proLékaře.cz | 30.10.2025

PŘEHLEDY A ODBORNÁ SDĚLENÍ

Lyofilizácia liečiv na báze proteínov

Lyophilisation of protein-based drugs

Andrej Murányi • Mária Vitková

Došlo 25. července 2014 / Přijato 2. září 2014

Souhrn

Lyofilizácia je plne priemyselne etablovaná metóda sušenia so širokými možnosťami použitia pri príprave liekov. Jej relevancia v ostatných rokoch rastie najmä vďaka veľkému počtu terapeuticky významných proteínov, zväčša obmedzene stabilných vo vodnom prostredí. Lyofilizácia proteínov prináša špecifické problémy, nakoľko počas procesu je molekula vystavená rôznym typom záťaže, ktoré môžu viesť k denaturácií a strate aktivity. Dôkladné pochopenie vlastností liečiva a fyzikálno-chemických základov a javov, ku ktorým dochádza počas jednotlivých fáz lyofilizácie, je preto základný predpoklad pre výrobu kvalitného, účinného a bezpečného lieku. Snaha minimalizovať náklady, rozšíriť možnosti použitia a zvýšiť kvalitu vedie výrobcov liekov a zariadení k rýchlemu zavádzaniu nových technológií, ako napr. technológie na analýzu procesov (PAT), metódy kontrolovanej nukleácie či špecifické typy primárnych obalov.
Kľúčové slová: lyofilizácia • proteíny • sušenie • technológie na analýzu procesov

Summary

Lyophilisation is a well-established method for drying of various substances with a wide range of applications in the pharmaceutical area. During the last decade its relevance increases with a number of therapeutically used proteins. A sensitive protein drug may undergo several changes, like unfolding and loss of activity due to various stresses during the lyophilisation process. Understanding of these processes (freezing, primary drying, secondary drying) is fundamental for manufacturing of a drug product with desired properties, namely its safety and efficacy. In order to reduce costs and increase the quality, new technologies are being rapidly developed and established in industrial lyophilisation (e.g. process analytical technologies, control nucleation techniques).
Keywords: lyophilisation • freeze-drying • proteins • process analytical technologies

PharmDr. Andrej Murányi (✉)
hameln rds a.s.
Horná 36, 900 01 Modra, SR
e-mail: andrejmuranyi@gmail.com

M. Vitková
Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta,
Katedra galenickej farmácie, SR

Úvod

Lyofilizácia (mrazové sušenie, mrazová sublimácia, angl. freeze-drying) je proces sušenia, pri ktorom sa zväčša vodné roztoky zmrazia a následne sušia sublimáciou vo vákuu. Dlhodobo sa používa v celej rade priemyselných odvetví ako napr. v potravinárstve, archívnictve či farmaceutickom priemysle. V posledných dekádach naberá lyofilizácia na význame najmä vďaka nárastu terapeutického používania biologických liekov na báze rekombinantných proteínov. Primárne sa lyofilizácia využíva najmä na stabilizáciu liečiv podliehajúcich rozkladu vo vodnom prostredí. Vo všeobecnosti sú práve proteíny kvôli zložitosti ich štruktúry zvlášť náchylné na degradáciu a stratu aktivity. Medzi registrovanými biofarmaceutikami na svetových trhoch je podstatná časť práve vo forme lyofilizátov[1]. Príkladom môžeme uviesť známe biologické liečivá zo skupiny cytokínov – interferón beta-1b (Extavia®), peginterferón alfa-2b (Pegintron®), monoklonálnych protilátok – infliximab (Remicade®), trastuzumab (Herceptin®), kanakinumab (Ilaris®), hormónov – somatropín (Genotropin®), faktorov krvného zrážania – eptakog alfa (NovoSeven®), nonakog alfa (BeneFix®) alebo trombolytík – altepláza (Actylise®). Na základe predpovedí odborníkov o ďalšom raste odvetvia, ako aj s príchodom podobných biologických liekov (tzv. biosimilars) možno predpokladať pokračovanie tohto trendu[2].

proLékaře.cz | 30.10.2025

Využitie lyofilizácie pri príprave moderných liekov sa však neobmedzuje len na terapeutické proteíny a peptidy. Lyofilizácia je využívaná pri príprave a stabilizácií vakcín[3, 4], potenciálnych liečiv na báze nukleových kyselín určených na génovú terapiu[5, 6], stabilizáciu mikro- a nanočasticových terapeutických systémov[7], prípravu práškov na inhalačnú aplikáciu[8], tkanivových náhrad[9] a polymérnych xerogélových systémov na bukálnu i topickú aplikáciu[10, 11]. V technológií výroby pevných liekových foriem našla lyofilizácia uplatnenie pri príprave orodisperzibiliných tabliet ako súčasť technológie Zydis® (R.P. Scherer), Lyoc® (Farmalyoc) alebo Lyopan® (Pantec AG). Lyofilizáciou je tiež možné pripraviť amorfné tuhé roztoky[12] alebo nanokryštáli[13] s cieľom zvýšiť rozpustnosť a biologickú dostupnosť liečiv.

Výsledkom procesu lyofilizácie v injekčných flaštičkách je pórovitý válček (tzv. lyofilizačný „koláč“) s veľkou vnútornou povrchovou plochou, umožňujúcou rýchlu rekonštitúciu pred použitím. Zariadenia používané na lyofilizáciu farmaceutických a biofarmaceutických prípravkou pozostávajú zo sušiacej komory, kondenzátora s chladenými trubkami alebo platňami a vákuovej pumpy. Na vytvorenie vákua a odvádzanie neskondenzovaných pár slúži vákuová pumpa. Niektoré výrobné a poloprevádzkové zariadenia sú vybavené aj uzáverou medzi lyofilizačnou komorou a priestorom s kondenzátorom. Absencia nárastu tlaku po jej zatvorení na krátky čas indikuje ukončenie sublimácie produktu[14]. Krátkodobé niekoľkosekundové prerušenie toku pár medzi komorou a kondenzátorom sa po softvérovom vyhodnotení môže použiť aj na stanovenie teploty produktu (tzv. manometrické meranie teploty). Koncept je založený na modeli publikovanom Miltonom a kol.[15] a technológia je komerčne dostupné ako súčasť patentovaného systému SMART freeze dryer® (SP Scientific Inc.).

Počas sublimácie sú vodné pary z lyofilizovaného roztoku transportované ku kondenzátoru, kde kondenzujú a vytvárajú vrstvu ľadu. Hnacou silou transportu vodných pár je rozdiel medzi tlakom pár nad ľadom v produkte a tlakom nad povrchom kondenzátora[16]. Keďže tlak pár nad ľadom je úmerný jeho teplote, je nevyhnutné aby bola teplota kondenzátora počas sublimácie podstatne nižšia ako teplota zmrazeného produktu. Súčasťou zariadení na lyofilizáciu sú aj rôzne senzory na registráciu tlaku, teploty, toku vodných pár, zariadenia umožňujúce čistenie (systém CIP „clean in place“) a sterilizáciu (systém SIP „sterilization in place“) vnútorného priestoru, rozmrazovanie kondenzátora, ventily i špeciálne prídavné zariadenia ako napr. mikrováhy či zariadenie umožňujúce vybratie flaštičky z komory bez prerušenia vákua (tzv. „zlodej vzoriek“).

Samotný proces lyofilizácie pozostáva z premeny vody na ľad vo fáze zmrazenia, odstránenie ľadu sublimáciou počas primárneho sušenia a finálne dosušenie produktu odstránením nezmrznutej viazanej vody vo fáze sekundárneho sušenia.

Zmrazovanie

Zmrazovanie roztoku je jedným z kritických krokov v procese lyofilizácie. Mikroštruktúra, ktorá vzniká počas zmrazenia, definuje kvalitu a vlastnosti finálneho produktu. Od veľkosti a tvaru kryštálov je závislá aj rýchlosť a efektivita primárneho a sekundárneho sušenia[18].

Zmrznutie roztoku dosiahneme znížením teploty políc na cca –30 °C až –50 °C, pričom dochádza k vzniku jadier a následnému rastu kryštálov ľadu. Nukleácia ľadu sa objavuje zvyčajne na povrchoch, napr. stien injekčných fľaštičiek, cudzích časticiach v roztoku alebo ponorených teplotných sondách. Takto iniciovaná nukleácia sa nazýva heterogénna. Homogénna nukleácia nastáva v roztoku bez cudzorodých častíc, kedy dochádza k vytvoreniu kryštalizačných jadier z vlastných molekúl. Najmä v čistých priestoroch sterilnej výroby môžeme badať signifikantný rozdiel medzi teplotou vzniku kryštálov ľadu a rovnovážnou teplotou tuhnutia, tzv. „podchladenie“ (z angl. supercooling). Kvôli nedostatku kryštalizačných jadier vo filtrovanom roztoku nezriedka dochádza k podchladeniu aj o –15 °C až –30 °C[19, 20]. Pre úspešný priebeh lyofilizácie je nevyhnutné úplné stuhnutie rozpúšťadla i rozpustených látok (liečivo a excipienty). Po nukleácií a vzniku kryštálov ľadu sa rozpustené látky koncentrujú v priestoroch medzi nimi, kde koncentrácia rastie až kým nedôjde k ich kryštalizácií, alebo pokiaľ sa viskozita oblasti nezvýši natoľko, že dôjde k vzniku tuhého amorfného systému – skla[17]. Teplota, pri ktorej dochádza k premene gumovitej amorfnej štruktúry na rigidnú a tuhú sklovitú štruktúru, sa nazýva teplota sklovitého prechodu zmrazením zakoncentrovanej látky T_g' [21]. V prípade, že rozpustená látka počas zmrazovania roztoku kryštalizuje, pri eutektickej (eutonickej) teplote T_{eu} dochádza k vzniku rovnávážneho stavu medzi tuhým skupenstvom vody, vykryštalizovanou látkou a jej roztokom. Pod teplotou T_{eu} už nie je prítomná žiadna kvapalina iba kryštály ľadu a tuhá rozpustená látka. Pre správny priebeh lyofilizácie je nevyhnutné zmraziť produkt v závislosti od jeho charakteru pod teplotu T_{eu} alebo T_g' [22]. Po ukončení fázy zmrazovania a dosiahnutí požadovanej teploty je roztok úplne stuhnutý, t.j., väčšina vody je vo forme ľadu oddelená od rozpustených látok, ktoré vykryštalizovali, alebo vytvorili amorfné sklo.

Rýchlosť zmrazovania ovplyvňuje veľkosť a tvar kryštálov ľadu. Rýchle zmrazovanie vedie k vyššiemu stupňu podchladenia, k vzniku veľkého množstva malých ľadových kryštálov, čo spôsobuje veľký odpor pre tok vodných pár počas sublimácie. Z toho dôvodu je primárne sušenie pomalšie[18]. Veľká povrchová plocha kryštálov ľadu môže taktiež indukovať denaturáciu alebo agregáciu proteínov[23]. Na druhej strane väčšia povrchová plocha zvyšuje rýchlosť a efektivitu sekundárneho sušenia[24].

Známym faktom je, že k samotnej nukleácií a vytvoreniu kryštálov v roztoku počas zmrazovania dochádza náhodne, napriek tomu že samotný lyofilizačný cyklus je kontrolovaný[25]. Keďže morfológia a rýchlosť sušenia závisí od teploty, pri ktorej dochádza k nukleácii, jej stochastická povaha vedie k nehomogenite v rámci šarže[26]. Táto štruktúrna nehomogenita sa môže prejaviť rozdielmi vo vzhľade lyofilizátu, obsahu vody[27], času rekonštitúcie, ale i aktivite liečiva[28]. V posledných rokoch sa preto vyvinuli metódy tzv. kontrolovanej nukleácie, ktorých výsledkom je nižšie podchladenie a väčšia uniformita v rámci šarže. Kontrolovaná nukleácia napomáha aj skráteniu dĺžky trvania

proLékaře.cz | 30.10.2025

primárneho sušenia a môže urýchliť rekonštitúciu lyoproduktov s vysokou koncentráciou liečiva, napr. s obsahom monoklonálnych protilátok[28]. K metódam priamej indukcie nukleácie patrí technika „ľadovej hmly“ (z angl. ice fog) vyvinutá Pikalom a kol. Do priestoru lyofilizačnej komory s policami vytemperovanými na požadovanú teplotu sa vpustí prúd ochladeného dusíka, ktorý z vlhkosti v prostredí vytvorí hmlu ľadových kryštálov indukujúcich nukleáciu v podchladenom roztoku[25]. Ďalším používaným postupom je natlakovanie komory inertným plynom a následná rýchla evakuácia vedúca k okamžitej nukleácii[27]. Oba spomenuté postupy sa už etablovali aj v priemyselnej farmácii ako technológia Veriseq® (Linde Gas) a ControLyo® (Praxair, Inc.). Zatiaľ na úrovni akademických experimentov sa používa aj nedávno publikovaný postup podľa Geidoblera a kol., umožňujúci iniciovať nukleáciu priamym zavzdušnením komory cez priestor zmrazeného kondenzátora[29]. Výhodou tejto metódy je jej jednoduchosť nevyžadujúca žiadne úpravy zariadenia. Dlhodobo zaužívanou technikou je aj tepelné ošetrenie (angl. „annealing“), pri ktorej sa vo fáze zmrazovania zdvihne teplota nad T_g' formulácie avšak stále pod teplotou topenia ľadu. Tepelné ošetrenie vedie k rastu kryštálov ľadu, zväčšeniu pórov v štruktúre lyofilizátu[30] a napomáha kryštalizácií excipientov (napr. manitol, glycín)[31].

Primárne sušenie

Po úplnom zmrazení lyofilizovanej sústavy nasleduje fáza primárneho sušenia. Primárne sušenie predstavuje sublimáciu zmrazeného ľadu. Zvykne byť najdlhšou fázou celého procesu, častokrát trvajúca niekoľko dní. V extrémnych prípadoch, pri nevhodnej formulácii lieku a neoptimalizovanom lyofilizačnom cykle môže primárne sušenie trvať aj niekoľko týždňov. Optimalizácia a skrátenie dĺžky primárneho sušenia má preto obrovský ekonomický dopad na cenu výsledného produktu.

Primárne sušenie dosiahneme evakuáciou systému pomocou vákuovej pumpy na tlak nižší, ako je tlak pár nad ľadom pri danej teplote za súčasného dodávanie energie na sublimáciu. Vzniknutá vodná para sa následné zachytáva na kondenzátore, kde vytvára vrstvu ľadu. Tlak a teplota, pri ktorých dochádza k premene vody z tuhého skupenstva na plynné (sublimácia), sú definované fázovým diagramom vody. Energiu do produktu dodávame prostredníctvom regulácie teploty políc lyofilizátora. Vodné pary sublimujú najskôr z hladiny zamrznutého roztoku, kde sa začína tvoriť vrstva vysušeného produktu. Medzi už vysušenou časťou produktu a stále zmrznutou je sublimačné rozhranie, ktoré sa spravidla posúva horizontálne smerom od vrchnej ku spodnej časti lyofilizovaného materiálu[17]. Ako už bolo povedané, hnacou silou sublimačného sušenia pri farmaceutickej lyofilizácií je rozdiel tlaku vodných pár medzi sublimačným rozhraním a kondenzátorom. Tlak pary závisí od teploty, pričom rozdiel týchto teplôt je hlavným hnacím motorom lyofilizácie[14]. Najnižšia teplota kondenzátora je daná technickými možnosťami zariadenia, navyše pri znižovaní teploty kondenzátora dosiahneme len veľmi malý rozdiel tlaku pár pri veľkej spotrebe energie. Pre urýchlenie primárneho sušenia je preto výhodnejšie zvyšovanie teploty produktu. Podľa Pikala a kol. má zvýšenie teploty produktu na sublimačnom rozhraní o 1 °C za následok zníženie času potrebného na primárne sušenie o približne 13 %[32]. Teplota produktu na sublimačnom rozhraní T_p závisí od formulácie (chemická štruktúra, koncentrácia liečiva a pomocných látok), teploty políc lyofilizátora, tlaku v lyofilizačnej komore a typu primárneho obalu, pričom ju nie je možné priamo kontrolovať. Jej ovplyvnenie je možné len nepriamo prostredníctvom kontroly procesných parametrov tlaku v komore a teploty políc. Limitujúcim prvkom pri zvyšovaní teploty produktu sú však kritické teploty formulácie, pri ktorých prekročení počas primárneho sušenia môže dôjsť k zrúteniu lyofilizátu, tzv. kolapsu[31]. Medzi kritické teploty patrí T_c – teplota makroskopického kolapsu formulácie, pri ktorej prekročení dochádza k strate makroskopickej štruktúry a zrúteniu lyofilizátu. T_c u amorfných liečiv je obyčajne o niekoľko stupňov vyššia ako teplota zosklovatenia T_g'. V prípade kryštalizujúcich látok sa rovná eutonickej teplote T_{eu}[33]. Zrútený lyofilizát má nevyhovujúci vzhľad (obr. 1), menšiu povrchovú plochu, avšak môže mať rovnaký obsah vody, či čas potrebný na rekonštitúciu. Výskumy tiež naznačujú, že sušenie nad kritickou teplotou nemusí mať negatívny vplyv na kvalitu a stabilitu lyofilizovaného proteínu[34]. Publikované štúdie dokonca preukázali vyššiu dlhodobú stabilitu niektorých proteínov v zrútenom lyofilizáte v porovnaní s konvenčne pripraveným produktom[35]. Napriek týmto zisteniam a finančným úsporách, ktoré by skrátenie lyofilizačných cyklov prinieslo je zrútený lyofilizačný koláč zatiaľ komerčne neakceptovateľný. Na dosiahnutie vyhovujúceho vzhľadu je možné upraviť zloženie lieku pridaním kryštalizujúceho excipientu ako manitol alebo glycín. Excipient po kryštalizácií vytvorí makroskopickú podporu štruktúry, pričom dôjde len k tzv. mikrokolapsu vzorky za súčasného zachovania vyhovujúceho vzhľadu[36].

Na stanovenie T_g' a T_{eu} sa štandardne používajú termoanalytické metódy DSC, mDSC a DTA[37]. Medzi novšie alternatívy patrí napr. súčasné meranie DTA a elektrickej impedancie systémom Lyotherm® 2 (Bio - pharma Technology Ltd.)[38]. Na stanovenie teploty

Obr. 1. Zrútený (vľavo) a vzhľadovo vyhovujúci lyofilizát (vpravo)

proLékaře.cz | 30.10.2025

kolapsu T_c sa používa lyofilizačný mikroskop umožňujúci sledovať štruktúru zmrazenej vzorky pod vákuom pri rôznych teplotách[39)].

Primárne sušenie prebieha nevyhnutne za nízkeho tlaku. Tlak v lyofilizačnej komore je dôležitým procesným parametrom počas lyofilizácie, nakoľko priamo i nepriamo ovplyvňuje rýchlosť sublimácie. Príliš vysoký tlak znižuje intenzitu sublimácie zmenšením tlakového gradientu medzi sublimačným rozhraním a komorou[31)]. Ak je tlak v komore vyšší ako tlak pár nad ľadom pri danej teplote produktu, nedochádza k sublimácií vôbec. Na druhej strane príliš nízky tlak negatívne ovplyvňuje prestup tepla do produktu. Teplo do produktu dodávame zahrievaním lyofilizačných políc, pričom sa šíri priamo vedením, prúdením a sálaním. Za vysokého vákua je malá pravdepodobnosť zrážok plynu, pri ktorých dochádza k prenosu tepelnej energie, čo má za následok menej energie dodanej do produktu. Príliš nízky tlak počas sušenia môže navyše viesť ku kontaminácií lyofilizátu prchavými zložkami z gumených zátok alebo olejom z vákuovej pumpy[40)]. Optimálny tlak pre sublimáciu sa preto zväčša pohybuje v rozpätí 50–200 mTorr (cca 0,07–0,27 mbar)[31)], alebo ¼ až ½ tlaku nasýtených pár nad ľadom pri teplote pri ktorej produkt sušíme[41)].

Až keď je zmrazená voda úplne odstránená, je možné primárne sušenie ukončiť a prejsť do fázy sekundárneho sušenia. Sekundárne sušenie prebieha za relatívne vysokej teploty, ktorá by pri neukončenej sublimácií viedla ku kolapsu štruktúry alebo roztopeniu lyofilizovaného roztoku. Z tohto dôvodu je nevyhnutné vedieť čo najpresnejšie stanoviť koniec primárneho sušenia. Základným indikátorom ukončenia sublimácie je vyrovnanie teploty produktu s teplotou políc. Medzi ďalšie techniky patrí porovnávacie merania tlaku v komore rôznymi typmi manometrov (Pirani vs. kapacitný manometer), sledovanie nárastu tlaku pri oddelení komory od kondenzátora, meranie koncentrácie vodnej pary v komore pomocou TDLAS (tunable diode laser absorption spectroscopy – systém LyoFlux®, Physical Sciences Inc.) či GPS (gas plasma spectroscopy – systém Lyotrack®, Adixen Inc.), elektronické meranie vlhkosti a pod.[42)] Väčšina spomenutých techník vyžaduje finančne náročné úpravy zariadenia.

Sekundárne sušenie

Po úplnom odstránení zmrazenej vody počas primárneho sušenia je v produkte stále viazané značné množstvo zostatkovej vlhkosti. V závislosti od formulácie, lyofilizát spravidla obsahuje ešte 5–20 % vody. Cieľom sekundárneho sušenia je zníženie tejto vlhkosti na hladinu zabezpečujúcu dostatočnú stabilitu liečiva. Počas sekundárneho sušenia sa odstraňuje viazaná voda desorpciou. Hranica medzi jednotlivými fázami sušenia nie je jednoznačná, k desorpcií vody dochádza už počas primárneho sušenia. Rýchlosť desorpcie je determinovaná rýchlosťou difúzie z vnútra tuhej látky na jej povrch. Pre jej efektívny priebeh je nevyhnutná zvýšená teplota, pričom energia je dodávaná policami o teplote 25 °C až 50 °C[17)]. Rýchlosť desorpcie je relatívne pomalá, čo vedie k takmer identickej teplote políc a produktu. Produkt je tým pádom vystavený teplotnej záťaži, čo treba mať na pamäti pri sušení zvlášť citlivých liečiv. Napriek tomu, že sekundárne sušenie sa často realizuje pri technicky najnižšom možnom tlaku, signifikantný vplyv jeho zníženia medzi primárnym a sekundárnym sušením na rýchlosť desorpcie nie je potvrdený[14, 24)]. Dĺžka trvania sekundárneho sušenia závisí od požadovanej zostatkovej vlhkosti v lyofilizáte. Vo všeobecnosti, nižší obsah vody vedie k vyššej stabilite proteínu[32, 43)]. Výskumy však potvrdili, že niektoré proteíny sú paradoxne stabilnejšie pri vyššom obsahu vody medzi 1–3 %[44–46)]. Stanovenie optimálnej vlhkosti pre stabilitu konkrétneho proteínu je preto treba overiť experimentálne. Najvernejšie dáta získavame realizáciou dlhotrvajúcej stabilitnej štúdie za doporučenej teploty, ktorá zohľadňuje aj možný nárast vlhkosti počas skladovania. Nárast vlhkosti počas skladovania je zväčša spôsobený uvoľňovaním vlhkosti priamo zo zátky[17, 47)]. Vhodný výber zátok, ich sušenie po sterilizácií parou a dôsledné dodržiavanie skladovacích podmienok pred použitím pomáha minimalizovať potenciálne stabilitné problémy[48)].

Zhodnotiť aktuálnu vlhkosť v produkte počas procesu, a tým stanoviť čas, kedy je vhodné ukončiť sekundárne sušenia (a celý proces lyofilizácie), je možné prostredníctvom niekoľkých metód. Bežnou laboratórnou technikou je tzv. zlodej vzoriek, zariadenie umožňujúce vybrať vzorku počas procesu bez jeho prerušenia. Vzorka sa následne analyzuje na obsah vody (napr. metódou titrácie podľa Karl Fischera). Medzi moderné metódy PAT (process analytical technology) patria aj vyššie spomenuté spektrometrické merania GPS a TDLAS[49)].

Vplyv lyofilizácie na stabilitu terapeutických proteínov

I keď sa lyofilizácia používa primárne na stabilizáciu terapeutických proteínov, proces môže paradoxne viesť k ich degradácií. Počas procesu je liečivo vystavené rôznym typom záťaže, ktoré môžu spôsobiť jeho denaturáciu. K štruktúrnym zmenám molekuly proteínu môže dôjsť vplyvom nízkych teplôt (zväčša pod bodom mrazu). Jav sa nazýva denaturácia chladom (z angl. „cold denaturation“), dochádza pri nej k strate hydrofóbnych interakcií v rámci molekuly proteínu a postihuje najmä oligomérne proteíny s kvartérnou štruktúrou[50)].

Počas zmrazovania roztoku dochádza k tvorbe ľadu, čím rapídne rastie koncentrácie všetkých rozpustených látok. Menia sa fyzikálne vlastnosti ako iónová sila a relatívne zloženie spôsobené selektívnou kryštalizáciou rozpustených látok. Vyššia koncentrácia solútov v parciálne zmrazenom roztoku môže urýchliť aj niektoré rozkladné chemické reakcie[51)]. Koncentrácia kyslíka v roztoku pri –3 °C je mnohonásobne vyššia ako pri nulovej teplote[52)]. Takto prítomný kyslík má potenciál oxidovať napríklad thiolové skupiny proteínov. Selektívna kryštalizácia zložky tlmivého roztoku môže viesť aj k dramatickým zmenám pH. Signifikantné zmeny pH vedúce k destabilizácií pH senzitívnych liečiv sú známe napríklad pri fosforečnanovom alebo sukcinátovom tlmivom roztoku s obsahom sodíkových iónov[53, 54)].

Pri zmrazovaní roztoku a tvorbe ľadu vznikajú aj medzipovrchové rozhrania voda – ľad. Proteíny majú

proLékaře.cz | 30.10.2025

tendenciu adsorbovať sa na rozhraniach, čo často krát vedie k strate natívnej konformácie a spôsobuje povrchovo-indukovanú denaturáciu[55]. Použitie povrchovo aktívnych látok (napr. Tween® 80) v zložení môže ochrániť molekulu pred takto iniciovanou stratou štruktúry[56].

Proteín nachádzajúci sa vo vodnom roztoku je plne hydratovaný, na jeho povrchu sa nachádza monovrstva vody tzv. hydratačný obal. Počas sušenia dochádza k strate časti tohto obalu, čo môže narušiť natívnu štruktúru proteínu a spôsobiť denaturáciu[57]. Degradácií liečiva sa dá efektívne predísť formuláciou s použitím vhodných excipientov tzv. lyoprotektantov[58]. Práve cukry najmä neredukujúce disacharidy ako sacharóza a trehalóza sú najčastejšie používané stabilizátory vo formulácií lyofilizovaných liekov na báze proteínov. Existuje niekoľko teórií popisujúcich mechanizmus stabilizácie proteínu v prostredí sacharidov v sklovitom stave. Podľa tzv. „water replacement“ teórie sacharidy termodynamicky stabilizujú natívnu konformáciu proteínu substitúciou vody a poskytovaním vodíkových väzieb a polárnych interakcií na jeho povrchu[58]. Ďalšie teórie spájajú stabilitu proteínov s celkovou mobilitou (α-relaxácia) amorfnej sacharidovej matrice[59], alebo lokálnou dynamikou v rámci štruktúry (β-relaxácia) [60].

Vplyv lyofilizácie na stabilitu terapeutických proteínov je predmetom intenzívneho vedeckého skúmania a je detailnejšie popísaný v niekoľko prehľadových článkoch, ako napr. Wang[41], Bhatnagar a kol.[61], Remmele a kol.[62], Chang a kol.[63] a iné.

Nové trendy vo farmaceutickej lyofilizácií

Moderný prístup k zabezpečovaniu kvality liekov pri ich vývoji a výrobe známy ako QbD (Quality by Design) si nachádza miesto aj vo farmaceutickej lyofilizácií[64, 65]. Jedným z kľúčových prvkov v QbD je identifikácia, vedecké pochopenie a dôsledná kontrola procesných parametrov a vlastností produktu. QbD využíva technológie na analýzu procesov (PAT – process analytical technology) a vývoj tzv. „design space“, čo je otestovaný rozsah procesných parametrov, ktorých dodržanie vedie k vzniku kvalitného lieku[66]. Na sledovanie teploty počas lyofilizácie sa konvenčne používajú teplotné senzory umiestnené v produkte. Nedávno sa na trh dostali aj bezdrôtové senzory (Tempris®, IQ-mobil solutions GmbH), ktoré sú kompatibilnejšie s automatickými plniacimi systémami a umožňujú jednoduchší transfer z laboratórnych podmienok do výroby[67]. Experimentuje sa s použitím systémov na báze optických vlákien, ktoré by po zabudovaní na povrch lyofilizačných políc umožnili neinvazívny spôsob monitorovania teploty počas procesu[68]. Manometrické meranie teploty ako aj metódy TDLAS a GPS už boli spomenuté. Okrem nich je možné použiť aj iné analytické metódy na in-line monitoring lyofilizačného procesu. Kombináciou techník ako spektroskopia v blízkej IČ oblasti (NIR) a Ramanova spektroskopia dokážme zachytiť začiatok nukleácie ľadu ako aj koniec jeho sublimácie[69].

Vývojom prešli aj lyofilizačné obaly. Na trhu sú injekčné fľaštičky špeciálne navrhnuté pre lyofilizáciu ako TopLyo® (Schott AG) a EasyLyo® (SGD Pharma), zabezpečujúce lepší transfer tepla z políc do produktu[70]. Novinkou sú aj rôzne neštandardné obaly ako dvojkomorové fľaštičky, striekačky (napr. Lyo-Ject®, Vetter) a karpule (napr. V-LK®, Vetter), ampulky, alebo tácky (Lyoguard®, Gore), ako aj plastové pertle umožňujúce zatváranie priamo v lyofilizátore (LyoSeal®, Biocorp Prod.).

Táto práca vznikla s podporou projektu „Priemyselný výskum nových liečiv na báze rekombinantných proteínov“, kód ITMS: 26240220034; „Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ.“

Stret záujmov: žiadny.

Literatúra

1. **Ho R. J. Y.** Biotechnology and Biopharmaceuticals: Transforming protein and Genes into Drugs. 2. vyd. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons 2003.
2. **Global Protein Therapeutics Market Outlook 2018.** Dublin: Research and Markets 2014.
3. **Hasset K. J., Cousins M. C., Rabia L. A., Chadwick C. M., O'Hara J. M., Nandi P., Brey R. N., Mantis N. J., Carpnter J. F., Randolph T. W.** Stabilization of a recombinant ricin toxin A subunit vaccine through lyophilization. Eur J. Pharm. Biopharm. 2013; 85(2), 279–286.
4. **Borde A., Larsson A., Holmgren J., Nygren E.** Preparation and evaluation of a freeze-dried oral killed cholera vaccine formulation. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011; 79(3), 505–518.
5. **Mohammed-Saeid W., Michel D., El-Anned A., Verrall R. E., Low N. H., Badea I.** Development of lyophilized gemini surfactant-based gene delivery systems: influence of lyophilization on the structure, activity and stability of the lipoplexes. J. Pharm. Pharm. Sci. 2012; 15(4), 548–567.
6. **Kasper J. C., Schaffert D., Ogris M., Wagner E., Friess W.** Development of a lyophilized plasmid/LPEI polyplex formulation with long-term stability-a step closer from promising technology to application. J. Controlled Release 2011; 151, 246–255.
7. **Abdelwahed W., Degobert G., Stainmasse S., Fessi H.** Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. Adv. Drug. Delivery Rev. 2006; 58, 1688–1713.
8. **Kaialy W., Nokhodchi A.** Freeze-dried mannitol for superior pulmonary drug delivery via dry powder inhaler. Pharm. Res. 2013; 30(2), 458–477.
9. **Oliveira J. M., Rodrigues M. T., Silva S. S., Malafaya P. B., Gomes M. E. Viegas C. A., Dias I. R., Azevedo J. T., Mano J. F., Reis, R. L.** Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. Biomaterials 2006; 27, 6123–6137.
10. **Labovitiadi O., Lamb A. J., Matthews K. H.** In vitro efficacy of antimicrobial wafers against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Ther. Deliv. 2012; 3(4), 443–455.
11. **Ayensu I., Mitchell J. C., Boateng J. S.** Development and physico-mechanical characterisation of lyophilised chitosan wafers as potential protein drug delivery systems via the buccal mucosa. Colloids Surf. B. Biointerfaces 2012; 1(91), 258–265.
12. **Vasconcelos T., Sarmento B., Costa P.** Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. Drug. Discov. Today 2007; 12(23–24), 1068–1075.
13. **De Waard H., Hinrichs W. L. J., Frijlink H. W.** A novel bottom-up process to produce drug nanocrystals: Controlled crystallization during freeze-drying. J. Control. Release 2008; 128(2), 179–183.
14. **Franks F.** Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals. Cambridge: RSC Publishning 2007.
15. **Milton N., Pikal M. J., Roy M. L., Nail S. T.** Evaluation of manometric temperature measurement as a method of monitoring product temperature during lyophilization. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1997; 51(1), 7–16.

proLékaře.cz | 30.10.2025

16. **Pikal M. J., Roy M. L., Shah S.** Mass and heat transfer in vial freeze-drying of pharmaceuticals: role of the vial. J. Pharm. Sci. 1984; 73(9), 1224–1237.
17. **Pikal M. J.** Freeze Drying. In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 2nd ed. Ed Swabrick, J. Boylan, J.C. New York: Marcel Dekker 2002.
18. **Searles J. A., Carpenter J. F., Randolph T. W.** The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. J. Pharm. Sci. 2001; 90(7), 860–871.
19. **Patapoff T. W., Overcashler D. E.** The importance of freezing on lyophilization cycle development. BioPharm. 2002; 15(3), 16–21.
20. **Bursac R., Sever R., Hunek B.** A practical method for resolving the nucleation problem in lyophilization. BioProcess Int. 2009; 7(9), 66–72.
21. **Franks F.** Freeze-drying: from empiricism to predictability. The significance of glass transitions. Dev. Biol. Stand. 1992; 74, 9–18; disccusion 19.
22. **Gatlin L. A., Nail S. L.** Protein purification process engineering. Freeze drying: A practical overview. Bioprocess Technol. 1994; 18, 317–367.
23. **Chang B. S., Kedrick B. S., Carpenter J. F.** Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. J. Pharm. Sci. 1996; 85(12), 1325–1330.
24. **Pikal M. J., Shah S., Roy M. L., Putman R.** The secondary drying stage of freeze-drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. Int. J. Pharm. 1990; 60(3), 203–207.
25. **Rambhatla S., Ramot R., Bhugra C., Pikal M. J.** Heat and mass transfer scale-up issues during freeze-drying: II. Control of characterization of the degree of supercooling. AAPS Pharm. Sci. Tech. 2004; 5(4), 1–8.
26. **Franks F.** Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. Eur. J. Pharm. Biopharm. 1998; 45, 221–229.
27. **Konstantinidis A. K., Kuu W., Otten L., Nail S. L., Sever R. R.** Controlled nucleation in freeze-drying: Effects on pore size in the dried product layer, mass transfer resistance, and primary drying rate. J. Pharm. Sci. 2011; 100(8), 3453–3470.
28. **Geidobler R., Konrad I., Winter G.** Can controlled ice nucleation improve freeze-drying of highly-concentrated protein formulations? J. Pharm. Sci. 2013; 102(11), 3915–3919.
29. **Geidobler R., Mannschedel S., Winter G.** A new approach to achieve controlled ice nucleation of supercooled solution during the freezing step in freeze-drying. 2012; 101(12), 4409–4413.
30. **Searles J. A., Carpenter J. F., Randolph T. W.** Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freeze-induced drying rate heterogenity, and determine $T_{(g)}'$ in pharmaceutical lyophilization. J. Pharm. Sci. 2001; 90(7), 872–887.
31. **Tang X., Pikal M. J.** Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice. Pharm. Res. 2004; 21(2), 191–200.
32. **Pikal M. J.** Freeze-drying of proteins. Part I.: Process Design. Bio.Pharm. 1990; 3, 18–27.
33. **Pikal M. J., Shah S.** The collapse temperature in freeze-drying: dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. In. J. Pharm. 1990; 62, 165–186.
34. **Schersch K., Betz O., Garidel P., Muehlau S., Bassarab S., Winter G.** Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on the pharmaceutically relevant proteins I: Stability after freeze-drying. J. Pharm. Sci. 2010; 99(5), 2256–2277.
35. **Schersch K., Betz O., Garidel P., Muehlau S., Bassarab S., Winter G.** Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on the pharmaceutically relevant proteins, part 2: Stability during storage at elevated temperatures. J. Pharm. Sci. 2012; 101(7), 2288–2306.
36. **Kasraian K., Spitznagel T. M., Juneau J. A., Yim K.** Characterization of the sucrose/glycine/water system by differential scanning calorimetry and freeze-drying microscopy. Pharm. Dev. Technol. 1998; 3(2): 233–239.
37. **Beirowski J., Geiseler H.** Application of DSC and MDSC in the development of freeze dried pharmaceuticals. Eur. Pharm. Rev. 2008; 6, 63–70.
38. **Hajare A. A., More H. N., Walekar P. S., Hajare D. A.** Optimization of Freeze Drying Cycle Protocol Using Real Time Microscopy and Integrated Differential Thermal Analysis-Electrical Impedance. Res. J. Pharm. Tech. 2012; 5(7), 985–991.
39. **Nail S. L., Her L. M. Proffitt C. P. Nail L. L.** An inproved microscope stage for direct observation of freezing and freeze drying. Pharm. Res. 1994; 11(8), 1098–1100.
40. **Pikal M. J., Lang J. E.** Rubber closures as a source of haze in freeze dried parenterals: Test methodology for closure evaluation. J. Parent. Drug. Assoc. 1978; 32, 162–173.
41. **Wang W.** Lyophilisation and development of solid protein pharmaceuticals. Int. J. Pharm. 2000; 203, 1–60.
42. **Patel S. M., Doen T., Pikal M. J.** Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control. AAPS Pharm. Sci.Tech. 2009; 11(1), 73–84.
43. **Hsu C. C., Ward C. A., Pearlman R., Nguyen H. M., Yeung D. A., Curley J. G.** Determining the optimum residual moisture in lyophilized protein pharmaceuticals. Dev. Biol. Stand. 1992; 74, 255–270, discussion 271.
44. **Pikal M. J., Dellerman K. M., Roy M. L., Riggin R. M.** The effects of formulation variables on the stability of freeze-dried human growth hormone. Pharm Res. 1991; 8(4), 427–436.
45. **Breen E. D., Curley J. G., Overcashier D. E., Hsu C. C., Shire S. J.** Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation. Pharm Res. 2001; 18(9), 1345–1353.
46. **Sarciaux J. M., Hageman M. J.** Effects of bovine somatotropin (rbSt) concentration at different moisture levels on the physical stability of sucrose in freeze-dried rbSt/sucrose mixtures. J Pharm Sci. 1997; 86(3), 365–371.
47. **Pikal M. J., Shah S.** Moisture transfer from stopper to product and resulting stability implications. Dev. Biol. Stand. 1992; 74, 165–177.
48. **Donovan P. D., Corvari V., Burton M. D., Rajagopalan N.** Effect of stopper processing conditions on moisture content and ramifications for lyophilized products: Comparison of "Low" and "High" moisture uptake stoppers. PDA J. Pharm. Sci. Tech. 2007; 61(1), 51–58.
49. **Schneid S., Geiseler H., Kessler W. J., Luthra S. A., Pikal M. J.** Optimization of secondary drying step in freeze drying using TDLAS technology. AAPS PharmSciTech. 2011; 12(1), 379–387.
50. **Graziano G., Catanzano F., Riccio A., Barone G.** A reassesment of the molecular origin of cold denaturation. J. Biochem. 1997; 122, 395–401.
51. **Koseki T., Kitabatake N., Doi E.** Freezing denaturation of ovalbumin at acid pH. J. Biochem. 1990; 107, 389–394.
52. **Jaenicke R.** Protein structure and function at low temperatures. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 1990; 326, 535–551.
53. **Pikal-Cleland K. A., Carpenter J. F.** Lyophilization-induced protein denaturation in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric beta-galactosidase. J. Pharm. Sci. 2001; 90(9), 1255–1268.
54. **Sundaramurthi P., Suryanarayanan R.** The effect of crystallizing and non-crystallizing cosolutes on succinate buffer crystallization and the consequent pH shift in frozen solutions. Pharm Res. 2011; 28(2), 374–385.
55. **Strambini G. B., Gabellieri E.** Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. Biophys. J. 1996; 70, 971–976.
56. **Chang B. S., Kendrick B. S., Carpenter J. F.** Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. J. Pharm. Sci. 1996; 85(12), 1325–1330.
57. **Rupley J. A., Careri G.** Protein hydration and function. Adv. Protein. Chem. 1991; 41: 37–173.
58. **Prestrelski S. J., Tedeschi N., Arakawa T., Carpenter J. F.** Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. Biophys. J. 1993; 65, 661–671.
59. **Franks F., Hatley H. M., Mathias S. F.** Material science and production of shelf-stable biologicals. Biopharm. 1991; 4, 38–55.
60. **Cicerone M. T., Douglas J. F.** β-relaxation governs protein stability in sugar-glass matrices. Soft Matter 2012; 8, 29831991.

proLékaře.cz | 30.10.2025

61. **Bhatnagar B. S., Bogner R. H., Pikal M. J.** Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. Pharm. Dev. Technol. 2007; 12(5), 505–523.
62. **Remmele R. L., Krishnan S., Callahan W. J.** Development of lyophilized protein drug products. Curr. Pharm. Biotechnol. 2012; 13(3), 471–496.
63. **Chang L., Pikal M. J.** Mechanisms of protein stabilization in the solid state. J. Pharm. Sci. 2009; 98(9); 2886–2908.
64. **Mockus L., LeBlond D., Basu P. K., Shah R. B., Khan M. A.** A QbD Case Study: Bayesian Prediction of Lyophilization Cycle Parameters. AAPS PharmSciTech. 2011; 12(1), 442–448.
65. **Patel S. M., Pikal M. J.** Lyophilization Process Design Space. J. Pharm. Sci. 2013; 1052(11), 3883–3887.
66. ICH Guideline Q8(R2) Pharmaceutical Development, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf (10. 02. 2014).
67. **Schneid S., Geiseler H.** Evaluation of a new wireless temperature remote interoggation system (TEMPRIS) to measure product temperature during freeze-drying. AAPS PharmSciTech. 2008; 9, 729–739.
68. **Kasper J. C., Wiggenhorn M., Resch M., Friess W.** Implementation and evaluation of an optical fiber system as novel process monitoring tool during lyophilizaion. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2013; 83, 449–459.
69. **De Beer T. R., Vercruysse P., Burgraevve A., Quinten T., Ouyang J., Zhang X., Vervaet C., Remon J. P., Baeyens W. R.** In-line and real-time process monitoring of a freeze drying process using Raman and NIR spectroscopy as complementary process analytical technology (PAT) tools. J. Pharm. Sci. 2009; 98(9), 3430–3446.
70. **Hibler S., Wagner C., Geiseler H.** Vial freeze-drying, part 1: new insights into heat transfer characteristics of tubing and moulded vials. J. Pharm. Sci. 2012; 101(3), 1189–1201.