

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutickej technológie



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**LYOFILIZÁCIA POLYMÉRNÝCH
NANOMATERIÁLOV**

Hradec Králové 2021

Ingrid Švehlíková

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktorú som písala samostatne a pod odborným vedením svojho školiteľa. Použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové

.....

Ingrid Švehlíková

Ďakujem PharmDr. Ondřejovi Holasovi, Ph.D. za odborné vedenie, trpezlivosť, ochotu a poskytovanie cenných rád pri spracovávaní mojej diplomovej práce. Veľké poďakovanie patrí aj Mgr. Barbore Boltnarovej za pomoc a pripomienky pri realizácii experimentálnej časti.

1. OBSAH

2.	ABSTRAKT	6
3.	ABSTRACT	7
4.	ÚVOD A CIEĽ PRÁCE	8
5.	TEORETICKÁ ČASŤ	9
5.1	Lyofilizačný proces	9
5.1.1	Zmrazenie	11
5.1.2	Primárne sušenie	12
5.1.3	Sekundárne sušenie.....	12
5.2	Charakteristika produktu lyofilizácie.....	13
5.3	Typy lyofilizátorov	15
5.4	Lyofilizácia nanočastíc	17
5.4.1	Pomocné látky používané pri lyofilizácii nanočastíc	17
5.5	Operačné postupy využívané pri príprave nanočastíc	20
5.5.1	Nanoprecipitácia.....	20
5.5.2	Centrifugácia.....	20
5.5.3	Metóda dynamického rozptylu svetla	20
6.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
6.1	Použité suroviny	22
6.2	Použité prístroje	22
6.3	Použité metódy	23
6.3.1	Príprava nanočastíc	23
6.3.2	Centrifugácia.....	24
6.3.3	Lyofilizácia.....	24
6.3.4	Charakterizácia nanočastíc na Zetasizeri.....	25
6.3.5	Metodika stanovenia stability nanočastíc	25
6.3.6	Disolúcia.....	26
7.	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	28
7.1	Lyofilizačný experiment	28
7.1.1	Lyofilizačný experiment – surfaktant 0,1% Cholát sodný	28
7.1.2	Lyofilizačný experiment – surfaktant 0,1% Pluronic	37
7.1.3	Zhrnutie lyofilizačného experimentu	44

7.2 Stabilita nanočastíc	45
7.2.1 Stabilita nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného	45
7.2.2 Stabilita nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Pluronicu..	48
7.2.3 Zhrnutie stabilného experimentu	50
7.3 Disolučný experiment	51
8. ZÁVER.....	53
9. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	54
10. ZOZNAM GRAFOV	55
11. ZOZNAM TABULIEK	57
12. ZOZNAM OBRÁZKOV.....	58
13. POUŽITÁ LITERATÚRA	59

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Prahe, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej technológie

Školiteľ: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Poslucháč: Ingrid Švehlíková

Názov diplomovej práce: Lyofilizácia polymérnych nanomateriálov

Lyofilizácia je široko využívaná metóda sušenia s rozsiahlymi možnosťami aplikácie pri príprave liekov. Jej význam vo farmácii rastie, pretože patrí k dôležitým metódam stabilizácie aktívnych látok, hlavne proteínov. Detailné porozumenie vlastností liečiva a fyzikálno – chemických javov jednotlivých fáz lyofilizácie je základný predpoklad pre vyhotovenie bezpečného, účinného a stabilného lieku. Biomedicínske nanočastice ako nosiče liečiv patria k liekovým formám, u ktorých je lyofilizácia takisto využívaná.

Vykonaná bola séria lyofilizačných experimentov s použitím trehalózy, manitolu, dextransu a xylitolu ako kryo a lyoprotektantu. Posudzovanými parametrami boli veľkosť častíc, PDI, vzhľad a rekonštitúcia lyofilizátu. Hodnotili sa vlastnosti nanočastíc pripravených nanoprecipitáciou z polyméru PLGA. Ďalej boli realizované experimenty s cieľom overiť metódu hlbokého zmrazenia ako alternatívnu metódu k lyofilizácii pre dlhodobé skladovanie nanočastíc. Nanočastice boli uchovávané v 5% roztokoch trehalózy, manitolu, dextransu a xylitolu, pri teplote - 70°C. Stabilita bola hodnotená na základe zmien vo veľkosti nanočastíc a PDI po dobu 4 mesiacov. Diplomová práca zahŕňa disolučné testy, v ktorých bol použitý kurkumín ako modelové liečivo. Vyhodnocovaný bol vplyv lyofilizácie a zmrazenia nanočastíc na percento uvoľneného kurkumínu.

Dopracovali sme sa k výsledkom, že najvhodnejší excipient z hľadiska vhodnosti pre lyofilizáciu, uvoľnenie účinnej látky z nanočastíc a k udržaniu stability pri hlbokom zmrazení je trehalóza. Najviac sa osvedčilo použitie 5% roztoku.

Kľúčové slová: PLGA, nanočastice, lyofilizácia, stabilita, dialýza

3. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Student: Ingrid Švehlíková

Title of thesis: Lyophilization of polymeric nanoparticles

Lyophilization is a widely used drying method with extensive application possibilities in the drug preparation. Its importance in pharmacy is growing because it is one of the important methods of stabilizing active substances, especially proteins. A detailed understanding of the properties of the drug and the physicochemical phenomena of the individual phases of lyophilization is a basic prerequisite for the preparation of a safe, effective and stable drug. Biomedical nanoparticles as drug carriers are the type of the dosage forms in which lyophilization is also used.

A series of lyophilization experiments were performed using trehalose, mannitol, dextran and xylitol as cryo and lyoprotectant. The parameters assessed were particle size, PDI, appearance and lyophilisate reconstitution. The properties of nanoparticles prepared by nanoprecipitation from PLGA polymer were evaluated. Furthermore, experiments were performed to validate the deep-freezing method as an alternative method to lyophilization for long-term storage of nanoparticles. The nanoparticles were stored in 5% solutions of trehalose, mannitol, dextran and xylitol at -70°C . Stability was assessed based on changes in nanoparticle size and PDI over 4 months. The diploma thesis includes dissolution tests in which curcumin was used as a model drug. The effect of lyophilization and freezing of nanoparticles on the percentage of released curcumin was evaluated.

We have come to the conclusion that the most suitable excipient in terms of suitability for lyophilization, release of the active substance from nanoparticles and for maintaining stability during deep freezing is trehalose. The use of a 5% solution proved to be the most effective.

Keywords: PLGA, nanoparticles, lyophilization, stability, dialysis

4. ÚVOD A CIEĽ PRÁCE

Nanočastice, a na nich založené liekové formy, sú dynamicky sa rozvíjajúcim nástrojom pre ciele distribúciu liečiv. Pre prípravu nanočastíc sa veľmi často využívajú biodegradovateľné polyestery ako napr. PLGA. Tieto materiály však vo vodnom prostredí bobtnajú, erodujú a inkorporované liečivo z nich uniká. Aby bola zaručená stabilita týchto liekových foriem a zabránilo sa vyššie zmieneným nežiadúcim javom, ponúka sa lyofilizácia ako optimálne riešenie. Väčšina publikovaných prác sa však obmedzuje len na konštatovanie, že častice boli lyofilizované bez toho, aby boli poskytnuté čitateľovi ďalšie detaily. Práce, kde tieto informácie poskytnuté sú, využívajú pre svoje experimenty komorové lyofilizátory s temperovanými policami a celý lyofilizačný cyklus trvá, je časovo i energeticky náročný.

Účelom práce bolo navrhnuť robustný protokol a takú kombináciu pomocných látok pre lyofilizáciu nanočastíc, aby boli častice použiteľné pre ďalšie experimenty. V experimentoch bol použitý relatívne jednoduchý lyofilizátor bez temperovaných polic, s cieľom maximálne zjednodušiť nároky na prípravu. Porovnával sa vplyv koncentrácie štyroch štruktúrotrvorných látok – manitolu, trehalózy, dextransu, xylitolu a ich kombináciu na vzhľad finálneho koláča. Posudzovanými parametrami boli taktiež veľkosť častíc, PDI a rekonštitúcia lyofilizátu.

Ďalšou náplňou práce bola stabilitná skúška.

5. TEORETICKÁ ČASŤ

5.1 Lyofilizačný proces

Lyofilizácia, taktiež sušenie mrazom, je proces odstránenia vody zo vzorky využívaný najmä na stabilizáciu liečivých prípravkov, ktoré podliehajú nestabilite vo vodnom prostredí.^{1, 2} Svoje uplatnenie dlhodobo nachádza i v potravinárskom priemysle. Lyofilizácia naberá na význame kvôli nárastu používania terapeutických biologických liekov na báze rekombinantných proteínov. Globálne sú práve proteíny náchylné na degradáciu a stratu aktivity pre ich zložitú štruktúru.² Pri príprave moderných liekov sa použité lyofilizácie neobmedzuje len na terapeutické proteíny či peptidy. Lyofilizácia sa využíva pri príprave a stabilizácii vakcín, inhalačných práškov, pri stabilizácii mikro a nanočasticových systémov a rôznych farmaceutických prípravkov, ktoré pozostávajú z vírov či hormónov.^{3, 2} Vo farmaceutickej technológii našiel tento postup uplatnenie i pri príprave orodispergovateľných tabliet, napr. s obsahom antibiotík, nesteroidných antiflogistík, antihypertenzív, antimigreník, antihistaminím, antipsychotík i antidepresív.^{2, 4} Týmto technologickým postupom súčasne uľahčíme manipuláciu s výsledným produktom, umožníme nastavenie jednoduchších skladovacích podmienok a predĺžime použiteľnosť takto upravených materiálov.¹

Lyofilizačný cyklus môžeme rozdeliť do troch hlavných krokov:

- zmrazenie,
- primárne sušenie,
- sekundárne sušenie.³

Úvodná fáza je zmrazenie, pri ktorej sa kvapalná matrica zmrazí do pevnej fázy, aby sa mohli realizovať nasledujúce kroky lyofilizácie. V priebehu primárneho sušenia dochádza k odstráneniu vody sublimáciou ľadu v prostredí vákua. Po ukončení primárneho sušenia plynule nadväzuje sekundárne sušenie, kedy je odstraňovaná zbytková voda.^{1, 3, 5}

Tento proces je relatívne časovo náročný a ekonomicky nákladný.^{3, 6} Hoci je účelom lyofilizácie zlepšiť stabilitu, niektoré formulácie môžu byť nestabilné behom

nasledujúcich udalostí - výskyt chladného šoku v priebehu ochladzovania, formovania kryokoncentrovanej fázy pri tvorbe ľadu. V prípade proteínových materiálov môže vysoká teplota dosky behom sekundárneho sušenia viesť k denaturácii bielkovín.¹ Preto pre dosiahnutie efektívnej lyofilizácie je potrebné dôkladne poznať tepelno-fyzikálne vlastnosti materiálu. Tieto charakteristiky sú nevyhnutné pre zachovanie biologickej aktivity, funkcie a štruktúry látok.^{1, 5} I keď je lyofilizácia robustnou technikou, dokonca aj triviálne zmeny v procese, ako je zmena typu vialiek alebo zásobníkov, môžu zmeniť tento postup v neprijateľný a neefektívny. Správne nastavené podmienky lyofilizácie zabezpečujú získanie výsledného koláča s dobrou vizuálnou stránkou, s požadovanou rýchlosťou rekonštitúcie a s nízkym obsahom zvyškovej vlhkosti. Pokiaľ by požadované podmienky neboli nastavené korektne, môže dôjsť vplyvom namáhania k poškodeniu, až kolapsu lyofilizátu a tým k znehodnoteniu výsledného produktu.¹

Pre vykonanie optimálneho cyklu lyofilizácie je zásadné zhodnotiť kritické parametre formulácie. Medzi tieto vlastnosti patrí teplota sklovitého prechodu (T_g), eutektická teplota (T_{eu}) a teplota kolapsu (T_c).¹

Termínom T_g sa označuje tepelný prechod, pri ktorom sa pevný, neohybný a sklovitý systém mení na viskóznou tekutinu. Jedná sa o tepelne vratný prechod. Pod T_g je materiál považovaný za kineticky zmrznutý a molekulárne pohyby sú veľmi obmedzené. Pri teplotách nad T_g látky nadobúdajú kaučukový charakter, sú pružné a elastické.⁵

V prípade, že rozpustená látka v priebehu mrazenia roztoku kryštalizuje, pri T_{eu} dochádza k vzniku rovnovážneho stavu medzi pevným skupenstvom vody, vykryštalizovanou látkou a jej roztokom. Pod T_{eu} už nie je prítomná žiadna kvapalina a dochádza ku kompletnému stuhnutiu všetkých zložiek systému.²

T_c je na druhej strane teplota, pri ktorej prekročení dochádza k makroskopickej zmene štruktúry a zrúteniu lyofilizátu.^{1, 2} U amorfných liečiv je obyčajne o niekoľko stupňov vyššia, než T_g .⁵ V prípade kryštalizujúcich látok sa rovná T_{eu} .² Kolaps usušenej štruktúry môžeme vizuálne určiť rozpoznaním morfológických zmien na sublimačnom čele vzorky prostredníctvom špeciálneho mikroskopu. Presiahnutie T_c nepredstavuje riziká len pred vzhľad koláča, ale aj pre ďalšie atribúty kvality

produktu.⁵ Nedostatočná porozita lyofilizátu môže spôsobiť predĺženie doby rekonštitúcie.¹ Strata porozity vedie i k spomaleniu sekundárneho sušenia a môže taktiež negatívne vplyvať na stabilitu proteínov pri ich skladovaní. A to v dôsledku vyššieho percenta zostatkovej vlhkosti, než je žiadúce. Spomalenie sublimácie a primárneho sušenia je taktiež dôsledok zmien viskózneho toku, zvýšenia hustoty, prípadne vzniku dier v štruktúre koláča.⁵

5.1.1 Zmrazenie

V procese lyofilizácie je zmrazovanie formulácie jedným z kritických krokov. Vzniknutá mikroštruktúra definuje kvalitu a vlastnosti výsledného produktu. Aj veľkosť a tvar kryštálov majú vplyv na rýchlosť či efektivitu primárneho a sekundárneho sušenia.^{2, 7}

Čistá voda sa postupne premieňa v kryštály ľadu. Čím dlhšie proces zmrazenia prebieha, tým zamrzá čoraz väčšie množstvo vody.³ Rozpustené látky sa koncentrujú v priestoroch medzi vzniknutými kryštálmi ľadu.² Kvapalná fáza sa následne stáva viac koncentrovaná a jej viskozita sa zvyšuje obmedzením ďalšej kryštalizácie. Takto vysoko koncentrovaná a viskózna kvapalina sa formuje v amorfnú, kryštalickú alebo spojenú amorfnú-kryštalickú fázu.³ Pre úspešný priebeh lyofilizácie je nevyhnutné zmraziť formuláciu v závislosti od jej charakteru pod T_{eu} alebo T_g . Po ukončení prvej fázy lyofilizačného cyklu a dosiahnutí požadovanej teploty je nevyhnutné, aby rozpúšťadlo i rozpustené látky (liečivo a excipienty) boli úplne zmrazené. Prevažná časť vody je vo forme ľadu separovaná od rozpustených látok, ktoré vykryštalizovali alebo vytvorili amorfné sklo.² Veľkosť a tvar kryštálov ľadu ovplyvňuje rýchlosť zmrazovania. Rýchle zmrazenie vedie k vzniku veľkého množstva malých ľadových kryštálov. Dôsledkom je vznik veľkého odporu pre tok vodných pár počas sublimácie a tým dôjde k spomaleniu primárneho sušenia.⁸ Na druhej strane väčšia povrchová plocha zvyšuje rýchlosť, efektivitu sekundárneho sušenia a umožňuje rýchlu rekonštitúciu pred použitím.²

5.1.2 Primárne sušenie

Fáza primárneho sušenia zahŕňa sublimáciu zamrznutého ľadu.³ Zvyčajne sa jedná o najdlhšiu fázu lyofilizačného procesu, ktorá častokrát trvá niekoľko dní, v závislosti na veľkosti vzorky. Preto optimalizácia, prípadne skrátenie dĺžky primárneho sušenia majú nesmierny ekonomický dopad na cenu finálneho produktu.²

K dosiahnutiu tohto cieľa je nevyhnutné, aby bol správne nastavený tlak a teplota, pri ktorých nastáva premena vody z tuhého skupenstva na plynné (sublimácia).^{1,2} Gradientom procesu je rozdiel tlaku vodných pár medzi sublimačným rozhraním a kondenzátorom. Nižší tlak, než je tlak pár nad ľadom pri danej teplote dosiahneme prostredníctvom vákuovej pumpy.² Tlak v lyofilizačnej komore môže ovplyvniť priamo i nepriamo rýchlosť sublimácie. Konzekvencia príliš vysokého tlaku je zníženie intenzity sublimácie zmenšením tlakového gradientu medzi sublimačným rozhraním a komorou.⁹ Pokiaľ by tlak v komore bol vyšší, než tlak pár nad ľadom pri určitej teplote produktu, k sublimácii by vôbec nedošlo. Naopak priveľmi nízky tlak negatívne ovplyvňuje prestup tepla do formulácie.² Optimálny tlak sa prevažne pohybuje v rozpätí 0,067-0,267 mBarr.⁹ Súčasne je pre vznik sublimácie potrebné dodávať energiu do produktu, a to pomocou regulácie teploty dosiek lyofilizátora. Sublimácia vodných pár začína u hladiny zamrznutého roztoku, kde sa postupne tvorí vrstva vysušeného produktu. Vzniknutá vodná para sa zachytáva na kondenzátore. Pojem sublimačné rozhranie označuje tú časť formulácie, kde sa stretáva už vysušená časť produktu so stále zamrznutou.²

K poslednému kroku lyofilizácie môžeme prejsť, až keď bude zamrznutá voda úplne odstránená. Pri neukončenej sublimácii by mohla relatívne vysoká teplota v priebehu sekundárneho sušenia spôsobiť kolaps štruktúry, prípadne roztopenie lyofilizovaného roztoku. Základným indikátorom ukončenia primárneho sušenia je vyrovnanie teploty dosiek s teplotou produktu.²

5.1.3 Sekundárne sušenie

V priebehu sekundárneho sušenia dochádza k eliminácii viazanej vody desorpciou, ktorá v priebehu primárneho sušenia nesublimovala.^{1, 2} Lyofilizát spravidla obsahuje ešte 5-20% zostatkovej vlhkosti. Cieľom posledného kroku

lyofilizácie je zníženie tejto vlhkosti na percento, ktoré zabezpečí dostatočnú stabilitu liečiva a formulácie.²

Rýchlosť desorpcie je pomerne pomalá, a preto pre jej efektívny priebeh je potrebná zvýšená teplota.^{1, 2} Produkt je takto vystavený teplotnému stresu, čo treba mať na pamäti hlavne pri sušení termolabilných liečiv. Celkový čas sekundárneho sušenia závisí od požadovanej zostatkovej vlhkosti v lyofilizáte.² Optimálna vlhkosť u farmaceutických výrobkov by sa mala pohybovať okolo 1%.¹

5.2 Charakteristika produktu lyofilizácie

Je veľmi dôležité charakterizovať parametre finálneho produktu lyofilizácie. Tieto charakteristiky nám pomáhajú overiť správnosť nastavenia podmienok lyofilizačného cyklu a optimalizovania formulácie. Medzi najdôležitejšie atribúty kvality patria makroskopické vlastnosti finálneho koláča, rekonštitučný čas, zbytková vlhkosť a čírosť rekonštituovaného roztoku.^{1, 3}

Vizuálna stránka finálneho koláča môže alebo i nemusí byť rozhodujúca z hľadiska kvality a bezpečnosti produktu.¹⁰ V ideálnom prípade by mal mať výsledný produkt po lyofilizácii totožný objem ako pôvodná zamrznutá hmota.^{1, 3, 10} Taktiež by mal mať pravidelnú, celistvú štruktúru a jednotnú farbu.^{1, 10}

Rekonštitučný čas udáva dobu, za ktorú sa produkt lyofilizácie rehydratuje. Všeobecne sa výsledný lyofilizát rehydratuje bezprostredne po pridaní rovnakého objemu vody, ktorý bol odstránený pri lyofilizácii. V niektorých prípadoch to však neplatí. Čas rekonštitúcie môžeme ovplyvniť trepaním, vírením alebo dokonca i ultrazvukom. Týmito spôsobmi zaistíme rýchlejšie a úplné resuspendovanie.^{1, 3}

Neadekvátne nastavené lyofilizačné podmienky, prípadne nesprávne zvolené pomocné látky sa môžu odzrkadliť znehodnotením výsledného koláča. Najčastejšie sa jedná o neideálny vzhľad koláča – nejednotnosť a nepravidelnosť. Tieto poškodenia môžeme klasifikovať na závažné, ktoré majú vplyv na bezpečnosť pacienta a účinnosť produktu, a na menej významné, ktoré sú prijateľné a neovplyvňujú na bezpečnosť a účinnosť.¹⁰

Najčastejším poškodením je kolaps lyofilizátu, pri ktorom dochádza k narušeniu mikroštruktúry. K jeho vzniku dochádza počas primárneho alebo

sekundárneho sušenia, ak teplota produktu prekročí teplotu skleneného prechodu. Okrem straty elegancie môže mať zrútenie koláča za následok zníženie špecifického povrchu (SSA) výsledného produktu. Pokles SSA sa môže prejaviť zvýšením vlhkosti v produkte a predĺžením času rekonštitúcie.¹⁰ Kolaps lyofilizačného koláča výrazne nevlplyva na kvalitu, ale môže dôjsť k predĺženiu rekonštitučného času a spomínaná zvýšená reziduálna vlhkosť má negatívny vplyv na stabilitu produktu.^{1, 3, 10, 11}

Ďalším typom znehodnotenia produktu je tzv. meltback. Jedná sa o určitú formu kolapsu, pri ktorej dochádza k roztaveniu matrice v priebehu lyofilizácie. Sušenie sa realizuje skôr z kvapalnej formy ako sublimáciou. Produkt, u ktorého nastane meltback, nie je akceptovateľný a je výsledkom nevhodne nastaveného lyofilizačného cyklu.¹⁰

Ako už bolo uvedené, lyofilizát by mal mať v ideálnom prípade konzistentnú štruktúru, ale nie vždy to tak je. Textúra koláča je zvyčajne na dne a na povrchu veľmi jemno zrnitá, ale v strede má hrubý zrnitý vzhľad. Príčinou veľmi hrubej štruktúry pórov v stredovej časti je samotný priebeh zmrazenia. K zmrazeniu dochádza najskôr na dne vialky, potom sa vytvorený ľad zdvihne k hornej časti a nasleduje ďalšie zmrazenie na dne. Zmena textúry obvykle vedie k poklesu SSA, ale bez známeho nepriaznivého vplyvu na kvalitu produktu.¹⁰

Lyofilizačný koláč niekedy migruje smerom k vrchnej časti vialky počas sušenia mrazom, vtedy hovoríme o tzv. zdvihnutí koláča. Lyofilizát je ihneď po sušení mrazom neporušený. Proces zdvíhania nastáva v priebehu primárneho sušenia, kedy sa koláč mierne oddeľuje od steny vialky a dôjde k vytvoreniu cesty pre prienik vodnej pary, ktorá následne vytláča koláč zo spodnej časti. Pokiaľ koláč zostane aj počas normálnej manipulácie nadvihnutý blízko pri zátku vialky, považuje sa za neakceptovateľný, pretože predstavuje výzvu z hľadiska rekonštitúcie produktu.¹⁰

Nielen migrácia lyofilizátu nie je prijateľná, ale taktiež aj šikmý, naklonený koláč nepredstavuje prípustný vzhľad finálneho produktu. Vzniká, ak sa vialka neuloží správne, celou plochou na rovnú dosku lyofilizátora. Následkom toho môže dôjsť k vzostupu zvyškovej vlhkosti a ovplyvneniu stability a aktivity produktu.¹⁰

Medzi problematiku javy z hľadiska vizuálnej stránky finálneho produktu môžeme zaradiť aj popraskanie lyofilizátu, prípadne úbytok objemu a penovitú

štruktúru lyofilizačného koláča.¹⁰ Všetky tieto poškodenia sú prijateľné a nemajú vplyv na kvalitu produktu.^{10,11}

Prítomnosť bubliniek v lyofilizovanom koláči predstavuje ďalší typ nevhodnej vizuálnej stránky lyofilizátu. Počas prípravy materiálu na lyofilizáciu je roztok nasýtený vzduchom a v priebehu zmrazenia dochádza k vzniku vzduchových bublín v zmrznutom koncentráte. Vplyvom kolapsu, alebo teploty topenia eutektickej zmesi dochádza k rozšíreniu vzduchových bublín, ktoré následne vystúpia na povrch. Pokiaľ sú bubliny dostatočne stabilné a vydržia celý lyofilizačný cyklus, budú prítomné i v konečnom produkte. Takýto produkt sa považuje za neakceptovateľný.¹⁰

Problémom je aj prítomnosť kvapôčok a produktu na vnútorných stenách liekovky. Príčinou vzniku týchto škvŕn môže byť chybný proces plnenia. Taktiež ďalšou možnosťou by mohlo byť miešanie vialky po naplnení alebo pred mrazením. Lyofilizovaný produkt na stenách vialky môže, alebo nemusí vplývať na kvalitu produktu. Záleží na stabilite a vlastnostiach použitej účinnej látky. Pokiaľ je zdroj kvapôčok neznámy, vialky by mali byť odmietnuté.¹⁰

5.3 Typy lyofilizátorov

Pre zrealizovanie lyofilizácie je nevyhnutný lyofilizátor. Medzi hlavné komponenty lyofilizačného zariadenia patrí sušiaci komora, kondenzátor, chladiaci, vákuový a riadiaci systém. Komory môžu mať vzhľad rozdeľovača s pripojenými bankami, alebo sa môže jednať o väčšiu komoru so systémom políc, na ktoré sa dá výrobok umiestniť a vytemperovať na požadovanú teplotu. Účelom kondenzátora je zachytiť pary, ktoré sa z produktu sublimujú. Kondenzátor sa udržuje na nižšej teplote vzhľadom na ľad produktu, dochádza ku kondenzácii pár a v kondenzátore sa opäť menia na pevnú formu. Sublimovaný ľad sa hromadí v kondenzátore a na konci cyklu sa manuálne odstráni. Chladiaci systém chladí kondenzátor a musí byť schopný udržiavať teplotu podstatne nižšiu pod teplotu produktu. Vákuový systém pozostáva z čerpadla pripojeného k vzduchotesnému kondenzátoru a pripojenej komore produktu. Za úlohu má udržiavať vákuum v priebehu celého lyofilizačného cyklu. Riadiace systémy sa môžu líšiť a obvykle zahrňujú schopnosť snímať teplotu a tlak. Tie pokročilé umožňujú programovanie kompletného „receptu“ lyofilizácie a možnosť monitorovania procesu.^{12, 13}

Výber lyofilizátora závisí od charakteristík produktu. Nutné je zobrať do úvahy typ a tvar sušeného produktu, a taktiež jeho finálne použitie. Medzi ďalšie faktory ovplyvňujúce voľbu lyofilizátora je prispôsobenie sa množstvu, ktoré sa má usušiť v každej šarži a celkový objem ľadu, ktorý sa má skondenzovať.¹²

Rozlišujeme 4 hlavné kategórie lyofilizátorov:

- laboratórne,
- pilotné,
- produkčné,
- potravinárske.^{12, 14}

Laboratórne lyofilizátory sú určené v prvom rade pre jednoduché sušenie produktu do 1-2kg. Ich použitie nie je príliš vhodné na výrobu, pretože nespĺňujú požiadavky napr. na zaznamenanie výroby šarže alebo možnosti validácie. Ich uplatnenie je predovšetkým v laboratóriu pri spracovávaní menších vzoriek.¹⁴

Ak je potrebné myslieť na optimalizáciu procesu lyofilizácie pred uvedením produktu do výroby, je vhodné použiť pilotný lyofilizátor. Jedná sa o väčšie zariadenie, ktoré je ale adekvátne pre menšiu výrobu.¹⁴

Produkčné lyofilizátory sú určené výhradne na výrobu a navrhované na zákazku podľa požiadaviek zákazníka.¹⁴ Uspôsobené sú na opakované spracovávanie veľkého množstva vzoriek (viac ako 100 kg roztokov, suspenzií). Keďže sú to systémy stavané na mieru užívateľa, je možné lyofilizovať z vialiek, ale aj iných nádob. Jedná sa o stavebnicový systém, kedy je myslené aj na prípadné následné zmeny. Samozrejmosťou je aj súlad so štandardami farmaceutických a potravinárskych výrob, teda i prácou v sterilnom prostredí a umožnenie vykonávania pravidelnej sterilizácie vlastného zariadenia.¹⁵

Prístroje určené pre ne-vedecké účely, prípadne jednoduché vedecké lyofilizácie sa označujú ako potravinárske lyofilizátory. Neponúkajú možnosť validácie, optimalizácie procesu, záznamové programy, ale ich výhodou je obrovská kapacita za zlomok ceny. Využívajú sa napr. pri lyofilizácii potravín, kvetín, kávy, archeologických nálezov, kníh, ktoré boli postihnuté povodňami.¹⁴

5.4 Lyofilizácia nanočastíc

Lyofilizácia nanočastíc je zložitý proces, ktorý si vyžaduje dôsledné preskúmanie formulácie a podmienok procesu. Mnoho parametrov môže ovplyvniť, prípadne rozhodnúť o úspechu lyofilizácie, napríklad typ polyméru, typ a koncentrácia povrchovo aktívnej látky, kryo a lyoprotektantu.³

Proces lyofilizácie je zásadný pre zlepšenie dlhodobej stability nanočastíc.¹ Veľký ohlas má využitie nanočastíc v oblasti cielej distribúcie liečiv. Tieto systémy môžeme všeobecne použiť k dosiahnutiu cielej buncenej i tkanivovej distribúci liečiva, k zlepšeniu biologickej dostupnosti liečiva po orálnej aplikácii, k udržaniu účinku liečiva v cieľovom tkanive a taktiež u menej stabilných liečiv, ktoré je vhodné solubilizovať tesne pred intravaskulárnym podaním.^{3,6}

K príprave nanočastíc sa využívajú polyméry, ktoré môžu byť biologicky odbúrateľné, ako napr. kyselina polymiečna (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a ich kopolymer (PLGA), alebo nebiodegradovateľné polyméry, ako sú napr. polyakryláty, polystyrény. Najviac využívané v oblasti cielej distribúcie sú polyestery, kvôli dobrej biokompatibilite a biologickej rozložiteľnosti. Hlavná nevýhoda, ktorá obmedzuje použitie je ich fyzikálna nestabilita. Môže dôjsť k agregácii, fúzii nanočastíc, erózii a napúčaniam. Medzi ďalšie obmedzenia, ktoré treba zohľadniť je prípadná hydrolyza polymérnych materiálov, únik liečiva z nanočastíc a chemická reaktivita liečiva v priebehu skladovania. Kvôli problémom so stabilitou, s ktorou sa stretávame v kvapalnej forme, sú nanočastice prevažne skladované v dehydratovanom stave. Technika lyofilizácie sa ukazuje ako jedna z najvhodnejších metód, ktorá zabezpečí podmienky pre dosiahnutie dlhodobej stability produktu.^{3, 6, 16,}
17

5.4.1 Pomocné látky používané pri lyofilizácii nanočastíc

Lyofilizačné podmienky - zmrazenie a vysušenie, ktorými je formulácia vystavená v priebehu lyofilizačného cyklu, môžu vytvoriť stres, ktorý má škodlivý vplyv na stabilitu nanočastíc. K minimalizácii stresu a zachovaniu fyzikálno-chemických vlastností nanočastíc sa využíva rada pomocných látok, z ktorých väčšina je multifunkčných. Preto k vykonaniu úspešnej lyofilizácie sú považované za nenahraditeľnú súčasť nanočasticovej formulácie.^{1, 16}

5.4.1.1 Kryo- a lyoprotektanty

Kryo- a lyoprotektanty sú látky, ktoré obmedzujú vznik nebezpečných fyzikálnych interakcií v priebehu lyofilizácie. Jedná sa o pomocné látky, ktoré sa pridávajú do suspenzie nanočastíc pred lyofilizáciou.¹

Kryoprotektanty chránia nanočastice pred stresom spôsobeným zmrazením. Ochranný mechanizmus kryoprotektantov spočíva vo vytvorení ochrannej matrix, v ktorej sú uložené nanočastice. Amorfná matrica tvorí vodíkové väzby s nanočasticami, ktoré pôsobia ako náhražka vody a inhibujú deštruktívny účinok kryštálov ľadu.^{1,16} Takýmto spôsobom vieme zabrániť aj ich agregácii. Všeobecne je známe, že vitrifikujú pri špecifickej teplote sklovitého prechodu T_g' . Prvú krok lyofilizácie, zmrazenie, je potrebné uskutočniť pod T_g' u amorfnej formulácie, aby sa zabezpečilo úplné stuhnutie formulácie, alebo pod T_{eu} u kryštalickej formulácie.¹

Najviac preferované sú chemicky inertné cukry. Dôležitú úlohu zohrávajú v terapeuticknej sfére, kedy proteíny sú často enkapsulované do nanočastíc, pretože v priebehu lyofilizácie a skladovania by mohlo dôjsť k inaktivácii proteínového liečiva. Najčastejšie využívaná je trehalóza, glukóza, sacharóza a manitol. Taktiež svoje uplatnenie tu našli aj polyméry.^{1,16}

Najviac využívaná je trehalóza, ktorá má oproti ostatným cukrom určité výhody. Absencia vnútorných vodíkových väzieb, ktorá umožňuje flexibilnejšiu tvorbu vodíkových mostíkov s nanočasticami v priebehu lyofilizácie, menšia hygroskopickosť, vyššia T_g' a nízka chemická aktivita. Stabilizačný efekt cukrov priamo súvisí aj s ich koncentráciou.^{1,6}

Odstraňovanie ľadu a nezamrzutej vody môže mať negatívny dopad na stabilitu nanočastíc, takže lyoprotektanty môžu byť použité i k zabráneniu namáhania nanočastíc vplyvom sušenia. Stabilizácia nanočastíc pomocou lyoprotektantov, spočíva vo vytvorení vodíkových väzieb s polárnymi skupinami nanočastice na jej povrchu v poslednom kroku sušenia. Amorfný stav nanočastíc a lyoprotektantu umožňuje medzi nimi vytvoriť maximálnu väzbu H-väzieb. Kryštalizácia lyoprotektantu bráni tvorbe takejto vodíkovej väzby. Koncentrácia nanočastíc môže tiež ovplyvniť výsledok lyofilizácie. Preukázaný lyoprotektívny efekt bol pri použití vyššej koncentrácie nanočastíc.¹

5.4.1.2 Surfaktanty

Surfaktanty (tenzidy) sú látky často používané k stabilizácii nanočastíc a k zabráneniu ich agregácii. Mechanizmus účinku spočíva v znížení medzifázového napätia v roztoku liečiva a zníženie jeho adsorpcie na kryštály ľadu, čím dôjde aj k zníženiu strát liečiva.^{1, 5} Svoje uplatnenie tu našiel polyvinylalkohol (PVA), ktorý zabezpečuje produkciu stabilných nanočastíc malej veľkosti s obmedzenou distribúciou. Nie všetky surfaktanty majú stabilizačný efekt na nanočastice v priebehu lyofilizácie. V prípade nanočastíc pripravených z poly(mliečnej kyseliny) stabilizovaných poloxamery to neplatí, pretože dôsledkom zvýšenia rozpustnosti povrchovo aktívnej látky vo vodnom roztoku kontinuálnej fázy počas zmrazovania dochádza k agregácii nanočastíc. Taktiež proces lyofilizácie môže ovplyvniť i liečivo voľne prítomné vo formulácii. Prítomnosť voľného liečiva môže znížiť zeta potenciál nanočastíc, čo vedie znovu k ich agregácii.¹

Ukázalo sa, že čistením disperzie nanočastíc z prebytku povrchovo aktívnej látky pred lyofilizáciou má pozitívny vplyv na výsledok procesu. Predpokladá sa, že poloxamér interaguje s ochrannými pomocnými látkami, čím sa zníži ich ochranný mechanizmus voči nanočasticiam.¹⁶

5.4.1.3 Štruktúrotvorné látky

Štruktúrotvorné látky sú pomocné látky, ktoré tvoria objem a zabezpečujú mechanickú pevnosť lyofilizátu. Vďaka týmto látkam môžeme predchádzať kolapsu lyofilizátu, avšak dôležité je použiť správnu koncentráciu štruktúrotvorných látok. Najčastejšie sa používa v zmesi manitol a glycín, ale môžu sa použiť i samostatne. Pokiaľ sa použije jedna zložka v koncentrácii nad 75% môže dôjsť ku kryštalizácii a tento jav je nežiadúci. Pri aplikácii glycínu je nutné počítať s jeho kyslým pH a možnosťou interakcie s redukujúcimi cukrami. Najvhodnejšie rozpätie pH pre vznik elegantnej štruktúry lyofilizačného koláča je 5-7. Laktóza je taktiež využívaná ako štruktúrotvorná látka, ale jej použitie obmedzuje nízka T_c (-31°C) a reaktivita s amínmi, pretože sa jedná o redukujúci cukor.^{5, 18, 19, 20}

5.5 Operačné postupy využívané pri príprave nanočastíc

5.5.1 Nanoprecipitácia

Nanoprecipitácia sa zaraďuje medzi najjednoduchší postup prípravy nanočastíc. Ide o neemulznú metódu, ktorá si vyžaduje použitie dvoch vzájomne miešateľných rozpúšťadiel, pričom polymér je rozpustný len v jednom z nich. Ako polymérne rozpúšťadlo sa používajú napríklad acetón, etanol alebo isopropylalkohol. Ako rozpúšťadlo, v ktorom polymér nie je rozpustný, sa najčastejšie používa voda. Liečivo a polymér sa najprv rozpustia v organickom rozpúšťadle. Takto pripravený roztok sa za stáleho miešania pridá naraz do vodného roztoku surfaktantu. V tomto okamihu dôjde k okamžitému utvoreniu koloidnej suspenzie s nanočasticami. Je to dôsledok rýchleho difundovania polymérneho rozpúšťadla do vodnej fázy, ktoré je nakoniec odstránené odparovaním alebo centrifugáciou.^{21, 22, 23}

5.5.2 Centrifugácia

Centrifugácia je pre jej rýchlosť a jednoduchosť jedna z najdôležitejších purifikačných a separačných metód. Služi k separácii heterogénnych zmesí na základe veľkosti a hustoty častíc.²⁴ Podstatou celého procesu je rozdielne sedimentačné chovanie častíc. Každá častica má rozdielnu sedimentačnú rýchlosť podľa jej tvaru, veľkosti a hustoty.²⁵ Existuje niekoľko druhov centrifugačných metód – napríklad ultracentrifugácia, centrifugácia podľa hustotného gradientu alebo diferenciálna centrifugácia.^{24, 26}

V tejto diplomovej práci bola použitá metóda ultracentrifugácie, ktorá spočíva v centrifugácii pri veľmi vysokých rýchlostiach. Nanočastice sú purifikované v niekoľkých etapách a po každom cykle sa odstráni supernatant, ktorý obsahuje dispergačné médium a nečistoty. Supernatant je vždy nahradený novým médium.²⁷

5.5.3 Metóda dynamického rozptylu svetla

Metóda dynamického rozptylu svetla, taktiež známa ako fotónová korelačná spektroskopia, sa využíva k stanoveniu veľkosti a distribúcie častíc v kvapalnom médium. Intenzita rozptýleného svetla sa detekuje pod určitým uhlom pomocou lúču monochromatického svetla, ktorý sa odráža od pohybujúcej sa častice. Častice sú

v neustálom pohybe a vykazujú Brownov pohyb. Ide o pohyb spôsobený tepelnou energiou, ktorá vzniká v dôsledku interakcie medzi nanočasticami a rozpúšťadlom. Výsledná intenzita rozptýleného svetla závisí na veľkosti, tvare častice a indexe lomu.^{28, 29}

Výhody tejto metódy spočívajú v jednoduchosti, rýchlosti a neinvazívnom postupe. Taktiež meranie poskytuje vysoké rozlíšenie, až do niekoľko nanometrov, za potreby malého množstva kvapalného média.²⁸

6. EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

6.1 Použité suroviny

PLGA 5/5, Purasorb® PDLG 5002A (Corbion, Amsterdam, Holandsko)

Acetón (Penta s.r.o., Chrudim, ČR)

Čistená voda (Faf UK)

Cholát sodný (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Nemecko)

Poloxamer 407, Pluronic® F-127 (Merck, Praha, ČR)

Kurkumin (Merck, Praha, ČR)

Dextran (Merck, Praha, ČR)

Xylitol (Merck, Praha, ČR)

Trehalóza (Merck, Praha, ČR)

Manitol (Merck, Praha, ČR)

Polysorbát 20, Tween® 20 (Merck Praha, ČR)

6.2 Použité prístroje

Analytické váhy Ohaus Discovery (Ohaus, Greifensee, Švajčiarsko), max. 210g,
d=0,1mg

Váhy Kren 440-53N (Kren, Balingen, Nemecko), max. 400g, d=0,01g

Pipety Finnpiette F2, Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, USA)

Multifunkčná chladená centrifuga MPW 260R, MPW Medical Instruments (Varšava,
Poľsko)

Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Panalytical, Malvern, Spojené Kráľovstvo)

Mraziak Vestfrost BSFS 290 (Dánsko)

Lyofilizátor FreeZone 1L Labconco (U.S., Kanada), -50°C

Magnetická miešačka IKA-WERKE RT 5 power, (IKA, Staufen, Nemecko) 100-1000ot./min

Spektrofotometer Specord 205, Analytik Jena (Jena, Nemecko)

Trepací vodný kúpeľ GFL 1083, GFL (Burgwedel, Nemecko)

6.3 Použité metódy

6.3.1 Príprava nanočastíc

Nanočastice využité v experimentoch boli pripravované metódou nanoprecipitácie, vid' kapitola 5.5.1.

POSTUP:

1. Príprava vodnej fáze

Vodná fáza bola tvorená 10ml, 20ml, alebo 50ml vodného roztoku stabilizátora. Ako stabilizátory boli použité Cholát sodný a Pluronic F127 v koncentrácii 0,1% (m/V). Vodná fáza bola pripravená navážením konkrétneho stabilizátora a jeho následným rozpustením v čistej vode. Rozpúšťanie prebiehalo za stáleho miešania na magnetickej miešačke (300 ot/min).

2. Príprava organickej fáze

Organická fáza zahŕňala polymér PLGA 5/5, acetón ako organické rozpúšťadlo polyméru a modelové liečivo kurkumin v koncentrácii 25 µg/ml tam, kde bol použitý. Koncentrácia PLGA bola 30 mg/ml.

3. Organická fáza bola prostredníctvom automatickej pipety kontinuálne a rúzne pridaná k vodnej fáze za vzniku surovej nanosuspenzie. Tento postup prebiehal za stáleho miešania na magnetickej miešačke.

4. Vzniknutá nanosuspenzia bola ponechaná na magnetickej miešačke cca 120 minút, kedy dochádzalo k odstráneniu acetónu.

5. Následne bola pripravená nanosuspenzia purifikovaná pomocou centrifugácie.

6.3.2 Centrifugácia

Pripravená nanosuspenzia bola rovnomerne rozdelená do 2 ml mikroskúmaviek typu eppendorf a centrifugovaná 3 x 15 minút pri 8 500 otáčkach. Centrifugácia je považovaná za purifikačnú a separačnú metódu, viď kapitola 5.5.2. Teplota, pri ktorej boli nanočastice centrifugované bola 4°C. Po každom cykle bol z mikroskúmavky odobraný supernatant. Nanočastice v pelete boli redispergované v redispergačnom médiu.

Nanočastice pripravené z 0,1% roztoku Cholátu sodného boli redispergované v tom istom roztoku stabilizátora, ako bol použitý pri príprave. Nanočastice stabilizované Pluronicom v koncentrácii 0,1% boli redispergované v čistej vode. Po treťom cykle centrifugácie bol odobraný supernatant a nanočastice boli redispergované v roztokoch kryoprotektantov a lyoprotektantov o rôznych koncentráciách.

Po ukončení tretieho cyklu a odstránení supernatantu bola vždy odobraná jedna mikroskúmavka pre meranie na Zetasizeri. Nanočastice boli redispergované v čistej vode a následne sa zmerala veľkosť častíc a polydisperzita (PDI).

6.3.3 Lyofilizácia

Po centrifugácii boli vzorky redispergovaných nanočastíc v 2 ml roztoku kryoprotektantu, alebo lyoprotektantu o rôznych koncentráciách umiestené do mrazničky. Zmrazenie prebiehalo po dobu 24 hodín pri teplote -60°C.

Pred lyofilizáciou boli mikroskúmavky typu eppendorf pootvárané. Otvorená časť eppendorfky bola prekrytá sterilnou buničinou a po obvode zagumičkovaná. Takto pripravené mikroskúmavky boli opäť umiestnené do mrazničky po dobu 2 hodín.

Pred lyofilizáciou bol lyofilizátor zapnutý aspoň 30 minút. V priebehu tohto kroku sa kondenzátor vytemperoval na požadovanú teplotu -50°C.

Potom boli zmrazené vzorky vybrané z mrazničky, a v mraziacom boxe premiestnené do lyofilizátora. Potom bol tlak v lyofilizátore znížený na hodnotu 0,8 mBarr. Lyofilizácia prebiehala po dobu 48 hodín. Ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.

6.3.4 Charakterizácia nanočastíc na Zetasizeri

Po ukončení lyofilizácie boli zlyofilizované vzorky vybrané. Zhodnotila sa vizuálna stránka finálneho koláča, taktiež schopnosť rekonštitúcie po pridaní 2 ml čistej destilovanej vody. Prijateľná doba pre rekonštitúciu sú 3 minúty. Na záver bola pomocou merania na Zetasizeri zhodnotená veľkosť častíc a PDI.

Pomocou prístroja Zetasizer boli zisťované parametre nanočastíc – veľkosť častíc a PDI. Príprava vzoriek spočívala v nariadení purifikovanej suspenzie nanočastíc 1:5 čistenou vodou, alebo rekonštituovaného lyofilizátu v rovnakom pomere. Meranie na Zetasizeri prebiehalo v 2,5 ml plastových kvetách metódou dynamického rozptylu svetla pri 25°C, viď kapitola 5.5.3.

6.3.5 Metodika stanovenia stability nanočastíc

V deň prípravy boli u vzoriek, pred centrifugáciou i po nej, zmerané sledované parametre na Zetasizeri. Vzorky boli hodnotené z hľadiska veľkosti častíc a PDI. Po 3. centrifugácii a odobraní supernatantu boli nanočastice redispergované 2 ml roztoku kryoprotektantu a čistenej vody, v pomere 1:1. Prehľad pripravených vzoriek zobrazuje Tabuľka 1. Ako kontrola boli použité vzorky 4 a 8, pozri Tab. 1.

Tab. 1: Prehľad vzoriek použitých v stabilitej štúdiu

Skupina vzoriek	Nanočastice	Redispergačné médium
1.	PLGA 5/5 + 0,1% Cholát sodný	5% Trehalóza
2.		5% Manitol
3.		5% Trehalóza + 5% Manitol
4.		Voda
5.	PLGA 5/5 + 0,1% Pluronic	5% Trehalóza
6.		5% Manitol
7.		5% Trehalóza + 5% Manitol
8.		Voda

Takto pripravené vzorky boli umiestnené do mrazničky o teplote $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ich stabilita bola sledovaná po dobu 16 týždňov. Sledované parametre boli hodnotené najprv každý týždeň, potom každé 2 týždne. V deň merania boli vzorky vybrané z mrazničky. Rozpúšťanie prebiehalo pri laboratórnej teplote a meranie na Zetasizeri sa uskutočnilo podľa postupu uvedeného v stati 6.3.4 Charakterizácia nanočastíc na Zetasizeri.

6.3.6 Disolúcia

Pre tento experiment boli nanočastice pripravené z PLGA 5/5A a kurkumínu. Pre prípravu nanočastíc bol použitý 0,1% roztok cholátu sodného a navážka kurkumínu predstavovala 0,10 mg. Častice boli zhotovené podľa protokolu popísaného v kapitolách 6.3.1 a 6.3.2. Ako kontrolná vzorka boli použité natívne nanočastice, pozri Tab. 2 vzorka 1. Takto pripravené vzorky boli prenesené do mrazničky a následne prešli procesom lyofilizácie.

Tab. 2: Prehľad základných parametrov vzoriek pre disolučný experiment

Vzorka	Nanočastice	Pomocná látka	Spôsob úpravy vzorky
1.	PLGA 5/5 + Kurkumín + 0,1% Cholát sodný	-	Chladnička
2.		5% Manitol	Lyofilizácia
3.		5% Dextrán	
4.		5% Trehalóza	
5.		5% Trehalóza	Zmrazenie

Finálny lyofilizát sme resuspendovali v 2 ml čistej vody a zcentrifugovali 1 x 15 minút pri 8 500 otáčkach a teplote $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Totožná centrifugácia bola vykonaná aj pri čisto zmrazenej vzorke nanočastíc s trehalózou. I v tomto prípade bol odobraný supernatant. Sedimet bol roztrepaný v 2ml 1% roztoku Tweenu 20. Celý obsah eppendorfky bol premiestnený do dialyzačnej membrány (MWCO 6000 – 8000 g/mol) o dĺžke 10 cm, ktorá sa zalepila akrylátovým lepidlom. Dialyzačná membrána bola vložená do liekovky, ktorá obsahovala 10 ml disolučného média (1% vodný roztok Tweenu 20). Naplnené liekovky boli umiestnené do vodného kúpeľa o teplote $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z disolučného média boli odobrané 2 ml k spektrofotometrickému stanoveniu

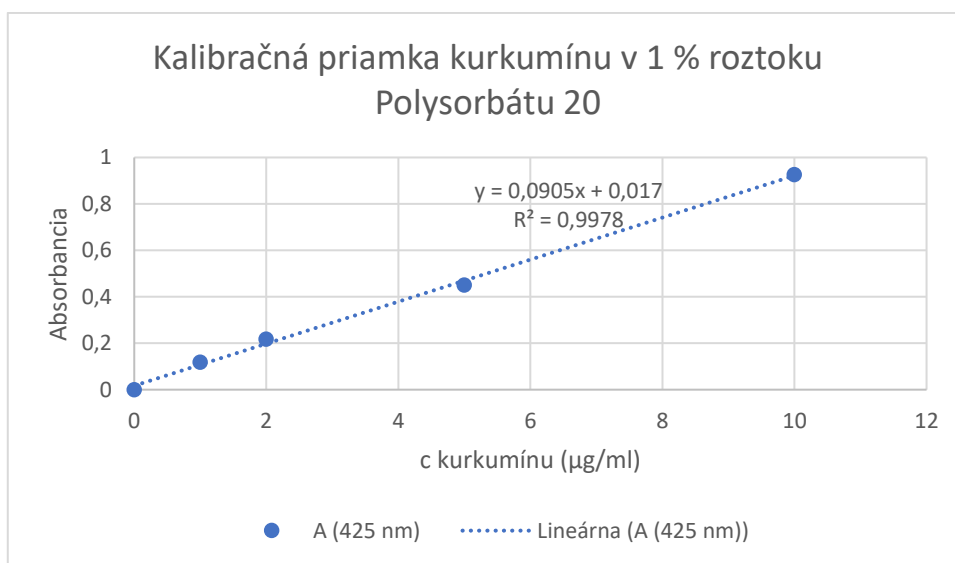
kurkumínu v určitých časových intervaloch (30 minút, 1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny, 6 hodín, 12 hodín, 24 hodín, 30,5 hodín a 48 hodín). Pri každom odbere bolo celé disolučné médium vymenené za nové.

Odobrané vzorky sa premerali na spektrofotometri pri 425 nm, proti 1% roztoku Polysorbátu 20. Pomocou rovnice kalibračnej priamky, pozri Graf 1, bolo stanovené množstvo uvoľneného kurkumínu v odobranom médiu.

Rovnica: Rovnica kalibračnej priamky kurkumínu v 1% roztoku Polysorbátu 20

$$y = 0,0905x + 0,017,$$

kde y je nameraná absorbanca a x koncentrácia enkapsulovaného kurkumínu v $\mu\text{g}/\text{ml}$



Graf 1: Kalibračná priamka kurkumínu v 1% roztoku Polysorbátu 20 meraná pri 425 nm

7. VÝSLEDKY A DISKUSIA

7.1 Lyofilizačný experiment

V lyofilizačnej štúdii bolo hodnotených 48 vzoriek. Na prípravu všetkých nanočastíc sa použil 0,3% roztok polyméru PLGA 5/5 A. U 24 vzoriek bol ako surfaktant použitý 0,1% roztok Cholátu sodného a u ďalších 24 0,1% roztok Pluronicu F127. Sledovanými parametrami boli u každej vzorky – veľkosť nanočastíc, PDI a záverečná vizuálna stránka lyofilizátu.

Skúšanými pomocnými, štruktúrotrvnými látkami pre lyofilizát boli manitol, trehalóza, dextrans a xylitol. Jedná sa o látky, ktoré môžu tvoriť čiastočne kryštalickú alebo amorfnú štruktúru. Funkčnosť týchto pomocných látok závisí od ich fyzikálnej formy pri lyofilizácii, a aj pri následnom skladovaní produktu. Manitol je látka, ktorá v procese zmrazenia ľahko kryštalizuje, zatiaľ čo trehalóza je neredukujúci disacharid s vysokou teplotou T_g a má tendenciu zachovať si amorfnú štruktúru.³⁰ Dextrans je dôležitý stabilizátor z hľadiska lyofilizácie. Jeho výhoda spočíva v znížení času primárneho sušenia o viac ako 60%. Hodnoty T_g však závisia od molekulovej hmotnosti dextransu.³¹

Rozhodujúcim faktorom pre zabezpečenie stability je aj pomer medzi stabilizujúcimi látkami a liečivom, pretože príliš vysoké množstvo cukrov znižuje T_g .³¹

7.1.1 Lyofilizačný experiment – surfaktant 0,1% Cholát sodný

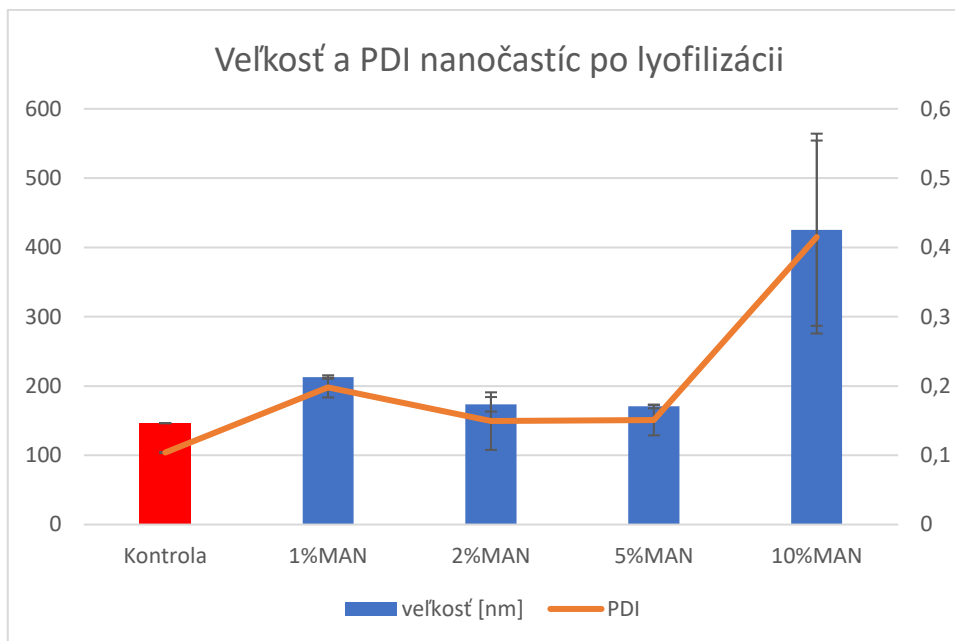
V tomto experimente boli nanočastice pripravené z PLGA 5/5 a roztoku Cholátu sodného. Tabuľka 3 zobrazuje priemerné veľkosti nanočastíc a PDI po lyofilizácii u vzoriek s 1%, 2%, 5% a 10% manitolom, trehalózou, dextransom a xylitolom. Taktiež uvádza vplyv kombinácie 1% a 2% manitolu s 1%, 2%, 5% a 10% trehalózou na veľkosť a PDI.

Tab. 3: Prehľad priemerných hodnôt veľkostí nanočastíc a PDI, vrátane SD, po lyofilizácii u vzoriek pripravovaných z PLGA 5/5 a roztoku Cholótu sodného

PLGA 5/5A + 0,1% CHOLÁT SODNÝ				
Roztok štruktúrotvorných látok	Veľkosť [nm]	SD	PDI	SD
Kontrola	146,3		0,104	
1% MANITOL	212,92	2,539619	0,1978	0,0144
2% MANITOL	173,57	10,46626	0,1493	0,041553
5% MANITOL	170,5	2,635147	0,1507	0,021961
10% MANITOL	425,5	138,6707	0,415	0,139234
1% TREHALÓZA	146,47	2,56177	0,14	0,03764
2% TREHALÓZA	155,77	2,407211	0,1677	0,019674
5% TREHALÓZA	141,38	0,897589	0,0912	0,019823
10% TREHALÓZA	153,85	3,272155	0,1427	0,039124
1% MANITOL + 1% TREHALÓZA	187,3	23,03896	0,2198	0,023727
1% MANITOL + 2% TREHALÓZA	170,48	3,423698	0,179	0,022109
1% MANITOL + 5% TREHALÓZA	160,62	1,074089	0,2836	0,009065
1% MANITOL + 10% TREHALÓZA	155,23	1,999667	0,1363	0,038396
2% MANITOL + 1% TREHALÓZA	217,2	2,698889	0,2186	0,011039
2% MANITOL + 2% TREHALÓZA	280,3	55,72234	0,369	0,118016
2% MANITOL + 5% TREHALÓZA	202,4	19,7932	0,2838	0,068309
2% MANITOL + 10% TREHALÓZA	163,4	1,140175	0,1258	0,017069
Kontrola	131,8		0,073	
1% DEXTRAN	222,93	15,26469	0,3052	0,01473
2% DEXTRAN	148,33	1,492202	0,1403	0,010501
5% DEXTRAN	161,48	2,906143	0,1783	0,011075
10% DEXTRAN	176,67	2,319195	0,2082	0,009261
1% XYLITOL	3492	2526,67	1	0
2% XYLITOL	4916	1749,766	0,8873	0,186749
5% XYLITOL	139,45	0,889382	0,1058	0,018082
10% XYLITOL	167,58	36,16647	0,1845	0,122681

7.1.1.1 Lyofilizačný experiment s manitolom

Veľkosť nanočastíc sa pohybovala od 170,5 nm do 425,5 nm. Hodnoty PDI boli od 0,1493 do 0,415. Najpriaznivejší vplyv na veľkosť i PDI mali roztoky s 2% a 5% manitolom, pozri Graf 2. Za nevhodné sa ukázalo použitie 10% manitolu s hodnotou veľkosti nanočastíc 425,5 nm a PDI 0,415. Predpokladaným dôvodom takéhoto správania je schopnosť manitolu tvoriť kryštalickú štruktúru, ktorá viedla k poškodeniu nanočastíc.



Graf 2: Vplyv koncentrácie roztoku manitolu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Cholátu sodného, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii

Vizuálne stránka lyofilizačného koláča je zobrazená na Obr. 1. Všetky 4 koncentrácie manitolu docielili kompaktný vzhľad lyofilizátu, ktorý sa dal ľahko vybrať zo skúmavky. Finálny koláč bol biely, nepriehľadný a redispergácia vo vode prijateľná.

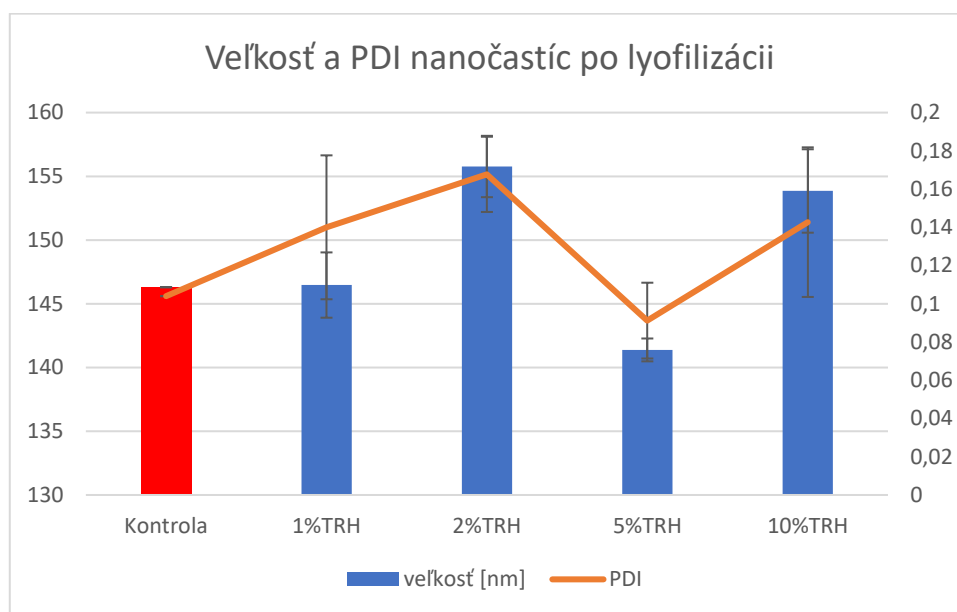


Obr. 1: Lyofilizát – PLGA + CholNa + Manitol

7.1.1.2 Lyofilizačný experiment s trehalózou

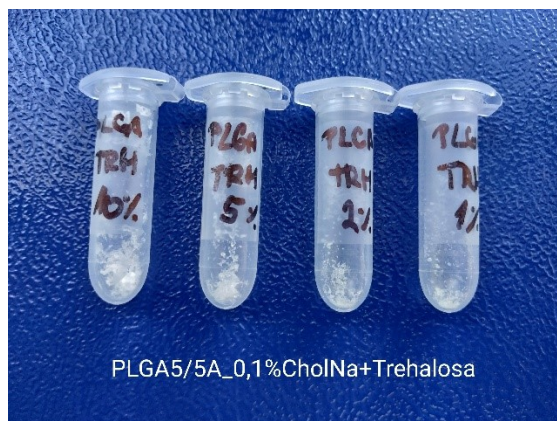
Hodnoty veľkosti nanočastíc sa pohybovali od 141,38 do 153,8 nm. Pôvodná veľkosť bola 146,3 nm, z čoho vyplýva, že u 1% trehalózy nenastala zmena, čomu

zodpovedá i PDI. U 5% trehalózy nastalo mierne zmenšenie nanočastíc. PDI sa pohybovala od 0,0912 do 0,1677. Ako veľmi pozitívne a prínosné zistenie môžeme usúdiť, že žiadna hodnota PDI nepresiahla 0,2. Namerané hodnoty veľkosti a PDI zobrazuje Graf 3. Z grafu je zjavná korelácia PDI a veľkosti, čo poukazuje na tvorbu agregátov.



Graf 3: Vplyv koncentrácie roztoku trehalózy na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Cholátu sodného, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii

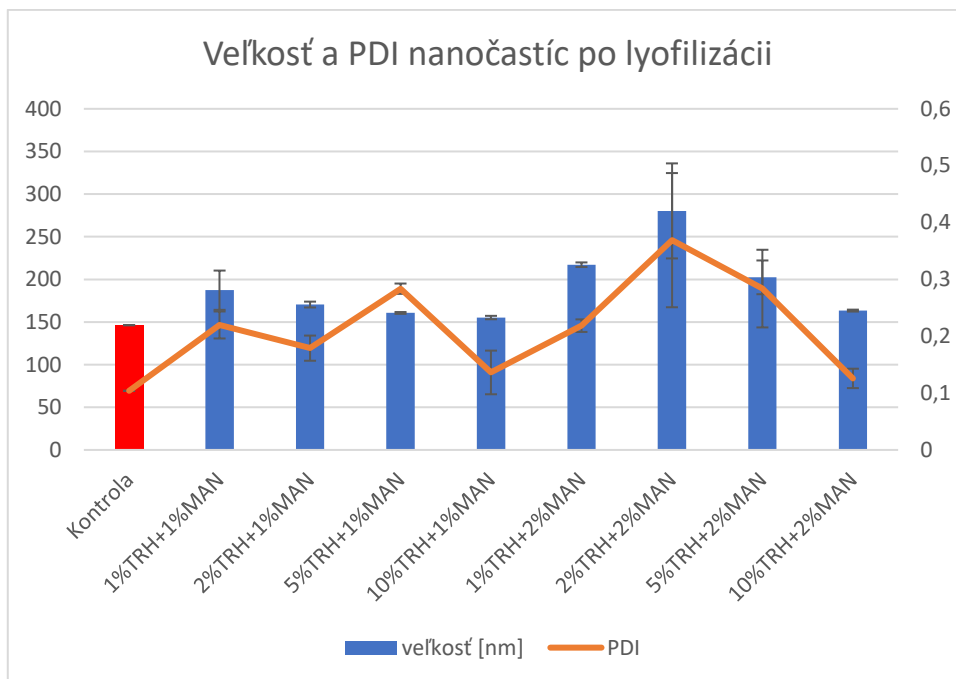
Použitie trehalózy ako lyoprotektantu a štruktúrotvornej látky nevedlo k vyhovujúcemu vzhl'adu lyofilizátu, pozri Obr. 2. Výsledný koláč bol skolabovaný a mal nevhodnú štruktúru. Trehalóza však mala priaznivý vplyv na výsledky veľkostnej stability a PDI. Redispergácia dobrá, do 3 minút.



Obr. 2: Lyofilizát – PLGA + CholNa + Trehalóza

7.1.1.3 Lyofilizačný experiment s kombináciou manitolu a trehalózy

Pri kombinácii 1% manitolu, pri rôznych koncentráciách trehalózy, veľkosť nanočastíc nadobúdala hodnôt od 155,23 do 187,3 nm, pri použití 2% manitolu s rovnakými koncentraciami trehalózy od 163,4 do 280,3 nm. Graf 4 znázorňuje veľkosť častíc a PDI. Z grafu vyplýva, že najvhodnejšia kombinácia je u 1% manitolu a 2% manitolu v kombinácii s 10% trehalózou, s čím koreluje i hodnota PDI, ktorá je v oboch prípadoch pod 0,2.



Graf 4: Vplyv koncentrácie roztoku manitolu a trehalózy na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Cholátu sodného, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii

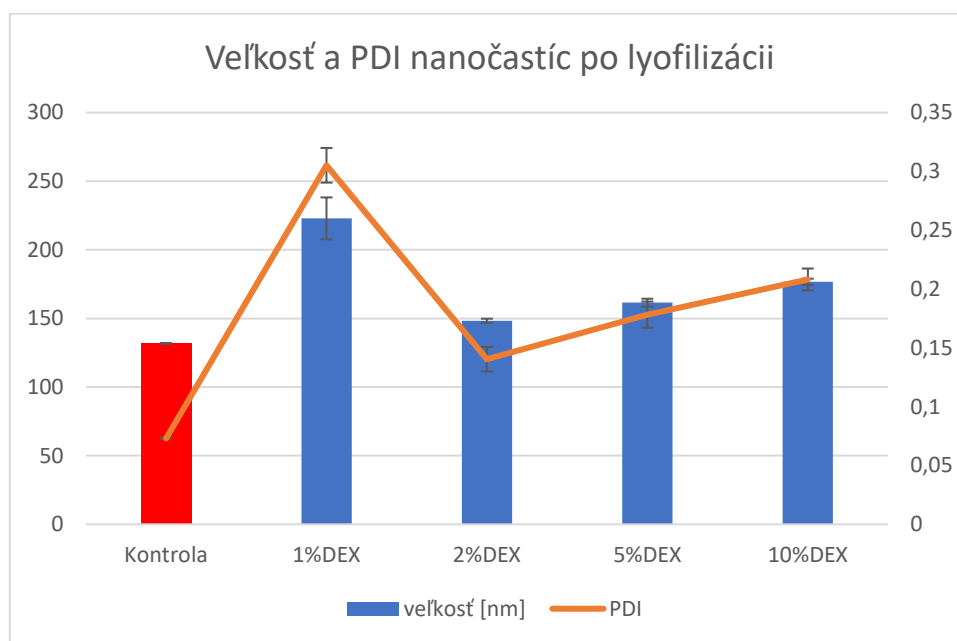
Najvhodnejšia štruktúra lyofilizátu bola docielená použitím kombinácie 2% manitolu s 2% a 1% trehalózou. Výsledné lyofilizačné koláče sú zobrazené na Obr. 3 a 4. Štruktúra koláča bola kompaktná, mierne porézna a dobre redispergovateľná. Použitie 2% manitolu s 5% a 10% trehalózou nezabezpečilo vhodnú vizuálnu stránku lyofilizátu, rovnako ako kombinácia 1% manitolu s trehalózou. Štruktúry boli veľmi porézne a stratili svoj objem.



Obr. 3 a 4: Lyofilizát – PLGA + CholNa + Manitol a Trehalóza

7.1.1.4 Lyofilizačný experiment s dextránom

Maximálnu hodnotu veľkosti i PDI dosiahla vzorka s 1% dextránom, čo poukazuje na nedostatočnú ochranu pred poškodením v procese mrazenia a lyofilizácie. Hodnota veľkosti činila 222,93 nm a PDI 0,3052. Z Grafu 5 vyplýva, že dextrán poskytuje väčšiu mieru ochrany vo vyšších koncentráciách.



Graf 5: Vplyv koncentrácie roztoku dextránu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Cholátu sodného, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii

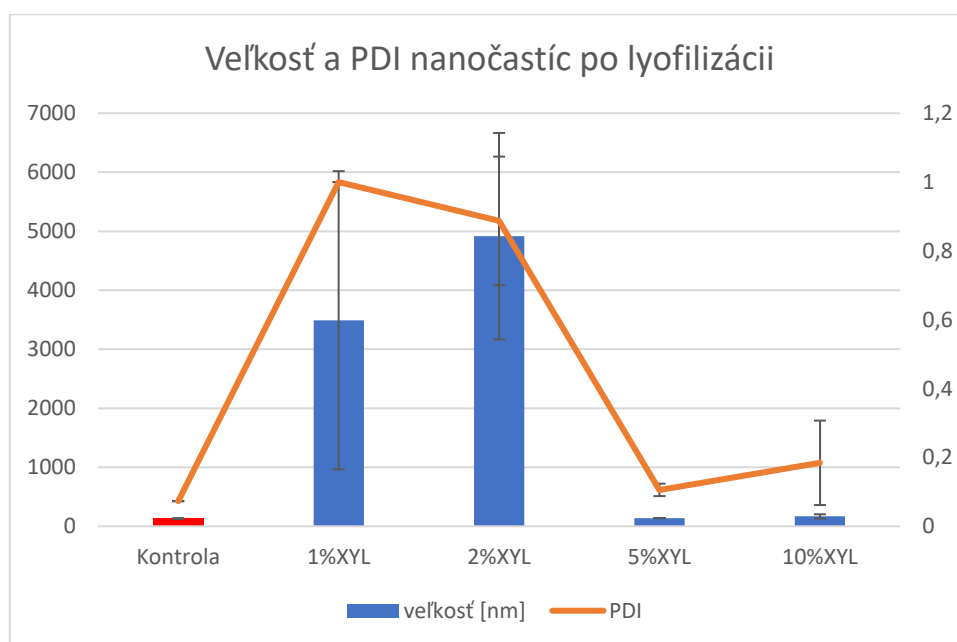
Vizuálna stránka finálnych koláčov je znázornená na Obr. 5. Kompaktnú, nepriehľadnú štruktúru mali vzorky s 10% a 5% dextránom. V koncentrácii 2% a 1% roztoku bola štruktúra neprijateľná. Rekonštitúcia vo vode bola dobrá.



Obr. 5: Lyofilizát – PLGA + CholNa + Dextrán

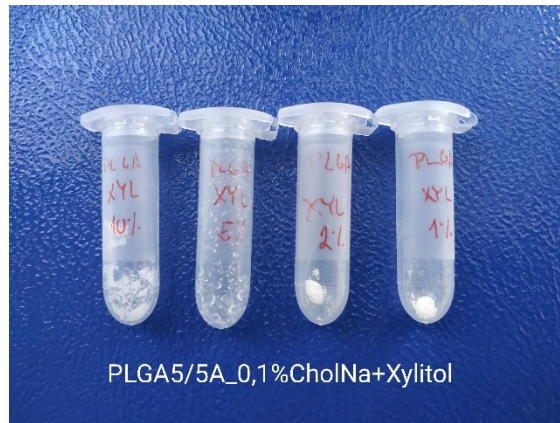
7.1.1.5 Lyofilizačný experiment so xylitolom

Roztok xylitolu v koncentrácii 1% a 2% nie je vhodný k použitiu ako lyoprotektívna látka. Hodnoty veľkosti nanočastíc po lyofilizácii dosahovali až 3492 nm a 4916 nm, čomu zodpovedajú i hodnoty PDI 1 a 0,8873. Jednoznačne môžeme zhodnotiť, že došlo k masívnej agregácii nanočastíc. Graf 6 sleduje vplyv koncentrácie roztoku na veľkosť a PDI. 5% xylitol sa ukázal ako najvhodnejší, jeho hodnoty veľkosti nanočastíc činili 139,45 nm a PDI 0,1058. Tieto hodnoty vyhovujú požiadavkám na veľkosť nanočastíc (100-200 nm) aj na PDI (0,1-0,2).



Graf 6: Vplyv koncentrácie roztoku xylitolu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Cholátu sodného, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii

Z Obr. 6 vyplýva, že 10%, 5%, 2% a 1% roztoky xylitolu poskytli vizuálne nevyhovujúci lyofilizát. Štruktúra bola nekompaktná a lyofilizačný koláč stratil svoj objem. Redispergácia bola dobrá, avšak u 1% a 2% roztoku zostali viditeľné častice.



Obr. 6: Lyofilizát – PLGA + CholNa + Xylitol

7.1.2 Lyofilizačný experiment – surfaktant 0,1% Pluronic

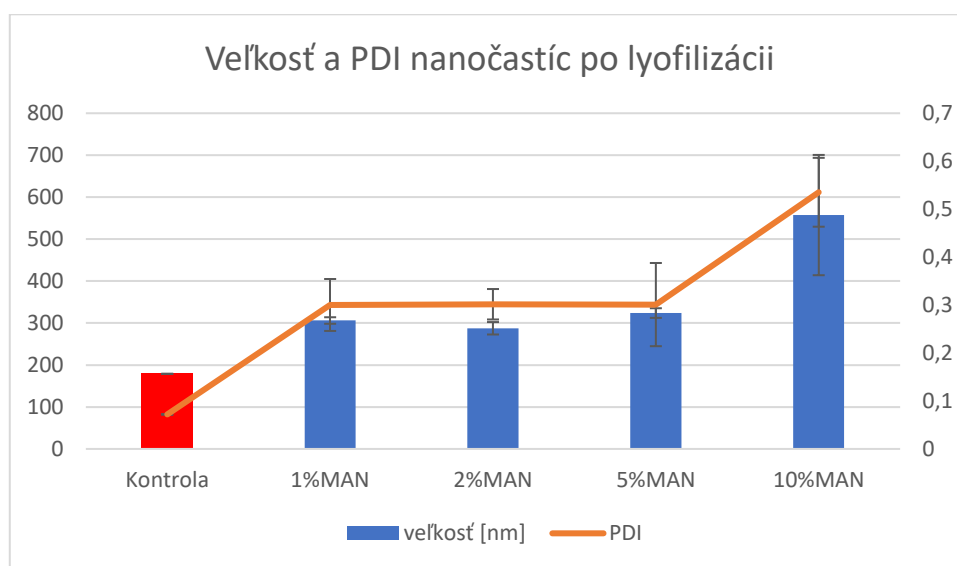
V tejto časti lyofilizačnej štúdií boli nanočastice pripravené z PLGA 5/5 a roztoku Pluronicu. Tabuľka 4 zachytáva priemerné veľkosti nanočastíc a PDI po lyofilizácii u vzoriek s 1%, 2%, 5% a 10% manitolom, trehalózou, dextransom a xylitolom. Taktiež zobrazuje vplyv kombinácie 1% a 2% manitolu s 1%, 2%, 5% a 10% trehalózou na veľkosť a PDI nanočastíc.

Tab. 4: Prehľad priemerných hodnôt veľkostí nanočastíc a PDI, vrátane SD, po lyofilizácii u vzoriek pripravovaných z PLGA5/5 a roztoku Pluronicu

PLGA 5/5A + 0,1% PLURONIC				
Roztok štruktúrotvorných látok	Veľkosť [nm]	SD	PDI	SD
Kontrola	179		0,072	
1% MANITOL	306,08	7,757169	0,3002	0,054146
2% MANITOL	287,53	14,79536	0,3017	0,031747
5% MANITOL	323,82	11,46864	0,301	0,086753
10% MANITOL	557,33	143,3094	0,5352	0,071832
1% TREHALÓZA	332,15	83,11784	0,413	0,066618
2% TREHALÓZA	363,18	182,294	0,4668	0,134938
5% TREHALÓZA	306,8	111,6225	0,385	0,086753
10% TREHALÓZA	360,17	94,56652	0,4142	0,072563
Kontrola	183,5		0,088	
1% MANITOL + 1% TREHALÓZA	368,55	24,71637	0,5735	0,063752
1% MANITOL + 2% TREHALÓZA	388,62	89,56141	0,4852	0,019385
1% MANITOL + 5% TREHALÓZA	284,05	33,62206	0,4356	0,057874
1% MANITOL + 10% TREHALÓZA	304,16	59,16745	0,426	0,071969
2% MANITOL + 1% TREHALÓZA	436,02	25,64967	0,5372	0,057548
2% MANITOL + 2% TREHALÓZA	403,52	83,40399	0,4792	0,070783
2% MANITOL + 5% TREHALÓZA	282,42	30,88122	0,377	0,01997
2% MANITOL + 10% TREHALÓZA	278,23	41,31066	0,3793	0,037998
Kontrola	179		0,072	
1% DEXTRAN	2715	949,4377	0,6617	0,319271
2% DEXTRAN	1203	116,7229	0,6107	0,112044
5% DEXTRAN	227,87	9,148479	0,2793	0,051972
10% DEXTRAN	215,53	2,833843	0,1422	0,029862
1% XYLITOL	245,68	91,4798	0,3132	0,139457
2% XYLITOL	188,38	7,150501	0,2397	0,036768
5% XYLITOL	347,63	52,67116	0,5053	0,11863
10% XYLITOL	560,78	136,0619	0,5733	0,119453

7.1.2.1 Lyofilizačný experiment s manitolom

V tomto prípade hodnoty veľkosti dosahovali až od 287,53 do 557,33 nm. Jedná sa o veľmi nepriaznivé hodnoty veľkosti nanočastíc. Taktiež aj PDI nadobúdala pomerne vysoké hodnoty, od 0,3002 do 0,5352. Môžeme usúdiť, že výsledky experimentu sú pri použití Pluronicu nevyhovujúce, v porovnaní s nameranými hodnotami u roztoku cholátu sodného. Prehľad vplyvu koncentrácie roztoku manitolu na veľkosť a PDI zobrazuje Graf 7. Z grafu vyplýva, že vysoké koncentrácie manitolu nemajú ochranný vplyv na nanočastice, dochádza k ich agregácii.



Graf 7: Vplyv koncentrácie roztoku manitolu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Pluronicu, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii

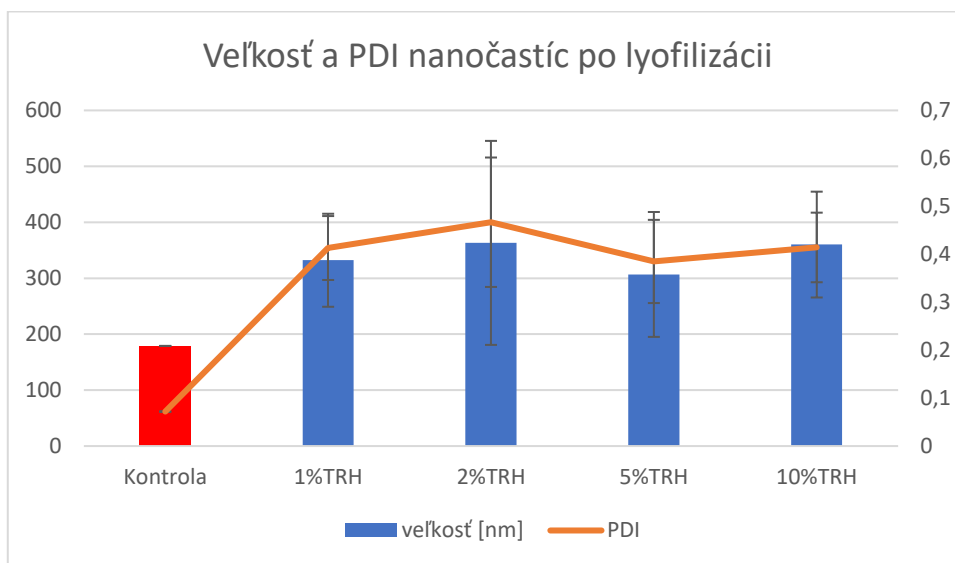
Rovnako ako u nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného, bol výsledný lyofilizát elegantného vzhľadu pri všetkých koncentráciách manitolu, pozri Obr. 7. Finálny koláč bol kompaktný, nepriehľadný a dobre redispergovateľný vo vode. Výnimkou bol 10% roztok manitolu, ktorého rekonštitúcia sa vykonala za pomoci ultrazvukového kúpeľa.



Obr. 7: Lyofilizát - PLGA + Pluronic + Manitol

7.1.2.2 Lyofilizačný experiment s trehalózou

Z Grafu 8 vyplýva, že veľkosti i PDI pri použití roztoku trehalózy nie sú vyhovujúce. Hodnota veľkosti nanočastíc sa pohybovala od 306,8 do 363,18 nm. Minimum PDI dosahovalo 0,385, maximum 0,4668. Tieto výsledky poukazujú na značnú agregáciu nanočastíc, ktorá je pravdepodobne spôsobená vyššou rozpustnosťou poloxaméru vo vode pri nízkych teplotách.



Graf 8: Vplyv koncentrácie roztoku trehalózy na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Pluronicu, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii

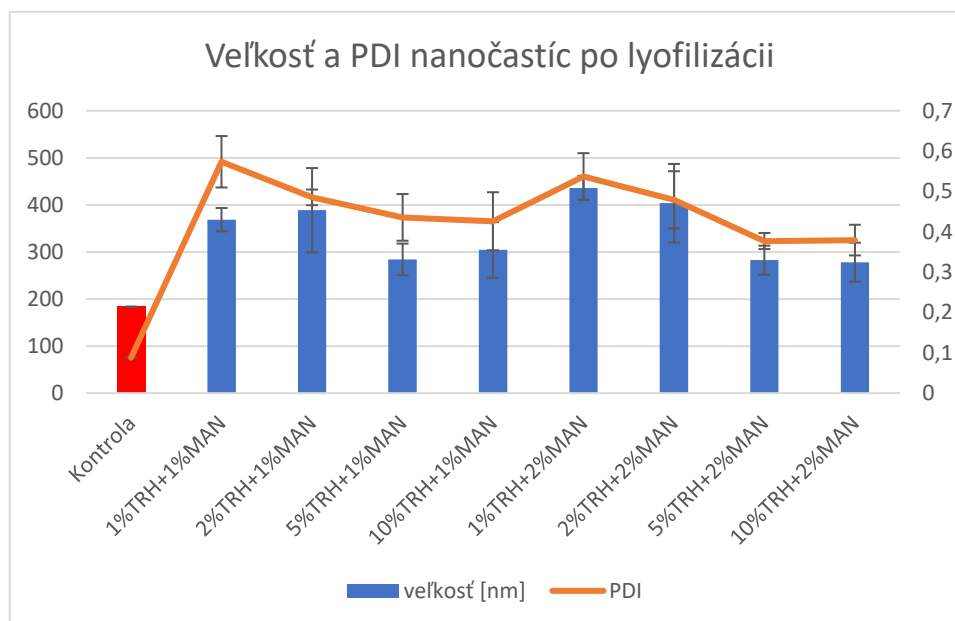
Na Obrázku 8 sú znázornené výsledné koláče, ktorých vizuálna stránka nespĺňa kritériá pre správny vzhľad lyofilizátu. Štruktúra je nekompaktná, porézna a koláč stratil svoj objem. Redispergácia bola prijateľná.



Obr. 8: Lyofilizát – PLGA + Pluronic + Trehalóza

7.1.2.3 Lyofilizačný experiment s kombináciou manitolu a trehalózy

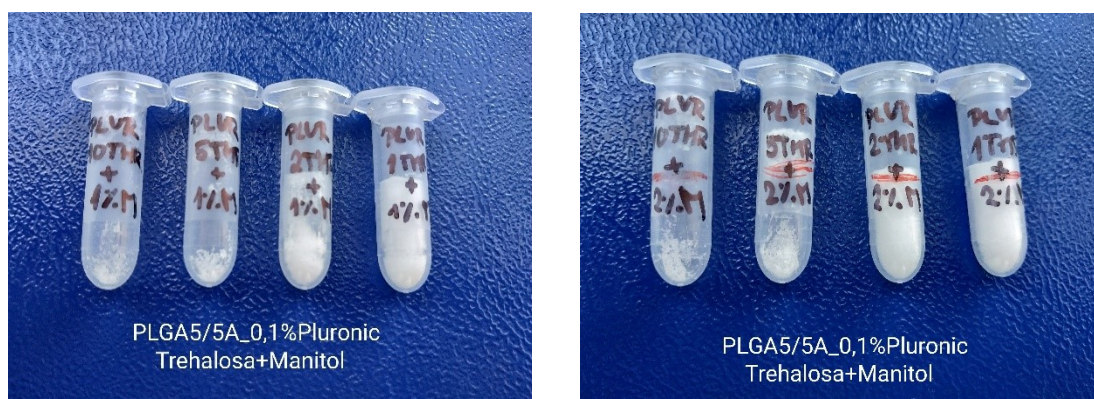
Kombinácia 1% a 2% roztoku manitolu s trehalózou, obdobne ako použitie jednozložkového roztoku manitolu alebo trehalózy, poukázalo, že nemajú dostatočne ochranný účinok na nanočastice pripravené z PLGA 5/5 a roztoku Pluronicu. Namerané hodnoty veľkosti a PDI zobrazuje Graf 9. Rozmedzie hodnôt veľkosti sa pohybovalo od 278,3 do 436,02 nm, PDI od 0,377 do 0,5735.



Graf 9: Vplyv koncentrácie roztoku manitolu a trehalózy na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Pluronicu, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii

Obrázok 9 a 10 zobrazuje vplyv koncentrácie roztoku štruktúrotvorných látok na finálny vzhľad lyofilizátu. Z obrázkov vyplýva, že so vzrastajúcou koncentráciou

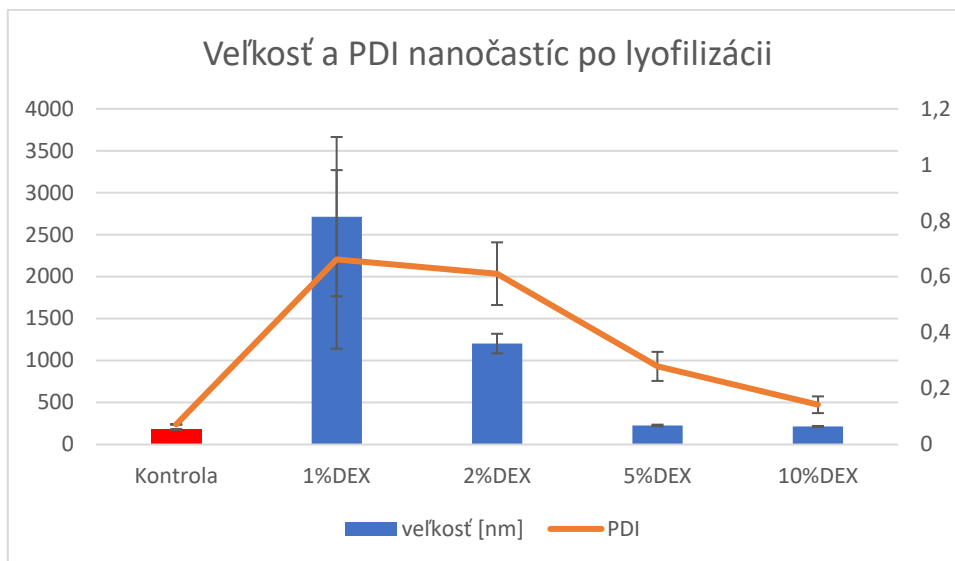
roztoku trehalózy sa štruktúra lyofilizačného koláču zhoršuje. Vyhovujúcu vizuálnu stránku mali vzorky mixu 1% a 2% manitolu s 1% a 2% trehalózou, avšak vzorka s kombináciou 1% manitolu a 2% trehalózy bola menej kompaktná a poréznejšia. Redispergácia bola v norme, no negatívum bola mierna sedimentácia prítomných nanočastíc.



Obr. 9 a 10: Lyofilizát – PLGA + Pluronic + Manitol a Trehalóza

7.1.2.4 Lyofilizačný experiment s dextránom

Roztok 1% a 2% dextránu sa ukázal ako nevhodný, pozri Graf 10. Veľkosť nanočastíc dosahovala hodnoty 2715 nm a 1203 nm, PDI 0,6617 a 0,6107. U 5% a 10% dextránu veľkosť nadobúdala o niečo pozitívnejšie výsledky, 227,87 nm a 215,53 nm. PDI bola 0,2793 a 0,1422. Možno usúdiť, že sa jedná o najpriateľnejšie hodnoty nanočastíc, ktoré sú stabilizované poloxamérom, čo ukazuje na dobrú protektívnu vlastnosť dextránu.



Graf 10: Vplyv koncentrácie roztoku dextransu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Pluronicu, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii

Lyofilizačné koláče u vzoriek s dextransom boli kompaktné, ľahko sa oddeľovali od strán skúmavky, pozri Obr. 11. Problémom bola ich redispergácia vo vode. U 1% a 2% roztoku dextransu zostávali viditeľné častice.

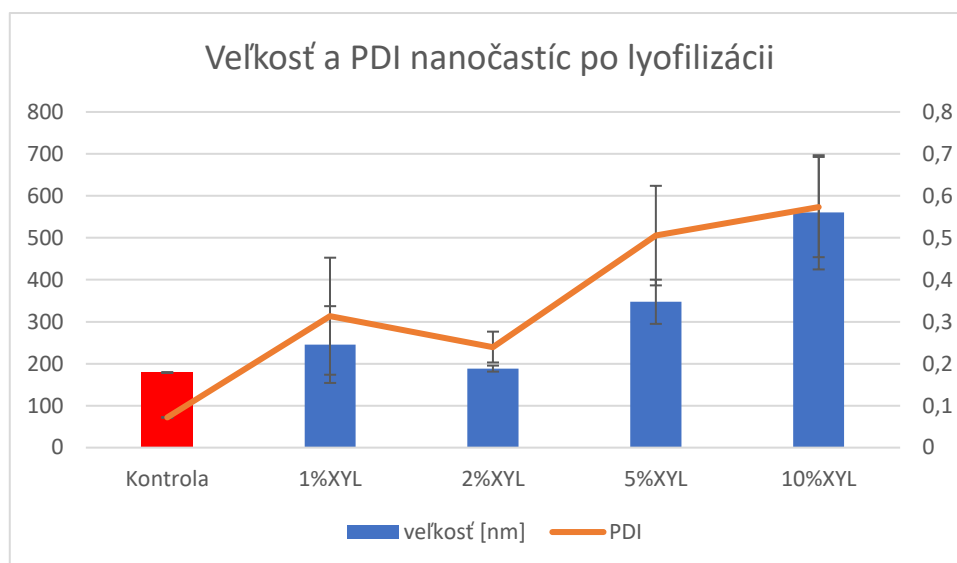


Obr. 11: Lyofilizát – PLGA + Pluronic + Dextrans

7.1.2.5 Lyofilizačný experiment so xylitolom

Konzentrácia roztoku xylitolu má presne opačný vplyv na veľkosť a PDI, ako predchádzajúce použitie dextransu. Závislosť koncentrácie veľkosti a PDI zobrazuje Graf 11. Ako najviac vyhovujúci sa javí roztok 2% xylitolu, čo je úplný protiklad v porovnaní s nanočasticami stabilizovanými Cholátom sodným. Veľkosť nanočastíc

po lyofilizácii predstavovala hodnotu 188,38 nm a PDI 0,2397. Maximálnu veľkosť, 560,78 nm, nadobudol roztok 10% xylitolu. V tomto prípade bola PDI 0,5733.



Graf 11: Vplyv koncentrácie roztoku xylitolu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Pluronicu, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii

Vizuálnu stránku lyofilizátu zobrazuje Obr. 12. Rovnako ako u nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného, je štruktúra finálneho koláča nevyhovujúca. Rekonštitúcia si vyžadovala použitie väčšieho množstva vody.



Obr. 12: Lyofilizát – PLGA + Pluronic + Xylitol

7.1.3 Zhrnutie lyofilizačného experimentu

Z vyššie uvedeného vyplýva niekoľko poznatkov. Pri porovnaní lyoprotektantov z hľadiska vlastností výsledného produktu sa ako najlepšie lyoprotektanty javia trehalóza a dextrán. Veľkosti častíc rekonštituovaných po lyofilizácii sa významne nelíšila od tých, ktoré boli hodnotené ihneď po príprave. Z hľadiska schopností plniť funkciu i štruktúrotvornej látky nemožno hodnotiť trehalózu ako perspektívnu látku, a to ani v kombinácii s manitolom, ktorý bol ako štruktúrotvorná látka veľmi dobrý.

Ďalším výstupom experimentu je to, že častice stabilizované poloxamérom sú náchylnejšie k poškodeniu v priebehu procesu lyofilizácie. Parametre častíc stabilizovaných poloxamérom boli významne horšie, než u častíc stabilizovaných Cholátom sodným. Toto platilo pre všetky lyoprotektanty s výnimkou trehalózy a dextránu, a i pre tieto dve pomocné látky boli výsledky nanočastíc stabilizovaných poloxamérom horšie, hoci boli prijateľné. Vysvetlenie sa ponúka v rozdielnej povrchovej aktivite poloxaméru v závislosti na teplote. Pre Poloxamér 407 totiž platí, že rozpustnosť stúpa a schopnosť viazať sa k povrchom klesá s tým, ako sa teplota sústavy znižuje. Nižšia miera ochrany povrchu častíc vedie k väčšej miere poškodenia pri mrazení a lyofilizácii.^{1,6}

7.2 Stabilita nanočastíc

V štúdiu sa hodnotilo 6 rozličných vzoriek. Všetky suspenzie nanočastíc sa pripravili z 0,3% roztoku polyméru PLGA 5/5 a uchovávali v mrazničke pri teplote cca - 70°C. V priebehu štyroch mesiacov sa u každej vzorky merala veľkosť častíc a PDI. V ďalšej časti sú popísané jednotlivé vzorky.

7.2.1 Stabilita nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného

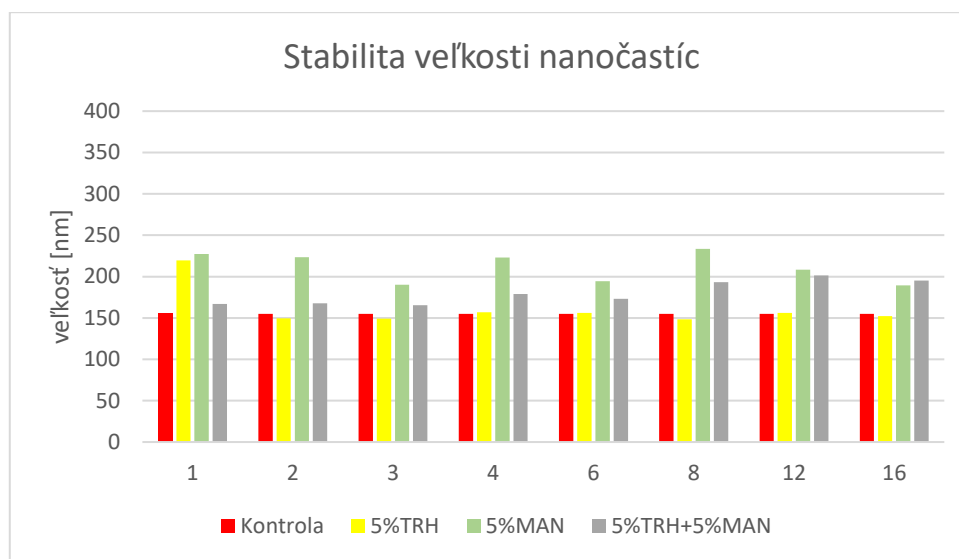
Hodnotenú vzorky boli tvorené nanočasticami z PLGA 5/5 v roztokoch kryoprotektantov – 5% trehalózy, 5% manitolu a mixu 5% trehalózy a 5% manitolu. Nanočastice boli centrifugované a redispersované 0,1% roztokom Cholátu sodného. Tabuľka 5 zhrňa hodnoty veľkostí nanočastíc a PDI.

Tab. 5: Prehľad veľkostí nanočastíc a PDI pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného v závislosti na týždni pri stabilite štúdiu

Stabilita nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného						
Týždeň	5% TRH		5% MAN		5% TRH + 5% MAN	
	Veľkosť [nm]	PDI	Veľkosť [nm]	PDI	Veľkosť [nm]	PDI
0	155	0,116	155	0,116	155	0,166
1	219,7	0,263	227,3	0,221	167	0,124
2	149,7	0,085	223,3	0,248	167,2	0,123
3	149,1	0,083	190,2	0,165	165,3	0,125
4	156,7	0,085	222,9	0,224	179,1	0,187
6	156,2	0,087	194,4	0,146	173,2	0,13
8	148,5	0,063	233,5	0,261	193,4	0,153
12	156	0,071	208,2	0,178	201,5	0,155
16	152,3	0,084	189,2	0,174	195,2	0,167

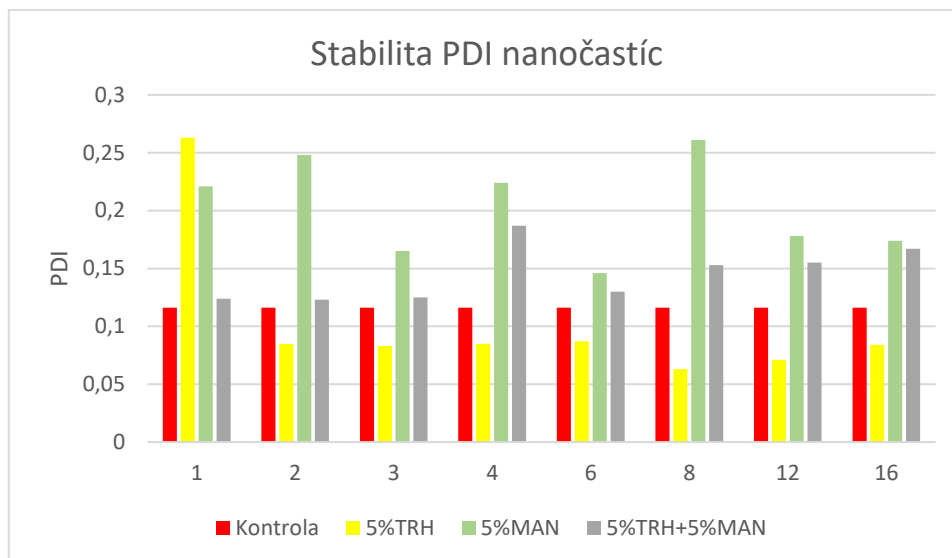
Najnižšiu hodnotu činila počiatočná veľkosť nanočastíc, 155 nm. Najvyššia hodnota veľkosti predstavovala 233,5 nm u 5% manitolu. Vzorky, v ktorých bol ako

kryoprotektant použitá 5% trehalóza sa prakticky nezmenili. Hodnoty veľkostí sú zobrazené v Grafe 12, pozri nižšie. U 5% manitolu nastalo zväčšenie veľkosti nanočastíc, ktoré vykazovalo miernu variabilitu. Rozmedzie hodnôt činilo 78,5 nm. Pri kombinácii 5% trehalózy a 5% manitolu veľkosť nanočastíc mierne rástla s časom skladovania, a ich rozsah predstavoval 46,5 nm. Minimálna hodnota tejto vzorky vykazovala 155 nm, maximálna dosahovala 201,5 nm.



Graf 12: Vývoj veľkosti nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného pri stabilitej štúdii, kontrola zobrazuje nanočastice skladované v čistej vode

PDI u vzorky s 5% trehalózou sa pohybovala od 0,06 do 0,085, čo poukazuje na zachovanie monodisperzného systému po celú dobu experimentu. Môžeme konštatovať, že sa jedná o veľmi priaznivé výsledky. Rovnako ako veľkosť i PDI ukazuje na to, že pri uchovávaní nanočastíc pri zníženej teplote v roztoku 5% trehalózy dochádza iba k zanedbateľným zmenám. Graf 13 zobrazuje vývoj PDI v priebehu experimentu. U 5% manitolu PDI predstavovala hodnoty od 0,146 do 0,261. Rozmedzie predstavuje 0,115, z čoho vyplýva, že dochádzalo k zmenám v PDI. Možným zdôvodnením môže byť kryštalická povaha manitolu, ktorá vedie k narušeniu štruktúry častíc pri porcese mrazenia a následná agregácia. Pri kombinácii 5% trehalózy a 5% manitolu PDI dosahovala hodnoty od 0,123 do 0,187, rozmedzie teda bolo 0,064. Tieto hodnoty sú prijateľné, no horšie v porovnaní s trehalózou. Vzorky boli monodisperzné počas štyroch mesiacov.



Graf 13: Vývoj PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného pri stabilitej štúdiu, kontrola zobrazuje nanočastice skladované v čistej vode

7.2.2 Stabilita nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Pluronicu

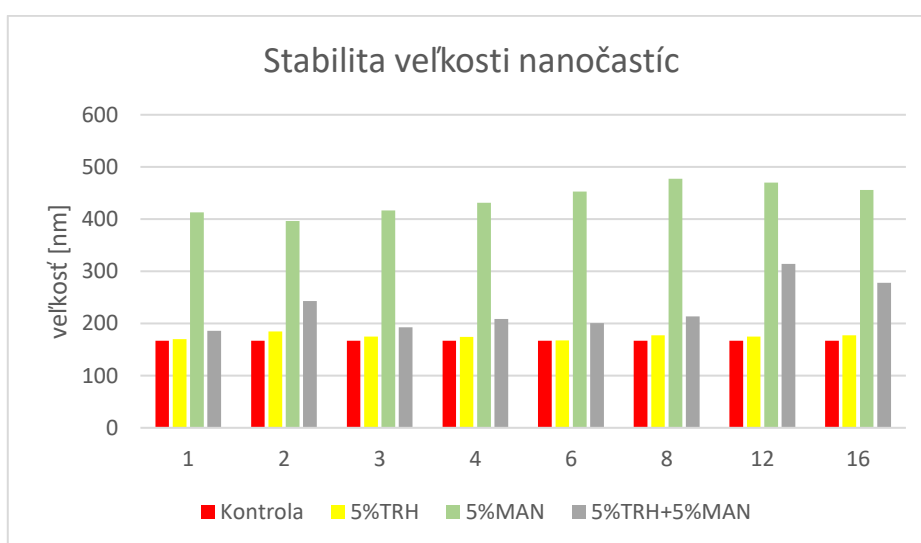
Vzorky nanočastíc boli taktiež uchovávané v totožných roztokoch kryoprotektantov. Rozdiel bol v použití redispergačného média - 0,1% roztoku Pluronicu. Tabuľka 6 zobrazuje hodnoty veľkostí nanočastíc a PDI.

Tab. 6: Prehľad veľkostí nanočastíc a PDI pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Pluronicu v závislosti na týždni pri stabilitnej štúdiu

Stabilita nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Pluronicu						
	5% TRH		5% MAN		5% TRH + 5% MAN	
	Veľkosť [nm]	PDI	Veľkosť [nm]	PDI	Veľkosť [nm]	PDI
0	167	0,059	167	0,059	167	0,059
1	170,1	0,049	412,7	0,422	186,2	0,107
2	184,5	0,15	396,3	0,504	243,2	0,277
3	175	0,045	416,7	0,52	192,5	0,096
4	174,3	0,046	431,4	0,482	208,9	0,187
6	167,7	0,058	452,7	0,493	200,8	0,173
8	177,4	0,083	477,4	0,567	213,3	0,17
12	174,7	0,063	469,8	0,689	314,3	0,23
16	177,3	0,087	455,7	0,477	277,7	0,23

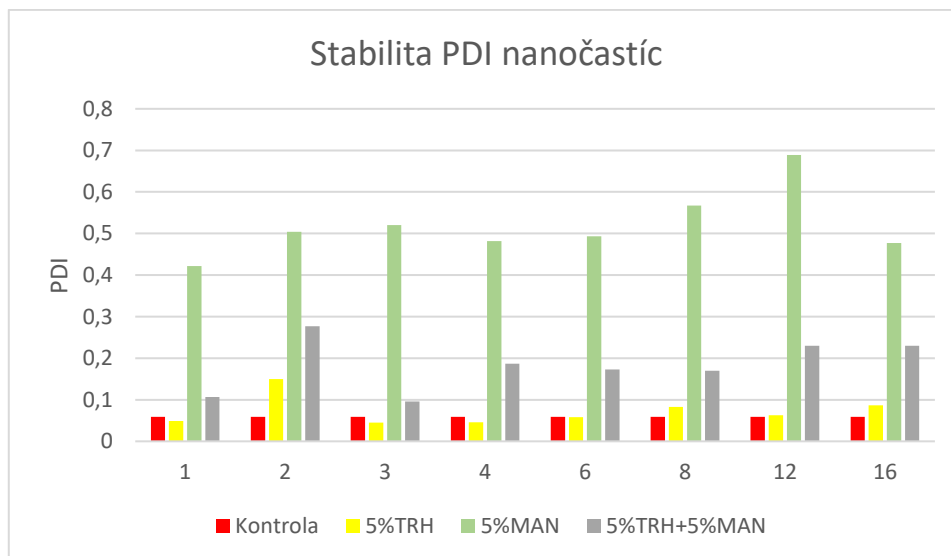
U vzorky s 5% trehalózou veľkosť dosahovala hodnoty od 167 do 184,5 nm. Rozdiel maxima a minima činil 17,5 nm, čo je zanedbateľná hodnota, ktorá je pravdepodobne spôsobená variabilitou merania. Môžeme konštatovať, že častice zostali po celú dobu stabilné. Namerané hodnoty sú zobrazené v Grafe 14. Rovnako ako u nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného, ktoré boli uchovávané tiež v 5% roztoku trehalózy, nebol zistený výrazný vzrast ani pokles veľkosti. Opäť teda nedochádzalo k negatívnemu vplyvu po vystavení stresového faktora – zmrazenie, čomu odpovedajú i hodnoty PDI, vid' polydisperzita. Pri vzorke

s 5% manitolom nastal rapidný vzrast veľkosti už po prvom týždni skladovania. Predpokladáme, že poškodenie nanočastíc nastalo už v procese zmrazenia a manitol nemá dostatočne ochranný účinok voči takémuto stresoru. Maximálna hodnota veľkosti nanočastíc nadobúdala 477,4 nm a minimálna bola pôvodná veľkosť, 167 nm. Rozmedzie hodnôt vykazovalo až 310,4 nm. Tento výsledok koreluje i s vývojom PDI, viď polydisperzita. Vzorky, kde bol použitý mix 5% trehalózy a 5% manitolu, vykazovali mierny vzrast a variabilitu veľkosti po dobu 8 týždňov. V 12 a 16 týždeň dosahovali veľkosť až 314,3 nm a 277,7 nm. Môžeme usúdiť, že sa jedná o negatívny vplyv manitolu, ktorý sa javí ako látka nevhodná pre tento typ skladovania nanočastíc.



Graf 14: Vývoj veľkosti nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Pluronicu pri stabilitnej štúdiu, kontrola zobrazuje nanočastice skladované v čistej vode

PDI u vzorky s 5% trehalózou dosahovala hodnôt od 0,045 do 0,15, rozmedzie ich hodnôt činilo 0,105. Trehalóza spĺňa požadované kritériá na hodnotu veľkosti nanočastíc i PDI. Graf 15 zachytáva vývoj PDI v priebehu experimentu. Z grafu však vyplýva, že PDI stagnuje a vzorky boli po celú dobu hodnotenia monodisperzné, i napriek jednej vychýlenej hodnote. PDI je veľmi premenlivá veličina a môžeme predpokladať, že sa jedná o chybu merania. Minimum PDI u vzorky s 5% manitolom činilo 0,056, čo bola počiatočná polydisperzita nanočastíc, a maximum 0,689. Rozsah PDI bol až 0,633. Pri kombinácii 5% trehalózy a 5% manitolu PDI nadobúdala hodnôt od 0,056 do 0,277, rozsah hodnôt činil 0,221.



Graf 15: Vývoj PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Pluronicu pri stabilitej štúdiu, kontrola zobrazuje nanočastice skladované v čistej vode

7.2.3 Zhrnutie stabilného experimentu

Nanočastice uchovávané v 5% roztoku trehalózy sa javili ako najstabilnejšie. Z nameraných dát vyplýva, že trehalóza je výrazne najlepším kryoprotektantom. Medzi použitými surfaktantmi neboli významné rozdiely a sledované parametre u nanočastíc vykazovali len malé zmeny, ktoré môžeme pokladať za zanedbateľné.

Najväčšie zmeny v priebehu stabilitej skúšky nastali u vzoriek, kde bol ako kryoprotektant použitý manitol. V prípade nanočastíc, pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Pluronicu, namerané hodnoty vychádzali horšie. PDI i veľkosť častíc vykazovali výrazne vyšší rozsah, než u nanočastíc z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného. Manitol neposkytuje dostatočnú ochranu nanočasticiam voči stresu, ktorý je spôsobený zmrazením. Zdôvodnením môže byť kryštalická povaha manitolu, ktorá vedie k narušeniu štruktúry častíc pri procese mrazenia a ich následná agregácia.

Kombinácia 5% trehalózy a 5% manitolu sa neosvedčila. Predpokladaným dôvodom nepriaznivých výsledkov je použitie manitolu, ktorý sa javí ako nevhodný kryoprotektant.

Dôvodom nevhodných výsledkov častíc stabilizovaných poloxamérom je proces lyofilizácie, pretože pri mrazení k rapidným zmenám nedochádza. Tento vplyv vysvetliť nevieme, avšak pozorovali sme ho.

7.3 Disolučný experiment

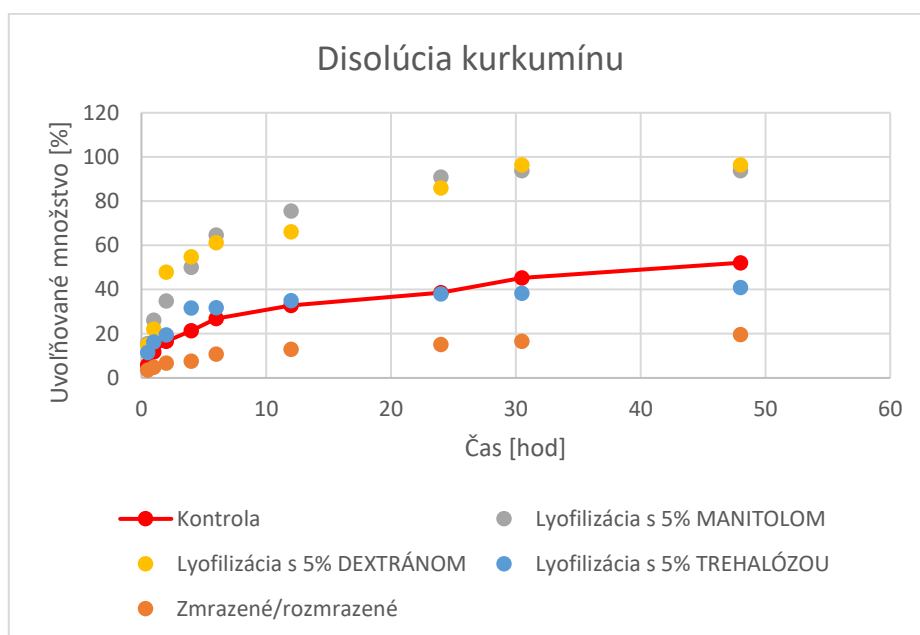
Disolučný test bol vykonaný s jedným modelovým liečivom, kurkumínom. Na prípravu nanočastíc sa znovu použil 0,3% roztok polyméru PLGA 5/5 a 0,1% roztok Cholátu sodného. V disolučnej štúdií sa hodnotili 4 rozlične spracované vzorky, u ktorých sa sledovalo uvoľňovanie kurkumínu v priebehu 48 hodín.

Tabuľka 7 zobrazuje percentuálne množstvo uvoľneného kurkumínu. Z lyofilizovaných nanočastíc s 5% manitolom sa uvoľnilo 93,8% kurkumínu, s 5% dextransom 96,5% kurkumínu a s 5% trehalózou sa uvoľnilo 41,0%. U nanočastíc, ktoré boli zmrazené a rozmrazené dosiahlo uvoľnenie kurkumínu len 19,6%.

Tab. 7: Disolúcia kurkumínu z lyofilizovaných nanočastíc a z nanočastíc po zmrazení a rozmrazení

	Kontrola	Lyofilizácia s 5% Manitolom	Lyofilizácia s 5% Dextránom	Lyofilizácia s 5% Trehalózou	Zmrazené a rozmrazené nanočastice
Čas [hod]	% uvoľneného kurkumínu				
0	0	0	0	0	0
0,5	5,9	15,6	15,0	11,5	3,5
1	11,7	26,1	22,1	16,3	4,8
2	16,6	34,9	47,9	19,5	6,7
4	21,3	50,1	54,8	31,6	7,7
6	26,8	64,7	61,2	31,8	10,7
12	32,8	75,5	66,1	35,0	12,9
24	38,5	90,9	85,9	38,0	15,1
30,5	45,2	93,8	96,5	38,3	16,5
48	52,1	93,8	96,5	41,0	19,6

Priebeh celej disolúcie zobrazuje Graf 16. Ako najvhodnejší excipientom sa ukázalo použitie trehalózy v koncentrácii 5%. Disolúcia kurkumínu bola takmer totožná s kontrolnou vzorkou. Použitie 5% roztokov dextransu a manitolu sa neosvedčilo. Vysvetelním pre uvoľnenie dvojnásobne väčšieho množstva kurkumínu je kryštalická vlastnosť manitolu, ktorá pravdepodobne narušila štruktúru nanočastíc. U vzorky, pri ktorej sme skúmali vplyv zmrazenia na množstvo uvoľneného kurkumínu z nanočastice, sme dospeli k neočakávanému výsledku. Množstvo uvoľneného modelového liečiva bolo nízke v porovnaní s natívnymi nanočasticami. Zdvôvodnením môže byť prípadná chyba meriania, no presné vysvetlenie si vyžaduje ďalší výskum.



Graf 16: Disolučná krivka zobrazujúca vplyv lyofilizácie a zmrazenia na disolúciu kurkumínu z nanočastíc v 1% Polysorbáte 20, kontrola zobrazuje natívne nanočastice

8. ZÁVER

Pozorovaný a porovnávaný bol vplyv koncentrácie štyroch štruktúrotvorných látok – manitolu, trehalózy, dextransu a xylitolu, na vzhľad finálneho lyofilizátu, s cieľom nájsť ich optimálnu koncentráciu a kombináciu. Nanočastice boli pripravené metódou nanoprecipitácie z lineárneho polyméru PLGA 5/5. Ako surfaktanty boli použité 0,1% roztoky Cholátu sodného a Pluronicu. Vzorky boli posudzované z hľadiska veľkosti častíc, PDI, vzhľadu a rekonštitúcie lyofilizátu.

Ako vhodný surfaktant pre lyofilizáciu sa osvedčil Cholát sodný. Pluronic sa ukazoval skôr ako nevhodný. Mechanizmus poškodenia nanočastíc, navodenie vyššej polydisperzity a tvorby agregátov u lyofilizovaných vzoriek po príprave s poloxamérom nie je presne známy. Vyžadoval by si ďalšie experimenty, čo je nad rámec tejto diplomovej práce. Ako najvhodnejšie lyoprotektívum sa javí trehalóza, u nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a Cholátu sodného. Hodnoty veľkosti nanočastíc sa pohybovali od 141,38 do 153,8 nm a PDI nepresiahla 0,2. Pomerne prijateľné hodnoty vyšli u 5% a 10% dextransu.

Výsledky stabilného experimentu poukazujú, že proces lyofilizácie nie je nutný k stabilizácii nanočastíc. Dostatočnú stabilitu nanočastíc zabezpečíme ich hlbokým zmrazením v 5% roztoku trehalózy.

Skúškou disolúcie kurkumínu, ako modelového liečiva, sme prišli k výsledku, že najvhodnejším excipientom je trehalóza.

V závere môžeme konštatovať, že použitie trehalózy v koncentrácii 5% sa u všetkých experimentoch, ktoré sú zahrnuté v tejto diplomovej práci javí ako najvhodnejšie.

9. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

Skratka	Jednotka	Význam
Tc	°C	Teplota kolapsu
Te	°C	Eutektická teplota
Tg	°C	Teplota sklovitého prechodu
SD	-	Smerodajná odchýlka
PDI	-	Index polydisperzity
PLGA 5/5 A	-	Poly(mliečna- <i>co</i> -glykolová) kyselina, zložená z monomérov kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej v pomere 50:50
TRH	-	Trehalóza
MAN	-	Manitol
DEX	-	Dextrán
XYL	-	Xylitol
PGA	-	Kyseliny polyglykolová
PLA	-	Kyselina polymliečna
PLGA	-	Poly(mliečna- <i>co</i> -glykolová) kyselina
CholNa	-	Cholát sodný
PVA	-	Polyvinylalkohol

10. ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Kalibračná priamka kurkumínu v 1% roztoku Polysorbátu 20 meraná pri 425 nm.....	27
Graf 2: Vplyv koncentrácie roztoku manitolu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Cholátu sodného, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.....	30
Graf 3: Vplyv koncentrácie roztoku trehalózy na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Cholátu sodného, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.....	31
Graf 4: Vplyv koncentrácie roztoku manitolu a trehalózy na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Cholátu sodného, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.....	33
Graf 5: Vplyv koncentrácie roztoku dextransu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Cholátu sodného, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.....	34
Graf 6: Vplyv koncentrácie roztoku xylitolu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Cholátu sodného, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.....	35
Graf 7: Vplyv koncentrácie roztoku manitolu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Pluronicu, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.....	38
Graf 8: Vplyv koncentrácie roztoku trehalózy na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Pluronicu, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.....	39
Graf 9: Vplyv koncentrácie roztoku manitolu a trehalózy na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Pluronicu, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.....	40
Graf 10: Vplyv koncentrácie roztoku dextransu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Pluronicu, ako kontrola boli použité natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.....	42
Graf 11: Vplyv koncentrácie roztoku xylitolu na veľkosť a PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% Pluronicu, ako kontrola boli použité	

natívne nanočastice, ich veľkosť a PDI po centrifugácii.....	43
Graf 12: Vývoj veľkosti nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného pri stabilitnej štúdií, kontrola zobrazuje nanočastice skladované v čistej vode.....	46
Graf 13: Vývoj PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného pri stabilitnej štúdií, kontrola zobrazuje nanočastice skladované v čistej vode.....	47
Graf 14: Vývoj veľkosti nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Pluronicu pri stabilitnej štúdií, kontrola zobrazuje nanočastice skladované v čistej vode.....	49
Graf 15: Vývoj PDI nanočastíc pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Pluronicu pri stabilitnej štúdií, kontrola zobrazuje nanočastice skladované v čistej vode.....	50
Graf 16: Disolučná krivka zobrazujúca vplyv lyofilizácie a zmrazenia na disolúciu kurkumínu z nanočastíc v 1% Polysorbáte 20, kontrola zobrazuje natívne nanočastice.....	52

11. ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Prehľad vzoriek použitých v stabilitnej štúdií.....	25
Tabuľka 2: Prehľad základných parametrov vzoriek pre disolučný experiment	26
Tabuľka 3: Prehľad priemerných hodnôt veľkostí nanočastíc a PDI, vrátane SD, po lyofilizácii u vzoriek pripravovaných z PLGA 5/5 a roztoku Cholátu sodného.....	29
Tabuľka 4: Prehľad priemerných hodnôt veľkostí nanočastíc a PDI, vrátane SD, po lyofilizácii u vzoriek pripravovaných z PLGA5/5 a roztoku Pluronicu.....	37
Tabuľka 5: Prehľad veľkostí nanočastíc a PDI pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Cholátu sodného v závislosti na týždni pri stabilitnej štúdií.....	45
Tabuľka 6: Prehľad veľkostí nanočastíc a PDI pripravených z PLGA 5/5 a 0,1% roztoku Pluronicu v závislosti na týždni pri stabilitnej štúdií.....	48
Tabuľka 7: Disolúcia kurkumínu z lyofilizovaných nanočastíc a z nanočastíc po zmrazení a rozmrazení.....	51

12. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Lyofilizát – PLGA + CholNa + Manitol.....	30
Obrázok 2: Lyofilizát – PLGA + CholNa + Trehalóza.....	32
Obrázok 3: Lyofilizát – PLGA + CholNa + 1% Manitol a Trehalóza.....	33
Obrázok 4: Lyofilizát – PLGA + CholNa + 2% Manitol a Trehalóza.....	33
Obrázok 5: Lyofilizát – PLGA + CholNa + Dextrán.....	34
Obrázok 6: Lyofilizát – PLGA + CholNa + Xylitol.....	36
Obrázok 7: Lyofilizát - PLGA + Pluronic + Manitol.....	39
Obrázok 8: Lyofilizát – PLGA + Pluronic + Trehalóza.....	40
Obrázok 9: Lyofilizát – PLGA + Pluronic + 1% Manitol a Trehalóza.....	41
Obrázok 9: Lyofilizát – PLGA + Pluronic + 2% Manitol a Trehalóza.....	41
Obrázok 11: Lyofilizát – PLGA + Pluronic + Dextrán.....	42
Obrázok 12: Lyofilizát – PLGA + Pluronic + Xylitol.....	43

13. POUŽITÁ LITERATÚRA

¹ **FONTE, Pedro, Salette REIS a Bruno SARMENTO.** Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 2016, 225, 75-86. ISSN 0168-3659.

² **MURÁNYI, Andrej a Mária VITKOVÁ.** Lyofilizácia liečiv na báze proteínov. *Česká a slovenská farmacie*. 2014(5), 199-205.

³ **ABDELWAHED, Wassim, Ghania DEGOBERT, Serge STAINMESSE a Hatem FESSI.** *Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations*. 58. France: Elsevier B.V., 2006. ISBN 1688–1713.

⁴ *Databáze léků* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/>

⁵ **L REMMELE, Richard, Krishnan SAMPATHKUMAR a William J CALLAHAN.** Development of Stable Lyophilized Protein Drug Products. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012, 13(3), 471-496. ISSN 1873-4316. Dostupné z: doi:10.2174/138920112799361990

⁶ **V. DATE, Praveen, Abdul SAMAD a Padma V. DEVARAJAN.** Freeze Thaw: A Simple Approach for Prediction of Optimal Cryoprotectant for Freeze Drying. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2010, 11(1), 304-313. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-010-9382-3

⁷ **Searles J., Carpenter J.F., Randolph T.W.** The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *J.Pharm. Sci.* 2001, 90(7), 860-871.

⁸ **J.A.Searles, J.F.Carpenter, T.W. Randolph:** The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *J.Pharm.Sci.* 2001, 90(7), 860-871.

⁹ **TANG, Xiaolin (Charlie) a Michael J. PIKAL.** Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharmaceutical Research*. Plenum Publishing Corporation, 2004, **21**(2), 191_200. Dostupné z: doi:0724-8741/04/0200-0191/0

¹⁰ **Patel S. M., Nail S. L., Pikal M. J., Geidobler R., Winter G., Hawe A., Davagnino J., Gupta S. R.,** Lyophilized drug product cake appearance: what is acceptable?. *J. Pharm. Sci.* 2017, 106(7), 1706-1721, ISSN: 0022-3549.

¹¹ **Esfandiary R., Gattu S. K., Stewart J. M., Patel S. M.,** Effect of freezing on lyophilization process performance and drug product cake appearance. *J. Pharm. Sci.* 2016, 105, 1427-1433.

¹² **BARLEY, John.** Basic Principles of Freeze Drying. *SP Scientific* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics/>

¹³ **REY L., May J.C. (Eds):** Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical And Biological Products. 2nd Ed, 2004, s. 618, CRS Press, ISBN: 0-8257-4868-9. BEUREL G.A., Global validation of freeze-drying cycle parameters by using integral HFT systems, s. 524-531.

¹⁴ Lyofilizátory. *Biotrade* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://www.biotrade.cz/lyofilizatory-3k>

¹⁵ Aplikacní možnosti lyofilizace a příklady současné instrumentace. *Pragolab* [online]. 25. 1. 2021 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://www.pragolab.cz/aplikacni-moznosti-lyofilizace-a-priklady-soucasne-instrumentace>

¹⁶ **HIRSJÄRVI, Samuli, Leena PELTONEN a Jouni HIRVONEN.** Effect of Sugars, Surfactant, and Tangential Flow Filtration on the Freeze-Drying of Poly(lactic acid) Nanoparticles Samuli. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2009, **10**(2), 488-494. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-009-9236-z

¹⁷ **Layre A.-M., Couvreur P., Richard J., Requier D., Eddine Ghermani N. and Gref R.,** Freeze-Drying of composite core-shell nanoparticles, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2006, s.839-846, ISSN: 0363-9045 print / 1520-5762 online

¹⁸ **Sinko P.J. (Ed):** Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences, 6th edition, 2011: Philadelphia, Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer Business, s.645, ISBN: 978-0-7817-9766-5. States of matter, s.17-54.

¹⁹ **Rowe R.C., Sheskey P.J., Quin M.E. (Eds.):** Handbook of pharmaceutical excipients, 6th Ed., 2009, London: Pharmaceutical Press and the American Pharmacist Association, s. 888, ISBN: 978-0-8536-9792-3, s.295-296.

²⁰ **Horn J., Tolardo E., Fissore D., Friess W.:** Crystallizing amino acids as bulking agents in freeze-drying. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018, 132, s.70-82, ISBN: 0939-6411.

²¹ **MITRA, Ashim, LEE, Chi H. a CHENG, Kun.** Advanced drug delivery. Hoboken, N.J. : Wiley, 2014. ISBN 9781118662830.

²² **REIS, Catarina Pinto, et al.** Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2006, 2.1: 8–21. ISSN 1549-9634.

²³ **TAMMAM, Salma N., AZZAZY, Hassan M. E. a LAMPRECHT, Alf.** Biodegradable particulate carrier formulation and tuning for targeted drug delivery. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2014, 10: 1–23. ISSN 1550-7041.

²⁴ **ROBERTSON, James D., et al.** Purification of nanoparticles by size and shape. *Scientific reports*. 2016, 6.1: 1–9. ISSN 2045-2322.

²⁵ **BEHDANI, Behrouz, et al.** Shape-based separation of micro-/nanoparticles in liquid phases. *Biomicrofluidics*. 2018, 12.5: 051503-2–26. ISSN 1932-1058.

²⁶ **FORNAGUERA, Cristina a SOLANS, Conxita.** Analytical methods to characterize and purify polymeric nanoparticles. *International Journal of Polymer Science*. 2018, 2018: 1–10. ISSN 1687-9430.

²⁷ **VAUTHIER, Christine a BOUCHEMAL, Kawthar.** Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 2009, 26.5: 1025-1058. ISSN 1573-904X.

²⁸ **FORNAGUERA, Cristina a SOLANS, Conxita.** Characterization of polymeric nanoparticle dispersions for biomedical applications: Size, surface charge and stability. *Pharmaceutical nanotechnology*. 2018, 6.3: 147-164. ISSN 2211-7393.

²⁹ **BHATTACHARJEE, Sourav.** DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016, 235: 337-351. ISSN 1873-4995.

³⁰ **JENA, SAMPREETI, Kumar N.S.KRISHNA, Suryanarayanan RAJ a Aksan ALPTEKIN.** Stability of Lyophilized albumin formulations: Role of excipient crystallinity and molecular mobility. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 2019, 569. ISSN 0378-5173.

³¹ **BJELOŠEVIĆ, Maja, Alenka ZVONAR POBIRK, Odon PLANINŠEK a Pegi Ahlin GRABNAR.** Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 2020, 576. ISSN 0378-5173.