

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické technológie

Kandidát Mgr. Jana Kubačková

Školiteľ Assoc. Prof. Jarmila Zbytovská, Mgr., Dr. rer. nat.

Konzultant PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Názov dizertačnej práce Príprava farmaceutických formulácií na bázi polymerných a lipidických nosičů

Nanomedicína umožňuje aplikáciu nanonosičov, ktorých úlohou je podávanie liečiv s cieľom dosiahnutia na mieru prispôsobenej terapie. Úlohou nanonosičou je medzi inými aj umožniť riadené uvoľňovanie liečiva, miestne špecifickú distribúciu a ochranu účinnej látky. Z viacerých nanoplatforiem dostupných na distribúciu liečiva sa táto práca zameriava na biokompatibilné a biologicky odbúrateľné polyméry a lipidy. Tieto materiály boli formulované tak, aby bolo umožnené cielečné intracelulárne dodanie, dodanie liečiva málo rozpustného vo vode a dodanie senzitivnej makromolekuly.

V štúdií s biologicky odbúrateľným polymérom nanomateriálom sme pracovali s experimentálnymi polymérmi kyseliny poly(mliečnej-ko-glykolovej) (PLGA). Formulácie boli optimalizované na zacielenie do fagocytujúcich makrofágov, t.j. nanočastice s veľkosťou do 300 nm a negatívnym povrchovým nábojom. Na tento účel sa testovali dva lineárne a jeden rozvetvený PLGA polymér v kombinácii s jednou zo štyroch povrchovo aktívnych látok v nízkej koncentrácii (0,1 až 1%). Tieto PLGA polyméry boli formulované do nanočastíc pomocou nanoprecipitácie (NPM) alebo emulzne odparovacej metódy (ESE) s enkapsulovaným hydrofilným fluorescenčným farbivom Rhodamín B. Najnižšia testovaná koncentrácia povrchovo aktívnej látky (0.1%) bola dostatočná na vytvorenie negatívne nabitých nanočastíc s veľkosťou približne 200 nm pomocou NPM. ESE poskytla menšie častice vo veľkosti približne 100 nm, keď sa použil 1% roztok povrchovo aktívnej látky, a väčšie nanočastice, > 200 nm, pri 0.1% povrchovo aktívnej látky. Zvýšená koncentrácia použitej povrchovo aktívnej látky teda viedla k efektívnejšiemu zníženiu veľkosti častíc pri použití ESE, nie v prípade NPM. Uvoľňovanie Rodamínu B bolo testované v troch rôznych médiách (izotonický solný roztok a pufrované solné roztoky s pH 4.5 a 7.4). Experiment bol realizovaný s nanočasticami pripravenými pomocou NPM zo všetkých troch experimentálnych polymérov kombinovaných s 0.1% Pluronic F127. U všetkých polymérov bolo pozorované rýchle

uvoľňovanie (90% Rodamínu B za 12 hodín) v izotonickom prostredí s pH 7.4. V ostatných médiách bolo v priebehu 12 hodín uvoľnených menej ako 50% tohto fluorescenčného farbiva. Tento trend pravdepodobne súvisí so spontánnym cyklickým bobtnaním pozorovaným u experimentálnych polymérov pri pH 7.4. Je pravdepodobné, že bobtnanie urýchlilo uvoľňovanie hydrofilného farbiva Rodamín B.

Obdobné metódy prípravy boli implementované pri príprave lipidických nanočastíc. Lipidické nanočastice majú schopnosť zvýšiť rozpustnosť liečiv málo rozpustných vo vode, ako je napríklad indometacín. Toto protizápalové liečivo bolo enkapsulované do nanoštrukturovaných lipidických nosičov založených na tuhých lipidoch, buď kyseline stearovej alebo glycerol monostearáte. Prídavok tekutého lipidu, izopropyl myristátu, podporil vytvorenie neštrukturovaného matrix tohto nosiča, ako to bolo ohodnotené pomocou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie. Nanoštrukturované lipidické nosiče založené na kyseline stearovej boli formulované pomocou NPM a výsledné nanočastice merali 175 nm s povrchovým zeta potenciálom okolo -35 mV. Rozpustnosť indometacínu v tejto formulácii bola 5-krát vyššia ako jeho rozpustnosť vo vode. Nanoštrukturované lipidické nosiče založené na glycerol monostearáte mali veľkosť 140 nm a povrchový zeta potenciál približne -45 mV. Boli pripravené metódou ESE a zvýšili rozpustnosť indometacínu približne 10-krát.

Ďalší skúmaný nanosystém na distribúciu liečiv je taktiež založený na lipidoch a je všeobecne používaný pre orálne podanie. Skúmané samo-nanoemulgujúce systémy pre distribúciu liečiv (SEDSS) boli založené na excipientoch, ktoré otvárajú tesné spoje (tzv. tight junctions) medzi enterocyty. Tieto excipienty zvyšujúce intestinálnu permeabilitu boli využité na lokálnu distribúciu oligonukleotidu cez intestinálny bunkový model Caco-2. Fluorescenčne značený oligonukleotid vytvoril iónové páry s jedným z testovaných kationických lipidov, bol použitý buď dimethyldioctadecylammonium bromid (DDAB) alebo 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propán (DOTAP). Výsledné hydrofóbne komplexy boli enkapsulované do jednej z dvoch testovaných SEDSS formulácií. Obe tieto SEDSS formulácie majú schopnosť sa dispergovať bezprostredne po kontakte s vodným prostredím na nanoútvary o veľkosti približne 200 nm, avšak líšia sa povrchovým nábojom na neutrálne a negatívne nabité SEDSS. Neutrálne SEDSS poskytujú lepšiu ochranu senzitivnému oligonukleotidu v prostredí nukleáz, konkrétne 58% oligonukleotidu ostáva intaktných v porovnaní s 16% v prípade negatívne nabitého SEDSS. Aby sa predĺžil protektívny efekt toho systému na oligonukleotid, do formulácie bol pridaný orlistat, inhibítor lipáz, ktorý spomalil lipolýzu SEDSS. Obidve formulácie zvýšili permeabilitu oligonukleotidu cez Caco-2

monovrstvu do lamina propria. Zvýšenie permeability korelovalo so znížením transepiteliálnej rezistencie, ktorá bola výraznejšie u neutrálnych SEDDS.

V práci sme optimalizovali PLGA nanočastice k tomu, aby pôsobili ako sľubný systém na distribúciu liečiv intracelulárne do makrofágov. Nanoštrukturované lipidické nosiče potvrdili svoj potenciál v zvyšovaní rozpustnosti slabo vo vode rozpustného indometacínu. SEEDS založené na lipidoch umožnili permeáciu oligonukleotidu cez intestinálny *in vitro* model. Nanosystémy na distribúciu liečiv ponúkajú množstvo formulačných prístupov, ktoré umožnia naplno využiť potenciál podávaného liečiva.