UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Diplomová práce

FORMULACE LIPOSOMŮ OBSAHUJÍCÍCH IMIQUIMOD V PŘÍTOMNOSTI DENDRIMERŮ

Vedoucí práce: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Konzultant: Eleni Panoutsopoulou

V Hradci Králové 2021

Tereza Štěpničková

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

V Hradci Králové Tereza Štěpničková

Poděkování

Ráda bych poděkovala Dr. Georgiosovi Paraskevopoulosovi, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a odborné vedení při zpracování mé práce. Stejně tak bych chtěla poděkovat své konzultantce Eleni Panoutsopoulou za pomoc, ochotu a praktické rady, které mi v průběhu experimentální části mé práce věnovala.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Konzultant: Eleni Panoutsopoulou

Autor: Tereza Štěpničková

Název diplomové práce: Formulace liposomů obsahujících imiquimod v přítomnosti dendrimerů

Dendritické molekuly, jakožto vysoce rozvětvené polymery, jsou velmi lákavými nanosystémy pro široké biomedicínské aplikace. Jejich specifické vlastnosti zahrnují schopnost zvýšit transdermální permeaci účinných látek a stejně tak schopnost zvýšit rozpustnost ve vodě jinak špatně rozpustných látek.

Primárním záměrem této práce bylo využití dendrimerů pro zvýšení koncentrace chemoterapeuticky působícího léčiva imiquimodu uvnitř liposomálních formulací. Postupně byly připraveny roztoky dendritických molekul nulté, první, druhé a třetí generace, každá vždy o koncentracích 5 mg/ml a 10 mg/ml. Tyto byly následně použity pro hydrataci tenkého filmu lipidů při přípravě liposomů s enkapsulovanou účinnou látkou. Bylo využito dvou metod začlenění imiquimodu do liposomů. První metoda představovala vnesení léčiva do lipidů, druhá pak jeho rozpuštění v roztoku dendrimerů. Následně byla zjišťována koncentrace zapouzdřeného imiquimodu ve vztahu k jednotlivým generacím dendrimerů, včetně enkapsulační účinnosti.

Bylo zjištěno, že dendritické molekuly skutečně zvyšují koncentraci imiquimodu uvnitř liposomů. Přesto však nebyla nalezena žádná korelace, která by naznačovala vliv jednotlivých generací dendrimerů na hodnotu koncentrace účinné látky.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical Technology
Supervisor: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.
Consultant: Eleni Panoutsopoulou
Author: Tereza Štěpničková
Title of the thesis: Formulation of Imiquimod loaded liposomes in the presence of dendrimers

Dendritic molecules, as highly branched polymers, are very attractive nanosystems for broad biomedical applications. Their specific properties include the ability to increase transdermal permeation of active ingredients as well as the ability to increase the water solubility of poorly soluble drugs.

The main purpose of this thesis was the utilization of dendrimers to raise the concentration of the chemoterapeutic drug imiquimod inside liposomal formulations. Solutions of dendritic molecules zero, first, second and third generation were prepared, each at concentrations of 5 mg/ml and 10 mg/ml. These were subsequently used for the hydration of thin film lipid during the preparation of liposomes with the encapsulated drug. Two methods of the incorporation of imiquimod to liposomes were used. The first method represented insertion of the drug to lipids, the second was dissolution of the drug in the dendrimer solution. The concentration of encapsulated imiquimod, including the encapsulation efficacy, was detected in relation to generations of dendrimers.

It has been found that dendritic molecules truly increase the concentration of imiquimod within liposomes. Despite this fact, no correlation has been noticed to suggest the influence of dendrimer generations on the concentration value of the active substance.

Obsah

Úvod a cíl práce **8**

Teoretická část **9**

1 Cílená distribuce léčiv do kůže/přes kůži **10**

2 Systémy pro cílenou distribuci **12**

3 Nanosystémy pro cílenou distribuci v protinádorové terapii **13**

3.1 Liposomy 15

3.1.1 Základní informace 15

3.1.2 Příprava liposomů 16

3.1.2.1 Mechanické metody - Hydratace lipidového filmu 16

3.1.2.2 Navazující metody úpravy liposomů 18

3.1.3 Charakterizace liposomů 19

3.1.3.1 Velikost a lamelarita 19

3.1.3.2 PDI 20

3.1.3.3 Zeta potenciál 20

3.1.3.4 Enkapsulační účinnost 22

3.2 Dendrimery 23

3.2.1 Struktura a vlastnosti 23

3.2.2 Typy dendrimerů 25

3.2.3 Využití dendrimerů k transdermální aplikaci 25

4 Imiquimod **27**

Experimentální část **28**

5 Použité přístroje a chemikálie **28**

6 Příprava liposomů s enkapsulovaným imiquimodem a dendrimery **29**

6.1 Struktury použitých generací dendrimerů 29

6.2 Příprava metodou imiquimod inkorporovaný do lipidů 31
6.2.1 Extruze 32
6.2.2 Měření velikosti a Zeta potenciálu 33
6.2.3 Purifikace 33
6.3 Příprava metodou imiquimod rozpuštěný v roztoku dendrimerů 35
6.3.1 Příprava roztoku dendrimerů s imiquimodem 35
6.3.2 Příprava liposomů 35
6.3.3 Extruze, měření velikosti, Zeta potenciálu a následná purifikace 36
7 Výsledky a diskuze 37
7.1 Vzorky připravené metodou imiquimod inkorporovaný do lipidů 39
7.2 Vzorky připravené metodou imiquimod rozpuštěný v roztoku dendrimerů 42
Závěr 46
Seznam zkratek 47
Použitá literatura 48

Úvod a cíl práce

Kožní bariéra tvořená rohovou vrstvou neboli *stratum corneum* omezuje penetraci některých léčiv skrze *epidermis*. Jednou z možností, jak tuto limitaci obejít, je využití nanočástic k (trans)dermálnímu přenosu léčiv, jako jsou liposomy a dendrimery. Ačkoliv se liposomy ukázaly jako velice efektivní nosiče léčiv, které zvyšují jejich penetraci skrze kůži, stále roste tendence tyto formulace zdokonalovat.

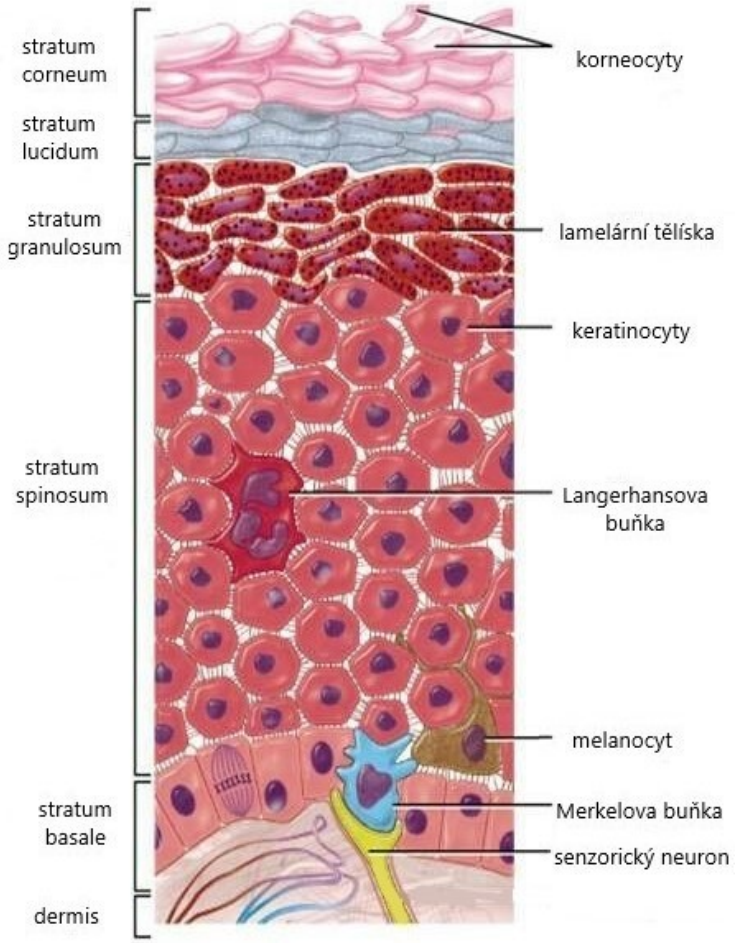
Hlavní záměr této práce spočíval v kombinaci dendritických molekul a liposomů společně s lipofilním léčivem imiquimodem do jedné formulace. Cílem bylo zvýšit množství enkapsulované látky uvnitř liposomů, a tím ve výsledku zajistit i její vyšší doručení do kůže. Díky schopnosti dendrimerů zvyšovat rozpustnost jiných látek, bylo hlavním cílem využít je pro zvýšení solubility ve vodě špatně rozpustného imiquimodu, a tím zvýšit jeho koncentraci uvnitř liposomů.

Teoretická část

Teoretická část této diplomové práce představuje úvod do nanočásticových systémů, které se využívají pro cílenou distribuci léčiv. Popisuje základní charakteristiky kůže, které ovlivňují transport léčiv do kůže a přes kůži. Detailněji se zabývá především liposomy a dendrimery. Je popsána příprava liposomů metodou hydratace lipidového filmu, včetně jejich dalších úprav, jako je extruze a sonikace. Dále se zaměřuje na fyzikálně-chemické charakteristiky liposomů. Na konci teoretické části jsou popsány dendritické molekuly, jejich charakteristika, využití a základní informace o imunomodulačním léčivu imiquimodu.

1 Cílená distribuce léčiv do kůže/přes kůži

Kůže je složitý orgán lidského těla, jehož hlavní funkcí je schopnost působit jako ochranná bariéra proti vniknutí cizích částic, ale také ztrátě endogenního materiálu, jako je voda. [1] Jednotlivé vrstvy kůže odspodu tvoří *hypodermis* (podkožní vazivo), *dermis* (škára) a nejsvrchnější vrstva *epidermis* (pokožka). [2] *Epidermis* se skládá především z keratinocytů a tvoří ji pět vrstev. Jedná se (odspodu) o *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum* a *stratum corneum* (obrázek č. 1). [3] Bariérové funkce kůže jsou umožněny právě díky *epidermis*, a to konkrétně díky její svrchní vrstvě *stratum corneum* (SC), která vykazuje selektivní permeabilitu jen pro některé látky. [4] Buňky ve SC (korneocyty) jsou pevně spojené, keratinizované, tvořící 10-20 vrstev. [5] Mezibuněčné prostory vyplňuje matrix bohatá na lipidy, která je tvořena volnými mastnými kyselinami, cholesterolem a ceramidy. [6]



Obrázek č. 1 – Struktura epidermis [10]

Významnou součástí *epidermis* (zejména *stratum spinosum*) jsou také Langerhansovy buňky, které vznikají z mezenchymu kostní dřeně. [7] Tyto buňky hvězdicovitého tvaru jsou součástí imunitního systému tím, že vážou antigeny a následně je prezentují T-lymfocytům.

Tím indukují aktivaci a proliferaci především regulačních T-lymfocytů. Migrují z kůže do odtokových lymfatických uzlin, kde aktivují další buňky imunitního systému. Rychlost migrace se zvyšuje především během zánětu. Uplatňují se u patologických stavů kůže (infekční a zánětlivá onemocnění, rakovina kůže), kdy plní důležitou roli při detekci cizího antigenu vstupujícího do těla kůží a při imunitní kontrole. [8, 9]

V závislosti na schopnosti permeantu pronikat do různých vrstev kůže lze rozlišit dermální a transdermální aplikaci. Dermální podání znamená penetraci do vrstev *epidermis,* přitom nedochází k systémovému účinku. [1] Transdermální podání je omezeno pouze pro látky s molekulovou hmotností do 500 g/mol, rozdělovacím koeficientem (log P) 1-3 a vyváženými hydro/lipofilními vlastnostmi. [10]

2 Systémy pro cílenou distribuci

Systémy pro cílenou distribuci jsou technologické formulace, jejichž hlavním cílem je kontrolovaně zavést a uvolnit léčivo do požadovaného orgánu či tkáně v organismu. Díky tomu se pak nachází vyšší množství léčiva právě v daném orgánu, což ve výsledku umožňuje snížit dávku léčiva a snižuje se i systémová toxicita. Jedná se tedy především o nosiče léčiv, které však mají řadu dalších benefitů. Mezi ně patří jejich biodegradabilita, ochrana léčiva proti enzymatickému a hydrolytickému rozkladu v organismu, zvýšení stability i prodloužení účinku léčivé látky. Zajištění řízeného uvolňování těmito systémy pak umožňuje sníženou frekvenci podávání léčiva. [11, 12] Z těchto důvodů patří systémy pro cílenou distribuci mezi nejrychleji se rozvíjející oblasti nejen farmaceutického průmyslu. [13]

3 Nanosystémy pro cílenou distribuci v protinádorové terapii

Poměrně velká část zájmu o systémy s cílenou distribucí je věnována nanotechnologiím. [13] Jedná se o pevné koloidální systémy s vysokou stabilitou a charakteristickou velikostí částic od 1 do 1000 nm. Léčivo v nich může být zapouzdřeno nebo kovalentně navázáno na povrch. Mohou integrovat lipofilní i hydrofilní léčiva. [13, 14] Hlavním pokrokem těchto systémů je především jejich kontrolovaná velikost, tvar i struktura částic, díky čemuž se pak mohou specificky vázat na cílová místa v organismu a selektivně se v nich akumulovat. Toho dosahují buněčnou adhezí, endocytózou nebo intracelulárním přenosem. [11]

Kromě překonání farmakokinetických a farmakodynamických omezení mnoha účinných látek, mohou být také užitečné pro pokročilejší účely podávání léčiv, jako je již zmíněné řízené uvolňování či zajištění zvýšené permeability skrze kožní bariéru. [12] Není tedy divu, že se nanočástice staly centrem pozornosti zejména protinádorové terapie. Právě zacílení účinné látky do zhoubné tkáně snižuje výskyt nežádoucích účinků, které jsou jinak typické pro konvenční systémy podávání léčiv a chemoterapii. [15] Toho může být dosaženo dvěma základními typy transportu, pasivním a aktivním. [16]

Pasivní transport

Při pasivním transportu (targetingu) se nanočástice s léčivem dostává do cílové nádorové tkáně na základě využití některé ze svých vlastností (např. velikost částic, povrchový náboj apod.), ale také díky patofyziologickým charakteristikám nádorových cév. Ty jsou obvykle poměrně dilatované s velkým množstvím pórů. Mezerové spoje mezi endotelovými buňkami jsou rozšířeny, což umožňuje migraci molekul (například liposomů) z cév přímo do oblasti nádoru. [16] Jedná se o tzv. efekt zvýšené permeability a retence, známý také jako EPR efekt, kdy se molekuly určitých velikostí, obvykle do 200 nm, hromadí v nádorové tkáni mnohem více než v té nepostižené. V oblasti tumoru navíc nebývá funkční lymfatická drenáž, která by za normálních okolností tyto částice odstraňovala. [17, 18] Ačkoliv je pasivní transport základ klinické terapie, propustnost cév nemusí být v celém nádoru stejná a dokonce některé nádory nemusí vykazovat EPR efekt, což limituje využití tohoto přístupu. [16]

Aktivní transport

Aktivní transport představuje způsob, jak se vyhnout omezení pasivního targetingu. [16] Spočívá v navázání specifického ligandu (často se jedná o protilátky, peptidy) na povrch nosiče. [16, 19] Cílem těchto inteligentních přenašečů jsou buňky, které nadměrně exprimují proteiny (receptory), na které se nosič pomocí ligandů, vystavených na svém povrchu, váže. Cílí tedy především na nádorovou tkáň, pro kterou je typické, že ve vyšší míře exprimuje na povrchu svých buněk právě bílkoviny. [15] Nanočástice mohou být rovněž navrženy tak, že reagují na určitý stimul. Mezi takové spouštěče patří například pH, kontakt s určitým enzymem, ultrazvuk či teplota. Například reakcí na změnu pH lze dosáhnout toho, že se léčivá látka uvolní v konkrétní části gastrointestinálního traktu. [13]

Jednou z dalších možností tvorby chytrých nanočástic je pegylace (PEG). Tato metoda povrchové modifikace částic využívá ke svému účelu hydrofilních polymerů. Takovými jsou polyethylenglykol či polyvinylalkohol, které vytváří okolo nanočástic ochrannou vrstvu a snižují tak jejich opsonizaci makrofágy v organismu. Retikuloendotelový systém (RES) totiž představuje jednu z hlavních překážek pro konvenční systémy s cílenou distribucí, a to zejména zkrácením doby cirkulace v organismu. Právě PEG je jedním z řešení, jak ochránit nanočástici před tímto čištěním RES a zároveň možností, jak zvýšit její stabilitu. [15]

Významnou část nanotechnologie tvoří liposomy a dendrimery. [11]

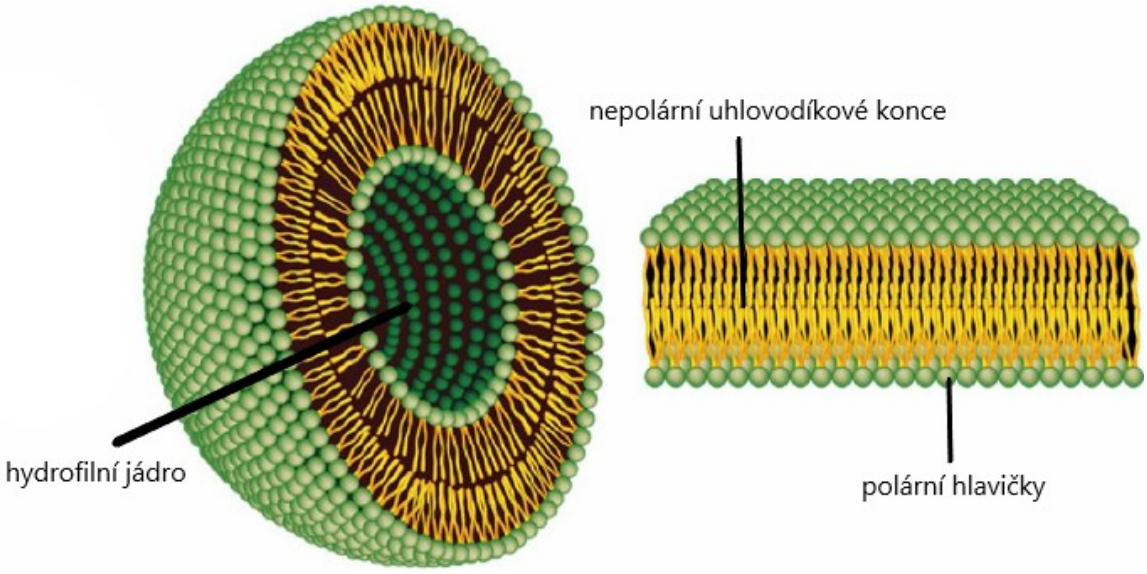
3.1 Liposomy

Liposomy představují jeden z hlavních přístupů pokročilých systémů pro cílenou distribuci léčiv. [20] Poprvé je popsal britský hematolog Alec D Bangham, a to v roce 1961. Od té doby jsou předmětem intenzivního výzkumu. Jednak díky tomu, že se jejich struktura podobá morfologii buněčných membrán, a také díky tomu, že mají schopnost enkapsulace různých léčivých látek. [21, 22]

3.1.1 Základní informace

Jedná se o částice skládající se z jedné nebo více koncentrických fosfolipidových dvojvrstev zapouzdřujících vodný oddíl. [21] Fosfolipidy, které jsou součástí dvojvrstvy, jsou pak tvořeny z polární hlavy a dvou na ni přidružených hydrofobních uhlovodíkových konců. [12, 15] Polární skupiny, ze kterých se fosfolipidy skládají, směřují vždy do vodného média a nepolární konce obou vrstev k sobě (obrázek č. 2). [15, 20] Přitom lze rozlišovat dva základní druhy fosfolipidů, glycerofosfolipidy, které jsou i součástí buněčných membrán eukaryotických buněk a sfingomyeliny. V případě glycerofosfolipidů lze modifikací hlavní skupiny získat další typy, jako například fosfatidylcholin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol či kardolipin. Stejně tak i obměnou délky uhlovodíkového řetězce lze získat odlišné variace glycerofosfolipidů. [20, 23]

Velikost těchto částic se může pohybovat od několika nanometrů po několik mikrometrů, pro lékařské využití však největší uplatnění nacházejí liposomy o velikosti mezi 50 až 450 nm. [20, 21]



Obrázek č. 2 – základní struktura liposomu a lipidové dvojvrstvy [21]

Běžné zdroje fosfolipidů pro syntézu liposomů tvoří zdroje živočišné (hovězí mozek, vaječný žloutek) i rostlinné (především oleje - sójový, kukuřičný, slunečnicový apod.). Zejména vaječný žloutek se vyznačuje vyšším obsahem fosfolipidů s polynenasycenými mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem (k. arachidonová a dokosahexaenová - DHA). [20]

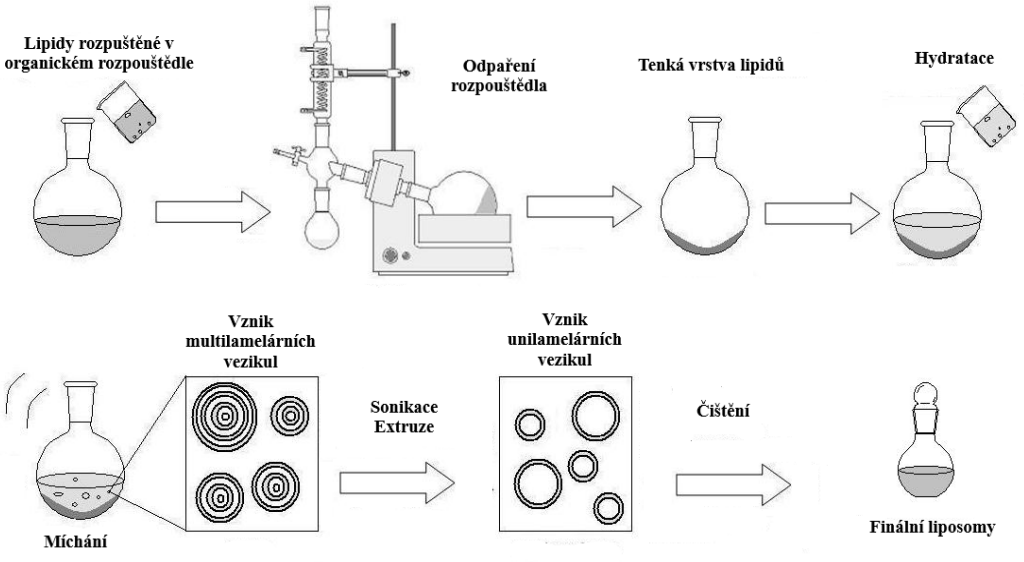
Přestože se liposomy zdají být téměř ideálním nosičem léčiv, mají několik omezení, která limitují jejich použití. Konvenční liposomy jsou poměrně rychle fagocytovány z krevního oběhu makrofágy, mají tedy poměrně krátký biologický poločas. Mohou být však upraveny tak, aby byla tato omezení minimalizována, a to již dříve zmíněnou pegylací. Liposomy jsou díky tomu méně náchylné k hepatální degradaci, což v konečném důsledku prodlužuje jejich cirkulaci v krevním řečišti. Další možností je vnesení protilátek či jiných ligandů, jako jsou peptidy a sacharidy, na povrch liposomu. Tím vznikají liposomy, které selektivně zacílí konkrétní buňky s odpovídajícím receptorem. [24, 22, 25] Příkladem mohou být imunoliposomy, které mají na svém povrchu právě protilátky. Kationické liposomy jsou pozitivně nabité, a tak je lze na základě elektrostatických interakcí využít pro přenos negativně nabitých nukleových kyselin. [20, 21]

3.1.2 Příprava liposomů

Pro přípravu liposomů lze využít zejména tří různých technik, mezi které patří mechanické metody, metoda disperze rozpouštědla, metoda založená na fúzi liposomů nebo na přeměně jejich velikosti. [20]

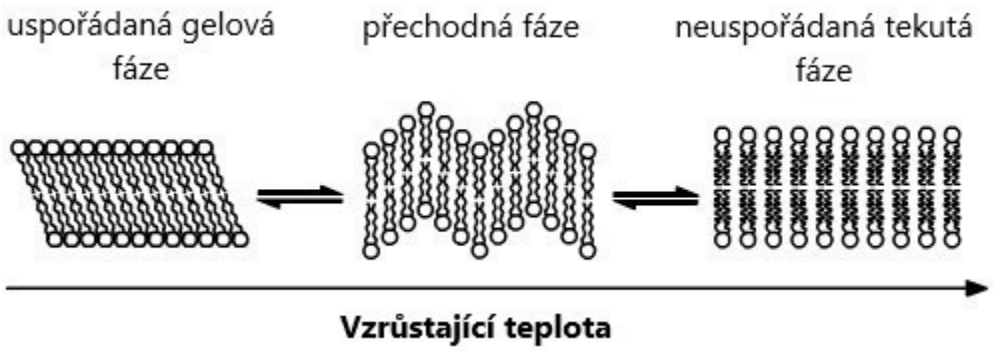
3.1.2.1 Mechanické metody - Hydratace lipidového filmu

Všeobecně nejpoužívanější metodou je hydratace lipidového filmu (obrázek č. 3). Tato metoda spočívá v rozpuštění lipidů ve vhodném organickém rozpouštědle, jako je chloroform, methanol nebo jejich směs. Poté následuje odpaření rozpouštědla nejprve rotační vakuovou odparkou při sníženém tlaku a následně s využitím vysokého vakua. To zajistí vytvoření tenkého filmu lipidů, který je následně hydratován vodným médiem při teplotě fázového přechodu a za současného míchání. [23]



Obrázek č. 3 - Znázornění přípravy liposomů metodou hydratace tenkého filmu lipidů a na to navazujících kroků [23]

Teplota fázového přechodu T_c je teplota, při které se dvojvrstva fosfolipidů mění z uspořádané gelové fáze na tekutou neuspořádanou fázi. Pokud jsou totiž fosfolipidy pod svou specifickou T_c, jsou těsně u sebe a tvoří pevnou gelovou vrstvu. Jestliže se však teplota přiblíží T_c, fosfolipidy se začnou rozvolňovat a z dosud pevné biomembrány se stane neuspořádaná kapalná fáze (obrázek č. 4). [26] Lipidy spontánně bobtnají a vytváří se tak liposomy. [20] Léčivá látka, která má být v liposomu zapouzdřena, může být na začátku tohoto procesu dispergována ve vodném médiu, užitého k hydrataci lipidového filmu, ale i v organickém rozpouštědle společně s lipidy. To, ve které části finálního vezikulu se pak léčivá látka nachází, závisí na jejích vlastnostech. Je-li účinná látka hydrofilní, je zapouzdřena ve vodném jádru liposomu a naopak, je-li hydrofobní, nachází se v lipidové dvojvrstvě. [20, 21]



Obrázek č. 4 - Vliv teploty fázového přechodu na lipidovou dvojvrstvu [27]

Mechanické metody však vytváří nehomogenní multilamelární vezikuly o různých velikostech od desítek nanometrů po několik mikrometrů v průměru, což vyžaduje použití navazujících technik, které zajistí tvorbu menších unilamelárních vezikul homogenního charakteru. Mezi tyto se řadí sonikace a extruze. [20, 21, 26]

3.1.2.2 Navazující metody úpravy liposomů

Sonikace

Jedním z klíčových parametrů, které mohou ovlivnit chování liposomů v organismu, je jejich velikost. Částice s průměrem >0,1 μm jsou imunitním systémem rozpoznány a zničeny rychleji než jejich menší protějšky. [28]

Jednou z možností, jak zmenšit liposomální velikost je sonikace. Jedná se o metodu využívající ultrazvukových vln k rozrušování částic. [20, 28] Zařízení k tomuto účelu využívané se nazývá sonikátor, přičemž lze rozlišit sonikátor s vodní lázní nebo se sondou. V prvním případě se vzorek ve zkumavce vkládá do vodní lázně sonikátoru generující vlnění, které tlakem narušuje zejména částicové agregáty. Z velkých multilamelárních vezikul se pak tvoří menší unilamelární. V případě druhého typu je hrot sonikátoru, který generuje energii, přímo ponořen do liposomální disperze. Tento typ sonikace je však spojen s rizikem degradace fosfolipidů i enkapsulované sloučeniny. [22]

Ačkoliv je proces sonikace poměrně rychlý a jednoduchý, nezajistí přibližně jednotnou velikost částic, a tak se musí přistupovat k dalším metodám, například extruzi. [20, 28]

Extruze

Extruze neboli vytlačování liposomů patří mezi velmi často používaný způsob, jak dosáhnout jejich požadované velikosti. Při tom jsou částice protlačovány skrze polykarbonátové filtry obsahující póry o konkrétním rozměru. [20] Jednou z možností je ruční extruze pomocí plynotěsných skleněných stříkaček, vložených do extrudéru, jehož součástí je porózní membrána. Skrze tuto membránu je vzorek protlačován z jedné injekční stříkačky do druhé (obrázek č. 5). [29] Výsledkem je homogenní směs liposomů, jejichž průměrná velikost je ovlivněna velikostí pórů v membráně a aplikovaným tlakem. Čím větší je tlak, tím menší částice vznikají. [20, 30] Neméně důležitá je i teplota, při které se extruze provádí. Extrudér by měl být vždy temperován na teplotu fázového přechodu lipidů. Tak se umožní rozvolnění pevné struktury lipidové dvojvrstvy a usnadní se zmenšování velikosti liposomů. [31]

Obrázek č. 5 – Zařízení ručního extrudéru s plynotěsnými injekčními stříkačkami [31]

Při extruzi multilamelárních liposomálních suspenzí s využitím membrán o velikosti pórů >0,2 μm nevznikají však unilamelární liposomy. Obvykle membrány s větší velikostí pórů poskytují polydisperzní suspenze multilamelárních liposomů. Naopak unilamelární liposomy navíc s nízkou polydisperzitou mohou být připraveny pouze extruzí s využitím membrán o velikosti pórů <0,2 μm. [20, 31]

Oproti dříve uvedené sonikaci má extruze tu výhodu, že je k dispozici celá řada membrán o různých rozměrech pórů. Stejně tak i rozpětí velikostí vyprodukovaných liposomů je poměrně úzké. Na druhou stranu póry mají tendenci se ucpávat zejména při zpracování koncentrovaných suspenzí. Proplachování membrány z důvodu její křehkosti není možné, často má tendenci se trhat a praskat. Samotné membrány musí být v extrudéru položeny oproti ploché mechanické podpěře. Tím je omezena plocha dostupná pro vytlačování extrudované směsi, což může často vést k pomalejší propustnosti membrány a celý proces se tak prodlužuje. [22]

3.1.3 Charakterizace liposomů

Chování liposomů při skladovacích podmínkách a tak stejně i v organismu je ovlivněno specifickými faktory. Mezi ně patří jejich velikost, povrchový náboj, permeabilita membrány a také množství enkapsulované látky. Z tohoto důvodu jsou informace o těchto parametrech klíčové. [23]

3.1.3.1 Velikost a lamelarita

Velikostní charakteristika liposomů je jeden ze základních faktorů, který určuje jejich budoucí terapeutické využití, účinnost v organismu i jejich stabilitu. Příprava tedy musí být

proces kontrolovaný právě z hlediska distribuce velikosti výsledných částic, které by měly být v určitém rozpětí. Zejména pokud jsou tyto formulace určené pro parenterální použití, ať už injekční, inhalační nebo topické. Pro dosažení požadované velikosti jsou dostupné metody jako výše uvedená sonikace či extruze. [20, 23]

Velikost ovlivňuje jejich distribuci *in vivo*, a tak může určovat dobu, po kterou budou cirkulovat v krevním řečišti. [23] Rovněž se ukázalo, že velikost má významný vliv na aktivní dodávání léčiva do kůže. Obecně částice o průměru 600 nm a více nejsou schopny dodávat léčivo do hlubších vrstev pokožky, naopak mají sklon zůstávat na povrchu případně uvnitř *stratum corneum*. Do hlubších vrstev pokožky dokážou dodávat svůj obsah částice s průměrem 300 nm a méně. Největší schopnost ukládání léčiva v dermálních a epidermálních vrstvách prokázaly částice o velikosti 70 nm a méně. [32]

Ve vztahu k lamelaritě liposomů, lze rozdílnými metodami přípravy i jejich postformačními úpravami dosáhnout různého počtu dvojvrstev. Dle počtu vrstev je lze rozdělit na unilamelární (ULV) s jednou dvojvrstvou, obklopující vodné jádro. Tyto se dále dělí na malé (SUV) dosahující velikosti 20-100 nm, a velké unilamelární (LUV) o typické velikosti 100-1000 nm. Jestliže se tyto částice skládají z více koncentrických dvojvrstev, jedná se o multilamelární vezikuly (MLV) o velikostech obvykle >500 nm. [13] Lamelarita pak ovlivňuje především kinetiku uvolňování navázaného léčiva. Bylo zjištěno, že zejména LUV vykazují mnohem vyšší rychlost uvolňování enkapsulovaného léčiva než je tomu u MLV. Důvodem pomalejšího uvolňování u MLV je vyšší počet dvojvrstev, které musí být narušeny, aby se dané léčivo uvolnilo. [21, 33]

3.1.3.2 PDI

Index polydisperzity, také známý jako PDI, je důležitý parametr, který popisuje rozpětí distribuce částic v pozorovaném vzorku. Charakterizuje tedy rozsah jejich velikosti. Tento index je bezrozměrný a v adekvátním případě by hodnota PDI měla být <0,3, což znamená monodisperzní částice. Hodnoty >0,3 naznačují, že vzorek má velmi širokou distribuci velikosti částic, odkazují na polydisperzitu a možnou agregaci či aglomeraci. [32, 34]

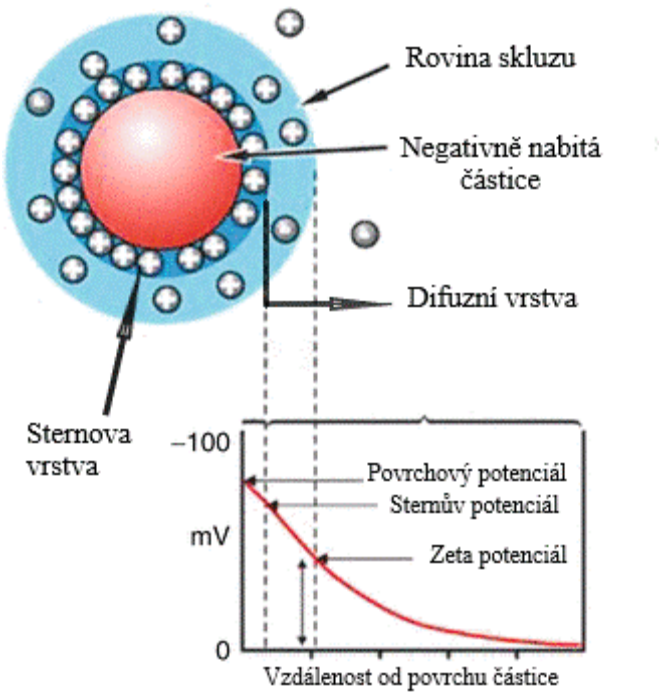
3.1.3.3 Zeta potenciál

Zeta potenciál (ZP) je základní charakteristikou částice, která poskytuje informace o její stabilitě. V roztoku je povrch každé nabité částice obklopen elektrickou dvojvrstvou. Tato dvojvrstva je vytvořena tak, že k povrchu dispergovaných nabitých částic jsou silně vázány

opačně nabité ionty, vzniká tak souvislá tenká a kapalná, tzv. Sternova vrstva. Za touto vrstvou jsou již ionty mobilnější a mnohem méně pevně vázány a dávají tak za vznik difúzní vrstvě. Uvnitř této vrstvy je pak tzv. rovina skluzu, což je v podstatě imaginární hranice, která odděluje nepohyblivé ionty okolo povrchu částice od pohyblivých, které jsou součástí roztoku. Potenciál, který je pak na této skluzové rovině generován, je nazýván Zeta potenciál (obrázek č. 6). [20, 35]

Nestabilita systému může být dána interakcí málo nabitých nebo nenabitých částic, kdy dochází k tvorbě agregátů. Hodnoty ZP větší než +30 mV a menší než -30 mV obecně svědčí o stabilních podmínkách. Zatímco hodnoty mezi -30 mV a +30 mV spíše poukazují na nestabilní podmínky, které se mohou projevit agregací, koagulací či flokulací částic. [36]

Nejčastěji se k měření ZP využívá principu elektroforetického rozptylu světla (ELS). Tato technika primárně měří elektroforetickou pohyblivost částic v disperzním prostředí. Základní princip spočívá v elektroforéze, kdy se do zředěné disperze v kyvetě zavede s využitím elektrody elektrické pole. Nabité částice poté migrují k opačně nabité elektrodě určitou rychlostí, která odpovídá jejich zeta potenciálu. Jeho hodnota je vysoce závislá nejen na hodnotě pH a iontové síle disperzního prostředí, ale také na povrchových charakteristikách částic. [35, 36]



Obrázek č. 6 - Znázornění elektrické dvojvrstvy na povrchu nanočástic [37]

3.1.3.4 Enkapsulační účinnost

Enkapsulační účinnost (EE) je důležitá chemická charakteristika vyjadřující poměr mezi reálným a teoretickým obsahem léčiva v liposomech a je udávána v procentech. [38] Jinak řečeno je to podíl léčiva skutečně zapouzdřeného uvnitř nanočástic a celkového množství léčiva, které bylo přidáno k disperzi na začátku přípravy.

K jejímu výpočtu se využívá jednoduché rovnice:

$$\text{EE (\%)} = \frac{množství\ enkapsulovaného\ léčiva}{množství\ celkového\ léčiva}\ x\ 100$$

Zjišťuje se po odstranění volného léčiva z média, které nebylo enkapsulováno. K separaci volného léčiva od zapouzdřeného se využívá technik jako je centrifugace neboli odstřeďování. [23] Jedná se o metodu využívající odstředivou sílu, která odděluje částice z roztoku podle jejich velikosti, hustoty i rychlosti rotoru centrifugy. Při aplikaci této metody je vzorek vložen do rotoru centrifugy, který se otáčí kolem pevné osy, tím je vytvářena síla kolmá k této ose a dochází k sedimentaci volných částic. [38] Po separaci je stanoveno množství zapouzdřeného léčiva, čehož se dosáhne rozrušením lipidové dvojvrstvy liposomů nejběžněji methanolem nebo chloroformem a následným měřením koncentrace léčiva.

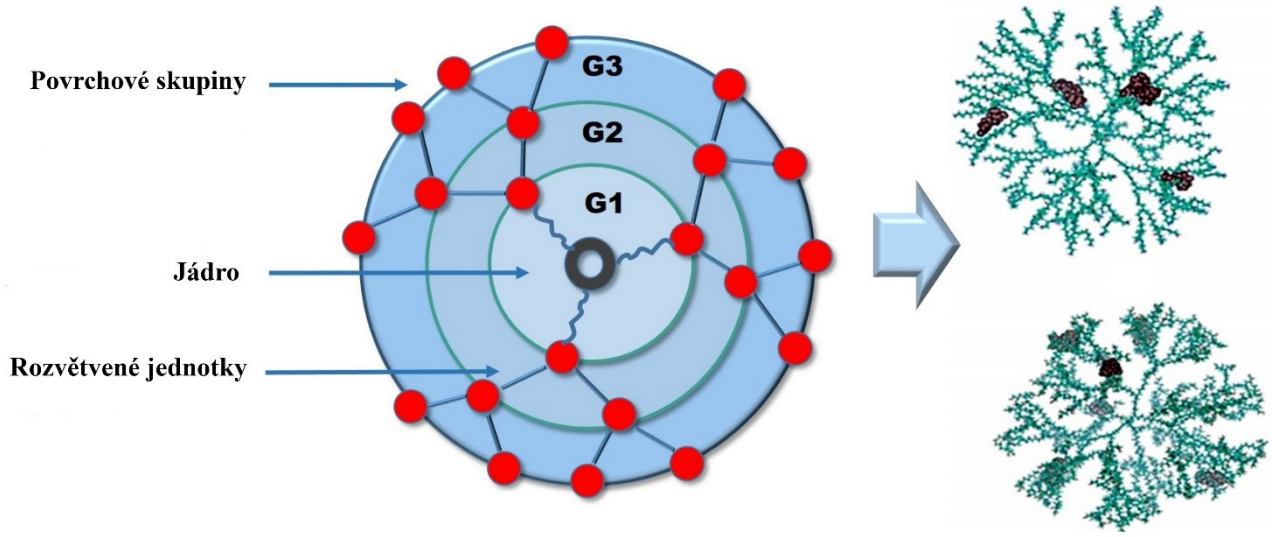
Zvyšování enkapsulační účinnosti přispívá ke zvyšování biologické dostupnosti léčivé látky. [20]

3.2 Dendrimery

Dendrimery jsou vysoce rozvětvené polymerní obvykle sférické makromolekuly s kompaktní trojrozměrnou architekturou a dobře definovanými velikostmi i tvary. Velikost se pohybuje v rozmezí 1-10 nm v závislosti na jejich generaci. [39, 40] Poprvé o dendritických molekulách padla zmínka v roce 1978, a to v publikaci vědecké skupiny vedené Fritzem Vögtlem. Od té doby přispěly četné výzkumné skupiny k vývoji nových typů dendrimerů i k jejich biomedicínským aplikacím. [41, 42]

3.2.1 Struktura a vlastnosti

Základní struktura se skládá ze tří hlavních komponent, kterými jsou centrální jádro, opakovaně se větvící jednotky, zvané také jako dendrony a koncové funkční povrchové skupiny. Nárůstem počtu opakujících se větvících jednotek okolo centrální jednotky se vytváří jednotlivé generace dendrimerů (obrázek č. 7). Tyto generace se tedy odvíjejí od počtu vrstev připojených k jádru a označují se jako G*n*, kde *n* se může pohybovat od 0 až po 12. [39, 41, 42]

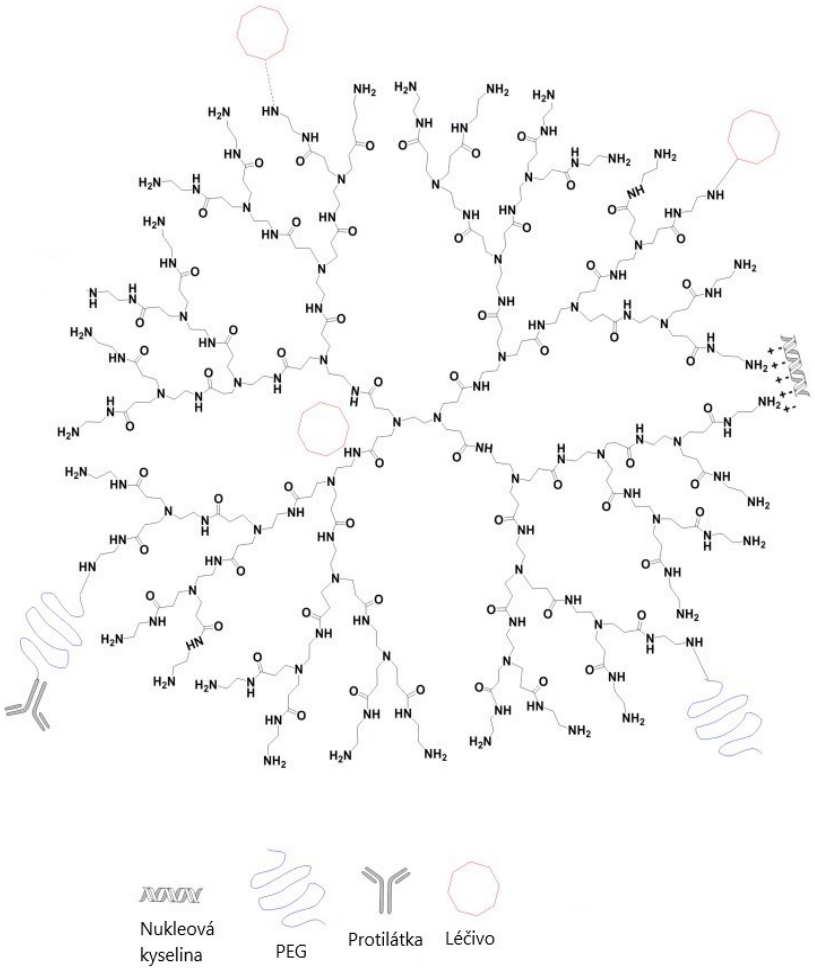


Obrázek č. 7 – Schématické znázornění struktury dendrimeru včetně vytváření generací zobrazených jako G1, G2 a G3 [43]

Dendritické molekuly se za poslední dvě dekády staly jedním z nejzajímavějších pokročilých systémů pro distribuci léčiv. Jednou z vlastností, která je činí natolik atraktivními, je možnost přesně navrhnout jejich strukturu. Během syntézy lze ovlivňovat větvení řetězců a upravovat koncové skupiny, čímž lze modifikovat vlastnosti těchto molekul a tím je přizpůsobovat k různým terapeutickým potřebám. [39, 42] Významným rysem je jejich rozpustnost ve vodných roztocích. Touto pro ně typickou vlastností výrazně zvyšují absorpci a

biologickou dostupnost ve vodě jinak nerozpustných léčiv. To celé je umožněno fyzikální interakcí dendrimeru s účinnou látkou, která může být enkapsulována uvnitř dutiny nebo navázána na terminální povrchové skupiny. Obvykle jsou menší organické molekuly léčiv vázány ve vnitřním prostoru dendrimeru, kde se hydrofobní léčivo asociuje s nepolárním centrem zejména díky hydrofobním interakcím. Větší, zejména biomolekuly (například nukleové kyseliny), preferují adsorbci na periferii (obrázek č. 8). Síly, které vedou k těmto interakcím, zahrnují dále vodíkové vazby, van der Waalsovy síly a elektrostatické interakce mezi opačnými náboji dendrimeru a léčiva. [39, 42, 43] Technika zapouzdření látky bývá umožněna čistě na fyzikálním základu nebo zahrnuje interakce se specifickými strukturami nanonosiče. Kupříkladu existence atomů kyslíku a dusíku ve vnitřní struktuře dendrimeru zajišťuje vznik interakcí s léčivem typu vodíkových vazeb. [44]

Dendrimery také poskytují ochranu léčiva, se kterým jsou konjugované, a tak zajišťují jeho stabilitu. [45]



Obrázek č. 8 – Možnosti vazby molekul s dendrimerem a zároveň zobrazení struktury PAMAM dendrimeru [41]

3.2.2 Typy dendrimerů

Od 80. let 20. století byla vyvinuta a používána řada dendrimerů, přesto však polyamidoaminové (PAMAM) dendrimery jsou nepochybně nejpoužívanější a nejlépe studované. [39] Jádro PAMAM je nejčastěji ethylendiamin, větvící se jednotky jsou založeny na methylakrylátu a ethylendiaminu. Koncové skupiny jsou tvořeny aminem, u některých generací karboxylem. Jejich struktura a vlastnosti je tak činí vhodnými kandidáty pro fixaci a zapouzdření léčiv. Lze je využít ke zlepšení solubilizace, biologické dostupnosti i permeace kůží. V důsledku toho hrají dendrimery PAMAM důležitou roli v různých aplikačních systémech, a to zejména transdermálních, očních a plicních. [39, 44, 46]

Prvotními průkopníky se však staly dendrimery na bázi poly(propyleniminu) (PPI). Jejich jádro bývá založeno na 1,4-diaminobutanu, jako větvící jednotky se používají propyleniminové monomery. Jejich interiér tak obsahuje různé terciární tris-propylenaminy. Výhodou tohoto typu dendrimerů je jednoduchá povrchová modifikace. Mechanismus zvyšování rozpustnosti spočívá ve vazbě léčiva skrze elektrostatické interakce. [41, 44]

Dalším typem jsou dendrimery poly-L-lysinu. S peptidovými vazbami ve svých strukturách jsou jejich základní i větvící jednotky založeny na aminokyselině lysinu. Díky jejich vynikající kondenzaci s oligonukleotidy je lze využít jako genové nosiče. Přestože mají řadu výhodných vlastností, kvůli jejich vysoké buněčné toxicitě mají limitované použití. [44]

Glykodendrimery jsou novějším typem dendrimerů, které se vyznačují nižší cytotoxicitou. Jejich struktura se skládá ze sacharidových zbytků v podobě terminálních skupin. Stejně tak i jádro těchto částic obsahuje cukerné jednotky. [47]

Z dalších typů za zmínku stojí dendrimery karbosilanové, peptidové, hybridní či dendrimery založené na polyesteru. [44]

3.2.3 Využití dendrimerů k transdermální aplikaci

Dendrimery jsou díky svým výhodným vlastnostem používány v různých terapeutických oborech, zejména v terapii zánětlivých onemocnění, virových i bakteriálních infekcí, v posledních letech však především v nádorové terapii. [47]

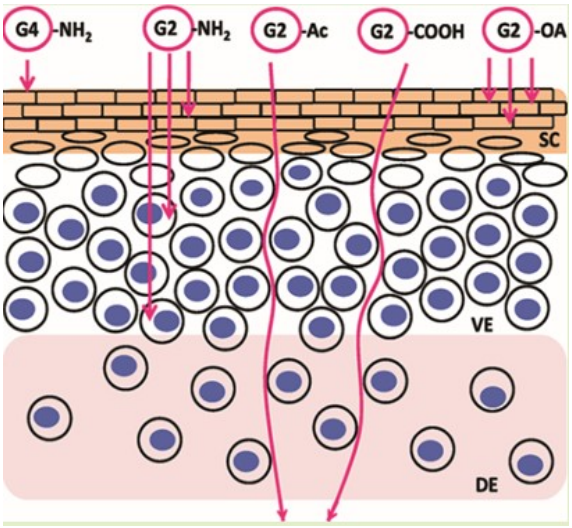
Bylo prokázáno, že dendrimery jsou účinné jako transdermální systémy pro podávání především nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSAID) jako je např. ketoprofen nebo diflunisal. Konjugáty těchto látek s dendrimery páté generace byly syntetizovány a testovány. Komplexy vykazovaly výrazně zlepšenou rozpustnost, což vedlo až k třikrát vyšší permeabilitě ve srovnání s podáním ketoprofenu a diflunisalu samostatně. Tato vysoká prostupnost

dendrimerů skrze biologické bariéry a buněčné membrány z nich činí vhodné akceleranty pro kožní permeaci. [47, 48]

Stratum corneum, ale i další epidermální vrstvy představují poměrně velkou výzvu při dosahování účinného (trans)dermálního podávání léčiv. Interakce dendrimerů s vrstvami pokožky i jejich průnik skrze ni jsou závislé na velikosti molekul a jejich povrchových funkčních skupinách. Výsledky studie, která porovnávala průnik PAMAM dendrimerů generace 2 a 4 (G2 a G4) skrze SC v závislosti na jejich velikosti, povrchovém náboji a hydrofobicitě, potvrdily, že velikostí menší G2 dendrimery pronikají do SC i dalších vrstev *epidermis* lépe než větší G4. Tyto naopak vykazují vyšší retenci ve SC. Stejně tak bylo zjištěno, že pokud jsou G2 PAMAM povrchově modifikovány, a sice acetylací nebo karboxylací, vykazují zvýšenou permeaci kůží a pravděpodobně extracelulárně difundují. Naopak, pokud byla na G2 navázána kyselina olejová, vedlo to k jejich zvýšené absorbci a zadržování ve SC (obrázek č. 9). [46]

Pravděpodobně jeden z největších potenciálů dendrimerů spočívá ve zlepšení farmakokinetických vlastností léčiv na nádorová onemocnění. Léčiva konjugovaná s dendrimery vykazují zvýšenou rozpustnost ve vodě, vyšší biologickou dostupnost i stabilitu a naopak sníženou systémovou toxicitu. Navíc patofyziologické vlastnosti nádoru, mezi které patří rozsáhlá angiogeneze, zvýšená propustnost cév a omezená lymfodrenáž, umožňují pasivní transport nanočástic a tím jejich selektivní akumulaci v nádorové tkáni. [49]

Velice perspektivní kombinaci tvoří dendrimery s jinými nanosystémy. Mohou být spojeny s liposomy či uhlíkovými nanotrubičkami za účelem modulace rozpustnosti léčiva, které je těmito systémy dopravováno do požadované tkáně. [50]

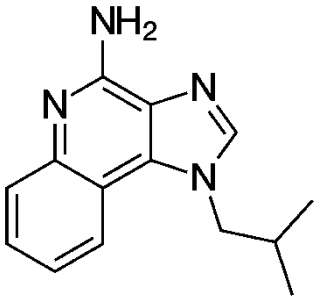


Obrázek č. 9 – Znázorněné porovnání schopnosti penetrace G2 a G4 PAMAM dendrimerů [46]

4 Imiquimod

Imiquimod (IMQ), jakožto modulátor imunitní odpovědi, se používá k lokální léčbě perigenitálních a perianálních kondylomat, aktinické keratózy a povrchových bazocelulárních karcinomů dospělých. Na trhu je dostupný ve formě krémů, konkrétně se jedná o 3,75% Zyclara a 5% Aldara. [51] Mechanismus jeho působení spočívá v aktivaci imunitních buněk prostřednictvím tzv. toll like receptoru 7, který se nachází na membránách monocytů (makrofágů) a dendritických buněk. Vazbou na tento receptor dozrávají epidermální Langerhansovy buňky, které migrují do lymfatických uzlin, kde na svém povrchu vystavují dané antigeny pro další buňky imunitního systému. Produkují prozánětlivé cytokiny - interferon alfa, interleukin 1 a tumor nekrotizující faktor alfa, které spouští celou kaskádu buněčných dějů. Dochází ke stimulaci protinádorové imunity, k modifikaci buněčných funkcí jako je spuštění apoptózy a celkově zničení nádorových buněk. [8, 52, 53]

Chemicky se jedná o imidazochinolon (obrázek č. 10) s velmi nízkou rozpustností ve vodě (<0,2 mg/ml) i většině farmaceutických pomocných látek. [6, 54] Kvůli tomu velmi špatně penetruje kůží. [54] Při jeho aplikaci na povrch kůže často způsobuje lokální nežádoucí reakce jako je erytém, pálení, bolest a pruritus v místě podání. [51, 52] V souvislosti s podáním IMQ se mohou objevit i systémové nežádoucí účinky typu bolesti hlavy či myalgie. Jejich výskyt a intenzita však souvisí s množstvím aplikovaného krému, prodlouženou dobou působení na pokožce i frekvencí podávání této lékové formy. [52] Systémové nežádoucí účinky bývají obvykle méně časté. Je to dáno nižší absorpcí látky kůží do systémové cirkulace, která při aplikaci 3,75% krému Zyclara (při jediné topicky aplikované dávce) představovala méně než 0,9 %. [55]



Obrázek č. 10 – Struktura imiquimodu [55]

Experimentální část

5 Použité přístroje a chemikálie

Pro experimentální část diplomové práce byly použity níže uvedené výchozí látky a rozpouštědla:

Ultračistá voda, čištěná systémem mili-Q, Faf UK

Dendrimery G-0, G-1, G-2, G-3, Faf UK [56]

Chloroform, PENTA, ČR

Imiquimod, Tokyo Chemical Industry CO., Japonsko

L-α-Phosphatidylcholine, Sigma-Aldrich, Německo

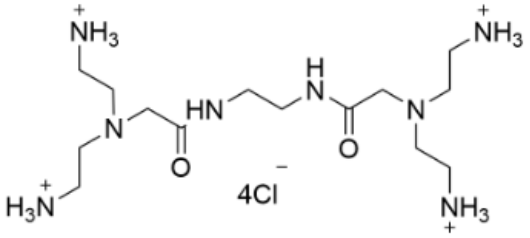
Methanol, PENTA, ČR

Sephadex G-50, Sigma-Aldrich, Německo

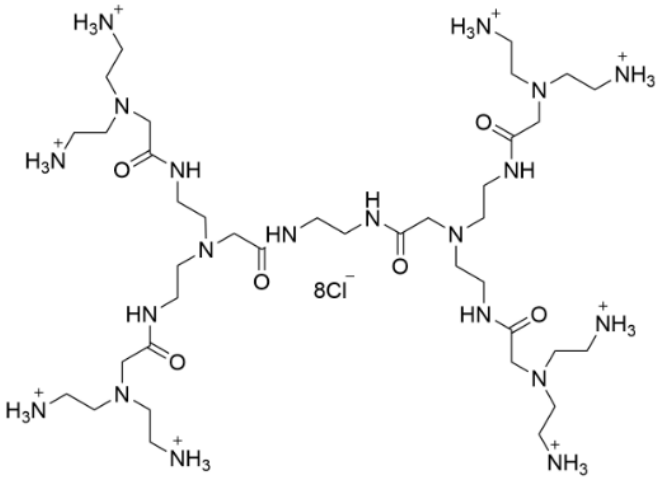
Z použitých přístrojů bylo pro navažování jednotlivých surovin využito analytických vah, Ohaus Pioneer a Ohaus Discovery. Kapalné látky byly odměřovány pomocí pipet s nastavitelným objemem Transferpette S, Brand. Homogenizace připravených roztoků byla umožněna díky přístroji Vortex MS 3 Digital, IKA. Sonikace byla prováděna v ultrazvukové lázni K-12 LE, Kraintek. Odpařování organického rozpouštědla bylo zajištěno díky využití rotační vakuové odparky IKA RV 10, Basic. Následná extruze připravených liposomálních směsí byla prováděna pomocí extrudéru Mini Extruder, Avanti Polar Lipids. Aby bylo dosaženo požadované teploty fázového přechodu lipidů při extruzi, extrudér byl zahříván magnetickou míchačkou MR Hei-Standard, Heidolph s nastavitelnou teplotou. Při samotné extruzi byly liposomy protlačovány pomocí plynotěsných injekčních stříkaček o objemu 1000 µL, firmy Avanti Polar Lipids, skrze membránu Nuclepore o velikostech 400 nm a následně 100 nm, firma Whatman. Membrána byla vždy ukotvena mezi dvěma podpůrnými filtry o velikosti 10 mm, Avanti Polar Lipids. Po provedené extruzi byly hodnoty zeta potenciálu, velikosti a PDI naměřeny přístrojem Zetasizer Nano-ZS, Malvern, přičemž měření bylo vždy prováděno v kyvetách typu DTS 1060, Malvern. Pro centrifugaci připravených liposomů s dendrimery, bylo využito Centrifugy MPW 260 R. Zjišťování koncentrace imiquimodu po purifikaci a stejně tak i enkapsulační účinnost byla umožněna díky systému HPLC 1290 Infinity, Agilent.

6 Příprava liposomů s enkapsulovaným imiquimodem a dendrimery

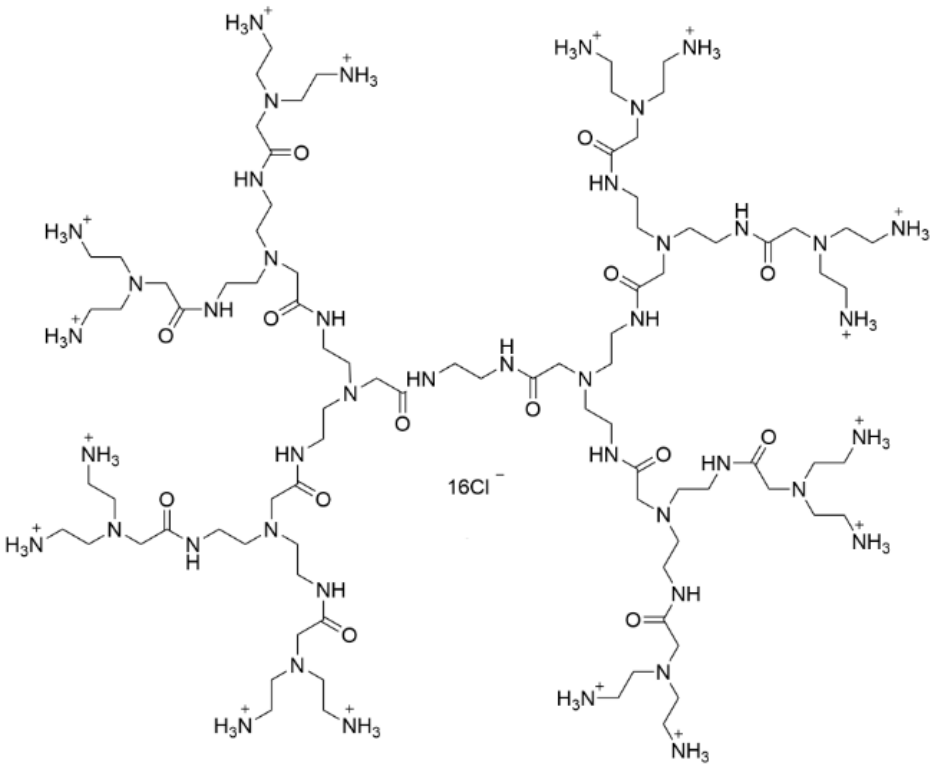
6.1 Struktury použitých generací dendrimerů



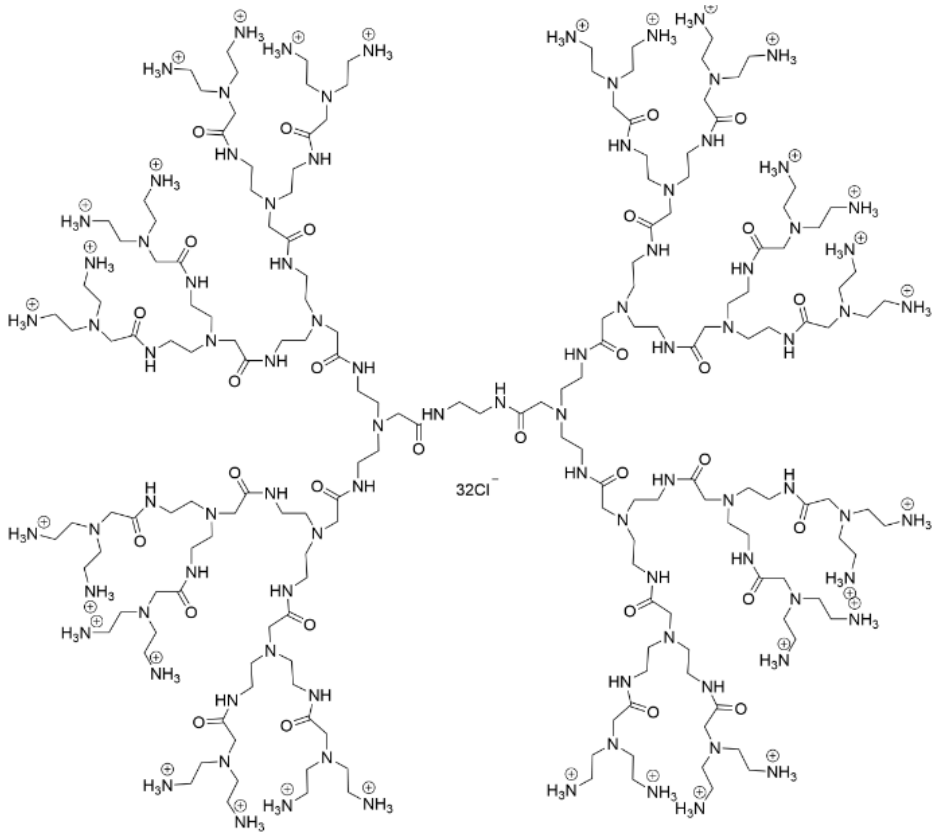
G0



G1



G2



G3

6.2 Příprava metodou imiquimod inkorporovaný do lipidů

Název prvního připravovaného vzorku G0-5 odkazuje na použití nulté generace dendrimerů a jejich zamýšlenou koncentraci 5 mg/ml. Pro jeho přípravu bylo do baňky s kulatým dnem naváženo 200 mg vaječného fosfatidylcholinu (PC) a zároveň bylo přidáno 5 mg IMQ. K rozpuštění bylo přidáno 10 ml směsi organických rozpouštědel chloroform/methanol (MeOH) v poměru 4:1. Baňka s touto směsí byla na 10 minut vložena do lázně sonikátoru pro homogenizaci.

Podobně byl připraven vzorek G0-10 - vzorek s opětovným použitím nulté generace dendrimerů, ale s jejich vyšší koncentrací, a sice 10 mg/ml. Do baňky bylo naváženo 200 mg PC, avšak tentokrát společně s 10 mg IMQ. Pro rozpuštění bylo přidáno 10 ml směsi chloroform/MeOH 4:1. K následnému rozpuštění lipidů v rozpouštědle a k homogenizaci došlo vložením baňky se směsí na 10 minut do sonikátoru.

Následující kroky probíhaly pro oba vzorky stejně. Pro odpaření organických rozpouštědel bylo využito rotační vakuové odparky, kdy pod sníženým tlakem během několika minut došlo k vytvoření tenké lipidové vrstvy na dně baňky. Odstranění veškerého rozpouštědla bylo zajištěno pumpou s vysokým vakuem, kde byla baňka ponechána 1 hodinu. Poté byla tenká vrstva lipidů hydratována roztokem dendrimerů odpovídající koncentrace. Pro hydrataci vzorku G0-5 byl roztok připraven rozpuštěním 10 mg dendrimerů G0 ve 2 ml ultračištěné vody, k dosažení koncentrace 5 mg/ml. Pro vzorek G0-10 byl připraven roztok dendrimerů navážením 20 mg G0 a jejich rozpuštěním ve 2 ml vody, pro koncentraci 10 mg/ml, kterým byla vrstva lipidů následně hydratována.

Po hydrataci patřičnými roztoky již opět probíhala příprava obdobně. Pro míchání a souběžnou tvorbu liposomů bylo využito rotační vakuové odparky. Baňka se vzorkem byla napojena na odparku, která byla překryta folií tak, aby nedocházelo k nechtěnému odpaření, nýbrž jen k míchání. Celý proces míchání probíhal nad teplotou fázového přechodu lipidů (>65°C), a to díky vodní lázni, u které byla po celou dobu tato teplota kontrolována, a do které byla baňka se směsí během míchání zčásti ponořena. Po 1 hodině byla směs liposomů s dendrimery vložena do lázně sonikátoru a sonikována po dobu další 1 hodiny, jakožto první krok zmenšování částic a rozrušování agregátů. Poté byly vzorky ve zkumavkách uloženy do lednice, kde byly ponechány přes noc.

Totožným způsobem byly připraveny vzorky G1-5; G1-10; G2-5; G2-10; G3-5 a G3-10, jak je znázorněno v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 – Připravené liposomální vzorky s obsahem odlišných generací dendrimerů a imiquimodu a tomu odpovídající dosažené koncentrace

Vzorek	Generace dendrimerů	Množství dendrimerů (mg)	Koncentrace dendrimerů (mg/ml)	Množství imiquimodu (mg)	Koncentrace imiquimodu (mg/ml)
G0-5	0	10	5	5	2,5
G0-10	0	20	10	10	5
G1-5	1	10	5	5	2,5
G1-10	1	20	10	10	5
G2-5	2	10	5	5	2,5
G2-10	2	20	10	10	5
G3-5	3	10	5	5	2,5
G3-10	3	20	10	10	5

6.2.1 Extruze

Pro zmenšení připravených liposomů na požadovanou velikost byla zvolena metoda ruční extruze. Po celou dobu bylo nutné, aby extruze probíhala nad teplotou fázového přechodu lipidů (>65°C). Pro tento účel byla využita magnetická míchačka s ohřevnou plochou, která byla temperována právě na výše zmíněnou teplotu. Na zahřívací plochu byl vložen stojan extrudéru a pomocí teploměru vloženého do jamky extrudéru byla teplota kontrolována.

Do stojanu extrudéru byl vnesen vlastní extrudér, do něhož byla vložena zvlhčená polykarbonátová membrána o velikosti pórů 400 nm a dva předvlhčené podpůrné filtry z obou stran membrány. Před každou samotnou extruzí liposomů bylo nutné membránu připravit na vlastní zmenšování částic pro zajištění co nejlepších výsledků. Toho bylo dosaženo tak, že jedna z plynotěsných stříkaček byla naplněna vodou a vložena do jednoho z konců extrudéru, zatímco druhá prázdná injekční stříkačka s pístem nastaveným na nulu byla vložena do opačného konce extrudéru. Následně byla voda přetlačována skrze membránu z jedné injekční stříkačky do druhé, a to v celkovém počtu 11 protlačení, které bylo shledáno jako nejadekvátnější pro hydrataci membrány i následnou extruzi. Poté byla injekční stříkačka vyprázdněna, hned opět naplněna liposomální suspenzí G0-5 a vložena do jednoho konce extrudéru, zatímco druhá injekční stříkačka na straně opačné zůstala prázdná. Po dobu 15 minut byla suspenze ponechána v extrudéru na topném bloku, aby došlo k ekvilibraci na požadovanou

teplotu *Tc*. Poté již následovala vlastní extruze. Píst naplněné stříkačky byl jemně tlačen, aby nedošlo k protržení membrány, ale k celkovému přenesení vzorku G0-5 skrze membránu do stříkačky opačné, a to opět 11×. Po extruzi s membránou 400 nm byla suspenze přenesena do zkumavky. Zařízení extrudéru bylo vyčištěno a dovnitř byla vnesena nová membrána o velikosti 100 nm a dva podpůrné filtry. Membrána byla opět zvlhčena protlačováním vody 11× z jedné plynotěsné stříkačky do druhé. Po jejich následném vyprázdnění byla jedna z nich naplněna vzorkem G0-5 extrudovaným skrze membránu 400 nm. Suspenze byla 11× protlačována skrz nitro extrudéru z jedné stříkačky do druhé a po dokončené extruzi byla směs uložena do lednice.

Analogicky byly extrudovány i další vzorky liposomů s dendrimery a IMQ G0-10; G1-5; G1-10; G2-5; G2-10; G3-5 a G3-10.

6.2.2 Měření velikosti a Zeta potenciálu

Pro zjištění získané velikosti po provedené extruzi bylo využito měření na přístroji ZetaSizer. Pomocí něj bylo možné rovněž změřit hodnotu zeta potenciálu, která vypovídá o stabilitě vzorku a stejně tak i PDI, který je měřítkem heterogenity vzorku.

Měření probíhalo v kyvetě odebráním 0,1 ml extrudovaného vzorku a jeho smícháním s 0,5 ml ultračištěné vody.

U každého z připravených vzorků byla v průběhu 8 týdnů sledována stabilita pomocí měření případné měnící se velikosti částic a PDI. V tabulce č. 2 jsou uvedeny hodnoty, kdy 0. týden odkazuje na prvotní měření bezprostředně po extruzi a každé další měření probíhalo vždy v odstupu 2 týdnů.

6.2.3 Purifikace

Před samotným čištěním vzorku od nezapouzdřeného léčiva bylo nutné zjistit množství celkového IMQ ve vzorku pro následný výpočet účinnosti enkapsulace. Aby bylo možné koncentraci léčiva kvantifikovat pomocí HPLC, bylo nutné vzorek nejprve zředit. Požadované zředění bylo 1000×, proto bylo odebráno 0,1 ml liposomů a zředěno 0,9 ml MeOH, pro získání 10× zředěného vzorku, a takto zopakováno ještě 2×, aby výsledné zředění bylo 1000. Methanol sloužil nejen pro zředění, ale především k narušení membrány liposomů, díky čemuž bylo možno změřit celkovou koncentraci léčiva, tj. léčiva enkapsulovaného i neenkapsulovaného. Z takto naředěného vzorku bylo odebráno 0,3 ml a přefiltrováno skrze vatu do vialky pro měření koncentrace IMQ pomocí HPLC.

Purifikace byla prováděna za účelem vyčištění liposomů od nezapouzdřeného léčiva, a bylo pro ni využito metody centrifugace. Do odstředivky (centrifugy) byly vloženy zkumavky s injekčními stříkačkami uvnitř. Každá z nich byla naplněna 3 ml Sephadex gelu, který byl připraven nabobtnáním sypkého prášku Sephadex G-50 ve vodě. Každý 1 g tohoto prášku potřebuje 20 ml vody, aby nabobtnal do 10 ml gelu. Pro získání gelu bylo den předem naváženo 3 g Sephadex G-50, který byl smíchán s 60 ml vody, a tato směs překrytá hliníkovou folií byla uchovávána v lednici přes noc.

Do konců stříkaček byl vložen smotek vaty, aby při odstřeďování docházelo pouze k filtraci tekutiny. Po naplnění stříkaček gelem bylo zbylé množství roztoku z gelu odstředěno do zkumavek využitím rotoru 11746 při otáčkách 1500/min po dobu 3 minut.

Každý 1 ml gelu byl nasycen 0,044 ml tzv. prázdných liposomů, tedy 3 ml gelu nasyceny 0,132 ml a odstředěny. Prázdné liposomy neobsahovaly žádné léčivo ani dendrimery. Byly připraveny navážením 200 mg vaječného PC a jeho rozpuštěním v 10 ml rozpouštědla chloroform/MeOH (4:1). Baňka s touto směsí byla vložena do lázně sonikátoru na 10 minut. Pro odpaření organického rozpouštědla byla využita rotační vakuová odparka po dobu přibližně 15 minut, dokud se na dně baňky nevytvořila tenká vrstva lipidového filmu. Aby bylo zajištěno plné odpaření rozpouštědla, byl lipidový film podroben ještě odpařování s využitím pumpy vysokého vakua na 1 hodinu. Následovala hydratace lipidového filmu 2 ml ultračištěné vody a vložení baňky na rotační vakuovou odparku na 1 hodinu při teplotě T_c. Vývěva odparky byla opět překryta folií, aby nedocházelo k odpařování tekutiny. Po hodině míchání na vakuové odparce byla směs sonikována po dobu další 1 hodiny. Následně byl vzorek přemístěn do lednice a zde uchováván. Stejně tak extruze prázdných liposomů k získání finální velikosti 100 nm, byla provedena analogicky jako u všech ostatních vzorků, jak je popsáno v kapitole 6.2.1 Extruze.

Po nasycení gelu prázdnými liposomy, následovalo jeho vymytí 0,2 ml vody a odstředění. Tento krok byl zopakován celkem 3× po sobě. Dalším krokem bylo odstranění zkumavek s profiltrovaným roztokem a vložení stříkaček do nových zkumavek pro pozdější odběr purifikovaných liposomů. Posléze bylo aplikováno 0,3 ml sledovaného vzorku do středu gelu a odstředěno 2× po sobě. Při centrifugaci bylo volné léčivo díky své menší molekulové hmotnosti zachyceno v pórech gelu, zatímco samotné liposomy se zapouzdřeným léčivem byly odstředěny do zkumavky.

K měření koncentrace zapouzdřeného IMQ bylo odebráno 0,1 ml purifikovaného vzorku a zředěno 0,9 ml MeOH. Výsledné zředění bylo 1000. Z tohoto roztoku bylo odebráno

0,3 ml, u kterého byla po přefiltrování skrze vatu měřena koncentrace léčiva a enkapsulační účinnost pomocí systému HPLC.

6.3 Příprava metodou imiquimod rozpuštěný v roztoku dendrimerů

6.3.1 Příprava roztoku dendrimerů s imiquimodem

Postupně byly připraveny roztoky IMQ a dendrimerů generace 0, 1, 2 a 3 tak, aby každý z roztoků dané generace byl připraven ve dvou koncentracích. Tedy pro přípravu vzorku G0-5 bylo rozpuštěno 10 mg dendrimer G0 ve 2 ml ultračištěné vody pro dosažení koncentrace 5 mg/ml. Společně s dendrimery bylo rozpuštěno 5 mg IMQ a tato směs byla několik vteřin vortexována a následně na 10 minut vložena do ultrazvukové lázně, aby vznikl homogenní roztok. Obdobně byl připraven vzorek G0-10, kdy 20 mg dendrimerů G0 bylo opět rozpuštěno ve 2 ml vody k získání koncentrace 10 mg/ml. V tomto roztoku byl následně rozpuštěn IMQ v množství 10 mg. Roztok byl opět s využitím přístroje Vortex a poté i sonikátoru homogenizován. Analogickým způsobem byly připraveny roztoky dendrimerů s IMQ G1-5, G1-10, G2-5, G2-10, G3-5 a G3-10, jak bylo možné vidět v tabulce č. 1. Připravené vzorky byly následně uchovávány v lednici.

6.3.2 Příprava liposomů

Pro přípravu liposomů byl využit PC, kterého bylo naváženo 200 mg do varné baňky. Následně bylo přidáno 10 ml rozpouštědla – chloroform/MeOH (4:1). Baňka byla poté po dobu 10 minut sonikována, aby došlo ke kompletnímu rozpuštění fosfolipidů v rozpouštědle. S využitím rotační vakuové odparky byla pod sníženým tlakem odpařena po přibližně 10 minutách většina organického rozpouštědla, přičemž na dně baňky ulpěl tenký film lipidů. Aby bylo zajištěno odpaření veškerého rozpouštědla, byla baňka s lipidovým filmem ponechána ještě 1 hodinu pod vysokým vakuem.

Poté byl vytvořený lipidový film hydratován dříve připraveným 2 ml roztokem dendrimerů s IMQ. S využitím rotační vakuové odparky byla směs hodinu míchána při teplotě T_c za účelem vzniku liposomů. Po celou dobu míchání byla vývěva rotační vakuové odparky překryta folií. Po hodině byla baňka s liposomální směsí vyjmuta a vložena na další hodinu do sonikátoru. Nakonec byla celá směs uložena ve zkumavce do lednice.

6.3.3 Extruze, měření velikosti, Zeta potenciálu a následná purifikace

Veškeré další kroky jako extruze, měření fyzikálně-chemických charakteristik na přístroji ZetaSizer, včetně následujícího čištění liposomů od nezapouzdřeného léčiva probíhaly totožně jako v případě přípravy liposomů s imiquimodem inkorporovaným do lipidů, viz kapitola 6.2.1 Extruze, 6.2.2 Měření velikosti a Zeta potenciálu a 6.2.3 Purifikace.

7 Výsledky a diskuze

Schopnost dendritických molekul zvyšovat rozpustnost ve vodě hydrofobním látkám a tím následně zlepšovat i jejich biodostupnost, byla prokázána řadou studií. [41, 43, 47, 57] Liposomy díky své strukturální podobnosti s buněčnou membránou, schopnosti inkorporovat různé substance a dalším dokázaným benefitům, byly již nespočtem předchozích prací využity a označeny jako ideální systémy pro distribuci léčiv. [11, 13, 20, 21, 25] Sloučené liposomy s dendrimery neboli liposomálně uzamčené dendrimery (LLD) zmiňuje již studie, která porovnávala účinnost enkapsulace u cytostatika doxorubicinu. Ten byl enkapsulován v jednom případě v liposomech společně s dendrimery, v druhém případě do čistých liposomů. Výsledky práce jasně ukázaly, že účinnost enkapsulace byla zřetelně vyšší u doxorubicinu uzavřeného v LLD. [58]

Předmětem této práce se proto stala kombinace obou výše uvedených formulací za účelem dosažení zvýšené koncentrace chemoterapeutika imiquimodu v místě cíleného působení.

Příprava liposomů probíhala metodou hydratace lipidového filmu. Některé studie uvádí potenciální nevýhody tohoto procesu, jako je nízká enkapsulační účinnost zejména u ve vodě rozpustných léčiv, produkce velkých nehomogenních MLV a tedy nutnost dalších postsyntetických úprav velikosti liposomů. [21, 23] Na druhou stranu ostatní způsoby přípravy liposomů, jako je metoda ethanolové injekce, etherové injekce, reverzně fázová evaporace či nanofluidizace nepředstavovaly žádné benefity. Nevýhodou ethanolové injekce je poměrně náročné odstranění veškerého ethanolu. Etherová injekce pak není vhodná pro všechny látky kvůli možné degradaci vysokými teplotami. [20, 21] Metoda hydratace lipidového filmu byla vybrána z několika důvodů: lipofilita léčiva, nutnost extruze pro získání částic o definované velikosti a jednoduché využití. Mimo jiné, v popředí zájmu této diplomové práce byla tendence dodržet obdobný postup přípravy, jako tomu bylo u předešlé práce, která měla podobný záměr, a to enkapsulaci IMQ do čistých liposomů (bez použití dendrimerů). [6]

Primární postup, který byl použit, bylo začlenění IMQ do lipidů s následnou hydratací roztokem dendrimerů. Tento přístup byl zvolen pro z předchozí práce zjištěnou vyšší enkapsulační účinnost právě, pokud je IMQ začleněn do lipidů (EE byla 62%) oproti tomu, když je v roztoku (EE byla 31%). [6]

K přípravě byl využit vaječný PC, neutrální lipid patřící do skupiny glycerofosfolipidů, který je jeden z nejvyužívanějších pro tvorbu liposomů. Literatura však zmiňuje i možnost aplikace dalších fosfolipidů k ovlivnění vlastností finálních liposomů. Jedná se například o

zavedení fosfatidylglycerolu, který uděluje lipidům náboj k zabránění fúze částic nebo zavedení cholesterolu pro snížení propustnosti lipidové dvojvrstvy. [22]

Jako první krok zmenšování částic byla využita sonikace v ultrazvukové lázni, jako příprava částic na následnou extruzi. Studie porovnávající efekt homogenizace, sonikace a extruze zmiňuje tuto metodu jako méně účinnou ke zmenšování částic. Uvádí, že při 30minutové sonikaci nebylo dosaženo požadované velikosti částic a bylo rovněž nutné využít extruzi s membránou 100 nm pro získání definované velikosti výsledných liposomů. Ze studie rovněž vyplývá, že prodloužené působení ultrazvuku může vést k peroxidačnímu poškození lipidů či degradaci látky, která má být zachycena. Delší aplikace ultrazvuku s cílem efektivnější redukce velikosti částic není proto vhodná. [28] Během experimentální části této diplomové práce byly vzorky po jejich přípravě sonikovány 1 hodinu. Z výsledků měření se hodnoty velikostí částic bezprostředně po sonikaci pohybovaly okolo 1000 nm v průměru. Nutnost provedení extruze byla tedy naprosto zřejmá.

Extruze po celou dobu probíhala nad teplotou fázového přechodu lipidů. Ve vztahu k adekvátnímu počtu protlačení vzorku membránou byla hodnota 11× převzata z předchozí obdobné práce přípravy liposomů s IMQ bez dendrimerů. [6] Podle dostupných informací by 5 až 10 protlačení membránou o rozměrech pórů 100 nm mělo zajistit tvorbu unilamelárních vezikul s průměrnou velikostí 110-120 nm. [20] Výsledky velikostí liposomů této diplomové práce jsou však důkazem, že počet 11 opakování byl zvolen správně.

7.1 Vzorky připravené metodou imiquimod inkorporovaný do lipidů

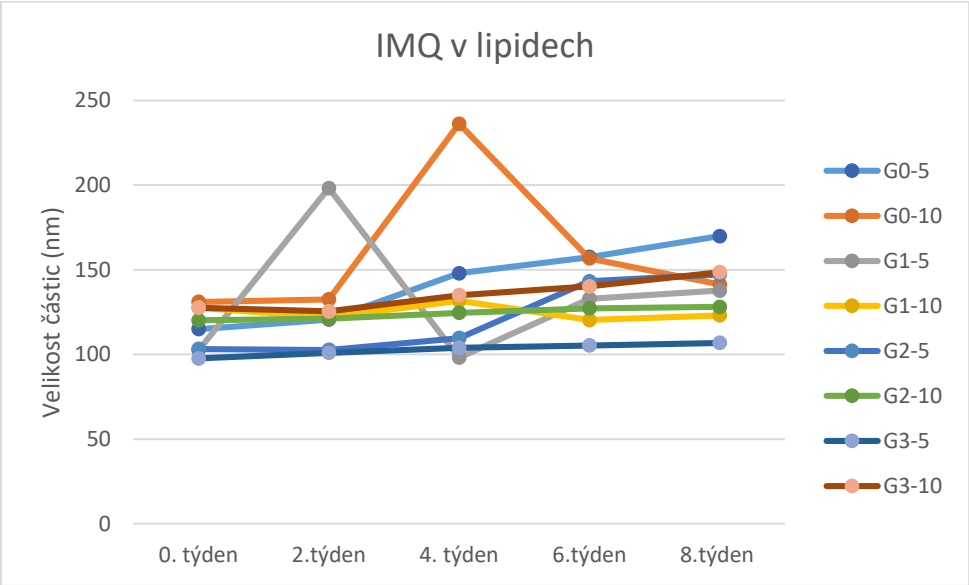
Tabulka č. 2 – Průměry naměřených velikostí a PDI u jednotlivých vzorků vždy v odstupu 2 týdnů

Vzorek	0. týden		2. týden		4. týden		6. týden		8. týden	
	Velikost ±SD	PDI	Velikost ±SD	PDI	Velikost ±SD	PDI	Velikost ±SD	PDI	Velikost ±SD	PDI
G0-5	115,0 ±0,8	0,146	120,6 ±1,0	0,230	147,9 ±1,8	0,352	157,5 ±1,6	0,265	169,9 ±1,4	0,204
G0-10	131,0 ±1,3	0,161	132,5 ±0,3	0,158	236,2 ±9,1	0,457	156,7 ±5,1	0,247	141,4 ±1,6	0,245
G1-5	102,5 ±0,5	0,196	198,2 ±38,2	0,240	98,2 ±3,4	0,223	132,9 ±2,6	0,306	137,7 ±0,5	0,299
G1-10	127,6 ±1,0	0,253	121,9 ±0,4	0,172	131,8 ±3,5	0,229	120,3 ±2,0	0,244	123,1 ±0,9	0,251
G2-5	103,2 ±0,8	0,155	102,7 ±1,5	0,217	109,7 ±1,9	0,271	143,2 ±2,3	0,244	147,3 ±2,7	0,245
G2-10	120,2 ±3,7	0,172	121,1 ±2,0	0,203	124,6 ±2,7	0,187	127,3 ±0,7	0,193	128,1 ±0,6	0,192
G3-5	97,7 ±0,9	0,202	101,0 ±1,1	0,236	103,9 ±2,7	0,238	105,3 ±0,3	0,239	106,8 ±0,3	0,241
G3-10	127,6 ±1,6	0,251	125,4 ±3,0	0,213	135,0 ±2,1	0,271	140,2 ±0,5	0,268	148,6 ±0,5	0,266

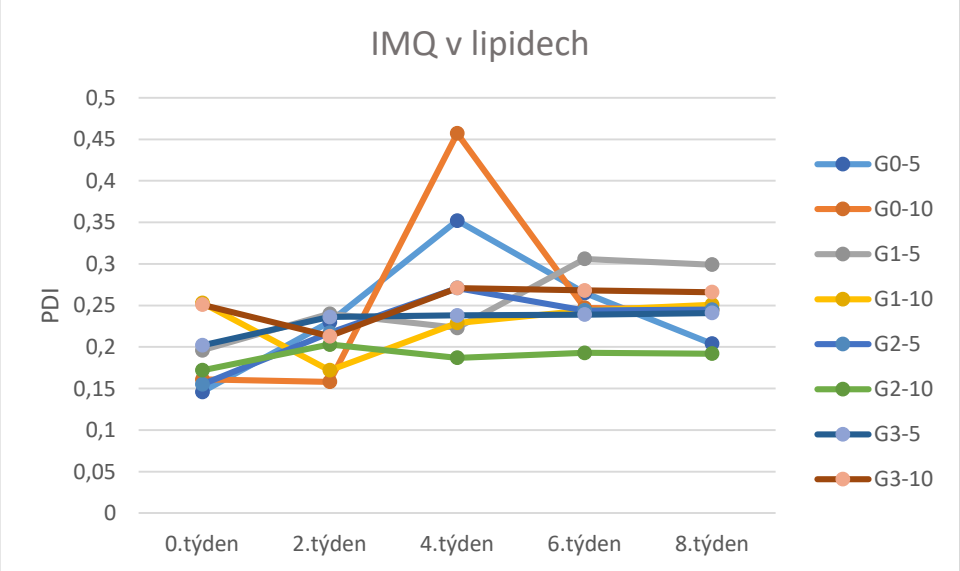
Tabulka č. 2 shrnuje naměřené velikosti částic se směrodatnou odchylkou (SD) a PDI. Jedná se o průměrné hodnoty vypočítané vždy ze tří měření. 0. týden odkazuje na měření těsně po extruzi membránou o velikosti pórů 100 nm a pak vždy po 2 týdnech. Celková doba měření 8 týdnů byla zvolena z důvodu zjištění stability pro budoucí praktické využití hotového léčivého přípravku. Pro řadu (trans)dermálních léčivých přípravků připravovaných v lékárně platí doporučené doby použitelnosti vycházející z Českého lékopisu 2017, a tyto se obvykle pohybují kolem 1-2 měsíců. [59] Cílem tedy bylo zjistit, zda a případně i jak dlouho zůstává vzorek po jeho přípravě stabilní. Výsledky v tabulce naznačují, že velikost částic i PDI se v průběhu týdnů zvyšovaly vcelku jen minimálně a vzorky tak lze považovat za stabilní.

Jedinou výjimku z hlediska PDI představovaly vzorky naměřené ve 4. týdnu, a sice G0-5 s hodnotou 0,357 a G0-10 s hodnotou 0,457. Jak bylo již zmíněno v teoretické části, hodnoty PDI by se měly pohybovat do 0,3. Tyto vzorky by tak bylo možno považovat za potencionálně nestabilní, pakliže by hodnoty PDI i v dalších týdnech měření stále rostly. Jak je však uvedeno

v tabulce č. 2, následující měření z 6. a 8. týdne jsou již opět v limitních hodnotách, a tak lze nanejvýš předpokládat, že měření bylo nesprávné. O tom svědčí i větší velikost částic u G0-10 ve 4. týdnu měření (236,2 nm), kdy při dalších měřeních v 6. a 8. týdnu byly hodnoty již opět podobné a lišily se od sebe nepatrně. Možným řešením by tedy bylo bezprostřední zopakování extruze u G0-5 i G0-10. Tyto výkyvy v hodnotách je také možno shlédnout na obrázku č. 11 a 12.



Obrázek č. 11 - Grafické zobrazení závislosti velikosti částic na čase



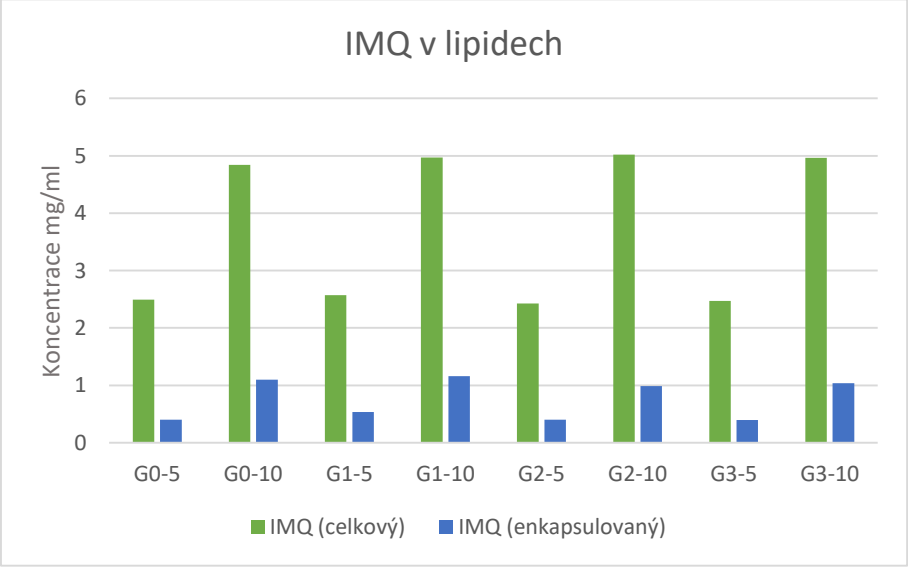
Obrázek č. 12 - Grafické zobrazení závislosti indexu polydisperzity na čase

Tabulka č. 3 – Znázornění úbytku IMQ během extruze a výsledná enkapsulační účinnost

Vzorek	C_{IMQ} (celkový, před extruzí, mg/ml)	C_{IMQ} (celkový, po extruzi, mg/ml)	C_{IMQ} (enkapsulovaný, mg/ml)	EE (enkapsulační účinnost, %)
G0-5	2,5	1,4	0,4	16
G0-10	4,8	2,6	1,1	23
G1-5	2,6	1,3	0,5	21
G1-10	5,0	2,7	1,2	23
G2-5	2,4	1,3	0,4	17
G2-10	5,0	3,0	1,0	20
G3-5	2,5	1,1	0,4	16
G3-10	5,0	2,6	1,0	21

V tabulce č. 3 je možno srovnat celkovou koncentraci IMQ změřenou před extruzí, tedy množství IMQ, které bylo prakticky naváženo a koncentraci IMQ po kompletní extruzi. Rozdíly v obou hodnotách u všech vzorků jasně naznačují ztrátu látky, ke které pravděpodobně během extruze došlo. Nízké hodnoty počáteční koncentrace po extruzi způsobily o to nižší naměřené koncentrace zapouzdřeného IMQ, a tím i dosti nízké hodnoty enkapsulační účinnosti. To vše vedlo k rozhodnutí pokračovat v přípravě liposomů druhou metodou - imiquimod rozpuštěný v roztoku dendrimerů.

Stejně tak lze zhodnotit koncentraci enkapsulovaného IMQ oproti původní celkové koncentraci na obrázku č. 13 v grafu.



Obrázek č. 13- Porovnání celkové koncentrace IMQ (nezapouzdřeného i zapouzdřeného) a koncentrace IMQ po purifikaci (pouze zapouzdřeného)

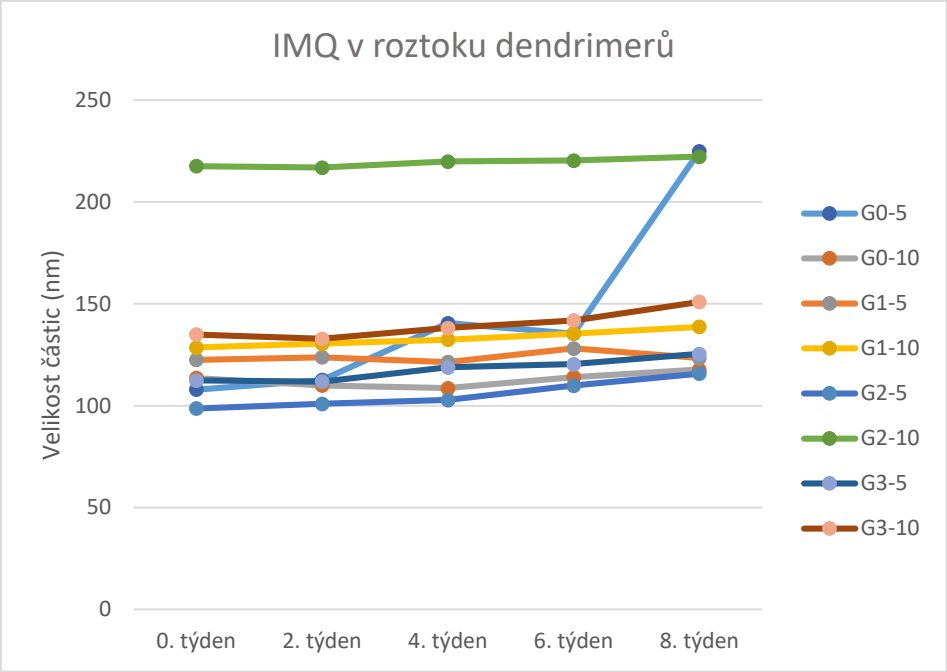
7.2 Vzorky připravené metodou imiquimod rozpuštěný v roztoku dendrimerů

Tabulka č. 4 – Průměry výsledků měření velikosti částic a PDI vždy v odstupu 2 týdnů

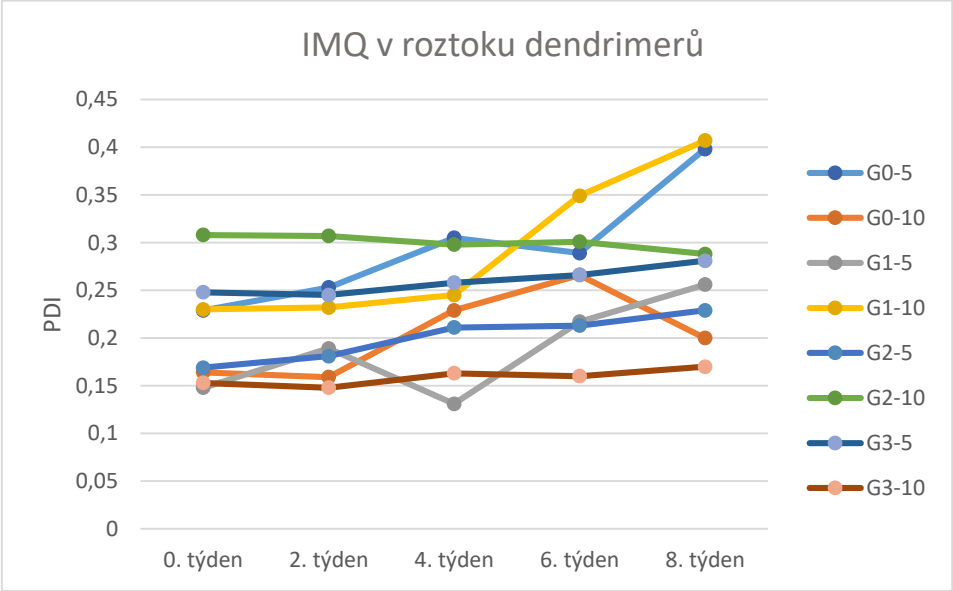
Vzorek	0. týden		2. týden		4. týden		6. týden		8. týden	
	Velikost ±SD	PDI	Velikost ±SD	PDI	Velikost ±SD	PDI	Velikost ±SD	PDI	Velikost ±SD	PDI
G0-5	107,9 ±0,6	0,229	112,6 ±2,0	0,253	140,5 ±5,2	0,305	135,4 ±2,0	0,289	224,8 ±7,0	0,398
G0-10	113,5 ±1,3	0,164	109,9 ±0,7	0,159	108,6 ±0,4	0,229	114,0 ±0,8	0,266	117,7 ±0,1	0,200
G1-5	122,5 ±0,7	0,148	123,8 ±1,1	0,189	121,4 ±0,9	0,131	128,1 ±0,6	0,217	123,4 ±1,9	0,256
G1-10	128,5 ±1,0	0,230	130,4 ±2,1	0,232	132,4 ±0,5	0,245	135,4 ±0,7	0,349	138,7 ±1,0	0,407
G2-5	98,7 ±0,8	0,169	100,9 ±1,4	0,181	102,8 ±1,2	0,211	109,8 ±1,4	0,213	115,8 ±0,1	0,229
G2-10	217,5 ±2,4	0,308	216,8 ±0,9	0,307	219,8 ±4,8	0,298	220,3 ±1,0	0,301	222,1 ±0,1	0,288
G3-5	112,4 ±0,9	0,248	111,8 ±1,5	0,245	118,8 ±0,5	0,258	120,4 ±2,9	0,266	125,4 ±3,0	0,281
G3-10	134,9 ±3,2	0,153	132,8 ±1,0	0,148	138,2 ±2,4	0,163	141,8 ±3,4	0,160	150,9 ±0,2	0,170

V tabulce č. 4 je možné zhodnotit měnící se velikost částic a PDI vzorků připravených rozpuštěním IMQ v roztoku dendrimerů. Opět jsou uvedeny průměry tří měření. Z pohledu velikosti částic se ostatním vzorkům vymyká G2-10, jehož velikost se od počátku pohybuje okolo 220 nm. Tento fakt lze zdůvodnit nejpravděpodobněji tím, že extruze nebyla provedena efektivně a správně, o čemž svědčí i zvýšený PDI. Na druhou stranu lze konstatovat, že optimální velikost částic pro (trans)dermální podávání je do 300 nm. [32] Této velikosti bylo dosaženo u veškerých vzorků. Daný výkyv G2-10 lze pozorovat také na obrázku č. 14.

Z hlediska PDI lze u G0-5 v 8. týdnu pozorovat vyšší hodnotu 0,398. Hodnoty PDI u G1-10 se zvyšují již od 6. týdne z 0,349 na 0,407 naměřené v 8. týdnu. Veškeré předchozí hodnoty PDI u těchto vzorků byly však v normě a především po 8 týdnech lze zvýšený PDI již předpokládat. Vše je uvedeno také na obrázku č. 15.



Obrázek č. 14 – Grafické znázornění ovlivnění velikosti částic jednotlivých vzorků časem



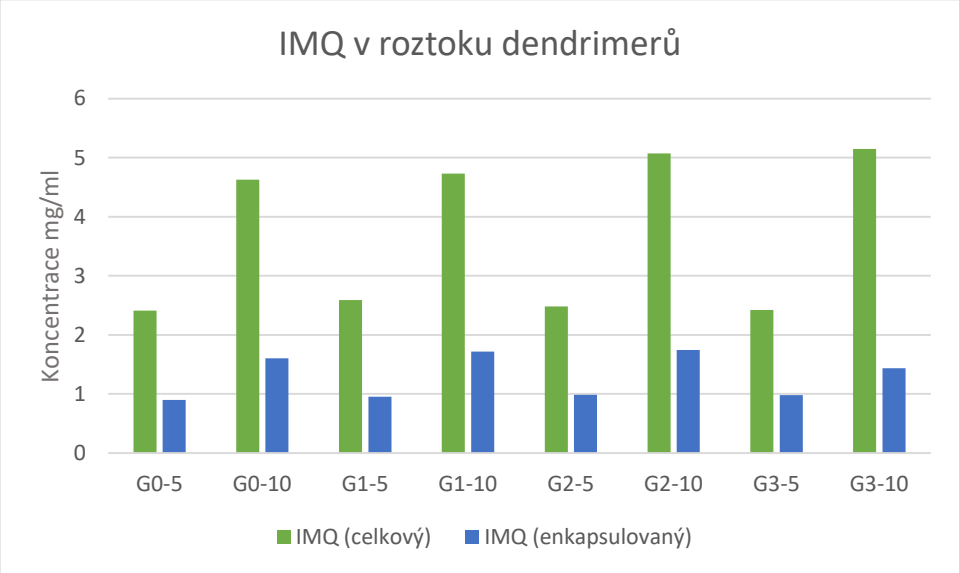
Obrázek č. 15 – Grafické znázornění ovlivnění hodnot PDI jednotlivých vzorků časem

Tabulka č. 5 – Koncentrace imiquimodu před purifikací a po ní, včetně vypočtené enkapsulační účinnosti

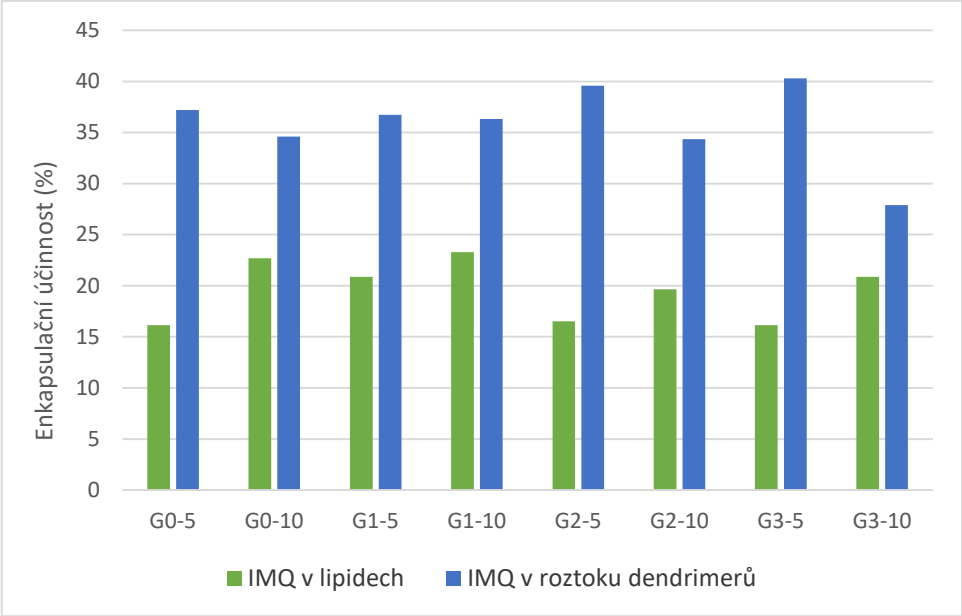
Vzorek	C_{IMQ} (celkový, mg/ml)	C_{IMQ} (enkapsulovaný, mg/ml)	EE (enkapsulační účinnost, %)
G0-5	2,4	0,9	37
G0-10	4,6	1,6	35
G1-5	2,6	1,0	37
G1-10	4,7	1,7	36
G2-5	2,5	1,0	40
G2-10	5,1	1,7	34
G3-5	2,4	1,0	40
G3-10	5,2	1,4	28

Tabulka č. 5 představuje výsledky naměřených koncentrací IMQ, a to koncentraci celkového IMQ v liposomech i mimo ně a také pouze enkapsulovaného IMQ. Z výsledků lze odvodit, že úspěšnost enkapsulace látky byla u všech generací i použitých koncentrací dendrimerů téměř totožná a v průměru se pohybovala okolo 36 %. Není tedy možno ani o jedné z generací tvrdit, že by byla účinnější ve vztahu ke zvýšení rozpustnosti IMQ, než jiná generace dendrimerů.

Pro přehled je možno obě koncentrace porovnat i na obrázku č. 16.



Obrázek č. 16 – Porovnání celkové koncentrace IMQ a koncentrace enkapsulovaného IMQ



Obrázek č. 17 - Graf porovnávající enkapsulační účinnost u obou metod

Na obrázku č. 17 je bezpochyby vidět, že metoda, kdy byl IMQ rozpuštěn v roztoku dendrimerů, byla jednoznačně úspěšnější ve smyslu účinnosti enkapsulace. Na druhou stranu z předchozích uvedených výsledků u metody, kde byl IMQ zaveden do lipidů, vyplývá, že určité množství IMQ bylo z jeho původního množství ztraceno. A tak je tedy pravděpodobné, že výsledná nižší koncentrace enkapsulovaného IMQ (tím i nižší enkapsulační účinnost) nebyla zapříčiněna horší účinností metody, ale například chybou v některém z kroků během procesu, a to zřejmě extruzí. Vhodným řešením by bylo zopakování celého postupu od přípravy liposomů začleněním IMQ do lipidů, přes extruzi, až po změření výsledných hodnot koncentrací.

Závěr

Tato diplomová práce zkombinovala výhodné vlastnosti dendrimerů a liposomů k vytvoření nové formulace pro doručení léčiv do kůže. Dendrimery nulté, první, druhé a třetí generace v koncentracích 5 mg/ml a 10 mg/ml byly použity ke zvýšení rozpustnosti lipofilního léčiva imiquimodu, a tím k dosažení jeho vyšší koncentrace uvnitř liposomálních částic. Formulace liposomů probíhala metodou hydratace lipidového filmu s využitím dvou přístupů. Postupně byly připraveny vzorky inkorporací imiquimodu do lipidů s následnou hydratací roztokem dendrimerů. V druhém případě byl imiquimod rozpuštěn v roztoku dendrimerů, který byl využit pro hydrataci samotných lipidů. Vzorky byly následně testovány z hlediska účinnosti enkapsulace.

Výsledky prokázaly, že dendrimery skutečně zvyšují koncentraci imiquimodu uvnitř liposomů, a to bez generační či koncentrační závislosti. Měřením bylo zjištěno, že metoda, kdy byl imiquimod zaveden do lipidů je méně efektivní z hlediska účinnosti enkapsulace (tato se pohybovala průměrně okolo 16 %), než v případě použití metody s rozpuštěním imiquimodu v roztoku dendrimerů (průměrná enkapsulační účinnost byla 36 %). Přesto však není možno s jistotou konstatovat, zda tato na první pohled nižší výsledná hodnota byla zapříčiněna menší efektivností metody nebo chybou v některém z kroků během experimentu. Do budoucna by tedy bylo vhodné proces začlenění imiquimodu do lipidů s hydratací roztokem dendrimerů zopakovat pro ověření správnosti.

Seznam zkratek

C_{IMQ}	koncentrace imiquimodu
EE	enkapsulační účinnost (*encapsulation efficacy*)
ELS	elektroforetický rozptyl světla (*electrophoretic light scattering*)
EPR	efekt zvýšené permeability a retence (*enhanced permeability and retention effect*)
G0-5	vzorek s generací dendrimeru 0 o jejich koncentraci 5 mg/ml
G0-10	vzorek s generací dendrimeru 0 o jejich koncentraci 10 mg/ml
G1-5	vzorek s generací dendrimeru 1 o jejich koncentraci 5 mg/ml
G1-10	vzorek s generací dendrimeru 1 o jejich koncentraci 10 mg/ml
G2-5	vzorek s generací dendrimeru 2 o jejich koncentraci 5 mg/ml
G2-10	vzorek s generací dendrimeru 2 o jejich koncentraci 10 mg/ml
G3-5	vzorek s generací dendrimeru 3 o jejich koncentraci 5 mg/ml
G3-10	vzorek s generací dendrimeru 3 o jejich koncentraci 10 mg/ml
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*high-performance liquid chromatography*)
IMQ	imiquimod
LLD	liposomálně uzamčené dendrimery (*liposomal locked dendrimers*)
LUV	velké unilamelární vezikuly (*large unilamellar vesicles*)
MeOH	methanol
MLV	multilamelární vezikuly (*multilamellar vesicles*)
NSAID	nesteroidní protizánětlivá léčiva
PAMAM	polyamidoamino
PC	fosfatidylcholin (*phosphatidylcholine*)
PDI	*polydispersity index*
PEG	pegylace
PPI	poly(propylenimin)
RES	retikuloendotelový systém
SC	*stratum corneum*
SD	směrodatná odchylka (*standard deviation*)
SUV	malé unilamelární vezikuly (*small unilamellar vesicles*)
T_c	teplota fázového přechodu
ULV	unilamelární vezikuly (*unilamellar vesicles*)
ZP	zeta potenciál (*zeta potential*)

Použitá literatura

[1] BROWN, Marc B., Gary P. MARTIN, Stuart A. JONES a Franklin K. AKOMEAH. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Delivery* [online]. 2008, 13(3), 175-187 [cit. 2021-03-30]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717540500455975

[2] DYLEVSKÝ, Ivan. *Somatologie*. 2. vyd. Olomouc: EPAVA, 2000. 480 s. [cit. 2021-03-30]. ISBN 80-86297-05-5

[3] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 3.* 3. vyd. Praha: GRADA, 2016. [cit. 2021-03-30]. ISBN 978-80-247-5636-3

[4] PRAUSNITZ, Mark R a Robert LANGER. Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology* [online]. 2008, 26(11), 1261-1268 [cit. 2021-03-30]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.1504

[5] Murphrey MB, Miao JH, Zito PM. *Histology, Stratum Corneum*. StatPearls, [online]. 2021 Jan. [cit. 2021-03-30] Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513299/

[6] PANOUTSOPOULOU, E., PARASKEVOPOULOS, G., SAGRAFENA, I., ZBYTOVSKÁ, J., VÁVROVÁ, K., (2019, September). *Imiquimod loaded liposomes for (trans)dermal delivery.* Poster sessison presented at the Skin and Formulation, 5th Symposium & 17th Skin Forum, Reims, France.

[7] T Chu , R Jaffe. The normal Langerhans cell and the LCH cell. *The British journal of cancer* [online]. 1994,70(23), S4-10. [cit. 2021-03-31]. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7521202/

[8] YUAN, Jianwei, Guoying NI, Tianfang WANG, Kate MOUNSEY, Shelley CAVEZZA, Xuan PAN a Xiaosong LIU. Genital warts treatment: Beyond imiquimod. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2018, 14(7), 1815-1819 [cit. 2021-01-26]. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.1080/21645515.2018.1445947

[9] RAJESH, Aarthi, Lyn WISE a Merilyn HIBMA. The role of Langerhans cells in pathologies of the skin. *Immunology & Cell Biology* [online]. 2019, 97(8), 700-713 [cit. 2021-03-31]. ISSN 0818-9641. Dostupné z: doi:10.1111/imcb.12253

[10] ALKILANI, Ahlam, Maelíosa T. MCCRUDDEN a Ryan DONNELLY. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics* [online]. 2015, 7(4), 438-470 [cit. 2021-03-31]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics7040438

[11] DEMETZOS, Costas a Natassa PIPPA. Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): a mini-review. *Drug Delivery* [online]. 2013, 21(4), 250-257 [cit. 2020-10-20]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.3109/10717544.2013.844745

[12] GHOSH, Shatadal, Sumit GHOSH a Parames C. SIL. Role of nanostructures in improvising oral medicine. *Toxicology Reports* [online]. 2019, 6, 358-368 [cit. 2020-10-26]. ISSN 22147500. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxrep.2019.04.004

[13] LAFFLEUR Flavia, KECKEIS Valérie. Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed? *International Journal of Pharmaceutics: X* [online]. 2020, 2(100050), [cit. 2020-10-21]. ISSN 2590-1567. Dostupné z doi: https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2020.100050

[14] RABIŠKOVÁ, Miloslava. Nanočástice pro lékové formy. *Remedia* [online]. 2007, 17, 495-501 [cit. 2020-10-28]. Dostupné z: http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Nanocastice-pro-lekove-formy/6-H-ix.magarticle.aspx

[15] HOSSEN, Sarwar, M. Khalid HOSSAIN, M.K. BASHER, M.N.H. MIA, M.T. RAHMAN a M. Jalal UDDIN. Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *Journal of Advanced Research* [online]. 2019, 15, 1-18 [cit. 2020-10-28]. ISSN 20901232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2018.06.005

[16] BAMRUNGSAP, Suwussa, Zilong ZHAO, Tao CHEN, Lin WANG, Chunmei LI, Ting FU a Weihong TAN. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine* [online]. 2012, 7(8), 1253-1271 [cit. 2020-10-28]. ISSN 1743-5889. Dostupné z: doi:10.2217/nnm.12.87

[17] SHI, Yang, Roy VAN DER MEEL, Xiaoyuan CHEN a Twan LAMMERS. The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy. *Theranostics* [online]. 2020, 10(17), 7921-7924 [cit. 2020-10-28]. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.49577

[18] SVOBODA, Jan, Kamila SYSLOVÁ, Petr KAČER. Cílený transport platinových cytostatik. *Chemické listy* [online]. 2016, 110, 909-916 [cit. 2020-10-28]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_12_909-916.pdf

[19] RABIŠKOVÁ, Miloslava. Využití nanočásticových systémů v medicíně. *Remedia* [online]. 2008, [cit. 2020-10-31]. Dostupné z: http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Vyuziti-nanocasticovych-systemu-v-medicine/6-H-j7.magarticle.aspx

[20] AHMED, Kamel S., Saied A. HUSSEIN, Abdelmoneim H. ALI, Sameh A. KORMA, Qiu LIPENG a Chen JINGHUA. Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2019, 27(7), 742-761 [cit. 2020-11-01]. ISSN 1061-186X. Dostupné z: doi:10.1080/1061186X.2018.1527337

[21] BOZZUTO, Giuseppina a Agnese MOLINARI. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine* [online]. [cit. 2020-11-01]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S68861

[22] SWAMI, Himanshi, Mahesh Kumar KATARIA, Ajay BILANDI, Prabhjot KOUR a Saroj BALA. Liposome: An art for drug delivery. International Journal of Pharmaceutical Sciences Letters [online]. 2015, 5(2), 523-530 [cit. 2016-07-31]. ISSN 2277-4564. Dostupné z: http://ijpsl.com/admin/upload_data/journal_Himanshi.pdf

[23] ARAJO LOPES, Svia Caldeira de, Cristiane dos SANTOS GIUBERTI, Talita Guieiro RIBEIRO, Digo dos SANTOS FERREIRA, Elaine AMARAL LEITE a Mnica CRISTINA. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. RANGEL, Letcia, ed. *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches* [online]. InTech, 2013, 2013-05-09 [cit. 2020-11-08]. ISBN 978-953-51-1098-9. Dostupné z: doi:10.5772/55290

[24] MONTANÉ, Xavier, Anna BAJEK, Krzysztof ROSZKOWSKI, et al. Encapsulation for Cancer Therapy. *Molecules* [online]. 2020, 25(7) [cit. 2020-11-03]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25071605

[25] LAMICHHANE, Narottam, Thirupandiyur UDAYAKUMAR, Warren D'SOUZA, Charles SIMONE II, Srinivasa RAGHAVAN, Jerimy POLF a Javed MAHMOOD. Liposomes: Clinical Applications and Potential for Image-Guided Drug Delivery. *Molecules* [online]. 2018, 23(2) [cit. 2020-11-10]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23020288

[26] CHEN, Wen, Filip DUŠA, Joanna WITOS, Suvi-Katriina RUOKONEN a Susanne K. WIEDMER. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. *Scientific Reports* [online]. 2018, 8(1) [cit. 2020-11-08]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-33107-5

[27] Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids - Avanti® Polar Lipids [online]. [cit. 2020-11-10]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/phase-transition-temperatures-for-glycerophospholipids.html

[28] ONG, Sandy, Mallikarjun CHITNENI, Kah LEE, Long MING a Kah YUEN. Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics* [online]. 2016, 8(4) [cit. 2020-11-11]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics8040036

[29] MORTON, Leslie A., Jonel P. SALUDES a Hang YIN. Constant Pressure-controlled Extrusion Method for the Preparation of Nano-sized Lipid Vesicles. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (64) [cit. 2020-11-12]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/4151

[30] MUI, Barbara, Laurie CHOW a Michael J HOPE. Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size. *Liposomes, Part A* [online]. Elsevier, 2003, 2003, s. 3-14 [cit. 2020-11-12]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121822705. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(03)67001-1

[31] Preparing Large, Unilamellar Vesicles by Extrusion. Avanti Polar Lipids, Inc. [online]. Alabama, 2016 [cit. 2020-11-14]. Dostupné z: https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/luvet

[32] DANAEI, M., M. DEHGHANKHOLD, S. ATAEI, F. HASANZADEH DAVARANI, R. JAVANMARD, A. DOKHANI, S. KHORASANI a M. MOZAFARI. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, 10(2) [cit. 2021-01-12]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057

[33] SCHIEREN, Hugh, Steven RUDOLPH, Morris FINKELSTEIN, Peter COLEMAN a Gerald WEISSMANN. Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1978, 542(1), 137-153 [cit. 2020-11-17]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/0304-4165(78)90240-4

[34] RAVAL, Nidhi, Rahul MAHESHWARI, Dnyaneshwar KALYANE, Susanne R. YOUNGREN-ORTIZ, Mahavir B. CHOUGULE a Rakesh K. TEKADE. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *Basic Fundamentals of Drug Delivery* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 369-400 [cit. 2021-01-07]. ISBN 9780128179093. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8

[35] BERBEL MANAIA, Eloísa, Marina PAIVA ABUÇAFY, Bruna Galdorfini CHIARI-ANDRÉO, Bruna LALLO SILVA, João Augusto OSHIRO-JÚNIOR a Leila CHIAVACCI. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2017, 12, 4991-5011 [cit. 2020-11-17]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S133832

[36] Electrophoretic light scattering (ELS). Malvern Panalytical, a spactris Company. [online]. [cit. 2020-11-21]. Dostupné z: https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/electrophoretic-light-scattering

[37] WILLIAMS, Paul Melvyn. Zeta Potential. DRIOLI, Enrico a Lidietta GIORNO, ed. *Encyclopedia of Membranes* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, 2016-8-31, s. 2063-2064 [cit. 2020-11-24]. ISBN 978-3-662-44323-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-44324-8_612

[38] M. Bajerová; K. Dvořáčková; J. Gajdziok; R. Masteiková. Mikročástice na bázi oxycelulosy – vliv procesních proměnných na enkapsulační účinnost [online]. Čes. slov. Farm., 2010; 2(59), 67-73 [cit. 2020-11-25]. Dostupné z: https://www.prolekarniky.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2010-2-6/mikrocastice-na-bazi-oxycelulosy-vliv-procesnich-promennych-na-enkapsulacni-ucinnost-32521

[39] SVENSON, Sonke a Abhay S CHAUHAN. Dendrimers for enhanced drug solubilization. *Nanomedicine* [online]. 2008, 3(5), 679-702 [cit. 2020-10-26]. ISSN 1743-5889. Dostupné z: doi:10.2217/17435889.3.5.679

[40] ORTEGA, Miguel Ángel, Alberto GUZMÁN MERINO, Oscar FRAILE-MARTÍNEZ, et al. Dendrimers and Dendritic Materials: From Laboratory to Medical Practice in Infectious Diseases. *Pharmaceutics* [online]. 2020, 12(9) [cit. 2021-03-29]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12090874

[41] PALMERSTON MENDES, Livia, Jiayi PAN a Vladimir TORCHILIN. Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. *Molecules* [online]. 2017, 22(9) [cit. 2020-11-26]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22091401

[42] JANASZEWSKA, LAZNIEWSKA, TRZEPIŃSKI, MARCINKOWSKA a KLAJNERT-MACULEWICZ. Cytotoxicity of Dendrimers. *Biomolecules* [online]. 2019, 9(8) [cit. 2020-11-26]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9080330

[43] CASTRO, RICARDO I., OSCAR FORERO-DORIA a LUIS GUZMÁN. Perspectives of Dendrimer-based Nanoparticles in Cancer Therapy. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* [online]. 2018, 90(2 suppl 1), 2331-2346 [cit. 2020-11-26]. ISSN 1678-2690. Dostupné z: doi:10.1590/0001-3765201820170387

[44] SANTOS, Ana, Francisco VEIGA a Ana FIGUEIRAS. Dendrimers as Pharmaceutical Excipients: Synthesis, Properties, Toxicity and Biomedical Applications. *Materials* [online]. 2020, 13(1) [cit. 2021-01-06]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma13010065

[45] CHAUHAN, Abhay. Dendrimers for Drug Delivery. *Molecules* [online]. 2018, 23(4) [cit. 2021-01-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23040938

[46] YANG, Yang, Suhair SUNOQROT, Chelsea STOWELL, Jingli JI, Chan-Woo LEE, Jin Woong KIM, Seema A. KHAN a Seungpyo HONG. Effect of Size, Surface Charge, and Hydrophobicity of Poly(amidoamine) Dendrimers on Their Skin Penetration. *Biomacromolecules* [online]. 2012, 13(7), 2154-2162 [cit. 2020-11-28]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm300545b

[47] CHIS, Adriana Aurelia, Carmen DOBREA, Claudiu MORGOVAN, et al. Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine. *Molecules* [online]. 2020, 25(17) [cit. 2020-11-28]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25173982

[48] AKBARZADEH, A, R KHALILOV, E MOSTAFAVI, et al. ROLE OF DENDRIMERS IN ADVANCED DRUG DELIVERY AND BIOMEDICAL APPLICATIONS: A REVIEW. *Experimental Oncology* [online]. 2018, 40(3), 178-183 [cit. 2020-12-01]. ISSN 2312-8852. Dostupné z: doi:10.31768/2312-8852.2018.40(3):178-183

[49] ABBASI, Elham, Sedigheh AVAL, Abolfazl AKBARZADEH, et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2014, 9(1) [cit. 2020-12-01]. ISSN 1556-276X. Dostupné z: doi:10.1186/1556-276X-9-247

[50] LI, Zhen, Shirui TAN, Shuan LI, Qiang SHEN a Kunhua WANG. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives. *Oncology Reports* [online]. 2017, 38(2), 611-624 [cit. 2021-01-06]. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2017.5718

[51] SÚKL, STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. Aldara 5% crm 24X250MG, *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2021-01-26]. Dostupné z: https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0193437&tab=texts

[52] ROZEHNALOVÁ Zuzana, HERCOGOVÁ Jana. Možnosti využití Imiquimodu v dermatologii. *Remedia* [online]. 2008; 18: 229–232 [cit. 2021-01-26]. Dostupné z: http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Moznosti-vyuziti-imiquimodu-v-dermatologii/6-F-jv.magarticle.aspx

[53] ARGENZIANO, Monica, Adam HAIMHOFFER, Chiara BASTIANCICH, et al. In Vitro Enhanced Skin Permeation and Retention of Imiquimod Loaded in β-Cyclodextrin Nanosponge Hydrogel. *Pharmaceutics* [online]. 2019, 11(3) [cit. 2021-01-27]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11030138

[54] PESCINA, Silvia, Gabriela GARRASTAZU, Elena DEL FAVERO, Valeria RONDELLI, Laura CANTÙ, Cristina PADULA, Patrizia SANTI a Sara NICOLI. Microemulsions based on TPGS and isostearic acid for imiquimod formulation and skin delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2018, 125, 223-231 [cit. 2021-01-27]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2018.10.007

[55] SÚKL, STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. Zyclara 3,75% crm 14X250MG, *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2021-01-28]. Dostupné z: https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0193489&tab=texts

[56] CHLADOVÁ, P., HOUŠKOVÁ, D. *Vliv koncentrace polyamidoaminodendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periferii na (trans)dermální podání 5-fluorouracilu* [online]. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

[57] GURUNATHAN, Sangiliyandi, Min-Hee KANG, Muhammad QASIM a Jin-Hoi KIM. Nanoparticle-Mediated Combination Therapy: Two-in-One Approach for Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(10) [cit. 2021-01-17]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19103264

[58] GARDIKIS, Konstantinos, Sophia HATZIANTONIOU, Madalina BUCOS, et al. New Drug Delivery Nanosystem Combining Liposomal and Dendrimeric Technology (Liposomal

Locked-In Dendrimers) for Cancer Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, 99(8), 3561-3571 [cit. 2021-01-17]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.22121

[59] SÚKL, STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. LEK-5 verze 8 Doporučené doby použitelnosti léčivých přípravků připravovaných v lékárně [online]. [cit. 2021-01-23]. Dostupné z: https://www.sukl.cz/lekarny/lek-5-verze-8