

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Příprava tobolek na bázi hypromelózy metodou FDM 3D tisku

Bakalářská práce

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martin Šanda**
Osobní číslo: **C20346**
Studijní program: **B0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Příprava tobolek na bázi hypromelózy metodou FDM 3D tisku**
Téma práce anglicky: **Preparation Of Hypromellose Based Capsules Using FDM 3D Printing**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma "Vlastnosti přírodních a syntetických polymerů ve vztahu k extruzi, 3D tisku pevných lékových forem a možnosti cílení léčiva do oblasti tenkého střeva a kolonu".
2. Metodou extruze připravte filameny na bázi hypromelózy s přidavkem různých typů Kollidónů.
3. Optimalizujte proces FDM 3D tisku s ohledem na složení a vlastnosti připravených filament a proveďte 3D tisk tobolek z využitím připravených filament.
4. Metodou disolučního testu prostudujte odolnost připravených tobolek ve vybraných disolučních médiích.
5. Výsledky diskutujte zejména s ohledem na chování materiálů při extruzi, 3D tisku a disoluci.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Kevin Matzick**
Katedra fyzikální chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Příprava tobolek na bázi hypromelózy metodou FDM 3D tisku jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27.6.2023

Martin Šanda

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Aleně Komersové, Ph.D. za odborné konzultace a vřelý přístup při vypracování této práce. Také bych rád poděkoval Ing. Kevinu Matzickovi, Ing. Marii Nevyhoštěné a Ing. Janě Macháčkové za přátelský přístup a zkušené poznatky při vypracování experimentální části. Nesmím zapomenout na velké poděkování mé rodině za bezmeznou podporu po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato práce se zaměřuje na přípravu silnostěnných tobolek na bázi hypromelózy metodou FDM 3D tisku. Cílem práce byla příprava a testování tobolek vhodných pro perorální transplantaci fekální mikrobioty nebo přívod léčiva do oblasti kolonu. Celý proces experimentu zahrnoval přípravu filament metodou hot melt extruze (HME), FDM 3D tisk tobolek ze zmíněných vláken, rozměrovou analýzu vytištěných tobolek a in vitro testování připravených tobolek pomocí disoluční zkoušky. Připraveny, vytištěny a testovány byly čtyři formulace, a to tobolky z hypromelózy (bez přídavku Kollidonu) a dále tři formulace s přídavkem různých typů Kollidonů. U těchto formulací byl testován vliv samotného přídavku Kollidonu i typu Kollidonu na extruzi, 3D tisk, důležité rozměry tisknutých tobolek a uvolnění modelové účinné látky z tobolky v oblasti kolonu. Z experimentu bylo zjištěno, že přídavek Kollidonů umožňuje snížení teploty při 3D tisku, zlepšuje stabilitu lékových forem, ale mírně ovlivňuje stálost rozměrů vytištěných tobolek.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fekální mikrobiální transplantace, rekurentní infekce *Clostridium difficile*, enterální lékové formy, hypromelóza, Kollidony[®], FDM 3D tisk

TITLE

Preparation of hypromellose-based capsules by FDM 3D printing

ANNOTATION

This thesis focuses on the preparation of thick-walled hypromellose-based capsules by FDM 3D printing. The aim of the thesis was to prepare and test capsules suitable for oral transplantation of fecal microbiota or drug delivery to the colonic region. The experiment included preparation of the filament by hot melt extrusion (HME), FDM 3D printing of the capsules from the mentioned filaments, dimensional analysis of the printed capsules and in vitro testing of the prepared capsules by dissolution test. Four formulations were prepared, printed and tested, namely hypromellose capsules (without addition of Kollidon) and three formulations with addition of different types of Kollidon. For these formulations, the effect of Kollidon addition alone and Kollidon type on extrusion, 3D printing, important dimensions of the printed capsules and the release of the model active ingredient from the capsule in the colonic region were tested. From the experiment, it was found that the addition of Kollidon allows a reduction in temperature during 3D printing, improves the stability of the dosage forms, but slightly affects the dimensional stability of the printed capsules.

KEYWORDS

fecal microbiota transplantation, recurrent *Clostridium difficile* infection, enteral dosage forms, hypromellose, Kollidon[®], FDM 3D printing

OBSAH

Úvod.....	15
1 Teoretická část.....	17
1.1 Využití enterosolventních lékových forem.....	17
1.1.1 Kolonické podávání léčiva.....	17
1.1.1.1 Léčiva podávaná enterosolventními lékovými formami.....	18
1.1.1.2 Chronoterapie.....	19
1.2 Fekální mikrobiální transplantace (FMT).....	20
1.2.1 Metodologie FMT.....	20
1.2.1.1 Průběh transplantace.....	20
1.2.1.2 Tobolka – moderní aplikační forma.....	21
1.2.2 Zánětlivá onemocnění střev.....	22
1.2.2.1 Rekurentní infekce Clostridium difficile (rCDI).....	22
1.2.2.2 Ulcerózní kolitida.....	25
1.2.2.3 Crohnova choroba.....	25
1.2.2.4 Pouchitida.....	26
1.2.3 Onemocnění přímo nesouvisející s tlustým střevem.....	26
1.3 Parametry zapříčiňující uvolnění účinné látky v tlustém střevě.....	27
1.3.1 pH.....	27
1.3.2 Působení enzymů mikrobiálního systému tlustého střeva.....	27
1.3.3 Tranzitní čas – doba průchodu segmenty GIT.....	29
1.3.4 Tlakové vlny tlustého střeva.....	29
1.3.5 Tekutý obsah segmentů GIT.....	29
1.3.6 Enzymy při průchodu tobolky GIT.....	30
1.4 Dělení polymerů využívaných při přípravě enterálních lékových forem.....	31
1.4.1 Polymery citlivé na změny pH.....	31
1.4.1.1 Deriváty celulózy.....	31

1.4.1.1.1	Hydroxypropylcelulóza (HPC)	32
1.4.1.1.2	Hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC).....	34
1.4.1.2	Polymethakryláty a jejich kopolymery	35
1.4.1.2.1	Eudragit [®] E	36
1.4.1.2.2	Eudragit [®] L	36
1.4.1.2.3	Eudragit [®] FS	37
1.4.2	Biopolymery degradovatelné střevní mikroflórou	37
1.4.2.1	Alginát.....	38
1.4.2.2	Kolagen	39
1.4.2.3	Chitosan	41
1.4.3	Změkčovadla (plastifikátory)	43
1.4.3.1	Polyethylenglykol (PEG)	44
1.4.3.2	Polyethylenoxid (PEO)	44
1.4.3.3	Kollicoat SR.....	45
1.4.3.4	Kollidony	45
1.4.3.4.1	Rozpustné Kollidony (povidony).....	46
1.4.3.4.2	Nerozpustné Kollidony (třídy CL).....	47
1.4.3.4.3	Kopovidony (Kollidon [®] VA 64).....	49
1.4.3.4.4	Kollidon [®] SR.....	51
1.5	Metody využívané při experimentální části	52
1.5.1	Hot melt extruze (HME)	52
1.5.2	Metoda FDM 3D tisku	55
1.5.3	Disoluční zkouška	57
2	Experimentální část	59
2.1	Cíle práce	59
2.2	Použité chemikálie	60
2.2.1	Chemikálie na přípravu filament.....	60

2.2.2	Chemikálie pro plnění tobolek.....	60
2.2.3	Chemikálie pro přípravu disolučních médií.....	60
2.3	Použité přístroje a pomůcky.....	60
2.4	Použitý software	61
2.5	Experimentální postupy	62
2.5.1	Příprava filament.....	62
2.5.2	Extruze filament.....	63
2.5.3	Návrh tobolek pro 3D tisk.....	64
2.5.4	Průběh FDM 3D tisku	65
2.5.5	Plnění tobolek (příprava na disoluční test)	66
2.5.6	Příprava disolučních médií.....	67
2.5.7	Disoluční test.....	67
2.5.8	Rozměrová analýza	68
2.5.9	Stanovení uvolněného množství kofeinu pomocí UV–VIS spektrometrie	69
3	Výsledky a diskuze.....	71
3.1	Extruze filament.....	71
3.2	3D tisk tobolek.....	72
3.3	Rozměrová analýza.....	74
3.4	Disoluční studie připravených tobolek	77
3.4.1	F0 – Affinisol™ (100 %)	79
3.4.2	F1 – Affinisol (95 %) + Kollidon® 12 PF (5 %).....	80
3.4.3	F2 – Affinisol (95 %) + Kollidon® 17 PF (5 %).....	81
3.4.4	F3 – Affinisol™ (95 %) + Kollidon® 25 (5 %).....	82
3.4.5	Srovnání disolučních profilů jednotlivých formulací	83
4	Závěr.....	85
5	Bibliografie.....	87

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Zastoupení složek ve směsi pro konkrétní formulace F0 – F3	62
Tabulka 2: Rozměrové parametry vyextrudovaných filament	64
Tabulka 3: Plnění analyzovaných tobolek	66
Tabulka 4: Průměrné hodnoty měřených rozměrů tobolek formulace F0	75
Tabulka 5: Průměrné hodnoty měřených rozměrů tobolek formulace F1	75
Tabulka 6: Průměrné hodnoty měřených rozměrů tobolek formulace F2	76
Tabulka 7: Průměrné hodnoty měřených rozměrů tobolek formulace F3	76
Tabulka 8: Souhrn časových údajů disolučních profilů	84

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Mechanismy účinku FMT při léčbě rCDI.....	24
Obrázek 2: Schéma produkce enzymů bakteriální mikroflórou	28
Obrázek 3: Strukturní vzorec celulózy	32
Obrázek 4: Strukturní vzorec HPMC.	35
Obrázek 5: Strukturní vzorec monomeru Eudragitu L100	37
Obrázek 6: Využití materiálu na bázi kolagenu	41
Obrázek 7: Zisk chitosanu z chitinu.	42
Obrázek 8: Popcornová struktura Kollidonu CL sledovaná pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM)	49
Obrázek 9: Strukturní vzorec Kollidonu SR (X – polyvinylacetát; Y – povidon)	52
Obrázek 10: Schématické znázornění dvoušnekového extrudéru	55
Obrázek 11: Schématické znázornění průběhu FDM 3D tisku.	57
Obrázek 12: Disoluční aparatura SOTAX AT 7 Smart	61
Obrázek 13: Využití práškové směsi polymerů	62
Obrázek 14: V–mixér (Filtra Vibracion, Barcelona, Španělsko)	63
Obrázek 15: Extrudér Noztec Touch (UK).....	64
Obrázek 16: Ilustrační obrázek tobolky o velikosti 000 v programu Prusa Slicer	65
Obrázek 17: FDM 3D tiskárna Original Prusa i3 MK3S+	66
Obrázek 18: Vytisknutá tobolka formulace F0 z čistého Affinisolu™	66
Obrázek 19: Vibrační mlýnek bez kuličky (Retsch GmbH, Haan, Německo).....	67
Obrázek 20: Analýza výšky topu tobolky pomocí digitálního posuvného měřítka.....	68
Obrázek 21: Měřené rozměry tobolky	69
Obrázek 22: Vyextrudovaná filamenta formulace F0 z čistého Affinisolu™ (vlevo) a srovnání se zástupcem formulace (F1) s přídavkem Kollidonu® (vpravo).....	71
Obrázek 23: Vyextrudované filamenty s přídavkem Kollidonu® 12 PF (vlevo), Kollidonu® 17 PF (uprostřed) a Kollidonu® 25 (vpravo).	72
Obrázek 24: Vytisknutá tobolka se špatně zvoleným násobičem extruze o hodnotě 1,1. ...	73
Obrázek 25: Vizuelní porovnání tobolek formulace F0 (vlevo) a F1 (vpravo).	73
Obrázek 26: Porovnání vizuelní stránky tobolek s přídavkem Kollidonu® 12 PF (vlevo nahoře), Kollidonu® 17 PF (vpravo nahoře) a Kollidonu® 25 (uprostřed dole). Efekt tmavnutí tobolek se vzrůstající „K–value“ Kollidonů®	74
Obrázek 27: Košíčky po 18–ti hodinové disoluci. Úplné rozpuštění dané formulace.	78

Obrázek 28: Disoluční profil formulace F0 (čistý Affinisol™).....	79
Obrázek 29: Disoluční profil formulace F1 s přídavkem Kollidonu® 12 PF	80
Obrázek 30: Disoluční profil formulace F2 s přídavkem Kollidonu® 17 PF	81
Obrázek 31: Disoluční profil formulace F3 s přídavkem Kollidonu® 25	82
Obrázek 32: Schématické znázornění disolučních profilů všech formulací F0–F3	84

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

API	Aktivní farmaceutické ingredience
ATB	Antibiotika
CMC	Karboxymethylcelulóza
ČL	Český lékopis
DLP	Digitální zpracování světla (metoda 3D tisku)
EC	Ethylcelulóza
ECM	Extracelulární matrix
EMA	Evropská léková agentura
FDM	Fused deposition modeling (Tavené depoziční modelování – metoda 3D tisku)
FMT	Fekální mikrobiální transplantace
GIT	Gastrointestinální trakt
HME	Hot melt extruze (vytlačování taveniny za tepla)
HPC	Hydroxypropylcelulóza
HPMC	Hydroxypropylmethylcelulóza
HPMCAS	Acetát sukcinát hypromelózy
MC	Methylcelulóza
rCDI	Rekurentní infekce Clostridium difficile
PCDC	Pressure Controlled Drug Capsules (tlakem řízené tobolky)
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
PLA	Kyselina polymléčná
PVA	Polyvinylacetát
SCFA	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SLS	Selektivní laserové sintrování (metoda 3D tisku)
SSE	Semi–solid extrusion (polotuhé vytlačování – metoda 3D tisku)
T _G	Teplota skelného přechodu
T _M	Teplota tání
3 DP	3D tisk
5–ASA	5–aminosalicylát

ÚVOD

Enterosolventní tobolky na bázi hypromelózy představují jednu z možností pro cílenou aplikaci léčiva nebo biologického materiálu do oblasti tlustého střeva. Úkolem tobolek je ochrana přenášeného materiálu (léčiva, mikroorganismu) před předčasným uvolněním v proximálních oblastech gastrointestinálního traktu (GIT), což by mohlo způsobit jejich nežádoucí účinky nebo infekce.

Podávání léčiv do oblasti kolonu se využívá pro lokální terapii postižené části střeva nebo cílené přivedení léčiva za účelem lepší nebo kontrolovanější absorpce. Mezi onemocněním léčená pomocí enterosolventních lékových forem patří nespecifické střevní záněty, polypy, syndrom dráždivého tračníku a kolorektální karcinom. Léčiva aplikovaná enterosolventními lékovými formami jsou nejčastěji protizánětlivé a imunosupresivní léky (např. aminosalicyláty, mesalazin). Mezi další využití těchto lékových forem patří cílená aplikace účinných látek, které se hůře vstřebávají v proximálních částech GIT. Využití enterosolventních lékových forem je možné i v tzv. chronoterapii.

V enterosolventních lékových formách se mikroorganismy aplikují v procesu fekální mikrobiální transplantace (FMT) do oblasti kolonu. FMT je proces, při kterém dochází k přenosu zpracované fekální mikrobioty zdravého člověka do GIT pacienta trpícího onemocněním, které změnilo jeho mikrobiální systém kolonu. Cílem transplantace je tak obnovit rovnováhu mikrobiálního systému tlustého střeva. FMT se využívá k léčbě rekurentní infekce *Clostridium difficile*, ulcerózní kolitidy, Crohnovy choroby (zánětlivá onemocnění střev) a onemocnění přímo nesouvisících s poruchami tlustého střeva (např. autismus). Aplikace transplantátu může probíhat tzv. dolní cestou podání (klystýr, kolonoskopie, endoskopické tuby) nebo tzv. horní cestou podání (nasojejunální/nasogastrické sondy, tobolky). Přičemž tobolky představují moderní aplikační formu, při které mají pacienti zvýšený komfort neinvazivního podání FMT a pro personál se jedná o jednoduchou, běžnou a finančně nenáročnou aplikaci.

Uvolnění účinné látky z enterosolventních lékových forem je indikováno změnou definovaných podmínek v GIT, mezi které patří pH prostředí, enzymy produkované střevní mikroflórou, doba průchodu formy určitými segmenty GIT, tlakové vlny tlustého střeva, tekutý obsah segmentů GIT a enzymy vyskytujících se fyziologicky v trávicím traktu.

Aplikace neporušených enterosolventních lékových forem do distálních oblastí GIT závisí především na volbě vhodného materiálu. Výběr materiálů vhodných pro zpracování „hot melt“ extruzí a FDM 3D tiskem, popis jejich fyzikálně–chemických vlastností a aplikace jednotlivých polymerních materiálů ve farmaceutické technologii tvoří teoretický základ této práce. Výše zmíněné polymerní materiály lze rozdělit do tří skupin: polymery citlivé na změny pH prostředí, polymery biodegradabilní střevní mikroflórou a změkčovadla, která ulehčují výrobní proces a zvyšují stabilitu lékových forem. U pH–sensitivních polymerů byly popsány především využívané deriváty celulózy a polymethakrylátů. Mezi zástupce biodegradabilních polymerů patří polysacharidy a proteiny, které jsou degradovány až v oblastech tlustého střeva v závislosti na produkci enzymů mikroorganismy tlustého střeva. U změkčovadel byl kladen důraz na popis zástupců Kollidonů, které byly využívány v experimentální části bakalářské práce.

Bakalářská práce se zaměřuje na přípravu silnostěnných tobolek na bázi hypromelózy metodou FDM 3D tisku. Cílem práce byla příprava a testování tobolek vhodných pro perorální transplantaci fekální mikrobioty nebo přívod léčiva do oblasti kolonu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Využití enterosolventních lékových forem

Enterosolventní lékové formy se využívají pro své vlastnosti k cílené aplikaci léčiva nebo biologického materiálu do tlustého střeva. Úkolem lékové formy je ochrana účinné látky před uvolněním v gastrointestinálním traktu (GIT) před dosažením kolonu. Při pochybení lékové formy může dojít k infikování proximální části GIT biologickým materiálem nebo k předčasnému uvolnění léčiva vedoucí k nežádoucím účinkům. Uvolnění účinné látky je indikováno změnou definovaných podmínek v gastrointestinálním traktu (kapitola 1.3). (1)

1.1.1 Kolonické podávání léčiva

Kolonické podávání léčiva označuje děj, při kterém je léčivo cíleně uvolněno ze speciálních lékových forem v oblasti tlustého střeva. Klinickým využitím této metody je lokální terapie postižené části střeva nebo cílené přivedení léčiva za účelem lepší nebo kontrolovanější absorpce.

Mezi onemocněním léčené enterosolventními lékovými formami patří nespecifické střevní záněty, polypy, syndrom dráždivého tračnicku a kolorektální karcinom. Použití enterosolventních lékových forem je efektivní a cílená terapie onemocnění GIT, která eliminuje jinak běžné nežádoucí účinky léčiv.

Mezi možné léčebné metody střevních infekcí patří tzv. chronoterapie, jejíž aplikace se netýká pouze léčby problémů GIT. Při chronoterapii dochází k časově řízené absorpci léčiva v závislosti na biorytmu onemocnění (2). Další využití cíleného podávání léčiva do oblasti kolonu je u účinných látek, které se hůře vstřebávají v proximálních částech GIT (na bázi peptidů nebo proteinů). Účinnější absorpci léčiva v tlustém střevě charakterizuje delší tranzitní čas a snížená aktivita proteolytických enzymů. Tyto vlastnosti zajišťují, že účinná látka není degradována enzymatickými pochody a zároveň získává delší čas pro vstřebání v místě účinku. Nevýhodou je snížený obsah tekutin v kolonu, který omezuje rozpustnost léčiva v distálních částech gastrointestinálního traktu (2).

1.1.1.1 Léčiva podávaná enterosolventními lékovými formami

V terapii proti zánětlivým onemocněním GIT převažují protizánětlivé a imunosupresivní léky. Jejich úkolem je potlačit střevní zánět, zlepšit kvalitu života lidem trpících těmito chronickými obtížemi a zlepšit stav střevního traktu.

Jednotlivých léčiv používaných v léčbě zánětlivých onemocnění je nespočet. Zároveň je velké množství mechanismů účinku lékových forem. Tato kapitola slouží k představení některých zástupců léčiv a materiálů lékových forem používaných k léčbě těchto onemocnění.

Léčba ulcerózní kolitidy probíhá na základě dvou protizánětlivých látek 5-aminosalicylátu (5-ASA) a mesalazinu. Aminosalicyláty se podávají ve speciálních lékových formách z polymerů na bázi upraveného kopolymeru methylmetakrylátu rozpustného při konkrétních hodnotách pH. 5-ASA je chráněna před účinkem prostředí žaludku speciálními polymerními lékovými formami (Eudragit[®] L; Salofalk[®] tbl., Claversal[®] tbl), které umožní uvolnění 5-ASA při překročení pH 6 za distálním ileem nebo (Eudragit[®] S; Asacol[®] tbl.), které se rozpadají při pH vyšším než 7. Mechanismus uvolnění mesalazinu je založen na změně pH průchodem lékové formy trávicí trubicí. Mesalazin chráněný většinou polymery Eudragit[®] S, L, L-100 prochází žaludkem o pH 1–2. Žaludeční šťávy jsou alkalizovány žlučí a pankreatickou sekrecí a tím se pH při putování lékové formy tenkým střevem zvyšuje. 5-ASA se podle hodnot pH uvolňuje v tračniku a mesalazin především v distálním konci tenkého střeva, caeca a proximální oblasti tračniku (3).

Léčba Crohnovy choroby se liší v závislosti na vážnosti onemocnění. Mírné stavy jsou stejně jako ulcerózní kolitida léčeny aminosalicyláty. Vážnější krátkodobé stavy jsou řešeny především kortikosteroidy. Dlouhodobé stavy jsou regulovány zavedením imunomodulátorů na bázi merkaptopurinu, azathiopurinu a methotrexátu (4).

Léčba rekurentní infekce způsobenou *Clostridium difficile* zahrnuje především léčbu antibiotiky jako je vankomycin nebo fidaxomicin. Dalším používaným antibiotikem a zároveň antiprotozoálním léčivem v léčbě tohoto onemocnění je metronidazol (5).

1.1.1.2 Chronoterapie

Enterosolventní lékové formy se využívají i pro léčbu závislou na cirkadiánních rytmech (chronoterapii). Speciálně upravené lékové formy umožňují dodávání účinné látky v definovaných časových intervalech do vybraného místa gastrointestinálního traktu. Uvolnění léčiv ve správném časovém intervalu závisí na individuální hladině pH v segmentech trávicí trubice jedince a na biodiverzitě konkrétního mikrobiálního střevního systému. Mechanismy uvolnění léčiv z lékové formy se liší v závislosti na zmíněných vlastnostech. Mezi mechanismy patří bobtnání, osmóza nebo kombinace obou. Specializovaná léková forma TIME CLOCK[®] zajišťuje uvolnění vybraného léčiva v závislosti na čase do zaníceného distálního ilea nebo tračníku. Tobolka TIME CLOCK[®] se skládá z jádra, ve kterém je účinná látka. Jádro je obaleno hydrofobním materiálem a povrchově aktivní látkou. (2)

Chronoterapie se využívá pro léčbu zánětlivých onemocnění střev – ulcerózní kolitidy (5-ASA) a Crohnovy choroby (6-merkaptopurin) (6). Chronoterapie se také hojně využívá u léčby kardiovaskulárních onemocnění (7) jako je například ischemická choroba srdeční nebo léčba vysokého krevního tlaku. Dále se chronoterapie zkouší u neurodegenerativních chorob (Parkinsonova choroba) (8) a nádorových onemocnění (urologických maligních stavech (9), glioblastomy (10)).

1.2 Fekální mikrobiální transplantace (FMT)

Transplantace fekální mikrobioty je proces, při kterém dochází k přenosu zpracované fekální hmoty zdravého jedince do gastrointestinálního traktu pacienta. Daný pacient trpí onemocněním, které změnilo složení jeho mikrobiálního systému tlustého střeva (dysbióza). Obecným cílem terapie je obnovení rovnováhy střevního mikrobiálního systému. Jedná se o neimunosupresivní terapii snažící se řešit mikrobiální defekty tlustého střeva, které jsou většinou základem patogeneze zánětlivých onemocnění střev.

Fekální mikrobiální transplantace se využívá k léčbě zánětlivých onemocnění střev a k experimentální léčbě nemocí, které přímo nesouvisí s onemocněním tlustého střeva. Mezi střevní zánětlivá onemocnění léčená metodou FMT patří rekurentní infekce *Clostridium difficile*, ulcerózní kolitida, Crohnova choroba a pouchitida. Léčba onemocnění přímo nesouvisících s poruchami kolonu bude zmíněna v kapitole 1.2.3.

1.2.1 Metodologie FMT

1.2.1.1 Průběh transplantace

Aby se mohla uskutečnit transplantace, musí se sehnat vhodný dárce. Testy na dárcovství podléhají přísným kritériím a kontrolám na drogy, onemocnění nebo používané léky. Dárce by měl disponovat stolicí s vysokou biodiverzitou střevní mikroflóry, především zvýšenou přítomností bakterií kmene Firmicutes a Bacteroidetes. Čím větší je biodiverzita stolice dárce, tím větší má pacient (příjemce) pravděpodobnost vyléčení dysbiózy typické pro konkrétní onemocnění.

Pokud máme ověřeného dárce fekální mikrobioty, je na pořadí zvolení vhodného příjemce (pacienta). Pacient musí trpět nemocí, která se úspěšně již léčí standardně touto metodou FMT (rekurentní infekce *Clostridium difficile*) nebo onemocněním, při němž nezabírá standardní terapie (Crohnova choroba, Parkinsonova choroba atd.).

Příprava transplantátu probíhá tak, aby byla kdykoliv a okamžitě daná směs použita. Transplantát se homogenizuje a následně se ředí 0,9 % NaCl. Transplantát je uchováván ve formě čerstvé, hluboce zmražené nebo lyofilizované. V transplantátu mohou být kompletně všechny kmeny fekálního mikrobiomu dárce nebo se mohou vyselektovat pouze vybrané kmeny

vhodné pro konkrétního pacienta (umožňuje lyofilizace). Uvádí se, že v 1 gramu stolice se nachází asi $8,6 \cdot 10^{10}$ bakterií.

Předešlé kroky lze shrnout do tzv. přípravné fáze, kdy se vytvářejí definované podmínky pro úspěšný průběh transplantace. Na tuto fázi volně navazuje aplikace transplantátu v podobě dvou možných cest podání. První je tzv. dolní podání transplantátu (starší cesta), při kterém dochází k aplikaci fekální mikrobioty do těla pacienta pomocí klystýru, kolonoskopie nebo speciálních endoskopických tub. Druhou cestou je tzv. horní podání transplantátu (novější cesta) prostřednictvím nasojejunálních či nasogastrických sond nebo pomocí tobolek (perorální podání). Rozdílem mezi těmito cestami je objem transplantátu aplikovaný do těla pacienta. Dolní cesta podání vyžaduje objem transplantátu v rozmezí 250–500 ml, přičemž horní cesta podání vyžaduje výrazně méně (mezi 25–100 ml transplantátu).

Výhodou FMT oproti jiným formám mikrobiální terapie (antibiotika, probiotika) je poskytování celého funkčního bakteriálního systému, který zahrnuje celé spektrum mikrobiálních organismů ze zdravého jedince. Tím pádem FMT může potenciálně správně vyřešit dosud necharakterizované dysbiózy a kritické funkční poruchy zánětlivých střevních onemocnění.

1.2.1.2 Tobolka – moderní aplikační forma

Nejnovejším způsobem aplikace FMT je tobolka. Tobolka se od ostatních FMT technik podstatně liší a proto tato kapitola shrnuje výhody a nevýhody jejího používání.

Mezi zásadní výhody patří zvýšení komfortu pacienta, jedná se totiž o neinvazivní a pro pacienta příjemnější formu podání. Tobolky nesou výhody i pro „druhou stranu“ – nemocniční personál. Pro zdravotníky jsou tobolky jednoduchou, běžnou a finančně nenáročnou formou podání. Studie ukazují, že v porovnání s invazivními metodami mají tobolky vyšší účinnost aplikace transplantátu na místo určení. V kombinaci tobolek vytvořené z vybraných polymerů metodou 3D tisku lze nastavit pro každého pacienta tobolku „na míru“, což vede k individualizaci terapie FMT.

Nevýhodou je nutná výroba tobolek ze specifických acidorezistentních materiálů. Jedná se tak o speciální enterické lékové formy nebo o enterosolventní polymerní obaly. Hlavním důvodem, proč tobolka musí být vyrobena z těchto složitých a specifických materiálů, je snaha

o „colon drug delivery system“ (1). Jedná se o systém podávání léků/biologických materiálů specifický pro tlusté střevo. Systém je schopen uvolňovat účinnou složku specificky v tlustém střevě předvídatelným a reprodukovatelným způsobem. Přenášené složky musí být chráněny před degradací, uvolňováním a absorpcí v horní části GIT (žaludek, proximální část tenkého střeva) a následně se musí náhle nebo řízeně uvolnit v proximální části kolonu. U léčiv může dojít k degradaci, ztrátě účinku nebo k nežádoucím účinkům. U bakterií tlustého střeva přenášených lékovou formou může dojít při uvolnění v oblasti žaludku k infekcím, které mohou vést až k sepsím.

Vývoj lékových forem pro kolonické podání biologického materiálu vyžaduje denní aplikaci v nemocničním prostředí. Musí se jednat o jednoduše reprodukovatelnou metodu v laboratorních podmínkách s okamžitou aplikací biologického materiálu do distálních částí kolonu. Potenciální materiály, podmínky a experimentální dosažení zmíněných kritérií můžete nalézt v dalších částech této práce.

1.2.2 Zánětlivá onemocnění střev

Metoda FMT se aplikuje jako léčba zánětlivých onemocnění distálního konce tenkého střeva a tlustého střeva. Jedná se o způsob terapie, která není komplexní pro všechny typy zánětlivých onemocnění střev, ale je modifikovaná pro konkrétní onemocnění. S tím souvisí i účinnost terapie FMT, která je u některých onemocnění kladně hodnocena, prokázána a používána – rekurentní infekce *Clostridium difficile* a ulcerózní kolitida. Naopak léčba některých onemocnění metodou FMT má pouze omezené účinky – Crohnova choroba a pouchitida.

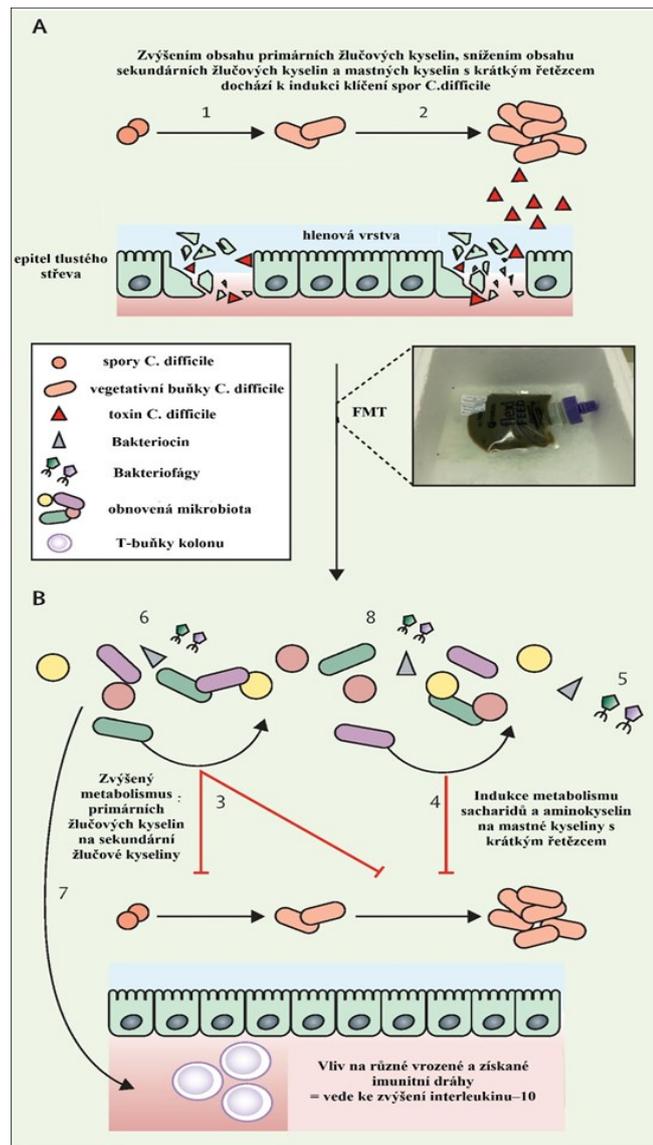
1.2.2.1 Rekurentní infekce *Clostridium difficile* (rCDI)

Jedná se o kolitidu způsobenou zvýšeným pomnožením toxinogenní bakterie *Clostridium difficile*, která způsobuje těžké průjemové stavy. V současné době je rCDI nejvýznamnějším tzv. nosokomiálním onemocněním čili nemocí spojenou s pobytem v nemocničním prostředí zhoršující stav hospitalizovaných pacientů (11).

Na tento bakteriální druh se aplikuje léčba antibiotiky, především vankomycinem nebo fidaxomycinem, které způsobují zánik bakterie ve vegetativním stádiu. Jenže rod *Clostridií* vytváří při nepříznivých vnějších existenčních podmínkách spory. Jedná se o rezistentní tělíska umožňující bakteriím přežít při nepříznivých vnějších podmínkách. Po odeznění antibiotické

léčby se spora promění zpět ve vegetativní buňku a nastává tzv. recidiva infekce. Podle studií je recidiva u infekce rCDI až u 20 % primárně vyléčených pacientů. Z těchto dvaceti procent pacientů podléhá následujícím recidivám tohoto onemocnění padesát šest procent z nich. Tito pacienti jsou opět léčeni antibiotiky, která jsou spojena s riziky (12). Dlouhodobé podávání antibiotik může působit nepříznivě změnou mikrobiomu tlustého střeva a zhoršit tak uzdravení pacienta. Při oslabeném stavu pacienta primárním onemocněním může vést tato nosokomiální infekce minimálně k horší kvalitě života nebo až ke smrti.

Dodnes neexistuje test, který by přímo tuto infekci s jistotou identifikoval, což komplikuje indikaci správné terapie. Jednou z možných pokročilých terapií je kombinovaná léčba ATB s metodou FMT. Fekální mikrobiální transplantace je bezpečnou, relativně levnou alternativní terapií, která především zastavuje chronicky se opakující infekce způsobené bakterií *Clostridium difficile*. FMT způsobí obnovení přirozeného mikrobiomu tlustého střeva. Budoucností terapie je zlepšená aplikace fekálního transplantátu pomocí enterosolventních tobolek a cílená úprava mikrobioty střeva vedoucí k rozšíření FMT na další onemocnění i mimo gastrointestinální trakt (13).



Obrázek 1: Mechanismy účinku FMT při léčbě rCDI. Upraveno a převzato: (11) A – Schéma distálního ilea během rCDI; B – Schéma distálního ilea po aplikaci FMT jako léčby rCDI (1) klíčení spor *Clostridium difficile* indukované mnoha faktory např. primárními žlučovými kyselinami (taurocholát – zvýšená hladina po léčbě ATB); (2) – ztráta signálů růstu zdravé mikrobioty střeva vede k rychlému nárůstu *C. difficile*; (3) – po aplikaci FMT dochází k produkci chybějících bakteriálních enzymů, které metabolizují primární žlučové kyseliny (hydrolázy) na sekundární žlučové kyseliny (deoxycholát) inhibující vegetativní růst *C. difficile*; (4) – valerát mastných kyselin s krátkým řetězcem inhibuje vegetativní růst *C. difficile* a obnovuje funkci střevní bariéry; (5) – při infekci *C. difficile* dochází ke změně profilu střevních bakteriofágů a plísňů, po FMT dochází k rychlé obnově na profily ve stolici dárců; (6) Bakteriociny = antimikrobiální látky produkované bakteriemi (např. anti-*C. difficile* aktivita); (7) – vliv FMT na imunitní systém – zvýšení produkce interleukinu-10 a snížená prezentace bakteriálních antigenů T-lymfocytů kolonu; (8) – *C. difficile* vychytává malé molekuly (sukcinát, kys. sialová, prolin), které podporují růst jejich vegetativních forem, po FMT dodaná zdravá střevní mikrobiota zvyšuje konkurenci o tyto látky a tím *C. difficile* přichází o své energetické zdroje

1.2.2.2 Ulcerózní kolitida

Jedná se o autoimunitní krvácející, hnisavý až ulcerózní zánět sliznice konečníku a sousedící části distálního tračníku. Pravděpodobnou příčinou je geneticky podmíněná dysregulovaná a trvalá reakce imunitního systému na střevní mikrobiotu. Nastává změna mikrobiálního obrazu tlustého střeva vedoucí k dysbióze – nerovnováhy střevní mikrobioty. Obecně se ulcerózní kolitida projevuje na mikrobiomu střeva změnou zastoupení určitých kmenů bakterií – snížené zastoupení kmene Firmicutes a Bacteroidetes a zvýšené zastoupení kmene Proteobacteria.

Aplikací metody FMT dochází k obnovení rovnováhy střevní mikroflóry. Posouzení účinku terapie u tohoto onemocnění lze na základě biomarkerů. Po podání FMT u všech úspěšně léčených pacientů dochází ke zvýšení bakteriální biodiverzity, zvýšení zastoupení kmenů Firmicutes a Bacteroidetes. Mikrobiální profily příjemců transplantátu se více podobají dárcovským profilům. Tím je způsobeno vyšší zastoupení třídy Clostridium, z nichž nejvíce čeledi Lachnospiraceae a Ruminococcaceae ve střevním mikrobiálním systému. Zmínění zástupci třídy Clostridium produkují faktor SCFA, který indukuje diferenciaci buněk imunitního systému, především imunosupresivních a protizánětlivých regulačních buněk. Jedná se tak o metabolický biomarker tohoto onemocnění, který zajišťuje správnou střevní funkci. Mezi další biochemické markery patří zvýšená hladina hemu, biosyntézy lipopolysacharidů a zvýšená hladina biotinu, který omezuje produkci prozánětlivých cytokinů ve střevě. (14)

1.2.2.3 Crohnova choroba

Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění tenkého i tlustého střeva způsobené pravděpodobně genetickou mutací ovlivňující správnou funkci střevního imunitního systému. Mezi příčiny vyvolávající toto onemocnění patří široká škála faktorů od dlouhodobého složení stravy s nízkým obsahem vlákniny a vysokým obsahem sacharidů až k faktorům vnějšího prostředí. Řadíme zde i změnu mikrobiálního střevního systému a nesteroidní protizánětlivá léčiva. Nemoc postihuje tenké i tlusté střevo, nejčastěji se infekce projevuje v terminálním ileu nebo na přechodu terminálního ilea do proximální části tlustého střeva. Diagnostikuje se endoskopicky nebo radiograficky (15).

Terapie především cílí na úlevu od symptomů a udržení pacienta v remisi celoživotní farmakoterapií. Pacient dodržuje předepsaný životní styl a stravování. Indikace typu

farmakoterapie záleží na vážnosti a umístění infekce. Při mírném průběhu v oblasti tlustého střeva se aplikují pacientovi aminosalicyláty a při vážnějších stavech kortikosteroidy (nevhodné pro dlouhodobou léčbu). Při dlouhodobějších vážnějších stavech se aplikují tzv. imunomodulátory na bázi methotrexátu nebo merkaptopurinu (4). Poznatky o využití FMT v léčbě Crohnovy choroby jsou různorodé. Jelikož se klinické projevy a umístění onemocnění liší, tak i klinická odpověď pacientů léčených FMT je odlišná. Pacientů, kteří dosáhli díky léčbě FMT klinické remise je podle studií 52 %. Zároveň autoři studie upozorňují na velké publikační zkreslení (bias), kterým tato studie disponuje (nízká důvěryhodnost) (13).

1.2.2.4 Pouchitida

Jedná se o idiopatický zánět vaku z kliček tenkého střeva u pacientů po chirurgickém odstranění tlustého střeva. Léčí se obezřetně antibiotiky, protože poucho je citlivé na radikální změny mikrobiálního systému. V závislosti na těchto skutečnostech byly provedeny studie na terapeutickou léčbu pomocí FMT. Účinnost terapie se podle několika studií liší způsobem podání transplantátu. Po podání transplantátu nasojejunální sondou (horní cesta podání) pacienti vykazovali až 80 % klinickou remisi. Naopak podání dolní cestou prostřednictvím pouchoskopie (endoskopie do poucha), kdy se zaváděly do daného místa dvě infuze FMT, dosáhlo pouze 5 % pacientů významné klinické odpovědi. Kombinovaná cesta podání transplantátu prvotní aplikací klyzmatem (dolní cesta podání) a následného dvoutýdenního podávání enterosolventních kapslí (horní cesta podání), byla předčasně ukončena pro nízkou míru odpovědi pacientů na léčbu. (13)

1.2.3 Onemocnění přímo nesouvisející s tlustým střevem

Metodou FMT se v průběhu posledních let začínají léčit i některá onemocnění zdánlivě nesouvisející s gastrointestinálním traktem. Do tohoto širokého portfolia můžeme zařadit například transplantační stavy. Takovým známým stavem je onemocnění zvané „reakce štěpu proti hostiteli“ nebo transplantace krvetvorných buněk do kostní dřeně (11), při kterých se využívá interakce fekální mikrobioty s imunitním systémem vedoucí k lepšímu průběhu zmiňovaných transplantací (16).

Mezi nemoci, které se léčí experimentálně metodou FMT, můžeme zařadit psychická onemocnění (bipolární porucha, autismus), neurodegenerativní onemocnění (Parkinsonova choroba), metabolické syndromy (obezita) a cirhózu jater. Novinkou je experimentální terapie proti psoriatické artritidě, což je zánětlivé kloubní onemocnění u pacientů s psoriázou. (11)

Posílení oslabeného mikrobiomu střeva po chemoterapeutické léčbě nádorových onemocnění je dalším možným využitím FMT.

1.3 Parametry zapříčiňující uvolnění účinné látky v tlustém střevě

U lékových forem aplikovaných do oblasti tlustého střeva se využívá změn vybraných fyziologických nebo fyzikálně–chemických parametrů při průchodu gastrointestinálním traktem. Změny těchto parametrů vedou k rozpadu nebo degradaci materiálu lékové formy, což zapříčiňuje uvolnění účinné látky z lékové formy na místo určení. Mezi hlavní parametry ovlivňující uvolnění účinné látky u řízené aplikace do GIT patří změna pH, počtu a typu mikroorganismů tlustého střeva, peristaltické tlakové vlny v kolonu a tranzitní čas lékové formy v jednotlivých částech GIT.

1.3.1 pH

Jednotlivé materiály používané pro výrobu lékových forem se deformují/degradují při konkrétních hodnotách pH. Léčivo procházející trávicí trubicí se setkává v segmentech GIT s různými hodnotami pH. V dutině ústní pH dosahuje mírně kyselých nebo spíše alkalických hodnot v rozmezí 6,4–7,5. Po průchodu léčiva jícnem je léčivo unášeno do žaludku, kde naráží na kyselé pH 1,2–3,0. Léčivo, jehož cílená aplikace je mířena do tlustého střeva, musí být rezistentní vůči působení kyselých šťáv žaludku. V duodenu je léčivo vystaveno největšímu náporu trávicích enzymů (kap. 1.3.6). V oddílech tenkého střeva je pH v rozmezí 6,0–7,5. Především se poukazuje na pH distálního ilea, které se liší oproti ostatním oddílům. pH zde dosahuje nejvyšších hodnot ve střevě (okolo pH 7,5) a je tedy oblíbenou oblastí pro aplikaci léčiv. Při průchodu lékové formy tlustým střevem nejnižší pH nacházíme na začátku tlustého střeva (pH 5,5) vlivem bakteriální enzymatické fermentace polysacharidů na krátké řetězce mastných kyselin. Hodnota pH se postupně zvyšuje směrem k rektu, kde dosahuje hodnot okolo pH 7. (1)

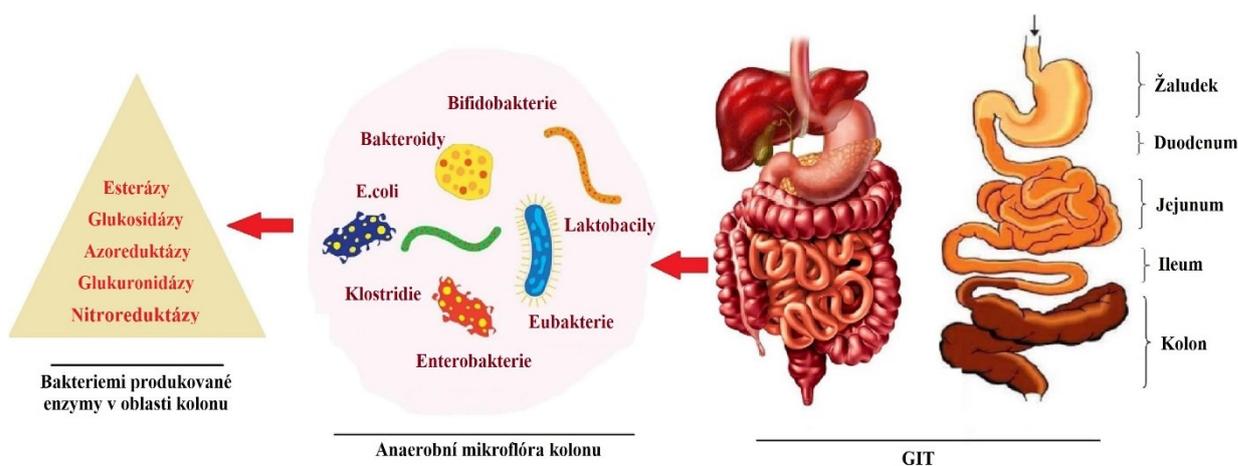
1.3.2 Působení enzymů mikrobiálního systému tlustého střeva

Využívanou vlastností mikroorganismů umístěných v tlustém střevě je produkce enzymů. Bakteriální enzymy cílí na polymery lékových forem, které mohou být ve formě potahů nebo matic. Polymery, které jsou biodegradabilní mikroflórou tlustého střeva, jsou většinou na bázi

polysacharidů a jsou řízeně degradovány v oblasti tlustého střeva. Polysacharidová stěna nebo potah formy je pomocí enzymů mikrobiálního systému tlustého střeva rozrušen a účinná látka se uvolňuje z formy do lumen GIT. Materiál však musí odolat kyselému pH žaludku a enzymatické aktivitě duodena, než vůbec peristaltikou doputuje do kolonu.

Převážně anaerobní bakterie tlustého střeva produkují enzymy ze třídy reduktáz a hydroláz. Bakterie tlustého střeva produkují např. nitroreduktázy, hydrogenázy, oxidoreduktázy, esterázy, amidázy, glukosidázy, sulfatázy a další (2). Hydrolýza a redukce polysacharidů vede k degradaci na monosacharidy, organické kyseliny, mastné kyseliny, methan a oxid uhličitý. Příkladem používaných polysacharidů jsou pektin, chitosan, alginát, amyloza atd (17). Mezi materiály biodegradabilní střevní mikroflórou patří také látky na bázi proteinů jako je například kolagen. Mezi další enzymy, které produkují bakterie tlustého střeva, patří azoreduktázy, které štěpí azo-vazby v syntetických polymerech (18).

Kombinací dvou nejdůležitějších faktorů, pH GIT a enzymů mikroflóry tlustého střeva, vznikla léková forma CODES. Tato léková forma obsahuje tři vrstvy polymerů chránící jádro s účinnou látkou a biodegradabilním polymerem. Enterosolventní vnější vrstva se rozpustí v tenkém střevě. Mezi vnitřní a vnější vrstvou je izolant hypromelóza. Vnitřní vrstva se rozpouští v kyselém prostředí na začátku tlustého střeva, jehož kyselost je způsobena fermentačními produkty bakterií. Kombinace těchto složek zaručuje spolehlivou cestu k zavedení léčiva do tlustého střeva. Pojistkou je biodegradabilní polymer jádra, který je degradován až za působení bakteriálního systému tlustého střeva. (1)



Obrázek 2: Schéma produkce enzymů bakteriální mikroflórou. Převzato a upraveno: (48)

1.3.3 Tranzitní čas – doba průchodu segmenty GIT

V jednotlivých segmentech gastrointestinálního traktu trvá fyziologický průchod např. tobolky odlišnou dobu. Perorální aplikace léčiva zanedbává dobu strávenou v dutině ústní. V žaludku zůstává léková forma v rozmezí patnácti minut až dvou hodin a následně putuje do tenkého střeva. Tenké střevo se využívá pro svůj konstantní tranzitní čas jako model pro vývoj lékových forem s řízeným uvolňováním. Tranzitní čas léčiva v tenkém střevě je 3–4 hodiny. V tlustém střevě se pasáž lékové formy před vyloučením z organismu odhaduje na 6–48 hodin. Tohoto faktoru se využívá u lékových forem pro chronoterapii nebo u aplikace cíleně opožděného uvolňování léčiva.

1.3.4 Tlakové vlny tlustého střeva

K podstatně zvýšenému tlaku ve střevě dochází třikrát až čtyřikrát za den vlivem silné peristaltické vlny. Jedná se o fyziologický jev způsobený nižším množstvím tekutin a tím pádem vyšší viskozitou tráveniny, která je tak posunuta dále směrem k rektu. Tento jev využívají lékové formy PCDC (Pressure Controlled Drug Capsules) složené většinou z želatinové tobolky potahované ethylcelulózou. Ethylcelulóza je nerozpustný polymer, jehož destrukce není závislá na pH prostředí a množství tráveniny v daném segmentu. Potažená tobolka odolává tlaku lumen tenkého střeva a hroučí se až na základě vlnou způsobeného zvýšeného tlaku tlustého střeva. Při perorálním podání se léková forma poškodí peristaltickou vlnou a reabsorpcí vody v tlustém střevě a dochází k uvolnění účinné látky z vnitřního prostoru tobolky. Tomuto jevu dochází mezi třetí až sedmou hodinou od perorálního podání. (2)

1.3.5 Tekutý obsah segmentů GIT

Na rozdílném objemu tekutin v jednotlivých segmentech GIT jsou založeny například osmoticky řízené systémy léčiv. U cílené aplikace do tlustého střeva může faktor nízkého objemu znepříjemňovat uvolnění léčiva do kolonu. Tlusté střevo má nízký objem tekutého obsahu (1,5 l/den), který se neustále reabsorpcí vody z lumen kolonu zakoncentrovává do stolice (okolo 100 ml/den). Naopak tenké střevo, jehož objem tvoří trávenina, enzymy a voda, poskytuje větší objem (2–4,5 l/den) pro případné rozpuštění účinné látky. Žaludek o objemu 1–3 litry není cílem aplikace léčiv. Systémy využívající osmotický princip se proti kyselému prostředí žaludku chrání obaly.

Lékové formy založené na osmotickém principu jsou tvořeny želatinovou tobolkou, která vytváří první ochranný obal a podléhá rozpadu v kyselém prostředí žaludku. Želatinová tobolka ve svém nitru obsahuje 5–6 tablet o speciální stavbě. Po rozpadu želatinové tobolky v žaludku dochází k uvolnění tablet chráněných vnějším enterosolventním obalem. Obal odolá kyselému pH žaludku a rozpouští se v tenkém střevě při pH vyšší než 7. Jelikož je v každé tabletě obsažena vrstva léčiva o vyšší koncentraci než v okolí, tak se díky polopropustné membráně otvorem tablety do systému začíná hrnout voda s tendencí naředit systém léčiva. Osmoticky aktivní polymer (tvořící druhou vrstvu tablety) přijímá vodu a bobtná. Bobtnáním tohoto polymeru dochází k vytlačování roztoku léčiva ven otvorem tobolky v oblasti distálního ilea nebo začátku tlustého střeva. Systém se zkratkou OROS-CT se využívá pro léčbu ulcerózní kolitidy a vydrží dávkovat léčivo po dobu 24 hodin (1).

1.3.6 Enzymy při průchodu tobolky GIT

Při formulaci lékové formy se musí počítat s vlivem trávicích enzymů GIT. V ústní dutině slinné žlázy produkují především amylázu štěpící škrob. V žaludku se musí brát v potaz účinek žaludečních lipáz a pepsinu štěpící bílkoviny (19). Do duodena ústí pankreatický vývod i vývod žlučových cest. Pankreas do tenkého střeva produkuje především amylázy, lipázy, peptidázy a nukleázy v rámci pankreatické šťávy. Žlučové cesty produkují žluč pomáhající emulgací k trávení lipidů. Tlusté střevo nemá vlastní enzymatickou aktivitu. Enzymy v tlustém střevě jsou produkovány jeho mikrobiálním systémem (kap.1.3.2).

1.4 Dělení polymerů využívaných při přípravě enterálních lékových forem

Tobolky, které jsou odolné vůči kyselému pH žaludku, dále procházejí do gastrointestinálního traktu a řízeně se z nich uvolňuje účinná látka do „cílové oblasti“. Tobolky musí být vytvořeny z materiálů, pro které platí obecné enterální podmínky. Využívá se přirozených vlastností průchodu tobolky GIT. Tobolka prochází žaludkem, kde by nemělo dojít k žádnému uvolnění účinné látky. Polymery by měly být tím pádem acidorezistentní. Po překonání této překážky tobolka vstupuje do tenkého střeva, jehož délkou prochází ve stabilním časovém úseku (3–4 h). V distálním ileu dochází k tomu, že se oproti předešlým částem GIT zvyšuje pH. Tobolka po přechodu do tlustého střeva prokazuje svoji mechanickou odolnost vůči tlakovým vlnám typickým pro oblast kolonu. V tlustém střevě dochází ke zvýšení počtu a záměně druhů některých mikroorganismů, které mají tendenci štěpit biopolymerní materiály. Tyto popsané změny podmínek při průchodu tobolky GIT zajišťují uvolnění účinné látky v cílové oblasti tlustého střeva. Podle těchto parametrů dělíme polymerní látky pro výrobu enterálních tobolek na polymery citlivé ke změnám pH, polymery degradovatelné mikroflórou tlustého střeva a změkčovadla zlepšující výrobní proces a stabilitu tobolek.

1.4.1 Polymery citlivé na změny pH

Skupina pH senzitivních polymerů (syntetických) je závislá především na změně pH v prostředí GIT. Tobolka se rozpouští po dosažení konkrétního pH po průchodu žaludkem a tenkým střevem. Mezi další parametr ovlivňující rozpustnost tobolky je tloušťka stěny tobolky, resp. tloušťka vrstvy polymeru. Do této skupiny patří polymery na bázi akrylátu/methakrylátu, kopolymery Eudragitu® a deriváty celulózy. V klinické praxi patří tento typ polymerů k nejvíce využívaným. Negativem a zároveň rizikem tobolek tvořených/potažených polymery závislých na pH jsou změny v individuálních hladinách pH GIT jedince. (20) (21)

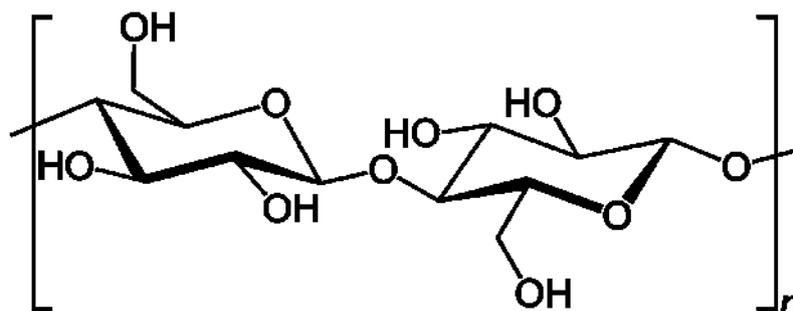
1.4.1.1 Deriváty celulózy

Celulóza je přírodní polymer, který se přirozeně vyskytuje jako stavební materiál buněčných stěn rostlin. Tento přírodní polysacharid je v lumen GIT člověka biodegradabilní (je fyziologicky odbouráván). Mezi další vlastnosti patří jeho výrazná mechanická odolnost a komplexní biokompatibilita s živými systémy. Celulóza je krystalická látka, jejíž struktura je podmíněna silnými mezimolekulovými vodíkovými vazbami, které způsobují její nerozpustnost

ve vodě a organických rozpouštědlech. Zároveň čistá celulóza disponuje vysokým bodem tání okolo 450 °C, což vytváří podstatný problém při jejím tepelném zpracování.

Pro zlepšení výše zmíněných fyzikálně-chemických vlastností celulózy se využívá její esterifikace nebo tvorba etherů. Estery jsou však špatně rozpustné ve vodě a pro farmaceutickou technologii mají méně podstatné využití než ethery, které jsou naopak hydrofilními sloučeninami. Mezi významné ethery celulózy patří methylcelulóza (MC), ethylcelulóza (EC), karboxymethylcelulóza (CMC), hydroxypropylcelulóza (HPC), hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC) a další.

Deriváty celulózy se využívají ve farmaceutické technologii při 3D tisku lékových forem jako matrice, pojivo nebo desintegrant ve směsi polymerů. Mezi nejpoužívanější deriváty celulózy patří HPC a HPMC, z nichž se vyrábí lékové formy s profilem velmi rychlého rozpouštění (okamžitého uvolnění účinné látky) i prodlouženého uvolňování účinné látky. (20)



Obrázek 3: Strukturní vzorec celulózy

1.4.1.1.1 Hydroxypropylcelulóza (HPC)

Hydroxypropylcelulóza je ether celulózy, který se synteticky vyrábí reakcí alkalické celulózy s propylenoxidem. Dochází tak k substituci propylenoxidu na hydroxylovou skupinu každé monomerní jednotky celulózy za vzniku etherové vazby. HPC můžeme podle rozdílné molekulové hmotnosti a viskozity dělit do jednotlivých tříd. Využívané HPC pro farmaceutické účely jsou SSL, SL, L, M, H a VH třídy. U těchto tříd se pohybují molekulové hmotnosti od 40 000 Da (SSL) až po 2 500 000 Da (VH), kdy má každá třída díky svým jedinečným vlastnostem odlišné použití.

Konkrétně pro výrobu lékových forem metodou FDM 3D tisku se využívají polymery o nižší molekulové hmotnosti (SSL, SL a L), které propůjčují lékovým formám své typické viskózní vlastnosti. SSL, SL a L polymery HPC tak vytvářejí stabilní amorfní pevné disperze, které jsou žádoucí pro stabilní a kontrolovanou výrobu lékových forem.

Mezi obecné vlastnosti patří vysoká hydrofilita materiálu, který je rozpustný ve vodě (při 45 °C) i v organických rozpouštědlech. Teplota skelného přechodu HPC je poměrně nízká (100–120 °C), což je výhodné s ohledem na proces extruze i z hlediska spotřeby energie. Rozkladná teplota materiálu (okolo 300 °C) je výrazně vzdálená od teploty skelného přechodu, což je další výhodou materiálu pro využití v praxi. Teplota skelného přechodu je důležitou vlastností chování všech amorfních materiálů. Skelný přechod polymerů je jev, při kterém dochází k přechodu tvrdého (krystalického) polymeru na polymer v gumovitém (amorfním) stavu. Dochází tak ke změnám jeho fyzikálních a mechanických vlastností. (20)

Z HPC se tisknou lékové formy pomocí metody FDM, SSE 3D tisku a „powder bed“ techniky. Hlavní funkce polymeru HPC je především ve vytvoření hlavní matrice držící strukturu dané lékové formy. Ovlivnění rychlosti uvolnění účinné látky z lékových forem vytvořených z HPC je závislá především na geometrii lékové formy (válcovitý, oválný, obdelníkový), procentuální výplň lékové formy polymerem (hustota matrice tablety/tobolky) a třídě HPC. Z uvedených poznatků vyplývá, že čím menší je procentuální výplň formy, tím rychlejší je rozpad a uvolnění účinné látky. Nejrychlejší eroze matrice lékové formy probíhá u třídy s nejmenší molekulovou hmotností HPC-SSL. Mechanismus disoluce lékové formy z HPC je rozložen do dvou fází. V první fázi dochází k nabobtnání polymeru, a tím dochází k přerušení vnitřních stabilizujících můstku lékové formy. Ve druhé fázi destabilizovaná léková forma podléhá erozi (rozpadu) matrice. Možným dalším využitím je potažení tablet vrstvou HPC, která zpožďuje uvolňování účinné látky.

Zajímavostí je výroba lékových forem pomocí metody „powder bed“ 3D tisku. Na uvolnění léčiva a rychlosti rozpadavosti lékové formy vyrobené touto metodou mají vliv viskozita a velikost částic jednotlivých tříd HPC. Třídy HPC s vysokou viskozitou a malými částicemi zapříčiňují delší dobu rozpadu tablety/tobolky. Malé částice jsou snadno hydratované, čímž zvyšují viskozitu daného materiálu. Vysoká viskozita způsobuje formování silnější gelové

vrstvy na povrchu lékové formy. Díky gelové vrstvě dochází ke zpomalení absorpce vody a eroze matrice lékové formy, což vede ke zpoždění uvolnění léčiva. (20)

1.4.1.1.2 Hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC)

HPMC známá jako hypromelóza se vyrábí reakcí celulózy s methylchloridem a propylenoxidem. Z těchto reagentů vznikají na celulóze dva substituenty, a to hydroxypropyl a methylová skupina, které mají přímý vliv na hydrataci HPMC, a tudíž na kinetiku uvolnění léčiva z takové formy. HPMC se využívá mimo jiné pro 3D tisk lékových forem metodou FDM a SSE, ve kterých slouží jako základní složka matrice nebo jako účinný povrchový film (potah).

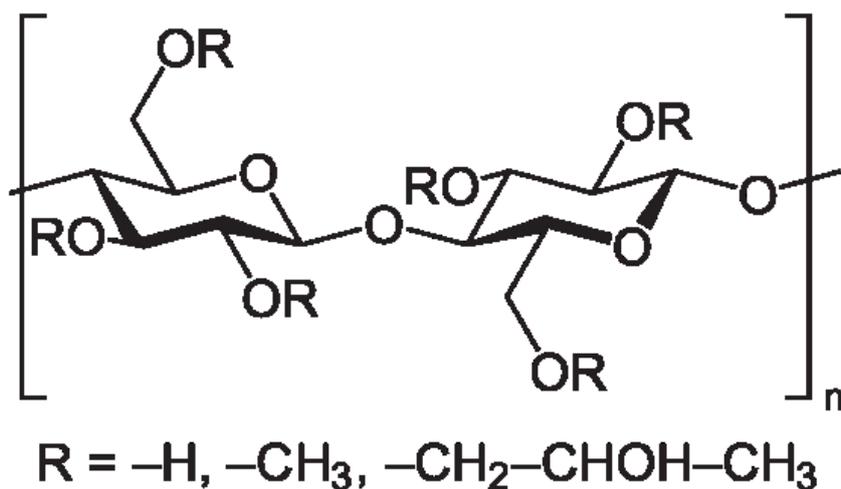
Mezi charakteristické vlastnosti HPMC patří vysoká teplota skelného přechodu (okolo 160–210 °C), vysoká viskozita taveniny a relativně nízká teplota rozkladu polymeru (200–250 °C), které jsou pro extruzi filamentu daného polymeru výrobně náročné. Náročná výroba filamentu HPMC tzv. hot melt extruzí (HME) je ulehčena buď přidavkem změkčovadla nebo použitím modifikovaného polymeru HPMC.

Nejpoužívanější modifikovaná HPMC je označována jako Affinisol™ lišící se oproti čisté HPMC výše zmíněnými vlastnostmi. Affinisol™ usnadňuje extruzi a 3D tisk polymeru na bázi HPMC díky své nižší teplotě skelného přechodu (117–128°C) a nízké viskozitě taveniny. Affinisol™ je dobře rozpustný ve vodě (hydrofilní) a v organických rozpouštědlech. Výše zmíněné vlastnosti se využívají při výrobě lékových forem s okamžitým i řízeným uvolňováním. Lékové formy jsou tištěny pomocí FDM 3D tisku, při kterém lze nastavovat parametry ovlivňující uvolňování léčiva z lékové formy. Čím větší procento výplně matrice/báze tobolky, tím pomaleji se uvolňují účinné látky z lékové formy. Teploty extruze filamentu a 3D tisku výsledných objektů se liší v závislosti na směsi polymerů, nicméně rozmezí teplot extruze je okolo 135–150 °C a teplota 3D tisku okolo 165 °C (22).

Další speciální modifikace HPMC je založena na vytvoření esteru HPMC. Přesněji HPMCAS (acetát sukcinát hypromelózy), ke kterému se přidává do směsi změkčovadlo (PEG) kvůli usnadnění průběhu extruze a ke zvýšení flexibility vláken (filament). HPMCAS je dobře rozpustná do pH 6, a tak se využívá u lékových forem s okamžitým uvolňováním.

HPMC je vhodným polymerem pro 3D tisk matic lékových forem s prodlouženým uvolňováním. K výrobě těchto lékových forem využíváme různé typy HPMC s přidavkem

pomocných látek, s jejichž pomocí můžeme navrhnout formy s řízeným uvolňováním „na míru“. Mechanismus uvolnění účinné látky z lékové formy z HPMC je komplexní. To znamená, že proces uvolnění léčiva z lékové formy zahrnuje bobtnání polymeru, difúzi léčiva do disolučního média a erozi (rozpad) matrice tablety. Hydrofilní léčiva se uvolňují z nítra lékové formy do lumen GIT pomocí difúze. Naopak hydrofobní léčiva se uvolňují až při erozi matrice lékové formy. (20)



Obrázek 4: Strukturní vzorec HPMC. Převzato a upraveno: (49)

1.4.1.2 Polymethakryláty a jejich kopolymery

Polymethakryláty jsou syntetické polymery tvořené převážně z jednotek kyseliny methakrylové a jejich esterů, nebo z dimethylaminoethylmethakrylátu. Ve farmaceutickém průmyslu se využívají jako potahový materiál na tablety, plnivo zvyšující hmotnost tablet nebo pojivo vytvářející vyšší stabilitu účinné látky. (20)

Kopolymery polymethakrylátů, známé pod obchodním názvem Eudragity[®], jsou hojně využívanými materiály v přípravě lékových forem pomocí FDM 3D tisku. Eudragitů[®] je spousta typů a lze je dělit minimálně podle dvou kritérií.

Prvním kritériem může být jejich rozdílná rozpustnost, kterou lze využít v kombinaci s ostatními polymery. Eudragity[®] samostatně nebo ve směsi mají funkci modulátoru, který ovlivňuje uvolnění účinné látky z lékové formy. Podle této vlastnosti dělíme Eudragity[®] na ty,

které poskytují okamžité uvolnění (Eudragit[®] E, EPO), se zpožděným uvolněním (Eudragit[®] L, S) a prodlouženým uvolňováním léčiva (Eudragit[®] NE, RL, RS).

Druhým kritériem je jejich rozdílná odolnost ve vodných médiích o odlišném pH. Těto vlastnosti se využívá u lékových forem využívaných pro aplikaci účinné látky do tlustého střeva. Každý typ Eudragitu[®] má svoji hodnotu pH, při které dochází k rozvolnění a degradaci jejich struktury. Podle pH dělíme Eudragity[®] na ty, které se rozpouští při $\text{pH} \geq 5,5-6$ (Eudragit[®] L) nebo při $\text{pH} \geq 7$ (např. Eudragit[®] S, FS). (21)

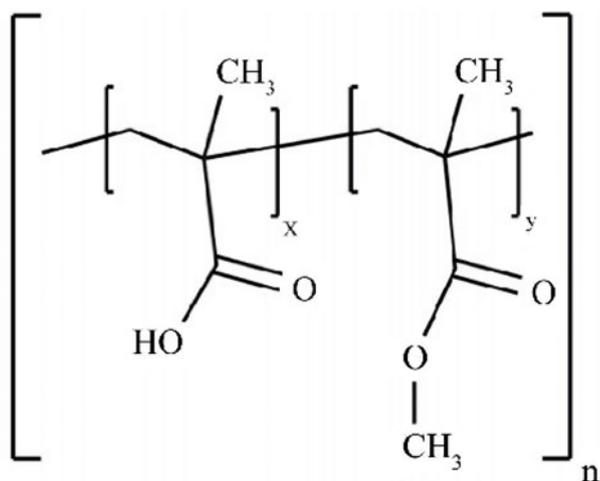
Jak již bylo zmíněno, Eudragity[®] jsou vhodným materiálem jak pro extruzi filament metodou „hot-melt“, tak následné využití filamentu pro FDM 3D tisk lékové formy. (20)

1.4.1.2.1 Eudragit[®] E

Eudragit[®] E je kationtový polymer tvořený dimethylaminoethylmethakrylátem a neutrálním esterem kyseliny methakrylové. Eudragit[®] E je dobře rozpustný v žaludečních šťávách (do $\text{pH} 5,0$). Proto se využívá při léčbě zhoršeného polykání, maskování nežádoucích chutí a jako ochrana proti vlhkosti, kyslíku a světlu. Z podtypů Eudragitu[®] E 100, E 12,5 a E PO se připravují lékové formy s okamžitým uvolňováním. Dle EMA i ČL se u lékových forem s okamžitým uvolňováním musí uvolnit minimálně 85 % léčiva do 30 min. Eudragit[®] E je vhodným polymerem pro přípravu lékových forem pomocí FDM 3D tisku, protože teplota degradace je vysoká (okolo 280 °C). (20)

1.4.1.2.2 Eudragit[®] L

Jedná se o aniontový polymer tvořený kyselinou methakrylovou a methakrylátem v poměru 1:1. Eudragit[®] L je v systémech podávání léčiv pomocnou, ve vodě nerozpustnou, látkou. Využívá se při léčbě parodontitidy, což je chronický zánětlivý stav týkající se zubů a dásní. Eudragit[®] L je pomocnou látkou v gelovém lékovém systému. Ten se v tekuté formě injekčně aplikuje do parodontálního vaku, kde dochází k fázové přeměně na gel nebo pevnou látku. Eudragit[®] L je především díky své rozpustnosti při hodnotě $\text{pH} 5,5-6,0$ hojně využíván při léčbě infekcí a zánětů v dutině ústní. (23)



Obrázek 5: Strukturní vzorec monomeru Eudragitu[®] L100 (50)

1.4.1.2.3 Eudragit[®] FS

Eudragit[®] FS je aniontový terpolymer methakrylátu, jehož rozpustnost závisí na pH. Zpracováván je hot-melt extruzí nad 100 °C společně s léčivem za vzniku pevné disperze léčiva. Tato metoda se využívá u léčiv se špatnou rozpustností ve vodě. Eudragit[®] FS se využívá pro přípravu lékových forem s řízeným uvolňováním, kdy dochází k rozpuštění polymeru při pH okolo 7,4. Polymer je společně s Eudragitem[®] S vhodnou matricí lékových forem podávaných per os pro aplikaci léčiva do tlustého střeva. (20) (24)

1.4.2 Biopolymery degradovatelné střevní mikroflórou

Jedná se o skupinu polymerů, která je degradována bakteriemi tlustého střeva. Biopolymery musí odolat v první fázi své cesty organismem kyselému pH žaludku a následně enzymům vyskytujících se v nejvíce enzymaticky aktivní oblasti tenkého střeva – duodena. Po průchodu do tlustého střeva jsou biopolymery štěpeny enzymy bakterií spadajících do mikroflóry kolonu. Dochází tak ke hydrolyzám a redukcím, které materiál degradují. Tyto biopolymery patří biochemicky mezi polysacharidy, proteiny a jejich deriváty. Výhodou je jejich minimální toxický vliv, kompatibilita s živými systémy a díky své biodegradabilitě nedochází k jejich hromadění v tlustém střevě. Mezi nevýhody patří jejich hydrofilní charakter, jejich struktura může podléhat destabilizujícím jevům v počátečních oblastech GIT (21).

Biopolymery jsou frekventovaně využívány v kombinaci se syntetickými polymery, především s deriváty celulózy, pro aplikaci léčiva do oblasti tlustého střeva. Těto kombinace se využívá při léčbě chronických střevních zánětů nebo při procesu fekální mikrobiální transplantace, kde za účinnou látku jsou vyměněny lyofilizované vybrané druhy bakterií.

Strukturálně můžeme tyto biopolymery rozdělit do dvou základních skupin, a to na polysacharidy a proteiny. Významnější skupinou ve farmaceutické technologii jsou polysacharidy. Polysacharidy využívané v lékových formách můžeme dle struktury dělit na klasické (necyklické), cyklické, vysoce viskózní a glykosaminoglykany. Mezi klasické (nejvíce využívané) polysacharidy patří alginát, chitosan, pektin, amyulóza, inulin a např. arabinogalaktan. Cyklickým oligosacharidem využívaným v lékových formách je cyklodextrin, vysoce viskózní polysacharid guar a glykosaminoglykany chondroitin sulfát a kyselina hyaluronová (21). Mezi proteiny, které jsou méně využívány především u 3D tištěných lékových forem, patří kolagen a polyaspartamid (25).

1.4.2.1 Alginát

Alginát se získává z hnědých řas rodu Phaeophyceae, u nichž je součástí jejich buněčné stěny. Jedná se o lineární polysacharid, který je při neutrálním pH polyaniontovým řetězcem složeným ze dvou sacharidových monomerů M a G. M monomer je kyselina β -D-manuronová a G monomer kyselina α -L-guluronová. Spojením monomerů vznikají homopolymerní (MM, GG) a heteropolymerní (MG) bloky. Délka a množství jednotlivých bloků ovlivňuje fyzikální vlastnosti daného polymeru. Přičemž podíl G-monomeru ve struktuře alginátu představuje 30–70 %. (26)

Alginát je nejpoužívanější polysacharid ve farmaceutické technologii kvůli své nízké toxicitě, biokompatibilitě a dobrému tuhnutí. Viskozita roztoku alginátu závisí na koncentraci alginátu v roztoku, relativní molekulové hmotnosti řetězce polymeru a teplotě. Se zvýšenou teplotou se snižuje viskozita roztoku. Tato závislost je patrná při zvýšených koncentracích alginátu v roztoku, při kterých se při zvýšené teplotě zvyrazňuje efekt snížení viskozity.

Využití alginátu z pohledu farmaceutické technologie je ve dvou hlavních formách. První formou je práškový alginát sodný využívaný jako materiál lékové formy s prodlouženým uvolňováním. Druhá možnost farmaceutické aplikace je ve formě hydrogelů.

V lékových formách s prodlouženým uvolňováním alginát sodný modifikuje uvolnění účinné látky. Jelikož je alginát sodný acidorezistentní látka, tak odolává kyselému pH žaludku a přenáší látku až do oblasti kolonu. Příkladem materiálu takové lékové formy může být alginát v kombinaci s nosným polymerem derivátem celulózy (HPMC) a dalšími pomocnými látkami (PVA, xanthanová guma). Zmíněný práškový materiál je zpracován „hot melt“ extruzí při teplotě 100–120 °C a následně je vytištěna léková forma pomocí FDM 3D tisku v rozmezí teplot trysky 170–186 °C. (27)

Tvorba hydrogelu je založena na mechanismu reakce alginátu jako polyaniontu (v neutrálním pH) s kationty kovů alkalických zemin, které jsou jediné dvojmocné netoxické kationty, s kterými proces tuhnutí (tvorby hydrogelu) probíhá. Tuhnutí je vratným dějem. Tuhost hydrogelu závisí na délce a množství tzv. G-bloků. Platí, že pevnost, stabilita a porozita hydrogelu roste s rostoucím podílem G-monomerů a délkou G bloků. Pružnost hydrogelu roste se zvyšujícím se zastoupením koncentrace alginátu (26). Hydrogely se využívají kvůli svým ideálním vlastnostem u řízeného uvolňování léčiv. Příkladem může být cílená aplikace chemoterapeutické látky (methotrexátu) do oblasti kolorekta při léčbě kolorektálního karcinomu (28). Pro pacienta se jedná o léčbu se sníženými vedlejšími účinky chemoterapeutika. Mezi další látky přenášené hydrogely patří lokální anestetika např. lidocain (29).

1.4.2.2 Kolagen

Kolagen je protein nejvíce zastoupený v extracelulární matrix (ECM) tkání. Představuje u savců zhruba 30 % všech proteinů v organismu. Udržuje mechanickou pevnost a buněčnou soudržnost v tkáních. Kolagen je biokompatibilní, biodegradabilní, relativně dobře tisknutelný a není toxický ani imunogenní. (30)

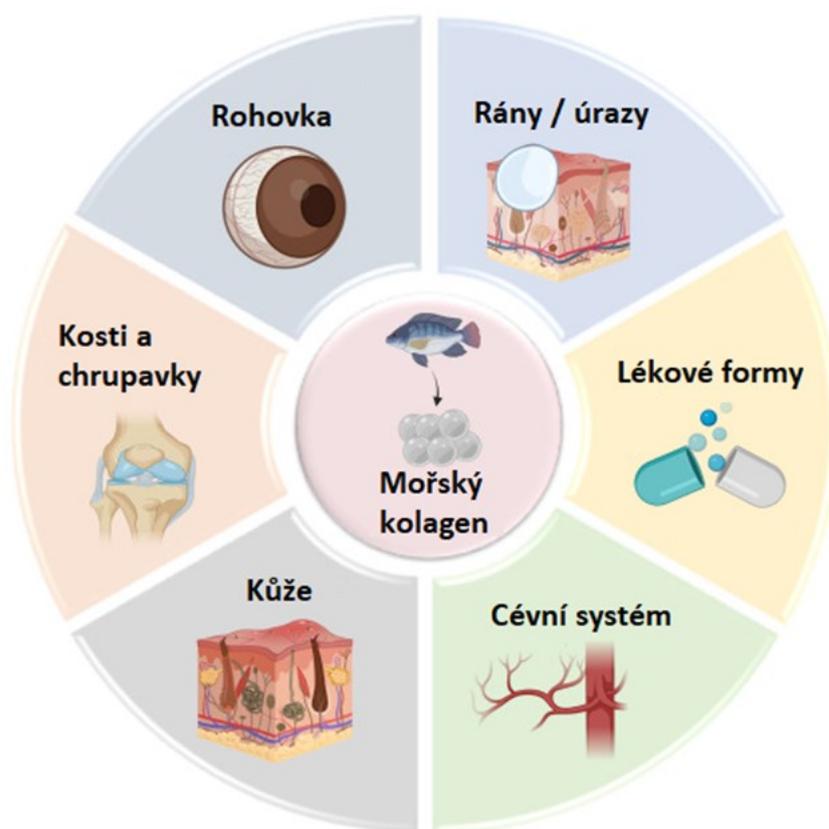
Roztoky kolagenu mají nízkou viskozitu, a proto vytištěné objekty neudrží stálý tvar. Kolageny se využívají i při tvorbě hydrogelů, které se samotným kolagenem mají nízkou mechanickou pevnost.

Jak již bylo naznačeno, samotný kolagen není vhodný pro 3D tisk kvůli své rychlé degradaci, proměnlivé viskozitě a pružnosti, která je způsobena neustálým síťováním v průběhu 3D tisku. Ideální koncentrace kolagenu pro 3D tisk je 30–50 mg/ml, dále se ke kolagenu přidávají materiály o vyšší viskozitě (polysacharidy – chitosan), které inhibují rychlou degradaci.

Další možností je přidavek síťovacích činidel (např. genipin), které zvyšují mechanickou pevnost hydrogelů. (30)

3D tisk kolagenu se ve větší míře využívá v tkáňovém inženýrství. Vytisknuté hydrogely mají vysokou podobnost se strukturou extracelulární matrix (ECM) tkáně. Využívá se tak ke kostní regeneraci, tisku chrupavkové tkáně (např. meniskus kolene) (31) nebo tisku stěny cév. Minoritním ovšem farmaceuticky zajímavým využitím je tisk lékových forem s prodlouženým uvolňováním.

U lékových forem se využívá savčího kolagenu pro tisk tablet, pelet a výrobu transdermálních filmů, které zlepšují hojení ran. Trendem poslední doby je výroba lékových forem z rybího (mořského) kolagenu, který je nositelem mnoha výhod. Mezi výhody patří získání vyššího procentuálního obsahu kolagenu ze tkání, vyšší absorpční vlastnosti, nižší molekulová hmotnost, biokompatibilita a nižší riziko přenosu onemocnění na člověka oproti savčímu kolagenu. Mořský kolagen se využívá při individualizaci farmakoterapie a u lékových forem s prodlouženým uvolňováním. V těchto formách je mořský kolagen nosičem účinných látek. Ve formě pH-senzitivního hydrogelu je kolagen nosič antibakteriálních, antimykotických léčiv a například alopurinolu, u kterého zpomaluje 2–6krát dobu uvolňování. Filmy vytvořené z kolagenu mořských hub urychlují hojení ran kvůli tomu, že se účinná látka L-cystein hydrochlorid pomaleji uvolňuje do místa rány a zároveň mořský kolagen absorbuje zánětlivý extravaskulární výpotek. (32)



Obrázek 6: Využití materiálu na bázi kolagenu v tkáňovém inženýrství (rohovka, hojení ran, kostí, chrupavky, cévy a kůže) a v systému podávání léčiv. Převzato a upraveno: (32)

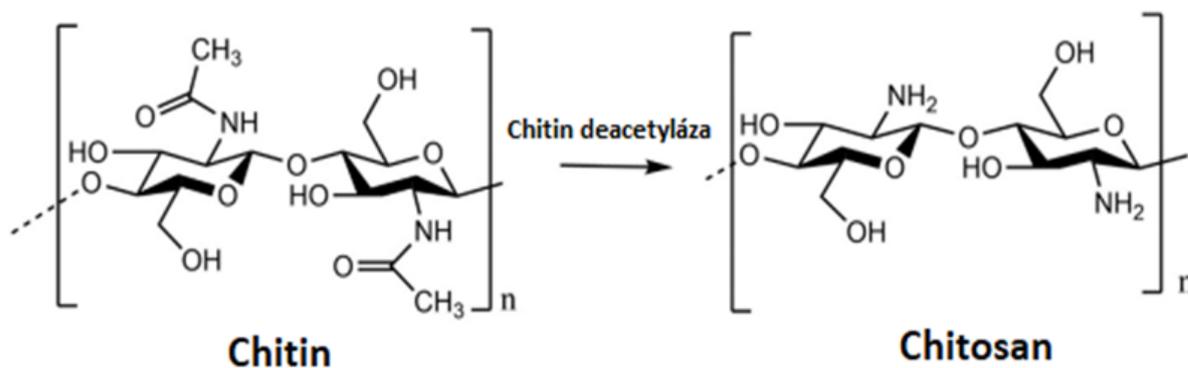
1.4.2.3 Chitosan

Chitosan je lineární aminopolysacharidový řetězec, který tvoří náhodně uspořádané dva typy jednotek. První jednotku tvoří D-glukosaminy a druhou N-acetyl-D-glukosaminové jednotky. Jedná se o jediný přirozeně se vyskytující kationtový biopolymer, který díky svému kladnému náboji má schopnost interagovat se sliznicí GIT, čehož se využívá v terapii. (33)

Chitosan je získáván z chitinu. Chitin je druhým světově nejrozšířenějším polysacharidem hned po celulóze. Je přirozeně obsažen ve schránkách korýšů, krevet a buněčných stěnách hub. Zisk chitosanu je založen na deacetylaci chitinu, při které dochází k odstranění acetylových skupin (navázaných na aminoskupinách) pomocí koncentrovaného roztoku hydroxidu sodného. Právě přítomnost první deacetylované aminoskupiny ovlivňuje specifické podávání léčiva do distálních částí GIT. V kyselém prostředí jsou aminoskupiny protonovány na NH_3^+ a přisuzují tak biopolymeru již zmíněný kladný náboj.

Chitosan je degradován hydrolytickými enzymy bakterií tlustého střeva (např. chitinasa rodu *Bacteroides*) (33), které štěpí glykosidické vazby spojující polysacharidové jednotky polymeru. Vlivem sporadického zastoupení bakteriální mikroflóry v oblasti žaludku a proximální části tenkého střeva není pravděpodobná degradace chitosanu v těchto oblastech. Této vlastnosti se využívá při podávání účinné látky prostřednictvím specifických lékových forem do oblasti kolonu. Na degradaci chitosanu má také vliv stupeň deacetylace. Při vysokém stupni deacetylace se zákonitě degradace chitosanu snižuje.

Chitosan se využívá jako biopolymer pro lékové formy s prodlouženým a řízeným uvolňováním. Výhodou chitosanu v lékových formách s prodlouženým uvolňováním je, že díky jeho zmíněným vlastnostem nedochází k nežádoucí distribuci léčiva v těle, snižuje se celková dávka účinné látky v lékové formě a léčivo se uvolňuje v závislosti na místě určení, kde má účinná látka nejvyšší koncentraci. Oproti ostatním polysacharidům disponuje kvůli svému kladnému náboji tzv. mukoadhezivními schopnostmi (34). Tato vlastnost umožňuje chitosanu adhezi ke sliznici tlustého střeva v místě poškození sliznice a poskytuje dlouhé působení (uvolňování) léčiva např. v místě chronických zánětů střeva (33).



Obrázek 7: Získání chitosanu z chitinu. Převzato a upraveno: (33)

1.4.3 Změkčovadla (plastifikátory)

Plastifikátory neboli změkčovadla jsou převážně syntetické polymery, které vytvářejí vazby s polymerními řetězci např. matrice lékové formy. Tyto vazby destabilizují vzájemné (sekundární) vazby mezi základními polymerními řetězci, které se tak vzájemně od sebe vzdalují, což způsobuje větší flexibilitu, hladkost a měkkost materiálu. Změkčovadla se zabudovávají do amorfni části polymeru a krystalická část polymeru zůstává nedotčena. V krystalické části polymeru jsou vazby příliš silné na to, aby změkčovadla mohla proniknout do této části polymeru. (35)

Změkčovadla ovlivňují chování základních (matricových) polymerů. Obecně snižují jejich tvrdost, hustotu, viskozitu taveniny, teplotu skelného přechodu a objemový odpor polymeru. Naopak zvyšují pružnost a stabilitu materiálu a mají významné lubrikační vlastnosti využívané při jejich farmaceutickém zpracování.

Některé vlastnosti plastifikátorů se využívají pro zlepšení průběhu extruze filament a 3D tisku navržených objektů. Především koncentrace změkčovadla ve směsi má vliv na snížení teploty skelného přechodu (T_g) materiálu. Tento jev závisí především na pružnosti molekul plastifikátoru. Čím větší pružnost molekuly plastifikátoru poskytují, tím větší bude snížení teploty skelného přechodu pro daný plastifikátor. Dále se využívá u extruze a 3D tisku dalších vlastností změkčovadel, které usnadňují proces vytlačení filament nebo vláken. Jedná se především o lubrikační vlastnosti, snížení viskozity taveniny a zvýšení pružnosti vyextrudovaných filament.

Změkčovadla mohou být při vyšších koncentracích faktory stabilizující lékové formy, které ochraňují účinnou látku před nežádoucími vlivy prostředí GIT a mohou kontrolovat cyklus léčiva v organismu. Těchto vlastností se využívá u lékových forem s prodlouženým uvolňováním. U těchto lékových forem se buď změkčovadlo přidává do matrice k základnímu (nosnému) polymeru (řízení matricové) nebo změkčovadlo vytváří souvislou membránu pokrývající tabletu s okamžitým uvolňováním léčiva (řízení membránové). (35)

1.4.3.1 Polyethylenglykol (PEG)

PEG je hydrofilní polymer, který ve farmaceutické technologii plní funkci změkčovadla nebo substance zvyšující rozpustnost špatně rozpustných léčiv. Obecně u PEG platí, že s jeho vysokou molekulovou hmotností se snižuje jeho tendence na vstřebávání v gastrointestinálním traktu. Obecný mechanismus uvolnění účinné látky z matrice PEG je difúze, eroze lékové formy nebo kombinace obou mechanismů vyvolaná tepelnou, chemickou nebo enzymatickou stimulací. Podstatnou funkcí PEG je zesíťování ostatních polymerů, které se tak stávají nosiči účinné látky. Čím je vyšší stupeň zesíťování polymerů spojený se silnými sterickými omezeními, tím pomalejší je uvolnění léčiva z matrice.

K přípravě 3D tištěných tablet složených z určitých typů PEG se využívá extruze, FDM a DLP 3D tisk. Vytvořené čisté PEG lékové formy se využívají pro lékové systémy s okamžitým uvolňováním. Mezi využívané typy PEG lišící se molekulovou hmotností patří PEG 6000 s nízkou molekulovou hmotností a nižší viskozitou, čímž se značně rychleji uvolňuje účinná látka z 3D lékové formy připravené metodou FDM 3D tisku. Speciálním případem je použití PEG 4000, kdy 3D léková forma je připravena tepelnou extruzí při nízké teplotě 3D tisku v rozmezí 54–57 °C. Této lékové formy se využívá při aplikaci léčiva puerazin. Jedná se o přírodní izoflavonoid se špatnou rozpustností a nízkou biologickou dostupností používaný k léčbě kardiovaskulárních onemocnění. (20)

Příprava lékových forem metodou DLP 3D tisku se sebou nese některé výhody jako jsou zkrácená doba přípravy, nízké teploty tisku a možnost práce s termolabilními účinnými látkami. Výzvou této metody je fotopolymerace fotoreaktivních modifikovaných polymerů PEGDA a PEGDMA, které umožňují zvýšení rozpustnosti theofylinu a zrychlení jeho uvolnění z formy. (20)

1.4.3.2 Polyethylenoxid (PEO)

Jedná se o neiontový hydrofilní polymer vznikající polymerací ethylenoxidu. PEO ve farmaceutické technologii představuje potahovací látku lékových forem, dále může být pojivem nebo zahušťovadlem v lékových systémech. Obecně u PEO platí, že se vzrůstající molekulovou hmotností dochází ke zvýšení viskozity systému, což vede ke zpožděnému uvolňování léčiva z lékové formy.

PEO je termoplastický polymer o molekulové hmotnosti v rozmezí 100 kDa až 7 MDa. Má silné hydrofilní vlastnosti, které způsobují hydrataci matrice. Tento jev vede k vytvoření gelové vrstvy na povrchu matrice, což usnadňuje uvolnění (difúzi) léčiva z lékové formy.

K přípravě lékových forem můžeme využít FDM metodu 3D tisku, která pracuje převážně s polymery PEO o nižší molekulové hmotnosti (200 kDa). Tyto lékové formy se používají například pro účinnější a rychlejší uvolnění ibalginu nebo isoniazidu z lékové formy. Specifickou modifikací je příprava lékových forem v uspořádání gyroidní mřížky metodou SLS 3D tisku s využitím 1 MDa PEO. Této modifikace se využívá pro úplné a rychlé uvolnění paracetamolu z lékové formy (do 10 minut). (20)

1.4.3.3 Kollicoat SR

Kollicoat SR je polymerní látka složená z polyvinylacetátu, povidonu a laurylsulfátu sodného. V lékových systémech zastává funkci změkčovadla, které určuje jedinečné mechanické a chemické vlastnosti lékových forem. Mezi hlavní vlastnosti patří vysoká pružnost, která umožňuje na formách vytvořit potahy, které odolají zvýšeným tlakům bez roztržení. Dále se léčivo uvolňuje z lékové formy nezávisle na hodnotě pH. Kollicoat SR má nízkou viskozitu, nízkou teplotu skelného přechodu, nízkou minimální teplotu tvorby filmu (18 °C) a je mísitelný s vodou. Využití Kollicoatu SR je příprava pH nezávislých lékových forem s prodlouženým uvolňováním s aplikací do kolonu ve formě matrice nebo potahu. (20) (36)

1.4.3.4 Kollidony

Kollidony jsou používaným obchodním názvem pro syntetické polymery na bázi polyvinylpyrrolidonu, které představují podstatnou skupinu pomocných látek (excipientů) ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu.

Kollidony můžeme dělit do tříd na rozpustné (povidony), nerozpustné (CL), kopovidony a třídy SR. Povidony jsou rozpustné Kollidony, které se často využívají v systémech léčiv s prodlouženým uvolňováním. Nerozpustné Kollidony[®] CL vznikají procesem fyzikálního zesíťování za vzniku „popcornových“ polymerů složených z jednotek vinylpyrrolidonů. Kopovidony jsou ve vodě rozpustné kopolymery vinylpyrrolidonu a vinylacetátu využívané jako pojivo v tabletách, granulích a v procesu potahování lékových forem. Kollidon[®] SR je směs polyvinylacetátu a povidonu, která se při poměru 8:2 využívá v systémech s prodlouženým uvolňováním léčiva. (37)

1.4.3.4.1 Rozpustné Kollidony (povidony)

Rozpustné Kollidony se získávají procesem radikálové polymerace vinylpyrrolidonu v prostředí vody nebo 2–propanolu. Povidony dělíme do tzv. řady povidonů, která se skládá z podtříd Kollidonu[®] 12 PF, 17 PF, 25, 30 a 90 F. Jednotlivé podtřídy se liší hodnotou „K-value“, která představuje vyjádření průměrné molekulové hmotnosti pro lékopisy platné v EU, USA a Japonsku (37). Označení PF za „K-hodnotou“ v názvu představuje zkratku „pyrogen free“ – bez bakteriálních endotoxinů. Kollidony jsou bílé nebo žlutobílé prášky s různou velikostí částic (s vyšší molekulovou hmotností roste procentuální zastoupení částic s větším průměrem ve směsi). U Kollidonu[®] 25 a 30 je patrný čpavkový zápach. Čpavek se při výrobě Kollidonu[®] 25 a 30 využívá jako neutralizační činidlo. Jak již bylo naznačeno, tak při přípravě Kollidonů se využívají voda a 2–propanol jako prostředí polymerace. Se snižujícím se číslem třídy polymeru (klesající molekulovou hmotností) se využívá k polymeraci více 2–propanol, který s sebou nese vyšší riziko vzniku nečistot – radikálových aduktů 2–propanol–vinylpyrrolidonu.

K-value vyjadřuje průměrnou molekulovou hmotnost, která je vždy obsažena v názvu podtříd rozpustných Kollidonů. Závislost mezi průměrnou molekulovou hmotností a K-value je lineární (přímo úměrná). K-value závisí u každé podtřídy na její relativní viskozitě ve vodě (z).

Povidony disponují širokým výčtem fyzikálně-chemických vlastností, které lze využít pro přípravu všech druhů lékových forem. Jak již napovídá název, tak rozpustné Kollidony jsou univerzálně rozpustné ve všech běžně využívaných rozpouštědlech ve farmaceutickém průmyslu tzv. od extrémně hydrofilních (voda) až po extrémně hydrofobní (butanol). Této vlastnosti se využívá při přípravě sirupů, injekčních a perorálních roztoků, při výrobě tablet a potahů na tablety. (37)

Nejdůležitější vlastností pro výrobu tablet, tobolek a dalších pevných lékových forem je adhezivní a vazebná síla povidonů. Primárně je stabilizátorem a pojivem v materiálech pro výrobu pevných lékových forem. Dále se využívá pro zajištění vyšší celistvosti potahů lékových forem, pro snazší lisování tablet (tabletování) a přípravu adhezivních gelů.

Povidony poskytují soubor vlastností, které jsou závislé pouze na průměrné molekulové hmotnosti dostupné podtřídy rozpustného Kollidonu. Se zvyšující se průměrnou molekulovou hmotností Kollidonu (se zvyšující se „K-value“) se zvyšuje adhezivní síla, viskozita a schopnost

tvořit ve vodě rozpustné komplexy jednotlivé podtřídy. Naopak se zpomaluje rychlost rozpouštění v rozpouštědlech.

Rozpustné Kollidony mají filmotvorné vlastnosti, které brzdí uvolnění účinné látky z lékové formy. Využívají se tedy pro potahy pevných lékových forem, ale i pro přípravu oftalmologických sprejů, které využívají zvlhčovacích a lubrikačních schopností Kollidonů.

Mezi další vlastnosti patří zahušťovací vlastnosti, které se využívají především pro přípravu perorálních nebo lokálních tekutých lékových forem (sirupy, suspenze). Další vlastností je afinita k hydrofilním a hydrofobním povrchům, která se využívá k ochraně účinné látky v jádru tablety. Další vlastností je tvorba ve vodě rozpustných komplexů, která se využívá pro zvýšení biologické dostupnosti léčiva, snížení lokální toxicity léků a stabilizaci enzymů/proteinů. Stabilní komplexy se tvoří pouze v kyselém prostředí (médiu), čehož se využívá u aplikace léčiv do distálních částí GIT. (37)

Využití pro 3D tisk a extruzi vláken jsou založeny na snížení teploty skelného přechodu, viskozity a tím lepší tisknutelnosti než u směsí bez přídavku Kollidonu (38). Teplota skelného přechodu (T_g) se u Kollidonů pohybuje v rozmezí 90–189 °C v závislosti na molekulové hmotnosti a obsahu vlhkosti přítomného Kollidonu. Z takto vyrobených filament je vyrobena pevná léková forma, ve které Kollidon zastává funkci pojiva a tím prodlužuje dobu uvolnění léčiva z lékové formy. Pro tyto zmíněné účely se využívá především Kollidon® 25 a 30, které poskytují zmíněné vlastnosti při koncentraci mezi 2–5 %. Kollidon® 90F je silnějším pojivem využívaný k výrobě tvrdších tablet, a proto se koncentrace ve směsi snižuje na poloviční hodnotu oproti Kollidonu® 25 a 30 (okolo 1–3 %). Kollidony® 25 a 30 poskytují svými fyzikálními vlastnostmi vysokou stabilitu a pružnost materiálu, zamezují vzniku prasklin a zlepšují homogenní rozložení dispergovaných částic ve směsích, filamentech a lékových formách. (37)

1.4.3.4.2 Nerozpustné Kollidony (třídy CL)

Nerozpustné Kollidony známé pod farmaceutickým názvem „krospovidony“ vznikají polymerací monomerních jednotek polyvinylpyrrolidonu v prostředí bez organických rozpouštědel. V jejich struktuře dochází k fyzikálnímu zesíťování polyvinylpyrrolidonu do formy „popcornového“ nerozpustného polymeru. Popcornová (pórovitá) struktura zvyšuje bobtnavost a hydratační schopnosti polymeru. K fyzikálnímu zesíťování dochází reakcí

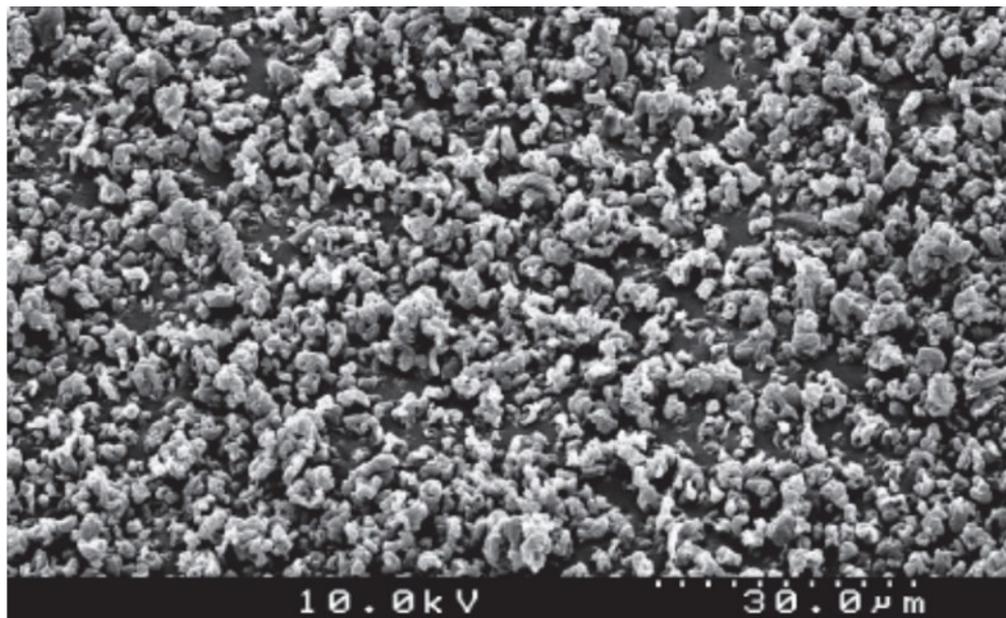
polyvinylpyrrolidonu s alkalickým hydroxidem za vzniku bifunkčního monomeru, který iniciuje zesíťování polymeru.

Krospovidony jsou bílé prášky s různými velikostmi částic, porézní strukturou a jsou nerozpustné ve všech farmaceutických rozpouštědlech. Rozdílná velikost částic ovlivňuje tokové a bobtnací vlastnosti polymeru, které se využívají pro přípravu pevných lékových forem. Čím menší průměr částic, tím nastávají menší změny na povrchu lékové formy.

Krospovidony se dělí na dva základní typy – A, B. Dělení probíhá na základě rozdílné velikosti částic obsažených v jednotlivých typech Kollidon[®] CL. Typ A zahrnuje Kollidon[®] CL (standard), jehož částice jsou hrubé v průměru 90–130 μm . Typ B představuje skupinu s jemnými částicemi, do které patří Kollidon[®] CL-F (částice 20–40 μm), Kollidon[®] CL-FS (10–30 μm) a Kollidon[®] CL-M (3–10 μm). Jednotlivé typy Kollidonů CL se liší fyzikálními vlastnostmi, velikostí částic, strukturou částic, hustotou a bobtnavostí, což ovlivňuje polymerační modifikace při jejich výrobě. Jemnost částic Kollidonu[®] CL-M je dosažena procesem mikronizace (mletí) a u ostatních typů Kollidonů CL nedochází k postsyntetické úpravě. (37)

Krospovidony se využívají ve farmacii jako pomocné látky mnoha funkcí. Mají majoritní funkci jako dezintegrant v pevných lékových formách s okamžitým uvolňováním a zvyšují biologickou dostupnost účinné látky procesem bobtnání. Vytvářejí komplexy s nerozpustnými účinnými látkami, čímž zvyšují jejich rozpustnost a biologickou dostupnost. Dalším využitím je ochrana vitamínů, antibiotik a antacid proti nežádoucí hydrolyze adsorpcí vody (vysoušecí funkce). Kollidon[®] CL-M se může využívat jako účinná látka proti průjmovým onemocněním (komplexotvorná schopnost).

Využití Kollidonů CL se pro pevné lékové formy s prodlouženým uvolňováním nedoporučuje. Jak již bylo zmíněno, působí v lékových formách jako dezintegrant, který způsobuje zrychlený rozpad materiálu lékové formy. Ve směsi pro extruzi filament a následný 3D tisk se využívá u tablet s rychlým profilem rozpadu (bukální tablety, tablety pro aplikaci do proximálního GIT). (37)



Obrázek 8: Popcornová struktura Kollidonu CL sledovaná pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) (37)

1.4.3.4.3 Kopovidony (Kollidon® VA 64)

Kollidon® VA 64 vzniká volnou radikálovou polymerací šesti dílů N-vinylpyrrolidonu a čtyř dílů vinylacetátu v prostředí 2-propanolu. Číslo 64 představuje hmotnostní poměr N-vinylpyrrolidonu a vinylacetátu bez souvislosti s „K-hodnotou“ povidonů. Nicméně K-value i zde je měřítkem molekulové hmotnosti a její průměrná hodnota se pohybuje okolo 28. Farmaceutické označení Kollidonů® VA 64 jsou „kopovidony“ nebo „kopolyvidony“.

Kopovidony jsou bílé až žlutobílé jemné prášky s relativně malou velikostí částic a typickým zápachem. Průměrná velikost částic měřené laserovou difrakcí dělí Kollidony® VA 64 na dva typy. Kollidon® VA 64 (standard) s průměrnou velikostí částic mezi 50–65 µm a Kollidon® VA 64 Fine s menší průměrnou velikostí částic 10–20 µm.

Často jsou srovnávány vlastnosti povidonů a kopovidonů, a to především kvůli podobné „K-hodnotě“ a téměř stejné univerzální rozpustnosti. Nejběžněji srovnávaným představitelem povidonů s kopovidony je v závislosti na „K-hodnotě“ Kollidon® 30. Obě látky se používají pro přípravu pevných lékových forem. Výhody Kollidonu® VA 64 oproti Kollidonu® 30 v pevných

lékových formách jsou nižší hygroskopičnost, zvýšená vazebná schopnost, lepší pružnost a plasticita (změkčení).

Využití Kollidonu[®] VA 64 je založeno na dobrých vazebných a filmtvorných vlastnostech. Díky dobrým vazebným vlastnostem zastává v pevných lékových formách funkci pojiva (granula, tablety). Pokud je filmtvorným činidlem, tak je využíván při výrobě potahovaných tablet nebo ochranné vrstvy jádra tablety. (37)

Teplota skelného přechodu pro Kollidon[®] VA 64 je 103 °C a je tedy nižší než u Kollidonu[®] 30. Využití kopovidonů při „hot melt“ extruzi zlepšuje vytlačování tuhého filamentu, zvyšuje jeho pružnost a snižuje teplotu extruze. Praktické využití je v extruzní směsi s účinnou látkou o špatné rozpustnosti, kdy kombinace této látky s kopovidonem zlepšuje její rozpustnost (platí např. pro indometacin, estradiolové tablety). Amorfni (vyextrudované) kopovidony nejsou pH-dependentní. Zmíněné vlastnosti pro extruzi se dají aplikovat na metodu FDM 3D tisku. FDM 3D tisk lékových forem probíhá v teplotním rozmezí 150–250 °C (39).

Mezi další výhodné vlastnosti kopovidonů patří zvýšená komplexotvornost se špatně biologicky dostupnými účinnými látkami, u kterých zvyšují rychlost rozpouštění (např. diklofenak, karbamazepin a kys. nikotinová). Této vlastnosti se využívá u lékových forem s okamžitým uvolňováním. (37)

Kopovidony se v kombinaci s „hot melt“ extruzí hojně využívají v lékových formách s řízeným nebo prodlouženým uvolňováním. Principem u lékových forem s prodlouženým uvolňováním je, že roztavením kopovidonu klesá jeho rozpustnost. Stává se tak ochranným materiálem, který zapouzdří účinnou látku, a tím oddaluje její uvolnění. Jejich pórtvorné a hydrofilní vlastnosti upravují uvolnění účinné látky z lékových forem s kontrolovaným uvolňováním. Avšak těchto vlastností lze dosáhnout pouze v kombinaci Kollidonu[®] VA 64 s běžnými pH závislými polymery. Například s deriváty celulózy (ethylcelulóza) nebo PVA, kdy se takto složená léková forma tiskne metodou 3D tisku pro kontrolovanou aplikaci např. antihypertenziv pro konkrétní pacienty (40).

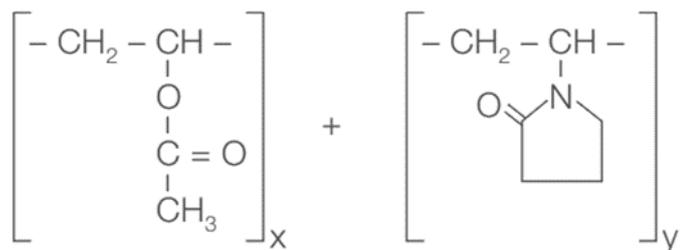
1.4.3.4.4 Kollidon® SR

Kollidon® SR se skládá ze směsi polyvinylacetátu (80 %), rozpustného sprejově sušeného povidonu (19 %, Kollidon® 30) a stabilizačních složek. Tyto složky tvoří laurylsíran sodný (0,6 %) a oxid křemičitý (0,4 %), které kromě stabilizátorů zastávají funkci činidel zlepšující tekutost Kollidonu® SR. K výrobě Kollidonu® SR je použit především Kollicoat SR 30D a Kollidon® 30.

Jedná se o bílý nebo nažloutlý sypký prášek, který je nerozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v N-methylpyrrolidonu. Tento jev je způsoben tím, že polyvinylacetát je ve vodě nerozpustný, ale povidon je rozpustný. „K-hodnota“ se pohybuje v rozmezí 60–65. Průměrná velikost sférických částic Kollidonu® SR je 80–100 µm způsobující výborné tokové vlastnosti, které zlepšují tekutost ostatních složek. (37)

Kollidon® SR je hojně využíván v metodě „hot melt“ extruze. Díky své nízké teplotě skelného přechodu (35 °C) zlepšuje extruzní vlastnosti směsí (41). Využívaný je především v tabletách jako plastifikátor nebo jako matrice společně s pH-senzitivním polymerem pro některé účinné látky (např. theofylin) u lékových forem s prodlouženým uvolňováním (42). Takto vyrobené lékové formy fungují na principu odlišného procentuálního zastoupení Kollidonu® SR v lékové formě. Čím více je matrice tvořena Kollidonem® SR, tím více bude prodlouženo uvolňování účinné látky. Čehož se využívá u účinných látek s jemnými částicemi, které jsou dobře rozpustné. U dobře rozpustných látek se přidává do tablet s prodlouženým uvolňováním až 40–55 % Kollidonu® SR, který modifikuje rozpustnost účinné látky. Tyto lékové formy s prodlouženým uvolňováním jsou vhodné pro aplikaci léčiva nebo mikroorganismů do oblasti tlustého střeva.

Ovlivnění uvolňování účinných látek z lékových forem s prodlouženým uvolňováním založených na Kollidonu® SR nezávisí na pH, iontové síle média a tvrdosti lékové formy. Naopak modifikace prodlouženého uvolňování může nastat při špatném skladování lékových forem s vysokým obsahem Kollidonu® SR. Modifikace způsobuje vysoká teplota a vlhkost ovzduší, proto se tyto lékové formy skladují při teplotě 20–25 °C a ve vzduchotěsných obalech. (37)



Obrázek 9: Strukturní vzorec Kollidonu[®] SR (X – polyvinylacetát; Y – povidon) (37)

1.5 Metody využívané při experimentální části

1.5.1 Hot melt extruze (HME)

Hot melt extruze (HME), ve volném překladu vytlačování taveniny za tepla, se poprvé uplatnila v polovině 19.století při výrobě plastů. V současné době se tato metoda rozšířila do desítek odvětví včetně farmaceutické technologie.

Fyzikální směs polymerů, pomocných látek nebo léčiv je převedena do extrudéru. Teplota uvnitř extrudéru je vyšší než teplota skelného přechodu (T_g) nosného polymeru nebo je dokonce vyšší než jeho teplota tání (T_m). V těle extrudéru dochází k tavení, mletí, hnětení, odvzdušňování a promíchání materiálu na molekulární úrovni. Materiál je následně vytlačen ve formě tuhého extrudátu o vysoké kvalitě s vynikajícím obsahovým rozmístěním jednotlivých složek. (43)

Vytlačovací zařízení tzv. extrudér se skládá ze samotného extrudéru, ve kterém se především materiál taví a míchá, dále z pomocných zařízení a kontrolních nástrojů. Pomocná zařízení jsou obecně určena pro zlepšení zpracování materiálu a následnou úpravu po jeho vytlačení. Patří mezi ně ohřívací nebo chladicí systém, čerpadlo pro rozpouštědlo s chladicí tekutinou a řezací nebo tvarovací zařízení. Kontrolní nástroje hodnotí kvalitu extrudátu (produktu). Mezi tato zařízení můžeme zařadit čidla pro kontrolu teploty extruze, indikátor tlaku nebo regulátor otáček šneku. Hodnocené parametry průběhu extruze jsou teplota a tlak v extrudéru, rychlost posunu taveniny, rychlost otáček šneku a zatížení motoru, které je ovlivněno rychlostí podávání směsi do násypky (nejlépe pro hladký průběh konstantní rychlostí). (43)

Postup HME se skládá z několika kroků: 1) zavedení fyzikální směsi do vstupní násypky; 2) posun materiálu do směřovacího prostoru s jedno– nebo dvoušnekovou hřídelí (zde dochází k míchání, tavení a hnětení materiálu); 3) vytlačování materiálu přes matrici v požadované formě; 4) zpracování vytlačeného extrudátu (43).

Obecně můžeme rozdělit extrudéry na radiální síta, válcové nebo šnekové a beranidla. Pro aplikaci ve farmaceutické technologii se využívají převážně šnekové extrudéry. Ty můžeme dělit podle počtu šneků v extrudéru na jednošnekové (SSE), dvoušneková (DSE) a vícešnekové (MSE). Jednošnekový extrudér je využíván především kvůli své jednoduché konstrukci a nízkým nákladům, naopak negativem SSE je omezená míchací schopnost, kterou mají DSE a MSE podstatně účinnější. Mezi důležité vlastnosti jednošnekového extrudéru patří krátká doba setrvání materiálu v extrudéru, vysoká kontrola teploty taveniny, snížená tendence k přehřívání a samočisticí schopnost. Dvoušnekové a vícešnekové (nejčastěji čtyři šneky) extrudéry redukuje nedostatek SSE v podobě vysoce kvalitní míchací schopnosti. Šneky jsou vyrobeny z nerezové oceli s povrchovou ochranou, která snižuje tření a nežádoucí chemické interakce. Podle směru otáčení šnekových hřídelí dělíme šrouby otáčející šneky na šrouby s prolínáním (ve směru otáčení více šneků) a neprolínající se, kdy šnekové hřídele jsou otáčeny v protisměru. Míchání taveniny prostřednictvím šneků dělíme na distributivní a disperzní. Distributivní míchání zajišťuje vysokou obsahovou stejnoměrnost produktu, ale nedochází u něj ke změnám velikosti částice materiálu. Podstatou disperzního míchání je především zmenšení velikosti částic materiálu. (43) (44)

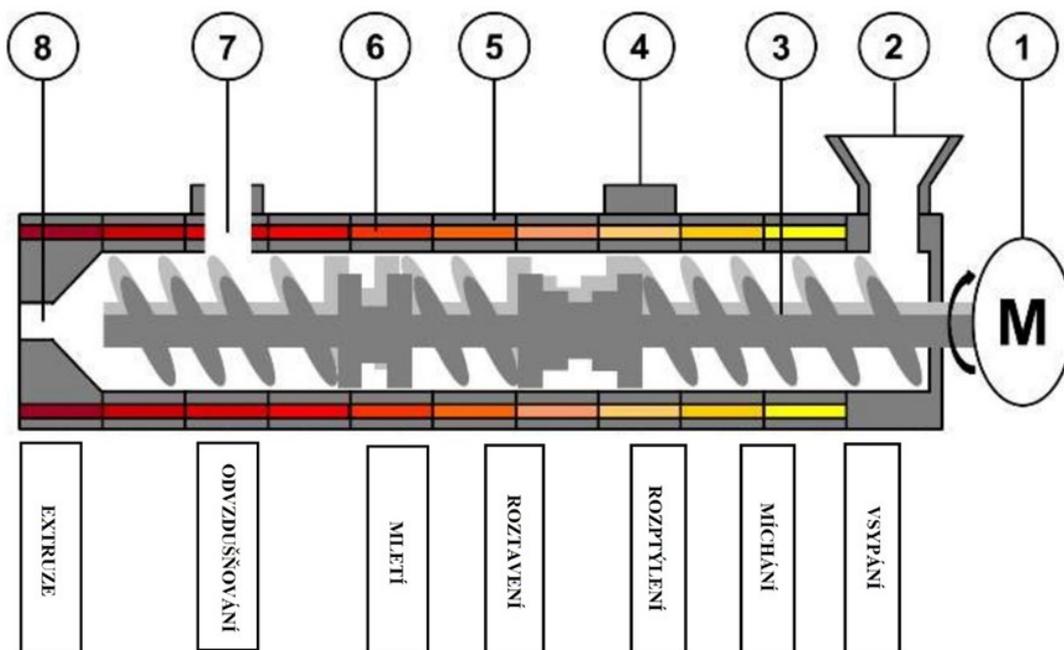
S vytlačovacími zařízeními jsou často spojené metody vhodné pro praktickou aplikaci. Dochází tak k propojení extrudéru s např. 3D tiskárnou, vysokotlakým homogenizátorem, peletizérem nebo Ramanovou infračervenou spektrometrií, kterou je možné sledovat kvalitu extrudátu v reálném čase (43).

Farmaceutické materiály využívané k HME se za ideálních podmínek uvnitř extrudéru deformují a po vytlačení dochází k jejich tuhnutí. Sledovaným parametrem u těchto materiálů je doba setrvání materiálu v extrudéru, která se pohybuje mezi 10 sekundami až 10 minutami. Delší doba setrvání taveniny v HME vede k vyššímu riziku degradace materiálu. Látky aplikující se do násypky jsou směsí nosiče, pomocných látek a dle využití i léčiva. Nosič je polymerní nebo nepolymerní látkou, která společně s aditivou vytváří nosný systém pro zabudování léčiva

do jejich struktury. Mezi nepolymerní nosiče patří vosky a lipidy, u kterých se testuje kompatibilita s API (např. karnaubský vosk, glycerylmonostearát). Pomocné látky ulehčují vytlačování taveniny, zlepšují homogenizaci materiálu a funkčně mezi ně patří pojiva, mazadla a aditiva. Do násypky jsou aplikovány léčivé látky v krystalické formě, které se vlivem tepelného procesu stávají amorfními produkty. Jedná se o proces, při kterém se zvyšuje rozpustnost špatně rozpustné API ve vodě. Bezproblémový průběh extruze závisí na volbě vhodného nosiče, teplotě skelného přechodu, viskozitě taveniny, tepelné stabilitě a biologické rozložitelnosti polymeru. Teplota extruze je o 20–30 °C vyšší než teplota skelného přechodu (T_g) nosného materiálu, kvůli plynulému toku taveniny. Teplota extruze však nesmí přesáhnout teplotu rozkladu nosného materiálu. Mezi nejpoužívanější pomocné látky patří plastifikátory snižující teplotu zpracování materiálu, modifikující fyzikální vlastnosti taveniny, změkčující polymery a snižující viskozitu taveniny. Faktory pro vhodnou aplikaci API do extruzní fyzikální směsi jsou tepelná stabilita, mísitelnost s nosnými materiály a rozpustnost v organických rozpouštědlech. Mezi zástupce jednotlivých komponent můžeme řadit např. HPMC, HPC, ethylcelulózu a Eudragity[®] jako nosné polymery. Využívanými plastifikátory jsou estery mastných kyselin, PEO, PEG, Kollidony a např. i některá léčiva jako ibuprofen a hydrokortizon. Procesem HME lze zpracovat i termosenzitivní nebo tepelně nestabilní látky např. léčiva, AMK nebo proteiny. (43) (44)

Úspěchy HME ve farmaceutické technologii jsou založeny na jednotném procesu, nízkých nákladech, vysoké reprodukovatelnosti, kontinuální výrobě produktu v porovnání s konvenčními technikami, možnosti automatizace a průmyslové proveditelnosti. Nevýhody HME jsou zapříčiněny potřebou vysokých teplot při zpracování, vysokého příkonu a spotřeby energie a nedostupnosti potřebných pomocných látek. (43)

Ve farmaceutické technologii je extruze využívána především pro výrobu 3D tištěných lékových forem vhodných pro špatně rozpustná léčiva, s nízkou biologickou dostupností, se silnými terapeutickými účinky, při maskování chuti nebo s odpuzujícími účinky jako je např. nepříjemný zápach z úst. HME se aplikuje dále v nanotechnologiích, chronoterapii nebo při výrobě veterinárních lékových forem pro personalizovanou léčbu zvířat. (43)



Obrázek 10: Schématické znázornění dvoušnekového extrudéru: (1) motor; (2) násypka; (3) šneky; (4) port; (5) tělo extrudéru; (6) topná tělesa; (7) odvzdušňovací otvor; (8) extruzní forma. Převzato a upraveno: (44)

1.5.2 Metoda FDM 3D tisku

Počátkem 90. let minulého století se začala rozvíjet nová inovativní technologie tzv. 3D tisku. Od původního záměru vyrábět rychle a levně prototypové modely, se 3D tisk posunul do řady průmyslových oblastí a mj. také do moderních metod ve farmaceutické technologii. Uplatnění 3 DP ve farmaceutické technologii je ve výrobě lékových forem v personalizované terapii, v modifikaci profilů uvolňování léčiv pomocí tisku speciálních lékových forem a v aplikaci více léčiv v jedné speciální lékové formě. (45)

Nejvyžívanější technikou 3 DP ve farmacii je metoda FDM (fused deposition modeling) neboli FFF (fused filament fabrication). Obě zkratky jsou si navzájem synonymy. FDM 3 DP se využívá především díky své jednoduché a málo nákladné konstrukci, přesnosti vytváření složitých tvarů, snadné výrobě lékových forem a rozmanitému výběru pomocných látek. Nevýhodou je využívání vysoké teploty tisku u filament s API, kdy může docházet k nežádoucí

degradaci léčiva (po dvojnásobné extruzi – HME, FDM 3 DP). Například u kyseliny 4-aminosalicylové došlo k degradaci 50 % léčiva po FDM tisku. (45)

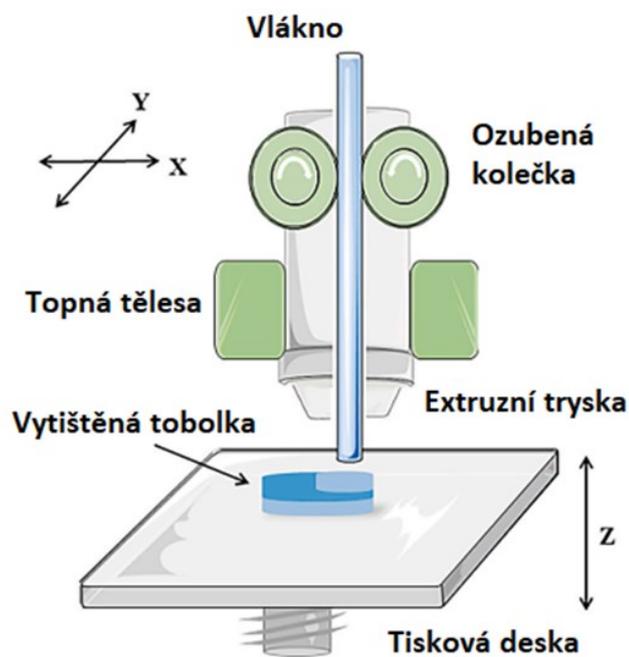
Základní stavební komponenty FDM 3D tiskárny jsou extrudér (tisková hlava), tisková deska, rám, krokové motory a řídicí jednotka. Hlavní funkcí tiskové hlavy je nanášení jednotlivých vrstev vlákna na tiskovou desku. Do tiskové hlavy se aplikuje tuhý filament (např. vyextrudovaný pomocí HME), který prochází teflonovou trubičkou do extrudéru. Teflonová trubička tuhý filament provází částmi tiskové hlavy jako jsou heat sink, heat break a heater block. Heat sink (chladič) odvádí přebytečné teplo z oblasti heat break, čímž zmenšuje přechodovou oblast mezi tuhým a roztaveným filamentem. Pro zvýšení účinnosti dané části se zavádí k chladiči ventilátor. Heat break je nejužší částí trubičky, kde dochází k roztavení filamentu. Heater block je složený z materiálu dobře vedoucího teplo (např. hliník). V heater blocku jsou uložena topná tělesa určující teplotu extruze a termistor, který zaznamenává aktuální teplotu a poskytuje informaci o ní řídicí jednotce. Poslední složkou tiskové hlavy je extruzní tryska, kterou je roztavené vlákno vytlačeno na tiskovou desku. Tryska o různém průměru ovlivňuje dobu a kvalitu tisku. (46)

Tisková deska s vyhříváním přispívá k lepší adhezi tištěného objektu a zabraňuje deformaci objektů z materiálů o větší teplotní roztažnosti. Rám zvyšuje kvalitu tisku svojí vysokou pevností, která zabraňuje nežádoucím vibracím při tisku. Krokové motory řídí mechanické pohyby tiskové hlavy a desky v prostoru (dle kartézských souřadnic). Řídicí jednotka zabezpečuje veškeré základní funkce tiskárny. Analyzuje a zpracovává tzv. G-code, který tiskárně poskytuje informace o pohybu krokových motorů a nahřívání trysky a desky. (46)

Principem FDM 3 DP je extruzní depozice termoplastických materiálů. Proces probíhá v několika krocích. V prvním kroku se termoplastické vlákno zavádí do tiskové hlavy. Tuhé vlákno se pomocí ozubených koleček tiskové hlavy posouvá do oblasti okolo topných těles, kde se roztaví. Roztavené vlákno je extruzní tryskou vytlačeno a nanášeno pohybující se tiskovou hlavou na tiskovou desku po vrstvách do formy výsledného objektu. V momentě nanesení vrstvy vlákna do své cílové pozice dochází k tuhnutí dané vrstvy a po ochlazení vytištěného výsledného objektu dochází k jeho stabilizaci. (38)

Materiály využívané pro 3 DP se pohybují v oblasti extruzní teploty od 150 °C do 230 °C. Nejpoužívanějšími jsou HPC, Eudragity, PVA a PLA, přičemž PLA a PVA nejsou

vhodné pro farmaceutickou aplikaci. U těchto známých polymerů lze očekávat dobré tiskové a vytlačovací vlastnosti. Speciálními polymerními vlákny jsou připravené filamenty s API pomocí HME, někdy nazývané jako ASD (amorfní pevná disperze) vlákna. U těchto filamentů je problémová již zmíněná vysoká teplota, která má vliv na účinnost léčiva. (38)



Obrázek 11: Schématické znázornění průběhu FDM 3D tisku. Převzato a upraveno: (38)

1.5.3 Disoluční zkouška

Disoluční zkouškou se stanovuje množství uvolněné látky z pevné lékové formy (tablety, tobolky, čípky) v předepsaných časových intervalech a v předepsaných kapalných disolučních médiích. Jedná se o lékopisnou metodu testování pevných lékových forem. Přístroje, tzv. disoluční aparatury, můžeme rozdělit do čtyř typů, a to na přístroj s míchadly nebo košíčky, přístroj s průtokovou celou nebo s vratným válcem. (47)

Podmínky k provedení disoluční zkoušky se určují individuálně pro každou lékovou formu s API a jsou uvedeny v Českém lékopise (47). Nejdůležitějším faktorem je výběr vhodného typu přístroje. Dále se nastavuje vhodné složení, objem a teplota disolučních médií, počet otáček nebo průtoková rychlost média celou. Pro stanovení obsahu účinné látky z lékové formy se definuje čas, způsob a množství odebraného kapalného vzorku z aparatury. Nedílnou

součástí disoluční zkoušky je vhodná metoda stanovení obsahu uvolněné API (např. UV–VIS spektrofotometrie). (47)

Části disoluční aparatury jsou obecně vyrobeny z inertních materiálů, které neadsorbují, nereagují a neinterferují s měřeným vzorkem. Kovové součásti jsou vyrobeny z nerezové oceli, která je ošetřena inertním materiálem. Disoluční aparatura s míchadly se skládá z válcovité nádoby z borosilikátového skla, které je inertní a průhledné o objemu 1000 ml. Další součástí je víko nad skleněnou nádobou se třemi otvory zamezující vypařování disolučního média. Otvory víka jsou určeny pro hnací hřídel, teploměr a odběr/přidávání média. Míchadlo je složeno z hnací hřídele a dvou lopatek umístěných na spodním konci míchadla (25 mm ode dna nádoby). Hnací hřídel je poháněna motorovou jednotkou, která reguluje rychlost otáček hřídele. Skleněné nádoby jsou uloženy ve vodní lázni, která udržuje stálou teplotu disolučních médií o teplotě 37 °C. Přístroj s košíčky má obdobnou konstrukci, pouze hnací hřídel je zakončena místo míchadel válcovitým košíčkem, do kterého se vkládá testovaná léková forma. Přístroj s průtokovou celou je sestaven ze zásobní nádoby na disoluční média, pumpy vytlačující média přes průtokovou celu a ze samotné průtokové cely s filtračním zařízením, které zabraňuje průchodu nerozpuštěných částic do cely. Využitím modifikace s průtokovou celou je testování lipofilních lékových forem (čípky, měkké želatinové tobolky). (47)

Disoluční zkouška začíná odměřením médií o předepsaném objemu do nádoby. Následně se média vytemperují na 37 °C a vyjme se z disoluční aparatury teploměr. Následně se sestaví vhodný typ přístroje a aplikuje se léková forma do přístroje. Způsob aplikace závisí na typu přístroje. U přístroje s míchadly se měřená forma vloží na dno nádoby před začátkem testu. U přístroje s košíčky se léková forma vkládá do suchého košíčku, ten se upevní na hnací hřídel a následně je ponořen do nádoby s disolučními médii. Následně se nastaví otáčky hřídele a spustí se zkouška. V průběhu zkoušky je odebírán vzorek v předepsaných časových intervalech o předepsaném množství kapalného vzorku z nádoby. Odběr kapalného vzorku je proveden ve středu nádoby (min. 10 mm od stěny nádoby), mezi hladinou média a horní hranou lopatky míchadla/košíčku. Vzorek je následně zfiltrován a hodnocen. Výsledkem disoluční zkoušky je závislost množství uvolněné API na čase. (47)

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Cíle práce

Hlavním cílem bakalářské práce byla příprava silnostěnných tobolek složených z nosného polymeru Affinisolu™ a změkčovadel Kollidonu® 12 PF, Kollidonu® 17 PF a Kollidonu® 25 metodou FDM 3D tisku. Tobolky mají splňovat podmínky pro transport účinné látky do tlustého střeva. Měly by tak být odolné vůči kyselému pH žaludku a uvolnění účinné látky by mělo nastat mezi 6. až 48. hodinou po perorálním podání. Dalším cílem bakalářské práce bylo zjistit vliv různých typů Kollidonů® jako materiálu lékové formy na extruzi, 3D tisk a uvolnění účinné látky z tobolky. Klinickým využitím experimentu je vývoj nových lékových forem pro aplikaci vybraných rodů lyofilizovaných bakterií v rámci procesu fekální mikrobiální transplantace (FMT) do oblasti kolonu.

Bakalářská práce zahrnovala studie, které jsou na základě Českého lékopisu vhodné k potenciálnímu uvedení lékové formy na trh. Primární provedenou studií je stanovení disolučního profilu daných lékových forem, jehož výsledkem je zjištění stability a možností aplikace lékové formy. Mezi další studie patří rozměrová analýza tobolek, která slouží ke zjištění rozměrových odchylek samostatných tištěných kusů a vhodné reprodukovatelnosti tisku.

2.2 Použité chemikálie

2.2.1 Chemikálie na přípravu filament

- Affinisol™ HPMC HME 15 LV (The Dow Chemical Company, Michigan, USA)
- Kollidon® 12 PF (BASF, Ludwigshafen, Německo)
- Kollidon® 17 PF (BASF, Ludwigshafen, Německo)
- Kollidon® 25 (BASF, Ludwigshafen, Německo)

2.2.2 Chemikálie pro plnění tobolek

- kofein (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA / product of Germany)
- laktóza monohydrát (Dr. Kulich Pharma, s. r. o., Hradec Králové ČR)

2.2.3 Chemikálie pro přípravu disolučních médií

- chlorid sodný p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, ČR)
- kyselina chlorovodíková 35 % p. a. (PENTA s. r. o., Praha, ČR)
- dihydrogenfosforečnan draselný p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, ČR)
- hydroxid sodný p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, ČR)
- redestilovaná voda

2.3 Použité přístroje a pomůcky

- laboratorní váha Sartorius H 120–D (Sartalex s.r.o, Ústí nad Labem)
- extrudér Noztek Touch (Noztek, Shoreham, UK)
- Homogenizátor: V-mixér (Filtru Vibracion, Barcelona, Španělsko)
- FDM 3D tiskárna Original Prusa i3 MK3S+ (Prusa Research a.s., Praha, ČR)
- analytické váhy KERN ALT 310-4AM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Německo)

- homogenizátor Mixer Mill MM200 (Retsch GmbH, Haan, Německo) a homogenizační nádoba (komůrka mlecí 10 ml, nerez. ocel) pro MM200
- disoluční aparatura Sotax AT 7 Smart (Solution for Pharmaceutical Testing – Sotax AG, Allschwill, Švýcarsko) a košíčky pro aparaturu Sotax AT 7 smart
- UV-Vis spektrometr Aligent 8453 (Aligent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn, Německo) a kyveta z křemenného skla 5 mm
- běžně používané laboratorní sklo a pomůcky
- digitální posuvné měřítko 0–150 mm/0,01 mm (Extrol® Premium)

2.4 Použitý software

- Autodesk Fusion 360 – návrh 3D tobolek (Autodesk, Inc., San Rafael, USA)
- Prusa slicer – optimalizace podmínek 3DP, export g-kódu (Prusa Research a.s., Praha, ČR)
- GraphPad Prism – statistické vyhodnocení dat (GraphPad Software, San Diego, USA)



Obrázek 12: Disoluční aparatura SOTAX AT 7 Smart

2.5 Experimentální postupy

2.5.1 Příprava filament

Práškové polymery, které byly popsány v kapitole 2.2.1, byly naváženy na laboratorní váze Sartorius a následně smíchány dle formulací. Formulace F0 byla složena ze 100 % Affinisolu™. Formulace F1 – F3 byly složeny z 5 % různých typů Kollidonů® (dle formulace) a 95 % nosného polymeru, kterým byl Affinisol™. Odlišné typy rozpustných Kollidonů® byly vybrány v rostoucí řadě jejich „K-value“ – Kollidon® 12 PF, Kollidon® 17 PF, Kollidon® 25. Na jeden cyklus homogenizace a následné extruze bylo připraveno 20 gramů směsi na každou formulaci.

Tabulka 1: Zastoupení složek ve směsi pro konkrétní formulace F0 – F3 (v gramech na cyklus)

Formulace	Affinisol™ (g)	Kollidon® 12 PF (g)	Kollidon® 17 PF (g)	Kollidon® 25 (g)
F0	20	–	–	–
F1	19	1	–	–
F2	19	–	1	–
F3	19	–	–	1

Po smíchání jednotlivých komponent byly fyzikální směsi homogenizovány s využitím V-mixéru po dobu 5 minut při 20 otáčkách za minutu.



Obrázek 13: Využití práškové směsi polymerů (vlevo – Affinisol™; vpravo – Kollidon® 12 PF)



Obrázek 14: V–mixér (Filtra Vibracion, Barcelona, Španělsko)

2.5.2 Extruze filament

Homogenizované směsi byly vsypány do násypky extrudéru (Noztec Touch, UK). Testovaná oblast teplot extruze byla mezi 150–180 °C. Byly použity dva profily extruzních trysek – kuželová a válcová – o stejném průměru 1,75 mm. Optimalizovaná (na základě předchozích experimentů) finální teplota extruze pro všechny formulace byla 170 °C. Při vyšší teplotě docházelo k přepalování polymerních částic filamentu a vlákno mělo nahnědlou barvu. Při extruzi filamentu pomocí kuželového profilu extruzní trysky docházelo k častému kolísání průměru vlákna, které následně nebylo kompatibilní s 3D tiskem.

Optimalizaci extruze: teplota – 170 °C; extruzní tryska – válcová. Optimalizovaná vlákna byla bílo–žlutá, hladká, pružná a kompatibilní pro 3D tisk. Vlákna F1–F3 s přídavkem Kollidonů® byla více nažloutlá než formulace F0 složená z čistého Affinisolu™. Vizuální porovnání vyextrudovaných vláken je popsáno a prodiskutováno v kapitole 3.1.

Jednotlivé filamenty byly zabaleny do vzduchotěsných obalů a byly uloženy do prostor bez přímého slunečního svitu.

Tabulka 2: Rozměrové parametry vyextrudovaných filament při teplotě extruze 170 °C a využití válcového profilu extruzní trysky.

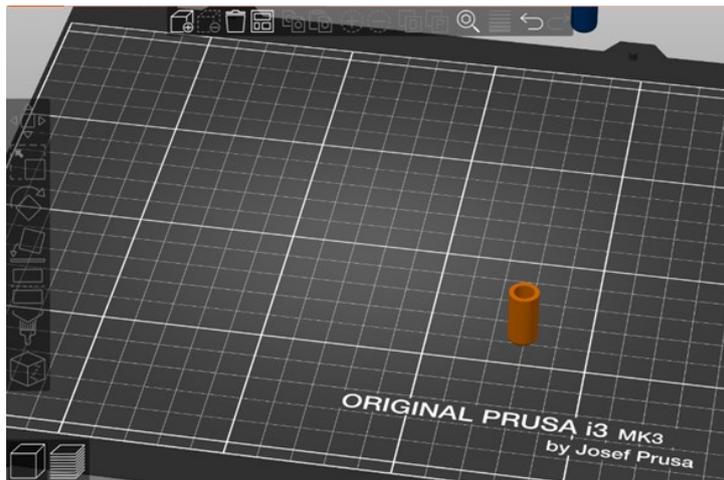
Formulace	Průměr vlákna (mm)
F0	1,66
F1	1,65
F2	1,59
F3	1,71



Obrázek 15: Extrudér Noztec Touch (UK)

2.5.3 Návrh tobolek pro 3D tisk

V programu Autodesk Fusion 360 byla navržena silnostěnná tobolka největších povolených rozměrů dle Českého lékopisu (velikost 000). Rozměry této tobolky činí v průměru 2,6 cm na výšku, 8,75 cm na šířku. V programu Prusa Slicer byly následně upraveny parametry tobolky pro 3D tisk bottomu (dno – menší část) a topu (vrchol – těla tobolky).



Obrázek 16: Ilustrační obrázek tobolky o velikosti 000 v programu Prusa Slicer

2.5.4 Průběh FDM 3D tisku

Vlákna vyextrudovaná metodou hot melt extruze byla zavedena do 3D tiskárny. Z tuhého filamentu pomocí extruzní trysky o průměru 0,4 mm bylo vytlačeno vlákno, které bylo nanášeno po vrstvách na tiskovou desku do formy výsledného objektu (tobolky).

Při 3D tisku byla optimalizována teplota trysky, teplota tiskové desky, násobiče extruze a výšky vrstvy. Při vyšší zvolené teplotě došlo k přepalování materiálu a jeho usazování v místě trysky, což způsobilo její ucpání. Při snížené teplotě tiskové desky docházelo ke špatnému uchycení první vrstvy tisku a následnému odtržení nedotisknuté tobolky z tiskové desky. Při využití vyššího násobiče extruze, došlo k přetékání materiálu v jednotlivých vrstvách tobolky.

Optimalizované podmínky 3D tisku pro formulaci F0: teplota trysky – 210 °C; teplota tiskové desky – 90 °C; výška vrstvy – 0,1 mm a násobič extruze – 1,0.

Optimalizované podmínky 3D tisku pro formulace F1–F3: teplota trysky – 200 °C; teplota tiskové desky – 90 °C; výška vrstvy – 0,1 mm a násobič extruze – 1,0.

V porovnání s extruzí filament můžeme sledovat vliv Kollidonů na teplotu tisku tobolek, kdy došlo v rámci optimalizace procesu k poklesu teploty o 10 °C. Další odlišnosti a charakteristiky jsou popsány v kapitole 3.2.



Obrázek 17: FDM 3D tiskárna Original Prusa i3 MK3S+



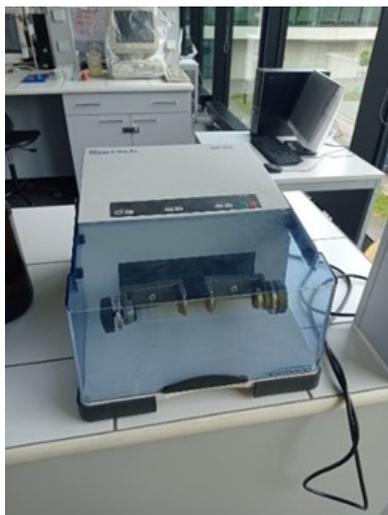
Obrázek 18: Vytištěná tobolka formulace F0 z čistého Affinisolu™

2.5.5 Plnění tobolek (příprava na disoluční test)

Na disoluční test bylo potřeba 6 tobolek pro každou formulaci, u kterých bylo sledováno uvolnění modelové účinné látky v závislosti na čase. Kontrolní tobolka, tzv. blank, neobsahovala modelovou účinnou látku. Do každé testované tobolky bylo na analytických vahách naváženo 50 mg kofeinu (modelová účinná látka) a 250 mg laktózy (plnivo). Blanková tobolka obsahovala 300 mg laktózy. Obsah tobolek byl homogenizován na vibračním mlýnku (bez kuličky) po dobu 3 minut a při frekvenci 15 kmitů za sekundu.

Tabulka 3: Plnění analyzovaných tobolek

Formulace	Kofein (mg)	Kofein (%)	Laktóza (mg)	Kofein (%)	Celková hmotnost plnicích složek (mg)
F0 – F3	50	16,67	250	83,33	300



Obrázek 19: Vibrační mlýnek bez kuličky (Retsch GmbH, Haan, Německo)

2.5.6 Příprava disolučních médií

Pro průchod tobolek žaludkem a lumen střeva jsou dle Českého lékopisu definována média a jejich postup přípravy. Médium o pH 1,2 simuluje prostředí žaludku a médium o pH 6,8 prostředí střev.

Médium o pH 1,2 se připravuje do dvoulitrové skleněné baňky smícháním 850 ml kyseliny chlorovodíkové (0,2 mol/l), 500 ml chloridu sodného (0,2 mol/l) a redestilované vody, kterou je doplněn objem dvoulitrové odměrné baňky po rysku.

Médium o pH 6,8 se připravuje do dvoulitrové skleněné baňky smícháním 500 ml dihydrogenfosforečnanu draselného (0,2 mol/l), 224 ml hydroxidu sodného (0,2 mol/l) a redestilované vody, kterou je doplněn objem dvoulitrové odměrné baňky po rysku.

2.5.7 Disoluční test

Disoluční test byl proveden na disoluční aparatuře Sotax AT 7 Smart. Pomocí disolučního testu bylo stanovováno množství uvolněného kofeinu (modelová účinná látka) z tobolky (materiál dle formulace F0 – F3) ve dvou disolučních médiích, kdy v předepsaných časových intervalech byl z disoluční aparatury odebírán kapalný vzorek o konstantním objemu (3 ml). Kofein v odebraném vzorku disolučního média byl stanovován pomocí UV-VIS spektrofotometrie (kapitola. 2.5.9).

Zvolené parametry disolučního testu: disoluční metoda – košíčková (100 ot./min); objem disolučního média v nádobě – 900 ml; teplota médií (prostředí) – 37 ± 0.5 °C.

Program disoluce byl nastaven podle cíle práce, a to připravit tobolku pro enterální aplikaci (kap. 2.1). Počet tobolek pro disoluční test byl 6+1 (norma dle Českého lékopisu). Frekvence předepsaných odběrů vzorku byla dělena do dvou fází. První fázi tvořilo 7 odběrů, kdy byl kapalný vzorek odebírán v 60–ti minutových intervalech. Druhá fáze byla založena na 22 odběrech po 30 minutách. Celková doba trvání jedné disoluce (pro jednu formulaci) byla 18 hodin. U tobolek byl simulován průchod GIT nejen v rámci předdefinovaného prostředí (média), ale i v rámci doby průchodu tobolky GIT. Tobolka tak zůstává 2 hodiny v pH 1,2 simulující průchod žaludkem, a zbylých 16 hodin v pH 6,8 simulující průchod střev. Z praktického hlediska to znamená, že po dvou hodinách disoluce došlo k výměně disolučních médií v aparatuře.

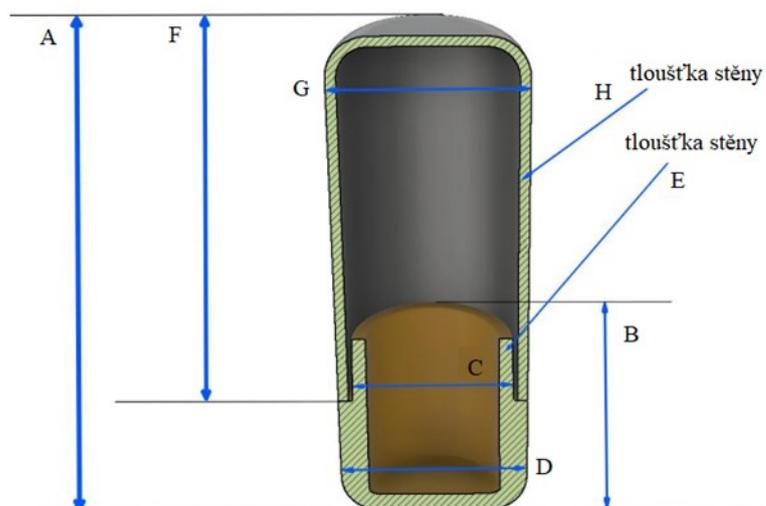
2.5.8 Rozměrová analýza

Dodatkový test reprodukovatelnosti tisku, tzv. rozměrová analýza, byla provedena u všech formulacích (F0 – F3). Byly analyzovány obě části tobolky, z každé formulace 10 ks. Všechny 10 zmíněných tobolek pro každou formulaci bylo proměřeno pro každý rozměr pětkrát pomocí digitálního posuvného měřítka.

Měřené rozměry: Celá tobolka – výška (A); Bottom (dno) – výška (B), šířka vnitřní části (C), šířka vnější části (D), tloušťka stěny (E); Top (vršek) – výška (F), šířka (G), tloušťka stěny (H). Dané rozměry znázorňuje Obrázek 21.



Obrázek 20: Analýza výšky topu tobolky pomocí digitálního posuvného měřítka



Obrázek 21: Měřené rozměry tobolky

2.5.9 Stanovení uvolněného množství kofeinu pomocí UV–VIS spektrometrie

Všechny vzorky disolučního média odebrané v předepsaných časech (kap. 2.5.7) byly proměřeny na UV–VIS spektrofotometru Aligent 8453. Vzorky byly přeneseny do kyvety o délce optické dráhy 5 mm. Použitá vlnová délka odpovídala absorpčnímu maximu kofeinu (273 nm). Uvolněné množství kofeinu bylo stanovováno proti slepému vzorku (bez kofeinu), který byl společně s měřenými vzorky odebírán ve stejném časovém intervalu. Hodnota absorbance byla odečítána s třibodovou korekcí pozadí v rozmezí 245–359 nm a následně přepočtena na koncentraci na základě Lambert – Beerova zákona.

Kalibrační křivka:

Pro stanovení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada roztoků o koncentraci 1,25; 2,5; 5, 10 a 20 mg/100 ml pro disoluční média o pH 1,2 a 6,8. Vzorky kalibrační řady byly proměřeny na UV–Vis spektrofotometru. Z naměřených absorbancí pro každý kalibrační roztok byl sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci kofeinu. Výsledné body byly proloženy přímkou. Regresní rovnice (Rovnice 1; Rovnice 2) byla dále využívána pro přepočet naměřené absorbance na koncentraci uvolněného kofeinu v mg/l.

Rovnice kalibrace pro pH 1,2 a 6,8: c [mg/l]

Rovnice 1: Kalibrační rovnice pro pH 1,2

$$\text{pH } 1,2 \quad A = 1,90574 \cdot 10^{-2} \cdot c - 1,21875 \cdot 10^{-3}$$

Rovnice 2: Kalibrační rovnice pro pH 6,8

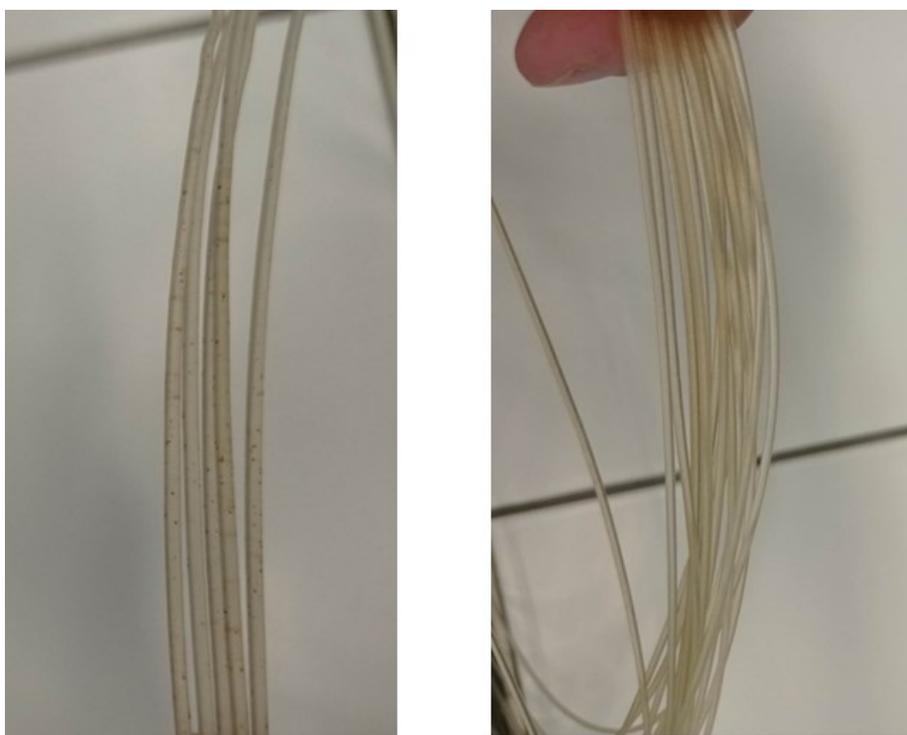
$$\text{pH } 6,8 \quad A = 1,47285 \cdot 10^{-2} \cdot c - 2,22417 \cdot 10^{-3}$$

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Extruze filament

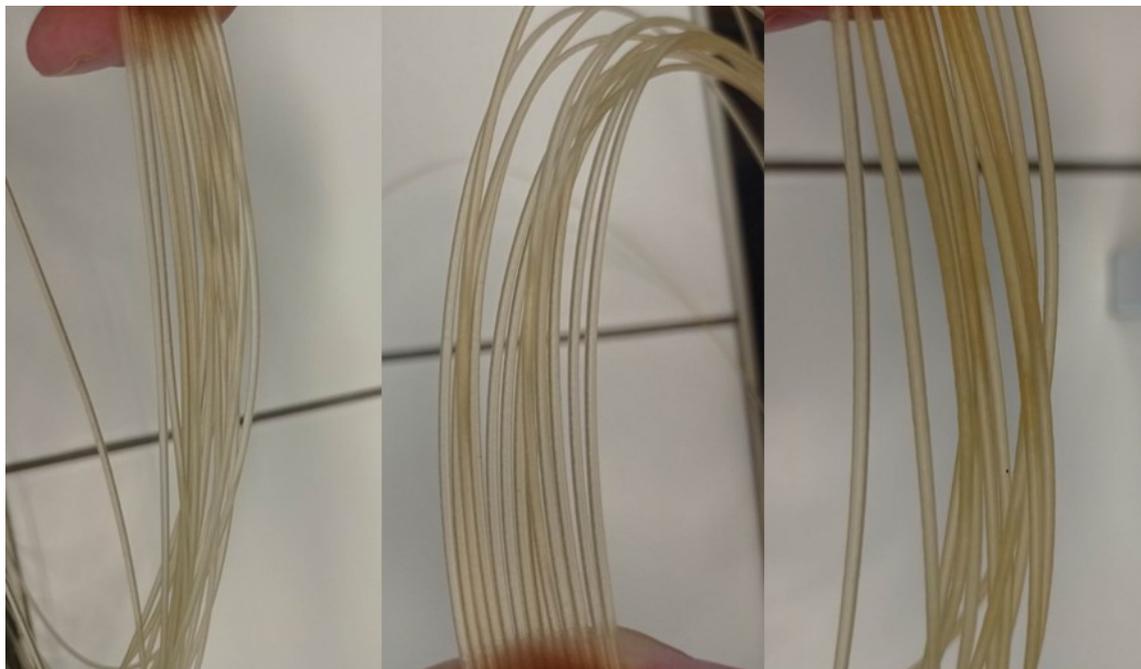
Jak již bylo popsáno v kapitole 2.5.2, pomocí metody hot melt extruze byly vyextrudovány filameny pro 4 různé formulace (F0–F3). Filameny byly vytlačovány za teploty 170 °C válcovým profilem trysky.

Filament formulace F0 složený z čistého Affinisolu™ je pružný, hladký, kompatibilní s 3D tiskem a má bílou barvu. Dále můžeme pozorovat na filamentu hnědé skvrny, které jsou způsobeny patrně přepalováním polymerních částic vlivem vyšší teploty extruze (Obrázek 22). V porovnání s filamenty s přísávkem Kollidonů® se liší formulace F0 především barvou a stálým průměrem vlákna (Obrázek 22).



Obrázek 22: Vyextrudovaná filamenta formulace F0 z čistého Affinisolu™ (vlevo) a srovnání se zástupcem formulace (F1) s přísávkem Kollidonů® (vpravo).

Formulace F1–F3 s přidavkem Kollidonu jsou stejně pružné, hladké a kompatibilní s 3D tiskem. Filamenty zmíněných formulací mají typickou nažloutlou barvu bez disperze přepalovaných částic polymeru. Pokud by mělo dojít ke srovnání těchto formulací, tak můžeme pozorovat, že se vzrůstající „K-value“ určitého typu Kollidonu se zvyšuje sytost žluté barvy filamentu (Obrázek 23).



Obrázek 23: Vyextrudované filamenty s přidavkem Kollidonu[®] 12 PF (vlevo), Kollidonu[®] 17 PF (uprostřed) a Kollidonu[®] 25 (vpravo).

3.2 3D tisk tobolek

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.5.4, pomocí FDM 3D tisku byly vytištěny tobolky všech zmíněných formulací. V procesu optimalizace tisku se projevila přítomnost Kollidonů[®], a to snížením teploty tisku o 10 °C u formulací F1–F3. V rámci optimalizace došlo k úpravě parametru násobiče extruze, který byl snížen z hodnoty 1,1 na hodnotu 1,0 u všech formulací. Při hodnotě 1,1 násobiče extruze docházelo k přetékání materiálu z vrstev objektu Obrázek 24.

Mezi další problémy, které se objevily až po optimalizaci tisku, patřil nestabilní průměr vyextrudovaného vlákna metodou HME a kompatibilita top / bottom. Vlivem kuželového profilu trysky docházelo k drobným odchylkám v průměru vlákna a jeho četným záhybům, které bránily zavedení filamentu do tiskárny. Vlivem vyšší roztékavosti Kollidonů docházelo v přechodu mezi

užší a širší části bottomu k rozměrovým odlišnostem, které znemožnily zkompletování tobolky jako celku (top + bottom) (kapitola 3.3).



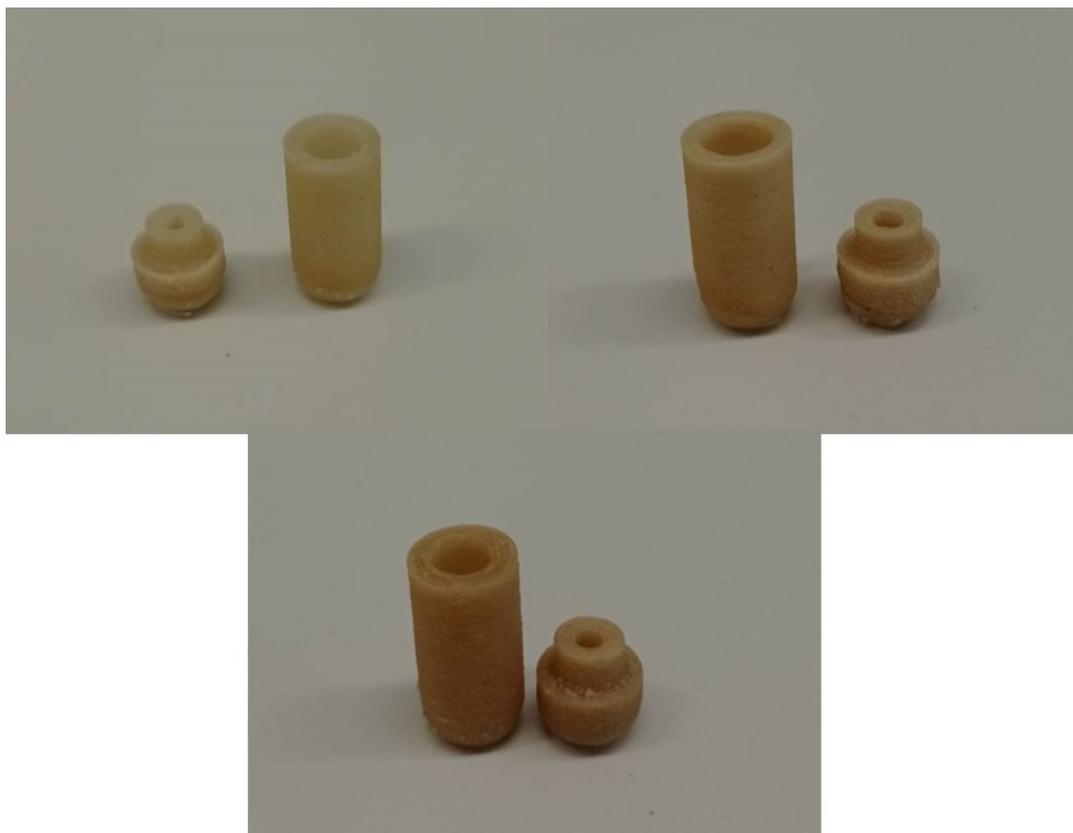
Obrázek 24: Vytisknutá tobolka se špatně zvoleným násobičem extruze o hodnotě 1,1.

Tobolky formulace F0 složené z čistého Affinisolu jsou barevně hnědé a na dotyk mají hrubší povrch. V porovnání s tobolkou formulace F1 je patrná především odlišná barva (Obrázek 25).

Tobolky s přidavkem Kollidonů (F1–F3) se od sebe liší v drobných detailech. Jedná se o žluto – hnědé, hladké a mechanicky odolné tobolky velikosti 000. Jak již bylo zmíněno u extruze filament, je patrný trend, že se zvyšujícím se číslem typu Kollidonu[®] dochází k tmavnutí tobolek od žluté po hnědou (Obrázek 26), patrně vlivem strukturálních změn polymerů.



Obrázek 25: Vizuální porovnání tobolek formulace F0 (vlevo) a F1 (vpravo).



Obrázek 26: Porovnání vizuální stránky tobolek s přidavkem Kollidonu[®] 12 PF (vlevo nahoře), Kollidonu[®] 17 PF (vpravo nahoře) a Kollidonu[®] 25 (uprostřed dole). Efekt tmavnutí tobolek se vzrůstající „K-value“ Kollidonů[®].

3.3 Rozměrová analýza

Data zaznamenaná v Tabulka 4; Tabulka 5; Tabulka 6 a Tabulka 7 představují jednotlivé měřené rozměry u vybraných deseti tobolek z každé formulace. Měřené rozměry tobolek jsou znázorněny na Obrázek 21. V každé tabulce pro danou formulaci je vypočten průměr konkrétního rozměru a směrodatná odchylka měření, z které lze vyhodnotit reprodukovatelnost tisku malé šarže tobolek. Odchyly jednotlivých měření jsou v řádech setin milimetru, že na základě těchto výsledků můžeme potvrdit dobrou reprodukovatelnost tisku.

Tabulka 4: Průměrné hodnoty měřených rozměrů tobolek formulace F0

F0 - Affinisol 100%								
F	Průměrné rozměry (mm)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	26,07	10,36	5,56	9,11	1,80	19,36	9,36	2,11
2	26,14	10,31	5,67	9,16	1,74	19,46	9,39	2,04
3	26,10	10,33	5,71	9,12	1,75	19,41	9,33	2,13
4	26,06	10,32	5,63	9,24	1,83	19,38	9,20	1,95
5	26,12	10,35	5,52	9,19	1,79	19,43	9,37	1,97
6	26,18	10,30	5,45	9,22	1,81	19,52	9,29	2,01
7	26,07	10,37	5,59	9,13	1,71	19,34	9,34	1,97
8	26,09	10,32	5,53	9,18	1,74	19,42	9,30	2,12
9	25,95	10,29	5,62	9,25	1,78	19,31	9,24	2,04
10	26,10	10,27	5,51	9,17	1,80	19,49	9,41	1,93
Průměr	26,09	10,32	5,58	9,18	1,78	19,41	9,32	2,03
Směrodatná odchylka	0,06	0,03	0,08	0,05	0,04	0,06	0,06	0,07

Tabulka 5: Průměrné hodnoty měřených rozměrů tobolek formulace F1

F1 - Affinisol (95%) + Kollidon 12 (5 %)								
F	Průměrné rozměry (mm)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	26,11	10,33	5,49	8,85	1,84	18,99	9,06	1,64
2	26,02	10,34	5,77	8,95	1,54	19,06	9,11	1,57
3	26,22	10,40	6,14	9,06	1,52	19,11	9,09	1,59
4	26,13	10,42	5,75	8,97	1,75	19,25	9,03	1,63
5	26,17	10,31	5,34	9,02	1,63	19,15	9,06	1,68
6	26,05	10,35	5,47	8,89	1,58	19,06	9,08	1,64
7	26,02	10,39	5,88	8,94	1,69	19,17	8,93	1,7
8	26,12	10,33	5,75	9,03	1,73	19,09	9,04	1,63
9	26,21	10,41	6,05	8,91	1,75	19,16	9,09	1,59
10	25,95	10,36	5,64	8,88	1,58	19,22	8,99	1,61
Průměr	26,10	10,36	5,73	8,95	1,66	19,13	9,05	1,63
Směrodatná odchylka	0,08	0,04	0,24	0,07	0,10	0,08	0,05	0,04

Tabulka 6: Průměrné hodnoty měřených rozměrů tobolek formulace F2

F2 - Affinisol (95%) + Kollidon 17 PF (5 %)								
F	Průměrné rozměry (mm)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	26,15	10,27	5,45	8,91	1,55	19,06	8,79	1,44
2	26,12	10,45	5,53	8,86	1,58	19,04	8,86	1,46
3	26,21	10,54	5,55	8,89	1,47	19,11	8,91	1,38
4	26,02	10,31	5,66	8,84	1,45	19,01	8,75	1,48
5	26,01	10,28	5,62	8,92	1,49	19,07	8,87	1,52
6	25,97	10,25	5,71	8,85	1,51	19,14	8,92	1,44
7	26,11	10,38	5,62	8,96	1,43	19,15	8,77	1,42
8	25,92	10,28	5,68	8,84	1,59	19,08	8,91	1,49
9	26,07	10,31	5,59	8,94	1,54	19,02	8,85	1,51
10	26,12	10,44	5,61	8,88	1,61	18,98	8,87	1,47
Průměr	26,07	10,35	5,60	8,89	1,52	19,07	8,85	1,46
Směrodatná odchylka	0,08	0,09	0,07	0,04	0,06	0,05	0,06	0,04

Tabulka 7: Průměrné hodnoty měřených rozměrů tobolek formulace F3

F3 - Affinisol 95% + Kollidon 25 (5 %)								
F	Průměrné rozměry (mm)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	26,02	10,29	6,12	9,31	1,75	19,34	9,31	2,15
2	25,88	10,32	6,23	9,26	1,83	19,29	9,34	2,03
3	26,09	10,39	6,08	9,24	1,81	19,25	9,28	2,16
4	26,07	10,37	5,97	9,13	1,78	19,33	9,35	1,98
5	26,01	10,42	6,21	9,2	1,74	19,22	9,3	1,94
6	25,91	10,39	6,07	9,16	1,8	19,19	9,37	2,04
7	25,93	10,27	6,14	9,27	1,73	19,28	9,39	1,95
8	26,06	10,35	5,99	9,16	1,79	19,33	9,37	2,07
9	26,02	10,4	6,04	9,19	1,73	19,25	9,32	1,99
10	25,97	10,33	6,18	9,25	1,81	19,27	9,29	2,04
Průměr	26,00	10,35	6,10	9,22	1,78	19,28	9,33	2,04
Směrodatná odchylka	0,07	0,05	0,08	0,05	0,03	0,05	0,04	0,07

S ohledem na složení formulací je zřejmé, že menší odchylky u jednotlivých měřených rozměrů můžeme pozorovat u formulace z čistého Affinisolu™ (F0). Formulace F1–F3 s přidavkem Kollidonů mají v určitých částech tobolek náznaky drobných nestabilit rozměrů. Tyto odchylky jsou pravděpodobně způsobeny vlivem přísadků změkčovadel, které způsobují větší roztékavost materiálu, a tak nižší tvarovou stálost tištěného objektu.

Z pohledu jednotlivých částí tobolky je zřejmé, že problémovou oblastí tobolek je především tisk menší části tzv. bottomu. Bottom je složený z širší nosné části a užší části, která slouží k zasunutí a spojení bottomu s topem tobolky. Tento proces může být často nekompatibilní, a to vlivem různého průměru užší a širší části bottomu vůči topu a přetékání přechodu mezi užší a širší částí bottomu. Konkrétně u formulace F2 je nejvyšší odchylka u výšky bottomu a u F1 a F3 je nejvyšší odchylka u průměru užší části bottomu. U formulace F2 si můžeme také všimnout odlišnosti u průměrné tloušťky stěny topu oproti ostatním formulacím. Tato změna parametru byla vytvořena cíleně jako řešení nekompatibility spojení bottomu a topu tobolky. Rozměr celkové výšky tobolky je často ovlivněn různou mírou těsnosti spojení bottom/top, a proto se může u tohoto rozměru vyskytovat také vyšší odchylka daného parametru (u F1 a F2).

3.4 Disoluční studie připravených tobolek

Výsledný disoluční profil jednotlivých formulací představuje množství uvolněného kofeinu z tobolek (%) v závislosti na čase. Pro statistické vyhodnocení dat z disoluční studie byl použit software GraphPad Prism.

Důležité sledované parametry u každé formulace jsou založeny na již zmíněných cílech práce (kap. 2.1). Pro zhodnocení, zda li je tobolka vhodná pro enterální aplikaci, pozorujeme odolnost tobolky v kyselém prostředí žaludku (disoluční médium o pH 1,2) a počáteční čas uvolnění modelové účinné látky (kofeinu) z tobolky. Kritérium přijatelnosti dle Českého lékopisu (47) je, že při počtu zkoušených jednotek 6 žádná jednotlivá hodnota nepřesahuje limit 10 % uvolněné látky. Počáteční čas uvolnění kofeinu z tobolky se stanovuje proto, že u enterálních lékových forem dochází k uvolnění účinné látky v časovém rozmezí 6–48 hodin po perorální aplikaci (po začátku disolučního testu).

Druhým cílem práce bylo určit vliv různých typů Kollidonů na extruzi filament, 3D tisk tobolek a především stabilitu tobolek při disolučním testu se změnou pH.

Předpokládaný obecný průběh disolučního testu pro enterální tobolky je následující. V pH 1,2 jsou odolné po dobu 2 hodin. Může docházet k částečnému narušení jejich povrchu a nežádoucí difúzi léčiva max. do 10 % celkového množství (47). Po změně pH na hodnotu 6,8 (po 2 hodinách od začátku disoluce) by nemělo docházet k žádnému nežádoucímu uvolnění kofeinu z tobolky. Po více než šesti hodinách by mělo dojít k rozpadu tobolky a uvolnění kofeinu

z tobolky. Disoluční profil by měl představovat esovitou křivku s tzv. lag timem minimálně 6 hod., což je hodnota zohledňující dobu průchodu žaludkem a tenkým střevem.

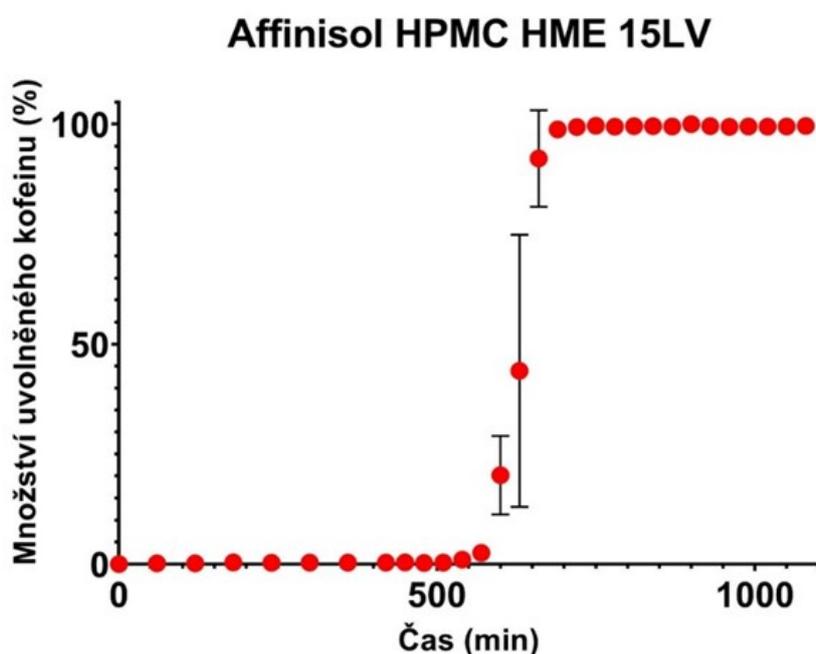
U všech sledovaných formulací proběhla disoluční zkouška bez problémů. Tobolky se po 18 hodinách disoluce dle čistých košíčků úplně rozpadly a rozpustily (Obrázek 27).



Obrázek 27: Košíčky po 18-ti hodinové disoluci. Úplné rozpuštění dané formulace.

3.4.1 F0 – Affinisol™ (100 %)

V prvních dvou hodinách, kdy byla tobolka vystavena kyselému pH, nedošlo k uvolnění žádného množství modelové účinné látky. Tobolka byla stabilní i při výměně disolučních médií. Tento stav trval zhruba do 570. minuty (lag time) od začátku testování. Následně se množství uvolněného kofeinu v disolučním médiu o pH 6,8 rapidně zvedlo a během 120 minut v médiu o pH 6,8 byl veškerý kofein uvolněn. Tím pádem byl po 690 minutách od začátku disoluce uvolněn veškerý kofein do disolučního média.

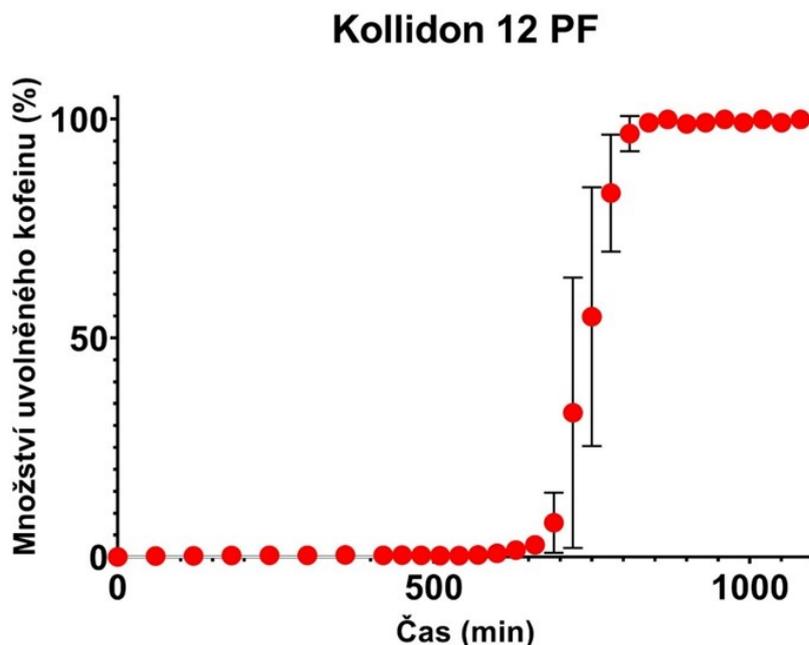


Obrázek 28: Disoluční profil formulace F0 (čistý Affinisol™)

Tobolka složená pouze z čistého Affinisolu je vhodná pro enterální aplikaci, jelikož je odolná vůči kyselému pH žaludku a zároveň k počátku uvolnění kofeinu z tobolky došlo až po 9 hodinách a 30 minutách od začátku testu. Modelové léčivo se uvolňovalo z tobolky po dobu dvou hodin.

3.4.2 F1 – Affinisol (95 %) + Kollidon® 12 PF (5 %)

U formulace F1 s přídavkem Kollidonu® 12 PF nedošlo k uvolnění kofeinu z tobolky během prvních dvou hodin v médiu o hodnotě pH 1,2 a ani při výměně disolučních médií. Léková forma byla stabilní až do 660. minuty, po níž došlo k rychlému nárůstu uvolněného kofeinu v disolučním médiu. Doba, po kterou byla modelová účinná látka uvolňována z tobolky, činí 180 minut. Po 840. minutě je veškeré množství kofeinu uvolněno v médiu.



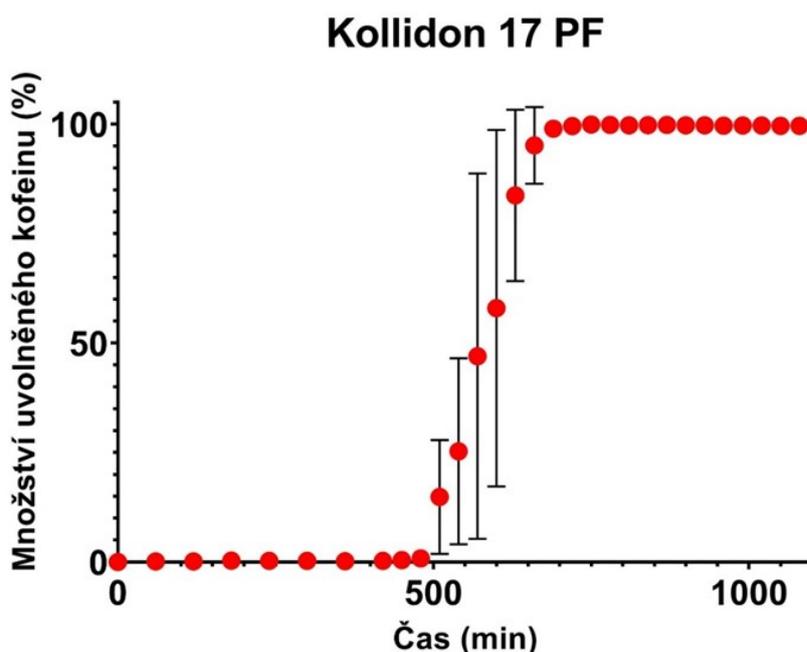
Obrázek 29: Disoluční profil formulace F1 s přídavkem Kollidonu® 12 PF

Tobolka s 5% přídavkem Kollidonu® 12 PF je vhodná jako enterální léková forma. Nedochozí u ní k žádnému významnému uvolnění modelové účinné látky v žaludečním pH a prvotní uvolnění účinné látky z tobolky nastává po 11 hodinách od začátku disoluce. Ve srovnání s tobolkou z čistého Affinisolu tak došlo k počáteční degradaci materiálu (a tím uvolnění většího množství kofeinu do média) až o hodinu a půl později. Doba degradace materiálu tobolky je delší než u formulace F0 o celou hodinu (celkově 3 hodiny).

Tobolky jsou velmi odolné a účinná látka se z nich uvolňuje příliš pozdě. V takovém případě by se nemusela léková forma udržet po celou dobu ve střevě. Nicméně v podmínkách *in vivo* lze předpokládat, že by se celková doba patrně zkrátila (např. vlivem enzymů a surfaktantů), což lze predikovat na základě disolučního testu s použitím biorelevantních médií simulujících GIT.

3.4.3 F2 – Affinisol (95 %) + Kollidon® 17 PF (5 %)

U formulace F2 v prvních dvou hodinách disoluce v žaludečním prostředí nedochází k uvolnění kofeinu z tobolky. Tobolka je stabilní i po změně pH, kofein se začíná uvolňovat až po 500 minutách od počátku disolučního testu. Uvolňování kofeinu trvalo přibližně 190 minut a veškerý kofein byl uvolněn z tobolky po 690. minutách od začátku disoluce.

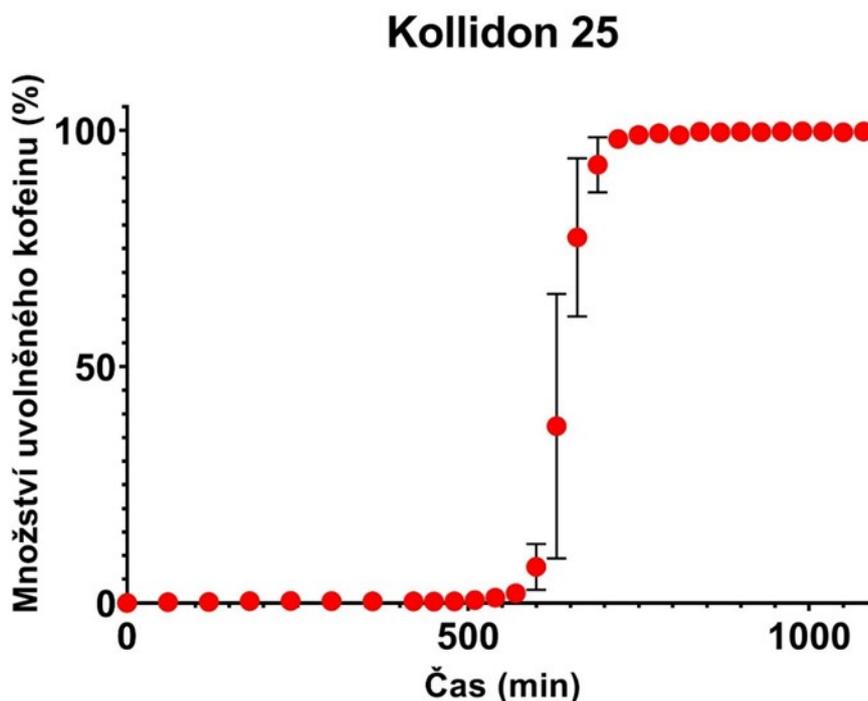


Obrázek 30: Disoluční profil formulace F2 s přidavkem Kollidonu® 17 PF

Tobolka s 5% přidavkem Kollidonu® 17 PF je vhodná pro aplikaci léčiva do tlustého střeva. Tobolka je odolná vůči kyselému pH a uvolnění účinné látky z ní nastalo až po 8 hodinách a 20 minutách (lag time). Ve srovnání s předem popsány formulacemi dochází u tobolky F2 k nejrychlejšímu počátku degradace lékové formy. Čistý Affinisol je odolnější než materiál tobolky F2. Ovšem doba uvolňování modelové účinné látky z tobolky byla delší (přes 3 hodiny). Tento údaj je srovnatelný s tobolkou s přidavkem Kollidonu® 12 PF.

3.4.4 F3 – Affinisol™ (95 %) + Kollidon® 25 (5 %)

U formulace F3 s přídavkem Kollidonu® 25 nedošlo k žádnému uvolnění kofeinu v průběhu prvních dvou hodin disolučního testu v kyselém prostředí. Zanedbatelné nebo žádné množství kofeinu bylo uvolněno z tobolky do disolučního média do 570. minuty, poté došlo k rychlému nárůstu množství kofeinu v médiu. Degradace tobolky trvala 180 minut. Po 750 minutách bylo uvolněno veškeré množství kofeinu.



Obrázek 31: Disoluční profil formulace F3 s přídavkem Kollidonu® 25

Tobolka s 5% přídavkem Kollidonu® 25 splňuje všechny podmínky pro aplikaci léčiva do oblasti kolonu. Počáteční uvolnění účinné látky z tobolky nastává ve stejný čas jako u čistého Affinisolu™ (F0). Ovšem doba degradace tobolky byla v porovnání s čistým Affinisolem (F0) o hodinu delší a ve srovnání s ostatními Kollidony je totožná (180 minut).

3.4.5 Srovnání disolučních profilů jednotlivých formulací

Při souhrnném grafickém znázornění disolučních profilů všech testovaných formulací (Obrázek 32) můžeme srovnávat rozdíly mezi jednotlivými formulacemi. U všech formulací byly splněny podmínky pro enterosolventní lékovou formu. Všechny formulace jsou odolné vůči pH o hodnotě 1,2 po dobu dvou hodin a počátek uvolnění účinné látky z tobolky nastává po deváté hodině od začátku testu. Dosažená hodnota tzv. lag timu (9 hod) u všech testovaných tobolek je dostačující pro enterosolventní lékovou formu (lékopisně požadováno 6 hod.) i pro následné testování v biorelevantních médiích, kde lze očekávat zkrácení lag timu vlivem přítomnosti enzymů a surfaktantů.

Nejstabilnější a vůči změně pH nejodolnější formulací byla tobolka F1 s 5% přídatkem Kollidonu[®] 12 PF. U formulace F1 došlo k uvolnění kofeinu z tobolky nejpozději ze všech sledovaných formulací až po 11 hodinách od začátku testu. V porovnání s ostatními formulacemi počátek uvolnění kofeinu z (i počátek degradace) tobolky nastal o 1 hodinu a 30 minut později a oproti nejméně stabilní formulaci F2 s 5% přídatkem Kollidonu[®] 17 PF dokonce o 2 hodiny a 40 minut.

Doba degradace tobolek vyjadřuje stabilitu lékové formy. Měřeným úsekem je interval mezi počátečním uvolněním kofeinu z tobolky až po uvolnění veškerého kofeinu do média. Doba degradace u tobolek s přídatkem Kollidonů se vzájemně neliší. Ovšem formulace s přídatkem 5 % Kollidonů (F1–F3) jsou v tomto ohledu stabilnější než formulace F0 z čistého Affinisolu[™]. Doba degradace tobolky u formulací F1–F3 je oproti formulaci F0 o 1 hodinu delší. Z toho lze usuzovat, že Kollidony zlepšují stabilitu studovaných lékových forem a pro podávání léčiv do oblasti kolonu má nejlepší předpoklady formulace F1 s přídatkem Kollidonu[®] 12 PF.

Tabulka 8: Souhrn časových údajů disolučních profilů

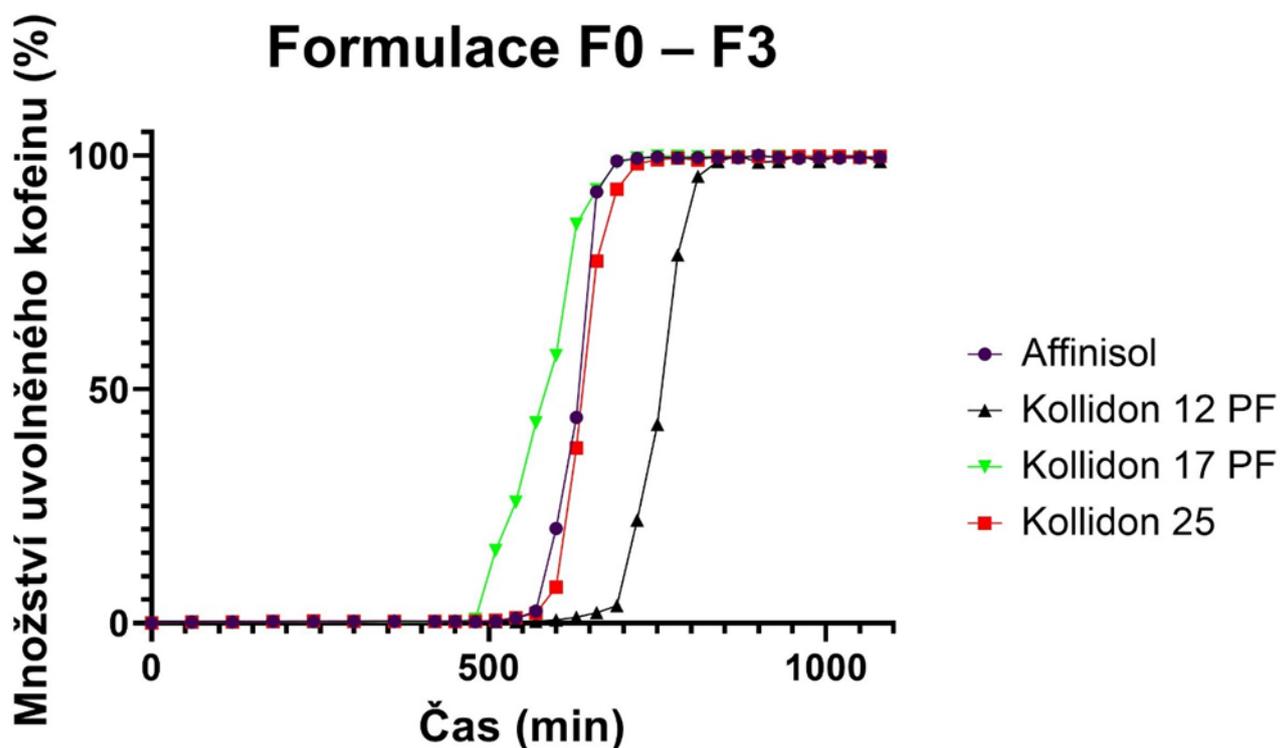
Formulace	Složení formulace	Lag time (min)	T _U (min)	T _M (min)
F0	Affinisol™	570	120	690
F1	Affinisol™ + Kollidon® 12 PF	660	180	840
F2	Affinisol™ + Kollidon® 17 PF	500	190	690
F3	Affinisol™ + Kollidon® 25	570	180	750

Legenda:

Lag time – počáteční čas uvolnění účinné látky z tobolky (od začátku disolučního testu)

T_U – doba, po kterou je účinná látka uvolňována z tobolky

T_M – čas, ve kterém dojde k uvolnění veškerého množství účinné látky do disolučního média (od začátku disoluce)



Obrázek 32: Schématické znázornění disolučních profilů všech formulací F0–F3

4 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na přípravu silnostěnných tobolek na bázi hypromelózy metodou FDM 3D tisku. Cílem práce byla příprava a testování tobolek vhodných pro perorální transplantaci fekální mikrobioty nebo přívod léčiva do oblasti kolonu.

Metodou hot melt extruze byly připraveny čtyři formulace vláken (F0–F3) pro následný 3D tisk silnostěnných tobolek na bázi Affinisolu™ s přídavkem Kollidonů® 12 PF, 17 PF a 25. U všech formulací byla použita teplota extruze 170 °C. Kollidony byly k Affinisolu™ přidávány kvůli možnému snížení teploty extruze a zlepšení mechanických a fyzikálně-chemických vlastností vlákna s ohledem na 3D tisk. Vliv na teplotu extruze nebyl prokázán. Z pohledu stability průměru vlákna byla nejstabilnější formulace F0 (bez Kollidonu®). Vlákna s přídavkem Kollidonů byla žlutá a lišila se barvou od formulace z čisté hypromelózy (F0), která měla bílou barvu.

Vlákna všech formulací byla zavedena do FDM 3D tiskárny. Následně byla provedena optimalizace 3D tisku, kdy u všech formulací byla stejná teplota tiskové desky (90 °C); výška vrstvy 0,1 mm a násobič extruze 1,0. Teplota při 3D tisku byla odlišná u formulace F0 (210 °C) a u formulací F1–F3 (200 °C). Vlivem Kollidonů byla snížena teplota tisku o 10 °C. Vizually se lišily tobolky formulace F0 od tobolek s přídavkem Kollidonů (F1–F3). Tobolky F0 byly tmavě hnědé a formulace F1–F3 měly žlutou barvu. Tobolky s přídavkem Kollidonů se barevně lišily v závislosti na K-value. S rostoucí hodnotou K-value přecházela barva od světle žluté na oranžovo-hnědou, což by mohlo být způsobeno změnou struktury polymeru.

Pomocí disolučních testů byl simulován průchod tobolek GIT a bylo sledováno jejich chování se změnou pH, rozdíly ve stabilitě a uvolňování modelové účinné látky (kofein). Všechny formulace splňovaly podmínky pro enterosolventní lékovou formu. Všechny formulace byly odolné vůči pH o hodnotě 1,2 po dobu dvou hodin a počátek uvolnění účinné látky z jednotlivých druhů tobolek nastal po deváté hodině od začátku testu. Nejodolnější formulací byly tobolky F1 s 5% přídavkem Kollidonu® 12 PF, u kterých došlo k uvolnění kofeinu nejpozději ze všech sledovaných formulací (až po 11 hodinách od začátku testu). Doba degradace tobolky vyjadřující stabilitu lékové formy byla stejná u formulací F1–F3 (s přídavkem Kollidonů), z toho můžeme vyvodit, že Kollidony zlepšují stabilitu lékových forem.

U vybraných tobolek všech formulací byla provedena rozměrová analýza, z které lze vyhodnotit reprodukovatelnost tisku tobolek. U formulace F0 byly naměřeny statisticky nevýznamné odchylky u všech sledovaných rozměrů. U formulace F1–F3 byly naměřené odchylky větší pravděpodobně vlivem přísadků změkčovadel, které způsobily větší roztékavost materiálu, a tak nižší tvarovou stálost tištěných objektů. Nicméně odchylky jednotlivých měření byly natolik malé (v řádech setin mm), že na základě těchto výsledků bylo možno potvrdit dobrou reprodukovatelnost tisku.

Připravené enterosolventní tobolky jsou vhodné pro aplikaci mikroorganismů do oblasti tlustého střeva v rámci procesu fekální mikrobiální transplantace. Tobolky jsou odolné vůči pH 1,2 a uvolnění mikroorganismů z tobolky nastává až po deváté hodině po perorálním podání. Jedná se o žádoucí vlastnosti, které ochraňují pacienty před nežádoucími infekcemi způsobenými mikroorganismy (v tobolce) v horní části GIT a zaručují cílené uvolnění mikroorganismů v oblasti tlustého střeva. Při FMT se předpokládá velká spotřeba tobolek, která může způsobovat nežádoucí tzv. střevní uzávěru. Možností, jak tomuto jevu předejít, je redukce syntetických polymerů (např. Kollidonu) za biodegradabilní polymery, které by zvýšily odbouratelnost tobolek v tlustém střevě. V rámci dalšího výzkumu bude tedy pozornost zaměřena na vývoj enterosolventních tobolek se stejně stabilními vlastnostmi jako poskytují Kollidony s hypromelózou, ale s vyšší biodegradabilitou.

5 BIBLIOGRAFIE

1. **Prasanth V.V, Jayaprakash. R, Sam T. Mathew.** Colon Specific Drug Delivery Systems: A Review on. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 02 2012, stránky 163-169.

2. **Christian Lautenschläger, Carsten Schmidt, Dagmar Fischer, Andreas Stallmach.** Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2014, stránky 58-76.

3. **L. Prokopová, , D. Ďuricová, M. Bortlík, V. Zbořil a Pracovní skupina pro idiopatické střevní záněty ČGS ČLS JEP.** Guidelines for the administration of aminosalicylates in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology & hepatology.* 2012, stránky 391-400.

4. **Charles W. Randall, John A. Vizuete, Nicholas Martinez, John J. Alvarez, Karthik V. Garapati, Mazyar Malakouti and Carlo M. Taboada.** From historical perspectives to modern therapy: a review of current and future biological treatments for Crohn's disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology.* 2015, stránky 143-159.

5. **Al-Jashaami, Layth S., DuPont, Herbert L.** Management of clostridium difficile infection. *Gastroenterology and hepatology.* October 2016, Sv. 12, 10, stránky 609-616.

6. **Garth Swanson, Mary Biglin, Vijit Chouhan, Hannah Raff, Gabreilla Sanzo, Faraz Bishehsari, Ali Keshavarzian.** Sa1888 CHRONOTHERAPY OF 6-MERCAPTOPYRIMIDINE (6-MP) METABOLITES IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE: A CROSSOVER TRIAL. *Gastroenterology.* 2020, Sv. 158, 6, stránky 466-467.

7. **Michael H Smolensky, Ramon C Hermida, Yong-Jian Geng.** Chronotherapy of cardiac and vascular disease: timing medications to circadian rhythms to optimize treatment effects and outcomes. *Current Opinion in Pharmacology.* 2021, Sv. 57, stránky 41-48.

8. **Karim Fifel, Aleksandar Videnovic.** Chronotherapies for Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology.* 2019, Sv. 174, stránky 16-27.

9. **Sierra T. Pence, Gregory T. Chesnut, Ayesha A. Shafi.** Time Matters: Importance of Circadian Rhythms, Disruption, and Chronotherapy in Urologic Malignancies. *Urology.* 2023.

10. **Marina Petković, Melad Henis, Oliver Heese, Angela Relógio.** Chronotherapy in Glioblastoma: state of the art and future perspectives. *eBioMedicine*. 2023, Sv. 89.
11. **Jessica R Allegretti, Benjamin H Mullish, Colleen Kelly, Monika Fischer.** The evolution of the use of faecal microbiota transplantation and emerging therapeutic indications. *The Lancet*. 2019, 394, stránky 420-431.
12. **Roman Stebel, Lenka Vojtilova, Radek Svacinka, Petr Husa.** Faecal microbiota transplantation in the treatment of Clostridioides difficile infection. *Human Microbiome Journal* . 16, 2020.
13. **Craig Haifer, Rupert W Leong, Sudarshan Paramsothy.** The role of faecal microbiota transplantation in the treatment of inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Pharmacology*. 12 2020.
14. **Nia Paddison Rees, Walaa Shaheen, Christopher Quince, Chris Tselepis, Richard D Horniblow, Naveen Sharma, Andrew D Beggs, Tariq H Iqbal, Mohammed Nabil Quraishi.** Systematic review of donor and recipient predictive biomarkers of response to faecal microbiota transplantation in patients with ulcerative colitis. *eBioMedicine*. 81, July 2022.
15. **Mukim, Mohammad, Chaturvedi, Mohit, Patel, Rakesh.** CROHN'S DISEASE: A REVIEW ON EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS AND THERAPEUTIC MANAGEMENT. *Indian drugs*. 9 2022, Sv. 59, 9, stránky 16-28.
16. **Florent Malard, Béatrice Gaugler, Mohamad Mohty.** Faecal microbiota transplantation in patients with haematological malignancies undergoing cellular therapies: from translational research to routine clinical practice. *The Lancet Haematology*. 2022, Sv. 9, 10, stránky 776-785.
17. **Moutaharrik, S.** In vitro and in vivo evaluation of a pH-, microbiota- and time-based oral. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2023, stránky 13-23.
18. **Andrew W. Lloyd, Gary P. Martin, S. Hashem Soozandehfar.** Azopolymers: a means of colon specific drug delivery? *International Journal of Pharmaceutics*. 1994, stránky 255-260.

19. **Martinsen TC, Fossmark R, Waldum HL.** The Phylogeny and Biological Function of Gastric Juice-Microbiological Consequences of Removing Gastric Acid. *International Journal of Molecular Sciences*. 29. 11 2019.
20. **Nadine Lysyk Funk, Stephani Fantaus, Ruy Carlos Ruver Beck.** Immediate release 3D printed oral dosage forms: How different polymers have been explored to reach suitable drug release behaviour. *International Journal of Pharmaceutics* . 2022, Sv. 625.
21. **KATEŘINA DVOŘÁČKOVÁ, ALEŠ FRANC, MARTINA KEJDUŠOVÁ.** Směrování léčiv do tlustého střeva. *Chemické listy*. 2013, Sv. 107, stránky 522-529.
22. **Anh Q. Vo a 1, Jiaxiang Zhang, Dinesh Nyavanandi, Suresh Bandari, Michael A. Repka.** Hot melt extrusion paired fused deposition modeling 3D printing to develop hydroxypropyl cellulose based floating tablets of cinnarizine. *Carbohydrate Polymers*. 2020, Sv. 246.
23. **Jongjan Mahadlek, Sarun Tuntarawongsa, Setthapong Senarat, Thawatchai Phaechamud.** In situ solvent removal-based Eudragit L/dimethyl sulfoxide forming gel. *Materials Today: Proceedings*. 2022, Sv. 52.
24. **Attila Balogh, Balázs Farkas, András Domokos, Attila Farkas, Balázs Démuth, Enikő Borbás, Brigitta Nagy, György Marosi, Zsombor Kristóf Nagy.** Controlled-release solid dispersions of Eudragit® FS 100 and poorly soluble spironolactone prepared by electrospinning and melt extrusion. *European Polymer Journal*. 2017, Sv. 95.
25. **Pradip Das, Nikhil R. Jana.** Biomedical Applications of Functional Polyaspartamide-Based Materials. *ACS Applied Polymer Materials*. 2021.
26. **Giovanni Falcone, Pierluigi Mazzei, Alessandro Piccolo, Tiziana Esposito, Teresa Mencherini, Rita P. Aquino, Pasquale Del Gaudio, Paola Russo.** Advanced printable hydrogels from pre-crosslinked alginate as a new tool in semi solid extrusion 3D printing process. *Carbohydrate Polymers*. 15. Leden 2022, Sv. 276.
27. **Sylvain Cailleaux, Noelia M. Sanchez-Ballester, Yanis A. Gueche, Bernard Bataille, Ian Soulairol.** Fused Deposition Modeling (FDM), the new asset for the production of tailored medicines. *Journal of Controlled Release*. 2021, Sv. 330, stránky 821-841.

28. **Yanshan Sheng, Jun Gao, Zheng-Zhi Yin, Jing Kang, Yong Kong.** Dual-drug delivery system based on the hydrogels of alginate and sodium carboxymethyl cellulose for colorectal cancer treatment. *Carbohydrate Polymers*. 1. Říjen 2021, Sv. 269.
29. **María Florencia Sanchez, María Laura Guzman, Ana Lidia Apas, Fabiana del Lujan Alovero, María Eugenia Olivera.** Sustained dual release of ciprofloxacin and lidocaine from ionic exchange responding film based on alginate and hyaluronate for wound healing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021, Sv. 161.
30. **Hairui Suo, Jiaying Zhang, Mingen Xu, Ling Wang.** Low-temperature 3D printing of collagen and chitosan composite for tissue engineering. *Materials Science & Engineering C*. 2021, 123.
31. **George J., Klarmann a kol.** 3D printing a universal knee meniscus using a custom collagen ink. *Bioprinting*. 2023, Sv. 31.
32. **Meison Furtado, Liang Chen, Zehao Chen, Ao Chen, Wenguo Cui.** Development of fish collagen in tissue regeneration and drug delivery. *Engineered Regeneration*. 2022, Sv. 3.
33. **Nilesh Kulkarni, Priti Jain, Amol Shindikar, Pravin Suryawanshi, Nanasaheb Thorat.** Advances in the colon-targeted chitosan based multiunit drug delivery systems for the treatment of inflammatory bowel disease. *Carbohydrate Polymers*. 14. Březen 2022, 288.
34. **Nagireddy Dumpa, Arun Butreddy, Honghe Wang, Neeraja Komanduri, Suresh Bandari, Michael A. Repka.** 3D printing in personalized drug delivery: An overview of hot-melt extrusion-based fused deposition modeling. *International Journal of Pharmaceutics*. 19. Březen 2021, 600.
35. **Pinak Khatrria, Dipen Desai, Namdev Shelke, Tamara Minko.** Role of plasticizer in membrane coated extended release oral drug delivery system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018, Sv. 44, stránky 231–243.
36. **A. Dashevsky, K. Wagner, K. Kolter, R. Bodmeier.** Physicochemical and release properties of pellets coated with Kollicoat® SR 30 D, a new aqueous polyvinyl acetate dispersion for extended release. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, Sv. 290.

37. **Bühler, Volker.** *Kollidon® Polyvinylpyrrolidone excipients for the pharmaceutical industry.* Ludwigshafen, Německo : BASF SE, Pharma Ingredients & Services , 2008.
38. **Ning Wang, Hixin Shi, Shude Yang.** 3D printed oral solid dosage form: Modified release and improved solubility. *Journal of Controlled Release.* 2022, Sv. 351, stránky 407–431.
39. **Nirali G. Patel, Abu T.M. Serajuddin.** Improving drug release rate, drug-polymer miscibility, printability and processability of FDM 3D-printed tablets by weak acid-base interaction . *International Journal of Pharmaceutics.* 2023, Sv. 632.
40. **Pavan Kalyan BG a, Sonal Mehrotra, Shirleen Miriam Marques, Lalit Kumar, Ruchi Verma.** 3D printing in personalized medicines: A focus on applications of the technology. *Materials Today Communications.* 2023, Sv. 35.
41. **Purushottam Suryavanshi, Subham Banerjee.** Exploration of theoretical and practical evaluation on Kollidon®SR matrix mediated amorphous filament extrusion of norfloxacin by melt extrusion. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2022, Sv. 67.
42. **Pinak Khatria, Mansi K. Shah, Namrata Vora.** Formulation strategies for solid oral dosage form using 3D printing technology: A mini-review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2018, Sv. 46.
43. **Srushti Tambe, Divya Jain, Yashvi Agarwal, Purnima Amin.** Hot-melt extrusion: Highlighting recent advances in pharmaceutical applications . *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2021, Sv. 63.
44. **Jens Wesholowski, Andreas Berghaus, Markus Thommes.** Inline Determination of Residence Time Distribution in Hot-Melt-Extrusion. *Pharmaceutics.* 2018.
45. **Gayathri Kollamaram, Denise M. Croker, Gavin M. Walker, Alvaro Goyanes, Abdul W. Basit, Simon Gaisford.** Low temperature fused deposition modeling (FDM) 3D printing of thermolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics.* 2018, Sv. 545, stránky 144–152.
46. **Ondřej Stříteský, Josef Průša, Martin Bach.** *Základy 3D tisku s Josefem Průšou.* Praha : Prusa Research a.s., 2019.

47. **Ministerstvo zdravotnictví České republiky.** *Český lékopis 2017 = Pharmacopoea Bohemica MMXVII (Ph. B. MMXVII)*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2017. 978-80-271-0500-7.

48. **Hossein Shahdadi Sardou, Fatemeh Sadeghi, Hadi Afrasiabi Garekani, Abbas Akhgari, Amir Hossein Jafarian, Mohammadreza Abbaspour, Ali Nokhodchi.** Comparison of 5-ASA layered or matrix pellets coated with a combination of ethylcellulose and eudragits L and s in the treatment of ulcerative colitis in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023, Sv. 640.

49. **IndiaMART.** www.indiamart.com. *Pharma Ingredients and Raw materials; Antiallergic API*. [Online] IndiaMART.

50. **Marsella Widjaja, Jefri Gan, Joseph Sunder Raj Talpaneni, Raymond Rubianto Tjandrawinata.** Determination of Eudragit® L100 in an Enteric-Coated Tablet Formulation Using Size-Exclusion Chromatography with Charged-Aerosol Detection. *Scientia Pharmaceutica*. 2018.