

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

**Hodnocení účinku PAMAM dendrimerů na
rozpustnost imiquimodu**

Rigorózní práce

Mgr. Thu Thao Truongová

V Hradci Králové 2023

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

Konzultant práce: Eleni Panoutsopoulou

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval(a) samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Mgr. Thu Thao Truongová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu rigorózní práce Dr. Georgiosovi Paraskevopoulosovi, Ph.D. za jeho čas, odborné vedení a cenné rady. Dále bych také chtěla poděkovat mé konzultantce Eleni Panoutsopoulou za její pomoc a ochotu v průběhu praktické části této práce.

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (GAUK 184217, SVV 260661) a Grantové agentuře České republiky (19-09600S).

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Konzultant: Eleni Panoutsopoulou

Autor: Mgr. Thu Thao Truongová

Název rigorózní práce: Hodnocení účinku PAMAM dendrimerů na rozpustnost imiquimodu

Dendrimery jsou velmi rozvětvené polymerické sloučeniny s definovanými vlastnostmi. Používají se jako nanočásticový distribuční systém, zároveň však mají významný potenciál v oblasti zvyšování rozpustnosti ve vodě špatně rozpustných léčiv. Dendrimery fungují jako nosiče léčiva buď na principu enkapsulace molekuly léčiva ve své rozvětvené vnitřní struktuře nebo vytvářejí interakce s léčivem ve vnější vrstvě skrze terminální funkční skupiny.

Cílem této práce bylo zhodnotit účinek polyamidoaminových (PAMAM) dendrimerů na rozpustnost hydrofobního léčiva imiquimod.

Postupně byly připraveny roztoky dendrimerů nulté, první, druhé a třetí generace v šesti různých koncentracích. Během experimentu se měřilo pH roztoků před a po přidání nadbytečného množství imiquimodu. Následně byla provedena analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Z naměřených výsledků použitých generací PAMAM dendrimerů vyplývá, že první generace těchto dendrimerů dokázala nejvíce zvýšit rozpustnost imiquimodu ve vodném prostředí. Do budoucna by bylo třeba experiment zopakovat za účelem prozkoumání možnosti změny pH prostředí k získání ještě většího efektu.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Consultant: Eleni Panoutsopoulou

Author: Mgr. Thu Thao Truongová

Title of the thesis: The evaluation of the effect of PAMAM dendrimers in the solubility of Imiquimod

Dendrimers are highly branched polymeric compounds with defined properties. They are used as a nanoparticle delivery system, however concurrently they have significant potential in enhancing the solubility of poorly water soluble drugs. Dendrimers work as drug carriers either by encapsulating the drug in their branched internal structure or they create interactions with the drug in the outer layer via terminal functional groups.

The aim of this work was to evaluate the effect of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on the solubility of the hydrophobic drug imiquimod.

Solutions of zero, first, second and third generation dendrimers were prepared at six different concentrations. During the experiment, the pH of the solutions was measured before and after addition of excess amount of imiquimod. Subsequently, analysis was performed by high-performance liquid chromatography. The measured results show that the first generation of PAMAM dendrimers is able to increase the solubility of imiquimod in aqueous medium the most among the used generations. In the future, the experiment should be repeated to investigate the possibility of changing the pH of the medium to obtain even higher effect.

Obsah

1. Seznam zkratek	8
2. Úvod a cíl práce	9
3. Teoretická část	10
3.1. Imiquimod.....	10
3.2. Metody pro zvýšení rozpustnosti hydrofobních léčiv.....	11
3.2.1. Fyzikální metody.....	11
3.2.2. Chemické metody	13
3.2.3. Technologické metody	14
3.3. Dendrimery	19
3.3.1. Složení a vlastnosti.....	19
3.3.2. Syntéza dendrimerů.....	20
3.4. Vliv dendrimerů na rozpustnost hydrofobních léčiv	21
3.4.1. Faktory ovlivňující působení dendrimerů na rozpustnost léčiv.....	22
3.5. Polyamidoamin dendrimery.....	26
4. Praktická část	28
4.1. Použité přístroje a chemikálie.....	28
4.2. Příprava vzorků s dendrimery	29
4.3. Příprava vzorků s imiquimodem.....	31
4.4. Měření koncentrace IMQ HPLC metodou.....	31
5. Výsledky a diskuze	32
5.1. Výsledky G0 dendrimerů s IMQ	33
5.2. Výsledky G1 dendrimerů s IMQ	34
5.3. Výsledky G2 dendrimerů s IMQ	35
5.4. Výsledky G3 dendrimerů s IMQ	36
5.5. Porovnání všech generací dendrimerů	37
5.6. Výsledky měření pH roztoků G0-G3 před a po přidání IMQ.....	38

6.	Závěr	41
7.	Zdroje	42

1. Seznam zkratek

5-FU	5-fluorouracil
Faf UK	Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova
CD	cyklodextrin
G0	nultá generace PAMAM dendrimerů
G1	první generace PAMAM dendrimerů
G2	druhá generace PAMAM dendrimerů
G3	třetí generace PAMAM dendrimerů
GIT	gastrointestinální trakt
IMQ	Imiquimod
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LF	léková forma
NK	nature killer
PAMAM	polyamidoamin
PEG	polyethylenglykol
SCF	Supercritical Fluid
SDEDDS	Self-double-emulsifying Drug Delivery Systems
SEDDS	Self-emulsifying Drug Delivery System
SEPS	Self-emulsifying Phospholipid Suspensions
SMEDDS	Self-microemulsifying Drug Delivery Systems
SNEDDS	Self-nanoemulsifying Drug Delivery Systems

2. Úvod a cíl práce

V současné době mnoho nových léčivých látek není možné přivést do klinické praxe. Je to převážně z důvodu jejich vlastností, zejména kvůli jejich nízké schopnosti rozpouštět se ve vodě. Hydrofobicitu látek lze ovlivnit kombinací s dendritickými molekulami. Interakcí s dendrimery se zvyšuje schopnost léčiv rozpouštět se, s čímž následně souvisí i jejich biodostupnost a distribuce po těle k dosažení cílového místa působení.

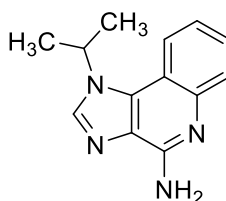
Hlavním cílem této rigorózní práce bylo zjistit, zda polyamidoaminové dendrimery dokáží pozitivně ovlivnit rozpustnost hydrofobního léčiva imiquimodu ve vodném prostředí.

3. Teoretická část

3.1. Imiquimod

Imiquimod (IMQ) patří mezi deriváty imidazochinolonů (Obrázek 1). Používá se především jako lokální chemoterapeutikum a virostatikum k léčbě povrchových bazocelulárních karcinomů, solárních keratóz a akuminátních kondylomat. Mechanismem účinku je aktivace imunitní odpovědi vazbou na buněčný receptor toll 7 uvnitř makrofágů a dendritických buněk (IMQ zde figuruje jako agonista). Navázáním na membránový receptor dochází k indukci sekrece prozánětlivých cytokinů (zejména interferonu α , tumor nekrotizujícího faktoru α a interleukinu 12). Uvolněné cytokiny spouští adaptivní imunitní buněčnou kaskádu za účasti T-lymfocytů a NK buněk („natural killer cells“). Stimulace protinádorové imunity vede ke zpomalení růstu nádorových buněk, dále je aktivována apoptóza a dochází k destrukci nádoru. Ve formě krému je imiquimod marketován pod obchodními názvy Aldara 5 % nebo Zyclara 3,75 %. [1] [2] [3] [4]

IMQ je hydrofobní, ve vodě špatně rozpustná látka s nízkou permeabilitou přes kůži. Kvůli těmto nevýhodným vlastnostem je použití imiquimodu omezeno pouze na topické lékové formy (LF). [5] [6] V klinických studiích bylo prokázáno, že se u lidí vstřebá kůží méně než 0,9 % topicky aplikované jedné dávky radioizotopicky značeného imiquimodu. [3] Léčivé přípravky s 5% imiquimodem vykazují nízkou systémovou absorpci, která je daná právě fyzikálně-chemickými vlastnostmi účinné látky a pojí se s dalšími komplikacemi léčby (př. nižší bezpečnost a tolerabilita). Lokální podání způsobuje v místě užití nežádoucí reakce typu erytém, svědění, pálení či bolest. K systémovým nežádoucím účinkům dochází také, avšak jejich frekvence bývá obvykle méně častá. [3]



Obrázek 1 – Chemický vzorec imiquimodu [7]

3.2. Metody pro zvýšení rozpustnosti hydrofobních léčiv

Významný počet nových, ale i již obchodovaných léčiv se skládá převážně z hydrofobních léčiv, která jsou špatně rozpustná ve vodě a mají nízkou biologickou dostupnost. [8] Nedostatečná rozpustnost ve vodě vytváří překážky při přípravě a vývoji léčiv. [9] V současnosti nemalé množství marketovaných léčiv má nedostatečné vlastnosti jako je špatná rozpustnost, nízká permeabilita, rychlý metabolismus a eliminace z těla spolu s vysokým rizikem nežádoucích účinků. [8]

Hydrofóbní léčiva často vyžadují vysokodávkový režim k dosažení terapeutické koncentrace v plazmě po orálním podání. [9] Vstřebání léčiv závisí do značné míry na 2 faktorech: rozpustnosti a propustnosti. S přibývajícím množstvím špatně rozpustných léčiv se projeví snahy o zvýšení rozpustnosti těchto látek. [10] Rozpustnost je jeden z důležitých parametrů determinující terapeutickou odpověď daného léčiva v systémové cirkulaci. [9] Z tohoto důvodu se stalo zvyšování biodostupnosti léčivých látek, které se ve vodě špatně rozpouštějí, zájmem farmaceutické technologie. [11]

Strategie zvyšující rozpustnost lipofilních látek můžeme pro přehled rozdělit na fyzikální, chemické a technologické metody. [11]

3.2.1. Fyzikální metody

- Zmenšení velikosti částic

Jedná se o jednu z nejčastěji používaných technik ke zvýšení rozpustnosti léčiva. Cílem je získat částice menší než 10 μm . [11] Čím menší bude velikost částic, tím se zvětší jejich povrch pro interakci léčiva s médiem. Větší počet interakcí vede ke zlepšení rozpustnosti látky. [12] Existuje několik metod, jenž mohou být použity pro redukci částic: mechanické rozmělnění, metoda sprejového sušení anebo vytvoření nanosuspenze. [9] [11]

Mechanické rozdrobňování probíhá podle vybrané metody (buď suchou nebo mokrou cestou) za použití různých typů mlýnu s ohledem na vybranou cestu. Mikronizovaných sférických částic lze dosáhnout pomocí metody sprejového sušení. Léčivo se rozpustí, případně suspenduje v kapalině. Vytvořený roztok/suspenze se následně nastříkuje do expanzní nádoby při vyšších teplotách a suší se v proudu vzduchu či inertního plynu. Podmínky procesu je možné upravit, a tím získat částice definovaného tvaru, velikosti

a hustoty. [11] Nanosuspenze jsou bifázické systémy složené z nanočástic, které jsou stabilizované pomocí surfaktantu. Jedná se o sub-mikron koloidální disperze částic léčiva. Velikost těchto částic se nachází většinou v rozmezí 200-600 nm. Lze je využít k topickému, orálnímu, parenterálnímu nebo pulmonárnímu podání. Nanosuspenze byly využity pro různá léčiva, kde jedním z nich je např. atovachon [12] [13]

- Lyofilizace (neboli sušení mrazem)

Jedná se o proces vysoušení léčivé látky nebo jejího roztoku/suspenze při velmi nízkých teplotách. Kryogenní metodou jsou získávány látky pórovité struktury tvořené kanálky, které vznikají po sublimaci rozpouštědla. Postup mrazového sušení je složen ze tří částí: zmrazení, primární a pak sekundární sušení. Během první fáze mrazení je roztok/suspenze ochlazována do chvíle, než začnou vznikat krystalky ledu, jenž postupně nabývají na velikosti. V další fázi dochází k primárnímu sušení (sublimaci) ledových krystalů za nízkého tlaku. Pro tuto chvíli meziproduct stále obsahuje zbytkové množství vody (okolo 20 %), tudíž se musí provést ještě 3. fáze – sekundární sušení neboli desorpce. Tato fáze probíhá za vyšší teploty a nízkého tlaku, kdy se na konci vyprodukuje látka s dostatečně nízkou vlhkostí. Proces lyofilizace je jak energeticky, tak i finančně a časově náročný. Z tohoto důvodu se v praxi preferuje metoda sprejové lyofilizace, která je skloubením lyofilizace a sprejového sušení. [11] [12]

Metoda sprejové lyofilizace vytváří vysoce porézní sférické částice v dané velikosti. Existuje několik způsobů přípravy, jehož příkladem je sprejové mrazení s kryogenní tekutinou. Mrazová sublimace je využívána často u injekčních přípravků s nestabilními účinnými látkami ve vodě. Dále může být součástí přípravy orálně dispergovatelných tablet, kde se jedná o zavedený technologický postup s patentem př. Zydis®. [11] [14] [15] Příkladem lyofilizátu na českém trhu je imunostimulační léčivý přípravek Imunor. Jedná se o transfer faktor z vepřové krve, který se musí uchovávat při teplotách 2 °C – 8 °C. [16]

- Modifikace krystalové mřížky

Rozpustnost léčivé látky je možné ovlivnit úpravou fyzikální formy. [11] Obměny v krystalické struktuře zlepšují rychlost rozpouštění, a tedy i biologickou dostupnost hydrofóbního léčiva. Polymorfie (schopnost účinné látky existovat ve více krystalických

formách) umožňuje látkám měnit své fyzikálně-chemické vlastnosti podle krystalické mřížky. Obecně platí, že amorfni látky jsou lépe rozpustné než jejich krystalické formy. [9] [11]

3.2.2. Chemické metody

- Příprava rozpustných solí

Jedná se o v praxi nejčastěji užívanou metodu, která přispívá ke zvýšení solubility a rychlosti rozpouštění lipofilních léčiv. Kyselá a zásaditá léčiva jsou přeměňována na odpovídající soli, která jsou pak ve vodě lépe rozpustná, př. teofylin. [9] Rychlost rozpouštění určité soli se obvykle liší od rychlosti rozpouštění výchozí látky. Sodné a draselné soli se rozpouštějí rychleji než jejich čisté soli. Nevýhodou je jejich vysoká alkalita, kvůli které může docházet u některých pacientů k epigastrickým potížím. [13]

- Změna pH

Léčiva špatně rozpustná ve vodě mohou být kladně/záporně nabita na základě svých vlastností (dle toho, zda se jedná o zásadu či kyselinu) přidáním pH modifikátorů. Tyto pufrovací pomocné látky se přidávají k léčivé látce a pomáhají vytvořit mikrooblasti s pH, ve kterém se léčivo může rozpouštět bez ohledu na pH okolního prostředí. Vliv pH modifikátorů závisí na vlastnostech jako je rozpustnost nebo rychlost uvolňování. Mezi zásadité modifikátory se řadí např. hydrogenfosforečnan sodný, uhličitán vápenatý či oxid hořečnatý. Tyto pufrovací látky se přidávají do roztoku slabých kyselin a jejich solí (př. kyselina acetylsalicylová anebo methotrexát). Naopak kyselé modifikátory pH jsou používány pro zvýšení rozpustnosti slabých zásad jako je atropin nebo kodein. Za kyselé modifikátory jsou považovány kyselina fumarová, kyselina citronová nebo kyselina askorbová. Po úpravě pH jsou ionizovatelné sloučeniny stabilnější, lépe rozpustné, a tímto je zajištěna optimalizovaná absorpce i biologická dostupnost. Nevýhodou této metody je riziko tvorby sraženin v důsledku ředění vodným roztokem média s pH, při kterém je sloučenina méně rozpustná, což v případě intravenózního podání může vést ke vzniku embolií. Dále je třeba brát v potaz rizika spojená s tolerancí a toxicitou při použití nefyziologického pH. [9] [11] [17]

- Hydrotropie

Hydrotropní látky (též hydrotrophy) je skupina látek, která při dostatečné koncentraci dokáže zvýšit rozpustnost lipofilních látek ve vodě. Na rozdíl od surfaktantů se liší krátkou hydrofobní částí. Za zlepšením solubility stojí tvorba slabých interakcí mezi hydrotropním činidlem a špatně rozpustným léčivem. Mezi jejich pozitivní vlastnosti pro použití v praxi patří zejména jejich jednoduchost. Hydrotrophy jsou nezávislé na pH, mají vysokou selektivitu a není potřeba chemické modifikace hydrofóbního léčiva nebo použití organického rozpouštědla či příprava emulzního systému. Dále mezi výhody hydrotropních látek patří nízké náklady a toxicita. Naopak jejich nevýhodou se stává potřeba vysokých koncentrací a také možnost vzniku interakcí mezi hydrotropní a léčivou látkou. Příkladem běžně užívaných hydrotropů je např. benzoan sodný, nikotinamid, močovina nebo salicylan sodný. [9] [11] [12]

3.2.3. Technologické metody

- Pevná disperze

Další metodou ovlivňující rozpustnost je příprava pevné disperze. [18] Disperze v pevné fázi se skládá minimálně ze 2 odlišných komponentů – účinné látky (hydrofobní léčivo) a hydrofilního nosiče (matrix). [12] Léčivo je dispergováno v prostředí matrix a tím vytváří molekulární směs. Vlastnosti hydrofilního nosiče zvyšují rychlost rozpouštění a uvolňování účinné látky. [11] Běžně používaným nosičem bývá dobře rozpustný polymer např. poly(vinylpyrrolidon), polyvinylchlorid, hydroxypropyl methylcelulóza, kopolymery derivátů kyseliny akrylové a jiné. [12] [18] Disperze léčiva v matrix je mnohonásobně rozpustnější než samotná krystalická látka. Jestliže se dispergovaná látka oddělí v tuhém stavu, jedná se o heterogenní disperzi. Pokud ale vznikne molekulární, případně iontová disperze, můžeme se bavit o homogenní disperzi neboli tuhém roztoku. [18]

Na základě molekulárního uspořádání je možné rozlišit pevné disperze do 6 kategorií: pevná eutektická směs, pevný roztok, skleněný roztok a suspenze, amorfni precipitace v krystalickém nosiči. O jaký typ se bude jednat rozhoduje způsob přípravy. [13] [19]

Pevné disperze jsou snadno připravitelné a dají se jednoduše zformulovat do běžných pevných lékových forem, což je jedna z jejich výhodných vlastností. Mezi další výhody patří

kromě zvýšení rozpustnosti a biodostupnosti také redukce velikosti částic, zvýšení pórovitosti, zlepšení smáčivosti a polymorfní změny léčiva. Nevýhodou pevných disperzí bývá zhoršená stabilita z důvodu rekrystalizace léčiva, která pak může vést ke snížené biologické dostupnosti tohoto léčiva. [11]

- Komplexy s cyklodextriny (inkluzní komplexy)

Rozpustnost hydrofóbních léčiv lze navýšit spojením do komplexů s vhodnou látkou, kdy se pak léčivá látka při styku s tělesnou tekutinou z komplexu uvolňuje. Cyklodextriny (CD) jsou složeny z jednotek D-glukosy. [18] Jedná se o cyklické oligosacharidy, které se běžně vyskytují v přírodě. [11] Existují tři typy CD: alfa, beta a gamma. Alfa CD tvoří inkluzní komplexy s alifatickými uhlovodíky, beta CD zase obvykle formují komplexy s malými aromatickými molekulami. Objemnější sloučeniny naopak vážou gamma CD. [10] CD mají tvar dutého komolého kužele s nepolární vnitřní dutinou a polárním vnějším povrchem, kde se nachází volné hydroxylové skupiny. Lipofilní prostředí centrální dutiny umožňuje zachycení hydrofóbní molekuly uvnitř dutiny a díky hydrofilnímu povrchu vzniká ve vodě dobře rozpustný inkluzní komplex. [8] [11] Léčivo je v komplexu vázáno slabými nekovalentními vazbami, které zvládají snadno uvolnit léčivo z vazby při styku s vodnou fází LF nebo tělesnou tekutinou. Pevnost vazby ovšem také záleží na tom, jak léčivo „zapadá“ do dutiny a také na specifických interakcích mezi povrchovými atomy. [11] [18]

CD se používají v technologii nejen pro zvyšování rozpustnosti, ale také pro zvýšení stability léčiva, zlepšení smáčivosti, k omezení interakcím mezi léčivem a pomocnými látkami, dále ke snížení iritace gastrointestinálního traktu (GIT) nebo k zamaskování nepříjemné chuti či zápachu. [8] [11] V praxi se můžeme setkat s komplexy beta-CD a paklitaxelu (pod komerčním názvem Taxol) nebo v kombinaci s nesteroidními antiflogistiky ibuprofenem či naproxenem. [10]

- Liposomy

Liposomy byly poprvé připraveny v Anglii v roce 1961 Alecem B. Banghamem, který se zabýval fosfolipidy a srážením krve. [20] Jedná se o sférické vezikuly tvořené fosfolipidovou membránovou dvojitou, uvnitř kterých se skrývá polární fáze. [8]

Podle struktury membrány je lze rozdělit na unilamelární a multilamelární liposomy. [20] Molekuly léčiv mohou být na základě svých charakteristik buď enkapsulovány ve vodném prostoru liposomů anebo mohou být inkorporovány do jejich membrány. Z těchto důvodů se liposomy v současnosti používají jako jeden z typů nosičového systému, jehož cílem je dopravit léčivo na místo určení k dosažení terapeutického účinku. [8] Jako nosičové systémy s řízeným uvolňováním se liposomy užívají především pro hydrofilní léčiva, zatímco pro sloučeniny špatně rozpustné ve vodě nabízí novou cestu ke zvýšení rozpustnosti a postupnému dosažení lepší biodostupnosti. [8] [11]

Liposomální látky nejsou toxické ani imunogenní, ba naopak se jedná o biokompatibilní a biodegradabilní molekuly, které jsou schopny zapouzdřit široké množství lipofilních sloučenin, což bývá jejich výraznou výhodou. [8] Schopnost enkapsulace se odvíjí u liposomů od dvou následujících faktorů – fyzikálně chemických vlastnostech léčiva (př. lipofilita) a složení dvojvrstvy spolu s metodou přípravy. Úspěšná liposomální formulace byla připravena s antimykotikem amfotericinem B, která vedla ke snížení jeho renálních nežádoucích účinků. [21]

- Micelární solubilizace

Micelární solubilizace je proces, při kterém se zvyšuje léková rozpustnost skrz snížení povrchového napětí. K rozpouštění léčiva přispívají micely povrchově aktivních látek (tenzidů), které s léčivem interagují a následně díky tomu vzniká termodynamicky stabilní izotropní roztok. Tyto micely se tvoří rozpuštěním tenzidů ve vodě v koncentraci vyšší než je kritická micelární koncentrace. [12] Potřebná koncentrace tenzidů se různí a její hodnota bývá zjištěna experimentálně, jelikož záleží na chemických vlastnostech rozpouštěné fáze. [18] Většina surfaktantů má hodnotu kritické micelární koncentrace v rozmezí 0,05 – 0,10 %. [11] Jakmile se vytvoří micely, dochází v nich k zachycení léčiva. Tento stav se nazývá micelizace a obecně vede ke zvýšení rozpustnosti špatně rozpustných látek. [14] Rozpuštění daného množství lipofilní látky je zprostředkováno určitým množstvím tenzidů, jenž je vyjádřeno maximální aditivní koncentrací. Působením teploty, změnou polarity/hodnoty disociační konstanty rozpouštěné látky nebo její molekulovou hmotností je možné tuto hodnotu ovlivnit. [18]

Běžně se používají neionogenní surfaktanty včetně polysorbátů, polyoxyetylovaný ricinový olej nebo glyceridy či estery nízkomolekulárních polyethylenglykolů. V praxi je

aplikována metoda micelární solubilizace u antidiabetik např. u gliklazidu nebo glimepiridu. [12] [14]

- Proces superkritických kapalin (Supercritical Fluid = SCF)

V současných letech je metoda superkritických kapalin v technologii jednou z nejpoužívanějších metod pro redukci velikosti částic a zvýšení rozpustnosti. Superkritická kapalina je tekutina, jejíž teplota a tlak jsou nad kritickými body (teplotním a tlakovým). Za těchto podmínek už neexistují oddělené fáze kapaliny a plynu, čímž látka získává vlastnosti obou skupenství (kapalného i plynného). [12] [14] Pokud SCF dosáhne blízkosti kritické teploty, stává se vysoce stlačitelnou, a následně je možné pozměnit vlastnosti materiálu (ve smyslu změny hustoty, viskozity, difuzivity anebo přenosu hmoty). Toto pak určuje míru rozpouštění látky při malých změnách tlaku. Jakmile je léčivo rozpuštěno za pomoci superkritické kapaliny, rekrystalizuje ve formě mikro- nebo nanočástic. Rekrystalizace přispívá ke zvýšení rozpustnosti léčiva. [12] [14]

Oxid uhličitý se běžně používá jako činidlo v procesu superkritických kapalin z důvodu nízké toxicity, nákladové efektivity, bezpečnosti a recyklovatelnosti. [12] Dalším příkladem superkritických rozpouštědel je oxid dusný, ethylen, propylen, ethanol, čpavek a voda. Zavedení superkritických tekutin v průmyslu nezatěžuje výrazně životní prostředí, díky čemuž bývá použití této metody žádoucí. [14] Nevýhodou jsou vysoké náklady a komplexnost procesu. [12]

- Samoemulgující systémy (Self-emulsifying drug delivery systems = SEDDS)

Samoemulgující systémy jsou nosičové systémy léčiva založené na lipofilní formulaci. Jedná se o izotropní roztoky léčiva, lipofilních látek (olejů), povrchově aktivních látek a v některých případech i kosolventů. [22] Principem těchto systémů je jejich schopnost vytvořit samovolně emulze typu olej ve vodě (o/v) při styku s vodnou fází (trávicími tekutinami). Léčivo se zředí trávicí šťávou, a to pak umožňuje rychlou absorpci vody, která má za následek samoemulgaci účinné látky. Po podání se díky tomu emulgované léčivo lépe vstřebává. [11] [23] Když se léčivá látka dostane do tenkého střeva, tyto exogenní lipidy stimulují exkreci žlučových lipidů, což zajišťuje kontinuitu lipidového prostředí. [22]

Velikost částic emulze závisí na typu použitého samoemulgujícího systému a pohybuje se v rozmezí menší než 150 nm až k 10-20 nm. [22] SEDDS lze na základě velikosti částic a vlastností vzniklé emulze rozdělit na: *samoemulgující systémy* (self-emulsifying drug delivery systems), *samomikroemulgující systémy* (self-microemulsifying drug delivery systems = SMEDDS), *samonanoemulgující systémy* (self-nanoemulsifying drug delivery systems = SNEDDS), *samodvojemulgující systémy* (self-double-emulsifying drug delivery systems = SDEDDS), *samoemulgující fosfolipidové suspenze* (self-emulsifying phospholipid suspensions = SEPS).

Samoemulgující systém nezávisí na podmínkách GIT díky emulgaci léčiva ještě před absorpcí, proto je působení jídla na vstřebání léčiva porovnatelně menší než u jiných lipofilních formulací. [22] Další výhodou je možnost snížení podávané dávky léčiva díky zvýšení biologické dostupnosti. [11] V praxi se pak používají jako náplň do měkkých želatinových tobolek. [22]

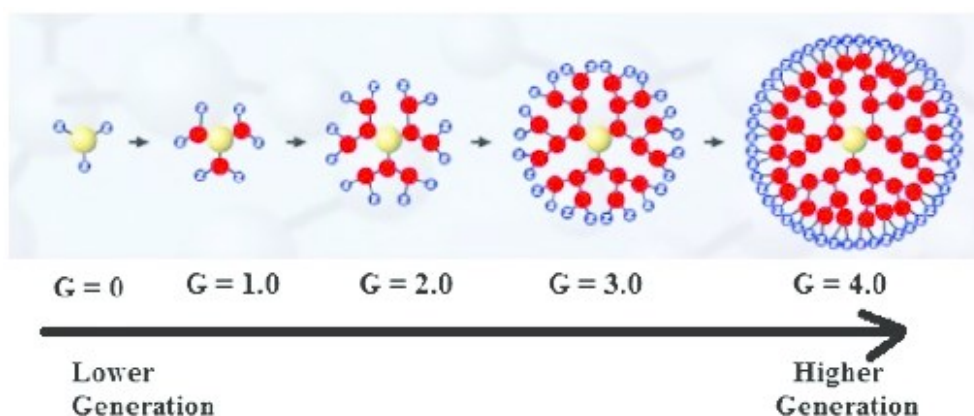
3.3. Dendrimery

Dendrimery jsou mimořádně rozvětvené globulární monodisperzní polymery s velmi dobře charakterizovanou trojrozměrnou stavbou a velikostí. [24] Název dendrimer vychází z řeckého slova *dendron* (neboli strom), jemuž se svojí stavbou dendrimery podobají. Další označení, se kterým se můžeme potkat bylo odvozeno z latinského slova pro strom – *arbor* - arboroly, avšak označení dendrimery se v praxi používá nejčastěji. [12] [24]

Dendrimery byly poprvé zmíněny v roce 1978 v publikaci Fritze Vögtle, který je spolu se svou vědeckou skupinou připravil divergentní metodou. [24] Od té doby se dendrimery zařadily mezi polymery, které mohou být konjugovány s různými chemickými entitami jako detekční činidlo, biomolekula, látka ovlivňující farmaceutické/terapeutické vlastnosti nebo jako nosič léčiva v rámci cílené distribuce. [25]

3.3.1. Složení a vlastnosti

Základní struktura je představena třemi jedinečnými komponenty: centrálním jádrem, vnitřní vrstvou a periferní oblastí. Multifunkčním jádrem může být malá molekula, nanočástice nebo polymerní částice. Dendritické molekuly jsou složeny z opakujících se jednotek vnitřní vrstvy spojenými s centrálním jádrem. Vnější vrstva je pak zakončena funkčními skupinami. [12] Každá nová větvičí se vrstva je reprezentována repetitivní monomerní jednotkou těchto makromolekul. Tímto se vytváří nová generace směřující od centra na periferii. [25] [26] Pro lepší představu lze na Obrázek 2 vidět generace pojmenované písmenem G_n , kde n značí počet vrstev.



Obrázek 2 Různé generace dendrimerů [27]

Dendritické polymery nabízí širokou škálu potencionálního využití v praxi. Díky své 3D struktuře jsou dendrimery obohaceny o jedinečné rysy. [25] Jedna z jejich největších předností je možnost plné kontroly procesu přípravy. Molekuly dendrimerů lze modifikovat podle jejich terapeutického využití např. úpravou terminálních skupin nebo množství větvení během přípravy. Další atraktivní vlastností je jejich všestrannost, uniformní design, nízká polydisperzita nebo multivalentnost. V cílené distribuci léčiv se pak pohlíží na jejich rozpustnost ve vodě a dostupnost hydrofobních dutin ve vnitřních vrstvách, které mohou sloužit k enkapsulaci lipofilních látek. [12] [25]

Další jejich hlavní pozitivní charakteristikou jsou jejich statické micelární vlastnosti. Na rozdíl od micel nepotřebují k formulaci dosáhnout kritické micelární koncentrace. Studie prokázaly, že použití dendrimerů ke zvýšení rozpustnosti hydrofobních látek je výhodnější v porovnání s micely nebo cyklodextriny, neboť nezávisí na kritické micelární koncentraci. Příkladem léčiv, které používají dendrimery jsou nifedipin nebo indometacin. Nifedipin se pojí s polyamidoaminovými (PAMAM) dendrimery, zatímco indometacin bývá v kombinaci s polyethylenglykol polyether dendrimery.. [10]

3.3.2. Syntéza dendrimerů

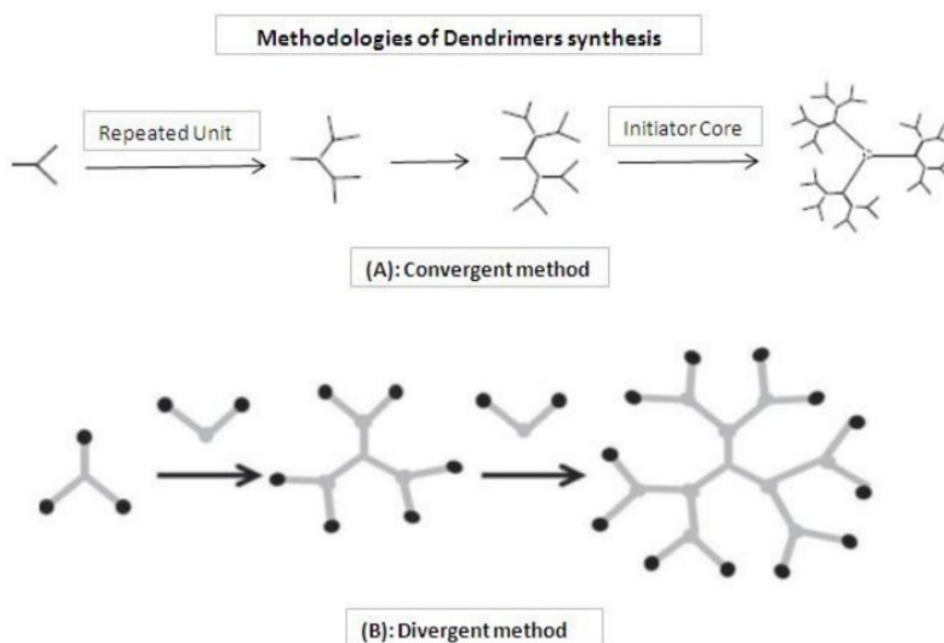
Jak již bylo zmíněno, každý krok v procesu syntézy dendrimerů je plně kontrolovaný. Kromě výše uvedené divergentní metody existuje ještě konvergentní metoda pro přípravu dendritických polymerů. [28]

A) Konvergentní metoda

Příprava dendrimerů konvergentní metodou probíhá ve směru dovnitř k centrálnímu jádru postupným přidáváním koncových jednotek s reaktivními monomery. Vedlejší produkty vyprodukované během reakce jsou odděleny purifikací, avšak u vyšších generací je vyčištění produktu těžší kvůli podobnosti mezi produktem a reaktantem. [25] Konvergentní strategie využívá ke svému prospěchu symetrickou strukturu těchto polymerů a díky malému počtu reakcí probíhajících v každém daném kroku je riziko přípravy strukturálně chybných produktů méně pravděpodobné. [28] Nevýhodou tohoto přístupu je omezená možnost přípravy velkých struktur, tudíž metoda je vhodná spíše pro výrobu nižších generací dendrimerů. [25]

B) Divergentní metoda

Divergentním způsobem jsou dendrimery budovány vrstvu po vrstvě směrem ven. [28] Dochází ke spojování monomerních jednotek s centrálním jádrem, které vede k postupnému napojování dalších generací okolo jádra s následným odstraněním ochranných skupin. [25] Každé nové větvení je přidáno pouze po redukci nitrilové skupiny na aminovou. Tento proces je opakován, dokud není dosaženo požadovaného množství větvení a syntéza je touto cestou plně pod kontrolou. [28] Divergentní metodou mohou být připraveny dendrimery s modifikovanými koncovými skupinami, čímž je možné ovlivnit jejich fyzikálně chemické vlastnosti dle použití v praxi. [25]



Obrázek 3 Přístupy k syntéze dendrimerů (A) Konvergentní metoda (B) Divergentní metoda [25]

3.4. Vliv dendrimerů na rozpustnost hydrofobních léčiv

Dendrimery mají díky svým fyzikálně chemickým vlastnostem potenciál zvýšit rozpustnost léčiv špatně rozpustných ve vodě. [24] Tento objev vedl k vyššímu prozkoumání vztahu mezi léčivem a dendrimery. Dendrimery fungují jako nosiče léčiv buď formou enkapsulace léčiva uvnitř dendritické struktury, nebo interakcí léčiva s terminálními skupinami, kdy tvoří dendrimer-léčivo konjugáty spojené elektrostatickými nebo kovalentními vazbami. [25]

- Enkapsulace léčiva v dendrimerech

Enkapsulace lipofilní účinné látky lze dosáhnout působením nekovalentních interakcí mezi léčivem a vnitřními skupinami dendrimerů nebo na základě pouhého fyzikálního zachycení léčiva. [25]

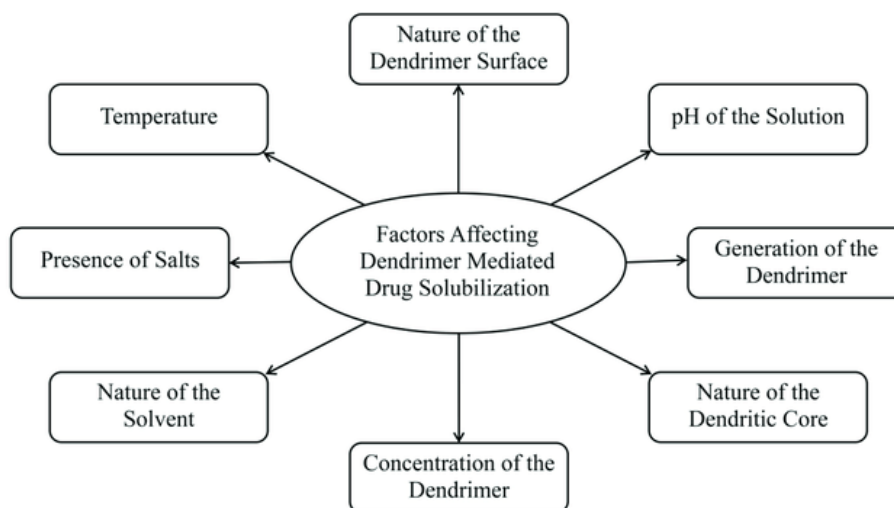
Vnitřní vrstva dendrimerů bývá obvykle hydrofobní z důvodu lipofilních interakcí a vodíkových vazeb. Tímto je zajištěno vhodné prostředí pro enkapsulaci hydrofobních léčiv. Čím vyšší je generace dendrimerů, tím se zvětšuje prostor pro zapouzdření hydrofobní aktivní látky. Je třeba brát v potaz, že zvýšením počtu větvení a povrchových skupin dochází k signifikantnímu snížení interakcí mezi mobilní fází z důvodu strukturálního složení a hustoty („de Gennes dense packing“). Tvorba komplexu za pomoci nekovalentních vazeb v dendrimerech je preferovaný způsob pro zvýšení rozpustnosti léčiv, který má ale také svá omezení. V tomto případě může dojít při styku biologické tekutiny s komplexem léčivo-dendrimer k rozpadu vazby a následnému uvolnění léčiva z dendritické dutiny. [12] [26]

- Konjugace léčiva

Koncové funkční skupiny umožňují vytvořit prostor pro vznik kovalentních vazeb pro terapeutické molekuly. Konjugaci je pak možno využít při vývoji proléčiva. Spojovacím článkem mohou být esterové nebo amidové skupiny, acidolabilní acylhydrazon nebo disulfidické můstky kovalentně navázané na léčivo a dendrimery. Dendritické komplexy jsou v praxi úspěšně zavedeny v diagnostice. Kontrastní látky konjugované s dendrimery nabízí větší tkáňovou specifitu, nedochází k rychlé exkreci a podávají se v nižší koncentraci v porovnání s konvenčními diagnostickými látkami. [12] [26] I přestože jsou dendrimery jedna molekula, mohou obsahovat na svém povrchu rozsáhlé množství funkčních skupin. Díky tomu je jejich využití pro různé druhy látek velmi atraktivní obzvláště v případech, kde je potřeba kovalentní nebo jiný typ vazby. [28]

3.4.1. Faktory ovlivňující působení dendrimerů na rozpustnost léčiv

Ačkoliv se dendrimery dají použít na zvýšení rozpustnosti široké škály látek, je nutno brát v potaz také ostatní činitele, které ji ovlivňují. Existuje několik faktorů, na které se musí brát ohled při vývoji, př. pH roztoku, generace dendrimerů, povrchové funkční skupiny, povaha centrálního jádra nebo koncentrace dendrimerů v roztoku. [12]



Obrázek 4 Faktory ovlivňující dendrimery zprostředkovanou rozpustnost léčiva [12]

- Působení pH

Parametr působící nejen na povrchové skupiny, ale i na vnitřní funkční uskupení dendritických molekul je pH média. Svým působením může významně zvýšit schopnost léčiva solubilizace ve vodném prostředí v komplexu s dendrimery. Protonizovaný stav dendrimerů v daném pH přispívá k lepší rozpustnosti hydrofobních látek. [12] K protonizovanému stavu může dojít na základě tvorby elektrostatických sil mezi hydrofobním léčivem a periferními (ale i interními) aminovými částmi dendrimerů. [29] U dendrimerů s PAMAM zakončením dochází při nízkém pH ($\text{pH} < 4$) k otevření konformace, která je založena na vysoce uspořádané struktuře. Při tomto pH se vnitřní prostory dendrimerů vyprazdňují v důsledku repulzních sil mezi pozitivně nabitými sekundárními aminy ve vnější vrstvě a negativně nabitými terciárními aminy ve vnitřních prostorách dendrimeru. Při neutrálním pH dochází k zpětnému skládání neboli “back-folding“, což může vyvstat jako důsledek nenabitých terciárních aminů uvnitř a pozitivně nabitých povrchových aminů. Naopak při vysokém pH ($\text{pH} > 10$) mají dendrimery neutrální náboj, a kvůli tomu získávají více globulární tvar. [25]

- Vliv generace dendrimerů

Velikost dendrimerů se zvyšuje úměrně se zvyšující se generací. Se zvyšující se velikostí získávají dendrimery sférický, lépe definovaný tvar. U menších velikostí je stavba

dendrimerů méně definovaná, zatímco vyšší generace si osvojuje globulární tvar, který se následně stává nosičem molekul léčiva buď interakcí s vnitřní vrstvou nebo zapouzdřením v dutině dendrimerů. Čím vyšší bude generace, tím se zvětšují prostory ve vnitřních vrstvách, což přispívá k lepším solubilizačním vlastnostem léčiva. Z důvodu menší cytotoxicity, imunogenity a lepší biokompatibility se obecně preferuje použití dendrimerů nižší generace než vyšší. [12] Většinou se volí dendrimery do třetí generace. Studií, ve kterých se pracuje se čtvrtou generací, je v porovnání s ostatními nižšími generacemi velmi málo. [29]

- Vliv koncentrace dendrimerů

Studie potvrdily, že zvýšením koncentrace dendrimerů v roztoku dochází k amplifikaci rozpustnosti lipofilních léčiv v komplexu s dendrimery. Při určování vhodné koncentrace je důležité mít na paměti potenciální riziko toxicity dendrimerů a problémy spojené s jejich biokompatibilitou. Existuje maximální bezpečná koncentrace dendrimerů, která byla odvozena z kontextu kationtové toxicity vzhledem k terminálním aminovým skupinám. [12] Dále struktura dendrimerů bývá ovlivňována nejen malými molekulami (rozpuštědlo, protony, soli), ale i většími subjekty jako jsou další molekuly dendrimerů, které mohou vytvářet vazby mezi sebou, a tím působit na molekulární hustotu a konformační strukturu dendrimerů. [25]

- Povaha vnější vrstvy a centrálního jádra

Cytotoxicita dendrimerů se odvíjí od chemické povahy povrchových skupin a jádra. Pozitivně nabitě molekuly dendrimerů vykazují vyšší toxicitu v porovnání s negativně nabitými dendrimery. To potvrzují dendrimery s koncovými karboxylovými skupinami (tedy dendrimery s negativním nábojem), které v koncentraci 5 mg/ml nebo nižší neprokázaly toxické vlastnosti při aplikaci v různých buněčných liniích. [12]

Vnitřní stavba dendrimerů je daná povahou jádra, větvením a použitými funkčními skupinami. Vhodně zvolené jádro zajišťuje lepší flexibilitu a dostatečné množství schránek pro enkapsulaci látek. [12] Při syntéze dendritických molekul je pak jednoduše možné měnit vlastnosti dendrimerů změnou centrálního jádra. [29] Studie Liu et al. prokázala tuto teorii. Během syntézy analogu unimolekulárních micel použili jako základní stavební kámen 4,4-

bis(4-hydroxyphenyl) pentanol místo běžně používaného 3,5-dihydroxybenzyl alkoholu. Touto změnou došlo ke zvětšení vnitřních prostorů, což vedlo následně ke zlepšení vodné solubility pyrenu. [29] [30]

- Působení rozpouštědla

Schopnost solvatace jakéhokoliv rozpouštědla je důležitým parametrem při zjišťování konformačního stavu dendrimerů. Při snížené solvatační kvalitě vykazují dendrimery ve všech generacích zpětné skládání („back-folding“). Nižší generace dendrimerů jsou flexibilnější, a proto bývají náchylnější k tomuto jevu více než jejich vyšší generace v případě špatného rozpouštění. Pokud je kyselé rozpouštědlo v prostředí zásaditého dendrimeru (nebo naopak), dochází k významnému ovlivnění interakcí mezi dendritickými funkčními skupinami a molekulami rozpouštědla, které vedou ke konformačním změnám. Nepochární rozpouštědla vyvolávají svým působením zpětné skládání (dochází ke zvýšení molekulární hustoty v okolí centrálního jádra), zatímco polární solventy tvorbou vodíkových můstků zvyšují molekulární hustotu na povrchu dendrimerů. Možnost zpětného skládání by mělo být zvažováno při snaze dosáhnout dendrimeru zprostředkované rozpustnosti. Zpětné skládání polárních vazeb může vést k expozici hydrofobních částí dendrimeru, a s tím bývá spojena redukce povrchové polarizace. [12] [25]

- Efekt solí

Vysoká koncentrace solí významně ovlivňuje náboj polypropylen-imin dendrimerů a podporuje kontrahovanou konformaci dendrimerů s vysokým stupněm tzv. „back-foldingu“. Tento jev je podobný chování, které bylo pozorováno při zvýšení pH nebo špatné solvataci. Nízká koncentrace solí a repulzní síly mezi nabitými částmi dendrimeru vedou k otevřené konformaci, což souvisí se snížením odporových sil ve struktuře. [12] [25]

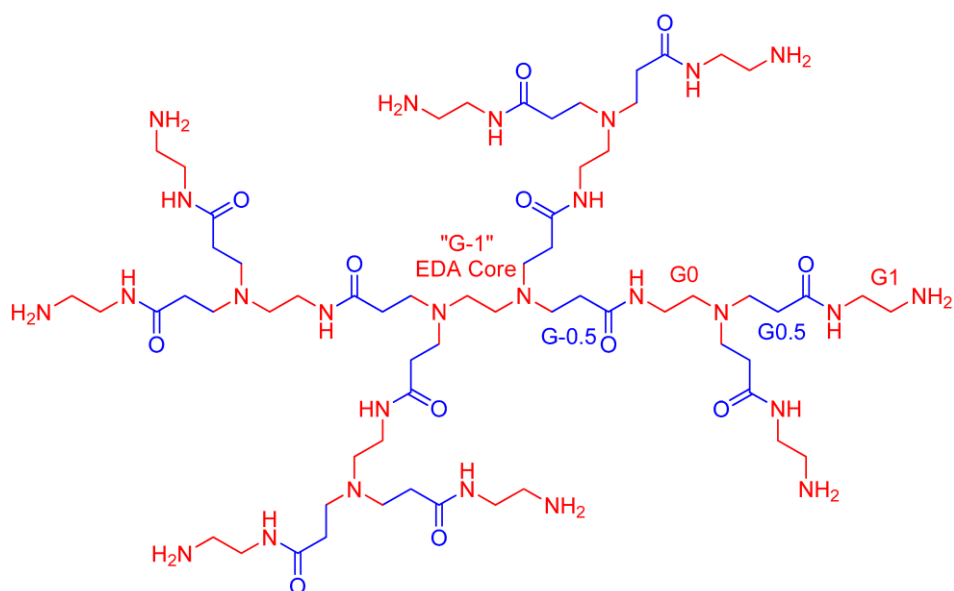
- Působení teploty

Ve studii Milhem et al. bylo popsáno pozitivní ovlivnění rozpustnosti ibuprofenu za použití G4 PAMAM dendrimerů. Rozpustnost ibuprofenu byla pozorována při různých teplotách (27, 35, 40, 45 a 50 °C). Během experimentu došlo k proporcionálnímu zlepšení

rozpuštěnosti se zvyšující se teplotou roztoku. [31] Teplota může významně ovlivnit chování léčiva ve vodě, především pak jeho schopnost rozpouštět se, avšak ve studii nebyly dále vysvětleny příčiny tohoto jevu. [12] [29]

3.5. Polyamidoaminové dendrimery

Polyamidoaminové (PAMAM) dendrimery byly prvními dendrimery, které začaly být syntetizovány a komerčně vyráběny. Můžeme je v praxi nalézt pod obchodním názvem Starburst®. Jejich jádro je složeno z lineárního řetězce obsahující primární aminy. Nejčastěji se v centru nachází ethylendiamin. Z centrálního jádra se pak opakováním amidoaminových jednotek dále větví a vytváří dendritickou strukturu. [31] [32]



Obrázek 5 PAMAM dendrimer [32]

PAMAM dendrimery vykazují určitou toxicitu, která omezuje jejich klinické použití. Specifickými postupy lze tuto jejich vlastnost snížit. [33] Cytotoxicita závisí na koncentraci, náboji a generaci. Kladně nabitě molekuly mají vyšší toxicitu v porovnání s jejich neutrálně nebo negativně nabitými protějšky. Se zvyšující se koncentrací nebo generací se zároveň zvyšuje také toxicita PAMAM dendrimerů [32]

Závislost toxicity na generaci souvisí s počtem primárních aminových skupin v dendritické molekule. Čím vyšší je generace dendrimerů, tím více se v nich nachází

primárních aminů. Tyto skupiny pak vyvolávají oxidativní stres a způsobují vyšší produkci cytokinů v organismu, se kterou souvisí následná toxická odpověď. [34]

Jeden ze způsobů jak snížit tuto toxicitu je PEGylace. Navázáním molekul polyethylenglykolu (PEG) na povrchové funkční skupiny dochází k neutralizaci kladného náboje, což zabraňuje elektrostatickým interakcím s biologickou membránou. Omezením kationických skupin jsou PAMAM dendrimery biokompatibilnější a neindukují imunitní systém k zánětlivé reakci. [35] [36]

PAMAM dendrimery mají schopnost aktivovat imunitní systém zvýšením produkce cytokinů. Díky tomu je zvažován jejich potenciál v distribuci vakcín (ve formě nosičů). Samotné molekuly dendrimerů nejsou imunogenní, avšak jejich spojení s plazmatickou bílkovinou vyvolává odpověď protilátek. Z tohoto důvodu se do budoucna uvažuje o konjugaci PAMAM dendrimerů s proteinovým nosičem k získání antigenního efektu. [32]

4. Praktická část

4.1. Použité přístroje a chemikálie

K provedení experimentální části rigorózní práce byly použity výchozí látky a rozpouštědla:

PAMAM dendrimery (G0, G1, G2, G3), Sigma Aldrich, Schnelldorf, Německo

Ultračistá voda, čištěná systémem mili-Q, Faf UK

Methanol, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Německo

Imiquimod, TCI chemicals, Tokio, Japonsko

Dusík pro evaporaci, Faf UK

Pro odměřování kapalin byla použita pipeta značky BRAND® Transferpette® S (Sigma Aldrich, Německo). Díky přístroji IKA® VORTEX 3 byla zajištěna homogenizace připravených roztoků. V ultrazvukové lázni KRAINTEK 12 byla provedena sonikace vzorků. Měření pH bylo umožněno mikro-pH metrem značky Hanna precision pH meter, model pH 210 společnosti Sigma Aldrich. Mechanické míchání bylo zabezpečeno zařízením LT3, Sigma Aldrich. Odstředování připravených koncentrátů s imiquimodem probíhalo v centrifuze MPW-260R od firmy MPW (Varšava, Polsko). Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla prováděna Agilent 1200 series přístrojem (Agilent Technologies, Německo) vybaveného odplyňovačem G1379B, izokratickou pumpou G1310A, termostatovanou kolonou G1316A, autosamplerem G1329A a fluorescenčním detektorem G1321B. IMQ byl analyzován na koloně HS Discovery C-18 150 × 4,6 mm (částice 5 μm s porozitou 100 Å) při 25 °C. Mobilní fáze byla složena z methanolu/acetonitrilu/acetátového pufru (100 mM, pH = 4) 185:275:540 v/v při průtoku 1 ml/min s injekčním objemem 1 μl. Doba analýzy byla 5 minut a IMQ byl detekován pomocí $\lambda_{exc} = 240$ nm a $\lambda_{em} = 360$ nm po 3,2 minutách. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 0,02 - 10 μg/ml ($R^2 \geq 0,999$, $p < 0,001$).

4.2. Příprava vzorků s dendrimery

K přípravě vzorků bylo využito komerčně vyráběných PAMAM dendrimerů čtyř různých generací (G0, G1, G2 a G3). Všechny tyto generace měly předem známou molární hmotnost viz. Tabulka 1

Generace dendrimerů	Molární hmotnost (M_w , g/mol)
G0	516,68
G1	1429,85
G2	3256,18
G3	6908,84

Tabulka 1 Přehled molární hmotnosti dendrimerů

Každá generace byla předem připravena po třech vzorcích (označené písmeny A, B, C) v šesti různých koncentracích. Přehled koncentrací je k nalezení v Tabulka 2. Rozmezí koncentrací vzorků bylo stanoveno podle předchozích experimentů.

Názvy vzorků			
G0-1 A	G1-0,5 A	G2-0,25 A	G3-0,1 A
G0-1 B	G1-0,5 B	G2-0,25 B	G3-0,1 B
G0-1 C	G1-0,5 C	G2-0,25 C	G3-0,1 C
G0-2,5 A	G1-1 A	G2-0,5 A	G3-0,25 A
G0-2,5 B	G1-1 B	G2-0,5 B	G3-0,25 B
G0-2,5 C	G1-1 C	G2-0,5 C	G3-0,25 C
G0-5 A	G1-2,5 A	G2-1 A	G3-0,5 A
G0-5 B	G1-2,5 B	G2-1 B	G3-0,5 B
G0-5 C	G1-2,5 C	G2-1 C	G3-0,5 C
G0-10 A	G1-5 A	G2-2,5 A	G3-1 A
G0-10 B	G1-5 B	G2-2,5 B	G3-1 B
G0-10 C	G1-5 C	G2-2,5 C	G3-1 C
G0-20 A	G1-10 A	G2-5 A	G3-2,5 A
G0-20 B	G1-10 B	G2-5 B	G3-2,5 B
G0-20 C	G1-10 C	G2-5 C	G3-2,5 C
G0-30 A	G1-20 A	G2-10 A	G3-5 A
G0-30 B	G1-20 B	G2-10 B	G3-5 B
G0-30 C	G1-20 C	G2-10 C	G3-5 C

Tabulka 2 Přehled koncentrací dendrimerů

- Příprava vzorků G0 dendrimerů

Pro přípravu roztoku G0-30 bylo do skleněné 8 ml vialky odměřeno 545 μ l PAMAM dendrimerů generace 0 v roztoku s methanolem. K získání čistého dendrimeru bylo nutné nechat methanol vypařit za použití dusíku. Evaporace trvala 30 minut, dokud vzorek nezískal gelovitý vzhled, který značil známky vysušení. Následně byla vialka vložena na 1 hodinu pod vysoké vakuum k zajištění úplného vypaření rozpouštědla.

Po odpaření nadbytečného methanolu bylo přidáno 6 ml vody. Vodný roztok se homogenizoval pomocí laboratorní třepačky a ultrazvukové lázně, dokud nebyl zcela rozpuštěn. Tímto byl připraven vzorek G0-30. Následným ředěním G0-30 byly připraveny zbylé koncentrace. Z roztoku G0-30 se vzaly 2 ml do 4 ml skleněné vialky a smíchaly se s 1 ml vody. Vytvořil se G0-20 roztok.

Pro přípravu roztoku G0-10 byl výchozím roztokem opět G0-30, ze kterého se odebral 1 ml do 4 ml vialky. Do této vialky se přidaly 2 ml vody a G0-10 byl zhotoven. Z G0-10 se odebral 1 ml a smíchal se s 1 ml vody, čímž byl získán roztok G0-5. Následným ředěním roztoku G0-5 v poměru 1:1 s vodou byl vytvořen roztok G0-2,5. Pro zhotovení roztoku G0-1 se opět použil G0-10 roztok. Odměření 1 ml a zředěním 9 ml vody byl roztok připraven.

- Příprava vzorků G1 dendrimerů

Příprava vzorků první generace PAMAM dendrimerů byla provedena obdobným způsobem jako u G0 generace. Do 8 ml skleněné vialky se přidalo 1 046 μ l PAMAM dendrimerů G1. Opět se roztok nechal odpařit pod dusíkem po dobu 40 minut a následně pak pod vakuem po dobu 1 hodiny. Poté se přidalo 6 ml vody. Vodný roztok se mechanicky míchal a následně zhomogenizoval v ultrazvukové lázni do úplného rozpuštění. Touto metodou byl vytvořen výchozí roztok G1-20.

Postupným ředěním byly připraveny zbylé vzorky první generace – G1-10, G1-5, G1-2,5, G1-1 a G1-0,5.

- Příprava vzorků G2 a G3 dendrimerů

Následující kroky pro přípravu vzorků probíhaly stejně s výjimkou použitého počátečního množství dendrimerů. Pro tvorbu G2 vzorků se použilo 1 136 μl G2 roztoku a pro G3 vzorky 1 201 μl . V těchto případech vypařování za pomoci dusíku trvalo déle než u předchozích vzorků (50 minut) a posléze byla použita vakuová pumpa do úplného vypaření organického rozpouštědla. Vzorky G2-10 a G3-5 se rozpustily v 6 ml vody.

Postupným ředěním se připravily zbylé roztoky podle Tabulka 2. Na konci jsme získali 1,5 ml z každé formulace. Jednotlivé roztoky byly rozděleny do 3 mikrokumavek po 0,5 ml. Dále byly připraveny 3 porovnávací vzorky (S vzorky) po 0,5 ml ultračisté vody v každé mikrokumavce. V mikrokumavkách bylo změřeno pH všech roztoků za použití mikro-pH metru. Měření pH-metrem bylo provedeno dvakrát pro každý vzorek.

4.3. Příprava vzorků s imiquimodem

Nadbytečné množství imiquimodu bylo přidáno do roztoků dendrimerů (G vzorky) a vodných roztoků (S vzorky) v 1,5 ml mikrokumavkách. Roztoky byly homogenizovány v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut. V případě úplného rozpuštění IMQ, další množství bylo přidáno. Mikrokumavky se zabezpečily parafilmem a nechaly se přes noc mechanicky míchat. Následující den se vzorky centrifugovaly při 10 000 otáčkách po dobu 10 minut. Supernatant byl opatrně přenesen (v množství 300 μl) za pomoci pipety do nových čistých mikrokumavek. Opět se u vzorků změnilo pH mikro-pH metrem v duplikátech.

4.4. Měření koncentrace IMQ HPLC metodou

Supernatanty byly zředěny 100x methanolem a analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

5. Výsledky a diskuze

Imiquimod je léčivá látka využívána v léčbě široké škály kožních patologií. Díky své schopnosti indukovat imunitní systém zvýšením počtu cytokinů přetrvává velká snaha využít IMQ více v praxi jako chemoterapeutikum. Pro své fyzikálně chemické vlastnosti je jeho použití omezeno pouze na topické podání. IMQ je málo rozpustný jak v hydrofilních, tak i v hydrofóbních činidlech. Zvýšením rozpustnosti IMQ je možné dosáhnout lepší biodostupnosti v organismu, což by mohlo vést k rozšíření jeho klinického využití. [37] [38]

Předmětem této rigorózní práce bylo vyhodnocení vlivu PAMAM dendrimerů na rozpustnost imiquimodu ve vodě.

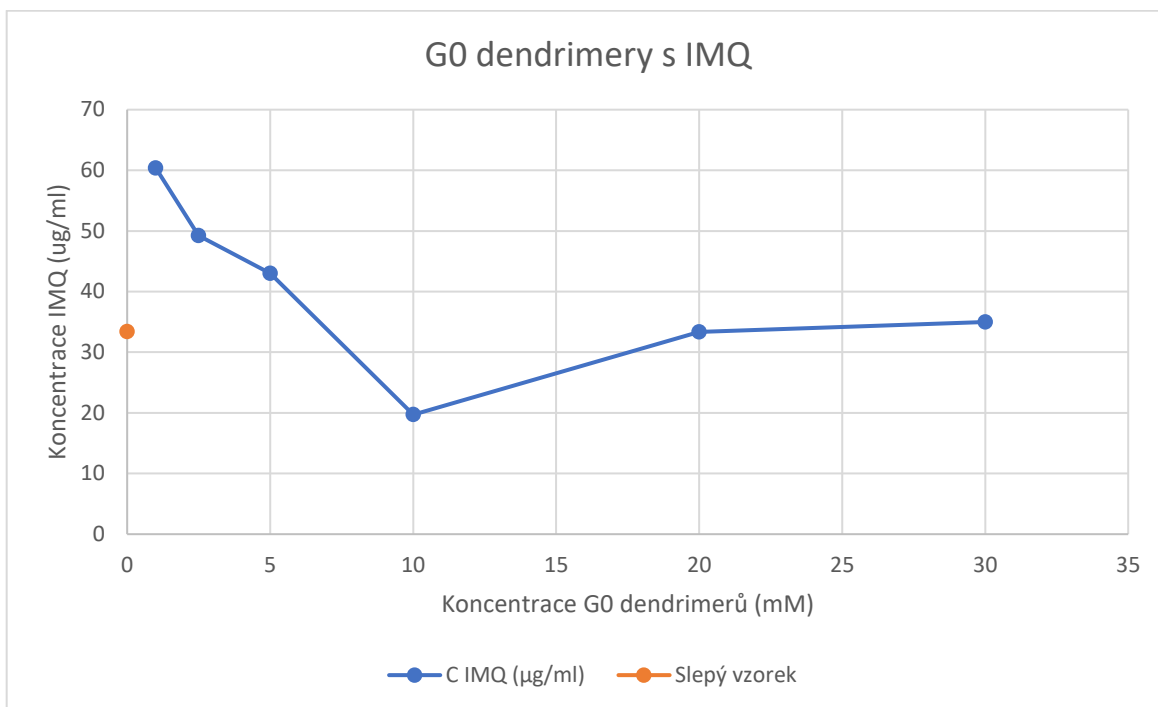
V posledních letech jsou dendritické polymery využívány jako přídatné látky zvyšující rozpustnost hydrofóbních léčiv, čemuž vděčí svým vlastnostem. Působení dendrimerů závisí na různých faktorech, jak již bylo zmíněno v teoretické části výše. [12] [24]

Vlastností dendritických PAMAM molekul využívá chemoterapeutikum 5-fluorouracil (5-FU). Na rozdíl od IMQ spadá pod hydrofilní léčiva s rozpustností 11 100 mg/L (při 22 °C). [39] Jedná se o pyrimidinový analog, který inhibuje dělení buněk interferencí se syntézou DNA. Jeho antineoplastická aktivita vzniká metabolizací 5-FU na fosforylované formy 5-fluoruridin a 5-fluordeoxyuridin. [12] [40]

Studie prokázaly lineární souvislost mezi zvýšením rozpustnosti 5-FU a koncentrací PAMAM dendrimerů. Zkouška rozpustnosti 5-FU ve vodě v přítomnosti G4 PAMAM dendrimerů potvrdila tvorbu supramolekulárních komplexů spolu s tímto antimetabolitem. K tomuto jevu došlo v důsledku působení elektrostatických interakcí a vodíkových vazeb mezi pozitivně nabitými amoniovými skupinami a nedisociovanými aminovými skupinami dendrimerů společně s molekulami 5-FU. [12] [41] [42]

Pro účely této práce byly také zvoleny komerčně vyráběné PAMAM dendrimery. Jejich vodný roztok s IMQ byl měřen za pomoci HPLC. Jedná se o separační metodu, při které dochází k oddělení složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti i koncentrace ve vzorku. [43]

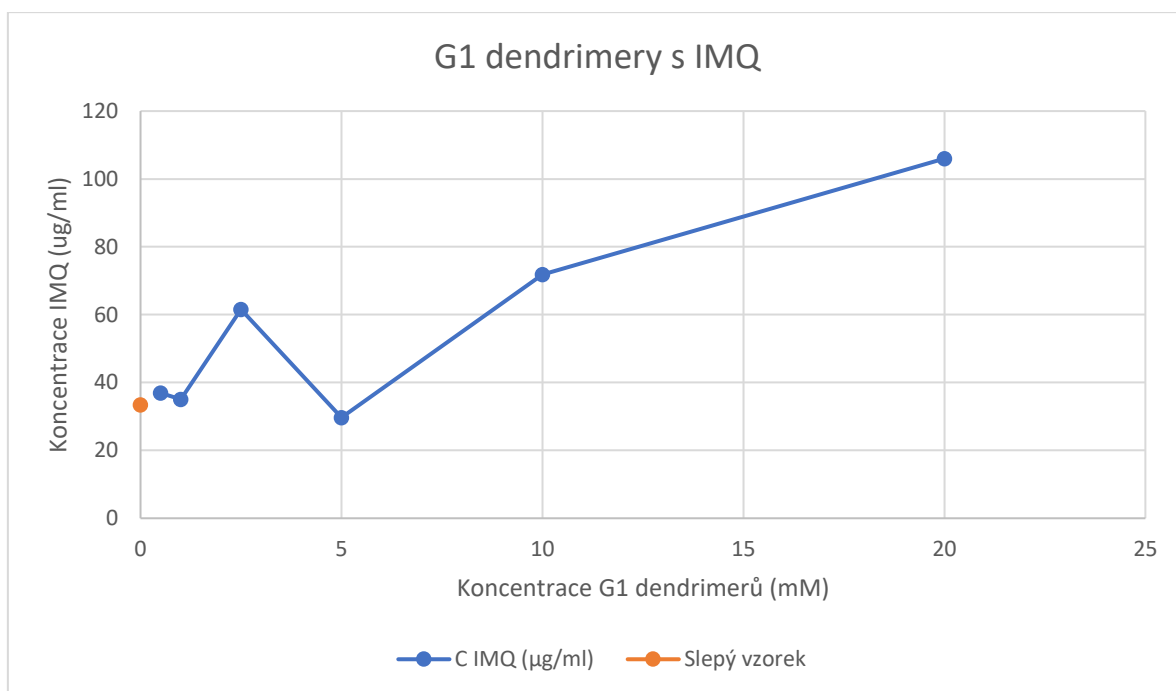
5.1. Výsledky G0 dendrimerů s IMQ



Obrázek 6 Graf rozpustnosti IMQ v roztoku G0 dendrimerů

Na obrázku číslo 6 lze vidět graf s maximální rozpustností IMQ v roztoku s G0 dendrimery získanou v koncentraci 1 mM, zatímco minimální rozpustnost byla naměřena v koncentraci 10 mM G0 dendrimerů. Hodnota maximálně rozpuštěného IMQ byla 60,38 µg/ml. Porovnáním se slepým vzorkem (s hodnotou 33,41 µg/ml) se jednalo o dvojnásobně větší rozpustnost. V následujících koncentracích 20 a 30 mM se pak množství rozpuštěného IMQ pohybuje stabilně mezi 30-40 µg/ml.

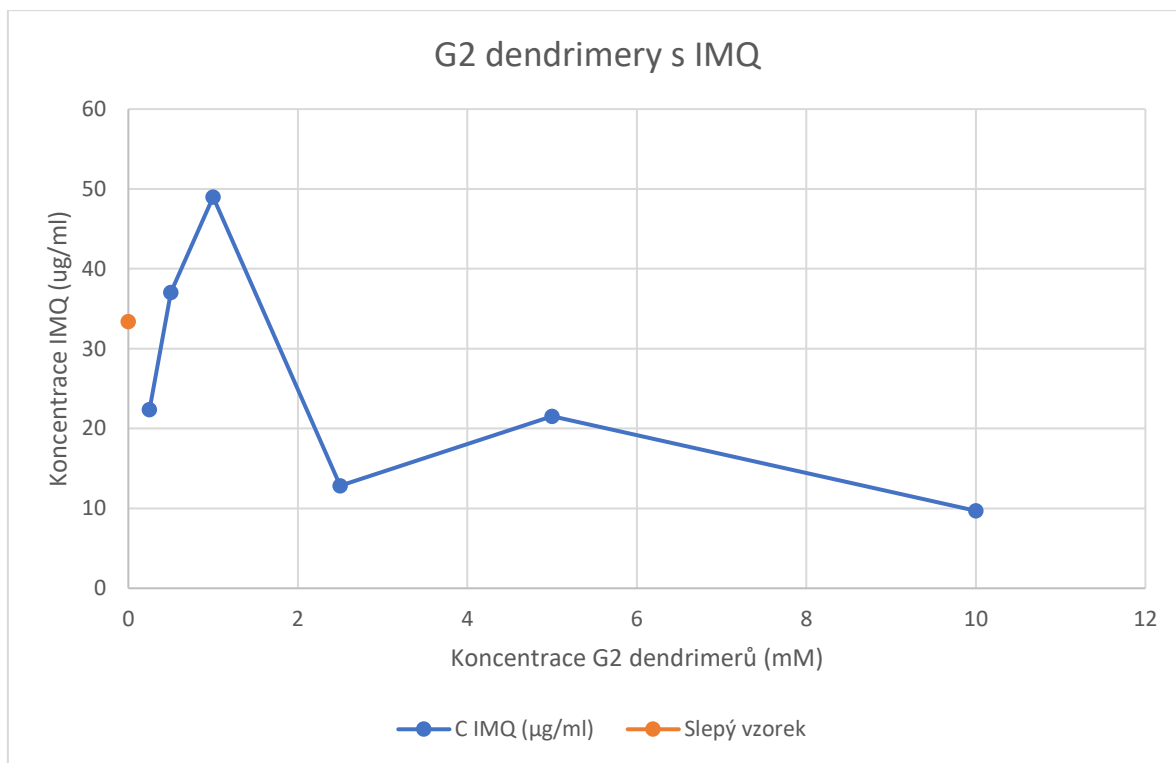
5.2. Výsledky G1 dendrimerů s IMQ



Obrázek 7 Graf rozpustnosti IMQ v roztoku G1 dendrimerů

Graf na obrázku číslo 7 zobrazuje vzestupnou tendenci koncentrace IMQ, jenž byl nejvíce rozpuštěn v roztoku 20 mM G1 dendrimerů. V této koncentraci byla dosažena také nejvyšší rozpustnost IMQ (106 µg/ml) ze všech použitých generací PAMAM dendrimerů. Pokud bychom porovnali tuto hodnotu se slepým vzorkem, jedná se o trojnásobné množství rozpuštěného IMQ ve vodném prostředí.

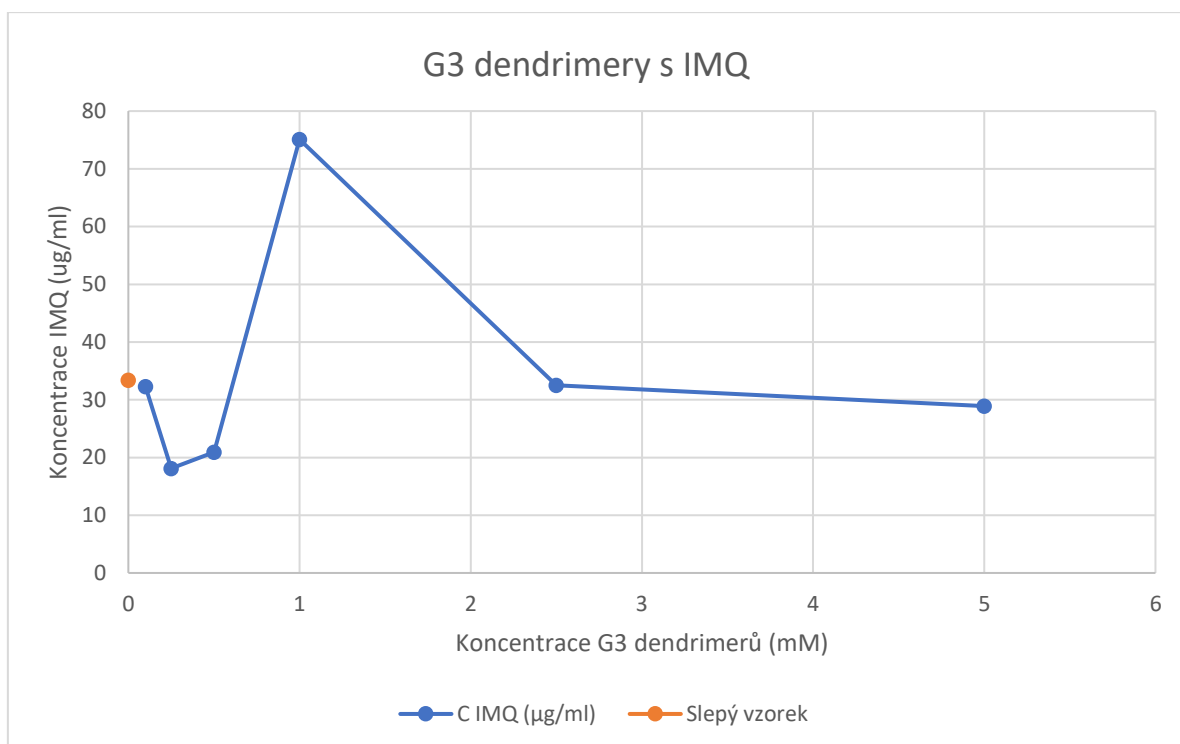
5.3. Výsledky G2 dendrimerů s IMQ



Obrázek 8 Graf rozpustnosti IMQ v roztoku G2 dendrimerů

Na obrázku číslo 8 je grafické zobrazení rozpustnosti IMQ v roztoku G2 PAMAM dendrimerů. Největší změna proběhla při koncentraci 1 mM G2 dendrimerů, při které se naměřilo 49 µg/ml. Po dosažení této maximální možné koncentrace rozpuštěného IMQ došlo k náhlému poklesu naměřeného množství IMQ pravděpodobně z důvodu dosažení maximální nasycené koncentrace. Oproti porovnávacímu vzorku s koncentrací 33,41 µg/ml je maximální množství IMQ s G2 dendrimery nevýznamné na rozdíl od generace 1.

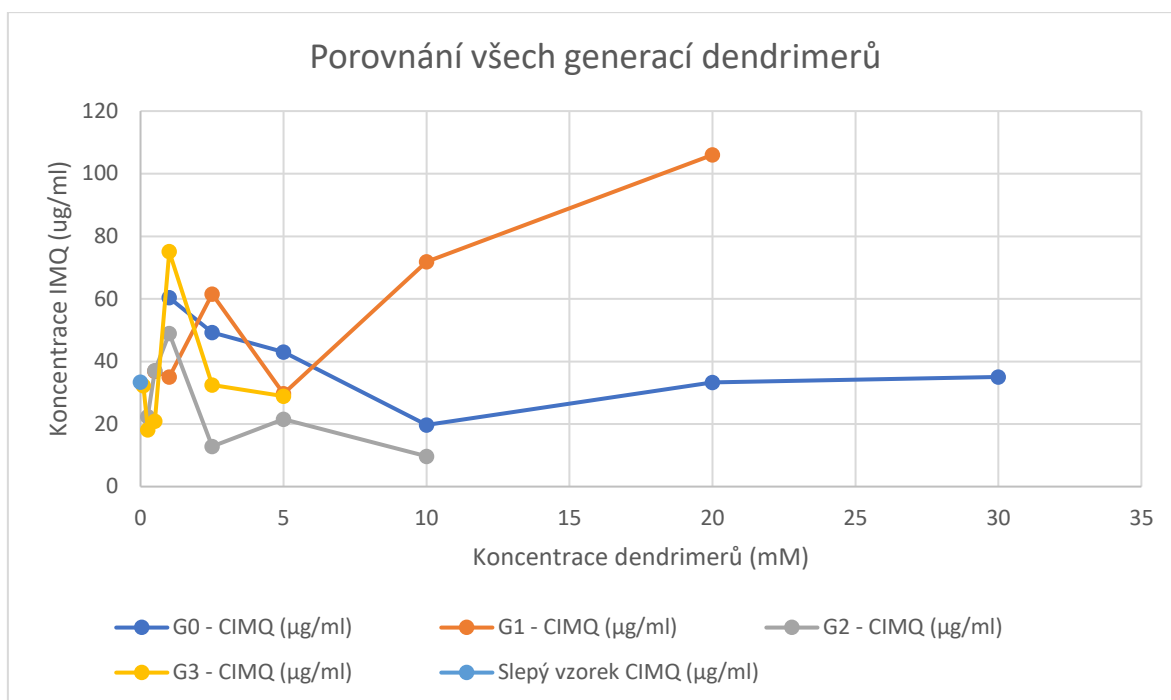
5.4. Výsledky G3 dendrimerů s IMQ



Obrázek 9 Graf rozpustnosti IMQ v roztoku G3 dendrimerů

Pro tuto generaci dendrimerů (G3) byla experimentem prokázána nejvyšší rozpustnost IMQ ve vodě v koncentraci 1 mM stejně jako tomu bylo u G0 PAMAM dendrimerů. Hodnota naměřeného IMQ v této koncentraci činila 75,1 µg/ml. Podobně jako tomu bylo v případě generace 0 můžeme říci, že se jednalo o dvojnásobné zvýšení v porovnání se slepým vzorkem (33,41 µg/ml).

5.5. Porovnání všech generací dendrimerů



Obrázek 10 Graf zobrazující všechny generace PAMAM dendrimerů a jejich vliv na rozpustnost IMQ

Jak lze odvodit z grafického zobrazení na obrázku 10, nejvyšší schopnost rozpouštět IMQ prokázala první generace. V této generaci byla naměřena průměrná hodnota rozpuštěného IMQ 56,35 µg/ml. Nejvyšší koncentrace rozpuštěného IMQ se dosáhlo hodnotou 106 µg/ml. Naopak nejhůře si vedla druhá generace PAMAM dendrimerů, kde bylo naměřeno nejnížší množství rozpuštěného IMQ v koncentraci 10 mM s hodnotou 9,7 µg/ml. Porovná-li se tato hodnota se slepým vzorkem (33,41 µg/ml), jedná se o trojnásobné snížení rozpustnosti.

Pro všechny generace dendrimerů kromě G1 byla optimální rozpustnost IMQ v blízkosti hodnoty 1 mM. Po dosažení maximální možné koncentrace došlo následně k poklesu rozpustnosti. Jednou z příčin může být dosažení maximální nasycené koncentrace. Vliv PAMAM dendrimerů G0, G2 a G3 na rozpustnost IMQ byl v těchto případech podobný. Všechny tyto 3 generace vykazují nízkou rozpustnost IMQ ve vodě. Naopak koncentrace rozpuštěného IMQ v roztoku s G1 dendrimery je nejvyšší v porovnání s ostatními generacemi.

5.6. Výsledky měření pH roztoků G0-G3 před a po přidání IMQ

	Před IMQ	Po IMQ		Před IMQ	Po IMQ
G0-1	10,21	9,30	G2-0,25	10,09	9,30
G0-2,5	10,42	9,82	G2-0,5	10,28	9,62
G0-5	10,55	10,08	G2-1	10,51	9,98
G0-10	10,62	10,32	G2-2,5	10,66	10,31
G0-20	10,80	10,54	G2-5	10,79	10,54
G0-30	10,83	10,65	G2-10	10,85	10,62
G1-0,5	10,16	9,57	G3-0,1	9,76	8,99
G1-1	10,43	9,94	G3-0,25	10,13	9,70
G1-2,5	10,65	10,36	G3-0,5	10,37	10,08
G1-5	10,81	10,56	G3-1	10,52	10,31
G1-10	10,98	10,75	G3-2,5	10,63	10,52
G1-20	11,07	10,90	G3-5	10,74	10,66

Tabulka 3 Hodnoty měření pH roztoků G0-G3 před a po přidání IMQ

Měření pH každého roztoku probíhalo dvakrát, v Tabulce 3 je jejich průměrná hodnota. Přidáním nadbytečného množství IMQ došlo k lehkému poklesu pH, ale výsledky se pořád pohybovaly nad pH 7. To může být vysvětleno tím, že pKa primárních aminoskupin PAMAM dendrimerů je 3-6, zatímco pKa sekundárních aminů je 7-9. [44] Na druhou stranu, IMQ je slabá báze s pKa=7,3. [45] Takže se předpokládá, že po přidání slabé báze do už zásaditého roztoku dendrimerů nedojde k dramatické změně pH. Hlavním důvodem zásaditosti roztoku jsou tedy primární aminoskupiny PAMAM dendrimerů a IMQ už k tomu příliš nepřispívá. Z naměřených hodnot tedy můžeme potvrdit, že roztoky dendrimerů byly zásadité a přidáním zásaditého léčiva IMQ nedošlo k významné změně v pH.

S ohledem na slepý vzorek můžeme z grafů vypožorovat, že PAMAM dendrimery přispívají ke zvýšení rozpustnosti IMQ ve vodě. Tato rozpustnost IMQ ve vodném prostředí není signifikantně výrazná, avšak je zde vidět určitý potenciál pro použití dendrimerů. Zda se IMQ bude rozpouštět ovlivňuje daná generace PAMAM dendrimerů. Dalším faktorem je také koncentrace použitého PAMAM dendrimeru.

Experimentem bylo prokázáno, že dendritické polymery pomáhají zvyšovat rozpustnost léčiva IMQ ve vodném prostředí. Je otázkou, jakým způsobem k tomu dochází. V teoretické části bylo již zmíněno, že dendrimery mohou s léčivem interagovat buď pomocí ne vazebných interakcí s terminálními skupinami nebo formou enkapsulace léčiva do vnitřní struktury dendrimeru. [12]

Vzhledem k velikosti a fyzikálně chemickým vlastnostem našeho léčiva jsme došli k předpokladu, že by se IMQ mohl enkapsulovat do vnitřní lipofilní struktury dendrimerů. Tato forma navázání byla již popsána např. u molekuly beklometason-dipropionátu. Jedná se o kortikosteroid s omezenou rozpustností ve vodě. V komplexu s PAMAM dendrimery díky jeho steroidní struktuře dochází k zachycení molekul beklometasonu v hydrofobní části dendrimerů. Ve studii Nasr et al. bylo dokázána závislost mezi mírou rozpouštění beklometasonu na hydrofobicitě jádra dendrimerů, neboť jsou tím také ovlivněny hydrofobní interakce mezi léčivem a vnitřními prostory dendrimerů. Tvorba komplexů s PAMAM dendrimery závisela na použité generaci a koncentraci dendrimerů stejně tak jako na pH použitého disperzního média. [46]

IMQ je zásaditá látka jako PAMAM dendrimery, které mají volné aminové funkční skupiny. Rozpustnost IMQ ve vodě je 0.6 $\mu\text{g/mL}$ při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$. [47] Při rozpouštění ve vodě vytváří zásadité prostředí. Během experimentu bylo naměřené pH IMQ ve vodném prostředí větší než 7. Zásadité prostředí podpořilo náš předpoklad o možné inkorporaci molekul IMQ do vnitřní struktury PAMAM dendrimerů, což následně vedlo ke zvýšení rozpustnosti IMQ ve vodě.

Z výsledků experimentu můžeme zhodnotit rozpustnost IMQ v kombinaci s PAMAM dendrimery mírně vyšší než rozpustnost samotného IMQ ve vodě. Konkrétně se jednalo o trojnásobné zlepšení v přítomnosti G1 PAMAM dendrimerů v porovnání se slepým vzorkem.

Předmětem dalšího studia k prokázání efektivnosti PAMAM dendrimerů s ethylendiaminovým jádrem vzhledem k rozpustnosti IMQ by bylo měření 4 generací

PAMAM dendrimerů při různých pH. Změnou pH je možné dosáhnout vyšší rozpustnosti hydrofobního léčiva v přítomnosti těchto dendrimerů. [12] V potaz by se mělo brát zásadité pH dendrimerů i IMQ. Přidání pufovacích látek by mohlo přispět k pozitivním změnám v rozpustnosti IMQ ve vodě.

Další způsob jak ovlivnit rozpustnost je použití dendrimerů s rozdílnou koncovou funkční skupinou např. karboxylovou skupinou. Jedná se o kyselou skupinu, jenž má potenciál interagovat se zásaditou aminovou skupinou IMQ na základě vztahu kyseliny a zásady.

6. Závěr

Tato rigorózní práce se věnovala zhodnocení efektu PAMAM dendrimerů na zvýšení rozpustnosti hydrofobního léčiva imiquimodu. Teoretická část práce obsahuje přehled různých metod používaných ke zvýšení rozpustnosti špatně rozpustných léčiv ve vodě s podrobněji popsáním přehledem o dendrimerech, jejich vlastnostech, syntéze a faktorech ovlivňujících působení dendrimerů na rozpustnost hydrofobních léčiv.

Výsledky praktické práce prokázaly, že PAMAM dendrimery pozitivně ovlivňují rozpustnost imiquimodu ve vodném prostředí. Nejlépe si v experimentu vedly PAMAM dendrimery 1. generace, kdy došlo ke zlepšení rozpustnosti IMQ o trojnásobné množství v porovnání se slepým vzorkem. Z toho můžeme usoudit, že PAMAM dendrimery dokážou přispět ke zvýšení rozpustnosti hydrofobního chemoterapeutika IMQ.

V budoucnu by bylo vhodné provést další pokusy s úpravou pH prostředí za účelem zjištění možného vlivu zásaditého/kyselého prostředí na rozpustnost IMQ. Dále by bylo vhodné experiment zopakovat za účelem reprodukovatelnosti.

7. Zdroje

- [1] Z. Rozehnalová a J. Hercogová, „Možnosti využití imiquimodu v dermatologii,“ *Remedia*, 2008.
- [2] M. A. Stanley, „Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential,“ *Clinical and Experimental dermatology*, č. 27, pp. 571-577, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2230.2002.01151.x.
- [3] „SÚKL, Státní ústav pro kontrolu léčiv, Aldara 5% crm,“ 25 November 2021. [Online]. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/aldara-epar-product-information_cs.pdf.
- [4] „SÚKL, Státní ústav pro kontrolu léčiv, Zyclara 3,75% crm,“ 28 November 2021. [Online]. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zyclara-epar-product-information_cs.pdf.
- [5] M. Man, W. Jinping, G. Fang, L. Mingzhu, T. Fengping a L. Nan, „Development of nanovesicular systems for dermal imiquimod delivery: physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation,“ *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, č. 26 (6), p. 191, 2015, doi: 10.1007/s10856-015-5524-1.
- [6] E. Panoutsopoulou, G. Paraskevopoulos a I. Sagrafena, „Imiquimod loaded liposomes for (trans)dermal delivery,“ v *Skin & Formulation, 5th Symposium & 17th Skin Forum*, Reims, France, 2019.
- [7] „The Human Metabolome Database, Imiquimod,“ 28 November 2021. [Online]. Available: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0014862>.
- [8] S. Kalepu a V. Nekkanti, „Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects,“ *Acta Pharmaceutica Sinica B*, č. 5 (5), pp. 442-453, 2015, doi: 10.1016/j.apsb.2015.07.003.

- [9] C. Vimalson, S. Parimalakrishnan, N. S. Jeganathan a S. Anbazhagan, „Techniques to Enhance Solubility of Hydrophobic Drugs: An Overview,“ *Asian Journal of Pharmaceutics*, č. 10 (2), pp. 67-75, 2016, doi: 10.22377/ajp.v10i2.625.
- [10] M. L. Hart, D. P. Do, R. A. Ansari a S. A. A. Rizvi, „Brief Overview of Various Approaches to Enhance Drug Solubility,“ *Journal of Developing Drugs*, sv. 3, č. 2, 2013, doi:10.4172/2329-6631.1000115.
- [11] B. Vraníková a J. Gajdziok, „Metody používané ve farmaceutické technologii ke zvyšování biologické dostupnosti špatně rozpustných léčiv po perorálním podání,“ *Česká a slovenská farmacie*, č. 64, pp. 159-172, 2015.
- [12] S. Choudhary, L. Gupta, S. Rani, D. Kaushalkumar a U. Gupta, „Impact of Dendrimers on Solubility of Hydrophobic Drug Molecules,“ *Frontiers in Pharmacology*, č. 8, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00261.
- [13] S. Sareen, G. Mathew a L. Joseph, „Improvement in solubility of poor water-soluble drugs,“ *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, sv. I, č. 2, pp. 12-17, 2012, doi: 10.4103/2230-973X.96921.
- [14] A. Chaudhary, U. Nagaich a N. Gulati, „Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review,“ *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, č. 2 (1), pp. 32-67, 2012, ISSN 2249-3379.
- [15] „Google Patents, Orally disintegrating tablets and methods of manufacture,“ 9 July 2022. [Online]. Available: <https://patents.google.com/patent/US20050232988A1/en>.
- [16] „SÚKL, Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv, IMUNOR 10 mg perorální lyofilizát,“ 9 July 2022. [Online]. Available: <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.
- [17] V. R. Vemula, V. Lagishetty a S. Lingala, „Solubility Enhancement Techniques,“ *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, sv. I, č. 5, pp. 41-51, 2010.

- [18] L. Okáčová, D. Vetchý, A. Franc a M. Rabišková, „Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek technologickými postupy usnadňujícími jejich rozpouštění,“ *Chemické Listy*, pp. 34-40, 2011.
- [19] S. Singh, R. S. Baghel a L. Yadav, „A review on solid dispersion,“ *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, sv. II, č. 9, pp. 1078-1095, 2011, ISSN: 0976-7126.
- [20] S. Shailesh, S. Neelam a K. Sandeep, „Liposomes: A review,“ *Journal of Pharmacy Research*, č. 2 (7), pp. 1163-1167, 2009.
- [21] A. Fahr a X. Liu, „Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs,“ *Expert Opinion on Drug Delivery*, č. 4 (4), pp. 403-416, 2007.
- [22] A. Singh, Z. A. Worku a V. Van der Mooter, „Oral formulation strategies to improve solubility of poorly water-soluble drugs,“ *Expert Opinion on Drug Delivery*, č. 8 (10), pp. 1361-1378, 2011, doi: 10.1517/17425247.2011.606808.
- [23] A. Franc, D. Vetchý, L. Smilková, M. Rabišková a B. Kratochvíl, „Lipofilní formulace pro zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek,“ *Chemické Listy*, č. 106, pp. 3-9, č. 106, pp. 3-9, 2012.
- [24] T. Baig, J. Nayak, V. Dwivedi, A. Singh, A. Srivastava a P. K. Tripathi, „A Review about Dendrimers: Synthesis, Types, Characterization and Applications,“ *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, č. 4 (1), pp. 44 - 59, 2015, ISSN: 2277 - 4688.
- [25] Kumar, P. S. Kumar, M. S. Datta a D. M. Kumar, „Dendrimers in drug delivery, diagnosis and therapy: basics and potential applications,“ *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, č. 6 (1), pp. 67-92, 2016, ISSN: 2250-1177.
- [26] M. A. H. Malek a P. M. Patel, „Dendrimers for drug solubility enhancement - A review,“ *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, č. 11 (2), pp. 507-523, 2020, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(2).507-23.

- [27] N. Dwivedi a J. S. Shah, „Dendrimer mediated approaches for the treatment of brain tumor,“ *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, pp. 1-49, 2015, 27 (7), doi: 10.1080/09205063.2015.1133155.
- [28] G. M. Dykes, „Dendrimers: a review of their appeal and applications,“ *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, č. 76, pp. 903-918, 2001, doi.org/10.1002/jctb.464.
- [29] U. Gupta, H. B. Agashe a A. Asthana, „Dendrimers: Novel Polymeric Nanoarchitectures for Solubility,“ *Biomacromolecules*, sv. III, č. 7, pp. 649-658, 2006.
- [30] M. Liu, K. Kono a J. M. Fréchet, „Water-soluble dendritic unimolecular micelles: Their potential as drug delivery agents,“ *Journal of Controlled Release*, č. 65, pp. 121-131, 2000.
- [31] O. Milhem, C. Myles, M. McKeown a D. Attwood, „Polyamidoamine Starburst dendrimers as solubility enhancers,“ *International Journal of Pharmaceutics*, č. 197, pp. 239-241, 2000.
- [32] R. Vinicius de Araújo, S. da Silva Santos, E. I. Ferreira a J. Giarolla, „New Advances in General Biomedical Applications of PAMAM Dendrimers,“ *Molecules Review*, č. 23, 2849, 2018, doi:10.3390/molecules23112849.
- [33] D. M. Shadrack, H. S. Swai, J. J. E. Munissi, E. B. Mubofu a S. S. Nyandoro, „Polyamidoamine Dendrimers for Enhanced Solubility of Small Molecules and Other Desirable Properties for Site Specific Delivery: Insights from Experimental and Computational Studies,“ *Molecules*, č. 23, 1419, 2018, doi:10.3390/molecules23061419.
- [34] Y. Gao, M. Shen a X. Shi, „Interaction of dendrimers with the immune system: An insight into cancer nanotheranostics,“ *View*, pp. 1-9, 2021, doi: 10.1002/VIW.20200120.
- [35] W. Wang, W. Xiong, Y. Zhu, H. Xu a X. Yang, „Protective Effect of PEGylation Against Poly(amidoamine) Dendrimer-Induced Hemolysis of

Human Red Blood Cells," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, pp. 59-64, 2010, doi: 10.1002/jbm.b.31558.

- [36] D. Luong, P. Kesharwani, R. Deshmukh, M. C. I. M. Amin a U. Gupta, „PEGylated PAMAM Dendrimers: Enhancing Efficacy and Mitigating Toxicity for Effective Anticancer Drug and Gene Delivery," *Acta Biomaterialia*, 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.07.015>.
- [37] J. Ryu a F. C. Yang, „A Review of Topical Imiquimod in the Management of Basal Cell Carcinoma, Actinic Keratoses, and Other Skin Lesions," *Clinical Medicine: Therapeutics*, č. 1, pp. 1557-1575, 2009.
- [38] I. Telò, S. Pescina, C. Padula a P. Santi, „The Mechanisms of Imiquimod Skin Penetration," *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.07.043.
- [39] „PubChem - National Library of Medicine - Fluorouracil (Compound)," [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluorouracil#section=Solubility>. [Přístup získán 8 October 2022].
- [40] „SÚKL, Státní Úřad pro Kontrolu Léčiv, 5-Fluorouracil Ebewe 50 mg/ml inj. sol.," 9 July 2022. [Online]. Available: <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.
- [41] A. Buczkowski, S. Sekowski, A. Grala a D. Palecz, „Interaction between PAMAM-NH₂ G₄ dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution," *International Journal of Pharmaceutics*, č. 408, pp. 266-270, 2011.
- [42] A. Buczkowski, T. Olesinski, E. Zbicinska, P. Urbaniak a B. Palecz, „Spectroscopic and calorimetric studies of formation of the supramolecular complexes of PAMAM G₅-NH₂ and G₅-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solution," *International Journal of Pharmaceutics*, č. 490, pp. 102-111, 2015.
- [43] F. Blum, „High performance liquid chromatography," *British Journal of Hospital Medicine*, sv. 75, č. 2, 2014.

- [44] J. R. Lloyd, P. S. Jayasekara a K. A. Jacobson, „Characterization of Polyamidoamino (PAMAM) Dendrimers Using In-Line Reversed Phase LC Electrospray Ionization Mass Spectrometry,“ *Analytical Methods Journal*, p. 263–269, 2016, 8(2), doi:10.1039/C5AY01995H.
- [45] M. Ghezzi, S. Pescina a S. Nicoli, „Improvement of Imiquimod Solubilization and Skin Retention via TPGS Micelles: Exploiting the Co-Solubilizing Effect of Oleic Acid,“ *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1476, doi: 10.3390/pharmaceutics13091476.
- [46] M. Nasr, M. Najlah, A. D'Emanuele a A. Elhissi, „PAMAM dendrimers as aerosol drug nanocarriers for pulmonary delivery via nebulization,“ *International Journal of Pharmaceutics*, č. 461, pp. 242-250, 2014.
- [47] „PubChem, National Library of Medicine,“ [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imiquimod#section=Solubility>. [Přístup získán 14 October 2022].
- [48] M. Najhal a A. D'Emanuele, „Synthesis of dendrimers and drug-dendrimer conjugates for drug delivery,“ *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, č. 10 (6), 2007.