

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie



**Formulace lyofilizovaných tablet pro orální aplikaci
peptidů**

Formulation of freeze dried tablets for oromucosal administration of peptides

Diplomová práce

Hradec Králové 2020

Eliška Macáková

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Datum:

Podpis:

Poděkování

Na začátek bych ráda poděkovala především doc. PharmDr. Zdeňce Šklubalové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a cenné rady při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Miloši Petříkovi za technickou pomoc při lyofilizaci a manipulaci s lyofilizátorem, laborantkám paní Janě Fendrichové a paní Lence Svobodové za ochotu a technickou pomoc při testování vzorků.

Velké poděkování patří také mé rodině za neustálou podporu a trpělivost během studia.

Obsah

1	Abstrakt.....	5
2	Abstract.....	6
3	Zadání	7
4	Seznam zkratk	8
5	Úvod.....	9
6	Teoretická část	10
6.1	Průběh lyofilizace.....	12
6.1.1	Mražení	14
6.1.2	Primární sušení	15
6.1.3	Sekundární sušení	15
6.2	Požadavky na lyofilizát	16
6.3	Lyofilizace proteinů a peptidů	19
6.4	Pomocné látky pro lyofilizaci	20
6.4.1	Kryo/lyoprotektivní látky a stabilizátory	20
6.4.2	Strukturotvorné látky	21
6.4.3	Antioxidanty	22
6.4.4	Tenzidy	22
6.4.5	Pufry.....	22
6.4.6	Izotonizační přísady	23
6.5	Použité pomocné látky	23
7	Experimentální část.....	26
7.1	Použité suroviny.....	26
7.2	Použité přístroje	26
7.3	Použité metody.....	27
7.3.1	Příprava vzorků.....	27
7.3.2	Měření pH	30
7.3.3	Měření osmolality	30

7.3.4	Diferenciální skenovací kalorimetrie.....	31
7.3.5	Lyofilizace	32
7.3.6	Hodnocení vlastností tablet.....	32
8	Výsledky	33
8.1	Výsledky formulační studie s pomocnými látkami.....	33
8.2	Výsledky formulační studie s modelovým proteinem	47
8.3	Výsledky formulační studie s aktivní látkou.....	55
9	Diskuse.....	61
9.1	Formulační studie s pomocnými látkami	63
9.2	Formulační studie s modelovým proteinem.....	67
9.3	Formulační studie s aktivní látkou	70
10	Závěry	73
11	Použitá literatura	75

1 Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.

Posluchač: Eliška Macáková

Název diplomové práce: Formulace lyofilizovaných tablet pro orální aplikaci peptidů

Lyofilizace patří k důležitým metodám stabilizace aktivních látek, zejména peptidů, ve farmacii. Tato diplomová práce se zabývá formulací bukalních/sublinguálních lyofilizovaných tablet pro aplikaci peptidů do dutiny ústní. Cílem je navrhnout kombinaci vhodných pomocných látek a jejich koncentraci tak, aby lyofilizační koláč měl požadované organoleptické vlastnosti a rozpadavost. Byly využity vhodné metody, jako je měření pH, osmolality, termálních vlastností látek, hodnocení mechanických vlastností tablet a jejich rozpadavosti. V závěru byly navrženy kombinace pomocných látek v matrici pro další etapy vývoje.

2 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology
Consultant: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.
Student: Eliška Macáková
Title of Thesis: Formulation of freeze dried tablets for oromucosal
administration of peptides

Freeze-drying is one out of the important methods for stabilization of active substances, particularly peptides, in pharmacy. The formulation of freeze-dried buccal/sublingual tablets for administration of peptides into the oral cavity is the main target of this thesis. The aim is to propose the combination of appropriate excipients and their concentration to achieve the suitable organoleptic properties and disintegration time of the product cake. The measurement of pH, osmolality, the thermal properties of substances, as well as the evaluation of mechanical quality of tablets and their disintegration were used. In conclusion, the combination of excipients for the composition of matrix for the further development.

3 Zadání

Zadáním této diplomové práce je v teoretické části zpracovat literární rešerši zaměřenou na využití lyofilizace ve farmacii a pomocné látky, které se používají k dosažení vhodných vlastností lyofilizačního koláče. Pozornost bude věnována mrazovému sušení látek bílkovinné povahy (proteiny, peptidy).

Experimentální část bude zaměřena na formulační studii a laboratorní přípravu lyofilizovaných tablet pro orální aplikaci. Práce bude probíhat ve třech dílčích etapách:

1. studie vlastností pomocných látek a jejich směsí s cílem dosažení vhodných vlastností finálních lyofilizovaných tablet
2. studie vlastností tablet s modelovým proteinem
3. studie vlastností tablet s aktivní látkou

4 Seznam zkratek

Zkratka	Jednotka	Význam
API	-	aktivní látka
BSA	-	bovinní sérový albumin
CRI	-	karagenan iota
CRK	-	karagenan kappa
CRKL	-	karagenan směsný kappa a lambda
CRL	-	karagenan lambda
ČL	-	Český lékopis
DSC	-	diferenciální skenovací kalorimetrie
G	-	rybí želatina
GL	-	glycerol
HPLC	-	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
M	-	mannitol
m _{os}	mOsmol/kg	osmolalita
P	-	povidon 25
p	Pa	tlak
SD	-	směrodatná odchylka
t	s	čas
T	°C	teplota
T _c	°C	teplota kolapsu
T _e	°C	eutektická teplota
T _g	°C	teplota skelného přechodu
T _m	°C	teplota tání

5 Úvod

Lyofilizace je způsob sušení materiálů, který se ve farmacii běžně využívá k přípravě lékových forem ve snaze prodloužit stabilitu molekul a léčivého přípravku. Například se jedná o přípravu lyofilizovaných bukalních a sublinguálních tablet a prášků pro přípravu injekce.¹

Jedná se obecně o několikastupňový proces skládající se z fáze mražení, cyklování, primárního sušení a sekundárního sušení, kterému předchází neméně důležitá příprava materiálu a nastavení podmínek a na který navazuje uskladnění již vysušeného finálního produktu.¹

Během všech těchto částí je nutné počítat s rizikem poškození aktivních látek, které jsou lyofilizaci podrobeny. Jsou totiž v průběhu lyofilizace vystaveny značnému stresu díky velkému ochlazení, změnám koncentrace při vypadávání ledu ve formě krystalů, či díky krystalizaci pomocných látek. Důsledkem u proteinů může být ztráta konformace a jejich denaturace, která může vést ke ztrátě účinnosti nebo i vzniku toxických produktů. Je tedy nezbytné pozorně nastavit podmínky ve směsi pro lyofilizaci tak, aby k poškození aktivních složek nedošlo.¹

Cílem této práce bylo navrhnout složení pro přípravu orálních lyofilizovaných tablet s aktivní látkou povahy proteinu/proteidu.

6 Teoretická část

Lyofilizace je proces, který sestává z několika fází. Počáteční fází je mražení, při kterém se kapalná matrice zmrazí do pevné fáze, aby se mohlo přejít k dalším fázím. Během fáze primárního sušení je vodná fáze (led) odstraněna sublimací v prostředí vakua. Po dokončení primárního sušení navazuje ihned sekundární sušení, kdy je odstraňována zbytková voda. Během lyofilizace nesmí být narušena struktura látek, jejich biologická aktivita ani funkce.¹

Pokud není lyofilizační proces správně nastavený, je velmi nákladný a neefektivní. Navíc, při špatně nastavených podmínkách lyofilizace může dojít ke kolapsu lyofilizátu a znehodnocení produktu.² Výsledný lyofilizační koláč by měl mít jednotnou strukturu a barvu, vhodnou velikost pórů a požadovanou rychlost rekonstituce. Požadavky na vzhled lyofilizačního koláče se mohou částečně lišit u parenterálních přípravků a tablet.^{1,2}

Orální lyofilizáty jsou obvykle tablety aplikované sublinguálně nebo bukálně. Jejich výhodou je snadná aplikace a rychlé rozpuštění v ústní dutině, díky čemuž dochází i k rychlému nástupu účinku. Dá se díky nim částečně obejít first-pass efekt v játrech, pro pacienty je další výhodou, že tyto lékové formy nemusí zapíjet vodou, čímž se usnadní aplikace a zlepší compliance.^{3,4,5}

Sublinguální tablety obvykle používáme, pokud potřebujeme dosáhnout rychlého vstřebání a účinku. Disoluce u těchto tablet závisí především na tvaru tablety a pomocných látkách, ze kterých byla vyrobena. U bukálních tablet lze prodloužit setrvání tablety v ústech, pokud se použijí vhodné mukoadhezivní složky.^{3,6}

Nevýhody u lyofilizovaných tablet zahrnují pro pacienta nepříjemnou chuť nebo pocit v ústech. Lyofilizace není vhodná pro vysoké dávky aktivní složky, protože je nutné připravit pouze malé množství roztoku tak, aby bylo možné ho nadávkovat do blistrů. Velké množství aktivní složky také může být hůře rozpustné nebo ovlivňovat lyofilizaci vysokým osmotickým tlakem.³

Další nevýhody tkví v nutnosti tablety vhodně skladovat a předcházet jejich znehodnocení vlhkostí. Tzv. peel-off blistry jsou speciálně vyrobené, obvykle

z hliníku, které jsou překryté hliníkovou fólií. Ta se musí odloupnout a teprve poté je možné tabletu vyjmout. Ihned po vyjmutí se tableta musí vložit do úst tak, aby se nenavlhčila například mokrou rukou. Mezi kvalitativní požadavky na lyofilizované tablety patří zkouška disoluce, hmotnostní a obsahová stejnoměrnost, rozpadavost, obsah vody, stejnoměrnost dávkových jednotek.^{3,7,8}

Pro parenterální využití se jedná zejména o **prášky pro injekce a infuze**. Lyofilizace probíhá přímo v konečném obalu a základními požadavky pro tyto lyofilizáty je sterilita a nepyrogenita, dále zkouška na obsahovou a hmotnostní stejnoměrnost a stejnoměrnost dávkových jednotek. Sterilita se zajišťuje sterilizací lyofilizátoru pomocí ethylenoxidu nebo stlačenou parou. Je nutné sterilizovat komoru lyofilizátoru i kondenzátoru a sterilizace musí být validována pomocí bioindikátorů. Aktivní složka a pomocné látky se rozpustí ve vodě na injekci, sterilizují se bakteriální filtrací, po které musí být zajištěn přesun do lyofilizátoru tak, aby nedošlo k opětovné kontaminaci. K uzavření obalu po lyofilizaci dochází v atmosféře sterilního plynu.³

Konečný lyofilizát musí mít objem srovnatelný s původním objemem lyofilizovaného roztoku a musí mít požadovanou porozitu a strukturu. Po přidání vody na injekci musí dojít k rychlé a kompletní rekonstrukci zpět na tekutou formu aplikovatelnou injekčně. Příkladem parenterálních lyofilizátů mohou být přípravky s obsahem antibiotik (peniciliny, cefalosporiny, soli erytromycinu, chloramfenikol), krevní deriváty (antihemoragické faktory), proteiny (enzymy, insulin, vakcíny).^{3,9}

Mezi nesporné výhody lyofilizace patří zvýšení stability léčivých přípravků během skladování, protože léková forma je téměř úplně zbavena vody, jejíž obsah je jinak vhodným místem pro vznik mikrobiálních nestabilit. Díky zvýšení stability je snazší i přeprava lyofilizovaných lékových forem. Výhodou představuje také sušení směsí bez výrazného zahřívání, které by mohly ohrozit účinnou látku. Rychlá doba rekonstrukce a vytvoření homogenní směsi (zejména u injekcí) usnadňuje aplikaci.¹⁰

Naopak jistou nevýhodou je riziko, že těkavé látky se mohou odsát vakuovou pumpou, takže je třeba znát dobře povahu lyofilizovaných látek a uzpůsobit tomu proces. Je potřeba vzít v úvahu i stresy, které při lyofilizaci působí na látky ve směsi

a fakt, že některé účinné látky, zejména látky povahy peptidů a proteinů, mohou na tyto stavy být velmi citlivé. Vzhledem k vysoké ceně je rovněž nutné zvážit, zda je výroba lyofilizátů finančně výhodná.¹⁰

6.1 Průběh lyofilizace

Pro průběh lyofilizace jsou charakteristické následující tepelné přechody.

Během tvorby jader ledu se koncentrace kapalné fáze postupně zvyšuje a snadno krystalizující látky tvoří krystaly, které se postupně zvětšují. V momentě, kdy dojde ke kompletnímu ztuhnutí všech složek soustavy, dosáhl systém své **eutektické** (eutonické) **teploty (Te)**.^{10,11}

Druhou situací je tepelný přechod, kdy dojde ke zvyšování viskozity amorfni látky. Jedná se o tepelně vratný přechod, který se nazývá **teplota skelného přechodu (Tg)**.¹ Jedná se tedy o vyjádření určitého zvýšeného pohybu molekul, který je umožněn měkknutím pevné látky do stavu viskózní tekutiny. Při teplotách pod Tg je amorfni látka tuhá, neohebná a sklovitá, přesto nemusí nutně být křehká. Při teplotách nad Tg jsou látky elastické, pružné a mohou téci. K tomuto přechodu dochází typicky u polyolů, cukrů nebo polymerů. U polymerů se Tg mohou pohybovat od 100-300°C.¹²

Tg je závislá na mnoha faktorech, například na délce řetězce polymeru, orientaci polárních a nepolárních skupin v polymeru, flexibilitě a ohebnosti polymerového řetězce, dále na jeho lineárnosti, roli hrají další pomocné látky, jako jsou plastifikátory.¹³

Teplota skelného přechodu je důležitá především pro oromukosalia, protože pro výrobu oromukosálií potřebujeme látky, které měknou při teplotě, jaká je v ústní dutině (tzn. při 37 °C).¹

Tg se dá běžně měřit pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), která měří endotermické a exotermické děje. Při měření je třeba kontrolovat průběh teploty v závislosti na čase. Nevýhodou metody je zvýšená nepřesnost u příliš malého množství vzorku.¹

Termínem **teplota kolapsu (Tc)** lyofilizačního koláče se označuje teplota, při které lyofilizát ztratí potřebnou strukturu.¹⁴ Ke kolapsu dochází vlivem viskózního toku, zvyšováním hustoty struktury koláče a případným zablokováním pórů, čímž dojde ke zpomalení sublimace a zpomalení primárního sušení.¹ Ztráta porozity produktu zpomaluje sekundární sušení, protože je menší povrch, ze kterého se voda může odpařovat, což následně způsobí vyšší obsah vlhkosti v produktu, která ohrožuje stabilitu proteinů při uchovávání. Nedostatečná porozita produktu zpomaluje i následnou rekonstituci při aplikaci.^{1,2} Tc charakterizuje danou soustavu a pro vhodné konečné vlastnosti lyofilizátu je potřeba znát Tc jednotlivých komponent směsi. Může být rovněž zjištěna pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie.¹³ Jednotlivé složky směsi mohou navzájem svoji Tc ovlivňovat.¹⁴

Pro lyofilizaci je nezbytný **lyofilizátor**, přístroj, který se skládá z několika částí. První částí je sušící komora, kde jsou umístěny vzorky na deskách, které je možné vytemperovat na požadovanou teplotu. Další částí je kondenzátor, kde kondenzuje odváděná vodní pára, která je tak zachycena, aby nezneškodila vakuovou pumpu. Vývěva a vakuová pumpa jsou posledními částmi lyofilizátoru a mají za úkol udržovat vakuum během lyofilizace.¹⁵

Před spuštěním lyofilizace můžeme nastavit některé parametry lyofilizátoru. Mezi tyto parametry patří například teplota desek, časování teplot nebo parametry ohřívání a ochlazování.¹¹ Naopak spousta parametrů nemůžeme v průběhu lyofilizace ovlivnit. Mezi tyto parametry řadíme teplotu kondensoru, která závisí na množství vzorku a vody, které potřebujeme sublimovat. Lyofilizace probíhá ve vakuu. Nicméně hodnota vakua v komoře je ovlivněna především sublimací ledu. Tlak v komoře můžeme za určitých podmínek řadit i mezi parametry, které se ovlivnit dají, například pokud během procesu opakovaně přidáváme do komory dusík. Mezi neovlivnitelné parametry řadíme dále teplotu produktu a dobu lyofilizace, které jsou závislé na teplotě desek a tlaku v komoře.¹¹

Lyofilizační cyklus má tři hlavní etapy, které jsou dále popsány.

6.1.1 Mražení

Tou první je mražení, kdy dochází k tvorbě ledu a vzniku mezifáze mezi ledem a amorfní fází.¹ Mražení se obvykle provádí v rozmezí teplot od -10 °C do -45 °C po dobu 2-5 hodin za normálního tlaku.¹³

Pro optimalizaci lyofilizačního cyklu je důležitá velikost krystalů ledu a rychlost mražení. Při rychlém mražení vznikají malé krystaly ledu, které může být velmi těžké odstranit. Potřebujeme tedy dostatečně velké krystaly ledu, které vznikají při pomalém mražení. Velké krystaly umožňují zrychlení primárního sušení a vznik velkých pórů, na druhou stranu ale vznik velkých pórů může prodloužit sekundární sušení, protože je redukován povrch, na kterém sekundární sušení probíhá. Při pomalém mražení může také v některých případech docházet k degradaci aktivní složky. Rychlost mražení je nutné nastavit pro každou formulaci zvlášť.^{11,16}

Mražení může způsobit různé stresy, kterým je lyofilizovaný materiál vystaven a které mohou výrazně ohrozit stabilitu lyofilizované látky (například peptidu, proteinu). Zvýšení koncentrace proteinu způsobuje redukcí prostoru mezi sousedními molekulami proteinu a jejich vzájemné interakce, které mohou vést k agregaci. V případě použití pufru může dojít k jeho krystalizaci a následná změna pH ohrožuje stabilitu proteinu, protože může vést k jeho hydrolýze a degradaci. Za třetí může docházet ke zvýšení koncentrace anorganických solí pomocných látek, které následně vykrystalizují. Rizikem je rovněž denaturace proteinu různou morfologií krystalů ledu.¹

Pro regulaci mražení se může využít postup zvaný annealing, neboli cyklování teplot, kdy se udržuje teplota nad T_g pro podporu tvorby optimálních zrněk ledu a krystalizace strukturotvorné látky. Cyklování je důležité pro tvorbu homogenních krystalů ledu a krystalizaci strukturotvorných látek jako je mannitol nebo glycin, které zlepšují vzhled lyofilizačního koláče a stabilitu při následném skladování lyofilizátu.^{1,13,16} Cyklování také snižuje agregaci proteinu a umožní zachovat jeho aktivitu po rekonstituci.¹⁷

6.1.2 Primární sušení

Druhou částí lyofilizačního cyklu je primární sušení, jehož hlavním úkolem je odstranění ledu sublimací.^{1,13} Je to nejdelší část celého procesu. Je nutné, aby teplota nepřesáhla teplotu tání (T_m) krystalických látek směsi nebo teplotu kolapsu amorfních látek.¹⁵ Teplota by se celou dobu měla pohybovat několik stupňů pod T_c a T_m . Obvykle primární sušení probíhá při teplotách od $-10\text{ }^\circ\text{C}$ do $-40\text{ }^\circ\text{C}$ a trvá 5 hodin až 5 dní.¹³

Během primárního sušení by měl být v komoře nejnižší možný tlak, který může trochu kolísat díky probíhající sublimaci.¹¹ Po skončení primárního sušení by hladina vlhkosti v produktu měla být kolem 10 %. Při primárním sušení je nezbytná přítomnost lyoprotektivních látek ve směsi, protože sušení by mohlo poškodit proteiny narušením nebo odstraněním vodíkových vazeb v molekule.¹³

6.1.3 Sekundární sušení

Třetí a zároveň poslední částí procesu je sekundární sušení, kdy dochází k odstranění vody dehydratací vzorku.¹³ Hranice mezi primárním a sekundárním sušením není striktně daná, ve spodní části směsi může ještě probíhat primární sušení, zatímco v horní části směsi už může probíhat sekundární sušení.¹¹ Sekundární sušení se provádí při teplotách od $-4\text{ }^\circ\text{C}$ do $50\text{ }^\circ\text{C}$ a trvá 5-15 hodin.¹³ Teplota na deskách lyofilizátoru musí být zvyšována pomalu, obvykle $0,1-0,15\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, jinak dochází ke kolapsu produktu. Aby sekundární sušení probíhalo správně, měl by tlak v komoře být pořád co nejnižší, stejně jako ve fázi primárního sušení.¹¹ Nutná je přítomnost lyoprotektivních látek ve směsi, aby nedošlo k poškození proteinu.¹ Během sekundárního sušení dochází k odstranění nezmražené vázané vody. Snažíme se dosáhnout zbytkového obsahu vody 0,5-1,0 %, nicméně finální obsah vody je závislý na aktivní látce a použitých pomocných látkách.¹ Každá látka potřebuje jinou dobu sekundárního sušení, například pro krystalický mannitol postačí kratší doba sekundárního sušení, protože obsahuje málo vázané vody, zatímco například laktosa vyžaduje delší dobu.¹¹

Po ukončení sekundárního sušení je nutné výsledné produkty vhodně uchovávat. Lyofilizované tablety je nutné ihned po ukončení vakua a otevření komory zabalit do primárního obalu, obvykle přetažením blistru hliníkovou fólií. Ukončení lyofilizace parenterálií musí proběhnout v aseptických podmínkách, použít se dá například napuštění dusíku nebo přefiltrovaného suchého vzduchu a uzavření lahvičky zátkou.¹⁰

6.2 Požadavky na lyofilizát

Po lyofilizaci by výsledný produkt měl být celistvý a s pravidelnou strukturou, ne příliš křehký, bez výrazných nepravidelností v porositě. Produkt musí mít jednotnou barvu. Objem by měl zůstat stejný jako u tekuté směsi před lyofilizací. Změna kvality produktu se projevuje horší stabilitou a časem rekonstituce, zvýšená může být i reziduální vlhkost.^{13,18}

Při nevhodnosti lyofilizačních podmínek nebo špatně zvolených pomocných látek se tedy může na výsledném lyofilizačním koláči objevit řada poškození, která můžeme rozdělit za prvé na významná, to je ovlivňující účinnost produktu i bezpečnost pacienta a která nejsou akceptovatelná, a za druhé na méně závažná, akceptovatelná poškození.¹⁸

Jedním z nejčastějších poškození jsou nepravidelnosti a nejednotnost vzhledu lyofilizačního koláče. Je obvykle znakem chyby během procesu lyofilizace nebo nevhodného obalu, ve kterém je produkt lyofilizován.¹⁸

Častým poškozením je kolaps lyofilizačního koláče (*collapsed cake*), který se obvykle objeví, pokud teplota produktu přesáhne teplotu skelného přechodu během primárního nebo sekundárního sušení, v důsledku čehož dojde ke ztrátě mikrostruktury.^{18,19} Ke stejnému poškození může dojít i překročením teploty kolapsu během primárního sušení. Kolaps lyofilizačního koláče nemusí nutně znamenat výrazné ovlivnění kvality produktu, může však ovlivnit stabilitu produktu. Stabilita je ohrožena především zvýšenou vlhkostí v produktu, která je důsledkem nedostatečného vysušení produktu.¹⁸

Tání zmrazené matrice (*meltback*) během procesu lyofilizace je výsledkem špatně nastaveného lyofilizačního procesu a způsobí, že systém v podstatě upřednostní sušení z kapalně formy před sublimací. Vialky nebo obalový materiál, ve kterém jsou lyofilizovány tablety, mohou mít špatný kontakt s podkladem, což mění přenos tepla a narušuje proces lyofilizace. Produkt, který roztaje, není přijatelný.¹⁸

Dalším typem je uvolnění produktu (*product ejection*), což znamená, že během primárního sušení dojde v podstatě k vysátí suchého nebo částečně suchého produktu z vialky nebo blistru. K tomu dochází, pokud není lyofilizační koláč dostatečně přilnavý k povrchu obalového materiálu, nebo pokud dojde k tání během primárního sušení. Dochází k uvolnění produktu z blistru anebo k oddělení části produktu od zbytku matrice, která potom zůstane u vrchu vialky. V případě lyofilizace tablet dojde k odpadnutí kousku tablety mimo blistr. K tomu jevu dochází často při lyofilizaci s využitím organických rozpouštědel, dále pokud přípravek obsahuje nízkou koncentraci rozpuštěných tuhých látek, což vede ke špatné kohezivitě a větší křehkosti koláče.^{18,20} Tento jev se považuje za kritický, protože může ovlivnit podanou dávku léčiva.¹⁸

Svažující se koláč (*slanted cake*) je dalším typem nevhodného vzhledu, kdy dojde k vytvoření nepravidelné tablety nebo nepravidelného lyofilizačního koláče ve vialce. Vytvoří se, pokud vialka nebo blistr nestojí celou plochou na rovném podloží desky v lyofilizátoru, ale například na její hraně. V důsledku může dojít k narušení stability produktu a aktivitu účinné látky. Tento typ koláče nelze akceptovat jako vyhovující.¹⁸

Dalším z typů poškození, jsou menší či větší bubliny v lyofilizátu (*puffing*). Zmražený roztok může být saturován vzduchovými bublinami, které se v průběhu lyofilizace roztáhnou buď kolapsem, nebo mírným roztátím matrice během sušení a pronikají na povrch směsi. Jestliže jsou bubliny dostatečně stabilní, aby vydržely ve směsi během lyofilizace, zůstanou nakonec ve finálním produktu. Objeví-li se v produktu bubliny, nelze produkt považovat za akceptovatelný.¹⁸

Zvednutý koláč (*lifted cake*) se vyznačuje tím, že produkt „doputoval“ během lyofilizace k vrchní části vialky, přičemž po vyjmutí z lyofilizátoru jsou patrné části

produktu na dně, které odpadly. Tento jev způsobují páry, které putují mezi stěnou vialky. Pokud je lyofilizační koláč celistvý a není příliš blízko k zátku vialky, je produkt akceptovatelný. Dojde-li k tomuto poškození při lyofilizaci tablet, tableta může úplně vypadnout z blistru a může tak dojít k jejímu poškození.¹⁸

Problematickými jevy jsou i úbytek objemu lyofilizačního koláče (*cake shrinkage*) a popraskání lyofilizačního koláče (*cracked cake*). Úbytek objemu koláče se projevuje odlepením od stěn vialky nebo blistru, popřípadě i ode dna. Tento jev je často prvním znakem kolapsu koláče. K tomuto jevu dochází odstraňováním nezmražené vody z produktu během sušení. Stejným principem může vzniknout popraskání koláče, který také způsobuje odstraňování nezmražené vody během sušení. Oba tyto jevy jsou pouze malými vadami a nemají vliv na stabilitu produktu. Nicméně u lyofilizovaných tablet mohou být tato poškození závažná z důvodu ztíženého vyndání tablety z blistru a následné aplikace. Tableta se při vyjímání z blistru může rozpadnout a je ohroženo podání správné dávky.¹⁸

Pěnovitá struktura koláče (*foam formation*) je další negativní jev, které má za následek nerovný a nehomogenní koláč vypadající spíše jako vysušená pěna. Důvodem je nevhodná rychlost plnění. Produkt je obvykle akceptovatelný, protože pěna nemá vliv na kvalitu.¹⁸

Díky nerovnoměrnosti při mražení se můžou vytvořit různě velké krystaly ledu a výsledkem je špatná struktura koláče, mohou se vytvořit dvě vrstvy s odlišnou porozitou a strukturou koláče. Takto odlišné struktury jsou neakceptovatelné a produkt musí být vyřazen.¹⁸

Jako mírná vada je vnímána nejednotnost barvy produktu v důsledku různé krystalizace během procesu. Produkt je obvykle akceptovatelný. Jestliže ale ke změně barvy dojde v průběhu skladování, je již kvalita produktu ohrožena a nelze to akceptovat.¹⁸

Během transportu jsou produkty vystaveny různým třesům a může docházet k tvorbě prachu (*dusting*), úlomků (*chipping*) anebo k rozlomení koláče (*broken cake*).¹⁸

6.3 Lyofilizace proteinů a peptidů

Proteiny patří mezi častou a nedílnou součást farmakoterapie v mnoha indikačních skupinách a ve vývoji je velké množství přípravků, které je obsahují.¹ Lyofilizace umožňuje zvýšit stabilitu proteinu a finální lékové formy během uchovávání a transportu. Přípravek s obsahem proteinu se pomocí lyofilizace převede na pevnou lékovou formu, která obsahuje minimální procento vlhkosti, čímž se zvyšuje odolnost proteinu proti fyzikální degradaci.^{1,12} Vzhledem k povaze proteinu je ale bohužel vždy velká pravděpodobnost, že se protein během lyofilizace nevratně poškodí, a tudíž je naprosto nezbytné nastavit vhodně celý proces a přidat ochranné pomocné látky, aby k poškození proteinu nedošlo.¹²

Existuje několik obecných pravidel při lyofilizaci makromolekul typu proteinů a peptidů. Je důležité co nejvíce minimalizovat přísady pufrů, pokud jsou potřeba pro úpravu pH a solí, které mohou být potřeba pro usnadnění rozpouštění některých látek, ale zároveň mohou negativně ovlivňovat proces mražení a lyofilizace. Snahou je maximálně zvýšit teplotu skelného přechodu.¹³ Jedním z nejosvědčenějších způsobů, jak ochránit protein při dehydrataci/rehydrataci, je přidání sacharidů, zejména disacharidů. Doporučuje se především použití neredukujících disacharidů (např. sacharosa a trehalosa), protože redukující disacharidy (např. laktosa a maltosa) mohou samy protein během uchovávání degradovat.²¹

Molekula proteinu má obecně kompaktní strukturu, ve které jsou obsaženy molekuly vody, část vody je přitom vázaná na polární skupiny na povrchu. Při lyofilizaci proteinů by ve výsledném produktu mělo zůstat určité optimální procento vlhkosti pro zachování celkové organizace proteinu (primární, sekundární, terciární i kvartérní struktura).²² Přesušení nebo naopak nedostatečné vysušení proteinu může vést ke ztrátě jeho aktivity během uchovávání.^{1,21,23,24}

K poškození proteinu může dojít dalšími několika způsoby, například denaturací vlivem nevhodného pH nebo změnami pH, teplem nebo nevhodným průběhem mražení vzorku. Tyto vlivy vedou k nevratným změnám struktury proteinu, doprovázeným například rozvolněním jeho struktury nebo prostorovou separací molekul proteinu. Výsledkem je neaktivní molekula proteinu. Problém nastává i

v případě, že dojde ke kolapsu lyofilizačního koláče. To znamená, že produkt ztratí nejenom svůj typický vzhled, ale dojde takto i k ovlivnění konečných vlastností jako je právě stabilita při skladování nebo čas rekonstituce.¹

6.4 Pomocné látky pro lyofilizaci

Pro úspěšnou lyofilizaci, při které vznikne produkt s kvalitním lyofilizačním koláčem, který splňuje všechny parametry, je potřeba přidat do směsi řadu pomocných látek, z nichž většina je multifunkčních. Jejich začlenění do skupin je tedy v některých situacích spíše formální.

6.4.1 Kryo/lyoprotektivní látky a stabilizátory

Pro stabilizaci lyofilizovaných látek se obvykle používají stabilizátory, lyoprotektivní a kryoprotektivní látky. Kryoprotektivní látky zabraňují agregaci a denaturaci proteinů a adsorpci aktivní složky na led, ochraňují molekuly aktivní látky především při mražení. Lyoprotektivní látky stabilizují nativní konformaci, snižují míru denaturace proteinů, interakcí a pohyblivosti molekul. Molekuly aktivní látky ochraňují nejen při mražení ale i při samotném sušení.¹³

Často používanými lyoprotektivní látkami a kryoprotektivní látkami jsou sacharidy, zejména disacharidy, a polyoly.²⁵ Sacharidy ochraňují proteiny před dehydratačním stresem pomocí vodíkové vazby mezi molekulami proteinu a molekulami esenciální vody.²³ Důležitým kritériem volby je, zda se jedná o redukující nebo neredukující sacharid; mezi redukující sacharidy se řadí například glukosa a laktosa. Redukující sacharidy způsobí degradaci proteinů, takzvané „hnědnutí“ proteinů (díky Maillardově reakci). Tento proces může být urychlen zbytkovou vlhkostí v produktu. Příkladem ověřeného stabilizátoru je sacharosa, která je často využívanou pomocnou látkou. Má velmi dobré vlastnosti, nicméně při použití ve směsi s nízkým pH se může rozložit na monosacharidy glukosu a fruktosu a ohrozit stabilitu proteinů, neboť glukosa je redukujícím cukrem. Dalším využívaným stabilizátorem je trehalosa, která se řadí mezi neredukující sacharidy. Se vzrůstající molekulovou hmotností sacharidů se snižuje jejich ochranný efekt na proteiny při lyofilizaci.^{1,12,13,21,23}

K disacharidům se přidávají další stabilizující pomocné látky jako je želatina, rybí želatina nebo albumin.²⁵ Stabilizátory musí mít dostatečně vysokou T_g, díky čemuž je možné, aby primární sušení probíhalo za vyšší teploty. Důležité ovšem je, aby cyklus probíhal při nižší teplotě než T_g zmraženého produktu, jak již bylo zmíněno v předchozích částech. Při T_g o několik °C nižší nebo stejné jako T_c, je nejnižší riziko kolapsu výsledného produktu. Například sacharosa má T_g cca -32 °C, což umožňuje vyšší teploty desek během sušení. Lyofilizace s vyšší teplotou na deskách je výhodná, protože se zkracuje čas procesu a snižuje se cena. Jako stabilizátory se pro svoji nízkou T_g nedoporučují nízkomolekulární látky jako je např. sorbitol. Na druhou stranu se ale dá výhodně využít glycerol, protože v malém množství může např. zvyšovat stabilitu sacharosy.¹

Používáním směsí různých pomocných látek se dá modifikovat T_g směsi.³ Látky s vyšší molekulovou hmotností mají většinou vyšší T_g, zatímco látky s nižší molekulovou hmotností mají nižší T_g. Jejich vhodnou kombinací a zvýšením koncentrace proteinu je možné získat poměrně vysokou T_g.¹ Pro určení T_g může být nápomocná Foxova rovnice,

$$\frac{1}{T_{gsměs}} = \frac{W_1}{T_1} + \frac{W_2}{T_2} + \dots + \frac{W_n}{T_n} \quad (1)$$

kdy W_n je hmotnost frakce n, T_{gn} ukazuje T_g čisté komponenty n (pomocná látka), T_{gsměs} je T_g směsi.¹

Nejlepší poměr stabilizátoru a strukturotvorné látky je průměrně od 1:2 do 1:4.¹

6.4.2 Strukturotvorné látky

Pomocné látky, jež zajišťují, aby došlo k vytvoření správné struktury lyofilizátu a její neporušenosti, se nazývají strukturotvorné látky. Díky těmto látkám se předchází kolapsu lyofilizačního koláče. Strukturotvorné látky krystalizují z roztoku během cyklování a vytvářejí porozitu koláče, díky čemuž může voda během lyofilizace lépe sublimovat. Pro eleganci a správný vzhled lyofilizátu je důležitá správná koncentrace strukturotvorných látek.^{1,13}

Většinou jsou strukturotvorné látky důležité především pro nízké koncentrace aktivní složky (<50 mg/ml), při vyšších koncentracích (>50 mg/ml) nemusí být pro vznik vhodné struktury potřeba. Nejčastěji se pro své vlastnosti používají mannitol a

glycin.^{1,13,26} Při využití glycinu je potřeba počítat s jeho kyselým pH (5,6-6,6) a volit ho do kombinací s látkami, kterým kyselé pH nevádí nebo použít vhodný pufr. Glycin může interagovat s redukujícími cukry a nejvhodnější rozpětí pH pro vznik vhodné struktury lyofilizátu je 5-7.^{1,13,27,28}

6.4.3 Antioxidanty

Antioxidanty jsou někdy do směsí přidávány, aby se předešlo oxidaci lyofilizovaných látek a proteinů a tím i k ohrožení stability a účinku lyofilizátů. Jejich účinek spočívá ve snižování chemických a kovalentních degradací proteinů. Nejčastěji používanými antioxidanty jsou kyselina askorbová, siřičitan sodný nebo methionin. Antioxidanty lyofilizované látky chrání, mohou ovšem katalyzovat rozkladné reakce proteinů.^{1,10}

6.4.4 Tenzidy

Potřebnými pomocnými látkami pro lyofilizaci mohou být často i tenzidy (surfaktanty). Mechanismem účinku tenzidů je pravděpodobně snížení mezifázového napětí v roztoku proteinu a snížení jeho adsorpce na mezifázi (na krystaly ledu) a prevence jeho agregace během lyofilizace.¹

Nejčastěji využívaným neionickým tenzidem je polysorbát 20 nebo 80, jejichž hlavní výhodou oproti jiným látkám je nízká koncentrace (0,004-0,01 %). V polysorbátech se během výroby mohou objevit nečistoty a je třeba dbát a to, aby kvůli těmto nečistotám nebyla narušena stabilita aktivní složky, zejména při koncentraci polysorbátů >0,05 %.¹

6.4.5 Pufry

Pro vytvoření stabilního lyofilizátu je důležité také zvolení vhodného pufru. Aby směs byla stabilní po lyofilizaci, je nutné, aby byla stabilní i v tekuté formě. Předpokládá se, že pH roztoku je ekvivalentní pH v pevné formě. Nejčastěji se pH lyofilizovaných proteinů a látek pohybuje v rozmezí 4-8.¹

Nevýhodou některých pufrů je sublimace během lyofilizace, což má za následek snížení jeho koncentrace a z tohoto důvodu jsou upřednostňovány pufry, které

nesublímují a jejichž koncentrace se nesnižuje (například histidin). Dalšími často používanými pufrů při lyofilizaci proteinů jsou fosfátové soli. Sodné soli fosfátů mohou způsobovat nestabilitu, proto jsou vhodnější draselné soli (pH rozmezí 6-8).^{1,25} Nestabilitě fosfátových pufrů během lyofilizace se dá zabránit použitím dalších pomocných látek, např. použitím mannitolu.²⁵ Pro lyofilizaci je přijatelný i glutamát sodný, pokud je pH od 4 do 6, citrát sodný, dále potom tartaráty, sukcináty, maláty.¹

6.4.6 Izotonizační přísady

Pro úpravu osmotického tlaku injekcí se nejčastěji přidávají izotonizační látky, mezi které patří například glycerol a chlorid sodný.¹³ Nevýhodou přidání chloridu sodného je možné snížení eutektické teploty. Chlorid sodný má T_e $-21,2^\circ\text{C}$.²⁹ Mezi používané izotonizační přísady řadíme i mannitol.^{3,30,31}

6.5 Použité pomocné látky

Mannitol, neboli D-mannitol, je bílý krystalický prášek, který chutná sladce a je bez zápachu.^{31,32} Chemicky se jedná o polyalkohol. Taje při $166-168^\circ\text{C}$ a je snadno rozpustný ve vodě. Vodný roztok, který má koncentraci 5,07 % je izosmotický.¹ Mannitol existuje v několika polymorfických modifikacích, které během uchovávání mohou přecházet jedna v druhou, což následně může vést ke zvýšení zbytkové vlhkosti v lyofilizátu. Vliv na vznik polymorfů má rychlost mražení a koncentrace. Nejstabilnějším polymorfem je β -polymorf.^{2,3,27}

Díky tomu, že není hygroskopický, ho lze využívat jako pomocnou látku i v kombinacích s aktivní složkou, která je citlivá na vlhkost. Má široké využití při výrobě lyofilizátů jako sladidlo, izotonizační činidlo, plastifikátor a jako strukturotvorná pomocná látka. Pro výrobu lyofilizovaných parenterálních lékových forem je dostupný i bez pyrogenů. Obvykle se využívá v koncentraci 20-90 %.³¹

Glycerol je čirá a bezbarvá viskózní kapalina se sladkou chutí a bez zápachu. Vyznačuje se hygroskopicitou a je mísitelný s vodou. Bod varu má při 290°C a taje při $17,8^\circ\text{C}$.³³ V orálních a oromukosálních přípravcích se nejčastěji využívá jako sladidlo, dále pro úpravu tonicity a jako plastifikátor, rozpouštědlo a kosolvatační činidlo.^{25,34}

Mezi často využívané pomocné látky se řadí také různé **polymery**.

Rybí želatina je název pro čištěný protein získaný z kůže, kostí a chrupavek mořských ryb, z nichž se získává kyselou nebo zásaditou extrakcí.^{35,36,37} Rybí želatina se po extrakci čistí a suší. Podle metody výroby se dělí na Typ A a Typ B, které se liší v některých svých vlastnostech.³⁶ Je to bezbarvá až lehce nažloutlá amorfnní látka, která po rozpuštění ve vodě typicky zapáchá. Mezi želatinou získávanou ze savců a rybí želatinou je rozdíl v obsahu imino kyselin, prolinu a hydroxyprolinu, které stabilizují konformaci při tvorbě gelu. Nižší obsah prolinu a hydroxyprolinu v rybí želatině způsobuje nižší schopnost gelace a nižší teplotu tání. Dalším rozdílem je vyšší viskozita rybí želatiny.³⁶ U rybí želatiny jsou znatelné i rozdíly mezi rybí želatinou vyráběnou z ryb žijících ve studených a teplých vodách. Rybí želatina z ryb žijících ve studených vodách negeluje při pokojové teplotě, geluje při 8-10 °C, kdežto rybí želatina z ryb žijících v teplých vodách geluje při teplotách 25-27 °C, takže tato želatina může být ve formě gelu uchovávána při nižších pokojových teplotách.³⁶ Ve vodě je dobře rozpustná za zvýšené teploty (>30 °C) a její pH je v rozmezí 3,8-7,6.³⁵

Rybí želatina je stabilní v suché formě, vodné roztoky rybí želatiny jsou stabilní, pokud se uchovávají za snížené teploty, nicméně i tak velmi snadno podléhají mikrobiální degradaci. Je oblíbená při přípravě matric pro bukalní nebo sublinguální podání a v postupech lyofilizace díky svým vlastnostem, kdy jakožto amorfnní látka pomáhá dodat těmto lékovým formám požadované vlastnosti.³⁵ Používá se i pro úpravu viskozity roztoků, čehož se dá taktéž využít při přípravě roztoků pro lyofilizaci tablet. Vzhledem k amfoternosti rybí želatiny je potřeba počítat s možnými interakcemi s kyselými i zásaditými látkami. Stejně tak může dojít k interakcím s různými polymery ve formě kationtů i aniontů.³⁵

Přírodními polymery získanými z mořských řas čeledi Rhodophyceae jsou **karagenany**. Existuje mnoho podtypů, ale v zásadě se dají rozdělit na tři hlavní typy, které se liší počtem esterové sulfo-skupiny a přítomností nebo absencí anhydrogalaktosy.³⁸ Prvním typem je lambda-karagenan (λ -karagenan), který nemá

ve své struktuře anhydrogalaktosu, druhým typem je iota-karagenan (ι -karagenan) a posledním je kappa-karagenan (κ -karagenan).³⁹

Jsou to bílé nebo nažloutlé krystalické látky bez chuti a bez zápachu. Rozpouští se v horké vodě (>80 °C všechny tři podtypy, >20 °C pouze λ -karagenan).^{38,40} Protože jsou to hygroskopické látky, měly by být skladovány na suchém místě. Karagenany jsou nejstabilnější při pH 9. V kyselém prostředí (pH by nemělo klesnout pod 3,5) jsou stabilní pouze podtyp kappa a iota ve formě gelu, lambda podtyp je v kyselém prostředí hydrolyzován.³⁸

λ -karagenan je negelující polymer, který se používá v koncentracích do 0,7 % pro zvyšování viskozity, přičemž např. u emulzí je doporučena koncentrace 0,1-0,5 %. ι -karagenan je gelující polymer tvořící husté tixotropní gely.³⁸ Používá se obvykle v koncentracích kolem 0,4 %. κ -karagenan je silně gelující.³⁸

Karagenany mohou interagovat s kationty, například karagenany kappa a iota gelují při kontaktu s K^+ a Ca^{2+} ionty. Ve směsích s některými látkami proteinového charakteru mohou měnit svou viskozitu – dochází k jejímu nárůstu, může dále dojít ke gelaci nebo až k precipitaci proteinů, proto je důležité pozorně nastavit složení směsi i podmínky, aby k tomuto jevu nedošlo. Karagenany se pro své mukoadhezivní vlastnosti s výhodou využívají pro orální a bukalní lékové formy, čehož se dá využít při přípravě lyofilizátů pro bukalní nebo sublinguální aplikaci. Používají se jako gely nebo se inkorporují do tabletové matrice.³⁸

Polyvinyl-pyrrolidon, zkráceně **povidon**, je polymer, který je obvykle v podobě bílého nebo lehce nažloutlého hygroskopického prášku bez zápachu. Je snadno rozpustný ve vodě.⁴¹ Na koncentraci povidonu ve vodných roztocích závisí i výsledná viskozita těchto roztoků. Jeho pH je kyselé, obvykle v rozmezí 3,0-7,0, a teplota tání je při 150°C.⁴² V parenterálních a orálních lékových formách se využívá pro zvýšení viskozity a stability přípravků, dále pro modifikaci teploty skelného přechodu. Obvykle se používá v koncentracích do 5 %. Poměrně podstatnou nevýhodou pro využívání povidonu jako pomocné látky se jeví jeho inkompatibilita s anorganickými solemi, se kterými vytváří neúčinné komplexy.^{42,43}

7 Experimentální část

7.1 Použité suroviny

Bovinní sérový albumin (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich)

Glycerol 85 % Ph. Eur. (M+H, Míča a Harašata s. r. o.)

HPLC voda (FaF UK v HK)

Karagenan iota (ι -Carrageenan, Sigma-Aldrich)

Karagenan kappa (κ -Carrageenan, Sigma-Aldrich)

Karagenan lambda (λ -Carrageenan, Sigma-Aldrich)

Karagenan směsný kappa-lambda (Carrageenan, Sigma-Aldrich)

Mannitol (Pearlitol Roquette, Sigma-Aldrich)

Povidon 25 (Kollidon 25 BASF)

Rybí želatina (Lapi Gelatines S. p. A.)

Aktivní složka ($M_r=5000$ mol/g, látka peptidové povahy)

7.2 Použité přístroje

DSC 200 PC Phox®, Netzsch-Geratebau GmbH, Selb, Německo, ruční lis Netzsch, Počítač s programem DSC 200 F3 NETZSCH Proteus (Netzsch-Geratebau GmbH, Selb, Německo)

Elektronické váhy Kern ABJ 120-4M, Kern and Sohn GmbH, Německo ($d=0,001$ mg)

Lyofilizátor Freeze-Dryer Beta 1-8 LSCPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Německo

Magnetická míchačka Heidolph MR 3001 (Německo)

Mraznička Vestfrost BSFS 290 (Dánsko)

Osmometr Automatic Semi-micro, Knauer, Německo

pH metr HI 221, Hanna Instruments, US

Pipeta Transferpettor 1000 μ l, Brand, Německo

Váhy Sartorius Entris S323I-1S, Lab Instruments GMBH a CO.KG, Goettingen, Německo ($d=0,001$ g)

7.3 Použité metody

7.3.1 Příprava vzorků

Při přípravě vzorků jsem vždy nejprve rozpustila příslušné množství mannitolu ve vodě vyšší kvality (pro HPLC) a v tomto roztoku jsem poté rozpouštěla za stálého míchání ostatní složky: karagenan nebo rybí želatinu zahřátím na vodní lázni při 70 °C, případně povidon 25. Roztoky jsem míchala, dokud se karagenan nebo želatina nerozpustily. Po zchlazení roztoku jsem doplnila odpařenou vodu.

Do některých vzorků jsem přidala glycerol 85 %

Při přípravě vzorků s modelovou aktivní látkou albuminem (BSA) jsem přidala BSA do zchlazených roztoků a nechala rozpustit za míchání na magnetické míchačce.

Vzorky obsahující aktivní složku (API) jsem připravila tak, že potřebný objem směsi pomocných látek jsem připravila zvlášť a API jsem rozpustila až nakonec ve zchlazených roztocích přímo v ampuli.

Celkem bylo připraveno 40 vzorků, jejichž složení uvádí Tab. 1-3. Vzorky byly označeny kódy podle složení. Např. M5/CRI0,3/P4/API1 znamená, že směs obsahuje mannitol v 5 % koncentraci, karagenan iota v 0,3 % koncentraci, povidon 25 ve 4 % koncentraci a aktivní látku API, přičemž v každé tabletě je jedna dávka aktivní látky, což je 84 mg (API1). Označení M3/G3/APIR a APIR2 znamená, že pro výrobu tablety jsem použila roztok API se sníženým množstvím solí (ultrafiltrací), nikoli lyofilizát.

Tab. 1: Vzorky připravené ve formulační studii s pomocnými látkami

Vzorek	Kód	Složení (%)						
		M	G	CRI	CRKL	CRL	CRK	P
V1	M3/G3	3	3					
V2	M5/G5	5	5					
V3	M5/CRL0,3	5				0,3		
V4	M5/CRI0,3	5		0,3				
V5	M5/CRKL0,3	5			0,3			
V6	M5/CRK0,3	5					0,3	
V7	M5/G3/P4	5	3					4
V8	M5/CRI0,3/P4	5		0,3				4
V9	M5/CRKL0,3/P4	5			0,3			4
V17	M5/CRL0,3/P4	5				0,3		4
V18	M5/CRK0,3/P4	5					0,3	4

Tab. 2: Vzorčky připravené ve formulační studii s modelovým proteinem

Vzorek	Kód	Složení (%)				mg/tbl
		M	G	CRI	GI	BSA
V19	M3/G3/BSA8	3	3			8
V20	M3/G3/BSA16	3	3			16
V21	M3/G3/BSA40	3	3			40
V22	M3/G3/GL/BSA8	3	3		0,05	8
V23	M3/G3/GL/BSA16	3	3		0,05	16
V24	M3/G3/GL/BSA40	3	3		0,05	40
V25	M3/CRI/BSA8	3		0,3		8
V26	M3/CRI/BSA16	3		0,3		16
V27	M3/CRI/BSA40	3		0,3		40
V28	M3/CRI/GL/BSA8	3		0,3	0,05	8
V29	M3/CRI/GL/BSA16	3		0,3	0,05	16
V30	M3/CRI/GL/BBSA40	3		0,3	0,05	40

Tab. 3: Vzorky připravené ve formulační studii s aktivní látkou

Vzorek	Kód	Složení (%)							mg/tbl
		M	G	CRI	CRKL	CRL	P	B	API
V10	M3/G3/API1	3	3						84
V11	M5/G5/API1	5	5						84
V12	M5/CRI0,3/API1	5		0,3					84
V13	M5/CRI0,3/P4/API1	5		0,3			4		84
V14	M5/CRKL0,3/API1	5			0,3				84
V15	M5/CRKL0,3/P4/API1	5			0,3		4		84
V16	M5/CRL0,3/API1	5				0,3			84
V31	M3/G3/API8	3	3						10,5
V32	M3/G3/API7	3	3						12
V33	M3/G3/API6	3	3						14
V34	M3/G3/API5	3	3						16,8
V35	M3/G3/API4	3	3						21
V36	M3/G3/API3	3	3						28
V37	M3/G3/API2	3	3						42
V38	M3/CRI/API8	3		0,3					10,5
V39	M3/G3/APIR	3	3						
V40	M3/G3/APIR2	3	3						

7.3.2 Měření pH

K měření pH jsem používala pH metr kalibrovaný na hodnoty pH 4 a pH 7 pomocí standardu. Pro měření jsem použila 25 ml vzorku a skleněnou elektrodu. Po měření jsem elektrodu omyla čišťenou vodou a osušila.

7.3.3 Měření osmolality

Na zjištění osmolality jsem používala automatický osmometr. Před začátkem měření samotných vzorků bylo nutné provést kalibraci přístroje, kterou jsem provedla tak, že jsem nejprve nastavila nulovou hodnotu (0 mOsmol/kg) pomocí ultračisté vody (pro

HPLC) a hodnotu 400 mOsmol/kg pomocí kalibračního roztoku chloridu sodného (12,687 g NaCl/kg H₂O). Následně jsem podle lékopisné tabulky ČL 2017, 2.2.35-1 provedla kalibraci přístroje pomocí kalibračních roztoků 100, 200, 300, 400 a 700 mOsmol/kg připravených rozpuštěním předepsaného množství chloridu sodného ve vodě.

Naměřené hodnoty osmolality jsem vynesla do grafu a získala kalibrační přímku, charakterizovanou kalibrační rovnicí:

$$y = 0,9945x + 0,9622 \quad (2)$$

kde y je naměřená hodnota osmolality (mOsmol/kg) a x je reálná hodnota osmolality (mOsmol/kg). Pomocí rovnice jsem potom vždy přepočtem z naměřených experimentálních hodnot získala skutečné hodnoty osmolality. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulkách.

Při vlastním měření jsem do vymyté a vysušené měřicí zkumavky napipetovala 150 μ l měřeného roztoku, umístila do chladicí komůrky přístroje a nechala 1 minutu vytemperovat. Po změření osmolality jsem počkala, až vzorek roztaje, měřicí nádobku vymyla, usušila a napipetovala nový vzorek. U každého měřeného roztoku jsem provedla pět měření, z nichž jsem vypočítala průměr a směrodatnou odchylku.

7.3.4 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Pro metodu DSC jsem si připravila prázdný hliníkový kelímek, udělala jsem díрку do víčka a prázdný kelímek jsem zvažila na kalibrovaných analytických vahách.

Do vytárovaného hliníkového kelímku jsem navážila vzorek (s přesností na 0,001 mg), kelímek jsem uzavřela v ručním lisu a znovu zvažila. Vyjádřila jsem hmotnost vzorku a údaje zadala do přístroje.

Uzavřený kelímek se vzorkem a referenční vzorek (prázdný hliníkový kelímek) jsem vložila do komory přístroje DSC a komoru uzavřela. Před spuštěním programu jsem nastavila průběh měření, rychlost ohřevu byla 10 °C/min. Měření probíhalo v jednom cyklu nebo ve dvou.

Pro jednotlivé vzorky substancí, směsí a tablet jsem získala DSC křivky, které jsem potom vyhodnotila. Výsledky pro jednotlivé pomocné látky či jejich směsi, příp. lyofilizáty, jsou uvedeny na obrázcích.

7.3.5 Lyofilizace

Vzorky jsem pomocí mikropipety dávkovala do blistrů po 0,6 ml, blistry jsem na etažérech lyofilizátoru umístila do mrazicího boxu a zmrazila po dobu 24 hod při teplotě -30 °C.

Na lyofilizátoru jsem nastavila teplotu kondenzátoru na -56 °C. Tlak v komoře pro primární sušení jsem nastavila na 42 Pa a na 0,1 Pa pro sekundární sušení. Po nastavení požadovaných parametrů lyofilizace jsem lyofilizátor na 15 minut zapnula. Během tohoto kroku se kondenzátor vymrazil na požadovanou teplotu -56 °C.

Poté jsem vyjmula zmrazené vzorky z mrazničky, a co nejrychleji přenesla do lyofilizátoru, okamžitě uzavřela komoru a zapnula program Sušení (Main Drying). Po zapnutí je zahájen proces evakuace pracovní komory a sušení sublimací. Během primárního sušení jsem registrovala hodnotu teploty na etažérech a hodnoty vakua. Po ukončení primárního sušení teplota postupně stoupala až na teplotu místnosti. Po skončení lyofilizace jsem vyjmula blistry s vysušenými tabletami a umístila je do exsikátoru.

7.3.6 Hodnocení vlastností tablet

U získaných tablet jsem hodnotila organoleptické vlastnosti: vzhled, vyjmutelnost z blistru a případný zbytek v blistru, strukturu tablety včetně řezu, a rozpadavost. U některých tablet byla hodnocena i chuť. Výsledky jsou prezentovány fotodokumentací a komentářem.

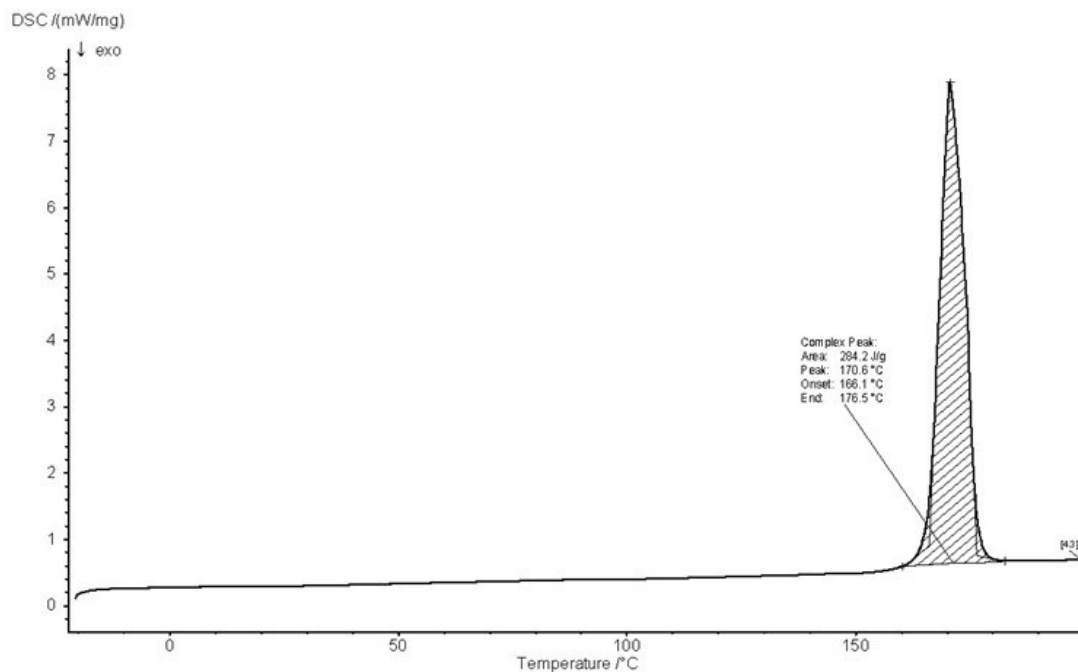
Pro hodnocení doby rozpadu jsem použila přístroj pro testování rozpadavosti vaginálních a rektálních přípravků. Kádinku o dostatečném objemu jsem naplnila médiem (čištěnou vodou) o teplotě 37 °C tak, aby hladina vody byla na úrovni děrované přepážky. Na ni jsem vždy vložila tabletu a měřila dobu rozpadu (vymizení bílých částí) s přesností na desetinu sekundy.

8 Výsledky

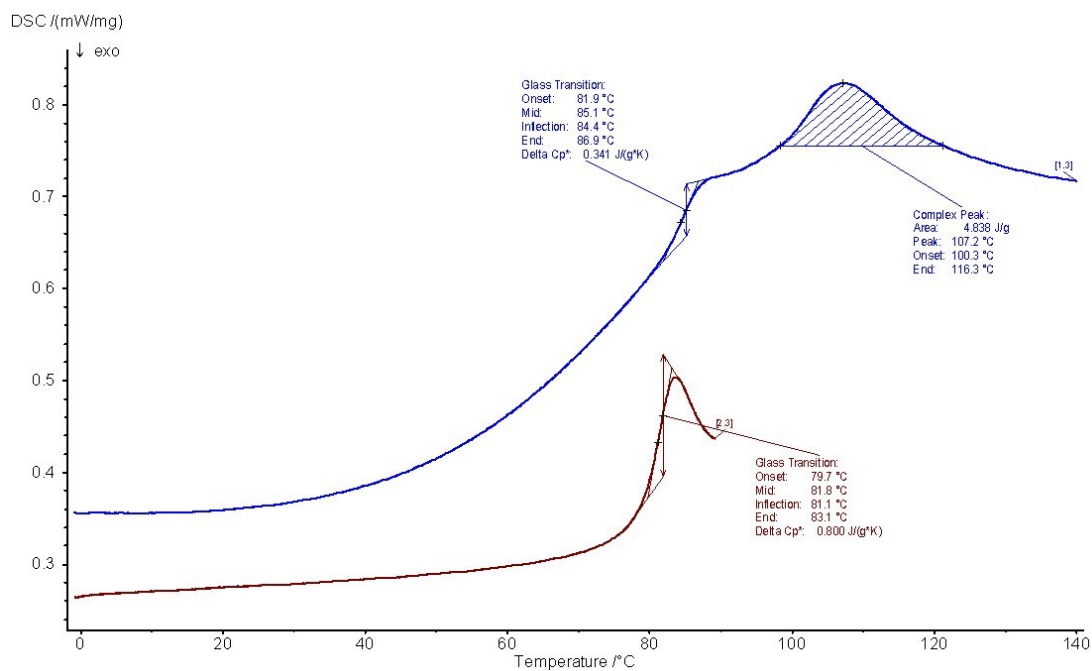
8.1 Výsledky formulační studie s pomocnými látkami

Tab. 4: Vlastnosti pomocných látek a jejich směsí ve formulační studii

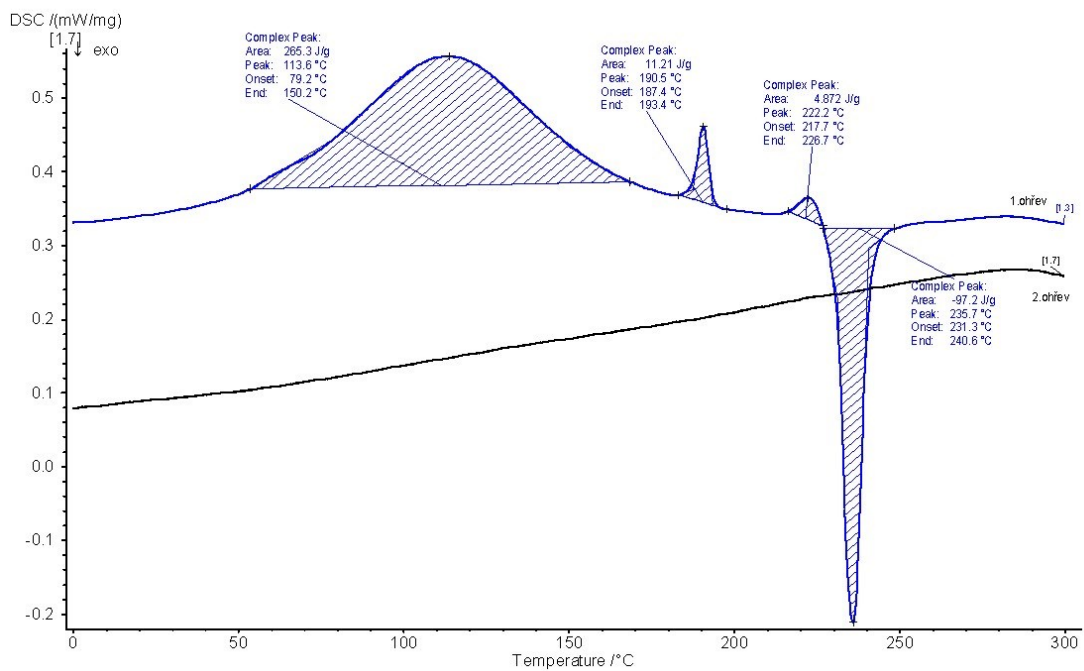
Vzorek	Osmolalita (mOsmol/kg)							pH
	1	2	3	4	5	Průměr	SD	
M3/G3	184	184	186	184	184	184	0,73	4,8
M5/G5	328	334	328	325	332	329	2,92	4,4
M5/CRL0,3	297	299	298	297	298	298	0,68	8,4
M5/CRI0,3	297	295	299	298	292	296	2,27	8,8
M5/CRKL0,3	301	305	303	303	303	303	1,15	8,5
M5/CRK0,3	305	305	301	304	305	304	1,41	8,2
M5/G3/P4	362	361	361	361	363	362	0,73	4,2
M5/CRI0,3/P4	346	347	348	341	345	345	2,21	3,6
M5/CRK0,3/P4	352	354	352	352	353	353	0,73	3,6
M5/CRL0,3/P4	354	355	355	357	354	355	1,00	3,5
M5/CRKL0,3/P4	359	359	359	361	356	359	1,46	3,5



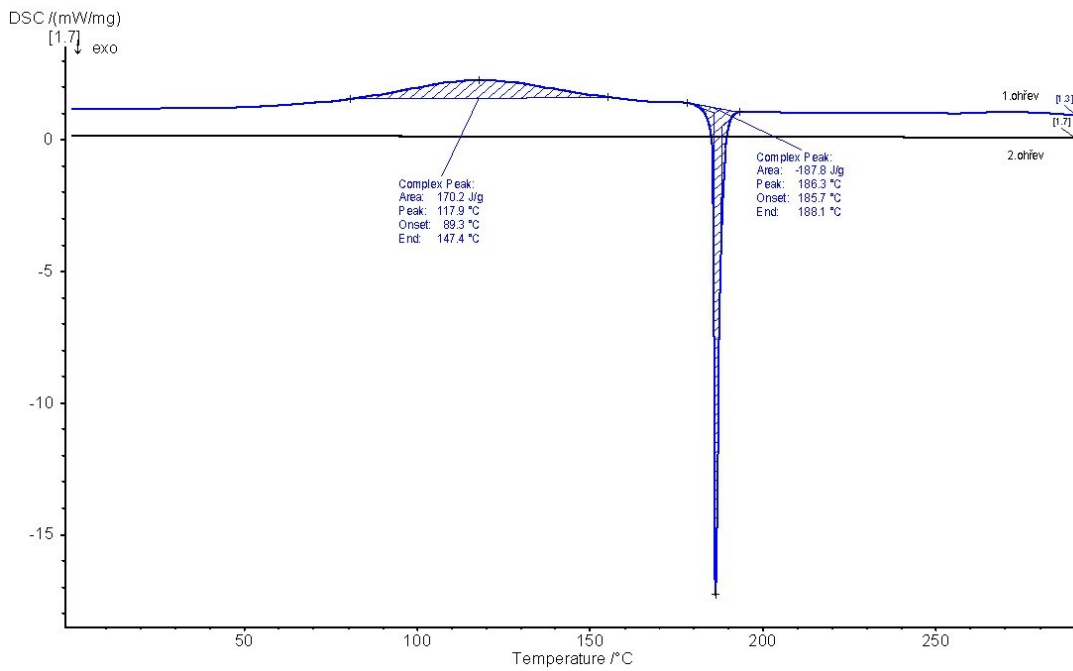
Obr. 1: Termogram mannitolu



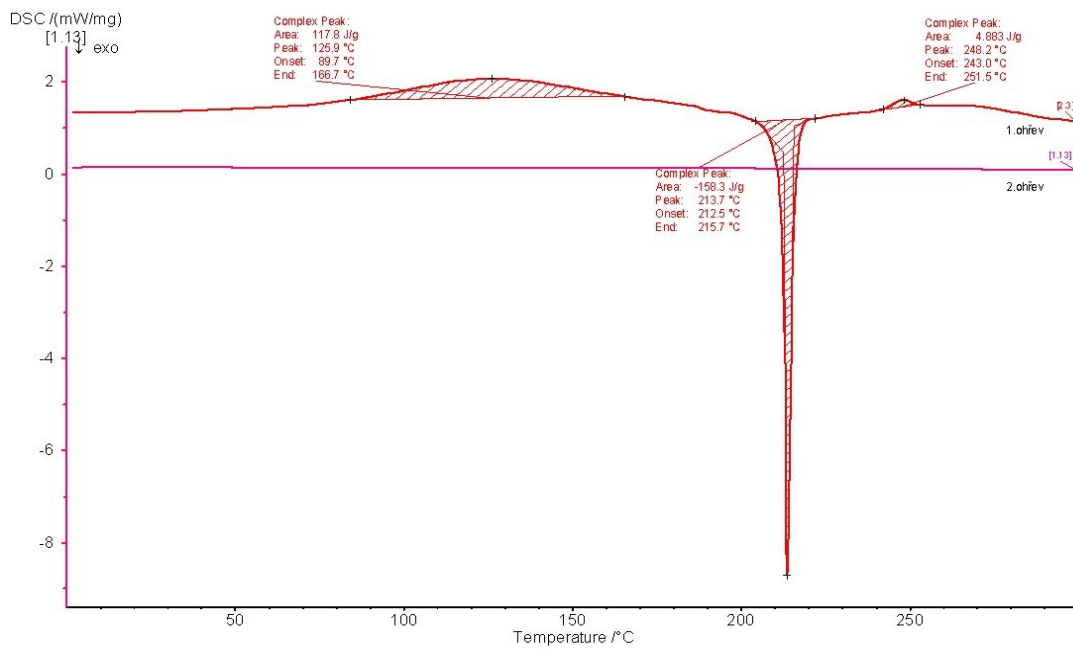
Obr. 2: Termogram rybí želatiny (1. ohřev, 2. ohřev)



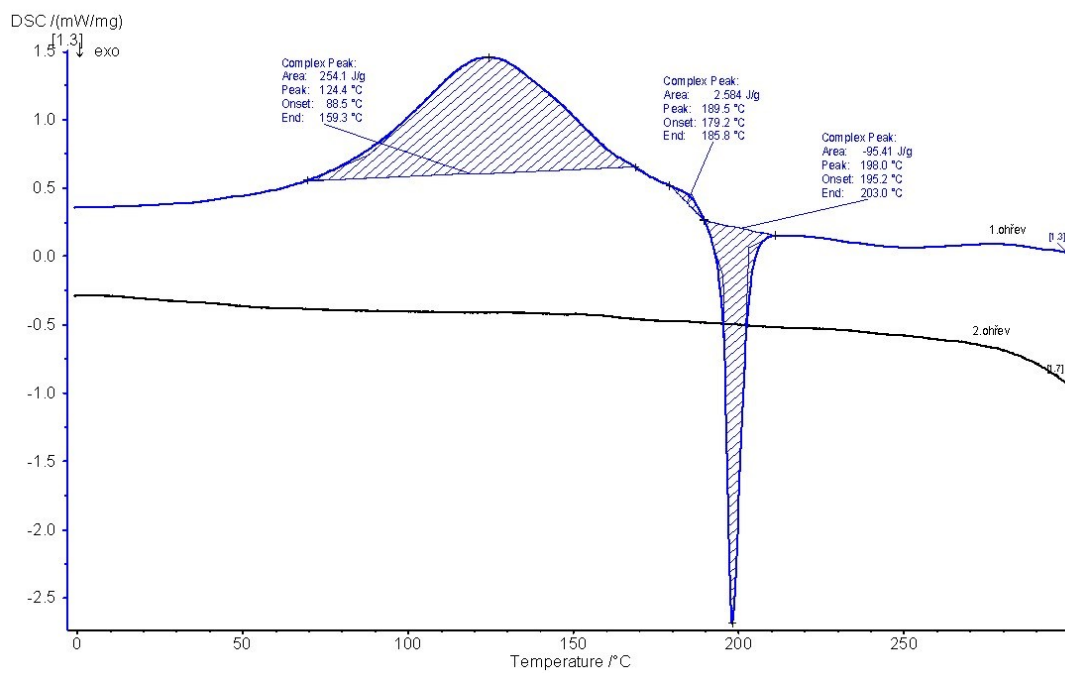
Obr. 3: Termogram karagenanu kappa (1. ohřev, 2. ohřev)



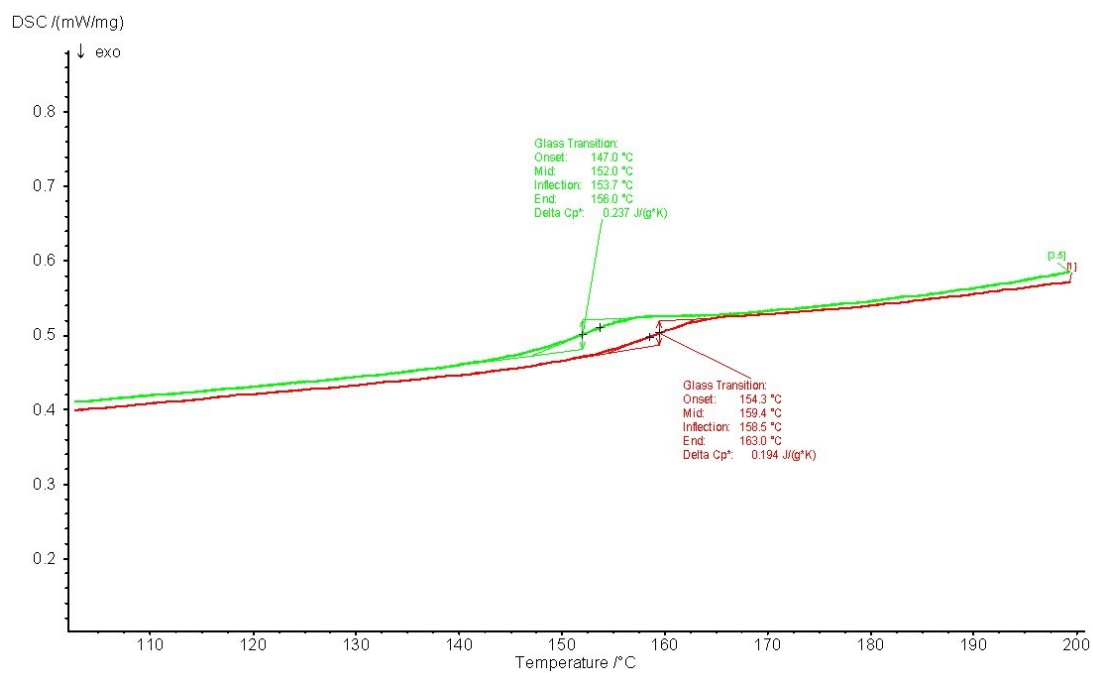
Obr. 4: Termogram karagenanu iota (1. ohřev, 2. ohřev)



Obr. 5: Termogram karagenanu lambda (1. ohřev, 2. ohřev)






Obr. 6: Termogram směšného karagenanu kappa a lambda (1. ohřev, 2. ohřev)










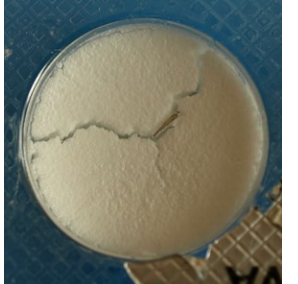
Obr. 7: Termogram povidonu 25 (1. ohřev, 2. ohřev)

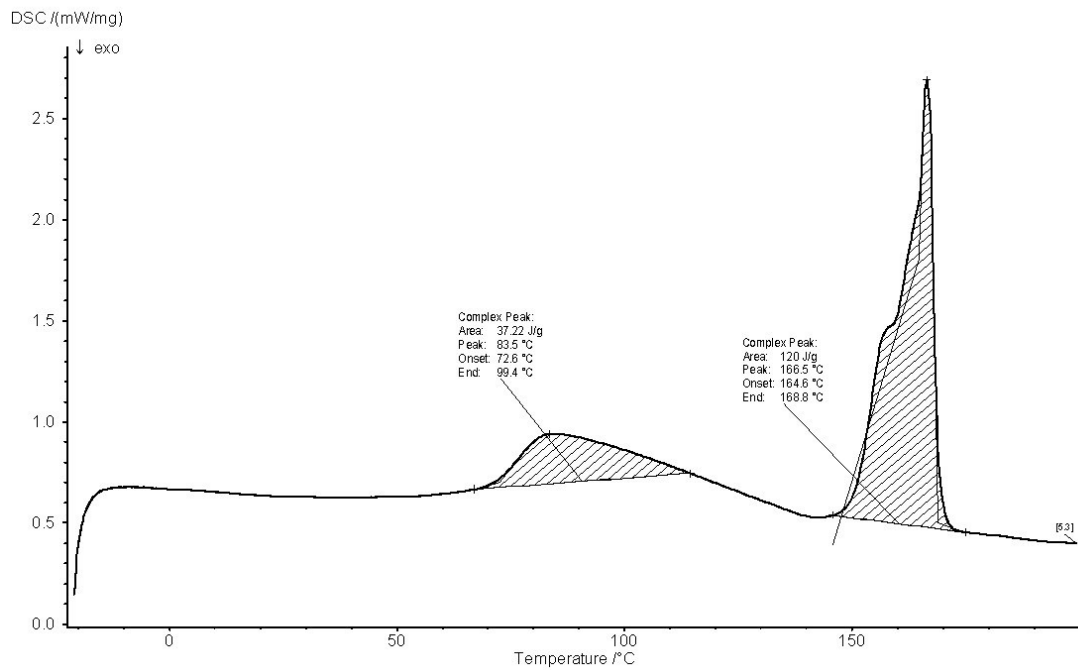
Tab. 5: Vlastnosti tablet s rybí želatinou

Vzorek	Kód	Obrázek	Popis
V1	M3/G3		Kompaktní, dobře vyjmutelné, nezůstává zbytek v blistru, pevné, struktura na řezu dobrá
V2	M5/G5		Kompaktní, snadno vyjmutelné, zbytek v blistru nezůstává, pevné, struktura na řezu dobrá
V7	M5/G3/P4		Nekompaktní, snadno vyjmutelné, zbytek v blistru nezůstává, pevné, struktura na řezu špatná

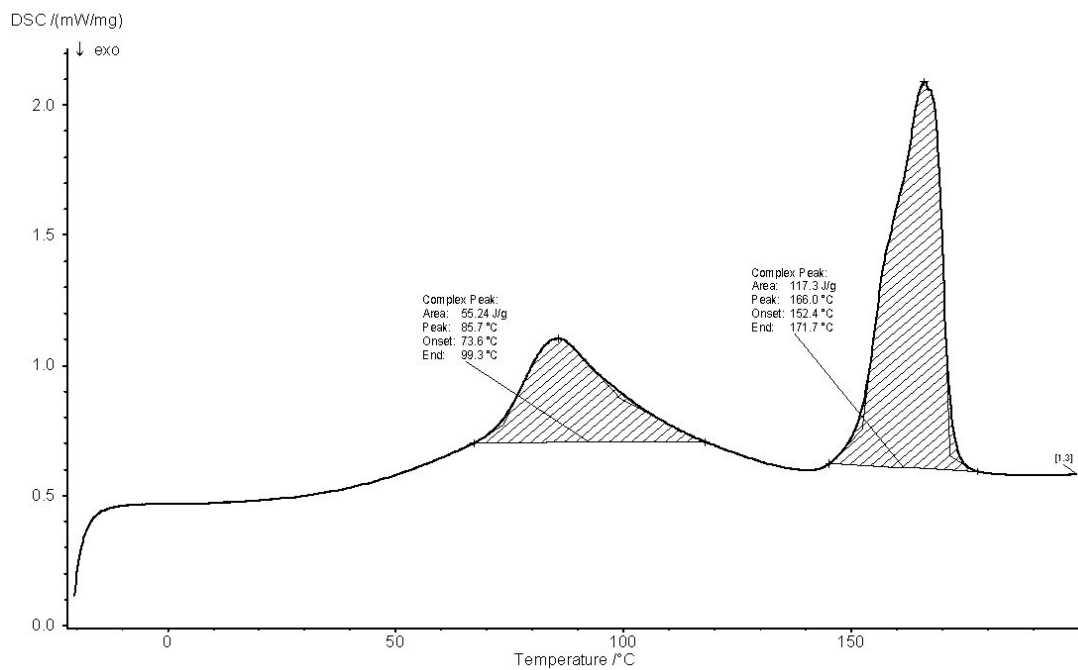
Tab. 6: Vlastnosti tablet s karagenany

Vzorek	Kód	Obrázek	Popis
V3	M5/CRL0,3		Kompaktní, snadno vyjmutelné, v blistru zůstává povlak, velmi křehké, struktura na řezu dobrá,
V4	M5/CRI0,3		Kompaktní, snadno vyjmutelné, není po nich takový povlak v blistru, křehké, struktura na řezu dobrá
V5	M5/CRKL0,3		Kompaktní, snadno vyjmutelné, malý povlak v blistru, křehké nejlepší struktura z karagenanů na řezu,
V6	M5/CRK0,3		Kompaktní, snadno vyjmutelné, zůstává povlak v blistru, křehké, struktura na řezu není moc dobrá
V8	M5/CRI0,3/P4		Kompaktní, snadno vyjmutelné, zůstává povlak v blistru, křehké, struktura na řezu není moc dobrá

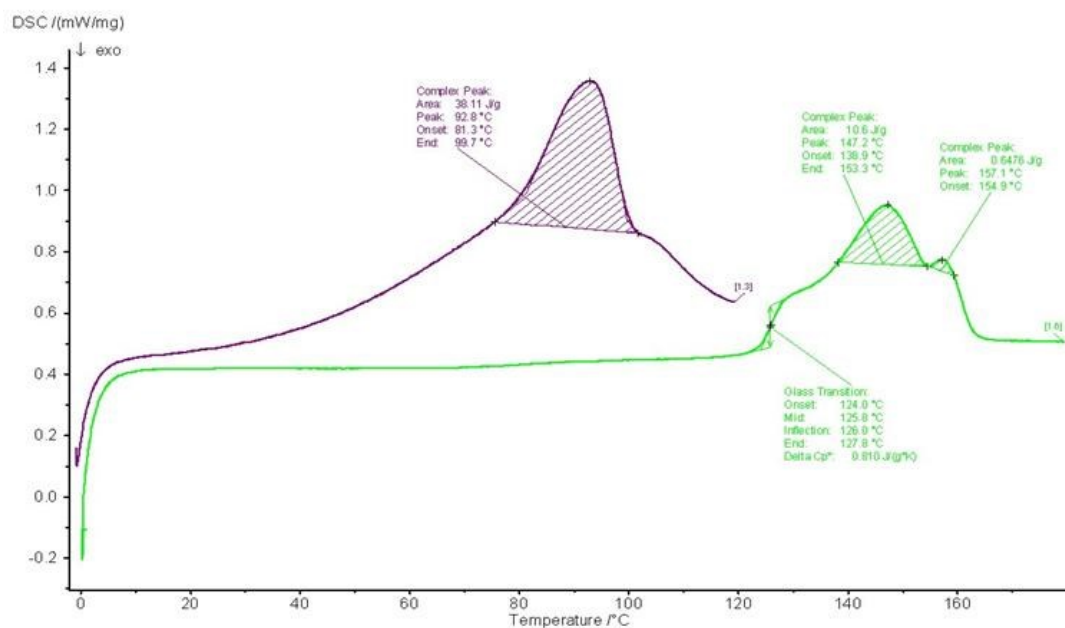
V9	M5/CRKL0,3/P4		Kompaktní, snadno vyjmutelné, malý povlak v blistru, některé drobné prasklinky a jsou křehké, struktura na řezu špatná
V17	M5/CRL0,3/P4		Kompaktní, snadno vyjmutelné, zůstává povlak v blistru, křehké, struktura na řezu špatná,
V18	M5/CRK0,3/P4		Nekompaktní, snadno vyjmutelné, zůstává povlak v blistru, křehké a popraskané, struktura na řezu špatná



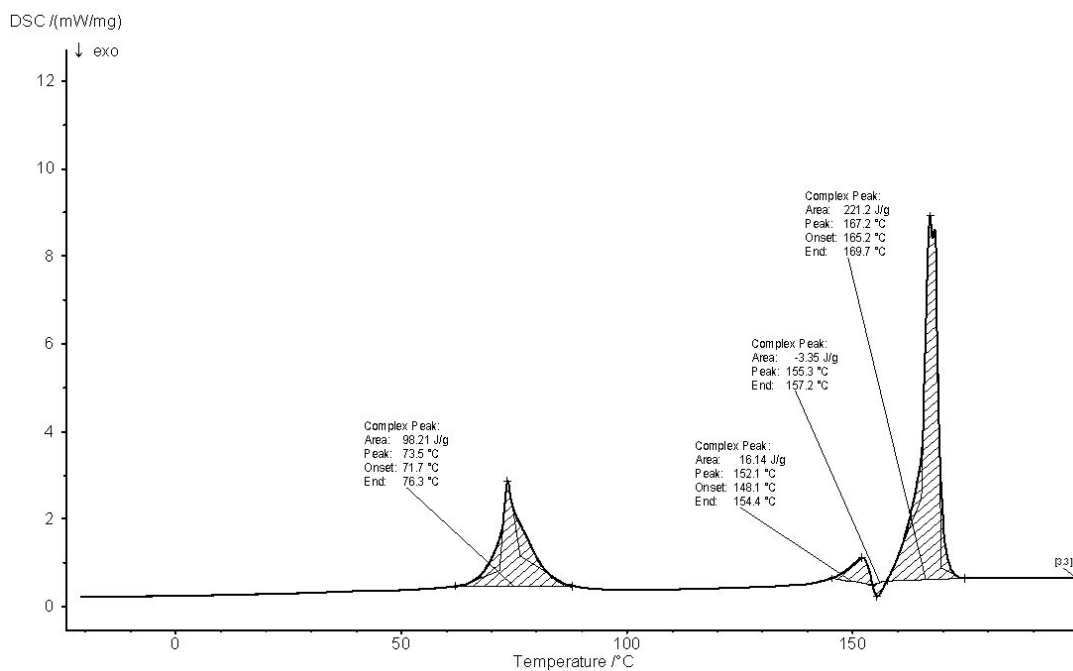
Obr. 8: Termogram M3/G3



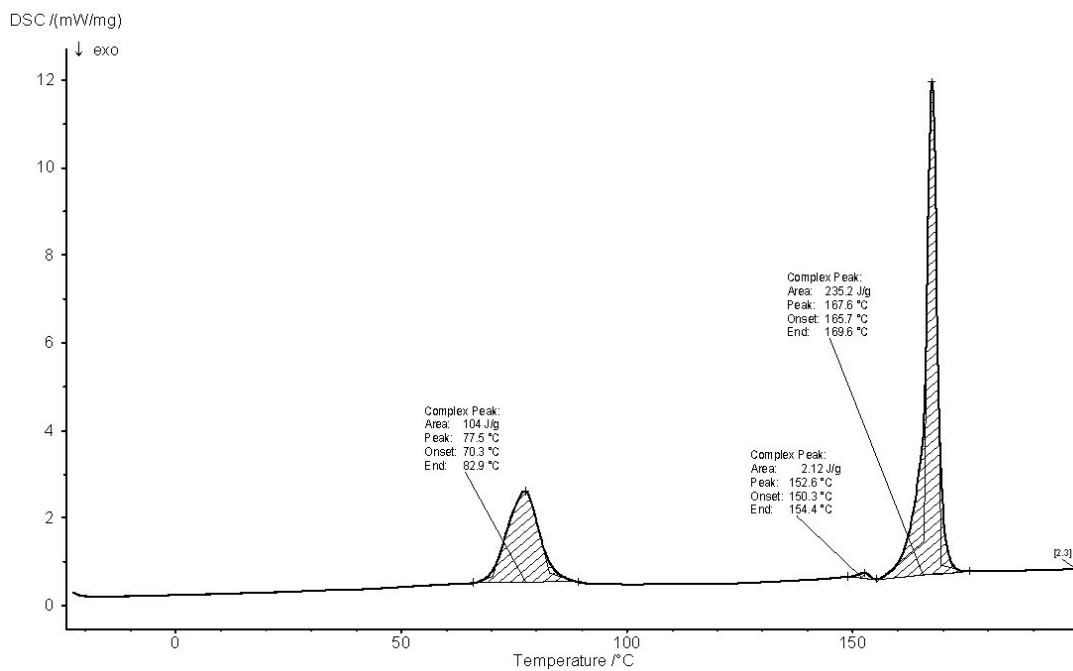
Obr. 9: Termogram M5/G5



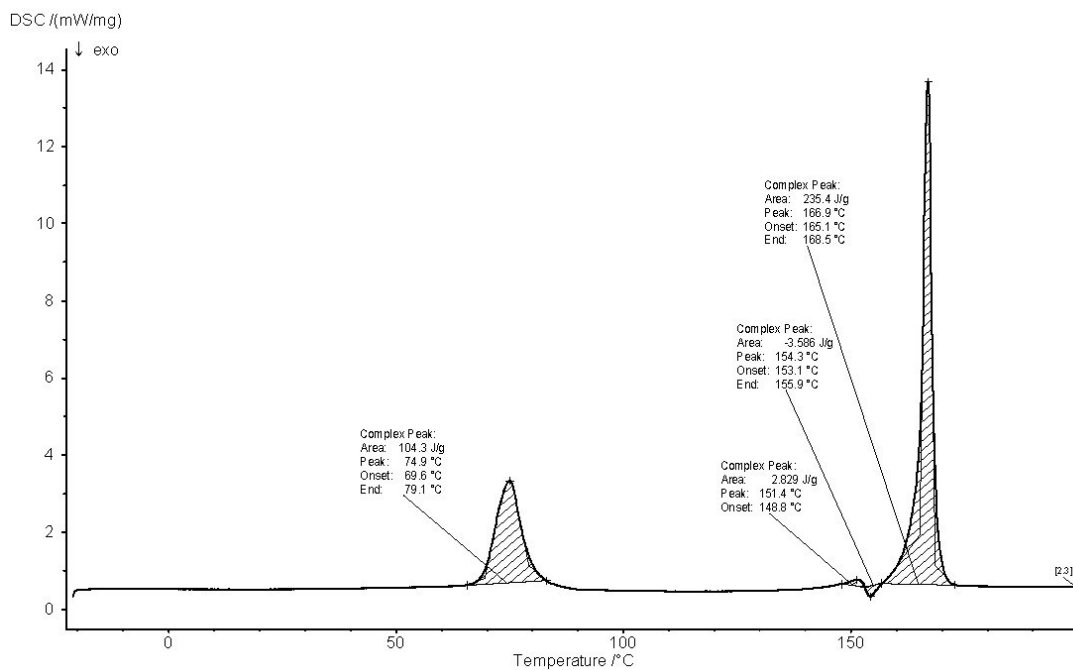
Obr. 10: Termogram M5/G3/P4 (1. ohřev, 2. ohřev)



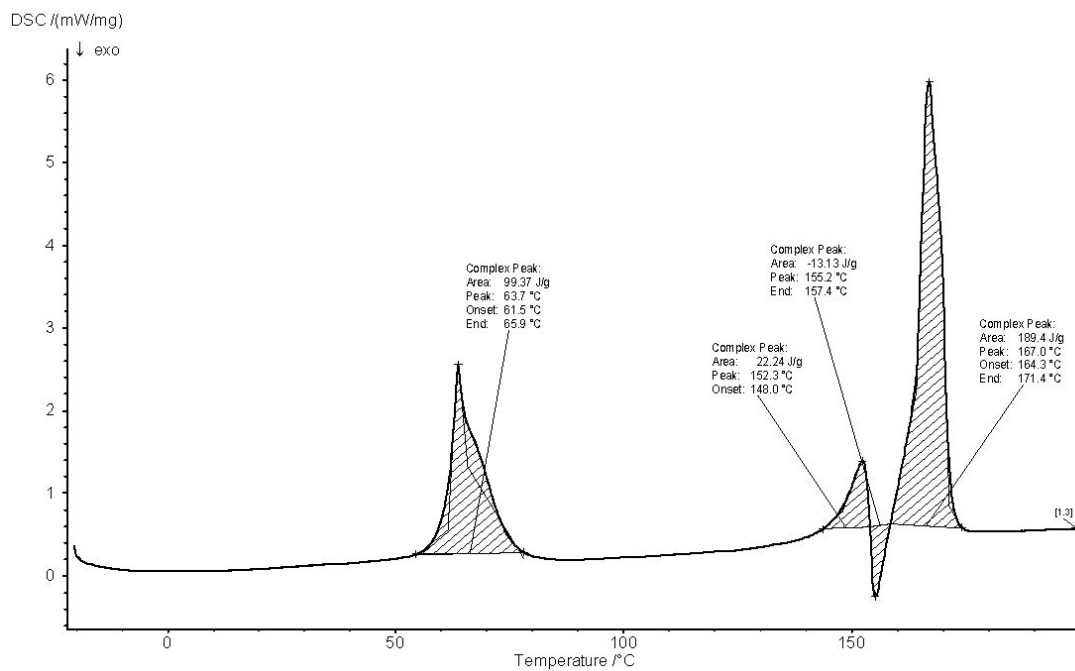
Obr. 11: Termogram M5/CRK0,3



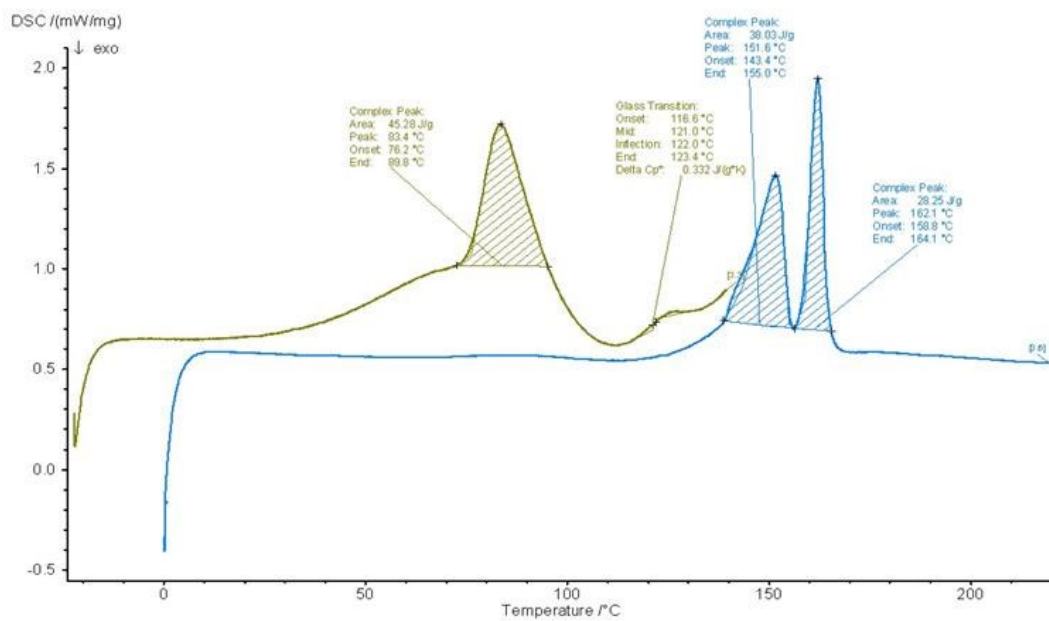
Obr. 12: Termogram M5/CRI0,3



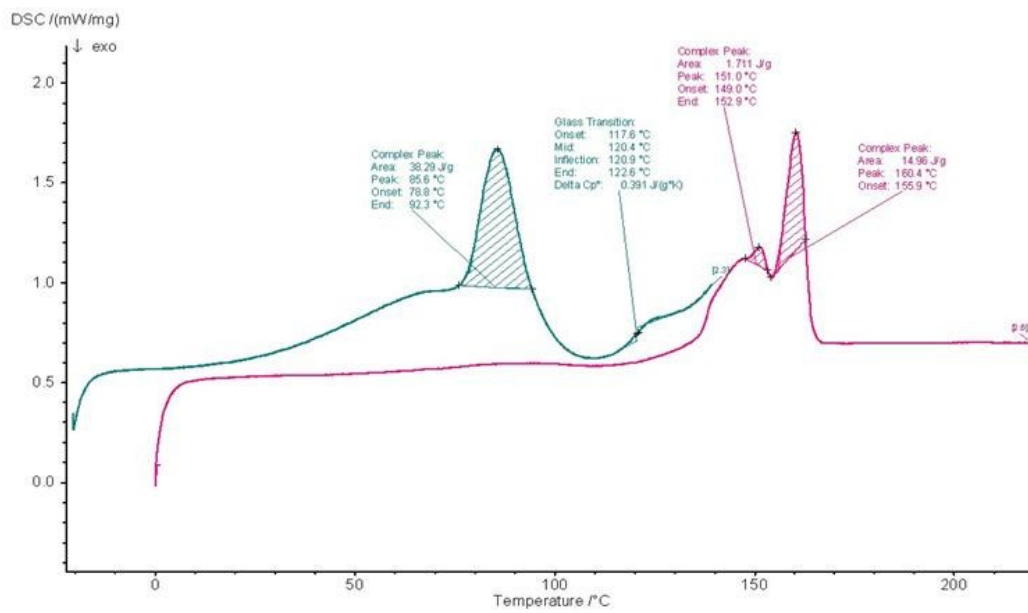
Obr. 13: Termogram M5/CRL0,3



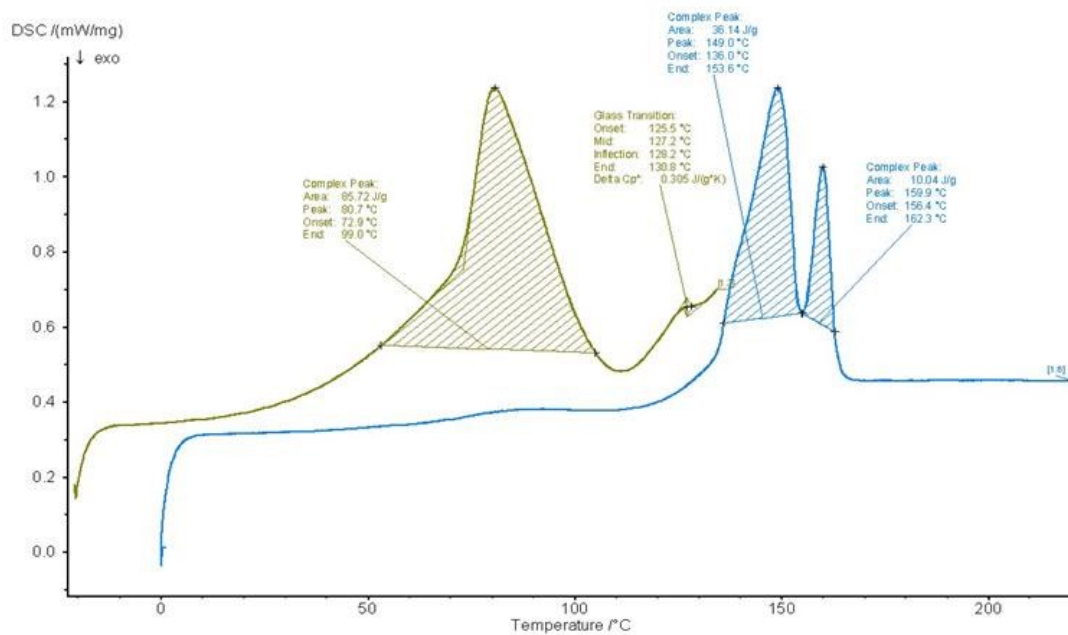
Obr. 14: Termogram M5/CRKL0,3



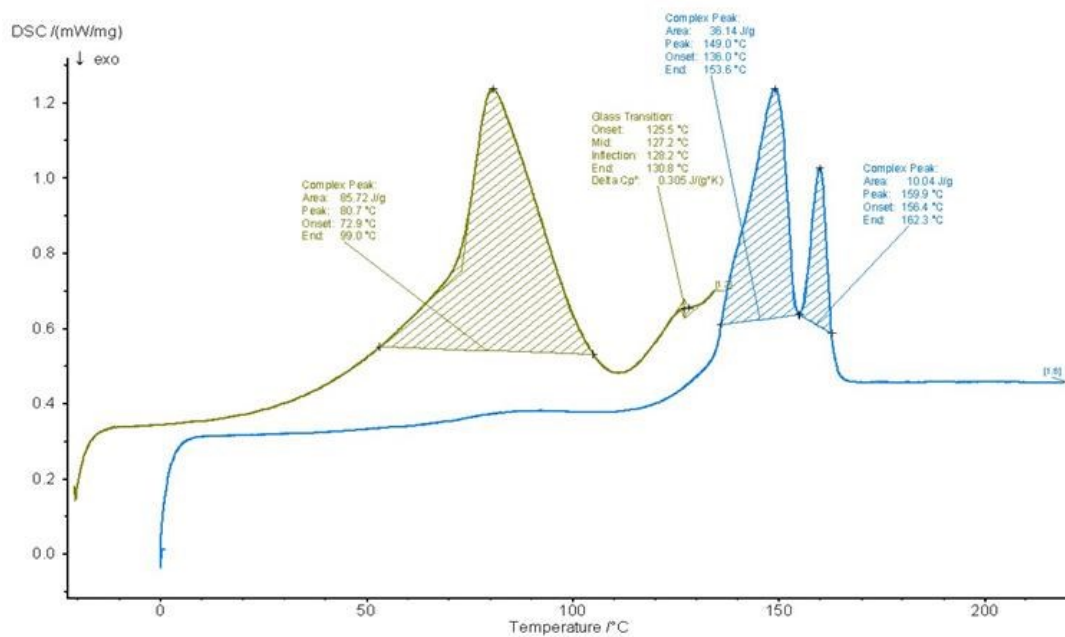
Obr. 15: Termogram M5/CRK0,3/P4 (1. ohřev, 2. ohřev)



Obr. 16: Termogram M5/CRI0,3/P4 (1. ohřev, 2. ohřev)



Obr. 17: Termogram M5/CRL0,3/P4 (1. ohřev, 2. ohřev)



Obr. 18: Termogram M5/CRKL0,3/P4 (1. ohřev, 2. ohřev)

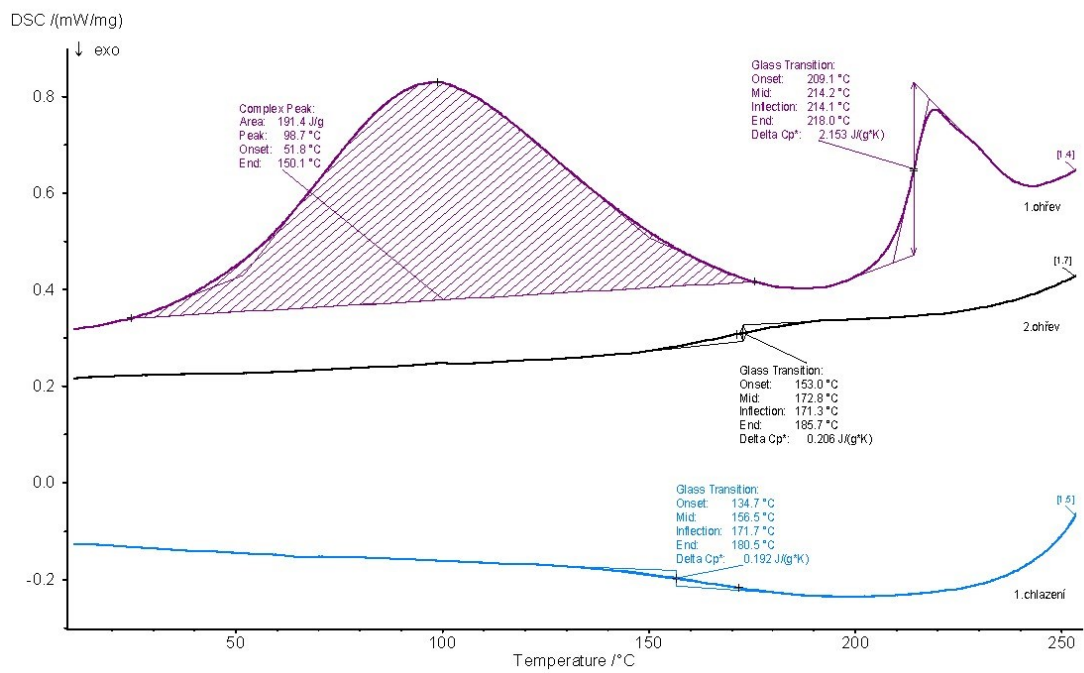
Tab. 7: Čas rozpadu tablet s pomocnými látkami a jejich směsmi

Vzorek	Čas (s)						Průměr	SD
	1	2	3	4	5	6		
M3/G3	3	3	3	3	4	4	3	0,35
M5/G5	29	29	(62)	35	32	29	31	10,95
M5/CRKL0,3	12	10	10	10	9	7	10	1,17
M5/CRI0,3	8	8	7	9	6	6	7	0,78
M5/CRK0,3	8	7	6	6	5	6	7	0,74
M5/CRL0,3	7	6	7	6	8	7	7	0,47
M5/G3/P4	58	53	59	(84)	60	63	47	9,30
M5/CRI0,3/P4	8	5	5	5	4	5	5	1,01
M5/CRKL0,3/P4	4	5	4	4	5	4	4	0,07
M5/CRK0,3/P4	5							
M5/CRL0,3/P4	5							

8.2 Výsledky formulační studie s modelovým proteinem




Tab. 8: Vlastnosti látek ve formulační studii s modelovým proteinem

Vzorek	Osmolalita (mOsmol/kg)							pH
	1	2	3	4	5	Průměr	SD	
M3/G3/BSA8	188					170	12,71	5,6
M3/G3/BSA16	191							5,98
M3/G3/BSA40	207							6,43
M3/G3/GL/BSA8	193							5,67
M3/G3/GL/BSA16	198							6,01
M3/G3/GL/BSA40	212							6,4
M3/CRI/BSA8	189	192	192	192	189	191	1,48	6,76
M3/CRI/BSA16	192	191	192	190	191	191	0,75	6,66
M3/CRI/BSA40	207	207	207	204	208	207	1,36	6,67
M3/CRI/GL/BSA8	192	193	191	190	192	192	1,03	6,65
M3/CRI/GL/BSA16	194	194	196	196	195	195	0,90	6,68
M3/CRI/GL/BSA40	207	207	207			207	0,00	6,83






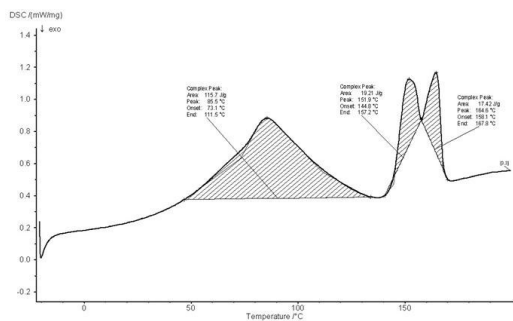
Obr. 19: Termogram modelového proteinu BSA (1. ohřev, 2. ohřev, 1. chlazení)

Tab. 9: Vlastnosti tablet s rybí želatinou a modelovým proteinem

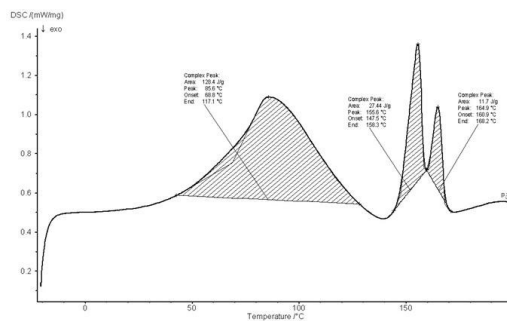
Vzorek	Kód	Obrázek	Popis	Doba rozpadu (s)
V19	M3/G3/BSA8		Kompaktní, vzhledově pěkné tablety, dobře vyjmutelné, beze zbytku v blistru, pevné, pěkná struktura na řezu, nasládlé	5
V20	M3/G3/BSA16			120
V21	M3/G3/BSA40		Kompaktní, pěkná struktura, dobře vyjmutelné, beze zbytku v blistru, pevné, bez chuti, déle lpí na sliznici	360

Tab. 10: Vlastnosti tablet s rybí želatinou, glycerolem 85 % a modelovým proteinem

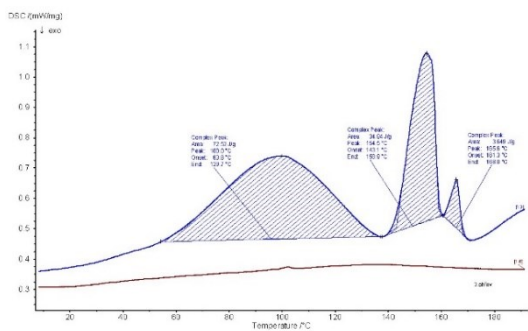
Vzorek	Kód	Obrázek	Popis	Doba rozpadu (s)
V22	M3/G3/GL/BSA8		Kompaktní, pěkná struktura, dobře vyjmutelné, beze zbytku v blistru, pevné, dobrá struktura na řezu, nasládlé	30
V23	M3/G3/GL/BSA16		Kompaktní, dobře vyjmutelné, beze zbytku v blistru, tvrdé, pěkná struktura, malinko nasládlé (příjemný pocit)	90
V24	M3/G3/GL/BSA40		Kompaktní, na povrchu hladké, snadno vyjmutelné, beze zbytku v blistru, křehké (samy se rozpadnou při řezu), nasládlé	9 (gelový zbytek <900)



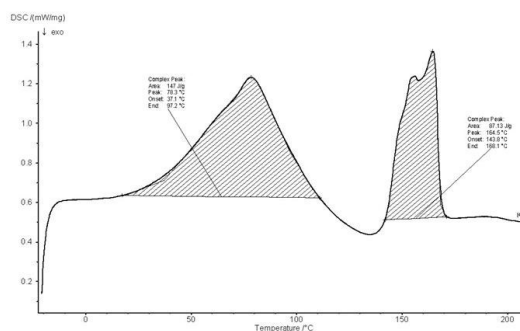
Obr. 20: Termogram M3/G3/BSA 8



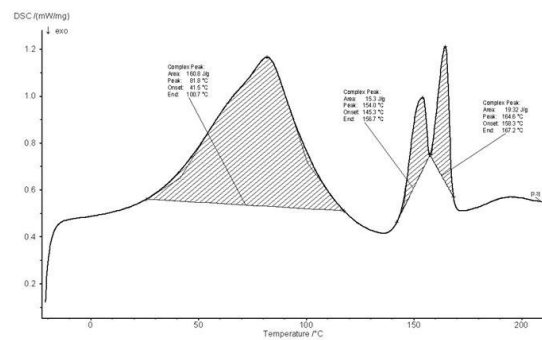
Obr. 21: Termogram M3/G3/BSA 16



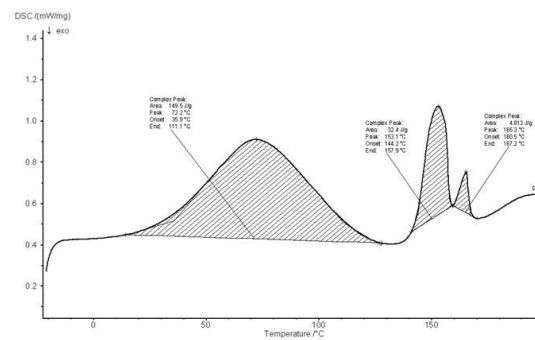
Obr. 22: Termogram M3/G3/BSA 40 (1. ohřev, 2. ohřev)



Obr. 23: Termogram M3/G3/GL/BSA 8






Obr. 24: Termogram M3/G3/GL/BSA 16



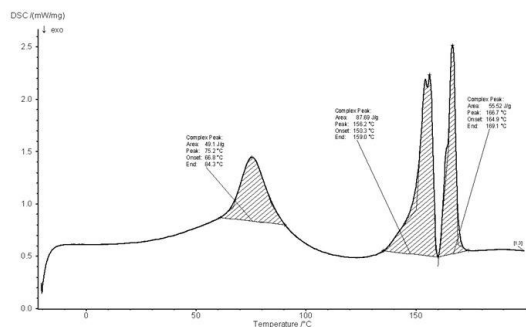
Obr. 25: Termogram M3/G3/GL/BSA 40

Tab. 11: Vlastnosti tablet s karagenanem iota a modelovým proteinem

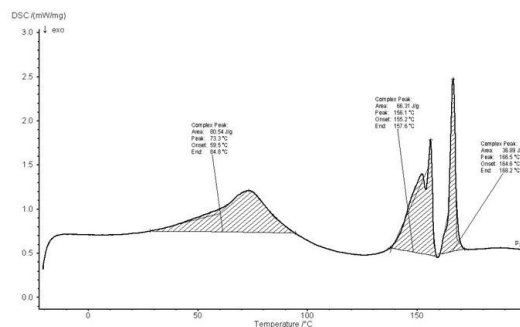
Vzorek	Kód	Obrázek	Popis	Doba rozpadu (s)
V25	M3/CRI/BSA8		Kompaktní, snadno vyjmutelné zanechávají povlak v blistru, dobrá struktura, křehké, nasládlé	50 (gelový zbytek >900)
V26	M3/CRI/BSA16		Kompaktní, snadno vyjmutelné, malý povlak v blistru, dobrá struktura, křehké, nasládlé	30 (gelový zbytek >720)
V27	M3/CRI/BSA40		Kompaktní, snadno vypadnou z blistru, minimální povlak v blistru, křehké, struktura krásná	20 (gelový zbytek >900)

Tab. 12: Vlastnosti tablet s karagenanem iota, glycerolem 85 % a modelovým proteinem

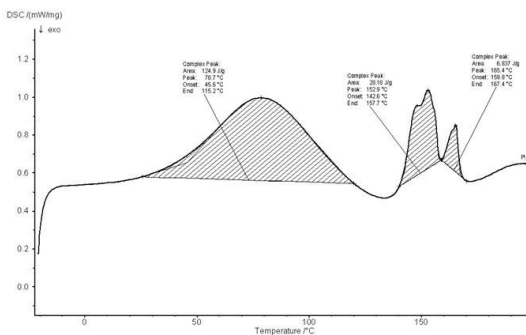
Vzorek	Kód	Obrázek	Popis	Doba rozpadu (s)
V28	M3/CRI/GL/BSA8		Kompaktní, snadno vyjmutelné, zanechávají malý povlak v blistru, dobrá struktura, ale velmi křehké, rozpadají se samy (drobí se)	50 (gelový zbytek >900)
V29	M3/CRI/GL/BSA16		Kompaktní křehké, dobře vyjmutelné z blistru, malý povlak v blistru, struktura dobrá, mají prasklinky a jsou křehké	40 (gelový zbytek >900)
V30	M3/CRI/GL/BBSA40		Kompaktní, kolaps lyofilizačního koláče, snadno vyjmutelné, minimální povlak v blistru, pevné	540



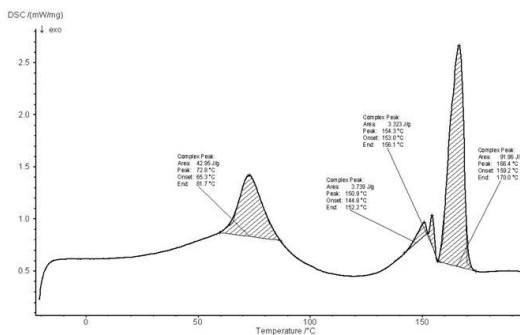
Obr. 26: Termogram M3/CRI/BSA 8



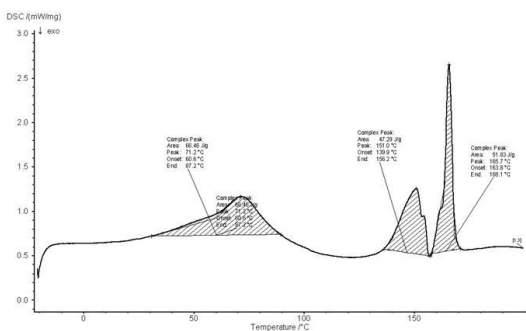
Obr. 27: Termogram M3/CRI/BSA 16



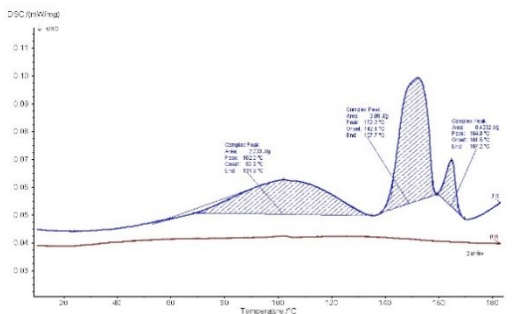
Obr. 28: Termogram M3/CRI/BSA 40



Obr. 29: Termogram M3/CRI/GL/BSA 8

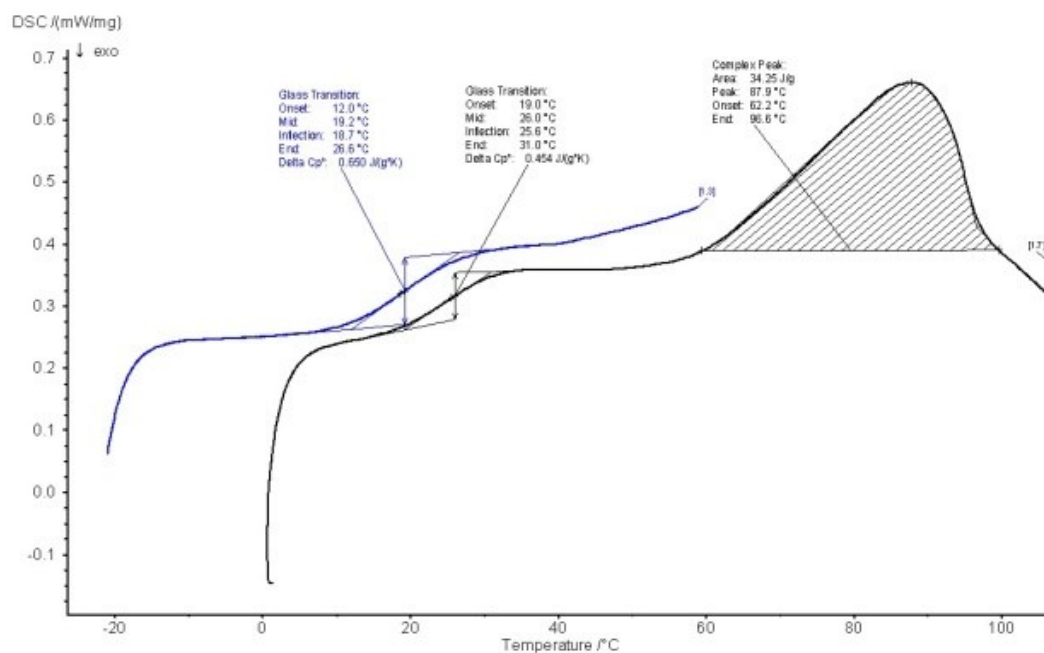


Obr. 30: Termogram M3/CRI/GL/BSA 16








Obr. 31: Termogram M3/CRI/GL/BSA 40
(1. ohřev, 2. ohřev)





8.3 Výsledky formulační studie s aktivní látkou








Obr. 32: Termogram aktivní látky API (1. ohřev, 2. ohřev)




Tab. 13: Vlastnosti tablet s rybí želatinou a aktivní látkou

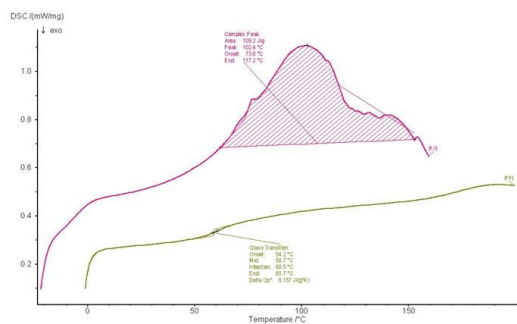
Vzorek	Kód	Obrázek	Popis	Doba rozpadu (s)
V10	M3/G3/API1		Nekompaktní, špatně vyjmutelné, nezůstal zbytek v blistru, pevné, špatná struktura na řezu, nevzhledná barva	150
V11	M5/G5/API1		Nekompaktní, špatně vyjmutelné, nezůstal zbytek v blistru, pevné, špatná struktura na řezu, nevzhledná barva	60
V31	M3/G3/API8		Porézní struktura, průhledné, viditelné trámce, špatně vyjmutelné z Al blistru, zanechávají povlak v blistru, křehké, lámavé	
V32	M3/G3/API7		Velmi porézní struktura na řezu (kostra želatiny), průhledné, špatně vyjmutelné z blistru, nezanechávají povlak v blistru, nejednotná barva, lámavé	
V33	M3/G3/API6		Rozdílná kvalita a kompaktnost tbl., na dně "bublina", špatně vyjmutelné, nezanechávají povlak v blistru Al, ale v plastu ano, křehké, lámavé	

V34	M3/G3/API5		Nekompaktní, špatně vyjmutelné, porézní struktura na řezu (kostra želatiny), bez povlaku v blistru, křehké, lámavé, průhledné, nejednotná barva	
V35	M3/G3/API4		Rozdílná kvalita a kompaktnost tbl., nepěkná struktura na řezu, špatně vyjmutelné z blistru, nezanechávají povlak, plastické, kolaps, hodně slané	
V36	M3/G3/API3		Nekompaktní, světle žlutá „skleněná“ tbl., obtížně vyjmutelná z blistru, zůstává zbytek v blistru, drť, drolí se	
V37	M3/G3/API2		Nekompaktní, světle žlutá „skleněná“ tbl., nepěkná struktura, obtížně vyjmutelná, zbytek v blistru, drť, při vyjímání z blistru se lámou, hodně slané	

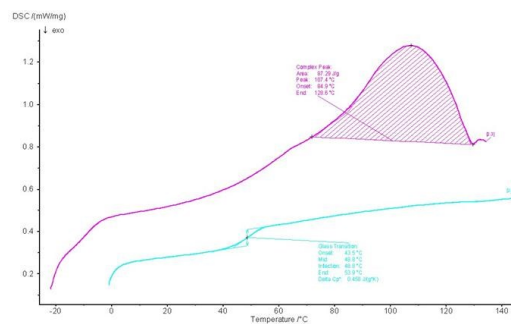
Tab. 14: Vlastnosti tablet s karagenany a aktivní látkou

Vzorek	Kód	Obrázek	Popis	Doba rozpadu (s)
V12	M5/CRI0,3/API1		Nekompaktní špatně vyjmutelné, nezůstal zbytek v blistru, pevné, špatná struktura na řezu, nevzhledná barva	70
V13	M5/CRI0,3/P4/API1		Nekompaktní, špatná struktura na řezu, nevzhledná barva, špatně vyjmutelné, nezůstal zbytek v blistru, velké bubliny ve struktuře, tvrdé	720
V14	M5/CRKL0,3/API1		Nekompaktní, špatně vyjmutelné, nezůstal zbytek v blistru, pevné, špatná struktura na řezu, velké dutiny, nevzhledná barva	90
V15	M5/CRKL0,3/P4/API1		Nekompaktní, špatně vyjmutelné, nezůstal zbytek v blistru, pevné, špatná struktura na řezu, velké dutiny ve struktuře, nevzhledná barva	300
V16	M5/CRL0,3/API1		Nekompaktní, špatná struktura na řezu, nevzhledná barva, špatně vyjmutelné, nezůstal zbytek v blistru, velké dutiny ve struktuře, tvrdé	120

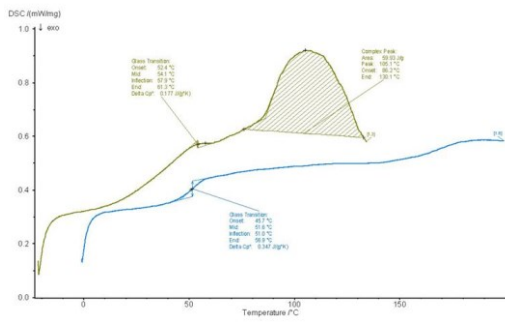
V38	M3/CRI/API8		Nekompaktní, nevhodná struktura, světle žlutá tableta, obtížně vyjmutelná, zůstal zbytek v blistru a drť, křehké
V39	M3/G3/APIR		Kompaktní, porézní struktura, průhledné, snadno vyjmutelné z blistru, zbytek v blistru nezůstal, nejsou tak křehké
V40	M3/G3/APIR2		Různé výsledky- některé tablety kompaktní s porézní strukturou, světlé, snadno vyjmutelné z blistru, zbytek blistru nezůstal, nejsou tak křehké, jiné tablety napěněné s naprosto nevhodnou strukturou



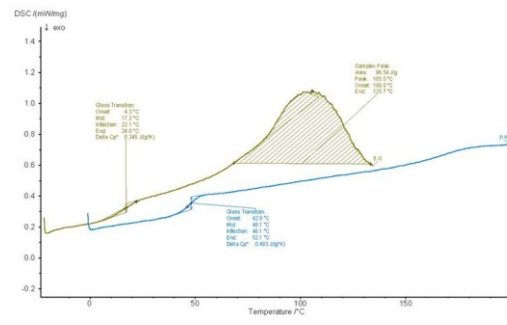
Obr. 33: Termogram M3/G3/APII (1. ohřev, 2. ohřev)



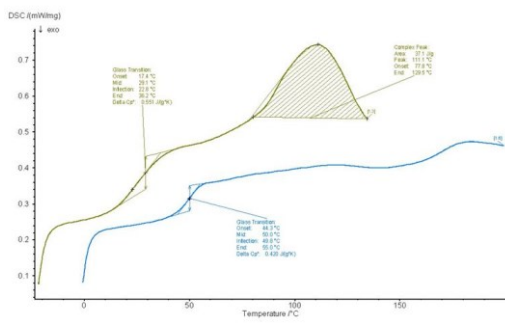
Obr. 34: Termogram M5/G5/APII (1. ohřev, 2. ohřev)



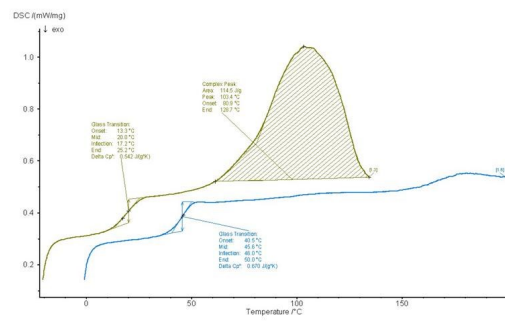
Obr. 35: Termogram M5/CRI0,3/P4/API1 (1. ohřev, 2. ohřev)



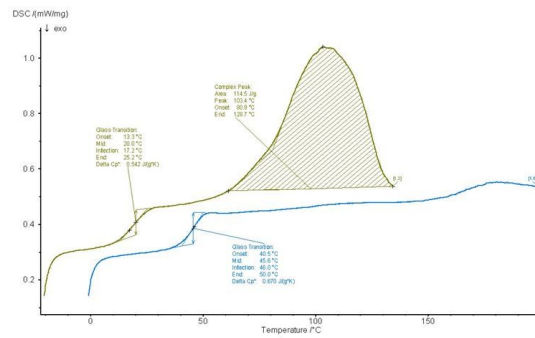
Obr. 36: Termogram M5/CRI0,3/API1 (1. ohřev, 2. ohřev)



Obr. 37: Termogram M5/CRKL0,3/P4/API1 (1. ohřev, 2. ohřev)



Obr. 38: Termogram M5/CRKL0,3/API1 (1. ohřev, 2. ohřev)



Obr. 39: Termogram M5/CRL/TF11 (1. ohřev, 2. ohřev)

9 Diskuse

Předmětem mé diplomové práce byly formulační studie, jejichž cílem je nahradit současně používanou injekční lékovou formu imunologického preparátu na orální. Pro pacienty je orální podání (do dutiny ústní) mnohem příjemnější a preferovanější oproti injekčnímu. Lyofilizovaná bukální nebo sublinguální tableta je výhodná z hlediska stability aktivní látky, rychlého rozpadu i snadné aplikace. Vhodnou úpravou směsi a volbou pomocných látek je možné dosáhnout mukoadhezivních vlastností a dostatečné doby kontaktu s tkání.

V práci jsem se zaměřila na hledání vhodných pomocných látek pro lyofilizaci. Struktura lyofilizátu je určena vlastnostmi pomocných látek. Základní skelet lyofilizačního koláče tvoří krystalické a amorfní strukturotvorné látky a spolu s dalšími látkami (např. modifikátory pH, kryo- a lyoprotektivními látkami) a také s postupem procesu (podmínky mražení a sušení) jsou předpokladem stability aktivní látky a vhodných vlastností přípravku.²

Vycházela jsem ze základní kompozice obsahující mannitol a rybí želatinu, která byla testována už v dřívější studii pro alergeny⁴⁴ s cílem úpravy složení pro vybranou aktivní látku a případnou náhradu želatiny.

Studii jsem rozdělila na tři etapy – první etapa probíhala pouze s pomocnými látkami a jejich směsmi, druhá etapa s modelovým proteinem BSA a třetí etapa s aktivní látkou API. Při výběru a hodnocení vhodnosti složení jsem hodnotila pH roztoků a osmolalitu směsí, které by mohly ovlivnit stabilitu aktivní složky; dalším kritériem byla také jednoduchost přípravy směsi pomocných látek, zejména nutnost zahřívání a viskozitu směsi po ochlazení na laboratorní teplotu, které z výrobního hlediska ovlivňují náročnost výroby, dávkovatelnost a cenu přípravku. Přesnost dávkování do blistru pak ovlivňuje hmotnostní stejnoměrnost, která je jedním z procesních parametrů přípravku.

U tablet jsem hodnotila vzhled, kompaktnost tablety, vyjmutelnost z blistru, zbytek v blistru, mechanickou odolnost a strukturu na řezu. Sledovala jsem rovněž termální vlastnosti (DSC), dobu rozpadu tablet a dále také jejich barvu a chuť.

Lyofilizace probíhala vždy za stejných podmínek: připravené vzorky byly nadávkovány do plastových nebo hliníkových blistrů, umístěny na desky lyofilizátoru a vloženy do mrazicího boxu (-30 °C). Poté byly vyjmuty a co nejrychleji umístěny do komory zařízení, kde byl po evakuaci zahájen proces sušení. Desky lyofilizátoru s vlastním ohřevem zajistily potřebnou energii pro sublimaci ledu. Po zahájení lyofilizace byla teplota na deskách přibližně -16 °C, teplota kondenzoru byla -56 °C po celou dobu lyofilizace a tlak v komoře 30 Pa. Teplota v průběhu primárního a sekundárního sušení postupně stoupala, až na konci procesu dosáhla cca 18 °C.

Průběh mražení bohužel nebylo možné zcela kontrolovat ani optimalizovat. To mohlo být příčinou některých dílčích neúspěchů (kolaps koláče, nevhodná struktura tablety), jak bude komentováno později. Rovněž se při provozu ukázalo, že vyšší patra v komoře mají v průběhu primárního sušení vyšší teplotu než dolní a některé prvotní experimenty tak byly znehodnoceny rozmražením před sublimací nebo kolapsem koláče. Proto byly další práce realizovány vždy pouze na třech dolních patrech (čísla pater 8, 9, 10 na Obr. 40).



Obr. 40: Komora lyofilizátoru

Výsledné produkty (tablety) jsem vyjmula z blistru, zdokumentovala jejich vlastnosti a změřila dobu jejich rozpadu. Obvykle jsem připravila 10 tablet, ale protože v některých kombinacích jsem měla jen velmi málo materiálu (zejména ve třetí etapě s aktivní látkou), musela jsem připravit jen např. 2 tablety. Proto jsou výsledky doby rozpadu někdy pouze výsledkem 1 měření a slouží ve formulační studii jako orientační. Komentáře k vlastnostem tablet jsou součástí fotodokumentace.

9.1 Formulační studie s pomocnými látkami

Pomocné látky pro lyofilizát by měly kombinovat látky tvořící strukturu. Kombinují se látky krystalické s amorfními. Některé látky mohou tvořit částečně krystalickou, částečně amorfni strukturu.³

K nejčastěji využívaným krystalickým plnivům pro lyofilizované produkty patří mannitol.^{26,31} Snadno se rozpouští ve vodě, není potřeba ho zahřívat, nezvyšuje viskozitu směsí, takže nezhoršuje manipulovatelnost se směsmi a neovlivňuje pH.

Jak ilustruje Obr. 1, byla pomocí DSC zjištěna z termogramu teplota tání 170°C. V této práci jsem použila mannitol v koncentraci 3 % (M3) nebo 5 % (M5).

Protože po rozpuštění ovlivňuje mannitol osmolalitu směsí, což by mohlo mít vliv na stabilitu proteinové složky (aktivní látky), měřila jsem osmolalitu směsí pro tablety na osmometru. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 4.

Rybí želatina je vhodnou náhradou želatiny získávané z přežvýkavců. Je to amorfni látka, což je patrné ze záznamu termogramu, v němž byl při prvním ohřevu identifikován skelný přechod při 85,1 °C a při druhém ohřevu při 81,8 °C, který je vidět na Obr. 2. Kolem teploty 100 °C je opět patrná vlhkost přítomná v surovině.

Určitou nevýhodou z provozního hlediska je, že je nutné ji rozpouštět zahříváním při cca 60 °C, viskozita však je přijatelná i po ochlazení, dobře se s ní manipuluje a dá se dobře pipetovat (dávkovat). Měřením na pH metru jsem zjistila, že snižuje hodnotu pH, což ukazuje Tab. 4 a pro formulaci přípravku s proteinovou aktivní složkou bude potřeba uvážít nutnost použití pufru na upravení pH roztoků. Neovlivňuje však osmolalitu směsí a může vhodně doplnit mannitol. Želatinu jsem používala v koncentraci 3 % (G3) a 5 % (G5).

Jako alternativu za rybí želatinu jsem se ve formulační studii rozhodla použít karagenany, které jsou často používány v potravinářském průmyslu. Jak ukazují obrázky DSC (Obr. 3-6), jsou to krystalické látky, jejichž pík byl identifikován u karagenanu lambda (CRL) při 213,7 °C (Obr. 5), karagenanu kappa (CRK) při 235,7 °C (Obr. 3), karagenanu iota (CRI) při 196,3 °C (Obr. 4), karagenanu směšného kappa a lambda (CRKL) při 198,0 °C (Obr. 6).³⁹ Endotermická aktivita, která byla identifikována v rozmezí teplot 113,6 – 125,9 °C poukazuje na zbytkovou vodu.

Prvotní experiment, ve kterém byla obdobně k želatině použita koncentrace karagenanů 3 %, ukázal její nevhodnost. Karagenany vytvořily gely a nebylo možné s nimi manipulovat. Proto jsem následně empiricky koncentraci snížila na 0,3 %, kdy se směsí dá stále ještě dobře manipulovat a rozpouštění ve vodě je dostatečně rychlé. Karagenany neovlivňují osmolalitu směsí a ani pH, takže v budoucnu nebude potřeba zvažovat použití pufru ve směsích s aktivní látkou, výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 4. Z hlediska přípravy a případného využití v provozu je ale nutné

zmínit nevýhodu mírného zahřívání na cca 50°-60 °C při rozpouštění a riziko interakcí s některými ionty.³⁸

Tab. 4 shrnuje výsledky měření pH a osmolality směsí M3G3, M5G5. Zatímco směs M3G3 má mírně hypoosmotické vlastnosti (184 mosmol/kg) a pH 4,8, směs M5G5 je mírně hypertonická (329 mosmol/kg) s hodnotou pH 4,35. Na Obr. 8 a 9 jsou uvedeny výsledky měření termálních vlastností tablet směsí M3/G3 a M5/G5. Jak je vidět na obrázcích v Tab. 5, tablety mají kompaktní strukturu i řez a rozpadají se v průměru během 3 sekund tablety M3/G3 a během 31 sekund tablety M5/G5.

V průběhu lyofilizace tablet ze směsí M5/G5 byly zaznamenány určité problémy. Bylo pozorované, že v některých tabletách došlo ke kolapsu koláče, vytvořila se velká dutina, jak je patrné na obrázku v Tab. 5. Tento jev pravděpodobně způsobilo nedostatečné zmražení vzorků nebo jeho nevhodná rychlost, problémy však mohly nastat díky výše zmíněným rozdílům v teplotě desek v různé pozici v lyofilizační komoře. Tablety M5G5 po kolapsu rychle nasakují vodu, ale v médiu dlouho zůstává zbytek, jehož rozpad je velmi dlouhý (i více než minuta). To je zřejmé z Tab. 8, kde je evidentní rozdíl mezi dobou rozpadu tablet bez kolapsu (31 sekund) a s kolapsem (64 sekund). Důvodem je menší pórovitost koláče, aglomerace řetězců želatiny a zhoršený průnik vody do tablety.

Jak ukázaly výsledky již zmíněného projektu s alergeny,⁴⁴ není doba rozpadu in vitro zcela odpovídající situaci v ústech (teplota, množství a složení „media“). Všichni dobrovolníci potvrdili okamžité rozplynutí tablety po vložení do úst.

Výsledky pro směsi karagenanů s mannitolem M5/CRL0,3; M5/CRI0,3; M5/CRK0,3; M5/CRKL0,3 prezentuje Tab. 4. Hodnoty pH se pohybovaly v rozmezí 7,35-8,84, osmolalita kopírovala již uvedené hodnoty pro M3, resp. M5. Vlastnosti tablet jsou i s obrázky shrnuty v Tab. 6.

Tablety z karagenanu kappa (CRK) a lambda (CRL) a mannitolu (M5/CRK0,3 a M5/CRK0,3) jsou kompaktní, ale velmi křehké a praskají, zůstává po nich velký povlak v blistru; nemají požadovanou strukturu. Směsný karagenan kappa a lambda

(CRKL) má ve směsi s mannitolem M5/CRKL0,3 dobrou strukturu na řezu i kompaktnost tablet, nezanechává velký povlak v blistru, ale tablety jsou křehké. Struktura a kompaktnost tablet v blistru byla vzhledově nejlepší pro kombinaci karagenanu iota M5/CRI0,3 a tablety zanechávaly pouze nepatrný povlak, po vyjmutí však byly velmi křehké. Přesto se v této fázi experimentu jeví jako nejvhodnější.

Čas rozpadu tablet M5/CRI0,3, M5/CRK0,3, M5/CRL0,3 a M5/CRKL0,3 byl velmi krátký, v rozmezí 4-10 sekund (Tab. 7). Vyhodnocení termálních vlastností tablet z těchto směsí je na Obr. 11-14. Na termogramech výše uvedených směsí je patrné posunutí, drobné rozštěpení a pokřivení píku mannitolu (Obr. 11-14), což může být způsobeno interakcemi látek mezi sebou. Kolem teploty 100 °C je vždy patrný projev přítomnosti vlhkosti v tabletě.

Pro zlepšení vlastností lyofilizátů se využívá vhodný polymer, který může vhodně modifikovat vlastnosti krystalických strukturotvorných látek, případně teplotu skelného přechodu, například povidon.⁴³ Proto jsem zkusila k základním směsím M/G a M/CR přidat povidon 25 v koncentraci 4 % (P4). Záměrem bylo snížení křehkosti tablet. Povidon je amorfni látka, jehož skelný přechod při teplotě 159,4 °C ukazuje Obr. 7. Rozpouští se za laboratorní teploty, což je výhodné pro technologické zpracování, viskozitu směsí zvyšuje jen mírně a primárně nezhoršuje manipulovatelnost.

Jak je ale patrné z Tab. 4, pro směsi M5/G3/P4, M5/CRI0,3/P4, M5/CRK0,3/P4, M5/CRL0,3/P4 a M5/CRKL0,3/P4, povidon způsobuje pokles pH na hodnoty 3,48-4,17. Díky tomu došlo ke změně vlastností směsí s karagenany, které jsou v kyselém pH nestabilní.³⁸ Po přidání P4 se viskozita výrazně zvýšila, čímž se manipulovatelnost proti předpokladu zhoršila.

Přídavek povidonu snížil kompaktnost, některé tablety byly popraskané, což mohlo být způsobeno lyofilizací v plastovém blistru, kde je roztažnost matrice imitovaná cylindrickým tvarem důlku. Rovněž byl u některých směsí zaznamenán kolaps lyofilizátu. Tablety přitom zůstávaly stále velmi křehké. Obr. 10 a 15-18 ukazuje

výsledky hodnocení termálních vlastností tablet; například u vzorku M5/CRK0,3/P4 je patrné rozštěpení píku kolem teploty 150 °C pravděpodobně v důsledku interakce mezi pomocnými látkami. V důsledku povidon ovlivnil také rozpad tablet, ty nasákly vodu a trvalo velmi dlouho (někdy déle než 10 minut), než se koláč rozplynul. Tato situace pochopitelně nemusí nutně znamenat problém pro orální aplikaci, neboť v ústech jsou jiné podmínky (pohyb a produkce slin). Tablety M5/G3/P4 se rozpadaly (47 sekund). Opět byly zaznamenány i delší časy rozpadu (84 sekund), což bylo projevem kolapsu lyofilizačního koláče. Všechny časy rozpadu jsou uvedeny v Tab. 7. Rozpadavost vzorků M5/CRK0,3/P4, M5/CRL0,3/P4 jsem testovala pouze orientačně u jedné tablety, protože bylo připraveno pouze malé množství tablet.

Pro úpravu osmotického tlaku, mírnou plastifikaci a také modifikaci chuti je často do lyofilizátů pro orální aplikaci používán glycerol.²⁶ Se směsí se mísí za studena a v nízké koncentraci neovlivňuje viskozitu ani manipulovatelnost. Příklad 0,5 % glycerolu (GL) neovlivnil hodnotu pH směsí, které se pohybují v rozmezí 5,6-6,83, ani jejich osmolalitu, hodnoty jsou v rozmezí 192-212 mOsmol/kg (Tab. 8). Tablety byly přitom pružnější, méně křehké a nezůstává po nich velký povlak v blistru, jejich vlastnosti jsou dokumentovány v Tab. 10 a 12. Pro malý počet tablet vzorků jsem dobu rozpadu měřila orientačně u jedné tablety z každé směsi. Glycerol ji výrazně neovlivnil.

Na základě průběžného hodnocení výsledků postoupily do další etapy tablety složené z mannitolu, želatiny, případně karagenanu iota a glycerolu.

9.2 Formulační studie s modelovým proteinem

Jako modelový protein byl použitý albumin, což je 98 % frakce bovinního sérového albuminu (BSA). Je to pevná látka, ve které je minimum nízkomolekulárních látek jako nečistot, které by ovlivňovaly vlastnosti směsí. Na termogramu BSA na Obr. 19 je kolem 98,7 °C patrná vlhkost v látce, která je příčinou posunutí skelného přechodu

na teplotu 214,2 °C. Při druhém ohřevu je identifikován při teplotě kolem 170 °C. Skelný přechod je zřetelný i při prvním chlazení a to cca při 156 °C. Díky přítomnosti skelného přechodu tedy víme, že BSA je amorfni látka. V základní matrici pomocných látek je BSA možné rozpustit za studena za použití magnetické míchačky, což usnadňuje proces přípravy směsi.

Připravila jsem směsi M3/G3/BSA M3/G3/GL, M3/CRI/BSA a M3/CRI/GL/BSA, přičemž číselné označení BSA8, BSA16, BSA40 znamená, kolik mg BSA připadá na jednu tabletu. Se zvyšující se koncentrací modelového proteinu ve směsích se doba potřebná k rozpuštění BSA i viskozita směsi zvyšovala, ale manipulace a dávkovatelnost ovlivněna nebyla. Termogramy směsí jsou shrnuty na obrázcích 20 – 25.

V Tab. 8 jsou uvedeny hodnoty pH a osmolality směsí. Hodnoty pH směsí M3/G3/BSA a M3/G3/GL/BSA se pohybují v rozmezí 5,60-6,43 a jejich osmolalitu jsem měřila pouze orientačně, neboť vliv modelového proteinu i glycerolu byl malý; hodnoty se pohybovaly v rozmezí 188-207 mOsmol/kg. Směsi M3/CRI/BSA a M3/CRI/GL/BSA měly pH v rozmezí 6,65-6,68 a jejich osmolalita je v rozmezí 191-207 mOsmol/kg. Pouze u nejvyšší koncentrace byla osmolalita mírně zvýšena, což může být způsobeno vyšším onkotickým tlakem makromolekuly a vzájemnou kompeticí o vodu.

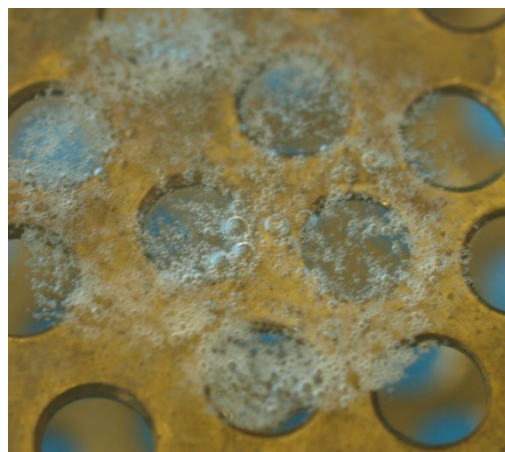
Rozdílná koncentrace BSA neměla na strukturu tablet velký vliv, jak je vidět na obrázcích v Tab. 9-12. Tablety M3/G3/BSA jsou kompaktní, mají pěknou strukturu, snadno se vyjímají z blistru, nezůstává v něm po nich povlak. V in vivo studii dobrovolníci deklarovali pocit prodlouženého ulpění na sliznici v ústech. Také kombinace M3/G3/GL/BSA poskytuje kompaktní tablety s dobrou strukturou. Po vyjmutí z blistru po nich nezůstává povlak, jsou ovšem tvrdší a křehčí a právě z důvodu křehkosti se samy rozpadaly při vyjímání z blistru. Tablety M3/CRI/BSA, byly kompaktní, s dobrou strukturou, snadno se vyjímaly z blistru a zanechávaly pouze malý povlak. Tablety M3/CRI/GL/BSA byly opět křehké, při vyjímání z blistrů a manipulaci se z důvodu křehkosti samy rozpadaly. Termogramy směsí jsou shrnuty na obrázcích 26 - 31.

Dobu rozpadu tablet jsem měřila jen orientačně na jedné tabletě z důvodu omezeného množství vyrobených tablet. Výsledky ukazuje Tab. 9-12. Tablety ze směsi M3/G3/BSA se rozpadaly po dobu 5-120 s, přičemž doba rozpadu se dle předpokladu se zvyšující se koncentrací BSA prodlužovala. Tablety ze směsi M3/G3/GL/BSA se rozpadaly po dobu 30-90 s, v nižších koncentracích BSA po nich na hladině zůstával jen napěněný zbytek. Tableta M3/G3/GL/BSA40 rychle nasákla vodu a vytvořila gel, který se rozpouštěl déle než 15 minut. Všechny tablety ze směsi s CRI kromě směsi M3/CRI/GL/BSA40 během jedné minuty nasákly vodu a poté rovněž vytvořily gel, který setrvával na hladině déle než 15 minut. Výše zmíněná tableta s BSA40 několik minut nasávala vodu, ale gel překvapivě nevytvořila a po 9 minutách zbyla pouze pěna na hladině.

Průběh rozpadu je znázorněn na Obr. 41 a 42. Kapsy, které se v přípravku někdy vytvoří po vzduchových bublinkách a během lyofilizace nedojde k jejich poškození, mohou vytvořit na povrchu lyofilizátu bublinky a uvolnit se při rozpuštění tablety¹⁸



Obr. 41: Rozpad tablety



Obr. 42: Zbytek tablety na hladině

Glycerol v tabletách pozitivně ovlivnil jejich chuť, tablety byly mírně sladší než tablety bez glycerolu.

Přestože hodnoty rozpadavosti byly vyšší, než je lékopisný limit, je nutné zmínit, podobně jak již bylo uvedeno pro směsi pomocných látek, že chování v ústech bude odlišné. Navíc určitý stupeň adheze a pomalejší rozpouštění umožní aktivní látce delší kontakt se sliznicí a její imunizaci.

Po vyhodnocení výsledků směsí s modelovým proteinem byla potvrzena vhodnost směsí M3/G3 a M3/CRI0,3. Pro doplnění byly ale testy s aktivní látkou (viz dále) realizovány také s ostatními kombinacemi (M5/G5, M5/CRKL0,3, případně s přídatkem P4).

9.3 Formulační studie s aktivní látkou

Aktivní látka (API) je amorfni látka peptidové povahy s relativně malou molekulou (cca 5000 mol/g). Jak ilustruje Obr. 32, byl skelný přechod identifikován při 26,0 °C. API je dostupná ve formě lyofilizátu, který se rekonstituuje po přidání 4 ml vody pro injekce a izoosmotický roztok se aplikuje injekčně. Pro účely experimentu byly k dispozici ampulky s lyofilizátem. Pro přípravu tablet se aktivní látka rozpouštěla v předem připravené směsi pomocných látek bez zahřívání.

Jak plyne z prvního sloupce Tab. 13 a 14, připravila jsem směsi s matricí M3/G3, M5/G5, M5/CRI0,3, M5/CRI0,3/P4, M5/CRKL0,3, M5/CRKL0,3/P4 a M5/CRL0,3. Prvotním záměrem bylo připravit tablety, ve které by 1 dávka API (84 mg) byla v 1 tabletě (API1). Během přípravy jsem pozorovala, že po rozpuštění aktivní látky ve směsi s M3/G3 a M5/G5 se viskozita mírně zvýšila, ale směs zůstala stále dobře pipetovatelná. Po rozpuštění aktivní látky ve směsi s karagenany se ale viskozita zvýšila natolik, že nastal problém při pipetování roztoku a nepodařilo se do blistrů odebrat veškeré teoreticky vypočítané množství podle počtu tablet. Směs ulpívala na stěnách nádoby a docházelo ke ztrátám. Z důvodu velmi omezeného množství aktivní látky jsem u směsí neměřila hodnoty pH ani osmolality.

Jak je zřejmé z obrázků v Tab. 13 a 14, aktivní látka měla na vzhled tablet velký vliv. Je evidentní, že došlo ke kolapsu koláče lyofilizátu, tablety měly nahnědlou barvu, vytvořily se v nich velké dutiny, byly tvrdé a přitom křehké, takže se velmi špatně vyjímaly z blistru.

Příčinou jsou soli obsažené v lyofilizátu samotné aktivní látky. Při koncentraci aktivní látky 84 mg v jedné tabletě a rozpuštění v malém množství vehikula byl díky součtu osmotického efektu všech pomocných látek roztok hypertonický. Zejména chlorid sodný snižuje eutektickou teplotu³⁰ a může tak ovlivnit teplotu skelného

přechodu pomocných látek, což způsobilo, že směs v mrazicím boxu nedostatečně zmrzla. To bylo patrné již při zahájení primárního sušení, kdy ne zcela zmražené vzorky začaly „pěnit“. Za laboratorních podmínek však nebylo možné regulovat ani teplotu v mrazicím boxu, průběh mražení, ani primární sušení. Na termogramech tablet s aktivní látkou (Obr. 33-39) je identifikovatelný skelný přechod aktivní látky na prvním i druhém ohřevu a rozpoznatelné sloučení píků jednotlivých látek směsi v jeden velký pík, což zřejmě souvisí s kolapsem lyofilizačního koláče.

Z důvodu omezeného množství aktivní látky a její ceny jsem v tomto pokusu připravila jen velmi malé množství tablet a dobu rozpadu tablet jsem testovala pouze orientačně u jedné tablety z každé směsi. Hodnoty jsou uvedeny v Tab. 13 a 14 a pohybují se v rozmezí 60-720 s. Tablety pomalu nasakují vodu, zprůhlední, část propadne mřížkou a část tablety zgelovatí a zůstane nerozpadnutá na hladině média. Subjektivně bylo zjištěno, že tablety jsou mírně slané.

Po vyhodnocení vlastností tablet s aktivní látkou v požadované zamýšlené koncentraci jsem koncentraci aktivní látky v tabletách snižovala postupným ředěním aktivní látky z 84 mg až na 10,5 mg. Vzorky byly označeny v koncentrační řadě API 2-8, kdy číslo označuje, do kolika tablet byla dávka API rozdělena.

Pro sníženou koncentraci aktivní látky jsem použila jako výchozí směs M3/G3 (vzorky M3/G3/API2, M3/G3/API3, M3/G3/API4, M3/G3/API5, M3/G3/API6, M3/G3/API7 a M3/G3/API8). Pro porovnání byl také připraven vzorek M3/CRI0,3/API8 a dále vzorek s API po ultrafiltraci se sníženou osmolalitou M3/G3/APIR a M3/G3/APIR2.

Snížení koncentrace nemá vliv na viskozitu a manipulovatelnost se vzorky obsahujícími želatinu. U tablet M3/G3/API2 a M3/G3/API3 je na první pohled patrná „sklovitost“ tablet a jejich rozdílná struktura, struktura na řezu je nekompaktní, tablety mají světle žlutou barvu a velmi slanou chuť. Tablety M3/G3/API4 a M3/G3/API5 mají taktéž patrnou rozdílnost v kvalitě, ale vzhledově i vlastnostmi jsou lepší než tablety předchozí. Poslední tři ředění M3/G3/API6, M3/G3/API7 a M3/G3/API8 jsou velmi porézní, lámavé a v některých tabletách je „bublina“. Některé nevhodné vlastnosti („bubliny“, poréznost, rozdílná kvalita) tablet

mohou být způsobeny nedostatečně rychlým mražením vzorků. Po přidání aktivní látky do směsi s CRI0,3 se opět tvoří velmi viskózní až gelovitá směs, se kterou se špatně manipuluje. Vlastnosti tablet jsou popsány v Tab. 13 a 14. Měření na osmometru a pH metru jsem neprováděla z důvodu omezeného množství surovin.

Tablety M3/G3/APIR a M3/G3/APIR2 měly výrazně lepší strukturu i poréznost než tablety připravované z lyofilizátu. Podle informace výrobce aktivní látky ale bohužel při této metodě došlo i k odfiltrování molekul účinné látky, čímž se snížila její koncentrace, takže i přes zjevné zvýšení kvality tablet i usnadnění přípravy matrice pro lyofilizaci, se tento proces nedá použít v budoucnosti, pokud se nezabrání odfiltrování molekul účinné látky výběrem vhodného filtru.

Vlastnosti tablet se s postupným snižováním koncentrace aktivní látky v jedné tabletě postupně zlepšovaly. Vhodnou strukturu a kompaktnost měly tablety M3/G3/API4 a M3/G3/API5, jak ilustrují obrázky v Tab. 13. Z hlediska výhodnosti jsem pro další testování (přidání barviva a sladidla) vybrala tablety M3/G3/API4, kdy vlastnosti tablet jsou vhodné pro další využití a zároveň 4 tablety jako jedna dávka jsou přijatelné i pro využití pacientem.

Pokračování studie má za úkol zlepšit vzhled tablet přidáním barviva a zlepšit chuť přidáním vhodného sladidla.

10 Závěry

Výsledky této pilotní formulační práce zabývající se hledáním vhodné kombinace pomocných látek pro tvorbu matrice lyofilizovaných tablet k orální aplikaci peptidů/proteinů lze shrnout do několika závěrů:

- Mannitol je ze studovaných látek nejvhodnější krystalické plnivo pro lyofilizované tablety. Vhodné jsou koncentrace 3 % a 5 %. Roztoky se snadno připraví, dobře dávkují, tablety mají pěkný a kompaktní vzhled a dobrou dobu rozpadu.
- S ohledem na vlastnosti lyofilizátu se jako nejvhodnější amorfnní látka jeví rybí želatina v koncentraci 3 %. Osvědčila se z hlediska rozpustnosti, přípravy vzorků i snadné manipulovatelnosti. Rybí želatina je vhodná do kombinací s mannitolem (M3/G3 i M5/G5), přičemž z hlediska vlastností se jako nejlepší jevila kombinace M3/G3. Vlastnosti tablet M5/G5 nebyly jednotné, u některých tablet došlo ke kolapsu lyofilizátu. V následujících studiích bude pouze potřeba upravit pH vhodným pufrům, protože rybí želatina snižuje pH směsí.
- Alternativou jsou karagenany, které jsou z hlediska přípravy směsí, rozpustnosti a manipulovatelnosti se vzorky podobné rybí želatině. Z testovaných podtypů karagenanu lambda, iota, kappa a směsného karagenanu je vhodný karagenan iota v koncentraci 0,3 %. Tablety mají dobrý vzhled, strukturu i vlastnosti.
- Povidon snižuje pH směsí a ve směsí s karagenany se zvýšila viskozita. Tím se zhoršila manipulovatelnost se vzorky. U tablet byl často pozorován kolaps koláče.
- Glycerol se dobře rozpouští ve vodě, neovlivňuje manipulaci se směsmi a je vhodný pro další studie při modifikaci struktury matric.

V dalších pokračovacích studiích bude nezbytné

- Modifikovat složení matrice tak, aby po přidání aktivní látky vytvořily tablety s vhodnými vlastnostmi a vzhledem.

- Zvolit vhodnou metodu úpravy aktivní složky pro odstranění přebytečných solí v lyofilizátu a snížení osmolality roztoků aktivní látky, aby bylo možné připravit finální přípravek s jednou dávkou aktivní složky v jedné tabletě.

11 Použitá literatura

- ¹ REMMELE R. L., SAMPATHKUMAR K., CALLAHAN E. J. Development of Stable lyophilized protein drug products. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2012, 13 (3), s. 471-496, ISSN: 1873-4316.
- ² SCHERCH K., BETZ O., GARIDEL P., MUEHLAU S., BASSARAB S., WINTER G.: Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins I: Stability after freeze-drying. *J. Pharm. Sci.*, 2010, 99 (5), s. 2256-2278, ISSN: 0022-3549.
- ³ ŠKLUBALOVÁ Z., *Využití lyofilizace ve farmacii a lékových formách*, Škola lyofilizace. Odborný seminář. Praha. 15. 10. 2015.
- ⁴ JONES R. J., RAJABI-SIAHBOOMI A., LEVINA M., PERRIE Y., MOHAMMED A. R.: The influence of formulation and manufacturing process parameters on the characteristics of lyophilized orally disintegrating tablets, *Pharmaceutics*, 2011, 3, s. 440-457, ISSN: 1999-4923.
- ⁵ AHMED T. A.: Formulation and clinical investigation of optimized vinpocetine lyopiant-tabs: new strategy in development of buccal solid dosage forms, *Drug design, development and therapy*, 2019, 13, s. 205-220, ISSN: 1177-8881.
- ⁶ KOSEKI T., ONISHI H., TAKAHASHI Y., UCHIDA M., MACHIDA Y.: Development of novel fast-disintegrating tablets by direct compression using source steric acid ester as a disintegration-accelerating agent, *Chem. Pharm. Bull*, 2008, 56 (10), s. 1384-1388, ISSN: 1347-5223.
- ⁷ *Český lékopis 2017, Doplnění 2019*, Praha, Grada Publishing, a. s., 4869 s, ISBN: 978-80-271-2531-9. *Obecné články lékových forem, Tabuletae*: s. 1043-1045.
- ⁸ HILLERY A., M., PARK K. (Eds.), *Drug delivery: Fundamentals & applications*. 2nd Ed, 2017, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton. ISBN: 978-1-4822-1771-1. BROWN M. B., PATEL V. F., *Buccal and sublingual drug delivery*, s. 201-214.
- ⁹ *Český lékopis 2017, Doplnění 2019*, Praha, Grada Publishing, a. s., 4869 s, ISBN: 978-80-271-2531-9. *Obecné články lékových forem, Parenteralia*: s. 1029-1031.

-
- ¹⁰ FELTON L. (Ed), *Essentials of pharmaceuticals*, 1st edition, 2013. London: Pharmaceutical Press. ISBN 9870857111050. AKERS M., J., *Parenteral preparations*, s. 495-532
- ¹¹ REY, L., MAY, J. C. (Eds): *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. 2nd Ed, 2004. 618 s., CRC Press, ISBN: 0-8247-4868-9. BINDSCHAEDLER Ch., *Lyophilization process validation*, s. 549-587.
- ¹² REY, L., MAY, J. C. (Eds): *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. 2nd Ed, 2004. 618 s., CRC Press, ISBN: 0-8247-4868-9. PIKAL M. J., *Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage: The relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics*, s. 84-128.
- ¹³ SINKO P. J. (Ed): *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences*, 6th edition, 2011: Philadelphia, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 645 s., ISBN 978-0-7817-9766-5. *States of matter*, s. 17-54.
- ¹⁴ FELTON L. (Ed), *Essentials of pharmaceuticals*, 1st edition, 2013. London: Pharmaceutical Press. ISBN 9870857111050. RADES T., GORDON, K. C., GRAESER K., *Molecular structure, properties, and states of matter*, s. 177-206.
- ¹⁵ REY, L., MAY, J. C. (Eds): *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. 2nd Ed, 2004. 618 s., CRC Press, ISBN: 0-8247-4868-9. BEUREL G. A., *Global validation of freeze-drying cycle parameters by using integral HFT systems*, s. 524-531.
- ¹⁶ HOTTOT A., VESSOT S., ANDRIEU J., Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried texture, *Chemical Engineering and Processing*, 2007, 46, 666-674, ISSN: 0255-2701.
- ¹⁷ PATAPOFF T., OVERCASHIER D. E., The importance of freezing on lyophilization cycle development, *BioPharm*, 2002, 15, s. 16-22, ISSN: 1939-1862.

-
- ¹⁸ PATEL S. M., NAIL S. L., PIKAL M. J., GEIDOBLE R., WINTER G., HAWE A., DAVAGNINO J., GUPTA S. R., Lyophilized drug product cake appearance: what is acceptable?. *J. Pharm. Sci.* 2017, 106 (7), s. 1706-1721, ISSN: 0022-3549.
- ¹⁹ PIKAL M. J., SHAH S. The collapse temperature in freeze-drying: dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *Int J Pharm.* 1990, 62,165-186, ISSN: 2249-1848.
- ²⁰ WITTAYA-AREEKUL S., NEEDHAM G. F., MILTON N., ROY M. L., NAIL S. L., Freeze-drying of tert-butanol/water cosolvent systems: a case report on formation of a friable freeze-dried powder of tobramycin sulfate. *J Pharm Sci.* 2002, 91, 1147-1155, ISSN: 0022-3549.
- ²¹ REY, L., MAY, J. C. (Eds): *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. 2nd Ed, 2004. 618 s., CRC Press, ISBN: 0-8247-4868-9. CARPENTER J. F., IZUTSU K., RANDOLPH T. W., Freezing- and drying-induced perturbation of proteins structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives, s. 166-205.
- ²² GREIF D.: Protein structure and freeze-drying: The effects of residual moisture and gases, *Cryobiology*, 1971, 8, s. 145-152, ISSN: 0011-2240.
- ²³ IZUTSU K. I., AOYAGI N., KOJIMA S.: Protection of protein secondary structure by saccharides of different molecular weights during freeze-drying. *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, 52 (2), s. 199-203, ISSN: 1347-5223.
- ²⁴ REY, L., MAY, J. C. (Eds): *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. 2nd Ed, 2004. 618 s., CRC Press, ISBN: 0-8247-4868-9. YOSHIOKA S., *Molecular mobility of freeze-dried formulations as determined by NMR relaxation, and its effect on storage stability*, s. 206-257.
- ²⁵ HANSEN L. J. J., DAOUSSI R., VERVAET C., REMON J. P., De BEER T. R. M. Freeze-drying of live virus vaccines: A review. *Vaccine*, 2015, 23 (42), s. 5507-5519, ISSN: 0264-410X.

-
- ²⁶ HORN J., SCHANDA J., FRIESS W.: Impact of fast and conservative freeze-drying on product quality of protein-mannitol-sucrose-glycerol lyophilizates [online], *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018, 127, s. 342-354, ISSN: 0939-6411.
- ²⁷ ROWE R. C., SHESKEY P. J., QUIN M. E. (Eds.): *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6th Ed., 2009. London: Pharmaceutical Press and the American Pharmacist Association, 888 s., ISBN 9780853697923. *Glycine*, s. 295-296.
- ²⁸ HORN J., TOLARDO E., FISSORE D., FRIESS W.: Crystallizing amino acids as bulking agents in freeze-drying. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018, 132, s. 70-82, ISSN:0939-6411.
- ²⁹ BONDAR R. J.: Revised equation and table for determining the freezing point depression of H₂O-NaCl solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1993, 57, s. 683-684, ISSN: 0016-7037.
- ³⁰ LU Xiaofeng, PIKAL M. J.: Freeze-drying of mannitol-trehalose-sodium chloride-based formulations: The impact of annealing on dry layer resistance to mass transfer and cake structure. *Pharm. Dev. Technol.*, 2004, 9 (1), s. 85-95, ISSN: 1097-9867 (Online).
- ³¹ ROWE R. C., SHESKEY P. J., QUIN M. E. (Eds.): *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6th Ed., 2009. London: Pharmaceutical Press and the American Pharmacist Association, 888 s., ISBN 9780853697923. *Mannitol*, s. 424-428.
- ³² Český lékopis 2017, Praha, Grada Publishing, a. s., 4869 s, ISBN: 978-80-271-0500-7. *Mannitolum*, s. 2577-2579.
- ³³ ROWE R. C., SHESKEY P. J., QUIN M. E. (Eds.): *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6th Ed., 2009. London: Pharmaceutical Press and the American Pharmacist Association, 888 s., ISBN 9780853697923. *Glycerin*, s. 283-286.
- ³⁴ Český lékopis 2017, Praha, Grada Publishing, a. s., 4869 s, ISBN: 978-80-271-0500-7. *Glycerolum 85 %*, s. 2185-2187.
- ³⁵ ROWE R. C., SHESKEY P. J., QUIN M. E. (Eds.): *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6th Ed., 2009. London: Pharmaceutical Press and the American Pharmacist Association, 888 s., ISBN 9780853697923. *Gelatine*, s. 278-281.

-
- ³⁶ KARIM A. A., BHAT R., Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23, s. 563-576, ISSN: 0268-005X.
- ³⁷ *Český lékopis 2017*, Praha, Grada Publishing, a. s., 4869 s, ISBN: 978-80-271-0500-7. *Gelatina*, s. 2143-2144.
- ³⁸ ROWE R. C., SHESKEY P. J., QUIN M. E. (Eds.): *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6th Ed., 2009. London: Pharmaceutical Press and the American Pharmacist Association, 888 s., ISBN 9780853697923. *Carrageenan*, s. 122-126.
- ³⁹ PAVLI M., VREČER F., BAUMGARTNER S.: Interactions of biopolymers carrageenans with cationic drug doxazosin mesylate characterized by means of differential scanning calorimetry. *Die Pharmazie*, 2010, 65 (7), s. 525-526, ISSN: 0031-7144.
- ⁴⁰ *Český lékopis 2017*, Praha, Grada Publishing, a. s., 4869 s, ISBN: 978-80-271-0500-7. *Carrageenanum*, s. 1464-1465.
- ⁴¹ *Český lékopis 2017*, Praha, Grada Publishing, a. s., 4869 s, ISBN: 978-80-271-0500-7. *Povidonum*, s. 3057-3060.
- ⁴² ROWE R. C., SHESKEY P. J., QUIN M. E. (Eds.): *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6th Ed., 2009. London: Pharmaceutical Press and the American Pharmacist Association, 888 s., ISBN 9780853697923. *Povidone*, s. 581-585.
- ⁴³ TAKAHASHI T., HIRSH A., ERBE E., WILLIAMS R. J.: Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes, *Biophys. J.*, 1988, 54, s. 509-518, ISSN: 0006-3495.
- ⁴⁴ JABO A., ŠKLUBALOVÁ Z. *Projekt TAČR TA01010128: Vývoj lyofilizovaných tablet pro tablety s alergeny. Závěrečná zpráva. 2015*