

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**SZEMCSEMÉRETCSÖKKENTŐ ELJÁRÁSOK A MODERN
GYÓGYSZERFEJLESZTÉSBEN; NAZÁLIS ÉS PULMONÁLIS
HATÓANYAGBEVITEL**

Dr. Ambrus Rita

Készült a
Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézetében



2023. Szeged

„Gondolkodj bátran, ne félj attól, hogy hibákat követsz el! Tartsd nyitva a szemed, az apró részleteket is vedd észre és legyél mindenben mértéktartó, céljaidat kivéve.”

Szent-Györgyi Albert

TARTALOMJEGYZÉK

Az értekezés alapját képező közlemények (K1-K32)	5
Az értekezés témaköréhez kapcsolódó egyéb közlemények	8
FONTOSABB FOGALMAK MAGYARÁZATA	9
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	10
I. BEVEZETÉS	12
II. CÉLKITŰZÉS	13
III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	15
3.1 Szemcseméretcsökkentés jelentősége, a mikro- és nano-mérettartomány elérésének technológiai irányelvei	15
3.1.1 <i>Dezintegráló eljárások</i>	18
3.1.2 <i>Integráló eljárások</i>	21
3.1.3 <i>Prediszperziók stabilitása és stabilizálása</i>	26
3.1.4 <i>Gyógyszer technológiai kísérlettervezés</i>	28
3.2 Intranazális gyógyszerbevitel formulálási aspektusai	29
3.3 Pulmonális gyógyszerbevitel formulálási aspektusai	31
IV. FELHASZNÁLT ANYAGOK	36
4.1 Hatóanyagok	36
4.2 Segédanyagok	37
V. TERMÉKELŐÁLLÍTÁSI ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	39
5.1 Minták előállítása céljából használt kísérlet-tervezés, szemcseméretcsökkentő eljárások és módszerek	39
5.2 Fizikai-kémiai tulajdonságok meghatározása	41
5.3 Szerkezeti vizsgálatok	43
5.4 Gyógyszerforma vizsgálatok	44
5.5 Sejtkultúra vizsgálatok	47
5.6 In vivo mérések	47
5.7 Stabilitási vizsgálat	48
5.8 Statisztikai analízis	48
VI. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	49
6.1 Innovatív szemcseméretcsökkentő eljárások kutatása és fejlesztése.	
Prediszperziók előállítása és vizsgálata	49
6.1.1 <i>Szemcseméretcsökkentés lehetőségeinek tanulmányozása dezintegráló eljárásokkal, mikro- és nanodiszperzió előállítása száraz ko-örléssel</i>	49
6.1.2 <i>Szemcseméretcsökkentés lehetőségeinek tanulmányozása dezintegráló eljárásokkal, mikro- és nanoszuszpenzió előállítása kombinált nedves ko-örléssel és kavitáción alapuló technológiákkal</i>	58

6.1.3 Nanotechnológiai eljárások tanulmányozása integráló eljárások alkalmazásával	67
6.1.3.1 Kombinált precipitációs eljárások.....	67
6.1.3.2 Új lehetőségek az oldószer-evaporációs eljárások területén, alternatív energiaforrások, nanoporlasztás.....	73
6.2 Prediszperziók innovatív gyógyszerformáinak terápiaszpecifikus fejlesztése alternatív beviteli kapukon keresztül	80
6.2.1 Nazális gyógyszerformák fejlesztése, in vitro/in vivo vizsgálatai	81
6.2.1.1 Optimalizált prediszperzió tartalmú intranazális spray gyógyszerforma fejlesztése.....	82
6.2.1.2 Optimalizált lamotrigin prediszperzió tartalmú orrpor gyógyszerforma fejlesztése.....	88
6.2.1.3 Permeabilitás vizsgáló rendszer fejlesztése.....	90
6.2.2 Hatóanyagot szállító mikroméretű hordozó rendszerek kutatása és fejlesztése pulmonális alkalmazás céljából	95
6.2.2.1 Összetett hordozó-alapú porinhalációs összetételek formulálása.....	98
6.2.2.2 Innovatív „micro-in-micro/extrafine” porinhalációs formulációk fejlesztése.....	100
6.2.2.3 Szubmikronos („nano-in-micro”) porinhalációs rendszerek fejlesztése krónikus tüdőbetegségek hatékonyabb kezelésének céljából kombinált nanotechnológiai eljárásokkal.....	105
VII. MEGÁLLAPÍTÁSOK TÉZISPONTOKBA RENDSZEREZÉSE	110
VIII. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI RELEVANCIÁI	114
IX. IRODALOMJEGYZÉK	118

Az értekezés alapját képező közlemények (K1-K32)

- K1-** Kürti, L; Kukovecz, Á; Kozma, G; **Ambrus, R**; Deli, M; Szabó-Révész, P
Study of the parameters influencing the co-grinding process for the production of meloxicam nanoparticles. *Powder Techn.* **2011**, 8, 210-217
IF: 2,08; Q1; Hiv: 32
- K2-** Gieszinger, P; Csóka, I; Pallagi, E; Katona, G; Jójárt-Laczkovich, O; Szabó-Révész, P; **Ambrus, R**
Preliminary study of nanonized lamotrigine containing products for nasal powder formulation. *Drug Des Devel Ther.* **2017**, 14, 2453-2466
IF: 2,935; Q1; Hiv: 6
- K3-** Gieszinger, P; Tomuta, I; Casian, T; Bartos, Cs; Szabó-Révész, P; **Ambrus, R**
Definition and validation of the Design Space for co-milled nasal powder containing nanosized lamotrigine. *Drug Devel Ind Pharm.* **2018**, 9, 1622-1630
IF: 2,367; Q2; Hiv: 4
- K4-** Bartos, C; Szabó-Révész, P; Bartos, Cs; Katona, G; Jójárt-Laczkovich, O; **Ambrus, R**
The effect of an optimized wet milling technology on the crystallinity, morphology and dissolution properties of micro- and nanonized meloxicam. *Molecules*, **2016**, 21(507), 11
IF=2,861; Q1; Hiv 16
- K5-** Bartos, Cs; Jójárt-Laczkovich, O; Katona, G; Budai-Szűcs, M; **Ambrus, R**; Bocsik, A; Gróf, I; Deli, M A; Szabó-Révész P
Optimization of a combined wet milling process in order to produce poly(vinyl alcohol) stabilized nanosuspension. *Drug Des Devel Ther.* **2018**, 12, 1567-1580
IF: 3,208; Q1; Hiv: 8
- K6-** Bartos, Cs; **Ambrus, R**; Katona, G; Gáspár, R; Márki, Á; Ducza, E; Ivanov, A; Tömösi, F; Janáky, T; Szabó-Révész P
Transformation of meloxicam containing nanosuspension into surfactant-free solid compositions to increase the product stability and drug bioavailability for rapid analgesia. *Drug Des Dev Ther.* **2019**, 13, 4007-4020
IF: 3,216; Q1; Hiv: 8
- K7-** Bartos, C; Szabó-Révész, P; **Ambrus, R**
Optimization of technological parameters by acoustic cavitation to achieve particle size reduction. *Farmacia (Bukarest).* **2014**, 14, 34-47
IF: 1,005; Q2; Hiv: 3
- K8-** Bartos, C; Kukovecz, Á; **Ambrus, R**; Farkas, G; Radacsi, N; Szabó-Révész, P
Comparison of static and dynamic sonication as process intensification for particle size reduction using a factorial design. *Chem Eng Process.* **2015**, 87, 26-34
IF: 2,154; Q1; Hiv: 15
- K9-** Iurian, S; Bogdan, C; Tomuță, I; Szabó-Révész, P; Chvatal, A; Leucuța, S; Moldovan, M; **Ambrus, R**
Development of oral lyophilisates containing meloxicam nanocrystals using QbD approach. *Eur J Pharm Sci.* **2017**, 10, 356-365
IF: 3,466; Q1; Hiv: 20
- K10-** **Ambrus, R**; Kocbek, P; Kristl, J; Sibanc, R; Rajko, R; Szabó-Révész, P
Investigation of preparation parameters to improve the dissolution of poorly water-soluble meloxicam. *Int J Pharm.* **2009**, 7, 153-159
IF: 2,962; Q1; Hiv: 70

- K11- Ambrus, R;** Amirzadi, N N; Sipos, P; Szabó-Révész, P
Effect of sonocrystallization on the habit and structure of gemfibrozil crystals. *Chem Eng Technol.* **2010**, 6, 827-832
IF: 1,394; Q1; Hiv: 20
- K12- Ambrus R;** Amirzadi N N; Aigner Z; Szabó-Révész P
Formulation of poorly water-soluble gemfibrozil applying power ultrasound. *Ultrason Sonochem.* **2012**, 6, 286-291
IF: 3,516; Q1; Hiv: 11
- K13- Alshweiat, A; Katona, G; Csóka, I; Ambrus, R**
Design and characterization of loratadine nanosuspension prepared by ultrasonic-assisted precipitation. *Eur J Pharm Sci.* **2018**, 11, 94-104
IF: 3,532; Q1; Hiv: 25
- K14- Radacsi, N; Ambrus, R; Szunyogh, T; Szabó-Révész, P; Stankiewicz, A; Van Der Heijden, A; Ter, Horst JH**
Electrospray crystallization for nanosized pharmaceuticals with improved properties. *Cryst Growth Des.* **2012**, 7, 3514-3520
IF: 4,689; D1; Hiv: 33
- K15- Ambrus, R; Radacsi, N; Szunyogh, T; Van Der Heijden, A; Ter, Horst JH; Szabó-Révész, P**
Analysis of submicron-sized niflumic acid crystals prepared by electrospray crystallization. *J Pharm Biomed Anal.* **2013**, 7, 1-7
IF: 2,829; D1; Hiv: 12
- K16- Radacsi N; Ambrus R; Szabó-Révész P; Van Der Heijden A; Ter Horst JH**
Atmospheric pressure cold plasma synthesis of submicrometer-sized pharmaceuticals with improved physicochemical properties. *Cryst Growth Des.* **2012**, 6, 5090-5095
IF: 4,689; D1; Hiv: 5
- K17- Radacsi, N; Stefanidis, G. D; Szabó-Révész, P; Ambrus, R**
Analysis of niflumic acid prepared by rapid microwave-assisted evaporation. *J Pharm Biomed Anal.* **2014**, 6, 16-21
IF: 2,979; D1; Hiv: 11
- K18- Party, P; Kókai, D; Burián, K; Nagy, A; Hopp, B; Ambrus, R**
Development of extra-fine particles containing nanosized meloxicam for deep pulmonary delivery: in vitro aerodynamic and cell line measurements. *Eur J Pharm Sci.* **2022**, 13, 106247
IF: 5,112; Q1
- K19- Kürti, L; Gáspár, R; Márki, Á; Kápolna, E; Bocsik, A; Veszélka, S; Bartos, C; Ambrus, R Vastag, M; Deli, MA; Szabó-Révész, P**
In vitro and in vivo characterization of meloxicam nanoparticles designed for nasal administration
Eur J Pharm Sci. **2013**, 7, 86-92
IF: 3,005; Q1; Hiv: 29
- K20- Bartos, Cs; Ambrus, R; Sipos, P; Budai-Szücs, M; Csányi, E; Gáspár, R; Márki, Á; B Seres, A; Sztojkov-Ivanov, A; Horváth, T; Szabó-Révész, P**
Study of sodium hyaluronate-based intranasal formulations containing micro- or nanosized meloxicam particles. *Int J Pharm.* **2015**, 10, 198-207
IF: 3,944; D1; Hiv: 15

K21- Bartos, C; **Ambrus, R**; Kovács, A; Gáspár, R; Sztojkov-Ivanov, A; Márki, Á; Janáky, T; Tömösi, F; Kecskeméti, G; Szabó-Révész, P

Investigation of Absorption Routes of Meloxicam and Its Salt Form from Intranasal Delivery Systems. *Molecules*. **2018**, 13, 784

IF: 3,06; Q1; Hiv: 5

K22- Alshweiat, A; Csóka, I; Tömösi, F; Janáky, T; Kovács, A; Gáspár, R; Sztojkov-Ivanov, A; Ducza, E; Márki, Á; Szabó-Révész, P; **Ambrus R**

Nasal delivery of nanosuspension-based mucoadhesive formulation with improved bioavailability of loratadine: preparation, characterization, and in vivo evaluation. *Int J Pharm*. **2020**, 579, 119166

IF: 5,875; D1; Hiv: 29

K23- **Ambrus, R**; Gieszinger, P; Gáspár, R; Sztojkov-Ivanov, A; Ducza, E; Márki, Á; Janáky, T; Tömösi, F; Kecskeméti, G; Szabó-Révész, P; Bartos, C

Investigation of the Absorption of Nanosized lamotrigine Containing Nasal Powder via the Nasal Cavity. *Molecules*. **2020**, 15, 1065

IF: 4,412; Q1; Hiv: 9

K24- Bartos, Cs; Szabó-Révész, P; Horváth, T; Varga, P; **Ambrus, R**

Comparison of Modern In Vitro Permeability Methods with the Aim of Investigation Nasal Dosage Forms. *Pharmaceutics*. **2021**, 12, 846

IF: 6,525; Q1; Hiv: 5

K25- Gieszinger, P; Kiss, T; Szabó-Révész, P; **Ambrus, R**

The Development of an In Vitro Horizontal Diffusion Cell to Monitor Nasal Powder Penetration Inline *Pharmaceutics*. **2021**, 6, 809

IF: 6,525; Q1

K26- Varga, P; **Ambrus, R**; Szabó-Révész, P; Kókai, D; Burián, K; Bella, Zs; Fenyvesi, F; Bartos, Cs
Physico-chemical, in vitro and ex vivo characterization of meloxicam potassium-cyclodextrin nanospheres. *Pharmaceutics*. **2021**, 14, 1883

IF: 6,525; Q1; Hiv: 1

K27- Benke, E; Farkas, Á; Szabó-Révész, P; **Ambrus, R**

Development of an Innovative, Carrier-Based Dry Powder Inhalation Formulation Containing Spray-Dried Meloxicam Potassium to Improve the In Vitro and In Silico Aerodynamic Properties. *Pharmaceutics*. **2020**, 19, 535

IF: 6,321; Q1; Hiv: 7

K28- Pomázi, A; **Ambrus, R**; Sipos, P; Szabó-Révész, P

Analysis of co-spray-dried meloxicam-mannitol systems containing crystalline microcomposites. *J Pharm Biomed Anal*. **2011**, 8, 183-190

IF: 2,967; D1; Hiv: 17

K29- Pomázi, A; Buttini, F; **Ambrus, R**; Colombo, P; Szabó-Révész, P

Effect of polymers for aerolization properties of mannitol-based microcomposites containing meloxicam. *Eur Polymer J*. **2013**, 10, 2518-2527

IF: 3,242; Q1; Hiv: 18

K30- Chvatal, A; Farkas, Á; Balásházy, I; Szabó-Révész, P; **Ambrus, R**

Aerodynamic properties and in silico deposition of meloxicam potassium incorporated in a carrier-free DPI pulmonary system. *Int J Pharm*. **2017**, 9, 70-78

IF: 3,862; D1; Hiv: 12

K31- Chvatal, A; **Ambrus, R**; Party, P; Katona, G; Jójárt-Laczkovich, O; Szabó-Révész, P; Fattal, E; Tsapis, N

Formulation and comparison of spray dried non-porous and large porous particles containing meloxicam for pulmonary drug delivery. *Int J Pharm.* **2019**, 8, 68-75

IF: 4,845; D1; Hiv: 32

K32- Party, P; Bartos, Cs; 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**, 18, 211

IF: 6,525; Q1; Hiv: 3

Összegezve

Kiemelt szerzős: 19

Társszerzős: 13

D1: 9

Q1: 21

Q2: 2

IF: 122,627

Független cit: 481

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó egyéb közlemények

EK1- Szunyogh, T; **Ambrus, R**; Szabó-Révész, P

Nanonization of Niflumic Acid by Co-Grinding. *Advances In Nanoparticles.* **2013**, 7, 329-335

EK2-Gieszinger, P; Katona, G; Szabó-Révész, P; **Ambrus, R**

Stability study of nasal powder formulation containing nanosized lamotrigine. *Acta Pharm Hung.* **2020**, 90, 27-31

EK3- **Ambrus, R**; Bartos, Cs; Szabóné Révész, P

Eljárási paraméterek optimalizálása szónikus kavitáció alkalmazásával hatóanyag szemcseméret csökkentése céljából. *Acta Pharm Hung.* **2011**, 81, 51-58

EK4- Szunyogh, T; **Ambrus, R**; Szabó-Révész, P

Formation of niflumic acid particle size by solvent diffusion and solvent evaporation as precipitation methods. *J D D S T.* **2012**, 307-312

EK5- Horváth, T; **Ambrus, R**; Völgyi, G; Budai-Szűcs, M; Márki, Á; Sipos, P; Bartos, Cs; Seres, A; Sztojkov-Ivanov, A; Takács-Novák, K; Csányi, E; Gáspár, R; Szabó-Révész, P

Effect of solubility enhancement on nasal absorption of meloxicam. *Eur J Pharm Sci.* **2016**, 7, 96-102

EK6- Horváth Tamás, **Ambrus Rita**, Szabóné Révész Piroska

Nazális gyógyszerformák permeabilitási vizsgálata Side-Bi-Side™ horizontális cella alkalmazásával. *Acta Pharm Hung.* **2015**, 85, 19-28

EK7- **Ambrus, R**; Benke, E; Farkas, Á; Balásházy, I; Szabó-Révész, P

Novel dry powder inhaler formulation containing antibiotic using combined technology to improve aerodynamic properties *Eur J Pharm Sci.* **2018**, 8, 20-27

EK8- Benke, E; Varga, P; Szabó-Révész, P; **Ambrus, R**

Stability and In Vitro Aerodynamic Studies of Inhalation Powders Containing Ciprofloxacin Hydrochloride Applying Different DPI Capsule Types. *Pharmaceutics* **2021**, 16, 689

EK9- **Ambrus, R**; Pomazi, A; Reti-Nagy, K; Fenyvesi, F; Vecsernyes, M; Szabó-Révész, P

Cytotoxicity testing of carrier-based microcomposites for DPI application. *Pharmazie* **2011**, 2, 549-550

EK10- Chvatal, A; Alzhrani, R; Tiwari, Amit, K.; **Ambrus, R**; Szabó-Révész, P; Sai, HS. B

Cytotoxicity of inhalable dry powders in A459 human lung cancer cell line. *Farmacia* (Bucharest). **2018**, 66, 172-175

FONTOSABB FOGALMAK MAGYARÁZATA

Aggregátum: erős kötésben lévő vagy egymással egyesült szemcsékből álló részecske (EU definíció).

Agglomerátum: gyenge kötésben lévő részecskék vagy aggregátumok halmaza, amelynek külső felülete az egyes alkotóelemei külső felületeinek összegével hasonló méretű (EU definíció).

Diszperzításhok: a szemcsék méretének (átmérő, hossz) reciproka.

Generikumok: bioekvivalens készítmények azonos gyógyszerformában és dózisban; *generikum plusz* esetében innováció a formát illetően; *super generikum* esetében pedig csökkentett dózis, jobb oldékonyság, gyorsabb oldódási sebesség). Ez utóbbi esetében nem elegendő a bioekvivalencia vizsgálat (teljes klinikai vizsgálatra van szükség).

„Holding time”: a prediszperzió tárolási időtartama, amely alatt fizikai-kémiai sajátságait a gyógyszerformulálásig megtartja.

Innováció: új, vagy jelentősen javított termék (áru vagy szolgáltatás) vagy eljárás; új marketing-módszer, vagy új szervezési-szervezeti módszer bevezetése - Oslo kézikönyv alapján (OECD és az Európai Bizottság -Eurostat által készült kézikönyv 3. kiadása, 2015).

Kavitációs őrlés: nagyintenzitású ultrahang (UH) vagy nagynyomású homogenizálás (HPH) által kiváltott szónikus vagy hidrodinamikai kavitáció, ami a szilárd részek deformációját, törését idézi elő.

Ko-őrlés: hatóanyag/ok és segédanyag/ok térben és időben történő együttes őrlése. Ko-őrlő anyag(ok) az(ok) a segédanyag(ok), amely(ek) az őrlés hatékonyságát befolyásolják.

Ko-porlasztás: hatóanyag/ok és segédanyag/ok térben és időben együttes porlasztva-szárítása.

Nanoanyag: olyan természetes anyag, szándékolatlanul előállított mesterséges anyag vagy szándékosan előállított anyag, amely önmagában vagy azonosítható alkotórészecske formájában aggregátumokban vagy agglomerátumokban jelen lévő szilárd részecskékből áll (EU definíció).

„Nano-in-micro/extrafine” inhalációs forma: nanoméretű hatóanyag részecske mikroméretű (5-10 μm) vagy extrafinom (1-2 μm) hordozóban.

Őrlő anyag/őrlőtest: a száraz és nedves közegben végbemenő mechanikai erőhatás kiváltására alkalmas, nagy kopásállóságú, eltérő anyagú és méretű golyók/gyöngyök (acél, kerámia, cirkónium stb.).

Prediszperzió: szemcseméretcsökkentéssel előállított mikro- vagy nanoméretű hatóanyagot tartalmazó diszperzió, amely optimalizálást követően gyógyszerforma előállításához használható fel.

Részecske/szemcse: a környezetétől fizikailag egyértelműen elhatárolható kicsiny anyagdarab; önálló molekulák nem minősülnek részecskének (EU definíció).

„Ready-to-use” termék: szemcseméretcsökkentő eljárás során optimalizált prediszperzió, amely inhalációs terápiában alkalmazható szereléssel használatra kész formulációt képez.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AB	ammónium-bikarbonát	EMA	European Medicines Agency, Európai Gyógyszerügynökség
ACI	Andersen Cascade Impactor, Andersen-féle kaszkádimpaktor	EU	Európai Unió
ANOVA	Analysis of Variance, varianciaanalízis	F_{adh}	Adhéziós erő
API	Active pharmaceutical ingredient, hatóanyag	F68	Pluronic F68, Poloxamer 188
AUC	Area under the curve, görbe alatti terület	FD	Fast dissolving, gyors kioldódású
BBB	Blood-brain barrier, vér-agy gát	FDA	Food and Drug Administration, az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala
BCS	Biopharmaceutical Classification System, biofarmáciai osztályozási rendszer	FESs	Free energy surfaces, felületi szabadenergia
CD	ciklodextrin	FRF	Fine Particle Fraction, finom részecske frakció
C_a	Drug concentration, hatóanyag-koncentráció	FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy, Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
C_t	koncentráció adott időpontban	GEM	Gemfibrozil
C_i	Constant characteristic of the material, anyag állandó tulajdonsága	GI	Gasztrointesztinális
CI	Kristályossági index	GRAS	Generally Recognized As Safe, általában biztonságosnak elismert
CMA	Critical Material Attributes, kritikus anyagi tulajdonság	GSD	Geometric standard deviation, geometria szórás
C_{max}	maximum koncentráció	HA	Hyaluronic acid, hialuronsav
CMP	Critical material parameter, kritikus anyagi tulajdonság	HPH	High pressure homogenizator, nagynyomású homogenizátor
CNS	Central nervous system, központi idegrendszer	HPLC	High-performance liquid chromatography, nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
COPD	Chronis obstructive pulmonary disease, krónikus obstruktív tüdőbetegség	HPMC	Hidroxiopropil-metilcellulóz
COST	Change One Separate factor at a Time, egy időben egy külön faktor változtatása	HPβCD	2-Hidroxiopropil-béta-ciklodextrin
CPPs	Critical Process Parameters, kritikus folyamat paraméterek	IBU	Ibuprofén
CQAs	Critical Quality Attributes, kritikus minőségi paraméterek	ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Emberi Felhasználásra szánt Gyógyszerekkel kapcsolatos Műszaki Követelmények Harmonizációs Nemzetközi Tanácsa
d	diameter, átmérő	IH70	InhaLac70, laktóz száraz porinhalációs célra
D10	az a méret, amelynél a szemcsék 10%-a kisebb	IN	Intranazális
D50	az a méret, amelynél a szemcsék 50%-a kisebb, medián	IPM	Izopropil Mirisztát
D90	az a méret, amelynél a szemcsék 90%-a kisebb	IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry, (Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Szövetség
DE	Dissolution efficiency, a kioldási görbe alatti terület, meghatározott időpontok között	IV	intravénás
DLN	Dried loratadine nanoparticle, szárított loratadin részecske	IVIVC	In vitro in-vivo korreláció
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek kolloidkémiai elmélet	J	Fluxus
DoE	Design of experiments, kísérlettervezés	KIR	Központi idegrendszer
DPI	Dry powder inhaler, száraz porinhalációs rendszer	K_p	Permeabilitási koefficiens
DSC	Differential scanning calorimetry, differenciális pásztázó kalorimetria	LAM	Lamotrigin
Design Space	tervezési tér	LC-MS/MS	Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry, Folyadékkromatográfia kapcsolt tandem tömegspektrometria
DTE	Drug Targeting Efficiency, hatóanyag targetálási hatékonysága	LIO	Liofilizált
EF	Emitted fraction, emittált frakció	LNS	Loratadin nanoszuszpenzió
E_{ki}	Kinetic energy, kinetikus energia	logP	megoszlási hányados

LOR	Loratadin	RD	Relative dissolution, relatív kioldódás
LPS	Lipopoliszacharid	REF	Referencia
M	Mannit	RH	Relatív biológiai hasznosíthatóság
MDT	Mean dissolution time, idő, ami a hatóanyag 50%-ának felszabadulásához szükséges	rpm	rate per minute, fordulatszám
MEL	Meloxikám	RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium, sejttenyésztő táptalaj
MELK	Meloxikám-kálium	SD	standard deviation, szórási
MgSt	Magnézium-sztearát	SEM	Scanning electron microscope, pásztázó elektronmikroszkóp
micro	Mikrométerű	spd	Spray-dried, porlasztva szárított
MMAD	Mass Median Aerodynamic Diameter, átlagos aerodinamikai átmérő	SSA	Specific surface area, fajlagos felület
MTT	Tetrazóliumsó reagens sejt életképesség vizsgálatához	T	Hőmérséklet
MW	Mikrohullám	T_g	Glass transition temperature, üvegesedési hőmérséklet
M_w	Molekula tömeg	TRE	Trehalóz
MXP	Meloxikám-kálium	Tween	Tween 80, poly(oxyethylenesorbitan monooleate)
nano	Nanométerű	UH	Ultrahang
NF	Nazális formuláció	UK	United Kingdom, Egyesült Királyság
NIF	Nifluminsav	USA	United States of America, Amerikai Egyesült államok
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug, nem szteroid gyulladáscsökkentő	X_c	Kristályossági fok
OCA	Optical Contact Angle, optikai peremszög	W_{adh}	adhéziós munka
O_p	Olvadáspont	W_c	kohéziós munka
PBS	Phosphate buffer solution, foszfát puffer-oldat	XRPD	X-ray powder diffraction, porröntgen diffrakció
PCS	Photon Correlation Spectroscopy, foton korrelációs spektroszkópia	z-érték	A mintaelem eltérése a minta átlagától
PDI	Polidiszperzitási index	ZP	Zeta potenciál
PEG	Polietilén-glikol	ZrO₂	cirkónium-dioxid
p-érték	Szignifikancia érték	αCD	alfa ciklodextrin
pK_a	Savi disszociációs állandó	ΔU	rendszer belső energiájának megváltozása
PM	Physical mixture, fizikai keverék	μm	mikrométer
PVA	Polivinil-alkohol	μMEL	mikronizált meloxikám
PVP	Polivinil-pirrolidon		
QbD	Quality by Design, holisztikus minőségügyi fejlesztési modell		
QbT	Quality by Testing,		
QTPP	Quality Target Product Profile, terméktől elvárt minőségi profil		
R	Sugár		
RA	Risk Assessment, kockázatértékelés		

I. BEVEZETÉS

A modern gyógyszer technológia célja olyan stabil készítmények kutatása és fejlesztése, amelyek hatóanyaga megfelelő helyen és időben szívódik fel és fejt ki hatását. A korszerű szemcseméretcsökkentő eljárások (mikro-, szubmikro- és nano-mérettartomány) alkalmazása minőségi ugrást jelent a meglévő gyógyszerek hatás-optimalizálásában, valamint újabb készítmények formulálását teszi lehetővé különböző megbetegedések terápiájában.

A hatóanyagok mikronizálásával és nanonizálásával gyorsabb oldódási sebességet érünk el, s ezzel növelhetjük a készítmény biológiai hasznosíthatóságát. Azonban a kívánt méret elérése különleges szemcseméretcsökkentő (dezintegráló és integráló) eljárásokat igényel, különös tekintettel a nanotechnológiára. Ez utóbbi esetében a nagyobb energiabefektetés és a hosszabb műveleti idő egyaránt fokozza az adhéziós és kohéziós erők működését, ami a prediszperziók instabilitásához vezethet. A termékek stabilizálására a műveleti paraméterek optimalizálása mellett segédanyagok jelenlétére is szükség van. Nem véletlen, hogy a gyógyszeripar folyamatosan kutatja és fejleszti azokat a szemcseképzési eljárásokat (particle engineering), amelyek a gyógyszerforma és beviteli kapu szempontjából optimális terméket eredményeznek. Ezt a folyamatot támogatja a minőség alapú kísérlettervezés (QbD), ami magába foglalja a kritikus gyártási folyamat mutatóit, valamint a kritikus termékparamétereket is. Ez az új tendencia a tervezési tér (Design space) ismeretét is megköveteli.

A megnövelt biológiai hatékonyságú mikro- és nanorészecskék már alkalmasak arra, hogy akár alternatív beviteli kapokon (tüdő, orr), a máj (emésztőtraktus) megkerülésével jussanak el a receptorhoz. A modern gyógyszerfejlesztés jövője tehát az innovatív eljárásokkal előállított termékek irányába mutat, amelyek akár csökkentett hatóanyagtartalmat, bizonyos esetben célzott terápiát és gazdaságosabb gyártást jelenthetnek.

Az alternatív beviteli kapuk vonatkozásában a mikrorészecskék kutatása és fejlesztése elsősorban a pulmonális terápiában jelent új vonatkozásokat, különös tekintettel a tüdőt érintő krónikus tüdőbetegedésekben (helyi hatás). A nanorészecskéket tekintve a szisztémás és centrális hatás elérése céljából pedig az intranazális bevitel került előtérbe.

A jövőbeni tendenciákat tekintve, jelen munka hozzájárulhat a hozzáadott értéket képviselő gyógyszerkészítmények fejlesztéséhez, lehetővé téve számos kórkép hatékonyabb kezelését.

II. CÉLKITŰZÉS

A kedvezőtlen fizikai-kémiai sajátságú hatóanyagok hagyományos úton történő formulálása és gyógyszerbevitel a szervezetbe nem megfelelő biohasznosíthatóságú készítmények alkalmazásával jár. Ezen problémafelvetés technológiai megoldásaira doktori értekezésemben az alábbi célok megvalósítását tűztem ki (1. ábra).



1. ábra: Doktori értekezés célkitűzései, várható terápiás előnyei

Korszerű, innovatív szemcseméretcsökkentő eljárások kutatása és fejlesztése, modell hatóanyagok fizikai-kémiai sajátságainak megváltoztatásával, prediszperziók előállítására. Kísérlettervezéssel megjelölni az ipar számára is hasznosítható technológiákat, valamint vizsgálati módszerek (*in vitro*, *ex vivo* és *in silico*) fejlesztése által olyan ismeretanyag megszerzése, amely segíti a modern gyógyszerkészítmények fejlesztését és gyártását.

- 1) A száraz/nedves őrlési paraméterek és a nano-precipitációt befolyásoló faktorok monitorozása, oldószer elpárolgatáson alapuló alternatív energiaforrások alkalmazása, összetételek és előállítási paraméterek tervezése **1-5 μm** , illetve **100-500 nm** szemcseméret-tartományok elérése céljából a rendszerek stabilizálása polimerekkel, a fizikai-kémiai kölcsönhatások tanulmányozása.
- 2) Különböző szemcseméretcsökkentő eljárások kutatása és fejlesztése innovatív technológiai megoldásokkal (adott habitusú szemcsék képzése) **prediszperziók** (nanoszuszpenziók folyékony, illetve szilárd formulációi) előállítása, a termékek, egyes esetben a köztitermék végtermékként történő **optimalizálása** (stabilizálószeres, szárítási eljárások, összetétel, toxicitás), preformulálása.
- 3) Továbbá preformulációs vizsgálatokkal meghatározni az alternatív bevitel (pulmonális, nazális) szempontjából is szükséges additíveket és azok alkalmazható koncentrációit különböző gyógyszerformák esetén. Ezeket alapul véve innovatív, nanoméretű hatóanyagot tartalmazó termékösszetételek kutatása és fejlesztése, amelyek alkalmasak lehetnek **intranazális és pulmonális** bevitelre pl. neurodegeneratív és allergiás kórképek (meloxicám-, lamotrigin-, loratadin-tartalmú **orrspray és orrspray**), valamint krónikus obstruktív tüdőbetegségek kezelésére (meloxicám-tartalmú **inhalációs por**).

Összeségében a végső cél tehát a szemcseméretcsökkentő eljárások és az alternatív kapuknak megfelelő formulációk kettős terápiás előnyének kihasználása (dóziscsökkentés, ezáltal mellékhatások mérséklése, valamint a hordozórendszereknek köszönhetően targetálás megvalósítása). Ezáltal új lehetőségek nyújtása pl. gyors fájdalomcsillapítás és gyulladáscsökkentés, valamint a központi idegrendszeri kórképek kezelése.

A formulálási stratégiának és beviteli kapunak köszönhetően új indikációs utak megnyitása már meglévő farmakon esetében, ezáltal módosult terápiás protokollok és korszerű gyógyszerkészítmények hatékony alkalmazására, valamint hosszútávon a kezelés költségcsökkentése is várható.

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

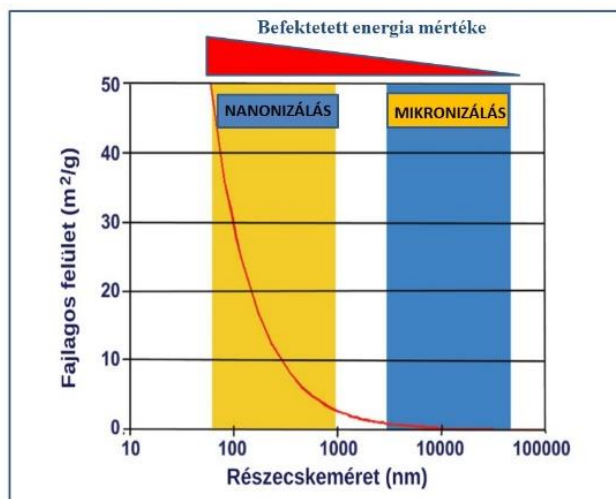
3.1 Szemcseméretcsökkentés jelentősége, a mikro- és nano-mérettartomány elérésének technológiai irányelvei

A vízben rosszul oldódó, már ismert hatóanyagok és farmakon-jelöltek nem megfelelő biológiai hasznosíthatósága egyre nagyobb kihívást jelent a generikus és az originális gyógyszergyártásban. Éppen ezért, az eddig alkalmazott formulálási lehetőségek mellett új stratégiákat kell alkalmazni a hatékonyság növelése érdekében, ami a nanotechnológia és az alternatív gyógyszerbeviteli kapuk irányába mutat.

Az eddig alkalmazott formulálási lehetőségek között szerepel pl. a sóképzés, ko-kristályosítás, amorfizálás, szilárd diszperziók előállítása és komplexálás [1–5]. A szemcseméretcsökkentő eljárások széles körben alkalmazottak az anyagok fizikai-kémiai és biofarmáciai tulajdonságainak javítása érdekében. Mikroméretű részecskék előállításával módosítható a gyenge vízoldékonyságú hatóanyagok kioldódási profilja és permeabilitása, ezáltal biohasznosíthatósága is [6, 7]. A hatóanyagok fizikai-kémiai sajátosságaira a szemcseméret-eloszlás, s azok specifikus felülete és az egyes szemcsék morfológiai sajátossága nagy befolyással van [8]. Kiemelendő, hogy a részecskék habitusának (alak, méret, felület) meg kell felelnie egyes formulálási és felhasználási követelményeknek is.

A hagyományos mikronizálási műveletek mechanikai úton megvalósuló dezintegrációt, illetve integrált módon molekulárisan elosztatott hatóanyagból szemcseképzést foglalnak magukba általában 1-10 μm tartományban [7, 9].

Új lehetőség a modern gyógyszerfejlesztésben a mikronizálással analóg módon olyan nanotechnológiai eljárások alkalmazása, amelyek nanokristályokat eredményeznek. A hatóanyag nanonizálásával, nanoanyag (1-100 nm) vagy szubmikronos méretű (100-1000 nm) rendszer hozható létre, amellyel méretből/felületből adódóan még gyorsabb oldódási sebesség érhető el [10–16]. A mikronizálás és a nanonizálás összehasonlítását a **2. ábra** szemlélteti.



2. ábra: A befektetett energiadózis nagyságának befolyása a fajlagos felület növekedésére és a részecskeméretre [10]

A nanoanyag, az Európai Unió módosított ajánlása alapján (2011/696/EU, módosítva 2022. június 10.), olyan szilárd részecskékből áll, amely részecskéknél a darabszám szerinti méreteloszlás alapján legalább 50%-a megfelel az alábbi feltételek legalább egyikének: i) a részecske egy vagy több külső mérete az 1 nm-től 100 nm-ig terjedő mérettartományba esik; ii) a részecske hosszúság, mint például egy rúd, rostszál vagy cső, amelynek két külső mérete kisebb, mint 1 nm, másik mérete pedig nagyobb, mint 100 nm; iii) a részecske lemezszerű formával rendelkezik, amelynek az egyik külső mérete kisebb, mint 1 nm, a többi mérete pedig nagyobb, mint 100 nm. A darabszám szerinti részecskeméret-eloszlás meghatározásakor a legalább két 100 μm -nél nagyobb ortogonális külső mérettel rendelkező részecskéket nem kell figyelembe venni. A $6 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ -nél kisebb térfogategységre vetített fajlagos felületű anyagok azonban nem minősülnek nanoanyagoknak. Az EU ajánlását vette át az EMA, az Európai Gyógyszerügynökség [17], [18]. Az FDA ajánlása szerint a 1-1000 nm tartományban lévő részecskék nanoanyagoknak tekinthetők, amennyiben kedvező fizikai, kémiai, biológia sajátosságai a nanodimenzióhoz köthetők.

Meg kell jegyezni, hogy az EU ajánlás a nanoanyag definiálása mellett az aggregátum és az agglomerátum fogalmak jelentését is meghatározta (lásd Fogalmak fejezet).

Tehát a mikronizálással és a nanonizálással létrejött szemcseméretcsökkentett termék nagyobb aktív felülettel rendelkezik és alkalmas nagyobb telítési koncentráció elérésére. A *Noyes-Whitney összefüggés* [19] alapján igazolható, hogy egy adott anyag akkor oldódik gyorsabban,

ha nagyobb felületen érintkezik az oldószerrel. Az oldószerrel érintkező aktív felület jelentősen függ a nedvesíthetőségtől és a szemcsemérettől:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{A \times D}{h} \times (C_s \times C)$$

(dc/dt: oldódási sebesség, A: aktív felület, D: diffúziós koefficiens, C_s: telítési oldhatóság, C: koncentráció, h: diffúziós réteg).

Az *Ostwald egyenlet* [20] közvetlenül leírja az összefüggést a hatóanyag telítési oldhatósága és a részecskeméret között. 1000 nm alatti részecskékkel a telítési koncentráció növelhető a következő összefüggés alapján:

$$\log \frac{C_s}{C_\alpha} = \frac{2\sigma V}{2.303RT\rho r}$$

(C_s: telítési oldhatóság, C_α: oldékonyság, V: moláris térfogat, R: konstans, σ: határfelületi feszültség, r: részecske sugara, T: abszolút hőmérséklet, ρ: sűrűség).

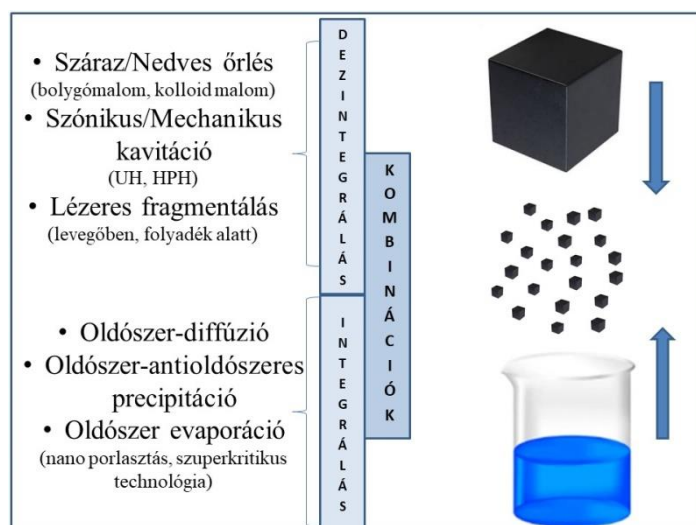
Fontos megjegyezni azt is, hogy a szemcseméretcsökkentés a kristályszerkezet letörését is eredményezheti, ami további oldódási sebesség-növekedést idézhet elő, a kristályt összetartó rácsenergia csökkenése, hiánya miatt [21].

A fajlagos felület növekedése a részecske adhezivitását is növeli, amely az adszorpció/mukoadhézió fokozódásához vezet. Azonban a megnövekedett felület a szabadenergia, a részecskék közötti kohézió, a felületi töltés és az aggregáció növekedését indukálja. Ezért van szükség stabilizáló, nedvességfokozó segédanyagok alkalmazására [22]. A nanokristályok előállításánál tehát az FDA által javasolt ún. GRAS (generally recognized as safe – általában véve biztonságos) segédanyagok alkalmazására van szükség, ebből adódóan „tisztá” hatóanyagról nem beszélhetünk. Az így nyert köztitermékből, prediszperzióból adott gyógyszerforma állítható elő. Alapvetően az anyagi sajátságok pl. nedvességtartalom, hőérzékenység, keménység, illetve a kiindulási és az elérni kívánt szemcseméret határozza meg a méretcsökkentő eljárás módját és energia-kielvonására alkalmas berendezés típusát.

A kristályok méretének és habitusának változtatása két lényeges technológiai irányvonal alapján csoportosítható, dezintegráló „top down” és molekuláris szintről kiindulva integráló „bottom up” technológiák szerint.

Gyógyszertechnológiai eljárások alkalmazásával elsődleges célunk, anyagi és technológiai paraméterek optimalizálásával, pl. a szemcseméret csökkentésével az oldékonyság, oldódási sebesség és a permeabilitás fokozása. A különböző technológiai

eljárásokkal előállított folyékony, vagy szilárd fázisú prediszperziók stabilizálása, majd formulálása (3. ábra).



3. ábra: Nanotechnológiai eljárások alkalmazása hatóanyag bevitel céljából [23]

A nanokristályok/nanoszuszpenziók előállítása számos eljárással valósítható meg. A főbb technológiák szabadalom alatt állnak és már forgalomban lévő készítmények előállításánál alkalmazzák azokat [24]. Az újabb nanotechnológiai eljárások kutatása és fejlesztése azonban még nem fejeződött be, amihez hozzájárul a technika fejlődése is. A következőkben a fontosabb, értekezés eredményeihez köthető eljárásokat mutatom be.

3.1.1. Dezintegráló eljárások

A nanonizálási technikák gyakran mechanikai hatásokon (nyomás, súrlódás, ütközés) alapulnak, amelyek végbemehetnek mind száraz, mind nedves közegben egyaránt. Az őrlés során a fellépő igénybevétel során megváltozhat a szemcseméret, a fajlagos felület és a felületi energia; a repedések és hibák száma a szemcsékben. Az őrléses eljárás, amely során mechanikai erő hatására a különféle részecskék törhetnek, deformálódhatnak, aminek következtében csökken az egyedi részecskék mérete és nő a fajlagos felületük [6].

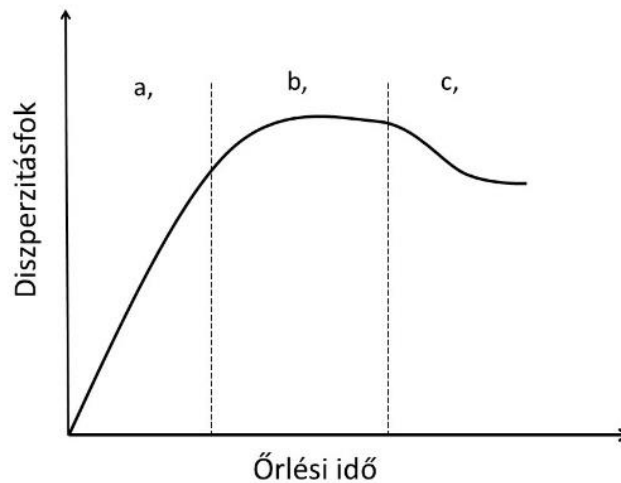
Az őrlés általános törvényszerűségét *Walker* és munkatársai definiálták [25]:

$$dE = -C \frac{dx}{x^n}$$

ahol E az egységnyi tömegre jutó őrlési energia, x a részecskeméret, C és n pedig az anyagra és őrlőmalomra jellemző konstansok. Az aprítási energia mennyiségének és hatásosságának elméleti leírásával ezt követően *Rittinger*, *Bond*, *Kick* és *Kirpicsov* foglalkozott. Matematikai

összefüggésekkel definiálták a tömeg- vagy térfogategységre eső aprítási munkát a kiindulási és elérni kívánt szemcsenagyság figyelembevételével [26–29].

Malomban történő száraz őrlés esetén a következő szempontokat célszerű figyelembe venni. Az őrlési idő függvényében vizsgálva a diszperzitásfokot azt látjuk, hogy a folyamat kezdetén az őrlési idővel megközelítőleg arányos az őrlemény diszperzitásfoka, azaz a létrejött új felület nagysága (**4. ábra, 'a' szakasz**). Ezen az ún. Rittinger-szakaszon a részecske-kölcsönhatás elhanyagolható. Az őrlési idő növelésével megkezdődik a részecskéknek az őrlőtestekre és a malom falára, valamint egymáshoz való tapadása. A diszperzitásfok görbéje ellaposodik, ami arra utal, hogy az őrléshez szükséges munka és a létrejött új felület közötti arányosság megszűnik, de a diszperzitásfok növekedése még mindig jelentős (**4. ábra 'b' szakasz**). A 'b' szakaszra jellemző a keletkezett új szemcsék aggregálódása, ami a *van der Waals-féle* erők jelenlétével hozható összefüggésbe. Tovább növelve az őrlési időt a diszperzitásfok csökken, s az őrlemény agglomerálódik (**4. ábra, 'c' szakasz**). *Tarján G. (1978)* szerint az agglomerálódás elsősorban elektrosztatikus és *van der Waals* kohéziós erők következtében jön létre, ami a részecskék igen tömör, sokszor „irreverzibilis” összetapadását jelenti, pl. összekristályosodás, olvadékhidak létrejötte stb. [30, 31].



4. ábra: A diszperzitásfok változása az őrlési idő függvényében [32]

A **száraz őrlés (5/A ábra)** alkalmazásakor tehát hatékony megoldás lehet a segédanyagokkal megvalósított együtt-őrlés. Különböző típusú, méretű és mennyiségű őrlőgolyó használható a termelési igénynek megfelelő méretű őrlőkamrában [33]. Szubmikronos részecskék előállítására céljából 1992-ben védtek le az ún. *IDD-PTM* technológiát (Insoluble Drug Delivery-Particles) gyenge vízdékonyságú hatóanyagok esetében. Ezt a technikát alkalmazták számos forgalomban lévő készítmény előállításánál. Ebben az esetben

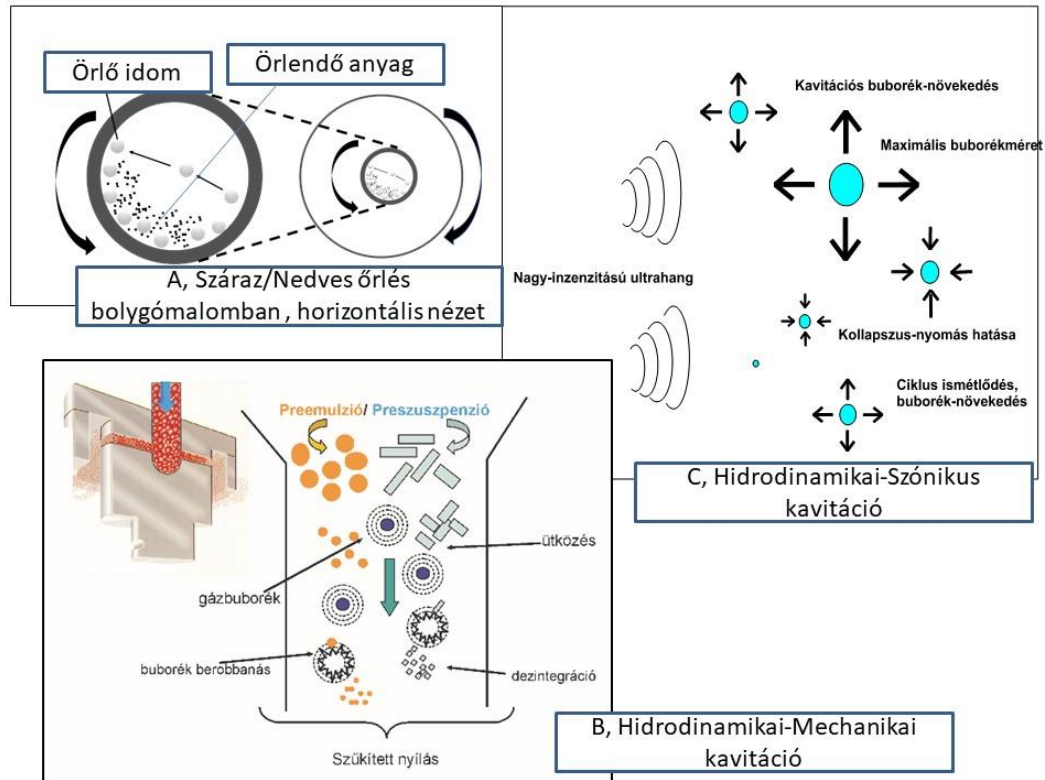
mikrofluidizálás valósult meg légsugármalomban, 50-100 cikluson keresztül az Y és Z alakú kamrákban, amelyekben 500-1700 bar nyomás alatt cirkulál az őrlendő anyag. Az egymáshoz ütköztetett részecskék nyírás és kavitáció következtében tovább aprítódnak [34, 35].

Bizonyos hatóanyagok esetében célszerű a száraz őrlést nedvesre váltani, amennyiben az őrlendő anyag nem érzékeny a nedves közegre. A **nedvesközegű őrlést** *Liversidge* és munkatársai tanulmányozták először 1992-ben [36], majd a különböző elven működő malmok alkalmazásával 2000-től az első nanoszuszpenziós készítmények is piacra kerültek (**Nanocrystal[®]**, **Nanomill[®]**) [12, 37, 38]. A NanoCrystal[®] technológiát az „elan Drug Discovery” (Elan Corporation, plc Ireland) szabadalmaztatta. Az őrlő berendezés kamrájában a méretcsökkentésért felelős nyíró erők generálása kerámia, rozsdamentes acél, üveg, esetleg polisztrén gyantával fedett gyöngyökkel/golyókkal történik. Az őrlési idő meghatározását (10 perctől akár napokig) jelentősen befolyásolja a hatóanyag keménysége, a viszkozitás, a hőmérséklet, az energia-bevitel, az őrlő közeg mérete és a segédanyag-koncentráció. Az eljárás hátránya az, hogy idővel az őrlő közeg errodálódhat, hőérzékeny anyagok esetében nem alkalmazható és gyakran mikroméretű frakció is található a termékben.

Müller és munkatársai fejlesztették ki a **mechanikai kavitáción** alapuló nedves közegű, nagynyomású **Dissocubes[®]** technológiát [39]. A nagynyomású homogenizálás során (**5/B ábra**) egy ún. preszuszpenzió vagy -emulzió nagy nyomás hatására megy keresztül szűk nyílású szelepen. A szűkítésben a nagy nyomáskülönbség hatására a minta rendkívüli módon felgyorsul (2–300 m/s), ezáltal erős mechanikai hatások lépnek fel (kavitáció, nyírás, ütközés), amelyek szemcse/cseppméret-csökkentést eredményeznek. A nyomás, a hőmérséklet és az átpréselési ciklusok számának változtatásával szabályozható a művelet hatásossága. A fő limitáló tényező egyes esetekben az, hogy az anyag kristályszerkezete megváltozik és nő az amorf frakció aránya, amely stabilitási problémákat eredményezhet [40]. Abban az esetben, amikor a diszperziós közeg nem vizes alapú, ún. Nanopure[®] technológiáról beszélünk (folyékony vagy olvasztott polietilén-glikolban, illetve glicerol-víz vagy etanol-víz elegyben megvalósuló diszpergálás), amelynek következtében a homogenizálás alacsony hőmérsékletű és kavitációtól mentes [40, 41].

Az ultrahangot mikro- és nanoméretű kristályok előállítására is használják, amely eljárásnak számos előnye van egyéb méretcsökkentő módszerekhez képest, pl. az, hogy magas hatásfoka miatt lényegesen kisebb teljesítményt igényel. A méretcsökkenés dezintegráció révén a szónikus kavitáció eredménye. Az **ultrahangos kavitáció** (**5/C. ábra**) nagy nyíróerőt generál, ami képes szétszakítani a részecske-aggregátumot, legyőzve a részecskék közötti vonzóerőket.

Az ultrahangos kezelés által elérhető a részecskék homogén eloszlása is. A részecskeméret 500 µm-ről akár 10 nm-re is csökkenthető [42–44].



5. ábra: Száraz és nedves közegű őrlési folyamatok bolygómalomban (A), nagy nyomású homogénizátorban mechanikus kavitációval (B) és szónikus kavitáció hatására (C) [45]

Új lehetőséget jelent a száraz és nedves őrlés vonatkozásában a hatóanyagok **lézeres fragmentálása**. Az abláció során nagyteljesítményű impulzslézer nyalábját adott felületre (pl. komprimátum) fókuszáltatva, a besugárzás hatására plazmaállapotú anyagfelhő lép ki. A folyamatot befolyásolják az alkalmazott lézer paraméterei (hullámhossz, energiasűrűség, impulzushossz) és a célfelület optikai, termikus, morfológiai és anyagai tulajdonságai [46]. Nedves közegben, víz alatt végbemenő fragmentálással hatóanyag mikro/nano diszperziója képezhető, amelyekből különböző gyógyszerformák formulálhatók.

3.1.2 Integráló eljárások

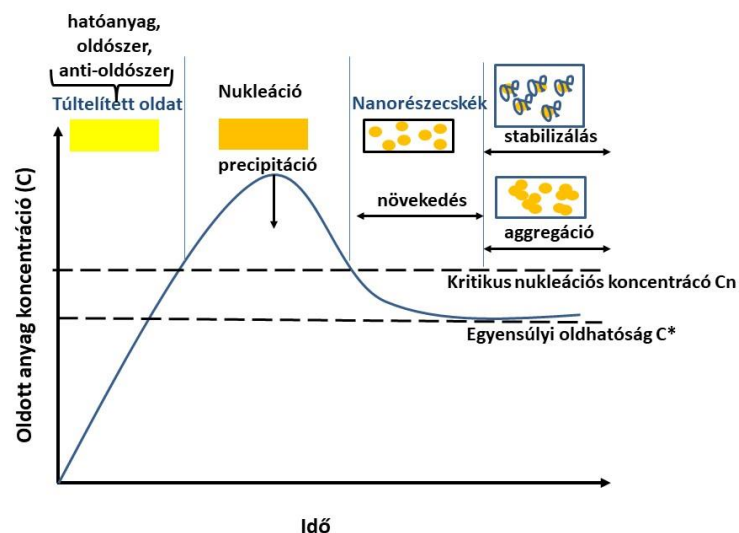
Az integráló, szemcséképző folyamatok során a molekulárisan oldott anyagokból mikro- vagy nanoméretű részecskék épülnek fel. E folyamatok folyadék-fázisok elegyítésével szilárd fázisú terméket képezve valósulnak meg.

Nanoprecipitációs folyamatok

A következő tényezők, pl. az oldószer, a keverési mechanizmus, a nukleáció, az aggregáció mértéke, a szuperszaturáció stb. befolyásolják a képződött szemcsék méretét, méreteloszlását és stabilitását. A nanoprecipitáció alapjai tulajdonképpen a kisózásos (salting-out) kristályosításhoz kapcsolódnak, ahol a kisózószer egy anti-oldószer (antiszolvens) [47]. A „nanoprecipitáció” esetében az anti-oldószeres eljárásnál a nukleációt követően a szemcsenövekedés sokkal rövidebb idő alatt zajlik le, mint a hagyományos kristályosítási eljárásoknál. A szemcsenövekedés kondenzációval történik, azaz a molekulák diffundálnak az éppen növekedő felületekre és felületi integrációjuk valósul meg, amíg a kritikus méretüket el nem éri [48–50]. A gyors keverés és rövid keverési idő kulcsparaméterek a nagy túltelítettség létrehozásához. A nanoprecipitációt indukáló szuperszaturáció (S) az alábbi összefüggéssel jellemezhető:

$$S = C/C^*$$

ahol C a hatóanyag valós idejű koncentrációja a szerves oldószer és az anti-oldószer elegyében, a C^* pedig a hatóanyag telítési oldhatósága az oldatban. Amikor az anti-oldószerrel való gyors elegyítés után az oldott anyag koncentrációja a telítési koncentrációig (C^*) emelkedik és eléri a kritikus gócképződési koncentrációt (C_n), a kicsapódási folyamat kezdetét veszi. Ebben a szakaszban a nukleáció, a koaguláció és kondenzáció következtében szemcsék képződnek, amelyek aggregációra hajlamosak ezért segédanyagokkal történő stabilizálásra van szükség (*La Mer* model **6. ábra**) [51].



6. ábra: Nanorészecskék képzése oldószer-antioldószeres precipitációval [51]

Az **oldószer-antioldószer precipitáció** esetén a kívánt mérettartomány egyszerű keveréssel is elérhető, azonban a hőmérséklet-különbség hatására (hatóanyag melegített oldata-hűtött antioldószer) nagyon gyors nukleáció indukálható, amelynek következtében szférikus, amorf nanorészecskék is keletkezhetnek [1]. A technológiát Nanomorph® eljárásként [52] szabadalmaztatták. Az ún. **emulzió-diffúzió** módszernél a hatóanyagot tartalmazó vízzel részben elegyedő oldószerrel az alkalmazott stabilizáló oldat mikroemulziót képez, amelyet a második lépésben vízzel teljes elegyedésig oldva hatóanyag nanokristályok kiválása történik meg [53–55]. Az „olvadék emulgeálásos” eljárásnál alacsony olvadáspontú hatóanyagot a vizes stabilizáló oldatban szuszpendálják, majd melegítéssel, energiaközléssel mikro-emulzió készül, amelyből a nanorészecskék hűtéssel nyerhetőek ki [56].

Esetenként **kombinációs technikákkal**, a precipitáláson túl nagy energiaközlés mellett (nagy nyomású homogenizálás, nagy intenzitású ultrahang, nagy sebességű keverés) rövidebb idő alatt megközelítőleg 200 nm-es méret elérése megvalósítható, több esetben előkezelés is alkalmazható (NanoedgeTM technika, H42, H69, H 96 kombinációk, „SmartCrystal” technológia) [41, 57].

Integrálás oldószer evaporációval

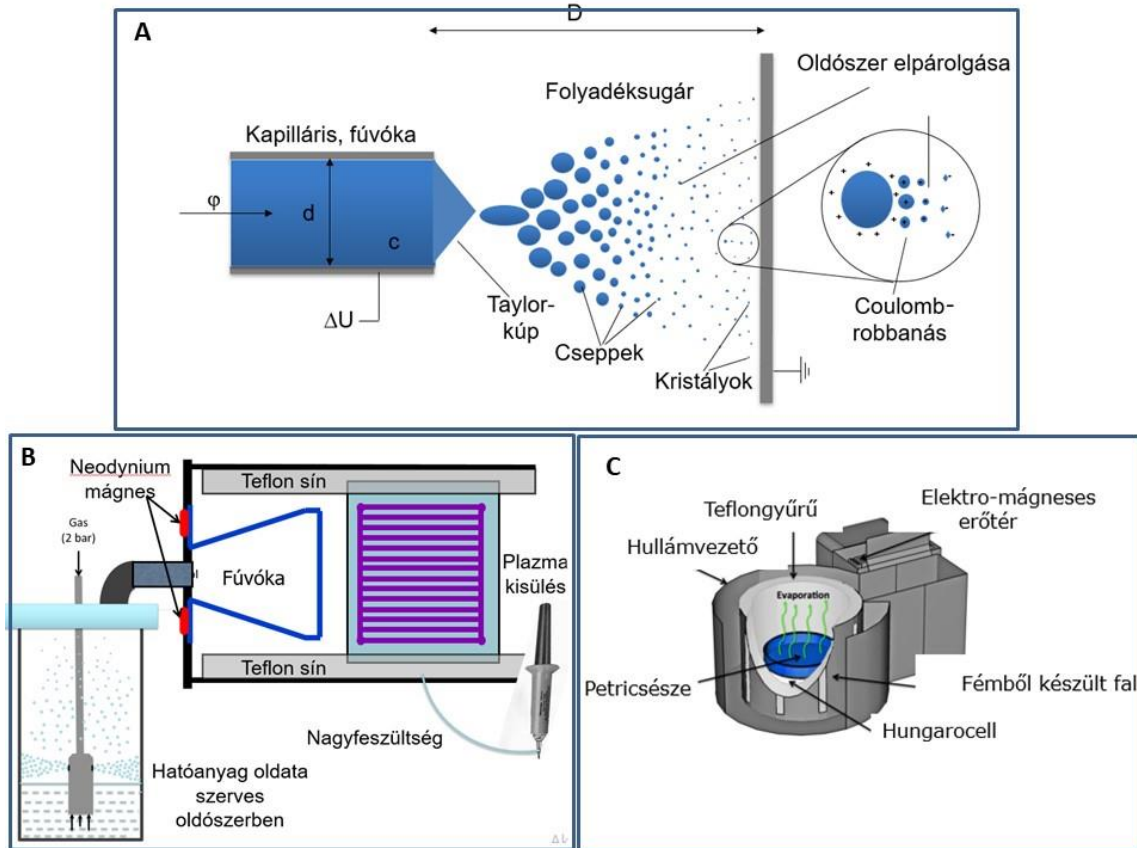
Hatóanyagok nanonizálásának következő módja szuperkritikus állapotú oldószeres használatával, gáz anti-oldószer átkristályosítással, porlasztott gyors-injektálással és az expandált folyékony szerves oldat nyomáscsökkentésével valósítható meg [37, 58, 59].

Újszerű lehetőség az **oldószer evaporáción** alapuló ún. **plazma-szintézis** [60] és az **elektroporlasztásos precipitáció** [61–63]. Az eljárások során magas feszültség, illetve plazma generálásával pillanatszerűen oldószer párologtatható el, amely a cseppeket elektromosan feltölti (**7/A és 7/B ábra**). A Coulomb-robbanás következtében a cseppek mérete csökken, majd precipitáció révén hatóanyag nanokristályok válnak ki [64].

Az elektromágneses hullámok közé tartozó **mikrohullám** alkalmazásával pillanatszerű oldószer evaporáció végezhető, amelynek folyamán gyors kioldódású, amorf nanorészecskék előállítására van lehetőség [65, 66] (**7/C ábra**). A mikrohullámú sugárzás a dipólusok polarizációja és ionvezetés révén képes hőt termelni, az energiaközlés nem konvektív, hanem úgynevezett belső hőkeltésen alapuló energiaközlés. A minta egyenletesebb melegítésének köszönhetően növelhető a reakciósebesség és a termékhozam a hagyományos hőmelegítéshez képest. A mikrohullámú szintézis drasztikusan csökkentheti a reakcióidőt.

Az eljárások előnye, hogy rövid idő alatt - léptéknövelhető módon - hosszú távon stabil, szilárdfázisú formulálásra alkalmas köztitermék állítható elő. A 7. ábrán bemutatott integráló

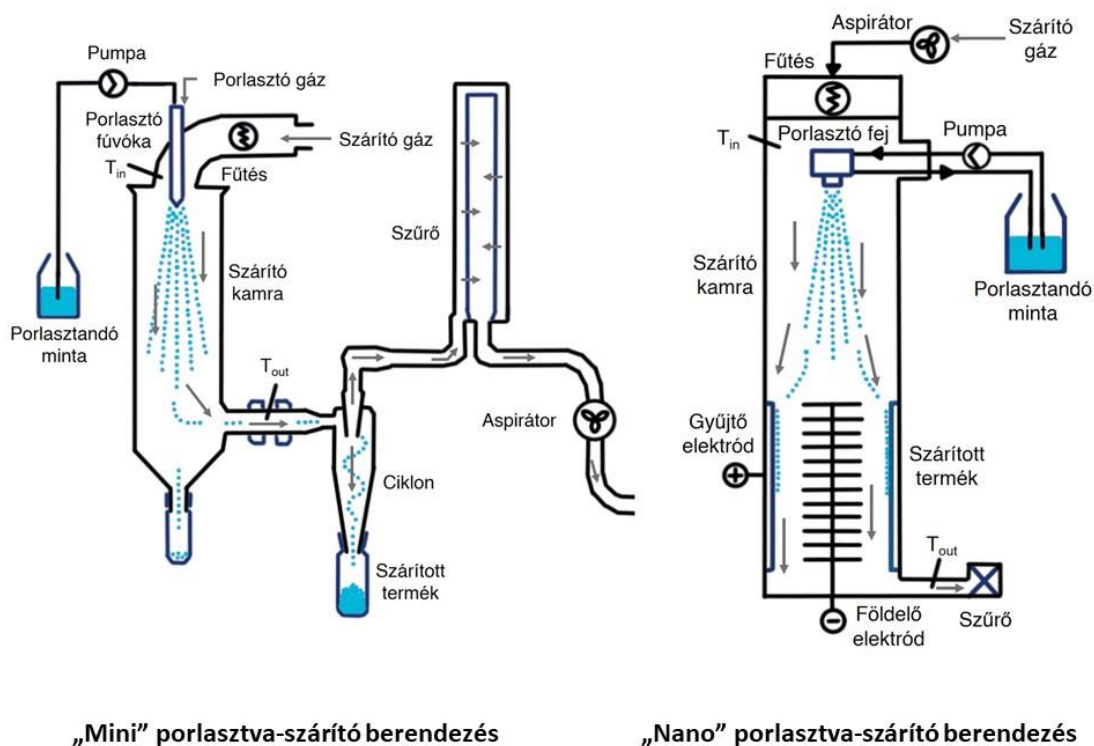
eljárások további lehetőségeket vetítenek elő hatóanyagok szemcseméretcsökkentésében, ezért kerültek kiválasztásra kísérleti eredmények bemutatására.



7. ábra: Alternatív energiák alkalmazása oldószer evaporáció céljából (A: elektro-porlasztás, B: hideg plazma szintézis, C: mikrohullámú szintézis) [65]

A folyékony nanodiszperziók stabilizálásának egyik lehetősége a szilárd terméké történő alakítás, ami hagyományos „Mini” porlasztva-szárító berendezéssel valósítható meg. Ez a szárítási eljárás a nanoméretű hatóanyag szemcséket mikroméretű aggregátumokká alakítja. A hagyományos laboratóriumi porlasztva-szárításnál a folyékony minta atomizációja, a folyadékcseppek keveredése forró szárító levegővel és részecske-képződés, majd a száraz részecskék elkülönítése a szárítóközegtől valósul meg. A cseppképződés révén a nagy fajlagos felület elősegíti a szárító levegő és a folyadékcseppek közötti hőátadást, ami az oldószer nagyon gyors elpárolgását eredményezi. A párolgás először a csepp felületén megy végbe, ezért az oldószer-molekulák a csepp magjából a csepp felszínére diffundálnak [62]. A szárítás utáni lehűlt levegő továbbítja a száraz részecskéket a rendszerben. A szárítón belüli turbulencia bizonyos részecskéket magasabb hőmérsékletnek tesz ki, ezért minden készítménynél szükséges a bemeneti és kimeneti hőmérséklet kontrolálása.

A szilárd, már végterméket is eredményező ún. „Nano” porlasztva-szárítás előállítási technológiájának újdonsága a piezoelektromos működési elv, illetve a 4,0, 5,5 és 7,0 μm átmérőjű fúvóka típusok megválasztása. A szárítógáz áramlása a részecskéket az elektrosztatikus részecskegyűjtőhöz irányítja. A megszáradt részecskék elektrosztatikusan feltöltődnek. Az elektródák közé kapcsolt nagy feszültség elektrosztatikus mezőt hoz létre, amely felgyorsítja a negatív töltésű részecskék lerakódását a részecskegyűjtő elektróda belső falára. A finom por a gyűjtőelektród belső felületéről könnyen eltávolítható. A végtermékek szemcsemérete 300 nm és 5 μm között van. A kétféle szárítási eljárás összevetése a **8. ábrán** látható [67–71].



„Mini” porlasztva-szárító berendezés

„Nano” porlasztva-szárító berendezés

8. ábra: Különböző elven alapuló porlasztva-szárító berendezések

A két berendezés alapvető különbsége az előállítandó részecskék méretében rejlik: amíg a „Mini” porlasztva-szárító készülék 2-60 μm , addig a „Nano” porlasztva-szárító akár szubmikron méretű részecskék előállítására is alkalmas. A „Nano” porlasztva-szárító maximálisan alkalmazható bemeneti hőmérséklete jóval alacsonyabb, viszont az elektrosztatikus részecskegyűjtője nagyobb kitermelésre képes, mint a „Mini” porlasztva-szárító ciklon gyűjtője. A „Nano” porlasztva-szárító minimális mennyiségű minta szárítására is

alkalmas, mert termékhozama ez esetben is nagy. Az **1. táblázat**ban a Büchi Mini B-290 és Nano B-90 HP porlasztva-szárító készülékek főbb paramétereit hasonlítom össze.

1. táblázat: Különböző elven működő porlasztási technikák összevetése

	„Mini” Spray Dryer B-290	„Nano” Spray dryer B-90 HP
Előnyök	Hagyományos porlasztva-szárító eljárás	Kismennyiségű, finom részecskék előállítása
Méret	2-60 µm	0,3-5 µm
Max. bemenő hőm.	220 °C	120 °C
Víz evaporáció	1 kg/h, szerves oldószerek esetében gyorsabb	Max. 0,2 kg/h, szerves oldószerek esetében gyorsabb
Fúvóka típus	kettős/hármas/ultrahangos fúvóka	piezoelektromos-eltű nebulizer
Szemceszeváparáció	ciklon függ a mintatömegtől	elektrosztatikus gyűjtő (ionos feltöltés) független a mintamennyiségtől
Kitermelés	50-70 %	70-90 %
Min. mintatérfogó	30 ml	3 ml
Max. minta viszkozitás	300 cps	10 cps

3.1.3 Prediszperziók stabilitása és stabilizálása

A hatóanyag kristályos állapota, kristályosságának mértéke nagy mértékben befolyásolja a gyógyszerkészítmény oldódási sajátságait, stabilitását és hatékonyságát. A nagy energiájú szemcseméretcsökkentő technikák esetében kisebb vagy nagyobb mértékben amorf hatóanyagfrakció képződhet. A nagy energiájú amorf részecskék instabilak, s a tárolás során rekristallizálódhatnak, tehát alacsony energiájú kristályos állapotot vesznek fel. Ezt a folyamatot a rendszerben lévő/maradt kristályok oltókristályként katalizálhatják. Ugyanazon szuszpenziós rendszerben lévő amorf és kristályos nanorészecskék telítési oldhatósága eltérő, ezért a diffúziós folyamat az amorf nanorészecskék kristályos állapotba történő átalakulásával járhat [72, 73].

A stabilizálásnak fontos szerepe van mind a prediszperzió előállításánál, mind a preformulálás esetében, mivel a nanorészecskék nagy felületi energiája és a közöttük lévő kohéziós erő aggregációt indukálhat. Formuláláshoz a prediszperziók azonnal felhasználhatók vagy tárolhatók adott hőmérsékleten és relatív páratartalommal („holding time”-eltartási idő). A nanokristályos rendszerek hosszú távú stabilitását különböző segédanyagokkal lehet biztosítani (**2. táblázat**). Stabilizáló szerek közül a felületaktív anyagok és a polimerek az aggregáció kivédését biztosítják. A stabilizátorok az újonnan keletkező felületekre történő adszorpcióját termodinamikai és kinetikai jelenségek befolyásolják. Ha a segédanyag nagy affinitással adszorbeálódik a részecske felületére, kis részecskék keletkezhetnek. A fizikailag stabil készítmény előállítása során a stabilizátorok biztosítják a felületek nedvesítését, valamint az *Ostwald-féle* érés (kristálynövekedés kolloid szuszpenziókban) és agglomeráció

megakadályozását (sztérikus vagy ionos gátlás). A stabilizálószer (például polimerek) különböző koncentrációi befolyásolhatják a viszkozitást és a részecskék elektrokinetikai tulajdonságait is a DLVO (*Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek*) elmélet szerint [74].

2. táblázat: Gyakran alkalmazott stabilizáló segédanyagok

Polimerek	Felületaktív anyagok	Kombinált stabilizáló rendszerek
Arabmézga [82]	Cremophor® EL [83]	Felület aktív anyagok kombinációi [76]
Hidroxipropil-cellulóz, Hidroxipropil-metil-cellulóz, Metil-cellulóz, Hidroxietil-cellulóz [84], [85],	Lecitin [86]	Felületaktív anyagok és polimerek kombinációi [76]
Polivinil-alkohol [87]	Poloxamer 188, Poloxamer 338, Poloxamer 407 [22,41,83,88,89]	
Polietilén-glikol 6000, Polietilén-glikol 20000 [79]	Nátrium-lauril-szulfát [90]	
Povidon K15 [91]	Tween® 80 [92,93]	
PVP/VA kopolimer (polivinil-pirrolidon-ko-vinil-acetát) [94]	Poloxamin 908 [81]	
	Poligliceril-10 laurát [95]	
	Tiloxapol [96]	
	Kólsav [97]	
	Nátrium-dokuzát [22,77]	
	Nátrium-deoxikolát [98]	

A **polimerek** felhalmozódnak a részecskék közötti hidrodinamikai rétegben (pl. nedves őrlés során), gátolva ezzel az ütközéseket és másodlagos növekedésüket. A nagyobb molekula-tömegű és viszkózusabb polimerek előnyösebbek méretcsökkentés céljából. A polimerek esetében kiemelendő továbbá, hogy az őrlési hatékonyságot is fokozzák (pl. szárazőrlés). Stabilizálás során a sztérikus taszítás mértékének növelése, a van der Waals-erők csökkentése és interszegmentális erők mérséklése dominál a polimer láncok között [75–79].

Felületaktív anyagok esetében a felületi feszültség csökkentése növeli a nukleáció sebességét. Másrészt a felületaktív ágensek mérséklik a hidrofób erőket (van der Waals erők) ilyen módon aggregációgátlás valósulhat meg. A nagyobb segédanyag-koncentráció — a megnövekedett koncentráció-grádiensnek köszönhetően — gyorsabb adszorpciót és kisebb méretet biztosít. A felületaktív anyagok segítik a részecskék nedvesítését és így csökkentik az aggregációs hajlamukat [80, 81]. A felületaktív anyagok hátránya lehet, hogy növelik az őrlőgolyók mozgási sebességét/energiáját nedves őrlés során, ami a hatóanyag bomlásához vezethet.

A nanorészecskék képzéséhez használható **oldószer** esetében meghatározók a fizikai tulajdonságok, valamint az, hogy milyen mértékben képes a polimert és a hatóanyagot

feloldani. A gyógyszerészetileg elfogadható és kevésbé veszélyes vízzel elegyedő oldószerek előnyösebbek a hagyományos szerves oldószerekkel szemben. A gyógyszeriparban biztonságosan alkalmazható oldószerek áttekintése és kimutatásuk a végső gyógyszerkészítményben az Egyesült Államok Gyógyszerkönyvében és az Európai Gyógyszerkönyvben is megtalálható, valamint az ICH maradékoldószerre vonatkozó irányelvei is iránymutatóak [99, 100].

Nanorészecskét tartalmazó prediszperzió stabilizálása két módon valósítható meg. A már bemutatott módon, a hatóanyag molekulárisan diszpergált rendszerből az oldószer gyors elpárologtatásával integrálható, szilárd terméket képezve (plazma-szintézis, elektroporlasztás mikrohullám, nano porlasztva-szárítás). Illetve, a prediszperzió hagyományos formulálási eljárásokkal megegyezően, szárítási folyamatoknak vethető alá (vákuum-szárítás, liofilezés, porlasztva-szárítás, granulálás, fluidizálás) [101–106]. A gyógyszerforma jellemzőitől és a végső adagolási forma kívánt tulajdonságaitól függően mind a szárítási folyamattal, mind a stabilizáláshoz használt segédanyagokkal a nanorészecskéket stabilizálni kell.

3.1.4 Gyógyszertechnológiai kísérlet-tervezés

Gyógyszerkészítmények preformulálása és formulálása esetén célravezető technológiai kísérleti tervek alkalmazása, figyelembevéve az optimalizálni kívánt paramétereket és a végtermék jellemzőit.

Az ipari gyakorlatban jól alkalmazható **faktoriális tervekkel** több faktor egyidejű vizsgálatát lehet megvalósítani. A faktorok számát általában kettőre korlátozzák a megvizsgálni kívánt beállítások esetén. Ez elegendő a faktorok jelentőségének kimutatásához és sok esetben az optimális beállítási tartomány meghatározásához is [107–109].

A többváltozós folyamatokat gyakran a COST (Change One Separate factor at a Time) módszerrel optimalizálják: egy kivételével minden paraméter rögzített és a rendszer válaszát a változó függvényében vizsgálják. Az egyes változókat ilyen módon szkenneljük és optimális értékük kombinációját fogadjuk el általános optimumnak. Egy többváltozós folyamat átfogó optimumának megtalálására jó stratégia a válaszfelület illesztése a jól megválasztott paraméterkészletekből kapott válaszok alapján. Mivel bármely egyedi változó hatása általában másodrendű polinomokkal számolható, a paramétereket három különböző szinten szokás tesztelni: magas, közepes és alacsony beállítással [110, 111].

A gyógyszeriparban jelenleg szemléletváltás zajlik, a Quality by Testing (QbT) módszer helyébe a **Quality by Design (QbD) szemlélet** lépett [112, 113]. A formulálás során a QbD alapú szemlélet követésével már a kutatás kezdeti fázisában megszabják a célként kitűzött

termék sajátosságait, amelyek bizonyos határokon belül változtathatóak [114]. A QbD alkalmazása során a kockázat-becslés, kockázat-elemzés és a kockázat menedzsment is rendkívül fontos elemzési folyamat.

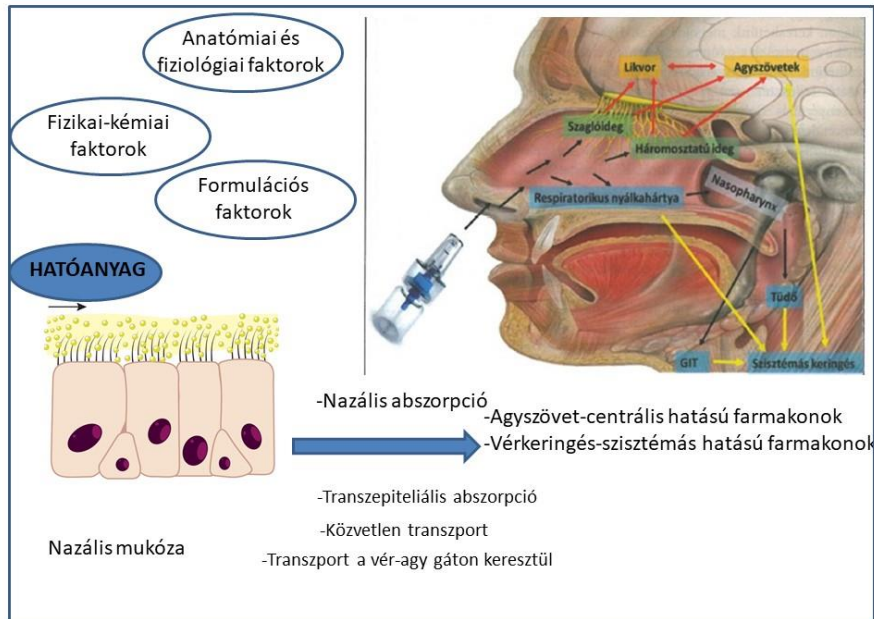
Első lépés meghatározni azokat a faktorokat, amelyek a gyártás folyamán befolyásolják a céltermék minőségét, majd a Quality Target Product Profile (QTPP), azaz a termék lényeges jellemzőinek minőségi alapon történő definiálása következik. A kritikus minőségi paraméterek (Critical Quality Attributes, CQAs) meghatározásánál olyan biológiai, fizikai, kémiai vagy mikrobiológiai tényezőket vizsgálnak, amelyek jelentős befolyást gyakorolnak a céltermék minőségére. A kritikus gyártási folyamat-paraméterek definiálása (Critical Process Parameters, CPPs) minden esetben egyedi módon kerülnek meghatározásra.

A QbD során a kockázat-becslésnek (Risk Assessment, RA) és annak értékelése során fel kell tárni a kapcsolatokat az egyes QTPP-k és CQA-k, illetve a CQA-k és a CPP-k között és értékelni kell egymásra gyakorolt befolyását, valamint annak fokát [115].

A jól meghatározott QTPP-k, CQA-k és CPP-k ismeretében definiálható a tervezési tér (Design Space). Megszabja a gyógyszer olyan összetételbeli és minőségi változásait, amelyekben belül maradv a céltermék minősége nem sérül, azaz felhasználás szempontjából fontos jellemzői megmaradnak [116–119].

3.2 Intranazális gyógyszerbevitel formulálási aspektusai

Az orr mint alternatív beviteli kapu, nagy permeabilitásának köszönhetően a terápiában széles körben alkalmazható, mivel lokális, szisztémás, valamint közvetlen idegrendszeri hatás is elérhető a bevitel során. A nazális készítmények esetében három fontos tényező befolyásolja a farmakonok nazális transzportját: az enzimek okozta bomlás (degradáció), a jelentős csillószőrös aktivitás (muco-ciliáris clearance, MCC), valamint a kis permeabilitás a szoros kapcsolatok (a „tight junctions”) következtében. E tényezők megfelelő irányba történő változtatásával jelentősen javítható a farmakonok szisztémás és akár központi idegrendszeri hatékonysága. Az egyik legjelentősebb előnyük, hogy egyes hatóanyagok közvetlenül a szaglóiidegen keresztül – megkerülve a vér-agy gátat – képesek a központi idegrendszerben hatást kifejteni (**9. ábra**) [120–126].



9. ábra: Intranazális hatóanyag abszorpció [127, 128]

Az intranazális bevétel előnyeit, kihívásait a **3. táblázat** szemlélteti. A beviteli kapu biofarmáciai előnyeinek köszönhetően intenzív kutatások folynak azzal a céllal, hogy gyógyszer technológiai eljárások fejlesztésével, nanoformulációkkal támogassák különböző kórképek kezelését [129].

3. táblázat: Az intranazális bevétel előnyei, kihívásai és formulálási követelményei [130]

Előnyök	Kihívások	Követelmények
Könnyen hozzáférhető, nem invazív	Orrnyálkahártya irritáció	Részecskeméret $\geq 10 \mu\text{m}$ (orrpor)
Gyors és nagy felszívódási felület a szisztémás keringésbe	Rövid tartózkodás az orrban MCC miatt	Viszkozitás, ozmolalitás
Közvetlen út a központi idegrendszerbe	Egyszeri adag 25-200 μl lehet	Mukoadhezivitás
Nincs „first pass effektus”	Patológiás állapot megváltoztatja a felszívódást Enzimatis barrier	Permeabilitás-fokozás

A nazális gyógyszerformák (spray, gél, kenőcs, por) olyan segédanyagokat tartalmaznak, amelyek igazodva a biofarmáciai háttérhez a hatás és stabilitás szempontjából meghatározóak [131]. Különböző szakirodalmi tanulmányok számolnak be szilárd/folyékony fázisú nanoszuszpenziók orrba juttatásáról, ahol kiemelten fontos az alkalmazott segédanyagok típusának és mennyiségének optimalizálása. Például carvedilol tartalmú nanoszuszpenzió *in situ* gél formulálása [132], vagy resveratrol alapú nanoszuszpenzió előállítás agyi tartózkodás

céljából [133]. Az oldhatóság és a permeabilitás is hatékonyan fokozható szemcseméretcsökkentéssel [134]. A biofarmáciai korlátok feloldására szolgáló megoldások közé tartozik a mukoadhezív szerek alkalmazása a mukociliáris clearance csökkentésére [135, 136]. A mukoadhézió fokozására leggyakrabban alkalmazott szerek például karbomerek [137], kitozánok [138], tiomerek [139], az alginát [140], polietilén-glikol-akrilát [141] és Poloxamer [88]. A nátrium-hialuronát (HA) meghosszabbítja a készítmény és az ornyálkahártya érintkezési idejét, ezáltal hozzájárul a növekedett gyógyszer felszívódásához [142]. Másrészt a HA biokompatibilis, biológiailag lebomló.

A polimerek igen jelentős hordozó szerepet töltenek be a gyógyszerformulálás területén, ezzel biztosítva a megfelelő hatás elérését, kiváltképpen a polimer alapú nanohordozók kapcsán, ahol a becsomagolt hatóanyag célbajuttatása programozható illetve megfelelő stabilitás biztosítható [143, 144].

Hangsúlyozni kell, hogy nanoszuszpenziók optimalizálását követően az alkalmazott formaadó technológiák (pl. spray-, gél-, por-formák előállítása) és a segédanyagok nagy mértékben hozzájárulnak a biológiai hasznosíthatóság és stabilitás fokozásához.

3.3 Pulmonális gyógyszerbevitel formulálási aspektusai

A pulmonális bevitel a tüdő fiziológiás sajátosságainak köszönhetően lokális és szisztémás hatás kiváltására alkalmazható (**4. táblázat**). A tüdőbe juttatott farmakonok elkerülik a gasztrointesztinális rendszer metabolikus folyamatait, a gazdag érhálózat és a nagy felszívó felület lehetővé teszi megfelelő formulációk terápiás felhasználását, ezért mind a krónikus obstruktív tüdőbetegségek (COPD) helyi, illetve pl. inhalációs inzulin vagy levodopa alkalmazásával szisztémás kórkepek kezelése megvalósítható [145–149].

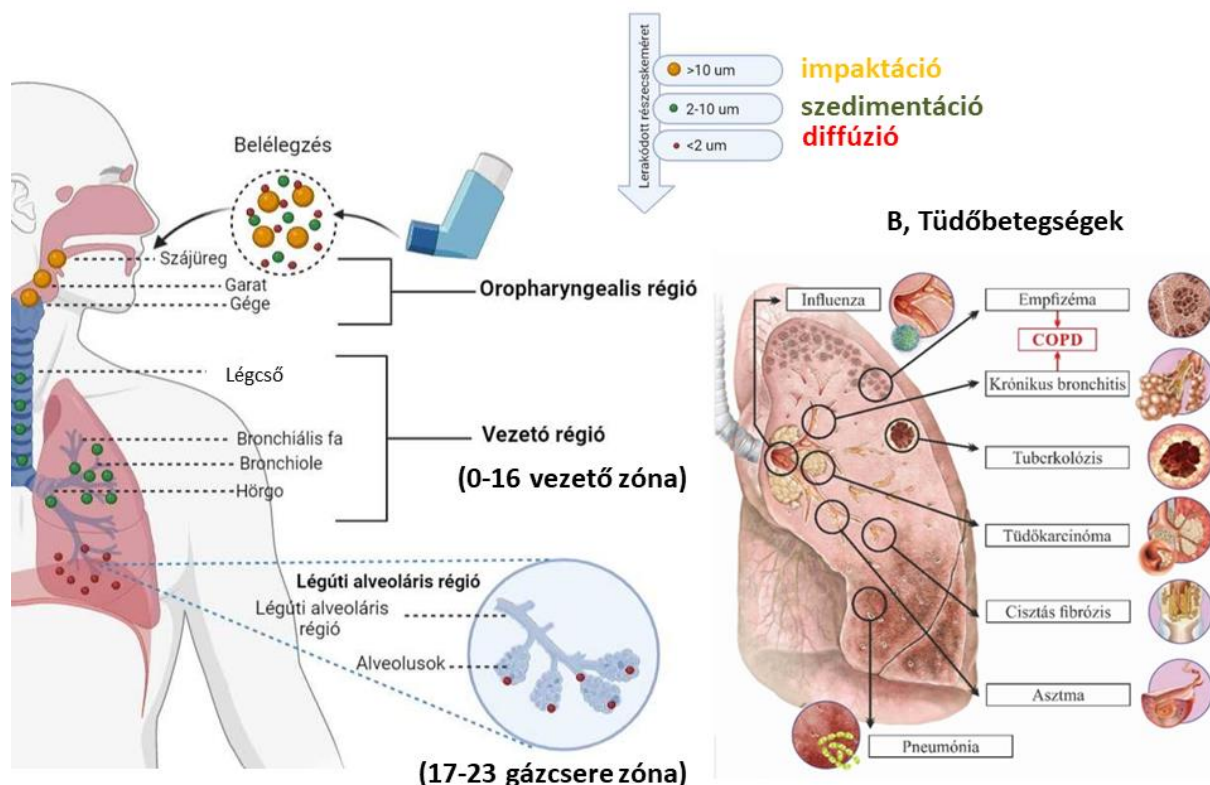
Pulmonális hatóanyag-szállítás a gépi porlasztók és túlnyomásos aeroszolok mellett a száraz porinhalációs készítmények (DPI-ok) használatával is megoldott [150–152]. A DPI-ok olyan stabil por formulációk, amelyek megfelelő, hajtógázmentes inhalációs szereléssel és beteg által elsajátított légzési manőverrel gyermek és felnőtt páciensek kezelésére alkalmazhatók. Azonban a forgalomban lévő készítmények csak kis százaléka jut le a tüdő mélyebb rétegeibe, amelyet a 20-50 %-os finom részecske frakció értékek (FRF, finom részecske frakció) bizonyítanak [153].

4. táblázat: A pulmonális bevitel előnyei, kihívásai és formulálási követelményei [154, 155]

Előnyök	Kihívásai	Követelmények
Nagy felszívófelület, nincs „first pass effektus”	Inhalációs szerelékek	Részecskeméret $\leq 5 \mu\text{m}$
Per os dózis tizede szükséges	Hajtógázrendszer környezetszennyezése	Kis sűrűség
Adagolószelvény alkalmazásnál erős hatású szerek is adhatók	Beteg „compliance”	Mukoadhezivitás
Lipidoldékony anyag diffúzió a membránon át	Belégzési paraméterek hatást befolyásoló szerepe	Jó aerodinamikai sajátság
Vízoldékony anyag felszívódása vízzel telt pórusokon	A légzőtraktus effektív térfogatának változása	

A légutak 0-tól 16-os generációjáig, a légsőtől a terminális bronchiolusokig tart a vezető zóna. A 17. generációtól a 23.-ig, a respirációs bronchiolusoktól a léghólyagocskákig tart a gázcsere zóna (10/A ábra) [156, 157].

A, Részecskedepozíciós mechanizmusok



10. ábra: Részecskedepozícióval összefüggő mechanizmusok tüdőbetegségek inhalációs terápiájában

Itt az alveoláris makrofágok fagocitálják az 1,5-3 mikrométeres szemcséket. Ezen a mechanizmusok mellett a sikeres abszorpcióhoz a farmakonnak át kell jutnia a „surfactant” rétegen is. A tüdőfolyadékból különböző oldékonyságú hatóanyagok képesek felszívódni az

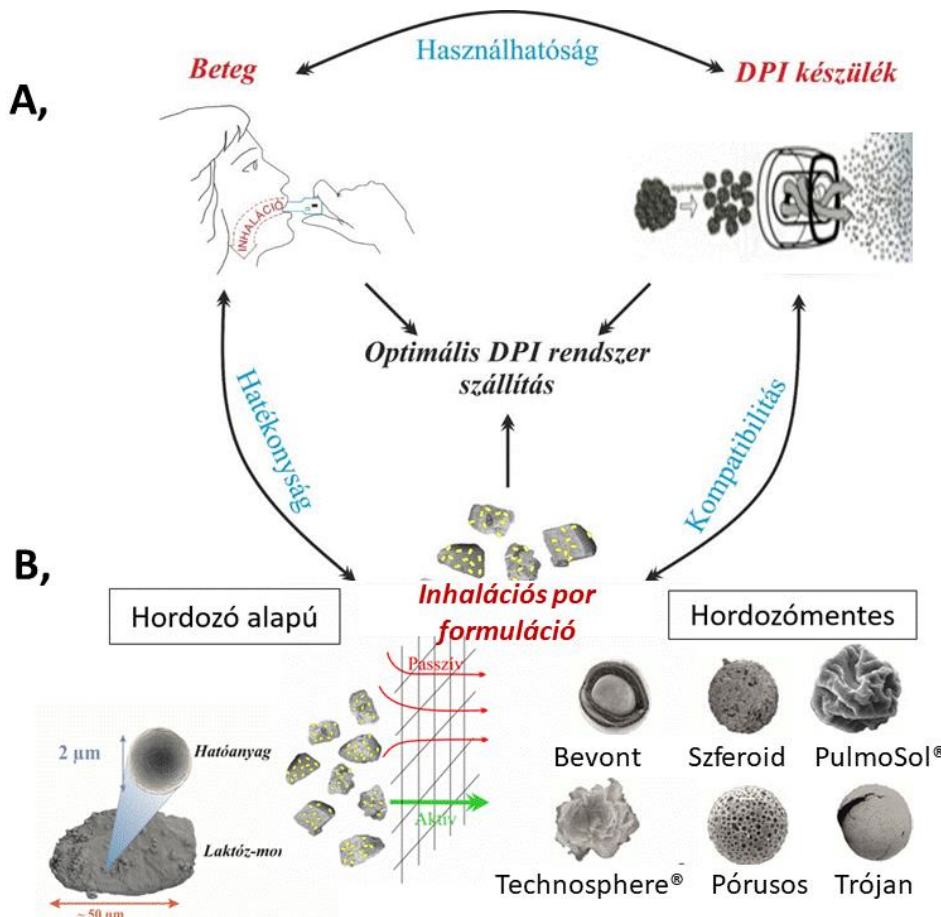
epitel sejtekbe, majd esetleg a keringésbe is bekerülnek. A lipidoldékony farmakonok képesek átdiffundálni a membránokon a keringésbe, amelynek sebessége közel megegyezhet az intravénás bevitelével. A vízóldékony anyagok a membránokon található pórusokon keresztül szívódnak fel [154, 158]. Elsősorban a részecskék mérete, aerodinamikai átmérője és sűrűsége a meghatározó a tüdődepozíció esetében, ezáltal különböző tüdőmegbetegedések kezelésére szánt készítmények fejlesztésében (**10/B. ábra**).

Különböző technológiai eljárások alkalmazásával az inhalációs partikulomok habitusa módosítható, ezáltal a részecskék alkalmassá válnak hordozó alapú és hordozó mentes formulációk tervezésére [159–161]. A **11. A ábra** bemutatja, hogy a DPI rendszer hatékonyságát legfőképp a beteg együttműködése és a DPI formuláció sajátosságai befolyásolják, valamint az inhalációs szerelék kialakítása is befolyásolja a diszpergálás, majd a depozíció hatékonyságát.

A hagyományos, **hordozó alapú** szárazpor-inhalátorok a legszélesebb körben alkalmazott készítmények, ahol a nagyméretű hordozószemcsék és mikronizált hatóanyagok interaktív fizikai keverékét alkalmazzák [162–164]. Elsősorban másodlagos kötőerő (*van der Waals*) tartja meg a hatóanyagot a hordozó felületén és engedi leszakadni a belégzés folyamán. Túl erős kapcsolat és gyenge belégzés esetén a hatóanyag a hordozó felületén maradván kitapad a felső légutakban, csökkentve ezzel a hatékonyságot.

Számos tanulmány foglalkozik hagyományos, hordozó alapú készítmények fejlesztésével, amelyekben elsősorban a hordozó felületkezelésével módosítható a hordozó és hatóanyag között létrejövő interpartikuláris kölcsönhatás, ezáltal a tüdődepozíció mértéke. *Adi* és munkatársai [165], kezeletlen hordozó és porlasztva szárított gyógyszer keverékét használt, *Hazare* munkatársaival magnézium-sztearáttal felületkezelt laktóz hordozóra vitték fel a porlasztva szárított hatóanyagot. Az FRF-értékek azonban 50%-nál kisebbek voltak. Ugyanakkor azt is meg kell jegyezni, hogy a forgalmazott hordozó alapú DPI készítmények még mindig csak a finom részecskEFRakció 20-30%-ával rendelkeznek [166].

A **hordozómentes** rendszerek esetében megfelelő segédanyagok és korszerű technológiai megoldások alkalmazásával kiküszöbölhetővé vált a hagyományos nagyméretű hordozók szükségszerűsége [167, 168]. Ilyen új formulálási lehetőségek közé tartoznak (**11. ábra**) pl. a réteges felépítésű bevont részecskék, nem-porózus (bevont részecskék, szferoidok, PulmoSol™ technológia) [169, 170], és porózus rendszerek (nagyporúsú szemcsék, nano-porózus mikrorészecskék, nano-porózus mikrorészecskék, PulmoSphere™ technológia, nanoagglomerátumok [171–174] **11. B. ábra**.



11. ábra: Száraz porinhalációs rendszerek formulálása [175, 176]

Az eljárások célja csökkenteni a részecskék közötti adhéziót és a kialakított szerkezettel megfelelő aerodinamikát biztosítani a hatékony inhalációhoz [177]. A könnyen irányítható részecskék és a pontosan adagolható készítmény előállításában alkalmazható segédanyagok növelik az aeroszolizációt (pl. aminosavak, mannit) [178], szerkezet stabilizálók (PVA, hialuronsav és más polimerek) vagy sűrűség csökkentők (ammónium-karbonát, illékony oldószerek és más porozitás növelők) [179] (5. táblázat).

Mivel számos készítmény szabadalmi oltalma lejár, valamint a tüdőbetegségek kezelésében új terápiás protokollokra van szükség. Ezért mind a hordozó alapú, mind a hordozómentes formulálás területén igény van arra, hogy újabb összetételekkel és formulálási megoldásokkal (integrálás, dezintegrálás) mikro- (1-3 μm) és nano- (100-800 nm) méretű rendszerekkel optimális aerodinamikai sajátosságú formulációkat fejlesszünk.

5. táblázat: Példák a leggyakrabban használt segédanyagokra hordozómentes DPI készítmények esetében [180]

Típus	Példa	Funkció	Referencia
Aminosavak	D vagy L-leucine Glicin Alanine	diszperzításfokozó aeroszolizációt javít	Minne et al., 2008 [181] Prota et al., 2011 [182] Simon et al., 2016 [183]
Polimerek	PLGA NaHA Kitozán PVA PVP PEG	mátrixképző filmképző stabilizáló hosszantartó hatást biztosít	Tewes et al., 2010 [184] Yand et al., 2012 [169] Iskandar et al., 2009 [185] Martinelli et al., 2017 [186]
Lipidek	DPPC PC DSPC	mátrixképző bevonó anyag abszorpciófokozó	Scalia et al., 2013 [187] Mehta, 2016 [188] Lam et al., 2013 [189]
Pórusképzők	Etanol Ammónium- bikarbonát	sűrűségcsökkentő aeroszolizációt javító porózus részecskékhez	Dellamary et al., 2000 [190] Ogienko et al., 2017 [191] Weers and Tarara, 2014 [172]
Egyéb segédanyagok	Magnézium-sztearát	nedvességvédő	Parlati et al., 2009 [192] Yu et al., 2018 [193]
	Kitozán	finom hordozó	Makhlof et al., 2010 [194] Mukhtar et al., 2020 [195]
	DKPF	finom hordozó	Angelo et al., 2009 [196] Kaur et al., 2008 [197]

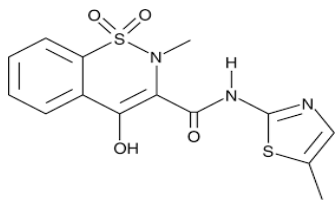
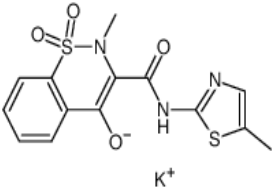
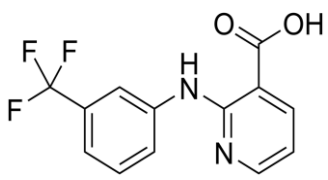
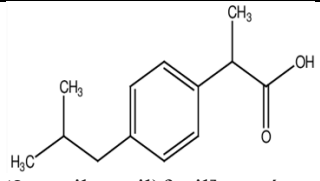
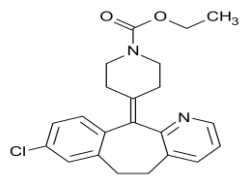
PLGA: poli(laktát-ko-glikolsav), PVA: Poli(vinil-alkohol), PVP: polivinil-pirrolidon, PEG: polietilén-glikol, DPPC: dipalmitoil-foszfátidil-kolin, PC: foszfátidil-kolin, DKPF: diketopiperazin-fumarát, perflubron: perfluor-oktíl-bromid, DSPC: disztearil-foszfátidil-kolin

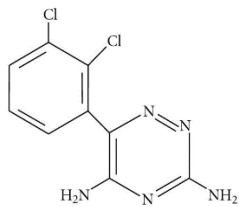
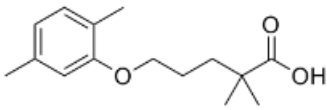
IV. FELHASZNÁLT ANYAGOK

4.1 Hatóanyagok

A kutatások során alkalmazott modell hatóanyagok (6. táblázat).

6. táblázat: Hatóanyagok jellemzői

Hatóanyag	Képlet, IUPAC név	logP	pKa	Víz-oldhatóság T: 25 °C	O _p (°C)	T _g (°C)
Meloxicám (Sigma- Aldrich Kft, Magyarország) M _w (g/mol): 351,40	 4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-1,3-tiazolil)- 2H-1,2-benzotiazin-3-karboxamid-1-1-dioxid	3,54	4,08	22 mg/l,	255	63,5
Meloxicám kálium monohidrát (Egis Zrt, Magyarország) M _w (g/mol): 389,49	 4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazin-3-karboxamid-1,1-dioxid, kálium só	ni.	ni.	13.1 mg/ml	170	ni.
Nifluminsav (Richter Nyrt, Magyarország) M _w (g/mol): 282,22	 2-[3-(trifluorometil)anilino]piridin-3-karboxil sav	4,43	2,26 4,44	19 mg/l	203	ni
Ibuprofén (Sigma- Aldrich Kft) M _w (g/mol): 206,29	 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propán sav	3,97	4,45- 5,1	21 mg/l	76	- 42,5
Loratadin (Sigma- Aldrich Kft) M _w (g/mol): 382,88	 etil 4-(13-klór-4-azatriciklo[9.4.0.0.3.8]pentadeca-1(11),3(8),4,6,12,14-hexaén-2-ildén)piperidin-1-karboxilát	5,2	4,33- 5	< 1 mg/ml	135	40,4

Lamotrigin (Sigma- Aldrich Kft.) M_w (g/mol): 256,09	 6-(2,3-diklórfenil)-1,2,4-triazin-3,5-diamin	1,93/2,57*	5,7	170 mg/l	179	ni
Gemfibrozil (Sigma- Aldrich Kft.) M_w (g/mol): 250,33	 5-(2,5-dimetilfenoxi)-2,2-dimetilpentán sav	4,387/3,4*	4,5	11 mg/l	60	- 29,2

ni: nem ismert

A gyógyszer technológiai eljárások paramétereinek befolyásán túl, az alkalmazott hatóanyag oldhatósági, permeabilitási, kristályossági jellemzőit a segédanyagok is jelentős mértékben módosíthatják. A kristályos anyagokkal ellentétben az amorf anyagok – rendezetlen állapotuk miatt – nem rendelkeznek karakteres olvadásponttal (O_p). Ezek az anyagok felmelegítve egy adott tartományban, az üveges átmenetnél (T_g) fokozatosan meglágyulnak. T_g alatt az amorf anyagok ridegek, kemények, felette rugalmasak, viszkózusak. Instabilak és nagy hajlandóságot mutatnak a rekrisztallizációra, továbbá higroszkóposak és kémiai aktivitásuk meghatározó. Bizonyos segédanyagok alkalmazása a hatóanyagok kristályosságának letörését is eredményezheti.

A 6. és 7. táblázat a kutatások során alkalmazott technológiai protokollok paramétereinek és a materiális jellemzők meghatározás szempontjából fontos adatokat mutatnak be [198], [199].

4.2 Segédanyagok

A kutatások során alkalmazott segédanyagok (7. táblázat).

7. táblázat: Segédanyagok jellemzői

Segédanyag	IUPAC név	M_w (g/mol)	O_p (°C)	T_g (°C)
Poli(vinil-alkohol) PVA (Sigma Aldrich Kft)	poli(1-acetiloxietilén)	27 000	212-267	60-85
Poli(vinil-pirrolidon) PVP K25 (BASF, Németország)	polivinilpirrolidon	34 000	13.9	155
Poli(vinil-pirrolidon) PVP C30 (BASF)	polivinilpirrolidon	58 000	13.9	168

Poliszorbát 80 Tween 80 (VWR International Kft, Magyarország)	polioxietylén (20) szorbitán- monooleát	1310	-25	na
Poloxamer 188 (Sigma Aldrich Kft)	2-(2-propoxipropoxi)etanol	162,23	52-57	-60
Polietylén-glikol PEG 4000 (Sigma Aldrich Kft)	poli(oxietylén)	3500- 4500	56	-22,37
Polietylén-glikol PEG 6000 (Sigma Aldrich Kft)	poli(oxietylén)	5400- 6600	60	-22,71
Polietylén-glikol PEG 20 000 (Sigma Aldrich Kft)	poli(oxietylén)	20 000	57.5	-34,63 -41
Nátrium-hialuronát (Richter Nyrt)	*	1400 Da	241-247	65
Mannit (Sigma Aldrich Kft)	(2R,3R,4R,5R)-hexán-1,2,3,4,5,6- hexol	182,17	166-168	8,8- 12,6
Hidroxypropil-beta-ciclodextrin Alfa-ciclodextrin (Cyclolab, Magyarország)	** ***	972 1134	290-300	90 83,38
Leucin (Sigma Aldrich Kft, Budapest)	(2S)-2-amino-4-metilpentán sav	131,17	294	na.
Ammónium-hidrogén-karbonát (Molar Chemicals Kft, Magyarország)	ammónium-hidrogén-karbonát	79,06	41,9	na.
Laktóz InhaLac® (Meggie excipients and technology, Németország)	β-D-galaktopiranozil-(1→4)-D- glükóz	360,32	202.8	101,2
Trehalóz dihidrát VWR International Kft., Magyarország)	(2R,3S,4S,5R,6R)-2- (hidroximetil)-6- [(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5- trihidroxil-6-(hidroximetil)oxán-2- il]oxioxán-3,4,5-triol; dihidrát	378,33	97	20
Nátrium-sztearát (Roth Hungary, Magyarország)	nátrium oktadekanoát	306,46	245–270	na.
Magnézium-sztearát (Roth Hungary)	magnézium oktadekanoát	591,27	88	204

na: nincs adat

*nátrium;(2S,3S,4S,5R,6R)-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-2-[(2S,3S,4R,5R,6R)-6-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-2,5-dihidroxil-6-(hidroximetil)oxán-4-il]oxi-2-karboxi-4,5-dihidroxioxán-3-il]oxi-5-hidroxil-6-(hidroximetil)oxán-4-yl]oxi-3,4,5-trihidroxioxán-2-karbonsav

**1S,3R,5R,6S,8R,10R,11S,13R,15R,16S,18R,20R,21S,23R,25R,26S,28R,30R,31S,33R,35R,36S,37S,38S,39S,40S,41S,42S,43S,44S,45S,46S,47S,48S,49S)-5,10,15,20,25,30,35-heptakis(2-hidroxipropoximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29,32,34-tetradekaoxaotaciklo[31.2.2.23,6.28,11.213,16.218,21.223,26.228,31]nonatetrakontán-36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49-tetradekol

***1S,3R,5R,6S,8R,10R,11S,13R,15R,16S,18R,20R,21S,23R,25R,26S,28R,30R,31R,32R,33R,34R,35R,36R,37R,38R,39R,40R,41R,42R-5,10,15,20,25,30-hexakis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-dodeksoxaheptaciklo[26.2.2.23,6.28,11.213,16.218,21.223,26]dotetrakontán-31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodekol

Szerves oldószer: etanol, metanol, aceton, etil-acetát, benzil-alkohol, triacetin (Sigma Aldrich, Budapest).

V. TERMÉK ELŐÁLLÍTÁSI ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

5.1 Minták előállítása céljából használt kísérlettervezés, szemcseméretcsökkentő eljárások és módszerek

Kísérlettervezés, a QbD-alapú megközelítés alkalmazása formuláció fejlesztéshez

Az optimális anyagi és technológiai paraméterek megválasztásához kétszinten vagy háromszinten faktoriális kísérlettervezést alkalmaztunk.

Kísérlettervezésnél alkalmazott programok: Minitab 14 (Minitab® Statistical Software, Minitab, LLC, USA), MODDE 11.1 Software (Umetrics, Svédország), Lean QbD Software® qbdworks.com (2014 QbDWorks LLC., USA).

A QbD-alapú gyógyszerfejlesztés során meghatároztuk a QTPP, a CQA, a CPP és a CMA tényezőket. A tudástérfejlesztéshez (Design space) és az RA-hoz számos minőségi eszköz használható, mint például Ishikawa-diagram, folyamatábra, döntési fa, Pareto-diagram stb. A QbD-alapú megközelítés nazális és pulmonális adagolású készítmények esetében egyaránt alkalmazható.

Száraz őrlés során alkalmazott őrlőberendezések (dezintegrálás)

Fritsch Pulverisette 6, (Fritsch GmbH, Németország) és Retsch PM 100 MA bolygómalom, (Retsch GmbH, Németország) acél őrlőgolyók alkalmazásával.

Nedves őrlés során alkalmazott berendezések

Retsch PM 100 MA bolygómalom, (Retsch GmbH, Németország) cirkóniumoxid őrlőgyöngyökkel.

Nagy intenzitású ultrahang (UH) (Hielscher UP 200S, 200W, Németország) statikus és dinamikus elrendezés, hőmérséklet (Julabo, Németország), amplitúdó és ciklus kontrollal perisztaltikus pumpa (Heidolph PD5006 Pumpa, Anglia) kettősfalú átfolyó rendszer.

Nagy nyomású homogenizátor (HPH) (Avestin Emulsiflex C3, Kanada), maximum 1000 bar nyomás, manuálisan szabályozható ciklusszám, hőmérséklet kontrollal.

Integráló eljárások berendezései oldószer evaporáció biztosítására

Kombinált precipitációs eljárás keretében az oldószer-antioldószer elegyítésével a hatóanyag precipitáció folyamatát kombináltuk nagy intenzitású ultrahang (UH) (Hielscher UP 200S,

200W, Németország) és nagy nyomású homogenizátor (HPH) (Avestin Emulsiflex C3, Kanada) alkalmazásával.

Új lehetőségek a szervesoldószer evaporáció területén az elektroporlasztás, plazmaszintézis és mikrohullám tanulmányozása.

Egy és nyolcfűvőkás (Aitecs SEP-10S fecskendő pumpa, Litvánia) elektroporlasztó berendezés összeállítás fűvókatartóból, egy földelt rozsdamentes acél gyűjtőlemezről, egy Meredos TL-EAD perisztaltikus pumpából (Baoding Shenchen Precision Pump Co.,Ltd, Kína) állt, biztosította az oldaláram egyenlő eloszlását a fűvókákra és egy Wallis ± 10 kV egyenáramú tápegységet alkalmaztunk. Egyenáram és váltóáram biztosította a potenciál különbséget. A használt fűvókák hossza kb. 25,4 mm, belső átmérője 0,33 mm.

Egyedi összeállítású hideg plazma reaktorkamra oxigéntartalmának mérésére Dräger X-am 3000 típusú gáz detektort alkalmaztunk. Az argongázt Collision porlasztón (BGI Inc., USA) szállítottuk és az oldatot aeroszolos permet formájában a plazmakamrába vittük. A reaktorkamra rozsdamentes acélból készült, egyik végéhez a porlasztó rögzíthető. A dielektromos kisülésű lemezfelület 20 db egymáshoz kapcsolódó 1 mm széles, 50 μ m vastag platinacsíkból áll, amelyet kerámialapon helyeztünk el. A váltakozó feszültség (3-5 kV) létrehozásához Xantrex XFR 600-4 DC tápegységet használtunk, amely egy szigetelt kapu bipoláris tranzisztort (IGBT) tartalmazó házi AC tápegységhez csatlakozik [200].

CEM Discover (CEM Company, Anglia) kémiai szintetizáló laborméretű mikrohullámú berendezés, magnetron frekvenciája 2450 MHz. Pulzálás-mentes teljesítménye 300 W.

Az egyedi elrendezések összeállítását Dr. Radacsi Norbert kooperációban valósította meg.

Szárítási eljárások eszközei

A porlasztva-szárítást Büchi B-191 „Mini” porlasztva szárító és B-90 „Nano” porlasztva-szárító (BÜCHI Labortechnik AG, Svájc) berendezéssel végeztük; hőmérséklet, pumpa sebesség; aspirátor és sűrített levegő áramlása változtatható.

A fagyasztva-szárító berendezés Scanvac CoolSafe 100-9 Pro típusú (LaboGene ApS, Lyngø, Dánia) volt, ahol a folyamatot számítógép kontrollálta (Scanlaf CTS16a02) a hőmérséklet és a nyomás detektálásával.

Interaktív fizikai keverékek előállítása

A ható- és segédanyagok fizikai keverékeit az előállított mintákkal megegyező arányban Turbula keverőben (Turbula WAB, Systems, Svájc) 50 rpm-mel 10 percig kevertettük, majd kontrollként alkalmaztuk különböző fizikai-kémiai és biofarmáciai vizsgálatok kiértékelésénél.

5.2 Fizikai-kémiai tulajdonságok meghatározása

Szemcseméret analízis

A minták méretének (hosszúság, szélesség) meghatározása optikai mikroszkópos méréssel történt (Leica Q500MC; Leica Microsystems, Németország).

A szemcseméret-eloszlás vizsgálat elvégzéséhez Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Egyesült Királyság) készüléket alkalmaztunk. A folyékony prediszperziók szemcseméretének meghatározásához nedves közegű diszpergáló egységet használtunk. A porkeverékek vizsgálatánál száraz feltétet (Sciocco egység száraz mintákhoz) alkalmaztunk. Ily módon a program segítségével megkapjuk a szemcsék méret szerinti eloszlását kifejező D10, D50, D90 értékeket, amelyek megadják, hogy a por hány %-a (10 %, 50 %, 90%) kisebb az adott μm -nél. A polidiszperzitási index (PDI) és fajlagos felület (SSA) értékek szintén értékelhetőek.

A szemcseméret, polidiszperzitási index és felületi feszültség (Zéta-potenciál, ZP) meghatározását fotonkorrelációs spektroszkópiával végeztük (PCS) (Zetasizer NanoZS[®], Malvern Instruments Ltd; Egyesült Királyság).

Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat

A termékek morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal elemeztük (Hitachi S-4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán). A szemcsék felületét arany-palládiummal vontuk be (Bio-Rad SC 502, VG Microtech, Anglia). Az elektromos vezetés kialakítására 1,3-13 mPa nyomású levegőt használtunk. A mérés 10 kV feszültségen és 10 mA áramerősségen történt különböző nagyításokkal. A részecskék méretét ImageJ programmal (1.50i; Java 1.6.0_20 [32-bit]; Windows NT) határoztuk meg.

Sűrűség-meghatározás

A minták látszólagos és tömörített sűrűségének meghatározását Engelsmann Stampfvolumeterrel (J. Engelsmann AG, Németország) (Ph. Eur., 2022) végeztük. A 250 cm^3 -es mérőhengerbe helyezett por tömegét lemértük, majd különböző leütésszámok után újra leolvastuk a térfogatukat. Minden mintából három párhuzamos mérést végeztünk el, majd porreológiai számításokat végeztünk.

Nedvesedési peremszög vizsgálat

A nedvesedési peremszög meghatározását OCA cseppkontúr analizáló készülékkel (Dataphysics OCA 20, Dataphysics Instruments GmbH, Németország), „Sessile-drop” módszerrel végeztük. A porokból 0,10 g-ot kimérve és hidraulikus prést alkalmazva 1 tonna préselővel pasztillát préseltünk (Specac Inc., USA). Minden mintából hat korongot préseltünk. Wu módszere alapján, két eltérő folyadékban, desztillált vízben és dijódmétánban detektált nedvesedési peremszög felvételével a minták határfelületi/felületi szabadenergiájának (γ_s) kiszámolása, majd a polaritás, kohéziós munka (W_c), adhéziós munka (W_a) és adhéziós erő (F_{adh}) meghatározása lehetséges [201]. A kohéziós munka (W_c) egyszerűen számolható a felületi szabadenergia (γ_s) kétszereseként:

$$W_c = 2 \times \gamma_s$$

A két különböző anyag (képletben 1-es és 2-es számokkal jelölve) között értelmezhető adhéziós munka (W_a) meghatározható az anyagra jellemző diszperziós (γ^d), illetve poláris komponens (γ^p) értékekből:

$$W_a = 4 \left[\frac{\gamma_1^d \gamma_2^d}{\gamma_1^d + \gamma_2^d} + \frac{\gamma_1^p \gamma_2^p}{\gamma_1^p + \gamma_2^p} \right]$$

Az adhéziós erő (F_{adh}) meghatározására több modell is ismeretes, munkánk során a *Derjaguin*-féle megközelítést vettük igénybe, amely a gyógyszer technológiában rendszerint alkalmazott [202],

$$F_{adh} = 2\pi \left(\frac{R_A R_B}{R_A + R_B} \right) W_{adh}$$

ahol R_A és R_B az A és B részecske sugara, amelyek közötti adhéziós kölcsönhatást vizsgáljuk. R méretét felhasznált alapanyagonként a szemcseméret-analízis során meghatározott D50 érték feleként határoztuk meg [203–206].

Oldékonyság, hatóanyagtartalom és pH-meghatározás

Az oldékonyság meghatározása céljából a mintákat 25 °C-on 24 órán át mágneses keverővel kevertettük, majd 0,1 μ m-es fecskendőszűrőn leszűrtük (FilterBio PES Syringe Filter Labex Ltd., Magyarország). A feloldódott hatóanyag mennyiségét spektrofotometriásan határoztuk meg (Unicam UV/VIS, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Egyesült Államok) ($n = 3$).

A kémhatás meghatározása Orion 3 star pH-mérő alkalmazásával (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Egyesült Államok) történt.

5.3 Szerkezeti vizsgálatok

Porröntgen vizsgálat

A porröntgen diffrakciós mérése (XRPD, X-ray powder diffraction) Bruker D8 Advance diffraktométerrel (Bruker AXS GmbH., Németország) végeztük. A sugárforrás: Cu K α I sugárzás ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). Egységesen 40 kV feszültségen és 15 mA áramerősségen történt a beolvasás 3°-tól 40°-ig (2Θ). Eredmények feldolgozásához DIFFRACT plus EVA szoftvert 28 használtunk. A kristályossági fok (X_c) szemikristályos anyagok esetében azok diffraktogramjának amorf és kristályos területe (A) vagy intenzitása közötti aránnyal adható meg [207]:

$$X_c = \frac{A_{kristályos}}{A_{kristályos} + A_{amorf}} \times 100$$

Termoanalitikai vizsgálat

A termoanalitikai méréseket Mettler Toledo STAR^e termoanalitikai készülékkel (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) végeztük. A differenciális pásztázó kalorimetria (DSC, differential scanning calorimetry) méréseket argon gáz áramoltatásával (10 l/óra), 2-3 mg-os mintamennyiséggel 25-300 °C között, 5-10 °C/perc fűtési sebességgel hajtottuk végre. kristályossági index (CI) a kristályosság kvantitatív mutatója, amely a DSC görbe normalizált integrál értékekből határozható meg [208].

Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiás mérés (FT-IR)

A kialakult kölcsönhatások, kémiai stabilitás vizsgálatára AVATAR330 FT-IR spektrométert (Thermo Nicolet, Unicam Magyarország Kft., Magyarország) használtunk 400-4000 cm^{-1} intervallumon, 4 cm^{-1} optikai felbontás mellett. A mintákból 0,15 g KBr használatával 10 t préselőt alkalmazva pasztillákat préseltük. E pasztillákon áthaladó infravörös sugárzás abszorbanciáját detektáltuk.

5.4 Gyógyszerforma vizsgálatok

In vitro kioldódás vizsgálatok

A termékekből történő hatóanyagfelszabadulást a Magyar Gyógyszerkönyvben is hivatalos forgólapátos kioldókészülék (Hanson SR8 Plus, ABLE JASCO, Magyarország) 900 ml-es illetve módosított térfogatú (25-150 ml) változatával határoztuk meg. Adott hatóanyagtartalmú terméket kioldóközegbe helyeztük (mesterséges gyomornedv, bélmedv, nazális, illetve tüdőfolyadék). A készüléket 100 fordulat/perc fordulatszámom működtettük. A termékre 3 párhuzamos mérést végeztünk az adott időintervallum után UV–VIS spektrofotométerrel megmértük az abszorbanciát (hatóanyagoknak megfelelő hullámhosszokon), amelyből meghatároztuk a kioldódott hatóanyag mennyiségét adott időintervallumot követően.

Permeabilitás vizsgálat in vitro és ex vivo

A *diffúziós vizsgálatokat vertikális* Franz diffúziós cellával végeztük puffer-oldatok alkalmazásával (Hanson Microette Topical and Transdermal Diffusion Cell and Autosampling System, Hanson Research, Egyesült Államok). Az átdiffundált (impregnált szintetikus membrán) hatóanyag koncentrációját spektrofotometriásan mértük (Unicam UV/VIS, Thermo Fisher Scientific Inc., Egyesült Államok). A hatóanyag flux (J) és permeabilitási koefficiens értékeit (Kp) is meghatároztuk. A donor fázisban maradt hatóanyag mennyiséget Agilent 1260 RP-HPLC-vel detektáltuk.

A hatóanyag diffúzióját *horizontális diffúziós* készülékkel (Side-Bi-Side™ Grown Glass, USA) is vizsgáltuk. A donor fázis 9 ml pH 5,6-os foszfát puffer-oldat, az akceptor fázis 9 ml pH 7,4-es foszfát puffer-oldat volt. A vizsgálat folyamatos mágneses keverés mellett, 30 °C-on történt. Membránként regenerált cellulózt (Whatman™) alkalmaztunk, amelyet előzetesen izopropil-mirisztátba (IPM) áztattunk. A minták hatóanyag-tartalmát spektrofotometriásan (Unicam UV/VIS Spectrophotometer, Egyesült Királyság), adott hullámhosszon határoztuk meg.

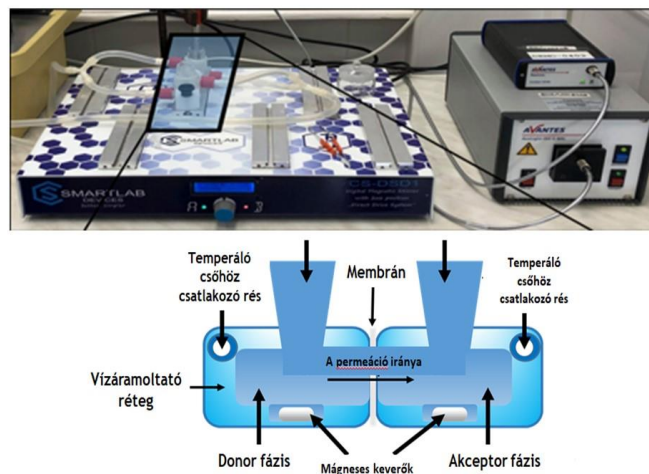
Flux (J): a membránon átdiffundált hatóanyag mennyiségének, a membrán felületének és az idő hányadosa.

Permeabilitási koefficiens (Kp): A Flux és a donor fázisban lévő hatóanyag koncentrációjának hányadosa.

Módosított permeabilitási vizsgálati módszer fejlesztése (geometriai paraméterek változtatása és valós idejű mérés kivitelezése), validálása és az eredmények értékelése után megállapítottuk, hogy az előző pontban alkalmazott mérési paraméterekkel lehet optimálisan

mérni hatóanyagok nazális diffúzióját (**12. ábra**). Az inline hatóanyagkoncentráció detektálása AvaLight DH-S-BAL spektrofotométerrel (AVANTES, Hollandia) és AvaSpec-2048L transzmissziós merülő szonda (AVANTES, Hollandia) alkalmazásával történt.

Az *ex vivo* mérésekhez a permeabilitási tesztet humán ornyálkahártyán (mucoperiostium) végeztük (etikai engedély száma: IV/3880-1/2021/EKU) a legmagasabb *in vitro* diffúziót mutató készítmények esetében. Az ornyálkahártya darabjait napi klinikai rutinszerű orr- és arcüregi műtétek során (septoplasty, FESS) gyűjtötték általános vagy helyi érzéstelenítés alatt. A műtéti területet 1%-os Lidocain-Tonogen lokális injekcióval infiltrálták és a nyálkahártyát raspatórium segítségével emelték ki az alapjáról. A preparált ornyálkahártyát a módosított diffúziós készülékbe helyezve, a vizsgálati paraméterek megegyeztek az előzőleg ismertetett paraméterekkel.



12. ábra: Módosított diffúziós készülék elrendezése

A permeabilitás-vizsgálatokat pulmonális formulációk esetében szintén módosított horizontális diffúziós készülékkel valósítottuk meg. A rendszert 37 °C-on temperáltuk, a mintákat 9 ml tüdőfolyadékot tartalmazó donor fázisba tettük. Egy 2 cm² felületű izo-propil-mirisztáttal impregnált cellulóz-membránon keresztül jutott át a minta a 9 ml térfogatú akceptor fázisba, amely foszfát-puffert tartalmazott. Mindkét fázis pH-ja 7,4 volt. Az akceptor fázisban 120 percen keresztül mértük az abszorbanciát, on-line Avaspec 204 BB spektrofotométerrel (Avantes, Hollandia).

Kioldó közegek, donor és akceptor fázisok: mesterséges gyomornedv pH: 1,2, foszfát puffer pH: 5,6, mesterséges bélnedv: pH: 6,8, foszfát-puffer pH: 7,4, mesterséges tüdőfolyadék pH: 7,4, mesterséges nazális fluidum pH: 5,6.

In vitro aerodinamikai vizsgálatok

Az Andersen-féle készülék (ACI, Andersen Cascade Impactor) a Gyógyszerkönyvben hivatalos („D” készülék, Copley Scientific Ltd., Egyesült Királyság), amely alkalmas a készítmények aerodinamikai tulajdonságainak meghatározására, tüdő depozíció prediktálására (**13. ábra**). A vizsgálat elvégzéséhez a formulációt kemény zselatin kapszulába (transzparens, 3-as méret, Capsugel, Németország) töltöttük és Breezhaler® típusú porinhalátor segítségével „inhaláltattuk” vákuum pumpa (High-capacity Pump model HCP5, Critical Flow Controller Model TPK, Copley Scientific Ltd., Egyesült Királyság) és áramlásmérő készülék (Flow Meter Model DFM 2000, Copley Scientific Ltd., Egyesült Királyság) segítségével.



13. ábra: Andersen impaktor elrendezése [209]

A mérések megkezdése előtt a felfogó tálcákat felületaktív anyaggal vontuk be, hogy a kitapadt szemcsék fennmaradjanak a tálcákon, lehetővé téve így a többszöri belélegeztetést. A tálcákon így kitapadt hatóanyag mennyiségét vizsgáltuk, ezáltal jól szemléltethető a belélegeztetett formuláció eloszlása a légzőrendszerben. Az UV-VIS spektroszkópia eredményekből Kaleida Graph/Inhalytix program segítségével számítottuk a finom részecskefrakciót (FRF: belélegeztett hatóanyag tömegének hány százaléka rendelkezik 5 μm -nél kisebb aerodinamikai átmérővel) és az átlagos aerodinamikai átmérőt (MMAD, mass medium aerodynamic diameter: részecskék belégzés során kialakuló átlagos átmérője μm -ben).

In silico tüdőmodell

Az *in silico* vizsgálatokat a Wigner Környezetfizikai Laboratóriuma által továbbfejlesztett sztochasztikus tüdőmodell alkalmazásával végeztük, amely a légutakba belélegeztett részecskék transzportját és depozícióját vizsgálja. Kiszámítható, hogy melyik anatómiai régióban tapadnak ki az inhalált részecskék, valamint a kilélegeztett frakció is meghatározható. A számításokhoz egyénre szabott módon adhatók meg adatok a kor, nem és betegség függvényében. A

számításokhoz felhasználtuk a részecskék jellemzőit (sűrűség, alak, aerodinamikai jellemzők) és a beteg légzési mintázatát (belélegzett levegő térfogata, belélegzés ideje, benntartás ideje, kilégzés ideje). Vizsgálataink során krónikus obstruktív tüdőbetegségben szenvedő felnőtt férfi és női betegek légzési paramétereit (belélegzési és kilégzési idő: 1,3-3,2 s, benntartási idő: 5-10 s, belélegzett térfogat: 1700 ml) vettük alapul és az Andersen-féle kaszkádimpaktor modellel kapott eloszlási eredményeket használtuk fel [210–214].

5.5 Sejtkultúra vizsgálatok

A sejt-életképességi vizsgálatokat A549 humán alveoláris epitelsejt eredetű adenokarcinóma sejtvonalon végeztük (ATCC[®], USA, A549 a tüdő adenokarcinóma sejtvonal) és RPMI 2650 nazális epiteliális laphámsejtes sejtvonalon vizsgáltuk. A mintákat eltérő hatóanyag-koncentrációk szerint adtuk a sejttenyészetekhez és az expozíciós idő után a sejtek életképességét MTT teszt segítségével vizsgáltuk. Gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata során *in vitro*, az RPMI 2650 sejteket 6 lyukú lemezre oltottuk 1x10⁶ sejt/lyuk sűrűségben és a legnagyobb nem citotoxikus koncentrációval kezeltük azokat. A kísérlet során az LPS-t, mint gyulladást indukáló anyag használtuk pozitív kontrollként. Az interleukin IL-6 egy citokin, fontos szerepet játszik a gyulladásban, többek között az epiteliális sejtek is termelik. A génexpresszió vizsgálatához valós idejű qPCR-t végeztünk (Bio-Rad CFX96) 5x HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Supermix-szel (Solis BioDyne, Észtország). génexpressziós vizsgálat előtt az amplifikációs specificitás ellenőrzésére olvadásgörbe-elemzést végeztünk.

5.6 *In vivo* mérések

Az *in vivo* vizsgálatokat patkányokon végeztük per os, IV és intranazális beadást követően, igazodva a hatóanyag terápiás dózisához és a testtömeghez. A vérbe és agyba jutott hatóanyag-koncentrációt elemeztük. A vérmintákat heparinizált csövekbe gyűjtöttük, mély izoflurán anesztézia alatt. Az agyszöveteket eltávolítottuk, bal és jobb féltekére osztottuk, tömegüket lemértük és az analitikai vizsgálatig -80 °C-on tároltuk. A kísérleteket az állatokon végzett kísérletekről szóló 2010/63/EU irányelv alapján végeztük, az Állategészségügyi Kutatási Magyar Etikai Bizottság jóváhagyásával (engedélyszám: IV/1247/2017). A minták analitikai elemzése LC-MS-MS technikával történt. A vér-mintákban lévő hatóanyag mennyiségét Agilent 1260 HLPC-vel detektáltuk. Az eredmények alapján *in vitro*–*in vivo* korrelációt (IVIVC) számoltunk Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Egyesült Államok) és Statistica

for Windows (StatSoft GmbH, Németország) alkalmazásával. A mérési eredmények gyűjtése és feldolgozása Xcalibur™ és Quan Browser szoftverek (Thermo Fisher Scientific; Egyesült Államok) alkalmazásával történt.

Plazmakoncentráció - idő görbe a fő paraméterekkel: AUC-görbe alatti terület (0-t, 0 - ∞), C_{max} : csúcskoncentráció, T_{max} : csúcskoncentráció időpontja. A hatóanyag célbajuttatásának hatékonyságát (DTE) a következő képlettel számítottuk: $DTE = \frac{(AUC_{cagy}/(AUC_{vér}))IN}{(AUC_{cagy}/AUC_{vér})IV}$ A DTE értéke $-\infty$ és ∞ között lehet. Az 1,0-nál nagyobb értékek azt mutatják, hogy az intranazális beadást követően a hatóanyag nagyobb mennyiségben jut az agyba, mint IV beadás során. Az egyes állatsoportokhoz tartozó idő (perc) - koncentráció ($\mu\text{g/l}$) görbék AUC-jének kiszámítása PK Solver bővítménnyel, Microsoft Excel (MS Office 2010) alkalmazásával történt.

5.7 Stabilitási vizsgálat

A stabilitás-vizsgálatokat nemzetközi irányelvek alapján terveztük meg (ICH - International Conference on Harmonization Q1A/R2/ - Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2003) Binder KBF 240 (Binder GmbH, Németország) berendezésben. A tesztet 25 ± 2 °C, 40-50-75 \pm 5% RH érték mellett végeztük. A mintavételi időpontok 0. nap és 6 hónap között voltak.

5.8. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést TIBCO Statistica® 13.4. szoftverrel végeztük (Statsoft Hungary, Budapest, Magyarország). A statisztikai szignifikancia meghatározása Student-féle t-teszt szolgált. A változásokat statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$. A statisztikai értékelést a Statistical for Windows programmal végeztük és az eredmények között tapasztalt változásokat egyszempontos varianciaanalízissel határoztuk meg. Akkor tekintettük az értéket szignifikánsnak, ha a p érték $< 0,05$.

A kutatások során alkalmazott kísérleti és vizsgálati módszerek részletes leírása a K1-K32 közleményekben megtalálható. *A sejt kultúrák (Dr Deli Mária és mtsai, Dr Burián Katalin és mtsai), az in silico (Dr Farkas Árpád) és az in vivo (Dr Gáspár Róbert és mtsai) vizsgálatokat kooperációs partnereink valósították meg.*

VI. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az egyes fejezetek bevezetése (összefoglaló táblázat alkalmazásával) előrevetíti az adott kutatási téma meghatározó technológiai és materiális paramétereit, fizikai-kémia és *in vitro* jellemzőket (prediszperziók és optimalizált termék előállítása céljából). A főbb kísérleti eredmények bemutatását követően diszkusszióval kerül lazarásra a fejezet. Az értekezés tézispontok szerinti fő megállapításait a VII. fejezetben foglaltam össze.

6.1 Innovatív szemcseméretcsökkentő eljárások kutatása és fejlesztése. Prediszperziók előállítása és vizsgálata

A gyógyszer technológiai kutatások egyik fő területe a hatóanyagok fizikai-kémiai sajátosságának változtatása a jobb terápiás cél elérése érdekében. Ebben a vonatkozásban a szemcseméretnek, a szemcseméret-eloszlásnak, a hatóanyag oldódási sebességének és permeabilitásának meghatározó szerepe van. Számos eljárás (örlés, kristályosítás) ismert a mikroméretű hatóanyag szemcsék (1-10 μm) előállítására és azok alkalmazhatóságára, viszont az 1-3 μm -es szemcsék hagyományos eljárással történő előállítása nem minden esetben megoldott, a szemcsék aggregációja miatt. Az utóbbi időben azonban a hatóanyagok nanonizálása is a kutatás középpontjába került, ami mind az eljárások, mind a termékfejlesztés szempontjából újabb kihívást jelent a gyógyszeripar számára.

Munkánk célkitűzése tehát olyan **dezintegráló**, száraz/nedves örléses, illetve **integráló**, kombinált precipitációs és oldószer evaporációs eljárások kutatása és fejlesztése volt, ahol az előállított prediszperziók (köztitermék) vizsgálatával határoztuk meg az eljárás kritikus paramétereit, valamint optimalizáltuk a köztitermék összetételét, ami szorosan kapcsolódik a végtermék preformulálásához és a végső gyógyszerforma kialakításához. Az alkalmazott ható- és segédanyagok megválasztásakor figyelembe vettük azok alkalmazhatóságát a gyógyszergyártásban, valamint a terápiás célt és a beviteli kaput is.

6.1.1 Szemcseméretcsökkentés lehetőségeinek tanulmányozása dezintegráló eljárásokkal, mikro- és nanodiszperzió előállítása száraz ko-örléssel és kavitáción alapuló technológiával

A hatóanyagok méretcsökkentése gyakran szárazörléssel érhető el, de a lehetséges méretcsökkentés a részecskék aggregációja miatt 3 μm körülire korlátozódik. Kísérletek történtek arra, hogy a részecskeméretet a mikron alatti régióig csökkentésük additívekkel való

együttes őrléssel. A dezintegráló eljárások szakirodalmát tekintve még kevés cikk található a kombinált eljárásokról, ahol különböző eljárásokkal gyógyszeranyagokat együtt őrltek pl. segédanyaggal. Munkánk során szisztematikusan tanulmányoztuk azokat a materiális és technológiai paramétereket, amelyek befolyásolják a bolygómalomban **száraz ko-őrléssel** előállított hatóanyag nanorészecskék fizikai-kémiai sajátosságait. Modellanyagként a meloxikámot és a lamotrigint választottuk (**8. táblázat**). Őrlést elősegítő segédanyagként pedig amorf és szemi-kristályos polimereket alkalmaztuk: PVP K25, PVP C30, PEG 6000, PEG 20 000, PVA, HA. **A 8. táblázat összegzi az őrlési paramétereket, a prediszpeziók összetételét, valamint az optimalizált termék jellemzőit.**

8. táblázat: Polimerek befolyása a fizikai-kémiai sajátosságokra száraz ko-őrlés optimalizása során

Malom	Száraz ko-őrlés bolygómalomban	
	Fritsch Pulverisette 6 bolygómalom	Retsch PM 100 MA bolygómalom
Dezintegrációs energia	örlő golyók katarakt és kaszkád hatása, nyírás, zúzás, törés, hajsálrepedések mentén	
Őrlőidom	25 db 10 mm átmérőjű golyóval Si ₃ N ₄	10 db 10 mm átmérőjű acél golyóval,
Tégely	80 ml	50 ml
Őrlési idő	2 óra	2 óra
Fordulatszám, rpm	200, 300, 400	200, 300, 400, 600
Hatóanyag	Meloxikám (MEL)	Lamotrigin (LAM)
Kiindulási méret	~40 µm	~8 µm
Segédanyag	PVP K25, PVP C30, PEG 6000, PEG 20 000	PVP K25, PVA, HA
Hatóanyag: segédanyag arány	1:0,5, 1:1, 1:2	1:1, 1:2, 2:1
Kísérlettervezés	COST 3 szinten faktorterv	DoE
Optimalizált összetétel	MEL:PVP C30 (1:1)	LAM:PVA (1:1,5)
Optimalizált paraméterek	400 rpm, 2 h	400 rpm, 1,5 h
Kristályosság	amorf	kristályos (CI-72,45 %)
Méret	140,4±69,2nm	97,46±60 – 140,62±70 nm
Oldódási sebesség	t _{30 perc} =65%	t _{30 perc} =100%
javasolt alkalmazási mód	MEL PEG 6000 (1:2) szemikristályos 173,8 nm±60,3 nm t _{30 perc} =8%	Nazális por forma

A **meloxikám** (MEL) esetében az őrlési eljárás paramétereit faktoriális kísérlettervezéssel optimalizáltuk, amelyek a következők voltak: az alkalmazott polimer típusa, a hatóanyag: polimer aránya (1:0,5, 1:1, 1:2) és az őrlési sebesség (200, 300, 400). Célpáraként jelöltük meg a szemcseméret tartományt (100-500 nm) és a szűk (legkisebb) szemcseméret szórását, amit a relatív standard deviációval (SD%) fejeztünk ki (**K1**).

A bolygómalomban az elsődleges hatás a golyók által kifejtett nagyerejű ütközésből adódik. Az eredmények azt jelezték, hogy ütközés következtében, az őrlendő anyagnak átadott kumulatív őrlési energia [215, 216] 2,85 és 68,50 kJg⁻¹ közötti tartományban volt (**9. táblázat**). Megállapítható, hogy az őrlési energia csökkentése és a termék stabilizálása céljából a meloxicám száraz őrléssel történő nanonizálása során a polimerek alkalmazása elengedhetetlen. A polimerek mennyiségének növelésével az ütközés által átadott kumulatív őrlési energia tovább csökkenthető, amely kíméletes őrlési eljárást eredményezhet.

9. táblázat: Polimerek mennyiségének befolyása az őrlési energiára

Fordulatszám (rpm)	Kollízió frekvenciája (s ⁻¹)	Kumulatív őrlési energia (kJg ⁻¹) Meloxicám:segédanyag arány			
		1:0	1:0,5	1:1	1:2
200	240	8,56	5,71	4,28	2,85
300	360	28,89	19,27	14,45	9,63
400	480	68,50	45,67	34,25	22,83

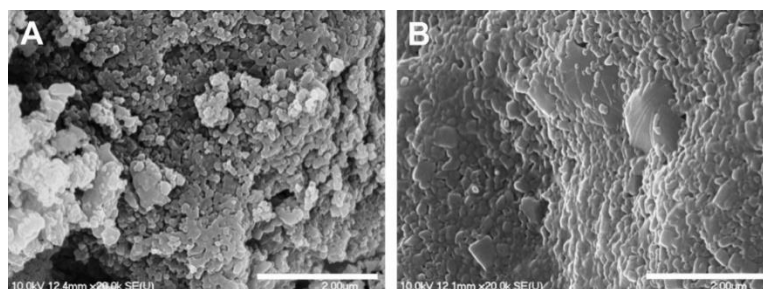
Mivel itt többváltozós rendszerről van szó, ezért az eredmények kiértékeléséhez a COST (Change One Separate factor at Time) megközelítés került alkalmazásra. Az őrlési- és anyagi paraméterek átlagos méretre és SD%-ra gyakorolt befolyását kölcsönhatási diagrammok elemzésével tanulmányoztuk (**K1**).

Az optimalizációs folyamat eredményét a 10. táblázat foglalja össze. Tehát a PVP esetében a nagyobb molekulatömegű (PVP C30), a PEG-t tekintve pedig a kisebb molekulatömegű polimer bizonyult hatékonyabbnak az őrlés szempontjából. Az összehasonlításához feltüntettem a PVP K25 és a PEG 20000 őrlőanyagok befolyását a szemcseméretre és a szemcseméret eloszlásra (SD%), ami jól mutatja a minták közötti különbséget (**10. táblázat**).

10. táblázat: Optimalizált termékek eljárásparaméterienek jellemzői, átlagos részecskeméretük

Őrlőanyag	MEL-őrlőanyag arány	Fordulatszám (rpm)	Részecskeméret (nm)
PVP C30	1:1	400	140,4±69,2
PVP K25	1:1	400	246,4±108,5
PEG 6000	1:2	400	173,8±60,3
PEG 20 000	1:2	400	338,8±151,0

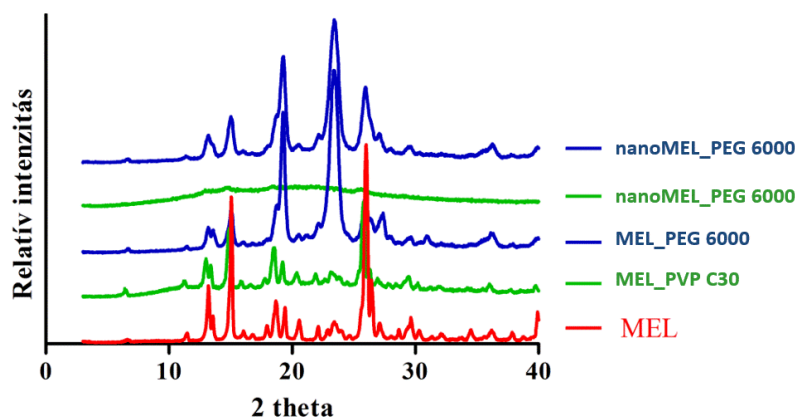
Az optimalizált termékek elektronmikroszkópos képét a **14. ábra** szemlélteti. Látható, hogy PVP C30 polimer jelenlétében a részecskék individualitása megtartottabb, mint PEG 6000 alkalmazásakor.



14. ábra: A nanoMEL_PVP C30 (A) és nanoMEL_PEG 6000 (B) tartalmú minták SEM képe

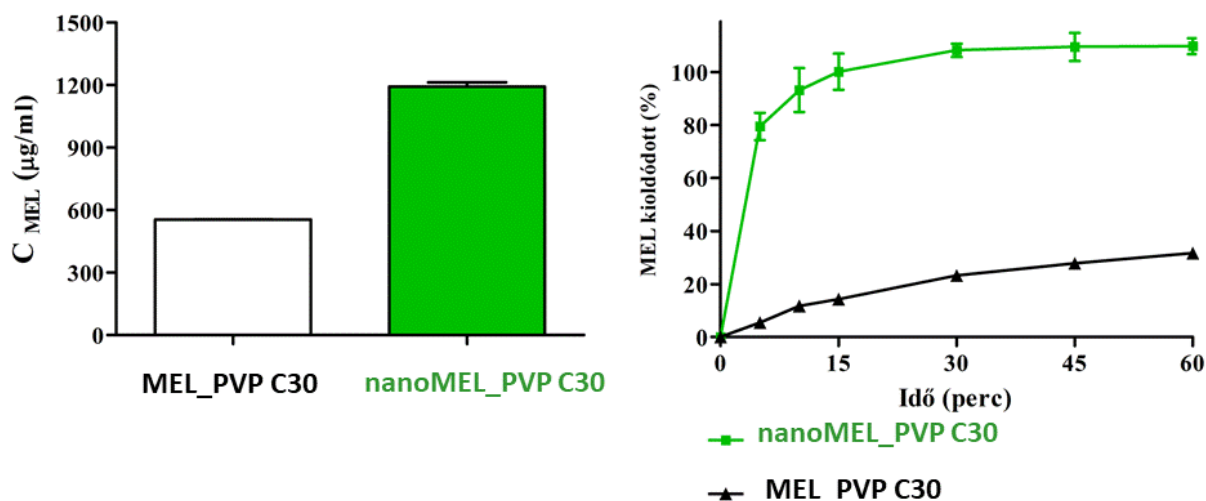
XRPD analízis során arra a következtetésre jutottunk, hogy a meloxicám és a nagyobb molekulatömegű PVP C30 ko-örlése amorf mintát eredményez. A PEG 6000 alkalmazásával pedig a mintákban lévő MEL kristályszerkezete kevésbé törik le, mivel az örlő anyag bevonatot képez a kristályok felületén, kíméletesebb behatást eredményezve.

Kutatócsoportunk további XRPD vizsgálatokat végzett a megjelölt polimerekkel a termékek kristályossági fokának meghatározása céljából [79]. Az eredmények azt mutatták, hogy az eltérő molekulatömegű PVP mintákban levő meloxicám kristályossági foka 10 %-ra csökkent, 2 órás ko-örlést követően. A PEG-ek esetében ez az érték 90 %-nak adódott. Összehasonlítás céljából a hatóanyag és a polimerekkel készült fizikai keverékek XRPD ujjlenyomata is feltüntetésre került (MEL_PVP C30 és MEL_PEG 6000) (**15. ábra**).



15. ábra: A PVP C30 és a PEG 6000 befolyása a nanonizált meloxicám amorfizálására

A kiválasztott PVP C30 és PEG 6000 tartalmú összetételekből a meloxicám kioldódását összevetve megállapítható, hogy a nanoMEL_PVP C30 amorf minta kioldódási sebessége 16-szorosára, míg a kristályos nanoMEL_PEG 6000 mintáé csupán kétszeresére növekedett a fizikai keverékekhez képest. A nanoMEL_PVP C30 minta oldódási tulajdonságait tovább vizsgálva eredményként azt kaptuk, hogy mind a termék oldékonysága (C_{MEL}), mind a kioldódás sebessége megnövekedett (**16. ábra**).



16. ábra: PVP C30 tartalmú fizikai keverék (MEL_PVP) oldékonysága és oldódási sebessége (pH 7,4)

Megállapítottuk továbbá, hogy az őrlés hatékonysága növelhető, a polimer mellett, kristályos segédanyag alkalmazásával. Nifluminsav esetében mannit képezte a kristályos segédanyagot (EK 1). A hatóanyag kristályossági foka megtartott volt. Szemcseméret 80 μm -ről 252 nm-re csökkent. A hatóanyag-felszabadulás mesterséges gyomor- és bélnedvben 90-100 % volt 30 perc alatt ($t_{30 \text{ perc}}$).

Ezt követően másik hatóanyag, a lamotrigin (LAM) esetében tanulmányoztuk azokat az anyagi és technológiai paramétereket, amelyek befolyásolják a bolygómalomban (Retsch PM 100 MA, Retsch GmbH, Németország) száraz ko-őrléssel előállított részecskék fizikai-kémiai sajátságait (K2, K3).

Előzetes vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a hatóanyag és a segédanyagok önmagukban történő 2 órás őrlést követően fizikai-kémiai változást nem mutattak (XRPD, DSC, FTIR jellemzés alapján). LAM megtartotta kristályosságát, PVA szemikristályos, valamint PVP és HA amorf sajátságát. Optikai és elektronmikroszkópos elemzésekkel morfológiai változás és kisebb mértékű méretcsökkenés volt tapasztalható.

QbD szempontokat figyelembe vevő kísérlettervezés és kockázatbecslés alkalmazásával, LAM hatóanyag ko-őrléssel történő szemcseméretcsökkentését optimalizáltuk, ahol segédanyagként PVP K25-t, PVA-t és HA-t alkalmaztunk. A LAM és a segédanyagok különböző arányú porkeverékeit (1:1, 1:2 és 2:1) együtt-őrölve elmondható, hogy a polimerek mindhárom esetben megakadályozták a LAM-részecskék aggregációját, valamint a polimerek és a LAM részecskemérete is csökkent (120-230 nm) az együttőrlés hatására. Az őrlött termékek vizsgálata során látható, hogy önmagában a hatóanyag-segédanyag fizikai keverékhez (PM)

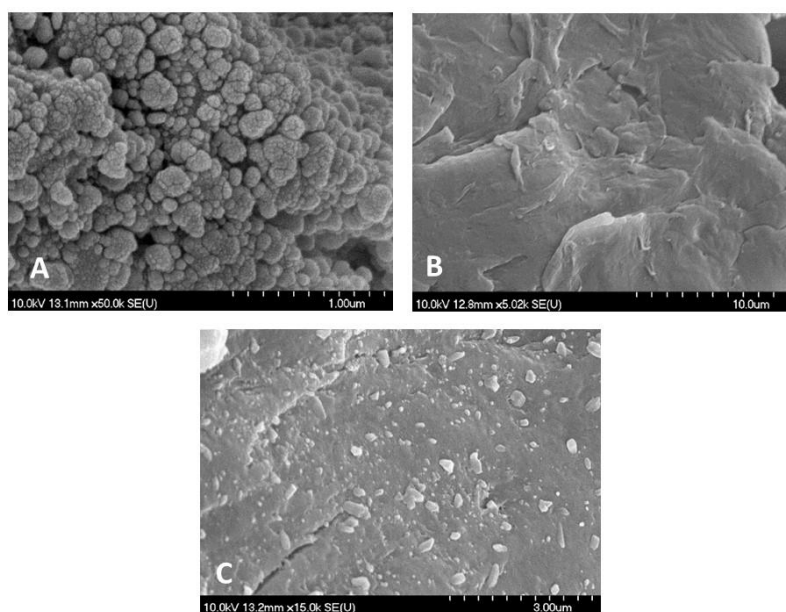
viszonyítva a termékek oldékonysága növekedett a fajlagos felület növekedése által, valamint hidrofil sajátságuk révén oldhatósági és kioldódási paraméterek javultak (**11. táblázat**).

11. táblázat: A minták fizikai-kémiai és *in vitro* sajátságai összevetve a fizikai keverékekkel

Minta megnevezése*	Oldékonyság vízben (mg/ml) T: 25 °C	LAM átlagos mérete a mátrixban (µm)	A termék átlagos átmérője (µm)	%DE 30 perc
PM_LAM_PVP_K25	0,0024 ± 0,0026	7,63 ± 20,07	26,80 ± 7,73	38,65
nanoLAM_PVP K25	0,2848 ± 0,0061	0,121 ± 0,027	13,60 ± 3,32	39,93
PM_LAM_PVA	0,0010 ± 0,0007	13,88 ± 21,15	26,90 ± 6,91	16,09
nanoLAM_PVA	0,1515 ± 0,0152	0,15 ± 0,042	25,33 ± 3,47	91,69
PM_LAM_HA	0,0267 ± 0,0202	26,17 ± 27,68	37,07 ± 14,29	6,69
nanoLAM_HA	0,1059 ± 0,0320	0,23 ± 0,016	16,83 ± 5,37	36,14

DE:Dissolution Efficacy 30 min (oldódás hatékonysága 0-30 perc)

Az R_LAM_PVA minta kiemelkedő oldékonysági és kioldódási eredménye az alábbi elektronmikroszkópos felvétellel (17/C ábra) magyarázható, ahol a hatóanyag nanorészecskék egyediségüket megőrizve, egyenletes eloszlásban helyezkednek el a PVA mátrixban (**17. ábra**).



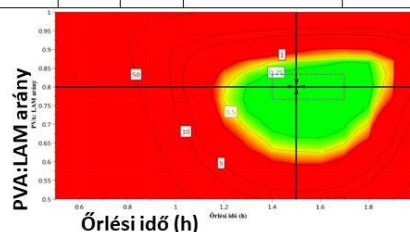
17. ábra: Őrölt LAM (A), Őrölt PVA (B) és R_LAM_PVA ko-őrlemény SEM felvétele 2h Őrlési időt követően

Kijelenthető, hogy a termék minőségét a szemcseméret és annak eloszlása, a ható- és segédanyag típus, azok aránya, valamint az Őrlési paraméterek befolyásolják. Ezen tényezők kiválasztása után (1:1 arányú termékek, nanoméretű hatóanyag, 2 órás Őrlés, 400 fordulatszám) után sikerült ko-őrléssel olyan termékeket előállítani, amelyekben a LAM szemcsemérete 120-230 nm. Szerekezeti vizsgálatokkal igazoltuk, hogy míg a kiindulási

anyagok őrlést követően szerkezeti változást nem mutattak (LAM kristályos állapota megtartott), addig az őrlött LAM_PVP minta teljesen amorf volt, a LAM_HA (50%-ban amorf) és LAM_PVA (72 %-ban kristályos) mintákban a hatóanyag kristályszerkezete letört.

A nanorendszerek és a QbD előnyeinek kombinálásával száraz ko-őrléssel, egylépésben lamotrigin-segédanyag tartalmú termékeket állítottunk elő, mint további formulálásra alkalmas prediszperziókat. A száraz őrléses eljárás optimalizálható DoE módszerrel, amely során meghatároztuk és validáltuk a ko-őrlés Design Space-ét, így kidolgozva idő és anyagfelhasználás szempontjából gazdaságosabb mintaelőállítási módszert, ahol az őrlési időt, fordulatszámot és PVA:LAM arányt jelöltük meg, illetve célértékeket is meghatároztunk méret és kioldódás szempontjából (**18. ábra**). Eredményeink alapján az optimális őrlési idő 1,4 és 1,7 óra, a PVA:LAM arány pedig 0,77 és 0,8 között van, tehát ezen értékek között változtatva a paramétereket mindig megfelelő tulajdonságú termékek állíthatóak elő (18. ábra zöld területe). Az őrlési sebességet állandónak, 400 rpm-nek választottuk meg. A Design Space közepe a 1,5 órás őrlési időnél és 0,8-as PVA:LAM aránynál volt, azonban célunk 100 nm-t meghaladó hatóanyagsemcsék előállításra volt, így az 1,4 órás paraméteregyüttest javasoljuk további felhasználásra szánt minta előállításra.

Jellemző	Paraméterek				Min	Max	Célérték	
Faktor szint	-1	0	+1	Átlagos méret LAM – Y1		350 nm	250 nm	
Őrlési idő (h)- X1	0,5	1	2		Standard Deviáció– Y2		± 200 nm	± 100 nm
Fordulatszám (rpm)- X2	200	300	400		5 perc után kioldódott LAM % – Y3	70 %		85 %
PVA: LAM arány (m/m %)- X3	0,5	0,75	1		10 perc után kioldódott LAM % – Y4	85 %		100 %



18. ábra: A száraz őrléses eljárás optimalizálása során kapott Design Space

Az *in vitro* hatóanyagfelszabadulás és permeabilitás vizsgálatok során az optimalizált mintából gyors és nagymértékű LAM felszabadulást detektáltunk a megnövekedett fajlagos felületnek, illetve a segédanyag nedvesedésfokozó hatásának köszönhetően (**12. táblázat**).

12. táblázat: Design Space felállítása LAM_PVA ko-örlés során

	Örlési idő (h)	Fordulatszám (rpm)	PVA:LAM arány	Y1- Átlagos LAM szemcseméret (nm)	Y3- Kioldódott LAM mennyiség 5 perc után (%)
Ko-örlemény 1 (P1)	0.6			521,42±310	71,24±3,19
Ko-örlemény 2 (P2)	0.9			212,77±150	61,06±6,03
Ko-örlemény 3 (P3)	1.0			198,71±120	64,67±6,14
Ko-örlemény 4 (P4)	1.1	400	0,8	143,36±80	77,04±3,00
Ko-örlemény 5 (P5)	1.2			124,18±60	66,20±3,33
Ko-örlemény 6 (P6)	1.3			140,62±70	63,69±3,48
Ko-örlemény 7 (P7)	1.5			97,46±60	80,48±3,66

Igazoltuk, hogy 400 rpm, 90 perc örlési idő, 0,8 segédanyag:hatóanyag arány esetén a megnövelt és nedvesített fajlagos felület pillanatszerű hatóanyagfelszabadulást eredményezett.

Az optimalizált nanonizált porkeverék stabilitását tekintve (15 °C, 50 % RH) elmondható, hogy a habitusa, szerkezete és *in vitro* sajátságai a terméknek megtartott (**13. táblázat**) (**EK2**).

13. táblázat: A nanonizált LAM termék részecskeméret-elemzésének eredményei stabilitási vizsgálat során (25 ± 2 °C, 50 ± 5% RH, ICH Q1A)

	A termék átlagos mérete (µm)	t-érték	p-érték	Szignifikancia
1. nap	29,91±15,85	-0,1435	0,8883	n.s.
3. hónap	28,48±12,81	0,2994	0,7690	n.s.
6. hónap	26,52±11,14	0,9064	0,3801	n.s.
	LAM átlagos mérete (nm)			
1. nap	97±60	1,2382	0,2347	n.s.
3. hónap	105±77	0,7934	0,4408	n.s.
6. hónap	120± 84	-0,0408	0,9687	n.s.

Az n.s. rövidítés jelentése, nem szignifikáns

Diszkusszió

Hatóanyagok bolygómalomban acél örlőgolyókkal végzett szemcseméretcsökkentése (nanonizálása) általában hosszú ideig tartó nagy mechanikai behatást igényel, ami a hatóanyag kristályos szerkezetének letörését is eredményezheti. A malomban fellépő adhéziós és kohéziós erők aggregációhoz, esetenként agglomerációhoz vezetnek. Ezért olyan ko-örülő anyagokra van szükség, amelyekkel a műveleti paraméterek optimalizálhatók, a keletkezett nanoszemcsék egyedisége megtartható, valamint a kristályszerkezet letörésének mértéke is befolyásolható. Méretcsökkentés szempontjából az alkalmazott polimerek (PVP, PVA, PEG, HA) közül a PVA

és PVP megfelelő ko-örülő segédanyagoknak bizonyultak, mind a két hatóanyag vonatkozásában. A száraz prediszperzió további feldolgozása alapján (gyógyszerforma, beviteli kapu, biofarmáciai háttér) javasoljuk azokat az optimalizált termék összetételeket definiálni, amelyek kioldódási és permeabilitási *in vitro* eredményekkel is alátámasztják a kedvező sajátságokat.

Meloxicám és Lamotrigin **nanorészecskék (100-500 nm) előállíthatóak polimerekkel történő száraz ko-örléssel. MEL esetében a PVP C30 bizonyult eredményes ko-örülő anyagnak.** Megállapítottuk, hogy az **örlési energia csökken a segédanyag arányának növelésével**, illetve alacsony fordulatszám alkalmazásakor, amely meghatározó lehet hőérzékeny hatóanyagok esetében. Igazoltuk, hogy a **segédanyag típusa és mennyisége a méreten túl a habitust és kristályosságot is befolyásolja.** Az eleve amorf sajátságú PVP jól stabilizálja a szerkezetet és a hatóanyag amorf karakterét. A szemikristályos polimer (PVA) alkalmazásával készült termék DE értéke 90% körül van (11. táblázat). Ezzel szemben a PVP K25 DE értéke csak ~ 40%. Örlés hatására a segédanyagok morfológiai struktúrája változik, az amorf sajátságú PVP és a szemikristályos PVA örölt struktúrájában a nanoméretű hatóanyag szemcsék eltérő módon rendeződnek.

Megállapítottuk, hogy a **kritikus minőségi paraméterek (CQA-k)** közül a szemcseméret és annak eloszlása, illetve a hatóanyag felszabadulása, míg a kritikus gyártási folyamat-paraméterek (CPP-k) esetében a LAM:segédanyag arány, valamint az örlési idő és sebesség a legkritikusabb paraméterek a nanorészecskék előállítás során. **Design Space validálásával költség és időhatékony módon mintaelőállítási módszert optimalizáltunk.**

Az optimalizált termékekből a nanoMEL_PVP C30 és nanoLAM_PVA jelzésű összetétel bizonyult a legjobbnak (8. táblázat), a hatóanyag oldékonysága és oldódási sebessége, permeabilitása egyaránt megnövekedett, ezáltal alkalmasak lehetnek intranazális formák kialakítására.

Tézispontok: T1-T3

Tézisekhez kapcsolódó közlemények: K1-K3 (IF: 2,08+2,935+2,367=7,382), EK1, EK2

6.1.2 Szemcseméretcsökkentés lehetőségeinek tanulmányozása dezintegráló eljárásokkal, mikro- és nanoszuszpenzió előállítására kombinált nedves ko-örléssel és kavitáción alapuló technológiákkal

A segédanyag jelenlétében történő száraz ko-örlés mintájára nedves ko-örléssel is foglalkoztunk mechanikai és kavitációs erőhatások befolyását tanulmányozva. A **14. táblázat** prezentálja azokat a technológiai paramétereket, optimalizált prediszperziókra és nanoszuszpenzióra jellemző sajátságokat, amelyek a mechanikai és kavitációs örlés során kiemelhető.

14. táblázat: Nedves örléses eljárások összegzése

	Mechanikai örlés		Kavitációs örlés
	Nedves ko-örlés	Szónikus	Hidrodinamikai
Kivitelezési mód	<i>bolygómalom örlőgyönggyel (Retsch PM100)</i>	<i>statikus/dinamikus UH (Hielscher S200)</i>	<i>nagynyomású homogenizátor (Avestin Emulsiflex C3)</i>
Dezintegráló energia	súrlódás, nyírás gyöngyök ütközési/törési hatása	ultrahang hullám keltett kollapszus	hidrodinamikai kavitáció
Technológiai paraméterek	idő, gyöngytömeg	térfogat, pozíció, rpm, frekvencia, idő, hőmérséklet	ciklusok száma, idő, hőmérséklet
Anyagi paraméterek	hatóanyag és segédanyag koncentrációja		
Hatóanyag	meloxikám	meloxikám	meloxikám
Segédanyag	PVA (M _w 27 000)	PVP K25, Poloxamer, Tween 80, Solutol HS 15	PVP K25, PEG 4000, Poloxamer
Kísérlettervezés	faktoriális tervezés 3 szinten (idő, rpm)	faktoriális tervezés	DoE kísérlettervezés
Optimalizált összetételű prediszperzió	1% MEL-0,5% PVA	0,2 % MEL-0,5% PVP	0,75 % MEL-1% Poloxamer
Optimalizált eljárási paraméterek	prediszperzió-gyöngy arány (1:1 (m/m), az örlő tégely fordulatszama (437 rpm) és örlési idő (43 perc)	statikus: 70% Amplitúdó, 25 ml térfogat, 30 perc szonikálás, 0,75-ös pozíció, 36 °C dinamikus: 70% Amplitúdó, 25 ml térfogat, 30 perc szonikálás, 50 rpm, 36 °C	UH 10 perc 70 % HPH 2 ciklus 500 bar HPH 20 ciklus 1000 bar
Kristályosság	18% (X _c)	kristályos (100% -X _c)	kristályos (100% X _c)
Méret	126-140 nm	10-14 µm	463 nm
Oldódási sebesség	t ₃₀ =82 %		t ₃₀ =100 %
Javasolt alkalmazási mód	per os és nazális bevitel	-prediszperziók előállítása -mikronizálás	per os bevitel

Új megoldásként a bolygómalmot (Retsch PM 100 MA) kombináltuk a gyöngymalomban használt örlőtesttel (0,3 mm átmérőjű ZrO₂ gyöngyök), s újszerű **nedves ko-örléses** eljárást fejlesztettünk. Azt vártuk, hogy az örlőgyöngy kis átmérőjének és a

bolygómalom nagy mechanikai behatásának köszönhetően az újszerű őrlési technika reprodukálható prediszperziót eredményez. Meg kell jegyezni, hogy az őrlendő nedves massa tömény szuszpenzió, ami a hatóanyagot és a gyöngyöket is tartalmazza. Az őrlési idő végén a szuszpenziót tízszeresére hígítottuk, majd a gyöngyöket 150 μm -os szitával eltávolítottuk. A hígított szuszpenzió képezte a prediszperziót, mint közti terméket.

Első lépésként tanulmányoztuk a hatóanyag **vizes diszperziójának** őrlését 0-90 perc időtartamban (10 % hatóanyagtartalom, 400 rpm, 50 ml őrlőtégelyben) 0/10/20/50/150g gyöngytömeg jelenlétében. **Megállapítottuk, hogy a gyöngytömeg 20 g felett már nem fokozta az őrlés hatékonyságát, valamint az őrlési idő növelése a hatóanyag aggregációját idézte elő. Azonban kijelenthető, hogy 10 perces őrléssel már mikronizált minta állítható elő (15. táblázat).**

15. táblázat: MEL szemcseméret-megoszlása és specifikus felülete (SSA) 20 g gyöngytömeg esetén vizes diszperziós közegben

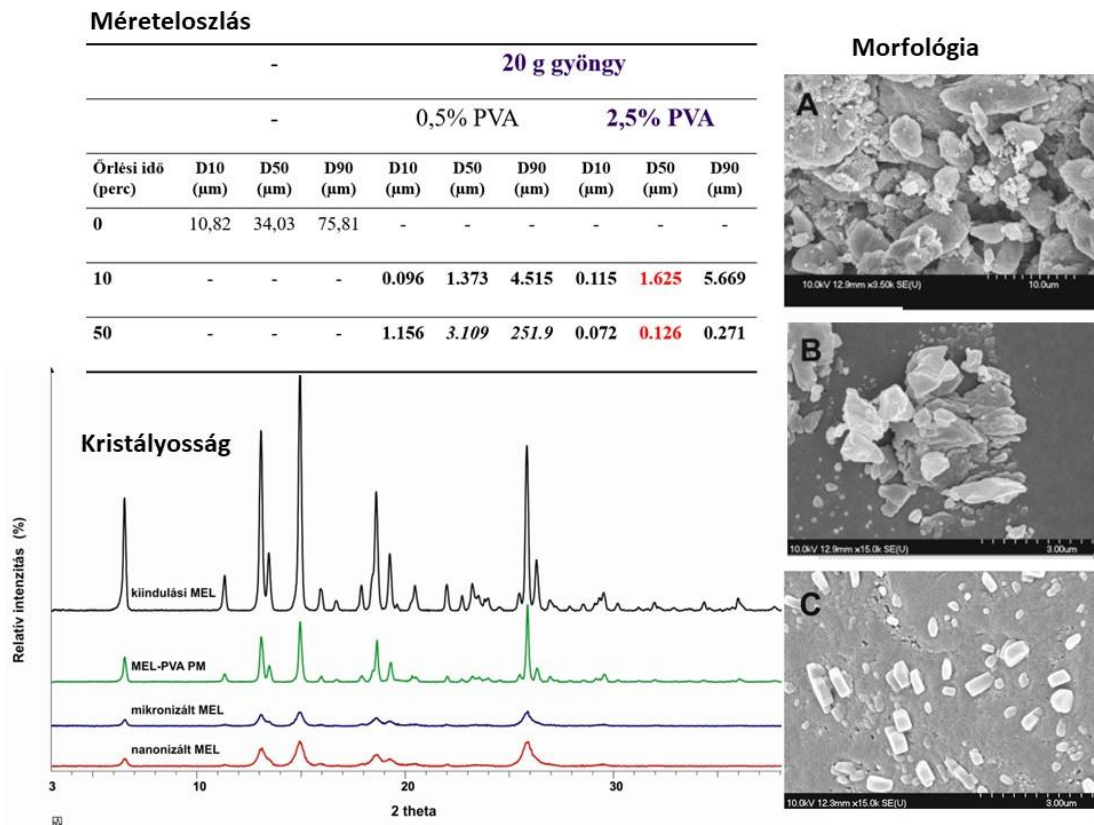
Őrlési idő (perc)	D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)	SSA (m^2/g)
0	11,40	34,26	73,59	0,332
10	1,76	3,55	8,69	1,89
50	2,72	6,13	19,56	1,15
90	2,51	5,55	18,88	1,25

Az aggregáció gátlása és a további méretcsökkentés elérése céljából polimer jelenlétében, állandó fordulatszámon az **őrlési időnek, a gyöngytömegnek és a segédanyag koncentrációnak szemcseméretcsökkentő hatását vizsgáltuk.** Megállapítottuk, hogy az őrlési időtől függően mikronizált (nanorészecskék aggregátuma, szabálytalan morfológia-10 perc) és nanonizált (szabályos, síma felszínű részecskék-50 perc) hatóanyagot tartalmazó prediszperzió állítható elő (**16. táblázat**). **PVA az őrlés hatékonyságát növeli, stabilizálja a prediszperziót.** Az őrlési idő növelésével a kristályszerkezet letörését idéztük elő, 10 perc után döntően kristályos, majd 50 percet követően az amorf szerkezet dominál (**K4**). A kezelés során a hatóanyag kristályossági foka lecsökkent (kb. 33%-a maradt kristályos), amelyet szerkezeti vizsgálatokkal igazoltunk (X_c).

16. táblázat: MEL szemcseméret-megoszlása 0, 10 vagy 20 g gyöngytömeg esetén 2,5%-os PVA-oldat diszperziós közegben

Örlési idő (perc)	0 g gyöngy			10 g gyöngy			20 g gyöngy		
	D10 (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)	D10 (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)	D10 (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)
0	11,40	34,260	73,590	11,400	34,260	73,590	11,400	34,260	73,590
10	10,199	26,616	52,668	0,255	2,934	10,940	0,115	1,625	5,669
20	9,239	25,285	55,202	0,108	1,254	4,775	0,070	0,151	1,951
30	11,207	28,768	54,147	0,080	0,151	2,156	0,068	0,140	1,223
40	8,585	23,848	45,489	0,069	0,146	1,667	0,070	0,135	0,729
50	7,871	24,025	50,346	0,068	0,143	1,280	0,072	0,126	0,271
60	5,203	14,269	27,548	0,068	0,141	1,082	0,069	0,129	0,295
70	5,161	15,047	29,542	0,067	0,135	0,618	0,070	0,131	0,292
80	8,966	25,478	47,930	0,067	0,135	0,538	0,068	0,127	0,288
90	5,805	17,627	34,196	0,069	0,132	0,317	0,068	0,126	0,277

A **19. ábra** szemlélteti, hogy a PVA koncentrációjának csökkentése (2,5%-ról 0,5%-ra) nem védte meg a hatóanyag részecskéket az aggregációtól, nanomérettartomány nem érhető el. Elmondható, hogy viszkózusabb PVA-oldat az örlés hatékonyságát növeli. A szemcseméretcsökkentés, illetve a 2,5 % PVA jelenléte gyors hatóanyagfelszabadulást eredményezett *in vitro* (82 % 30 perc elteltével) körülmények között (**K4**).



19. ábra: A kombinált ko-örlés hatása a meloxicám fizikai-kémiai sajátosságaira (A-kezeletlen, B-10 perces örlés, C-50 perces örlés)

Az előző eredmények alapján további célul tűztük ki **az eljárási paraméterek optimalizálását** (3^3 faktoriális terv), a folyamat robusztusságának előrevetítését, valamint a PVA mennyiségének (2,5-7,5 %) optimalizálását. **Kritikus eljárási paraméternek** tekintettük a hatóanyag és a gyöngy arányát a prediszperzióban, ami az optimalizáció során 1:1 (m/m) adódott, továbbá az őrlési időt (43 perc) és az őrlő tégely fordulatszámát (437 rpm). Az őrlés robusztusságának meghatározásánál figyelembe kell venni, hogy a hatóanyag mennyiségének növelésével az őrlő gyöngyök mennyisége csökkenthető, ezzel a hatóanyag kristályossága is kontrollálható. A 200-szoros szemcseméretcsökkenés (~130-135 nm) igazolja az eljárás hatékonyságát, amely előőrlés és felületaktív anyag nélkül, PVA jelenlétében valósult meg (**17. táblázat**).

17. táblázat: Őrlési paraméterek (prediszperzió:gyöngy arány) optimalizálása

	Prediszperzió és gyöngyök mennyiségének aránya (w/w)			
	1:0,5	1:1	1:2	1:4
	Szemcseméret (D50) (µm)			
10 perc	4,015±0,060	2,426±0,029	2,383±0,016	0,149±0,030
30 perc	0,293±0,008	0,145±0,007	0,190±0,003	0,137±0,006
50 perc	0,202±0,003	0,140±0,004	0,140±0,002	0,130±0,004

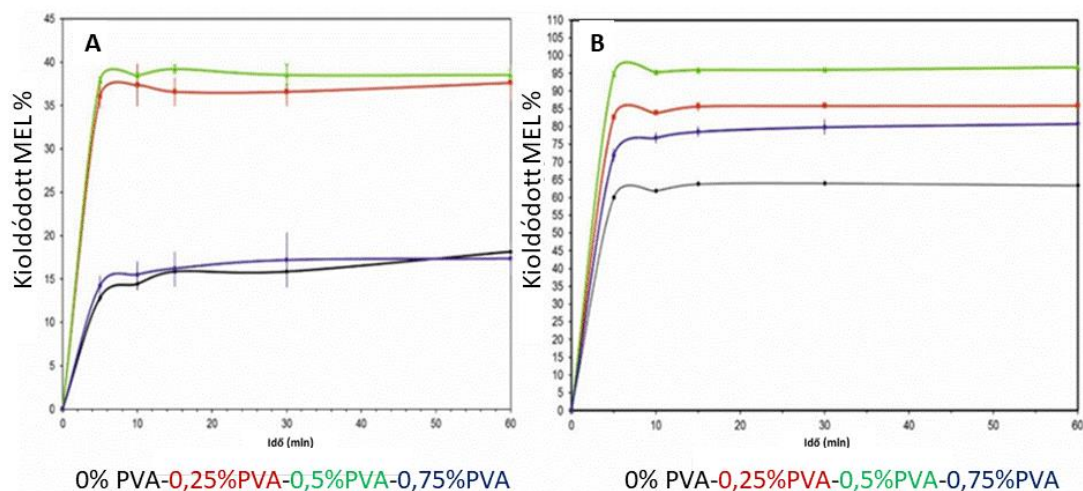
Megállapítottuk, hogy kis PVA koncentráció esetén (< 4%) az őrlés hatékonysága nem megfelelő, kevésbé érvényesül a gyöngyök ütközési/törési hatása. Nagy PVA koncentrációnál (> 5%) szintén csökken a hatékonyság, mivel a szemcsék felületén képződő polimer film gátolja azok fragmentálódását. Figyelembe véve az eredményeket, 5% PVA tartalom bizonyult megfelelőnek a kívánt szemcseméret kritérium eléréséhez (D90 < 500 nm). A prediszperziót szilárd fázisú terméké alakítottunk (**18. táblázat**).

18. táblázat: Őrlési paraméterek és PVA mennyiségének optimalizálása, hatása a stabilitásra és a kristályosságra

	D10 (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)	Zeta Potencial (mV)	Kristályosság (%)
MEL PVA 0%	2,508±1,100	5,762±2,700	135,640±12,900	-30,7	100
MEL PVA 0,25%	0,070±0,001	0,150±0,009	1,478±0,004	-20,9	75,82
MEL PVA 0,50%	0,067±0,001	0,130±0,005	0,371±0,010	-16,1	51,44
MEL PVA 0,75%	1,235±0,006	2,611±0,018	5,560±0,070	-15,7	13,43

Az eredmények azt mutatták, hogy maga a mechanikai hatás nem változtatta meg a polimer oldatok viszkozitását, így a PVA láncok szerkezete nem változott az őrlés során. Tehát a PVA koncentrációja hatással van a diszperziók viszkozitására, a MEL szemcseméret-eloszlására és a részecskék elektrokinetikai sajátságára (zeta potenciál) (18. táblázat), valamint a termék stabilitására. Az *in vitro* kioldódási vizsgálatok pedig igazolták, hogy a MEL

szemcsemérete és kristályossági foka egymással összefüggő és a kioldódási profilra nagy hatást gyakorló paraméterek (20. ábra).



20. ábra: A PVA mennyiségének befolyása a MEL *in vitro* kioldódási sebességére mesterséges gyomornedvben (A) és mesterséges bélnedvben (B)

Megállapítottuk, hogy rövid műveleti idővel, hatékonyan történhet a MEL nanonizálása, valamint 5 % PVA és 10 % meloxikám koncentrációval mellőzhető volt egyéb felületaktív anyag jelenléte az őrlés során.

Az intermedier (prediszperzió) stabilitása/stabilizálása: a MEL és a PVA között nem volt kimutatható interakció, bomlásra utaló jel sem volt látható (FT-IR). A MEL homogén eloszlást mutatott a különböző PVA tartalmú diszperziókban. Felületaktív anyag nélkül is megtartották a szemcsék az egyediségüket (RAMAN vizsgálat). A termék 2 hétig stabilnak bizonyult, tehát ez idő alatt alkalmas a végtermék/gyógyszerforma előállítására (K5).

A prediszperzió stabilizálása megoldható szilárd hordozó felületére történő rögzítéssel is pl. szárító eljárások alkalmazásával. A nanoszuszpenzió szilárd formává történő transzformálása például liofilezéssel (374 nm, 40,11 % kristályos frakció) trehalóz alkalmazásával vagy fluidizálással (144 nm, 12,98 % kristályos frakció) mikrokristályos cellulóz jelenlétében új lehetőséget jelent a nanorészecskék stabilizálására, továbbá lehetővé teszi szilárd gyógyszerformák előállítását (pl. por, tablettá, kapszula). Az *in vivo* állatkísérletekkel bizonyítottuk, hogy a nanonizált hatóanyag a szilárd termékekből passzív transzcelluláris transzport által gyorsan felszívódik a gyomor barrieren keresztül. A fluidizált és liofilezett termékek biohasznosulása a nanonizált MEL értékének ötszöröse volt, szájon át történő bevitel esetében. Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok közötti szoros korreláció igazolja a nanoszemcsék hordozó felületéről történő gyors oldódását majd a telítési koncentráció gyors

elérését mind mesterséges gyomornedvben, mind pedig az állat gyomrában (**K6**). Megállapítottuk, hogy 6 hónapos szobahőmérsékleten történő tárolás után a nanoszuszpenziót tartalmazó szárított termékek mérete és kristályossági foka nem módosult.

Az őrlés robusztusságának meghatározásához figyelembe kell venni, hogy az őrlő gyöngyök mennyisége csökkenthető a hatóanyag mennyiségének növelésével, valamint ezzel a hatóanyag kristályossága is szabályozható. Ebben az esetben a DSC módszer javasolt a kristályossági fok meghatározására, mivel a nagy amorf tartalom esetében ez a módszer biztonságosan alkalmazható [217].

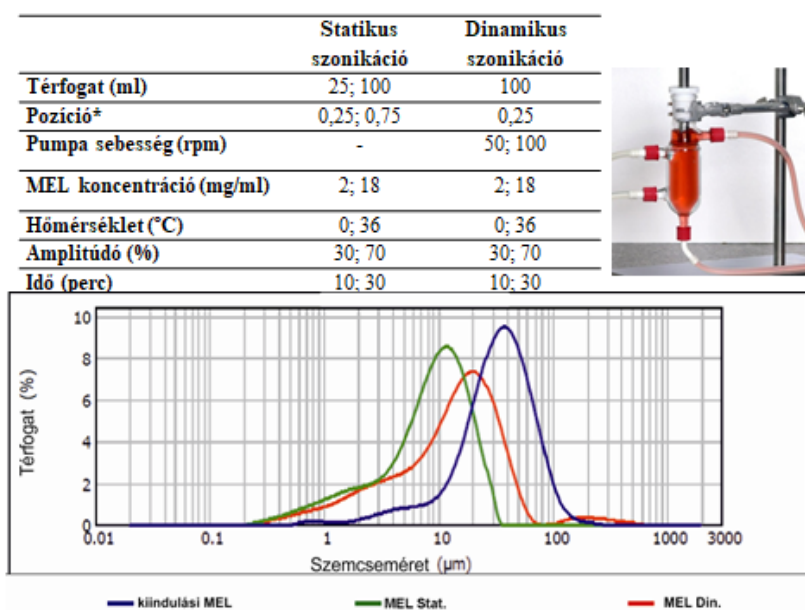
Következő munkánkban tanulmányoztuk a szintén nedves őrlésnek számító **szonikus kavitáció** szemcseméret-csökkentő hatását ultrahang hullám által keltett kollapszus létrehozásával. Mivel az irodalomban elsősorban kristályosítási folyamatok hatékonyságát támogató eljárásként mutatták be, esetleg elő-őrlésként alkalmazták korábban [218], így **szervesoldószer-mentes dezintegráló technikaként újdonságot hordozhat magában.** Az elővizsgálatok során a statikus szonikációt (Hielscher 200 W Ultrasound system, Németország) alkalmaztuk ibuprofen (IBU) és meloxikám (MEL) hatóanyagok esetében, ahol optimalizáltuk az eljárási paramétereket és az összetételt (hőmérséklet, amplitúdó, szonikációs idő és segédanyag típusa/mennyisége) (**19. táblázat**). A hatóanyagok kiindulási szemcseméretéhez képest a kavitáció hatására szemcseméret-csökkenést tapasztaltunk, de **további méret-csökkentéshez segédanyagra (PVP K25, Poloxamer, Tween 80), hőmérsékletcsökkentésre és nagyobb amplitúdóra volt szükség** (IBU–Poloxamer: D50 = 11 μm ; MEL–PVP: D50 = 4 μm). Megállapítottuk, hogy statikus szonikációval, **segédanyag jelenlétében** a vizsgált hatóanyagok esetében **mikrométer tartományba** csökkenthető azok szemcsemérete (**K7, EK3**).

19. táblázat: Az előkísérletek paraméterei

	Folyamatparaméterek
Hőmérséklet (°C)	25 ; 18
Amplitúdó (%)	30; 50; 70
Idő (perc)	10; 20; 30
Koncentráció (m/v%)	1; 0,25 (IBU)
	0,5; 0,25 (additív)

A **statikus és a dinamikus** (szonikálás közben duplafalú áramlási cellában folyamatosan cirkuláltatott minta) **módon megvalósuló szonikáció** összehasonlításánál az eljárási paramétereket *faktoriális kísérleti terv* alapján optimalizáltuk (fő- és kereszthatások monitorozásával). A szonikációs idő (30 perc), az amplitúdó (70%), a hőmérséklet (36 °C) és

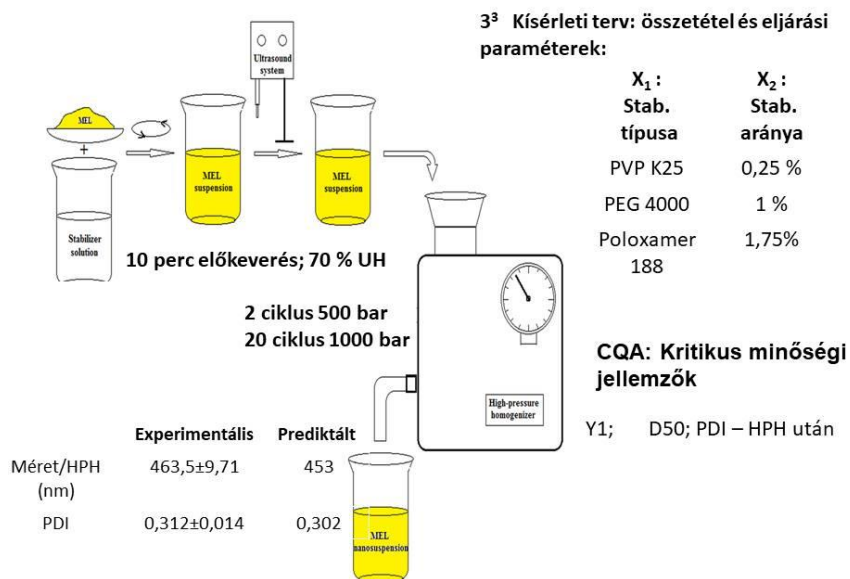
az alacsony hatóanyag-koncentráció (2 mg/ml) meghatározó szerepet játszott a szemcseméret-csökkentés szempontjából (**21. ábra**). Az optimalizált paraméterekkel előállított mintákban a MEL morfológiai sajátságai változtak, a **szonikáció kerekded, mikroméretű részecskéket** eredményezett. A hatóanyag kristályos szerkezete a kezelés hatására nem változott meg, bomlás nem történt. **A szonikáció elsősorban a hatóanyagok mikronizálására alkalmas**, azonban diszperziós közeg igénye nagy, ezért kevésbé ajánlott közti termék előállítására. Az eljárás **kíméletes nedves őrlésként** jellemezhető, amely kristályos mikrorészecskéket eredményez (**K8**).



21. ábra: A statikus és dinamikus szonikáció paramétereit

Pre-szonikálás, mint elő-őrlési eljárás és hidrodinamikai kavitáció (nagy nyomású homogenizálás (HPH), Avestin Emulsiflex C3, Kanada) alkalmazásával DoE metodikával optimalizált meloxikám-tartalmú nanoszuszpenziót állítottunk elő, ahol kiemeltük a stabilizáló szer típusának és koncentrációjának fontosságát a hatóanyag kioldódási sebessége szempontjából (**22. ábra**).

A stabilizálószernek biztosítaniuk kell a hidrofób felületek nedvesítését és az agglomerációs folyamat aktiválási energiájának növelését, ezáltal képesek annak mértékét is befolyásolni. Kísérleti tervvel **optimalizáltuk** az előállítás minden lépését.



22. ábra: Eljárás folyamatai, technológiai és anyagi paramétereit

Először 10 perc szonikálással (dezintegráló előkezelés), stabilizáló segédanyagokkal nedvesítettük a kezelendő MEL-t. mikroszuszpenziókat (D50: ~6 µm), mint prediszperziókat állítva elő. Majd nagynyomású homogenizálással paraméterek optimalizálásával értük el a kívánt, szubmikronos mérettartományt (20. táblázat).

A vizsgálni kívánt szinteken, azaz a -1 és +1 szinten kívül a szoftver középszintű kísérleteket rendel hozzá, de a kvalitatív tényezők közül csak kettőhöz, a Poloxamer-hez és a PVP-hez.

20. táblázat: Kavitáció és segédanyagok befolyása a szemcseméretre

	D50 (µm) UH 10 perc	D50 (nm) HPH	PDI HPH
MEL	13,65	-	-
MEL PVP 0,25%	5,92	496,80	0,412
MEL PVP 1%	5,98	609,63	0,290
MEL PVP 1,75%	8,28	780,83	0,461
MEL Polox 0,25%	6,49	700,86	0,460
MEL Polox 1%	5,68	463,50	0,312
MEL Polox 1,75%	6,28	503,43	0,384
MEL PEG 4000 0,25%	6,53	854,06	0,631
MEL PEG 4000 1,75%	14,34	1125,00	0,793

A 463 nm-es szemcseméretet tartalmazó prediszperzió stabilizálását fagyasztva-szárítással (VirTis Advantages Plus SP Scientific, USA) mannit krioprotektánsal végeztük. Tanulmányoztuk a stabilizátorok és a krioprotektáns hatását és egy optimalizált összetételt

állítottunk elő (preformuláció) tervezési tér segítségével, ahol a szemcseméret és a polidiszperzitási index a legalacsonyabb értékkel rendelkezik (477-1232 nm, PDI: 0,29-0,88). Az optimalizált összetétel javasolható orodiszperz liofilizátumok fejlesztésére. A készítmény optimalizálásakor azt a polimert választottuk, amely az orodiszperz készítmény esetén szükséges mechanikai szilárdságot és gyors MEL-oldódást eredményezett. Mivel a **Poloxamer meghatározó méretcsökkentést biztosított, miközben megőrizte a MEL kristályosságát, ezért az optimalizált készítményhez ezt használtuk fel**, amely végül 1% Poloxamert és 5% mannitot tartalmazott a fagyasztva szárítás előtt. Az optimalizált készítmény, 3,33 másodperc alatt szétesett, és 2 perc elteltével a MEL 77,14%-át szabadította fel. A minőségi tervezés (QbD) biztosította a gyógyszerforma minőségét és az előállítási folyamat megértését, megfelelő alkalmazását (**K9**).

Diszkusszió

Az értekezésben bemutatott nedves közegű, módosított mechanikai és kavitációs őrlésen alapuló eljárások kíméletesek, ipari léptékben is megvalósíthatóak. Előnyként emelhető ki a **rövidebb őrlési idő alkalmazása, kíméletes kezelés (minta hőmérséklete 60 °C alatt), szerves oldószer, illetve felületaktív anyag-mentes módszer és aggregációgátlás biztosítása** védőpolimerekkel (**innovatív technológia**) megvalósítható. Eljárásonként szemléltettük a méretcsökkentést eredményező behatás jellegét, a kritikus technológiai és anyagi paramétereket, illetve optimalizálást (faktoriális terv, DoE) szemcseméret szempontjából. Megállapítottuk, hogy minden esetben segédanyag alkalmazására van szükség.

Az órlőgyöngyök használatával módosított nedves őrlés kritikus paramétereinek a prediszperzió-gyöngy arány, őrlési idő és a polimer koncentráció tekinthető. A hatóanyag kristályossága az őrlési idő változtatásával kontrolálható, nanoméret elérése (~140 nm) kristályszerkezet nagyméretű letörését (X_c :16%) eredményezte. Az ultrahangos kavitáció által kristályos mikropartikulomok képezhetők az amplitúdó, szonotrod pozíció és szonikálási idő kontrolálásával, míg a hidronamikai kavitáció ennél hatékonyabbnak bizonyult. A DoE kísérlettervezés alapján Poloxamer-rel stabilizált 460 nm-es prediszperzió állítható elő.

A gyógyszer technológia területén preformulálás és formulálás során alkalmazható **prediszperziók kombinálhatók szárítási folyamatokkal**, amelyek közül példaként említettünk néhányat. Ez új lehetőséget jelent a nanoszuszpenzió szilárd formává történő transzformálására, kiváltképpen az amorf részecskék stabilizálására, továbbá lehetővé teszi felületaktív anyag alkalmazása nélkül is kiváló biohasznosulású szilárd fázisú termék

előállítását, ami fontos szempont bizonyos betegcsoportok esetében pl. a gyors fájdalomcsillapítás elérése céljából (**innovatív termék**).

Tézispontok: T4-T6

K4-K9 (IF: 2,861+3,208+3,216+1,005+2,154+3,466=15,91), EK3

6.1.3 Nanotechnológiai eljárások tanulmányozása integráló eljárások alkalmazásával

Az utóbbi néhány évben kerültek igazán gyakorlatba a hatóanyag **oldatából történő precipitációra épülő technikák**, illetve **eljárás-kombinációk** habitus változtatása, illetve hatóanyag-felszabadulás, permeabilitás fokozása céljából. **Szonikus**, illetve **hidrodinamikai kavitációt** alkalmaztuk **mikro- és nanoprecipitáció** indukálásra (kombinált eljárás) **meloxicám és loratadin, valamint** gemfibrozil **modellanyagok** és stabilizáló segédanyagok bevonásával. A szerves oldószer evaporáció megvalósítása alternatív technológiákkal további lehetőséget jelent a hatóanyag szemcsék preformulálása területén (**nifluminsav**). Továbbá az integráló folyamatok közül a szerves oldószer-mentes szemcséképzés, a **nano porlasztvaszáritás** emelhető ki, amely eljárást megfelelő habitusú részecskék formulálása céljából alkalmaztuk (**meloxicám**).

6.1.3.1 Kombinált precipitációs eljárások

Célunk volt a munka folyamán nano-, illetve mikrométerű szemcsék felépítése, oldószer-diffúzió, valamint az „oldószer-antioldószeres kicsapás”-os eljárások tanulmányozása, paraméterek optimalizálása folyamatos energiaközlés biztosításával, különböző modell anyagok alkalmazásával (**21. táblázat**). Továbbá az előállított prediszperziók stabilizálása száritási eljárásokkal.

21. táblázat: Kombinált precipitációs eljárások alkalmazása modell hatóanyagoknál

	Meloxicám	Loratadin
Precipitációs eljárás	oldószerdiffúzió	oldószer-antioldószer
Energiaközlés	nagynyomású homogenizátor, HPH (Emulsiflex C3) szonikálás (Hielscher S200 UH)	szonikálás (Hielscher S200 UH)
Kiindulási méret	34 µm	4,6 µm
Op	256 °C	135 °C
Vízoldékonyság	4,4 µg/ml	3,03 µg/ml
Prediszperzió előállítása	oldószerdiffúzió: etilacetát vagy benzilalkohol	oldószer-antioldószer: etanol-víz
Energia közlése	PVP K25, Tween, Poloxamer 800 Bar 10 perc HPH vagy 6 perc szonikus kavitáció	Poloxamer, PVP K25 30 perc szonikus kavitáció
Összetétel	MEL_Tween/Poloxamer	LOR_Poloxamer
Optimalizált eljárás paraméterek	800 Bar 5-5perc HPH vagy 6 perc szonikus kavitáció	30 perc szonikus kavitáció
Prediszperzió stabilizálása	porlasztva-szárítás fagyasztva-szárítás (trehalóz)	fagyasztva-szárítás (trehalóz)
Méret	500 nm	350-450 nm
Kristályosság	amorf	amorf
Oldódási sebesség	t ₃₀ =100%	t ₃₀ =40%

Oldószer-diffúziós módszerrel **meloxicám** nanoszuszpenzió előállítását befolyásoló összetétel és eljárás-paramétereket tanulmányoztuk. Az energiaközlés módja (hidrodinamikai kavitáció nagynyomású homogenizátorral (HPH) és szonikus kavitáció, nagyintenzitású ultrahanggal (UH)), az oldószer (etilacetát, benzilalkohol) és stabilizáló típusa és mennyisége (Tween 80, Poloxamer 188, PVP K-25) alapján 300-800 nm-es szemcséket tartalmazó diszperziókat képeztünk. A 22. táblázat mutatja be ezek alapján, hogy további felhasználás céljából 0,5 % Tween 80 és Poloxamer 188 stabilizálók jelenlétében, oldószer-diffúzió és kavitáció kombinálásával 300-600 nm-es meloxicám részecskéket állítottunk elő, amelyek kialakulását az oldószer típusa nem befolyásolta. Tehát **a stabilizálószer nagyobb koncentrációban történő alkalmazása meghatározó** tényezőnek számít precipitációs eljárások esetében (22. táblázat).

22. táblázat: Segédanyag típusának és mennyiségének befolyása a részecskeméretre, PDI-re

Segédanyag koncentrációja:	0.2%		0.5%	
	Méret (nm)	PDI	Méret (nm)	PDI
Etil acetát				
Tween 80	864,6±117,90	0,414±0,33	788±17,30	0,732±0,42
Poloxamer 188	704,1±14,60	1	595,5±21,90	0,541±0,38
PVP K-25	Kicsapódás	-	Kicsapódás	-
Tween 80 + Poloxamer 188 (1:1)	599,3±30,40	0,730±0,43	799±45,60	0,304±0,28
Tween 80 + PVP K-25 (1:1)	705,7±41,20	0,452±0,50	895,8±99,10	0,577±0,39
Benzil alkohol				
Tween 80	406,0±11,30	0,823±0,10	294,5±28,30	0,495±0,20
Poloxamer 188	300,7±3,30	0,363±0,17	292,9±2,80	0,188±0,16
PVP K-25	604,9±57,40	0,578±0,22	605,6±116,90	1
Tween 80 + Poloxamer 188 (1:1)	430,3±6,50	0,502±0,34	416,4±13,90	1
Tween 80 + PVP K-25 (1:1)	509,6±18,40	0,898±0,18	382,1±38,70	0,655±0,38

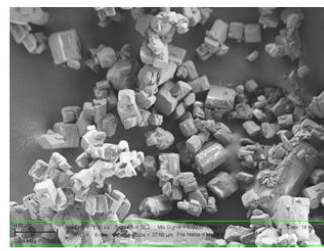
Megállapítottuk továbbá, hogy a prediszperzió stabilizálása során liofilezéssel (LIO) és porlasztással (SPD) (hordozóként trehalózt alkalmazva) előállított szilárd fázisú minták közel azonos méretű 500 nm-es kristályos szerkezetű szemcséket eredményeztek, 100%-os hatóanyagfelszabadulással az első 10 percet követően pH 7,4 pufferben (23. táblázat).

23. táblázat: Nanoméretű MEL tartalmú szárított minták és referencia termékek méreteloszlása

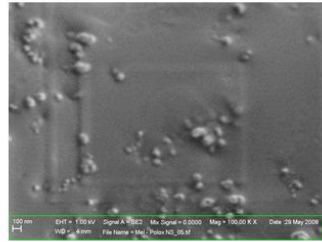
	d (µm)		
	D10	D50	D90
MEL	24,80 ± 2,94	85,39 ± 6,63	237,92 ± 28,44
Porlasztott SPD-NS	0,14 ± 0,09	0,46 ± 0,23	2,71 ± 0,91
SPD-REF	5,62 ± 3,18	42,00 ± 6,21	50,00 ± 4,37
Liofilizált LIO-NS	0,17 ± 0,04	0,53 ± 0,11	3,60 ± 1,26
LIO-REF	22,83 ± 2,15	59,17 ± 3,44	68,87 ± 1,06

NS:nanoszuszpenzió

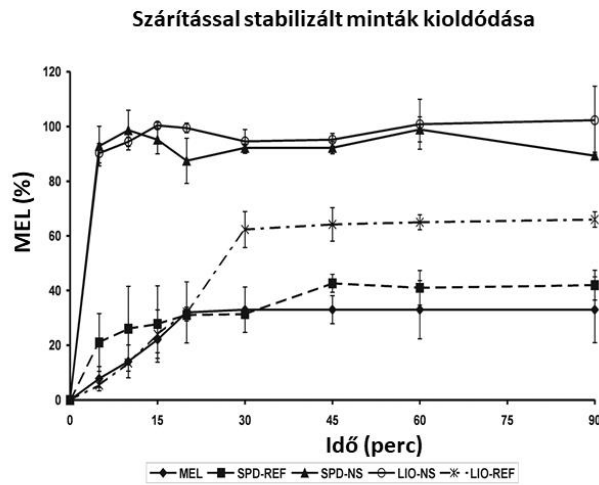
A szárítás típusa a termék morfológiáját igen, de a végtermék kioldódási profilját nem befolyásolta. Továbbá jól látható, hogy az azonos összetételű, kezelésmentes fizikai keverékből (referencia, REF) időben elhúzódva kisebb koncentrációban szabadult fel a hatóanyag (23. ábra) (K10).



Kiindulási MEL



MEL nanorészecskék a szárított pre-diszperzióban



23. ábra: Szilárd fázisú nanodiszperzió in vitro kioldódási profilja

A szonikálással asszisztált precipitáció folyamatának tanulmányozása, az alkalmazott paraméterek beállítása meghatározó a minta-előkészítés során, különösen a hőmérséklet, pH és időtartam vonatkozásában [219]. Ezek a paraméterek befolyásolják a részecske habitusának módosítását. A szonikálási idő növelésével a részecskeméret-csökkentés hatékonysága nő. A hőmérséklet kontrol fontos paraméter alacsony olvadáspontú hatóanyagok esetében (a gemfibrozil alacsony olvadáspontú, 61 °C, ezért fizikai állapota változhat). Az oldószer-diffúziós módszerrel együtt alkalmazott energiaközlés során ezért hőmérséklet-kontrollra van szükség. A pH változása megváltoztatja a gemfibrozil, GEM oldhatóságát. Etilacetát jelenlétében és hosszabb ideig (10 percig) végzett ultrahangos kezeléssel a pH 6-ról 3,5-re csökkent. Előkísérletek után a hőmérsékletet kontrolálva az eljárás a hatóanyag olvadáspontja alatt valósult meg folyamatonként 7,5 percig 30 % amplitúdóval működő szonikálás mellett (Hielscher UP 200S Ultrasonic processor, Németország). GEM esetében alkalmazott oldószer-diffúziós módszernél 2 ml etilacetát oldószerben 500 mg hatóanyagot feloldva, majd 15 ml 0,5% PVP K25 vizes oldatot használva emulziót képeztünk, amelyből ezt követően 33 ml vízzel elegyítve precipitáltattuk a hatóanyagot.

Megváltoztattuk a kiindulási anyag méretét és morfológiáját a szárítási eljárásnak megfelelően (porlasztva-szárítás, liofilezés, mannit hozzáadásával) amorf vagy kristályos szerkezetű, kerekded, mikornizált (D50- 2,89 μm) vagy tús nagyobb méretű (D50- 38,30 μm)

szemcséket képeztünk az általános 65 µm-es GEM részecskékből. A nedvesedési vizsgálat eredményei alapján elmondható, hogy a vízzel felvett peremszög-értékek csökkenését, a polaritás 47%-ra történő növelését eredményeztük, amely a mikronizált minta hidrofíli karakterét tükrözi. Az *in vitro* kioldódási vizsgálatok esetén a pH 1,2 pufferben a mikroméretű termék 58%, míg pH 6,8-on 100% hatóanyagfelszabadulást eredményezett az első 15 percen **(K11, K12)**.

Hatóanyagok oldatból történő precipitálásával, folyamatos energiaközlés alkalmazásával adott habitusú mikro- és nanorészecskék képezhetők nifluminsav modellanyag használatával **(EK4)**.

Oldószer-antioldószeres ultrahang-precipitálás alkalmazását tanulmányoztuk **loratadin** (LOR) tartalmú nanoszuszpenziók (LNS) előállítására céljából, ahol a szemcseméretet, a polidiszperzitási indexet, a zéta-potenciált, az oldódási sebességet jelöltük meg kiemelten fontos kritikus minőségi jellemzőként. Valamint a hatóanyag, a stabilizátor(ok) típusa és koncentrációja, az oldószer:antiszolvens arány, illetve az ultrahangos kezelési idő, a hőmérséklet és a teljesítmény, mint kritikus eljárási paramétereket (CPP) optimalizáltuk. Az előkísérletek alapján etanolt alkalmaztunk szerves oldószerként, míg stabilizátorként PVP K25, HPMC, Poloxamer kerültek kiválasztásra. A **24. táblázatban** feltüntetett előállítási paraméterek befolyásolták a nanorészecskék képzését, valamint a szemcseméretet.

24. táblázat: Kritikus eljárás paraméterek

Precipitáció			Szonikálás, UH kezelés				Liofilizálás						
Oldószer:antioldószer arány			Hőm (°C)	Idő (perc)		Amplitudo (%)		Hőm (°C)	Idő (h)	P (mbar)			
1:20	1:40	1:60	4	25	10	20	30	50	70	100	-40	36	0,01

Megállapítottuk, hogy a LOR kiindulási szemcseméretét (4,6 µm) a precipitáció, illetve 0,2 % PVP, valamint HPMC alkalmazása nem befolyásolta. Azonban 0,2% Poloxamer stabilizáló hatása elegendő volt ahhoz, hogy 246 nm-es szemcséket képezzünk. A Poloxamer koncentrációjának növelése kismértékben szemcseméret-növekedést eredményezett. Igazoltuk, hogy a hatóanyagtartalom csökkenése (100-75-50 mg) szintén szemcseméret-növekedést okozott (LNS 10, 11, 12). Felületaktív anyag és nagyobb koncentrációjú polimer együttes alkalmazásával a diszperzió ZP értéke, ezáltal a stabilizálása javítható **(25. táblázat)**.

25. táblázat: Segédanyagok befolyása az átlagos méretre, PDI és ZP értékekre

	LOR (mg)	Stabilizáló típusa	Stabilizó (% w/v)	Átlagos méret (nm)	PDI	ZP (mV)
LOR	100	-	-	4607,5±41,7	0,71±0,18	-7,7±5,28
LNS1	100	PVP-K25	0,2	4900±71,98	0,98±0,028	-13,4±4,02
LNS2	100	HPMC	0,2	4212±14,14	0,767±0,18	-11,9±4,51
LNS5	100	Poloxamer	0,2	246,5±1,83	0,133±0,03	-6,5±3,98
LNS6	100	Poloxamer	0,4	288,3±37,33	0,104±0,01	-6,4±4,45
LNS7	100	Poloxamer	0,6	325,4±28,20	0,198±0,01	-12,1±5,91
LNS10	50	Poloxamer+PVP K25	0,2+0,2	306,7±14,97	0,158±0,11	-27,8±5,08
LNS11	75	Poloxamer+PVP K25	0,2+0,2	276,5±2,69	0,108±0,02	-4,8±4,11
LNS12	100	Poloxamer+PVP K25	0,2+0,2	253,4±1,27	0,123±0,01	-11,1±4,89
LNS13	100	Poloxamer+PVP K25	0,2+0,4	265,6±20,79	0,122±0,03	-18,1±3,85
LNS14	100	Poloxamer+PVP-K25	0,2+0,6	307,25±7,28	0,166±0,01	-23,6±5,07

LNS: LOR tartalmú nanoszuszpenzió

A megjelölt összetételek „holding time” értéke 7 nap (276-294 nm). A fagyasztva-száritott minták (DLN) rediszpergálást követően kismértékben tapasztaltunk szemcseméret-növekedést (353-441 nm). A szerkezeti és termikus vizsgálatok azt mutatták, hogy a fagyasztva-száritási módszer kiemelkedően befolyásolta a minta tulajdonságait, amorfizációt eredményezve. A száritott nanorészecskék oldékonysága javult, fokozott felszabadulást mutattak a kiindulási hatóanyaghoz képest, az amorf karakternek és a nagy fajlagosfelületnek tulajdoníthatóan (**26. táblázat**) (**K13**).

26. táblázat: Oldékonysági és *in vitro* adatok (DE-kiodódási hatékonyság, MDT- átlagos kioldódási idő)

Minta	pH 7,4 (µg/ml)	víz (µg/ml)	%DE30	MDT (perc)
LOR	0,49±0,001	2,22±0,001	3,309	16,439
PM1	1,87±0,008	2,13±0,001	13,567	6,615
PM2	4,26±0,011	7,06±0,024	8,873	16,882
DLN5	4,57±0,063	12,17±0,007	36,662	5,0185
DLN12	3,90±0,008	19,11±0,045	27,153	0,514
DLN13	4,19±0,001	34,26±0,004	32,876	1,218

(DLN= fagyasztva-száritott minta, PM1= DLN5 összetétel fizikai keveréke; PM2= DLN13 összetétel fizikai keveréke)

Diszkusszió

Nanoprecipitációs eljárásokat vizsgáltunk hasonló logP és pKa értékekkel rendelkező, gyenge vízoldékonyságú, illetve jó permeabilitási sajátságú hatóanyagok esetében, amelyek olvadáspontja különböző (62/256/135 °C). Az előzetes oldhatósági vizsgálatok megjelölt szerves oldószerekben befolyásolják a hatóanyag alkalmazható koncentrációját. A szemcseméretcsökkentő eljárások során befolyásolhatók a kristályosodási folyamatok, mint például a gyors primer göcképződés, a kristályméret csökkentése, a monodiszperz

méreteloszlás biztosítása, a morfológia változtatása és az aggregáció gátlása segédanyagokkal. A hatóanyag molekulák diffúziója lassú, ezáltal a stabilizálók gyors felületi adszorpciója révén a nukleáció sebessége nő, míg a kristálynövekedés gátlása következik be. A segédanyagok közül PVP és Poloxamer alkalmazását javasoljuk 0,2-0,2 %-ban a formulációk összetétel tervezéséhez, ezáltal a hatóanyag szempontjából ~300 nm-es szemcséket tartalmazó szuszpenzió előállítása biztosítható. A rövid „holding time” (7 nap alatt) következtében szárítási eljárások alkalmazására van szükség, amely nagyobb stabilitást, jobb feldolgozhatóságot, ám kismértékű méretnövekedést és amorfizációt eredményezhet.

Tézispont: T7

K 10-13 (IF:2,962+1,394+3,516+3,532=11,404), EK4

6.1.3.2 Új lehetőségek az oldószer evaporációs eljárások területén Gyors oldószer evaporáció kiváltása „alternatív” energiák közlésével

Hatóanyagok nanonizálásának egyik újszerű lehetősége alternatív energiák bevitelével végbemenő folyamatok eszközöské pl. elektroporlasztásos, hideg plazma szintézissel vagy mikrohullámmal asszisztált kristályosítás.

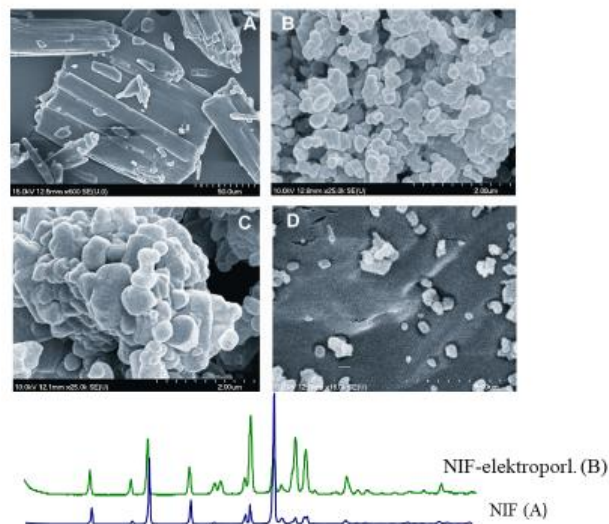
27. táblázat: Új megoldások összegzése szervesoldószer gyors elpárologtatására

	Elektro-porlasztás	Plazma-szintézis	Mikrohullám
Előállítási paraméterek	$\Delta U=4.7$ kV; $c=20$ mg/ml-aceton, $d=0,33$ mm áramlás: 1,8ml/h T: 25 °C	$\Delta U=3.7$ kV; $c=20$ mg/ml-aceton, frekvencia: 10kHz argon gáz áramlási seb: $\varphi:11$ L /m T: 40-70 °C	Powder: 150W/300 W $c=20-48$ mg/ml- etanol Precipitációs idő: 1.4/2.8 sec T: 120-150 °C
Hatóanyag Szemcsemérete, morfológia	~200-800 nm koncentrációfüggő: tús v. szférikus	~400-1000 nm szférikus	~200- 25 000 nm szférikus
Stabilizálás	Mannit-Poloxamer felületen	Mannit-Poloxamer felületen	PVP mátrixban/ felületen
Kristályosság	kristályos (85%)	kristályos (80%)	amorf
Oldódási sebesség	$t_{30}=60\%$	$t_{30}=90\%$	$t_{30}=60\%$

Mivel ezen „alternatív” energiák alkalmazása új lehetőséget jelent gyógyszeranyagok szubmikronos méretcsökkentésére, vizsgáltuk alkalmazhatóságukat (27. táblázat). **Kritikus**

paraméterek a kapilláris-geometria, koncentráció, feszültség-különbség, fokozott kohézió, a preformuláláshoz segédanyag szükséges (mannit-poloxamer).

Munkánk következő motivációja a precipitációs eljárások továbbfejlesztése volt **alternatív energiaforrások** használatával, a meglévő módszerek újragondolása és új (költséghatékony és gyors) lehetőségek megnyitása céljából, gyenge vízdékonyságú nifluminsav (NIF) modellhatóanyag (D50: 80 μm) alkalmazásával. **Elektromos térben végbemenő oldószer evaporációs módszereket** tanulmányoztunk (elektroporlasztás, plazmaszintézis, mikrohullám-evaporáció). Hatóanyagok nanonizálásának egyik új lehetősége az elektroporlasztásos precipitáció, illetve a hideg plazma szintézis, amelyek során magas feszültség vagy plazma generálásával oldószer elpárolgatás eszközölhető, miközben a képződött cseppek elektromos feltöltése (Coulomb-robbanás) megy végbe. Az elektroporlasztásos és plazmaprecipitációt leginkább befolyásoló paraméterek a fúvóka átmérője (d), az áramlási sebesség (φ), a kezdeti oldat koncentráció (c), a feszültség különbség (ΔU), a kapilláris és a földelt tálca távolsága (D). Az elektroporlasztásos eljárás esetén a hatóanyag acetonos oldatát alkalmazva, vizsgáltuk a koncentráció (10-20-30 mg/ml), a fúvóka átmérő (**0,33 mm** és 0,41 mm), a feszültség különbség (**+4,7 kV**, +4kV) és az áramlási sebesség (**1,8 ml/h**, 2,2 ml/h) befolyását a keletkezett szemcsék méretére és morfológiájára. A megjelölt eljárási paraméterekkel 500 nanométeres szférikus kristályokat kaptunk (24. ábra).

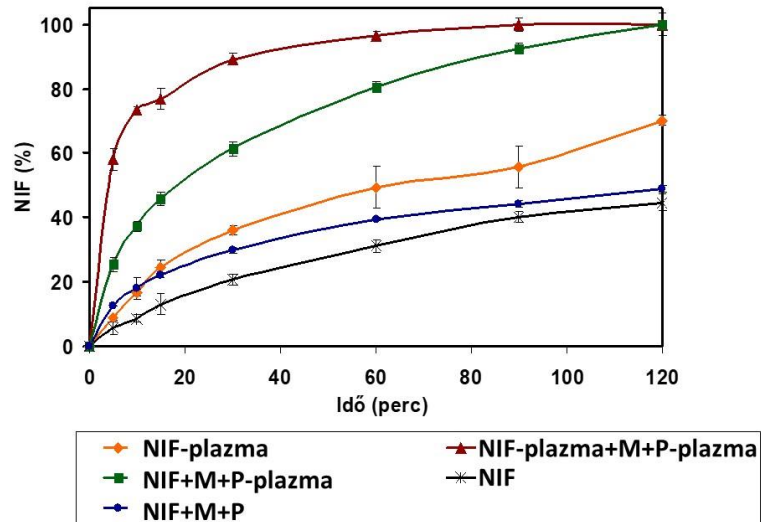


24. ábra: Elektronmikroszkópos felvételek kezeletlen nifluminsav (A), elektroporlasztott aggregátumok (B, C) és hordozó felületén elosztatott de-aggregált nanokristályok (D); XRPD mintázat

Összehasonlítottuk az elektroporlasztásos eljárást hagyományos kristályosítási eljárásokkal. Referenciaként a hatóanyag acetonos oldatát (20 mg/ml) elegyítettük vízzel

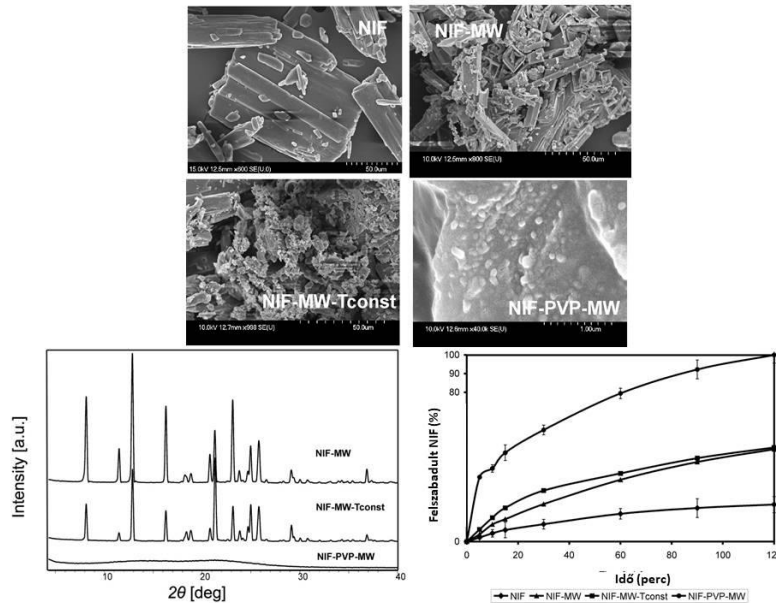
(24 000 rpm, 10 perc IKA Staufen, Németország), így **oldószer-antioldószeres** módszerrel 7,4 μm -es tús kristályokat, míg **oldószer elpárologtatásával** (HM Dryer MH915020, Siemens, Németország) 46,2 μm -es tús kristályokat kaptunk. Szerkezeti vizsgálatokkal (FTIR, XRPD) igazoltuk, hogy a folyamat során kémiai változás nem történt. Azonban formulálás szempontjából kiemelendő, hogy a kohéziós erők által a nanorészecskék kb 30 μm -es aggregátumokba „rendeződtek” (**24. ábra**) és ezáltal az *in vitro* kioldódási sebesség a kezeletlen anyaghoz képest nem javult. Ezért 10 perces Turbula keveréssel segédanyag (NIF:mannit:Poloxamer, 1:2,5:0,25 tömegarányban) felületére vittük fel a szemcséket de-aggregálás céljából. Ennek következtében a kioldódási sebesség háromszorosára fokozódott az első harminc percet követően összevetve a kezeletlen hatóanyaggal, a nanoaggregátummal és NIF:mannit:poloxamer keverékekkel foszfát pufferben pH 1,2 vizsgálva (**K14, K15**).

Atmoszférikus nyomáson végzett hideg plazmaszintézis szintén egy új lehetőség ható- és segédanyagok szemcseméretének csökkentésére. Al_2O_3 kerámia lapon (amelyet 20, egymással összekapcsolt platina szalag borít) elektromos kisülés hozható létre a nagy feszültségnek köszönhetően (Xantrex XFR 600-4 generátor, Spellman SL-1200 + 10 kV USA váltóáram). A hatóanyag oldatát (20 mg/ml NIF acetonban) 70 mm hosszú fűvókán keresztül 2 bar nyomáson nebulizer porlasztja (4,5 ml/perc) be a plazmareaktorba ($\Delta U=3.7$ kV; $c=20$ mg/ml-aceton, frekvencia: 10 kHz, argon gáz áramlási sebesség: $\varphi:11$ L/m). Az eljárás során 400-1000 nm tartományban kristályos szemcsék keletkeztek. Poloxamer 188 segédanyag acetonos oldatát is kezeltük külön a reaktorba, ezáltal 1-3 μm -es részecskéket képezve (P-plasma). Majd 10 perces Turbula keveréssel segédanyag (NIF:mannit:Poloxamer+1:2,5:0,25 tömegarányban) felületére vittük fel a szemcséket de-aggregálás céljából. Az *in vitro* kioldódási vizsgálatot pH 1,2 közegben végezve elmondható, hogy a kezeletlen hatóanyag, az aggregálódott nanorészecskék és referencia fizikai keverék 20-30% hatóanyagfelszabadulást, míg a mikronizált Poloxamert és nanonizált hatóanyagot tartalmazó keverékből 90% hatóanyagfelszabadulást detektáltunk 30 perc elteltével (**25. ábra**) (**K16**).



25. ábra: Hideg plazmaszintézissel előállított, valamint NIF és a NIF-mannit+Poloxamer minták kioldódási vizsgálata eredménye pH 1,2 közegben

Laboratóriumi mikrohullámú szintetizáló berendezéssel (CEM Discover) hatóanyagra nézve 20 mg/ml etanos oldatból evaporációval amorf nifluminsav nanorészecskéket (200 nm) állítottunk elő. Vizsgáltuk az energiaközlés mértékeinek (150 és 300 W / 120 és 180 °C), a koncentrációnak és a precipitációs időnek (2,8 és 1,4 sec) szemcseméretre gyakorolt hatását. A 300 W-os mikrohullámú kezelés során hőmérséklet kontrollal 180 °C helyett 70 °C-ot tudtunk biztosítani (T const). Ez alapján 25 illetve 17 μm -es átlagos méretet értünk el. Azonban gyors energiaközlés (1,4 másodperc oldószer párolgási idő) hatására, illetve PVP segédanyag használatával (NIF-PVP-MW) 200 nm-es szemcsék épültek fel, a hatóanyag amorf formában van, amely szerkezeti sajátosság a PVP mátrix stabilizálásnak köszönhetően hosszútávon megtartott (12 hónap). Az első harminc percet követően 60 % hatóanyag felszabadulás érhető el (**26. ábra**) (**K17**).



26. ábra: Mikrohullám-indukálta nanoprecipitáció eredményeinek összefoglalása

Oldószer elpárologtatás nano porlasztva-szárítással

A porlasztva-szárítás az egyik legelterjedtebb, jól ismert integráló eljárás a gyógyszeriparban, amellyel szabályozott méretű és morfológiájú részecskék állíthatók elő, akár szerves oldószer használata nélkül. Lehetővé teszi szilárd fázisú termék előállítását még hőérzékeny vegyületek felhasználásával is.

A **nano porlasztva-szárítás** új, hatékony módszer a gyógyszerek biohasznosíthatóságának növelésére, mivel a nanorészecskék nagy fajlagos felülettel rendelkeznek méretükhöz képest, amely megnövekedett oldhatóságot és jobb felszívódási sebességet eredményezhet. A BÜCHI Nano Spray Dryer B-90 laboratóriumi méretű berendezés alacsony mintaigénnyel üzemeltethető, amely 0,2-5 μm mérettartományba eső (szub)mikronos részecskéket állít elő. Célunk az volt, hogy **egy lépésben, integráló eljárással** használatra alkalmas (további formulálást nem igénylő) szilárdfázisú inhalációra szánt terméket állítsunk elő.

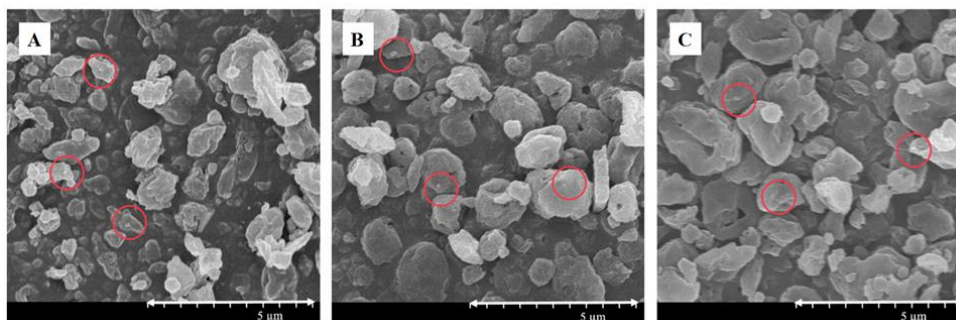
A következőkben nanoszuszpenzióból történő szemcseintegrálás eredményeit összefoglalom. A kiindulási MEL hatóanyag szemcseméret-csökkentését korábban optimalizált nedves őrléssel végeztük el (**K5**). Bolygómalomban (Retsch Planetary Ball Mill PM 100 MA) cirkónium gyöngyök jelenlétében őrltük a hatóanyagot, stabilitást biztosító polivinil-alkohol (PVA) vizes oldatában szuszpendálva. A porlasztást 4,0 μm -es porlasztófej átmérő, 100%-os levegőáramlás, 80 °C-os szárító hőmérséklet alkalmazása mellett végeztük.

Nanoszuszpenzióból kiinduló ko-porlasztásnál Leucint (LEU) alkalmaztunk különböző koncentrációban (0-0,5-1%) a porlasztás során segédanyagként a diszperzításhoz javítása céljából (28. táblázat).

28. táblázat: Az őrölt prediszperzió és a nano porlasztva-szárított minták szemcseméreteloszlása, Span és SSA értékei

Minta	D 10 (µm)	D 50 (µm)	D 90 (µm)	Span	SSA (m ² /g)
prediszperzió (MEL_PVA)	0,067 ± 0,001	0,138 ± 0,005	0,555 ± 0,310	3,584 ± 2,056	43,65 ± 5,318
Nanospd (MEL1_PVA_LEU0)	0,441 ± 0,004	1,168 ± 0,004	6,770 ± 1,722	5,422 ± 1,488	6,600 ± 0,028
Nanospd (MEL1_PVA_LEU0.5)	0,659 ± 0,017	1,307 ± 0,036	2,854 ± 0,430	1,677 ± 0,296	5,185 ± 0,064
Nanospd (MEL1_PVA_LEU1)	0,789 ± 0,017	1,429 ± 0,088	3,400 ± 0,503	1,586 ± 0,116	4,385 ± 0,007

A 27. ábra SEM felvételei és adatsorai mutatják, hogy a porlasztott termékek mérete extrafinom tartományban található 1,1-1,4 µm, amelyben amorf, nanoméretű MEL szemcsék aggregátuma található. A segédanyagok mennyisége befolyással bír a fizikai-kémiai sajátságokra (oldékonyságfokozás, stabilizálás). A 21-24 mV ZP-értékek a nanoméretű részecskék szuszpenzióban lévő stabilitását támasztják alá.

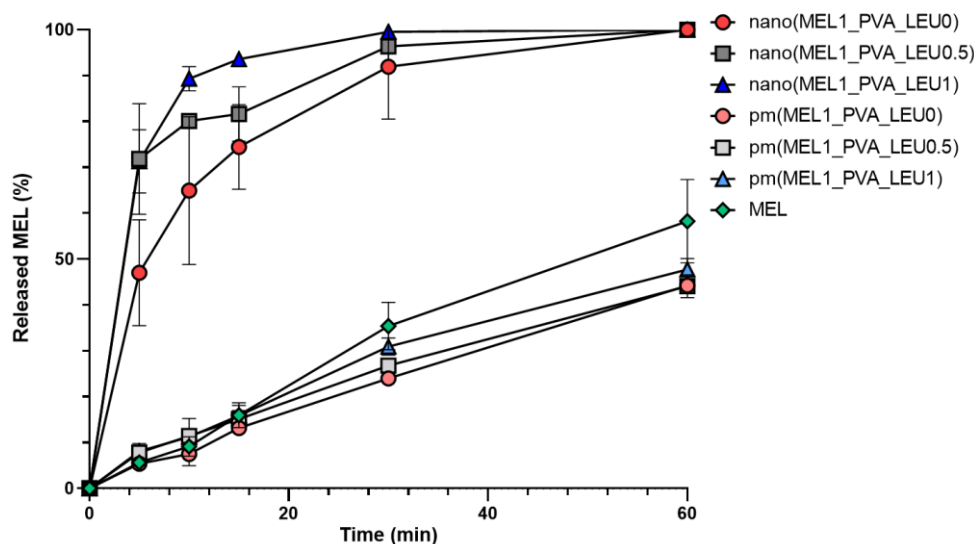


Minta	D (nm)	Pdl	Zéta-potencial (mV)
Őrölt prediszperzió[MEL_PVA]	359,75 ± 12	0,3403 ± 0,057	-23,70 ± 0,85
nanospd[MEL1_PVA_LEU0]	676,70 ± 47	0,543 ± 0,055	-21,35 ± 5,27
nanospd[MEL1_PVA_LEU0,5]	743,25 ± 27	0,502 ± 0,074	-23,30 ± 2,74
nanospd[MEL1_PVA_LEU1]	526,90 ± 20	0,381 ± 0,031	-24,50 ± 1,47

Minta	Oldékonyság [mg/mL]
MEL	0,502 ± 0,002
nanospd[MEL1_PVA_LEU0]	0,701 ± 0,003
nanospd[MEL1_PVA_LEU0.5]	0,695 ± 0,002
nanospd[MEL1_PVA_LEU1]	0,701 ± 0,004

27. ábra: Segédanyagok befolyása a porlasztott nanokompozitok morfológiájára, méretére, oldhatóságára és stabilitására (A: MEL1_PVA_LEU0; B: MEL1_PVA_LEU0,5; C: MEL1_PVA_LEU1)

A 28. ábrán látható kioldódási profil jól szemlélteti a nanonizált minták oldódási sebességének szignifikáns javulását a referencia termékekhez képest. Az első 5 perc elteltével 70 %, míg 30 percet követően 100 % hatóanyagmennyiség felszabadult.



28. ábra: *In vitro* kioldódási profil pH 7,4-en

A permeabilitási vizsgálatok során a nanoméretű részecskék által biztosított nagy felület volt a fő tényező, amely befolyásolta a passzív diffúzió sebességét. A Nanospd minták diffúziója nagyobb értéket ért el, mint a kontrol mintáké. Az eredmények ($85\text{--}110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) kiemelkedőek voltak, ha azokat a tüdő teljes felületére interpoláljuk. A termékek szignifikánsan megnövekedett fluxust (J) és permeabilitási együtthatót (K_p) mutattak a referencia mintákhoz képest (29. táblázat). Ezért a nanoporlasztóval szárított formulációkkal megnövelt mennyiségű MEL kerülhet a tüdőepitél rétegébe.

29. táblázat: *In vitro* permeabilitási eredmények

Minták	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	K_p (cm/h)
MEL	28,23	0,1394
pm (MEL1_PVA_LEU0)	34,69	0,2081
pm (MEL1_PVA_LEU0.5)	37,45	0,2247
pm (MEL1_PVA_LEU1)	33,25	0,1995
Nanospd (MEL1_PVA_LEU0)	97,11	0,5827
Nanospd (MEL1_PVA_LEU0.5)	108,32	0,6499
Nanospd (MEL1_PVA_LEU1)	85,57	0,5134

Diskusszió

Új alternatív lehetőségeket tanulmányoztunk nanoméretű hatóanyagsemcsék képzése céljából. Minden esetben a szerves vagy vizes oldószer evaporációjával indukáltuk a hatóanyag-polimer

szilárdfázisú részecskéinek felépülését. Igazoltuk, hogy elektroporlasztás és plazma-szintézis folytán kristályos, míg mikrohullám, illetve nanoporlasztás során amorf sajátságú részecskék képezhetők. Ez azzal is magyarázható, hogy míg az első két esetben a precipitációs folyamat során segédanyagot nem alkalmaztunk (amely a kristályosodást meggátolná), addig mikrohullám és nanoporlasztás esetében a nanomérettartomány elérése segédanyagok jelenlétében valósulhatott meg, ahol együttesen kezeltük azokat. Valamint az utóbbi esetekben 2-3-szor magasabb hőmérsékleten ment végbe az eljárás, ami szintén befolyásolta a minta amorfizálódását. A nagy feszültségen végbemenő elektroporlasztás és plazma-szintézis a részecskék aggregációval jár, amit hordozó felületén interaktív fizikai keveréssel ki lehet védeni. Mivel a mikrohullámmal végzett párologtatás pillanatszerű, igazoltuk, hogy egy polimer mátrixban egyedi nanorészecskék alakulhatnak ki, amely az aggregációgátló polimer jelenléte miatt stabil módon amorfizált karaktert biztosít a hatóanyagoknak.

Nano porlasztva-szárító berendezéssel preszuspenzióból kiindulva a jövőben pulmonális formuláláshoz szükséges segédanyagok alkalmazásával redy-to-use (használatra alkalmas) termékek képezhetőek, ahol a szemcseképzés folyamán szubmikronos hatóanyag partikulum biztosítja az oldhatóság, és a permeabilitás javulását.

Tézispont: T8-T9

K14-18 (4,689+2,829+4,689+2,979+5,112=20,298)

6.2 Prediszperziók innovatív gyógyszerformáinak terápiaszpecifikus fejlesztése alternatív beviteli kapukon keresztül

Az előzőekben általunk tanulmányozott újabb eljárások alkalmazása hatékonyabb készítmények előállítását teszi lehetővé. Szemcseméretcsökkentéssel, illetve korszerű hordozórendszerek (DDS) alkalmazásával a hagyományos beviteli kapuk (pl. per orális, parenterális) mellett alternatív módon **nazális és pulmonális gyógyszerbevitellel** is lehetséges a hatóanyagokat gyorsabb, célzott hatás elérése céljából a szervezetbe juttatni. A következőkben a korábbi fejezetekben bemutatott **optimalizált prediszperziók** gyógyszerformának és beviteli kapunak megfelelő segédanyagokkal történő formulálása, szemcseméretcsökkentésből adódó terápiás előnyök lehetőségeinek bemutatása kerül sorra. A megjelölt hatóanyagok terápiaszpecifikus formulálásának létjogosultságait is részletezem.

6.2.1 Nazális gyógyszerformák fejlesztése, *in vitro/in vivo* vizsgálatai

A **nazális bevitel** számos terápiás előnyének köszönhetően egyre nagyobb figyelmet kap az utóbbi időben a gyógyszerfejlesztésben. Nanodiszperzió alkalmazása a nazális gyógyszerforma előállításában új lehetőség a hatóanyag jobb biohasznosulása céljából. Megfelelő nazális gyógyszerformák fejlesztése számos ismert hatóanyagok új indikációs területet nyithat meg és a farmakon-jelöltek bejuttatási problémáit is megoldhatja. Az ornyálkahártya szerkezeti felépítésének köszönhetően a gyógyászatban már megtalálhatók a szisztémás alkalmazásra szánt összetételek (nose-to-blood). Azokban az esetekben a nazális gyógyszerbevitel előnyösnek mondható, ahol azonnali gyors hatás kiváltására van szükség, mint például sürgősségi fájdalomcsillapításra migrén esetén, vagy neurodegeneratív kórkepek hosszú távú gyógyszeres kezelése indokolt (nose-to-brain). Ezáltal különböző vegyületek az orrüregből közvetlenül az agyszövetbe juttathatók, megkerülve a vér-agy gátat. **A következő fejezet a nazális gyógyszerformák preformulációjához kapcsolódóan a hatóanyagok (meloxicam, loratadin, lamotrigin) szemcseméretcsökkentésének befolyását mutatja be *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján. Alternatív bevitel céljából nazális formulációkat állítottunk elő (viszkózus folyadék, por) és vizsgáltunk, valamint összehasonlítást végeztünk a hatóanyag mikronizált, nanonizált és só formájából készített nazális formulációk vizsgálati eredményei esetében (30. táblázat).**

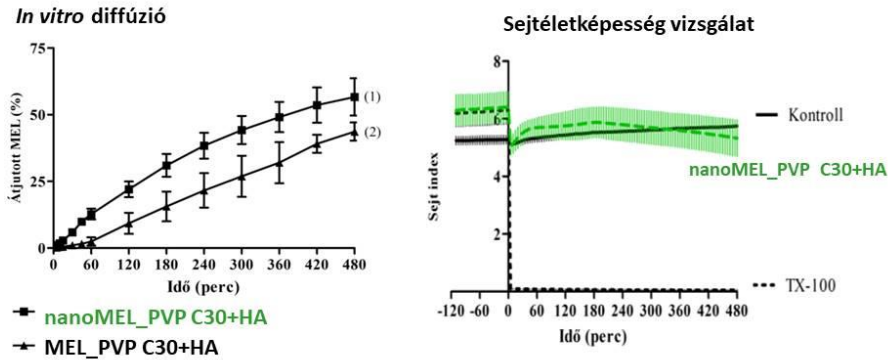
30. táblázat: Prediszperziók intranazális formulálása preformulációs és preklinikai vizsgálatok elvégzése céljából

Prediszperzió előállítás; hatóanyag szemcsemérete	Preformulált összetétel	Nazális gyógyszerforma	Jellemzők
Száraz ko-örlés (MEL:PVP C30 1:1 m/m%) 140 nm MEL	MEL -PVP -HA 1 mg/ml -1 mg/ml - 5 mg/ml	folyékony nazális forma	nanoszuszpenzió alapú viszkózus folyadék
Nedves ko-örlés (1% MEL, 0,5% PVA) 1,5 µm MEL	MEL-PVA-HA- 1 mg/ml-0,2 mg/ml- 5 mg/ml	folyékony nazális forma	mikroszuszpenzió alapú viszkózus folyadék
Nedves ko-örlés (1% MEL, 0,5% PVA) 130 nm MEL	MEL-PVA-HA- 1 mg/ml-0,2 mg/ml- 5 mg/ml	folyékony nazális forma	nanoszuszpenzió alapú viszkózus folyadék
Sóképzés, oldott MELK	MELK-HA 1 mg/ml-5 mg/ml	folyékony nazális forma	viszkózus oldat
Kombinált (UH) precipitálás, 311 nm LOR	LOR-2,5 mg/ml Poloxamer- HA-5 mg/ml	folyékony nazális forma	nanoszuszpenzió alapú viszkózus folyadék
Száraz örlés, 97 nm LAM	LAM-1g PVA-0,8g	orppor	szilárd fázisú diszperzió

6.2.1.1 Optimalizált prediszperzió tartalmú intranazális folyékony gyógyszerforma fejlesztése Meloxikám tartalmú intranazális készítmények

Nem szteroid gyulladáscsökkentő-tartalmú intranazális rendszerekről az irodalomban kevés adat áll rendelkezésre (pl. ketorolak-trometamin tartalmú oldat [220]). Az NSAID-ok, beleértve a MEL-t is, súlyos gasztrointesztinális mellékhatásokat okozhatnak [221]. Ezért a nazális beadási útvonala előnyösebb a gasztrointesztinális mellékhatások csökkentése és a májban történő first-pass metabolizmus megkerülése érdekében [222]. A hatóanyag gyenge oldódási tulajdonsága korlátozó tényező a felszívódási sebesség és a hatás kezdete szempontjából. A MEL parenterális készítményét (15 mg/1,5 ml) olyan esetekre fejlesztették ki, amelyek gyors fájdalomcsillapítást igényelnek, mint például akut mechanikus derékfájás, isiász és az osteoarthritis akut fellángolása [223].

Az optimalizált prediszperziót előzetes **száraz ko-örlés** eljárást követően (2 óra, 400 rpm örlési idő, MEL:PVP 1:1 tömegarányban, 140 nm-es hatóanyagsemcsék) állítottuk elő porkeverékként, majd nanoMEL_PVP+HA folyékony **nazális gyógyszerformát** formulálva vizsgáltuk. A nazális készítmény MEL-t 1 mg/ml koncentrációban és HA-t (Natrium hialuronát) 5 mg/ml koncentrációban tartalmazott, a vivőanyag foszfátpuffer (pH 7,4) volt. A HA természetes anionos polimerként, viszkozitásnövelő és a sztérikus gátlás folytán stabilizáló funkciót tölt be. Az amorf MEL nanorészecskék termodinamikai oldhatósága 1,2 mg/ml-re emelkedett (0,55 mg/ml-ről), másrészt a hatóanyag teljes kioldódása 15 perc alatt volt megfigyelhető. Franz cellás diffúziós rendszeren tesztelve a MEL nanorészecskéket és HA-t tartalmazó készítményből gyorsabb volt a diffúzió, a MEL 25%-a diffundált (25 mg/1,8 cm²) a nanonizált formát tartalmazó készítményből vs. 10% fizikai keverék esetén. A tiszta hatóanyagot vagy nanonizált MEL-t tartalmazó gyógyszerkészítmények a humán RPMI 2650 sejtek életképességét nem csökkentették (különböző MEL-tartalmú folyékony készítményekkel az alkalmazott koncentrációkban, összehasonlítva a kontrollcsoporttal, amelyet a készítmények vivőanyagaként használt tápközegével kezeltünk). Ezekkel az eredményekkel igazoltuk, hogy a preformulált **nazális összetétel nem befolyásolja az orrhámsejtek életképességét**. A MEL átáramlása a humán RPMI 2650 sejtrétegeken szignifikánsan megnövekedett a nanorészecskéket és HA-t tartalmazó nazális készítmény esetében (**29. ábra**).

**In vivo vizsgálatok**

	intranazális MEL (MEL_PVP C30+HA)	intranazális nanoMEL (nanoMEL_PVP C30+HA)
t_{max} (perc)	312,0 ± 107,3	5,0 ± 0,0
C_{max} (µM)	2,92 ± 0,96	7,95 ± 0,23
AUC 0-t (µmol*perc/l)	3342,0 ± 1236,0	4838,0 ± 384,4

29. ábra: In vitro és in vivo eredmények intranazális nanoMEL_PVP C30+HA alkalmazása esetén

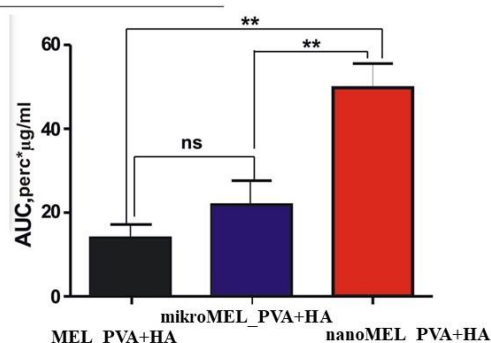
Ezen MEL nanorészecskéket tartalmazó nazális és referenciaként orális formulációk patkányoknak történő beadását vizsgáltuk. A 60 µg MEL/állat intranazális és orális kezelést követő első 60 percben detektáltuk a gyógyszer koncentrációját a vérplazmában. MEL nanorészecskék nazális beadása esetén magas, kb. 8 µM-os MEL plazmaszintet figyeltünk meg 5 perc elteltével. A nazális és orális adagolási mód közötti különbségek 30 perc elteltével szinte megszűntek, de a két készítmény teljesen eltérő kinetikai profilt mutatott, a MEL átlagos plazmaszintje 6 µM (intranazál) vs. 2 µM (per os) volt. Igazoltuk továbbá az AUC és a C_{max} szignifikáns emelkedését, abban az esetben, ha a MEL-t patkányoknak nazálisan adagoltuk nanorészecske formájában, összehasonlítva a hatóanyag és a segédanyagok per orálisan alkalmazott fizikai keverékével (2-szer magasabb AUC, 4-szer magasabb C_{max}) (29. ábra) (K19).

A vizsgált technikák közül ezt követően a **nedves közegű őrlés** alkalmas volt mikronizálásra (10 perc, 400 rpm, 1,5 µm) és nanonizálásra (50 perc, 400 rpm, 130 nm) egyaránt, ezért az **optimalizált eljárási paraméterekkel („holding time” 1 nap) az ornyálkahártyának megfelelő kémhatáson (pH 5,6) további mikronizált és nanonizált MEL-t tartalmazó prediszperziót készítettünk** (MEL_PVA+HA- 1 mg/ml-0,2 mg/ml-5 mg/ml), és mukoadhezív sajátságú anyag hozzáadásával **folyékony nazális gyógyszerformát** állítottunk elő. A szemcsék nanoméret-tartományba csökkentése megnövekedett telítési

koncentrációt (3-5 szörösére), ez a HA és a MEL közötti interakcióval magyarázható, amely komplexet eredményezett a HA-ban lévő karboxil-csoportok és a MEL-ben a protonálható csoportok között [224], gyorsabb oldódási sebességet és fokozott felülethez való adhéziót mutatott, összehasonlítva a mikronizált hatóanyagot tartalmazó prediszperzióval. **Megállapítottuk, hogy a részecskeméret és a növekedett felület jelentős hatással volt a passzív diffúzióra is.** A fluxus (J), amely a membrán 1 cm^2 -én 1 órán belül átjutó MEL mennyiségét mutatja, szignifikánsan megnőtt a nanorészecskéket tartalmazó nazális készítmény esetében, a mikronizált vagy kezeletlen MEL-t tartalmazó folyékony formákhoz képest. A nanonizált MEL fluxus adataiból számított permeabilitási együttható (K_p) is szignifikánsan magasabb volt, mint a másik két esetben. A szabályozott hatóanyag felszabadulást a HA-PVA rendszer javította [224]. A PVA-val bevont részecskék szerepet játszottak a gyógyszer felszabadulásában, *Ding* szerint a szintetikus polimerek csökkentik a természetes polimerek lebomlási sebességét és megakadályozták azok gyors oldódását a biológiai folyadékokban [225]. A MEL nanorészecskéket tartalmazó készítmény esetében 5 perc elteltével háromszor magasabb MEL plazmaszintet mértünk, mint a kezeletlen vagy mikronizált MEL-t tartalmazó készítményeknél (**30. ábra**).

Flux (J) és permeabilitási koefficiens (K_p):

	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	T_{max} (perc)
MEL_PVA+HA készítmény	3,41	0,28	15
mikro MEL_PVA+HA készítmény	4,25	0,41	30
nano MEL_PVA+HA készítmény	9,43	0,92	30

In vivo AUC értékek:**30. ábra:** Mikro- és nanoMEL nazális formulációk *in vitro* és *in vivo* jellemzése

A plazmakoncentrációk az első körülbelül 30 percben lassan emelkedtek, de a nanonizált vagy mikronizált MEL-t tartalmazó készítmények közötti 3-szoros különbség a kezelést követő 60 percben megmaradt. Az AUC értékek és a MEL fajlagos felülete között lineáris korrelációt állapítottunk meg. Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján elmondható, hogy a hosszabb

tartózkodási idő és a nanonizált MEL homogén eloszlása a mesterséges membránon és az orrnyálkahártyán fokozott diffúziót, nagyobb AUC értéket eredményezett (**K20**).

Ezt követően célunk volt az intranazálisan alkalmazott **MEL és sóformája, a meloxikám kálium (MELK)** transz-epiteliális abszorpciójának összehasonlító vizsgálata a szisztémás keringésbe juttatást követően. Ez esetben a sóképzés új megközelítés lehet az oldhatóság és az oldódási sebesség növelésére, valamint a gyors felszívódás elérésére az orrnyálkahártyán keresztül a véráram elérése céljából. Kiemelendő, hogy az EGIS által újonnan szabadalmaztatott MELK nazális formulálási lehetőségeivel kizárólag kutatócsoportunk foglalkozik. Oldhatósági vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a víz pH-át a MELK 5,8-ról 8,15-re eltolja. Összevetve a MEL 0,04 mg/ml oldhatóságával a MELK 13,10 mg/ml oldhatósági koncentrációt mutatott, míg pH 5,6 és 7,4 pufferben ezt a jelenséget nem tapasztaltuk, az oldhatósági adatokban jelentős változás nem volt kimutatható. Kísérletekkel alátámasztottuk, hogy a sóforma használata gyorsabb (6-szoros) kioldódást és közel 7-szer nagyobb fluxus értéket eredményezett. Mind az *in vitro*, mind az *in vivo* eredmények azt mutatták, hogy az MELK javasolható intranazális folyékony adagolási forma kifejlesztésére (**EK5**).

Összehasonlítás céljából a **nanonizált MEL-t (MEL_PVA+HA) és annak sóformáját (MELK_PVA+HA) tartalmazó folyékony nazális készítményeket** HA alkalmazásával állítottuk elő. A sóforma és a nanonizált MEL kapcsán is gyors kioldódását tapasztaltunk. A nanonizált MEL jobb felszívódást és állandó plazmakoncentrációt mutatott a gyógyszerkészítményből 5 perccel beadás után, mint a MELK. Ez összefügg a nano MEL nagy fajlagos felületével, fokozott telítési oldhatóságával, valamint a kiemelkedő mukoadhezivitásával. Az *in vivo* tesztek során a MEL intravénás (IV MEL) beadásával is összevetettük az eredményeket, vizsgálva a plazmában és agyban detektálható koncentrációértékeket. A MEL részecskeméretének nano tartományba való csökkentése a felületekhez való fokozott tapadást eredményezett, amely biztosította a hatóanyag gyors megjelenését a vérplazmában. A MELK kezdeti lassú felszívódása a disszociált formának alacsony transzepiteliális aktivitásával magyarázható, ami csökkentette a mukoadhéziót. A plazma AUC értékei hasonlóak és szignifikánsan alacsonyabbak voltak az intranazális formák alkalmazása esetén, mint a MEL tartalmú IV injekciónál. Megállapítható, hogy az „orr-plazma” útvonal meghatározó a MEL transzportjában. Ez összhangban van az irodalmi adatokkal is.

A MEL **axonális transzportját** az igazolja, hogy a hatóanyag nazális alkalmazását követő első öt percben megjelent az agyszövetekben. Az agyi AUC értékek tekintetében a nano MEL forma abszolút biohasznosulása 100% volt az IV injekcióhoz képest. A MEL és a MELK

intranazális beadása a készítmény nagyobb relatív felhalmozódását (% DTE) eredményezte az agyban az axonális („orr-agy” és BBB („vér-agy”) transzport révén, mint az IV adminisztráció (31. A/B ábra).

Az Alzheimer-kór megelőzését célzó NSAID-ok intranazális alkalmazásáról kevés adat áll rendelkezésre. Ez gyulladáscsökkentő hatásukkal hozható összefüggésbe, ami egy új megközelítés az agy NSAID-okkal történő megcélzására (K21).

A, Plazma

	Flux (J) µg/cm ² /h (in vitro)	t _{max} (perc)	C _{max} (nM)	AUC (perc*ng/ml)
IV MEL	-	5	10554±147	1351000±82000
nano MEL_PVA+HA készítmény	20	5	3105±255	492007±95176
MELK+HA készítmény	98	60	3007±309	538393±105892

B, Agy

	t _{max} (perc)	C _{max} (nM)	AUC (perc*ng/ml)	AUC agy/ AUC vér	Abs BH agy (%)	DTE (%)
IV MEL	5	0,62	35,72±2,35	2,644*10 ⁻⁵	100	100
nano MEL_PVA+HA készítmény	5	0,88	35,72±8,79	7,26*10 ⁻⁵	100	274,58
MELK+HA készítmény	60	0,34	21,14±4,73	3,93*10 ⁻⁵	59	148,64

31. ábra: In vitro diffúzió és in vivo mérési eredmények összevetése az IV MEL, nano MEL és MELK esetében

Összevetve tehát sikeresen preformuláltunk mikro- vagy nanoméretű MEL, illetve MELK tartalmú folyékony nazális formákat. Megállapítottuk, hogy szintetikus és természetes polimerek interakciója befolyásolja a hatóanyag felszabadulásának módját, a PVP-HA tartalmú formuláció gyors, míg a PVA-HA alkalmazása esetén szabályozott kioldódást tapasztaltunk. Minden esetben igazoltuk, hogy a nanorészecskék felületekhez való fokozott tapadása elősegíti mind a transzepitális, mind az axonális transzportot.

A nanonizált MEL-t tartalmazó prediszperziók alkalmasak lehetnek innovatív intranazális gyógyszerforma előállítására, ezáltal újabb lehetőséget teremtve pl. a fájdalom gyors csökkentésében.

Loratadin nanoszuszpenzió intranazális formulálása

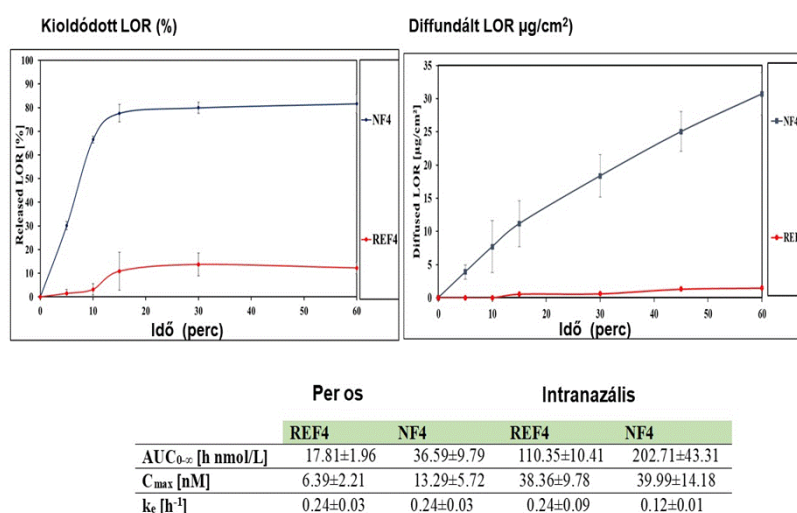
Az **integráló** eljárások közül az **ultrahanggal kombinált precipitáción alapuló technológia** eljárási és anyag-paramétereit optimalizáltuk és formulálásra alkalmas loratadin (LOR) tartalmú prediszperziót állítottunk elő. A LOR-t általában különféle allergiás állapotok kezelésében alkalmazzák, főleg szezonális allergiák esetében. A LOR a BCS II. osztályába tartozik és gyengén bázikus hatóanyagának minősül, ezért pH-függő oldhatóságot mutat. A LOR orális adagolása változó és biológiai hasznosíthatósága gyenge (10-40%) rendelkezik [226]. **Nazális adagolási formában a közforgalomban nem elérhető.** Különböző kísérletek történtek már LOR nazális forma előállítására, például *in situ* orrgél formulálásával [227], β -ciklodextrin zárványkomplexálással, Carbopol 943-mal és Poloxamer 407-tel [228], valamint kitozán-etilcellulóz mikrogömbök [229] formulálásával.

Tanulmányunk célja egy **LOR nanoszuszpenziót (LNS)** tartalmazó nazális készítmény kifejlesztése volt. A LOR-t etanolban (200 mg/ml) oldottuk fel oldószeres fázisként és Poloxamer vizes oldatához (antiszolvens fázisként 0,2 m/v%) adagoltuk (UP 200 S Ultrasonic processzor Hielscher Ultrasonics GmbH, Németország) 30 percig 4 °C-on és 50%-os amplitúdóval kezeltük. Az prediszperzióban a LOR:Poloxamer tömegarány 2,5:1 volt. A **nanoszuszpenzió alapú loratadin tartalmú nazális készítményt** 1 vagy 2,5 mg/ml LOR illetve 1 vagy 5 mg/ml HA koncentrációban állítottuk elő a prediszperzióból. A HA szignifikáns hatással volt a méretre és zéta potenciál (ZP) értékre (**31. táblázat**). A részecskeméret ezen növekedése a részecskék HA általi felületi bevonásának tulajdonítható [230]. A PDI értékek szűk szememéret tartományra utal. Ezenkívül a HA jelenléte a készítményben növelte a negatív töltést [231]. A minták pH-ja 6,3-6,4 volt, amely az intranazális készítmények esetében elfogadható tartomány (az orrnyálkahártya pH-ja 4,5-6,5).

31. táblázat: Nazális folyékony összetételek (NF) jellemző paraméterei

Minta LOR:HA (mg/ml)	pH	Hatóanyagtart. (%)	D50 (nm)	PDI	ZP
NF1 1:1	6,28±0,05	98,98±1,2	327,3±8,23	0,25±0,04	-55,10±5,67
NF2 1:5	6,38±0,19	97,66±4,2	437,27±28,6	0,31±0,07	-50,3±6,68
NF3 2,5:1	6,36±0,23	95,15±3,4	341,6±11,84	0,25±0,04	-45,9±6,36
NF4 2,5:5	6,31±0,14	92,99±2,8	450±24,30	0,26±0,03	-52,2±6,91

A legnagyobb LOR és HA koncentrációjú **NF4 összetétel** a referenciához (REF: azonos arányú makroszuszpenzió) képest 8-szoros mukoadhéziót eredményezett (a komponensek interakciójának köszönhetően fokozott nyálkahártya adhézió várható), ezért a további vizsgálatokat ezzel a formulációval végeztük (**32. ábra**). Kiemelendő, hogy a LOR ~ 80%-a az első 15 perc alatt felszabadult a készítményből, előrevetítve kedvező biológiai hasznosíthatóságát. Az *in vivo* vizsgálatok azt mutatták, hogy a nazális bejuttatás kedvezőbb beadási mód a per os alkalmazáshoz viszonyítva (C_{max} 3-szorosára, míg az AUC érték 6-szorosára növekedett). Stabilitási vizsgálatokkal igazoltuk, hogy 4 °C tárolási hőmérsékleten a fizikai-kémiai sajátságok nem változtak. Megállapítható, hogy az antihisztamin tartalmú összetétel *in vivo* vizsgálati paraméterei nazális bevitel esetén többszörösére növekedtek (**K22**).



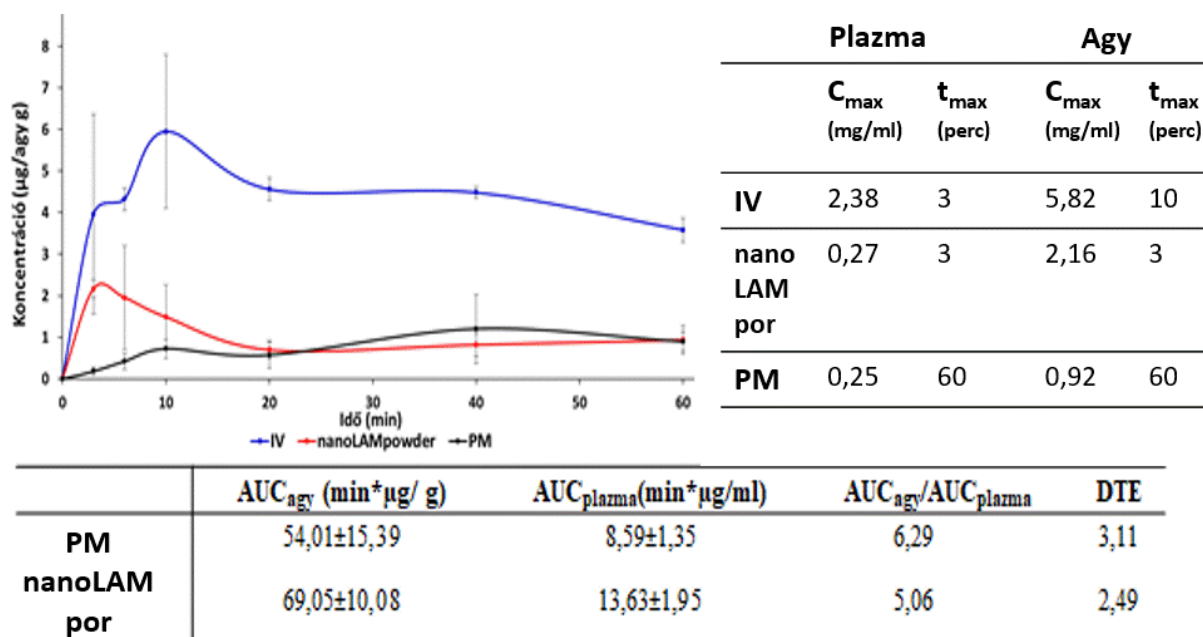
T_{max} =25-30 perc

32. ábra: Loratadin tartalmú nazális készítmény és referencia minta *in vitro* és *in vivo* jellemzése

6.2.1.2 Optimalizált lamotrigin prediszperzió tartalmú orrpor gyógyszerforma fejlesztése

Elmondható, hogy nagyon kis számú **nazális por készítmény** van jelen a közforgalomban, a rendelkezésre álló tudományos-háttérinformáció mennyiség is limitált az alkalmazásukban rejlő nagy potenciál ellenére is. Pedig a **por formulációk jobb stabilitással rendelkeznek**, mint a folyékony formák, nagyobb a beadható dózis, a nyálkahártyán való tartózkodási idejük hosszabb, formulálásukhoz kevesebb segédanyag szükséges. A BCS II. osztályba tartozó lamotrigint epilepszia, Lennox-Gastaut szindróma és bipoláris betegség kezelésére alkalmazzák monoterápiában vagy adjuvánsként. A gyomor-bél traktusból szívódik fel, szájon át bevéve 2,5 órán belül eléri a plazma csúcskoncentrációját. A gyógyszerpiacon lévő antiepileptikus lamotrigin-tartalmú készítményeknek beviteli kapu szempontjából nincs alternatívájuk, csak

per os alkalmazható készítmények találhatók a klinikumban [232, 233]. Korábbi munkánink során optimalizált mintaelőállítási módszer alapján készített nanonizált összetételt (400 rpm, 1,5 óra, LAM:PVA/1:0,8 és 97 ± 60 nm-es LAM részecskék), mint nazális por forma (nanoLAMpor) került alkalmazásra. A meghatározott szemcseméret 6 hónap után sem változik szignifikánsan.



33. ábra: Nanonizált LAM nazális por jellemzése és *in vivo* vizsgálati eredményei

Az *in vitro* hatóanyagfelszabadulás- és permeabilitás-vizsgálatok során az optimalizált mintából gyors és nagymértékű LAM felszabadulást és permeabilitást detektáltunk. Az *in vivo* vizsgálatok esetében nanoLAM por és a fizikai keverék kontroll (PM) is 0,555 mg LAM-ot tartalmazott. Ezt az adagot 160-180 g-os hím Sprague–Dawley patkányok ($n = 4$) jobb orrlyukába adtuk be kis spatulával. Az *in vivo* vizsgálatokban az IV minta nagyobb mértékben jutott be a hatóanyag a szisztémás keringésbe, mint a nazálisan alkalmazott összetételeknél, amelyek között nem volt számottevő különbség (33. ábra).

A nazális készítményekből a LAM gyorsan és detektálható mennyiségben jelen volt viszont a KIR-ben, tehát a hatóanyag axonális transzporttal jutott be az agy szöveteibe. Különösen nagymértékű LAM koncentráció volt az agyban a nanoLAM por alkalmazása során. A minta stabilitás vizsgálatának eredményei azt mutatták, hogy a nanorészecskék fontos tulajdonságai (részecskeméret, kristályossági tulajdonságok, *in vitro* hatóanyagfelszabadulás profilja) nem mutattak szignifikáns változást. Véleményünk szerint a nanonizált összetétel

képes lehet alternatívaként szolgálni a piacon lévő tabletták helyett, ha azok alkalmazása valamilyen okból kifolyólag nem lehetséges (K23).

6.2.1.3 Permeabilitás vizsgáló módszer fejlesztése

A nazális formulációk fejlesztésénél alkalmazott vizsgálati protokoll része a **hatóanyag-diffúziós mérési módszer, amelyre nem található hivatalos gyógyszerkönyvi leírás**. A szakirodalomban számtalan diffúziós készülék található a permeabilitási vizsgálatokhoz. A bemutatott modellek szerint a legfontosabb paraméterek az akceptor-donor fázisok orientációja, az alkalmazott térfogat, a hőmérséklet és a keverési sebesség szabályozása, valamint a folyamatlemezés módja (inline, atline, online és offline).

A μ FLUX diffúziós cella (Pion Inc., Billerica, Egyesült Államok) horizontális készülék, amelyben a kompartmenteket szintetikus membrán osztja ketté és alkalmas lehet nazális adagolási formák vizsgálatára is. A *Franz diffúziós vertikális cella* a hivatalos gyógyszerkönyvi módszer, elsősorban a transzdermális készítmények diffúziójának vizsgálatára, az intranazális adagolási formák vizsgálatának egyik leggyakrabban alkalmazott módszere a szakirodalomban, elsősorban gélek esetén. A *horizontális Side-Bi-Side cella* kis térfogatú donor és akceptor rekeszekkel rendelkezik, amelyek, mint nazális adagolási formák, lehetővé teszik kis mennyiségű minta mérését [234].

Első célunk két különböző fázisorientációjú *in vitro* vizsgálati modell összehasonlítása volt; vertikális rendszerként a Franz diffúziós cellát (Hanson Microrette Diffusion Cell, Egyesült Államok), horizontálisként pedig a Side-Bi-Side (Side-Bi-Side™ Grown Glass, Egyesült Államok) rendszert választottuk abból a szempontból, hogy alkalmazhatók-e különböző intranazális adagolási formák: viszkózus folyadékok, gélek és porok vizsgálatára. A por-, folyékony- és gélformák összehasonlító vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy a Side-Bi-Side cella alkalmas a porokból és folyadékokból történő gyógyszerdiffúzió vizsgálatára, különösen a szuszpenziók vizsgálatára. A donor fázis folyamatos keverése révén biztosítható a hatóanyagsemcsék homogén eloszlása. Megjegyzendő, hogy az orrporok egyre fontosabbá válnak az orrba történő beadásnál, mivel e gyógyszerforma megválasztásával egyes hatóanyagok stabilitási problémái kiküszöbölhetők (K24, EK6). A 32. táblázat adatai alapján igazoltuk, hogy gélek esetében a vertikális, míg szuszpenziók és porok vizsgálata során horizontális cellán javasolt diffúziós méréseket végezni.

32. táblázat: Intranazális készítmények fluxus (J) értékei Franz és Side-Bi-Side diffúziós cellákon

	Franz cella	Side-Bi-Side cella
Sample	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)
nanoMEL_PVP C30 por	nem mérhető	38,26
nanoMEL_PVP C30 foly	16,20	72,61
nanoMEL_PVP C30 gél	212,44	37,97
MEL_PVP C30 por	nem mérhető	36,96
MEL_PVP C30 foly	9,14	25,93
MEL_PVP C30 gél	40,90	13,48

Ezt követően a Side-Bi-Side cella mintájára alkalmassá tettük saját tervezésű, módosított geometriai elrendezésű diffúziós cellát nazális porok és szuszpenziók valós idejű vizsgálatára inline (vizsgálati protokoll kidolgozásával), amely ex vivo human orrnyálkahártya adaptálását is lehetővé teszi. A donor és az akceptor fázis maximális térfogata 9 ml, a membrán felülete csökkentett, $0,785 \text{ cm}^2$ volt. A kamrákat úgy alakítottuk ki, hogy a teret alkalmassá tegyünk a valós idejű mérésre, merülőszonda bemenettel. Mágneses keverőket a folyadék alatt egy speciálisan kialakított üregben helyeztük el (12. ábra).

A beállítás további optimalizálásához, valamint az eredmények elemzéséhez és értelmezéséhez háromféle hatóanyagot (MEL, LAM, levodopa) és háromféle membránt (Metricel[®], Isopore[™], Whatman[™]), két impregnálási módszert (pH 7,7 puffer, izopropil mirisztát, IPM) és két analitikai módszert (offline, inline spektrofotometria) használtunk (33. táblázat). A permeabilitási vizsgálati módszer adaptálása, fejlesztése és validálása is megtörtént. A módosított diffúziós model alkalmas inline, valós idejű detektálásra, a nazális körülményekhez igazodva (szimulált nazális elektrolit oldat), kis térfogatban, megfelelően impregnált membrán alkalmazásával a hatóanyag diffúziójának monitorozására, ezáltal akceptor és donor fázisban lévő koncentrációjának meghatározására. Igazodva a hatóanyagok fizikai-kémia sajátosságaihoz, kiválasztható a megfelelő membrán típus és impregnáló közeg. Ezeknek megfelelően sikerült egyszerűen kivitelezhető, könnyen reprodukálható, valós idejű, precíz és időhatékony módszert kifejlesztenünk (K25).

33. táblázat: Offline és Inline diffúziós eredmények módosított elrendezésű cella alkalmazhatósága céljából

		Offline			Inline		
J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/15$ perc)							
	Membrán impregnálása	Metrical®	Isopore™	Whatman™	Metrical®	Isopore™	Whatman™
MEL	pH = 7.4	0,91	2,20	1,18	-0,37	2,44	3,12
	IPM	1,25	8,54	5,51	69,41	32,00	39,62
LAM	pH = 7.4	55,21	41,73	30,17	0,18	53,48	45,20
	IPM	2,38	15,84	25,56	8,98	11,12	57,04
Relatív szórások számtani átlaga (%)							
	Membrán impregnálása	Metrical®	Isopore™	Whatman™	Metrical®	Isopore™	Whatman™
MEL	pH = 7.4	81.44	40.53	93.00	84.53	21.27	62.97
	IPM	66.33	57.79	78.98	14.72	22.86	38.77
LAM	pH = 7.4	17.00	63.02	22.09	89.23	76.39	35.92
	IPM	58.66	14.15	54.90	16.67	27.67	19.54

Az *in vitro-in vivo* korrelációt (IVIVC) vizsgálva, a módosított horizontális elrendezéssel mért diffúziós eredményeket összehasonlítottuk korábbi Side-Bi-Side cellás eredményekkel valamint *in vivo* eredményeinkkel (kutatócsoportjaink korábbi publikáció alapján) is. Igazoltuk, hogy a módosított horizontális elrendezés offline mérési eredményei szorosabb korrelációt mutatnak ($R = 0,9580$) az *in vivo* adatokkal, mint a Side-Bi-Side™ készülékkel ($0,9532$). Ezen túlmenően, a módosított horizontális elrendezés inline eredményei ($R = 0,9727$) korreláltak a legszorosabban az *in vivo* eredményekkel. Ez a statisztikai összehasonlítás a készülék által meghatározott mintavételi pontok közötti AUC-értékeken alapult, amelyek az azonos mintavételi pontok közötti *in vivo* AUC-értékekkel korreláltak (**K25**).

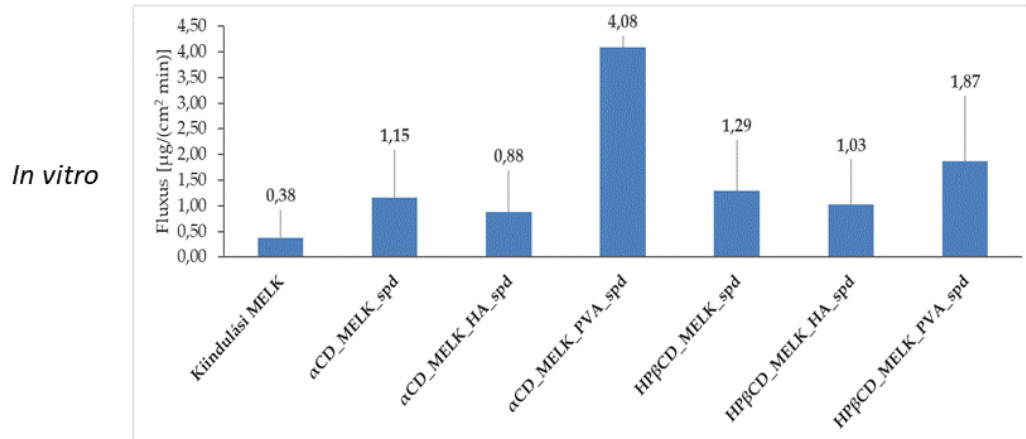
A módosított horizontális elrendezés kialakítását alkalmassá tettük *ex vivo* mérések elvégzéséhez is. A permeabilitási tesztet humán ornyálkahártyán (mucoperiostium) végeztük (etikai engedély száma: IV/3880-1/2021/EKU) a legnagyobb *in vitro* diffúziót mutató készítmények esetében. Az ornyálkahártya darabjait napi klinikai rutinszerű orr- és arcüregi műtétek során (septoplasty, FESS) gyűjtötték általános vagy helyi érzéstelenítés alatt. A műtéti területet 1%-os Lidocain-Tonogen lokális injekcióval infiltrálták és a nyálkahártyát

raspatóriummal emelték ki az alapjából. A műtőből történő szállítást fiziológiás sóoldatban történt (**K26**).

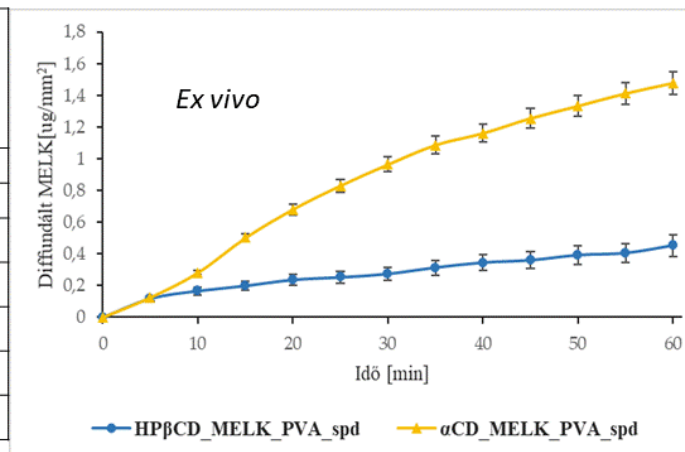
Az *in vitro* és *ex vivo* eredmények tanulmányozását **integrálással képzett intranazális porformuláció** szerves oldószermentes nano porlasztva-szárítással készült, ahol a hatóanyagot (meloxikám-kálium MELK) segédanyagokkal porlasztottuk. **Tanulmányoztuk továbbá, hogy a mukoadhezív polimerek, mint hialuronsav (HA) vagy polivinil-alkohol (PVA) milyen módon befolyásolja a nanokompozit fizikai-kémiai sajátosságait, illetve a hatóanyag felszabadulását.**

A ciklodextrinek (CD-k) növelhetik a nyálkahártya permeabilitását, így javulhat a hatóanyagok felszívódása és csökkenthetik azok irritatív hatását is, ezáltal alkalmazásuk kedvező lehet nazális készítményekben [235]. Sikeresen állítottunk elő a kiindulási 52 μm -es MELK-ből **nanokompozitokat (600-800 nm)**, amelyekben a MELK amorf állapotban volt jelen. Másodlagos kölcsönhatások alakultak ki a hatóanyag és a CD-k között minden termékben, a MELK komplexálódhatott. A porlasztva-szárítást követően a MELK-hoz és α -CD-hez tartozó diffrakciós csúcsok intenzitása jelentősen csökkent, ami az amorfizációjukra és komplexek kialakulására enged következtetni. 3 hónapos laboratóriumi körülmények között történő tárolás után változás a termékek kristályosságában nem volt megfigyelhető.

A PVA-t tartalmazó minták nagyobb mukoadhéziót mutattak, mint a HA-tartalmúak, az összes termék közül az $\alpha\text{CD_MELK_PVA_spd}$ rendelkezett a legjobb mukoadhéziós tulajdonsággal. Az *in vitro* fluxus 15 percnél nagyobb volt a HP- β -CD-t tartalmazó minták esetén, mint az α -CD-t tartalmazóknál, kivéve a PVA-tartalmú termékeket. Az $\alpha\text{CD_MELK_PVA_spd}$ -ből volt a MELK permeációja a legnagyobb mértékű (209 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 60 perc alatt). A HA jelenléte a MELK *in vitro* permeációjának csökkenését eredményezte a duzzadás visszatartó hatása miatt, míg a PVA jelenléte mindkét CD tartalmú minta esetében jelentősen megnövelte az *in vitro* permeációt. **A különbség az $\alpha\text{CD_MELK_PVA_spd}$ és a HP β CD_MELK_PVA_spd minták között az *ex vivo* mérések során jobban érzékelhető volt (1,47 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ és 0,45 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$) (34. ábra), ami az α -CD HP- β -CD-nél nagyobb permeáció fokozó hatásának tudható be. A két fent említett formuláció a vizsgált koncentrációkban **nem volt citotoxikus** a nazális epitelsejtekre és szignifikáns gyulladáscsökkentő hatást mutatott.**



Minták	Átlagos szemcseméret (µm)
MELK Kiindulási	52,27 ± 2,829
HPβCD_MELK_spd	0,871 ± 0,439
HPβCD_MELK_HA_spd	0,868 ± 0,243
HPβCD_MELK_PVA_spd	0,723 ± 0,229
αCD_MELK_spd	0,612 ± 0,227
αCD_MELK_HA_spd	0,756 ± 0,175
αCD_MELK_PVA_spd	0,799 ± 0,256



34. ábra: *In vitro* és *ex vivo* mérési eredmények a szférikus MELK-tartalmú nanoszféra formuláció esetében

Diszkusszió

A hatóanyagok nanonizálása termodinamikai oldhatóságuk és permeabilitásuk jelentős növekedéséhez vezetett. A nanorészecskék lényegesen jobb oldódási tulajdonságaihoz több tényező is hozzájárulhat, nevezetesen (i) a részecskeméret csökkenése, (ii) a fajlagos felület növekedése, (iii) a hidrofíl polimerek jelenléte, (iv) az amorfizáció, (v) a gyógyszer és a polimer segédanyag közötti kölcsönhatás.

Száraz és nedves őrléssel, kombinált nanoprecipitáció és nanoporlasztóval történő szemcseképzés alkalmazásával **optimalizáltuk a meloxicám, a lamotrigin és a loratadin hatóanyag-nanodiszperziók előállítását, majd ezen prediszperziókból mukoadhezív segédanyag (HA) felhasználásával viszkózus nazális folyékony formát, illetve orrport formuláltunk.** A preformulációs vizsgálatok, bevitelnek megfelelő *in vitro* és *in vivo* tesztek igazolták a nazális bevitel alkalmazhatóságát.

Igazoltuk, hogy intranazális beadással a nanoméretnek köszönhetően a hatóanyagok mind a transzepitális, mind az axonális transzporton keresztül plazmába és az agyba juttathatók.

Nazális gyógyszerformák megfelelő tesztelése céljából diffúziós vizsgálatra alkalmas készülékeket hasonlítottunk össze. Bebizonyítottuk, hogy Side-Bi-Side cella alkalmas a porokból és folyadékokból történő gyógyszerdiffúzió vizsgálatára, különösen a szuszpenziók vizsgálatára. Permeabilitást vizsgáló **módszert fejlesztettünk** egy módosított horizontális cella tervezésével, alkalmassá tettük **nazális szuszpenziók és porok** valós idejű *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatára. Vizsgálati protokollt dolgoztunk ki.

Eredményeink azt mutatják, hogy a nanoméretű MEL javasolható innovatív intranazális folyékony adagolási forma kifejlesztésére az akut fájdalom csökkentésére, vagy adjuvánsként a fájdalomcsillapítás fokozására. LAM-tartalmú tabletták, rövid távú helyettesítésére epilepsziában, valamilyen felszívódási zavar vagy akut hasmenés esetében javasolható a fejlesztett orrpor formuláció. LOR-tartalmú nanoszuszpenzió alapú viszkózus oldat nazális aplikálás alternatívája lehet per os antihisztamin készítményeknek.

Tézispontok: T10-13

K19-26 (3,005+3,944+3,06+4,412+5,875+6,525+6,525=33,346), EK5-6

6.2.2 Hatóanyagot szállító mikroméretű hordozó rendszerek kutatása és fejlesztése pulmonális alkalmazás céljából

Aktuális fejlesztési feladatnak tekinthető korszerű porinhalációs összetételek (dry powder inhalation-DPI) formulálása, lokális és szisztémás hatás elérése céljából (kiváltképpen gyenge vízdékonyságú hatóanyagok esetén). A **pulmonális gyógyszerbevitel** szempontjából kritikusnak mondható szemcseméret-tartomány (1-5 μm) és aerodinamikai jellemzők (*in vitro* tüdő depozíció mértéke) a tradicionális módszerek mellett új technológiákkal optimalizálható. A mikro- vagy nano-méretű hatóanyagot a tüdő centrális vagy perifériás területeire **mikroméretű hordozórendszerek segítségével juttathatjuk**, a nanorészecskék önmagukban kilégzésre kerülnek. Kutatómunkánk során inhalációs porok fejlesztésével foglalkoztunk, ahol a szemcseméretcsökkentés és preformulálás együtt valósult meg (dezintegráló és integráló eljárások). Alapul véve az előzetesen már optimalizált prediszperzió összetételeket, illetve a ko-porlasztva szárítás során az előnyös szemcseképzési technológiát új összetételek fejlesztése valósítható meg.

A porinhalációs készítmények jelentős hányada hordozó-alapú, amelyben a mikronizált méretű hatóanyag nagy felületű laktózzal alkot fizikai keveréket. A fejlesztésben **újszerű hordozó alapú megközelítés** az általunk alkalmazott formulálási technológia, ahol mind a

hatóanyag, mind a hordozó habitusa megváltozik. Kutatásaink során **kidolgoztunk egy olyan segédanyagokkal történő ko-porlasztásos eljárást, amely alkalmas vízben jól és rosszul oldódó hatóanyag mikronizálására/nanonizálására (micro-in-micro/nano-in-micro)**, a hordozómentes pulmonális alkalmazásnak megfelelő szemcseméretű mikrokompozit (porózus, nem porózus morfológia) előállítására. A **34. táblázat** a fejezet első részében bemutatott formulálási vonalak mikronizált hatóanyagtartalmú DPI termékek jellemzőit foglalja össze (6.2.2.1 és 6.2.2.2).

Hatóanyagként a meloxicámot választottuk, mivel korábban optimalizált mikro- és nanoméretű prediszperziók előállítására alkalmas technológiai protokollok álltak rendelkezésünkre, amelyekre a preformulálási lépések alapozhatók. Gyulladásgátló hatása érvényesíthető különböző lokális tüdőbetegségek kezelésében. Farmakológiai vizsgálatok igazolják antioxidáns, antifibrotikus és analgetikus hatását. Cisztás fibrózis kezelésében a részecskék eljutnak a tüdő apikális részére, valamint átjutnak a viszkózusabb nyákon is. Nano méretű DPIként formulálva hatása a különböző kórképekben fokozható. Nem kis sejtes tüdőkarcinómában carciniogenezis során befolyásolja a magasabb a ciklooxygenáz-2 kifejeződést, ezért a meloxicám használható a terápiában citosztatikummal kombinálva is, a nanonizált hatóanyagokkal pedig megcélozhatóak a tumor sejtek [236, 237]. Az új típusú koronavírus eljut az mélyebb légutakba és az alveolusokba, a 2-es típusú pneumocitákban replikálódik. Gyulladást indukál, ami szövődményekhez vezet [238, 239], nanonizált hatóanyag formulálása áttörést jelenthet a terápia szempontjából. A 6.2.2.3 részben inhalációra alkalmas nanoméretű hatóanyagot tartalmazó formulációk előállítását *in vitro* és *in silico* aerodinamikai karakterizálást mutatom be.

34. táblázat: Mikronizált hatóanyagot tartalmazó DPI-ok fejlesztése

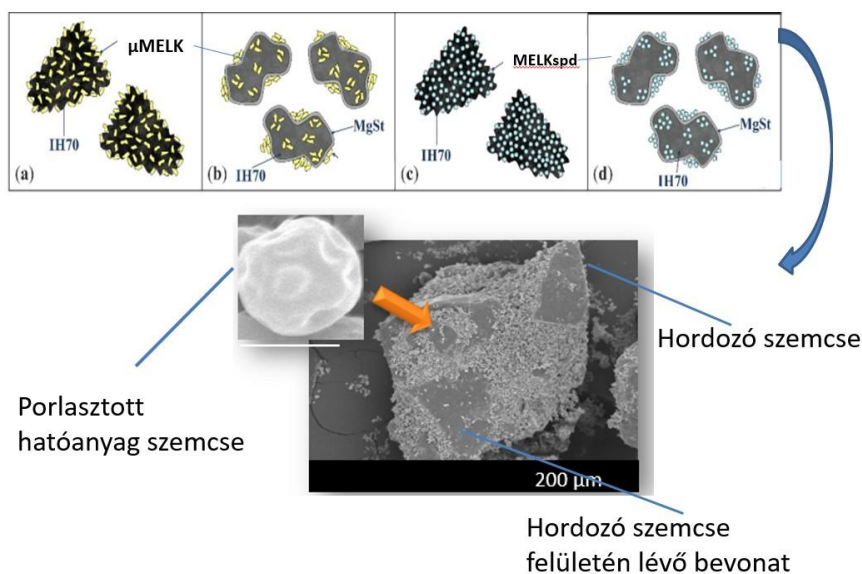
	Hordozó alapú formulálás	„Micro-in-micro”	Nem-porózus formulálás	Porózus formulálás
Hatóanyag	MELK: 0,2 g	MEL: 50 mg/ml	MELK: 20 mg/ml	MEL: 1,5 mg/ml
Segédanyagok	IH70: 2 g MgSt: 0,044 g	PVP: 0,25 mg/ml Tween 80: 0,5 mg/ml LEU: 2 mg/ml PVA: 0,1 mg/ml Mannit: 50 mg/ml	LEU: 20-40 mg/ml PVA: 2-2,5 mg/ml	LEU: 0,75 mg/ml AB: 1,5-2 mg/ml HA: 0,15-0,3 mg/ml
Eljárás	Porlasztva-száritás, Turbula keverő Hordozó felületkezelése	Ultra-Turrax, Nagy nyomású homogenizátor, Porlasztva-száritás	Oldatkészítés, Porlasztva-száritás	Oldatkészítés, Porlasztva-száritás
Kitermelés	54,3%	75-77%	60-64%	61-70%
Optimalizált összetétel	MELK _{spd} + IH70_MgSt	MEL-M-PVA-LEU MEL-M-PVP-LEU	MELK_LEU_PVA	MEL-LEU-HA ^{0,15} -AB ²
Morfológia	Szférikus, gödrös felszín Sima felszínű, szögletes hordozó	Szférikus, egyedi részecskék, Tween 80: rétegződés	Kagyló-alakú, egyenetlen felszín	Szférikus, porózus szerkezetű
Geometriai átmérő	MELK: 2,1 µm, Hordozó: 215 µm	3-3,5 µm	3,0-3,8 µm	4,9-5,6 µm
Kristályosság	Amorf	Kristályos	Amorf	Amorf
Sűrűség	-	-	0,30-0,42 g/cm ³	0,09-0,16 g/cm ³
In vitro kioldás	Gyors (t ₅ =100%)	Gyors (t ₅ =80%)	Gyors (t ₅ =100%)	-
Citotoxicitás	Nem toxikus	Nem toxikus	Nem toxikus	Nem toxikus
In vitro aerodinamikai tulajdonságok:				
EF	87%	40-48%	67-78%	77-90%
FRF	73%	53-58%	42-53%	54-70%
MMAD	3,11 µm	3,05-3,3 µm	2,6-3,0 µm	2,2-2,8 µm
In silico aerodinamikai tulajdonságok (t_{b-h}=10 mp):				
Felső légúti	40%	-	22-24%	21-25%
Tüdő/Centrális	65%	-	48-51%	51-52%
Kilégzett/Periféria	10%	-	26-27%	23-27%

IH70: ihalációs laktóz; MgSt: magnézium-sztearát; LEU: L-leucin; AB: ammónium-hidrogén-karbonát

EF: emittált frakció; FRF: finom részecske frakció; MMAD: átlagos aerodinamikai átmérő; t_{b-h}: benttartási idő

6.2.2.1 Összetett hordozó alapú DPI rendszerek formulálása

A munkánk célja egy innovatív, korábban még nem alkalmazott hordozó alapú, MELK-t tartalmazó DPI rendszer kifejlesztése volt, amely során **hordozómentes és hordozó alapú technikák előnyeinek** felhasználásával, porlasztva-szárított MELK-t alkalmaztunk felületmódosított hordozóval homogenizálva. Kiemelendő, hogy az EGIS által újonnan szabadalmaztatott MELK pulmonális formulálási lehetőségeivel kizárólag kutatócsoportunk foglalkozik. Négyféle módon készítettünk termékeket: a referenciaként szolgáló mintáknál *száraz őrléssel mikronizált* meloxikám-káliumot (μ MELK- 3,6 μ m) Turbula-keveréssel vittük fel a nagyméretű hordozó (inhalációs laktóz-IH 70-215 μ m) felületére, egy másik termék esetében pedig MgSt-vel felületkezelt IH70-et használtunk fel (**35. ábra/a, b**). Ezt követően az előzetesen porlasztva-szárított (Büchi Mini Dryer B-191) hatóanyagból (MELKspd- 2,11 μ m) és IH 70-ből álló interaktív fizikai keveréket (**35. ábra/c**) készítettük el. Előállítottuk az említett formuláció olyan változatát is, ahol a hordozót előzetesen magnézium-sztearáttal (MgSt) felületkezeltük (4 órás Turbula keverés) (**35. ábra/d**). A termékek előállítási paramétereit irodalmi adatok alapján definiáltuk, így a hordozó-hatóanyag arány minden esetben 10 az 1-hez [192] volt. **Tehát az inhalációra alkalmas részecskék mikronizálását dezintegráló száraz őrléssel, illetve integráló porlasztással, azaz szemcseképzéssel valósítottuk meg. Ez utóbbi esetben a hatóanyag teljes habitusát kedvező módon befolyásoltuk.** Megállapítottuk, hogy a magnézium-sztearát a hordozó aktív helyeit betöltve módosította a hatóanyag hordozó felületén való elterülését és ezáltal az interpartikuláris kölcsönhatásokat is befolyásolta.



35. ábra: Őrléssel és porlasztva-szárítással mikronizált hatóanyag felvitele felületkezelt hordozóra

Kimondható, hogy ha a hatóanyag aggregációra hajlamos (pl. MELKspd), ezáltal nagy kohéziós munka (W_c) jellemzi, de az adhéziója a hordozóhoz kismértékű, javasolt hordozó-alapú formulálás alkalmazása. Úgy véljük, ilyen esetben a hordozó preventíve segíti azt, hogy a hatóanyag ne tapadjon össze, de a kismértékű adhézió miatt inhaláció során könnyen le tud szakadni a farmakon a hordozó felületéről. Igazoltuk, hogy magnézium-sztearátot tartalmazó minta esetén csökkent a polaritás, az adhéziós munka (W_{adh}) és az adhéziós erő (F_{adh}) is. Az interpartikuláris kölcsönhatások módosultak, inhaláció során a hatóanyag könnyebben leválhat a hordozó felszínéről inhaláció során.

A tüdődepozíció (FRF) mértéke növelhető a kedvező habitusú (szférikus morfológia, mikronos szemcsék, kis sűrűség) porlasztva-szárított meloxicám-kálium (MELKspd) hordozón való alkalmazásával. Ezzel ellentétben az őrléssel mikronizált meloxicám (μ MEL) esetén a hordozó jelenléte rontotta a tüdődepozíciót (**35. táblázat**). A magnézium-sztearáttal történő felületkezeléssel az FRF értéke szintén javítható. Az átlagos aerodinamikai átmérő (MMAD) vonatkozásában kijelenthető, hogy fordított arányosság figyelhető meg a szemcsék mérete és a depozíció mértéke között. Megállapítottuk, hogy a hatóanyag szférikus morfológiája, a hordozó felületkezelése és a részecskék között lévő kölcsönhatás együttesen játszik szerepet a termék aerodinamikai sajátságainak befolyásolásában, a deponálódott hatóanyag mértékének javításában.

35. táblázat: Interpartikuláris kölcsönhatások és *in vitro* aerodinamikai jellemzők

Minták	W_{adh} [mN/m]	F_{adh} [mN]	W_c [mN/m]	FRF (%) < 5 μ m	FRF (%) < 3 μ m	MMAD (μ m)
μ MEL			118,76	27,71 \pm 1,32	15,52 \pm 0,66	6,54 \pm 0,15
μ MEL + IH70	101,16	1,68* 10 ⁻³		24,99 \pm 0,89	14,71 \pm 0,27	7,18 \pm 0,06
μ MEL + IH70_MgSt				31,50 \pm 1,08	19,17 \pm 0,45	7,43 \pm 0,11
MELspd			146,74	59,47 \pm 1,33	37,66 \pm 0,36	3,41 \pm 0,18
MELKspd + IH70	102,67	0,67* 10 ⁻³		59,60 \pm 0,65	35,68 \pm 0,21	3,82 \pm 0,16
MELKspd + IH70_MgSt	76,80	0,49* 10⁻³		72,32 \pm 0,74	46,05 \pm 0,41	3,11 \pm 0,09

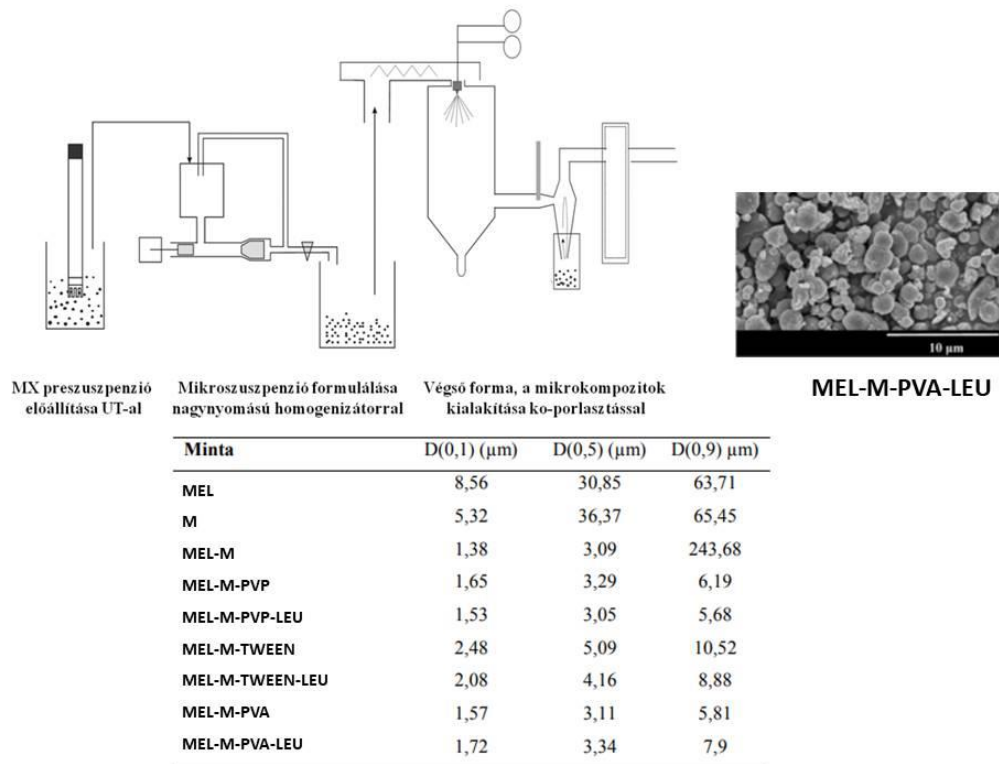
Összeségében megállapítottuk, hogy a fejlesztett és innovatív, hordozó alapú rendszerek közül az amorf sajátságú MELKspd + IH70_MgSt készítmény kiemelkedő *in vitro* tüdődepozíciót mutatott – FPF < 5 μ m (72,32%) és FPF < 3 μ m (46,05%), amit *in silico* mérésekkel is alátámasztottunk (**K27**).

Igazoltuk, hogy a hordozómentes formulációk fejlesztése mellett még mindig vannak lehetőségek a hordozóalapú DPI-k továbbfejlesztésére kombinált technológiák alkalmazásával. NSAID kutatási vonalunk mellett antibiotikum-tartalmú DPI fejlesztések (**EK 7, EK 8**) is igazolták e technológia alkalmazhatóságát, ahol a formulálás utolsó lépéseként az inhalációs kapuszala típusokat is tanulmányoztuk, ennek köszönhetően a jövőben a CF- és COPD-terápia hatékonyságának javítása is előrevetíthető.

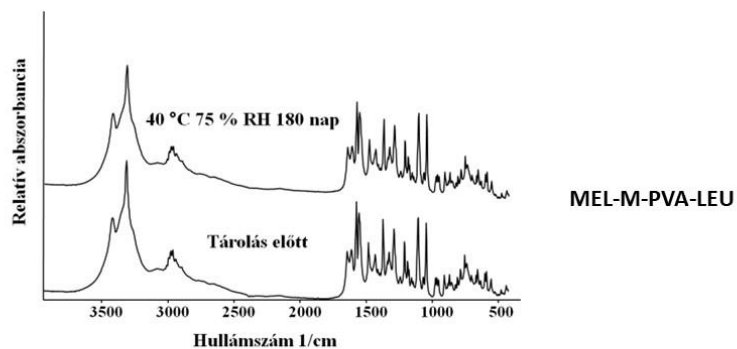
6.2.2.2 Innovatív „micro-in-micro” porinhalációs formulációk fejlesztése

A klasszikus formulálási megközelítéssel ellentétben (porkeverék előállítás) következő lépésként a MEL-tartalmú mikrokompozitokat a hatóanyag/segédanyagok ko-porlasztásával kétlépéses folyamatként állítottuk elő (**37. ábra**). Ez az eljárás új tendenciát képvisel a száraz-porinhalációs készítmények formulálásában. Innovatív technológiával a vízben rosszul oldódó meloxicám hatóanyagot, **vizes mikroszuszpenzióból** a tüdőben biztonságosan alkalmazható segédanyagokkal (különböző kombinációkban: PVP, PVA, TWEEN, LEU) és mikrohordozóval (mannit, M) együtt porlasztottuk, **új-típusú mikrokompozitot (micro-in-micro formuláció)** eredményezve. A szemcseméret csökkentést *nedves őrléssel* hajtottuk végre (Ultraturrax -UT-6500 és 24000 rpm 10 perc). Az előállított pre-szuszpenzióból mikroszuszpenziót (1,5-5 μm) készítettünk nagy nyomású homogenizátor (Avestin Emulsiflex C3, Kanada) alkalmazásával, majd porlasztva-szárítással képeztük (Büchi Mini Dryer B-191) az inhalációs gyógyszerformát. A két lépésben kialakított mikrokompozitok szemcsemérete a pulmonális alkalmazásnak megfelelőek ($\sim 3 \mu\text{m}$). a polimerek (PVA és PVP) kedvezően módosítják a mikrokompozitok felületét, aggregáció-gátlást biztosítva az összetételben, ezzel a szemcsék egyediségét megőrizve. Megállapítható, hogy a LEU alkalmazásával a deponálódott frakció növelhető, az *in vitro* aerodinamikai vizsgálatok során kedvező kitapadás figyelhető meg a bronchiális traktusnak megfelelő szinteken. **A hatóanyag felületén segédanyagokkal kialakított hidrofil réteg elősegíti a MEL pillanatszerű kioldódását a bronchiális traktust modellező hidrofil környezetben** (80% MEL-felszabadulás 5 perc elteltével, amely több, mint 25-szörösére fokozódott a kezeletlen anyaghoz képest). A végtermék kristályos sajátságának megtartása előnyös a stabilitás (40 °C, 75 % RH, 6 hónap) szempontjából. **Innovatív terméket fejlesztettünk**, a képzett mikrokompozitok új tendenciát képviselnek a pulmonális hatóanyagszállítás területén (**36. ábra**). A MEL-M-PVA-LEU összetételű mikrokompozit a gyorsított stabilitási vizsgálatok során fizikai és kémiai szempontból stabil és a vizsgált tulajdonságok szignifikáns változást nem mutatnak, az FRF értéke meghaladja a jelenleg forgalomban lévő készítmények aerodinamikai paramétereit (53-57%) (**37. ábra**), valamint a

terápiás céllal tüdőbe juttatott koncentrációk citotoxicitási vizsgálatai alapján a Calu-3 típusú sejtek életképességét nem befolyásolták (K28, K29, EK9).



36. ábra: Micro-in-micro rendszerek előállítási folyamata és a termék mérete, morfológiája



Minta	FRF	Átlagos aerodinamikai
	(%)	átmérő (µm)
MEL-M-PVP-LEU tárolás előtt	53,05 ± 1,13	3,52 ± 0,13
MEL-M-PVP-LEU tárolás után	41,16 ± 2,81	3,91 ± 0,45
MEL-M-PVA-LEU tárolás előtt	57,50 ± 1,0	3,04 ± 0,17
MEL-M-PVA-LEU tárolás után	52,5 ± 2,2	3,39 ± 0,11

37. ábra: Micro-in-micro rendszerek szerkezeti és aerodinamikai jellemzése stabilitási vizsgálatok során

Munkám folytatásaként az újonnan szabadalmaztatott meloxikám-kálium és az *in situ* (pH eltolással) képzett meloxikám **vizes oldataiból** előállítottunk **hordozómentes DPI-formákat**. A korábbi mikro-szuszpenziós ko-porlasztást követően tehát jelen esetben, az előállított vizes oldatot porlasztva-szárítottuk, ezáltal nagy kitermeléssel (60–70%), jól reprodukálható amorf termékekhez jutottunk.

Elvégeztük a MELK-LEU/MELK-PVA és MELK-LEU-PVA szervesoldószer-mentes oldatának ko-porlasztását különböző összetétel-arányokat vizsgálva. Megállapítottuk, hogy integráló eljárással D (0,5): 2,5-4,4 μm -es szemcsék képezhetők, amelyek kerekded, kagyszólyszerű morfológiával jellemezhetők. A DPI-ok sűrűségének kontrollálása is befolyásolja aerodinamikai profiljukat. A DPI-részecskék kisebb sűrűsége jobb folyási sajátságot és nagyobb depozíciót biztosíthat a mélyebb légutakban. A mintában lévő nagyobb mennyiségű LEU tovább csökkenti a sűrűséget, e részecskék felületének érdessége is erőteljesebb. A PVA jelenléte csökkenti a sűrűséget. E segédanyagok kombinálása esetén a sűrűség $0,153 \text{ g/cm}^3$ alá csökkent. A DPI-k sűrűsége általában 1 g/cm^3 , ezért saját formulációink kis sűrűségű készítményeknek tekinthetők. Az *in vitro* és *in silico* aerodinamikai mérések során megállapítottuk, hogy LEU-PVA segédanyagok használatával a FRF érték 70% fölé emelhető, MMAD: $\sim 2,5 \mu\text{m}$. Javasolt a LEU nagyobb koncentrációban és a PVA kisebb mennyiségben történő alkalmazása. 30/60/80 l/perc-es áramlási sebesség beállításával is meghaladtuk a gyári készítmények FRF értékeit minden összetétel vonatkozásában, ezzel alátámasztva alkalmazhatóságukat különböző légzésfunkcióval bíró páciensek terápiájának megvalósítására, eltérő ellenállású szerelékek használatával is (**K30**).

Következő célunk hordozómentes, meloxikám tartalmú, nem porózus (MEL-LEU és/vagy HA), illetve porózus (MEL-LEU-HA-AB -ammónium-bikarbonát-) DPI-ok előállítása volt porlasztva-szárítással. A porózus készítményekhez különböző koncentrációjú AB-t (0,5, 1,5 és 2,0 mg/ml) adtunk, amely porogén anyagként működik, melegítés hatására CO_2 -ra és H_2O -ra bomlik. Az AB-t 5 perccel a porlasztva szárítás előtt feloldottuk (2 perc keverés, 200 ford./perc), hogy minimalizáljuk a porlasztva-szárítás előtti bomlását.

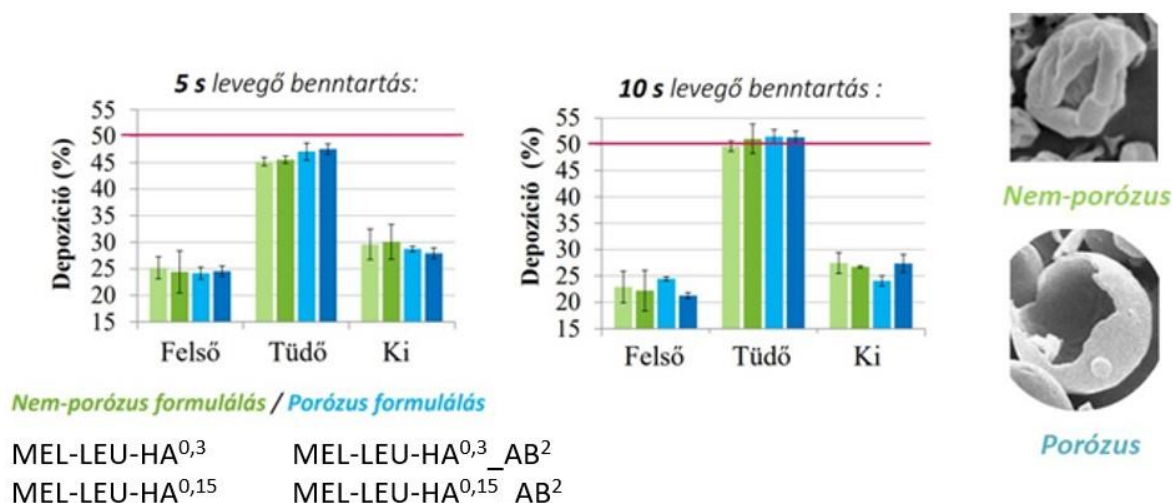
Megállapítottuk, hogy a kisebb sűrűségű ($<0,19 \text{ g/cm}^3$) és nagy geometriai átmérőjű porózus összetételek aerodinamikai tulajdonságai ($\text{EF} \geq 76,1\%$ és $\text{FRF} \geq 77,5\%$) kedvezőbbek, a kisebb méretű, de tömörebb szerkezetű nem-porózus formulációkhoz viszonyítva ($\text{EF} \leq 61,7\%$ és $\text{FRF} \leq 41,2\%$) (36. táblázat). Mind a nem-porózus, mind a porózus összetételek kiemelkedő *in vitro* és *in silico* aerodinamikai tulajdonságokkal rendelkeztek, amelyek meghaladják a jelenleg forgalomban lévő inhalációs készítmények hasonló értékeit.

36. táblázat: Mikrometriai és aerodinamikai értékelés

	D (0,5) (μm)	Valódi sűrűség (g/cm^3)	Tömörített sűrűség (g/cm^3)	MMAD (μm)	FRF (%)	EF (%)
Nem porózus DPI						
MEL-LEU	3,4 \pm 0,02	0,27 \pm 0,01	0,45 \pm 0,05	2,52	41,2 \pm 3,3	61,7 \pm 4,1
MEL-LEU-HA ^{0,3}	4,3 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	0,47 \pm 0,03	2,71	36,2 \pm 4,2	57,1 \pm 1,8
MEL-LEU-HA^{0,15}	3,9\pm1,07	0,27\pm0,01	0,42\pm0,10	2,95	35,6\pm2,7	59,9\pm1,7
Porózus DPI						
MEL-LEU-HA ^{0,3} _AB ^{1,5}	5,6 \pm 0,73	0,09 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	2,74	54,5 \pm 2,1	79,5 \pm 4,2
MEL-LEU-HA ^{0,15} AB ^{1,5}	5,0 \pm 0,60	0,09 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	2,57	57,4 \pm 5,6	77,5 \pm 6,8
MEL-LEU-HA ^{0,3} _AB ²	5,6 \pm 0,06	0,07 \pm 0,02	0,10 \pm 0,02	2,41	59,7 \pm 4,0	79,5 \pm 5,5
MEL-LEU-HA^{0,15}_AB²	4,9\pm0,60	0,10\pm0,02	0,19\pm0,05	2,32	65,8\pm3,2	82,8\pm6,8

*felső index számértéke: HA és AB mg/ml koncentrációt jelöli, MEL: 1,5 mg/ml és LEU: 0,75 mg/ml

Különböző segédanyag koncentrációkat összehasonlítva, megállapítottuk, hogy 2,0 mg/ml AB-koncentrációjú porózus részecskék alacsonyabb MMAD-t (2,32–2,41 μm) mutatnak, mint az 1,5 mg/ml-es (2,57–2,74 μm). A nagyobb mennyiségű porogén pozitívan befolyásolta a részecskék folyási sajátságait, így kisebb aerodinamikai átmérőt eredményezett. Ezzel szemben nincs szignifikáns különbség az MMAD értékben a 0,15 és 0,30 mg/ml HA koncentrációk között. Az *in vitro* aerodinamikai elemzéssel összhangban lévő depozíció prediktálható az *in silico* vizsgálatokkal is. A tüdődepozíció a levegő bentartási idő növelésével fokozható (38. ábra). A459 tüdősejt kultúrán tesztelve ezeket az összetételeket, sejt toxicitást adott koncentrációban nem mutattak, 1 mg/ml-koncentráció alatt alkalmazhatók. Ennélfogva alkalmassá válnak fibrózis, COPD és egyéb tüdőt érintő gyulladásos megbetegedések lokális kezelésére (K31, EK10).



38. ábra: Porózus és nem-porózus formulációk *in vitro* és *in silico* aerodinamikai jellemzése (Felsőlegúti (Felső), Bronhiális és alveoláris (Tüdő), Alveoláris és kilélegezhető (Ki))

Diszkusszió

Előállítási technológiákat vizsgáltunk hordozóalapú és hordozómentes mikrorészecskék preformulációja során. Dezintegráló és integráló eljárásokat alkalmazva inhalációra alkalmas MEL-tartalmú DPI termékeket képeztünk, inhalációra alkalmazható segédanyagokkal (porózus és nem porózus részecskék oldatból és szuszpenzióból ko-porlasztással). A porlasztva-szárítás 55-75%-os kitermeléssel amorf szemcséket eredményezett 2,51-5,6 μm -es geometriai átmérővel, kivétel a mikrosuszpenzió porlasztása, ahol a kristályosság megtartott volt. *In vitro* és *in silico* aerodinamikai vizsgálatokkal prediktáltuk a depozíció mértékét.

Továbbfejlesztettünk egy hagyományos, **hordozó alapú formulálást**, ahol a hordozó felületkezelő eljárását (a felületen lévő aktív helyek bevonásával) követően előzetesen beállított, megfelelő habitusú porlasztott hatóanyaggal interaktív fizikai keveréket állítottunk elő. Minden esetben a ko-porlasztott hatóanyag és a felhasznált segédanyagok biztosították az egyedi morfológiát, a megkövetelt mikronos geometriai és aerodinamikai átmérőt. Megállapítottuk, hogy aggregációra hajlamos szemcsék esetén a részecskék között nagy a kohéziós munka (W_c), azonban az adhézió a hordozóhoz kismértékű, javasolt az általunk alkalmazott hordozó-alapú formulálási technológia. Igazoltuk, hogy magnézium-sztearátot tartalmazó minta esetén csökkent a polaritás, az adhéziós munka (W_{adh}) és az adhéziós erő (F_{adh}) is. Az interpartikuláris kölcsönhatások módosultak, a hatóanyag könnyebben leválhat a hordozó felszínéről inhaláció során.

Korszerű, innovatív technológiák alkalmazásával **hordozómentes** porinhalációs készítményeket („micro-in-micro” kompakt/nem porózus, illetve porózus) formuláltunk elsősorban a tüdő bronchiális régiójának targetálása céljából. Igazoltuk, hogy indifferens vivőanyagot (M) a szemcsék egyediségének biztosítására, polimereket és nedvesedést fokozó segédanyagokat (PVA, HA, Tween) a morfológia befolyásolása céljából, illetve aminosav hozzáadását (LEU) az aerodinamikai sajátságok növelése érdekében szükséges a készítmény összetétel tervezésénél alkalmazni. A LEU nagyobb koncentrációban tovább csökkenti a sűrűséget, e részecskék felületének érdessége is erőteljesebb, kagylószerű morfológia dominál. Pórusképző AB-t szintén nagyobb koncentrációban javasolt alkalmazni, ezáltal 5-6 μm -es 0,1 g/cm^3 kissűrűségű részecskék 70%-os FRF értéket mutattak. Olyan technológiai előállítási protokoll lépéseket alkalmaztunk, amelyek mind hidrofil, mind lipofil sajátságú hatóanyagok pulmonális terápiában való alkalmazhatóságát vetítik elő. Vizsgálati protokoll részét képező *in silico aerodinamikai* modellezés alapján elsősorban a centrális tüdő régió érintettsége prediktálható, ami a krónikus obstruktív tüdőmegbetegedések hatékony kezelését biztosítja.

6.2.2.3 Szubmikronos („nano-in-micro/extrafine”) porinhalációs rendszerek fejlesztése krónikus tüdőbetegségek hatékonyabb kezelésének céljából kombinált nanotechnológiai eljárásokkal

A nanorészecskék DPI formulálásának megoldása új lehetőségeket biztosít az inhalációs terápiában, forgalmazott készítmény azonban jelenleg nincs piacon. Következő lépésben meloxikám-tartalmú hordozómentes **„nano-in-micro/extrafine” formulálást** valósítottunk meg, megfelelő segédanyagokkal kialakított részecskék képzésével. Nedves őrléssel (MEL_PVA) előállított prediszperzióval, majd különböző elven alapuló, mikro- és nano-porlasztva szárítással nanonizált hatóanyag tartalmú inhalációs port (MEL, PVA és LEU tartalmú) formuláltunk. A porlasztó típusa alapján „Mini porlasztó” – 165 °C illetve „Nano porlasztó” – 80 °C-os szárító levegő hőmérséklet alkalmazása mellett végeztük a 138 nm-es prediszperzió szilárd fázisú szemcsévé történő integrálását (**37. táblázat**).

37. táblázat: Nanonizált MEL-t tartalmazó prediszperzió DPI formulálása

	„Nano-in-micro” formulálás	„Nano-in-extrafine” formulálás
Hatóanyag	MEL: 1,5 mg/ml	MEL: 1,5 mg/ml
Segédanyagok	LEU: 20-40 mg/ml PVA: 2-2,5 mg/ml	LEU: 20-40 mg/ml PVA: 2-2,5 mg/ml
Eljárás	Nedves őrlés-prediszperzió 138 nm, Porlasztva szárítás (165 °C)	Nedves őrlés-prediszperzió 138 nm Nano-porlasztva szárítás (80 °C)
Kitermelés	45-58%	61-64%
Morfológia	Szférikus, fánkyszerű, egyenetlen felszín	Szférikus, egyenetlen felszín
Geometriai átmérő	3,1-4,4 µm	1,1-1,5 µm
Kristályosság	Részben amorf (29-58%)	Részben amorf (54-69 %)
Sűrűség	0,20-0,28 g/cm ³	0,30-0,32 g/cm ³
<i>In vitro</i> kioldás	t ₃₀ = 82%	t ₃₀ = 100%)
Citotoxicitás	Nem toxikus	Nem toxikus
Gyulladáscsökkentő hatás	-	Jelentős
<i>In vitro</i> aerodinamikai tulajdonságok		
EF	72-84%	30-81%
FRF	73-76%	62-95%
MMAD	1,5-2,4 µm	1,2-2,2 µm
<i>In silico</i> aerodinamikai tulajdonságok (t_{b-h}=10 s)		
Felső légúti	10-22%	5-34%
Tüdő/Centrális	22-47%	16-29%
Kilégzett/Periféria	32-68%	29-67%
Terápiás alkalmazási javaslat	Krónikus obstruktív tüdőbetegség, Cisztás fibrózis	Covid-19 okozta tüdőgyulladás, Nem kissejtes tüdőcarcinóma

A MEL nanorészecskéket (138 nm) tartalmazó nanoszuszpenzióból közel gömb alakú, 3-4 µm méretű mikrorészecskéket integráltunk „Mini” porlasztóval (µspd). LEU hozzáadásával

(0-20-40 mg/ml) a porlasztva szárítás hozama (58%) javítható. A minták fajlagos felülete (1,7-2,2 m²/g) nőtt a MELhez (1,09 m²/g) képest. A kis sűrűségű (0,20-0,27 g/cm³) készítményekkel megfelelő aerodinamikai tulajdonságokat értünk el. A PVA alkalmazásával megnőtt a minták polaritása, a LEU a részecskék kohézióját csökkentette. Az XRPD és DSC mérésekkel a MEL amorf állapotát támasztottuk alá. A fajlagos felület növekedése, az amorfizáció és a segédanyagok hatására mesterséges tüdőfolyadékban a kioldódás 23%-ról 82%-ra javult és *in vitro* permeabilitás is háromszorosára fokozódott. A minták jó aeroszolképző tulajdonságokat mutattak az *in vitro* aerodinamikai mérések során: 72% feletti FPF, 1,55 és 2,33 µm közötti MMAD, 72% feletti ED. A LEU alkalmazása növeli a mélyebb légutakban történő depozíciót (38. táblázat).

38. táblázat: „Nano-in-micro” DPI-ok fizikai-kémiai és *in vitro* jellemzése

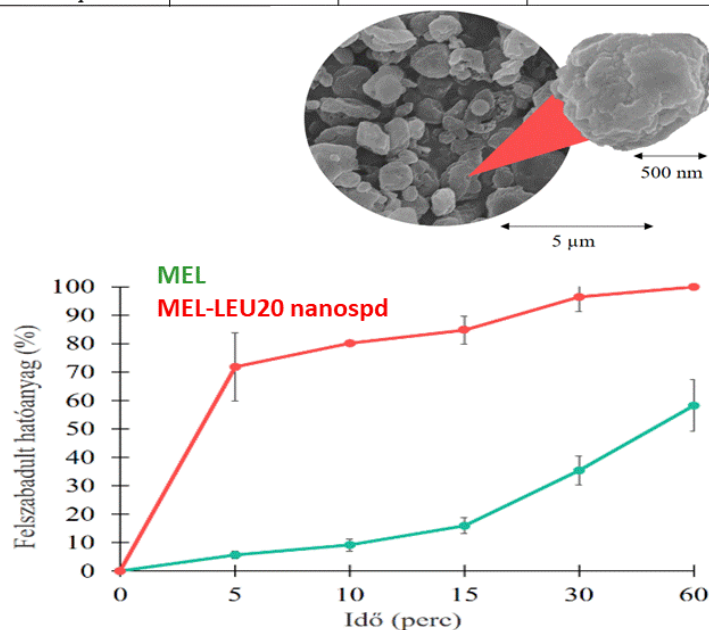
	D (0,5) (µm)	Valódi sűrűség (g/cm ³)	Tömörített sűrűség (g/cm ³)	W _c (mN/m)	J (µg/cm ² /h)	t ₃₀ (%/30perc)	MMAD (µm)	FRF (%)	EF (%)
MEL- LEU0 µspd	3,186 ±0,02	0,177 ± 0,02	0,262 ± 0,01	146,76 ± 1,40	61,80	56	2,33 ± 0,08	75,67 ± 3,46	72,42 ± 3,05
MEL- LEU20 µspd	3,800 ±0,014	0,156 ± 0,01	0,274 ± 0,01	123,68 ± 1,02	86,90	67	1,74 ± 0,35	72,81 ± 1,46	83,47 ± 1,33
MEL- LEU40 µspd	4,396 ±0,03	0,147 ± 0,01	0,204 ± 0,01	99,96 ± 1,94	73,58	82	1,55 ± 0,06	73,63 ± 0,96	75,22 ± 1,75

Az *in silico* számításokat 5 s és 10 s benntartási idővel számoltuk. 10 másodperces lélegzetvisszatartást alkalmazva a lerakódott frakció mértéke minden esetben javult. A LEU tartalmú termékek javult diszperzitásfokának köszönhetően az extrathoracalis depozíció csökkent. Az *in silico* aerodinamikai értékek a termékek légutakban való mély depozícióját bizonyították, ami az acináris régióban magasabb volt a bronchiális régióhoz képest (K32).

Ezt követően ugyanezeket a formulációkat „Nano” porlasztóval is integráltuk (nanospd) azzal a céllal, hogy a végtermék extra finom méret-eloszlással, közel 1 mikronos részecskéket tartalmazzon. A termékek átlagosan 1-1,5 µm-es részecskékből álltak, amelyben a MEL nanoméretű aggregátumként detektálható. A minták zéta-potenciálja -21 és -25 mV között volt, ami azt mutatja, hogy stabil szuszpenziós rendszert képeznek. A negatív zéta potenciállal

rendelkező összetételek jobban lebomlanak a tüdőben, ezért nem okoznak további fertőzést vagy fibrózist a hosszú retenció miatt. A kioldódási és permeabilitási profilok alapján a Nano porlasztóval történő integrálás előnyösebbnek mondható (39. ábra).

Minta	d (nm)	Zéta-potenciál (mV)	Tömörített sűrűség (g/cm ³)
MEL-LEU20 nanospd	743,05 ± 27	-23,30 ± 2,74	0,3180 ± 1,32



39. ábra: Szubmikronos porinhalációs rendszer fejlesztése (nano-in-extrafine)

Az előállított „nano-in-extrafine” DPI kiemelkedő tüdődepozíciót mutat, aerodinamikai átmérője nanométeres, megcélozhatók vele az alveolusok. Az előállított minta FPF értéke 96,17% volt egészséges tüdőkapacitás mellett és 90,17% csökkent légzésfunkcióval. Ezen értékek meghaladják a jelenleg forgalomban levő készítmények értékeit. Az aerodinamikai részecskeszámláló módszer is igazolta az extrafinom partikulomok jelenlétét. Az alkalmazott koncentrációban nem toxikusak, az IL-6 koncentrációját nullára csökkentették, ezért a MEL gyulladáscsökkentő hatása alapján az alveoláris gyulladások lokális kezelésében lehet alkalmazni (39. táblázat).

Az *in silico* számításokat sztochasztikus tüdőmodell segítségével végeztük. Az eredmények korrelálnak az *in vitro* aerodinamikai értékekkel. A formulációból 25% jutott a centrális légutakba és majdnem 70% a perifériára (alveolusokba). A formulációk stabilak, aerodinamikai paramétereikben 6 és 12 hónap alatt sem mutattak szignifikáns változást. A módszer adaptálható más hatóanyagok formulálására is, tágítva a kezelhető betegségek körét

(asztma, tuberkulózis). A nanotechnológiai megoldások alkalmazása még magasabb szintre emeli a készítmények hatékonyságát. A szubmikronos részecskék mélyebbre jutnak a légutakban, a nanonizált hatóanyag pedig nagyobb mennyiségben képes elérni a célsejteket (K18).

39. táblázat: „Nano-in-micro” DPI-ok fizikai-kémiai és *in vitro* jellemzése

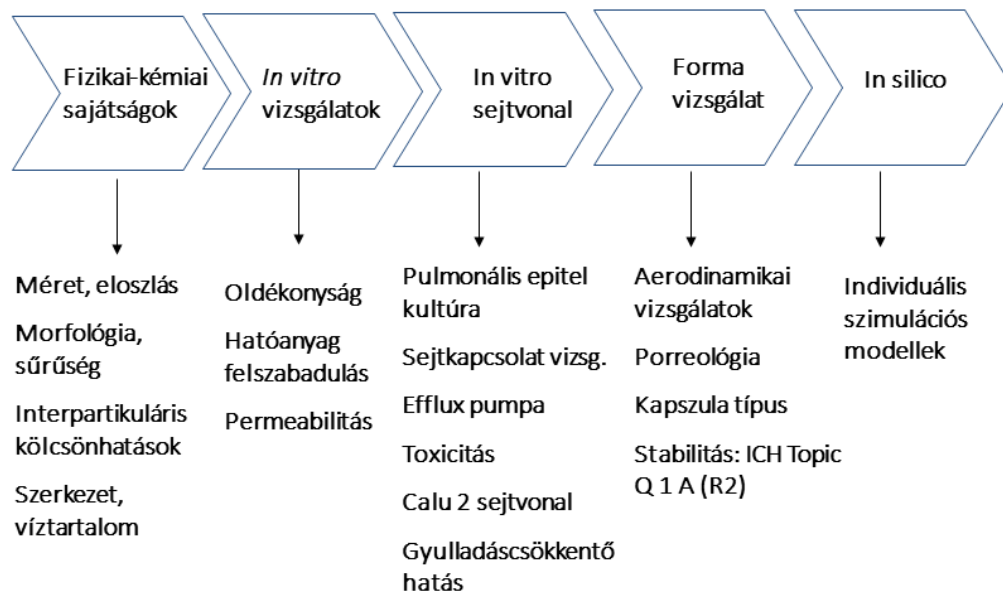
	D (0,5) (μm)	Tömörített sűrűség (g/cm^3)	W_c (mN/m)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	t_{30} (%/30pec)	MMAD (μm)	FRF (%)	EF (%)
MEL_LEU0 nanospd	1,168 $\pm 0,004$	0,3036 $\pm 0,002$	136,7	98	90	2,151 $\pm 0,106$	65,93 $\pm 0,226$	30,50 $\pm 1,131$
MEL- LEU20 nanospd	1,307 $\pm 0,036$	0,3180 $\pm 0,001$	110,48	107	94	1,344 $\pm 0,231$	86,99 $\pm 2,086$	58,77 $\pm 11,06$
MEL- LEU40 nanospd	1,429 $\pm 0,088$	0,3155 $\pm 0,006$	97,38	81	96	1,265 $\pm 0,072$	94,91 $\pm 0,812$	80,90 $\pm 10,97$

Diszkusszió

Összegzésként elmondható, hogy a porlasztva-szárítás mechanizmusa azonos összetétel ellenére eltérő karakterű DPI terméket eredményezett, azonban a nanoméretű hatóanyagoknak köszönhetően az *in vitro* és az *in silico* aerodinamikai eredmények következtében, mind a „nano-in-micro”, mind a „nano-in-extrafine” termékeket javasoljuk terápia-specifikus készítmények kutatása és fejlesztése céljából. A nano porlasztva-szárítással a kitermelés fokozható, az eljárással szubmikronos aggregárumok képezhetők.

A Mini porlasztóval készített minták magas deponálódást mutattak a hörgőket modellező 3. és 4. szinten. A nano-porlasztóval szárított LEU nélküli minták aggregálódtak és lerakódhatnak a felső légutakban. Ebben az esetben a LEU-t tartalmazó termékek viszont kimagaslóan nagy mennyiségben jutottak el az alveoláris régióba. A LEU hozzáadása növelte a kitapadt hatóanyag mennyiséget a szűrőn, amely jól szimulálja az alveolusok szintjét. Az aerodinamikai átmérő mikro- és nano-tartományban volt. **Az FRF értékek a mikrometrikus mintáknál 70%-ot, a nanoaggregárumoknál pedig 90%-ot kaptunk. A közel 80%-os emittált frakció-érték mind a két esetben elérhető.** Az alacsonyabb légzési paraméterek mellett is magas tüdődepozíciót biztosító DPI készítmények alkalmasak lehetnek a több millió krónikus tüdőbeteg életminőségének javítására, ezzel komoly társadalmi és gazdasági problémákra nyújtanának megoldást.

Összeségében elmondható, hogy formulálási és vizsgálati protokollt dolgoztunk ki (hazai szinten elsőként), amely az inhalációra szánt termékek teljes körű fizikai-kémiai, szerkezeti, morfológiai és aerodinamikai (*in vitro* és *in silico*) analízisét teszi lehetővé (**40. ábra**).



40. ábra: Inhalációs porok kutatásának és fejlesztésének vizsgálati protokollja

Tézispontok:T14-17

K18+K27-32 (6,525+6,321+2,967+3,242+3,862+4,845+5,112=32,874) EK7-10

VII. MEGÁLLAPÍTÁSOK TÉZISPONTOKBA RENDSZEREZÉSE

T1. Bolygómalomban, száraz ko-örléssel történő nanonizálás során, az acélgolyók mellett alkalmazott ko-örlő segédanyagok csökkentik az ütközés által átadott kumulatív örlési energiát, és stabilizálják a terméket (K1).

T2. Amorf és/vagy kristályos nanorészecske előállítását az örlési eljárás optimalizálásával, valamint az amorf, szemi-kristályos, illetve kristályos ko-örlő segédanyagok helyes megválasztásával lehet elérni. A ko-örlő segédanyagok (pl. PVP, PEG, PVA, mannit) alkalmazásával a szemcseméret csökkentésén túl a kristályszerkezet letörésének mértéke, valamint a hatóanyagok (MEL, LAM, NIF) oldódási sebessége és oldékonysága is befolyásolható (K1, K2, EK1).

T3. A száraz ko-örlés kritikus minőségi paraméterei (CQA-k) közül a szemcseméret és annak eloszlása, illetve a hatóanyag felszabadulása, míg a kritikus gyártási folyamat-paraméterek (CPP-k) esetében a hatóanyag:segédanyag arány, valamint az örlési idő és sebesség a legkritikusabb paraméterek a nanorészecskék előállítása során. Design Space (tervezési tér) validálásával költség és időhatékony módon mintaelőállítási módszer optimalizálható (K2, K3, EK2).

T4. A bolygómalom és a gyöngymalom előnyeinek kombinálásával fejlesztett nedves örlési eljárás alkalmas a hatóanyagok kíméletes nanonizálására. Az alkalmazott polimer-oldat viszkozitása, valamint a 0,3 mm átmérőjű cirkónium-oxid gyöngyök együttesen teszik lehetővé a műveleti idő csökkentését, elő-örlés és felületaktív anyag alkalmazása nélkül eredményeznek kívánt szemcseméretű terméket (100-500 nm). Az örlő gyöngyök mennyisége csökkenthető a hatóanyag mennyiségének növelésével, valamint ezzel a hatóanyag kristályossága is szabályozható. A prediszperzió stabilizálása szilárd hordozó felületére történő rögzítéssel vagy szárítási eljárásokkal valósítható meg (K4, K5, K6).

T5. Az ultrahangos kavitáció alkalmas, alacsony hőmérsékleten végbemenő (~40 °C) nedves örlési eljárás segédanyag jelenlétében történő mikronizálásra. A hatóanyag kristályos szerkezete a kezelés hatására nem törik le, kristályossági foka nem változik, bomlás nem prediktálható. Mind a statikus, mind a dinamikus elrendezés esetén igazoltuk, hogy a kis mintatérfogat, nagy amplitudó, 0,75 szontród pozíció eredményezi a fajlagos felület növelését, mikrorészecskék előállítását (K7, K8, EK3).

T6. Pre-szonikálással, felületnedvesítő stabilizáló (0,2-1% koncentráció) jelenlétében előállított mikroszuszpenzió (6-7 μm) nagynyomású homogenizálása nanodiszperziók (400-500 nm) előállítását teszi lehetővé, ahol minőségtervezéssel (QbD, DoE) igazoltuk a prediktált, illetve experimentális adatok korrelációját. Ezáltal az előállítási folyamat megértése, megfelelő alkalmazása, a gyógyszerforma előállítására alkalmas prediszperzió minősége biztosított, szárítási folyamattal kombinálva szilárd orodiszperz gyógyszerformaként stabilizálható (K9).

T7. Különböző sajátságú modellanyagok esetében kombinált integráló eljárással, kavitáció által asszisztált mikro/nano hatóanyagprecipitáció érhető el. A hatóanyagsemcsék megnövekedett fajlagos felületének felületi nedvesítése és amorf jellege az oldékonyság és oldódási sebesség növekedést eredményezte. Igazoltuk, hogy az oldószer-antioldószeres precipitáció során a folyamatos energiaközléssel a stabilizálók gyors felületi adszorpciója révén a nukleáció sebessége nő, míg a kristálynövekedés gátlása következik be, a PVP K25, illetve Poloxamer stabilizáló szerek (0,2%) fizikai-kémiai kölcsönhatásba kerültek a hatóanyaggal, a keletkezett amorf nanorészecskéket megfelelő módon stabilizálják, ezáltal 7 napos „holding time”-ot is biztosítva (K10, K11, K12, K13, EK4).

T8. Alternatív energiaforrások, összehasonlítva hagyományos kristályosító eljárással (kristályosítás megvalósítása, elektrosztatikus tér, nagyfeszültségű hideg plazma szintézis, illetve elektromágneses sugárzás által indukált oldószer evaporáció), új lehetőségként alkalmazhatók hatóanyagok szemcseméretcsökkentése céljából.

Mind az elektroporlasztás, mind a hideg plazma-szintézis kristályos, szférikus morfológiájú szubmikronos szemcsék (200-1000 nm) előállítását teszi lehetővé, mivel kristályosodásgátló védőpolimert a folyamat során nem használtunk fel. A nagy feszültségen végbemenő elektroporlasztás és plazma-szintézis a részecskék aggregációjával jár, amit hordozó felületén interaktív fizikai keveréssel preformulálás során ki lehet védeni.

A pillanatszerű oldószer-elpárolgatást eredményező mikrohullámú szintézisnél a PVP stabilizáló polimer egyedi, amorf hatóanyagsemcsék képzését teszi lehetővé. Alternatív integráló technológiák javasolhatók gyenge oldékonyságú hatóanyagok esetében farmakonjelöltek klinikai tesztelése, hatóanyaggyártás területén, illetve re-formulálás, biohasznosíthatóság javítása céljából (K14, K15, K16, K17).

T9. Optimalizált, nedvesőrléssel előállított nano-prediszperzióból (138 nm) a szemcsék nano porlasztva-szárítással történő integrálása közvetlen alkalmazásra használható végterméket biztosít. Javaslatot tettünk szerves oldószermentes összetételekre (szuszpendált hatóanyag, mukoadhezív és

diszperzitást fokozó segédanyagokat tartalmazva –PVA-LEU–), amelyek 1-2 mikronos termékként, nanorészecskék agglomerátumait tartalmazva, a gyenge vízoldhatóságú hatóanyag oldékonyságát, oldódási sebességét és permeabilitását 3-4-szeresére javítja. Ilyen formulációkat tudomásunk szerint még nem képeztek és nem vizsgáltak (K18).

T10. Igazoltuk mikronizált és nanonizált meloxicám-tartalmú prediszperziók alkalmazhatóságát innovatív folyékony nazális gyógyszerkészítmények fejlesztésére. Fizikai-kémiai vizsgálatokkal először minősítettük és vizsgáltuk meloxicám-kálium alternatív beviteli kapukon történő alkalmazását (EGIS által szabadalmaztatott termék). Megállapítottuk, hogy szintetikus és természetes polimerek interakciója befolyásolja a kioldódást, a PVP-HA tartalmú formuláció gyors („fast release”), míg a PVA-HA alkalmazása esetén a hatóanyagfelszabadulás szabályozott („controlled release”). A nanoMEL-PVA és a MELK intranazális beadása a készítmények nagyobb relatív felhalmozódását (% DTE) eredményezte az agyban az axonális transzport révén, mint az IV adminisztráció (K19, K20, K21, EK5).

T11. A szonikálással kombinált anti-oldószeres kicsapás alkalmas eljárásnak bizonyult loratadin-tartalmú prediszperzió preformulálására. Tudomásunk szerint először állítottunk elő loratadin nanoszuszpenzióból formulált intranazális készítményt. Mukoadhezív anyagként HA javasolható különböző koncentrációban, amely befolyásolta a rendszer fizikai-kémiai-reológiai sajátosságait. Stabilitás vizsgálat során meghatároztuk a tárolási hőmérsékletet, amely révén megtartotta kedvező sajátosságait a forma. *In vivo* tesztekkel igazolva a készítmény terápiás hatékonysága többszörösére nőtt a bevételre szánt készítménnyel összehasonlítva (K22).

A vizsgált nazális készítmények (T10-11) nem befolyásolják az orrhámsejtek életképességét. MTT-teszt és valós idejű vizsgálat segítségével először igazoltuk, hogy a hatóanyag nanorészecskéket és nátrium-hialuronátot tartalmazó folyékony gyógyszerkészítmények nem toxikusak az emberi orrhámsejtekre (K22).

T12. Száraz ko-örléssel optimalizált nanonizált lamotrigin-PVA prediszperzió mint végtermék nazális porkészítményként alkalmazható, amellyel igazoltuk, hogy bejut a központi idegrendszerbe. A PVA megfelelő mátrixot szolgáltat a LAM nanorészecskék számára a ko-örlés során, ezzel segítve kimagasló *in vitro* és *in vivo* eredmények elérését (K23).

T13. Kifejezetten szuszpenzió- és por forma teszteléséhez diffúziós vizsgáló módszert fejlesztettünk. Összehasonlító méréseket végeztünk a vertikális Franz Cella és az általunk kifejlesztett horizontális cella alkalmazhatóságával kapcsolatban. Megállapítottuk, hogy a vizsgált

mikro- és nanoszuszpenziók, szilárd diszperziók esetében a horizontális cella alkalmazása javasolt, mivel kisebb szórás mellett, nagyobb farmakon diffúziót biztosít, köszönhetően a geometria elrendezésnek, a donor fázis folyamatos keverhetőségének és az in-line hatóanyag-meghatározás analitikai háttérének. A módosított diffúziós modell alkalmas a nazális/pulmonális körülményekhez igazodva (szimulált elektrolit oldatok), kis térfogatban (3-9 ml), hatóanyagnak megfelelő membrántípus és impregnálás alkalmazásával a hatóanyag diffúziójának monitorozására, ezáltal akceptor és donor fázisban lévő koncentrációjának meghatározására. Igazoltuk a rendszer *in vitro* és *ex vivo* mérési alkalmazhatóságát. Mérési protokollt dolgoztunk ki, amit validáltunk (K24, K25, K26, EK6).

T14. Eljárás- és összetételfejlesztést végeztünk inhalációs porok hordozóalapú és hordozómentes formulálási lépéseinek kombinálásával. Igazoltuk, hogy interpartikuláris kölcsönhatások befolyásolásával (hordozó felületkezelése, hatóanyag habitus módosítása, interaktív fizikai keverés) kiemelkedően magas tüdődepozíció (~75 % FRF) érhető el, ezáltal új lehetőséget javasolva a hordozóalapú készítmények re-formulálására (K27, EK7, EK8).

T15. Igazoltuk, hogy egylépéses eljárással mikroszuszpenzióból, „micro-in-micro” hatékony DPI rendszerek képezhetők. Megállapítottuk, hogy a LEU alkalmazásával a belélegezhető frakció növelhető, polimerekkel (PVA, PVP) módosítható a felület, míg a mikronos hordozóval (M) befolyásolható a méret és a szférikus morfológia. A kidolgozott eljárás kifejezetten alkalmas a vízben rosszul oldódó hatóanyagok szemcseméretének csökkentésére és ko-porlasztva szárítással stabil kristályos és a pulmonális alkalmazásnak megfelelő habitusú mikrokompozit fejlesztésére (K28, K29, EK9).

Oldatból segédanyagok hozzáadásával (LEU, PVA, HA, AB) először állítottunk elő inhalációra alkalmas NSAID tartalmú porózus és nem porózus DPI-eket. Megállapítottuk, hogy a porózus és nem-porózus formuláció biztonságosnak tekinthető A549-es humán alveoláris sejtvonalon 1 mg/ml-es koncentráció alatt. Összehasonlító vizsgálatok eredményei alapján kijelenthető, hogy a kis sűrűségű, nagyobb geometriai átmérővel rendelkező porózus részecskék az *in vitro* és *in silico* aerodinamikai analízise szerint előnyösebb formulációnak tekinthető, mint a nem porózus (K30, K31, EK10).

T16. Optimalizált prediszperzió nano porlasztva-szárítással történő integrálása (diszperzitásfoknövelő segédanyag alkalmazásával) nano-DPI formulálását („nano-in-micro/extrafine”) valósítottuk meg, az innovatív termék nanorészecskék agglomerátumait tartalmazva kis sűrűségű, közel 1 μm MMAD-val rendelkezve, kimagasló aerodinamikai

sajátságokkal, magas tüdődepozíciót jelez előre *in vitro* és *in silico*. A kétlépéses előállítási módszer összekapcsolása adaptálható gyenge vízdékonyságú hatóanyagok esetén (oldódási sebesség és permeabilitás fokozásával) inhalációs porok előállítására, ami az ipar számára is alkalmazható technológiai újítás (K18, K31).

T17. Olyan vizsgálati protokoll került kidolgozásra, amely az inhalációra szánt szárazpor készítmények kutatásához és fejlesztéséhez teljes körű fizikai-kémiai, szerkezeti, morfológiai és aerodinamikai (*in vitro* és *in silico*) analízist foglal magába. Az *in silico* aerodinamikai modell preformulálási protokollba illesztését először javasoltuk, amely lehetővé teszi az egyénre-szabott gyógyszerfejlesztés korai fázisban történő megvalósítását (K28, K29, K30, K31, K32).

VIII. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI RELEVANCIÁI

1. Szemcseméretcsökkentés: mikronizálás és nanonizálás integráló/dezintegráló eljárások optimalizálása: innovatív technológia

Szemcseméretcsökkentő eljárások és technológiák paramétereinek optimalizálása (100-500 nm) fontos kutatási és fejlesztési feladat. Az egyes eljárások vonatkozásában ún. **minőség alapú tervezést (QbD)** alkalmaztunk és a **szabályozási háttér** is megvizsgáltuk a termék hasznosíthatósága céljából (EMA, FDA). Ezek az eljárási protokollok minden olyan anyag esetében javasolhatók, ahol a szemcsék habitusának, fizikai-kémiai sajátságainak módosítására van szükség, amely révén biológiai hatékonyság és feldolgozhatóság is javítható. Ezáltal **gyógyszeripari szakember gyári fejlesztési munkája, illetve szabadalmak bejelentése támogatható.**

Meghatároztuk a szárazörlés kritikus paramétereit, kockázatbecslést, illetve részletes minőségi analízist végeztünk. **A bolygómalom zárt teret biztosít, ún. kiporzás-mentes eljárásnak tekinthető, ezért az erős hatású hatóanyagok esetén is adaptálható.** Kutatási eredményeink újdonságát az őrlési paraméterek és a polimer mennyiségének optimalizálása jelenti a hatóanyag adott szemcseméretének eléréséhez (őrlés hatékonysága), a **nanoszuszpenzió, mint köztitermék egy lépésben történő környezetkímélő előállításához (innovatív technológia).** A nanomérettartomány ko-örlő segédanyagok (polimerek, felületaktívanyagok) jelenlétében érhető el.

Két technika előnyeit kombinálva tettünk javaslatot **újszerű nedves ko-örléses eljárás módszerére**, amelyre a kis diszperziós közeg-igény, nagy hatékonyság és léptéknövelhetőség jellemző, mikronizált és nanonizált hatóanyag tartalmú köztitermék állítható elő.

A **statikus szonikáció** nem méretnövelhető, ezért kis mennyiségű minta előállítására alkalmas (**preklinikai mintaelőkészítés**). **Dinamikus szonikációval** nagyobb mennyiségű minta is kezelhető, a módszer **standardizálható és méretnövelhető**.

Az **integráló eljárások** közül a kombinált precipitációs technológiák **kis mennyiségű minta nanoprecipitációjára (kis dózisú anyagok)** javasolható.

Az **alternatív energiaforrások** közül az elektroporlasztással és plazma-szintézissel **segédanyag alkalmazása nélkül képezhetők nanoméretű kristályos szemcsék, amelyek hordozófelületén történő elosztatását javasoltuk a preformulálás során, új lehetőségeket biztosítva gyártásban és preformulálásban.**

Nano porlasztva-szárítással végzett oldószer elpárologtatás technológiai és anyagi paramétereit definiáltuk nanoméretű hatóanyagot tartalmazó szemcsék képzése céljából, amely már **használatra alkalmas végtermék** előállítását is eredményezheti.

A bemutatott szemcseméretcsökkentő eljárások gyógyszerkészítmény fejlesztésre alkalmas prediszperzió előállítására alkalmazhatóak (pl. szárító eljárást követően meloxicám nanorészecskéket tartalmazó orodiszperz liofilizátum).

2. Prediszperzió: mikro- és nanoszuszpenziók kutatása és fejlesztése: innovatív termék

A tanulmányozott folyamatokkal nagy kitermelés érhető el, kíméletes, léptéknövelhető eljárások (laborméret, pilot üzem).

A **prediszperzió** (köztitermék) **stabilizálása** anyagi és technológiai paraméterek optimalizálásával megvalósítható. Folyamatkövetés és -ellenőrzés prediszperziók előállítása során (ipari alkalmazhatóság, reprodukálhatóság, robosztusság).

Szárázórlés alkalmazásával „mikro méretű” kristályokból amorf nanorészecskék állíthatóak elő, amely közttitermékből nazális viszkózus folyadék formulálható.

A kisebb diszperziós közeg-igényű cirkónium oxid gyönggyel történő nedves őrlés nagyobb hatékonyságú és kifejezetten ajánlott különböző szemcsméretű hatóanyagot tartalmazó prediszperziók előállítására, amelyből per os, nazális és pulmonális forma is fejleszthető.

Új eljárási protokoll kidolgozása nanorészecskék tüdőbe juttatására. „nano-in-micro” inhalációs termék fejlesztése (innovatív termék).

Horizontális **diffúzió modell fejlesztése**, validálása szuszpenziók, porok vizsgálatára (geometria elrendezés, „real time”, membrán impregnálás, kis térfogat). Inhalációs készítményfejlesztési vizsgálati protokoll ajánlása, *in silico* aerodinamikai modell beépítésével.

3. Preformulálás/gyógyszerformulálás/terápiás előnyök: „value added” készítmények

Orodiszperz és per os alkalmazású készítmények re-formulálásában minőségi ugrást jelent nanorészecskék előállítás, ezáltal dóziscsökkentés, mellékhatás mérséklése és biológiai hasznosíthatóság növelése érhető el (meloxicám, gemfibrozil, nifluminsav).

A szisztémás hatású **nazálisan alkalmazott gyógyszerek** száma egyre növekszik. Olyan betegségek esetén érdemes ilyen készítményeket használni, amikor **azonnali gyors hatásra van szükség** (pl. sürgősségi fájdalomcsillapítás, epilepsziás görcsök), a betegség a bélmotilitást is érinti, így az enterális felszívódás változik, valamint amelyek esetén hosszantartó gyógyszeres terápia szükséges és ezzel az egyszerű adagolási móddal növelhető a beteg „compliance” (meloxicám, loratadin). Külön előnyt jelent **hatóanyagok intranazális agyba juttatása, központi idegrendszeri hatás kiváltása** céljából neurodegeneratív kórképek kezelése (meloxicám, lamotrigin).

A meloxicám elsőként választható nem szteroid gyulladáscsökkentő szer, mivel pulmonális alkalmazása során az acetyl-salicilsavra jellemző hiperszenzitivitási reakciók nem észlelhetők. Azonban **ilyen indikációval meloxicám-tartalmú készítmény nincs forgalomban**, először vizsgáltuk annak lehetőségét, hogy inhalációs összetétel formulálásával („szuper generikumként”) megcélazzuk a tüdő bronchiális régióját. Egyéb nem szteroid gyulladásgátlók is alkalmazhatók a lokális gyulladásos folyamatok visszaszorítására, így újonnan fejlesztett készítmények eljuttatva az alveolusokig potenciális szereplői lehetnek a terápiának. Különböző kórfolyamatok hatékonyabb vagy kiegészítő kezelése: cisztás fibrózis, COPD, tüdőgyulladás stb. **A munka újdonságát jelzi az SZTE Innovációs pályadíjának elnyerése (2023) és ipari megkeresés az összetétel és technológia vonatkozásában.**

A kutatási terület hazai-nemzetközi-ipari partnerségi kapcsolatokat erősítette. Az eredmények segíthetik originális nanogyógyszerek generikus formában történő gyártását, illetve esetleges originális nanogyógyszer fejlesztését.

Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm **Mentoromnak, Prof. Dr. Révész Piroskának**, az Intézet korábbi vezetőjének, hogy szakmai hitelességével, tudományos szemléletével megszerettette velem a gyógyszer-technológiai kutatásokat. Inspirált új témák megismerésére, külföldi kapcsolatok kiépítésére, ipari partnerekkel történő együttműködésekre. Biztatása mindig beigazolódt, miszerint a kemény, kitartó és alázatos munkának meglesz az eredménye.

Hálás köszönettel tartozom TDK és PhD témavezetőimnek **Prof. Dr. Kata Mihálynak és Dr. Aigner Zoltán**[†] docensnek, hogy megismertették és megszerettették velem a kutatómunkában rejlő lehetőségeket. A tudományos szemlélet, amit kaptam tőlük, meghatározóvá vált további tevékenységemben is.

Köszönet munkahelyem jelenlegi vezetőjének, **Prof. Dr. Csóka Ildikónak**, hogy teret engedett és támogatta kutatómunkám megvalósítását, az anyagi háttér és infrastruktúra biztosításával. Példaértékű vezetői szemlélete/stratégiája, szakmai és erkölcsi meglátásai, építő kritikái hozzájárultak oktatói és kutatói pályám kiteljesedéséhez.

Köszönöm a korábbi és a jelenlegi kari vezetésnek, hogy ösztönöztek az MTA doktori fokozat megszerzésére.

Köszönöm, a külföldi munkatársaknak a gyümölcsöző tudományos eszmecseréket (Prof. Julijana Kristl, Prof. Francesca Buttini, Prof. Elias Fattal, Prof. Tomuta Ioan, Prof. Norbert Radacsi, Prof. Csaba Noémi). Köszönöm hazai együttműködő akadémiai és ipari kollégáknak a számomra sokszor új és izgalmas kooperációs témákat, továbbá az eredményes munkát az SZTE és SZBK, valamint a Wigner Kutatóközpont kollégáinak, különös tekintettel: Prof. Kónya Zoltán, Prof. Kukovecz Ákos, Prof. Deli Mária, Prof. Hopp Béla, Dr. Burián Katalin, Dr. Farkas Árpád és Dr. Nagy Attila.

Köszönet illeti azokat a közvetlen kollégákat, akikhez bármikor fordulhattam kéréseimmel és tevékenységükkel folyamatosan támogatták a kutatási témák megvalósítását: Feczkoné Boda Erika, Lakatos Zoltánné Pirooska és Kovács Klára. Köszönöm a PhD és TDK hallgatóim ambíciózus munkáját.

Nagy támogatást jelentettek a következő egyéni kutatási pályázati támogatások: Magyary Zoltán Kutatói Ösztöndíj, Bolyai János Kutatói Ösztöndíj, Új Nemzeti Kiválósági Program, Fiatal Kutató II. kategória, MTA Gyermekek nevelő kutatók tudományos előmenetelének támogatása (KGYNK).

Külön köszönöm **Szüleimnek, Férjemnek és Kisfiamnak**, hogy az évek során mindvégig támogatták szakmai előrehaladásomat. Segítségükkel tudtam helytállni a hivatásomban és a családi teendőimben egyaránt.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Christopher Vimalson D, Parimalakrishnan S, Jeganathan NS, Anbazhagan S. Techniques to enhance solubility of hydrophobic drugs: An overview. *Asian J Pharm* 2016;10:S67–75.
- [2] Józó M, Simon N, Yi L, Móczó J, Pukánszky B. Improved release of a drug with poor water solubility by using electrospun water-soluble polymers as carriers. *Pharmaceutics* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010034>.
- [3] Nieto K, Mallery SR, Schwendeman SP. Microencapsulation of amorphous solid dispersions of fenretinide enhances drug solubility and release from PLGA in vitro and in vivo. *Int J Pharm* 2020;586:119475. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119475>.
- [4] Kata M, Ambrus R, Aigner Z. Preparation and investigation of inclusion complexes containing niflumonic acid and cyclodextrins. *J Incl Phenom* 2002;44:123–6. <https://doi.org/10.1023/A:1023074025175>.
- [5] Pataki H, Soti P, Vigh T, Nagy ZK, Vajna B, Csontos I, et al. Controlled Formation of Free-Flowing Carvedilol Particles in the Presence of Polyvinylpyrrolidone. *Chem Eng Technol* 2014;37:249–56. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300203>.
- [6] Loh ZH, Samanta AK, Sia Heng PW. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. *Asian J Pharm Sci* 2014;10:255–74. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.12.006>.
- [7] Kumar R, Thakur AK, Chaudhari P, Banerjee N. Particle Size Reduction Techniques of Pharmaceutical Compounds for the Enhancement of Their Dissolution Rate and Bioavailability. *J Pharm Innov* 2022;17:333–52. <https://doi.org/10.1007/s12247-020-09530-5>.
- [8] Takácsné Novák K, Völgyi G. A fizikai-kémiai jellemzés helye és módszerei a gyógyszerkutatásban. *Magy Kémiai Folyóirat* 2005;111:169–76.
- [9] Antal I. The importance of micronization in the design of dosage forms I. Theoretical and biopharmaceutical aspects. *Acta Pharm Hung* 2006;76:95–103.
- [10] Merisko-Liversidge EM, Liversidge GG. Drug Nanoparticles: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds. *Toxicol Pathol* 2008;36:43–8. <https://doi.org/10.1177/0192623307310946>.
- [11] Révész P. *Gyógyszertechnológia*. Szeged: JATE Press; 2012.
- [12] Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper ER. Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci* 2003;18:113–20. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00251-8](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00251-8).
- [13] Pu X, Sun J, Li M, He Z. Formulation of Nanosuspensions as a New Approach for the Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Curr Nanosci* 2012;5:417–27. <https://doi.org/10.2174/157341309789378177>.
- [14] Thorley AJ, Tetley TD. New perspectives in nanomedicine. *Pharmacol Ther* 2013. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.008>.
- [15] Chogale MM, Ghodake VN, Patravale VB. Performance parameters and characterizations of nanocrystals: A brief review. *Pharmaceutics* 2016;8. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8030026>.
- [16] Al-Kassas R, Bansal M, Shaw J. Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs. *J Control Release* 2017;260:202–12. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.003>.
- [17] European C. Commission Recommendation of 10 June 2022 on the definition of nanomaterial 2022;36237:1–5. <https://doi.org/10.2788/36237>.

- [18] U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology 2014. <https://www.fda.gov/media/88423/download>.
- [19] Noyes AA, Whitney WR. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J Am Chem Soc* 1897;19:930–4. <https://doi.org/10.1021/ja02086a003>.
- [20] Ostwald W. Über die vermeintliche Isomerie des roten und gelben Quecksilberoxyds und die Oberflächenspannung fester Körper. *Zeitschrift Für Phys Chemie* 1900;34U:495–503. <https://doi.org/10.1515/zpch-1900-3431>.
- [21] Salazar J, Ghanem A, Müller RH, Möschwitzer JP. Nanocrystals: Comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches. *Eur J Pharm Biopharm* 2012;81:82–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.12.015>.
- [22] Lestari MLAD, Müller RH, Möschwitzer JP. Systematic screening of different surface modifiers for the production of physically stable nanosuspensions. *J Pharm Sci* 2015;104:1128–40. <https://doi.org/10.1002/jps.24266>.
- [23] Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:785–96. <https://doi.org/10.1038/nrd1494>.
- [24] Chin WWL, Parmentier J, Widzinski M, Tan ENH, Gokhale R. A brief literature and patent review of nanosuspensions to a final drug product. *J Pharm Sci* 2014;103:2980–99. <https://doi.org/10.1002/jps.24098>.
- [25] Walker WH, Lewis WK, McAdams WH, Gilliland ER. Principles of chemical engineering 1937.
- [26] Stamboliadis ET. Energy distribution in comminution: A new approach to the laws of Rittinger, Bond and Kick. *Can Metall Q* 2004;43:249–58. <https://doi.org/10.1179/cm.2004.43.2.249>.
- [27] von Rittinger P. *Lehrbuch der Aufbereitungskunde*. Berlin: Verlag von Ernst & Korn; 1867.
- [28] Kick F. *Das Gesetz der Proportionale Widerstände und Seine Anwendung*. Leipzig: 1885.
- [29] Bond FC. The Third Theory of Comminution. *Trans AIME Min Eng* 1952;193:484–94.
- [30] Tarján G. *Ásványelőkészítés I*. Budapest: Nehézipari Műszaki Egyetem, Tankönyvkiadó; 1978.
- [31] Rác Á. *Örlési eljárások kutatása, fejlesztése különösen finom őrlmények előállítására*. Miskolci Egyetem, 2014. <https://doi.org/10.14750/ME.2014.015>.
- [32] Juhász AZ, Opoczky L. *Mechanokémia és agglomeráció*. *Építőanyag* 2003;55:86–90. <https://doi.org/10.1http://dx.doi.org/10.14382/epitoanyag-jsbcm.2003.16>.
- [33] Naik S, Chaudhuri B. Quantifying Dry Milling in Pharmaceutical Processing: A Review on Experimental and Modeling Approaches. *J Pharm Sci* 2015;104:2401–13. <https://doi.org/10.1002/jps.24512>.
- [34] Junghanns JUAH, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine* 2008;3:295–309.
- [35] Bansal S, Bansal M, Kumria R. Nanocrystals: Current Strategies and Trends. *Technology* 2012;3:406–19.
- [36] Liversidge GG, Cundy KC, Bishop JF, Czepak DA. Surface modified drug nanoparticles. 5145684, 1992.
- [37] Shegokar R, Müller RH. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm* 2010;399:129–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.044>.
- [38] Bilgili E, Guner G. Mechanistic Modeling of Wet Stirred Media Milling for Production of Drug Nanosuspensions. *AAPS PharmSciTech* 2021;22. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01876-w>.
- [39] Muller RH, Becker R, Kruss B, Peters K. Pharmaceutical nanosuspension dor medicament administration

- as systems with increased saturation solubility and rate of solution. 5858410, 1999.
- [40] Keck CM, Müller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;62:3–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.05.009>.
- [41] Möschwitzer J, Müller RH. New method for the effective production of ultrafine drug nanocrystals. *J Nanosci Nanotechnol* 2006;6:3145–53. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.480>.
- [42] Caupin F, Herbert E. Cavitation in water: a review. *Comptes Rendus Phys* 2006;7:1000–17. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2006.10.015>.
- [43] Church CC, Carstensen EL. “Stable” inertial cavitation. *Ultrasound Med Biol* 2001;27:1435–7. [https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(01\)00441-0](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(01)00441-0).
- [44] Servant G, Caltagirone JP, Gérard A, Laborde JL, Hita A. Numerical simulation of cavitation bubble dynamics induced by ultrasound waves in a high frequency reactor. *Ultrason Sonochem* 2000;7:217–27. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00059-6).
- [45] Ambrus R, Berkó S, Csóka I, Sipos P, Pallagi E, Jójártné Laczkovich O, et al. *Gyógyszer-nanotechnológia (Kurzus-háttéranyag)*. Szeged: Szegedi Tudományegyetem; 2015.
- [46] Ambrus R, Szabó-Révész P, Kiss T, Nagy E, Szűcs T, Smausz T, et al. Application of a suitable particle engineering technique by pulsed laser ablation in liquid (PLAL) to modify the physicochemical properties of poorly soluble drugs. *J Drug Deliv Sci Technol* 2020;57:101727. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101727>.
- [47] Farkas B, Révész P. *Kristályosítástól a tablettázásig*. Szeged: Universitas Szeged Kiadó; 2007.
- [48] Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int J Pharm* 2017;532:66–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>.
- [49] Iván Martínez-Muñoz O, Elizabeth Mora-Huertas C. Nanoprecipitation technology to prepare carrier systems of interest in pharmaceuticals: An overview of patenting. *Int J Pharm* 2022;614. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121440>.
- [50] Yan X, Bernard J, Ganachaud F. Nanoprecipitation as a simple and straightforward process to create complex polymeric colloidal morphologies. *Adv Colloid Interface Sci* 2021;294:102474. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102474>.
- [51] Mer VK La. Nucleation in Phase Transitions. *Ind Eng Chem* 1952;44:1270–7. <https://doi.org/10.1021/ie50510a027>.
- [52] Kumar S, Dilbaghi N, Rani R, Bhanjana G, Umar A. Novel Approaches for Enhancement of Drug Bioavailability. *Nov Approaches Enhanc Drug Bioavailab* 2013;2:133–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1166/rase.2013.1038>.
- [53] Moinard-Checot D, Chevalier Y, Briançon S, Fessi H, Guinebretière S. Nanoparticles for drug delivery: Review of the formulation and process difficulties illustrated by the emulsion-diffusion process. *J Nanosci Nanotechnol* 2006;6:2664–81. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.479>.
- [54] Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 2006;312:179–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.008>.
- [55] Ambrus R, Kocbek P, Kristl J, Šibanc R, Rajkó R, Szabó-Révész P. Investigation of preparation

- parameters to improve the dissolution of poorly water-soluble meloxicam. *Int J Pharm* 2009;381:153–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.009>.
- [56] Bhakay A, Vizzotti E, Li M, Davé R, Bilgili E. Incorporation of Fenofibrate Nanoparticles Prepared by Melt Emulsification into Polymeric Films. *J Pharm Innov* 2016;11:53–63. <https://doi.org/10.1007/s12247-015-9237-2>.
- [57] Salazar J, Müller RH, Möschwitzer JP. Combinative Particle Size Reduction Technologies for the Production of Drug Nanocrystals. *J Pharm* 2014;2014:1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/265754>.
- [58] Ventosa N, Sala S, Veciana J, Torres J, Llibre J. Depressurization of an Expanded Liquid Organic Solution (DELOS): A New Procedure for Obtaining Submicron- Or Micron-Sized Crystalline Particles. *Cryst Growth Des* 2001;1:299–303. <https://doi.org/10.1021/cg0155090>.
- [59] Franco P, Marco I De. Supercritical antisolvent process for pharmaceutical applications: A review. *Processes* 2020;8. <https://doi.org/10.3390/PR8080938>.
- [60] Vollath D. Plasma synthesis of nanoparticles. *KONA Powder Part J* 2007;25:39–55. <https://doi.org/10.14356/kona.2007007>.
- [61] Salata O. Tools of Nanotechnology: Electrospray. *Curr Nanosci* 2006;1:25–33. <https://doi.org/10.2174/1573413052953192>.
- [62] Songsurang K, Praphairaksit N, Siraleartmukul K, Muangsin N. Electrospray fabrication of doxorubicin-chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of doxorubicin. *Arch Pharm Res* 2011;34:583–92. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0408-5>.
- [63] Brown NA, Zhu Y, German GK, Yong X, Chiarot PR. Electrospray deposit structure of nanoparticle suspensions. *J Electrostat* 2017;90:67–73. <https://doi.org/10.1016/j.elstat.2017.09.004>.
- [64] Radacsi N, Van Der Heijden AEDM, Stankiewicz AI, Ter Horst JH. Cold plasma synthesis of high quality organic nanoparticles at atmospheric pressure. *J Nanoparticle Res* 2013;15. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1445-4>.
- [65] Radacsi N, Stefanidis GD, Szabó-Révész P, Ambrus R. Analysis of niflumic acid prepared by rapid microwave-assisted evaporation. *J Pharm Biomed Anal* 2014;98:16–21. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.020>.
- [66] Radacsi N, Ter Horst JH, Stefanidis GD. Microwave-assisted evaporative crystallization of niflumic acid for particle size reduction. *Cryst Growth Des* 2013;13:4186–9. <https://doi.org/10.1021/cg4010906>.
- [67] Salama AH. Spray drying as an advantageous strategy for enhancing pharmaceuticals bioavailability. *Drug Deliv Transl Res* 2020;10:1–12. <https://doi.org/10.1007/s13346-019-00648-9>.
- [68] Schmid K, Arpagaus C, Friess W. Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications. *Pharm Dev Technol* 2011;16:287–94. <https://doi.org/10.3109/10837450.2010.485320>.
- [69] Heng D, Lee SH, Ng WK, Tan RB. The nano spray dryer B-90. *Expert Opin Drug Deliv* 2011;8:965–72. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.588206>.
- [70] Arpagaus C. Nano Spray Dryer B-90: Literature review and applications. *Büchi Inf Bull* 2011;8.
- [71] Li X, Anton N, Arpagaus C, Belleiteix F, Vandamme TF. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *J Control Release* 2010;147:304–10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.113>.
- [72] Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*

- 2011;63:456–69. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.001>.
- [73] Ahmadi Tehrani A, Omranpoor MM, Vatanara A, Seyedabadi M, Ramezani V. Formation of nanosuspensions in bottom-up approach: theories and optimization. *DARU, J Pharm Sci* 2019;27:451–73. <https://doi.org/10.1007/s40199-018-00235-2>.
- [74] Derjaguin B, Landau L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Phys Chim* 1941;41:633–62.
- [75] Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J Control Release* 2013;172:1126–41. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.006>.
- [76] Van Eerdenbrugh B, Van den Mooter G, Augustijns P. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int J Pharm* 2008;364:64–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.023>.
- [77] Cerdeira AM, Mazzotti M, Gander B. Miconazole nanosuspensions: Influence of formulation variables on particle size reduction and physical stability. *Int J Pharm* 2010;396:210–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.020>.
- [78] Lindfors L, Skantze P, Skantze U, Westergren J, Olsson U. Amorphous drug nanosuspensions. 3. Particle dissolution and crystal growth. *Langmuir* 2007;23:9866–74. <https://doi.org/10.1021/la700811b>.
- [79] Mártha C, Kürti L, Farkas G, Jójárt-Laczkovich O, Szalontai B, Glässer E, et al. Effects of polymers on the crystallinity of nanonized meloxicam during a co-grinding process. *Eur Polym J* 2013;49:2426–32. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.03.006>.
- [80] Van Eerdenbrugh B, Vermant J, Martens JA, Froyen L, Van Humbeeck J, Augustijns P, et al. A Screening Study of Surface Stabilization during the Production of Drug Nanocrystals. *J Pharm Sci* 2008;98:2091–103. <https://doi.org/10.1002/jps>.
- [81] Merisko-Liversidge E, Liversidge GG. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:427–40. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.12.007>.
- [82] Duong BH, Truong HN, Nguyen QAP, Phu TNN, Nhan LTH. Preparation of curcumin nanosuspension with gum arabic as a natural stabilizer: Process optimization and product characterization. *Processes* 2020;8. <https://doi.org/10.3390/PR8080970>.
- [83] Beirowski J, Inghelbrecht S, Arien A, Gieseler H. Freeze-drying of nanosuspensions, part 3: Investigation of factors compromising storage stability of highly concentrated drug nanosuspensions. *J Pharm Sci* 2012;101:354–62. <https://doi.org/10.1002/jps.22745>.
- [84] Lee J, Cheng Y. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. *J Control Release* 2006;111:185–92. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.12.003>.
- [85] Verma S, Gokhale R, Burgess DJ. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. *Int J Pharm* 2009;380:216–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.005>.
- [86] Müller RH, Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. I. Preparation by a size-reduction technique. *Int J Pharm* 1998;160:229–37. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00311-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00311-6).
- [87] Attari Z, Kalvakuntla S, Reddy MS, Deshpande M, Rao CM, Koteswara KB. Formulation and characterisation of nanosuspensions of BCS class II and IV drugs by combinative method. *J Exp Nanosci*

- 2016;11:276–88. <https://doi.org/10.1080/17458080.2015.1055841>.
- [88] Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res* 2006;23:2709–28. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9104-4>.
- [89] Jacob S, Nair AB, Shah J. Emerging role of nanosuspensions in drug delivery systems. *Biomater Res* 2020;24:1–16. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-0184-8>.
- [90] Singhal M, Baumgartner A, Turunen E, van Veen B, Hirvonen J, Peltonen L. Nanosuspensions of a poorly soluble investigational molecule ODM-106: Impact of milling bead diameter and stabilizer concentration. *Int J Pharm* 2020;587:119636. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119636>.
- [91] Liversidge GG, Cundy KC. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int J Pharm* 1995;125:91–7. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)00122-Y](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)00122-Y).
- [92] Nada A. Formulation of Ibuprofen Nanoparticles and Nanosuspensions with Enhanced Dissolution Rate using Ultra-Homogenization Technique. *Asian J Pharm* 2017;11:4–10.
- [93] Fernandes AR, Ferreira NR, Fangueiro JF, Santos AC, Veiga FJ, Cabral C, et al. Ibuprofen nanocrystals developed by 22 factorial design experiment: A new approach for poorly water-soluble drugs. *Saudi Pharm J* 2017;25:1117–24. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.07.004>.
- [94] Lee H, Bang JB, Na YG, Lee JY, Cho CW, Baek JS, et al. Development and evaluation of tannic acid-coated nanosuspension for enhancing oral bioavailability of curcumin. *Pharmaceutics* 2021;13:1–20. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091460>.
- [95] Joseph S, Bunjes H. Preparation of nanoemulsions and solid lipid nanoparticles by premix membrane emulsification. *J Pharm Sci* 2012;101:2479–89. <https://doi.org/10.1002/jps.23163>.
- [96] Jacobs C, Müller RH. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. *Pharm Res* 2002;19:189–94. <https://doi.org/10.1023/A:1014276917363>.
- [97] Xiong R, Lu W, Li J, Wang P, Xu R, Chen T. Preparation and characterization of intravenously injectable nimodipine nanosuspension. *Int J Pharm* 2008;350:338–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.036>.
- [98] Ibrahim MA, Shazly GA, Aleanizy FS, Alqahtani FY, Elosaily GM. Formulation and evaluation of docetaxel nanosuspensions: In-vitro evaluation and cytotoxicity. *Saudi Pharm J* 2019;27:49–55. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.018>.
- [99] International Council for Harmonisation. Guidance for Industry Q3C. US Dep Heal Hum Serv Food Drug Adm 2017;9765:1–8.
- [100] Committee for Human Medicinal Products. ICH guideline Q3C (R5) on impurities: Guideline for Residual Solvents. *Int Conf Harmon Tech Requir Regist Pharm Hum Use* 2015;44:24.
- [101] Walters RH, Bhatnagar B, Tchessalov S, Izutsu KI, Tsumoto K, Ohtake S. Next generation drying technologies for pharmaceutical applications. *J Pharm Sci* 2014;103:2673–95. <https://doi.org/10.1002/jps.23998>.
- [102] Kemp IC. Drying of pharmaceuticals in theory and practice. *Dry Technol* 2017;35:918–24.
- [103] Parikh DM. Vacuum Drying: Basics and application. *Chem Eng (United States)* 2015;122:48–54.
- [104] Tang X, Pikal MJ. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharm Res*

- 2004;21:191–200. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016234.73023.75>.
- [105] 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.10.026>.
- [106] Zhou QT, Armstrong B, Larson I, Stewart PJ, Morton DAV. Understanding the influence of powder flowability, fluidization and de-agglomeration characteristics on the aerosolization of pharmaceutical model powders. *Eur J Pharm Sci* 2010;40:412–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.04.012>.
- [107] 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.007>.
- [108] Beg S, Principles F. Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development. vol. I. 2021. <https://doi.org/10.1007/978-981-33-4717-5>.
- [109] Supare V, Wadher K, Umekar M. Experimental Design: Approaches and Applications in Development of Pharmaceutical Drug Delivery System. *J Drug Deliv Ther* 2021;11:154–61. <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i4-s.4908>.
- [110] Frey DD, Engelhardt F, Greitzer EM. A role for “one-factor-at-a-time” experimentation in parameter design. *Res Eng Des* 2003;14:65–74. <https://doi.org/10.1007/s00163-002-0026-9>.
- [111] Nor NM, Mohamed MS, Loh TC, Foo HL, Rahim RA, Tan JS, et al. Comparative analyses on medium optimization using one-factor-at-a-time, response surface methodology, and artificial neural network for lysine–methionine biosynthesis by *Pediococcus pentosaceus* RF-1. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2017;31:935–47. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1335177>.
- [112] Yu LX. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control. *Pharm Res* 2008;25:781–91. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9511-1>.
- [113] 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.007>.
- [114] Csóka I, Pallagi E, Paál TL. Extension of quality-by-design concept to the early development phase of pharmaceutical R&D processes. *Drug Discov Today* 2018;23:1340–3. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.03.012>.
- [115] Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, et al. Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS J* 2014;16:771–83. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9598-3>.
- [116] Pallagi E, Karimi K, Ambrus R, Szabó-Révész P, Csóka I. New aspects of developing a dry powder inhalation formulation applying the quality-by-design approach. *Int J Pharm* 2016;511:151–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.003>.
- [117] Pallagi E, Ismail R, Paál TL, Csóka I. Initial Risk Assessment as part of the Quality by Design in peptide drug containing formulation development. *Eur J Pharm Sci* 2018;122:160–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.003>.
- [118] Pallagi E, Ambrus R, Szabó-Révész P, Csóka I. Adaptation of the quality by design concept in early pharmaceutical development of an intranasal nanosized formulation. *Int J Pharm* 2015;491:384–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.018>.

- [119] Buttini F, Rozou S, Rossi A, Zoumpliou V, Rekkas DM. The application of Quality by Design framework in the pharmaceutical development of dry powder inhalers. *Eur J Pharm Sci* 2018;113:64–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.10.042>.
- [120] Türker S, Onur E, Ózer Y. Nasal route and drug delivery systems. *Pharm World Sci* 2004;26:137–42. <https://doi.org/10.1023/B:PHAR.0000026823.82950.ff>.
- [121] Illum L. Nasal drug delivery - Possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 2003;87:187–98. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00363-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00363-2).
- [122] Illum L. Nasal drug delivery: New developments and strategies. *Drug Discov Today* 2002;7:1184–9. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02529-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02529-1).
- [123] Touitou E, Illum L. Nasal drug delivery. *Drug Deliv Transl Res* 2013;3:1–3. <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0111-1>.
- [124] Forbes B, Bommer R, Goole J, Hellfritsch M, De Kruijf W, Lambert P, et al. A consensus research agenda for optimising nasal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2020;17:127–32. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1714589>.
- [125] Shim S, Yoo HS. The Application of Mucoadhesive Chitosan Nanoparticles in Nasal Drug Delivery. *Mar Drugs* 2020;18:1–17. <https://doi.org/10.3390/MD18120605>.
- [126] Rabiee N, Ahmadi S, Afshari R, Khalaji S, Rabiee M, Bagherzadeh M, et al. Polymeric Nanoparticles for Nasal Drug Delivery to the Brain: Relevance to Alzheimer's Disease. *Adv Ther* 2021;4:1–24. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000076>.
- [127] Arora P, Sharma S, Garg S. Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discov Today* 2002;7:967–75. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02452-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02452-2).
- [128] Graff CL, Pollack GM. Nasal drug administration: Potential for targeted central nervous system delivery. *J Pharm Sci* 2005;94:1187–95. <https://doi.org/10.1002/jps.20318>.
- [129] Alshweiat A, Ambrus R, Csóka Ii. Intranasal Nanoparticulate Systems as Alternative Route of Drug Delivery. *Curr Med Chem* 2019;26:6459–92. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190827151741>.
- [130] Scherließ R. Nasal formulations for drug administration and characterization of nasal preparations in drug delivery. *Ther Deliv* 2020;11:183–91. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0086>.
- [131] Laffleur F, Bauer B. Progress in nasal drug delivery systems. *Int J Pharm* 2021;607:120994. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120994>.
- [132] Saindane NS, Pagar KP, Vavia PR. Nanosuspension based in situ gelling nasal spray of carvedilol: Development, in vitro and in vivo characterization. *AAPS PharmSciTech* 2013;14:189–99. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9896-y>.
- [133] Hao J, Zhao J, Zhang S, Tong T, Zhuang Q, Jin K, et al. Fabrication of an ionic-sensitive in situ gel loaded with resveratrol nanosuspensions intended for direct nose-to-brain delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2016;147:376–86. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.011>.
- [134] Ayoub AM, Ibrahim MM, Abdallah MH, Mahdy MA. Sulpiride microemulsions as antipsychotic nasal drug delivery systems: In-vitro and pharmacodynamic study. *J Drug Deliv Sci Technol* 2016;36:10–22. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.09.002>.
- [135] Musumeci T, Cupri S, Bonaccorso A, Impallomeni G, Ballistreri A, Puglisi G, et al. Technology assessment of new biodegradable poly(R-3-hydroxybutyrate-co-1,4-butylene adipate) copolymers for

- drug delivery. *J Appl Polym Sci* 2019;136:1–10. <https://doi.org/10.1002/app.47233>.
- [136] Sosnik A, Das Neves J, Sarmiento B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Prog Polym Sci* 2014;39:2030–75. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.07.010>.
- [137] Bromberg LE. Enhanced nasal retention of hydrophobically modified polyelectrolytes. *J Pharm Pharmacol* 2010;53:109–14. <https://doi.org/10.1211/0022357011775082>.
- [138] Issa MM, Köping-Höggård M, Artursson P. Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. *Drug Discov Today Technol* 2005;2:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2005.05.008>.
- [139] Leitner VM, Guggi D, Bernkop-Schnürch A. Thiomers in noninvasive polypeptide delivery: In vitro and in vivo characterization of a polycarboxiphil-cysteine/glutathione gel formulation for human growth hormone. *J Pharm Sci* 2004;93:1682–91. <https://doi.org/10.1002/jps.20069>.
- [140] Patil SB, Sawant KK. Development, optimization and in vitro evaluation of alginate mucoadhesive microspheres of carvedilol for nasal delivery. *J Microencapsul* 2009;26:432–43. <https://doi.org/10.1080/02652040802456726>.
- [141] Ugwoke MI, Agu RU, Verbeke N, Kinget R. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1640–65. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.009>.
- [142] 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;5:709–33. <https://doi.org/10.4155/tde.14.41>.
- [143] Sipos B, Szabó-Révész P, Csóka I, Pallagi E, Dobó DG, Béteky P, et al. Quality by design based formulation study of meloxicam-loaded polymeric micelles for intranasal administration. *Pharmaceutics* 2020;12:1–29. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080697>.
- [144] Gieszinger P, Tomuta I, Casian T, Bartos C, Szabó-Révész P, Ambrus R. Definition and validation of the Design Space for co-milled nasal powder containing nanosized lamotrigine. *Drug Dev Ind Pharm* 2018;44:1622–30. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1483388>.
- [145] Rau JL. Practical Problems With Aerosol Therapy in COPD. *Respir Care* 2006;51:158–72.
- [146] Quarta E, Chierici V, Flammini L, Tognolini M, Barocelli E, Cantoni AM, et al. Excipient-free pulmonary insulin dry powder: Pharmacokinetic and pharmacodynamics profiles in rats. *J Control Release* 2020;323:412–20. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.015>.
- [147] Paul M, Lau R. Potentials and challenges of Levodopa particle formulation for treatment of Parkinson's disease through intranasal and pulmonary delivery. *Adv Powder Technol* 2020;31:2357–65. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2020.03.028>.
- [148] Huang Z, Kłodzińska SN, Wan F, Nielsen HM. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: state of the art towards efficient treatment of recalcitrant respiratory tract bacterial infections. *Drug Deliv Transl Res* 2021;11:1634–54. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00954-1>.
- [149] Yıldız-Peköz A, Ehrhardt C. Advances in pulmonary drug delivery. *Pharmaceutics* 2020;12:1–7. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100911>.
- [150] Dolovich MB, Ahrens RC, Hess DR, Anderson P, Dhand R, Rau JL, et al. Device selection and outcomes of aerosol therapy: Evidence-based guidelines: American College of Chest Physicians/American College

- of Asthma, Allergy, and Immunology. *Chest* 2005;127:335–71. <https://doi.org/10.1378/chest.127.1.335>.
- [151] Rubin BK. Air and soul: The science and application of aerosol therapy. *Respir Care* 2010;55:911–21.
- [152] Ari A, Fink JB. Guidelines for aerosol devices in infants, children and adults: Which to choose, why and how to achieve effective aerosol therapy. *Expert Rev Respir Med* 2011;5:561–72. <https://doi.org/10.1586/ers.11.49>.
- [153] Chapman KR, Fogarty CM, Peckitt C, Lassen C. Delivery characteristics and patients' handling of two single-dose dry-powder inhalers used in COPD. *Int J COPD* 2011;6:353–63.
- [154] Ruge CC, Kirch J, Lehr CM. Pulmonary drug delivery: From generating aerosols to overcoming biological barriers-therapeutic possibilities and technological challenges. *Lancet Respir Med* 2013;1:402–13. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70072-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70072-9).
- [155] Patton JS, Byron PR. Inhaling medicines: Delivering drugs to the body through the lungs. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:67–74. <https://doi.org/10.1038/nrd2153>.
- [156] Bennett WD, Brown JS, Zeman KL, Hu S, Scheuch G, Sommerer K, et al. Targeting Delivery of Aerosols to Different Lung Regions. *J Aerosol Med* 2002;15:179–88.
- [157] Heyder J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:315–20. <https://doi.org/10.1513/pats.200409-046TA>.
- [158] Strong P, Ito K, Murray J, Rapeport G. Current approaches to the discovery of novel inhaled medicines. *Drug Discov Today* 2018;23:1705–17. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.017>.
- [159] Yang MY, Chan JGY, Chan HK. Pulmonary drug delivery by powder aerosols. *J Control Release* 2014;193:228–40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.055>.
- [160] Farkas DR, Hindle M, Longest PW. Characterization of a New High-Dose Dry Powder Inhaler (DPI) Based on a Fluidized Bed Design. *Ann Biomed Eng* 2015;43:2804–15. <https://doi.org/10.1007/s10439-015-1335-2>.
- [161] Demoly P, Hagedoorn P, Boer AH De, Frijlink HW. The clinical relevance of dry powder inhaler performance for drug delivery. *Respir Med* 2014;108:1195–203. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2014.05.009>.
- [162] de Boer AH, Hagedoorn P, Hoppentocht M, Buttini F, Grasmeyer F, Frijlink HW. Dry powder inhalation: past, present and future. *Expert Opin Drug Deliv* 2017;14:499–512. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1224846>.
- [163] Hebbink GA, Jaspers M, Peters HJW, Dickhoff BHJ. Recent developments in lactose blend formulations for carrier-based dry powder inhalation. *Adv Drug Deliv Rev* 2022;189:114527. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114527>.
- [164] Pomázi A, Szabó Révész P, Ambrus R. Pulmonális gyógyszerbevitel, DPI készítmények formulálásának szempontjai 2009.
- [165] Adi H, Young PM, Chan HK, Agus H, Traini D. Co-spray-dried mannitol-ciprofloxacin dry powder inhaler formulation for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Pharm Sci* 2010;40:239–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.03.020>.
- [166] Hazare S, Menon M. Improvement of inhalation profile of DPI formulations by carrier treatment with magnesium stearate. *Indian J Pharm Sci* 2009;71:725–7.

- [167] Healy AM, Amaro MI, Paluch KJ, Tajber L. Dry powders for oral inhalation free of lactose carrier particles. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;75:32–52. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.04.005>.
- [168] Benke E, Winter C, Szabó-Révész P, Roblegg E, Ambrus R. The effect of ethanol on the habit and in vitro aerodynamic results of dry powder inhalation formulations containing ciprofloxacin hydrochloride. *Asian J Pharm Sci* 2021;16:471–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2021.04.003>.
- [169] Yang M, Yamamoto H, Kurashima H, Takeuchi H, Yokoyama T, Tsujimoto H, et al. Design and evaluation of inhalable chitosan-modified poly (dl-lactic-co-glycolic acid) nanocomposite particles. *Eur J Pharm Sci* 2012;47:235–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.05.016>.
- [170] White S, Bennett DB, Cheu S, Conley PW, Guzek DB, Gray S, et al. EXUBERA®: Pharmaceutical development of a novel product for pulmonary delivery of insulin. *Diabetes Technol Ther* 2005;7:896–906. <https://doi.org/10.1089/dia.2005.7.896>.
- [171] Kaur R, Garg T, Malik B, Gupta UD, Gupta P, Rath G, et al. Development and characterization of spray-dried porous nanoaggregates for pulmonary delivery of anti-tubercular drugs. *Drug Deliv* 2016;23:882–7. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.920428>.
- [172] Weers J, Tarara T. The PulmoSphere™ platform for pulmonary drug delivery. *Ther Deliv* 2014;5:277–95. <https://doi.org/10.4155/tde.14.3>.
- [173] Cruz L, Fattal E, Tasso L, Freitas GC, Carregaro AB, Guterres SS, et al. Formulation and in vivo evaluation of sodium alendronate spray-dried microparticles intended for lung delivery. *J Control Release* 2011;152:370–5. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.030>.
- [174] Tsapis N, Bennett D, Jackson B, Weitz DA, Edwards DA. Trojan particles: Large porous carriers of nanoparticles for drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12001–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.182233999>.
- [175] Edit B, Szabó-Révész P, Hopp B, Rita A. Hordozó alapú száraz porinhalációs rendszerek jellemzése és fejlesztési lehetőségei. *Acta Pharm Hung* 2017;2:59–68.
- [176] Chvatal A, Benke E, Szabóné Révész P, Ambrus R. Új formulálási stratégiák a porinhalációs készítmények előállításában. *Gyogyszereszet* 2016:1–10.
- [177] Hoppentocht M, Hagedoorn P, Frijlink HW, de Boer AH. Technological and practical challenges of dry powder inhalers and formulations. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;75:18–31. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.04.004>.
- [178] Moon C, Smyth HDC, Watts AB, Williams RO. Delivery Technologies for Orally Inhaled Products: an Update. *AAPS PharmSciTech* 2019;20. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1314-2>.
- [179] Vehring R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm Res* 2008;25:999–1022. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9475-1>.
- [180] Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* 2010;392:1–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.017>.
- [181] Minne A, Boireau H, Horta MJ, Vanbever R. Optimization of the aerosolization properties of an inhalation dry powder based on selection of excipients. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;70:839–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.06.013>.
- [182] Prota L, Santoro A, Bifulco M, Aquino RP, Mencherini T, Russo P. Leucine enhances aerosol performance of Naringin dry powder and its activity on cystic fibrosis airway epithelial cells. *Int J Pharm* 2011;412:8–

19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.055>.
- [183] Simon A, Amaro MI, Cabral LM, Healy AM, De Sousa VP. Development of a novel dry powder inhalation formulation for the delivery of rivastigmine hydrogen tartrate. *Int J Pharm* 2016;501:124–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.066>.
- [184] Tewes F, Tajber L, Corrigan OI, Ehrhardt C, Healy AM. Development and characterisation of soluble polymeric particles for pulmonary peptide delivery. *Eur J Pharm Sci* 2010;41:337–52. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.07.001>.
- [185] Iskandar F, Nandiyanto ABD, Widiyastuti W, Young LS, Okuyama K, Gradon L. Production of morphology-controllable porous hyaluronic acid particles using a spray-drying method. *Acta Biomater* 2009;5:1027–34. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.11.016>.
- [186] Martinelli F, Balducci AG, Kumar A, Sonvico F, Forbes B, Bettini R, et al. Engineered sodium hyaluronate respirable dry powders for pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* 2017;517:286–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.002>.
- [187] Scalia S, Haghi M, Losi V, Trotta V, Young PM, Traini D. Quercetin solid lipid microparticles: A flavonoid for inhalation lung delivery. *Eur J Pharm Sci* 2013;49:278–85. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.03.009>.
- [188] Mehta P. Dry Powder Inhalers : A Focus on Advancements in. *J Od Drug Deliv* 2016;2016:1–17.
- [189] Lam J, Vaughan S, Parkins MD. Tobramycin inhalation powder (TIP): An efficient treatment strategy for the management of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med* 2013;7:61–77. <https://doi.org/10.4137/ccrpm.s10592>.
- [190] Dellamary LA, Tarara TE, Smith DJ, Woelk CH, Adractas A, Costello ML, et al. Hollow Porous Particles in Metered 2000;17:168–74.
- [191] Ogienko AG, Bogdanova EG, Trofimov NA, Myz SA, Ogienko AA, Kolesov BA, et al. Large porous particles for respiratory drug delivery. Glycine-based formulations. *Eur J Pharm Sci* 2017;110:148–56. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.007>.
- [192] Parlati C, Colombo P, Buttini F, Young PM, Adi H, Ammit AJ, et al. Pulmonary Spray Dried Powders of Tobramycin Containing Sodium Stearate to Improve Aerosolization Efficiency. *Pharm Res* 2009;26:1084–92. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9825-2>.
- [193] Yu J, Romeo MC, Cavallaro AA, Chan HK. Protective effect of sodium stearate on the moisture-induced deterioration of hygroscopic spray-dried powders. *Int J Pharm* 2018;541:11–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.018>.
- [194] Makhlof A, Werle M, Tozuka Y, Takeuchi H. Nanoparticles of glycol chitosan and its thiolated derivative significantly improved the pulmonary delivery of calcitonin. *Int J Pharm* 2010;397:92–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.001>.
- [195] Mukhtar M, Pallagi E, Csóka I, Benke E, Farkas Á, Zeeshan M, et al. Aerodynamic properties and in silico deposition of isoniazid loaded chitosan/thiolated chitosan and hyaluronic acid hybrid nanoplex DPIs as a potential TB treatment. *Int J Biol Macromol* 2020;165:3007–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.192>.
- [196] Angelo R, Rousseau K, Grant M, Leone-Bay A, Richardson P. Technosphere® insulin: Defining the role of technosphere particles at the cellular level. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3:545–54.

- <https://doi.org/10.1177/193229680900300320>.
- [197] Kaur N, Zhou B, Breitbeil F, Hardy K, Kraft KS, Trantcheva I, et al. A delineation of diketopiperazine self-assembly processes: Understanding the molecular events involved in N ϵ -(fumaroyl)diketopiperazine of L-Lys (FDKP) interactions. *Mol Pharm* 2008;5:294–315. <https://doi.org/10.1021/mp700096e>.
- [198] Mártha C. Crystallinity changes of organic materials in pharmaceutical technology. University of Szeged, 2014.
- [199] Zelkó R. Amorf polimer degédanyagok fizikai öregedésének hatása a gyógyszerforma fizikai stabilitására. Semmelweis Egyetem, 2007.
- [200] Radacsi N, van der Heijden AEDM, Stankiewicz AI, Ter Horst JH. Nanoparticle generation by intensified solution crystallization using cold plasma. *Chem Eng Process Process Intensif* 2013;71:51–8. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2013.03.002>.
- [201] Wu S. Calculation of interfacial tension in polymer systems. *J Polym Sci Part C* 1971;34:19–30. <https://doi.org/10.1002/polc.5070340105>.
- [202] Derjaguin B V., Muller VM, Toporov YP. Effect of contact deformation on the adhesion of elastic solids. *J Colloid Interface Sci* 1975;53:314–26.
- [203] Israelachvili JN. Intermolecular and Surface Forces Third edition. Academic Press is an imprint of Elsevier; 2011.
- [204] Iveson SM, Litster JD, Hapgood K, Ennis BJ. Nucleation, growth and breakage phenomena in agitated wet granulation processes: a review. *Powder Technol* 2001;117:3–39.
- [205] Podczeczek F. Particle-Particle Adhesion in Pharmaceutical Powder Handling. London: Imperial College Press; 1998.
- [206] Zimon AD. Adhesion of Dust and Powder. New York: Springer; 1982. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8576-3>.
- [207] SHAH B, KAKUMANU VK, BANSAL AK. Analytical Techniques for Quantification of Amorphous/Crystalline Phases in Pharmaceutical Solids. *J Pharm Sci* 2006;95:1641–65. <https://doi.org/10.1002/jps.20644>.
- [208] Gombás Á, Szabó-Révész P, Kata M, Regdon G, Eros I. Quantitative determination of crystallinity of α -lactose monohydrate by DSC. *J Therm Anal Calorim* 2002;68:503–10. <https://doi.org/10.1023/A:1016039819247>.
- [209] Copley Scientific L. Aerodynamic Particle Size Distribution (APSD) 2023. <https://www.copleyscientific.com/inhaler-testing/aerodynamic-particle-size-distribution-apsd/>.
- [210] Koblinger L, Hofmann W. Monte Carlo modeling of aerosol deposition in human lungs. Part I: Simulation of particle transport in a stochastic lung structure. *J Aerosol Sci* 1990;21:661–74. [https://doi.org/10.1016/0021-8502\(90\)90121-D](https://doi.org/10.1016/0021-8502(90)90121-D).
- [211] Farkas Á, Jókay Á, Fűri P, Balásházy I, Müller V, Odler B, et al. Computer modelling as a tool in characterization and optimization of aerosol drug delivery. *Aerosol Air Qual Res* 2015;15:2466–74. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2015.03.0144>.
- [212] Farkas Á, Lizal F, Jedelsky J, Elcner J, Horváth A, Jicha M. Simulation of Airway Deposition of an Aerosol Drug in Copd Patients. *Pharmaceutics* 2019;11:1–10. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040153>.

- [213] Farkas Á, Szipócs A, Horváth A, Horváth I, Gálffy G, Varga J, et al. Establishment of relationships between native and inhalation device specific spirometric parameters as a step towards patient tailored inhalation device selection. *Respir Med* 2019;154:133–40. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.06.021>.
- [214] Horváth A, Farkas Á, Szipócs A, Tomisa G, Szalai Z, Gálffy G. Numerical simulation of the effect of inhalation parameters, gender, age and disease severity on the lung deposition of dry powder aerosol drugs emitted by Turbuhaler®, Breezhaler® and Genuair® in COPD patients. *Eur J Pharm Sci* 2020;154. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105508>.
- [215] Kukovecz Á, Kanyó T, Kónya Z, Kiricsi I. Long-time low-impact ball milling of multi-wall carbon nanotubes. *Carbon N Y* 2005;43:994–1000. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.11.030>.
- [216] Chattopadhyay PP, Manna I, Talapatra S, Pabi SK. Mathematical analysis of milling mechanics in a planetary ball mill. *Mater Chem Phys* 2001;68:85–94. [https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(00\)00289-3](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(00)00289-3).
- [217] Bartos C, Jójárt-Laczkovich O, Regdon G, Szabó-Révész P. Robustness testing of milling process, analyzing the particle size distribution and crystallinity of the milled samples. *J Therm Anal Calorim* 2020;139:393–8. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08395-2>.
- [218] Hatkar UN, Gogate PR. Process intensification of anti-solvent crystallization of salicylic acid using ultrasonic irradiations. *Chem Eng Process Process Intensif* 2012;57–58:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.04.005>.
- [219] Krishna Sandilya D, Kannan A. Effect of ultrasound on the solubility limit of a sparingly soluble solid. *Ultrason Sonochem* 2010;17:427–34. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.10.005>.
- [220] Li X, Du L, Chen X, Ge P, Wang Y, Fu Y, et al. Nasal delivery of analgesic ketorolac tromethamine thermo- and ion-sensitive in situ hydrogels. *Int J Pharm* 2015;489:252–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.009>.
- [221] Hanft G, Türck D, Scheuerer S, Sigmund R. Meloxicam oral suspension: A treatment alternative to solid meloxicam formulations. *Inflamm Res* 2001;50:35–7. <https://doi.org/10.1007/pl00000219>.
- [222] Szabó-Révész P. Modifying the physicochemical properties of NSAIDs for nasal and pulmonary administration. *Drug Discov Today Technol* 2018;27:87–93. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.03.002>.
- [223] Davies NM, Skjodt NM. Clinical pharmacokinetics of meloxicam: A cyclo-oxygenase-2 preferential nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:115–26. <https://doi.org/10.2165/00003088-199936020-00003>.
- [224] Battistini FD, Olivera ME, Manzo RH. Equilibrium and release properties of hyaluronic acid-drug complexes. *Eur J Pharm Sci* 2013;49:588–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.04.023>.
- [225] Ding J, He R, Zhou G, Tang C, Yin C. Multilayered mucoadhesive hydrogel films based on thiolated hyaluronic acid and polyvinylalcohol for insulin delivery. *Acta Biomater* 2012;8:3643–51. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.027>.
- [226] Assanasen P, Naclerio RM. Antiallergic Anti-Inflammatory Effects of H1-Antihistamines in Humans. *Histamine H1-Antihistamines Allerg. Dis.*, 2002, p. 40.
- [227] Sherafudeen SP, Vasantha PV. Development and evaluation of in situ nasal gel formulations of loratadine. *Res Pharm Sci* 2015;10:466–76.
- [228] Rathnam G, Narayanan N, Ilavarasan R. Carbopol-based gels for nasal delivery of progesterone. *AAPS PharmSciTech* 2008;9:1078–82. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9144-7>.

- [229] Martinac A, Filipović-Grčić J, Voinovich D, Perissutti B, Franceschinis E. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *Int J Pharm* 2005;291:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.044>.
- [230] Shen H, Shi S, Zhang Z, Gong T, Sun X. Coating solid lipid nanoparticles with hyaluronic acid enhances antitumor activity against melanoma stem-like cells. *Theranostics* 2015;5:755–71. <https://doi.org/10.7150/thno.10804>.
- [231] Sharma S, Singh J, Verma A, Teja BV, Shukla RP, Singh SK, et al. Hyaluronic acid anchored paclitaxel nanocrystals improves chemotherapeutic efficacy and inhibits lung metastasis in tumor-bearing rat model. *RSC Adv* 2016;6:73083–95. <https://doi.org/10.1039/c6ra11260a>.
- [232] Yasam VR, Jakki SL, Senthil V, Eswaramoorthy M, Shanmuganathan S, Arjunan K, et al. A pharmacological overview of lamotrigine for the treatment of epilepsy. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2016;9:1533–46. <https://doi.org/10.1080/17512433.2016.1254041>.
- [233] Choi H, Morrell MJ. Review of lamotrigine and its clinical applications in epilepsy. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4:243–51. <https://doi.org/10.1517/14656566.4.2.243>.
- [234] Trbojevich RA, Fernandez A, Watanabe F, Mustafa T, Bryant MS. Comparative study of silver nanoparticle permeation using Side-Bi-Side and Franz diffusion cells. *J Nanoparticle Res* 2016;18:1–12. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3363-8>.
- [235] Rassa G, Sorrenti M, Catenacci L, Pavan B, Ferraro L, Gavini E, et al. Versatile nasal application of cyclodextrins: Excipients and/or actives? *Pharmaceutics* 2021;13:1–21. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081180>.
- [236] Suzuki R, Yamamoto M, Saka H, Taniguchi H, Shindoh J, Tanikawa Y, et al. A phase II study of carboplatin and paclitaxel with meloxicam. *Lung Cancer* 2009;63:72–6. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.04.002>.
- [237] Abdelaziz HM, Gaber M, Abd-Elwakil MM, Mabrouk MT, Elgohary MM, Kamel NM, et al. Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. *J Control Release* 2018;269:374–92. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.036>.
- [238] Chugh H, Awasthi A, Agarwal Y, Gaur RK, Dhawan G, Chandra R. A comprehensive review on potential therapeutics interventions for COVID-19. *Eur J Pharmacol* 2021;890:173741. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173741>.
- [239] Chen JS, Alfajaro MM, Wei J, Chow RD, Filler RB, Eisenbarth SC, et al. Cyclooxygenase-2 is induced by SARS-CoV-2 infection but does not affect viral entry or replication. *BioRxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.09.24.312769>.