

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie



**Formulace lyofilizovaných tablet
pro bukální aplikaci vakcín**

**Formulation of freeze dried tablets for buccal administration
of vaccines**

Diplomová práce

Hradec Králové, 2021

Ngoc Lien Vuová

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro 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

Největší poděkování patří doc. PharmDr. Zdeňce Šklubalové, Ph.D. za odborné a důsledné vedení, vstřícnost a užitečné rady při zpracování diplomové práce. Dále děkuji Ing. Miloši Petříkovi za technickou podporu při lyofilizaci, laborantkám paní Janě Fendrichové a paní Lence Svobodové za pomoc při přípravě a hodnocení vzorků a děkuji za finanční podporu grantu MPO Trio FV40365. V neposlední řadě děkuji svému příteli a rodině, kteří mi byli po celou dobu studia oporou.

Obsah

1	Abstrakt.....	6
2	Abstract.....	7
3	Seznam zkratk.....	8
4	Zadání	10
5	Úvod.....	11
6	Teoretická část	12
6.1	Druhy vakcín.....	12
6.2	Technologie vakcín.....	17
6.2.1	Injekční aplikace	17
6.2.2	Slizniční vakcíny.....	18
6.2.2.1	Perorální aplikace	19
6.2.2.2	Bukální a sublingvální aplikace.....	21
6.2.2.3	Nasální aplikace.....	27
6.2.3	Transdermální aplikace.....	28
6.3	Bordetella pertussis.....	30
6.4	Využití lyofilizace při produkci vakcín	32
7	Experimentální část.....	35
7.1	Použité suroviny	35
7.2	Použité přístroje	35
7.3	Použité metody	36
7.3.1	Příprava vzorků.....	36
7.3.2	Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)	37
7.3.3	Měření osmolality	37
7.3.4	Měření pH.....	38
7.3.5	Lyofilizace	38
7.3.6	Hodnocení lyofilizátů	39
8	Výsledky a diskuze	40
8.1	Charakterizace pomocných látek pro matrice.....	41
8.2	Vlastnosti lyofilizátů bez aktivní složky.....	49

8.3	Vlastnosti lyofilizátů s aktivní složkou.....	53
8.4	Hodnocení postupu přípravy.....	65
9	Závěry	67
10	Použitá literatura	69

1 Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

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

Posluchač: Ngoc Lien Vuová

Název diplomové práce: Formulace lyofilizovaných tablet pro bukální aplikaci vakcín

Slizniční vakcinace je velmi atraktivním způsobem aplikace vakcín s výhodou indukce jak systémové, tak i lokální imunity. Cílem této diplomové práce byl návrh složení lyofilizovaných tablet pro bukální aplikaci modelové vakcíny *Bordetella pertusis*. Požadovanými vlastnostmi bylo snadné vyjmutí z blistru, pevnost a vyhovující vzhled, vhodná chuť a mukoadhezivita lyofilizované tablety. Vlastnosti pomocných látek a lyofilizátů byly hodnoceny pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie, měření osmolality a pH; byly sledovány mechanické vlastnosti a rozpadavost tablet. Z řady použitých pomocných látek a jejich kombinací bylo nejlepších výsledků dosaženo použitím dextransu 40 jako hlavní složky, pro modifikaci vlastností je vhodný přídavek rybí želatiny, karagenanu iota a makrogolu 300. Lyofilizáty obsahující trehalosu, mannitol a povidon 25 neměly vhodné vlastnosti. Lyofilizované tablety obsahující karagenan iota jako vhodnou alternativu rybí želatiny v kombinaci s dextransem a makrogolem měly nejlepší vlastnosti.

2 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

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

Student: Ngoc Lien Vuová

Title of Thesis: Formulation of freeze dried tablets for buccal application of vaccines

Mucosal vaccines represent an attractive way of vaccination with an advantage of inducing both systemic and local immunity. The aim of this diploma thesis was designing a composition of freeze-dried tablets for buccal administration of a model *Bordetella pertusis* vaccine. The easy removal from blister, firmness and aesthetic appearance as well as the appropriate taste and mucoadhesivity were the required product quality parameters. The excipients were characterised by differential scanning calorimetry, osmolality and pH measurement; the mechanical properties and disintegration time of freeze-dried tablets were evaluated. Among the variety of studied excipients and their combinations, dextran 40 as the main component of the preparation provided the best results. For the further modification of properties, the addition of fish gelatin, iota carrageenan and macrogol 300 is suitable. Freeze-dried tablets containing trehalose, mannitol and povidon 25 did not achieve the desirable quality parameters. Freeze-dried tablets containing iota carrageenan as a good alternative to fish gelatin in combination with dextran and macrogol provided the best properties.

3 Seznam zkratek

Zkratka	Jednotka	Vysvětlení
APC		antigen prezentující buňky
BALT		bronchiální lymfatická tkáň
BCG		Bacillus Calmette-Guérin
BPV		aktivní látka (inaktivovaná celobuněčná vakcína proti pertusi)
CD4+ T lymfocyty		lymfocyty, z nichž se diferencují pomocné a regulační T lymfocyty
CD8+ T lymfocyty		lymfocyty, z nichž se diferencují cytotoxické lymfocyty
CRI		karagenan iota
CT		cholerový toxin
CTB		B-subjednotka cholerového toxinu
ČL		Český lékopis
ČR		Česká republika
D		dextran
DNA		deoxyribonukleová kyselina
DSC		diferenciální skenovací kalorimetrie
dTap		vakcína proti difterii, tetanu a černému kašli
EMA		Evropská léková agentura
FDA		Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
G		rybí želatina
GALT		střevní lymfatická tkáň
GIT		gastrointestinální trakt
rHBsAg		rekombinantní povrchový antigen viru hepatitidy B
HIV		virus lidské imunitní nedostatečnosti (human imunodeficiency virus)
HPLC		vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPMC		hypromelosa, hydroxypropylmethylcelulosa

HPV		lidský papilomavirus
IgA		imunoglobulin A
IgG		imunoglobulin G
IgM		imunoglobulin M
IPV		inaktivovaná vakcína proti poliomyelitidě
ISCOM		imunitu-stimulující komplexy, immune-stimulating complexes
KHP		hydrogenfosfát draselný (K_2HPO_4)
KP		dihydrogenfosfát draselný (KH_2PO_4)
LT		termolabilní toxin z <i>Escherichia coli</i>
M		mannitol
MALT		slizniční lymfatická tkáň (mucosa-associated lymphoid system)
MCC		mikrokystalická celulóza
MG		makrogol 300
mRNA		mediátorová (messenger) ribonukleová kyselina
NALT		nosní lymfatická tkáň
P		povidon 25
PLA		kyselina polyléčná
PLGA		kopolymer kyseliny polyglykolové a polyléčné
SD		směrodatná odchylka
SS		sacharin sodná sůl
T		trehalosa
Tc		cytotoxické T-lymfocyty
T _g	°C	teplota skelného přechodu
Th		pomocné T-lymfocyty
TLR		receptor podobný genu Toll (toll-like receptor)
Treg		regulační T-lymfocyty
WHO		Světová zdravotnická organizace

4 Zadání

Tato práce bude zaměřena na vývoj lyofilizovaných tablet pro aplikaci modelové vakcíny pertusse (*Bordetella pertussis*). Bude použita celulární vakcína tvořená usmrcenými buňkami (cca 20×10^9 buněk/dávka).

V teoretické části se práce bude zabývat principy vakcinace, technologií vakcín (aplikačními cestami), s primárním zaměřením na aplikaci do ústní dutiny. Stručně bude také věnována pozornost možnosti využití lyofilizace.

Předmětem experimentální části bude návrh vhodného složení pro lyofilizované bukální/sublingvální tablety pro modelovou vakcínu. Práce budou postupovat v etapách a dílčích krocích:

- výběr vhodných pomocných látek pro tvorbu struktury tablety
- termální charakterizace složek
- lyofilizace na laboratorním zařízení
- modifikace vlastností tablet z pohledu přijatelnosti (chuť)
- hodnocení vlastností lyofilizátů
- poloprovozní lyofilizace

Během experimentální práce se jednotlivé dílčí kroky budou podle okolností prolínat.

5 Úvod

Je známo, že již ve středověku požívali Indové hadí jed k imunizaci proti hadímu uštknutí. Také Číňané již v roce 1695 namáčeli tampóny v lézích pravých neštovic (variola) a za účelem imunizace jimi následně potírali nosní sliznici zdravým jedincům. Na počátku vakcinace s vědeckým podkladem však stál až anglický lékař Edward Jenner v roce 1796. Použil rozdrčený neštovičný strup z vemene dojnice (lat. *vacca*), která prodělala kravské neštovice, k imunizaci proti pravým neštovicím (variole).¹

Dnes je metoda vakcinace považována za nejefektivnější způsob prevence a eradikace infekčních onemocnění. V současné snaze redukovat užití antibiotik získává vývoj v oblasti vakcín stále více na významu. Vakcíny jsou rovněž cíleny proti rakovinným, zánětlivým onemocněním a alergiím.²

Tato diplomová práce se věnuje technologii vakcín a jejich aplikačním cestám. S ohledem na předpokládané využití pro ochranu před černým kašlem (pertusí) je záměrem vývoj vakcíny pro orální podání ve formě lyofilizátu. Tento způsob podání vakcín představuje mnoho výhod oproti současné nejpoužívanější injekční aplikaci vakcín, především u infekcí, jejichž vstupní branou je sliznice dutiny ústní.

6 Teoretická část

Organismus může být chráněn vrozenou (nespecifickou) a získanou (specifickou) imunitní odpovědí.³ Specifická imunita se získává vakcinací a můžeme ji dále rozdělit na humorální a buněčnou odpověď. Humorální reakce vedou k produkci specifických protilátek, tzv. imunoglobulinů (Ig) proti danému antigenu. Po antigenní stimulaci vyvrávají B-lymfocyty a tvoří protilátky. Diferencují se poté v plazmatické buňky, jež protilátky uvolňují. Specifickou buněčnou imunitní odpověď zajišťují především T-lymfocyty. Významně se uplatňují cytotoxické lymfocyty T (Tc), které rozpoznávají buňky infikované viry či jinými intracelulárními parazity a ničí je.^{4,5}

Z obecného hlediska je vakcína přípravek obsahující antigen, který funguje na principu prezentování cizího antigenu imunitnímu systému za účelem vyvolání protektivní imunologické odpovědi.^{3,6} Je požadováno, aby vakcíny byly bezpečné a účinné, tj. aby u pacienta rychle navodily imunitní odpověď, která napodobuje ochranné imunitní mechanismy doprovázející přirozené setkání s infekčním agens.² Účinnost vakcíny může být ovlivněna vlastnostmi a kvalitou antigenu, složením přípravku (formulací, tj. kombinací pomocných látek), dávkovacím schématem, místem aplikace vakcíny a konkrétní lékovou formou.²

6.1 Druhy vakcín

Tato část byla zpracována s převážným využitím přehledového článku A. France¹ a lékopisného článku *Vaccina ad usum humanum*³.

V principu existují dva základní typy vakcín: 1) živé oslabené (atenuované) a 2) usmrcené (inaktivované) mikroorganismy. V živých **atenuovaných** vakcínách jsou mikroorganismy ošetřeny tak, aby byla oslabena jejich virulence při zachování potřebných imunogenních vlastností.³ Tyto vakcíny rychle indukují silnou imunitní odpověď, která napodobuje reakci organismu po přirozeném setkání s onemocněním. Pro požadovaný účinek většinou postačí jedna dávka.⁷ Nevýhodou živých vakcín je riziko vyvolání onemocnění u imunodeficientních jedinců, a proto se od nich v současnosti spíše ustupuje.^{7,8} Řadí se sem BCG vakcína (*Bacillus Calmette-Guérin*) proti tuberkulóze způsobená bakterií *Mycobacterium tuberculosis*⁹; vakcína proti břišnímu tyfu, jehož původcem je bakterie *Salmonella typhi* a dále virové

vakcíny proti dětské obrně (poliomyelitidě), zarděnkám (rubeole), rotaviru, žluté zimnici, viru *Varicella zoster* a vakcína proti chřipce v nasálním spreji.^{7,10}

Inaktivované vakcíny obsahují celé viry nebo bakterie, které byly fyzikálními či chemickými metodami usmrceny. Není zde riziko potenciálního vyvolání infekčního onemocnění a jsou tedy považovány za bezpečnější než živé atenuované vakcíny. Získaná imunita je ale dočasná a obvykle nestačí podat jen jednu dávku, je nutné vakcinovat opakovaně. Do této skupiny vakcín patří např. inaktivovaná celobuněčná vakcína proti pertusi a poliomyelitidě.¹¹

V **subjednotkových** vakcínách jsou obsaženy pouze určité antigenní fragmenty mikroorganismů, které jsou zodpovědné za vyvolání imunitní odpovědi.¹² Obsahují pouze povrchové antigeny, nikoliv antigeny vnitřní, a proto jsou méně imunogenní. Podle složení je lze rozdělit na proteinové, polysacharidové a konjugované. V současnosti se používají bakteriální i virové.

Mezi proteinový typ subjednotkových vakcín patří acelulární vakcína proti pertusi, která obsahuje inaktivovaný pertusový toxin (protein) a může rovněž obsahovat další bakteriální komponenty. Dále sem patří vakcína proti hepatitidě B a vakcína proti lidskému papilomaviru (HPV).¹² **Toxoidy** jsou vakcíny pocházející z inaktivovaného bakteriálního proteinového toxinu, který byl pozměněn tak, aby byl pro organismus netoxický a zároveň byl dostatečně imunogenní. Pro zvýšení imunogenity mohou být toxoidy adsorbovány na hlinité či vápenaté soli, které slouží jako imunoadjuvanty, tj. obecně látky, které zvyšují a nebo modulují imunitní odpověď na antigeny obsažené ve vakcíně.^{13,14} V současné době se k výrobě toxoidů používá tetanotoxin (TT) produkovaný bakterií *Clostridium tetani*, způsobující tetanus a difterický toxin (DT) produkovaný bakterií *Corynebacterium diphtheriae*, způsobující záškrť (difterii).

Některé bakterie tvoří polysacharidový obal, který chrání patogenní organismus před destrukcí imunitním systémem hostitelského organismu. Polysacharidové pouzdro je znakem virulence a využívá se k tvorbě polysacharidové vakcíny. Molekuly těchto polysacharidů jsou ale malé a nebývají dostatečně imunogenní, proto nejsou účinné u dětí do 2 let a indukují pouze slabou imunitní odezvu. Příkladem je vakcína proti meningitidě a pneumokoková vakcína Pneumo 23.¹²

Imunogenita může být zvýšena konjugací (vazbou) antigenu s proteinovým nosičem, kterým může být i difterický a tetanický toxoid. Dnes se používají konjugované

vakcíny proti meningokokovým infekcím, infekci bakterií *Haemophilus influenzae* typu b nebo sedmi-, deseti- nebo třináctivalentní konjugáty proti pneumokokové infekci.¹²

Štěpné vakcíny (*split vaccines*) rovněž obsahují fragmentované částice mikroorganismů, ale liší se od subjednotkových vakcín v tom, že obsahují povrchové i vnitřní antigeny. V praxi jsou dostupné vakcíny proti chřipce. Vznikají ošetřením virové částice diethyletherem nebo vhodným detergentem a obsahují všechny virové proteiny, přičemž původní struktura virové částice a virová RNA je převážně ztracena.¹⁵ Při každoročním opakovaném očkování proti chřipce je v některých případech preferována právě tato štěpná vakcína, protože ve srovnání se subjednotkovou vyvolává vyšší vzestup titru protilátek.¹⁶

Spolu s dalším rozvojem v oblasti vakcín se začaly více uplatňovat metody biotechnologie, molekulární biologie a genetiky. Byly vyvinuty nové a bezpečnější vakcíny, mezi které řadíme rekombinantní, vektorové nebo genové vakcíny. Tyto moderní vakcíny mají sice zachovalý antigenní potenciál, ale jejich nevýhodou je, že účinek nebývá dostatečný a musí být často zvyšován pomocí imunoadjuvantů.

V případě **rekombinantních** vakcín (*recombinant vaccines*) jsou imunogenní fragmenty patogenů produkovány metodami genetického inženýrství. Izolovaný gen, zodpovědný za produkci daného imunogenního fragmentu, je vpraven do genomu kultivovaného mikroorganismu (obvykle kvasinky, *Escherichia coli* nebo i tkáňové kultury savčích buněk), pomocí kterého je poté produkován protein dále využitý k vakcinaci. Na trhu je v současnosti rekombinantní vakcína proti hepatitidě B obsahující virový povrchový antigen rHBsAg nebo vakcína proti humánnímu papilomaviru (HPV), která chrání před rakovinou děložního čípku.

Vektorové vakcíny (*vector vaccines*) využívají celé mikroorganismy (viry či bakterie). Tyto nepatogenní vektory jsou geneticky upraveny tak, aby nesly genetickou informaci pro produkci antigenů jiných patogenních mikroorganismů, a to i několik antigenů současně. Vektory po podání vakcíny do těla instruuji lidské buňky k produkci velkého množství antigenních proteinů na základě přijaté genetické informace z vektoru, což vyvolává silnou imunitní odpověď. Je napodoben proces přirozené infekce, zejména virové. Vektory lze rozdělit na nereplikující, neschopné vytvářet nové virové částice, a replikující, schopné se rozmnožit a

vytvořit nové virové částice, které vnikají do dalších buněk a tím dochází k další produkci antigenů.^{17,18} Ve srovnání se subjednotkovými vakcínami, které indukují humorální imunitní odezvu (tj. produkci specifických protilátek proti danému antigenu), jsou vektorové vakcíny zpravidla schopny vyvolat humorální i buněčnou imunitu. Díky tomu odpadá nutnost použití imunoadjuvantů a redukuje se náklady při výrobě.

Další nový způsob imunizace představují tzv. **genové vakcíny**. Tato technologie spočívá v transfekci geneticky modifikovaného plasmidu, obsahujícího specifickou sekvenci DNA kódující daný antigen, do jádra buněk hostitele. Tyto buňky poté syntetizují antigen na základě genu přítomného v plasmidu, čímž dojde k vyvolání imunitní odpovědi. Výhodou je stimulace jak humorální, tak i buněčné imunitní odpovědi v podobě cytotoxických lymfocytů (Tc), která byla prokázána v řadě případů u zvířat.¹⁹ Plasmidy mohou obsahovat i geny, které kódují další látky ovlivňující imunitní mechanismy, např. cytokiny s imunostimulačním efektem.²⁰ DNA vakcíny jsou nadějnou metodou pro vakcinaci proti onemocněním, proti kterým zatím nelze očkovat. Je totiž známo, že některé viry, jako jsou ortomyxoviry nebo HIV, snadno mutují, resp. mění svůj zevní obal, aby nevzbudily imunitní odpověď, což je velkou překážkou úspěšného vývoje vakcín. Vnitrobuněčné proteiny ale mutují velmi neochotně a stále přitom obsahují antigeny, na které se mohou vázat cytotoxické T-lymfocyty. Žádné DNA vakcíny zatím nejsou schváleny k užívání, nicméně probíhá jejich intenzivní výzkum.

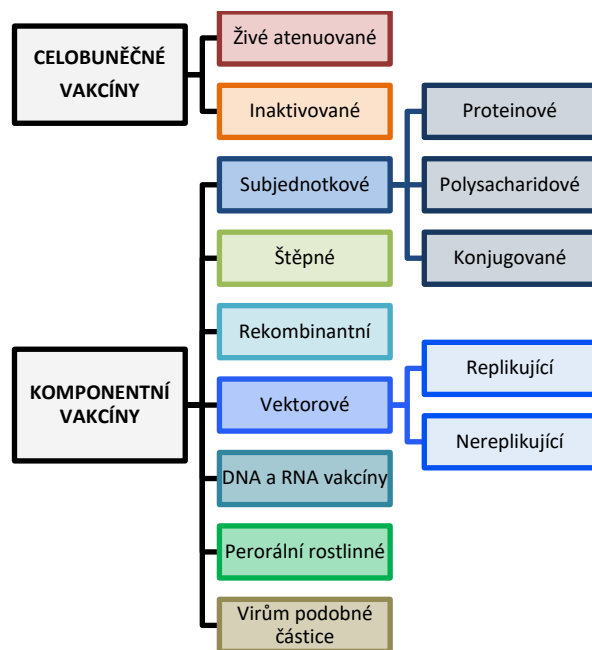
Použití DNA vakcín se pojí s rizikem negativních důsledků souvisejících s integrací cizí DNA do hostitelského genomu, např. s přeměnou buněk na buňky nádorové.²¹ V tomto směru jsou bezpečnější mRNA (*messenger RNA*) vakcíny, které nevstupují do jádra hostitelské buňky, ale pouze do cytosolu, kde probíhá jejich translace. Riziko nežádoucího ovlivnění hostitelského genomu je tedy vyloučeno.²² První mRNA vakcína byla v roce 2020 schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropskou lékovou agenturou (EMA) pro emergentní použití k vakcinaci proti onemocnění **COVID-19** způsobené koronavirem SARS-CoV-2.^{23,24} Vakcína obsahuje mRNA, která nese informace k produkci tzv. *Spike proteinu*, jenž se vyskytuje na povrchu viru a je potřebný pro vstup viru do hostitelských buněk. Po podání vakcíny lidem začnou na základě informace obsažené v mRNA některé jejich

buňky dočasně produkovat tento spike protein, který imunitní systém člověka rozpozná jako cizí, začne tvořit protilátky a aktivovat T-lymfocyty pro jeho napadnutí. Setká-li se později očkováná osoba s virem SARS-CoV-2, její imunitní systém virus rozpozná a bude připraven se proti němu bránit. Messenger RNA (mRNA) z vakcíny nezůstává v těle, ale je krátce po vakcinaci rozložena.²⁴ V České republice (ČR) jsou nyní schváleny dvě vakcíny tohoto typu, a to vakcína Comirnaty (Pfizer/BioNTech) a vakcína od firmy Moderna. Obě vakcíny obsahují mRNA enkapsulovanou v lipidových nanočásticích a jsou podávány v tekuté formě intramuskulárně.^{25,26} Kromě těchto dvou vakcín se v ČR nyní rovněž používají k očkování proti COVID-19 vakcíny Vaxzevria (AstraZeneca) a Janssen (Johnson & Johnson), které obsahují nereplikující adenovirový vektor kódující koronavirový *Spike protein*.^{27,28} Na principu adenovirového vektoru funguje i vakcína Sputnik V (The Gamaleya National Centre), která ale zatím (k červnu 2021) není schválena Evropskou komisí.²⁹

Perorální rostlinné (*plant-based peroral vaccines*) vakcíny jsou vyráběny z geneticky modifikovaných rostlin. Do těchto rostlin je bakteriálními či virovými vektory přenesena genetická informace, podle které rostlinné buňky produkují antigen. Vakcíny se užívají perorálně ve formě lyofilizované či enkapsulované rostlinné drogy.

Vakcíny v podobě **virům podobných částic** (*virus-like particles*) se vyrábějí pomocí rekombinantních bakterií nebo kvasinek, které produkují potřebné virové proteiny. Po extrakci a purifikaci jsou jednotlivé proteiny smíseny a samovolným seskládáním proteinů vznikají částice s tyčovou nebo ikosahedrální strukturou o rozměrech obvykle 30–90 nm. V současnosti jsou FDA schváleny vakcíny proti hepatitidě B a lidskému papilomaviru (HPV).

Jednotlivé výše uvedené druhy vakcín shrnuje Obr. 1.



Obr. 1: Druhy vakcín.

6.2 Technologie vakcín

Kromě přípravy aktivní složky a zajištění její účinnosti je nutné rovněž uvažovat o formulaci vlastní lékové formy a její akceptovatelnosti pacientem. V současnosti se vakcíny standardně aplikují několika cestami, o kterých pojednává následující část. Velká pozornost je ale neustále věnována i dalším, méně tradičním možnostem.

6.2.1 Injekční aplikace

Tradiční aplikační cestou je parenterální podání vakcín, tedy intramuskulární či subkutánní injekcí. Ačkoliv je tento způsob aplikace nejrozšířenější, pojí se s mnoha nevýhodami. Vpich je pro pacienta nepříjemný a podání injekce je vázáno na speciálně vyškolený zdravotnický personál.²

Vakcíny jsou obvykle aplikovány v tekuté formě. Mohou být jednodávkové i vícedávkové. Ve vodném prostředí jsou ale nestabilní. Podléhají různým fyzikálním i chemikálním degradačním mechanismům. V případě proteinových vakcín to mohou být konformační změny, oxidace, hydrolýza, deamidace a agregace. Musí být transportovány a skladovány za nízké teploty a i přesto je jejich doba použitelnosti limitována. Pro zvýšení stability se vakcíny převádějí na suchou formu lyofilizací, o které bude pojednáno dále.³⁰

Injekční vakcíny musí splňovat všechny požadavky injekcí. Týká se to jak tradičních injekcí, tak i lyofilizátů, ze kterých se injekce připravuje rekonstitucí in situ před podáním pacientovi.¹ Lékopisné požadavky na vakcíny zahrnují tyto zkoušky: hodnotu pH, obsah adjuvans, obsah hliníku a vápníku, volný formaldehyd, fenol, obsah vody (u lyofilizovaných vakcín), využitelný objem a bakteriální endotoxiny. U jednotlivých článků vakcín je uvedena i zkouška na sterilitu. Vakcíny se skladují chráněny před světlem a pokud není stanoveno jinak, při teplotě 5 ± 3 °C. Tekuté adsorbované vakcíny nesmějí zmrznout.³

Vakcíny obsahují kromě běžných složek i další specifické přísady. Jak již bylo uvedeno výše, mnoho vakcín obsahuje imunoadjuvanty, které napomáhají k zajištění dostatečně efektivní protektivní imunitní odpovědi. Patří sem anorganické látky, které se stále nejčastěji používají: hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý a fosforečnan vápenatý. Zároveň mají funkci sorbentů, kdy vzniká gelová struktura, pomocí které lze příznivě ovlivnit i délku imunitní odpovědi. Kvůli často kritizovaným toxickým vlastnostem hliníku je snahou najít další látky s podobným účinkem, jako jsou různé uhlovodíky rostlinného, bakteriálního či syntetického původu. Jako imunoadjuvanty se rovněž používají olejové emulze (známé je tzv. Freundovo adjuvans) a imunostimulátory (cytokiny a interleukiny); z bakteriálních produktů se používá např. muramyl dipeptid.¹ Dalšími složkami vakcín jsou stabilizátory. Tyto látky udržují účinnost aktivní látky během skladování. Faktory ovlivňující stabilitu jsou např. změny teploty a pH.³¹ Protimikrobními látkami mohou být thiomersal, jehož použití bylo omezeno pro toxicitu u pediatrických vakcín, nebo 2-fenoxyethanol, fenol a formaldehyd. Při výrobě vakcín lze nežádoucím množení potenciálních patogenů zabránit přidávkem antibiotik (např. neomycinu), která mohou zůstat ve vakcíně v residuálním množství.^{1,32}

6.2.2 Slizniční vakcíny

Většina patogenů proniká do těla hostitele přes sliznice. Proto by vakcína měla ideálně navozovat i ochranné imunitní mechanismy na sliznici, aby byl organismus schopen obrany již při prvním kontaktu s infekčním agens. Aplikace vakcín subkutánně a intramuskulárně zpravidla navozuje slizniční imunitu pouze slabou. Naopak u vakcín aplikovaných přes sliznici je dokázáno, že jsou schopny efektivně

indukovat imunitní odpověď jak systémově tvorbou protilátek, tak lokálně na sliznici v místě podání a zároveň ve vzdálenějších slizničních kompartmentech tvorbou slizničních protilátek IgA a buněčné imunitní odpovědi, např. imunitní reakce zprostředkované T-lymfocyty.^{33,34,35}

Antigeny podané přes sliznici jsou totiž zpracovávány celotělovým slizničním imunitním systémem neboli MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*, slizniční lymfatická tkáň). MALT se skládá z dílčích slizničních lymfatických tkání, které jsou navzájem propojeny a lze je rozdělit podle jejich lokalizace: střevní lymfatická tkáň (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*), nosní lymfatická tkáň (NALT, *nasal-associated lymphoid tissue*), bronchiální lymfatická tkáň (BALT, *bronchus-associated lymphoid tissue*). To znamená, že např. po imunizaci prostřednictvím gastrointestinálního traktu (GIT) může dojít k vytvoření protektivní imunitní odpovědi i v bronchiálním a urogenitálním traktu, na nosní sliznici a ve slinných a mléčných žlázách.^{5,33}

Oproti parenterální aplikaci má aplikace vakcín přes sliznici také řadu dalších výhod. Není třeba proškoleného personálu, což je výhodou v případě potřeby rozsáhlé vakcinace v populaci, je vyloučeno riziko infekce kontaminovanou jehlou a poranění v důsledku vpichu jehly, pro pacienta je aplikace mnohem přijatelnější a méně stresová, což je důležité zejména pro dětské pacienty.^{30,36}

6.2.2.1 Perorální aplikace

Perorální aplikace léčiv představuje pacientem nejakceptovatelnější cestu podání a obecně platí, že více než 60 % komerčně dostupných přípravků obsahujících malé molekuly léčiv je podáváno právě perorálně.³⁷ V případě vakcín je však tato aplikační cesta komplikována agresivitou prostředí GIT, jako je široké rozpětí pH v průběhu celého GIT, zejména kyselé prostředí žaludku, přítomnost proteolytických enzymů a omezená doba pro vstřebání v tenkém střevě (3-4h). Antigeny, biomolekuly bílkovinné povahy, jsou v takových podmínkách obzvláště náchylné k degradaci a denaturaci. Přes všechny výše zmíněné aplikační i technologické výhody je proto pouze malá část používaných vakcín aplikována perorálně.³⁸

K tomu, aby byl antigen po perorálním podání efektivně využit, vede dlouhá cesta.³⁸ Pro indukci silné protektivní imunitní odpovědi po podání vakcíny je zapotřebí

úspěšný transport intaktního a aktivního antigenu do tenkého střeva, transport antigenu přes slizniční bariéru střeva a následná aktivace antigen prezentujících buněk (APC).^{37,39,40} Antigeny jsou v tenkém střevě zpracovávány dvěma rozdílnými cestami: (1) membránovými epitelovými buňkami (M-buňkami) na povrchu Peyeroých plaků, tj. lymfoidní tkáň tenkého střeva a (2) dendritickými buňkami ve střevní sliznici. M-buňky zachytávají antigen a transcytózou ho zanášejí APC umístěným ve spodnějších vrstvách sliznice.^{41,42}

Oproti parenterálnímu podání je navíc nutno aplikovat vyšší dávku antigenu pro vyvolání potřebné imunitní odpovědi.⁴³ Tato skutečnost limituje možnost využití nosičů, které musí být schopny transportovat dostatečnou dávku antigenu. Vyšší dávky antigenu rovněž zvyšují riziko indukce imunitní tolerance namísto stimulace tvorby protektivní imunitní odpovědi.^{44,45,46}

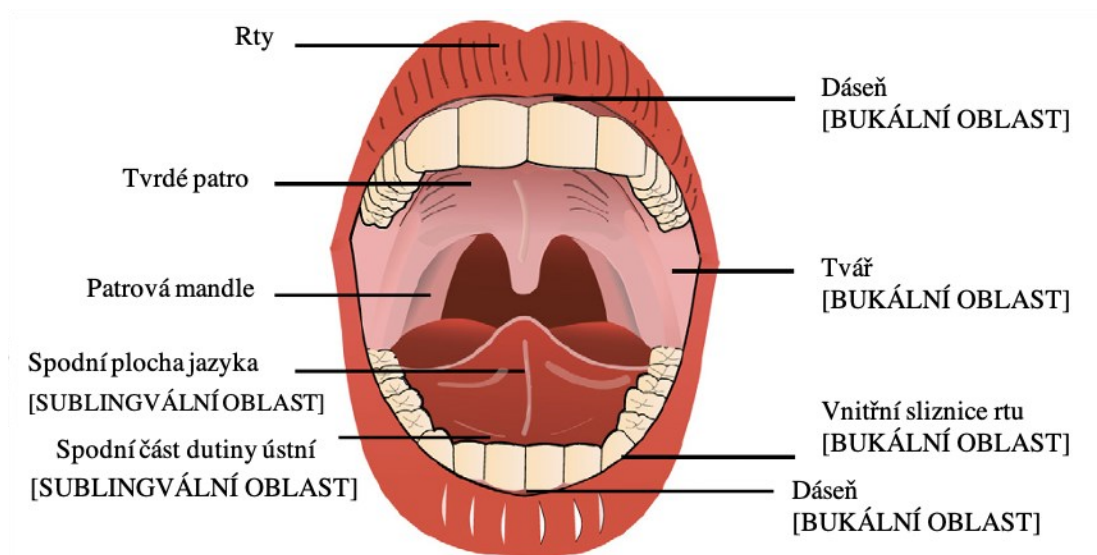
Kvůli výše uvedeným rizikům má technologické zpracování antigenu velmi důležitou roli. Antigeny mohou být aplikovány ve formě různých nosičů, jako jsou např. liposomy⁴⁷, niosomy (liposomům podobné vezikuly složené z neionických tenzidů)⁴⁸, bilosomy (liposomům podobné částice stabilizované žlučovými solemi)⁴⁹, ISCOM (imunitu-stimulující komplexy, immune-stimulating complexes)³⁸, polymerní mikročástice a nanočástice⁵⁰, kde se jako polymerů může využívat kyseliny polymléčné (PLA) a kopolymeru kyseliny polyglykolové a polymléčné (PLGA), případně různých fosforylovaných lipidů, chitosanu atd. Částice pak mohou být obaleny enterosolventními polymery.^{1,51}

Příkladem úspěšného použití perorální aplikace jsou vakcíny proti dětské obrně (poliomyelitidě): inaktivovaná Salkova (1952) a živá Sabinova vakcína (1962), díky nimž došlo k podstatnému snížení až eradikování výskytu poliomyelitidy.⁵² Perorální vakcíny jsou nyní používány např. ve formě enterosolventní tvrdé tobolky s živou atenuovanou vakcínou proti *Salmonella typhi* (Vivotif®) či perorální suspenze s inaktivovanou vakcínou proti *Vibrio cholerae* (Dukoral®).^{53,54} Mimo zmíněné bakteriální vakcíny existuje i např. živá atenuovaná vakcína proti rotaviru ve formě perorální suspenze (Rotarix®).⁵⁵

6.2.2.2 Bukální a sublingvální aplikace

Na rozdíl od agresivního prostředí GIT nabízí ústní dutina mírnější fyziologické podmínky udržované kontinuální produkcí slin, které obsahují 99,5 % vody a jsou mediem pro rozpuštění a následnou absorpci léčiva. Jsou vylučovány primárně hlavními slinnými žlázami (příušní, podčelistní a sublingvální) a v menší míře i žlázami umístěnými pod sliznicí dutiny ústní. V sublingvální oblasti jsou vylučovány ve větší míře ve srovnání s bukální oblastí.⁵⁶

Na Obr. 2 je schematicky znázorněna dutina ústní a jsou vyznačena místa pro sublingvální a bukální podání léčiv.



Obr. 2: Místa pro podání sublingválních a bukálních léčiv. Upraveno podle ⁵⁶.

Sliny slouží k zajištění dostatečné vlhkosti ústní dutiny, usnadnění polykání, snížení tření sliznice a pomáhají předcházet demineralizaci zubní skloviny.⁵⁷ Mají také enzymatickou aktivitu díky obsahu α -amylázy, lysozymu a lingvální lipázy; je ale nižší. Díky aktivitě enzymů a udržováním pH 5,5 – 7 regulují sliny rovněž ústní mikroflóru. Výhodné pro aplikaci proteinů a peptidů je nepřítomnost proteáz.^{2,57}

Sliznici dutiny ústní tvoří tři základní vrstvy: vrstevnatý dlaždicový epitel, bazální membrána a pojivová tkáň (*lamina propria a submucosa*), na kterou dále navazuje hladká svalovina.⁵⁸ Struktura sliznice je v různých částech dutiny ústní rozdílná.⁵⁹ Tvrdé patro, vnitřní strana dásní a rty jsou vystlány zrohovatělým (keratinizovaným)

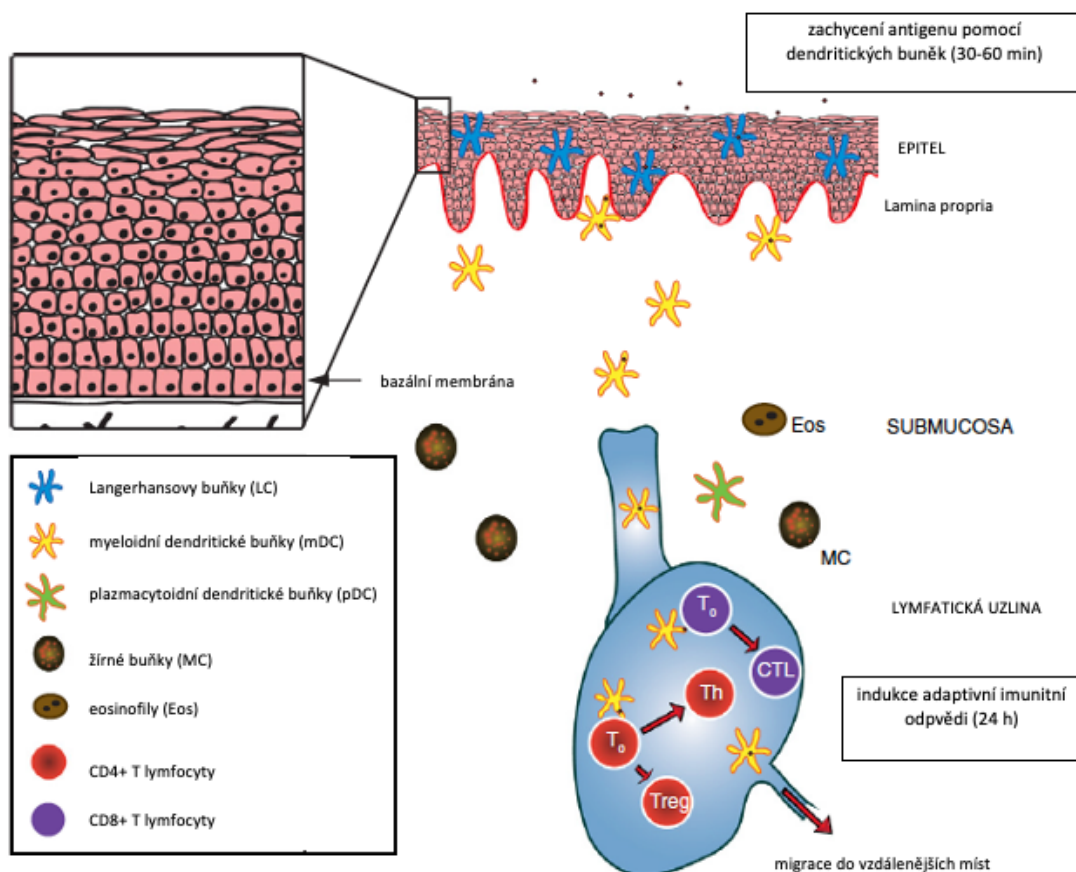
epitelem. Jsou to především místa, která jsou zatížena mechanickým stresem spojeným se žvýkáním.⁵⁶ Tyto části sliznice obsahují neutrální lipidy – ceramidy a acylceramidy, které vytvářejí bariéru proti vstupu většiny látek.⁶⁰

Místem pro sublingvální podání léčiv je spodní strana jazyka a spodní část dutiny ústní pod jazykem. V případě bukalního podání je to sliznice tváří, vnější strana dásní a vnitřní strana horního a spodního rtu (viz Obr. 2). Tyto části sliznice dutiny ústní jsou vystlány elastickým nekeratinizovaným epitelem.⁵⁶ Obsahují pouze malé množství ceramidů a navíc obsahují polární lipidy, především cholesterol sulfát a glukosylceramidy a jsou prostupnější pro vodu.^{2,56}

Povrch sliznice dutiny ústní je potažen slizem, který je složen převážně z vody (95–99 %), bílkovin a sacharidů. Jeho specifické vlastnosti jsou dány makromolekulárními látkami známými jako tzv. mucin (1–5%). Obecně je to glykoprotein obsahující velké množství sacharidových jednotek na bílkovinné kostře. Tyto molekuly společně tvoří trojrozměrné struktury, které působí jako kluzný materiál. Hlenová vrstva poskytuje funkci ochrannou, bariérovou, adhezivní a zvlhčující. Při fyziologickém pH má hlen díky přítomnosti kyseliny sialové a síranových funkčních skupin negativní náboj. S touto vrstvou mohou interagovat léčivé i pomocné látky, čímž může dojít k prodloužení doby kontaktu přípravku. Na druhou stranu může dojít kvůli přítomnosti hlenové vrstvy také k omezení transportu přes epitel.⁶⁰

Sliznice dutiny ústní obsahuje řadu buněk podílejících se na indukci **imunologických** ochranných mechanismů. Jsou to antigen prezentující buňky (APC): Langerhansovy buňky v nejsvrchnějších vrstvách sliznice a dále myeloidní a plazmacytoidní dendritické buňky ve spodnějších vrstvách.⁵⁶ Na rozdíl od malých molekul léčiv se antigeny po prostupu sublingvální či bukalní sliznicí nedostávají do krevního řečiště. Jak ukazuje Obr. 3, jsou zachyceny antigen prezentujícími buňkami ve sliznici, zejména Langerhansovými buňkami. Dendritické buňky ve spodnějších vrstvách sliznice zanesou antigen do přilehlých lymfatických uzlin.⁵⁶ V nich je zpracovaný antigen předložen CD4+ a CD8+ T-lymfocytům, které jsou následně aktivovány.^{61,62} Po aktivaci opouštějí T a B-lymfocyty prvotní místo setkání s prezentovaným antigenem, dostávají se do krevního řečiště a rozšiřují se do

vzdálenějších sliznic v těle. Výsledkem této indukční imunitní odpovědi je produkce protilátek třídy IgA, IgM nebo IgG a aktivace pomocných (Th), regulačních (Treg) nebo cytotoxických lymfocytů (Tc).^{2,63} Lokální sekrece IgA protilátek je typickým znakem pro slizniční imunitu, která se tím zároveň odlišuje od systémové imunity.⁶⁴



Obr. 3: Prostup antigenu sliznicí dutiny ústní a jeho zachycení buňkami imunitního systému. Upraveno podle ⁵⁶.

Je tedy zřejmé, že díky přítomnosti Langerhansových buněk je sliznice dutiny ústní pro aplikaci vakcín atraktivním místem. Orálně aplikovaná vakcína tak působí i proti antigenům, které vstupují do organismu na místech vzdálenějších než je sliznice dutiny ústní, tj. např. sliznice respiračního traktu.⁵⁶

Na druhou stranu má ale slizniční imunita vyvinutou určitou míru tolerance k antigenům mikroorganismů běžně přítomných na sliznici (tzv. komensálních). To může být nevýhodou, jelikož antigeny podávané v sublingvální či bukální vakcíně

mohou být méně imunogenní. Proto je pro potřebný účinek vakcíny zpravidla nezbytné použití **imunoaktivantů**.³⁶ Nejméně efektivní mezi studovanými imunoaktivanty jsou cholera toxin (CT) a termolabilní toxin z *Escherichie coli* (LT), dále se používá např. B subjednotka cholera toxinu (CTB) a ligandy Toll-like receptoru (TLR). Protože tyto adjuvanty (zejména CT a LT) jsou pro člověka příliš toxické, nabízí se možnost použití těchto adjuvantů upravených geneticky (mutantů), jejichž toxicita je redukována nebo minimální a které zároveň mají potenciál zvyšovat systémovou i lokální imunitní odpověď.⁵⁶

Na trhu existuje řada přípravků k sublingválnímu a bukalnímu podání v podobě kapek, sprejů, tablet rozpustných v ústech či orálních filmů. Pouze některé z nich však byly zkoumány pro podání vakcín, většina byla ve formě kapek aplikovaných pod jazyk.⁵⁶ V preklinických studiích byla vakcína v podobě orálních kapek (s použitím izotonického roztoku chloridu sodného jako vehikula) aplikována pod jazyk laboratorním myším. Po aplikaci byly myši po dobu 30 min v sedaci, aby se předešlo pasáži vakcíny do GIT.^{65,66} Po aplikaci vakcíny s tetanickým toxoidem byla prokázána indukce imunitní odpovědi na sliznici (v podobě slizničních IgA protilátek) a rovněž i systémová protilátková odpověď (IgG protilátky v séru).⁶⁵ Po aplikaci vakcíny se subjednotkovou HIV vakcínou byla dokonce prokázána indukce tvorby protilátek a aktivace Tc v genitální sliznici myších samic.⁶⁶

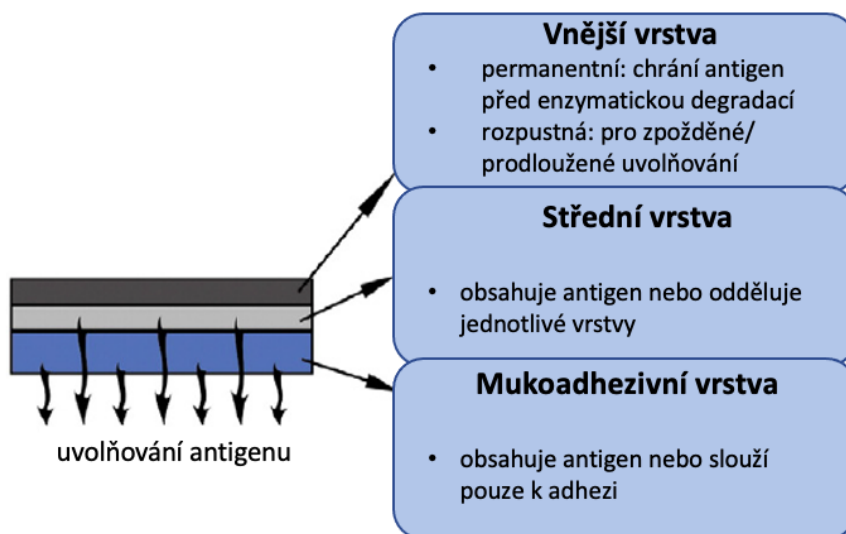
S cílem prodloužit čas kontaktu antigenu se sliznicí byl studován také termoresponzivní gel obsahující tetanický toxoid. Gelující složkou byly tyto polymery: poloxamer, karbopol a hypromelosa (HPMC). Za teploty 2 °C – 8 °C je vakcína v tekuté formě a po kontaktu se sliznicí (při teplotě cca 37 °C) tvoří gel, adhezuje k sublingvální sliznici a setrvává na ní více než 20 min. Antigen je tak chráněn před vymytím slinami nebo polknutím a také před degradací vlivem enzymů přítomných ve slinách. Jako imunoaktivant byl použit netoxický mutant LT. Podání gelové formulace laboratorním myším vyvolalo produkci vysokých hladin protilátek IgG a IgA jak v séru, tak v sekretech dutiny ústní, GIT a reprodukčního traktu. Výsledky byly srovnány s intramuskulárním podáním těchto antigenů, jenž vyvolalo pouze nevýznamný, téměř žádný vzestup slizničních IgA protilátek.⁶⁷

Sublingvální spreje jsou již léta používány pro podání nitroglycerinu pacientům s akutní anginou pectoris.⁵⁶ V několika studiích byly zkoušeny vakcíny ve formě spreje aplikovaného do celé dutiny ústní (**orálního spreje**). Dobrovolníkům byla pomocí jednoduchého rozprašovacího zařízení (bez propelentu) podána vakcína obsahující celý inaktivovaný virus chřipky. Nedošlo k imunitní odpovědi v podobě produkce IgA protilátek na nosní sliznici, ale došlo k významnému zvýšení hladin protilátek IgA ve slinách. Ačkoliv nebyla zaznamenána stimulace Tc (aktivace buněčné imunity), byly v séru detekovány specifické protilátky proti viru chřipky (aktivace humorální imunity).⁶⁸

Pevné lékové formy mají ve srovnání s tekutými lékovými formami mnoho výhod. Příkladem jsou orodispergovatelné tablety (ODT) pro sublingvální a bukální podání. Jsou to obecně tablety s porézní strukturou, které se po podání do dutiny ústní rychle a bez použití vody rozpadají a představují suchou stabilnější alternativu pro vakcínu ve formě kapek.⁵⁶

Ve studii zabývající se vývojem orodispergovatelných **orálních oplatek** (*oral wafers*) obsahujících HPV vakcínu pro sublingvální podání byly hodnoceny pomocné látky. Oplatky byly vyrobeny přímým lisováním. Nejlepší vlastnosti vykazovaly přípravky s obsahem 70% směsi myo-inositolu, leucinu a octanu amonného a 30% mikrokrytalické celulosy (MCC) nebo 60% výše uvedené směsi a 40% směsi tvořené 2/3 hypromelózy (HPMC) a 1/3 MCC. Doba rozpadu těchto dvou přípravků ve 3 ml vody o teplotě 36-37 °C byla 16-20 s resp. 60-90 s.⁶⁹ Imunologické účinky ještě nebyly studovány.

Z výše uvedeného je zřejmé, že pro efektivní sublingvální a bukální vakcinaci je důležitý čas kontaktu antigenu se sliznicí. Sublingvální a bukální lékové formy s prodlouženým uvolňováním adherují ke sliznici, umožňují delší čas setrvání antigenu na sliznici a zvyšují efektivitu vakcinace. K tomuto účelu mohou být využity **orální filmy** či vícevrstvé tablety s prodlouženým uvolňováním.⁵⁶ Na Obr. 4 je znázorněna jejich struktura.



Obr. 4: Obecná struktura vícevrstevného orálního filmu či tablety. Upraveno podle 56.

Jak již bylo výše zmíněno, sliny jsou v sublingvální oblasti vylučovány ve větší míře. To může být výhodné pro lepší nabobtnání a disoluci orálních tablet, ale na druhou stranu to může být překážkou kvůli riziku ztráty antigenu odplavením (*salivary washout*). Z toho důvodu se jeví pro podání vakcín v orální lékové formě s prodlouženým uvolňováním vhodnější bukalní sliznice.⁵⁶

Pro prodloužení uvolňování léčivé látky se používají gelující hydrofilní polymery, které při kontaktu s vodou tvoří na povrchu tablety gelovou vrstvu. Dojde k přilnutí k bukalní sliznici pomocí ne vazebných interakcí, jako jsou vodíkové můstky, elektrostatické síly a van der Waalsovy síly.⁵⁶ Svým bobtnáním a erozí tak řídí profil uvolňování léčiva.⁷⁰

Ve studii Bordeho a kol. byly porovnány imunitní odpovědi po sublingválním podání tablet obsahujících modelový protein ovalbumin s rychlým uvolňováním a tablet s prodlouženým uvolňováním. Bezprostředně po sublingvální aplikaci tablet byl podán roztok cholerového toxinu (CT) jako adjuvant. Přestože se očekávalo, že tablety s prodlouženým uvolňováním budou indukovat výraznější imunitní odpověď, bylo zjištěno, že imunitní odpověď u tablet s rychlým uvolňováním byla výraznější a byla srovnatelná s referenčním tekutým přípravkem ovalbuminu s CT ve stejné dávce. Jedním z vysvětlení, které autoři prezentovali, může být expozice malé dávky

antigenů imunitnímu systému díky kontinuálnímu uvolňování antigenů, která nebyla pro indukci žádoucí imunitní odpovědi dostatečná.⁷¹

6.2.2.3 Nasální aplikace

Nosní sliznice je dobře přístupným místem pro aplikaci léčiv, zároveň je to prostředí s výrazně mírnějšími fyziologickými podmínkami v porovnání s GIT. Nosní dutina je bohatě prokrvena a je atraktivním místem pro aplikaci slizničních vakcín díky možnosti ovlivnění jak systémové, tak slizniční imunity. Jak již bylo zmíněno, nosní dutina je vybavena nosní lymfatickou tkání (NALT), která je velmi podobná Peyerovým plakům v tenkém střevě. NALT je rovněž pokryt M-buňkami, které aktivně zachytávají vzorky antigenů. Intraepiteliální dendritické buňky vystupují svými dendrity k lumen nosní dutiny a jsou též schopny vzorkovat antigeny. Antigeny částicové povahy jsou preferenčně zachytávány M-buňkami, kdežto malé rozpustné antigeny mají přístup k epitelii, kde jsou zachyceny dendritickými buňkami.⁷²

Efektivitu nasální vakcinace negativně ovlivňuje přirozený ochranný mechanismus nosní sliznice: mukociliární clearance. Rychlá obnova a pohyb slizničního hlenu v nosní dutině díky kontinuálnímu pohybu cílů (odvod cizích látek z dutiny) limituje čas setrvání podané vakcíny na sliznici. Přítomnost enzymů a fyziologické pH nosního sekretu (5,5 – 6,5) může rovněž negativně ovlivnit stabilitu vakcíny.^{72,73}

Nasální vakcíny mohou být připravovány ve formě systémů, jako jsou mikročástice obalené membránou, liposomy, imunostimulační komplexy (ISCOM) nebo například mikročástice na bázi PLGA.¹ Komerčně dostupná je např. kvadrivalentní živá vakcína proti chřipce typu A a B (FluMist Quadrivalent®).^{74,75}

Při vývoji intranasálních vakcín se použití efektivních imunoadjuvantů jako jsou CT a LT ukázalo jako problém. CT u potkanů zasahuje do čichového nervu s potenciálním rizikem poškození centrálního nervového systému.⁷⁶ Komerčně dostupná intranasální vakcína proti chřipce Nasalflu®, obsahující LT, byla kvůli výskytu obrny lícního nervu z trhu stažena.⁷⁷

Virus SARS-CoV-2 primárně vstupuje do těla prostřednictvím dýchacích cest (nasofaryngu) a tudíž je v tomto případě vhodné cílit vakcínu na nasální sliznici. V současnosti je 8 intranasálních vakcín proti COVID-19 ve fázi výzkumu, z toho 2

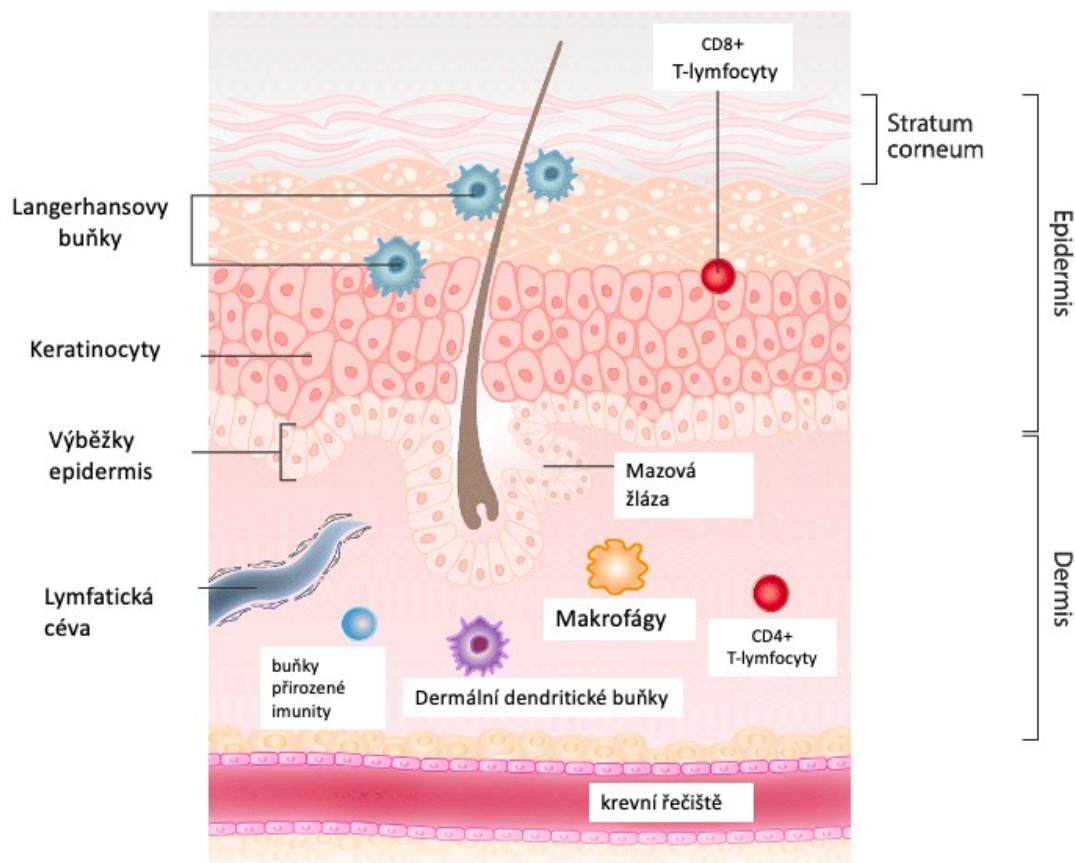
jsou v II. fázi klinického zkoušení. V prvním případě se jedná o vakcínu obsahující oslabený virový chřipkový vektor exprimující tzv. receptor-vázající doménu (*receptor binding domain*) Spike proteinu koronaviru. Druhá vakcína je proteinová subjednotková vakcína, obsahující rekombinantní Spike protein. Je podávána ve třech dávkách; první dvě jsou aplikovány injekčně a třetí dávka je aplikována inhalací nosního spreje.^{78,79,80}

6.2.3 Transdermální aplikace

Kůže je imunologicky aktivní orgán obsahující komponenty, které mohou indukovat jak humorální, tak buněčnou imunitu.⁸¹ Je v přímém kontaktu s okolním prostředím a jejím úkolem je chránit organismus před patogeny. Obsahuje více APC než svalová a subkutánní tkáň a nabízí tedy možnost vyvolání efektivnější imunitní odpovědi s potřebou nižší dávky antigenu.^{81,82}

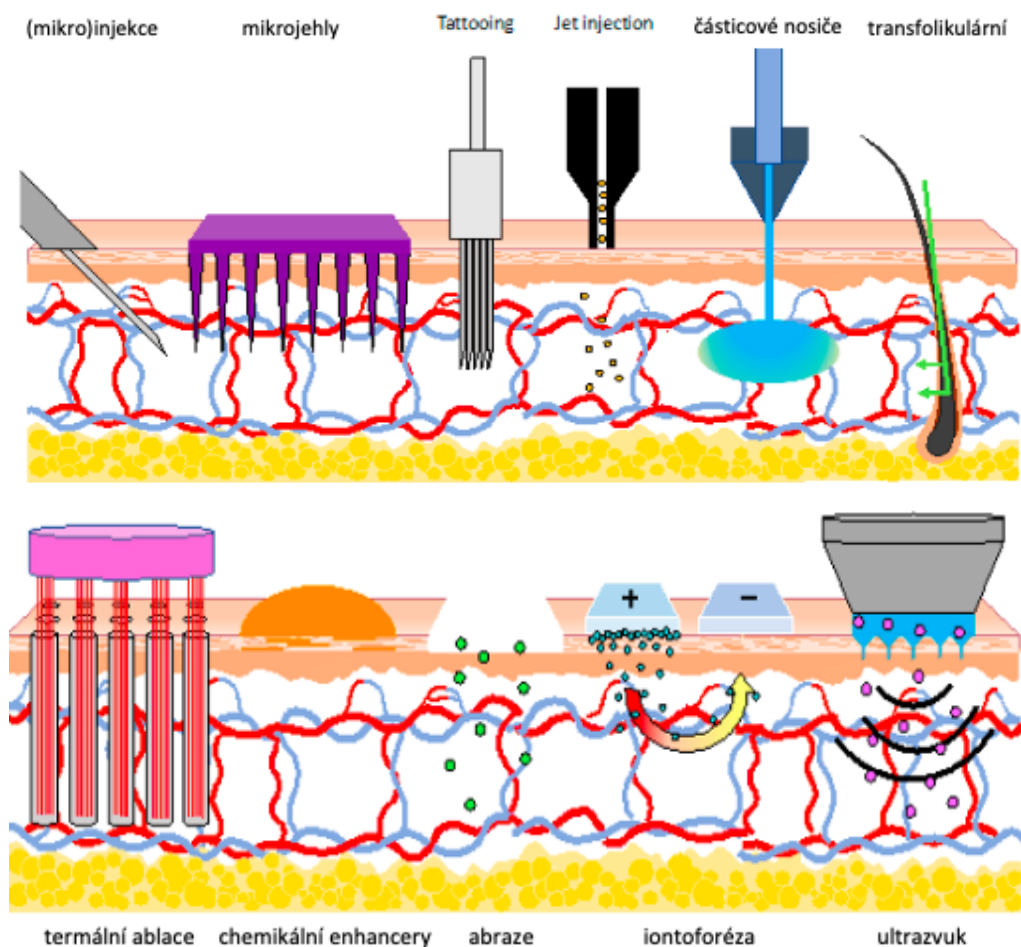
Transdermální podání vakcín má podobné charakteristiky jako sublingvální a bukální podání. V obou případech je soustředěna pozornost na Langerhansovy buňky, které se spolu s dalšími APC (dendritické buňky, makrofágy) podílejí na vyvolání imunitní odpovědi.^{83,84} Na Obr. 5 je schematicky znázorněna struktura kůže. Skládá se ze 3 základních vrstev: *epidermis*, *dermis* a *hypodermis*. Součástí *epidermis* je svrchní vrstva kůže, *stratum corneum*. Jak ukazuje Obr. 5, Langerhansovy buňky se nacházejí v *epidermis* a dendritické buňky, makrofágy a T-lymfocyty jsou bohatě zastoupeny zejména ve střední vrstvě kůže, *dermis*.

Nevýhodou dermální vakcinace je přítomnost keratinizované svrchní vrstvy, *stratum corneum*, která má omezenou propustnost. Tato fyziologická bariéra brání prostupu antigenů k Langerhansovým buňkám po topické aplikaci. Transdermální vakcinace proto vyžaduje chemikální nebo mechanické narušení této vrstvy kůže, aby mohl antigen proniknout k Langerhansovým buňkám a indukovat imunitní odpověď.⁸³



Obr. 5: Distribuce imunitních buněk ve vrstvách kůže. Upraveno podle ⁸⁵.

Aplikovat vakcínu do dermis lze jednoduše pomocí intradermální injekce. Dnes se takto aplikuje několik vakcín: BCG vakcína proti tuberkulóze, vakcína proti vzteklině a některé vakcíny proti chřipce.^{2,84} Vývoj alternativních způsobů podnítla mimo jiné nevýhody injekčního podání i snaha zajistit méně bolestivou aplikaci za účelem zvýšení compliance pacientů. Moderní aplikační technologie ilustruje Obr. 6 zpracovaný podle přehledového článku Hettinga a Carlisle.⁸⁴ Možnosti zahrnují použití mikrojehel, tetování (*tattooing*), tlakové injeckáže (*jet injection*), využití částicových nosičů pro doručení do dermis, transfolikulární aplikaci a využití zvýšeného prostupu kůží po termální ablací nebo abrazi, využití enhancerů, iontoforézy, elektroporézy nebo ultrazvuku.



Obr. 6: Možnosti imunizace transdermální cestou. Upraveno podle ⁸⁴.

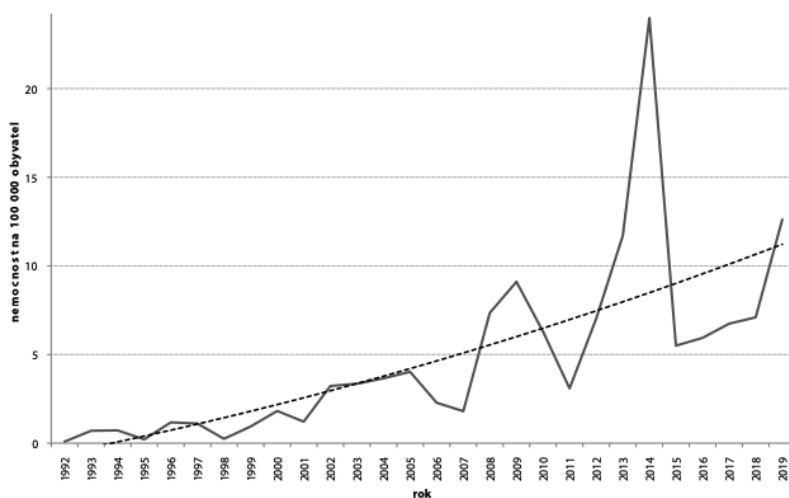
Příkladem komerčně dostupné vakcíny s moderní aplikační technologií je Afluria Quadrivalent® (Seqirus), aplikovaná zařízením *Jet Injector*, které namísto jehly využívá vysokotlaký úzký proud tekutiny k penetraci přes kůži.^{86,87} Předmětem výzkumu je v současnosti vakcína proti COVID-19 ve formě náplasti s mikrojehlami.⁷⁸

6.3 *Bordetella pertussis*

Pertuse (dávivý či černý kašel) je vysoce infekční, akutní bakteriální onemocnění dýchacích cest. Původcem nemoci je bakterie *Bordetella pertussis*. K přenosu od nemocného nebo infikovaného jedince na jiné osoby dochází prostřednictvím kapének, které vznikají hlavně při mluvení, kašláním a kýchním. Výjimečně se přenáší prostřednictvím předmětů kontaminovaných sekrety od nemocného. Typickým příznakem onemocnění jsou záchvaty dávivého kašle, které mohou přetrvávat

několik týdnů a rekonvalescence může trvat i měsíce. Klinický obraz pertuse má více podob v závislosti na věku a zdravotním stavu pacienta, na velikosti infekční dávky a na době, která uplynula od vakcinace. Onemocnění je nejrizikovější pro neočkované či částečně očkované malé děti, u nichž může dojít k rozvoji závažných komplikací i případnému úmrtí.⁸⁸

Pertusi lze předcházet očkováním.⁸⁹ V proočkované populaci může mít pertuse i subklinický či asymptomatický průběh, proto často není rozpoznána a léčena. Očkování ani prodělané onemocnění však neposkytuje ochranu celý život. Po určité době po vakcinaci nebo prodělání nemoci dochází ke snížení imunity; člověk se stává opět vnímavým a může proto být nakažen i několikrát za život. I přes vysokou proočkovanost dětské populace je od roku 1993 v ČR patrný vzestupný trend nemocnosti na pertusi a pravidelně se opakující dvou až pětileté cykly nárůstu a poklesu hlášené nemocnosti (Obr. 7). Podobná situace je i v jiných státech.⁹⁰ Kvůli postupnému poklesu ochrany po očkování se pertuse vyskytuje častěji u vyšších věkových kategorií (adolescenti, dospělí), kteří jsou poté zdrojem infekce pro novorozence a kojence, pro které může být onemocnění, jak již bylo zmíněno, až fatální.⁸⁹



Obr. 7: Výskyt pertuse v ČR. Trend hlášené nemocnosti (na 100 000 obyvatel) v letech 1992–2019. Převzato od ⁹⁰.

Onemocnění pertusí je tedy velkou zdravotní hrozbou v ČR i ve světě.⁹¹

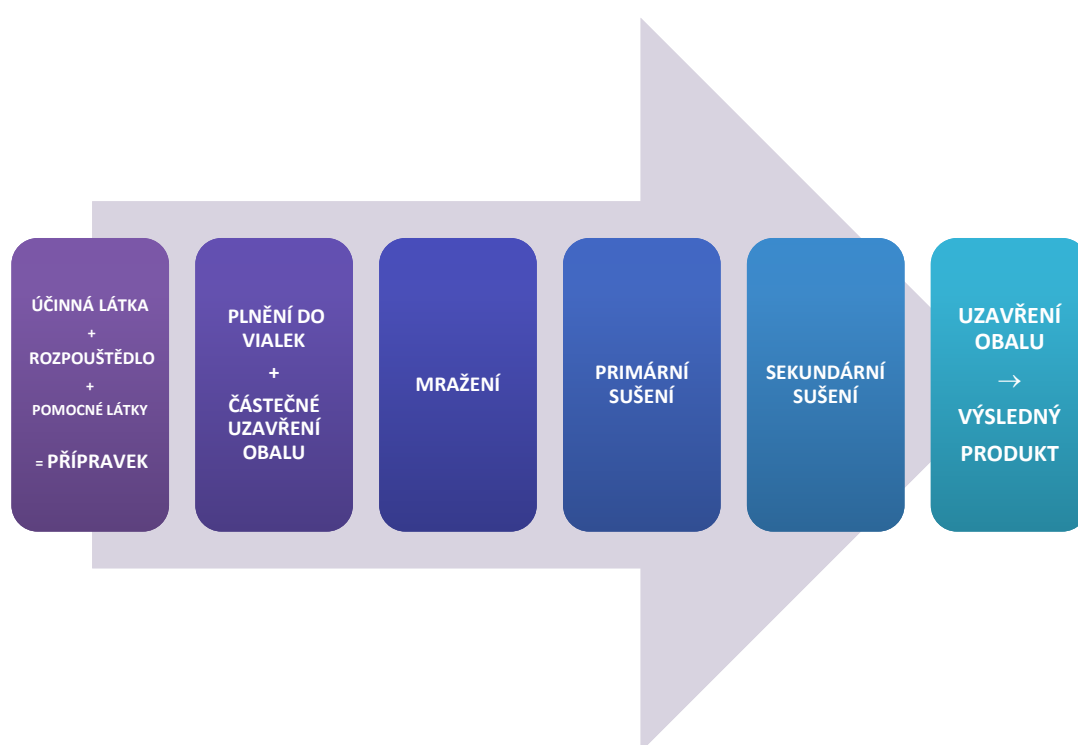
Od roku 1995 se ve vyspělých zemích začalo přecházet na acelulární pertusové vakcíny. Nynější vývoj epidemiologické situace však naznačuje, že tyto vakcíny vykazují nedostačující účinnost. Z toho důvodu je v současnosti velkou snahou vyvinout celobuněčnou vakcínu nové generace, která bude mít zachovanou vysokou imunogenicitu a oproti celobuněčné vakcíně předešlé generace nebude vykazovat nežádoucí vedlejší účinky pojící se s vyšším alergizujícím potenciálem a reaktivitou. Podle světové odborné komunity je potřeba co nejrychleji zavést schéma pravidelného přeočkování adolescentů a dospělých proti pertusi účinnější vakcínou, nejlépe ve spojení s pravidelným přeočkováním proti tetanu.⁹¹ Velice výhodná by byla vakcína, která by indukovala účinnou imunitní ochranu jak systémově, tak lokálně ve slizničních komponentách, kudy patogen vstupuje do těla. V současnosti je vakcína proti pertusi podávána intramuskulárně v rámci povinných očkování, vždy společně s dalšími očkovacími látkami (hexavakcína, dTap vakcína).⁹²

6.4 Využití lyofilizace při produkci vakcín

Lyofilizace je proces sušení sublimací ledu, tj. odstraňování vody ze zmrazeného vodného roztoku látek, s následnou desorpcí zbytkové vody. Je to šetrný způsob sušení bez nutnosti zahřátí přípravku, přičemž nedochází k poškození sušeného materiálu. Aby bylo dosaženo podmínek pro sublimaci vody a kvalitního produktu, jsou směsi sušeny ve vakuu, aniž by došlo k jejich rozmrznutí.^{6,93}

Proces lyofilizace lze rozdělit do tří etap: 1) mražení, 2) primární sušení a 3) sekundární sušení. Protože většina lyofilizovaných vakcín je následně aplikována injekčně, připraví se roztok aktivní látky (vakcína) s vhodným rozpouštědlem (predominantně vodou na injekci) a pomocnými látkami, které jsou přidávány ve vhodném množství tak, aby zajistily aplikační vlastnosti (tlumivé přísady, příp. izotonizační), strukturu (strukturotvorné látky – plniva), stabilitu přípravku během lyofilizace (např. tenzidy, kryoprotektivní a lyoprotektivní látky) a následně i při dlouhodobém skladování (např. protimikrobní látky). Vodný roztok se následně naplní do vialek, které jsou poté částečně uzavřeny pryžovou zátkou.^{6,94,95,96}

Následuje mražení, při němž dochází k formování ledových krystalů. Jeho průběh (rychlost), stejně jako přítomné pomocné látky, určují výslednou strukturu produktu – porézní mikrostruktura lyofilizačního koláče kopíruje krystalickou strukturu ledu. Při primárním sušení dochází v prostředí vakua k sublimaci ledu, čímž se odstraní více než 95 % ledu. Sekundární fáze sušení je prováděna za vyšší teploty a dochází k desorpci vody pevněji vázané ve formulaci. Tato fáze určuje zbytkové množství vlhkosti v lyofilizátu. Po sekundárním sušení je tlak zvyšován na požadovanou hodnotu inertním plynem (např. dusík) nebo filtrovaným vzduchem a vialky jsou uzavřeny.^{6,94,95}



Obr. 8: Základní schéma procesu lyofilizace. Upraveno podle ^{6,95}.

Kontrola a optimalizace procesu lyofilizace je stěžejní pro dosažení požadovaných vlastností produktu.⁹⁴ Je hodnocen vzhled a objem lyofilizačního koláče, jeho struktura a porozita a zbytková vlhkost, která bývá u vakcín pod 5 %. Objem by měl být srovnatelný s původním přípravkem. Nežádoucím jevem je kolaps lyofilizačního koláče. Důležitým parametrem je také rekonstituční čas (rychlost rekonstituce).^{6,95}

Řada vakcín ve formě roztoku není stabilní ani v chladu (2 – 8 °C) nebo zmražená. Díky lyofilizaci se udržuje účinnost citlivých aktivních látek (např. proteinů), zabraňuje se jejich agregaci a chemické degradaci. Lyofilizace se tedy využívá především ke zvýšení jejich stability, ekonomicky důležitý je ale snazší transport produktů.^{6,94} Další výhodou je rychlá rekonstituce před aplikací.⁹⁵

Nevýhodou této metody je náročná optimalizace formulace přípravku pro dosažení vyhovujícího produktu, potřeba nastavení specifických podmínek lyofilizačního procesu, přístrojového vybavení k hodnocení lyofilizovaného produktu a časová i finanční náročnost.^{6,95}

Přehled pomocných látek pro lyofilizaci byl zpracován v předchozí diplomové práci.⁹⁷ V Tabulce 1 je proto uveden jen stručný přehled skupin s uvedením příkladů.

Tab. 1: Přehled pomocných látek pro lyofilizaci vakcín. Upraveno podle ^{31,95,98,99}

STRUKTUROTVORNÉ LÁTKY (PLNIVA)	mannitol, glycin glukosa, laktosa, sacharosa, dextran, trehalosa
KRYOPROTEKTIVNÍ LÁTKY	cukry: sacharosa, laktosa, trehalosa polyoly: glycerol, mannitol, sorbitol glycin, alanin, lysin polymery: makrogol, dextran, povidon
LYOPROTEKTIVNÍ LÁTKY	cukry: sacharosa, laktosa, trehalosa proteiny: želatina
TENZIDY	polysorbát 20, polysorbát 80
TLUMIVÉ PŘÍSAKY	citrát sodný, acetát sodný, kyselina fosforečná, fosfát sodný, hydrogenfosfát draselný, glutamát, trometamin, L-histidin, glycin, L-alanin
IZOTONIZAČNÍ PŘÍSAKY	chlorid sodný, mannitol, glycerol
PROTIMIKROBNÍ LÁTKY	benzylalkohol, fenol, fenoxylethanol, benzalkoniumchlorid, m-kresol, m-paraben, chlorbutanol
ANTIOXIDANTY	kyselina askorbová, siřičitan sodný, methionin

Některé látky, např. trehalosa nebo aminokyseliny, jsou multifunkční a při lyofilizaci působí různými mechanismy.

7 Experimentální část

7.1 Použité suroviny

Surovina	Výrobce	Země původu
D-(+)- Trehalosa dihydrát	Sigma-Aldrich	USA
Dextran 40 (Mr 40 000)	Sigma	Japonsko
Dihydrogenfosfát draselný (KH ₂ PO ₄)	Dr. Kulich Pharma s.r.o.	Česká republika
Hněď skořicová	AROCO, spol. s.r.o.	Česká republika
Hydrogenfosfát draselný (K ₂ HPO ₄)	Dr. Kulich Pharma s.r.o.	Česká republika
I- Karagenan (Iota karagenan)	Sigma-Aldrich	USA
Makrogol 300	Dr. Kulich Pharma s.r.o.	Česká republika
Mannitol (Pearlitol 160 C)	Roquette	Francie
Povidon 25	BAST Corporation	Německo
Rybí želatina	LAPI GELATINES	Itálie
Sacharin sodná sůl	Sigma-Aldrich	USA

7.2 Použité přístroje

Přístroj	Typ přístroje
Analytické váhy	SARTORIUS Entris 0,1 mg (Lab Instruments GMBH a CO.KG, Německo)
Analytické váhy	CAHN 26 Automatic Electrobalance 0,001 mg (Cahn Instruments, USA)
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetr, DSC 200 PC Phox (Netzsch-Geratebau GmbH, Německo)
DSC software	DSC 200 F3 NETZSCH Proteus (Netzsch-Geratebau GmbH, Německo)
Laboratorní váhy	SARTORIUS Entris 1 mg (Lab Instruments GMBH a CO.KG, Německo)
Lyofilizátor	BETA 1-8 LSC plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany)
Mrazicí zařízení	BSFS 290 (Vestfrost, Dánsko)
Osmometr	Automatic Semi-Micro osmometer (Knauer, Německo)
pH metr	Microprocessor pH Meter HI 211 (Hanna, USA)
Pipeta pro viskózní vzorky	Transferpettor 5 ml (Brand, Německo)

Pipeta pro viskózní vzorky	Transferpettor 1000 µl (Brand, Německo)
Ruční lis	Netzsch (Netzsch-Geratebau GmbH, Německo)
Ultrazvuková lázeň	WiseClean Ultrasonic Cleaner Set (Witeg, Německo)

7.3 Použité metody

7.3.1 Příprava vzorků

V počáteční fázi práce byly připraveny vzorky obsahující pomocné látky, následně jejich směsi (matrice). Ve finální fázi byly připravovány i vzorky obsahující aktivní složku, vakcínu *Bordetella pertussis* označenou jako BPV. Při přípravě vodných roztoků se vždy používala voda pro HPLC.

- Matrice obsahující rybí želatinu (G) či karagenan iota (CRI) byly připraveny rozpuštěním G či CRI za zvýšené teploty (do 60 °C) ve vodní lázni. Po ochlazení byly rozpuštěny zbylé složky a byly doplněny vodou do potřebného množství. Matrice zamýšlené pro smísení s aktivní složkou bylo nutné připravovat ve dvojnásobné koncentraci a polovičním objemu. Vychladlý roztok byl smísen se suspenzí BPV v poměru 1:1.
- Pokud nebyly tyto složky obsaženy, ostatní dobře rozpustné pomocné látky (mannitol, dextran, sacharin sodná sůl, trehalosa, makrogol, povidon, hydrogenufosfát draselný, dihydrogenfosfát draselný) byly rozpouštěny ve vodě za laboratorní teploty, případně přímo v suspenzi aktivní látky BPV. Rozpouštění dextransu v koncentraci 10 % bylo urychleno pomocí ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

Vzorky byly označeny pomocí kódů, které specifikují použité složky, čísla označují jejich koncentraci (*m/m*), např. D10/T3/P1 znamená směs dextransu v koncentraci 10 %, trehalosy v koncentraci 3 % a povidonu 25 v koncentraci 1 %. V případě směsi s BPV byla použita koncentrace BVP0,5 (1 dávka v 0,5 ml).

Pro přehlednost jsou výsledky a diskuze rozděleny do 2 částí. První část obsahuje vzorky matic tvořených pomocnými látkami a jejich směsmi, druhá obsahuje matrice s BPV.

7.3.2 Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)

Termální vlastnosti byly měřeny na přístroji DSC 200 PC Phox.

Nejprve byl zapnut přístroj. K navážení vzorku se používaly digitální analytické váhy s přesností 0,001 mg, na kterých byl nejprve zvážen prázdný hliníkový kelímek spolu s víčkem, který byl předtím perforován. Následně byl kelímek naplněn přibližně 1 až 10 mg vzorku (lyofilizátu nebo vlastních pomocných látek), umístěn do zařízení s lisovací páčkou, přičemž došlo k pevnému přilisování víčka ke kelímku. Naplněný kelímek byl zvážen a vyjádřila se hmotnost vzorku.

Měření probíhalo v dusíkové atmosféře. Do měřicí komory byl vždy umístěn slepý vzorek (prázdný kelímek) a kelímek s měřeným vzorkem. Na počítači byly nastaveny parametry průběhu měření: rychlost ohřevu, chlazení, maximální dosahované teploty, čas udržování určité stálé teploty (izoterma). Následně bylo spuštěno měření. Rychlost ohřevu 10 °C/min byla vždy stejná. Vzorek se zahříval do teploty 300 °C, poté byl ochlazen a byl proveden 2. ohřev. U vzorků matric byly provedeny dvě měření. Při druhém měření byl 1. ohřev proveden do teploty mírně nad T_g , následně byl vzorek ochlazen a opět se zahřál. Vzorky s aktivními látkami byly měřeny jednou.

Výsledkem měření byl termogram charakterizující děje související s tepelným namáháním vzorku. Získané termogramy jsou ilustrovány na obrázcích v dalších částech práce.

7.3.3 Měření osmolality

Před měřením byl přístroj po zapnutí ponechán 5 min zahřívat. Pro přípravu vzorků byla použita voda pro HPLC, která byla uchovávána ve skleněné nádobě. Před měřením bylo zkontrolováno nastavení přístroje pomocí vody (0 mOsmol/kg) a standardního roztoku chloridu sodného s osmolalitou 400 mOsmol/kg.

Pro správnost měření byla provedena kalibrace přístroje proměřením řady porovnávacích roztoků chloridu sodného s osmolalitou v rozsahu 100 až 700 mOsmol/kg připravených podle Tabulky 2.2.35-1 (ČL 2017)¹⁰⁰. Byla vyjádřena kalibrační rovnice

$$y = 0,993x + 1,0554 \quad (1),$$

s koeficientem determinace $R^2 = 0,99999$, ve které „x“ je skutečná osmolalita (mOsmol/kg) a „y“ je naměřená hodnota (mOsmol/kg). Rovnice umožnila přepočítat naměřených hodnot na skutečnou osmolalitu (mOsmol/kg).

Měřicí zkumavka byla naplněna vzorkem o objemu 0,15 ml, byl do ní ponořen termistor s drátkem tak, aby se nedotýkaly dna a zároveň byly pod hladinou roztoku vzorku. Zkumavka byla umístěna do měřicí komory, kde byla před měřením ponechána vždy nejméně po dobu 1 min pro temperaci vzorku. Poté bylo spuštěno měření stiskem tlačítka „start“. Po skončení měření byla zaznamenána naměřená hodnota na displeji a následně se vyčkalo do rozmrznutí vzorku.

Před měřením dalšího vzorku byly zkumavka a termistor s drátkem omyty vodou pro HPLC a následně usušeny bavlněnou látkou.

Každý vzorek byl proměřen pětikrát, vypočítal se průměr a směrodatná odchylka (SD). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 2

Při měření osmolality vzorků, které obsahovaly BPV, byla suspenze vždy nejdříve přefiltrována přes membránový bakteriální filtr s velikostí pórů 0,22 μm .

7.3.4 Měření pH

Kalibrace pH metru byla provedena pomocí kalibračních roztoků s pH 4 a pH 7.

Při měření pH jednotlivých vzorků o objemu 25 ml byla do měřeného roztoku ponořena skleněná indikační (měrná elektroda) a následně byla odečtena hodnota pH na displeji. Každý vzorek byl změřen jednou. Mezi jednotlivými měřeními byla elektroda vždy omyta čišťenou vodou a usušena.

7.3.5 Lyofilizace

Pro lyofilizaci vzorků byly použity plastové či hliníkové blistry umístěné přímo na etažérech. Vzorky byly nadávkovány po 0,5 ml pomocí pipety pro viskózní roztoky. Etažéry s blistry byly umístěny do mrazicího zařízení při teplotě $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 24 hodin.

Lyofilizace probíhala v laboratorním lyofilizátoru. Předchozí zkušenosti ukázaly, že pro dosažení dobrých výsledků je nezbytné používat pouze dva nejspodnější etažéry.⁹⁷ Parametry pro lyofilizaci byly nastaveny následovně: teplota kondenzátoru byla nastavena na $-56\text{ }^{\circ}\text{C}$, tlak v komoře pro primární sušení byl nastaven na 42 Pa a na 0,1 Pa pro sekundární sušení. Po nastavení požadovaných parametrů byl lyofilizátor spuštěn na 15 min. Během tohoto kroku se kondenzátor zchladil na

požadovanou teplotu. Poté byly zmrazené vzorky vyjmuty z mrazicího boxu a co nejrychleji přeneseny do sušicí komory, zařízení bylo ihned uzavřeno a byl spuštěn program Sušení (Main Drying).

Po zapnutí byl zahájen proces evakuace sušicí komory a sušení sublimací. Během primárního sušení byly sledovány teploty na etažerech a hodnoty tlaku. Po zahájení lyofilizace byla teplota na etažerech přibližně -16 °C. Po ukončení primárního sušení teplota postupně stoupala až na teplotu přibližně 18 – 20 °C.

Po ukončení lyofilizace, která trvala 24 hodin, byly blistry s tabletami umístěny do exsikátoru.

7.3.6 Hodnocení lyofilizátů

Připravené lyofilizáty (tablety) byly hodnoceny podle následujících kritérií:

Vzhled tablet a vyjmutí z blistru

Bylo posuzováno, jak snadno se tableta dá vyjmout z blistru. Snadno vyjmutelné tablety buď samy vypadly nebo bylo nutné pouze lehké promáčknutí blistru. Rovněž bylo hodnoceno, zda po vyjmutí tablety zůstává v blistru zbytek.

Hodnotila se celistvost, jednodušnost vzhledu tablety a její pevnost. Posuzovalo se, zda nedošlo ke kolapsu struktury lyofilizačního koláče. Po rozkrojení skalpelem byla posuzována struktura tablety na řezu a její mechanická odolnost/ křehkost.

Hodnocení rozpadavosti tablet

Podle upravené lékopisné zkoušky rozpadavosti vaginálních tablet.¹⁰¹ Byl měřen čas, za který se tableta rozpadne. Zařízení s děrovanými disky bylo umístěno do nádoby naplněné vodou temperovanou na 37 °C, naplněnou těsně nad horní disk. Tableta byla vždy položena na hladinu vody a měřil se čas, za který se tableta nasákne vodou, zprůhlední a rozpadne (rozplyne na hladině).

8 Výsledky a diskuze

Aplikace peptidů a vakcín formou orální tablety představuje moderní typ aplikační cesty. Oproti aplikaci injekční má řadu výhod, zejména vysokou stabilitu a snadnou manipulovatelnost s lyofilizovanými tabletami, podání přípravku pacientovi je méně stresující, což je výhodou zvláště u dětí. Další výhodou jsou i méně přísné požadavky na výrobní podmínky oproti injekcím.^{1,56}

Tato diplomová práce se zabývá návrhem vhodného složení matrice pro výrobu lyofilizovaných tablet k orální aplikaci modelové vakcíny. Práci je rozdělena do dvou logických celků. V první části byly studovány vlastnosti matric složených z pomocných látek a jejich kombinací, v další části vlastnosti matric s aktivní složkou, kterou byla suspenze kmene *Bordetella Pertussis* (BPV) v roztoku chloridu sodného s obsahem 20×10^9 buněk/dávka.

Kromě osmolality a pH byly studovanými parametry také podmínky pro rozpuštění složek a viskozita celé matrice. Nutnost zahřívání komplikuje rutinní práci v provozu, zatímco viskozita je riziková pro správné dávkování a následné hodnocení hmotnostní stejnoměrnosti tablet. Navíc je při zahřívání nutné připravovat koncentrované matrice, které jsou v dalším kroku míseny s aktivní složkou v poměru 1:1. Kromě rizika chyby při přípravě se tím dále zvyšuje dále viskozita, což znesnadňuje manipulovatelnost a je potřeba vždy dlouhodobě mísit s aktivní složkou (rozdíl ve viskozitách dílčích podílů), aby byla zajištěna homogenita produktu.

Lyofilizace vždy probíhala za stejných podmínek. Protože použitý laboratorní lyofilizátor neumožňoval mražení přímo v komoře, připravené vzorky byly po nadávkování do blistrů umístěny do mrazicího boxu ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) a po 24 hodinách co nejrychleji přemístěny do sušicí komory, kde byl po evakuaci zahájen proces sušení. Externí mražení s sebou nese riziko částečného rozmražení vzorku při transportu a zahájení procesu a riziko kolapsu koláče.

Z předchozího experimentu⁹⁷ bylo známo, že vyšší patra v sušicí komoře mají v průběhu primárního sušení vyšší teplotu než spodní a docházelo k znehodnocení vzorků a kolapsu koláče kvůli částečnému rozmražení před sublimací. Proto se v této práci používala pouze dvě dolní patra (etažéry). Díky prostorové limitaci se v prvních fázích používaly plastové blistry, přestože mají horší tepelnou vodivost. Teprve vyhovující kompozice byly lyofilizovány v hliníkových blistrech.

Lyofilizované tablety jsou náchylné na vlhko, proto byly transportovány a uchovávány v exsikátoru. Vlastnosti lyofilizátu (tablet) byly charakterizovány organolepticky posouzením vzhledu (celistvost, barevná jednotnost), manipulovatelnosti (vyjmutí z blistru, zbytek v blistru, křehkost koláče) a mechanických vlastností (pevnost, struktura na řezu, homogenita struktury, rozpadavost). Vzhledem k omezené kapacitě lyofilizátoru, časové náročnosti procesu a počtu vzorků byla limitována i možnost připravovat větší množství tablet. Proto jsou výsledky rozpadavosti většinou výsledkem jednoho měření a sloužily jako orientační při dalším výběru vhodného složení tablet pro aktivní složku.

U připravených tablet byla také hodnocena chuť. Ta je při aplikaci do dutiny ústní důležitá pro akceptovatelnost pacientem, zejména v případě delšího kontaktu se sliznicí, který byl jedním z cílů práce při formulaci matrice. Protože aktivní složky byly izotonizovány chloridem sodným, bylo nutné primárně uvažovat o potlačení pocitu slanosti. K vjemu sladké chuti by mohly přispívat některé pomocné látky (mannitol, trehalosa), k potlačení hořké chuti makrogolu však byla k některým vybraným formulacím přidána také sodná sůl sacharinu, nejčastěji v koncentraci 0,1 %, což je v kódu vyznačeno (SS0,1), případně i nižší (0,07 %).

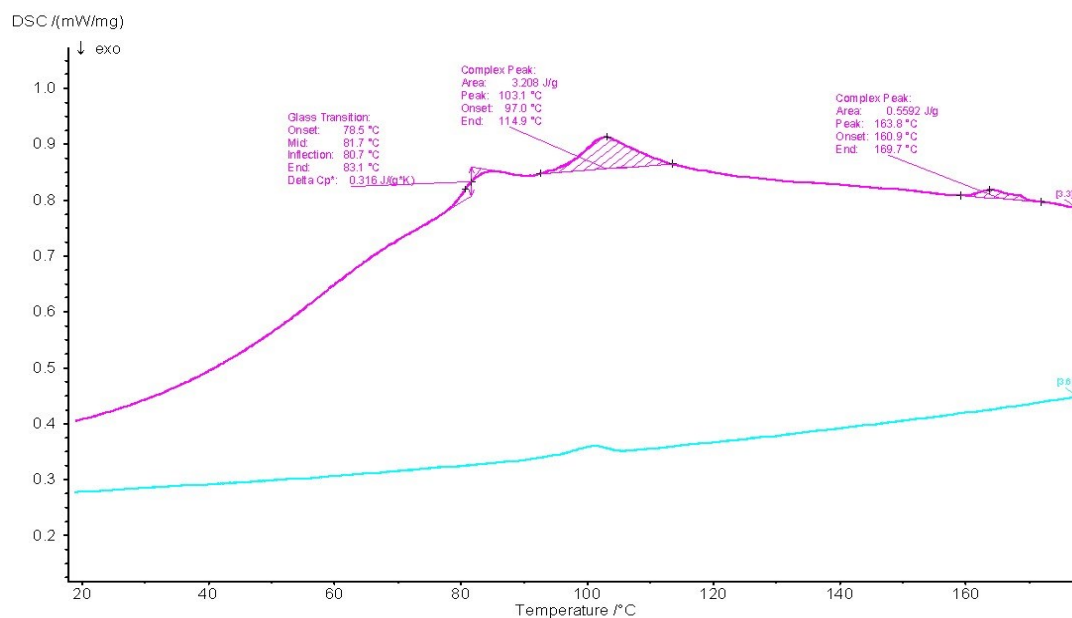
Výsledky jsou ilustrovány v tabulkách a obrázcích a členěny podle složení, jak již bylo zmíněno, do dvou částí.

8.1 Charakterizace pomocných látek pro matrice

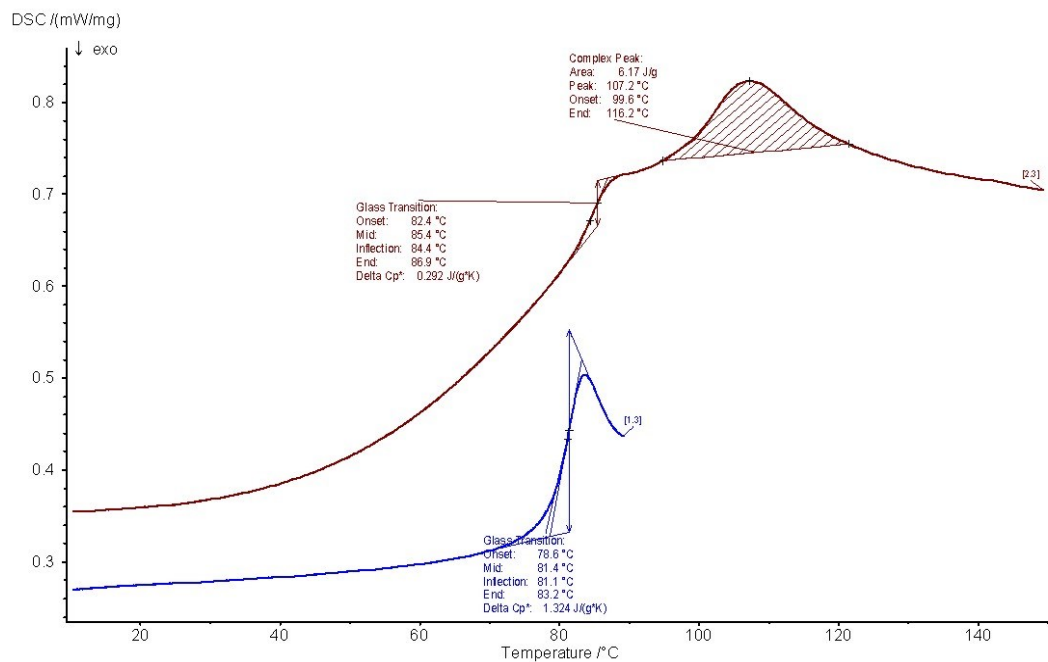
Při výběru vhodných pomocných látek se částečně vycházelo ze zkušenosti předchozí diplomové práce Macákové, ve které se osvědčil mannitol (M), rybí želatina (G) a karagenan iota (CRI).⁹⁷ Protože se v současné době ustupuje od používání pomocných látek živočišného původu, byla snaha nahradit rybí želatinu jinou pomocnou látkou a modifikovat dále vlastnosti matric. Hlavní pozornost byla věnována dextransu (D) a trehalose (T).

Pomocné látky byly primárně charakterizovány pomocí **diferenciální skenovací kalorimetrie**. Vhodná kombinace krystalických a amorfních látek je pro strukturu lyofilizačního koláče zásadní.⁹⁶ V této práci byly jako hlavní složky testovány: rybí želatina, dextran 40, karagenan iota, mannitol, trehalosa, povidon 25 a makrogol 300. Na Obr. 9 – 16 jsou ilustrovány jejich termogramy.

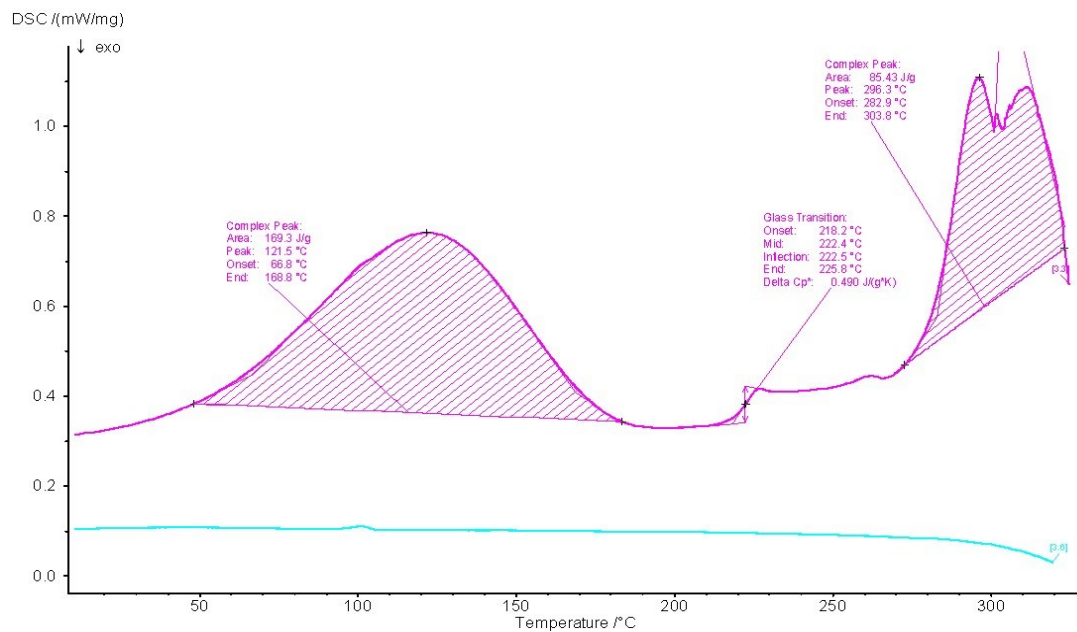
Termogramy amorfni rybí želatiny jsou zobrazeny na Obr. 9. Zjištená teplota skelného přechodu (T_g) 81,7 °C je potvrzena v detailu na Obr. 9b. Na Obr. 10 jsou zobrazeny termogramy amorfniho dextransu 40. Při prvni měření (Obr. 10a) byly provedeny 2 ohřevy. Z prvniho ohřevu lze vyčíst T_g 222,4 °C. Na Obr. 10b je zachycen detail teploty skelného přechodu. Hodnota T_g dextransu 40 je v souladu s literaturou.¹⁰² Obr. 11 ilustruje termogram směsi D3/G3. T_g dextransu je zachovaná a pozorovatelná při 221, 5 °C, zatímco T_g želatiny je překrytá pikem vody. Termogram karagenanu iota (Obr. 12) ukazuje jeho krystalickou povahu s teplotou tání.



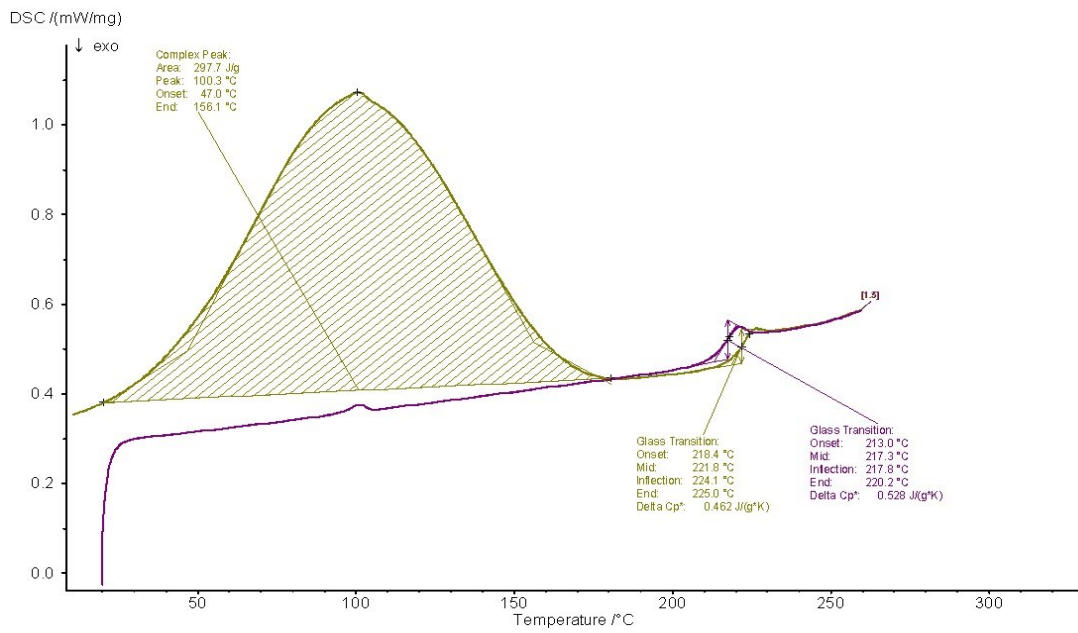
Obr. 9a: Termogram rybí želatiny.



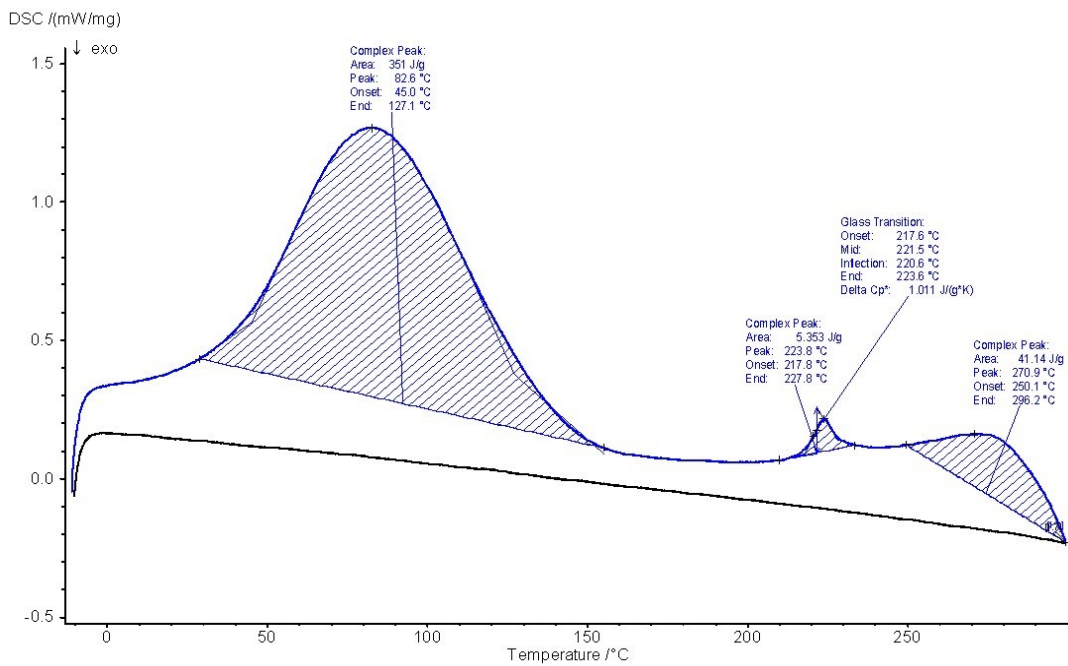
Obr. 9b: Termogram rybí želatiny. Detail T_g



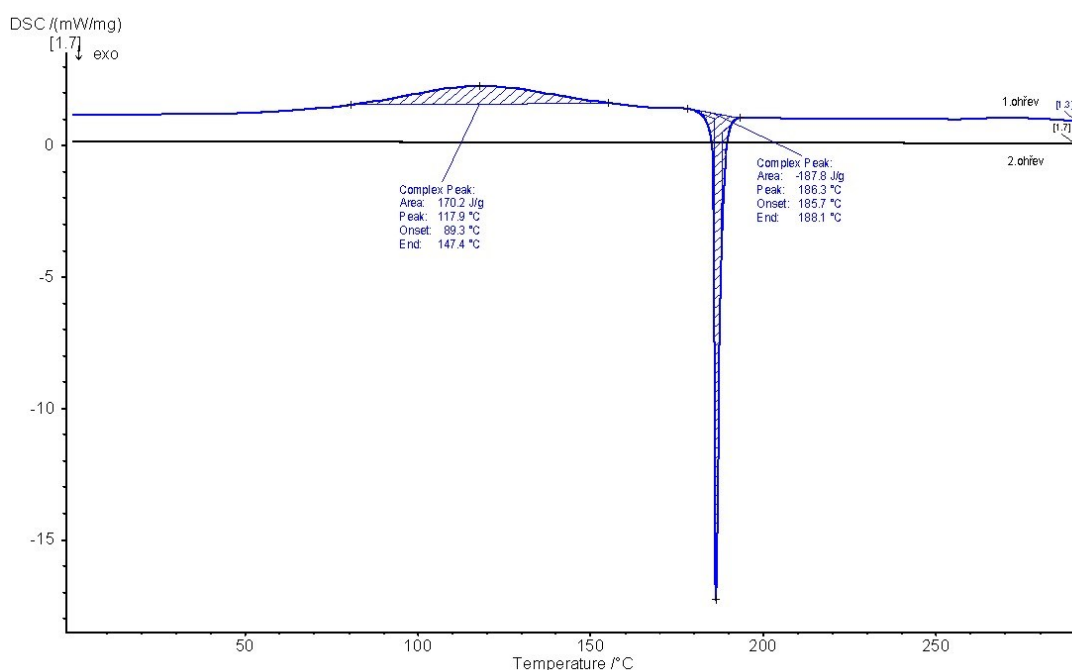
Obr. 10a: Termogram dextransu.



Obr. 10b: Termogram dextransu. Detail T_g.

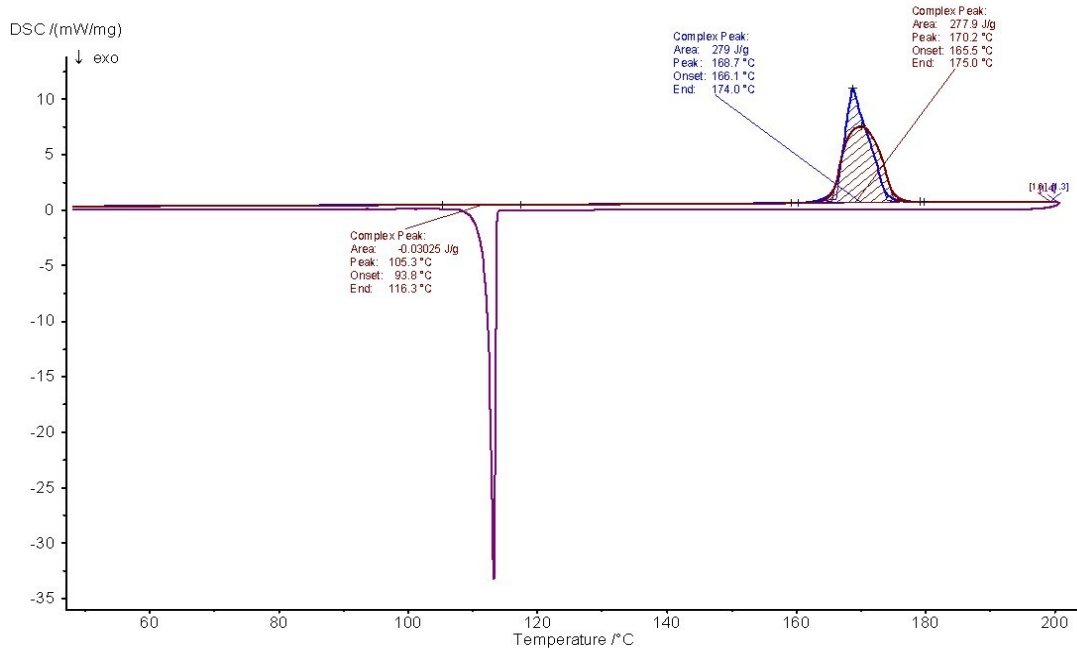


Obr. 11: Termogram směsi G3/D3.

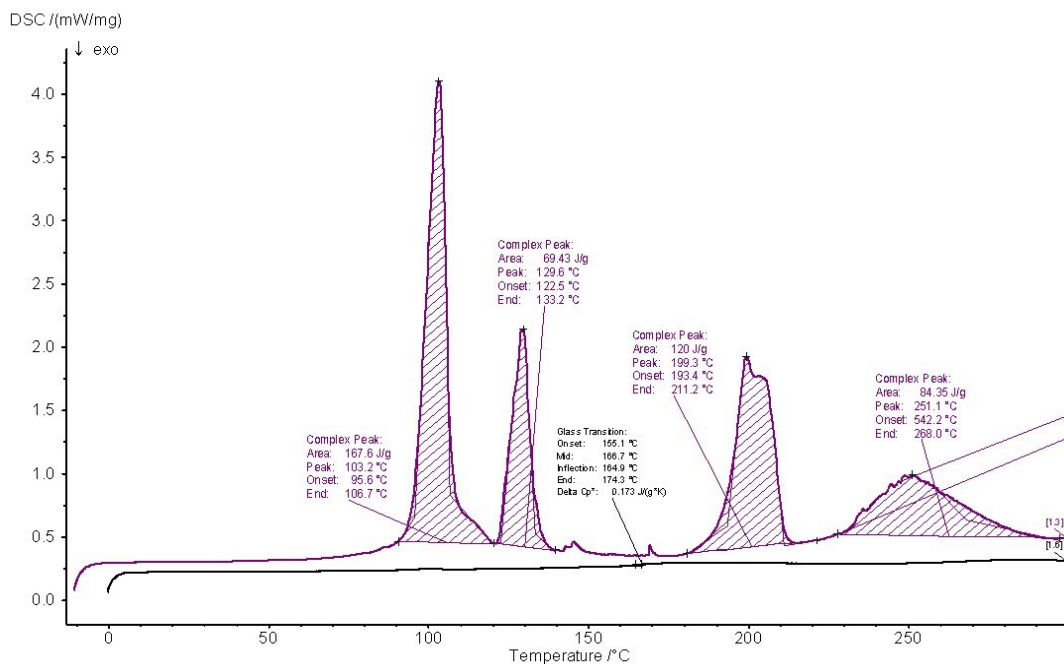


Obr. 12: Termogram CRI

Často používané krystalické látky, které kromě struktury koláče podporují také stabilitu aktivních složek ochranou vůči stresu vyvolanému mražením a sušením, jsou mannitol a trehalosa.⁹⁶ Pík charakterizující teplotu tání mannitolu je pozorovatelný na Obr. 13, při chlazení dochází ke zpětné krystalizaci. Termogram trehalosy (Obr. 14) ukazuje její složitou polymorfní strukturu, s několika krystalickými píky i skelnými přechody.^{103,104} Po druhém ohřevu lze potvrdit T_g 166,7 °C. Uváděné hodnoty T_g se v literatuře liší a tento rozdíl je způsoben různými použitými metodami měření a zejména různým zbytkovým obsahem vody. T_g pro trehalosu s 0,3 % zbytkového obsahu vody je podle Crowe a kol. 111,3 °C.¹⁰⁵

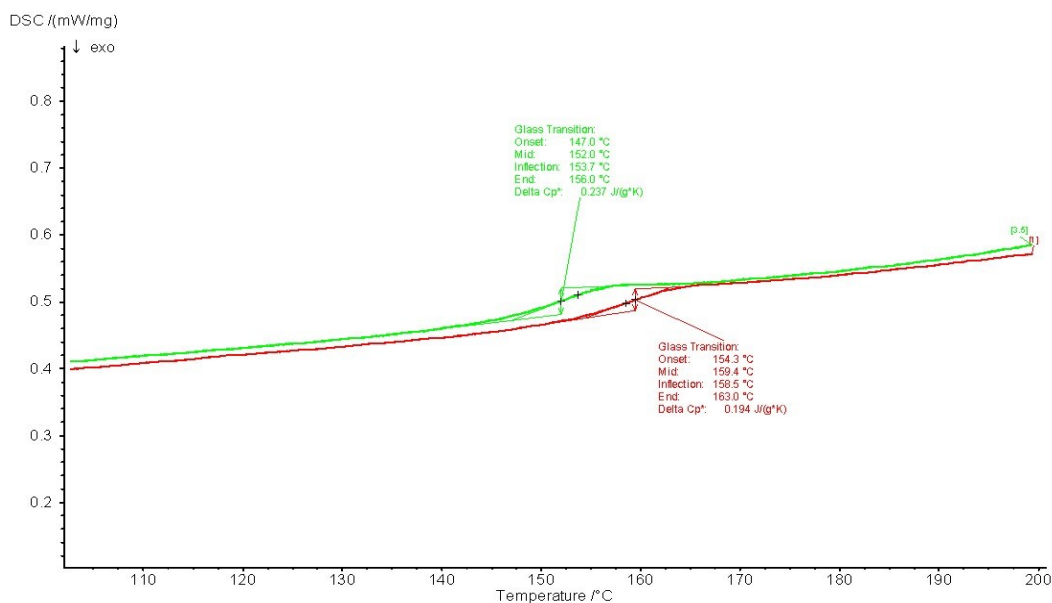


Obr. 13: Termogram mannitolu.



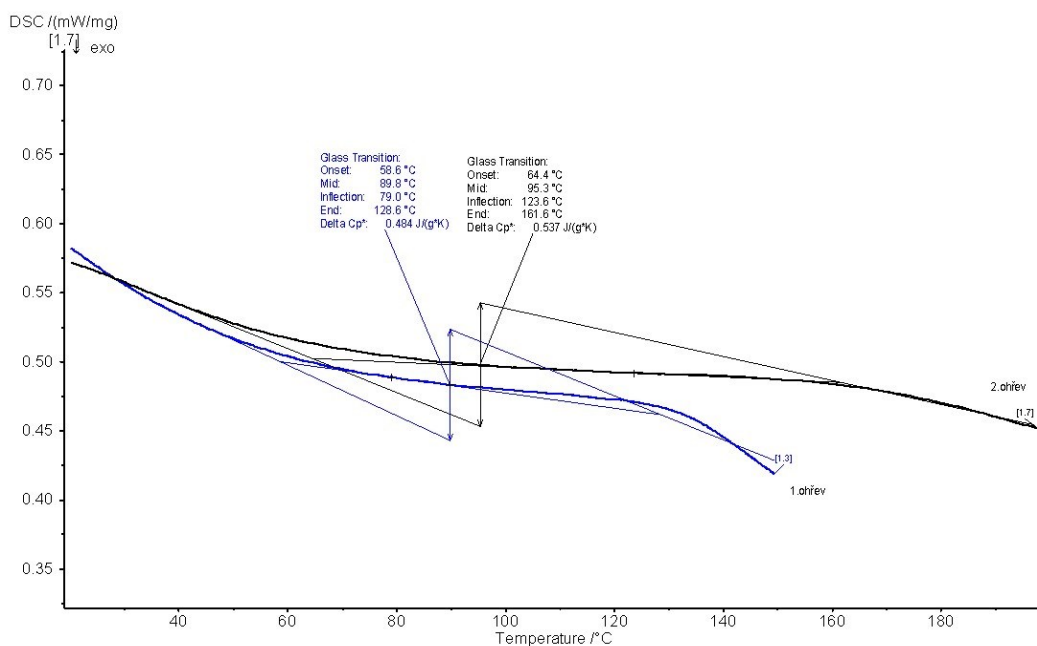
Obr. 14: Termogram trehalosy.

Jako látky modifikující strukturu koláče lze využít rovněž některé polymery. Velmi často jsou v literatuře zmiňovány povidon a makrogol^{106,107}, kterým byla proto věnována pozornost i v této práci.



Obr. 15: Termogram povidonu 25 (1. ohřev, 2. ohřev). Převzato z práce⁹⁷

Na termogramu povidonu (P, Obr.15) byl v předchozí diplomové práci identifikován skelný přechod při cca 150 °C.⁹⁷ Termogram makrogolu (MG, Obr. 16) ukazuje skelný přechod při teplotě asi 60 °C. Obě látky kromě zvýšení amorfního podílu v koláči přispívají rovněž k úpravě viskozity matrice, vzhledem k molekulové hmotnosti to bylo předpokládáno zejména pro P.



Obr. 16: Termogram makrogolu 300

Vodné roztoky vybraných pomocných látek byly orientačně charakterizovány osmolalitou a byla určena hodnota pH. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 2.

Tabulka 2: Vlastnosti roztoků vybraných pomocných látek a jejich směsí

Vzorek	Osmolalita (mOsmol/kg)	pH	Vzorek	pH
D10	17	4,5	D10/KHP0,1	8,8
T5	135		D10/KHP0.1/MG1	8,7
T10	300		D10/KHP0.1/P1	8,2
T15	-	4,9	D10/KHP0.1/G3	8,2
P1	-	3,4	M2/G2/KP0,1/ SS0,07	5,3
P3	-	3,3	M2/D10/KP0,1/P1/SS0,07	5,2
P5	-	3,2	M2/D10/KP0,1/MG1/SS0,07	5,4
KP0,1	8	4,9		
KP0,2	19	4,8		
KP0,3	29	4,7		
KHP0,1	-	9,0		
KHP0,5	-	9,1		
KHP1	-	9,1		

S výjimkou 10% roztoku trehalosy, který byl s hodnotou 300 mOsmol/kg slabě hypertonický (izotonickému roztoku odpovídá hodnota 286 mOsmol/kg), byly všechny roztoky hypotonické. Po přidavku suspenze aktivní látky nedojde tedy k nadměrnému zvýšení osmolality, což by mohlo komplikovat budoucí stabilitu aktivní složky.

Podobný záměr byl také sledován u hodnoty pH. Některé pomocné látky v maticích by mohly snižovat hodnotu pH a tím ovlivnit stabilitu aktivní složky v tabletě. Za vhodné tlumivé přísady, stabilizující lyofilizační koláč především v případě proteinů, jsou považovány fosfáty, přednostně draselné.⁹⁶ V experimentu byly připraveny směsi s přidavkem dihydrogenfosfátu (KP) nebo hydrogenfosfátu draselného (KHP). Protože KP má kyselé pH (cca 5, Tab. 2), je KHP s hodnotou pH cca 9 pro dosažení neutrálního pH matrice vhodnější. Výhodou po přidání KHP k roztoku CRI je také empiricky pozorovaný pokles viskozity vyvolaný změnou pH.¹⁰⁸

Pro budoucí využití v rutinní produkci jsou rovněž zásadní rozpustnost látek ve vodě za laboratorní teploty a přijatelná viskozita produktu. Toto očekávání splnily mannitol, trehalosa, dextran a makrogol. Povidon je rozpustný za laboratorní teploty, přičemž jeho 2% roztok byl viskózní a rozpouštění tedy trvalo déle. Vzorky obsahující rybí želatinu nebo karagenan ale bylo nutné připravovat za mírně zvýšené teploty (cca 60 °C) ve vodní lázni za míchání. Teprve poté byly přidány dobře rozpustné látky. Hlavním problémem G nebo CRI vzorků však byla nutnost pracovat s dvojnásobnou koncentrací, protože za vyšší teploty není možné rozpouštět přímo v suspenzi aktivní složky, jelikož by hrozila ztráta její účinnosti. To dále zvyšovalo viskozitu směsi. Snížení teploty na cca 40 °C sice prodlužovalo čas přípravy (do rozpouštění), ale z perspektivy budoucího mísení s aktivní složkou je vhodnější. Kromě obtížné manipulace může být vyšší viskozita matrice příčinou vzniku nepřesností při dávkování do blistrů. Viskozita většiny směsí pomocných látek byla pro dávkování do blistrů přiměřená, vždy však bylo nutné použít speciální pipetu pro viskózní vzorky.

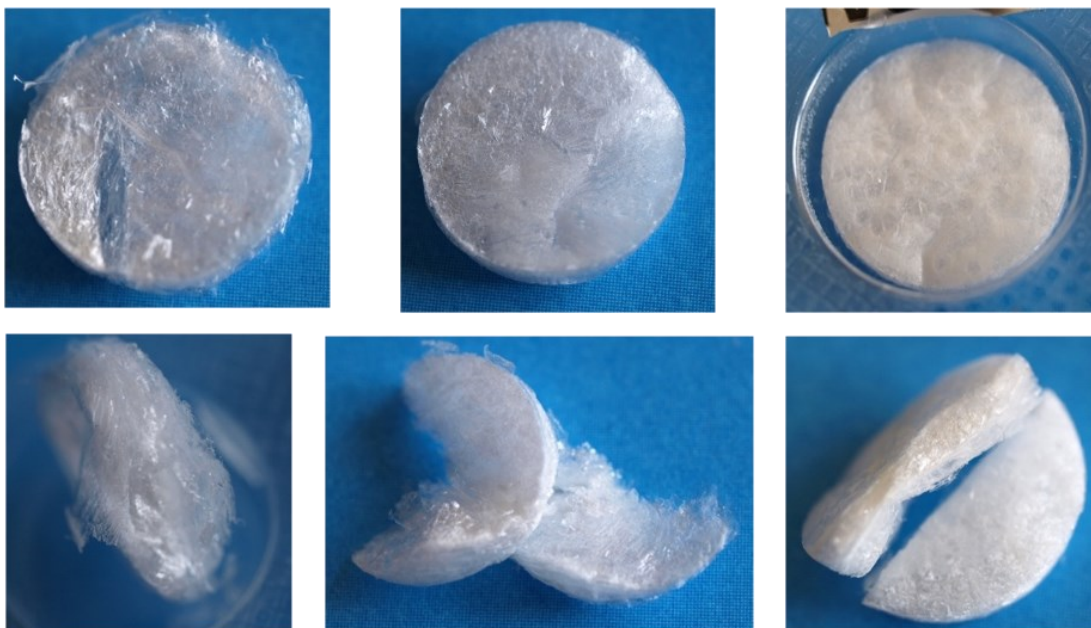
8.2 Vlastnosti lyofilizátů bez aktivní složky

Tato část shrnuje experimentální poznatky z laboratorní lyofilizace pomocných látek v různých koncentracích a jejich směsí. Požadovaným cílem byla vzhledově vyhovující a mechanicky odolná tableta s dobrou porézni strukturou a vhodnou dobou rozpadu.

Vzhled a struktura připravených lyofilizátů jsou zobrazeny v přehledech obrázků/fotografií tablet. Všechny tablety byly bílé nebo více či méně průhledné, případné odchylky v barvě jsou způsobeny pouze nesprávným vyvážením bílé při pořizování fotografií.

Dextran je považován za látku strukturotvornou, zlepšující vzhled lyofilizačního koláče a modifikující teplotu kolapsu.^{99,102} Pro účely formulační studie byly hodnoceny vzorky v koncentračním rozmezí 3 – 10%. Jak dokumentují fotografie (Obr. 17), mají lyofilizáty hezký vzhled, jsou bílé a perleťově lesklé. Tablety připravené pouze z dextransu jsou ale křehké a doba rozpadu je krátká (2 s). Pro dosažení efektivního účinku by měly tablety mít dobu rozpadu delší, aby doba setrvání tablety na sliznici dutiny ústní byla dostatečná pro kontakt aktivní složky.

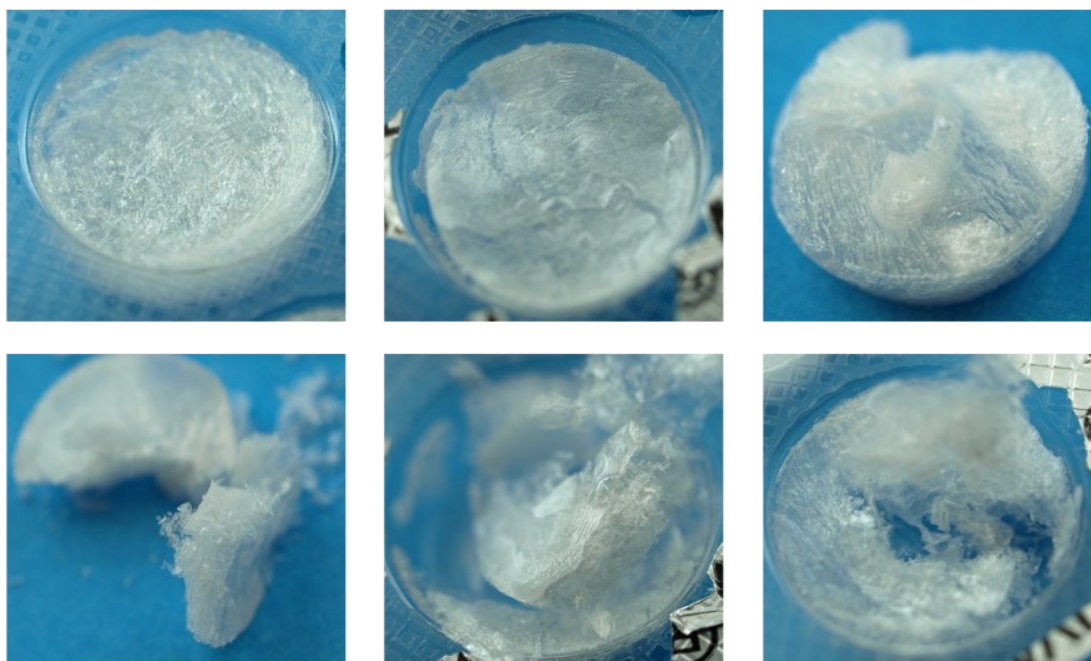
zvyšující se koncentrace DEXTRANU



Obr. 17: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací dextransu

Ve stejném koncentračním rozmezí byly lyofilizovány také roztoky trehalosy. Vlastnosti lyofilizátů jsou uvedeny souborně na Obr. 18. Tablety nebylo možné připravit, lyofilizáty byly křehké a kolabované a rozpadaly se během 1 s. Prakticky s nimi nebylo možné manipulovat, aniž by se mechanicky nepoškodily.

zvyšující se koncentrace TREHALOSY



Obr. 18: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací trehalosy

Mannitol patří mezi nejčastěji používané krystalické strukturotvorné látky.⁹⁸ Matrice D/M byly zprvu křehké, se stoupající koncentrací dextransu ale vznikaly tablety s dobrými mechanickými vlastnostmi (Obr. 19). Doba rozpadu však zůstala krátká (1 - 2 s). Za účelem zvýšení pevnosti a prodloužení doby rozpadu byla do matrice dextransu v koncentraci 3 – 10 % přidána rybí želatina v koncentraci 3%. Tablety získaly lepší strukturu a výraznější mechanickou odolnost, byly lehce vyjmutelné z blistru a doba rozpadu se prodloužila na cca 30 s. Jejich vlastnosti jsou ilustrovány na Obr. 20. Po rozpadu tablety zůstával na hladině zbobtnalý průhledný gelovitý zbytek, který se rozplynul (bez míchání) až za delší čas cca 10 - 15 min.

zvyšující se podíl DEXTRANU



Obr. 19: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/M

zvyšující se podíl DEXTRANU



Obr. 20: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/G

Vzhledem k časové zátěži i technickým potížím (laboratorní typ přístroje) nebyly některé vícesložkové kombinace studovány v této části práce, ale byly přímo lyofilizovány s aktivní složkou. Výsledky jsou shrnuty v následné kapitole.

8.3 Vlastnosti lyofilizátů s aktivní složkou

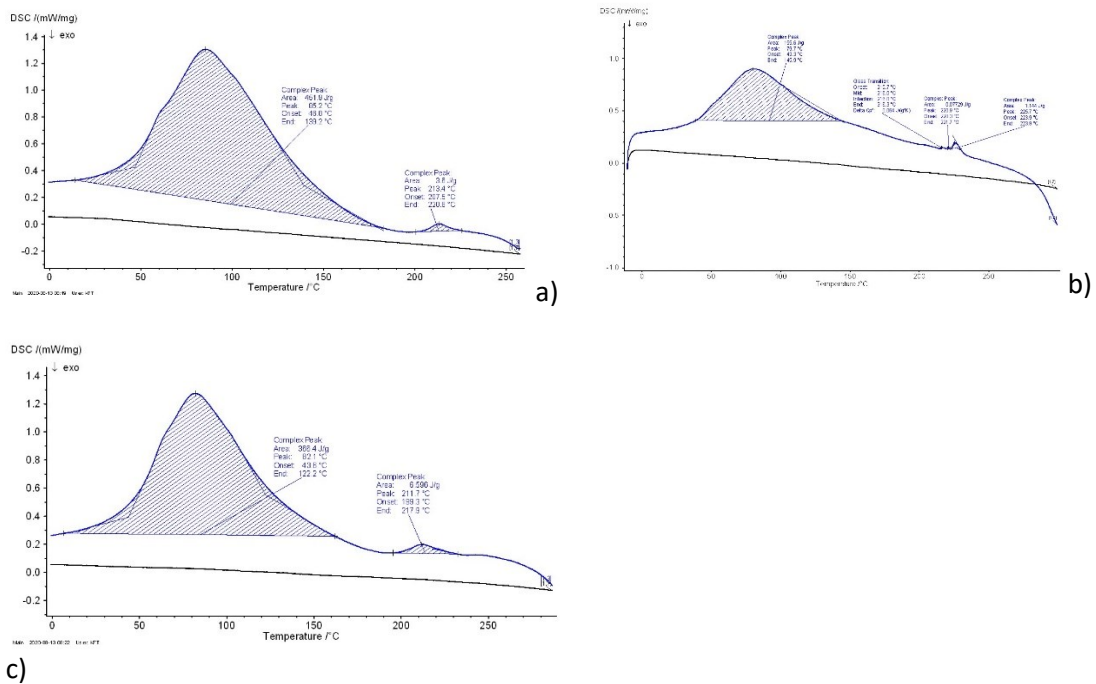
Pro přípravu lyofilizovaných tablet s aktivní složkou byla použita suspenze BPV, ve které byla koncentrace buněk upravena tak, aby obsahovala potřebnou vakcinační dávku v 0,5 ml (BPV0,5). Protože do blistru bylo plněno celkem 0,5 ml směsi matrice a BPV, bude potřebná dávka ve dvou finálních tabletách.

Tabulka 3 shrnuje výsledky hodnocení osmolality a pH některých vzorků s aktivní látkou. Vzorky BPV0,5 byly před měřením přefiltrovány přes membránový filtr, aby byly odstraněny buňky *Bordetella*, které by stanovení rušily. Osmolalita suspenze byla 316 mOsmol/kg, pH bylo přibližně neutrální. Jak ukazuje Tabulka 3, osmolalita ostatních vzorků byla v rozmezí cca 200 mOsmol/kg až 350 mOsmol/kg. Hodnota pH po smísení s pomocnými látkami mírně klesla, k čemuž přispívá rybí želatina i dextran.

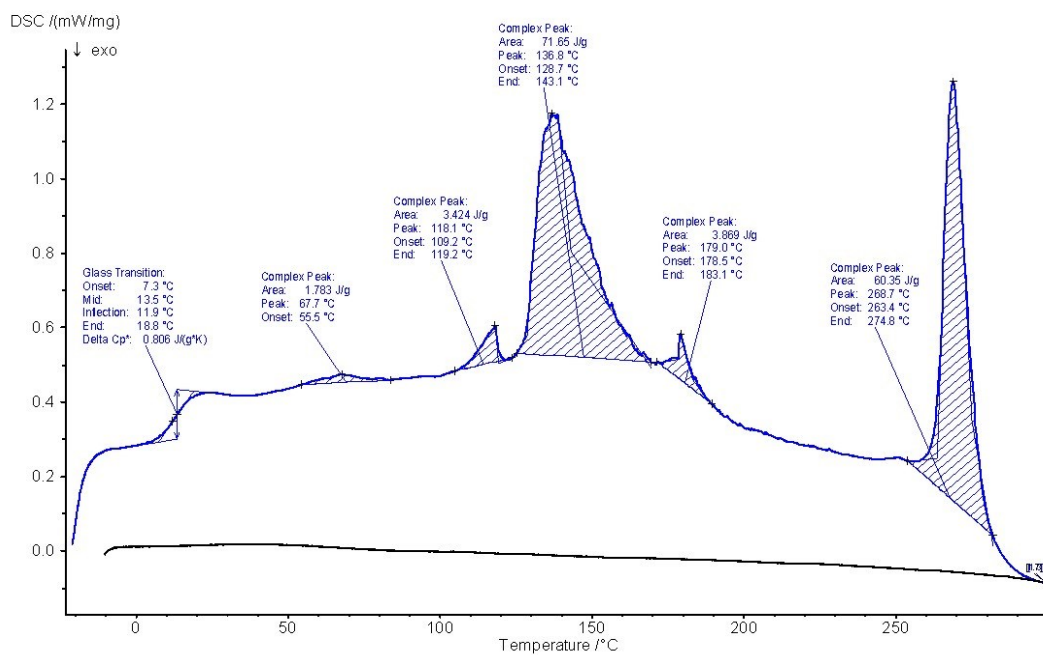
Tab. 3: Vlastnosti vybraných vzorků matric s aktivní látkou BPV

Vzorek	Osmolalita (mOsmol/kg)	pH
BPV0,5	316	7,16
D10/G3/BPV0,5	216	6,2
M3/G3/BPV0,5/SS0,07	354	6,16

Pro koncentrační rozmezí dextranu 3 – 10 % jsou na Obr. 21 ilustrovány termální charakteristiky vybraných matric s BPV. Je zřejmé, že přítomnost aktivní složky ovlivňuje T_g pouze mírně. Na Obr. 22 je podobně ilustrován termogram směsi 15% trehalosy a BPV0,5, na které se oproti termogramu T (Obr. 14) objevil skelný přechod při cca 13 °C. Hlubší studium těchto změn u směsí s aktivní složkou však nebylo předmětem práce, vyžadovalo by i náročnější instrumentální vybavení (např. MDSC, rentgenovou difrakci, apod.).



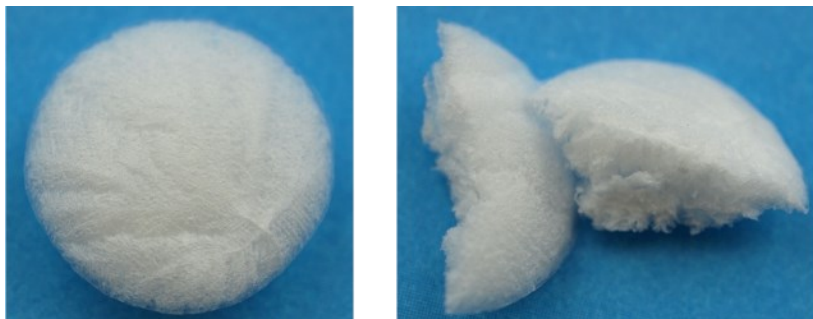
Obr. 21: Termogram D/BPV0,5: 3% a), 5% b), 10% c)



Obr. 22: Termogram T15/BPV0,5

V prvním kroku byly připraveny lyofilizované tablety s již osvědčeným složením z předchozí formulační studie⁹⁷, složené z mannitolu a rybí želatiny, do které byla přidána aktivní látka. Dle očekávání vznikly tablety vyhovujících vlastností a

vzhledu, které byly mechanicky odolné a měly homogenní strukturu. Jejich vlastnosti jsou uvedeny na Obr. 23.



Obr. 23: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z kombinace M/G/BPV0,5

Jak již bylo zmíněno, záměrem této práce bylo najít vhodnou alternativu rybí želatiny. Proces návrhu vhodné kompozice tablet s aktivní látkou BPV lze v souladu s předchozí částí rozdělit na dvě části, a to na část s dextransou jako stěžejní složkou a dále na část s trehalosou jako hlavní složkou. Studovány byly také jejich kombinace v různém koncentračním rozmezí a vzájemném poměru. Z velkého množství dat jsou vybrána ta podstatná, která shrnují poznatky z hodnocení vzhledu a vlastností tablet s aktivní látkou BPV0,5 formou přehledných obrázků. Jak již bylo dříve zmíněno, z časových a prostorových důvodů byly některé směsi lyofilizovány v plastových blistrech pouze v omezeném množství a doba rozpadu byla považována pouze za orientační informaci. Teprve u směsí, které měly požadované mechanické vlastnosti, byl následně připraven větší počet tablet a zkouška rozpadavosti byla opakována s větším počtem vzorků.

Vlastnosti lyofilizátů D/BPV0,5 při stoupající koncentraci dextransou jsou ilustrovány na Obr. 24. Je evidentní, že nebyly ovlivněny přítomností aktivní složky, a podobně jako samotné lyofilizáty dextransou byly křehké, po vyjmutí zůstával v blistru zbytek, na řezu byla patrná vrstevnatá struktura a jednotlivé vrstvy bylo možné od sebe oddělit. K rozpadu došlo téměř okamžitě (1 s). Podobně jako u samotné pomocné látky se odolnost zlepšovala zvýšením koncentrace D. Dextransou dává tabletám lesklý, perleťový vzhled.

zvyšující se podíl DEXTRANU



Obr. 24: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/BPV0,5

V koncentračním rozmezí 3 – 15 % se za podmínek laboratorní lyofilizace nepodařilo připravit lyofilizáty vhodných vlastností pouze z trehalosy a BPV0,5. Vzorky měly nevhodnou strukturu (byly zkolabované), koláč byl křehký a měl nehomogenní vzhled. Za příčinu lze považovat absenci plniva (strukturotvorné látky). Protože všechny vzorky poskytly srovnatelné výsledky, je zde znázorněna pro ilustraci pouze jedna fotografie (Obr. 25).



Obr. 25: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z kombinace T/BPV0,5

Byla proto dále testována také kombinace D/T/BPV0,5. Smísení pomocné látky s kryo/lyoprotektivní funkcí s plnivem umožnilo přípravu lyofilizátů s vhodnější strukturou. Tablety s nižší koncentrací D byly křehké. V koncentrační řadě 3-10% D při zachování koncentrace T, vznikly tablety s hladkým lesklým povrchem, které byly lehce vyjmutelné z blistru, případně vypadly samy a nezanechávaly na blistru zbytek. Byly ale stále relativně křehké. Jejich vlastnosti shrnuje Obr. 26. Zvýšením koncentrace trehalosy došlo ke kolapsu lyofilizačního koláče. Doba rozpadu byla krátká (1 s).



Obr. 26: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/T/BPV0,5

Předchozí zkušenosti z kombinace amorfnní a krystalické látky vedly také k úvaze o využití směsi **D/M**. Lyofilizáty byly zprvu křehké, některé byly popraskané a na řezu se odlamovaly malé části. Vlastnosti lze vidět na Obr. 27. Se zvyšující se koncentrací dextranu vznikaly pevnější tablety. Nejlepších výsledků a kompaktnosti se dosáhlo opět při nejvyšší koncentraci D. Doba rozpadu byla ale stále velmi krátká (1 s).



Obr. 27: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/M/BPV0,5

Za účelem zvýšení pevnosti produktů a prodloužení doby rozpadu byly v následujících krocích postupně přidávány polymery. Jako již ověřená varianta byl nejprve testován příravek **rybí želatiny** v koncentračním rozmezí 1 – 5 % k dextransu v koncentraci 3 – 10 %. Z obrázků je evidentní, že želatina dodala tabletě potřebné vlastnosti a strukturu. Lyofilizáty byly lehce vyjmutelné z blistru, pevné a mechanicky odolné, na řezu porézní. Jejich vlastnosti shrnuje Obr. 28. Doba rozpadu se výrazně prodloužila (19 s). Při hodnocení tablet byl pozorován po rozpadu tablety gelovitý zbytek, který zůstal na hladině a byl plně rozpuštěn až po delší době 5 – 10 min.

zvyšující se podíl DEXTRANU



Obr. 28a: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/G/BPV0,5

zvyšující se koncentrace RYBÍ ŽELATINY



Obr. 28b: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/G/BPV0,5

Ve snaze nahradit rybí želatinu byl zkoušen **povidon** v koncentraci 1 – 2 % a byl kombinován s dextranem, trehalosou a mannitolem. Tabletám s povidonem v kombinaci s dextranem chyběla pevná struktura. Byly velmi křehké. Vlastnosti těchto tablet shrnuje Obr. 29. Doba rozpadu byla velmi krátká (1 s).



Obr. 29: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/P/BPV0,5

Po přidání **povidonu k trehalose** se vytvořila průhledná kostra tablety, ale nevytvořil se kompaktní koláč. Nebylo tedy možné tabletu z blistru vyjmout, dotykem se okamžitě rozpadla. Ukázka lyofilizátu je uvedena na Obr. 30.



Obr. 30: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z kombinace T/P/BPV0,5

Ani přidání **povidonu** ke kombinaci **D/T** nepřineslo lepší výsledky. Vlastnosti těchto tablet jsou vyobrazeny na Obr. 31. Tablety měly horší vlastnosti: byly křehké, neměly homogenní strukturu, místy byly průhledné (sklovité) a rozpadly se během 1–2 s.



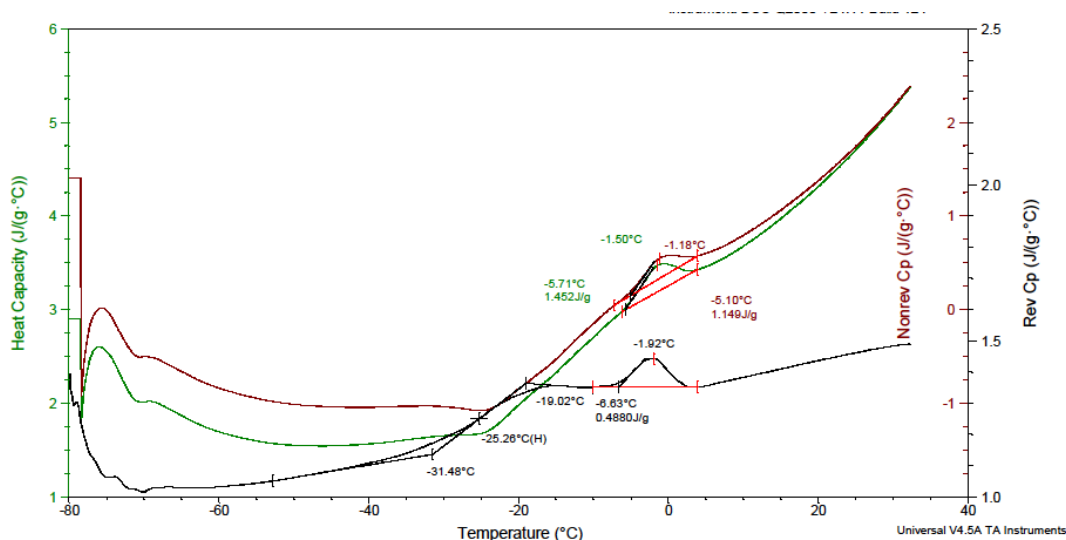
Obr. 31: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z kombinace D/T/P/BPV0,5

Ani přídavek **povidonu** ke kombinaci **D/M** neupravil vlastnosti lyofilizátů, jak bylo očekáváno. Na Obr. 32 jsou ilustrovány jejich vlastnosti. Doba rozpadu se sice prodloužila na 6 - 9 s, ale podobně jako předchozí varianty vykazovaly tablety často kolaps a neměly homogenní strukturu.



Obr. 32: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/M/P/BPV0,5

Příčinou tohoto jevu mohlo být částečné rozmrazení vzorků při jejich přemístování z mrazicího zařízení do lyofilizátoru. Příčina byla studována pomocí modulovaného DSC (MDSC, TA Instruments) ve spolupráci s Laboratoří zkušebnictví a hodnocení firmy Synpo, a.s. Pardubice. Termogram povidonu na Obr. 33 znázorňuje jeho T_g v záporné oblasti ($-25,3\text{ °C}$), což je důležité pro chování zmrazeného vzorku. Je zřejmé, že pro zachování struktury koláče musí být udržena teplota pod -25 °C . S ohledem na transport vzorku z mrazicího zařízení do laboratorního lyofilizátoru, došlo pravděpodobně k dílčímu roztátí zmrazeného vzorku a jeho kolapsu.



Obr. 33: Termogram povidonu 25

Mezi polymery vhodnými pro lyofilizáty se velmi často zmiňuje také makrogol (MG).^{96,98} Po nahrazení povidonu makrogolem u výše zmíněné kompozice vznikly tablety s rozdílnými výsledky (Obr. 34). Některé tablety byly kolabované, měly nehomogenní strukturu a místy byly sklovité (průhledné). Některé z nich měly naopak hezký vzhled, byly homogenní a měly pevnou strukturu. Z výsledků vyplynulo, že makrogol by mohl pomoci dosáhnout očekávané struktury koláče.



Obr. 34: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/M/MG/BPV0,5

Po přidání MG ke kombinaci s D/T byly získány vzhledově lepší tablety, s dobrou strukturou, ale byly stále křehké (Obr. 35)



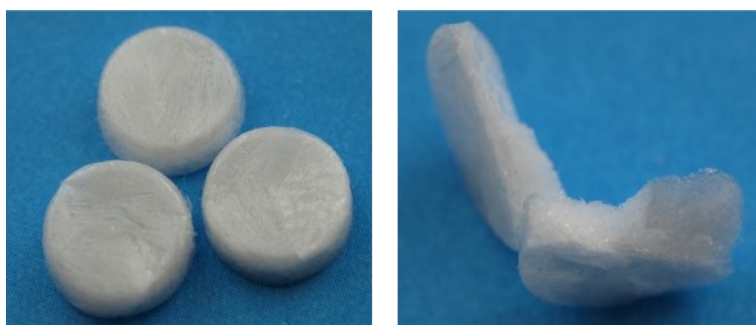
Obr. 35: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/T/MG/BPV0,5

Navíc se subjektivním hodnocením chuti, které bylo u lyofilizátů průběžně testováno dobrovolníky, ukázalo, že vzorky obsahující makrogol byly po ochutnání hodnoceny jako hořké.

Jako alternativa rybí želatiny byl v předchozí studii⁹⁷ navrhován **karagenan iota**. V této diplomové práci byla studována kombinace s dextranskem a dalšími pomocnými látkami (makrogol, hydrogenfosfát draselný). Tablety měly velmi dobrý vzhled, mechanické vlastnosti i strukturu. Jejich vlastnosti ukazuje Obr. 36. Doba rozpadu je ale oproti vzorkům s rybí želatinou stále kratší (5 s).



Obr. 36a: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z různých koncentrací kombinace D/CRI/MG/BPV0,5



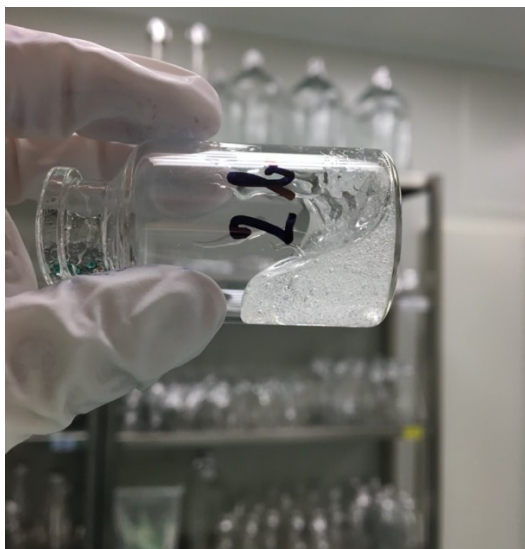
Obr. 36b: Vzhled a struktura lyofilizátů získaných z kombinace D/CRI/MG/KHP/BPV0,5

Po přidání sladidla, sodné soli sacharinu v 0,07% koncentraci, byla chuť tablet subjektivně posouzena jako vyhovující. Výsledná kombinace pomocných látek se v závěrečném hodnocení jevila jako nejvhodnější pro přípravu orálních

lyofilizovaných tablet s aktivní složkou. Kromě hodnocení chuti tablet byla po aplikaci rovněž subjektivně hodnocena míra adhezivity k bukální sliznici. Bylo zaznamenáno ulpění tablet na sliznici tváře s pomalým vymýváním slinami.

8.4 Hodnocení postupu přípravy

Jak bylo již komentováno dříve, v suspenzi BPV v izotonickém roztoku chloridu sodného byly za laboratorní teploty rozpuštěny všechny dobře rozpustné pomocné látky v potřebné koncentraci. Příprava i dávkování těchto vzorků bylo bezproblémové. Vzorky obsahující želatinu nebo karagenan iota byly nejdříve rozpuštěny ve vodě pro HPLC za použití vodní lázně (60 °C) a po vychladnutí byly smíseny se suspenzí BPV. Vzorky tedy byly vždy 2x koncentrovanější a očekávaná koncentrace vznikla až po přidavku stejného objemu suspenze BPV. Dávkování vzorků s želatinou bylo i přesto bezproblémové. Naopak vzorky s karagenanem byly viskóznější. Při laboratorní lyofilizaci byl vzorek matrice smísen s aktivní složkou ihned. Při přípravě na poloprovodním lyofilizátoru (Aumed, a.s., Brno) musely však matrice být připraveny předem a byly uchovány v chladu. Stáním získaly gelovitou konzistenci (Obr. 37), musely být mírně zahřáty pomocí vodní lázně (40 °C) a po smísení s BPV dlouho homogenizovány.



Obr. 37: Vzorek matrice s CRI za laboratorní teploty

Při přípravě se používaly pipety pro viskózní vzorky, aby se předešlo nestejném nadávkování do blistrů. Nezabránilo se ovšem ztrátám vzorku

danými ulpíváním směsi na stěnách laboratorního skla. Nicméně ke kontextu změn viskozity je nutné poznamenat, že při vlastní výrobě bude s poloprodukty manipulováno bez prodlev a budou hned dávkovány, tedy popisované problémy odpadnou. V případě použití povidonu byla problémem pouze vyšší viskozita jeho 2% roztoku.

9 Závěry

Výsledky této experimentální vývojové diplomové práce zaměřené na přípravu lyofilizátů dovolují shrnout následující závěry:

1. Výsledky diferenciální skenovací kalorimetrie prokázaly krystalickou strukturu karagenanu iota a mannitolu a amorfní strukturu rybí želatiny, dextransu 40, povidonu 25 a makrogolu 300. Trehalosa vykazovala polymorfii s podílem krystalické i amorfní složky.
2. Výsledky hodnocení matric bez aktivní složky
 - a. Lyofilizáty dextransu mají dobrý vzhled a strukturu, ale jsou křehké. Jako nejvhodnější se ukázala koncentrace 10 %.
 - b. Lyofilizované tablety s trehalosou byly velmi křehké a kolabované, bez ohledu na koncentraci nevytvořily koláč vhodné struktury.
 - c. Pro kombinaci s dextransem je vhodný mannitol a rybí želatina, která navíc prodloužila dobu rozpadu lyofilizátů.
3. Výsledky hodnocení matric s aktivní složkou ukázaly, že BPV vlastnosti matric neovlivňuje a rozhodující je vždy kombinace zvolených pomocných látek. Vhodná koncentrace buněk pro dávku v suspenzi je 20×10^9 .
 - a. Po přidání aktivní složky ke kombinaci dextransu a trehalosy zůstaly lyofilizáty křehké. S rostoucí koncentrací dextransu se vlastnosti zlepšovaly, avšak se zvýšením podílu trehalosy došlo ke kolapsu lyofilizačního koláče.
 - b. Lyofilizáty tvořené kombinací rybí želatiny a dextransu měly vhodnou strukturu a mechanickou odolnost. Pozitivně je rovněž hodnocena prodloužená doba rozpadu, která naznačuje delší kontakt lyofilizátu se sliznicí po aplikaci.
 - c. Použití povidonu se za laboratorních podmínek neosvědčilo. Byla potvrzena nízká teplota skelného přechodu v záporné oblasti ($-25 \text{ }^\circ\text{C}$). Pro dosažení vhodné struktury lyofilizátu je nezbytné udržet zmražený vzorek pod touto teplotou, jinak dochází ke kolapsu koláče.
 - d. Lyofilizáty tvořené kombinací makrogolu, dextransu a mannitolu měly dobrou strukturu i mechanickou odolnost, lyofilizáty s makrogolem v kombinaci s dextransem a trehalosou však byly křehké.

- e. Jako vhodná alternativa rybí želatiny se osvědčil karagenan iota. V kombinaci s dextranem a makrogolem měly lyofilizáty výbornou mechanickou odolnost, vyhovující strukturu a vzhled a prodlouženou dobu rozpadu.
 - f. Za negativní lze považovat hořkou chuť makrogolu, kterou lze korigovat přidavkem sodné soli sacharinu jako sladidla. Přídavek sladidla vlastnosti lyofilizátů neovlivňuje.
4. Celkové zhodnocení postupu přípravy
- a. Dextran, trehalosa a mannitol jsou snadno rozpustné ve vodě za laboratorní teploty. Povidon je rovněž rozpustný ve vodě za laboratorní teploty, avšak jeho 2% roztok je značně viskózní.
 - b. Rybí želatina a karagenan iota vyžadují rozpouštění ve vodě za zvýšené teploty (vodní lázeň). Pro mísení s aktivní složkou je nezbytné připravit matrici v polovičním množství s dvojnásobnou koncentrací složek.
 - c. Přidání hydrogenfosfátu draselného viskozitu roztoku karagenanu iota snižuje.
 - d. Rozpouštění karagenanu iota při teplotě 40 °C prodlouží čas přípravy, ale umožňuje pracovat přímo se suspenzí aktivní složky. Přípravu předem a delší stání matrice nelze doporučit pro tvorbu gelu, což prodlužuje dobu homogenizace s aktivní složkou, zvyšuje riziko nepřesného dávkování a ztrát vzorku při dávkování do blistru.

10 Použitá literatura

¹ FRANC, A.: Vakcíny z pohledu farmaceuta. *Čes. Slov. Farm.*, 2020, 69, s.151-152.
ISSN: 1210-7816

² HILLERY, A. M., PARK, K. (Ed.): *Drug delivery: Fundamentals & applications*.
2nd Ed., 2017. Boca Raton, Florida: CRC Press (Taylor & Francis Group), 614 s.,
ISBN: 978-1-4822-1771-1

³ *Český lékopis 2017, Doplněk 2020*, Praha, Grada Publishing, a.s., 2040 s., ISBN: 978-
80-271-1757-4. *Obecné články, Vaccina ad usum humanum*. s. 941-945

⁴ CHAPEL, H., HAENEY, M., MISBAH, S. A., SNOWDEN, N.: *Základy klinické
imunologie*. 6. vydání, 2018. Praha: Triton, 360 s., ISBN 978-80-7553-396-8

⁵ JÍLEK, P.: *Základy imunologie*. 2. vydání, 2008. Praha: Anyway, 79 s., ISBN 978-
80-254-2422-3

⁶ WEN, E.P., ELLIS, R., PUJAR, N. S. (Eds.): *Vaccine development and
manufacturing*. 2015. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 440 s., ISBN 978-0-470-
26194-1

⁷ CDC: *Principles of vaccination*.

<https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/prinvac.pdf> (27.1.2021)

⁸ MINOR, P. D.: Live attenuated vaccines: historical successes and current
challenges. *Virology*, 2015, 479-480, s. 379–392. ISSN: 1096-0341

⁹ WHO: *BCG Vaccine*. [https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-
standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/bcg](https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/bcg) (16.6.2021)

¹⁰ WHO: *Vaccine safety training (e-learning course). Live attenuated vaccines (LAV)*
<https://vaccine-safety-training.org/live-attenuated-vaccines.html> (14.2.2021)

¹¹ WHO: *Vaccine safety training (e-learning course). Inactivated whole-cell (killed
antigen) vaccines* [https://vaccine-safety-training.org/inactivated-whole-cell-
vaccines.html](https://vaccine-safety-training.org/inactivated-whole-cell-vaccines.html) (14. 2. 2021)

¹² WHO: *Vaccine safety training (e-learning course). Subunit vaccines*.
<https://vaccine-safety-training.org/subunit-vaccines.html> (14.2.2021)

-
- ¹³ WHO: *Vaccine safety training (e-learning course). Toxoid vaccines.*
<https://vaccine-safety-training.org/toxoid-vaccines.html> (14.2.2021)
- ¹⁴ EMA: *Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use.*
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-adjuvants-vaccines-human-use-see-also-explanatory-note_en.pdf (25.4.2021)
- ¹⁵ SOEMA, P. C., KOMPIER, R., AMORIJ, J.-P., KERSTEN, G. F.A.: Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, 94, s. 251-263. ISSN: 0939-6411
- ¹⁶ BERAN, J., HAVLÍK, J.: *Chřipka. Klinický obraz, prevence a léčba.* 2. vydání, 2005. Praha: Maxdorf, 175 s., ISBN: 978-80-7345-073-1
- ¹⁷ HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J.: *Základy imunologie.* 4. vydání, 2009. Praha: Triton, 340 s., ISBN 978-80-7387-280-9.
- ¹⁸ GAVI (The Vaccine Alliance): *What are viral vector-based vaccines and how could they be used against COVID-19?* <https://www.gavi.org/vaccineswork/what-are-viral-vector-based-vaccines-and-how-could-they-be-used-against-covid-19> (16.6.2021)
- ¹⁹ WHO: *DNA vaccines.* <https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/dna> (25.2.2021)
- ²⁰ SRIVASTAVA, I. K., LIU, M. A.: Gene vaccines. *Ann. Intern. Med.* 2003, 138 (7), s. 550-559. ISSN: 1539-3704
- ²¹ KHAN, K. H.: DNA vaccines: roles against diseases. *Germes*, 2013, 3 (1), s. 26-35. ISSN: 22482997
- ²² VERBEKE, R., LENTACKER, I., DE SMEDT, S. C., DEWITTE, H.: Three decades of messenger RNA vaccine development. *Nano Today*, 2019, 28. ISSN: 1748-0132 <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100766>
- ²³ FDA: *FDA Takes Key Action in Fight Against COVID-19 By Issuing Emergency Use Authorization for First COVID-19 Vaccine.*
<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-takes-key-action-fight-against-covid-19-issuing-emergency-use-authorization-first-covid-19> (26.2.2021)

²⁴ SÚKL: *Vakcína Comirnaty od firem Pfizer a BioNTech získala podmíněčnou registraci*. Tisková zpráva k činnosti SÚKL. <https://www.sukl.cz/sukl/evropska-agentura-pro-lecive-pripravky-doporucila-udelit-1> (26.2.2021)

²⁵ Evropská komise: *Comirnaty 500 mikrogramů/ml koncentrát pro injekční disperzi*. Souhrn údajů o přípravku (SPC).

https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2021/20210223151110/anx_151110_cs.pdf (28.2.2021)

²⁶ EMA: *COVID-19 Vaccine Moderna injekční disperze* (Souhrn údajů o přípravku, SPC) https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-moderna-epar-product-information_cs.pdf (28.2.2021)

²⁷ Evropská komise: *COVID-19 Vaccine AstraZeneca injekční suspenze*. Souhrn údajů o přípravku (SPC).

https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2021/20210129150842/anx_150842_cs.pdf (28.2.2021)

²⁸ EMA: *COVID-19 Vaccine Janssen suspension for injection*. Summary of Product Characteristics (SPC).

https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-janssen-epar-product-information_en.pdf (17.6.2021)

²⁹ WHO: *Status of COVID-19 vaccines*.

https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status_of_COVID-19_Vaccines_within_WHO_EUL-PQ_evaluation_process-16June2021_Final.pdf (17.6.2021)

³⁰ AMORIJ, J.P., KERSTEN, G. F.A., SALUJA, V., TONNIS, W. F., W. L. J. HINRICHS, SLÜTTER, B., BAL, S. M., BOUWSTRA, J. A., HUCKRIEDE, A., JISKOOT, W.: Towards tailored vaccine delivery: needs, challenges and perspectives. *J. Control. Release*, 2012, 161 (2), s. 363–376, ISSN: 1873-4995

³¹ WHO: *Vaccine safety training (e-learning course)*. *Components of a vaccine*. <https://vaccine-safety-training.org/vaccine-components.html> (16.6.2021)

-
- ³² CDC: *What's in Vaccines?* <https://www.cdc.gov/vaccines/parents/ingredients.html> (16.6.2021)
- ³³ BRANTZAEG, P.: Function of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue in Antibody Formation. *Immunol. Investig.* 2010, 39 (4-5), s. 303-355. ISSN: 1532-4311
- ³⁴ WANG, J., THORSON, L., STOKES, R.W., SANTOSUOSSO, M., HUYGEN, K., ZGANIACZ, A., HITT, M., XING, Z.: Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis. *J. Immunol.*, 2004, 173 (10), s. 6357–6365. ISSN: 1550-6606
- ³⁵ LYCKE, N., BEMARK, M.: Mucosal adjuvants and long-term memory development with special focus on CTA1-DD and other ADP-ribosylating toxins. *Mucosal Immunol.*, 2010, 3 (6), s. 556–566. ISSN: 1935-3456
- ³⁶ OWEN, L. J., SAHAY, B., MOHAMADZADEH, M.: New generation of oral mucosal vaccines targeting dendritic cells. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013, 17 (6), s. 918-924. ISSN: 1367-5931
- ³⁷ RENUKUNTLA, J., VADLAPUDI, A.D., PATEL, A., BODDU, S.H.S., MITRA, A.K.: Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int. J. Pharm.*, 2013, 447 (1-2), s. 75–93. ISSN: 1873-3476
- ³⁸ RAMIREZ, J. E., SHARPE, L. A., PEPPAS, N. A.: Current state and challenges in developing oral vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2017, 114, s. 116–131. ISSN: 1872-8294
- ³⁹ MITRAGOTRI, S., BURKE, P.A., LANGER, R.: Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2014, 13 (9), s. 655–672. ISSN: 1474-1784
- ⁴⁰ IBRAHEEM, D., ELAISSARI, A., FESSI, H.: Administration strategies for proteins and peptides. *Int. J. Pharm.*, 2014, 477 (1-2), s. 578–589. ISSN: 1873-3476
- ⁴¹ RESCIGNO, M., URBANO, M., VALZASINA, B., FRANCOLINI, M., ROTTA G., BONASIO, R., GRANUCCI, F., KRAEHENBUHL, J.P., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.: Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut

-
- epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.*, 2001, 2 (4), s. 361–367. ISSN: 1529-2916
- ⁴² BRAYDEN, D.J., JEPSON, M.A., BAIRD, A.W.: Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov. Today*, 2005, 10 (17), s. 1145–1157. ISSN: 1359-6446
- ⁴³ PAVOT, V., ROCHEREAU, N., GENIN C., VERRIER, B., PAUL, S.: New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine*, 2012, 30 (2), s. 142–154. ISSN: 0264-410X
- ⁴⁴ DAVITT, C.J.H., LAVELLE, E.C.: Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015, 91, s. 52–69. ISSN: 0169-409X
- ⁴⁵ MESTECKY, J., RUSSELL, M.W., ELSON, C.O.: Perspectives on mucosal vaccines: is mucosal tolerance a barrier? *J. Immunol.*, 2007, 179 (9), s. 5633–5638. ISSN: 1550-6606
- ⁴⁶ OGRA, P.L., FADEN, H., WELLIVER, R.C.: Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, 14 (2), s. 430–445. ISSN: 1098-6618
- ⁴⁷ GOULD-FOGERITE, S., MANNINO, R. J.: Mucosal and systemic immunization using cochleate and liposome vaccines. *J. Liposome Res.*, 1996, 6 (2), s. 357–379. ISSN: 1532-2394
- ⁴⁸ ARORA, R.: Advances in niosome as a drug carrier: a review. *Asian J. Pharm.*, 2016, 9, s. 29–39. ISSN: 1998-409X
- ⁴⁹ JAIN, S., KHOMANE, K. K., JAIN, A., DANI, P.: Nanocarriers for transmucosal vaccine delivery. *Curr. Nanosci.*, 2011, 7 (2), s. 160–177. ISSN: 1875-6786
- ⁵⁰ NARASIMHAN, B., GOODMAN, J. T., RAMIREZ, J. E. V.: Rational design of targeted next-generation carriers for drug and vaccine delivery. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2016, 18, s. 25–49. ISSN: 1545-4274
- ⁵¹ ZHU, Q., TALTON, J., ZHANG, G., CUNNINGHAM, T., WANG, Z., WATERS, R. C., KIRK, J., EPPLER, B., KLINMAN, D. M., SUI, Y., GAGNON, S.: Large

intestine-targeted, nanoparticle-releasing oral vaccine to control genitorectal viral infection. *Nature Med.*, 2012, 18 (8), s. 1291-1296. ISSN: 1546-170X

⁵² BAKKER, W. A., THOMASSEN, Y. E., VAN'T OEVER, A. G., WESTDIJK, J., VAN OIJEN, M. G., SUNDERMANN, L. C., VAN'T VELD, P., SLEEMAN, E., VAN NIMWEGEN, F. W., HAMIDI, A., KERSTEN, G. F.: Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine*, 2011, 29 (41), s. 7188–7196. ISSN: 0264-410X

⁵³ SÚKL: *Vivotif enterosolventní tvrdé tobolky*. Souhrn údajů o přípravku (SPC). <https://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC142661.pdf&type=spc&as=vivotif-spc> (16.6.2021)

⁵⁴ EMA: *Dukoral suspenze a šumivé granule pro perorální suspenzi*. Souhrn údajů o přípravku (SPC). https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dukoral-epar-product-information_cs.pdf (16.6.2021)

⁵⁵ EMA: *Rotarix prášek a rozpouštědlo pro perorální suspenzi*. Souhrn údajů o přípravku (SPC). [ema.europa.eu/en/documents/product-information/rotarix-epar-product-information_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rotarix-epar-product-information_cs.pdf) (16.6.2021)

⁵⁶ KRAAN, H., VRIELING, H., CZERKINSKY, C., JISKOOT, W., KERSTEN, G., AMORIJ, J.-P.: Buccal and sublingual vaccine delivery. *J. Control. Release*, 2014, 190, s. 580-592. ISSN: 1873-4995

⁵⁷ TREUTING, P. M., DINTZIS, S., LIGGITT, D., FREVERT, CH. W. (Eds.): *Comparative Anatomy and Histology*. 2012. San Diego: Academic Press, 474 s., ISBN: 9780123813626. TREUTING, P. M., MORTON, T. H.: *Oral Cavity and teeth*. s. 95-110

⁵⁸ SUDHAKAR, Y., KUOTSU, K., BANDYOPADHYAY, A.K.: Buccal bioadhesive drug delivery – A promising option for orally less efficient drugs. *J. Control. Rel.*, 2006, 114 (1), s. 15-40. ISSN: 0168-3659

-
- ⁵⁹ SCHOLZ, O. A., WOLFF, A., SCHUMACHER, A., GIANNOLA, L. I., CAMPISI, G., CIACH, T., VELTEN, T.: Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device. *Drug Discov. Today*, 2008, 13 (5-6), s. 247-253. ISSN: 1359-6446
- ⁶⁰ GAJDZIOK, J., VETCHÝ, D.: Dutina ústní jako aplikační místo pro přívod léčiva do organismu. *Prakt. lékáren.*, 2016; 12(2), s. 63–65. ISSN: 1803-5329
- ⁶¹ ERIKSSON, K., AHLFORS, E., GEORGE-CHANDY, A., KAISERLIAN, D., CZERKINSKY, C.: Antigen presentation in the murine oral epithelium, *Immunology*, 1996, 88 (1), s. 147–152. ISSN: 1365-2567
- ⁶² DESVIGNES, C., ESTÈVES, F., ETCHART, N., BELLA, C., CZERKINSKY, C., KAISERLIAN, D.: The murine buccal mucosa is an inductive site for priming class I restricted CD8+ effector T cells in vivo. *Clin. Exp. Immunol.*, 1998, 113 (3), s. 386-393. ISSN: 1365-2249
- ⁶³ KUNKEL, E.J., CAMPBELL, D.J., BUTCHER, E.C.: Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation*, 2003, 10 (3–4), s. 313–323. ISSN: 1549-8719
- ⁶⁴ SUTHERLAND, D. B., FAGARASAN, S.: IgA synthesis: a form of functional immune adaptation extending beyond gut. *Curr. Opin. Immunol.*, 2012, 24 (3), s. 261-268. ISSN: 0952-7915
- ⁶⁵ NEGRI, D. R. M., RICCOMI, A., PINTO, D., VENDETTI S., ROSSI, A., CICCONI, R., RUGGIERO, P., DEL GIUDICE, G., DE MAGISTRIS, M. T.: Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization, *Vaccine*, 2010, 28 (25), s. 4175–4180. ISSN: 0264-410X
- ⁶⁶ HERVOUET, C., LUCI, C., ÇUBURU, N., CREMEL, M., BEKRI, S., VIMEUX, L., MARAÑÓN, C., CZERKINSKY, C., HOSMALIN, A., ANJUÈRE, F.: Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in the mouse female genital tract, *Vaccine*, 2010, 28 (34), s. 5582–5590. ISSN: 0264-410X

-
- ⁶⁷ LAL M., WHITE J., ZHU C.: Preparing an Adjuvanted Thermoresponsive Gel Formulation for Sublingual Vaccination. *Methods Mol. Biol.*, 2017, 1494, s. 153-163. ISSN: 1064-3745
- ⁶⁸ BAKKE, H., SAMDAL, H. H., HOLST, J., OFTUNG, F., HAUGEN, I. L., KRISTOFFERSEN, A.-C., HAUGAN, A., JANAKOVA, L., KORSVOLD, G. E., KROGH, G., ANDERSEN, E. A. S., DJUPESLAND, P., HOLAND, T., RAPPUOLI, R., HANEBERG, B.: Oral spray immunization may be an alternative to intranasal vaccine delivery to induce systemic antibodies but not nasal mucosal or cellular immunity. *Scand. J. Immunol.*, 2006, 63 (3), s. 223–231. ISSN: 1365-3083
- ⁶⁹ CHEN, D.J.: Formulation of HPV Dry Powder Wafers for Sublingual Vaccination. Undergraduate Honors Theses. 2012. University of Colorado at Boulder, Department of Chemistry and Biochemistry, 30 s.
- ⁷⁰ TAJAROBI F., ABRAHMSÉN-ALAMI S., HANSEN M., LARSSON A.: The impact of dose and solubility of additives on the release from HPMC matrix tablets—identifying critical conditions. *Pharm. Res.*, 2009, 26 (6), s. 1496–1503. ISSN: 1573-904X
- ⁷¹ BORDE, A., EKMAN, A., HOLMGREN, J., LARSSON, A.: Effect of protein release rates from tablet formulations on the immune response after sublingual immunization. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2012, 47 (4), s. 695–700. ISSN: 1879-0720
- ⁷² KIYONO, H.; PASCUAL, D. W. (Ed.): *Mucosal Vaccines: Innovation for Preventing Infectious Diseases*. 2nd Ed., 2020. London: Elsevier/Academic Press, 915 s., ISBN 978-0-12-811924-2. RHEE, J. H.: *Current and New Approaches for Mucosal Vaccine Delivery*. s. 325-356
- ⁷³ ENGLAND, R. J.; HOMER, J. J.; KNIGHT, L. C.; ELL, S. R.: Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.*, 1999, 24 (1), s. 67-68. ISSN 1749-4486
- ⁷⁴ FDA: *Vaccines Licensed for Use in the United States*
<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/vaccines-licensed-use-united-states> (15.6.2021)

-
- ⁷⁵ FDA: *FluMist Quadrivalent*. Package Insert.
<https://www.fda.gov/media/120689/download> (16.6.2021)
- ⁷⁶ KENNEY R. T., FRECH S. A., MUENZ L. R., VILLAR C. P., GLENN G. M.: Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 351(22), s. 2295–2301. ISSN: 1533-4406
- ⁷⁷ MUTSCH, M., ZHOU, W., RHODES P., BOPP M., CHEN R. T., LINDER T., SPYR CH., STEFFEN R.: Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 350(9), s. 896–903. ISSN: 1533-4406
- ⁷⁸ PARKINS, K.: *Who is exploring alternative delivery methods for Covid-19 vaccines?* <https://www.clinicaltrialsarena.com/analysis/who-is-exploring-alternative-delivery-methods-for-covid-19-vaccines/> (15.6.2021)
- ⁷⁹ WHO: *COVID-19 vaccine tracker and landscape*.
<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (15.6.2021)
- ⁸⁰ RAWAT, K., KUMARI, P., SAHA, L.: COVID-19 vaccine: A recent update in pipeline vaccines, their design and development strategies. *Eur. J. Pharmacol.*, 2021, 892. ISSN: 1879-0712 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173751>
- ⁸¹ LAMBERT, P.H.; LAURENT, P.E.: Intradermal vaccine delivery: Will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine*, 2008, 26 (26), s. 3197-3208. ISSN: 0264-410X
- ⁸² NESTLE, F.O., DI MEGLIO, P., QIN, J.Z., NICKOLOFF, B.J.: Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, 9 (10), s. 679–691. ISSN: 1474-1741
- ⁸³ BAL, S. M., DING Z., VAN RIET, E., JISKOOT, W., BOUWSTRA, J. A.: Advances in transcutaneous vaccine delivery: Do all ways lead to Rome? *J. Control. Release.*, 2010, 148 (3), s. 266-282. ISSN: 1873-4995
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910007832>

-
- ⁸⁴ HETTINGA, J., CARLISLE, R.: Vaccination into the Dermal Compartment: Techniques, Challenges, and Prospects, *Vaccines.*, 2020, 8 (3). ISSN: 2076-393X
<https://doi.org/10.3390/vaccines8030534>
- ⁸⁵ BIRD, J. A., SÁNCHEZ-BORGES, M., ANSOTEGUI, I. J., EBISAWA, M., MARTEL, J. A. O.: Skin as an immune organ and clinical applications of skin-based immunotherapy. *World Allergy Organ. J.*, 2018, 11 (1). ISSN: 1939-4551
<https://doi.org/10.1186/s40413-018-0215-2>
- ⁸⁶ FDA: *Afluria Quadrivalent, Afluria Quadrivalent Southern Hemisphere*
<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/afluria-quadrivalent-afluria-quadrivalent-southern-hemisphere> (15.6.2021)
- ⁸⁷ CDC: *Flu Vaccination by Jet Injector* <https://www.cdc.gov/flu/prevent/jet-injector.htm> (15.6.2021)
- ⁸⁸ SZÚ: Černý kašel – základní informace. <http://www.szu.cz/tema/prevence/cerny-kasel-davivy-kasel-pertuse-zakladni-informace> (17.6.2021)
- ⁸⁹ RUMLAROVÁ, Š., Očkování proti černému kašli – současný stav a výhledy do budoucna. *Remedia*. 2012, 22, s. 82-85, ISSN: 2336-3541
- ⁹⁰ FABIÁNOVÁ, K., ZAVADILOVÁ, J., LENZ, P., ŠEBESTOVÁ, H., KYNČL, J.: Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2019 – epidemiologická situace. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2020, 29 (10), s. 402-410
http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Pertuse/402_410_CEM_10_2020_pertuse.pdf
- ⁹¹ AUMED, a.s.: Černý kašel. <https://aumed.cz/vyzkum/cerny-kasel/> (15.6.2021)
- ⁹² Česká vakcinologická společnost ČLS JEP: *Dětský očkovací kalendář hrazeného očkování v ČR platný od 1. 1. 2021*
http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Ockovani/ockovaci_kalendar_pro_deti_2021_01_01.pdf (17.6.2021)
- ⁹³ Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH: *Smart Freeze Drying*. Brožura.
https://www.martinchrist.de/fileadmin/user_upload/christ/04_anwendungen/lyophilisation/Smart_FD_Basics_Apps_en.pdf (16.6.2021)

-
- ⁹⁴ GREBE, J. (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany): The Basic Principles of the Lyophilization process, Controlled Nucleation (LyoCoN). In: Škola lyofilizace, Pragolab s.r.o., Praha, 30.5.2017, (přednáška)
- ⁹⁵ ŠKLUBALOVÁ, Z.: Využití lyofilizace ve farmacii a lékových formách. In: Škola lyofilizace, Pragolab s.r.o., Praha, 15.10.2015, (přednáška)
- ⁹⁶ REY, L., MAY, J. C. (Ed.): *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, 2nd Ed., 2004, USA: CRC Press, 640 s., ISBN: 0-8247-4868-9
- ⁹⁷ MACÁKOVÁ, E.: Formulace lyofilizovaných tablet pro orální aplikaci peptidů. Diplomová práce. 2020. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 80 s.
- ⁹⁸ REMMELE, R. L., KRISHNAN, S., CALLAHAN, W. J. Development of Stable Lyophilized Protein Drug Products. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2012, 13 (3), s. 471-496, ISSN: 1873-4316
- ⁹⁹ MCNALLY, E. J.: *Protein Formulation and Delivery*, 2000. New York: Marcel Dekker, 262 s., ISBN: 9780824778835. CAPPOLA, M. L.: *Freeze-Drying Concepts: The Basics*, s. 159-199
- ¹⁰⁰ *Český lékopis 2017, Doplněk 2018.*, Praha, Grada Publishing a.s., 1496 s., ISBN: 978-80-271-0858-9. *Osmolalita*. s. 119-120
- ¹⁰¹ *Český lékopis 2017, Doplněk 2018.*, Praha, Grada Publishing a.s., 1496 s., ISBN: 978-80-271-0858-9. *Zkouška rozpadavosti vaginálních tablet*. s. 379-380
- ¹⁰² LARSEN, B. S., SKYTTE, J., SVAGAN, A. J., MENG-LUND, H., GROHGANZ, H., LÖBMANN, K.: Using dextran of different molecular weights to achieve faster freeze-drying and improved storage stability of lactate dehydrogenase. *Pharm. Dev. Technol.*, 2019, 24 (3), s. 323-328, ISSN: 1097-9867
- ¹⁰³ SUSSICH, F., CESÀRO, A.: Transitions and phenomenology of α,α -trehalose polymorphs inter-conversion, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2000, 62 (757), s.757-768, ISSN: 1572-8943
- ¹⁰⁴ OHTAKE, R., WANG, Y. J.: Trehalose: Current Use and Future Applications. *J. Pharm. Sci.*, 2011, 100 (6), s.2020–2053, ISSN 0022-3549

-
- ¹⁰⁵ CROWE, L. M., REID, D. S., CROWE, J. H.: Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.*, 1996, 71 (4), s. 2087–2093, ISSN: 1542-0086
- ¹⁰⁶ BÜHLER, V.: *Polyvinylpyrrolidone Excipients for Pharmaceuticals*, 2005, Berlin, Heidelberg: Springer, 254 s., ISBN: 978-3-642-06243-8
- ¹⁰⁷ AMIN, K., DANNENFELSER, R., ZIELINSKI, J., WANG, B.: Lyophilization of polyethylene glycol mixtures. *J. Pharm. Sci.*, 2004, 93 (9), s. 2244-2249, ISSN: 0022-3549
- ¹⁰⁸ ŠKLUBALOVÁ, Z. a kol.: *Roční průběžná odborná zpráva o postupu jednotlivých prací a dosažených výsledcích projektu za rok 2019*. Projekt MPO TRIO FV 40365. 38 s.