

TYPY A PŘÍPRAVA LIPOZOMÁLNÍCH PŘÍPRAVKŮ PRO PLICNÍ PODÁNÍ

HANA HOŘAVOVÁ, JAN GAJZIOK a DAVID VETCHÝ

*Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého třída 1946/1, 612 42 Brno
gajdziokj@vfu.cz*

Došlo 19.7.19, přijato 24.10.19.

Klíčová slova: lipozomy, plicní aplikace, sprejové sušení, lyofilizace, suché práškové přípravky, protektanty

Obsah

1. Úvod
2. Inhalační systémy
3. Lipozomy
4. Plicní aplikace lipozomů
5. Příprava a stabilizace lipozomálních přípravků pomocí sušení
 - 5.1. Lyofilizace
 - 5.2. Sprejové sušení
 - 5.3. Sprejově-mrazové sušení
 - 5.4. Sušení pomocí superkritických kapalin
 - 5.5. Pomocné látky využívané v procesu sušení
 - 5.5.1. Protektanty pro lyofilizaci
 - 5.5.2. Protektanty pro sprejové sušení
 - 5.5.3. Protektanty pro sprejově-mrazové sušení
 - 5.5.4. Pomocné látky zlepšující vlastnosti aerosolu
6. Závěr

1. Úvod

Inhalační podávání léčiv představuje optimální cílené řešení při terapii plicních onemocnění. Benefity inhalační aplikace jsou využívány jak u akutních, tak u chronických plicních onemocnění, jako jsou astma bronchiale, pneumonie, bronchitida, chronická plicní obstrukční nemoc (CHOPN), plicní karcinomy či cystická fibróza. Inhalace může být také alternativou k orálnímu či parenterálnímu systémovému podání¹.

Dýchací trakt představuje vhodnou oblast pro neinvazivní podání léčiv pro lokální i systémové působení, kdy může být dosaženo rychlého nástupu účinku a vysoké biologické dostupnosti díky dobrému prokrvení, rozsáhlé ploše a přítomnosti pouze tenkého, dobře dostupného

alveolárního epitelu. Z důvodu cíleného podání do místa působení je potřebná dávka touto cestou aplikovaného léčiva většinou nižší než při perorálním či orálním podání a jsou tak redukovány vedlejší účinky. V případě systémového účinku je navíc obcházen efekt prvního průchodu játry (first-pass effect). Nelze však opomenout ani nevýhody, mezi něž patří především krátká doba působení podaného léku, kdy je léčivo rychle odstraňováno z dýchacích cest přirozenými eliminačními mechanismy. To následně vyžaduje častější dávkování a tím sníženou ochotu pacienta spolupracovat (compliance). Plíce představují několik bariér, které musí inhalační systémy překonat. Jednak je to samotný tvar tracheobronchiálního stromu, dále potom patologické změny způsobené onemocněním (např. změny viskozity hlenu) a imunologická bariéra představovaná makrofágy¹.

2. Inhalační systémy

V současné době jsou v klinické praxi nejčastěji používány tři základní inhalační systémy: tlakové dávkované inhalátory (pressurized metered-dose inhalers = pMDI), rozprašovače (nebulizéry) a suché práškové inhalátory (dry powder inhalers = DPI)². Inhalátory pMDI obsahují účinnou látku v kapalně formě spolu s inaktivními pomocnými látkami. Tlaková nádoba je odolná proti vlivům vnějšího prostředí a umožňuje podávání přesné reprodukovatelné dávky. Nevýhoda tkví ve vyšší depozici v orofaryngeální oblasti na úkor depozice v plicích kvůli vysoké rychlosti proudění a příliš velkým kapkám. Řada pacientů má také problém zkoordinovat vdech s ruční aktivací inhalátoru¹.

Existuje několik typů nebulizérů, které využívají různé mechanismy pro vytvoření aerosolu – stlačený vzduch, ultrazvuk, vibrující děrovanou destičku atd³. Není u nich třeba synchronizace s dechem, inhalace probíhá při normálním klidovém dýchání. Během nebulizace ovšem dochází k vysokým ztrátám účinné látky, inhalátory jsou často objemné a nepřenositelné, poměrně nákladné a nebulizace je časově náročná. Do určité míry tyto překážky překonávají moderní systémy, které jsou schopny produkce částic s vhodnou velikostí a nebulizace nízkých objemů s malými ztrátami¹.

Inhalátory DPI zprostředkovávají distribuci práškových přípravků a v mnohém překonávají nevýhody předchozích systémů. Obecně mají snazší použití, neboť není nutná koordinace aktivace a vdechu. Jsou přenosné, kompaktní, stabilnější a efektivnější – mají vyšší dávkovou kapacitu, vysokou plicní depozici s minimálními ztrátami. Doba inhalace je v porovnání s nebulizéry podstatně kratší¹.

3. Lipozomy

Jak již bylo zmíněno, bez ohledu na použitý aplikační systém podléhá léčivo v dýchacím traktu rychlému odstranění (clearance). Je tedy snaha hledat efektivnější přípravky s prodlouženým časem setrvání, řízeným uvolňováním a sníženou eliminací z plic. V tomto směru se zdají být výhodné lipozomální přípravky¹.

Lipozomy ve svém nejjednodušším uspořádání představují sférické vezikuly, jejichž stěna je tvořena dvojvrstvou fosfolipidů uzavírající ve svém středu vodnou fázi – stejná kompozice jako buněčná membrána⁴ (obr. 1). Jsou potenciálními nosiči pro různé typy léčiv, od nízkomolekulárních až po velké proteiny či frakce DNA. Kromě toho lze do lipozomů enkapsulovat látky různých fyzikálně-chemických vlastností – lipofilní léčiva se inkorporují do fosfolipidové membrány a hydrofilní bývají součástí vnitřního vodného kompartmentu⁵.

Co se týče možných metod přípravy lipozomů, v dnešní době jich existuje celá řada. Jsou to např. metody hydratace tenkého lipidového filmu, injekce organického roztoku, odpaření reverzní fáze nebo z modernějších technik mikrofluidizace a sprejové nebo mrazové sušení⁵. Výsledkem jsou lipozomy různé velikosti a lamelarity. Na základě toho se rozlišují následující typy lipozomů (obr. 1): malé unilamelární vezikuly (SUV), velké unilamelární vezikuly (LUV), multilamelární vezikuly (MLV) a případně multivezikulární vezikuly (MVV). Pro přívod léčiva je žádoucí velikost mezi 50 a 200 nm (cit.⁶).

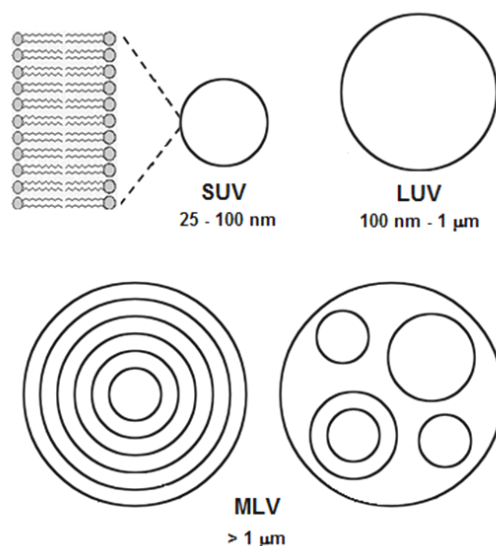
Lipozomy mají řadu výhodných vlastností, které je činí atraktivními pro využití ve farmacii. Především jsou to biokompatibilita, biodegradovatelnost a nízká imunogenita vycházející z jejich složení. Zachycené léčivo je chráněno před vlivy vnějšího prostředí (např. enzymy) a je

stabilnější. K lepší biologické dostupnosti přispívá subcelulární velikost lipozomů umožňující intracelulární příjem. Lipozomy jsou schopny přivádět léčiva na specifická cílová místa, tzv. „drug targeting“ a lze jimi dosáhnout prodlouženého uvolňování. Konvenční lipozomy bez úpravy povrchu mají v těle cirkulační poločas v řádu několika hodin. Modifikací jejich povrchu např. vazbou polyethylenglykolu lze zvýšit schopnost vyhýbat se imunitnímu systému a prodloužit poločas až na 45 hodin. Navázáním různých protilátek, peptidů a dalších ligandů lze dosáhnout aktivního cílení k určitým strukturám organismu. Pasivně jsou využívány patofyziologické abnormality (např. změny v okolí nádorů). Lipozomy v cílovém místě přilnou k buněčné stěně, se kterou následně splývají a uvolňují svůj obsah, případně je iniciována endocytóza a k uvolnění dochází po zpracování lysosomem. Může být ale také cíleně spuštěno různými mechanismy, např. zvýšením teploty, změnou pH, světelným zářením nebo působením enzymů^{4,5,8,9}.

Lipozomy je možné podávat různými aplikačními cestami. Ukázalo se, že lipozomální enkapsulace snižuje vstup léčiva do systémové cirkulace ve srovnání s inhalačním podáním léčiva samotného. V konečném důsledku se po aplikaci lipozomů snižuje potřebná dávka, četnost nežádoucích účinků a toxicita enkapsulovaného léčiva^{4,5,8,9}.

4. Plicní aplikace lipozomů

Studie naznačují, že lipozomy mohou být efektivně přiváděny do plic např. aerosolizací ve formě vodné disperze, případně mohou být aplikovány jako součást porézních suchých částic¹. Jsou využívány jako prostředek



Obr. 1. **Struktura a základní klasifikace lipozomů**⁷; SUV – malé unilamelární vezikuly, LUV – velké unilamelární vezikuly, MLV – multilamelární vezikuly

k přívodu fosfolipidů na alveolární povrch a k modulaci trvání účinku nebo plicní absorpce farmakologicky aktivních látek. Lipozomy jsou k podání do plic zvláště výhodné, přihlédneme-li ke složení plicního surfaktantu¹⁰. Ten je totiž komplexní směsí 80–90 % fosfolipidů a podstatně menšího množství proteinů. Nejvíce je mezi nimi zastoupen 1,2-dipalmitoylfosfatidylcholin (až 55 % surfaktantu) a kromě fosfolipidů je zde přítomen také neutrální lipid cholesterol (cca 10 %)^{10,11}.

Benefity potom přináší aplikace lipozomů připravených z těchto složek. Můžeme je zařadit do skupiny látek označovaných jako GRAS (z angl. generally recognized as safe). V případě plicní aplikace jsou to látky, které jsou uznány americkou FDA (Food and Drug Administration) za bezpečné a jsou schváleny pro danou aplikaci, neboť jsou v plicích endogenní a přítomny ve velkém množství¹². Endogenní materiály mají navíc podstatně nižší a pomalejší odstraňování (clearance)¹³.

Před využitím lipozomů jako nosičů pro léčiva byla nejdříve studována jejich bezpečnost při podávání do plic. Došlo se k závěru, že inhalačně podávané lipozomy jsou bezpečné, nedráždí plic a nevyvolávají žádné fyziologické abnormality. U zdravých lidských dobrovolníků byly prázdné lipozomy dobře tolerovány a nevykazovaly škodlivý efekt na funkci plic. Ve studii Gilberta a spol. lipozomální aerosol nevyvolával tracheální iritace, kašel ani změny dechových objemů¹⁴.

Nejvýznamnější skupinou léčiv, která lze přivádět do plic pomocí lipozomů, jsou protinádorová léčiva. Možnosti jsou však daleko širší a je nutno do výčtu zahrnout také antimikrobiální látky, antiastmatika, geny či antidiabetika¹⁵. Studie dokládají prodloužení účinku lipozomálně formulovaných léčiv oproti léčivu volnému a snížení nežádoucích účinků. Uvolňování může být řízeno složením a strukturou lipozomů. Pro prodloužení uvolňování jsou vhodné vícelamelární lipozomy, vezmeme-li v úvahu, že uvolňování může probíhat po fúzi váčků s povrchem alveol¹⁰.

Aby se aplikované přípravky vyhnuly mechanismům plicní očisty, musí dosáhnout periferních dýchacích cest. Místo depozice je závislé zejména na velikosti inhalovaných částic (ať už kapek aerosolu nebo práškových částic), nikoliv na velikosti samotných lipozomů, které jsou jejich součástí. Je známo, že ideální velikost částic pro depozici hluboko v plicích je mezi 1–5 μm. Větší částice jsou zachyceny již v orofaryngu, zatímco menší jsou rychle vychytávány makrofágy nebo vydechovány. Důležitější než geometrický průměr je ovšem u suchých částic průměr aerodynamický, který zohledňuje morfologii a další vlastnosti jednotlivých částic. Parametr popisující aerodynamické vlastnosti přípravků je střední aerodynamický průměr (MMAD – mass median aerodynamic diameter)¹⁶.

5. Příprava a stabilizace lipozomálních přípravků pomocí sušení

Přestože jsou lipozomální přípravky na základě zmíněných kvalit uznávány regulačními autoritami a jsou dostupné jako komerční přípravky, stále je v oblasti jejich

aplikace výzvou fyzikální a chemická stabilita vodných disperzí, zejména z dlouhodobého hlediska. Fosfolipidy dvojvrstvy mohou ve vodném prostředí podléhat oxidaci či hydrolyze. Následkem kumulace hydrolytických produktů v membráně jsou strukturální změny lipozomů, jejich agregace až fúze a únik obsaženého léčiva¹⁷. Byly popsány velké ztráty enkapsulovaného léčiva při nebulizaci vodných disperzí mechanickým poškozením lipozomálních částic. Návrhem na řešení těchto nestabilit je příprava suchých prášků. V lipozomálních suchých práškových přípravcích se lipozomy s enkapsulovaným léčivem homogenizují, dispergují se do struktury nosiče a převedou se do suchého stavu. Nejsou tedy aplikovány čisté lipozomy, ale nosné částice, ve kterých jsou inkorporovány¹. Jsou-li tyto suché částice inhalovány, v kontaktu s vlhkým povrchem dýchacího traktu dochází k jejich rehydrataci a rekonstrukci obsažených vezikul *in situ*¹⁸. Technologie, kterých se k procesu sušení využívá, jsou mrazové sušení neboli lyofilizace, sprejové sušení, sprejové-mrazové sušení nebo případně technologie využívající superkritických kapalin¹.

5.1. Lyofilizace

Lyofilizace je nejužívanějším sušicím přístupem, vhodným zvláště pro termosenzitivní látky. Proces zahrnuje odstranění vody ze zmrazených produktů za nízkých tlaků. Je známo, že přítom může docházet k narušení lipozomální stěny (hlavně ledovými krystaly během fáze mrazení) a ke ztrátě enkapsulovaného materiálu. Pokud se ovšem použijí vhodné protektanty (viz dále), složení lipozomů a podmínky procesu, lze dosáhnout velmi dobré stability s minimální ztrátou enkapsulované látky a přijatelné enkapsulace^{4,17}.

Na stabilitu během lyofilizace může mít vliv i velikost lipozomálních částic. Aby mohly být efektivně chráněny a udržely si svou původní velikost i po procesu sušení, měla by být jejich optimální vstupní velikost v rozmezí 50 až 100 nm. Malé lipozomy kolem 25 nm jsou totiž v průběhu sušení namáhány kvůli vysokému poloměru zakřivení a snadno fúzují. Velké lipozomy jsou také poměrně nestabilní kvůli nedostatečné strukturální rigiditě¹⁹.

5.2. Sprejové sušení

Sprejové sušení představuje zajímavou metodu pro přípravu prášků s vhodnými aerodynamickými vlastnostmi pro inhalaci. Navíc vyžaduje méně času a energie než lyofilizace. Při procesu je dehydratace dosaženo odpařováním vody, které je umožněno vysokou sušicí teplotou a usnadněno vytvořením velkého povrchu malých kapek procesem atomizace²⁰. Lze dosáhnout vzniku přibližně sférických částic s úzkou velikostní distribucí a dobrými tokovými vlastnostmi. Modifikací procesních podmínek lze regulovat celou řadu vlastností vznikajícího prášku (např. vzhled, velikost částic, hustotu, obsah vlhkosti, porozitu, atd.)²¹.

Goldbach a spol. zkoumali vliv sprejového sušení na stabilitu lipozomální membrány ve smyslu hydrolyzy a oxidace jako dvou hlavních procesů možného rozkladu. Došli k závěru, že fosfatidylcholin není během přípravy

a sušení výrazněji hydrolyzován a nebyly pozorovány ani oxidativní změny¹⁸. Stejná skupina autorů sledovala také retenci hydrofilního a lipofilního léčiva (bronchodilatační atropin-sulfát a α -tokoferol) během sprejového sušení. Ukázalo se, že k úniku lipofilního léčiva téměř nedochází (1–2 %). Naproti tomu lipozomy s hydrofilním léčivem podléhají významné, až 80% ztrátě. Příčina je pravděpodobně ve zvýšení fluidity membrán působením vysoké teploty a zvýšení propustnosti pro zachycené látky. Léčivo též může procházet membránami společně s vodou během kroku sušení. Retenci lze zvýšit výběrem vhodného protektantu²².

5.3. Sprejově-mrazové sušení

Sprejově-mrazové sušení (SFD) je jednou z metod, které mohou produkovat suché částice použitím procesu atomizace, rychlého zmrazování a lyofilizace. Tryska rozprašuje disperzi přímo do nádoby s kapalným dusíkem. Zmrazené částice se shromáždí a lyofilizují za vzniku suchého prášku²³. Přitom se tlak atomizačního vzduchu zdá být hlavním faktorem ovlivňujícím velikost výsledných částic – čím vyšší tlak, tím jemnější částice vznikají. Rychlost nástřiku má vliv opačný – s rostoucí rychlostí roste velikost částic²⁴.

SFD s sebou přináší výhody výroby částic s úzkou velikostní distribucí a jedinečnou porézní strukturou²³. Částice jsou sice poměrně velké, ale mají malý MMAD, což vede k lepší aerosolizaci a depozici v plicích²⁴.

5.4. Sušení pomocí superkritických kapalin

Kapaliny jsou označovány jako nadkritické, když jejich teplota a tlak překračují příslušné kritické hodnoty. Tekutina má za těchto podmínek jedinečné termo-fyzikální vlastnosti: je schopna proniknout látkami jako plyn a rozpouštět materiály jako kapalina. Nejčastěji se používá oxid uhličitý, který se řadí mezi GRAS látky²⁵.

Touto technologií byl připraven např. přípravek s amfotericinem B k terapii invazivních houbových infekcí

plic. Lipidy a léčiva jsou rozpouštěny v organickém rozpouštědle, které je částečně nebo zcela mísitelné se superkritickou kapalinou, která se označuje jako antirozpouštědlo. Roztok je do této tekoucí kapaliny nastříknut a organické rozpouštědlo se rozpouští v antirozpouštědle, zatímco lipidy s léčivem nikoliv. Dochází k precipitaci pevných látek a výsledkem jsou suché lipozomy mikronových rozměrů s inkorporovaným léčivem. Výhody technologie spočívají v použití mírných podmínek a v produkci částic s kontrolovatelnou morfologií a úzkou distribucí velikosti. Navíc může být zajištěno úplné odstranění organických rozpouštědel¹. Lipozomy jsou menší, stabilnější a oproti volnému léčivu vykazují silnější efekt a nižší toxicitu²⁶.

5.5. Pomocné látky využívané v procesu sušení

Příklady pomocných látek využívaných v procesu sušení uvádí tab. I.

5.5.1. Protektanty pro lyofilizaci

Protektanty lze obecně dělit na kryoprotektanty, chránící během fáze mrazení, a lyoprotektanty, které zajišťují protekci během sušení²⁸. Jako protektanty jsou používány zejména sacharidy (laktosa, sacharosa, trehalosa) a jejich stabilizační efekt je popsán dvěma hypotézami: náhrada vody a vitrifikace^{4,17}.

První z teorií navrhl Crowe a spol., a je založena na předpokladu, že molekuly vody mezi fosfolipidovými hlavičkami jsou během procesu sušení nahrazeny molekulami sacharidů, přičemž tato interakce je zprostředkována vodíkovými vazbami. Sacharidy tak udržují rozestupy mezi hlavičkami a redukují van der Waalsovy interakce mezi acylovými řetězci. Tím dochází ke snížení teploty fázového přechodu a náhradě funkce vody u lipozomů v suchém stavu¹⁹. Teplota fázového přechodu (T_g) je taková, při níž uhlovodíkové řetězce fosfolipidu podléhají reversibilnímu přechodu z uspořádaného (gelového) stavu do méně uspořádaného stavu kapalných krystalů. Je závislá na složení fosfolipidů. Pokud je tato teplota překročena, zvýšená fluidita membrány má za následek také zvýšenou

Tabulka I

Příklady používaných pomocných látek při sušení

Sušící metoda	Pomocné látky ke stabilizaci	Příklad
Lyofilizace	disacharidy (trehalosa, laktosa, sacharosa), cukerné alkoholy (mannitol), polymery (kalcium-alginát), hydroxypropyl- β -cyklodextrin	lipozomy s protinádorovým gemcitabinem stabilizované trehalosou ¹³
Sprejové sušení	disacharidy (trehalosa, laktosa, sacharosa), polymery (kalcium-alginát), hydroxypropyl- β -cyklodextrin, chitosan	lipozomy s protinádorovým paklitaxelem stabilizované vrstvou kalcium-alginátu ²⁷
Sprejově-mrazové sušení	disacharidy (trehalosa, laktosa, sacharosa), cukerné alkoholy (mannitol)	lipozomy s antibiotikem klaritromycinem stabilizované směsí mannitolu a sacharosy ²³
Sušení se superkritickými kapalinami	oxid uhličitý	lipozomy s antimykotikem amfotericinem B (cit. ¹)

propustnost pro inkorporované látky²².

Mechanismus vitifikace spočívá v zakoncentrování sacharidového roztoku během mrazení a přechodu do určitého skelného stavu po odstranění vody. Tento stav pravděpodobně díky vysoké viskozitě a nízké pohyblivosti brání agregaci a fúzi lipozomů a chrání je před poškozením ledovými krystaly. Protože je sacharid v přebytku, vytváří matici, ve které jsou lipozomy uloženy²⁹.

Sacharidy používané jako protektanty by měly mít vysokou teplotu skelného přechodu a nízkou molekulovou hmotnost, aby bylo dosaženo maximální retence²⁰. Pro maximální stabilizaci je zapotřebí přítomnosti sacharidu na obou stranách dvojvrstvy. Např. laktosa nezaručuje příliš vysoké hodnoty retence, i když je přítomná oboustranně. Neplatí však, že výsledný účinek je součtem sacharidu vně a uvnitř¹⁹.

Při studiích stabilizace lipozomů (jako modelů biologických membrán) pomocí sacharidů během mrazového sušení se ukázala jako nejúčinnější trehalosa. Dokáže zabránit fúzi membrán a úniku materiálu. Potřebná množství jsou podobná množství zdokumentovaným u organismů, které jsou schopny přežít úplnou dehydrataci (15–20 %). K maximalizaci retence léčiva je zapotřebí podstatně více sacharidů, než je zapotřebí k minimalizaci fúze³⁰. Například Gandhi a spol. označili za složení s nejlepšími vlastnostmi směs lipid:trehalosa v poměru 1:2. Použitým léčivem byl gemcitabin hydrochlorid, který je považován za nejúčinnější v terapii karcinomu plic a kromě jiných výhod je v přípravku chráněn před rychlou enzymatickou inaktivací. Vzniklé částice měly aerodynamicky výhodnou morfologii, téměř úplnou retenci léčiva a minimální změnu velikosti lipozomů po rehydrataci. Díky nižší hygroskopicitě oproti ostatním protektantům tvoří trehalosa aerodynamicky menší částice¹³.

U jiných autorů se jevil jako nejlepší protektant manitol. Ve srovnání s laktosou a trehalosou vykazoval nejvyšší procenta udržení léčiva, v tomto případě kombinace antifibrotika kolchicinu a kortikosteroidu budesonidu k léčbě idiopatické plicní fibrózy. Byl účinný v zachování velikosti vezikul a přípravky měly nejnižší zbytkovou vlhkost. V důsledku toho byla frakce jemných částic u mannitolu nejvyšší (čím vyšší je tato frakce, tím vyšší bude depozice v plicích), přípravky měly vyšší emisi z inhalátoru, lepší schopnost dispergace a MMAD vhodný pro cílenou aplikaci do plic⁸. Mannitol byl vybrán jako nejvhodnější také z pohledu vzhledu a rozpustnosti výsledných částic obsahujících lipozomy s protinádorovým paklitaxelem skupinou autorů kolem Wangu. Ti navíc ukázali, že potažení lipozomů vrstvou polymeru kalcium-alginátu je dokáže ochránit během lyofilizace lépe než sacharid a vzniklé částice mají menší tendenci k agregaci²⁷.

Kromě sacharidů vykazuje ochranný účinek např. i hydroxypropyl- β -cyklodextrin, zatím neznámým mechanismem. Může být zlepšena vitifikace kvůli vyšší T_g a/ nebo zlepšená výměna vody vzhledem k jeho velkému počtu donorů a akceptorů vodíku. Výhodou je také jeho bezpečný toxikologický profil pro různé způsoby podání a vysoká rozpustnost ve vodě. I produkt lyofilizace podlé-

há rekonstituci podstatně rychleji než při použití sacharosy nebo trehalosy, přičemž je zachována velikost lipozomů a míra enkapsulace ve vodě rozpustné sodné soli prednison-fosfátu³¹.

5.5.2. Protektanty pro sprejové sušení

Pro sprejové sušení lze využít stejné protektanty jako při lyofilizaci. Například Chen a spol. zkoušeli různé koncentrace sacharosy a trehalosy, přičemž za kritický parametr stability považovali změnu velikosti lipozomů. Nejlepší výsledky vykazoval přídavek 10 % sacharosy, trehalosa ani při koncentraci 15 % nezabránila změně velikosti. Při hodnocení dalších parametrů se sacharosa ovšem nejevila jednoznačně výhodnější. Má totiž oproti trehalose nižší T_g a při sušení může dojít k překročení jak této teploty, tak „bodu lepidivosti“, který je obecně 10–20 °C nad T_g . To vede k prudkému zvýšení koheze částic a může docházet také k přilnutí na stěny sušárny. Sacharosové částice jsou hladké, zatímco trehalosové zvrásněné, což vede k menšímu vzájemnému přilnutí částic a snížené agregaci. Také má vyšší frakci jemných částic a obecně lepší aerodynamické vlastnosti a lipozomy vykazují vyšší míru obnovy (opětovné seskupení struktur po rozpuštění prášku)³².

Lo a spol. poukazují na protektivní účinek sacharosy, kdy po sprejovém sušení prokázali zachování aktivity enzymu superoxididmutasy zabudovaného do lipozomu. Navíc částice vykazovaly vhodný aerodynamický průměr, emitovanou dávku a respirabilní frakci³³. Wessmann a spol. pracovali s laktosou a upozornili na skutečnost vzniku jejího osmotického gradientu při odstraňování vody během sušení. Pokud je roztok laktosy přidán k disperzi vzniklé hydrataci pouze vodou, osmotický tlak laktosy způsobí rychlou difuzi vody z vnitřku lipozomů a vyvolává jejich strukturální změny. Při sušení potom mají tendenci růst a stávat se více unilamelárními. Pro zabránění rekombinaci do větších struktur je výhodné zahrnout laktosu do hydratačního media při přípravě lipozomů²⁰.

Disacharidy však nejsou jedinými materiály, které je možno použít k protekci lipozomů. Wang a spol. využili obalení lipozomů kalcium-alginátem také při sprejovém sušení. Velikost takto obalených lipozomů zůstává po sprejovém sušení stabilní, mění se pouze tloušťka obalové vrstvy – ta se se ztrátou vody zmenší a následně při rehydrataci postupně nabobtná do původní velikosti. Částice vykazují menší tendenci k agregaci a lepší retenci paklitaxelu než neobalené lipozomy²⁷. Podobně jako při lyofilizaci vykazuje ochranný účinek hydroxypropyl- β -cyklodextrin. K plnohodnotné stabilizaci stačí jeho přítomnost pouze na vnější straně membrány. Vysoká teplota skelného přechodu zabraňuje kolapsu prášku během sprejového sušení³¹. Chougule a spol. se snažili vytvořit lipozomální přípravek s antibiotikem dapsonem pro prevenci pneumocystové pneumonie, která je nejčastější infekcí ohrožující život u imunosuprimovaných pacientů, a jehož konvenční podávání je zatíženo mnoha vedlejšími účinky. Pracovali s hydrolyzovanou želatinou, která vykazovala srovnatelnou retenci léčiva v porovnání se sacharosou a laktosou, navíc však měl produkt výborné aerodynamické vlastnosti³⁴. Několik autorů použilo chitosanový obal.

U něj ale většinou docházelo ke změně velikosti lipozomů po sušení³⁵.

5.5.3. Protektanty pro sprejově-mrazové sušení

Ke stabilizaci během lyofilizační fáze procesu se obvykle používají jako protektanty sacharidy jako sacharosa, mannitol, laktosa, dextrosa a maltosa, podobně jako u lyofilizace samotné. Avšak většina těchto sacharidů, které jsou amorfní, přispívá k absorpci vlhkosti lipozomálních suchých prášků a vážně ovlivňuje stabilitu DPI pro plicní podání. Bi a spol. sušili lipozomy s inzulínem, který má vysokou permeabilitu skrz alveolární membránu. Nejlepší ochranu vykazovala sacharosa, vezme-li se v potaz retence léčiva. Ta navíc roste s rostoucím hmotnostním poměrem sacharidu vůči lipidu²⁴. Ye a spol. testovali různé kombinace těchto sacharidů a došli k závěru, že nejlépe kombinuje protekci při lyofilizaci a zároveň proti vlhkosti směs 15 % mannitolu a 5 % sacharosy. Takové přípravky vykazují vysokou enkapsulační efektivitu, úplnou dvojitou vrstvu po rehydrataci, porézní a rovnoměrný povrch částic, dobré aerosolizační vlastnosti a depozici. Enkapsulované antibiotikum klaritromycin se vyhne rychlému jaternímu metabolismu (first-pass effect) a má vyšší účinnost než volné léčivo²³.

5.5.4. Pomocné látky zlepšující vlastnosti aerosolu

Adler a spol. demonstrovali, že přítomnost povrchově aktivní látky ve složení lipozomu může změnit viskozitu rozhraní a tím ovlivňovat tvar kapky během sprejového sušení a tak i tvar výsledné částice³⁶. Vlastností podobné povrchově aktivním látkám jsou v souvislosti s lipozomy přisuzovány aminokyselině leucinu. Tato vlastnost, společně s hydrofobním charakterem, umožňuje jeho rychlou migraci na povrch částic během sušení. Také bylo prokázáno, že dobře interaguje s lipidovými membránami. Má pozitivní vliv na aerosolové vlastnosti prášků, ve výsledku působí jako antiadherent³². Čím vyšší je podle Adlera a spol. poměr povrchově aktivní látky vůči dalším komponentům, tím sférickější a hladší částice vznikají³⁶. Množstvím přidaného leucinu tedy můžeme řídit zvlnění povrchu částic³⁷. Rostoucí podíl leucinu ve složení snižuje velikost agregátů. Při vyšší koncentraci leucinu ale zřejmě dochází k rozdělení aminokyseliny na membránách a k jejich fúzi. Nejúčinněji chrání před změnami velikosti lipozomů přídavek v koncentraci 0,5 % (cit.³²). Bylo také zjištěno, že obohacení leucinem na povrchu částic zpomaluje příjem vody hygroskopických léčiv³⁷. Z dalších aminokyselin je využíván též glycin, případně serin⁸.

Přídavek albuminu do složení mění vzhled částic z hladkých a sférických na extrémně porézní a tvarově houbovitě. Jeho vynecháním vznikají těžší a hustší částice a také je sledován výrazně nižší podíl respirabilní frakce a dávky emitované z dávkovacího zařízení. Albumin pravděpodobně snižuje interpartikulární adhezi, může mít povrchově aktivní vlastnosti a omezovat kontakt částic kvůli povrchovým nerovnostem¹².

6. Závěr

Při terapii plicních onemocnění se ideálně volí strategie přívodu léčiva přímo na místo účinku. Aplikace léčiva uzavřeného do lipozomů může přinést řadu výhod – vyšší stabilita samotného léčiva, snížení nežádoucích účinků nebo možnost řízeného uvolňování. Lipozomy mají podobné složení jako plicní surfaktant, jsou tedy bezpečné pro podání do plic. Z možných typů inhalátorů použitelných k jejich přívodu do cílového orgánu se nabízí nebulizéry tvořící kapalný aerosol z lipozomálních disperzí. Hlavním limitujícím faktorem vodných disperzí je ovšem jejich chemická a fyzikální nestabilita. Lipozomální stěny podléhají strukturálním změnám, dochází k jejich fúzování a ztrátám uzavřeného materiálu. Tento problém může být efektivně řešen převodem disperzí na suchý prášek pomocí určitých technologických procesů, nejčastěji mrazového nebo sprejového sušení. Vdechnuté částice jsou poté na sliznici rehydratovány a lipozomy rekonstituovány.

Během sušících procesů jsou lipozomy vystaveny riziku poškození a ztráty léčiva. Proto se k přípravkům přidávají specifické látky, tzv. protektanty.

Práce vznikla za podpory z projektu IGA VFU Brno č. 302/2019/FaF.

LITERATURA

- Misra A., Jinturkar K., Patel D., Lalani J., Chougule M.: *Expert Opin. Drug Delivery* 6, 71 (2009).
- Willis L., Hayes D., Mansour H. M.: *Lung* 190, 251 (2012).
- Baravalle-Einaudi M., Dufeu N., Dupont C., Vecellio L., Delaisi B., Carsin A., Dubus J.-C.: *Pulm. Pharmacol. Ther.* 44, 57 (2017).
- Dua J. S., Bhandari A. K.: *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 3, 14 (2012).
- Svoboda J., Syslová K., Kačer P.: *Chem. Listy* 110, 909 (2016).
- Patil Y. P., Jadhav S.: *Chem. Phys. Lipids* 177, 8 (2014).
- Arajo Lopes S. C. de, Santos Giuberti C. dos, Ribeiro T. G., Santos Ferreira D. dos, Amaral Leite E., Cristina M., v knize: *Cancer Treatment – Conventional and Innovative Approaches*, str. 89. InTech, Rijeka 2013.
- Huang Z., Li X., Zhang T., Song Y., She Z., Li J., Deng Y.: *Asian J. Pharm. Sci. (Singapore, Singapore)* 9, 176 (2014).
- Chennakesavulu S., Mishra A., Sudheer A., Sowmya C., Suryaprakash Reddy C., Bhargav E.: *Asian J. Pharm. Sci. (Singapore, Singapore)* 13, 91 (2018).
- Taylor K. M., Newton J. M.: *Thorax* 47, 257 (1992).
- Bernhard W.: *Ann. Anat.* 208, 146 (2016).
- Bosquillon C., Lombry C., Préat V., Vanbever R.: *J. Controlled Release* 70, 329 (2001).
- Gandhi M., Pandya T., Gandhi R., Patel S., Mashru R., Misra A., Tandel H.: *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* 496, 886 (2015).

14. Gilbert B. E., Knight C., Alvarez F. G., Waldrep J. C., Rodarte J. R., Knight V., Eschenbacher W. L.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 1789 (1997).
15. Rudokas M., Najlah M., Alhnan M. A., Elhissi A.: *Med. Princ. Pract.* 25, 60 (2016).
16. Mašková L., Ondráčková L., Kozáková J., Kovářová E., Ždímal V.: *Chem. Listy* 112, 446 (2018).
17. Chen C., Han D., Cai C., Tang X.: *J. Controlled Release* 142, 299 (2010).
18. Goldbach P., Brochart H., Stamm A. A.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 19, 2611 (1993).
19. Crowe J. H., Crowe L. M.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 939, 327 (1988).
20. Wessman P., Edward, K., Mahlin D.: *J. Pharm. Sci. (Philadelphia, PA, U. S.)* 99, 2032 (2010).
21. Okáčová L., Vetchý D., Franc. A., Rabišková M., Kratochvíl B.: *Chem. Listy* 104, 21 (2010).
22. Goldbach P., Brochart H., Stamm A.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 19, 2623 (1993).
23. Ye T., Yu J., Luo Q., Wang S., Chan H.-K.: *Powder Technol.* 305, 63 (2017).
24. Bi R., Shao W., Wang Q., Zhang N.: *J. Drug Targeting* 16, 639 (2008).
25. Jovanović N., Bouchard A., Hofland G. W., Witkamp G.-J., Crommelin D. J. A., Jiskoot W.: *Pharm. Res.* 21, 1955 (2004).
26. Sankar Kadimi U., Balasubramanian D. R., Ganni U. R., Balaraman M., Govindarajulu V.: *Nanomedicine (N. Y., NY, U. S.)* 3, 273 (2007).
27. Wang L., Hu X., Shen B., Xie Y., Shen C., Lu Y., Qi J., Yuan H., Wu W.: *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 30, 163 (2015).
28. Constantino H. R., Pikal M. J.: *Lyophilization of biopharmaceuticals*, AAPS Press, Arlington 2004.
29. Sun W. Q., Leopold A. C., Crowe L. M., Crowe J. H.: *Biophys. J.* 70, 1769 (1996).
30. Crowe L. M., Womersley C., Crowe J. H., Reid D., Appel L., Rudolph A.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 861, 131 (1986).
31. Van den Hoven J. M., Metselaa, J. M., Storm G., Beijnen J. H., Nuijen B.: *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* 438, 209 (2012).
32. Chen K.-H., Mueannoorn W., Gaisford S., Kett V. L.: *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 1412 (2012).
33. Lo Y., Tsai J., Kuo J.: *J. Controlled Release* 94, 259 (2004).
34. Chougule M., Padhi B., Misra A.: *AAPS J.* 9, 47 (2008).
35. Altin G., Gültekin-Özgülven M., Ozcelik B.: *J. Food Eng.* 223, 91 (2018).
36. Adler M., Unger M., Lee G.: *Pharm. Res.* 17, 863 (2000).
37. Hoppentocht M., Hagedoorn P., Frijlink H. W., de Boer A. H.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 75, 18 (2014).

H. Hořavová, J. Gajdziok, and D. Vetchý
(*Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*): **Types and Preparation of Liposomal Formulations for Pulmonary Administration**

The use of liposomes as carriers for different types of drugs in formulations to be administered to the lungs brings a number of advantages, including the possibility of controlled release, prolongation of retention at the site of action or reduced systemic exposure. However, the main disadvantage of liposomal suspensions is their physical and chemical instability. Therefore, they are preferably converted to dry powders by several drying technologies. In doing so, it is necessary to include specific excipients in the formulation, in particular protectants (saccharides), protecting liposomes from changes during these processes.

Keywords: liposomes, lung application, spray drying, lyophilization, dry powder formulations, protectants

Acknowledgements

This work was supported by IGA VFU Brno (302/2019/FaF).