

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



REOLOGICKÉ A ADHEZIVNÍ VLASTNOSTI MATRIC  
PRO LYOFILIZOVANÉ ORÁLNÍ VAKCÍNY

Diplomová práce

Hradec Králové 2021

Vendula Longinová

Čestně prohlašuji, že tato diplomová práce je mým autorským dílem a vypracovala jsem ji samostatně pod odborným vedením PharmDr. Evy Šnejdrové, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem při práci čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány. Také prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Vendula Longinová

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce PharmDr. Evě Šnejdové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a věcných připomínek při vypracování diplomové práce a za čas věnovaný konzultacím.

# OBSAH

Abstrakt .....	6
Abstract.....	7
Zadání práce .....	8
Seznam zkratk.....	9
Úvod .....	10
1 Teoretická část.....	11
1.1 Lékové formy pro aplikaci do dutiny ústní.....	11
1.1.1 Oromucosalia.....	11
1.1.2 Orálně dispergovatelné lékové formy.....	12
1.1.3 Příklady orálně dispergovatelných lékových forem registrovaných v ČR	13
1.1.4 Polymerní mikro a nanočástice jako léková forma .....	14
1.1.5 Mukoadhezivní filmy .....	15
1.1.6 Umělé sliny.....	16
1.2 Aplikace peptidů a proteinů.....	18
1.2.1 Perorální aplikace vakcín.....	19
1.2.2 Sublingvální vakcíny .....	20
1.2.3 Sublingvální imunoterapie.....	21
1.3 Lyofilizované přípravky .....	21
1.3.1 Obecné vlastnosti lyofilizátů .....	22
1.3.2 Terminologie lyofilizátů.....	24
1.3.3 Orální lyofilizáty .....	24
1.3.4 Gastroretentivní tablety .....	25
1.4 Pomocné látky v mukoadhezivních přípravcích.....	27
1.4.1 Mukoadhezivní polymery.....	27
1.4.2 Povrchově aktivní látky v lyofilizovaných přípravcích.....	29
2 Experimentální část .....	30

2.1	Suroviny.....	30
2.2	Použité přístroje a pomůcky.....	30
2.3	Příprava hydratovaného mucinu .....	31
2.4	Příprava formulací pro lyofilizaci.....	31
2.5	Lyofilizované tablety .....	32
2.6	Stanovení tokových, viskoelastických a adhezivních vlastností .....	33
2.6.1	Rotační testy .....	34
2.6.2	Oscilační testy .....	35
2.6.3	Tahové testy.....	35
3	Výsledky a diskuze.....	37
3.1	Reologické a adhezivní vlastnosti hydratovaného mucinu.....	38
3.2	Reologické vlastnosti formulací pro lyofilizaci.....	41
3.3	Reologické a mukoadhezivní vlastnosti lyofilizovaných tablet .....	45
4	Závěry.....	49
5	Seznam literatury .....	50

# ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autorka: Vendula Longinová

Název diplomové práce:

Reologické a adhezivní vlastnosti matric pro lyofilizované orální vakcíny

Vedoucí práce: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit reologické a adhezivní vlastnosti formulací pro lyofilizované orální vakcíny a lyofilizovaných tablet formulovaných na bázi dextranu, iota-karagenanu nebo trehalosy. Teoretická část charakterizuje lékové formy pro aplikaci do dutiny ústní, lyofilizované přípravky a pomocné látky pro mukoadhezivní přípravky. V experimentální části byly hodnoceny reologické a mukoadhezivní vlastnosti na rotačním reometru. Formulace obsahující iota-karagenan vykazovaly vyšší viskozitu, vyšší tuhost gelu, nižší stupeň relaxace a vyšší mez toku než formulace s trehalosou. Všechny lyofilizované tablety vykazovaly *in vitro* dostatečnou adhezi na standardizovaný mucinový podklad. Realizované experimenty představují pilotní testy tokových, viskoelastických a mukoadhezivních vlastností lyofilizovaných tablet pro orální podání vakcíny proti černému kašli. Přínosem práce je vytvoření metodiky testování pro finální formulace v průběhu stabilitních testů.

**Klíčová slova:** lyofilizované tablety, viskoelastická, mukoadheze, dextran, iota-karagenan

# ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Technology

Name: Vendula Longinová

Title of diploma thesis:

Rheological and adhesive properties of matrix for freeze-dried oral vaccines

Supervisor: PharmDr. Eva Snejdrova, Ph.D.

The aim of the diploma thesis was to evaluate the rheological and adhesive properties of formulations for lyophilized oral vaccines and lyophilized tablets formulated on the basis of dextran, iota-carrageenan or trehalose. The theoretical part characterizes dosage forms for application to the oral cavity, lyophilized preparations and excipients for mucoadhesive preparations. In the experimental part, rheological and mucoadhesive properties on a rotary rheometer were evaluated. Formulations containing iota-carrageenan showed higher viscosity, higher gel stiffness, lower degree of relaxation and higher yield stress than trehalose formulations. All lyophilized tablets showed sufficient adhesion to a standardized mucin support *in vitro*. The performed experiments represent pilot tests of flow, viscoelastic and mucoadhesive properties of lyophilized tablets for oral administration of pertussis vaccine. The contribution of the work is the design of a testing methodology for the final formulations during stability tests.

**Key words:** lyophilized tablets, viscoelasticity, mucoadhesion, dextran, iota-carrageenan

## ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit reologické a adhezní vlastnosti formulací pro lyofilizované orální vakcíny a lyofilizovaných tablet na bázi dextranu, iota-karagenanu nebo trehalosy pomocí rotačních, oscilačních a tahových testů na absolutním rotačním reometru. Byly rovněž hodnoceny vlastnosti mucinu, který byl použit jako modelový substrát při testování mukoadhezivních vlastností lyofilizovaných tablet.

Zadání práce lze konkretizovat do následujících dílčích kroků:

1. Na absolutním rotačním reometru charakterizovat tokové, viskoelastické a adhezivní vlastnosti mucinu hydratovaného pufrům pH 7,4.
2. Připravit matrice pro lyofilizaci a hodnotit jejich tokové a viskoelastické vlastnosti.
3. Testovat tokové, viskoelastické a mukoadhezivní vlastnosti orálních tablet připravených lyofilizací matric.



## SEZNAM ZKRATEK

ALF	alfuzosin hydrochlorid
APD	amorfní pevné disperze
BPV	Bordetella pertussis vaccine – vakcína bakterie způsobující černý kašel
BSA	Bovine Serum Albumin – albumin z bovinního séra
CDG	Chlorhexidin diglukonát
CMC	karmelosa (karboxymethylcelulosa)
Cyc	cyklosporin
DOPA	dihydroxyfenylalanin
EC	ethylcelulosa
ECS	ecabet sodium
GAP	želatina z vepřové kůže
GBP	želatina z hovězí kůže
GC	glykolchitosanové
GRT	gastroretentivní tablety
GSH	glutathion
HA	hyaluronát
HPMC	hypromelosa (hydroxypropylmethylcelulosa)
HPV	human papiloma virus
LVER	oblast lineární viskoelasticity
MG	makrogol 300
NAC	<i>N</i> -acetylcystein
NP	nanočástice
ODT	orálně dispergovatelné tablety
PEG-DA	polyetylen glykol-diakrylát
PVA	polyvinylalkohol
SLIT	sublingvální alergenová imunoterapie

## ÚVOD

Ve farmaceutické technologii představují lyofilizované tablety nový směr ve vývoji lékové formy pro orální podání vakcín. V současné době dramaticky narůstají lokální epidemie černého kašle, a proto byla inovována do této lékové formy vakcína proti tomuto onemocnění. Zvolená vakcína má opodstatnění a vysokou společenskou poptávku. Dosud používané vakcíny proti pertusi jsou aplikovány injekčně, jako klasické parenterální léčivo. Jejich nevýhodou je, že mají redukováný protektivní účinek na sliznici nasopharynxu, která je vstupní branou infekce. Orální aplikace vakcinačních kmenů *Bordetella pertusis* je odborně opodstatněná, protože slizniční imunitní systémy ústní dutiny a nasopharynxu jsou propojeny. Imunitní odezva na tuto formu podání je podložena klinickými testy a lyofilizovaná tableta, jako nový nosič léčivé látky, zaručuje vyhovující distribuci na bukalní sliznici.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Lékové formy pro aplikaci do dutiny ústní

Lékové formy určené k podání do dutiny ústní rozděluje Český lékopis do čtyř kategorií: tekuté a polotuhé perorální přípravky (liquid and semi-solid forms), pevné perorální přípravky (solid forms), orální přípravky (oromucosal preparations) a přípravky pro stomatologické ošetření (preparations for dental use).<sup>1</sup> Najdeme zde lékové formy, se kterými se setkáváme běžně v lékárnách. Jsou to například perorální kapky, prášek pro perorální roztok, granule pro perorální roztok, sirup, rozpustná tableta, šumivý prášek, žvýkáci tableta, léčivá žvýkáci guma apod.

### 1.1.1 Oromucosalia

Oromucosalia – orální přípravky jsou pevné, polotuhé nebo tekuté přípravky obsahující jednu nebo více léčivých látek, určené k podání do ústní dutiny nebo ústní části hltanu k dosažení lokálního nebo systémového účinku. Přípravky se zamýšleným lokálním účinkem mohou být určené k podání na specifické místo v ústní dutině, jako jsou dásně nebo ústní část hltanu (orofaryngeální přípravky). Přípravky se systémovým účinkem jsou určené k primární absorpci v jednom nebo více místech ústní dutiny (sublingvální přípravky). Mukoadhezivní přípravky se pomocí adheze zadržují v ústní dutině na slizničním epitelu a mohou modifikovat absorpci systémově účinkujících léčiv.<sup>1,2</sup>

Mezi orální přípravky patří kloktadla, roztoky pro ústní výplachy, roztoky na dásně, orální roztoky a orální suspenze, polotuhé orální přípravky (gel na dásně, pasta na dásně, orální gel, orální pasta), orální kapky, orální spreje a sublingvální spreje včetně orofaryngeálních sprejů, pastilky tvrdé a měkké, lisované pastilky, sublingvální tablety (Obr. 1) a bukalní tablety, orální tobolky, mukoadhezivní přípravky, filmy dispergovatelné v ústech.<sup>3</sup>



Obr. 1 Příklad lékové formy k rozpuštění v ústech s nitroglycerinem<sup>4</sup>

### 1.1.2 Orálně dispergovatelné lékové formy

Moderní orálně dispergovatelné lékové formy mají řadu výhod, mezi které patří například aplikační komfort bez nutnosti zapíjení, rychlý nástup účinku, dobrá biologická dostupnost léčivé látky, přesnost dávkování, redukce nežádoucích účinků a zvyšování bezpečnosti terapie. Na trhu jsou dostupné orálně dispergovatelné tablety (Obr. 2) a dispergovatelné filmy. Hranice mezi nimi není přesně stanovena.



Obr. 2 Orodispergovatelné tablety s rychlým nástupem účinku<sup>5</sup>

Do těchto lékových forem jsou transformována léčiva ze skupiny antimigrenik, psychofarmak, analgetik-antipyretik, antagonistů  $H_2$  receptorů a antiemetik, a to z důvodu rychlého nástupu bez nutnosti příjmu tekutin a rizika vyzvracení.

V současnosti se využívá několik patentově chráněných technologií výroby, jež lze rozdělit na lyofilizaci, lisování a ostatní postupy.<sup>6</sup> Mezi druhy pevných orálně dispergovatelných tablet patří lyofilizáty, výlisky a dispergovatelné filmy.

Lyofilizáty jsou křehké, pórovité destičky s léčivou látkou vzniklé lyofilizací (freeze-dried wafers). V ústní dutině se rychle rozpadají a obsažené léčivo se uvolňuje a disperguje ve slinách. Léčivo se vstřebává přímo v dutině ústní nebo se polyká spolu se slinami a absorbuje se v další části trávicího traktu. Mechnická odolnost těchto přípravků je velmi malá a snižuje se při zvyšující se vlhkosti prostředí. Proto musí být tyto přípravky zabaleny ve speciálním několikvrstevném obalu.

Výlisky jsou pórovité dispergovatelné tablety vzniklé lisováním a podobnými tvarovacími procesy. Jsou mechanicky i fyzikálně odolnější než lyofilizáty, mohou se proto balit do běžných vícedávkových obalů. Mají menší pórovitost než lyofilizáty, proto se rozpadají o něco pomaleji.

Dispergovatelné filmy jsou rychle rozpustné tenké polymerní filmy. Léčivý film vzniká nejčastěji tavením. Rozpouští se kompletně ve slinách dutiny ústní. Uvolněné léčivo se vstřebává nebo spolkně se slinami.<sup>7</sup>

### **1.1.3 Příklady orálně dispergovatelných lékových forem registrovaných v ČR**

V databázi Státního ústavu pro kontrolu léčiv lze vyhledávat léčivé přípravky, kromě jiného, také podle cesty podání. Pro aplikaci do dutiny ústní lze zvolit podání pod jazyk, bukální, orální, perorální nebo dentální podání.

Mezi registrované léčivé přípravky podávané v lékové formě bukálních tablet patří například Effentora a Fenroo s účinnou látkou fentanyl-citrát. Jakmile je bukální tableta jednou vystavena působení vlhkosti, začne se rozpouštět, a tím dochází k uvolnění léčivé látky. Proto je zapotřebí pacienty poučit, aby neotevírali blistr, dokud nebudou připraveni vložit tabletu do úst. Jedná se o lékové formy, které se rychle rozpustí v ústní dutině a léčivá látka pak může být snadno absorbována a mít rychlý nástup účinku během několika minut. Používá se zejména pro pacienty s ataky akutní bolesti při nádorových onemocněních.

Ve formě sublingvální tablety je v České republice registrovaný např. léčivý přípravek Suboxone<sup>8</sup> (Obr. 3) s účinnými látkami buprenorfin-hydrochlorid, dihydrát naloxon-hydrochloridu a natrium-citrát. Tableta má být vložena pod jazyk, kde se nechá úplně rozpustit. Pacienti nemají polykat nebo konzumovat jídlo nebo nápoje, dokud se tableta úplně nerozpustí.



Obr. 3 Porovnání velikosti orálně dispergovatelných tablet a filmu Suboxone<sup>9</sup>

#### 1.1.4 Polymerní mikro a nanočástice jako léková forma

Polymerní mikro a nanočástice (NP) jsou široce používány ve farmaceutickém průmyslu, protože jejich povrchové vlastnosti jsou vhodné pro zlepšení mukoadheze a schopnosti pronikat mukózní vrstvou. Díky své biodegradabilitě, biokompatibilitě a netoxičnosti získaly polymerní NP v posledních letech ohlas jako mukoadhezivní systémy. Přesto může být internalizace polymerních NP do tkáně ve srovnání s nosiči na bázi lipidů nízká, kvůli nedostatečné specificitě k transportérům lipoproteinů. Tuto zjevnou nevýhodu lze překonat díky modifikaci povrchových vlastností polymerních nanonosičů.<sup>10</sup>

Byly testovány modifikované *S*-preaktivované *N*-acetylcystein (NAC) a glutathion (GSH) glykolchitosanové (GC) polymerní konjugáty vytvořené jako potenciální mukoadhezivní platforma. Polymery byly testovány *ex vivo* a *in vitro* na své mukoadhezivní vlastnosti. Výsledky ukázaly, že preaktivace GC-NAC a GC-GSH zvýšila jejich mukoadhezivní schopnosti ve srovnání s jejich thiolovanými prekurzory při měření doby adheze hodnocené metodou rotačního válce.<sup>11</sup>

Byly vyvinuty a charakterizovány také mikročástice poly-*D,L*-laktid-ko-glykolidu (PLGA) s obsahem chlorhexidinu pro dentální aplikaci. Chlorhexidin digluconát (CDG) je antiseptikum volby pro výplachy ústní dutiny, protože méně dráždí sliznice. Používá se ve formě zředěných roztoků nebo gelů. I když má velmi dobré bakteriocidní vlastnosti, má určité nevýhody, jako jsou barvení zubů nebo změna chuti a změna barvy jazyka. Proto je technologické zdokonalení lékové formy velmi žádoucí, aby se podpořilo jeho prodloužené uvolňování a zabránilo se těmto problémům. Mikročástice byly připraveny technikou sprejového sušení a charakterizovány z hlediska velikosti částic, polydisperzity, morfologie, stability, výtěžku, účinnosti zapouzdření (encapsulation efficacy), množství pojmutého léčiva, kumulativního uvolňování a antibakteriální

odpovědi. CDG v mikročásticích byl schopen inhibovat *Streptococcus mutans in vitro*. Mikročástice na bázi PLGA tedy představují vhodnou alternativu k běžným lékovým formám v oblasti dentální hygieny.<sup>12</sup>

Obdobně byly také vyvinuty nanočástice monometoxypolyetylenglykol-polyepsilon-kaprolaktonu (MPEG-PCL) s naringeninem (flavonoid) a formulovány do bukálních tablet. Použily se mukoadhezivní polymery. Cílem bylo zlepšení dostupnosti naringeninu pro léčbu zánětů v dutině ústní.<sup>13</sup> Ve srovnání s kontrolními skupinami vykazovaly bukální tablety obsahující nanočástice rychlejší a lepší uvolňování léčiva (více než 80 %) během 12 hodin na dvou disolučních zařízeních.

V podobné studii byly testovány nanočástice s peptidy odvozenými od beta-laktoglobulinu (BLG), které mohou vyvolat po orální aplikaci toleranci imunity a zabránit alergii na kravské mléko. BLG peptidy byly vloženy do nanočástic z PLGA. Studovala se absorpce NP, kapacita NP a schopnost aktivovat dendritické buňky kostní dřevě. Tato studie poskytuje důkaz, že nanočástice z PLGA jsou slibné pro orální aplikaci peptidů BLG, a také usnadňují těmto peptidům schopnost vyvolat toleranci k celé mléčné bílkovině.<sup>14</sup>

### **1.1.5 Mukoadhezivní filmy**

Mukoadhezivní bukální přípravky obsahují jednu nebo více léčivých látek určených k systémové absorpci přes sliznice tváře v delším časovém úseku. Mohou se dodávat jako mukoadhezivní bukální tablety, jako bukální filmy nebo jiné pevné nebo polotuhé přípravky. Obvykle obsahují hydrofilní polymery, které po hydrataci slinami vytvoří hydrogel, jenž se přilepí na sliznici tváře, bukální filmy se navíc mohou zcela rozpustit. Mukoadhezivní bukální tablety se vyrábějí lisováním jako jednovrstvé nebo vícevrstvé tablety. Bukální filmy jsou jednovrstvé nebo vícevrstvé plátky ze vhodného materiálu.

Studie od Marija Jovanović a kol.<sup>15</sup> zkoumali mukoadhezivní bukální filmy s účinnou látkou propranolol hydrochlorid. Byly použity dva typy želatiny: želatina z vepřové kůže, typ A (GAP), a želatina z hovězí kůže (GBP). Byl hodnocen vliv želatiny na mechanické, mukoadhezivní a biofarmaceutické vlastnosti bukálních filmů. Výsledky mechanického testování (tahová zkouška, test tvrdosti) odhalily, že GAP filmy vykazují vyšší modul pružnosti, pevnost v tahu a tvrdost. Zkoušky mukoadheze ukázaly, že GBP měla vyšší adhezivní sílu než GAP. Následně studie uvolňování *in vitro* i *in silico* ukázaly, že tyto mukoadhezivní bukální filmy mohou zajistit účinný transport léčiva bukální sliznicí.

Byl proveden podobný výzkum,<sup>16</sup> jehož účelem bylo optimalizovat tenký mukoadhezivní bukální film rizatriptanu a posoudit jeho využití jako potenciální náhrady konvenční lékové formy při léčbě migrény. Bukální filmy byly vyrobeny konvenční metodou za použití kombinace polymerů (Proloc, hydroxypropylmethylcelulosa a Eudragit *RS 100*). U bukálních filmů byly testovány mechanické, mukoadhezivní a stupeň bobtnání. Filmy vykazovaly optimální fyzikálně-mechanické vlastnosti včetně mukoadhezivní síly, která může prodloužit dobu adheze na sliznici.

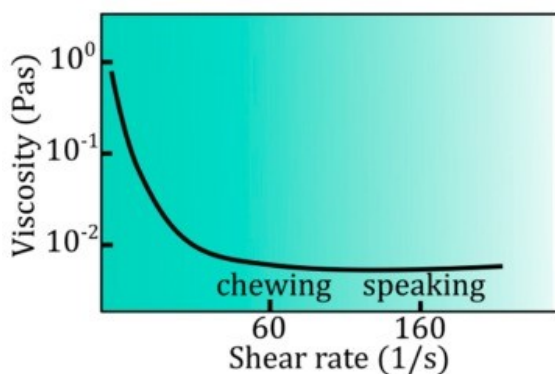
Nicméně, vývoj systémů s uspokojivou mukoadhezí ve vlhkém prostředí a adekvátní biologickou dostupností léčiva stále zůstává výzvou, proto byl navržen mukoadhezivní film inspirovaný mušlemi.<sup>17</sup> Mořské mušle mají pozoruhodnou schopnost adheze v přítomnosti vody, proto přitahují pozornost a jsou potenciálním zdrojem ideálního adheziva. Rychlou a silnou adhezi mušlí lze připsat přítomnosti adhezivních proteinů, které mají ve své struktuře katecholickou aminokyselinu 3,4-dihydroxyfenylalaninu (DOPA). Byl navržen tenký film vyrobený z kombinace mukoadhezivního polymeru polyvinylalkoholu (PVA) a adhezivního proteinu mušlí DOPA. Modely *ex vivo* ukázaly, že tento mukoadhezivní film může dosáhnout silné adheze k bukální tkáni. Mechanismus adheze tohoto filmu je závislý jak na mechanickém přilnutí, tak na kovalentní vazbě mezi filmem a mukózou. Film vykazuje lepší transport léčiva přes slizniční bariéru a 3,5krát vyšší biologickou dostupnost léčiva v porovnání s orálním podání konvenční formy.

### 1.1.6 Umělé sliny

Pacientům, kterým se netvoří dostatek slin, není vhodné podávat orálně dispergovatelné tablety z důvodu nedostatečné hydratace ústní dutiny a možného nedostatečného rozpadnutí tablety. Může se jednat o pacienty vyššího věku, pacienty užívající anticholinergní léčiva nebo pacienty trpící Sjogrenovým syndromem. Těmto pacientům lze doporučit takzvané umělé sliny. Jedná se o přípravky s podobnými látkami, jaké jsou obsaženy ve slinách. Patří sem například methylcelulosa, glycerol, xylitol, chlorid sodný, voda.

Přírodní sliny dutiny ústní jsou neneutonské tekutiny. To znamená, že jejich viskozita (míra odporu vnitřního tření) se mění v závislosti na smykové rychlosti (Obr. 4). Viskozita slin v klidu, kdy je smyková rychlost v rozmezí  $0,1-1 \text{ s}^{-1}$ , je mnohem vyšší než viskozita během žvýkání a mluvení, kdy je smyková rychlost přibližně  $60 \text{ až } 160 \text{ s}^{-1}$ .<sup>18</sup>





Obr. 4 Pokles viskozity slin v závislosti na namáhání při fyziologických podmínkách<sup>19</sup>

Tato pseudoplasticita je důležitou vlastností slin. Náhračky slin na bázi derivátů celulosy nebo glycerolu jsou newtonovské tekutiny a jejich viskozita je obvykle vyšší ve srovnání s slinami. Podobné reologické vlastnosti přírodních slin mají umělé sliny obsahující mucin nebo mucin s xanthanem nebo guarovou klovatinou.<sup>20</sup>

Aranya Manosroi a kol.<sup>21</sup> vyvinuli pět nových formulací umělých slin složených ze slizu získaného z cejlonského špenátu (*Basella alba*), chloridu vápenatého, chloridu draselného a fluoridu sodného. Výsledky této studie ukázaly vysokou biologickou aktivitu a bezpečnost vyvinuté formulace. Výsledky této studie také naznačují, že sliz z cejlonského špenátu má vynikající reologické vlastnosti, které jsou podobné přirozeným lidským slinám. Vykazuje vyšší antioxidační a antiadhezivní účinky než přirozené lidské sliny a není cytotoxický pro lidské gingivální fibroblasty a je jedlý. Vyvinutá formulace umělých slin obsahující sliz z této rostliny je tedy bezpečnější než jiné chemické formulace umělých slin.

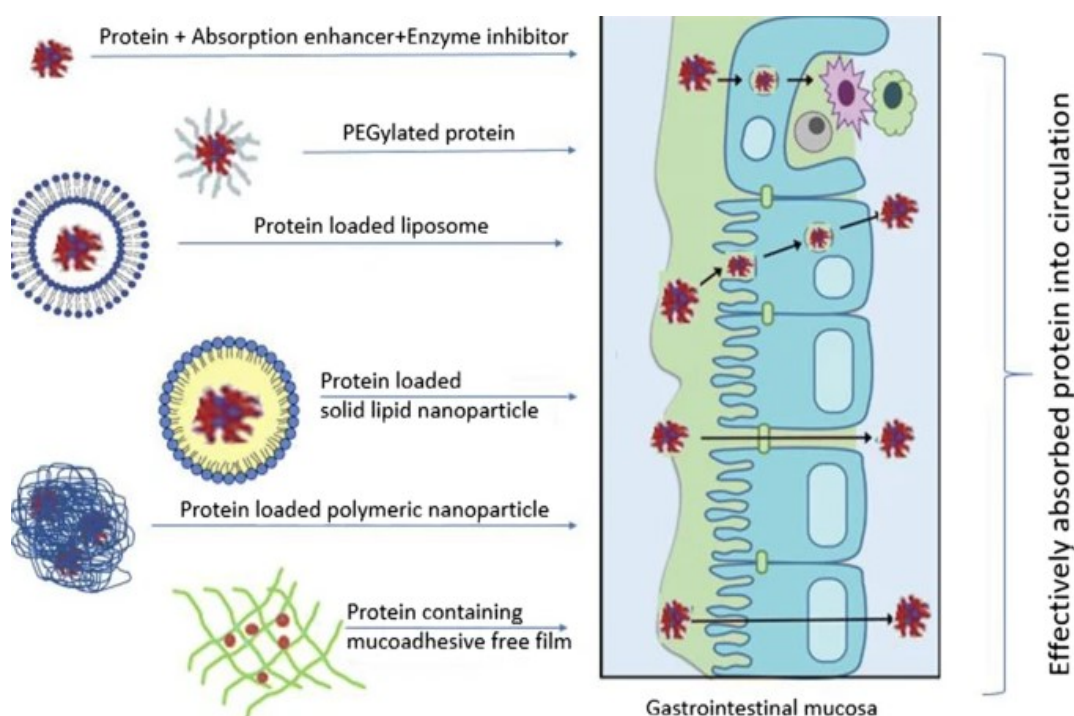
Další studie<sup>22</sup> hodnotila vliv magnetických nanočástic přidaných do tří komerčně dostupných formulací umělých slin na antimikrobiální vlastnosti (adheze mikroorganismů, tvorba biofilmu), reologické vlastnosti (viskozita, viskoelasticita) a fyzikálně-chemické vlastnosti (pH, povrchové napětí, vodivost). Výsledky ukázaly, že přidání nanočástic snížilo adhezi mikroorganismů a tvorbu biofilmu. Nanočástice navíc omezují proliferaci bakteriálních planktonických buněk a také životaschopnost buněk zabudovaných do biofilmu. Kromě toho se s přidáním nanočástic nezměnily fyzikálně-chemické a reologické vlastnosti testovaných přípravků, což naznačuje, že nanočástice pravděpodobně nebudou interferovat s homeostázou ústní dutiny.

Při vývoji umělých slin je důležitá také schopnost lubrikace ústní dutiny. Cílem studie<sup>23</sup> bylo posoudit účinnost různých umělých slin z hlediska lubrikace ústní dutiny a schopnost

umělých slin adsorbovat a změnit strukturu původního biofilmu v ústech. Většina náhražek slin se na biofilm neabsorbovala, a tak nezlepšila lubrikaci. Lepší lubrikaci vykazovaly pouze náhražky slin obsahující karagenan, karmelosu, mucin z prasečích žaludků, xanthanovou klovatinu nebo karbomery. Pouze dva ze šestnácti testovaných přípravků umělých slin vykazovaly lepší lubrikaci než voda.

## 1.2 Aplikace peptidů a proteinů

V současnosti se většina peptidů a proteinů aplikuje injekčně, protože jiné způsoby aplikace, zejména perorální, mají nižší absorpci léčiva. Je to především kvůli vysoké molekulové hmotnosti proteinů, degradaci proteolytickými enzymy, vysokou hydrofilitou a rigiditou tkáně v místě absorpce. Z hlediska výroby může být nejjednodušším způsobem inkorporace inhibitorů enzymů (enzyme inhibitors), látek zvyšujících permeaci (permeation enhancers) nebo mukoadhezivních polymerů do konvenčních dávkových forem (Obr.5).



Obr. 5 Způsoby perorální aplikace proteinů a peptidů <sup>24</sup>

Například zapouzdření do lipidových vezikul dostatečně chrání začleněnou makromolekulu a zlepšuje absorpci ve střevě, ale vyskytují se značné problémy se stabilitou. Naproti tomu polymerní nanonosiče mohou být stabilnější, ale zároveň mají nižší absorpci ve srovnání s nosiči na bázi lipidů.<sup>10</sup>

Proteiny nebo peptidy v lyofilizovaných rostlinných buňkách (plant-produced biopharmaceuticals) mohou být stabilní po několik let při různé teplotě, přičemž si zachovávají své složení a účinek. Enkapsulací do rostlinných buněk jsou chráněny před žaludečními kyselinami a enzymy. Následně jsou uvolňovány ve střevě díky mikrobům, které tráví buněčnou stěnu rostlinných buněk. Velká plocha sliznice lidského střeva pak umožňuje jejich vstřebávání.<sup>25</sup>

Jako nosič inzulínu byly testovány přírodní nebo syntetické nanočástice (liposomy, polymerní nanovesikuly), různé polymerní nosiče (polylaktidy, polyalkylkyanoakryláty) a různé polymerní hydrogely.<sup>26</sup> Přírodní polymery jsou obzvláště zajímavé díky své netoxické, biokompatibilní, biodegradabilní povaze a hydrofilitě. Mezi přírodní polymery používané k perorálnímu podávání inzulínu patří chitosan. Je hojně testován zvláště díky své snadné chemické modifikaci a biologickým vlastnostem.<sup>27</sup> Byly formulovány nanočástice inzulínu o velikosti 396 nm nukleací alginátu a dextransulfátu na vápníku a navázáním na poloxamer. Byly stabilizovány chitosanem a následně potaženy albuminem. Výsledně záporně nabitě nanočástice si zachovaly bioaktivitu inzulínu a zvýšily dostupnost inzulínu tím, že ochránily inzulín před enzymatickou degradací a usnadnily permeaci přes střevní membránu.<sup>28</sup>

### **1.2.1 Perorální aplikace vakcín**

Výhodou perorálně aplikovaných vakcín je zvýšená compliance na rozdíl od jejich konvenčních forem. Podávání perorálních vakcín nabízí také významné klinické a logistické výhody tím, že eliminuje chladič řetězec požadovaný u běžných vakcín.

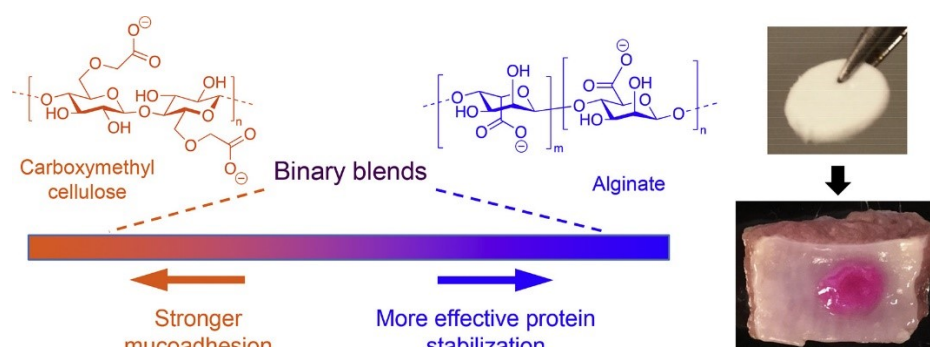
Studie od D.M. Hariyadi a kol. testovala modelový antigen - bovinní sérum albumin (BSA), který byl zapouzdřen do alginátových mikrosfér pomocí aerosolizace. Byly získány hydratované mikrosféry o velikosti 25 až 65  $\mu\text{m}$  s obsahem antigenu 3,3 %. Lyofilizace alginátových mikrosfér bez použití kryoprotektantu vedla ke fragmentaci a následné ztrátě většiny proteinu v simulovaném střevním prostředí během 2 h. Zatímco mikrosféry lyofilizované v přítomnosti maltodextrinu měly odlišné výsledky. Uvolnilo se méně než 7 % BSA během 2 h z těchto lyofilizovaných mikrosfér s maltodextrinem v simulované žaludeční tekutině, zatímco 90 % BSA bylo postupně uvolňováno po dobu 10 h. Tato zjištění ukazují potenciál alginátových mikrosfér pro výrobu lyofilizovaných perorálních vakcín.<sup>29</sup>

### 1.2.2 Sublingvální vakcíny

Dalším příkladem nekonvenční aplikace peptidů a proteinů je sublingvální vakcína. V poslední době bylo zkoumáno několik pomocných látek z hlediska jejich schopnosti vytvořit destičky (tj. vysoce porézní tablety vyrobené přímým lisováním) s cílem formulovat tyto destičky obsahující HPV (human papiloma virus) pro sublingvální vakcinaci. Rychle se rozpadající destičky o průměru 4 mm, které byly rozpuštěny za méně než 25 s (ve 3 ml při 37 °C), byly složeny z 65 % myo-inositolu a 35 % mikrokrystalické celulosy.<sup>30</sup>

Sublingvální vakcinace je relativně velmi jednoduchá, protože zahrnuje aplikaci kapalných forem nebo rychle se rozpouštějících tablet do ústní dutiny. Podobně jako jiné vakcíny aplikované přes mukózu, mají i sublingvální vakcíny potenciál vyvolat slizniční imunitu zvýšením sekrečních IgA, kromě zvýšení IgG v krevním řečišti. Jelikož u sublingválně podávaných vakcín je menší pravděpodobnost, že se dostanou do tkání centrálního nervového systému, jsou potenciálně bezpečnější než například nasálně aplikované vakcíny.<sup>31</sup>

Při vývoji sublingvální formy je třeba zajistit stabilitu proteinu, proto cílem této studie bylo vyvinout jednoduchý biopolymer mukoadhezivních tablet, který umožní efektivní sublingvální podání a konzervaci proteinových vakcín. Tablety obsahovaly polymerní směs karboxymethylcelulosy (CMC) a alginátu (ALG). Byly vytvořeny tablety s různým poměrem CMC a ALG. Tablety měly odlišnou mikrostrukturu, mechanické vlastnosti, čas rozpadu a kinetiku uvolňování modelových sloučenin. Tablety s vysokým obsahem CMC byly vysoce mukoadhezivní k sublingvální tkáni a vydržely promývání, což vedlo k lepší permeaci proteinu přes tkáň. Na druhé straně tablety s vysokým obsahem ALG byly nejen mechanicky odolné, ale také schopné chránit modelový enzym ( $\beta$  - galaktosidasu) před lyofilizací a tepelnou expozicí (Obr.6).<sup>32</sup>



Obr. 6 Závislost mukoadheze a stabilizace proteinu na složení tablet při použití karboxymethylcelulosy a alginátu

V další studii byla představena jednoduchá léková forma pro aplikaci proteinů založená na sestavení dvou polysacharidů, chitosanu a kyseliny hyaluronové. Přírodní polymery byly sestaveny metodou Layer-by-Layer za vzniku mukoadhezivní a orodispergovatelné membrány, u které byla prokázána netoxičnost na lidské epiteliální buňky. Bylo testováno uvolňování proteinů a byly zaznamenány mechanické vlastnosti membrány.<sup>33</sup>

### **1.2.3 Sublingvální imunoterapie**

V Evropě se pro léčbu alergií využívá sublingvální alergenová imunoterapie (SLIT). Typicky se pod jazyk aplikují kapičky vysoce viskózní glycerolové formulace obsahující alergenový extrakt. Vysoká viskozita přispívá k retenci antigenu pod jazykem a zvyšuje účinnost imunoterapie.<sup>34</sup> Při technologickém vývoji nových lékových forem, je důležité, aby byla zachována stabilita alergenu a zároveň došlo k rychlému uvolnění alergenu po sublingválním podání. Touto problematikou se zabývala studie, která porovnávala sublingvální tablety s alergenem vzniklé lisováním anebo lyofilizací. Bylo zjištěno, že rychlé a úplné uvolnění alergenu v malém objemu rozpouštědla, jak dokazuje lyofilizovaná forma, je klíčové pro účinné sublingvální podávání alergenu při SLIT. Úplné uvolnění alergenu znamená, že se z tablety uvolní plná dávka alergenu, která je k dispozici sublingválnímu imunitnímu systému. Okamžité uvolnění alergenu z tablety zajistí, že imunitní systém bude vystaven nejvyšší možné dávce alergenu po co nejdelší dobu před spolknutím. Naproti tomu lisované tablety, které poskytují neúplné a pomalejší uvolňování alergenu, budou pravděpodobně obsahovat vyšší množství alergenu v tabletě, které může být následně spolknuto, aniž by byl alergen absorbován sublingválně.<sup>35</sup>

### **1.3 Lyofilizované přípravky**

Lyofilizované přípravky vznikají lyofilizací neboli odstraněním vody zmrazením produktu a následnou sublimací ledu. Kromě ochrany léčiva a zajištění stability vytváří sublimace při lyofilizaci velký povrch tablety, který je využit ke zvýšení biologické dostupnosti léčiva. Tato technologie se také využívá pro zvýšení stability hydrolyticky degradovatelných látek, rychlé rozpuštění (rekonstituce) produktu, snazší transport a snazší skladování. Nevýhodou je finanční a časová nákladnost při výrobě, složitost a nákladnost použitých zařízení, požadavek validovaného postupu a zvýšené požadavky na čistotu prostředí, ve kterém výroba probíhá.<sup>36</sup>

Proces lyofilizace je zvláště atraktivní pro výrobu tablet s řízeným uvolňováním léčiv. Ačkoli se k výrobě tablet s řízeným uvolňováním v různých studiích používaly tradiční

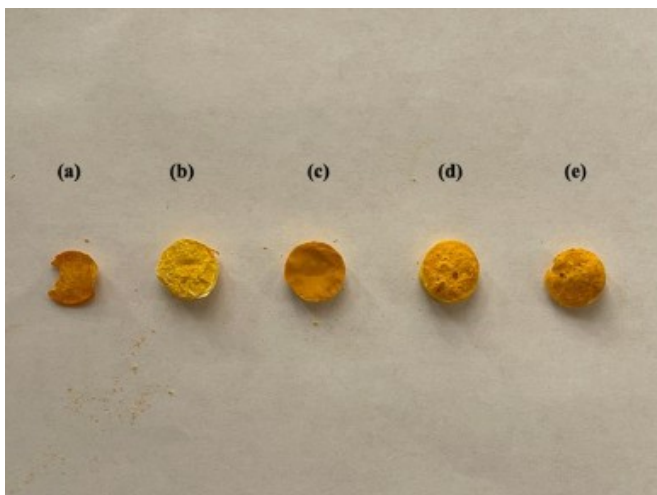
technologie jako je granulace nebo přímé lisování, byl za určitých okolností kvůli jeho výhodám použit proces lyofilizace. Celkově je však stále nezbytný další rozvoj těchto technologií, který začal studii orodispergovatelých tablet a pokračoval vývojem lyofilizovaných tablet. Kromě toho byly popsány použité pomocné látky, podmínky lyofilizace, rekonstituce formulace a struktura tablet pro optimalizaci účinnosti lyofilizovaných tablet, včetně strategií s nanoformulacemi a přírodními materiály.

Jedním z příkladů lyofilizovaných lékových forem jsou tablety na bázi polysacharidu pullulanu s rychlým rozpouštěním. Byly vyvinuty chitosomy rosuvastatinu a následně formulovány do tablety na bázi pullulanu, aby se zlepšila biologická dostupnost rosuvastatinu a maximalizoval hypolipidemický a antioxidační účinek. Rosuvastatin totiž patří mezi hypolipidemikum s omezenou biologickou dostupností při podání ústy. Vnější a vnitřní struktury tablet byly morfologicky zkoumány. Tablety vykazovaly dobu dezintegrace *in vivo* 1 a půl minuty a vyšší relativní biologickou dostupnost o více než 30 % a 36 % ve srovnání s komerčně dostupnými tabletami s rosuvastatinem.<sup>37</sup>

### **1.3.1 Obecné vlastnosti lyofilizátů**

Konečná struktura lyofilizátu je velmi pórovitá, uvádí se až 90 %. Díky tomu se lyofilizovaná tableta rychle rozpouští nebo disperguje při kontaktu se slinami. Léčivo, vhodné pro tuto lékovou formu, by mělo být málo rozpustné ve vodě, mělo by mít jemné částice a s vodou tvořit suspenzi.<sup>56</sup>

Studie od Adel, I. M. a kol.<sup>38</sup> testovala lyofilizované destičky s obsahem kurkuminu. Kurkuminové destičky byly vyrobeny zesítním chitosanu s beta-glycerofosfátem za magnetického míchání. Pak byl přidán hyaluronát sodný. Destičky byly vyrobeny technikou lyofilizace. Výsledné destičky byly zkoumány a jejich rozměry byly měřeny pomocí posuvného měřítka. Byly provedeny testy na stanovení % obsahu léčiva, uvolňování *in vitro* a % absorpce vody. Dále se testovala pórovitost, mechanické chování v tlaku, morfologie pomocí rastrovací elektronové mikroskopie, tepelné chování pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Potom následovaly mikrobiologické testy a studie cytotoxicity. Výsledky ukázaly, že lyofilizované destičky mají vysokou schopnost absorpce vody a zároveň mají velmi vysokou úroveň pórovitosti (86-89 %) viz. Obr.7.



Obr. 7 Vizualizace lyofilizovaných destiček s kurkuminem obsahující (a) 1 % chitosanu, (b) 2 % chitosanu, (c) 3 % chitosanu, (d) 3 % chitosanu + 1 % HA, (e) 3 % chitosanu a 3 % HA

Lyofilizované tablety jsou vhodné nejen jako rychle se rozpadající nebo rychle se rozpouštějící lékové formy, ale lze je také využít v dávkových formách pro prodloužené uvolňování léčiva.

Použitím chitosanové matrice v lyofilizovaných tabletách Elsharawy a kol. prokázali, že tyto tablety mají dobré fyzikálně-chemické vlastnosti a jsou vhodné k bukalnímu podání duloxetin-hydrochloridu. Bukoadhezivní lyofilizované tablety byly připraveny metodou lyofilizace za použití hypromelosity (HPMC), chitosanu a karbomery samostatně nebo v kombinaci s polyvinylalkoholem.<sup>39</sup>

Schopnost rekonstituce v rozpouštěcím médiu je také jedním z důležitých faktorů pro formulaci lyofilizovaných tablet vytvořených z emulzí. Ve studii Niczinger a kol. provedli rekonstituci lyofilizovaných tablet, která ukázala, že existuje rozdíl mezi jednotlivými nosiči (manitol, laktosa a erythritol).<sup>40</sup>

Lyofilizací byly upraveny i amorfní pevné disperze (APD) sestávající z ibuprofenu jako modelového léčiva a methakrylátového kopolymeru Eudragit L100-55 jako nosiče. Byly připraveny nanočástice Eudragit L100-55 s různými dávkami ibuprofenu. Byla provedena víceúrovňová analýza. Testy stability ukázaly, že ibuprofen zůstal v amorfní formě i po dvanácti měsících skladování. Eudragit L100-55 má v APD dvě funkce, tj. stabilizaci ibuprofenu v amorfním stavu během doby skladování a zajištění řízeného uvolňování léčiva.<sup>41</sup>

### 1.3.2 Terminologie lyofilizátů

Za účelem sjednocení terminologie zpracovávají státy, které jsou signatáři Úmluvy o vypracování Evropského lékopisu, standardní názvy lékových forem, způsobů podání a typů obalů léčiv v národních jazycích. Lyofilizáty nalezneme v Českém lékopise (ČL) v Tabulce X: *Standardní názvy lékových forem, způsobů podání a obalů*. Jsou to lyofilizát pro podání v pitné vodě, orální lyofilizát, lyofilizát a rozpouštědlo pro přípravu nosních kapek, suspenze, lyofilizát a rozpouštědlo pro přípravu injekčního roztoku, lyofilizát a suspenze pro přípravu injekční suspenze apod. Nově byl změněn v ČL 2017 termín Lyofilizát pro přípravu suspenze na Lyofilizát pro perorální suspenzi v části Peroralia.<sup>42</sup> Na rozdíl od Českého lékopisu v Zákoně o léčivech se termín lyofilizát vyskytuje pouze jednou, a to jako perorální lyofilizát v oddělení tuhých perorálních přípravků v příloze č.1 k vyhlášce č. 84/2008 Sb. v tabulce Podrobné členění lékových forem s ohledem na složení a cestu podání.<sup>43</sup> V anglicky mluvících zemích se používá pro lyofilizované přípravky a lyofilizaci také označení freeze-dried tablets/wafers, freeze-drying, z kterého lze odvodit samotný proces výroby. Termín wafer lze do češtiny přeložit jako oplatka nebo destička.

### 1.3.3 Orální lyofilizáty

Orální lyofilizáty jsou přípravky, které se aplikují do dutiny ústní. Jejich výhodou je snadné podání, rychlé rozpuštění v ústech a rychlý nástup účinku. Ten je možný díky vyšší biodostupnosti léčiva způsobené eliminací first-pass efektu v játrech. Orální lyofilizáty se nezapíjí vodou, a proto u pacientů zvyšují compliance. Jejich disoluce závisí především na tvaru tablety a použitých pomocných látkách. U tablet s bukalním podáním lze prodloužit setrvání tablety v ústní dutině, pokud se použijí vhodné mukoadhezivní složky.<sup>42</sup>

V ústech rozpadající se tablety (ODT) vyrobené lyofilizací jsou také nazývané orální lyofilizáty. Mají ultrarychlou dynamiku dezintegrace, mají přijatelnou mechanickou pevnost a hladkou texturu. Byl zkoumán polyvinylalkohol (PVA) jako alternativní polymer k želatině pro formulaci ODT. Studie dokázala použití PVA jako vhodnou alternativu k želatině v lyofilizovaných ODT.<sup>44</sup>

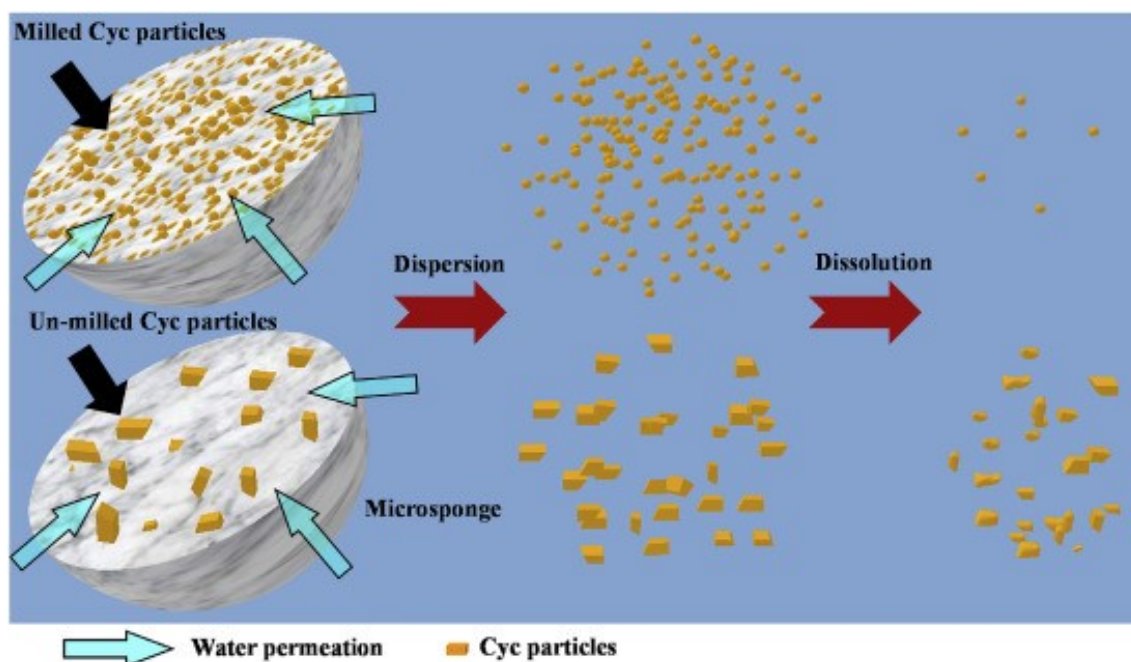
Použití metody lyofilizace vede k vyšší porozitě tablet s rychlým rozpouštěním vhodné zejména pro tablety dispergovatelné v ústech. T. Gulsun a kol. prokázali, že lyofilizované tablety obsahující terbutalin sulfát se rozpustily za 11 s, zatímco přímo lisované tablety



přibližně za 150 s. Také disoluce terbutalinu z lyofilizovaných tablet byla 100 % za pouhých 5 minut (20 minut pro přímo lisované tablety).<sup>45</sup>

Nedávná studie týkající se rychle se rozpadajících tablet obsahujících deferasirox potvrdila tuto výhodu lyofilizovaných tablet ve srovnání s tabletami vyrobenými metodou přímého lisování. Tato studie ukázala, že ačkoli dobrý index stlačitelnosti a doba rozpadu tablet připravených metodou přímého lisování mohou splňovat všechny požadavky lékopisu, u lyofilizovaných tablet byla pozorována rychlejší doba rozpadu (< 5 s).<sup>46</sup>

Autoři Masato Kobayashi a kol. se pokusili formulovat pevné lékové formy pro orální použití (granule, tablety) se zlepšenou rozpustností cyklosporinu (Cyc). V tomto výzkumu byla nově vyvinuta metoda výroby sférických granulí obsahujících nanočástice Cyc. Granule o velikosti přibližně 300  $\mu\text{m}$  byly vyrobeny pomocí kombinace procesů mokrého mletí a lyofilizace. Formulované lyofilizované granule byly pojmenovány *microsponge* a vykazovaly vysokou disoluci. Během 10 minut ve vodě se rozpustilo více než 80 %. Disoluce Cyc z *microsponge* významně závisela na velikosti inkorporovaných částic cyklosporinu, což ukazuje, že mokré nano-mletí je nezbytné pro přípravu *microsponge* (Obr.8).<sup>47</sup>



Obr. 8 Schéma zobrazující uvolňování částic cyklosporinu z lyofilizovaných granulí

#### 1.3.4 Gastroretentivní tablety

Ačkoli se v minulosti většina studií zaměřovala na orálně se rozpadající nebo rychle se rozpouštějící tablety, současné studie také zkoumaly tablety s prodlouženým uvolňováním, mukoadhezivní tablety, gastroretentivní tablety.

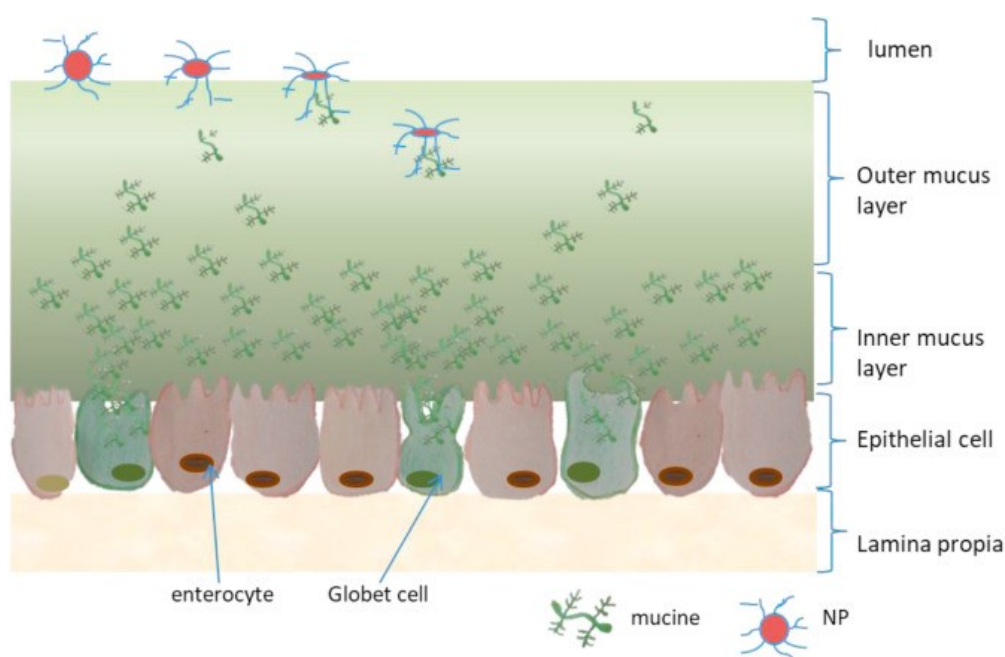
Ju-Young Kim a kol. testovali gastroretentivní tablety. Cílem jejich studie<sup>48</sup> bylo připravit tablety na bázi hypromelosity a ethylcelulosity (EC) metodou lyofilizace pro podání sodium-ecabetu (ECS), lokálně působícího antiulcerózního léčiva. Lyofilizované gastroretentivní tablety (GRT) měly porézní strukturu. Porézní struktura snížila hustotu tablety a umožnila tabletám plavat na hladině modelové žaludeční tekutiny. Tablety se udržely na hladině, dokud se během testování uvolňování *in vitro* zcela nerozpadly. Rychlost uvolňování ECS mohla být ovlivněna množstvím ethylcelulosity v tabletách. Se zvyšujícím se množstvím EC došlo ke snížení rychlosti uvolňování léčiva i rychlosti eroze GRT.

Cílem další práce od Abd EL-Aziz a kol.<sup>49</sup> bylo vyvinout gastroretentivní tablety s nízkou hustotou obsahující alfuzosin HCl (ALF), aby se udržela rychlost uvolňování léčiva a zvýšila se biologická dostupnost do hlavního místa absorpce. Tablety byly vyvinuty lisováním lyofilizovaných roztoků hypromelosity (HPMC) nebo chitosanu (CH). Byl zkoumán vliv typu polymeru a koncentrace na vzhled tablet, topografie, pórovitost, hustota, uvolňování léčiva *in vitro*, plování, bobtnání, eroze a mukoadhezivní potenciál. Při srovnání tablety na bázi CH vykazovaly vyšší pórovitost, větší velikost pórů, nižší objemovou hustotu, vyšší rychlosti uvolňování léčiva, větší bobtnání, větší rychlosti eroze a lepší mukoadhezivní vlastnosti než tablety na bázi HPMC.

Byly testovány i mukoadhezivní vlastnosti tablet z mukodendrimeru. V tomto výzkumu<sup>50</sup> byl albendazol (ABZ) formulován do mukodendrimeru do tablety s prodlouženým uvolňováním. Mukoadhezivní komplex byl syntetizován zakotvením chitosanu k dendrimeru (Muco-PPI). ABZ byl zachycen uvnitř Muco-PPI a následně byla připravena matricová tableta lyofilizací a tabletováním. Tato nová formulace ABZ na bázi mukoadhezivního komplexu zvýšila významně biologický poločas ABZ, téměř dvojnásobně ve srovnání s podáváním konvenčního léčiva. Studie uvolňování léčiva *in vivo* ukázaly, že formulace na bázi Muco-PPI mají významně vyšší  $C_{max}$  (2,40 ug/ml) ve srovnání s orálně podávaným ABZ (0,19 ug/ml) nebo konvenčními tabletami (0,20 ug/ml).

## 1.4 Pomocné látky v mukoadhezivních přípravcích

Mukóza je vysoce hydratovaná viskoelastická gelová struktura obsahující přibližně 95 % vody. Skládá se z vysoce glykosylovaného mucinového proteinu tvořeného čtyřmi monomery spojenými disulfidovými vazbami. Tyto jednotky interagují prostřednictvím van der Waalsových sil, vodíkových vazeb, elektrostatických interakcí a hydrofobních interakcí a tvoří vysoce hydratovaný hydrogel s porézní strukturou. Velikost pórů uvnitř mukózy limituje velikost částic, které mohou procházet touto sítí. Sloučeniny nebo částice větší, než velikost pórů nemusí překročit mukózní bariéru. Nanočástice tuto podmínku splňují a snadno mukózní vrstvou pronikají (Obr. 9).<sup>51</sup>



Obr. 9 Schéma zobrazující mukózní bariéru<sup>52</sup>

### 1.4.1 Mukoadhezivní polymery

Mukoadhezivní polymery jsou syntetické nebo přírodní makromolekuly, které jsou schopné se přilepit k povrchu sliznice. Koncept mukoadhezivních polymerů byl zaveden před více než 40 lety a stále představuje slibnou strategii pro prodloužení doby adheze na specifickém místě membrány.<sup>53</sup>

Mukoadhezivní biopolymery sestávají z různých hydrofilních funkčních skupin, jako je amid, karboxyl, hydroxyl a sulfát. Tyto funkční skupiny se vážou s mukózou pomocí vodíkových vazeb, hydrofobních, elektrostatických interakcí a dalších interakcí. Biopolymery bobtnají ve vodě díky přítomnosti hydrofilních skupin a velkého počtu

adhezivních míst.<sup>54</sup> Ideální biopolymer pro mukoadhezivní systém pro dodávání léčiv by měl mít tyto charakteristiky:

- a) je nedráždivý
- b) jeho rozkladné produkty jsou netoxické a neabsorbovatelné
- c) tvoří silnou nekovalentní vazbu s povrchem epitelálních nebo hlenových buněk
- d) rychle přilne ke tkáni
- e) má určitou specifčnost pro dané místo
- f) umožní snadnou inkorporaci léčiva a nepřerušuje jeho uvolňování
- g) biopolymer se nesmí během skladování lékové formy rozkládat
- h) cena polymeru by neměla být příliš vysoká (ekonomicky výhodná)

Biopolymery, které adherují na biologických površích, lze rozdělit do několika kategorií:

- a) biopolymery, které ulpívají prostřednictvím nespecifických interakcí;
- b) mají hydrofilní funkční skupiny
- c) vážou se na specifický receptor na povrchu sliznice nebo buňky.

Mezi používané biopolymery patří například chitosan<sup>55</sup>, pektin a hypromelosa<sup>56</sup>, polyethylenglykol a polymethakrylová kyselina<sup>57</sup>, alginát.<sup>58</sup>

V některých studiích je považováno pH polymeru za jeden z hlavních faktorů ovlivňujících mukoadhezivní vazbu aniontových a kationtových polymerů.<sup>59</sup> Proto byly polymery testovány při dvou různých pH, konkrétně při pH 3,0 a 7,0. Ukázalo se, že pro mukoadhezi je také důležitá schopnost polymeru absorbovat vodu z mukózy.<sup>60</sup> Rychlost absorpce vody může záviset na průměru pórů polymeru<sup>61</sup>, který je mimo jiné ovlivněn metodou sušení.<sup>62</sup> Byla měřena doba adheze po lyofilizaci a po sušení na vzduchu. Nejvyšší mukoadheze byla prokázána u thiolovaných polymerů sušených lyofilizací při pH 3. Naopak polyakryláty byly nejvíce mukoadhezivní ve formě precipitovaných neutrálních sodných solí. Přírodní polysacharidy, deriváty celulosy, povidonu a polyethylenglykol, ačkoli byly dříve prezentovány jako dobrá mukoadheziva, vykazovaly nízkou až téměř žádnou mukoadhezi. Bylo zjištěno, že pH polymeru a metoda sušení jsou důležitými faktory ovlivňujícími mukoadhezivní vlastnosti polymerů.

Mukoadhezivní materiály jsou široce využívány při vývoji transmukózních lékových forem aplikovaných okulárně, nasálně, esofageálně, orálně, vaginálně, rektálně a intravezikálně. Byly aplikovány nejvýznamnější a nejnovější syntetické metody používané k modifikaci polymerních materiálů za účelem zlepšení mukoadhezivních

vlastností. Metody zahrnovaly chemickou konjugaci polymerů s molekulami nesoucími thiolové, katecholové, boronátové, akrylátové, methakrylátové, maleimidové a *N*-hydroxy(sulfo)sukcinimidesterové skupiny.<sup>63</sup>

Byl navržen nový zesítěný mukoadhezivní systém, který kovalentně interagoval s glykoproteinem mucinu, čímž zajistil prodloužené uvolňování léčiva. Byla prokázána kovalentní vazba mezi mucinem a polymerním hydrogelem vytvořeným *in situ* z polyetylen glykoldiakrylátu (PEG-DA). Schopnost mukoadheze PEG-DA byla hodnocena měřením síly v tahu. PEG-DA je vhodným kandidátem pro prodloužené uvolňování hydrofilního léčiva ibuprofenu.<sup>64</sup> Bianco-Peled a kol.<sup>65</sup> připravili maleinimidový alginát reakcí komerčně dostupného PEG-bis-maleimidu s thiolovaným alginátem. Bylo zjištěno, že alginát nesoucí PEG maleimid (Alg-PEGM) vykazoval dvojnásobnou mukoadhezivitu ve srovnání s thiomerním analogem.

#### **1.4.2 Povrchově aktivní látky v lyofilizovaných přípravcích**

V případě bukalního podání lze ke zvýšení transbukální permeace použít povrchově aktivní látky. Byla použita směs povrchově aktivních látek s cílem připravit lyofilizaci mukoadhezivní tablety dispergovatelné v ústech, obsahující lidokain a prilokain. Tato studie posuzovala synergii mezi mukoadhezivním polymerem a směsí povrchově aktivních látek, která vede ke zvýšení uvolňování a permeace léčiva. Pullulan interagoval s povrchově aktivními látkami, což vedlo ke snížení viskozity matrice a usnadnění uvolňování a permeace léčiva. U směsi s HPMC povrchově aktivní látka změnila polaritu, což následně snížilo difúzi léčiva.<sup>66</sup>

Povrchově aktivní látky zkoumala i další studie.<sup>67</sup> Jejím cílem byla formulace lyofilizovaného bioadhezivního vaginálního bi-gelu postupně uvolňujícího tenofovir. Byly připraveny systémy obsahující tři různé podíly hydrogelu guarové klovatiny a sezamového oleje, přičemž jako povrchově aktivní látka byl přidán Span 60 nebo směs Span 60 a Tween 60. Systém s nejnižším podílem hydrogelu guarové klovatiny a sezamového oleje a zároveň obsahující Span 60 a Tween 60 měl nejvyšší konzistenci a adhezivitu.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Suroviny

Čištěná voda (Faf UK HK)

Dextran z *Leuconostoc* spp. (Sigma-Aldrich, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika)

Hydrogenfosforečnan draselný  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich, USA)

Iota-karagenan (Sigma-Aldrich, USA)

Lyofilizované tablety (AUMED a.s., Česká republika)

Makrogol 300 (Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika)

Mucin z prasečích žaludků (Sigma-Aldrich, USA)

Tableta pro přípravu fosfátového pufru pH 7,4 (Sigma-Aldrich, USA)

Trehalosa dihydrát (Sigma-Aldrich, USA)

### 2.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy AND HR-120, max.120 g, d=0,1 mg (AaD Company, Limited, Japonsko)

Digitální teploměr (Hanna Instruments Czech s.r.o., Česká republika)

Digitální váhy KERN 440-35 N, max. 400 g, d=0,01 g (Fisher Scientific s.r.o.)

Exsikátor (Fisher Scientific s.r.o.)

Lepicí páska (Semoplast s.r.o.)

Magnetická míchačka s ohřevem IKA - WERKE RT 5

Melaminová třecí miska s tloučkem 300 ml (LP Italiana)

Rotační reometr Kinexus Pro+ (Malvern Instruments, Inc.)

## 2.3 Příprava hydratovaného mucinu

Bylo připraveno 200,0 g fosfátového pufru pH 7,4 rozpuštěním jedné tablety ve 200,0 g čištěné vody při teplotě 25 °C. Bylo naváženo 0,50 g mucinu z prasečích žaludků a v třecí misce byl mucin postupně hydratován připraveným pufrem pH 7,4 v poměru 1 díl mucinu a 5 dílů pufru. Po důkladné homogenizaci byl hydratovaný mucin adjustován do skleněné vialky s dobře těsnícím uzávěrem a označen.

## 2.4 Příprava formulací pro lyofilizaci

Bylo připraveno 20,0 g formulace daného složení podle Tab.1. V rychlovarné konvici byla ohřáta čištěná voda a navážena do třech kádinek. Kádinky byly umístěny na elektromagnetickou míchačku a bylo spuštěno míchání. Následně byla změřena teplota vody v kádinkách a při teplotě 80 °C bylo na hladinu nasypáno 0,06 g iota-karagenanu. Míchalo se do rozpuštění. Po rozpuštění karagenanu byly přidány 2,00 g dextransu, a po rozpuštění 0,20 g makrogolu. Do druhé kádinky bylo ještě přimícháno 0,02 g hydrogenfosforečnanu draselného, a do třetí 0,02 g dihydrogenfosforečnanu draselného. Formulace 4 a 5 byly připraveny obdobně podle Tab. 1. Do dvou kádinek bylo naváženo předepsané množství vody pokojové teploty a přidány 2,00 g dextransu. Po rozpuštění dextransu bylo přidáno 0,60 g trehalosy. Nakonec bylo přidáno 0,20 g a 0,40 g makrogolu 300. Po promíchání byly všechny roztoky adjustovány do tmavých lékovek, uzavřeny a umístěny do chladničky.

Tab. 1 Složení formulací pro lyofilizaci v %

	D	CRI	T	MG	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
formulace 1	10	0,3	-	1	-	-
formulace 2	10	0,3	-	1	0,1	-
formulace 3	10	0,3	-	1	-	0,1
formulace 4	10	-	3	1	-	-
formulace 5	10	-	3	2	-	-

D Dextran

CRI Iota-karagenan

T Trehalosa

MG Makrogol 300

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Hydrogenfosforečnan draselný

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Dihydrogenfosforečnan draselný

## 2.5 Lyofilizované tablety

Byly testovány reologické vlastnosti lyofilizovaných tablet dodané z firmy AUMED a.s. Tablety byly připraveny z dextranu, iota-karagenanu, trehalosu, makrogolu 300, hydrogenfosforečnanu draselného, dihydrogenfosforečnanu draselného a *Bordetella pertussis vaccine* (BPV) ve dvou různých koncentracích. Před testováním byly označeny čísly 1 až 5 a písmenem *a* nebo *b* viz Tab.2. Všechny tablety obsahovaly dextran a makrogol 300. Tablety 1 až 3 obsahovaly iota-karagenan. Tablety 2 a 3 hydrogen resp. dihydrogenfosforečnan draselný. Tablety 4 a 5 obsahovaly místo iota-karagenanu trehalosu. Označení *a* nesly tablety s 0,3 % BPV a označení *b* tablety s 0,5 % BPV.

Tab. 2 Složení lyofilizovaných tablet v %

označení	D	CRI	T	MG	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	BPV	
1	a	10	0,3	-	1	-	-	0,3
	b	10	0,3	-	1	-	-	0,5
2	a	10	0,3	-	1	0,1	-	0,3
	b	10	0,3	-	1	0,1	-	0,5
3	a	10	0,3	-	1	-	0,1	0,3
	b	10	0,3	-	1	-	0,1	0,5
4	a	10	-	3	1	-	-	0,3
	b	10	-	3	1	-	-	0,5
5	a	10	-	3	2	-	-	0,3
	b	10	-	3	2	-	-	0,5

D	Dextran
CRI	Iota-karagenan
T	Trehalosa
MG	Makrogol 300
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogenfosforečnan draselný
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihydrogenfosforečnan draselný
BPV	Bordetella pertussis vaccine



## 2.6 Stanovení tokových, viskoelastických a adhezivních vlastností

Byly testovány reologické vlastnosti hydratovaného mucinu, formulací pro lyofilizaci a lyofilizovaných tablet. Testy byly provedeny na rotačním reometru Kinexus Pro+ firmy Malvern (Obr. 10) s vyhodnocením v softwaru rSpace for Kinexus verze 1.75.

Před zapnutím přístroje byl zkontrolován přívod stlačeného vzduchu. Byl odstraněn kryt horní a spodní geometrie, zapnut počítač a spuštěn softwaru rSpace. Následovalo spárování přístrojů a stabilizace. Byla vybrána vhodná horní geometrie a nastavena nulová štěrbina. Následně byl zvolen příslušný test (Tab. 3).



Obr. 10 Rotační reometr Kinexus Pro+ <sup>68</sup>

Tab. 3 Zvolené testy pro měření reologických vlastností vzorků

	Typ testu		
	Rotační	Oscilační	Tahový
Hydratovaný mucin	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
Formulace pro lyofilizaci	<b>X</b>	<b>X</b>	-
Lyofilizované tablety	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>

Tab. 4 Přehled testů realizovaných na rotačním reometru

Rotační test	<i>Viscometry_0010 Table of shear rates with Power law model fit</i>
Oscilační test	<i>rSolution_0008 Characterising gel properties using oscillation testing</i>
Tahový test	<i>rSolution_0019 Determination of pressure sensitive tack and adhesion using axial measurements</i>

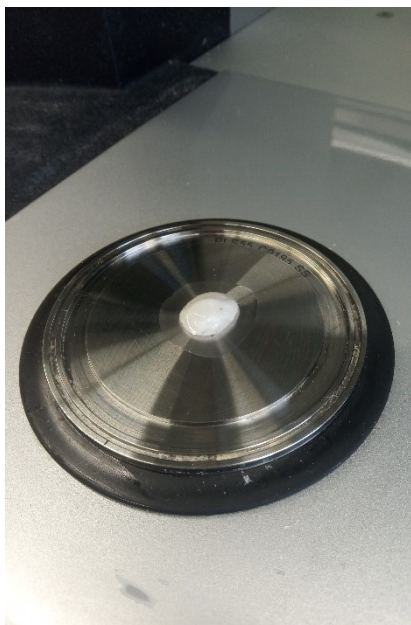
### 2.6.1 Rotační testy

Při rotačních testech byla vybrána sekvence *Viscometry\_0010 Table of shear rates with Power law model fit*. Postupovalo se podle pokynů softwaru. Parametry nastavení testu jsou shrnuté v Tab. 5.

Tab. 5 Parametry nastavení reometru pro stanovení tokových vlastností

Parametr	Hydratovaný mucin	Formulace pro lyofilizaci	Lyofilizované tablety
Teplota	37 °C		
Horní geometrie	CP2/20	CP4/40	CP2/20
Rozsah rychlostního spádu	0,1 – 100 s <sup>-1</sup>		

Vzorek byl nanesen na střed dolní geometrie. Poté byla spuštěna horní geometrie a přebytečné množství vzorku odstraněno. Geometrie byly zakryty ochranným krytem, poté byl spuštěn test. Po ukončení testu byl vzorek odstraněn a geometrie očištěny. Při měření lyofilizovaných tablet byla tableta umístěna na spodní geometrii do středu a byla hydratována 0,35 g pufru pH 7,4 (Obr.11). Mucin a formulace pro lyofilizaci byly změřeny třikrát, hydratované tablety jednou. Výsledky byly zapsány a uloženy v sekci Analysis Tables. Byl zaznamenán index konzistence (K), index tokového chování (n), korelační koeficient (corr.) a stanoven průměr a směrodatná odchylka.



Obr. 11 Tableta umístěná na dolní geometrii reometru a hydratovaná pufrům pH 7,4

### 2.6.2 Oscilační testy

Viskoelastické vlastnosti mucinu, vybraných formulací a lyofilizovaných tablet byly hodnoceny oscilačním testem *rSolution\_0008 Characterising gel properties using oscillatory testing*. Parametry testu jsou shrnuty v Tab. 6. Test je složen z těchto sekvencí:

- *Load sample*: nanesení vzorku
- *Amplitude sweep strain controlled*: měření při konstantní frekvenci
- *LVER Analysis*: analýza lineární viskoelastické oblasti
- *Frequency sweep strain controlled*: měření při konstantní amplitudě
- *Power law model fit*: výpočet relaxační síly a relaxačního exponentu
- *Amplitude sweep with yield stress analysis*: výpočet meze toku

Tab. 6 Parametry nastavení testu pro stanovení viskoelastických vlastností

Parametry	Mucin Formulace	Lyofilizované tablety
Teplota	37 °C	
Horní geometrie	PU20	
Finální mezera	0,5 mm	1 mm
Rozsah rychl. spádu pro amplitude sweep	0,01 – 100 %	
Frekvence	1,0 Hz	

Měřený vzorek byl nanesen na spodní geometrii. Byla spuštěna horní geometrie, při měření mucínu a kapalných formulací byl odstraněn přebytek vzorku. Byl vložen ochranný kryt. Následovala stabilizace a potom byl spuštěn test. Nejprve proběhl oscilační test při konstantní frekvenci, následoval test při konstantní oscilaci. Test byl vyhodnocen pomocí elastického modulu, viskózního modulu a fázového úhlu v závislosti na oscilačním namáhání. Byl použit *Power law model* a zjištěny hodnoty  $K^*$  (relaxační síla) a  $n^*$  (relaxační exponent). Byly vyhodnoceny hodnoty meze toku  $\sigma$ .

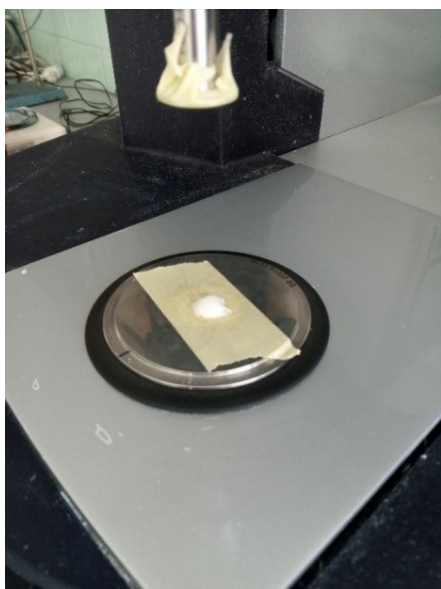
### 2.6.3 Tahové testy

Byl proveden test adhezivních vlastností hydratovaného mucinu a mukoadhezivních vlastností lyofilizovaných tablet pomocí sekvence *rSolution\_0019 Determination of pressure sensitive tack and adhesion using axial measurements*. Byla zvolena geometrie, nastavena teplota, kontaktní čas, kontaktní síla a finální mezera (Tab. 7).

Tab. 7 Parametry nastavení testu pro stanovení adhezních vlastností

Parametry	Hydratovaný mucin	Lyofilizované tablety
Teplota	37 °C	
Horní geometrie	PU20	
Kontaktní čas	10 s	
Kontaktní síla	1 N; 5 N	1 N

Byl nanesen hydratovaný mucin o velikosti hrášku na spodní geometrii a změřen. Při měření tablet byla na obě geometrie přilepena páska se savým povrchem. Na spodní geometrii s páskou bylo naváženo 0,15 g hydratovaného mucinu. Na mucin byla umístěna lyofilizovaná tableta a následně hydratována 0,35 g pufru pH 7,4 (Obr. 12). Nakonec se nanasla tenká vrstva mucinu i na horní geometrii. Poté byl spuštěn test. Po ukončení testu byl vzorek odstraněn a geometrie očištěny. Byly měřeny tři tablety od každého složení. Každá tableta byla měřena třikrát za sebou. Hydratovaný mucin by změřen pětkrát. Byla vyhodnocena maximální síla nutná k odtržení horní geometrie od spodní, plocha pod křivkou síla/čas a doba potřebná pro pokles maximální síly o 90 % (odlehčení). Byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.



Obr. 12 Hydratovaná tableta s mucinem při měření adhezivních vlastností

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V diplomové práci byly zhodnoceny reologické vlastnosti tekutých formulací pro lyofilizované orální vakcíny. Vhodné reologické vlastnosti jsou důležité ve fázi dávkování formulací do blistrů. Dále byly hodnoceny reologické a mukoadhezivní vlastnosti lyofilizovaných tablet po jejich hydrataci pufrům pH 7,4 s cílem predikovat adhezi tablet v místě aplikace, průběh dezintegrace tablet a uvolnění léčiva. Rovněž byl testován hydratovaný mucin, použitý jako modelový substrát pro testování mukoadhezivní tablety, aby byly standardizovány jeho vlastnosti. Základem formulací pro lyofilizované tablety je dextran, makrogol 300 a iota-karagenan nebo trehalosa. Přesné složení formulací je uvedeno v Tab. 1. Lyofilizované tablety obsahovaly ještě 0,3 % resp. 0,5 % *Bordetella pertussis vaccine* (Tab. 2).

Testování bylo realizováno na absolutním rotačním reometru Kinexus Pro + Malvern a výsledky vyhodnoceny v softwaru rSpace for Kinexus verze 1.75.

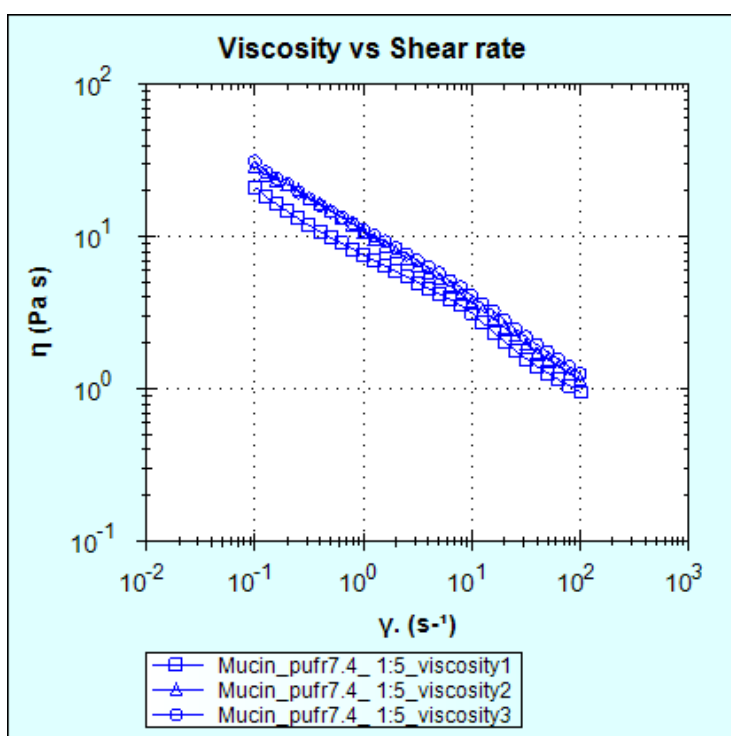
Tokové vlastnosti byly hodnoceny na základě analýzy nerovnovážných (alternativních) tokových křivek vhodným modelem.<sup>69</sup> Při stanovení nerovnovážné tokové křivky dochází k postupnému zvyšování rychlostního spádu v daném rozsahu (*shear rate ramp*), aniž by se čekalo na ustálení do rovnovážného stavu, což lépe simuluje skutečné namáhání vzorku při jeho zpracování a aplikaci.<sup>70</sup> Model vhodný pro analýzu tokových křivek byl určen dle hodnoty koeficientu korelace. Hodnoty indexů použitých modelů sloužily pro porovnání tokového chování testovaných vzorků.

Viskoelastické vlastnosti byly hodnoceny na základě průběhu elastického modulu, viskózního modulu a fázového úhlu v závislosti na oscilačním namáhání. Hodnoty relaxační síly, relaxačního exponentu a meze toku byly použity pro porovnání testovaných formulací.

Mukoadhezivní vlastnosti finálních lyofilizátů byly hodnoceny tahovými testy, při kterých byl jako modelový substrát použit mucin hydratovaný pufrům pH 7,4. Mukoadhezivita vzorků byla porovnána na základě maximální síly potřebné pro odtržení vzorku od substrátu.

### 3.1 Reologické a adhezivní vlastnosti hydratovaného mucinu

Byly získány viskozitní křivky mucinu hydratovaného pufrům pH 7,4 v poměru 1:5 (Obr.13) a analyzovány pomocí *Power law* modelu. Tabulka 8 uvádí index konzistence, který je číselně roven viskozitě při rychlostním spádu  $1 \text{ s}^{-1}$ , a index tokového chování, který vyjadřuje míru neneutonského chování. Hydratovaný mucin vykazuje neneutonské tokové chování s výrazným poklesem viskozity při namáhání a indexem konzistence přibližně  $10 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ . Případnou mez toku a bikoherentní strukturu typickou pro gel lze prokázat oscilačními testy.

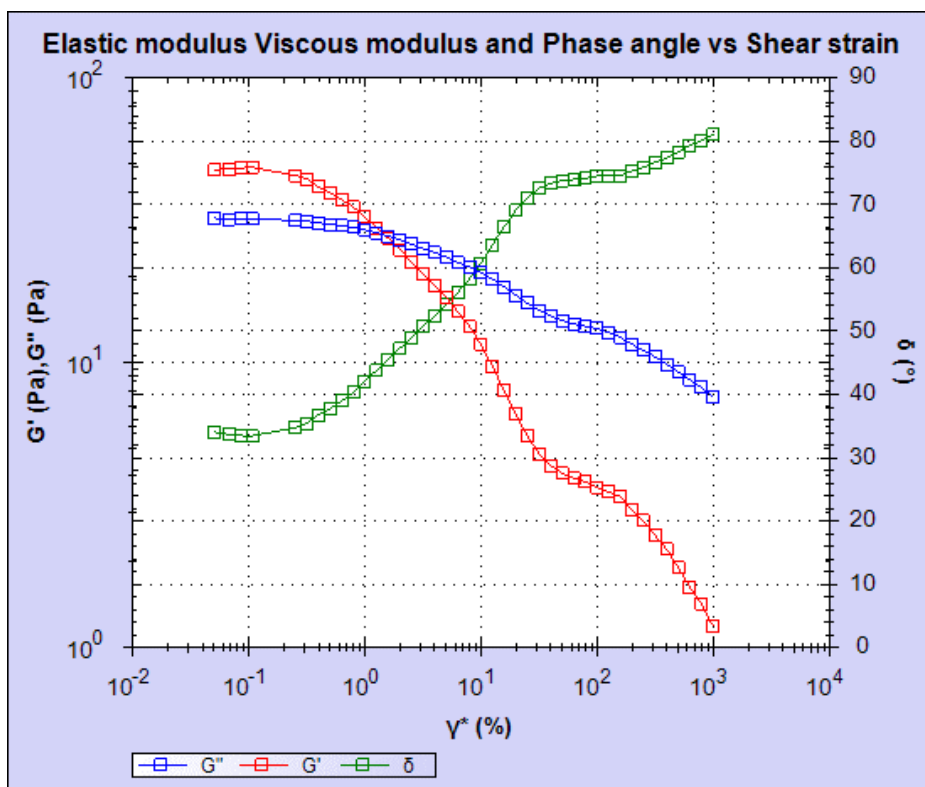


Obr. 13 Viskozitní křivka mucinu hydratovaného v poměru 1:5

Tab. 8 Koeficienty mocninného vztahu pro mucin

Měření	K ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ )	n (-)	corr.
1	7,6640	0,5629	0,9982
2	11,0300	0,5458	0,9989
3	10,6100	0,5255	0,9990
průměr	9,7680	0,5447	
SD	1,8342	0,0187	

Průběh elastického modulu, viskózního modulu a fázového úhlu v závislosti na rychlostním spádu je znázorněn na Obr. 14. V oblasti lineární viskoelastivity (LVER) je hodnota elastického modulu vyšší než hodnota viskózního modulu. Hodnota fázového úhlu je přibližně 35°. Z reologického hlediska se tedy jedná o viskoelastickou pevnou soustavu.



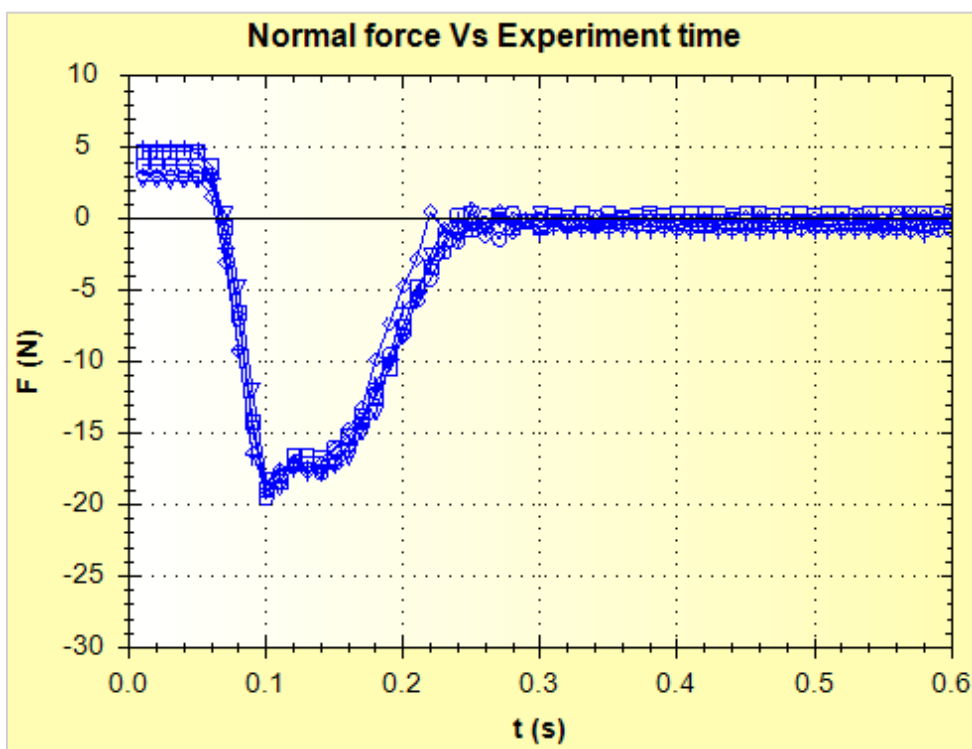
Obr. 14 Závislost elastického modulu  $G'$ , viskózního modulu  $G''$  a fázového úhlu  $\delta$  na rychlostním spádu

Aplikací *Power law* (mocinného) modelu byly získány hodnoty relaxační síly a relaxačního exponentu (Tab. 9). Relaxační síla číselně odpovídá elastickému modulu  $G'$  při dané úhlové rychlosti. Relaxační exponent je důležitý parametr pro charakterizaci pevnosti 3D struktury gelu. U ideálního gelu nedochází k relaxaci struktury a hodnota relaxačního exponentu se rovná nule. Hodnota relaxačního exponentu mucinu  $n^* = 0,3691$  značí určitou relaxaci jeho gelové struktury vlivem namáhání. Byla stanovena mez toku mucinu, vyjadřující napětí potřebné k rozrušení 3D struktury a iniciaci toku. Po překročení meze toku mucinu, která je 14,84 Pa, se začne viskoelastický mucin chovat jako viskoelastická kapalina.

Tab. 9 Relaxační síla  $K^*$  a relaxační exponent  $n^*$  a mez toku  $\bar{\sigma}$  mucinu hydratovaného PBS pH 7,4 v poměru 1:5

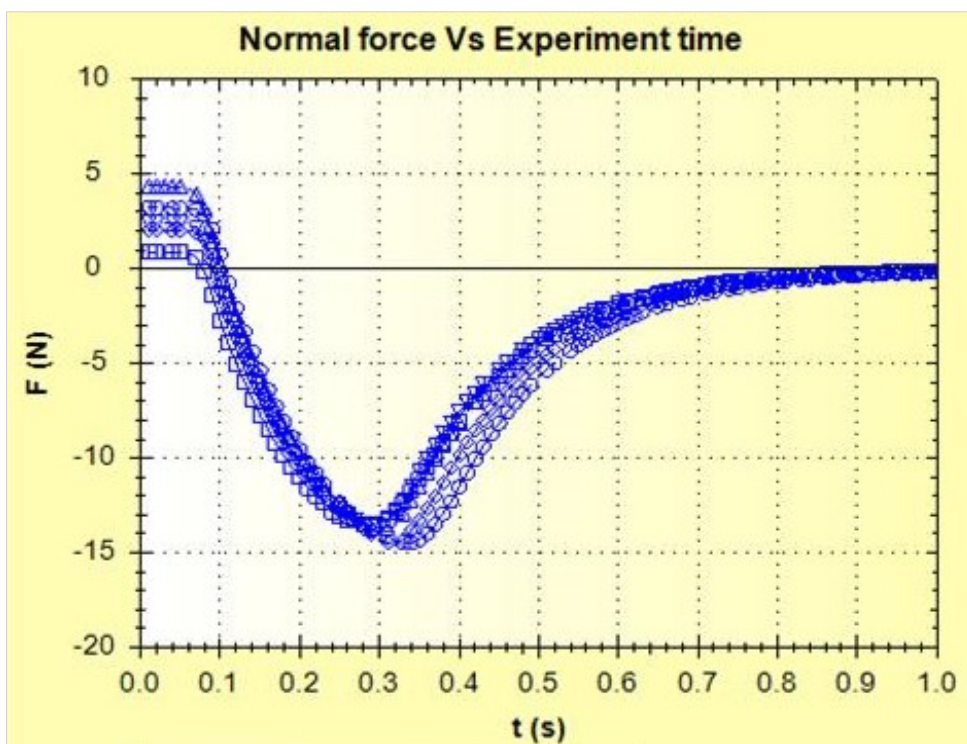
	$K^*$ ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ )	$n^*$ (-)	corr.	$\bar{\sigma}$ (Pa)
Mucin	39,69	0,3691	0,9988	14,84

Byly testovány adhezivní vlastnosti mucinu hydratovaného puřem pH 7,4 v poměru 1:5 při dvou různých kontaktních silách (Obr.15 a 16). Byly získány hodnoty síly potřebné k odtrhnutí vzorku od podkladu, hodnoty plochy pod křivkou a času potřebného ke snížení normálové síly o 90 % (Tab. 10). Adhezivita mucinu, vyjádřená hodnotou síly, byla vyšší při vyšší kontaktní síle. Čas potřebný k odlehčení je kratší při vyšší kontaktní síle. Plocha pod křivkou síla/čas, která je mírou adhezních/kohezních sil v materiálu, není kontaktní silou významně ovlivněna.<sup>71</sup>



Obr. 15 Záznam síla/čas při kontaktní síle 1 N





Obr. 16 Záznam síla/čas při kontaktní síle 5 N

Tab. 10 Adhezivita mucinu při různé kontaktní síle

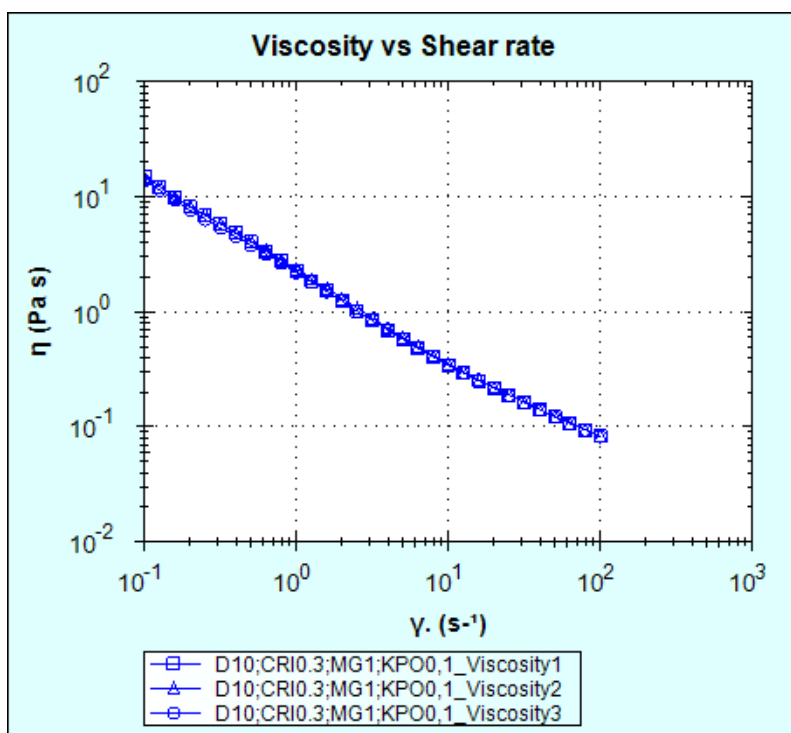
Kontaktní síla	Síla (N)	Čas (s)	Plocha (N/s)
1 N	$13,95 \pm 0,48$	$0,6088 \pm 0,1269$	$4,5474 \pm 0,3283$
5 N	$17,21 \pm 0,41$	$0,2912 \pm 0,1174$	$4,1180 \pm 0,1775$

### 3.2 Reologické vlastnosti formulací pro lyofilizaci

Tokové vlastnosti formulací určených k přípravě orálních tablet lyofilizací byly charakterizovány viskozitními křivkami. Průběh viskozitních křivek formulací 1, 2 a 3, které obsahují 0,3 % iota-karagenanu je znázorněn na Obr. 17. Pro jejich analýzu byl použit Power law model (Tab. 11). Viskozitní křivky formulací 4 a 5, ve kterých byla místo iota-karagenanu použita trehalosa, měly průběh odlišný (Obr. 18) a pro jejich analýzu byl použit Sisko model (Tab. 12).

Formulace s iota-karagenanem vykazovaly vyšší viskozitu než formulace s trehalosou. Projevil se rovněž vliv hodnoty pH. Nejvyšší index konzistence a zároveň nejnižší index tokového chování měla formulace 2, která obsahuje hydrogenfosforečnan draselný. Následuje formulace 1 obsahující čištěnou vodu a formulace 3 obsahující

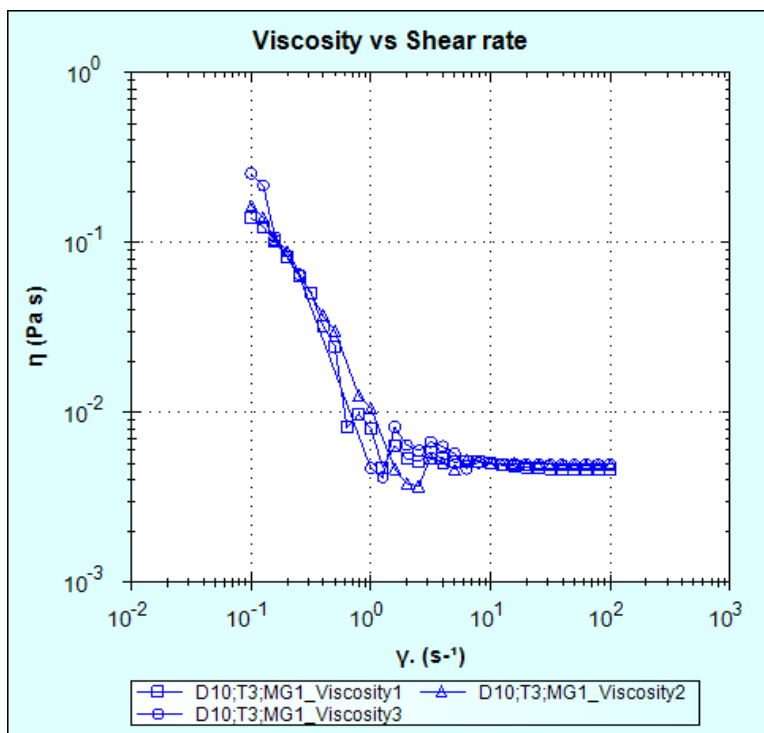
dihydrogenfosforečnan draselný. Čím je viskozita formulace nižší, tím více se tokové chování blíží Newtonské kapalině.



Obr. 17 Ukázka průběhu viskozitních křivek analyzovaných dle Power law modelu

Tab. 11 Koeficienty Power law modelu

	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (-)	corr.
Formulace 1	0,3111 ± 0,3111	0,6734 ± 0,0065	0,9971
Formulace 2	2,2637 ± 0,0709	0,2354 ± 0,0080	0,9879
Formulace 3	0,0539 ± 0,0023	0,8943 ± 0,0130	0,9993

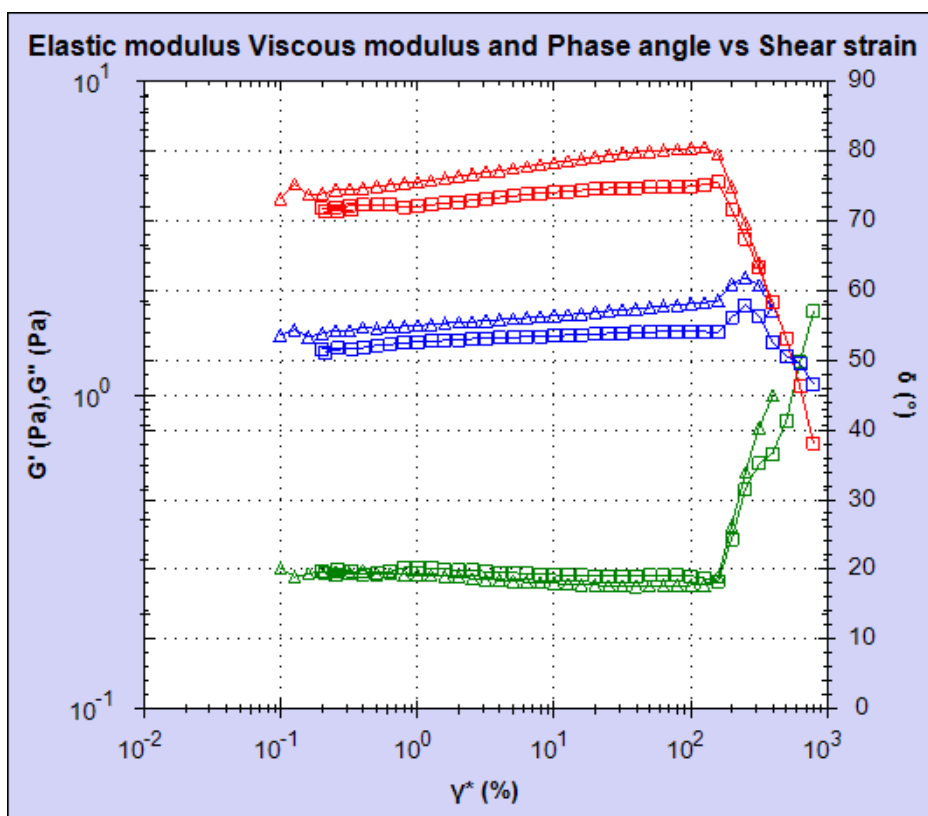


Obr. 18 Ukázka průběhu viskozitních křivek analyzovaných dle Sisko modelu

Tab. 12 Koficienty Sisko modelu

	$K_2$ (Pa.s <sup>n</sup> )	n (-)	corr.
Formulace 4	$0,0109 \pm 0,0037$	$1,2553 \pm 0,3000$	0,9965
Formulace 5	$0,0025 \pm 0,0008$	$1,5420 \pm 0,3125$	0,9861

Viskoelastické vlastnosti formulací určených k lyofilizaci byly charakterizovány oscilačními testy, během kterých jsou vzorky vystaveny nižšímu namáhání, než při rotačních testech. Je možno zjistit, zda se jedná jen o viskózní kapalinu nebo gel s 3D strukturou. Struktura gelu byla zjištěna pouze u formulací 1 a 2. Na Obr. 19 je průběh elastického modulu  $G'$ , viskózního modulu  $G''$  a fázového úhlu  $\delta$  v závislosti na rychlostním spádu. Gelovou strukturu, tedy charakter viskoelastické pevné látky, dokazuje vyšší hodnota elastického modulu než modulu viskózního a hodnota fázového úhlu přibližně  $20^\circ$ . V Tab. 13 jsou uvedeny hodnoty relaxační síly ( $K^*$ ), relaxačního exponentu ( $n^*$ ) a meze toku ( $\sigma$ ). Formulace 2 tvoří tužší gel, který podléhá relaxaci méně než v případě formulace 1. Formulace 2 má také vyšší hodnotu meze toku, vyjadřující napětí potřebné k rozrušení 3D struktury.



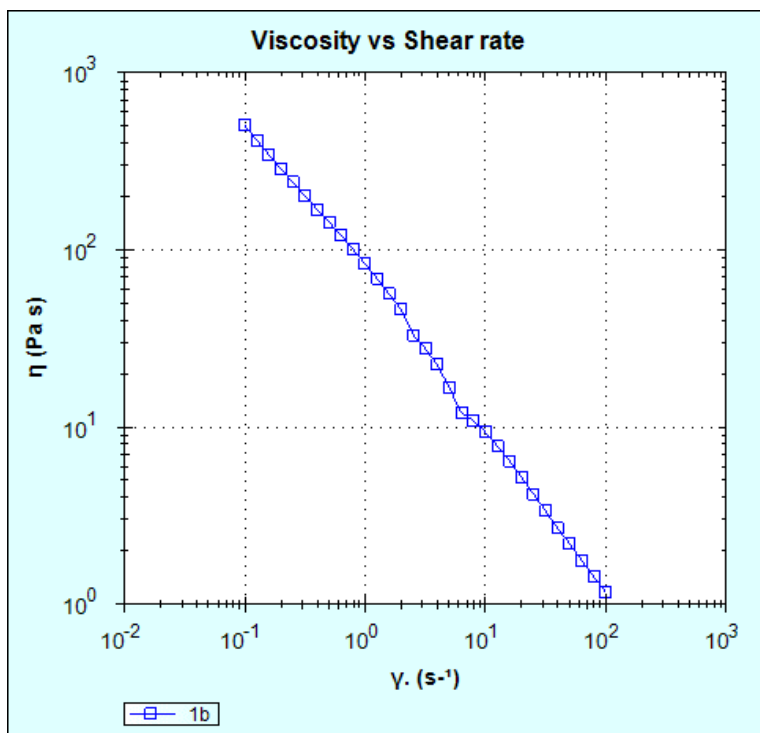
Obr. 19 Závislost **elastického modulu  $G'$** , **viskózního modulu  $G''$**  a **fázového úhlu  $\delta$**  na rychlostním spádu (čtverec - formulace 1; trojúhelník – formulace 2)

Tab. 13 Relaxační síla  $K^*$  a relaxační exponent  $n^*$  a mez toku

	$K^*$ (Pa·s)	$n^*$ (-)	corr.	$\sigma$ (Pa)
Formulace 1	$0,35 \pm 0,06$	$0,7063 \pm 0,0920$	0,9725	$3,24 \pm 0,80$
Formulace 2	$1,79 \pm 0,18$	$0,3928 \pm 0,0154$	0,8977	$8,25 \pm 0,76$

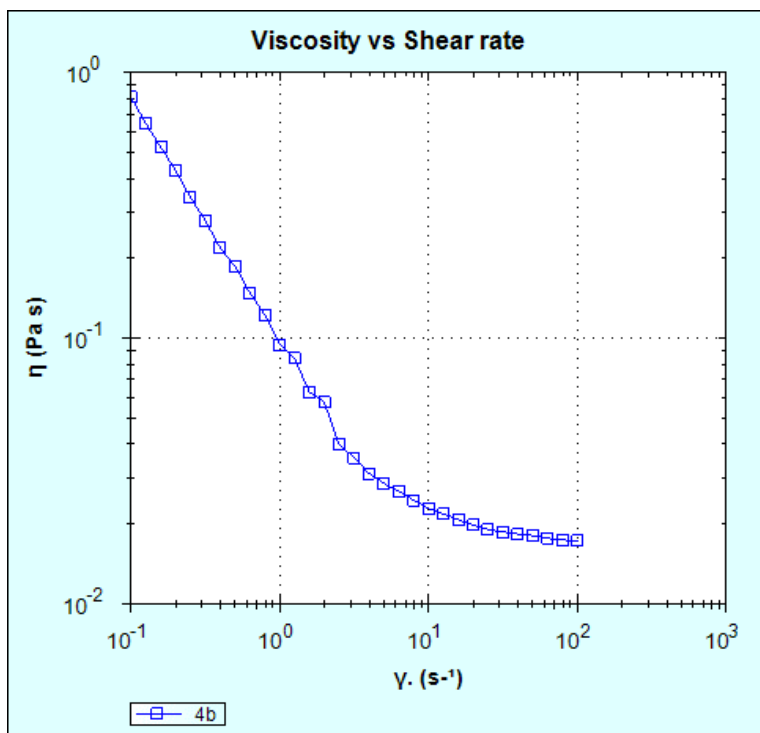
### 3.3 Reologické a mukoadhezivní vlastnosti lyofilizovaných tablet

Lyofilizované tablety byly před testováním hydratovány konstantním množstvím pufru pH 7,4. Pro testování mukoadhezivity byl použit modelový substrát standardizovaných vlastností (viz. kap. 3.1 Reologické a adhezivní vlastnosti hydratovaného mucinu). Viskozitní křivky lyofilizovaných tablet 1a až 3b vykazují lineární pokles viskozity vlivem rychlostního spádu, jak ukazuje Obr. 20.



Obr. 20 Ukázka průběhu viskozitní křivky lyofilizovaných tablet 1a až 3b

Viskozitní křivky lyofilizovaných tablet 4a až 5b vykazují nejprve lineární pokles viskozity vlivem rychlostního spádu, při vyšších hodnotách rychlostního spádu je viskozita konstantní, tzv. *infinite viscosity* (Obr. 21).



Obr. 21 Ukázka průběhu viskozitní křivky lyofilizovaných tablet 4a až 5b

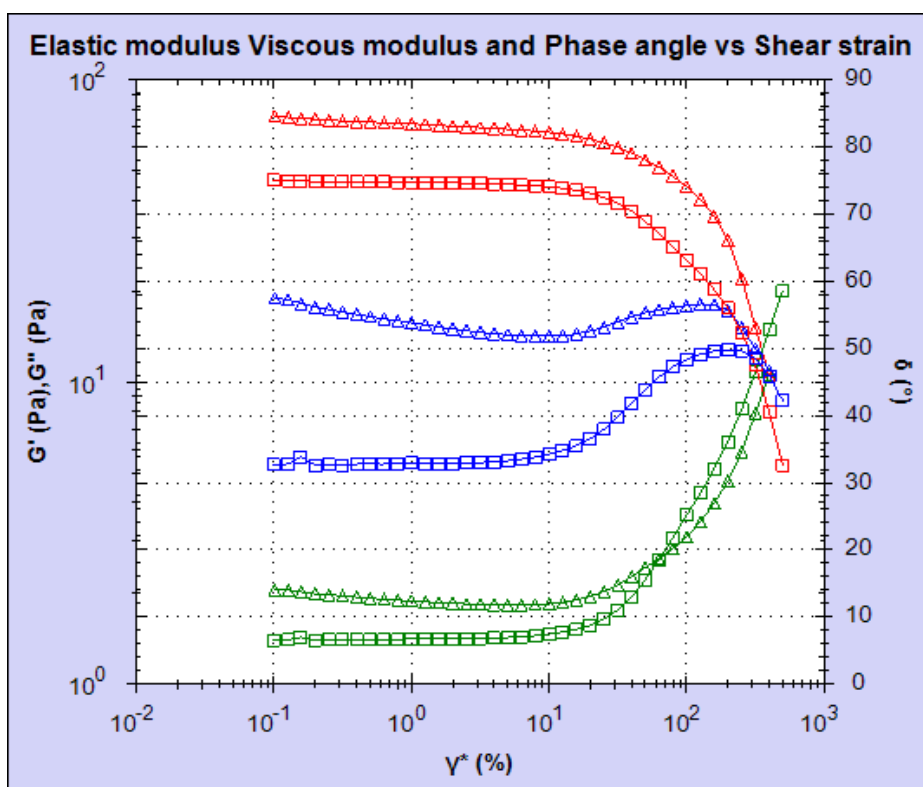
Křivky byly analyzovány Power law modelem i Sisko modelem (Tab. 14). Vyšší korelace byla zjištěna u Sisko modelu. Z hodnot indexu konzistence vyplývá, že tablety 1, 2 a 3 obsahující iota-karagenan mají vyšší index konzistence než tablety 4 a 5 s trehalosou. Iota-karagenan tedy zvyšuje viskozitu lyofilizovaných tablet. Zjištěné výsledky korelují s tokovými vlastnostmi formulací pro lyofilizaci. Lyofilizované tablety s vyšším obsahem *Bordetella pertussis vaccine* mají nižší viskozitu.

Tab. 14 Koficienty Power law modelu a Sisko modelu lyofilizovaných tablet

Lyo		Power law model			Sisko model		
		K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (-)	corr.	K <sub>2</sub> (Pa·s <sup>n</sup> )	n (-)	corr.
1	a	127,5000	0,1196	0,9023	84,38	1,5010	0,9951
	b	73,7700	0,1087	0,9427	84,03	0,7776	0,9998
2	a	113,2000	0,0132	0,9458	131,30	0,9021	0,9998
	b	54,7100	0,1417	0,9056	42,71	0,9747	0,9990
3	a	80,5500	0,0467	0,6098	95,33	0,7921	0,9991
	b	76,5700	0,0778	0,9029	76,70	0,8803	0,9997
4	a	0,2853	0,6262	0,9544	0,0839	1,2720	0,9981
	b	0,1191	0,4226	0,9177	0,0861	0,9660	0,9998
5	a	0,0427	0,6395	0,9704	0,0121	1,2330	0,9990
	b	0,0398	0,7073	0,9738	0,0108	1,1660	0,9993

Viskoelastické vlastnosti byly testovány u lyofilizovaných tablet 1a, obsahujících 0,3 % iota-karagenanu a lyofilizovaných tablet 4a, které místo iota-karagenanu obsahují 3 % trehalosu. Ostatní složky tablet jsou stejné (viz. Tab. 2). Z důvodu omezeného celkového množství lyofilizovaných tablet bylo provedeno jen jedno měření.

Průběh elastického modulu  $G'$ , viskózního modulu  $G''$  a fázového úhlu  $\delta$  v závislosti na rychlostním spádu je na Obr. 22. Gelovou strukturu obou formulací dokazují vyšší hodnoty elastického modulu než modulu viskózního. Potvrzuje to i hodnota fázového úhlu, která je přibližně  $14^\circ$ , resp.  $7^\circ$ . V Tab. 15 jsou uvedeny hodnoty relaxační síly ( $K^*$ ), relaxačního exponentu ( $n^*$ ) a meze toku ( $\sigma$ ). Formulace 1a představuje tužší gel, vykazuje nižší relaxaci a má vyšší hodnotu meze toku než formulace 4a.

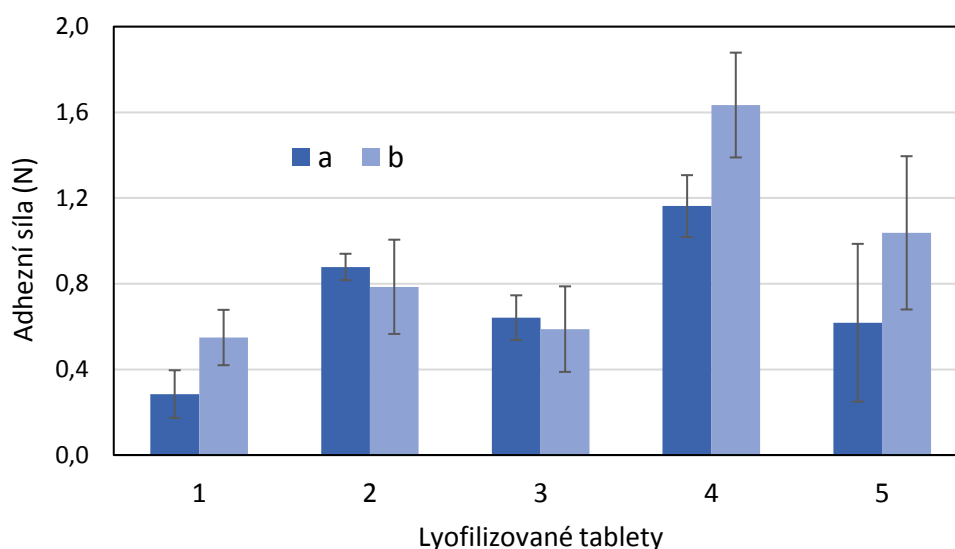


Obr. 22 Závislost **elastického modulu  $G'$** , **viskózního modulu  $G''$**  a **fázového úhlu  $\delta$**  na rychlostním spádu (trojúhelník - formulace 1a; čtverec – formulace 4a)

Tab. 15 Relaxační síla  $K^*$  a relaxační exponent  $n^*$  a mez toku

	$K^*$ (Pa·s)	$n^*$ (-)	corr.	$\bar{\sigma}$ (Pa)
Formulace 1a	78,2	0,3928	0,9805	58,7
Formulace 4a	44,6	0,7063	0,9795	36,8

Mukoadhezivita lyofilizovaných tablet byla vyhodnocena pomocí maximální síly potřebné k odtržení tablety od modelového mucinového podkladu. Porovnání testovaných tablet je na Obr. 23.



Obr. 23 Porovnání mukoadhezivita lyofilizovaných tablet

Všechny tablety v testu dostatečně adherovaly na mucinový podklad. Nejvyšší mukoadhezivitu vykazovaly překvapivě tablety 4b obsahující trehalosu, 1 % makrogolu 300 a 0,5 % BPV. Nejnižší mukoadhezní síla byla naměřena u tablet 1a s 0,3 % iota- karagenanu a 0,3% BPV. Vyšší mukoadhezi měly tablety s nižší viskozitou. Lze to vysvětlit lepším rozprostřením níže viskózních vzorků na podklad. Pravděpodobnější je však skutečnost, že vypočtené hodnoty síly byly ovlivněny nestandardní hydratací tablet před měřením z důvodu jejich čokkovitého tvaru s výstupkem v centrální části. Výsledek je rozněž ovlivněn vysokou variabilitou hodnot, protože bylo k dispozici malé množství tablet, což bylo kompenzováno opakovaným měřením téhož vzorku.



## 4 ZÁVĚRY

Mucin z prasečích žaludků, hydratovaný puftrem pH 7,4 v poměru 1:5, má vhodné tokové, viskoelastické a adhezivní vlastnosti pro použití jako modelový substrát při měření mukoadhezních vlastností lyofilizovaných tablet.

Formulace určené k lyofilizaci obsahující iota-karagenan vykazovaly vyšší viskozitu než formulace s trehalosou. Projevil se rovněž vliv hodnoty pH. Gelovou strukturu, tedy charakter viskoelastické pevné látky, vykazovaly pouze formulace obsahující 0,3 % iota-karagenanu v prostředí čištěné vody nebo hydrogenfosforečnanu draselného.

Lyofilizované tablety obsahující iota-karagenan byly viskóznější než tablety s trehalosou. Tyto výsledky korelují s tokovými vlastnostmi formulací pro lyofilizaci. Lyofilizované tablety s iota-karagenanem představují tužší gel, vykazují nižší relaxaci a mají vyšší hodnotu meze toku než lyofilizované tablety stejného složení, které místo iota-karagenanu obsahují trehalosu.

Všechny lyofilizované tablety vykazovaly *in vitro* dostatečnou adhezi na mucinový podklad. Nejvyšší mukoadhezivitu měly překvapivě tablety obsahující trehalosu, 1 % makrogolu 300 a 0,5 % *Bordetella pertussis vaccine*, u kterých byla zjištěna relativně nízká viskozita. Lze to vysvětlit lepším rozprostřením níže viskózních vzorků na podklad.

Realizované experimenty představují pilotní testy tokových, viskoelastických a mukoadhezivních vlastností lyofilizovaných tablet pro orální podání vakcíny proti černému kašli. Některé výsledky mohly být zkresleny omezeným počtem tablet, které byly pro testování k dispozici. Přínosem práce je vytvoření metodiky testování pro finální formulace v průběhu stabilitních testů.

## 5 SEZNAM LITERATURY

---

1. Český lékopis, Praha: Grada Publishing, a.s., 2017;880 ISBN:859-404-924-034-0
2. SANDER C., MADSEN K. D., HYRUP B., NIELSEN H. M., RANTANEN J., JACOBSEN J. Characterization of spray dried bioadhesive metformin microparticles for oromucosal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.2013;85(3):682–688. doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.05.017
3. ROHANI SHIRVAN A., BASHARI A., HEMMATINEJAD N. New insight into the fabrication of smart mucoadhesive buccal patches as a novel controlled-drug delivery system. *European Polymer Journal*, 2019;119:541–550. doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.07.010
4. <https://cit.vfu.cz/farmakologie-potravin/obrazky/obrazky%20cviceni/tabletyperoralni.JPG>; 8.5.2021
5. [https://www.magistra.cz/cs/produkt/imodium-rapid-6-tablet-rozpustnych-v-ustech?\\_m=24](https://www.magistra.cz/cs/produkt/imodium-rapid-6-tablet-rozpustnych-v-ustech?_m=24); 9.5.2021
6. GAJDZIOK J., RABIŠOVÁ M. Orálně dispergovatelné lékové formy a technologie jejich výroby, *Časopis České a Slovenské farmacie*, 2010;59,251-255.
7. PFISTER W.R., GHOSH T.K. Orally Disintegrating Tablets - Products, Technologies, and Development Issues, *Pharm. Technol.*, 2005;29:136–150.
8. Státní ústav pro kontrolu léčiv, Databáze léčiv: Suboxone 2MG/0,5MG SLG FLM, Souhrn údajů o přípravku dostupný na: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0249749&tab=info>
9. <https://www.zubsolv.com/zubsolv/patient-preferred/> 4.6.2021
10. IBRAHIM Y.H.E.Y., REGDON G., HAMEDELNIEL E. I., SOVÁNY T. Review of recently used techniques and materials to improve the efficiency of orally administered proteins/peptides. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;28(1):403–416. doi:10.1007/s40199-019-00316-w
11. PERRONE M., LOPALCO A., LOPEDOTA A., CUTRIGNELLI A., LAQUINTANA V., FRANCO M., BERNKOP-SCHNÜRCH A., DENORA N. S-preactivated thiolated glycol chitosan useful to combine mucoadhesion and drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;132:103-111. doi:10.1016/j.ejpb.2018.09.015
12. SOUSA F.F.O., NOJOSA J.S., ALENCAR C.A.A., ALCANTARA A.P.M.P., ARAÚJO R.S., YAMAUTI M., RODRIGUES L.K.A. Design and characterization of digluconate and diacetate chlorhexidine loaded-PLGA microparticles for dental applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;62. doi:10.1016/j.jddst.2021.102361

- 
13. WANG K., LIU T., LIN R., et al. Preparation and in vitro release of buccal tablets of naringenin-loaded MPEG-PCL nanoparticles. *RSC Advances*. 2014;4(64): 2046-2069. doi:10.1039/C4RA04920A
  14. KOSTADINOVA A.I., MIDDELBURG J., CIULLA M., GARSSSEN J., HENNINK W.E., KNIPPELS L.M.J., VAN NOSTRUM C.F., WILLEMSSEN L.E.M. PLGA nanoparticles loaded with beta-lactoglobulin-derived peptides modulate mucosal immunity and may facilitate cow's milk allergy prevention. *European Journal of Pharmacology*. 2018; 818:211-220. doi:10.1016/j.ejphar.2017.10.051
  15. JOVANOVIĆ M., TOMIĆ N., CVIJIĆ S., STOJANOVIĆ D., IBRIĆ S., USKOKOVIĆ P. Mucoadhesive Gelatin Buccal Films with Propranolol Hydrochloride: Evaluation of Mechanical, Mucoadhesive, and Biopharmaceutical Properties. *Pharmaceutics*. 2021;13(2):273. doi:10.3390/pharmaceutics13020273
  16. NAIR A., SHAH J., JACOB S., et Al. Development of Mucoadhesive Buccal Film for Rizatriptan: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*. 2021;13(5):728. doi:10.3390/pharmaceutics13050728
  17. HU S., PEI X., DUAN L., et Al. A mussel-inspired film for adhesion to wet buccal tissue and efficient buccal drug delivery. *Nat Commun*. 2021;12(1):1689. doi:10.1038/s41467-021-21989-5
  18. ŁYSIK D., NIEMIROWICZ-LASKOWSKA K., BUCKI R., TOKAJUK G., MYSTKOWSKA J. Artificial Saliva: Challenges and Future Perspectives for the Treatment of Xerostomia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(13):3199. doi:10.3390/ijms20133199
  19. DAVIS S.S. The rheological properties of saliva. *Rheologica Acta*. 1971; 10:28–35. doi: 10.1007/BF01972473
  20. VISSINK A., WATERMAN H.A., 'S-GRAVENMADE E.J., PANDERS A.K., VERMEY A. Rheological properties of saliva substitutes containing mucin, carboxymethylcellulose or polyethylenoxide. *J. Oral Pathol. Med.*1984; 13:22–28. doi: 10.1111/j.1600-0714.1984.tb01397.x.
  21. MANOSROI A., PATTAMAPUN K., CHANKHAMPAN C., et al. A biological active artificial saliva formulation containing flower mucilage from Ceylon Spinach (*Basella alba* Linn.). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020;27(3):769-776. doi:10.1016/j.sjbs.2020.01.007
  22. NIEMIROWICZ-LASKOWSKA K., MYSTKOWSKA J., ŁYSIK D., et al. Antimicrobial and Physicochemical Properties of Artificial Saliva Formulations Supplemented with Core-Shell Magnetic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(6):1979. doi:10.3390/ijms21061979

- 
23. VINKE J., KAPER H.J., VISSINK A., SHARMA P.K. Dry mouth: saliva substitutes which adsorb and modify existing salivary condition films improve oral lubrication. *Clin Oral Investig.* 2020;24(11):4019-4030. doi:10.1007/s00784-020-03272-x
  24. IBRAHIM Y.H., REGDON G., HAMEDELNIEL E.I., et al. Review of recently used techniques and materials to improve the efficiency of orally administered proteins/peptides. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2020;28:403–416. doi 10.1007/s40199-019-00316-w
  25. KWON K.C., DANIELL H. Oral Delivery of Protein Drugs Bioencapsulated in Plant Cells. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2016;24:1342-50. doi:10.1038/mt.2016.115
  26. AMANI M. Oral Delivery of Insulin: Novel Approaches. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems.* InTech, 2012; doi:10.5772/52265
  27. SONIA T.A., SHARMA Ch.P. An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug Discovery Today.* 2012;17(13-14):784-792. doi:10.1016/j.drudis.2012.03.019
  28. WOITISKI C.B., NEUFELD R.J., VEIGA F., CARVALHO R.A., FIGUEIREDO I.V. Pharmacological effect of orally delivered insulin facilitated by multilayered stable nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2010;41(3-4):556-563. doi:10.1016/j.ejps.2010.08.009
  29. HARIYADI D.M., MA Y., WANG Y., BOSTROM T., MALOUF J., TURNER M.S., BHANDARI B., COOMBES A.G.A. The potential for production of freeze-dried oral vaccines using alginate hydrogel microspheres as protein carriers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2014;24(2):178-184. doi:10.1016/S1773-2247(14)50029-9
  30. CHEN D.J. Formulation of HPV Dry Powder Wafers for Sublingual Vaccination. *University of Colorado at Boulder, Department of Chemistry and Biochemistry.* 2012;23.
  31. ROWE J.C., ATTIA Z., KIM E., CORMET-BOYAKA E., BOYAKA P.N. A Novel Supplementation Approach to Enhance Host Response to Sublingual Vaccination. *Sci Rep.* 2019;9(1):715. doi:10.1038/s41598-018-36370-8
  32. HANSON S. M., SINGH S., TABET A., SASTRY K. J., BARRY M., WANG Ch. Mucoadhesive wafers composed of binary polymer blends for sublingual delivery and preservation of protein vaccines. *Journal of Controlled Release.* 2021;330:427-437. doi:10.1016/j.jconrel.2020.12.029
  33. PARIS A., CARIDADE S., COLOMB E., BELLINA M., BOUCARD E., VERRIER B., MONGE C. Sublingual protein delivery by a mucoadhesive patch made of natural polymers. *Acta Biomaterialia.* 2021; 128:222–235. doi:10.1016/j.actbio.2021.04.024

- 
34. KRAAN H., VRIELING H., CZERKINSKY C., JISKOOT W., KERSTEN G., AMORIJ JP. Buccal and sublingual vaccine delivery. *J Control Release*. 2014;190:580-592. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.060
  35. LUND K., KITO H., SKYDTSGAARD M.B., NAKAZAWA H., OHASHI-DOI K., LAWTON S. The importance of tablet formulation on allergen release kinetics and efficiency: Comparison of freeze-dried and compressed grass pollen sublingual allergy immunotherapy tablet formulations. *Clinical Therapeutics*. 2019;41(4):742-753. doi:10.1016/j.clinthera.2019.02.008
  36. GAIDHANI K.A., et al. Lyophilization/Freeze drying, *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2015;4(8):516-543.
  40. AHMED T.A., ELIMAM H., ALRIFAI A.O., NADHRAH H.M., MASOUDI L.Y., SAIRAFI W.O., EL-SAY K.M. Rosuvastatin lyophilized tablets loaded with flexible chitosomes for improved drug bioavailability, antihyperlipidemic and antioxidant activity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;588:119791. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119791
  38. ADEL I. M., ELMELIGY M. F., ABDELKHALEK A.A., ELKASABGY N.A. Design and characterization of highly porous curcumin loaded freeze-dried wafers for wound healing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;164:105888. doi:10.1016/j.ejps.2021.105888
  39. ELSHARAWY A.M., SHUKR M.H., ELSHAFEEY A.H. Optimization and in vivo evaluation of duloxetine hydrochloride buccoadhesive lyophilized tablets. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;52:282-291. doi:10.1016/j.jddst.2019.04.033
  40. NICZINGER N.A., KÁLLAI-SZABÓ B., LENGYEL M., GORDON P., KLEBOVICH I., ANTAL I. Physicochemical analysis in the evaluation of reconstituted dry emulsion tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;134:86-93. doi:10.1016/j.jpba.2016.11.031
  41. HASSOUNA F., ABO EL DAHAB M., FULEM M., DE LIMA HAIEK A., LAACHACHI A., KOPECKÝ D., ŠOŮŠ M. Multi-scale analysis of amorphous solid dispersions prepared by freeze drying of ibuprofen loaded acrylic polymer nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;53:101182. doi:10.1016/j.jddst.2019.101182
  42. Český lékopis, Praha, Grada Publishing, a. s., 2017;4594. ISBN: 978-80-271-2531-9
  43. Příloha č. 1 k vyhlášce č. 84/2008 Sb.: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-84#prilohy> 3.6.2021
  44. VANBILLEMONT B., DE BEER T. Application of polyvinyl acetate in an innovative formulation strategy for lyophilized orally disintegrating tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;588:119717. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119717

- 
45. GULSUN T., AKDAG CAYLI Y., IZAT N., CETIN M., ONER L., SAHIN S. Development and evaluation of terbutaline sulfate orally disintegrating tablets by direct compression and freeze drying methods. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018;46:251-258. doi:10.1016/j.jddst.2018.05.014
  46. AKDAG Y., GULSUN T., IZAT N., CETIN M., ONER L., SAHIN S. Characterization and comparison of deferasirox fast disintegrating tablets prepared by direct compression and lyophilization methods. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;57:101760. doi:10.1016/j.jddst.2020.101760
  47. KOBAYASHI M., KONDO K., NAKASHIMA Ch., KIDA Y., NIWA T. Design of self-dispersible microsphere containing cyclosporine through wet milling and drop freeze-drying processes to improve dissolution behavior. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;57:101577. doi:10.1016/j.jddst.2020.101577
  48. KIM J.Y., SEO J.W., RHEE Y.S., PARK C.W., PARK E.S. Freeze-Dried Highly Porous Matrix as a New Gastroretentive Dosage Form for Ecabet Sodium: In Vitro and In Vivo Characterizations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;103(1):262-273. doi:10.1002/jps.23798
  49. ABD EL-AZIZ M. F., ISMAIL S., TADROS M. I., ELNABARAWI M. A. Alfuzosin hydrochloride-loaded low-density gastroretentive sponges: development, in vitro characterization and gastroretentive monitoring in healthy volunteers via MRI. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2020;25:566-578. doi:10.1080/10837450.2020.1720235
  50. MANSURI S., KESHARWANI P., TEKADE R. K., JAIN N.K. Lyophilized mucoadhesive-dendrimer enclosed matrix tablet for extended oral delivery of albendazole. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;102:202-213. doi:10.1016/j.ejpb.2015.10.015
  51. NORDGÅRD C.T., DRAGET K.I., Co-association of mucus modulating agents and NPs for mucosal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;124:175-183.
  52. GÓMEZ-GUILLÉN M.C., MONTERO M.P. Enhancement of oral bioavailability of natural compounds and probiotics by mucoadhesive tailored biopolymer-based nanoparticles: A review. *Food Hydrocolloids*. 2021;118:106772. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106772
  53. GRABOVAC V., GUGGI D., BERNKOP-SCHNÜRCH A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(11):1713–1723. doi:10.1016/j.addr.2005.07.006
  54. BAUS R.A., ZAHIR-JOUZDANI F., DÜNNHAUPT S., ATYABI F., BERNKOP-SCHNÜRCH A. Mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery: in vitro-in vivo correlation study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;142:498–505. doi:10.1016/j.ejpb.2019.07.019

- 
55. FREITAS E.D., MOURA JR.C.F., KERWALD J., BEPPU M. M. An Overview of Current Knowledge on the Properties, Synthesis and Applications of Quaternary Chitosan Derivatives. *Polymers*. 2020;12(12):2878. doi.org/10.3390/polym12122878
  56. LIU L., FISHMAN M.L., KOST J., HICKS K. B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*. 2003;24(19):3333–3343. doi:10.1016/s0142-9612(03)00213-8
  57. CHATURVEDI K., GANGULY K., NADAGOUDA M.N., et al. Polymeric hydrogels for oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release*. 2013;165(2):129–138. doi:10.1016/j.jconrel.2012.11.005
  58. WILKINSON J., WADE A., THOMAS S. J., JENNER B., HODGKINSON V., COYLE C. Randomized clinical trial: a double-blind, placebo-controlled study to assess the clinical efficacy and safety of alginate–antacid (Gaviscon Double Action) chewable tablets in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2019;31(1):86–93. doi:10.1097/meg.0000000000001258
  59. CH'NG H.S., PARK H., KELLY P., ROBINSON J. R. Bioadhesive Polymers as Platforms for Oral Controlled Drug Delivery II: Synthesis and Evaluation of Some Swelling, Water-Insoluble Bioadhesive Polymers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1985;74(4):399-405. doi:10.1002/jps.2600740407
  60. SMART J. The role of water movement and polymer hydration in mucoadhesion. *Drugs and the pharmaceutical sciences*. 1999; 98:11-23. doi:10.1201/b14099-3
  61. PENA ROMERO A., CAMELLA C., RONCHI M., FERARRI F., CHULIA D. Water uptake and force development in an optimized prolonged release formulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 1991;73(3):239-248. doi:10.1016/0378-5173(91)90416-L
  62. FERRERO C., JIMÉNEZ-CASTELLANOS M. R. The influence of carbohydrate nature and drying methods on the compaction properties and pore structure of new methyl methacrylate copolymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;248(1-2):157-171. doi:10.1016/S0378-5173(02)00432-5
  63. BRANNIGAN R. P., KHUTORYANSKIY V.V. Progress and Current Trends in the Synthesis of Novel Polymers with Enhanced Mucoadhesive Properties. *Macromolecular Bioscience*. 2019;19(10):1900194. doi:10.1002/mabi.201900194
  64. DAVIDOVICH-PINHAS M., BIANCO-PELED H. Novel mucoadhesive system based on sulfhydryl-acrylate interactions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(7):2027-2034. doi:10.1007/s10856-010-4069-6
  65. SHTENBERG Y., GOLDFEDER M., SCHROEDER A., BIANCO-PELED H. Alginate modified with maleimide-terminated PEG as drug carriers with

---

enhanced mucoadhesion. *Carbohydrate Polymers*. 2017; 175:337-346.  
doi:10.1016/j.carbpol.2017.07.076

66. SILVA FAVACHO H. A., OLIVEIRA DO COUTO R., FERREIRA DUARTE M. P., GAROFO PEIXOTO M. P., VIANNA LOPEZ R. F., PEDRAZZI V., MASETTO DE GAITANI C., DE FREITAS O. Synergy between surfactants and mucoadhesive polymers enhances the transbuccal permeation of local anesthetics from freeze-dried tablets. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;108: 110373. doi:10.1016/j.msec.2019.110373
67. MARTÍN-ILLANA A., CAZORLA-LUNA R., NOTARIO-PÉREZ F., BEDOYA L.M., RUIZ-CARO R., VEIGA M. D. Freeze-dried bioadhesive vaginal bigels for controlled release of Tenofovir. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;127:38-51. doi:10.1016/j.ejps.2018.10.013
68. <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/en/products-solutions/rheology/kinexus-pro/> 12.6.2021
69. WP160620BasicIntroRheology.pdf (technologynetworks.com)
70. SISKA B., SNEJDROVA E., MACHAC I., DOLECEK P., MARTISKA J. Contribution to the rheological testing of pharmaceutical semisolids, *Pharmaceutical Development and Technology*. 2019;24:1,80-88. doi: 10.1080/10837450.2018.1425432
71. Malvern Instruments Application Note, A. *Determination of pressure sensitive tack and adhesion using axial measurements on a rotational rheometer*; 2015