

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelisaveta S. Ignjatović

**RAZVOJ FORMULACIJE I *IN VITRO/IN SILICO*  
KARAKTERIZACIJA PRAŠKOVA ZA  
INHALACIJU SA MODIFIKOVANIM  
OSLOBAĐANJEM LEKOVITIH SUPSTANCI  
RAZLIČITIH BIOFARMACEUTSKIH  
SVOJSTAVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Jelisaveta S. Ignjatović

**FORMULATION AND *IN VITRO/IN SILICO*  
CHARACTERIZATION OF MODIFIED-  
RELEASE DRY POWDERS FOR INHALATION  
WITH DRUGS OF DIFFERENT  
BIOPHARMACEUTICAL PROPERTIES**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022

## **Mentori**

---

Dr sc. Sandra Cvijić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Jelena Đuriš, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

## **Članovi komisije**

---

Dr sc. Svetlana Ibrić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Nenad Filipović, redovni profesor,  
Univerzitet u Kragujevcu – Fakultet inženjerskih nauka

---

Dr sc. Vladimir Dobričić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Datum odbrane \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

*Pisanje zahvalnice kao dela doktorske disertacije je nešto što me je dovelo do razmišljanja i suočavanja sa sobom.*

*Šta je svrha i šta je proizvod mog proteklog posvećenog vremena i zašto zahvalnica deluje kao završetak nečega a u stvari je možda početak.*

*Prethodni period života, od odluke da upišem studije farmacije (hvala mami), preko izbora teme i izrade diplomskog rada (beskrajno hvala Taji, tati i Tanji, koji su uvek tu i sa kojima je sve lakše), ideje i podrške da se prijavim i započnem doktorske studije (hvala profesorkama Sandri Cvijić i Jeleni Parojčić), rada na Katedri (hvala kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju i mojoj Erni), rada na disertaciji (hvala profesorkama Sandri Cvijić i Jeleni Đuriš, kao i kolegama sa drugih katedri i fakulteta, profesoru Vladimiru Dobričiću i asistentkinji Tijani Geroski), do konačnog uobličavanja disertacije (hvala članovima komisije i opet profesorkama Sandri Cvijić i Jeleni Đuriš) i podršci u odluci da nastavim dalje stručno usavršavanje (hvala profesorkama Sandri Cvijić, Jeleni Đuriš i Svetlani Ibrić) je nešto što sam doživela i kao nastavak i kao početak trajnog i velikog poštovanja i ljubavi za ove drage ljude.*

*Posle gore navedenog moje pitanje šta je svrha i šta je proizvod mog proteklog posvećenog vremena dobija odgovor.*

*Pa upravo početak i otkrića...*

*Da li postoji nešto važnije u nauci od volje i želje da se uđe u prelepe lavirinte znanja i započne avantura puna radoznalosti i želja da se putevi lavirinta spoznaju i otkriju što više i bolje, sa punom svešću da uvek ima mnogo toga još što treba istražiti i savladati i da ta avantura nema kraja, ali i da izlaz iz svakog lavirita uvek postoji...*

*Još važniji početak i otkriće za mene su emocije i bliskosti koje su nastale u ovom periodu prema i sa ljudima koje uz porodicu pominjem, a koje sam upoznala i sa kojima sam proživela ovaj deo života. Te emocije su nešto što me je oplemenilo i napravilo boljom. I za tu drugu ljudsku prelepu avanturu želim da, kao i ona naučna, stalno traje, nema kraja i da mi da mogućnost da je iznova i iznova istražujem, oplemenjujem i obogaćujem.*

*I samo još...*

*Ogromno hvala mom Nikoli na neprekidnoj podršci i razumevanju.*

*Veliko hvala baba Lepi koja je sve vreme tu, nenametljiva i stalna.*

*Još jedno hvala profesorki Jeleni Đuriš na svemu... Podršci, dodatnoj snazi i sigurnosti koje mi je davala i to radi i dalje.*

*I na početku i na kraju hvala profesorki Sandri Cvijić. Tragajući da nađem reč kojom bih joj izrazila svoju zahvalnost, svi putevi mog traganja doveli su do jedne reči, a to je inspiracija... I kada kritikuje i kada daje pohvalu... I kada vodi i kada prati... I kada zahteva i traži savršenstvo, a ovde ne postoji drugo jer uvek teži savršenstvu... U radu, misli i razmišljanju... Sve se završi inspiracijom za dalje, za bolje, za pametnije. Hvala, profesorka.*

# Razvoj formulacije i *in vitro/in silico* karakterizacija praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovitih supstanci različitih biofarmaceutskih svojstava

## SAŽETAK

Inhalacioni put primene lekova pokazuje brojne prednosti, no broj registrovanih preparata za ovaj put primene je relativno ograničen u odnosu na ostale vrste preparata. Dodatno, svi do sada registrovani preparati za inhalaciju predstavljaju preparate sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance. Poslednjih godina se intenzivno radi na razvoju preparata za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance, koji bi mogli da doprinesu povećanju komplijanse pacijenata i efikasnosti terapije. U skladu sa tim, cilj ove disertacije je razvoj formulacije čvrstih lipidnih mikročestica u obliku praškova za inhalaciju, odgovarajućih aerodinamičkih karakteristika i sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance, kao i *in vitro/in silico* karakterizacija praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovitih supstanci različitih biofarmaceutskih svojstava, salbutamol-sulfata i budesonida.

Metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi, u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem, izrađeni su praškovi za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, koji su pokazali odgovarajuće aerodinamičke karakteristike i modifikovanu (produženu) brzinu oslobađanja salbutamol-sulfata u odnosu na prašak čistog salbutamol-sulfata. Rezultati sprovedenih ispitivanja su ukazali na značaj primene *in silico* modela zasnovanih na računarskoj dinamici fluida i čestica u razvoju praškova za inhalaciju, jer su na ovaj način određene karakteristike ispitivanih formulacija koje nije moguće utvrditi *in vitro* metodama.

Fiziološki-zasnovano farmakokinetičko (PBPK) modelovanje pokazalo je da bi se inhalacionom primenom mukoadhezivnog praška sa modifikovanim oslobađanjem budesonida postiglo sporije rastvaranje i produžena apsorpcija budesonida. Takođe, rezultati PBPK modelovanja ukazali su na to da bi inhalacionom primenom praškova čvrstih lipidnih mikročestica mogla da se produži apsorpcija salbutamola u plućima. Pri tome je predviđeno da se, nakon primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica, veći procenat salbutamola apsorbuje putem pluća, a manji iz gastrointestinalnog trakta, u odnosu na registrovani preparat sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance. Dobijeni rezultati ukazuju na to da bi inhalaciona primena praškova čvrstih lipidnih mikročestica potencijalno mogla obezbediti veću efikasnost i bezbednost inhalacione terapije.

**Ključne reči:** praškovi za inhalaciju, modifikovano oslobađanje, čvrste lipidne mikročestice, aerodinamičke karakteristike, modeli zasnovani na računarskoj dinamici fluida i čestica, fiziološki-zasnovano farmakokinetičko (PBPK) modelovanje, salbutamol-sulfat, budesonid

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

# **Formulation and *in vitro/in silico* characterization of modified-release dry powders for inhalation with drugs of different biopharmaceutical properties**

## **ABSTRACT**

Pulmonary drug delivery has many advantages, but the number of marketed inhalation products is still limited, in comparison to the other types of drug products. In addition, all currently marketed inhalation medicines represent immediate release drug products. The development of modified-release inhalation products has received widespread attention over the last few years, since they can improve patient compliance and treatment efficacy. Therefore, the aim of this dissertation was to develop solid lipid microparticles as dry powders for inhalation (DPIs) with adequate aerodynamic characteristics and modified drug release, as well as *in vitro/in silico* characterization of modified-release DPIs with drugs of different biopharmaceutical properties, salbutamol-sulphate and budesonide.

DPIs comprised of solid lipid microparticles were successfully formulated and prepared using the melt emulsification process coupled with spray drying. The obtained formulations exhibited suitable aerodynamic characteristics and modified (prolonged) drug release in comparison to the raw salbutamol-sulphate powder. The results of *in silico* characterization studies highlighted the importance of computational fluid and particle dynamics models in the DPI development, considering that these models enabled the assessment of certain DPI characteristics which cannot be determined using *in vitro* methods.

Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling indicated that inhalation administration of mucoadhesive modified-release DPI may provide prolonged budesonide dissolution and absorption in the lungs. Also, PBPK modeling results implied that inhalation of DPI comprised of solid lipid microparticles may lead to prolonged salbutamol pulmonary absorption. In addition, the model predicted increased salbutamol absorption in the lungs, together with decreased absorption in the gastrointestinal tract, following inhalation administration of solid lipid microparticles, in comparison to the marketed immediate release drug product. The obtained results implied that inhalation administration of DPIs containing solid lipid microparticles could potentially improve therapeutic efficacy and safety of inhaled drugs.

**Keywords:** dry powders for inhalation (DPIs), modified release, solid lipid microparticles, aerodynamic characteristics, computational fluid and particle dynamics models, physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling, salbutamol-sulphate, budesonide

**Scientific field:** Pharmacy

**Specific scientific field:** Pharmaceutical technology

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Fiziološke karakteristike respiratornog trakta.....	4
1.2. Inhalacioni put primene lekova.....	6
1.3. Praškovi za inhalaciju .....	8
1.3.1. Čvrste lipidne mikročestice.....	10
1.4. QbD pristup u razvoju praškova za inhalaciju.....	18
1.5. <i>In vitro</i> metode karakterizacije praškova za inhalaciju.....	19
1.6. Biofarmaceutska karakterizacija lekovitih supstanci za inhalacioni put primene .....	25
1.7. <i>In silico</i> metode karakterizacije praškova za inhalaciju .....	28
1.7.1. <i>In silico</i> modeli za predviđanje depozicije.....	28
1.7.1.1. Semiempirijski modeli .....	29
1.7.1.2. Mehanistički modeli.....	29
1.7.2. <i>In silico</i> fiziološki-zasnovani farmakokinetički (PBPK) modeli za predviđanje apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci .....	33
1.7.3. <i>In silico</i> modelovanje bioperformansi inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci kod eksperimentalnih životinja .....	39
1.7.4. Validacija <i>in silico</i> PBPK modela.....	40
1.8. Model lekovite supstance.....	40
1.8.1. Salbutamol-sulfat .....	40
1.8.2. Budesonid .....	42
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	44
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	46
3.1. Materijali.....	47
3.2. Metode .....	48
3.2.1. Formulacija i karakterizacija čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem ili sušenjem smrzavanjem .....	48
3.2.1.1. Izrada praškova čvrstih lipidnih mikročestica .....	48
3.2.1.2. Raspodela veličine čvrstih lipidnih mikročestica .....	49
3.2.1.3. Stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica .....	49
3.2.1.4. Nasipna i tapkana gustina praškova .....	49
3.2.1.5. Protočnost praškova .....	50
3.2.1.6. Morfologija čvrstih lipidnih mikročestica .....	50
3.2.1.7. <i>In vitro</i> ispitivanje aerodinamičkih svojstava praškova čvrstih lipidnih mikročestica .....	50

3.2.1.8. Eksperimentalni dizajn.....	51
3.2.1.9. Analitička metoda za određivanje koncentracije salbutamol-sulfata: Tečna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom .....	52
3.2.1.10. Udeo salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica.....	52
3.2.1.11. Ispitivanje rastvorljivosti salbutamol-sulfata.....	53
3.2.1.12. Ispitivanje <i>in vitro</i> brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica .....	53
3.2.2. Formulacija i karakterizacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih procesom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem .....	54
3.2.2.1. Koncept dizajniranja kvaliteta (QbD pristup) u razvoju praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica.....	54
3.2.2.2. Izrada praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem .....	58
3.2.2.3. Analitička metoda za određivanje koncentracije salbutamol-sulfata: Tečna hromatografija visokih performansi .....	61
3.2.2.4. Određivanje udela salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica .....	62
3.2.2.5. <i>In vitro</i> ispitivanje aerodinamičkih svojstava praškova čvrstih lipidnih mikročestica .....	63
3.2.2.6. Karakterizacija čvrstog stanja formulacije čvrstih lipidnih mikročestica, lekovite i pomoćnih supstanci.....	64
3.2.2.7. Ispitivanje <i>in vitro</i> brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica .....	64
3.2.2.8. Analiza podataka.....	66
3.2.3. <i>In vitro/in silico</i> komparativna analiza aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica.....	68
3.2.3.1. Ispitivanje aerodinamičkih svojstava praškova za inhalaciju u dvofaznom staklenom impindžeru (TSI).....	68
3.2.3.2. CFPD simulacije .....	69
3.2.3.3. Obrada CFD-DPM generisanih rezultata.....	76
3.2.3.4. Komparativna analiza podataka .....	77
3.2.4. Razvoj i primena <i>in silico</i> PBPK modela za predviđanje depozicije, apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci različitih biofarmaceutskih svojstava.....	78
3.2.4.1. Budesonid-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod pacova .....	81
3.2.4.2. Budesonid-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod čoveka .....	83
3.2.4.3. Salbutamol-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod pacova.....	85
3.2.4.4. Salbutamol-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod čoveka.....	87
3.2.4.5. Skaliranje farmakokinetičkih parametara sa modela za pacova na model čoveka i određivanje humane $k_a$ vrednosti na osnovu $k_a$ vrednosti dobijene na modelu za pacova .....	89
3.2.4.6. Analiza rezultata simulacija.....	90
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	91



4.1. Formulacija i karakterizacija čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem ili sušenjem smrzavanjem .....	92
4.1.1. Raspodela veličine i stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica .....	92
4.1.2. Nasipna i tapkana gustina i protočnost praškova čvrstih lipidnih mikročestica .....	96
4.1.3. Morfologija čvrstih lipidnih mikročestica .....	98
4.1.4. Aerodinamička svojstva praškova čvrstih lipidnih mikročestica.....	104
4.1.5. Udeo salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica.....	106
4.1.6. <i>In vitro</i> brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica .....	107
4.1.7. Izbor metode sušenja suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica izrađenih metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi .....	110
4.2. Formulacija i karakterizacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih procesom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem .....	112
4.2.1. Validacija i transfer HPLC metode za analitičko određivanje salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica.....	112
4.2.2. Raspodela veličine i stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica .....	114
4.2.3. Nasipna i tapkana gustina i protočnost praškova čvrstih lipidnih mikročestica .....	118
4.2.4. Morfologija čvrstih lipidnih mikročestica .....	118
4.2.5. Aerodinamička svojstva praškova čvrstih lipidnih mikročestica.....	121
4.2.6. Udeo salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica.....	125
4.2.7. Karakterizacija čvrstog stanja odabrane formulacije čvrstih lipidnih mikročestica, lekovite i pomoćnih supstanci.....	127
4.2.8. <i>In vitro</i> brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica .....	129
4.3. <i>In vitro/in silico</i> komparativna analiza aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica.....	135
4.3.1. CFD-DPM simulacije .....	135
4.3.2. Komparativna analiza rezultata ispitivanja aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju dobijenih primenom različitih metoda .....	142
4.4. Razvoj i primena <i>in silico</i> PBPK modela za predviđanje depozicije, apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci različitih biofarmaceutskih svojstava.....	150
4.4.1. Budesonid-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod pacova .....	150
4.4.1.1. <i>In silico</i> predviđena i <i>in vivo</i> određena depozicija budesonida u plućima pacova .....	150
4.4.1.2. Izgradnja <i>in silico</i> modela za predviđanje apsorpcije i raspodele budesonida kod pacova .....	152
4.4.1.3. Primena budesonid-specifičnog modela budesonida za pacova .....	156
4.4.2. Budesonid-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod čoveka .....	164
4.4.2.1. Izgradnja i validacija <i>in silico</i> modela za predviđanje apsorpcije i raspodele budesonida kod čoveka .....	164

4.4.2.2. Razvoj i primena <i>in silico</i> modela za predviđanje apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenog budesonida kod čoveka.....	168
4.4.3. Salbutamol-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod pacova.....	177
4.4.3.1. <i>In silico</i> predviđena depozicija praška za inhalaciju SAL-HA u plućima pacova.....	177
4.4.3.2. Izgradnja <i>in silico</i> modela za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola kod pacova.....	179
4.4.3.3. Skaliranje farmakokinetičkih parametara sa pacova na čoveka i određivanje humane $k_a$ vrednosti na osnovu $k_a$ vrednosti dobijene na modelu za pacova.....	182
4.4.4. Salbutamol-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod čoveka.....	184
4.4.4.1. Izgradnja i validacija <i>in silico</i> modela za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola kod čoveka.....	184
4.4.4.2. Razvoj i primena <i>in silico</i> modela za predviđanje apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenog salbutamola kod čoveka.....	188
5. ZAKLJUČAK.....	200
6. LITERATURA.....	206
7. PRILOZI.....	230
7.1. Spisak radova i saopštenja koji čine deo doktorske disertacije.....	231
7.2. Biografija autora.....	233

## Lista skraćenica

<b>ACAT</b>	Unapređeni prostorni model apsorpcije i transporta (engl. <i>Advanced Compartmental Absorption and Transit Model</i> )
<b>ACI</b>	Andersenov kaskadni impaktor (engl. <i>Andersen Cascade Impactor</i> )
<b>ANOVA</b>	Analiza varijanse
<b>BCS</b>	Biofarmaceutski sistem klasifikacije (engl. <i>Biopharmaceutics Classification System</i> )
<b>CFC</b>	Deo za sakupljanje krupne frakcije čestica (engl. <i>Coarse Fraction Collector</i> )
<b>CFD</b>	Računarska dinamika fluida (engl. <i>Computational Fluid Dynamics</i> )
<b>CFD-DPM</b>	Računarska dinamika fluida u kombinaciji sa modelom diskretnih faza ( <i>Computational Fluid Dynamics coupled with Discrete Phase Model</i> )
<b>CFPD</b>	Računarska dinamika fluida i čestica (engl. <i>Computational Fluid and Particle Dynamics</i> )
<b>CMA</b>	Kritični atributi materijala (engl. <i>Critical Material Attributes</i> )
<b>CPP</b>	Kritični parametri procesa (engl. <i>Critical Process Parameters</i> )
<b>CQA</b>	Kritični atributi kvaliteta (engl. <i>Critical Quality Attributes</i> )
<b>DE</b>	Efikasnost brzine rastvaranja (engl. <i>Dissolution Efficiency</i> )
<b>DPI</b>	Inhalatori za prašak (eng. <i>Dry Powder Inhalers</i> ); Praškovi za inhalaciju (engl. <i>Dry Powders for Inhalation</i> )
<b>DPM</b>	Model diskretnih faza (engl. <i>Discrete Phase Model</i> )
<b>DPPC</b>	Dipalmitoilfosfatidilholin (engl. <i>Dipalmitoylphosphatidylcholine</i> )
<b>DSC</b>	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
<b>DSPC</b>	Distearoilfosfatidilholin (engl. <i>Distearoylphosphatidylcholine</i> )
<b>DV</b>	Disajni volumen
<b>ED</b>	Emitovana doza (engl. <i>Emitted Dose</i> )
<b>EF</b>	Emitovana frakcija (engl. <i>Emitted Fraction</i> )
<b>EMA</b>	Evropska agencija za lekove (engl. <i>European Medicines Agency</i> )
<b>EPA</b>	Američka agencija za zaštitu životne sredine (engl. <i>U.S. Environmental Protection Agency</i> )
<b>FDA</b>	Američka uprava za hranu i lekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FE</b>	Nivo greške (engl. <i>Fold-error</i> )
<b>FPD</b>	Doza sitnih čestica (engl. <i>Fine Particle Dose</i> )
<b>FPE</b>	Presistenski metabolizam (engl. <i>First Pass Effect</i> )
<b>FPF</b>	Frakcija sitnih čestica (engl. <i>Fine Particle Fraction</i> )
<b>FS</b>	Fizička smeša
<b>FSI</b>	Impaktor za brzu analizu (engl. <i>Fast Screening Impactor</i> )
<b>GB</b>	Glicerildibehenat
<b>GIT</b>	Gastrointestinalni trakt
<b>GRAS</b>	engl. <i>Generally Recognized as Safe</i>
<b>GSD</b>	Geometrijska standardna devijacija (engl. <i>Geometric Standard Deviation</i> )
<b>HPLC</b>	Tečna hromatografija visokih performansi (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>HPMC</b>	Hidroksipropilmetilceluloza
<b>HSPC</b>	Hidrogenizovani fosfatidilholin soje (engl. <i>Hydrogenated Soybean Phosphatidylcholine</i> )
<b>iBCS</b>	inhalacioni Biofarmaceutski sistem klasifikacije (engl. <i>inhalation-based Biopharmaceutics Classification System</i> )

<b>ICRP66</b>	engl. <i>International Commission on Radiological Protection-Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection</i>
<b>IR</b>	Trenutno oslobađanje (engl. <i>Immediate Release</i> )
<b>IVIVK</b>	<i>In vitro-in vivo</i> korelacija
<b>LC/MS</b>	Tečna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (engl. <i>Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry</i> )
<b>LOD</b>	Limit detekcije (engl. <i>Limit of Detection</i> )
<b>LOQ</b>	Limit kvantifikacije (engl. <i>Limit of Quantification</i> )
<b>MAT</b>	Srednje vreme apsorpcije lekovite supstance (engl. <i>Mean Absorption Time</i> )
<b>MDT</b>	Srednje vreme brzine rastvaranja lekovite supstance (engl. <i>Mean Dissolution Time</i> )
<b>MMAD</b>	Medijana raspodele mase čestica u odnosu na aerodinamički prečnik (engl. <i>Mass Median Aerodynamic Diameter</i> )
<b>MOC</b>	Kolektor za najsitnije čestice (engl. <i>Micro-orifice Collector</i> )
<b>MPPD</b>	engl. <i>Multiple Path Particle Dosimetry Model</i>
<b>MRT</b>	Srednje vreme zadržavanja lekovite supstance (engl. <i>Mean Residence Time</i> )
<b>NGI</b>	Impaktor nove generacije (engl. <i>Next Generation Impactor</i> )
<b>NRMSE</b>	Normalizovana vrednost korena srednje kvadratne greške (engl. <i>Normalized Root Mean Square Error</i> )
<b>PBPK</b>	Fiziološki-zasnovan farmakokinetički model (engl. <i>Physiologically-Based Pharmacokinetic Model</i> )
<b>PBS</b>	Izotoničan fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
<b>PCA</b>	Analiza glavnih komponentata (engl. <i>Principal Component Analysis</i> )
<b>PCAT™</b>	engl. <i>Pulmonary Compartmental Absorption and Transit Model</i>
<b>Ph. Eur.</b>	Evropska farmakopeja (engl. <i>European Pharmacopoeia</i> )
<b>PIK</b>	Površina ispod krive
<b>pMDI</b>	Inhalatori pod pritiskom sa dozatorom (engl. <i>pressurized Metered Dose Inhalers</i> )
<b>PSA</b>	Analiza osetljivosti parametara (engl. <i>Parametar Sensitivity Analysis</i> )
<b>RANS</b>	engl. <i>Reynolds Averaged Navier Stokes</i>
<b>RMSE</b>	Koren srednje kvadratne greške (engl. <i>Root Mean Square Error</i> )
<b>RSD</b>	Relativna standardna devijacija
<b>SA</b>	Stearilalkohol
<b>SC</b>	Koeficijent osetljivosti (engl. <i>Sensitivity Coefficient</i> )
<b>SD</b>	Standardna devijacija
<b>SE</b>	Standardna greška (engl. <i>Standard Error</i> )
<b>SEM</b>	Skenirajuća elektronska mikroskopija
<b>SL</b>	Sušenje smrzanjem (liofilizacija)
<b>SLF</b>	Veštačka plućna tečnost (engl. <i>Simulated Lung Fluid</i> )
<b>SLS</b>	Natrijum-laurilsulfat (engl. <i>Sodium Lauryl Sulfate</i> )
<b>SR</b>	Sušenje raspršivanjem
<b>SS</b>	Salbutamol-sulfat
<b>SST</b>	engl. <i>Shear Stress Transport</i>
<b>SV</b>	Srednja vrednost
<b>TSI</b>	Stakleni impindžer (engl. <i>Twin Stage Impinger</i> )
<b>QbD</b>	Koncept dizajniranja kvaliteta (engl. <i>Quality by Design</i> )
<b>QTTP</b>	Ciljani profil kvaliteta proizvoda (engl. <i>Quality Target Product Profile</i> )
<b>UDF</b>	Funkcija koju definiše korisnik (engl. <i>User Defined Function</i> )
<b>USP</b>	Farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država (engl. <i>United States Pharmacopoeia</i> )

# **1. UVOD**

Primena lekova inhalacionim putem ima sve veći značaj u postizanju ciljane isporuke leka u pluća za tretman respiratornih bolesti, kao što su astma, hronična opstruktivna bolest pluća, cistična fibroza, hronični bronhitis i respiratorne infekcije. Takođe, smatra se da je inhalacioni put alternativan način za sistemsku primenu lekova u terapiji *diabetes mellitus*-a, shizofrenije, bipolarnog poremećaja, migrene itd. (Cipolla i Gonda, 2011). Na tržištu je dostupno nekoliko vrsta preparata za inhalaciju, svrstanih u pet kategorija prema Evropskoj farmakopeji (engl. *European Pharmacopoeia*, Ph. Eur. 10.0), od kojih su u terapiji najzastupljeniji: preparati za inhalaciju sa dozatorom, tečni preparati za raspršivanje (nebulizaciju) i praškovi za inhalaciju (engl. *Dry Powders for Inhalation*, DPI), pri čemu su svi dostupni preparati za inhalaciju sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance, odnosno za sada na tržištu ne postoji nijedan registrovan preparat za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance. Razvoj preparata za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance bi bio značajan jer bi mogao da dovede do povećanja komplijanse i poboljšanje terapije usled ređe primene leka, i/ili dužeg zadržavanja lekovite supstance na mestu dejstva, kao i efikasnije terapije (sprečavanje pogoršanja simptoma) npr. noćnih epizoda astme (Daman i sar., 2014). Jednu od mogućih strategija za modifikaciju brzine oslobađanja lekovitih supstanci iz preparata za inhalaciju predstavlja formulacija čvrstih lipidnih mikročestica u obliku praškova za inhalaciju. Pored toga što čvrste lipidne mikročestice omogućavaju modifikovano oslobađanje lekovitih supstanci, pokazano je da upotreba hidrofobnih ekscipijenasa iz grupe lipida doprinosi razvoju visoko poroznih praškova za inhalaciju sa unapređenim aerodinamičkim svojstima (Weers i sar., 2010). Samo jedan preparat na bazi poroznih čvrstih lipidnih mikročestica sa tobramicinom u obliku praška za inhalaciju, TOBI Podhaler<sup>®</sup>, koji se primenjuje u tretmanu respiratornih infekcija (Wang i sar., 2022), do sada je registrovan na tržištu, a odobren je od strane Američke uprave za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) u martu, 2013. godine (Cipolla i sar., 2014).

Do sada je u literaturi opisano nekoliko metoda za dobijanje čvrstih lipidnih mikročestica (Jaspart i sar., 2005). Najčešće korišćena metoda za dobijanje suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica je metoda emulgovanja na povišenoj temperaturi, koja se može koristiti u kombinaciji sa sušenjem smrzanjem (Scalia i sar., 2015) kako bi se dobili čvrsti farmaceutski oblici, odnosno čvrste lipidne mikročestice u obliku praška. Sušenje raspršivanjem je takođe često korišćena metoda za dobijanje čvrstih lipidnih mikročestica za inhalaciju, koja se obično koristi kao samostalna metoda i tada neretko podrazumeva i upotrebu organskih rastvarača (Sebti i Amighi, 2006; Jaspart i sar., 2007; Daman i sar., 2014; Levet i sar., 2016). Međutim, ova metoda se može koristiti i u kombinaciji sa metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi, pri čemu nije potrebno koristiti organske rastvarače. Do sada je u literaturi opisan samo jedan primer izrade praškova čvrstih lipidnih mikročestica kombinacijom metoda emulgovanja na povišenoj temperaturi i sušenja raspršivanjem (Mezzena i sar., 2009).

Proces izrade čvrstih lipidnih mikročestica metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem smrzanjem ili raspršivanjem podrazumeva optimizaciju velikog broja procesnih parametara kako bi se dobile željene karakteristike krajnjeg proizvoda. Pored procesnih parametara, i karakteristike polaznih lekovitih i pomoćnih supstanci utiču na kvalitet finalnog proizvoda. Stoga je u razvoju formulacije praškova za inhalaciju potrebno primeniti savremeni pristup koncepta dizajniranja kvaliteta (engl. *Quality by Design*, QbD) (ICH Q8 (R2), 2009; Buttini i sar., 2018) QbD je naučno zasnovan i sistematičan pristup koji podrazumeva razumevanje uticaja parametara formulacije i procesa proizvodnje na karakteristike, odnosno, kvalitet gotovog farmaceutskog proizvoda. Iako je primena QbD pristupa u razvoju praškova za inhalaciju opisana u naučnim radovima (pregled studija dat je u radu koji su objavili Buttini i sar. (2018)), primena QbD pristupa u razvoju praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica do sada nije opisana u literaturi.

Kvalitet formulisanog praška za inhalaciju potvrđuje se odgovarajućim ispitivanjima koja su opisana u Ph. Eur. 10.0 i u regulatornim smernicama Evropske agencije za lekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) i FDA (*Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products*, EMA, 2006; *Guidance for Industry-Metered Dose Inhaler (MDI) and Dry Powder Inhaler*

(DPI) *Drug Products, Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation*, FDA, 2018a). Najznačajnija ispitivanja praškova za inhalaciju predstavljaju ispitivanja njegovih aerodinamičkih karakteristika. *In vitro* metode za procenu aerodinamičkih svojstava, odnosno, depozicije praška za inhalaciju podrazumevaju primenu različitih vrsta impindžera i impaktora, i stoga nisu međusobno usaglašene (de Boer i sar., 2002). Ovo predstavlja problem u regulatornom smislu, prilikom registracije generičkih preparata praškova za inhalaciju, s obzirom na to da se dokazivanje biološke ekvivalencije praškova za inhalaciju bazira na rezultatima *in vitro* ispitivanja njihovih aerodinamičkih karakteristika. Još jedan od izazova vezanih za *in vitro* ispitivanja odnosi se na nepostojanje odgovarajućih propisa i smernica za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju (Velaga i sar., 2018). Nedostatak zvaničnih preporuka ovog tipa trenutno otežava tržišni razvoj preparat za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance, s obzirom na to da je ovo ispitivanje neophodno za izbor optimalne formulacije, kontrolu kvaliteta i procenu stabilnosti preparata. Stoga je definisanje uslova i zahteva za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju jedan od imperativa za regulatorne propise koji se odnose na razvoj i proizvodnju inhalacionih preparata.

Poslednjih godina se intenzivno radi na unapređenju strategija za razvoj formulacija farmaceutskih preparata, kako bi se ovaj proces olakšao i skratio, što je značajno sa aspekta pacijenata, kompetitivne farmaceutske industrije, ali i regulatornih organa. Pored inovativnih tehnoloških postupaka i uvođenja principa QbD koncepta, nove strategije podrazumevaju i primenu kompjuterski podržanih *in silico* metoda za predviđanje karakteristika i performansi lekovite supstance i farmaceutskog preparata. Primena *in silico* metoda u razvoju preparata za inhalaciju je tek u povoju i potrebna su dalja istraživanja da bi našle širu primenu u praksi. Ipak, izvestan, relativno mali broj istraživačkih radova ukazuje na to da bi metode za modelovanje i predviđanje aerodinamičkih svojstava praškova za inhalaciju (npr. modeli zasnovani na računarskoj dinamici fluida i čestica, engl. *Computational Fluid and Particle Dynamics*, CFPD) i metode za predviđanje depozicije, apsorpcije i raspodele lekovitih supstanci mogle značajno da pospeše razvoj inhalacionih preparata. CFPD modeli simuliraju kretanje (laminarno i turbulentno) vazduha i raspršenih čestica aerosola u 3D prostornim modelima, pri čemu se u obzir uzimaju i interakcije čestica. Ovakva vrsta modelovanja je primenjiva za 3D modele inhalatora (kada se procenjuju emitovana doza i raspodela čestica oslobođenog aerosola) ili za 3D modele respiratornog trakta (kada se procenjuje regionalna depozicija leka u organizmu). Ipak, CFPD modeli za predviđanje depozicije u respiratornom traktu su jako složeni i zahtevni u pogledu kompjuterskih performansi, te su za ovu svrhu pogodniji semi-empirijski modeli (npr. ICRP66 model, engl. *International Commission on Radiological Protection-Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection*) ili jednodimenzionalni modeli pluća (npr. MPPD model, engl. *Multiple Path Particle Dosimetry Model*). ICRP66 i MPPD modeli se uglavnom primenjuju u toksikološkoj proceni rizika, za predviđanje depozicije čestica zagađivača iz vazduha, dok je njihov potencijal za procenu depozicije inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci za sada nedovoljno iskorišćen. Sa druge strane, fiziološki-zasnovani *in silico* farmakokinetički modeli (engl. *Physiologically-Based Pharmacokinetic Model*, PBPK) za predviđanje apsorpcije i raspodele lekovite supstance kod ljudi i eksperimentalnih životinja se u poslednje vreme sve više primenjuju u farmaceutskoj industriji, a dostupno je i nekoliko komercijalnih programskih paketa ovog tipa (npr. GastroPlus™, SimulationsPlus, Inc., SAD). PBPK modeli simuliraju fiziološka svojstva i funkcije organizma u pogledu uticaja na transport, rastvaranje, apsorpciju, raspodelu i metabolizam lekovitih supstanci, uzimajući pri tome u obzir biofarmaceutska svojstva lekovite supstance i farmaceutskog preparata. Na ovaj način moguće je identifikovati kritična svojstva lekovite supstance i farmaceutskog preparata koja utiču na lokalnu ili sistemsku raspoloživost leka i omogućiti uspostavljanje kritičnih atributa kvaliteta i klinički značajnih specifikacija, a time olakšati izbor optimalne formulacije. Pored predviđanja bioperformansi lekova, PBPK modelovanje omogućava testiranje mehanističkih hipoteza, odnosno, identifikaciju mehanizama koji su odgovorni za fenomene kojima lekovita supstanca podleže *in vivo*. Iako se PBPK modelovanje već duži niz godina uspešno primenjuje za simulaciju apsorpcije i raspodele peroralno primenjenih lekova, modeli za predviđanje bioperformansi lekova primenjenih

inhalacionim putem (npr. PCAT™, engl. *Pulmonary Compartmental Absorption and Transit Model*, implementiran u okviru GastroPlus™ programskog paketa) su relativno novi i malo je radova u kojima je opisana njihova primena (Wu i sar., 2016; Bäckman i sar., 2017; Salar-Behzadi i sar., 2017; Vulović i sar., 2018; Boger i Fridén, 2019; Pinto i sar., 2021; Radivojević i sar., 2021; Miller i sar., 2022). Pri tome se svi pomenuti radovi odnose na predviđanje performansi inhalacionih preparata sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance, dok je njihovu primenljivost za simulaciju apsorpcije i raspodele lekovitih supstanci iz inhalacionih preparata sa modifikovanim oslobađanjem tek potrebno proceniti.

### 1.1. Fiziološke karakteristike respiratornog trakta

Pluća su složeni organ, čija je uloga da omogućuje efikasnu razmenu gasova između krvi i spoljašnje sredine. Deo su respiratornog trakta, kompleksnog organskog sistema, koji se deli anatomski na dva dela: gornji respiratorni trakt, koji obuhvata nos, nosnu duplju i ždrelo, i donji respiratorni trakt, koji obuhvata dušnik, bronhije, bronhiole i alveole (Gehr, 1984). Postoji i funkcionalna podela u literaturi, i na osnovu nje, respiratorni trakt se deli na sprovodni i respiratorni deo. Sprovodni deo čine: nos i nosna duplja, ždrelo, grkljan, dušnik, leva i desna primarna bronhija, sekundarne i tercijarne bronhije i terminalne bronhiole. Respiratorni deo čine: respiratorne bronhiole, alveolarni duktusi i alveole (Weibel, 1963).

U respiratornom traktu su prisutni brojni odbrambeni mehanizmi, koji uklanjaju strane čestice (ksenobiotike) i na taj način štite pluća od štetnih materija. Sa druge strane, ovi mehanizmi predstavljaju i barijeru za primenu lekova inhalacijom, pa je izazov formulisati preparat za inhalaciju koji će uspeli da prevaziđe fiziološke barijere i ostvari terapijski efekat.

Sprovodni deo respiratornog trakta poseduje fiziološke odbrambene mehanizme koji se mogu svrstati u 4 grupe i to su:

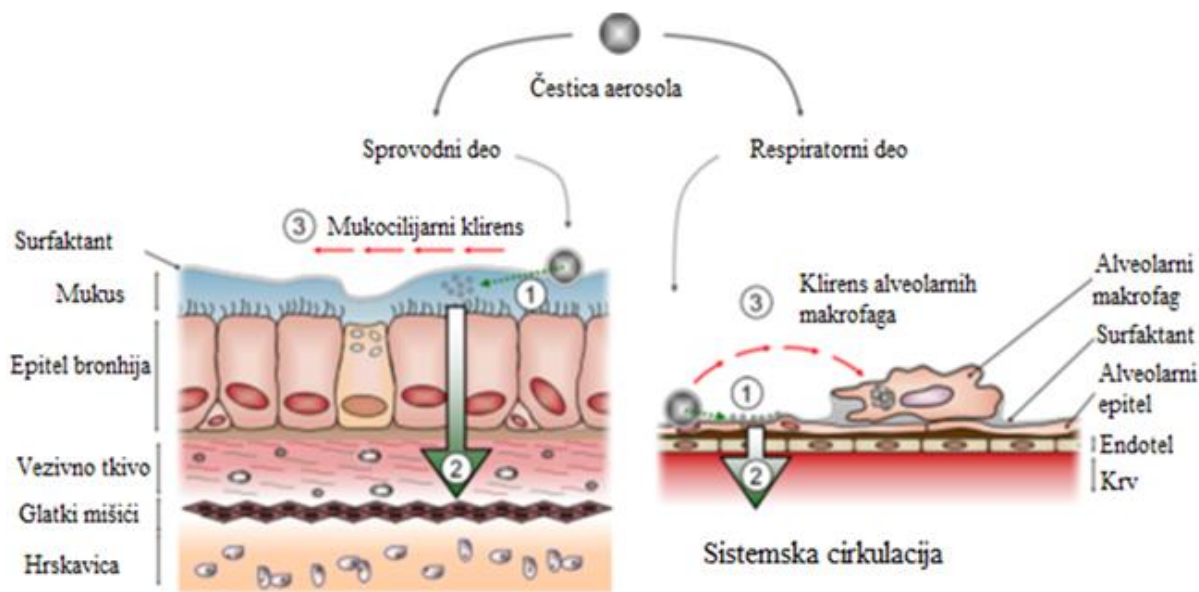
1. Anatomaska organizacija: granjanje disajnih puteva omogućava „hvatanje“ većih čestica pomoću mehanizama impakcije i sedimentacije i na taj način vrši se prečišćavanje udahnutog vazduha. Pored toga, vlažnost i temperatura udahnutog vazduha prilagođavaju se fiziološkim uslovima (Hastedt i sar., 2016).
2. Mukusni sloj i epitel sa cilijalnim ćelijama omogućavaju „hvatanje“ čestica i njihov transport mukocilijarnim klirensom do ždrela, gde bivaju progutane i na taj način uklonjene iz respiratornog trakta, kako ne bi stigle do pluća. Mukus je prirodni glikoproteinski hidrogel, koji poseduje idealne strukturne i reološke karakteristike koje mu omogućavaju da zadrži određene čestice i tako čini jednu od barijera respiratornog trakta (Hastedt i sar., 2016). Konstantno uklanjanje mukusa pokretima cilija preko traheje i jednjaka onemogućava dugo zadržavanje stranih (štetnih) čestica, ali i lekova u disajnim putevima. Debljina mukusa kod zdravih dobrovoljaca varira, ali generalno iznosi 10-30 µm u traheji, a samo 2-5 µm u bronhijama (Wauthoz i Amighi, 2015). Sekretacija i uklanjanje mukusa se kod zdravih osoba odvija konstantnom brzinom, dok kod nekih bolesti ovi procesi mogu biti narušeni (Labiris i Dolovich, 2003).
3. Ispod mukocilijarnog sloja je epitel u kome se nalaze ćelije imunog sistema (Hastedt i sar., 2016). Ukoliko čestice lekovite supstance ne podlegnu nekom od prethodno navedenih mehanizama klirensa i stignu do plućnog epitela, postoji šansa da pri prolasku kroz epitelne ćelije podlegnu degradaciji i inaktivaciji, što će opet dovesti do smanjenja terapijskog efekta leka. Iako se u plućnom epitelu nalazi znatno manji broj enzima nego u crevnom epitelu, poznato je da su neke lekovite supstance supstrati za CYP 450 enzime, koji su prisutni u plućnom epitelu (Thum i sar., 2006). Takođe, dokazano je prisustvo esteraza i peptidaza, kao i nekih efluks transportera, sa tim da regionalna zastupljenost enzima i transportera u plućnom tkivu i dalje ostaje tema za istraživanje (Somers i sar., 2007).



4. Vrsta neuronskih receptora, čija stimulacija dovodi do pokretanja mehaničkih mehanizama klirensa, kao što su kašljanje, promena u šemi disanja itd. (Hastedt i sar., 2016). Mehanički klirens čestica obuhvata: kašljanje, kihanje ili gutanje inhaliranih čestica iz gornjeg dela respiratornog trakta. Ova vrsta klirensa se dešava spontano kada se udahnu čestice prečnika većeg od 10  $\mu\text{m}$ , pri čemu je za efikasan mehanički klirens neophodna velika brzina protoka vazduha, što znači da će se efikasno uklanjanje čestica mehaničkim klirensom odvijati samo u gornjim disajnim putevima, gde je brzina protoka vazduha velika (Verma i sar., 2015). U slučaju respiratornih oboljenja, kao što su astma i bronhitis, u kojima je narušen mehanizam mukocilijarnog klirensa, kašalj postaje jedini mehanizam klirensa udahnutih čestica (Verma i sar., 2015).

U odbrambene mehanizme alveolarnog dela pluća spadaju aktivnost plućnog surfaktanta i klirens alveolarnih makrofaga. Plućni surfaktant je složena lipoproteinska smeša, koja se sastoji iz 90% lipida i 10% proteina, čija je glavna uloga da smanji površinski napon na međupovršini između vazduha i plućne tečnosti i tako spreči kolaps alveola prilikom udisaja/izdisaja. Pored toga, surfaktant ima i antiinflamatorno i antioksidativno dejstvo (Verma i sar., 2015). Debljina sloja surfaktanta u alveolama iznosi nešto manje od 0,2  $\mu\text{m}$  (Hamm i sar., 1992). Klirens alveolarnih makrofaga je drugi značajan mehanizam koji može da smanji efikasnost određenih lekova primenjenih inhalacijom. Lekovite supstance koje imaju nisku rastvorljivost i koje se zbog toga zadržavaju dovoljno dugo u alveolama, mogu podleći klirensu alveolarnih makrofaga, što će rezultovati smanjenjem količine lekovite supstance na mestu dejstva i potencijalnim izostankom terapijskog efekta leka. Klirens alveolarnih makrofaga zajedno sa mukocilijarnim klirensom predstavlja glavnu prepreku za formulaciju farmaceutskih preparata za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance (Oberdörster, 1992).

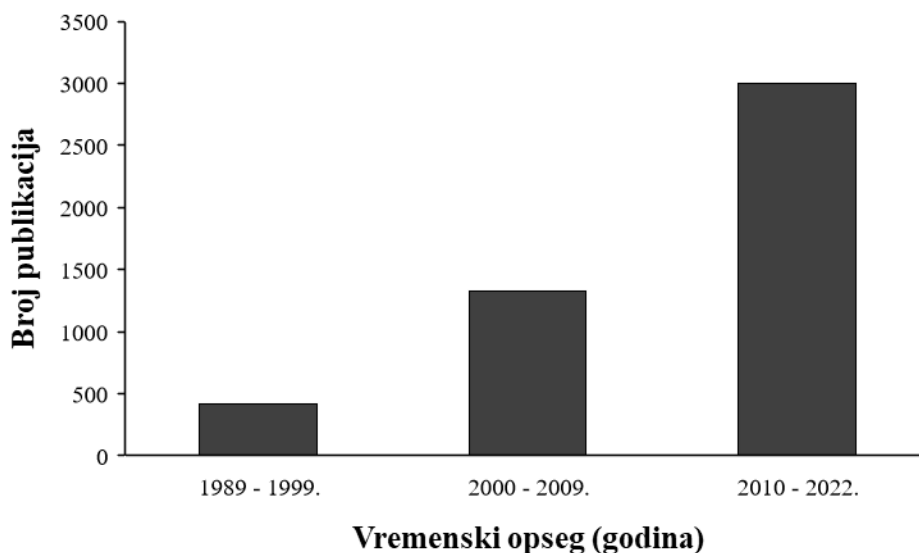
Na Slici 1.1 prikazane su fiziološke barijere koje lekovita supstanca treba da prevaziđe da bi došla do ciljanog mesta dejstva, npr. do glatkih mišića u slučaju lokalne primene leka, ili do plućnih kapilara u slučaju da se teži sistemske primeni leka (Hastedt i sar., 2016).



**Slika 1.1.** Barijere za primenu lekova inhalacionim putem; 1) lekovita supstanca mora da prođe kroz bronhijalni/alveolarni epitel (ćelijska barijera); 2) ukoliko prođe kroz epitel i ne podleže metaboličkoj degradaciji u epitelu, može da stigne do glatkih mišića ili sistemske cirkulacije; 3) nećelijske barijere: mukocilijarni klirens i klirens alveolarnih makrofaga (preuzeto i prilagođeno iz Hastedt i sar., 2016)

## 1.2. Inhalacioni put primene lekova

Inhalacioni put primene lekova postaje sve značajniji u poslednjih par decenija. Kao dokaz tome, jednostavnom pretragom izraza „*inhaled formulations*“ u *PubMed* bazi dobijeno je više od 3000 rezultata za period 2010-2022. godine, dok je za period 2000-2009. godine ovaj broj iznosio oko 1330, a za period 1989-1999. godine tek nešto više od 415 rezultata, što je prikazano i na Slici 1.2 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=inhaled+formulations&filter=years.2010-2022>). Ovo je posledica brojnih mogućnosti i prednosti ovog puta primene u poređenju sa konvencionalnim putevima primene lekova, kao što su parenteralni i peroralni.



**Slika 1.2.** Rezultati pretrage izraza „*inhaled formulations*“ u *PubMed* bazi

Primena lekova inhalacionim putem ima sve veći značaj u postizanju ciljane isporuke leka u pluća za tretman respiratornih bolesti, kao što su astma, hronična opstruktivna bolest pluća, cistična fibroza, hronični bronhitis i respiratorne infekcije. Neki od razloga za to su postizanje visokih koncentracija lekovite supstance na ciljanom mestu dejstva, relativno brzo nastupanje dejstva i smanjenje neželjenih efekata u poređenju sa peroralnim putem primene (Labiris i Dolovich, 2003). Međutim, smatra se da je inhalacioni put i alternativan način za sistemsku primenu lekova u terapiji različitih bolesti i stanja, kao što su npr. *diabetes mellitus*, shizofrenija, bipolarni poremećaj, migrena itd. (Cipolla i Gonda, 2011). Sistemska isporuka lekova nakon inhalacione primene je moguća s obzirom na pogodne karakteristike pluća, kao što su: velika površina dostupna za apsorpciju, dobra prokrvljenost pluća i zaobilazanje presistemskog metabolizma (engl. *First Pass Effect*, FPE) u jetri (Eixarch i sar., 2010). Pored toga, u poređenju sa parenteralnim putem primene, inhalacioni put nije invazivan, ne izaziva bol pri primeni kod pacijenata, pa to dovodi do veće komplijanse, što može dovesti do boljeg terapijskog ishoda. Usled niske enzimske aktivnosti u alveolama, znatno je manji metabolički klirens lekovitih supstanci primenjenih inhalacionim putem u poređenju sa ostalim putevima primene. Zbog toga je biološka raspoloživost mnogih lekovitih supstanci, a naročito nisko rastvorljivih, veća nakon njihove inhalacione primene (Tolman i Williams, 2010) nego nakon peroralne i primene na kožu, pa je inhalacionim putem moguće dati manje doze i smanjiti učestalost doziranja lekova.

Sa druge strane, inhalaciona primena lekova nosi sa sobom brojne izazove i probleme. Prvenstveno, komplijansa pacijenata može biti smanjena jer pacijenti ne razumeju ili se ne pridržavaju uputstva za primenu inhalatora, što može dovesti do izostanka terapijskog efekta. Zatim, veliki broj lekovitih supstanci pokazuje kratko poluvreme eliminacije i nisku biološku raspoloživost u plućima, što

može dovesti do smanjene terapijske efikasnosti i ugrožene bezbednosti pacijenta. Kratko poluvreme eliminacije i niska biološka raspoloživost u plućima su posledica tri mehanizma: (i) klirensa u plućima, koji uključuje mukocilijarni klirens i klirens alveolarnih makrofaga, (ii) enzimske degradacije (iii) brze sistemske apsorpcije, koja je nepoželjna kada je u pitanju preparat sa ciljanim lokalnim dejstvom u plućima (El-Sherbiny i sar., 2015). Terapijska efikasnost lekova primenjenih inhalacionim putem zavisi i od depozicije tj. regionalne raspodele lekovite supstance u respiratornom traktu (Patton i Byron, 2007). Depozicija leka/lekovite supstance je proces koji je specifičan za inhalacioni put primene lekova i zbog toga će detaljnije biti objašnjen u nastavku.

Depozicija leka/lekovite supstance je kompleksan proces, koji zavisi od anatomskih i fizioloških karakteristika pluća, fizičko-hemijskih svojstava lekovite supstance, farmaceutsko-tehnoloških karakteristika formulacije (npr. veličina i oblik čestica) i vrste uređaja koji se koristi za isporuku leka u pluća. Važan anatomski faktor od koga zavisi depozicija lekovite supstance su geometrijske karakteristike disajnih puteva (Byron i Patton, 1994). Različite bolesti i stanja respiratornog trakta mogu dovesti do patofizioloških promena u disajnim putevima, što se može u velikoj meri odraziti na depoziciju leka, a onda i na njegovu terapijsku efikasnost. Ključni farmaceutsko-tehnološki faktor formulacije pak, od koga zavisi depozicija čestica aerosola, je aerodinamički prečnik čestica jer je utvrđeno da su čestice sa aerodinamičkim prečnikom od 0,5 (1) do 5  $\mu\text{m}$  neophodne kako bi se efikasno isporučila doza leka u donji deo respiratornog trakta (Myrdal i sar., 2014). Aerodinamički prečnik je najpogodniji parametar za opisivanje veličine čestica aerosola jer uzima u obzir gustinu čestica i njihovo dinamičko ponašanje. Definiše se kao prečnik sferne čestice jedinične gustine, koja ima istu konačnu brzinu taloženja u vazduhu, kao i čestica koja se posmatra. Računa se na osnovu jednačine 1:

$$d_{\text{aer}} = d_g \times \sqrt{\frac{\rho}{\lambda \times \rho_0}} \quad (1)$$

gde  $d_{\text{aer}}$  predstavlja aerodinamički prečnik čestica,  $d_g$  je geometrijski prečnik,  $\rho$  je gustina čestica,  $\lambda$  je faktor sferičnosti, a  $\rho_0$  je jedinična gustina, koja se najčešće odnosi na gustinu vode (Carvalho i sar., 2011). U zavisnosti od aerodinamičkog prečnika čestica, ali i od protoka vazduha i regiona respiratornog trakta, depozicija čestica će se odvijati putem jednog od tri glavna mehanizma: impakcije, sedimentacije i/ili difuzije (Schulz i sar., 2000).

Čestice veličine od 5 do 10  $\mu\text{m}$  se dominantno deponuju inercijalnom impakcijom, mehanizmom koji je primarno zastupljen u gornjem delu respiratornog trakta (orofaringealnom i traheobronhijalnom delu), gde je brzina vazduha velika, a protok turbulentan (Labiris i Dolovich, 2003). Ukoliko su čestice veće od 10  $\mu\text{m}$ , deponuju se u orofaringealnom regionu, ali se brzo uklanjaju mukocilijarnim klirensom, kašljanjem i gutanjem (Schulz i sar., 2000). Čestice koje se progutaju, mogu da se apsorbuju preko gastrointestinalnog trakta (GIT-a), minimalno (ako uopšte) doprinesu terapijskom efektu (Labiris i Dolovich, 2003), ali mogu i da izazovu neželjene efekte. Smanjeni protok vazduha usled bronhokonstrikcije ili inflamacije (koje se javljaju kod npr. astme ili hronične opstruktivne bolesti pluća) može dovesti do povećane impakcije čestica u gornjim disajnim putevima. Povećani protok vazduha može takođe da poveća impakciju u grlu i gornjim disajnim putevima, zbog čega se pacijenti obučavaju da, prilikom primene preparata za inhalaciju, dišu sporo i duboko (Wright, 2012). Zbog toga se, pri formulaciji preparata za inhalacionu primenu, uglavnom preporučuje da veličina čestica bude manja od 5  $\mu\text{m}$ , mada postoje različite preporuke.

Depozicija čestica sedimentacijom se dešava u donjim bronhijalnim disajnim putevima i alveolarnom delu, gde je protok vazduha sporiji. Čestice veličine 0,5-5  $\mu\text{m}$  mogu izbeći mehanizam impakcije u gornjim vazdušnim putevima, pa se mogu deponovati mehanizmom sedimentacije, pri čemu će se čestice veličine između 3 i 5  $\mu\text{m}$  deponovati sedimentacijom najčešće u traheobronhijalnom delu, dok će se čestice manje od 3  $\mu\text{m}$  deponovati u alveolarnom regionu (Yeh i Schum, 1980; Kim i Hu, 1998). Zbog toga se pri formulaciji preparata koji treba da ostvari sistemsko dejstvo teži da veličina čestica bude

manja od 3  $\mu\text{m}$ . Proces sedimentacije zavisi, pored aerodinamičkog prečnika čestica, i od brzine čestica i gravitacione sile (El-Sherbiny i sar., 2015), pa će brzina sedimentacije rasti sa povećanjem veličine čestica i smanjenjem brzine protoka vazduha.

Čestice veličine manje od 0,5  $\mu\text{m}$  će se deponovati mehanizmom difuzije u alveolama, koji je uzrokovan Braunovim kretanjem (engl. *Brownian motion*) čestica. Čestice se brže kreću difuzijom što su veličina čestica i brzina protoka vazduha manje. Zbog toga je difuzija primaran mehanizam depozicije čestica u alveolarnom delu, gde gotovo da nema protoka vazduha (Yeh i Schum, 1980; Kim i Hu, 1998). Ipak, najveći deo čestica veličine manje od 0,5  $\mu\text{m}$  će biti izdahnut (El-Sherbiny i sar., 2015).

Pored svih pomenutih izazova, razvoj preparata za inhalaciju je kompleksniji i zbog toga što treba razmotriti još jedan dodatni aspekt, a to je izbor inhalatora, koji će biti kompatibilan sa formulacijom i odgovarajući za ciljanu populaciju pacijenata. Inhalator osim kompatibilnosti, mora biti robustan, lak za upotrebu, prenosiv, pogodan za različite uzraste, kako bi se postigla dobra komplijansa pacijenta (Hou i sar., 2015). Osim razvoja inhalatora koji treba da ispuni gore pomenute zahteve, prilikom razvoja preparata za inhalaciju moraju se uzeti u obzir sledeći aspekti: izbor lekovite supstance i definisanje da li ostvaruje lokalni ili sistemski terapijski efekat, fizičko-hemijske karakteristike lekovite supstance, kao što su rastvorljivost, veličina čestice, morfologija i gustina, kao i izbor pomoćnih supstanci/nosača (Hou i sar., 2015); izbor tipa preparata/formulacije; doza i učestalost/način primene preparata za inhalaciju; toksikološki aspekt, gde jedan od najvećih problema predstavljaju pomoćne supstance s obzirom na to da je mali broj njih odobren za primenu u preparatima za inhalaciju, te se moraju razvijati formulacije sa već odobrenim pomoćnim supstancama, što ograničava mogućnosti razvoja formulacija sa inovativnim nosačima ili se moraju sprovoditi studije toksičnosti novih potencijalnih pomoćnih supstanci. Pritom, dodatnu kompleksnost procesa stvara to što su svi pomenuti faktori koji se razmatraju prilikom razvoja preparata za inhalaciju međusobno povezani.

Ono što je još svakako neophodno definisati prilikom razvoja novih formulacija je i vrsta preparata za inhalaciju. Na tržištu je do sada dostupno nekoliko kategorija preparata za inhalaciju (Ph. Eur. 10.0):

1. preparati koji se prevode u paru;
2. tečni preparati za raspršivanje (nebulizaciju);
3. preparati za inhalaciju pod pritiskom, sa dozatorom;
4. preparati za inhalaciju koji nisu pod pritiskom, sa dozatorom;
5. praškovi za inhalaciju.

Izuzev prve grupe, ostale grupe preparata za inhalaciju se primenjuju korišćenjem uređaja: nebulizatora (engl. *nebulizer*), inhalatora pod pritiskom sa dozatorom (engl. *pressurized Metered Dose Inhalers*, pMDI), inhalatora koji nisu pod pritiskom sa dozatorom (engl. *soft mist inhalers*) i inhalatora za prašak (engl. *Dry Powder Inhalers*, DPI).

### 1.3. Praškovi za inhalaciju

Praškovci za inhalaciju su podgrupa preparata za inhalacionu primenu, koji su se pojavili kao odgovor na neke nedostatke koje su pokazivali nebulizatori i pMDI. Prednosti DPI ogledaju se u tome da: (i) nije potrebna koordinacija između aktiviranja uređaja i inhalacije, što je npr. veliki problem kod pMDI; (ii) ne sadrže propelente, koji doprinose „efektu staklene bašte“, te su ekološki prihvatljiviji; (iii) pokazuju veću stabilnost od ostalih preparata za inhalaciju s obzirom na to da se radi o čvrstim farmaceutskim oblicima; (iv) jednostavniji su za upotrebu i kraće je vreme primene (od npr. preparata za nebulizaciju), pa to doprinosi boljoj komplijansi pacijenata (Levy i sar., 2019; Shetty i sar., 2020). Ph. Eur. 10.0 propisuje samo tri *in vitro* ispitivanja za utvrđivanje kvaliteta praškova za inhalaciju: (i) ispitivanje ujednačenosti oslobođene doze (za jednodozne preparate); (ii) aerodinamičko određivanje

sitnih čestica leka (određivanje doze sitnih čestica leka, engl. *Fine Particle Dose*, FPD) i (iii) broj oslobođenih doza po višedoznom kontejneru (Ph. Eur. 10.0). Kada su se prvi put pojavili, praškovi za inhalaciju podrazumevali su formulacije tipa tzv. „uređenih“ smeša (engl. *ordered mixtures*) koje predstavljaju smeše mikronizirane lekovite supstance i nekog „grubog“ (engl. *coarse*) nosača, pri čemu je lekovita supstanca (veličine čestica 1-5 μm) adherirana na čestice nosača (najčešće laktoze) veće veličine (50-200 μm) (Thalberg i sar., 2004; Peng i sar., 2016), ili čak najjednostavnije formulacije preparata koji se sastoje samo iz mikronizirane lekovite supstance. Jedan od razloga za jednostavnost formulacija registrovanih praškova za inhalaciju je i činjenica da je mali broj pomoćnih supstanci odobren za inhalacioni put primene od strane regulatornih agencija, iako se u literaturi pominje mnogo više ekscipijenasa koji su korišćeni u istraživanju novih formulacija praškova za inhalaciju. U Tabeli 1.1 dat je prikaz odobrenih ekscipijenasa od strane FDA (FDA, 2022), koji mogu ući u sastav formulacije praškova za inhalaciju, kao i neke pomoćne supstance koje su do sada korišćene samo u istraživanju praškova za inhalaciju, od kojih većina nije još uvek odobrena od strane FDA, a čija je primena opisana u novijoj literaturi (Sou i Bergström, 2021; Zillen i sar., 2021).

**Tabela 1.1.** Prikaz ekscipijenasa odobrenih od strane FDA za primenu u praškovima za inhalaciju, kao i onih koji su do sada korišćeni samo u istraživanju praškova za inhalaciju

Grupa	Pomoćne supstance odobrene od strane FDA	Neke od pomoćnih supstanci koje su korišćene u istraživanju praškova za inhalaciju
Aminokiseline	Glicin	Leucin, trileucin, glicin, alanin, metionin, triptofan, tirozin
Ugljeni hidrati kratkog lanca	Laktoza, monohidrat, manitol	Trehaloza
Oligo/polisaharidi	Karagenan	Dekstran, hitozan, hijaluronska kiselina, pululan
Polimeri	/	Povidon (PVP K25, PVP K30), etilceluloza, skrob, poli(laktid-ko-glikolid), natrijum-kaboksimetilceluloza
Fosfolipidi	/	Dipalmitoilfosfatidilholin (engl. <i>dipalmitoylphosphatidylcholine</i> , DPPC), hidrogenizovani fosfatidilholin soje (engl. <i>hydrogenated soybean phosphatidylcholine</i> , HSPC), dipalmitoilfosfatidilglicerol, distearoilfosfatidilholin (engl. <i>distearoylphosphatidylcholine</i> , DSPC)*
Razno	Magnezijum-stearat, kalijum-hlorid, natrijum-hlorid, trinatrijum-citrat dihidrat, natrijum-laurilsulfat (engl. <i>sodium lauryl sulfate</i> , SLS), natrijum-hidroksid, silicijum-dioksid, titan-dioksid, gvožđe-oksidi, žuti	Holesterol, natrijum-citrat, natrijum-alginat, amonijum-bikarbonat, fumaril-diketopiperazin

\*DSPC se ne nalazi na listi odobrenih pomoćnih supstanci od strane FDA, iako ulazi u sastav registrovanog praška za inhalaciju, Tobi Podhaler®-a

Proizvodnja DPI je veliki izazov, jer je svaki od procesa složen, od izrade formulacije, punjenja formulacije praška u kapsule, blistere ili inhalatore, zatim očuvanja stabilnosti tokom skladištenja do omogućavanja adekvatnog pražnjenja inhalatora tokom primene leka (Hou i sar., 2015). Formulacija praškova za inhalaciju podrazumeva primenu ozbiljnog inženjeringa čestica kako bi se istovremeno postigao balans u jačini međučestičnih adhezivnih sila (sila između čestica lekovite i pomoćnih supstanci) koje treba da budu dovoljno jake da se spreči raslojavanje praška, te očuva stabilnost tokom punjenja i čuvanja proizvoda, a istovremeno dovoljno slabe da se omogući adekvatno raspršivanje (aerosolizacija) praška prilikom njegove primene (Hickey, 2003). Najveći napredak u razvoju formulacija praškova za inhalaciju iniciran je razvojem metoda za inženjering čestica, kao što su mikronizacija kristala lekovite supstance, kontrolisana kristalizacija i metoda za izradu disperzija, kao što je sušenje raspršivanjem rastvora/disperzija, kojima se dobijaju čestice odgovarajuće veličine za inhalacionu primenu. Prilikom inženjeringa čestica teži se razvoju visoko poroznih čestica kontrolisanog oblika, raspodele veličine i gustine, jer se tako dobijaju čestice odgovarajućeg aerodinamičkih karakteristika koje pokazuju adekvatnu depoziciju u plućima. Među najbitnijim aerodinamičkim karakteristikama praškova za inhalaciju, pored pomenutog aerodinamičkog prečnika, izdvajaju se sitna frakcija leka (engl. *Fine Particle Fraction*, FPF), kao sitna frakcija čestica praška manjih od 5 (6)  $\mu\text{m}$  koje dospevaju u pluća i frakcija (u %) emitovanog praška (engl. *Emitted Fraction*, EF) koja predstavlja frakciju nominalne doze praška koja je napustila inhalator. Naime, u slučaju primene najzastupljenijeg tipa formulacije praškova za inhalaciju na tržištu (tzv. „uređenih smeša“) pokazano je da čak 40-85% (u proseku 65%) lekovite supstance ne uspeva da se odvoji od čestica nosača, što znači da neće moći da ostvari dejstvo, a da se 21% praška za inhalaciju deponuje u orofaringealnom regionu, te FPF iznosi samo oko 14% (de Boer i sar., 2017). Zbog toga se intenzivno razvijaju strategije kojim bi se povećale EF leka pri manjim brzinama udaha, zatim smanjila depozicija lekovite supstance u orofaringealnom regionu i smanjila varijabilnost doze koja dospeva u pluća (Weers i sar., 2010), kao i strategije kojim bi se povećala FPF praškova za inhalaciju.

Uvođenje specifičnih ekscipijenasa (npr. različiti polimeri, lipidne supstance) u formulaciju predstavlja jednu od strategija za razvoj praškova za inhalaciju sa unapređenim aerodinamičkim svojstvima. Između ostalog, pokazano je da upotreba hidrofobnih ekscipijenasa iz grupe lipida doprinosi razvoju visoko poroznih čestica praškova za inhalaciju male gustine (Weers i sar., 2010). Formulacija ovakvih praškova za inhalaciju podrazumeva primenu lipidnih ekscipijenasa kao nosača za lekovitu supstancu, koji se mogu svrstati u nekoliko grupa: (i) čvrste lipidne mikročestice; (ii) liposomi; (iii) čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači (Cipolla i sar., 2014). Čvrste lipidne mikročestice za inhalacionu primenu su nosači koji su dosta napredovali u razvoju preparata za inhalaciju s obzirom na to da je na tržištu do sada već registrovan jedan preparat na bazi poroznih čvrstih lipidnih mikročestica sa tobramicinom u obliku praška za inhalaciju, TOBI Podhaler® (Wauthoz i Amighi, 2014).

### 1.3.1. Čvrste lipidne mikročestice

#### Karakteristike i sastav

Čvrste lipidne mikročestice su nosači veličine čestica od 1 do 1000  $\mu\text{m}$  čiji je matriks izgrađen iz masnih kiselina, glicerida, masnih alkohola ili čvrstih voskova sa visokim temperaturama topljenja. Pored toga što, kao što je već pomenuto, upotreba lipida uz odgovarajući postupak izrade doprinosi razvoju čestica velikog poroziteta, a utiče povoljno i na smanjenje međupovršinske energije čime se poboljšava raspršivanje praška, čvrste lipidne mikročestice poseduju i niz drugih prednosti: (i) izrađuju se od fiziološki prihvatljivih sastojaka, među kojima su prvenstveno lipidi koji imaju tzv. GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) status; (ii) čvrsti lipidni matriks štiti lekovitu supstancu od degradacije, omogućava modifikaciju brzine oslobađanja lekovite supstance (Scalia i sar., 2015) i sprečava prerano

otpuštanje lekovite supstance iz nosača; (iii) proizvodnja čvrstih lipidnih mikročestica je moguća u industrijskim razmerama (Gugu i sar., 2015); (iv) tokom izrade čvrstih lipidnih mikročestica moguće je izbeći korišćenje organskih rastvarača, što je značajno sa bezbedonosnog i ekološkog aspekta. Pored čvrstih lipidnih mikročestica, lipidni nosači, na kojima se intenzivnije radi u cilju razvoja formulacija praškova za inhalaciju, su čvrste lipidne nanočestice i liposomi, a od ostalih disperznih sistema, veliki potencijal imaju polimerne nanočestice (nanokapsule i nanosfere) i nanokristali (Scherließ i sar., 2022).

Komponente koje ulaze u sastav čvrstih lipidnih mikročestica su lipidne supstance, surfaktanti i voda. Lipidne supstance izgrađuju hidrofobno jezgro mikročestica i trebalo bi da se biraju oni lipidi koji se nalaze u čvrstom stanju na sobnoj i temperaturi tela. Više različitih tipova lipidnih supstanci ulazi u sastav čvrstih lipidnih mikročestica i to: triacilgliceridi (npr. tristearin, tripalmitin); parcijalni gliceridi i njihove smeše (npr. mono, di i tri estri glicerola i behenske kiseline); masne kiseline (npr. stearinska kiselina); masni alkoholi (npr. cetilalkohol); steroli (npr. holesterol); negliceridni estri zasićenih masnih kiselina i zasićenih masnih alkohola (npr. cetil palmitat) i voskovi (npr. karnauba vosak) (Jaspart i sar., 2005; Scalia i sar., 2015). U Tabeli 1.2 nalazi se prikaz najčešće korišćenih lipidnih komponenata koje ulaze u sastav čvrstih lipidnih mikročestica (Jaspart i sar., 2005; Scalia i sar., 2015).

**Tabela 1.2.** Lipidne komponente koje ulaze u sastav čvrstih lipidnih mikročestica (Jaspart i sar., 2005; Scalia i sar., 2015)

Klasa lipida	Naziv	Temperatura topljenja
Masni alkohol	Cetilalkohol	49 °C
	Stearilalkohol	60-61 °C
	Behenski alkohol	71 °C
Masna kiselina	Stearinska kiselina	69 °C
	Palmitinska kiselina	62,9 °C
	Behenska kiselina	81 °C
Estri glicerola i masnih kiselina	Glicerilmonostearat	58-59 °C
	Glicerildibehenat	65-77 °C
	Glicerilpalmitostearat	52-56 °C
Negliceridni estri	Cetil palmitat	54 °C
Trigliceridi	Tristearin	73 °C
	Tripalmitin	65,5 °C
Voskovi	Karnauba vosak	82-86 °C
	Pčelinji vosak	62-65 °C
	Parafinski vosak	46-68 °C
	Mikrokristalni vosak	63-93 °C
Ostalo	Holesterol	148-149 °C
	Fosfatidilholin	225-231 °C

Pri izboru lipidne komponente veoma je važno uzeti u obzir potencijal solubilizacije koju ta komponenta ima za izabranu lekovitu supstancu, odnosno najbolje je izabrati lipidnu komponentu sa maksimalnim potencijalom solubilizacije za datu lekovitu supstancu kako bi se postigla što efikasnija inkapsulacija lekovite supstance (Scalia i sar., 2015). Tako je npr. za inkapsulaciju hidrofilnih lekovitih supstanci bolje koristiti polarnije lipidne komponente, kao što su stearilalkohol, mono- i digliceridi (Singh i sar., 2009; Rohit i sar., 2013), a za lipofilne lekovite supstance, hidrofobnije lipidne komponente, npr. trigliceride. Još jedan kritičan parametar koji se razmatra kako bi se postigla što bolja inkapsulacija lekovite supstance je kristalna struktura lipida, odnosno njene polimorfne tranzicije do kojih može doći u toku procesa proizvodnje i/ili tokom čuvanja preparata (Jaspart i sar., 2005). Manja efikasnost inkapsulacije lekovite supstance očekuje se ukoliko je u pitanju kristalno stanje, a veća ukoliko je u

pitanju amorfno stanje lipidne komponente. Takođe, polimorfni prelazi iz metastabilne forme u stabilniju kristalnu formu mogu dovesti do smanjenja udela inkapsulirane lekovite supstance (Müller i sar., 2002).

Surfaktanti, kao druga grupa pomoćnih supstanci koji ulaze u sastav čvrstih lipidnih mikročestica, su veoma važni jer dovode do nastanka početne U/V emulzije iz koje će, nakon hlađenja i sušenja, nastati čvrste lipidne mikročestice. U ove svrhe koriste se surfaktanti iz sve četiri grupe tj. katjonski, anjonski, amfoterni i nejonski surfaktanti, pri čemu se prednost daje supstancama koje su fiziološki prisutne u organizmu, kao što su fosfatidilholin i žučne soli (npr. natrijum-holat) (Scalia i sar., 2015). Najčešće korišćeni surfaktanti, pored fosfatidilholina, jesu nejonski surfaktanti tj. poloksameri i polisorbati. Pokazano je da lipidne čestice, za čiju se izradu koriste smeše surfaktanata, pokazuju mnogo veću stabilnost u odnosu na formulacije izrađene od jednog surfaktanta, što je verovatno posledica sinergističkog efekta surfaktanata na međupovršinski napon između čestica (Mehnert i Mäder, 2012). U Tabeli 1.3 dat je prikaz najčešće korišćenih surfaktanata u izradi čvrstih lipidnih mikročestica (Jaspart i sar., 2005; Scalia i sar., 2015).

**Tabela 1.3.** Najčešće korišćeni surfaktanti u izradi čvrstih lipidnih mikročestica (Jaspart i sar., 2005; Scalia i sar., 2015)

Grupa surfaktanta	Hemijski naziv
Anjonski	Natrijum-holat Natrijum-tauroholat Natrijum-glukoholat SLS Dioktil natrijum-sulfosukcinat
Amfoterni	Fosfatidilholin Lecitin
Nejonski	Polisorbat 40 Polisorbat 60 Polisorbat 80 Sorbitanpalmitat Sorbitanstearat Poloksamer 188 Poloksamer 407 Alkil poliglukozidi Šećerni estri
Katjonski	Stearilamin Alkiltrimetilamonijum-bromid

U literaturi je dostupan određen, ne tako veliki broj publikacija, u kojima je opisan razvoj formulacija čvrstih lipidnih mikročestica za inhalacioni put primene (uglavnom za primenu u obliku praškova za inhalaciju), pomoću različitih metoda i kombinacijom različitih ekscipijenasa. U Tabeli 1.4 dat je prikaz metoda, lekovitih i pomoćnih supstanci, koje su do sada korišćene prilikom izrade čvrstih lipidnih mikročestica za inhalacionu primenu. Kao jedan od primarnih ciljeva formulacije praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, pored odgovarajućih aerodinamičkih karakteristika je, često, i postizanje modifikovanog oslobađanja lekovite supstance. Zbog toga je neophodno pažljivo izabrati kombinaciju pomoćnih supstanci koje bi uspešno obezbedile usporeno oslobađanje lekovite supstance iz čvrstih lipidnih mikročestica.



**Tabela 1.4.** Prikaz metoda i ekscipijenasa, koji su korišćeni u izradi čvrstih lipidnih mikročestica za primenu u obliku praškova za inhalaciju (preuzeta, dopunjena i prilagođena iz Cipolla i sar., 2014)

Metoda izrade	Pomoćne supstance	Lekovita supstanca	Referenca
Sušenje raspršivanjem	Heptafluoropropan*/fosfatidilholin (iz jajeta) ili DPPC/poloksamer 188	salbutamol-sulfat	Steckel i Brandes, 2004
	Holesterol/fosfolipon 90H	budesonid	Sebti i Amighi, 2006; Sebti i sar., 2006
	Holesterol/DPPC	salbutamol-sulfat	Daman i sar., 2014
	Poliglicerolni estri behenske kiseline, tripalmitin, glicerildibehenat	ibuprofen	Corzo i sar., 2021
Homogenizacija pod visokim pritiskom i sušenje raspršivanjem	Perflubron*/fosfatidilholin (iz jajeta)	hIgG/tobramicin	Bot i sar., 2000; Newhouse i sar., 2003
	Perflubron/DSPC/DPPC	virus influenza	Bot i sar., 2001
	Perflubron/fosfatidilholin (iz jajeta)/Na-oleat	gentamicin/budesonid	Smith i sar., 2001; Duddu i sar., 2002
	Holesterol/fosfolipon 90/HSPC	tobramicin	Pilcer i sar., 2006
	Perflubron/DSPC	tobramicin	Geller i sar., 2011
	Holesterol/fosfolipon 90	insulin	Depreter i Amighi, 2010
	Tristearin/ $\alpha$ -tokoferil polietilenglikol 1000 sukcinat/distearoilfosfoetanolamin polietilenglikol 2000	cisplatin	Levet i sar., 2016
	DSPC/fosfatidilholin	/	Wang i sar., 2022
Emulgovanje na povišenoj temperaturi, sonifikacija i sušenje raspršivanjem	Glicerildibehenat/poloksamer 188	budesonid	Mezzena i sar., 2009
Emulgovanje na povišenoj temperaturi, (sonifikacija) i sušenje smrzavanjem	Glicerildibehenat/poloksamer 188	placebo/salbutamol-acetonid	Sanna i sar., 2004; Jaspert i sar., 2007
	Tristearin, stearinska kiselina ili glicerildibehenat/poloksamer 188/HSPC	salbutamol-sulfat/acetonid	Scalia i sar., 2012; Scalia i sar., 2013a
	Tristearin/HSPC	kvercetin	Scalia i sar., 2013b
	Glicerildibehenat/lecitin/poloksamer 188	kvercetin	Silva i sar., 2013
	Stearinska kiselina/natrijum-tauroholat	rifampicin	Maretti i sar., 2014

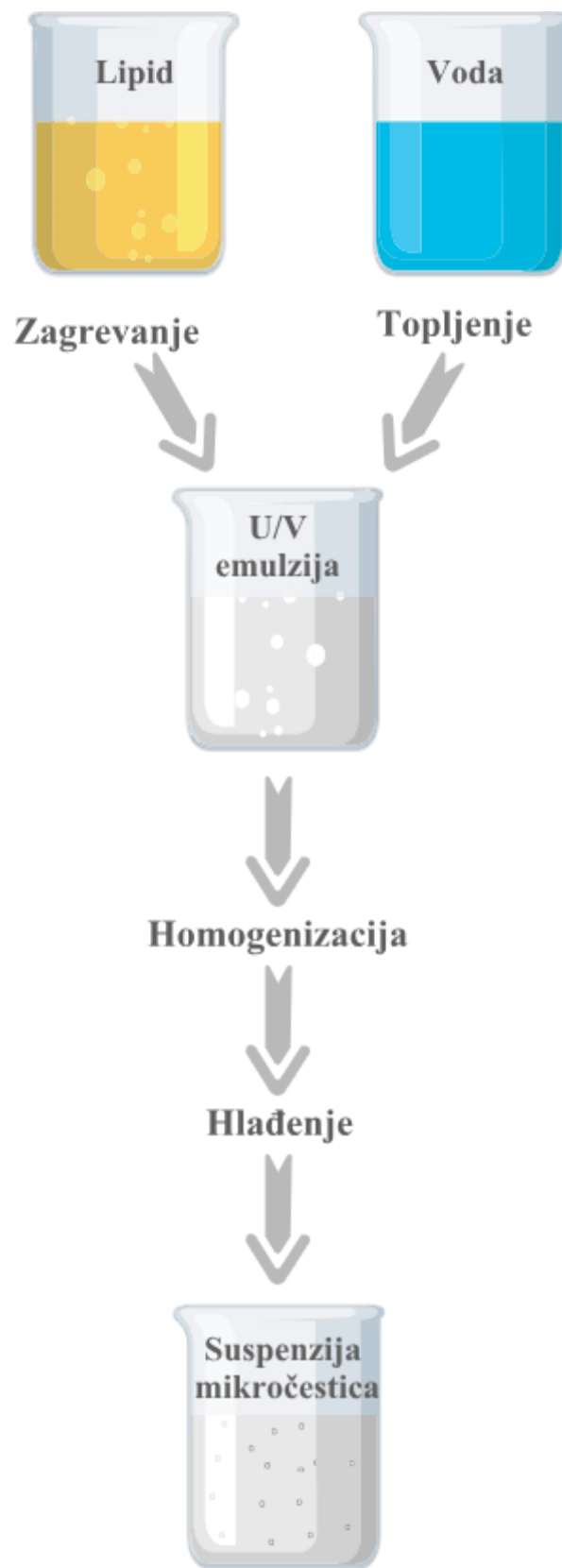
\*Heptafluoropropan i perflubron su korišćeni kao masna faza, kao tzv. „tečni ispraljivi propelenti“, koji u toku procesa sušenja raspršivanjem isparavaju dajući tako porozne šuplje čestice (Steckel i Brandes, 2004); DPPC – dipalmitoilfosfatidilholin, DSPC – distearoilfosfatidilholin, HSPC – Hidrogenizovani fosfatidilholin soje

### Metode izrade čvrstih lipidnih mikročestica

U literaturi su opisane brojne tehnike izrade čvrstih lipidnih mikročestica, a u Tabeli 1.4 je dat prikaz najčešće korišćenih metoda. Većina njih je zasnovana na tehnologijama koje su već dostupne u farmaceutskoj industriji, pa je lako izvršiti *scale-up*. Međutim, ograničenja metoda za dobijanje čvrstih lipidnih mikročestica su njihova reproduktivnost, postizanje ujednačenosti veličine čestica i oblika čestica, postizanje optimalnog udela i optimalne brzine oslobađanja lekovite supstance, te zbog toga razvoj i proizvodnja praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica predstavljaju veliki izazov.

### Metoda emulgovanja na povišenoj temperaturi (engl. *melt emulsification technique*)

Princip metode emulgovanja na povišenoj temperaturi zasniva se na topljenju lipidne komponente, u kojoj je rastvorena ili dispergovana lekovita supstanca, što zajedno čini lipidnu fazu. Vodena faza, u kojoj se nalazi surfaktant, greje se do temperature približne temperaturi lipidne faze (Scalia i sar., 2015). Kada se dostigne odgovarajuća temperatura obe faze, vodena faza se postepeno dodaje lipidnoj fazi (proces inverzije faza), uz kontinuirano mešanje, kako bi se izbegao gubitak lekovitih i pomoćnih supstanci (Scalia i sar., 2012). Nastala emulzije se potom meša uz održavanje povišene temperature (koja je korišćena i prilikom procesa emulgovanja, a koja zavisi od temperature topljenja lipidnih ekscipijenasa) pomoću rotor-stator homogenizatora. Brzina i vreme mešanja pomoću rotor-stator homogenizatora su bitni procesni parametri, od kojih će, u velikom broju slučajeva, zavisiti veličina i raspodela veličine čvrstih lipidnih mikročestica, te ih je neophodno optimizovati prilikom razvoja novih formulacija. Nakon homogenizacije, nastala emulzija se hladi mešanjem na magnetnoj mešalici, na sobnoj temperaturi ili sniženoj temperaturi pomoću leda, kako bi se dobila suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica. Čvrste lipidne mikročestice se iz nastale suspenzije izdvajaju filtracijom, centrifugiranjem i/ili sušenjem smrzanjem (Scalia i sar., 2015), pri čemu se često vrši i tzv. „pranje“ čvrstih lipidnih mikročestica kako bi se uklonila lekovita supstanca koja se nije inkorporirala u lipidni matriks. Uklanjanje rastvarača (vode) je poslednji korak koji je neophodan ukoliko se razvija formulacija praška za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, i najčešće se sprovodi metodama sušenja smrzanjem ili, ređe, sušenja raspršivanjem. Međutim, i u drugim slučajevima je uklanjanje rastvarača poželjan korak koji se često primenjuje jer se ovim postupkom povećava stabilnost formulacije. Glavna prednost metode emulgovanja na povišenoj temperaturi je ta što se ne koriste organski rastvarači, a glavni nedostaci su reproduktivnost metode (Scalia i sar., 2015), kao i niska efikasnost inkapsulacije hidrofилnih lekovitih supstanci (Cook i sar., 2005). Čvrste lipidne mikročestice se generalno najčešće izrađuju ovom metodom (Scalia i sar., 2015) i opisano je njihovo dobijanje za različite puteve primene u brojnim publikacijama. Međutim, izrada čvrstih lipidnih mikročestica metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi za respiratorni put primene opisana je u svega nekoliko publikacija (Tabela 1.4). Na Slici 1.3 dat je shematski prikaz izrade čvrstih lipidnih mikročestica procesom emulgovanja na povišenoj temperaturi.



**Slika 1.3.** Shematski prikaz izrade suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica postupkom emulgovanja na povišenoj temperaturi

Metoda emulgovanja na povišenoj temperaturi je do sada u literaturi korišćena najčešće u kombinaciji sa sušenjem smrzanjem (Tabela 1.4) u cilju dobijanja praškova čvrstih lipidnih mikročestica.

#### Metoda sušenja smrzanjem (engl. *freeze drying*)

Sušenje smrzanjem (liofilizacija) je metoda koja se u farmaceutskoj industriji koristi za sušenje najrazličitijih tipova disperznih sistema (Abdelwahed i sar., 2006). Proces sušenja smrzanjem se sastoji iz tri faze: smrzanje (očvršćavanje) uzorka, primarno sušenje i sekundarno sušenje. U prvoj fazi uzorak se smrzava na niskim temperaturama od oko -30 do -40 °C. Zatim se led nastao u prvoj fazi uklanja sublimacijom u uslovima visokog vakuuma, što predstavlja drugu fazu procesa, odnosno primarno sušenje uzorka. Na kraju, faza sekundarnog sušenja podrazumeva grejanje uzorka pod vakuumom kako bi se uklonila zaostala voda, koja se nije zaledila u prvoj fazi, pa onda ni uklonila sublimacijom u drugoj fazi procesa (Abdelwahed i sar., 2006; Broadhead i Gibson, 2012). S obzirom na to da se u ovoj metodi sušenje (uklanjanje vode) odvija sublimacijom u uslovima visokog vakuuma, izbegava se korišćenje organskih rastvarača, što je velika prednost ove metode. Međutim, kao potencijalni problem javlja se destabilizacija koloidnih suspenzija, koja može nastati usled velikih promena u pritisku u toku procesa sušenja smrzanjem. Stoga se, kako bi se sprečila aglomeracija čestica i očuvala stabilnost koloidnih suspenzija, dodaju pomoćne supstance koje imaju ulogu krioprotektanata pre početka procesa sušenja (Abdelwahed i sar., 2006). Krioprotektanti, koji se koriste u procesu sušenja koloidnih suspenzija nanočestica, su supstance iz grupe ugljenih hidrata, i to: ugljeni hidrati male molekulske mase (trehaloza, saharoza, glukoza, laktoza), šećerni alkoholi (manitol, sorbitol) i ugljeni hidrati velike molekulske mase (maltodekstrini) itd. (Kumar i sar., 2014). Trehaloza se, zbog prednosti u odnosu na ostale navedene ugljene hidrate, izdvojila kao krioprotektant izbora za sušenje biomolekula. Prednosti trehaloze u poređenju sa ostalim ugljenim hidratima podrazumevaju to da je manje higroskopna, ne poseduje intramolekularne vodonične veze, što omogućava fleksibilniji nastanak intermolekulskih vodoničnih veza sa česticama uzorka, poseduje veoma nisku hemijsku reaktivnost, ne pokazuje tendenciju ka kristalizaciji i ima relativno visoku temperaturu staklastog prelaza,  $T_g'$  (Crowe i sar., 1996; Umerska i sar., 2018). Pomenuti ugljeni hidrati generalno imaju karakteristiku da na određenim temperaturama, definisanim kao temperatura staklastog prelaza,  $T_g'$  prelaze u tzv. staklasto stanje, koje pokazuje veliki viskozitet i malu mobilnost, što dovodi do toga da se npr. (nano)čestice „disperguju“ u tom staklastom matriksu krioprotektanta. Na ovaj način se sprečava da dođe do aglomeracije (nano)čestica i ujedno se štite od mehaničkog stresa koji mogu da izazovu kristali leda (Crowe i sar., 1996; Abdelwahed i sar., 2006). Na ovaj način se ponaša i trehaloza, koja se izdvojila kao najefikasniji krioprotektant i za sušenje smrzanjem suspenzija lipidnih nano- i mikročestica (Cavalli i sar., 1997; Schwartz i Mehnert, 1997; Heiati i sar., 1998; Zimmermann i sar., 2000; Zhang i sar., 2008). Pored vrste, neophodno je utvrditi i koncentraciju krioprotektanta koja će efikasno sprečiti destabilizaciju koloidne suspenzije prilikom sušenja. Uobičajena koncentracija ugljenih hidrata kao krioprotektanata kreće se u opsegu od 5% do 10% (Soares i sar., 2013), mada su takođe korišćene i koncentracije do 20% (Zhang i sar., 2008), dok je čak 30% trehaloze korišćeno za stabilizaciju suspenzije nanokapsula (Abdelwahed i sar., 2006). Ipak, pokazano je da je stabilizacija suspenzija lipidnih nano- i mikročestica najefikasnija kada se kao krioprotektant koristi trehaloza u koncentraciji od 15% (Schwarz i Mehnert, 1997; Zhang i sar., 2008).

#### Metoda sušenja raspršivanjem (engl. *spray drying*)

Sušenje raspršivanjem je još jedna od metoda koja je korišćena za dobijanje praškova čvrstih lipidnih mikročestica za inhalaciju, ali i generalno za dobijanje/proizvodnju praškova za inhalaciju, kada

se obično koristi kao samostalna metoda (Tabela 1.4), i tada neretko podrazumeva upotrebu organskih rastvarača (Jaspart i sar., 2005; Daman i sar., 2014). Osnovni princip zasniva se na tome da se tečna formulacija (rastvor, suspenzija, emulzija, koloidna disperzija itd.) prvo raspršuje (korak atomizacije/raspršivanja) u sitne kapi, iz kojih potom isparava rastvarač pod dejstvom vrelog vazduha/gasa i nastaju čvrste, suve čestice (korak sušenja), koje se onda izdvajaju iz struje vazduha/gasa najčešće pomoću ciklona (korak izdvajanja čestica) (Pilcer i Amighi, 2010). Kada je u pitanju izrada praškova čvrstih lipidnih mikročestica ovom metodom, princip je sledeći: lekovita supstanca i lipidna komponenta se prvo rastvori/disperguju u organskom rastvaraču. Smeša se zatim raspršuje pod dejstvom vrelog vazduha u uređaju, pri čemu isparava rastvarač i nastaju čvrste lipidne (mikro)čestice, koje se izdvajaju iz struje vazduha pomoću ciklona. Glavno ograničenje metode sušenja raspršivanjem je to što je neophodno koristiti lipidne komponente sa visokim temperaturama topljenja (temperature topljenja lipidnog ekscipijensa uglavnom moraju biti veće od 60-70 °C) kako ne bi došlo do topljenja nastalih lipidnih čestica tokom procesa sušenja, pa je ovo razlog ograničene primene ove metode za dobijanje praškova čvrstih lipidnih mikročestica (Jaspart i sar., 2005; Scalia i sar., 2015). Prednosti primene sušenja raspršivanjem u proizvodnji praškova za inhalaciju ogledaju se u potencijalu za kontrolisanje veličine i raspodele veličine čestica, oblika, površinske energije i morfologije čestica, kao i protočnosti, gustine i sadržaja vlage praška. Ovo se postiže podešavanjem parametara procesa sušenja raspršivanjem, kao što su protok ulaznog materijala za sušenje, ulazna/izlazna temperatura i brzina vazduha za raspršivanje (Mehta, 2018), kao i faktora formulacije među kojima su viskozitet formulacije, vrsta i sastav rastvarača, kao i koncentracija rastvorenih/dispergovanih supstanci (udeo čvrste faze) (Pilcer i Amighi, 2010). S obzirom na to da veliki broj parametara utiče na karakteristike finalnog proizvoda, odnosno da svaka karakteristika dobijenog praška zavisi od kombinacije uticaja više polaznih faktora, na Slici 1.4 prikazano je na koje karakteristike praškova najčešće utiču ključni procesni parametri (Lechanteur i Evrard, 2020).



**Slika 1.4.** Prikaz ključnih procesnih parametara koji mogu da utiču na karakteristike finalnog praška dobijenog sušenjem raspršivanjem

Metoda sušenja raspršivanjem se, kao i metoda sušenja smrzavanjem, osim kao samostalna metoda, može koristiti i u kombinaciji sa metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi za dobijanje praškova čvrstih lipidnih mikročestica, pri čemu se na ovaj način izbegava korišćenje organskih rastvarača. Princip je da se, u ovom slučaju, suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica dobiju metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi, a da se sušenje raspršivanjem koristi za uklanjanje vode iz pripremljenih suspenzija kako bi se dobili farmaceutski oblici sa većom stabilnošću, tj. praškovi za inhalaciju. Do sada je u literaturi opisan samo jedan primer izrade praška čvrstih lipidnih mikročestica kombinacijom metoda emulgovanja na povišenoj temperaturi i sušenja raspršivanjem (Mezzena i sar., 2009).

Slično kao u procesu sušenja smrzavanjem, trehaloza se pokazala kao efikasan protektant, koji može da spreči aglomeraciju čestica i u toku sušenja raspršivanjem suspenzija čvrstih lipidnih nanočestica (Freitas i Müller, 1998). U studiji koju su objavili Umerska i sar. (2020), pokazano je i da je trehaloza uspešno zaštitila lipidne nanočestice od termalnog stresa koji nastaje usled sušenja kapi tokom procesa sušenja raspršivanjem i očuvala njihove koloidne karakteristike, pri čemu su lipidne nanočestice

uspešno inkorporirane u šećerne (trehalozne) nosače, te dobijene mikročestice koje su pogodne za inhalacionu primenu.

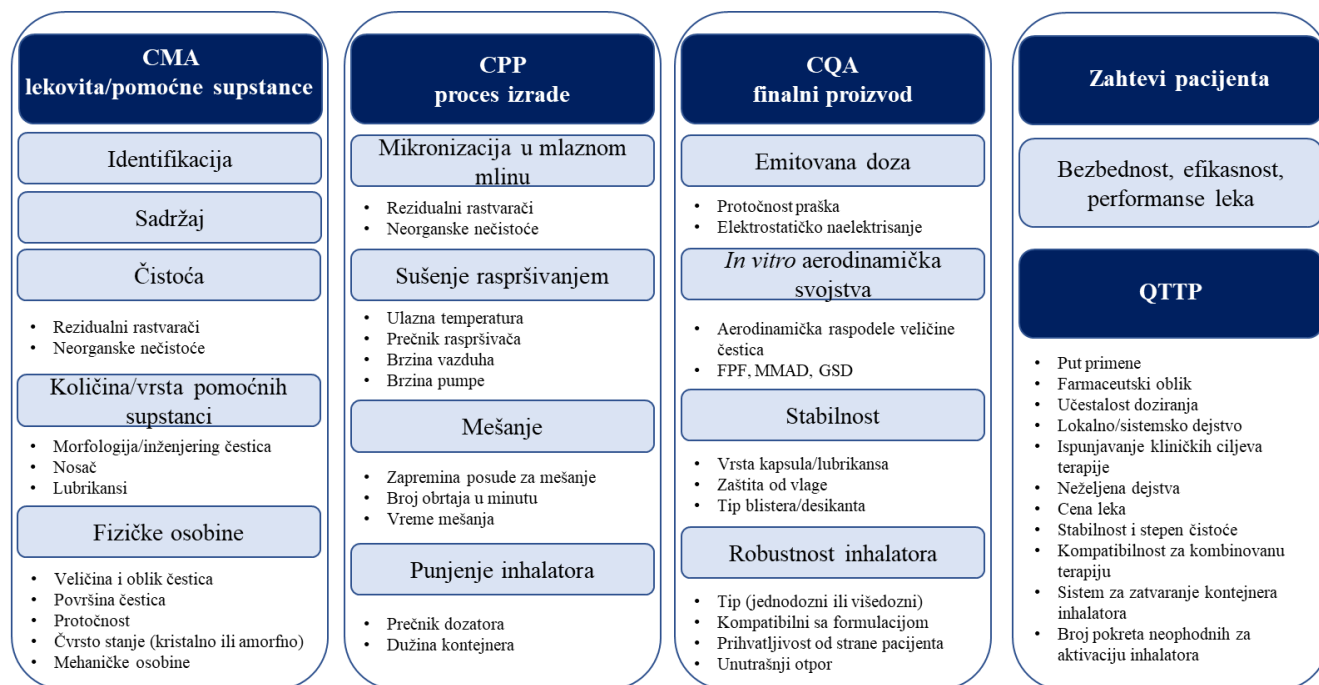
Alternativna opcija sušenju raspršivanjem je metoda sušenja hlađenjem (eng. *spray congealing*). Sušenje hlađenjem spada u novije metode. Lipidne komponente se tope, a zatim se lekovita supstanca rastvara/disperguje u otopljenjnoj lipidnoj komponenti. Nastala vrela smeša se raspršuje u sudu, koji je uronjen u ledeno kupatilo, pa hlađenjem nastaju čvrste lipidne mikročestice. Prednost metode se ogleda u tome što se uopšte ne koriste rastvarači, pa nije potrebno uklanjanje ni vode ni organskog rastvarača, stoga je znatno veća stabilnost formulacija čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih ovom metodom. Takođe, pokazano je da je sušenje hlađenjem efikasnija metoda za inkapsulaciju hidrofилnih lekovitih supstanci od metode emulgovanja na povišenoj temperaturi. Glavni nedostatak ove metode je što se dobijaju mikročestice veličine 30-40  $\mu\text{m}$ , koje su pogodne za peroralnu i topikalnu primenu, ali nisu odgovarajuće veličine za inhalacionu primenu lekova (Jaspart i sar., 2005; McCarron i sar., 2008; Scalia i sar., 2015).

#### 1.4. QbD pristup u razvoju praškova za inhalaciju

QbD je naučno zasnovan i sistematičan pristup koji podrazumeva razumevanje uticaja parametara formulacije i procesa proizvodnje na karakteristike, odnosno, kvalitet gotovog farmaceutskog proizvoda. Ovaj pristup je detaljno opisan u smernici ICH Q8 (R2) (ICH Q8 (R2), 2009). Ovo je sistematski pristup razvoju proizvoda koji podrazumeva procenu, unapređenje razumevanja i optimizaciju formulacije i proizvodnog procesa kombinovanom primenom prethodnog znanja, analize rizika i izvođenja eksperimenata. U okviru sprovođenja QbD pristupa, najpre se definiše ciljani profil kvaliteta proizvoda (engl. *Quality Target Product Profile*, QTTP). Pri definisanju QTTP-a, neophodno je razmotriti sledeće aspekte: (i) put primene, farmaceutski oblik, tip sistema za isporuku lekovite supstance; (ii) jačinu leka; (iii) pakovanje; (iv) karakteristike formulacije koje imaju uticaj na farmakokinetiku lekovite supstance (npr. brzina rastvaranja lekovite supstance, aerodinamičke karakteristike); (v) karakteristike kvaliteta (npr. sterilnost, stabilnost, brzina rastvaranja lekovite supstance) finalnog proizvoda (ICH Q8 (R2), 2009). Realizacija QTTP-a se postiže identifikacijom i definisanjem kritičnih karakteristika kvaliteta proizvoda (engl. *Critical Quality Attributes*, CQA), a zatim se analiziraju i optimizuju kritični atributi materijala (engl. *Critical Material Attributes*, CMA) i kritični parametri procesa (engl. *Critical Process Parameters*, CPP) koji utiču na CQA. CQA je fizičko, hemijsko, biološko ili mikrobiološko svojstvo ili karakteristika koja bi trebalo da bude u određenom opsegu, ili u odgovarajućim graničnim vrednostima kako bi se obezbedio željeni kvalitet finalnog proizvoda, odnosno postigao QTTP i generalno se odnosi na karakteristike lekovite i pomoćnih supstanci, međuproizvoda i finalnog proizvoda. Opšte CQA koje se odnose na sve farmaceutske proizvode su npr. ujednačenost sadržaja, stabilnost, stepen čistoće, brzina rastvaranja lekovite supstance (ICH Q8 (R2), 2009; Buttini i sar., 2018). Pored njih, postoje brojne CQA karakteristične za različite farmaceutske oblike i puteve primene. Za inhalatore sa praškovima za inhalaciju (DPI), koji su dosta kompleksniji u odnosu na konvencionalne farmaceutske preparate jer predstavljaju, kao što je već objašnjeno, sistem isporuke leka koji se sastoji iz uređaja (inhalatora) i formulacije praška, neophodno je utvrditi mnogo veći broj dodatnih CQA, koji utiču na terapijsku efikasnost i bezbednost leka. CQA koje su specifične za preparate za inhalaciju su: emitovana (isporučena) doza, ujednačenost emitovane (isporučene) doze, FPF, medijana raspodele mase čestica u odnosu na aerodinamički prečnik (engl. *Mass Median Aerodynamic Diameter*, MMAD) i geometrijska standardna devijacija (engl. *Geometric Standard Deviation*, GSD) raspodele (Slika 1.5). CMA i CPP koji mogu uticati na CQA su, kao što je prikazano na Slici 1.5, uglavnom slični kao za većinu farmaceutskih oblika, pri čemu se dodatno uzima u obzir proces punjenja inhalatora. Za proces punjenja inhalatora neophodno je pažljivo razmotriti tip inhalatora, pre svega da li se pune kapsule koje idu u inhalator ili se vrši direktno punjenje kontejnera inhalatora, kao i karakteristike inhalatora (npr. dužinu kontejnera).

Međutim, za razliku od drugih farmaceutskih oblika, ovde je drugačije i to što se pri definisanju CQA moraju uzeti u obzir interakcije CMA i CPP, kakav uticaj na njih ima dizajn inhalatora, kao i sposobnost pacijenta za pravilnu inhalaciju (Buttini i sar., 2018).

Sastavna komponenta QbD pristupa je i procena rizika (engl. *Risk Assessment*), koja je deo sistema upravljanja rizikom kvaliteta (engl. *Quality Risk Management*), što je opisano u regulatornoj ICH Q9 smernici (ICH Q9 (R1), 2021). Procena rizika je sistematičan proces organizovanja informacija kako bi se omogućilo da odluka o riziku bude doneta u okviru procesa upravljanja rizicima. Sastoji se iz identifikacije opasnih situacija (hazarda) i analizu i procenu rizika za izloženost tim opasnim situacijama. Neke od tehnika koje se koriste za organizaciju podataka i donošenje odluka kod upravljanja rizicima su: dijagrami toka, procesne mape, *Ishikawa (fish bone)* dijagrami, dok se za statističku obradu podataka koriste: kontrolne karte, histogrami, Pareto dijagrami i eksperimentalni dizajn (ICH Q9 (R1), 2021).



**Slika 1.5.** Mapa QbD pristupa, na osnovu koje bi mogli da se definišu QTTP, CQA, CMA i CPP za DPI proizvod (preuzeto i prilagođeno iz Buttini i sar., 2018)

### 1.5. *In vitro* metode karakterizacije praškova za inhalaciju

Karakterizacija praškova za inhalaciju je složen proces i obuhvata veliki broj metoda, koje su zbog lakšeg razumevanja, svrstane u nekoliko grupa, u zavisnosti od toga koja svojstva praškova za inhalaciju se ispituju pomoću određene metode. Glavne karakteristike praškova za inhalaciju koje se ispituju prilikom razvoja novih formulacija uključuju:

- određivanje veličine, raspodele veličine i oblika čestica;
- određivanje gustine i protočnosti praškova za inhalaciju;
- određivanje aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju;
- karakterizaciju čvrstog stanja;
- *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju.

### Određivanje veličine, raspodele veličine i oblika čestica

Veličina čestica, kao jedan od ključnih CMA u razvoju velikog broja farmaceutskih oblika, je i jedna od bitnijih karakteristika kvaliteta praškova za inhalaciju. Naime, od veličine čestica, oblika i njihove stvarne gustine, zavisiće aerodinamički prečnik čestica, koji je ključna karakteristika kvaliteta praškova za inhalaciju. Najčešće metode za određivanje veličine čestica praškova za inhalaciju su: metoda laserske difrakcije, skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), optička mikroskopija, mikroskopija atomskih sila, dinamička analiza slika, foton korelaciona spektroskopija (za merenje veličine nanočestica i mikročestica  $< 10 \mu\text{m}$ ). Većina ovih metoda (sve pomenute mikroskopske metode) može se koristiti i za utvrđivanje oblika čestica iz praškova za inhalaciju.

### Određivanje stvarne gustine i protočnosti praškova za inhalaciju

Određivanje stvarne gustine je važan aspekt pri karakterizaciji praškova za inhalaciju s obzirom na to da, kao što je već objašnjeno, aerodinamički prečnik čestica zavisi i od njihove gustine. Metoda koja se najčešće koristi za određivanje stvarne gustine praškova za inhalaciju je helijumska piknometrija. Gustina je, takođe, u korelaciji sa protočnošću praškova, a odgovarajuća protočnost praška za inhalaciju je preduslov za adekvatno punjenje inhalatora, odnosno punjenje kapsula koje se onda ubacuju u određene vrste inhalatora. S obzirom na to da većina lekovitih supstanci, pogotovo kada su mikronizirane, čine veoma kohezivne praškove koji imaju lošu protočnost, „grubi“ nosač (laktoza) uglavnom ima i ulogu da poboljša protočnost praškova za inhalaciju. Problem nastaje kada se, zbog pomenutih prednosti, razvijaju formulacije bez laktoze kao nosača, te se u poslednjih desetak godina istražuju i drugi potencijalni ekscipijensi koji bi mogli da uđu u sastav praškova za inhalaciju. Kao jedna od mogućih opcija pojavili su se lipidni ekscipijensi, koji mogu doprineti razvoju praškova za inhalaciju male gustine (Weers i sar., 2010).

Protočnost praškova za inhalaciju može se odrediti pomoću više standardnih farmakopejskih metoda: metodom određivanja nasipnog ugla, direktnim određivanjem brzine proticanja kroz otvor, metodom pomoću smicajne ćelije i indirektno, određivanjem *Hausner*-ovog odnosa i *Carr*-ovog indeksa, koji se izračunavaju na osnovu nasipne i tapkane gustine (Ph. Eur. 10.0).

### Određivanje aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju

Određivanje aerodinamičkih karakteristika je ispitivanje koje se sprovodi isključivo za karakterizaciju preparata za inhalaciju. O značaju aerodinamičkih karakteristika preparata za inhalaciju, pa samim tim i praškova za inhalaciju, govori i činjenica da je, pored ispitivanja ujednačenosti oslobođene doze (za jednodozne preparate) i broja oslobođenih doza po višedoznom kontejneru, određivanje aerodinamičkih karakteristika preparata za inhalaciju (preciznije aerodinamičko određivanje sitnih čestica, odnosno određivanje FPD) jedino ispitivanje koje farmakopeja (Ph. Eur. 10.0) zahteva za ove preparate. Aerodinamički prečnik je jedna od najznačajnijih karakteristika praškova za inhalaciju. Kao što je već pomenuto, aerodinamički prečnik čestice ili kapi se opisuje kao prečnik sferne čestice, jedinične gustine, koja ima istu brzinu taloženja u vazduhu kao čestica koja se posmatra (Hickey, 2004). Zbog toga što uzima u obzir gustinu, oblik i dinamičko ponašanje čestica, smatra se najpogodnijim parametrom za opisivanje veličine čestica aerosola. Predstavlja najvažniji faktor formulacije od koga zavisi depozicija aerosola i njegove FPD i FPF, koje predstavljaju, redom, dozu i frakciju lekovite supstance dostupnu za dejstvo u plućima, što znači da od aerodinamičkog prečnika zavisi i terapijska efikasnost leka.



*In vitro* metode za procenu aerodinamičkih svojstava, odnosno, depozicije praškova za inhalaciju podrazumevaju primenu različitih vrsta impindžera i impaktora, i stoga nisu međusobno usaglašene (de Boer i sar., 2002). Ovo predstavlja problem u regulatornom smislu, prilikom registracije generičkih preparata praškova za inhalaciju, s obzirom na to da se dokazivanje biološke ekvivalencije praškova za inhalaciju bazira na rezultatima *in vitro* ispitivanja njihovih aerodinamičkih karakteristika (EMA, 2006; FDA, 2018a). Postupak aerodinamičkog određivanja sitnih čestica iz inhalatora za praškove se, po Ph. Eur. 10.0, sprovodi pomoću jednog od sledećih uređaja: staklenog impindžera (engl. *Twin Stage Impinger*, TSI), višefaznog impindžera, Andersenovog kaskadnog impaktora (engl. *Andersen Cascade Impactor*, ACI) i impaktora novije generacije (engl. *Next Generation Impactor*, NGI). Međutim, različite farmakopeje propisuju različite uređaje za ovo ispitivanje. Razlike između važećih uređaja po Američkoj (engl. *United States Pharmacopoeia*, USP 44-NF 39) i Evropskoj farmakopeji (Ph. Eur. 10.0) prikazane su u Tabeli 1.5. U svim ovim uređajima opšti princip rada podrazumeva da se pod dejstvom struje vazduha (određenog protoka) primenjena doza praška za inhalaciju razdvaja na nekoliko frakcija u zavisnosti od aerodinamičkog prečnika čestica, pri čemu se svaka frakcija sakuplja posebno, pa se onda određuje njen procentualni udeo u odnosu na početnu primenjenu dozu. Iako svi funkcionišu na istom/sličnom opštem principu, impaktori i impindžeri se razlikuju po broju faza (predstavlja deo za prikupljanje jedne frakcije čestica), graničnim (*cut-off*) dijametrima čestica unutar faza i ostalim karakteristikama, prikazanim u Tabeli 1.6. Osnovna razlika između impindžera i impaktora je u tome što se u faze impindžera pre sprovođenja testa unosi odgovarajuća zapremina nekog tečnog medijuma (rastvarača ili smeše rastvarača). Sažeti prikaz sastava (faza) uređaja, kao i prednosti i nedostataka svih pomenutih uređaja, nalazi se u Tabeli 1.6.

**Tabela 1.5.** Uređaji za ispitivanje aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju po Američkoj (USP 44-NF 39) i Evropskoj farmakopeji (Ph. Eur. 10.0)

Uređaj	Ph. Eur. 10.0*	USP 44-NF 39
Stakleni impinđer (TSI)	Aparatura A	/
Višefazni impindđer	Aparatura C	/
ACI	Aparatura D	Procedura C.3.2.
NGI	Aparatura E	Procedura C.5.2.

\*Aparatura B je bio metalni impindđer u starijim verzijama Evropske farmakopeje, međutim u Ph. Eur. 10.0 se više ne navodi kao važeća aparatura za ispitivanje praškova za inhalaciju; iako je status Aparature A bio pod revizijom (Mitchell i Nagel, 2003), ona se i dalje navodi kao važeća po Ph. Eur. 10.0

**Tabela 1.6.** Principi rada, prednosti i nedostaci impindžera i impaktora (preuzeto i prilagođeno iz D' Oyley i sar., 2006)

Uređaj	Princip/faze	Prednosti	Nedostaci
Stakleni impinžer (TSI)	U prvoj fazi se sakuplja nerespabilna frakcija leka (čestice > 6,4 μm), a u drugoj fazi frakcija sitnijih čestica (čestice < 6,4 μm), pri brzini protoka vazduha 60 L/min.	Prednost je što se koristi tečni medijum za sakupljanje čestica, pa ne dolazi do „razletanja“ čestica, nego se kvase i mešaju sa medijumom, te je prikupljanje frakcija praška lakše; Jednostavni su za upotrebu, stakleni i metalni sadrže samo dve faze; Višefazni daje više podataka, uključujući aerodinamičku raspodelu veličine čestica, MMAD i FPF.	Dvofazni i višefazni impindžer ne generišu celokupnu raspodelu veličine čestica, pa nije moguće odrediti MMAD ni FPF; Koriste se pri konstantnim brzinama protoka vazduha od 60 L/min; Višefazni je vremenski zahtevan za korišćenje.
Metalni impinžer	Postoji samo jedna faza, sa koje se sakupljaju čestice veće od 9,8 μm na disku od sinterovanog stakla, dok se manje čestice prikupljaju na rezervnom filteru, pri brzini protoka vazduha 60 L/min.		
Višefazni impindžer	Sastoji se iz 4 faze i filtera, sa <i>cut-off</i> dijametrima: 6,8 μm, 3,1 μm i 1,7 μm. Stakleni filter zadržava čestice < 1,7 μm.		
ACI	Izrađen je od čelika, sastoji se iz ulaznog otvora (tzv. „grla“), čak 8 faza i filtera. Čestice > 10 μm se sakupljaju u „grlu“, a frakcija praška koja se prikupi sa treće faze i sa faza ispod nje čini respirabilnu frakciju (FPF).	Generiše veliki broj podataka (uključujući aerodinamičku raspodelu veličine čestica, MMAD i FPF); Moguće je validirati postupak.	Vremenski zahtevan i složen proces; „Razletanje“ čestica (pošto u fazama ne postoji tečni medijum) usled nastanka elektostatičkog naelektrisanja; <i>Cut-off</i> dijometri variraju sa promenom protoka vazduha.
NGI	Sastoji se iz 7 faza, sa <i>cut-off</i> dijametrima u opsegu 0,24-11,70 μm, kolektora za najsitnije čestice, „grla“ i preseparatora (koji se koristi po potrebi za odvajanje čestica lekovite supstance od čestica nosača); Protok vazduha je horizontalan, tj. nije vertikaln kao kod ACI.	Generiše veliki broj podataka, isto kao ACI; Moguće je validirati postupak. Posude faza mogu da se lako uklanjaju tako da smanjuju vreme trajanja analize; Može se koristiti primenom različitih protoka vazduha (30-100 L/min).	Uglavnom iste kao za ACI osim što analiza nije vremenski zahtevna kao u slučaju ACI.

Kaskadnim impaktorima, u koje spadaju ACI i NGI, se generalno daje prednost iako su analize u ova dva uređaja vremenski zahtevnije i komplikovanije jer, za razliku od impindžera, omogućavaju generisanje celokupne aerodinamičke raspodele veličine čestica. Međutim, u poslednje vreme pojavio se koncept tzv. „skraćenog impaktorskog merenja“ (engl. *Abbreviated Impactor Measurement*), kao jednostavnije i brže tehnike u odnosu na punu/kompletnu analizu u dva pomenuta kaskadna impaktora (Sou i Bergström, 2021). Ovakav koncept je realno primenjiv s obzirom na to da, u zavisnosti od faze u razvoju preparata za inhalaciju, nije uvek neophodno obezbediti kompletnu karakterizaciju aerodinamičke raspodele veličine čestica. Tako je, na primer, predloženo da se koncept „skraćenog impaktorskog merenja“ može sprovoditi u ranim fazama razvoja preparata za inhalaciju, kao tzv. skrining (engl. *screening*) metod, kao i u fazama kontrole kvaliteta, kada je preparat već prethodno detaljno okarakterisan (Sou i Bergström, 2021). U te svrhe, mogu se koristiti skraćene verzije ACI i NGI impaktora: *Fast Screening Andersen* i *Reduced Next Generation Impactor* (Sou i Bergström, 2021), kao i impaktor za brzu analizu (engl. *Fast Screening Impactor*, FSI) (Mohan i sar., 2017). Međutim, iako su neke studije (Mitchell i sar., 2009; Nichols i sar., 2016; Mohan i sar., 2017) pokazale dobro slaganje rezultata „skraćenog impaktorskog merenja“ sa rezultatima kompletne analize u impaktorima, potrebna su dodatna ispitivanja kojima bi se ovo potvrdilo, pa bi metode „skraćenog impaktorskog merenja“ mogle naći širu primenu u razvoju i kontroli kvaliteta preparata za inhalaciju.

### Karakterizacija čvrstog stanja

Karakterizacija čvrstog stanja lipidnih mikročestica je važna s obzirom na to da, tokom njihove izrade i čuvanja, može doći do promena u fizičko-hemijskim karakteristikama kako lekovite supstance, tako i pomoćnih supstanci, najčešće lipidnih komponenti. Iako se čvrste lipidne mikročestice izrađuju od polaznih kristalnih materijala, dokazano je da npr. neke metode izrade čvrstih lipidnih mikročestica, homogenizacija uzorka pri velikim brzinama smicanja, kao i prisustvo emulgatora u formulaciji mogu rezultovati promenama u čvrstom stanju nastalih matriksnih sistema, tj. mogu nastati tečni, amorfni ili parcijalno kristalni metastabilni sistemi (Westesen i sar., 1997). Najveći potencijalni problem predstavljaju polimorfne tranzicije lipidnih komponenti, koje se mogu dogoditi u bilo kojoj fazi izrade/proizvodnje farmaceutskih preparata, kao i u fazi skladištenja/čuvanja. Tako npr. prilikom očvršćavanja istopljenih lipidnih komponenti može doći do njihove kristalizacije u različite polimorfne oblike, koji mogu imati drugačije fizičko-hemijske karakteristike (kao što su temperatura topljenja, rastvorljivost) od polaznog oblika supstance. Promene u kristalnoj strukturi lipidnih komponenti mogu uticati na efikasnost inkapsulacije i brzinu oslobađanja lekovite supstance iz lipidnog nosača, a onda i na raspoloživost i terapijsku efikasnost leka (Jaspart i sar., 2005). Pored toga, promena čvrstog stanja lekovite supstance (kristalni ili amorfni oblik) može uticati na brzinu oslobađanja lekovite supstance (Eldem i sar., 1991). Zbog toga je neophodno izvršiti procenu čvrstog stanja kako svih supstanci koje ulaze u sastav čvrstih lipidnih mikročestica pojedinačno, tako i dobijenih praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Tehnike koje se uglavnom koriste za karakterizaciju čvrstog stanja lipidnih mikročestica su diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) i difrakcija X-zraka (Scalia i sar., 2015).

### In vitro ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju

Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata za inhalaciju je kritičan korak u karakterizaciji ovih preparata, jer sve do danas ne postoji zvanična preporuka od strane regulatornih agencija za način izvođenja, uslove i zahteve *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata za inhalaciju (pa samim tim ni iz praškova za inhalaciju) (Amini i sar., 2021). Nedostatak

zvaničnih preporuka ovog tipa trenutno ograničava tržišni razvoj preparata za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance, s obzirom na to da je ovo ispitivanje neophodno za izbor optimalne formulacije, kontrolu kvaliteta i procenu stabilnosti preparata ovog tipa.

Do sada je u literaturi opisana primena velikog broja različitih metoda i eksperimentalnih uslova kako bi se odabrali adekvatni uslovi za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju (prikazani u preglednom radu koji su objavili Velaga i sar. (2018)). Razvoj ovakvog testa nije jednostavan s obzirom na to da je potrebno definisati sledeće uslove: izbor uzorka (ceo uzorak ili samo frakcija čestica određene veličine), metoda prikupljanja uzorka ukoliko se koristi određena frakcija praška za inhalaciju, izbor medijuma za ispitivanje (vrsta, zapremina itd.), izbor odgovarajućeg uređaja i eksperimentalnih uslova u njemu (npr. brzina mešanja medijuma) (Cvijić, 2017).

Izbor uzorka kod ispitivanja praškova za inhalaciju otežava situacija da samo čestice prečnika 1-5  $\mu\text{m}$  dospevaju do dubljih slojeva pluća, tako da je samo određena frakcija primenjene doze leka dostupna za dejstvo u plućima. Stoga bi se idealan test za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju sastojao najpre iz određivanja depozicije praška za inhalaciju, a tek nakon toga, ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz različitih frakcija praška ponaosob, ali samo onih za koje se smatra da će ostvariti dejstvo u plućima (Son i sar., 2010). *In vitro* ispitivanje depozicije i prikupljanje frakcija čestica određene veličine moguće je izvesti, kao što je već objašnjeno, pomoću uređaja prikazanih u Tabeli 1.5. Do sada su u literaturi opisane studije u kojima su se za sakupljanje određene (respirabilne) frakcije čestica za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance uglavnom koristili ACI (Davies i Feddah, 2003; Salama i sar., 2008; Arora i sar., 2010; May i sar., 2012; May i sar., 2015; Tay i sar., 2018), NGI (Son i sar., 2009; Son i sar., 2010; Mees i sar., 2011; Riley i sar., 2012; Chan i sar., 2013; Pilcer i sar., 2013; Rohrschneider i sar., 2015; Mangal i sar., 2018; Amini i sar., 2021) i TSI (Haghi i sar., 2012; Kumar i sar., 2017; Eedara i sar., 2019; Al ayoub i sar., 2022). Iako se primena TSI aparature donekle smatra opsoletnom metodom i bilo je upitno da li će zadržati status u Evropskoj farmakopeji, ovaj uređaj se, zbog određenih prednosti (prvenstveno jednostavnosti za rukovanje i uštede vremena i troškova), navodi kao metoda izbora za sakupljanje respirabilne frakcije uzorka za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju (Al ayoub i sar., 2022).

Vrstu i zapreminu medijuma za ispitivanje takođe nije lako definisati uzimajući u obzir da dugo nije bio poznat tačan sastav plućne tečnosti, koja značajno utiče na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz preparata za inhalaciju. Procenjeno je da se u plućima nalazi oko 10-30 mL plućne tečnosti (Olsson i sar., 2011), mada ove vrednosti variraju u zavisnosti od literarnog izvora, pa tako neki podaci navode zapreminu od čak 70 mL (Bohr i sar., 2014; Hastedt i sar., 2022). Pored toga utvrđeno je i da u sastav plućne tečnosti ulaze i plućni surfaktanti koji su neophodni za održavanje prohodnosti disajnih puteva (Verma i sar., 2015). Kako trenutno ne postoji regulatorni ili farmakopejski standard za sastav veštačke plućne tečnosti (engl. *Simulated Lung Fluid*, SLF), u ispitivanju brzine rastvaranja inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci koriste se različiti medijumi. Medijum koji je do sada najčešće korišćen je izotoničan fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffer Saline*, PBS) pH 7,4, bez ili sa dodatkom surfaktanata i/ili korastvarača. Surfaktanti su uglavnom dodavani u medijum kako bi se što vernije simulirala humana plućna tečnost. Pored toga, neki istraživači smatraju da je dodavanje surfaktanata u medijum neophodno npr. prilikom ispitivanja praškova čvrstih lipidnih mikročestica kako bi se postiglo bolje kvašenje praškova (Jaspart i sar., 2005; Scalia i sar., 2012). Najčešće korišćeni surfaktanti u medijumima za ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz praškova za inhalaciju su: DPPC, polisorbit 80 i SLS (Davies i Fedah, 2003; Son i sar., 2010; Duret i sar., 2012; May i sar., 2014; Arora i sar., 2015; Bhagwat i sar., 2017). U literaturi je dostupan veliki broj različitih predloga za sastav i izradu SLF, a sastav najčešće korišćenih SLF prikazan je u radu koji su objavili Marques i sar. (2011). Međutim, u nešto novijoj studiji, Kumar i sar. (2017) formulisali su SLF tako da ona sadrži komponente humane plućne tečnosti u koncentracijama u kojima su ove komponente zastupljene *in vivo*, i to: DPPC (4,8 mg/mL), dipalmitoilfosfatidilglicerol (0,5 mg/mL), holesterol (0,1 mg/mL), albumin (8,8 mg/mL), IgG (2,6 mg/mL), transferin (1,5 mg/mL), askorbati (140  $\mu\text{M}$ ), urati (95  $\mu\text{M}$ ), glutation (170  $\mu\text{M}$ ), i Henkov

balansirani rastvor elektrolita (engl. *Hanks' Balanced Salt Solution*) (Kumar i sar., 2017). Kada je u pitanju zapremina medijuma, u cilju simulacije fizioloških uslova trebalo bi koristiti manje zapremine medijuma s obzirom na malu zapreminu plućne tečnosti. Za razliku od standardnih aparatura za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance, kao što su aparatura sa rotirajućom lopaticom i aparatura sa rotirajućom korpicom, gde se koriste velike zapremine medijuma (do 900 mL), za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju češće se opisuju aparature u kojima je moguće vršiti ispitivanje u maloj zapremini medijuma, kao što su Francova difuziona ćelija, dijalizna vrećica i (modifikovani) Transwell<sup>®</sup> sistem. Ipak, u određenom broju studija je brzina rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju ispitivana u modifikovanim/prilagođenim standardnim aparaturama sa rotirajućim korpicama (USP1) i sa rotirajućim lopaticama (USP2), protočnom ćelijom (USP4) i aparaturi sa lopaticom iznad diska (studije prikazane u preglednim radovima, koje su objavili Velaga i sar. (2018) i Radivojev i sar. (2019)). Sistemima koji omogućavaju primenu manjih zapremina medijuma i koji su zasnovani na difuziji lekovite supstance (Francova difuziona ćelija i Transwell<sup>®</sup> sistem) daje se prednost u odnosu na ostale pomenute aparature i prilikom ispitivanja praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance (Salama i sar., 2008). U literaturi (Gerde i sar., 2017) je opisan još jedan sistem, tzv. *DissolvIt*<sup>®</sup>, specijalno razvijen za ispitivanje *in vitro* brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz preparata za inhalaciju, koji bi trebalo da simulira fiziološke uslove u plućima, i da dodatno omogući oponašanje *in vivo* apsorpcije inhaliranih čestica lekovite supstance. Ovaj sistem uključuje i sloj mukusa (debljine 50  $\mu\text{m}$ ), koji se i fiziološki nalazi u respiratornom traktu, mada je u *in vivo* uslovima mnogo tanji i debljina mu varira u zavisnosti od regiona pluća (10-30  $\mu\text{m}$  je debljina mukusnog sloja u traheji, a samo 2-5  $\mu\text{m}$  u bronhijama; Wauthoz i Amighi (2015)). Simuliranje uticaja sloja mukusa na brzinu rastvaranja inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci rađeno je i u drugim aparaturama, nanošenjem sloja mukusa na polupropustljive difuzione membrane modifikovanih Francovih difuzionih ćelija i Transwell<sup>®</sup> sistema (Russo i sar., 2013; Stigliani i sar., 2013; Cingolani i sar., 2019; Alqahtani i sar., 2020). Ipak, u svim ovim studijama, sloj mukusa je bio mnogo deblji nego što je zapravo njegova debljina u humanom respiratornom traktu (u prve dve studije, debljina mukusa iznosi čak 3 mm, dok je u druge dve smanjena na 100  $\mu\text{m}$ ). Stoga se dovodi u pitanje fiziološka relevantnost primenjenih uslova u pomenutim studijama s obzirom na to da debljina mukusa može znatno uticati na *in vitro* brzinu rastvaranja lekovitih supstanci. Naime, poznato je da prisustvo mukusa može znatno da uspori brzinu rastvaranja te odloži apsorpciju visoko rastvorljivih lekovitih supstanci (Selo i sar., 2021).

Iako je tek u poslednjih nekoliko godina stavljen akcenat na razvoj testova za ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz preparata za inhalaciju, evidentno je da su brojni pristupi i različite metode opisane u literaturi kako bi se razvio odgovarajući test. Ipak, neophodno je dalje istraživanje u ovoj oblasti kako bi se identifikovali biorelevantni uslovi i postavili odgovarajući zahtevi za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata (praškova) za inhalaciju. Razvoj biorelevantnog testa bi bio jedan od ključnih koraka u (biofarmaceutskoj) karakterizaciji preparata za inhalaciju. Dodatno, razvoj adekvatne (biorelevantne) metode za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata za inhalaciju bi pružio potencijalnu mogućnost za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVK). Uspostavljanje pouzdane IVIVK doprinelo bi razvoju preparata za inhalaciju jer bi *in vitro* metode potencijalno mogle da zamene *in vivo* studije na humanim dobrovoljcima (Forbes i sar., 2015).

## **1.6. Biofarmaceutska karakterizacija lekovitih supstanci za inhalacioni put primene**

Biofarmaceutska karakterizacija lekovitih supstanci/farmaceutskih preparata podrazumeva sprovođenje određenih *in vitro*, *in vivo* i *in silico* ispitivanja kako bi se identifikovali faktori koji određuju brzinu i obim apsorpcije lekovite supstance u organizmu. Kada se sprovedu odgovarajuća ispitivanja, lekovita supstanca se, na osnovu utvrđene rastvorljivosti i permeabilnosti, klasifikuje u jednu od četiri

grupe Biofarmaceutskog sistema klasifikacije (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS). Ovaj BCS sistem je, kada se radi o peroralnom putu primene lekova, predložen još 1995. godine, od strane Amidon-a (Amidon i sar., 1995), te je do sada već kompletno utemeljen u regulatornim smernicama (EMA 2010; FDA, 2017; EMA, 2020). Pre desetak godina javila se tendencija za uspostavljanje sličnog sistema za inhalacioni put primene lekova. Tako je 2010. godine grupa istraživača (Eixarch i sar., 2010) opisala razvoj BCS-a koji bi se odnosio na inhalaciono primenjene lekovite supstance/preparate za inhalaciju, tzv. inhalacionog Biofarmaceutskog sistema klasifikacije (engl. *inhalation-based Biopharmaceutics Classification System*, iBCS). Nakon toga je, druga grupa istraživača od 2015. godine nastavila da radi na razvoju iBCS-a (Hastedt i sar., 2016), a nedavno je ista grupa objavila i dve nove publikacije na ovu temu (Bäckman i sar., 2022; Hastedt i sar., 2022). Smatra se da bi iBCS ubrzao i poboljšao razvoj kako novih lekovitih supstanci za inhalacionu primenu, tako i preparata za inhalaciju.

iBCS se bazira na glavnim postavkama i principima BCS-a, koji su ipak morali biti prilagođeni usled drugačije anatomije i fiziologije pluća, kao i specifičnosti vezanih za inhalacionu primenu lekova i procesima (npr. depozicija) kojim inhalaciono primenjena lekovita supstanca podleže nakon primene. Dodatno, kod uspostavljanja iBCS-a, neophodno je obratiti pažnju i na ogromne anatomske i fiziološke razlike koje postoje između centralnog i perifernog dela, odnosno sprovodnog i respiratornog dela pluća (Eixarch i sar., 2010). Sva tri parametra (dozni broj, apsorpcioni broj i broj brzine rastvaranja) na osnovu kojih se lekovite supstance klasifikuju po BCS-u, korišćena su i pri uspostavljanju iBCS-a, pa će u nastavku biti opisane promene koje su uzete u obzir kod definisanja svakog od ovih parametara ponaosob, kao i faktori koji na njih utiču.

Dozni broj (engl. *Dose number*,  $D_0$ ) je parametar koji označava količinu (dozu) lekovite supstance koja se rastvara u određenoj zapremini telesne tečnosti.  $D_0$  kod inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci ( $D_{0i}$ ) zavisi od mesta depozicije i raspoložive zapremine plućne tečnosti, a računa se na osnovu sledeće jednačine (Hastedt i sar., 2016):

$$D_{0i} = \frac{(M_i / V_i)}{C_{si}} \quad (2)$$

gde je:  $M_i$  – doza,  $V_i$  – zapremina plućne tečnosti u centralnom/perifernom regionu,  $C_{si}$  – rastvorljivost u vodi/plućnoj tečnosti (pH 6~7).

Doza je kod inhalaciono primenjenih lekova kompleksan pojam. U ovoj jednačini se odnosi na količinu lekovite supstance koja je isporučena u pluća i koja, u stvari, predstavlja određeni deo primenjene (nominalne) doze leka, pri čemu je predlog da se, ukoliko je moguće, napravi razlika između doze u centralnom i perifernom (alveolarnom) delu pluća. Ugrubo je procenjeno da se otprilike oko 50% od ukupne primenjene doze leka deponuje u alveolarnom regionu pluća (Hastedt i sar., 2016). Isporučena doza i depozicija preparata za inhalaciju u plućima zavisi od brojnih faktora, među kojima su faktori formulacije, vrsta i geometrija inhalatora, načina udisaja, protoka vazduha prilikom udaha, geometrije disajnih puteva (Hastedt i sar., 2022). Zapremina plućne tečnosti može da se odnosi na zapreminu u centralnom ili perifernom regionu pluća, u zavisnosti od toga gde je lekovita supstanca isporučena. Lekovita supstanca se, na osnovu doznog broja, klasifikuje kao visoko rastvorljiva kada je vrednost  $D_{0i}$  manja od 1.

Brzina rastvaranja lekovite supstance je drugi važan faktor koji se ispituje prilikom biofarmaceutske karakterizacije lekovitih preparata. Opisuje se pomoću parametra, broja brzine rastvaranja (engl. *Dissolution number*,  $D_n$ ), koji se računa na osnovu jednačine 3 (Amidon i sar., 1995):

$$D_n = \frac{t_{res} \times DC_s}{\rho \times r_0^2} \quad (3)$$

gde  $t_{res}$  predstavlja vreme zadržavanja lekovite supstance u plućima,  $D$  je koeficijent difuzije lekovite supstance,  $\rho$  je gustina čestica, a  $r_0$  je poluprečnik čestica na početku rastvaranja.

Faktori koji utiču na brzinu rastvaranja lekovite supstance uključuju: veličinu čestica, rastvorljivost, čvrsto stanje supstance (kristalno ili amorfno, polimorfni oblici itd.), udeo i vrstu pomoćnih supstanci, kao i zapreminu, viskozitet i hidrodinamiku plućne tečnosti. U zavisnosti od brzine rastvaranja i permeabilnosti lekovite supstance, zavisice i njeno delovanje nakon inhalacione primene. Naime, ukoliko lekovita supstanca treba da ostvari sistemsko dejstvo, potrebno je da pokazuje veliku brzinu rastvaranja i veliku permeabilnost, dok za lekovite supstance sa lokalnim dejstvom u plućima, važi obrnuta situacija, one treba da pokazuju nisku permeabilnost i/ili sporu brzinu rastvaranja (Hastedt i sar., 2016).

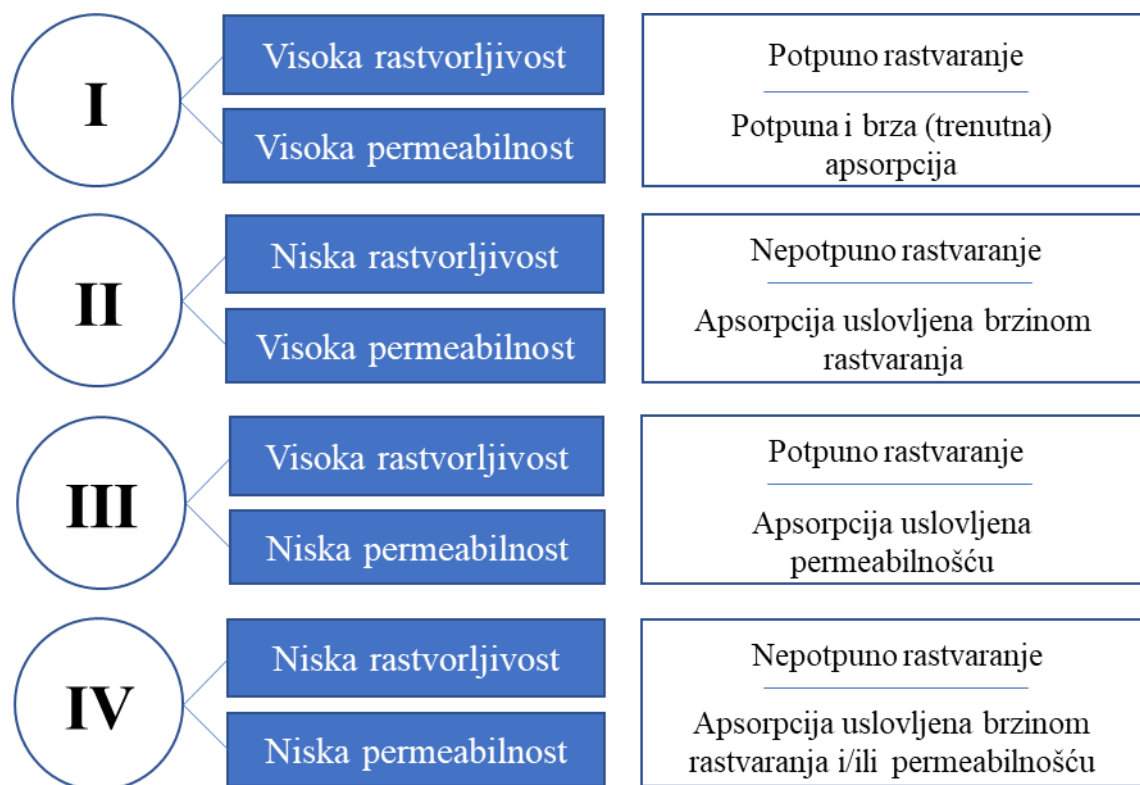
Permeabilnost lekovite supstance opisuje se apsorpcionim brojem (engl. *Absorption number*,  $A_n$ ), koji se izračunava na osnovu jednačine 4 (Amidon i sar., 1995; Hastedt i sar., 2016):

$$A_n = k_a \times t_{res} = \frac{t_{res}}{t_{abs}} \quad (4)$$

gde je  $k_a$  konstanta brzine apsorpcije lekovite supstance,  $t_{abs}$  je srednje vreme apsorpcije lekovite supstance u plućima.

Sva tri parametra koja ulaze u sastav jednačine 4 je vrlo teško odrediti *in vitro* i *in vivo*, te se često koriste *in silico* metode za njihovo predviđanje. Kao alternativa, Hastedt i sar. (2022) predložili su određivanje efektivne epitelne permeabilnosti u plućima, kao brzine kojom lekovita supstanca prolazi kroz epitel respiratornog trakta, pri čemu će vrednost i ovog parametra zavisiti od regiona respiratornog trakta. Nažalost, pokazano je da postoje velike razlike između vrednosti permeabilnosti lekovite supstance kroz epitel gastrointestinalnog i respiratornog trakta (Eixarch i sar., 2010), tako da nije moguće koristiti vrednosti permeabilnosti koje su korišćenje prilikom uspostavljanja BCS-a za uspostavljanje iBCS-a. Pored toga, još uvek ne postoji jasno definisana i standardizovana metoda (*in vitro* model) za određivanje permeabilnosti lekovitih supstanci kroz epitel pluća, kao što je to slučaj sa određivanjem permeabilnosti u GIT-u, pomoću Caco-2 ćelija, za potrebe BCS-a (Cingolani i sar., 2019). Zbog toga su potrebne dodatne studije da bi se najpre razvio odgovarajući model za određivanje permeabilnosti lekovitih supstanci u plućima, a potom definisale granične vrednosti kako bi supstance mogle da se klasifikuju na nisko i visoko permeabilne u okviru iBCS-a (Velaga i sar., 2018). Tek tada će, na osnovu vrednosti efektivne epitelne permeabilnosti u plućima, rastvorljivosti i doze, biti moguće svrstati lekovite supstance u jednu od klasa iBCS-a.

Za sada su i u slučaju iBCS-a predložene 4 potencijalne klase (Hastedt i sar., 2022). Predložena podela, kao i karakteristike procesa rastvaranja i apsorpcije inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci u zavisnosti od toga u kojoj su iBCS klasi, prikazane su na Slici 1.6 (Hastedt i sar., 2022).



**Slika 1.6.** Predložena podela, kao i karakteristike procesa rastvaranja i apsorpcije inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci u zavisnosti od iBCS klase (preuzeta i prilagođena na osnovu Hastedt i sar., 2022)

Ipak, ovde je prikazan samo potencijalni predlog, a potrebna su dalja istraživanja kako bi se jasno definisale granične vrednosti na osnovu kojih bi lekovite supstance, nakon sprovedene odgovarajuće karakterizacije, mogle da se klasifikuju u jednu od grupa iBCS-a. U svrhe karakterizacije inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci se, pored *in vitro* metoda koje tek treba da budu dodatno unapređene i standardizovane, sve više koriste i *in silico* metode (Bäckman i sar., 2022).

## 1.7. *In silico* metode karakterizacije praškova za inhalaciju

*In silico* metode koje su do sada korišćene za karakterizaciju preparata, pa i praškova za inhalaciju, mogu se podeliti u dve velike grupe, na metode (modele) koje se koriste za predviđanje/simulaciju depozicije i metode (modele) za predviđanje/simulaciju apsorpcije i raspodele lekovite supstance nakon inhalacione primene.

### 1.7.1. *In silico* modeli za predviđanje depozicije

Kompjuterski modeli za predviđanje depozicije aerosola u respiratornom traktu mogu se podeliti na nekoliko grupa: (semi)empirijski, deterministički i stohastički, pri čemu se deterministički i stohastički modeli smatraju mehanističkim modelima, jer su zasnovani na mehanističkom poznavanju fizioloških i fizičkih mehanizama, dok su semiempirijski modeli zasnovani na matematičkim jednačinama, koje su fitovane pomoću eksperimentalnih podataka (Hofmann, 2011). Prikazana podela može ipak malo da varira u zavisnosti od literaturnog izvora.



### 1.7.1.1. Semiempirijski modeli

Semiempirijski modeli se zasnivaju na matematičkim jednačinama koje su fitovane pomoću eksperimentalnih podataka.

Primer za ovakvu vrstu modela je ICRP66 model (ICRP, 1995), koji se nalazi i u okviru GastroPlus™ softvera (SimulationsPlus Inc., SAD), kao sastavni deo PCAT™ modela. ICRP66 model koristi set algebarskih izraza koji daju procenu regionalne depozicije u plućima, pri različitim uslovima disanja. Kao primarni ulazni parametri za predviđanje depozicije u ovom modelu koriste se faktori formulacije. Za formulacije sa monodisperznom veličinom čestica, potrebno je uneti poluprečnik i faktor sferičnosti (faktor oblika) čestica, dok je za preparate sa polidisperznom raspodelom veličine čestica moguće uneti raspodelu veličine čestica. Ukoliko se radi o formulaciji praška za inhalaciju sa nosačem (npr. laktozom), unose se i masa, gustina, veličina i raspodela veličine čestica nosača. U okviru PCAT™ modela dostupne su tri opcije za korišćenje ICRP66 modela: ICRP66 - *mouth*, ICRP66 - *nose* i ICRP66 - *custom* (GastroPlus™ 9.8. Manual, SimulationsPlus Inc., 2020). Prve dve opcije podrazumevaju da se kompletno disanje obavlja preko usta, odnosno nosa, redom, i u ovim slučajevima model koristi već unapred definisane fiziološke parametre iz ICRP66 modela (ICRP, 1995), dok treća opcija omogućava variranje vrednosti fizioloških parametara (GastroPlus™ 9.8. Manual, SimulationsPlus Inc., 2020). Pomenuti ulazni fiziološki parametri koji se mogu menjati u modelu su: disajni volumen, brzina protoka vazduha, funkcionalni rezidualni kapacitet pluća, dijametar traheje i bronhija itd. Model podrazumeva postojanje 4 anatomskih regiona: (i) ekstratorakalnog, koji se sastoji iz prednje i zadnje nazalne šupljine, nazofarinksa, orofarinksa i grkljana; (ii) torakalnog, koji se sastoji iz traheje i bronhija; (iii) bronhijalnog, koji se sastoji iz bronhiola i terminalnih bronhiola; (iv) alveolarno-intersticijskog regiona, koji se sastoji iz respiratornih bronhiola, alveolarnih duktusa i alveola (Hofmann, 2011).

Pored ICRP66 modela, odnedavno je u okviru GastroPlus™ softvera, kao sastavni deo PCAT™ modela, dostupan i Finlay semiempirijski model za predviđanje depozicije (DeHaan i Finlay, 2004; GastroPlus™ 9.8. Manual, SimulationsPlus Inc., 2020). Semiempirijske jednačine koje se koriste u Finlay modelu, zajedno sa jednačinama definisanim u studiji koju su objavili Finlay i Martin (2008), osnov su na kome se zasniva *ARLA online calculator* (*ARLA Respiratory Deposition Calculator, The aerosol research lab of Alberta*, 2007; Ung i sar., 2014), koji je još jedan komercijalno dostupan (*online*) softver za predviđanje depozicije lekova u humanim plućima.

Glavna prednost semiempirijskih modela je ta što su zasnovani na podacima dobijenim na ljudima. Pored toga, prednost je što predstavljaju pluća kao jednostavnu strukturu, pa ne zahtevaju komplikovane softvere kako bi se primenjivali. Nedostatak konkretno ICRP66 i Finlay modela je otežana validacija rezultata zbog toga što je eksperimentalno na ljudima nemoguće odrediti deponovane frakcije leka u torakalnom i bronhijalnom regionu posebno, već se dobija zbirna depozicija u traheobronhijalnom regionu (Hofmann, 2011), pa nije moguće izvršiti precizno poređenje između *in silico* i eksperimentalnih *in vivo* podataka. Drugi nedostatak je to što ove modele nije moguće primeniti za predviđanje depozicije leka kod eksperimentalnih životinja, već samo kod ljudi.

### 1.7.1.2. Mehanistički modeli

U okviru ove grupe razlikuju se: deterministički simetrični, „*trumpet*“ jednodimenzionalni, deterministički asimetrični, stohastički asimetrični i modeli zasnovani na računarskoj dinamici fluida i čestica (CFPD). Prve četiri grupe predstavljaju jednodimenzionalne modele celih pluća, u kojima se depozicija leka određuje na osnovu jednačina koje podrazumevaju idealizovanu geometriju disajnih puteva i idealizovane profile konstantnog protoka vazduha u njima, za razliku od pete grupe, koji su trodimenzionalni modeli, pa realno simuliraju protok čestica i vazduha (Hofmann, 2020).

### Deterministički simetrični ili „single path“ modeli

Ovi modeli posmatraju respiratorno stablo kao strukturu kod koje se svaka generacija disajnih puteva grana na dve manje identične grane disajnih puteva. Stoga ovaj model pretpostavlja da će se aerosol deponovati podjednako u identičnim granama disajnih puteva, jer su istih dimenzija (Hofmann, 1996). Ovakav tip modela za predviđanje depozicije bazira se na modelu anatomije pluća, koji su razvili Yeh i Schum (1980). Dalja potencijalna unapređenja ovog determinističkog simetričnog modela podrazumevaju mogućnost njegove primene u slučaju specifičnih morfologija pluća kao što su npr. dečija pluća, izmenjena fiziologija u slučaju bolesti pluća i generalno uzimanje u obzir asimetrične geometrije disajnih puteva kako bi predviđanje depozicije bilo realnije (Hofmann, 2011), čime bi se ujedno uklonili nedostaci ovih modela.

### „Trumpet“ jednodimenzionalni model

„Trumpet“ model spada u grupu *single path* modela, zasnovanih na Weibel-ovom simetričnom modelu pluća (Weibel, 1963). Ovaj model podrazumeva simetriju svih puteva iste generacije i podrazumeva da su oni istog prečnika, dužine i da se granaju pod istim uglom. „Trumpet“ model posmatra respiratorno stablo kao jednodimenzionalni kanal, u kome se disanje simulira kao kretanje vazduha u kanal i iz kanala, jer se disajni putevi i alveole ujednačeno šire i skupljaju (Yu, 1978). Veliki nedostatak ovog modela je njegova jednostavnost, jer ne obuhvata strukturu unutrašnjih disajnih puteva. Stoga „trumpet“ model ne može da simulira efekat asimetričnih disajnih puteva na depoziciju leka (Hofmann, 2011).

### Deterministički asimetrični ili „multiple path“ modeli

Za razliku od simetričnih modela, ovi modeli podrazumevaju asimetrično dihotomo granjanje disajnih puteva i varijacije u ventilaciji u različitim delovima pluća. *Multiple path* modeli su razvijeni da bi se vernije opisala morfologija i fiziologija pluća u odnosu na *single path* modele u cilju uspešnijeg predviđanje depozicije (Hofmann, 2011). U pomenutim modelima uzeto je u obzir i asimetrično granjanje disajnih puteva, a kombinacija jednačina za predviđanje depozicije čestica u svakom regionu pluća može da varira u zavisnosti od toga u kojoj meri su, pri definisanim uslovima, zastupljeni različiti mehanizmi depozicije (difuzija, sedimentacija, impakcija).

U ovu grupu modela spada *Multiple Path Particle Dosimetry* (MPPD) model, koji se nalazi u sklopu komercijalno dostupnog MPPD softvera (*Applied Research Associates Inc.*, SAD). Ovaj model daje potpuniju sliku o morfologiji pluća tj. uzima u obzir asimetrično granjanje disajnih puteva u respiratornom traktu. Ulazni parametri koji se unose u softver su podeljeni u četiri grupe: tip morfologije disajnih puteva, karakteristike formulacije/čestica formulacije, podaci o izlaganju jedinice preparatu za inhalaciju, kao i mogućnost da se izabere da li se uzima u obzir samo depozicija ili depozicija i klirens inhaliranih čestica (*MPPD User's guide, Applied Research Associates Inc.*, 2015). Prednost MPPD modela ogleda se u tome što je moguće vršiti predviđanje depozicije ne samo kod ljudi, već i kod različitih eksperimentalnih životinja (pacova, miševa, majmuna, ovaca i svinja) (Miller i sar., 2016). Najveća prednost u poređenju sa simetričnim modelima je to da se određivanje deponovanih frakcija vrši u realnije simuliranim uslovima koji se dešavaju u plućima, kao i simuliranje intra- i interindividualnih razlika između subjekata u generacijama disajnih puteva ili regionima pluća (Hofmann, 2020). Nažalost, validacija ovih modela poređenjem sa *in vivo* podacima moguća je samo za ukupnu i regionalnu depoziciju, a ne i za svaku generaciju disajnih puteva. MPPD model (i softver) je trenutno u procesu razmatranja za korišćenje od strane Američke agencije za zaštitu životne sredine (engl. *U.S.*

Environmental Protection Agency, EPA), a u pripremi je i zvanično uputstvo za korisnike (Phalen i sar., 2021; US EPA, 2021), koje će olakšati i unaprediti korišćenje ovog softvera.

### Stohastički asimetrični modeli

Stohastički model je asimetrični model u kome geometrija disajnih puteva nije fiksirana (što odgovara realnim *in vivo* uslovima i razlikama između pojedinaca), a parametri koji opisuju geometriju disajnih puteva (dužina, prečnik, uglovi granjanja) se u svakoj simulaciji biraju iz grupe vrednosti sa unapred definisanim granicama odstupanja (Koblinger i Hofmann, 1990). Sekvence granjanja disajnih puteva sa slučajnom geometrijom i orijentacijom generišu se za svaku pojedinačnu česticu prilikom udisaja korišćenjem tehnike stohastičkog modelovanja. Zatim se procenjuje depozicija čestica impakcijom, sedimentacijom i difuzijom u svim disajnim putevima pomoću determinističkih jednačina. Takođe, moguća su preračunavanja mukocilijarnog klirensa leka, s tim što model pretpostavlja da se klirens čestica iz disajnih puteva uvek odvija konstantnom brzinom kretanja mukusa (Hofmann i Sturm, 2004). Prvi asimetrični stohastički model pod nazivom „*Ideal*“ (*Inhalation, Deposition and Exhalation of Aerosols in/from the Lung*), opisan je u radu koji su objavili Koblinger i Hofmann (1986). Stohastički modeli se i ne spominju uvek kao posebna grupa modela, verovatno zato što bi se mogli svrstati u grupu determinističkih asimetričnih modela. Hofmann (1996; 2011) ih izvaja kao posebnu grupu i navodi da su prednosti u odnosu na uobičajne determinističke modele te što je procena deponovanih frakcija leka zasnovana na realnijem opisu morfologije humanih disajnih puteva (strukturna asimetrija disajnih puteva i biološka varijabilnost) i moguće je kvantifikovati efekat intraindividualnih razlika u dimenzijama disajnih puteva na depoziciju leka u svakoj generaciji disajnih puteva posebno. Interindividualna varijabilnost u morfologiji disajnih puteva može biti simulirana menjanjem plućnog volumena, pri čemu struktura disajnih puteva ostaje ista ili obrnuto. Međutim, pokazano je da su fluktuacije u depoziciji kod ljudi češće prouzrokovane razlikama u morfologiji disajnih puteva, nego razlikama u načinu disanja (Hofmann, 1996).

Svi prethodno prikazani modeli predstavljaju semiempirijske ili jednodimenzionalne modele celih pluća (deterministički, stohastički, „*trumpet*“ jednodimenzionalni model), kod kojih su ipak neophodne korekcije predviđanja za veliki broj faktora koji utiču na transport i depoziciju lekova. Korekcije su uglavnom neophodne kako bi se na adekvatan način uzeli u obzir: higroskopnost, kondenzacija i efekat isparavanja (koji svi doprinose promeni veličine kapi aerosola), zatim turbulentni protok vazduha, specifična geometrija granjanja disajnih puteva i realne alveolarne strukture (Longest i sar., 2019a). Naime, ovi modeli ne uzimaju u obzir svu kompleksnost disajnih puteva i ne mogu da opišu veliki broj fenomena za koje je poznato da utiču na depoziciju lekova (Longest i Hoolbruk, 2012). Stoga se u poslednje vreme, kao alternativa tradicionalnim (jednodimenzionalnim) modelima, sve više koriste trodimenzionalni CFPD modeli.

### CFPD modeli

CFPD modeli koriste trodimenzionalni model kretanja fluida, odnosno simuliraju laminarni i turbulentni protok vazduha u inhalatoru i respiratornom traktu, što nije moguće simulirati pomoću jednodimenzionalnih modela. CFPD modeli podrazumevaju modele zasnovane na računarskoj dinamici fluida (engl. *Computational Fluid Dynamics*, CFD) povezane sa dinamičkim modelima za simuliranje protoka čestica aerosola i njihovih međučestičnih interakcija, kao što su model diskretnih faza (engl. *Discrete Phase Model*, DPM), dvofluidni model (engl. *two-fluid model*), model smeše, disperzni fazni model (engl. *dense dispersed phase model*) i model diskretnih elemenata (engl. *discrete element model*) (Vulović i sar., 2018). Prednosti CFPD modela u poređenju sa semiempirijskim i jednodimenzionalnim

modelima celih pluća su u tome što su zasnovani na jednačinama koje inicijalno mogu da uzmu u obzir turbulentan protok vazduha i raspršivanje čestica, promene u veličini čestica usled higroskopsnosti ili evaporacije, kao i interakcije fluida sa zidom inhalatora/respiratornog trakta. Pored toga, ovi modeli mogu da simuliraju različite geometrije disajnih puteva (npr. razlike usled godina, pola), različiti protok vazduha, načine disanja, karakteristike aerosola (veličinu, gustinu, oblik i morfologiju čestica, efekte promene u veličini čestica usled higroskopsnosti itd.) (Huang i sar., 2021), kao i primenu različite vrste inhalatora, a da pri tome nije potrebno razvijati empirijske ili semiempirijske korelacije za svaku od ovih promena kako bi mogla da se predvidi depozicija leka (Longest i Hoolbruk, 2012). Stoga su ovi modeli korišćeni i za simulacije depozicije lekova kod odojčadi i dece (Xi i sar., 2014), kao i u slučaju različitih bolesti pluća, među kojima su astma (De Backer i sar., 2008), hronična opstruktivna bolest pluća (De Backer i sar., 2015), cistična fibroza (DeBoer i sar., 2021) itd. Nedostatak ovih modela ogleda se u tome što su vrlo kompleksni i zahtevni u pogledu kompjuterskih performansi, te i finansijski i vremenski zahtevni (Longest i sar., 2019a). Pored toga, najveće ograničenje CFPD modela respiratornog trakta je to što je, do sada, predviđanje depozicije lekova moguće vršiti samo do bronhijalnog dela pluća. Odnosno, potreban je dalji razvoj i validacija modela alveolarnog dela pluća, kako bi se moglo vršiti predviđanje depozicije lekova i u ovom regionu (Longest i sar., 2019a; Hofmann, 2020). Na kraju, ono što postoji kao problem kod svih *in silico* modela za predviđanje depozicije, pa tako i kod ovih najkompleksnijih trodimenzionalnih CFPD modela, je validacija rezultata *in silico* predviđanja tj. poređenje *in silico* predviđenih rezultata sa *in vivo* eksperimentalnim rezultatima. Naime, *in vivo* studijama je za sada nemoguće direktno izmeriti regionalne frakcije deponovanog praška za inhalaciju (npr. deponovane frakcije leka u bronhijalnom i alveolarnom regionu), već samo totalnu (ukupnu) depoziciju leka u plućima (Hofmann, 2020). Zbog toga se validacija najčešće vrši poređenjem *in vivo* i *in silico* ukupnih frakcija deponovanog leka koje i kad se poklapaju, ne podrazumeva se da su i regionalne frakcije deponovanog leka jednake, pa nije moguće sprovesti adekvatnu validaciju *in silico* dobijenih rezultata.

CFPD modeli se, osim za predviđanje depozicije u respiratornom traktu (3D modeli respiratornog trakta), mogu koristiti u razvoju dizajna inhalatora, optimizacije njegovih performansi, razumevanja procesa raspršivanja leka i određivanja emitovane doze leka (3D modeli inhalatora), kao i za simulaciju formiranja aerosola (deagregacija praška/razbijanje kapi) (Longest i sar., 2019a).

3D CFPD modelima inhalatora se simulira protok vazduha kroz inhalator i simuliraju putanje kretanja čestica, njihove međusobne interakcije, kao i njihove interakcije sa zidom inhalatora. U skorijem preglednom radu, Zheng i sar. (2021) su dali prikaz studija koje su se bavile CFPD simulacijama za procenu performansi inhalatora sa praškovima za inhalaciju, a u nastavku će biti opisane samo neke od njih. Najveći broj pomenutih studija uključio je simulacije putanja kretanja čestica, od kojih se veliki broj studija bavio procenom uticaja geometrije inhalatora (dužina dela za usta, dimenzije ulaznog dela za vazduh, strukture mrežice), vrste kapsule za prašak i protoka vazduha na performanse inhalatora (Coates i sar., 2004; Coates i sar., 2005a; Coates i sar., 2005b; Coates i sar., 2006; Coates i sar., 2007; Milenkovic i sar., 2013; Milenkovic i sar., 2014a; Milenkovic i sar., 2017 itd.). Pored toga, simulirane su i putanje kretanja čestica nosača, a praćen je i uticaj promene veličine i oblika čestica nosača na performanse inhalatora, i otkriveno je da povećanje prečnika čestica nosača značajno povećava brzinu udarca čestica u zid inhalatora, što dovodi do odvajanja čestica lekovite supstance od čestica nosača (Donovan i sar., 2012). U nekoliko studija razvijeni su CFPD modeli koji simuliraju deaglomeraciju i aglomeraciju čestica, odnosno koji uzimaju u obzir međusobne interakcije između čestica (Zheng i sar., 2021). Ove studije procenjivale su uticaj različitih faktora (npr. veličine čestica, brzine udara, ugla veštačkog USP „grla“) na deaglomeraciju čestica i proces raspršivanja praška za inhalaciju (Tong i sar., 2010; Tong i sar., 2011; Tong i sar., 2013). U jednoj od ovih studija, Tong i sar. (2013) pokazali su da je dominantan mehanizam raspršivanja praška u inhalatoru u stvari predstavljao sam udarac aglomerata najpre o zid komore inhalatora, a onda o zid u predelu mrežice, što je rezultovalo deaglomeracijom i povećanjem FPF, pri čemu je i povećanje protoka vazduha (do 130 L/min) istovremeno imalo pozitivan

uticaj na FPF. U dostupnoj literaturi, međutim, nisu pronađeni primeri koji istražuju šta se dešava sa česticama nakon njihovog udara o zid inhalatora, odnosno da li će doći do njihovog lepljenja, eventualnog klizanja ili kotrljanja. Postoje pak studije, u kojima su definisane jednačine koje opisuju proces lepljenja čestica za zid inhalatora (Milenkovic i sar., 2014b), iako nisu definisani mehanizmi ponašanja čestice nakon njenog lepljenja za zid inhalatora.

Iako se pomenuti *in silico* CFPD modeli inhalatora smatraju veoma korisnim u razvoju preparata za inhalaciju, smatra se da je potrebno validirati rezultati CFPD simulacija pomoću eksperimentalnih rezultata (Wong i sar., 2012). Međutim, razlike koje postoje između različitih *in vitro* metoda (poglavlje 1.5; Tabela 1.6), kao i između *in silico* i *in vitro* metoda, otežavaju direktno poređenje eksperimentalnih i simuliranih rezultata. U velikom broju studija, rezultati CFPD simulacija su upoređivani sa *in vitro* eksperimentalnim rezultatima (uglavnom dobijenim pomoću samo jedne *in vitro* metode, najčešće pomoću višefaznog impindžera, NGI ili ACI) (Coates i sar., 2004; Coates i sar., 2005a; Coates i sar., 2005b; Coates i sar., 2006; Coates i sar., 2007; Tong i sar., 2011; de Boer i sar., 2012; Donovan i sar., 2012; Longest i sar., 2013; Behara i sar., 2014; Milenkovic i sar., 2014a; Tong i sar., 2015; Nguyen i sar., 2018; Vulović i sar., 2018; Bass i sar., 2019; Longest i sar., 2019b). Iako je neki vid korelacije između *in vitro* i *in silico* CFPD rezultata uspostavljen (Behara i sar., 2014; Milenkovic i sar., 2014a; Tong i sar., 2015; Nguyen i sar., 2018; Bass i sar., 2019; Longest i sar., 2019b), potrebna su dalja ispitivanja u kojima će rezultati CFPD simulacija biti validirani pomoću eksperimentalnih *in vitro* rezultata, kako bi se potvrdila opravdanost primene CFPD modelovanja u razvoju novih formulacija praškova za inhalaciju. U studiji Zheng i sar. (2021) zaključeno je, takođe, da su dodatna direktna poređenja između eksperimentalnih i rezultata CFPD simulacija neophodna kako bi se povećala sposobnost predviđanja ovih *in silico* modela.

Sledeći značajan korak u razvoju novih formulacija praškova za inhalaciju bio bi kombinovanje CFPD modela sa *in silico* fiziološki-zasnovanim farmakokinetičkim (PBPK) modelima za predviđanje apsorpcije i raspodele lekovitih supstanci, kako bi se omogućila kompletna *in silico* karakterizacija preparata za inhalaciju (Walenga i sar., 2019). Dve publikovane studije (Kannan i sar., 2017; Vulović i sar., 2018) su, za sada, jedine primenile ovaj kombinovani CFPD-PBPK pristup za predviđanje apsorpcije i raspodele lekovitih supstanci nakon primene praškova za inhalaciju.

### **1.7.2. *In silico* fiziološki-zasnovani farmakokinetički (PBPK) modeli za predviđanje apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci**

*In silico* fiziološki-zasnovani farmakokinetički (PBPK) modeli simuliraju fiziološka svojstva i funkcije organizma u pogledu uticaja na transport, rastvaranje, apsorpciju, raspodelu i metabolizam lekovitih supstanci, uzimajući pri tome u obzir biofarmaceutska svojstva lekovite supstance i farmaceutskog preparata. Na ovaj način moguće je identifikovati kritična svojstva lekovite supstance i farmaceutskog preparata koja utiču na lokalnu ili sistemsku raspoloživost leka i omogućiti uspostavljanje CQA i klinički značajnih specifikacija, a time olakšati izbor optimalne formulacije. Jedna od tehnika *in silico* modelovanja koja olakšava identifikaciju kritičnih faktora je analiza osetljivosti parametara (engl. *Parameter Sensitivity Analysis*, PSA). PSA procenjuje uticaj promena vrednosti ulaznih parametara za simulacije (npr. karakteristike lekovite supstance i farmaceutskog oblika) na farmakokinetičke parametre koji opisuju obim i brzinu apsorpcije lekovite supstance. Pored predviđanja bioperformansi lekova, PBPK modelovanje omogućava testiranje mehanističkih hipoteza, odnosno, identifikaciju mehanizama koji su odgovorni za fenomene kojima lekovita supstanca podleže *in vivo*. Takođe, PBPK modelovanje se koristi za sprovođenje „virtuelnih“ kliničkih studija kako bi se procenio uticaj interindividualne varijabilnosti i varijabilnosti između različitih populacija na farmakokinetiku lekovite supstance, čime se olakšava razvoj formulacije, izbor farmaceutskog oblika i doze za specijalne populacije pacijenata, najčešće pedijatrijsku (Cvijić i sar., 2021). Dodatno, ovi *in silico* modeli omogućavaju procenu uticaja

varijacija u vrednostima fizioloških parametara između pojedinaca ili različitih populacija u slučaju poremećaja nekih fizioloških funkcija i bolesti (npr. zdravi vs. pacijenti sa oslabljenim respiratornim funkcijama) na bioperformanse lekova, i time omogućavaju definisanje optimalne doze i režima doziranja preparata. Još jedna značajna primena PBPK modela odnosi se na uspostavljanje IVIVK, kada se na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja lekovite supstance, kao ulaznih parametara za simulacije, predviđaju obim i stepen apsorpcije lekovite supstance *in vivo* (Cvijić i sar., 2021). Ovaj pristup bi mogao da se koristi i kao podrška za pružanje *biowaiver-a* (Wu i sar., 2021), zbog čega bi rezultati PBPK modelovanja mogli da se koriste prilikom podnošenja zahteva za *biowaiver*.

Primena *in silico* PBPK modela za predviđanje apsorpcije lekovitih supstanci je sada već široko zastupljena u istraživanju, a sve više i u farmaceutskoj industriji. Njihov značaj prepoznat je i od strane regulatornih agencija EMA i FDA, koje su nedavno izdale smernice za industriju, u kojima je definisan sadržaj izveštaja generisanih primenom PBPK modela, koji se podnose kao deo dokumentacije za registraciju leka. Međutim, ove smernice, kao i većina objavljenih studija u literaturi, bave se isključivo primenom *in silico* modela za peroralni put primene lekova (EMA, 2018; FDA, 2018b). Ipak, u poslednje vreme sve je veći broj studija u kojima je opisana primena *in silico* modela za predviđanje bioperformansi inhalaciono primenjenih lekova (npr. Borghardt i sar., 2015; Wu i sar., 2016; Bäckman i sar., 2017; Salar-Bezadi i sar., 2017; Martin i Finlay, 2018; Vulović i sar., 2018; Boger i Fridén, 2019; Eriksson i sar., 2020; Pinto i sar., 2021; Radivojević i sar., 2021; Miller i sar., 2022).

PBPK modelovanje inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci je mnogo zahtevnije, prvenstveno iz razloga što se mora uzeti u obzir i korak depozicije, od koga će zavisiati najpre apsorpcija lekovite supstance, a zatim i svi ostali farmakokinetički procesi. Zbog toga se modeli za predviđanje depozicije (uglavnom jednodimenzionalni) kombinuju sa farmakokinetičkim ili fiziološki-zasnovanim farmakokinetičkim modelima. Gastroplus™ *Nasal-Pulmonary Compartmental Absorption and Transit* (PCAT™) model (SimulationsPlus Inc., SAD) je trenutno jedini komercijalno dostupan mehanistički model u kome su povezani jednodimenzionalni modeli (ICRP66 i Finlay) za predviđanje depozicije leka i mehanistički modeli koji opisuju rastvaranje, apsorptivni i neapsorptivni klirens lekovite supstance sa fiziološki-zasnovanim farmakokinetičkim modelom celog organizma.

### Gastroplus™

PCAT™ model u okviru Gastroplus™ softvera se koristi za predviđanje depozicije, apsorpcije i distribucije lekovite supstance nakon primene različitih farmaceutskih oblika za inhalacioni/intranazalni put primene. U dostupnoj verziji programa, moguće je simulirati primenu samo intranazalnih i inhalacionih farmaceutskih oblika sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance, kao što su: rastvor za inhalaciju, prašak za inhalaciju, uključujući i rastvor i prašak za inhalaciju koji se primenjuje tokom određenog vremenskog perioda (namenjeno simulaciji preparata za raspršivanje/nebulizaciju), rastvor i prašak za intratrahealnu primenu (primena kod eksperimentalnih životinja iz grupe glodara), rastvor i prašak za primenu u nazalni region. PCAT™ model uzima u obzir pet regiona respiratornog trakta (Slika 1.7): nos, kao opcioni region (uključuje nazalne puteve), ekstratorakalni (uključuje nazalne i oralne delove ždrela i grkljan), torakalni (uključuje traheju i bronhije), bronhijalni (uključuje bronhiole i terminalne bronhiole) i alveolarno-intersticijalni (uključuje respiratorne bronhiole, alveolarne duktuse i alveole okružene intersticijalnim vezivnim tkivom). Kada se lek primeni inhalacionim putem, dolazi do njegove depozicije, odnosno lek se raspodeljuje u određenom procentu u svaki od ovih regiona pluća, pri čemu se određena frakcija leka izdahne, dok se određeni procenat leka proguta. Frakcija koja se deponuje u ekstratorakalnom regionu će se progutati, a predviđanje apsorpcije progutane frakcije leka pomoću GastroPlus™ softvera moguće je zbog toga što je PCAT™ model povezan sa ACAT (engl. *Advanced Compartmental Absorption and Transit*) modelom (Slika 1.7).

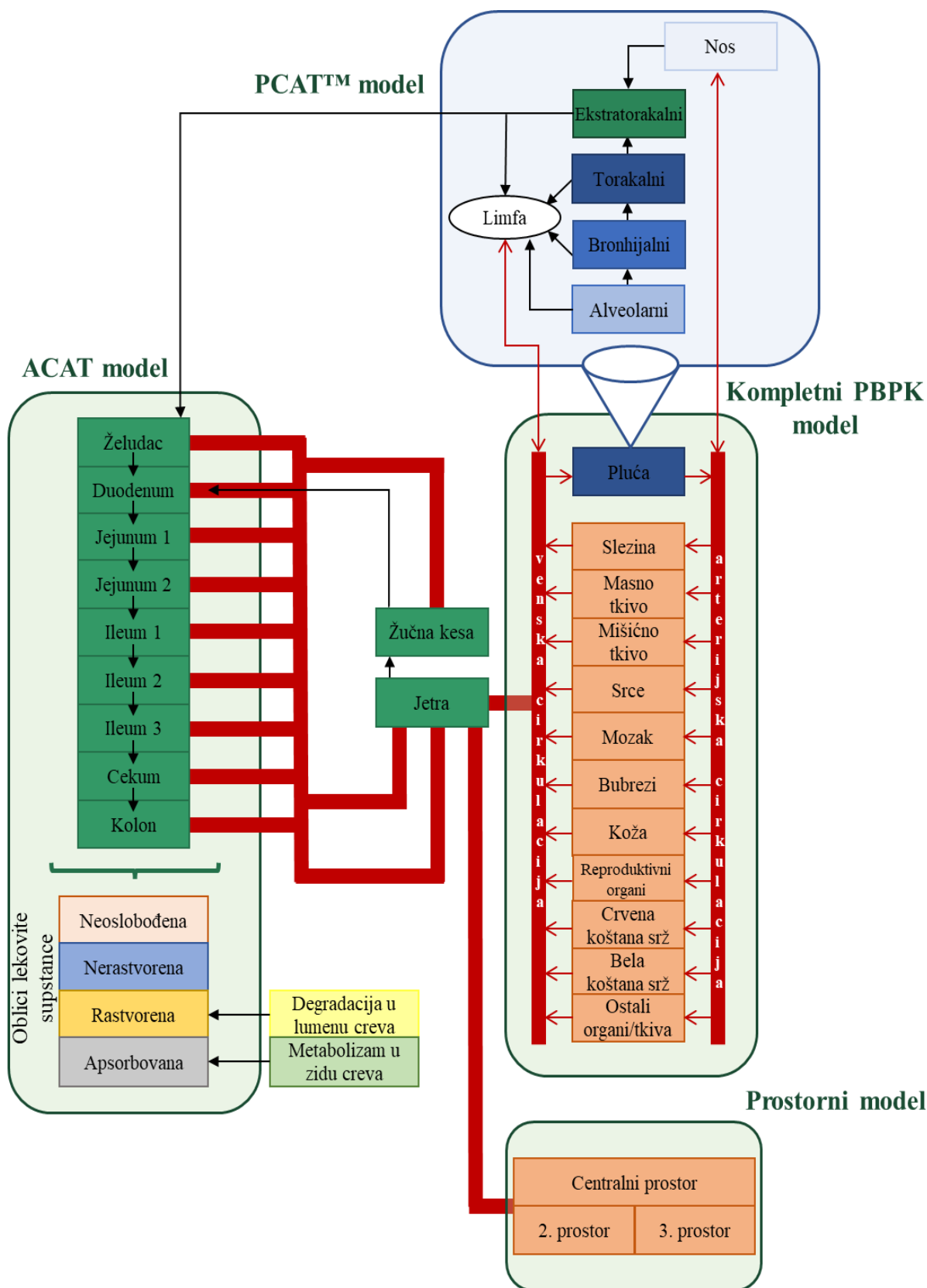
ACAT model je matematički model, razvijen za predviđanje brzine i stepena apsorpcije lekovitih supstanci nakon peroralne primene lekova, koji uzima u obzir brzinu rastvaranja lekovite supstance, pH-zavisnu rastvorljivost lekovite supstance, apsorpciju u svim delovima GIT-a, FPE u zidu GIT-a, degradaciju i precipitaciju lekovite supstance u GIT-u, prisustvo transportera itd. Po ovom modelu, humani GIT je podeljen na 18 prostora: 9 regiona GIT-a (želudac, duodenum, jejunum (2 regiona), ileum (3 regiona), cekum i uzlazni kolon) i 9 segmenata enterocita koji odgovaraju regionima GIT-a. U svakom od ovih 9 regiona GIT-a razmatraju se tri frakcije lekovite supstance: neoslobodena, nerastvorena i rastvorena frakcija. Lekovita supstanca se, po ovom modelu, smatra apsorbovanom kada uđe u enterocite. Apсорpcija lekovite supstance u enterocite se dešava pasivnom difuzijom, paracelularnim transportom ili aktivnim transportom putem influks/efluks transportera. Deo lekovite supstance može biti metabolisan u enterocitima (FPE), a ostatak prolazi kroz bazolateralnu membranu u krv (portalnu venu), zatim u jetru, gde opet može podleći FPE-u, i na kraju dospeva u sistemsku cirkulaciju (GastoPlus™ 9.8. Manual, SimulationsPlus Inc., 2020). Dalja raspodela i eliminacija lekovite supstance može se opisati pomoću dva različita pristupa, primenom prostornog (engl. *compartmental*) modela ili primenom kompletnog fiziološki-zasnovanog farmakokinetičkog (engl. *full/whole body Physiologically-Based Pharmacokinetic*, PBPK) modela. Prema prostornom modelu, lekovita supstanca se raspodeljuje u jedan (centralni), dva ili tri „prostora“ organizma, pri čemu je „prostor“ hipotetička struktura tj. farmakokinetička celina, a ne anatomska i fiziološka celina. Prostorni model je jednostavniji i prilikom njegove izgradnje neophodno je poznavanje znatno manjeg broja ulaznih parametara koji opisuju farmakokinetiku lekovite supstance, kao što su: klirens (ukupni i/ili renalni), volumen distribucije i konstante raspodele lekovite supstance između dva različita prostora. Sa druge strane, prema kompletnom PBPK modelu, lekovita supstanca se raspodeljuje u tkiva i organe, čije su anatomske (npr. veličina i zapremina) i fiziološke karakteristike opisane uz pomoć vrednosti određenih u *in vivo* ispitivanjima. Kompletan PBPK model se sastoji iz organa (npr. pluća, slezina, srce, mozak, bubrezi, koža, reproduktivni organi) i tkiva (masno i mišićno) koji su međusobno povezani sistemskom cirkulacijom (venski i arterijski krvotok). Organi/tkiva su definisana kao „*perfusion limited*“ ili kao „*permeability limited*“, u zavisnosti od toga koji je faktor ograničavajući za raspodelu supstance u tkivu/organu (da li je to, redom, perfuzija krvi kroz tkiva ili permeabilnost lekovite supstance). U zavisnosti od faktora koji ograničava raspodelu lekovite supstance u tkiva/organe, koriste se različite jednačine za izračunavanje podeonog koeficijenta plazma-tkivo (engl. *plasma to tissue partition coefficient*,  $k_p$ ). Pored jednačina za definisanje  $k_p$  vrednosti u tkivima, procesi koje simulira PBPK model opisuju se mnoštvom različitih jednačina, što čini ovaj model mnogo složenijim u odnosu na prostorne modele. Zbog toga kompletni PBPK model daje verniji prikaz prolaska lekovite supstance kroz organizam u odnosu na prostorni model, ali proces njegove izgradnje zahteva poznavanje velikog broja ulaznih podataka, pa je komplikovaniji i duže traje.

Depozicija leka primenjenog inhalacionim putem može biti određena pomoću gore pomenutih ICRP66 ili Finlay modela. Treća opcija je da depoziciju definiše sam korisnik npr. ukoliko su dostupni eksperimentalni podaci (GastoPlus™ 9.8. Manual, SimulationsPlus Inc., 2020). Nakon depozicije, dolazi do rastvaranja lekovite supstance, i ovaj proces je opisan mehanistički pomoću *Noyes-Whitney* jednačine, koja uzima u obzir rastvorljivost lekovite supstance, raspodelu veličine čestica i brzinu difuzije (Borghardt i sar., 2015). Nažalost, trenutno ne postoji opcija za unos *in vitro* profila brzine rastvaranja lekovite supstance iz inhalacionih preparata kao ulaznih podataka, što je jedan od razloga koji otežava modelovanje preparata za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovitih supstanci. Paralelno sa procesom rastvaranja, dešava se i mukocilijarni klirens iz ekstratorakalnog, torakalnog i bronhijalnog dela pluća, koji predstavlja deo neapsorptivnog klirensa lekovite supstance zajedno sa klirensom alveolarnih makrofaga u alveolarno-intersticijalnom delu. U neapsorptivni klirens spada i metabolički klirens u plućima, koji je moguće uneti kao jedan od ulaznih parametara. Nakon rastvaranja, dolazi do apsorpcije lekovite supstance. Absorptivni klirens predstavlja prelazak rastvorene lekovite supstance iz plućne tečnosti u plućno tkivo i ovo je ili pasivan proces ograničen difuzijom lekovite supstance ili

aktivan transport (Bäckman i sar., 2017). Preračunava se za svaki region posebno na osnovu permeabilnosti lekovite supstance (koja je različita u svakom od regiona) i anatomskih i fizioloških karakteristika plućnog regiona (debljine sloja mukusa, zapremine mukusa, debljine epitela, površine regiona) (Borghardt i sar., 2015). Prelazak lekovite supstance iz plućnog tkiva svakog od ovih regiona u sistemsku cirkulaciju, tj. proces apsorpcije određen je konstantom brzine apsorpcije u plućima ( $k_a$ ), koju softver sam računa na osnovu jednačine koja uzima u obzir zapreminu pluća, brzinu protoka krvi,  $k_p$  koeficijent i odnos koncentracije lekovite supstance u krvi/plazmi. Nakon prelaska lekovite supstance u sistemsku cirkulaciju, ona se raspodeljuje i eliminiše iz organizma, prema parametrima definisanim u okviru prostornog ili kompletnog PBPK modela. Shematski prikaz povezanosti između PCAT™, ACAT i prostornih/kompletnog PBPK modela u sklopu GastoPlus™ softvera dat je na Slici 1.7.

Iako PCAT™ važi za najkompletniji i jedini mehanistički model za predviđanje bioperformansi lekova primenjenih inhalacionim putem, čiji je veliki potencijal u razvoju inhalacionih lekova opisan u literaturi, do sada je samo u nekoliko naučnih publikacija opisana njegova primena (Wu i sar., 2016; Bäckman i sar., 2017; Salar-Behzadi i sar., 2017; Vulović i sar., 2018; Boger i Fridén, 2019; Pinto i sar., 2021; Radivojev i sar., 2021; Miller i sar., 2022).





**Slika 1.7.** Shematski prikaz PCAT™, ACAT i (jedno-, dvo- i tro-) prostornog/kompletnog PBPK modela i njihove međusobne povezanosti u sklopu GastroPlus™ softvera (prilagođeno iz Simulation plus, Inc., 2020 i Cvijić i sar., 2021)

### Mimetikos Preludium™

Mimetikos Preludium™ (<https://www.emmace.se/products/mimetikos-preludium>) softver (Emmace Consulting AB, Lund, Švedska) se takođe sastoji iz modela za predviđanje depozicije i farmakokinetičkog modela za predviđanje apsorpcije lekovitih supstanci. Ovo je jedinstveni softver koji je razvijen ciljano i isključivo za simulaciju primene inhalacionih lekova. Softver se zasniva na semimehanističkom modelu za predviđanje depozicije, pri čemu je moguće izabrati jednu od nekoliko mogućih morfometrija pluća (ugrađeni su različiti modeli pluća po Weibel-u, Yeh i Schum-u, Hansen i Ampaya-i, i Olsen-u) (Olsson i Bäckman, 2018). Pored toga, u softveru je dostupan i semimehanistički farmakokinetički model, u kome su procesi apsorpcije lekovite supstance u plućima opisani mehanistički (brzina rastvaranja, mukocilijarni klirens, permeacija, perfuzija tkiva), dok su drugi procesi empirijski (bukalna apsorpcija, gutanje, apsorpcija iz GIT-a, raspodela lekovite supstance između centralnog i perifernog prostora i klirens). Model se sastoji iz 4 regiona pluća: ekstratorakalni, traheobronhijalni, bronhiolarni i alveolarni.

Prednosti ovog softvera ogledaju se u sledećem:

- moguće je podešavati protok vazduha u zavisnosti od vremena u toku ciklusa inhalacija/udah-pauza-izdah;
- može se simulirati inhalacija aerosola kao bolusa doze u bilo kom trenutku trajanja udaha;
- sadrži regresione algoritme koji fituju *in vitro* podatke dobijene primenom kaskadnih impaktora tako da se dobiju parametri koji opisuju raspodelu veličine čestica aerosola (MMAD, GSD i FPF);
- ulazni podaci o depoziciji pMDI u ustima, određeni na realnim *in vitro* modelima, se mogu koristiti kao ulazni podaci za simulacije u ovom softveru, što je velika prednost budući da još uvek ne postoje pouzdani *in silico* modeli koji predviđaju deponovanu frakciju pMDI u ustima.

Nedostaci ovog softvera se ogledaju u tome što su gastrointestinalni deo i deo koji opisuje sistemsku cirkulaciju modela kompletno empirijski, što znači da zahtevaju unos podataka iz kliničkih studija dobijenih nakon intravenske i peroralne primene leka. Zbog toga bi ovaj farmakokinetički model mogao naći eventualnu primenu u kasnoj prvoj fazi razvoja leka, kada su česte promene u formulaciji i dizajnu inhalatora, kao i u razvoju generičkih preparata, jer su u oba slučaja poznate fizičko-hemijske i farmakokinetičke karakteristike lekovite supstance (Olsson i Bäckman, 2018).

### Simcyp™ PBPK Simulator™ i PK-SIM®

Simcyp™ PBPK Simulator (<https://www.certara.com/software/simcyp-pbpbk/>) i PK-Sim® (<http://www.systems-biology.com/products/PK-Sim/>) su još dva komercijalno dostupna softvera koja se mogu koristiti između ostalog za predviđanje *in vivo* ponašanja lekovite supstance nakon inhalacione primene. Ovi softveri se, međutim, zasnivaju na nemehanističkim PBPK modelima. Nemehanistički PBPK modeli imaju veliki značaj u pretkliničkim i ranim kliničkim ispitivanjima, ali im je ograničenje to što su procesi rastvaranja i permeacije lekovite supstance kroz epitel pluća opisani kao nemehanistički procesi prvog reda, što onemogućava ove modele da uzmu u obzir realne karakteristike preparata, kao ni razlike između regiona pluća u pogledu prirode i ravnoteže između apsorptivnog i neapsorptivnog klirensa lekovite supstance (Bäckman i sar., 2017).

### PulmoSim™

PulmoSim™ je Pfizer-ov (Pfizer Inc., SAD) *in house* PBPK model. Za ovaj model se tvrdi da sadrži mehanističke deskriptore procesa rastvaranja, permeacije lekovite supstance, njene raspodele

između plućnih tkiva, kao i model za opisivanje systemske raspodele lekovite supstance nakon inhalacione primene. Međutim, do sada nisu objavljene publikacije u kojima je opisana primena ovog PBPK modela, pa nije dostupan ni detaljniji opis modela (Borghardt i sar., 2015).

### **1.7.3. *In silico* modelovanje bioperformansi inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci kod eksperimentalnih životinja**

Iako je većina pomenutih *in silico* modela (softvera) tek u fazi razvoja i nema mogućnosti da simulira sve procese koji utiču na ponašanje lekovite supstance u plućima, ovi modeli imaju veliki potencijal da olakšaju razvoj preparata za inhalaciju, pogotovo ukoliko se kombinuju sa pretkliničkim studijama na životinjama. Jones i sar. (2006) su prvi pokazali da bi rezultati PBPK modelovanja, validirani pomoću *in vivo* podataka dobijenih na eksperimentalnim životinjama, mogli da se koriste za predviđanje bioperformansi lekova kod ljudi pre sprovođenja prvih kliničkih studija. Od tada, još nekoliko studija potvrdilo je mogućnosti ovakvog *in vivo-in silico* pristupa za procenu farmakokinetike lekovite supstance kod ljudi (De Buck i sar., 2007; Jones i sar., 2011; Zhang i sar., 2015; Miller i sar., 2019). Međutim, sve pomenute studije se odnose samo na peroralni put primene lekova. Ovakav pristup je potencijalno moguć i za inhalaciono primenjene lekovite supstance, pri čemu bi prvi korak bio izgradnja i validacija modela za eksperimentalnu životinjsku vrstu nakon intratrahealne/inhalacione primene leka, koji bi onda mogao da se prilagodi (skalira) za predviđanje bioperformansi inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci kod ljudi.

*In silico* modelovanje inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci kod eksperimentalnih životinja je otežano činjenicom da nijedan od pomenutih softvera nema mogućnost da predvidi i depoziciju i apsorpciju lekovitih supstanci u respiratornom traktu životinja. Odnosno, komercijalno dostupni softveri za predviđanje apsorpcije lekovitih supstanci (GastroPlus™, Mimetikos Preludium™), kao što je već rečeno, imaju integrisane modele za procenu regionalne depozicije i apsorpcije lekovite supstance u humanim plućima, ali ne i kod životinja. Sa druge strane, modeli za predviđanje depozicije, kao što je npr. MPPD model, mogu da predvide depoziciju lekova kod nekih vrsta životinja (miševa, pacova, zečeva, majmuna, svinje), ali rezultati depozicije ne mogu biti iskorišćeni direktno kao ulazni parametri za simulacije apsorpcije lekovite supstance kod životinja u drugim softverima tj. potrebna je njihova modifikacija. Ovaj problem nastaje zbog toga što MPPD model predviđa depoziciju leka u dva regiona pluća (traheobronhijalni i alveolarni), dok je npr. u GastroPlus™ softveru (PCAT™ modelu) potrebno uneti deponovane frakcije leka u četiri regiona respiratornog trakta (ekstratorakalni, torakalni, bronhijalni i alveolarni).

Na kraju, ukoliko se ipak uspešno izgradi i validira model za određenu životinjsku vrstu, vrši se (alometrijsko) skaliranje svih neophodnih farmakokinetičkih parametara (klirens, volumen distribucije, konstante distribucije, poluvreme eliminacije itd.) sa životinja na ljude. Pacovi su, uz miševu, jedna od najčešće korišćenih laboratorijskih životinja u *in vivo* studijama za ispitivanje inhalacionih lekova, prvenstveno zbog dostupnosti i lakoće izvođenja eksperimenata (Fernandes i Vanbever, 2009; Fröhlich, 2021). Pri skaliranju farmakokinetičkih podataka sa pacova i generalno svih eksperimentalnih životinja na ljude neophodno je poznavati kako se anatomija i fiziologija organa, preko kog se vrši apsorpcija, razlikuje između životinja i ljudi. Anatomija i fiziologija GIT-a pacova je dobro istražena i dokumentovana u literaturi (DeSesso i Williams, 2008), tako da softveri, kao što je GastroPlus™, koriste ove podatke za predviđanje apsorpcije lekovitih supstanci primenjenih peroralnim putem, kao i progutane frakcije inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci. Međutim, kada su pluća u pitanju, situacija je drugačija jer postoje značajne razlike u anatomiji i fiziologiji između pluća pacova i ljudi. Granjanje disajnih puteva kod ljudi je dihotomo (ili trihotomo) i simetrično (što znači da se bronhija grana u dve bronhiole, koje se dalje granaju u dve manje grane disajnih puteva), dok je kod pacova asimetrično i monopodijalno (odnosno jedna bronhija se grana u mnoštvo bronhiola) (Miller i sar., 1993).

Pored toga, mukocilijarni klirens je znatno brži kod pacova tako da se prosečno lekovita supstanca eliminiše klirensom za 8 h, dok kod ljudi ovaj proces traje i do 24 h (Tanner i Single, 2020). Velika razlika postoji i u tome što pacovi dišu samo preko nosa, dok ljudi dišu pomoću usta i nosa, pa je kod ljudi smanjeno filtriranje čestica, te se veća količina čestica isporučuje u pluća. Ovaj problem se donekle prevazilazi intratrahealnom primenom leka kod pacova, koja sa druge strane, opet doprinosi razlikama, sada u načinu primene između ljudi i pacova. Zbog toga je preporuka da se intratrahealna instilacija koristi samo dok se ne utvrdi odgovarajuća doza, a da se onda lek primenjuje inhalacionim putem (preko nosa) i kod pacova (Fröhlich, 2021). Na osnovu prisutnih razlika u anatomiji, fiziologiji i načinu primene, moguće su velike razlike u depoziciji i, posledično, apsorpciji inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci između ljudi i pacova, pa se ovo mora uzeti u obzir prilikom prevođenja podataka sa pacova na ljude (Jones i Harisson, 2012).

#### 1.7.4. Validacija *in silico* PBPK modela

Validacija PBPK modela podrazumeva poređenje predviđenih rezultata simulacija sa *in vivo* utvrđenim vrednostima kako bi se potvrdila pouzdanost predviđanja ovih modela. Validacija se obično sprovodi poređenjem *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih profila koncentracije lekovite supstance tokom vremena, najčešće određenim u plazmi (u sistemskej cirkulaciji), mada je moguće koristiti i profile koncentracije lekovite supstance u nekom tkivu/organu i u urinu. Osim vizuelnog poređenja oblika krive profila koncentracije lekovite supstance, porede se srednje vrednosti farmakokinetičkih parametara koji opisuju obim i brzinu apsorpcije: maksimalne koncentracije leka u plazmi ( $C_{max}$ ), vremena za koje se postiže  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ), površine ispod krive (PIK) i biološke raspoloživosti ( $F$  (%)). Iako se smatra da koncentracija lekovite supstance u sistemskej cirkulaciji nije adekvatan parametar za opisivanje apsorpcije inhalaciono primenjenih lekova koje ostvaruju lokalno dejstvo u plućima, u nedostatku *in vivo* metoda koje bi se koristile za određivanje lokalnih koncentracija lekovite supstance u plućima, te bile dostupne i za validaciju rezultata simulacija, i u slučaju inhalacionih PBPK modela koriste se pomenuti parametri za njihovu validaciju.

Neke od metoda koje se koriste za poređenje *in silico* i *in vivo* vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i PIK) su procena greške predviđanja u procentima (engl. *percent prediction error* (%)) (Marković i sar., 2021) i određivanje tzv. nivoa greške (engl. *fold-error*, FE) (Zhang i sar., 2015; Miller i sar., 2019).

### 1.8. Model lekovite supstance

#### 1.8.1. Salbutamol-sulfat

Salbutamol-sulfat je lekovita supstanca koja spada u grupu kratkodelujućih agonista  $\beta$ -2 adrenergičkih receptora u bronhijalnim mišićima. Koristi se za smanjenje bronhospazma, u hroničnoj terapiji pacijenata obolelih od astme ili hronične opstruktivne bolesti pluća. Primenjuje se intravenskim, peroralnim i inhalacionim putem, ali za razliku od intravenske i peroralne primene, kod inhalacione primene se koriste manje doze, te je i manja učestalost neželjenih reakcija kao što su suva usta, palpitacije, glavobolje i tremor (Tukiainen i sar., 1988). Na tržištu je dostupan u velikom broju farmaceutskih oblika (Tabela 1.7) (Nacionalni Registar Lekova, 2020; Martindale: The Complete Drug Reference, 2022). U registrovanim preparatima sa tržišta nalazi se u obliku salbutamol baze ili soli, salbutamol-sulfata, pri čemu je 1,2 mg soli ekvivalentno količini od 1 mg salbutamol baze. Početak delovanja salbutamol-sulfata je već oko 5 min nakon inhalacione primene, a maksimalni efekat ostvaruje nakon 1 h, dok mu je dužina trajanja dejstva samo 3-4 h, pa se svrstava u grupu simpatomimetika sa

kratkim delovanjem. Upravo je to kratko delovanje i potreba za čestim doziranjem salbutamol-sulfata (3-4 puta dnevno) jedan od najvećih nedostataka primene ove lekovite supstance u hroničnoj terapiji bolesti pluća. To je razlog zbog čega se javila ideja, opisana u literaturi, za razvoj formulacije praška za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata (Daman i sar., 2014). Ovakva formulacija bi potencijalno povećala komplijansu pacijenata i mogla da spreči noćne napade astme (Daman i sar., 2014).

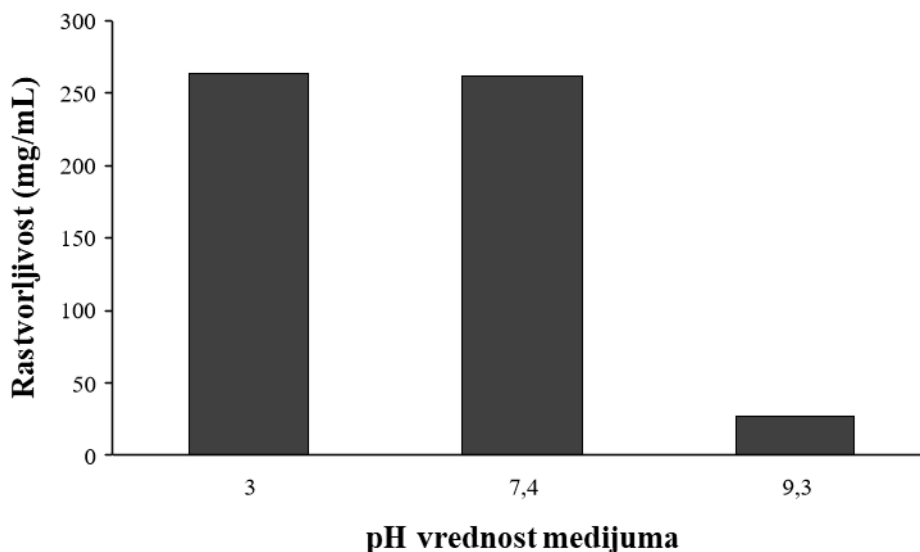
**Tabela 1.7.** Dostupni farmaceutski oblici i primeri registrovanih preparata sa salbutamolom ili salbutamol-sulfatom

Put primene leka	Farmaceutski oblik	Primer registrovanog preparata
Intravenski	rastvor za injekciju	Ventolin <sup>®</sup> , GlaxoSmithKline, UK
Peroralni	tableta sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance	Spalmotil <sup>®</sup> , Galenika, Srbija
	tableta sa produženim oslobađanjem lekovite supstance	Mylan Pharmaceuticals Inc., SAD
	kapsula sa produženim oslobađanjem lekovite supstance	Zvanične po Britanskoj farmakopeji, BP2020 (Martindale: The Complete Drug Reference, 2022), ali ne postoji registrovan preparat
	oralni rastvor	Spalmotil <sup>®</sup> , Galenika, Srbija
	sirup	Ventolin <sup>®</sup> , GlaxoSmithKline, Australija
Inhalacioni	prašak za inhalaciju	Easyhaler <sup>®</sup> Salbutamol sulphate, Orion pharma, UK
	prašak za inhalaciju, podeljeni	Ventolin <sup>®</sup> Rotacaps <sup>®</sup> , GlaxoSmithKline, Australija
	rastvor za raspršivanje/nebulizaciju	Spalmotil <sup>®</sup> , Galenika, Srbija
	rastvor za inhalaciju pod pritiskom	Ventolin <sup>®</sup> Evohaler <sup>®</sup> , GlaxoSmithKline, Australija
	suspencija za inhalaciju pod pritiskom	Ventolin <sup>®</sup> HFA, GlaxoSmithKline, UK

Na osnovu autoradiografskih snimaka pluća, utvrđeno je da su  $\beta$ -2 adrenergički receptori najgušće eksprimirani u bronhijama pa sve do terminalnih bronhiola, što znači da salbutamol-sulfat treba da se isporuči i deponuje do ovih generacija disajnih puteva kako bi ostvario svoj maksimalni terapijski efekat (Labiris i Dolovich, 2003). Imajući ovo u vidu, utvrđeno je da bi optimalan MMAD aerosola salbutamol-sulfata koji se primenjuje kod pacijenata sa slabom do umerenom astmom trebalo da bude oko 2,8  $\mu$ m (Zanen i sar., 1994), odnosno oko 3  $\mu$ m u slučaju primene kod pacijenata sa izraženom opstrukcijom disajnih puteva (Zanen i sar., 1996), kako bi se postigla optimalna bronhodilatacija disajnih puteva. Drugim rečima, u slučaju razvoja formulacije sa salbutamol-sulfatom ne treba težiti „preteranom“ smanjenju veličine čestica aerosola (manjem od 1  $\mu$ m), kao što je to slučaj sa lekovitim supstancama koje treba da se deponuju u alveolarnom delu, odnosno onima koje treba da ostvare sistemsko dejstvo.

Salbutamol-sulfat se klasifikuje kao visoko rastvorljiva lekovita supstanca, čija je rastvorljivost u vodi na 37 °C oko 252,57 mg/mL (Haghi i sar., 2012). Rastvorljivost salbutamol-sulfata je pH-zavisna, i može se uočiti (Slika 1.8) da se smanjuje sa povećanjem pH vrednosti medijuma (Imboden i Imanidis, 1999). Međutim uočava se da je, u fiziološkom opsegu pH vrednosti, rastvorljivost približno ista, a da se drastično smanjenje rastvorljivosti dešava tek na pH vrednosti od 9,3. Salbutamol-sulfat se, na osnovu

visoke rastvorljivosti i niske permeabilnosti, svrstava u III grupu BCS sistema (Cingolani i sar., 2019). Pokazuje nisku biološku raspoloživost nakon peroralne primene, što je posledica intenzivnog FPE-a u jetri i moguće u GIT-u (Morgan i sar., 1986). Ipak, biološka raspoloživost salbutamola nakon inhalacione primene iznosi oko 90% (Ehrhardt i sar., 2005), pa se zbog toga inhalacionim putem primenjuju znatno niže doze (200-400 µg) u poređenju sa peroralnim putem primene (2-4 mg) (Rau, 2005). Ovo je jedan od glavnih razloga prednosti primene salbutamol-sulfata inhalacionim putem. Salbutamol se ne metaboliše u plućima. Na osnovu iBCS-a, salbutamol-sulfat bi se takođe mogao svrstati u III klasu zbog niske permeabilnosti kroz epitel pluća, koja iznosi  $P_{eff} = 0,82 \times 10^{-6}$  i manja je od  $1 \times 10^{-6}$ , što je postavljeno kao granična vrednost za permeabilnost lekovitih supstanci kroz epitel pluća (Bäckman i sar., 2022).



**Slika 1.8.** Eksperimentalno određena rastvorljivost salbutamol-sulfata u medijumima različitih pH vrednosti (vrednosti preuzete iz studije Imboden i Imanidis, 1999)

### 1.8.2. Budesonid

Budesonid je lekovita supstanca iz grupe kortikosteroida sa izraženom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću i niskom sistemskom aktivnošću. Primenjuje se peroralnim, inhalacionim, rektalnim i nazalnim putem (Tabela 1.8), pri čemu se u zavisnosti od puta primene, razlikuju i indikacije za primenu budesonida. Peroralno i rektalno se primenjuje u terapiji Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa, nazalno u terapiji alergijskog rinitisa, dok se inhalaciono primenjuje, kao i salbutamol-sulfat, u terapiji astme i hronične opstruktivne bolesti pluća, često u kombinaciji sa dugodelujućim  $\beta$ -2 agonistima (Kalola i Ambati, 2022). Nedavno je opet postao aktuelan, kada je dobio novu potencijalnu indikaciju u terapiji COVID-a 19, s obzirom na to da je klinička studija pokazala da rana inhalaciona primena budesonida može dovesti do smanjenja vremena oporavka od COVID-a 19 (Ramakrishnan i sar., 2021). Na tržištu je za inhalacionu primenu dostupan u vidu nekoliko farmaceutskih oblika, prikazanih u Tabeli 1.8 (Nacionalni Registar Lekova, 2020; Martindale: The Complete Drug Reference, 2022). Pokazuje nisku sistemsku biološku raspoloživost nakon peroralne primene (9-21%) usled intenzivnog FPE-a, primarno u jetri (Edsbäcker i Andersson, 2004), te se zbog toga prednost daje lokalnoj primeni budesonida. Budesonid se nakon inhalacione primene apsorbuje brzo (Lähelmä i sar., 2005), a smatra se da brza apsorpcija lekovitih supstanci u plućima može da ograniči njihov lokalni terapijski efekat, zbog mukocilijarnog klirensa u plućima. Zbog toga je i u slučaju inhalacione primene budesonida potrebno

češće doziranje, što opet može dovesti do loše komplijanse pacijenata (La Zara i sar., 2021). Kontrolisana isporuka preparata za inhalaciju u pogledu depozicije, brzine rastvaranja i apsorpcije lekovite supstance je stoga veoma poželjna u terapiji hroničnih bolesti pluća, za koje se i budesonid koristi, te su u literaturi opisani brojni primeri razvoja formulacije sa modifikovanim oslobađanjem budesonida (Singh i sar., 2002; Arya i sar., 2006; Mezzena i sar., 2009; Parmar i sar., 2010; Liu i sar., 2018; La Zara i sar., 2021; itd.). Inhalacionom primenom budesonida se, u zavisnosti od tipa i vrste inhalatora, u plućima deponuje samo 10% (pMDI) do 30% (DPI) lekovite supstance, odnosno čak oko 70-90% budesonida se nakon depozicije u orofaringealnom delu proguta. Od te progutane frakcije samo oko 10% budesonida je sistemski raspoloživo, jer 90% podleže FPE u jetri pod dejstvom CYP3A4 enzima, pri čemu nastaju neaktivni metaboliti (Ryrfeldt i sar., 1982). Budesonid se ne metaboliše se u plućima, niti u GIT-u (Donnelly i Seale, 2001).

**Tabela 1.8.** *Dostupni farmaceutski oblici i primeri registrovanih preparata sa budesonidom*

Put primene leka	Farmaceutski oblik	Primer registrovanog preparata
Peroralni	gastro-rezistentna kapsula	Budosan <sup>®</sup> , Dr. Falk Pharma GmbH, Nemačka
	tableta sa produženim oslobađanjem lekovite supstance	Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Izrael
	kapsula sa produženim oslobađanjem lekovite supstance	Entocort <sup>®</sup> EC, Perrigo Pharma, Irska
Rektalni	rektalna pena	Budenofalk <sup>®</sup> , Dr. Falk Pharma GmbH, Nemačka
Nazalni	sprej za nos	Rhinocort <sup>®</sup> , AstraZeneca, UK
Inhalacioni	prašak za inhalaciju	Pulmicort <sup>®</sup> Turbuhaler <sup>®</sup> , Astra Zeneca, UK
	prašak za inhalaciju, podeljen	Foracort <sup>®</sup> Rotacaps <sup>®</sup> , Cipla Ltd., Indija (u kombinaciji sa formoterol-fumaratom)
	suspenzija za raspršivanje/nebulizaciju	Pulmicort <sup>®</sup> Respules, AstraZeneca, UK
	suspenzija za inhalaciju pod pritiskom	Budecort <sup>®</sup> , Cipla Ltd., Indija

Budesonid je lipofilna supstanca sa particionim koeficijentom (logP) koji iznosi 2,42. pKa vrednost budesonida iznosi 13,74, pa će se u fiziološkom opsegu pH vrednosti nalaziti u nejonizovanom obliku (Wu i sar., 2013). Na osnovu niske rastvorljivosti u vodi od 0,045 mg/mL (Bodas i Ige, 2019) i visoke permeabilnosti (Sjögren i sar., 2015), budesonid se svrstava u II grupu BCS-a. Sa druge strane, Bäckman i sar. (2022) su dali predlog da se budesonid svrsta u I grupu iBCS-a, na osnovu visoke permeabilnosti budesonida i  $D_{0i}$  broja, koji je u slučaju inhalacione primene manji od 1 ( $D_{0i} = 0,17$ ). Prikazana vrednost  $D_{0i}$  broja izračunata je na osnovu jednačine 2, sa pretpostavkom da je doza u plućima jednaka 50% nominalne doze budesonida (90 µg) i uzimajući u obzir zapreminu plućne tečnosti od 10 mL (Bäckman i sar., 2022).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**



Cilj eksperimentalnog rada je razvoj formulacije čvrstih lipidnih mikročestica u obliku praškova za inhalaciju, odgovarajućih aerodinamičkih karakteristika i sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance, kao i *in vitro/in silico* karakterizacija praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovitih supstanci različitih biofarmaceutskih svojstava.

Pojedinačni ciljevi su postavljeni u okviru svake od četiri definisane faze istraživanja, i obuhvataju sledeće:

1. Formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi i sušenjem u uređajima za sušenje raspršivanjem ili sušenje smrzavanjem, kao i njihova karakterizacija;
2. Ispitivanje uticaja parametara procesa emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem na farmaceutsko-tehnološke i funkcionalne karakteristike praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica;
3. Određivanje aerodinamičkih karakteristika odabranih formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica *in vitro* i *in silico* metodama, komparativna analiza aerodinamičkih karakteristika određenih primenom tri *in vitro* (TSI, FSI i NGI) i jedne *in silico* (CFPD) metode, kao i procena prednosti/nedostataka svake od metoda;
4. Razvoj modela za predviđanje depozicije, apsorpcije i raspodele lekovitih supstanci različitih biofarmaceutskih svojstava: salbutamola (primenjenog u obliku sulfata) i budesonida, nakon primene praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem, pomoću *in silico* PBPK modelovanja.

### **3. EKSPERIMENTALNI DEO**

### 3.1. Materijali

Za izradu praškova čvrstih lipidnih mikročestica korišćene su dve lipidne komponente: glicerildibehenat (Compritol<sup>®</sup> ATO 888, Gattefosse', Francuska) i steirilalkohol (Ph. Eur.), surfaktant poloksamer 188 (Kolliphor<sup>®</sup> P188, BASF, Nemačka) i trehaloza dihidrat (TCI Chemicals, Japan) kao (krio)protektant. Kao model lekovita supstanca korišćen je salbutamol-sulfat (Ph. Eur.). Za izradu fosfatnog pufera pH 7,4 i PBS (pH 7,4), koji su služili kao medijumi za ispitivanje rastvorljivosti i/ili brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz formulacija čvrstih lipidnih mikročestica u prvoj fazi eksperimentalnog rada, korišćeni su: kalijum-dihidrogenfosfat (Carl Roth GmbH, Nemačka), dinatrijum-hidrogenfosfat (Moss-Hemoss, Srbija), natrijum-hidroksid (Sigma Aldrich, Nemačka) natrijum-hlorid (Sigma Aldrich, Nemačka), kalijum-hlorid (Merck, SAD) i surfaktanti polisorbitat 80 (Tween<sup>®</sup> 80, Fisher Scientific, Velika Britanija) i SLS (Merck, SAD). Za izradu mobilne faze, korišćeni su: acetonitril (HPLC stepen čistoće, Sigma Aldrich, SAD) i amonijum-acetat (Analytika Ltd., Češka republika).

U drugoj fazi, za izradu PBS pufera (pH 7,4), koji je služio kao medijum za ispitivanje brzine rastvaranja salbutamol-sulfata, korišćeni su: kalijum-dihidrogenfosfat (A.C.E.F., Italija), dinatrijum-hidrogenfosfat (Alfa Aesar, SAD), natrijum-hlorid (A.C.E.F., Italija) i kalijum-hlorid (A.C.E.F., Italija). Za ispitivanje aerodinamičkih karakteristika praškova čvrstih lipidnih mikročestica korišćene su kapsule od hidroksipropilmetilceluloze (hipromeloze, HPMC) veličine 3 (Capsugel<sup>®</sup> Vcaps<sup>®</sup> Plus DPI, Lonza Capsule Delivery Solutions, Francuska) i RS01<sup>®</sup> inhalator za praškove za inhalaciju (protok 60 L/min, Plastiap<sup>®</sup> S.p.a., Italija). Pored toga, za izradu mobilne faze, korišćeni su diamonijum-hidrogenfosfat (Merck, SAD) i fosforna kiselina, 85% (VWR Radnor, SAD). Polisorbitat 20 (Tween<sup>®</sup> 20, VWR Radnor, SAD) korišćen je za oblaganje NGI faza, a polisorbitat 80 (Tween<sup>®</sup> 80, VWR Radnor, SAD) kao sastavni deo rastvarača za sakupljanje praška čvrstih lipidnih mikročestica iz delova NGI uređaja nakon aktivacije inhalatora i, zajedno sa PBS puferom (pH 7,4), kao sastavni deo medijuma za potapanje celuloznih membrana (0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemačka) pre njihovog korišćenja za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance u Francovim difuzionim ćelijama. Svi ostali korišćeni rastvarači i reagensi su bili odgovarajućeg stepena analitičke čistoće i nabavljeni od komercijalnih dobavljača. Visoko prečišćena voda dobijena je procesom reverzne osmoze (MilliQ<sup>®</sup>, Merck Millipore, SAD).

U trećoj fazi je za pripremu fosfatnog pufera mobilne faze korišćen diamonijum-hidrogenfosfat (J.T Baker, Holandija) i fosforna kiselina, 85% (Merck, SAD). Za ispitivanje aerodinamičkih karakteristika praškova korišćene su HPMC kapsule veličine 3 (Capsugel<sup>®</sup> Vcaps<sup>®</sup> Plus DPI, Lonza Capsule Delivery Solutions, Francuska) i RS01<sup>®</sup> inhalator za praškove za inhalaciju (protok 60 L/min, Plastiap<sup>®</sup> S.p.a., Italija). Svi ostali korišćeni rastvarači i reagensi su bili odgovarajućeg stepena analitičke čistoće i nabavljeni od komercijalnih dobavljača. Visoko prečišćena voda dobijena je procesom reverzne osmoze pomoću sistema za prečišćavanje vode (TKA, Nemačka).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Formulacija i karakterizacija čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem ili sušenjem smrzavanjem

Prva faza istraživanja odnosila se na razvoj formulacije suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi i izabrana je adekvatna metoda sušenja suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica za dobijanje praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica. Suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica su pripremljene metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa metodom sušenja raspršivanjem ili sušenja smrzavanjem kako bi se dobili praškovi čvrstih lipidnih mikročestica. Izrađeni praškovi čvrstih lipidnih mikročestica su okarakterisani u pogledu geometrijske veličine i raspodele veličine mikročestica, morfologije mikročestica, stvarne gustine praškova, protočnosti praškova, udela salbutamol-sulfata i *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz čvrstih lipidnih mikročestica.

#### 3.2.1.1. Izrada praškova čvrstih lipidnih mikročestica

Suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica su izrađene metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi, a nakon toga je za uklanjanje vode korišćena metoda sušenja raspršivanjem ili sušenja smrzavanjem. Smeša lipida (glicerildibehenat ili stearylalkohol) i salbutamol-sulfata je grejana na magnetnoj mešalici na oko 10-15 °C iznad temperature topljenja lipidnih ekscipijenasa (odnosno, na 90 °C u slučaju glicerildibehenata i 70 °C u slučaju stearylalkohola), kako bi došlo do topljenja masne faze. Poloksamer 188 i prečišćena voda su zagrejani na temperaturu sličnu temperaturi masne faze. Topla vodena faza je postepeno, konstantnom brzinom, dodavana masnoj fazi pomoću peristaltičke pumpe kako bi se obrazovala emulzija. Nakon toga su, uz nastavljeno zagrevanje na magnetnoj mešalici, dobijene emulzije podvrgnute homogenizaciji (na 13400 obr/min) pomoću rotor-stator homogenizatora (Ultra-Turrax T-25, IKA-Werk, Nemačka) u trajanju od 2 ili 8 min. Dobijene emulzije su zatim hladene mešanjem na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi, pri čemu su sa očvršćavanjem lipida nastale suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica. Zatim je vršeno „pranje“ suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica dodatkom rastvora poloksamera 188 u prečišćenoj vodi (0,40% (*m/V*)) dva puta i centrifugiranjem (Centric 322B, Tehtnika®, Slovenija) na 4000 obr/min u trajanju od 15 min, kako bi se uklonio višak salbutamol-sulfata koji se nije inkorporirao u lipidni matriks. Na kraju je u suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica dodat rastvor trehaloze u prečišćenoj vodi (15% (*m/V*)) u odnosu 50:50 (suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica : rastvor trehaloze), kao krioprotektanta pre procesa sušenja smrzavanjem. Suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica su zatim sušene smrzavanjem u liofilizatoru (Free Zone Stoppering Tray Dryer, Labconco Corporation, SAD) ili u uređaju za sušenje raspršivanjem (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Büchi Laboratory-Technique, Švajcarska).

Za proces sušenja smrzavanjem, suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica su najpre smrzavane na temperaturi od -70 °C, a potom sušene u liofilizatoru na temperaturi od -20 °C i pritisku od 3 mbar u trajanju od 24 h. Parametri za sušenje raspršivanjem su bili sledeći: prečnik raspršivača 0,7 mm; ulazna temperatura 70-100 °C (u zavisnosti od vrste lipidne komponente); izlazna temperatura 38-50 °C (u zavisnosti od ulazne temperature); brzina aspiratora 100%; brzina pumpe 0,35 mL/min i brzina vazduha za raspršivanje 670 L/h. U Tabeli 3.1 prikazan je sastav izrađenih formulacija u prvoj fazi, kao i procesni parametri koji su korišćeni za njihovu izradu.

**Tabela 3.1.** Sastav izrađenih formulacija u prvoj fazi i procesni parametri korišćeni za njihovu izradu

Formulacija	Tip lipidne komponente	Lipid (%) <sup>*</sup>	Poloksamer 188 (%) <sup>*</sup>	SS (%) <sup>*</sup>	Vreme homogenizacije (min)	Brzina homogenizacije (obr/min)	Metoda sušenja
P1/S1	GB	5,00	0,40	1,00	2,00	13400	SL/SR
P2/S2	GB	5,00	1,50	1,00	2,00	13400	SL/SR
P3/S3	GB	5,00	0,40	1,00	8,00	13400	SL/SR
P4/S4	GB	5,00	1,50	1,00	8,00	13400	SL/SR
P5/S5	SA	5,00	0,40	1,00	2,00	13400	SL/SR
P6/S6	SA	5,00	1,50	1,00	2,00	13400	SL/SR
P7/S7	SA	5,00	0,40	1,00	8,00	13400	SL
P8/S8	SA	5,00	1,50	1,00	8,00	13400	SL

<sup>\*</sup>Označava procenat u odnosu na ukupnu masu emulzije (*m/m*); GB – glicehidibehenat, SA – stearilalkohol, SS – salbutamol-sulfat, SL – sušenje smrzavanjem (liofilizacija), SR – sušenje raspršivanjem

### 3.2.1.2. Raspodela veličine čvrstih lipidnih mikročestica

Raspodela veličine čvrstih lipidnih mikročestica je određena metodom koja se zasniva na principu difrakcije laserske svetlosti, na uređaju *Malvern Mastersizer 2000* (Malvern Panalytical Ltd., Velika Britanija), korišćenjem jedinice za dispergovanje suvih čestica u vazduhu (*Malvern Scirocco 2000 dry powder feeder*, Malvern Panalytical Ltd., Velika Britanija), pod pritiskom od 4 bar. Rezultati podrazumevaju srednje vrednosti tri merenja i izraženi su kao: medijana prečnika zapreminske raspodele  $d_{v50}$  ( $\mu\text{m}$ ), koji ukazuje da je 50% čestica manje od te vrednosti; prečnici  $d_{v10}$  ( $\mu\text{m}$ ) i  $d_{v90}$  ( $\mu\text{m}$ ), koji ukazuju da je 10%, odnosno 90% čestica u uzorku manje od tih vrednosti; zapreminski srednji prečnik  $D_{[4,3]}$  koji predstavlja srednju vrednost prečnika svih čestica; *span* vrednost, kao mera širine raspodele čestica, koji se računa na osnovu jednačine 5:

$$\text{span} = \frac{d_{v90} - d_{v10}}{d_{v50}} \quad (5)$$

### 3.2.1.3. Stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica

Stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica je određena pomoću helijumskog piknometra (AccuPyc II 1340, Micromeritics Instrument Corporation, SAD). Ova metoda se zasniva na ispitivanju uzorka poznate mase, koji se prenosi u mernu ćeliju poznate zapremine. Nakon toga, u uslovima vakuuma, uvodi se helijum u hermetički zatvoreni sistem, koji penetrira u otvorene pore uzorka i zauzima celu zapreminu merne ćelije. Na osnovu razlike zapremine merne jedinice koju helijum zauzima kada je prazna i kada je sa uzorkom, kao i poznate mase uzorka, određuje se stvarna gustina uzorka, koja se izražava u  $\text{g/cm}^3$ . Uzorci su analizirani u triplikatu.

### 3.2.1.4. Nasipna i tapkana gustina praškova

Prethodno izmerena masa praška čvrstih lipidnih mikročestica (1,00 g) je sipana u menzuru zapremine 10 mL, i očitana je zapremina koju ova masa uzorka zauzima (nasipna zapremina). Nasipna gustina izračunata je kao količnik mase i nasipne zapremine uzorka. Tapkana gustina je izračunata kao

količnik mase uzorka i zapremine koju zauzima uzorak nakon tapkanja pomoću uređaja *Stampf volumeter STAV2003* (J. Engelsmann AG, Nemačka), do postizanja konačne zapremine (1250 udaraca).

Porozitet praškova čvrstih lipidnih mikročestica izračunat je na osnovu nasipne i stvarne gustine, pomoću jednačine 6:

$$\text{Porozitet (\%)} = 1 - \left( \frac{\text{nasipna gustina}}{\text{stvarna gustina}} \right) \quad (6)$$

### 3.2.1.5. Protočnost praškova

Protočnost praškova indirektnom metodom je određena na osnovu vrednosti *Hausner*-ovog odnosa i indeksa kompresibilnosti (*Carr*-ov indeks), i klasifikovana je na osnovu Tabele 3.2, preuzete iz Ph. Eur. 10.0. *Hausner*-ov odnos i indeks kompresibilnosti su izračunati primenom jednačina 7 i 8 (Ph. Eur. 10.0):

$$\text{Hausner-ov odnos} = \frac{\text{tapkana gustina}}{\text{nasipna gustina}} \quad (7)$$

$$\text{Carr-ov indeks (\%)} = 100 \times \frac{\text{tapkana gustina} - \text{nasipna gustina}}{\text{tapkana gustina}} \quad (8)$$

**Tabela 3.2.** Veza između Carr-ovog indeksa, Hausnerov-og odnosa i protočnosti materijala

Carr-ov indeks (%)	Protočnost	Hausner-ov odnos
1-10	odlična	1,00-1,11
11-15	dobra	1,12-1,18
16-20	prosečna	1,19-1,25
21-25	prihvatljiva	1,26-1,34
26-31	loša	1,35-1,45
32-37	jako loša	1,46-1,59
> 38	izuzetno loša	> 1,60

### 3.2.1.6. Morfologija čvrstih lipidnih mikročestica

Za analizu oblika i morfologije čvrstih lipidnih mikročestica korišćena je metoda skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) (Sigma HD, Carl Zeiss, Nemačka). Uzorci praškova su fiksirani pomoću karbonskog adheziva na aluminijumski držač i ubačeni u komoru za analizu. SEM analize su rađene u uslovima visokog vakuuma, pod naponom od 1,0 kV. Slikanje je vršeno na različitim, slučajno odabranim lokacijama, koristeći različita uvećanja.

### 3.2.1.7. In vitro ispitivanje aerodinamičkih svojstava praškova čvrstih lipidnih mikročestica

*In vitro* ispitivanje aerodinamičkih svojstava je obuhvatilo ispitivanja odabranih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica u impaktoru za brzu analizu (FSI). FSI analizom (Copley Scientific, UK) su određene vrednosti FPF i EF ispitivanih formulacija, kako bi se preliminarno utvrdilo da li se ove formulacije mogu potencijalno koristiti kao praškovi za inhalaciju.

Analizom u FSI uređaju se čestice praška za inhalaciju, koje se oslobode iz inhalatora dele na dve frakcije, krupnu i sitnu (čestice sa aerodinamičkim dijametrom manjim od 5 μm). U sklopu FSI uređaja

(Slika 3.1), nalazi se tzv. deo za sakupljanje krupne frakcije (engl. *Coarse Fraction Collector*, CFC) sa umetkom čija je granična tj. *cut-off* vrednost prečnika 5  $\mu\text{m}$  pri protoku vazduha od 60 L/min. Čestice koje se ne zadrže na CFC delu, produžavaju kretanje uz pomoć struje vazduha i deponuju se na filteru, koji je u sklopu dela za skupljanje sitne frakcije čestica (eng. *Fine Fraction Collector*, FFC). FSI uređaj je povezan sa VP1000 vakuum pumpom (Erweka GmbH, Nemačka) preko TPK uređaja za kontrolu protoka vazduha (*Critical Flow Controller TPK*, Copley Scientific, UK). Protok vazduha od 60 L/min podešen je pomoću uređaja *DFM 2000 Flow Meter* (Copley Scientific, UK).

U CFC deo je pre početka ispitivanja stavljeno 10 mL smeše metanol/voda (50:50 (V/V)), a potom je FSI uređaj sklopljen i povezan sa vakuum pumpom. Tačno izmerena masa ( $20 \pm 0,5$  mg) praškova čvrstih lipidnih mikročestica je punjena u HPMC kapsule veličine 3. Napunjene kapsule su zatim pozicionirane u RS01<sup>®</sup> inhalator, a onda je inhalator postavljan na FSI uređaj pomoću gumenog adaptera, pri čemu su kapsule probušene pre početka ispitivanja. Ispitivanje je vršeno pri protoku vazduha od 60 L/min u trajanju od 4 s, kako bi se oponašala brzina i dužina trajanja udaha pacijenta. Masa A/E staklenog filtera (76 mm, Pall Corporation, SAD), koji je postavljan na FFC je merena na analitičkoj vagi pre i posle zadnje aktivacije inhalatora, kako bi se odredila masa praška (gravimetrijski) koja se deponovala na FFC. Izmereni/izračunati su sledeći parametri: doza (u mg) emitovanog (oslobođenog) praška (engl. *Emitted Dose*, ED), koja predstavlja masu praška koja je izašla iz inhalatora; EF, koja predstavlja odnos ED u odnosu na nominalnu (početnu) masu praška koja je punjena u kapsule; doza (u mg) sitnih čestica praška (FPD), koja predstavlja masu praška čestica manjih od 5  $\mu\text{m}$ , koji se deponovao na FFC filteru; doza (u %) sitnih čestica praška (FPF), koja je izračunata kao odnos FPD i ED.



**Slika 3.1.** *In vitro* ispitivanje aerodinamičkih svojstava praškova čvrstih lipidnih mikročestica u impaktoru za brzu analizu (FSI)

### 3.2.1.8. Eksperimentalni dizajn

Eksperimentalni dizajn je u prvoj fazi podrazumevao izvođenje skrining studije, koja je sprovedena pomoću softvera *Design Expert*<sup>®</sup> (verzija 7.0.0, Stat-Ease Inc., SAD). Skrining studija je izvedena prema tzv. frakcionom faktorijalnom dizajnu, po kome se sprovodi samo deo eksperimenata, za razliku od punog faktorskog eksperimentalnog dizajna. Ispitivan je uticaj četiri parametra, od kojih su dva procesna parametra (vreme homogenizacije i metoda sušenja) i dva faktora formulacije (vrsta lipidne komponente i udeo (%) surfaktanta poloksamera 188), na funkcionalne karakteristike dobijenih praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Cilj skrining studije je bio utvrđivanje faktora koji imaju značajan uticaj na ispitivane funkcionalne karakteristike praškova (veličina i raspodela veličine čvrstih lipidnih mikročestica, nasipna i tapkana gustina, protočnost praškova, FPF). Ispitivani parametri su podešeni u

skladu sa  $2^{5-1}$  frakcionim faktorijskim dizajnom rezolucije V, što znači da su četiri procesne promenljive varirane na dva nivoa, te je sprovedeno ukupno 16 eksperimenata (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3.** Shema dizajna eksperimenata

	Vrsta lipida		Udeo poloksamera		Vreme homogenizacije		Metoda sušenja	
	Realno	Kodirano	Realno (%)	Kodirano	Realno (min)	Kodirano	Realno	Kodirano
1.	GB	+1	0,40	-1	2	-1	SL/SR	-1/+1
2.	GB	+1	1,50	+1	2	-1	SL/SR	-1/+1
3.	GB	+1	0,40	-1	8	+1	SL/SR	-1/+1
4.	GB	+1	1,50	+1	8	+1	SL/SR	-1/+1
5.	SA	-1	0,40	-1	2	-1	SL/SR	-1/+1
6.	SA	-1	1,50	+1	2	-1	SL/SR	-1/+1
7.	SA	-1	0,40	-1	8	+1	SL/SR	-1/+1
8.	SA	-1	1,50	+1	8	+1	SL/SR	-1/+1

GB – glicehildibehenat, SA – stearylalkohol, SL – sušenje smrzanjem (liofilizacija), SR – sušenje raspršivanjem

Analiza varijanse (ANOVA) je korišćena za statističku obradu rezultata i utvrđivanje značajnosti ( $p$  vrednost  $< 0,05$ ) uticaja pojedinačnih faktora i njihovih interakcija na ispitivane funkcionalne karakteristike praškova čvrstih lipidnih mikročestica.

### 3.2.1.9. Analitička metoda za određivanje koncentracije salbutamol-sulfata: Tečna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom

Određivanje koncentracije salbutamol-sulfata u ovoj fazi eksperimentalnog rada vršeno je metodom tečne hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (engl. *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*, LC/MS) pomoću masenog spektrometra, opremljenog elektrosprej jonizacionim izvorom (engl. *Heated electrospray ionization source*) (TSQ Quantum™ Access MAX Triple Quadrupole, Thermo Scientific™, SAD). Ispitivanje je izvršeno na koloni Zorbax SB-CN (150 × 4,6 mm, 5 μm), pri čemu je temperatura kolone podešena na 30 °C. Korišćena je mobilna faza, koju su činili acetonitril i 20 mM rastvor amonijum-acetata u odnosu 20:80 (V/V), pri protoku od 0,5 mL/min. Za detekciju salbutamol-sulfata korišćen je maseni detektor (masena tranzicija: 240 → 148).

### 3.2.1.10. Udeo salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica

Udeo salbutamol-sulfata u uzorcima praškova čvrstih lipidnih mikročestica je određen tako što je tačno izmerena masa čvrstih lipidnih mikročestica ( $20,00 \pm 0,05$  mg) preneti u normalni sud i postavljena na zagrejanu magnetnu mešalicu (90 °C), da bi došlo do topljenja lipida. Nakon toga, normalni sud je dopunjen zagrejanim fosfatnim puferom (pH 7,4) i postavljen u ultrazvučno vodeno kupatilo (Sonorex Super, Bandelin, Nemačka) kako bi došlo do rastvaranja salbutamol-sulfata. Uzorci su zatim profiltrirani (0,45 μm), a koncentracija salbutamol-sulfata u uzorcima je određena pomoću LC/MS metode opisane u poglavlju 3.2.1.9. Ispitivanje je vršeno u triplicatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost (SV) ± standardna devijacija (SD). Udeo salbutamol-sulfata u uzorcima praškova čvrstih lipidnih mikročestica je izračunat na osnovu jednačine 9 (Scalia i sar., 2015):

$$\text{udeo (\%)} = \frac{\text{Masa salbutamol-sulfata određena u uzorcima (mg)}}{\text{Ukupna masa uzorka (mg)}} \times 100 \quad (9)$$



### 3.2.1.11. Ispitivanje rastvorljivosti salbutamol-sulfata

Rastvorljivost salbutamol-sulfata ispitana je u sledećim medijumima: fosfatnom puferu pH 7,4, PBS-u (pH 7,4), 0,1% i 0,5% (*m/V*) rastvoru polisorbata 80 u fosfatnom puferu pH 7,4 i i 0,5% (*m/V*) rastvoru SLS-a u PBS-u. Najpre je odmerena masa salbutamol-sulfata ( $1,2 \pm 0,0005$  g) prenetu u bočice. U bočice je zatim dodato po 3 mL medijuma, kako bi se dobio prezasićeni rastvor salbutamol-sulfata, imajući u vidu da je u pitanju visoko rastvorljiva lekovita supstanca. Bočice su postavljene na laboratorijski šejker (Grant LSB 18, Velika Britanija) i fiksirane pomoću opruga. Mešanje je vršeno na pokretnoj platformi tokom 72 h, brzinom od 75 obr/min, na temperaturi od  $37 \pm 0,5$  °C. Nakon 72 h, suspenzije su istaložene, supernatanti su izdvojeni odlivanjem i profiltrirani ( $0,45 \mu\text{m}$ ). Koncentracija salbutamol-sulfata određena je LC/MS metodom opisanom u poglavlju 3.2.1.9. Ispitivanje je rađeno u duplikatu.

### 3.2.1.12. Ispitivanje *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica

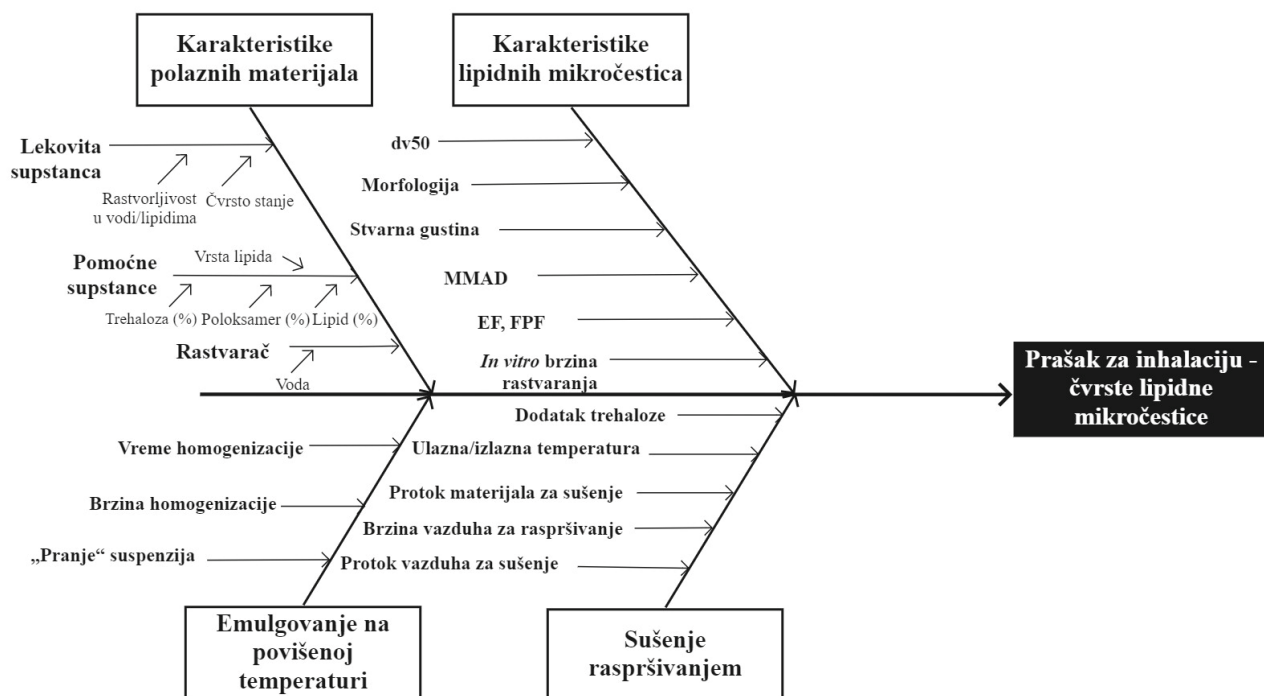
Ispitivanje *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz odabranih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica (P2, P3, P5, P6) je sprovedeno u hemijskoj čaši, na laboratorijskom šejkeru sa vodenim kupatilom (Grant LSB 18, Velika Britanija), pri brzini od 50 obr/min i temperaturi od  $37 \pm 0,5$  °C, koristeći 10 mL fosfatnog pufera pH 7,4, kao i u 10 mL fosfatnog pufera pH 7,4 uz dodatak 0,1% (*m/V*) polisorbata 80 kao medijuma za ispitivanje. Ova zapremina medijuma je korišćena kako bi se simulirala mala zapremina plućne tečnosti (Velaga i sar., 2018), dok je polisorbit 80 dodat u medijum kako bi se ispitaio uticaj surfaktanta (simulira uticaj fiziološkog surfaktanta) na brzinu rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Ispitivanje je paralelno izvedeno sa čistim salbutamol-sulfatom u obliku praška. U ispitivanju je korišćena masa uzorka od  $40 \pm 0,5$  mg (za čvrste lipidne mikročestice), odnosno 10 mg (za čist prašak salbutamol-sulfata). U unapred definisanim vremenskim intervalima tokom 180 min uzorkovano je po 1 mL medijuma, pri čemu je vršena nadoknada istom zapreminom zagrejanog medijuma. Uzorci su potom filtrirani ( $0,45 \mu\text{m}$ ) i po potrebi razblaženi, a kumulativna koncentracija rastvorenog salbutamol-sulfata određena je LC/MS metodom opisanom u poglavlju 3.2.1.9. Rezultati su izraženi kao procenat rastvorenog salbutamol-sulfata (u odnosu na polaznu količinu u uzorku) za određeno vreme, koji je izračunat na osnovu eksperimentalno određenog udela salbutamol-sulfata. Ispitivanja su vršena u duplikatu/triplikatu, a rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ .

### **3.2.2. Formulacija i karakterizacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih procesom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem**

Praškovi čvrstih lipidnih mikročestica su u ovoj fazi pripremljeni metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa metodom sušenja raspršivanjem. Formulacije praškova čvrstih lipidnih mikročestica su izrađene korišćenjem lipidnih komponenti glicerildibehenata ili stearylalkohola, surfaktanta poloksamera 188, trehaloze kao protektanta i model lekovite supstance, salbutamol-sulfata. Zatim je ispitan uticaj parametara procesa emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem na farmaceutsko-tehnološke i funkcionalne karakteristike praškova za inhalaciju primenom QbD pristupa. Odnosno, u ovoj fazi eksperimentalnog rada, identifikovani su i optimizovani potencijalni CMA i CPP tako da se dobije prašak za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica sa CQA karakteristikama definisanim u QTTP, tačnije prašak za inhalaciju koji poseduje odgovarajuće aerodinamičke karakteristike uz istovremenu modifikaciju brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz čvrstih lipidnih mikročestica. Svojstva praškova čvrstih lipidnih mikročestica koja su ispitana obuhvatila su: raspodelu veličine mikročestica, morfologiju mikročestica, stvarnu gustinu praškova, nasipnu i tapkanu gustinu, protočnost, aerodinamičke karakteristike, udeo i brzinu rastvaranja salbutamol-sulfata iz čvrstih lipidnih mikročestica. Pored toga, sprovedena je i karakterizacija čvrstog stanja odabranih uzoraka.

#### **3.2.2.1. Koncept dizajniranja kvaliteta (QbD pristup) u razvoju praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica**

U skladu sa principima dizajniranja kvaliteta u farmaceutskom razvoju proizvoda (QbD pristupom), definisan je QTTP, tako da ciljani proizvod- prašak za inhalaciju pokazuje odgovarajuće aerodinamičke karakteristike, uz istovremenu modifikaciju brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Najpre je konstruisan *Ishikawa* dijagram, kako bi se identifikovali parametri koji utiču na kvalitet praška za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica. *Ishikawa* dijagram je konstruisan po ugledu na studiju koju su objavili Buttini i sar. (2018), uzimajući u obzir proces emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa procesom sušenja raspršivanjem za dobijanje praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica (Slika 3.2).



**Slika 3.2.** Ishikawa dijagram, na kome su prikazani parametri koji mogu potencijalno da utiču na kvalitet praška za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica

Realizacija QTTP, koji je prikazan u Tabeli 3.4, postiže se formulacijom praška za inhalaciju koji će pokazivati karakteristike u skladu sa unapred definisanim CQA. FPF je najbitnija karakteristika za procenu performansi praškova za inhalaciju i predstavlja, kao što je već objašnjeno, deo isporučene doze praška čiji je prečnik čestica manji od 5  $\mu\text{m}$ . EF je takođe značajan CQA, koji je neophodno uzeti u obzir, jer ukazuje na procenat leka koji je dostupan za inhalaciju pacijentu (Buttini i sar., 2016). Takođe, MMAD i GSD, zajedno sa FPF i EF, su karakteristike koje utiču na depoziciju praška za inhalaciju u plućima i njegovu efikasnost. Pored toga, kao CQA definisana je i modifikovana (produžena) brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova za inhalaciju jer bi ovakva formulacija potencijalno mogla da poboljša komplijansu pacijenata u terapiji astme i smanji učestalost „noćnih“ napada astme (Smolensky i sar., 1987; Daman i sar., 2014). Ciljani CQA se postižu identifikacijom i optimizacijom CMA i CPP. Na osnovu prethodne faze eksperimentalnog rada i literaturnih podataka, vreme homogenizacije, brzina homogenizacije i „pranje“ suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica su identifikovani kao potencijalni CPP za proces emulgovanja na povišenoj temperaturi (Sanna i sar., 2004; Mezzena i sar., 2009; Scalia i sar., 2012; Scalia i sar., 2013a), dok su temperatura i brzina vazduha za raspršivanje identifikovani kao ključni CPP za proces sušenja raspršivanjem (Slike 1.4 i 3.2, Tabela 3.4). Vrsta i udeo lipidne komponente, udeo surfaktanta (poloksamera 188) i dodatak trehaloze su izabrani kao potencijalni CMA. Uticaj dodatka trehaloze je takođe ispitan, budući da je pokazano da se ugljeni-hidrati uspešno koriste kao (krio)protektanti, ne samo za proces sušenja smrzanjem, već i sušenja raspršivanjem suspenzija čvrstih lipidnih nanočestica (Freitas i Müller, 1998). Pored toga, ispitan je i uticaj efekat „pranja“ na finalne karakteristike praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Definisani QTTP, CQA i potencijalni CMA i CPP su prikazani u Tabeli 3.4, zajedno sa zadatim ciljevima i odgovarajućim objašnjenjima, a definisani su na osnovu studije koju su objavili Pallagi i sar. (2016) i rezultata prve faze eksperimentalnog rada.

**Tabela 3.4.** QTTP za prašak za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, sa detaljnim objašnjenjima za CQA, CMA i CPP

Karakteristika	Cilj	Opravdanje/objašnjenje
<b>QTTP</b>		
Farmaceutski oblik	Prašak za inhalaciju	Formulacije praškova su stabilne, ekološki prihvatljive i lake za primenu.
Aerodinamičke karakteristike praškova za inhalaciju	Prašak koji se lako raspršuje, uz odgovarajuću FPF	Ciljane aerodinamičke karakteristike, kao što su MMAD, FPF, EF itd. su neophodne za adekvatnu depoziciju i efikasnost praškova za inhalaciju.
Profil <i>in vitro</i> brzine rastvaranja lekovite supstance	Modifikovana brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica	Modifikovano oslobađanje salbutamol-sulfata je poželjno kako bi se poboljšala komplijansa pacijenata u terapiji astme, usled smanjenja učestalosti doziranja i održavanja koncentracije salbutamol-sulfata u plazmi i tokom noći.
<b>CQA</b>		
Geometrijska veličina čvrstih lipidnih mikročestica	$\leq 6 \mu\text{m}$	Geometrijski prečnik $\leq 6 \mu\text{m}$ je neophodan za praškove za inhalaciju, osim u slučaju velikih poroznih mikročestica (Abdelazis i sar., 2018).
Morfologija mikročestica	Porozne, sferne mikročestice	Visoka poroznost mikročestica je poželjna jer može da doprinese većoj FPF vrednosti.
Stvarna gustina	Niska ( $\leq 1 \text{ g/cm}^3$ )	Niska gustina je poželjna jer može da doprinese većoj FPF vrednosti.
Aerodinamičke karakteristike	MMAD između 1 i 5 $\mu\text{m}$	Optimalni aerodinamički prečnik čestica je jedan od najbitnijih CQA praškova za inhalaciju i neophodna je karakteristika za adekvatnu depoziciju praška u plućima. Aerodinamički prečnik čestica bi trebalo da bude između 1 i 5 $\mu\text{m}$ za optimalnu isporuku leka u pluća (Simon i sar., 2016). EF i FPF bi trebalo da budu što veće kako bi se postigla adekvatna efikasnost i ostvarilo dejstvo leka.
	EF	
	FPF	
<i>In vitro</i> brzina rastvaranja lekovite supstance	Modifikovana brzina rastvaranja salbutamol-sulfata (%) iz formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica u poređenju sa čistim salbutamol-sulfatom	Modifikovana brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica, koja je određena parametrima (kao što su %DE <sub>15</sub> <sup>*</sup> , %DE <sub>30</sub> <sup>*</sup> , %DE <sub>120</sub> <sup>*</sup> ), koji opisuju brzinu rastvaranja lekovite supstance.
<b>Potencijalni CMA</b>		

Vrsta i udeo lipidne komponente		Optimalan izbor udela i vrste lipidne komponente, koja će obezbediti mikročestice sa dovoljnim udelom salbutamol-sulfata, ali i porozne mikročestice male gustine, sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata i adekvatnom stabilnošću praška za inhalaciju	Lipidne komponente imaju različitu efikasnost za inkapsulaciju lekovitih supstanci, u zavisnosti od strukture lipida i rastvorljivosti lekovite supstance u lipidnoj komponenti. Poželjno je izabrati lipidnu komponentu sa maksimalnim potencijalom solubilizacije lekovite supstance kako bi se postigao maksimalan nivo inkapsulacije (Scalia i sar., 2015), ali i komponentu sa potencijalom za modifikaciju oslobađanja lekovite supstance. S obzirom na to da su lipidi podložni modifikacijama strukture i polimorfnim prelazima, neophodno je uzeti u obzir i tu činjenicu pri odabiru lipidne komponente, kako stabilnost praška za inhalaciju ne bi bila narušena.
Udeo poloksamera 188		Prašak bez aglomerata mikročestica	Udeo surfaktanta može imati uticaj na veličinu i raspodelu veličine mikročestica. Surfaktant može sprečiti i koalescenciju mikročestica u suspenziji. Dodatno, može sprečiti aglomeraciju mikročestica u toku procesa emulgovanja na povišenoj temperaturi.
Dodatak trehaloze		Prašak bez aglomerata mikročestica	Sprečavanje aglomeracije mikročestica u toku procesa sušenja raspršivanjem.
<b>Potencijalni CPP</b>			
Emulgovanje na povišenoj temperaturi	Brzina homogenizacije	Uska i uniformna raspodela veličine mikročestica sa srednjom veličinom mikročestica < 6 μm	Optimalna brzina homogenizacije je kritičan parametar za pripremu homogene pre-suspenzije (13400-17400 obr/min).
	Vreme homogenizacije		Vreme homogenizacije je kritičan parametar za pripremu homogene pre-suspenzije (2-8 min).
„Pranje“ mikročestica		Veličina mikročestica treba da ostane ista kao pre „pranja“, a neinkapsulirana frakcija salbutamol-sulfata treba da bude uklonjena	„Pranje“ mikročestica je rađeno kako bi se uklonio višak salbutamol-sulfata, koji je zaostao na površini mikročestica, odnosno koji nije inkapsuliran u lipidni matriks.
Sušenje raspršivanjem	Brzina vazduha za raspršivanje	Optimalna veličina mikročestica	Različite brzine vazduha za raspršivanje mogu imati veliki uticaj na finalnu veličinu mikročestica.
	Ulazna/izlazna temperatura vazduha	Temperatura sušenja se optimizuje u zavisnosti od temperature topljenja lipidne komponente	Temperatura treba da bude dovoljno visoka da se dobiju suvi (sa niskim % vlage) praškovi, a dovoljno niska da se izbegne topljenje lipida i aglomeracija mikročestica. Utiče i na oblik mikročestica.

\*%DE<sub>15</sub>, %DE<sub>30</sub>, %DE<sub>120</sub> – označava efikasnost brzine rastvaranja u % (engl. *Dissolution Efficiency, DE*) nakon 15, 30 i 120 min, redom

Na osnovu definisanog QTTP praška za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica (Tabela 3.4), i nakon definisanja CQA, izvršena je analiza rizika u cilju utvrđivanja potencijalnih CMA i CPP, a potom je na osnovu odgovarajućih varijacija u formulacionim faktorima i procesnim parametrima procenjena statistička značajnost njihovog uticaja na CQA metodama opisanim u poglavlju 3.2.2.8.

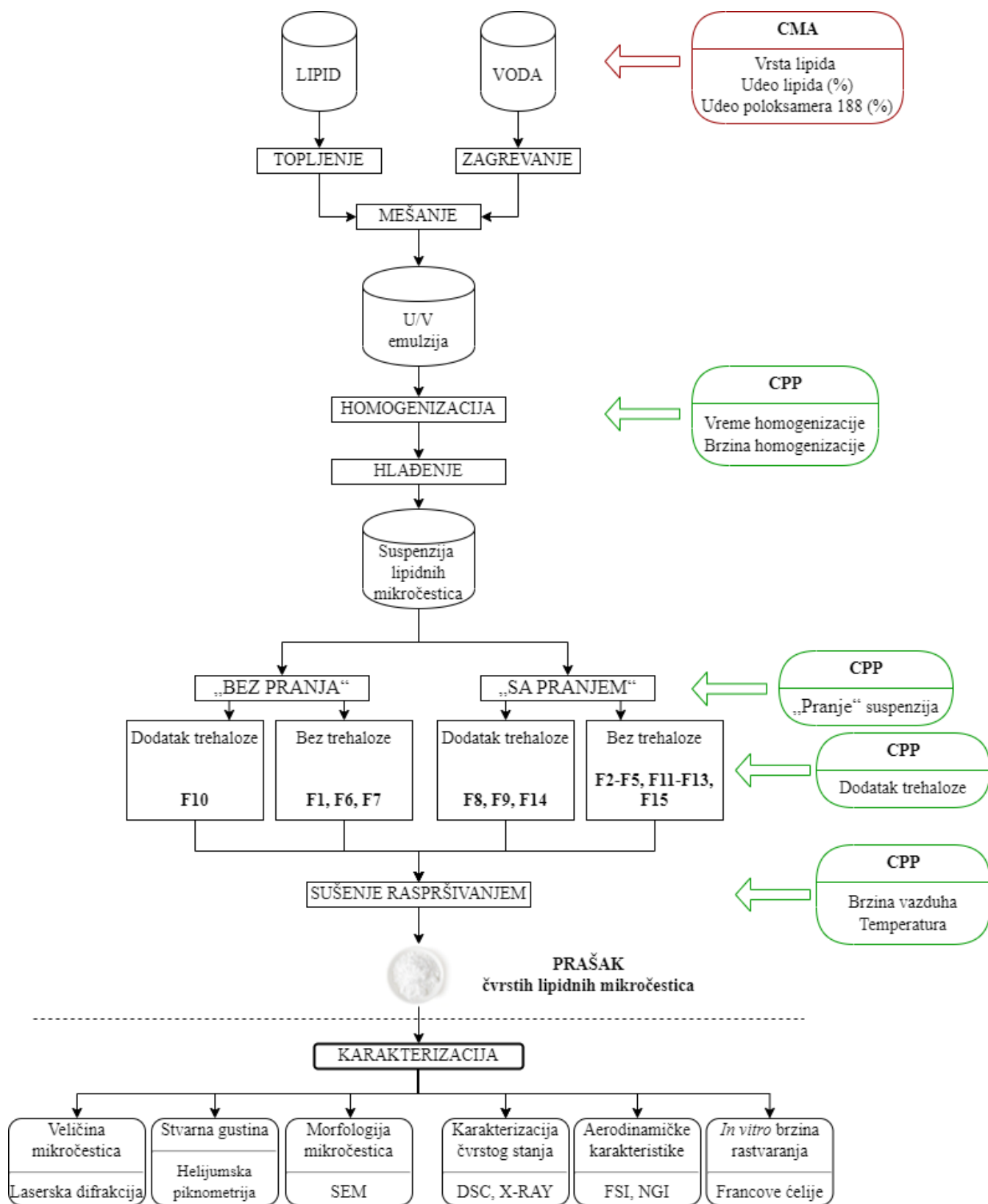
### **3.2.2.2. Izrada praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem**

Suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica su izrađene metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi, a nakon toga je za uklanjanje vode korišćena metoda sušenja raspršivanjem. Smeša lipida (glicerildibehenat ili stearylalkohol) i salbutamol-sulfata je grejana na magnetnoj mešalici na oko 10-15 °C iznad temperature topljenja lipida (odnosno, na 90 °C u slučaju glicerildibehenata i 70 °C u slučaju stearylalkohola), kako bi došlo do topljenja lipidne faze. Poloksamer 188 i prečišćena voda su zagrejani na temperaturu sličnu temperaturi lipidne faze. Topla vodena faza je polako dodavana u lipidnu fazu pomoću peristaltičke pumpe. Nakon toga su, uz nastavljeno zagrevanje na magnetnoj mešalici, dobijene emulzije podvrgnute homogenizaciji (na 13400 ili 17400 obr/min) pomoću rotor-stator homogenizatora (Ultra-Turrax T-25, IKA-Werk, Nemačka) u trajanju od 2 ili 8 min. Dobijene emulzije su zatim hladene mešanjem na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi, pri čemu su sa očvršćavanjem lipida, nastale suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica. Zatim se vršilo „ispiranje“ („pranje“) određenih formulacija suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica dodatkom rastvora poloksamera 188 u prečišćenoj vodi (0,40-1,50% (*m/V*)) dva puta i centrifugiranjem (Universal 32, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Nemačka) na 4000 obr/min u trajanju od 15 min, kako bi se uklonio višak salbutamol-sulfata koji se nije inkorporirao u lipidni matriks. Na kraju je, u određene formulacije suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica, dodavan rastvor trehaloze u prečišćenoj vodi (15% (*m/V*)) u odnosu 60:40 (suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica : rastvor trehaloze) pre početka procesa sušenja raspršivanjem. Suspenzije čvrstih lipidnih mikročestica su zatim sušene u uređaju za sušenje raspršivanjem (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Büchi Laboratory-Technique, Švajcarska). Parametri koji su korišćeni za sušenje raspršivanjem su sledeći: prečnik raspršivača 0,7 mm; ulazna temperatura 60-90 °C (u zavisnosti od vrste lipidne komponente); izlazna temperatura 43-62 °C (u zavisnosti od ulazne temperature); brzina aspiratora 100%; brzina pumpe (protoka materijala za sušenje) 0,35-1,80 mL/min i brzina vazduha za raspršivanje 473-670 L/h. U Tabeli 3.5 prikazan je sastav izrađenih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica, kao i procesni parametri korišćeni za njihovu izradu. Shematski prikaz izrade praškova čvrstih lipidnih mikročestica i njihove karakterizacije dat je na Slici 3.3.

**Tabela 3.5.** Sastav izrađenih formulacija druge faze i procesni parametri korišćeni za njihovu izradu

Formulacija	Tip lipidne komponente	Lipid (%) <sup>*</sup>	Poloksamer 188 (%) <sup>*</sup>	SS (%) <sup>*</sup>	Brzina homogenizacije (obr/min)	Vreme homogenizacije (min)	Ulazna temperatura (°C)	Protok materijala (mL/min)	Brzina vazduha za raspršivanje (L/h)	„Pranje“ <sup>***</sup>
F1	GB	5,00	0,40	1,00	13400	8,00	89	1,80	473	N
F2	GB	5,00	0,40	1,00	13400	8,00	89	1,80	473	P
F3	GB	5,00	0,40	1,00	17400	8,00	89	1,80	473	P
F4	GB	5,00	1,50	1,00	13400	2,00	89	1,80	473	P
F5	GB	5,00	1,50	1,00	13400	2,00	89	0,38	473	P
F6	GB	5,00	1,50	1,00	13400	2,00	89	1,80	473	N
F7	GB	5,00	1,50	1,00	13400	2,00	89	1,80	670	N
F8 <sup>***</sup>	GB	5,00	1,50	2,00	13400	2,00	89	1,80	473	P
F9 <sup>***</sup>	GB	5,00	1,50	2,00	13400	2,00	89	1,80	670	P
F10 <sup>***</sup>	GB	5,00	1,50	1,00	13400	2,00	89	1,80	670	N
F11	GB	5,00	1,50	1,00	13400	2,00	89	1,80	670	P
F12	GB	5,00	1,50	1,00	13400	2,00	80	1,80	670	P
F13	SA	5,00	1,50	1,00	13400	2,00	61	1,80	473	P
F14 <sup>***</sup>	SA	5,00	1,50	1,00	13400	2,00	61	1,80	670	P
F15	SA	5,00	1,50	1,00	13400	2,00	61	1,80	670	P

<sup>\*</sup>Procenat u odnosu na ukupnu masu emulzije (*m/m*); <sup>\*\*</sup>N označava formulacije koje nisu centrifugirane tj. nisu podvignute procesu „pranja“, a P označava formulacije čvrstih lipidnih mikročestica podvignute procesu „pranja“; <sup>\*\*\*</sup>Rastvor trehaloze (20% (*m/V*)) je dodat pre procesa sušenja raspršivanjem u odnosu 60:40 (formulacija : rastvor trehaloze); GB – glicehildibehenat, SA – stearylalkohol, SS – salbutamol-sulfat



**Slika 3.3.** Shematski prikaz procesa izrade praškova čvrstih lipidnih mikročestica u drugoj fazi i njihova karakterizacija



Karakterizacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem obuhvatila je ispitivanja prikazana na Slici 3.3. Ispitivanja veličine i raspodele veličine mikročestica, stvarne, nasipne i tapkane gustine praškova, protočnosti praškova indirektnom metodom, oblika i morfologije čvrstih lipidnih mikročestica sprovedena su pod uslovima opisanim u prvoj fazi eksperimentalnog rada.

### 3.2.2.3. Analitička metoda za određivanje koncentracije salbutamol-sulfata: Tečna hromatografija visokih performansi

Dve različite metode tečne hromatografije visokih performansi (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) korišćene su za kvantifikovanje salbutamol-sulfata u uzorcima dobijenih iz različitih ispitivanja: određivanja udela salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica, ispitivanja aerodinamičkih karakteristika praškova čvrstih lipidnih mikročestica u NGI uređaju i ispitivanja *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica.

#### Metoda 1

Za kvantifikaciju salbutamol-sulfata metodom 1 korišćen je HPLC sistem (LC-10AT, Shimadzu Europe GmbH, Nemačka), koji se sastoji iz pumpe (LC-10AT VP, Shimadzu Europe GmbH, Nemačka), UV-VIS detektora (SPD-10A VP, Shimadzu Europe GmbH, Nemačka) podešenog na talasnu dužinu maksimuma apsorpcije salbutamol-sulfata (276 nm) i autosemplera *Waters 717plus* (Waters Corporation, SAD). Za analizu je izabrana kolona Supelcosil™ LC-SCX (25 cm × 4,6 mm, 5 μm; Sigma-Aldrich, SAD). Mobilna faza se sastojala iz smeše fosfatnog pufera (pH 7,0) i metanola u odnosu 40:60 (V/V) sa protokom od 1,0 mL/min. Fosfatni pufer (pH 7,0) je napravljen rastvaranjem 6,00 g diamonijum-hidrogenfosfata u 1 L visoko prečišćene *MilliQ*® vode, a za podešavanje pH vrednosti do 7,0 korišćena je fosforna kiselina (85%). Održavana je temperatura kolone od 30 °C, a zapremina injektovanog uzorka je iznosila 20 μL.

#### Metoda 2

Kvantifikacija salbutamol-sulfata metodom 2 vršena je pomoću HPLC sistema (Dionex Ultimate 3000, Thermo scientific, Nemačka), koji se sastojao od Dionex Ultimate 3000 kvaternerne pumpe, autosamplera i PDA detektora (podešenog na talasnu dužinu maksimuma apsorpcije salbutamol-sulfata od 276 nm), a izabrana je Zorbax Eclipse™ C18 kolona (4,6 × 150 mm, 5 μm; Agilent Technologies, SAD). Mobilnu fazu je činila smeša fosfatnog pufera (pH 2,8) i metanola u odnosu 80:20 (V/V) sa protokom od 1,0 mL/min. Fosfatni pufer je pripremljen rastvaranjem 2,625 g amonijum-hidrogenfosfata u 100 mL visoko prečišćene vode, a za podešavanje pH vrednosti do pH 2,8 korišćena je fosforna kiselina (85%). Održavana je temperatura kolone od 25 °C, a zapremina injektovanog uzorka je bila 20 μL.

Kompletna validacija metode 2 podrazumevala je sledeća ispitivanja: linearnost, preciznost, tačnost, limit detekcije (engl. *Limit of Detection*, LOD), limit kvantifikacije (engl. *Limit of Quantification*, LOQ), selektivnost i robusnost metode.

Linearnost metode je ispitivana korišćenjem šest rastvora različitih koncentracija dobijenih razblaživanjem standardnog (*Stock*) vodenog rastvora salbutamol-sulfata za izradu kalibracione krive. Linearnost je ispitivana u opsegu 0,125-100 μg/mL.

Preciznost metode je utvrđena ispitivanjima ponovljivosti, srednje preciznosti i preciznosti injektovanja. Za ispitivanje ponovljivosti pripremljeno je šest uzoraka iste formulacije po postupku za

određivanje udela salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica (poglavlje 3.2.2.4). Ovih šest uzoraka (srednje koncentracije salbutamol-sulfata 17,4 µg/mL) je potom injektovano u HPLC uređaj i izračunata je relativna standardna devijacija (RSD). Za srednju preciznost je pripremljeno još šest istih uzoraka (srednje koncentracije salbutamol-sulfata 17,2 µg/mL), koji su analizirani na drugom HPLC uređaju (Agilent1200, Agilent Technologies, SAD) sledećeg dana, od strane drugog analitičara i izračunata je RSD za ukupno 12 ispitivanih uzoraka. Preciznost injektovanja ispitana je injektovanjem istog rastvora 10 puta i računanjem RSD vrednosti.

Tačnost metode je ispitivana na tri uzorka različite koncentracije salbutamol-sulfata (80%, 100% i 120%), koji su pripremljeni dodatkom tri različite zapremine standardnog rastvora salbutamol-sulfata (4, 5 i 6 mL) u tri normalna suda od 50 mL, od kojih je svaki sadržao placebo uzorak, pripremljen postupkom za određivanje udela salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica (poglavlje 3.2.2.4). Nakon dodatka standardnog rastvora, uzorci su dopunjeni do 50 mL fosfatnim puferom, profiltrirani (0,45 µm, filter od celuloznih estara, Carl Roth GmbH, Nemačka) i svaki od njih je injektovan tri puta u HPLC uređaj. Ciljne koncentracije salbutamol-sulfata su bile sledeće: 8 µg/mL (80%), 10 µg/mL (100%) i 12 µg/mL (120%). Računata je *recovery* vrednost za svaku od ovih koncentracija, a onda i odgovarajuće RSD vrednosti.

LOQ određen je na osnovu šest injektovanja rastvora najniže koncentracije, korišćenog za ispitivanje linearnosti (0,125 µg/mL) i određivanjem signal/šum odnosa (engl. *signal-to-noise ratio*), dok je LOD određen na osnovu jednačine 10:

$$\text{LOD} = \frac{\text{LOQ}}{3} \quad (10)$$

Selektivnost metode je određena injektovanjem uzorka placebo formulacije čvrstih lipidnih mikročestica i uzorka formulacije čvrstih lipidnih mikročestica sa salbutamol-sulfatom i poređenjem njihovih hromatograma na retencionom vremenu salbutamol-sulfata (2,8 min).

Robusnost je analizirana malim promenama izabranih parametara metode: temperature kolone (23 °C i 27 °C), protoka mobilne faze (0,95 mL/min i 1,05 mL/min), odnosa fosfatnog pufera (pH 2,8) i metanola u mobilnoj fazi (78:22 i 82:18 (V/V)) i talasne dužine na kojoj je kvantifikovan salbutamol-sulfat (274 nm i 278 nm). Izračunat je procenat promene retencionog vremena i površine pika salbutamol-sulfata u odnosu na optimalne uslove.

Na kraju je urađen transfer HPLC metode 1, tako što su najpre pripremljeni uzorci za određivanje udela salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica (formulacije F7, F9, F10, F11 i F15) na isti način kako je opisano u sledećem poglavlju 3.2.2.4, a zatim je koncentracija salbutamol-sulfata analizirana pomoću obe HPLC metode. Na osnovu određenih koncentracija HPLC metodama 1 i 2, izračunat je udeo salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica. Dve HPLC metode su onda upoređene na osnovu razlike (u procentima) između vrednosti udela salbutamol-sulfata u uzorcima čvrstih lipidnih mikročestica. Transfer HPLC metode 1, razvijene na Katedri za hranu i lekove, Univerziteta u Parmi (Italija) je urađen sa ciljem da se dokaže da koncentracija salbutamol-sulfata može pouzdano biti određena i HPLC metodom 2, koja se primenjivala u laboratoriji na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu.

#### 3.2.2.4. Određivanje udela salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica

Udeo salbutamol-sulfata u uzorcima praškova čvrstih lipidnih mikročestica određen je metodom opisanom u prvoj fazi eksperimentalnog rada (poglavlje 3.2.1.10), samo što je za određivanje udela salbutamol-sulfata u uzorcima korišćena HPLC metoda 1, opisana u prethodnom poglavlju (poglavlje 3.2.2.3).

### 3.2.2.5. *In vitro* ispitivanje aerodinamičkih svojstava praškova čvrstih lipidnih mikročestica

*In vitro* ispitivanje aerodinamičkih svojstava praškova čvrstih lipidnih mikročestica je obuhvatilo FSI i NGI ispitivanja.

FSI analiza je primenjena za one formulacije koje su pokazale srednji geometrijski prečnik čestica manji od 6  $\mu\text{m}$ . Ova analiza je rađena u triplikatu, pod uslovima opisanim u prvoj fazi eksperimentalnog rada (poglavlje 3.2.1.7.).

Formulacije sa najvećim FPF vrednostima, određenim pomoću FSI analize, su analizirane i pomoću NGI uređaja (Copley Scientific, UK) kako bi se utvrdila dodatne aerodinamičke karakteristike praškova, koje ne mogu biti određene pomoću FSI uređaja, a to su MMAD i GSD.

Najpre su delovi tj. posude (faze) NGI i „USP grlo“ uređaja (engl. *USP induction port*) obloženi tankim slojem rastvora 2% (*m/V*) polisorbata 20 u etanolu kako bi se sprečilo odbijanje čestica o delove uređaja. Stakleni filter (82,60 mm, 934-AH, Whatman GE Healthcare, UK) je postavljen u kolektor za najsitnije čestice (engl. *Micro-orifice Collector*, MOC). NGI (Slika 3.4) je potom povezan sa VP1000 vakuum pumpom (Erweka GmbH, Nemačka) preko TPK uređaja za kontrolu protoka vazduha (engl. *Critical Flow Controller TPK*, Copley Scientific, UK). Protok vazduha od 60 L/min podešen je pomoću uređaja *DFM 2000 Flow Meter* (Copley Scientific, UK). Tačno izmerena masa ( $20 \pm 0,5$  mg) praškova čvrstih lipidnih mikročestica je punjena u HPMC kapsule veličine 3. Napunjene kapsule su zatim pozicionirane u RS01<sup>®</sup> inhalator, a onda je inhalator postavljan na NGI uređaj pomoću gumenog adaptera, pri čemu su kapsule probušene pre početka ispitivanja. Ispitivanje je vršeno pri protoku vazduha od 60 L/min u trajanju od 4 s, kako bi se oponašala brzina i dužina trajanja inspiracije pacijenta. Nakon aktivacije tri kapsule svake ispitivane formulacije, količina deponovanog praška je sakupljena ispiranjem svih NGI delova (posude, „USP grlo“ i MOC), inhalatora i gumenog adaptera za inhalator rastvorom 1% (*m/V*) polisorbata 80 u visoko prečišćenoj vodi (prethodno zagrejanom na 70 °C). Uzorci su zatim postavljeni u ultrazvučno kupatilo, kako bi se omogućilo kompletno sakupljanje deponovanog praška. Nakon toga, sadržaj svih posuda pojedinačno i inhalatora prebačen je u posebne normalne sudove, koji su opet postavljeni u zagrejano (90 °C) ultrazvučno kupatilo kako bi se omogućilo kompletno topljenje lipidnog matriksa i rastvaranje salbutamol-sulfata u medijumu. Nakon rastvaranja, normalni sudovi su dopunjeni do crte 1% (*m/V*) vodenim rastvorom polisorbata 80, filtrirani (0,45  $\mu\text{m}$  celuloznoacetatni membranski filtri, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemačka) i analizirani HPLC metodom 1 (opisanom u poglavlju 3.2.2.3). Uzorci su analizirani u triplikatu.

ED je izračunata kao suma količine lekovite supstance koja je deponovana na fazama (posudama) od 1 do 7, „USP grlu“ i u MOC-u, a EF kao odnos ED i ukupne sakupljene količine lekovite supstance, u procentima. MMAD je određen na osnovu linearne zavisnosti između kumulativne mase lekovite supstance (*y*-osa) u odnosu na *cut-off* vrednosti aerodinamičkog prečnika izraženog u  $\mu\text{m}$ , na logaritamskoj skali (*x*-osa). Linearnom regresionom analizom grafički predstavljenih podataka dobijena je jednačina prave, na osnovu koje je za *y* vrednost koja predstavlja 50% procenata kumulativne mase, izračunata nepoznata *x* vrednost prečnika, koja u stvari predstavlja MMAD. FPD je određena kao kumulativna masa lekovite supstance za MMAD < 5  $\mu\text{m}$ , izračunata takođe na osnovu konstruisane jednačine prave. FPF je izračunata kao odnos FPD i ED, u procentima. Pored toga, očitani su  $d_{16}$  i  $d_{84}$ , koji predstavljaju 16. i 84. procenat kumulativne mase i, na osnovu jednačine 11, izračunata je GSD vrednost (USP 44-NF 39).

$$\text{GSD} = \sqrt{\frac{d_{84}}{d_{16}}} \quad (11)$$

MMAD, GSD i FPF su određeni pomoću *KaleidaGraph* softvera (verzija 4.5.2, Sinergy Software, Reading, SAD).



**Slika 3.4.** *In vitro* ispitivanje aerodinamičkih svojstava praškova čvrstih lipidnih mikročestica u impaktoru novije generacije (NGI)

### 3.2.2.6. Karakterizacija čvrstog stanja formulacije čvrstih lipidnih mikročestica, lekovite i pomoćnih supstanci

#### DSC

DSC analiza vršena je u cilju procene fizičkog stanja salbutamol-sulfata i procene eventualnog prisustva proizvoda degradacije, kao i za utvrđivanje eventualno prisutnih polimornih prelaza i modifikacija strukture lipidnih komponenti. Ispitivanje odabranog uzorka praška čvrstih lipidnih mikročestica F7, kao i uzoraka praškova salbutamol-sulfata, poloksamera 188 i glicerildibehenata vršeno je na uređaju DSC 821e STARe system (Mettler Toledo, Švajcarska). Precizno odmereni uzorci (2-4 mg) u aluminijskoj posudi zapremine 40  $\mu\text{L}$  su skenirani pri brzini promene temperature od 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , u temperaturnom intervalu 25-200  $^{\circ}\text{C}$ , pri konstantnom protoku azota od 100 mL/min. Sve analize su rađene najmanje u duplikatu.

#### Difrakcija X-zraka

Difrakcija X-zraka vršena je takođe u cilju dodatne procene fizičkog stanja salbutamol-sulfata i utvrđivanje eventualnih strukturnih modifikacija lipidnih komponenti. Difrakcija X-zraka na uzorcima praška čistog salbutamol-sulfata, poloksamera 188, glicerildibehenata i formulacije F7 je rađena pomoću MiniFlex difraktometra (Rigaku, Japan), korišćenjem Cu K $\alpha$  zračenja (napona od 30 kV i jačine struje od 15 mA), pri brzinama skeniranja od 0,05/2 s i opsegom ugla skeniranja ( $2\theta^{\circ}$ ) od 2 do 50.

### 3.2.2.7. Ispitivanje *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica

Preliminarno *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz dve odabrane formulacije čvrstih lipidnih mikročestica (jedan predstavnik formulacije sa glicerildibehenatom, F11 i jedan sa stearylalkoholom, F15) rađeno je po metodi opisanoj u prvoj fazi (poglavlje 3.1.12), uz razliku

da je masa uzoraka iznosila  $20 \pm 0,5$  mg. Pored toga, analiziran je i prašak čistog salbutamol-sulfata ( $10 \pm 0,5$  mg).

Nakon toga je sprovedeno *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz odabranih uzoraka praškova čvrstih lipidnih mikročestica (F1, F7, F9, F10 i F11), u Francovim difuzionim ćelijama (vertikalne difuzione ćelije, prečnika 4,6 mm, površine  $18 \text{ mm}^2$ ), primenom modifikovane metode opisane u studiji koju su objavili Scalia i sar. (2012). Ispitivani uzorci čvrstih lipidnih mikročestica su odabrani na osnovu rezultata FSI analize kao formulacije koje su pokazale najviše FPF vrednosti. U poređeno sa ispitivanjem brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz formulacija čvrstih lipidnih mikročestica, ispitana je i brzina rastvaranja čistog praška salbutamol-sulfata, kao i brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz fizičke smeše sa glicerildibehenatom, kako bi se utvrdila sposobnost izrađenih formulacija čvrstih lipidnih mikročestica da modifikuju brzinu rastvaranja inkorporirane lekovite supstance. Celuloznoacetatni hidrofилni filteri ( $0,45 \mu\text{m}$ , Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemačka), koji su korišćeni kao membrane, potopljeni su i ostavljeni da stoje 16 h u medijumu za ispitivanje brzine rastvaranja (PBS (pH 7,4) uz dodatak 0,1% (*m/V*) polisorbata 80) pre početka ispitivanja. Akceptorski deo Francovih difuzionih ćelija je napunjen sa 18 mL medijuma, koji je zagrejan na  $37 \pm 0,5$  °C i mešan konstantnom brzinom u toku trajanja ispitivanja. Ova zapremina medijuma je korišćena kako bi se simulirala mala zapremina plućne tečnosti, koja iznosi oko 10-30 mL (Velaga i sar., 2018). Najpre je ispitivana formulacija F7 primenom više setova uslova ispitivanja:

- masa uzorka od 5 mg, medijum PBS (pH 7,4) uz dodatak 0,1% (*m/V*) polisorbata 80;
- masa uzorka od 5 mg, medijum PBS (pH 7,4) uz dodatak 0,5% (*m/V*) polisorbata 80;
- masa uzorka od 15 mg, medijum PBS (pH 7,4) uz dodatak 0,1% (*m/V*) polisorbata 80;
- masa uzorka od 20 mg, medijum PBS (pH 7,4) uz dodatak 0,1% (*m/V*) polisorbata 80;
- masa uzorka od 20 mg, medijum PBS (pH 7,4) uz dodatak 0,5% (*m/V*) polisorbata 80;
- masa uzorka od 20 mg, medijum PBS (pH 7,4).

Nakon definisanja optimalnih uslova ispitivanja, precizno odmerene mase salbutamol-sulfata ( $1,00 \pm 0,05$  mg), fizičke smeše salbutamol-sulfata i gliceridibehenata ( $5,00 \pm 0,05$  mg) i izabranih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica ( $5,00 \pm 0,05$  mg) su ravnomerno raspoređene po prethodno medijumom natopljenim celuloznoacetatnim membranama, i onda je 1 mL medijuma (PBS (pH 7,4) uz dodatak 0,1% (*m/V*) polisorbata 80) dodat u donorski deo Francovih ćelija kako bi se obezbedila ujednačena raspodela mase praška po celoj dostupnoj površini membrana. U unapred definisanim vremenskim intervalima tokom 120 min (2, 6, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90 i 120 min) uzorkovano je po 1 mL medijuma, pri čemu je vršena nadoknada dodatkom iste zapremine zagrejanog medijuma. Uzorci su potom filtrirani ( $0,45 \mu\text{m}$ , celuloznoacetatni membranski filteri, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemačka), a kumulativna koncentracija rastvorenog salbutamol-sulfata određena je HPLC metodom 1, opisanom u poglavlju 3.2.2.3. Rezultati su izraženi kao procenat rastvorenog salbutamol-sulfata za određeno vreme, koji je izračunat na osnovu eksperimentalno određenog udela salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica. Ispitivanja su vršena u triplikatu, a rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ .

U cilju boljeg razumevanja mehanizma oslobađanja lekovite supstance iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica, analizirana je kinetika profila oslobađanja salbutamol-sulfata iz formulacija F1, F7, F9, F10 i F11, primenom sledećih matematičkih modela: kinetika I reda, *Higuchi*, *Korsmeyer-Peppas* i *Peppas-Sahlin*. Kinetika prvog reda je izabrana jer je ovaj model primenljiv za farmaceutske oblike sa visoko rastvorljivim lekovitim supstancama (u vodi) inkapsuliranim u visoko porozne matrikse (Costa i Lobo, 2001), dok je *Higuchi* model primenljiv za nerastvorne matrikse (Karasulu i sar., 2003). *Peppas-Sahlin* i *Korsmeyer-Peppas* modeli su primenjeni kako bi se utvrdio tačan mehanizam oslobađanja salbutamol-sulfata iz čvrstih lipidnih mikročestica, s obzirom na to da su moguće tri opcije: difuzija, erozija i kombinacija ova dva mehanizma oslobađanja lekovite supstance iz lipidnih matriksa.

*Higuchi* model je opisan jednačinom 12 (Higuchi, 1963):

$$F = \frac{M_t}{M_\infty} = k_H \times t^{1/2} \quad (12)$$

gde  $F$  predstavlja frakciju rastvorenog salbutamol-sulfata nakon vremena  $t$ ,  $M_t$  je količina rastvorenog salbutamol-sulfata u vremenskoj tački  $t$ ,  $M_\infty$  je ukupna količina salbutamol-sulfata raspoloživa za rastvaranje, a  $k_H$  je *Higuchi*-jeva konstanta brzine rastvaranja.

Kinetika I reda se opisuje jednačinom 13 (Polli i sar., 1997):

$$F = \frac{M_t}{M_\infty} = (1 - (e^{-k_{1st} \times t})) \times 100 \quad (13)$$

gde  $k_{1st}$  predstavlja konstantu brzine rastvaranja kinetikom I reda.

*Korsmeyer-Peppas* model se opisuje jednačinom 14 (Ritger i Peppas, 1987):

$$F = \frac{M_t}{M_\infty} = k_{kp} \times t^n \quad (14)$$

gde  $k_{kp}$  predstavlja *Korsmeyer-Peppas*-ovu konstantu brzine rastvaranja, a  $n$  je difuzioni eksponent. U zavisnosti od vrednosti  $n$  difuzionog eksponenta može se odrediti mehanizam oslobađanja lekovite supstance, pri čemu su moguća tri slučaja (Tabela 3.6).

**Tabela 3.6.** Predloženi mehanizmi oslobađanja lekovite supstance u zavisnosti od vrednosti difuzionog eksponenta  $n$  za čestice sfernog oblika (preuzeto i prilagođeno iz Ritger i Peppas, 1987)

Vrednost eksponenta $n$	Mehanizam oslobađanja
0,43	<i>Fick</i> -ova difuzija
0,43 < $n$ < 1,0	anomalni transport (difuzija + erozija)
1,0	kinetika nultog reda (erozija)

*Peppas-Sahlin* model se opisuje jednačinom 15 (Peppas i Sahlin, 1989):

$$F = \frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \times t^m + k_2 \times t^{2m} \quad (15)$$

gde je  $k_1$  konstanta brzine rastvaranja lekovite supstance mehanizmom difuzije,  $k_2$  konstanta brzine rastvaranja lekovite supstance mehanizmom erozije, a  $m$  je difuzioni eksponent koji zavisi od geometrije matriks sistema.

Stepen uklapanja eksperimentalnih rezultata u primenjene matematičke modele određen je na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ).

### 3.2.2.8. Analiza podataka

QbD pristupom identifikovani su CMA i CPP koji statistički značajno utiču na CQA praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Statistička analiza, zasnovana na izračunavanju  $t$ -odnosa (engl. *Lenth t-ratios*), korišćena je kako bi se utvrdili CMA i CPP koji imaju značajan uticaj ( $p$  vrednost < 0,05) na određene karakteristike praškova čvrstih lipidnih mikročestica kao što su stvarna gustina i veličina i raspodela veličine mikročestica. Za statističku analizu korišćen je JMP<sup>®</sup> softver (verzija 8, SAS Institute Inc., SAD). Pored toga, s obzirom na to da brojni CMA i CPP faktori mogu uticati na CQA krajnjeg proizvoda, za analizu dobijenih rezultata korišćena je i multivarijantna analiza. Analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) je tehnika obrade podataka koja omogućava njihovu transformaciju, kroz smanjenje broja dimenzija uz zadržavanje maksimalne moguće varijanse,

odnosno najveće varijabilnosti podataka (Ilin i Raiko, 2010). Ovo se postiže transformacijom celog seta podataka u novi set varijabli koje nisu u korelaciji, a koje su uređene tako da prvih par varijabli odnese najveći deo varijacija originalnih (početnih) varijabli (Jolliffe i Cadima, 2016). PCA analiza je sprovedena kako bi se više parametara: dodatak trehaloze, brzina vazduha za raspršivanje, kao i svojstva praškova (veličina i stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica) dovelo u međusobnu korelaciju sa aerodinamičkim karakteristikama praškova čvrstih lipidnih mikročestica, EF i FPF. Tačnije, cilj PCA analize je bio da se odrede parametri koji imaju najveći uticaj na FPF i EF praškova čvrstih lipidnih mikročestica kako bi se optimizovao proces izrade i dobila formulacija praška za inhalaciju sa maksimalnom vrednošću FPF uz adekvatnu EF. PCA analiza je sprovedena pomoću PAST softvera, verzija 4.03 (Hammer i sar., 2001).

Vrednosti koje opisuju brzinu rastvaranja salbutamol-sulfata iz ispitivanih uzoraka praškova čvrstih lipidnih mikročestica i fizičke smeše, kao što su površina ispod krive brzine rastvaranja salbutamol-sulfata za vreme trajanja ispitivanja ( $PIK_{0 \rightarrow 120\text{min}}$ ) i efikasnost brzine rastvaranja (engl. *Dissolution Efficiency*, DE) u različitim vremenskim tačkama (%DE<sub>15</sub>, %DE<sub>30</sub> i %DE<sub>120</sub>), izračunati su pomoću softvera *DDSolver* (Zhang i sar., 2010). *DDSolver* je korišćen i za preračunavanje koeficijenta determinacije ( $R^2$ ), *in vitro* konstanti brzine oslobađanja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica ( $k_H$ ,  $k_{1st}$ ,  $k_{kp}$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ ) i difuzionih eksponenata ( $m$  i  $n$ ).

### 3.2.3. *In vitro/in silico* komparativna analiza aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica

U ovoj fazi ekperimentalnog rada rađena je komparativna analiza aerodinamičkih karakteristika odabranih formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica primenom različitih metoda ispitivanja: *in vitro* pomoću TSI, FSI i NGI uređaja, kao i *in silico* primenom CFPD. U zavisnosti od metode, određivane su i poređene FPF, EF, MMAD i GSD vrednosti. EF, FPF, MMAD i GSD vrednosti, određene u FSI i NGI uređaju, preuzete su iz rezultata istraživanja sprovedenog u skladu sa postupcima opisanim u drugoj fazi ekperimentalnog rada.

#### 3.2.3.1. Ispitivanje aerodinamičkih svojstava praškova za inhalaciju u dvofaznom staklenom impindžeru (TSI)

Određivanje aerodinamičkih karakteristika (EF i FPF) odabranih formulacija praškova za inhalaciju (F1, F7, F9, F10, F12) sprovedeno je u TSI aparaturi (Slika 3.5). Najpre je 7 mL smeše metanola i vode 50:50 (V/V) uneto u fazu 1, a 30 mL smeše u fazu 2 staklenog impindžera. Tačno izmerena masa ( $15 \pm 0,5$  mg) praškova za inhalaciju je punjena u HPMC kapsule veličine 3. Napunjene kapsule su zatim pozicionirane u RS01<sup>®</sup> inhalator, a onda je inhalator postavljen na TSI pomoću adaptera, pri čemu su kapsule probušene pre početka ispitivanja. Ispitivanje je vršeno pri protoku vazduha od 60 L/min u trajanju od 4 s. Nakon aktivacije tri kapsule, količina deponovanog praška je sakupljena ispiranjem svih delova TSI aparature, inhalatora i kapsula smešom metanola i vode 50:50 (V/V) u posebne normalne sudove. Uzorci su zatim postavljeni u zagrejano ultrazvučno kupatilo, kako bi se omogućilo kompletno topljenje lipidnog matriksa i rastvaranje salbutamol-sulfata u medijumu. Nakon rastvaranja, normalni sudovi su dopunjeni do crte smešom metanola i vode 50:50 (V/V), filtrirani (0,45  $\mu$ m, filter od celuloznih estara, Carl Roth GmbH, Nemačka) i analizirani HPLC metodom 2, opisanom u poglavlju 3.2.2.3. Uzorci su analizirani u triplikatu. FPF u ovom slučaju predstavlja koncentraciju salbutamol-sulfata određenu u donjoj fazi staklenog impindžera (pri čemu *cut-off* vrednost prečnika druge faze iznosi 6,4  $\mu$ m) i izraženu kao procenat u odnosu na ukupnu masu salbutamol-sulfata u ispitivanom prašku. EF je izračunata kao razlika između ukupne mase salbutamol-sulfata, sakupljenog iz svih delova TSI aparature, inhalatora i kapsula i mase salbutamol-sulfata, sakupljenog u inhalatoru i kapsulama, i dobijena masa je izražena u procentima.



**Slika 3.5.** *In vitro* ispitivanje aerodinamičkih svojstava praškova za inhalaciju u dvofaznom staklenom impindžeru (TSI)

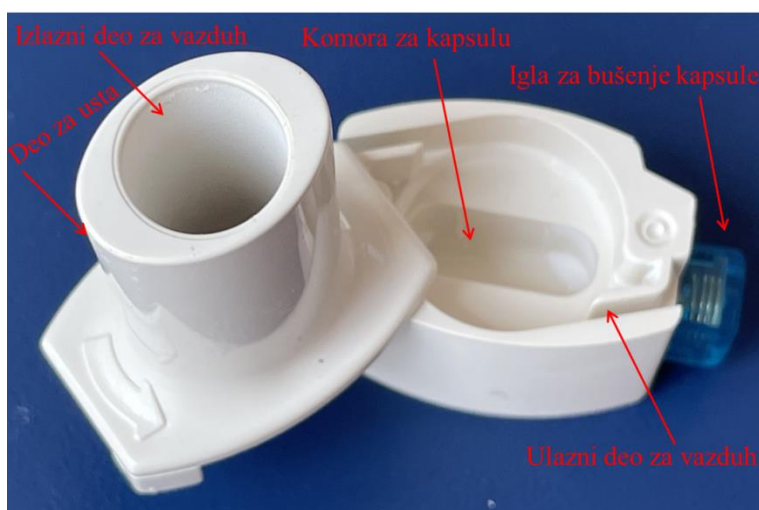


### 3.2.3.2. CFPD simulacije

CFPD simulacije su korišćene za predviđanje EF i FPF odabranih formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica (F1, F7, F9, F10, F12), kao i procenta praška koji zaostaje u inhalatoru. Takođe, na osnovu podataka o broju, prečniku i masi čestica koje napuštaju inhalator izračunate su odgovarajuće MMAD i GSD vrednosti, korišćenjem prilagođene metode opisane u Američkoj farmakopeji (USP 44-NF 39) i metode interpolacije opisane u literaturi (Christopher i sar., 2010).

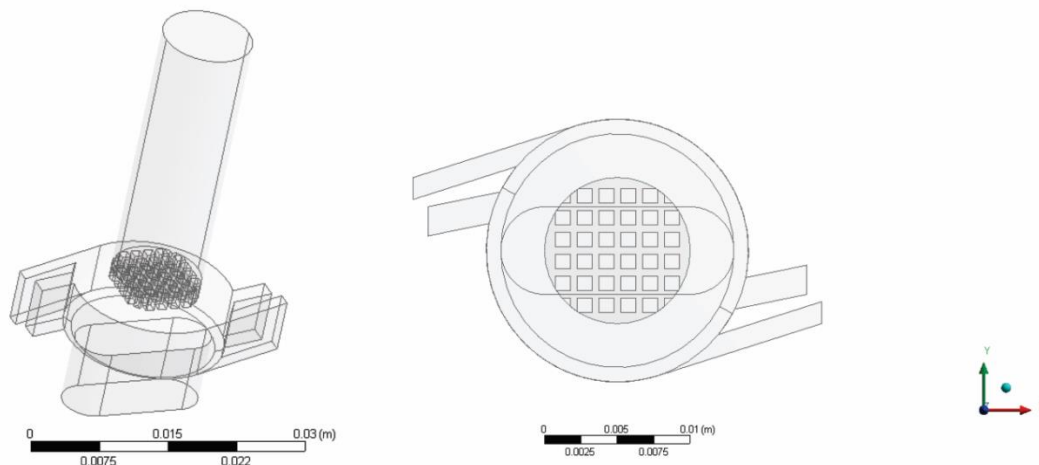
#### Geometrija i mreža inhalatora

Pre CFPD simulacija bilo je neophodno konstruisati 3D model inhalatora, pa su zbog toga prvo izmerene realne dimenzije RS01<sup>®</sup> inhalatora: (i) maksimalna visina: 47,5 mm; (ii) maksimalna širina: 28,0 mm; (iii) prečnik izlaznog dela za vazduh: 10,0 mm; (iv) dimenzije ulaznog dela za vazduh: 1,5 mm × 6,0 mm (Slika 3.6).



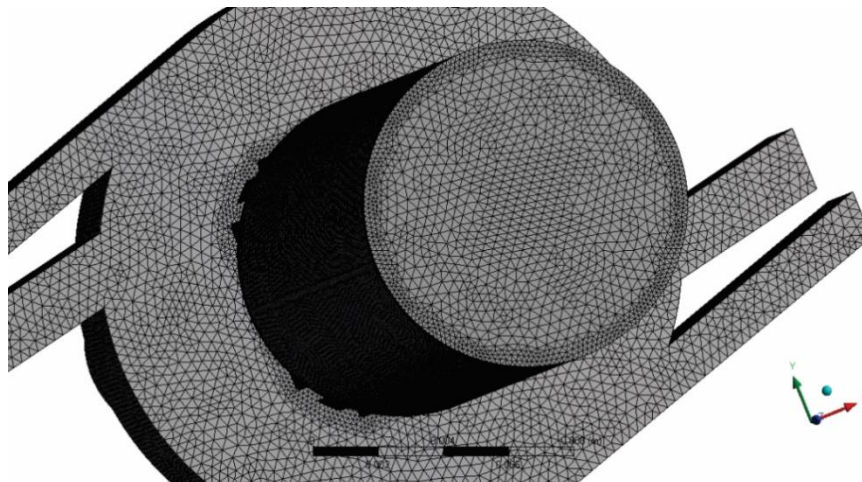
**Slika 3.6.** Delovi RS01<sup>®</sup> inhalatora za praškove (model 7, visokog otpora)

Geometrija RS01<sup>®</sup> inhalatora (Slika 3.7) je kreirana pomoću CAD/CAM (engl. *Computer-aided design/computer-aided manufacturing*) programa (CATIA softver, verzija 5, 3 DS Dassault Systèmes, Francuska) i nakon toga ubačena u drugi komercijalno dostupan softver Ansys (verzija 16, ANSYS, SAD), pri čemu je *Ansys Meshing* korišćen za kreiranje mreže inhalatora, prikazane na Slici 3.8, dok je Fluent softver (verzija 6.3, ANSYS, SAD) korišćen za numeričke simulacije.



**Slika 3.7.** Geometrija RS01<sup>®</sup> inhalatora: izometrijski pogled (levo) i pogled odozgo (desno) (preuzeto iz Ignjatović i sar., 2021)

Finalna mreža sa ukupnim brojem čvorova od 349 460 i brojem elemenata od 1 930 248 ( $\approx 2 \times 10^6$ ) se pokazala kao dovoljno dobra, te je izabrana za dalje simulacije, s obzirom na to da je i preciznija mreža od  $1 \times 10^7$  ćelija dala identične rezultate u smislu tačnosti i konzistentnosti rezultata.



**Slika 3.8.** Finalna mreža inhalatora (preuzeto iz Ignjatović i sar., 2021)

Nakon definisanja finalne mreže inhalatora, potrebno je bilo definisati ulazni i izlazni pritisak, odnosno definisati sve granične vrednosti parametara neophodnih za simulacije. Ulazni i izlazni pritisci su definisani tako da njihova razlika obezbedi protok vazduha kroz inhalator od oko 60 L/min, s obzirom na to da je u *in vitro* ispitivanjima aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju (TSI, FSI i NGI) korišćen isti protok vazduha. Na osnovu eksperimentalnog protoka vazduha od 60 L/min i površine izlaznog dela inhalatora, izračunato je da bi brzina vazduha na izlazu iz inhalatora trebalo da postigne vrednost od oko 12 m/s. Da bi se dobila ova brzina, definisan je pad pritiska od 2500 Pa, a da bi se postigao ovaj pad pritiska, podešen je pritisak na ulazu inhalatora od 0 Pa, dok je na izlazu iz inhalatora podešen pritisak od -2500 Pa. Sličan pristup za definisanje razlike između ulaznog i izlaznog pritiska primenjen je u studiji koju su sprovedi Milenkovic i sar. (2013).

Za opisivanje protoka fluida korišćene su *Navier-Stokes*-ove jednačine, koje su dostupne u okviru Fluent softvera. Kretanje i depozicija čestica opisane su pomoću *Eulerian-fluid/Lagrangian-particle*

pristupa. U ovoj studiji ispitivane su samo interakcije čestica sa zidovima inhalatora, dok međučestične interakcije nisu ispitivane, iako ove interakcije mogu imati značajan uticaj na finalni rezultat simulacija i generalno ih treba uzeti u obzir. Međutim, smatra se da se, ako je zapreminski udeo simuliranih čestica manji od  $10^{-3}$ , međučestične interakcije mogu zanemariti (Sommerfeld i sar., 2008). Pored toga, u studiji koju je objavila Milenkovic (2015) se navodi da uticaj međučestičnih sudara i agregacije čestica prestaje da bude značajan nakon inicijalnog raspršivanja praška. S obzirom na to da je u ovoj studiji primenjena mala zapreminska frakcija čestica od  $10^{-4}$ , nije bilo neophodno uzeti u obzir uticaj međučestičnih interakcija. Takođe, pretpostavljeno je da će se raspršivanje praška desiti momentalno, te je opisano *Rosin-Rammler* modelom raspodele veličine čestica, koji uzima u obzir minimalni, maksimalni i srednji prečnik čestica, širinu raspodele čestica (npr. *span*) i broj čestica (Dunham, 2012).

### CFD modelovanje protoka vazduha

Protok vazduha kroz inhalator simuliran je pomoću jednačina koje definišu održivost mase i momenta sile u toku vremena (odnosno *Navier-Stokes*-ove jednačine). Ove jednačine su povezane sa adekvatnim turbulentnim modelom kako bi se opisalo turbulentno kretanje vazduha unutar inhalatora. *Navier-Stokes*-ove vremenske jednačine se nazivaju *Reynolds Averaged Navier Stokes* (RANS) jednačinama i definišu se sledećim odnosom (jednačina 16):

$$\frac{\partial \bar{u}_i}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x_j} (\bar{u}_j \bar{u}_i) = -\frac{\partial \bar{p}}{\partial x_i} + \frac{\partial}{\partial x_j} \left[ \nu \left( \frac{\partial \bar{u}_i}{\partial x_j} + \frac{\partial \bar{u}_j}{\partial x_i} - \overline{u'_i u'_j} \right) \right] \quad (16)$$

gde izraz  $\overline{u'_i u'_j}$  predstavlja *Reynolds*-ov tenzor napona, koji zavisi samo od brzine fluktuacije. U zavisnosti od načina kojim se definišu *Reynolds*-ovi tenzori napona, razvijeni su i primenjuju se različiti RANS turbulentni modeli. U ovom istraživanju korišćen je *shear stress transport* (SST)  $k-\omega$  turbulentni model, za koji se smatra (Milenkovic i sar., 2013) da daje najpreciznije rezultate u poređenju sa ostalim modelima turbulencije. Pomenuti  $k-\omega$  SST model kombinuje  $k-\omega$  i  $k-\varepsilon$  turbulentne modele kako bi se eliminisali njihovi nedostaci. Ovaj hibridni model se zasniva na kombinovanoj primeni  $k-\omega$  modela u graničnim delovima koji su blizu zida inhalatora i na primeni  $k-\varepsilon$  modela u centralnom delu. Na osnovu  $k-\omega$  SST modela, turbulentna kinematska viskoznost ( $\nu_t$ ) definiše *Reynolds*-ov tenzor napona, a određuje se izračunavanjem kinetičke energije turbulencije ( $k$ ) i specifične brzine turbulentnog rasipanja ( $\omega$ ). Stoga se ovaj turbulentni model sastoji od dve jednačine transporta, jedne za izračunavanje parametra  $k$  i druge za izračunavanje parametra  $\omega$ . Jednačina transporta za kinetičku energiju turbulencije (jednačina 17) glasi:

$$\rho \left( \frac{\partial k}{\partial t} + \bar{u}_j \frac{\partial k}{\partial x_j} \right) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[ (\mu + \sigma^* \mu_t) \frac{\partial k}{\partial x_j} \right] + P_k - \beta_k \rho k \omega \quad (17)$$

Jednačina transporta (jednačina 18) za specifičnu brzinu turbulentnog rasipanja se može prikazati sledećim izrazom:

$$\frac{\partial \omega}{\partial t} + U_j \frac{\partial \omega}{\partial x_j} = \alpha S^2 - \beta \omega^2 + \frac{\partial}{\partial x_j} \left[ (\nu + \sigma_\omega \nu_t) \frac{\partial \omega}{\partial x_j} \right] + 2(1-F_1) \sigma_{\omega 2} \frac{1}{\omega} \frac{\partial k}{\partial x_i} \frac{\partial \omega}{\partial x_i} \quad (18)$$

Turbulentna kinematska viskoznost se preračunava pomoću jednačine 19:

$$\nu_t = \frac{a_1 k}{\max(a_1 \omega, SF_2)} \quad (19)$$

gde  $a_1$  predstavlja empirijski određenu konstantu, parametar  $S$  je definisan pomoću tenzora deformacije  $S_{ij}$  i funkcija  $F_1$  i  $F_2$  koje određuju vezu između  $k-\omega$  i  $k-\varepsilon$  modela.

## Modelovanje mehanizma lepljenja čestica

Mehanizam lepljenja čestica zavisi od brojnih parametara, kao što su veličina čestica, brzina čestica, ugao pod kojim čestica dolazi u kontakt sa inhalatorom, karakteristike materijala od kojih su sačinjene čestice i zid inhalatora. Lepljenje čestica je obično rezultat jednog ili nekoliko mehanizama: *Van der Vals*-ovih i elektrostatičkih sila koje nastaju u „suvim“ uslovima i sila koje stvaraju tečni mostovi (engl. *liquid bridge forces*) u „vlažnim“ uslovima (El-Batsh i Haselbacher, 2002). *Van der Vals*-ove sile nastaju usled molekularnih interakcija između dve površine, što su u ovom slučaju, interakcije između čestica i zida inhalatora. Elektrostatička sila doprinosi procesu lepljenja ukoliko su čestice naelektrisane u struji vazduha ili fluida. S obzirom na to da je u ovoj studiji simulirano kretanje čestica praška u struji vazduha, podrazumevani su tzv. „suvi“ uslovi u inhalatoru.

Kriterijumi za lepljenje čestica za površine definisani su u radu koji je objavio Dahneke (Dahneke, 1975). Naime, u ovom radu je opisana analiza uticaja brzine udara čestice o površinu na brzinu odbijanja sferne čestice i zaključeno je da se sa smanjenjem normalne brzine udara ( $v_n$ ) povećava uticaj sile lepljenja, što dovodi do smanjene brzine odbijanja. Odnosno, postoji kritična vrednost normalne brzine udara ispod koje ne dolazi do odbijanja čestica, što znači da se čestica lepi za zid inhalatora. Ova brzina predstavlja kritičnu brzinu lepljenja čestica ( $v_{cr}$ ). Naučnici Brach i Dunn (Brach i Dunn, 1992) su, na osnovu eksperimentalnih rezultata, a primenom matematičkog modela za opisivanje udara i lepljenja sfernih čestica, definisali jednačinu za izračunavanje  $v_{cr}$  (jednačina 20):

$$v_{cr} = \left[ \frac{2E}{d_p} \right]^{\frac{10}{7}} \quad (20)$$

gde  $E$  predstavlja *El Batch*-ov parametar (El-Din i Diab, 2016), a  $d_p$  je prečnik čestice. Parametar  $E$  se računa na osnovu jednačine 21:

$$E = 0,51 \left[ \frac{5\pi^2(k_1 + k_2)}{4\rho_p^{3/2}} \right]^{\frac{2}{5}} \quad (21)$$

Parametri  $k_1$  i  $k_2$  definisani su jednačinama 22 i 23:

$$k_1 = \left( \frac{1 - v_s^2}{\pi E_s} \right) \quad (22)$$

$$k_2 = \left( \frac{1 - v_p^2}{\pi E_p} \right) \quad (23)$$

gde  $E_s$  i  $E_p$  predstavljaju Jangov modul elastičnosti za površinu zida inhalatora i čestica redom, dok su  $v_s$  i  $v_p$  Poasonovi koeficijenti za površinu zida inhalatora i čestica, redom. Na osnovu pretrage literature, i činjenice da nije bilo moguće eksperimentalno odrediti karakteristike materijala od kojih su sačinjene čvrste lipidne mikročestice, usvojeno je da Poasonov koeficijent za čestice iznosi  $v_p = 0,4$ , a da je Jangov modul elastičnosti  $E_p = 1,0$  Gpa, dok su za materijal zida RS01<sup>®</sup> inhalatora korišćene karakteristike polistirena ( $v_s = 0,35$  i  $E_s = 4,1$  GPa). Ostale konstante, koje su korišćene da bi se definisao mehanizam lepljenja čestica za zid inhalatora, prikazane su u Tabeli 3.7. Čestica koja pokazuje normalnu brzinu udara veću od kritične brzine lepljenja (brzina čestice  $v_n > v_{cr}$ ) će se odbiti o površinu zida inhalatora. Iz ovoga sledi da će se čestica zalepiti za površinu zida inhalatora ukoliko je  $v_n < v_{cr}$ .

**Tabela 3.7.** Spisak konstanti koje se koriste za definisanje mehanizma lepljenja čestica za zid inhalatora

Parametar	Simbol	Vrednost	Jedinica	Referenca
Jangov modul elastičnosti za površinu zida inhalatora	$E_s$	$4,1 \times 10^9$	Pa	(Milenkovic i sar., 2014b)
Jangov modul elastičnosti za čestice	$E_p$	$1,0 \times 10^9$	Pa	(Milenkovic i sar., 2014b)
Rad adhezije	$W_A$	0,039	J/m <sup>2</sup>	Sommerfeld i Schmalfuß, 2016; Soltani i Ahmadi, 1994
Poasonov koeficijent za površinu zida inhalatora	$\nu_s$	0,35	/	(Milenkovic i sar., 2014b)
Poasonov koeficijent za čestice	$\nu_p$	0,40	/	(Milenkovic i sar., 2014b)
Gustina čestica	$\rho_p$	Preuzeto iz Tabele 4.8	kg/m <sup>3</sup>	/
Gustina vazduha (na 1013,25 hPa (apsolutni) i 15 °C)	$\rho$	1,225	kg/m <sup>3</sup>	(Milenkovic i sar., 2014b)
Dinamički viskozitet fluida	$\mu$	$1,7894 \times 10^{-5}$	N s/m <sup>2</sup>	(Milenkovic i sar., 2014b)
Faktor korekcije za oblast blizu zida	$f$	1,70	/	Sommerfeld i Schmalfuß, 2016; Soltani i Ahmadi, 1994
Cunningham-ov faktor korekcije	$C_u$	1 (za sferne čestice)	/	
Statički koeficijent frikcije	$k_s$	0,50	/	

### Modelovanje mehanizama odvajanja zalepljenih čestica

Zalepljene čestice se mogu odvojiti od zidova inhalatora i tako se opet mogu naći u struji vazduha ukoliko su sile fluida dovoljno jake da nadjačaju sile adhezije čestica. Soltani i Ahmadi (1994) su istraživali moguće mehanizme odvajanja čestica od zidova/površina (generalno) pri turbulentnom protoku fluida. Čestice se od zida inhalatora mogu odvojiti mehanizmima kotrljanja i klizanja, ali je kotrljanje ipak verovatniji mehanizam odvajanja kada su u pitanju sferne čestice (Soltani i Ahmadi, 1994).

*Mehanizam kotrljanja:* Ukoliko je moment sile indukovan silama fluida u određenom trenutku interakcije između čestice i zida inhalatora veći od momenta sile indukovane silama adhezije čestice ( $F_{st}$ ), čestica počinje da se kotrlja i dolazi do njenog odvajanja od zida. Ovaj fenomen je opisan sledećom jednačinom (jednačina 24):

$$F_D \left( \frac{d_p}{2} - b \right) + F_L a \geq F_{st} a \quad (24)$$

gde  $F_D$  predstavlja silu potiska fluida,  $F_L$  silu uzgona,  $a$  je mera deformacije čestice duž površine, dok  $b$  predstavlja meru deformacije čestice normalnu u odnosu na površinu. Utvrđeno je da je uticaj  $F_L$  na proces odvajanja čestica zanemarljiv u poređenju sa  $F_D$  (Soltani i Ahmadi, 1994), pa se može izostaviti iz prethodnog izraza. Pored toga, u slučaju elastične adhezije čestice za zid, smatra se da je  $b$  suviše

malo, pa se takođe može zanemariti. Zbog toga se proces odvajanja čestica kotrljanjem može predstaviti uprošćenom jednačinom 25:

$$F_D \left( \frac{d_p}{2} \right) \geq F_{st} a \quad (25)$$

gde se  $a$  izračunava na osnovu sledećeg izraza (Soltani i Ahmadi, 1994):

$$a = \sqrt[3]{\frac{3\pi W_A d_p^2}{2 K_C}} \quad (26)$$

$K_C$  predstavlja složeni Jangov modul elastičnosti, koji se izračunava na osnovu izraza 27:

$$K_C = \frac{4}{3} \left[ \frac{(1 - v_s^2)}{E_s} + \frac{(1 - v_p^2)}{E_p} \right]^{-1} \quad (27)$$

*Mehanizam klizanja:* Čestica će se odvojiti od površine zida mehanizmom klizanja ukoliko je sila potiska  $F_D$  dovoljno jaka da dovede do klizanja čestice, odnosno kada je (Wang, 1990):

$$F_D \geq k_s F_{st} \quad (28)$$

gde je  $k_s$  koeficijent statičkog trenja između čestice i zida inhalatora. Sila potiska  $F_D$  se određuje na osnovu jednačine 29:

$$F_D = \frac{1}{2} C_D \rho V^2 \left( \frac{\pi d_p}{4} \right) \left( \frac{f}{C_u} \right) \quad (29)$$

gde je  $C_D$  koeficijent potiska, koji se računa na osnovu jednačine 30:

$$C_D = \frac{24}{Re_p} \quad (30)$$

$Re_p$  je *Reynolds*-ov broj, i određuje se pomoću jednačine 31:

$$Re_p = \frac{d_p \rho V}{\mu} \quad (31)$$

gde je  $f$  faktor korekcije u oblasti blizu zida inhalatora (Soltani i Ahmadi, 1994), a vrednost faktora  $f$ , koja je korišćena za simulacije, je prikazana u Tabeli 3.7.  $C_u$  je *Cunningham*-ov faktor korekcije, koji za sferne čestice iznosi 1 (Tabela 3.7).  $V$  je brzina fluida u centru čestice, definisana izrazom:

$$V = \sqrt{u^2 + v_n^2} \quad (32)$$

gde su  $u$  i  $v_n$  komponente brzine fluida paralelne sa zidom i normalne u odnosu na zid, redom.

S obzirom na to da je protok fluida paralelan sa zidom,  $v_n$  će biti jednaka nuli, što znači da će  $V$  biti jednaka komponenti  $u$  ( $V = u$ ). Za čestice koje se nalaze u viskoznim podslojevima,  $V$  se izračunava na osnovu jednačine 33:

$$V = \frac{\rho d_p}{\mu} (u^*)^2 \quad (33)$$

pa se jednačina 29 za preračunavanje  $F_D$  svodi na jednačinu 34:

$$F_D = \frac{5.1\pi}{2} d_p^2 \rho u^{*2} \quad (34)$$

U jednačini 34, parametar  $u^*$  predstavlja brzinu smicanja, pri čemu se  $u^*$  označava kao  $u_R^*$  u slučaju kritične brzine smicanja za kotrljanje, odnosno  $u_S^*$  za klizanje čestica. Kada se u izraz koji definiše

mehanizam kotrljanja (jednačina 25) sila potiska  $F_D$  zameni izrazom za njegovo preračunavanje (jednačina 34), dobija se jednačina za preračunavanje kritične brzine smicanja koja će dovesti do kotrljanja čestica (jednačina 35):

$$u_R^* = \sqrt{\left(\frac{1}{\rho}\right) \left(\frac{1}{K_C}\right)^{1/3} \left(\frac{W_A}{d_p}\right)^{4/3}} \quad (35)$$

A kada se u izraz koji definiše mehanizam klizanja (jednačina 28), sila potiska  $F_D$  zameni izrazom za njeno preračunavanje (jednačina 34), dobija se jednačina za preračunavanje kritične brzine smicanja koja će dovesti do klizanja čestica (jednačina 36):

$$u_s^* = 0,5 \sqrt{\frac{k_s W_A}{\rho_p d_p}} \quad (36)$$

Da bi došlo do odvajanja čestica od zida inhalatora, mora biti ispunjen zahtev da je brzina smicanja  $u^*$  veća od kritičnih brzina smicanja za kotrljanje,  $u_R^*$  (jednačina 37), odnosno klizanje čestica,  $u_s^*$  (jednačina 38):

$$u^* \geq u_R^* \quad (37)$$

$$u^* \geq u_s^* \quad (38)$$

## CFPD

CFPD simulacije su konkretno u ovoj studiji podrazumevale primenu CFD modela u kombinaciji sa DPM modelom za simuliranje kretanja čestica (engl. *Computational Fluid Dynamics coupled with Discrete Phase Model*, CFD-DPM model). Za CFD-DPM simulacije primenjen je samo konstantan protok vazduha, jer se može smatrati da on približno oslikava uslove dinamičke inhalacije, onda kada protok vazduha dostigne vrednost maksimalnog udaha (Milenkovic, 2015). Nakon postizanja konstantnog protoka vazduha u *Fluent* softveru, simulirano je injektovanje čestica u struju vazduha (fluida). Odnosno, trenutkom injektovanja čestica se smatra onaj kada su čestice ušle u domen simulacija sa unapred tačno precizirane površine (Milenkovic, 2015), koja je u ovom slučaju bila na 12,5 mm od dna inhalatora. Ova precizirana površina u stvari predstavlja realnu poziciju na kojoj se nalazi kapsula u *in vitro/in vivo* uslovima. U ovom istraživanju pretpostavljeno je da se čestice injektuju brzinom koja je jednaka brzini fluida, a na osnovu pretpostavke iznete u studiji koju je objavila Milenkovic (2015).

Izgrađeni model je testiran primenom različitog broja injektovanih (ulaznih) čestica (100-40000) kako bi se postigla konzistentnost ishoda simulacija bez obzira na broj čestica. Veličina čestica, koja je korišćena kao ulazni parametar u simulacijama, dobijena je u *in vitro* ispitivanjima praškova čvrstih lipidnih mikročestica iz druge faze eksperimentalnog rada metodom laserske difrakcije. Tačnije, parametri koji opisuju geometrijsku veličinu čestica ( $d_{v10}$ ,  $d_{v50}$  i  $d_{v90}$ ) i raspodelu veličine čestica (*span*) za pet izabranih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica (formulacije F1, F7, F9, F10 i F12) iz druge faze eksperimentalnog rada korišćeni su kao ulazni parametri za CFD-DPM simulacije. Vrednosti parametara koji opisuju raspodelu veličine čestica pet izabranih formulacija prikazani su kao rezultati druge faze eksperimentalnog rada, u poglavlju 4.2.2 i Tabeli 4.8. Nakon testiranja modela za različit broj ulaznih čestica, utvrđene su postavke modela koje daju konzistentne rezultate i ustanovljeno je da finalne simulacije mogu biti izvedene sa 100 čestica kako bi se smanjilo vreme trajanja simulacija i resursi, ali istovremeno vodeći računa da se ne naruši tačnost predviđanja modela. Mehanizmi lepljenja i odvajanja čestica od zida inhalatora simulirani su uvođenjem tzv. funkcija koje definiše korisnik (engl. *User Defined Function*, UDF). UDF je zadata tako da preračuna kritičnu brzinu čestica pomoću jednačine

20, i da poređenjem ove vrednosti sa vrednošću normalne brzine čestica odredi da li je došlo do lepljenja čestica za zid inhalatora ili do njihovog odbijanja. U slučaju da je došlo do lepljenja čestice, UDF je koristila jednačinu 25 da bi se utvrdilo da li se zalepljena čestica odvojila od zida mehanizmom kotrljanja, odnosno jednačinu 28 da bi se utvrdilo da li se zalepljena čestica odvojila mehanizmom klizanja. Ukoliko nijedan od ova dva uslova nije bio ispunjen, to je značilo da je čestica ostala zalepljena za zid inhalatora i da je dalje praćeno njeno ponašanje. Po završetku pomenutog preračunavanja, generisana je UDF datoteka sa rezultatima o tome koje se čestice lepe za zid inhalatora, a koje se odvajaju od njega mehanizmom kotrljanja ili klizanja, kao i informacija o tome koje su čestice generalno udarile u zid inhalatora. Na osnovu ovih podataka, izračunat je procenat čestica koje su ostale u inhalatoru, na osnovu čega je indirektno određena EF (kao procenat čestica koje su izašle iz inhalatora).

Ključne karakteristike računara koji je korišćen za CFD-DPM simulacije su: 8 GB RAM memorije i Intel(R) Core (TM) i3-7020U CPU procesor, koji radi na 2,30 GHz-a (sa 4 procesorska jezgra). Vreme trajanja finalnih simulacija iznosilo je 6-7 h.

### 3.2.3.3. Obrada CFD-DPM generisanih rezultata

CFD-DPM simulacijama predviđene su vrednosti EF i FPF odabranih formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, kao i procenat praška koji zaostaje u inhalatoru. Takođe, na osnovu CFD-DPM rezultata broja, prečnika i mase čestica koje su napustile inhalator izračunate su odgovarajuće MMAD i GSD vrednosti, koristeći dve različite metode. Za svaku formulaciju je, na osnovu podataka o broju, prečniku i masi čestica koje napuštaju inhalator, definisano po deset frakcija čestica koje su određene različitim vrednostima *cut-off* prečnika. *Cut-off* prečnik karakteriše graničnu veličinu čestica koja je obuhvaćena jednom frakcijom. Prva metoda (metoda 1) je podrazumevala primenu prilagođene metode opisane u Američkoj farmakopeji (USP 44-NF 39). Najpre je preračunat aerodinamički prečnik čestica ( $d_{aer}$ ) na osnovu jednačine 39, koja predstavlja uprošćenu jednačinu 1 za čestice sfernog oblika:

$$d_{aer} = d_g \times \rho_p \quad (39)$$

gde je  $d_g$  geometrijski prečnik čestica, i  $\rho_p$  je stvarna gustina praška.

Nakon toga, određen je MMAD na osnovu linearne zavisnosti između kumulativne mase čestica (izražene u procentima u odnosu na ukupnu masu čestica) ( $y$ -osa) u odnosu na *cut-off* vrednosti aerodinamičkog prečnika izraženog u  $\mu\text{m}$ , na logaritamskoj skali ( $x$ -osa). Linearnom regresionom analizom grafički predstavljenih podataka dobijena je jednačina prave, na osnovu koje je za  $y$  vrednost koja predstavlja 50% procenata kumulativne mase, izračunata nepoznata  $x$  vrednost prečnika, koja u stvari predstavlja MMAD.

Druga metoda (metoda 2) podrazumevala je primenu metode linearne interpolacije u dve tačke (Christopher i sar., 2010). Ovakav pristup za obradu podataka dobijenih iz CFD-DPM simulacija je već primenjen u studiji koju su sprovedi Vulović i sar. (2018). Kao polazne vrednosti korišćeni su podaci o kumulativnom procentu mase izračunati kao kod USP propisanog postupka. Ove vrednosti su, nakon konverzije iz procenta, primenom *NORMSINV* funkcije u Excel-u, prevedene u odgovarajuće vrednosti *probit*-a. Nakon toga konstruisan je grafik zavisnosti između vrednosti *probit*-a ( $y$ -osa) i aerodinamičkog dijametra ( $x$ -osa na logaritamskoj skali) unošenjem samo 3 tačke (aerodinamički dijametar koji je najpribližniji tački koja predstavlja 50% procenata kumulativne mase i još dve vrednosti koje su najbliže prvoj tački tj. prva manja i prva veća vrednost). Korišćena je linearna regresiona analiza za konstruisanje jednačine prave, na osnovu koje je izračunata MMAD vrednost.

Dve metode korišćene su i za izračunavanja GSD vrednosti. Prvi način je uključivao primenu odgovarajućeg softvera (*Excel format GSD Calculator*). Podešeno je da broj frakcija čestica bude 10, a zatim su za svaku frakciju uneti podaci o *cut-off* vrednosti geometrijskog prečnika, izraženog u mm i



vrednosti kumulativne mase čestica (izražene u procentima) koja odgovara toj frakciji. Na osnovu unetih podataka i integrisane funkcije u okviru softvera, izračunate su vrednosti  $d_{16}$  i  $d_{84}$ , a onda je na osnovu jednačine 11 izračunata GSD vrednost (metoda 1). Istim kompjuterskim programom je na osnovu unetih podataka izračunata GSD vrednost (metoda 2).

### 3.2.3.4. Komparativna analiza podataka

Kako bi se uporedili rezultati analize aerodinamičkih svojstava ispitivanih čvrstih lipidnih mikročestica (EF, MMAD, GSD i FPF), dobijenih pomoću četiri različite metode (jedne *in silico* metode i tri *in vitro* metode) konstruisani su korelacioni dijagrami. Poređenje između ove četiri metode je izvršeno na osnovu izračunatog koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) između grafički predstavljenih podataka. Dodatno, izračunati su i sledeći parametri greške: koren srednje kvadratne greške (engl. *Root Mean Square Error*, RMSE) i normalizovana vrednost RMSE (engl. *Normalized Root Mean Square Error*, NRMSE). RMSE je preračunat na osnovu jednačine 40 (Hupet i sar., 2002):

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (P_i - O_i)^2}{N}} \quad (40)$$

gde  $P_i$  predstavlja predviđenu (test) vrednost,  $O_i$  predstavlja referentnu vrednost, a  $N$  je broj referentnih, odnosno, test vrednosti.

NRMSE je izračunata na osnovu jednačine 41 (Hupet i sar., 2002):

$$\text{NRMSE} = \sqrt{\frac{\text{RMSE}}{\bar{O}}} \quad (41)$$

gde je  $\bar{O}$  srednja vrednost referentnih vrednosti.

### 3.2.4. Razvoj i primena *in silico* PBPK modela za predviđanje depozicije, apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci različitih biofarmaceutskih svojstava

U ovoj fazi su razvijeni *in silico* PBPK modeli za predviđanje depozicije, apsorpcije i raspodele dve model lekovite supstance različitih biofarmaceutskih svojstava nakon inhalacione primene praškova sa modifikovanim oslobađanjem. Izabrane model supstance se primarno razlikuju prema rastvorljivosti u vodenim medijumima, pri čemu je salbutamol-sulfat visoko rastvorljiv, a budesonid nisko rastvorljiv. PBPK modeli su izgrađeni za čoveka, kao i za pacova koji se najčešće koristi kao eksperimentalna životinja u prekliničkim fazama razvoja preparata za inhalaciju. Salbutamol-specifičan model za pacova je dodatno skaliran na humani model, kako bi se procenila mogućnost korišćenja podataka dobijenih na životinjama za *in silico* predviđanje bioperformansi praškova za inhalaciju kod ljudi. Generisani *in silico* model salbutamola je potom korišćen za predviđanje stepena i brzine apsorpcije lekovite supstance nakon primene praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica sa salbutamol-sulfatom, izrađenih u drugoj fazi eksperimentalnog rada. Kao što je već objašnjeno, u zavisnosti od biofarmaceutskih svojstava lekovite supstance zavisi da li će se postići lokalno ili sistemsko dejstvo inhalaciono primenjenog leka u plućima. Te je u ovoj studiji budesonid korišćen kao model supstance suprotnih biofarmaceutskih svojstava od salbutamol-sulfata kako bi se procenio uticaj biofarmaceutskih svojstava lekovite supstance na performanse *in silico* modela za predviđanje apsorpcije inhalaciono primenjenih lekova sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance.

#### *In silico* predviđanje depozicije aerosola kod pacova

Za predviđanje depozicije aerosola nakon intratrahealne primene formulacija sa salbutamol-sulfatom i budesonidom u plućima pacova korišćen je MPPD softver (verzija 3.04, ARA, Inc., SAD). MPPD softver/model je primenjen za predviđanje depozicije leka u plućima pacova nakon primene eksperimentalne formulacije mikročestica hijaluronske kiseline sa salbutamol-sulfatom, SAL-HA, preuzete iz literature (Li i sar., 2017a). Takođe, MPPD softver je korišćen i za predviđanje depozicije budesonida iz tri različite intratrahealno primenjene formulacije kod pacova, kako bi se dobijeni podaci o *in silico* depoziciji uporedili sa eksperimentalno određenom *in vivo* depozicijom za tri pomenute formulacije, koja je preuzeta iz literature (Han i sar., 2019). Tri eksperimentalne formulacije odnose se na: (i) smešu Pulmicort Turbuhaler<sup>®</sup>-a i laktoze u odnosu 1:4 (*m/m*), BUD-PT; (ii) nanokristalnu suspenziju budesonida, BUD-NC; (iii) mikročestice hijaluronske kiseline u koje su inkorporirani nanokristali budesonida, BUD-NEM. Podaci o depoziciji lekova, dobijeni pomoću MPPD modela se, međutim, ne mogu koristiti direktno kao ulazni podaci u PCAT<sup>™</sup> modelu, koji je korišćen za predviđanje apsorpcije i raspodele lekovitih supstanci kod pacova. Pulmonalna frakcija (generisana u MPPD modelu) je stoga izjednačena sa alveolarnom frakcijom (u PCAT<sup>™</sup> modelu) jer je, u slučaju oba modela, opisano da se pulmonalni/alveolarni deo odnosi na respiratorne bronhiole, alveolarne duktuse i alveole (GastroPlus<sup>™</sup> 9.8. Manual, SimulationsPlus, Inc., 2020; Yeh i sar., 1979). Ekstratorakalna frakcija se u slučaju obe lekovite supstance može smatrati zanemarljivom kod pacova jer su ispitivane formulacije primenjivane intratrahealnim putem.

Konverzija traheobronhijalne frakcije (dobijene MPPD modelom) u dve frakcije (torakalnu i bronhijalnu) je bila neophodna da bi mogla da se koristi kao ulazni podatak u PCAT<sup>™</sup> modelu i vršena je na osnovu odnosa površina torakalnog i bronhijalnog regiona pluća pacova. Torakalna i bronhijalna površina su preuzete iz PCAT<sup>™</sup> modela, iz dela koji opisuje fiziologiju pacova (11,93 cm<sup>2</sup> za torakalni i 41,88 cm<sup>2</sup> za bronhijalni region). Izračunati odnos površina ovih regiona iznosio je 3,51 i korišćen je za konverziju MPPD podataka u PCAT<sup>™</sup> prepoznatljive podatke o frakcijama deponovanog salbutamol-sulfata i budesonida u torakalnom i bronhijalnom regionu pluća pacova. Ovako određene vrednosti za frakcije deponovanog leka u torakalnom, bronhijalnom i alveolarnom delu pluća unete su u PCAT<sup>™</sup>

model, pri čemu je iskorišćena opcija redistribucije deponovanih frakcija kako bi finalna suma deponovanih frakcija u plućima bila 100%. Ovo je urađeno s obzirom na to da su formulacije pacovima primenjene intratrahealno, pa se ne očekuje da je deo doze bio izdahnut niti progutan. Konvertovani podaci o *in silico* predviđenoj i modifikovanoj depoziciji čestica formulacija salbutamol-sulfata i budesonida su zatim korišćeni kao ulazni podaci za PBPK simulacije apsorpcije i raspodele ove dve lekovite supstance. Pored toga, za validaciju modela budesonida i poređenje *in silico* sa *in vivo* podacima, korišćena je i *in vivo* depozicija tri eksperimentalne formulacije, preuzeta iz literature (Han i sar., 2019). U slučaju formulacije sa salbutamol-sulfatom (SAL-HA) nisu dostupni podaci o *in vivo* depoziciji leka, stoga je samo *in silico* depozicija korišćena za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola nakon primene SAL-HA kod pacova.

Ulazni parametri koji opisuju fiziologiju disajnog trakta pacova u MPPD softveru su vrednosti izračunate na osnovu mase, pomoću integrisanih jednačina koje program nudi, dok su faktori formulacije (MMAD i GSD) preuzeti iz literature. Ulazni parametri, korišćeni za predviđanje depozicije salbutamol-sulfata (SAL-HA) i budesonida (BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM) u MPPD softveru navedeni su u Tabeli 3.8.

**Tabela 3.8.** Ulazni parametri za predviđanje depozicije intratrahealno primenjenog salbutamol-sulfata i budesonida kod pacova pomoću MPPD modela

Parametar	Salbutamol-sulfat	Budesonid
Telesna težina pacova (g)	200 <sup>a</sup>	210 <sup>d</sup>
Volumen pluća na kraju izdaha (mL)	2,790 <sup>b</sup>	2,866 <sup>e</sup>
Zapremina gornjeg dela respiratornog trakta (mL)	0,314 <sup>b</sup>	0,325 <sup>e</sup>
Disajni volumen (mL)	1,40 <sup>c</sup>	1,38 <sup>e</sup>
Brzina disanja (udah/min)	130 <sup>c</sup>	166 <sup>e</sup>
Scenario disanja	Endotrahealni	Endotrahealni
MMAD (µm)	4,220 <sup>a</sup> (SAL-HA)	2,630 <sup>d</sup> (BUD-PT) 27,900 <sup>d,f</sup> (BUD-NC) 5,330 <sup>g</sup> (BUD-NEM)
GSD	2,06 <sup>a</sup>	1,97 <sup>d</sup> 0,89 <sup>d,h</sup> 1,68 <sup>g</sup>

<sup>a</sup>Li i sar., 2017a; <sup>b</sup>MPPD izračunata vrednost za *Sprague-Dawley* pacove telesne težine 200 g; <sup>c</sup>Parametri izračunati na osnovu jednačina integrisanih u okviru MPPD softvera (MPPD manual, ARA Inc, 2015); <sup>d</sup>Shi i sar., 2021; <sup>e</sup>MPPD izračunata vrednost za *Sprague-Dawley* pacove telesne težine 210 g; <sup>f</sup>Odnosi se na veličinu raspršene kapi nanokristalne suspenzije; <sup>g</sup>Liu i sar., 2018; <sup>h</sup>Odnosi se na *span* vrednost merenja raspodele veličine kapi

Disajni volumen (DV) i brzina disanja su, u slučaju predviđanja depozicije čestica formulacije SAL-HA, izračunati na osnovu formula koje su date u uputstvu za korišćenje MPPD softvera (MPPD Manual, ARA Inc., 2015). Disajni volumen se računa na osnovu jednačine 42, pri čemu je važno napomenuti da su za izračunavanje ovog parametra u MPPD softveru date dve jednačine, ali je u ovom slučaju korišćenja jednačina za *Sprague-Dawley* vrstu pacova:

$$DV = 0,7 \times TT \text{ (g/100)} \quad (42)$$

pri čemu je TT telesna težina pacova.

Brzina disanja (BD) preračunata je na osnovu jednačine (43):

$$BD = 82 \times TT \text{ (kg)}^{-0,287} \quad (43)$$

### In silico predviđanje depozicije aerosola kod čoveka

Za *in silico* predviđanje depozicije čestica aerosola inhaliranih lekova kod čoveka korišćen je ICRP66 model, integrisan u okviru PCAT™ modela u GastroPlus™ softveru (verzija 9.7, SimulationsPlus Inc., SAD).

*In silico* predviđanje depozicije budesonida kod čoveka vršeno je pomoću ICRP66 - *custom* modela, pri čemu opcija *custom* označava da korisnik može da varira *default* ulazne vrednosti: funkcionalni rezidualni kapacitet pluća, dijametar traheje i bronhiola, zapremine ekstratorakalnog, torakalnog i bronhijalnog mrtvog prostora, disajni volumen i brzina protoka vazduha. Za *in silico* predviđanje depozicije komercijalno dostupnog preparata, Pulmicort® Turbuhaler®-a pomoću ICRP66 - *custom* modela korišćen je protok vazduha od 60 L/min (1000 mL/s) i MMAD od 3 µm (Feddah i sar., 2000; Salar Behzadi i sar., 2017) (Tabela 3.9). ICRP66 - *custom* model korišćen je i za predviđanje depozicije leka nakon primene tri eksperimentalne formulacije (BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM) kod čoveka. Ulazni parametri koji su korišćeni za predviđanje depozicije leka nakon primene četiri različite formulacije sa budesonidom kod čoveka pomoću ova dva modela prikazani su u Tabeli 3.9.

**Tabela 3.9.** Ulazni parametri za predviđanje depozicije Pulmicort® Turbuhaler®-a, BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM kod čoveka primenom ICRP66 - *custom* modela

Parametar	ICRP66 - <i>custom</i>			
	Pulmicort®	BUD-PT	BUD-NC	BUD-NEM
Preparat	Pulmicort®	BUD-PT	BUD-NC	BUD-NEM
MMAD (µm)	3,00	2,63	27,90	5,33
GSD	1,00 ( <i>default</i> )	1,97	0,89	1,68
Protok vazduha (mL/s)	1000	1000	1000	1000
Studija	Salar Behzadi i sar., 2017	Shi i sar., 2021	Liu i sar., 2018	Liu i sar., 2018

*In silico* predviđanje depozicije salbutamol-sulfata kod čoveka vršeno je takođe pomoću ICRP66 - *custom* modela. Najpre je predviđena depozicija Ventolin® pMDI (GlaxoSmithKline Pharmaceutical Co., Ltd., Kina) iz dve različite serije. U studiji koju su objavili Jiang i sar. (2016) vršeno je *in vitro* određivanje MMAD vrednosti Ventolin® pMDI, i dobijena je vrednost od 2,99 pri protoku vazduha od 500 mL/s. U dodatnoj literaturi prikazane su različite MMAD vrednosti za Ventolin® pMDI, pri nešto nižem protokom vazduha (471,6 mL/s), od 2,07 µm (Hoye i sar., 2005; Biswas i sar., 2017). Zbog toga je *in silico* depozicija Ventolin® pMDI kod čoveka predviđena primenom dva različita seta ulaznih podataka, označenih kao Slučaj 1 i Slučaj 2 (Tabela 3.10). ICRP66 - *custom* model korišćen je i za *in silico* predviđanje depozicije registrovanog praška za inhalaciju (Diskus® DPI, GlaxoSmithKline Pharmaceutical Co., Ltd), pri čemu su aerodinamičke karakteristike Diskus® DPI preuzete iz studije koju su objavili Pinto i sar., 2021 (Tabela 3.10).

**Tabela 3.10.** Ulazni parametri korišćeni za predviđanje depozicije Ventolin® pMDI i Diskus® DPI kod čoveka primenom ICRP66 - *custom* modela

Parametar	pMDI - Slučaj 1	pMDI - Slučaj 2	DPI
Preparat	Ventolin® pMDI	Ventolin® pMDI	Diskus® DPI
MMAD (µm)	2,99	2,07	1,83
Protok vazduha (mL/s)	500	471,60	1500
Studija	Jiang i sar., 2016	Hoye i sar., 2005; Biswas i sar., 2017	Pinto i sar., 2021

Pored navedenog, primenom ICRP66 - *custom* modela predviđena je depozicija praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata:

- formulacije SAL-HA;
- pet formulacija čvrstih lipidnih mikročestica (F1, F7, F9, F10 i F11), izrađenih u drugoj fazi eksperimentalnog rada.

Kao ulazni parametri za predviđanje depozicije čestica formulacije SAL-HA, korišćene su MMAD i GSD vrednosti određene pri protoku vazduha od 100 L/min (1666, 67 mL/s), koje su preuzete iz literature (Li i sar., 2017a), dok su za predviđanje depozicije praškova čvrstih lipidnih mikročestica korišćene *in vitro* eksperimentalno utvrđene MMAD i GSD vrednosti u NGI uređaju, pri protoku vazduha od 60 L/min (1000 mL/s) (Tabela 3.11).

**Tabela 3.11.** Ulazni parametri za predviđanje depozicije praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata primenom ICRP66 - *custom* modela

Parametar	SAL-HA	F1	F7	F9	F10	F11
MMAD ( $\mu\text{m}$ )	4,22	2,94	3,50	3,31	3,40	3,56
GSD	2,06	1,89	2,66	1,87	2,49	1,91
Protok vazduha (mL/s)	1666,67	1000	1000	1000	1000	1000

#### In silico modelovanje apsorpcije i raspodele salbutamola i budesonida kod pacova i čoveka

*In silico* modelovanje apsorpcije i raspodele salbutamola i budesonida nakon intravenske, peroralne i inhalacione primene vršeno je u GastroPlus™ programskom paketu (verzija 9.7, SimulationsPlus Inc., SAD). Za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola i budesonida nakon intravenske i peroralne primene korišćen je ACAT model, dostupan u okviru GastroPlus™ programskog paketa. Apсорpcija salbutamola i budesonida nakon inhalacione primene modelovana je pomoću PCAT™ modela, koji se povezan sa ACAT modelom, kako bi se predvidela i apсорpcija progutane frakcije lekovite supstance.

Pomoćni modul u GastroPlus™ softveru tzv. PKPlus™ modul, korišćen je za analizu podataka o koncentraciji model lekovitih supstanci u plazmi nakon intravenske primene kod pacova i čoveka, i procenu odgovarajućih farmakokinetičkih parametara.

#### **3.2.4.1. Budesonid-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod pacova**

Ulazni parametri koji su korišćeni za izgradnju modela budesonida za predviđanje bioperformansi leka kod pacova prikazani su u Tabeli 3.12. Vrednosti ukupnog klirensa, volumena distribucije i konstanti distribucije  $k_{1/2}$ ,  $k_{2/1}$ ,  $k_{1/3}$ ,  $k_{3/1}$  dobijene su pomoću PKPlus™ modula, analizom *in vivo* profila koncentracije budesonida u plazmi u toku vremena nakon intravenske primene (Shi i sar., 2021). Generisani farmakokinetički parametri su zatim korišćeni za izgradnju budesonid-specifičnog *in silico* modela koji opisuje apсорpciju lekovite supstance nakon primene intravenskog bolusa i nakon intratrahealne primene. Za validaciju modela korišćeni su *in vivo* profili koncentracije budesonida u plazmi nakon primene intravenskog bolusa (0,34 mg) i intratrahealne primene formulacije BUD-PT (0,42 mg). Validiran model je onda korišćen za predviđanje apсорpcije i raspodele budesonida nakon intratrahealne primene još dve formulacije (BUD-NC i BUD-NEM), za koje su takođe dostupni *in vivo* profili koncentracije budesonida u plazmi pacova. Ovo je rađeno sa ciljem da se ispita sposobnost izgrađenog modela da predvidi apсорpciju i raspodelu budesonida nakon intratrahealne primene nekonvencionalnih formulacija.

**Tabela 3.12.** *Ulazni parametri za in silico predviđanje apsorpcije i raspodele budesonida na modelu pacova*

Parametar	Vrednost	Referenca
Molekulska masa (g/mol)	430,54	Wu i sar., 2013
logD <sub>(pH 7,40)</sub>	2,42	Wu i sar., 2013
pK <sub>a</sub>	13,74 (baza)	Wu i sar., 2013
Permeabilnost kroz jejunum pacova, P <sub>eff</sub> (cm/s)	1,41 × 10 <sup>-5*</sup>	GastroPlus™ preračunata vrednost
Difuzioni koeficijent (cm <sup>2</sup> /s)	6,33 × 10 <sup>-6**</sup>	GastroPlus™ preračunata vrednost
Farmaceutski oblik	Intravenski bolus (i.v.); Prašak za intratrahealnu primenu (BUD-PT, BUD-NC, BUD-NEM)	/
Doza (mg)	0,34 (i.v.) 0,42 (BUD-PT) 0,49 (BUD-NC) 0,39 (BUD-NEM)	Shi i sar., 2021
Gustina čestica (g/cm <sup>3</sup> )	1,28***	Predviđeno pomoću ACD/Labs Percepta platform-e
Geometrijski prečnik čestica (μm)	50,00 (i.v.) 2,32 (BUD-PT) 0,26 (BUD-NC) 6,30 (BUD-NEM)	GastroPlus™ default vrednost Shi i sar., 2021 Liu i sar., 2018 Liu i sar., 2018
Telesna težina (kg)	0,21	Shi i sar., 2021
Odnos koncentracije lekovite supstance u punoj krvi/plazmi	1,07	Raje i sar., 2018
Slobodna frakcija lekovite supstance u plazmi (%)	12	Derendorf i sar., 1998
Ukupni klirens, Cl (L/h)	0,44	PKPlus™ preračunata vrednost
Volumen distribucije, V <sub>c</sub> (L/kg)	0,37	PKPlus™ preračunata vrednost
Konstante distribucije k <sub>1/2</sub> , k <sub>2/1</sub> (h <sup>-1</sup> )	30,12; 5,70	PKPlus™ preračunata vrednost
Konstante distribucije k <sub>1/3</sub> , k <sub>3/1</sub> (h <sup>-1</sup> )	6,18; 0,10	PKPlus™ preračunata vrednost

Ulazni parametri za PCAT™ model

Rastvorljivost u plućnoj tečnosti (pH 6,9) (mg/mL)	0,05 (BUD-PT, BUD-NEM); 10,00 (BUD-NC)	Wu i sar., 2013 Optimizovana vrednost
Konstanta brzine apsorpcije u plućima, k <sub>a</sub> (s <sup>-1</sup> )	9,30 × 10 <sup>-3</sup> (BUD-PT, BUD-NC) 2,93 × 10 <sup>-3</sup> (BUD-NEM)	Optimizovana vrednost Optimizovana vrednost

Procenat lekovite supstance koji nije vezan za mukus (%)	100	GastroPlus™ <i>default</i> vrednost
Procenat lekovite supstance koji nije vezan za epitelne ćelije pluća (%)	100	GastroPlus™ <i>default</i> vrednost
Permeabilnost u plućima (cm/s)	2,69 × 10 <sup>-6</sup> (torakalni deo) 4,46 × 10 <sup>-6</sup> (bronhijalni deo) 1,57 × 10 <sup>-4</sup> (alveolarni deo)****	GastroPlus™ preračunate vrednosti

\*Vrednost preračunata pomoću GastroPlus™ integrisanog konvertera, na osnovu podatka o permeabilnosti budesonida na Caco-2 ćelijama, koja iznosi  $2,20 \times 10^{-5}$  cm/s (preuzeto iz Raje i sar., 2018); \*\*Vrednost preračunata na osnovu molekulske mase; \*\*\*Preuzeto sa sajta: <https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=budesonide#properties:> \*\*\*\*Permeabilnost u alveolarnom delu se preračunava na osnovu poluprečnika lekovite supstance primenom teorijskog modela, dobijenog nakon izmerene permeabilnosti u alveolarnom delu pluća pacova za 11 lekovitih supstanci, dok se permeabilnost u ostalim delovima pluća preračunava korekcijom vrednosti za permeabilnost u alveolarnom delu u zavisnosti od debljine epitela ćelija u tom delu pluća

### 3.2.4.2. Budesonid-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod čoveka

Humani model budesonida izgrađen je na osnovu ulaznih parametara iz Tabele 3.13. Za validaciju *in silico* humanog modela korišćeni su *in vivo* podaci o koncentraciji budesonida u plazmi, preuzeti iz studija koje su objavili: (i) Thorsson i sar. (1994), podaci dobijeni na ispitanicima prosečne telesne mase 68 kg, koji su primili 0,50 mg budesonida u obliku intravenske infuzije u trajanju od 9 min; (ii) Edsbäcker i sar. (2002), podaci dobijeni nakon primene kapsula sa trenutnim oslobađanjem (engl. *Immediate Release*, IR) u dozi od 4,82 mg. Za procenu predviđanja modela u slučaju inhalacione primene, korišćeni su *in vivo* podaci o koncentraciji budesonida u plazmi nakon primene 1 mg praška za inhalaciju (Pulmicort® Turbuhaler®), preuzeti iz literature (Thorsson i sar., 1994). Nakon validacije, izgrađeni model je korišćen za predviđanje apsorpcije i raspodele budesonida nakon inhalacione primene tri eksperimentalne formulacije (BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM), za koje nije rađena *in vivo* studija na ljudima, pa je izabrana doza budesonida od 1 mg kako bi bila ista dozi Pulmicort®-a, za koju je dostupna *in vivo* studija na ljudima (Tabela 3.13). S obzirom na to da prva eksperimentalna formulacija, BUD-PT, u stvari predstavlja smešu Pulmicort®-a (koji je korišćen za validaciju humanog modela) i laktoze, korišćeni su isti ulazni parametri za simulacije, sa izuzetkom  $d_{v50}$  i MMAD vrednosti, koji su eksperimentalno određeni za formulaciju BUD-PT i koji su se razlikovali od vrednosti ovih parametara za Pulmicort®. Rastvorljivost budesonida kao i konstanta brzine apsorpcije u plućima ( $k_a$ ) su smatrane jednake vrednostima tih ulaznih parametara korišćenih za simulacije apsorpcije budesonida iz Pulmicort®-a, pa nije ispitivan njihov uticaj na apsorpciju budesonida nakon primene BUD-PT. Inicijalna vrednost  $k_a$  budesonida ( $7,94 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ), preuzeta iz Bhagwat i sar. (2017), koja je korišćena za simulacije inhalacione primene Pulmicort®-a dobijena je na osnovu uspostavljene korelacije između srednjeg vremena brzine rastvaranja lekovite supstance (engl. *Mean Dissolution Time*, MDT) i srednjeg vremena apsorpcije lekovite supstance (engl. *Mean Absorption Time*, MAT) nekoliko inhalacionih nisko rastvorljivih lekovitih supstanci, pri čemu je na osnovu određene MAT vrednosti budesonida iz korelacije,  $k_a$  izračunata primenom izraza:  $k_a = 1/\text{MAT}$ . Kako se ne očekuje da laktoza može da utiče na brzinu rastvaranja i apsorpciju budesonida jer će se prilikom primene praška odvojiti od čestica lekovite supstance, smatrano je adekvatnim koristiti istu  $k_a$  vrednost za simulacije primene BUD-PT kao  $k_a$  vrednost korišćenu za simulacije Pulmicort®-a. Vrednost niže izračunate konstante  $k_a$  ( $2,50 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ), korišćene za simulacije inhalacione primene BUD-NEM kod čoveka (Tabela 3.13), dobijena je na osnovu odnosa konstanti za BUD-PT formulaciju kod pacova ( $9,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) i čoveka ( $7,94 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) i konstante za BUD-NEM formulaciju kod pacova ( $2,93 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Ostali ulazni parametri koji su korišćeni bili su isti kao u modelu za predviđanje bioperformansi leka kod pacova (Tabela 3.12).

**Tabela 3.13.** *Ulazni parametri za in silico predviđanje apsorpcije i raspodele budesonida na modelu čoveka*

Parametar	Vrednost	Referenca
Permeabilnost kroz humani jejunum, $P_{eff}$ (cm/s)	$1,90 \times 10^{-4}$	Sjögren i sar., 2015
Farmaceutski oblik	Intravenska infuzija (i.v.); Peroralni (p.o.) rastvor; IR kapsula; Prašak za inhalaciju (inh.)	/
Doza (mg)	0,50 (i.v.) <sup>*</sup> 4,82 (IR kapsula); 1,00 (inh.) 1,00 (BUD-PT, BUD-NC, BUD-NEM)	Thorsson i sar., 1994 Edsbäcker i sar., 2002 Thorsson i sar., 1994 Eksperimentalne formulacije iz <i>in vivo</i> studije na pacovima (Shi i sar., 2021)
Geometrijski prečnik čestica ( $\mu\text{m}$ )	50,00 (i.v.) 50,00 (IR kapsula) 3,00 (inh.) <sup>**</sup> 2,63 (BUD-PT) 27,90 (BUD-NC) 6,30 (BUD-NEM)	GastroPlus™ <i>default</i> vrednost GastroPlus™ <i>default</i> vrednost Feddah i sar., 2000 Shi i sar., 2021 Liu i sar., 2018 Liu i sar., 2018
Telesna težina (kg)	68 (i.v.) 68 (IR kapsula) 68 (inh.) 68 (BUD-PT, BUD-NC, BUD-NEM)	Thorsson i sar., 1994 / Thorsson i sar., 1994 /
FPE u jetri (%)	85	Szeffler i sar., 1999
Odnos koncentracije lekovite supstance u punoj krvi/plazmi	0,80	Szeffler i sar., 1999
Renalni klirens, $Cl_{ren}$ (L/h)	81,64	PKPlus™ preračunata vrednost
Volumen distribucije, $V_c$ (L/kg)	0,247	PKPlus™ preračunata vrednost
Konstante distribucije $k_{1/2}$ , $k_{2/1}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	7,353; 2,104	PKPlus™ preračunata vrednost
Konstante distribucije $k_{1/3}$ , $k_{3/1}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	2,537; 0,527	PKPlus™ preračunata vrednost

Ulazni parametri za PCAT™ model

Rastvorljivost u plućnoj tečnosti (pH 6,9) (mg/mL)	0,05 10,00 (BUD-NC)	Wu i sar., 2013 Optimizovana vrednost
Konstanta brzine apsorpcije u plućima, $k_a$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$7,94 \times 10^{-4}$ (BUD-PT, BUD-NC) $2,50 \times 10^{-4}$ (BUD-NEM) <sup>***</sup>	Bhagwat i sar., 2017 Preračunata vrednost
% leka koji se proguta iz ekstratorakalnog dela (%)	100	Szeffler i sar., 1999
Permeabilnost u plućima (cm/s)	$1,53 \times 10^{-7}$ (ekstratorakalni deo)	Salar-Bahzadi i sar., 2017



	$1,39 \times 10^{-7}$ (torakalni deo) $5,11 \times 10^{-7}$ (bronhijalni deo) $1,32 \times 10^{-5}$ (alveolarni deo) <sup>****</sup>	
--	--	--

\*Vreme trajanja infuzije od 9 min (Thorsson i sar., 1994); \*\*Odnosi se na MMAD vrednost za Pulmicort® Turbuhaler®, ali je ista vrednost korišćena i kao geometrijski prečnik čestica; \*\*\*Vrednost  $k_a$  (BUD-NEM) za čoveka je dobijena na osnovu odnosa  $k_a$  (BUD-PT) za pacova /  $k_a$  (BUD-PT) za čoveka =  $k_a$  (BUD-NEM) za pacova /  $k_a$  (BUD-NEM) za čoveka; \*\*\*\*Podatak o permeabilnosti budesonida u alveolarnom delu pluća preuzet iz literature (Salar-Bahzadi i sar., 2017), dok su vrednosti permeabilnosti za ekstratorakalni, torakalni i bronhijalni deo skalirane u odnosu na ovu vrednost pomoću integrisanog konvertera u okviru GastroPlus™ softvera

### 3.2.4.3. Salbutamol-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod pacova

Ulazni parametri koji su korišćeni za izgradnju modela salbutamol-sulfata za predviđanje bioperformansi leka kod pacova nalaze se u Tabeli 3.14. Za validaciju *in silico* modela za intravensku primenu salbutamol-sulfata korišćeni su nepublikovani podaci dobijeni na pacovima *Wistar* soja, prosečne telesne mase  $200 \pm 10$  g, koji su primili 0,50 mg salbutamol-sulfata u obliku intravenskog bolusa i *in vivo* podaci o koncentraciji salbutamola u plazmi nakon intratrahealne primene 2,30 mg praška za inhalaciju (koji je sadržao 0,50 mg salbutamol-sulfata) (Li i sar., 2017a). Vrednost za ukupni klirens lekovite supstance u plazmi dobijena je pomoću PKPlus™ modula, analizom profila koncentracije salbutamola u plazmi u toku vremena nakon intravenske primene.  $P_{eff}$  vrednost salbutamola izračunata je na osnovu vrednosti konstante apsorpcije lekovite supstance u srednjem delu tankog creva pacova ( $k_a = 0,34$  h) (Valenzuela i sar., 2004) i poluprečnika jejunuma pacova ( $R = 0,22$  cm, GastroPlus™ *default* vrednost) primenom jednačine 44 (Lin i Wong, 2017):

$$k_a = \frac{2 P_{eff}}{R} \quad (44)$$

**Tabela 3.14.** Ulazni parametri za *in silico* predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola na modelu pacova

Parametar	Vrednost	Referenca
Molekulska masa (g/mol)	239,32	Wu i sar., 2016
logP	0,74	Pinto i sar., 2021
pK <sub>a</sub>	9,25 (baza); 10,77 (kiselina)	Wu i sar., 2016
Rastvorljivost (pH 3,0); (pH 7,4); (pH 9,3) (mg/mL)	263,50; 261,60; 26,96	Imboden i Imanidis, 1999
Permeabilnost kroz jejunum pacova, P <sub>eff</sub> (cm/s)	$0,094 \times 10^{-4}$	Preračunato na osnovu Valenzuela i sar., 2004
Difuzioni koeficijent (cm <sup>2</sup> /s)	$8,67 \times 10^{-6}$ *	GastroPlus™ preračunata vrednost
Farmaceutski oblik	Intravenski bolus (i.v.); Prašak za intratrahealnu (i.t.) primenu	/
Doza (mg)	0,50 (i.v., i.t.)	Li i sar., 2017a
Gustina čestica (g/cm <sup>3</sup> )	1,20	GastroPlus™ default vrednost
Geometrijski prečnik čestica (μm)	50 (i.v.); 4,39 (i.t.)	GastroPlus™ default vrednost; Nepublikovan podatak
Telesna težina (kg)	0,20	Li i sar., 2017a
Odnos koncentracije lekovite supstance u punoj krvi/plazmi	1,10	Jones i Harrison, 2012
Slobodna frakcija lekovite supstance u plazmi (%)	80	Jones i Harrison, 2012
Ukupni klirens, Cl (L/h)	0,70	PKPlus™ preračunata vrednost
Volumen distribucije, V <sub>c</sub> (L/kg)	1,70	Optimizovana vrednost
Konstante distribucije k <sub>1/2</sub> , k <sub>2/1</sub> (h <sup>-1</sup> )	1,70; 1,20	Jones i Harrison, 2012

Ulazni parametri za PCAT™ model

Rastvorljivost u plućnoj tečnosti (pH 6,9) (mg/mL)	259,10*	GastroPlus™ preračunata vrednost
Konstanta brzine apsorpcije u plućima, k <sub>a</sub> (s <sup>-1</sup> )	0,01	Jones i Harrison, 2012
Procenat lekovite supstance koji nije vezan za mukus (%)	100	GastroPlus™ default vrednost
Procenat lekovite supstance koji nije vezan za epitelne ćelije pluća (%)	100	GastroPlus™ default vrednost
Permeabilnost u plućima (cm/s)	$2,73 \times 10^{-7}$ (torakalni deo) $4,51 \times 10^{-7}$ (bronhijalni deo) $1,59 \times 10^{-5}$ (alveolarni deo)**	Zellnitz i sar., 2019a

\*Vrednost izračunata na osnovu molekulske mase; \*\*Podatak o permeabilnosti salbutamol-sulfata u alveolarnom delu preuzet iz literature (Zellnitz i sar., 2019a), dok su vrednosti permeabilnosti za torakalni i alveolarni deo skalirane u odnosu na ovu vrednost pomoću integrisanog konvertera u okviru GastroPlus™ softvera

#### 3.2.4.4. Salbutamol-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod čoveka

Za izgradnju humanog salbutamol-specifičnog modela korišćeni su literaturni podaci, kao i eksperimentalne i *in silico* dobijene vrednosti ulaznih parametara prikazane u Tabeli 3.15. *In silico* humani model validiran je poređenjem rezultata simulacija sa *in vivo* podacima o koncentraciji lekovite supstance u plazmi ispitanika koji su primili 1,50 mg salbutamola u obliku intravenske infuzije u trajanju od 30 min (Goldstein i sar., 1987), kao i *in vivo* profil koncentracije salbutamola u plazmi nakon primene 1,20 mg salbutamola u obliku rastvora za peroralnu primenu (100 mL) (Du i sar., 2002). Model inhalacione primene validiran je na osnovu *in vivo* podataka o koncentraciji salbutamola u plazmi nakon primene dve različite doze salbutamola (0,2 mg - Slučaj 1 i 1,2 mg - Slučaj 2) u obliku pMDI (Ventolin® pMDI), preuzetih iz studija koje su sproveli Jiang i sar. (2016) i Du i sar. (2002), redom. S obzirom na to da u GastroPlus™ softveru nije dostupna opcija da se za farmaceutski oblik izabere suspenzija za inhalaciju (što predstavlja preparat Ventolin®), već samo rastvor ili prašak za inhalaciju, u oba slučaja je za simulacije kao farmaceutski oblik izabran prašak za inhalaciju. Pri tome je podešeno da se određena zapremina tečnosti uzme sa lekom, kako bi se simulirala opcija inhalacione primene suspenzije (a ne praška za inhalaciju). Druge grupe istraživača su, takođe, za validaciju *in silico* inhalacionih modela salbutamola koristile samo *in vivo* podatke o koncentraciji lekovite supstance u plazmi nakon primene pMDI (Jones i Harisson, 2012; Wu i sar., 2016). Profili koncentracije salbutamola u plazmi nakon primene Diskus DPI (0,6 mg) bez/uz istovremenu primenu aktivnog uglja korišćeni su za dodatnu validaciju modela za inhalacionu primenu (Moore i sar., 2017). Nakon validacije, model za inhalacionu primenu je korišćen za predviđanje apsorpcije i raspodele lekovite supstance nakon primene eksperimentalne formulacije sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata (SAL-HA) opisane u studiji koju su sproveli Li i sar., 2017a. Kako je dostupna samo *in vivo* studija nakon primene formulacije SAL-HA pacovima, ne i ljudima, izabrana je doza salbutamol-sulfata od 0,6 mg, koja je ista kao doza salbutamol-sulfata nakon primene Diskus® DPI (Tabela 3.15).

Za sve simulacije je korišćena prosečna telesna težina ispitanika od 70 kg. Vrednosti volumena distribucije ( $V_c$ ) i konstanti distribucije  $k_{1/2}$ ,  $k_{2/1}$  dobijene su pomoću PKPlus™ modula, analizom profila koncentracije salbutamola u plazmi u toku vremena nakon intravenske primene (Goldstein i sar., 1987). Ukupni klirens salbutamola (28,80 L/h), kao i vrednost renalnog klirensa (17,46 L/h) preuzeti su iz literature (Morgan i sar., 1986), pri čemu je razlika ove dve vrednosti (11,34 L/h) uneta u model kao hepatski klirens (Tabela 3.15) s obzirom na to da se salbutamol dominantno eliminiše putem jetre (Cubitt i sar., 2011). Ostali ulazni parametri koji su korišćeni bili su isti kao u modelu pacova (Tabela 3.14).

**Tabela 3.15.** Ulazni parametri za *in silico* predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola na modelu čoveka

Parametar	Vrednost	Referenca
Permeabilnost kroz humani jejunum, $P_{eff}$ (cm/s)	$1,40 \times 10^{-4}$	Optimizovana vrednost
Farmaceutski oblik	Intravenska infuzija (i.v.); Oralni rastvor (p.o.); Prašak za inhalaciju (inh.)	
Doza (mg)	1,50 (i.v.)*	Goldstein i sar., 1987
	1,20 (p.o.), 100 mL	Du i sar., 2002
	0,20 (inh.), Ventolin® pMDI	Jiang i sar., 2016
	1,20 (inh.), Ventolin® pMDI	Du i sar., 2002
	0,60 (inh.), Diskus® DPI	Moore i sar., 2017
	0,60 (SAL-HA)	Eksperimentalna formulacija iz <i>in vivo</i> studije na pacovima (Li i sar., 2017a)
Gustina čestica ( $g/cm^3$ )	1,20	GastroPlus™ <i>default</i> vrednost
Geometrijski prečnik čestica ( $\mu m$ )	50 (i.v.); 50 (p.o.); 3,00 (inh.) 2,07 (inh.) 1,83 (inh.) 4,39 (SAL-HA)	GastroPlus™ <i>default</i> vrednost; Jiang i sar., 2016 Hoye i sar., 2005 Pinto i sar., 2021 Nepublikovan podatak
Telesna težina (kg)	70	/
FPE u tankom crevu (%)	48	Morgan i sar., 1986
Odnos koncentracije lekovite supstance u punoj krvi/plazmi	1,10	Jones i Harrison, 2012
Slobodna frakcija lekovite supstance u plazmi (%)	91	Jones i Harrison, 2012
Renalni klirens, $Cl_{ren}$ (L/h)	17,46	Morgan i sar., 1986
Hepatički klirens (L/h)	11,34	Preračunato na osnovu literaturnih podataka (Morgan i sar., 1986)
Volumen distribucije, $V_c$ (L/kg)	0,762	PKPlus™ preračunata vrednost
Konstante distribucije $k_{1/2}$ , $k_{2/1}$ ( $h^{-1}$ )	1,58; 0,84	PKPlus™ preračunata vrednost
<b>Ulazni parametri za PCAT™ model</b>		
Konstanta brzine apsorpcije u plućima, $k_a$ ( $s^{-1}$ )	$4,0 \times 10^{-3}$ (Ventolin® pMDI, Diskus® DPI)	Optimizovana vrednost
	$8,5 \times 10^{-4}$ (SAL-HA)**	Preračunata vrednost
% leka koji se proguta/iskašlje iz ekstratorakalnog dela (%)	60***/40	Melchor i sar., 1993; Lipworth, 1996
Permeabilnost u plućima (cm/s)	$1,85 \times 10^{-7}$ (ekstratorakalni deo) $1,68 \times 10^{-7}$ (torakalni deo)	Zellnitz i sar., 2019a

	$6,16 \times 10^{-7}$ (bronhijalni deo)	
	$1,59 \times 10^{-5}$ (alveolarni deo)****	

\*Vreme trajanja infuzije 30 min (Goldstein i sar., 1987); \*\*Vrednost  $k_a$  (SAL-HA) za čoveka je dobijena na osnovu odnosa  $k_a$  (BUD-PT) za pacova /  $k_a$  (BUD-PT) za čoveka =  $k_a$  (SAL-HA) za pacova /  $k_a$  (SAL-HA) za čoveka; \*\*\*Određeni procenat emitovane doze salbutamola se proguta, što prema procenama iznosi 50-60% (Melchor i sar., 1993), odnosno 60-80% (Lipworth, 1996), a zavisi od vrste inhalatora, karakteristika formulacije itd.; \*\*\*\*Podatak o permeabilnosti salbutamol-sulfata u alveolarnom delu preuzet iz literature (Zellintz i sar., 2019a), dok su vrednosti permeabilnosti za ekstratorakalni, torakalni i alveolarni deo skalirane u odnosu na ovu vrednost pomoću integrisanog konvertera u okviru GastroPlus™ softvera

Većina parametara iz Tabele 3.15 korišćena je i za simulacije inhalacione primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata čija je izrada opisana u okviru druge faze eksperimentalnog rada, uz razlike koje se odnose na faktore formulacije, koji su eksperimentalno utvrđeni (prikazani u poglavlju 4.2.2). U Tabeli 3.16 prikazani su faktori formulacija F1, F7, F9, F10 i F11, koji su korišćeni za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola nakon primene praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica kod čoveka. Izabrana doza salbutamol-sulfata za formulacije čvrstih lipidnih mikročestica bila je 0,6 mg, kako bi odgovarala primenjenoj dozi salbutamol-sulfata iz Diskus® DPI.

**Tabela 3.16.** *Ulazni parametri korišćeni za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola iz eksperimentalnih formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica kod čoveka*

Parametar	F1	F7	F9	F10	F11
Prečnik čestica, $d_{v50}$ ( $\mu\text{m}$ )	4,42	4,67	4,03	5,13	3,97
Span	1,49	1,30	1,22	2,02	1,11
Gustina čestica ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	1,05	1,06	1,17	1,23	1,02

Humane vrednosti konstante  $k_a$  za eksperimentalne formulacije praškova čvrstih lipidnih mikročestica (F1, F7, F9, F10 i F11) dobijene su na osnovu jednačine uspostavljene korelacije između  $k_a$  vrednosti za formulacije (SAL-HA, BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM) dobijenih na modelima za pacove i  $k_a$  vrednosti za iste formulacije dobijenih na ljudima, što je detaljnije opisano u sledećem poglavlju 3.2.4.5.

### 3.2.4.5. Skaliranje farmakokinetičkih parametara sa modela za pacova na model čoveka i određivanje humane $k_a$ vrednosti na osnovu $k_a$ vrednosti dobijene na modelu za pacova

Salbutamol-specifičan model za pacova je korišćen za skaliranje farmakokinetičkih parametara ( $Cl$ ,  $V_c$ ,  $t_{1/2}$ ) sa pacova na čoveka, na osnovu jednačina 45, 46 i 47 (Caldwell i sar., 2004):

$$Cl_{\text{human}} \approx 40 \times Cl_{\text{rat}} \text{ (L/h)} \quad (45)$$

$$V_{\text{ss human}} \approx 200 \times V_{\text{ss rat}} \text{ (L)} \quad (46)$$

$$t_{1/2 \text{ human}} \approx 4 \times t_{1/2 \text{ rat}} \text{ (h)} \quad (47)$$

pri čemu  $V_{\text{ss}}$  predstavlja volumen distribucije u stanju ravnoteže (engl. *steady state*).

Pored ova tri farmakokinetička parametra, salbutamol i budesonid-specifični modeli za pacova korišćeni su i za uspostavljanje korelacije između konstante brzine apsorpcije u plućima,  $k_a$  (određene na osnovu *in vivo* profila koncentracije lekovitih supstanci u plazmi pacova) sa parametrom  $D_n$ , koji opisuje *in vitro* brzinu rastvaranja lekovitih supstanci iz tri formulacije (SAL-HA, BUD-PT i BUD-NC). *In vitro* profili brzine rastvaranja salbutamol-sulfata i budesonida iz ove tri formulacije preuzeti su iz literature (Li i sar., 2017a; Liu i sar., 2018) i na osnovu ovih profila su, primenom softvera *DDSolver*,

preračunati parametri: MDT i srednje vreme zadržavanja lekovite supstance (engl. *Mean Residence Time*, MRT).  $D_n$  je izračunat kao odnos odgovarajućih vrednosti MRT i MDT. Zatim je dobijena jednačina koja opisuje korelaciju između  $k_a$  vrednosti za modele pacova i parametra  $D_n$ . Dobijena jednačina je onda primenjena da se, na osnovu  $D_n$  vrednosti koje opisuju profile *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz formulacija čvrstih lipidnih mikročestica (F1, F7, F9, F10, F11), odrede najpre  $k_a$  vrednosti ovih eksperimentalnih formulacija kod pacova. Paralelno je uspostavljena korelacija između  $k_a$  vrednosti formulacija (SAL-HA, BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM) dobijenih na modelima za pacove i  $k_a$  vrednosti za iste formulacije dobijenih na ljudima. Primenom jednačine pomenute korelacije između  $k_a$  vrednosti za pacove i humanih  $k_a$  vrednosti za formulacije SAL-HA, BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM, izračunata je humana  $k_a$  vrednost za eksperimentalne formulacije čvrstih lipidnih mikročestica (F1, F7, F9, F10 i F11) na osnovu  $k_a$  vrednosti određenih na modelu za pacova za ovih pet eksperimentalnih formulacija.

### 3.2.4.6. Analiza rezultata simulacija

Moć predviđanja generisanih modela procenjena je na osnovu izračunate FE vrednosti, koja opisuje razliku između *in silico* predviđenih i *in vivo* uočenih podataka (jednačina 48), pri čemu se predviđanje može smatrati uspešnim ukoliko je vrednost greške predviđanja bliska jedinici. Ako se predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara (npr.  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ ) nalaze u dvostrukom opsegu *in vivo* uočenih vrednosti, predviđanje se može smatrati uspešnim (Li i sar., 2012; Jones i sar., 2015; Zhang i sar., 2015; Park i sar., 2017; Medarević i sar., 2018). Pored toga, izračunat je i koeficijent determinacije ( $R^2$ ) kako bi se procenila linearna zavisnost između *in vivo* uočenih i *in silico* predviđenih vrednosti farmakokinetičkih parametara.

$$FE = \frac{\text{Predviđeno}}{\text{In vivo}} \quad (48)$$

Analiza osetljivosti parametara (PSA), opcija u sklopu GastroPlus™ softvera, korišćena je za procenu uticaja vrednosti izabranih ulaznih parametara na predviđene profile apsorpcije i farmakokinetičke parametre ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ ) budesonida i salbutamola. Za ovu svrhu, izabrane vrednosti ulaznih parametara su postepeno varirane u definisanom opsegu, dok su vrednosti svih ostalih parametara modela bile konstantne. Rezultati PSA su izraženi preko koeficijenta osetljivosti (engl. *Sensitivity Coefficient*, SC), koji se računa na osnovu jednačine 49:

$$SC = \frac{\text{Frakciona promena u izlaznoj vrednosti}}{\text{Frakciona promena u ulaznoj vrednosti}} \quad (49)$$

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

## 4.1. Formulacija i karakterizacija čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem ili sušenjem smrzavanjem

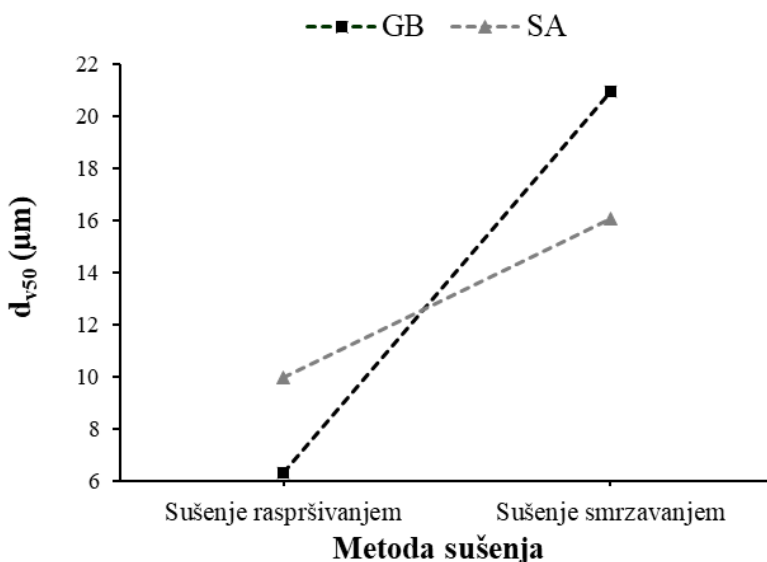
### 4.1.1. Raspodela veličine i stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica

U Tabeli 4.1 prikazani su rezultati raspodele veličine čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih sušenjem smrzavanjem i sušenjem raspršivanjem. Formulacije S7 i S8 nisu mogle uspešno da se izrade pod zadatim parametrima procesa sušenja raspršivanjem, te stoga nisu analizirane. Na osnovu podataka iz Tabele 4.1 može se zaključiti da su sve formulacije dobijene sušenjem smrzavanjem (P1-P8) pokazale veći prečnik mikročestica u odnosu na formulacije dobijene sušenjem raspršivanjem (S1, S2, S3, S6).

**Tabela 4.1.** Raspodela veličine čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih sušenjem smrzavanjem i raspršivanjem

Parametar	$d_{v50}$ ( $\mu\text{m}$ )	Span	Parametar	$d_{v50}$ ( $\mu\text{m}$ )	Span
Formulacije sušene smrzavanjem			Formulacije sušene raspršivanjem		
P1	19,86	2,46	S1	6,31	3,11
P2	21,78	3,21	S2	8,05	2,25
P3	19,87	3,58	S3	4,51	3,09
P4	22,26	4,90	S4	n.a.	n.a.
P5	16,55	3,23	S5	n.a.	n.a.
P6	13,60	4,25	S6	9,99	1,54
P7	15,47	3,37	S7	/	/
P8	18,57	3,92	S8	/	/

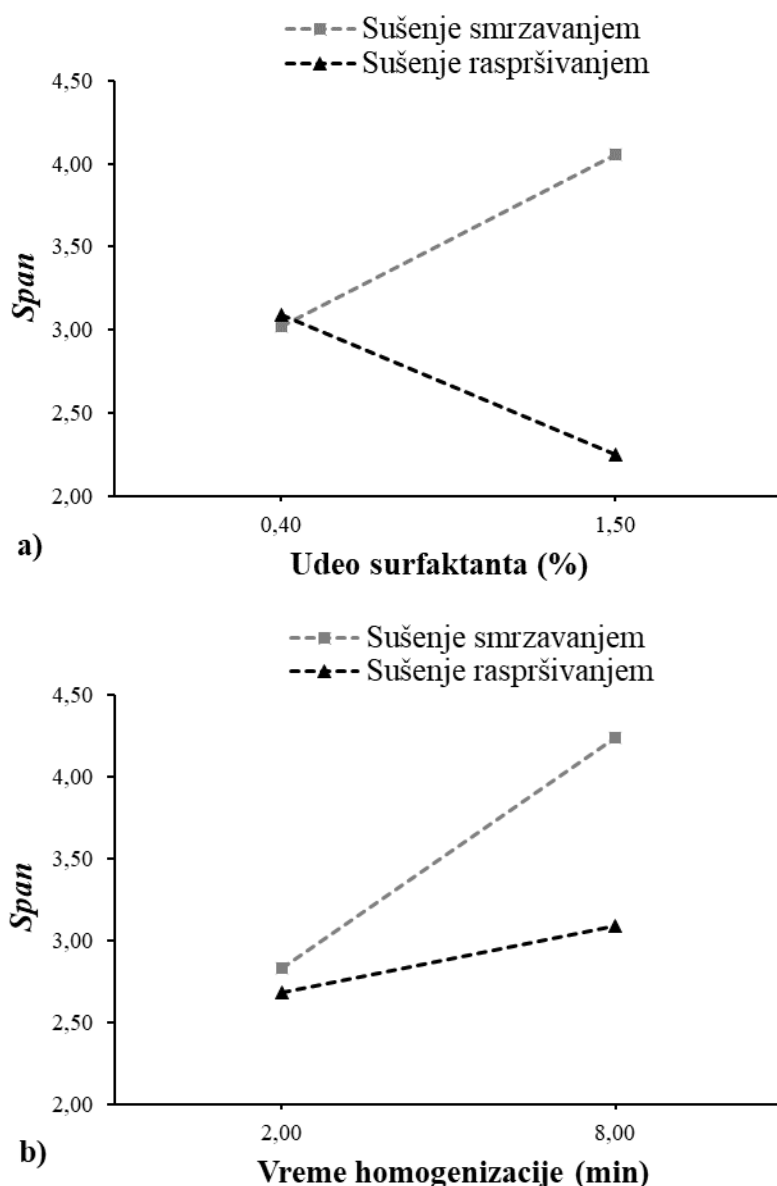
Rezultatima ANOVA analize podataka, dobijenim kroz faktorski eksperimentalni dizajn, potvrđeno je da metoda sušenja ima značajan uticaj na geometrijski prečnik ( $d_{v50}$ ) čvrstih lipidnih mikročestica ( $p < 0,0001$ ), pri čemu su mikročestice manjeg prečnika dobijene procesom sušenja raspršivanjem (Slika 4.1). Uočeno je da su razlike u veličini čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih primenom dve metode sušenja veće kada je kao lipidna komponenta korišćen glicerildibehenat.



**Slika 4.1.** Uticaj metode sušenja na geometrijski prečnik ( $d_{v50}$ ) čvrstih lipidnih mikročestica; GB – glicerildibehenat, SA – stearilalkohol



U slučaju formulacija dobijenih sušenjem smrzavanjem, uočava se da formulacije sa stearylalkoholom kao lipidnom komponentom imaju manji prečnik mikročestica u odnosu na formulacije sa glicerildibehenatom, dok se suprotno može uočiti za formulacije dobijene sušenjem raspršivanjem. Formulacija P3 sušena raspršivanjem je jedina pokazala  $d_{v50} < 6 \mu\text{m}$ , koji je, uz adekvatnu gustinu, preduslov da formulacija praška pokaže odgovarajući aerodinamički prečnik (MMAD  $< 5 \mu\text{m}$ ). Jedino u slučaju visoko poroznih čestica veoma niske gustine (čija je gustina  $< 0,4 \text{ g/cm}^3$ , a ide do svega  $0,02 \text{ g/cm}^3$ ) poželjne su veće vrednosti geometrijskog prečnika od 5 do 30  $\mu\text{m}$  (Steckel i Brandes, 2004; Abdelazis i sar., 2018). Relativno veliki prečnik ( $d_{v50}$  od 14,5  $\mu\text{m}$ ) čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih procesom emulgovanja na visokoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem smrzavanjem dobijen je i u studiji koju su objavili Scalia i sar. (2012), zbog čega je u toj studiji primenjen dodatni korak usitnjavanja suspenzije mikročestica ultrazvučnim talasima. Međutim, ispostavilo se da ovaj proces može da naruši stabilnost suspenzija usled stvaranja aglomerata mikročestica pre nego što dođe do procesa sušenja smrzavanjem. Pored toga, većina formulacija sušenih smrzavanjem (prvenstveno P3, P4, P6, P7 i P8) pokazala je veoma visoke *span* vrednosti, što ukazuje na široku raspodelu veličine čvrstih lipidnih mikročestica, i nehomogenu raspodelu čvrstih lipidnih mikročestica, u nekim slučajevima čak bimodalnu, što može dovesti do velikih varijacija u depoziciji leka u plućima i varijacija u terapijskom efektu leka. Uticaj različitih faktora i njihovih interakcija na *span* vrednost čvrstih lipidnih mikročestica prikazana je na Slikama 4.2 i 4.3. Metoda sušenja je opet izdvojena kao faktor koji je imao značajan uticaj i na *span* vrednost ( $p < 0,0001$ ), pri čemu je uža raspodela veličine čestica (manje *span* vrednosti) dobijena u slučaju formulacija sušenih raspršivanjem. Pored same metode sušenja, uočene su značajne interakcije faktora koje su imale uticaj na *span* vrednost, kao što su: interakcija udela surfaktanta i metode sušenja ( $p < 0,0001$ ), metode sušenja i vremena homogenizacije ( $p = 0,0002$ ), kao i vrste lipidne komponente i vremena homogenizacije ( $p = 0,0001$ ).

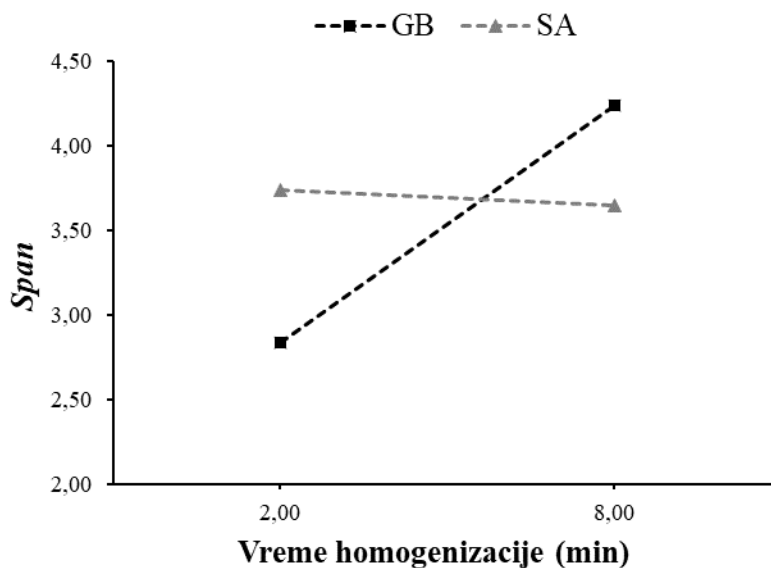


**Slika 4.2.** Uticaj interakcija faktora metode sušenja i: udela surfaktanta poloksamera 188 (a); vremena homogenizacije (b) na span vrednost

Udeo surfaktanta poloksamera 188 u opsegu 0,40-1,50% imao je suprotan uticaj na *span* vrednost formulacija sušenih smrzavanjem u odnosu na formulacije sušene raspršivanjem (Slika 4.2a). Povećanje udela surfaktanta u slučaju formulacija sušenih smrzavanjem dovelo je do većih *span* vrednosti, za razliku od uticaja većeg udela surfaktanta na *span* vrednosti čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem. Razlog za uočene razlike u ovom slučaju nije posledica samo različitih metoda sušenja, već i razlika u sastavu formulacija pre procesa sušenja. Naime, usled prisustva trehaloze, čvrste lipidne mikročestice dobijene sušenjem smrzavanjem podložnije su stvaranju aglomerata, pa udeo surfaktanta nije bio dovoljan da spreči aglomeraciju čestica pre sušenja, što je posledično moglo da se manifestuje većim *span* vrednostima. Međutim, ostaje nejasno kako je veći udeo surfaktanta doprineo većim *span* vrednostima u slučaju formulacija sušenih smrzavanjem. Kod uzoraka sušenih raspršivanjem je, kao što je i očekivano, veći udeo surfaktanta uspešno stabilizovao suspenzije mikročestica, te doprineo užoj raspodeli veličine čvrstih lipidnih mikročestica. Sa druge strane, produžavanje vremena homogenizacije sa 2 na 8 min, dovelo je do povećanja *span* vrednosti za formulacije čvrstih lipidnih

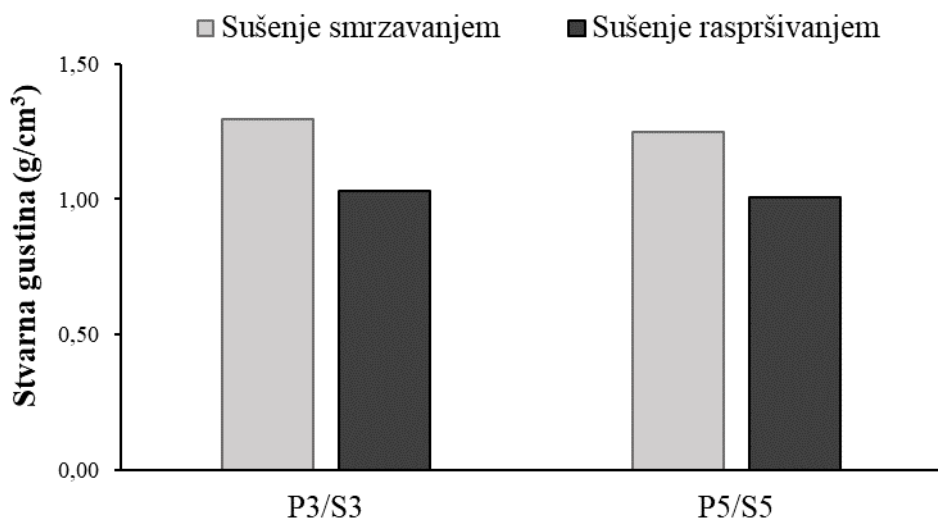
mikročestica sušenih metodama raspršivanja i smrzavanja (Slika 4.2b). Dodatno, *span* vrednost bila je viša u slučaju formulacija sa glicerildibehenatom u poređenju sa formulacijama sa stearylalkoholom za vrednost dužeg vremena homogenizacije od 8 min, dok je pri kraćem vremenu homogenizacije niža *span* vrednost uočena za formulacije sa glicerildibehenatom (Slika 4.3). Ipak, *span* vrednosti su bile dosta visoke u svim slučajevima, budući da se teži da one budu oko 1 i manje (Ramakrishnan i sar., 2014). Ovakvi rezultati ukazuju na neophodnost dalje optimizacije procesnih parametara i faktora formulacije kako bi se dobili praškovi sa užom raspodelom veličine čvrstih lipidnih mikročestica.

Na osnovu rezultata (raspodele) veličine čvrstih lipidnih mikročestica moglo bi se zaključiti da se za dalji razvoj praškova za inhalaciju prednost daje formulacijama dobijenih sušenjem raspršivanjem.



**Slika 4.3.** Uticaj interakcije faktora vrste lipidne komponente i vremena homogenizacije na *span* vrednost; GB – glicerildibehenat, SA – stearylalkohol

Stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih sušenjem smrzavanjem iznosila je oko  $1,2 \text{ g/cm}^3$ , dok je stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem bila nešto niža, oko  $1,0 \text{ g/cm}^3$  (Slika 4.4). Male razlike u stvarnoj gustini između uzoraka dobijenih sušenjem smrzavanjem (P3 i P5) i sušenjem raspršivanjem (S3 i S5) verovatno su posledica prisustva trehaloze u formulacijama dobijenih sušenjem smrzavanjem. Iako ne postoji jasan zahtev za vrednost stvarne gustine praškova za inhalaciju, teži se razvoju formulacija što manje gustine koja će, kao što je već objašnjeno, zajedno sa odgovarajućim geometrijskim prečnikom čestica i faktorom sferičnosti koji opisuje oblik mikročestica, doprineti odgovarajućem aerodinamičkom prečniku mikročestica ( $\text{MMAD} < 5 \mu\text{m}$ ), a posledično uticati i na ostale aerodinamičke karakteristike praškova za inhalaciju.



**Slika 4.4.** Stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih sušenjem smrzavanjem (P3, P5) i sušenjem raspršivanjem (S3, S5)

#### 4.1.2. Nasipna i tapkana gustina i protočnost praškova čvrstih lipidnih mikročestica

Pored stvarne gustine praškova za inhalaciju, u praksi se često određuju i nasipna i tapkana gustina, kako bi se procenila protočnost praškova za inhalaciju. Nasipna (ponekad i tapkana) gustina praškova za inhalaciju se često koristi umesto stvarne gustine i za izračunavanje/predviđanje aerodinamičkog prečnika čestica, te se stoga navodi u literaturi da su čestice prečnika 1-5  $\mu\text{m}$  i nasipne gustine manje od 1  $\text{g}/\text{cm}^3$  optimalne za adekvatnu depoziciju leka u plućima (Chaurasiya i sar., 2020). Međutim, ovde je bitno napraviti razliku između stvarne gustine mikročestica i nasipne gustine praška, koja podrazumeva zapreminu koju određena masa praška zauzima, zajedno sa međučestičnim prostorom ispunjenim vazduhom (porama), i funkcija je gustine čestica i sposobnosti „pakovanja“ čestica praška koja zavisi od kohezivnih sila (Boraey i sar., 2013). Drugim rečima, za razliku od stvarne gustine koja se prvenstveno odnosi na strukturu čestica, nasipna i tapkana gustina su karakteristike praška u *bulk*-u. Pored nasipne i tapkane gustine i porozitet je karakteristika koja opisuje strukturu praška i utiče na njegovu protočnost (Van Campen i Venthoye, 2002). Ukupni međučestični prostor ispunjen vazduhom (pore) predstavlja porozitet praška.

U Tabelama 4.2 i 4.3 prikazane su nasipna i tapkana gustina, *Carr*-ov indeks i *Hausner*-ov odnos izrađenih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica, kao i opisna protočnost, određena na osnovu *Carr*-ovog indeksa i *Hausner*-ovog odnosa. Nasipne gustine svih formulacija su bile u opsegu od 0,1190 do 0,2703  $\text{g}/\text{cm}^3$ , a tapkane nešto veće, u opsegu od 0,1515 do 0,3571  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Iako ne postoji jasan trend između nasipnih i tapkanih gustina uzoraka dobijenih različitim metodama sušenja, primećuje se da su nasipna i tapkana gustina bile veće kod većine formulacija sušenih smrzavanjem. Slične vrednosti nasipne i tapkane gustine pominju se u literaturi (Sebti i Amighi, 2006) za formulacije praškova dobijenih sušenjem raspršivanjem etanolnih rastvora lipidnih mikročestica. Sve formulacije su pokazale nasipnu gustinu manju od 1  $\text{g}/\text{cm}^3$  (tačnije, manju od 0,4  $\text{g}/\text{cm}^3$ ), koja je optimalna za postizanje adekvatne depozicije leka u plućima (Chaurasiya i sar., 2020; Duong i sar., 2021). Kod praškova za inhalaciju, optimizacija nasipne gustine je nezahvalan proces s obzirom na to da je smanjenje nasipne gustine povoljno za adekvatno raspršivanje praška, dok njeno povećanje doprinosi boljim protočnim karakteristikama praška. Raspršivanje praška i njegova protočnost su podjednako bitne karakteristike jer omogućavaju adekvatno oslobađanje praška iz inhalatora, doziranje i depoziciju leka (Belotti i sar., 2014). Pored nasipne gustine, tapkana gustina utiče na protočnost praškova i pokazano je da su praškovi

za inhalaciju sa niskom tapkanom gustinom vrlo kohezivni, te da se sa povećanjem tapkane gustine može smanjiti kohezivnost praškova (Boraey i sar., 2013). Iz Tabela 4.2 i 4.3 se primećuje da je Carr-ov indeks bio manji od 25% za većinu formulacija, što ukazuje na njihove zadovoljavajuće protočne karakteristike, s obzirom na to da se smatra da Carr-ov indeks manji od 25% ukazuje na dobra protočna svojstva praškova za inhalaciju (Rattanupatam i Srichana, 2014), dok vrednosti Carr-ovog indeksa veće od 40% ukazuju na njihove loše protočne karakteristike (Sebti i Amighi, 2006). Naime, iako bi se protočnost većine prikazanih formulacija mogla opisati kao „prihvatljiva“ ili „prosečna“ (u skladu sa pojmovima iz Ph. Eur. 10.0), može se smatrati da je ovakva protočnost sasvim zadovoljavajuća u slučaju praškova za inhalaciju, imajući u vidu da su mikronizirane čestice praškova za inhalaciju vrlo kohezivne prirode i generalno pokazuju loša protočna svojstva (Sebti i Amighi, 2006). Zbog toga jedan od pristupa za dobijanje formulacija praškova za inhalaciju sa poboljšanim protočnim karakteristikama podrazumeva da se mikronizirane čestice lekovite supstance mešaju sa krupnijim česticama nekog nosača kako bi se dobile tzv. „uređene smeše“, koje su manje kohezivne u poređenju sa čistom mikroniziranom lekovitom supstancom. U slučaju izrađenih formulacija je, pak, dobijena zadovoljavajuća protočnost praškova čvrstih lipidnih mikročestica, iako pomenute formulacije ne sadrže nosač, odnosno nisu izrađene tzv. „uređene smeše“ praškova. Trehaloza, kao sastavni deo formulacija koje su sušene smrzavanjem, nije služila kao nosač, već kao krioprotektant. Dodatni dokaz da trehaloza nije odgovorna za zadovoljavajuće protočne karakteristike praškova čvrstih lipidnih mikročestica je i to što su formulacije praškova sušenih raspršivanjem pokazale odgovarajuću protočnost (Tabela 4.3), iako se u njihovom sastavu ne nalazi trehaloza.

**Tabela 4.2.** Nasipna i tapkana gustina, Hausner-ov odnos i Carr-ov indeks za formulacije dobijene sušenjem smrzavanjem

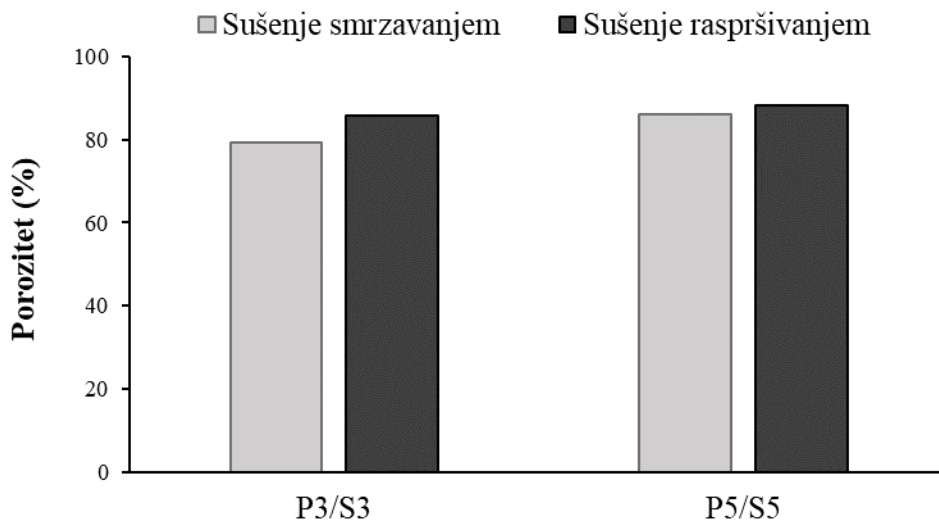
Formulacija	Nasipna gustina (g/cm <sup>3</sup> )	Tapkana gustina (g/cm <sup>3</sup> )	Hausner-ov odnos	Carr-ov indeks (%)	Protočnost
P1	0,1190	0,1587	1,33	25,02	prihvatljiva
P2	0,1578	0,1972	1,25	19,98	prosečna
P3	0,2703	0,3571	1,32	24,31	prihvatljiva
P4	0,2083	0,2632	1,26	20,86	prihvatljiva
P5	0,1724	0,2174	1,26	20,70	prihvatljiva
P6	0,1724	0,2326	1,35	25,88	prihvatljiva
P7	0,1667	0,2174	1,30	23,32	prihvatljiva
P8	0,1786	0,2381	1,33	25,00	prihvatljiva

**Tabela 4.3.** Nasipna i tapkana gustina, Hausner-ov odnos i Carr-ov indeks za formulacije dobijene sušenjem raspršivanjem

Formulacija	Nasipna gustina (g/cm <sup>3</sup> )	Tapkana gustina (g/cm <sup>3</sup> )	Hausner-ov odnos	Carr-ov indeks (%)	Protočnost
S1	0,1695	0,2239	1,32	24,30	prihvatljiva
S2	0,2277	0,2845	1,25	19,95	prosečna
S3	0,1471	0,1923	1,3073	23,50	prihvatljiva
S4	0,1390	0,1781	1,2813	21,95	prihvatljiva
S5	0,1200	0,1593	1,3275	24,67	prihvatljiva
S6	0,1213	0,1515	1,24	19,96	prosečna

Porozitet praškova je bio sličan za sve četiri izabrane formulacije čvrstih lipidnih mikročestica, iako su nešto više vrednosti poroziteta uočene za uzorke sušene raspršivanjem (Slika 4.5). S obzirom na to da je visok porozitet jedna od poželjnih karakteristika praškova za inhalaciju (Duong i sar., 2021),

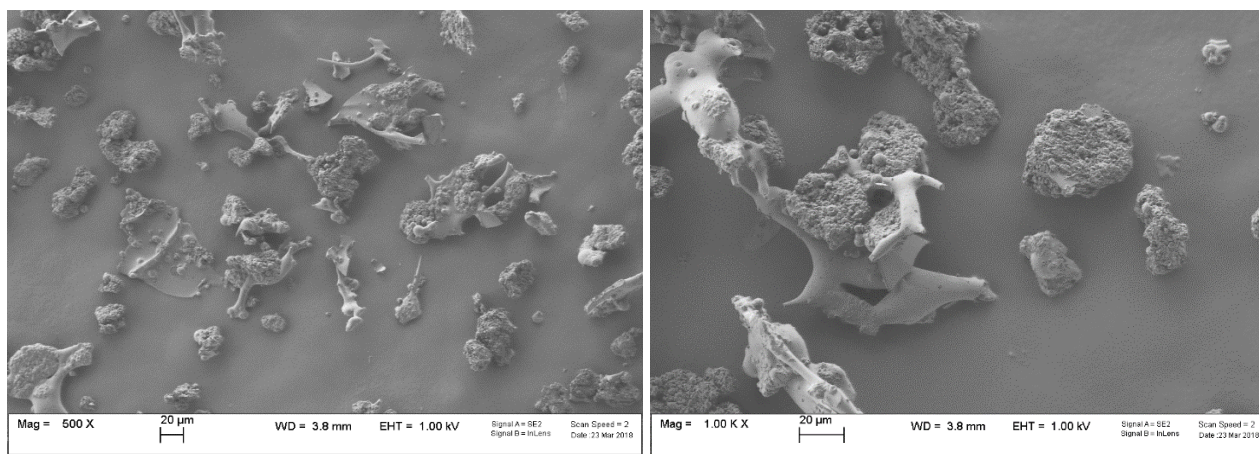
prednost se opet daje praškovima čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem. Sličan porozitet praškova čvrstih lipidnih mikročestica (oko 80-85%) dobijen je i u studiji koju su objavili Maretti i sar. (2014).



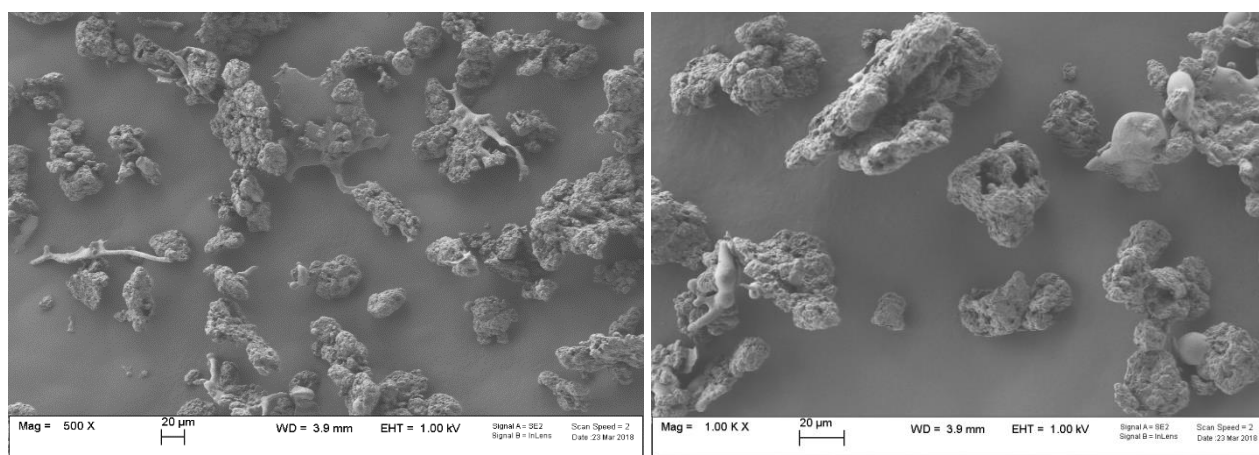
**Slika 4.5.** Porozitet (%) praškova čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih sušenjem smrzanjem (P3, P5) i sušenjem raspršivanjem (S3, S5)

#### 4.1.3. Morfologija čvrstih lipidnih mikročestica

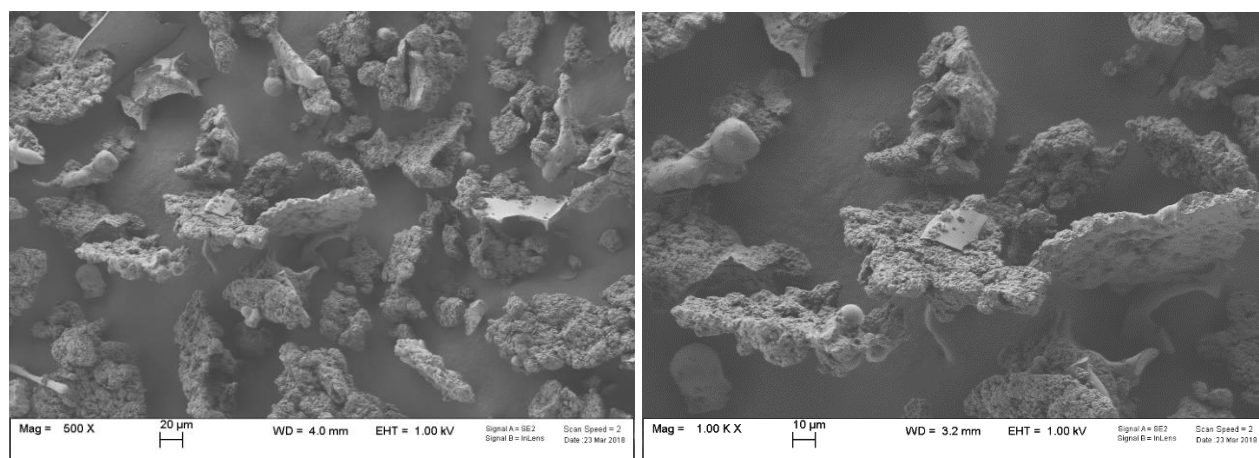
Oblik i morfologija mikročestica su, zajedno sa geometrijskom raspodelom veličine, gustinom i porozitetom mikročestica, parametri koji određuju aerodinamičke karakteristike praškova za inhalaciju. Na Slikama 4.6 do 4.19 prikazane su SEM mikrografije čvrstih lipidnih mikročestica sušenih smrzanjem (P1-P8) i raspršivanjem (S1-S6). Može se primetiti da su čvrste lipidne mikročestice formulacija sušenih smrzanjem izraženo nepravilnog oblika (Slike 4.6 do 4.13). Pored toga, uočavaju se bar dve različite populacije mikročestica, što ukazuje na to da se komponente ovih formulacija nisu homogeno izmešale. Dodatno, na mikrografijama formulacija sa stearylalkoholom (Slike 4.10 do 4.13) jasno se uočavaju ljuspe stearylalkohola (obeležene crvenom bojom), koje ukazuju da ove formulacije nisu homogene. Takođe, može se uočiti da su na mikrografijama svih formulacija sušenih smrzanjem prisutni aglomerati čestica, koji su još izraženiji kod čvrstih lipidnih mikročestica sušenih raspršivanjem. Ovo nije neočekivano s obzirom na to da su u procesu izrade korišćeni lipidi, pa je prilikom procesa sušenja raspršivanjem usled viših temperatura ulaznog vazduha moglo doći do topljenja lipida i međusobnog slepljivanja čestica. Pored toga, kao što je već pomenuto, mikročestice su same po sebi vrlo kohezivne prirode, te su generalno podložne stvaranju aglomerata.



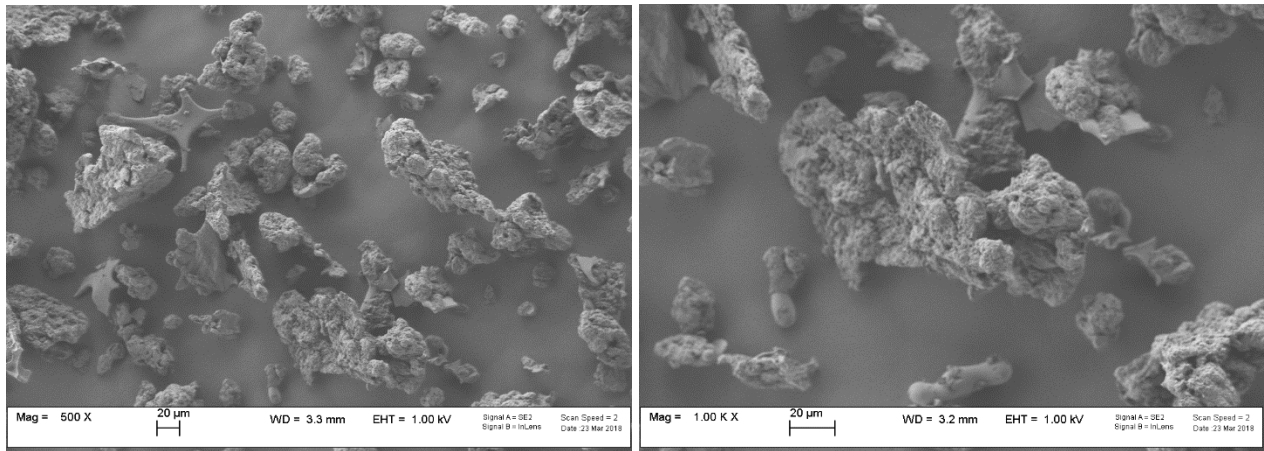
**Slika 4.6.** SEM mikrografije formulacije P1, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)



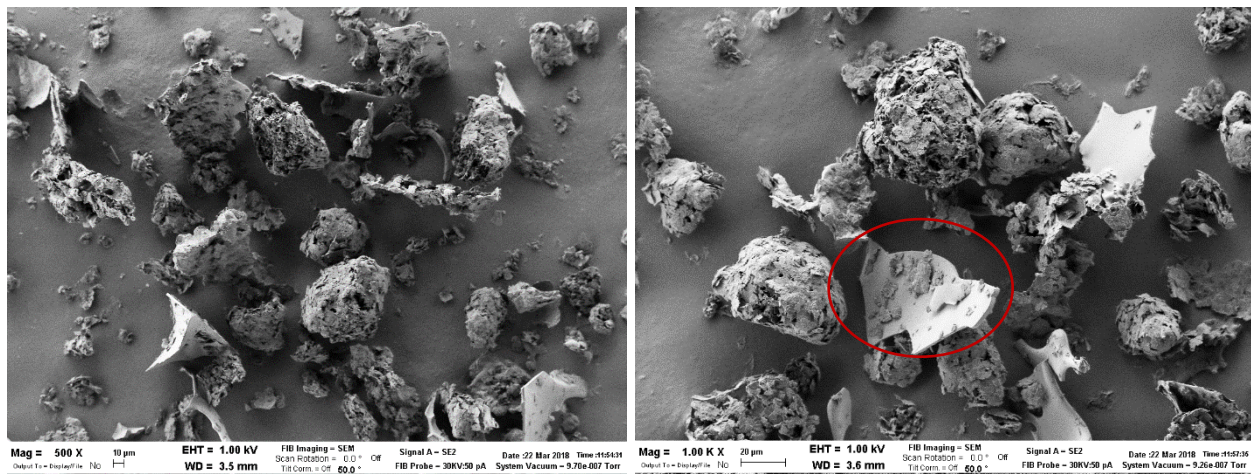
**Slika 4.7.** SEM mikrografije formulacije P2, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)



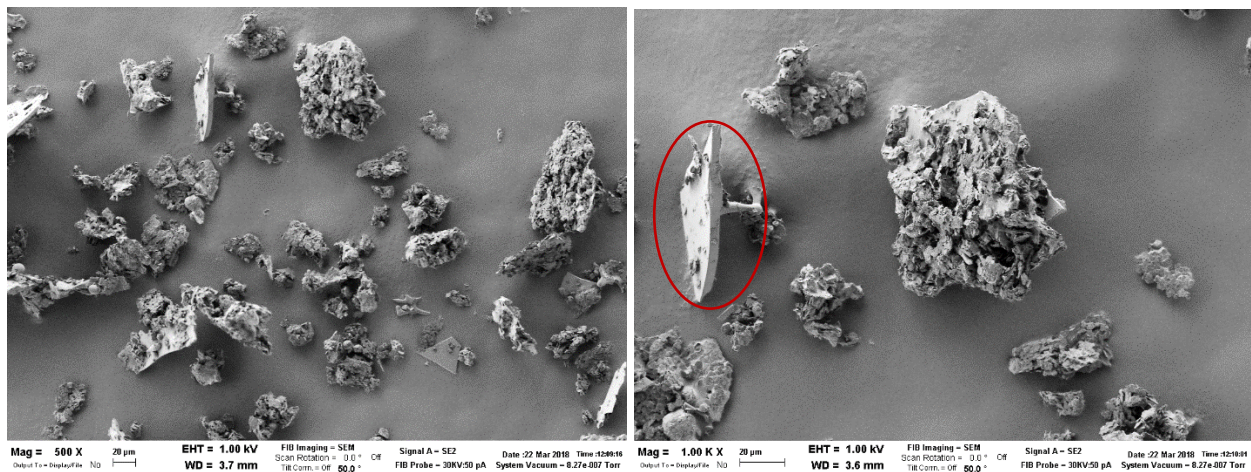
**Slika 4.8.** SEM mikrografije formulacije P3, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)



**Slika 4.9.** SEM mikrografije formulacije P4, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)

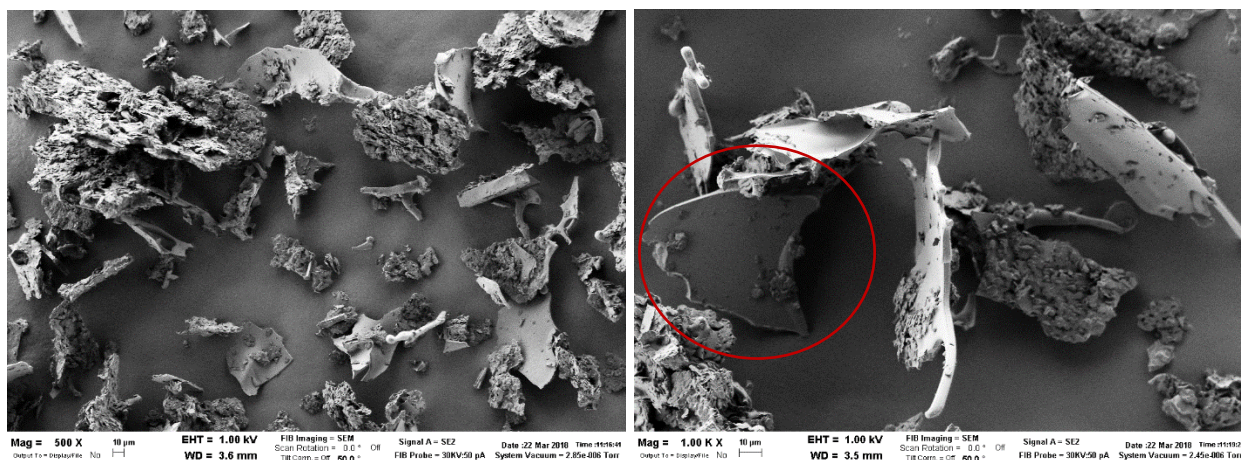


**Slika 4.10.** SEM mikrografije formulacije P5, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)

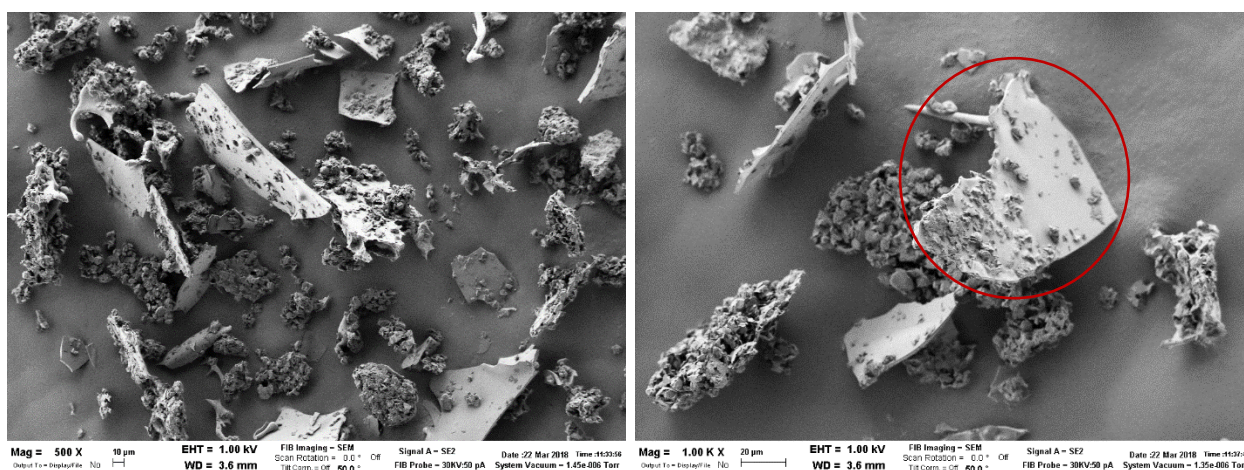


**Slika 4.11.** SEM mikrografije formulacije P6, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)



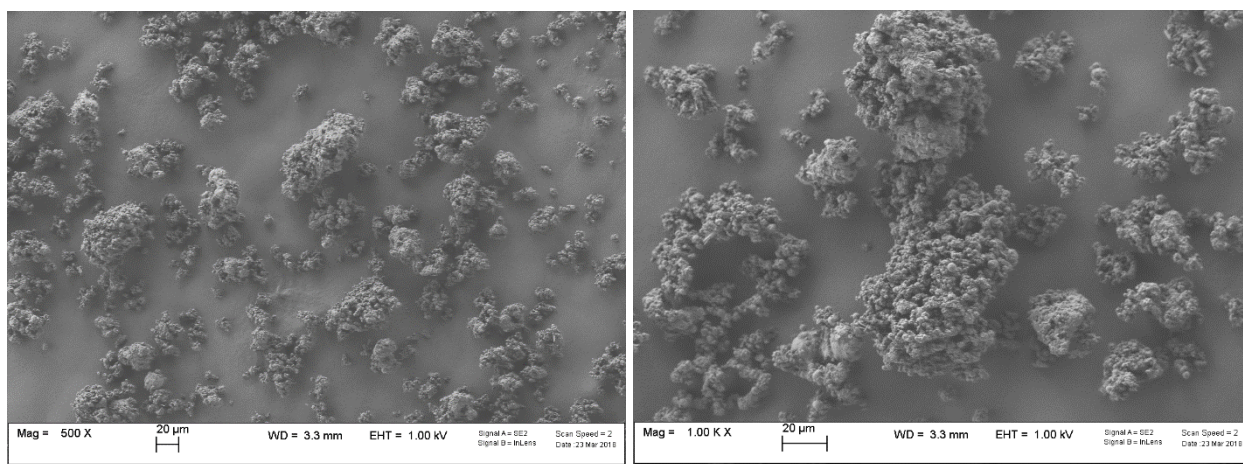


**Slika 4.12.** SEM mikrografije formulacije P7, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)

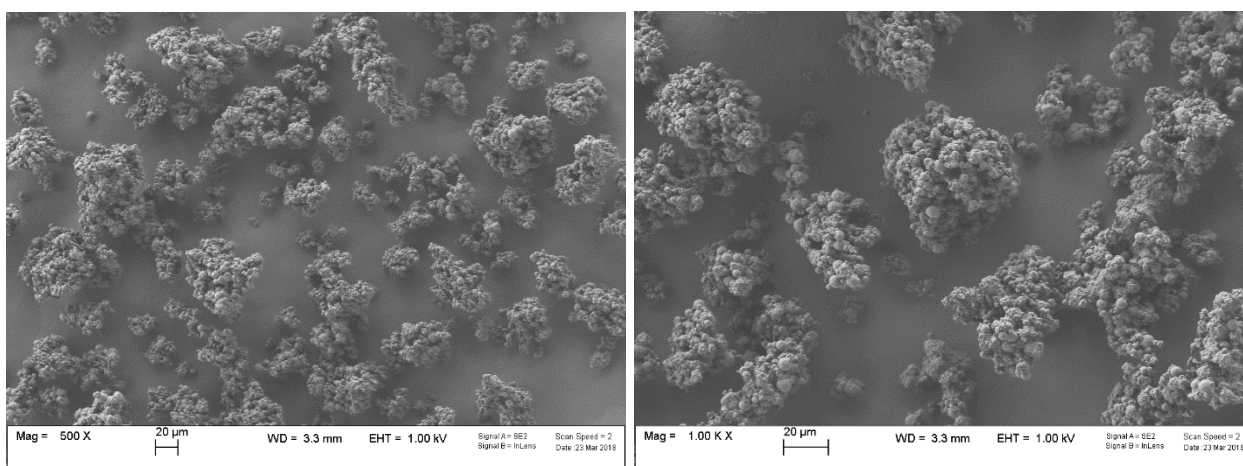


**Slika 4.13.** SEM mikrografije formulacije P8, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)

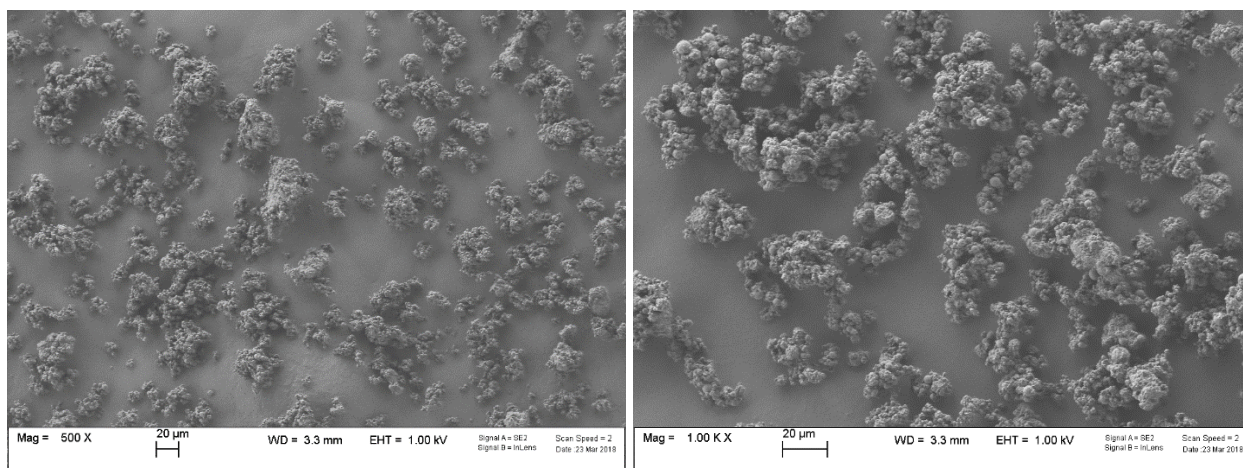
Za razliku od formulacija izrađenih sušenjem smrzanjem, može se uočiti da su čvrste lipidne mikročestice dobijene sušenjem raspršivanjem znatno sitnije, pravilnijeg i uglavnom sfernog oblika (Slika 4.14 do 4.19). Takođe, u slučaju formulacija sušenih raspršivanjem nisu uočene dve različite populacije čestica, što znači da su formulacije bile homogeno izmešane. Stoga se, na osnovu SEM rezultata, može zaključiti da formulacije čvrstih lipidnih mikročestica sušene raspršivanjem imaju veći potencijal za dalji razvoj praškova za inhalaciju u odnosu na formulacije sušene smrzanjem.



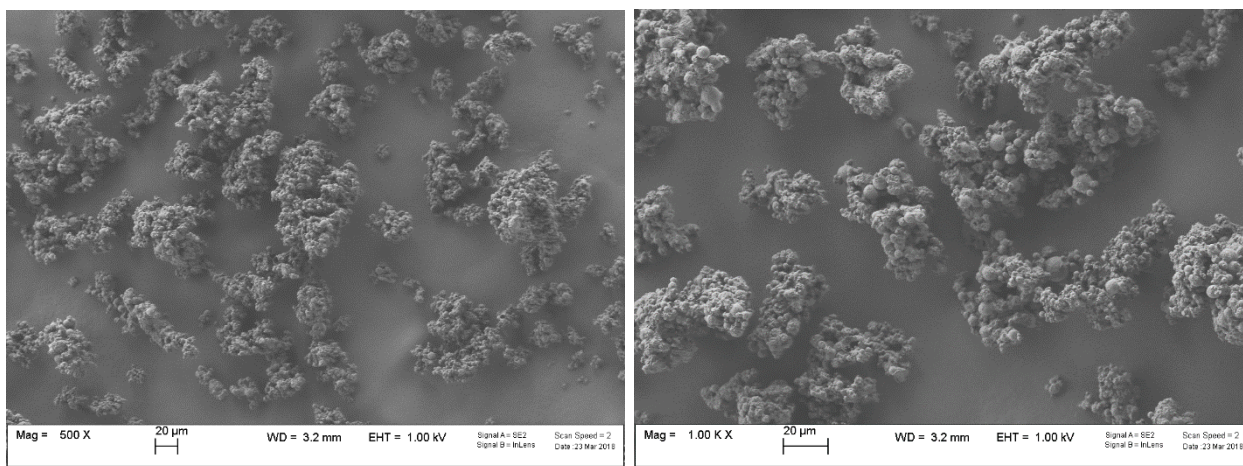
**Slika 4.14.** SEM mikrografije formulacije S1, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)



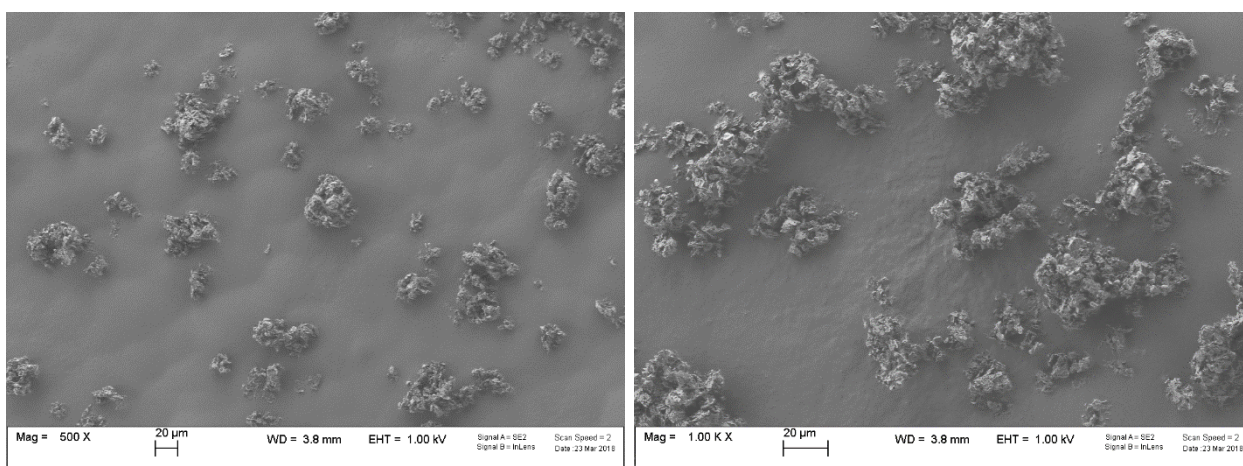
**Slika 4.15.** SEM mikrografije formulacije S2, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)



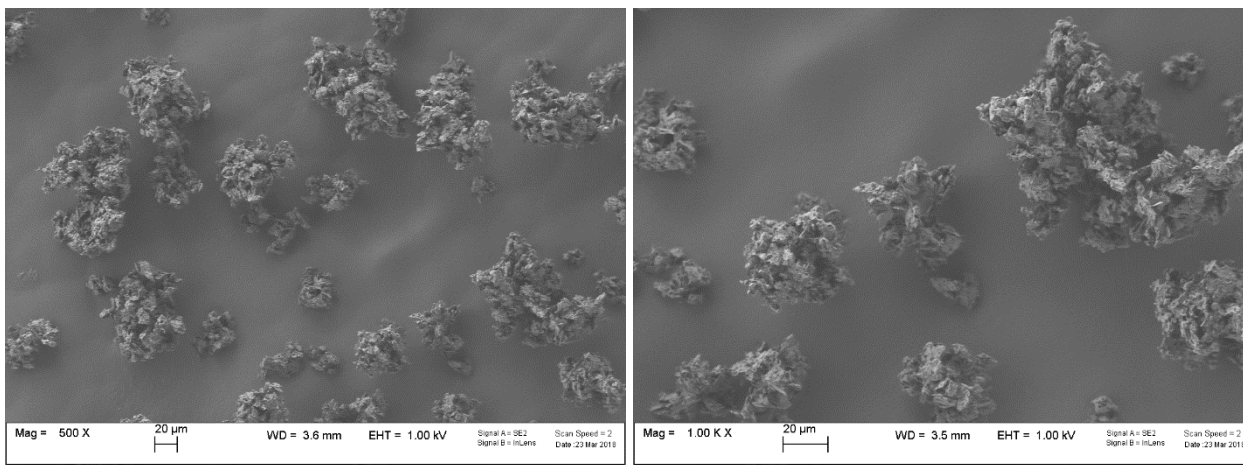
**Slika 4.16.** SEM mikrografije formulacije S3, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)



**Slika 4.17.** SEM mikrografije formulacije S4, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)



**Slika 4.18.** SEM mikrografije formulacije S5, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)



**Slika 4.19.** SEM mikrografije formulacije S6, uvećanja 500 puta (levo) i 1000 puta (desno)

#### 4.1.4. Aerodinamička svojstva praškova čvrstih lipidnih mikročestica

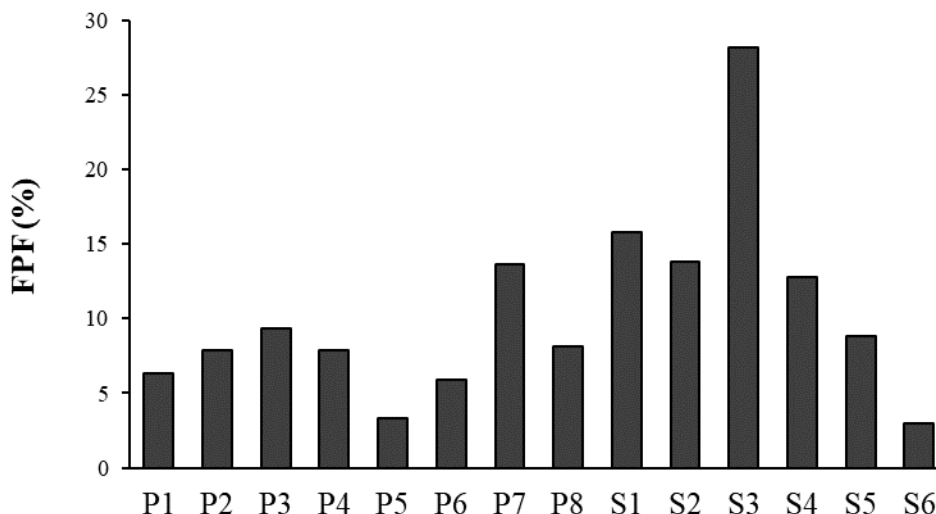
U Tabeli 4.4 prikazana su aerodinamička svojstva praškova čvrstih lipidnih mikročestica sušenih smrzavanjem i raspršivanjem, određena pomoću FSI metode. Prvi preduslov za aerodinamička svojstva praškova za inhalaciju je odgovarajuća emitovana frakcija, EF (%), koja se odnosi na procenat praška koji napusti inhalator u odnosu na masu praška koja je napunjena u kapsule prilikom ispitivanja pod uslovima opisanim u farmakopeji i koja, po zahtevima farmakopeje, treba da bude veća od 75% (Ph. Eur. 10.0; Buttini i sar., 2016). Može se uočiti da je EF praškova čvrstih lipidnih mikročestica bila veća od 75% u slučaju svih ispitivanih formulacija izuzev S5, što znači da većina formulacija sušenih pomoću obe metode ispunjava spomenuti zahtev. Međutim, najznačajnije aerodinamičko svojstvo praškova za inhalaciju je frakcija sitnih čestica (FPF), za koju ne postoji jasno preciziran zahtev u trenutnoj verziji farmakopeje (Ph. Eur. 10), ali je cilj da se razvojem formulacije praška za inhalaciju postignu što veće FPF vrednosti. Iz Tabele 4.4 se primećuje da je FPD vrednost bila dosta niska u slučaju većine formulacija, što se negativno odrazilo i na FPF vrednosti. Naime, izuzev P7, sve ostale formulacije dobijene sušenjem smrzavanjem pokazale su FPF vrednosti manje od 10% (Slika 4.20). Ovo je prilično niska frakcija sitnih čestica praška, a imajući u vidu da je procenat lekovite supstance još niži (jer čini samo deo praška čvrstih lipidnih mikročestica), ova FPF vrednost je nedovoljna za postizanje terapijske efikasnosti salbutamol-sulfata.

**Tabela 4.4.** Aerodinamička svojstva praškova čvrstih lipidnih mikročestica sušenih smrzavanjem i raspršivanjem

Formulacija	Masa praška koji je punjen u kapsule (mg)	ED (mg)	EF (%)	FPD (mg) < 5 mm
P1	43,1	40,4	93,7	2,7
P2	44,3	39,8	89,8	3,5
P3	43,9	40,9	93,1	4,1
P4	42,5	41,9	98,5	3,4
P5	41,8	38,3	91,5	1,4
P6	42,1	35,7	84,7	2,5
P7	41,2	37,9	91,9	5,6
P8	41,8	32,3	77,2	3,4
S1	41,7	39,2	93,9	6,6
S2	44,2	44,2	100,0	6,1
S3	44,3	38,3	86,5	12,5
S4	42,1	42,0	100,0	5,4
S5	41,8	28,9	69,1	3,7
S6	42,8	36,0	84,1	1,3

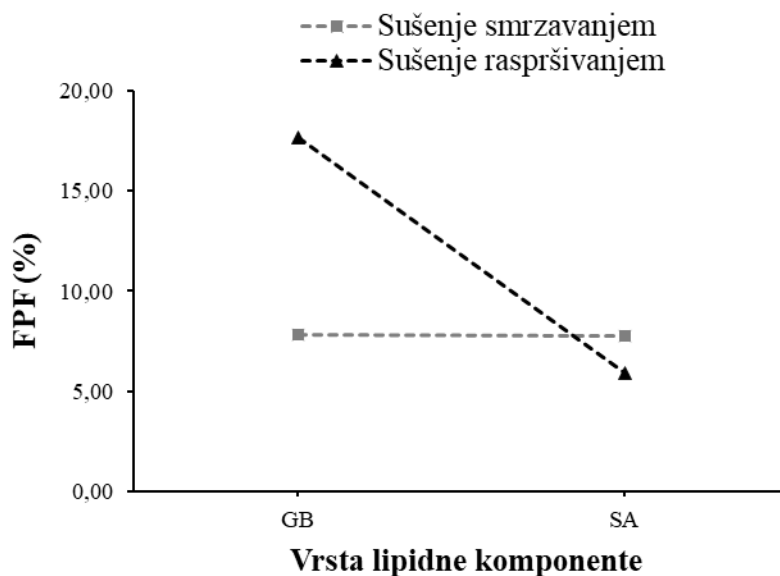
Za razliku od formulacija dobijenih sušenjem smrzavanjem, može se primetiti (Slika 4.20) da su sve četiri formulacije sušene raspršivanjem sa glicerildibehenatom (S1, S2, S3 i S4) pokazale FPF veću od 10%, što opet ukazuje na to da bi sušenje raspršivanjem, u kombinaciji sa metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi, mogla biti metoda izbora za izradu praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica. Formulacija S3 izdvojila se kao formulacija sa najvećom FPF vrednošću od 28,2% uz odgovarajuću EF vrednost (Tabela 4.4, Slika 4.20), sa potencijalom za dalju optimizaciju i razvoj kako bi se dodatno unapredile njene aerodinamičke karakteristike. Scalia i sar. (2012) su za praškove čvrstih lipidnih mikročestica sa salbutamol-bazom (koji su bili izrađeni metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem smrzavanjem) dobili FPF vrednost od 17,3% (izraženo na salbutamol), i konstatovali da je ovo dovoljan procenat za ostvarivanje terapijskog efekta lekovite

supstance kada su u pitanju formulacije bez nosača tj. kada nisu u pitanju „uređene smeše“ praškova za inhalaciju. Slične rezultate su dobili Mezzena i sar. (2009), koji su za praškove čvrstih lipidnih mikročestica sa budesonidom postigli FPF od 21,1%. Stoga se može zaključiti da je formulacija S3 pokazala zadovoljavajuću FPF vrednost, pri čemu bi se njenom daljom optimizacijom u smislu dodatnog povećanja FPF vrednosti mogla omogućiti primena manjih nominalnih (početnih) doza praška za inhalaciju.



**Slika 4.20.** FPF (%) praškova čvrstih lipidnih mikročestica sušenih smrzavanjem i raspršivanjem, određena FSI metodom

ANOVA analizom rezultata utvrđeni su faktori koji značajno utiču na FPF praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Naime, značajan uticaj na FPF praškova ima vrsta lipidne komponente ( $p = 0,0053$ ), pri čemu je primećeno da su formulacije sa glicerildibehenatom uglavnom pokazale veće FPF vrednosti. Osim vrste lipidne komponente, vreme homogenizacije je značajno uticalo na FPF praškova čvrstih lipidnih mikročestica ( $p = 0,0373$ ), tako da je duže vreme homogenizacije doprinelo većim FPF vrednostima. Pored uticaja ova dva faktora, uočen je i značajan uticaj interakcije vrste lipidne komponente i metode sušenja ( $p = 0,0045$ ) na FPF vrednost (Slika 4.21). Pokazano je da su formulacije sa glicerildibehenatom sušene raspršivanjem imale značajno višu FPF vrednost u odnosu na formulacije sa stearylalkoholom, dok kod formulacija sušenih smrzavanjem nije uočena značajna razlika između FPF vrednosti formulacija sa glicerildibehenatom i stearylalkoholom.

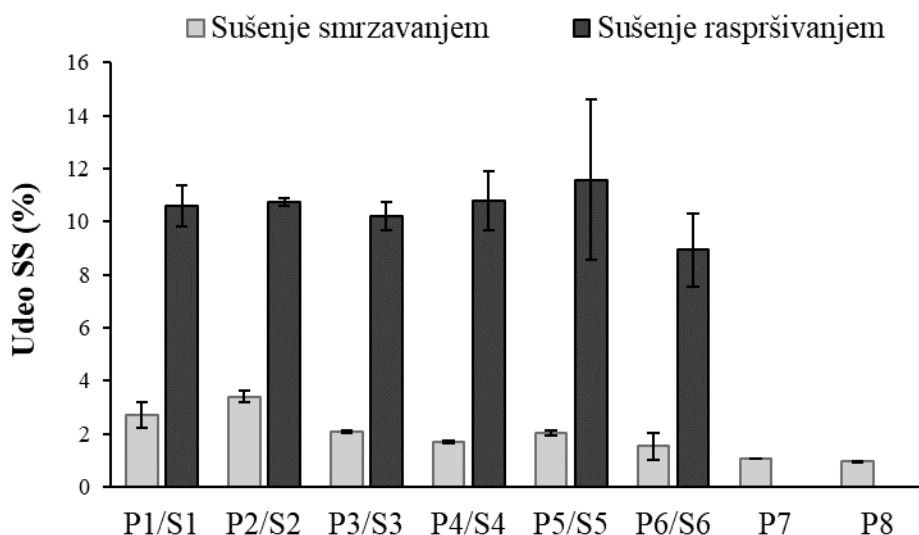


**Slika 4.21.** Uticaj interakcije vrste lipidne komponente i metode sušenja na FPF (%); GB – glicerildibehenat, SA – stearilalkohol

#### 4.1.5. Udeo salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica

Udeo i efikasnost inkapsulacije lekovite supstance u čvrstim lipidnim mikročesticama zavise od brojnih parametara, među kojima su: rastvorljivost lekovite supstance u izabranoj lipidnoj komponenti, karakteristike čvrstog stanja lipidne komponente, metoda izrade, stepen disperziteta lekovite supstance u lipidnom ekscipijensu (rastvorena ili dispergovana), veličina mikročestica itd. (Jaspart i sar., 2005). Zbog ovako velikog broja parametara, često je neophodno sprovesti optimizaciju formulacije kako bi se postigla maksimalna vrednost udela lekovite supstance, te smanjila količina praška za inhalaciju koju je potrebno primeniti da bi se obezbedila neophodna doza lekovite supstance.

Udeo salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica sušenih smržavanjem iznosio je između 0,95-3,41%, dok je u formulacijama dobijenih sušenjem raspršivanjem ovaj procenat bio znatno viši, odnosno 8,93-11,57% (Slika 4.22). Nizak udeo salbutamol-sulfata je bio očekivan, s obzirom na to da ova lekovita supstance ima hidrofilna svojstva, odnosno spada u visoko rastvorljive lekovite supstance (Cingolani i sar., 2019), koje ne pokazuju visoku efikasnost inkapsulacije u lipidnim matriksima (Cortesi i sar., 2002). Cook i sar. (2005) pokazali su, pak, da je moguće uspešno inkorporirati hidrofilnu lekovitu supstancu (terbutalin-sulfat) u lipidni matriks. Sa druge strane, kako bi izbegli nisku efikasnost inkapsulacije hidrofilnog salbutamol-sulfata u čvrste lipidne mikročestice, Jaspart i sar. (2007) su sintetisali njegov lipofilniji derivat, salbutamol-acetonid, čije terapijska efikasnost ni bezbednost do sada nisu potvrđene, dok su Scalia i sar. (2012) koristili salbutamol u obliku baze (Jaspart i sar., 2007; Scalia i sar., 2012). Jaspart i sar. (2007) postigli su udeo salbutamol-acetonida u prašku čvrstih lipidnih mikročestica od 4,36% do 18%, u zavisnosti od udela lekovite supstance koji su koristili za izradu, dok su Scalia i sar. (2012) postigli udeo od samo 4,2% salbutamola (u obliku baze) u prašku čvrstih lipidnih mikročestica. Stoga se može zaključiti da se vrednosti dobijene u ovoj studiji nisu razlikovale mnogo od literaturnih vrednosti, iako je kao model lekovita supstanca korišćen salbutamol-sulfat. Znatno niži udeo salbutamol-sulfata u formulacijama praškova dobijenih sušenih smržavanjem u odnosu na formulacije dobijene sušenjem raspršivanjem je posledica razlika u načinu izrade. Naime, uzorci su pre procesa sušenja smržavanjem mešani sa rastvorom trehaloze kao krioprotektantom u odnosu 1:1 kako bi postigla zaštita čvrstih lipidnih mikročestica od niskih temperatura, dok to nije bio slučaj za uzorke dobijene sušenjem raspršivanjem.

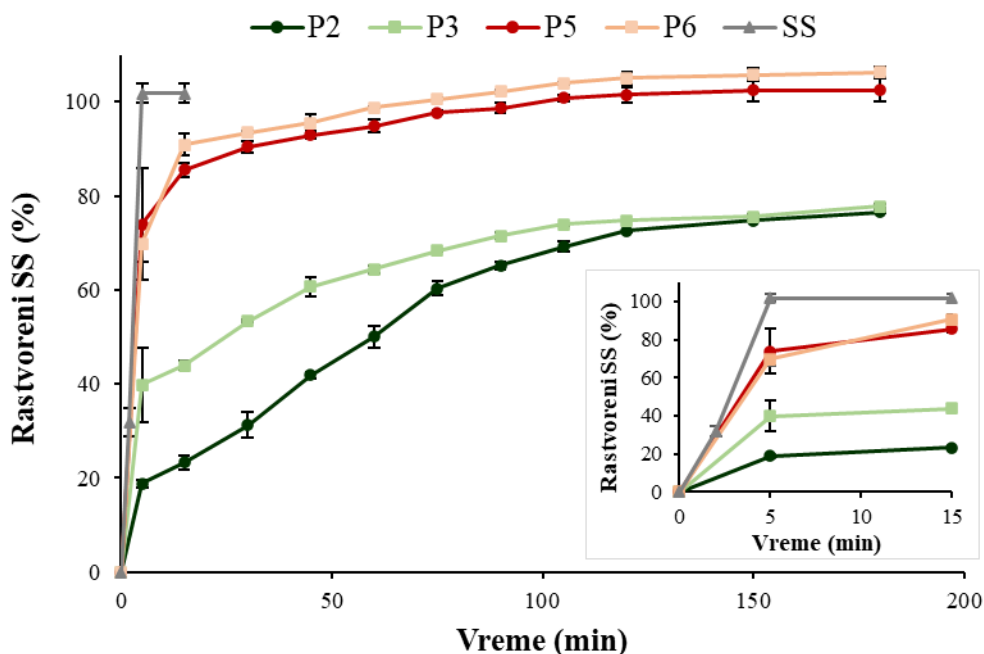


**Slika 4.22.** Udeo salbutamol-sulfata (SS) u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica, dobijenih sušenjem smrzavanjem (P1-P8) i sušenjem raspršivanjem (S1-S6)

#### 4.1.6. *In vitro* brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica

*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica sprovedeno je kako bi se utvrdilo da li je moguće postići modifikovano (produženo) oslobađanje salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica, koji su dobijeni metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi.

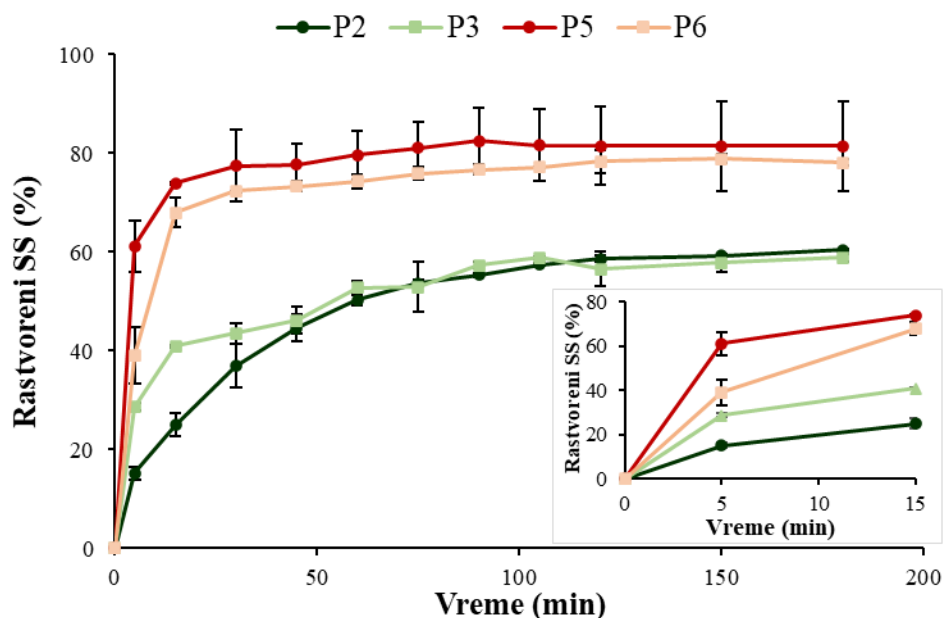
Na Slici 4.23 prikazani su profili *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi i sušenjem smrzavanjem, kao i profil brzine rastvaranja praška čistog salbutamol-sulfata. U ovom slučaju, profil brzine rastvaranja čistog salbutamol-sulfata služio je kao standard za poređenje, s obzirom na to da kod preparata za inhalaciju nije jasno definisano koji zahtev treba da bude ispunjen da bi se smatralo da je došlo do modifikacije brzine rastvaranja lekovite supstance. Rezultati sprovedenog ispitivanja su pokazali sporije rastvaranje salbutamol-sulfata iz svih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica u odnosu na čistu lekovitu supstancu (Slika 4.23). Pored toga, postignuto je znatno sporije rastvaranje salbutamol-sulfata iz formulacija sa glicerildibehenatom (P2 i P3) u odnosu na formulacije sa stearylalkoholom P5 i P6. Razlike između formulacija izrađenih od dva različita lipida su verovatno posledica toga što se salbutamol-sulfat nije inkorporirao u lipidni matriks stearylalkohola, već je ostao na površini čestica, što se vidi i na osnovu SEM mikrografija, gde su uočene „prazne“ ljuspe stearylalkohola, bez salbutamol-sulfata (Slike 4.10 do 4.13). Odnosno, pretpostavlja se da inicijalna faza rastvaranja, gde se oko 80% salbutamol-sulfata iz formulacija čvrstih lipidnih mikročestica (P5 i P6) rastvorilo za 15 min, predstavlja rastvaranje salbutamol-sulfata koji se nije inkorporirao u lipidni matriks. Sa druge strane, manje od 20% preostalog salbutamol-sulfata bilo je inkorporirano u čvrste lipidne mikročestice, i zato se postepeno rastvaralo iz čvrstih lipidnih mikročestica u toku 120 min. Za razliku od formulacija P5 i P6, u slučaju formulacije P3 rastvoreno je duplo manje salbutamol-sulfata (oko 40%), a samo 20% u slučaju P2 formulacije nakon 15 min. Brže rastvaranje salbutamol-sulfata iz formulacije P3 u odnosu na P2 je verovatno posledica skoro duplo manje veličine čestica u slučaju P3 (4,51 μm u odnosu na 8,05 μm).



**Slika 4.23.** Profili *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata (SS) iz odabranih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica (P2, P3, P5, P6), dobijenih sušenjem smrzanjem i praška čistog salbutamol-sulfata (SS) u fosfatnom puferu pH 7,4. Umetnuta slika predstavlja uveličanu inicijalnu fazu rastvaranja SS (do 15 min)

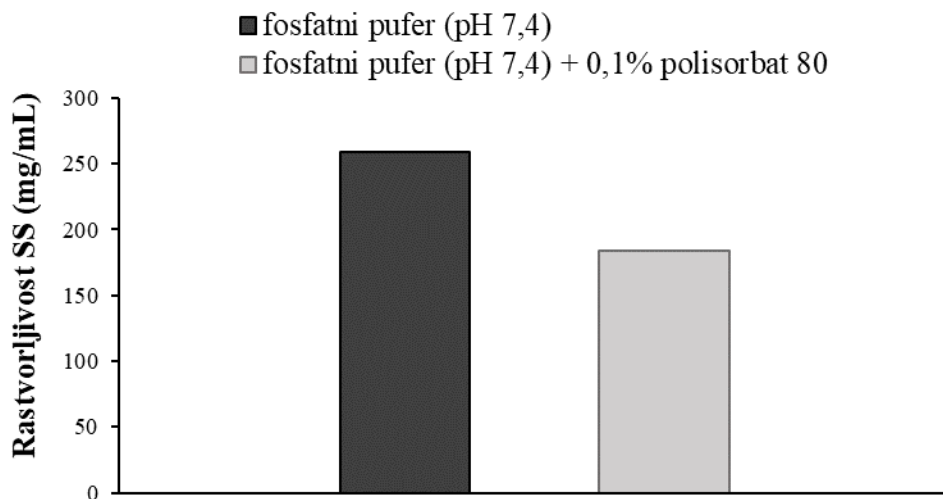
Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja salbutamol-sulfata u fosfatnom puferu pH 7,4 kao medijumu, uz dodatak surfaktanta 0,1% (*m/V*) polisorbata 80 prikazani su na Slici 4.24. Surfaktant je prvenstveno dodat u fosfatni pufer kako bi se postiglo bolje kvašenje čvrstih lipidnih mikročestica, koje imaju tendenciju ka flotiranju. Dodatno, surfaktanti se generalno dodaju u medijum kako bi se simulirali uslovi u humanom respiratornom traktu, s obzirom na to da je poznato da se u humanoj plućnoj tečnosti nalaze plućni surfaktanti, kao što je DPPC (Velaga i sar., 2018). Međutim, iako je postignuto bolje kvašenje čvrstih lipidnih mikročestica (što je vizuelno uočeno u toku ispitivanja), primećeno je znatno sporije rastvaranje salbutamol-sulfata iz svih formulacija čvrstih lipidnih mikročestica (P2, P3, P5 i P6) kada je ispitivanje rađeno u fosfatnom puferu pH 7,4 uz dodatak 0,1% (*m/V*) polisorbata 80 (Slika 4.24) u odnosu na ispitivanje u čistom fosfatnom puferu pH 7,4 (Slika 4.23). Ovakvi rezultati nisu bili očekivani s obzirom na to da bi surfaktanti trebalo da povećaju stepen solubilizacije lekovite supstance. Kako bi se utvrdio razlog smanjene brzine rastvaranja salbutamol-sulfata u medijumu sa polisorbatom 80 kao surfaktantom, ispitana je rastvorljivost salbutamol-sulfata u medijumima bez i sa dodatkom različite vrste i koncentracije surfaktanata.





**Slika 4.24.** Profili *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata (SS) iz odabranih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica (P2, P3, P5, P6), dobijenih sušenjem smrzanjem u fosfatnom puferu pH 7,4 uz dodatak 0,1% (m/V) polisorbata 80. Umetnuta slika predstavlja uveličanu inicijalnu fazu rastvaranja SS (do 15 min)

Na Slici 4.25 prikazani su rezultati ispitivanja rastvorljivosti salbutamol-sulfata u fosfatnom puferu pH 7,4 bez/sa dodatkom 0,1% (m/V) polisorbata 80. Pokazano je da je rastvorljivost salbutamol-sulfata smanjena u fosfatnom puferu sa dodatkom 0,1% (m/V) polisorbata 80 u odnosu na njegovu rastvorljivost u čistom fosfatnom puferu. Time su objašnjene razlike u brzini rastvaranja salbutamol-sulfata iz formulacija čvrstih lipidnih mikročestica u pomenutim medijumima.



**Slika 4.25.** Rastvorljivost salbutamol-sulfata (SS) u fosfatnom puferu pH 7,4 bez/sa dodatkom 0,1% (m/V) polisorbata 80

Kako bi se utvrdio razlog smanjene rastvorljivosti salbutamol-sulfata u prisustvu polisorbata 80, ispitana je rastvorljivost ove supstance u dodatnim medijumima: PBS-u (pH 7,4); 0,5% (m/V) rastvoru

polisorbata 80 u fosfatnom puferu pH 7,4 i 0,5% (*m/V*) rastvoru SLS-a u PBS-u (pH 7,4). Rezultati su pokazali da dodatak veće koncentracije polisorbata 80 u medijum dovodi do većeg smanjenja rastvorljivosti salbutamol-sulfata u odnosu na rastvorljivost u čistom fosfatnom puferu (oko 40% sniženja rastvorljivosti u 0,5% (*m/V*) rastvoru polisorbata 80, odnosno oko 30% sniženja u 0,1% (*m/V*) rastvoru polisorbata 80). Ovo zapažanje bi se moglo objasniti činjenicom da se formira veći broj micela polisorbata 80 pri većim koncentracijama surfaktanta, te salbutamol-sulfat ostaje „zarobljen“ unutar micela. Takođe, primećeno je da se dodatkom 0,5% (*m/V*) SLS-a kao surfaktanta, rastvorljivost salbutamol-sulfata opet smanjila u odnosu na rastvorljivost u kontrolnom medijumu (čistom PBS-u), što potvrđuje pretpostavku da salbutamol-sulfat ostaje „zarobljen“ unutar micela surfaktanta.

#### **4.1.7. Izbor metode sušenja suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica izrađenih metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi**

Na osnovu rezultata raspodele veličine mikročestica, utvrđeno je da su se metodom sušenja raspršivanjem dobile sitnije lipidne mikročestice u odnosu na mikročestice dobijene sušenjem smrzavanjem. Međutim, ni većina formulacija čvrstih lipidnih mikročestica sušenih raspršivanjem nije pokazala dovoljno mali geometrijski prečnik da bi ove formulacije bile primenjivane kao praškovi za inhalaciju, izuzev formulacije S3, koja je imala srednji geometrijski prečnik manji od 6  $\mu\text{m}$ , što je zahtev za veličinu čestica praškova za inhalaciju ukoliko je njihova gustina  $\leq 1 \text{ g/cm}^3$ . Formulacije dobijene sušenjem raspršivanjem pokazale su i nešto manju stvarnu gustinu i veći porozitet u odnosu na formulacije dobijene sušenjem smrzavanjem. Na osnovu SEM mikrografija, uočeno je da je i morfologija čvrstih lipidnih mikročestica sušenih raspršivanjem adekvatnija od morfologije mikročestica sušenih smrzavanjem jer su dobijene sferne mikročestice, i utvrđeno je da su prisutne samo mikročestice jedne generacije, odnosno pokazana je homogenost formulacija. Dodatno, pomoću SEM metode potvrđeni su rezultati određivanja veličine čestica laserskom difrakcijom da su mikročestice dobijene sušenjem raspršivanjem bile sitnije u odnosu na one dobijene sušenjem smrzavanjem. Uočen je i znatno veći udeo salbutamol-sulfata u uzorcima čvrstih lipidnih mikročestica sušenih raspršivanjem. Prikazani rezultati ukazuju na to da bi sušenje raspršivanjem mogla biti metoda izbora za razvoj formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica.

Ispitivanjem aerodinamičkih svojstava praškova čvrstih lipidnih mikročestica utvrđeno je da bi formulacija S3 mogla biti razvijana dalje kako bi se dobila optimalna formulacija praška za inhalaciju s obzirom na to da je formulacija S3 pokazala najveću FPF vrednost, uz odgovarajuću EF vrednost. Parametri koji su primenjeni za izradu formulacije S3 su sledeći: glicerildibehenat je korišćen kao lipidna komponenta, udeo surfaktanta poloksamera 188 je iznosio 0,4% (*m/m*), vreme homogenizacije je bilo 8 min, a brzina homogenizacije 13400 obr/min i primenjen je proces sušenja raspršivanjem.

Rezultatima eksperimentalnog dizajna potvrđeno je da je proces sušenja raspršivanjem obezbedio manju veličinu i užu raspodelu veličine čvrstih lipidnih mikročestica formulacija sa glicerildibehenatom. Manja veličina čestica je jedan od razloga zbog čega su uzorci dobijeni sušenjem raspršivanjem ujedno pokazali i više FPF vrednosti. Osim toga, uočeno je da su veće vrednosti vremena homogenizacije dovele do većih *span* vrednosti. Stoga bi, iako je S3 izabrana kao najbolja od ispitivanih formulacija zbog najviše FPF vrednosti, bilo potrebno optimizovati (smanjiti) vreme homogenizacije kako bi se smanjila *span* vrednost uz istovremeno očuvanje FPF vrednosti.

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica pokazali su da je moguće postići modifikovano (produženo) oslobađanje lekovite supstance iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Međutim, modifikacija brzine oslobađanja lekovite supstance iz izrađenih formulacija praškova je zavisila od vrste lipidne komponente koja je korišćena za izradu čvrstih lipidnih mikročestica, što je i bilo očekivano jer lipidni matriks treba da uspori difuziju lekovite supstance iz čvrstih lipidnih mikročestica. Naime, stearylalkohol je samo neznatno usporio brzinu

rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica, dok su formulacije sa glicerildibehenatom obezbedile dosta sporije rastvaranje lekovite supstance iz izrađenih praškova u poređenju sa brzinom rastvaranja praška čistog salbutamol-sulfata. Stoga se, na osnovu *in vitro* brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica, može zaključiti da je glicerildibehenat lipidna komponenta izbora u razvoju praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata.

## **4.2. Formulacija i karakterizacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih procesom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem**

S obzirom na to da su u prvoj fazi identifikovani neki od procesnih parametara i faktora formulacije koje je neophodno optimizovati da bi se dobili praškovi za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, kao i da je izabrana odgovarajuća metoda sušenja, u drugoj fazi je izrađeno 15 novih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem. Izvršena je karakterizacija izrađenih formulacija i ispitan je uticaj parametara procesa emulgovanja na povišenoj temperaturi, u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem, na farmaceutsko-tehnološke i funkcionalne karakteristike praškova za inhalaciju primenom QbD pristupa. Optimalna svojstva praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica su definisana na osnovu rezultata sprovedenih eksperimenata, tako da se dobiju praškovi za inhalaciju odgovarajućih aerodinamičkih karakteristika uz modifikovano oslobađanje salbutamol-sulfata. U skladu sa navedenim, na osnovu rezultata druge faze izabrane su optimalne formulacije praškova za inhalaciju koje su naknadno ispitane u trećoj fazi eksperimentalnog rada.

### **4.2.1. Validacija i transfer HPLC metode za analitičko određivanje salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica**

#### Metoda 1

Linearnost metode 1 ( $R^2 = 0,9999$ ) je potvrđena u opsegu koncentracija 5-200  $\mu\text{g/mL}$  standardnog vodenog rastvora salbutamol-sulfata. Osetljivost metode je procenjena preko LOQ, koji je iznosio 2,09  $\mu\text{g/mL}$  i LOD, koji je iznosio 0,63  $\mu\text{g/mL}$ . Preciznost instrumenta je takođe potvrđena u sklopu validacije metode ( $RSD = 0,75\%$ ). Retenciono vreme salbutamol-sulfata je bilo oko 6 min.

#### Metoda 2

Metoda 2 je razvijena kako bi se smanjilo vreme trajanje analize i omogućila primena druge kolone, dostupne za dalja ispitivanja. Metoda 2 se zasniva na metodi iz literature (Daman i sar., 2014), ali je u cilju unapređenja metode izvršena modifikacija koja je podrazumevala zamenu trokomponentne mobilne faze dvokomponentnom, koja je stabilnija i jednostavnija za pripremu. Pored toga, nije korišćen interni standard, koji je korišćen u metodi opisanoj u literaturi, što dodatno pojednostavljuje razvijenu metodu. Razvijena modifikovana metoda je validirana, kako bi se dokazalo da može da se koristi za određivanje koncentracije salbutamol-sulfata, a rezultati validacije su prikazani u nastavku.

Linearnost metode je potvrđena u opsegu koncentracija 0,125-100  $\mu\text{g/mL}$ , sa koeficijentom korelacije ( $R = 0,9999$ ) dobijenim regresionom analizom, kao i odsečkom kalibracione krive  $b$  koji nije statistički značajan ( $p > 0,05$ ), što je prikazano u Tabeli 4.5.

**Tabela 4.5. Parametri koji potvrđuju linearnost HPLC metode 2**

Parametar	Vrednost
Opseg ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,125-100,000
Nagib krive, $a$	108,0310
Odsečak krive, $b$	-0,0014
Koeficijent korelacije, $R$	0,9999
$p^*$	0,7439
SE nagiba krive, $a^{**}$	0,0821
SE odsečka krive, $b^{**}$	0,0039

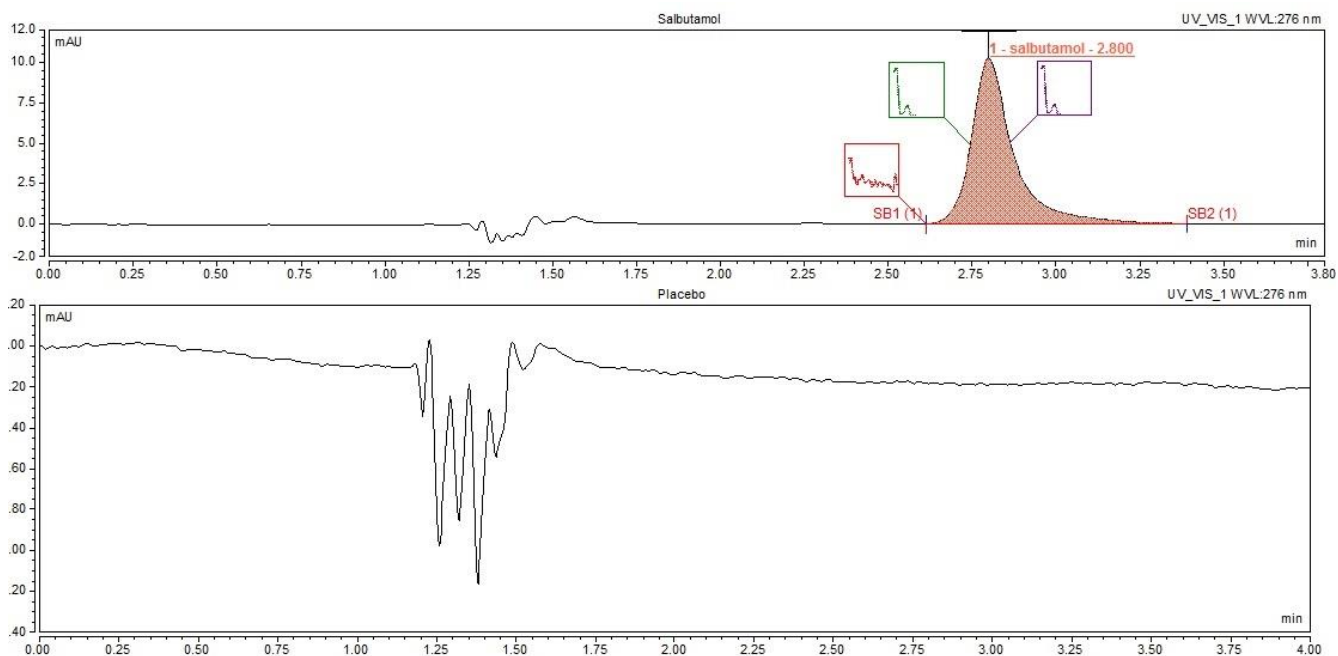
\*Statistička značajnost odsečka kalibracione krive,  $b$ ;

\*\*Standardna greška (engl. *Standard Error*, SE) nagiba kalibracione krive  $a$  i odsečka  $b$

Preciznost metode je potvrđena na osnovu izračunatih RSD vrednosti: za ponovljivost RSD = 0,78%, što je < 2% (Ivković i sar., 2019), za preciznost injektovanja RSD = 0,65, što je < 1% (CDER, 1994; Shabir, 2003) i za srednju preciznost RSD = 2,54%, što je < 3% (Ivković i sar., 2019).

*Recovery* vrednosti uzoraka (80%, 100% i 120%) bile su u opsegu 99,50-101,72%, što je u skladu za zahtevanim opsegom od 98-102% (Shabir, 2003), čime je dokazana tačnost metode.

Selektivnost metode je potvrđena na osnovu hromatograma (Slika 4.26), sa kojih se uočava da se u uzorku formulacije čvrstih lipidnih mikročestica sa lekovitom supstancom na 2,8 min pojavljuje pik salbutamol-sulfata, dok se na hromatogramu placebo formulacije ne uočavaju pikovi na ovom retencionom vremenu, što znači da ne postoje interferencije koje bi ometale kvantifikaciju salbutamol-sulfata iz formulacija čvrstih lipidnih mikročestica ovom metodom.



**Slika 4.26. Hromatogrami formulacije čvrstih lipidnih mikročestica sa salbutamol-sulfatom (gore) i placebo formulacije čvrstih lipidnih mikročestica (dole)**

Vrednost LOQ iznosila je 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . Ova vrednost je pouzdano ustanovljena kao LOQ s obzirom na to da je, nakon šest injektovanja rastvora ove koncentracije, dobijen RSD = 8,72%, što je < 10% (Pack i sar., 2017). Takođe, signal/šum odnos iznosio je 14,7, a neophodno je da bude veći od 10 (Shabir, 2003). LOD vrednost je izračunata na osnovu LOQ vrednosti i iznosila je 0,04  $\mu\text{g/mL}$ . Na

osnovu ovih podataka, može se zaključiti da je metoda 2 unapređena u pogledu osetljivosti u odnosu na metodu 1, gde su utvrđene veće LOQ i LOD vrednosti (2,09 µg/mL i 0,63 µg/mL, redom).

Robusnost metode je dokazana na osnovu niskog procenta promene površine pika u odnosu na optimalne uslove (manje od 5%), što je prikazano u Tabeli 4.6. Iako je uočen nešto veći procenat promene retencionog vremena (17,5%) prilikom promene odnosa fosfatnog pufera i metanola u mobilnoj fazi, ne očekuje se da bi ova promena mogla da dovede do neadekvatne kvantifikacije salbutamol-sulfata.

**Tabela 4.6.** Rezultati robusnosti HPLC metode 2

Promena	Retenciono vreme (min)	Površina pika	% promene retencionog vremena	% promene površine pika
Optimalni uslovi	2,80	1,0865	0	0
Temperatura kolone 23 °C	2,85	1,0800	1,79	0,60
Temperatura kolone 27 °C	2,75	1,0914	1,79	0,45
Protok 0,95 mL/min	2,95	1,1185	5,36	2,95
Protok 1,05 mL/min	2,67	1,0407	4,64	4,22
Talasna dužina 274 nm	2,80	1,0333	0	4,90
Talasna dužina 278 nm	2,80	1,1013	0	1,36
Pufer : metanol = 78:22 (V/V)	2,55	1,0662	8,93	1,87
Pufer : metanol = 82:18 (V/V)	3,29	1,0733	17,5	1,21

#### Transfer metode

Poređenjem rezultata određivanja udela salbutamol-sulfata u formulacijama čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih pomoću HPLC metoda 1 i 2 ustanovljeno je da razlika između ove dve metode iznosi do 11% u zavisnosti od uzorka (Tabela 4.7), čime je potvrđeno da se za pouzdanu kvantifikaciju salbutamol-sulfata može primeniti i metoda 2.

**Tabela 4.7.** Rezultati određivanja udela salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica HPLC metodama 1 i 2

Uzorak	Metoda 1	Metoda 2	% razlike
F7	11,34 ± 0,17	12,76 ± 0,30	11,13
F9	3,11 ± 0,28	3,30 ± 0,00	5,76
F10	6,44 ± 0,12	6,39 ± 0,10	0,78
F11	3,47 ± 0,09	3,63 ± 0,01	4,41
F15	2,15 ± 0,05	1,98 ± 0,04	8,59

#### **4.2.2. Raspodela veličine i stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica**

Na osnovu rezultata prve eksperimentalne faze, kao i prvog seta eksperimenata (formulacije F1, F2, F3 i F4) druge faze, izabrani su sledeći parametri procesa emulgovanja na povišenoj temperaturi za izradu svih ostalih formulacija suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica: 1,50% poloksamera 188, vreme homogenizacije od 2 min i brzina homogenizacije od 13400 obr/min, koji su prethodno korišćeni za dobijanje formulacije F4 u drugoj fazi (Tabela 4.8). Naime, formulacija F4 je pokazala najužu raspodelu veličine mikročestica (prikazano preko najmanje *span* vrednosti od 1,14) i najmanju veličinu mikročestica (prikazano preko parametara  $D_{[4,3]}$  od 4,93 µm i  $d_{v90}$  od 7,79 µm), iako je vrednost  $d_{v50}$  formulacije F4 bila nešto viša u odnosu na  $d_{v50}$  vrednost formulacije F1 (Tabela 4.8). Očekivano je bilo, na osnovu zapažanja u prvoj fazi rada, da ovi parametri (vreme homogenizacije od 2 min i brzina

homogenizacije od 13400 obr/min) budu optimalni, budući da produžavanje vremena homogenizacije može dovesti do formiranja čvrstih lipidnih mikročestica većeg prečnika sa širom raspodelom veličine. Ovo je zapaženo i u studiji koju su sprovedli Sanna i sar. (2004), koji su takođe pokazali da produžavanje vremena homogenizacije dovodi do povećanja veličine čestica usled njihove koalescencije. Naime, kao što je i pokazano u prvoj eksperimentalnoj fazi, duže vreme homogenizacije (8 min) dovelo je do većih *span* vrednosti u slučaju formulacija sušenih raspršivanjem.

Pored navedenog, uočeno je i da se sa povećanjem udela poloksamera 188 smanjuje *span* vrednost, te je zbog toga za ostale formulacije u drugoj fazi korišćen veći udeo (1,5%) ovog surfaktanta. Jaspert i sar. (2007) su uočili da se optimalna veličina čvrstih lipidnih mikročestica može postići čak i pri nižim brzinama homogenizacije od 8000 obr/min, a poređenjem formulacija F2 i F3 uočeno je da nema velike razlike u raspodeli veličine čestica kada je kao brzina homogenizacije korišćeno 17400 obr/min (F3), tako da je zaključeno da nije potrebno dodatno povećati brzinu homogenizacije. Stoga su, za dalju izradu formulacija, korišćeni sledeći parametri procesa emulgovanja na povišenoj temperaturi: vreme homogenizacije od 2 min i brzina homogenizacije od 13400 obr/min, dok su procesni parametri sušenja raspršivanjem varirani prilikom izrade formulacija F5-F15. Osim parametara koji definišu proces sušenja raspršivanjem, u drugoj fazi rada procenjivan je i uticaj efekta „pranja“ suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica i dodatka trehaloze, čiji uticaj nije procenjen u prvoj fazi eksperimentalnog rada za formulacije sušene raspršivanjem.

**Tabela 4.8.** *Veličina, raspodela veličine i stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica*

Formulacija	$d_{v10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{v50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{v90}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{[4,3]}$ ( $\mu\text{m}$ )	<i>Span</i>	Stvarna gustina ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
F1	$2,24 \pm 0,04$	$4,42 \pm 0,07$	$8,84 \pm 0,37$	$5,08 \pm 0,12$	$1,49 \pm 0,07$	$1,050 \pm 0,001$
F2	$2,16 \pm 0,09$	$4,97 \pm 0,07$	$11,19 \pm 0,13$	$5,94 \pm 0,04$	$1,82 \pm 0,07$	$1,030 \pm 0,001$
F3	$2,09 \pm 0,02$	$4,48 \pm 0,04$	$9,63 \pm 0,06$	$5,28 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,01$	$1,030 \pm 0,001$
F4	$2,58 \pm 0,21$	$4,57 \pm 0,04$	$7,79 \pm 0,47$	$4,93 \pm 0,08$	$1,14 \pm 0,15$	$1,050 \pm 0,001$
F5	$2,99 \pm 0,05$	$5,55 \pm 0,18$	$10,02 \pm 0,73$	$6,10 \pm 0,26$	$1,27 \pm 0,10$	$1,050 \pm 0,001$
F6	$3,31 \pm 0,03$	$7,09 \pm 0,05$	$13,31 \pm 0,06$	$7,74 \pm 0,05$	$1,41 \pm 0,01$	$1,050 \pm 0,002$
F7	$2,43 \pm 0,02$	$4,67 \pm 0,03$	$8,51 \pm 0,06$	$5,12 \pm 0,04$	$1,30 \pm 0,00$	$1,060 \pm 0,002$
F8	$2,20 \pm 0,05$	$5,90 \pm 0,05$	$7,10 \pm 0,03$	$6,74 \pm 0,10$	$1,72 \pm 0,08$	$1,210 \pm 0,001$
F9	$2,20 \pm 0,05$	$4,03 \pm 0,06$	$7,10 \pm 0,03$	$4,39 \pm 0,05$	$1,22 \pm 0,02$	$1,170 \pm 0,001$
F10	$1,87 \pm 0,01$	$5,13 \pm 0,09$	$12,21 \pm 0,06$	$6,21 \pm 0,05$	$2,02 \pm 0,03$	$1,230 \pm 0,001$
F11	$2,28 \pm 0,06$	$3,97 \pm 0,09$	$6,70 \pm 0,12$	$4,28 \pm 0,09$	$1,11 \pm 0,01$	$1,020 \pm 0,001$
F12	$2,26 \pm 0,02$	$3,94 \pm 0,03$	$6,63 \pm 0,04$	$4,24 \pm 0,03$	$1,11 \pm 0,00$	$1,030 \pm 0,002$
F13	$3,17 \pm 0,01$	$6,53 \pm 0,01$	$14,72 \pm 0,04$	$8,63 \pm 0,06$	$1,77 \pm 0,01$	$0,990 \pm 0,002$
F14	$1,84 \pm 0,09$	$4,07 \pm 0,11$	$8,71 \pm 0,83$	$4,76 \pm 0,29$	$1,69 \pm 0,19$	$1,270 \pm 0,001$
F15	$3,13 \pm 0,12$	$6,11 \pm 0,13$	$11,61 \pm 0,26$	$6,82 \pm 0,15$	$1,39 \pm 0,04$	$1,000 \pm 0,003$



Statističkom analizom procenjeno je da je efekat „pranja“ suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica imao značajan uticaj na veličinu čvrstih lipidnih mikročestica ( $p = 0,0087$ ). Tačnije, formulacije čvrstih lipidnih mikročestica podvrgnute pranju su pokazale manju veličinu čestica u odnosu na formulacije izrađene bez pranja, što se uočava na osnovu formulacija F4 („sa pranjem“) u odnosu na F6 („bez pranja“) i na osnovu F11 („sa pranjem“) u odnosu na F7 („bez pranja“), gde je jedina razlika između formulacija bilo „pranje“ suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica. U dostupnoj literaturi do sada nije opisan uticaj „pranja“ suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica na karakteristike čestica dobijenog praška.

Efekat dodatka trehaloze na veličinu mikročestica procenjen je poređenjem formulacija F4 i F8, pri čemu je dodatak rastvora trehaloze suspenziji čvrstih lipidnih mikročestica (F8) doveo do povećanja veličine mikročestica (Tabela 4.8). Ovo je potvrđeno poređenjem formulacija F10 i F7, gde je dodatak trehaloze u slučaju formulacije F10 doprineo povećanju veličine mikročestica, ali i širini raspodele mikročestica, što se vidi na osnovu veće *span* vrednosti.

Rezultati su ukazali i na značajan efekat ( $p = 0,0054$ ) brzine vazduha za raspršivanje na veličinu čvrstih lipidnih mikročestica, čije je povećanje sa 473 na 670 L/h (u slučaju F7) dovelo do smanjenja veličine čestica (F6 u odnosu na F7). Ovo je potvrđeno i u slučaju formulacija F8 i F9, gde je veća brzina vazduha za raspršivanje (473 i 670 L/h za F8 i F9, redom) rezultovala manjom veličinom čestica formulacije F9 (4,01  $\mu\text{m}$ ) u odnosu na F8 (5,90  $\mu\text{m}$ ). Očekivano je bilo da će veće brzine vazduha za raspršivanje doprineti manjoj veličini čvrstih lipidnih mikročestica jer se generisao veći pritisak u raspršivaču koji je doprineo porastu energije, koja je posledično efikasnije raspršivala suspenziju u sitnije kapi. Sušenje sitnijih kapi rezultovalo je i sitnijim česticama praška (Lechanteur and Evrard, 2020).

Od formulacionih faktora, uočeno je da je udeo poloksamera 188 imao negativan efekat na veličinu i raspodelu veličine čestica ( $p < 0,0001$  i  $p = 0,0344$ , redom), što znači da je manja veličina mikročestica, zajedno sa užom raspodelom veličine mikročestica, postignuta primenom većeg udela poloksamera 188 kao surfaktanta. Ovim je potvrđeno slično zapažanje iz prve faze eksperimentalnog rada. Kao što je već pomenuto, ovakav ishod je očekivan, imajući u vidu da je veći udeo surfaktanta mogao efikasnije da spreči koalescenciju čestica. Svi faktori koji imaju značajan uticaj na karakteristike praškova čvrstih lipidnih mikročestica (pri čemu su uzete u obzir samo formulacije izrađene od glicerildibehenata kao lipidne komponente) prikazani su u Tabeli 4.9.

**Tabela 4.9.** CMA i CPP koji imaju značajan uticaj na karakteristike praškova čvrstih lipidnih mikročestica, izrađenih od glicerildibehenata

Karakteristika formulacije	Veličina mikročestica ( $d_{v50}$ )	Raspodela veličine mikročestica ( <i>span</i> )	Stvarna gustina
CMA/ CPP	Brzina vazduha za raspršivanje	Udeo poloksamera 188	Dodatak trehaloze
	„Pranje“ mikročestica		
	Udeo poloksamera 188		

Stvarna gustina čvrstih lipidnih mikročestica bila je oko 1,00 g/cm<sup>3</sup> za sve formulacije koje ne sadrže trehalozu, što je prikazano u Tabeli 4.8. Međutim, u slučaju formulacija F8, F9, F10 i F14, uočeno je statistički značajno povećanje stvarne gustine usled prisustva trehaloze u ovim formulacijama ( $p = 0,0009$ ), što je pokazano i u prvoj fazi eksperimentalnog rada. Slične vrednosti stvarne gustine praškova čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem objavljene su i u studiji Daman-a i sar. (2014). Tačnije, u ovoj studiji dobijeni su praškovi, koji su imali stvarnu gustinu od oko 1,1 g/cm<sup>3</sup>, i to primenom smeše vode i metanola za proces sušenja raspršivanjem (Daman i sar., 2014). Očekivano bi bilo da je moguće postići manju stvarnu gustina praškova jer su u procesu sušenja raspršivanjem Daman i sar. (2014) koristili različite procenete etanola umesto vode, budući da se očekuje da etanol isparava brže i potpunije u odnosu na vodu. U ovoj fazi istraživanja, dobijeni su praškovi čvrstih lipidnih mikročestica sa sličnom stvarnom gustinom, pri čemu je izbegnuto korišćenje organskih rastvarača, što je jedna od velikih prednosti u procesu izrade/proizvodnje praškova.

Efekat vrste lipidne komponente na karakteristike praškova čvrstih lipidnih mikročestica evaluiran je delimično i u ovoj fazi eksperimentalnog rada. S obzirom na to da formulacije izrađene u prvoj fazi nisu pokazale odgovarajuće karakteristike, u drugoj fazi pripremljene su inicijalno samo tri formulacije čvrstih lipidnih mikročestica sa stearylalkoholom (F13, F14 i F15). Međutim, pokazano je da su samo čvrste lipidne mikročestice iz formulacije F14 manje od 6  $\mu\text{m}$ , uz nešto veću gustinu u poređenju sa F13 i F15, koje su imale geometrijski prečnik preko 6  $\mu\text{m}$  uz nedovoljno nisku stvarnu gustinu da bi pokazale aerodinamički prečnik manji od 5  $\mu\text{m}$ . Može se ipak zapaziti (Tabela 4.8) da je, suprotno u odnosu na formulacije sa glicerildibehenatom, dodatak trehaloze (u slučaju F14) uspešno stabilizovao čvrste lipidne mikročestice tokom procesa sušenja raspršivanjem, što je dovelo do smanjenja veličine mikročestica (F14 u odnosu na F15).

#### 4.2.3. Nasipna i tapkana gustina i protočnost praškova čvrstih lipidnih mikročestica

Slično rezultatima prve faze, nasipne i tapkane gustine praškova čvrstih lipidnih mikročestica iznosile su između 0,1 i 0,3  $\text{g}/\text{cm}^3$  (Tabela 4.10). Formulacije koje u svom sastavu imaju trehalozu (F8, F9, F10 i F14) pokazale su očekivano i najveće vrednosti nasipne i tapkane gustine, kao što je slučaj i sa stvarnom gustinom. Ove vrednosti tapkane gustine se smatraju odgovarajućim za adekvatnu aerosolizaciju praškova za inhalaciju (Silva i sar., 2013). Carr-ov indeks je bio manji od 25% u slučaju svih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica, čime je dokazana njihova odgovarajuća protočnost. S obzirom na to da nisu uočene velike razlike u nasipnoj i tapkanoj gustini, niti u protočnosti između izrađenih formulacija, može se zaključiti da su sve izrađene formulacije praškova čvrstih lipidnih mikročestica pokazale odgovarajuće karakteristike.

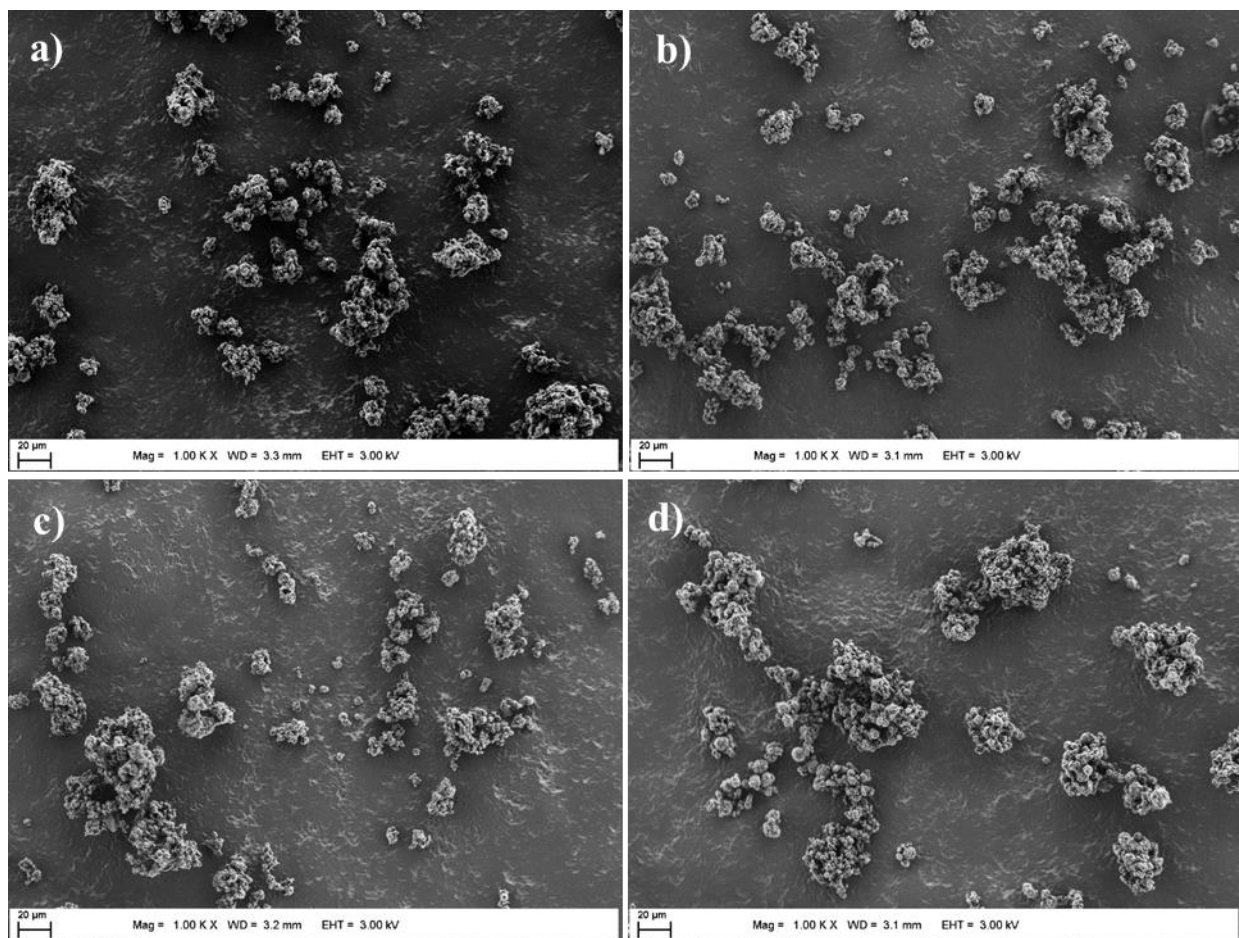
**Tabela 4.10.** Nasipna i tapkana gustina, Hausner-ov odnos i Carr-ov indeks za formulacije praškova čvrstih lipidnih mikročestica

Formulacija	Nasipna gustina ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Tapkana gustina ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Hausner-ov odnos	Carr-ov indeks (%)	Protočnost
F1	0,147	0,192	1,31	23,53	prihvatljiva
F2	0,192	0,233	1,21	17,31	prosečna
F3	0,169	0,213	1,26	20,34	prihvatljiva
F4	0,156	0,200	1,28	21,88	prihvatljiva
F5	0,161	0,200	1,24	19,35	prosečna
F6	0,208	0,263	1,26	20,83	prihvatljiva
F7	0,192	0,238	1,24	19,23	prosečna
F8	0,250	0,333	1,33	25,00	prihvatljiva
F9	0,252	0,315	1,25	20,00	prosečna
F10	0,263	0,313	1,19	15,79	prosečna
F11	0,161	0,192	1,19	16,13	prosečna
F12	0,156	0,185	1,19	15,63	prosečna
F13	0,147	0,179	1,21	17,65	prosečna
F14	0,217	0,263	1,21	17,39	prosečna
F15	0,122	0,152	1,24	19,51	prosečna

#### 4.2.4. Morfologija čvrstih lipidnih mikročestica

SEM mikrofografije prve četiri izrađene formulacije čvrstih lipidnih mikročestica (F1, F2, F3 i F4) prikazane su na Slici 4.27. Može se primetiti da su čvrste lipidne mikročestice dobijene u ovoj fazi sitnije

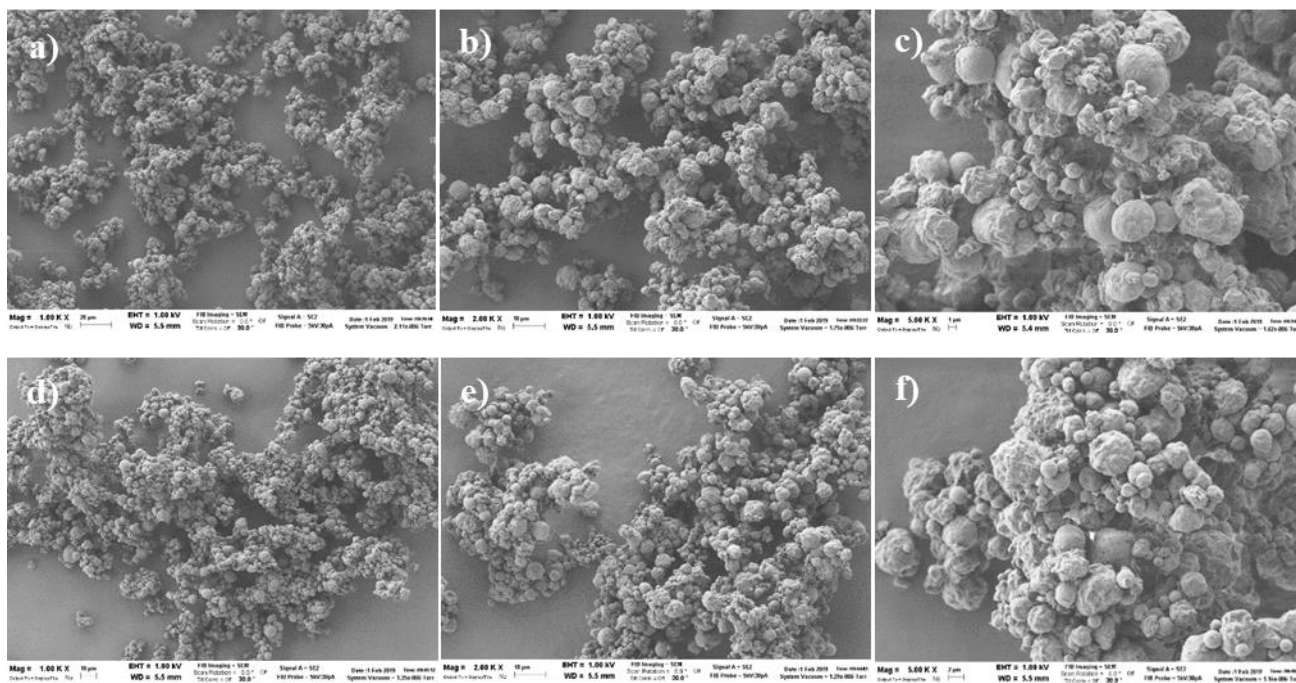
u poređenju sa čvrstim lipidnim mikročesticama dobijenim sušenjem raspršivanjem u prvoj fazi, usled uspešne optimizacije parametara procesa sušenja raspršivanjem, ali da su i dalje prisutni aglomerati mikročestica. Određeni stepen slepljivanja i aglomeracije čestica bili su očekivani, imajući u vidu da su u pitanju praškovi čvrstih lipidnih mikročestica. Međutim, kao što je već istaknuto, prilikom razvoja praškova za inhalaciju, potrebno je postizanje balansa u jačini međučestičnih adhezivnih i kohezivnih sila koje treba da budu dovoljno jake da se spreči raslojavanje praška, te očuva stabilnost tokom punjenja i čuvanja proizvoda, a istovremeno dovoljno slabe da se omogući adekvatno raspršivanje (aerosolizacija) praška prilikom njegove inhalacione primene (Hickey, 2004). Stoga prikazani aglomerati sa Slike 4.27 ne moraju predstavljati problem ukoliko su međučestične sile dovoljno slabe da se omogući adekvatno raspršivanje praškova, što će biti opisano u okviru rezultata *in vitro* ispitivanja njihovih aerodinamičkih karakteristika.



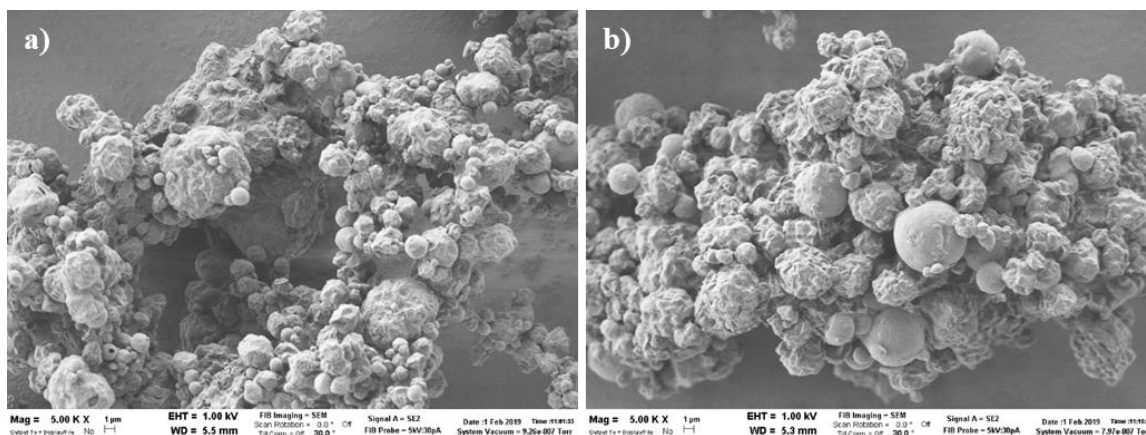
**Slika 4.27.** SEM mikrografije izabranih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica (uvećanje 1000 puta): F1 (a); F2 (b); F3 (c); F4 (d)

Slike 4.28a-c jasno pokazuju da su, i u slučaju formulacije F7, prisutni aglomerati čvrstih lipidnih mikročestica, ali se pri većim uvećanjima (2000 i 5000 puta) uočavaju sitne i sferične mikročestice. Na osnovu SEM mikrografija čvrstih lipidnih mikročestica formulacije F9 sa trehalozom (Slika 4.28d-f) može se primetiti da su u slučaju ove formulacije dobijene sitne, sferne i „naborane“ mikročestice sa većom specifičnom površinom, koje su više porozne u odnosu na mikročestice formulacije F7 u čiji sastav ne ulazi trehaloza. Veća poroznost i veća specifična površina mikročestica su poželjne kod formulacije praškova za inhalaciju jer mogu doprineti većim FPF vrednostima (Kaiyal i Nokhodchi, 2015). Visoko porozne mikročestice potvrđene su i u slučaju formulacija F10 (sa trehalozom) i F11 (bez

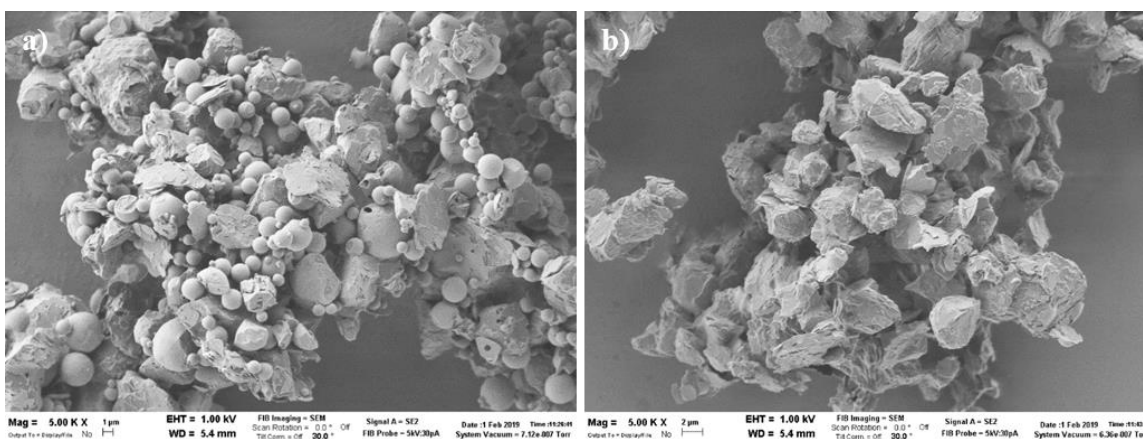
trehaloze) (Slika 4.29). Sa druge strane, još jednom su potvrđeni rezultati prve faze eksperimentalnog rada (poglavlje 4.1.3) da stearylalkohol nije pogodna lipidna komponenta za izradu čvrstih lipidnih mikročestica metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi, kako u kombinaciji sa sušenjem smrzavanjem, tako i u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem. Naime, može se uočiti (Slika 4.30a) da je najveći broj mikročestica formulacije F14 nepravilnog oblika, a iako je prisutan i određen broj mikročestica idealno sfernog oblika, primećuje se da ove mikročestice nisu porozne. Pored toga, kao i u prvoj fazi, uočene su dve generacije mikročestica u slučaju formulacije F14 sa trehalozom, što opet ukazuje na to da komponente nisu bile homogeno izmešane prilikom izrade ove formulacije (Slika 4.30a). U slučaju formulacije F15 (sa trehalozom), čvrste lipidne mikročestice imaju nepravilan oblik (Slika 4.30b), što može biti posledica interakcije stearylalkohola sa trehalozom, te je ovaj fenomen neophodno detaljnije ispitati. Ipak, na osnovu svega navedenog može se zaključiti da formulacije praškova čvrstih lipidnih mikročestica sa stearylalkoholom nisu adekvatne za inhalacionu primenu.



**Slika 4.28.** SEM mikrografije: F7, uvećanje 1000 puta (a); F7, uvećanje 2000 puta (b); F7, uvećanje 5000 puta (c); F9, uvećanje 1000 puta (d); F9, uvećanje 2000 puta (e); F9, uvećanje 5000 puta (f)



**Slika 4.29.** SEM mikrografije (uvećanje 5000 puta): F10 (a); F11 (b)



**Slika 4.30.** SEM mikrografije (uvećanje 5000 puta): F14 (a); F15 (b)

#### 4.2.5. Aerodinamička svojstva praškova čvrstih lipidnih mikročestica

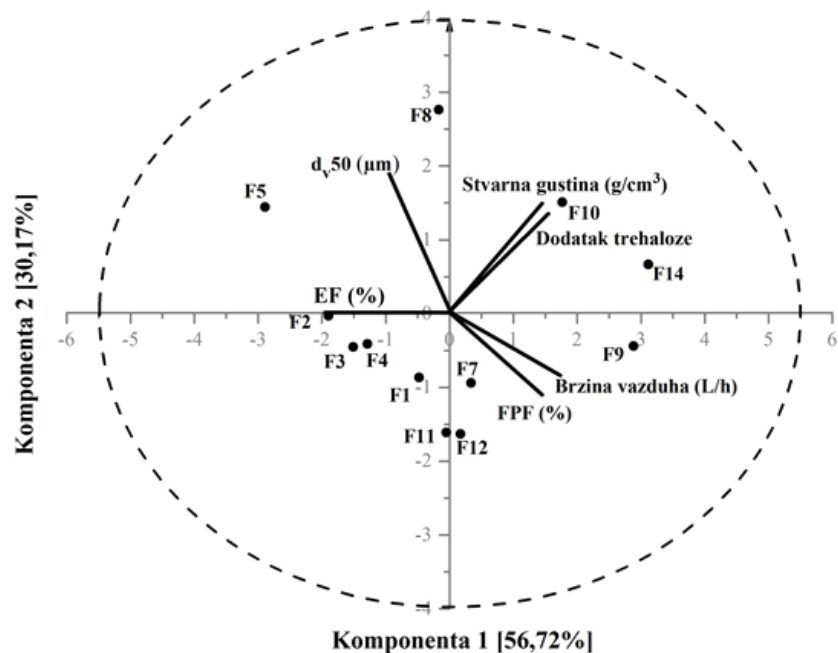
FSI analiza aerodinamičkih karakteristika praškova čvrstih lipidnih mikročestica je sprovedena za sve formulacije izuzev F6, F13 i F15, zbog toga što su ove formulacije pokazale veliki geometrijski prečnik čvrstih lipidnih mikročestica ( $d_{v50} > 6 \mu\text{m}$ ). Geometrijski prečnik mikročestica veći od  $6 \mu\text{m}$  nije odgovarajući za formulacije praškova za inhalaciju, osim u slučaju velikih poroznih mikročestica, čija je gustina manja od  $0,40 \text{ g/cm}^3$  (Abdelazis i sar., 2018). Kao što je već pomenuto, stvarna gustina praškova F1-F15 iznosila je oko  $1 \text{ g/cm}^3$ , što znači da bi za mikročestice koje imaju geometrijski prečnik  $> 6 \mu\text{m}$  teorijski aerodinamički prečnik bio  $> 6 \mu\text{m}$ , a ovaj aerodinamički prečnik nije adekvatan za mikročestice praškova za inhalaciju.

Rezultati FSI analize su, u većini slučajeva, bili u skladu sa rezultatima određivanja geometrijske veličine čestica (Tabela 4.8). Odnosno, rezultati FSI analize ukazali su na to da su formulacije sa manjom veličinom čestica (manjim  $d_{v50}$ ) pokazale više FPF vrednosti (Tabela 4.11). Izuzetak od ovakvog odnosa uočen je u slučaju formulacija koje u svom sastavu sadrže trehalozu, kao npr. F8 koja je, iako je imala veći  $d_{v50}$  ( $5,90 \mu\text{m}$ ) u odnosu na F5 ( $5,55 \mu\text{m}$ ), pokazala veću FPF vrednost (Tabela 4.11). Pored toga, uočeno je da je, iako su formulacije F9, F11 and F12 imale skoro istu vrednost  $d_{v50}$ , formulacija F9 pokazala višu FPF vrednost u odnosu na F11 i F12 (38,04% u poređenju sa 27,01% i 27,93%, redom). Stoga se može pretpostaviti da je dodatak trehaloze poboljšao aerodinamička svojstva ispitivanih praškova za inhalaciju. U skladu sa zahtevima Ph. Eur. 10.0, više od 75% nominalne doze praška za inhalaciju bilo je emitovano iz kapsula i inhalatora za većinu formulacija, odnosno EF vrednosti većine ispitivanih formulacije bile su veće od 75% (Tabela 4.11).

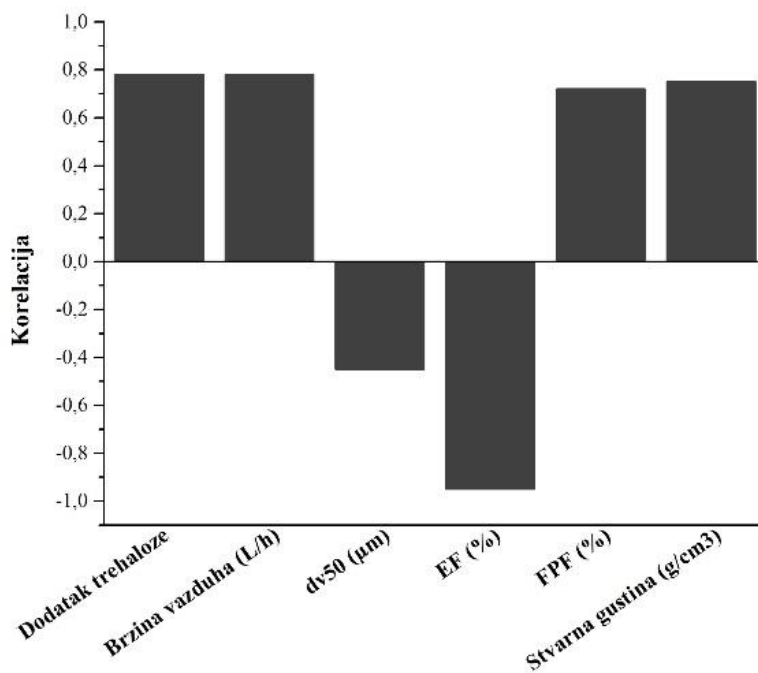
**Tabela 4.11. Rezultati FSI analize**

Formulacija	EF (%)	FPF (%) < 5 $\mu\text{m}$
F1	82,27 $\pm$ 1,68	34,57 $\pm$ 4,27
F2	94,10 $\pm$ 2,68	24,18 $\pm$ 2,71
F3	90,45 $\pm$ 2,45	22,83 $\pm$ 2,19
F4	90,45 $\pm$ 0,05	26,66 $\pm$ 0,73
F5	93,32 $\pm$ 1,63	3,45 $\pm$ 1,95
F6	/	/
F7	82,80 $\pm$ 2,15	32,46 $\pm$ 2,10
F8	83,80 $\pm$ 2,71	19,93 $\pm$ 1,18
F9	71,36 $\pm$ 0,45	38,04 $\pm$ 4,84
F10	83,13 $\pm$ 3,66	30,72 $\pm$ 2,90
F11	86,06 $\pm$ 3,23	27,01 $\pm$ 3,60
F12	84,01 $\pm$ 0,81	27,93 $\pm$ 3,51
F13	/	/
F14	72,71 $\pm$ 3,18	30,91 $\pm$ 0,46
F15	/	/

Na osnovu prikazanih rezultata, primećeno je da postoji različit tip uticaja faktora i njihovih potencijalnih interakcija na karakteristike praškova čvrstih lipidnih mikročestica, što je ukazalo na potrebu da se primeni neka od multifaktorijalnih metoda analize, kao što je PCA. Analizom rezultata u poglavlju 4.2.2 identifikovani su CMA i CPP koji su statistički značajno uticali na stvarnu gustinu i veličinu čvrstih lipidnih mikročestica, gde su se, kao najznačajniji faktori, izdvojili brzina vazduha za raspršivanje i dodatak trehaloze. Pored toga, uočeno je da su veličina čvrstih lipidnih mikročestica i njihova stvarna gustina (i dodatak trehaloze) uticale na EF i FPF praškova (Tabela 4.11). Stoga je sprovedena PCA analiza kako bi se pomenuti parametri (dodatak trehaloze, brzina vazduha za raspršivanje, veličina i stvarna gustina mikročestica) dovele u međusobnu korelaciju sa aerodinamičkim karakteristikama praškova čvrstih lipidnih mikročestica, EF i FPF. Tačnije, PCA analizom određeni su parametri koji su imali najveći uticaj na FPF i EF praškova čvrstih lipidnih mikročestica kako bi mogao da se optimizuje proces izrade i dobije formulacija sa maksimalnom FPF vrednošću, istovremeno uz adekvatnu EF vrednost. Rezultati PCA analize prikazani su na Slici 4.31. Pokazano je da se pomoću prve dve komponente objašnjava najveći deo varijabilnosti podataka (56,72% i 30,17%, redom), što je poželjno da bi se rezultati PCA analize mogli smatrati pouzdanim. Najveći udeo varijabilnosti pripao je parametrima EF (Komponenta 1) i  $d_{v50}$  (Komponenta 2) (Slika 4.31a). Na osnovu korelacionog grafika (Slika 4.31b), može se uočiti da je dodatak trehaloze faktor koji je imao uticaj na EF, pri čemu postoji negativna korelacija između ova dva faktora. Negativna korelacija znači da je dodatak trehaloze rezultovao praškovima sa nižim EF vrednostima. Pretpostavlja se da su niže vrednosti EF posledica većih stvarnih gustina praškova, u čiji sastav ulazi i trehaloza u poređenju sa onim bez trehaloze (Tabela 4.11). Ovakav odnos se uočava i na osnovu korelacionog grafika (Slika 4.31b) koji pokazuje negativnu korelaciju između stvarne gustine praškova i EF. Pored toga, EF je i u negativnoj korelaciji sa FPF, što znači da bi optimizacija formulacije mogla biti problematična s obzirom na to da bi povećanje FPF vrednosti dovelo do potencijalnog smanjenja EF i obrnuto. Takođe, s obzirom na to da je FPF u pozitivnoj korelaciji sa dodatkom trehaloze, potvrđeno je očekivanje da će dodatak trehaloze doprineti razvoju formulacije sa većim FPF vrednostima.



a)



b)

**Slika 4.31.** Rezultati PCA procene korelacije više različitih faktora u razvoju praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica: a) „scatter biplot“ grafik; b) korelacioni grafik

Iako je dodatak trehaloze imao za cilj da zaštiti čvrste lipidne mikročestice u procesu sušenja raspršivanjem (Alhajj i sar., 2021), moguće je da je istovremeno poboljšao finalne aerodinamičke karakteristike praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Ovakav ishod je moguć s obzirom na to da se ugljeni hidrati, kao što su trehaloza, laktoza itd. često koriste u formulacijama praškova za inhalaciju jer je pokazano da mogu poboljšati njihove aerodinamičke karakteristike (Bosquillon i sar., 2001).

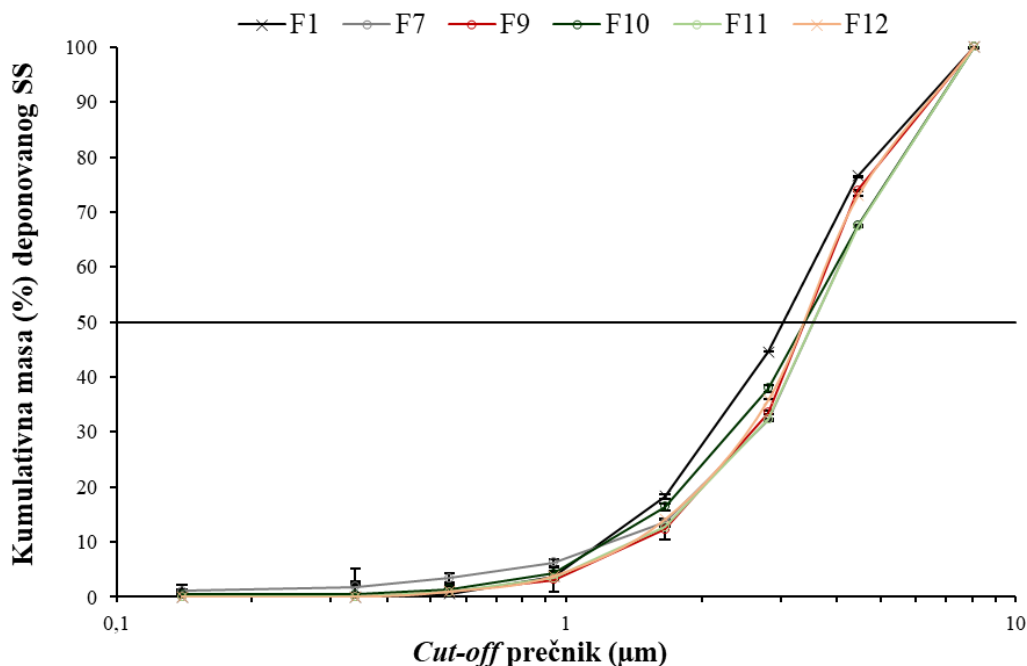
Na osnovu prikazanih rezultata, primećuje se i da je jedan procesni parametar sušenja raspršivanjem, tačnije brzina vazduha za raspršivanje, pokazao pozitivnu korelaciju sa FPF vrednošću praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Ovakva zavisnost je očekivana, s obzirom na to da je veća brzina vazduha za raspršivanje dovela do manje veličine čestica (manjeg  $d_{v50}$ ), što je pokazano u poglavlju 4.2.2, a to je posledično dovelo do većih FPF vrednosti. Negativna korelacija između  $d_{v50}$  i FPF je takođe potvrđena i pomoću PCA analize (Slika 4.31). Primeri primene PCA analize u razvoju praškova za inhalaciju se mogu naći u literaturi (Guenette i sar., 2009; Lakio i sar., 2015; Buttini i sar., 2016; Muddle i sar., 2017; Sun i sar., 2020 itd.), ali u pomenutim publikacijama nije opisana primena PCA analize u razvoju praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica.

S obzirom na to da primenom FSI metode nije moguće odrediti MMAD, koji je jedan od ključnih CQA praškova za inhalaciju, sprovedena je NGI analiza za šest formulacija čvrstih lipidnih mikročestica sa glicerildibehenatom (F1, F7, F9, F10, F11, F12) koje su pokazale najviše FPF vrednosti dobijene skriningom pomoću FSI analize. Rezultati NGI ispitivanja pokazali su da su sve ispitivane formulacije imale MMAD manji od 5  $\mu\text{m}$ , što ukazuje na to da bi svi ispitivani praškovi čvrstih lipidnih mikročestica mogli biti adekvatni za inhalacionu primenu (Tabela 4.12, Slika 4.32).

**Tabela 4.12.** Rezultati NGI analize

Formulacija	MMAD ( $\mu\text{m}$ )	GSD	EF <sub>NGI</sub> (%) <sup>*</sup>	FPF <sub>NGI</sub> (%)
F1	2,94 ± 0,14	1,89 ± 0,03	83,41 ± 0,51	30,34 ± 2,48
F7	3,50 ± 0,11	2,66 ± 0,18	89,65 ± 1,25	20,52 ± 1,23
F9	3,31 ± 0,35	1,87 ± 0,07	79,33 ± 4,45	35,77 ± 1,07
F10	3,40 ± 0,21	2,49 ± 0,02	86,96 ± 0,49	23,57 ± 2,31
F11	3,56 ± 0,11	1,91 ± 0,17	89,01 ± 2,56	20,23 ± 1,88
F12	3,26 ± 0,08	2,05 ± 0,01	83,21 ± 1,73	24,89 ± 2,81

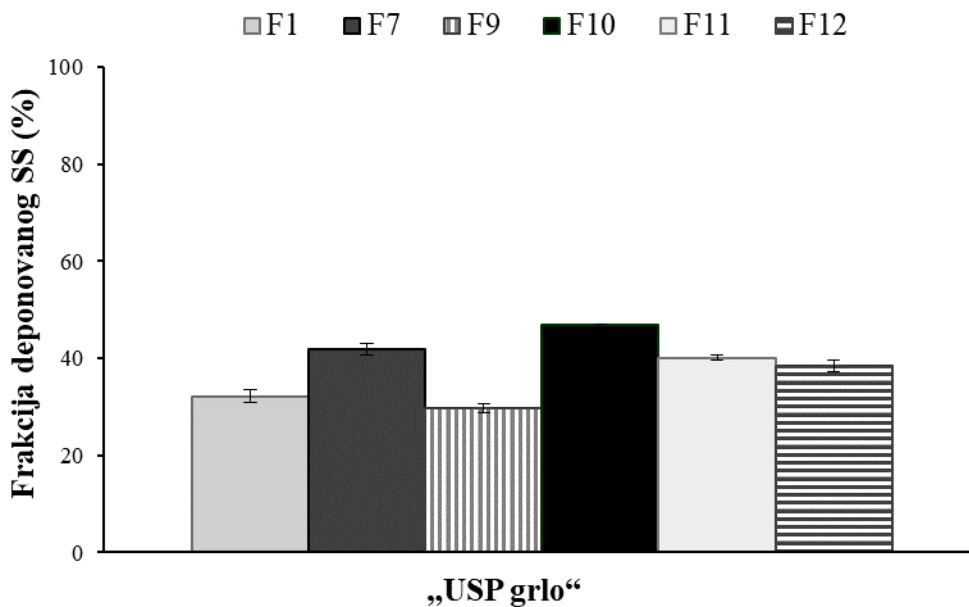
<sup>\*</sup>EF<sub>NGI</sub> (%) je izračunata kao odnos (u procentima) sume količina lekovite supstance koje su deponovane na fazama (posudama) od 1 do 7, „USP grlu“ i u MOC-u, i ukupne sakupljene količine salbutamol-sulfata



**Slika 4.32.** Kumulativna masa (%) deponovanog salbutamol-sulfata (SS) nakon aktivacije RS01<sup>®</sup> inhalatora sa praškovima čvrstih lipidnih mikročestica u NGI uređaju; crna linija predstavlja 50% kumulativne mase (y-osa), za koji se očitava MMAD vrednost sa x-ose



Na osnovu rezultata FSI i NGI analiza, može se primetiti da je većina formulacija čvrstih lipidnih mikročestica pokazala FPF > 20%, što je očekivana vrednost za ovakvu vrstu praškova za inhalaciju, gde su čvrste lipidne mikročestice nosači lekovite supstance, i za koju su do sada *in vitro* ispitivanjima aerodinamičkih karakteristika različitim metodama uglavnom dobijene FPF vrednosti u opsegu 20-30% (Mezzena i sar., 2009; Scalia i sar., 2012; Scalia i sar., 2013b; Daman i sar., 2014). Osim toga, na osnovu NGI rezultata se uočava da je  $EF_{NGI}$  bila viša od 80% za svih šest ispitivanih formulacija (odnosno  $EF_{NGI}$  je oko 80% u slučaju F9), pa se može pretpostaviti da su niže FPF vrednosti posledica značajne depozicije praška čvrstih lipidnih mikročestica (čak 30-47%) u „USP grlu“ NGI uređaja (Slika 4.33). Najveći procenat deponovanog salbutamol-sulfata iz praška za inhalaciju (čak 47%, što je skoro polovina od emitovane frakcije) u „USP grlu“ zapažen je prilikom ispitivanja formulacije F10. Ovaj rezultat nije povoljan imajući na umu da se deo praška koji se deponuje u grlu proguta, pa se lekovita supstanca može apsorbovati preko GIT-a u većem obimu. Zbog toga formulacija F10 nije pogodna za dalji razvoj. Formulacija F9 je pokazala najveću FPF vrednost (35,77%) i na osnovu NGI rezultata, kao i na osnovu FSI rezultata, što znači da ova formulacija ima najveći potencijal da bude izabrana kao optimalna za dalju optimizaciju i razvoj praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica.



**Slika 4.33.** Deponovana frakcija (%) salbutamol-sulfata (SS) u „USP grlu“ nakon aktivacije RS01® inhalatora sa praškovima čvrstih lipidnih mikročestica u NGI uređaju

#### 4.2.6. Udeo salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica

Udeo salbutamol-sulfata u formulacijama čvrstih lipidnih mikročestica je bio u opsegu 0,87-13,99%, u zavisnosti od vrste lipidne komponente (glicerildibehenat ili stearylalkohol) koja je korišćena za izradu formulacija, kao i od toga da li su formulacije čvrstih lipidnih mikročestica podrgnute „pranju“ ili ne (Tabela 4.13). Formulacije F13, F14 i F15 pokazale su najniži udeo salbutamol-sulfata. Ovo nije bilo očekivano imajući u vidu da je stearylalkohol izabran kao polarnija lipidna komponenta (Scalia i sar., 2015) u odnosu na glicerildibehenat, te komponenta sa većim potencijalom za efikasnu inkapsulaciju hidrofилnih lekovitih supstanci, kao što je salbutamol-sulfat. Moguće objašnjenje za uočenu pojavu je u tome što, kao što je zabeleženo na osnovu SEM mikrografija, formulacije sa stearylalkoholom nisu bile homogene, odnosno uočene su „prazne“ ljuske ove lipidne

komponente u koje salbutamol-sulfat nije mogao da se inkorporira. Dodatno, na osnovu SEM mikrografija, pretpostavljeno je da je došlo do interakcije stearylalkohola sa trehalozom, što je takođe moglo negativno da utiče na udeo salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica. Sa druge strane, ono što je bilo očekivano, je veći udeo salbutamol-sulfata u slučaju formulacija čvrstih lipidnih mikročestica koje nisu podvrgnute „pranju“ (F1, F6, F7 i F10), pri čemu je pretpostavljeno da je deo salbutamol-sulfata uspešno inkapsuliran u matriks čvrstih lipidnih mikročestica, dok je ostatak salbutamol-sulfata verovatno ostao na njihovoj površini. Udeo salbutamol-sulfata u formulaciji F10 nije bio toliko visok kao u slučaju ostale tri formulacije koje nisu podvrgnute „pranju“ (F1, F6 i F7), jer ova formulacija sadrži trehalozu. Dodatak trehaloze doveo je do smanjenog udela salbutamol-sulfata i u slučaju formulacija F9 u poređenju sa F11, kao i u slučaju F14 u poređenju sa F15, koje su se međusobno razlikovale jedino po prisustvu/odsustvu trehaloze. Ovo je i očekivano budući da su najpre izrađene jednake mase svih formulacija suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica, pa je zatim u slučaju formulacija F8, F9, F10 i F14 naknadno dodat rastvor trehaloze, čime su razblažene „inicijalne“ suspenzije neposredno pre procesa sušenja raspršivanjem.

S obzirom na to da je propisana pojedinačna doza salbutamol-sulfata nakon primene praškova za inhalaciju svega 100-400 µg (Easyhaler® Salbutamol sažetak karakteristika leka, 2018), može se zaključiti da bi čak i formulacije sa najmanjim udelom salbutamol-sulfata mogle da obezbede ove doze, i to primenom relativno niske i za pacijenta podnošljive količine praška za inhalaciju. Npr. u slučaju formulacije F11, kod koje je udeo salbutamol-sulfata 3,47%, a koja pokazuje FPF od oko 20% (Tabela 4.12), primenom nominalne količine praška za inhalaciju od 20 mg bi potencijalno bilo isporučeno oko 140 µg salbutamol-sulfata u donji deo respiratornog trakta.

**Tabela 4.13.** Eksperimentalno određen udeo salbutamol-sulfata u praškovima čvrstih lipidnih mikročestica

Formulacija	Udeo (%)
F1*	13,99 ± 0,57
F2	6,64 ± 0,07
F3	5,11 ± 0,06
F4	6,28 ± 0,15
F5	6,07 ± 0,04
F6*	12,44 ± 0,09
F7*	11,34 ± 0,17
F8**	3,10 ± 0,03
F9**	3,11 ± 0,28
F10*, **	6,44 ± 0,12
F11	3,47 ± 0,09
F12	3,50 ± 0,07
F13	2,36 ± 0,08
F14**	0,87 ± 0,04
F15	2,15 ± 0,05

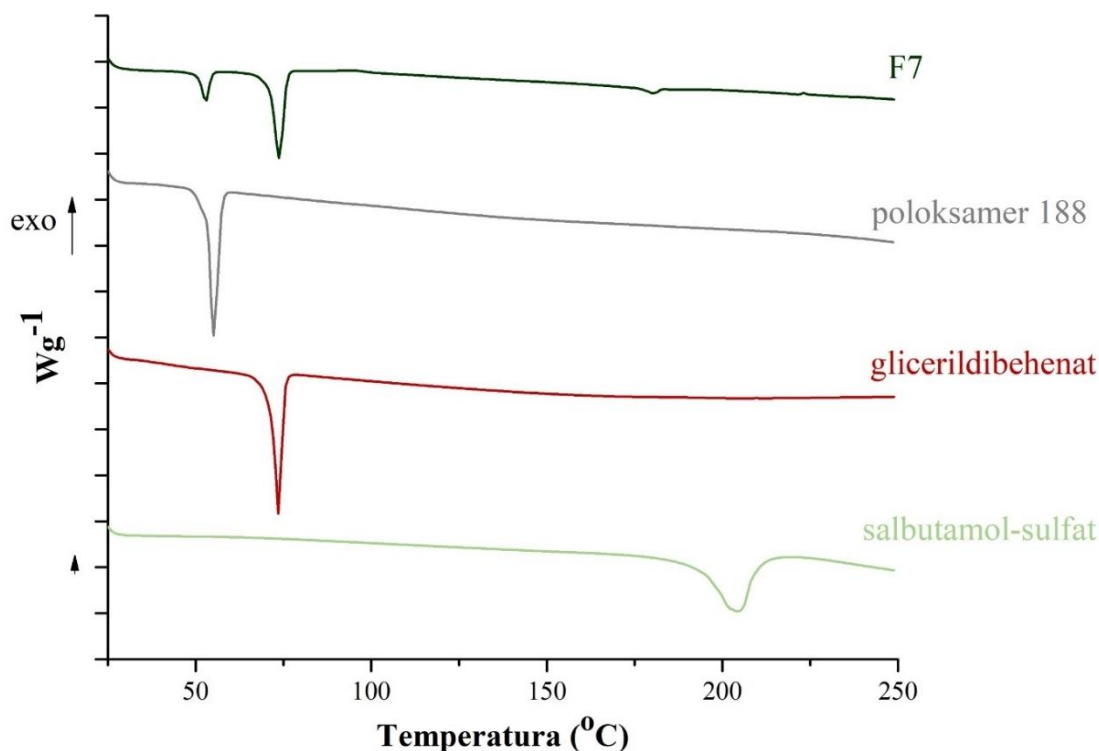
\*Formulacije koje nisu podvrgnute „pranju“;

\*\*Formulacije u čiji sastav ulazi trehaloza

#### 4.2.7. Karakterizacija čvrstog stanja odabrane formulacije čvrstih lipidnih mikročestica, lekovite i pomoćnih supstanci

##### DSC

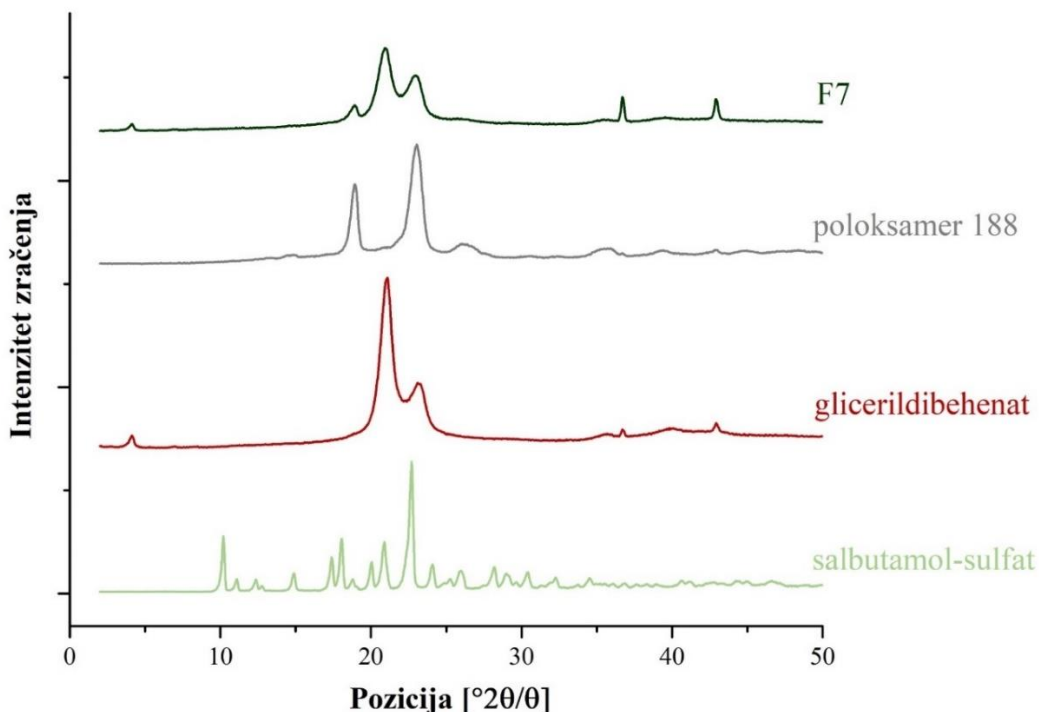
Na DSC termogramu odabrane formulacije čvrstih lipidnih mikročestica (F7), jasno se uočavaju pikovi glicerildibehenata i poloksamera 188, bez termalnih promena u odnosu na termograme čistih supstanci, dok se istovremeno primećuje modifikacija pika salbutamol-sulfata (Slika 4.34). U slučaju formulacije F7, endotermni pik salbutamol-sulfata bio je na 180 °C, dok je endotermni pik kod praška čistog salbutamol-sulfata bio na 204-205 °C (Slika 4.34). Obe vrednosti temperature topljenja salbutamol-sulfata se mogu pronaći u literaturi (Murphy i sar., 2003; Scalia i sar., 2013a). Grupa istraživača iz studije koju su objavili Murphy i sar. (2003), uočila je da 170-180 °C odgovara temperaturi topljenja uzorka salbutamol-sulfata sušenog raspršivanjem. Pored toga, uočili su da se i kristalno i amorfno stanje salbutamol-sulfata slično ponašaju prilikom termalne analize (Murphy i sar., 2003). Međutim, podaci iz drugih studija (Shariare i sar., 2011; Haghi i sar., 2012; Scalia i sar., 2013a; Ong i sar., 2014) ukazuju na endotermni pik salbutamol-sulfata na oko 205 °C. U slučaju formulacije čvrstih lipidnih mikročestica F7, može se pretpostaviti da je promena endoternog pika salbutamol-sulfata sa 205 °C na 180 °C posledica toga što je salbutamol-sulfat počeo da se meša i rastvara u ostalim otopljenim komponentama formulacije pre topljenja (Medarević i sar., 2019) ili da je došlo do prelaska salbutamol-sulfata iz kristalnog u amorfni oblik. Na osnovu prikazanih rezultata, važno je naglasiti da je DSC analizom pokazano da nije došlo do degradacije salbutamol-sulfata prilikom procesa emulgovanja na povišenoj temperaturi i sušenja raspršivanjem. Pored toga, jedini endotermni pik glicerildibehenata je na oko 73 °C, koji se pojavljuje i na termogramu formulacije F7 na istoj temperaturi, što odgovara temperaturi topljenja ove lipidne komponente (Tabela 1.2). Ovo znači da nije došlo do polimorfnih prelaza, niti strukturnih modifikacija glicerildibehenata prilikom izrade formulacije.



**Slika 4.34.** DSC termogrami: formulacije F7, poloksamera 188, glicerildibehenata i salbutamol-sulfata

## Difrakcija X-zraka

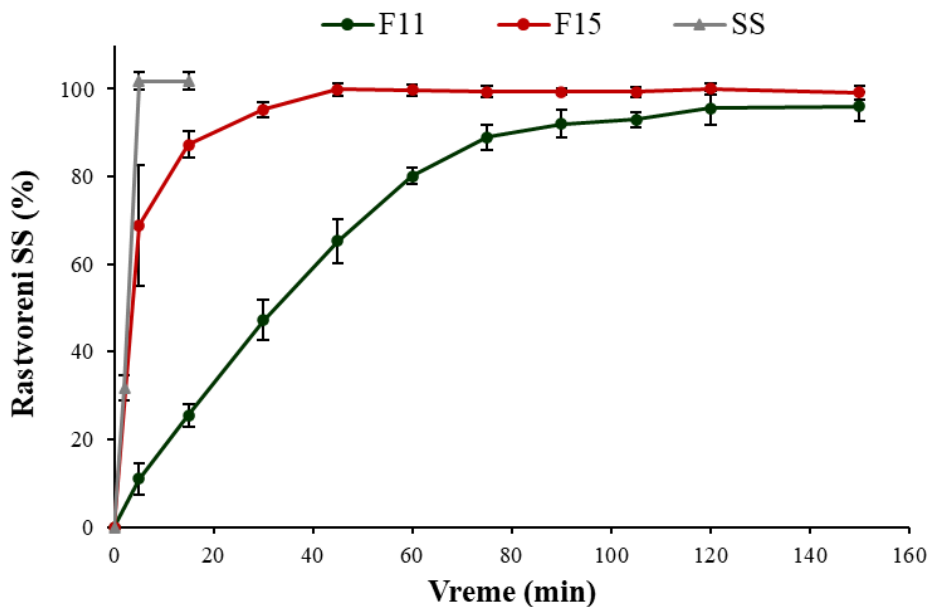
Difraktogrami odabrane formulacije F7, kao i čistih supstanci glicerildibehenata, poloksamera 188 i salbutamol-sulfata prikazani su na Slici 4.35. Može se uočiti da su karakteristični pikovi glicerildibehenata na pozicijama  $6,51^\circ$ ,  $22,5^\circ$  i  $24,6^\circ$   $2\theta/\theta$  prisutni i na difraktogramu formulacije F7. Pored toga, karakteristični pik poloksamera 188 na poziciji  $20,6^\circ$   $2\theta/\theta$  je takođe uočen na difraktogramu formulacije F7, dok se za njegov drugi karakteristični pik na poziciji  $22,5^\circ$   $2\theta/\theta$  to ne može sa sigurnošću tvrditi, s obzirom na to da se preklapio sa pikom glicerildibehenata, ali i zbog toga što je udeo poloksamera 188 bio niži od udela glicerildibehenata u formulaciji F7. Svi uočeni karakteristični pikovi čistih supstanci glicerildibehenata i poloksamera 188 sa Slike 4.35 se slažu sa podacima dostupnim u literaturi (Jaspart i sar., 2007; Scalia i sar., 2013a). Time su potvrđeni rezultati DSC analize da nije došlo do modifikacija u lipidnoj strukturi glicerildibehenata prilikom procesa emulgovanja na povišenoj temperaturi i sušenja raspršivanjem. Karakteristični kristalni pikovi salbutamol-sulfata na  $11,2^\circ$ ,  $19,7^\circ$ ,  $22,4^\circ$  i  $24,1^\circ$ , ilustrovani na Slici 4.35, su takođe u skladu sa podacima iz literature (Raula i sar., 2008; Davies i sar., 2013; Zellnitz i sar., 2019b), ali se ne mogu uočiti na difraktogramu formulacije F7. Jedan od mogućih razloga što karakteristični pikovi salbutamol-sulfata nisu jasno vidljivi na difraktogramu formulacije F7 je taj što je udeo salbutamol-sulfata bio najmanji u odnosu na druge dve komponente formulacije F7, glicerildibehenat i poloksamer 188, pa je došlo do preklapanja pikova. Međutim, veća je verovatnoća da je u toku procesa sušenja raspršivanjem došlo do prelaska salbutamol-sulfata iz kristalnog u amorfni oblik, s obzirom na to da je ova pojava već opisana u literaturi (Müller i sar., 2015; Li i sar., 2017b). Pored toga, može se zapaziti da bazna linija difraktograma formulacije F7 nije ravna, što opet može ukazivati na prisustvo amornog oblika salbutamol-sulfata. Ovo može biti problematično sa aspekta stabilnosti, s obzirom na to da amorfni oblici lekovitih i pomoćnih supstanci mogu da apsorbuju atmosfersku vlagu, što može dovesti do aglomeracije čestica praška tokom stajanja i dalje se negativno odraziti na aerodinamičke karakteristike praškova za inhalaciju (Zhou i sar., 2013; Li i sar., 2017b). Zbog toga je neophodno obratiti posebnu pažnju na način čuvanja praškova za inhalaciju tipa čvrstih lipidnih mikročestica.



**Slika 4.35.** Difraktogrami: formulacije F7, poloksamera 188, glicerildibehenata i salbutamol-sulfata

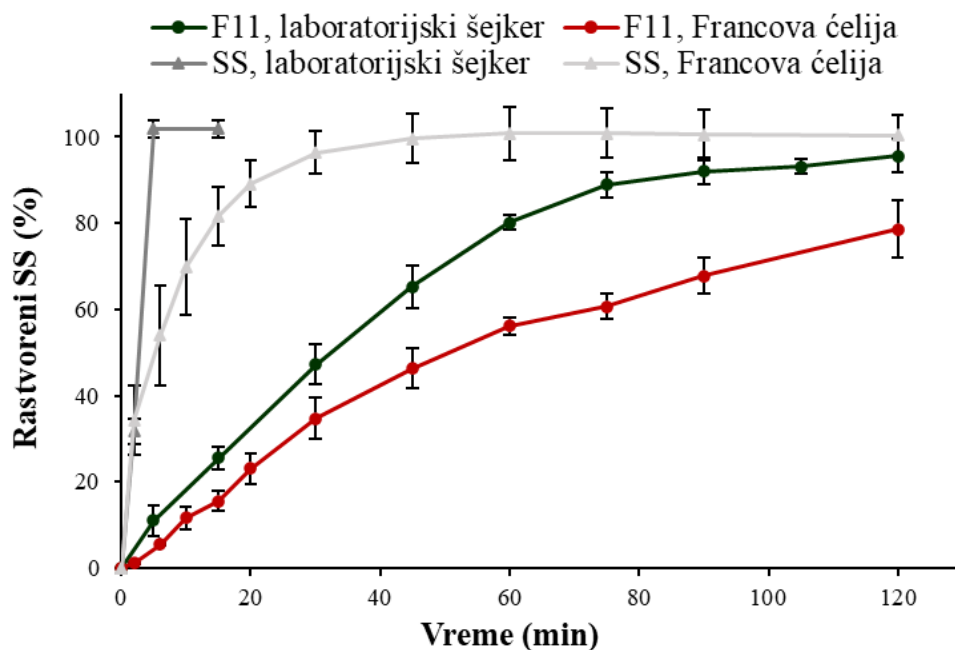
#### 4.2.8. *In vitro* brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica

Preliminarno ispitivanje *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica podrazumevalo je poređenje dve formulacije, jedne u čiji sastav ulazi glicerildibehenat (F11), a druge sa stearylalcoholom (F15), pri čemu su svi ostali CMA i CPP procesa izrade bili isti, izuzev ulazne temperature, koja je različita usled različite temperature topljenja ove dve lipidne komponente (Tabela 3.5). Ispitivanje je najpre sprovedeno u laboratorijskom šejkeru, kako bi rezultati bili uporedivi sa rezultatima prve faze eksperimentalnog rada. U ovoj fazi je potvrđeno da je stearylalkohol samo neznatno usporio rastvaranje salbutamol-sulfata iz formulacije F15, dok je u slučaju formulacije sa glicerildibehenatom (F11) postignuto znatno sporije rastvaranje salbutamol-sulfata (Slika 4.36). Naime, 100% salbutamol-sulfata iz uzorka čistog praška lekovite supstance rastvoreno je nakon samo 5 min, dok je čak 68,91% salbutamol-sulfata rastvoreno iz formulacije F15, a samo 10,97% iz formulacije F11 nakon istog vremenskog perioda. Pored toga, skoro 100% salbutamol-sulfata iz formulacije F15 rastvoreno je nakon 45 min, dok je u tom trenutku rastvoreno oko 65% salbutamol-sulfata iz formulacije F11, a celokupna količina lekovite supstance iz ove formulacije rastvorena je tek nakon 2 h. Ovakav rezultat je verovatno posledica toga da najveća količina salbutamol-sulfata iz formulacije F15 nije efikasno inkorporirana u lipidni matriks stearylakohola, te da je ostala na površini mikročestica i bila dostupna za brzo rastvaranje u kontaktu sa medijumom. Karasulu i sar. (2003) su primetili značajno brže rastvaranje lekovite supstance iz čvrstih lipidnih mikročestica sa stearylalkoholom u poređenju sa mikročesticama cetilalkohola i cetostearylalkohola, koje su pripisali tome da je hemijska struktura stearylalkohola pogodnija za difuziju lekovite supstance, kao i manjoj gustini i nižoj temperaturi topljenja stearylalkohola u poređenju sa druge dve lipidne komponente. Manja gustina i niža temperatura topljenja su evidentne i u slučaju stearylalkohola u odnosu na glicerildibehenat, tako da je ova činjenica možda doprinela većoj brzini rastvaranja salbutamol-sulfata iz čvrstih lipidnih mikročestica sa stearylalkoholom. S obzirom na to da je formulacija F11 pokazala znatno sporije oslobađanje lekovite supstance u odnosu na F15, ali da su i u drugoj fazi eksperimentalnog rada formulacije sa glicerildibehenatom pokazale generalno bolje karakteristike u odnosu na formulacije sa stearylalkoholom (što je prikazano u poglavljima 4.2.2, 4.2.4, 4.2.5 i 4.2.6), dalje *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz formulacija sa stearylalkoholom nije sprovedeno.



**Slika 4.36.** Rezultati preliminarnog *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja salbutamol-sulfata (SS) iz izabranih formulacija (F11 i F15) praškova čvrstih lipidnih mikročestica u laboratorijskom šejkeru

U ovoj fazi rada, primenjena je dodatna metoda za ispitivanje *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica, koja je podrazumevala primenu Francovih difuzionih ćelija, kako bi se potencijalno obezbedili biorelevantniji uslovi. U farmakopeji i regulatornim smernicama (Eur. Ph. 10.0; EMA, 2006; FDA, 2018a) ne postoje odgovarajući propisi za sprovođenje ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju. Stoga je u ovoj fazi ispitivanje brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz odabrane formulacije F11 sprovedeno u dve različite aparature i primenom dva različita eksperimentalna seta uslova, kako bi se procenio uticaj različitih uslova ispitivanja na rezultate *in vitro* brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Rezultati ispitivanja su prikazani na Slici 4.37. Može se uočiti da je brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz formulacije F11 nešto sporija kada je ispitivanje vršeno u Francovoj difuzionoj ćeliji, iako je ispitivana manja masa uzorka u odnosu na ispitivanje u laboratorijskom šejkeru. Pored toga, i brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz uzorka čistog praška je bila sporija prilikom ispitivanja u Francovoj difuzionoj ćeliji u poređenju sa ispitivanjem u laboratorijskom šejkeru. Sporije rastvaranje lekovite supstance prilikom ispitivanja u Francovoj difuzionoj ćeliji je očekivano imajući u vidu da je u okviru primenjene aparature prisutna membrana kroz koju lekovita supstanca prolazi difuzijom (Balducci i sar., 2015; Rohrschneider i sar., 2015), a koja simulira vazduh-plućna tečnost međupovršinu ćelija plućnog epitela (May i sar., 2012), pa predstavlja barijeru kroz koju lekovita supstanca mora da difunduje. Pored toga, Hastedt i sar. (2016) zaključili su da je apsorpcija visoko rastvorljivih lekovitih supstanci, kao što je salbutamol-sulfat, ograničena permeacijom lekovite supstance kroz epitel pluća (Hastedt i sar., 2016; Radivojević i sar., 2019), te je i zbog toga adekvatnije ispitivati brzinu rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova za inhalaciju u Francovoj difuzionoj ćeliji. Osim toga, Francova difuziona ćelija smatra se metodom izbora za ispitivanje praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance (Davies i Feddah, 2003), pa je zbog toga pogodnija za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Sa druge strane, metoda u laboratorijskom šejkeru bi se mogla koristiti za preliminarna ispitivanja u skrining fazi razvoja formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica za inhalaciju, prvenstveno zbog toga što je jednostavnija za primenu.



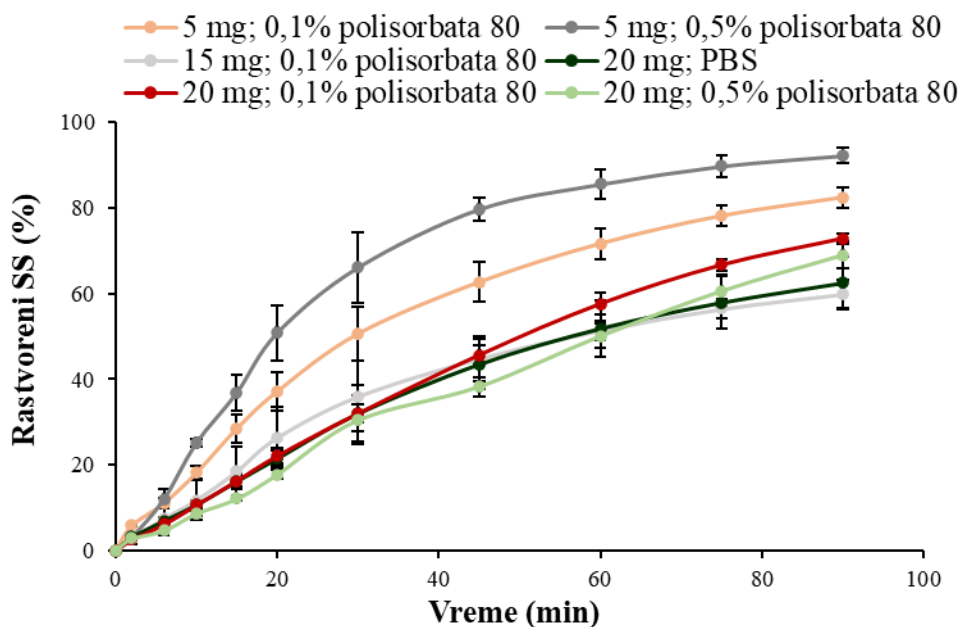
**Slika 4.37.** Rezultati preliminarnog *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja salbutamol-sulfata (SS) iz formulacije F11 u laboratorijskom šejkeru (masa uzorka F11 20 mg, a masa uzorka SS 10 mg, zapremina medijuma 10 mL) i Francovoj difuzionoj ćeliji (masa uzorka F11 i SS 5 mg, zapremina medijuma 18 mL)

Pored toga što je neophodno izabrati aparaturu za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz praškova za inhalaciju, potrebno je definisati i uslove ispitivanja, kao što su zapremina i vrsta medijuma, vrsta membrane, masa uzorka koja se analizira itd. Zbog toga je izabrana formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica (F7) analizirana primenom različitih uslova ispitivanja.

Na Slici 4.38 prikazani su rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz date formulacije u Francovoj difuzionoj ćeliji, sprovedenog pod različitim uslovima ispitivanja. Može se primetiti da je masa uzorka imala najveći uticaj na brzinu rastvaranja salbutamol-sulfata iz formulacije F7, pri čemu se lekovita supstanca brže rastvarala iz manje mase uzorka, verovatno usled lakšeg kvašenja manje količine uzorka, ali i manje ukupne količine čistog salbutamol-sulfata koji treba da difunduje kroz membranu. Dodatno, nisu uočene velike razlike između profila brzine rastvaranja salbutamol-sulfata u zavisnosti od toga da li je u medijum dodat surfaktant (polisorbata 80), njegove koncentracije (0,1% ili 0,5% (*m/V*)), kao ni od mase uzorka u opsegu 15-20 mg. U ovoj fazi je pokazano i da polisorbata 80 pod navedenim uslovima ispitivanja ne utiče negativno na obim rastvaranja salbutamol-sulfata, za razliku od zapažanja u prvoj fazi eksperimentalnog rada. Jedno od mogućih objašnjenja za to što nije došlo do smanjenja obima rastvaranja salbutamol-sulfata u prisustvu polisorbata 80 je pretpostavka da se smanjenje rastvorljivosti i brzine rastvaranja ove lekovite supstance dešava samo pri višim koncentracijama salbutamol-sulfata u medijumu, što je bio slučaj kod ispitivanja rastvorljivosti u prvoj fazi rada. Do smanjenja obima rastvaranja salbutamol-sulfata je došlo u prvoj fazi i prilikom ispitivanja brzine rastvaranja ove supstance iz čvrstih lipidnih mikročestica, jer je za ispitivanje u laboratorijskom šejkeru korišćena veća masa uzorka (40 mg), a ispitivanje je sprovedeno u manjoj zapremini medijuma (10 mL), te je koncentracija salbutamol-sulfata u medijumu bila veća.

S obzirom na to da je primećeno da se prilikom ispitivanja 15-20 mg uzorka čvrste lipidne mikročestice loše kvase, a da ni 0,5% (*m/V*) polisorbata 80 u medijumu ne doprinosi njihovom boljem kvašenju, u daljem ispitivanju je korišćena manja masa uzorka (5 mg). Kod ispitivanja 5 mg uzorka praškova čvrstih lipidnih mikročestica u medijumima sa 0,1% (*m/V*) polisorbata 80 i 0,5% (*m/V*) polisorbata 80 uočene su razlike između profila brzine rastvaranja salbutamol-sulfata, pri čemu je brže rastvaranje uočeno u medijumu sa 0,5% (*m/V*) polisorbata 80, usled boljeg kvašenja čvrstih lipidnih mikročestica. Stoga je zaključeno da bi se 5 mg uzorka u Francovoj difuzionoj ćeliji moglo koristiti za dalje ispitivanje, jer se pokazalo da je ova metoda dovoljno diskriminatorna za ispitivanje brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica.

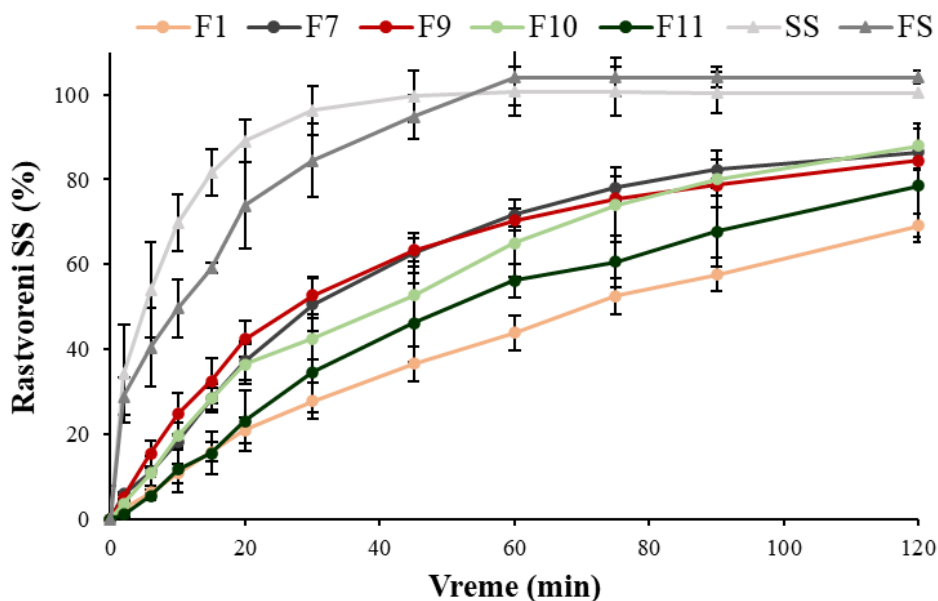
Za dalje ispitivanje ostalih formulacija izabran je medijum PBS (pH 7,4) sa dodatkom manje koncentracije (0,1% (*m/V*)) polisorbata 80 kao surfaktanta, kako bi se postigli diskriminatorniji uslovi ispitivanja. U dostupnoj literaturi (Scalia i sar., 2012) je takođe za kvašenje čvrstih lipidnih mikročestica prilikom ispitivanja u Francovoj difuzionoj ćeliji korišćeno 0,1% (*m/V*) polisorbata 80.



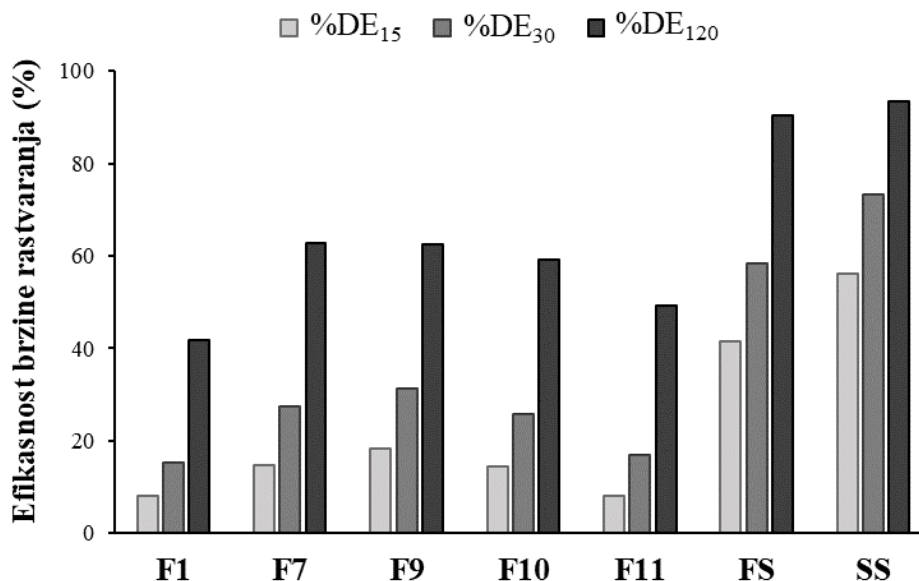
**Slika 4.38.** Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja salbutamol-sulfata (SS) iz formulacije F7 u Francovoj difuzionoj ćeliji primenom različitih uslova ispitivanja: različite masa uzorka (5, 15 ili 20 mg) i različitog procenta surfaktanta (0,1% ili 0,5% (m/V)) polisorbata 80, koji je dodat u osnovni medijum (PBS, pH 7,4)

Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz pet odabranih formulacija čvrstih lipidnih mikročestica primenom izabranih (optimalnih) uslova ispitivanja u Francovoj difuzionoj ćeliji prikazani su na Slici 4.39. Rezultati su pokazali da je oslobađanje salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica modifikovano (produženo) u odnosu na čistu lekovitu supstancu, kao i u odnosu na fizičku smešu (FS) salbutamol-sulfata i glicerildibehenata. Ovo se može potvrditi i na osnovu razlika u %DE vrednostima izračunatih na osnovu podataka o brzini rastvaranja salbutamol-sulfata iz praška čiste lekovite supstance (SS), njene fizičke smeše (FS) i pet ispitivanih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica (Slika 4.40). Dodatno, gotovo kompletna količina salbutamol-sulfata iz uzorka praška čiste supstance (96,29%) je rastvorena nakon 30 min, dok je u istom vremenskom intervalu rastvoreno od 27,88% do 52,67% salbutamol-sulfata iz različitih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica (Slika 4.39). Kao što je i očekivano, formulacija F7 je pokazala veću brzinu oslobađanja lekovite supstance u odnosu na formulaciju F11, zbog toga što formulacija F7 nije podvrgnuta „pranju“, pa se neinkapsulirana količina salbutamol-sulfata koja je ostala na površini lipidnih mikročestica prva rastvorila. Slično ovome, salbutamol-sulfat se iz formulacije F10 (koja nije podvrgnuta „pranju“) rastvorio brže nego iz formulacije F11 (podvrgnuta „pranju“). Međutim, brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz formulacije F9 (podvrgnuta „pranju“) je bila samo neznatno veća u odnosu na brzinu rastvaranja iz formulacije F10 (nije podvrgnuta „pranju“). Najveća brzina rastvaranja salbutamol-sulfata je generalno uočena u slučaju formulacije F9, što je verovatno posledica kombinovanih efekata dodatka trehaloze (koja može povećati sposobnost praškova da se redispersuju u tečnostima, kao što je objašnjeno u studiji koju su objavili Freitas i Muller (1998)) i manje veličine mikročestica ove formulacije. S obzirom na to da je veličina mikročestica formulacije F10 ( $d_{v50} = 5,14$ ) veća u odnosu na F9 ( $d_{v50} = 4,01$ ), pretpostavlja se da je veličina mikročestica imala dominantan efekat na brzinu rastvaranja salbutamol-sulfata u slučaju formulacije F9. Formulacija F1 pokazala je najsporije oslobađanje salbutamol-sulfata, verovatno usled najmanjeg udela surfaktanta poloksamera 188, koji ulazi u sastav ove formulacije (0,40%, u odnosu na 1,50% u slučaju ostale četiri formulacije). Stoga se može zaključiti da je modifikovano oslobađanje salbutamol-sulfata iz ispitivanih praškova čvrstih lipidnih mikročestica rezultat kompleksnog uticaja brojnih faktora, kao i njihovih međusobnih interakcija.





**Slika 4.39.** Profili *in vitro* brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz uzorka praška čiste lekovite supstance (SS), fizičke smeše (FS) salbutamol-sulfata i glicerildibehenata, kao i iz pet izabranih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica



**Slika 4.40.** Parametri koji opisuju brzinu rastvaranja salbutamol-sulfata iz uzorka praška čiste lekovite supstance (SS), fizičke smeše (FS) salbutamol-sulfata i glicerildibehenata, kao i iz pet izabranih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica; %DE<sub>15</sub>, %DE<sub>30</sub>, %DE<sub>120</sub> – efikasnost brzine rastvaranja (izražena u %) nakon 15, 30 i 120 min, redom

*In vitro* brzina rastvaranja salbutamol-sulfata iz svih pet ispitivanih formulacija je bila sporija u poređenju sa praškom čiste lekovite supstance i njenom fizičkom smešom sa glicerildibehenatom, čime je ispunjen i drugi glavni cilj razvoja praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica. Scalia i sar. (2013a) su приметili da tehnika izrade može uticati na brzinu rastvaranja salbutamol-sulfata iz čvrstih lipidnih mikročestica. Naime, čvrste lipidne mikročestice sa salbutamol-sulfatom izrađene od

glicerildibehenata, metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem smrzanjem, u studiji koju su objavili Scalia i sar. (2013a) nisu obezbedile modifikovano oslobađanje lekovite supstance, dok je modifikovano rastvaranje salbutamol-sulfata uspešno postignuto iz formulacija dobijenih metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem u ovoj studiji. Pri ovome je neophodno naglasiti da uslovi ispitivanja primenjeni u ovoj fazi rada i u studiji Scalia i sar. (2013a) nisu bili isti. Međutim, kao što je pokazano u prvoj fazi eksperimentalnog rada, u ovoj studiji postignuta je modifikovana brzina oslobađanja salbutamol-sulfata i iz uzoraka čvrstih lipidnih mikročestica glicerildibehenata dobijenih sušenjem smrzanjem u odnosu na prašak čiste lekovite supstance, što je suprotno od rezultata koje su dobili Scalia i sar. (2013a). Ovakve razlike su moguće usled drugačijih uslova ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance, ali i usled izvesnih razlika u sastavu ispitivanih formulacija, tako da nije moguće napraviti direktno poređenje između rezultata ove dve studije. Naime, u studiji koji su objavili Scalia i sar. (2013a) je za izradu praškova čvrstih lipidnih mikročestica korišćen surfaktant fosfatidilholin, dok je u ovom istraživanju korišćen poloksamer 188. Za razliku od studije koju su objavili Scalia i sar. (2013a), u ovoj studiji je pokazano da dominantan uticaj na brzinu rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica ima izbor lipidne komponente, a onda i udeo surfaktanta, prisustvo trehaloze i veličina čvrstih lipidnih mikročestica.

Parametri koji opisuju kinetiku oslobađanja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica prikazani su u Tabeli 4.14. Najveća vrednost koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) uočena je za *Peppas-Sahlin* model u slučaju formulacija F1, F9 i F10, i model kinetike I reda u slučaju formulacija F7 i F11 ( $R^2 > 0,99$ ), mada su i druga dva modela pokazala visoke  $R^2$  vrednosti (Tabela 4.14). Na osnovu modela kinetike I reda može se zaključiti da je mehanizam oslobađanja salbutamol-sulfata iz čvrstih lipidnih mikročestica kontrolisan brzinom rastvaranja lekovite supstance, dok su, dodatno, rezultati *Korsmeyer-Peppas* i *Peppas-Sahlin* modela pokazali da mehanizam oslobađanja lekovite supstance uključuje kombinaciju difuzije i erozije. Vrednosti *Korsmeyer-Peppas* eksponenta  $n$  bile su u opsegu između 0,43 i 1 (opseg za sferne čestice, Tabela 3.6), što ukazuje na to da mehanizam oslobađanja salbutamol-sulfata iz čvrstih lipidnih mikročestica odgovara anomalnom transportu, koji predstavlja kombinaciju difuzije i erozije (Ritger i Peppas, 1987). Ovo je potvrđeno i pomoću *Peppas-Sahlin* modela, gde konstante  $k_1$  i  $k_2$  pokazuju da brzina difuzije opada (negativne vrednosti  $k_1$ ) dok brzina erozije raste (pozitivne vrednosti  $k_2$ ) tokom vremena. Pored difuzije, koja je očekivani i najčešći mehanizam oslobađanja lekovite supstance iz čvrstih lipidnih mikročestica, moguće je da dođe i do erozije lipidnog matriksa, pogotovo u ovom slučaju, usled prisustva surfaktanta poloksamera 188 u formulacijama, kao i usled velike poroznosti čvrstih lipidnih mikročestica. Slična zapažanja za mehanizme oslobađanja lekovite supstance iz lipidnih sistema prikazana su u literaturi (Bhoyar i sar., 2011; Rao i sar., 2014).

**Tabela 4.14.** Parametri koji opisuju kinetiku rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica, dobijeni primenom odgovarajućih matematičkih modela

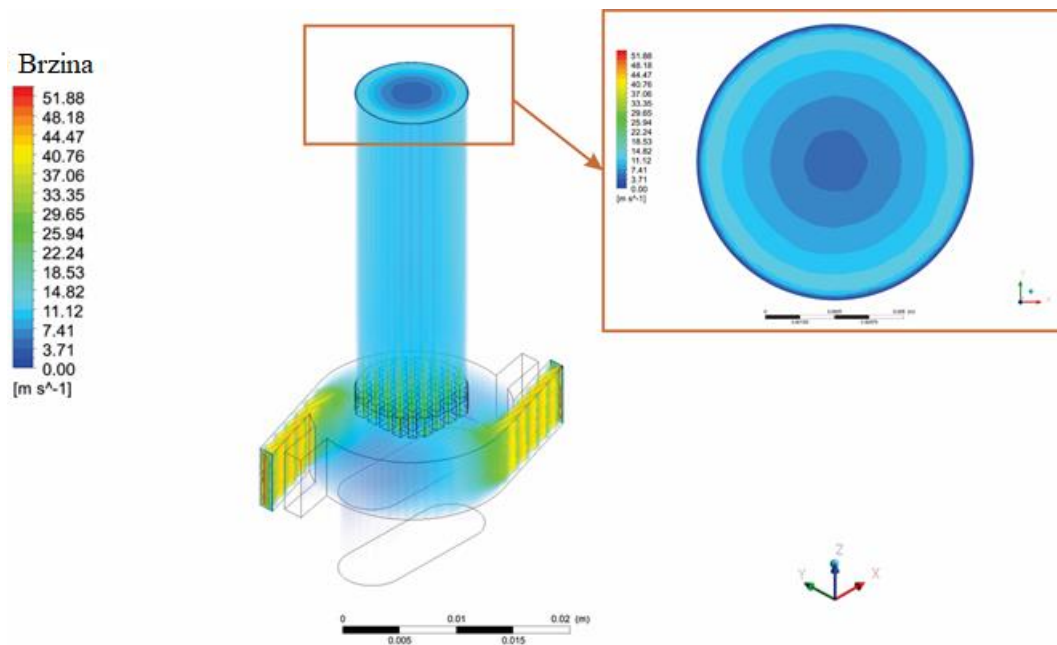
Model Formulacija	<i>Higuchi</i>		Kinetika I reda		<i>Korsmeyer-Peppas</i>			<i>Peppas-Sahlin</i>		
	$k_H$	$R^2$	$k_I$	$R^2$	$k_{kp}$	$n$	$R^2$	$k_1$	$k_2$	$R^2$
F1	5,518	0,9449	0,010	0,9945	2,249	0,726	0,9968	-7,429	7,299	0,9988
F7	8,341	0,9209	0,022	0,9964	3,460	0,771	0,9906	-8,818	9,740	0,9927
F9	9,013	0,9595	0,025	0,9894	5,463	0,655	0,9887	-35,731	34,971	0,9968
F10	7,753	0,9561	0,019	0,9817	4,466	0,657	0,9865	-30,787	29,121	0,9944
F11	6,375	0,9058	0,013	0,9944	2,085	0,796	0,9856	-15,953	12,914	0,9934

### 4.3. *In vitro/in silico* komparativna analiza aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica

#### 4.3.1. CFD-DPM simulacije

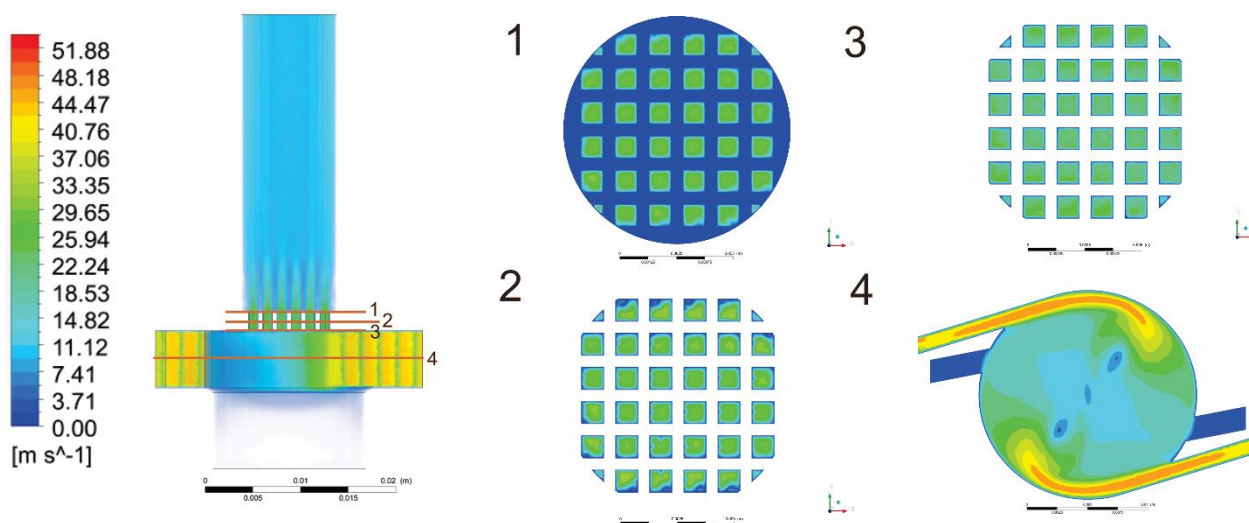
Računarsko modelovanje performansi RS01<sup>®</sup> inhalatora podrazumevalo je modelovanje protoka vazduha, raspršivanje praška za inhalaciju i depoziciju mikročestica u inhalatoru.

Rezultati CFD simuliranog protoka vazduha kroz inhalator, odnosno brzine vazduha u različitim delovima inhalatora prikazani su na Slici 4.41. Izlazni otvor dela za usta DPI uređaja predstavlja kritičan deo jer određuje stepen raspršivanja čestica i njihov izlazak iz inhalatora, koje zatim prelaze u usnu duplju i delove respiratornog trakta. U ovoj studiji je za simulacije primenjen protok vazduha od 60 L/min, jer je ovaj protok vazduha korišćen i u *in vitro* ispitivanjima u drugoj fazi eksperimentalnog rada. Usled toga se može uočiti da je na izlaznom otvoru RS01<sup>®</sup> inhalatora brzina vazduha oko 12 m/s, što odgovara protoku vazduha od 60 L/min.



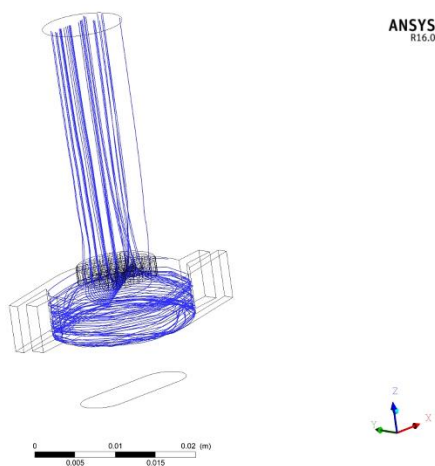
**Slika 4.41.** Distribucija brzine vazduha u RS01<sup>®</sup> inhalatoru (na uvećanom delu slike prikazana je distribucija brzine vazduha na izlaznom delu inhalatora) (preuzeto iz Ignjatović i sar., 2021)

Veće brzine vazduha uočene su u ulaznim otvorima za vazduh i u delu mrežice RS01<sup>®</sup> inhalatora. Poprečni preseki ovih delova inhalatora sa raspodelom brzine vazduha prikazani su na Slici 4.42.



**Slika 4.42.** Distribucija brzine vazduha na poprečnim presecima RS01<sup>®</sup> inhalatora: 1 i 2 - delovi iznad mrežice, 3 - mrežica, 4 - centralna komora za kapsulu sa ulaznim otvorima za vazduh

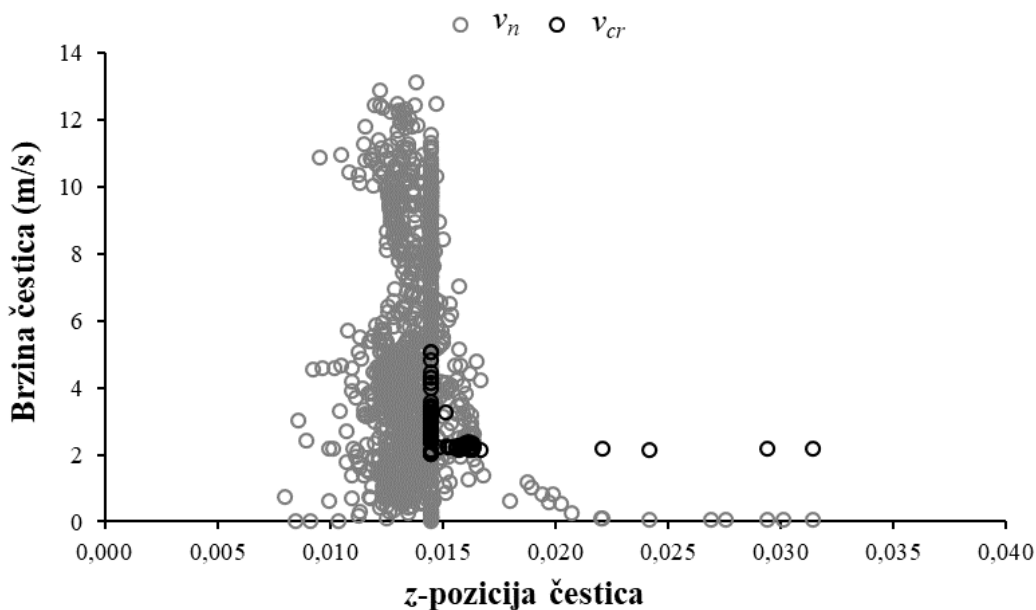
Nakon postizanja konstantnog protoka vazduha, čvrste lipidne mikročestice su uključene u model i praćeno je njihovo kretanje pomoću prethodno definisanih UDF. Simulacije su sprovedene za pet formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, dobijenih u drugoj fazi eksperimentalnog rada: F1, F7, F9, F10 i F12 (Tabela 3.5), koje su se izdvojile kao optimalne formulacije za dalje istraživanje i razvoj. Rezultati simulacije kretanja čvrstih lipidnih mikročestica formulacije F1 i njihove putanje (trajektorije) u RS01<sup>®</sup> inhalatoru prikazani su na Slici 4.43.



**Slika 4.43.** Putanje (trajektorije) kretanja čvrstih lipidnih mikročestica formulacije F1 u RS01<sup>®</sup> inhalatoru (preuzeto iz Ignjatović i sar., 2021)

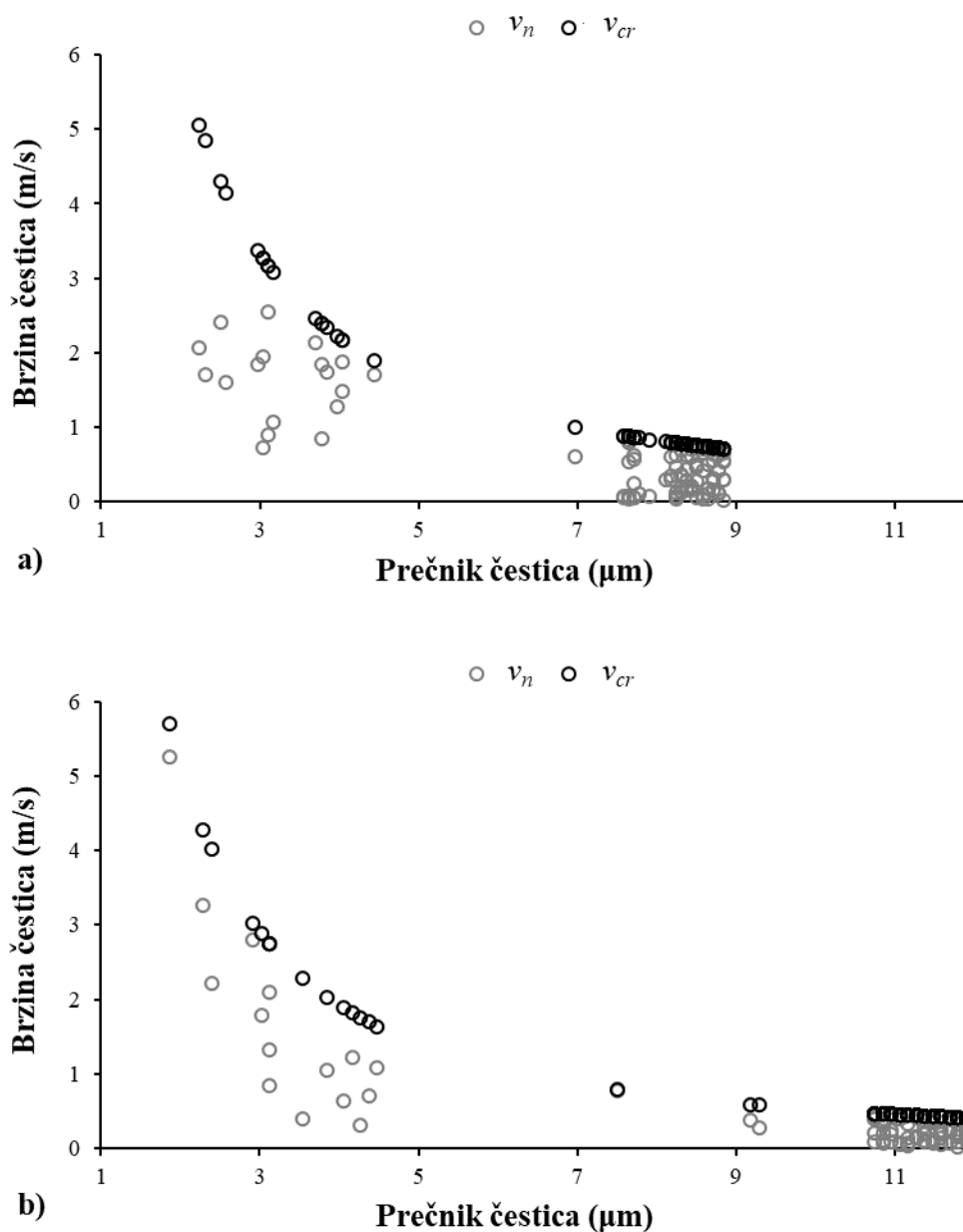
Analiziranjem odnosa brzine udara ( $v_n$ ) i kritične brzine lepljenja čvrstih lipidnih mikročestica ( $v_{cr}$ ) sa  $z$ -pozicijom ( $z$ -pozicija predstavlja mesto na kome se mikročestica deponovala u inhalatoru) mikročestica koje su udarile u zid inhalatora (pa se potom odbile ili zalepile) utvrđeno je da je većina mikročestica udarila u donji deo inhalatora (komora za kapsulu) jer je vrednost  $z$  bila manja od 0,0145, odnosno u deo mrežice jer je  $z$ -vrednost bila na graničnoj vrednosti od 0,0145, a manja od 0,0165. Pri tome, samo mali deo mikročestica je udario u zid inhalatora u delu za usta ( $0,0165 < z < 0,0475$ ). Ovo je

prikazano na Slici 4.44, na primeru formulacije F1, a sličan trend je uočen i za ostale formulacije. Za čestice koje nisu udarile u neki od delova inhalatora se podrazumevalo da su samo izašle iz inhalatora, i predstavljale su deo EF praškova za inhalaciju.



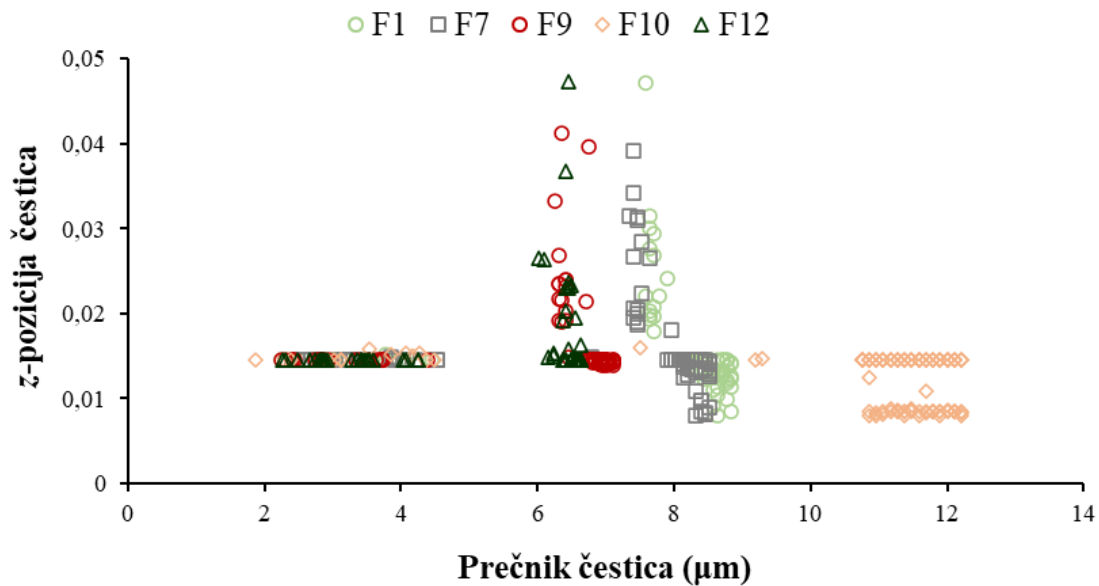
**Slika 4.44.** Normalne brzine udara ( $v_n$ ) i kritične brzine lepljenja ( $v_{cr}$ ) čvrstih lipidnih mikročestica formulacije F1 u zavisnosti od z-pozicije čestica

Deo čvrstih lipidnih mikročestica, koji je udario u zid inhalatora, se i zalepio za zid, dok se deo prilikom kontakta sa zidom odbio od njega. Kao što je već objašnjeno u eksperimentalnom delu (poglavlje 3.2.3.2.), čvrste lipidne mikročestice koje su imale normalnu brzinu udara veću od kritične brzine lepljenja čestica ( $v_n > v_{cr}$ ) su se odbile prilikom kontakta sa površinom zida inhalatora. Odnosno, ovo znači da je do lepljenja čvrstih lipidnih mikročestica za zid inhalatora došlo ukoliko je  $v_n < v_{cr}$ . Na Slici 4.45 prikazane su normalne i kritične brzine lepljenja čvrstih lipidnih mikročestica različitih prečnika (formulacija F1) koje su u nekom trenutku bile zalepljene za zid inhalatora. Može se primetiti da je za čvrste lipidne mikročestice prečnika od 2 do 5  $\mu\text{m}$ , razlika između  $v_n$  i  $v_{cr}$  bila veća nego za čvrste lipidne mikročestice prečnika od 7 do 9  $\mu\text{m}$  (što se vidi na primeru formulacije F1), kao i za one veće od 9  $\mu\text{m}$  (što se uočava jedino kod formulacije F10). Ovakvi podaci ukazuju na to da je mehanizam lepljenja čestica dominantan u slučaju manjih čestica, dok se ponašanje krupnijih čestica može opisati kompleksnijim mehanizmima, s obzirom na to da može doći do „loma“ krupnijih čestica (podela jedne čestice na više delova), koji u ovoj studiji nije ispitan.



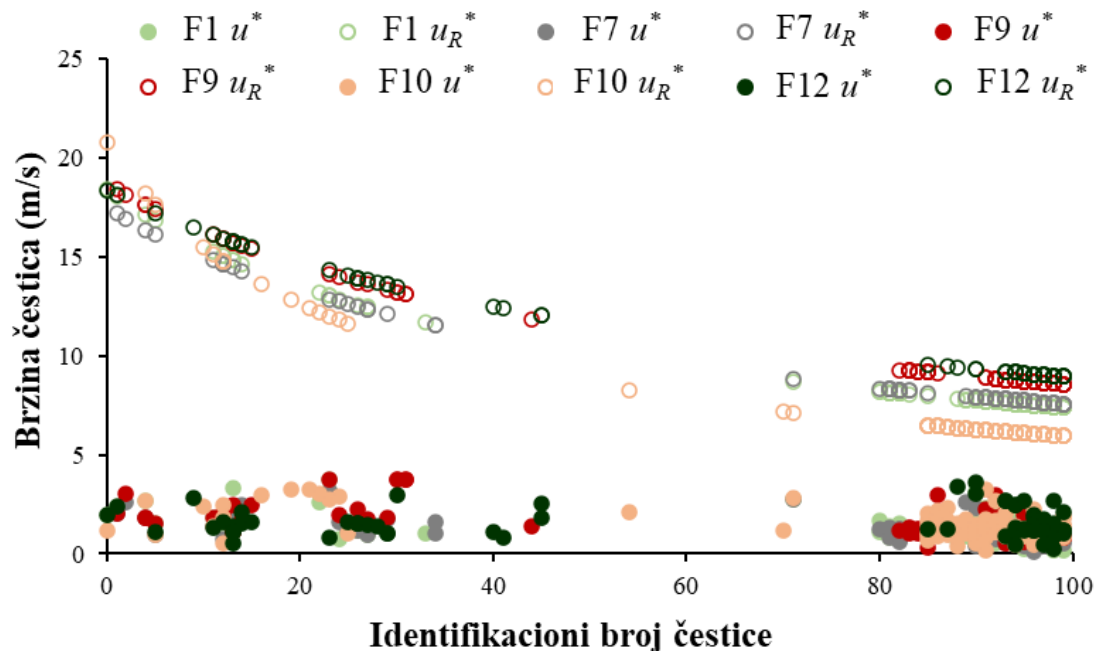
**Slika 4.45.** Normalne brzine udara ( $v_n$ ) i kritične brzine lepljenja ( $v_{cr}$ ) čvrstih lipidnih mikročestica formulacija F1 (a) i F10 (b) u zavisnosti od prečnika čestica

Analiziranjem odnosa između prečnika čvrstih lipidnih mikročestica koje su u nekom trenutku bile zalepljene i  $z$ -pozicije čestica utvrđeno je da će se sitnije mikročestice prečnika 2-5  $\mu\text{m}$  najverovatnije „lepit“ samo u donjim delovima inhalatora (komora za kapsulu i mrežica) (Slika 4.46), dok će se mikročestice prečnika 6-10  $\mu\text{m}$  lepit, kako u donjim, tako i u gornjim delovima inhalatora (deo za usta). Najkrupnije čvrste lipidne mikročestice prečnika 10-13  $\mu\text{m}$  (formulacija F10) će se, kao i sitnije mikročestice, lepit verovatno samo u donjim delovima inhalatora.



**Slika 4.46.** Veza između  $z$ -pozicije i prečnika čvrstih lipidnih mikročestica formulacija F1, F7, F9, F10 i F12

Iako je inicijalno pretpostavljeno da se odvajanje zalepljenih čvrstih lipidnih mikročestica od zida može odvijati mehanizmima klizanja ili kotrljanja, rezultati CFD-DPM simulacija pokazali su da se zalepljene čestice u slučaju svih pet ispitivanih formulacija nisu odvojile ovim mehanizmima od zida inhalatora. Ovo je prikazano na Slici 4.47, na kojoj se uočava da je u slučaju svih zalepljenih mikročestica  $u^*$  bilo manje od  $u_R^*$ , pa uslov da se čestica odvoji od zida mehanizmom kotrljanja (da je  $u \geq u_R^*$ ) nije bio ispunjen. Isti zaključak dobijen je i za mehanizam odvajanja klizanjem jer su sve čvrste lipidne mikročestice pokazale manju vrednost  $u^*$  u odnosu na  $u_S^*$ , odnosno nije bio ispunjen uslov da je  $u \geq u_S^*$ .

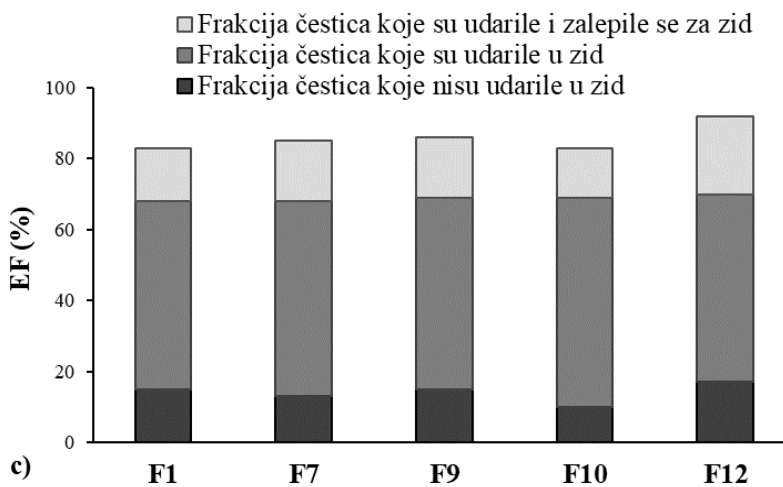
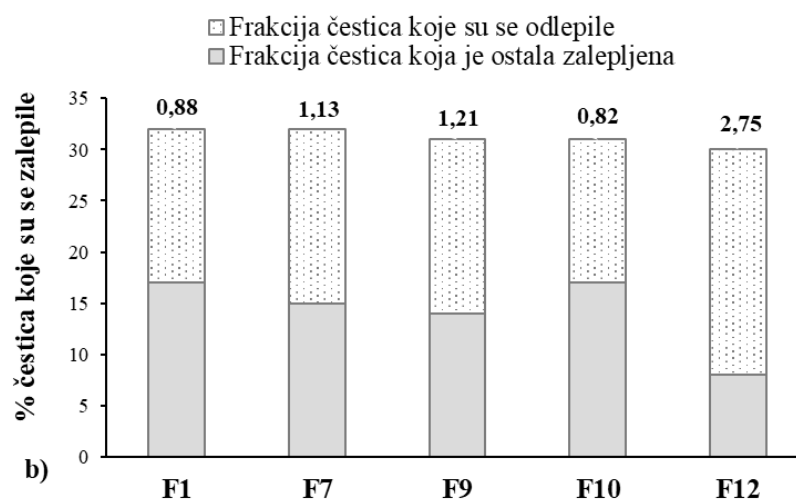
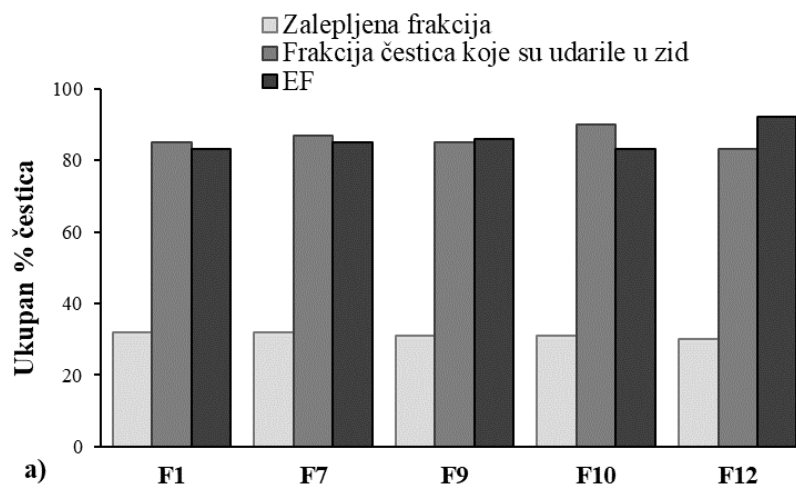


**Slika 4.47.** Brzina smicanja ( $u^*$ ) i kritična brzina smicanja za kotrljanje ( $u_R^*$ ) u zavisnosti od identifikacionog broja čvrstih lipidnih mikročestica

S obzirom na to da nisu bili prisutni mehanizmi odvajanja zalepljenih čestica klizanjem i kotrljanjem, na osnovu izlaznih rezultata CFD-DPM simulacija, mogao se utvrditi broj čvrstih lipidnih mikročestica koje su udarile u zid inhalatora, broj čvrstih lipidnih mikročestica koje su udarile u zid inhalatora i ostale zalepljene, ukupan broj zalepljenih čvrstih lipidnih mikročestica, broj zalepljenih čvrstih lipidnih mikročestica koji se odlepio i broj mikročestica koji je ostao trajno zalepljen za zid inhalatora. Na osnovu ovih izlaznih podataka, bilo je moguće izračunati broj čvrstih lipidnih mikročestica koji je napustio inhalator, što je značajno jer u stvari predstavlja EF praška za inhalaciju, odnosno prvu aerodinamičku karakteristiku koju je bilo moguće utvrditi ovom *in silico* metodom.

Na Slici 4.48 prikazane su CFD-DPM predviđene frakcije čvrstih lipidnih mikročestica koje su udarile o površinu zida inhalatora, frakcije čestica koje su se lepile za zid inhalatora i onih koje su napustile inhalator (odnosno emitovane frakcije, EF). Uzevši u obzir svih pet ispitivanih formulacija, CFD-DPM simulacijama utvrđeno je da je između 83% i 90% čestica u nekom trenutku udarilo u zid inhalatora (Slika 4.48a). Neke od ovih čestica su se zalepile za zid inhalatora, od kojih je samo deo napustio inhalator. Tačnije, oko 30% čestica svake formulacije bilo je zalepljeno za zid inhalatora u nekom trenutku, ali se različit procenat ovih čestica, u zavisnosti od ispitivane formulacije, odlepio od zida (Slika 4.48b) i napustio inhalator. Ovo je posledično dovelo do razlika u EF između različitih formulacija s obzirom na to da čestice koje su ostale zalepljene za zid inhalatora nisu mogle da ga napuste. Stoga su predviđene EF vrednosti za pet formulacija varirale između 83% i 92% (Slike 4.48a i 4.48c). Simulacije su predvidele najveću EF vrednost u slučaju formulacije F12 (EF = 92%), koja je ujedno imala i najmanji procenat čestica koje su udarile u zid inhalatora (83%; Slika 4.48a), kao i najveći odnos između procenta ukupnih čestica koje su se odvojile od zida i procenta ukupnih čestica koje su ostale zalepljene za zid inhalatora (Slika 4.48b). Utvrđeno je i da su se krupnije čestice više lepile za zid inhalatora i ostajale „trajno“ zalepljene, dok su se sitnije čestice, koje su u nekom trenutku bile zalepljene za zid inhalatora, lakše odlepile i nakon toga napustile inhalator. Na primer, u slučaju formulacije F12, koja je imala najmanji geometrijski prečnik i najužu raspodelu veličine mikročestica (Tabela 4.8), utvrđeno je da postoji najmanja verovatnoća da dođe do „trajnog“ lepljenja čestica za zid inhalatora, jer je većina čestica nakon udarca o zid inhalatora nastavila putanju i izašla iz inhalatora (Slika 4.48c).



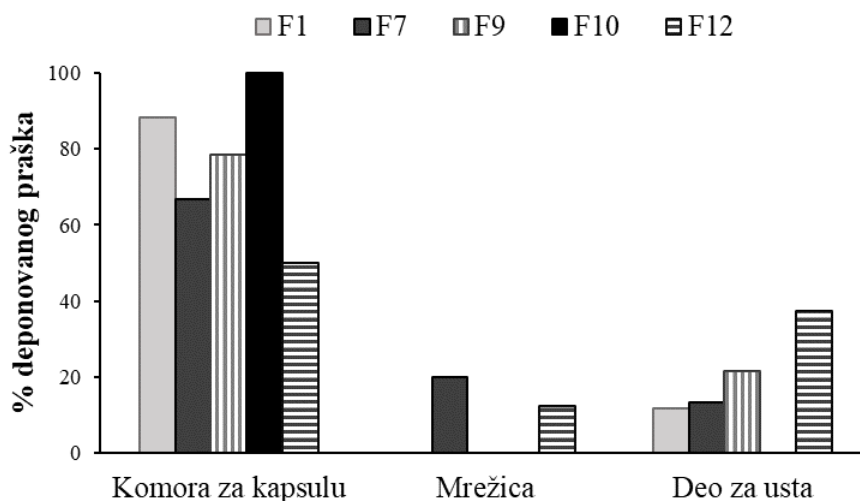


**Slika 4.48.** Ukupna frakcija čestica koje su se zalepile za zid, udarile u zid i izašle iz inhalatora (EF) (a); ukupna frakcija čestica koje su ostale zalepljene ili su se odlepile sa zida inhalatora (brojevi iznad barova na grafiku predstavljaju odnos između ukupnog procenta čestica koje su se odlepile i procenta ukupnog broja čestica koje su ostale zalepljene za zid inhalatora (b); frakcija emitovanih čestica (EF) koje su prethodno udarile u zid, udarile i zalepile se za zid ili koje nisu uopšte udarile u zid inhalatora (c)

### 4.3.2. Komparativna analiza rezultata ispitivanja aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju dobijenih primenom različitih metoda

CFD-DPM simulacijama je, kao što je predstavljeno u prethodnom poglavlju, predviđen procenat čvrstih lipidnih mikročestica praška koje ostaju deponovane u inhalatoru, na osnovu čega su izračunate vrednosti EF ispitivanih formulacija praškova za inhalaciju. Zatim je, na osnovu CFD-DPM generisanih podataka o broju, prečniku i masi čvrstih lipidnih mikročestica koje su napustile inhalator bilo moguće izračunati FPF, MMAD i GSD vrednosti, metodom objašnjenom u poglavlju 3.2.3.3. Kako bi se procenila sposobnost predviđanja *in silico* CFD-DPM simulacija, predviđeni rezultati su upoređeni sa *in vitro* rezultatima dobijenim pomoću tri različite metode, FSI, TSI i NGI.

Pored toga što mogu da predvide ukupan procenat deponovanog praška u inhalatoru, CFD-DPM simulacije mogu da pokažu poziciju svake čestice koja je ostala u inhalatoru, odnosno ukažu u kom delu inhalatora (komora za kapsulu, mrežica ili deo za usta) se svaka od čestica deponovala, što je teško precizno odrediti pomoću dostupnih *in vitro* metoda. Na Slici 4.49 prikazana je raspodela čvrstih lipidnih mikročestica ispitivanih praškova za inhalaciju, deponovanih u različitim delovima inhalatora. Može se uočiti da je, u slučaju svih pet formulacija, najveći deo praška za inhalaciju deponovan u komori RS01<sup>®</sup> inhalatora. Međutim, za veliki deo čvrstih lipidnih mikročestica, koji je prikazan kao deponovan u komori inhalatora, je u stvari predviđeno da se deponovao na granici između mrežice i komore inhalatora, odnosno u jednom od ta dva dela. Najveći procenat čvrstih lipidnih mikročestica koje su deponovane na granici ova dva dela predviđen je u slučaju formulacije F10 (oko 59%). CFD-DPM simulacije su pokazale da manje čvrste lipidne mikročestice, kao i mikročestice najvećeg prečnika, imaju tendenciju da se deponuju u komori inhalatora ili između komore i mrežice inhalatora, dok je za čvrste lipidne mikročestice prečnika od 6 µm do 10 µm uočeno da se mogu deponovati i u delu za usta. Takođe, sa Slike 4.49 može se uočiti da se čvrste lipidne mikročestice formulacije F10, koje su imale najveći prečnik u poređenju sa preostale četiri ispitivane formulacije, uopšte nisu deponovale u delu za usta, dok je u slučaju formulacije F12, znatan deo čvrstih lipidnih mikročestica bio deponovan u delu za usta. Ovakav trend je u skladu sa onim prikazanim na Slici 4.46, što je i očekivano jer deponovane čvrste lipidne mikročestice u stvari predstavljaju frakciju mikročestica koja se zalepila i ostala zalepljena za zid inhalatora. Rezultati CFD-DPM simulacija, koji su ukazali da je najveći deo čvrstih lipidnih mikročestica svih ispitivanih formulacija praškova za inhalaciju bio deponovan u komori RS01<sup>®</sup> inhalatora, su u skladu sa zapažanjima prilikom *in vitro* ispitivanja (Slika 4.50).

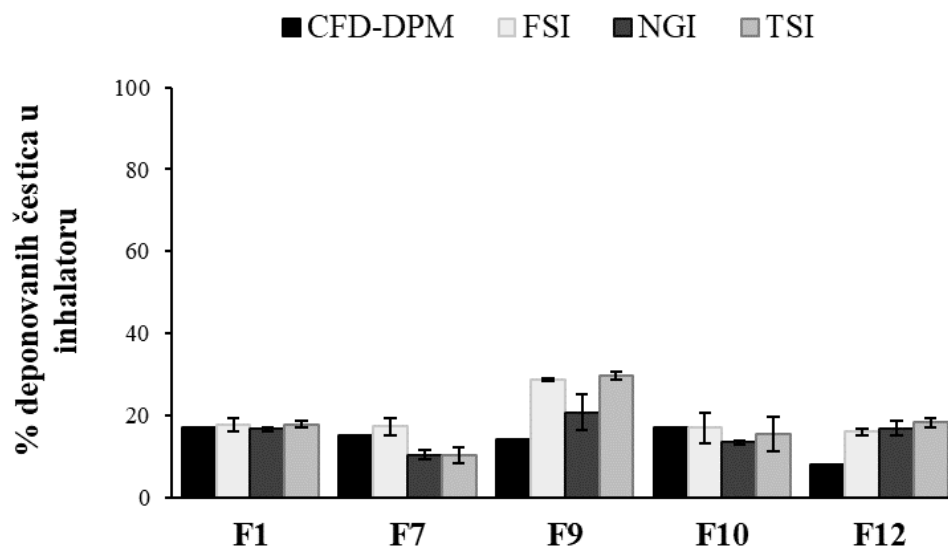


**Slika 4.49.** CFD-DPM predviđena regionalna depozicija čvrstih lipidnih mikročestica u RS01<sup>®</sup> inhalatoru



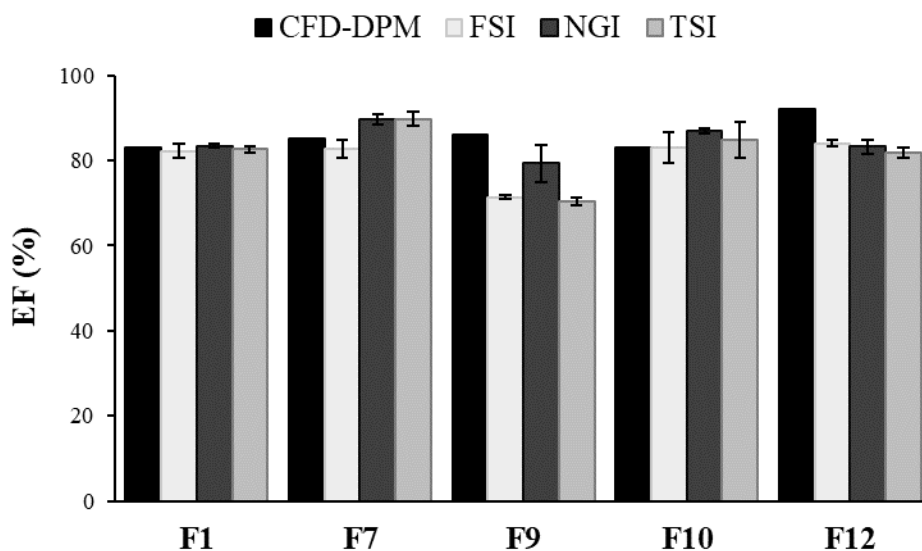
**Slika 4.50.** Depozicija čvrstih lipidnih mikročestica formulacije F12 u RS01<sup>®</sup> inhalatoru nakon sprovedene TSI analize

Na Slici 4.51 prikazan je i ukupni procenat deponovanih čestica praškova za inhalaciju u RS01<sup>®</sup> inhalatoru, predviđen pomoću CFD-DPM simulacija. Ove CFD-DPM predviđene frakcije deponovanog praška u inhalatoru upoređene su sa rezultatima dobijenim pomoću tri različite *in vitro* metode. Može se uočiti da su CFD-DPM predviđene deponovane frakcije čvrstih lipidnih mikročestica u slučaju formulacija F1, F7 i F10 slične deponovanim frakcijama praška čvrstih lipidnih mikročestica dobijenim primenom FSI metode. Najveća razlika između CFD-DPM i *in vitro* rezultata (dobijenih pomoću sve tri metode) uočena je u slučaju formulacije F9. Niža vrednost CFD-DPM predviđene frakcije deponovanih čvrstih lipidnih mikročestica formulacije F9 u odnosu na *in vitro* uočene vrednosti je verovatno uzrokovana nemogućnošću CFD-DPM modela da simulira formiranje aglomerata čvrstih lipidnih mikročestica sa trehalozom, njihovo ponašanje i depoziciju u inhalatoru. Iako se i u sastavu formulacije F10 nalazi trehaloza, čestice u formulaciji F9 su sitnije, te podložnije stvaranju aglomerata, pa se zbog toga nemogućnost CFD-DPM modela da simulira aglomerate najviše odrazila na predviđene rezultate za formulaciju F9.



**Slika 4.51.** *In vitro* određene ( $SV \pm SD$ ) i CFD-DPM predviđene frakcije deponovanih lipidnih mikročestica za odabrane formulacije u RS01<sup>®</sup> inhalatoru

Na osnovu CFD-DPM predviđenih frakcija deponovanih čvrstih lipidnih mikročestica u RS01® inhalatoru (Slika 4.51), izračunat je procenat čestica koje su napustile inhalator, odnosno vrednosti EF (%) ispitivanih praškova za inhalaciju. Uporedni prikaz EF vrednosti dobijenih pomoću CFD-DPM metode i tri različite *in vitro* metode dat je na Slici 4.52.



**Slika 4.52.** Rezultati *in vitro* određenih ( $SV \pm SD$ ) i CFD-DPM predviđenih EF (%) vrednosti odabranih formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica

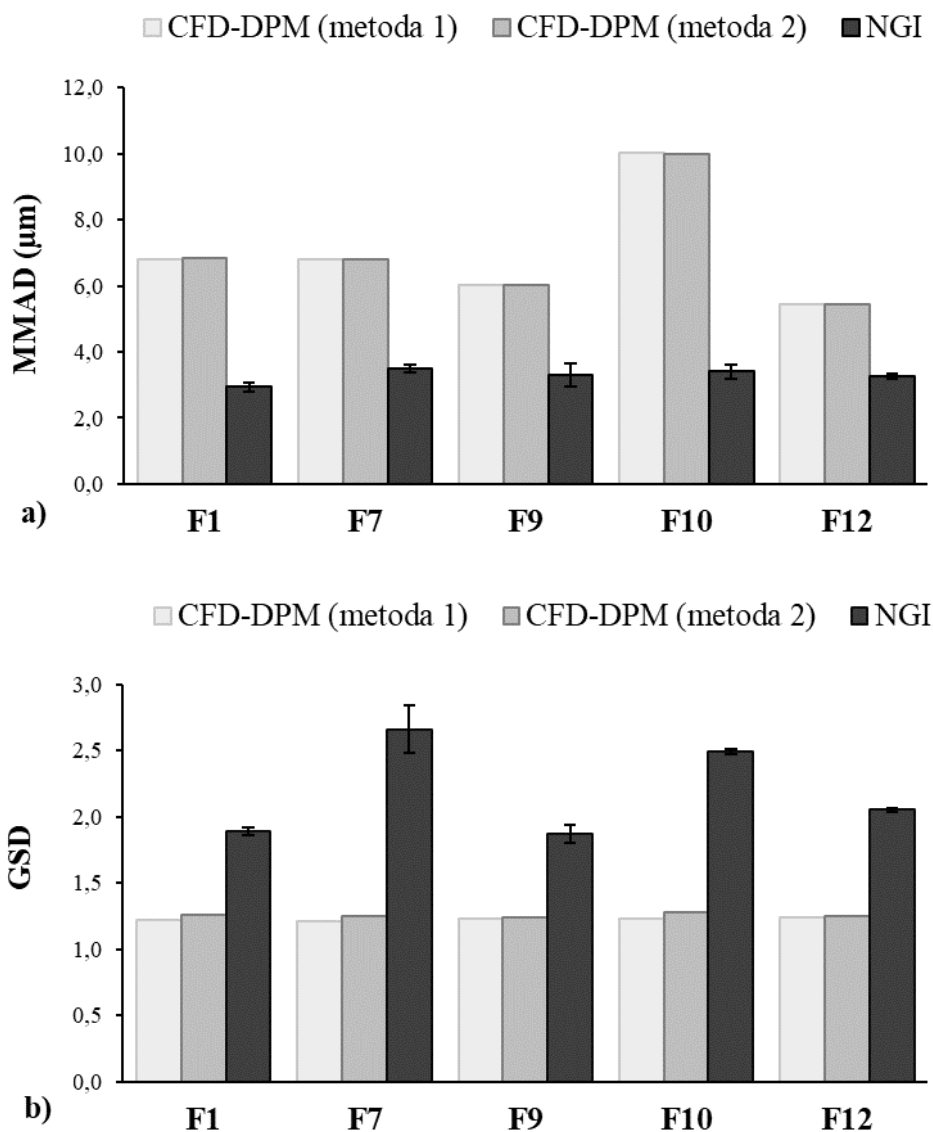
Može se uočiti da su CFD-DPM predviđene EF vrednosti uporedive sa vrednostima EF dobijenih primenom tri različite *in vitro* metode. Tačnije, CFD-DPM predviđene EF vrednosti za tri formulacije (F1, F7 i F10) su bile slične sa *in vitro* određenim vrednostima, dok su veće razlike između *in vitro* i *in silico* predviđenih EF vrednosti uočene kod formulacije F12 i naročito u slučaju formulacije F9. Najveće vrednosti EF u slučaju formulacija F9 i F12 predviđene CFD-DPM simulacijama su verovatno posledica toga što je kao ulazni parametar za simulacije korišćena geometrijska raspodela veličine čvrstih lipidnih mikročestica, koja je u slučaju ove dve formulacije bila najmanja, odnosno ove dve formulacije su pokazale manju veličinu čvrstih lipidnih mikročestica u poređenju sa ostale tri (Tabela 4.8). Naime, kao što je već objašnjeno, CFD-DPM simulacijama je predviđeno da su sitnije čvrste lipidne mikročestice pokazale manju tendenciju da se trajno zalepe za zid inhalatora i ostanu zalepljene, što znači da su lakše napustile inhalator. Sa druge strane, najmanje EF vrednosti dobijene su u slučaju formulacije F9 pomoću sve tri *in vitro* metode, verovatno kao posledica nastanka aglomerata čvrstih lipidnih mikročestica usled prisustva trehaloze u ovoj formulaciji. Međutim, fenomen nastanka aglomerata i njihovo ponašanje nisu mogli biti simulirani pomoću izgrađenog CFD-DPM modela, koji bi morao biti unapređen kako bi potencijalno mogao da simulira pomenute fenomene. Usled ovako velike razlike između *in vitro* i *in silico* rezultata za formulacije F9 i F12, nije bilo moguće uspostaviti korelaciju između rezultata dobijenih pomoću CFD-DPM metode i tri *in vitro* metode (Tabela 4.15). Sa druge strane, bilo je moguće uspostaviti korelaciju (relativno visok koeficijent determinacije,  $R^2 = 0,8969$ ) između rezultata za EF dobijenih pomoću NGI i TSI metode, dok je koeficijent determinacije između NGI i FSI rezultata bio znatno niži ( $R^2 = 0,5064$ ), što je prikazano u Tabeli 4.15. Pored toga, određeni nivo korelacije uočen je i između rezultata dobijenih TSI i FSI metodom, sa koeficijentom determinacije  $R^2 = 0,7686$ , uključujući i najmanje vrednosti RMSE (3,380) i NRMSE grešaka (0,041). Ovi rezultati ukazuju na to da bi se obe jednostavnije *in vitro* metode (FSI i TSI) mogle koristiti za određivanje EF praškova za inhalaciju u fazi skrininga prilikom razvoja novih formulacija praškova za inhalaciju, ali da su rezultati dobijeni primenom TSI metode bili u boljoj korelaciji sa rezultatima dobijenim u NGI uređaju.

**Tabela 4.15.** Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ), koren srednje kvadratne greške (RMSE) i normalizovana vrednost RMSE (NRMSE) za rezultate EF (%) dobijene primenom četiri različite metode

	NGI**			TSI**			FSI**		
	$R^2$	RMSE	NRMSE	$R^2$	RMSE	NRMSE	$R^2$	RMSE	NRMSE
CFD-DPM*	0,0847	5,643	0,067	0,0342	8,651	0,106	0,0055	7,531	0,093
FSI*	0,5064	5,041	0,060	0,7686	3,380	0,041	/	/	/
TSI*	0,8969	4,183	0,049	/	/	/	/	/	/

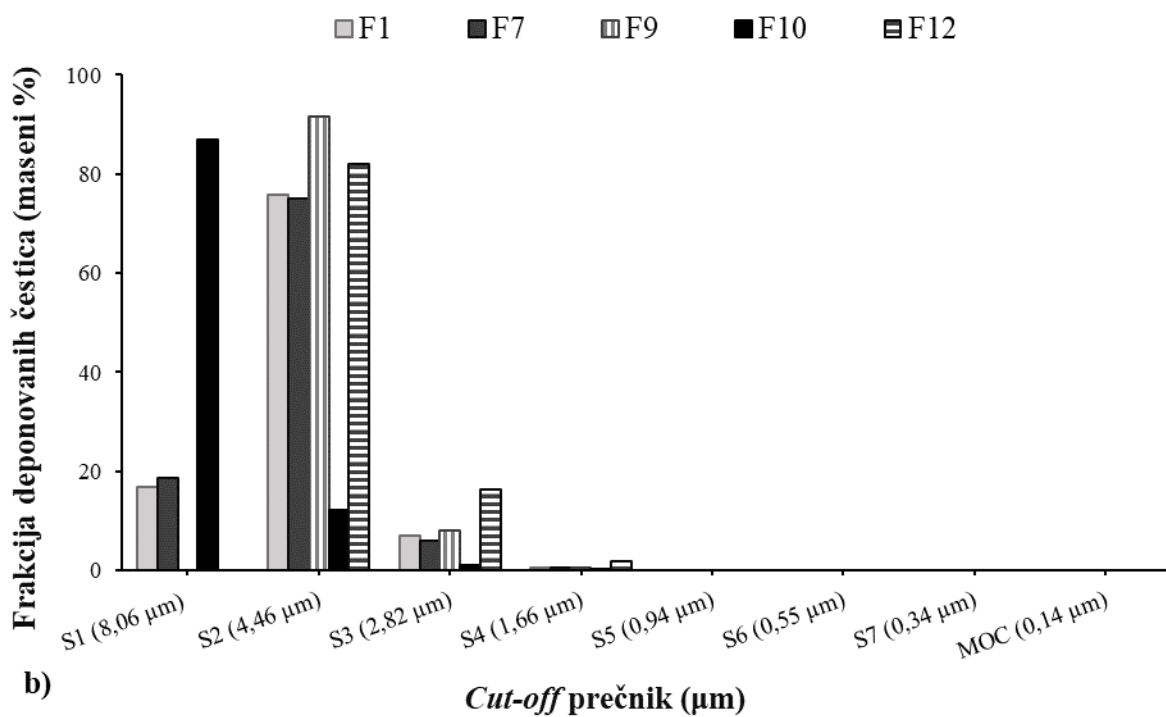
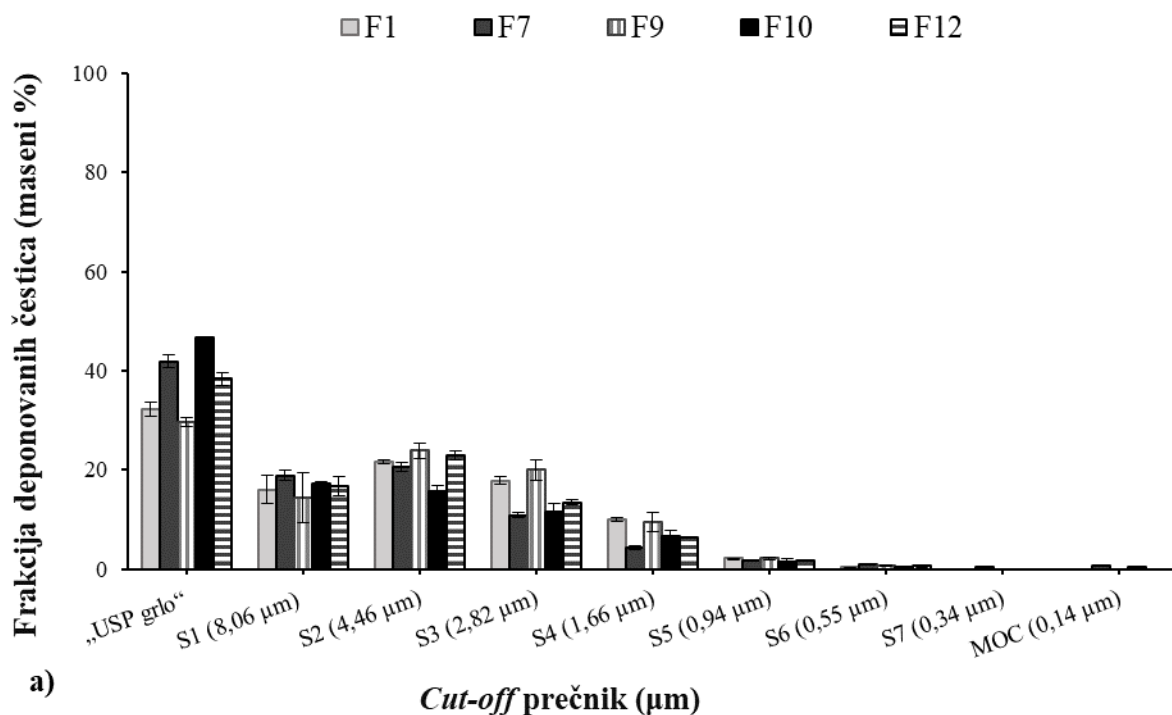
\*Označava metodu kojom su dobijene vrednosti korišćene kao previđene ili test vrednosti ( $P_i$ ) u jednačini 40; \*\*Označava metodu kojom su dobijene vrednosti korišćene kao uočene ili referentne vrednosti ( $O_i$ ) u jednačini 40

Pored EF, analizirana su još dva značajna parametra koja opisuju aerodinamičko ponašanje praškova za inhalaciju, MMAD i GSD. Od tri primenjene *in vitro* metode, samo su NGI rezultati mogli da se koriste za izračunavanje MMAD i GSD, stoga je rezultate CFD-DPM simulacija bilo moguće uporediti samo sa rezultatima NGI analize (Slika 4.53). Izlazni podaci CFD-DPM simulacija o broju, prečniku i masi čvrstih lipidnih mikročestica koje su napustile inhalator su obrađeni pomoću dve metode da bi se dobile MMAD i GSD vrednosti (poglavlje 3.2.3.3). Međutim, u slučaju CFD-DPM predviđenih MMAD vrednosti nisu uočene razlike između metode 1 i metode 2 (Slika 4.53a), dok su u slučaju GSD vrednosti te razlike bile minimalne (Slika 4.53b). Sa druge strane, može se uočiti da su CFD-DPM predviđene MMAD vrednosti bile skoro duplo veće od odgovarajućih vrednosti dobijenih pomoću NGI metode. Pored toga, CFD-DPM predviđene vrednosti su ukazale na veće razlike u MMAD vrednostima između različitih formulacija u poređenju sa *in vitro* rezultatima, koji su pokazali približne MMAD vrednosti za sve ispitivane formulacije. Na osnovu rezultata CFD-DPM simulacija, uočava se da je najveća MMAD vrednost dobijena u slučaju formulacije F10, što je bilo očekivano, s obzirom na to da je CFD-DPM predviđena vrednost aerodinamičkog prečnika dobijena na osnovu stvarne gustine i geometrijskog prečnika mikročestica ove formulacije, a vrednosti oba parametra su bile najveće u slučaju formulacije F10. Nažalost, drugi fenomeni, kao što je uticaj trehaloze na aerodinamičko ponašanje praškova za inhalaciju, nije mogao biti simuliran primenjenim CFD-DPM modelom. Ovo je još jedan od nedostataka ove *in silico* metode i dodatni razlog zbog čega je predviđena MMAD vrednost formulacije F10 bila mnogo veća u odnosu na ostale četiri formulacije. Pozitivan uticaj trehaloze na aerodinamičko ponašanje praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica utvrđen je *in vitro* metodama, kao što je već objašnjeno u drugoj fazi eksperimentalnog rada.



**Slika 4.53.** *In vitro* (NGI) određene ( $SV \pm SD$ ) i CFD-DPM predviđene MMAD (a) i GSD vrednosti (b) odabranih formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica

Suprotno od rezultata simulacija za MMAD, CFD-DPM predviđene GSD vrednosti bile su skoro iste za svih pet formulacija, i bile su niže u poređenju sa vrednostima dobijenih primenom NGI uređaja. Ovakvi rezultati se mogu objasniti razlikama između CFD-DPM i NGI procenjene aerodinamičke raspodele veličine čestica (Slika 4.54). Kako bi se omogućilo direktno poređenje CFD-DPM i NGI rezultata za aerodinamičku raspodelu veličine čestica, *cut-off* vrednosti prečnika mikročestica (Slika 4.54b) podešene su tako da budu iste kao *cut-off* vrednosti različitih nivoa/faza u NGI uređaju (Slika 4.54a). Može se uočiti da su CFD-DPM rezultati pokazali užu aerodinamičku raspodelu veličine čestica u poređenju sa NGI rezultatima, pri čemu je najveći procenat čestica svih formulacija raspodeljen u samo dve ili tri grupe (Slika 4.54b). Ovakvi rezultati objašnjavaju niže CFD-DPM predviđene GSD vrednosti u poređenju sa vrednostima dobijenim NGI metodom (Slika 4.53b). Ovo je istovremeno i uzrok izostanka korelacije između MMAD i GSD rezultata dobijenih pomoću CFD-DPM i NGI metode (Tabela 4.16).

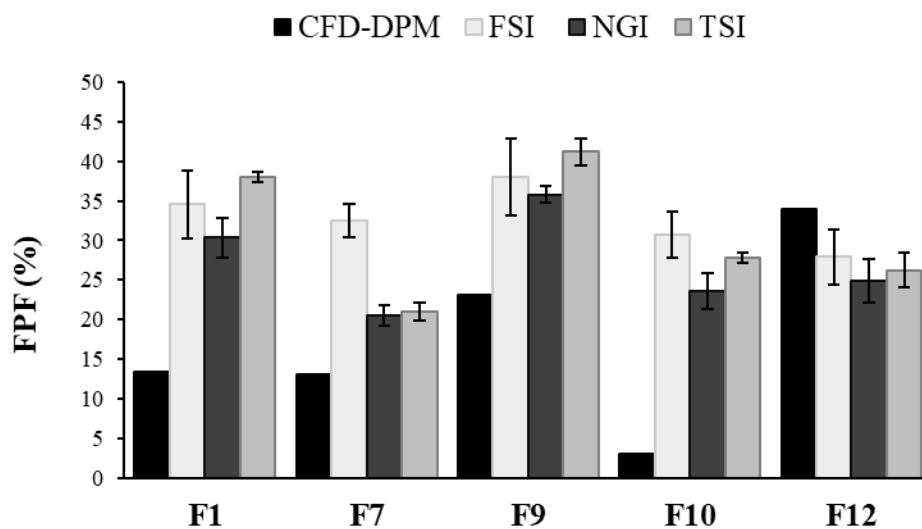


**Slika 4.54.** Frakciona aerodinamička raspodela veličine čvrstih lipidnih mikročestica: određena ispitivanjem praškova za inhalaciju u NGI uređaju (prikazane su deponovane frakcije čestica na različitim NGI nivoima/fazama) (a) i predviđena na osnovu CFD-DPM simulacija (b)

**Tabela 4.16.** Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ), koren srednje kvadratne greške (RMSE) i normalizovana vrednost RMSE (NRMSE) za rezultate MMAD i GSD, dobijene CDF-DPM simulacijama i NGI in vitro metodom

	$R^2$	RMSE	NRMSE
MMAD (metoda 1)	0,0643	4,044	1,232
MMAD (metoda 2)	0,0639	4,045	1,232
GSD (metoda 1)	0,2215	1,020	0,465
GSD (metoda 2)	0,1737	0,989	0,451

Poređenje rezultata *in vitro* i *in silico* ispitivanja obuhvatilo je i FPF, važan parametar koji opisuje aerodinamičko ponašanje praškova za inhalaciju, od koga direktno zavisi terapijski efekat inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci. CFD-DPM predviđene i *in vitro* određene FPF vrednosti odabranih formulacija praškova za inhalaciju prikazane su na Slici 4.55. Rezultati su pokazali da su CFD-DPM predviđene FPF vrednosti bile mnogo niže nego *in vitro* određene vrednosti za sve formulacije izuzev za formulaciju F12 (Slika 4.55). U studiji koju su objavili Tong i sar. (2011), primećeno je takođe da su CFD-DPM predviđene FPF vrednosti bile niže u poređenju sa eksperimentalno određenim vrednostima. Najveća razlika između *in vitro* određenih i CFD-DPM predviđenih rezultata za FPF je opet uočena za formulaciju F10. Ovakav ishod je očekivan s obzirom na to da je za formulaciju F10 simulacijama predviđena najveća MMAD vrednost, koja je dovela do najmanje FPF vrednosti. Stoga nije bilo moguće uspostaviti korelaciju između *in silico* i *in vitro* određenih FPF vrednosti za ispitivane formulacije praškova za inhalaciju (Tabela 4.17).



**Slika 4.55.** *In vitro* određene ( $SV \pm SD$ ) i CFD-DPM predviđene FPF (%) vrednosti odabranih formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica

Komparativna analiza rezultata dobijenih pomoću tri različite *in vitro* metode pokazala je da su TSI i FSI metodama dobijene veće FPF vrednosti u poređenju sa rezultatima dobijenim NGI metodom (Slika 4.55). Razlike između rezultata dobijenih TSI i NGI metodom su najverovatnije posledica toga što se određivanjem FPF u TSI uređaju podrazumeva da su respirabilne čestice one koje imaju prečnik manji od 6,4  $\mu\text{m}$ , dok *cut-off* aerodinamički prečnik za određivanje FPF vrednosti u NGI uređaju iznosi oko 5  $\mu\text{m}$  (pri protoku vazduha od 60 L/min). Veće FPF vrednosti dobijene TSI metodom u poređenju sa NGI metodom, usled razlika u *cut-off* vrednostima prečnika ova dva uređaja, uočene su i u studiji koju su sprovedli Omer i sar. (2019). Više FPF vrednosti, koje se mogu dobiti ispitivanjem formulacija u FSI



uređaju, u poređenju sa rezultatima određenim pomoću NGI uređaja su već prepoznate kao ograničenije FSI metode i opisane u literaturi (Russell-Graham i sar., 2010; Mitchell i Nichols, 2011). Međutim, neke studije su pokazale da ne postoji značajna razlika između rezultata dobijenih pomoću ove dve metode (npr. Nichols i sar., 2016; Mohan i sar., 2017). Najveći nivo korelacije ( $R^2 = 0,9440$ ), uz najmanje vrednosti RMSE (4,669) i NMRSE (0,173), uočen je između FPF rezultata dobijenih pomoću NGI i TSI metode, dok između rezultata NGI i FSI metode, kao i TSI i FSI metode nije uočen visok nivo korelacije ( $R^2 = 0,5948$  i  $R^2 = 0,5868$ , redom) (Tabela 4.17). Prikazanim rezultatima za FPF potvrđena je gore izneta pretpostavka da bi TSI metoda mogla biti primenljiva u fazi skrininga, tokom razvoja novih formulacija praškova za inhalaciju. Međutim, neophodne su dodatne studije u kojima bi se uporedili rezultati različitih *in vitro* metoda, važećih u farmakopejama, te utvrdila njihova međusobna usaglašenost, s obzirom na to da ona može zavisiti i od vrste i sastava ispitivanih formulacija praškova za inhalaciju.

**Tabela 4.17.** Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ), koren srednje kvadratne greške (RMSE) i normalizovana vrednost RMSE (NRMSE) za FPF (%) rezultate dobijene primenom četiri različite metode

	NGI**			TSI**			FSI**		
	$R^2$	RMSE	NRMSE	$R^2$	RMSE	NRMSE	$R^2$	RMSE	NRMSE
CFD-DPM*	0,0789	14,178	0,525	0,0111	18,263	0,592	0,0219	19,227	0,587
FSI*	0,5948	6,723	0,249	0,5868	5,726	0,186	/	/	/
TSI*	0,9440	4,669	0,173	/	/	/	/	/	/

\*Označava metodu kojom su dobijene vrednosti korišćene kao previdene ili test vrednosti ( $P_i$ ) u jednačini 40; \*\*Označava metodu kojom su dobijene vrednosti korišćene kao uočene ili referentne vrednosti ( $O_i$ ) u jednačini 40

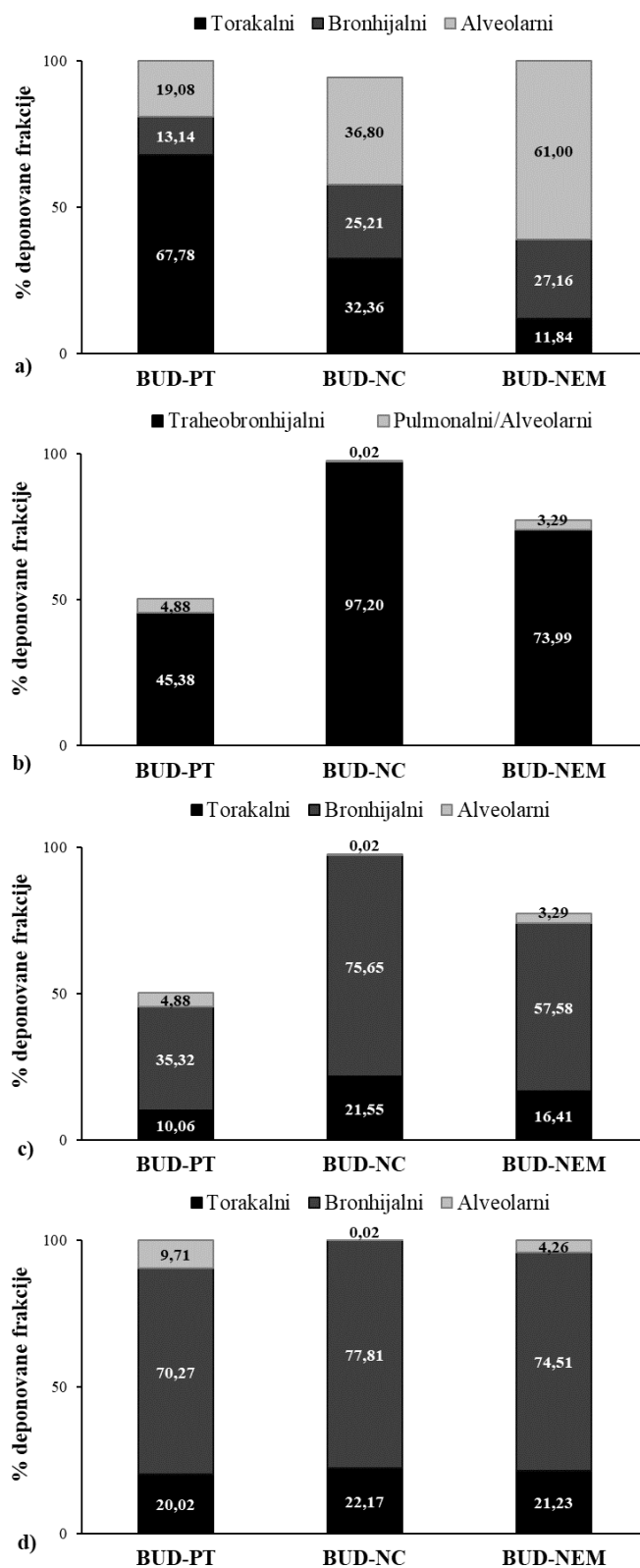
#### **4.4. Razvoj i primena *in silico* PBPK modela za predviđanje depozicije, apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci različitih biofarmaceutskih svojstava**

##### **4.4.1. Budesonid-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod pacova**

Razvoj budesonid-specifičnog modela za predviđanje bioperformansi leka kod pacova podrazumevao je najpre predviđanje depozicije čestica/kapljica nakon inhalacione primene tri formulacije (BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM) pomoću *in silico* (MPPD) modela i poređenje predviđenih vrednosti sa *in vivo* uočenim vrednostima kako bi se procenila pouzdanost predviđanja ovih *in silico* metoda. Zatim je vršena izgradnja i validacija modela za predviđanje apsorpcije i raspodele budesonida nakon intravenske i inhalacione primene formulacija sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance. Izgrađeni model je potom korišćen za predviđanje bioperformansi preparata sa modifikovanim oslobađanjem budesonida.

##### **4.4.1.1. *In silico* predviđena i *in vivo* određena depozicija budesonida u plućima pacova**

*In vivo* određena depozicija čestica/kapljica nakon inhalacione primene tri ispitivane formulacije (BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM) u plućima pacova, preuzeta iz literature (Han i sar., 2019), prikazana je na Slici 4.56a (D1 depozicija). Ovi podaci o depoziciji služili su za validaciju budesonid-specifičnog modela i procenu *in silico* MPPD modela da predvidi depoziciju lekovite supstance kod pacova. MPPD predviđena depozicija prikazana je na Slici 4.56b. Međutim, da bi ova depozicija mogla da se koristi kao ulazni parametar za PCAT™ model, MPPD predviđena deponovana frakcija leka u traheobronhijalnom regionu (Slika 4.56b) je konvertovana u dve posebne frakcije deponovane u torakalnom i bronhijalnom delu (Slika 4.56c). Konverzija podataka sa Slike 4.56b u podatke prikazane na Slici 4.56c objašnjena je u eksperimentalnom delu (poglavlje 3.2.4). Na kraju je primenjena opcija redistribucije deponovanih frakcija leka u PCAT™ modelu kako bi se frakcije sa Slike 4.56c srazmerno povećale da ukupna depozicija bude jednaka 100% (D2 depozicija, Slika 4.56d). Ovaj korak je vršen s obzirom na to da je, na osnovu *in vivo* podataka, uočena skoro kompletna depozicija čestica/kapljica BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM u plućima pacova (Slika 4.56a). *In silico* depozicija (D2 depozicija) je korišćena za predviđanje apsorpcije i raspodele budesonida nakon inhalacione primene ove tri formulacije.



**Slika 4.56.** Depozicija čestica/kapljica nakon inhalacione primene BUD-PT, BUD-NC i BUD-NEM formulacije kod pacova: *in vivo* određena (D1 depozicija), preuzeta iz Han i sar. (2019) (a); *in silico* (MPPD) predviđena depozicija (b); depozicija konvertovana iz MPPD modela u podatke koje „prepoznaje“ GastroPlus™ softver (c) i *in silico* depozicija koja je korišćena za simulacije u GastroPlus™ softveru (D2 depozicija) (d)

Rezultati *in vivo* studije za depoziciju mikročestica (BUD-NEM) pokazali su da je deponovana frakcija budesonida u alveolama (61,00%) bila mnogo veća od *in silico* predviđene vrednosti (3,29%). Ovakve razlike mogu se objasniti činjenicom da trenutno dostupni *in silico* modeli pluća (među kojima je i PCAT™) ne mogu da simuliraju/predvide mukoadheziju mikročestica BUD-NEM formulacije (u čiji sastav ulazi hijaluronska kiselina, kao predstavnik mukoadhezivnih polimera), čija je mukoadhezivnost dokazana u *in vitro* studiji (Liu i sar., 2018).

Velike razlike između *in vivo* uočenih (36,80%) i *in silico* predviđenih (0,02%) deponovanih frakcija budesonida u alveolarnom delu bile su izražene i u slučaju nanokristalne suspenzije (BUD-NC), verovatno zbog toga što su MPPD predviđanja zasnovana na srednjoj veličini kapi nanosuspenzije ( $d_{v50} = 27,90 \mu\text{m}$ ), dok u *in vivo* uslovima verovatno dolazi do raspršivanja kapi nanosuspenzije usled impakcije prilikom njihove primene. Naime, BUD-NC formulacija primenjena je pacovima direktno u traheju primenom *MicroSprayer*® *Aerosolizer – Model IA-1C* (Penn-Century, Inc., Wyndmoor, SAD) uređaja povezanog sa *FMJ-250* špicem, koji podrazumeva primenu velikog pritiska kako bi se omogućilo adekvatno raspršivanje tečnih formulacija (Shi i sar., 2021). U slučaju BUD-PT formulacije, *in silico* predviđena frakcija u alveolama (4,88%) je takođe niža u poređenju sa *in vivo* uočenom (19,08%), ali razlike nisu bile toliko izražene kao u slučaju ostale dve formulacije.

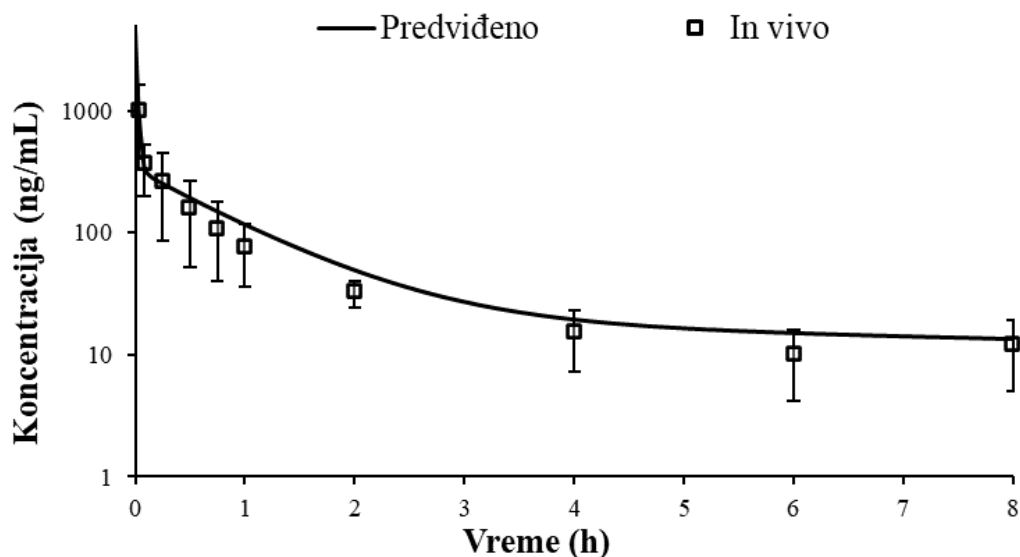
Iako predviđanja *in silico* modela po pitanju depozicije čestica nakon primene pomenutih formulacija budesonida kod pacova nisu odgovarala *in vivo* vrednostima, oba seta podataka (D1 i D2) su korišćena kao ulazni podaci za simulacije apsorpcije i raspodele budesonida kod pacova. Svrha ovakvog pristupa je bila procena sposobnosti predviđanja apsorpcije modela primenom *in silico* (D2) ulaznih podataka o depoziciji u odnosu na *in vivo* ulazni set podataka o depoziciji budesonida (D1). Dodatno, *in vivo* određena (D1) depozicija čestica za tri formulacije budesonida korišćena je i za validaciju modela.

#### 4.4.1.2. Izgradnja *in silico* modela za predviđanje apsorpcije i raspodele budesonida kod pacova

##### Model za intravensku primenu

Izgradnja budesonid-specifičnog *in silico* modela za pacova obuhvatila je odabir ulaznih parametara i opravdavanje njihovog izbora, s obzirom na to da se vrednosti nekih parametara često mogu razlikovati u zavisnosti od literaturnog izvora. Zbog toga je teško izabrati odgovarajuću vrednost ulaznog parametra, odnosno postoji uvek određen stepen nesigurnosti da li je izabrana realna vrednost ulaznog parametra, pogotovo kada u literaturi nije dostupno mnogo podataka o farmakokinetici lekovite supstance, kao što je to slučaj sa farmakokinetikom budesonida kod pacova. Stoga je primenjena PKPlus™ analiza intravenskog profila koncentracije budesonida tokom vremena, preuzetog iz literature (Shi i sar., 2021). PKPlus™ analizom utvrđeno je da se farmakokinetika budesonida kod pacova najbolje može opisati troprostornim farmakokinetičkim modelom, pa su izračunati farmakokinetički parametri:  $Cl$ ,  $V_c$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{13}$  i  $k_{31}$ , zajedno sa ostalim parametrima iz Tabele 3.12, korišćeni za izgradnju budesonid-specifičnog *in silico* modela za pacova. Izgrađen model je zatim primenjen za previđanje apsorpcije i raspodele budesonida nakon intravenske primene.

Rezultati simulacija primene intravenskog bolusa budesonida kod pacova prikazani su na Slici 4.57, zajedno sa *in vivo* uočenim vrednostima. Može se primetiti da se predviđeni profil koncentracije budesonida u plazmi tokom vremena dobro slaže sa *in vivo* uočenim profilom. Međutim, predviđena  $C_{\text{max}}$  vrednost (4505,30 ng/mL) je četiri puta veća u odnosu na *in vivo* uočenu  $C_{\text{max}}$  vrednost (1012,40 ng/mL). Ovo nije neuobičajena pojava kada se radi o intravenskoj primeni lekova, i uočena razlika može se objasniti činjenicom da je kasno izvršeno prvo uzorkovanje krvi u *in vivo* studiji. Naime, moguće je da je realna *in vivo* vrednost  $C_{\text{max}}$  propuštena jer nije bilo moguće dovoljno brzo izvršiti prvo uzorkovanje i odrediti realnu *in vivo* vrednost  $C_{\text{max}}$ .



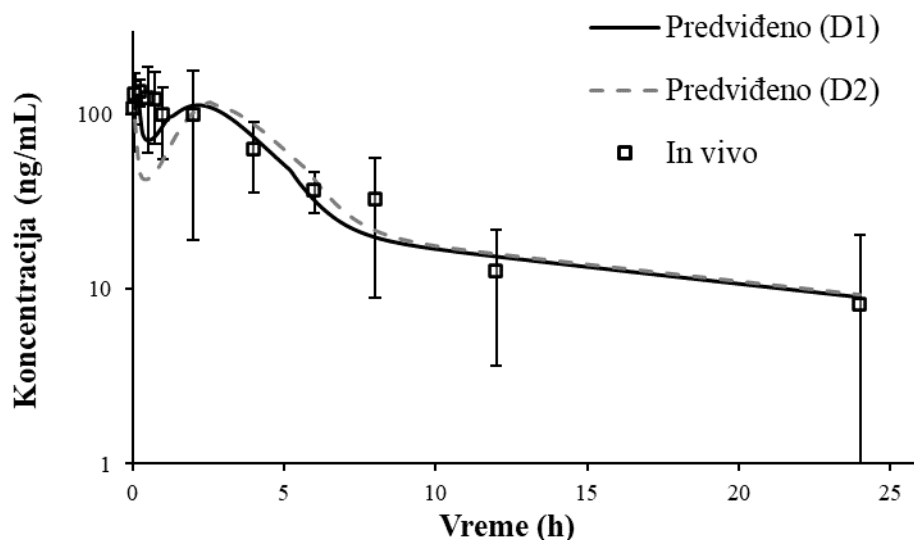
**Slika 4.57.** Predviđeni i in vivo uočeni (Shi i sar., 2021) profili koncentracije budesonida u plazmi nakon primene intravenskog bolusa (0,34 mg budesonida) kod pacova

Izgrađen i validiran model za intravensku primenu korišćen je dalje za izgradnju modela za inhalacionu primenu budesonida kod pacova.

#### Model za inhalacionu primenu

Na osnovu ulaznih podataka koji su korišćeni za izgradnju modela za intravensku primenu i primenom dodatnih ulaznih podataka koji su neophodni za simulaciju performansi lekovite supstance u plućima (Tabela 3.12), generisan je model za predviđanje apsorpcije budesonida nakon intratrahealne primene formulacije BUD-PT. Izgrađeni model validiran je poređenjem simuliranih profila sa *in vivo* uočenim profilom koncentracije budesonida u plazmi pacova nakon primene formulacije BUD-PT (koja predstavlja fizičku smešu budesonida i laktoze) (Shi i sar., 2021). Primena Pulmicort®-a i njegovo ponašanje kod ljudi je već opisano u literaturi (Borgström i sar., 1994; Thorsson i sar., 1994; Thorsson i sar., 2001; Wu i sar., 2013), dok podaci o depoziciji intratrahealno primenjenog Pulmicort®-a kod pacova nisu poznati. Značajno je naglasiti i da su podaci o farmakokinetici budesonida kod pacova u literaturi veoma oskudni (Yang i sar., 2008; Liu i sar., 2018).

Na Slici 4.58 prikazani su *in silico* predviđeni profili koncentracije budesonida u plazmi nakon intratrahealne primene formulacije BUD-PT za dva različita seta ulaznih podataka o depoziciji budesonida (D1 i D2). U oba slučaja se uočavaju dva  $C_{max}$  pika na predviđenim profilima koncentracije budesonida u plazmi. Dva  $C_{max}$  pika se mogu primetiti i na prikazanom srednjem *in vivo* profilu koncentracije budesonida u plazmi pacova. Prvi  $C_{max1}$  pik predstavlja apsorpciju budesonida u plućima (predviđena frakcija apsorbovane lekovite supstance u plućima ( $F_{pluća}$ ) iznosi oko 34%), dok drugi  $C_{max2}$  pik predstavlja apsorpciju lekovite supstance u GIT-u (predviđena frakcija apsorbovanog budesonida u GIT-u ( $F_{GIT}$ ) je oko 70%, Tabela 4.18). Drugi  $C_{max2}$  pik se može objasniti depozicijom budesonida u plućima tj. visokom frakcijom doze koja se deponuje u gornjim delovima respiratornog trakta (Slika 4.58) i koja podleže mukocilijarnom klirensu u plućima, te biva progutana, pa drugi  $C_{max2}$  pik, koji se kasnije pojavljuje (veća vrednost  $t_{max}$ ), potiče od apsorpcije budesonida iz GIT-a (Tabela 4.18).



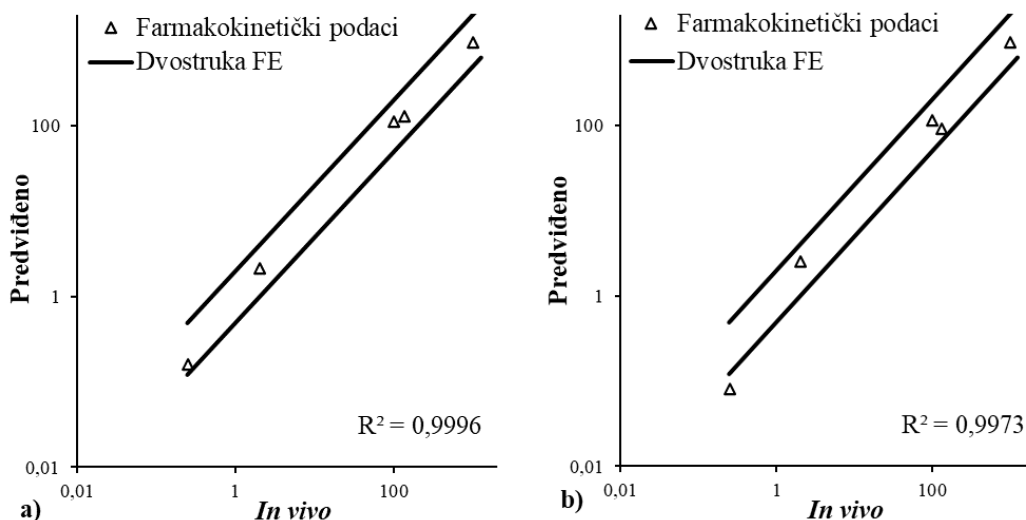
**Slika 4.58.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Shi i sar., 2021) profili koncentracije budesonida u plazmi nakon intratrahealne primene BUD-PT (0,42 mg budesonida) kod pacova

**Tabela 4.18.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Shi i sar., 2021) farmakokinetički parametri budesonida za formulaciju BUD-PT (0,42 mg budesonida)

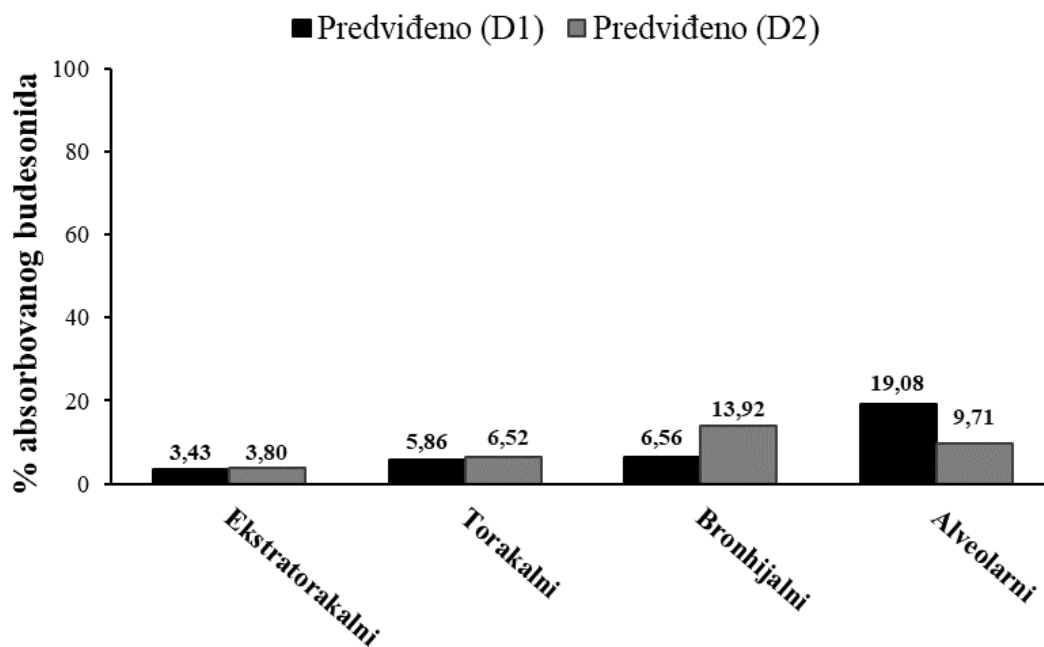
Parametar	<i>In vivo</i>	Predviđeno (D1)	FE	Predviđeno (D2)	FE
$C_{max1}^*$ (ng/mL)	132,70	128,05	0,96	91,25	0,69
$t_{max1}^*$ (h)	0,25	0,16	0,64	0,08	0,32
$C_{max2}^{**}$ (ng/mL)	98,35	112,13	1,14	115,92	1,17
$t_{max2}^{**}$ (h)	2,00	2,16	1,08	2,56	1,28
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	985,73	949,63	0,96	949,52	0,96
$F_{pluća}$ (%)	/	34,93	/	33,95	/
$F_{GIT}$ (%)		69,83	/	65,79	/

\*Odgovara prvom pik; \*\*Odgovara drugom pik

Primenom *in vivo* podataka o depoziciji (D1) kao ulaznih parametara, predviđeni profil koncentracije budesonida u plazmi je mnogo sličniji srednjem *in vivo* učenom profilu, što se vidi i na osnovu veće vrednosti koeficijenta determinacije,  $R^2$  (Slike 4.59a i b). Međutim, u slučaju oba simulirana profila, zasnovana na D1 i D2 kao ulaznim podacima o depoziciji, FE između predviđenih i *in vivo* učenih vrednosti farmakokinetičkih parametara je bila blizu 1 (Tabela 4.18), odnosno predviđeni farmakokinetički parametri su ušli u opseg dvostruke vrednosti FE (Tabela 4.18, Slike 4.59a i b). Na osnovu navedenog, može se zaključiti da su oba seta ulaznih podataka (D1 i D2) rezultovala zadovoljavajućim predviđanjima apsorpcije budesonida nakon intratrahealne primene BUD-PT. Pored toga, raspodela regionalne apsorpcije budesonida u plućima bila je slična za D1 i D2 setove ulaznih parametara (Slika 4.60). Najveća razlika između apsorbovanih frakcija budesonida uočena je u donjim delovima pluća, gde se veći procenat apsorbovao iz alveolarnog dela pluća u slučaju D1 depozicije (19,08%) u odnosu na D2 depoziciju (9,71%), zbog čega je i dobijena viša vrednost  $C_{max1}$  u slučaju primene D1 ulaznih podataka (Slika 4.58, Tabela 4.18). Ipak, iz Tabele 4.18 uočava se da je ukupni procenat budesonida apsorbovan u plućima u slučaju D1 (34,93%) bio sličan kao u slučaju D2 (33,95%), a jedina razlika je u nešto većem procentu apsorbovanog budesonida iz GIT-a u slučaju D1 podataka o depoziciji (69,83%). Ova razlika posledica je veće frakcije deponovanog budesonida u torakalnom delu pluća pacova u slučaju D1 depozicije (Slika 4.56).

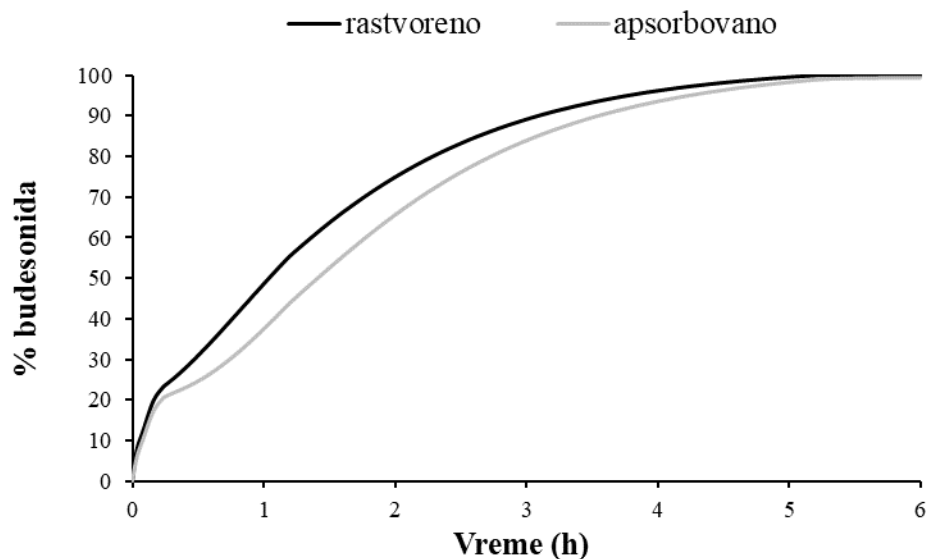


**Slika 4.59.** Poređenje između *in vivo* uočenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara:  $C_{max1}$ ,  $t_{max1}$ ,  $C_{max2}$ ,  $t_{max2}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (trouglasti markeri) gde linije predstavljaju dvostruku vrednost FE za *in vivo* uočene farmakokinetičke parametre budesonida nakon primene BUD-PT: na osnovu ulaznih podataka o depoziciji D1 (a); na osnovu ulaznih podataka o depoziciji D2 (b)



**Slika 4.60.** Predviđeni profil apsorpcije budesonida u regionima pluća nakon primene BUD-PT

Na Slici 4.61 prikazan je predviđeni profil brzine rastvaranja i apsorpcije budesonida iz formulacije BUD-PT. Prikazani profili pokazuju da se između 20-30% budesonida brzo rastvorilo i apsorbovalo, što odgovara apsorpciji budesonida u plućima, dok se ostatak primenjene doze budesonida (većinski deo) rastvorio i apsorbovao iz GIT-a, tek nakon 2 h.



**Slika 4.61.** Predviđeni profili rastvorenog i apsorbovanog budesonida iz formulacije BUD-PT

Na osnovu navedenih zapažanja može se zaključiti da je model inhalacione (intratrahealne) primene budesonida za pacova uspešno izgrađen i validiran, pa se može koristiti za dalja predviđanja apsorpcije i raspodele budesonida nakon primene ostalih eksperimentalnih formulacija. Takođe, pokazano je da u slučaju jednostavnijih formulacija praškova za inhalaciju, kao što je Pulmicort®, određene razlike između *in vivo* uočene i *in silico* predviđene depozicije lekovite supstance u plućima neće imati značajan uticaj na moć *in silico* modela da predvidi apsorpciju lekovite supstance. Ovo znači da bi se, ukoliko podaci o *in vivo* depoziciji leka u plućima pacova nisu dostupni, *in vitro* aerodinamičke karakteristike jednostavnijih formulacija praškova za inhalaciju mogle potencijalno koristiti kao ulazni podatak za *in silico* predviđanje depozicije, koje može dati prilično dobra predviđanja profila apsorpcije lekovite supstance.

#### 4.4.1.3. Primena budesonid-specifičnog modela budesonida za pacova

##### Formulacija sa trenutnim oslobađanjem budesonida, BUD-NC

Izgrađen budesonid-specifičan *in silico* model za pacova korišćen je najpre za predviđanje apsorpcije budesonida nakon intratrahealne primene formulacije sa trenutnim oslobađanjem, BUD-NC. Kao i kod formulacije BUD-PT, u ovom slučaju su predviđanja apsorpcije budesonida nakon primene BUD-NC sprovedena za dva različita ulazna seta podataka o depoziciji leka (D1 i D2). Pored toga, simulirani su profili za dve različite vrednosti rastvorljivosti budesonida u plućnoj tečnosti (Cs):

- inicijalna vrednost od 0,05 mg/mL preuzeta iz literature (Wu i sar., 2013)
- višestruko povećana (optimizovana) vrednost od 10 mg/mL (Tabela 3.12).

Rezultati simulacija koji se zasnivaju na različitim ulaznim vrednostima za rastvorljivost budesonida (0,05 mg/mL i 10,00 mg/mL) su jasno pokazali (Tabela 4.19) da je rastvorljivost budesonida u plućnoj tečnosti jedan od ključnih faktora koji je imao uticaj na njegovu apsorpciju nakon inhalacione primene formulacije BUD-NC.

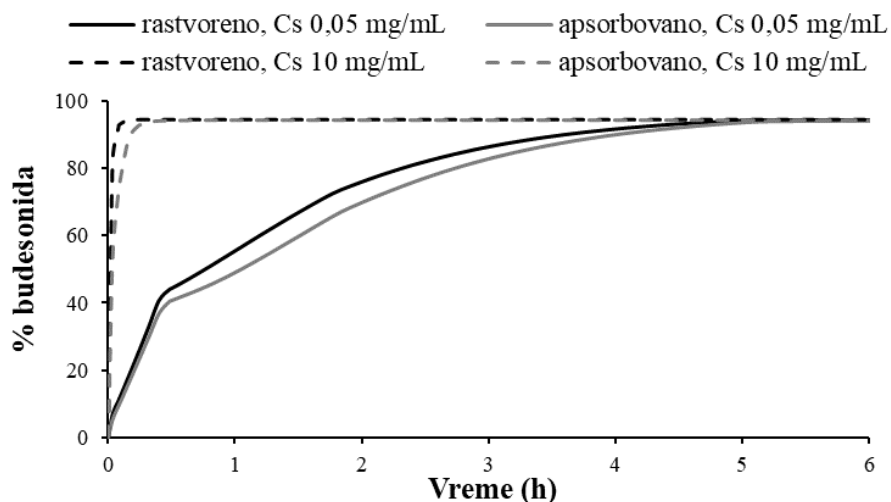


**Tabela 4.19.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Shi i sar., 2021) farmakokinetički parametri budesonida za formulaciju BUD-NC (0,49 mg budesonida)

Parametar	<i>In vivo</i>	Predviđeno (D1)		Predviđeno (D2)	
C <sub>s</sub> (mg/mL)	/	0,05	10	0,05	10
C <sub>max</sub> (ng/mL)	1022,10	209,95	848,91	141,75	1021,40
t <sub>max</sub> (h)	0,03	0,40	0,03	2,80	0,08
PIK <sub>0→∞</sub> (ng h/mL)	1132,60	1046,40	1048,30	1107,20	1110,90

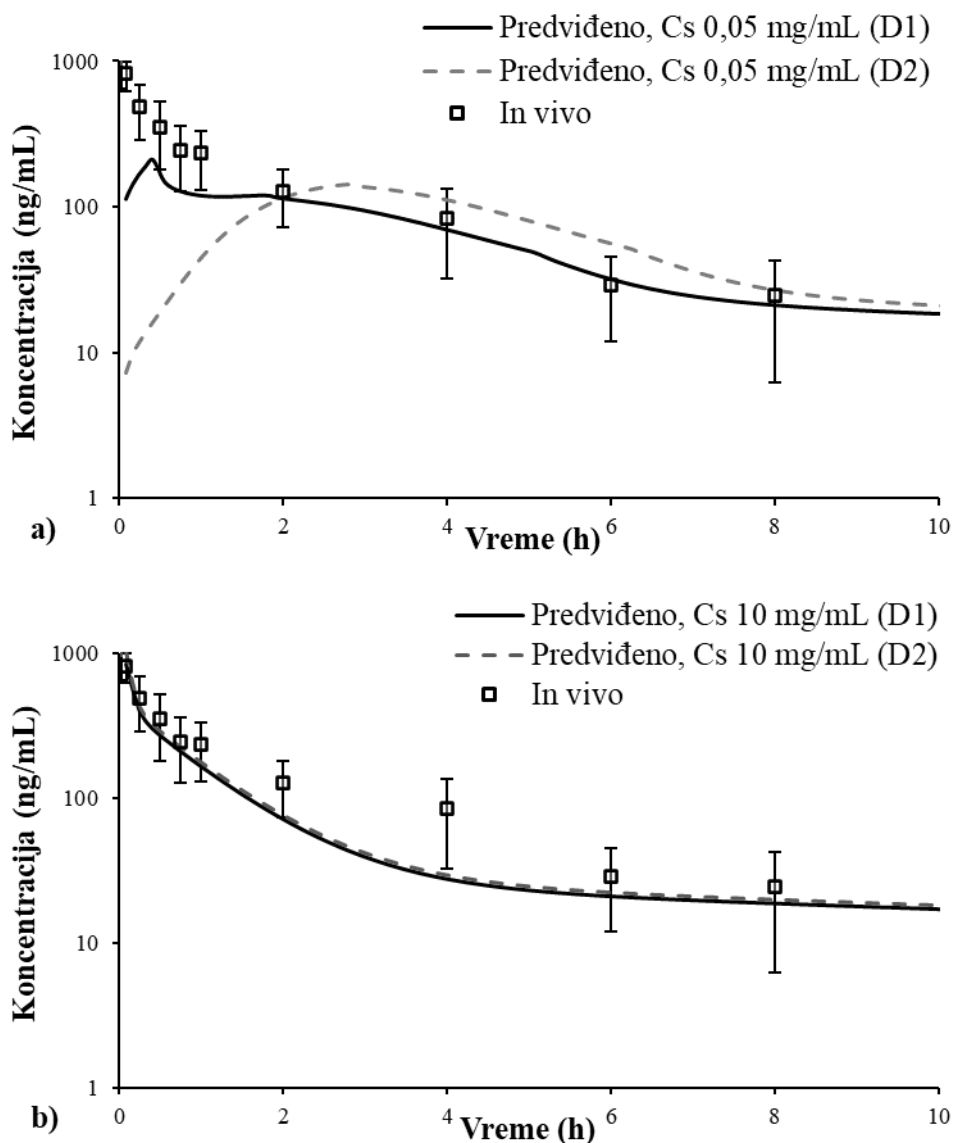
Kako bi se objasnio uzrok izrazito brze *in vivo* uočene apsorpcije budesonida nakon intratrahealne primene formulacije BUD-NC, pretpostavljeno je da je *in vivo* brzina rastvaranja budesonida iz nebulizovane nanosuspenzije brža i kompletnija od očekivane brzine rastvaranja zasnovane na inicijalnoj vrednosti za rastvorljivost (0,05 mg/mL). Ovakva pretpostavka može da se objasni nano efektom tj. povećanom rastvorljivošću i brzinom rastvaranja čestica nano veličine, koja je dodatno favorizovana prisustvom dodatne količine vode u nebulizovanim kapima. Ova hipoteza je potvrđena u studiji koju su objavili Yang i sar. (2008), gde je zaključeno da se nanosuspenzija budesonida (čiji je srednji prečnik čestica manji od 0,5 μm) ponašala više kao rastvor nego kao konvencionalna suspenzija. Takođe, Yang i sar. (2008) su pretpostavili da visoka permeabilnost budesonida u epitelnim ćelijama pluća, kao i nepostojanje presistemskog metabolizma, doprinose brznoj apsorpciji budesonida nakon inhalacione primene aerosola. Pored toga, u literaturi je zabeleženo da nanokristali/nanočestice poseduju veći odnos površine i zapremine u odnosu na veće čestice (kao što su npr. mikročestice), što dovodi do značajnog povećanja rastvorljivosti i brzine rastvaranja lekovite supstance (Merisko-Liversidge i sar., 2003; Wu i sar., 2004; Jinno i sar., 2006; Mansour i sar., 2009; Chang i sar., 2015; Fontana i sar., 2018).

Da bi se simulirala veća brzina rastvaranja budesonida iz BUD-NC nanosuspenzije i scenario u kome rastvorljivost lekovite supstance i njena brzina rastvaranja nisu ograničavajući faktori za apsorpciju, rastvorljivost budesonida u plućnoj tečnosti je povećana na hipotetičkih 10 mg/mL. Predviđeni profili brzine rastvaranja budesonida u zavisnosti od njegove rastvorljivosti, prikazani su na Slici 4.62. Prikazani profili jasno ukazuju da su predviđene brzine rastvaranja i apsorpcije budesonida iz BUD-NC mnogo veće u slučaju veće ulazne vrednosti za rastvorljivost budesonida (C<sub>s</sub> = 10 mg/mL). Pored toga, model je uzeo u obzir i veoma brzu apsorpciju budesonida iz regiona pluća, određenu konstantom brzine apsorpcije (Tabela 3.12), koja je bila ista kao u slučaju formulacije BUD-PT. Identična k<sub>a</sub> vrednost za ove dve formulacije korišćena je s obzirom na to da su ustanovljene jednake MDT (a i MAT) vrednosti budesonida za ove dve formulacije.



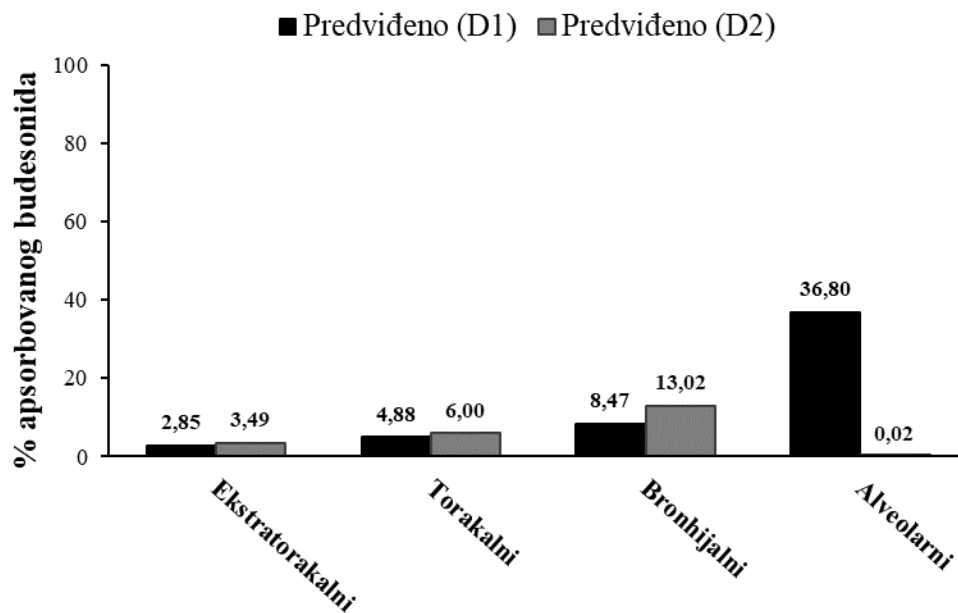
**Slika 4.62.** Predviđeni profili rastvorenog i apsorbovanog budesonida iz formulacije BUD-NC

Ukoliko je rastvorljivost budesonida (0,05 mg/mL) faktor koji ograničava njegovu brzinu rastvaranja u plućnoj tečnosti, zapaženo je da su predviđeni profili apsorpcije budesonida nakon primene BUD-NC formulacije (Slika 4.63a) bili dosta niži u poređenju sa *in vivo* uočenim profilom, nezavisno od toga koji su podaci o depoziciji (D1 ili D2) korišćeni kao ulazni set za simulacije. Sa druge strane, predviđeni profili koncentracije budesonida u plazmi tokom vremena su se dobro slagali sa *in vivo* uočenim profilom kada je rastvorljivost u plućnoj tečnosti optimizovana na 10 mg/mL (Slika 4.63b). Takođe, uočeno je da je prihvatljivo slaganje predviđenih profila sa *in vivo* uočenim profilom koncentracije budesonida u plazmi dobijeno nezavisno od seta ulaznih podataka o depoziciji (D1 i D2), kao i da su se ova dva predviđena profila međusobno preklapila (Slika 4.63b). Međutim, razlike između dva seta ulaznih podataka o depoziciji odrazila su se na vrednosti predviđenih farmakokinetičkih parametara prikazanih u Tabeli 4.19.



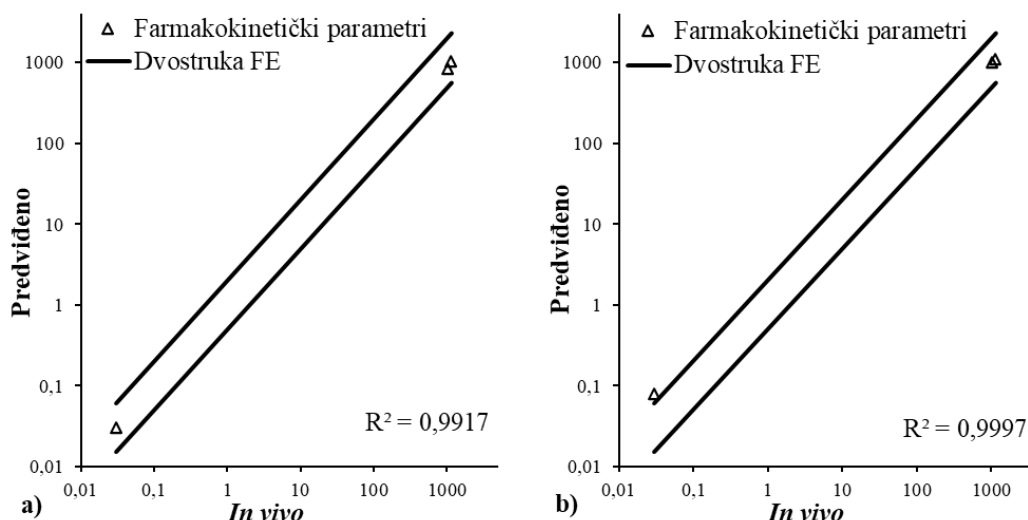
**Slika 4.63.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Shi i sar., 2021) profili koncentracije budesonida u plazmi nakon intratrahealne primene BUD-NC (0,49 mg budesonida) kod pacova, kada je kao ulazni parametar korišćena rastvorljivost budesonida u plućnoj tečnosti od: 0,05 mg/mL (a); 10 mg/mL (b)

Sa druge strane, nešto izraženije razlike u simuliranim profilima koncentracije budesonida u plazmi u zavisnosti od korišćenog seta podataka o depoziciji (D1 ili D2) uočene su (Slika 4.63a) u slučaju kada je rastvorljivost budesonida (inicijalna rastvorljivost od 0,05 mg/mL) bila ograničavajući faktor za njegovu apsorpciju. Ove razlike su verovatno posledica razlike u deponovanim frakcijama lekovite supstance u alveolarnom regionu (Slika 4.56). Veća apsorbovana frakcija budesonida u alveolarnom delu pluća u slučaju D1 depozicije (Slika 4.64) dovela je do većeg stepena i brzine apsorpcije (kraći  $t_{max}$  od 0,40 h), koja je posledica apsorbovane frakcije budesonida iz pluća, dok je, u slučaju D2 depozicije, uočena sporija apsorpcija lekovite supstance ( $t_{max}$  od 2,80 h) kojoj je dominantno doprinela apsorbovana frakcija lekovite supstance iz GIT-a.



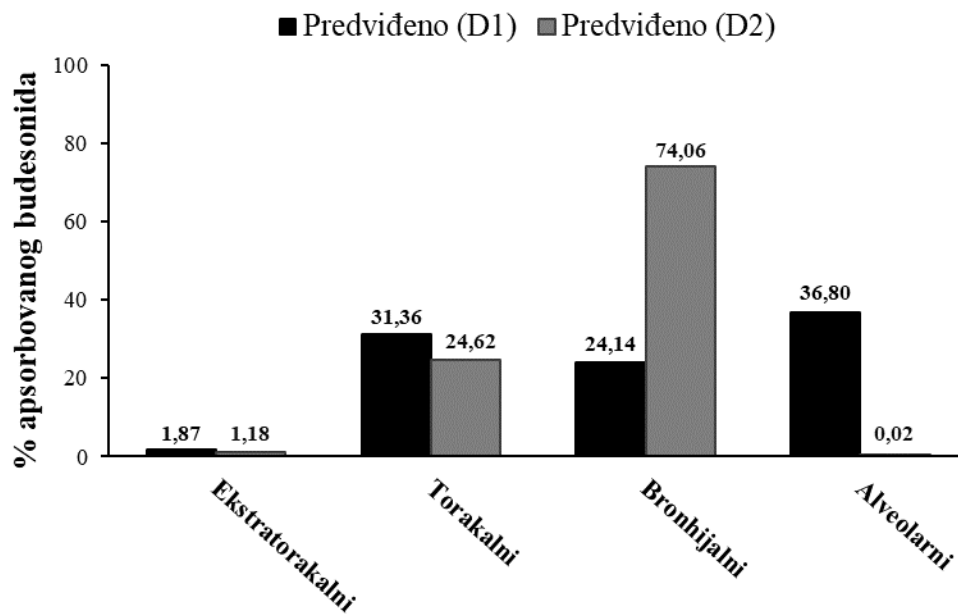
**Slika 4.64.** Predviđeni profil apsorpcije budesonida po regionima pluća nakon primene formulacije BUD-NC (inicijalna rastvorljivost budesonida,  $C_s$  0,05 mg/mL)

S obzirom na to da je ulazna vrednost za rastvorljivost budesonida od 10 mg/mL u slučaju nanokristalne suspenzije BUD-NC dala realnija predviđanja, koja su sličnija *in vivo* vrednostima, ostali rezultati simulacija prikazani su samo za ovu vrednost rastvorljivosti, ali su prikazane razlike u zavisnosti od toga koji je ulazni set depozicije (D1 ili D2) korišćen za simulacije apsorpcije i raspodele budesonida. Sa Slike 4.65 može se primetiti da su, na osnovu oba seta depozicije kao ulaznih parametara, predviđeni farmakokinetički parametri bili u opsegu dvostrukih srednjih *in vivo* vrednosti, sa izuzetkom  $t_{max}$  predviđenog na osnovu D2 depozicije (Slike 4.65a i b).



**Slika 4.65.** Poređenje između *in vivo* uočenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (trouglasti markeri) za rastvorljivost budesonida od 10 mg/mL, gde linije predstavljaju dvostruku vrednost FE za *in vivo* uočene farmakokinetičke parametre budesonida nakon primene BUD-NC na osnovu: D1 depozicije (a); D2 depozicije (b)

Iako je, kao što je već pomenuto, uticaj različitih ulaznih setova podataka o depoziciji BUD-NC na apsorpciju budesonida (kada je kao ulazni parametar korišćena rastvorljivost budesonida od 10 mg/mL) bilo moguće primetiti samo na osnovu vrednosti farmakokinetičkih parametara (Tabela 4.19), uočene razlike između vrednosti ovih parametara opet su bile posledica drugačijeg regionalnog profila apsorpcije budesonida u plućima (Slika 4.66). Naime, sa Slike 4.66 se uočava da se budesonid primarno apsorbovao iz alveolarnog regiona u slučaju D1 depozicije, dok se dominantno apsorbovao iz bronhijalnog dela pluća kada je kao ulazni parametar korišćena D2 depozicija.



**Slika 4.66.** Predviđeni profil apsorpcije budesonida po regionima pluća nakon primene formulacije BUD-NC (optimizovana rastvorljivost budesonida,  $C_s$  od 10 mg/mL)

Rezultati simulacija pokazali su da je povećanje rastvorljivosti lekovite supstance bio glavni korak u izgradnji validnog modela za predviđanje bioperformansi formulacije nanokristalne suspenzije (BUD-NC). Dobijeni rezultati za formulaciju BUD-NC pokazali su da je rastvorljivost u plućima visoko permeabilnih lekovitih supstanci ključni faktor od koga zavisi njihova apsorpcija u plućima nakon inhalacione primene nanosuspenzija. Tačnije, kada je rastvorljivost nanočestica lekovite supstance bila dovoljno visoka, podaci o depoziciji (*in vivo* i *in silico*) nisu imali izražen uticaj na profil koncentracije lekovite supstance u plazmi (Slika 4.63b). Međutim, precizno određena depozicija leka je važna kako bi se adekvatno predvideo regionalni profil apsorpcije budesonida u plućima (Slika 4.66).

#### Formulacija sa modifikovanim oslobađanjem budesonida, BUD-NEM

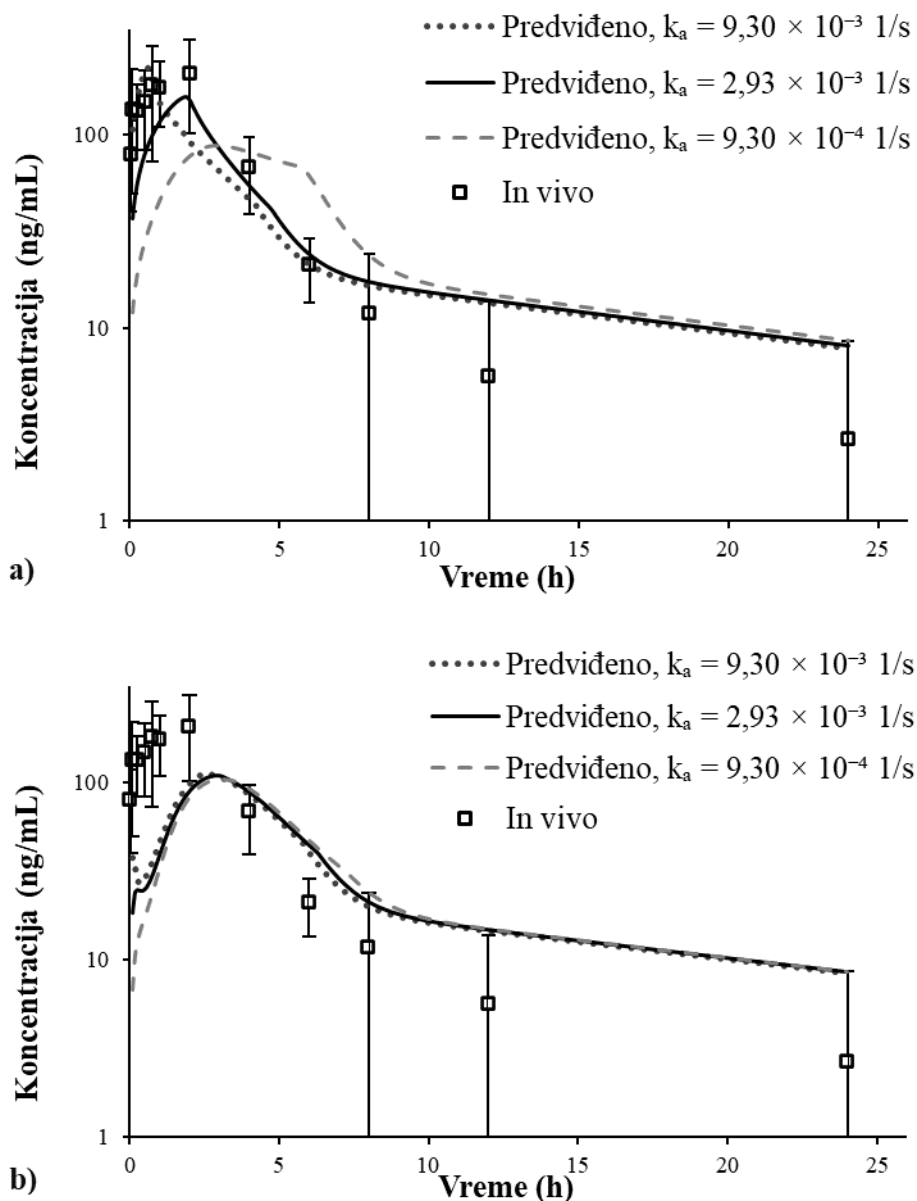
Dodatni izazov u daljem razvoju izgrađenog budesonid-specifičnog modela za pacova predstavljale su simulacije apsorpcije ove lekovite supstance nakon intratrahealne primene mikročestica hijaluronske kiseline sa inkorporiranim nanokristalima budesonida (BUD-NEM), jer je ova formulacija *in vivo* pokazala odloženu apsorpciju lekovite supstance prilikom ispitivanja na pacovima (Slika 4.67). Liu i sar. (2018) zaključili su da je odložena apsorpcija budesonida posledica izražene mukoadhezije mikročestica hijaluronske kiseline i produženog zadržavanja lekovite supstance u plućima.

*In silico* predviđanje bioperformansi preparata sa modifikovanim oslobađanjem lekovitih supstanci poseduje izvesna ograničenja jer PCAT™ model ne poseduje opciju da simulira produženu mukoadheziju čestica, niti produženo zadržavanje i produženu brzinu rastvaranja lekovite supstance iz preparata za inhalaciju u plućima. Tačnije, trenutna verzija PCAT™ modela ne nudi opciju da se vreme zadržavanja lekovite supstance u plućima, niti profil *in vitro* brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata za inhalaciju koriste kao ulazni parametri za simulacije. Stoga je primenjen alternativni pristup modelovanja, koji je podrazumevao menjanje konstante brzine apsorpcije u plućima ( $k_a$ ), što je opisano u studiji koju su objavili Bhagwat i sar. (2017). Ova studija se bazira na pretpostavci da rastvorljivost i brzina rastvaranja lekovite supstance kontrolišu brzinu apsorpcije nisko rastvorljivih lipofilnih lekovitih supstanci, što znači da se promene u brzini rastvaranja direktno odražavaju na  $k_a$  vrednost inhalaciono primenjenih lekovitih supstanci. Zbog toga je ispitana osetljivost predviđenih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ ) na promene ulaznih vrednosti konstante  $k_a$  primenom PSA.

Rezultati PSA su pokazali značajan uticaj konstante  $k_a$  na apsorpciju budesonida iz formulacije BUD-NEM. Dobijene vrednosti koeficijenta osetljivosti su iznosile  $SC = 0,73$  za  $C_{max}$  i  $SC = -3,37$  za  $t_{max}$ , pri čemu se smatra da ulazni parametar ima veliki uticaj na predviđenu vrednost farmakokinetičkog parametra ako je  $SC \geq 0,5$  (Ellison i Wu, 2020). Da bi se dodatno procenio uticaj konstante  $k_a$  na apsorpciju budesonida iz formulacije BUD-NEM, ispitivana su tri različita scenarija koja se odnose na različite vrednosti  $k_a$ , za dva seta ulaznih podataka o depoziciji čestica BUD-NEM (D1 i D2). Rezultati simulacija prikazani su u Tabeli 4.20 i na Slici 4.67.

**Tabela 4.20.** Uticaj različitih vrednosti konstante  $k_a$  na predviđene farmakokinetičke parametre budesonida za formulaciju BUD-NEM (0,39 mg budesonida) i *in vivo* uočene vrednosti (Shi i sar., 2021)

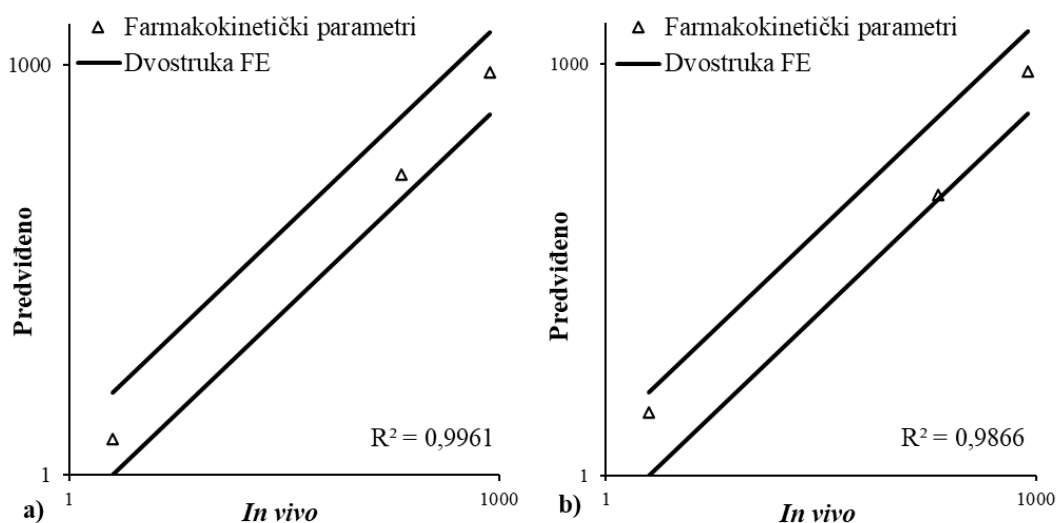
Parametar	<i>In vivo</i>	Predviđeno $k_a=9,30 \times 10^{-3} s^{-1}$		Predviđeno $k_a=2,93 \times 10^{-3} s^{-1}$		Predviđeno $k_a=9,30 \times 10^{-4} s^{-1}$	
		D1	D2	D1	D2	D1	D2
$C_{max}$ (ng/mL)	206,43	223,49	113,97	157,29	110,68	87,82	104,55
$t_{max}$ (h)	2,00	0,64	2,56	1,84	2,88	2,88	3,04
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	864,60	883,40	881,54	883,27	881,31	883,07	881,00
$F_{pluća}$ (%)	/	78,90	30,12	75,80	24,80	71,10	17,37
$F_{GIT}$ (%)	/	21,00	69,62	24,10	74,87	28,80	82,33



**Slika 4.67.** Uticaj različitih vrednosti  $k_a$  na predviđene profile koncentracije budesonida u plazmi nakon intratrahealne primene formulacije BUD-NEM (0,39 mg budesonida) na osnovu: D1 depozicije (a); D2 depozicije (b) i in vivo uočen profil koncentracije budesonida u plazmi nakon intratrahealne primene BUD-NEM (Shi i sar., 2021)

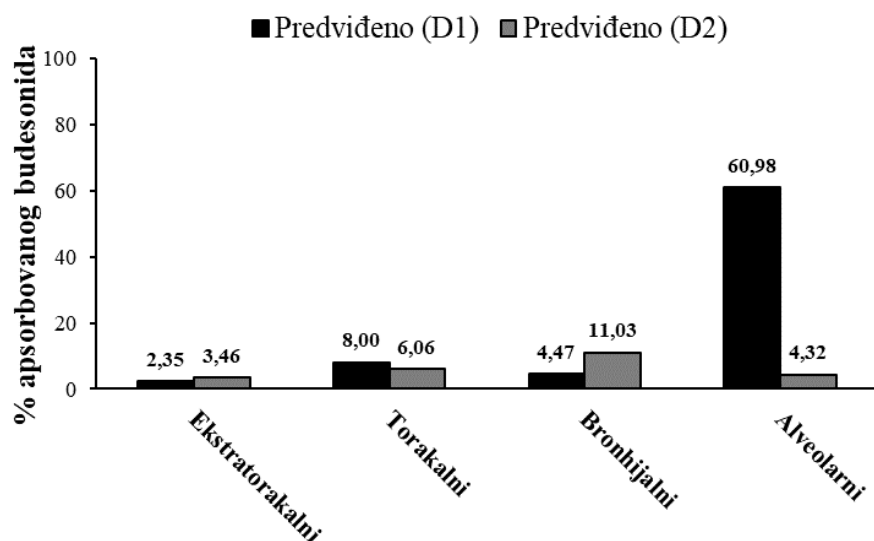
Sa Slike 4.67a može se uočiti efekat različitih vrednosti  $k_a$  na predviđene profile koncentracije budesonida u plazmi nakon intratrahealne primene formulacije BUD-NEM u slučaju kada je korišćena D1 depozicija. Inicijalna  $k_a$  vrednost ( $9,30 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), koja je korišćena za simulacije formulacija BUD-PT i BUD-NC, rezultovala je i relativno dobrim predviđanjem  $C_{\max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  budesonida nakon primene formulacije BUD-NEM. Međutim predviđena brzina apsorpcije budesonida, reflektovana preko vrednosti parametra  $t_{\max}$  (0,64 h), razlikovala se od srednje *in vivo* uočene vrednosti  $t_{\max}$  (2,00 h). Sa druge strane, kada je deset puta manja vrednost  $k_a$  ( $9,30 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) korišćena kao ulazni parametar za simulacije, dobijena vrednost  $C_{\max}$  (87,82 ng/mL) bila je mnogo niža nego *in vivo* uočena vrednost (206,43 ng/mL), a predviđena  $t_{\max}$  vrednost (2,88 h) bila je viša u poređenju sa *in vivo* uočenom vrednošću  $t_{\max}$  (Tabela 4.20). Može se primetiti da se jedino predviđene vrednosti  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  nisu menjale u zavisnosti od promene  $k_a$  vrednosti. Optimalna vrednost  $k_a$ , koja je rezultovala najboljim slaganjem

između predviđenih i srednjih *in vivo* uočenih farmakokinetičkih parametara bila je  $2,93 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Predviđena vrednost  $C_{\max}$  je u slučaju ove vrednosti  $k_a$  bila niža u odnosu na srednju *in vivo* uočenu vrednost, ali se uklapala u opseg individualnih *in vivo* vrednosti (121,95-360,70 ng/mL; Shi i sar. (2021)). Pored toga, uočava se da se oblik predviđenog profila koncentracije budesonida u plazmi dobro slaže sa oblikom *in vivo* uočenog profila (Slika 4.67a). Predviđanja na osnovu *in silico* procenjene depozicije budesonida (D2) su, u slučaju sve tri vrednosti  $k_a$ , bila lošija u odnosu na vrednosti dobijene sa D1 depozicijom kao ulaznim parametrom (Tabela 4.20). Sa Slike 4.67b se uočava da u ovom slučaju uticaj različitih vrednosti  $k_a$  na predviđene profile koncentracije budesonida u plazmi nije bio toliko izražen kao u slučaju D1 depozicije (Slika 4.67a), verovatno zbog toga što je predviđena frakcija deponovane lekovite supstance u alveolarnom regionu (Slika 4.56) u slučaju D2 depozicije mnogo niža nego u slučaju D1 depozicije. Ovakvi rezultati ukazuju na to da *in silico* (MPPD) metode često ne predviđaju precizno depoziciju leka u plućima pacova, pa je stoga poželjno, kada je moguće, za *in silico* predviđanja profila apsorpcije lekovite supstance koristiti *in vivo* određenu depoziciju. Ovo je posebno značajno za specifične formulacije, kao što su npr. ispitivane mukoadhezivne mikročestice budesonida (BUD-NEM), s obzirom na to da u *in silico* modelima još uvek ne postoji opcija za simuliranje produžene mukoadhezije. Pomenuta zapažanja potvrđuje i prikaz na Slici 4.68, gde se primećuje da su svi farmakokinetički parametri, predviđeni na osnovu D1 depozicije i optimizovane  $k_a$  vrednosti ( $2,93 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), bili u opsegu dvostruke FE *in vivo* uočenih vrednosti, dok je vrednost  $C_{\max}$  predviđena na osnovu D2 depozicije bila na granici ovog opsega. Takođe, vrednost  $R^2$  bila je veća (0,9961) za predviđene farmakokinetičke parametre zasnovane na D1 (*in vivo*) ulaznom setu depozicije čestica BUD-NEM u odnosu na vrednost koja se odnosi na D2 depoziciju (Slika 4.68).



**Slika 4.68.** Poređenje između *in vivo* uočenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara:  $C_{\max}$ ,  $t_{\max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (trouglasti markeri), gde linije predstavljaju dvostruku vrednost FE za *in vivo* uočene farmakokinetičke parametre budesonida nakon primene BUD-NEM: na osnovu D1 depozicije (a); na osnovu D2 depozicije (b)

Na Slici 4.69 prikazani su rezultati simulacija (na osnovu optimizovane vrednosti  $k_a$  od  $2,93 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) za predviđeni regionalni profil apsorpcije budesonida u plućima nakon intratrahealne primene formulacije BUD-NEM kod pacova. Može se primetiti da je frakcija budesonida koji se apsorbovao iz alveolarnog dela pluća u slučaju D1 depozicije bila veća nego u slučaju D2 depozicije. Ovo se i u slučaju formulacije BUD-NEM, kao i ostale dve formulacije (BUD-NC i BUD-PT), objašnjava izraženim razlikama u frakcijama budesonida deponovanog u alveolama u slučaju D1 depozicije u poređenju sa D2 depozicijom (Slika 4.56).



**Slika 4.69.** Predviđeni profil apsorpcije budesonida po regionima pluća nakon primene formulacije BUD-NEM

Rezultati *in silico* modelovanja apsorpcije budesonida nakon primene BUD-NEM pokazali su da predviđanje apsorpcije lekovite supstance nakon inhalacione primene formulacije sa izraženim mukoadhezivnim svojstvima predstavlja veliki izazov usled nemogućnosti da se precizno odredi konstanta brzine apsorpcije lekovite supstance u plućima. Međutim, na primeru BUD-NEM formulacije pokazano je da bi se primenjen pristup, koji se zasniva na optimizaciji  $k_a$  vrednosti, mogao koristiti za okvirna predviđanja apsorpcije lekovite supstance u plućima u slučajevima kada su dostupni *in vivo* podaci o koncentraciji lekovite supstance u plazmi kako bi rezultati simulacija mogli biti validirani. Sa druge strane, ovakav pristup nije primenljiv u ranoj fazi razvoja preparata za inhalaciju, kada nisu dostupni podaci iz *in vivo* farmakokinetičkih studija na životinjama.

#### 4.4.2. Budesonid-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod čoveka

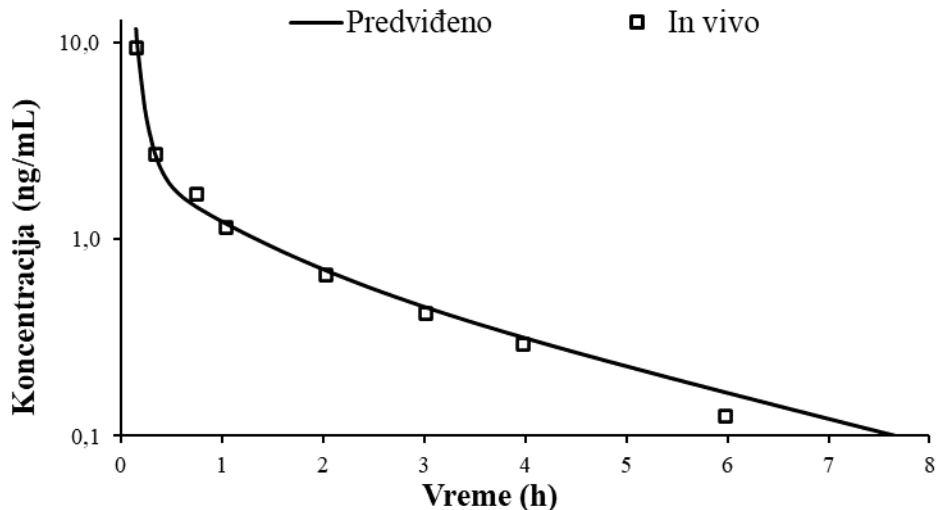
##### 4.4.2.1. Izgradnja i validacija *in silico* modela za predviđanje apsorpcije i raspodele budesonida kod čoveka

###### Model za intravensku primenu

Model za intravensku primenu budesonida izgrađen je na osnovu parametara koji opisuju biofarmaceutske karakteristike lekovite supstance i formulacije, kao i fizioloških parametara, prikazanih u Tabeli 3.13. Izgrađen je troprostorni farmakokinetički model, za koji je pokazano da najbolje opisuje farmakokinetiku budesonida kod čoveka, što je bio slučaj i kod opisivanja farmakokinetike budesonida kod pacova. Ulazni farmakokinetički parametri ( $Cl$ ,  $V_c$ ,  $k_{1/2}$ ,  $k_{2/1}$ ,  $k_{1/3}$ ,  $k_{3/1}$ ) dobijeni su PKPlus™ analizom intravenskog profila koncentracije budesonida u plazmi, preuzetog iz literature (Thorsson i sar., 1994). Na osnovu ovih vrednosti ulaznih parametara (Tabela 3.13), softver je preračunao da poluvreme eliminacije ( $t_{1/2}$ ) budesonida kod ljudi iznosi 2,31 h, što je u skladu sa opsegom vrednosti 1,7-3,4 h objavljenim u literaturi (Thorsson i sar., 1994; Boobis, 1998; Derendorf i sar., 1998; Edsbäcker i sar., 2002). Dobijena vrednost klirensa od 81,64 L/h je takođe bila u skladu sa literaturnim podacima (Ryrfeldt i sar., 1982). Dobar izbor ulaznih vrednosti farmakokinetičkih parametara potvrđen je i činjenicom da se predviđeni profil koncentracije budesonida u plazmi podudara sa srednjim *in vivo*



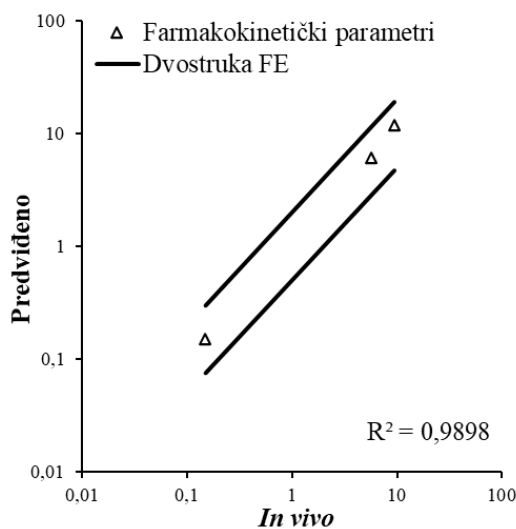
uočenim profilom, preuzetim iz literature (Thorsson i sar., 1994). Može se primetiti (Slika 4.70) da su se *in vivo* i *in silico* profili koncentracije budesonida u plazmi skoro potpuno poklopili, dok su se vrednosti predviđenih farmakokinetičkih parametara  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  slagale sa *in vivo* uočenim vrednostima (Tabela 4.21, Slika 4.71). Ovo se može zaključiti i na osnovu vrednosti greške FE, koja je bila približna 1, izuzev za vrednost parametra  $C_{max}$ , za koji je vrednost FE bila nešto viša.



**Slika 4.70.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Thorsson i sar., 1994) profili koncentracije budesonida u plazmi nakon primene intravenske infuzije (0,50 mg budesonida) kod čoveka

**Tabela 4.21.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Thorsson i sar., 1994) farmakokinetički parametri budesonida nakon primene intravenske infuzije (0,5 mg budesonida)

Parametar	<i>In vivo</i>	Predviđeno	FE
$C_{max}$ (ng/mL)	9,37	11,70	1,25
$t_{max}$ (h)	0,15	0,15	1,00
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	5,73	6,12	1,07

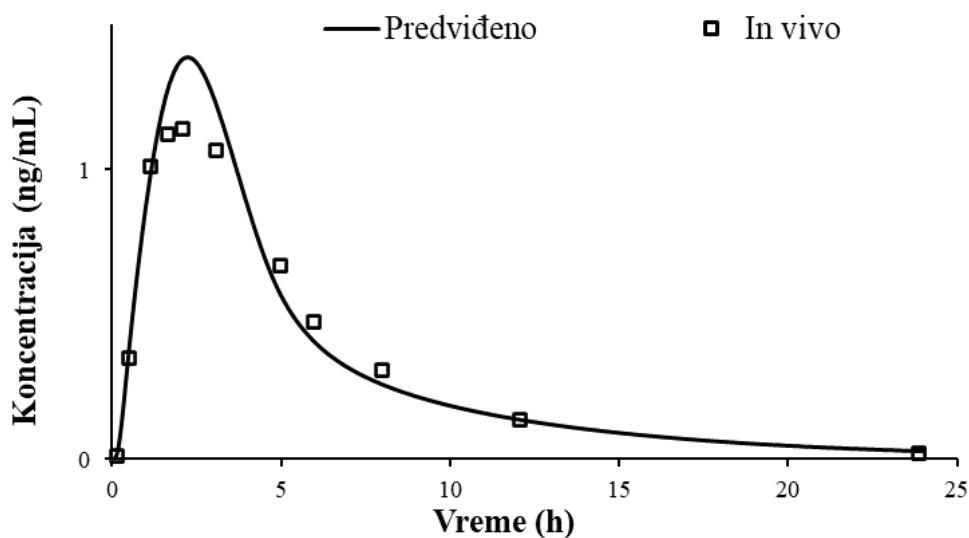


**Slika 4.71.** Poređenje između *in vivo* uočenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (trouglasti markeri), gde linije predstavljaju dvostruku vrednost FE za *in vivo* uočene farmakokinetičke parametre za intravensku infuziju (0,50 mg budesonida)

### Model za peroralnu primenu

Izgrađeni model za intravensku primenu budesonida je proširen na peroralni put primene kako bi se simulirala i faza apsorpcije lekovite supstance kod čoveka. Model za peroralnu primenu je validiran pomoću *in vivo* podataka dobijenih nakon primene budesonida u obliku IR kapsula kod zdravih dobrovoljaca, preuzetih iz studije koju su sproveli Edsbäcker i sar. (2002).

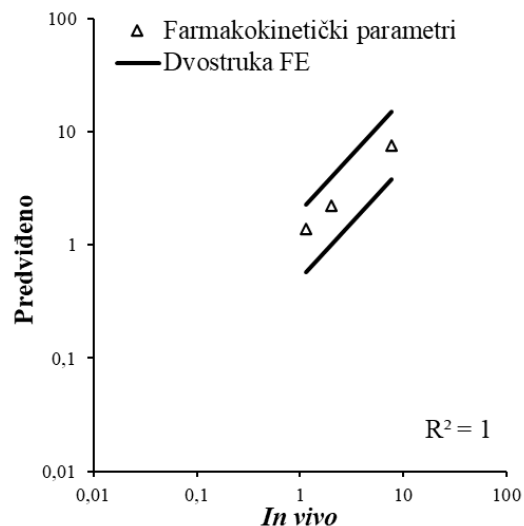
Za predviđeni profil koncentracije budesonida u plazmi (Slika 4.72) izračunata je vrednost  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (7,54 ng h/mL), koja je odgovarala *in vivo* uočenoj vrednosti (7,75 ng h/mL; Edbacker i sar. (2002)). Sa druge strane, predviđena vrednost  $C_{max}$  je bila nešto viša od srednje *in vivo* uočene vrednosti, no i ova vrednost ulazi u opseg *in vivo* uočenih individualnih vrednosti datog parametra (Tabela 4.22). Takođe, sa Slike 4.73 može se primetiti da su predviđeni farmakokinetički parametri bili u opsegu dvostrukih srednjih *in vivo* vrednosti, pri čemu je dobijena maksimalna vrednost koeficijenta determinacije. Ovo znači da je model uspešno opisao apsorpciju budesonida nakon peroralne primene IR kapsula.



**Slika 4.72.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Edsbäcker i sar., 2002) profili koncentracije budesonida u plazmi nakon peroralne primene IR kapsula (4,82 mg budesonida) kod čoveka

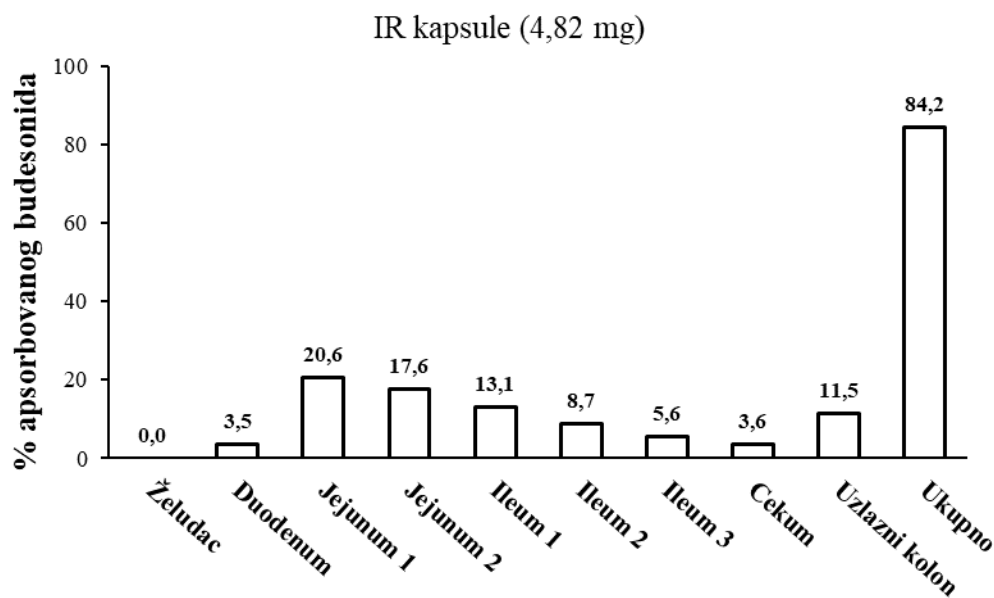
**Tabela 4.22.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Edsbäcker i sar., 2002) farmakokinetički parametri budesonida nakon peroralne primene IR kapsula (4,82 mg budesonida)

Parametar	<i>In vivo</i> (SV)	<i>In vivo</i> opseg	Predviđeno	FE
$C_{max}$ (ng/mL)	1,14	0,65-1,64	1,39	1,22
$t_{max}$ (h)	2,00	1,00-4,00	2,24	1,12
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	7,61	6,11-9,39	7,54	0,99
F (%)	/	/	12,57	/



**Slika 4.73.** Poređenje između *in vivo* uočenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (trouglasti markeri), gde linije predstavljaju dvostruku vrednost FE za *in vivo* uočene farmakokinetičke parametre za peroralnu primenu IR kapsula budesonida

Predviđena biološka raspoloživost  $F(\%)$  budesonida nakon peroralne primene IR kapsula iznosila je 12,56%, što je u skladu sa podacima iz literature koji pokazuju da je biološka raspoloživost budesonida nakon peroralne primene 10-11% (Boobis, 1998; Derendorf i sar., 1998). Na Slici 4.74 prikazana je predviđena regionalna apsorpcija budesonida nakon peroralne primene IR kapsula u GIT-u. Može se uočiti da se u gornjim delovima tankog creva apsorbovalo ukupno 41,7% budesonida, dok se počevši od ileuma do uzlaznog kolona apsorbovalo oko 42,5%, računato u odnosu na primenjenju dozu.



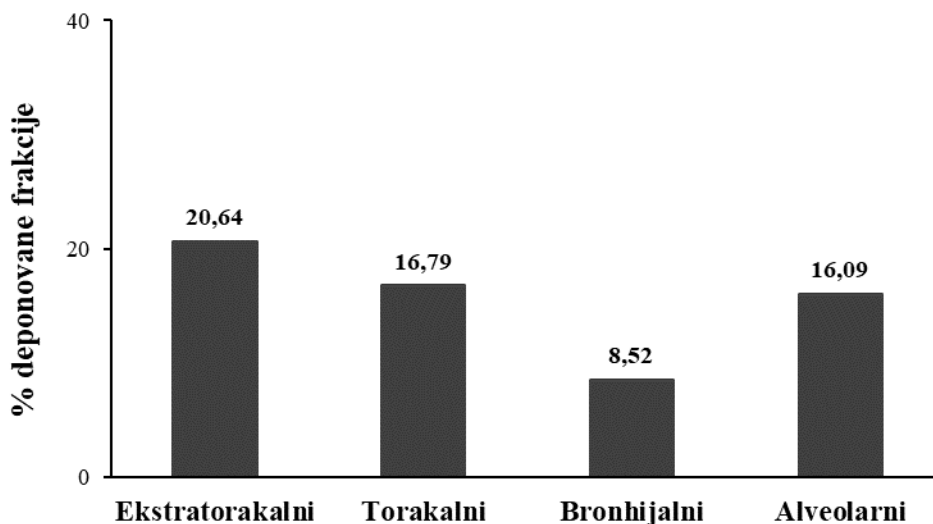
**Slika 4.74.** Predviđena regionalna apsorpcija budesonida nakon peroralne primene IR kapsula (4,82 mg budesonida) u GIT-u

Na osnovu svih prikazanih rezultata, može se zaključiti da je izgrađeni model adekvatno opisao apsorpciju i raspodelu budesonida kod čoveka, te je mogao biti korišćen za dalja predviđanja apsorpcije i raspodele budesonida nakon inhalacione primene.

#### 4.4.2.2. Razvoj i primena *in silico* modela za predviđanje apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenog budesonida kod čoveka

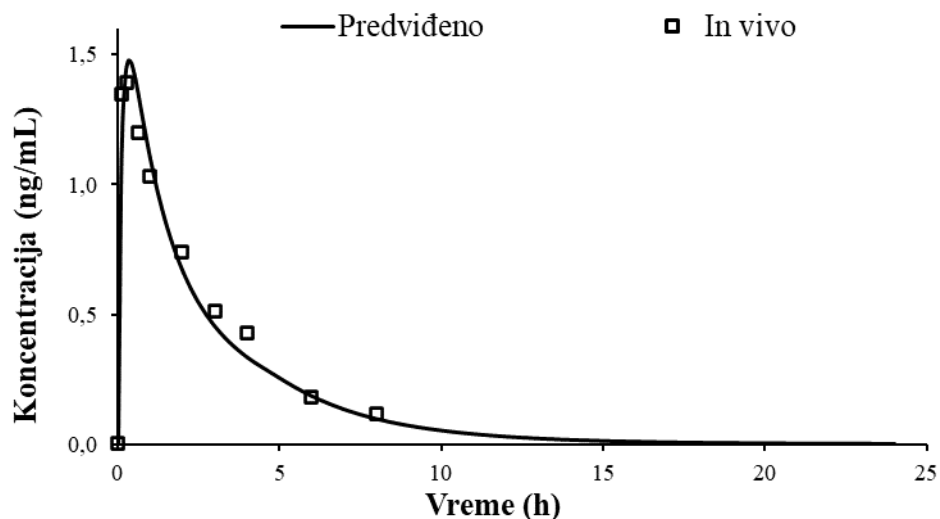
##### Izgradnja i validacija modela za inhalacionu primenu

Prilikom razvoja modela za inhalacionu primenu korišćeni su ulazni podaci o depoziciji budesonida nakon primene Pulmicort® Turbuhaler®-a, dobijeni primenom ICRP66 - *custom* modela za predviđanje depozicije u GastroPlus™ softveru (Slika 4.75). Odnos frakcija deponovanog budesonida u perifernoj i centralnoj zoni pluća (P/C odnos) iznosio je 0,96. Sličan P/C odnos (0,95) dobijen je i u *in vivo* studiji određivanja depozicije budesonida nakon primene Pulmicort® Turbuhaler®-a kod ljudi (Borgström i sar., 1994).



**Slika 4.75.** ICRP66 - *custom* predviđena depozicija budesonida nakon primene Pulmicort® Turbuhaler®-a (pri protoku vazduha od 60 L/min); ostatak do 100% predstavlja izdahnutu frakciju leka

Na Slici 4.76 prikazani su predviđeni i srednji *in vivo* uočeni profil koncentracije budesonida u plazmi nakon primene praška za inhalaciju sa budesonidom (Pulmicort® Turbuhaler®). Može se uočiti da je postignuto dobro poklapanje predviđenog profila koncentracije budesonida u plazmi i *in vivo* profila (Thorsson i sar., 1994). Dodatno, predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara  $C_{max}$  i  $t_{max}$  su bile vrlo slične srednjim *in vivo* uočenim vrednostima ovih parametara, dok je predviđena vrednost  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  bila nešto niža u poređenju sa *in vivo* uočenom vrednošću. Ovo je potvrđeno i na osnovu izračunatih vrednosti FE, koje su bile bliske 1 (Tabela 4.23).



**Slika 4.76.** Predviđeni i in vivo uočeni (Thorsson i sar., 1994) profili koncentracije budesonida u plazmi nakon primene Pulmicort® praška za inhalaciju (1 mg budesonida) kod čoveka

**Tabela 4.23.** Predviđeni i in vivo uočeni (Thorsson i sar., 1994) farmakokinetički parametri budesonida nakon primene Pulmicort® praška za inhalaciju (1 mg budesonida) kod čoveka

Parametar	In vivo	Predviđeno	FE
$C_{max}$ (ng/mL)	1,39	1,48	1,06
$t_{max}$ (h)	0,31	0,32	1,03
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	4,48	4,14	0,92
F (%)	/	33,78	/

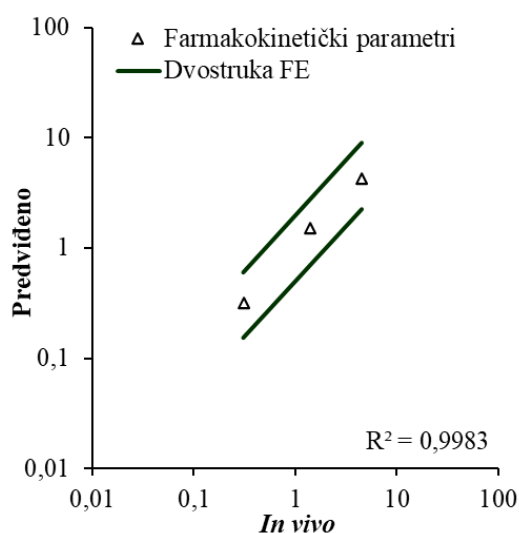
Međutim, ono što je problematično kod ICRP66 - *custom* predviđene depozicije budesonida nakon primene Pulmicort® Turbuhaler®-a (Slika 4.75) je nešto veća izdahnutu frakcija leka, kao i dosta manja frakcija deponovanog leka u ekstratorakalnom regionu u odnosu na *in vivo* uočene deponovane frakcije leka. Naime, u literaturi je, u zavisnosti od izvora, prikazano da od 19% do 30% Pulmicort®-a ostaje u inhalatoru, što znači da ta frakcija praška nije dostupna za depoziciju u respiratornom traktu (Borgström i sar., 1994; Thorsson i sar., 1994; Pitcairn i sar., 2005), a da se čak do 57,9% može deponovati u ekstratorakalnom delu (Yang i sar., 2014), dok samo minimalan procenat leka (oko 1%) biva izdahnut (Borgström i sar., 1994). Stoga su ulazne vrednosti za depoziciju čestica inhaliranog budesonida u regionima pluća dalje optimizovane, kako bi se slagale sa *in vivo* uočenim podacima za deponovane frakcije Pulmicort®-a u plućima. Finalna ekstratorakalna frakcija budesonida je povećana za 10%, a sa ciljem da se ujedno smanji i izdahnutu frakcija, tako da je na kraju dobijeno da izdahnutu frakcija iznosi 27,96%.

Rezultati predviđanja apsorpcije budesonida, pri čemu je korišćena modifikovana depozicija Pulmicort®-a (ICRP66<sub>mod</sub>) kao ulazni podatak za simulacije, prikazani su u Tabeli 4.24. Može se uočiti da je predviđena vrednost  $C_{max}$  (Tabela 4.24) bila nešto viša u odnosu na *in vivo* uočenu vrednost, kao i u odnosu na predviđenu vrednost  $C_{max}$  dobijenu na osnovu ICRP66 - *custom* depozicije Pulmicort®-a (Tabela 4.23). Sa druge strane, predviđena vrednost  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  je u ovom slučaju bila približnija *in vivo* uočenoj vrednosti, što se manifestovalo i vrednošću FE (0,96), koja je sada bila bliža 1 (Tabela 4.24). Pored toga, sva tri predviđena farmakokinetička parametra su bila u opsegu dvostrukih *in vivo* uočenih vrednosti (Slika 4.77). Dodatno, predviđena sistemska biološka raspoloživost (F(%)) budesonida, kao i apsorbovana frakcija budesonida u plućima, bile su vrlo slične srednjim *in vivo* dobijenim vrednostima, mada je ustanovljena velika *in vivo* varijabilnost ova dva parametra (*in vivo* opseg vrednosti biološke

raspoloživosti budesonida je bio 23-62%, a apsorbovane frakcije budesonida u plućima 16-59%) (Thorsson i sar., 1994). S obzirom na to da je uspješnije predviđanje  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (manja FE vrednost) postignuto kada je kao ulazni podatak korišćena ICRP66<sub>mod</sub> depozicija Pulmicort<sup>®</sup>-a, ova depozicija korišćena je i za dalja predviđanja apsorpcije i raspodele budesonida nakon inhalacione primene.

**Tabela 4.24.** Predviđeni (na osnovu ICRP66<sub>mod</sub> depozicije) i in vivo uočeni (Thorsson i sar., 1994) farmakokinetički parametri budesonida nakon inhalacione primene Pulmicort<sup>®</sup>-a (1 mg budesonida)

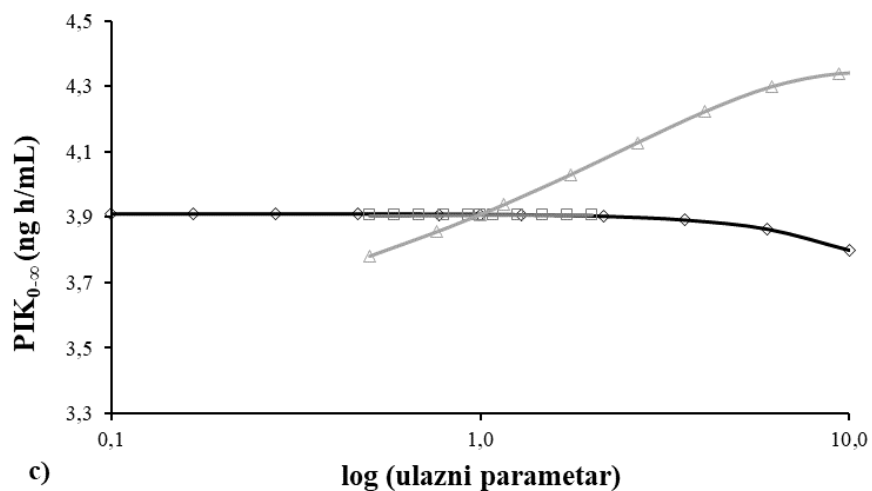
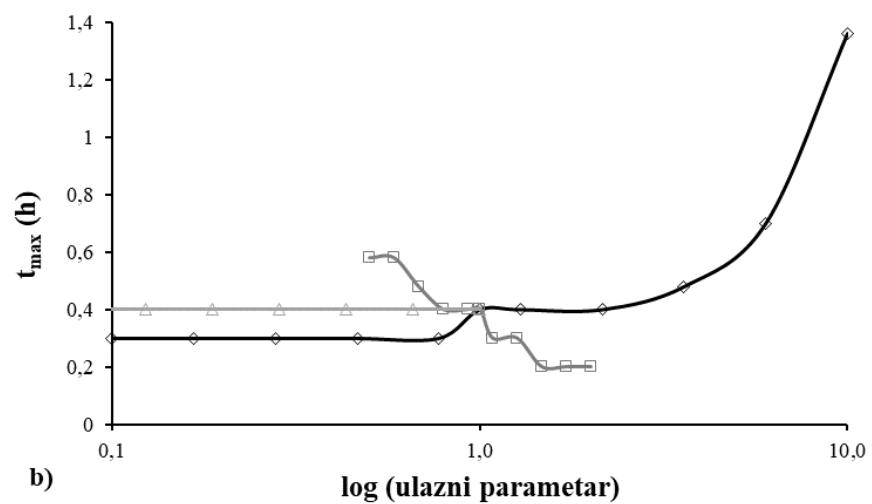
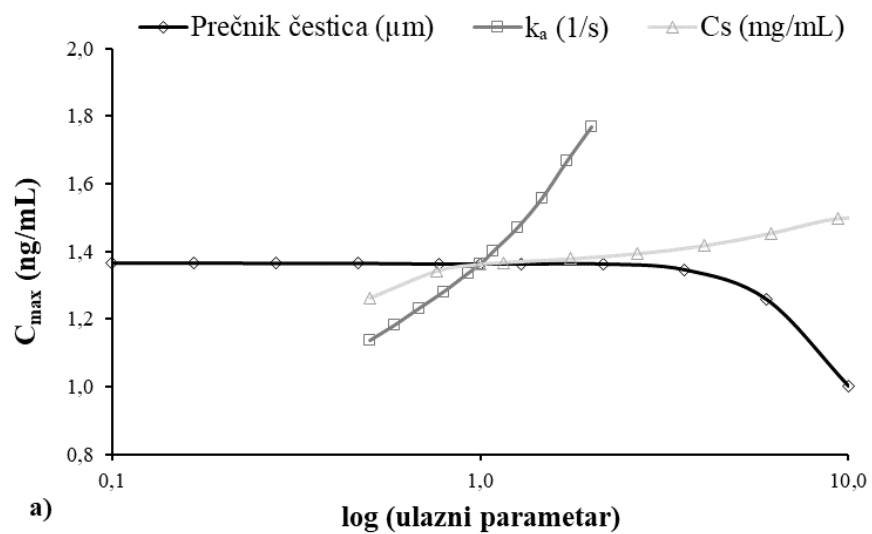
Parametar	In vivo	Predviđeno (ICRP66 <sub>mod</sub> depozicija)	FE
$C_{max}$ (ng/mL)	1,39	1,51	1,09
$t_{max}$ (h)	0,31	0,32	1,03
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	4,48	4,32	0,96
F (%)	38,00	35,25	/
$F_{pluća}$ (%)	32,00	28,90	/



**Slika 4.77.** Poređenje između in vivo uočenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (trouglasti markeri), gde linije predstavljaju dvostruku vrednost FE za in vivo uočene farmakokinetičke parametre nakon primene Pulmicort<sup>®</sup> praška za inhalaciju (ICRP66<sub>mod</sub> depozicija)

#### Primena modela za inhalacionu primenu

Razvijeni model za inhalacionu primenu budesonida je najpre korišćen za identifikaciju ulaznih parametara koji imaju najveći uticaj na predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ ) primenom PSA simulacija. Rezultati PSA pokazali su da je konstanta brzine apsorpcije u plućima ( $k_a$ ) imala dominantan uticaj na  $t_{max}$  (SC = -0,90), a uticala je i na vrednost  $C_{max}$  (SC = 0,33) (Slika 4.78a). Slična zapažanja su opisana i kod modela za pacova (poglavlje 4.4.1.3). Prečnik čestica se takođe izdvojio kao ulazni parametar koji je imao izvestan uticaj (SC = 0,27) na  $t_{max}$  (Slika 4.78b). Ipak, veći porast  $t_{max}$  očekuje se tek ukoliko je srednji prečnik čestica veći od 10  $\mu m$ , što nije slučaj kod praškova za inhalaciju. Naime, kod ovakvih formulacija se strogo kontroliše veličina čestica tako da prečnik čestica uglavnom bude manji od 5  $\mu m$ . Ipak, problem može nastati usled potencijalnog stvaranja aglomerata čestica, što bi moglo da se odrazi na vrednost  $t_{max}$ . Stoga je pri razvoju formulacije praškova za inhalaciju sa budesonidom potrebno vršiti strogu kontrolu veličine čestica. Što se tiče stepena apsorpcije, određeni uticaj pokazala je rastvorljivost budesonida u plućnoj tečnosti, čije bi potencijalno povećanje dovelo do porasta vrednosti  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (Slika 4.78c).

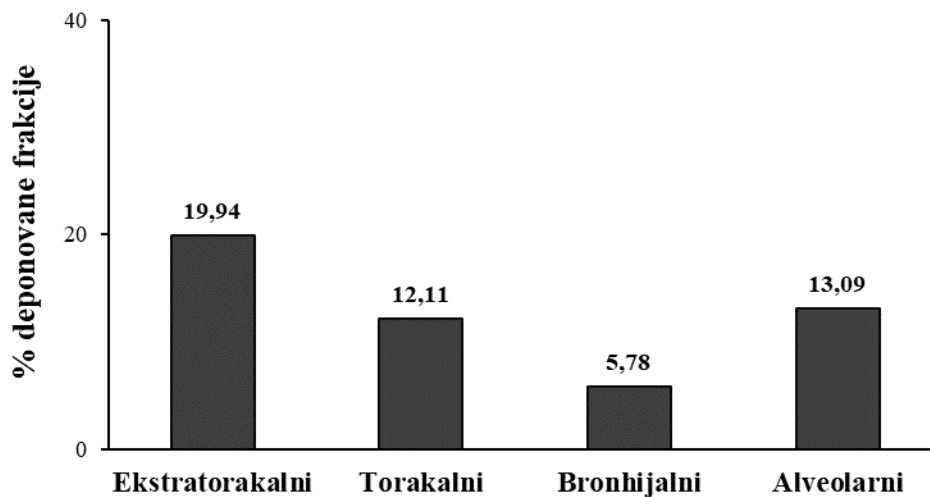


**Slika 4.78.** Rezultati PSA koji prikazuju uticaj različitih ulaznih parametara na predviđene vrednosti:  $C_{max}$  (a);  $t_{max}$  (b);  $PIK_{0-\infty}$  (c) budesonida, pri čemu su vrednosti ulaznih parametara na x-osi kodirane

Nakon identifikacije kritičnih faktora koji bi mogli da utiču na apsorpciju budesonida nakon primene praška za inhalaciju, model je korišćen za predviđanje depozicije, apsorpcije i raspodele budesonida nakon inhalacione primene tri eksperimentalne formulacije (BUD-PT, BUD-NC, BUD-NEM) kod čoveka.

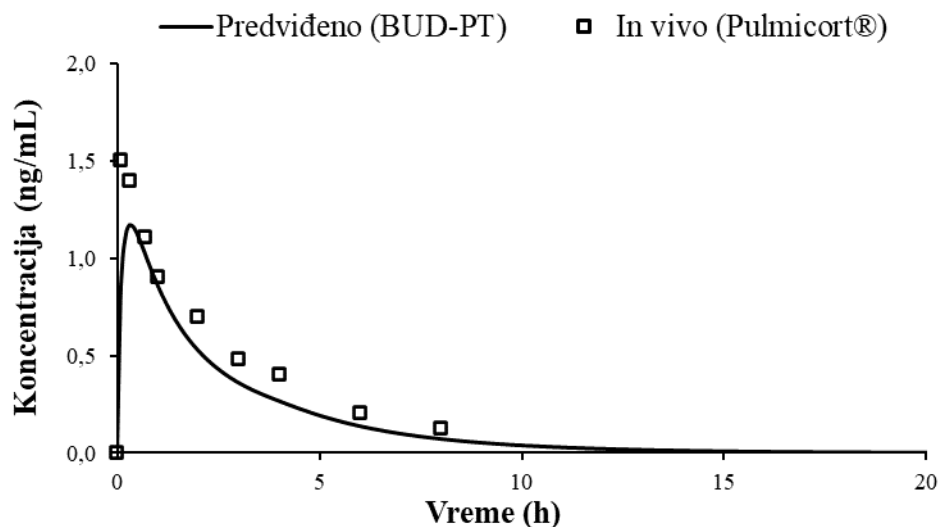
### BUD-PT

Depozicija čestica formulacije BUD-PT predviđena je pomoću ICRP66 - *custom* modela na osnovu eksperimentalno određenog aerodinamičkog prečnika, pri protoku vazduha od 60 L/min (Tabela 3.9). Rezultati ICRP66 - *custom* predviđene depozicije čestica BUD-PT prikazani su na Slici 4.79. Ono što je problematično kod predviđenih deponovanih frakcija čestica BUD-PT, kao i u slučaju predviđene depozicije Pulmicort<sup>®</sup>-a, je visok procenat izdahnutе frakcije (čak oko 50%). Zbog toga je predviđeni profil koncentracije budesonida u plazmi (na osnovu ICRP66 - *custom* ulaznog seta depozicije) bio niži u poređenju sa *in vivo* uočenim profilom za Pulmicort<sup>®</sup> (Slika 4.80). Usled ove razlike, *in silico* model nije mogao da adekvatno opiše apsorpciju i raspodelu budesonida nakon inhalacione primene BUD-PT. Naime, očekivano je bilo da predviđeni profil koncentracije budesonida u plazmi nakon primene BUD-PT bude vrlo sličan *in vivo* profilu budesonida nakon primene Pulmicort<sup>®</sup>-a, budući da su primenjene iste doza budesonida, a da formulacija BUD-PT predstavlja „uređenu smešu“ Pulmicort<sup>®</sup>-a i laktoze kao nosača.



**Slika 4.79.** ICRP66 - *custom* predviđena depozicija čestica formulacije BUD-PT; ostatak do 100% predstavlja izdahnutu frakciju praška za inhalaciju





**Slika 4.80.** *In vivo* uočeni (Pulmicort®, Thorsson i sar., 1994) i predviđeni (na osnovu ICRP66 - custom modela depozicije) profili koncentracije budesonida u plazmi nakon primene BUD-PT praška za inhalaciju (1 mg budesonida)

#### BUD-NC

U slučaju eksperimentalne formulacije BUD-NC, koja predstavlja suspenziju nanokristala budesonida, korišćena je veličina kapi kao ulazni parametar za predviđanje depozicije leka nakon inhalacione primene date formulacije kod čoveka. S obzirom na to da GastroPlus™ softver ne daje opciju izbora suspenzije za inhalaciju kao farmaceutskog oblika (opcije su samo prašak ili rastvor za inhalaciju), za simulacije je izabrana opcija praška za inhalaciju. Ovakav izbor se objašnjava time da će, nakon raspršivanja nanosuspenzije, čvrsti nanokristali budesonida biti suspendovani u vazduhu. Budući da je srednji prečnik kapi iznosio 27,9 μm, što softver prepoznaje kao veličinu čestica čvrste faze, ICRP66 - custom model je predvideo da se oko 50% kapljica formulacije BUD-NC deponuje u ekstratorakalnom regionu, uz zanemarljiv procenat depozicije u torakalnom regionu. Kao posledica ovakve depozicije, model je predvideo relativno niske vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ , uz odloženu vrednost  $t_{max}$  u odnosu na formulaciju BUD-PT, jer se celokupna količina primenjenog budesonida apsorbovala u GIT-u, a ne u plućima (Tabela 4.25).

**Tabela 4.25.** *Predviđeni (na osnovu ICRP66 - custom modela depozicije) farmakokinetički parametri budesonida nakon inhalacione primene formulacija BUD-NC i BUD-PT (1 mg budesonida)*

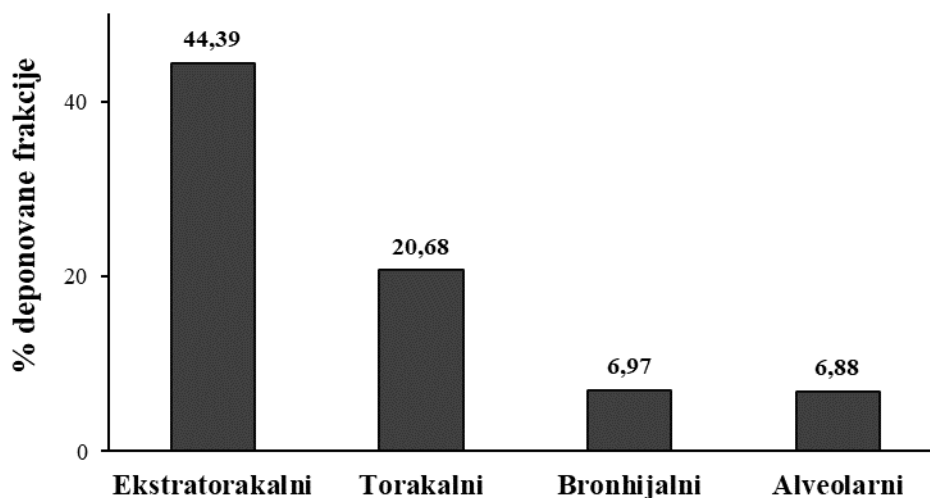
Parametar	Predviđeno (BUD-NC)	Predviđeno (BUD-PT)
$C_{max}$ (ng/mL)	0,32	1,17
$t_{max}$ (h)	0,88	0,32
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	1,00	3,26
F (%)	8,14	26,66
$F_{pluća}$ (%)	0,30	22,50

Bitno je napomenuti da je, u slučaju BUD-NC formulacije, korišćena ista  $k_a$  vrednost kao u slučaju BUD-PT formulacije, s obzirom na to da su ustanovljene jednake MDT i MAT vrednosti budesonida za ove dve formulacije. Dodatno, validacijom modela za pacova ustanovljeno je da su se jednake  $k_a$  vrednosti za ove dve formulacije (BUD-PT i BUD-NC) pokazale kao odgovarajuće za predviđanje apsorpcije budesonida kod pacova. Ipak, model je predvideo lošije bioperformanse

BUD-NC u poređenju sa BUD-PT formulacijom kod ljudi, za razliku od situacije kod pacova. Međutim, u nedostatku *in vivo* vrednosti, *in silico* model koji predviđa apsorpciju i distribuciju budesonida nakon inhalacione primene BUD-NC formulacije kod ljudi nije bilo moguće validirati, stoga nije moguće utvrditi ni njegovu pouzdanost predviđanja.

### BUD-NEM

Depozicija čestica eksperimentalne formulacije BUD-NEM u respiratornom traktu čoveka je takođe predviđena pomoću ICRP66 - *custom* modela. Rezultati su prikazani na Slici 4.81. U ovom slučaju model je, pak, dao realnija predviđanja izdahnutе frakcije, koja je iznosila oko 20%.

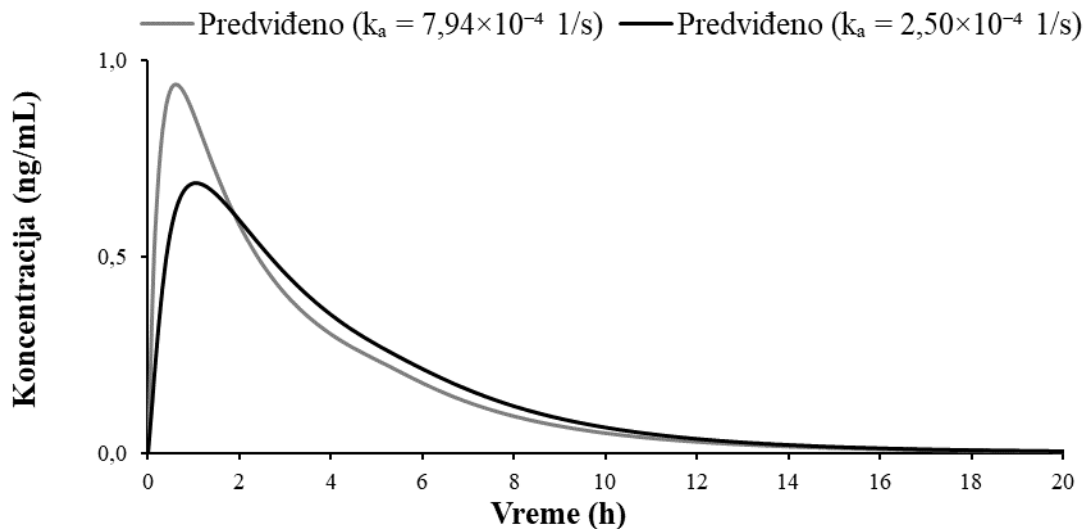


**Slika 4.81.** ICRP66 - *custom* predviđena depozicija čestica formulacije BUD-NEM; ostatak do 100% predstavlja izdahnutu frakciju praška za inhalaciju

U slučaju BUD-NEM praška za inhalaciju ispitivan je i uticaj različite  $k_a$  vrednosti na apsorpciju budesonida. Ovaj uticaj je ispitivan jer je simulacijama apsorpcije budesonida kod pacova utvrđeno da je niža  $k_a$  vrednost u slučaju BUD-NEM formulacije sa modifikovanim oslobađanjem budesonida u poređenju sa  $k_a$  vrednošću za druge dve formulacije (BUD-PT i BUD-NC) adekvatnije opisala apsorpciju ove lekovite supstance. Nižom konstantom brzine apsorpcije  $k_a$  ( $2,50 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) je u stvari simulirana sporija brzina rastvaranja budesonida iz formulacije BUD-NEM, s obzirom na to da nije bilo moguće koristiti *in vitro* profil brzine rastvaranja lekovite supstance iz praška za inhalaciju kao ulazni parametar u GastroPlus™ softveru.

Rezultati simulacija apsorpcije i raspodele budesonida nakon inhalacione primene BUD-NEM prikazani su na Slici 4.82 i u Tabeli 4.26. Predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  i  $F_{\text{pluća}} (\%)$  su jednake za različite ulazne  $k_a$  vrednosti budesonida nakon inhalacione primene BUD-NEM, dok su razlike uočene u slučaju  $C_{\text{max}}$  i  $t_{\text{max}}$  vrednosti (Tabela 4.26). Međutim, obe konstante brzine apsorpcije budesonida u slučaju BUD-NEM formulacije rezultirale su većom vrednošću  $t_{\text{max}}$  lekovite supstance u odnosu na  $t_{\text{max}}$  budesonida nakon primene ostalih ispitivanih formulacija. Odnosno, simulacije su pokazale da bi inhalacionom primenom mukoadhezivnih formulacija, kao što je BUD-NEM potencijalno bilo moguće postići sporije rastvaranje i produženu apsorpciju budesonida i kod čoveka, kao što je uočeno i kod pacova. Pokazano je i da je primenjenim pristupom menjanja  $k_a$  vrednosti moguće okvirno simulirati razlike u brzini rastvaranja nisko rastvorljive lekovite supstance. Ovakav

pristup nije idealan budući da brzina rastvaranja lekovite supstance nije jedini faktor koji se može odraziti na konstantu brzine apsorpcije. Međutim, ograničenje PCAT™ modela je u tome što trenutno nije moguće drugačije simulirati primenu mukoadhezivnih formulacija jer nije moguće produžiti vreme zadržavanja leka u plućima, niti uzeti u obzir uticaj potencijalno produžene brzine rastvaranja lekovite supstance u plućima na apsorpciju inhalaciono primenjenih lekova.



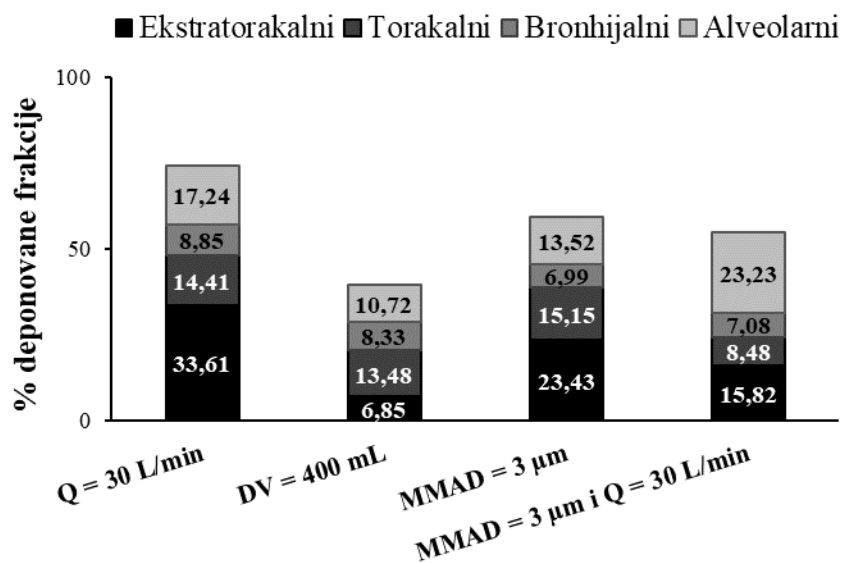
**Slika 4.82.** Predviđeni (na osnovu ICRP66 - custom modela depozicije) profili koncentracije budesonida u plazmi nakon primene BUD-NEM praška za inhalaciju sa budesonidom (1 mg)

**Tabela 4.26.** Predviđeni (na osnovu ICRP66 - custom modela depozicije) farmakokinetički parametri budesonida nakon inhalacione primene BUD-NEM praška za inhalaciju sa budesonidom (1 mg)

Parametar	Predviđeno ( $k_a = 7,94 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )	Predviđeno ( $k_a = 2,50 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )
$C_{\max}$ (ng/mL)	0,94	0,68
$t_{\max}$ (h)	0,64	1,04
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	3,37	3,33
F (%)	27,48	27,18
$F_{\text{pluća}}$ (%)	18,60	18,30

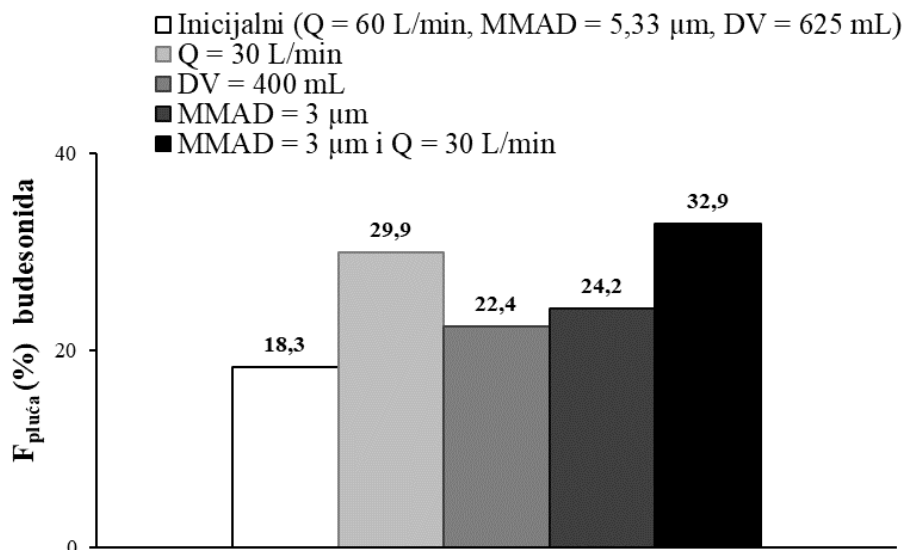
Može se zaključiti da su, u slučaju BUD-NEM formulacije, simulacije predvidele najduže  $t_{\max}$  budesonida ukazujući na potencijal ove formulacije da omogući produženu apsorpciju lekovite supstance. Sprovedene su dodatne simulacije apsorpcije i raspodele lekovite supstance kako bi se ispitalo koji bi faktori potencijalno mogli da doprinesu većoj depoziciji čestica BUD-NEM u humanim plućima i posledično većoj apsorbovanoj frakciji budesonida u plućima. Naime, ispitan je uticaj varijacija u ulaznim parametrima (faktorima formulacije i fiziološkim faktorima) na depoziciju čestica formulacije BUD-NEM u plućima. Prvo je ispitan uticaj manjeg protoka vazduha ( $Q = 30 \text{ L/min}$ ) na depoziciju i posledično apsorpciju budesonida iz formulacije BUD-NEM. Zatim je ispitan uticaj manjeg disajnog volumena ( $DV = 400 \text{ mL}$ ), jer je utvrđeno da je GastroPlus™ default vrednost za ovaj parametar znatno viša od vrednosti koje se navode u literaturi. Naime, prosečne fiziološke vrednosti disajnog volumena iznose oko 400 mL za žene, odnosno 500 mL za muškarce (Hallett i sar., 2022), mada ova vrednost varira u opsegu 5-8 mL/kg, zavisnosti od literaturnog izvora, dok GastroPlus™ default vrednost za disajni volumen iznosi čak 625 mL. Ispitan je i uticaj manje MMAD vrednosti ( $3 \mu\text{m}$ ) na depoziciju čestica formulacije BUD-NEM, kao ključnog CQA praškova za inhalaciju.

Rezultati *in silico* predviđene depozicije čestica formulacije BUD-NEM u zavisnosti od promene ulaznih parametara prikazani su na Slici 4.83. Uočava se da je smanjenje protoka vazduha sa 60 L/min (Slika 4.81) na 30 L/min (Slika 4.83) dovelo do velikog porasta u deponovanoj frakciji čestica BUD-NEM u alveolarnom delu. Ovo znači da bi sporijim disanjem pacijent potencijalno mogao da doprinese većoj deponovanoj frakciji čestica BUD-NEM u donjim delovima plućima. Porast deponovane frakcije čestica BUD-NEM u alveolama uočen je i u slučaju manjeg disajnog volumena i manje MMAD vrednosti, ali ova promena nije bila toliko izražena kao u slučaju manjeg protoka vazduha. Smanjenje disajnog volumena sa 625 mL na 400 mL dovelo je do generalnog smanjenja deponovanih frakcija leka u svim regionima pluća izuzev alveolarnog (Slike 4.81 i 4.83). Manja MMAD vrednost je takođe rezultovala manjim frakcijama deponovanog leka u ekstratorakalnom i torakalnom regionu, što je i očekivano, budući da se u ovim regionima dominantno deponuju čestice veće od 5  $\mu\text{m}$ . Kako su manji protok vazduha od 30 L/min i MMAD od 3  $\mu\text{m}$  doprineli najznačajnijem porastu deponovane frakcije leka u alveolarnom delu, simuliran je zbirni uticaj ova dva faktora na depoziciju čestica BUD-NEM u plućima. Uočen je porast deponovane frakcije leka u alveolama sa 6,88% na čak 23,23% (Slika 4.83).



**Slika 4.83.** Predviđena depozicija čestica formulacije BUD-NEM pomoću ICRP66 - custom modela u slučaju: manjeg protoka vazduha ( $Q = 30 \text{ L/min}$ ), manjeg disajnog volumena ( $DV = 400 \text{ mL}$ ), manjeg aerodinamičkog prečnika ( $MMAD = 3 \mu\text{m}$ ) i zbirnog uticaja manje MMAD vrednosti i manjeg protoka vazduha

Najveća deponovana frakcija čestica BUD-NEM u alveolama u slučaju manjeg protoka vazduha i manje MMAD vrednosti (Slika 4.83) dovela je očekivano i do najveće apsorbovane frakcije budesonida u plućima (32,9%), što je prikazano na Slici 4.84. Uočava se da bi se ovom kombinacijom faktora potencijalno mogla postići najviša apsorbovana frakcija budesonida u plućima nakon inhalacione primene BUD-NEM u odnosu na ostale ispitivane formulacije, ukazujući na to da bi dalji razvoj formulacije BUD-NEM trebalo da ide u smeru smanjenja MMAD vrednosti pri protoku vazduha od 30 L/min, uz odabir odgovarajućeg inhalatora. Simulacije su pokazale da bi se inhalacionom primenom optimizovane formulacije BUD-NEM potencijalno mogao postići jednak ili čak veći procenat apsorbovanog budesonida u plućima, uz produženu apsorpciju budesonida, u poređenju sa komercijalnim preparatom za inhalaciju, Pulmicort®-om. Prednost unapređene formulacije BUD-NEM ogleda se u mogućnosti za ređim doziranjem budesonida i poboljšanjem komplijanse pacijenata.



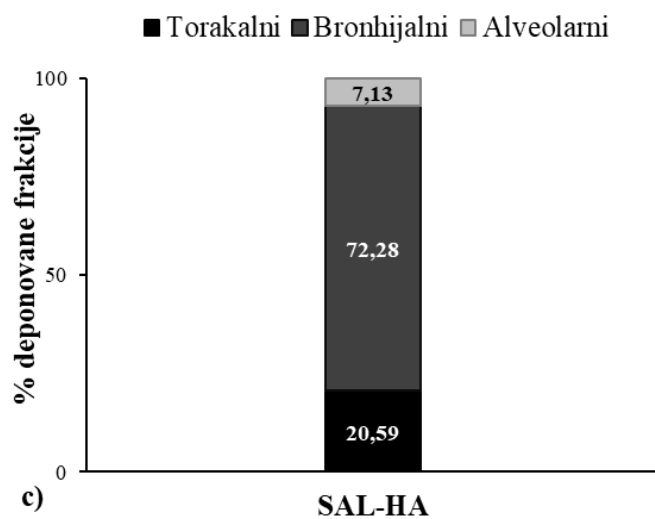
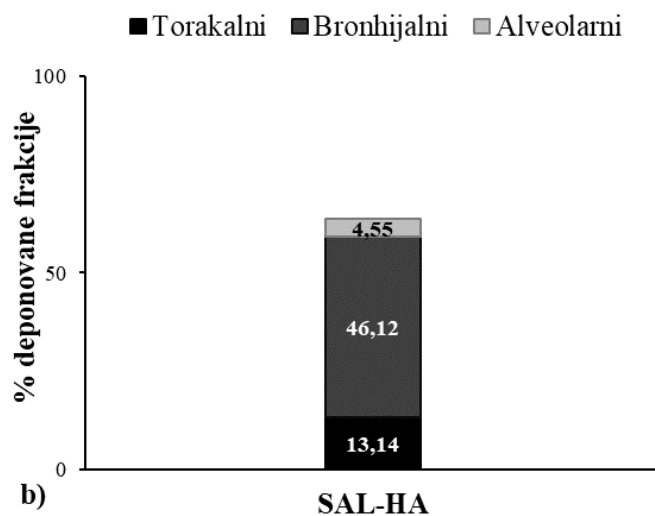
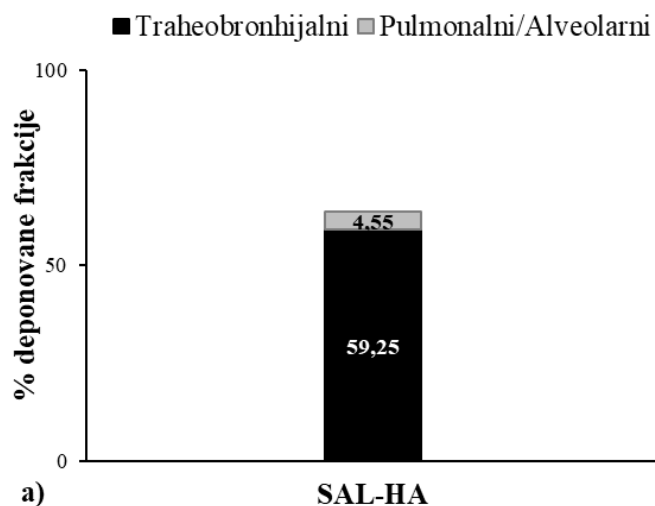
**Slika 4.84.** Predviđena apsorpcija budesonida u plućima nakon primene formulacije BUD-NEM u slučaju: inicijalnih vrednosti parametara ( $Q = 60$  L/min,  $MMAD = 5,33$  µm,  $DV = 625$  mL), manjeg protoka vazduha ( $Q = 30$  L/min), manjeg disajnog volumena ( $DV = 400$  mL), manjeg aerodinamičkog prečnika ( $MMAD = 3$  µm) i zbirnog uticaja manje  $MMAD$  vrednosti i manjeg protoka vazduha

#### 4.4.3. Salbutamol-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod pacova

Razvoj salbutamol-specifičnog modela za predviđanje bioperformansi leka kod pacova podrazumevao je najpre predviđanje depozicije praška za inhalaciju (SAL-HA) pomoću *in silico* (MPPD) modela s obzirom na to da nisu dostupni *in vivo* podaci o depoziciji ove formulacije u plućima pacova, zatim izgradnju i validaciju modela za intravensku primenu i, na kraju, izgradnju modela za predviđanje bioperformansi praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata kod pacova.

##### 4.4.3.1. *In silico* predviđena depozicija praška za inhalaciju SAL-HA u plućima pacova

Depozicija praška za inhalaciju SAL-HA u plućima pacova predviđena je pomoću MPPD modela, na osnovu parametara iz Tabele 3.8. MPPD predviđena depozicija prikazana je na Slici 4.85a. MPPD predviđene frakcije u traheobronhijalnom i alveolarnom delu su, kao i kod budesonida, konvertovane u tri deponovane frakcije koje GastroPlus™ softver prepoznaje (Slika 4.85b). Dodatno, korišćena je opcija redistribucije deponovanih frakcija leka u GastroPlus™ softveru kako bi se postigla depozicija od 100% u plućima (Slika 4.85c). Depozicija sa Slike 4.85c je korišćena za predviđanje apsorpcije i distribucije salbutamola nakon inhalacione/intratrahealne primene SAL-HA kod pacova.



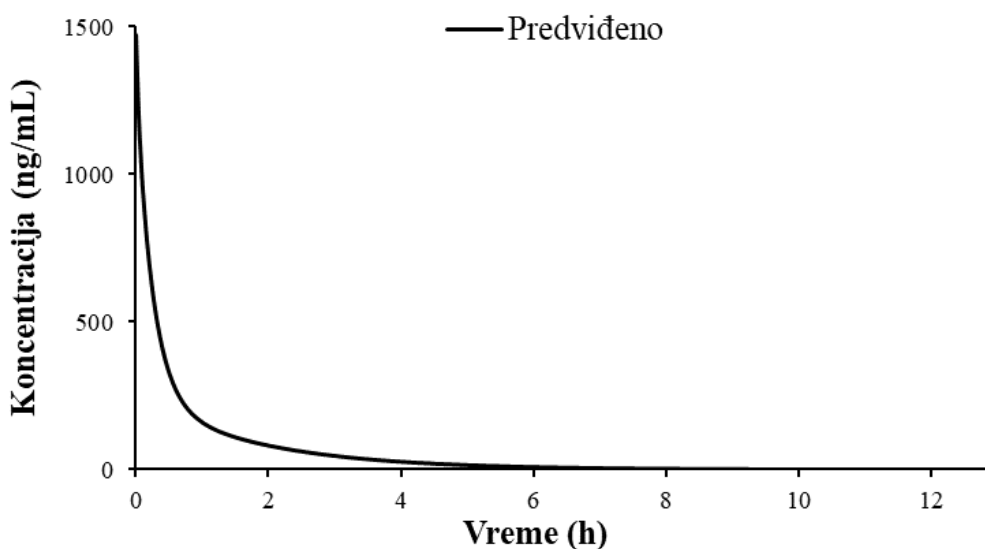
**Slika 4.85.** Depozicija čestica formulacije SAL-HA u plućima pacova: in silico (MPPD) predviđena depozicija (a); depozicija konvertovana iz MPPD modela u podatke koje „prepoznaje“ GastroPlus™ softver (b) in silico depozicija, koja je korišćena za simulacije u GastroPlus™ softveru (c)

#### 4.4.3.2. Izgradnja *in silico* modela za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola kod pacova

##### Model za intravensku primenu

Model za intravensku primenu salbutamola kod pacova izgrađen je na osnovu ulaznih parametara iz Tabele 3.14. Izabrana je fiziologija pacova „na gladno“ (engl. *Rat Fasted-State Physiology*) sa *default* vrednostima koje softver podrazumeva za fiziološke karakteristike organizma pacova. Korišćen je dvoprostorni farmakokinetički model jer je PKPlus™ analizom intravenskog profila koncentracije salbutamola u plazmi utvrđeno da se farmakokinetika salbutamola najbolje može opisati pomoću dvoprostornog modela. U literaturi se takođe navodi da se raspodela salbutamola kod pacova može opisati dvoprostornim modelom (Jones i Harrison, 2012). Pomoću PKPlus™ analize intravenskog profila koncentracije salbutamola u plazmi pacova dobijena je i vrednost za ukupni klirens salbutamola, koja je korišćena kao jedan od ulaznih parametara za simulacije. Vrednost volumena distribucije u centralnom prostoru je optimizovana na 1,7 L/kg, tako da se dobije odgovarajuće poluvreme eliminacije salbutamola, koje odgovara vrednostima ovog parametra objavljenih u literaturi. Jones i Harisson (2012) su utvrdili sličnu srednju vrednost  $V_c$  od 1,3 L/kg (opseg 0,9-1,7 L/kg) nakon intravenske primene salbutamola kod pacova. Dobijena vrednost poluvremena eliminacije, na osnovu unetih vrednosti klirensa, volumena distribucije i konstanti raspodele ( $k_{12}$  i  $k_{21}$ ), iznosila je 1,23 h. Wu i sar. su takođe dobili vrednost poluvremena eliminacije salbutamola kod pacova od 1,029 h (Wu i sar., 2011).

Simulirani profil koncentracije salbutamola nakon intravenske primene (Slika 4.86) validiran je poređenjem sa srednjim vrednostima farmakokinetičkih parametara salbutamola u plazmi pacova, dobijenim u *in vivo* studiji (nepublikovani podaci). Predviđena vrednost  $C_{max}$  je bila nešto viša u poređenju sa srednjom *in vivo* vrednošću (Tabela 4.27), što ukazuje na to da je realna vrednost  $C_{max}$  u *in vivo* studiji verovatno propuštena usled kasnog prvog uzorkovanja. Adekvatno slaganje predviđenog profila koncentracije salbutamola u plazmi sa *in vivo* podacima potvrđeno je na osnovu sličnih predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  i  $PIK_{0 \rightarrow t}$  salbutamola, kao i na osnovu greške predviđanja koja je bila blizu 1 za ova dva parametra (Tabela 4.27).



**Slika 4.86.** Predviđen profil koncentracije salbutamola u plazmi nakon primene intravenskog bolusa (0,50 mg salbutamol-sulfata) kod pacova

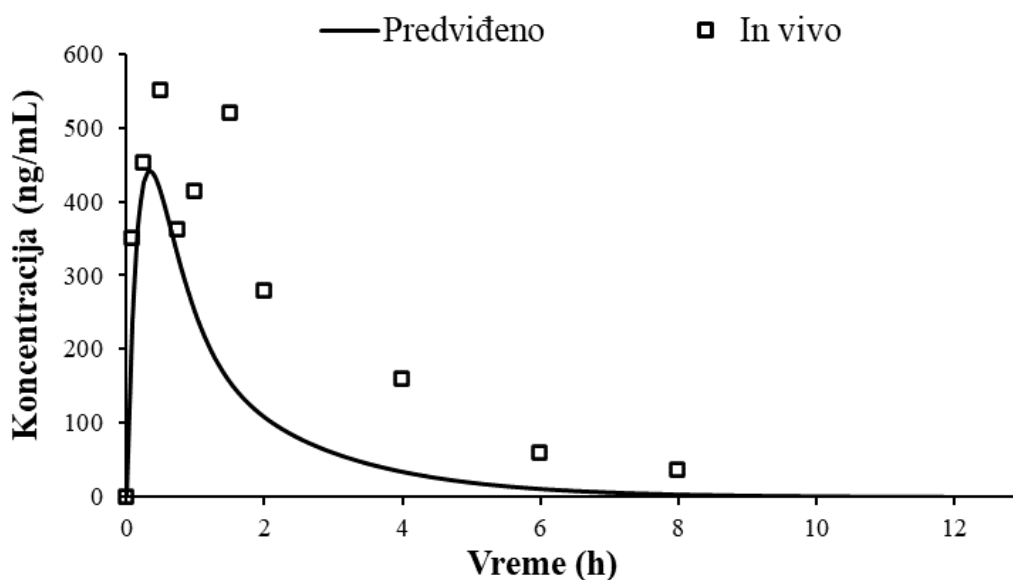
**Tabela 4.27.** Predviđeni i in vivo uočeni (nepublikovani podaci) farmakokinetički parametri salbutamola nakon primene intravenskog bolusa (0,5 mg salbutamol-sulfata)

Parametar	In vivo	Predviđeno	FE
$C_{max}$ (ng/mL)	1170,00	1470,60	1,25
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	722,79	714,05	0,99
$PIK_{0 \rightarrow t}$ (ng h/mL)	701,40	713,45	1,02

Izgrađen i validiran model za intravensku primenu korišćen je za izgradnju modela za inhalacionu/intratrahealnu primenu salbutamol-sulfata kod pacova.

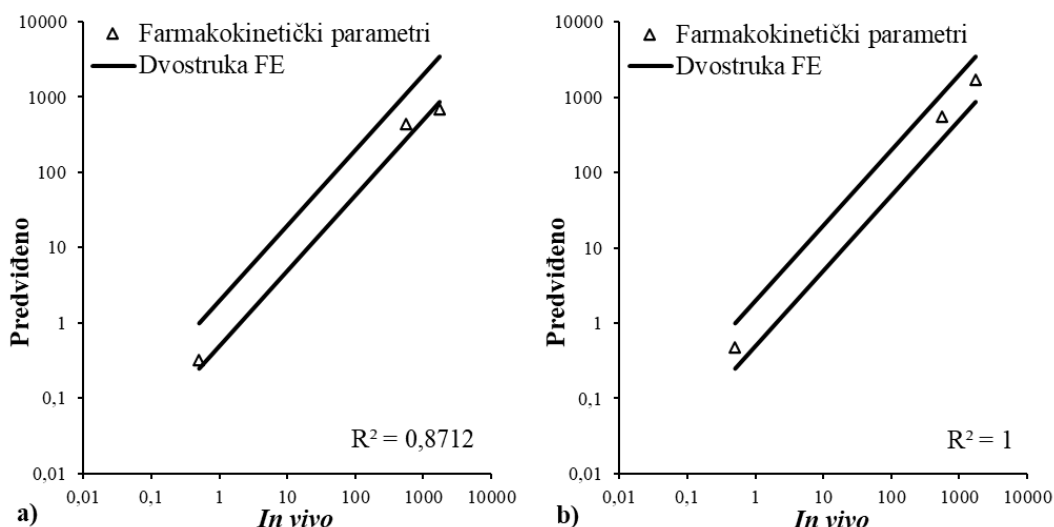
#### Model za inhalacionu primenu

Model za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola nakon intratrahealne primene formulacije SAL-HA generisan je na osnovu ulaznih podataka koji su korišćeni za izgradnju modela za intravensku primenu i dodatnih ulaznih podataka koji su neophodni za simulaciju performansi lekovite supstance u plućima (Tabela 3.14). Rezultati simulacija (Slika 4.87) pokazali su da se predviđeni profil koncentracije salbutamola u plazmi nakon intratrahealne primene SAL-HA nije slagao sa srednjim *in vivo* uočenim profilom, preuzetim iz studije koju su objavili Li i sar. (2017a). Tačnije, predviđene vrednosti  $C_{max}$  i  $t_{max}$  su bile dosta niže od *in vivo* vrednosti ovih parametara, mada su ušle u opseg dvostruke vrednosti FE (Slika 4.88a). Međutim, predviđena vrednost  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  se znatno razlikovala od *in vivo* uočene vrednosti, što je potvrđeno i na osnovu velike greške predviđanja (FE je iznosila 0,40; Tabela 4.28), pri čemu je predviđena vrednost  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  izašla iz opsega dvostruke vrednosti FE (Slika 4.88a). Niže vrednosti  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  ukazale su na mnogo bržu eliminaciju salbutamola predviđenu *in silico* simulacijama u odnosu na *in vivo* podatke koje su za model formulaciju SAL-HA dobili Li i sar. (2017a). Zbog toga je inicijalna vrednost ukupnog klirensa salbutamola ( $Cl = 0,70$  L/h) optimizovana i smanjena na hipotetičkih 0,28 L/h kako bi se utvrdilo da li je to razlog lošeg predviđanja modela.



**Slika 4.87.** Predviđeni i in vivo uočeni (Li i sar., 2017a) profili koncentracije salbutamola u plazmi nakon intratrahealne primene SAL-HA (0,50 mg salbutamol-sulfata) kod pacova





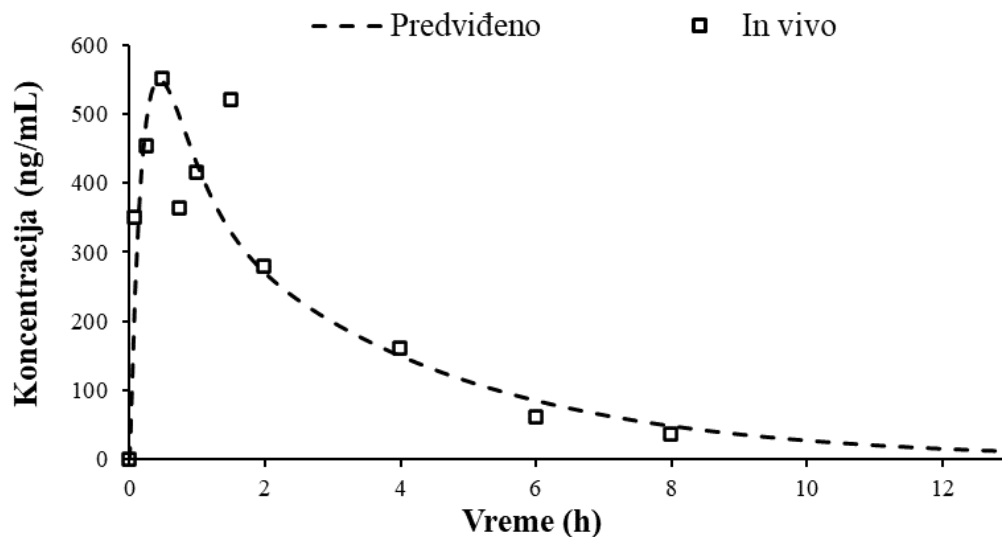
**Slika 4.88.** Poređenje između *in vivo* uočenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (trouglasti markeri) gde linije predstavljaju dvostruku vrednost FE za *in vivo* uočene farmakokinetičke parametre salbutamola nakon primene SAL-HA: na osnovu inicijalne vrednosti klirensa,  $Cl = 0,70$  L/h (a); na osnovu optimizovanog klirensa,  $Cl = 0,28$  L/h (b)

**Tabela 4.28.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Li i sar., 2017a) farmakokinetički parametri salbutamola nakon primene formulacije SAL-HA (0,5 mg salbutamol-sulfata) kod pacova

Parametar	<i>In vivo</i>	Predviđeno ( $Cl = 0,70$ L/h)	FE	Predviđeno ( $Cl = 0,28$ L/h)	FE
$C_{max}$ (ng/mL)	550,00	440,69	0,80	547,04	0,99
$t_{max}$ (h)	0,50	0,32	0,64	0,48	0,96
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	1754,20	693,71	0,40	1730,10	0,99
F (%)	/	97,09	/	96,87	/
$F_{pluća}$ (%)	/	94,90	/	94,87	/
$F_{GIT}$ (%)	/	2,19	/	2,00	/

Rezultati simulacija sa smanjenim klirensom salbutamola (0,28 L/h) pokazali su znatno bolje slaganje predviđenih vrednosti  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ ,  $C_{max}$  i  $t_{max}$  sa *in vivo* uočenim srednjim vrednostima ovih parametara, pri čemu se najveća promena u odnosu na predviđene farmakokinetičke parametre sa inicijalnim klirensom salbutamola mogla uočiti kod predviđene vrednosti  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (Slika 4.88b, Tabela 4.28). Profil koncentracije salbutamola u plazmi, predviđen na osnovu optimizovane vrednosti klirensa, se takođe znatno bolje slaže sa *in vivo* uočenim profilom (Slika 4.89). Međutim, i u ovom slučaju model je predvideo da se skoro kompletna deponovana frakcija lekovite supstance iz sva tri plućna regiona i apsorbovala u plućima, odnosno da je samo minimalan procenat salbutamola (2%) apsorbovan iz GIT-a (Tabela 4.28). Drugim rečima, model nije „prepoznao“ da se deo salbutamola apsorbovao iz GIT-a, što je jedna od mogućih hipoteza za prisustvo drugog  $C_{max}$  pika u *in vivo* profilu koncentracije salbutamola u plazmi. Jedan od razloga za to što model nije simulirao delimičnu apsorpciju salbutamola u GIT-u je taj što je na osnovu ulaznih podataka o depoziciji čestica aerosola predviđeno da se salbutamol-sulfat nakon primene formulacije SAL-HA uopšte nije deponovao u ekstratorakalnom regionu pluća pacova (Slika 4.85) (jer je preparat primenjen intratrahealno). Ovakav scenario je očekivan samo u slučaju visoko rastvorljivih lekovitih supstanci (kao što je salbutamol-sulfat) kod kojih rastvorljivost nije ograničavajući faktor za apsorpciju, pa se celokupna količina lekovite supstance koja se deponuje u plućima i apsorbuje preko epitela pluća. Za razliku od formulacije SAL-HA, u slučaju formulacije

BUD-PT apsorpcija budesonida je bila ograničena njegovom rastvorljivošću u plućnoj tečnosti i brzinom rastvaranja, tako da se samo deo deponovane frakcije budesonida u torakalnom regionu i apsorbovao preko pluća, dok je deo budesonida koji se nije dovoljno brzo rastvorio u plućnoj tečnosti, „očišćen“ mukocilijarnim klirensom, te bio progutan i apsorbovan iz GIT-a. Međutim, u slučaju intratrahealne primene visoko rastvorljivih lekovitih supstanci se ne očekuje da će doći do gutanja velikog procenta lekovite supstance i do njene apsorpcije u GIT-u. Stoga se može pretpostaviti da je drugi  $C_{max}$  pik u *in vivo* uočenom profilu koncentracije salbutamola u plazmi pacova posledica eksperimentalne greške, odnosno da je prilikom intratrahealne primene formulacije SAL-HA, deo lekovite supstance ostao u ustima pacova, koji je onda zatim progutan i apsorbovan iz GIT-a.



**Slika 4.89.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (*Li i sar., 2017a*) profili koncentracije salbutamola u plazmi nakon intratrahealne primene SAL-HA (0,50 mg salbutamol-sulfata) kod pacova sa smanjenom vrednošću klirensa ( $Cl = 0,28$  L/h)

#### 4.4.3.3. Skaliranje farmakokinetičkih parametara sa pacova na čoveka i određivanje humane $k_a$ vrednosti na osnovu $k_a$ vrednosti dobijene na modelu za pacova

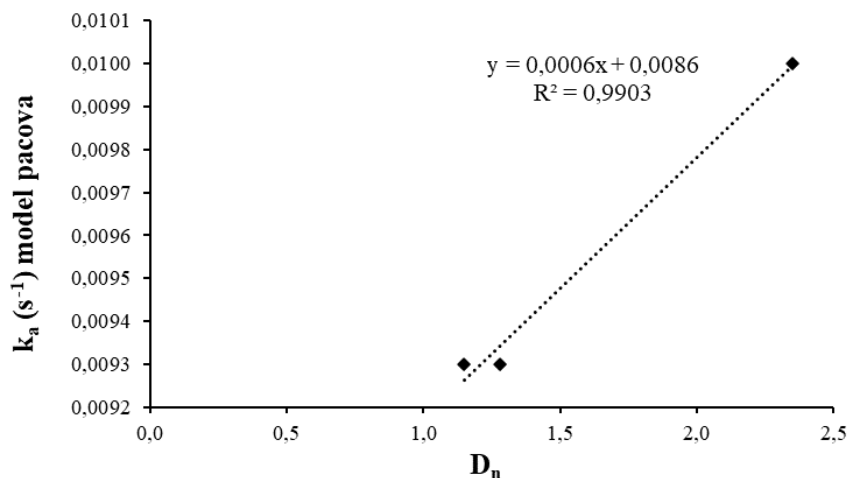
Validiran salbutamol-specifičan model za pacova korišćen je za skaliranje farmakokinetičkih parametara ( $Cl$ ,  $V_c$  i  $t_{1/2}$ ) sa modela za pacova na čoveka. U Tabeli 4.29 prikazane su vrednosti parametara koji opisuju farmakokinetiku salbutamola kod pacova, korišćenih za izgradnju salbutamol-specifičnog modela za pacova (Tabela 3.14), kao i vrednosti koje su dobijene njihovim skaliranjem na čoveka primenom jednačina 45-47.

**Tabela 4.29.** Skalirane vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $Cl$ ,  $V_c$ ,  $t_{1/2}$ ) sa pacova na čoveka

Parametar	Pacov	Čovek
$Cl$ (L/h)	0,70	28,00
$V_c$ (L)	0,34	68,00
$t_{1/2}$ (h)	1,23	4,92

Pored toga, salbutamol-specifičan model za pacova korišćen je za određivanje humane vrednosti  $k_a$  za formulaciju SAL-HA na osnovu  $k_a$  vrednosti ove formulacije dobijene na modelu za pacova. Salbutamol-specifičan model za pacova je, zajedno sa budesonid-specifičnim modelom za pacova,

korišćen za uspostavljanje korelacije između  $k_a$  vrednosti jedne eksperimentalne formulacije salbutamol-sulfata (SAL-HA) i dve eksperimentalne formulacije budesonida (BUD-NC i BUD-PT) dobijene na modelima za pacove sa parametrom  $D_n$ , koji opisuje *in vitro* brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz ove tri formulacije. Na osnovu uspostavljene korelacije najpre su određene  $k_a$  vrednosti eksperimentalnih formulacija praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica kod pacova. Vrednosti  $k_a$  salbutamola za formulacije praškova čvrstih lipidnih mikročestica (F1, F7, F9, F10 i F11) kod pacova određene su na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti parametra  $D_n$ , primenom jednačine uspostavljene korelacije prikazane na Slici 4.90. Dobijene vrednosti  $k_a$  salbutamola za praškove čvrstih lipidnih mikročestica kod pacova prikazane su u Tabeli 4.30.

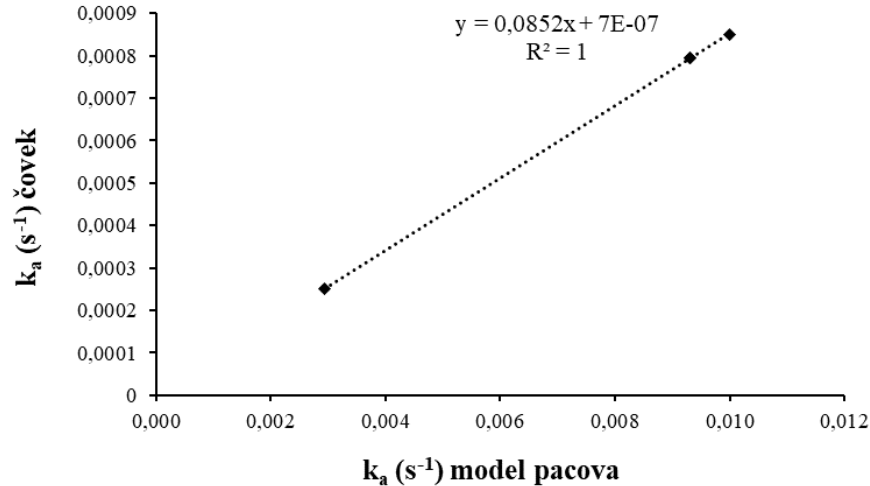


**Slika 4.90.** Korelacija između vrednosti  $k_a$  dobijenih na modelu pacova za SAL-HA, BUD-PT i BUD-NC (određenih na osnovu *in vivo* profila koncentracije lekovitih supstanci u plazmi pacova) i parametra  $D_n$ , koji opisuje *in vitro* brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz ove tri formulacije

**Tabela 4.30.** Dobijene vrednosti  $k_a$  na modelu pacova za praškove čvrstih lipidnih mikročestica

Formulacija	$D_n$	$k_a$ (s <sup>-1</sup> ) na osnovu $D_n$
F1	1,01	$9,206 \times 10^{-3}$
F7	1,22	$9,332 \times 10^{-3}$
F9	1,34	$9,404 \times 10^{-3}$
F10	1,02	$9,212 \times 10^{-3}$
F11	1,00	$9,202 \times 10^{-3}$

Pored navedenog, uspostavljena je i korelacija između  $k_a$  vrednosti jedne formulacije salbutamol-sulfata (SAL-HA) i tri formulacije budesonida (BUD-NC, BUD-PT, BUD-NEM), dobijenih na modelima za pacova, sa  $k_a$  vrednostima za ove četiri formulacije na ljudima (Slika 4.91).



**Slika 4.91.** Korelacija između vrednosti  $k_a$  dobijenih na modelu za pacova (određenih na osnovu *in vivo* profila koncentracije lekovitih supstanci u plazmi pacova) i  $k_a$  kod čoveka za SAL-HA, BUD-PT, BUD-NC, BUD-NEM;  $k_a$  vrednosti dobijene na modelu za pacova i čoveka za formulacije BUD-NC i BUD-PT se poklapaju

Konačno, na osnovu izračunatih  $k_a$  vrednosti salbutamola za formulacije čvrstih lipidnih mikročestica kod pacova (Tabela 4.30) i dobijene jednačine korelacije sa Slike 4.91, izračunate su vrednosti  $k_a$  salbutamola za formulacije čvrstih lipidnih mikročestica kod čoveka (Tabela 4.31), koje su u daljem postupku korišćene za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola nakon primene praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica kod čoveka.

**Tabela 4.31.** Dobijene vrednosti  $k_a$  salbutamola za praškove za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica kod čoveka

Formulacija	$k_a$ ( $s^{-1}$ ) čoveka
F1	$7,851 \times 10^{-4}$
F7	$7,958 \times 10^{-4}$
F9	$8,019 \times 10^{-4}$
F10	$7,856 \times 10^{-4}$
F11	$7,847 \times 10^{-4}$

#### 4.4.4. Salbutamol-specifičan model za predviđanje bioperformansi leka kod čoveka

##### 4.4.4.1. Izgradnja i validacija *in silico* modela za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola kod čoveka

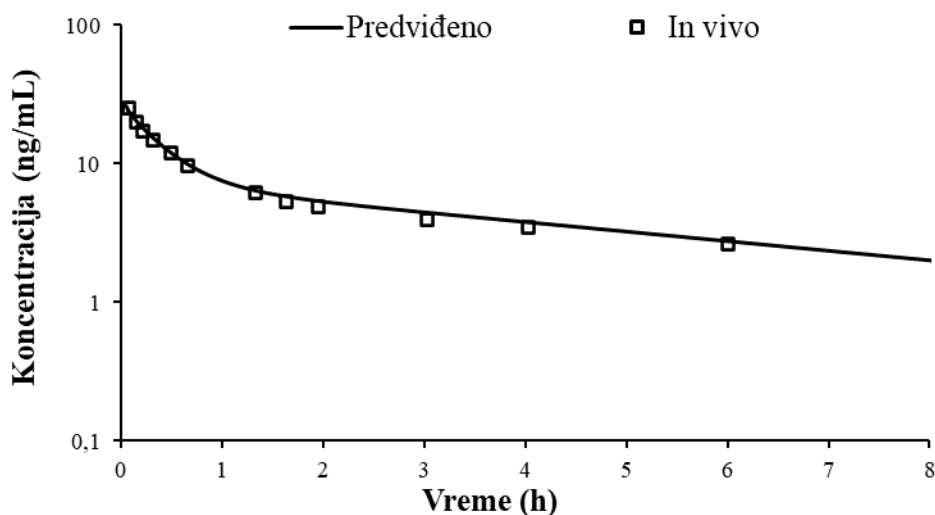
PKPlus™ analizom intravenskog profila koncentracije lekovite supstance u plazmi, preuzetog iz literature (Goldstein i sar., 1987), utvrđeno je da se farmakokinetika salbutamola kod čoveka najbolje može opisati dvoprostornim modelom, što je pokazano i kod pacova. Izračunata PKPlus™ vrednost  $V_c$  od 0,762 L/kg (odnosno 53,34 L za prosečnog dobrovoljca od 70 kg) odgovara rangu skalirane vrednosti ovog parametra sa pacova na čoveka (68 L), pri čemu prilikom skaliranja ovog parametra nije uzeta u obzir telesna težina čoveka (Tabela 4.29). Vrednost klirensa salbutamola kod ljudi (28 L/h), dobijena skaliranjem klirensa salbutamola kod pacova (Tabela 4.29), skoro je identična vrednosti ovog parametra preuzetog iz literature (28,8 L/h). Na osnovu unetih farmakokinetičkih parametara ( $Cl$ ,  $V_c$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ),

dobijeno je vreme polueliminacije od 4,28 h, koje je u skladu sa *in vivo* vrednostima zabeleženim u literaturi: 3,95 h (Goldstein i sar., 1987), 4,78 h (Powell i sar., 1985), 2,7-5,0 h (Walker i sar., 1972), 4,06-6,52 h (Jiang i sar., 2016) i 3,0-6,0 h (Du i sar., 2002). Takođe, dobijeno vreme polueliminacije salbutamola ( $t_{1/2} = 4,28$  h) je slično skaliranoj vrednosti ovog parametra sa pacova na čoveka ( $t_{1/2} = 4,93$  h) (Tabela 4.29). Opisani farmakokinetički parametri su, zajedno sa fizičko-hemijskim parametrima lekovite supstance (Tabela 3.15) i *default* vrednostima fizioloških karakteristika humanog organizma korišćeni za izgradnju modela za intravensku primenu salbutamola kod čoveka.

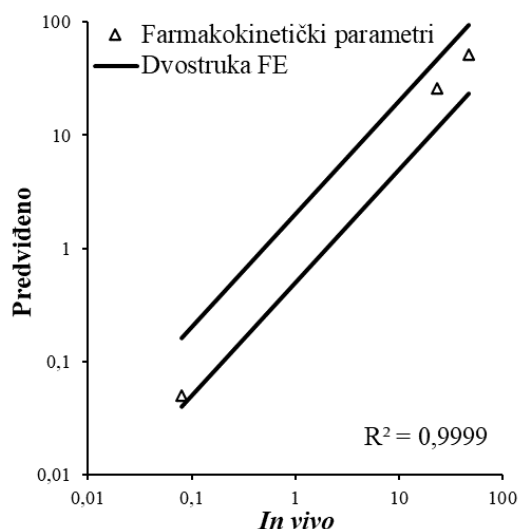
Rezultati predviđanja modela za intravensku primenu salbutamola prikazani su u Tabeli 4.32 i na Slici 4.92. Predviđeni farmakokinetički parametri su slični sa *in vivo* dobijenim srednjim vrednostima  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  salbutamola, iako se uočavaju malo više predviđene vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (Tabela 4.32). Simulirani profil koncentracije salbutamola u plazmi se u potpunosti slaže sa *in vivo* uočenim profilom (Slika 4.92), čime je potvrđeno da su izabrani farmakokinetički parametri ( $Cl$ ,  $V_c$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ) adekvatno opisali raspodelu i eliminaciju salbutamola kod čoveka. Takođe, dodatna potvrda da je model uspešno validiran je to što su predviđeni farmakokinetički parametri bili u opsegu dvostrukih srednjih *in vivo* vrednosti, pri čemu je dobijena visoka vrednost koeficijenta determinacije (Slika 4.93).

**Tabela 4.32.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Goldstein i sar., 1987) farmakokinetički parametri salbutamola nakon primene intravenske infuzije (1,50 mg)

Parametar	<i>In vivo</i>	Predviđeno	FE
$C_{max}$ (ng/mL)	23,13	25,88	1,12
$t_{max}$ (h)	0,08	0,05	0,63
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	46,92	51,85	1,11



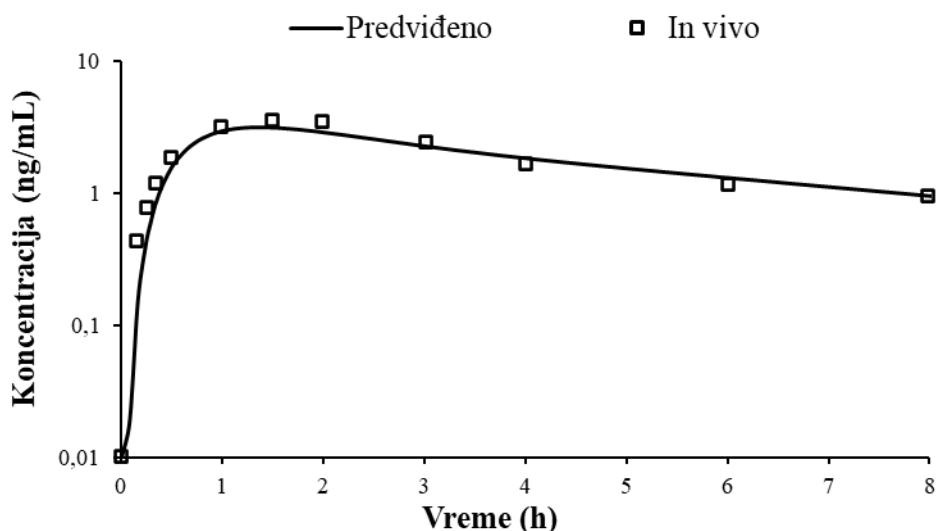
**Slika 4.92.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Goldstein i sar., 1987) profili koncentracije salbutamola u plazmi nakon primene intravenske infuzije (1,50 mg) kod čoveka



**Slika 4.93.** Poređenje između *in vivo* uočenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (trouglasti markeri), gde linije predstavljaju dvostruku vrednost FE za *in vivo* uočene farmakokinetičke parametre salbutamola za intravensku infuziju (1,50 mg)

Izgrađeni model za intravensku primenu je u narednoj fazi modelovanja proširen na peroralnu primenu salbutamola. Faza apsorpcije salbutamola nakon peroralne primene je određena permeabilnošću ove lekovite supstance u GIT-u, koja je morala biti optimizovana s obzirom na nedostatak podataka o permeabilnosti salbutamola u dostupnoj literaturi. Optimizovana vrednost  $P_{eff}$  iznosila je  $1,40 \times 10^{-4}$  cm/s (Tabela 3.15) i slična je  $P_{eff}$  vrednosti salbutamola koju su koristili Pinto i sar. (2021) za izgradnju modela ( $1,33 \times 10^{-4}$  cm/s), a koja je *in silico* predviđena na osnovu strukture molekula pomoću *ADMET Predictor* softverskog paketa (Pinto i sar., 2021). Pored toga, kao ulazni parametar za simulacije je uzeto u obzir i da salbutamol podleže intenzivnom presistemskom metabolizmu u tankom crevu i jetri (FPE = 48%), što je pokazano u *in vivo* studijama (Morgan i sar., 1986; Goldstein i sar., 1987).

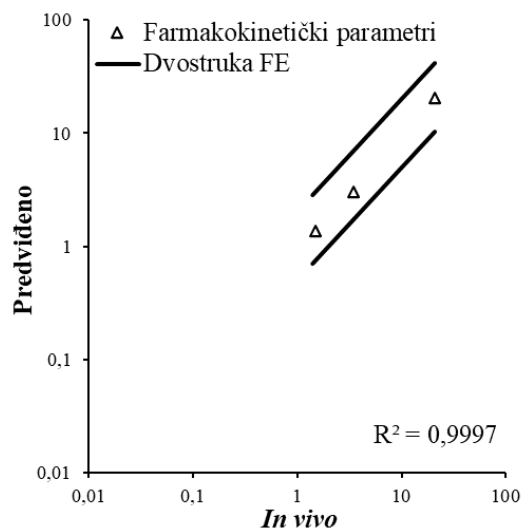
Rezultati simulacija pokazali su da se predviđeni profil koncentracije salbutamola u plazmi nakon primene oralnog rastvora slaže sa srednjim *in vivo* uočenim profilom (Slika 4.94), mada je predviđena vrednost  $C_{max}$  nešto niža od srednje *in vivo* vrednosti (Tabela 4.33). Ipak, predviđena vrednost  $C_{max}$  ulazi u opseg *in vivo* uočenih vrednosti (2,50-5,30 ng/mL; Du i sar., 2002). Pored toga, predviđene vrednosti svih farmakokinetičkih parametara su bile u opsegu dvostrukih srednjih *in vivo* vrednosti (Slika 4.95), pa se predviđanja apsorpcije i raspodele salbutamola modela nakon peroralne primene mogu smatrati uspešnim.



**Slika 4.94.** Predviđeni i in vivo uočeni (Du i sar., 2002) profili koncentracije salbutamola u plazmi nakon peroralne primene rastvora (1,20 mg) kod čoveka

**Tabela 4.33.** Predviđeni i in vivo uočeni (Du i sar., 2002) farmakokinetički parametri salbutamola nakon peroralne primene rastvora (1,20 mg)

Parametar	In vivo (SV)	In vivo opseg	Predviđeno	FE
$C_{max}$ (ng/mL)	3,49	2,50-5,30	3,01	0,86
$t_{max}$ (h)	1,50	1,20-2,40	1,36	0,91
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	20,81	15,00-27,00	20,59	0,99
F (%)	/	/	49,26	/



**Slika 4.95.** Poređenje između in vivo uočenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (trouglasti markeri), gde linije predstavljaju dvostruku vrednost FE za in vivo uočene farmakokinetičke parametre salbutamola za oralni rastvor (1,20 mg)

Predviđena biološka raspoloživost salbutamola nakon primene oralnog rastvora je bila oko 50% (Tabela 4.33), kao posledica intenzivnog presistenskog metabolizma u GIT-u. Biološka raspoloživost salbutamola od 50% uočena je i u studiji koju su sproveli Morgan i sar. (1986). Slična biološka

raspoloživost nakon peroralne primene salbutamola zabeležena je i u literaturi (53% u studiji koju su sproveli Boulton i Fawcett (1996) i 44% u studiji koju su objavili Goldstein i sar. (1987)). Na osnovu navedenog, može se reći da je uspešno validiran i model za peroralnu primenu salbutamola. Validacija modela za peroralnu primenu leka je bitan korak u razvoju modela za inhalacionu primenu, s obzirom na to da se izvesni procenat inhalirane doze lekovite supstance proguta i apsorbuje iz GIT-a (Jones i Harisson, 2012).

#### **4.4.4.2. Razvoj i primena *in silico* modela za predviđanje apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenog salbutamola kod čoveka**

##### *Izgradnja i validacija modela za inhalacionu primenu*

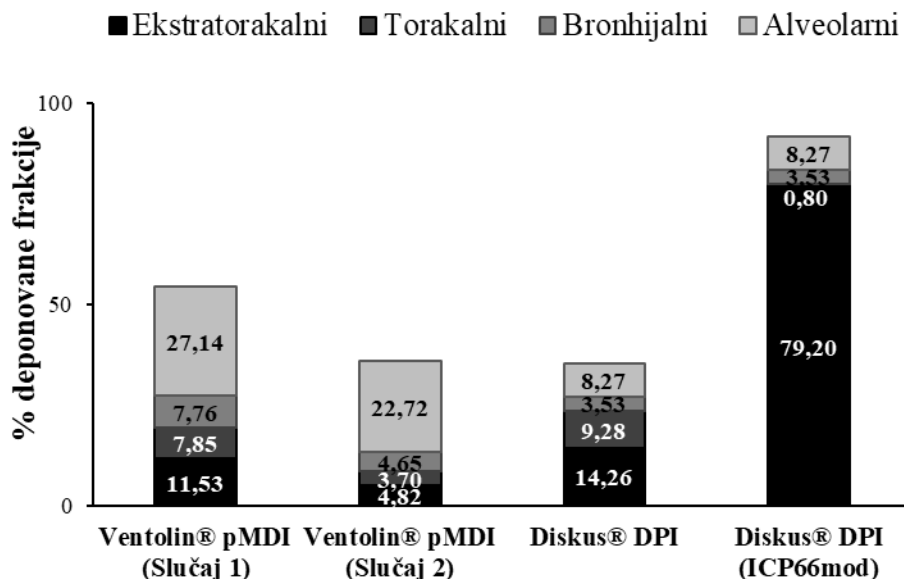
Prvi korak u izgradnji i validaciji modela salbutamola za inhalacionu primenu predstavljao je poređenje simuliranih profila koncentracije lekovite supstance u plazmi sa *in vivo* profilima, dobijenim nakon primene Ventolin® pMDI u dve različite doze (0,2 mg - Slučaj 1 i 1,2 mg - Slučaj 2), preuzetih iz studija koje su sproveli Jiang i sar. (2016) i Du i sar. (2002), redom. U narednom koraku je simulirana apsorpcija salbutamola nakon primene Diskus® DPI (0,6 mg) u kombinaciji sa aktivnim ugljem i rezultati su upoređeni sa podacima iz *in vivo* studije (Moore i sar., 2017). S obzirom na to da ne postoje podaci o *in vivo* depoziciji ova dva preparata za inhalaciju u humanim plućima, depozicija je predviđena pomoću *in silico* ICRP66 - *custom* modela.

Rezultati ICRP66 - *custom* predviđene depozicije salbutamol-sulfata iz Ventolin® pMDI za dva različita slučaja aerodinamičkog prečnika i protoka vazduha (Tabela 3.10), kao i iz Diskus® DPI, prikazani su na Slici 4.96. Primećuju se generalno niži procenti deponovanog Ventolin® pMDI u svim regionima pluća u Slučaju 2, što je verovatno posledica manjeg ulaznog protoka vazduha. Naime, na primeru procene depozicije budesonida kod čoveka je primećeno da smanjeni protok vazduha dovodi do smanjene depozicije leka u svim regionima pluća, izuzev alveolarnog, gde dovodi do povećanja deponovane frakcije leka. Takođe, veće frakcije deponovanog leka u torakalnom, bronhijalnom i alveolarnom regionu pluća u Slučaju 1 su posledica i veličine čestica, koja je u ovom slučaju bila optimalnija po pitanju postizanja veće depozicije leka u plućima. Drugim rečima, iako je u Slučaju 1 korišćena veća MMAD vrednost, može se pretpostaviti da su u Slučaju 2 čestice previše sitne, zbog čega je predviđena i veća izdahnuta frakcija u ovom slučaju. Visoka predviđena vrednost izdahnute frakcije leka u sva tri slučaja (Ventolin® pMDI - Slučaj 1, Ventolin® pMDI - Slučaj 2 i Diskus® DPI) se slaže sa zapažanjima koja se odnose na predviđanje depozicije leka nakon primene Pulmicort®-a kod ljudi, čime je pokazano da ICRP66 model generalno uvek predviđa nižu ukupnu depoziciju leka u plućima, nezavisno od aerodinamičkih svojstava čestica leka, protoka vazduha, karakteristika lekovite supstance itd. Međutim, u nedostatku *in vivo* podataka o depoziciji Ventolin® pMDI kod ljudi, za simulacije apsorpcije i raspodele salbutamola nakon inhalacione primene ovog preparata korišćena je ICRP66 - *custom* predviđena depozicija.

Sa druge strane, u literaturi se navode podaci o MPPD predviđenoj depoziciji salbutamol-sulfata nakon inhalacione primene Diskus® DPI (Pinto i sar., 2021), koji su ukazali na to da se 79,2% salbutamol-sulfata deponuje u ekstratorakalnom regionu i 12,6% u preostalim regionima pluća. Autori ove studije su pri tome konstatovali da su ovakvi rezultati u skladu sa drugim literaturnim podacima, koji navode da se 10-20% salbutamol-sulfata nakon primene Ventolin® Diskus® deponuje u plućima, dok se ostatak proguta ili ostaje u inhalatoru (Du i sar., 2002; Ventolin® Accuhaler® 200 Micrograms, 2010; Pinto i sar., 2021). Imajući u vidu navedene podatke, ICRP66 - *custom* predviđena depozicija salbutamol-sulfata nakon primene Diskus® DPI je modifikovana (ICRP66<sub>mod</sub>) tako što je frakcija deponovanog leka u ekstratorakalnom regionu povećana na 79,2%, frakcije u bronhijalnom i alveolarnom regionu su



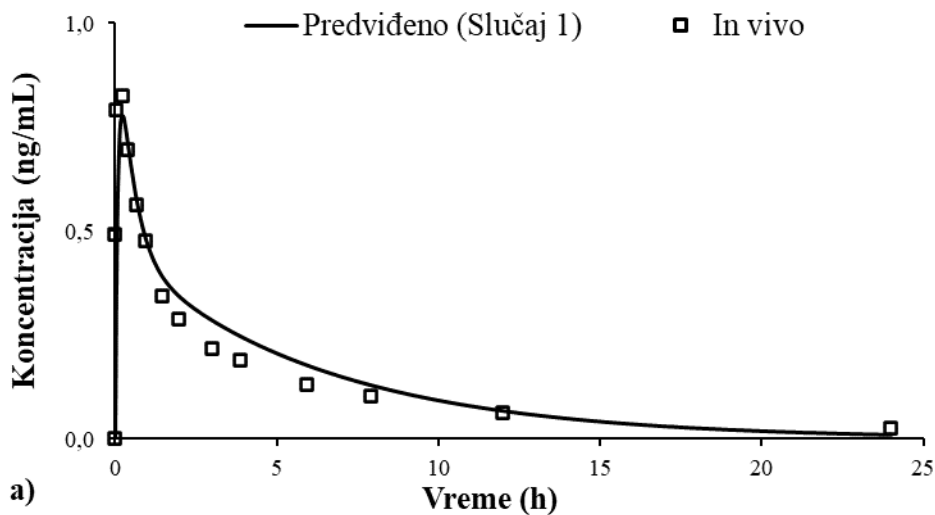
zadržane na predviđenim vrednostima, a ostatak do 12,6% deponovanog leka u plućima (što iznosi svega 0,8%) je tretirano kao frakcija koja se deponuje u torakalnom regionu (Slika 4.96).

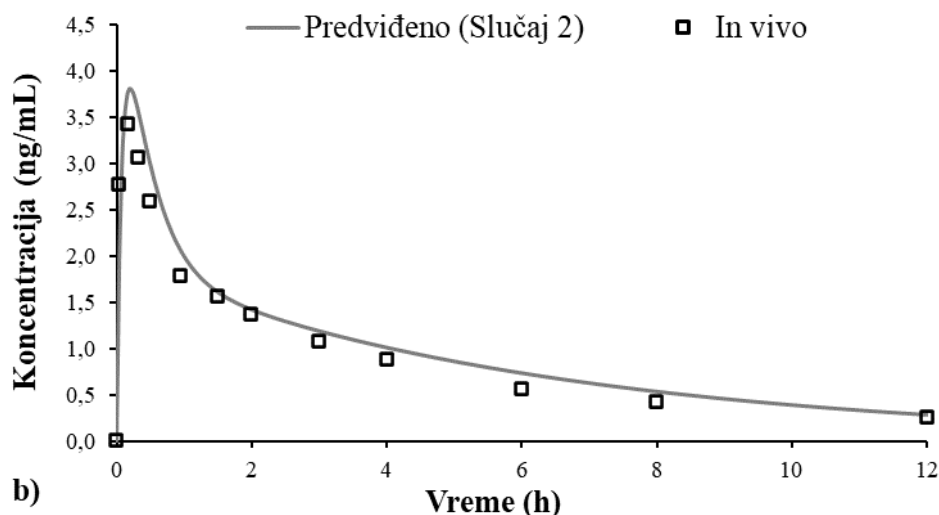


**Slika 4.96.** ICRP66 - custom predviđena depozicija salbutamol-sulfata u plućima nakon primene: Ventolin® pMDI, Slučaj 1 (MMAD = 2,99  $\mu\text{m}$ ;  $Q = 500 \text{ mL/s}$ ), Ventolin® pMDI, Slučaj 2 (MMAD = 2,0  $\mu\text{m}$ ;  $Q = 471,60 \text{ mL/s}$ ), Diskus® DPI i modifikovana ICRP66 - custom depozicija Diskus® DPI (ICRP66<sub>mod</sub>) na osnovu podataka iz literature (Pinto i sar., 2021); ostatak do 100% predstavlja izdahnutu frakciju leka

Na osnovu predviđene depozicije (Slika 4.96) i dodatnih ulaznih parametara specifičnih za PCAT™ model (Tabela 3.15) izgrađen je salbutamol-specifičan model za čoveka, koji je zatim korišćen za predviđanja apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenog salbutamola (u obliku sulfata).

Simulirani profili koncentracije salbutamola u plazmi se dobro slažu sa *in vivo* uočenim profilima dobijenim nakon inhalacione primene 0,2 mg (Slika 4.97a), kao i nakon primene 1,2 mg Ventolin® pMDI kod čoveka (Slika 4.97b).





**Slika 4.97.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Jiang i sar., 2016; Du i sar., 2002) profili koncentracije salbutamola u plazmi nakon inhalacione primene Ventolin® pMDI kod čoveka: 0,20 mg salbutamol-sulfata - Slučaj 1 (a); 1,20 mg salbutamol-sulfata - Slučaj 2 (b)

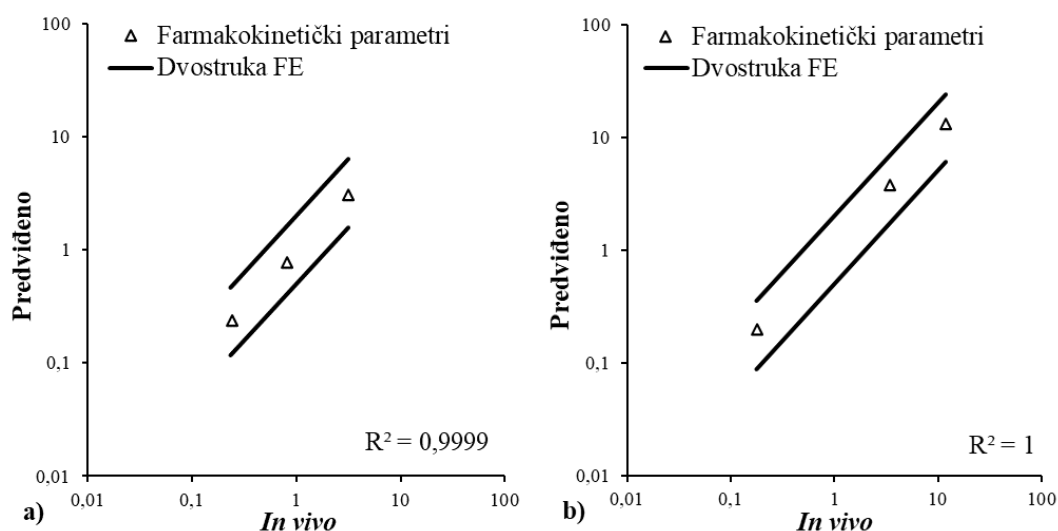
Razlike između predviđenih i *in vivo* učenih farmakokinetičkih parametara salbutamola su u oba slučaja bile male, što se vidi iz podataka u Tabelama 4.34 i 4.35. U slučaju manje doze, predviđena vrednost  $C_{max}$  je bila nešto niža od srednje *in vivo* vrednosti  $C_{max}$  (Tabela 4.34), dok su slučaju inhalacione primene veće doze salbutamola, predviđene vrednosti sva tri farmakokinetička parametra bile nešto više od srednjih *in vivo* vrednosti (Tabela 4.35). Međutim, sve predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara se nalaze u okviru odgovarajućih *in vivo* opsega vrednosti (Tabele 4.34 i 4.35). Takođe, sve simulirane vrednosti se nalaze u opsegu dvostruke vrednosti FE, pri čemu je u oba slučaja dobijen visok koeficijent determinacije (Slika 4.98). Ovi podaci ukazuju na to da je model adekvatno opisao apsorpciju i raspodelu inhalaciono primenjenog salbutamola.

**Tabela 4.34.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Jiang i sar., 2016) farmakokinetički parametri salbutamola nakon inhalacione primene Ventolin® pMDI (0,20 mg salbutamol-sulfata - Slučaj 1)

Parametar	<i>In vivo</i> (SV)	<i>In vivo</i> opseg	Predviđeno	FE
$C_{max}$ (ng/mL)	0,82	0,49-1,11	0,78	0,95
$t_{max}$ (h)	0,24	0,07-0,33	0,24	1,00
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	3,18	1,69-3,88	3,09	0,97

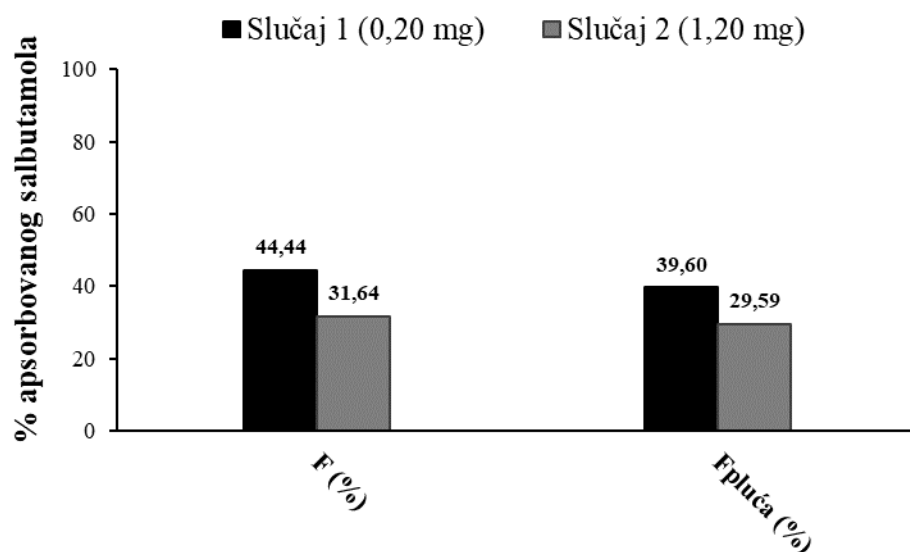
**Tabela 4.35.** Predviđeni i *in vivo* uočeni (Du i sar., 2002) farmakokinetički parametri salbutamola nakon inhalacione primene Ventolin® pMDI (1,20 mg salbutamol-sulfata - Slučaj 2)

Parametar	<i>In vivo</i> (SV)	<i>In vivo</i> opseg	Predviđeno	FE
$C_{max}$ (ng/mL)	3,42	2,30-4,50	3,81	1,11
$t_{max}$ (h)	0,18	0,15-0,29	0,20	1,11
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	12,00	6,00-18,00	13,18	1,10

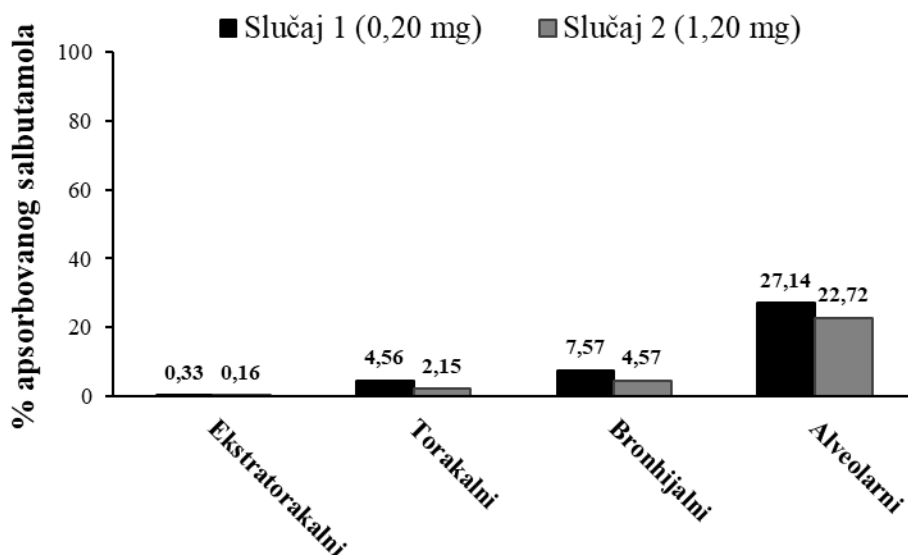


**Slika 4.98.** Poređenje između *in vivo* uočenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (trouglasti markeri), gde linije predstavljaju dvostruku vrednost FE za *in vivo* uočene farmakokinetičke parametre salbutamola nakon inhalacione primene Ventolin® pMDI: 0,20 mg salbutamol-sulfata - Slučaj 1(a); 1,20 mg salbutamol-sulfata - Slučaj 2 (b)

Rezultati simulacija ukazali su i na razlike u biološkoj raspoloživosti salbutamola za dve primenjene doze (Slika 4.99), koje su posledica korišćenja različitih ulaznih podataka o depoziciji Ventolin® pMDI u plućima u ova dva slučaja (Slika 4.96). Tačnije, veća biološka raspoloživost i veća frakcija apsorbovanog salbutamola u plućima u Slučaju 1 (Slike 4.99 i 4.100) rezultat su ukupno veće deponovane frakcije salbutamola u torakalnom, bronhijalnom i alveolarnom regionu pluća u odnosu na Slučaj 2 (Slika 4.96).



**Slika 4.99.** Predviđena biološka raspoloživost ( $F(\%)$ ) salbutamola i frakcija salbutamola koja se apsorbuje u plućima ( $F_{pluća}(\%)$ )

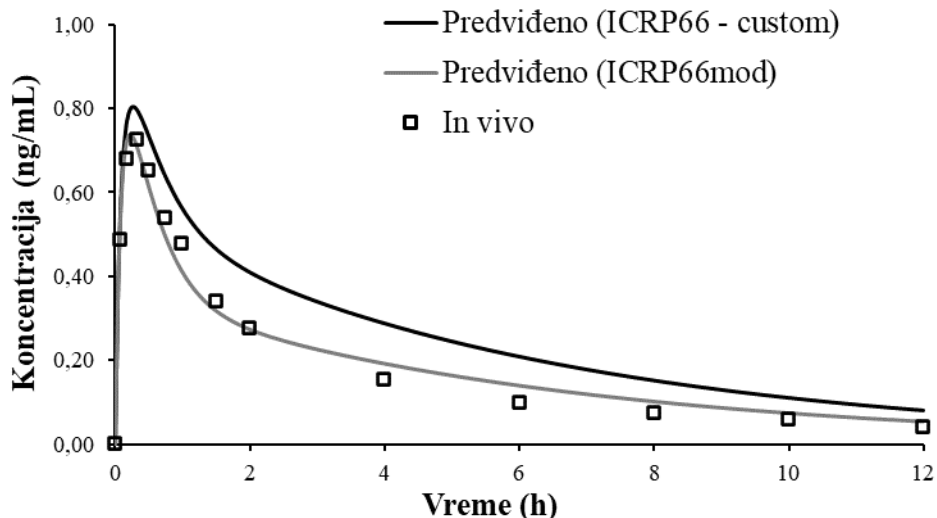


**Slika 4.100.** Predviđeni profil apsorpcije salbutamola po regionima pluća nakon primene dve različite doze (0,20 i 1,20 mg salbutamol-sulfata) Ventolin® pMDI

Ward i sar. (2000) su pokazali da biološka raspoloživost salbutamola nakon inhalacione primene Ventolin® pMDI iznosi oko 42%, što je slično vrednosti predviđene  $F(\%)$  u Slučaju 1. Pored toga, Du i sar. (2002) navode da relativna raspoloživost salbutamola nakon inhalacione primene (1,20 mg) u odnosu na istu dozu primenjenu u obliku oralnog rastvora iznosi  $57 \pm 24\%$ . Rezultati simulacija su pokazali da relativna raspoloživost salbutamola (nakon primene 1,20 mg salbutamol-sulfata, Slučaj 2), dobijena na osnovu odnosa predviđenih  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  inhalacija/ $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  peroralni rastvor, iznosi 64,01%, što odgovara vrednosti uočenoj u *in vivo* studiji. Što se tiče frakcije apsorbovanog salbutamola u plućima, u literaturi se navodi da ona uglavnom iznosi oko 10-20% (Lipworth, 1996; Ward i sar., 2000; Jones i Harrison, 2012), maksimalno do 30% (Ammari i sar., 2020), pa je predviđena apsorbovana frakcija salbutamola u plućima od 39,6% u slučaju manje doze (Slučaj 1) u izvesnoj meri precenjena, dok predviđena vrednost  $F_{pluća}(\%)$  u Slučaju 2 ulazi u opseg *in vivo* uočenih vrednosti. U poslednjem koraku validacije su rezultati predviđanja razvijenog modela upoređeni sa *in vivo* dobijenim profilom koncentracije salbutamola u plazmi nakon inhalacione primene Diskus® DPI. Korišćeni su isti ulazni parametri kao za simulacije primene Ventolin® pMDI (Tabela 3.15), uključujući istu  $k_a$  vrednost, budući da je u *in vivo* studijama na pacovima pokazano da u slučaju visoko rastvorljive lekovite supstance prelazak sa rastvora na prašak za inhalaciju nema uticaja na konstantu brzine apsorpcije u plućima (Jones i Harisson, 2012).

Na Slici 4.101 se uočava da su simulirane koncentracije salbutamola u plazmi na osnovu ICRP66 - *custom* predviđene depozicije veće u poređenju sa koncentracijama predviđenim na osnovu ICRP66<sub>mod</sub> depozicije. Razlike između predviđenih profila su posledica ukupno veće depovane frakcije salbutamola u torakalnom, bronhijalnom i alveolarnom regionu pluća u slučaju ICRP66 - *custom* depozicije. Bolje slaganje simuliranog sa srednjim *in vivo* uočenim profilom koncentracije salbutamola u plazmi dobijeno je u slučaju korišćenja ICRP66<sub>mod</sub> depozicije kao ulaznog parametra (Slika 4.101). Predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara (izuzev parametra  $t_{max}$ ) su se, u ovom slučaju, takođe bolje slagale sa *in vivo* uočenim vrednostima, u poređenju sa predviđenim farmakokinetičkim parametrima dobijenim na osnovu ICRP66 - *custom* depozicije, što se vidi i na osnovu FE vrednosti koje su bile bliže 1 (Tabela 4.36). Predviđena vrednost  $PIK_{0 \rightarrow 12}$  je, u slučaju ICRP66<sub>mod</sub> depozicije, takođe bila sličnija *in vivo* uočenoj vrednosti, mada je bila na samoj gornjoj granici *in vivo* uočenog opsega vrednosti (Tabela 4.36). Pored toga, predviđena vrednost frakcije apsorbovanog salbutamola u plućima iznosila je oko 12%, što se slaže sa podacima iz literature koji ukazuju na to da se 10-20% salbutamola apsorbuje u plućima (Lipworth, 1996). Predviđena inicijalna količina salbutamol-sulfata deponovanog u

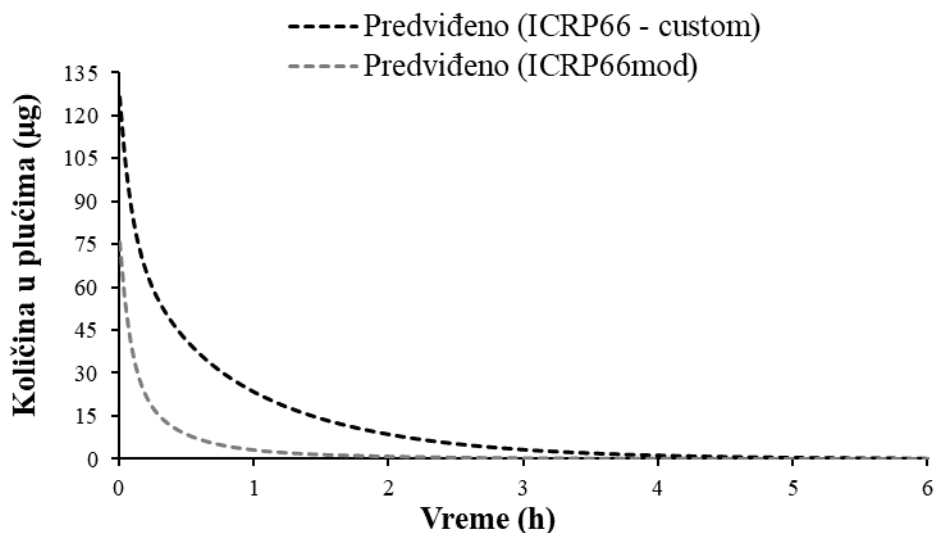
plućima u slučaju ICRP66<sub>mod</sub> depozicije iznosila je oko 76 µg (Slika 4.102), što odgovara predviđenoj količini lekovite supstance u plućima koju su dobili Pinto i sar. (2021). Imajući u vidu sve navedene podatke, u daljem postupku je za poređenje sa rezultatima simulacija za formulacije sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata (SAL-HA i praškova u obliku čvrstih lipidnih mikročestica) korišćen profil apsorpcije salbutamola nakon primene Diskus<sup>®</sup> DPI dobijen na osnovu ICRP66<sub>mod</sub> depozicije.



**Slika 4.101.** Predviđeni i in vivo uočeni (Moore i sar., 2017) profili koncentracije salbutamola u plazmi nakon inhalacione primene Diskus<sup>®</sup> DPI (0,60 mg salbutamol-sulfata) uz primenu aktivnog uglja kod čoveka

**Tabela 4.36.** Predviđeni i in vivo uočeni (Moore i sar., 2017) farmakokinetički parametri salbutamola nakon inhalacione primene Diskus<sup>®</sup> DPI (0,60 mg salbutamol-sulfata) uz primenu aktivnog uglja

Parametar	In vivo (SV)	In vivo opseg	Predviđeno (ICRP66 - custom)	FE	Predviđeno (ICRP66 <sub>mod</sub> )	FE
C <sub>max</sub> (ng/mL)	0,73	0,65-0,83	0,80	1,10	0,74	1,01
t <sub>max</sub> (h)	0,33	0,17-0,50	0,28	0,85	0,24	0,73
PIK <sub>0→∞</sub> (ng h/mL)	2,21	/	3,63	1,64	2,55	1,15
PIK <sub>0→12</sub> (ng h/mL)	2,02	1,79-2,21	3,12	1,54	2,21	1,09
F (%) = F <sub>pluća</sub> (%)	/	/	17,41	/	12,25	/

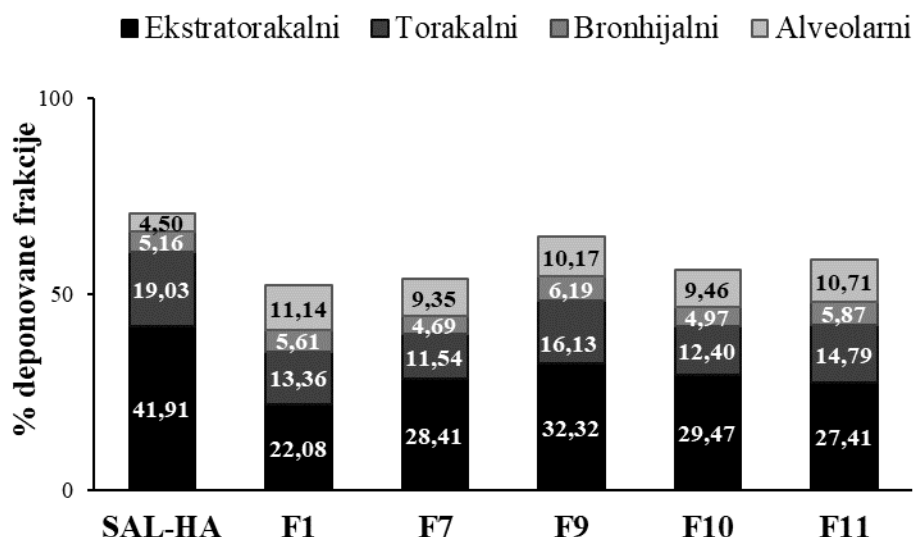


**Slika 4.102.** *Predviđene količine deponovanog salbutamol-sulfata u plućima nakon inhalacione primene Diskus® DPI (0,60 mg salbutamol-sulfata) kod čoveka*

#### Primena modela salbutamola za inhalacionu primenu

ICRP66 - *custom* modelom predviđena je depozicija eksperimentalnih formulacija praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata na osnovu ulaznih parametara iz Tabele 3.11. Pri tome je jedino u slučaju formulacije SAL-HA korišćena vrednost protoka vazduha od 100 L/min jer je MMAD vrednost, određena pri ovom protoku vazduha, preuzeta iz literature (Li i sar., 2017a). Rezultati su prikazani na Slici 4.103. Može se primetiti da je, u slučaju formulacije SAL-HA, velika frakcija leka deponovana u ekstratorakalnom i torakalnom delu pluća, dok je procenat deponovanog leka u alveolarnom delu mali (svega 4,50%). Uočene razlike u depoziciji čestica između pet različitih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica posledica su drugačijih ulaznih MMAD i GSD vrednosti, pa je formulacija sa najmanjom MMAD i niskom GSD vrednošću (F1) pokazala najveći procenat deponovanog leka u alveolarnom delu. Sa druge strane, ICRP66 - *custom* model je predvideo da je ukupan procenat deponovanog leka u plućima najmanji u slučaju formulacije F1, verovatno usled najmanje MMAD vrednosti, te najmanjeg procenta deponovanog leka u ekstratorakalnom regionu, gde se inače deponuju krupnije čestice, dok je najveći ukupni procenat deponovanog leka predviđen za formulaciju F9 (Slika 4.103). Predviđena frakcija izdahnutog leka u slučaju svih pet formulacija je bila visoka i iznosila je između 35% i 47%.

Iako je pokazano da *in silico* modeli za predviđanje depozicije čestica inhaliranog aerosola, kao što je ICRP66, ne daju uvek pouzdana predviđanja vezana za ukupnu deponovanu frakciju leka, ipak se smatraju korisnim, jer daju uvid u raspodelu/odnose deponovanih frakcija leka između plućnih regiona, za različite formulacije. Zbog toga mogu biti korisni za okvirno predviđanje depozicije eksperimentalnih formulacija praškova za inhalaciju kod ljudi, pogotovo umajući u vidu da skaliranje *in vivo* podataka o deponovanim frakcijama leka kod eksperimentalnih životinja (najčešće pacova) na ljude nije prepoznato kao adekvatan pristup usled razlika u anatomiji i fiziologiji pluća pacova i čoveka.



**Slika 4.103.** ICRP66 - custom predviđena depozicija salbutamol-sulfata u plućima nakon primene praškova za inhalaciju: SAL-HA i čvrstih lipidnih mikročestica (F1, F7, F9, F10 i F11); ostatak do 100% predstavlja izdahnutu frakciju leka

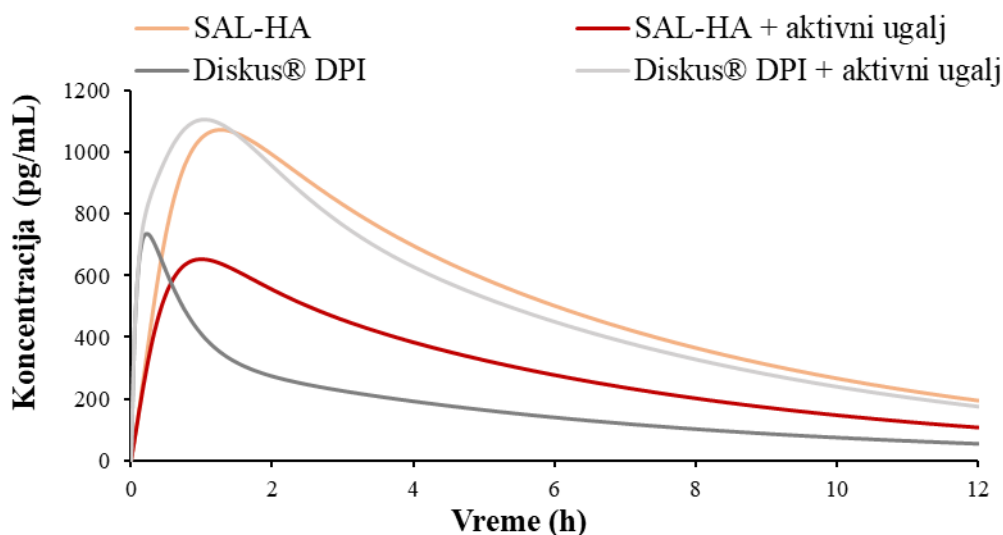
Na osnovu ICRP66 - custom predviđene depozicije čestica SAL-HA (Slika 4.103) i ostalih ulaznih parametara (Tabela 3.15), predviđena je apsorpcija i raspodela salbutamola nakon inhalacione primene formulacije SAL-HA kod čoveka uz primenu aktivnog uglja. Predviđeni farmakokinetički parametri prikazani su u Tabeli 4.37, zajedno sa rezultatima simulacija za Diskus<sup>®</sup> DPI uz primenu aktivnog uglja. Pored toga, u slučaju oba praška za inhalaciju (Diskus<sup>®</sup> i SAL-HA), simulirana je apsorpcija inhalaciono primenjenog salbutamola bez peroralne primene aktivnog uglja, kako bi se uzeo u obzir i deo lekovite supstance koji se proguta, te procenila očekivana apsorpcija i raspodela salbutamola kod ljudi pod realnim uslovima.

**Tabela 4.37.** Predviđeni farmakokinetički parametri salbutamola nakon inhalacione primene Diskus<sup>®</sup> DPI (0,60 mg salbutamol-sulfata) i formulacije SAL-HA (0,60 mg salbutamol-sulfata) uz/bez primene aktivnog uglja

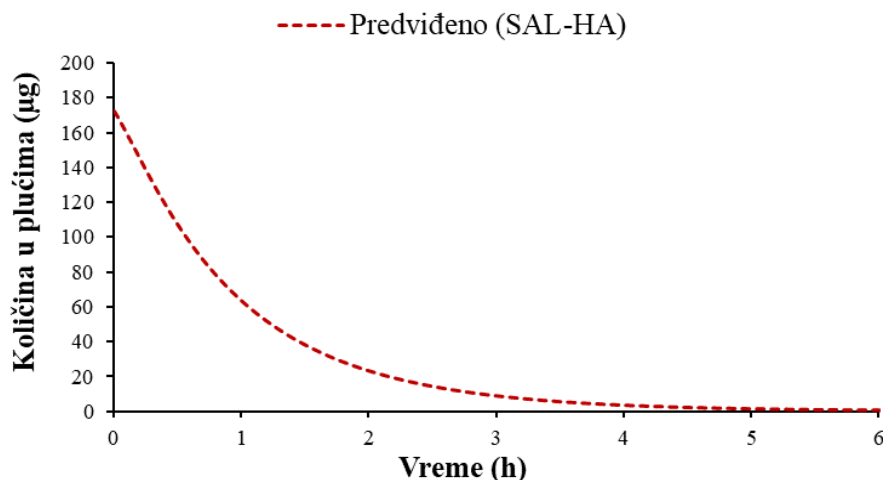
Parametar	Diskus <sup>®</sup> DPI + aktivni ugalj	Diskus <sup>®</sup> DPI	SAL-HA + aktivni ugalj	SAL-HA
C <sub>max</sub> (pg/mL)	737,22 (0,74 ng/mL)	1108,00	651,92	1072,00
t <sub>max</sub> (h)	0,24	1,04	1,00	1,28
PIK <sub>0→∞</sub> (pg h/mL)	2552,70 (2,55 ng h/mL)	7438,00	4380,90	7722,30
F (%)	12,25	35,61	21,03	37,01
F <sub>pluća</sub> (%)	12,25	12,25	21,03	21,03
F <sub>GIT</sub> (%)	/	23,36	/	15,98

Iz Tabele 4.37 i sa Slike 4.104 se može uočiti produženje t<sub>max</sub> salbutamola u slučaju primene formulacije SAL-HA u poređenju sa Diskus<sup>®</sup> DPI, kada se uzme u obzir samo apsorpcija lekovite supstance u plućima (uz istovremeno davanje aktivnog uglja). Sa druge strane, u slučaju primene preparata bez blokiranja gastrointestinalne apsorpcije, povećanje t<sub>max</sub> nije toliko izraženo (Tabela 4.37). Pored toga, uočavaju se veće vrednosti PIK<sub>0→∞</sub> salbutamola u slučaju SAL-HA u poređenju sa Diskus<sup>®</sup> DPI. Ovi rezultati simulacija ukazuju na to da bi inhalaciona primena SAL-HA kod čoveka potencijalno mogla da dovede do produžene apsorpcije salbutamola u plućima, kao što je pokazano i kod pacova.

Dodatno, očekuje se da bi  $t_{max}$  *in vivo* nakon primene formulacije SAL-HA moglo biti još duže, usled mukoadhezivnog ponašanja ove formulacije (Li i sar., 2017a), koje nije moglo biti uzeto u obzir u trenutnoj verziji softvera. Predviđena biološka raspoloživost salbutamola nakon primene dve pomenute formulacije je bila slična (Tabela 4.37), pri čemu je predviđeni procenat salbutamola apsorbovanog u GIT-u bio niži u slučaju formulacije SAL-HA (oko 16%) u odnosu na primenu Diskus® DPI (oko 23%). Ovakvi rezultati ukazuju na to da bi inhalaciona primena SAL-HA potencijalno bila pogodnija u terapiji i sa aspekta bezbednosti. Niža predviđena vrednost  $C_{max}$  salbutamola u plazmi u slučaju SAL-HA (Slika 4.104) je takođe povoljna sa aspekta terapijske bezbednosti ove formulacije. Pored toga, uočava se veća ukupna količina deponovanog salbutamola u plućima u slučaju SAL-HA (Slika 4.105) u poređenju sa Diskus® DPI (Slika 4.102), što je značajno sa aspekta potencijalno bolje efikasnosti inhalacione terapije primenom formulacije SAL-HA. Ovakvi rezultati ukazuju na potencijalnu prednost inhalacione primene SAL-HA formulacije u poređenju sa jednostavnijom formulacijom praška za inhalaciju, kakav je Diskus® DPI. No, za potvrdu iznete pretpostavke potrebne su dodatne *in vivo* studije.



**Slika 4.104.** Predviđeni profili koncentracije salbutamola u plazmi nakon inhalacione primene Diskus® DPI (0,60 mg salbutamol-sulfata) i formulacije SAL-HA (0,60 mg salbutamol-sulfata) uz/bez primene aktivnog uglja kod čoveka



**Slika 4.105.** Predviđena količina (µg) deponovanog salbutamol-sulfata u plućima nakon inhalacione primene SAL-HA (0,60 mg salbutamol-sulfata) kod čoveka



U sledećem koraku, model je korišćen za predviđanje apsorpcije i raspodele salbutamola iz praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica. Predviđeni farmakokinetički parametri i profili koji opisuju apsorpciju salbutamola nakon inhalacione primene pet različitih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica prikazani su u Tabeli 4.38 i na Slici 4.106. Uočava se da je svih pet formulacija čvrstih lipidnih mikročestica rezultovalo većom predviđenom vrednošću  $t_{max}$  salbutamola u odnosu na simuliranu vrednost  $t_{max}$  salbutamola za Diskus<sup>®</sup> DPI, kada su simulacije sprovedene sa opcijom blokade gastrointestinalne apsorpcije. Ovakvi rezultati ukazuju na to da bi inhalacionom primenom praškova čvrstih lipidnih mikročestica kod ljudi potencijalno mogla da se produži apsorpcija salbutamola u plućima. Pored toga,  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  vrednost salbutamola nakon inhalacione primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica je bila duplo veća u odnosu na  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  vrednost salbutamola iz Diskus<sup>®</sup> DPI (u slučaju simulacija sa blokiranom gastrointestinalnom apsorpcijom), što je posledica znatno većeg procenta apsorbovanog salbutamola u plućima (Tabela 4.38). Simulacije su, u slučaju kada nije blokirana gastrointestinalna apsorpcija, pokazale da su vrednosti  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  salbutamola za većinu praškova čvrstih lipidnih mikročestica manje od  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  salbutamola nakon primene Diskus<sup>®</sup> DPI, što je posledica manje frakcije apsorbovanog salbutamola iz GIT-a (Tabele 4.37 i 4.38). Na osnovu navedenih podataka bi se moglo očekivati da bi se inhalacijom salbutamol-sulfata u obliku praškova čvrstih lipidnih mikročestica mogla smanjiti apsorpcija lekovite supstance u GIT-u, čime bi se smanjila i učestalost potencijalnih neželjenih dejstava salbutamola.

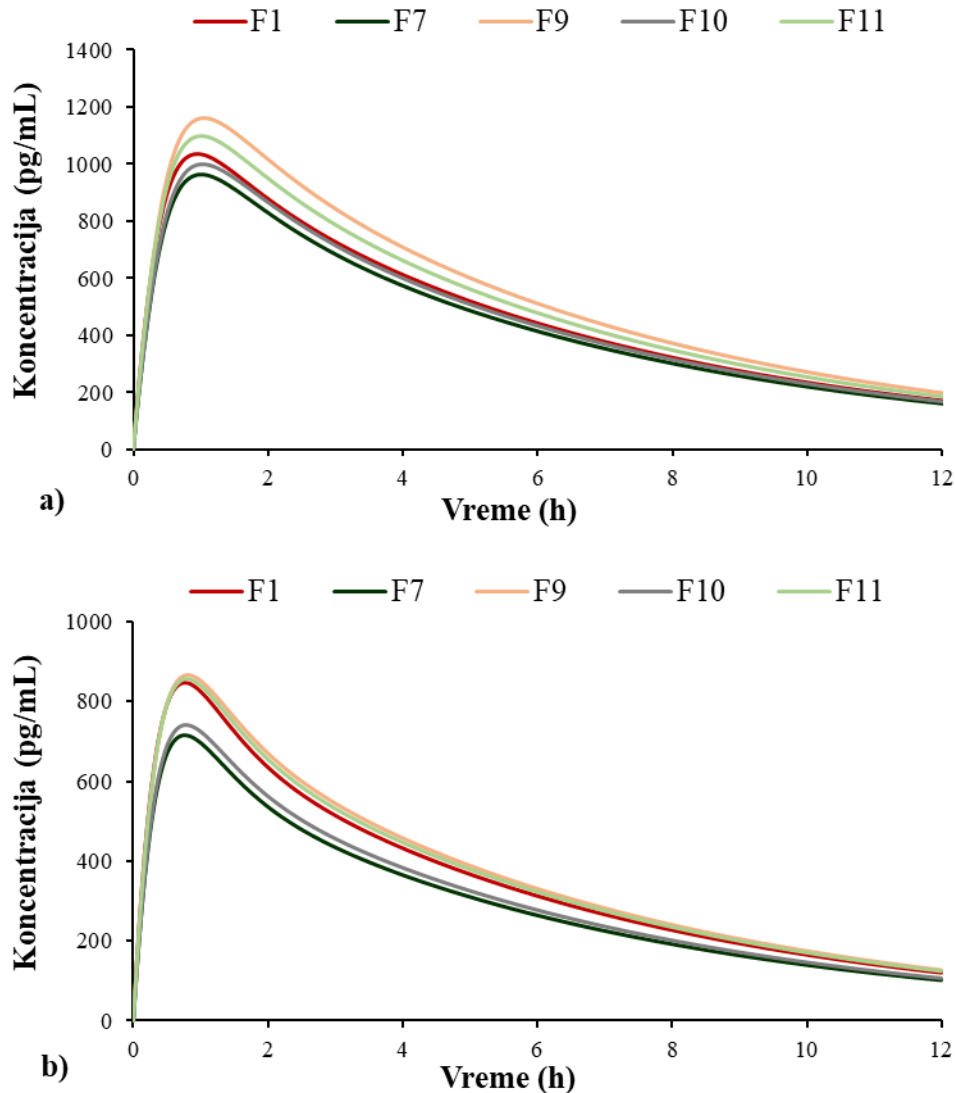
**Tabela 4.38.** Predviđeni farmakokinetički parametri salbutamola nakon inhalacione primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica (0,60 mg salbutamol-sulfata) uz/bez primene aktivnog uglja

Parametar	F1		F7		F9		F10		F11	
	A*	B**	A	B	A	B	A	B	A	B
$C_{max}$ (pg/mL)	847,37	1037,20	717,33	962,87	867,91	1159,70	740,44	999,42	856,66	1099,80
$t_{max}$ (h)	0,76	0,96	0,76	1,00	0,80	1,04	0,80	1,04	0,80	1,00
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ (pg h/mL)	5144,40	7037,60	4355,20	6563,20	5407,70	8043,00	4542,80	6851,10	5287,00	7565,60
F (%)	24,69	33,75	20,90	31,46	25,96	38,56	21,80	32,84	25,38	36,28
$F_{pluća}$ (%)	24,69	24,69	20,90	20,90	25,96	25,96	21,80	21,80	25,38	25,38
$F_{GIT}$ (%)	/	9,06	/	10,56	/	12,60	/	11,04	/	10,90

\*A – predviđeni farmakokinetički parametri salbutamola kada je simulirana primena aktivnog uglja; \*\*B – predviđeni farmakokinetički parametri salbutamola kada nije simulirana primena aktivnog uglja

Poređenjem pet različitih formulacija čvrstih lipidnih mikročestica, uočava se (Tabela 4.38, Slika 4.106) da formulacija F9 pokazuje najveće predviđene vrednosti  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  (za simulacije sa/bez primene aktivnog uglja), uz istovremeno najviše vrednosti apsorbovane frakcije salbutamola u plućima, pri čemu je i F11 pokazala sličnu vrednost apsorbovane frakcije salbutamola u plućima. Međutim obe formulacije (F9 i F11) pokazale su nešto više vrednosti  $C_{max}$  u poređenju sa  $C_{max}$  salbutamola nakon primene Diskus<sup>®</sup> DPI, što nije poželjno. Ipak, ovakav ishod je očekivan s obzirom na to da predviđanja ukazuju na mnogo veću frakciju salbutamola apsorbovanog u plućima nakon primene F9 i F11 u odnosu na Diskus<sup>®</sup> DPI (Tabele 4.37 i 4.38). Predviđeni profil koncentracije salbutamola u plazmi za formulaciju F1 je sličan profilima za formulacije F9 i F11 uz primenu aktivnog uglja (Slika 4.106b). Međutim, razlike između predviđenog profila koncentracije salbutamola u plazmi za formulaciju F1 u odnosu na profile za formulacije F9 i F11 se uočavaju u slučaju scenarija koji opisuje primenu preparata bez blokade gastrointestinalne apsorpcije pomoću aktivnog uglja (Slika 4.106a). Tačnije, u ovom slučaju je za formulaciju F1 predviđen najmanji procenat apsorbovanog salbutamola u GIT-u (Tabela 4.38). Najmanja vrednost apsorbovanog salbutamola u GIT-u za formulaciju F1 posledica je najmanje deponovane

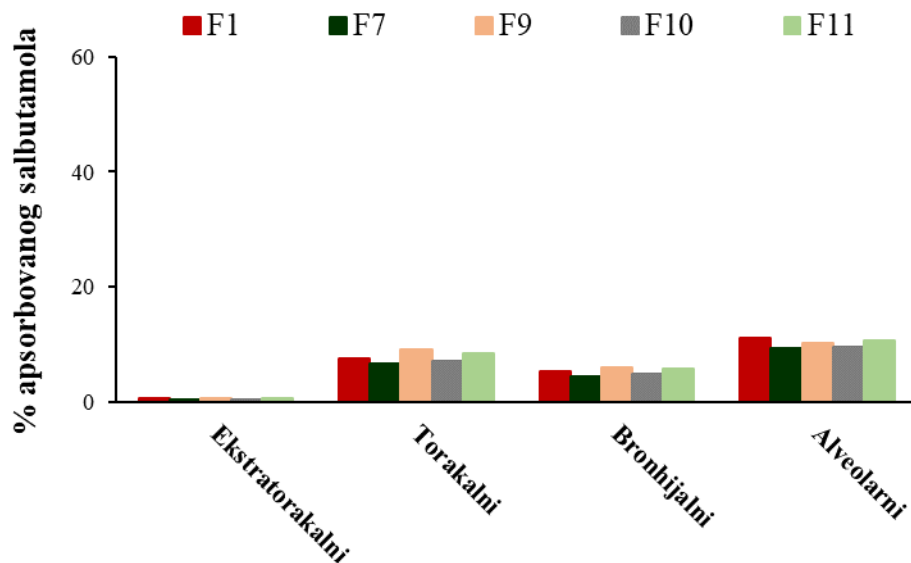
frakcije čestica ove formulacije u ekstratorakalnom regionu (Slika 4.103), što je poželjno sa aspekta bezbednosti primene leka.



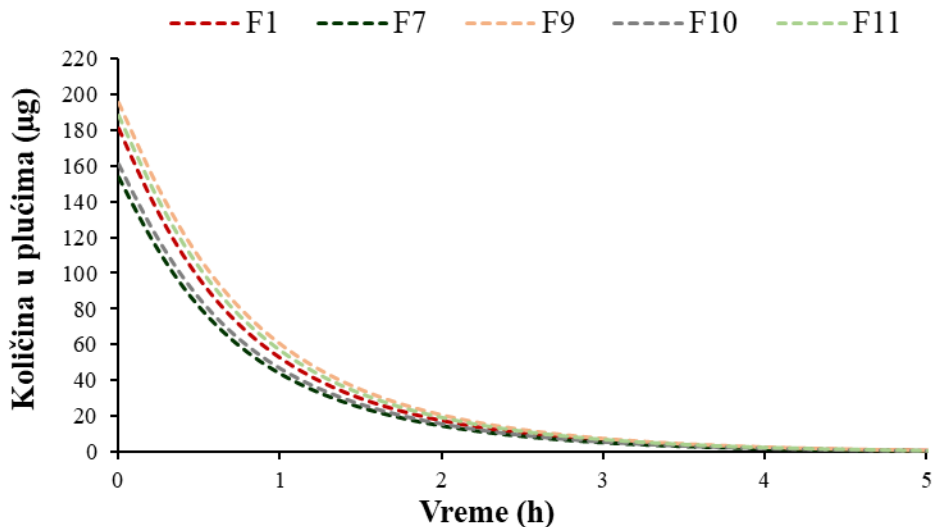
**Slika 4.106.** Predviđeni profili koncentracije salbutamola u plazmi nakon inhalacione primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica (0,60 mg salbutamol-sulfata) kod čoveka: uz primenu aktivnog uglja (a); bez primene aktivnog uglja (b)

Na Slici 4.107 prikazan je predviđen profil apsorpcije salbutamola po regionima pluća, gde se primećuje da, iako su formulacije F1 i F11 pokazale zanemarljivo veći procenat apsorbovane lekovite supstance u alveolarnom delu pluća u odnosu na F9, ukupan procenat apsorbovanog salbutamola u plućima je bio najveći u slučaju formulacije F9 (25,96%), kao posledica veće apsorbovane frakcije lekovite supstance u torakalnom delu pluća. Ovo je rezultat najveće ukupne simulirane količine deponovanog salbutamol-sulfata u plućima u slučaju formulacije F9 (194,94  $\mu$ g), a zatim formulacije F11, pa F1 (Slika 4.108). Ovakvi rezultati su u skladu sa *in vitro* rezultatima ispitivanja aerodinamičkih karakteristika praškova čvrstih lipidnih mikročestica u FSI i NGI uređajima, gde je F9 pokazala najveću FPF vrednost (Tabele 4.11 i 4.12). U slučaju sve tri pomenute formulacije (F1, F9 i F11) predviđena deponovana količina salbutamol-sulfata u plućima bila je znatno viša od predviđene količine salbutamol-sulfata nakon primene Diskus<sup>®</sup> DPI (Slika 4.102), što implicira da bi u slučaju inhalacione primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica potencijalno bile potrebne manje doze salbutamol-sulfata. Naime,

pojedinačna doza salbutamola po jednoj aktivaciji Ventolin® Diskus® DPI iznosi 200 µg (0,20 mg), od čega se u sažetku karakteristika leka navodi da samo 10-20% stiže do donjih delova pluća (odnosno 20-40 µg) (Ventolin® Accuhaler® 200 Micrograms, 2010), dok predviđena količina deponovanog salbutamola u plućima nakon primene 0,20 mg salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica (formulacija F9) iznosi oko 65 µg. Na osnovu prikazanih rezultata, moglo bi se zaključiti da bi primena praškova čvrstih lipidnih mikročestica potencijalno mogla obezbediti i veću efikasnost inhalacione terapije, uz gore pomenutu bolju bezbednost. Ovo bi bilo neophodno potvrditi odgovarajućim *in vivo* studijama.



**Slika 4.107.** Predviđeni profil apsorpcije salbutamola po regionima pluća nakon inhalacione primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica (0,60 mg salbutamol-sulfata)



**Slika 4.108.** Predviđene količine deponovanog salbutamol-sulfata u plućima nakon inhalacione primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica (0,60 mg salbutamol-sulfata) kod čoveka

## **5. ZAKLJUČAK**

U okviru ove disertacije sprovedena su ispitivanja sa ciljem razvoja i optimizacije postupka za izradu praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, kao i *in vitro* i *in silico* karakterizacija praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance u smislu ispitivanja farmaceutsko-tehnoloških, funkcionalnih i biofarmaceutskih svojstava, sa posebnim aspektom na *in silico* predviđanje aerodinamičkih svojstava praškova za inhalaciju (CFPD metodom) i primenu fiziološki-zasnovanog farmakokinetičkog (PBPK) modelovanja za predviđanje depozicije, apsorpcije i raspodele inhalaciono primenjenih model lekovitih supstanci: salbutamola (primenjenog u obliku sulfata), kao visoko rastvorljive lekovite supstance i budesonida, kao nisko rastvorljive lekovite supstance. Na osnovu dobijenih rezultata, doneto je nekoliko zaključaka, koji su navedeni u skladu sa postavljenim ciljevima četiri različite faze istraživanja.

1. U prvoj fazi eksperimentalnog rada razvijene su odgovarajuće metode (emulgovanje na povišenoj temperaturi praćeno sušenjem smrzavanjem ili raspršivanjem) za izradu praška za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica. Nakon toga, dobijene su formulacije praškova čvrstih lipidnih mikročestica primenom obe metode sušenja. Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz izrađenih formulacija pokazali su da je moguće postići modifikovano (produženo) oslobađanje salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Modifikacija brzine oslobađanja lekovite supstance iz izrađenih praškova je, između ostalog, zavisila od vrste lipidne komponente koja je korišćena za izradu čvrstih lipidnih mikročestica. Formulacije sa glicerildibehenatom su obezbedile znatno sporije rastvaranje salbutamol-sulfata iz praškova čvrstih lipidnih mikročestica u odnosu na formulacije sa stearylalkoholom. Zbog toga je zaključeno da je glicerildibehenat lipidna komponenta izbora u razvoju praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata. Na osnovu sveobuhvatne *in vitro* karakterizacije dobijenih formulacija (raspodele veličine, morfologije i gustine čvrstih lipidnih mikročestica, aerodinamičkih karakteristika praškova, udela salbutamol-sulfata), zaključeno je da su praškovi čvrstih lipidnih mikročestica dobijeni metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem pokazali adekvatnije farmaceutsko-tehnološke i funkcionalne karakteristike u odnosu na praškove dobijene metodom emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem smrzavanjem. Stoga je metoda sušenja raspršivanjem izabrana kao optimalna metoda sušenja suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica za dobijanje praškova za inhalaciju, pa je korišćena i u drugoj fazi eksperimentalnog rada za izradu novih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica.

2. Izabrana metoda emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem za izradu praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica je složen proces, u kome je bilo neophodno optimizovati veliki broj različitih faktora formulacije i parametara procesa kako bi se dobili praškovi za inhalaciju odgovarajućeg kvaliteta. Zbog toga je primenom QbD pristupa definisan QTTP praška za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, tako da dobijeni prašak za inhalaciju pokazuje željene aerodinamičke karakteristike, uz istovremenu modifikaciju brzine rastvaranja salbutamol-sulfata. Najpre su identifikovani CMA i CPP koji su značajno uticali na farmaceutsko-tehnološke karakteristike čvrstih lipidnih mikročestica. Uočeno je da je udeo surfaktanta imao značajan efekat na veličinu i raspodelu veličine čvrstih lipidnih mikročestica ( $p < 0,0001$  i  $p = 0,0344$ , redom), pri čemu su se manja veličina mikročestica i uža širina raspodele veličine mikročestica dobile primenom većeg udela surfaktanta. Pored toga, procenjeno je da je efekat „pranja“ suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica imao značajan uticaj samo na veličinu čvrstih lipidnih mikročestica ( $p = 0,0087$ ). Kao najznačajniji CMA i CPP, koji su značajno uticali na veličinu i stvarnu gustinu čvrstih lipidnih mikročestica, izdvojili su se brzina vazduha za raspršivanje i dodatak trehaloze. Iako se generalno teži manjoj gustini čestica praškova za inhalaciju, ispostavilo se da je dodatak trehaloze statistički značajno ( $p = 0,0009$ ) povećao gustinu čvrstih lipidnih mikročestica, pri čemu ovo povećanje gustine nije imalo negativan uticaj na njihove aerodinamičke karakteristike. Štaviše, dodatak trehaloze

doprineo je razvoju praškova za inhalaciju sa većom FPF vrednošću. Drugim rečima, iako je dodatak trehaloze imao za cilj da zaštiti čvrste lipidne mikročestice u procesu sušenja raspršivanjem, istovremeno je poboljšao finalne aerodinamičke karakteristike praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Brzina vazduha za raspršivanje se izdvojila kao najbitniji CPP procesa sušenja raspršivanjem, čije je povećanje dovelo do značajno manje veličine mikročestica ( $p = 0,0054$ ), što je posledično dovelo do većih FPF vrednosti praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Formulacija F9 se izdvojila kao formulacija koja je pokazala najveću FPF vrednost (oko 36-38%) na osnovu rezultata *in vitro* ispitivanja aerodinamičkih karakteristika ove formulacije u dva različita uređaja, NGI i FSI. Parametri koji su korišćeni za izradu F9 formulacije su: 1,5% (*m/m*) poloksamera 188, 5% (*m/m*) glicerildibehenata, brzina homogenizacije od 13400 obr/min, vreme homogenizacije od 2 min, „pranje“ čvrstih lipidnih mikročestica, dodatak rastvora trehaloze pre procesa sušenja raspršivanjem, brzina vazduha za raspršivanje od 670 L/h, ulazna temperatura sušenja od 89 °C. Vezano za drugi deo QTTP-a, koji se odnosio na modifikaciju brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz praškova za inhalaciju, izdvojili su se CMA i CPP: udeo surfaktanta i „pranje“ suspenzija čvrstih lipidnih mikročestica, pri čemu je, očekivano, uočen i uticaj veličine čvrstih lipidnih mikročestica na brzinu rastvaranja lekovite supstance. Međutim, zaključeno je da je modifikovano (produženo) oslobađanje salbutamol-sulfata iz ispitivanih praškova čvrstih lipidnih mikročestica rezultat kompleksnog uticaja brojnih faktora, kao i njihovih međusobnih interakcija. Rezultati druge faze su pokazali da je *in vitro* oslobađanje salbutamol-sulfata iz svih ispitivanih formulacija bilo sporije u poređenju sa čistom lekovitom supstancom i njenom fizičkom smešom sa lipidnom komponentom (glicerildibehenatom), što ukazuje na potencijal postizanja modifikovane (produžene) brzine rastvaranja salbutamol-sulfata iz razvijenih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica.

Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da je metoda emulgovanja na povišenoj temperaturi u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem pogodna za izradu praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica. Ova metoda se može koristiti za izradu praškova za inhalaciju sa odgovarajućim aerodinamičkim karakteristikama i modifikovanim brzinom oslobađanja salbutamol-sulfata, čime bi mogla da se poboljša komplijansa pacijenata i poveća efikasnost terapije kroz npr. sprečavanje pogoršanja simptoma, koji se javljaju u noćnim epizodama astme. Pristup primenjen u ovoj studiji može poslužiti kao osnova za razvoj novih preparata praškova za inhalaciju sa različitim model lekovitim supstancama i lipidnim komponentama za terapiju raznih respiratornih bolesti, uključujući respiratorne virusne infekcije koje su trenutno ogromna pretnja ljudskoj populaciji.

3. U trećoj fazi istraživanja, primenom *in silico* CFD-DPM modela su mehanistički opisane trajektorije čvrstih lipidnih mikročestica i njihove interakcije sa zidom RS01<sup>®</sup> inhalatora i predviđeni su parametri, kao što su npr. regionalna depozicija čestica u inhalatoru, frakcije čestica koje se lepe za zid inhalatora i koje udaraju u zid, koji se ne mogu utvrditi dostupnim *in vitro* metodama karakterizacije. Pored toga, ovom savremenom *in silico* metodom procenjene su i aerodinamičke karakteristike praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, kao što su EF, FPF, MMAD i GSD. Ovo je velika prednost pomenute *in silico* metode budući da je jednostavnijim *in vitro* metodama (kao što su FSI i TSI), korišćenim u ovoj studiji, moguće proceniti samo karakteristike kao što su EF i FPF, dok je za određivanje MMAD parametra neophodno primeniti složenije metode, kao što je npr. NGI. Performanse CFD-DPM modela procenjene su poređenjem rezultata aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju dobijenih *in vitro* metodama sa rezultatima *in silico* predviđanja. CFD-DPM predviđene EF vrednosti bile su uporedive sa vrednostima EF dobijenih primenom tri različite *in vitro* metode. Tačnije, CFD-DPM predviđene EF vrednosti za tri formulacije (F1, F7 i F10) bile su vrlo slične sa *in vitro* određenim vrednostima, dok je loša sposobnost predviđanja modela primećena u slučaju formulacije F9, kao posledica nastanka aglomerata čvrstih lipidnih mikročestica usled prisustva trehaloze u ovoj formulaciji. Naime, nastanak aglomerata i njihovo aerodinamičko ponašanje nije moglo biti simulirano pomoću izgrađenog CFD-DPM modela. S obzirom na to da pozitivan uticaj trehaloze na aerodinamičko

ponašanje praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, prethodno utvrđen u *in vitro* ispitivanjima, nije mogao biti simuliran primenjenim CFD-DPM modelom, korelaciju između *in silico* i *in vitro* dobijenih rezultata u vezi ostalih aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju (MMAD, GSD i FPF) nije bilo moguće uspostaviti. Ipak, rezultati treće faze istraživanja ukazali su na značaj primenjenih *in silico* modela u razvoju novih formulacija praškova za inhalaciju, budući da su CFD-DPM modelom određeni parametri koje nije moguće utvrditi dostupnim *in vitro* metodama. Pri tome je pokazano da su neophodna dodatna unapređenja razvijenog CFD-DPM modela kako bi mogao da simulira sve fenomene (npr. (de)aglomeraciju mikročestica) koji utiču na aerodinamičke karakteristike specifičnih formulacija praškova za inhalaciju, kao što su čvrste lipidne mikročestice. Na osnovu svih zapažanja, preporuka je da se pomenuti CFD-DPM *in silico* modeli koriste u kombinaciji sa *in vitro* metodama radi pouzdane i sveobuhvatne karakterizacije praškova za inhalaciju.

Poređenjem aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju (FPF i EF) dobijenih pomoću tri *in vitro* metode ustanovljeno je da rezultati dobijeni različitim metodama nisu uvek uporedivi. Naime, zaključeno je da bi se obe jednostavnije *in vitro* metode (FSI i TSI) mogle koristiti za određivanje EF praškova za inhalaciju u fazi skrininga, prilikom razvoja novih formulacija praškova za inhalaciju, ali da su rezultati dobijeni primenom TSI metode u boljoj korelaciji sa rezultatima dobijenim u NGI uređaju. Dodatno, najveći nivo korelacije ( $R^2 = 0,9440$ ) uočen je između NGI i TSI rezultata za FPF vrednosti ispitivanih praškova čvrstih lipidnih mikročestica. Ovo pokazuje da TSI može da se koristi kao pouzdana metoda u fazi skrininga tokom razvoja novih formulacija praškova za inhalaciju, kao i za određivanje FPF i EF praškova za inhalaciju u obliku čvrstih lipidnih mikročestica, iako novi trendovi i regulatorni propisi daju prednost analizama u impaktorima. Dobijeni rezultati stoga služe kao potvrda da TSI treba zadržati kao farmakopejski (Ph. Eur.) propisanu metodu. Međutim, neophodne su dodatne studije u kojima bi se uporedili rezultati određivanja aerodinamičkih karakteristika praškova za inhalaciju dobijeni različitim, farmakopejski propisanim *in vitro* metodama, te utvrdila njihova međusobna usaglašenost, s obzirom na to da ona može zavisi i od vrste i sastava ispitivanih formulacija praškova za inhalaciju. Ovakvi podaci su od velikog značaja, kako za proizvođače lekova za inhalaciju, tako i za regulatorne agencije, jer trenutna regulativa ne prepoznaje razlike između rezultata različitih metoda koje su opisane u ovoj disertaciji.

4. U četvrtoj fazi eksperimentalnog rada izgrađeni su *in silico* PBPK modeli za pacova (kao eksperimentalnu životinju koja se najčešće koristi u pretkliničkim ispitivanjima) i čoveka za predviđanje depozicije, apsorpcije i raspodele salbutamola (primenjenog u obliku sulfata) i budesonida nakon inhalacione primene.

Najpre je izgrađen i validiran PBPK model inhalacione (intratrahealne) primene budesonida za pacova. Simulacijama za relativno jednostavnu formulaciju praška za inhalaciju, kao što je BUD-PT, utvrđeno je da određene razlike između *in vivo* uočene i *in silico* predviđene depozicije lekovite supstance u plućima nemaju značajan uticaj na moć *in silico* modela da predvidi apsorpciju lekovite supstance. Odnosno, ukoliko podaci o *in vivo* depoziciji leka u plućima pacova nisu dostupni, *in vitro* aerodinamičke karakteristike jednostavnijih formulacija praškova za inhalaciju mogle bi se potencijalno koristiti kao ulazni podatak za *in silico* predviđanje depozicije, koje može dati prilično dobra predviđanja profila apsorpcije lekovite supstance. Ipak, trenutno ograničenje *in silico* metoda za predviđanje depozicije lekova kod životinja je to što se deponovane frakcije leka, dobijene pomoću MPPD modela, ne mogu koristiti direktno kao ulazni podaci u PCAT™ modelu (u okviru GastroPlus™ softvera) za simulacije apsorpcije i raspodele lekovite supstance, dok sam PCAT™ model ne daje opciju za predviđanje depozicije leka u plućima životinja. Još jedna prednost razvijenog PBPK modela ogleda se u tome što je pružio mehanistička objašnjenja i omogućio razumevanje uticaja aerodinamičkih svojstava praškova za inhalaciju i posledične depozicije u plućima na regionalni profil apsorpcije lekovite supstance. Naime, simulacije su ukazale na očekivane razlike u profilima apsorpcije budesonida po regionima pluća u zavisnosti od depozicije čestica (koja, sa druge strane, zavisi od aerodinamičkih

svojstava praškova) čak i u slučajevima kada se te razlike nisu odrazile na predviđene profile koncentracije budesonida u plazmi (što je utvrđeno na primeru BUD-NC formulacije). Ovo je velika prednost *in silico* PBPK modelovanja jer se apsorpcija lekovite supstance po regionima pluća ne može utvrditi *in vivo* studijama. Rezultati PBPK modelovanja apsorpcije budesonida nakon primene formulacije BUD-NEM pokazali su da predviđanje apsorpcije lekovite supstance nakon inhalacione primene formulacije sa izraženim mukoadhezivnim svojstvima predstavlja veliki izazov usled nemogućnosti da se precizno odredi konstanta brzine apsorpcije lekovite supstance u plućima ( $k_a$ ). Međutim, na primeru BUD-NEM, pokazano je da bi se primenjeni pristup, koji se zasniva na optimizaciji  $k_a$  vrednosti, mogao koristiti za okvirna predviđanja apsorpcije lekovite supstance u plućima u slučajevima kada su dostupni *in vivo* podaci o koncentraciji lekovite supstance u plazmi, kako bi rezultati simulacija mogli biti validirani. Sa druge strane, ovakav pristup nije primenljiv u ranoj fazi razvoja preparata za inhalaciju, kada nisu dostupni podaci iz *in vivo* farmakokinetičkih studija na životinjama.

Validiranim modelom za inhalacionu primenu budesonida kod čoveka su najpre identifikovani ulazni parametri koji imaju najveći uticaj na predviđeni stepen i brzinu apsorpcije budesonida. Rezultati PSA pokazali su da parametar  $k_a$  ima dominantan uticaj na brzinu i stepen apsorpcije lekovite supstance. Slična zapažanja su dobijena i primenom modela za pacova. Određeni uticaj na stepen apsorpcije lekovite supstance pokazala je i rastvorljivost budesonida u plućnoj tečnosti, čije povećanje dovodi do porasta vrednosti  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ . Dodatno, simulacije su pokazale da bi inhalacionom primenom mukoadhezivnih formulacija, kao što je BUD-NEM, bilo moguće postići sporije rastvaranje i produženu apsorpciju budesonida i kod ljudi, kao što je uočeno kod pacova. Pokazano je i da primenjeni pristup menjanja  $k_a$  vrednosti može u određenoj meri da simulira razlike u brzini rastvaranja i predvidi apsorpciju nisko rastvorljivih lekovitih supstanci primenjenih inhalacijom. Ovakav pristup nije idealan budući da brzina rastvaranja lekovite supstance nije jedini faktor koji utiče na konstantu brzine apsorpcije. Međutim, usled trenutnih ograničenja PCAT™ modela koje podrazumevaju nemogućnost simulacije produženog vremena zadržavanja leka u plućima, kao i produžene brzine rastvaranja lekovite supstance na njenu apsorpciju, primenjeni pristup menjanja  $k_a$  vrednosti predstavlja prihvatljivo rešenje.

Na primeru salbutamol-specifičnog modela pokazana je mogućnost skaliranja farmakokinetičkih parametara ( $Cl$ ,  $V_c$  i  $t_{1/2}$ ) sa modela za pacova na model čoveka. Salbutamol-specifičan model za pacova je, zajedno sa budesonid-specifičnim modelom za pacova, korišćen za uspostavljanje korelacije između  $k_a$  vrednosti eksperimentalnih formulacija salbutamol-sulfata i budesonida (SAL-HA, BUD-NC i BUD-PT) dobijenih na modelima za pacove, sa parametrom  $D_n$ , koji opisuje *in vitro* brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz ove tri formulacije. Pored navedene, uspostavljena je i korelacija između  $k_a$  vrednosti formulacija salbutamol-sulfata i budesonida (SAL-HA, BUD-NC, BUD-PT, BUD-NEM) dobijenih na modelima za pacove, sa  $k_a$  vrednostima za ove četiri formulacije na ljudima. Na osnovu uspostavljenih korelacija izračunate su vrednosti  $k_a$  salbutamola za eksperimentalne formulacije čvrstih lipidnih mikročestica kod ljudi.

Salbutamol-specifičan model za čoveka validiran je poređenjem predviđenih farmakokinetičkih parametara sa *in vivo* podacima dobijenim nakon inhalacione primene registrovanih preparata za inhalaciju sa salbutamol-sulfatom (pMDI u dve različite doze i DPI u jednoj dozi, uz blokadu gastrointestinalne apsorpcije). Usled nedostatka dostupnih *in vivo* podataka o depoziciji pomenutih preparata po regionima pluća, depozicija leka u sva tri slučaja predviđena je *in silico* ICRP66 modelom. Pored toga, ovaj model je korišćen i za predviđanje depozicije čestica svih ispitivanih eksperimentalnih formulacija praškova za inhalaciju sa modifikovanim oslobađanjem salbutamol-sulfata. Zaključeno je, međutim, da ICRP66 model generalno uvek predviđa nižu ukupnu depoziciju leka u plućima u odnosu na očekivanu, nezavisno od aerodinamičkih svojstava čestica leka, protoka vazduha, karakteristika lekovite supstance itd. No, bez obzira na to što ICRP66 model ne daje uvek pouzdana predviđanja vezana za ukupnu deponovanu frakciju leka, ovaj model se može smatrati korisnim jer daje uvid u raspodelu/odnose deponovanih frakcija leka po regionima pluća za različite eksperimentalne formulacije. Zbog toga je primenljiv za preliminarna predviđanja depozicije čestica eksperimentalnih formulacija



praškova za inhalaciju kod ljudi. Ovo je naročito značajno ako se uzme u obzir da skaliranje *in vivo* podataka o pulmonalnoj depoziciji leka kod eksperimentalnih životinja (najčešće pacova) na ljude nije prepoznato kao adekvatan pristup usled razlika u anatomiji i fiziologiji pluća pacova i čoveka.

Rezultati simulacija ukazali su na sporiju apsorpciju salbutamola nakon inhalacione primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica u odnosu na apsorpciju lekovite supstance nakon primene registrovanog preparata sa tržišta (Diskus<sup>®</sup> DPI). Ovakvi rezultati ukazuju na to da bi inhalacionom primenom praškova čvrstih lipidnih mikročestica potencijalno mogla da se produži apsorpcija salbutamola u plućima i omogući ređe doziranje preparata. Takođe, simulacije su pokazale da se nakon inhalacione primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica očekuje kompletnija depozicija leka u plućima i, posledično, znatno veći procenat apsorbovanog salbutamola u odnosu na primenu Diskus<sup>®</sup> DPI. Ovo ukazuje na to da bi u slučaju inhalacione primene praškova čvrstih lipidnih mikročestica bile potrebne manje doze salbutamol-sulfata u odnosu na doze preparata sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance. Dodatno, PBPK simulacije su pokazale da se nakon inhalacione primene većine ispitivanih formulacija praškova čvrstih lipidnih mikročestica očekuje manji obim apsorpcije salbutamola iz GIT-a u odnosu na inhalacionu primenu Diskus<sup>®</sup> DPI kod ljudi. Na osnovu toga bi se moglo očekivati i smanjenje potencijalnih neželjenih dejstava salbutamola.

Dobijeni rezultati pokazuju da bi inhalaciona primena praškova čvrstih lipidnih mikročestica sa salbutamol-sulfatom potencijalno mogla obezbediti bolju komplijansu pacijenata usled ređeg doziranja leka, veću efikasnost i bolju bezbednost inhalacione terapije. Ova zapažanja predstavljaju racionalnu osnovu za dalje *in vivo* studije, koje bi eventualno potvrdile *in silico* predviđanja.

## **6. LITERATURA**

- Abdelaziz, H.M., Gaber, M., Abd-Elwakil, M.M., Mabrouk, M.T., Elgohary, M.M., Kamel, N.M., Kabary, D.M., Freag, M.S., Samaha, M.W., Mortada, S.M., Elkhodairy, K.A., 2018. Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. *J. Control. Release.* 269, 374-392.
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., 2006. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1688-1713.
- Al ayoub, Y., Buzgeia, A., Almousawi, G., Mazhar, H.R.A., Alzouebi, B., Gopalan, R.C., Assi, K.H., 2022. In-vitro in-vivo correlation (IVIVC) of inhaled products using twin stage impinger. *J. Pharm. Sci.* 111, 395-402.
- Alhajj, N., O'Reilly, N.J., Cathcart, H., 2021. Designing enhanced spray dried particles for inhalation: a review of the impact of excipients and processing parameters on particle properties. *Powder Technol.* 384, 313-331.
- Alqahtani, S., Roberts, C.J., Stolnik, S., Bosquillon, C., 2020. Development of an in vitro system to study the interactions of aerosolized drugs with pulmonary mucus. *Pharmaceutics.* 12, 145.
- Amidon, G.L., Lennernäs, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 12, 413-420.
- Amini, E., Kurumaddali, A., Bhagwat, S., Berger, S.M., Hochhaus, G., 2021. Optimization of the Transwell<sup>®</sup> system for assessing the dissolution behavior of orally inhaled drug products through in vitro and in silico approaches. *Pharmaceutics.* 13, 1109.
- Ammari, W.G., Oriquat, G.A., Sanders, M., 2020. Comparative pharmacokinetics of salbutamol inhaled from a pressurized metered dose inhaler either alone or connected to a newly enhanced spacer design. *Eur. J. Pharm. Sci.* 147, 105304.
- Applied Research Associates, Inc. (ARA), Multiple-path particle dosimetry model (v. 3.04). Dostupno na: <https://www.ara.com/mppd/> (datum poslednjeg pristupa: 08.07.2022.).
- ARLA Respiratory Deposition Calculator, The aerosol research lab of Alberta, 2007. Dostupno na [https://sites.ualberta.ca/~arla/deposition\\_calculator.html](https://sites.ualberta.ca/~arla/deposition_calculator.html) (datum poslednjeg pristupa: 19.08.2022.).
- Arora, D., Shah, K.A., Halquist, M.S., Sakagami, M., 2010. In vitro aqueous fluid-capacity-limited dissolution testing of respirable aerosol drug particles generated from inhaler products. *Pharm. Res.* 27, 786-795.
- Arora, S., Haghi, M., Loo, C.Y., Traini, D., Young, P.M., Jain, S., 2015. Development of an inhaled controlled release voriconazole dry powder formulation for the treatment of respiratory fungal infection. *Mol. Pharm.* 12, 2001-2009.
- Arya, V., Coowanitwong, I., Brugos, B., Kim, W.S., Singh, R., Hochhaus, G., 2006. Pulmonary targeting of sustained release formulation of budesonide in neonatal rats. *J. Drug. Target.* 14, 680-686.
- Bäckman, P., Tehler, U., Olsson, B., 2017. Predicting exposure after oral inhalation of the selective glucocorticoid receptor modulator, AZD5423, based on dose, deposition pattern, and mechanistic modeling of pulmonary disposition. *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug Deliv.* 30, 108-117.
- Bäckman, P., Cabal, A., Clark, A., Ehrhardt, C., Forbes, B., Hastedt, J., Hickey, A., Hochhaus, G., Jiang, W., Kassinos, S., Kuehl, P.J., 2022. iBCS. 2: mechanistic modeling of pulmonary availability of inhaled drugs versus critical product attributes. *Mol. Pharm.* 19, 2040-2070.

- Balducci, A.G., Steckel, H., Guarneri, F., Rossi, A., Colombo, G., Sonvico, F., Cordts, E., Bettini, R., Colombo, P., Buttini, F., 2015. High shear mixing of lactose and salmeterol xinafoate dry powder blends: Biopharmaceutic and aerodynamic performances. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 30, 443-449.
- Bass, K., Farkas, D., Longest, W., 2019. Optimizing aerosolization using computational fluid dynamics in a pediatric air-jet dry powder inhaler. *AAPS PharmSciTech.* 20, 1-19.
- Behara, S.R., Farkas, D.R., Hindle, M., Longest, P., 2014. Development of a high efficiency dry powder inhaler: effects of capsule chamber design and inhaler surface modifications. *Pharm. Res.* 31, 360-372.
- Belotti, S., Rossi, A., Colombo, P., Bettini, R., Rekkas, D., Politis, S., Colombo, G., Balducci, A.G., Buttini, F., 2014. Spray dried amikacin powder for inhalation in cystic fibrosis patients: a quality by design approach for product construction. *Int. J. Pharm.* 471, 507-515.
- Bhagwat, S., Schilling, U., Chen, M.J., Wei, X., Delvadia, R., Absar, M., Saluja, B., Hochhaus, G., 2017. Predicting pulmonary pharmacokinetics from in vitro properties of dry powder inhalers. *Pharm. Res.* 34, 2541-2556.
- Bhojar, P.K., Morani, D.O., Biyani, D.M., Umekar, M.J., Mahure, J.G., Amgaonkar, Y.M., 2011. Encapsulation of naproxen in lipid-based matrix microspheres: characterization and release kinetics. *J. Young Pharm.* 3, 105-111.
- Biswas, R., Hanania, N.A., Sabharwal, A., 2017. Factors determining in vitro lung deposition of albuterol aerosol delivered by ventolin metered-dose inhaler. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 30, 256-266.
- Bodas, D.S., Ige, P.P., 2019. Central composite rotatable design for optimization of budesonide-loaded cross-linked chitosan–dextran sulfate nanodispersion: characterization, in vitro diffusion and aerodynamic study. *Drug Dev. Ind.* 45, 1193-1204.
- Boger, E., Fridén, M., 2019. Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling accurately predicts the better bronchodilatory effect of inhaled versus oral salbutamol dosage forms. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 32, 1-12.
- Bohr, A., Ruge, C.A., Beck-Broichsitter, M. 2014. Preparation of nanoscale pulmonary drug delivery formulations by spray drying. In: Capco, D., Chen, Y. (Eds), *Nanomaterial. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer, Dordrecht, 183-206.
- Boobis, A.R., 1998. Comparative physicochemical and pharmacokinetic profiles of inhaled beclomethasone dipropionate and budesonide. *Respir. Med.* 92, 2-6.
- Boraey, M.A., Hoe, S., Sharif, H., Miller, D.P., Lechuga-Ballesteros, D., Vehring, R., 2013. Improvement of the dispersibility of spray-dried budesonide powders using leucine in an ethanol–water cosolvent system. *Powder Technol.* 236, 171-178.
- Borghardt, J.M., Weber, B., Staab, A., Kloft, C., 2015. Pharmacometric models for characterizing the pharmacokinetics of orally inhaled drugs. *AAPS J.* 17, 853-870.
- Borgström, L., Bondesson, E., Moren, F., Trofast, E., Newman, S.P., 1994. Lung deposition of budesonide inhaled via turbuhaler: a comparison with terbutaline sulphate in normal subjects. *Eur. Respir. J.* 7, 69-73.
- Bosquillon, C., Lombry, C., Preat, V., Vanbever, R., 2001. Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. *J. Control. Release.* 70, 329-339.

- Bot, A.I., Tarara, T.E., Smith, D.J., Bot, S.R., Woods, C.M., Weers, J.G., 2000. Novel lipid-based hollow-porous microparticles as a platform for immunoglobulin delivery to the respiratory tract. *Pharm. Res.* 17, 275-283.
- Bot, A.I., Smith, D.J., Bot, S., Dellamary, L., Tarara, T.E., Harders, S., Phillips, W., Weers, J.G., Woods, C.M., 2001. Receptor-mediated targeting of spray-dried lipid particles coformulated with immunoglobulin and loaded with a prototype vaccine. *Pharm. Res.* 18, 971-979.
- Boulton, D.W., Fawcett, J.P., 1996. Enantioselective disposition of salbutamol in man following oral and intravenous administration. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 41, 35-40.
- Brach, R.M., Dunn, P.F., 1992. A mathematical model of the impact and adhesion of microspheres. *Aerosol Sci. Technol.* 16, 51-64.
- Broadhead, J., Gibson, M., 2012. Parenteralni preparati. In: Gibson, M., Ibrić, S., Parojčić, J. (Eds.), *Preformulacija i formulacija lekova*. Informa Healthcare, London, 345-369.
- Buckingham, R. (Ed.), *Martindale: The Complete Drug Reference*. [online] London: Pharmaceutical Press. Dostupno na: <http://www.medicinescomplete.com/> (datum poslednjeg pristupa: 09.11.2022.).
- Buttini, F., Pasquali, I., Brambilla, G., Copelli, D., Alberi, M.D., Balducci, A.G., Bettini, R., Sisti, V., 2016. Multivariate analysis of effects of asthmatic patient respiratory profiles on the in vitro performance of a reservoir multidose and a capsule-based dry powder inhaler. *Pharm. Res.* 33, 701-715.
- Buttini, F., Rozou, S., Rossi, A., Zoumpliou, V., Rekkas, D.M., 2018. The application of quality by design framework in the pharmaceutical development of dry powder inhalers. *Eur. J. Pharm. Sci.* 113, 64-76.
- Byron, P.R., Patton, J.S., 1994. Drug delivery via the respiratory tract. *J. Aerosol Med.* 7, 49-75.
- Caldwell, G.W., Masucci, J.A., Yan, Z., Hageman, W., 2004. Allometric scaling of pharmacokinetic parameters in drug discovery: can human CL, Vss and t1/2 be predicted from in-vivo rat data? *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 29, 133-143.
- Carvalho, T.C., Peters, J.I., Williams III, R.O., 2011. Influence of particle size on regional lung deposition—what evidence is there? *Int. J. Pharm.* 406, 1-10.
- Cavalli, R., Caputo, O., Carlotti, M.E., Trotta, M., Scarnecchia, C., Gasco, M.R., 1997. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 148, 47-54.
- Chan, J.G.Y., Chan, H.K., Prestidge, C.A., Denman, J.A., Young, P.M., Traini, D., 2013. A novel dry powder inhalable formulation incorporating three first-line anti-tubercular antibiotics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83, 285-292.
- Chang, T.L., Zhan, H., Liang, D., Liang, J.F., 2015. Nanocrystal technology for drug formulation and delivery. *Front. Chem. Sci. Eng.* 9, 1-14.
- Chaurasiya, B., Zhao, Y.Y., 2020. Dry powder for pulmonary delivery: a comprehensive review. *Pharmaceutics.* 13, 31.
- Christopher, D., Dey, M., Lyapustina, S., Mitchell, J., Stein, S., Tougas, T.P., Van Oort, M., Strickland, H., Wyka, B., 2010. Generalized simplified approaches for MMAD determination. In *Pharm Forum.* 36, 812-823.

- Cingolani, E., Alqahtani, S., Sadler, R.C., Prime, D., Stolnik, S., Bosquillon, C., 2019. In vitro investigation on the impact of airway mucus on drug dissolution and absorption at the air-epithelium interface in the lungs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 141, 210-220.
- Cipolla, D.C., Gonda, I., 2011. Formulation technology to repurpose drugs for inhalation delivery. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* 8, 123-130.
- Cipolla, D., Shekunov, B., Blanchard, J., Hickey, A., 2014. Lipid-based carriers for pulmonary products: preclinical development and case studies in humans. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75, 53-80.
- Coates, M.S., Fletcher, D.F., Chan, H.K., Raper, J.A., 2004. Effect of design on the performance of a dry powder inhaler using computational fluid dynamics. Part 1: grid structure and mouthpiece length. *J. Pharm. Sci.* 93, 2863-2876.
- Coates, M.S., Fletcher, D.F., Chan, H.K., Raper, J.A., 2005a. The role of capsule on the performance of a dry powder inhaler using computational and experimental analyses. *Pharm. Res.* 22, 923-932.
- Coates, M.S., Chan, H.K., Fletcher, D.F., Raper, J.A., 2005b. Influence of air flow on the performance of a dry powder inhaler using computational and experimental analyses. *Pharm. Res.* 22, 1445-1453.
- Coates, M.S., Chan, H.K., Fletcher, D.F., Raper, J.A., 2006. Effect of design on the performance of a dry powder inhaler using computational fluid dynamics. Part 2: air inlet size. *J. Pharm. Sci.* 95, 1382-1392.
- Coates, M.S., Chan, H.K., Fletcher, D.F., Chiou, H., 2007. Influence of mouthpiece geometry on the aerosol delivery performance of a dry powder inhaler. *Pharm. Res.* 24, 1450-1456.
- Cook, R.O., Pannu, R.K., Kellaway, I.W., 2005. Novel sustained release microspheres for pulmonary drug delivery. *J. Control. Release.* 104, 79-90.
- Cortesi, R., Esposito, E., Luca, G., Nastruzzi, C., 2002. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials.* 23, 2283-2294.
- Corzo, C., Fuchsbichler, A., Savencu, I., Urich, J.A., Zimmer, A., Lochmann, D., Reyer, S., Salar-Bezadi, S., 2021. Lipid-microparticles for pulmonary delivery of active pharmaceutical ingredients: impact of lipid crystallization on spray-drying processability. *Int. J. Pharm.* 610, 121259.
- Costa, P., Lobo, J.M.S., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 123-133.
- Crowe, L.M., Reid, D.S., Crowe, J.H., 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 71, 2087-2093.
- Cubitt, H.E., Houston, J.B., Galetin, A., 2011. Prediction of human drug clearance by multiple metabolic pathways: integration of hepatic and intestinal microsomal and cytosolic data. *Drug Metab. Dispos.* 39, 864-873.
- Cvijić, S., Djuris, J., Ibric, S., 2017. Proceedings from Training school “Emerging Device and Particle Engineering Technologies for Optimal Pulmonary Drug Delivery”, 20-22 February 2017, Valletta, Malta.
- Cvijić, S., Ignjatović, J., Parojčić, J., Ibrić, S., 2021. The emerging role of physiologically-based pharmacokinetic/biopharmaceutics modeling in formulation development. *Arh. Farm.* 71, 318-335.

- D' Oyley, S., Nelmes, L., Blatchford, C., 2006. Review of alternative particle sizing techniques to the ACI for MDIs. Dostupno na: <https://slideplayer.com/slide/10199651/> (datum poslednjeg pristupa: 09.11.2022.).
- Dahneke, B., 1975. Further measurements of the bouncing of small latex spheres. *J. Colloid Interface Sci.* 51, 58-65.
- Daman, Z., Gilani, K., Rouholamini Najafabadi, A., Eftekhari, H.R., Barghi, M.A., 2014. Formulation of inhalable lipid-based salbutamol sulfate microparticles by spray drying technique. *DARU J. Pharm. Sci.* 22, 1-9.
- Davies, N.M., Feddah, M.R., 2003. A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products. *Int. J. Pharm.* 255, 175-187.
- Davies, M.J., Kerry, T.D., Seton, L., Murphy, M.F., Gibbons, P., Khoo, J., Naderi, M., 2013. The crystal engineering of salbutamol sulphate via simulated pulmonary surfactant monolayers. *Int. J. Pharm.* 446, 34-45.
- De Backer, J.W., Vos, W.G., Devolder, A., Verhulst, S.L., Germonpré, P., Wuyts, F.L., Parizel, P.M., De Backer, W., 2008. Computational fluid dynamics can detect changes in airway resistance in asthmatics after acute bronchodilation. *J. Biomech.* 41, 106-113.
- De Backer, J., Vos, W., Vinchurkar, S., Van Holsbeke, C., Poli, G., Claes, R., Salgado, R., De Backer, W., 2015. The effects of extrafine beclometasone/formoterol (BDP/F) on lung function, dyspnea, hyperinflation, and airway geometry in COPD patients: novel insight using functional respiratory imaging. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 28, 88-99.
- De Boer, A.H., Gjaltema, D., Hagedoorn, P., Frijlink, H.W., 2002. Characterization of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor analysis and laser diffraction technique. *Int. J. Pharm.* 249, 219-231.
- de Boer, A.H., Hagedoorn, P., Woolhouse, R., Wynn, E., 2012. Computational fluid dynamics (CFD) assisted performance evaluation of the Twincer™ disposable high-dose dry powder inhaler. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 1316-1325.
- de Boer, A.H., Hagedoorn, P., Hoppentocht, M., Buttini, F., Grasmeyer, F., Frijlink, H.W., 2017. Dry powder inhalation: past, present and future. *Expert Opin. Drug Deliv.* 14, 499-512.
- DeBoer, E.M., Kimbell, J.S., Pickett, K., Hatch, J.E., Akers, K., Brinton, J., Hall, G.L., King, L., Ramanauskas, F., Rosenow, T., Stick, S.M., 2021. Lung inflammation and simulated airway resistance in infants with cystic fibrosis. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 293, 103722.
- De Buck, S.S., Sinha, V.K., Fenu, L.A., Nijsen, M.J., Mackie, C.E., Gilissen, R.A., 2007. Prediction of human pharmacokinetics using physiologically based modeling: a retrospective analysis of 26 clinically tested drugs. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1766-1780.
- DeHaan, W.H., Finlay, W.H., 2004. Predicting extrathoracic deposition from dry powder inhalers. *J. Aerosol Sci.* 35, 309-331.
- Depreter, F., Amighi, K., 2010. Formulation and in vitro evaluation of highly dispersive insulin dry powder formulations for lung administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 454-463.
- Derendorf, H., Hochhaus, G., Meibohm, B., Möllmann, H., Barth, J., 1998. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101, S440-S446.

- DeSesso, J.M., Williams, A.L., 2008. Contrasting the gastrointestinal tracts of mammals: factors that influence absorption. *Annu. Rep. Med. Chem.* 43, 353-371.
- Donnelly, R., Seale, J. P., 2001. Clinical pharmacokinetics of inhaled budesonide. *Clin. Pharmacokinet.* 40, 427-440.
- Donovan, M.J., Kim, S.H., Raman, V., Smyth, H.D., 2012. Dry powder inhaler device influence on carrier particle performance. *J. Pharm. Sci.* 101, 1097-1107.
- Du, X.L., Zhu, Z., Fu, Q., Li, D.K., Xu, W.B., 2002. Pharmacokinetics and relative bioavailability of salbutamol metered-dose inhaler in healthy volunteers. *Acta Pharmacol. Sin.* 23, 663-666.
- Duddu, S.P., Sisk, S.A., Walter, Y.H., Tarara, T.E., Trimble, K.R., Clark, A.R., Eldon, M.A., Elton, R.C., Pickford, M., Hirst, P.H., Newman, S.P., 2002. Improved lung delivery from a passive dry powder inhaler using an engineered PulmoSphere<sup>®</sup> powder. *Pharm. Res.* 19, 689-695.
- Dunham, R.Q., 2012. Rosin-Rammler distributions in ANSYS Fluent. Los Alamos National Lab. (LANL), Los Alamos, NM (United States). Dostupno na: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://permalink.lanl.gov/object/tr?what=info:lanl-repo/lareport/LA-UR-12-24026 (datum poslednjeg pristupa: 14.07.2022.).
- Duong, T., López-Iglesias, C., Szewczyk, P.K., Stachewicz, U., Barros, J., Alvarez-Lorenzo, C., Alnaief, M., García-González, C.A., 2021. A pathway from porous particle technology toward tailoring aerogels for pulmonary drug administration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 671381.
- Duret, C., Wauthoz, N., Sebti, T., Vanderbist, F., Amighi, K., 2012. New respirable and fast dissolving itraconazole dry powder composition for the treatment of invasive pulmonary aspergillosis. *Pharm. Res.* 29, 2845-2859.
- Easyhaler<sup>®</sup> Salbutamol sažetak karakteristika leka, 2018, dostupno na <https://www.medicines.org.uk/emc/product/6339/smpc> (datum poslednjeg pristupa: 26.07.2022.).
- Edsbäcker, S., Larsson, P., Wollmer, P., 2002. Gut delivery of budesonide, a locally active corticosteroid, from plain and controlled-release capsules. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 1357-1362.
- Edsbäcker, S., Andersson, T., 2004. Pharmacokinetics of budesonide (Entocort<sup>™</sup> EC) capsules for crohn's disease. *Clin. Pharmacokinet.* 43, 803-821.
- Eedara, B.B., Tucker, I.G., Das, S.C., 2019. In vitro dissolution testing of respirable size anti-tubercular drug particles using a small volume dissolution apparatus. *Int. J. Pharm.* 559, 235-244.
- Ehrhardt, C., Kneuer, C., Bies, C., Lehr, C.M., Kim, K.J., Bakowsky, U., 2005. Salbutamol is actively absorbed across human bronchial epithelial cell layers. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 18, 165-170.
- Eixarch, H., Haltner-Ukomadu, E., Beisswenger, C., Bock, U., 2010. Drug delivery to the lung: permeability and physicochemical characteristics of drugs as the basis for a pulmonary biopharmaceutical classification system (pBCS). *J. Epithel. Biol. Pharmacol.* 3, 1-14.
- El-Batsh, H., Haselbacher, H., 2002. Numerical investigation of the effect of ash particle deposition on the flow field through turbine cascades. *ASME Turbo Expo 2002: Power for Land, Sea, and Air. Volume 5: Turbo Expo 2002, Parts A and B.* 3-6 June, 2002, Amsterdam, The Netherlands, 1035-1043.
- Eldem, T., Speiser, P., Hincal, A., 1991. Optimization of spray-dried and-congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharm. Res.* 8, 47-54.



El-Din, A.H., Diab, A., Ghoneim, Z., 2016. Assessment of losses in annual energy production of wind turbines subjected to sand erosion. International Conference on Fluid Dynamics, 19-20 December, 2016, Cairo, Egypt.

Ellison, C.A., Wu, S., 2020. Application of structural and functional pharmacokinetic analogs for physiologically based pharmacokinetic model development and evaluation. Regul. Toxicol. Pharmacol. 114, 104667.

El-Sherbiny, I.M., El-Baz, N.M., Yacoub, M.H., 2015. Inhaled nano-and microparticles for drug delivery. Glob. Cardiol. Sci. Pract. 2.

EMA, 2006. Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products. EMEA/CHMP/QWP/49313/2005.

EMA, 2010. Guideline on the investigation of bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98.

EMA, 2018. Guideline on the reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation. EMA/CHMP/458101/2016.

EMA, 2020. ICH M9 guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers. EMA/CHMP/ICH/493213/2018.

Eriksson, J., Thörn, H., Lennernäs, H., Sjögren, E., 2020. Pulmonary drug absorption and systemic exposure in human: predictions using physiologically based biopharmaceutics modeling. Eur. J. Pharm. Biopharm. 156, 191-202.

European Pharmacopoeia 10.0. Strasbourg: Council of Europe. 2020.

Feddah, M.R., Brown, K.F., Gipps, E.M., Davies, N.M., 2000. In-vitro characterization of metered dose inhaler versus dry powder inhaler glucocorticoid products: influence of inspiratory flow rates. J. Pharm. Sci. 3, 318-324.

Fernandes, C.A., Vanbever, R., 2009. Preclinical models for pulmonary drug delivery. Expert Opin. Drug Deliv. 6, 1231-1245.

Finlay, W.H., Martin, A.R., 2008. Recent advances in predictive understanding of respiratory tract deposition. J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv. 21, 189-206.

Fontana, F., Figueiredo, P., Zhang, P., Hirvonen, J.T., Liu, D., Santos, H.A., 2018. Production of pure drug nanocrystals and nano co-crystals by confinement methods. Adv. Drug Deliv. Rev. 131, 3-21.

FDA, 1994. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic methods. Dostupno na <https://www.fda.gov/media/75643/download> (datum poslednjeg pristupa: 26.07.2022.).

FDA, 2017. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutical Classification System. Dostupno na: <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/UCM070246.pdf> (datum poslednjeg pristupa: 03.10.2022.).

FDA, 2018a. Guidance for Industry: Metered Dose Inhaler (MDI) and Dry Powder Inhaler (DPI) Quality Considerations. Dostupno na: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070573.pdf> (datum poslednjeg pristupa 03.07.2022.).

FDA, 2018b. Guidance for Industry: Physiologically Based Pharmacokinetic Analyses - Format and Content. Dostupno na: chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.fda.gov/files/drugs/published/Physiologically-Based-Pharmacokinetic-Analyses-%E2%80%94Format-and-Content-Guidance-for-Industry.pdf (datum poslednjeg pristupa 20.10.2022.).

FDA, 2022. Inactive Ingredients Database. Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/inactive-ingredients-database-download> (datum poslednjeg pristupa 19.08.2022).

Forbes, B., Bäckman, P., Christopher, D., Dolovich, M., Li, B.V., Morgan, B., 2015. In vitro testing for orally inhaled products: developments in science-based regulatory approaches. *AAPS J.* 17, 837-852.

Freitas, C., Müller, R.H., 1998. Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46, 145-151.

Fröhlich, E., 2021. Replacement strategies for animal studies in inhalation testing. *Sci.* 3, 45.

Gehr, P., 1984. Respiratory tract structure and function. *J. Toxicol. Environ. Health Part A Current Issues.* 13, 235-249.

Geller, D.E., Weers, J., Heurding, S., 2011. Development of an inhaled dry-powder formulation of tobramycin using PulmoSphere™ technology. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 24, 175-182.

Gerde, P., Malmlöf, M., Havsborn, L., Sjöberg, C.O., Ewing, P., Eirefelt, S., Ekelund, K., 2017. *DissolvIt*: an in vitro method for simulating the dissolution and absorption of inhaled dry powder drugs in the lungs. *Assay Drug Dev. Technol.* 15, 77-88.

Goldstein, D.A., Tan, Y.K., Soldin, S.J., 1987. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of salbutamol in healthy adult volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 32, 631-634.

Guenette, E., Barrett, A., Kraus, D., Brody, R., Harding, L., Magee, G., 2009. Understanding the effect of lactose particle size on the properties of DPI formulations using experimental design. *Int. J. Pharm.* 380, 80-88.

Gugu, T.H., Chime, S.A., Attama, A.A., 2015. Solid lipid microparticles: an approach for improving oral bioavailability of aspirin. *Asian J. Pharm.* 10, 425-432.

Haghi, M., Traini, D., Bebawy, M., Young, P.M., 2012. Deposition, diffusion and transport mechanism of dry powder microparticulate salbutamol, at the respiratory epithelia. *Mol. Pharm.* 9, 1717-1726.

Hallett, S., Toro, F., Ashurst, J.V., 2022. Physiology, Tidal Volume. [Updated 2022 May 8]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482502/> (datum poslednjeg pristupa: 21.10.2022.).

Hamm, H., Fabel, H., Bartsch, W., 1992. The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives. *Clin. Investig.* 70, 637-657.

Hammer, Ø., Harper, D.A., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 9.

Han, M., Cun, D., Yang, M., 2019. Studies on pulmonary distribution of budesonide nanocrystal loaded muco-adhesive microparticles for inhalation. *J. Shenyang Pharm. Univ.* 36, 956-962.

Hastedt, J.E., Bäckman, P., Clark, A.R., Doub, W., Hickey, A., Hochhaus, G., Kuehl, P.J., Lehr, C.M., Mauser, P., McConville, J., Niven, R., 2016. Scope and relevance of a pulmonary biopharmaceutical classification system. *AAPS/FDA/USP Workshop*, 16-17 March, 2015, Baltimore, MD AAPS Open 2.

- Hastedt, J.E., Bäckman, P., Cabal, A., Clark, A., Ehrhardt, C., Forbes, B., Hickey, A.J., Hochhaus, G., Jiang, W., Kassinos, S., Kuehl, P.J., 2022. iBCS: 1. principles and framework of an inhalation-based biopharmaceutics classification system. *Mol. Pharm.* 19, 2032–2039.
- Heiati, H., Tawashi, R., Phillips, N.C., 1998. Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization. *J. Microencapsul.* 15, 173-184.
- Hickey, A.J., 2003. Pharmaceutical inhalation aerosol powder dispersion: an unbalancing act. *Am. Pharm. Rev.* 6, 106-110.
- Hickey, A.J., 2004. Methods of aerosol particle size characterization. In: Hickey, A.J. (Ed.), *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*. Marcel Dekker Inc., 345-384.
- Higuchi, T., 1963. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.* 52, 1145-1149.
- Hofmann, W., 1996. Modeling techniques for inhaled particle deposition: the state of the art. *J. Aerosol Sci.* 9, 369-388.
- Hofmann, W., 2011. Modelling inhaled particle deposition in the human lung—a review. *J. Aerosol Sci.* 42, 693-724.
- Hofmann, W., 2020. Regional deposition: deposition models. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 33, 239-248.
- Hofmann, W., Sturm, R., 2004. Stochastic model of particle clearance in human bronchial airways. *J. Aerosol Sci.* 17, 73-89.
- Hou, S., Wu, J., Li, X., Shu, H., 2015. Practical, regulatory and clinical considerations for development of inhalation drug products. *Asian J. Pharm.* 10, 490-500.
- Hoye, W.L., Mogalian, E.M., Myrdal, P.B., 2005. Effects of extreme temperatures on drug delivery of albuterol sulfate hydrofluoroalkane inhalation aerosols. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 62, 2271-2277.
- Huang, F., Zhu, Q., Zhou, X., Gou, D., Yu, J., Li, R., Tong, Z., Yang, R., 2021. Role of CFD based in silico modelling in establishing an in vitro-in vivo correlation of aerosol deposition in the respiratory tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 170, 369-385.
- Hupet, F., Lambot, S., Javaux, M., Vanclooster, M., 2002. On the identification of macroscopic root water uptake parameters from soil water content observations. *Water Res. Res.* 38, 36-1-36-14.
- ICH Q8 (R2), 2009. Pharmaceutical development Q8 (R2). ICH harmonised tripartite guideline.
- ICH Q9 (R1), 2021. Quality risk management Q9 (R1). ICH harmonised guideline.
- ICRP, 1995. ICRP publication 66: human respiratory tract model for radiological protection. Elsevier Health Sciences.
- Ignjatović, J., Šušteršič, T., Bodić, A., Cvijić, S., Đuriš, J., Rossi, A., Dobričić, V., Ibrić, S., Filipović, N., 2021. Comparative assessment of in vitro and in silico methods for aerodynamic characterization of powders for inhalation. *Pharmaceutics*, 13, 1831.
- Ilin, A., Raiko, T., 2010. Practical approaches to principal component analysis in the presence of missing values. *J. Mach. Learn. Res.* 11, 1957-2000.

- Imboden, R., Imanidis, G., 1999. Effect of the amphoteric properties of salbutamol on its release rate through a polypropylene control membrane. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47, 161-167.
- Ivković, B., Brborić, J., Dobričić, V., Čudina, O., 2019. Development and validation of a new isocratic RP-HPLC method for simultaneous determination of sodium metabisulfite and sodium benzoate in pharmaceutical formulation. *Acta. Chromatogr.* 31, 133-137.
- Jaspart, S., Piel, G., Delattre, L., Evrard, B., 2005. Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterisation, drug release and applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 75-87.
- Jaspart, S., Bertholet, P., Piel, G., Dogné, J.M., Delattre, L., Evrard, B., 2007. Solid lipid microparticles as a sustained release system for pulmonary drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65, 47-56.
- Jiang, B., Ruan, Z., Chen, J., Lou, H., Shao, R., Jin, F., Shen, H., 2016. Pharmacokinetic properties and bioequivalence of orally inhaled salbutamol in healthy Chinese volunteers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42, 1476-1481.
- Jinno, J.I., Kamada, N., Miyake, M., Yamada, K., Mukai, T., Odomi, M., Toguchi, H., Liversidge, G.G., Higaki, K., Kimura, T., 2006. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J. Control Release.* 111, 56-64.
- Jolliffe, I.T., Cadima, J., 2016. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos. Trans. Royal Soc. A.* 374, 20150202.
- Jones, H.M., Parrott, N., Jorga, K., Lavé, T., 2006. A novel strategy for physiologically based predictions of human pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 45, 511-542.
- Jones, H.M., Gardner, I.B., Collard, W.T., Stanley, P., Oxley, P., Hosea, N.A., Plowchalk, D., Gernhardt, S., Lin, J., Dickins, M., Rahavendran, S.R., 2011. Simulation of human intravenous and oral pharmacokinetics of 21 diverse compounds using physiologically based pharmacokinetic modelling. *Clin. Pharmacokinet.* 50, 331-347.
- Jones, R.M., Harrison, A., 2012. A new methodology for predicting human pharmacokinetics for inhaled drugs from orotracheal pharmacokinetic data in rats. *Xenobiotica.* 42, 75-85.
- Jones, H.M., Chen, Y., Gibson, C., Heimbach, T., Parrott, N., Peters, S.A., Snoeys, J., Upreti, V.V., Zheng, M., Hall, S.D., 2015. Physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development: a pharmaceutical industry perspective. *Clin. Pharmacol. Ther.* 97, 247-262.
- Kaialy, W., Nokhodchi, A., 2015. Particle engineering for improved pulmonary drug delivery through dry powder inhalers. In: Nokhodchi, A., Martin, G.P. (Eds.), *Pulmonary drug delivery: advances and challenges*. John Wiley & Sons, Ltd., 171-198.
- Kalola, U.K., Ambati, S., 2022. Budesonide. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563201/> (datum poslednjeg pristupa: 11.07.2022.).
- Kannan, R.R., Przekwas, A.J., Singh, N., Delvadia, R., Tian, G., Walenga, R., 2017. Pharmaceutical aerosols deposition patterns from a dry powder inhaler: Euler Lagrangian prediction and validation. *Med. Eng. Phys.* 42, 35-47.
- Karasulu, E., Karasulu, H.Y., Ertan, G., Kirilmaz, L., Güneri, T., 2003. Extended release lipophilic indomethacin microspheres: formulation factors and mathematical equations fitted drug release rates. *Eur. J. Pharm. Sci.* 19, 99-104.

- Kim, C.S., Hu, S.C., 1998. Regional deposition of inhaled particles in human lungs: comparison between men and women. *J. Appl. Physiol.* 84, 1834-1844.
- Koblinger, L., Hofmann, W., 1986. Aerosol deposition with a stochastic lung model. *Acta Phys. Hung.* 59, 31-34.
- Koblinger, L., Hofmann W., 1990. Monte Carlo modeling of aerosol deposition in human lungs. Part I: simulation of particle transport in a stochastic lung structure. *J. Aerosol Sci.* 21, 661-674.
- Kumar, S., Gokhale, R., Burgess, D.J., 2014. Sugars as bulking agents to prevent nano-crystal aggregation during spray or freeze-drying. *Int. J. Pharm.* 471, 303-311.
- Kumar, A., Terakosolphan, W., Hassoun, M., Vandera, K.K., Novicky, A., Harvey, R., Royall, P.G., Bicer, E.M., Eriksson, J., Edwards, K., Valkenborg, D., 2017. A biocompatible synthetic lung fluid based on human respiratory tract lining fluid composition. *Pharm. Res.* 34, 2454-2465.
- La Zara, D., Sun, F., Zhang, F., Franek, F., Balogh Sivars, K., Horndahl, J., Bates, S., Brannstrom, M., Ewing, P., Quayle, M.J., Petersson, G., 2021. Controlled pulmonary delivery of carrier-free budesonide dry powder by atomic layer deposition. *ACS Nano.* 15, 6684-6698.
- Labiris, N.R., Dolovich, M.B., 2003. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br. J. Clin. Pharm.* 56, 588-599.
- Lähelmä, S., Kirjavainen, M., Kela, M., Herttuainen, J., Vahteristo, M., Silvasti, M., Ranki-Pesonen, M., 2005. Equivalent lung deposition of budesonide in vivo: a comparison of dry powder inhalers using a pharmacokinetic method. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 59, 167-173.
- Lakio, S., Morton, D.A., Ralph, A.P., Lambert, P., 2015. Optimizing aerosolization of a high-dose L-arginine powder for pulmonary delivery. *Asian J. Pharm.* 10, 528-540.
- Lechanteur, A., Evrard, B., 2020. Influence of composition and spray-drying process parameters on carrier-free DPI properties and behaviors in the lung: a review. *Pharmaceutics.* 12, 55.
- Levet, V., Rosière, R., Merlos, R., Fusaro, L., Berger, G., Amighi, K., Wauthoz, N., 2016. Development of controlled-release cisplatin dry powders for inhalation against lung cancers. *Int. J. Pharm.* 515, 209-220.
- Levy, M.L., Carroll, W., Izquierdo Alonso, J.L., Keller, C., Lavorini, F., Lehtimäki, L., 2019. Understanding dry powder inhalers: key technical and patient preference attributes. *Adv. Ther.* 36, 2547-2557.
- Li, G.F., Wang, K., Chen, R., Zhao, H.R., Yang, J., Zheng, Q.S., 2012. Simulation of the pharmacokinetics of bisoprolol in healthy adults and patients with impaired renal function using whole-body physiologically based pharmacokinetic modeling. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 1359-1371.
- Li, Y., Han, M., Liu, T., Cun, D., Fang, L., Yang, M., 2017a. Inhaled hyaluronic acid microparticles extended pulmonary retention and suppressed systemic exposure of a short-acting bronchodilator. *Carbohydr. Polym.* 172, 197-204.
- Li, L., Leung, S.S.Y., Gengenbach, T., Yu, J., Gao, G.F., Tang, P., Zhou, Q.T., Chan, H.K., 2017b. Investigation of L-leucine in reducing the moisture-induced deterioration of spray-dried salbutamol sulfate powder for inhalation. *Int. J. Pharm.* 530, 30-39.
- Lin, L., Wong, H., 2017. Predicting oral drug absorption: mini review on physiologically-based pharmacokinetic models. *Pharmaceutics.* 9, 41.

- Lipworth, B.J., 1996. Pharmacokinetics of inhaled drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 42, 697-705.
- Liu, T., Han, M., Tian, F., Cun, D., Rantanen, J., Yang, M., 2018. Budesonide nanocrystal-loaded hyaluronic acid microparticles for inhalation: in vitro and in vivo evaluation. *Carbohydr. Polym.* 181, 1143-1152.
- Longest, P.W., Holbrook, L.T., 2012. In silico models of aerosol delivery to the respiratory tract-development and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 296-311.
- Longest, P., Son, Y.J., Holbrook, L., Hindle, M., 2013. Aerodynamic factors responsible for the deaggregation of carrier-free drug powders to form micrometer and submicrometer aerosols. *Pharm. Res.* 30, 1608-1627.
- Longest, P.W., Bass, K., Dutta, R., Rani, V., Thomas, M.L., El-Achwah, A., Hindle, M., 2019a. Use of computational fluid dynamics deposition modeling in respiratory drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 16, 7-26.
- Longest, W., Farkas, D., Bass, K., Hindle, M., 2019b. Use of computational fluid dynamics (CFD) dispersion parameters in the development of a new DPI actuated with low air volumes. *Pharm. Res.* 36, 1-17.
- Mangal, S., Nie, H., Xu, R., Guo, R., Cavallaro, A., Zemlyanov, D., Zhou, Q.T., 2018. Physico-chemical properties, aerosolization and dissolution of co-spray dried azithromycin particles with l-leucine for inhalation. *Pharm. Res.* 35, 1-15.
- Mansour, H.M., Rhee, Y.S., Wu, X., 2009. Nanomedicine in pulmonary delivery. *Int. J. Nanomedicine.* 4, 299-319.
- Maretti, E., Rossi, T., Bondi, M., Croce, M.A., Hanuskova, M., Leo, E., Sacchetti, F., Iannuccelli, V., 2014. Inhaled solid lipid microparticles to target alveolar macrophages for tuberculosis. *Int. J. Pharm.* 462, 74-82.
- Marković, M., Zur, M., Garsiani, S., Porat, D., Cvijić, S., Amidon, G.L., Dahan, A., 2022. The role of paracellular transport in the intestinal absorption and biopharmaceutical characterization of minoxidil. *Pharmaceutics.* 14, 1360.
- Marques, M.R., Loebenberg, R., Almukainzi, M., 2011. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol.* 18, 15-28.
- Martin, A.R., Finlay, W.H., 2018. Model calculations of regional deposition and disposition for single doses of inhaled liposomal and dry powder ciprofloxacin. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 31, 49-60.
- May, S., Jensen, B., Wolkenhauer, M., Schneider, M., Lehr, C.M., 2012. Dissolution techniques for in vitro testing of dry powders for inhalation. *Pharm. Res.* 29, 2157-2166.
- May, S., Kind, S., Jensen, B., Wolkenhauer, M., Schneider, M., Lehr, C.M., 2015. Miniature in vitro dissolution testing of powders for inhalation. *Dissolution Technol.* 22, 40-51.
- McCarron, P.A., Donnelly, R.F., Al-Kassas, R., 2008. Comparison of a novel spray congealing procedure with emulsion-based methods for the micro-encapsulation of water-soluble drugs in low melting point triglycerides. *J. Microencapsul.* 25, 365-378.
- Medarević, D., Cvijić, S., Dobričić, V., Mitrić, M., Djuriš, J., Ibrić, S., 2018. Assessing the potential of solid dispersions to improve dissolution rate and bioavailability of valsartan: in vitro-in silico approach. *Eur. J. Pharm. Sci.* 124, 188-198.

- Medarević, D., Djuriš, J., Barmplexis, P., Kachrimanis, K., Ibrić, S., 2019. Analytical and computational methods for the estimation of drug-polymer solubility and miscibility in solid dispersions development. *Pharmaceutics*. 11, 372.
- Mees, J., Fulton, C., Wilson, S., Bramwell, N., Lucius, M., Cooper, A., 2011. Development of dissolution methodology for dry powder inhalation aerosols. In IPAC-RS 2011 Conference, March 2011, Bethesda.
- Mehnert, W., Mäder, K., 2012. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 83-101.
- Mehta, P., 2018. Imagine the superiority of dry powder inhalers from carrier engineering. *J. Drug Deliv.* 2018.
- Melchor, R., Biddiscombe, M.F., Mak, V.H., Short, M.D., Spiro, S.G., 1993. Lung deposition patterns of directly labelled salbutamol in normal subjects and in patients with reversible airflow obstruction. *Thorax*. 48, 506-511.
- Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G., Cooper, E.R., 2003. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 18, 113-120.
- Mezzena, M., Scalia, S., Young, P.M., Traini, D., 2009. Solid lipid budesonide microparticles for controlled release inhalation therapy. *AAPS J.* 11, 771-778.
- Milenkovic, J., Alexopoulos, A.H., Kiparissides, C., 2013. Flow and particle deposition in the turbuhaler: a CFD simulation. *Int. J. Pharm.* 448, 205-213.
- Milenkovic, J., Alexopoulos, A.H., Kiparissides, C., 2014a. Deposition and fine particle production during dynamic flow in a dry powder inhaler: A CFD approach. *Int. J. Pharm.* 461, 129-136.
- Milenkovic, J., Alexopoulos, A.H., Kiparissides, C., 2014b. Airflow and particle deposition in a dry powder inhaler: an integrated CFD approach. In: Obaidat, M., Filipe, J., Kacprzyk, J., Pina, N. (Eds.), *Simulation and Modeling Methodologies, Technologies and Applications*. Springer, Cham., 127-140.
- Milenkovic, J.M. Ποή αέρα και εναιώθηση σωματιδίων σε εισπνευστήρα ξηράς σκόνης. Aristotle University of Thessaloniki; 2015. Dostupno na: <http://ikee.lib.auth.gr/record/136474/files/GRI-2015-14388.pdf?version=1> (datum poslednjeg pristupa: 14.07.2022.).
- Milenkovic, J., Alexopoulos, A.H., Kiparissides, C., 2017. Optimization of a DPI inhaler: a computational approach. *J. Pharm. Sci.* 106, 850-858.
- Miller, F.J., Mercer, R.R., Crapo, J.D., 1993. Lower respiratory tract structure of laboratory animals and humans: dosimetry implications. *Aerosol Sci. Technol.* 18, 257-271.
- Miller, F.J., Asgharian, B., Schroeter, J.D., Price, O., 2016. Improvements and additions to the multiple path particle dosimetry model. *J. Aerosol Sci.* 99, 14-26.
- Miller, N.A., Reddy, M.B., Heikkinen, A.T., Lukacova, V., Parrott, N., 2019. Physiologically based pharmacokinetic modelling for first-in-human predictions: an updated model building strategy illustrated with challenging industry case studies. *Clin. Pharmacokinet.* 58, 727-746.
- Miller, N.A., Graves, R.H., Edwards, C.D., Amour, A., Taylor, E., Robb, O., O'Brien, B., Patel, A., Harrell, A.W., Hessel, E.M., 2022. Physiologically based pharmacokinetic modelling of inhaled nemiralisib: mechanistic components for pulmonary absorption, systemic distribution, and oral absorption. *Clin. Pharmacokinet.* 61, 281-293.

Mimeticos Preludium™ softver. Dostupan na: <https://www.emmace.se/products/mimetikos-preludium/> (datum poslednjeg pristupa: 13.07.2022.).

Mitchell, J.P., Nagel, M.W., 2003. Cascade impactors for the size characterization of aerosols from medical inhalers: their uses and limitations. *J. Aerosol Med.* 16, 341-377.

Mitchell, J.P., Nagel, M.W., Avvakoumova, V., MacKay, H., Ali, R., 2009. The abbreviated impactor measurement (AIM) concept: part 1-influence of particle bounce and re-entrainment-evaluation with a “dry” pressurized metered dose inhaler (pMDI)-based formulation. *AAPS PharmSciTech.* 10, 243-251.

Mitchell, J.P., Nichols, S.C., 2011. Meeting report: summary of abbreviated impactor measurement workshop organized by the European pharmaceutical aerosol group. *Ther. Deliv.* 2, 307-310.

Mohan, M., Lee, S., Guo, C., Peri, S.P., Doub, W.H., 2017. Evaluation of abbreviated impactor measurements (AIM) and efficient data analysis (EDA) for dry powder inhalers (DPIs) against the full-resolution next generation impactor (NGI). *AAPS PharmSciTech.* 18, 1585-1594.

Moore, A., Riddell, K., Joshi, S., Chan, R., Mehta, R., 2017. Pharmacokinetics of salbutamol delivered from the unit dose dry powder inhaler: comparison with the metered dose inhaler and diskus dry powder inhaler. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 30, 164-172.

Morgan, D.J., Paull, J.D., Richmond, B.H., Wilson-Evered, E., Ziccone, S.P., 1986. Pharmacokinetics of intravenous and oral salbutamol and its sulphate conjugate. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 22, 587-593.

MPPD User’s guide, ARA Inc, 2015.

Muddle, J., Kirton, S.B., Parisini, I., Muddle, A., Murnane, D., Ali, J., Brown, M., Page, C., Forbes, B., 2017. Predicting the fine particle fraction of dry powder inhalers using artificial neural networks. *J. Pharm. Sci.* 106, 313-321.

Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, S131-S155.

Müller, T., Krehl, R., Schiewe, J., Weiler, C., Steckel, H., 2015. Influence of small amorphous amounts in hydrophilic and hydrophobic APIs on storage stability of dry powder inhalation products. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 92, 130-138.

Murphy, J., Andrews, C.S., Craig, D.Q., 2003. Characterization of the thermal properties of powder particles using microthermal analysis. *Pharm. Res.* 20, 500-507.

Myrdal, P.B., Sheth, P., Stein, S.W., 2014. Advances in metered dose inhaler technology: formulation development. *AAPS PharmSciTech,* 15, 434-455.

Nacionalni registar lekova 2020. Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Beograd, 2020.

Newhouse, M.T., Hirst, P.H., Duddu, S.P., Walter, Y.H., Tarara, T.E., Clark, A.R., Weers, J.G., 2003. Inhalation of a dry powder tobramycin pulmosphere formulation in healthy volunteers. *Chest.* 124, 360-366.

Nguyen, D., Rimmelgas, J., Björn, I.N., van Wachem, B., Thalberg, K., 2018. Towards quantitative prediction of the performance of dry powder inhalers by multi-scale simulations and experiments. *Int. J. Pharm.* 547, 31-43.

Nichols, S.C., Mitchell, J.P., Sandell, D., Andersson, P.U., Fischer, M., Howald, M., Pengilly, R., Krüger, P., 2016. A multi-laboratory in vitro study to compare data from abbreviated and pharmacopeial



- impactor measurements for orally inhaled products: a report of the European Aerosol Group (EPAG). *AAPS PharmSciTech.* 17, 1383-1392.
- Oberdörster, G., 1992. Pulmonary deposition, clearance and effects of inhaled soluble and insoluble cadmium compounds. *IARC Sci. Publ.* 118, 189-204.
- Olsson, B., Bondesson, E., Borgström, L., Edsbäcker, S., Eirefelt, S., Ekelund, K., Gustavsson, L., Hegelund-Myrbäck, T., 2011. Pulmonary Drug Metabolism, Clearance, and Absorption. In: Smyth, H., Hickey, A. (Eds), *Controlled Pulmonary Drug Delivery. Advances in Delivery Science and Technology.* Springer, New York, 21-50.
- Olsson, B., Bäckman, P., 2018. Mimetikos Preludium™: a new pharma-friendly aerosol drug deposition calculator. In *Respiratory Drug Delivery*, Davis Healthcare International Publishing, LLC., 103-112.
- Omer, H.K., Husein, N.R., Hamadameen, H.A., 2019. Comparison between the next generation impactor and the twin glass impinge as model pulmonary drug delivery devices. *Zanco J. Med. Sci.* 23, 74-80.
- Ong, H.X., Traini, D., Ballerin, G., Morgan, L., Buddle, L., Scalia, S., Young, P.M., 2014. Combined inhaled salbutamol and mannitol therapy for mucus hyper-secretion in pulmonary diseases. *AAPS J.* 16, 269-280.
- Pack, B.W., Stithit, S., Chen, W., 2017. Clinical supplies manufacture: Strategy, GMP considerations, and cleaning validation. In: Qiu, Y., Chen, Y., Zhang, G.G.Z., Yu, L., Mantri R.V. (Eds.), *Developing solid oral dosage forms (Second edition).* Academic Press, 653-676.
- Pallagi, E., Karimi, K., Ambrus, R., Szabó-Révész, P., Csóka, I., 2016. New aspects of developing a dry powder inhalation formulation applying the quality-by-design approach. *Int. J. Pharm.* 511, 151-160.
- Park, M.H., Shin, S.H., Byeon, J.J., Lee, G.H., Yu, B.Y., Shin, Y.G., 2017. Prediction of pharmacokinetics and drug-drug interaction potential using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach: a case study of caffeine and ciprofloxacin. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 21, 107.
- Parmar, J.J., Singh, D.J., Hegde, D.D., Lohade, A.A., Soni, P.S., Samad, A., Menon, M.D., 2010. Development and evaluation of inhalational liposomal system of budesonide for better management of asthma. *Indian J. Pharm. Sci.* 72, 442.
- Patton, J.S., Byron, P.R., 2007. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 67-74.
- Peng, T., Lin, S., Niu, B., Wang, X., Huang, Y., Zhang, X., Li, G., Pan, X., Wu, C., 2016. Influence of physical properties of carrier on the performance of dry powder inhalers. *Acta Pharm. Sin. B.* 6, 308-318.
- Peppas, N.A., Sahlin, J.J., 1989. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int. J. Pharm.* 57, 169-172.
- Phalen, R.F., Hoover, M.D., Oldham, M.J., Jarabek, A.M., 2021. Inhaled aerosol dosimetry: research-related needs and recommendations. *J. Aerosol Sci.* 155, 105755.
- Pilcer, G., Sebti, T., Amighi, K., 2006. Formulation and characterization of lipid-coated tobramycin particles for dry powder inhalation. *Pharm. Res.* 23, 931-940.
- Pilcer, G., Amighi, K., 2010. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* 392, 1-19.

- Pilcer, G., De Bueger, V., Traina, K., Traore, H., Sebti, T., Vanderbist, F., Amighi, K., 2013. Carrier-free combination for dry powder inhalation of antibiotics in the treatment of lung infections in cystic fibrosis. *Int. J. Pharm.* 451, 112-120.
- Pinto, J.T., Cachola, I., F. Pinto, J., Paudel, A., 2021. Understanding carrier performance in low-dose dry powder inhalation: an in vitro–in silico approach. *Pharmaceutics*. 13, 297.
- Pitcairn, G., Reader, S., Pavia, D., Newman, S., 2005. Deposition of corticosteroid aerosol in the human lung by Respimat® Soft Mist™ inhaler compared to deposition by metered dose inhaler or by Turbuhaler® dry powder inhaler. *J. Aerosol Med.* 18, 264-272.
- PK-Sim® softver, Dostupan na: <http://www.systems-biology.com/products/PK-Sim/> (datum poslednjeg pristupa: 13.07.2022.).
- Polli, J.E., Rekhi, G.S., Augsburger, L.L., Shah, V.P., 1997. Methods to compare dissolution profiles and a rationale for wide dissolution specifications for metoprolol tartrate tablets. *J. Pharm. Sci.* 86, 690-700.
- Powell, M.L., Weisberger, M., Gural, R., Chung, M., Patrick, J.E., Radwanski, E., Symchowicz, S.S., 1985. Comparative bioavailability and pharmacokinetics of three formulations of albuterol. *J. Pharm. Sci.* 74, 217-219.
- PubMed National Library of Medicine. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=inhaled+formulations&filter=years.2010-2022> (datum poslednjeg pristupa: 19.08.2022).
- Radivojev, S., Zellnitz, S., Paudel, A., Froehlich, E., 2019. Searching for physiologically relevant in vitro dissolution techniques for orally inhaled drugs. *Int. J. Pharm.* 556, 45-56.
- Radivojev, S., Luschin-Ebengreuth, G., Pinto, J.T., Lagner, P., Cavecchi, A., Cesari, N., Cella, M., Melli, F., Paudel, A., Fröhlich, E., 2021. Impact of simulated lung fluid components on the solubility of inhaled drugs and predicted in vivo performance. *Int. J. Pharm.* 606, 120893.
- Raje, A.A., Deshpande, R.D., Pathade, V.V., Mahajan, V., Joshi, K., Tambe, A., Jinugu, R., Madgula, V.L., Gaur, A., Kandikere, V., Patil, C.R., 2018. Evaluation of separate role of intestine and liver in first pass metabolism of budesonide in rat. *Xenobiotica*. 48, 1206-1214.
- Ramakrishnan, S., Nicolau Jr, D.V., Langford, B., Mahdi, M., Jeffers, H., Mwasuku, C., Krassowska, K., Fox, R., Binnian, I., Glover, V., Bright, S., 2021. Inhaled budesonide in the treatment of early COVID-19 (STOIC): a phase 2, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* 9, 763-772.
- Rao, M.P., Manjunath, K., Bhagawati, S.T., Thippeswamy, B.S., 2014. Bixin loaded solid lipid nanoparticles for enhanced hepatoprotection–preparation, characterization and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 473, 485-492.
- Rattanupatam, T., Srichana, T., 2014. Budesonide dry powder for inhalation: effects of leucine and mannitol on the efficiency of delivery. *Drug Deliv.* 21, 397-405.
- Rau, J.L., 2005. The inhalation of drugs: advantages and problems. *Respir. Care*. 50, 367-382.
- Raula, J., Thielmann, F., Kansikas, J., Hietala, S., Annala, M., Seppälä, J., Lähde, A., Kauppinen, E.I., 2008. Investigations on the humidity-induced transformations of salbutamol sulphate particles coated with L-leucine. *Pharm. Res.* 25, 2250-2261.

- Riley, T., Christopher, D., Arp, J., Casazza, A., Colombani, A., Cooper, A., Dey, M., Maas, J., Mitchell, J., Reiners, M., Sigari, N., 2012. Challenges with developing in vitro dissolution tests for orally inhaled products (OIPs). *AAPS PharmSciTech.* 13, 978-989.
- Ritger, P.L., Peppas, N.A., 1987. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release.* 5, 23-36.
- Rohit, B., Pal, K.I., 2013. A method to prepare solid lipid nanoparticles with improved entrapment efficiency of hydrophilic drugs. *Curr. Nanosci.* 9, 211-220.
- Rohrschneider, M., Bhagwat, S., Krampe, R., Michler, V., Breitzkreutz, J., Hochhaus, G., 2015. Evaluation of the transwell system for characterization of dissolution behavior of inhalation drugs: effects of membrane and surfactant. *Mol. Pharm.* 12, 2618-2624.
- Russell-Graham, D., Cooper, A., Stobbs, B., McAulay, E., Bogard, H., Heath, V., Monsallier, E., 2010. Further evaluation of the fast-screening impactor for determining fine particle fraction of dry powder inhalers. *Drug delivery to the lungs-21, The Aerosol Society; Edinburgh, UK,* 374-377.
- Russo, P., Stigliani, M., Prota, L., Auriemma, G., Crescenzi, C., Porta, A., Aquino, R.P., 2013. Gentamicin and leucine inhalable powder: what about antipseudomonal activity and permeation through cystic fibrosis mucus? *Int. J. Pharm.* 440, 250-255.
- Ryrfeldt, Å., Andersson, P., Edsbäcker, S., Tönnesson, M., Davies, D., Pauwels, R., 1982. Pharmacokinetics and metabolism of budesonide, a selective glucocorticoid. *Eur. J. Respir. Dis. Suppl.* 122, 86-95.
- Salama, R.O., Traini, D., Chan, H.K., Young, P.M., 2008. Preparation and characterisation of controlled release co-spray dried drug-polymer microparticles for inhalation 2: evaluation of in vitro release profiling methodologies for controlled release respiratory aerosols. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 145-152.
- Salar-Behzadi, S., Wu, S., Mercuri, A., Meindl, C., Stranzinger, S., Fröhlich, E., 2017. Effect of the pulmonary deposition and in vitro permeability on the prediction of plasma levels of inhaled budesonide formulation. *Int. J. Pharm.* 532, 337-344.
- Sanna, V., Kirschvink, N., Gustin, P., Gavini, E., Roland, I., Delattre, L., Evrard, B., 2004. Preparation and in vivo toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration. *AAPS PharmSciTech.* 5, 17-23.
- Scalia, S., Salama, R., Young, P., Traini, D., 2012. Preparation and in vitro evaluation of salbutamol-loaded lipid microparticles for sustained release pulmonary therapy. *J Microencapsul.* 29, 225-233.
- Scalia, S., Traini, D., Young, P.M., Di Sabatino, M., Passerini, N., Albertini, B., 2013a. Comparison of spray congealing and melt emulsification methods for the incorporation of the water-soluble salbutamol sulphate in lipid microparticles. *Pharm. Dev. Technol.* 18, 266-273.
- Scalia, S., Haghi, M., Losi, V., Trotta, V., Young, P.M., Traini, D., 2013b. Quercetin solid lipid microparticles: a flavonoid for inhalation lung delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 278-285.
- Scalia, S., Young, P.M., Traini, D., 2015. Solid lipid microparticles as an approach to drug delivery. *Expert Opin. Drug. Deliv.* 12, 583-599.
- Scherließ, R., Bock, S., Bungert, N., Neustock, A., Valentin, L., 2022. Particle engineering in dry powders for inhalation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 106158.

- Schulz H, Brand, P., Heyder, J., 2000. Particle deposition in the respiratory tract. In: Gehr, P., Heyder, J. (Eds.), Particle-Lung Interactions. Marcel Dekker, Inc., New York, 229-290.
- Schwarz, C., Mehnert, W., 1997. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.* 157, 171-179.
- Sebti, T., Amighi, K., 2006. Preparation and in vitro evaluation of lipidic carriers and fillers for inhalation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63, 51-58.
- Sebti, T., Pilcer, G., Van Gansbeke, B., Goldman, S., Michils, A., Vanderbist, F., Amighi, K., 2006. Pharmacoscintigraphic evaluation of lipid dry powder budesonide formulations for inhalation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64, 26-32.
- Selo, M.A., Sake, J.A., Kim, K.J., Ehrhardt, C., 2021. In vitro and ex vivo models in inhalation biopharmaceutical research-advances, challenges and future perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 177, 113862.
- Shabir, G.A., 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US food and drug administration, the US pharmacopeia and the international conference on harmonization. *J. Chromatogr. A.* 987, 57-66.
- Shariare, M.H., De Matas, M., York, P., 2011. Effect of crystallisation conditions and feedstock morphology on the aerosolization performance of micronised salbutamol sulphate. *Int. J. Pharm.* 415, 62-72.
- Shetty, N., Cipolla, D., Park, H., Zhou, Q.T., 2020. Physical stability of dry powder inhaler formulations. *Expert Opin. Drug. Deliv.* 17, 77-96.
- Shi, C., Ignjatović, J., Liu, T., Han, M., Cun, D., Đuriš, J., Yang, M., Cvijić, S., 2021. In vitro-in vivo-in silico approach in the development of inhaled drug products: nanocrystal-based formulations with budesonide as a model drug. *Asian J. Pharm.* 16, 350-362.
- Silva, L.F.C., Kasten, G., de Campos, C.E.M., Chinelatto, A.L., Lemos-Senna, E., 2013. Preparation and characterization of quercetin-loaded solid lipid microparticles for pulmonary delivery. *Powder Technol.* 239, 183-192.
- Simcyp™ PBPK Simulator, Dostupan na: <https://www.certara.com/software/simcyp-pbpbk/> (datum poslednjeg pristupa: 13.07.2022.).
- Simon, A., Amaro, M.I., Cabral, L.M., Healy, A.M., de Sousa, V.P., 2016. Development of a novel dry powder inhalation formulation for the delivery of rivastigmine hydrogen tartrate. *Int. J. Pharm.* 501, 124-138.
- SimulationPlus, Inc., (2020) GastroPlus™ version 9.8 Manual, Lancaster, CA, USA.
- Singh, R.K., Kim, W.S., Ollinger, M., Craciun, V., Coowantwong, I., Hochhaus, G., Koshizaki, N., 2002. Laser based synthesis of nanofunctionalized particulates for pulmonary based controlled drug delivery applications. *Appl. Surf. Sci.* 197, 610-614.
- Singh, M.R., Singh, D., Saraf, S., 2009. Development and in vitro evaluation of polar lipid based lipospheres for oral delivery of peptide drugs. *Int. J. Drug Deliv.* 3, 15-26.
- Sjögren, E., Dahlgren, D., Roos, C., Lennernas, H., 2015. Human in vivo regional intestinal permeability: quantitation using site-specific drug absorption data. *Mol. Pharm.* 12, 2026-2039.

- Smith, D.J., Gambone, L.M., Tarara, T., Meays, D.R., Dellamary, L.A., Woods, C.M., Weers, J., 2001. Liquid dose pulmonary instillation of gentamicin Pulmospheres<sup>®</sup> formulations: tissue distribution and pharmacokinetics in rabbits. *Pharm. Res.* 18, 1556-1561.
- Smolensky, M.H., D'alonzo, G.E., Kunkel, G., Barnes, P.J., 1987. Day-night patterns in bronchial patency and dyspnea: basis for once-daily and unequally divided twice-daily theophylline dosing schedules. *Chronobiol. Int.* 4, 303-317.
- Soares, S., Fonte, P., Costa, A., Andrade, J., Seabra, V., Ferreira, D., Reis, S., Sarmiento, B., 2013. Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 456, 370-381.
- Soltani, M., Ahmadi, G., 1994. On particle adhesion and removal mechanisms in turbulent flows. *J. Adhes. Sci. Technol.* 8, 763-785.
- Somers, G.I., Lindsay, N., Lowdon, B.M., Jones, A.E., Freathy, C., Ho, S., Woodrooffe, A.J.M., Bayliss, M.K., Manchee, G.R., 2007. A comparison of the expression and metabolizing activities of phase I and II enzymes in freshly isolated human lung parenchymal cells and cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1797-1805.
- Sommerfeld, M., van Wachem, B., Oliemans, R., 2008. Best practice guidelines for computational fluid dynamics of dispersed multiphase flows. Publisher: ERCOFTAC European Research Community on Flow, Turbulence and Combustion, 2008, Brussels, Belgium.
- Sommerfeld, M., Schmalfuß, S., 2016. Numerical analysis of carrier particle motion in a dry powder inhaler. *J. Fluids Eng.* 138, 041308.
- Son, Y.J., McConville, J.T., 2009. Development of a standardized dissolution test method for inhaled pharmaceutical formulations. *Int. J. Pharm.* 382, 15-22.
- Son, Y.J., Horng, M., Copley, M., McConville, J.T., 2010. Optimization of an in vitro dissolution test method for inhalation formulations. *Dissolution Technol.* 17, 6-13.
- Sou, T., Bergström, C.A., 2021. Contemporary formulation development for inhaled pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* 110, 66-86.
- Steckel, H., Brandes, H.G., 2004. A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.* 278, 187-195.
- Stigliani, M., Aquino, R.P., Del Gaudio, P., Mencherini, T., Sansone, F., Russo, P., 2013. Non-steroidal anti-inflammatory drug for pulmonary administration: design and investigation of ketoprofen lysinate fine dry powders. *Int. J. Pharm.* 448, 198-204.
- Sun, Y., Qin, L., Liu, C., Su, J., Zhang, X., Yu, D., Guo, C., Lu, H., Li, L., Xiong, W., Mao, S., 2020. Exploring the influence of drug content on DPI powder properties and potential prediction of pulmonary drug deposition. *Int. J. Pharm.* 575, 119000.
- Szefler, S.J., 1999. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of budesonide: a new nebulized corticosteroid. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, S175-S183.
- Tanner, L., Single, A.B., 2020. Animal models reflecting chronic obstructive pulmonary disease and related respiratory disorders: translating pre-clinical data into clinical relevance. *J. Innate Immun.* 12, 203-225.

- Tay, J.Y.S., Liew, C.V., Heng, P.W.S., 2018. Dissolution of fine particle fraction from truncated Anderson cascade impactor with an enhancer cell. *Int. J. Pharm.* 545, 45-50.
- Thalberg, K., Lindholm, D., Axelsson, A., 2004. Comparison of different flowability tests for powders for inhalation. *Powder Technol.* 146, 206-213.
- Thorsson, L., Edsbäcker, S., Conradson, T.B., 1994. Lung deposition of budesonide from Turbuhaler is twice that from a pressurized metered-dose inhaler P-MDI. *Eur. Respir. J.* 7, 1839-1844.
- Thorsson, L., Edsbäcker, S., Källén, A., Löfdahl, C.G., 2001. Pharmacokinetics and systemic activity of fluticasone via Diskus<sup>®</sup> and pMDI, and of budesonide via Turbuhaler<sup>®</sup>. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52, 529-538.
- Thum, T., Erpenbeck, V.J., Moeller, J., Hohlfeld, J.M., Krug, N., Borlak, J., 2006. Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in different lung compartments of smokers and nonsmokers. *Environ. Health Perspect.* 114, 1655-1661.
- Tolman, J.A., Williams III, R.O., 2010. Advances in the pulmonary delivery of poorly water-soluble drugs: influence of solubilization on pharmacokinetic properties. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 36, 1-30.
- Tong, Z.B., Yang, R.Y., Chu, K.W., Yu, A.B., Adi, S., Chan, H.K., 2010. Numerical study of the effects of particle size and polydispersity on the agglomerate dispersion in a cyclonic flow. *Chem. Eng. J.* 164, 432-441.
- Tong, Z.B., Adi, S., Yang, R.Y., Chan, H.K., Yu, A.B., 2011. Numerical investigation of the de-agglomeration mechanisms of fine powders on mechanical impaction. *J. Aerosol Sci.* 42, 811-819.
- Tong, Z.B., Zheng, B., Yang, R.Y., Yu, A.B., Chan, H.K., 2013. CFD-DEM investigation of the dispersion mechanisms in commercial dry powder inhalers. *Powder Technol.* 240, 19-24.
- Tong, Z., Kamiya, H., Yu, A., Chan, H.K., Yang, R., 2015. Multi-scale modelling of powder dispersion in a carrier-based inhalation system. *Pharm. Res.* 32, 2086-2096.
- Tukiainen, H., Jaakkola, J., Torkko, M., Terho, E.O., 1988. Comparison between oral procaterol and salbutamol in patients with bronchial asthma. *Curr. Med. Res. Opin.* 11, 236-241.
- Umerska, A., Paluch, K.J., Santos-Martinez, M.J., Corrigan, O.I., Medina, C., Tajber, L., 2018. Freeze drying of polyelectrolyte complex nanoparticles: effect of nanoparticle composition and cryoprotectant selection. *Int. J. Pharm.* 552, 27-38.
- Umerska, A., Mugheirbi, N.A., Kasprzak, A., Saulnier, P., Tajber, L., 2020. Carbohydrate-based trojan microparticles as carriers for pulmonary delivery of lipid nanocapsules using dry powder inhalation. *Powder Technol.* 364, 507-521.
- Ung, K.T., Rao, N., Weers, J.G., Clark, A.R., Chan, H.K., 2014. In vitro assessment of dose delivery performance of dry powders for inhalation. *Aerosol Sci. Technol.* 48, 1099-1110.
- United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 44-NF 39), 2021. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2021. Multi-path particle dosimetry (MPPD) model: US EPA technical support documentation and user's guide (MPPD EPA 2021\_V1.01) Office of Research and Development, Center for Public Health and Environmental Assessment, Research Triangle Park, NC. External review draft [EPA/600/R-20/406]. Dostupno na:

[https://cfpub.epa.gov/si/si\\_public\\_record\\_Report.cfm?dirEntryId=351875&Lab=CPHEA](https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?dirEntryId=351875&Lab=CPHEA)  
(posednji pristup 09.07.2022.)

Valenzuela, B., Nacher, A., Ruiz-Carretero, P., Martín-Villodre, A., López-Carballo, G., Baretino, D., 2004. Profile of P-glycoprotein distribution in the rat and its possible influence on the salbutamol intestinal absorption process. *J. Pharm. Sci.* 93, 1641-1648.

Van Campen, L., Venthoye, G., 2002. Inhalation, dry powder. In: Swarbrick, J. (Ed.), *Encyclopedia of pharmaceutical science and technology*. Taylor and Francis, UK, 1529-1544.

Velaga, S.P., Djuris, J., Cvijic, S., Rozou, S., Russo, P., Colombo, G., Rossi, A., 2018. Dry powder inhalers: an overview of the in vitro dissolution methodologies and their correlation with the biopharmaceutical aspects of the drug products. *Eur. J. Pharm. Sci.* 113, 18-28.

Ventolin® Accuhaler® 200 Micrograms, sažetak karakteristika leka, 2010. Dostupno na: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/849/smpc#gref> (datum poslednjeg pristupa: 20.10.2022.).

Verma, R.K., Ibrahim, M., Garcia-Contreras, L., 2015. Lung anatomy and physiology and their implications for pulmonary drug delivery. In: Nokhodchi, A., Martin, G.P. (Eds.), *Pulmonary drug delivery: advances and challenges*. John Wiley & Sons, Ltd., 1-18.

Vulović, A., Šušteršič, T., Cvijić, S., Ibrić, S., Filipović, N., 2018. Coupled in silico platform: computational fluid dynamics (CFD) and physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modelling. *Eur. J. Pharm. Sci.* 113, 171-184.

Walenga, R.L., Babiskin, A.H., Zhao, L., 2019. In silico methods for development of generic drug-device combination orally inhaled drug products. *CPT: Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* 8, 359-370.

Walker, S.R., Evans, M.E., Richards, A.J., Paterson, J.W., 1972. The clinical pharmacology of oral and inhaled salbutamol. *Clin. Pharmacol. Ther.* 13, 861-867.

Wang, H.C., 1990. Effects of inceptive motion on particle detachment from surfaces. *Aerosol Sci. Technol.* 13, 386-393.

Wang, H., Ordoubadi, M., Connaughton, P., Lachacz, K., Carrigy, N., Tavernini, S., Martin, A.R., Finlay, W.H., Lechuga-Ballesteros, D., Vehring, R., 2022. Spray dried rugose lipid particle platform for respiratory drug delivery. *Pharm. Res.* 39, 805-823.

Ward, J.K., Dow, J., Dallow, N., Eynott, P., Miller, S., Ventresca, G.P., 2000. Enantiomeric disposition of inhaled, intravenous and oral racemic-salbutamol in man-no evidence of enantioselective lung metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49, 15-22.

Wauthoz, N., Amighi, K., 2014. Phospholipids in pulmonary drug delivery. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 1114-1128.

Wauthoz, N., Amighi, K., 2015. Formulation strategies for pulmonary delivery of poorly soluble drugs. In: Nokhodchi, A., Martin, G.P. (Eds.), *Pulmonary drug delivery: advances and challenges*. John Wiley & Sons, Ltd., 87-121.

Weers, J.G., Bell, J., Chan, H.K., Cipolla, D., Dunbar, C., Hickey, A.J., Smith, I.J., 2010. Pulmonary formulations: what remains to be done? *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 23, S-5-S-23.

Weibel, E.R., 1963. *Morphometry of the human lung*. Springer, Berlin.

- Westesen, K., Bunjes, H., Koch, M.H.J., 1997. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J. Control. Release.* 48, 223-236.
- Wong, W., Fletcher, D.F., Traini, D., Chan, H.K. Young, P.M., 2012. The use of computational approaches in inhaler development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 312-322.
- Wright P., 2012. Preparati za inhalaciju. In: Gibson, M., Ibrić, S., Parojčić, J. (Eds.), *Preformulacija i formulacija lekova*. Informa Healthcare, London, 369-387.
- Wu, Y., Loper, A., Landis, E., Hettrick, L., Novak, L., Lynn, K., Chen, C., Thompson, K., Higgins, R., Batra, U., Shelukar, S., 2004. The role of biopharmaceutics in the development of a clinical nanoparticle formulation of MK-0869: a beagle dog model predicts improved bioavailability and diminished food effect on absorption in human. *Int. J. Pharm.* 285, 135-146.
- Wu, J., Ding, C., Ge, Q., Li, Z., Zhou, Z., Zhi, X., 2011. Simultaneous determination of ipratropium and salbutamol in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B.* 879, 3475-3483.
- Wu, S., Salar-Behzadi, S., Frohlich, E., 2013. Role of in-silico modeling in drug development for inhalation treatment. *J. Mol. Pharm. Org. Process Res.* 1, 106.
- Wu, S., Zellnitz, S., Mercuri, A., Salar-Behzadi, S., Bresciani, M., Fröhlich, E., 2016. An in vitro and in silico study of the impact of engineered surface modifications on drug detachment from model carriers. *Int. J. Pharm.* 513, 109-117.
- Wu, F., Cristofolletti, R., Zhao, L., Rostami-Hodjegan, A., 2021. Scientific considerations to move towards biowaiver for biopharmaceutical classification system class III drugs: how modeling and simulation can help. *Biopharm. Drug Dispos.* 42, 118-127.
- Xi, J., Si, X., Zhou, Y., Kim, J., Berlinski, A., 2014. Growth of nasal and laryngeal airways in children: implications in breathing and inhaled aerosol dynamics. *Respir. Care.* 59, 263-273.
- Yang, J.Z., Young, A.L., Chiang, P.C., Thurston, A., Pretzer, D.K., 2008. Fluticasone and budesonide nanosuspensions for pulmonary delivery: preparation, characterization, and pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Sci.* 97, 4869-4878.
- Yang, M.Y., Chan, J.G.Y., Chan, H.K., 2014. Pulmonary drug delivery by powder aerosols. *J. Control. Release.* 193, 228-240.
- Yeh, H.C., Schum, G.M., Duggan, M.T., 1979. Anatomic models of the tracheobronchial and pulmonary regions of the rat. *Anat. Rec.* 195, 483-492.
- Yeh, H.C., Schum, G.M., 1980. Models of human lung airways and their application to inhaled particle deposition. *Bull. Math. Biol.* 42, 461-480.
- Yu, C.P., 1978. A two-component theory of aerosol deposition in lung airways. *Bull. Math. Biol.* 40, 693-706.
- Zanen, P., Go, L.T., Lammers, J.W.J., 1994. The optimal particle size for  $\beta$ -adrenergic aerosols in mild asthmatics. *Int. J. Pharm.* 107, 211-217.
- Zanen, P.L.T.G., Go, L.T., Lammers, J.W., 1996. Optimal particle size for beta 2 agonist and anticholinergic aerosols in patients with severe airflow obstruction. *Thorax.* 51, 977-980.



- Zellnitz, S., Zellnitz, L., Müller, M.T., Meindl, C., Schröttner, H., Fröhlich, E., 2019a. Impact of drug particle shape on permeability and cellular uptake in the lung. *Eur. J. Pharm. Sci.* 139, 105065.
- Zellnitz, S., Pinto, J.T., Brunsteiner, M., Schröttner, H., Khinast, J., Paudel, A., 2019b. Tribo-charging behaviour of inhalable mannitol blends with salbutamol sulphate. *Pharm. Res.* 36, 1-11.
- Zhang, L., Liu, L., Qian, Y., Chen, Y., 2008. The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 750-759.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., Xie, S., 2010. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J.* 12, 263-271.
- Zhang, T., Heimbach, T., Lin, W., Zhang, J., He, H., 2015. Prospective predictions of human pharmacokinetics for eighteen compounds. *J. Pharm. Sci.* 104, 2795-2806.
- Zheng, Z., Leung, S.S.Y., Gupta, R., 2021. Flow and particle modelling of dry powder inhalers: methodologies, recent development and emerging applications. *Pharmaceutics.* 13, 189.
- Zhou, Q.T., Morton, D.A., Heidi, H.Y., Jacob, J., Wang, J., Li, J., Chan, H.K., 2013. Colistin powders with high aerosolisation efficiency for respiratory infection: preparation and in vitro evaluation. *J. Pharm. Sci.* 102, 3736-3747.
- Zillen, D., Beugeling, M., Hinrichs, W.L., Frijlink, H.W., Grasmeijer, F., 2021. Natural and bioinspired excipients for dry powder inhalation formulations. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 56, 101497.
- Zimmermann, E., Müller, R.H., Mäder, K., 2000. Influence of different parameters on reconstitution of lyophilized SLN. *Int. J. Pharm.* 196, 211-213.

## **7. PRILOZI**

## 7.1. Spisak radova i saopštenja koji čine deo doktorske disertacije

### Rad objavljen u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a):

1. Shi, C., Ignjatović, J., Liu, T., Han, M., Cun, D., Đuriš, J., Yang, M., Cvijić, S., 2021. *In vitro-in vivo-in silico* approach in the development of inhaled drug products: nanocrystal-based formulations with budesonide as a model drug. *Asian J Pharm Sci.* 16, 350-362. (IF<sub>2021</sub>: 9,289; 19/279)

### Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. Ignjatović, J., Šušteršič, T., Bodić, A., Cvijić, S., Đuriš, J., Rossi, A., Dobričić, V., Ibrić, S., Filipović, N., 2021. Comparative assessment of *in vitro* and *in silico* methods for aerodynamic characterization of powders for inhalation. *Pharmaceutics.* 13, 1831. (IF<sub>2021</sub>: 6,525; 39/279)
2. Ignjatović, J., Đuriš, J., Cvijić, S., Dobričić, V., Montepietra, A., Lombardi, C., Ibrić, S., Rossi, A., 2021. Development of solid lipid microparticles by melt-emulsification/spray-drying processes as carriers for pulmonary drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 156, 105588. (IF<sub>2021</sub>: 5,112; 74/279)

### Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33):

1. Ignjatović, J., Šušteršič, T., Cvijić, S., Bodić, A., Đuriš, J., Ibrić, S., Filipović, N., 2021. Comparative assessment of computational vs. *in vitro* methods for the estimation of dry powders for inhalation emitted fraction. 21st IEEE International Conference on BioInformatics and BioEngineering. 25-27. oktobar 2021, Kragujevac, Srbija.
2. Ignjatović, J., Šušteršič, T., Cvijić, S., Bodić, A., Đuriš, J., Ibrić, S., Filipović, N., 2021. Computational vs. *in vitro* approach to predict aerodynamic performance of dry powders for inhalation. 1st International Conference on Chemo and BioInformatics ICCBIKG 2021. 26-27. oktobar 2021, Kragujevac, Srbija.

### Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):

1. Ignjatovic, J., Han, M., Cun, D., Yang, M., Djuris, J., Ibric, S., Nikolic, I., Cvijic, S., 2017. *In silico* modelling of salbutamol deposition and absorption following intravenous and inhalation administration in rats. 7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences. 5-7. oktobar 2017, Balaton, Mađarska. *Acta Pharm. Hung.* 87, 158.
2. Ignjatovic, J., Cvijic, S., Goracinova, K., Dobricic, V., Djuris, J., 2018. QbD approach to development of solid lipid microparticles as dry powders for inhalation. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology. 20-22. septembar 2018, Segedin, Mađarska. *Acta Pharm. Hung.* 88, 132.
3. Ignjatović, J., Djuriš, J., Ibrić, S., Parojčić, J., Cvijić, S., 2018. Mechanistic interpretation of budesonide deposition and absorption in rats using *in silico* tools. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology. 20-22. septembar 2018, Segedin, Mađarska. *Acta Pharm. Hung.* 88, 186-187.

4. Ignjatović, J., Cvijić, S., Đuriš, J., 2020. Spray vs freeze-dried solid lipid microparticles: Challenges in development. II. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science. 23-24. januar 2020, Segedin, Mađarska. Book of Abstracts, 7.
5. Ignjatović, J., Shi, C., Cun, D., Đuriš, J., Yang, M., Cvijić, S., 2021. *In vitro-in silico* approach in the assessment of drug deposition and absorption following intratracheal insufflation of an ordered mixture in rats. 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (PBP). 11-14. maj 2021. Online (virtual event).

**Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64):**

1. Ignjatović, J., Han, M., Cun, D., Yang, M., Đuriš, J., Parojčić, J., Cvijić, S., 2018. *In vitro/in silico* pristup za procenu depozicije i apsorpcije inhalaciono primenjenih lekova kod pacova: studija slučaja. VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. 10-14. oktobar, 2018, Beograd, Srbija. Arh. farm. 68, 606-607.
2. Ignjatović, J., Cvijić, S., Dobričić, V., Ibrić, S., Đuriš, J., 2018. Aerodinamičko određivanje frakcije sitnih čestica praškova za inhalaciju formulisanih u obliku lipidnih mikročestica. VII Serbian Congress of Pharmacy with international participation. 10-14. oktobar 2018, Beograd, Srbija. Arh. farm. 68, 608-609.

## 7.2. Biografija autora

Jelisaveta Ignjatović rođena je 27.03.1992. godine u Nišu. Osnovnu školu „Branko Miljković” završila je u Nišu 2007. godine sa dodeljenom diplomom „Vuk Karadžić”, a zatim i gimnaziju Svetozar Marković, prirodno-matematički smer, 2011. godine. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, profil magistar farmacije, upisala je školske 2011/2012. godine, a diplomirala 19.09.2016. godine sa opštim uspehom 8,59 u toku studija i ocenom 10 na završnom ispitu.

Pripravnički staž obavila je u Apoteci „Beograd” u toku 2016/2017. godine, a stručni ispit za magistra farmacije položila je decembra 2017. godine.

Doktorske akademske studije iz farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2016/2017. godine. U toku trajanja doktorskih studija, bila je aktivni učesnik COST Akcije MP1404 SimInhale (2016-2019). Deo istraživanja u okviru pripreme ove doktorske disertacije sproveden je u Sektoru istraživanja i razvoja, Hemofarm A.D. u Vršcu, Srbija, zatim na Katedri za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta Sv. Ćirilo i Metodije u Skoplju, Severna Makedonija, pod pokroviteljstvom CEEPUS mreže, kao i na Katedri za hranu i lekove, Univerziteta u Parmi, Italija, gde je boravila kao stipendista COST MP1404 SimInhale akcije. Takođe, deo doktorske disertacije urađen je u saradnji sa Farmaceutskim Univerzitetom u Šenjangu, Kina i Fakultetom inženjerskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Srbija.

Od decembra 2016. do septembra 2022. godine radila je na Univerzitetu u Beogradu-Farmaceutskom fakultetu, na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, najpre kao saradnik na projektu u oblasti tehnološkog razvoja br. TR34007 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, zatim od marta 2018. godine kao istraživač-pripravnik, od marta 2021. godine kao istraživač-saradnik i od februara 2022. godine kao asistent. Od oktobra 2022. godine je angažovana na projektu stručnog usavršavanja u farmaceutskoj kompaniji Boehringer Ingelheim u Nemačkoj.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелисавета Игњатовић

Број индекса 14/2016

### Изјављујем

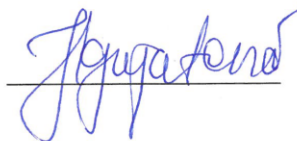
да је докторска дисертација под насловом

Развој формулације и *in vitro/in silico* карактеризација прашкова за инхалацију са модификованим ослобађањем лековитих супстанци различитих биофармацеутских својстава

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

### Потпис аутора

У Београду, 16.11.2022.



**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Јелисавета Игњатовић

Број индекса 14/2016

Студијски програм Фармацеутска технологија

Наслов рада Развој формулације и *in vitro/in silico* карактеризација прашкова за инхалацију са модификованим ослобађањем лековитих супстанци различитих биофармацеутских својстава

Ментор Др сц. Сандра Цвијић, редовни професор

Др сц. Јелена Ђуриш, редовни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 16.11.2022.



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Развој формулације и *in vitro/in silico* карактеризација прашкова за инхалацију са модификованим ослобађањем лековитих супстанци различитих биофармацеутских својстава

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 16.11.2022.





1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.