

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



DISERTAČNÍ PRÁCE

Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv

Vedoucí disertační práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, 2018

Ing. Denisa Stránská

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

.....

Ing. Denisa Stránská

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za odborné rady, pomoc a vřelý přístup v průběhu mého celého doktorského studia. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Pavlu Berkovi a všem spolupracovníkům na Katedře farmaceutické technologie, se kterými jsem v průběhu doktorského studia spolupracovala. Děkuji PharmDr. Aleši Berkovi za odbornou výpomoc s legislativní záležitostmi týkající se Správné výrobní praxe.

Děkuji společnosti Elmarco s.r.o. a Instar Technologies a.s. za přístrojovou a materiální výpomoc. Dále děkuji společnosti Quinta-Analytica s.r.o. za vřelou spolupráci v průběhu klinického testování vyrobených produktů.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie
Kandidát: Ing. Denisa Stránská
Školitel: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.
Název disertační práce: Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv

Nanovláknna jsou materiálové struktury jedinečných vlastností, které jsou výhodně použitelné v mnoha důležitých oborech, včetně produktů pro léčebné účely. V oblasti filtrace vzduchu jsou průmyslově produkovány různé typy nanovláknenných filtrů. Naproti tomu v oblasti medikovaných nanovláken je stále velkou překážkou výroby, a proto i širšího použití nanovláken, především nízká hmotnost a požadovaná obsahová stejnoměrnost produktů. Technologie elektrostatického zvláknňování je v této souvislosti nejslibnější, nicméně žádné výsledky dokládající hodnocení nanovláknenných produktů určených k systémovému podání léčiv získaných výrobou ověřenou pro zdravotnictví nebyly publikovány.

V práci jsou popsány, experimentálně vyhodnoceny a v souladu s požadavky na správnou výrobní praxi dokumentovány jednotlivé kroky výroby nanovláknenných přípravků s důrazem na validaci procedur a tedy na jednoznačnou opakovatelnost veškerých kroků vedoucích k výrobě konečného produktu.

Validační procesy zahrnovaly validaci výroby nanovláknenné vrstvy a validační postupy analytického charakteru, především hodnocení disoluce a obsahové stejnoměrnosti, které jsou stanoveny jako jedny ze zkoušek umožňující propuštění výrobku ke klinickému hodnocení. K ověření funkčnosti byly produkty v předklinických zkouškách testovány v *in vitro* permeačních pokusech za použití prasečí sublingvální membrány.

Vyrobený produkt byl finálně testován dle pravidel správné klinické praxe ve srovnávací studii, která prověřila biodostupnost rizatriptanu, jako zvoleného léčiva, z nanovláknenného nosiče po sublingvální aplikaci zdravým dobrovolníkům.

Výsledky práce prokazují využitelnost nanovláknenné technologie elektrospiningu pro výrobu jednodávkových lékových forem. Zvolené přístupy k ověření funkčnosti nanovláknenného přípravku se ukázaly jako věrohodné a provedená klinická studie

ukázala jeho zlepšené farmakokinetické parametry v porovnání s terapeuticky již zavedeným sublingválním přípravkem typu lyofilizované tablety.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Pharmaceutical technology
Candidate: Ing. Denisa Stránská
Supervisor: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.
Title of Doctoral Thesis: Nanofibrous membranes as drug delivery systems

Nanofibres are material structures of unique properties that are well-useable in many exciting areas, including medical products. In the field of air filtration, different types of nanofibre filters are produced industrially. On the other hand, in the area of medicated nanofibres, there is still a major barrier for production, and hence the commercial use of nanofibres, especially due to the low weight and required content uniformity of the final products. Electrospinning technology is the most promising in this context, however, no results on the evaluation of nanofibrous products intended for the systemic administration of drugs obtained by certified manufacturing process have been published.

In this doctoral thesis the individual steps of the nanofibrous products production are described, experimentally evaluated in compliance with good manufacturing practice and documented with an emphasis on the validation procedures and thus on the desired repeatability of all steps leading to the production of the final product. Validation processes included the validation of the production of nanofibrous layers however also validation procedures of analytical methods especially content uniformity and dissolution which are determined by pharmacopeia allowing the release of the medicinal product for clinical evaluation. The produced products were also tested in *in vitro* permeation tests using fresh porcine sublingual membranes in order to verify the functionality of the proposed nanofibrous product.

The manufactured product was finally tested according to the rules of good clinical practice in a comparative study that examined the bioavailability of rizatriptan as the chosen drug from nanofibrous carrier to sublingual administration to healthy volunteers. The results of this thesis proved the utility of nanofibrous technology for the production of single-dose drug forms. The clinical trial demonstrated its improved pharmacokinetic

parameters compared to a therapeutically already marketed sublingual formulation of the lyophilized tablet.

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	5
Seznam obrázků.....	10
Seznam tabulek.....	13
Seznam zkratk.....	14
1 ÚVOD.....	16
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	17
2.1 Metody tvorby nanovláken.....	17
2.1.1 Dloužení.....	18
2.1.2 Šablonová syntéza.....	19
2.1.3 Samoskládání.....	20
2.1.4 Fázová separace.....	20
2.1.5 Metoda extruze heterogenních soustav.....	21
2.1.6 Foukání taveniny.....	22
2.1.7 Odstředivé spřádání.....	23
2.1.8 Elektrospining.....	24
2.2 Použití nanovláken.....	42
2.2.1 Vzdušná filtrace.....	42
2.2.2 Textilní aplikace.....	43
2.2.3 Medicinální aplikace.....	43
2.3 Nanovláčenné nosiče pro sublingvální podání léčiv.....	47
2.3.1 Mukóza dutiny ústní.....	47
2.3.2 Situace na trhu.....	48
2.3.3 Využití nanovláken při transmukosálním podání léčiv.....	52
2.4 Studovaná léčiva.....	52
2.4.1 Rizatriptan benzoát.....	52
2.5 Polymery.....	54
2.5.1 Hydroxypropylcelulosa.....	54

2.5.2	Hydroxypropylmethylcelulosa.....	54
2.5.3	Polyethylenoxid	54
2.6	Farmaceutický systém jakosti	55
2.6.1	Validace	56
3	CÍLE PRÁCE.....	57
4	MATERIÁL A METODY	58
4.1	Materiál	58
4.1.1	Polymery	58
4.1.2	Rozpouštědla.....	58
4.1.3	Látky a ostatní suroviny.....	58
4.1.4	Přístroje a zařízení	58
4.2	Metody	59
4.2.1	Výroba nanovlákných nosičů.....	59
4.2.2	HPLC stanovení rizatriptan benzoátu	60
4.2.3	Skenovací elektronová mikroskopie.....	61
4.2.4	Permeační <i>in vitro</i> experimenty.....	61
4.2.5	Obsahová stejnoměrnost	62
4.2.6	Disoluce	63
4.2.7	Kvalifikace zařízení Nanospider™.....	63
4.3	Validační procedury	65
4.3.1	Validace přípravy roztoků polymerů bez léčiva	65
4.3.2	Validace výroby nanovlákné vrstvy.....	65
4.3.3	Stabilitní studie	66
4.4	Studie biodostupnosti	66
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	67
5.1	Permeační studie s nanovlákným nosičem.....	67
5.2	Validační procedury	68
5.2.1	Validace výroby polymerních roztoků bez léčiva	68
5.2.2	Validace výroby nanovlákné vrstvy.....	69

5.2.3	Kvalifikace zařízení Nanospider™	73
5.2.4	Validace stanovení obsahu RZT	73
5.2.5	Validace postupu disoluce	74
5.3	Výroba šarže pro bioekvivalenční studii	74
5.3.1	Stanovení nečistot	75
5.3.2	Mikrobiální čistota	77
5.4	Propuštění přípravku	77
5.4.1	Stabilitní studie	78
5.5	Biodostupnostní studie	78
6	ZÁVĚRY	82
7	LITERATURA	83
8	SEZNAM PRACÍ	97

Seznam obrázků

Obrázek 1: Ilustrace výrobního procesu nanovláken dloužením.....	18
Obrázek 2: SEM snímky vláken vytvořených metodou dloužení membrány vyrobené eloxací (a) PCL nanovláknem (průměr 270 nm), (b) PVA nanovláknem (průměr 200 nm), (c) PMMA nanovláknem (průměr 560 nm), (d) HA+želatina (průměr 900 nm). ¹¹	19
Obrázek 3: Ilustrace vzhledu AAO membrány vyrobené eloxací: (a) pohled shora (b) pohled z profilu ¹³	19
Obrázek 4: Tvorba chitinových nanovláken metodou samoskládání ¹⁶	20
Obrázek 5: SEM snímky PLLA vlákenné matrice: vliv koncentrace polymerního roztoku, (a) 1% (m/v), (b) 7,5% (m/v) ¹⁸	21
Obrázek 6: SEM snímky PLA vlákenné matrice o koncentraci 5 % (m/v) v THF: vliv teploty gelace na vzhled struktury, (c) při teplotě 23 °C, (d) při teplotě -197 °C ¹⁸	21
Obrázek 7: SEM snímky PA6/COPET (polyamid 6/kopolymer polyetylen tereftalát) ²²	22
Obrázek 8: Procesní schéma výroby vláken metodou melt-blown.....	23
Obrázek 9: Vzhled zvlákňovací trysky ²⁶	23
Obrázek 10: A: Celkové funkční schéma odstředivé zvlákňování nanovláken, B: Detaily rotoru a celkový pohled na nanovláknovou odstředivku ²⁸	24
Obrázek 11: Základní schéma elektrostatického zvlákňování: (1) stříkačka napojená na pumpu, (2) jehla/kapilára jako jedna z elektrod, (3) stabilní část trysky, (4) obtáčecí zóna, (5) kolektor, (6) uzemnění, (7) zdroj vysokého napětí.....	25
Obrázek 12: Taylorův kužel a proud roztoku polymeru.....	28
Obrázek 13: Tvorba Taylorových kuželů a vymrštění polymeru	28
Obrázek 14: Chování proudu polymeru v elektrostatickém poli. Tvorba Taylorova kužele, rovný úsek vymrštěného vlákna, úsek prostorové nestability a ohýbání vlákna.	29
Obrázek 15: Proces elektrospinningu NanoStatics	30
Obrázek 16: Znázornění procesu a zařízení TOPTEC elektrospinningu.....	31
Obrázek 17: Elektrospinning PVA při (a) 32kV a (b) 43kV ⁵⁴	32
Obrázek 18: Různé typy zvlákňovacích elektrod (zleva rotující strunová, elektroda trnová, rotující váleček) ⁵⁴	33
Obrázek 19: Druhá generace zařízení pro proces zvlákňování vyvinutá ve firmě ELMARCO 2010 ⁵⁴	33

Obrázek 20: Nanospider™ v šíři 1,6 metru pro průmyslovou výrobu nanovláken ⁵⁴	34
Obrázek 21: Vliv koncentrace polymerního roztoku (polymer concentration) na průměry vláken (fiber diameter).	34
Obrázek 22: Vliv teploty na viskozitu polymerního roztoku polyamidu 6 ve směsi kyselina octová/kyselina mravenčí (2: 1) při různých koncentracích polyamidu ⁵⁴	35
Obrázek 23: SEM obrázky polystyrenových nanovláken v různých rozpouštědlových systémech (a) DMF/THF = 100/0; (b) DMF/THF = 75/25; (c) DMF/THF = 50/50; (d) DMF/THF = 25/75; (e) DMF/THF = 0/100.	36
Obrázek 24: SEM obrázky zvláknění polystyrenu při různé hodnotě vodivosti roztoku ⁵⁴	37
Obrázek 25: Závislost hodnoty průměru vláken (fiber diameter) na dielektrické konstantě (relativní permitivity) ⁵⁴	37
Obrázek 26: Efekt skladby rozpouštědlového systému (solvent composition) na velikost povrchové napětí (surface tension) ⁵⁴	38
Obrázek 27: „ribbon-like“ nanovláknena polystyrenu v DMF ⁵⁴	39
Obrázek 28: Fotografie výboje Nanospider™ ⁵⁴	39
Obrázek 29: Vzhled tvorby Taylorových kuželů a povlákněná plochy („area covered by nanofibers“) v závislosti na intenzitě elektrického pole („electric field intensity“) ⁵⁴	40
Obrázek 30: SEM obrázek nanovláknenné vrstvy kopírující nehomogenity podkladového materiálu, polyamid-6 ⁵⁴	41
Obrázek 31: Vyjádření významných osob k procesu elektrospinningu ⁵⁴	41
Obrázek 32: Homogenita nanovláknenné vrstvy v čase vyjádřená velikostí tlakového spádu v pascálech, příčný řez nanovláknenu vrstvou PA6 o plošné hmotnosti 0,28g/m ² ⁵⁴	42
Obrázek 33: Statistická data reprezentující zvyšující se počet publikací a patentů v oblasti medicíny získána z sciencedirect.com	43
Obrázek 34: Příklad růstů různých typů buněk na nanovláknenech PCL (keratinocyty, fibroblasty, lidské kostní buňky)	44
Obrázek 35: SEM snímek řezu PLLA nanovláken s částicí hydroxyapatitu v červeném kruhu ⁷⁸	45
Obrázek 36: Strukturní vzorek Rizatriptan benzoátu	52
Obrázek 37: Průběh změn mobilní fáze.....	61
Obrázek 38: Sestavená permeační Franzova cela (modifikovaná).....	62

Obrázek 39: Permeace 0,7 mg rizatriptanu z nanovláknenného nosiče a ze srovnávacího roztoku	68
Obrázek 40: Hmotnostní profily vyrobených šarží s vyznačenými limity ($\pm 15\%$) pro přípustnou hmotnost stripu a) šarže V1 b) šarže V2 c) šarže V3	70
Obrázek 41: Typický chromatogram z HPLC analýzy nanovláknenného produktu obsahující 5mg léčiva	71
Obrázek 42: Vztah hmotnosti nanovláknenného stripu a obsahu RZT pro	72
Obrázek 43: SEM snímky aktivní nanovláknenné vrstvy při 5000násobném zvětšení....	75
Obrázek 44: Nečistoty ve vyrobeném nanovláknenném přípravku RZT 5mg	76
Obrázek 45: Vzhled hodnoceného testovaného produktu, a) bílá vrstva obsahující léčivo, b) krycí vrstva bez léčiva obarvená Kollicoat IR Red	79

Seznam tabulek

Tabulka 1: Výčet technologií pro orálně rozpustné filmy (ODF – orálně rozpustné filmy i OTF – orální transmukozální filmy) ⁹⁹	48
Tabulka 2: Léčiva na předpis – stav vývoje ⁹⁹	49
Tabulka 3: Složení orodisperzních filmů ⁹⁹	51
Tabulka 4: Nastavení gradientu mobilní fáze pro HPLC	61
Tabulka 5: Zkoušky a kritéria pro kvalifikaci Nanospider™ NS 1WS500U	64
Tabulka 6: Testovací schéma klinické studie	79
Tabulka 7: Výstupy z bioekvivalenční studie	80

Seznam zkratek

µm	mikrometr
5-HT1	typ serotoninového receptoru
AAO	anodizovaná hliníková fólie
AUC _(0-t)	plocha pod křivkou od bodu 0 do sledovaného času t
BMI	index tělesné hmotnosti
C _{max}	maximálně dosažená koncentrace
CV	koeficient variace
DMAc	N,N-dimetylacetamid
DMF	dimethylforamid
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
ES	Elektrospining
GMEAN	geometrická průměrná hodnota
HA	hyaluronová kyselina
HFIP	hexafluoroisopropanol
hMSCs	lidské mezenchymální kmenové buňky
HPC	hydroxypropylcelulosa
HPLC	vysokotlaký kapalinový chromatograf
HPMC	hydroxypropylmethylcelulosa
HVAC	vytápění, ventilace, klimatizace
kV	kilovolt
m	hmotnost
M	molární
MC	mikrokrystalická celulosa
ml	mililitr
NA	nedefinováno
nm	nanometr
NSAID	nesteroidní protizánětlivá léčiva
ODF	orálně rozpustné filmy
OTF	orální transmukosální filmy
PCL	poly-ε-kaprolakton
PE	polyethylen

PEG.....	polyethylenglykol
PEO.....	polyethylenoxid
PES.....	polyester
PP.....	polypropylen
pKa.....	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
PLA.....	polymléčná kyselina
PLLA.....	poly-L-mléčná kyselina
PMMA.....	polymethylmetakrylát
PP.....	polypropylen
PVA.....	polyvinylalkohol
q.s.....	quantum statis
R ²	koeficient determinace
RH.....	relativní vlhkost
RZT.....	rizatriptan
RZTB.....	rizatriptan benzoát
SEM.....	skenovací elektronový mikroskop
<i>SEM</i>	směrodatná odchylka
SKP.....	Správná klinická praxe
SÚKL.....	Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv
SVP.....	Správná výrobní praxe
THF.....	tetrahydrofuran
TUL.....	Technická univerzita v Liberci
UK.....	Univerzita Karlova
v.....	objem
V.....	volt

1 ÚVOD

Disertační práce byla v počátcích po experimentální stránce vytvořena paralelně s mými aktivitami ve firmě Elmarco spol. s.r.o. Liberec a jako doktorandky katedry farmaceutické technologie na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové. Další část vznikala souběžně s mojí prací v nově zakládané firmě InStar Technologies a.s., Liberec, v níž jsem se v roce 2014 stala vedoucím farmaceuticko-technologického vývoje.

Cílem práce bylo na základě nejnovějších poznatků z oblasti tvorby nanovlákných produktů bezjehlovým elektrospiningem a nových vlastních poznatků vypracovat strategii a realizovat vývoj přípravku určeného pro systémovou aplikaci nízkomolekulárního léčiva sublingvální cestou podání.

Přípravky pro oromukosální aplikaci mají svoje místo v lékopisech poměrně krátkou dobu (od roku 2012). K nanovlákným nosičům léčiv pro systémovou aplikaci nejsou v závazných farmaceutických kompendiích dosud žádná ustanovení. Pravděpodobně z toho důvodu, že opakovaná, dostatečně reprodukovatelná a kapacitně robustní výroba takových léčivých přípravků dosud nebyla úspěšně realizována. Vzhledem k tomu bylo nutným východiskem vývojových prací využití i ověření použitelnosti souvisejících již zavedených lékopisných kritérií a požadavků pro jiné lékové formy.

Konečným cílem a smyslem práce bylo ověřit stávající teoretické předpoklady výhodného využití nanovlákného nosiče pro transmukosální podání léčiv provedením pilotního klinického pokusu s nově vyvinutým produktem. Získání příslušných povolení státní autoritou bylo podmíněno relevantními výsledky hodnocení nanovlákného nosiče vyrobeného a otestovaného za podmínek Správné výrobní praxe a Správné laboratorní praxe. Pro dokumentaci hlavních kroků jsou využité metody spolu s vybranými výsledky v rozsahu nezbytném prezentovány v experimentální části práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Nanotechnologie prodělávají od konce dvacátého století velký rozvoj ve sféře akademického výzkumu a vývoje, návazně také v oblasti průmyslové a komerční. Odpovídá tomu dnes již velmi rozsáhlá časopisecká, knižní i patentová literatura, počet publikačních výstupů přitom neustále roste.

Podle nejjednodušší a široce akceptované definice se nanomateriály vyznačují alespoň jedním externím rozměrem v oblasti 1 až 100 nanometrů.¹ Vykazují neobvyklé fyzikálně-chemické vlastnosti související zejména s velmi vysokou hodnotou poměru velikosti jejich specifického povrchu k objemu (větší než $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$) póru.¹ Mohou mít velmi odlišné geometrické uspořádání a vnější i vnitřní strukturu, terminologicky se dosud jednoznačně neukotvily. Z velikostních a tvarových variant nanomateriálů popisovaných v souvislosti s podáváním léčiv lze uvést například bezrozměrné nanotečky (nanodots), jednorozměrné nanočástice (nanoparticles), nanodrátky (nanowires), nanotrubic (nanotubes) nebo a nanolupínky (nanochips), ale také dendrimery a některé liposomy. Zvláště zajímavou podskupinu nanomateriálů představují nanovlákná (nanofibers, nanofibres), zejména polymerní, z nichž se připravují různě komponované vrstvy.

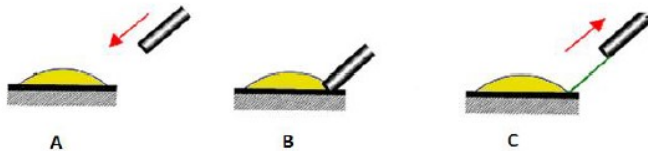
Existuje několik možných metod přípravy polymerních nanovláken, z nichž některé zůstávají v oblasti laboratorní přípravy, jiné se podařilo vyvinout do úrovně vhodné k průmyslové produkci.

2.1 Metody tvorby nanovláken

Nejrozšířenějším způsobem výroby nanovláken je elektrostatické zvlákňování, zkráceně elektrospining (ES, z anglického electrospinning).² Z dalších metod výroby nanovláken lze zmínit odstředivé spřádání (force spinning) a metodu foukání taveniny (melt-blown). K laboratorním technikám přípravy nanovláken patří metoda dloužení (drawing), metoda šablonové syntézy (template synthesis), metoda fázové separace (phase separation) a také samoskládání (self-assembly).^{3,4,5} V následujících odstavcích budou s využitím několika časopiseckých a knižních přehledů^{6,7,8} zmíněné metody popsány více. S ohledem na vlastní experimentální část bude největší prostor věnován elektrostatickému zvlákňování technologii Nanospider™.

2.1.1 Dloužení

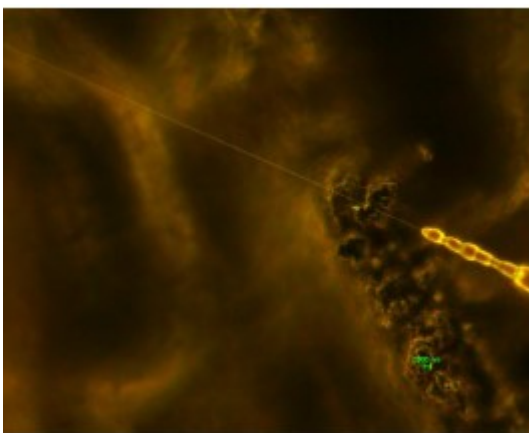
Jedná se o relativně novou metodu, první zmínky o ní jsou v publikaci z roku 1998.⁹ Touto metodou lze v laboratorním měřítku získat jednotlivá nanovlákná, což například elektrospinning neumožňuje a lze tedy studovat jednotlivé vlastnosti takto vyrobených vláken.¹⁰ Existuje několik cest přípravy jednotlivých nanovláken. Nejjednodušší z nich je schematicky popsána na obrázku 1.



Obrázek 1: Ilustrace výrobního procesu nanovláken dlužením¹¹

Při této metodě je na podkladový materiál aplikována milimetrová kapka polymerního roztoku (A). Mikropipeta se poté pohybuje směrem dolů k hraně kapky, se kterou se dostává do kontaktu (B) a při zpětném pohybu mikropipety se vytáhne vlákno určitou rychlostí v závislosti na typu polymeru (C). Vzhled výsledného vlákna velmi závisí na použitém polymeru, rychlosti dlužení a rychlosti vypařování rozpouštědla.

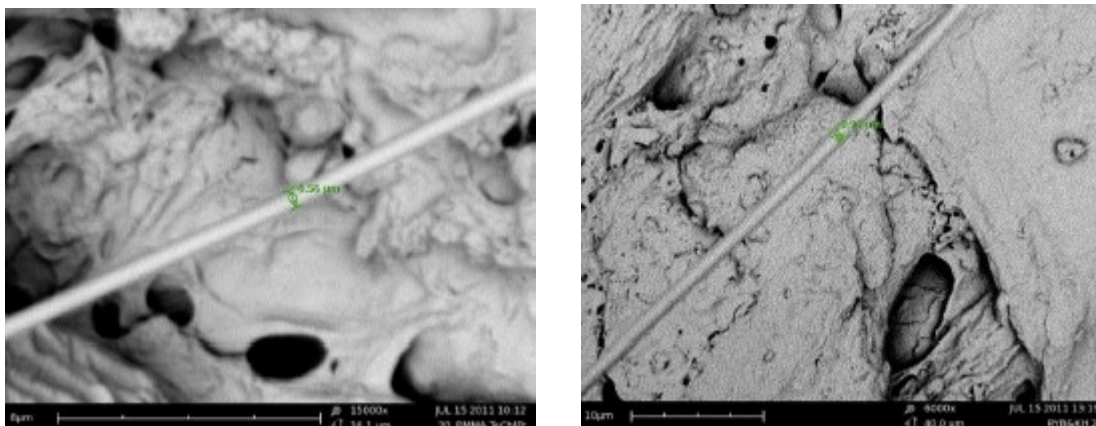
Tato metoda tvorby nanovláken je prováděna za pomoci mikropipet. Existuje možnost použití zařízení zvaného mikromanipulátor, který poskytuje kontinuální dávkování přesného množství polymeru. Metoda dlužení je vhodná pro viskoelastické materiály, které jsou schopny vydržet silné deformace a tahy během dlužení. Průmyslově je používána pro tvorbu optických vláken.¹²



(a) PCL nanovláknko (270 nm)



(b) PVA nanovláknko (200 nm)



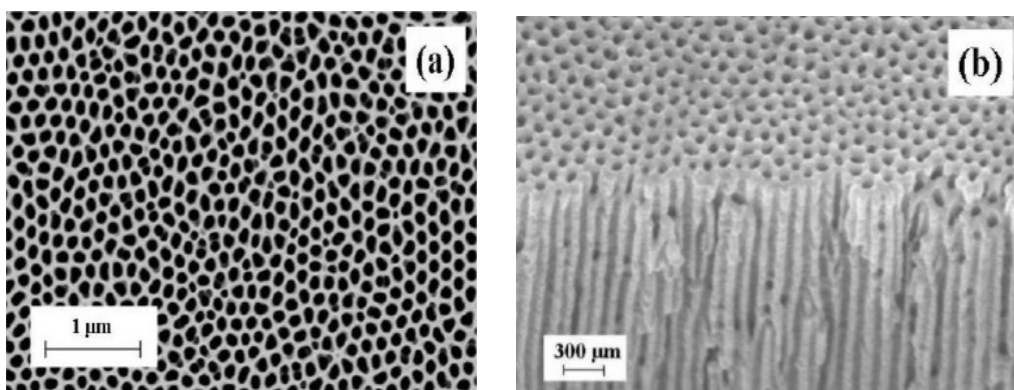
(c) PMMA nanovlákná (560 nm)

(d) HA+želatína (900nm)

Obrázek 2: SEM snímky vláken vytvořených metodou dloužení membrány vyrobené eloxací (a) PCL nanovlákná (průměr 270 nm), (b) PVA nanovlákná (průměr 200 nm), (c) PMMA nanovlákná (průměr 560 nm), (d) HA+želatína (průměr 900 nm).¹¹

2.1.2 Šablonová syntéza

Tato metoda tvorby nanovláken vychází z použití určité šablony či membrány k získání požadovaných nanovláknenných materiálů. Jako vhodné membrány se nejčastěji používají oxidy kovů, například oxid hlinitý. Syntéza takové membrány, která se v literatuře označuje jako AAO membrána (anodized aluminium oxide), vychází z procesu eloxace hliníkové fólie, tedy elektrolytické oxidace hliníku za použití kyselin a elektrického napětí. Jeden z možných způsobů výroby AAO membrány o velikosti pórů 25 nm zahrnuje použití 0,5 M roztoku kyseliny sírové při použití 20 V elektrického napětí.¹³



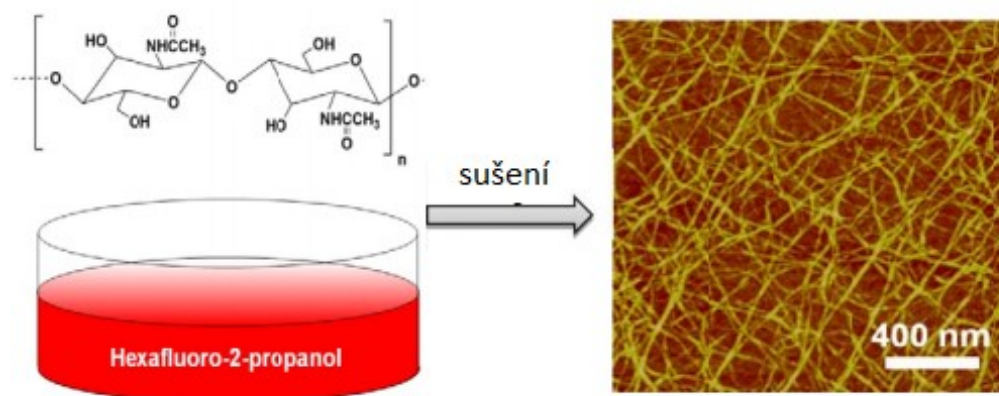
Obrázek 3: Ilustrace vzhledu AAO membrány vyrobené eloxací: (a) pohled shora (b) pohled z profilu¹³

Při výrobě nanovláken polyakrylonitrilu (PAN) pomocí šablonové syntézy se nejprve připraví polymerní roztoku PAN v dimetylformamidu (DMF).

Polymerní roztok je protlačován skrz AAO membránu za pomoci vodní pumpy. Nanovlákná procházející skrz membránu tuhnou v ztužujícím roztoku (solidification solution) ze směsi DMF s ultračistou odvzdušněnou vodou, poté jsou vlákna několikrát vyprána v deionizované vodě.¹⁴

2.1.3 Samoskládání

Podstatou této metody je spojování molekul intramolekulárními interakcemi. V roce 2009 byl vyvinut nový postup přípravy chitinových nanovláken *in vitro* rozpouštěním β -chitinu v hexafluoroisopropanolu (HFIP) nebo směsi chloridu lithného a N,N-dimetylacetamid (DMAc).¹⁵ V případě HFIP vede prosté sušení při mírných podmínkách k přípravě chitinových nanovláken o velmi malých průměrech, konkrétně asi 3 nm. Tento průměr nanovláken odpovídá biologickým nanofibrilám v živých organismech. V případě použití druhého zmíněného rozpouštědlového systému dochází k vytvoření nanovláken precipitací připraveného roztoku za pomoci velkého přebytku (až 25 násobku) objemu vody k objemu roztoku chitinu.¹⁶

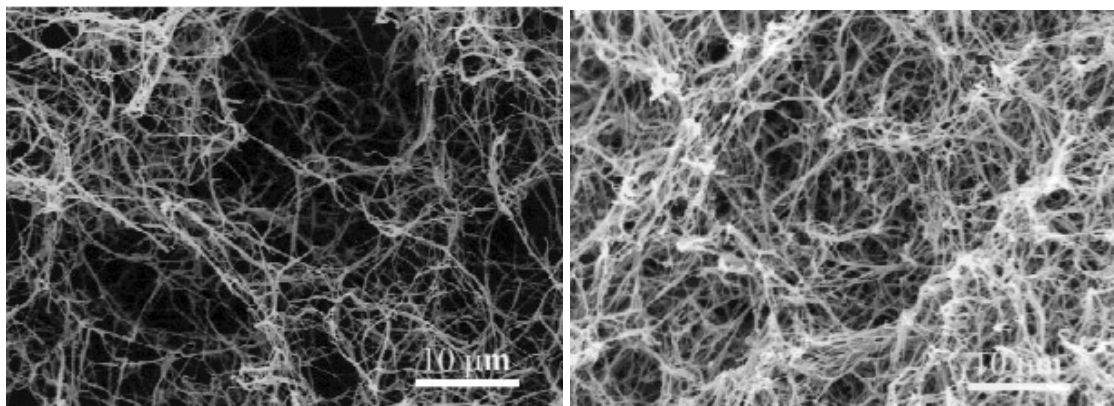


Obrázek 4: Tvorba chitinových nanovláken metodou samoskládání¹⁶

2.1.4 Fázová separace

Fázová separace je metoda zahrnující několik kroků, kterými jsou příprava polymerního roztoku, gelace s fázovou separací, extrakce rozpouštědla z gelu za pomoci vody, ochlazení a sušení. Typicky se této metody využívá při přípravě porézních biodegradabilních materiálů z polymléčné kyseliny (PLLA), případně z kopolymeru mléčné a glykolové kyseliny.^{4,17} V procesu gelace hraje roli několik parametrů, které mají vliv na finální vzhled nanostruktury. Především se jedná o volbu rozpouštědla, případně

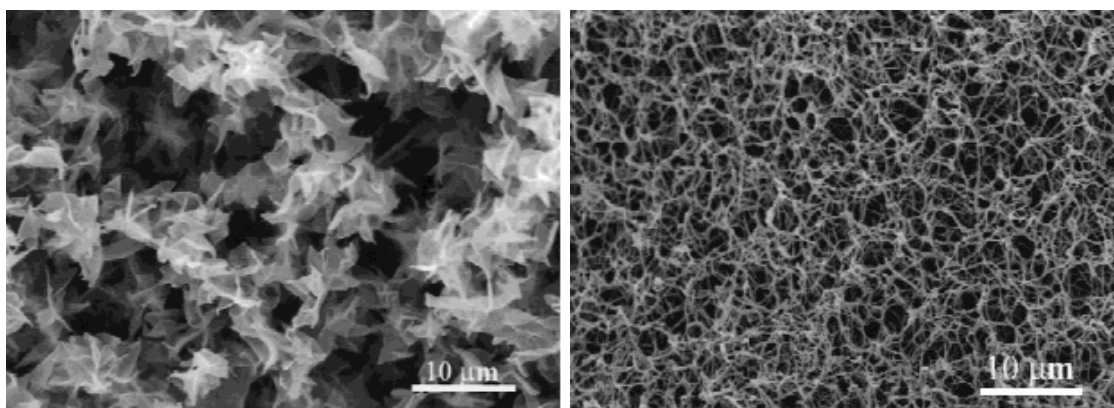
směsi rozpouštědel (THF, DMF, THF/metanol), koncentraci polymeru v roztoku a teplotu gelace.¹⁸



(a)

(b)

Obrázek 5: SEM snímky PLLA vlákenné matrice: vliv koncentrace polymerního roztoku, (a) 1% (m/v), (b) 7,5% (m/v)¹⁸



(a)

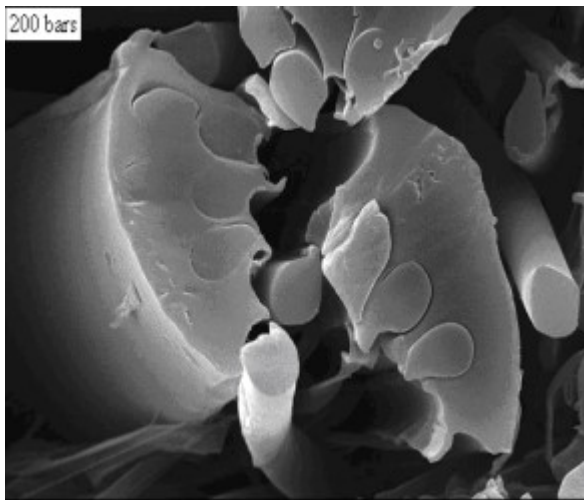
(b)

Obrázek 6: SEM snímky PLA vlákenné matrice o koncentrace 5 % (m/v) v THF: vliv teploty gelace na vzhled struktury, (c) při teplotě 23 °C, (d) při teplotě -197 °C¹⁸

2.1.5 Metoda extruze heterogenních soustav

Tato výrobní technologie pod propagačním označením „island in the sea“ vychází z dvousložkových heterogenních polymerních soustav, přičemž materiál pro tvorbu vlákna jednoho polymeru je dispergován v prostředí (roztoku, taveniny) druhého polymeru, který má výrazně rozdílnou rozpustnost. Tvorby vláken je dosaženo použitím zvláknovací přepážky, kterou se výchozí substrát protlačuje, přičemž vzniká soustava

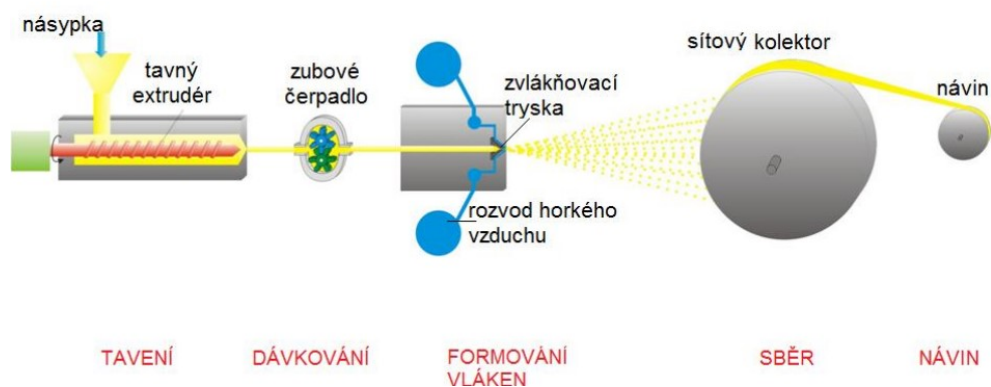
vláken jednoho polymeru obklopená vlákny druhé komponenty.^{19,20} V poslední dekádě 20. století na tomto principu vyvinula společnost Hills Incorporation, vyrábějící v USA různé druhy vlákenných produktů, nové výrobní zařízení k produkci dvousložkových mikrovláken a nanovláken. Uvádí se, že touto technologií lze dnes dosáhnout tvorbu až 4000 takových nanovláknenných podjednotek současně.^{21,22,23} Bez dalších podrobností firma zmiňuje i možnost využití technologie v medicínských aplikacích. Odvozené technologie dále údajně umožňují tvorbu nanotrubic a elektricky vodivých nanovláknenných kompozitů s kovy.²⁴



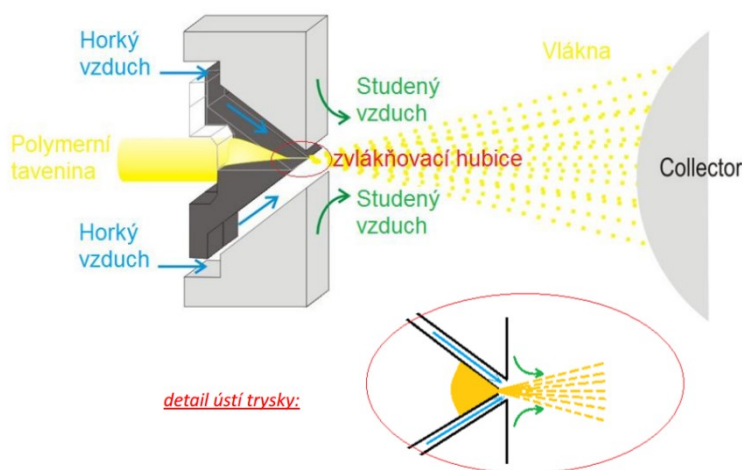
Obrázek 7: SEM snímky PA6/COPET (polyamid 6/kopolymer polyetylen tereftalát)²²

2.1.6 Foukání taveniny

Název technologie (melt-blown) metodu dobře vystihuje, byla vyvinuta již v 50. letech dvacátého století v americké Naval Research Laboratory s cílem vyrobit submikronová vlákna.²⁵ Proces výroby je znázorněn na obrázku 8. Do extrudéru se vkládá polymer (např. PP, PE, PES), který se za zvýšené teploty roztaví a následně zubovým čerpadlem dopraví k trysce, ke které je zároveň přiváděn stlačený horký vzduch. Vytlačovaná tavenina je při průchodu tryskou strhávána prouděním studeného vzduchu a vzniklá vlákna po určité dráze dloužení dopadají na kolektor, ze kterého jsou dále navíjena. Pro lepší manipulaci s vlákninou se do technologie zařazuje ještě kalandrování, při kterém dochází ke zpevnění struktury.



Obrázek 8: Procesní schéma výroby vláken metodou melt-blown²⁶



Obrázek 9: Vzhled zvlákňovací trysky²⁶

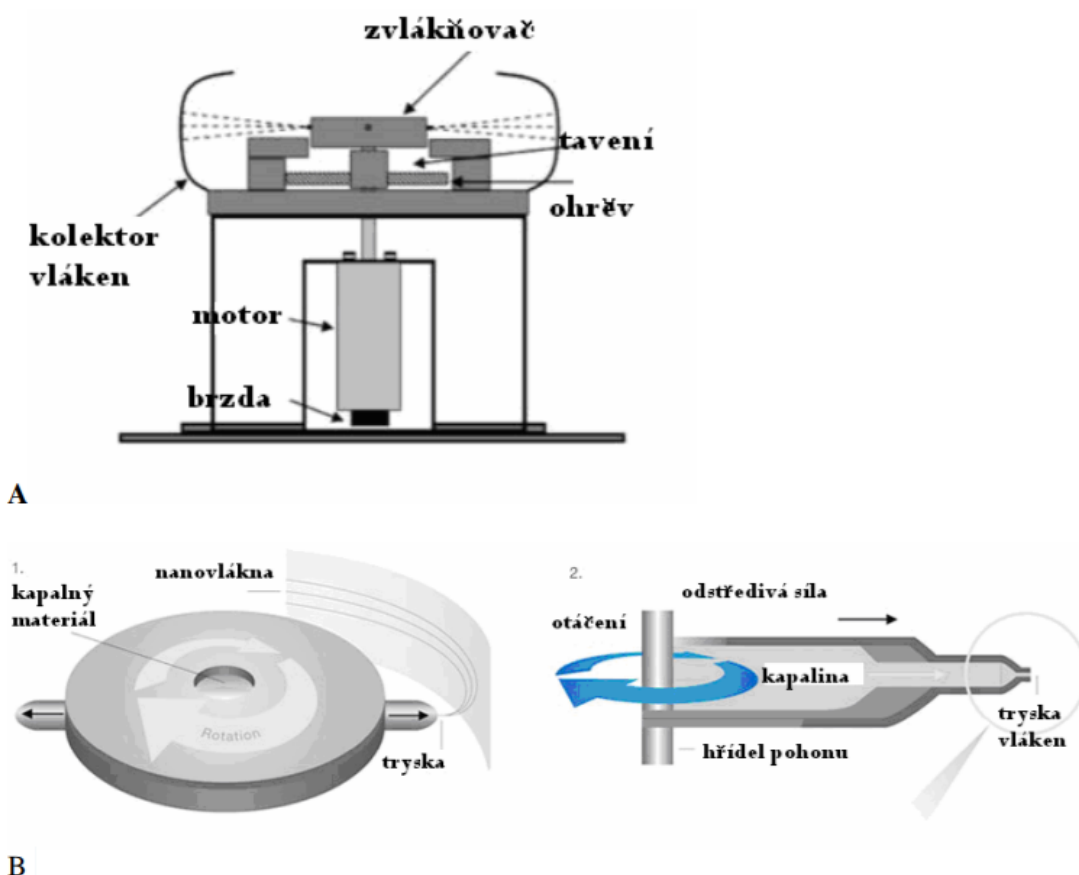
Nastavením vhodných parametrů jako je velikost vzdálenosti štěrbin trysky od studeného vzduchu, velikost štěrbin přívodu horkého vzduchu a velikosti štěrbin unášející vlákna studeným vzduchem lze docílit výroby nanovláknenných materiálů, ovšem se značně širokou distribucí průměrů vláken.²⁷

2.1.7 Odstředivé spřádání

Podstatou výrobního zařízení pro tuto metodu (force spinning) je zvlákňovací komora se dvěma tryskami. Tekutý materiál je vytlačován odstředivou silou tryskami do okolí, po výstupu je strháván proudícím vzduchem a uložen v podobě vláken na okolní válcový kolektor. Rozčleňování vláknenného materiálu do nanovláken je zajištěno prouděním vzduchu se současným elektrostatickým odpuzováním. Elektrostatické pole vzniká triboelektrickým nábojem vytvořeném třením v trysce a třením s okolním vzduchem.²⁸

Výrobou zařízení pro odstředivé zvlákňování se zabývá například významná americká technologická společnost FibeRio,^{29,30,31,32} která je v současnosti největším konkurentem ostatním producentům na trhu nanovláken určených zejména k tepelně izolačnímu a zvukově izolačnímu využití.

V České republice zmiňuje studium této technologie pro medicínské využití v podobě jako nosičů léčiv pracoviště Akademie věd ČR.³³

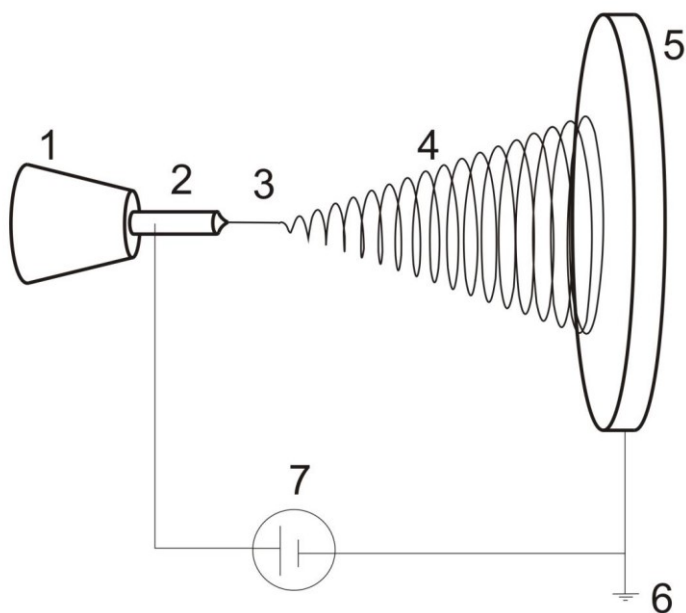


Obrázek 10: A: Celkové funkční schéma odstředivé zvlákňování nanovláken, B: Detaily rotoru a celkový pohled na nanovláknovou odstředivku²⁸

2.1.8 Elektrospining

Elektrostatické zvlákňování, elektrospining (ES) je proces, při kterém dochází vlivem silného elektrického pole na roztok nebo taveninu k tvorbě velmi jemných vláken o průměrech v desítkách či stovkách nanometrů. Může probíhat z ostře zakřivených povrchů typu jehly (trnu) i volně zakřivených ploch na elektrodách typu struna, váleček, disk (a řady dalších geometrií).

Elektrody rozdělujeme na zvlákňovací, na které je nanášen polymerní roztok a elektrodu sběrnou, kolektor. Před sběrnou elektrodou je umístěn substrát, podkladová textilie, na který dopadají vytvořená nanovlákná. Rychlostí posunu substrátu lze definovat finální tloušťku nanovláknenné vrstvy, které se běžně pohybuje řádově v desítkách mikrometrů.



Obrázek 11: Základní schéma elektrostatického zvlákňování: (1) stříkačka napojená na pumpu, (2) jehla/kapilára jako jedna z elektrod, (3) stabilní část trysky, (4) obtáčecí zóna, (5) kolektor, (6) uzemnění, (7) zdroj vysokého napětí.³⁴

2.1.8.1 Historie elektrospiningu

První zmínka o elektrostatickém zvlákňování polymerního roztoku pochází podle publikovaných přehledů^{35,36} již z roku 1902 v patentech J. F. Cooleyho a W. J. Mortona. Popisují nanosení viskózního polymerního roztoku na kladně nabitou elektrodu a následnou indukci zvlákňování k opačně nabité elektrodě. O rok později podal J. F. Cooley nový patent, v němž popsal, že polymerní roztok nemusí být nutně v kontaktu s elektrodou, nicméně musí být v její blízkosti. Současně také definoval potřebu určité viskozity polymerního roztoku.³⁷

V roce 1934 patentoval A. Formals vylepšenou metodu ES. Popsal systém pohyblivého kolektoru nanovláken, který dovoluje určitou orientaci vláken při zvlákňování a vyzdvihl důležitost adekvátního vysušení vláken před dopadem na kolektor. V roce 1944 podal další čtyři patenty a zároveň popsal metodu tvorby multikomponentních vláken. V roce

1936 popsal C. L. Norton deskovou kolektorovou elektrodu ve spojení s generátorem příčně působící elektromotorické síly, což zlepšilo kvalitu a sběr vláken.³⁸

Historicky významná byla pro oblast elektrospinningu šedesátá léta 20. století, kdy G. Taylor popsal chování kapek roztoku polymerů na špičce jehlové trysky v elektrickém poli. Ve svých studiích dospěl k závěru, že polymerní kapka vlivem elektrického pole získává tvar kužele, z jehož vrcholu se vymršťuje polymerní vlákno (v angličtině „jet“), a to způsobem, jaký je z reálného experimentu dokumentován na obrázku 12.³⁹

V roce 1966 popsal H. L. Simons přípravu nanovlákných vrstev o různé hustotě vláken z polykarbonátů a polyuretanů za použití kovových mřížek. V jeho patentu byly popsány klíčové parametry procesu zvlákňování, konkrétně viskozita, vodivost, dielektrická konstanta a těkavost rozpouštědla. V roce 1971 popsal P. Baumgarten závislost průměru vláken na viskozitě polymerního roztoku a na intenzitě elektrického pole.⁴⁰ I. Hayati, J. M. Deitzel, Y. M. Shin či P. W. Gibson, společně se svými kolegy v dalších letech proces ES dále zkoumali, detailněji studovali efekt elektrického pole, růstu aplikovaného napětí na tvar povrchu kapky, apod.^{41,42,43,44} Jejich výsledky ovšem zůstávaly mimo oblast praktického využití. Až v devadesátých letech 20. století se o obnovení zájmu o ES zasloužil D.H. Reneker.⁴⁵ Následně bylo do současnosti touto metodou zvlákňováno přes 100 druhů přírodních i syntetických polymerů a další stovky jejich různých směsí.

V rámci průmyslového procesu ES byl významný zejména patent Prof. O. Jirsáka z Technické Univerzity v Liberci, který popsal metodu bezjehlového ES nazvanou Nanospider™ vhodnou pro průmyslovou výrobu nanovláken.⁴⁶

Později byly popsány některé další modifikace elektrospinningu, například jeho kombinace s působením proudu vzduchu (electroblowing)⁴⁷ nebo kombinace s výše zmíněným odstředivým působením rotační energie (forcespinning). Jejich využití pro dávkované podání léčiv je sporné, především z hlediska nároků na přesnost a správnost dávkování.

2.1.8.2 Teoretický popis elektrostatického zvlákňování

Proces elektrostatického zvlákňování lze rozdělit do několika následujících kroků: tvorba kapek (droplet generation), formování Taylorova kuželu (Taylor's cone formation), vymršťení vlákna polymeru (launching of the jet) prodlužování rovného segmentu (elongation of straight segment), region nestability obtáčení (whipping instability region) a tuhnutí vláken (solidification into nanofibers).

Tvorba kapek

Prvním krokem při elektrospinningu je nabití polymerní kapky. Typicky je polymerní roztok velmi malou rychlostí přiveden na hrot kapiláry. Pokud není na hrot přivedeno elektrické napětí, polymerní kapka vlivem gravitace skápne a zaniká (například skápne). Jakmile je na kapičku aplikováno elektrické pole získává polymerní kapka na povrchu dodatečné dílčí elektrostatické náboje. Jejich vzájemné odpuzování působí proti povrchovému napětí, opačným směrem, což vede ke změně tvaru povrchu kapky z široce sférického na tvar podlouhlého kužele (Taylorův kužel), z něhož se uvolňuje vlákno. Toto vlákno má ke sběrné elektrodě složitou cestu, protože je vystaveno nestabilitě vyvolané elektrickými náboji.

V nepřítomnosti viskózní polymerní látky se vlákno kapaliny nakonec atomizuje na malé kapičky. Dochází k jejímu rozprašování, což je podstatou procesu elektroprašování (electrospraying),⁴⁸ Také tento proces se při výrobě léčivých přípravků uplatňuje, jeho problematika představuje samostatnou širokou oblast.

Pokud kapalina obsahuje rozpuštěný polymer, začíná hrát zvýšenou roli také její viskozita. A pokud je hodnota viskozity dostatečně velká, potom viskozita brání rozdělování vlákna do kapiček a z polymerního roztoku tak vznikne vlákno.⁴⁹ Toto vlákno je na cestě ke sběrné elektrodě vystavováno elektrickým silám způsobujícím jeho prohýbání, na cestě ke kolektoru vlákno prochází složitou drahou (viz obr. 14).

V průběhu pohybu a protahování vlákna se odstraní rozpouštědlo a vlákno se nejen prodlužuje, ale také ztenčuje, někdy také štěpí, vznikají vlákna submikronového průřezu, tedy nanovlákna.

Extrémní prodloužení a ztenčení odlišuje ES od jiných technologií produkujících vlákna. Vzhledem k tomu, že k existenci elektrických sil je nutné přihlížet také při ES polymerních soustav s obsahem léčiv, je vhodné jeho problematiku popsat poněkud detailněji.

Vytvoření Taylorova kuželu

Deformace relativně malých kapek vlivem elektrického proudu byla popsána již v roce 1931.⁵⁰ Taylorův kužel se formuje při dosažení kritického elektrického napětí V_C na kapku na konci kapiláry o délce h a poloměru R . γ – povrchové napětí kapaliny, L – velikost vzduchové mezery

$$V_c^2 = (2 L/h)^2 (\ln 2h/R - 1,5) (0.117\pi R \gamma)^{51} \quad (1)$$

Taylor vyjádřil hodnotu úhlu, který je potřeba k vyrovnání povrchového napětí polymerního roztoku elektrostatickými silami hodnotou 49,3.



Obrázek 12: Taylorův kužel a proud roztoku polymeru⁵²

Vymrštění vlákna polymeru

Vzhledem k velkému propletení polymerních řetězců v koncentrovaném roztoku je síla, kterou disponuje kapka prostřednictvím coulombovské repulze nedostatečná k její explozi. Při studiu pohyblivosti částic v proudech vláken J. M. Deitzel a spol. předpokládali, že štěpení kapky vzniká na povrchových vrstvách kužele.⁵³ Může to být vysvětleno smykovými silami na povrchu, které vznikají rozdílem potenciálů mezi základnou a špičkou Taylorova kužele. U některých zvlákněvaných soustav bylo pozorováno tvoření několika vláken pocházejících ze stejné kapičky.



Obrázek 13: Tvorba Taylorových kuželů a vymrštění polymeru⁵⁴

Prodlužování rovných segmentů

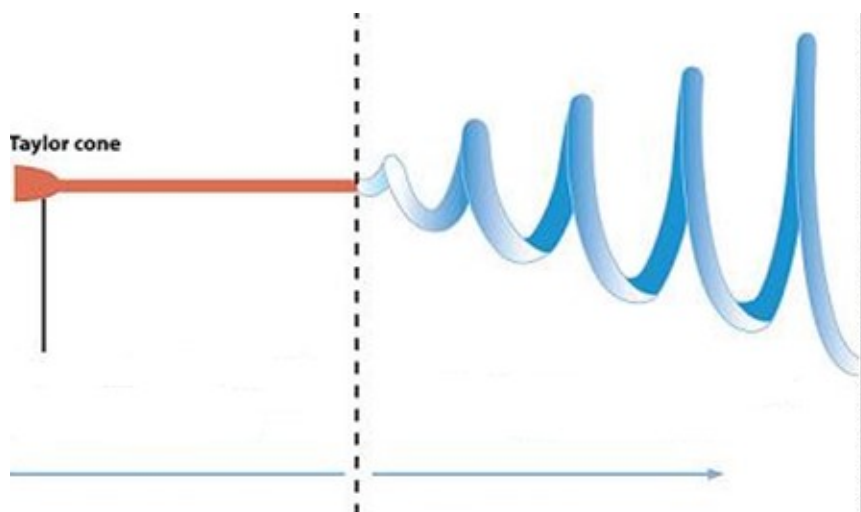
K vymrštění roztoku z kapičky polymeru dochází při aplikaci elektrického napětí překračujícího kritické elektrické napětí V_c . Coulombovské odpuzování povrchových

nábojů na vymrštěném proudu polymeru má axiální složku, která vznikající vlákno při pohybu ke kolektoru prodlužuje. Vlivem odpařování rozpouštědla dochází ke snižování průměru vymrštěného proudu polymeru o několik řádů, zároveň dochází ke zvyšování povrchového náboje na jednotce plochy vlákna. Chování vymrštěného proudu polymeru před tím, než dojde k jeho obtáčení, vykazuje relativně přímkový počáteční průběh.⁵⁵

Region nestability obtáčení

Z počátku přímý proud vymrštěného polymeru je při průchodu ke kolektoru destabilizován. V závislosti na velikosti elektrostatického pole lze pozorovat existenci několika různých nestabilit. Jde o Raleighovu nestabilitu, spočívající ve tvorbě kapiček na vláknech dokud je elektrostatické pole příliš nízké a viskozita roztoku nízká, dále nestabilitu ohýbání (bending) a nestabilitu obtáčení (whipping).^{56,57} Nestabilita obtáčení je primárně zodpovědná za snižování průměrů nanovláken, jedná o velmi rychlý proces.

Na stáčené vlákno polymeru působí několik sil: gravitační síla F_G závisující na hustotě roztoku, elektrostatická síla F_E definována použitým elektrickým polem, odpudivá Coulombova síla F_C , viskoelastická síla působící proti proudu vymršťování polymeru, síly povrchového napětí působící proti protahování proudu polymeru a třecí síly mezi povrchem vymrštěného proudu polymeru a okolním vzduchem. Souhra výše zmíněných sil předurčuje výsledný průměr vymrštěného proudu polymeru.⁵⁸



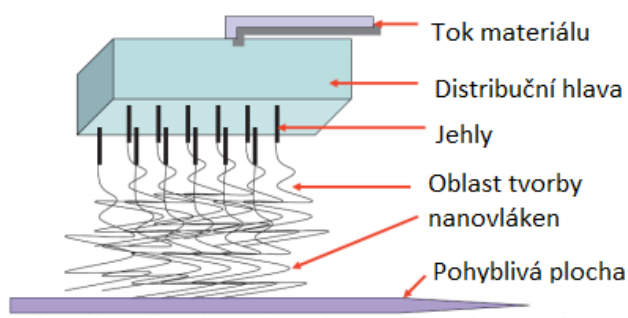
Obrázek 14: Chování proudu polymeru v elektrostatickém poli. Tvorba Taylorova kužele, rovný úsek vymrštěného vlákna, úsek prostorové nestability a ohýbání vlákna.⁵⁹

Tuhnutí vláken

Rychlost lineárního proudění polymeru směrem k oblasti nestability a obtáčení (stáčení) je ovlivněna rychlostí odpařování rozpouštědla. Těkavost rozpouštědla tedy hraje při kontrole průměrů vláken významnou roli.⁶⁰

2.1.8.3 Typy elektrod, zařízení k průmyslovému použití

Veškeré patenty a publikace od začátku 20. století vycházely k nastartování procesu zvlákňování z použití jehly či ostrého hrotu. Cílem výzkumu a vývoje bylo vytvoření takového zařízení, které bude schopné produkovat nanovlákná v průmyslové šíři a kvalitě.⁶¹ Společnost NANOSTATICS vyvinula v roce 2007 technologii založenou na využití několika trysek, do kterých se z jednoho zásobníku dávkoval polymerní roztok. Problémem této technologie bylo odkapávání polymerního roztoku na již vytvořená nanovlákná.



Obrázek 15: Proces elektrospiningu NanoStatics⁶²

V roce 2011 představila společnost TOPTEC další verzi (viz obr. 16) zařízení k tvorbě nanovláken. Používá opačný směr zvlákňování, tedy směrem nahoru, s cílem zabránit odkapávání polymerního roztoku na vytvořená vlákna.



Obrázek 16: Znázornění procesu a zařízení TOPTEC elektrospinningu⁶³

K průmyslové produkci nanovláken potřebují obě výše zmíněné technologie velké množství jehel, řádově tisíce, které zaručují rychlou výrobu a relativně dostačující homogenitu produktu. V oblasti zdravotnictví komplikují reálnou komerční aplikaci obou těchto technologií požadavky na metodiku čištění značného množství jehel.

Převratným momentem pro průmyslovou aplikaci nanovláken se stal začátek 21. století, kdy prof. Oldřich Jirsák společně se svým týmem z Technické Univerzity v Liberci (TUL) vyvinuli průmyslovou metodu tvorby nanovláken s názvem Nanospider™.⁴⁶ Tato technologie spočívá ve zvlákňování z volné hladiny polymerního roztoku, při kterém přirozeně dochází k formování Taylorových kuželů. Detailněji popsal celou teorii prof. D. Lukáš se svým týmem, když předpovídá velikost kritického napětí V_C (kritické elektrické intenzity E_C) na základě hladinových vln vznikajících v elektrickém poli.⁶⁴ Zároveň popisuje závislost vzdálenosti vymršťovaných polymerních trysek mezi sebou na aplikovaném přiloženém napětí. Při použití disperzního zákona byl sestaven vzorec pro kritickou hodnotu elektrického pole následovně:

$$E_c = \sqrt[4]{4\gamma\rho g/\varepsilon^2} \quad (2)$$

V tomto vztahu je E_C kritická hodnota elektrického pole, γ povrchové napětí kapaliny, ρ je hustota kapaliny, g je tíhové zrychlení a ε je permitivita vakua.

Z této rovnice odvodili výraz pro kritickou délku vln a tedy průměrnou vzdálenost mezi jednotlivými tryskami vystupujícími z povrchu kapaliny:

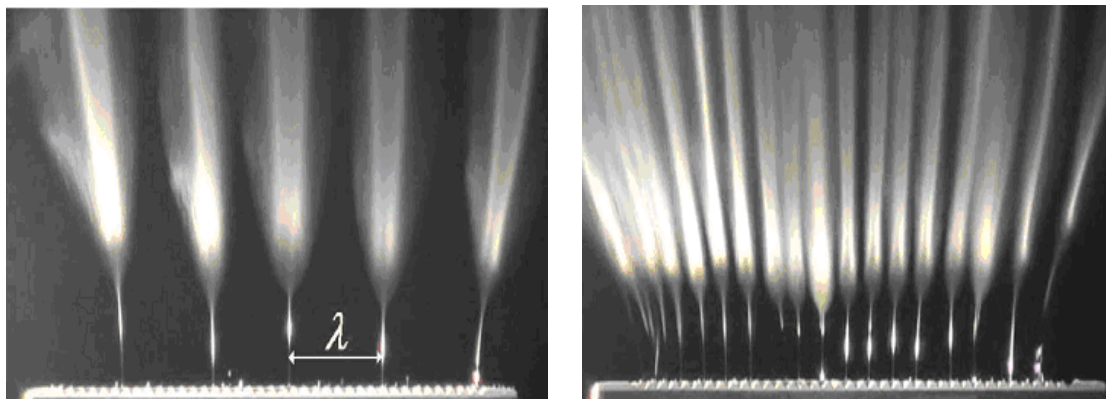
$$\lambda_c = 2\pi/k_c = 2\pi a \quad a = \sqrt{\gamma/\rho g} \quad (3)$$

Kde k_c je počet vln při kritické vlnové délce a a je délka kapiláry.

Výsledná rovnice popisující vzdálenost mezi jednotlivými vymrštěnými proudy polymeru, jak je znázorněno na obr. 17, vypadá následovně:

$$\lambda = 12\pi\gamma/[2\varepsilon E_0^2 + \sqrt{(2\varepsilon E_0^2)^2 - 12\gamma\rho g}] \quad (4)$$

Kde E_0 je použitá energie elektrického pole.



Obrázek 17: Elektrospining PVA při (a) 32kV a (b) 43kV⁵⁴

V roce 2004 česká společnost ELMARCO Ladislava Marešem podepsala s TUL exkluzivní smlouvu o průmyslovém využití technologie Nanospider™ a cílem výroby komerčních zařízení pro průmyslovou výrobu nanovláken. Díky společnosti ELMARCO došlo ke značnému konstrukčnímu vývoji technologie Nanospider™, což lze prezentovat na velkém posunu ve změně tvaru zvlákňovací elektrody. Původní vynález prof. Jirsáka definoval rotující váleček jako základní typ zvlákňovací elektrody.

Brzy se ukázalo, že tato elektroda není vhodná pro všechny typy polymerních roztoků. Byla vyvinuta elektroda trnová, u které však bylo problémem nepřírozené generování míst ke zvlákňování. O pár měsíců později následovala rotující elektroda strunová, která již tento problém řešila. Výzvou k vyřešení nadále zůstávalo zvlákňování z roztoku, který byl ve všech výše popsaných systémech umístěn do zvlákňovací vaničky a v průběhu procesu ES tak docházelo k postupnému zvyšování koncentrace roztoku polymeru a ke změně finálních vlastností vlákenné vrstvy.



Obrázek 18: Různé typy zvláknovacích elektrod (zleva rotující strunová, elektroda trnová, rotující váleček)⁵⁴

Významnou potíž nadále představovala následná likvidace roztoku zbylého po zvláknování, což při určitých složeních polymerních roztoků představovalo ekologický problém.

V roce 2010 společnost ELMARCO přišla s dalším řešením a představila novou linku tzv. druhé generace, která používá jako zvláknovací elektrodu drát (viz obr 19), na který je posuvným jezdcem aplikováno takové přesné množství polymerního roztoku, které se při procesu zvláknění právě spotřebuje.



Obrázek 19: Druhá generace zařízení pro proces zvláknování vyvinutá ve firmě ELMARCO 2010⁵⁴

ELMARCO nabízí ve svém portfoliu stroje laboratorní až po průmyslová zařízení s produkční šíří 1,6 m vyrobeného nanovláknenného pásu. Byla již prodána do řady zemí po celém světě a aktuálně slouží především v oblasti vzdušné či kapalně filtraci.



Obrázek 20: Nanospider™ v šíři 1,6 metru pro průmyslovou výrobu nanovláken⁵⁴

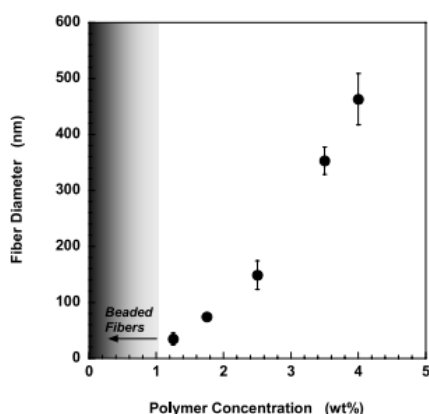
2.1.8.4 Faktory ovlivňující kvalitu nanovlákněné vrstvy

Proces elektrostatičkého zvlákňování ovlivňuje velká škála parametrů. U bezjehlových procesů je lze rozdělit na parametry vztahující se k polymeru a rozpouštědlu a parametry náležející k procesu samotnému, tedy velikost elektrického napětí, vzdálenost elektrod, zvlákňovací prostředí, typ elektrody.

2.1.8.4.1 Koncentrace polymerní roztoku

Koncentrace polymeru v roztoku má klíčový vliv na výsledné průměry vláken, stejně tak jako na jejich morfologii. Vyšší koncentrace většinou znamená větší průměry vláken, jak bylo ověřeno v několika studiích, například zvlákňování PLLA při různých koncentracích.⁶⁵

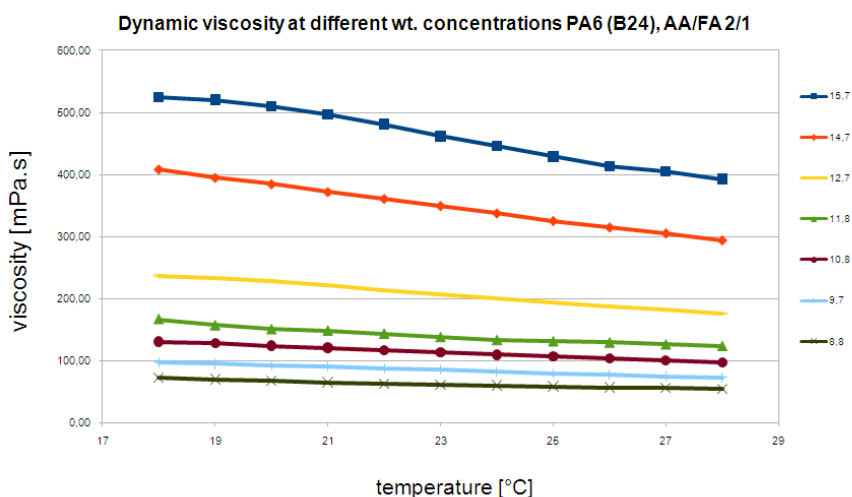
Jako minimální hmotnostní koncentrace pro zvlákňování byla experimentálně stanovena na 1 % hmot. Pod touto koncentrací se na vytvořených vláknech vyskytovaly značné poruchy tvaru ve formě kuliček (beads). Při tvorbě tzv. beaded fibers totiž hraje značnou roli povrchové napětí.



Obrázek 21: Vliv koncentrace polymerního roztoku (polymer concentration) na průměry vláken (fiber diameter).⁶⁶

Koncentrace polymerního roztoku je velmi úzce spjata s jeho finální viskozitou. Viskozita polymerního roztoku se mění s molekulovou hmotností polymeru, substitucí, typem rozpouštědla, přítomností iontů, výslednou koncentrací polymerního roztoku a teplotou. Se zvyšující se koncentrací polymerního roztoku roste v jistém rozmezí exponenciálně i jeho viskozita. Viskozita polymerního roztoku se většinou udává jako dynamická viskozita a její vhodná hodnota pro zvlákňování se pohybuje v rozmezí 60 mPa.s až 7000 mPa.s.⁵⁴

Příklady možného vztahu mezi viskozitou a teplotou polymerní soustavy při různých koncentracích ukazuje obrátek 22.



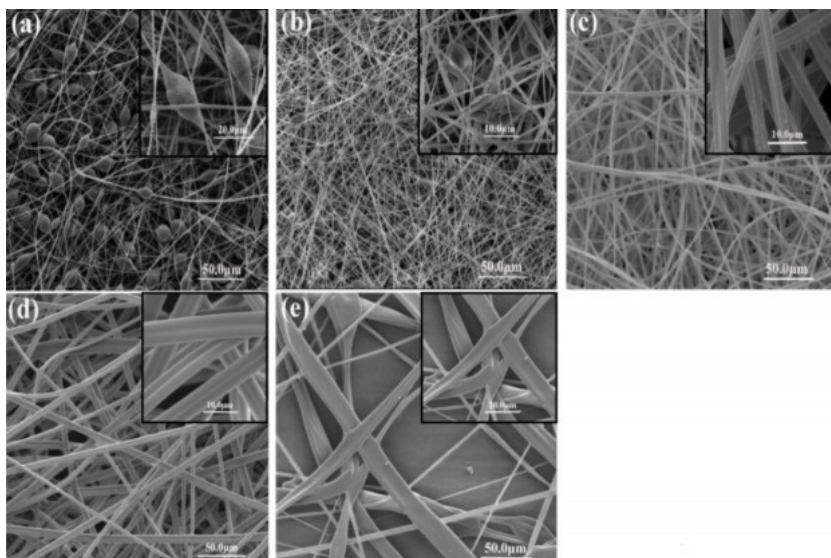
Obrázek 22: Vliv teploty na viskozitu polymerního roztoku polyamidu 6 ve směsi kyselina octová/kyselina mravenčí (2: 1) při různých koncentracích polyamidu⁵⁴

2.1.8.4.2 Rozpouštědlový systém

Volba vhodného rozpouštědla ovlivňuje několik parametrů zvlákňování, zejména konformaci rozpuštěných polymerních řetězců, velikost náboje vymršťovaného polymerního vlákna a rychlost odpařování rozpouštědla, tedy vysychání vznikajících nanovláken. ES je umožněn určitou mírou propletení částečně orientovaných polymerních řetězců.

Při volbě rozpouštědla hraje roli několik faktorů, konkrétně jeho vodivost, povrchové napětí, dielektrické vlastnosti a výparnost. Dramatický vliv rozpouštědla byl ilustrován zvlákňováním polystyrenu z 18 rozdílných rozpouštědel.⁶⁷

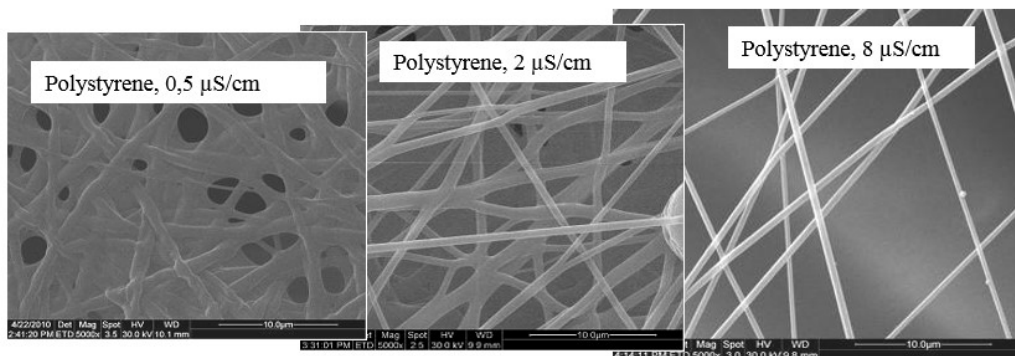
Ačkoliv existují snahy vytvořit jednoznačný experimentálně prokázaný a prakticky použitelný model, je výběr ideálního rozpouštědla komplexním úkolem a jeho volba dosud spočívá v metodě „pokusu-omyl“.⁶⁸



Obrázek 23: SEM obrázky polystyrenových nanovláken v různých rozpouštědlových systémech (a) DMF/THF = 100/0; (b) DMF/THF = 75/25; (c) DMF/THF = 50/50; (d) DMF/THF = 25/75; (e) DMF/THF = 0/100.⁶⁹

2.1.8.4.3 Vodivost

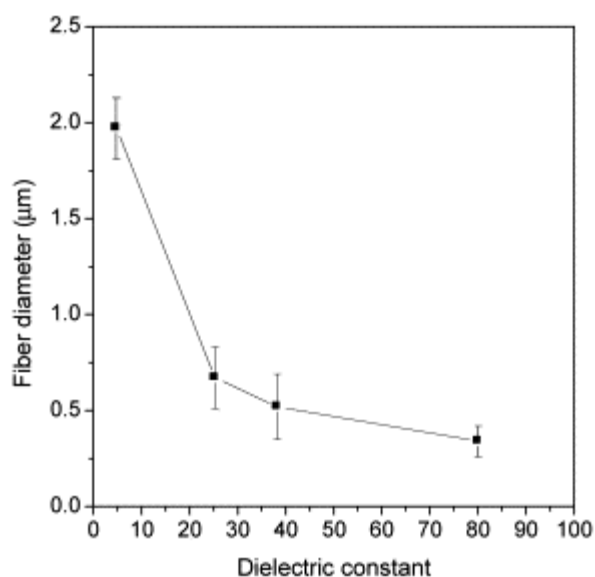
Proces ES je spojen s možností transferu elektrického náboje z elektrody na polymerní roztok. Je tedy nezbytné zajistit určitou minimální vodivost polymerního roztoku. Polymerní roztoky s nulou vodivostí nemohou být zvlákněny. Vodivost může být v mnoha případech nedostatečná a je potřeba do systému přidat aditiva, která způsobí zvýšení hustoty povrchového náboje. Se zvyšováním vodivosti roste výkon procesu zvláknění a zvyšují se průměry vláken, což platí do určité hranice, nad kterou přidáním aditiva rapidně klesá účinnost procesu a tím i průměr vláken. Toto tvrzení bylo za použití zařízení Nanospider™ experimentálně ověřeno. Přestože je vodivost velmi důležitým parametrem zvlákněvaného roztoku, nelze předem určit vhodný rozsah a nastavení hodnoty je pro různé typy polymerů a rozpouštědel potřeba stanovit experimentálně.



Obrázek 24: SEM obrázky zvláknění polystyrenu při různé hodnotě vodivosti roztoku⁵⁴

2.1.8.4.4 Relativní permitivita

Z praktického hlediska tato hodnota udává, jak efektivně je rozpouštědlo schopno nést elektrický náboj. Rozpouštědla s rozdílnou hodnotou relativní permitivity ϵ reagují v elektrostatickém poli rozdílně, tento parametr tudíž ovlivňuje zvláknování a výslednou morfologii nanovláknenné vrstvy. Rozpouštědla s vyšší hodnotou relativní permitivity poskytovala nanovláknna s menšími průměry.⁷⁰ Nicméně se změnou rozpouštědla se v systému mění nejen hodnota relativní permitivity, ale i vodivost a povrchové napětí, nelze tudíž výsledný vzhled nanovláknenné vrstvy přisuzovat pouze změně hodnoty ϵ .

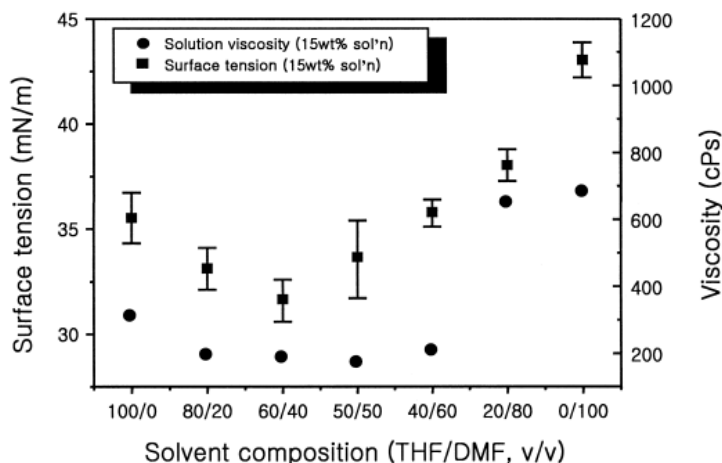


Obrázek 25: Závislost hodnoty průměru vláken (fiber diameter) na dielektrické konstantě (relativní permitivity)⁵⁴

2.1.8.4.5 Povrchové napětí

Povrchové napětí hraje při ES celkově značnou roli, speciálně potom v regionu nestability vymršťeného polymerního vlákna, kdy jsou elektrostatické síly právě

potlačovány silami povrchového napětí roztoku. Rovnováha mezi soudržnými silami povrchového napětí a odpuzivými elektrostatickými silami určuje vzhled křivky ohýbání vlákna v elektricky nestabilním prostředí. Povrchové napětí a viskozita polymerního roztoku zásadně ovlivňují výslednou zvláknitelnost roztoku.⁷¹ Minimální hodnota kritického napětí V_C se tedy zvyšuje s hodnotou povrchového napětí roztoku. Povrchové napětí polymerního roztoku může být měněno volbou rozpouštědla.⁷²

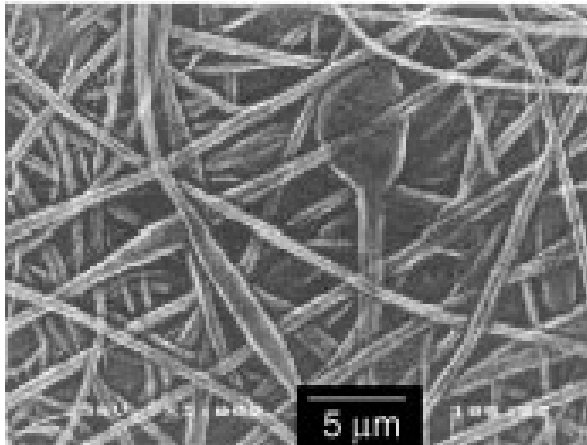


Obrázek 26: Efekt skladby rozpouštědlového systému (solvent composition) na velikost povrchové napětí (surface tension)⁵⁴

Pro snížení hodnoty povrchového napětí se používají různé typy surfaktantů, například dodecyltriethylamonium bromid nebo triethylbenzylamonium chlorid.^{73,74}

2.1.8.4.6 Výparnost rozpouštědla

V podstatě jde o vypařování rozpouštědla z vymrštěného polymerního vlákna, je zodpovědné za vyschnutí vytvořených polymerních vláken. Pokud v průběhu ES nedojde k dostatečnému vypaření rozpouštědla, vlákna dolétávají na podložku vlhká, poté dochází k jejich slepování, vznikají tzv. „ribbon-like“ nanovlákna. Naopak pokud se rozpouštědlo odpaří velmi rychle, dochází k zasychání polymerního roztoku na zvláknovací elektrodě a zástavě procesu zvláknování.⁵⁸



Obrázek 27: „ribbon-like“ nanovlákná polystyrenu v DMF⁵⁴

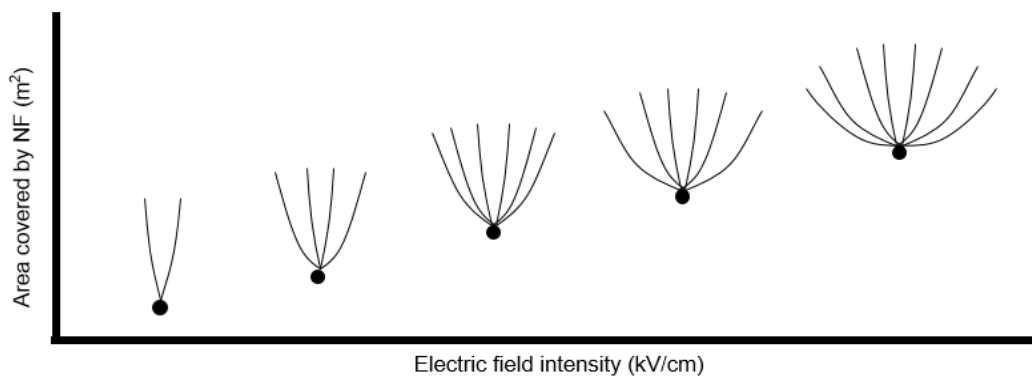
2.1.8.4.7 Velikost elektrického napětí a vzdálenosti elektrod

Intenzita elektrického pole (jednotky kV) je základním fyzikálním parametrem procesu zvlákňování. V podstatě se tato intenzita dá vyjádřit jako poměr potenciálu mezi zvlákňovací a sběrnou elektrodou a vzdálenosti mezi těmito elektrodami. Se zvýšením intenzity elektrického pole většinou roste i výkon procesu zvlákňování, nicméně vzdálenost elektrod hraje významnou ve výsledné kvalitě nanovláknenné vrstvy. Krátká vzdálenost obecně umožňuje použití nižší hodnoty napětí, což může mít ovšem za následek nedostatečný prostor a čas k dloužení a vysychání nanovláken. Vyšší vzdálenost elektrod je vhodná u vodných polymerních systémů, které mají vysokou hodnotu povrchového napětí. Vhodnou hodnotu elektrického napětí je zapotřebí nalézt a ověřit experimentálně. Obecně se v průmyslové technologii Nanospider™ nedoporučuje užití vyšších hodnot než 60 kV při vzdálenosti elektrod 10 cm. V tomto případě může docházet k vzniku výbojů (viz obr. 28), případně lze dosáhnout i vzplanutí materiálu vláken.



Obrázek 28: Fotografie výboje Nanospider™⁵⁴

Se zvyšující se hodnotou elektrického pole dochází současně k několika jevům. Klesají průměry nanovláken, výkon procesu je vyšší, povlákňená oblast je větší, což souvisí se změnou trajektorie vymrštěných polymerních vláken (viz obr. 29) a objevuje se více vymrštěných svazků.



Obrázek 29: Vzhled tvorby Taylorových kuželů a povlákňená plochy („area covered by nanofibers“) v závislosti na intenzitě elektrického pole („electric field intensity“)⁵⁴

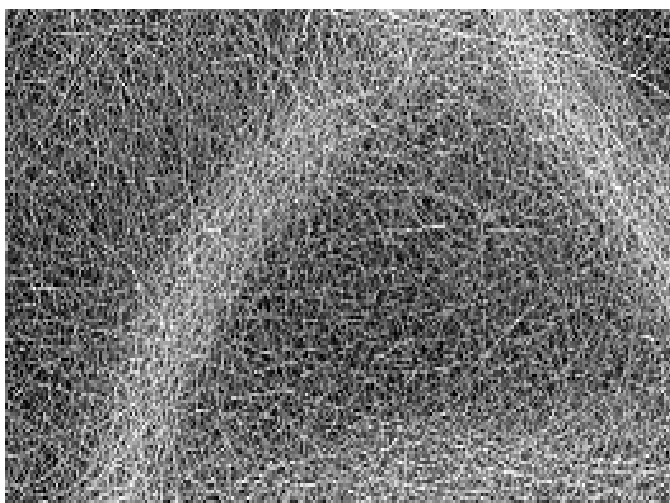
V souvislosti s uplatněním ES při tvorbě medikovaných nanovláken je samozřejmé, že působení elektrického pole může mít vliv na orientaci molekul polymeru v nanovlákně, rozložení léčiva mezi řetězci polymeru a vnitřním prostoru nanovlákná i na jeho výsledném povrchu. Tyto vlivy je nutné mít na paměti z hlediska smáčivosti nanovláken, adsorpce vlhkosti, stability polymeru i léčiva.

2.1.8.4.8 Zvlákňovací prostředí

Pro proces ES hrají další roli volba substrátu, na který dopadají vytvořená nanovlákná, a především relativní vlhkost vzduchu v komoře. Co se týká podkladového materiálu, ten by měl být dostatečně pevný, vzhledem ke značným tahům a ohybům při technologii Nanospider™, měl by být dostatečně homogenní v ploše, jelikož nerovnosti způsobují změny zakřivení elektrického pole a poté i nehomogenity ve výsledné nanovlákně vrstvě (viz obr. 30).

Kritickým parametrem podkladového materiálu je jeho vodivost (resp. hodnoty elektrického odporu). Tento parametr určuje výběr a použití sběrné zvlákňovací elektrody. Materiály s povrchovým odporem pod hodnotou 10^9 ohmů, vyžadují použití cylindrické elektrody, která je v přímém kontaktu se substrátem. U strunové sběrné elektrody, která většinou není kontaktní, se používá u méně vodivých podkladových materiálů.

Relativní vlhkost (RH) vzduchu udává poměr mezi okamžitým množstvím vodních par ve vzduchu a množstvím par, které by měl vzduch o stejném tlaku a teplotě při plném nasycení. Udává se v procentech (%).⁷⁵ Optimální hodnota RH musí být experimentálně určena. RH ovlivňuje několik parametrů zvláknování, především průměry vláken, výkon procesu, obecně nastartování procesu ES, poruchy, apod. U polymerů PA-6 nebo PVA se snižují velikosti průměru vláken s rostoucí relativní vlhkostí vzduchu a u technologie Nanospider™ bylo experimentálně zjištěno, že změna RH v rozmezí od 20 % do 50 % vede k změně průměru vláken o 10 až 30 %.



Obrázek 30: SEM obrázek nanovláknenné vrstvy kopírující nehomogenity podkladového materiálu, polyamid-6⁵⁴

Dnes stále přibývají publikace snažící se dále popsat proces elektrospinningu. Společnosti ELMARCO se podařilo oslovit nejvýznamnější osoby v oboru při své konferenci „Nano for the 3rd Millenium“. Jejich vyjádření je shrnuto na obrázku 31.

“[A priori Electrospinning] process control is not as precise as desired, even though a model has already been generalized for the case of multiple electrospun jets.”

Přestože kontrolovatelnost (modelování chování) elektrostatického procesu není tak přesná jak by bylo žádoucí, model pro multijet elektrospinning byl zobecněn.

D. Renneker, G. Chase (Akron), and A. Yarin (University of Illinois at Chicago)

“The complex interplay between even the key interrelated variables that govern the process is not understood at a level that allows practical predictive models to be developed.”

Dokonce ani mezi klíčovými parametry řídicími (elektrostatický) proces není pochopena složitá vzájemná interakce na úrovni umožňující vytvoření prediktivních modelů.

T. Andrady (Research Triangle International, NC State Uni)

“Despite the discrepancy between experiment and theory [in published electrospinning literature], the theoretical foundation is sound.”

Navzdory nesouladu mezi experimentem a teorií [v publikované literatuře elektrostatického zvláknování], je teoretický základ správný.

S. Ramakrishna (National University of Singapore)

Obrázek 31: Vyjádření významných osob k procesu elektrospinningu⁵⁴

2.2 Použití nanovláken

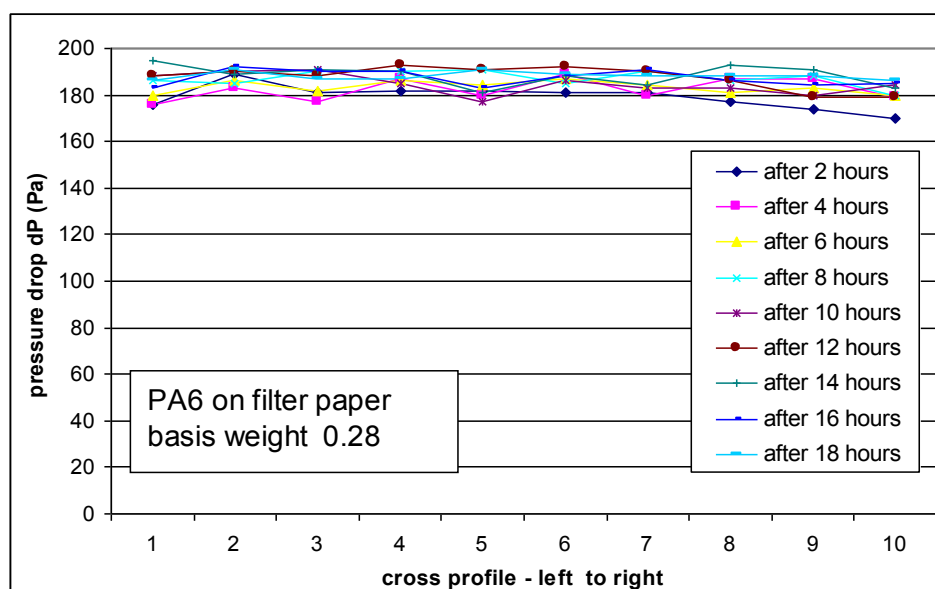
Nanovláknenné materiály díky svým vlastnostem nacházejí uplatnění v mnoha technických i medicínálních oblastech. V textu níže jsou shrnuty ty nejpodstatnější směry, ve kterých bylo zatím dosaženo největšího komerčního úspěchu. V oblasti medicíny bude nejvíce rozebrána kapitola podání a dávkování léčiv (drug delivery).

2.2.1 Vzdušná filtrace

Nanovláknena pro vzdušnou filtraci mají dlouhou historii. Americká společnost Donaldson vyrábí nanovláknenné filtry již 20 let, vlastní svou technologii k produkci nanovláken a konečnými uživateli jsou domácnosti, průmysl i armáda. Společnost DuPont vyrábí nanovláknenné filtry pro oblast HVAC (vytápění, ventilace, klimatizace) a společnost Amsoil vyvinula filtry pro automobilové aplikace.

Filtrace probíhá dvojím mechanismem, větší částice se odstraňují mechanickým síťováním, menší většinou na základě elektrostatického náboje. Velkou roli ve výsledné filtrační efektivitě hraje velikost pórů a s tím spojená homogenita nanovláknenné vrstvy v ploše a velikost a distribuce průměrů nanovláken.

Technologii Nanospider™ je možné vyrábět velmi homogenní nanovláknennou vrstvu s úzkou distribucí velikosti pórů, což ukazuje například následující obrázek 32.



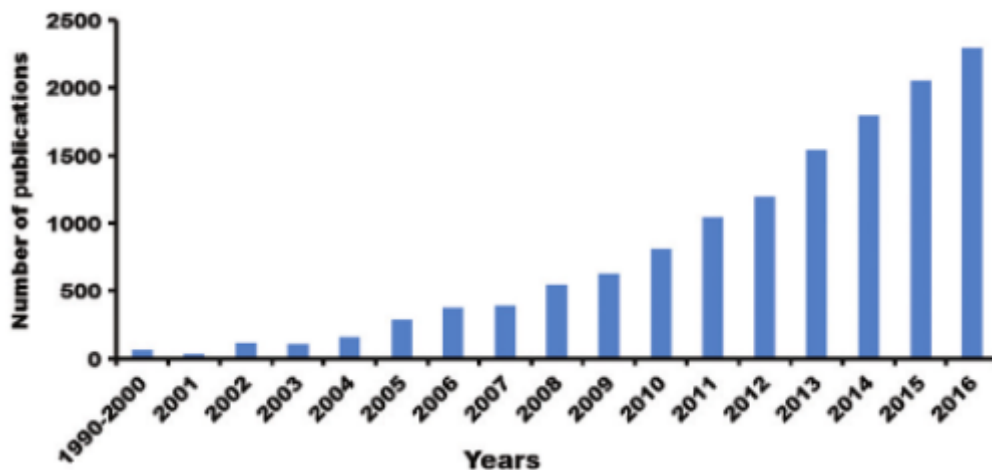
Obrázek 32: Homogenita nanovláknenné vrstvy v čase vyjádřená velikostí tlakového spádu v pascalech, příčný řez nanovláknennou vrstvou PA6 o plošné hmotnosti 0,28g/m²⁵⁴

2.2.2 Textilní aplikace

Nanovlákná v této oblasti mají vylepšovat vlastnosti stávajících textilních materiálů. V tomto sektoru existuje několik možností uplatnění nanovláknenných membrán, o komercializaci textilních nanovláknenných produktů se významně zasloužila Česká republika. Například litvínovská společnost Nanovia vyrábí obličejové masky, dále AntiAllergy textilie, inovativní textilie zabraňující průniku roztočů a jimi produkováných prachových alergenů. Společnost Elmarco pracuje na vývoji nové funkční textilie, která má skloubit hned několik vlastností, voděodolnost, prodyšnost, propustnost vodní páry, větruodolnost a odolnost vůči opotřebení. V roce 2016 již byly dodány funkční oděvy k testování.

2.2.3 Medicinální aplikace

Z počtů patentů a publikací v uplynulých letech je zřejmé, že využití nanovláken v medicíně se drží na samém vrcholu zájmu akademických i komerčních subjektů pracujících s nanovláknem. Největší pozornost se obrací na dvě oblasti využití nanovláken a sice na tkáňové inženýrství a na nanovláken jako nosičů léčiv.



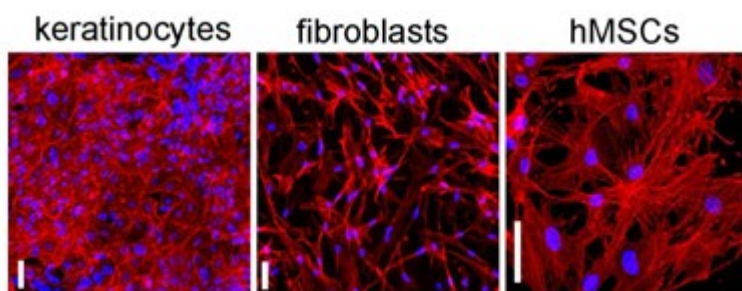
Obrázek 33: Statistická data reprezentující zvyšující se počet publikací a patentů v oblasti medicíny získána z sciencedirect.com ⁷⁶

2.2.3.1 Tkáňové inženýrství

Ve tkáňovém inženýrství je úspěšné využití nanovláken dáno jejich strukturou velmi podobnou s mezibuněčnou hmotou, extracelulární matricí. Nanovlákná jsou zkoumána z několika úhlů možného využití. Jde o opravu či náhradu poškozených tkání, transplantaci orgánů, kožní štěpy, defekty periferního nervového systému, podpora růstů

kostních buněk, a další. Funkční tkáňové nosiče (tzv. scaffoldy) musí splňovat určité předpoklady, kterými jsou velká míra porozity s vhodnou distribucí pórů, značný měrný povrch, biodegradabilita odpovídající rychlosti výstavby nové tkáně, dostatečná mechanická pevnost, netoxičnost, pozitivní interakce buněk s tkáňovým nosičem a samozřejmě biokompatibilita.

Výzkum v oblasti kostních tkání byl v podstatě zahájen prací na svalech.⁷⁷ Pro kostní tkáňové inženýrství byl nejvíce zkoumán poly- ϵ -kaprolakton jako biodegradabilní a biokompatibilní polymer.

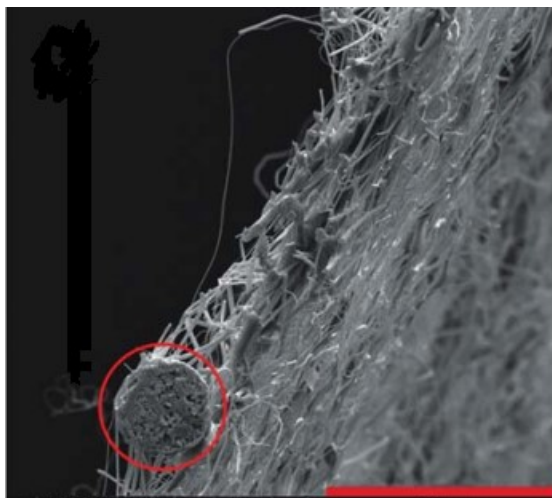


Obrázek 34: Příklad růstů různých typů buněk na nanovláčkách PCL (keratinocyty, fibroblasty, lidské kostní buňky)⁷⁸

Stejně tak byl zkoumán vliv hydroxyapatitu v kostních tkáňových nosičích.⁷⁸ Nanovláčka polymléčné kyseliny obsahovala různé množství hydroxyapatitu, který má pozitivní účinky na adhezi, růst a proliferaci kostních buněk. U takto připravených kompozitů byl již po 7 dnech od nasazení kostních buněk detekován osteokalcin jako hlavní marker kostní diferenciace.

Kůže, jako největší lidská tkáň má mnoho velmi důležitých funkcí, její poškození tedy může vést k fatálním následkům a často je potřeba jednat velmi rychle. Krytí ran by tedy primárně mělo zabránit prostupu infekce dále do rány a těla a také by mělo odvádět exudát vytvářený během procesu hojení. Oblast využití nanovláken v krytech ran lze rozdělit na dvě oblasti, první je oblast krytí ran v tkáňovém inženýrství a druhou je krytí ran bez přítomnosti buněk, tedy kryty pro povrchovou či orgánovou zástavu krvácení.^{79,80} Pro druhou zmiňovanou oblast je zapotřebí, aby nanovláčka byla dostatečně mechanicky pevná, dovolovala výměnu plynů, byla dostatečně nasákavá a sterilní. Zde se používají nanovláčka na bázi chitosanu či želatiny, nanovláčka se ještě případně dají povrchově upravit imobilizací vhodných proteolytických enzymů, např. trypsinu, nebo antibiotiky.^{81,82,83,84,85} Nanovláčka představují i efektivní tkáňový nosič pro nervovou

tkáň. *In vivo* studie nervových kmenových buněk na nanovlákném PLA nosiči prokázala, že nanovláknna nejen podporují růst a diferenciaci buněk, ale zároveň i jejich adhezi.⁸⁶



Obrázek 35: SEM snímek řezu PLLA nanovláken s částicí hydroxyapatitu v červeném kruhu⁷⁸

2.2.3.2 Nanovláknenné nosiče léčiv

U řízeného uvolňování léčiv je nezbytné dosáhnout rovnováhy mezi kinetikou uvolňování, toxicitou, vedlejšími účinky a uživatelským pohodlím pro pacienta. Nanovláknna v této oblasti poskytují několik výhod. Léčiva lze do nanovláknenné matrice inkorporovat velice jednoduše v průběhu procesu ES, podle dosavadních poznatků nemá intenzita používaného elektrického pole negativní vliv na vnitřní aktivitu použitého léčiva. Velký měrný povrch, elasticita nanovláknenných vrstev, možnost volby polymerních nosičů na základě požadovaných kinetických vlastností dávají nanovláknům vyšší přidanou hodnotu například ve srovnání s filmy. Bylo zkoumáno velké množství léčiv, od vodorozpustných, omezeně rozpustných až po ve vodných prostředích prakticky nerozpustná léčiva.^{87,88,89}

Uvolňování léčiv z nanovláken může probíhat několika možnými způsoby, a sice uvolňováním léčiva na základě biodegradace polymerní matrice, velmi rychlou disolucí vláken či pomalým uvolňováním kovalentně vázaných léčiv v důsledku hydrolytického štěpení vazeb.

V podstatě existují tři různé typy nanovláken s obsahem léčiv. Jednak je léčivo dispergováno (rozpuštěno) v polymerní matrici na molekulové úrovni nebo je léčivo

rozptýleno v amorfnní podobě mezi polymerními řetězci nanovláknenné matrice, nebo je ve vláknách a na jejich povrchu rozptýleno v krystalické podobě. Zvláštinným typem jsou kocentrická nanovláknna typu jádro-obal.⁹⁰ V prvním zmíněném případě je rozpustnost léčiva limitujícím faktorem pro jeho finální obsah ve vlákně. Tyto systémy jsou většinou schopny nést jen malé množství aktivní substance vzhledem k nízké plošné hmotnosti produktů. V druhém případě může být obsah (loading) léčiva mnohem větší. Profil uvolňování léčiva v typickém případě vykazuje vyšší počáteční rychlost (burst phase).⁹¹ Průběh uvolňování závisí na volbě systému polymer/léčivo a mění se též s množstvím vpraveného léčiva. Třetí typ systému je možné vyrobit pomocí koaxiálního zvláknění.⁹²

Podstatnou roli v rychlosti uvolňování léčiva z nanovláken hraje jejich smáčivost, která je především závislá na volbě polymerní matrice. V případě hydrofobních polymerů se disoluční médium jen velmi těžce dostává do pórů nanovláken a disoluce léčiva je výrazně pomalejší. Naopak u hydrofilních polymerů je uvolňování řízeno rozpouštěním aktivních látek cestou pórů, disoluce vlastní polymerní matrice tomuto procesu výrazně přispívá. Je možné navrhovat takové kompozitní materiály, aby byla dosažena a řízena kinetika uvolňování aktivních látek.⁹³

Rozpustnost léčiva v rozpouštědle použitém pro proces ES hraje významnou roli. Látky omezeně či vůbec nerozpustné v roztoku polymeru (nebo jejich směsi) se ukládají na povrch vlákna a liberace léčiva je v tomto případě velmi rychlá. Vlastní zvláknění probíhá v podstatě z jemné suspenze. Naopak, rozpustná léčiva se do nanovláknenné matrice dostávají a jejich uvolňování může být ovlivněna např. volbou polymeru (iontový charakter, molekulová hmotnost, substituce, větvení atd.).

Bylo prokázáno, že ES zvlákněné léčivo se nenachází v krystalické podobě, ale bývá v amorfnním stavu, popř. ve stavu molekulární disperze. Mnoho studií s využitím měření DSC a X-ray krystalografie, že nanovláknna připravená elektrospinningem z roztoků neobsahují krystalickou fázi daných léčiv. Toho je pravděpodobně dosaženo velmi rychlým odpařením rozpouštědla v průběhu procesu a fixací molekulární disperze léčiva mezi vzájemně propletenými řetězci polymeru. Molekuly látky v tomto energetickém stavu jsou vázány slabšími silami, jsou proto lépe rozpustné, jak bylo experimentálně prokázáno a popsáno ve výše zmíněných publikacích. Rozpustnost mnoha léčiv byla nanozvlákněním úspěšně navýšena.⁹⁴

2.3 Nanovláknenné nosiče pro sublingvální podání léčiv

Sublingvální podání léčiv lze využít jak pro lokální tak i systémové podání léčiv, tato aplikační cesta patří k transmukozálnímu podání léčiv v dutině ústní. Mukózu v dutině lze rozdělit na sublingvální, která se nachází ve spodní straně jazyka a dolní části dutiny ústní pod jazykem, bukální na spodní straně tváře a rtů a gingivální.⁹⁵

Vzhledem k výhodným vlastnostem tohoto podání ve srovnání s perorální či injekční aplikační cestou je tato sublingvální (případně bukální) cesta již několik let předmětem zájmu řady farmaceutických společností (např. Tesa-Labtec, LTS Lohmann, MonosolRx).

2.3.1 Mukóza dutiny ústní

Mukóza dutiny ústní má následující složení:

- ústní epitel je tvořen vrstevnatým dlaždicovým epitelem; sublingvální a část bukální oblasti není keratinizována
- bazální membrána leží mezi epitelem a pojivovou tkání v ústní sliznici. Neslouží k oddělení mezi těmito dvěma typy tkání oba tyto dva typy tkání spojuje. Nacházejí se v ní buňky schopné dělení, jež se následně diferencují a tvoří epiteliální buňky.
- lamina propria je tvořena pojivovou tkání, kolagenními vlákny, obsahuje propojení krevních kapilár i lymfatické kapiláry
- submukóza je spodní část lamina propria s obsahem kapilár a inervací

Sublingvální membrána je membránou nejtenčí (v řádech stovek mikrometrů), není keratinizovaná s celkovou dobou obnovy do 28 dnů. Krevní průtok v této části se pohybuje asi $0,97 \text{ ml/min/cm}^2$.

Pro sublingvální podání léčiv může být nevýhodné neustálé omývání dutiny ústní slinami, které mohou zapříčinit vyplavování léčiva do nižších částí gastrointestinálního traktu. Kromě toho negativně působí i přítomnost glykoproteinu mucinu ve slinách.⁹⁶

Největší odpor průchodu aktivních látek klade svrchní třetina ústního epitelu a stává se tedy hlavním řídicím krokem určujícím průchod látek skrz tuto sublingvální sliznici. Transportní cesty lze rozdělit na dva hlavní typy, a sice extracelulární (mezibuněčnými prostory epitelu) a intracelulární cestu (vedoucí přes buňky epitelu). Extracelulární cesta je určena především pro nízkomolekulární látky rozpustné ve vodě. Jedná se o pasivní transport na základě koncentračního gradientu. Díky přítomnosti lipidů v mezibuněčném

prostoru je ovšem mnohdy pasivní transport aktivních látek hydrofilní povahy komplikován.

Intracelulární cesta – pro tuto cestu jsou možné tři různé transportní mechanismy (pasivní difúze, přenašeče a endocytóza), nicméně hlavním transportním mechanismem zůstává pasivní difúze.

Cesta pasivní difúze závisí na lipofilitě materiálu, rozdělovacím koeficientu mezi lipofilními a hydrofilními oblastmi a na difúzním koeficientu látky v mezibuněčném prostoru.⁹⁷ Léky s vysokou pKa difundují přes sliznici efektivněji.⁹⁸

2.3.2 Situace na trhu

V současné době jsou na trhu dostupná léčiva určená pro sublingvální podání a to v různých formách, např. jako spreje, sublingvální tablety a orálně rozpustné filmy. Právě orálně rozpustné filmy se dostávají do popředí, ať už ve formě orálně rozpustných filmů či rozpustných transmukosálních filmů. V následujících tabulkách 1 a 2 je zobrazen výčet aktuálních technologií na trhu a dále výčet produktů na předpis včetně fáze vývoje.⁹⁹

Tabulka 1: Výčet technologií pro orálně rozpustné filmy (ODF – orálně rozpustné filmy i OTF – orální transmukozální filmy)⁹⁹

Pořadí	Název Technologie	Společnost
1	PharmFilm	MonoSol Rx
2	RapidFilm	tesa Labtec + Applied Pharma Research
3	VersaFilm	IntelGenX
4	VetaFilm (for animal products)	IntelGenX
5	BioErodible MucoAdhesive (BEMA)	BioDelivery Sciences
6	Thin Film Technology	Innoteq and Gammatec86
7	Slow Dissolve Film Technology	Innoteq and Gammatec
8	Tri-Active Film Matrix	Cure Pharmaceutical
9	Dissolvable Film Technology	Adhesives Research
10	Oral Transmucosal Thin Film Technology	FFT Medical
11	QuickDissolve Technology	LaviPharm87
12	SlowDissolve Technology	LaviPharm
13	Thinsol	ODF Pharma
14	Oral Thin Film Technology	Pace Wellness
15	-	Ethypharm88
16	Bi-Active Film-Strip Delivery Technology	Buccal Pharma
17	Mucolys Film	Galenix Innovations
18	Bio-FX	NAL Pharma

Tabulka 2: Léčiva na předpis – stav vývoje⁹⁹

OTF- orální tenké filmy, ODF-orálně rozpustné filmy

Produkt / Léčivo	Indikace	Typ	Technologický partner	Stav
Adrenalin	Anafylaktický šok/srdeční selhání	OTF	FFT Medical	Pre-klinika
APL-130277 (Apomorphine)	Parkinson	Sublingvální Film	Cynapsus Therapeutics	Fáze II
Aripiprazole	Schizofrenie	ODF	Labtec	Klinika
AVISH-01	AIDS	ODF	Aavishkar	Vývoj
AVISH-02	Vaginální infekce	ODF	Aavishkar	Vývoj
BEMA Buprenorphine / EN 3409	Chronická bolest	Bukální Film	BioDelivery Sciences	Fáze III
Breakyl (Fentanyl)	Průlomová bolest	Bukální Film	BioDelivery Sciences	Na trhu (EU)
Bunavail (Buprenorphine+ Naloxone)	Léčba závislosti	Bukální Film	BioDelivery Sciences	Na trhu (US)
Donepezil	Alzheimer	ODF	APR and Labtec	Na trhu (EU)
Donepezil	Alzheimer	ODF	Aavishkar	Vývoj
Fastanix/ NAL1239 (Fentanyl)	Průlomová bolest	OTF	NAL Pharma	Fáze II (US)
Fentanyl/ oxycodone	Průlomová bolest	OTF	FFT Medical	Vývoj
Flu Vaccine	Chřipka	ODF	MonoSol Rx	Vývoj
Levodopa	Parkinson	OTF	FFT Medical	Vývoj
Memantine	Alzheimer	ODF	Aavishkar	Vývoj
MidaForm Insulin PharmFilm	Diabetes	Bukální Film	MonoSol Rx, Midatech	Fáze I
MidaSol GLP-1	Diabetes	Bukální Film	MonoSol Rx, Midatech	Pre-klinika
MidaSol Insulin GLP-1 combo	Diabetes	Bukální Film	MonoSol Rx, Midatech	Pre-klinika
Montelukast Sodium	Asthma / Alergie	ODF	MonoSol Rx	Klinika
MSRX-110 (Testosterone)	Hypogonadismus	OTF	MonoSol Rx	Fáze I/II
MSRX-202 (Rizatriptan+ Ondansetron)	Migréna	NA	MonoSol Rx	Pre-klinika
NAL1606 (Rizatriptan)	Migréna	Sublingvální Film	NAL Pharma	NA
NAL6013 (Levocetirizine dihydrochloride)	Alergie	OTF	NAL Pharma	NA
NAL6336 (Montelukast)	Asthma/ Alergie	Sublingual Film	NAL Pharma	Pre-klinika
NAL8817 (Donepezil)	Alzheimer	OTF	NAL Pharma	NA

Produkt / Léčivo (pokračování)	Indikace	Typ	Technologický partner	Stav
NH004 (Tropicamide)	Sialorrhea	OTF	NeuroHealing Pharmaceuticals	Fáze II
NH004 (Tropicamide)	Sialorrhea	OTF	NeuroHealing Pharmaceuticals	Fáze II
Olanzapine	Bipolární porucha	ODF	APR and Labtec	Na trhu (EU)
Ondansetron	Nevolnost	ODF	Aavishkar	Scháleno
Ondissolve (Ondansetron)	Nevolnost	ODF	APR and Labtec	Na trhu (Kanada)
Onsolis (Fentanyl)	Průlomová bolest	Bukální Film	BioDelivery Sciences	Na trhu (US)
Painkyl (Fentanyl)	Průlomová bolest	Bukální Film	BioDelivery Sciences	Na trhu (Taiwan)
Pencillin G	Bakteriální infekce	OTF	FFT Medical	Pre-klinika
Rizaport (Rizatriptan benzoate)	Migréna	ODF	IntelGenX	Na trhu (US)
Rotavirus Vaccine104	Rotavirus Infekce	NA	Hilleman Laboratories	Pre-klinika
Rotavirus Vaccine	Rotavirus Infekce	ODF	Aridis Pharma, Johns Hopkins University	Vývoj
Setofilm (Ondansetron)	Nevolnost	ODF	APR and Labtec	Na trhu (EU)
Suboxone (Buprenorphine+ Naloxone)	Léčba závislosti	Sublingvální Film	MonoSol Rx	Na trhu (US)
Zolmitriptan	Migréna	ODF	APR and Labtec	Na trhu (EU)
Zuplenz (Ondansetron)	Nevolnost	ODF	MonoSol Rx	Na trhu (US)

Složení výše zmíněných filmů je popsáno v Tabulce 3.

Tabulka 3: Složení orodisperzních filmů⁹⁹

č.	Složka	Množství [% hmot.]
1	Léčivo	5-30
2	Hydrofilní polymer	45
3	Plastifikátory	0-20
4	Stimulátor slinění	2 -6
5	Surfaktanty	q.s.
6	Sladidla	3- 6
7	Chuťové látky	do 10
8	Barviva	do 1
9	Akcelerant prostupu	q.s.
10	Stabilizátor	do 5

Z možných polymerů se nejčastěji jedná o HPMC, MC, PVA, pektin či želatinu. Plastifikátory se používají k vylepšení flexibility a redukci křehkosti filmů. Výběr plastifikátorů je prováděn na základě kompatibility s polymerem a rozpouštědlem.

Pomáhají při zlepšování vlastností filmu, především snížením teploty skelného přechodu, což snižuje křehkost polymeru (40 °C až 60 °C pro soustavy s nevodným rozpouštědlem a pod 75 °C pro vodné soustavy),¹⁰⁰ zlepšují pružnost a mechanické vlastnosti, jakými jsou pevnost v tahu.¹⁰¹ Z běžně používaných plastifikátorů lze uvést glycerol, propylenglykol, deriváty kyseliny ftalové, deriváty kyseliny citronové, PEG s nízkou molekulovou hmotností a ricinový olej.¹⁰²

Film je formulován tak, aby se při styku se slinami rychle rozpustil. K dosažení rychlejšího rozpadu filmu se přidávají činidla stimulující tvorbu slin, nejčastěji kyselina citrónová, kyselina jablečná a kyselina mléčná.

Vzhledem k tomu, že tyto rozpustné filmy jsou často určeny pro pediatrické a geriatrické pacienty, je mnohdy velmi žádoucí jejich sladká chuť. Jako nejběžnější sladidla se používá glukosa, fruktosa, dextrosa, sacharin.

Povrchově aktivní látky se používají pro zvýšení rychlosti rozpouštění a rychlosti uvolňování léčiva. Působí jako solubilizační, smáčecí a dispergační činidla. Některé z široce používaných surfaktantů jsou laurylsulfát sodný, chlorid benzalkonia, polysorbát 80 a polaxamer 407.

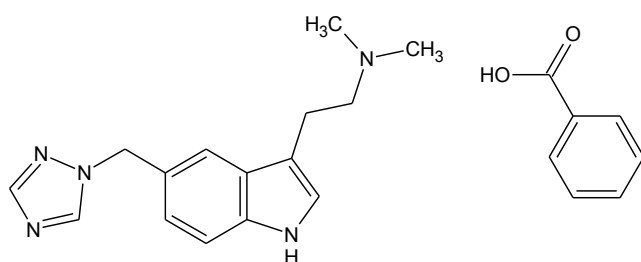
Léčivo uvolněné z tenké vrstvy filmu je absorbováno sliznicemi. Aby se zvýšila jeho absorpce, přidávají se látky zvyšující permeaci. Jako příklady těchto akceleračtů permeace jsou uváděny aprotinin a 23-laurylether.

2.3.3 Využití nanovláken při transmukosálním podání léčiv

Nanovláčenná membrána se svou charakteristikou, tedy flexibilitou, možností využívat různé typy polymeru či možností nést velké množství rozdílných léčiv, jistě řadí ke konkurenčnímu materiálu pro tenké orálně rozpustné filmy. V uplynulých letech bylo publikováno nemalé množství výsledků týkajících se nanovláken jako nosiče léčiv pro transmukosální podání.^{103,104,105} Téměř 100 % publikovaných výsledků ovšem pochází z laboratorní výroby nanovláken, převážně tryskovým způsobem, které je ovšem velmi vzdálené průmyslové aplikaci. V roce 2012 byl udělen patent č. CZ 303244 společnosti ELMARCO a Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové týkající se transmukosálního podání léčiv pomocí nanovláčenné matrice vyrobené průmyslovou technologií Nanospider™.¹⁰⁶ Tento patent popisuje přístup ke skladbě produktu tak, aby bylo zabráněno vymývání léčiva do slin, přesněji řečeno jedná se multikompozitní produkt, který obsahuje membránu dopovanou léčivou látkou, která z jedné strany může být překryta mukoadhezivní vrstvou a z druhé strany vrstvou krycí-omezeně či vůbec nerozpustnou v dutině ústní.

2.4 Studovaná léčiva

2.4.1 Rizatriptan benzoát



Obrázek 36: Strukturální vzorek Rizatriptan benzoátu

CAS: 145202-66-0

IUPAC název: *N,N*-dimethyl-2-[5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1*H*-indol-3-yl]ethanamine

Molekulární vzorec: $C_{15}H_{19}N_5 \cdot C_7H_6O_2$

Molekulová hmotnost: 391,466 g/mol

Rizatriptan patří do třídy triptanů a funguje jako agonista receptorů serotoninu pro léčbu migrénových bolestí hlavy.¹⁰⁷ Na trhu je k dispozici pod obchodním názvem Maxalt™ v koncentracích 5 mg a 10 mg jako tablety, anebo orálně rozpustné tablety. Stejně jako u ostatních triptanů, například sumatriptanu a zolmitriptanu, vyvolává rizatriptan vazokonstrikci, pravděpodobně tím, že inhibuje uvolňování peptidu příbuzného genu kalcitoninu ze sensorických neuronů v trigeminálním nervu.¹⁰⁸

2.4.1.1 Migréna

Migréna je chronický a opakující se syndrom bolesti hlavy, často spojený s nevolností a zvracením, který postihuje přibližně 15 % až 20 % populace rozvinutých zemí. Existují dva hlavní typy migrény, s aurou a bez aury, postihují přibližně 15 %, resp. 8 % této populace. U typu bez aury je bolest hlavy jednostranná, pulzující a středně těžké až těžké intenzity a často včetně nevolnosti a dalších příznaků trvajících od několika hodin až po několik dní. V případě migrény s aurou se aura (např. včetně vizuálních, somatosenzorických a motorických příznaků) rozvíjí před vznikem migrénového záchvatu.

Farmakologické léčebné režimy s migrénou zahrnují použití jak analgetik, tak i léků, které patří do skupiny ergotaminu a jeho derivátů, nesteroidních protizánětlivých léků (NSAID) a hlavně triptanů samotných nebo v kombinaci. Tyto účinné látky (léčiva) se podávají hlavně perorální, rektální, parenterální (intravenózní, subkutánní), inhalační, intranasální, transdermální (včetně iontoforetických přípravků) a oromukosální (bukální a sublingvální) cestou.

Hlavní třída léčiv proti migréně dnes obsahuje selektivní agonisty 5-HT_{1B,1D}. Triptany mají tři hlavní mechanismy působení: kraniální vazokonstrikce, periferní inhibice trigeminu a inhibice přenosu neuronů druhého řádu trigeminocervikálního komplexu.¹⁰⁹ Lasmiditan (5-HT/1F agonista, formálně diptan) je ve vývojových a klinických studiích fáze III a ukazuje, že je příslibem dalšího léku na migrénu.¹¹⁰

Triptany jako aktivní agonistické sloučeniny 5-HT_{1D} jsou při léčbě migrény od používány od roku 1993. Prvním byl sumatriptan, v současnosti je v terapii perorálně používáno dalších osm, konkrétně rizatriptan, naratriptan, zolmitriptan, eletriptan, almotriptan,

frovatriptan, avitriptan a donitriptan v podobě jejich solí a esterů. Jako léčiva jsou uváděna na trh pod různými názvy (obchodními značkami).

2.5 Polymery

2.5.1 Hydroxypropylcelulosa

HPC je částečně substituovaný hydroxypropylether celulosy, který je komerčně dostupný v molekulové hmotnosti 50 000–1 250 000 g/mol. Výroba probíhá z čištěné celulózy převedením na alkalixelulosu a její reakci s propylenoxidem. Je dobře rozpustná ve studené vodě a nízkých alifatických alkoholech a vykazuje dobrou biokompatibilitu. Ve farmacii je hojně využívána v topických a perorálních přípravcích, a to jako viskozifiant, stabilizátor, emulgátor, pojivo nebo součást obalu potahovaných tablet.¹¹¹

HPC lze ES zvláknit z roztoků bezvodých alkoholů – ethanol či propanol, a to až v koncentraci 15 %, zároveň lze tento polymer zvláknit z vodného roztoku, ovšem ideálně za přídavku polyethylenoxidu, který výraznou měrou napomáhá snížení množství defektu ve vláknech.¹¹²

2.5.2 Hydroxypropylmethylcelulosa

HPMC je syntetický polymer, v lékopisech je označován jako hypromelosa.¹¹³ Jedná se methylhydroxypropyletheru celulózy. HPMC je bílý, nažloutle bílý nebo šedobílý prášek nebo granule. Ve vysušeném stavu je to hygroskopická, prakticky nerozpustná v horké vodě, v acetonu, v ethanolu, v etheru a v toluenu. Rozpouští ve studené vodě za vzniku koloidního roztoku. Na výrobu se používá čištěná forma celulózy, která reaguje s roztokem hydroxidu sodného za vzniku alkalické celulózy. Ta následně reaguje s chlormethanem a propylenoxidem za vzniku methylhydroxypropyletheru celulózy. Ve farmaceutickém průmyslu je používána jako pojivo, filmotvorná látka, stabilizátor polotuhých a tekutých emulzních a suspenzních přípravků, látka zvyšující viskozitu, v neposlední řadě jako látka modifikující uvolňování léčiva z tablet.¹¹⁴ ES zvláknění HPMC probíhá z vody, ideální je ovšem přídavek PEO.¹¹⁵

2.5.3 Polyethylenoxid

PEO je syntetický polymer a komerčně nejvýznamnějším polyetherem, je dostupný v mnoha molekulových hmotnostech. Do hmotnosti 20 000g/mol je označován jako polyethylenglykol a je viskózní kapalinou. PEO s molekulovou hmotností mezi 100 000 a 5 000 000 g/mol je bílým práškem.¹¹⁶ Hustota PEO se pohybuje v rozmezí 1,15-1,26

g/cm³.¹¹⁷ PEO je vyráběn katalytickou polymerací ethylenoxidu v přítomnosti kovů jako katalyzátorů. Polymerace je vedena při teplotě v rozmezí 110-150°C.¹¹⁸ PEO se rozpouští ve vodě, ale i ve vybraných polárních i nepolárních rozpouštědlech (aceton, alkoholy, toluen).

2.6 Farmaceutický systém jakosti¹¹⁹

Farmaceutický výrobce musí vyrábět léčivé přípravky tak, aby zajistil, že jsou vhodné pro zamýšlený účel, odpovídají požadavkům registrace nebo povolení klinického hodnocení a nevystavují pacienty riziku vyplývajícimu z nedostatečné bezpečnosti, jakosti či účinnosti.

Řízení jakosti je širokým pojmem zahrnujícím vše, co jednotlivě i společně ovlivňuje jakost produktu. Je to souhrn všech záměrných opatření sledujících zajištění toho, aby léčivé přípravky splňovaly jakostní požadavky pro své zamýšlené použití. Součástí řízení jakosti je proto i správná výrobní praxe (SVP). SVP se vztahuje na všechny fáze životního cyklu léčivého přípravku od výroby, transferu technologie, komerční výroby až po stažení z výroby.

Základní požadavky SVP jsou následující:

Veškeré výrobní procesy jsou jasně definovány, systematicky přezkoumávány na základě zkušeností a prokazují schopnost zajistit ustálenou výrobu léčivých přípravků v požadované kvalitě a dle specifikací;

Provádí se validace kritických stupňů výrobních postupů a jejich významnějších změn.

Jsou zajištěny potřebné předpoklady k dodržování SVP včetně:

- příslušně kvalifikovaných a vyškolených pracovníků,
- vhodných budov a prostor,
- vhodného zařízení a služeb,
- správných výchozích látek, primárních a potitštěných obalových materiálů,
- schválených postupů a instrukcí v souladu s farmaceutickým systémem jakosti,
- vhodných skladovacích prostor a dopravy;

Instrukce a postupy jsou názorné a jednoznačné, vypracované cíleně pro určitá pracoviště a zařízení;

Postupy jsou prováděny správně a obsluha je k tomu vyškolená;

Během výroby jsou pořizovány záznamy, písemné a/nebo záznamovým zařízením, které prokazují, že všechny kroky požadované definovanými postupy a instrukcemi byly dodrženy a že jakost produktu a množství odpovídají předpokladům.

Všechny podstatné odchylky jsou plně zaznamenány a prošetřeny s cílem určit příčinu a jsou přijata odpovídající nápravná a preventivní opatření;

Záznamy o výrobě včetně distribuce umožňující sledování celé historie šarže jsou uchovávány ve srozumitelné a přístupné formě;

Distribuce léčivých přípravků je prováděna tak, aby minimalizovala ohrožení jejich jakosti, a v souladu se správnou distribuční praxí;

Je vytvořen systém, který umožňuje stáhnout z distribuce a oběhu jakoukoliv šarži léčivého přípravku;

Jsou prošetřovány reklamace léčivých přípravků na trhu, zkoumány příčiny závad jakosti a přijímána opatření zabráňující opakování zjištěných závad.

2.6.1 **Validace**

Cílem validace je dokumentované ověření, že výrobní proces provozovaný v rámci stanovených parametrů může účinně a reprodukovatelně vyrábět produkt splňující předem definované specifikace a atributy jakosti. Při práci je nutné se řídit pokynem vydaným SÚKL Vyr 32: Pokyny pro správnou výrobní praxi.¹²⁰

Obvykle mají mít šarže vyráběné pro validaci procesu stejnou velikost jako šarže zamýšlené komerční výroby, přičemž použití jakýchkoliv jiných velikostí šarží musí být odůvodněno. Zařízení, prostory, média a systémy používané pro validaci procesů mají být kvalifikované (ověřené a písemně zdokumentované).

3 CÍLE PRÁCE

1. S využitím patentově chráněného rozmezí podmínek¹²¹ navrhnout dvouvrstvou nanovláknennou matici jako membránový kompozit použitelný pro systémové transmukosální podání léčiv terapeuticky dávkovaných v miligramech.
2. Navrhnout a vyzkoušet postup inkorporace rizatriptan benzoátu, resp. rizatriptan, zástupce antimigrenózních léčiv do polymerní matrice vyrobené elektrospiningem
3. Získaných poznatků využít k výrobě nanovláknenného produktu škálovatelnou technologií elektrospiningu za podmínek vyhovujících kritériím pro výrobu léčivých přípravků
4. Experimentálně a pomocí validačních přístupů ověřit a zdokumentovat, zdali proces nastavení procesu elektrospiningu může efektivně a reprodukovatelně poskytovat produkt splňující atributy jakosti definované příslušnou zdravotnickou legislativou.¹²²
S ohledem na možnou klinickou studii se přitom zaměřit na zejména na
 - elektronmikroskopickou charakterizaci
 - hmotnostní stejnoměrnost
 - obsahovou stejnoměrnost
 - charakteristiku disoluce
 - permeační *in vitro* profil
 - prvotní stabilitní data
5. Vyrobit produkt vyhovující podmínkám pro realizaci externě zajištěné klinické srovnávací studie systémové biodostupnosti rizatriptan s referenčním přípravkem registrovaným pro stejný typ aplikace daného léčiva. Výsledky vyhodnotit z hlediska srovnání dvou až třech základních farmakokinetických parametrů

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Polymery

Polyethylenoxid (Mw=300 000 g/mol, USP 37).....	Dow Company, USA
Hydroxypropylcelulosa (Mw= 100 000g/mol, Ph.Eur.8.0).....	Nippon Soda, Japonsko
Hypromelosa (Mw= 13 000 g/mol, Ph.Eur.8.0).....	Shin Etsu, Čína
Kollicoat IR Red (Ph.Eur.8.0).....	BASF, Německo

4.1.2 Rozpouštědla

Čištěná voda.....	Fagron, ČR
Isopropylalkohol (HPLC grade).....	Alchimica, ČR
Isopropylalkohol čistý (p.a.).....	Penta, ČR
Acetonitril (HPLC grade).....	Applichem, USA

4.1.3 Látky a ostatní suroviny

Rizatriptan benzoát (Ph.Eur. 8.0).....	Inke S.A., Španělsko
Dihydrogenfosforečnan draselný (Ph.Eur. 8.0).....	Alchimica, ČR
Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Ph.Eur.8.0).....	Alchimica, ČR
Chlorid sodný (Ph.Eur.8.0).....	Alchimica, ČR
Standard SST (Rizatriptan for System suitability).....	EDQM, Francie
Kyselina fosforečná (Ph.Eur. 8.0).....	Alchimica, ČR
Kyselina chlorovodíková (čistá, Ph.Eur.8.0).....	Applichem, USA
Peroxid vodíku (3%vodný roztok, Ph.Eur.8.0).....	Applichem, USA
Hydroxid draselný (čistý, Ph.Eur.8.0).....	Applichem, USA
Všechny použité látky splňovaly podle deklarační požadavky lékopisu (Ph.Eur. 8.0 a USP 37)	

4.1.4 Přístroje a zařízení

Nanospider™ NS 1WS500U.....	Elmarco, ČR
SEM, Phenom-Pure.....	Phenom World, Nizozemí
Magnetické míchačky Hei-Standard.....	Heidolph, Německo

Analytické váhy XSE105DU	Mettler Toledo, Švýcarsko
Váhy ME 2002.....	Mettler Toledo, Švýcarsko
Viskozimetr Viscotester E	Haake, Německo
Konduktometr Cyber Scan NOC 11	Eutech Instruments, USA
Elektronická váha Pioneer PA 413 CO.....	Ohaus Corporation, USA
Vodní lázeň Julabo TW 20	Julabo GmbH, Německo
Magnetické míchadlo vícemístné ponorné	Fisher Scientific, USA
pH metr FG 2 s elektrodou LE 438.....	Mettler Toledo, Švýcarsko
Ultrazvuková lázeň FB 15065	Fisher Scientific, USA
Automatické pipety Fisherbrand.....	Fisher Scientific, USA
Elektronický časovač Fisher – TM 110	Fisher Scientific, USA
Kapalinový chromatograf HPLC 1260	Agilent Technologies, USA
• pumpa - Quat. Pump (G1311B)	
• autosampler s termostatem Sampler (G1329B)	
• kolonový prostor Column Comp. (G1316A),	
• předkolona - Agilent Poroshell 120 EC-C18 (3.0 x 5.0 mm, 2.7 µm core-shell; PN: 823750-911)	
• kolona - Agilent Poroshell 120 EC-C18 (3.0 x 150.0 mm, 2.7 µm core-shell; PN: 693975-302)	
• DAD - detektor DAD (G4212B)	

4.2 Metody

4.2.1 Výroba nanovlákněných nosičů

4.2.1.1 Roztoky pro zvláknění

Pro ES tvorbu nanovlákněné vrstvy s léčivem (aktivní vrstvy) byl k vodnému roztoku hypromelosity (HPMC) a polyethylenoxidu (PEO) přidán za stálého míchání rizatriptan benzoát (RZTB) v množství 4 % hmot. Vzniklý roztok byl míchán na magnetické míchačce po dobu 120 minut při 1400 ot./min. Druhá, protektivní vrstva nanovlákněného kompozitu byla pro ES složena z vodného roztoku hydroxypropylcelulosity (HPC) a PEO, do kterého byl přidán Kollicoat IR Red v množství 0,5 % hmot. jako barvivo. Tento roztok byl míchán na magnetické míchačce po dobu 60 minut při 750 ot./min.

4.2.1.2 Zařízení na elektrospinning

Nanovláknenné membrány byly vyrobeny elektrostatickým zvlákňováním na zařízení Nanospider™ NS 1WS500U. Jedná se o bezjehlové zařízení druhé generace, ve kterém zvlákňovací elektrodu představuje pohybující se struna.

Při výběru podmínek zvlákňovacího procesu, stejně jako při výrobě nanovláknenných nosičů pro disoluční a permeační testování, byl ES prováděn vždy v kontrolovaném prostředí odpovídajícím platným předpisům a požadavkům lékopisu (ČL ČL 2009 – Dopl. 2013)¹²³

Zařízení Nanospider™ bylo před výrobou šarže přípravků určených pro klinické hodnocení příslušnými postupy kvalifikováno, tzn. byly ověřeny jeho kritické výrobní parametry (odst.4.2.7).

4.2.1.3 Výroba

Zvlákňování probíhalo s využitím výše zmíněných, předem připravených roztoků polymerů, případně s přidavkem rizatriptan benzoátu, ve vodném rozpouštědle. Na zařízení byly nastaveny optimální parametry zvlákňování, které byly optimalizovány v předešlých letech. Jednalo se konkrétně o použité napětí 60/-15 kV, vzdálenost zvlákňovací a sběrné elektrody 170 mm, a podmínky ve zvlákňovací komoře (22 °C a 25 % RH).

Nanovláknenný materiál se při ES ukládal ve formě nanovláknenné vrstvy na nosnou textilií, polypropylenový spunbond. Rychlost posunu spunbondu spoluurčovala výslednou tloušťku nanovláknenné vrstvy, její plošnou hmotnost, a tím i obsah léčiva ve vláknech.

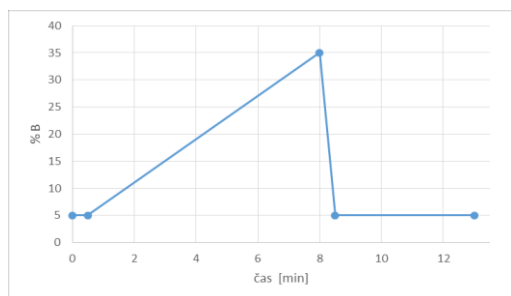
4.2.2 HPLC stanovení rizatriptan benzoátu

Stanovení léčiva bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Agilent 1260 (viz odst. 4.1.4) Byla použita gradientová metoda s podílem acetonitrilu jako organické složky vzrůstajícím od 5 % do 35 % během 7,5 minut. Nastavení gradientu je uvedeno v tabulce 4, a průběh gradientu znázorněn na obrázku 39. Jako vodná mobilní fáze byl použit fosfátový pufr o pH 2,4 (mobilní fáze: A: 25 mM dihydrogenfosforečnan drasenský, pH 2,4); mobilní fáze B: acetonitril (HPLC grade)

Tabulka 4: Nastavení gradientu mobilní fáze pro HPLC

Čas [min]	% B
0,00	5,0
0,50	5,0
8,00	35,0
8,50	5,0
13,0	5,0

Celková doba analýzy při nástřiku 5,0 μ l, teplotě kolony 40 °C a průtoku 0,8 ml/min činila 13 minut. UV detekce probíhala při vlnové délce 280 nm. Retenční čas (Rt) píku rizatriptanu byl za těchto podmínek cca 4,45 min, retenční čas píku kyseliny benzoové: 7,76 min.



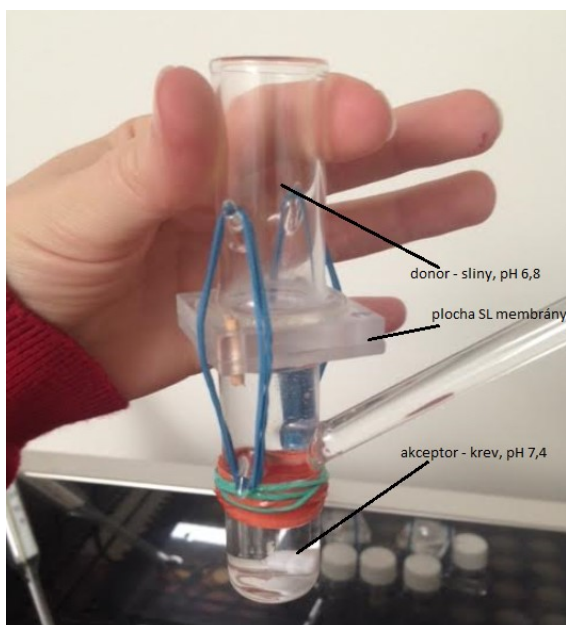
Obrázek 37: Průběh změn mobilní fáze

4.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Morfologie vyrobených vláken byla sledována a charakterizována pomocí snímků skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) a to pro každou konkrétní šarži u 5 náhodně vybraných vzorků. Měření vzorků probíhalo ve společnosti InStar Technologies a.s.

4.2.4 Permeační *in vitro* experimenty

Pro permeační pokusy byly používány sublingvální membrány získané z jazyků čerstvě poražených prasat. Membrány byly zbaveny svalové tkáně a částečně i submukózy. Přípravené membrány byly promyty fyziologickým roztokem (0,9 % vodný roztok chloridu sodného), před pokusy rozděleny na přibližně stejné dílky a vloženy mezi donorový a akceptorový kompartment permeační cely tak, že exponovaná plocha membrány činila asi 1,0 cm².



Obrázek 38: Sestavená permeační Franzova cela (modifikovaná)

Akceptorový kompartiment byl naplněn vytemperovanou akceptorovou fází (izotonizovaný fosfátový pufr o pH 7,4).

Testovány byly dvouvrstvé nanovláknenné nosiče složené z aktivní vrstvy obsahující léčivo ve směsi HPMC a PEO a vrstvy obsahující HPC a PEO. Pro srovnání byl použit vodný roztok léčiva nesoucí sublingvální membráně stejné koncentraci RTZB jako nanovláknenný nosiči. Jako donorová kapalina sloužil fosfátový roztok s výsledným pH 6,8. Vzorčky akceptorové fáze o objemu 0,7 ml byly odebírány v předem vybraných časových intervalech a odebraný objem doplňován temperovanou akceptorovou fází. Odebrané vzorky (6) byly analyzovány na obsah sledované substance s využitím HPLC (odst.4.2.2).

4.2.5 Obsahová stejnoměrnost

Při zkoušce byl nejprve stanovován obsah rizatriptan benzoátu v nanovláknenném nosiči, následně byla provedeno hodnocení podle Ph.Eur., článku 2.9.6 Uniformity of content of single-dose preparations (ve znění ČL 2009, Dopl. 2013, 2.9.6 Obsahová stejnoměrnost jednodávkových lékových forem¹²⁴).

Pro analýzu byly využity kádinky objemu (150 ml), do kterých bylo naváženo 100,0 g čištěné vody. Kádinky byly opatřeny magnetickým míchadlem a vloženy do vodní lázně temperované na 37,0 °C promíchávány (600 otáček za minutu).

Odpočítávání času bylo spuštěno při vložení přípravku do kádinky, po 30 minutách bylo z kádinky automatickou pipetou odebráno 1000 μ l roztoku do připravené vialky a následně byla provedeno stanovení rizatriptan benzoátu.

Předem validovanou HPLC metodou byl jednotlivě u deseti namátkově vybraných jednotek zkoušeného přípravku stanoven obsah rizatriptan benzoátu.

K hodnocení byla použita kritéria zkoušky B: „Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše jeden jednotlivý obsah léčivé látky je mimo rozmezí 85 % až 115 % průměrného obsahu a žádný není mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu léčivé látky. Přípravek nevyhovuje zkoušce, jestliže více než tři jednotlivé obsahy jsou mimo rozmezí 85 % až 115 % průměrného obsahu nebo jestliže je jeden nebo více jednotlivých obsahů mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu“.

4.2.6 Disoluce

Rychlost disoluce rizatriptan benzoátu z nanovláčenného přípravku do fosfátového pufru o pH 7,4 jako disolučního média o objemu 10,0 ml byla testována při teplotě 37,0 °C. Lahvičky s 10,0 ml pufru opatřené magnetickými míchadly byly umístěny do vytemperované vodní lázně na desku ponorné magnetické míchačky, frekvence otáčení míchadla byla nastavena na 600 otáček za minutu.

Vlastní disoluční test byl zahájen vložением nanovláčenného přípravku pomocí pinzety do příslušné lahvičky s obsahem vytemperovaného pufru. V časových intervalech 1, 3, 5, 10, 20 a 30 minut byly z lahviček mikropipetou odebíráno 200 μ l vzorku do předem označených vialek a totéž množství disolučního média bylo do lahvičky s přípravkem zpětně doplněno. Po posledním odběru bylo do prázdné vialky přidáno 1,0 ml pufru pro kontrolní analýzu.

Předem validovanou HPLC metodou byl v odebraných vzorcích stanoven obsah rizatriptan benzoátu. Hodnoty naměřených koncentrací rizatriptan benzoátu byly korigovány na odebrané a doplněné objemy disolučního média.

4.2.7 Kvalifikace zařízení Nanospider™

Kvalifikace klíčových zařízení, které mají či mohou mít přímý vliv na zajištění jakosti přípravků je nezbytnou nutností před zahájením výrobních či validačních prací. Veškerá použitá měřidla musí být zkalibrována. Byly provedeny zkoušky uvedené

v tabulce 5, neboť všechny kontrolované parametry mají na finální kvalitu vyráběného přípravku přímý vliv.

Tabulka 5: Zkoušky a kritéria pro kvalifikaci Nanospider™ NS 1WS500U

Název zkoušky	Kritérium přijatelnosti
Zkouška funkčnosti bezpečnostních prvků zařízení	Všechny bezpečnostní prvky zařízení fungují správně dle specifikací výrobce přístroje.
Kontrola funkcí řídicí jednotky (ovládací panel a dotykový displej)	Všechny funkce řídicí jednotky pracují dle specifikací výrobce. Měření vzdáleností zvlákňovací elektrody a substrátu
Měření vzdáleností zvlákňovací elektrody a substrátu	Měření probíhá pro vzdálenosti 130 až 230 mm s nárůstem vzdáleností o 20 mm. Každá vzdálenost se měří na 3 místech zvlákňovací komory.
Ověření funkčnosti a rychlosti převinu zvlákňovací elektrody	Návin struny funguje správně a rychlost odpovídá hodnotě udané dotykovým displejem. Rozsah měření: 0,2 a 0,5 mm/s.
Ověření funkčnosti přívodu a odsávání vzduchu ve zvlákňovací komoře	Hodnoty udávané přístrojem odpovídají nastaveným hodnotám ± 5 m ³ /hod v celém rozsahu měření. Rozsah měření: Pro odtah vzduchu z komory v rozmezí 30–180 m ³ /hod a přívod vzduchu v rozmezí 10–170 m ³ /hod.
Test funkčnosti nanášecí hlavy a příslušných komponentů	Nanášecí hlava funguje správně v rozsahu rychlostí a délek pojezdu uváděných výrobcem zařízení. Rozsah měření: Průměrná rychlost vozíku 150–600 mm/s a délka pojezdu 35–50 cm.
Test funkčnosti a rychlosti navíjení substrátu a řídicích rychlost navíjení systémem	Naměřená délka převinutého substrátu odpovídá při všech měřených rychlostech. Rozsah měření: Provádí se v rozsahu 15–215 mm/min (nízko rychlostní převod).
Ověření funkčnosti zdrojů vysokého napětí	Napájecí zdroje poskytují napětí až 60 kV zvlákňovací elektroda (kladné) a 40 kV sběrná elektroda (záporné). Rozsah měření: Rozsah vysokého napětí 1–60 kV zvlákňovací elektroda (kladné) a 1–40 kV sběrná elektroda (záporné).

4.3 Validační procedury

4.3.1 Validace přípravy roztoků polymerů bez léčiva

Validačními kritérii byly hodnoty viskozity polymerních roztoků, hodnoty jejich vodivosti a výtěžnost zjištěná na základě hmotnosti roztoků pro zvláknění, výpočtem zjištěný výtěžek výrobního procesu byl srovnán s požadavkem, a to u třech odděleně vyrobených polymerních roztoků.

Viskozita byla měřena na viskozimetru Viscotester E, s použitým vřetenem TL6 při otáčkách 50 otáčkách za minutu a při teplotě 22 °C s odebraným množstvím 20 ml polymerního roztoku. Pro měření vodivosti byl využíván konduktometr CON 11 a vodivost byla stanovena u 20 ml polymerního roztoku. Výtěžnost byla kontrolována na vahách ME2002.

4.3.2 Validace výroby nanovlákněné vrstvy

Validace výroby nanovlákněné vrstvy pomocí bezjehlového procesu zvláknění byla naprosto kritickým procesem všech validací a kvalifikací a tudíž zásadním krokem k udělení povolení k výrobě od SÚKL. Validační proces zahrnoval výrobu 3 po sobě jdoucích šarží o stejné velikosti, jaká by případně odpovídala šarži určené pro klinické hodnocení a s totožným obsahem RTB, tedy 5mg. Vyrobený nanovlákněný materiál v podobě pásu o šířce 30 cm nanesený na podkladovou textilii byl v rovnoměrném rozložení příčně i podélně vysekán kruhovým výsečником o průměru 2,76 mm. Plocha jednotlivých nanovlákněných kompozitních stripů, tedy přípravku Rizatriptan InStar 5 mg, výsledně činila 6,0 cm². Vysekávání probíhalo tak, aby podkladová textilie zůstala nedotčena. V případě, že k vyseknutí podkladové textilie došlo, byl z ní nanovlákněný vzorek pro následné hodnocení sejmut pomocí pinzety.

Všechny vysekuté stripy byly váženy na analytických vahách a z výsledných hodnot byla sestrojena hmotnostní mapa s vyznačenými limity odpovídajícími lékopisnému článku Hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem.¹²⁵ Důležitým aspektem výroby nanovlákněné vrstvy bylo zjištění, jak bude při poloprovozní výrobě reálně vycházet předpoklad vysoké korelace mezi hmotností dvouvrstvých stripů a obsahem léčiva v nich. S tímto cílem bylo z náhodně vybraných míst vyrobeného nanovlákněného pásu v každé šarži odebráno 32 stripů (výseků). Každý z nich byl nejprve zvážen, následně bylo provedeno HPLC stanovení obsahu rizatriptanu a

vyhodnocena jako validační parametr obsahová stejnoměrnost stripů. Stanovený limit pro validaci na úrovni $\pm 15\%$ průměrného obsahu byl převzat z lékopisného článku Obsahová stejnoměrnost jednodávkových lékových forem.

4.3.3 **Stabilitní studie**

Před zahájením klinického hodnocení byla zahájena stabilitní dlouhodobé (25 °C/60 % RH) a zrychlené studie (40 °C/75 % RH) u šarže V3. Příslušné vzorky byly uloženy ve společnosti Quinta-Analytica s.r.o. Praha v primárních a sekundárních obalech. Na začátku studie a pak v předem zvolených intervalech (u zrychlené studie po 1, 2, 3, 6, 9 a 12 měsících, u dlouhodobé studie po 3, 6, 9, 12, 18 měsících, a dále dle plánu po 24, 30, 36, 42 a 48 měsících, byly vzorky převezeny do společnosti InStar Technologies a.s. Liberec. Zde byly hodnoceny parametry, jejichž přehled i s příslušnými limity kritérií přijatelnosti je uveden v příloze 1.

4.4 **Studie biodostupnosti**

K vyhodnocení základních parametrů systémové biodostupnosti léčiva po sublingválním podání testovaného nanovlákného přípravku sloužila speciálně designovaná klinická studie. Byla současně koncipována jako srovnávací studie. Jako referenční standard byl použit registrovaný sublingvální přípravek typu lyofilizované tablety úspěšně zavedený do terapeutické praxe. Klinické hodnocení bylo provedeno na zdravých dobrovolnících nezávislým akreditovaným pracovištěm Quinta-Analytica s.r.o., Praha.

5 VÝSLEKDY A DISKUSE

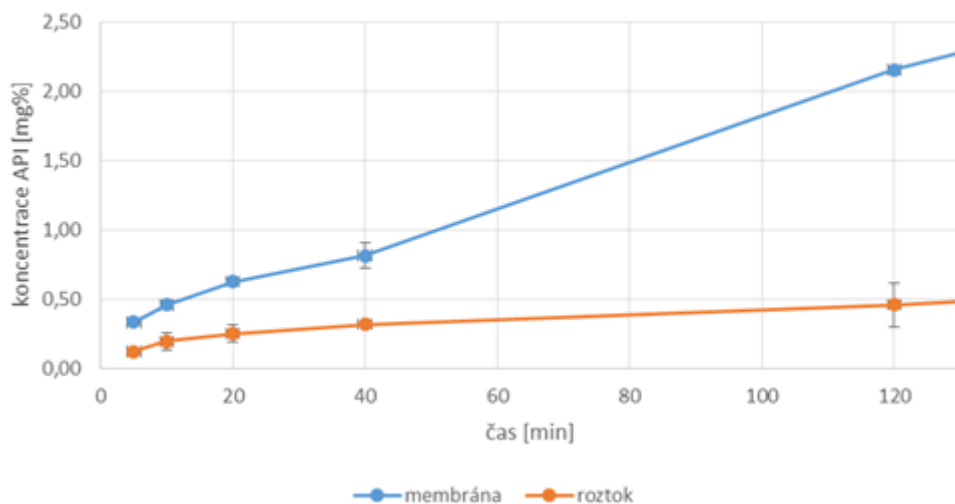
Prvním z cílů disertační práce bylo ověřit průmyslovou využitelnost technologie Nanospider™ v oblasti výroby nanovlákných přípravků pro systémové podání léčiv. Tato problematika ve farmaceutické praxi spadá pod oblast Správné výrobní praxe (SVP) a je striktně kontrolována Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL). Vzhledem k tomu musela samotné výrobě dále hodnocených vzorků nanovlákných nosičů předcházet řada kroků ověřujících opakovatelnost a stálost veškerých procesů spojených s výrobou jednodávkových léčivých přípravků.

V následujících odstavcích jsou detailně popsány nejvýznamnější kroky, tedy validace vlastních procesních parametrů. Ostatní, ač pro schválení výroby podle SVP neméně důležité, jakými jsou například validace praní oděvů, mytí skla či sanitace čistých prostor, jsou v rámci této disertační práce upozaděny.

Dříve než bylo přistoupeno k validačním pracím, byla k ověření funkčnosti navrženého systému kompozitního nosiče s rizatriptan benzoátem provedena ověřovací permeační studie. V předpokusech byly vyhledány a ustáleny podmínky, za kterých mohou být permeační pokusy s danou aktivní látkou, tedy rizatriptan benzoátem vyhovující všem požadavkům i s výhledem na klinické testování.

5.1 Permeační studie s nanovlákným nosičem

V rámci *in vitro* experimentu bylo provedeno měření permeace léčiva z nanovlákné membrány, která byla složena ze dvou různých polymerních vrstev. Z aktivní vrstva obsahovala rizatriptan benzoát ve směsi HPMC a PEO a vrstva krycí obsahovala HPC, PEO. Ke srovnávacímu posuzování *in vitro* permeačních výsledků byl použit vodný roztok léčiva o stejné koncentraci, jakou by poskytlo v daném objemu donorové kapaliny při jeho kompletním rozpuštění z nanovlákného nosiče. Předem validovaná metoda HPLC stanovení léčiva z akceptorovém kompartmentu odebíraného ve stanovených časových intervalech poskytla výsledky převedeny do grafické podoby. Takto bylo postupně testováno několik vývojových nanovlákných přípravků. V souboru pro permeační *in vitro* testování bylo vždy 6 vzorků. Výsledky získané při nalezeném vyhovujícím složení nanovlákného přípravku jsou znázorněny na obrázku 39.



Obrázek 39: Permeace 0,7 mg rizatriptanu z nanovláknenného nosiče a ze srovnávacího roztoku

Z obr. 39 je zřejmé, že vyšší průchod léčiva přes sublingvální prasečí membránu poskytuje nanovláknenný nosič než stejně koncentrovaný pufrovaný roztok léčiva. Počet šesti paralelně odečítaných hodnot (vždy $n = 6$) umožňoval bezproblémový výpočet hodnot *SEM* příslušných směrodatných odchylek, v obrázku jsou obvyklým způsobem vyznačeny rovněž. Již první odběry v 5. minutě permeačního pokusu poskytly u nanovláknenného vzorku vyšší koncentraci RZT v akceptorovém kompartmentu než tomu bylo u roztoku. Ve 120. minutě bylo množství prošlého sublingvální membránou z nanovláknenného nosiče více než čtyřnásobné.

Na základě takto ilustrovaných výsledků bylo možné rozhodnout o oprávněnosti výroby nanovláknenných nosičů o daném složení nanovláken včetně obsahu léčiva, tentokrát již při uplatnění hledisek potřebných validačních kroků.

5.2 Validační procedury

5.2.1 Validace výroby polymerních roztoků bez léčiva

Validace probíhala u všech jednotlivých základních roztoků polymerů, tedy vodných roztoků HPC, HPMC a PEO. Validačními kritérii byla stanovení viskozity polymerních roztoků, měření jejich vodivosti a stanovení výtěžnosti. U každého polymerního roztoku byla stanovena na základě předchozích experimentálních zkušeností kritéria přijatelnosti,

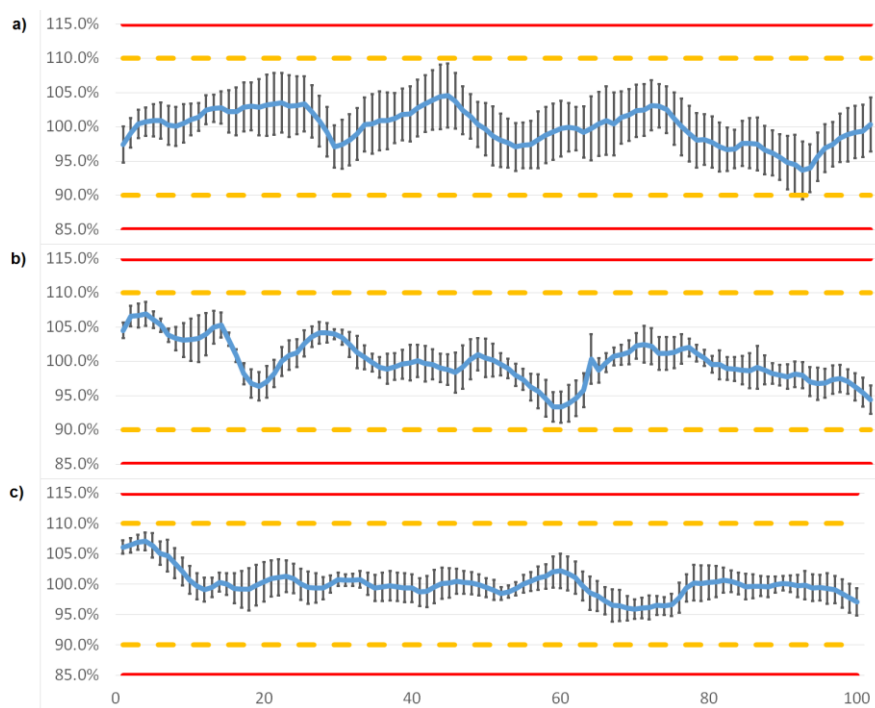
na základě kterých se vyhodnocovala validace za úspěšnou. Naměřené parametry jednotlivých roztoků jsou uvedeny v příloze 2.

Validace přípravy polymerních roztoků proběhla tedy u všech potřebných polymerních roztoků bez komplikací a všechny připravené roztoky validačním kritériím vyhověly.

5.2.2 Validace výroby nanovlákněné vrstvy

Tento validační proces byl zcela zásadním pro celou výrobní proceduru. Měl prověřit a zdokumentovat, zdali výrobní proces provozovaný v rámci parametrů stanovených pro léčiva, může efektivně a reprodukovatelně vyrábět produkt splňující specifikace a atributy jakosti definované příslušnou zdravotnickou legislativou.

Pro toto vyhodnocení byly vyrobeny 3 po sobě jdoucí šarže o velikosti 800 přípravků (V1, V2, V3) s obsahem 5mg rizatriptanu benzoátu na uvažovaný přípravek kruhového tvaru o průměru 2,76 cm, tj. o ploše cca 6 cm². Ustálenost procesu ES a uniformitu jednotlivých nanovlákněných produktů z podrobnějšího hlediska a přesněji umožňuje vyhodnocení hmotnostní variability. K tomuto účelu byly po zvážení každého jednotlivého vzorku s přesností na 0,01 mg pro každou šarži vytvořeny hmotnostní mapy (obr. 39). V nich jsou ve vodorovném směru postupně vyneseny průměrné hmotnosti stripů (střední modrá linka) ve vysekávaných řadách po 8 kusech a hodnoty příslušných směrodatných odchylek (svislé chybové úsečky) v jednotlivých vysekávaných řadách (celkem 100 v každé šarži), a to od počátku do konce výrobního procesu. Nepřerušované (červené) linie vyznačují limitní úroveň hmotnosti stripů ($\pm 15 \%$). Tato úroveň byla zvolena tak, aby stripy o vyhovujících hmotnostech mohly splňovat požadavek daný lékopisným článkem Obsahová stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Byla totiž předpokládána a následně ověřována úzká korelace mezi hmotností stripu a obsahem léčiva. Pomocná pracovní přerušovaná (žlutá) linie vyznačující úroveň $\pm 10 \%$ od průměrné hmotnosti odpovídá požadavku lékopisného článku Hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem definovaná lékopisem pro přípravky o průměrné hmotnosti nižší než 80 mg. A hodnocené stripy o hmotnosti cca 30 mg právě do této podskupiny patří.



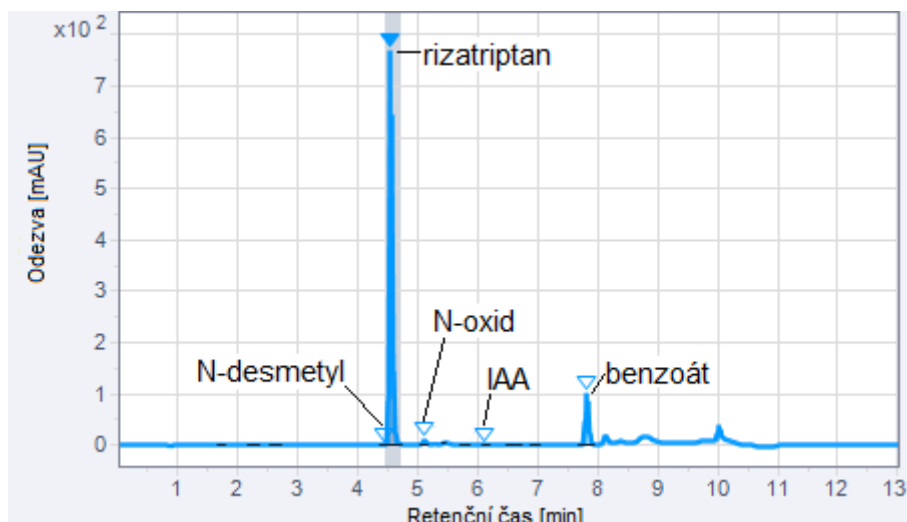
Obrázek 40: Hmotnostní profily vyrobených šarží s vyznačenými limity ($\pm 15\%$) pro přípustnou hmotnost stripu a) šarže V1 b) šarže V2 c) šarže V3

Zobrazené mapy ukazují, že u všech tří vyrobených po sobě jdoucích šarží stripů se jejich hmotnost v udržovala ve stanoveném limitu. Toto zjištění je z hlediska praktického využití validace ES v daném kontextu nejvýznamnější. Vyplývá z něj důležitý závěr v tom smyslu, že použité procesní parametry výroby kusových dávkových nanovlákných přípravků, stripů, umožňují jejich stabilizovanou produkci jak v rámci jednotlivých šarží, tak i při opakované produkci v poloprovozním rozsahu.

V detailnějším pohledu by zajímavý zvlněný charakter do jisté míry pravidelného kolísání průměrných hmotností v podskupinách hodnocených vzorků. Tento jev byl impulzem pro hledání jeho příčin. Za hlavní příčinu bylo identifikováno krátkodobé zastavování výrobního stroje Nanospider™ při dolévání čerstvého polymerního roztoku. Je tudíž nasnadě uplatnit konstrukční vylepšení spočívající v kontinuálním doplňování zásobníku roztoku v celém průběhu ES výroby.

Další důležitou otázkou bylo, jak bude při poloprovozní výrobě reálně vycházet předpoklad vysoké korelace mezi hmotnostmi dvouvrstvých stripů a obsahem léčiva v nich. Z náhodně vybraných míst vyrobeného nanovlákného pásu bylo v každé šarži odebráno 32 stripů (výseků). Každý z nich byl nejprve zvážen, následně bylo provedeno HPLC stanovení obsahu rizatriptanu (viz obr. 41) a jako validační parametr vyhodnocena

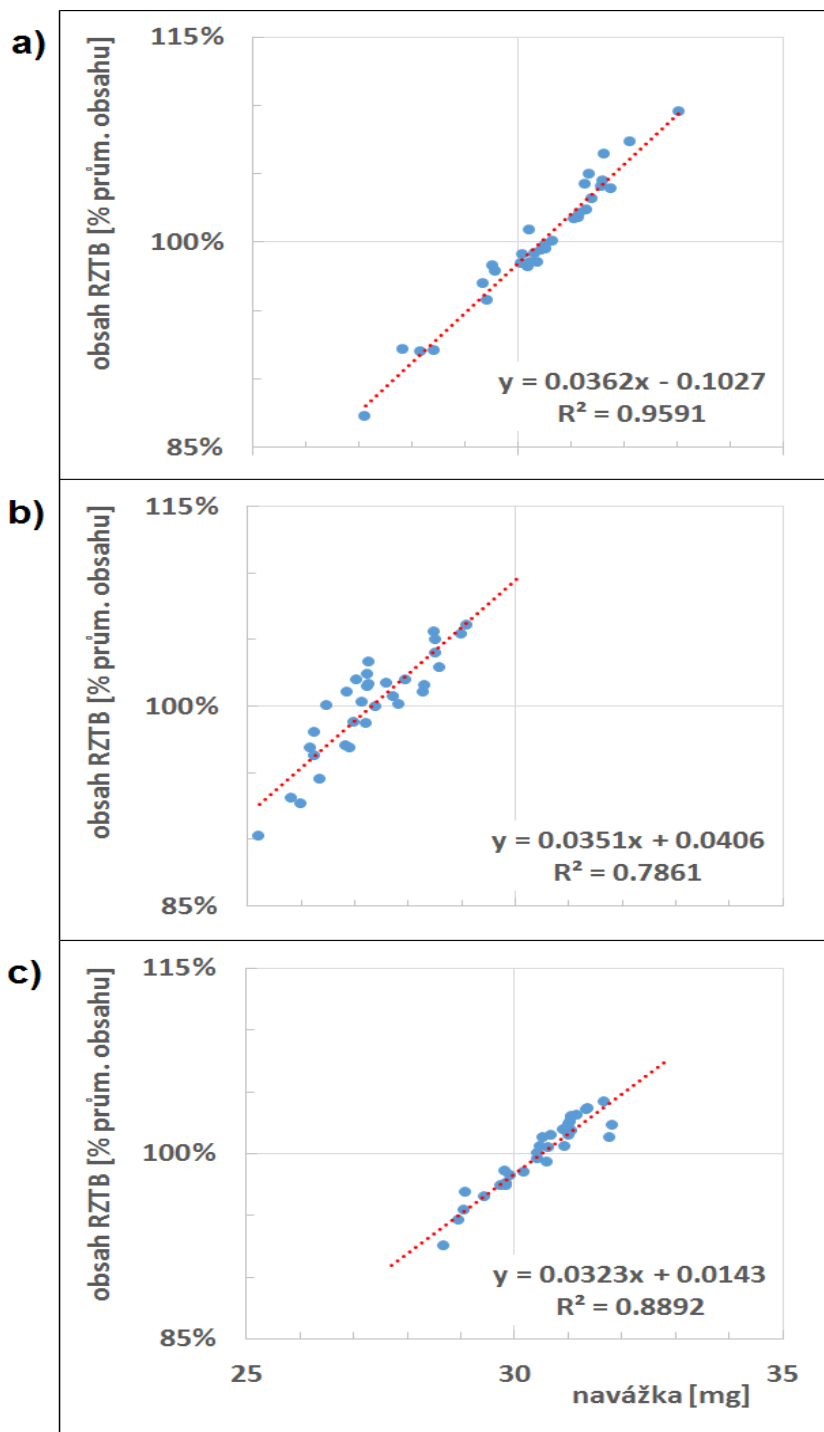
obsahová stejnoměrnost stripů. Stanovený limit pro validaci na úrovni $\pm 15\%$ průměrného obsahu byl převzat z lékopisného článku Obsahová stejnoměrnost jednodávkových lékových forem, výsledky shrnuje příloha 3..



Obrázek 41: Typický chromatogram z HPLC analýzy nanovlákného produktu obsahující 5mg léčiva

U šarže V2 byly nalezeny poněkud nižší hodnoty obsahu RZT, nicméně stále ještě spadaly do přípustného rozmezí, což samo o sobě bylo uspokojivé. Přesto byl v rámci validace posun hodnot obsahu RTZ v této šarži byl dále věcně analyzován. Jeho zdroj byl identifikován v kolísání gramáže protektivní vrstvy (bez obsahu léčiva), které bylo zapříčiněno nepřesným chodem motoru řídícím posun podkladové textilie. Pro výrobu šarže V3 došlo k operativní nápravě a tento rušivý faktor se v ní již výrazněji neprojevil. Z uvedeného lze ovšem pro další výrobu dvouvrstevných (a vícevrstevných) jednodávkových přípravků spatřovat důležité upozornění v tom smyslu, že i kolísání gramáže vrstvy bez obsahu léčiva může mít pro kvalitu produktu kritickou roli.

Pro stabilizovanou výrobu dávkovaného přípravku s jednou aktivní a jednou protektivní nanovláknou vrstvou bylo dále v rámci validační procedury potřebné ozřejmit vztah mezi hmotností stripů a aktuálním obsahem léčiva.



Obrázek 42: Vztah hmotnosti nanovlákněného stripu a obsahu RZT pro

a) šarži V1 b) šarži V2 c) šarži V3

Ze získaných údajů o hmotnosti a obsahu RZT analyzovaných stripů a byly sestrojeny grafy (viz obr. 42), provedena lineární regrese a vyčísleny příslušné hodnoty daného proložení včetně hodnot R^2 příslušných koeficientů determinace.

Lineární regresní model se ukázal pro danou situaci jako plně vyhovující. Předpoklad těsného vztahu mezi hmotností a obsahem potvrzují vyčíslené hodnoty R^2 . V základní interpretaci pro validaci vysvětlují tyto hodnoty celkově přípustnou variabilitu obsahu léčiva v analyzovaných stripech variabilitou jejich hmotnosti, a to z 95,91 % u šarže V1, 78,60 % u šarže V2 a 88,91 % u šarže V3.

5.2.3 Kvalifikace zařízení Nanospider™

Kvalifikace zařízení Nanospider™ probíhala dle předem definovaných zkoušek a kritérií přijatelnosti. Na základě provedené kontroly funkcí zařízení Nanospider™ bylo prokázáno, že jednotlivé prvky zařízení fungují správně dle specifikací výrobce a požadavků SVP. Výsledky měření jsou shrnuty v příloze 4.

5.2.4 Validace stanovení obsahu RZT

Byly validovány parametry analytické metody (včetně přípravy vzorku) pro zjištění obsahu rizatriptanu v produktu. Podle metodiky ICH (*ICH Q2(R1) (2005): ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, London, 13 pp.*)¹²⁶ byla získána data o specifitě, linearitě, přesnosti, správnosti a robustnosti validované metody. Součástí bylo i potvrzení totožnosti léčivé látky a testy stability roztoků standardů a odebraných vzorků.

Pro prokázání specifity bylo analyzováno placebo, disoluční médium (čištěná voda), mobilní fáze a standard rizatriptanu. K prokázání linearity byly provedeny dvě přípravy roztoku standardu s přídatkem placeba odpovídajícím jednomu stripu. Standardy byly připraveny na osmi koncentračních úrovních. Přesnost metody byla prokázána testem opakovatelnosti nástřiku, tj. vyhodnocením směrodatných odchylek ploch píku a retenčních časů píku rizatriptanu po analýze 6 nástřiků ze stejného vzorku. Pro testování správnosti byly připraveny vzorky se standardním přídatkem (spiking) rizatriptan benzoátu, v trojnásobném provedení (tj. 3 navážky) na třech různých koncentračních úrovních. Při testování robustnosti byl testován efekt změn chromatografických podmínek na dosažené výsledky. Potvrzení totožnosti léčivé látky bylo provedeno porovnáním HPLC/UV spektra a retenčního času píku rizatriptanu ve vzorku s jeho standardem. Vzorky byly vystaveny stresovým podmínkám: zvýšená teplota (1 hod. při 100°C), kyselé prostředí (0,1M HCl, 1 hod při 100°C), zásadité prostředí (0,1M KOH, 1 hod při 100°C), oxidativní prostředí (3% H₂O₂, 1hod při 100°C), UV záření (1,5 hod u UV lampy). Výsledky jsou uvedeny v příloze 5.

Validace analytické interní (in-house) metody prokázala, že zjištění obsahu rizatriptanu v produktu touto metodou je validní. Vždy byla splněna akceptační kritéria.

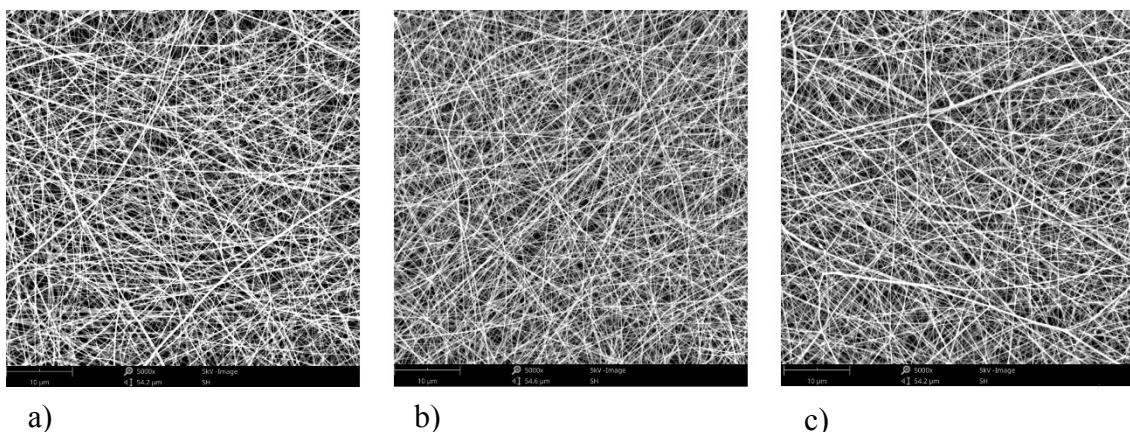
5.2.5 Validace postupu disoluce

Pro prokázání specificity byla analyzována mobilní fáze, placebo a disoluční médium (pufr o pH 7,4) a standard rizatriptanu. K prokázání linearity byly provedeny dvě přípravy roztoku standardu s přidavkem placebo odpovídajícím jednomu stripu, tentokrát na sedmi koncentračních úrovních. Přesnost metody byla prokázána testem opakovatelnosti nástřiku (tj. vyhodnocením směrodatných odchylek ploch píku a retenčních časů píku rizatriptanu po analýze 6 nástřiků ze stejného vzorku), testem opakovatelnosti metody (při které bylo připraveno a analyzováno 6 samostatných vzorků) a testem intermediální přesnosti (kdy byla analýza opakována v různých dnech různými analytiky). Pro testování správnosti byly připraveny vzorky se standardním přidavkem (spiking) rizatriptan benzoátu, v trojnásobném provedení (tj. 3 navážky) na třech různých koncentračních úrovních. Při testování robustnosti byla disoluce provedena s pozměněnými podmínkami (teplota, otáčky, ne-/odplynění média), vždy na dvou vzorcích. Byl testován efekt změn těchto parametrů na dosažené výsledky disoluce (viz příloha 6).

Validace analytické interní (in-house) metody prokázala, že hodnocení disolučního testu touto metodou je validní. Vždy byla splněna akceptační kritéria.

5.3 Výroba šarže pro bioekvivalenční studii

Na základě předešlých validačních procesů mohlo být přistoupeno k výrobě šarže určené pro biodostupnostní studie. Šarže pro klinického hodnocení byla vyrobena dle stejných procedurálních postupů, jaké jsou popsány v kapitole 4.2.1. Pomocí elektronové mikroskopie byla charakterizována kvalita aktivní vrstvy obsahující léčivo. Získané snímky jsou prezentovány na obrázku 43.



Obrázek 43: SEM snímky aktivní nanovláčkové vrstvy při 5000násobném zvětšení

Na snímcích je patrné, že zobrazovaná vlákna jsou rozložena náhodně, bez hustěji nanesených okrásků, mají pravidelnou tloušťku, rozměrově v oblasti cca 100 nm až 300 nm, nevyskytují se na nich ztlustělá místa, uzlíky, známky krystalizace (léčiva, polymeru) nebo jiné nepravidelnosti, nejsou patrné ani delší těsně přilehlé úseky nanovláčků. Taková zobrazení signalizují správné nastavení ES procesu a dobrou kvalitu nanovláčkového produktu.

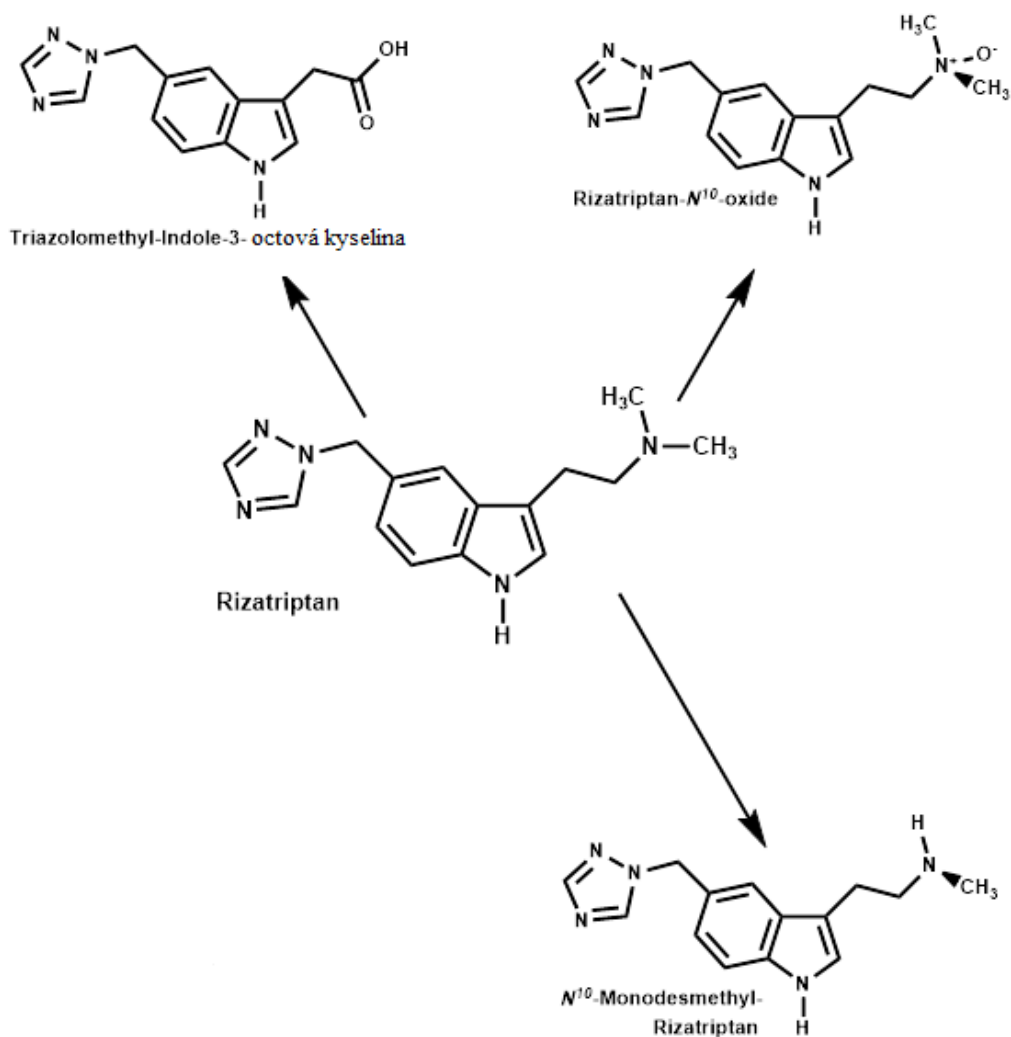
Po výrobě byl produkt zabalen do primárního obalu složeného z PET-ALU-PE fólie a dále do sekundárního obalu, papírové krabičky obsahující vždy 6 ks produktu.

5.3.1 Stanovení nečistot

Identifikace nečistot proběhla ve spolupráci se společností Quinta–Analytica s.r.o. Praha, kam byly zaslány vzorky z validačních šarží. Vzorky byly podrobeny analýzám HPLC a LC-MS. V hodnoceném produktu byly nalezeny 3 hlavní nečistoty:

- triazolomethyl-indol-3-octová kyselina
- rizatriptan-N¹⁰-oxid
- N¹⁰-monodesmethyl-rizatriptan

Všechny tři látky nalezené jako rozkladné produkty v nanovláčkovém přípravku po jeho výrobě metodou elektrospinningu na výrobním zařízení Nanospider™ jsou kvalitativně shodné s těmi (viz obr. 44), které byly nalezeny a dříve popsány také jako metabolity po perorální aplikaci rizatriptanu v moči lidských subjektů¹²⁷.



Obrázek 44: Nečistoty ve vyrobeném nanovláčném přípravku RZT 5mg

Jak bylo dříve publikováno, z celkově podaného množství rizatriptanu, přibližně 14 %, nestačí podlehnout biotransformaci a vylučuje se močí.¹²⁸

Triazolomethyl-indol-3-octová kyselina je hlavním metabolitem rizatriptanu, představuje asi 51 % produktů biotransformace, je bez farmakologické aktivity a tvoří hlavní část metabolitů vyloučených do moči.

Rizatriptan-N¹⁰-oxid je jako nečistota rizatriptanu popsán v PhEur. 8.0. Studie o této látce uvádějí, že patří k méně významným metabolitům a není farmakologicky aktivní, po perorálním podání tvoří do 2 % metabolitů vyloučených močí.

N¹⁰-monodesmethyl-rizatriptan je popsán v Ph.Eur. 8.0. Má podobnou aktivitu jako rizatriptan a v množství 1% je vylučován ledvinami.

Z uvedených informací o biotransformaci rizatriptanu¹²⁹ bylo možné stanovit limit obsahu nečistot v nanovlákném přípravku na 5% vzhledem k deklarovanému množství rizatriptanu v jedné dávce přípravku. U jednotlivých nalezených nečistot byly nastaveny limitní koncentrace následovně (viz příloha 7):

5.3.2 Mikrobiální čistota

Proto, aby produkt mohl být uvolněn, musela být otestována jeho mikrobiální čistota s podmínkou splnění kritéria článku Ph.Eur. 5.1.4 (Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití), Tab. 5.1.4-1 (Kritéria přijatelnosti pro mikrobiologickou jakost nesterilních lékových forem), Způsob podání: orální podání:

- celkový počet aerobních mikroorganismů (TAMC): nejvýše 10^2 CFU/g
- celkový počet kvasinek/plísní (TYMC): nejvýše 10^1 CFU/g
- nepřítomnost *Staphylococcus aureus* (v 1 g nebo v 1 ml)
- nepřítomnost *Pseudomonas aeruginosa* (v 1 g nebo v 1 ml)

Vzorky byly otestovány v mikrobiologické laboratoři společnosti VÚAB v Roztokách u Prahy. Všechny hodnocené vzorky splnily výše uvedené limity (vždy <5 CFU/g, bez *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*).

5.4 Propuštění přípravku

Propouštění přípravku probíhalo dle schváleného standardního operačního postupu, který uváděl podrobně požadavky na kvalitu, podmínky zkoušení, uchovávání a propouštění do výroby, resp. k expedici. Propouštěná šarže musela vyhovovat zkouškám na totožnost, obsah rizatriptanu, obsahovou stejnoměrnost, disoluce, obsah nečistot a mikrobiální nezávadnosti. Pro chemické, mikrobiologické testování a referenční vzorky bylo odebráno celkem 78 ks zabaleného finálního produktu. Pro testy totožnosti i obsahu se využily chromatogramy naměřené při hodnocení obsahové stejnoměrnosti (viz odst. 5.2.2.).

Ve zkoušce totožnosti byly hodnoceny získané chromatogramy, přičemž retenční časy a velikosti píků zkoušeného roztoku musely odpovídat roztoku standardu o stejné koncentraci. U zkoušky obsahu musely testované vzorky obsahovat 80 – 120 % deklarovaného obsahu (tedy 4,0-6,0 mg rizatriptanu báze). Testu disoluce se podrobilo 6 náhodně vybraných vzorků, u kterých se muselo uvolnit 70 % deklarovaného obsahu léčiva do 20 minut (viz. příloha 8)

Jak je v příloze 8 uvedeno, veškeré nutné testy k propuštění produktu vyhověly dané specifikaci a produkt mohl být tedy kvalifikovanou osobou uvolněn pro klinické hodnocení.

5.4.1 Stabilitní studie

Před zahájením klinického hodnocení byla zahájena stabilitní dlouhodobé (25 °C/60% RH) a zrychlené studie (40 °C/75% RH) u šarže V3. Příslušné vzorky byly uloženy ve společnosti Quinta-Analytica s.r.o. Praha v primárních a sekundárních obalech. Na začátku studie a pak v předem zvolených intervalech (u zrychlené studie po 1, 2, 3, 6, 9 a 12 měsících, u dlouhodobé studie po 3, 6, 9, 12, 18 měsících, a dále dle plánu po 24, 30, 36, 42 a 48 měsících, byly vzorky převezeny do společnosti InStar Technologies a.s. Liberec, kde byly hodnoceny parametry, jejichž přehled i s příslušnými limity kritérií přijatelnosti je uveden v příloze 1 k odst. 4.3.3.

Výsledky jsou uvedeny v přílohách 9 až 10.

Hodnocená výrobní šarže nanovlákného přípravku doposud vždy vyhověla ve všech sledovaných parametrech, a to jak ve zrychlené, tak v dlouhodobé stabilitní studii. Zrychlená stabilitní studie byla již ukončena. Studie dlouhodobá bude pokračovat nadále po dobu zbývajících 3 let.

5.5 Biodostupnostní studie

Vlastnosti referenčního přípravku byly již popsány a známy z rozsáhlé literatury,¹³⁰ testovaný přípravek se od referenčního přípravku nelišil v množství léčivé látky, rizatriptanu. Podání testovaného a referenčního přípravku bylo jednorázové nebo krátkodobé. Bioekvivalenční studie nanovlákného přípravku rizatriptan 5 mg (testovaný produkt) společně s Maxalt® Smelt 5 mg, Smelttabletten (lyofilizované tablety firmy MSD; referenční přípravek).

Klinická studie byla provedena ve spolupráci se společností Quinta-Analytica s.r.o., dle pravidel správné klinické praxe.

Po vyjasnění smyslu, povahy a zaměření studie byly upřesněny její základní parametry. Cílem bylo srovnání biodostupnosti testovaného nanovlákného přípravku (T) a referenčního (R) produktu (oba s obsahem 5 mg rizatriptanu) při sublingvální aplikaci u zdravých dobrovolníků. Hlavními hodnotícími parametry byly plocha pod křivkou koncentrací léčiva v krvi, $AUC_{(0-t)}$, maximální dosažená koncentrace, C_{max} , a čas dosažení maximální koncentrace t_{max} rizatriptanu.

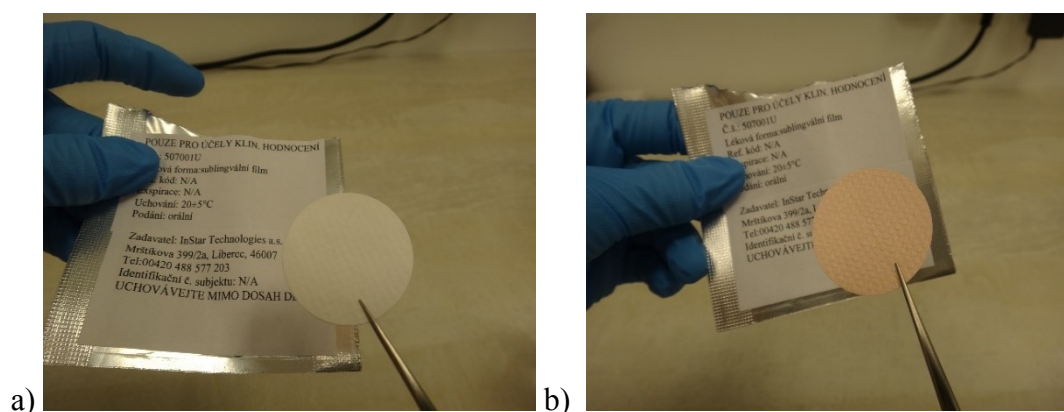
Klinická část studie byla provedena v Gruzii na pracovišti Emergency Cardiology Center by Acad. G. Chapidze, Tbilisi.

Z protokolu studie jsou níže uvedeny pouze vybrané nejzásadnější informace. Zdraví dobrovolníci byli rozděleni do dvou skupin, přičemž jedné skupině byl podán testovaný produkt (T) a druhé produkt (R), referenční. Testovací schéma bylo při druhé aplikaci vyměněno, jak je uvedeno v tabulce 6. Mezi oběma aplikacemi byla stanovena klidová fáze 2 dnů bez aplikace léčiva.

Testovaný produkt měl krycí polymerní vrstvu barevně odlišenou pro zamezení záměny při aplikaci (viz obr. 45). Aktivní bílou vrstvu si dobrovolník nalepil pod jazyk směrem k sublingvální membráně.

Tabulka 6: Testovací schéma klinické studie

	Sekvence	Počet dobrovolníků	Administrace	
			Perioda 1	Perioda 2
Počet subjektů	TR	6	T	R
	RT	6	R	T



Obrázek 45: Vzhled hodnoceného testovaného produktu, a) bílá vrstva obsahující léčivo, b) krycí vrstva bez léčiva obarvená Kollicoat IR Red

Dobrovolníkům ve stanovených intervalech odebírána pomocí katetru krev od času 0 po 12.00 hodin, celkově 18 vzorků.

Hodinu po aplikaci dobrovolníci nepožívali žádné jídlo ani nepili tekutiny. Po celou dobu byl monitorován jejich zdravotní stav, byl měřen krevní tlak a srdeční tep. Odebrané

vzorky byly po ukončení studie převezeny do České republiky, kde ve společnosti Quinta-Analtica proběhlo stanovení a vyhodnocení požadovaných parametrů.

Hodnoty farmakokinetických parametrů odvozených z časového průběhu plasmatických koncentrací léčiva byly vypočteny softwarem Phoenix WinNonlin® za použití non-kompartmenového modelu, lineární trapezoidální a lineární interpolační metodiky, metody nejlepšího proložení a bez vyloučení jakýchkoli dat.

Akceptační interval pro vyhodnocení běžné studie za úspěšnou ve smyslu prokázání bioekvivalence leží v rozmezí 80 % až 125 % poměru příslušných farmakokinetických hodnot testovaného a referenčního produktu. Předmětem studie ovšem v daném případě nebylo ověřování bioekvivalence dvou produktů, ale biodostupnosti léčiva (rizatriptanu) z nanovláčenného produktu (T) v porovnání s registrovaným přípravkem (R) podávaným stejnou aplikační cestou.

K tomuto účelu byly kromě hlavních farmakokinetických parametrů v procentech vyčísleny poměry T/R příslušných hodnot $AUC_{(0-t)}$ (ng·h/ml) a C_{max} (ng/ml). Tyto podstatné údaje shrnuje tabulka 7. V ní jsou dále uvedeny vypočtené (ANOVA) hodnoty příslušných geometrických průměrů GMEAN parametrů a intraindividuální koeficienty variance % CV pro ln-transformované parametry, symbolem N je označen počet probandů ve skupině.

Vzhledem k akceptačnímu rozmezí je zřejmé, že bioekvivalence srovnávaných produktů nebyla prokázána. Z hlediska smyslu studie to ovšem vůbec není důležité. Podstatné je to, že po podání nanovláčenného přípravku bylo dosaženo AUC na úrovni 145 % hodnot referenčního přípravku. V případě analogického porovnání maximálních dosažených koncentrací C_{max} u nanovláčenného a referenčního přípravku je vyčíslená hodnota poměru T/R na úrovni 146 % prakticky stejná.

Tabulka 7: Výstupy z bioekvivalenční studie

Parametr	Testovaný produkt			Referenční produkt			POMĚR T/R (%)
	N	GMEAN	CV (%)	N	GMEAN	CV (%)	
$AUC_{(0-t)}$ (ng·h/ml)	12	28.255	12.84	12	19.467	16.00	145.15
C_{max} (ng/ml)	12	10.193	17.85	12	7.001	21.70	145.59

Bylo by samozřejmě možné teoreticky zvažovat, do jaké míry je takový výsledek dán rozdílným složením excipientů v testovaném nanovlákněném a referenčním sublingválním přípravku, jejich vlivem na léčivo nebo sublingvální membránu, vlivem nanovláknění na strukturu léčiva a použitých polymerů a s tím související parametry rozpouštění léčiva i nosiče, to však nebylo předmětem studia této práce. Tím bylo hledání a ověřování podmínek robustní produkce nanovlákněného nosiče pro systémové podání miligramových kvant léčiv.

6 ZÁVĚRY

1. Po návrhu složení nanovlákněné dvouvrstvé matrice s aktivní vrstvou obsahující rizatriptan a protektivní nanovlákněnou vrstvou bylo vymezeno rozmezí výrobních podmínek elektrospiningu nutných pro opakovanou výrobu medikovaného sublingválního přípravku zamýšleného k transmukosální aplikaci miligramových dávek léčiva.
2. Byly nalezeny, ověřovány a validovány jednotlivé kroky procesu výroby medikovaného nanovlákněného přípravku elektrospiningem.
3. Po elektronmikroskopické charakterizaci tvaru a povrchu byly validační kroky zaměřeny na hmotnostní stejnoměrnost, obsahovou stejnoměrnost, charakteristiku disoluce, permeační *in vitro* profil rizatriptanu a stabilitní data kompletního přípravku.
4. Principiálně dobře škálovatelnou technologií elektrospiningu se za splnění všech podmínek pro výrobu léčivých přípravků podařilo validovanou procedurou vyrobit 3 šarže produktu, který mohl být propuštěn do klinické studie na lidských dobrovolnících.
5. V klinické biodostupnostní studii bylo ve dvou skupinách po 12 dobrovolnících zjištěno, že nově navržený nanovlákněný přípravek převyšuje ve dvou základních farmakokinetických parametrech přípravku referenční, registrovaný pro sublingvální podání rizatriptanu v podobě lyofilizovaných tablet.
6. Nalezené výsledky hodnot $AUC_{(0-t)}$ (ng·h/ml) a C_{max} (ng/ml) prokázaly biodostupnost rizatriptanu na úrovni 145 procent ve srovnání s registrovaným přípravkem.
7. Praktický zaměřený závěr práce lze vyjádřit tak, že testovaný nanovlákněný produkt, vyrobený validovanou ES technologií, splňuje lékopisná kritéria pro jednodávkové přípravky s obsahem léčiva v jednotkách miligramů. Umožňuje tedy neinvazivní, terapeuticky účinné sublingvální systémové podání léčivé látky i s použitím menšího kvanta léčiva než při jeho aplikaci úspěšně zavedeným registrovaným přípravkem.
8. Obecnější a zásadní závěr lze formulovat tak, že potenciální přednosti nanovlákněných nosičů léčiv lze za použití elektrospiningu technologicky realizovat na výrobní úrovni. Neinvazivní transmukosální aplikační cesta je přitom příkladem možné oblasti využití medikovaných nanovlákněných přípravků.

7 LITERATURA

¹ Doporučení komise ze dne 18. října 2011 o definici nanomateriálu. Úřední věstník Evropské unie. 2011/696/EU. L 275/38. (20.10.2011).

² HE, J.-H., Y.-Q. WAN a L. XU. Nano-effects, quantum-like properties in electrospun nanofibers. *Chaos, Solitons and Fractals*. 2007, 33(1), 26-37. DOI: 10.1016/j.chaos.2006.09.023. ISSN 09600779.

³ MITCHELL, G., BEN ZHONG TANG (Eds.), *Electrospinning: principles, practice and possibilities*. RSC polymer chemistry series, 14. RCS Publishing. 2015 London. 288 s. ISBN 10:1849735565.

⁴ RAMAKRISHNA, S., K.FUJIHARA, W.-E. TEO, T.-CH. LIM, Z.MA. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2005. 369 s. ISBN 978-981-256-415-3

⁵ STANGER, J., N. TUCKER a M. STAIGER. *Electrospinning*. Shawbury, Shrewsbury, Shropshire: Smithers Rapra technology, 2005. ISBN 9781847350916.

⁶ WENDORFF, J.H., S. AGARWAL a A. GREINER. *Electrospinning: Materials, Processing, and Applications [e-book]*: New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012. ISBN 978-3-527-32080-6.

⁷ LIN, T. a X. WANG. *Needleless electrospinning of nanofibers: technology and applications*. Singapore : Pan Stanford Publishing, 2014, 192 s. ISBN 9789814316354

⁸ ANDRADY, A.L.. *Science and Technology of Polymer Nanofibers*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008. 424 s. ISBN 9780470229835.

⁹ ONDARÇUHU, T. a C. JOACHIM. Drawing a single nanofibre over hundreds of microns. *Europhysics Letters*. 1998, 42(2), 215-220 [cit. 2017-07-21]. DOI: 10.1209/epl/i1998-00233-9. ISSN 02955075.

¹⁰ NAIN, A.S., J.C. WONG, C. AMON a M. SITTI. Drawing suspended polymer micro-/nanofibers using glass micropipettes. *Applied Physics Letters*. 2006, 89(18), 183105-183107 [cit. 2017-07-21]. DOI: 10.1063/1.2372694. ISSN 00036951.

- ¹¹ BAJÁKOVÁ, J., J. CHALOUPEK, D. LUKÁŠ a M. LACARIN: Drawing – the production of individual nanofibers by experimental method, NANOCON 2011. Conference Proceedings, 3rd International Conference 2011, s. 322-326; Hotel Voronez Brno; Czech Republic; 21 - 23 September 2011; Code 110447
- ¹² TONG, L. -SUMETSKY, M. Subwavelength and Nanometer Diameter Optical Fibers. Hangzhou; Heidelberg; New York: Zhejiang University Press; Springer, 2010. 236 s. ISBN 9783642033612.
- ¹³ POINERN, G., L. XT, M. O'DEA, T. BECKER a D. FAWCETT. Chemical synthesis, characterisation, and biocompatibility of nanometre scale porous anodic aluminium oxide membranes for use as a cell culture substrate for the vero cell line: a preliminary study. *Biomed Research International*. 2014, 238762. DOI: 10.1155/2014/238762. ISSN 23146141.
- ¹⁴ FENG L, S. LI, H. LI, J. ZHAI, Y. SONG, L. JIANG a D. ZHU. Super-hydrophobic surface of aligned polyacrylonitrile nanofibers. *Angewandte Chemie*. 2002, 41(7), 1221-3. ISSN 14337851.
- ¹⁵ ZHONG, Ch., A. COOPER, A. KAPETANOVIC, Z. FANG, Mi. ZHANG a M. ROLANDI. A facile bottom-up route to self-assembled biogenic chitin nanofibers Electronic supplementary information (ESI) available: Procedures for (1) preparation and characterization of chitin nanofibers and (2) cell culture and cytotoxicity test. DOI. *Soft Matter* . 2010, 6(21), 5298-5301. ISSN 1744683X.
- ¹⁶ ZHANG, K., A. GEISLER, S. FISCHER, E. BRENDLER a E. BÄUCKER. Solid-state spectroscopic characterization of α -chitins deacetylated in homogeneous solutions. *The Journal of Physical Chemistry. B*. 2012, 116(15), 4584-92. DOI: 10.1021/jp210469x. ISSN 15205207.
- ¹⁷ BEACHLEY, V. a X. WEN. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Science*. 2010, 35(7), 868-892. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.03.003. ISSN 00796700.
- ¹⁸ MA, P.X. a R. ZHANG. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *Journal of Biomedical Materials Research* . 1999, 46(1), 60-72. ISSN 00219304.
- ¹⁹ MATHER, R.R. a R. H. WARDMAN: The Chemistry of Textile Fibres. *Materials World* . 2011, 19(2), 43-43. ISSN 09678638.

- ²⁰ RUSSEL, S.J. Handbook of nonwovens. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., 2007. 515 s. ISBN 1845691997
- ²¹ DUGAN, J., E.HOMONOFF : Synthetic Split Microfiber Technology for filtration, retriever at <http://www.fitfibers.com> (dostupné 21.7.2017)
- ²² NDARO, M.S., J. XIANG-YU, TING CHEN a CHONG-WEN YU. Splitting of Islands-in-the-Sea Fibers (PA6/COPET) During Hydroentangling of Nonwovens. *Journal of Engineered Fabrics*. 2007, 2(4), 1-9. ISSN 15589250.
- ²³ HILLS, Inc.. Method and apparatus for in-line splitting of plural component fibers and formation nonwoven fabrics: International Patent: 99/19131.1999-4-22.
- ²⁴ <http://www.hillsinc.net/assets/pdfs/nano-fibers.pdf> (dostupné 7.9.2017)
- ²⁵ NAYAK, R., R. PADHYE, I.L. KYRATZIS, Y.B. TRUONG a L. ARNOLD. Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Textile Research Journal*. 2012, 82(2), 129-147. DOI: 10.1177/0040517511424524. ISSN 00405175.
- ²⁶ <http://docplayer.cz/46201426-Netkane-textilie-technologie-2.html> (dostupné 7.9.2017)
- ²⁷ ELLISON, Ch. J., A. PHATAK, D. W. GILES, Ch. W. MACOSKO a F. S. BATES. Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup. *Polymer*. 2007, 48(11), 3306-3316. DOI: 10.1016/j.polymer.2007.04.005. ISSN 00323861.
- ²⁸ WIRAPUTRA, I. G.P.A. EKA, A. FAUZI, A. ZULFI, M. M. MUNIR a KHAIRURRIJAL. The Design of Mini-Rotary Forcespinning System for Nanofiber Synthesis. *Proceedings Engineering*. 2017, 170, 24-30. DOI: 10.1016/j.proeng.2017.03.005. ISSN 18777058
- ²⁹ K.LOZANO K. a K.SARKAR. Methods and apparatuses for making superfine fibers, US20090280325 A1, WO App., Priority date 2008-03-17
- ³⁰ K.LOZANO K. a K.SARKAR. Superfine fiber creating spinneret and uses thereof. US20090280207 A1, US App., Priority date 2008-03-17
- ³¹ K.LOZANO K. a K.SARKAR. Superfine fiber creating spinneret and uses thereof. US20090269429 A1, US App., Priority date 2008-03-17
- ³² K.LOZANO K. a K.SARKAR. Superfine fiber creating spinneret and uses thereof. US20090232920 A1, US App., Priority date 2008-03-17

- ³³ KRENKOVA, J., J. MORAVKOVA, J. BUK, F. FORET. Phosphopeptide enrichment with inorganic nanofibers prepared by forcespinning technology. *Journal of Chromatography A*. 2016, 1427, 8-15. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.12.022. ISSN 00219673.
- ³⁴https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/125/course/section/100/1_%C3%9Avod_cz.pdf, (dostupné 7.9.2017)
- ³⁵ AFSHARI, M.. *Electrospun Nanofibers*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017. 648s. ISBN 9780081009079
- ³⁶ SILL, T. J. a H. A. VON RECUM. Review: Electrospinning. *Biomaterials* . 2008, 29(13), 1989-2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011. ISSN 01429612.
- ³⁷ COOLEY, J. F., U.S. Pat. 745,276, 1903. Electrical method of dispersing fluids.
- ³⁸ NORTON, C.L.. U.S. Pat. 2,048,651 , 1938. Method of and apparatus for producing fibrous or filamentary material.
- ³⁹ TAYLOR, G.. Electrically Driven Jets. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*. 1969, 313(1515), 453-475. ISSN 00804630.
- ⁴⁰ BAUMGARTEN, P. K. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1971, 36(1), 71-79. DOI: 10.1016/0021-9797(71)90241-4. ISSN 00219797.
- ⁴¹ HAYATI, I., A. BAILEY a Th.F. TADROS. Investigations into the mechanism of electrohydrodynamic spraying of liquids. II. Mechanism of stable jet formation and electrical forces acting on a liquid cone. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1987, 117(1), 222-230. DOI: 10.1016/0021-9797(87)90186-X. ISSN 00219797.
- ⁴² DEITZEL, J.M., J.D. KLEINMEYER, J.K. HIRVONEN a N.C. BECK TAN. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*. 2001, 42(19), 8163-8170. DOI: 10.1016/S0032-3861(01)00336-6. ISSN 00323861.
- ⁴³ SHIN, Y.M., M.M. HOHMAN, M.P. BRENNER a G.C. RUTLEDGE. Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer*. 2001, 42(25), 9955-9967. ISSN 00323861.

- ⁴⁴GIBSON, P. W., H. L. SCHREUDER-GIBSON a D. RIVIN. Electrospun fiber mats: Transport properties. *AIChE Journal*. 1999, 45(1), 190-195. DOI: 10.1002/aic.690450116. ISSN 00011541.
- ⁴⁵DOSHI, J. a D. H. RENEKER. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*. 1995, 35(2), 151-160. DOI: 10.1016/0304-3886(95)00041-8. ISSN 03043886.
- ⁴⁶JIRSÁK, O., F.SANETRŇÍK, D. LUKÁŠ, V. KOTEK, L.MARTINOVÁ, J. CHALOUPEK. Method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method, U.S. Pat. 7585437 B2, 2003.
- ⁴⁷HOLOPAINEN, J. a M. RITALA. Rapid production of bioactive hydroxyapatite fibers via electroblowing. *Journal of the European Ceramic Society*. 2016, 36(13), 3219-3224. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2016.05.011. ISSN 09552219.
- ⁴⁸ Sridhar R., Ramakrishna S.: Electrospayed nanoparticles for drug delivery and pharmaceutical applications. *Biomaterials* 3:3, e24281-12; 2013
- ⁴⁹ Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, G., C Rutledge: Electrospinning: A whipping fluid jet generates submicron polymer fibers, *Applied Physics Letters* 78, 1149 (2001); doi.org/10.1063/1.1345798
- ⁵⁰ MACKY, W. A.. Some Investigations on the Deformation and Breaking of Water Drops in Strong Electric Fields. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* . 1931, 133(822), 565-587. ISSN 09501207.
- ⁵¹ GARG, K. a G. L. BOWLIN. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics*. 2011, 5(1), 013403. DOI: 10.1063/1.3567097. ISSN 1932-1058.
- ⁵² MORAD, M. R., A. RAJABI, M. RAZAVI a S. R. P. SERESHKEH. A Very Stable High Throughput Taylor Cone-jet in Electrohydrodynamics. *Scientific Reports*. 2016, 6(1). DOI: 10.1038/srep38509. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep38509>

- ⁵³ DEITZEL, J.M. et al. Key parameters influencing the onset and maintenance of electrospinning jet. *Polymeric Nanofiners*. ACS symposium Series 918. Oxford University Press (USA), s.56
- ⁵⁴ Archív společnosti ELMARCO v letech 2005-2013, www.elmarco.com
- ⁵⁵ FENG, J.J. Stretching of a straight electrically charged viscoelastic jet. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 2003, 116(1), 55-70. DOI: 10.1016/S0377-0257(03)00173-3. ISSN 03770257.
- ⁵⁶ SHIN, Y. M., M. M. HOHMAN, M. P. BRENNER a G. C. RUTLEDGE. Electrospinning: A whipping fluid jet generates submicron polymer fibers. *Applied Physics Letters*. 2001, 78(8), 1149-1151. ISSN 00036951.
- ⁵⁷ SHIN, Y.M. et al. Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer*. 2001, 42(25), 9955-9967. ISSN 00323861.
- ⁵⁸ WANNATONG, L., A. SIRIVAT a P. SUPAPHOL. Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene. *Polymer International*. 2004, 53(11), 1851-1859. ISSN 09598103.
- ⁵⁹ <https://en.wikipedia.org/wiki/Electrospinning> (dostupné 7.9.2017)
- ⁶⁰ MEGELSKI, S., J. S. STEPHENS, D. B. CHASE a J. F. RABOLT. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules*. 2002, 35(22), 8456-8466. ISSN 00249297.
- ⁶¹ KIRICHENKO, V., A. BUDYKA a Y. FILATOV. "Electrospinning of Micro- and Nanofibers: Fundamentals in Separation and Filtration Processes". *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 2008, 3(1), 36-37. ISSN 15589250.
- ⁶² LINHARTOVÁ, B., Bakalářská práce, FCH-BAK0207/2007, Nanovlákná na bázi hyaluronanu, <http://docplayer.cz/17350071-Nanovlakna-na-bazi-hyaluronanu.html> (dostupné 21.7.2017)
- ⁶³ PETRIK, S.. An overview of recent development in the production technologies of nanofibers for high performance nonwovens, Institut for Nanomaterials, Advanced Technologies and Innovation, Liberec. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/23289.pdf>, (dostupné 21.7.2017)

- ⁶⁴ LUKÁŠ, D., A. SARKAR a P. POKORNÝ. Self-organization of jets in electrospinning from free liquid surface: A generalized approach. *Journal of Applied Physics*. 2008, 103(8), 084309-84315. DOI: 10.1063/1.2907967. ISSN 00218979.
- ⁶⁵ TAN, S-H., R. INAI, M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*. 2005, 46(16), 6128-6134. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.05.068. ISSN 00323861.
- ⁶⁶ SUKIGARA, S., M. GANDHI, J. AYUTSEDE, M. MICKLUS a F. KO. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning—Part 1: processing parameters and geometric properties. *Polymer*. 2003, 44(19), 5721-5727. DOI: 10.1016/S0032-3861(03)00532-9. ISSN 00323861.
- ⁶⁷ JARUSUWANNAPOOM, T., W. HONGROJJANAWIWAT, S. JITJAICHAM, et al. Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. *European Polymer Journal*. 2005, 41(3), 409-421. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2004.10.010. ISSN 00143057.
- ⁶⁸ LU, Ch., P. CHEN, J. LI a Y. ZHANG. Computer simulation of electrospinning. Part I. Effect of solvent in electrospinning. *Polymer*. 2006, 47(3), 915-921. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.11.090. ISSN 00323861.
- ⁶⁹ SIQI H., G. LIU, G. HAN, W. CHENG, Z. FU, Q. WU a Q. WANG. Effect of Experimental Parameters on Morphological, Mechanical and Hydrophobic Properties of Electrospun Polystyrene Fibers. *Materials, Vol 8, Iss 5, Pp 2718-2734 (2015)*. 2015, 8(5), 2718-2734. DOI: 10.3390/ma8052718. ISSN 19961944.
- ⁷⁰ SON, W. K., J. H. YOUK, T. S. LEE a W. H. PARK. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*. 2004, 45(9), 2959-2966. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.03.006. ISSN 00323861.
- ⁷¹ DEITZEL, J.M, J KLEINMEYER, D HARRIS a N.C BECK TAN. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*. 2001, 42(1), 261-272. DOI: 10.1016/S0032-3861(00)00250-0. ISSN 00323861.
- ⁷² LEE, K. H., KIM, H. Y., LA, Y. M., LEE, D. R. and SUNG, N. H. (2002), Influence of a mixing solvent with tetrahydrofuran and N,N-dimethylformamide on electrospun poly(vinyl chloride) nonwoven mats. *Journal of Polymer Science, part B, Polymer Physics*. 2002, 40, 2259–2268. doi:10.1002/polb.1029.

- ⁷³ LIN, T., H.X.WANG, H.M.WANG, X.G.WANG: The charge effect of cationic surfactants on the elimination of fibre beads in the electrospinning of polystyrene. *Nanotechnology* 15(9),1375-1381
- ⁷⁴ JING, Z., X. XIAOYI, Ch. XUESI, L. QIZHI, B. XINCHAO, Y. LIXIN a J. XIABIN. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2003, 92(3), 227-228. DOI: 10.1016/S0168-3659(03)00372-9. ISSN 01683659.
- ⁷⁵ https://cs.wikipedia.org/wiki/Vlhkost_vzduchu (dostupné 21.7.2017)
- ⁷⁶ RAMALINGHAM, R. a S.RAMAKRISNA. *Nanofiber composite materials for biomedical applications*. Cambridge: WoodHead Publishing, 2017. 564 s. ISBN 9780081001738
- ⁷⁷ LI W.J., C.T. LAURENCIN, E.J. CATERSON, R.S. TUAN a F.K. KO. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* . 2002, 60(4), 613-21. ISSN 00219304.
- ⁷⁸ NOVOTNÁ, K., M. ZAJDLOVÁ, T. SUCHÝ et al. Polylactide nanofibers with hydroxyapatite as growth substrates for osteoblast-like cells. *Journal Of Biomedical Materials Research. Part A*. 2014, 102(11), 3918-30. DOI: 10.1002/jbm.a.35061. ISSN 15524965.
- ⁷⁹ BAČÁKOVÁ, M., J. PAJOROVÁ, D. STRÁNSKÁ, D. HADRABA, F.LOPOT, T. RIEDEL, E. BRYNDA, M. ŽALOUDKOVÁ, L. BAČÁKOVÁ. Protein nanocoatings on synthetic polymeric nanofibrous membranes designed as carriers for skin cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 12, 1143-1160. DOI: 10.2147/IJN.S121299. ISSN 11782013.
- ⁸⁰ BAČÁKOVÁ, M., J. MUSILKOVÁ, T. RIEDEL, D. STRÁNSKÁ, E. BRYNDA, M. ŽALOUDKOVÁ a L. BAČÁKOVÁ. The potential applications of fibrin-coated electrospun polylactide nanofibers in skin tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 2016, 11, 771-89. DOI: 10.2147/IJN.S99317. ISSN 11782013.
- ⁸¹ LEE, S.M., L.H. JIN, J.H. KIM, S.O. HAN, H.B. NA, T. HEYON, Y.M. KOO, J. KIM, J.H. LEE. Beta-glucosidase coating on polymer nanofibers for improved cellulosic ethanol production. *Bioprocess And Biosystems Engineering*. 2010, 33(1), 141-7. DOI: 10.1007/s00449-009-0386-x. ISSN 16157605.

- ⁸² HAN, D., S. FILOCAMO, R. KIRBY a A.J. STECKL. Deactivating chemical agents using enzyme-coated nanofibers formed by electrospinning. *ACS Applied Materials* . 2011, 3(12), 4633-9. DOI: 10.1021/am201064b. ISSN 19448252.
- ⁸³ SRBOVÁ, J., M. SLOVÁKOVÁ, Z. KŘÍPALOVÁ, M. ŽÁRSKÁ, M. ŠPAČKOVÁ, D. STRÁNSKÁ a Z. BÍLKOVÁ. Covalent biofunctionalization of chitosan nanofibers with trypsin for high enzyme stability. *Reactive and Functional Polymers* . 2016, 104, 38-44. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.05.009. ISSN 13815148.
- ⁸⁴ DING, F., H. DENG, Y. DU, X. SHI a Q. WANG. Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale* . 2014, 6(16), 9477-93. DOI: 10.1039/c4nr02814g. ISSN 20403372.
- ⁸⁵ KUBINOVÁ, S., E. SYKOVÁ. Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minimally Invasive Therapy* . 2010, 19(3), 144-56. DOI: 10.3109/13645706.2010.481398. ISSN 13652931.
- ⁸⁶ YANG, F., C.Y. XU, M. KOTAKI, S. WANG a S. RAMAKRISHNA. Characterization of neural stem cells on electrospun poly(L-lactic acid) nanofibrous scaffold. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*. 2004, 15(12), 1483-97. ISSN 09205063.
- ⁸⁷ KENAWY, E.-R., G.L. BOWLIN, K. MANSFIELD, J. LAYMAN, D.G. SIMPSON , E.H. SANDERS a G.E. WNEK. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of Controlled Release*. 2002, 81(1-2), 57-64 . ISSN 01683659.
- ⁸⁸ GEERT, V., CH. IKSOO, R. JOEL, P. JEF, D. A. VAN, M. JURGEN, N. MARC a B. MARCUS E. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *Journal of Controlled Release* . 2003, 92(3), 349-350. DOI: 10.1016/S0168-3659(03)00342-0. ISSN 01683659.
- ⁸⁹ ZENG, J., X. XU, X. CHEN, Q. LIANG, X. BIAN, L. YANG , X. JING. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2003, 92(3), 227-31. ISSN 01683659.

- ⁹⁰ VERRECK, G., I. CHUN, J. PEETERS, J. ROSENBLATT, M.E. BREWSTER. Preparation and characterization of nanofibers containing amorphous drug dispersions generated by electrostatic spinning. *Pharmaceutical Research*. 2003, 20(5), 810-7. ISSN 07248741.
- ⁹¹ KENAWY, E.-R., J. M. LAYMAN, J.R. WATKINS, G.L. BOWLIN, J.A. MATTHEWS, D.G. SIMPSON, G.E. WNEK. Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials*. 2003, 24(6), 907-913. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00422-2. ISSN 01429612.
- ⁹² JIANG, H., Y. HU, Y. LI, P. ZHAO, K. ZHU, W. CHEN. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *Journal of Controlled Release*. 2005, 108(2-3), 237-24. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.08.006. ISSN 01683659.
- ⁹³ LI-YA, H., B.W. CHRISTOPHER, S. XIA-XIA, Y. DENG-GUANG, Z. LI-MIN. Time-engineered biphasic drug release by electrospun nanofiber meshes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, 436(1), 88-89. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.058. ISSN 03785173.
- ⁹⁴ VRBATA, P., P. BERKA, D. STRÁNSKÁ, P. DOLEŽAL, M. MUSILOVÁ, L. ČIŽINSKÁ. Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, 457(1), 168-76. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.08.085. ISSN 18733476.
- ⁹⁵ HILLERY, A.M., A.W. LLOYD, J. SWARBRICK. Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists. London: Taylor & Francis, 2001. 496 s. ISBN 0415271975.
- ⁹⁶ VIRALKUMAR, F., P.L. FANG a M.B. BROWN. Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2011, 153(2), 106-107. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.01.027. ISSN 01683659.
- ⁹⁷ OOD, S., S.J. SHIFF, Ch.S. YANG a X. CHEN. Selection of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs for oral cancer chemoprevention. *Oral Oncology*. 2005, 41(6), 562-567. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2005.01.003. ISSN 13688375.

- ⁹⁸ MADHAV, N.V., S.A.K. SHAKYA, P. SHAKYA a K. SINGH. Review: Orotransmucosal drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2009, 140(1), 2-11. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.07.016. ISSN 01683659.
- ⁹⁹ https://www.rootsanalysis.com/reports/view_document/oral-thin-films-market-2015-2025/81.html (dostupné 21.7.2017)
- ¹⁰⁰ KUNTE, S., P. TANDALE. Fast dissolving strips: A novel approach for the delivery of verapamil. *Journal of Pharmacy*. 2010, 2(4), 325-328. DOI: 10.4103/0975-7406.72133. ISSN 09764879.
- ¹⁰¹ TIWARI BHUPENDRA, R., R. RANE BHUSHAN, A. GUJRATHI NAYAN, R. BAKLIWAL SUNIL, R. TIWARI PRANAV a S. P. PAWAR. A short review on "A novel approach in oral fast dissolving drug delivery system". *Pharma Science Monitor*. 2012, 3(4), 3080-3098. ISSN 09769242.
- ¹⁰² MANDEEP, K., A. C. RANA a S. NIMRATA. Fast Dissolving Films: An Innovative Drug Delivery System. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2013, 2(1), 14-24. ISSN 22773657.
- ¹⁰³ SINGH, H., R. SHARMA, M. JOSHI, T. GARG, A.K. GOYAL a G.RATH. Transmucosal delivery of Docetaxel by mucoadhesive polymeric nanofibers. *Artificial Cells, Nanomedicine*. 2015, 43(4), 263-269. DOI: 10.3109/21691401.2014.885442. ISSN 21691401.
- ¹⁰⁴ SHARMA, A., A. GUPTA, G. RATH, A. GOYAL, R. B. MATHUR a S. R. DHAKATE. Electrospun composite nanofiber-based transmucosal patch for anti-diabetic drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013, 1(27), 3410-3418. DOI: 10.1039/c3tb20487a. ISSN 2050750X.
- ¹⁰⁵ GREWAL H, S.R. DHAKATE, A.K. GOYAL, T.S. MARKANDEYWAR, B. MALIK a G. RATH. Development of transmucosal patch using nanofibers. *Artificial Cells, Blood Substitutes, And Immobilization Biotechnology* . 2012, 40(1-2), 146-50. DOI: 10.3109/10731199.2011.637924. ISSN 15324184.
- ¹⁰⁶ STRANSKA, D., A. KLABANOVA, P. DOLEZAL, P. VRBATA, P. BERKA a M. MUSILOVA. Patent č. CZ 303244 B6. 2013. Nosič pro oromukosální, zejména sublingvální aplikaci fyziologicky aktivních látek.

¹⁰⁷Rizatriptan, *MedlinePlus*. U.S. National Library of Medicine, <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a601109.html>. (dostupné 21.7.2017)

¹⁰⁸ TFELT-HANSEN, P. a K. BRØSEN. Pharmacogenomics and migraine: possible implications. *The Journal of Headache and Pain*. 2008, 9(1), 13-18. DOI: 10.1007/s10194-008-0009-y. ISSN 1129-2369. Dostupné 21.7.2017 z: <http://thejournalofheadacheandpain.springeropen.com/articles/10.1007/s10194-008-0009-y>

¹⁰⁹ GOADSBY, P.J. Serotonin 5-HT Receptor Agonists in Migraine: Comparative Pharmacology and Its Therapeutic Implications. *CNS Drugs*. 1998, 10(4), 271-286. ISSN 11727047.

¹¹⁰ REUTER, U., H. ISRAEL, L.NEEB. The pharmacological profile and clinical prospects of the oral 5-HT_{1F} receptor agonist lasmiditan in the acute treatment of migraine. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 2014, 8(1), 46-54. DOI: 10.1177/1756285614562419. ISSN 1756-2856. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756285614562419>

¹¹¹ DUAN, B., C. DONG, X. YUAN a K. YAO. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*. 2004, 15(6), 797-811. ISSN 09205063.

¹¹² SHUKLA, S., E. BRINLEY, H.J. CHO a S. SEAL. Electrospinning of hydroxypropyl cellulose fibers and their application in synthesis of nano and submicron tin oxide fibers. *Polymer*. 2005, 46(26), 12130-12145. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.10.070. ISSN 00323861.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386105015363>.

¹¹³ HPMC (Hydroxypropyl Methylcellulose) Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2017-2022 - Research and Markets. *Business Wire (English)*. 2017.

¹¹⁴ SIEPMANN, J., N.A. PEPPAS. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, 64 Suppl, 163-164. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.028. ISSN 0169409X.

- ¹¹⁵ FRENOT, A., M.W. HENRIKSSON a P. WALKENSTRÖM. Electrospinning of cellulose-based nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007, 103(3), 1473-1482. ISSN 00218995.
- ¹¹⁶ KROSCWITZ, J., I. a H.F. MARK. *Encyclopedia of polymer science and technology*. 3rd Ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2004, s. 3005. ISBN 0471288241.
- ¹¹⁷ ŠVRČINOVÁ, P. *The crosslinking of PEO nanofibres*. TUL, Liberec, 2005. Diplomová práce. (dostupné 7.9.2017)
- ¹¹⁸ DHAWAN, S., M. VARMA a V. R. SINHA. High Molecular Weight Poly(ethylene oxide)-Based Drug Delivery Systems Part I: Hydrogels and Hydrophilic Matrix Systems. *Pharmaceutical Technology*. 2005, 29(5), 72-78. ISSN 15432521.
- ¹¹⁹ <http://www.sukl.cz/leciva/vyr-32-kapitola-1-verze-4>. (dostupné 7.9.2017)
- ¹²⁰ <http://www.sukl.cz/leciva/vyr-32-verze-3>. (dostupné 7.9.2017)
- ¹²¹ STRÁNSKÁ, D., A. KLABANOVÁ, P. DOLEŽAL, P. VRBATA, P. BERKA, M. MUSILOVÁ: US 9789060B2 (2017). Carrier for oromucosal administration of physiologically active substances.
- ¹²² <http://www.sukl.cz/leciva/vyr-32-verze4> (platnost od 1.3.2015). Pokyny pro správnou výrobní praxi.(dostupné 7.9.2017)
- ¹²³ Český lékopis 2009, doplněk 2013. Praha: Grada, 2013, s. 1168
- ¹²⁴ 2.9.6 Obsahová stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. *Český lékopis 2009, doplněk 2013*. Praha: Grada, 2013, s. 350
- ¹²⁵ 2.9.5 Hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem. *Český lékopis 2009, doplněk 2013*. Praha: Grada, 2013, s. 349
- ¹²⁶ http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
- ¹²⁷ VYAS, K.P., R.A. HALPIN, L.A. GEER, J.D. ELLIS, L. LIU, H. CHENG, C. CHAVEZ-ENG, B.K. MATUSZEWSKI, S.L. VARG, A.R. GUIBLIN, J.D. ROGERS. Disposition and pharmacokinetics of the antimigraine drug, rizatriptan, in humans. *Drug Metabolism And Disposition: The Biological Fate Of Chemicals*. 2000, **28**(1), 89-95. ISSN 00909556.

¹²⁸ LEE, Y., J.A. CONROY, M.E. STEPANAVAGE, C. M. MENDEL, G. SOMERS, D. A. MCLOUGHLIN, T. V. OLAH, M. DE SMET, B. KEYMEULEN, J. D. ROGERS. Pharmacokinetics and tolerability of oral rizatriptan in healthy male and female volunteers. *British Journal Of Clinical Pharmacology*. 1999, **47**(4), 373-8. ISSN 03065251.

¹²⁹ 2585 Rizatriptan benzoate. *European Pharmacopoeia 8.0*. Strasbourg: Council of Europe, 2013, s. 3179

¹³⁰Rizatriptan. Micromedex. www.micromedexsolutions.com.ezproxy.is.cuni.cz (dostupné 21.3.2018)

8 SEZNAM PRACÍ

Publikace:

STRÁNSKÁ, D., P.BERKA, P.DOLEŽAL. Validace výroby jednodávkových medikovaných nanovlákných přípravků produkovaných elektrosponingem. *Chemické listy*, 2018, přijato do tisku

VRBATA, P., P. BERKA, **D. STRÁNSKÁ**, P. DOLEŽAL, M. LÁZNÍČEK. Electrospinning of diosmin from aqueous solutions for improved dissolution and oral absorption. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014, **473**(1-2), 407-13. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.07.017. ISSN 18733476.

VRBATA, P., P. BERKA, **D. STRÁNSKÁ**, P. DOLEŽAL, M. MUSILOVÁ a L. ČIŽINSKÁ. Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. *International Journal of Pharmaceutics* 2013, **457**(1), 168-76 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.08.085. ISSN 18733476.

KVÍČALA, J., O. BASZCZYŃSKI, A. KRUPKOVÁ, **D. STRÁNSKÁ**. Hydroboration of 1,1'-Bi(cyklopent-1-ene) and 3,3'-Bindene: experimental and theoretical study. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 2006, **71**(11), 1611-1626 DOI: 10.1135/cccc20061611. ISSN 00100765.

ŠIRC, J., S. KUBINOVÁ, R. HOBZOVÁ, D. STRÁNSKÁ, P. KOZLÍK, Z. BOSÁKOVÁ, D. MAŘEKOVÁ, V. HOLÁŇ, E. SYKOVÁ, J. MICHÁLEK. Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **2012**, 5315-5325, jména až do počtu 10 deseti uvést všechna ISSN 11769114.

NOVOTNÁ, K., M. ZAJDLOVÁ, T. SUCHÝ, et al. Polylactide nanofibers with hydroxyapatite as growth substrates for osteoblast-like cells. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2014, **102**(11), 3918-30. DOI: 10.1002/jbm.a.35061. ISSN 15524965.

BAČÁKOVÁ, L., I. KOPOVÁ, L. STAŇKOVÁ, J. LIŠKOVÁ, J. VACÍK, V. LAVRENTIEV, A. KROMKA, Š. POTOCKÝ, **D. STRÁNSKÁ**. Bone cells in cultures on nanocarbon-based materials for potential bone tissue engineering: A review (Phys.

Status Solidi A 12/2014). *Physica Status Solidi. A: Applications* . 2014, **211**(12), n/a.
DOI: 10.1002/pssa.201470276. ISSN 18626300.

BAČÁKOVÁ, M., J. MUSILKOVÁ, T. RIEDEL, **D. STRÁNSKÁ**, E. BRYNDA, M. ŽALOUDKOVÁ, L. BAČÁKOVÁ. The potential applications of fibrin-coated electrospun polylactide nanofibers in skin tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 2016, **11**, 771-89]. DOI: 10.2147/IJN.S99317. ISSN 11782013.

BAČÁKOVÁ, M., J. PAJOROVÁ, **D. STRÁNSKÁ**, D. HADRABA, F.LOPOT, T. RIEDEL, E. BRYNDA, M. ŽALOUDKOVÁ, L. BAČÁKOVÁ. Protein nanocoatings on synthetic polymeric nanofibrous membranes designed as carriers for skin cells. *International Journal of Nanomedicine* . 2017, **12**, 1143-1160 [cit. 2017-07-21]. DOI: 10.2147/IJN.S121299. ISSN 11782013.

SRBOVÁ, J., M. SLOVÁKOVÁ, Z. KŘÍPALOVÁ, M. ŽÁRSKÁ, M. ŠPAČKOVÁ, **D. STRÁNSKÁ** a Z. BÍLKOVÁ. Covalent biofunctionalization of chitosan nanofibers with trypsin for high enzyme stability. *Reactive and Functional Polymers*. 2016, **104**, 38-44 DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.05.009. ISSN 13815148.

Patenty

STRANSKA, D., A. KLABANOVÁ, P. DOLEŽAL, P.VRBATA, P.BERKA, M. MUSILOVÁ. Patent č. CZ 303244, 2013. Nosič pro oromukosální, zejména sublingvální aplikaci fyziologicky aktivních látek.

STRANSKA, D., A. KLABANOVÁ, P. DOLEŽAL, P. VRBATA, P. BERKA, M. MUSILOVÁ. US 9,789,060 B2. 2017. Carrier for oromucosal administration of physiologically active substances.

