

Szemcseméretcsökkentő eljárások a modern gyógyszerfejlesztésben; nazális és pulmonális hatóanyagbevitel (MTA doktori értekezés összefoglaló)

AMBRUS Rita*

Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet, Eötvös utca 6, 6720 Szeged, Magyarország

1. Bevezetés és célkitűzések

A modern gyógyszer technológia célja olyan stabil készítmények kutatása és fejlesztése, amelyek hatóanyaga megfelelő helyen és időben szívódik fel és fejti 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 kapukon (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 hatóanyag-tartalmat, 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.

Doktori értekezésemben az alábbi célok megvalósítását tűztem ki. Korszerű, innovatív szemcseméretcsökkentő eljárások kutatása és fejlesztése, modell hatóanyagok fizikai-kémiai sajátosságainak megváltoztatásával, prediszperziók előállítása céljából. 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. 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 gyulladás, 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.

2. Experimentális rész

2.1. Alkalmazott ható- és segédanyagok

Hatóanyagok: Meloxicám, MEL (Sigma- Aldrich Kft, Magyarország); Meloxicám kálium monohidrát, MELK (Egis Zrt, Magyarország Nifluminsav, NIF (Richter Nyrt, Magyarország); Ibuprofén, IBU, Loratadin, LOR, Lamotrigín, LAM, Gemfibrozil, GEM (Sigma- Aldrich Kft, Magyarország).

Segédanyagok: Poli(vinil-alkohol), PVA (Sigma Aldrich Kft, Magyarország); Poli(vinil-pirrolidon) PVP K25, PVP C30 (BASF, Németország); Poliszorbát 80, Tween 80 (VWR International Kft, Magyarország); Poloxamer 188 (Sigma

* Tel.: +36 20 823 2139, e-mail: ambrus.rita@szte.hu

Aldrich Kft.); Polietilén-glikol, PEG 4000, PEG 6000, PEG 20 000 (Sigma Aldrich Kft.); Nátrium-hialuronát, HA (Richter Nyrt, Magyarország Mannit (Sigma Aldrich Kft); Ciklodextrin, CD (Cyclolab, Budapest); Leucin, LEU (Sigma Aldrich Kft, Magyarország); Ammónium-hidrogénkarbonát, AB (Molar Chemicals Kft, Magyarország) Laktóz, InhaLac®, IH70 (Meggie excipients and technology, Németország), Trehalóz dihidrát (VWR International Kft., Magyarország); Magnézium-sztearát, MgSt (Roth Hungary, Magyarország), etanol, metanol, aceton, etil-acetát, benzil-alkohol, triacetin (Sigma Aldrich Kft).

2.2. A minták előállítása céljából használt kísérlettervezés, szemcseméretcsökkentő eljárások és módszerek

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). *Száraz és nedves őrlés valamint kombinált precipitációs eljárásoknál* Fritsch Pulverisette 6 Bolygómalom (Fritsch GmbH, Németország) és Retsch PM 100 MA (Retsch GmbH, Németország) acél golyókkal és cirkónium oxid őrlőgyöngyökkel; nagy intenzitású ultrahang (UH) (Hielscher UP 200S, 200W, Németország) statikus és dinamikus elrendezéssel; nagy nyomású homogenizátor (HPH) (Avestin Emulsiflex C3, Kanada) kerültek alkalmazásra. *Alternatív energiaforrásokkal asszisztált precipitációs technikák* kivitelezésére egy és nyolcfűvókás (Aitecs SEP-10S fecskendő pumpa, Litvánia) elektroporlasztót; egyedi összeállítású hideg plazma reaktorkamrát és CEM Discover (CEM Company, Anglia) kémiai szintetizáló laborméretű mikrohullámú berendezést használtunk. A *porlasztva-szárítást* (spd) Büchi B-191 „Mini” porlasztva szárító és B-90 „Nano” porlasztva-szárító (BÜCHI Labortechnik AG, Svájc) berendezéssel végeztük. A *fagyasztva-szárító* berendezés Scanvac CoolSafe 100-9 Pro típusú (LaboGene ApS, Dánia) eszköz volt. A ható- és segédanyagok fizikai keverékeit az előállított mintákkal megegyező arányban Turbula keverőben (Turbula WAB, Systems Svájc) kevertettük, majd kontrollként alkalmaztuk.

2.3. Fizikai-kémiai tulajdonságok jellemzése

A minták méretének meghatározása Leica Q500MC optikai mikroszkóppal (Leica Microsystems, Németország), Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Egyesült Királyság), a szubmikronos szemcseméret, polidiszperzitási index és felületi feszültség (Zetapotenciál, ZP) meghatározását fotonkorrelációs spektroszkópiával végeztük (PCS) (Zetasizer NanoZS®, Malvern Instruments; Malvern, Egyesült Királyság). A morfológiát pásztázó elektronmikroszkóppal elemeztük (Hitachi S-4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán). A minták látszólagos és tömörített sűrűségének meghatározását Engelsmann Stampfvolumeter (J. Engelsmann AG, Németország) (Ph. Eur., 2022) segítségével végeztük. A nedvesedési peremszög meghatározását,

polaritás, interpartikuláris kölcsönhatások elemzését OCA cseppkontúr analízáló készülékkel (Dataphysics OCA 20, Dataphysics Instruments GmbH, Németország) végeztük. A hatóanyag mennyiségét spektrofotometriásan határoztuk meg (Unicam UV/VIS) (Thermo Fisher Scientific Inc., Egyesült Államok) ($n = 3$). A porröntgen diffrakció felvétele (XRPD) Bruker D8 Advance diffraktométerrel (Bruker AXS GmbH., Németország) végeztük. A termoanalitikai méréseket Mettler Toledo STARE termoanalitikai készülékkel (Mettler Inc., Svájc) végeztük. A kialakult kölcsönhatások, kémiai stabilitás vizsgálatára AVATAR330 FT-IR spektrométert (Thermo Nicolet, Unicam Magyarország Kft.) használtunk.

2.4. Gyógyszerforma, sejtkultúra és *in vivo* vizsgálatok

A termékekből történő hatóanyagfelszabadulást forgólapátos kioldókészülékben határoztuk meg. A diffúziós vizsgálatokat vertikális Franz diffúziós cellával végeztük pufferoldatok alkalmazásával (Hanson Microette Topical and Transdermal Diffusion Cell and Autosampling System, Hanson Research, Chatsworth CA, Egyesült Államok). A hatóanyag flux (J) és permeabilitási koeficiens értékeit (K_p) 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. Módosított permeabilitási vizsgálati módszer fejlesztése (geometriai paraméterek változtatása és valós idejű mérés kivitelezése), validálása és az eredmények értékelése alapján az inline hatóanyagkoncentráció detektálása AvaLight DH-S-BAL spektrofotométerrel) és AvaSpec-2048L transzmissziós merülő szonda (AVANTES, Apeldoorn, Hollandia) alkalmazásával történt. Az *ex vivo* mérésekhez a permeabilitási tesztet humán orrnyálkahártyán (mucoperiostium) végeztük (etikai engedély száma: IV/3880-1/2021/EKU) a legmagasabb *in vitro* diffúziót mutató készítmények esetében. A permeabilitás-vizsgálatokat pulmonális formulációk esetében szintén módosított horizontális diffúziós készülékkel valósítottuk meg. Az Andersen-féle készülék (ACI, Andersen Cascade Impactor) a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos („D” készülék, Copley Scientific Ltd., Egyesült Királyság), amely alkalmas különböző készítmények aerodinamikai tulajdonságainak meghatározására, tüdődepozíció prediktálására. Az *in silico* vizsgálatokat továbbfejlesztett sztochasztikus tüdőmodell alkalmazásával végeztük, amely a légutakba belélegzett részecskék transzportját és depozícióját vizsgálja.

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. Gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata során *in vitro*, az RPMI 2650 sejteket 6 lyukú lemezre oltottuk és a legnagyobb nem citotoxikus

koncentrációval kezeltük őket. Az *in vivo* vizsgálatokat Sprague–Dawley patkányokon végeztük per os, intravénás (IV) és intranazális beadást követően, igazodva a hatóanyag terápiás dózisához és a testtömeghez. A vérbe és agyba jutott hatóanyag-koncentrációt elemeztük. A minták analitikai elemzése LC-MS-MS technikával történt. A vér-mintákban lévő hatóanyag mennyiségét Agilent 1260 HPLC-vel detektáltuk. A farmakokinetikai paramétereket PK Solver 2.0 szoftver segítségével határoztuk meg.

Az elektroporlasztás és plazma-szintézis eljárások kísérleti berendezéseit Dr. Radacsi Norbert állította össze, a sejtkultúrás (Dr. Deli Mária és mtsai, Dr. Burián Katalin és mtsai), *in silico* (Dr. Farkas Árpád) és *in vivo* (Dr. Gáspár Róbert és mtsai) vizsgálatok elvégzését kooperációban valósítottuk meg.

3. Tudományos megállapítások tézisei (T1-T17)

T1. Bolygómalomban, száraz ko-örléssel történő nanonizálás során, az acélgolyók mellett alkalmazott ko-örelő 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, szemikristályos, illetve kristályos ko-örelő segédanyagok helyes megválasztásával lehet elérni. A ko-örelő 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).

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).

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 se-

gédanyag 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 amplitúdó, 0,75 szontród pozíció eredményezi a fajlagos felület növelését, mikrorészecskék előállítását (K7, K8).

T6. Pre-szonikálással, felületnedvesítő stabilizáló (0,2-1% koncentráció) jelenlétében előállított mikroszuspenzió (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 sajátosságú modellanyagok esetében kombinált integráló eljárással, kavitáció által asszisztált mikro/nano hatóanyagprecipitáció érhető el. A hatóanyagszemcsék megnövekedett fajlagos felületének felületi nedvesítése és amorf jellege az oldékonyság és oldódási sebesség növekedést eredményezte. Igazoltuk, hogy az oldószer-antoldószeres 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-K13).

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 hatóanyagszemcsék képzését teszi lehetővé. Alternatív integráló technológiák javasolhatók gyenge oldékonyságú hatóanyagok esetében farmakonjelöltek klinikai tesztelése, hatóanyaggyártás területén, illetve re-formulálás, biohasznosíthatóság javítása céljából (K14-K17).

T9. Optimalizált, nedvesörléssel előállított nano-prediszperzióból (138 nm) a szemcsék nano porlasztva-szárítással történő integrálása közvetlen alkalmazásra használható végterméket biztosít. Javaslatot tettünk szerves oldószerves összetételekre (szuszpendált hatóanyag, mukoadhezív és diszperzitást fokozó segédanyagokat tartalmazva –PVA-LEU–), amelyek 1-2 mikronos termékként, nanorészecskék agglomerátumait tartalmazva, a gyenge vízdoldhatóságú 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 meloxikám-tartalmú prediszperziók alkalmazhatóságát innovatív folyékony nazális gyógyszerkészítmények fejlesztésére. Fizikai-kémiai vizsgálatokkal először minősítettük és vizsgáltuk meloxikám-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- K21).

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 sajátságait. Stabilitás vizsgálat során meghatároztuk a tárolási hőmérsékletet, amely révén megtartotta kedvező sajátságait 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 álta-

lunk 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-K26).

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).

T15. Igazoltuk, hogy egy lépéses eljárással mikrosuszpenzióból, „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-ket. 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).

T16. Optimalizált prediszperzió nano porlasztva-szárítással történő integrálása (diszperzításfoknövelő 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 vízdoldékonyságú 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-K32).

4. A munka gyakorlati relevanciái Preformulálás/gyógyszerformulálás/terápiás előnyök/ „value added” készítmények vonatkozásában

Orodiszperz és per os alkalmazású készítmények re-formulálásában minőségi ugrást jelent nanorészecskék előállítása, 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 acetil-szalicilsavra jellemző hiperszenzitivitási reakciók nem észlelhetők. Azonban ilyen indikációval meloxicám-tartalmú készítmény nincs forgalomban, először vizsgáltuk annak lehetőségét, hogy inhalációs összetétel formulálásával („szuper generikumként”) megcélizzuk 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 (2022) 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 beigazolódott, 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. Példaértékű vezetői szemlélete/stratégiája, szakmai és erkölcsi meglátásai, építő kritikái hozzájárultak oktatói és kutatói pályám kiteljesedéséhez. Nagy támogatást jelentettek különböző GINOP, EFOP, TÉT kutatási projektek valamint a következő egyéni kutatási pályázati támogatások: Magyar Zoltán Kutatói Ösztöndíj, Bolyai János Kutatói Ösztöndíj, Új Nemzeti Kiválósági Program, Fiatal Kutató II. kategória, MTA Gyermekek nevelő kutatók tudományos előmenetelének támogatása (KGYNK), OTKA-K és rangos szakmai díjak: MGYT elnökségi kitüntetés Szebellédy László Emlékérem, SZTE Az év fiatal kutatója.

Külön köszönöm *Szüleimnek, Férfjemnek és Kisfiamnak*.

Hivatkozások (A tézisek alapját képező közlemények)

- 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
<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.05.018>
- K2. Gieszinger, P; Csóka, I; Pallagi, E; Katona, G; Jójárt-Laczovich, 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
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S138559>
- 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
<https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1483388>
- K4. Bartos, C; Szabó-Révész, P; Bartos, Cs; Katona, G; Jójárt-Laczovich, 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
<https://doi.org/10.3390/molecules21040507>
- K5. Bartos, Cs; Jójárt-Laczovich, 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
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S159965>

- 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
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S220876>
- 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
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2014.10.015>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.04.011>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.009>
- K11. Ambrus, R; Amirzadi, N N; Sipos, P; Szabó-Révész, P. *Effect of sonocrystallization on the habit and structure of gemfibrozil crystals*. Chem Eng Techn. **2010**, 6, 827-832
<https://doi.org/10.1002/ceat.200900568>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.07.002>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.06.010>
- 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
<https://doi.org/10.1021/cg300285w>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.12.001>
- 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
<https://doi.org/10.1021/cg301026b>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.020>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106247>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.03.012>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.046>
- 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
<https://doi.org/10.3390/molecules23040784>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119166>
- 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
<https://doi.org/10.3390/molecules25051065>
- 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
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060846>
- 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
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060809>
- 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
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111883>
- K27. Benke, E; Farkas, A; 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
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060535>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.05.008>
- 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
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.03.017>
- K30. Chvatal, A; Farkas, A; 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
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.070>

- K31. Chvatal, A; Ambrus, R; Party, P; Katona, G; Jójárt-Laczovich, 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
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.034>
- 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
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020211>

Particle size reduction processes in modern drug formulation; nasal and pulmonary drug administration

Modern pharmaceutical technology is focused on formulations that are targeted to the exact site at the appropriate time, with maximum efficiency and with reduced side effects. Nanoparticle engineering has been developed and reported for pharmaceutical applications. In this approach, poorly water-soluble compounds are formulated as nanometer-sized (< 1000 nm) drug particles. Nanoparticulate technology offers increased bioavailability, improved absorption, and the potential for drug targeting. The main question of our work is, how can we use and apply the prepared nanosized systems (as predispersions) in drug formulation (to reach local or systemic effect) to get effective therapies for different diseases. Therefore, we should find cost-effective production by new technological processes containing the most important technological and material parameters.

The main focus of my research work is the development of modern, innovative particle size reduction processes for the production of predispersions by modification the physico-chemical properties of model active ingredients, Using experimental design to identify technologies that can also be used by industry, as well as by developing test methods (in vitro, ex vivo and in silico) to acquire knowledge that helps the development and production of modern pharmaceutical formulations.

In this work, different methods were used to decrease particle size into the micro- or the nanosize range. They can be divided into two main categories: bottom-up and top-down techniques. These two categories are not separated sharply, because the combination of the top-down and the bottom-up technique is necessary to control the particle size. Basically, we focused on the following methods: research and development of dry/wet milling; ultrasonic-assisted nanoprecipitation and preparation of nanocarriers by nano spray drying.

We developed formulations for per os, nasal and pulmonary application. The applied model drugs were nonsteroidal anti-inflam-

matory agents such as meloxicam. Different type of excipients e.g. PVA, PVP, PEG, Leucine, Inhalac, Mannitol, Hyaluronic acid were used. Characterization of micrometric and physicochemical properties, structure, compatibility, stability, in vitro, ex vivo and in silico properties took a part of the scientific evaluations. The innovative formulations could play a significant role in modern therapies. We monitored the dry/wet grinding parameters and the factors affecting nano-precipitation, used alternative energy sources based on solvent evaporation, designed compositions and production parameters in the 1-5 µm and 100-500 nm particle size ranges. A predispersions (liquid and solid formulations of nanosuspensions) were produced with innovative technological solutions (formation of particles with a specific habit), optimized the products, and in some cases the intermediate product as final products (stabilizers, drying procedures, composition, toxicity) could be used. Furthermore, with preformulation tests, we determined the additives necessary for alternative drug intake (pulmonary, nasal) and their applicable concentrations in the case of different dosageforms. We developed a new preparation protocol for delivering nanoparticles to the lungs by developing a „nano-in-micro” inhalation product (innovative product). In silico aerodynamic model was introduced as a part of inhalation investigation protocol. A horizontal diffusion model for the examination of suspensions and powders (geometric arrangement, real-time analysis, membrane impregnation, small volume). was also used.

Based on these results, we carried out research and development of innovative product compositions containing nano-sized active ingredients, which may be suitable for intranasal and pulmonary intake, e.g. for the treatment of neurodegenerative and pain treatment (nasal powder and nasal spray containing meloxicam) and chronic obstructive pulmonary diseases (inhalation powder containing meloxicam). The results can help the production of extra generic forms, as well as the development of possible original nanomedicines.