

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE

**STANOVENÍ OSMOTICKY AKTIVNÍCH
DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ OLIGOESTEROVÝCH
NOSIČŮ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Antonín Faulkner

Hradec Králové, 2008

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně pod vedením školitele a použil jen literaturu a prameny uvedené v seznamu literatury.

Hradec Králové, 17.3.2008

Antonín Faulkner

Děkuji vedoucímu práce Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za odborné vedení při zpracování diplomové práce a za poskytování cenných rad.

Souhrn

V práci se pojednává o interakci oligoesterových nosičů, založených na kopolymeru kyseliny DL-mléčné a glykolové, s hydrofilním médiem. Výsledkem interakce jsou jevy degradace, eroze a bobtnání nosiče. Cílem práce bylo stanovit ve vodě rozpustné, výrazně osmoticky aktivní degradační produkty vzniklé hydrolyzou v matricích a nalézt souvislost mezi jejich koncentrací a změnami bobtnání v závislosti na čase. Experimenty proběhly se čtyřmi druhy větvených polymerů, které se lišily větvicí složkou a její koncentrací. Byly vybrány nosiče, u nichž se předpokládalo výrazné maximum stupně bobtnání během jejich třítydenního sledování. Metoda zahrnovala gravimetrické sledování eroze a bobtnání matric a alkalimetrické stanovení kyselých degradačních produktů, které byly získány rozdělením hydrofilních a lipofilních frakcí matrice mezi organickou a vodnou fází. Byla prokázána těsná korelace mezi bobtnáním matric a koncentrací v nich obsažených hydrofilních oligoesterů.

Summary

This work deals with interaction of oligoester carriers based on DL-lactic-co-glycolic acid, with hydrophilic medium. The interaction results with phenomena of degradation, erosion and swelling of delivery system. The purpose of this work was to quantify water soluble, high osmotically active degradation products generated via hydrolysis in the matrices, and to find a connection between concentration of degradation products and changes of swelling in time. There were experiments with four types of branched polymers, which differ in branching unit and its concentration. There were chosen delivery systems, where in the three week observation outstanding maximum of swelling grade was expected. This method included gravimetric monitoring of erosion and swelling of matrices and alkalimetric quantifying of acid degradation products. The last parameter was obtained by the separation of hydrophilic and lipophilic fractions of matrices between organic and aqueous phase. Narrow correlation between matrices swelling and concentration of hydrophilic oligoesters generated in matrices was proven.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Příprava PLGA polymerů	8
2.2	Mechanismy degradace.....	8
2.2.1	Velikost, tvar a porozita.....	11
2.2.2	Vliv přítomnosti iontových léčiv	11
2.2.3	Iniciátory polymerace	11
2.3	Užití PLGA implantátů jako nosičů s řízeným uvolňováním léčiv	12
2.3.1	Vlákna	12
2.3.2	Tablety	13
2.3.3	Implantáty připravené extruzí.....	13
2.3.4	Filmy	13
2.3.5	Další implantovatelné systémy	14
2.4	Mikročástečkové nosiče léčiv.....	14
2.4.1	Příprava částicových systémů	14
2.4.2	Analýza degradace částic.....	14
2.5	Kopolymery PLA, PLGA a dalších sloučenin.....	15
2.5.1	Kopolymery s polyethylenglykolem a polyethylenoxidem.....	15
2.5.2	Kopolymery s ϵ -kaprolaktonem.....	15
2.5.3	Ostatní kopolymery.....	15
2.6	Uvolňování léčiv z lékových forem založených na botnání	16
2.6.1	Dynamika průniku vody, botnání matric a tvorby gelové vrstvy v botnacích matricových tabletách	16
2.6.2	Hranice gelové vrstvy a související rozhraní	17
2.6.3	Botnání, pohyby rozhraní a uvolňování léčiva	19
2.7	Seznam použitých zkratk	21
3	CÍL PRÁCE	22
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1	Použité přístroje a chemikálie.....	23
4.1.1	Chemikálie	23
4.1.2	Přístroje	23
4.1.3	Charakteristika použitých oligoesterových nosičů	24
4.2	Stanovení stupně botnání a stupně eroze testovaného nosiče.....	25
4.2.1	Příprava tělísek	25
4.2.2	Příprava vzorků.....	26
4.2.3	Měření	26
4.2.4	Stupeň botnání	26
4.2.5	Stupeň eroze.....	27
4.3	Stanovení karboxylového čísla	27
4.3.1	Příprava odměrného roztoku.....	27
4.3.2	Příprava indikátoru	27
4.3.3	Měření	27
4.3.4	Karboxylové číslo	28

5	VÝSLEDKY – TABULKY A GRAFY	29
6	DISKUZE	42
6.1	K tématu a zaměření práce.....	43
6.2	K degradaci nosiče 1T	44
6.3	K degradaci nosiče 3T	45
6.4	K degradaci nosiče 5T	46
6.5	K degradaci nosiče 2D.....	46
7	ZÁVĚR	48
8	LITERATURA	49

1 ÚVOD

Prvními resorbovatelnými syntetickými polymery, které byly navrženy k tělnímu použití, byly polyglykolidy, též známé jako polyglykolové kyseliny (PGA). (1) V roce 1970 našly využití jako šicí materiál Dexon. Vedle toho začal výzkum alifatických polyesterů odvozených od kyseliny mléčné, který vedl k prvním kopolymerům mléčné a glykolové kyseliny (PLGA), využitý v šicím materiálu Vicryl. (2) Stehy založené na PLGA, nevyžadující chirurgické odstranění po vyléčení, vydláždily cestu mnoha dalším užitím, jež jsou známé jako dočasné terapeutické aplikace, např. protetické pomůcky na časově ohraničenou dobu, zejména po čas léčby.

Rozsáhlý výzkum polymerů, kopolymerů a stereokopolymerů PLGA zavedl mnoho postupů přípravy a výroby implantátových a injekčních nosičů léčiv. Výzkumníkům netrvalo dlouho uvědomit si užitečnost biodegradabilních stehů, jako materiálu pro podání léčiv. Patent z roku 1974 popisuje pryskyřice obsahující jednotky kyseliny polyglykolové pro vodou degradující obalování a pomalé uvolňování látek. (3) Koncem osmdesátých let významně vzrostl počet patentů na implantáty a další přípravky založených na kyselině polymléčné a polyglykolové. Implantátové a injekční nosičové systémy léčiv v současné době velkou měrou závisí na degradaci a na minimu nepříznivých biologických reakcí.

Věda se zaměřila na pochopení mechanismu biodegradace, přípravu, zpracování a sterilizaci těchto polymerů. (4, 5) Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové měly velký úspěch ve výrobě nosičů léčiv, protože degradace může být v rozsahu 3 týdnů až více než rok, což závisí na složení kopolymeru a na postupu přípravy a výroby. (4, 6) Degradace probíhá rychleji u kopolymerů s poměrem 50:50 mléčné ke glykolové a s nižší molekulovou hmotností. Také snížení stupně krystalinity zrychlí degradaci vzniklého polymeru.

Schopnost PLGA polymerů rozpouštět se v různých organických rozpouštědlech a možnost tvarování do velkého počtu tvarů, napomohlo k jejich použití od šicích materiálů přes implantáty, mikročástice, nanočástice a vlákna, ke stále rostoucímu počtu přípravků s kontrolovaným uvolňováním. PLGA je nepochybně polymer volby v nové oblasti tkáňového inženýrství, může sloužit jako kostra pro růst nových orgánů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Příprava PLGA polymerů

PLGA polymery nelze zakoupit jako jednoduché sloučeniny, situace je složitější, protože rodina alifatických PLGA polyesterů zahrnuje téměř nekonečný počet sloučenin. Ty se liší zejména konstitucí, rozložením chirálních a achirálních opakujících se jednotek a molekulovou hmotností. Mezi těmito sloučeninami můžeme nalézt amorfní, semikrystalické či voskovité polymery s rozličnou životností. (7) Bylo zkoumáno mnoho těchto forem polymerů, jen málo z nich se však ukázalo vhodných pro využití na biodegradabilní systémy s léčivy.

Syntézu lze provést polykondenzací enantiomerů kyseliny mléčné s kyselinou glykolovou. Tato syntéza se většinou provádí za přítomnosti katalyzátorů a vede ke sloučeninám o nižší molekulové hmotnosti. Sloučeniny o vyšší molekulové hmotnosti lze získat syntézou z oligomerů připravených polykondenzací a následnou kondenzací pomocí činidla připojujícího molekuly k hlavnímu řetězci. Nejvyužívanější cestou přípravy se stala polymerace za otevření kruhu z 1,4-dioxan-2,5-dionů, což jsou heterocyklické monomery složené ze dvou jednotek kyseliny mléčné nebo dvou jednotek kyseliny glykolové. Tento typ polymerace vyžaduje přítomnost iniciátorů.

Univerzální metoda syntézy PLGA polymerů neexistuje. Je třeba brát v úvahu, že použitá metoda syntézy (modifikace konců řetězce, přítomnost iniciátorů a další nečistoty) ovlivní vlastnosti připraveného polymeru.

2.2 Mechanismy degradace

Předmětem mnoha diskuzí byla otázka, zda degradace PLGA polymerů ve vodném prostředí (in vivo nebo v médiu) závisí na enzymech, nebo jestli se jedná o děj čistě chemický. V současné době se většina kloní k názoru, že degradace alifatických polyesterů ve styku s živými tkáněmi či tělními tekutinami, které obsahují enzymy, probíhá chemickou hydrolyzou esterových vazeb. Že se jedná o enzymatickou degradaci bychom neměli tvrdit, dokud přesvědčivě nedokážeme úbytek hmoty a změny velikosti bez poklesu molárního množství, protože enzymy jen stěží proniknou hluboko do husté polymerní matrice. Může však nastat případ, kdy je rychlost povrchové

degradace vyšší než rychlost difuze vody do hmoty polymeru, nastává povrchová eroze a je možnost záměny mezi povrchovou, enzymatickou degradací a povrchovou, chemickou, hydrolytickou degradací. To je však nepravděpodobné pro PLGA polymery, kde je příjem vody vždy rychlejší než rychlost degradace.

Absence útoků enzymů na polymerní systémy však neznamená, že hydrolýza je jednoduchý proces. Z makroskopického pohledu se degradace alifatických polyesterů jeví jako homogenní (objemová eroze) (8), avšak v několika málo případech předpokládáme povrchovou erozi (5), a to zejména z toho důvodu, že viskozimetricky byla změřena změna molekulové hmotnosti. V posledních deseti letech významně pokročilo pochopení hydrolytické degradace PLGA díky použití velikostně vylučovací chromatografie (SEC), která odhalila přítomnost dvou populací částečně degradovaných PLGA systémů poměrně větších rozměrů. Tento objev vedl k úvodu do konceptu heterogenní degradace vztažené k jevu difuze-reakce-rozpouštění. (9, 10)

Stručně vyjádřeno, pokud se systém PLGA umístí do vodného média, voda začne pronikat do vzorku a započne hydrolytické štěpení esterových vazeb. Každé rozštěpení esterové vazby dává vznik nové koncové karboxylové skupině, která má schopnost katalyzovat další hydrolýzu esterových vazeb, jak se předpokládá v případě mechanismu homogenní degradace. (8) Částečně degradované makromolekuly zůstávají po určitou dobu, bez ohledu na jejich vlastnosti, nerozpustné v okolním vodném médiu a degradace probíhá homogenně. Jakmile molekulová hmotnost částečně degradovaných makromolekul poklesne natolik, že se rozpustí ve vodném médiu, započne difuze v celém objemu, rozpustné sloučeniny putují k povrchu a pryč, přičemž pokračují v degradaci. Tento proces, který je kombinací jevů difuze, chemické reakce a rozpouštění, má za následek rozdíly mezi rychlostí degradace na povrchu a uvnitř matrice. Oligomery, které se nacházejí na povrchu, je mohou opustit před konečnou degradací, což je v kontrastu s těmi, které jsou hluboko uvnitř. Výsledkem je nižší autokatalytický účinek na povrchu, kde je nedostatek COOH skupin ve srovnání s celým objemem. Neutralizace koncových karboxylů v pufovaném prostředí může také přispívat ke snížení rychlosti degradace na povrchu. Tento mechanismus byl dobře prozkoumán díky vytváření dvou populací částečně degradovaných makromolekul s rozdílnou molekulovou hmotností a tudíž byly vyzorovány bimodální distribuce na SEC. Byly zkoumány i duté struktury, zejména z amorfních polymerů. (11, 12)

Krystalizující polymery totiž neumožňují vytvořit duté struktury kvůli krystalizaci degradačních produktů. (13)

Objev tohoto jevu pomohl pochopit účinky mnoha faktorů, zejména se jedná o stavbu matrice, chemické složení a konfiguraci, molární hmotnost, velikost a tvar, rozložení chemicky reaktivních sloučenin uvnitř matrice a vlastnosti degradačního média. (14) Přispěl též při vysvětlování vlivu vymezeného léčiva na charakteristiky degradace a uvolňování, které závisí na hydrofilně-lipofilní rovnováze. Když uvážíme vzájemnou souvislost degradace a uvolňování léčiva z nosičových systémů léčiv, všechny tyto faktory pak také ovlivňují charakteristiky uvolňování.

Následující faktory tedy mají vliv na chování PLGA polymerů ve vodném médiu a na uvolňování léčiva: chemická stavba, molekulová hmotnost, rozložení molekulové hmotnosti, rozložení komonomerních jednotek, rozložení chirálních jednotek, řetězcové poruchy, přítomnost sloučenin o nízké molekulové hmotnosti (monomery, oligomery, rozpouštědla, iniciátory, léčiva), průběh zpracování, morfologie (popouštění, zmražení, mikrostruktury, zbytkové napětí, porozita), historie uchovávání, tvar a velikost, podmínky stárnutí (teplota, iontová síla, iontová výměna, pH), absorpce a adsorpce sloučenin (voda, lipidy, ionty), změny fyzikálních vlastností (tvar, velikost, difuzní koeficient, napínání, praskliny) a přítomnost enzymů. (7)

V souvislosti s obecným mechanismem degradace PLGA polymerů existují 4 hlavní faktory, které podmiňují jev difuze-reakce-rozpouštění: 1) rychlostní konstanta hydrolýzy esterové vazby, 2) difuzní koeficient vody uvnitř matrice, 3) difuzní koeficient řetězcových fragmentů uvnitř matrice, 4) rozpustnost degradačních produktů, zvláště oligomerů, v médiu obklopujícím polymer. Dalšími faktory jsou teplota, přísady v polymerní matici a okolním médiu, pH, pufrovací kapacita, velikost a průběh zpracování, zmražení nebo popouštění, sterické bránění, porozita a další proměnné, které ovlivňují hlavní faktory uvedené výše. (10)

Účinky chemického složení, molekulové hmotnosti, rozložení molekulové hmotnosti a opakujících se jednotek, krystalinity, jsou v literatuře dobře popsány. Mezi nově studované vlivy se řadí tyto sekundární faktory: velikost, tvar a porozita, iontový charakter vymezeného léčiva, použitý iniciátor při syntéze polymeru.

2.2.1 Velikost, tvar a porozita

Velikost polymerních vzorků je v literatuře občas zmíněna. (15) V nedávné době Grizzi et al. vysvětlil, na základě heterogenního mechanismu degradace, rozdíly v rychlostech degradace. Srovnáním degradačních charakteristik filmů, prášků a mikrosfér, zhotovených ze stejné šarže polymeru PLA₅₀ (racemát kyseliny polymlečné) přesvědčivě dokázal, že čím je menší velikost tělísek z polymeru, tím je pomalejší rychlost degradace. (16) Z toho lze též odvodit, že porézní systémy budou degradovat pomaleji než neporézní, zejména pokud rozměry zamýšleného zařízení budou v řádu milimetrů.

2.2.2 Vliv přítomnosti iontových léčiv

V souladu s heterogenním mechanismem degradace, jakákoliv elektrostatická interakce mezi PLGA maticí a kyselou, zásaditou či amfoterní molekulou léčiva, významně ovlivňuje degradační charakteristiky změnou acidobazické rovnováhy v matici, díky přítomnosti koncových karboxylových skupin. V případě kyselých léčiv lze očekávat rychlejší hydrolýzu esterových vazeb. Co se týče bazických léčiv, byly objeveny dva účinky: když je léčivo v nadbytku oproti kyselým koncům řetězců, probíhá zásaditá katalýza štěpení esterových vazeb, v opačném případě je rychlost degradace snížena. (17)

2.2.3 Iniciátory polymerace

Poslední dobou se pozornost zaměřuje na možnost ovlivnění degradačních charakteristik některých PLGA polymerů iniciátory degradace. Významné rozdíly v rozložení opakujících se jednotek byly pozorovány u stereokopolymerů jako PLA₅₀. (18) Na druhou stranu se předpokládalo, že oktoát cínatý (stannum-[bis(2-ethylhexanoát)]) způsobuje změny koncových alkoholických skupin prostřednictvím jejich esterifikace kyselinou oktanovou, což produkuje hydrofobní rezidua, která znemožňují čištění PLGA pomocí precipitace z organického rozpouštědla s ethanolem či vodou. (19) V případě použití kovového zinku nebo mléčnanu zinečnatého se takové změny neobjevují. Jestli se podobné jevy mohou objevit i v případech malých částic, jako mikro a nanočástice nebo při použití alkoholů jako iniciátorů, není ještě jasné.

Jednotlivé články obvykle neposkytují přesné informace o struktuře a historii přípravků založených na PLGA polymerech. Proto je dost obtížné poznat, které z výše uvedených faktorů mají vliv na charakteristiky degradace a uvolňování. Je důležité, aby výzkumníci měli na paměti, že charakteristiky degradace a uvolňování pro PLGA polymery závisí na podmínkách experimentu a historii vzorku daleko více než u jiných polymerních matic.

Pro modelování za podmínek *in vivo* je doporučováno brát v úvahu fyziologické pH, iontovou sílu, osmolaritu a teplotu, jak je to jen možné. Vhodnou volbou je použít 0,13 M isoosmolární fosfátový pufr o pH 7,4 a teplotě 37 °C. Pokud hrozí riziko interakce mezi léčivem a fosfátovými ionty, nabízí se použít jiný pufr o pH 7,4. Pokud mohou fosfátové ionty narušit systém, potom je možné použití jiného isoosmolárního pufru o pH 7,4, včetně média buněčných kultur. Při použití takového média je třeba mít na paměti, že v něm mohou být přítomny látky, které mohou difundovat, změnit fyzikální podmínky matrice a chemii koncových skupin a takto ovlivnit celé chování díky souvisejícím faktorům, které byly uvedeny výše.

2.3 Užití PLGA implantátů jako nosičů s řízeným uvolňováním léčiv

Implantáty využívané jako nosiče pro řízené uvolňování léčiv se liší od přípravků, jejichž funkce je primárně strukturní. Strukturní implantáty mohou nacházet užití jako ortopedické přípravky (20), v neuronální transplantaci (21), jako intravaskulární stenty (22) a na opravy kloubní chrupavky (23). Implantáty připravované z PLGA polymerů jsou většinou ve tvaru vláken, lisovaných tablet, tělísek vyrobených extruzí a filmů.

2.3.1 Vlákna

Biodegradabilní vlákna jsou obvykle připravována z kyseliny poly-L-mléčné (PLA₁₀₀) zvlákněním a lze připravit celistvá (24) i dutá vlákna (25). Tyto implantáty mohou být podkožně podány menšími jehlami, než těmi, které se používají pro podání ostatních implantátů. Pomocí metody fázového přechodu v kombinaci se zvlákněním lze připravit systémy dutých vláken o široké škále porozit.

Nosiče léčiv se zhotovují napuštěním roztoku léčiva do dutiny vláken a utěsněním jejich konců. Uvolňování léčiva silně závisí na struktuře membrány ve stěně dutého vlákna.

Přestože jsou tato vlákna zajímavá z hlediska snadnosti podání a jejich schopnosti řízeného uvolňování, každý rezervoárový systém založený na vodném roztoku léčiva s sebou nese riziko poškození membrány a uvolnění celé dávky léčiva najednou.

2.3.2 Tablety

Docela běžnou metodou přípravy implantátů ve formě tablet či pelet z PLGA polymerů je přímé lisování, a to buď za normální, nebo zvýšené teploty a s rozpouštědlem či bez něj. Mnoho z těchto lisovacích metod je založeno na klasických farmaceutických tabletovacích postupech. Metoda bez přidání rozpouštědla je vhodná jen pro polymery s nižší molekulovou hmotností, které mají nižší teploty skelného přechodu a umožní tak splynutí jednotlivých částic polymeru a léčiva tlakem. (26)

Další variantou tohoto postupu je zhotovení dvouvrstvého implantátu. Ten sestává z jedné vrstvy samotného polymeru a druhá vrstva je kombinací polymeru a léčiva. (27)

2.3.3 Implantáty připravené extruzí

Nosičové systémy založené na vytlačování jsou obvykle připravovány z koncentrovaného roztoku polymeru. Rozpouštědlem je např. aceton, ve kterém je léčivo rozpuštěno či dispergováno. (28) Pevné materiály se zase zpracovávají za vyšších teplot. (29) Tyto přípravky jsou obvykle ve tvaru válečků a mohou být použity jako monolitické matrice nebo se potahují vrstvou PLA, která omezí degradaci a následné uvolňování léčiva. Nepotahované válečky, zvláště s vyšší dávkou léčiva kolem 30-40 %, uvolňují léčivo hlavně difuzí. Potahované válečky s obsahem léčiva 15 % a méně, vykazují osmoticky řízené uvolňování.

2.3.4 Filmy

Filmy s obsahem PLA se mohou připravit jednoduchým rozpuštěním polymeru ve vhodném rozpouštědle; přidáním požadovaného léčiva vznikne společný roztok či suspenze, která se odlije do požadovaného tvaru a rozpouštědlo se nechá odpařit. Pro přípravu takovýchto filmů se používá aceton, chloroform, dichlormethan, ethylacetát a další. (30, 31)

2.3.5 Další implantovatelné systémy

Méně typické formy PLGA implantátů zahrnují tobolky, které prasknou a uvolní léčivo v předem určeném čase, a implantáty, které se tvoří in situ. (32, 33)

2.4 Mikročásticové nosiče léčiv

Zdaleka největší snahou je využít PLGA polymery jako nosiče léčiv v mikročásticových systémech. Obrovskou výhodou těchto přípravků je uvolňování souvislé dávky léčiva po dlouhou dobu. Ta se obvykle pohybuje v řádu týdnů až měsíců. Jakmile je dávka podána, je již téměř nemožné léčbu přerušit. (34)

2.4.1 Příprava částicových systémů

Většina postupů je založena na odpařování rozpouštědla. Dále se uplatňují enkapsulace, metody založené na fázové separaci a koacervaci, sprejové sušení. Výběr postupu přípravy závisí zejména na vlastnostech léčiva, hlavně jeho rozpustnosti v organické či vodné fázi. (34)

2.4.2 Analýza degradace částic

Uvolňování léčiva z mikročástic je úzce spojeno s degradací PLGA polymeru. Přestože existuje celá řada testovacích metod, oficiální metoda disoluce již byla zavedena. (35)

Protože uvolňování léčiva přímo závisí na degradaci polymeru, je nutné zjistit změny molekulové hmotnosti polymeru během jeho degradace. To se provádí vyjmutím mikročástic z média ve stanovených intervalech a jejich rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle, např. dichlormethanu či chloroformu. Přestože se průměrná molekulová hmotnost během degradace dá zjistit měřením viskozity, většinou se používá SEC nebo gelová permeační chromatografie, která poskytne nejen průměrnou molekulovou hmotnost, ale celé rozložení molekulové hmotnosti. (36)

Vzhledem k tomu, že degradační produkty PLGA, kyselina mléčná a glykolová, jsou kyselé, s časem klesá pH v nosičovém systému a v prostředí, které jej obklopuje. Studie prokázaly značný pokles pH degradačního média (2 ml fosfátového pufru) ze 7,4 na 3 ve 28 dnech v systému obsahujícím 20 mg částic, které byly připraveny z nízkomolekulárního PLGA polymeru. Kyselejší prostředí pak přispívá k rychlejší

degradaci částic a může představovat i stabilitní riziko pro inkorporované léčivo, zejména proteiny. (37)

2.5 Kopolymery PLA, PLGA a dalších sloučenin

2.5.1 Kopolymery s polyethylenglykolem a polyethylenoxidem

Současný výzkum se zaměřil na spojení polyethylenglykolu (PEG) nebo polyethylenoxidu (PEO) s PLA nebo PLGA. Struktura PEG a PEO je shodná, jako PEG se většinou označují polymery s molekulovou hmotností do 20 000, PEO se týká polymerů o větší molekulové hmotnosti. Zájem o tyto kopolymery je dán touhou zkombinovat hydrofilní a biokompatibilní vlastnosti PEG s degradabilitou PLGA. V závislosti na složení výsledného kopolymeru lze získat materiál s vlastnostmi hydrofobními až hydrofilními a nedegradabilní až degradabilní.

V zájmu pozornosti stojí zejména triblokové ABA kopolymery s centrálním PEG nebo PEO a dvěma koncovými řetězci PLA nebo PLGA. (38)

2.5.2 Kopolymery s ϵ -kaprolaktonem

Byla zkoumána řada kopolymerů s různým zastoupením PGA, PLA a ϵ -kaprolaktonu. Rychlost degradace a další vlastnosti lze ovlivnit podílem jednotlivých složek v terpolymeru. Tyto polymery degradují v celém objemu a během degradace lze pozorovat krystalickou fázi složenou zejména z poly-L-mléčné kyseliny a amorfni, která sestává zejména z ϵ -kaprolaktonu. (39)

2.5.3 Ostatní kopolymery

Dalšími zkoumanými kopolymery jsou kopolymery s glycinem, kyselinou p-hydroxybenzoovou, p-hydroxyskořicovou a aspartovou. Tyto materiály si zachovávají biodegradabilní vlastnosti, ale liší se od samotných PLA či PGA v degradaci a uvolňování. (40)

2.6 Uvolňování léčiv z lékových forem založených na botnání

Botnání matric je významné v oblasti nosičů léčiv. V literatuře je tento jev popsán odlišně. Například Peppas používá termín uvolňování řízené botnáním, Lee jej nazývá hydrogelovými nebo polymerními matricemi, které se vyznačují pohyblivými hranicemi, Ford navrhuje termín hydrofilní matricové tablety. Tyto systémy lze také nazývat botnací matricové tablety, což zohledňuje i postup výroby. (41)

2.6.1 Dynamika průniku vody, botnání matric a tvorby gelové vrstvy v botnacích matricových tabletách

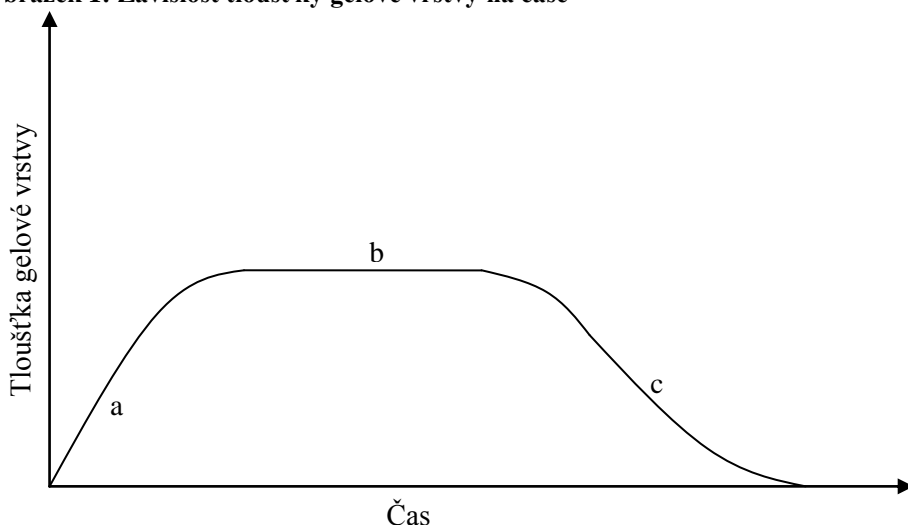
Botnací matricové tablety jsou aktivovány vodou, řízené uvolňování léčiva závisí na interakcích vody, polymeru a léčiva. Prvním krokem, který vede k botnání matrice a disoluce léčiva, je průnik vody do matrice. Přítomnost vody snižuje teplotu skelného přechodu polymeru (např. pro hydroxypropylmethylcelulózu, HPMC, ze 184 °C na méně než 37 °C) a přetváří skelnou fázi polymeru v plastickou fázi (gelovou vrstvu). Vyšší hybnost řetězců polymeru umožňuje transport rozpuštěného léčiva. Jevy dané relaxací molekul polymeru určuje botnání či zvětšení objemu matrice. Později může ovlivnit mechanismus uvolňování léčiva z nosiče.

V závislosti na charakteristikách polymeru, část polymeru v plastické fázi, na povrchu matrice, může dosáhnout koncentrace rozpletení řetězců. Proto se liší tloušťka gelové vrstvy a matrice se rozpouští, nebo eroduje. Koncentrace, při které se dá předpokládat rozpletení řetězců, byla demonstrována v souvislosti s náhlou změnou reologických vlastností gelu. (42) Tato hodnota byla měřena pro HPMC a významně se neliší od dat získaných z modelové rovnice, která popisuje gelovou vrstvu a uvolňování léčiva. (43) Bonferoni et al. nověji ukázal spolehlivou souvislost mezi reologickým chováním HPMC gelů a jejich rychlostí eroze, což potvrzuje, že interakce polymer-polymer a polymer-voda jsou zodpovědné za strukturu gelu a jeho vnímavost k erozi. V případě hůře rozpustných léčiv ovlivňují i rychlost uvolňování. (44)

Tloušťka gelové vrstvy závisí na průniku vody, rozplétání řetězců a transferu hmoty (polymeru a léčiva) ve vodě. Na počátku je pronikání vody rychlejší než rozplétání řetězců a dochází k rychlé tvorbě gelové vrstvy. Protože naroste difuzní vzdálenost, voda začne pronikat pomaleji, tloušťka gelové vrstvy příliš nemění. V této

fázi je pronikání vody a rozplétání řetězců v rovnováze. (45) Tloušťka gelové vrstvy v botnacích matricových tabletách má tedy tři fáze: roste tehdy, když je pronikání vody nejrychlejším jevem (obrázek 1, a); zůstává konstantní, když je rychlost rozplétání řetězců shodná s penetrací (obrázek 1, b); a začne klesat, jakmile je celý objem polymeru v plastické fázi (obrázek 1, c). (43)

Obrázek 1: Závislost tloušťky gelové vrstvy na čase



Kinetika uvolňování léčiva je úzce spojena s dynamikou gelové vrstvy. Na začátku probíhá difuze dle Ficka až anomální, pokračuje od kvazi-konstantní až ke konstantní, končí kinetikou prvního řádu.

Gelová vrstva, která se utváří kolem matrice, určuje mechanismus uvolňování, hlavním zkoumaným jevem je tedy penetrace vody. Gel musí být schopen zabránit dezintegraci matrice a řídit dodatečný průnik vody. Tvorbu gelové vrstvy a následnou rychlost uvolňování léčiva řídí průnik vody, botnání polymeru, rozpustnost a difuze léčiva a eroze matrice. Řízeného uvolňování léčiva je dosaženo difuzí molekul skrz gelovou vrstvou, která se může rozpustit či erodovat. Dalším příspěvkem k transportu léčiva v gelové vrstvě je relaxace molekul polymeru. (46)

2.6.2 Hranice gelové vrstvy a související rozhraní

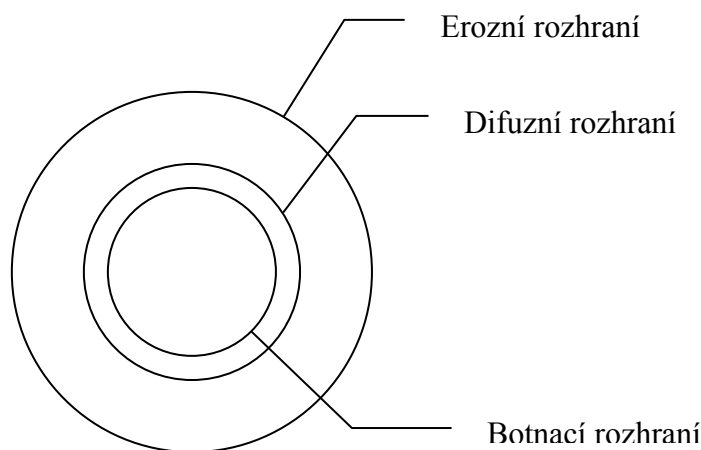
Vzhledem k hlavní roli gelové vrstvy je důležité definovat její hranice. Ty souvisejí s jednotlivými rozhraními, které oddělují rozdílné fáze matrice. Dynamika

tvorby gelové vrstvy je pak určena jejich pohyby. Tloušťka gelové vrstvy je definována rozhraním mezi matricí a disolučním médiem (erozní rozhraní), a rozhraním mezi skelnou a plastickou fází polymeru (botnací rozhraní). Chování gelové vrstvy je tedy ovlivňováno pohyby erozního a botnacího rozhraní.

Lee popsal třetí rozhraní v gelové vrstvě botnacích matric, které obsahovaly diklofenak. (47) Toto špatně rozpustné léčivo, které bylo dispergováno ve skelné fázi matrice, precipitovalo v gelové vrstvě. Tak vzniká rozhraní, nazvané difuzní, které souvisí s hranicí mezi rozpuštěným a nerozpuštěným léčivem. Jeho přítomnost je závislá na rozpustnosti a dávce léčiva. V botnacích matricových tabletách tedy předpokládáme tři rozhraní (obrázek 2):

- a) *botnací rozhraní*, hranice mezi dosud skelným polymerem a jeho plastickou fází
- b) *difuzní rozhraní*, hranice mezi pevným, dosud nerozpuštěným léčivem a rozpuštěným v gelové vrstvě
- c) *erozní rozhraní*, hranice mezi matricí a disolučním médiem.

Obrázek 2: Botnací matricová tableta a jednotlivá rozhraní



Pohyb botnacího rozhraní souvisí s rychlostí příjmu vody, pohyb difuzního rozhraní s rychlostí disoluce a pohyb erozního rozhraní s rychlostí eroze matrice. (48)

Rychlost a kinetika uvolňování léčiva z matricových HPMC tablet jsou řízeny dynamikou tloušťky gelové vrstvy, která je určena pohyby jednotlivých rozhraní. V některých případech, při použití dostatečně rozpustných polymerů, zůstává tloušťka

gelové vrstvy konstantní, v tomto případě jsou pohyby rozhraní společně synchronizovány. Při zachování konstantních podmínek vede tato situace k uvolňování nultým řádem. Vzhledem k tomu, že matrice je trojrozměrný systém, musí se brát v úvahu též zvětšování plochy uvolňování během botnání.

2.6.3 Botnání, pohyby rozhraní a uvolňování léčiva

Analýza uvolňování léčiva z botnacíh matricových tablet obvykle zahrnuje úpravu získaných dat mocninnou funkcí. Tato operace může poskytnout informace o kinetice a mechanismu uvolňování léčiva. Abychom získali kompletní představu o chování matrice během uvolňování, je zapotřebí studovat botnání. Vzhledem k tomu, že tloušťka gelové vrstvy závisí na pohybech botnacího, difuzního a erozního rozhraní, pak analýza těchto pohybů umožní vysvětlení uvolňování léčiva ve vztahu k botnání.

Přítomnost difuzního rozhraní nás nutí k přehodnocení významu poloh botnacího a erozního rozhraní pro řízení uvolňování. Nedávná měření na HPMC matricích ukázala vliv pohybů rozhraní, zejména difuzního, na kinetiku uvolňování. Bylo zjištěno, že s rostoucí tloušťkou gelové vrstvy klesá rychlost uvolňování. Vzhledem k tomu, že je obtížné zajistit synchronizaci pohybů rozhraní, kinetika uvolňování závisí na vzájemných polohách erozního, botnacího a difuzního rozhraní.

Pro kinetiku uvolňování je rozhodující vzdálenost mezi difuzním a erozním rozhraním. Tloušťka gelové vrstvy s rozpuštěným léčivem (vrstva mezi difuzním a erozním rozhraním) je pak rozhodující pro uvolňování léčiva, namísto celé tloušťky gelové vrstvy (mezi botnacím a erozním rozhraním).

Taktéž se ukázalo, že rychlost uvolňování závisí na rychlosti pohybu difuzního rozhraní. Když začalo narůstat botnací rozhraní (díky rychlejšímu pronikání vody a zvýšení porozity matrice) a difuzní rozhraní zůstalo beze změn, tok léčiva se také nezměnil. (49) Když se však zvýšila rozpustnost léčiva a začalo narůstat difuzní rozhraní, aniž by se měnilo erozní rozhraní, rychlost uvolňování se zvýšila. Zatímco pohyb difuzního rozhraní je téměř lineární, gelová vrstva je ovlivňována pohybem erozního rozhraní. Výsledkem tohoto jevu je fakt, že v botnacíh matricových tabletách je kinetika uvolňování určena pohybem erozního rozhraní a rychlost uvolňování pohybem difuzního rozhraní.

Uvolňování léčiva z botnací matricové tablety tedy zahrnuje difuzi léčiva přes gelovou vrstvu a transport léčiva díky relaxaci molekul polymeru. Rychlost difuze přes gelovou vrstvu závisí na rozpustnosti léčiva a na erozi matrice, což jsou faktory ovlivňující koncentrační gradient léčiva v gelové vrstvě. Uvolňování léčiva z botnací matricové tablety je úzce spojen s dynamikou gelové vrstvy, a to i v těch případech, kdy je rozpustnost léčiva tak nízká, že se dá předpokládat uvolňování pevných částic léčiva z rozpouštějící se vrstvy gelu. (50)

2.7 Seznam použitých zkratek

HPMC	hydroxypropylmethylcelulóza
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLA ₁₀₀	kyselina poly-L-mléčná
PLA ₅₀	racemát kyseliny polymléčné
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
SEC	velikostně vylučovací chromatografie

3 CÍL PRÁCE

V rámci diplomové práce byl zadán úkol přispět k řešení mechanismu botnání oligoesterů a polyesterů alifatických hydroxykyselin. Botnání, jako součást hydrolytických degradačních procesů, probíhá u všech oligoesterů nerovnovážně, u některých nosičů se projevuje maximálními nebo minimálními hodnotami stupně botnání jako charakteristiky procesu. Problém je komplikován současnou erozí systémů. Ke splnění cíle bylo doporučeno využít klasickou metodu separace hydrofilních vodorozpustných produktů degradace jejich rozdělováním z chloroformových roztoků do vodné fáze. Při zadání tématu se očekávalo, že v případě dostatečně shodného nebo obdobného průběhu změn koncentrace karboxylových skupin v matricích s časovým průběhem stupně botnání by bylo možno dojít ke konkrétním poznatkům o příčině a podstatě změn v rozsahu botnání biodegradabilních nosičů typu oligoesterů alifatických hydroxykyselin.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a chemikálie

4.1.1 Chemikálie

Oligoesterové nosiče (viz tabulka 1), Katedra farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Chloroform p.a., Penta Chrudim

Chlorid sodný p.a., Lachema a.s.

Hydroxid draselný p.a., Lachema a.s.

Ethanol 96%, Penta Chrudim

Methanol p.a., Lachema a.s.

Phenolphthaleinum, Zdravotnické zásobování, Říčany u Prahy

Destilovaná voda, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

4.1.2 Přístroje

Digitální váhy, KERN 440-35N (max. 400 g, d = 0,01 g)

Analytické digitální váhy, KERN ABS (max. 220 g, d = 0,1 mg)

Vakuová sušárna, HSPT200, Memmert

Horkovzdušná sušárna MEMMERT ULE 400

Biologický termostat, BT 120, Laboratorní přístroje Praha

Magnetická míchačka HEIDOLPH MR 3001

Termostatovaná třepačka Julabo HS

4.1.3 Charakteristika použitých oligoesterových nosičů

Použité polymery byly syntetizovány na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Syntéza: stupňová kopolymerace ternární směsi složené z ekvimolárního podílu kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové doplněné větvicími monomery dipentaerythritolem v hmotnostní koncentraci 2 % nebo tripentaerythritolem v hmotnostní koncentraci 1 %, 3 % nebo 5 %.

Molekulární hmotnosti byly stanoveny metodou CPC-MALLS, hodnota T_g metodou DSC.

Tabulka 1: Charakteristiky testovaných oligoesterových nosičů

nosič	M_n	M_w	M_w/M_n	MP	M_z	M_{z+1}	ΔC_p	g'	T_g
1T	2877	12035	4,18	16849	26284	41062	0,656	0,42	25,3
3T	3355	13334	3,97	9074	27152	43224	0,508	0,31	21,7
5T	3016	8555	2,84	6379	15025	22625	0,471	0,34	17,2
2D	2645	6174	2,33	6287	9271	12391	1,618	0,52	17,9

Použité symboly:

1, 2, 3, 5 koncentrace větvicího monomeru v procentech

T tripentaerythritol

D dipentaerythritol

M_n číselně střední relativní molekulová hmotnost

M_w hmotnostně střední relativní molekulová hmotnost

M_w/M_n stupeň polydisperzity

MP pík relativní molekulární hmotnosti

M_z charakteristika frakce velkých molekul ve vzorku

M_{z+1} charakteristika úzké frakce extrémně velkých molekul ve vzorku

ΔC_p tepelná kapacita v $J \cdot K^{-1} \cdot g^{-1}$

g' index větvení molekul

T_g teplota skelného přechodu ve $^{\circ}C$

4.2 Stanovení stupně botnání a stupně eroze testovaného nosiče

4.2.1 Příprava tělísek

K přípravě tělísek ze zkoušeného polymeru byly použity hadičky ze silikonové pryže o vnitřním průměru 4 mm. Hadičky byly nejprve umyty pomocí injekční stříkačky naplněné vodou s detergentem a vypláchnuty čistou vodou. Poté byly hadičky umístěny do horkovzdušné sušárny vyhřáté na 80 °C.

Mezitím bylo naváženo potřebné množství polymeru navýšené o předpokládané ztráty, cca 20 %. Kádinka s naváženým polymerem se umístila do silikonové lázně na magnetickou míchačku. Teplota lázně byla udržována na hodnotě o cca 20 °C více, než je teplota skelného přechodu daného polymeru. Postupně měknoucí polymer nebyl míchán z důvodu vyvarování se vzniku vzduchových bublin.

Po dostatečném zahřátí polymeru a jeho přechodu do plastického stavu byla horká hadička připojena jedním koncem k vodní vývěvě a druhým koncem ponořena do roztaveného polymeru. Poté, co přestala tavenina v hadičce stoupat (chladnutí polymeru), byla hadička ustřižena a konce uzavřeny pryžovými zátkami. Tento celek se nechal chladnout v rovné poloze s ohledem na jeho další snadnější zpracování a byl umístěn přes noc do exsikátoru.

Po ztuhnutí byla silikonová hadička rozříznuta podél pomocí žiletky a sklovitý polymer byl vyjmut. Vzhledem k hygroskopičnosti materiálu se pracovalo v rukavicích.

Vzniklé válce o průměru 4 mm byly poté nařezány na délku cca 1 cm pomocí speciálně upravené žiletky. Na upravené žiletce se nastavila vzdálenost břitu od dorazu tak, aby výsledná tělíška měla hmotnost $150 \text{ mg} \pm 5 \%$, tzn. v intervalu 142,5 až 157,5 mg včetně. Každé tělíško bylo jednotlivě zváženo, pokud bylo tělíško těžší než 157,5 mg, byla jeho hmotnost upravena pomocí jemného smirkového papíru. Tělíška s hmotností pod 142,5 mg byla vyřazena. Vyhovující tělíška byla umístěna do exsikátoru.

4.2.2 Příprava vzorků

Čistá a prázdná scintilační lahvička označená jednoznačným kódem byla zvážena na analytických vahách. Hodnota se zapsala jako m_x . Poté bylo pomocí pinzety do této lahvičky vloženo tělísko a zvážila se celková hmotnost lahvičky a tělíska (m_x+m_0).

Do lahvičky s tělískem bylo nalito 15 ml čištěné vody, pak se uzavřela a umístila do třepací lázně vytemperované na 37 °C. Zde byly vzorky umístěny 3 dny, poté byly přemístěny do biologického termostatu, kde byla nastavena tatáž teplota. Analogicky se postupovalo při přípravě dalších vzorků.

Vodné médium bylo vyměňováno každé 3 dny.

4.2.3 Měření

Měření probíhalo v intervalech 1, 3, 7, 14 a 21 dnů od přidání vodného média k tělísku. Pro každý interval byly použity 2 vzorky.

Vzorky s příslušným kódem, který označoval interval měření, byly vyjmuty z termostatu a vodné médium se opatrně slilo. Pomocí vatové tyčinky byly odstraněny kapky vody. Dосуšení lahvičky se provedlo pomocí vysoušeče vlasů tak, aby nedošlo ke ztrátám vody ze zbotnalého tělíska.

Lahvičky se zbotnalým tělískem byly zváženy, naměřené hodnoty zapsány (m_x+m_b). Lahvičky byly umístěny na den do vakuové sušárny, kde se sušily při teplotě 70 °C. Po vysušení do konstantní hmotnosti byly lahvičky opět zváženy a hodnoty zapsány (m_x+m_s).

Z naměřených hodnot se vypočítal stupeň botnání a stupeň eroze.

4.2.4 Stupeň botnání

$$B = \frac{m_b - m_s}{m_s} \cdot 100$$

B stupeň botnání [%]

m_b hmotnost zbotnalého tělíska [g]

m_s hmotnost vysušeného tělíska [g]

4.2.5 Stupeň eroze

$$E = \left(1 - \frac{m_0 - m_s}{m_0} \right) \cdot 100$$

E stupeň eroze [%]

m_0 počáteční hmotnost tělíška [g]

m_s hmotnost vysušeného tělíška [g]

4.3 Stanovení karboxylového čísla

4.3.1 Příprava odměrného roztoku

Odměrný roztok hydroxidu draselného byl připraven rozpuštěním 1,1222 g KOH v methanolu ve 2000,00 ml odměrné baňce. Koncentrace byla stanovena jako 0,0099 mol/l.

4.3.2 Příprava indikátoru

Roztok fenolftaleinu byl připraven rozpuštěním 1,00 g fenolftaleinu v 80 ml 96% ethanolu a doplněním do objemu 100,00 ml destilovanou vodou.

4.3.3 Měření

Pro toto stanovení byla použita řada vzorků, které se připravily analogicky k vzorkům pro stanovení stupňů botnání a degradace.

Po uplynutí daného intervalu byly vyjmuty vzorky z termostatu, slilo se vodné médium a stěny lahvičky se osušily vatovou tyčinkou. Ke zbotnalému polymeru v lahvičce bylo přilito 5,00 ml chloroformu. Po rozpuštění bylo do lahvičky přidáno 5,00 ml destilované vody a obsah se několikrát intenzivně protřepal. Pokud byla po oddělení vrstev vodná vrstva zakalená, k soustavě se přidalo 0,1 g chloridu sodného a postup se opakoval. Po oddělení fází bylo injekční stříkačkou odebráno 3 ml horní vodné fáze a přeneseno do vytárované kádinky na analytických vahách, hmotnost se zapsala (h). Do kádinky bylo vloženo magnetické míchadlo a přikápnut indikátor. Kádinka se umístila na magnetickou míchačku a ponořilo se do ní ústí byrety s odměrným roztokem hydroxidu draselného. Titrovalo se do prvního růžového

zbarvení roztoku, které setrvalo po dobu minimálně 5 sekund. Spotřeba odměrného roztoku se zaznamenala.

Vzorek pro slepou titraci byl připraven třepáním 5,00 ml chloroformu s 5,00 ml destilované vody a 0,1 g chloridu sodného. Spotřeba slepé titrace (V_0), která činila 0,05 ml, se zjistila titrací vodné vrstvy.

Karboxylové číslo bylo vypočítáno dle následujícího vztahu.

4.3.4 Karboxylové číslo

$$k = c_{\text{KOH}} \cdot (V_{\text{KOH}} - V_0) \cdot \frac{5 + m_b - m_s}{h} \cdot \frac{1}{m_s}$$

k	karboxylové číslo [mol/g]
c_{KOH}	koncentrace odměrného roztoku KOH [mol/l]
V_{KOH}	spotřeba odměrného roztoku KOH [l]
V_0	spotřeba slepé titrace [l]
m_b	hmotnost zbotnalého tělíška [g]
m_s	hmotnost vysušeného tělíška [g]
h	hmotnost odebrané vodné fáze [g]

5 VÝSLEDKY – TABULKY A GRAFY

Tabulka 2: Naměřené hodnoty nosiče 1T	30
Tabulka 3: Časový průběh stupně eroze nosiče 1T v procentech.....	30
Tabulka 4: Časový průběh stupně botnání nosiče 1T v procentech	30
Tabulka 5: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 1T v mol/g.....	30
Tabulka 6: Naměřené hodnoty nosiče 3T	31
Tabulka 7: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T v procentech.....	31
Tabulka 8: Časový průběh stupně botnání nosiče 3T v procentech	31
Tabulka 9: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T v mol/g.....	31
Tabulka 10: Naměřené hodnoty nosiče 5T	32
Tabulka 11: Časový průběh stupně eroze nosiče 5T v procentech.....	32
Tabulka 12: Časový průběh stupně botnání nosiče 5T v procentech	32
Tabulka 13: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 5T v mol/g.....	32
Tabulka 14: Naměřené hodnoty nosiče 2D.....	33
Tabulka 15: Časový průběh stupně eroze nosiče 2D v procentech	33
Tabulka 16: Časový průběh stupně botnání nosiče 2D v procentech.....	33
Tabulka 17: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 2D v mol/g	33
Graf 1: Eroze nosiče 1T	34
Graf 2: Botnání nosiče 1T.....	34
Graf 3: Karboxylové číslo nosiče 1T	35
Graf 4: Eroze nosiče 3T	36
Graf 5: Botnání nosiče 3T.....	36
Graf 6: Karboxylové číslo nosiče 3T	37
Graf 7: Eroze nosiče 5T	38
Graf 8: Botnání nosiče 5T.....	38
Graf 9: Karboxylové číslo nosiče 5T	39
Graf 10: Eroze nosiče 2D.....	40
Graf 11: Botnání nosiče 2D	40
Graf 12: Karboxylové číslo nosiče 2D	41

Tabulka 2: Naměřené hodnoty nosiče 1T

Veličina	vzorek	Čas [dny]				
		1	3	7	14	21
m_0 [g]	A	0,1534	0,1549	0,1539	0,1484	0,1505
m_0 [g]	B	0,1531	0,1546	0,1531	0,1568	0,1527
m_b [g]	A	0,1644	0,2096	0,2071	0,0608	0,0178
m_b [g]	B	0,1767	0,2025	0,2098	0,0691	0,0161
m_s [g]	A	0,1508	0,1525	0,1369	0,0522	0,0157
m_s [g]	B	0,1499	0,1521	0,1337	0,0574	0,0160
h [g]	A	2,9300	2,8926	2,9415	2,9205	3,0423
h [g]	B	2,9503	2,8816	2,9681	2,9334	3,0422
V_{KOH} [ml]	A	2,90	3,40	5,10	0,94	0,19
V_{KOH} [ml]	B	2,94	3,42	5,40	1,51	0,21

Tabulka 3: Časový průběh stupně eroze nosiče 1T v procentech

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	98,31	98,45	88,95	35,18	10,43
B	97,91	98,38	87,33	36,61	10,48

Tabulka 4: Časový průběh stupně botnání nosiče 1T v procentech

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	9,02	37,44	51,28	16,48	13,38
B	17,88	33,14	56,92	20,38	0,62

Tabulka 5: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 1T v mol/g

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	$9,396 \cdot 10^{-4}$	$1,093 \cdot 10^{-3}$	$1,857 \cdot 10^{-3}$	$8,045 \cdot 10^{-4}$	$4,373 \cdot 10^{-4}$
B	$9,528 \cdot 10^{-4}$	$1,099 \cdot 10^{-3}$	$1,967 \cdot 10^{-3}$	$1,320 \cdot 10^{-3}$	$4,997 \cdot 10^{-4}$

Tabulka 6: Naměřené hodnoty nosiče 3T

Veličina	vzorek	Čas [dny]				
		1	3	7	14	21
m_0 [g]	A	0,1488	0,1549	0,1500	0,1526	0,1534
m_0 [g]	B	0,1487	0,1581	0,1531	0,1516	0,1573
m_b [g]	A	0,1630	0,1845	0,1788	0,0974	0,0456
m_b [g]	B	0,1646	0,1866	0,1892	0,0860	0,0451
m_s [g]	A	0,1499	0,1533	0,1218	0,0728	0,0361
m_s [g]	B	0,1498	0,1561	0,1249	0,0625	0,0383
h [g]	A	2,9129	2,9988	2,9533	3,0494	2,9940
h [g]	B	2,9796	3,0465	2,9699	2,9761	3,0040
V_{KOH} [ml]	A	2,53	4,40	3,17	0,54	0,16
V_{KOH} [ml]	B	2,33	4,32	3,27	0,53	0,21

Tabulka 7: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T v procentech

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	100,74	98,97	81,20	47,71	23,53
B	100,74	98,73	81,58	41,23	24,35

Tabulka 8: Časový průběh stupně botnění nosiče 3T v procentech

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	8,74	20,35	46,80	33,79	26,32
B	9,88	19,54	51,48	37,60	17,75

Tabulka 9: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T v mol/g

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	$8,200 \cdot 10^{-4}$	$1,395 \cdot 10^{-3}$	$1,257 \cdot 10^{-3}$	$3,591 \cdot 10^{-4}$	$1,465 \cdot 10^{-4}$
B	$7,539 \cdot 10^{-4}$	$1,369 \cdot 10^{-3}$	$1,297 \cdot 10^{-3}$	$3,518 \cdot 10^{-4}$	$2,130 \cdot 10^{-4}$

**Tabulka 10: Naměřené hodnoty nosiče 5T
(hlavním autorem je Lenka Táplová)**

Veličina	vzorek	Čas [dny]				
		1	3	7	14	21
m_0 [g]	A	0,1564	0,1520	0,1502	0,1520	0,1511
m_0 [g]	B	0,1537	0,1512	0,1569	0,1549	0,1481
m_b [g]	A	0,1652	0,1645	0,1808	0,1186	0,0755
m_b [g]	B	0,1599	0,1658	0,1863	0,1240	0,0718
m_s [g]	A	0,1571	0,1471	0,1272	0,0912	0,0650
m_s [g]	B	0,1543	0,1456	0,1324	0,0935	0,0615
h [g]	A	3,0310	3,0115	3,0190	3,0015	2,9963
h [g]	B	3,0157	3,0266	3,0297	2,9770	3,0181
V_{KOH} [ml]	A	2,40	3,30	2,15	0,75	0,24
V_{KOH} [ml]	B	2,38	3,45	1,93	0,57	0,24

**Tabulka 11: Časový průběh stupně eroze nosiče 5T v procentech
(hlavním autorem je Lenka Táplová)**

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	100,45	96,78	84,69	60,00	43,02
B	100,39	96,30	84,38	60,36	41,53

**Tabulka 12: Časový průběh stupně botnění nosiče 5T v procentech
(hlavním autorem je Lenka Táplová)**

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	5,16	11,83	42,14	30,04	16,15
B	3,63	13,87	40,71	32,62	16,75

**Tabulka 13: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 5T v mol/g
(hlavním autorem je Lenka Táplová)**

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	$7,474 \cdot 10^{-4}$	$1,101 \cdot 10^{-3}$	$8,037 \cdot 10^{-4}$	$3,759 \cdot 10^{-4}$	$1,488 \cdot 10^{-4}$
B	$7,411 \cdot 10^{-4}$	$1,151 \cdot 10^{-3}$	$7,195 \cdot 10^{-4}$	$2,793 \cdot 10^{-4}$	$1,488 \cdot 10^{-4}$

**Tabulka 14: Naměřené hodnoty nosiče 2D
(hlavním autorem je Lenka Táplová)**

Veličina	vzorek	Čas [dny]				
		1	3	7	14	21
m_0 [g]	A	0,1455	0,1514	0,1541	0,1537	0,1512
m_0 [g]	B	0,1526	0,1503	0,1557	0,1461	0,1563
m_b [g]	A	0,1602	0,1583	0,1132	0,0609	0,0180
m_b [g]	B	0,1687	0,1564	0,1135	0,0534	0,0220
m_s [g]	A	0,1331	0,1197	0,0953	0,0500	0,0173
m_s [g]	B	0,1416	0,1180	0,0965	0,0447	0,0208
h [g]	A	3,0188	3,0363	3,0000	3,0018	2,9962
h [g]	B	3,0334	3,0980	3,0300	3,0065	2,9998
V_{KOH} [ml]	A	4,14	2,30	1,15	0,31	0,14
V_{KOH} [ml]	B	4,03	2,65	1,17	0,36	0,14

**Tabulka 15: Časový průběh stupně eroze nosiče 2D v procentech
(hlavním autorem je Lenka Táplová)**

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	91,48	79,06	61,84	32,53	11,44
B	92,79	78,51	61,98	30,60	13,31

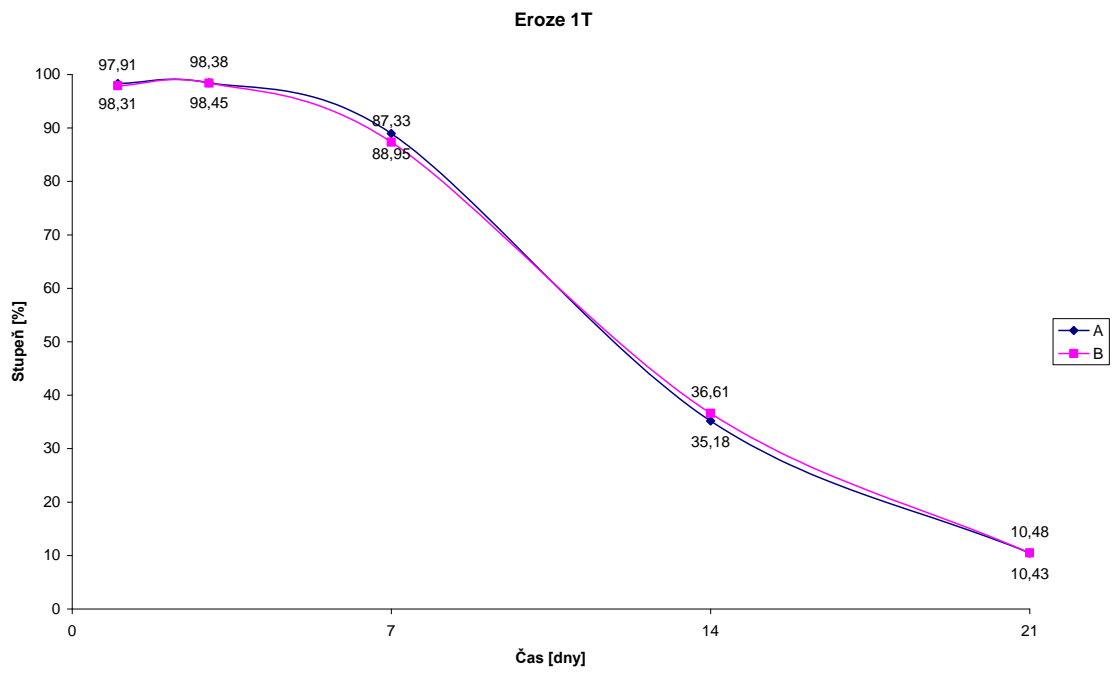
**Tabulka 16: Časový průběh stupně botnění nosiče 2D v procentech
(hlavním autorem je Lenka Táplová)**

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	20,36	32,25	18,78	21,80	4,05
B	19,14	32,54	17,62	19,46	5,77

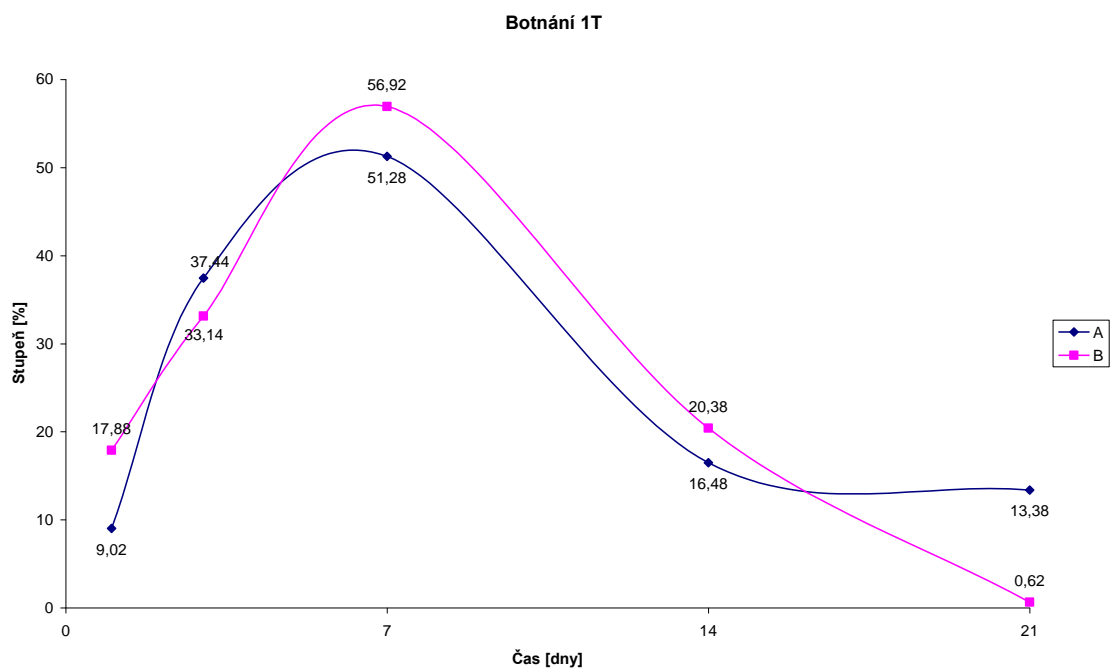
**Tabulka 17: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 2D v mol/g
(hlavním autorem je Lenka Táplová)**

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	$1,477 \cdot 10^{-3}$	$9,395 \cdot 10^{-4}$	$5,684 \cdot 10^{-4}$	$2,720 \cdot 10^{-4}$	$2,339 \cdot 10^{-4}$
B	$1,437 \cdot 10^{-3}$	$1,086 \cdot 10^{-3}$	$5,788 \cdot 10^{-4}$	$3,243 \cdot 10^{-4}$	$2,339 \cdot 10^{-4}$

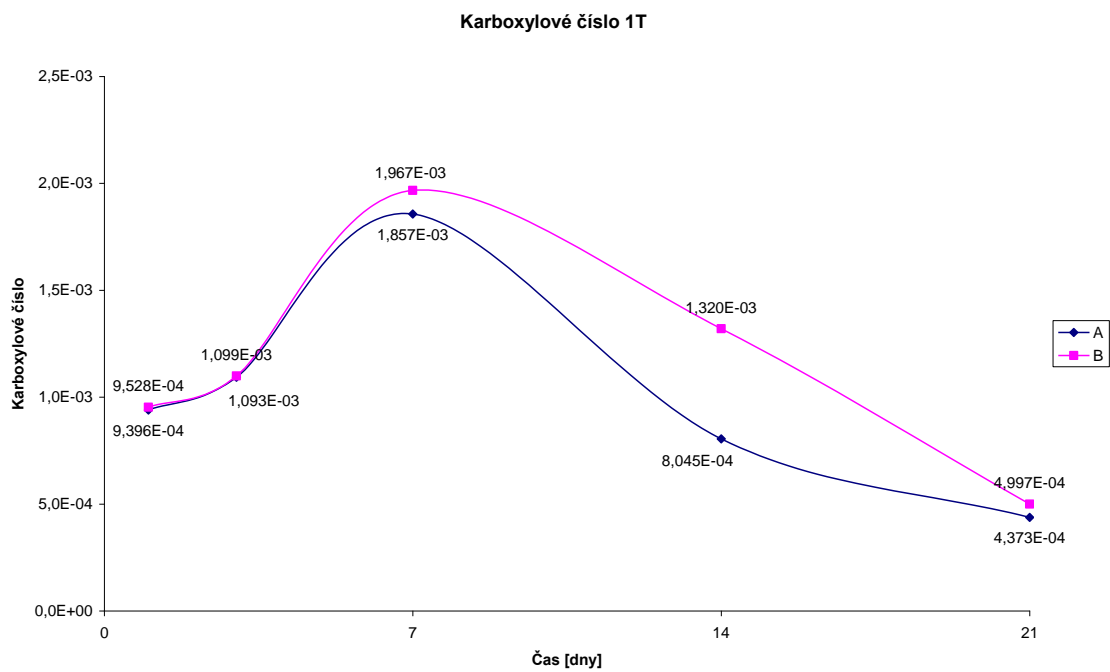
Graf 1: Eroze nosiče 1T



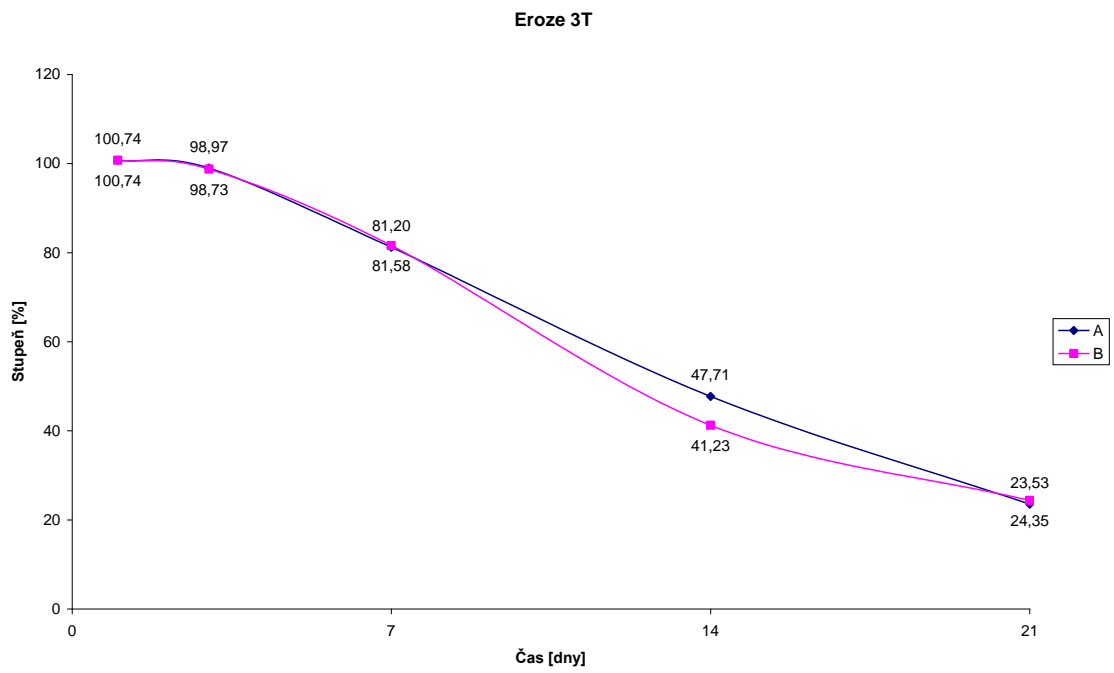
Graf 2: Botnání nosiče 1T



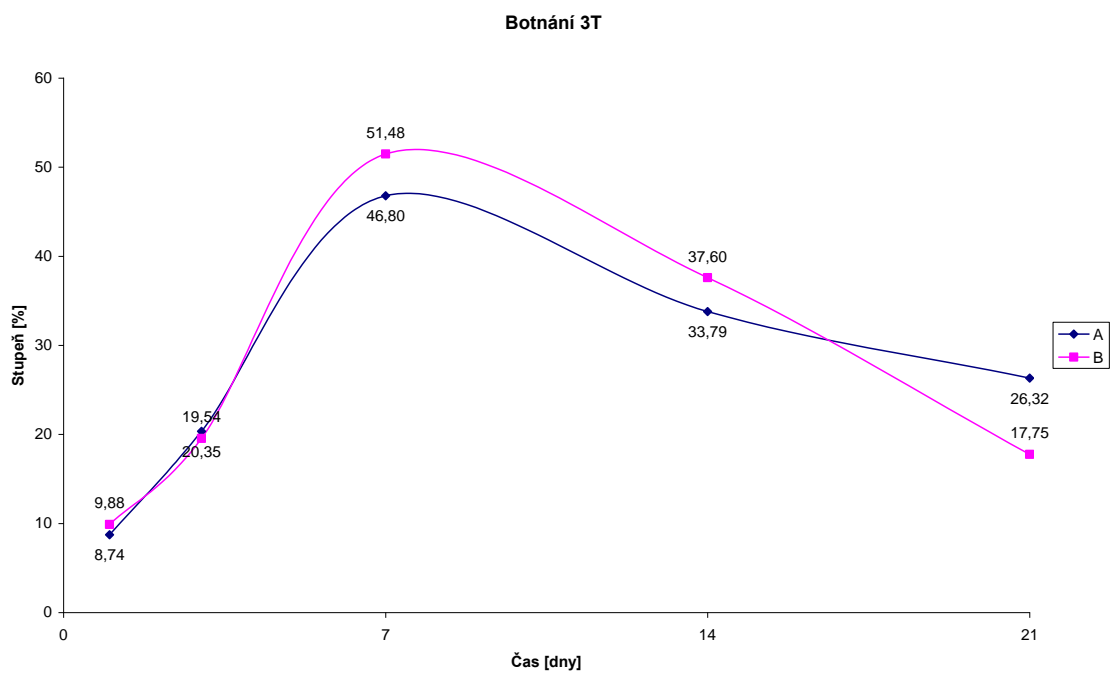
Graf 3: Karboxylové číslo nosiče 1T



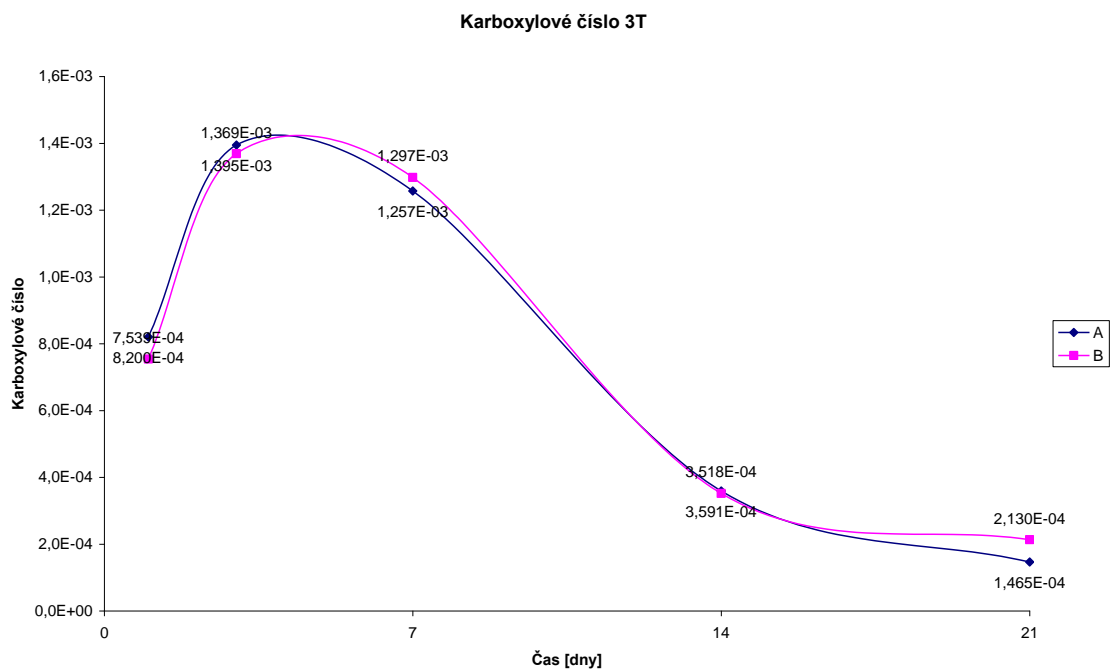
Graf 4: Eroze nosiče 3T



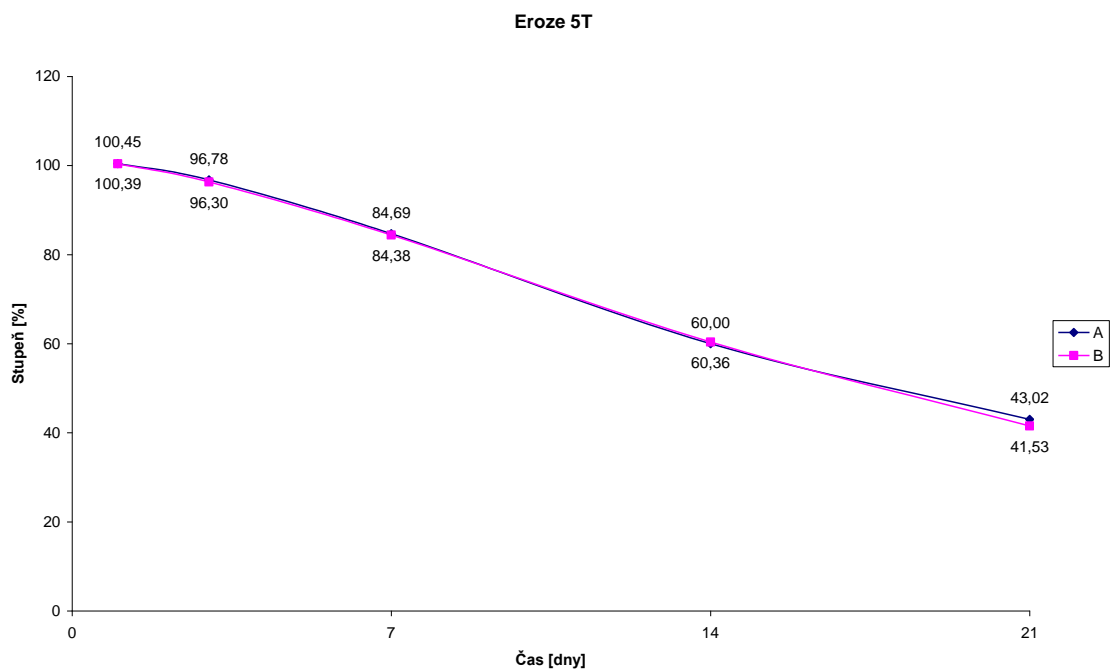
Graf 5: Botnání nosiče 3T



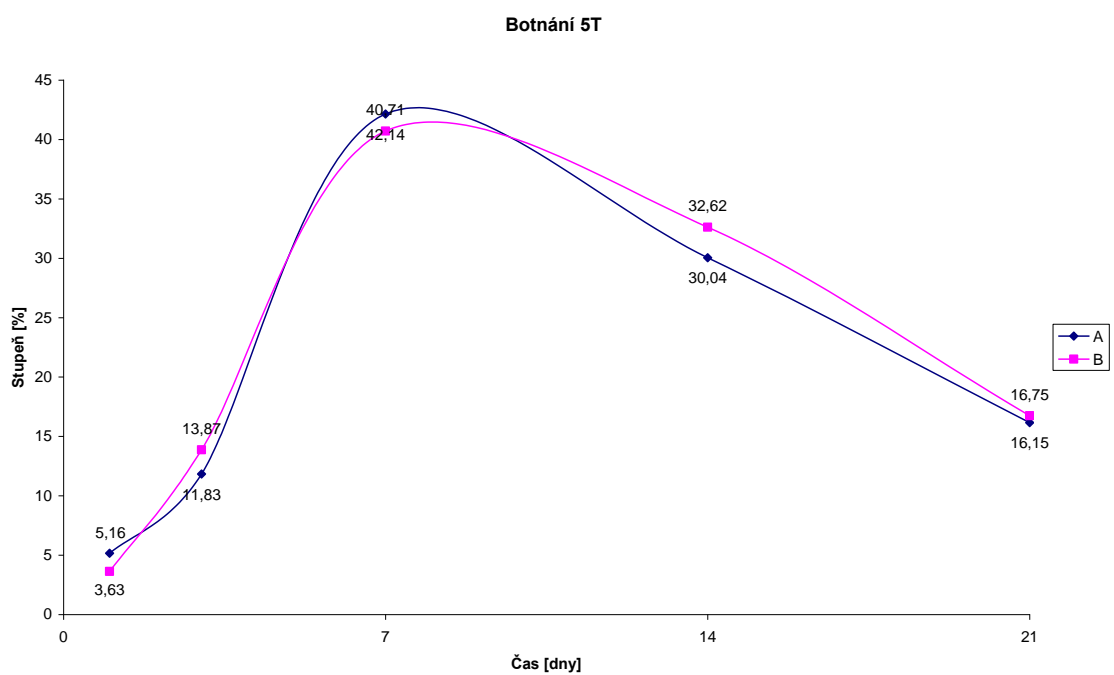
Graf 6: Karboxylové číslo nosiče 3T



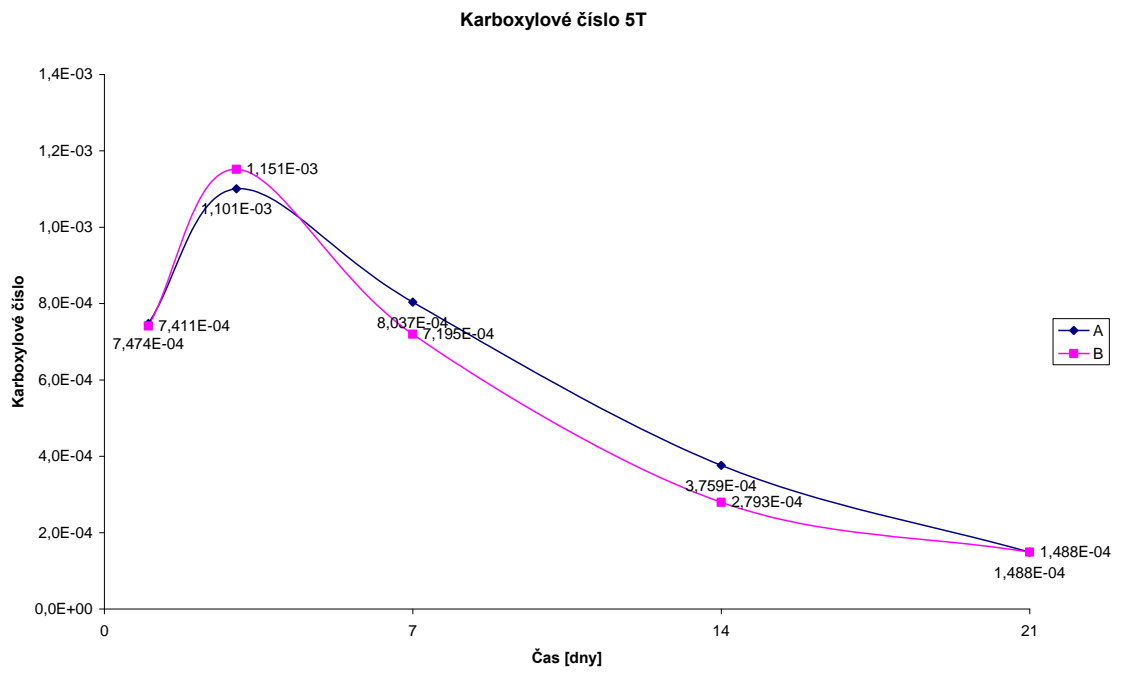
Graf 7: Eroze nosiče 5T



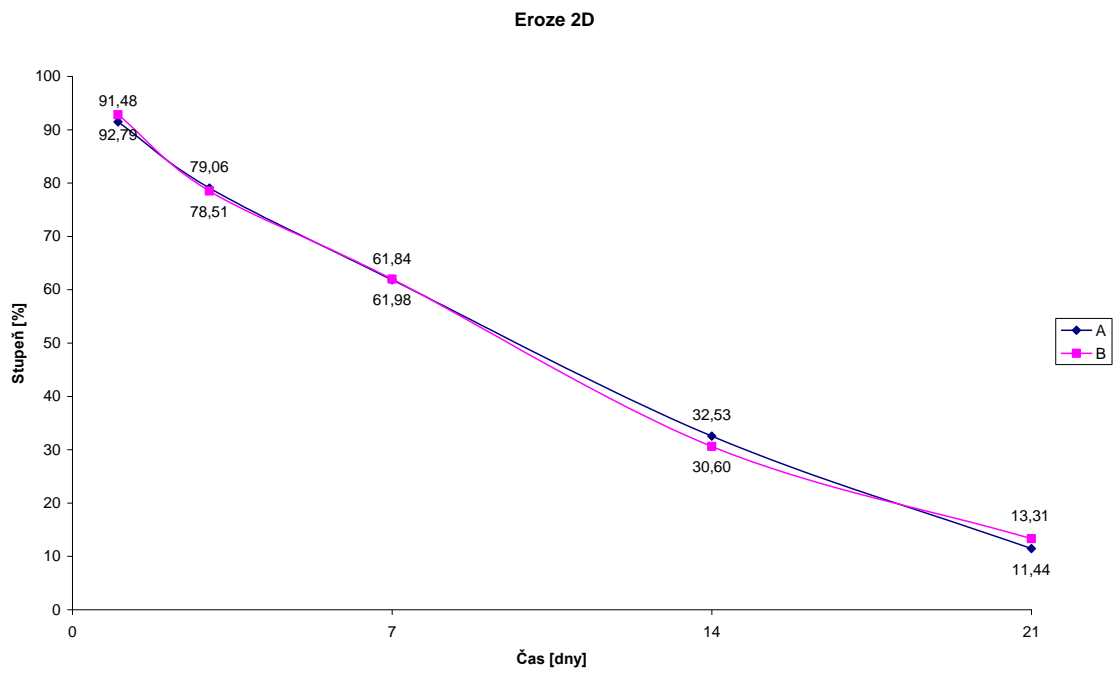
Graf 8: Botnání nosiče 5T



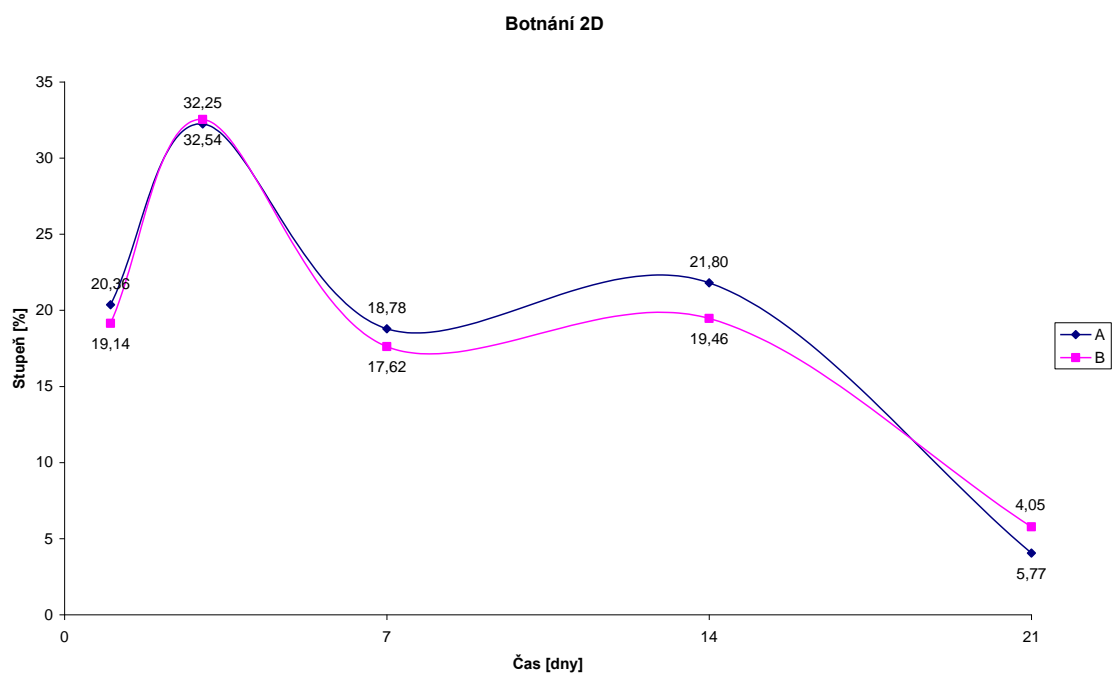
Graf 9: Karboxylové číslo nosiče 5T



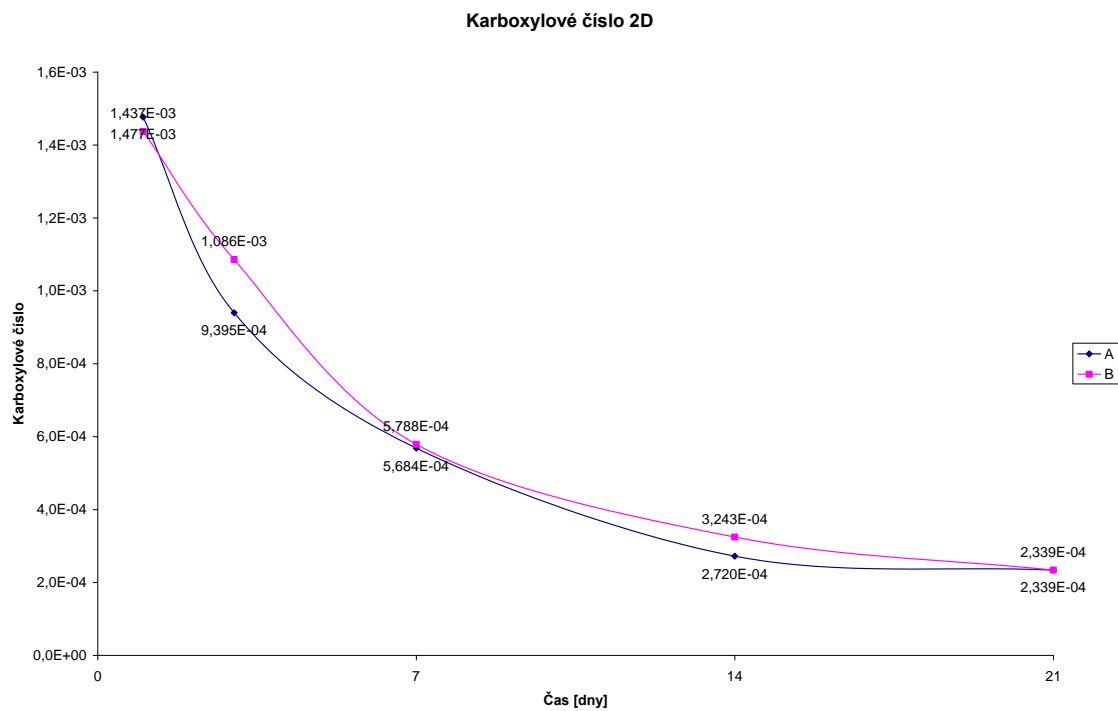
Graf 10: Eroze nosiče 2D



Graf 11: Botnání nosiče 2D



Graf 12: Karboxylové číslo nosiče 2D



5.1 Vysvětlivky

m_0	počáteční hmotnost tělíska
m_b	hmotnost zbotnalého tělíska
m_s	hmotnost vysušeného tělíska
h	hmotnost odebrané vodné fáze
V_{KOH}	spotřeba odměrného roztoku KOH
A, B	opakování vzorku

6 DISKUZE

6.1 K tématu a zaměření práce

Problém řešený v diplomové práci je součástí systematické studie interakcí biodegradabilních alifatických oligoesterů a polyesterů s lineární nebo větvenou konstitucí molekuly s hydrofilním prostředím sloužícím jednak jako standard pro testování a studium, jednak jako médium simulující podmínky biologického okolí aplikované léčivé formy. Oligoestery a polyestery alifatických hydroxykyselin, především kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové, jsou syntetizovány na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Důležitým aspektem degradačních procesů biodegradabilních oligoesterů je nejen hydrolyza esterových vazeb, ale také botnání matric nebo částic a jejich eroze. Při studiu botnání bylo u všech nosičů daného typu prokázáno nerovnovážné botnání. V mnoha případech, především v prostředí pufrů neutrálního nebo slabě alkalického pH, bylo také zjištěno, že stupeň botnání, jako charakteristika procesu, nabývá extrémní hodnoty, tj. maximum, případně maximum následované minimem, v některých případech byla zjištěna i 4 extréma v rámci jednoho degradačního procesu.

Původní předpoklad o změnách stupně větvení během degradace byl ověřován pomocí metody SEC-MALLS. Bylo zjištěno, že v celém průběhu degradace hodnoty molekulové hmotnosti rychle klesají, avšak nedochází přitom ke změnám stupně větvení. Proto byla hledána příčina pomocí zvýšení nebo snížení iontové síly pufrů a jiných osmoticky aktivních agens. Tato cesta také nevedla k cíli. Důvodem byla rychlá penetrace molekul nebo iontů do botnajících matric s rychlým vyrovnáním poměrů s jejich okolím. Byly tak vytvořeny modelové podmínky hypertonického nebo hypotonického prostředí, které však neodpovídaly skutečným poměrům v matricích v procesu jejich degradace vůči jejich okolí.

Proto bylo přikročeno ke studiu chování matric v samotné vodě. Nevýhodou metody byl nízký stupeň botnání matric daný malým stupněm ionizace koncových karboxylů. K testování byly vybrány takové nosiče, které se vyznačovaly dostatečnými maximy i v prostředí čištěné vody. Při degradaci nosičů se uplatnil mechanismus kyselé hydrolyzy esterových vazeb. Při rozštěpení každé esterové vazby vznikla další

karboxylová skupina. Vzhledem k tomu, že již dříve bylo prokázáno, že štěpení řetězce je náhodné, je možno předpokládat, že při degradaci vznikají i nízkomolekulární ve vodě rozpustné oligoestery. Tyto degradační produkty mohou difundovat z matric. Rychlost jejich difuze může být regulována stupněm botnání a naopak stupeň botnání může být rozhodujícím činitelem pro difuzi degradačních ve vodě rozpustných fragmentů.

6.2 K degradaci nosiče 1T

Nosič 1T byl syntetizován z ekvimolární směsi kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné s přísadou 1% tripentaerythritolu. Tripentaerythritol má osm hydroxylových skupin s rovnocennou reaktivitou. Při polykondenzační reakci je dosahována limitní délka řetězce. Podle podmínek reakce bývá maximálně dosažitelná délka řetězce v rozmezí mezi 5 000 a 10 000. Je nutno uvážit, že při pokročilém stádiu reakce dochází nejen k růstu řetězce, ale probíhá také jeho náhodné štěpení. Z toho plyne nestejná délka jednotlivých řetězců. Je také pravděpodobné, že kromě větvených struktur se v produktech budou nacházet i různé dlouhé lineární řetězce. Tomu nasvědčují hodnoty jednotlivých parametrů molekulové hmotnosti uvedené v tabulce 1. Hodnota M_w je 12 000, stupeň polydisperzity má vysokou hodnotu 4,2, hodnota M_z je 26 300, hodnota M_{z+1} je 41 100.

Průběh eroze uvádí graf 1. Materiál začne erodovat až těsně po třídenním intervalu. Potom se rychlost eroze zvyšuje a dosahuje maxima kolem 10. dne. Po třech týdnech působení vody jako média, jak je vidět na grafu 2, zbývá asi 10 % neerodovaného materiálu.

Při první fázi degradace nosiče bez jeho eroze dochází k postupnému zvyšování stupně botnání. Maximum hodnoty bylo 54 %, bylo nalezeno v intervalu 7 dní. Potom stupeň botnání postupně klesá k velmi nízkým hodnotám. Zajímavé je porovnání hodnot charakteristiky botnání z jednotlivých, dvakrát opakovaných měření. V intervalu prvního dne byly nalezeny dvojnásobné hodnoty. Příčinou je s vysokou pravděpodobností různý tvar tělísek a jejich různé umístění v nádobkách. Po dosažení maxima v 7. dni došlo k procesu odbotnání. Rychlost tohoto procesu smršťování struktury byla stejná, stejně tak jako eroze materiálu.

Na grafu 3 jsou hodnoty karboxylového čísla stejných vzorků. Vyjadřují koncentraci ve vodě rozpustných fragmentů molekul oligoesteru 1T vzniklých jejich hydrolýzou. Již v jednodenním intervalu byla v matricích nalezena poměrně vysoká koncentrace hydrofilních oligoesterů. Do 3. dne tato koncentrace mírně stoupala, k výraznému vzestupu došlo mezi 3. dnem a 7. dnem. V další fázi byl zjištěn monotónní pokles hodnot. Z celkového zhodnocení průběhu hodnot stupně botnání a průběhu hodnot koncentrace hydrofilních nízkomolekulárních degradačních produktů je možno vyvodit závěr o pozoruhodně shodných rysech obou procesů. Znamená to tedy, že rozsah botnání polyesteru větveného tripentaerythritolem je ovlivněn koncentrací osmoticky aktivních molekul v matricích. Nízkomolekulární oligoestery se v matricích při nízkém stupni botnání hromadí a zvyšují tak osmotický tlak, který vede k vyššímu stupni botnání. Po dosažení vyššího botnání se otevřou difuzní cesty pro únik molekul z matrice, což vede ke snížení osmotického tlaku v matricích a ke kolapsu zbotnalé struktury. Uvedené procesy jsou relativně pomalé, v daném případě trvají několik dní.

6.3 K degradaci nosiče 3T

Polyester označený jako 3T byl syntetizován za stejných podmínek jako 1T. Rozdíl je ve vyšší, 3% koncentraci tripentaerythritolu použitého při syntéze jako větvicí složky. Má vyšší hodnoty parametrů molekulové hmotnosti. Polydisperzita je také vysoká. O vyšším podílu větvených struktur v materiálu svědčí o 3,5 °C nižší hodnota teploty skelného přechodu.

Eroze nosiče 3T probíhala v počáteční fázi rychleji než tomu bylo u 1T (graf 4). Přibližně od 3. dne byl její průběh poměrně plynulý a s nižší rychlostí než u nosiče 1T. I tato skutečnost je v souladu s předpokladem o vyšším stupni větvení. Po 21. dni působení vody jako degradačního prostředí byl stanoven asi čtvrtinový neerodovaný zbytek.

Botnání nosiče 3T mělo velmi podobný průběh jako u nosiče 1T (graf 5 vs. graf 2). V intervalu prvního dne byl stupeň botnání ještě nižší než u 1T, do 3. dne se zdvojnásobil. Těsně po 7. dni bylo dosaženo maximum stupně botnání. Mělo hodnotu velmi blízkou hodnotě, která byla prokázána u nosiče 1T. Potom následovalo pomalé odbotnání. Příčina pomalejšího kolapsu méně relaxované struktury není v tomto stádiu experimentů známa.

Na grafu 6 je historie hodnot koncentrace hydrofilních fragmentů v matricích. Byla prokázána vysoká reprodukovatelnost hodnot, stejně tak jako v případě botnání a eroze. Maximum koncentrace se prokázalo dříve, než bylo maximum botnání. To je možno vysvětlit hysterezí procesu botnání, jako důsledku postupného zvyšování koncentrace osmoticky aktivních látek. Koncentrace fragmentů v matricích je příčinou, rozsah botnání následkem, který má časovou prodlevu. Koncentrace ve vodě rozpustných molekul v matricích byla na konci pokusu (21. den) přibližně desetkrát nižší než v maximu hodnot prokázaném v intervalu 3. dne.

6.4 K degradaci nosiče 5T

Výsledky byly dosaženy ve spolupráci s Lenkou Āápalovou, posluchačkou 5. ročníku FaF. Na grafu 7 je eroze nosiče. Probíhá prakticky od začátku interakce s vodou a řídí se kinetikou nultého řádu, což pokládáme za pozoruhodné. Je pomalejší než u nosičů 1T, protože stupeň větvení je vysoký. Za 20 dní zbylo ještě přes 40 % neerodovaného materiálu.

Průběh botnání nosiče je na grafu 8. Zajímavé jsou velmi malé hodnoty charakteristiky v intervalu 1. dne (kolem 5 %), což je v souladu s předpoklady o chování větvených polymerů. Potom následuje prudký vzrůst hodnot s maximem v 7. dni. Následný pokles hodnot charakteristiky je pomalejší než jejich vzrůst.

Na grafu 9 je časový průběh hodnot karboxylového čísla. Zřetelný je pík, který byl nalezen ve třídním intervalu. Posun oproti maximu z hlediska stupně botnání je důkazem hystereze botnání oproti změně koncentrace osmoticky aktivních molekul v matricích.

6.5 K degradaci nosiče 2D

Hlavním autorem těchto výsledků je Lenka Āápalová. Nosič 2D byl na rozdíl od dříve popsaných větvený 2 % dipentaerythritolem. Jeho erozi ukazuje graf 10. Probíhá prakticky od počátku působení vody a pokračuje kontinuálně a poměrně rychle. Za 21 dní zbývá málo přes 10 % neerodovaného nosiče.

Na grafu 11 je průběh botnání. Zajímavý je tím, že je charakterizován dvěma maximy a jedním minimem hodnot stupně botnání. Nízký stupeň botnání je nepřímou indikací vysokého stupně větvení molekul. Na rozdíl od tří výše popsaných nosičů se

maximum botnání projevilo již ve 3. dni. Tomu odpovídá průběh hodnot karboxylového čísla. Projevila se také hystereze, která je patrně dána vysokým stupněm větvení. Maximum hodnot karboxylového čísla je v intervalu kratším než jeden den. Celý další průběh degradace nosiče je doprovázen plynulým úbytkem nízkomolekulárních, ve vodě rozpustných molekul. V počáteční fázi není vyloučena přítomnost nízkomolekulárních oligoesterů v matricích, pocházejících již ze syntézy nosiče 2D. Druhý nevýrazný pík hodnot stupně botnání se z hlediska koncentrace osmoticky aktivních látek neprojevil. Botnání je tedy jevem, který je velmi citlivý i k malým změnám koncentrace osmoticky aktivních látek. Je možné, že odráží změny koncentrace molekul, které mají velmi omezenou rozpustnost ve vodě nebo molekul, které jsou v málo zbotnalých matricích fixovány obstrukčními efekty.

7 ZÁVĚR

Oligoestery a polyestery alifatických hydroxykyselin větvené polyedrickými alkoholy degradují ve vodě hydrolyzou velmi vysokou rychlostí. Celková doba úplné degradace tělísek o hmotnosti 150 mg je mezi jedním a dvěma měsíci. Degradace je provázena kontinuální erozí tělísek. Botnání na rozdíl od eroze probíhá oscilačně s jedním nebo dvěma maximy hodnot charakteristiky. Bylo prokázáno, že oscilační průběh botnání souvisí velmi těsně s koncentrací osmoticky aktivních molekul, které jsou generovány náhodným štěpením molekul sloučenin při jejich hydrolyze. Separací těchto molekul ve vodné fázi a jejich stanovením byla prokázána těsná souvislost mezi koncentrací osmoticky aktivních molekul a stupněm botnání. U více větvených sloučenin byla mezi koncentrací nízkomolekulárních produktů degradace a stupněm botnání prokázána hystereze.

8 LITERATURA

- (1) Frazza, E. J. and Schmitt, E. E., 1971. A new absorbable suture. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, 1: 43-58.
- (2) Wasserman, D., 1971. US Patent 1,375,008.
- (3) Schmitt, E. E., Suen, T. J. and Updegraff, I. H., 1974. Water-degradable resins containing recurring, contiguous, polymerized glycolide units and process for preparing same, US Patent 3,784,585, Jan. 8, 1974, American Cyanamid.
- (4) Dunn, R. L., English, J. P., Strobel, J. D., Crowsar, D. R., and Tice, T. R., 1988. Preparation and Evaluation of lactide/glycolide copolymers for drug delivery, In: C. Migliaresi (Ed.), *Polymers in Medicine*, Vol. 3, Amsterdam, Elsevier.
- (5) Vert, M., Li, S. M., Spenlehauer, G., and Guerin, P., 1992. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 3: 432-446.
- (6) Vert, M., Chabot, F., Leray, J., and Christel, P., 1981. Bioresorbable polyesters for bone surgery. *Makromol. Chem. Suppl.*, 5: 30.
- (7) Brekke, J. H., 1989. Biodegradable, osteogenic, bone graft substitute, UK Patent 2215209A, Sept. 20, 1989, Osmed Inc.
- (8) Pitt, C. G., Gratzel, M. M., Kimmel, G. L., Surles, J., and Schindler, A., 1981. Aliphatic polyesters. 2. The degradation of poly(DL-lactide), poly (ϵ -caprolactone) and their complexes in vivo. *Biomaterials*, 2: 215-220.
- (9) Li, S. M., Garreau, H., and Vert, M., 1990. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media: Part 1: Poly (DL-lactic acid). *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1: 123-130
- (10) Vert, M., 1998. Bioresorbable synthetic polymers and their operation field, In: G. Walenkamp (Ed.), *Biomaterials in Surgery*, Stuttgart, Georg Thieme, pp. 97-101.
- (11) Li, S. M., Garreau, H., and Vert, M., 1990. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media: Part 1: Poly (DL-lactic acid). *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1: 123-130.
- (12) Li, S., Garreau, H., and Vert, M., 1990. Structure-property relationships in the case of degradation of solid aliphatic poly (α -hydroxy acids) in aqueous media: 2. PLA37.5GA25 and PLA75GA25 copolymers. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1: 131-139.

- (13) Li, S., Garreau, H., and Vert, M., 1990. Structure-property relationships in the case of degradation of solid aliphatic poly (α -hydroxy acids) in aqueous media: 3. Amorphous and semi-crystalline PLA 100. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1: 198.
- (14) Vert, M., 1990. Degradation of polymeric biomaterials with respect to temporary applications, In: *Degradable Materials*, Boca Raton, CRC Press, pp. 11-37.
- (15) Visscher, E. G., Pearson, J. E., and Fong, J. W., 1988. Effects of particle size on the in vitro and in vivo degradation rates of poly (DL-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.*, 22: 736-746.
- (16) Grizzi, I., Garreau, H., Li, S., and Vert, M., 1995. Biodegradation of devices based on poly(DL-lactic acid): Size dependence. *Biomaterials*, 16: 305-311.
- (17) Li, S. M., Girod-Holland, S., and Vert, M., 1996. Hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid) in the presence of caffeine base. *J. Controlled Release*, 40: 41-53.
- (18) Schwach, G., Engel, R., Coudane, J., and Vert, M., 1994. Stannous octoate versus zinc-initiated polymerization of racemic lactide: effect of configurational structures. *Polym. Bull.*, 32: 617-623.
- (19) Schwach, G., Coudane, J., Engel, R., and Vert, M., 1997. More about the initiation mechanic of lactide polymerization in the presence of stannous octoate. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 35: 3431-3440.
- (20) Tunc, D. C., 1995. Orientruded polylactide based body-absorbable osteosynthesis devices: A short review. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 7: 375-380.
- (21) Schugens, C., Grandfils, C., Jerome, R., Teyssie, P., Delree, P., Martin, D., Malgrange, B., and Moonen, G., 1995. Preparation of macroporous biodegradable polylactide implant for neuronal transplantation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29: 1349-1362.
- (22) Agrawal, C. M., Haas, K. F., Leopold, D. A., and Clark, H. G., 1992. Evaluation of poly(L-lactic acid) as a material for intravascular polymeric stents. *Biomaterials*, 13: 176-182.
- (23) Athanasiou, K. A., Schmitz, J. P., and Agrawal, C. M., 1998. The effects of porosity on in vitro degradation of polylactic acid-polyglycolic acid implants used in repair of articular cartilage. *Tissue Eng.*, 4: 53-63.
- (24) Pegoretti, A., Fambri, L., and Migliaresi, C., 1997. In vitro degradation of poly(L-lactic acid) fibers produced by melt spinning. *J. Appl. Polym. Sci.*, 64: 213-233.

- (25) Eenink, M. J. D., Feijen, J., Olijslager, J., Albers, J. H. M., Rieke, J. C., and Greidanus, P. J., 1987. Biodegradable hollow fibers for the controlled release of hormones. *J. Controlled Release*, 6: 225-247.
- (26) Bodmeier, R. and Chen, H., 1989. Evaluation of biodegradable poly(lactide) pellets prepared by direct compression. *J. Pharm. Sci.*, 78: 819-822.
- (27) Yamakawa, I., Kawahara, M., Watanabe, S., and Miyake, Y., 1990. Sustained release of insulin by double-layered implant using poly(DL-lactic acid). *J. Pharm. Sci.*, 79(6): 505-509.
- (28) Zhang, X., Wyss, U. P., Pichora, D., Amsden, B., and Goosen, M. F. A., 1993. Controlled release of albumin from biodegradable poly(DL-lactide) cylinders. *J. Controlled Release*. 25: 61-69.
- (29) Bhardwaj, R., and Blanchard, J., 1997. In vitro evaluation of poly(DL-lactide-co-glycolide) polymer-based implants containing the alpha-melanocyte stimulating hormone analog, Melanotan-I. *J. Controlled Release*, 45: 49-55.
- (30) Lewis, K. J., Irwin, W. J., and Akhtar, S., 1995. Biodegradable poly(L-lactic acid) matrices for the sustained delivery of antisense oligonucleotides. *J. Controlled Release*, 37: 173-183.
- (31) Mauduit, J., Perouse, E., and Vert, M., 1996. Hydrolytic degradation of films prepared from blends of high and low molecular weight poly (DL-lactic acid)s. *J. Biomed. Mater. Res.*, 30: 201-207.
- (32) Jimoh, A. G., Wise, D. L., Gresser, J. D., and Trantolo, D. J., 1995. Pulsed FSH release from an implantable capsule system. *J. Controlled Release*, 34: 87-95.
- (33) Shively, M. L., Coonts, B. A., Renner W. D., Southard, J. L., and Bennett, A. T., 1995. Physicochemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system. *J. Controlled Release*, 33: 237-243.
- (34) Brannon-Peppas, L., Vert, M., Polylactic and polyglycolic acids as drug delivery carriers. In: Wise, et al., editors. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. New York: Marcel Dekker, 2000. 108-119.
- (35) Conti, B., Genta, I., Giunchedi, P., and Modena, T., 1995. Testing of in vitro dissolution behavior of microparticulate drug delivery systems. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 21: 1223-1233.

- (36) Sansdrap, P., and Moes, A. J., 1997. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of the dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Controlled Release*, 43: 47-58.
- (37) Witschi, C., and Doelker, E., 1998. Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *J. Controlled Release*, 51: 327-341.
- (38) Youxin, L., and Kissel, T., 1993. Synthesis and properties of biodegradable ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic acid) or poly(L-lactic-co-glycolic acid) A-blocks attached to central poly(ethylene) B-blocks. *J. Controlled Release*, 27: 247-257.
- (39) Hiljanen-Vainio, M. P., Orava, P. A., and Seppälä, J. V., 1997. Properties of ϵ -caprolactone/DL-lactide (ϵ CL/DL-LA) copolymers with a minor ϵ -CL content. *J. Biomed. Mater. Res.*, 34: 39-46.
- (40) Jin, X., Carfagna, C., Nicolais, L., and Lanzetta, R., 1995. Synthesis, characterization and in vitro degradation of a novel thermotropic ternary and p-hydroxybenzoic acid, glycolic acid, and p-hydroxycinnamic acid. *Macromolecules*, 28: 4785-4794.
- (41) Colombo, P., Santi, P., Bettini, R., Brazel, Ch. S., Drug Release from Swelling-Controlled Systems. In: Wise, et al., editors. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. New York: Marcel Dekker, 2000. 183-192.
- (42) Caramella, C., Ferrari, F., Bonferoni, M C., Ronchi, M., and Colombo, P., 1989. Rheological properties and diffusion dissolution behaviour of hydrophilic polymers. *Boll. Chim. Farmaceutico*, 128: 298-301.
- (43) Harland, R. S., Gazzaniga, A., Sangalli, M. E., Colombo, P., and Peppas, N. A., 1988. Drug/polymer matrix swelling and dissolution, *Pharm. Res.*, 5: 488-494.
- (44) Bonferoni, M. F., Rossi, S., Ferrari, F., Bertoni, M., Sinistri, R., and Caramella, C., 1995. Characterization of three hydroxypropylmethyl-cellulose substitution types: rheological properties and dissolution behaviour, *Eur J. Pharm. Biopharm.*, 41: 242-246.
- (45) Lee. P. I., 1981. Controlled drug release from polymeric matrices involving moving boundaries. In: D. H. Lewis (Ed.), *Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals*, Plenum Publishing, New York, pp. 39-48.

- (46) Bettini, R., Peppas, N. A., and Colombo, P., 1998. Polymer relaxation in swellable matrices contributes to drug release. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 25, pp. 26-37.
- (47) Lee, P. I., and Kim, C., 1991. Probing the mechanisms of drug release from hydrogels. *J. Controlled Release*, 16: 229-236.
- (48) Colombo, P., Bettini, R., Massimo, G., Catellani, P. L., Santi, P., and Peppas, N. A., 1995. Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. *J. Pharm. Sci.*, 84: 991-997.
- (49) Bettini, R., Colombo, P., Massimo, G., Santi, P., Catellani, P. L., and Peppas, N. A., 1994. Moving fronts and drug release from hydrogel matrices. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 21: 19-20.
- (50) Colombo, P., Gazzaniga, A., Caramella, C., Conte, U., and La Manna, A., 1987. In vitro programmable zero-order release drug delivery system. *Acta Pharm. Technol.*, 33: 15-20.