

# Parenteralni pripravci produljenog oslobađanja temeljeni na inovativnoj tehnologiji polimernih mikročestica

---

Skelin, Petar

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:295273>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Petar Skelin

Parenteralni pripravci produljenog oslobađanja  
temeljeni na inovativnoj tehnologiji polimernih  
mikročestica

DIPLOMSKI RAD

Predan Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasmine Lovrić.

*Zahvaljujem mentorici dr. sc. Jasmini Lovrić na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.*

## SADRŽAJ

1. Uvod .....	2
1.1. Inovativna tehnologija polimernih mikročestica.....	2
1.2. Prednosti parenteralne primjene polimernih mikročestica .....	3
1.3. Intramuskularna i supkutana primjena polimernih mikročestica .....	3
1.4. Odobreni pripravci koji se temelje na inovativnoj tehnologiji polimernih mikročestica .....	7
2. Obrazloženje teme .....	13
3. Materijali i metode .....	14
4. Rezultati i rasprava .....	15
4.1. Metode pripreme polimernih mikročestica .....	15
4.2. PLGA kao polimer izbora u izradi polimernih mikročestica za parenteralnu primjenu.....	22
4.3. . Ispitivanje oslobađanje djelatne tvari iz polimernih mikročestica.....	29
4.3.1. Mehanizmi oslobađanja .....	30
4.4. Postupci kontrole kakvoće gotovih pripravaka polimernih mikročestica za parenteralnu primjenu.....	32
5. Zaključak .....	36
6. Literatura .....	38
7. Sažetak/Summary .....	41
8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentacion card .....	42

# 1. UVOD

## 1.1. Inovativna tehnologija polimernih mikročestica

Ljekoviti oblici s kontroliranim oslobađanjem djelatne tvari omogućuju isporuku djelatne tvari u pravilnoj dozi, željenom vremenu i potrebnom trajanju, optimirajući učinkovitost i sigurnost liječenja. Zbog svoje neinvazivnosti i jednostavnosti primjene, oralna prijemna lijekova je najzastupljenija i najbolje prihvaćena kod bolesnika. Međutim, u mnogo slučajeva takav način nije primjenljiv kako zbog specifičnosti djelatne tvari tako i zbog stanja bolesnika. Parenteralna primjena je, primjerice, pogodnija za djelatne tvari koje se razgrađuju u probavnom sustavu kao što su proteinski i peptidni lijekovi. Također prolaskom kroz jetru koncentracija određenih djelatnih tvari može se značajno smanjiti zbog metabolizma u samoj jetri. U tim slučajevima parenteralnom primjenom povećava se bioraspoloživost lijeka u odnosu na oralnu primjenu, smanjuje se izloženost lijeku te izbjegava varijabilnost uslijed razlika u apsorpciji lijeka iz probavnog sustava. Kao i kod oralne primjene, višekratna primjena klasičnog parenteralnog pripravaka rezultira fluktuacijom koncentracije lijeka u krvi između doziranja što povećava vjerojatnost pojave toksičnog učinka lijeka ili neučinkovitosti liječenja. Klinički značajna fluktuacija koncentracije lijeka u krvi može se izbjeći parenteralnom primjenom inovativnih oblika s kontroliranim oslobađanjem. Kontrolirajući brzinu oslobađanja lijeka omogućuju održavanje koncentracije lijeka u krvi unutar terapijske širine kroz dulje vrijeme u odnosu na parenteralnu primjenu klasičnih ljekovitih oblika. U idealnom slučaju, profil ovisnosti koncentracije lijeka o vremenu nakon parenteralne primjene inovativnih oblika s kontroliranim oslobađanjem izjednačava se s profilom karakterističnim za intravensku infuziju. Produljeno održavanje koncentracije lijeka u krvi unutar terapijske širine smanjuje učestalost doziranja i približava ovaj način primjene lijeka bolesnicima usprkos invazivnosti parenteralne primjene (Tracy i sur., 1999).

Jedan od inovativnih terapijskih sustava s mogućnošću kontroliranja oslobađanja djelatne tvari su polimerne mikročestice. Opsežna istraživanja koja su rezultirala brojnim metodama pripreme uz sve veći izbor polimernih materijala usmjerila su razvoj tehnologije mikročestica prema gotovim lijekovima s velikim translacijskim i komercijalnim potencijalom. Brzinu oslobađanja djelatne tvari možemo prilagoditi sljedećim načinima: odabirom optimalnog polimernog nosača, masenog omjera djelatne tvari i polimera te metodama pripreme mikročestica. Također tim postupcima možemo osigurati produljeni učinak primijenjenog lijeka od nekoliko dana do više tjedana, pa i mjeseci. Lijek se uklapa u spremišne (mikrokapsule) i matriksne (mikrosfere) sustave. Metode pripreme takvih sustava su sušenje

raspršivanjem, koacervacija, uklanjanje otapala iz emulzijskih sustava, fluidizacija (Wurster) te ekstruzija i sferonizacija. Najčešći polimer izbora je kopolimer mliječne i glikolne kiseline (engl. *polylactide-co-glycolide*, PLGA) (Steven i sur., 2014).

## **1.2. Prednosti parenteralne primjene polimernih mikročestica**

Brojne su prednosti ove tehnologije za pacijenta: smanjena učestalost doziranja i javljanja nuspojava te poboljšani terapijski ishodi. Rjeđe doziranje poboljšava suradljivost bolesnika posebice jer je parenteralna primjena invazivna. Također brojne su prednosti i za zdravstveni sustav: uslijed produljenog oslobađanja/učinka lijeka rjeđa je primjena i pojednostavljen je postupak liječenja, racionalizira se opterećenje zdravstvenih djelatnika te troškovi liječenja što rezultira poboljšanjem kvalitete zdravstvenih usluga općenito. Brojne koristi ima i farmaceutska industrija: poboljšanje iskoristivosti skupih (bio)farmaceutika kroz povećanje topljivosti/stabilnosti, osiguranje učinkovitosti manjih doza, kontrolirano oslobađanje te poboljšanje farmakokinetičkog profila. Jako je bitno naglasiti primjenjivost ove inovativne tehnologije u svrhu preoblikovanja (preformuliranja) postojećih gotovih lijekova radi unaprijeđenja njihove kvalitete, produljenja vijeka i/ili ponovnog uvođenja na tržište. Proces proizvodnje mikročestica je složen, više stupanjski proces koji se mora provoditi u aseptičkim uvjetima na specifičnoj opremi i postrojenjima. Registracija i odobravanje tih proizvoda zahtijeva bazična, preklinička i klinička istraživanja te ispitivanja sigurnosti koje traju više godina. Zato su razvojni programi za složene i napredne terapijske sustave dugotrajni, skupi i zahtjevaju posebnu posvećenost (Steven i sur., 2014).

## **1.3. Intramuskularna i supkutana primjena polimernih mikročestica**

Parenteralna primjena polimernih mikročestica uključuje njihovu intramuskularnu i supkutanu primjenu. Na mjestu primjene nastaje depo lijeka, a apsorpcija lijeka s mjesta primjene u sistemske cirkulacije ovisi o brzini oslobađanja lijeka iz polimernih mikročestica.

### *Intramuskularna primjena*

Pod intramuskularnom primjenom podrazumijevamo injekciju dozirnog oblika u mišić, odakle je djelatna tvar apsorbirana u sistemske cirkulacije. Mišićna vlakna obavija endomizij (rahlo vezivno tkivo) u kojem se nalaze kapilare. Kapilare se većinom pružaju longitudinalno

s mišićnim vlaknima, ali i stvaraju i velik broj unakrsnih veza. Vlakna se udružuju u snopice koji su isto obavijeni vezivom, kojeg čini neformirano vezivno tkivo, a zove se perimizij u kojem se nalaze krvne žile. A oko cijelog mišića je isto sloj vezivnog tkiva, epimizij koji je povezan s ovojnicom od formiranog vezivnog tkiva, fascijom. Mišićno tkivo je izuzetno dobro prokrvljeno. Periferna mjesta primjene su gluteus, deltoid, triceps te kvadriceps (najčešće vastus lateralis i rectus femoris). Deltoidni mišić je odličan izbor zbog velikog stupnja perfuzije u odnosu na ostale mišiće. Vastus lateralis je još bolji izbor zbog toga što kroz njega prolazi manje glavnih žila u koje možemo slučajno injektirati ljekoviti oblik. Važno je napomenuti da injektiranje oštećuje tkivo, pogotovo ako će formulacija ostati duže vrijeme u tijelu (Han i sur., 2010).

Najznačajnija prednost intramuskularne primjene je lakoća s kojom se širok raspon djelatnih tvari može primijeniti u različitim oblicima (vodene otopine, uljne otopine te suspenzije djelatne tvari, polimerne mikročestice s uklopljnom djelatnom tvari, implantati) te mogućnost relativno brze apsorpcije, ali i produljenog učinaka odnosno liječenja ovisno o brzini oslobađanja lijeka iz primjenjenog pripravka. Djelatna tvar iz ljekovitog oblika oslobađa se u međustaničnu tekućinu te apsorbira u krv i limfu, a zatim transportira iz lokalnog krvotoka u sistemsku cirkulaciju. Koncentracija djelatne tvari i kinetički profil su određeni relativnim brzinama tih procesa (Guse i sur.,2006). Treba naglasiti da je kapilarna membrana jako permeabilna te stoga ona nije ograničavajući faktor, ali perfuzija mišića krvlju može biti značajno sporija. Moramo razlikovati dva zasebna ograničavajuća čimbenika:

i) primjena vodene otopine djelatne tvari – u tom slučaju djelatna tvar je odmah dostupna u međustaničnoj tekućini te se brzo apsorbira u kapilare. Ograničavajući čimbenik je perfuzija mišića krvlju. Bilo koji čimbenik koji utječe na perfuziju mišića krvlju (kao što je primjerice tjelovježba) će promijeniti stupanj apsorpcije. Ako dođe do srčanog zatajenja apsorpcija će biti vrlo mala budući da će mišićna perfuzija biti mala. Zbog tog razloga intramuskularna primjena lijeka je kontraindicirana ako je srčana funkcija slaba.

ii) primjena pripravaka s produljenim oslobađanjem (primjerice suspenzije kristala djelatne tvari ili mikročestica s uklopljenom djelatnom tvari) – u tom slučaju oslobađanje iz formulacije je sporije nego apsorpcija ili perfuzija i stoga ovdje učinak mišićne perfuzije nije vidljiv. Pod ovim uvjetima koncentracija djelatne tvari u plazmi ostaje otprilike stalna sve dok se ne iscrpi sva količina djelatne tvari. To je period koji može trajati od nekoliko sati do nekoliko mjeseci ovisno o pripravku produljenog oslobađanja.

Budući da se formulacija ne treba miješati s vodom moguće je injektirati mnogo veći raspon materijala nego onih koji se mogu primjeniti intravenski. Moguće formulacije uključuju vodene otopine, vodene suspenzije, U/V emulzije, V/U emulzije, uljne suspenzije, suspenzije polimernih mikročestica i polimerni implantati. Prethodno navedeni oblici su poredani po stupnju oslobađanja djelatne tvari. Vodene otopine mogu biti apsorbirane u minuti dok polimerne mikročestice i implantati mogu oslobađati djelatnu tvar danima, tjednima ili čak mjesecima. Mnoštvo drugih čimbenika također može utjecati na stupanj apsorpcije. Ako je djelatna tvar iznimno hidrofobna slabo će se otopiti u međustaničnoj tekućini. Nadalje ako je djelatna tvar ionizirana ili vrlo dobro topljiva u vodi neće biti u mogućnosti proći kroz kapilarnu membranu (Sophocleous i sur., 1997). Djelatne tvari koje su snažno vezane za proteine će također biti polako apsorbirane. Djelatna tvar primijenjena kao vodenoj otopini se također može apsorbirati sporo, ako nastupi promjena nekog od fizičko-kemijskih svojstava djelatne tvari po primjeni. Npr. fenitoin je formuliran pri pH 12 zbog svoje niske topljivosti. Kada djelatna tvar dođe u kontakt s međustaničnom tekućinom brzo se smanjuje pH na fiziološku razinu i djelatna tvar se istaloži jer nije topljiva pri tim uvjetima. Kao rezultat toga može biti potrebno nekoliko dana da se doza potpuno apsorbira (Song i sur., 1997).

#### *Supkutana primjena*

Subkutana injekcija se primjenjuje u vezivno tkivo ispod dermisa i treba ju razlikovati od intradermalne injekcije koja se primjenjuje u intradermalni sloj, često između dermisa i epidermisa. To je ključna razlika zato što supkutano tkivo ima značajan volumen međustanične tekućine u kojoj djelatna tvar može difundirati, dok epidermis ima relativno malo slobodne tekućine i nije dobro prokrvljen. Kao rezultat intradermalne primjene djelatna tvar je postojana na mjestu primjene dulje vrijeme te je dostupni volumen za injektiranje jako malen. Taj put primjene koristi se za neka cjepiva. Djelatna tvar primijenjena supkutano se otapa u međustaničnoj tekućini te dospijeva u krvotok dvama putevima, direktno preko krvnih kapilara ili apsorpcijom preko limfnih kapilara. Oba puta apsorpcije su relativno spora i ovise o lokalnim krvnim žilama, stoga apsorpcija nakon subkutane primjene lijeka može biti spora i nepredvidiva. To pruža efekt produljenog oslobađanja, ali nije baš povoljno dizajnirati ljekoviti oblik na ovaj način zbog nepredvidive farmakokinetike (Sun i sur., 2008). Bolji način je osmisliti ljekoviti oblik s ograničenom brzinom oslobađanja tako da biološke varijacije onda imaju malo utjecaja na farmakokinetiku djelatne tvari. Velik broj ljekovitih oblika je osmišljen da funkcionira na taj način, a uz polimerne mikročestice o čijoj će supkutanoj primjeni uskoro biti govora, vjerojatno je najpoznatiji lijek Zoladex (Astra Zeneca) koji



oslobađa hormon goserelin, sintetski analog gonadotropin-otpuštajućeg hormona koje se koristi u liječenju tumora ovisnih o androgenima. Hormon je dispergiran u matriksu biorazgradivog polimera oblikovanog u štapić dužine oko 5 mm, a koji se implantira supkutano u područje prednjeg trbušnog zida. Lijek se primjenjuje svaka četiri tjedna. Tehnologija ovog tipa je osobito pogodna za peptidne hormone kod kojih je doza mala te veličina ljeovitog oblika može biti minimalizirana (Vila i sur., 2004).

#### *Oštećenje tkiva i biokompatibilnost*

Prilikom bilo kojeg injiciranja lijeka putem hipodermičke igle dolazi do određenog oštećenja okolnog tkiva. U slučaju intravenske injekcije to ima jako malo utjecaja na apsorpciju djelatne tvari, ali u slučaju intramuskularne i supkutane primjene djelatna tvar je inherentno prisutna na ozljeđenom mjestu. Reakcija će ovisiti o sastavu formulacije, a može ovisiti i o veličini mikročestica. Male izolirane čestice manje od 10  $\mu\text{m}$  će fagocitirati makrofagi bez pojavljivanja ikakve značajne reakcije, ali prisutnost većih čestica pri primjeni pripravaka koji se temelje na polimernim mikročesticama može rezultirati nakupljanjem makrofaga i velikih stanica na mjestu primjene. To uzrokuje upalu, a potom i nastanak granuloznog tkiva. Na kraju će vlaknasta ovojnica od fibroblasta i kolagena okružiti ljeoviti oblik (Cui i sur., 2007). Posljedice ovih promjena prilikom primjene se nisu opsežno istraživale, ali se trenutno misli da ovi procesi rade malu razliku u oslobađanju djelatne tvari i apsorpciji osim ako reakcija nije ozbiljna.

## 1.4. Odobreni pripravci koji se temelje na inovativnoj tehnologiji polimernih mikročestica

Dosad je odobreno desetak pripravaka temeljenih na mikročesticama za parenteralnu primjenu koji su ostvarili zapažen terapijski i komercijalni uspjeh (tablica 1).

Tablica 1. Popis odobrenih pripravaka temeljenih na inovativnoj tehnologiji mikročestica.

Djelatna tvar	Zaštićeno ime lijeka	Proizvođač	Indikacija
Risperidon	Risperdal <sup>®</sup> Consta <sup>®</sup>	Janssen <sup>®</sup> /Alkermes	Shizofrenija
Naltrekson	Vivitrol <sup>®</sup>	Alkermes	Ovisnost o alkoholu opijanima
Eksenatid	Bydureon	Bristol-Myers- Squibb/AstraZeneca EEIG	Diabetes mellitus tip 2
Leuprolid	Lupron Depot <sup>®</sup> ,	TAP	Karcinom prostate/endometrijoza
	Enantone Depot <sup>®</sup>	Takeda	
	Trenantone <sup>®</sup>	Takeda	
	Enantone Gyn	Takeda	
Oktreotid	Sandostatin <sup>®</sup> LAR <sup>®</sup>	Novartis	Akromegalija
Triptorelin	Trelstar <sup>™</sup> depot	Pfizer	Karcinom prostate
	Decapeptyl <sup>®</sup> SR	Ferring	
Busirelin	Suprecur <sup>®</sup> MP	Sanofi-Aventis	Endometrijoza
Lanreotid	Somatuline <sup>®</sup> LA	Ipsen-Beaforce	Akromegalija
Bromokriptin	Parlodel LAR <sup>™</sup>	Novartis	Parkinsonizam
Minociklin	Arestin <sup>®</sup>	Orapharma	Periodontitis

### Lupron Depo<sup>®</sup>

Prvi odobreni pripravak za parenteralnu primjenu temeljen na PLGA mikročesticama je lijek Lupron Depo<sup>®</sup>. Odobren je u SAD-u 1989. godine. Djelatna tvar je leuprorelinacetat, sintetski, nonapeptidni analog prirodnog gonadotropin oslobađajućeg hormona (GnRH), koji djeluje snažnije od prirodnog hormona. Lijek se primjenjuje u nekoliko indikacija odnosno u liječenju metastatskog raka prostate, lokalno uznapredovalog raka prostate, kao

zamjena za kiruršku kastraciju, kao adjuvantno liječenje uz radioterapiju u bolesnika s visokorizičnim lokaliziranim ili lokalno uznapredovalim rakom prostate, kao adjuvantno liječenje uz radikalnu prostatektomiju u bolesnika s lokalno uznapredovalim rakom prostate s visokim rizikom od progresije bolesti, liječenje endometrioze, uključujući liječenje boli i smanjenje endometriotičkih žarišta, liječenje raka dojke kod premenopauzalnih i perimenopauzalnih žena kod kojih je indicirana hormonska terapija. Doze lijeka se razlikuju ovisno o indikaciji. Uklapanjem lijeka u PLGA mikročestice omogućena je primjena lijeka jedanput mjesečno do jedanput u 6 mjeseci ovisno o dozi. Lijek se primjenjuje supkutano ili intramuskularno.

### Rispoplet® Consta®

Djelatna tvar risperidon uklopljena je u PLGA mikročestice, a lijek je indiciran za terapiju održavanja u liječenju shizofrenije kod bolesnika koji su trenutno stabilizirani oralnim antipsihotikom. Risperidon je selektivni monoaminergički antagonist jedinstvenih svojstava. Posjeduje visoki afinitet za serotoninergičke 5-HT<sub>2</sub> i dopaminergičke D<sub>2</sub> receptore. Risperidon se također veže na alfa<sub>1</sub>-adrenergičke receptore, i, manjim afinitetom, na H<sub>1</sub>-histaminergičke i alfa<sub>2</sub>-adrenergične receptore. Risperidon nema afinitet prema kolinergičkim receptorima. Iako je risperidon potentan D<sub>2</sub> antagonist uslijed čega se smatra da povoljno djeluje na pozitivne simptome shizofrenije, on u manjoj mjeri utječe na smanjenje motoričke aktivnosti i nastanak katalepsije nego klasični antipsihotici. Zbog uravnoteženog središnjeg antagonizma serotonina i dopamina može se smanjiti vjerojatnost ekstrapiramidalnih nuspojava te proširiti terapijsko djelovanje na negativne i afektivne simptome shizofrenije.

Osim kao depo pripravak risperidon je odobren u obliku oralne topine, filmom obloženih tableta te raspadljivih filmova i tableta za usta, no, oralna primjena kod psihičkih bolesnika često je otežana zbog nesuradljivosti što utječe na učinkovitost liječenja. Rispolept® Consta® učinkovitiji je u terapiji održavanja u liječenju shizofrenije u usporedbi s klasičnim oralnim pripravcima (Steven i sur., 20104).

Farmaceutski oblik je prašak i otapalo za suspenziju za injekciju s produljenim oslobađanjem za primjenu u mišić. Rispolept Consta injicira zdravstveni djelatnik, putem injekcije u mišić ruke ili stražnjice, svaka dva tjedna. Injekciju treba primjenjivati naizmjenično u lijevu i desnu stranu. Injekcija se ne smije dati intravenski. Početna doza ovisi o oralnoj dozi. Ako je tijekom zadnja dva tjedna dnevna doza oralnog (npr. tablete) risperidona bila 4 mg ili manje, trebalo bi početi liječenje s 25 mg. Ako je tijekom zadnja dva tjedna dnevna doza oralnog

(npr. tablete) risperidona bila više od 4 mg, kao početnu dozu možete dobiti 37.5 mg. Doza održavanja-uobičajeno je to injekcija od 25 mg svaka dva tjedna. Može biti potrebna i viša doza od 37,5 mg ili od 50 mg. Cijelo pakiranje lijeka treba se čuvati sa svim komponentama u hladnjaku (2-8°C). Ukoliko hladnjak nije dostupan, pakiranje se može čuvati na sobnoj temperaturi (ispod 25°C), najviše 7 dana prije primjene. Jedno pakiranje Rispoplet Consta® sadrži:

- jednu malu bočicu koja sadrži prašak za suspenziju za injekciju s produljenim oslobađanjem (prašak sadrži mikročestice s djelatnom tvari, risperidonom). Jednu štrcaljku koja sadrži 2 ml prozirne, bezbojne tekućine koja se dodaje u prašak za suspenziju za injekciju s produljenim oslobađanjem.

- jednu Alaris™ SmartSite Needle-Free Vial Access napravu za rekonstituciju suspenzije

- dvije igle za intramuskularnu primjenu lijeka (21 G TW 1 inčnu (0,8 mm x 25 mm) sigurnosnu iglu s Needle Pro zaštitnim uređajem za deltoidnu primjenu i 20 G TW 2 inčnu (0,9 mm x 50 mm) sigurnosnu iglu s Needle Pro zaštitnim uređajem za glutealnu primjenu) ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr))

Prilikom primjene treba snažno protresati bočicu tijekom najmanje 10 sekundi dok ne dobijemo homogenu suspenziju. Miješanje je završeno kada suspenzija postane jednolična, gusta i mliječno bijele boje. Mikrosfere će biti vidljive u otopini, ali suhe mikrosfere ne smiju zaostati. Prije same primjene lijeka resuspendiranje će biti neophodno jer može doći do taloženja nakon nekog vremena od pripreme lijeka. Treba protresti štrcaljku energično da se mikrosfere mogu resuspendirati.

Apsorpcija risperidona je potpuna. Nakon jednokratne intramuskularne injekcije profil oslobađanja sastoji se od malog inicijalnog oslobađanja lijeka (<1% doze lijeka), nakon čega slijedi razmak od 3 tjedna u kojem se lijek ne oslobađa ("lag" faza). Glavno oslobađanje risperidona započinje od 3. tjedna nakon intramuskularne injekcije te se zadržava od 4 do 6 tjedna i potom opada do 7. tjedna. Stoga se tijekom prva tri tjedna od prve primjene primjenjuje dodatna oralna antipsihotička terapija. Kombinacija profila oslobađanja lijeka i načina doziranja (i.m. injekcija svaka 2 tjedna) rezultira održavanjem stabilne terapijske koncentracija lijeka u plazmi. Polimerni matriks mikročestica bubri u kontaktu s vodom čime započinje proces oslobađanja lijeka s površine ili u blizini površine mikročestica procesom difuzije. U izdubrenom matriksu tijekom vremena dolazi i do erozije polimera što omogućuje produljeno oslobađanje lijeka gotovo konstantnom brzinom. Takav profil oslobađanja lijeka

rezultira održavanjem koncentracije lijeka u krvi unutar terapijske širine uz smanjenu fluktuaciju. Monomeri mliječne i glikolne kiseline nastali erozijom polimera metaboliziraju se i eliminiraju u obliku ugljičnog dioksida i vode.

Terapijska koncentracija lijeka u plazmi zadržava se do 4 - 6 tjedana nakon posljednje primjene injekcije lijeka. Nakon ponovljene intramuskularne injekcije od 25 mg ili 50 mg svaka dva tjedna, medijan najniže i vršne koncentracije u plazmi djelatne frakcije s antipsihotičnim učinkom kretao se između 9,9 - 19,2 ng/ml i 17,9 – 45,5 ng/ml. Nije primijećeno nakupljanje risperidona tijekom dugotrajne primjene (12 mjeseci) kod bolesnika kod kojih je primijenjena injekcija s 25 mg do 50 mg lijeka svaka 2 tjedna ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr))

### Vivitrol®

Zanimljiv primjer odobrenog lijeka s dodanom vrijednošću temeljenog na inovativnoj tehnologiji polimernih mikročestica je i pripravak naltreksona Vivitrol® (Alkermes). Naltrekson, specifični opioidni antagonist s minimalnim agonističkim djelovanjem, koristi se u liječenju ovisnosti o alkoholu i o opioidima. Za oralnu primjenu naltreksona odobrene su filmom obložene tablete. No, više od 98% oralno primijenjenog lijeka metabolizira se prvim prolaskom kroz jetru te samo mali dio primijenjene doze dospije u mozak. Naltrekson se u pravilu oralno dozira jednom dnevno. Oralna primjena naltreksona rezultira fluktuirajućim profilom ovisnosti koncentracije lijeka u krvi o vremenu; vršna koncentracija naltreksona postiže se unutar jednog sata nakon doziranja, a uslijed brze eliminacije, koncentracija lijeka unutar intervala doziranja spušta se i ispod minimalne učinkovite koncentracije.

Razvoj parenteralnih pripravaka naltreksona s produljenim oslobađanjem/učinkom rezultirao je povećanom bioraspoloživošću lijeka i boljom učinkovitošću liječenja te predstavlja rješenje problema opsežnog metaboliziranja naltreksona prvim prolaskom kroz jetru karakterističnog za oralnu primjenu lijeka kao i problem nesuradljivosti bolesnika. Parenteralni pripravci naltreksona s produljenim oslobađanjem/učinkom omogućavaju održavanje terapijske koncentracije lijeka u krvi kroz dulje vrijeme, izbjegavajući fluktuacije. Trenutno je u SAD-u kao parenteralni pripravak naltreksona s produljenim oslobađanjem registriran Vivitrol® (Alkermes), pripravak temeljen na tehnologiji mikročestica (Medisorb®, Alkermes). Mikročestice veličine od oko 100 µm pripravljene su iz PLGA kopolimera. Primjenjuju se intramuskularno, nakon suspendiranja u vodenom mediju. Nakon primjene Vivitrola naltrekson se oslobađa iz mikročestica u više faza kombinacijom procesa difuzije i erozije polimera.

## Bydureon<sup>®</sup>

Eksenatid je indiciran u liječenju šećerne bolesti tipa 2 u kombinaciji s oralnim antidijabeticima. Pripravak produljenog oslobađanja kod kojeg je esenatid uklopljen u PLGA mikročestice, Bydureon<sup>®</sup>, primjenjuje se jednom tjedno za razliku od prethodnog ljekovitog oblika eksenatida (Byetta<sup>®</sup>, otopina za injekciju u napunjenoj štrcaljki) koji se primjenjuje supkutano dva puta dnevno.

Ključnu točku u povijesti liječenja dijabetesa temeljenom na inkretinu bilo je otkriće eksenidna-4, prirodnog peptidnog hormona izolirang iz sline otrovnog bradavičara. Eksenidin-4 ima 53% sekvencijske homologije sa peptidom-1 nalik glukagonu (engl. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1). Ima duže vrijeme poluživota jer je otporan na proteolizu DPP-4 te je potentniji od prirodnog GLP-1. Glicinski ostatak na drugom položaju u primarnom slijedu aminokiselina je odgovoran za rezistentnost na DPP-4. Eksenatid je sintetički analog eksenidina-4 i homolog GLP-1 te djeluje kao agonist receptora GLP-1.

Lijek Byetta<sup>®</sup>, otopina eksenatida, na tržištu je od 2005. godine te se primjenjuje dva puta dnevno, supkutano, pomoću brizgalice u dozi od 5 ili 10 µg. Byetta se primjenjuje kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim oralnim pripravcima za sniženje glukoze ili inzulinom glarginom. Bydureon<sup>®</sup>, pripravak eksenatida s produljenim oslobađanjem, jedini je oblik agonista receptora GLP-1 s kontroliranim oslobađanjem na tržištu. Uklapanje eksenatida u PLGA mikročestice rezultira odgovarajućim profilom oslobađanja što omogućuje doziranje jednom tjedno. Studije koje su uspoređivale Bydureon<sup>®</sup> (2 mg jedanput tjedno) te lijek Byetta<sup>®</sup> (10 µg, dvaput dnevno) su pokazale veće smanjenje glikiranog hemoglobina (HbA1c), nižu razinu glukoze u plazmi te slično smanjenje tjelesne mase s manje gastrointestinalnih nuspojava. Provedeno je randomizirano kliničko ispitivanje radi istraživanja sigurnosti i učinkovitosti prilikom petogodišnje primjene Bydureona u dijabetesu tipa 2. Bydureon<sup>®</sup> se generalno jako dobro podnosi s kontinuiranim poboljšanjem glikemijske kontrole, gubitka težine, kao i smanjenjem pokazatelja kardiovaskularnih rizika. Lijek je u početku bio dostupan samo u obliku praška koji se neposredno prije primjene miješao s otapalom. To je bilo komplicirano za pacijente koji su jednom tjedno morali sami primijeniti lijek. AstraZeneca je razvila i dobila od FDA odobrenje za brizgalicu koja je već napunjena ljekovitim oblikom. Takvi ljekoviti oblici bi trebali omogućiti širu primjenu djelatnih tvari koje su manje stabilne te olakšati samoprimjenu lijekova.

Farmaceutski oblik je prašak i otapalo za suspenziju za injekciju s produljenim oslobađanjem. Odmah nakon suspenzije praška u otapalu doza se mora primijeniti supkutanom injekcijom u područje abdomena. Lijek se ne smije primjenjivati intramuskularnom ili intravenskom injekcijom. Primjenom ovog lijeka zabilježene su reakcije na mjestu injekcije u usporedbi s bolesnicima koji su primali usporedni lijek (16% napsram raspona od 2-7%) tijekom 6 mjesečne kontrolirane faze ispitivanja. Reakcije su većinom bile blage te nije došlo do prekida sudjelovanja u ispitivanju. Simptome se mogu ublažiti te nastaviti dalje s liječenjem. Mjesto primjene injekcije treba mijenjati svaki tjedan. Postoje i prijavljeni slučajevi s apscesima i celulitismom na mjestu primjene. Većina čvorića nije pokazivala nikakve simptome te su se povukli kroz 4-8 tjedana. Svojstva apsorpcije eksenatida odražavaju svojstva formulacije s produljenim oslobađanjem. Nakon što se oblik eksenatida s produljenim oslobađanjem primjeni u tjednoj dozi od 2 mg, u 2 tjedna srednja vrijednost koncentracije eksenatida premašila je najniže djelotvorne koncentracije (50 pg/ml). Prosječna koncentracija eksenatida u plazmi se dalje postupno povećavala tijekom 6-7 tjedana. Nakon toga se koncentracija eksenatida održava na 300 pg/ml jer je postignuto stanje dinamičke ravnoteže. Tijekom jednog tjedna, odnosno intervala između dviju doza, održava se stanje dinamičke ravnoteže. Fluktuacije najniže i najviše doze su minimalne u usporedbi sa prosječnom terapijskom koncentracijom. Pripravak se čuva u hladnjaku pri temperaturi od 2 do 8°C. Ako je kojim slučajem neki set lijeka bio zamrznut mora se baciti. Prije nego što pacijent prvi put primjeni lijek liječnik ili medicinska sestra moraju informirati pacijenta o načinu primjene. Na samom početku treba se provjeriti da li je tekućina prozirna i bez čestica. Nakon miješanja tekućine i praška suspenziju se može upotrijebiti samo ako je bijele do bjelkaste boje i mutna. Lijek nije dobro promiješan, ako se na stijenkama brizgalice pojave nakupine suhog praška što znači da treba brizgalicom snažno lupati od dlan dok se lijek skroz ne promiješa. Lijek se mora odmah injicirati nakon miješanja praška i otapala. Za svaku injekciju se mora upotrijebiti nova igla, a upotrebljena igla mora se sigurno zbrinuti ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Polimerne mikročestice su nova rastuća klasa formulacija. Omogućuju produljeno oslobađanje djelatne tvari kroz dulje vrijeme. Imaju brojne prednosti za pacijenta, zdravstveni sustav te farmaceutsku industriju u usporedbi s drugim pripravcima. Ovi pripravci su posebno pogodni onda kad oralna primjena nije moguća te kod bolesnika koji nisu u stanju uzimati terapiju. Treba napomenuti da skraćuju vrijeme hospitalizacije i broj dolazaka u bolnicu. Prilikom terapije glavni cilj je smanjiti fluktuacije koncentracije lijeka u plazmi te održati koncentraciju stalnom kroz dulje vremensko razdoblje. Njihova proizvodnja je jako složen i skup proces koji zahtijeva stalna ulaganja. Velik broj pripravaka koji se razvijaju nikad ne doživi primjenu iako prođu pretklinička istraživanja što znači gubitak uloženi sredstava koja su jako velika. Trenutno se provode opsežna istraživanja na različitim polimerima koji moraju biti biokompatibilni i biorazgradljivi. Važno je naglasiti da se ova tehnologija koristi u reformuliranju postojećih pripravaka koji imaju drugačiji put primjene. U ovom radu se raspravlja o metodama pripreme parenteralnih mikročestica te o uvjetima proizvodnje koji su jako zahtjevni i specifični.

Cilj ovog rada je prikazati značaj inovativne tehnologije polimernih mikročestica, ukazati na njihove prednosti i nedostatke te naglasiti da je to novi način liječenja koji će u budućnosti zasigurno imati mnogo širu primjenu.



### 3. MATERIJALI I METODE

U ovom teorijskom diplomskom radu korištena je stručna i znanstvena literatura na temu inovativne tehnologije polimernih mikročestica. Korišteni su znanstveni i stručni članci koji su usko vezani za ovu temu kao i udžbenici iz oblikovanja lijekova, farmaceutike, farmakologije, farmakoterapije. Također su pretraživane mrežne stranice Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) i Europske agencije za lijekove (EMA).

Pretraživanje znanstvenih i stručnih članaka u bibliografskim bazama se radilo prema ključnim riječima: biorazgradljive mikročestice, kontrolirano oslobađanje, produljeno oslobađanje, pripravci produljenog oslobađanja za parenteralnu primjenu, PLGA kopolimer.

Odabrana su tri znanstvena rada koji čine okosnicu ovog diplomskog rada. To su:

1. Mingli Ye, Sungwon Kim, Kinam Park, Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles, *Journal of Controlled Release* 146 (2010) 241–260
2. Steven P. Schwendeman, Ronak B. Shah, Brittany A. Bailey, Anna S. Schwendeman, Injectable controlled release depots for large molecules, *Journal of Controlled Release* 190 (2014) 240–253
3. Rajesh Kumar, Michael J. Palmieri Jr, Points to Consider when Establishing Drug Product Specifications for Parenteral Microspheres, *The AAPS Journal*, 12 (2010), 27–32

Dijelovi ovih znanstvenih radova su prevedeni i sastavni dio su ovog diplomskog rada.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Odobreni pripravci za parenteralnu primjenu temeljeni na tehnologiji mikročestica su pripravci malih molekula (risperidon, naltrekson) i peptida (leuprolid, eksenatid, oktreatid, triptorelin, buserelin, lanreotid i goserelin; tablica 1). U tijeku su i brojna preklinička i klinička ispitivanja primjenjivosti inovativne tehnologije mikročestica u razvoju pripravaka drugih peptida i proteina kao što su inzulin, različiti faktori rasta, interferon, lizozim, eritropoetin. Uz lijekove peptidne i proteinske strukture, inovativna tehnologija mikročestice prikladna je i za razvoj parenteralnih pripravaka za primjenu nukleinskih kiselina.

Odobreni lijekovi koji se temelje na naprednoj tehnologiji polimernih mikročestica duguju svoj uspjeh temeljitim znanstvenim istraživanjima i razumijevanju fizičko-kemijskih svojstava mikročestica, njihove izrade i mehanizama djelovanja u biološkom okruženju. Proces proizvodnje mikročestica je složen, višestupanjski proces koji se mora provoditi u sterilnim uvjetima na specifičnoj opremi i postrojenjima. Registracija i odobravanje tih proizvoda zahtijeva bazična, preklinička i klinička istraživanja te ispitivanja sigurnosti koje traju više godina. Zato su razvojni programi za složene i napredne terapijske sustave dugotrajni, skupi i zahtijevaju posebnu posvećenost.

### **4.1. Metode pripreme polimernih mikročestica**

Mikročestice se pripravlja koristeći biokompatibilne i biorazgradljive polimere kao što su polimer mliječne kiseline (engl. polylactic acid, PLA) polimer glikolne kiseline (polyglycolic acid, PGA) i, najčešće, kopolimer mliječne i glikolne kiseline (PLGA). Cilj pripreme mikročestica je osigurati visoku uspješnost uklapanja, kapacitet uklapanja (sadržaj lijeka) te produljeno oslobađanje djelatne tvari uz zadržanu bioaktivnost (posebno važno za proteinske djelatne tvari). Uspješnost uklapanja definira se kao omjer mase uklopljene djelatne tvari i mase djelatne tvari korištene u pripravi mikročestica izražen u postotku, a opisuje koliki udio početne djelatne tvari je prisutan unutar mikročestica. Kapacitet uklapanja definira se ga kao omjer mase uklopljenog proteina i mase mikročestica izražen u postotku.

Razumijevanje uklapanja djelatne tvari i mehanizma njezinog oslobađanja zahtijeva razumijevanje metoda pripreme mikročestica odnosno tehnologije mikrokapsuliranja. Kako je većina djelatnih tvari u već odobrenih lijekovima ili koje su kandidati za razvoj novih lijekova peptidne i proteinske prirode, bit će opisane metode pripreme polimernih mikročestica za

uklapanje peptida i proteina (tablica 2). U usporedbi s metodom dvostruke emulzije, sušenje raspršivanjem i sušenje raspršivanjem i smrzavanjem, metoda ultrazvučne atomizacije, metoda elektroraspršivanja, metoda zatvaranja pora i termoreverzibilna-gel metoda, mikrofluidizacijska metoda te metoda mikrotehnologije su relativno nove metode pripreve te se još razvijaju (Ye i sur., 2010). Sve metode, osim metode mikrotehnologije proizvode mikročestice sferičnog oblika.

Tablica 2. Metode pripreve polimernih mikročestica s ukopljenim peptidnim/proteinskim lijekovima (preuzeto iz Ye i sur., 2010).

<b>Metoda dvostruke emulzije</b>
Voda/ulje/voda (V/U/V) metoda
Kruto/ulje/voda (K/U/V) metoda
Voda/ulje/ulje (V/U/U) metoda (Metoda koacervacije)
Kruto/ulje/ulje (K/U/U) metoda
<b>Ostale metode</b>
Sušenje raspršivanjem
Sušenje raspršivanjem i smrzavanjem
Ultrazvučna atomizacija
Elektroraspršivanje
Mikrofluidizacija
Metoda zatvaranja pora i termoreverzibilna-gel metoda

### V/U/V metoda dvostruke emulzije

Metoda dvostruke voda/ulje/voda (V/U/V) emulzije se najviše koristi zbog relativne jednostavnosti procesa, praktičnosti kontrole procesnih parametara te mogućnosti proizvodnje s ne tako sofisticiranim uređajima. U metodi dvostruke V/U/V emulzije, vodena otopina peptida/proteina je dispergirana u organskom otapalu u kojem je topljiv polimer. Primjerice PLGA polimer u diklormetanu ili etilacetatu tvori primarnu V/U emulziju. Primarna emulzija se zatim dispergira u velikom volumenu vode koja sadržava emulgator kao primjerice polivinil alkohol (PVA) te tvori dvostruku V/U/V emulziju. Krute mikročestice se formiraju uklanjanjem organskog otapala iz polimerne faze. Organsko otapalo se uklanja solvent

ekstrakcijom ili solvent evaporacijom (Grayson i sur.,2004). U solvent ekstrakciji V/U/V dvostruka emulzija se izlaže velikom volumenu vode ili otapalu kao što je aceton ili alkohol koji se dodaju u vodenu kupelj. Solvent evaporacija se odvija pri povišenoj temperaturi i povišenom tlaku. Modifikacija tradicionalne V/U/V metode, emulgiranje membranom, daje mikrosfere ujednačene veličine. Primarna emulzija pod tlakom prolazi kroz jednolične pore staklene membrane u vanjsku vodenu fazu. Tlak uzrokuje dušikov plin. Veličina čestica i raspodjela veličine mogu biti kontrolirani veličinom pora staklene membrane i koncentracijom emulgatora u vanjskoj vodenoj fazi. Svojstva mikročestica (kao što su kapacitet uklapanja, uspješnost uklapanja, kinetika oslobađanja, veličina čestica) ovise o parametrima djelatne tvari (vrsta i koncentracija), polimera (molekularna masa, koncentracija), volumnom omjeru proteina i otopine polimera, metodi emulgiranja (vrijeme i intezitet), surfaktantu (vrsta i koncentracija).

### K/U/V metoda

Adsorpcija proteina i denaturacija na međupovršini voda/otapalo je jedan od glavnih čimbenika za smanjenu bioaktivnost tijekom procesa uklapanja. Da bi izbjegli denaturaciju proteina tijekom pripreve V/U emulzije, razvila se metoda dvostruke emulzije krutina/ulje/voda (K/U/V). Razvila se zato što se smatra da proteini u krutom stanju zadržavaju svoju bioaktivnost drastično smanjujući konformacijsku mobilnost u usporedbi s velikim strukturnim promjenama u otopljenom stanju. U K/U/V metodi, krute čestice proteina su dispergirane u otopini polimera te tvore primarnu emulziju. Zatim se čvrsta disperzija uvodi u velik volumen vodenog otapala koji sadrži emulgator kao što je PVA ili polietilenglikol (PEG). Priprava disperzije proteinskih čestica u organskom otapalu nije jednostavna. Mikroniziranje proteinskih čestica je jedan od glavnih problema u K/U/V metodi. Metoda mikroniziranja uključuje liofilizaciju, sušenje raspršivanjem i sušenje raspršivanjem i smrzavanjem. Sušenje raspršivanjem i smrzavanjem stvara atomizirane proteinske mikrokapljice u zaleđenom obliku te potom slijedi sublimacija vode pri sniženom tlaku. Prema tome denaturacija proteina povezana s temperaturom i deaktivacija koja se javlja prilikom sušenja raspršivanjem su izbjegnute. Procesi koji se odvijaju pri niskim temperaturama kao što su sušenje raspršivanjem i smrzavanjem te liofilizacija se često koriste prilikom mikroniziranja proteinskih čestica (Dong i sur., 2006). Također je važno kontrolirati veličinu mikroniziranog proteina. Prilikom istraživanja uklapanja rekombinantnog ljudskog hormona rasta pokazalo se da veličina čestica proteina značajno utječe na učinkovitost uklapanja proteina i profil oslobađanja *in vivo*. K/U/V metoda može biti modificirana za

peptide i neke niskomolekularne proteine. Pretpostavlja se da se peptidi i niskomolekularni proteini mogu otopiti u dimetil sulfoksidu (DMSO) ili metanolu bez induciranja gubitka aktivnosti zato što oni nemaju izraženu terciarnu ili kvaternarnu strukturu viskomolekularnih proteina. Temeljena na tim pretpostavkama, metoda nazvana *in situ* K/U/V, se primjenila za uklapanje inzulina. U ovoj metodi inzulin je prvo otopljen u DMSO. K/U emulzija je potom dispergirana u PLGA otopljenom u DCM otapalu da bi proizveli mikročestice. Slično, ornitin acetat i leuprolin su otopljeni u metanolu i dispergirani u PLGA otapalu da bi dobili mikročestice. Ova modificirana metoda obično proizvodi mikročestice sa visokom uspješnošću uklapanja (Mingli i sur., 2010).

### V/U/U metoda (metoda koacervacije)

U metodi V/U/U emulzije koja se još naziva koacervacija ili separacija faza, dva koraka zamjenjuju drugi korak oblikovanja emulzije u V/U/V metodi. Prvi je da se doda primarna emulzija u neotapalo u kojem polimer nije ili je neznatno topljiv. Neotaplo koje se uglavnom koristi za PLGA je polidimetil siloksan (PDMS). Miješanjem dolazi do separacije faza odnosno do nastanka koacervata. Kako se otapalo postepeno ekstrahira iz faze koacervata, koacervati se obogaćuju polimerom te se formiraju fizički stabilne kapljice koacervata. Drugi korak je dodavanje velike količine sredstva za otvrdnjavanje koje se miješa samo s uljnom fazom. Najčešće korištena sredstva za otvrdnjavanje su heksan i oktametilklotetrasiloksan. Ekstrakcija otapala i neotapala rezultira stvaranjem krutih mikročestica. V/U/U metoda se dosad koristila za pripremu PLGA/PLA mikročestica koje sadržavaju različite proteine i peptide kao primjerice goveđi serumski albumina (BSA) i vapreotid acetat (analog somatostatina) (Mingli i sur., 2010).

### K/U/U metoda

Ne-vodeni pristup za izradu mikročestica ima određenih prednosti vezano za stabilnost proteina. Smatra se da se strukturne promjene proteina uzrokovane proizvodnim procesom mogu minimalizirati. Bioaktivnost proteina se može zadržati ako dispergiramo protein u suhom obliku u organskom otapalu. U K/U/U metodi, protein u suhom obliku je direktno dispergirani ili u organskom otapalu i onda izmiješan s otopinom polimera ili u otopini polimera tvori primarnu emulziju slijedeći standardnu proceduru koacervacije. U modificiranoj metodi znanom kao vrtložni uljni film (engl. *spinning oil film*, SOF), kapljice koacervata se uvode u vrtložni film ulja sjemenki pamuka pri kontroliranoj brzini protoka tako da smicanje uzrokovano vrtlogom filma razdvaja kapi kako bi se proizvele jednolične

mikročestice. Ta metoda rezultira mikročesticama ujednačene veličine, veće učinkovitosti uklapanja, manjeg učinka naglog oslobađanja proteina u usporedbi s mikročesticama proizvedenima konvencionalnim tehnikama emulgiranja (Mingli i sur.,2010).

### Sušenje raspršivanjem i sušenje raspršivanjem i smrzavanjem

U metodi sušenja raspršivanjem otopina proteina ili emulzija (V/U ili S/U) se raspršuje u zraku da bi se atomizirala uglavnom pri povišenoj temperaturi da ispari organsko otapalo. Svojstva konačnih mikročestica ovise o prirodi formulacije koja se raspršuje (otopina ili V/U emulzija) kao i o procesnim parametrima kao što su brzina protoka i ulazna temperatura. Glavne prednosti sušenja raspršivanjem su jednostavna kontrola svojstava mikročestica mijenjanjem proizvodnih parametara te relativna jednostavnost uvećanja proizvodnog mjerila. Međutim, visoka proizvodna temperatura, separacija konačnog proizvoda te gubitak proizvoda prilikom proizvodnje su značajni nedostaci te metode (Takada i sur., 2003).

Kao način da se izbjegne visoka temperatura povezana s sušenjem raspršivanjem razvila se metoda sušenja raspršivanjem i smrzavanjem. Prvi korak u sušenju raspršivanjem i smrzavanjem je raspršivanje otopine proteina u tekućem dušiku nakon kojeg slijedi liofilizacija. Tada se proteinske čestice suspendiraju u otopini polimera da bi tvorili K/U emulziju. Ultrazvučni raspršivač se koristi za raspršivanje K/U emulzije u posudu koja sadrži smrznuti etanol koji je prekriven tekućim dušikom. Nakon uranjanja posude u tekući dušik, da bi zadržali etanol smrznutim, posuda se prenosi na  $-80^{\circ}\text{C}$  pri čemu se etanol odmrzava te dolazi do ekstrakcije organskim otapalom. Nakon 3 dana mikročestice očvrstnu te su spremne za sušenje prolaskom kroz atmosferu dušika pri  $2-8^{\circ}\text{C}$  (Vert i sur., 1991).

### Metoda ultrazvučne atomizacije

Priprema mikročestica ultrazvučnom atomizacijom je relativno nova metoda. Prenosi te metode odnose se na jednostavnost procesa (odvija se u jednom koraku), mogućnost aseptične proizvodnje te kontinuirane proizvodnje. Preciznost izrade mikročestica se razvila kombiniranjem ultrazvučnog raspršivača te struje nosača (neotapalo polimera) koji struji oko početnih mikrokapljica. Kako otopina polimera prolazi kroz vibrirajuće mlaznice, mehaničko djelovanje pokreće val akustične energije kroz tekućinu, uzrokuje povremenu nestabilnost te nastaju jednolične mikrokapljice. Te mikrokapljice su okružene strujom nosača na mlaznici i putuju s njim naprijed prema vodenoj kupelji. Sa isparavanjem otapala mikrokapljice se ukrutnjuju te tvore mikročestice. Glavna prednost ove metode jest da se različite veličine

jednoličnih mikročestica mogu proizvesti mijenjanjem dijametra mlaznice, frekvencije vibracije, brzine protoka otopine polimera i nosača (Cun i sur., 2010). Treba naglasiti da miješanjem mikročestica različitih veličina, može kontrolirati brzina oslobađanja proteina. Uz ispravnu kombinaciju se može postići linearna kinetika oslobađanja.

Pumpanjem dvije različite otopine polimera kroz koaksijalnu mlaznicu mogu se proizvesti jednolične mikrokapsule s dvostrukom ovojnicom i kontroliranom debljinom ovojnice.

Jedan od razvijenih ultrazvučnih sustava sastoji se od 3 glavne jedinice. Prva jedinica je jednostavni mješač koji proizvodi grubu V/U emulziju. Druga jedinica je ultrazvučna protočna ćelija koja omogućava prijenos ultrazvuk visokog inteziteta na grubu emulziju te nastanak fine emulzije. Fina emulzija se zatim prenosi u treću jedinicu koju čini statični mikromješač. V/UV dvostruka emulzija nastaje uvodeći tekućinu za ekstrakciju kroz mikrokanale u mikromješač. Tako emulzija i tekućina za ekstrakciju, prolaze kroz pripadajuće mikorkanale i miješaju se na izlazu. Zbog znatno bržeg toka tekućine za ekstrakciju, emulzije se raspada na kapljice. Konačno dvostruka emulzija se prikuplja i dalje očvrstuje da bi se pripravile mikročestice. Srednji promjer mikročestica se može podesiti mijenjanjem brzine protoka dviju tekućina, te jačine i trajanja sonikacije. Međutim, raspodjela veličine čestica je poprilično široka (Gu i sur., 2007).

Razvijen je i mikrodispenser sustav koji sadržava dvije inkjet mlaznice. Nakon pojedinačnog pumpanja proteina i otopine polimera kroz dvije različite mlaznice, jednolične kapi se proizvode na vrhu svake mlaznice visokom frekvencijom vibracije proizvedene frekvencijskim generatorom. Postava od dvije mlaznice je fino podešena tako da se ove dvije vrste kapljica sudaraju u zraku. Sudaranjem se organska otopina širi po površini vodenih kapljica zbog njihove razlike u površinskoj napetosti. Početne mikrokapsule se formiraju izmjenom otapala i sakupljanjem u vodenoj kupelji koja sadržava emulgator. Dvostruki mikrodispenser sustav međutim ima inherentno ograničenje u stvaranju velike količine kapljica. Postavljanje ovog sustava zahtijeva visoku preciznost postrojavanja što je jako komplicirano pri proizvodnji industrijskog mjerila. Ovaj problem se može riješiti pomoću ultrazvučnog raspršivača za proizvodnju mikrokapljica u velikim količinama. Kada ultrazvučni raspršivač raspršuje u smjeru paralelno na središnju os transduktora, tekućina se širi na vrh prednjeg roga i apsorbira energiju da bi se usitnila na veliku količinu mikrokapljica. Očito je sustav s ultrazvučnim raspršivanjem jednostavan za postavljanje i za proizvodnju industrijskog mjerila (Siepman i Gopherich., 2001). Takozvani dizajn „koaksijalnih mlaznica“ u kojoj dvije koncentrične mlazice s različitim unutarnjim

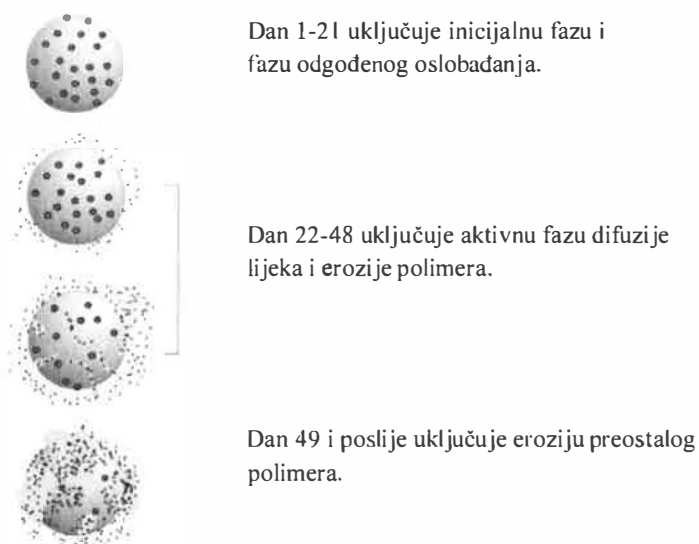
promjerima dijele istu os mogu raspršiti otopinu proteina i otopinu polimera bez prethodnog miješanja. Pri raspršivanju ove dvije otopine vibriraju na određenoj frekvenciji te se otopina polimera u organskom otapalu i vodene kapljice formiraju i sudaraju. Zbog njihove razlike u površinskoj napetosti, organsko otapalo se širi po površini vodenih kapljica te nastaju mikrokapsule. Te mikrokapsule se prikupljaju u vodenoj kupelji koja sadrži neki emulgator (Spencehauer i sur., 1989).



## 4.2. PLGA kao polimer izbora u izradi polimernih mikročestica za parenteralnu primjenu

PLGA polimer je polimer izbora u pripravi polimernih mikročestica za parenteralnu primjenu. PLGA a i ostali polimeri koji se ispituju u te svrhe su biorazgradljivi polimeri zbog činjenice da oslobađanje uklopljene djelatne tvari ovisi o kinetici razgradnje polimera (Schwendeman i sur., 2014). Kinetika razgradnje PLGA polimera može se prilagođavati terapijskim potrebama mijenjajući omjer mliječne i glikolne kiseline te mijenjajući molekulsku masu polimera. Međutim, i drugi faktori imaju utjecaj na oslobađanje djelatne tvari iz mikročestica i ponekad njihov učinak prevladava učinak razgradnje samog polimera.

Oslobađanje djelatne tvari iz PLGA ima nekoliko faza. Prva faza je **inicijalna faza naglog oslobađanja** koja traje nekoliko dana pa sve do tjeda dana. Druga faza je **faza odgođenog oslobađanja** gdje male količine polimera erodiraju, a ponekad se primijeti da se malo ili ništa djelatne tvari oslobodi. Treća faza je **aktivna faza erozije** u kojoj se masa polimera konstantno smanjuje, a oslobađanje djelatne tvari postaje kontinuirano.



**Slika 1.** Oslobađanje risperidona iz PLGA mikročestica. Profil oslobađanja podijeljen je na inicijalnu fazu oslobađanja lijeka (<1% doze lijeka), nakon čega slijedi razmak od 3 tjedna u kojem se lijek ne oslobađa (faza odgođenog oslobađanja). Glavno oslobađanje risperidona započinje od 3. tjedna nakon intramuskularne injekcije te se zadržava od 4 do 6 tjedna i potom opada do 7. tjedna.

Srednja faza se uglavnom pojavljuje kada je difuzija peptida i proteina kroz polimerni matriks mala ili je nema te kada je molekulska masa polimera prevelika. Savladavanje faze

odgođenog oslobađanja je ključno da bi se postiglo produljeno oslobađanje. Zatim međusobna interakcija proteina i peptida (npr. agregacija proteina) i s polimerom (npr. acilacija peptida) su manje poznati načini kontroliranja brzine oslobađanja (Goraltchour i sur., 2006).

Ako značajan dio djelatne tvari nije uklopljen ili ako je adsorbiran na površini mikročestica ili postoji slobodan protok čvrste djelatne tvari unutar PLGA polimera, taj dio djelatne tvari će zasigurno doprinijeti naglom oslobađanju. Kada je polimer jednom hidratiziran u biološkom okruženju, postoje 3 različita mjesta na kojima djelatna tvar može biti locirana. Djelatna tvar može biti otopljena u polimernoj fazi, dispergirana u nepolimernoj fazi koja sadržava djelatnu tvar u čvrstom stanju te otopljena ili vezana unutar pora polimera. Udio u kojem se djelatna tvar raspodjeljuje u svakoj od ovih domena će snažno utjecati i na oslobađanje i na stabilnost djelatne tvari (Gaspar i sur., 1998).

Jako je bitno koliko brzo voda ulazi u polimerni matriks kao i brzina penetracije vode u nepolimerna područja. To uzrokuje stvaranje pora i ulazak vode u polimerna područja, plastifikaciju i povećanu mobilnost polimernih lanaca. U stvarnosti ništa ne može difundirati iz polimernog matriksa dok nije hidratizirano. Drugi faktor je otvaranje mreže pora (kao i pore na površini i/ili pukotina) što stvara puteve difuzije za djelatnu tvar. Treći faktor je sama difuzija djelatne tvari jednom kad se stvori put difuzije. Također za brzinu difuzije je jako važan proces zatvaranja pora ili ono što se u znanosti o materijalima naziva "pasivno ozdravljenje polimera". Posljednji proces se smatra zaslužnim za prekid puta nagle difuzije djelatne tvari. Prirodno, ako je djelatna tvar značajno topljiva u i/ili ima interakcije s polimernom fazom, postoji dodatni faktor koji treba uzeti u obzir, a ovisno o okolnostima dodatni ograničavajući faktori se mogu javiti (npr. smanjenje topljivosti proteina zbog njihove agregacije). Zacijeljenje pora značajno je bilo zanemareno u ranijim znanstvenim radovima o pripravcima s produljenim oslobađanjem usprkos tome što se to otkrilo davno prije. U inicijalnim istraživanjima se pokazalo da se stvaranje pora, što je rezultat bubrenja polimernog matriksa i neujednačenosti polimernog matriksa, može pojaviti puno brže nego zatvaranje pora. Treba napomenuti da će zatvaranje ovisiti o veličini pora jer je više vremena potrebno polimernim lancima da ispune veće pore nego male. To može biti jedno od objašnjenja pojave da smanjenje veličine pora u mikrosferama rezultira smanjenom fazom naglog oslobađanja peptida.

## Pet uobičajenih načina za postizanje produljenog oslobađanja djelatne tvari

Produljeno oslobađanje djelatne tvari iz PLGA je postignuto tek nakon mnogo godina. Neke od tih metoda su korisne za velike molekule, a neke nisu. Važno je opisati metode za male molekule jer je važno i kretanje malih molekula u i iz PLGA (D'Souza i sur., 2000). Oslobađanje malih molekula može indirektno utjecati na stabilnost velikih molekula. Npr. oslobađanje kiselina male molekulske mase koje su nastale degradacijom polimera ili pomoćnih tvari male molekulske mase. Te tvari mogu utjecati na brzinu razgradnje te promjenu pH u mikrookolini. Dolje niže je opisano 5 metoda koje se koriste za kontrolu produljenog oslobađanja iz PLGA (Schwendeman i sur., 2014).

### 1) Upotreba frakcije polimera male molekulske mase

Produljeno oslobađanje peptida se može postići ako smanjimo molekulsku masu značajnijeg dijela ili frakcije PLGA. Povećanje udjela djelatne tvari se također smatra korisnim. Niskomolekularni PLGA uglavnom sadržava oligomere polimera koji imaju ograničenu topljivost u vodi te aktiviraju eroziju uz hidrolizu pri čemu kontinuirano nastaju polimerni lanci u rasponu do 1kD.

### 2) Uklapanje slabo topljivih baza

Kada se slabo topljive baze ( $MgCO_3$ ,  $Mg(OH)_2$ ,  $ZnCO_3$ ) dodaju pri pripravi mikročestica koristeći PLGA srednje molekulske mase, uočeno je kontinuirano produljeno oslobađanje, odnosno izostanak faze odgođenog oslobađanja. Baze su ista skupina pomoćnih tvari koja se naširoko koristila da bi smanjila kiselost mikrookoline u polimerima. Taj proces može biti objašnjen sljedećim argumentima:

- a) baze reagiraju sa kiselinama (vjerojatno s kiselinama male molekulske mase te tvore soli što uzrokuje povećanje osmotskog tlaka te nastanak novih pora za oslobađanje velikih molekula);
- b) kako baze reagiraju s kiselinama nastalima hidrolizom PLGA, kiseline se odstranjuju iz polimerne faze što rezultira smanjenjem kiselinom katalizirane hidrolize PLGA;
- c) zadržavanje kiselina inducira značajan ulazak vode u polimerni matriks.

### 3) Dodatak vodotopljivog polimera

Polietilenglikol se djelomično miješa sa PLGA te je njegov dodatak u formulaciju osigurao produženo oslobađanje proteina mjesec dana bez negativnog utjecaja promjene pH na stabilnost proteina.

### 4) Upotreba klasičnih puteva difuzije opisanih za nerazgradive polimerne matriksne sustave

Četiri slučaja (1-4) za difuziju djelatne tvari kroz pore i kroz polimerni matriks su opisana za oslobađanje djelatne tvari iz nerazgradljivih polimera (npr. polietilenkovinilacetat). Ako je djelatna tvar topljiva u PLGA može se osloboditi difuzijom kroz polimer kao u slučaju 1 (udio djelatne tvari < topljivosti djelatne tvari u polimeru) ili kao u slučaju 2 (udio djelatne tvari > topljivosti djelatne tvari u polimeru). Ako je udio djelatne tvari iznad niže razine praga difuzije kroz polimer (obično se pojavljuje pri 20%-30%) tada se djelatna tvar može osloboditi na način da difundira kroz pore – slučaj 3 (kada je topljivost djelatne tvari u vodi < udjela djelatne tvari) ili slučaj 4 - (topljivost djelatne tvari u vodi > udjela djelatne tvari).

### 5) Oslobađanje djelatne tvari posredovano osmotskim tlakom

Značajan osmotski tlak se može stvoriti kada se velika količina niskomolekularnih pomoćnih osmotskih tvari topljivih u vodi ili same djelatne tvar uklopi u polimerni matriks.

## Stabilnost uklopljenih proteina i peptida

Za razliku od nerazgradljivih polimera, PLGA reagira s vodom cijelo vrijeme i sadrži kisele skupine na završecima i esterske veze koje mogu fizički i/ili kemijski reagirati s uklopljenim proteinom ili peptidom. Mikrookolina je često kiselina i slabo kontrolirana što može ugroziti stabilnost peptida i proteina. Stoga se problem stabilnosti peptida i proteina uklopljenih u PLGA opsežno istraživao te se smatra najznačajnijim problemom koji otežava razvoj PLGA mikročestica kao nosača peptida/proteina. Općeniti pristup se temelji na analizi fizičko-kemijskih događanja koji se pojavljuju od vremena uklapanja djelatne tvari pa sve do oslobađanja djelatne tvari *in vivo*. Ta analiza te prikupljeni eksperimentalni dokazi su identificirali nekoliko problema. Npr. oštećenje proteina je uobičajeno tijekom mikroniziranja što generalno podrazumijeva značajan unos energije da bi se razbile kohezivne sile u proteinu te se stvaraju čestice proteina velike površine u krutom ili tekućem stanju. Isto tako izlaganje

organskom otapalu (pogotovo ako je protein pokretan) bilo prije, tijekom ili nakon mikroniziranja može uzrokovati odmatanje proteina što je povezano s destabilizacijom, pogotovo agregacijom proteina. Sušenje je također važan korak te se može odvijati pri povišenoj temperaturi ili liofilizacijom. Tijekom oslobađanja javljaju se 4 dominantna čimbenika stresa na protein:

1) izloženost vlazi

- hidratacija i dugotrajno izlaganje proteina vlazi može izložiti protein za njegovu stabilnost štetnoj razini vode.

2) nekontrolirana i uglavnom kisela mikrookolina

- razgradnjom PLGA polimera nastaju kiseline i to različitim brzinama ovisno u udjelu građevnih jedinica polimera. Najbrži u tom pogledu je PLGA 50/50, a najsporiji PLA. Nadalje, niskomolekularne kiseline za koje se pokazalo da kontroliraju pH u porama polimera mogu imati različite brzine difuzije ovisno o poroznosti polimera, molekularnoj masi polimera, plastifikaciji i drugima faktorima. Nizak pH ( $\text{pH} < 5$ ) je često problematičan za proteine zbog denaturacije u kiselom mediju.

3) polimerne interakcije (fizičke)

- fizičke interakcije polimera se mogu pojaviti na različitim razinama. Može doći do jednoslojne adsorpcije proteina na polimer koja može biti reverzibilna ili ireverzibilna. Za proteine koji su podložni površinski induciranom odmatanju ovaj mehanizam može biti bitan. Nadalje protein može ući u polimernu fazu pri razgradnji polimernih lanaca ili ako se koriste oligomeri PLGA. Taj proces nije dovoljno istražen. Međutim u takvim slučajevima se očekuje da će doći protein odmatanja zbog smanjene aktivnosti vode, koja je nužna kako bi struktura proteina ostala sačuvana.

4) polimerne interakcije (kemijske)

- kemijske reakcije polimera sa peptidima se često pojavljuju te su dokumentirane za velik broj terapijskih peptida. Najnoviji dokazi upućuju na to da u određenim slučajevima peptidi mogu penetrirati u polimernu fazu. Ova činjenica pomaže razjasniti u kojoj mjeri određeni peptidi tvore amidne veze s polimrom u acilacijskim reakcijama. Obično su to peptidi u polimernoj fazi koji su u bliskom kontaktu s polimernim lancima u prisutnosti smanjene razine vode. Acilacija proteina je manje jasan proces te zahtijeva daljnje istraživanje.

Nekoliko fizičkih i kemijskih čimbenika djeluje destabilizirajuće na peptide i proteine. Među najčešćima su odmatanje, agregacija topljivih i netopljivih proteina, hidroliza, deaminacija (i rezultirajuća racemizacija) te oksidacija. Manjak analitičke opreme i stručnog kadra u tom području otežava inače teško određivanje faktora nestabilnosti proteina i peptida. Analitičke oprema je poprilično skupa i najčešće sva potrebna oprema (CD, FTIR, LC/MS, NMR) nije dostupna. Štoviše odvajanje proteina i peptida od polimera u uzorcima prikupljenim pri ispitivanju oslobađanja *in vitro* nije uvijek moguće i zahtijeva odgovarajuću validaciju. Često testovi za proteine i biološki testovi mogu interferirati sa komponentama iz medija za ispitivanje oslobađanja. Uklopljenost polipeptida u PLGA mikročestice se može odrediti aminokiselinskom analizom nakon kiselinske hidrolize. Te vrijednosti je dobro poznavati bez obzira na stabilnost djelatne tvari u početnoj fazi razvoja formulacije.

### Industrijska proizvodnja PLGA mikročestica

Većina PLGA mikročestica s uklopljenom djelatnom tvari ne može biti sterilizirana zračenjem bez ugrožavanja stabilnosti peptidne/proteinske djelatne tvari. To znači da se proizvodnja mora se provoditi u aseptičkim uvjetima u prisutnosti organskih otapala. Isparavanje otapala, koacervacija te sušenje raspršivanjem su procesi koji su dosta dobro razvijeni te prevedeni u industrijsko mjerilo proizvodnje te su tim tehnologijama proizvedene PLGA mikročestice s uklopljenim peptidima koje su već dugo dostupne na tržištu. Međutim proizvođači su pretrpjeli značajne nepredvidive troškove prilikom razvitka tih proizvoda posebice uvećanja mjerila proizvodnje te uklanjanja organskih otapala. Onečišćenja u PLGA terapijskim sustavima uzrokuju jako mnogo problema. Primjerice ostatak u vodi topljive osmotski aktivne kiseline u polimeru uzrokuje povećan efekt naglog oslobađanja leuprolina (te uzrokuje probleme s uklapanjem samog peptida i rokom valjanosti gotovog lijeka). Većina ostatnih organskih otapala su značajno topljiva u vodi te su osmotski aktivna. Kada se otope u vodi, organska otapala su površinski aktivna, smanjuju površinsku napetost i mogu uzrokovati degradaciju polimera. Postizanje odgovarajuće raspodjele veličine mikročestica kao i održavanje visokog prinosa pri proizvodnji daljnji su izazovi.

### Specifičnosti primjene PLGA mikročestičnih formulacija

Produljeno oslobađanje lijeka iz PLGA mikročestica te posljedično održavanje koncentracije lijeka u krvi unutar terapijske širine smanjuje učestalost doziranja i približava ovaj način primjene lijeka bolesnicima usprkos invazivnosti parenteralne primjene. Tip igle korišten za parenteralnu primjenu ovisi o mnogo čimbenika, primjerice o putu primjene, tipu formulacije,

te populaciji pacijenata kojima je namijenjen lijek. Dva važna parametra su duljina igle te dijametar igle. Dijametar je manji što je veći broj dijametara. Npr. standardne intramuskularne injekcije zahtijevaju duže igle sa širim dijametrom. Manje igle se općenito upotrebljavaju za supkutanu primjenu iako su nove tehnologije značajno smanjile veličinu igle. Geometrija igle je također određena formulacijom koja se primjenjuje. Da bi razvili učinkovitu i farmaceutski prihvatljivu suspenziju PLGA mikročestica velik broj kriterija mora biti zadovoljen. Kao za bilo koju suspenziju koja se primjenjuje parenteralno ključni parametri koji definiraju farmaceutsku prihvatljivost su: mjera lakoće s kojom neka suspenzija prolazi kroz hipodermičku iglu iz bočice u štrcaljku, injektabilnost, mogućnost začepljenja igle, resuspenzibilnost te viskoznost. Povećanje viskoznosti i gustoće formulacije, veličine čestica i koncentracije čvrste tvari u suspenziji otežava prolaz suspenzije kroz iglu. Injektabilnost se odnosi na ponašanje suspenzije tijekom injektiranja, npr. tlak potreban za injektiranje, ravnomjernost protoka, kvaliteta aspiracije te izbjegavanje začepljenja. Začepljenje se može pojaviti zbog pojedinačnih velikih čestica ili agregacije čestica. Također utječe velik broj faktora kao što su močenje čestica, veličina čestica, raspodjela veličine, oblik čestica, viskoznost te protočnost suspenzije (D'Souza i sur., 2005). Resuspenzibilnost opisuje sposobnost suspenzije da se jednolično rasprši upotrebom minimalnog treskanja nakon što je suspenzija odstajala duže vrijeme. Glavni problem povezan s upotrebom igala su bol te neugodnost što može zabrinuti pacijenta te smanjiti njegovu suradljivost. Intervjuiranjem pacijenata na terapiji inzulinom se spoznalo da je skoro polovica pacijenata izrazila želju da se ublaži bol prilikom primjene lijeka štrcaljkom. Također većina pacijenata je izrazila želju da se smanji broj dnevnih primjena lijeka. Dijametar igle je direktno povezan sa boli i incidencijom krvarenja. Upotrebom tanjih igala pacijenti osjećaju manju bol te je manja učestalost krvarenja. Lokalne reakcije su česte prilikom supkutane primjene PLGA formulacija. Supkutana primjena PLGA mikročestica može izazvati stvaranje čvorića na mjestu primjene, međutim ta pojava je uglavnom kratkotrajna i ne zahtjeva liječničku intervenciju.

### Je li PLGA jedina moguća opcija?

Veliki broj prirodnih i sintetskih polimera se istraživao tijekom godina u svrhu produljenog oslobađanja djelatne tvari. Od mnogih novih polimera samo ih nekoliko dođe do kliničkih ispitivanja i dalje u velikoj mjeri zbog visoke cijene i rizika uzrokovanih upotrebom novih materijala. Nadalje drugi razlozi mogu biti slaba kompatibilnost djelatne tvari i polimera, toksičnost polimera, imunotoksičnost, slabo uklapanje djelatne tvari u polimer te slabo učinak

u pretkliničkim ispitivanjima. Unatoč tim preprekama došlo se do obećavajućih kliničkih rezultata. Primjerice, Locetron<sup>®</sup>, polieterester je mikrosferni oblik za dostavu interferona alfa 2b. On je imao obećavajuće rezultate u drugoj fazi kliničkih istraživanja. Objavljeni su i obećavajući rezultati za lijek Lucermera<sup>®</sup> i Insumera<sup>®</sup> (PhaseBio Pharmaceuticals) koji se temelje na elastinu sličnom sustavu za dostavu djelatne tvari. Poli(D,L laktid-ko-hidroksi metilglikolid) (PLHMGA) mikrosfere uzrokuju stvaranje manje kiselih uvjeta u usporedbi s ekvivalentnim PLGA mikrosferama te osiguravaju oslobađanje stabilnog oktreotid preko 60 dana. Kopolimerizacija hidrofobnih polimera (primjerice PLGA i PLA) je također razmatrana kako bi se predvladali problemi kiselinske razgradnje. Polimerni sustavi temeljeni na polioksalatu se se pokazali biorazgradljivi, biokompatibilni u odnosu na PLGA. Poliketalni kopolimeri su se pokazali učinkoviti u dostavi Imatiniba, ali zbog upalnih odgovora se zahtijevaju daljnja istraživanja. Kao što je vidljivo, novi polimeri obećavaju bolje terapijske ishode, ali izazovi ostaju isti, odnosno sigurnost i učinkovitost. Stoga se tijekom godina godina razvio velik broj novih biorazgradljivih polimera, ali se suočavaju s regulatornim i kliničkim zaprekama. Temeljita pretklinička ispitivanja na kulturama stanicama i životinjama se trebaju provesti da bi problemi vezani uz biokompatibilnost bili predvaladani za pravovremeni razvoj sigurnih i djelotvornih terapijskih sustava. Još jedan faktor koji ograničava upotrebu alternativa PLGA-u je sraz između istraživačkog rada u razvoju novih polimera te razvojnog rada u farmaceutskoj industriji. Većina novih polimernih sustava su ispitani isključivo u pretkliničkim studijama te rijetko prolaze daljnja klinička istraživanja i razvoj. Farmaceutska industrija više preferira rad sa materijalima vrlo dobro poznatih svojstava kao što su PLGA čija sigurnost je potvrđena dugogodišnjom kliničkom primjenom odobrenih pripravaka. Na taj način se izbjegavaju rizici i visoka cijena koji nastaju tijekom postupka regulatornog odobrenja (Dong i sur., 2006).

### **4.3. Ispitivanje oslobađanje djelatne tvari iz polimernih mikročestica**

*In vitro* oslobađanje je ključno kvalitativno svojstvo za procjenu kakvoće lijeka. Za razliku od oralnih oblika, kod parenteralnih mikročestičnih pripravaka nema standardiziranih postupaka/metoda ispitivanja oslobađanja *in vitro*. Odgovarajuće *in vitro* ispitivanje obično zahtijeva mnogo složenije metode kao i proces uspostavljanja kriterija prihvatljivosti. Zatim *in vitro* metoda oslobađanja bi trebala biti osmišljena da bude biorelevantna u smislu da oponaša trajanje i oslobađanje uzorka već utvrđenog u *in vivo* uvjetima na odgovarajućim



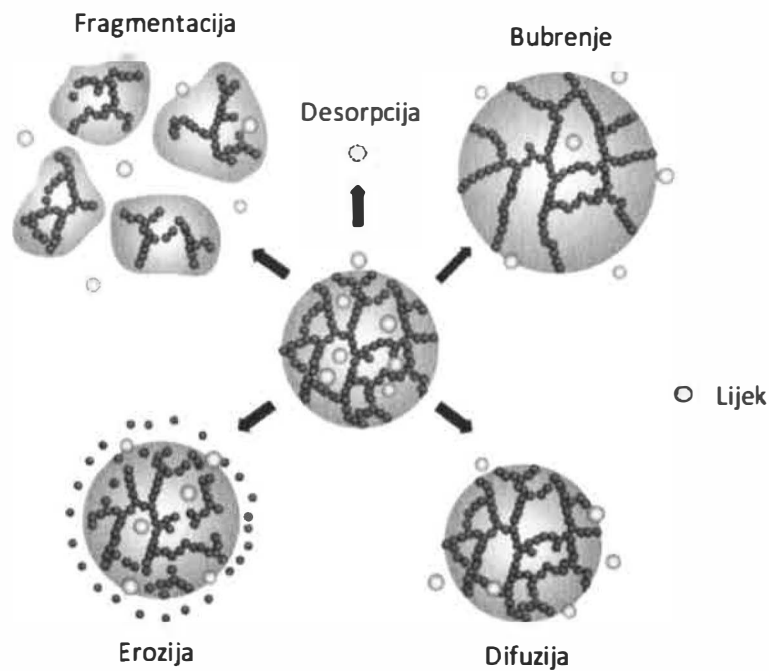
animalnim modelima. Ispitivanje uključuje jednu ili više kombiniranih metoda (ako nije u literaturi naveden veći broj metoda za vrednovanje *in vitro* profila oslobađanja, najvažnije je da se identificira metoda koja je najrelevantnija za mehanizam oslobađanja i kvantificira različite profile faza oslobađanja). Kako su mikročestice dugo oslobađajući dozirni oblici dizajnirani da oslobađaju tijekom razdoblja od nekoliko tjedana, mjeseci ili čak godina, postaje nepraktično čekati stvarno vrijeme ispitivanja za potpuno oslobađanje djelatne tvari. Stoga se razvijaju ubrzane metode kako bi se olakšala evaluacija i izdavanje serije proizvoda. Ubrzane metode moraju povećati brzinu oslobađanja bez utjecaja na mehanizam oslobađanja. Zatim diskriminatorska sposobnost i relevantnost *in vitro* metode oslobađanja bi trebala biti određena u odnosu na učinak *in vivo*. Tipični mehanizam oslobađanja za tu vrstu terapijskih sustava uključuje 3 faze oslobađanja (opisane ranije) koje moraju biti detektirane metodama *in vitro* metode (u stvarnom vremenu i korištenjem ubrzane metode pri višoj temperaturi) (Dorta i sur., 2002).

Kvantifikacija kumulativnog profila oslobađanja u više vremenskih točaka pruža način za procjenu djelovanja ljekovitog oblika. Nekoliko vremenskih točaka sa odgovarajućim kriterijima bi trebalo razmotriti da se opiše cijeli profil. Pri kontroliranju inicijalne faze treba uzeti u obzir točke dobivene u prvih nekoliko dana. Konačna vremenska točka treba biti izabrana na način da osigura potpuno oslobađanje djelatne tvari iz ljekovitog oblika. Kriterij za puno oslobađanje je uglavnom oko 80% ukupnog lijeka.

### **4.3.1. Mehanizmi oslobađanja**

Mehanizam oslobađanja se uglavnom proučava uzorkovanjem u različitim vremenskim točkama uz profil ukupnog oslobađanja tvari pri *in vitro* uvjetima oslobađanja (pri temperaturi od 37 i 45°C). Koristi se i skenirajuća elektronska mikroskopija kako bi se pratila veličina pore i pukotina odnosno erozija polimera. U prvoj fazi oslobađanja, mikročestice dolaze u kontakt s vodenim medijem te dolazi do močenja površine mikročestica i otapanja i oslobađanja adsorbiranog lijeka otapa. Tijekom druge faze, odnosno faze odgođenog oslobađanja, mikročestice se kontinuirano hidratiziraju i prolaze kroz stalno smanjenje molekularne mase polimera. Temperatura inkubacije ima snažan utjecaj na brzinu smanjenja molekularne mase. Više temperature skraćuju ovu fazu otprilike s 21 dan pri 37°C na 7 dana pri 45°C. Kada se ispituje faza 2 sa skenirajućom elektronskom mikroskopijom poprečni snimci mikročestica pokazuju porast unutrašnjeg dijametra pora i progresiju erozije polimernog matriksa. U trećoj fazi, fazi primarnog oslobađanja djelatne tvari, nakon otprilike

21. dana na 37°C (ili 7 dana na 45°C), molekularna masa polimera pada ispod najviše dopuštene razine (otprilike 5-10 kD). Tad se uklopljena djelatna tvar nastavlja oslobađati na kontroliran način dok potpuno oslobađanje nije postignuto. Oslobađanje je najvjerojatnije olakšano kombinacijom difuzije lijeka kroz raspadnuti matriks i direktne izloženosti djelatne tvari mediju kao rezultat erozije mikrosfera.



**Slika 2.** Mehanizam oslobađanja lijeka ovisi o svojstvima nosača i načinu vezanja/uklapanja lijeka u nosač pa se tako oslobađanje lijeka može odvijati desorpcijom s površine, otapanjem i difuzijom kroz (izbubreni) matriks ili stijenku (membranu), erozijom ili fragmentacijom matriksa nosača. U većini slučajeva radi se o kombinaciji navedenih mehanizama oslobađanja. Ako je lijek uklopljen unutar matriksa uključeni su procesi difuzije i erozije, dok će difuzija biti glavni mehanizam ako nosač nije biorazgradljiv. Ako je nosač građen od polimera koji bubri, oslobađanje lijeka bit će kontrolirano difuzijom kroz izbubreni matriks.

#### **4.4. Postupci kontrole kakvoće gotovih pripravaka polimernih mikročestica za parenteralnu primjenu**

Razvoj i proizvodnja lijeka koji se temelji na polimernim mikročesticama zahtjeva velika ulaganja u specifične metode oblikovanja tih pripravaka, kontrolu procesa proizvodnje i analitički napredene metode za kontrolu kakvoće (Kumar i sur., 2010). Specifikacije proizvoda su ključne u kontrolnoj strategiji. Mikročestični pripravci uglavnom su dostupni kao prašak koji se resuspendira u napunjenim štrcaljkama prije same primjene (Dunne i sur., 2000).

Proizvodnja mikročestica je aseptički proces zato što terminalna sterilizacija (toplinski stres i gama zračenje) rezultira degradacijom mikročestica, smanjenjem molekulske mase polimera i stoga izostankom djelovanja. Zbog kompleksnosti u razvoju i proizvodnom procesu mikročestičnih lijekova ključno je osmisliti odgovarajuću kontrolu kakvoće tih proizvoda. Strategija treba sadržavati temeljitu karakterizaciju proizvoda tijekom razvoja, treba se pridržavati dobre proizvođačke prakse (odgovarajuća postrojenja), validiranih proizvodnih procesa, validiranih testova kontrole kakvoće, kontrole kakvoće sirovina, ispitivanja kakvoće tijekom procesa proizvodnje i ispitivanja stabilnosti. Specifikacije su osmišljene da osiguraju kakvoću proizvoda i konzistenciju i obično su utemeljene na regulatornim smjernicama, dostupnim podacima iz proizvodnog procesa, iz pretkliničkih i kliničkih ispitivanja te ispitivanja stabilnosti.

Prema ICH smjernicama, specifikacije su definirane kao popis ispitivanja, analitičkih postupaka i odgovarajućih kriterija prihvatljivosti, koji su predstavljaju granične vrijednosti, rasponi ili drugi kriterije za opisano ispitivanje. Specifikacije utemeljuju skup kriterija koje bi proizvod trebao zadovoljavati da bi se smatrao prihvatljivim za namijenjenu upotrebu. Nadalje specifikacije su ključni standardi kakvoće koji su predloženi i zadovoljeni od strane proizvođača i regulatornih tijela kao preduvjet ishođenja odobrenja za stavljanje lijeka u promet.

Dva osnovna aspekta pri određivanju specifikacija su definiranost ključnih svojstava te uspostavljanje kriterija za preciznu kontrolu svakog svojstva. Specifikacije gotovog lijeka su određene kako bi se osigurala kakvoća proizvoda i usredotočene su na one karakteristike koje se smatraju ključnim u vidu osiguranja učinkovitosti i sigurnosti primjene lijeka (Gaspari sur., 1998).

## Karakteristike farmaceutskog oblika

Izbor karakteristika farmaceutskog oblika i odgovarajuće metode ispitivanja trebaju biti prikladni kako bi se osigurala kakvoća lijeka što dalje rezultira osiguranjem sigurnosti primjene lijeka, njegovom učinkovitošću, te stabilnošću pri skladištenju sve do isteka roka valjanosti. Konačne specifikacije trebala biti utemeljene na oslobađanju djelatne tvari i podacima stabilnosti dobivenima tijekom razvoja proizvoda, procesa njegove proizvodnje, analitičkim mogućnostima, kliničkim i prekliničkim ispitivanjima i regulatornim smjericama.

## Izgled

Ispitivanje izgleda uključuje vizualnu inspekciju integriteta spremnika, izgled mikročestica i ispitivanje proizvoda sa sustavom za primjenu lijeka. Primjerice ta ispitivanja uključuju ispitivanja suspendiranosti mikročestica, mjere lakoće s kojom suspenzija prolazi kroz hipodermičku iglu iz bočice u štrcaljku, injektabilnosti suspenzije, mogućnosti začepljenja igle i resuspenzibilnosti te viskoznosti suspenzije mikročestica.

## Identifikacija

Identifikacija djelatne tvari se provodi metodama kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) ili masena spektroskopijom. Kriteriji prihvatljivosti mogu biti usporedba retencijskog vremena referentnog standarda i glavnog pika u uzorku i usporedba spektara referentnog standarda sa spektrom uzorka ili određivanje mase djelatne tvari.

## Određivanje količine djelatne tvari/čistoća

Određivanje količine djelatne tvari je kvantitativni postupak koji se koristi za kontrolu jačine proizvoda. Izražava se kao količina ukupne djelatne tvari u mg uklopljene u 100 mg mikročestica. Također se može odnositi na učinkovitost uklapanja. Metoda bi trebala razlikovati količinu uklopljenog lijeka od neuklopljenog. Trebaju se razviti odgovarajuće metode ekstrakcije koje osiguraju prihvatljivo iskorištenje djelatne tvari i bilo kojeg mogućeg onečišćenja ili produkta razgradnje. Iako je poželjno razviti jednu samostalnu metodu za određivanje količine djelatne tvari i onečišćenja, najčešće su potrebne višestruke kromatografske metode za kontrolu razine ključnih onečišćenja.

## Brzina oslobađanja djelatne tvari

Ispitivanje brzine oslobađanje *in vitro* je ključno je ispitivanje kontrole kakvoće. Profil oslobađanja djelatne tvari iz mikročestica ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima djelatne tvari (topljivost u vodi, svojstva čvrstog stanja, interakcije sa polimerom) kao i o parametrima koji definiraju mikročestice (npr. karakteristike polimera, uklopljenost lijeka, veličina čestica). Ključni parametri mikročestica koji kontroliraju oslobađanje lijeka su uklopljenost djelatne tvari (omjer djelatne tvari i polimera), vrsta polimera i molekulska masa polimera . Različiti profili oslobađanja se mogu postići promjenom uvjeta proizvodnog procesa te promjenom svojstva polimera upotrebljenog za proizvodnju. *In vitro* metoda oslobađanja treba biti diskriminatorna odnosno treba razlikovati promjene formulacije nastale tijekom proizvodnje koje mogu utjecati na kakvoću proizvoda. Svrha diskriminatorne sposobnosti *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja jest procjena procesne kontrole i pouzdanosti izvedbe proizvoda od serije do serije (Dunne i sur., 2000).

## Molekulska masa polimera

Molekulska masa polimera je ključno svojstvo koje utječe na izvedbu proizvoda. Molekulska masa može biti promijenjena tijekom samog proizvodnog procesa. Primjerice pri homogenizaciji ili ultrazvučnom miješanju pri proizvodnji mikročestica može doći do smanjenja molekulske mase polimera. Određivanje molekulske mase polimera je kvantitativna metoda koja uključuje određivanje prosječne molekulske mase u usporedbi s odgovarajućim standardima upotrebom gel kromatografije. Specifikacija o molekulskoj masi polimera neophodna je kako bi se osiguralo odgovarajuće oslobađanje djelatne tvari te rok valjanosti proizvoda.

## Veličina čestica

Za određivanje veličine mikročestica i raspodjele veličine mikročestica najčešće se koriste metoda raspršenja laserske svjetlosti ili mikroskopske metode. Kontrola veličine čestica je važna zbog toga što ona osigurava ujednačenost proizvoda od serije do serije. Dodatno, učinak veličine čestica na oslobađanje djelatne tvari treba biti utvrđen *in vitro* metodama oslobađanja kako bi se definirala točna specifikacija proizvoda.

## Sadržaj vode

Sadržaj vode je ključni parametar zato što se polimerne mikročestice razgrađuju procesom hidrolizom. Najčešće se koristi Karl-Fischerova titracija. Ključno je dokazati da nema značajne promjene u sadržaju vode prilikom skladištenja proizvoda.

## Ujednačenost sadržaja

Odgovarajuće metode se trebaju razviti za ispitivanje ujednačenosti sadržaja dozirnog oblika. Te metode ne trebaju biti selektivne ili indicirati stabilnost. Plan uzorkovanja i kriteriji prihvatljivosti prema američkoj farmakopeji USP<905> trebaju se razmotriti i odrediti.

## Ostatna otapala

Analiza ostatnih otapala je jako bitna ako proizvodni proces uključuje organska otapla. Granične vrijednosti se trebaju definirati za određena otapala uzimajući u obzir učinkovitost i sigurnost primjene lijeka. Kao metoda se najčešće upotrebljavaja plinska kromatografija.

## Bakterijski endotoksini

Specifikacije vezane uz prisutnost bakterijskih endotoksina trebaju se odrediti radi sigurnosti. Ispitivanje bakterijskih endotoksina se izvodi prema američkoj farmakopeji USP<85> upotrebljavajući vodeni ekstrakt pripremljen iz stanica krvi raka bodljaša, pod nazivom limulus amebocitni lizat te računanje granične vrijednosti endotoksina mora biti vođeno USP smjericama.

## Sterilnost

Mikročestice se uglavnom proizvode u aseptičkim uvjetima. Da bi osigurali sterilnost, ispitivanje sterilnosti se provodi prema USP<71> upotrebljavajući direktnu inokulaciju. Dvije vrste ispitivanja sterilnosti se provode, odnosno dokazuje se odsutnost mikroorganizama u spremniku gotovog lijeka te odsutnost mikroorganizama u samim mikročesticama (obično se provodi otapanjem mikročestica u otapalu koje ne posjeduje antimikrobna svojstva) (Han i sur., 2010).

## 5. ZAKLJUČAK

Pripravci produljenog oslobađanja smatraju se budućnošću farmacije. Ulažu se jako veliki napori i sredstva u njihovo istraživanje zbog velikih pogodnosti za zdravstveni sustav u cijelini. Jedan od inovativnih terapijskih sustava s mogućnošću kontroliranja oslobađanja djelatne tvari su polimerne mikročestice. Opsežna istraživanja koja su rezultirala brojnim metodama pripreme uz sve veći izbor polimernih materijala usmjerila su razvoj tehnologije mikročestica prema gotovim lijekovima s velikim trasnacijskim i komercijalnim potencijalom. Odobreni pripravci za parenteralnu primjenu temeljeni na tehnologiji mikročestica su pripravci malih molekula (risperidon, naltrekson) i peptida (leuprolid, eksenatid, oktreotid, triptorelin, buserelin, lanreotid i goserelin; tablica 1). U tijeku su i brojna pretklinička i klinička ispitivanja primjenjivosti inovativne tehnologije mikročestica u razvoju pripravaka drugih peptida i proteina kao što su inzulin, različiti faktori rasta, interferon, lizozim, eritropoetin.

Za pripremu polimernih mikročestica koriste se polimeri glikolne kiseline, polimeri mliječne kiseline, kopolimeri mliječne i glikolne kiseline (PLGA). Prilikom pripreme jako je važno osigurati visoku uspješnost uklapanja i produljeno oslobađanje pripravka. Kao metoda pripreme najviše se koristi V/U/V dvostruka emulzija zbog svoje jednostavnosti i praktičnosti postupka. Da bi se smanjila denaturacija proteina razvila se K/U/V metoda dvostruke emulzije. Da bi povećali stabilnost proteina koristi se ne-vodeni pristup, odnosno K/U/U metoda dvostruke emulzije. Metoda sušenja raspršivanjem je također jedna od metoda pripreme, ali zbog visoke temperature proizvodnog procesa dolazi do velikih gubitaka konačnog proizvoda. Da bi se izbjegli gubitci zbog visoke temperature koristi se metoda sušenja raspršivanjem i smrzavanjem.

PLGA je pogodan za izradu ovakvih pripravaka jer je prirodnog porijekla te njegovom razgradnjom nastaju netoksični produkti. Kinetiku razgradnje PLGA-a možemo mijenjati mijenjajući omjer mliječne i glikolne kiseline, te mijenjanjem molekulske mase. Produljeno oslobađanje može se postići na sljedeće načine : upotrebom frakcije polimera male molekulske mase, uklanjanjem slabo topljivih baza, dodatkom vodotopljivih polimera, oslobađanjem djelatne tvari posredovane osmotskim tlakom te upotrebom klasičnih puteva difuzije. Ako je djelatna tvar protein prilikom uklapanja javljaju se 4 dominantna čimbenika stresa: izloženost vlazi, nekontrolirana i kisela mikrookolina te fizičke i kemijske polimerne interakcije. Prilikom industrijske proizvodnje jako je bitno održavati aseptičke uvjete budući

da PLGA mikročestice ne mogu biti sterilizirane gamma zračenjem zbog narušavanja peptidne/proteinske strukture djelatne tvari.

Parenteralni mikročestični oblici su složeni dozirni oblici koji zahtijevaju pažljiv razvoj metoda za ispitivanje kakvoće i kriterija prihvatljivosti. U načelu ispitivanje brzine oslobađanja *in vitro* i kriteriji prihvatljivosti zahtijevaju strogo znanstveno razmatranje te se treba razumjeti mehanizam oslobađanja.



## 6. LITERATURA

- Cui C, Stevens V.C, Schwendeman S.P, Injectable polymer microspheres enhance immunogenicity of a contraceptive peptide vaccine. *Vaccine* 25, 2007, 500–509.
- Cun D, Foged C, Yang M, Frøkjær, S, Mørk Nielsen, H., Preparation and characterization of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery. *Int. J. Pharm.*, 2010. 390, 70–75.
- Desai K.G.H, Olsen, K.F, Mallery SR, Stoner, G.D., Schwendeman, S.P., 2010. Formulation and in vitro–in vivo evaluation of black raspberry extract-loaded PLGA/PLA injectable millicylindrical implants for sustained delivery of anthocyanins. *Pharm. Res.*, 2010, 27, 628–642.
- Dong, W.Y., Körber, M., Esguerra, L., Bodmeier, R., 2006. Stability of leuprolide acetate in in-situ forming drug delivery systems. *J.Control. Release* 115, 158-167.
- Dorta, M.J., Santovena, A., Llabrés, M., Farina, J.B., 2002. Potential application of PLGA film-implants in modulating in vitro drugs release. *Int. J. Pharm.* 248, 149–156.
- D’Souza, S.S., Faraj, J.A., DeLuca, P.P., 2005. Model dependent approach to correlate accelerated with real-time release from biodegradable microspheres. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 6 (article 70).
- D’Souza, S.S., Selmin, F., Murty, S.B., Qiu, W., Thanoo, B.C., DeLuca, P.P., 2004. Assessment of fertility in male rats after extended chemical castration with a GnRH antagonist. *AAPS Pharm. Sci.* 6 (article 10).
- Dunne, M., Corrigan, O.I., Ramtoola, Z., 2000. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials* 21, 1659–1668.
- Gaspar, M.M., Blanco, D., Cruz, M.E.M., Alonso, M.J., 1998. Formulation of l-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. *J. Control. Release* 52, 53–62.
- Goraltchouk, A., Scanga, V., Morshead, C.M., Shoichet, M.S., 2006. Incorporation of protein-eluting microspheres into biodegradable nerve guidance channels for controlled release. *J. Control. Release* 110, 400–407.
- Grayson, A.C.R., Voskerician, G., Lynn, A., Anderson, J.M., Cima, M.J., Langer, R.,

2004. Differential degradation rates in vivo and in vitro of biocompatible poly(lactic acid) and poly(glycolic acid) homo- and co-polymers for a polymeric drug delivery microchip. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15, 1281–1304.
- Gu, H., Song, C., Long, D., Mei, L., Sun, H., 2007. Controlled release of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) from poly[(lactic acid)-co(glycolic acid)] microspheres for the treatment of neurodegenerative disorders. *Polym. Int.* 56, 1272–1280.
- Guse, C., Koennings, S., Kreye, F., Siepmann, F., Goepferich, A., Siepmann, J., 2006b. Drug release from lipid-based implants: elucidation of the underlying mass transport mechanisms. *Int. J. Pharm.* 314, 137–144.
- Han, B., Gao, S.-Z., Zhang, X.-H., Tian, H.-B., Wang, H.-T., 2010. Preparation of aclarubicin PLGA nanospheres and related in vitro/in vivo studies. *J. Appl. Polym. Sci.* 117, 2754–2761.
- Mingli Ye, Sungwon Kim, Kinam Park, Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles, *Journal of Controlled Release* 146 (2010) 241–260
- Rajesh Kumar, Michael J. Palmieri Jr, Points to Consider when Establishing Drug Product Specifications for Parenteral Microspheres, *The AAPS Journal*, 12 (2010), 27–32
- Siepmann, J., Göpferich, A., 2001. Mathematical modelling of bioerodible, polymer drug delivery systems. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 48, 229–247
- Song, C.X., Laghasetwar, V., Levy, R.J., 1997. Controlled release of U-86983 from double-layer biodegradable matrices: effect of additives on release mechanism and kinetics. *J. Control. Release* 45, 177–192.
- Sophocleous, A.M., Zhang, Y., Schwendeman, S.P., 2009. A new class of inhibitors of peptide sorption and acylation in PLGA. *J. Control. Release* 137, 179–184.
- Spenlehauer, G., Vert, M., Benoit, J.P., Boddaert, A., 1989. In vitro and in vivo degradation of poly(d,l-lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method. *Biomaterials* 10, 557–563.
- Steven P. Schwendeman, Ronak B. Shah, Brittany A. Bailey, Anna S. Schwendeman, Injectable controlled release depots for large molecules, *Journal of Controlled Release* 190 (2014) 240–253

- Sun, Y., Wang, J.-C., Zhang, X., Zhang, Z., Zheng, Y., Chen, D.-W., Zhang, Q., 2008. Synchronic release of two hormonal contraceptives for about one month from the PLGA microspheres: in vitro and in vivo studies. *J. Control. Release* 129, 192–199.
- Takada, S., Yamagata, Y., Misaki, M., Taira, K., Kurokawa, T., 2003. Sustained release of human growth hormone from microcapsules prepared by a solvent evaporation technique. *J. Control. Release* 88, 229–242.
- Tracy, M.A., Ward, K.L., Firouzabadian, L., Wang, Y., Dong, N., Qian, R., Zhang, Y., 1999. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. *Biomaterials* 20, 1057–1062.
- Uputa o lijeku, <http://www.halmed.hr/>, pristupljeno 21.9.2016.
- Vert, M., Li, S., Garreau, H., 1991. More about degradation of LA/GA-derived matrices in aqueous media. *J. Control. Release* 16, 15–26.
- Vila, A., Gill, H., McCallion, O., Alonso, M.J., 2004. Transport of PLA–PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *J. Control. Release* 98, 231–244.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je prikazati inovativnu tehnologiju polimernih mikročestica kao tehnologiju koja će zasigurno imati veliki značaj u budućnosti. Prilikom izrade rada raspravljalo se o prednostima i nedostacima tehnologije te o uvjetima proizvodnje koji su jako specifični budući da se radi o parenteralnim pripravcima. U radu je navedeno i detaljno opisano nekoliko pripravaka koji već duže vrijeme postoje na tržištu. Također opisane su i tehnike proizvodnje i uvjeti koji su strogo specifični. Istraživanje i razvoj ovakvih pripravka je vrlo složen i neizvjestan proces koji ne jamči uvijek povrat uložениh sredstava. Opisan je cijeli put od pripreme mikročestica pa sve do problema s kojima se susrećemo prilikom same primjene. Na kraju rada su navedeni parametri o kojima strogo treba voditi računa prilikom proizvodnog procesa.

The main aim of this thesis was to present the innovative technology of polymer microparticles as a technology that will surely be of great importance in the future. In this work it was discussed about the advantages and disadvantages of technology and the production conditions that are very specific because these are parenteral formulations. Also some of most recognized and well known products that have been long available on market are described in detail. In addition, main manufacturing techniques are described and conditions that are very specific. Research and development of such preparation is very complex and uncertain process that does not always guarantee return on investment. The whole process from preparing microparticles to the problems encountered during the application of drug product are described. At the end, the points to consider when establishing drug product specifications for parenteral microparticles are named and defined.



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Farmaceutsku tehnologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Parenteralni pripravci produljenog oslobađanja temeljeni na inovativnoj tehnologiji polimernih mikročestica

Petar Skelin

#### SAŽETAK

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je prikazati inovativnu tehnologiju polimernih mikročestica kao tehnologiju koja će zasigurno imati veliki značaj u budućnosti. Prilikom izrade rada raspravljalo se o prednostima i nedostacima tehnologije te o uvjetima proizvodnje koji su jako specifični budući da se radi o parenteralnim pripravcima. U radu je navedeno i detaljno opisano nekoliko pripravaka koji već duže vrijeme postoje na tržištu. Također opisane su i tehnike proizvodnje i uvjeti koji su strogo specifični. Istraživanje i razvoj ovakvih pripravka je vrlo složen i neizvjestan proces koji ne jamči uvijek povrat uloženi sredstava. Opisan je cijeli put od pripreme mikročestica pa sve do problema s kojima se susrećemo prilikom same primjene. Na kraju rada su navedeni parametri o kojima strogo treba voditi računa prilikom proizvodnog procesa

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 2 grafičkih prikaza, 2 tablice i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: biorazgradljive mikročestice, kontrolirano oslobađanje, produljeno oslobađanje, pripravci produljenog oslobađanja za parenteralnu primjenu, PLGA kopolimer

Mentor: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: studeni, 2016..

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical technology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### The parenteral preparations with extended release based on the innovative technology of polymer microparticles

**Petar Skelin**

#### SUMMARY

The main aim of this thesis was to present the innovative technology of polymer microparticles as a technology that will surely be of great importance in the future. In this work it was discussed about the advantages and disadvantages of technology and the production conditions that are very specific because these are parenteral formulations. Also some of most recognized and well known products that have been long available on market are described in detail. In addition, main manufacturing techniques are described and conditions that are very specific. Research and development of such preparation is very complex and uncertain process that does not always guarantee return on investment. The whole process from preparing microparticles to the problems encountered during the application of drug product are described. At the end, the points to consider when establishing drug product specifications for parenteral microparticles are named and defined.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 2 figures, 2 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: biodegradable microparticles, controlled release, sustained release, extended release formulations for parenteral administration, the PLGA copolymer

Mentor: **Jasmina Lovrić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Jasmina Lovrić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Anita Hafner, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
The thesis was accepted: November, 2016