



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Intézetvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó, Ph.D.

A Ph.D. értekezés tézisei

**„NANO-IN-MICRO” MELOXIKÁM TARTALMÚ HORDOZÓMENTES
SZÁRAZ PORINHALÁCIÓS KÉSZÍTMÉNYEK FEJLESZTÉSE**

dr. Party Petra
okleveles gyógyszerész

Témavezető:
Dr. Ambrus Rita, Ph.D.

Szeged
2024

Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Hohmann Judit, D.Sc., akadémikus

Képzési program: Gyógyszertechnológia, gyógyszerfelügyelet

Programvezető: Prof. Dr. Csóka Ildikó, Ph.D., tanszékvezető egyetemi tanár

Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Témavezető: Dr. habil Ambrus Rita, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Party Petra

**„NANO-IN-MICRO” MELOXIKÁM TARTALMÚ, HORDOZÓMENTES
SZÁRAZ PORINHALÁCIÓS KÉSZÍTMÉNYEK FEJLESZTÉSE**

Komplex vizsga vizsgabizottság:

- Elnök:** Prof. Dr. Szabóné Révész Piroska, D.Sc., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
- Tagok:** Dr. Csóka Gabriella, Ph.D., Meditop Gyógyszeripari Kft., Pilisborosjenő
- Dr. habil. Budai-Szűcs Mária, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Bírálnói bizottság:

- Elnök:** Prof. Dr. Szatmári István, D.Sc., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerkémia Intézet
- Opponensek:** Prof. Dr. Csaba Noémi, Ph.D., Santiago de Compostela-i Egyetem, Farmakológiai, Gyógyszerészeti és Gyógyszertechnológiai Tanszék
- Vidáné Dr. habil. Erdő Franciska Ph.D., Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Információs Technológiai és Bionikai Kar
- Titkár:** Dr. Minorics Renáta, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet
- Tag:** Dr. habil. Vasas Andrea, Ph.D., Szegedi Tudományegyetem, Farmakognóziai Intézet

ABBREVIATIONS

A549 cells	Adenokarcinómás humán alveoláris bazális epitélsejtek	K_p LEU LPS	Permeabilitási együttható L-leucin Lipopoliszacharid
ACI	Andersen-féle kaszkádimpaktor	MMAD	Átlagos aerodinamikai átmérő
API	Hatóanyag	MX	Meloxicám
BCS	Biofarmáciai klasszifikációs rendszer	NSAID	Nem-szteroid gyulladásgátló
CF	Cisztás fibrózis	NSCLC	Nem-kissejtes tüdőkarcinóma
CI	Carr index		
COPD	Krónikus obstruktív tüdőbetegség	NTA	Nanorészecske nyomkövető analízis
COVID-19	2019-es koronavírus betegség	PdI PM	Polidisziperzitási index Fizikai keverék
COX-2	Ciklooxygenáz-2 enzim	PSD	Részecske méreteloszlás
D[0,1]	az a méret, amelynél a szemcsék 10%-a kisebb	PVA qPCR	Polivinil-alkohol Kvantitatív polimeráz
D[0,5]	az a méret, amelynél a szemcsék 50%-a kisebb		láncreakció
D[0,9]	az a méret, amelynél a szemcsék 90%-a kisebb	RI S.D. SEM	Refraktív index Szórás Pásztázó
DLS	Dinamikus fényszórás		elektronmikroszkóp
DMSO	Dimetil szulfoxid	SPD	Porlasztva szárított
DPI	Száraz porinhalációs rendszer	SSA T_g	Fajlagos felület Üvegesedési hőmérséklet
DSC	Differenciális pásztázó kalorimetria	X_c XRPD	Kristályossági fok Porröntgen diffraktométer
EF	Emittált frakció	Z-average	Átlagos hidrodinamikai átmérő
ELISA	Enzimhez kötött immunoszorbens analízis	ζ pot.	Zéta potenciál
FPF	Finom részecske frakció	ρ_b	Látszólagos sűrűség
HR	Hausner faktor	ρ_t	Tömörített sűrűség
ICH	Nemzetközi Harmonizációs Tanács		
IL-6	Interleukin 6		
J	Fluxus		

1. Bevezetés

A krónikus tüdőbetegségek világra gyakorolt terhe az elmúlt évtizedekben folyamatosan nő. Az öt leggyakoribb tüdőbetegség az asztma, a tuberkulózis, a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), a tüdőrák és a különböző fertőzések okozta tüdőgyulladás. A kórképek helyi kezelése az orális vagy parenterális gyógyszerbevitelhez képest hatékonyabb lehet, valamint a beteg compliance is javulhat.

A pulmonális gyógyszerbeviteli rendszerek közül a szárazpor-inhalátorok (DPI-k) alkalmazása egyre növekvő tendenciát mutat a terápiában a kiemelkedő stabilitásuknak, egyszerű használatuknak és alacsony előállítási költségüknek köszönhetően. A hajtógáz aszrolokhoz képest előnyük, hogy a belélegzett légáram juttatja el a hatóanyagot (API) a légutakba, ami jelentősen csökkentheti az üvegházhatású gázok kibocsátását. A hagyományos hordozóalapú DPI-okhoz képest a hordozómentes DPI-k hatékonyabbak lehetnek, mivel az API segédanyagokkal egy komplex rendszert alkotnak. Speciális morfológiájuk, szerkezetük és jobb aerodinamikai tulajdonságaik miatt még alacsony légzésfunkció mellett is a megfelelő tüdődepozíciót biztosítanak.

Az alkalmazott API-ok többsége rossz vízoldhatóságú. A nano méretű anyagok kisebb részecskeméretük és nagyobb fajlagos felületük által nagyobb biohasznosulást biztosíthatnak. A vízoldhatóság javítható részecsketervezési technikák alkalmazásával, amelyek új, alternatív beadási utakat is lehetővé tesznek.

Bár a tüdőbetegségek kezelésében előnyös lehet a nanorészecskék alkalmazása, jelenleg nincs kereskedelmi forgalomban kapható formuláció. A fő kihívás az, hogy az aerodinamikai részecskeméret az előírt 1-5 μm között legyen. A "nano-in-mikro" struktúra megoldást jelenthet, amely rendelkezik a nano méretű hatóanyagok előnyeivel, miközben megfelelő aerodinamikai tulajdonságokkal rendelkezik. A nedves őrlés és a porlasztva szárítás technológia kombinációja alkalmas ilyen rendszerek előállítására, melyek a hagyományos készítményekhez képest mélyebben rakódnak le a légutakban, miközben túljutnak annak eliminációs mechanizmusain.

A gyógyszertechnológiában kihívást jelent olyan szerves oldószermentes, léptéknövelhető, költség- és időhatékony előállítási módszert találni, amely alkalmas "nano-in-mikro" DPI-ok előállítására. A disszertáció, nem-szteroid gyulladáscsökkentő (NSAID) meloxicámot (MX) tartalmazó DPI-ok fejlesztéséről számol be, kombinált előállítási technológia alkalmazásával, hatékony tüdőbevitel céljából.

2. Célkitűzés

A doktori munka célja egy innovatív, hordozómentes, MX tartalmú "nano-in-mikro" DPI fejlesztése volt. A tüdőben való hatékonyság a megfelelő részecske habituson, az aerodinamikai átmérőn és a megfelelő hatóanyag-felszabaduláson alapul. A fejlesztési követelményeket figyelembe véve a következő lépések szerint terveztük meg a munkát:

- I. A "nano-in-mikro" DPI-ok alapvető jellemzőiről, a megfelelő segédanyagokról, az előállítási módszerekről és a hatásuk mechanizmusáról szóló irodalom áttekintése, valamint az elérhető NSAID-tartalmú készítmények azonosítása.
- II. A szerves oldószer nélküli stratégia és összetétel kidolgozása 200 nm alatti MX részecskeméretű nanoszuszpenzió nedves örléssel történő előállításához.
- III. Az MX-tartalmú "nano-in-mikro" részecskék előállítási eljárásának és összetételének optimalizálása, megfelelő részecskemérettel, monodiszperz méreteloszlással és szférikus morfológiával, mini és nano porlasztva szárító berendezések használatával. Az előállított DPI-ok egyik csoportját úgy terveztük, hogy a részecskeméretük a 2-5 μm -es tartományba essen, a másik esetben 2 μm -nél kisebb részecskék képzése volt a cél. Különböző vizsgálatokat végeztünk el, hogy a két porlasztva szárítási módszer előnyeit és hátrányait megállapításuk, miközben megfigyeltük a kiválasztott segédanyagok befolyását is a DPI-ok tulajdonságaira.
- IV. A DPI-k *in vitro* és *in silico* aerodinamikai tulajdonságait határoztuk meg különböző áramlási sebességek mellett, Andersen-féle kaszkádimpaktor (ACI) és sztochasztikus tüdőmodell segítségével, a megfelelő tüdődepozíció bizonyítására.
- V. A készítmény pulmonális hatékonyságának alátámasztására *in vitro* hatóanyag-felszabadulási vizsgálatot és *in vitro* permeabilitási vizsgálatot hajtottunk végre. Ezenkívül *in vitro* citotoxicitási és gyulladáscsökkentő vizsgálatokat is végeztünk.
- VI. Végezetül célul tűztük ki a DPI fizikai stabilitásának vizsgálata a Nemzetközi Harmonizációs Tanács (ICH) Q1A irányelve szerint.

Összességében a célunk az volt, hogy a nanorészecskék terápiás előnyeinek és egy alternatív beviteli útvonalnak a kombinálásával, MX tartalmú "nano-in-mikro" DPI-t hozzunk létre légzőszervi betegségek kezelésére. A modern részecsketervezési technikák alkalmazása mellett a DPI-k átfogó vizsgálati protokolljának kidolgozását is célul tűztük ki.

3. Anyagok

3.1. Hatóanyag

API-ként a rossz vízoldékonyságú (7,15 mg/l, 25 °C), NSAID MX-ot alkalmaztuk (4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-1,3-thiazol-2-yl)-1,1-dioxo-1λ6,2-benzothiazine-3-carboxamide, Egis Pharma-ceuticals PLC., Budapest, Magyarország).

3.2. Segédanyagok

Polivinil-alkohol 4–98-at (PVA, $M_w \sim 27,000$ g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk a stabilitás biztosítására. L-leucinnal (LEU, M_w : 131,17 g/mol, AppliChem GmbH, Darmstadt, Németország) növeltük a por diszperzitásfokát.

4. A „nano-in-mikro” DPI rendszerek előállítása

4.1. Nanoszuszpenzió előállítása nedves őrléssel

A minta előállításának első lépésében optimalizált nedves őrléssel állítottunk elő nanoszuszpenziót. Kimértünk 2 g MX-t, 18 g 2,5%-os (w/w%) PVA oldatot és hozzáadtunk 20 g cirkónium (ZrO_2) gyöngyöt ($d = 0.3$ mm). Ezt bolygómalomban (Retsch PM 100 MA, Retsch GmbH Haan, Németország) őrlöttük 60 percig 500 rpm fordulatszámmal. Porlasztás előtt tisztított vízzel 500 ml-re hígítottuk a nanoszuszpenziót.

4.2. DPI-ok előállítása porlasztva szárítással

4.2.1. Mini porlasztva szárítás

Három különböző összetételű mintát alakítottunk ki a nanoszuszpenzióból LEU hozzáadásával (1. Táblázat). A szilárd részecskéket mini porlasztva szárító berendezéssel, 0.7 mm átmérőjű fúvókán keresztül szárítottuk (Büchi Mini Spray Dryer B-191, Büchi, Flawil, Svájc). A következő paramétereket állítottuk be: a szárító levegő hőmérséklete 165 °C, a kimenő levegő hőmérséklete: 100 °C, a szárító levegő áramlása 85%, a mintaadagoló pumpa sebessége: 10%, a sűrített levegő áramlási sebessége: 500 l/óra.

4.2.2. Nano porlasztva szárítás

A nanoszuszpenzióhoz különböző mennyiségben LEU-t adtunk (1. Táblázat). Az inhalálható port nano porlasztva szárító berendezéssel állítottuk elő (Büchi Nano Spray Dryer B-90 HP, Büchi, Flawil, Switzerland). A 2 μ m alatti szemcseméret eléréséhez a legkisebb feltétet alkalmaztunk (pórusátmérő: 4 μ m). A következő paramétereket alkalmaztuk: bemeneti hőmérséklet: 80 °C, a szárító levegő áramlásának erőssége: 100%, a sűrített levegő áramlási sebessége: 120 ml/perc, a mintaadagoló pumpa sebessége: 20%.

4.3. Fizikai-keverékek előállítása

Az kiindulási anyagokból, a porlasztva szárított (SPD) mintakéval megegyező összetételű fizikai keveréket (PM) hoztunk létre (1. táblázat). A porkeverékek hatóanyag-tartalmát meghatároztuk (lásd 6.5.1. rész).

1. Táblázat A SPD minták és a PM-ek összetétele, a porlasztások kitermelése és az API tartalmak.

Minta	MX (g)	PVA (g)	LEU (g)	Kitermelés (%)	API tart. (%)
mini[MX1_PVA_LEU0]	2,00	0,45	0,00	45,41 ± 5,10	93,81 ± 2,99
mini[MX1_PVA_LEU0,5]	2,00	0,45	1,00	57,56 ± 1,36	55,48 ± 0,78
mini[MX1_PVA_LEU1]	2,00	0,45	2,00	58,43 ± 6,36	51,46 ± 2,99
nano[MX1_PVA_LEU0]	2,00	0,45	0,00	61,44 ± 3,34	72,50 ± 3,55
nano[MX1_PVA_LEU0,5]	2,00	0,45	1,00	63,29 ± 2,38	51,26 ± 3,19
nano[MX1_PVA_LEU1]	2,00	0,45	2,00	62,44 ± 5,86	42,65 ± 1,33
pm[MX1_PVA_LEU0]	2,00	0,45	0,00	-	81,63
pm[MX1_PVA_LEU0,5]	2,00	0,45	1,00	-	57,97
pm[MX1_PVA_LEU1]	2,00	0,45	2,00	-	44,94

5. Nanoszuszpenzió karakterizálás

5.1. Részecskeméret analízis

5.1.1. Lézer diffrakción alapuló szemcseméret analízis

A nanoszuszpenzió részecskeméretét Malvern Mastersizer 2000 Scirocco (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Egyesült Királyság) készülék nedves diszpergáló egységét használva vizsgáltuk. Beállítottuk az MX refraktív indexét 1,72-re, desztillált vízben 2000 rpm kevertetéssel végeztük a három párhuzamos vizsgálatot.

5.1.2. Dinamikus fényszórás mérés

Az átlagos hidrodinamikai átmérő (Z-average), a polidiszperzitási index (PDI) és a zéta potenciál érték (ζ pot.) a dinamikus fényszórás (DLS) elvén került meghatározásra (Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Egyesült Királyság)). A nanoszuszpenziót tisztított vízzel hígítottuk, majd 25 °C-on, 1,72 refraktív index mellett mértük kapilláris üvegküvetékben. Három párhuzamos mérést végeztünk.

5.1.3. Nanorészecske nyomkövető analízis

A nanorészecske nyomkövető analízist (NTA) NanoSight NS 3000 készülékkel (Malvern Instruments, Worcestershire, Egyesült Királyság) végeztük. A műszer 565 nm-es lézerrel, sCMOS kamerával volt felszerelve. Az MX szuszpenziót 1000-szeresére hígítottuk, és 50-es fordulatszámmal töltöttük be a készülékbe fecskendő segítségével. A kísérleti videókat az NTA 3.4 Build 3.4.4.4 segítségével elemeztük, miután 3 db 30 s-os videót rögzítettünk méésenként, mintánként összesen 1500 képkockát.

6. Szilárd forma karakterizálása

6.1. Részecskeméret analízis

6.1.1. Lézer diffrakción alapuló szemcseméret analízis

A porlasztott szemcsék méretét Malvern Mastersizer 2000 Scirocco (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Egyesült Királyság) készülékkel vizsgáltuk. A DPI-ok mérése során száraz feltétet alkalmaztunk, 3 bar nyomáson 75%-os vibráció mellett. Beállítottuk az MX refraktív indexét. A programmal megkaptuk a szemcsék méret szerinti eloszlását kifejező $D[0,1]$, $D[0,5]$, $D[0,9]$ értékeket, amelyek megadják, hogy a por térfogatának hány%-a (10%, 50%, 90%) kisebb az adott μm -nél (1. egyenlet).

$$\text{Span} = \frac{D[0,9]-D[0,1]}{D[0,5]} \quad (1)$$

6.1.2. Dinamikus fényszórás mérés eredményei

A Z-average, PDI és ζ potenciál és a DLS elvén került meghatározásra a porlasztott minták esetén is. A száraz mintákat tisztított vízben diszpergáltuk, majd 25 °C-on, 1,72 refraktív index mellett mértük kapilláris üvegküvetékben. Három párhuzamos mérést végeztünk.

6.2. Morfológia vizsgálat

A termékek morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal határoztuk meg (Hitachi S-4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán). A szemcséket arany-palládiummal vontuk be (Bio-Rad SC 502, VG Microtech, Anglia). A mérés 10 kV feszültségen és 10 mA áramerősségen történt.

6.3. Sűrűség és folyási sajátságok mérése

A termékek látszólagos (ρ_b) és tömörített sűrűségének (ρ_t) megállapítását sűrűségmérő berendezéssel (ETD-1020x, Electrolab, Mumbai, India) végeztük el. A 10 cm³-es mérőhengerbe helyezett 1,5-2,0 cm³ por tömegét lemértük, és 1000 leütés után újra leolvastuk a térfogatukat. Minden mintából három párhuzamos mérést hajtottunk végre three times. A Hausner faktor (HR) és Carr index (CI) értékeit a minták látszólagos és tömörített sűrűségi értékeiből számoltuk ki. (2. és 3. egyenlet).

$$\text{HR} = \frac{\rho_t}{\rho_b} \quad (2)$$

$$\text{CI} = \frac{(\rho_t - \rho_b)}{\rho_t} * 100 \quad (3)$$

6.4. Kristályosság meghatározása

6.4.1. Termoanalitikai vizsgálat

A termoanalitikai méréseket Mettler Toledo STARe termoanalitikai készülék (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) segítségével végeztük. A differenciális pásztázó kalorimetria (DSC, differential scanning calorimetry) méréseket argon gáz áramoltatásával (10 l/óra) végeztük, 2-4 mg-os mintával, 25-300°C között, 10 °C/perc fűtési sebességgel.

6.4.2. Kristályszerkezet vizsgálat

A kristályos jelleg jellemzésére porröntgen diffrakciós (XRPD, X-ray powder diffraction) vizsgálatot végeztünk (Bruker D8 Advance, Bruker AXS GmbH., Karlsruhe, Németország). A sugárforrás: Cu K λ I sugárzás volt. Egységesen 40 kV feszültségen és 40 mA áramerősségen történt a beolvasás 3°-tól 40°-ig, a szkennelési sebesség 0,1°/min, lépésköz 0,01° volt. A kiértékeléshez DIFFRACT plus EVA szoftvert használtunk. Meghatároztuk a kristályossági fokot (X_c) (4. egyenlet), A jelölte a görbe alatti területet. A PM-eket 100% kristályos anyagként kezeltük.

$$X_c = \frac{A_{kristályos}}{A_{kristályos} + A_{amorf}} * 100 \quad (4)$$

6.5. A DPI-ok *in vitro* és *in silico* aerodinamikai karakterizálása

6.5.1. Andersen-féle kaszkádimpaktossal végzett vizsgálat

Az Andersen-féle kaszkádimpaktort (ACI, Andersen Cascade Impactor, Copley Scientific Ltd., Nottingham, Egyesült Királyság) használtuk a készítmények *in vitro* aerodinamikai tulajdonságainak meghatározására. Az eszközre kapcsolt vákuum pumpa (High-capacity Pump model HCP5, Critical Flow Controller Model TPK, Copley Scientific Ltd., Nottingham, Egyesült Királyság) és áramlásmérő készülék (Flow Meter Model DFM 2000, Copley Scientific Ltd., Nottingham, Egyesült Királyság) segítségével beállítottuk az áramló levegő sebességét 28,3 l/min-re és 60 l/min-re. A készítményeket mindkét esetben 4 s hosszan lélegeztettük be. A különböző DPI-k hatóanyag-tartalmát (1. táblázat) 1 mg por 25 ml metanolban és pH 7,4 foszfátpufferben (60+40 V/V%) történő oldásával határoztuk meg, és UV/Vis spektrofotometriával elemeztük 362 nm hullámhosszon. A kapszulákba 1,5 mg MX-ot tartalmazó por mennyiséget mértünk ki a minden mintából. A vizsgálat elvégzéséhez a készítményt kemény zselatin kapszulába (transzparens, 3-as méret, Capsugel, Bornem, Belgium) töltöttük és Breezhaler® típusú porinhalátor (Novartis International AG, Bazel, Svájc) segítségével inhaláltattuk be a készülékbe. A mérések megkezdése előtt a felfogó tálcákat Span 85 és ciklohexán oldat 1+99 (m/m%) arányú

elegyével vontuk be, hogy a kitapadt szemcsék fennmaradjanak a tálcákon. A mérés után a tálcákon kitapadt por mennyiségét vizsgáltuk. Metanol és 7,4 foszfát puffer (60+40 V/V%) arányú elegyével, mostuk le és oldottuk fel a kapszulákban, a készülékben, a légcsőben, az egyes tálcákon és a filteren kitapadt port. Az UV-VIS spektroszkópia eredményei alapján Inhalytix[®] program segítségével számítottuk ki a finom részecske-dózist (FPF) és az átlagos aerodinamikai átmérőt (MMAD). Az FPF az 5 µm-nél kisebb MMAD értékű hatóanyagot tartalmazó részecskék tömegének százalékos aránya osztva a készítmények emittált dóziséval. Kiszámítottuk az emittált frakciót (EF), ami az az eszközből kibocsátott frakció, ami bejut az impaktorba.

6.5.2. *In silico* aerodinamikai karakterizálás

Az *in silico* vizsgálatokat sztochasztikus tüdőmodell alkalmazásával végeztük, ami a légutakba belélegzett részecskék transzportját és depozícióját vizsgálja. Kiszámítható a modell alkalmazásával, hogy melyik anatómiai régióban tapadnak ki a részecskék, valamint a kilélegzett frakció is. Vizsgálataink során COPD-ben szenvedő felnőtt férfi és női betegek Breezehaler[®] típusú készüléken keresztüli légzési paramétereit (belégzési idő: 3,2 s, légzés benntartási idő: 5 s és 10 s, belélegzett térfogat: 1,7 l) vettük alapul és az Andersen-féle kaszkád impaktor modellel kapott eloszlási eredményeket használtuk fel a számításainkhoz. A vizsgálatot a Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpontjával együttműködésben végeztük.

6.6. *In vitro* pulmonális gyógyszerforma vizsgálatok

6.6.1. *In vitro* kioldódás vizsgálat

A termékekből való hatóanyag kioldódását a Magyar Gyógyszerkönyvben is hivatalos forgólapátos kioldókészülék módosított változatával határoztuk meg. Az orális dózis tizedét, a pulmonálisan elegendő 1,5 mg MX-ot tartalmazó termék mennyiségét mértünk ki. A mintákat 50 ml 37 °C-os tüdőfolyadékba (NaCl, NaHCO₃, CaCl₂, glicin, NaH₂PO₄, H₂SO₄, pH: 7,4 ± 0,1) vizsgáltuk. A készülék 100 fordulat/perc fordulatszámra működött. A termékre 3 párhuzamos mérést végeztünk 5, 10, 15, 30 és 60 perc után. Az adott időpontban 5 ml mintát vettünk, szűrtük, majd UV–VIS spektrofotométerrel megmértük az abszorbanciát ($\lambda = 362$ nm), amelyből meghatároztuk a kioldódott hatóanyag mennyiségét.

6.6.2. *In vitro* permeabilitás teszt

A permeabilitás vizsgálatokat 3D nyomtatott diffúziós készülékkel valósítottuk meg. A rendszer 37 °C-on volt temperálva. 1,5 mg MX tartalmú termék mintákat tettünk a 9 ml tüdőfolyadékot tartalmazó donor fázisba. 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 60 percen keresztül, valós időben mértük az abszorbanciát ($\lambda = 362$ nm), szondával (FDP-7UV200-VAR, Avantes, Apeldoorn, Hollandia) felszerelt spektrométerrel (Avaspec-ULS2048-USB2, Avantes, Apeldoorn, Hollandia). Három párhuzamos mérést végeztünk. Az MX fluxust (J) a membránon áthatoló MX mennyiségéből (m), osztva a membrán felületével (A_m) és az időtartam (t) hányadosával számoltuk ki (6. egyenlet). A permeabilitási együtthatót (K_p) a fluxus és a donorfázisban lévő MX-koncentráció [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$] hányadosaként határoztuk meg (7. egyenlet).

$$J = \frac{m}{A_m \cdot t} \quad (6)$$

$$K_p = \frac{J}{C_d} \quad (7)$$

6.6.3. *In vitro* sejtvonalas vizsgálatok

6.6.3.1. Citotoxicitás mérés

Az SPD-mintákat dimetil-szulfoxidban (DMSO, VWR Chemicals, Leuven, Belgium) oldottuk fel, 0,1 mg/ml koncentrációt alkalmaztunk. Ez az MX-koncentráció megfelelő a tüdőbe történő beadáshoz. Teszteltünk további hígított koncentrációkat is. A mitokondriális aktivitást, mint a sejtek életképességének mérőszámát MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) teszttel végeztük, 96 lyukú sejtenyésztési mikrolemezekben, A549 (adenokarcinómás humán alveoláris bazális epithel sejtek, ATCC) felhasználásával. Az A549 sejteket 4×10^4 sejt/lyuk sűrűséggel alkalmaztuk. A sejteket MX vagy nano SPD mintákkal kezeltük. A citotoxicitást az 550 nm-en mért optikai sűrűség (OD) mérésével határoztuk meg, egy EZ READ 400 ELISA olvasóval (Biochrom, Cambridge, Egyesült Királyság). A vizsgálatot minden koncentráció esetében négyszer ismételtük meg. A sejtek életképességére a következő 8. egyenlet alapján következtítettünk.

$$\text{Sejtéletképesség} = 100 \cdot \frac{(\text{OD}_{\text{minta}} - \text{OD}_{\text{kontroll közeg}})}{(\text{OD}_{\text{kontroll}} - \text{OD}_{\text{kontroll közeg}})} \times 100 \quad (8)$$

6.6.3.2. Gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata

A sejteket Earle-sót (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartalmazó minimum esszenciális táptalajban szaporítottuk, amelyet 25 µg/ml gentamicinnel, 10% magzati borjúsérummal, 0,5% (wt/vol) glükózzal, 0,3 mg/ml l-glutaminnal és 4 mM HEPES-szel egészítettünk ki. Az A549 sejteket 6 lyukú lemezekbe vetettük 1 x 10⁶ sejt/lyuk sűrűséggel, és 0,1 mg/ml MX vagy DPI formulációval és 5 µg/ml LPS-szel vagy csak 5 µg/ml LPS-szel kezeltük, vagy kezeletlenül hagytuk, majd a sejteket 48 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A kezelést követően a ribonukleinsavat (RNS) TRI reagenssel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA) extraháltuk. Ezt követően 0,1 µg mRNS-t reverz transzkripciót végeztünk Maxima reverz transzkriptáz segítségével oligo(dT) primerekkel (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). A kvantitatív polimeráz lánreakciót (qPCR) Bio-Rad CFX96 valós idejű rendszerrel végeztük, az 5x HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Supermix (Solis BioDyne, Tartu, Észtország) és a következő humánspecifikus primerpárokkal: interleukin-6 (IL-6) és Actb (aktin béta). Az IL-6 és az Actb esetében küszöbciklusokat (Ct) határoztunk meg, és a relatív génexpressziót a 2-($\Delta\Delta C_t$) módszerrel számoltuk ki. A 48 órás kezelés után a sejtek felülíróját összegyűjtöttük, és az IL-6 koncentrációjának meghatározására szendvics humán IL-6 enzimhez kötött immunszorbens ELISA-kitet Legend Max[™] (BioLegend, San Diego, CA, USA) használtunk. A lemezeket a Biochrom Anthos 2010 mikrolemezolvasóval (Biochrom, Cambridge, Egyesült Királyság) elemeztük. A mintákat két példányban vizsgáltuk. Az *in vitro* sejtvonalas vizsgálatokat a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének segítségével végeztük.

6.7. Stabilitás teszt

Megvizsgáltuk a nano[MX1_PVA_LEU1] minta stabilitását. Az eredmények a többi készítményre is kiterjeszthetők voltak, azok hasonló összetétele miatt. A stabilitási vizsgálatot 25 ± 2 °C-on, 50 ± 5% relatív páratartalom mellett végeztük exsikkátorban, hogy imitáljuk a jövőbeli tárolási körülményeket. A mintákat 1 nap, 6 hónap és 12 hónap elteltével vettük és mértük.

6.8. Statisztikai analízis

Minden leírt adat három párhuzamos mérés (n = 3) szórását (± SD) mutatja. A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 8.0.1. szoftver (GraphPad Software, CA, USA) segítségével Student's t-teszt és egyirányú varianciaanalízis (ANOVA) segítségével végeztük. A P-értékek < 0,05 statisztikailag szignifikáns különbségeket jeleztek.

7. A nanoszuszpenzió szemcseméret karakterizálásának eredményei

7.1. Részecskeméret analízis

7.1.1. Lézer diffrakción alapuló szemcseméret analízis eredményei

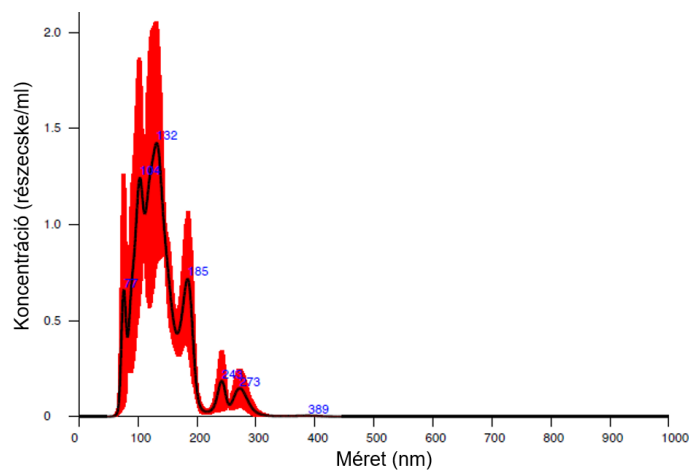
Az API kiindulási átmérője mikrométeres nagyságrendű volt ($D[0.5] = 9,91 \pm 0,37 \mu\text{m}$), amit sikeresen lecsökkentettünk nedves őrléssel a nano mérettartományba $D[0.5] = 137,70 \pm 4,97 \text{ nm}$. Az SSA emelkedett $1,09 \pm 0,03 \text{ m}^2/\text{g}$ -ról $43,65 \pm 5,32 \text{ m}^2/\text{g}$ -ra. A PVA bevonta az MX részecskéket, ami megakadályozta a részecskék aggregációját a szemcseméret csökkentés során.

7.1.2. Dinamikus fényszórás mérés eredményei

A DLS teszt alapján a szuszpenzió Z-average értéke $359,75 \pm 12 \text{ nm}$ volt és a PDI $0,34 \pm 0,06$ értéket mutatott. A mérés bizonyította, hogy az MX átmérőjét 500 nm alá csökkentettük. Ezáltal az API elkerülheti az alveoláris makrofágok eliminációját. A ζ potenciál ($-23,70 \pm 0,85$) alapján a nanoszuszpenzió stabil szuszpenziós rendszert alkot.

7.1.3. Nanorészecske nyomkövető analízis eredményei

Az NTA egyszerre érzékeli a nagy és a kis részecskéket, ami pontosabb részecske meghatározást eredményez, mint a DLS. Az NTA szerint az MX nanoszuszpenzió $D[0,5]$ értéke $124,90 \pm 8,60 \text{ nm}$ volt, a PSD pedig monodiszperz (1. ábra).



1. ábra: A nanoszuszpenzió részecskeméret eredménye az NTA szerint.

8. A szilárd forma szemcseméret karakterizálásának eredményei

8.1. Részecske méret analízis

8.1.1. Lézer diffrakción alapuló szemcseméret analízis eredményei

A nanoszuszpenziók szárítása után a részecskék mérete megfelelőnek bizonyult inhalációs bevitelre, mivel a $D[0,5]$ értékek minden esetben az 1-5 μm -es tartományban voltak (2. táblázat). A mini SPD minták geometriai átmérője 3,2-4,4 μm között volt. A nano

SPD minták D[0,5] értékei 1-1,5 μm között voltak. Az eredmények megfeleltek az eredeti célnak, amely a 2 μm feletti és alatti részecskék előállítására volt a két különböző porlasztva szárítási technikával. A LEU alkalmazása megnövelte az porlasztott részecskék geometriai méretét, ami az SSA csökkenéséhez vezetett. Ennek oka, hogy a részecske közötti kölcsönhatás a részecskeméret megváltoztatását eredményezte. Minél nagyobb a Span érték, annál szélesebb az eloszlás. A PSD monodiszperz (Span < 2,0) volt a mini SPD és a LEU-t tartalmazó nano SPD termékek esetében, ami fontos a pontos adagoláshoz.

2. Táblázat: A DPI-ok részecskeméret, Span és SSA értékei.

Minta	D[0,5] (μm)	Span	SSA (m^2/g)
mini[MX1_PVA_LEU0]	3,19 \pm 0,02	1,56 \pm 0,07	2,22 \pm 0,03
mini[MX1_PVA_LEU0,5]	3,80 \pm 0,01	1,46 \pm 0,00	1,88 \pm 0,02
mini[MX1_PVA_LEU1]	4,40 \pm 0,03	1,58 \pm 0,08	1,71 \pm 0,05
nano[MX1_PVA_LEU0]	1,17 \pm 0,00	5,42 \pm 1,49	6,60 \pm 0,03
nano[MX1_PVA_LEU0,5]	1,31 \pm 0,04	1,68 \pm 0,30	5,19 \pm 0,06
nano[MX1_PVA_LEU1]	1,43 \pm 0,09	1,59 \pm 0,12	4,39 \pm 0,01

8.1.2. Dinamikus fényszórás mérés eredményei

A 3. táblázat a DLS-vizsgálat eredményeit mutatja. Az eredmények szerint a mini SPD minták a nagyobb részecskeméret miatt lassabban esnek szét, mint a nano SPD részecskék. Az inhomogén eloszlást a viszonylag magas PDI eredmények mutatták (PDI > 0,3). Ezt azonban nem jelent problémát, ha nem befolyásolja negatívan a hatóanyag-felszabadulást. A termékek negatív ζ -potenciálértékei miatt valamennyi DPI degradábilis és kevésbé retentív a légutakban.

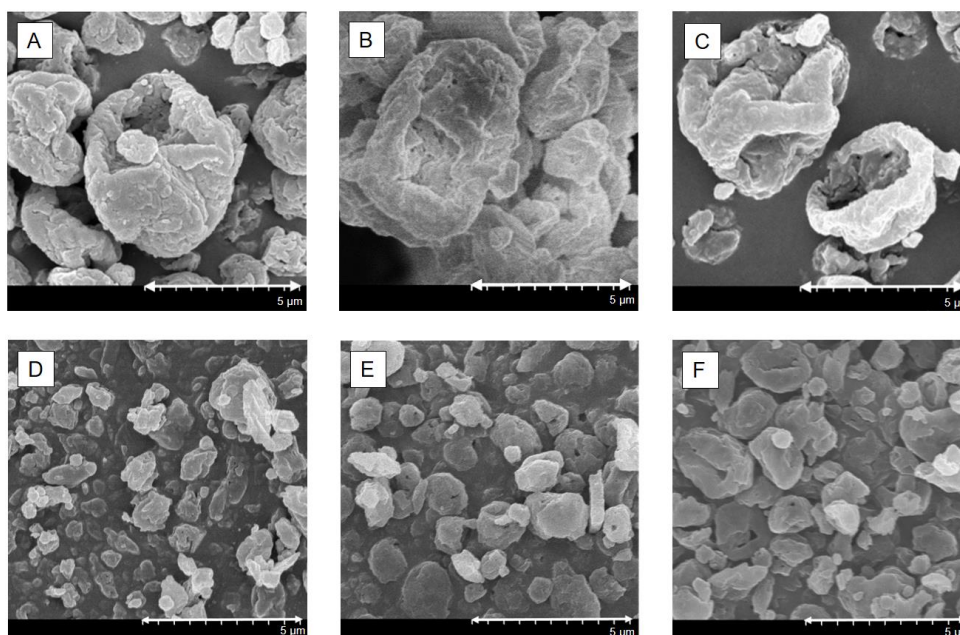
3. Táblázat: A DPI-ok Z average, PDI és ζ potenciál értékei.

Sample name	Z average (nm)	PDI	ζ potential (mV)
mini[MX1_PVA_LEU0]	1852.00 \pm 126	0.552 \pm 0.056	-2.15 \pm 0.25
mini[MX1_PVA_LEU0.5]	1292.00 \pm 231	0.653 \pm 0.065	-18.63 \pm 2.06
mini[MX1_PVA_LEU1]	1386.00 \pm 142	0.706 \pm 0.074	-23.83 \pm 1.19
nano[MX1_PVA_LEU0]	676.70 \pm 47	0.543 \pm 0.055	-21.35 \pm 5.27
nano[MX1_PVA_LEU0.5]	743.25 \pm 27	0.502 \pm 0.074	-23.30 \pm 2.74
nano[MX1_PVA_LEU1]	526.90 \pm 20	0.381 \pm 0.031	-24.50 \pm 1.47

8.2. A morfológia vizsgálat elemzése

A DPI-k SEM-felvételein (2. ábra) jól láthatók a különböző porlasztóval szárított termékek közötti méretkülönbségek. Közel szférikus alak volt megfigyelhető, ami az optimalizált szárítási módszerek eredménye. Az alak megfelelt a DPI-kkel szemben támasztott követelményeknek. A PVA megakadályozta a részecskék aggregációját, mivel hidrophil réteget hozott létre az MX részecskék körül. Amikor a LEU jelen volt a rendszerekben, előnyösen rancos részecskék jöttek létre, és a szférikus morfológia

fánszerű lett. Az érdes felület a gyorsan száradó mag összegyűrődésével keletkezett. A LEU kristályos réteget alakított ki, amely csökkentette a felületi energiát, ami durvább felületet eredményezett. Ezáltal a LEU csökkentheti a részecskék közötti adhéziót és a kapszulához való tapadást, ami magasabb EF és FPF értékeket eredményez. A minták üreges szerkezettel rendelkeznek, ami alacsony sűrűséget prediktál. A LEU tartalom nedvességvédelmet is eredményezhet, így javítja a minták fizikai stabilitását tárolás során.



2. Ábra A DPI minták SEM képei: A: mini[MX1_PVA_LEU0], B: mini[MX1_PVA_LEU0,5], C: mini[MX1_PVA_LEU1], D: nano[MX1_PVA_LEU0], E: nano[MX1_PVA_LEU0,5], F: nano[MX1_PVA_LEU1].

8.3. A sűrűség és folyási sajátságok mérésének értékelése

A termékek ρ_t értéke $0,3 \text{ g/cm}^3$ körüli vagy annál kisebb volt. A kereskedelemben kapható DPI-k sűrűsége körülbelül 1 g/cm^3 , ezért a minták alacsony sűrűségű készítményeknek tekinthetők. Kedvező, ha minél alacsonyabb a ρ_t , hiszen annál magasabb az FPF. Nagyobb mennyiségű LEU alkalmazásával csökkent a ρ_b , ezért javult a por diszpergálhatósága. A HR és a CI (4. táblázat) hasonló volt az irodalomban található hordozómentes rendszerekhez. A HR és CI értékek a porkeverékek folyási tulajdonságait jellemzik, ami szintén felelős az aeroszolizációért.

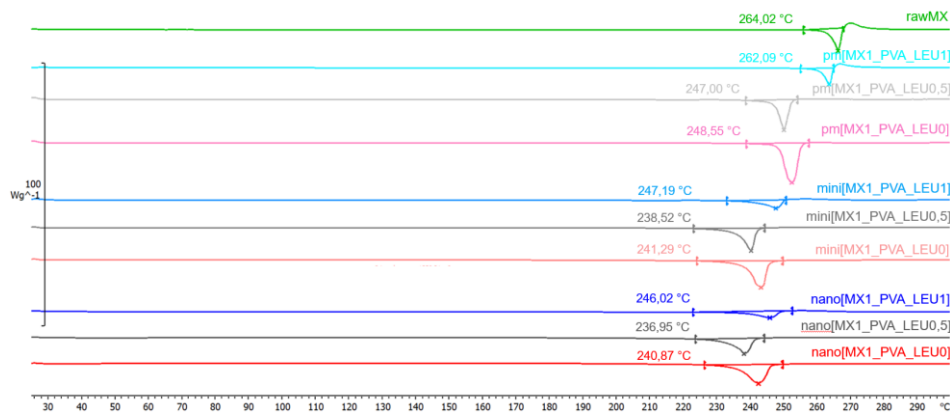
4. Táblázat: Sűrűség, HR és CI eredmények.

Minta	$\rho_b(\text{g/cm}^3)$	$\rho_t(\text{g/cm}^3)$	HR	CI
mini[MX1_PVA_LEU0]	$0,18 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,00$	$1,49 \pm 0,05$	$32,39 \pm 7,23$
mini[MX1_PVA_LEU0,5]	$0,16 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,00$	$1,76 \pm 0,08$	$43,09 \pm 2,70$
mini[MX1_PVA_LEU1]	$0,15 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$	$1,40 \pm 0,21$	$27,65 \pm 10,8$
nano[MX1_PVA_LEU0]	$0,22 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$1,33 \pm 0,09$	$27,27 \pm 4,55$
nano[MX1_PVA_LEU0,5]	$0,22 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,02$	$1,43 \pm 0,10$	$30,00 \pm 5,00$
nano[MX1_PVA_LEU1]	$0,21 \pm 0,00$	$0,32 \pm 0,01$	$1,50 \pm 0,08$	$33,33 \pm 3,33$

8.4. Kristályosság meghatározásának összegzése

8.4.1. Termoanalitikai vizsgálat eredménye

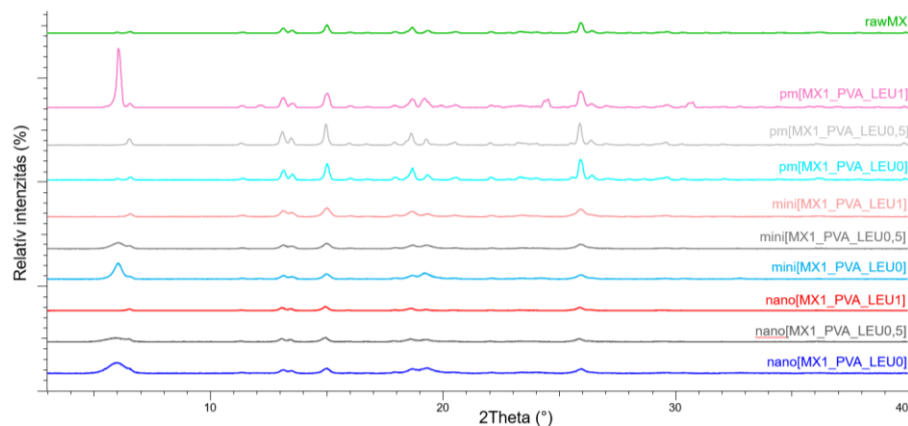
Az MX termoanalitikai tulajdonságainak meghatározására DSC-t alkalmaztunk (3. ábra). A kiindulási MX endoterm csúcsot mutatott 264,03 °C-on, ami az olvadáspontját és kristályosságát tükrözi. Az előállítási módszerek által az MX szélesebb endoterm csúcsokat mutatott, ami a kristályossági fok csökkenésére utal. A visszamaradt MX kristályok a kisebb szemcseméret miatt alacsonyabb hőmérsékleten olvadtak meg, mint az eredeti MX. Ezt elősegítette a PVA, amelynek üvegesedési hőmérséklete (T_g) 85 °C.



3. ábra: A kiindulási MX, PM és SPD minták DSC görbéi.

8.4.2. A kristályos szerkezet vizsgálatának eredménye

Az XRPD-t az MX kristályos állapotának jellemzésére használtuk az előállítási folyamatok előtt és után. A kiindulási anyag XRPD-mintázata az MX kristályos szerkezetét mutatta. A termékek esetében a jellegzetes csúcsok intenzitása csökkent (4. ábra). A kezelés után a mini[MX1_PVA_LEU0] esetében az MX 73,23%-a, a mini[MX1_PVA_LEU0,5] esetében 51,81%-a és a mini[MX1_PVA_LEU01] esetében 54,14%-a maradt kristályos. A nano[MX1_PVA_LEU0], nano[MX1_PVA_LEU0,5] és nano[MX1_PVA_LEU1] esetében az MX 68,19%-a, 66,11%-a és 54,04%-a amorfizálódott.



4. ábra: A kiindulási MX, PM és SPD minták XRPD görbéi.

8.5. A DPI-ok *in vitro* és *in silico* aerodinamikai karakterizálásának értékelése

8.5.1. Andersen-féle kaszkádimpaktoros mérések összefoglalása

Az *in vitro* aerodinamikai vizsgálatot különböző áramlási sebességek mellett végeztük el. Az Inhalitix™ szoftverrel kiértékelt eredményeket az 5. táblázat mutatja be. A mini SPD minták MMAD értékei 3,0-3,7 µm között voltak, amelyek megfelelőek voltak a kisebb vezető légutak megcélzására. A LEU-t tartalmazó nano SPD-minták MMAD értékei 1,2 és 1,3 µm között voltak, ami előnyös volt a légutak mélyebb részeinek eléréséhez. Voltak 1 µm-nél kisebb MMAD-ok is, amelyek prediktálták a "nano-in-mikro" készítmények inhaláció közbeni szétesését. A LEU-t tartalmazó mini SPD minták esetében mindkét áramlási sebességnél jobb FPF-értékeket (akár 65%-ot) figyeltek meg, ami megfelelő gyógyszerbevitelt jelzett a különböző állapotú betegeknél. Az FPF-értékek meghaladták a Breezhaler® készülékben a kereskedelemben kapható DPI-készítményeket. A nano SPD minták FPF-eredményei 87 és 95% közötti értéket mutattak, ami még az irodalomban jelenleg fejlesztés alatt álló készítményekhez képest is kiemelkedő. A LEU-t tartalmazó minták EF értékei emelkedtek a LEU nélkülihez képest, különösen a nano SPD minták esetében. Ennek oka a részecskék közötti csökkent kohézió. Az ACI mérés eredményei ígéretesek, hiszen a részecskék jelenlegi kísérleti adatai korrelációt mutatnak az *in vitro* kaszkádimpaktoros mérések és a klinikai tüdődepozíciós értékek között.

5. Táblázat: A DPI-ok MMAD, FPF és EF értékei 28,3 and 60l/min áramlási sebességgel.

Minta	MMAD (µm)		FPF (%)		EF (%)	
	28,3 l/min	60 l/min	28,3 l/min	60 l/min	28,3 l/min	60 l/min
mini[MX1_PVA_LEU0]	3,63	3,06	68,82	54,27	72,42	53,68
	±0,15	±0,62	±5,15	±14,41	±3,05	±15,68
mini[MX1_PVA_LEU0,5]	3,33	0,88	65,20	72,16	83,47	61,48
	±0,35	±0,51	±4,84	±3,50	±1,33	±16,16
mini[MX1_PVA_LEU1]	3,37	0,91	67,03	72,26	75,22	66,28
	±0,03	±0,40	±0,32	±2,57	±1,75	±12,25
nano[MX1_PVA_LEU0]	4,46	2,17	21,97	62,62	54,80	28,02
	±0,65	±0,13	±4,98	±0,20	±0,46	±1,48
nano[MX1_PVA_LEU0,5]	0,51	1,34 ±	69,55	86,16	61,99	54,29
	±0,17	0,23	±4,29	±2,33	±2,48	±9,36
nano[MX1_PVA_LEU1]	0,33	1,27	82,93	94,45±	73,89	92,42
	±0,06	±0,07	±1,61	0,88	±2,86	±13,07

8.5.2. Az *in silico* aerodinamikai karakterizáció eredményei

Az *in silico* jellemzés során a minták deponálódott és kilélegzett frakcióinak meghatározására került sor (6. táblázat és 7. táblázat). A LEU-tartalmú termékek esetében az extrathorakális deponálódás alacsonyabb, különösen a nano SPD minták esetében, a jobb

diszperzitás miatt. A 10 s légzés visszatartási idő alkalmazásával a felső légutakban és a kilélegzett frakcióban csökkent a depozíció, tehát a bronchiális és alveoláris depozíció minden esetben javult. Kimutattuk, hogy a légzés visszatartás hossza jelentős hatással van a deponálódott frakcióra, amit az *in vitro* aerodinamikai értékelés során nem vehető figyelembe. A mini SPD minták esetében nagyobb deponálódási értékeket kaptunk a tüdőben, a nano SPD minták esetében pedig nagyobb volt a kilélegzett frakció. A hosszabb légzés visszatartási idő azonban csökkentheti ezt a kilélegzett frakciót, így javítja a lerakódást a kisebb légutakban. A betegek megfelelő belégzési és légzés visszatartási technikák megtanítása javíthatja a DPI hatékonyságát, és elérheti a kisebb légutakat, ahogy azt az ACI-mérések mutatták. Több kereskedelmi forgalomban kapható DPI-t is teszteltek a sztochasztikus tüdőmodellel, amelyek a fejlesztett "nano-in-mikro" DPI készítményekhez képest rosszabb depozíciót mutattak.

6. Táblázat: *In silico* aerodinamikai eredmények 28,3 l/min-en, 5 és 10 s-os légzés visszatartási idővel.

Minta	Extrathor. (%)		Bronchiális (%)		Acináris (%)		Kilélegzett(%)	
	5 s	10 s	5 s	10 s	5 s	10 s	5 s	10 s
mini[MX1_PVA_LEU0]	20,75 ±1,93	20,57 ±1,93	14,54 ±0,98	15,39 ±1,00	33,65 ±2,42	35,71 ±2,40	10,48 ±0,31	7,71 ±0,26
mini[MX1_PVA_LEU0,5]	22,01 ±2,30	21,86 ±2,29	14,10 ±0,85	14,69 ±0,91	32,06 ±0,94	35,06 ±1,49	18,17 ±3,43	14,72 ±2,94
mini[MX1_PVA_LEU1]	18,82 ±0,95	18,66 ±0,95	14,32 ±0,30	14,88 ±0,31	32,65 ±0,94	36,01 ±1,03	20,25 ±0,55	16,48 ±0,44
nano[MX1_PVA_LEU0]	29,99 ±2,31	29,92 ±2,31	10,50 ±0,48	10,77 ±0,44	10,71 ±1,61	11,42 ±1,72	3,59 ±0,72	2,69 ±0,56
nano[MX1_PVA_LEU0,5]	6,64 ±0,23	6,54 ±0,22	6,15 ±0,06	6,39 ±0,12	25,93 ±0,61	30,30 ±0,96	23,24 ±2,16	18,75 ±1,86
nano[MX1_PVA_LEU1]	4,61 ±0,28	4,51 ±0,27	6,13 ±0,40	6,33 ±0,46	31,46 ±1,56	37,20 ±1,64	31,67 ±0,62	25,85 ±0,49

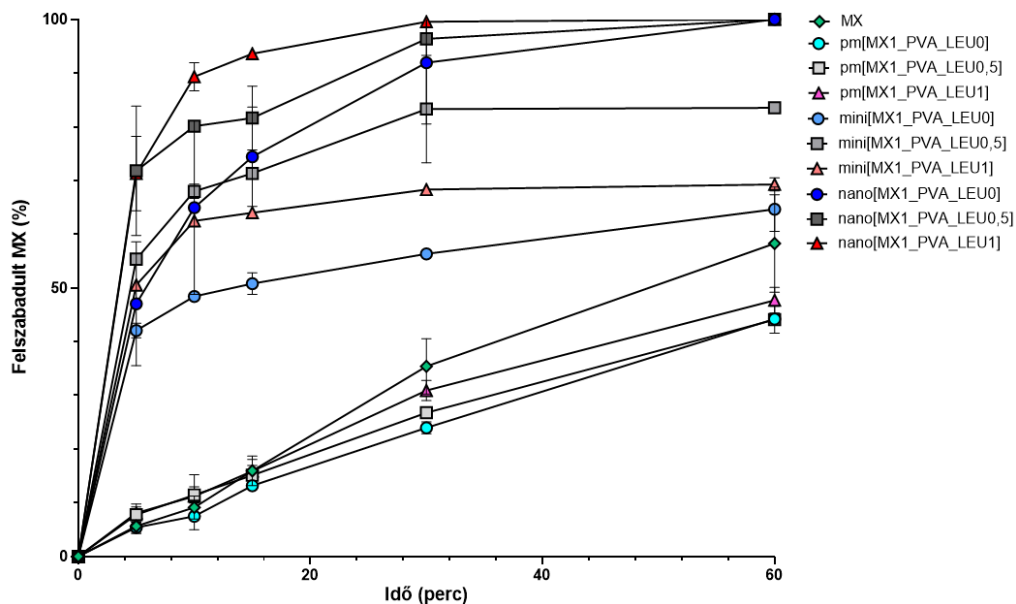
7. Táblázat: *In silico* aerodinamikai eredmények 60 l/min-en, 5 és 10 s-os légzés visszatartási idővel.

Minta	Extrathor. (%)		Bronchiális (%)		Acináris (%)		Kilélegzett(%)	
	5 s	10 s	5 s	10 s	5 s	10 s	5 s	10 s
mini[MX1_PVA_LEU0]	34,98 ±8,09	34,53 ±8,09	10,39 ±0,05	10,39 ±0,05	9,85 ±1,76	12,80 ±2,24	23,32 ±7,35	20,68 ±6,79
mini[MX1_PVA_LEU0,5]	20,36 ±2,49	20,02 ±2,48	7,99 ±1,23	7,99 ±1,23	13,98 ±2,73	17,84 ±3,47	33,11 ±6,02	29,54 ±5,35
mini[MX1_PVA_LEU1]	22,02 ±2,62	21,56 ±2,58	9,97 ±0,65	9,97 ±0,65	16,40 ±0,81	20,92 ±1,04	37,54 ±0,82	33,46 ±0,67
nano[MX1_PVA_LEU0]	16,41 ±0,44	16,18 ±0,43	6,15 ±0,04	6,15 ±0,04	7,16 ±0,12	9,09 ±0,13	21,49 ±0,94	19,65 ±0,92
nano[MX1_PVA_LEU0,5]	7,73 ±2,06	7,57 ±2,04	5,69 ±0,52	5,69 ±0,52	13,69 ±2,56	17,11 ±3,23	45,69 ±4,17	42,18 ±3,53
nano[MX1_PVA_LEU1]	6,06 ±0,48	5,90 ±0,47	6,16 ±0,25	6,16 ±0,25	18,18 ±0,98	22,81 ±1,22	57,49 ±1,52	52,74 ±1,29

8.6. A pulmonális gyógyszerforma *in vitro* vizsgálatainak elemzése

8.6.1. Az *in vitro* kioldódás teszt eredményeinek összegzése

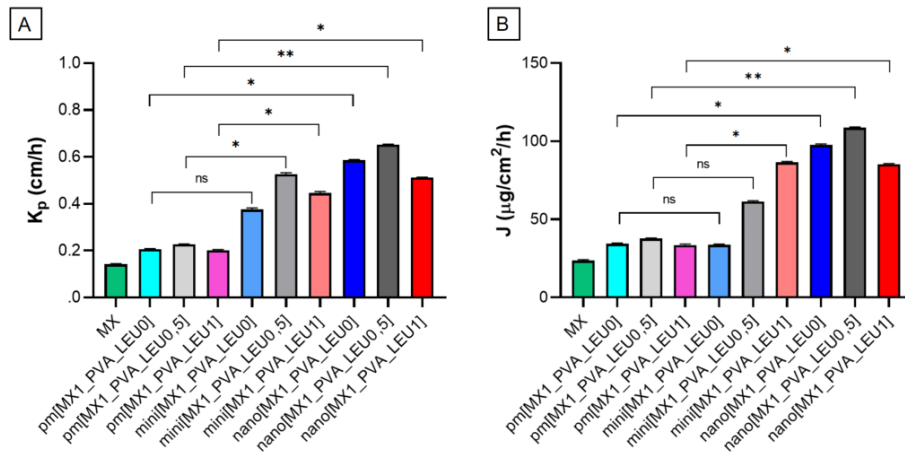
Az *in vitro* hatóanyag-felszabadulási teszt során az MX felszabaduló mennyisége a kiindulási anyagokat tartalmazó minták esetében volt a legalacsonyabb (5. ábra.). A mini SPD mintákból a hatóanyag körülbelül fele szabadult fel az első 5 percen, szemben a referencia minták 5%-ával. A nano SPD DPI-k esetében a LEU-t tartalmazó mintákból a kisebb részecskeméretnek és a gyorsabb dezintegrációnak köszönhetően az MX 70%-a felszabadult az első 5 percen. Ezek a javulások a nagyobb fajlagos felülettel, az MX jobb oldhatóságával és amorfizációjával függenek össze. A hidrophil PVA gátolta az aggregációt és növelte a polaritást, a LEU csökkentette a részecskék közötti kohéziót, ezért nagyobb mennyiségű MX szabadult fel. Az eredmények előnyösek a helyi terápiában, mert elegendő időt adnak a nano-méretű MX kioldódására.



5. Ábra: *In vitro* hatóanyag felszabadulás a DPI termékekből.

8.6.2. Az *in vitro* permeabilitás vizsgálat eredményei

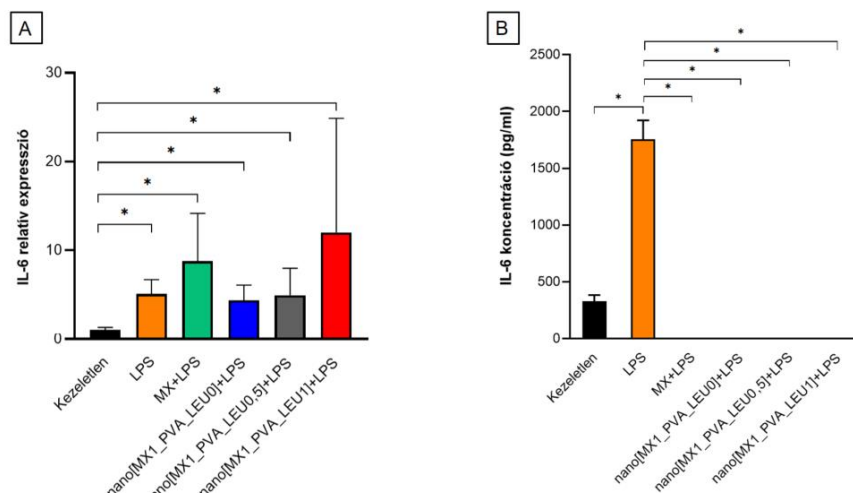
Az *in vitro* diffúziós vizsgálat során a nanorészecskék által elért nagy felület volt a fő tényező, amely befolyásolta a passzív diffúzió sebességét. Az API diffúziója a mintákból a kiindulási MX-hez képest minden esetben nagyobb volt. A készítmények K_p értékei szignifikánsan javultak (0,37-0-0,65 cm/h). A termékek szignifikánsan megnövekedett J értékeket mutattak (6. ábra) a PM-ekhez képest. Az eredmények kiemelkedően nagy diffundált API mennyiséget (60-110 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) mutatnak, ha figyelembe vesszük, hogy a tüdő teljes felülete körülbelül 100 m^2 . Összességében az SPD formulációkkal megnövekedett mennyiségű API juthat az epitel sejtekbe.



6. Ábra: A formulációk *in vitro* hatóanyag permeábiltsa: A: K_p , B: J eredmények.

8.6.3. Az *in vitro* sejtvonalas vizsgálatok konzekvenciái

A citotoxicitási vizsgálat azt mutatta, hogy 0,1 mg/ml koncentrációban minden mintának alacsony a citotoxikus hatása. A sejtek életképessége az MX, nano[MX1_PVA_LEU0], nano[MX1_PVA_LEU0,5], nano[MX1_PVA_LEU1] 91,97%, 90,32%, 80,38% és 82,77% volt. A formulációk biztonságosan alkalmazhatók pulmonális célra. Az MX-tartalmú minták transzlációs szinten gátolták az IL-6 termelést, de transzkripciós szinten nem. Az LPS-sel kezelt sejtek szignifikánsan magasabb relatív expressziót mutattak a kezeltlen sejtekhez képest; azonban sem az MX, sem az SPD készítmény nem gátolta az IL-6 növekedését (7. ábra). Az IL-6 szintjét ELISA segítségével ellenőriztük, és azt találtuk, hogy az IL-6 expressziója jelentősen megnőtt az LPS-sel kezelt sejtekben, a kezeltlen sejtekhez képest. Érdekes módon az MX és az összes SPD minta akadályozta az IL-6 termelést (7. ábra). Az IL-6 koncentráció növekedése összefügg a 2019-es koronavírus betegség (COVID-19) légzési elégtelenségének és halálzásának, és korai csökkentése ígértes a túlélés meghosszabbítása szempontjából.



7. Ábra: A: IL-6 relatív expresszió a sejtekben, B: IL-6 koncentráció a sejtek felülúszójában

8.7. A stabilitás teszt eredményei

A stabilitási vizsgálathoz a legígéretesebb nano[MX1_PVA_LEU1]-t választottuk. A jellemzésből kiderült, hogy a fejlesztett DPI hosszú ideig (12 hónap) megőrizte kritikus minőségi tulajdonságait. Azonban további stabilitás vizsgálatokra lehet szükség, például a végleges csomagolásban történő vizsgálatra.

9. Következtetések

A doktori értekezés célja egy innovatív, hordozómentes "nano-in-mikro" DPI rendszer fejlesztése volt, amely magában hordozza a nano-méretű hatóanyaghoz köthető sajátságok és a pulmonális bevitel előnyeit. Továbbá célunk volt a szerves oldószermentes, kombinált előállítási technika mellett, egy átfogó DPI vizsgálati protokoll kidolgozása is. A disszertáció célkitűzéseivel összhangban a következő megállapítások tehetők:

- I. Az irodalmi háttér feldolgozása alapján a MX-et tartalmazó hordozómentes "nano-in-mikro" DPI készítmények fejlesztésével elsőként foglalkoztunk. Eddig csak néhány tanulmány foglalkozott NSAID tartalmú DPI előállításával, és ezek közül egyik sem tárgyalta nano méretű MX pulmonális alkalmazhatóságát. Segédanyagként PVA és LEU összetétel kombinációját is először vizsgáltuk nanoméretű hatóanyag mellett, megfelelő tüdődepozíció elérése céljából, egyéb segédanyagok alkalmazása nélkül.
- II. A nanoszuszpenziót szerves oldószermentes, kombinált nedves őrlési technikával állítottuk elő, bolygómalomban. Az optimalizált folyamat monodiszperz méreteloszlást és 150 nm alatti MX részecskéket eredményezett ($D[0,5] = 137,70 \pm 4,97$ nm a lézerdiffrakciós mérés alapján és $D[0,5] = 124,90$ nm \pm 8,60 nm a NTA szerint). Az előállított szuszpenzió szemcsemérete és összetétele alkalmas volt „nano-in-mikro” szerkezetű inhalációs porok létrehozására.
- III. A nanoszuszpenzió szilárd formává alakítása során a két eltérő elven működő porlasztva szárító készüléket alkalmaztunk. Megállapítható, hogy mindkét berendezés pulmonális bevitelnek megfelelő tulajdonságú inhalációs porok előállítására alkalmas, amelyek szférikus alakkal és alacsony sűrűséggel (0,2-0,3 g/cm³) jellemezhetők. A mini porlasztva szárítás eredménye 3-4 μ m méretű „nano-in-mikro” DPI volt, amellyel megcélozhatók a bronchiolusok. A nano porlasztva szárító 2 μ m alatti átmérőjű, extra-finom részecskék előállítására volt alkalmas, melyekkel elérhető a tüdő alveoláris régiója. A két szárító berendezés közötti fő

különbségek a kitermelésben, az elért részecskeméretben és az ebből következő a depozíciós eloszlásban voltak. A porlasztva szárító módszerek kitermelésén érdemes a jövőben tovább javítani, különösen a léptéknövelés szempontjából. A PVA alkalmazása hozzájárult a stabil nanoszuszpenzió előállításához, továbbá megőrizte az MX-részecskék egyediségét a szilárd fázisú termékek esetén. A LEU fokozta a porkeverék diszpergálhatóságát és módosította a részecskék morfológiáját, melyet alátámasztottunk különböző részecskeméret vizsgálatok eredményeivel és a SEM felvételekkel. Az *in vitro* és *in silico* aerodinamikai jellemzésekkel igazoltuk, hogy megfelelő LEU koncentrációval kedvezően befolyásolhatók a minták aerodinamikai tulajdonságai. A részecskék közötti kohézió csökkentése által javult az *in vitro* kioldódás és permeabilitás.

- IV. A különböző aerodinamikai mérési eredményekkel bizonyítottuk a termékek kiemelkedő tüdődepozícióját (FPF = $72,26 \pm 2,57\%$ a mini[MX1_PVA_LEU1] és $94,45 \pm 0,88\%$ a nano[MX1_PVA_LEU1] esetében). A vizsgálati technikák eredményei megerősítették a DPI rendszerek megfelelő részecskeméreteloszlását ahhoz, hogy a tüdő különböző régiói megcélozhatóvá váljanak. A mini porlasztva szárított minták aerodinamikai átmérője 3 és 4 μm között volt. A nano porlasztva szárított LEU-t tartalmazó minták 2 μm alatti részecskékből álltak. Az *in silico* vizsgálattal igazoltuk a megfelelő részecskeloszlást a bronchiolusokban és az alveolusokban. A hosszabb levegőben tartási idő csökkentette a légutakon kívüli területeken és a kilélegzett frakcióban lerakódott hatóanyag mennyiségét.
- V. Az *in vitro* hatóanyag-felszabadulási vizsgálat (70% és 100% közötti felszabadulása az MX pulmonális dózisának 30 perc alatt) és az *in vitro* permeabilitási vizsgálat (60 perc alatt $60\text{-}110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ permeabilitása az MX pulmonális dózisának) alapján megállapítottuk, hogy a formulációk alkalmasak tüdön keresztüli bevitelre. A nagyobb felületnek, az amorfizációnak és a segédanyagoknak köszönhetően a kioldódás gyors volt a mesterséges tüdőfolyadékban, és a DPI-ok *in vitro* permeabilitása javult. Igazoltuk, hogy a termékek tüdőben alkalmazandó koncentrációja nem volt toxikus az A549 sejtvonalakon, amelyeket a humán alveoláris epitélium modellezésére szolgáltak. Az *in vitro* sejtvonalas vizsgálat eredménye szerint a készítmények az IL-6 koncentrációjának csökkentése által erős gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek.

VI. A "nano-in-mikro" rendszer stabilitása kulcsfontosságú a jövőbeli termékfejlesztés szempontjából. Elmondható, hogy a nano[MX1_PVA_LEU1] formuláció stabil, 6 és 12 hónap elteltével nem mutatott jelentős változásokat a pulmonális alkalmazás szempontjából kritikus paramétereiben.

10. A munka újdonsága és gyakorlati jelentősége

A munka új eredményei és gyakorlati vonatkozásai a következőkben foglalhatók össze:

- Új "porlasztva szárítás nanoszuszpenzióból" technológiát fejlesztettünk ki MX tartalmú "nano-in-mikro" DPI-ok fejlesztésére, amely a zöld előállítási eljárás előnyeit és léptéknövelés lehetőségét kínálja.
- A bemutatott DPI-ok az elsők a szakirodalomban, amelyek nano méretű MX-ot tartalmaznak.
- A PVA és a LEU kombinációjának egyéb segédanyagok nélküli hatását először vizsgáltuk "nano-in-mikro" DPI rendszerek esetében.
- Részletes vizsgálati protokollt dolgoztunk ki a "nano-in-mikro" DPI-ok vizsgálatára, beleértve a részecskeméret-elemzést, a hatóanyag-felszabadulást és az *in vitro-in silico* aerodinamikai vizsgálatokat, amely a jövőben más DPI rendszerek fejlesztésének alapját képezheti.
- Mindkét módszerrel porlasztva szárított nanonizált MX-t tartalmú készítmény kiváló aerodinamikai tulajdonságokkal rendelkezik, és jobb *in vitro* és *in silico* aerodinamikai viselkedést mutatott, mint a jelenleg kereskedelmi forgalomban lévő termékek.
- A "nano-in-mikro" készítmények a sejtvonal-vizsgálatok szerint biztonságosak, hatékonyak és hosszú távú stabilitással rendelkeznek.
- A "nano-in-mikro" MX-ot tartalmazó DPI rendszerek új lehetőségeket kínálhatnak az NSAID-ok inhalációs terápiában történő alkalmazásában, a tüdőgyulladással is járó betegségek, például a tüdőfibrózis, a COPD, az NSCLC és a 2019-es koronavírus betegség (COVID-19), hatékony helyi kezelésére, gyenge légzési paraméterekkel rendelkező betegek esetében is.
- Az előállítási mód előnyös lehet más, gyenge vízdékonyságú gyógyszerek biohasznosulásának javítására, a kezelhető tüdőbetegségek (pl, asztma, tuberkulózis) körének bővítésére.

Tézishez kapcsolódó publikációk

- I. **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*, 13:2, Paper: 211, 18 p. 2021.
(Q1, IF: 6.52)
- II. **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, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 176, Paper: 106247, 13 p. 2022.
(Q1, IF: 4.6)
- III. **Party, P.;** Ambrus, R.; Investigation of Physico-Chemical Stability and Aerodynamic Properties of Novel “Nano-in-Micro” Structured Dry Powder Inhaler System, *Micromachines*, 14:7, Paper: 1348, 14 p. 2023.
(Q2, IF: 3.4)

Tézishez nem kapcsolódó publikációk

- I. Chvatal, A.; **Party, P.;** Katona, G.; Jójárt-Laczkovich, O.; Szabó-Révész, P.; Fattal, E.; Tsapis, N.; Ambrus, R.; Formulation and comparison of spray dried non-porous and large porous particles containing meloxicam for pulmonary drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 559 pp. 68-75., 8 p. .2019.
(D1, IF: 4.845)
- II. Party, P.; Klement, ML.; Szabó-Révész, P.; Ambrus, R.; Preparation and Characterization of Ibuprofen Containing Nano-Embedded-Microparticles for Pulmonary Delivery *Pharmaceutics*, 15:2, Paper: 545, 15 p. 2023.
(Q1; IF: 5.4)

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném kifejezni hálámat a témavezetőmnek, **Dr. Ambrus Ritának**, minden szakmai és érzelmi támogatásáért, bátorításáért és útmutatásáért.

Szeretném őszintén megköszönni **Prof. Dr. Csóka Ildikónak**, a Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy ebben az intézetben végezhessem kutatásomat.

Továbbá szeretném megköszönni **Prof. Dr. Révész Piroskának** tudományos mentorálását és **Dr. Chvatal Anitának**, hogy hallgatóként bevezetett a kutatás világába.

Hálás vagyok továbbá társszerzőimnek az együttműködésért és felbecsülhetetlen segítségükért: **Dr. Balla-Bartos Csillának** a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézetéből; **Dr. Farkas Árpádnak** a Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpontjából; **Dr. Kókai Dávidnak** és **Prof. Dr. Burián Katalinnak** a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetéből; **Prof. Dr. Hopp Bélának** a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékéről és **Dr. Nagy Attilának** a Magyar Tudományos Akadémia Wigner Fizikai Kutatóközpontjából.

Köszönetemet fejezem ki Feczkóné Boda Erikának és Lakatosné Fekete Piroskának a kiváló technikai segítségért és a TDK hallgatóknak, akikkel együtt dolgozhattam. Továbbá szeretném megköszönni a Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet minden munkatársának a segítségét és kedvességét. Szerencsésnek érzem magam, hogy ilyen együttműködő környezetben végezhettem a munkám.

Szeretnék köszönetet mondani barátaimnak, akik támogattak a doktori munka során: Falusi Fanni, Németh Dorottya, Plesz Szonja, Pomaházi Zsanett és Sipos Bence. Hálás vagyok szeretett szüleimnek, nővéremnek, unokahúgomnak és nagymamámnak a szeretetükért és megértésükért a tanulmányaim során. Végezetül szeretnék köszönetet mondani Lőrinczi Bálintnak.

Munkámat anyagilag támogatta a Richter Gedeon Talentum Alapítvány, a Richter Gedeon Kft, az ÚNKP-19-2-SZTE-101; ÚNKP-21-3-SZTE-258, ÚNKP-22-3-SZTE-157 és ÚNKP-23-3-SZTE-184 Új Nemzeti Kiválósági Program a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap forrásából, valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium által a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból a TKP2021-EGA támogatási rendszer keretében finanszírozott TKP2021-EGA-32 számú projekt és az Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap forrásából az OTKA K_146148 projekt.