transport of the hydrophilic drug, no influence of DH concentration in the donor/receiver compartment on DH permeation could be expected [102,103]. Transepithelial electric resistance (TEER) was monitored over the experiment and up to 24 h upon the start of the experiment, as an indicator of the monolayer integrity.

The results of permeability studies of DH from the tested samples across the Calu-3 cell monolayer are given in Table 4. The  $P_{app}$  value of the DH from the solution in HBSS/HEPES

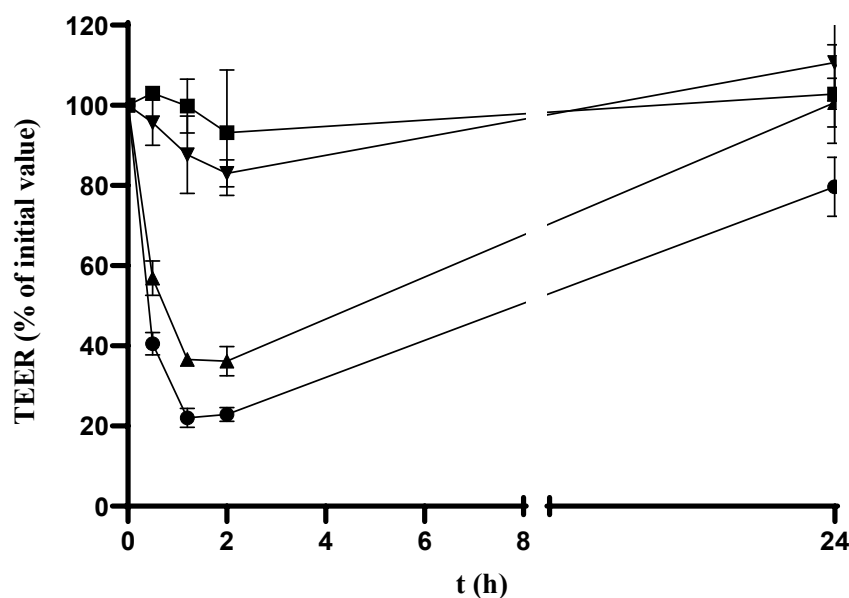
(pH 7.0) (DH concentration  $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $P_{\text{app}} = 3.38 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ ) evaluated in this study is in line with the previously obtained  $P_{\text{app}}$  value for the DH solution in HBSS- $\text{Ca}^{2+}$ /HEPES (pH = 6.0) (DH concentration  $0.008 \text{ mg mL}^{-1}$ ; osmolality  $321 \pm 1 \text{ mOsm/kg}$ ;  $P_{\text{app}} = 3.59 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ ) using the same cell model [12].

**Table 4.** Osmolality and DH apparent permeability coefficients ( $P_{\text{app}}$ ) across the Calu-3 monolayer of the LF, the DH solution in hyperosmolar HBSS/HEPES (pH = 7.0), and the DH solution in HBSS/HEPES (pH = 7.0).

Sample	Osmolality (mOsm $\text{kg}^{-1}$ )	$P_{\text{app}}$ ( $10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ )	Attenuation Factor
Leading DH-C-BGP formulation (LF)	$750 \pm 3$	$4.96 \pm 0.84$	1.47
DH solution in hyperosmolar HBSS/HEPES (pH = 7.0)	$745 \pm 9$	$3.31 \pm 2.60$	0.98
DH solution in HBSS/HEPES (pH = 7.0)	$340 \pm 1$	$3.38 \pm 3.23$	-
HBSS/HEPES (pH = 7.0)	$312 \pm 2$	-	-

The attenuation factor was calculated as the ratio between the  $P_{\text{app}}$  value of the LF or DH solution in hyperosmolar HBSS/HEPES (pH = 7.0) and the  $P_{\text{app}}$  value of the DH solution in HBSS/HEPES (pH = 7.0). Values are the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

The  $P_{\text{app}}$  value of the DH from the LF was 1.47-fold higher than that of the DH solution, confirming the formulation's permeation-enhancing effect. Considering the prolonged DH release observed in in vitro release studies, it may be concluded that the permeation-enhancing effect was even higher than described with the calculated attenuation factor. Namely, in the case of the LF, only the released fraction of the drug was available for permeation at each time point, while in the case of drug solution, the total dose of dissolved drug is instantly available for permeating the cell monolayer [12,104]. The permeation-enhancing effect of the LF can be explained by the observed decrease in the TEER value of the cell monolayer (Figure 4), indicating the loosening of the barrier properties and favouring paracellular transport of a hydrophilic drug.



**Figure 4.** Trans-epithelial electric resistance (TEER) values of the Calu-3 cell monolayer during the study of DH permeability from the LF (circle), the DH solution in hyperosmolar HBSS/HEPES (pH = 7.0) (triangle), the DH solution in HBSS/HEPES (pH = 7.0) (square), and HBSS/HEPES (pH = 7.0) (reverse triangle). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

The reversible nature of the LF effect on the barrier integrity was confirmed by the TEER increase to  $80 \pm 7\%$  of the initial value 22 h after the formulation was washed off the cell monolayer. The observed TEER decrease was ascribed to the reversible opening of the tight junctions resulting from a combined effect of the chitosan and the hyperosmolality of the formulation. Such a conclusion was supported by a more pronounced TEER decrease observed for the leading hyperosmolar chitosan-based formulation than for the chitosan-free hyperosmolar DH solution (Figure 4). Interestingly, the hyperosmolar DH solution showed no permeation-enhancing effect compared with the isoosmolar DH solution (attenuation factor = 0.98), stressing the role of chitosan in promoting DH permeation across the cell monolayer barrier.

#### 3.4.5. Slug Mucosal Irritation Assay

Due to the intense contact of the applied nasal formulation and the sensitive nasal mucosa, certain nasal discomfort, described as stinging, itching, and burning (SIB) sensations, may occur. These adverse effects affect patient compliance, and consequently the outcome of the treatment [105]. For this reason, it is very important to assess the formulation's potential for irritation in the early stage of formulation development. Adriaens and Remon [106] developed a simple and inexpensive method to predict the formulation's potential irritancy on the mucosal surfaces. The slug mucosal irritation (SMI) assay uses slugs of species *Arion lusitanicus* as a test organism to assess the irritation potency. Slugs are placed on a tested substance. If the formulation causes irritation, the slug produces mucus as a protective mechanism [107]. Based on the total amount of the produced mucus, and in relation to the positive and negative controls, it is possible to assess the irritation potential of the formulation and predict the discomfort the formulation may cause to the patient [37].

We performed the SMI assay as described earlier [37]. The mucus production after exposing the slug to the LF was compared with the results of the SMI assay performed on the positive control (maximum irritation) and the negative control (no irritation). The results of the performed SMI assay are presented in Table 5.

**Table 5.** Total mucus production from the three contact periods in the SMI assay expressed as a percentage of the initial body weight of the slugs. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

Sample	Total Mucus Production (%)
Leading DH-C-BGP formulation (LF)	$6.64 \pm 1.04$
PBS—negative control	$0.48 \pm 1.50$
BAC 1% ( <i>w/v</i> )—positive control	$17.64 \pm 4.33$

The mucus production for the LF was 2.7 times lower compared with the BAC 1% (*w/v*), which is used as a marker for severe discomfort [108]. The observed LF-induced mucus production was comparable to a previously reported result obtained for mannitol (sieved fraction 32–90  $\mu\text{m}$ ;  $6.30 \pm 0.61\%$ ), employing the same SMI assay. The observed mucus production was ascribed to a size-related dissolution rate and osmotic effect [37].

The tolerability and formulation potential to cause irritation can be ascribed to formulation pH, constituents, and osmolality [105]. Considering the relatively high mucus production previously observed for carboxymethyl chitosan powder [37], it may be assumed that the neutral pH of the LF contributed to its tolerability, as a neutral pH renders the chitosan charge density to a moderately low value.

The hypertonic nature of thermosensitive chitosan/polyol-phosphate in situ gelling systems has already been reported [43,51,109]. Lenoir et al. tested a hypertonic NaCl solution (2.6%, *w/v*), characterised by similar osmolality to the LF, employing a human nose irritation test [105]. After 5 min of the nasal exposure, 54% of the participants did not feel discomfort, while 41.5% experienced mild discomfort. Ten minutes after the exposure, 79% of the participants did not feel discomfort anymore.

It can be concluded that the LF in the SMI assay showed an acceptable irritability profile, demonstrating its potential for safe nasal delivery.

### 3.4.6. Stability Profile

The physicochemical stability of the LF was monitored over a period of 3 months. The formulation was stored in an impermeable container at  $5 \pm 3$  °C and inspected for drug concentration, rheological and gelling properties (zero-shear viscosity, and gelation temperature and time), spray characteristics, and drug release profile. Stability studies revealed no significant change in any of the tested characteristics, confirming the suitability of the formulation stability profile (Table 6). The  $f_2$  criteria for similarity estimation revealed no significant difference between release profiles of the LF determined after 0, 30, and 90 days of storage at described conditions (Table 6; Figure 2, insert).

**Table 6.** Three-month stability data for the leading DH-C-BGP in situ gelling formulation.

Inspected Property	Immediately after Preparation	After 30 Days	After 90 Days
DC (mg mL <sup>-1</sup> )	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.01
$\eta_0$ (mPa s)	206.37 ± 1.46	192.28 ± 11.57	211.02 ± 6.53
$T_{GEL}$ (°)	33.7 ± 0.1	33.9 ± 0.3	34.9 ± 0.1
$t_{GEL}$ (min)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
$D_{v10}$ (µm)	69.8 ± 3.7	74.6 ± 6.0	70.2 ± 1.4
$D_{v50}$ (µm)	161.1 ± 5.2	167.2 ± 4.5	166.5 ± 2.6
$D_{v90}$ (µm)	309.7 ± 10.9	313.1 ± 3.9	317.4 ± 7.7
Span	1.5 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.0
SCA (°)	15.5 ± 0.4	15.6 ± 0.2	15.8 ± 0.1
$f_2$	-	72.7	70.2

DC = drug concentration;  $\eta_0$  = zero-shear viscosity;  $T_{GEL}$  = gelation temperature;  $t_{GEL}$  = gelation time;  $D_{v10}$ ;  $D_{v50}$  and  $D_{v90}$  = droplet size distribution; SCA = spray cone angle; and  $f_2$  = similarity factor of in vitro release profiles after 30 and 90 days compared with the release profile immediately after preparation.

### 3.5. Discussing the Potential of the Developed DH Liquid Formulation in Comparison with the DH Powder Formulation

In this study, a thermoresponsive chitosan-based in situ gelling system was proven to be a promising platform for an efficient nasal DH delivery. Recently, our research group developed a comparable nasal spray-dried DH formulation, embedding the well-known advantages of a dry nasal form [12]. The applied complementary approach, including the development of both powder and liquid DH delivery platforms, is beneficial considering the patient perspective, as patients still prefer liquid formulations over nasal powders [110,111]. This aspect is particularly important in the targeted patient population since the adherence of AD patients is linked to the tolerability of drug therapy [112].

The comparison between powder and liquid formulations, based on their advantages and disadvantages, is presented in the literature [2,5]. However, to the best of our knowledge, there are no reports in which the comparability between powder and liquid platforms of the same active substance has been discussed, particularly in terms of nasal deposition profiles.

Both technological platforms, apart from being of simple production and acceptable stability profile, allowed for the optimisation of physicochemical, biopharmaceutical, and nasal deposition properties, which are crucial for an efficient DH nose-to-brain delivery. Indeed, a high olfactory deposition was obtained with both liquid (71.8% of the applied dose) and powder (65.5% of the applied dose) formulations [12], despite distinct aerodynamic properties of dispersed droplets and dried particles. The direct comparison of deposition profiles is feasible since the same 3D-printed model of the nasal cavity was used for the evaluation of both types of formulations. The high olfactory deposition was achieved by a fine-tuning of administration parameters in relation to formulation-specific properties. Generally, different administration angles from the horizontal plane were found to favour an olfactory deposition of aerosolised droplets and dry particles, while inspiratory airflow reduced the olfactory deposition of both formulations. Complex regression models for olfactory deposition efficiency, coupling formulation properties, and mode

of administration stress the need for deposition considerations in the early phase of the formulation development.

Finally, the comparison of distinct liquid and powder DH formulations using an animal model is needed to rate their in vivo performance in terms of potentiating DH brain bioavailability.

#### 4. Conclusions

A thermogelling chitosan-based donepezil formulation was prepared by a fast, single-step method applicable in industrial settings. The manufacturing process enabled the fine-tuning of the formulation parameters that resulted in a final product of desirable characteristics. Droplet size, rheology, and sprayability were optimised features of the nasal product that, coupled with appropriate administration parameters, resulted in an efficient olfactory deposition (71.8% of the applied dose), which is crucial for the therapeutic outcome of nasally applied donepezil. The optimised formulation proved to be stable at the observed period of time and showed biopharmaceutical properties, suggesting the potential for safe nasal administration, prolonged retention at the nasal mucosa, sustained DH release, and increased permeability across the epithelial barrier. The obtained results indicate the formulation potential to promote DH brain bioavailability and support the continuation of studies aimed at gaining in vivo proof-of-concept and comparison of distinct liquid and powder DH formulations.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics15061660/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.H., M.P., L.N.N. and D.Š.; methodology, A.H., M.P., L.N.N., D.Š., I.U., C.J.B., I.P., J.L., M.S.K., M.T., R.S., D.Z. and L.K.; validation, M.P., C.J.B. and A.H.; formal analysis, M.P., L.N.N., D.Š., I.U., C.J.B., M.T., R.S. and A.H.; investigation, M.P., L.N.N., C.J.B., I.P., J.L., M.T., R.S. and A.H.; resources, A.H., J.L., M.S.K., R.S., D.Z. and L.K.; data curation, M.P., I.P., J.L., D.Š., I.U. and A.H.; writing—original draft, A.H., M.P., L.N.N., D.Š. and I.U.; writing—review and editing, M.P., L.N.N., D.Š., I.U., C.J.B., I.P., J.L., M.S.K., M.T., R.S., D.Z., L.K. and A.H.; visualization, M.P., L.N.N. and A.H.; supervision, A.H. and R.S.; project administration, A.H.; and funding acquisition, A.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported in part by the Croatian Science Foundation under the project UIP-2017-05-4592, the European Social Fund under the Croatian Science Foundation project DOK-2020-01-2473, and by the project FarmInova (KK.01.1.1.02.0021) funded by the European Regional Development Fund.

**Institutional Review Board Statement:** The development of the nasal cavity model based on a CT scan of a patient was carried out following the rules of the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Sisters of Charity Hospital (project identification code: EP-9941/19-3) and the Ethics Committee of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (class: 643-02/19-01/02; registry number: 251-62-03-19-43).

**Informed Consent Statement:** The patient gave informed consent for inclusion before exporting data for the reconstruction of the nasal cavity and 3D printing.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors thank Miodrag Katalenić and Mladen Šercer (Cateh d.o.o., Zagreb) for help in the production of the 3D nasal cavity model and AptarGroup Inc. for providing us with the VP7 device used for nasal deposition studies.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Giunchedi, P.; Gavini, E.; Bonferoni, M.C. Nose-to-Brain Delivery. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Deruyver, L.; Rigaut, C.; Lambert, P.; Haut, B.; Goole, J. The Importance of Pre-Formulation Studies and of 3D-Printed Nasal Casts in the Success of a Pharmaceutical Product Intended for Nose-to-Brain Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *175*, 113826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



3. Laffleur, F.; Bauer, B. Progress in Nasal Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2021**, *607*, 120994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Scherließ, R. Nasal Formulations for Drug Administration and Characterization of Nasal Preparations in Drug Delivery. *Ther. Deliv.* **2020**, *11*, 183–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Salade, L.; Wauthoz, N.; Goole, J.; Amighi, K. How to Characterize a Nasal Product. The State of the Art of in Vitro and Ex Vivo Specific Methods. *Int. J. Pharm.* **2019**, *561*, 47–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Agrawal, M.; Saraf, S.; Saraf, S.; Dubey, S.K.; Puri, A.; Gupta, U.; Kesharwani, P.; Ravichandiran, V.; Kumar, P.; Naidu, V.G.M.; et al. Stimuli-Responsive In Situ Gelling System for Nose-to-Brain Drug Delivery. *J. Control. Release* **2020**, *327*, 235–265. [[CrossRef](#)]
7. Formica, M.L.; Real, D.A.; Picchio, M.L.; Catlin, E.; Donnelly, R.F.; Paredes, A.J. On a Highway to the Brain: A Review on Nose-to-Brain Drug Delivery Using Nanoparticles. *Appl. Mater. Today* **2022**, *29*, 101631. [[CrossRef](#)]
8. Pandey, V.; Gadeval, A.; Asati, S.; Jain, P.; Jain, N.; Roy, R.K.; Tekade, M.; Soni, V.; Tekade, R.K. Formulation Strategies for Nose-to-Brain Delivery of Therapeutic Molecules. In *Drug Delivery Systems*; Tekade, R.K., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 291–332.
9. Le Guellec, S.; Ehrmann, S.; Vecellio, L. In Vitro–in Vivo Correlation of Intranasal Drug Deposition. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *170*, 340–352. [[CrossRef](#)]
10. Nižić, L.; Ugrina, I.; Špoljarić, D.; Saršon, V.; Kučuk, M.S.; Pepić, I.; Hafner, A. Innovative Sprayable in Situ Gelling Fluticasone Suspension: Development and Optimization of Nasal Deposition. *Int. J. Pharm.* **2019**, *563*, 445–456. [[CrossRef](#)]
11. Nižić Nodilo, L.; Perkušić, M.; Ugrina, I.; Špoljarić, D.; Jakobušić Brala, C.; Amidžić Klarić, D.; Lovrić, J.; Saršon, V.; Safundžić Kučuk, M.; Zadravec, D.; et al. In Situ Gelling Nanosuspension as an Advanced Platform for Fluticasone Propionate Nasal Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2022**, *175*, 27–42. [[CrossRef](#)]
12. Perkušić, M.; Nižić Nodilo, L.; Ugrina, I.; Špoljarić, D.; Jakobušić Brala, C.; Pepić, I.; Lovrić, J.; Matijašić, G.; Gretić, M.; Zadravec, D.; et al. Tailoring Functional Spray-Dried Powder Platform for Efficient Donepezil Nose-to-Brain Delivery. *Int. J. Pharm.* **2022**, *624*, 122038. [[CrossRef](#)]
13. Agrawal, M.; Saraf, S.; Saraf, S.; Antimisiaris, S.G.; Chougule, M.B.; Shoyele, S.A.; Alexander, A. Nose-to-Brain Drug Delivery: An Update on Clinical Challenges and Progress towards Approval of Anti-Alzheimer Drugs. *J. Control. Release* **2018**, *281*, 139–177. [[CrossRef](#)]
14. Knopman, D.S.; Amieva, H.; Petersen, R.C.; Chételat, G.; Holtzman, D.M.; Hyman, B.T.; Nixon, R.A.; Jones, D.T. Alzheimer Disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2021**, *7*, 33. [[CrossRef](#)]
15. Prabakaran, A.; Agrawal, M.; Dethle, M.R.; Ahmed, H.; Yadav, A.; Gupta, U.; Alexander, A. Nose-to-Brain Drug Delivery for the Treatment of Alzheimer’s Disease: Current Advancements and Challenges. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2022**, *19*, 87–102. [[CrossRef](#)]
16. Adlimoghaddam, A.; Neuendorff, M.; Roy, B.; Albensi, B.C. A Review of Clinical Treatment Considerations of Donepezil in Severe Alzheimer’s Disease. *CNS Neurosci. Ther.* **2018**, *24*, 876–888. [[CrossRef](#)]
17. Gu, F.; Fan, H.; Cong, Z.; Li, S.; Wang, Y.; Wu, C. Preparation, Characterization, and in Vivo Pharmacokinetics of Thermosensitive in Situ Nasal Gel of Donepezil Hydrochloride. *Acta Pharm.* **2020**, *70*, 411–422. [[CrossRef](#)]
18. Espinoza, L.C.; Guaya, D.; Calpena, A.C.; Perotti, R.M.; Halbaut, L.; Sosa, L.; Brito-Llera, A.; Mallandrich, M. Comparative Study of Donepezil-Loaded Formulations for the Treatment of Alzheimer’s Disease by Nasal Administration. *Gels* **2022**, *8*, 715. [[CrossRef](#)]
19. Bhavna; Md, S.; Ali, M.; Ali, R.; Bhatnagar, A.; Baboota, S.; Ali, J. Donepezil Nanosuspension Intended for Nose to Brain Targeting: In Vitro and in Vivo Safety Evaluation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *67*, 418–425. [[CrossRef](#)]
20. Al Asmari, A.K.; Ullah, Z.; Tariq, M.; Fatani, A. Preparation, Characterization, and in Vivo Evaluation of Intranasally Administered Liposomal Formulation of Donepezil. *Drug Des. Dev. Ther.* **2016**, *10*, 205–215. [[CrossRef](#)]
21. de Souza, I.F.F.; Dos Santos, T.Q.; Placido, R.V.; Mangerona, B.A.; Carvalho, F.C.; Boralli, V.B.; Ruela, A.L.M.; Pereira, G.R. The Liquid Crystalline Phase Behaviour of a Nasal Formulation Modifies the Brain Disposition of Donepezil in Rats in the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *203*, 111721. [[CrossRef](#)]
22. Espinoza, L.C.; Silva-Abreu, M.; Clares, B.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Halbaut, L.; Cañas, M.-A.; Calpena, A.C. Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 64. [[CrossRef](#)]
23. Akel, H.; Csóka, I.; Ambrus, R.; Bocsik, A.; Gróf, I.; Mészáros, M.; Szecskó, A.; Kozma, G.; Veszelka, S.; Deli, M.A.; et al. In Vitro Comparative Study of Solid Lipid and PLGA Nanoparticles Designed to Facilitate Nose-to-Brain Delivery of Insulin. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Espinoza, L.C.; Vacacela, M.; Clares, B.; García, M.L.; Fabrega, M.-J.; Calpena, A.C. Development of a Nasal Donepezil-Loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer’s Disease: In Vitro and Ex Vivo Characterization. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2018**, *17*, 43–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kaur, P.; Garg, T.; Rath, G.; Goyal, A.K. In Situ Nasal Gel Drug Delivery: A Novel Approach for Brain Targeting through the Mucosal Membrane. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2016**, *44*, 1167–1176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Casettari, L.; Illum, L. Chitosan in Nasal Delivery Systems for Therapeutic Drugs. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 189–200. [[CrossRef](#)]
27. Kolawole, O.M.; Cook, M.T. In Situ Gelling Drug Delivery Systems for Topical Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2023**, *184*, 36–49. [[CrossRef](#)]
28. Gholizadeh, H.; Cheng, S.; Pozzoli, M.; Messerotti, E.; Traini, D.; Young, P.; Kourmatzis, A.; Ong, H.X. Smart Thermosensitive Chitosan Hydrogel for Nasal Delivery of Ibuprofen to Treat Neurological Disorders. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2019**, *16*, 453–466. [[CrossRef](#)]

29. Kolawole, O.M.; Lau, W.M.; Khutoryanskiy, V.V. Chitosan/ $\beta$ -Glycerophosphate in Situ Gelling Mucoadhesive Systems for Intravesical Delivery of Mitomycin-C. *Int. J. Pharm. X* **2019**, *1*, 100007. [CrossRef]
30. Supper, S.; Anton, N.; Seidel, N.; Riemenschnitter, M.; Schoch, C.; Vandamme, T. Rheological Study of Chitosan/Polyol-Phosphate Systems: Influence of the Polyol Part on the Thermo-Induced Gelation Mechanism. *Langmuir* **2013**, *29*, 10229–10237. [CrossRef]
31. Center for Drug Evaluation and Research. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Nasal Aerosols and Nasal Sprays for Local Action. Available online: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioavailability-and-bioequivalence-studies-nasal-aerosols-and-nasal-sprays-local-action> (accessed on 15 March 2023).
32. Nižić Nodilo, L.; Ugrina, I.; Špoljarić, D.; Amidžić Klarić, D.; Jakobušić Brala, C.; Perkušić, M.; Pepić, I.; Lovrić, J.; Saršon, V.; Safundžić Kučuk, M.; et al. A Dry Powder Platform for Nose-to-Brain Delivery of Dexamethasone: Formulation Development and Nasal Deposition Studies. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 795. [CrossRef]
33. Pappa, H.; Farrú, R.; Vilanova, P.O.; Palacios, M.; Pizzorno, M.T. A New HPLC Method to Determine Donepezil Hydrochloride in Tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 177–182. [CrossRef]
34. EMA ICH Q2(R2) Validation of Analytical Procedures—Scientific Guideline. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (accessed on 1 April 2023).
35. Fachel, F.N.S.; Medeiros-Neves, B.; Dal Prá, M.; Schuh, R.S.; Veras, K.S.; Bassani, V.L.; Koester, L.S.; Henriques, A.T.; Braganhol, E.; Teixeira, H.F. Box-Behnken Design Optimization of Mucoadhesive Chitosan-Coated Nanoemulsions for Rosmarinic Acid Nasal Delivery—In Vitro Studies. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *199*, 572–582. [CrossRef]
36. Soni, V.; Pandey, V.; Tiwari, R.; Asati, S.; Tekade, R.K. Chapter 13—Design and Evaluation of Ophthalmic Delivery Formulations. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*; Tekade, R.K., Ed.; Advances in Pharmaceutical Product Development and Research; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 473–538. ISBN 978-0-12-817909-3.
37. Trenkel, M.; Scherließ, R. Nasal Powder Formulations: In-Vitro Characterisation of the Impact of Powders on Nasal Residence Time and Sensory Effects. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 385. [CrossRef]
38. Nippe, S.; Preuße, C.; General, S. Evaluation of the in Vitro Release and Pharmacokinetics of Parenteral Injectable Formulations for Steroids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *83*, 253–265. [CrossRef]
39. Blažević, F.; Milekić, T.; Romić, M.D.; Juretić, M.; Pepić, I.; Filipović-Grčić, J.; Lovrić, J.; Hafner, A. Nanoparticle-Mediated Interplay of Chitosan and Melatonin for Improved Wound Epithelialisation. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *146*, 445–454. [CrossRef]
40. Ghasemi Tahrir, F.; Ganji, F.; Mani, A.R.; Khodaverdi, E. In Vitro and in Vivo Evaluation of Thermosensitive Chitosan Hydrogel for Sustained Release of Insulin. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 1038–1046. [CrossRef]
41. Zhou, H.Y.; Jiang, L.J.; Cao, P.P.; Li, J.B.; Chen, X.G. Glycerophosphate-Based Chitosan Thermosensitive Hydrogels and Their Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *117*, 524–536. [CrossRef]
42. Szymańska, E.; Sosnowska, K.; Milytyk, W.; Rusak, M.; Basa, A.; Winnicka, K. The Effect of  $\beta$ -Glycerophosphate Crosslinking on Chitosan Cytotoxicity and Properties of Hydrogels for Vaginal Application. *Polymers* **2015**, *7*, 2223–2244. [CrossRef]
43. Naik, A.; Nair, H. Formulation and Evaluation of Thermosensitive Biogels for Nose to Brain Delivery of Doxepin. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 847547. [CrossRef]
44. Foxman, E.F.; Storer, J.A.; Fitzgerald, M.E.; Wasik, B.R.; Hou, L.; Zhao, H.; Turner, P.E.; Pyle, A.M.; Iwasaki, A. Temperature-Dependent Innate Defense against the Common Cold Virus Limits Viral Replication at Warm Temperature in Mouse Airway Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 827–832. [CrossRef]
45. Karavasili, C.; Fatouros, D.G. Smart Materials: In Situ Gel-Forming Systems for Nasal Delivery. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 157–166. [CrossRef] [PubMed]
46. Grangeia, H.B.; Silva, C.; Simões, S.P.; Reis, M.S. Quality by Design in Pharmaceutical Manufacturing: A Systematic Review of Current Status, Challenges and Future Perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *147*, 19–37. [CrossRef] [PubMed]
47. Erdő, F.; Bors, L.A.; Farkas, D.; Bajza, Á.; Gizurarson, S. Evaluation of Intranasal Delivery Route of Drug Administration for Brain Targeting. *Brain Res. Bull.* **2018**, *143*, 155–170. [CrossRef] [PubMed]
48. Gholizadeh, H.; Messerotti, E.; Pozzoli, M.; Cheng, S.; Traini, D.; Young, P.; Kourmatzis, A.; Caramella, C.; Ong, H.X. Application of a Thermosensitive In Situ Gel of Chitosan-Based Nasal Spray Loaded with Tranexamic Acid for Localised Treatment of Nasal Wounds. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 299. [CrossRef] [PubMed]
49. Aliaghaie, M.; Mirzadeh, H.; Dashtimoghadam, E.; Taranejo, S. Investigation of Gelation Mechanism of an Injectable Hydrogel Based on Chitosan by Rheological Measurements for a Drug Delivery Application. *Soft Matter* **2012**, *8*, 7128–7137. [CrossRef]
50. Zhou, H.Y.; Chen, X.G.; Kong, M.; Liu, C.S.; Cha, D.S.; Kennedy, J.F. Effect of Molecular Weight and Degree of Chitosan Deacetylation on the Preparation and Characteristics of Chitosan Thermosensitive Hydrogel as a Delivery System. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73*, 265–273. [CrossRef]
51. Supper, S.; Anton, N.; Seidel, N.; Riemenschnitter, M.; Curdy, C.; Vandamme, T. Thermosensitive Chitosan/Glycerophosphate-Based Hydrogel and Its Derivatives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 249–267. [CrossRef]
52. Zhou, J.-F.; Duan, L.; Wang, Y.-X.; Wang, C.-L.; Tian, M.-L.; Qi, X.-J.; Qiu, F. Design, Characterization of Resveratrol-Thermosensitive Hydrogel System (Res-THS) and Evaluation of Its Anti-Depressant Effect v Intranasal Administration. *Mater. Des.* **2022**, *216*, 110597. [CrossRef]
53. Peng, Y.; Li, J.; Li, J.; Fei, Y.; Dong, J.; Pan, W. Optimization of Thermosensitive Chitosan Hydrogels for the Sustained Delivery of Venlafaxine Hydrochloride. *Int. J. Pharm.* **2013**, *441*, 482–490. [CrossRef]

54. Warnken, Z.N.; Smyth, H.D.C.; Davis, D.A.; Weitman, S.; Kuhn, J.G.; Williams, R.O. Personalized Medicine in Nasal Delivery: The Use of Patient-Specific Administration Parameters To Improve Nasal Drug Targeting Using 3D-Printed Nasal Replica Casts. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 1392–1402. [CrossRef]
55. Moraga-Espinoza, D.; Warnken, Z.; Moore, A.; Williams, R.O.; Smyth, H.D.C. A Modified USP Induction Port to Characterize Nasal Spray Plume Geometry and Predict Turbinate Deposition under Flow. *Int. J. Pharm.* **2018**, *548*, 305–313. [CrossRef]
56. Kundoor, V.; Dalby, R.N. Effect of Formulation- and Administration-Related Variables on Deposition Pattern of Nasal Spray Pumps Evaluated Using a Nasal Cast. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 1895–1904. [CrossRef]
57. Xi, J.; Yuan, J.E.; Zhang, Y.; Nevorski, D.; Wang, Z.; Zhou, Y. Visualization and Quantification of Nasal and Olfactory Deposition in a Sectional Adult Nasal Airway Cast. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 1527–1541. [CrossRef]
58. Needham, D. The pH Dependence of Niclosamide Solubility, Dissolution, and Morphology: Motivation for Potentially Universal Mucin-Penetrating Nasal and Throat Sprays for COVID19, Its Variants and Other Viral Infections. *Pharm. Res.* **2022**, *39*, 115–141. [CrossRef]
59. Chusakul, S.; Warathanasin, S.; Suksangpanya, N.; Phannaso, C.; Ruxrungtham, S.; Snidvongs, K.; Aejumjaturapat, S. Comparison of Buffered and Nonbuffered Nasal Saline Irrigations in Treating Allergic Rhinitis. *Laryngoscope* **2013**, *123*, 53–56. [CrossRef]
60. Optimal Design of Experiments: A Case Study Approach. Available online: <https://www.wiley.com/en-us/Optimal+Design+of+Experiments%3A+A+Case+Study+Approach-p-9780470744611> (accessed on 15 March 2023).
61. Ghadiri, M.; Young, P.M.; Traini, D. Strategies to Enhance Drug Absorption via Nasal and Pulmonary Routes. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 113. [CrossRef]
62. Maaz, A.; Blagbrough, I.S.; De Bank, P.A. In Vitro Evaluation of Nasal Aerosol Depositions: An Insight for Direct Nose to Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1079. [CrossRef]
63. Gao, M.; Shen, X.; Mao, S. Factors Influencing Drug Deposition in The Nasal Cavity upon Delivery via Nasal Sprays. *J. Pharm. Investig.* **2020**, *50*, 251–259. [CrossRef]
64. Trows, S.; Wuchner, K.; Spycher, R.; Steckel, H. Analytical Challenges and Regulatory Requirements for Nasal Drug Products in Europe and the U.S. *Pharmaceutics* **2014**, *6*, 195–219. [CrossRef]
65. Party, P.; Bartos, C.; Farkas, Á.; Szabó-Révész, P.; Ambrus, R. Formulation and In Vitro and In Silico Characterization of “Nano-in-Micro” Dry Powder Inhalers Containing Meloxicam. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 211. [CrossRef]
66. Guo, Y.; Laube, B.; Dalby, R. The Effect of Formulation Variables and Breathing Patterns on the Site of Nasal Deposition in an Anatomically Correct Model. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 1871–1878. [CrossRef] [PubMed]
67. do Amaral Sobral, P.J.; Gebremariam, G.; Drudi, F.; De Aguiar Saldanha Pinheiro, A.C.; Romani, S.; Rocculi, P.; Dalla Rosa, M. Rheological and Viscoelastic Properties of Chitosan Solutions Prepared with Different Chitosan or Acetic Acid Concentrations. *Foods* **2022**, *11*, 2692. [CrossRef] [PubMed]
68. Cho, J.; Heuzey, M.-C.; Bégin, A.; Carreau, P.J. Chitosan and Glycerophosphate Concentration Dependence of Solution Behaviour and Gel Point Using Small Amplitude Oscillatory Rheometry. *Food Hydrocoll.* **2006**, *20*, 936–945. [CrossRef]
69. Pu, Y.; Goodey, A.P.; Fang, X.; Jacob, K. A Comparison of the Deposition Patterns of Different Nasal Spray Formulations Using a Nasal Cast. *Aerosol Sci. Technol.* **2014**, *48*, 930–938. [CrossRef]
70. Foo, M.Y.; Cheng, Y.-S.; Su, W.-C.; Donovan, M.D. The Influence of Spray Properties on Intranasal Deposition. *J. Aerosol Med.* **2007**, *20*, 495–508. [CrossRef] [PubMed]
71. Coutu, J.-M.; Fatimi, A.; Berrahmoune, S.; Soulez, G.; Lerouge, S. A New Radiopaque Embolizing Agent for the Treatment of Endoleaks after Endovascular Repair: Influence of Contrast Agent on Chitosan Thermogel Properties. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2013**, *101*, 153–161. [CrossRef]
72. Lavertu, M.; Fillion, D.; Buschmann, M.D. Heat-Induced Transfer of Protons from Chitosan to Glycerol Phosphate Produces Chitosan Precipitation and Gelation. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 640–650. [CrossRef]
73. Fillion, D.; Lavertu, M.; Buschmann, M.D. Ionization and Solubility of Chitosan Solutions Related to Thermosensitive Chitosan/Glycerol-Phosphate Systems. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3224–3234. [CrossRef]
74. Sandri, G.; Bonferoni, M.C.; Rossi, S.; Ferrari, F.; Mori, M.; Del Fante, C.; Perotti, C.; Caramella, C. Thermosensitive Eyedrops Containing Platelet Lysate for the Treatment of Corneal Ulcers. *Int. J. Pharm.* **2012**, *426*, 1–6. [CrossRef]
75. Johnson, N.J.; Hanson, L.R.; Frey, W.H., II. Trigeminal Pathways Deliver a Low Molecular Weight Drug from the Nose to the Brain and Orofacial Structures. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 884–893. [CrossRef]
76. Martins, P.P.; Smyth, H.D.C.; Cui, Z. Strategies to Facilitate or Block Nose-to-Brain Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2019**, *570*, 118635. [CrossRef]
77. Djupesland, P.G.; Messina, J.C.; Mahmoud, R.A. The Nasal Approach to Delivering Treatment for Brain Diseases: An Anatomic, Physiologic, and Delivery Technology Overview. *Ther. Deliv.* **2014**, *5*, 709–733. [CrossRef]
78. Möller, W.; Schuschnig, U.; Celik, G.; Münzing, W.; Bartenstein, P.; Häussinger, K.; Kreyling, W.G.; Knoch, M.; Canis, M.; Becker, S. Topical Drug Delivery in Chronic Rhinosinusitis Patients before and after Sinus Surgery Using Pulsating Aerosols. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74991. [CrossRef]
79. Yasue, M.; Sugiura, S.; Uchida, Y.; Otake, H.; Teranishi, M.; Sakurai, T.; Toba, K.; Shimokata, H.; Ando, F.; Otsuka, R.; et al. Prevalence of Sinusitis Detected by Magnetic Resonance Imaging in Subjects with Dementia or Alzheimer’s Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2015**, *12*, 1006–1011. [CrossRef]



80. Djupesland, P.G.; Messina, J.C.; Mahmoud, R.A. Role of Nasal Casts for in Vitro Evaluation of Nasal Drug Delivery and Quantitative Evaluation of Various Nasal Casts. *Ther. Deliv.* **2020**, *11*, 485–495. [[CrossRef](#)]
81. Issakhov, A.; Mardiyeva, A.; Zhandaulet, Y.; Abylkassymova, A. Numerical Study of Air Flow in the Human Respiratory System with Rhinitis. *Case Stud. Therm. Eng.* **2021**, *26*, 101079. [[CrossRef](#)]
82. Xi, J.; Si, X.; Kim, J.W.; Berlinski, A. Simulation of Airflow and Aerosol Deposition in the Nasal Cavity of a 5-Year-Old Child. *J. Aerosol Sci.* **2011**, *42*, 156–173. [[CrossRef](#)]
83. Schroeter, J.D.; Tewksbury, E.W.; Wong, B.A.; Kimbell, J.S. Experimental Measurements and Computational Predictions of Regional Particle Deposition in a Sectional Nasal Model. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **2015**, *28*, 20–29. [[CrossRef](#)]
84. Grmaš, J.; Stare, K.; Božič, D.; Injac, R.; Dreu, R. Elucidation of Formulation and Delivery Device-Related Effects on In Vitro Performance of Nasal Spray with Implication to Rational Product Specification Identification. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **2017**, *30*, 230–246. [[CrossRef](#)]
85. Tian, L.; Shang, Y.; Chen, R.; Bai, R.; Chen, C.; Inthavong, K.; Tu, J. Correlation of Regional Deposition Dosage for Inhaled Nanoparticles in Human and Rat Olfactory. *Part. Fibre Toxicol.* **2019**, *16*, 6. [[CrossRef](#)]
86. Sutthapitaksakul, L.; Dass, C.R.; Sriamornsak, P. Donepezil—An Updated Review of Challenges in Dosage Form Design. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *63*, 102549. [[CrossRef](#)]
87. Chen, J.Z.; Kiaee, M.; Martin, A.R.; Finlay, W.H. In Vitro Assessment of an Idealized Nose for Nasal Spray Testing: Comparison with Regional Deposition in Realistic Nasal Replicas. *Int. J. Pharm.* **2020**, *582*, 119341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Patel, S.; Koradia, H.; Parikh, R. Design and Development of Intranasal in Situ Gelling System of Midazolam Hydrochloride Using 32 Full Factorial Design. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2015**, *30*, 154–162. [[CrossRef](#)]
89. Jug, M.; Hafner, A.; Lovrić, J.; Kregar, M.L.; Pepić, I.; Vanić, Ž.; Cetina-Čizmek, B.; Filipović-Grčić, J. An Overview of in Vitro Dissolution/Release Methods for Novel Mucosal Drug Delivery Systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *147*, 350–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Shelke, S.; Shahi, S.; Jalalpure, S.; Dhamecha, D. Poloxamer 407-Based Intranasal Thermoreversible Gel of Zolmitriptan-Loaded Nanoethosomes: Formulation, Optimization, Evaluation and Permeation Studies. *J. Liposome Res.* **2016**, *26*, 313–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Patil, M. Chapter 7—Mucoadhesion as a Strategy to Enhance the Direct Nose-to-Brain Drug Delivery. In *Direct Nose-to-Brain Drug Delivery*; Pardeshi, C.V., Souto, E.B., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2021; pp. 115–156, ISBN 978-0-12-822522-6.
92. Yang, J.; Dai, L.; Yu, Q.; Yang, Q. Histological and Anatomical Structure of the Nasal Cavity of Bama Minipigs. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173902. [[CrossRef](#)]
93. Popescu, R.; Ghica, M.V.; Dinu-Pîrvu, C.-E.; Anuța, V.; Lupuliasa, D.; Popa, L. New Opportunity to Formulate Intranasal Vaccines and Drug Delivery Systems Based on Chitosan. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5016. [[CrossRef](#)]
94. Dowd, F.J. 2—Pharmacokinetics: The Absorption, Distribution, and Fate of Drugs. In *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*, 7th ed.; Dowd, F.J., Johnson, B.S., Mariotti, A.J., Eds.; Mosby: Maryland Heights, MO, USA, 2017; pp. 15–43, ISBN 978-0-323-39307-2.
95. Abouelmagd, S.A.; Ku, Y.J.; Yeo, Y. Low Molecular Weight Chitosan-Coated Polymeric Nanoparticles for Sustained and pH-Sensitive Delivery of Paclitaxel. *J. Drug Target.* **2015**, *23*, 725–735. [[CrossRef](#)]
96. Kudsiova, L.; Lawrence, M.J. A Comparison of the Effect of Chitosan and Chitosan-Coated Vesicles on Monolayer Integrity and Permeability across Caco-2 and 16HBE14o-Cells. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 3998–4010. [[CrossRef](#)]
97. M. Ways, T.M.; Lau, W.M.; Khutoryanskiy, V.V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers* **2018**, *10*, 267. [[CrossRef](#)]
98. Kou, S.G.; Peters, L.; Mucalo, M. Chitosan: A Review of Molecular Structure, Bioactivities and Interactions with the Human Body and Micro-Organisms. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *282*, 119132. [[CrossRef](#)]
99. Casettari, L.; Villasaliu, D.; Mantovani, G.; Howdle, S.M.; Stolnik, S.; Illum, L. Effect of PEGylation on the Toxicity and Permeability Enhancement of Chitosan. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2854–2865. [[CrossRef](#)]
100. Sibinovska, N.; Žakelj, S.; Trontelj, J.; Kristan, K. Applicability of RPMI 2650 and Calu-3 Cell Models for Evaluation of Nasal Formulations. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 369. [[CrossRef](#)]
101. Sibinovska, N.; Žakelj, S.; Roškar, R.; Kristan, K. Suitability and Functional Characterization of Two Calu-3 Cell Models for Prediction of Drug Permeability across the Airway Epithelial Barrier. *Int. J. Pharm.* **2020**, *585*, 119484. [[CrossRef](#)]
102. Fredlund, L.; Winiwarer, S.; Hilgendorf, C. In Vitro Intrinsic Permeability: A Transporter-Independent Measure of Caco-2 Cell Permeability in Drug Design and Development. *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 1601–1609. [[CrossRef](#)]
103. Flaten, G.E.; Dhanikula, A.B.; Luthman, K.; Brandl, M. Drug Permeability across a Phospholipid Vesicle Based Barrier: A Novel Approach for Studying Passive Diffusion. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *27*, 80–90. [[CrossRef](#)]
104. Ventura, C.A.; Tommasini, S.; Crupi, E.; Giannone, I.; Cardile, V.; Musumeci, T.; Puglisi, G. Chitosan Microspheres for Intrapulmonary Administration of Moxifloxacin: Interaction with Biomembrane Models and In Vitro Permeation Studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 235–244. [[CrossRef](#)]
105. Lenoir, J.; Bachert, C.; Remon, J.-P.; Adriaens, E. The Slug Mucosal Irritation (SMI) Assay: A Tool for the Evaluation of Nasal Discomfort. *Toxicol. Vitro.* **2013**, *27*, 1954–1961. [[CrossRef](#)]
106. Adriaens, E.; Remon, J.P. Gastropods as an Evaluation Tool for Screening the Irritating Potency of Absorption Enhancers and Drugs. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1240–1244. [[CrossRef](#)]

107. Adriaens, E.; Remon, J.P. Mucosal Irritation Potential of Personal Lubricants Relates to Product Osmolality as Detected by the Slug Mucosal Irritation Assay. *Sex. Transm. Dis.* **2008**, *35*, 512–516. [[CrossRef](#)]
108. Lenoir, J.; Adriaens, E.; Remon, J.-P. New Aspects of the Slug Mucosal Irritation Assay: Predicting Nasal Stinging, Itching and Burning Sensations. *J. Appl. Toxicol.* **2011**, *31*, 640–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Ahmadi, R.; de Bruijn, J.D. Biocompatibility and Gelation of Chitosan–Glycerol Phosphate Hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *86*, 824–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Henriques, P.; Fortuna, A.; Doktorovová, S. Spray Dried Powders for Nasal Delivery: Process and Formulation Considerations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2022**, *176*, 1–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Tiozzo Fasiolo, L.; Manniello, M.D.; Tratta, E.; Buttini, F.; Rossi, A.; Sonvico, F.; Bortolotti, F.; Russo, P.; Colombo, G. Opportunity and Challenges of Nasal Powders: Drug Formulation and Delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *113*, 2–17. [[CrossRef](#)]
112. Borah, B.; Sacco, P.; Zarotsky, V. Predictors of Adherence among Alzheimer’s Disease Patients Receiving Oral Therapy. *Curr. Med. Res. Opin.* **2010**, *26*, 1957–1965. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## **7 ŽIVOTOPIS**

Mirna Perkušić rođena je u Zagrebu 24. listopada 1992. godine. Opću gimnaziju završila je u Zagrebu, a 2011. godine upisala je integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2016. godine i stekla naslov magistre farmacije te dobila odobrenje za samostalan rad u ljekarničkoj djelatnosti. 2017. godine zapošljava se kao istraživač-analitičar u Pliva d.o.o. u odjelu Istraživanje i razvoj, Analitika, Laboratorij za fizikalnu karakterizaciju parenteralnih proizvoda. 2019. zapošljava se kao asistentica na zamjeni na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a krajem iste godine i kao asistentica na zamjeni na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2020. godine zaposlena je kao doktorand – asistent na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu projekta „Razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ (DOK-2020-01-2473) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti (grana Farmacija) na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2020. godine, a doktorski rad izradila je u sklopu uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod naslovom „Optimiranje depozicije raspršenih *in situ* gelirajućih i praškastih terapijskih sustava u nosnoj šupljini“, voditeljice prof. dr. sc. Anite Hafner (UIP-2017-05-4592). Sudjeluje u izvođenju nastave predmeta Biofarmacija s farmakokinetikom, Magistralna receptura i Kozmetologija na integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju farmacije te Nosači i aktivne supstancije u dermatološkim i kozmetičkim pripravcima na poslijediplomskom specijalističkom studiju Dermatofarmacija i kozmetologija. Do sada je u koautorstvu objavila četiri znanstvena rada zastupljenih u bazi Web of Science Core Collection. Aktivno je sudjelovala na stranim i domaćim znanstvenim skupovima s dva usmena i jedanaest posterskih priopćenja. Na 14. kongresu *Central European Symposium on Pharmaceutical Technology* (CESPT) 2023. godine osvojila je nagradu stručnog povjerenstva za najbolju postersku prezentaciju. Održala je nekoliko radionica na Danima otvorenih vrata Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i Festivalu znanosti. Držala je prezentacije na Danu bruoša i PhD Café-u u organizaciji Hrvatske zaklade za znanost. Sudjelovala je na EIT Health Inovacijskom izazovu 2021. godine u organizaciji Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i Centra za istraživanje, razvoj i transfer tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

#### **Znanstveni radovi (CC):**

1. Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Amidžić Klarić D, Jakobušić Brala C, Perkušić M, et al. A dry powder platform for nose-to-brain delivery of dexamethasone: Formulation development and nasal deposition studies. *Pharmaceutics*. 2021;13:1–30.
2. Nižić Nodilo L, Perkušić M, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Amidžić Klarić D, et al. *In situ* gelling nanosuspension as an advanced platform for fluticasone propionate nasal delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2022;175:27–42.
3. **Perkušić M**, Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Pepić I, Lovrić J, Matijašić G, Gretić M, Zadravec D, Kalogjera L, Hafner A. Tailoring functional spray-dried powder platform for efficient donepezil nose-to-brain delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;624:122038.
4. **Perkušić M**, Nižić Nodilo L, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Pepić I, Lovrić J, Safundžić Kučuk M, Trenkel M, Scherließ R, Zadravec D, Kalogjera L, Hafner A. Chitosan-Based Thermogelling System for Nose-to-Brain Donepezil Delivery: Optimising Formulation Properties and Nasal Deposition Profile. *Pharmaceutics*. 2023;15(6):1660.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

### RAZVOJ NAPREDNIH *IN SITU* GELIRAJUĆIH SUSTAVA ZA NAZALNU PRIMJENU DONEPEZILA

Mirna Perkušić

#### SAŽETAK

Alzheimerova bolest (AB) je kronični i progresivni neurodegenerativni poremećaj. Liječenje AB-a trenutno podrazumijeva simptomatsko liječenje demencije pomoću reverzibilnih inhibitora kolinesteraze. U tu skupinu ubraja se donepezil, lijek prvog izbora za AB. Trenutno je donepezil uglavnom dostupan u obliku oralnih tableta, a takav način primjene ima određene nedostatke, poput gastrointestinalnih nuspojava i loše bioraspodivnosti donepezila u mozgu uslijed slabog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Jedan od mogućih načina zaobilaska krvno-moždane barijere je nazalna primjena lijekova. Nazalna primjena omogućava izravnu dostavu lijeka u mozak prvenstveno putem olfaktornog područja i u manjoj mjeri putem respiratornog područja nosne šupljine. Učinkovitost nazalno primijenjenog lijeka uvelike ovisi o profilu nazalne depozicije u ciljano područje, vremenu zadržavanja na mjestu primjene te utjecaju farmaceutskog oblika na oslobađanje lijeka i barijerna svojstva sluznice. U ovom radu razvijeni su napredni *in situ* gelirajući sustavi za nazalnu primjenu donepezila: praškasti *in situ* gelirajući sustav – kitozansko-manitolne mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem korištenjem ultrazvučne sapnice; i tekući *in situ* gelirajući sustav - termoosjetljiva otopina donepezila, kitozana i  $\beta$ -glicerofosfata. Primjenom statističkog dizajna eksperimenta omogućeno je fino ugađanje formulacijskih, procesnih i/ili parametara primjene s ciljem optimiranja ključnih svojstava *in situ* gelirajućih sustava s donepezilom. Oba razvijena nazalna sustava pokazuju odgovarajući sadržaj donepezila te optimalna reološka svojstva i svojstva raspršivanja, uključujući veličinu čestica/kapljica prikladnu za nazalnu primjenu. Formulacije su optimirane i s obzirom na profil nazalne depozicije, osiguravajući dostavu visokog postotka doze lijeka u olfaktorno područje. Razvijeni farmaceutski oblici pokazuju i poželjna biofarmaceutska svojstva, uključujući biokompatibilnost, mukoadhezivnost, neiritabilnost, produljeno oslobađanje i povećani permeacijski potencijal donepezila, te su zadovoljavajućeg profila stabilnosti. Zaključno, vodeći se načelima kakvoće utemeljene kroz dizajn, razvijeni su napredni *in situ* gelirajući sustavi za nazalnu primjenu donepezila s ugrađenim potencijalom izravne dostave lijeka iz nosne šupljine u mozak. Komplementarni razvoj praškastog i tekućeg sustava omogućio je njihovu usporedbu te predstavlja čvrst temelj za buduća farmakokinetička *in vivo* ispitivanja na animalnim modelima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 219 stranica, 32 grafička prikaza, 30 tablica i 326 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: donepezil, nazalna depozicija, olfaktorno područje, sušenje raspršivanjem, ultrazvučna sapnica, *in situ* gelirajući sustav, kitozan

Mentor: **Dr. sc. Anita Hafner**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Marjana Dürriegl**, znanstvena suradnica, PLIVA Hrvatska d.o.o., Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

Rad prihvaćen: studeni 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Pharmaceutical Technology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

### DEVELOPMENT OF ADVANCED *IN SITU* GELLING SYSTEMS FOR NASAL DONEPEZIL DELIVERY

Mirna Perkušić

#### SUMMARY

Alzheimer's disease is a chronic and progressive neurodegenerative disease. The first drug of choice for the symptomatic treatment of dementia is acetylcholinesterase inhibitor donepezil, which is currently available predominantly in oral solid dosage forms. Donepezil oral delivery is related to several drawbacks such as first pass metabolism, gastrointestinal adverse effects, and low brain delivery efficiency due to low blood-brain barrier penetration. A viable alternative of bypassing the blood-brain barrier is nasal drug administration. Nasal route of administration enables direct nose-to-brain delivery *via* olfactory nerve located in the olfactory region, and to a lesser extent, *via* the trigeminal nerve located in the olfactory and respiratory region of the nasal cavity. Nasal deposition profile, retention time at the nasal mucosa and drug release profile from the therapeutic system are the key factors for efficient therapeutic outcome of the nasally applied drug. In this work, donepezil loaded chitosan/mannitol microspheres as dry powder delivery platform were successfully developed by spray-drying technique using ultrasonic nozzle. Also, liquid *in situ* gelling system for donepezil nose-to-brain delivery was successfully developed as a thermosensitive solution of donepezil, chitosan and  $\beta$ -glycerophosphate. DoE approach enabled fine tuning of the formulation, process and/or administration parameters that resulted in final powder and liquid advanced donepezil *in situ* gelling formulation of desirable properties. Both powder and liquid donepezil *in situ* gelling systems are characterised by appropriate rheological and spraying properties, with particle/droplet size suitable for nasal delivery. Nasal deposition studies revealed a high olfactory deposition for both systems. Furthermore, formulations showed optimal biopharmaceutical properties: prolonged drug release, suitable mucoadhesive properties, prominent permeation enhancing effect and nonirritating properties. The systematic and overall approach to the development of the advanced donepezil nasal systems proposed within this work showed encouraging results that can be a starting point for extending the study to an appropriate *in vivo* model for final proof-of-concept.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 219 pages, 32 figures, 30 tables and 326 references. Original is in Croatian language.

Keywords: donepezil, nasal deposition, olfactory region, spray drying, ultrasonic nozzle, *in situ* gelling system, chitosan

Mentor: **Anita Hafner, PhD**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Jelena Filipović-Grčić, PhD**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Morna Turk, PhD**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marjana Dürriegl, PhD**, Research Associate, PLIVA Croatia Ltd., University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2023.