
Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

**Velikost a povrchový náboj oligoesterových nanočástic
v průběhu jejich zpracování.**

Size and surface charge parameters of oligoester nanoparticles
during their fabrication.

Rigorózní práce

V Hradci Králové 2007

David Bolek

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucímu rigorózní práce Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za odborné vedení a korekturu mé práce a Mgr. Evě Valentové za kolegiální pomoc při řešení metodických problémů.

Obsah

Obsah	
Seznam tabulek.....	5
Seznam obrázků.....	6
Seznam zkratk.....	8
1 Úvod.....	9
2 Příprava nanočástic.....	9
2.1 Disperze polymeru.....	9
2.1.1 Metoda odpaření rozpouštědla.....	9
2.1.2 Metoda spontánní emulgace - difuze rozpouštědla.....	10
2.1.3 Metoda vysolování, Metoda emulgace - difuze rozpouštědla.....	10
2.1.4 Příprava NPs využívající technologie nadkritických kapalin (SCF).....	10
2.1.5 Polymerizační metoda.....	11
2.1.6 Nanočástice připravené z hydrofilních polymerů.....	13
3 Drug loading (inkorporace a adsorpce léčivé látky).....	13
4 Uvolňování léčivé látky.....	14
5 Povrchové vlastnosti nanočástic.....	15
5.1 Adsorpce proteinů a fagocytóza nanočástic.....	15
5.2 Metody charakterizace povrchu nanočástic.....	16
5.3 Metody modifikace povrchu nanočástic.....	17
5.3.1 Nanočástice povrchově modifikované PEG a PEO.....	17
5.3.2 Nanočástice s adsorbovaným poloxaminem a poloxamerem.....	18
5.3.3 Nanočástice s cyklodextrinem a jinými karbohydráty.....	19
5.3.4 Nanočástice s polysorbátem - jejich prostupnost hematoencefalickou bariérou.....	19
6 Využití nanočástic jako nosičů proteinů a peptidů.....	21
7 Závěr.....	22
8 Cíl práce.....	23
9 Principy měření velikosti nanočástic.....	24
9.1 Dynamický rozptyl světla.....	24
9.1.1 Korelační funkce.....	24
9.1.2 Číselná, objemová a intenzitní distribuce.....	25
9.1.3 Měření velikosti částic.....	26
9.2 Měření a principy zeta potenciálu.....	27
9.2.1 Teorie zeta potenciálu.....	27

9.2.2	Elektroforéza	28
9.2.3	Měření elektroforetické pohyblivosti	28
9.2.4	Zetasizer, nano a zeta-potenciálové měření	28
10	Experimentální část	30
10.1	Použité přístroje	30
10.2	Chemikálie	30
10.3	Příprava nanočástic	31
10.4	Příprava mannitolových mikročástic	32
10.5	Měření velikosti částic	33
10.6	Měření zeta potenciálu částic	34
10.7	Schématické znázornění provedených pokusů a měření	36
10.8	Výsledky – tabulky, grafy a schémata	37
10.8.1	Sledování stability volně stojících částic za pokojové teploty	37
10.8.2	Sledování stability rotujících částic za pokojové teploty	41
10.8.3	Sledování stability volně stojících částic za zvýšené teploty	43
10.8.4	Sledování stability volně stojících částic za snížené teploty	47
10.8.5	Měření velikosti sušených mannitolových mikročástic	51
10.8.6	Vliv sušení na velikost nanočástic	55
10.8.7	Sledování stability mannitolových mikročástic třepaných za zvýšené teploty v plasmatickém médiu	57
11	Diskuse	60
11.1	Obecné poznámky	60
11.2	Stabilita nanočástic uchovávaných bez míchání za obyčejné teploty	60
11.3	Stabilita nanočástic uchovávaných za míchání při obyčejné teplotě	61
11.4	Stabilita nanočástic uchovávaných bez míchání za zvýšené teploty	62
11.5	Stabilita nanočástic uchovávaných bez míchání za snížené teploty	62
11.6	Stabilita nanočástic v procesu sprejového sušení	62
11.7	Stabilita nanočástic v podmínkách in vitro	63
12	Závěry	64
13	Souhrn	65
14	Summary	66
15	Literatura	67

Seznam tabulek

Table 10-1	Roztok 0.75 % lecitin + 0.25% Pso (vnější fáze)	31
Table 10-2	Roztok 1% polymeru v DCM (vnitřní fáze)	31
Table 10-3	Závislost stability volně stojících nanočástic na čase za pokojové teploty (I. část)	37
Table 10-4	Závislost stability volně stojících nanočástic na čase za pokojové teploty (II.část)	40
Table 10-5	Závislost stability rotujících nanočástic na čase za pokojové teploty	41
Table 10-6	Závislost stability stojících nanočástic na čase za zvýšené teploty (37°C) (I.část)	43
Table 10-7	Závislost stability stojících nanočástic na čase za zvýšené teploty (37°C) (II.část)	46
Table 10-8	Závislost stability volně stojících nanočástic na čase za snížené teploty (7°C) (I.část)	47
Table 10-9	Závislost stability volně stojících nanočástic na čase za snížené teploty (7°C) (II.část)	49
Table 10-10	Roztok A1 (0.75 % lecitin + 0.25% PSO)	51
Table 10-11	Roztok A2 (1% polymeru v DCM)	51
Table 10-12	Statistické funkce charakterizující průměr sušených mannitolových mikročástic	51
Table 10-13	Hodnoty histogramu	52
Table 10-14	Nanočástice polymer-10%mannitol, před sušením	55
Table 10-15	Nanočástice polymer-10%mannitol, po sušením	56
Table 10-16	Závislost stability usušených 3D-nanočástic vázaných v mannitolu na čase za zvýšené teploty (37°C) v plasmatickém mediu	58
Table 10-17	Závislost stability usušených PLGA-nanočástic vázaných v mannitolu na čase za zvýšené teploty (37°C) v plasmatickém mediu	58

Seznam obrázků

Obrázek 2-1	Mechanismus polymerační reakce při přípravě polyalkykyanoakrylátu	11
Obrázek 2-2	Schématické znázornění produkce PACA NPs	12
Obrázek 2-3	Polymerace PMM	12
Obrázek 5-1	Schématické znázornění vlivu hustoty a konformace PEG na opsonizaci NPs	18
Obrázek 5-2	Schématické znázornění zvýšeného průniku léčiva přes biologickou membránu	20
Obrázek 9-1	Skvrna zobrazující Brownův pohyb	24
Obrázek 9-2	Stokes-Einsteinův zákon	24
Obrázek 9-3	Graf korelační funkce	25
Obrázek 9-4	Graf distribuce velikosti částic	25
Obrázek 9-5	Graf číselné, objemové a intenzitní distribuce	26
Obrázek 9-6	DSL systém	26
Obrázek 9-7	Zeta potenciál	27
Obrázek 9-8	Isoelektrický bod	28
Obrázek 9-9	Henryho rovnice	28
Obrázek 9-10	Kyveta s elektrodami	28
Obrázek 9-11	Principy měření zeta potenciálu	29
Obrázek 10-1	Schématické znázornění provedeného experimentu	32
Obrázek 10-2	Schématické znázornění provedeného experimentu	33
Obrázek 10-3	Ukázka grafu distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku	33
Obrázek 10-4	Ukázka grafu distribuce velikosti částic (v nm) podle objemu	34
Obrázek 10-5	Ukázka grafu velikosti částic podle číselné distribuce	34
Obrázek 10-6	Ukázka grafu distribuce zeta potenciálu	35
Obrázek 10-7	Ukázka grafu distribuce elektroforetické mobility	35
Obrázek 10-8	Schématické znázornění provedených experimentů	36
Obrázek 10-9	Závislost stability volně stojících 3P-nanočástic na čase za pokojové teploty	38
Obrázek 10-10	Závislost stability volně stojících 3D-nanočástic na čase za pokojové teploty	38
Obrázek 10-11	Závislost stability volně stojících 3T-nanočástic na čase za pokojové teploty	39
Obrázek 10-12	Závislost stability volně stojících PLGA 50:50-nanočástic na čase za pokojové teploty	39
Obrázek 10-13	Závislost stability volně stojících PDLLA-nanočástic na čase za pokojové teploty	39
Obrázek 10-14	Závislost stability volně stojících 5P-nanočástic na čase za pokojové teploty	40
Obrázek 10-15	Závislost stability volně stojících 5D-nanočástic na čase za pokojové teploty	40
Obrázek 10-16	Závislost stability volně stojících 5T-nanočástic na čase za pokojové teploty	41
Obrázek 10-17	Závislost stability volně stojících 3P-nanočástic na čase za pokojové teploty	42
Obrázek 10-18	Závislost stability volně stojících 3D-nanočástic na čase za pokojové teploty	42
Obrázek 10-19	Závislost stability volně stojících 3T-nanočástic na čase za pokojové teploty	42
Obrázek 10-20	Závislost stability volně stojících PLGA 50:50-nanočástic na čase za pokojové teploty	43
Obrázek 10-21	Závislost stability volně stojících PDLLA-nanočástic na čase za pokojové	43

	teploty	
Obrázek 10-22	Závislost stability volně stojících 3P-nanočástic na čase za zvýšené teploty	44
Obrázek 10-23	Závislost stability volně stojících 3D-nanočástic na čase za zvýšené teploty	44
Obrázek 10-24	Závislost stability volně stojících 3T-nanočástic na čase za zvýšené teploty	45
Obrázek 10-25	Závislost stability volně stojících PLGA 50:50-nanočástic na čase za zvýšené teploty	45
Obrázek 10-26	Závislost stability volně stojících PDLLA-nanočástic na čase za zvýšené teploty	45
Obrázek 10-27	Závislost stability volně stojících 5P-nanočástic na čase za zvýšené teploty	46
Obrázek 10-28	Závislost stability volně stojících 5D-nanočástic na čase za zvýšené teploty	46
Obrázek 10-29	Závislost stability volně stojících 5T-nanočástic na čase za zvýšené teploty	47
Obrázek 10-30	Závislost stability volně stojících 3P-nanočástic na čase za snížené teploty	48
Obrázek 10-31	Závislost stability volně stojících 3D-nanočástic na čase za snížené teploty	48
Obrázek 10-32	Závislost stability volně stojících 3T-nanočástic na čase za snížené teploty	48
Obrázek 10-33	Závislost stability volně stojících PLGA 50:50-nanočástic na čase za snížené teploty	49
Obrázek 10-34	Závislost stability volně stojících PDLLA-nanočástic na čase za snížené teploty	49
Obrázek 10-35	Závislost stability volně stojících 5P-nanočástic na čase za snížené teploty	50
Obrázek 10-36	Závislost stability volně stojících 5D-nanočástic na čase za snížené teploty	50
Obrázek 10-37	Závislost stability volně stojících 5T-nanočástic na čase za snížené teploty	50
Obrázek 10-38	Schématické znázornění provedení experimentu	51
Obrázek 10-39	Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 3P-10%mannitol	52
Obrázek 10-40	Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 3D-10%mannitol	53
Obrázek 10-41	Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 3T-10%mannitol	53
Obrázek 10-42	Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice PLGA 50:50-10%mannitol	53
Obrázek 10-43	Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice PDLLA 50:50-10%mannitol	54
Obrázek 10-44	Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 5P-10%mannitol	54
Obrázek 10-45	Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 5D-10%mannitol	54
Obrázek 10-46	Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 5T-10%mannitol	55
Obrázek 10-47	Změny velikosti nanočástic	56
Obrázek 10-48	Změny polydisperzity nanočástic	56
Obrázek 10-49	Změny zeta-potenciálu nanočástic	57
Obrázek 10-50	Schématické znázornění provedení experimentu	
	Chyba!	
	Pomocí karty Domů použijte u textu, který se má zde zobrazit, styl Heading 1.	57
Obrázek 10-51	Závislost stability usušených 3D-nanočástic vázaných v mannitolu na čase za zvýšené teploty (37°C) v plasmatickém mediu	58
Obrázek 10-52	Závislost stability usušených PLGA-nanočástic vázaných v mannitolu na čase	59

za zvýšené teploty (37°C) v plasmatickém mediu

Seznam zkratk

BBB	hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)
BSA	hovězí sérový albumin, bovine serum albumin
CNS	centrální nervový systém
CR	controlled release
DDS	drug delivery system
2-DPAGE	dvoudimenzionální polyakrylamidová gelová elektroforéza
ESCA	elektronová spektroskopie pro chemickou analýzu
FDA	Food and Drug Administration
HSA	lidský sérový albumin, human serum albumine
IgG	Imunoglobulin G
i.v.	Intravenosní
LL	léčivá látka
NP	Nanočástice, nanoparticles
MPOE	monomethoxypolyoxyethylen
PACA	polyalkylkyanoakrylát
PCA	polykyanoakrylát
PCL	poly (ϵ -)kaprolakton
PIBCA	polyisobutylcyanoacrylát
PMM, PDEMM	polymethylidenmalonát
PMMA	polymethylmetakrylátových
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PLA	polymléčná kyselina, poly(lactic acid)
PLG	polylglykolid
PLGA	polylaktid-ko-glykolid
PVA	polyvinylalkohol
RESS	Rapid Expansion of Supercritical Solution
SAS	supercritical anti-solvent
SCF	Supercritical fluids
TPP	tripolyfosfát sodný
XPS	rentgenová photoelektronová spektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy)

1 Úvod

Posledních několik desítek let je patrný zájem o vývoj biodegradabilních nanočástic, jako vysoce efektivních transportních systémů. V souvislosti s tím byly zkoumány četné polymery. Nanočástice se testovaly jako efektivní přenašeče léčivé látky do místa působení. Výsledkem je potom zvýšení terapeutického účinku spojené s minimalizací postraních nežádoucích jevů [1]. Postupné uvolňování farmakologicky aktivních substancí na určené místo v terapeuticky použitelném režimu bylo tedy hlavním cílem při navrhování těchto systémů. NP tedy napomáhají zvyšovat stabilitu léčivých látek (výhoda u proteinů). Dále disponují vlastnostmi řízeného uvolňování.

Velikost NP se pohybuje od 10 do 1000 nm. Léčivá látka je rozpuštěna, enkapsulována, nebo navázána na NP matrix a v závislosti na metodě přípravy jsou tak získány nanočástice, nanosféry nebo nanokapsle. *Nanokapsle* jsou vesikulární systémy v nichž je léčivá látka uvězněna do dutiny, která je obklopená polymerní membránou, zatímco *nanosféry* jsou matricovým systémem, v nichž je léčivá látka stejnoměrně dispergována. V posledních letech přitahovaly NP značnou pozornost také jako transportní systémy z pohledu jejich využitelnosti coby přenašeče DNA v genové terapii a jejich schopnosti transportovat proteiny, peptidy a geny perorální cestou. [2,3].

Většina dřívějších publikací pojednává o NPs tvořených z poly(D, L- laktidu), polymléčné kyseliny (PLA), poly(D,L-glykolidu) (PLG), poly(laktid-ko-glykolidu) (PLGA) a poly(kyanoakrylátu) (PCA). [1,4-10] Současné přehledy se zabývají kromě výše zmíněných polymerů také NPs založenými na chitosanu, želatině, alginátu sodném a jiných hydrofilních biodegradabilních polymerech. PLA, PLG a PLGA polymery, jakožto tkáňově kompatibilní, byli již dříve využíváni coby nosiče při formulaci léčiv s řízeným uvolňováním určených k parenterální aplikaci. [11-13]. Kvůli CR steroidů a narkoticky působících antagonistů, jakožto i k transportu očních látek byly vyvinuty NPs připravené z poly(ϵ -kaprolaktonu) a PCL. [14,15,16] Dále se nyní vyvíjejí NP z poly(alkylcyanoakrylátu) a PACA.

2 Příprava nanočástic

NPs se obvykle připravují převážně dvěma metodami: (a) disperze polymeru, (b) polymerizace monomeru

2.1 Disperze polymeru

K přípravě biodegradabilních NPs z PLA, PLG, PLGA a poly(ϵ -kaprolaktonu) bylo navrženo několik metod založených na dispersi polymeru.

2.1.1 Metoda odpaření rozpouštědla

Polymer je rozpuštěn v organickém rozpouštědle, např. dichloromethanu, chloroformu nebo ethylacetátu. Léčivá látka je rozpuštěna nebo dispergována v tomto polymerním roztoku a vzniklá směs je poté emulgována do vodného roztoku. Vzniká tak emulze typu olej ve vodě

(O/V). Emulgátorem může být např. želatina, polyvinylalkohol, polysorbát-80 či poloxamer 188. Po vytvoření stabilní emulze je organické rozpouštědlo odpařeno buď zvýšením teploty/snížením tlaku nebo kontinuálním mícháním. Metoda přípravy emulze V/O/V byla použita při přípravě NPs obsahujících ve vodě rozpustné léčivé látky. [18] Obě výše uvedené metody využívají vysoce-rychlostní homogenizaci či ozvučením ultrazvukem.

2.1.2 Metoda spontánní emulgate - difuze rozpouštědla

Jedná se o modifikovanou verzi "Metody odpaření rozpouštědla." [20-21] V rámci této metody se používají s vodou mísící se rozpouštědla jako aceton nebo methanol spolu s ve vodě nerozpustnými organickými rozpouštědly jako dichlormethan nebo chloroform, která slouží jako olejová fáze. Díky spontánní difúzi ve vodě rozpustného rozpouštědla se vytváří na rozhraní dvou fází interfaciální turbulence, která vede ke vzniku menších částic. Se vzrůstající koncentrací tohoto s vodou mísitelného rozpouštědla, lze docílit značného snížení velikosti částic.

2.1.3 Metoda vysolování, Metoda emulgate - difuze rozpouštědla

Obě předchozí metody vyžadují použití organických rozpouštědel, jež jsou nebezpečné pro životní prostředí, jakožto i pro živé bytosti. [22] US FDA vymezuje zbytková množství organických rozpouštědel v injekčních koloidních systémech. [23,24] Za účelem splnění těchto požadavků byly vyvinuty 2 metody přípravy NPs. První je "Metoda vysolování" [25,26], zatímco druhou "Metoda emulgate – difuze rozpouštědla." [26,27]

2.1.4 Příprava NPs využívající technologie nadkritických kapalin (SCF)

Obvykle používané metody jako odpařování rozpouštědla, koacervace a polymerizace "in situ" nezdědk vyžadují použití toxických rozpouštědel anebo surfaktantů. Proto se úsilí vědců zaměřilo na vyvinutí takových metod enkapsulace pro přípravu submikronových částic, které by byly k životnímu prostředí citlivější. Pokud zůstávají v nanočásticích obsahujících léčivo zbytky rozpouštědla, potom se tato zbytková množství stávají toxická a uvnitř polymerní matrix může docházet k jejímu rozkladu. SCF se nyní tedy stávají zajímavou alternativou, protože jsou šetrné k životnímu prostředí a tato metoda může být výhodně použita při tvorbě částic o vysoké čistotě a bez jakýchkoliv stopových množství organických rozpouštědel. Objem literatury zabývající se tvorbou mikročástic obsahujících léčivo za použití SCF je ohromný. [28-34] Avšak, pouze pro srovnání, tvorba NP je prozkoumána mnohem méně. [29,30] Budeme se zabývat pouze dvěma nejčastěji užívanými metodami přípravy mikro- a nanočástic.

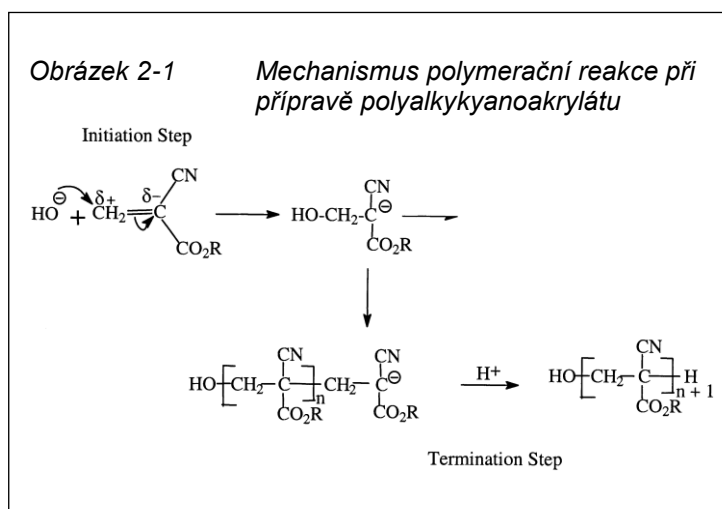
V případě *metody rychlé expanze superkritického roztoku* (Rapid Expansion of Supercritical Solution, **RESS**) je rozpouštěná látka rozpuštěna v SCF a takový roztok je expandován přes trysku. V důsledku toho se rozpouštěcí vlastnosti SCF rapidně sníží (SCF přejde do plynného skupenství) a rozpuštěná látka precipituje. Precipitovaná látka neobsahuje žádné rozpouštědlo. Naneštěstí jeví většina polymerů pramalou anebo vůbec žádnou rozpustnost v SCF. Takže její použitelnost je prakticky velice omezená. RESS byl velice populární na přelomu 80. let při přípravě částic z biodegradabilních polymerů, jako např.

PLA. Rovnoměrné rozdělení léčiva uvnitř polymerní matrix může být touto metodou docíleno pouze u polymerů s nižší molekulární hmotností (< 10.000). Metoda RESS však nemůže být použita u polymerů s vyšší molekulární hmotností, díky jejich omezené rozpustnosti v SCF. Z těchto důvodů nalézáme v posledních letech v literatuře o této metodě mnohem méně informací. [31,33]

Při využití *metody nadkritických srážedel* (Supercritical Anti-solvents, *SAS*) [34] je roztok srážedla hnán s SCF do precipitační komory, která obsahuje rozpuštěné látky v organickém rozpouštědle. Za vysokého tlaku vstupuje srážedlo do kapalně fáze dostatečně, takže její schopnost rozpouštět se snižuje, a tak rozpouštěné látky precipitují. Po precipitaci a dosažení konečného pracovního tlaku srážedlo cirkuluje v nádrži a absorbuje zbytky rozpouštědla. Po redukci obsahu rozpouštědla na požadovanou úroveň je tlak v nádobě vyrovnán s atmosférickým tlakem a precipitát je izolován.

2.1.5 Polymerizační metoda

NP mohou být též připraveny polymerizací monomerů. *Couvreur et. al* [35,36] publikovali přípravu NP o průměru přibližně 200 nm mechanickou polymerizací dispergovaného methyl- nebo ethylkyanoakrylátu ve vodném kyselém prostředí v přítomnosti polysorbátu-20 jako tenzidu bez ozáření nebo bez iniciátoru. Monomer *kyanoakrylátu* je za intenzivního mechanického míchání a běžné pokojové teploty přidán do vodného roztoku povrchově



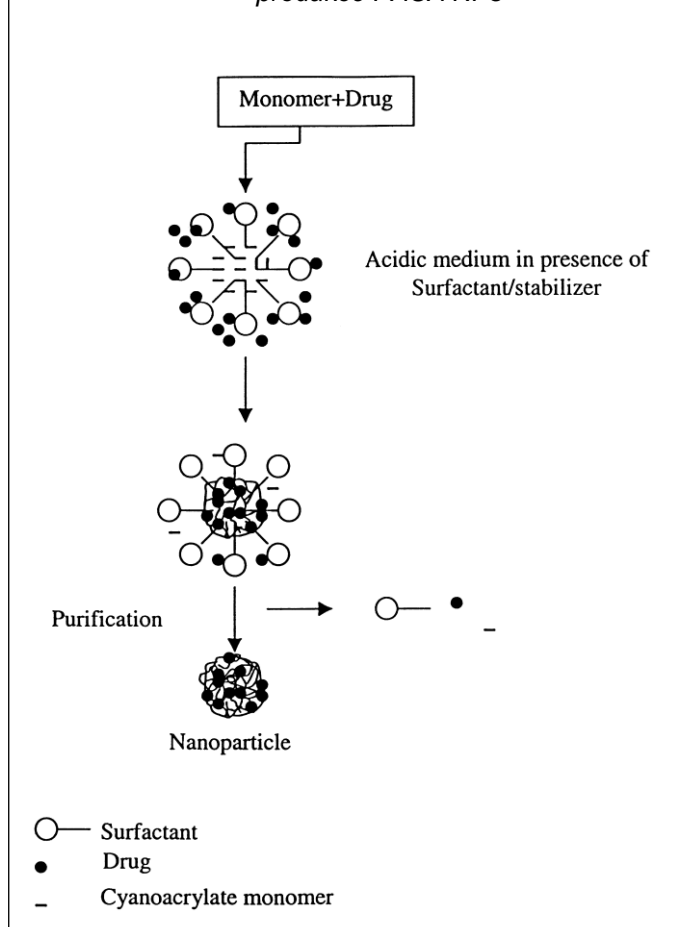
aktivního media (polymerizačního media). Léčivá látka je rozpuštěna v polymerizačním mediu buď před přidáním monomeru nebo před ukončením polymerizační reakce. Suspenze NP je purifikována ultracentrifugací nebo resuspenzací částic v isotonicném roztoku neobsahujícím tenzid.

Polymerace daná anionickým mechanismem (obr.2-1) je iniciována nukleofilními činidly (OH^- , CH_3O^- , CH_3COO^-). Díky rychlé polymerizaci vede k tvorbě

NP o malé molekulové hmotnosti. Takovéto NP jsou degradovány velmi rychle. Abychom se tomuto problému vyhnuli a vytvořili jsme NP o vyšší molekulární hmotnosti (a tedy i stabilnější), musí být polymerizace provedena v kyselém prostředí (pH 1.0-3.5). Po dispergaci monomeru ve vodném kyselém prostředí obsahujícím surfactant a stabilizátor pokračuje polymerace za zvyšování pH 3-4 hodiny až do získání požadovaného produktu.

Během polymerizační reakce jsou přidávány různé stabilizátory jako např. Dextran-70, Dextran-40, Dextran-10, Poloxamer-188, -184, -327, Polysorbát-20, -40 nebo -80, atd. Velikost částic a molekulová hmotnost závisí na typu a koncentraci použitého stabilizátoru a/nebo tenzidu. Schématická ukázka tvorby *polyalkylkyanoakrylátových NPs (PACA)* je na

Obrázek 2-2 Schématické znázornění produkce PACA NPs

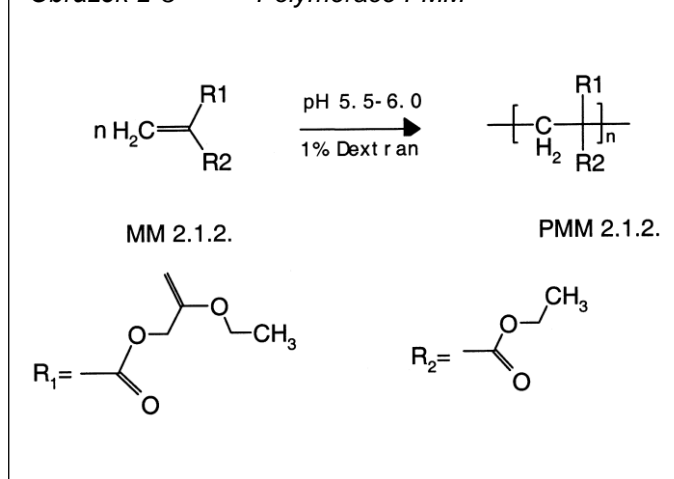


obrázku (obr.2-2). Velikost a molekulová hmotnost NP také závisí na pH polymerizačního media. Příprava NP však není možná za vyššího pH než 3.0, zřejmě díky agregaci a postupnému zvyšování molekulové hmotnosti při nižším pH. Dalšími faktory ovlivňujícími tvorbu NPs jsou koncentrace monomeru a rychlost míchání.

NP z PACA si získaly v posledních letech oblibu i přes jejich nedostatky, kterými jsou jejich nízké pH (okolo 2) a cytotoxicita. [34] To vedlo k syntéze nových monomerů [37] typu dialkyl esterů methylen malonové kyseliny a přípravě NPs z *polymethylenmalonatu (PMM)*, PDEMM. Tyto NPs však nejsou biodegradabilní in-vitro a ani in-vivo [38,39] Aby byl tento problém překonán, byly syntetizovány nové deriváty PDEMM, jmenovitě ethyl-2-ethoxy-karbonylmethylenoxy-karbonyl-akrylát. NPs z těchto monomerů byly připraveny stejnou metodou jako u PACA, tj. anionovou polymerizací. [37] pH polymerizačního media zásadně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti NPs. Částice o minimální velikosti byly připraveny při pH kolem 5.5 – 6.0, ve srovnání s pH 2.0 u PBCA a pH 7.6 u PDEMM (obr.2-3).

Byly také učiněny snahy ve směru omezit tvorbu oligomerů a zvýšit výtěžek PMM. Změnami parametrů (pH, koncentrace tenzidu, koncentrace monomeru) se docílilo tvorby NPs o vyšší molekulové hmotnosti. [40] Nedávno byla publikována metoda přípravy kopolymeru ethyl-2-

Obrázek 2-3 Polymerace PMM



ethoxykarbonyl-ethyl-methylen malonoátu s polyethylenoxidem. [41] Tyto kopolymery mají jak hydrofobní tak i hydrofilní vlastnosti, a proto mohou být vhodnější při přípravě dlouhocirkulujících NPs.

2.1.6 Nanočástice připravené z hydrofilních polymerů

Kromě běžně používaných syntetických hydrofobních polymerů se nyní výzkum aktivně zaměřuje i na přípravu NPs z hydrofilních polymerů jako např. **chitosan, alginát sodný, želatina**, atd. *Calvo et al.* [42-45] představili metodu přípravy hydrofilních chitosanových NP. Příprava spočívá v ionické gelaci za použití směsi dvou vodných fází, z nichž jedna obsahuje chitosan a dvojblokový kopolymer ethylenoxidu (EO) a druhá obsahuje polyaniontový tripolyfosfát sodný (TPP). Pozitivně nabitá aminoskupina chitosanu interaguje s negativně nabitým TPP. Obměňováním složení diblokového polymeru chitosan + PEO-PPO byly připraveny částice o velikosti 200-1.000nm a zeta-potenciálu +20 a +60mV. Takto připravené NP vykazují dobrou asociaci s proteiny, jako např. hovězím sérovým albuminem, toxoidem tetanu, toxoidem záškrtu [42,43], insulinem [44] nebo oligonukleotidy. [45]

Mao et al. [46,47] připravili komplexní koacervační metodou NPs DNA-chitosan a využili je pro perorální transport genů. Metoda komplexní koacervace byla dále použita k přípravě NPs DNA-želatina. [48] Jako nosiče imunologicky a antineoplasticky působících proteinů se chitosanové NPs osvědčily lépe nežli želatinové. [49] Chitosanové NPs byly dále připraveny metodou emulzní koacervace. [50] V této metodě byly chitosan a léčivá látka rozpuštěny ve vodě a v emulzi voda/olej, která byla připravena v tekutém parafínu za použití emulgátoru. K této stabilní emulzi byla přidána druhá emulze hydroxidu sodného v parafínu. Ve styku s NaOH se koacervací polymeru vytvořily chitosanové NP. Také k transportu oligonukleotidů byly vyvinuty a použity alginátové nanočástice. [17,51]

Nové biodegradabilní polyestery, sestávající se z krátkých polylaktonových řetězců připojených na polyvinylalkohol (PVA) nebo na sulfobutyl-PVA (SB-PVA), byly připraveny bulk-melt polymerizací laktidu a glykolidu za přítomnosti různých polyolových jader. Modifikované řetězce vznikly reakcí aktivovaného PVA se sulfobutylovými skupinami. Pečlivou úpravou složení byla připravena nová skupina ve vodě rozpustných polyesterů. Tyto polymery podléhají samovolné agregaci za vzniku NPs. Tyto nanočástice tvoří stabilní komplexy s lidským sérovým albuminem, tetanovým toxoidem a cytochromem C. Vývoj NP z takových polymerů nevyžaduje použití rozpouštědel ani tenzorů. [52-54]

3 Drug loading (inkorporace a adsorpce léčivé látky)

Úspěšný nanočásticový systém je pouze takový, na který lze navázat velké množství léčivé látky a tím zároveň omezit množství nosiče nutného k podání léčiva. Existují dvě metody "drug loadingu:" (a) **inkorporace** léčivé látky v době vzniku NP, (b) **adsorpce** léčivé látky na již vzniklou NP, které je pak inkubována v roztoku LL.

Je zcela jasné, že větší množství léčivé látky je zachyceno metodou inkorporace nežli při adsorpci. [55,56] Adsorpční isotermy pro transportní systém NPs/léčivo poskytují důležitou

informaci o nejlepší možné formulaci, o vazebné kapacitě povrchu NPs a o množství adsorbovaného léčiva. Např. *Covreur et al.* [57] popisoval adsorpci dvou antineoplastických látek – daktinimycinu a methotrexátu – na polymethylkyanoakrylát a polyethylkyanoakrylát. Bylo pozorováno, že methotrexát se vázal na NPs v menší míře nežli daktinimycin. V případě polyalkylkyanoakrylátu (PACA) lze obecně říci, že čím je alkylový řetězec delší, tím je jeho afinita k léčivé látce vyšší. Adsorpční kapacita je tedy závislá na hydrofobicitě polymeru a charakteru povrchu částice. V případě inkorporační metody se vzrůstající koncentrací monomeru vzrůstá i množství inkorporované léčivé látky. Opačný trend však pozorujeme u koncentrace léčiva v dispergovaném roztoku. Tyto závěry značí, že v případě inkorporace je množství monomeru nutné optimalizovat. [57]

Yoo et al. [58] navrhnul jako novou metodu "drug loadingu" ve vodě rozpustných látek, kombinaci adsorpce a inkorporace. Léčivá látka je v případě této metody chemicky navázána na NPs. Metodou spontánní emulgace / difúze rozpouštědla byly připraveny nanočástice z doxorubicin-PLGA konjugátu a PLGA obsahujícího doxorubicín. U doxorubicin-konjugátu byla účinnost enkapsulace 96,6% a obsah doxorubicin-konjugátu 3,5%. U nekonjugovaného doxorubicinu byly tyto hodnoty 6,7% a 0,3% (m/m).

4 Uvolňování léčivé látky

Průběh uvolňování léčivé látky a následná biodegradabilita NP jsou důležité faktory pro vývoj úspěšného léčivého přípravku. Průběh uvolňování léčivé látky závisí na (a) desorpci léčivé látky z povrchu, (b) difuzi léčivé látky přes matici NP, (c) difuzi přes stěnu z polymeru (v případě nanokapslí), (d) erozi nanočásticové matrice, (e) kombinaci eroze a difuze. Takže difuze a biodegradace řídí průběh uvolňování léčivé látky.

Metody testování uvolňování in-vitro jsou následující: (a) měření difuze z jedné strany na druhou přes umělou anebo biologickou membránu, (b) metoda difuzní dialýzi, (c) metoda reverzní dialýzi, (d) ultracentrifugace, (e) ultrafiltrace, (f) metoda centrifugální ultrafiltrace. Přes neustále vynakládané úsilí v této oblasti existují při studiu uvolňování léčivých látek z NPs stále určité technické obtíže. [59,60] Ty jsou spojeny se separací z testovacího disolučního media. Abychom se vyhnuli zdlouhavým a časově náročným technikám, užívá se dialyzační metoda. Suspenze NPs je dána do dialyzačního vaku/trubičky, kde jsou NPs rozdělovány na základě jejich odlišné molekulové hmotnosti. Tyto vaky, každý obsahuje NP o specifické molekulové hmotnosti, jsou poté inkubovány spolu s testovacím disolučním mediem.

Jiná technika využívá difuzní cely, které se skládají ze dva kompartmentů – donora a akceptora. Separace potom probíhá přes umělou nebo biologickou membránu [62].

Profil uvolňování léčivé látky z NP závisí na povaze transportního systému. V případě **matricového systému** je léčivá látka rovnoměrně rozmístěna v matrix a uvolňování se odehrává difúzí anebo erozí matrix. Jeli difundování LL rychlejší nežli degradace matrix, potom je mechanismus uvolňování dán převážně difúzí, v opačném případě závisí na

degradaci. [19] Rychlé počáteční uvolňování LL je přisuzováno adsorbované frakci, anebo slabé vazbě na velký povrch NP.

Rychlé počáteční uvolňování je spíše přisuzováno té frakci léčivé látky, která je adsorbována, potažmo slabě navázána na povrchu NP, nežli té, která je inkorporována uvnitř. Pozdější, exponenciální zpožděný průběh uvolňování je pozorován pravděpodobně díky difúzi LL. [63,64,25,16,19] Uvolňování z matrix se řídí kinetikou prvního řádu. [61,108]

Nedávno, *Polakovic et al.* [65] teoreticky studovali uvolňování lidokainu z PLA NPs, které ho obsahovaly různé množství (7-32%, w/w). Ke studiu uvolňování byly použity dva modely: (a) rozpouštění krystalu, (b) difúze skrze polymerní matrix. Jeli obsah LL < 10% (m/m) (látko je dispergována na jednotlivé molekuly), pak kinetika uvolňování odpovídá spíše difúznímu modelu. Ve vyšších koncentracích je pozorována přítomnost lidokainových krystalů (> 10%). Protože by se LL měla prvně rozpustit z krystalu a až pak difundovat z matrix, tak může být celý mechanismus liberace popsán disolučním modelem.

V případě *nanokapslí* (zásobníkový typ transportního systému LL, reservoir-type drug-delivery systems) je jádro léčiva potaženo polymerem a uvolňování se odehrává difúzí LL přes polymerní vrstvu, která představuje určitou bariéru. Takže, čistě teoreticky, by se uvolňování LL mělo řídit kinetikou nultého řádu. *Calvo et al.* [16] získali převážně podobné liberační profily uvolňování indometacinu, jak u matricových NPs, tak i u nanokapslí. To značí, že potažení polymerem nemůže pro uvolňování LL představovat žádnou bariéru. Takže hlavním faktorem kontrolujícím uvolňování je objem vodného média.

Metoda inkorporace LL do NPs dále ukázala vliv na uvolňování LL. *Fresta et al.* [61] popisují až o 60-70% vyšší dávku u NPs, v nichž byla látka vázána adsorpcí. Takže účinnok dávky je menší a uvolňování zbývající LL je poměrně pomalé. Tato studie dokazuje, že inkorporační metoda je pro postupné uvolňování léčiva vhodnější. Byla-li látka chemicky spojena s nanočásticemi PLGA, tak uvolňování trvalo přes 25 dní, zatímco v případě NPs s nekonjugovanou volnou LL bylo pozorováno pouze 5 dní. [58] CR bylo tedy přičteno na vrub chemické degradaci konjugovaného PLGA, který byl uvolňován rozpouštěním vodou a následným uvolněním oligomerů LL-PLGA do média. V případě uvolňování NPs z hydrogelu se uvolňování odehrává převážně díky bobtnání, které může být kontrolováno buď přidáním hydrofilních funkčních skupin, anebo kontrolovaným zesíťováním matrice.

5 Povrchové vlastnosti nanočástic

5.1 Adsorpce proteinů a fagocytóza nanočástic

Asorpce plasmatických proteinů a fagocytóza NPs se staly v posledních letech široce studovaným tématem. Po i.v. podání jsou NPs imunitním systémem snadno rozpoznány a vyloučeny z cirkulace. Vedle velikosti i hydrofobicita předurčuje NPs k adsorbování množství krevních komponent, převážně proteinů (opsoniny). Tyto parametry předurčují osud NPs in-vivo. [66,67] Vazba opsoninů na povrch NPs se nazývá opsonizace a představuje můstek mezi

NPs a fagocyty. Takže pro kvalitativní a kvantitativní pochopení interakce krevních proteinů s NPs je nezbytné navrhnout povrchově modifikované dlouhocirkulující NPs.

V studii provedené *Alleman et al.* [68] se uvádí, že byly-li PLA NPs inkubovány v lidské plazmě a séru, tak hlavním nalezeným proteinem byl IgG, dalšími adsorbovanými proteiny byly albumin a apolipoprotein. Po inkubaci v séru byly na povrchu NPs dále naadsorbovány komponenty komplementu C₃, které dosahovaly hladin protilátek. *Blunk et al.* [69] studovali kinetiku adsorpce proteinů na polystyrenové NPs a potvrdili, že albumin a fibrinogen byly adsorbovány i ve vysoce zředěné plasmě (0,08-0,8%). Nicméně v plasmě o vysoké koncentraci (80%) byly tyto proteiny vytlačeny. Hlavními adsorbovanými proteiny pak byly apolipoproteiny (A-I, C-III, E a J).

Dvoudimensionální polyakrylamidová gelová elektroforéza (2-DPAGE) byla použita ke kvantitativnímu určení interakce plasmatických proteinů s NPs obsahujícími oxidem železitým v prostředí plasmatických proteinů stabilizovaných polysacharidy. Částice inkubované v plasmě byly odděleny a poté promyty čistícím médiem. Protein naadsorbovaný na NPs byl stanoven 2-DPAGE. Takto bylo nalazeno, že hlavními proteiny neadsorbovanými na povrch částic byly fibrinogen, IgG a albumin. [68,70] V jiné studii provedené *Luckem et al.* [71] byla ukázána interakce proteinů s NPs v závislosti na metodě přípravy NPs. Např. v modelu adsorpce plasmatických proteinů na PLGA a PLA NPs, které byly připraveny sprayovým sušením, bylo množství některých apolipoproteinů zřetelně vyšší, nežli ve srovnání s modelem adsorpce částic, které byly připraveny emulzní metodou V/O/V. Bylo zjištěno, že adsorpce některých proteinů je specifická pro danou metodu přípravy. Přítomnost hydrofilních řetězců polyoxyethylenu v polymeru dramaticky snižuje adsorpci proteinů v porovnání s čistými polyestery.

V jiné studii, provedené stejnou skupinou vědců [72] byl učiněn pokus nalézt vztah mezi adsorpcí proteinů a cirkulací NPs in-vivo. K ukázaní snížené adsorpce proteinů byly použity di- a multi-blokové kopolymery PEG. Tyto částice cirkulovaly dlouho. Snížené vychytávání NPs játry bylo závislé na molekulární hmotnosti a povrchové hustotě PEG. Snížení adsorpce proteinů na NPs potahovaných PEG bylo dokázáno 2-DPAGE po inkubování v lidském séru.

5.2 Metody charakterizace povrchu nanočástic

Technik ke studiu povrchové modifikace NPs bylo vyvinuto a použito mnoho. Účinnost modifikace povrchu může být stanovena buď měřením změn povrchového náboje, hustoty funkčních skupin, anebo zvýšením hydrofility povrchu. Jednou z metod na měření modifikace povrchu je určení zeta potenciálu vodné suspenze obsahující NP. Touto metodou je sledována pohyblivost nabitých částic za působení elektrického potenciálu. Hodnoty zeta potenciálu mohou být pozitivní, anebo negativní, v závislosti na povaze polymeru anebo materiálu použitého při modifikaci povrchu. Míra hydrofility povrchu může být odhadnuta z hodnot zeta potenciálu. Toto je široce užívaná technika, sloužící k stanovení náboje povrchu.

Jinou běžně užívanou technikou je elektronová spektroskopie pro chemickou analýzu (elektron spektroskopie for chemical analysis, ESCA), také nazývaná rentgenová photoelektronová spektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS). Tato metoda je založena na vyzařování elektronů z materiálu v reakci na ozáření fotony, které mají

dostatečnou energii k tomu, aby vyvolaly ionizaci elektronů (corelevel electrons). Tyto elektrony jsou vyzařovány za energeticky charakteristických podmínek pro daný atom, Protože fotony mají nízkou průnikovou energii, tak pouze ty elektrony, které proniknou do atomů na anebo blízko povrchu, uniknou a mohou být počítány. Užitím této techniky byla provedena prvková analýza povrchu. [73]

Povrchová hydrofobicita NPs může být přímo měřena hydrofobní interakční chromatografií. Tato technika zahrnuje sloupcovou chromatografii, která umožňuje rozdělit materiály na základě jejich interakce s hydrofobní gelovou maticí. [74] Nanočásticové a gelové interakce jsou funkcí povrchové hydrofobicity NPs. Jako stacionární fáze je používán propylagarosový gel a eluce NPs se dosahuje použitím fosfátového pufru.

5.3 Metody modifikace povrchu nanočástic

Modifikace povrchu biodegradabilních a dlouhocirkulujících NPs může být dosaženo převážně dvěma metodami: (a) metodou pokrytí povrchu hydrofilními polymery / tenzidy anebo (b) vývojem biodegradabilních kopolymerů s hydrofilními částmi. Některými z široce používaných polymerů jsou: polyethylenglykol (PEG), polyethylenoxid (PEO), poloxamer, poloxamin, polysorbát (Tween-80) a lauryl estery (Brij-35).

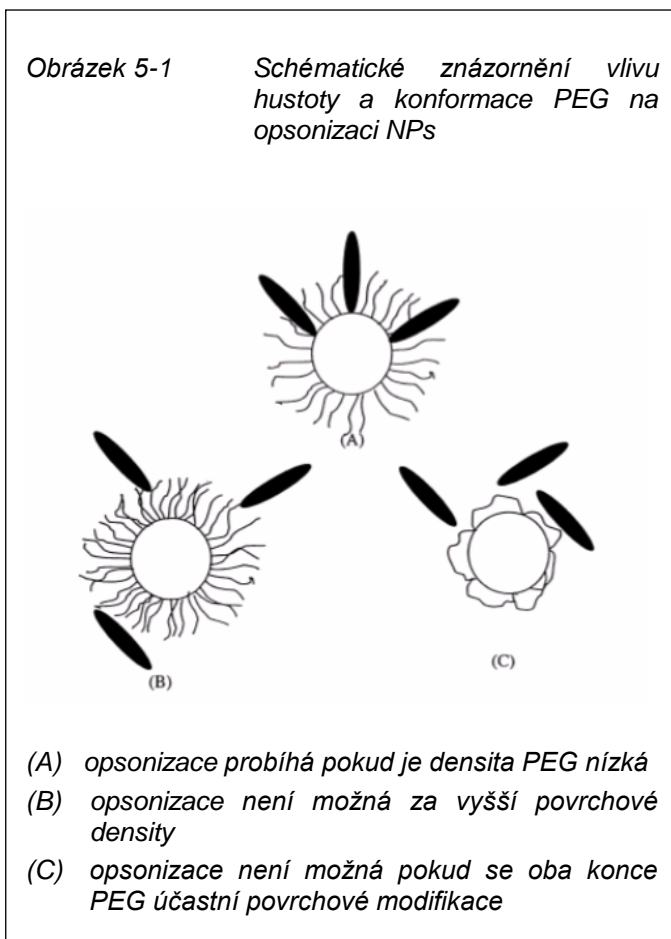
5.3.1 Nanočástice povrchově modifikované PEG a PEO

Nanočásticím pokrytým PEG se dostalo mnoho pozornosti. *Gref et al.* [75] popisovali jedнокrokovou metodu přípravy PEG potahovaných NPs za použití amfifilního PEG-polyester diblokového kopolymeru coby výchozího materiálu a ukázali, že účinnost ochranného potažení proti činnosti fagocytů závisí na hustotě pokrytí NP a na molekulové hmotnosti použitého PEG. Dále také studovali biodistribuci NPs s kovalentně připojeným PEG-PLGA. Ochranný účinek PEG na nosičích typu liposomů, NPs a micel byl z pohledu statistického chování polymerů studován *Torchilinem*. [10] Byl navržen mechanismus, který předpokládá, že řetězce flexibilních, hydrofilních polymerů, které jsou připojeny na povrchu, tvoří hustý konformační mrak, takže chrání jiné polymery od interakce s povrchem, dokonce i při nižší koncentraci ochranné polymerní vrstvy. Teoretický model vytlačování proteinů z pevného substrátu byl navržen *Joenum et al.* [76] Důležitými faktory byly sterické odpuzování, van der Waalsovy interakce a volná energie hydrofobní interakce. Model poskytuje základní informace pro předcházení opsonizace. Vysoká povrchová hustota a dlouhé řetězce PEG jsou nezbytné pro nízkou adsorpci proteinů. Povrchová hustota má však při sterickém odpuzování větší vliv nežli délka řetězce a van der Waalsovy interakce.

Gref et al. [77] popisují přípravu směsných PLA NPs s monomethoxy polyoxyethylenem (MPOE). Metodou evaporace rozpouštědla za použití chlátku sodného, coby tenzidu. Zeta potenciál, měřený v různých koncentracích chloridu sodného, se pohyboval od -55mV u PLA do 0mV u směsí, v závislosti na zastoupení MPOE v NPs. Zeta potenciál stoupal se zvyšujícím se množstvím MPOE, což značí, že řetězce MPOE, které jsou přítomny na povrchu NP maskují ionizované terminální karboxyly PLA. Tyto výsledky jsou podpořeny studií fagocytózy monocytů. Jeli obsah MPOE ve směsi vyšší než 2-3%, pak zaujímají řetězce

MPOE kartáčovitou konfigurací, tvoří sterickou nenabitou bariéru, a tak snižují zeta potenciál a fagocytózu.

Optimální hustota PEG na povrchu NP hraje důležitou roli při sterickém vytlačování. NPs, jež pozbývaly PEG pláštiku, se méně hromadily v játrech, zato avšak vykazovaly vyšší vychytávání ve slezině – tzn. využitelnost při targetingu. [78] Dále vzdálenost mezi PEG řetězci na povrchu je rozhodující při zabránění adsorpce plasmatických proteinů. Např. snížení vzdálenosti mezi PEG řetězci na povrchu z 6.2 na 5.1nm dramaticky snižuje adsorpci apolipoproteinů až o 90%. Toto dále potvrzuje, že hustota hydrofilního segmentu na povrchu je při opsonizaci důležitá. Žádné další snížení této vzdálenosti nemá na adsorpci PP podstatnější vliv. [79]



Systemy s povrchy modifikovanými PEO se v posledních letech dočkaly zvýšené pozornosti. Jeaghere *et al.* [80] se zabývali mrazem sušenými NPs s PEO modifikovaným povrchem a vlivem délky řetězce PEO a hustoty povrchu na vychytávání makrofágy. NPs byly připraveny metodou vysolování, za použití směsi PLA a PLA-PEO kopolymeru. Ve snaze studovat vliv hustoty povrchu PEO na snadnost požití (mikrofágy), použili Vittaz *et al.* [81] diblokový polymer PLA a polyethylenoxidu (PEO). Bylo zjištěno, že se zvrůstající hustotou PEO na povrchu NP je pozorována klesající ochota tyto částice požírat. To vše díky sterickému odpuzování proteinů od povrchu NP.

Systemy s povrchy modifikovanými PEO se v posledních letech dočkaly zvýšené pozornosti. Jeaghere *et al.* [80] se zabývali mrazem sušenými NPs s PEO modifikovaným povrchem a vlivem délky řetězce PEO a hustoty povrchu na vychytávání makrofágy. NPs byly připraveny metodou vysolování, za použití směsi PLA a PLA-PEO kopolymeru. Ve snaze studovat vliv hustoty povrchu PEO na snadnost požití (mikrofágy), použili Vittaz *et al.* [81] diblokový polymer PLA a polyethylenoxidu (PEO). Bylo zjištěno, že se zvrůstající hustotou PEO na povrchu NP je pozorována klesající ochota tyto částice požírat. To vše díky sterickému odpuzování proteinů od povrchu NP.

5.3.2 Nanočástice s adsorbovaným poloxaminem a poloxamerem

Při studiu potahování povrchu byl široce používán poloxamer a poloxamin. Ve studii Illuma a Davise [82,83] byly jako potahující materiály dlouhocirkulujících polystyrenových a poly(methylmethakrylátových) částic použity poloxamer a poloxamin. Delší čas cirkulace a snížené vychytávání v játrech bylo zaznamenáno u králíka v případě podání polystyrenových NPs, které byly potaženy poloxaminem, zatímco u nepotahovaných NPs o stejné velikosti (60nm) nikoliv. U NPs potahovaných poloxamerem-188 bylo pozorováno snížení vychytávání játry o 20%, a u poloxameru-338 o 40%. Při experimentech na králicích s jodem ¹³¹I značenými a poloxamerem-407 potahovanými polystyrenovými částicemi byly při testování vychytávání játry a slezinou získány ještě lepší výsledky nežli v případě poloxameru-338.

Rudt a Miller [84] se zabývali vychytáváním povrchově upravovaných poloxamidem potahovaných polystyrénových NPs a našli extrémě nízký stupeň vychytávání NPs o velikosti do 100nm. U králíků se poloxamid ve srovnání s poloxamerem ukázal při vyhýbání degradaci játry jako mnohem lepší obalovací materiál. [85] *Moghimi a Gray* [86] vyvinuli dlouhodoběcirkulující polystyrenové částice potahované poloxaminem-908, které byly rezistentní k vychytávání mikrořágy.

5.3.3 Nanočástice s cyklodextrinem a jinými karbohydráty

Bylo zjiřtěno, že pokud potáhneme povrch NPs karbohydráty, tak se můžeme vyhnout jejich vychytávání mikrořágy. Přesně toto popisuje *Cho et al.* [87] Pro transport DNA byly také vyvinuty PLA NČs potahované poly(L-lysin)-vázajícím-polysacharidem. [88] Ty se ukázaly jako rezistentní vůči autoagregaci a nespecifické vazbě sérových proteinů. Nedávno použili *Duchene et al.* [89] amfifilní cyklodextrinové NPs ke zvýšení nosné kapacity a biologické dostupnosti ve vodě rozpustných a nebo pouze slabě rozpustných LL, které by byly aplikovány orální anebo parenterální cestou. PIBCA NPs byly připraveny v přítomnosti cyklodextrinu anionickou polymerací isobutylkyanoakrylátu v 0,01 M HCl obsahující 1% poloxamer-188. Velikost, zeta potenciál a obsah cyklodextrinu byly ovlivněny vlastnostmi daného cyklodextrinu. Částice o nejmenší velikosti byly získány z hydroxypropyl β -cyklodextrinu, zatímco nejvyššího obsahu cyklodextrinu se dosáhlo u β -cyklodextrinu. Cyklodextrinové nanočástice, anebo polymerní NPs obsahující cyklodextrin se ukázaly být užitečné při targetingu ve vodě nerozpustných LL orální nebo parenterální cestou. Přítomnost cyklodextrinů v těchto částicích silně sniřuje jejich negativitu povrchu. Takže cyklodextrinem potažené NPs mohou napomoci při obcházení MPS.

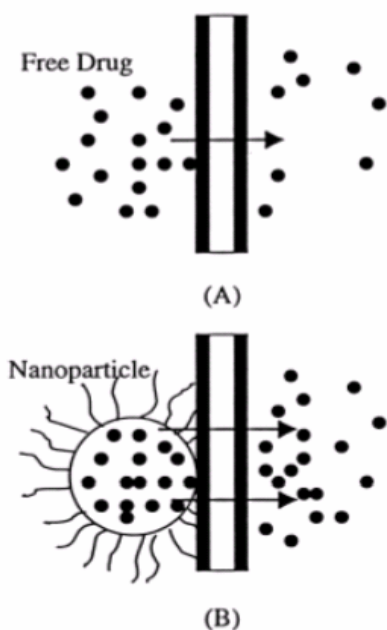
5.3.4 Nanočástice s polysorbátem - jejich prostupnost hematoencefalickou bariérou

Cílený transport LL do mozku přestupem přes hematoencefalickou bariéru (BBB) byl problém. Bylo učiněno mnoho pokusů k překonání tohoto problému. BBB je tvořena těsnými spoji endoteliálních buněk kapilár s mozkiem, které limitují schopnost mnoha LL prostupovat mozkovou tkání, zpravidla do centrálního nervového systému (CNS). Je známo, že přes BBB přestupuje z cév do mozku [90,91] mnoho regulátorů mozkových funkcí, jako např. (cytokiny, transferin, enkephaliny, endorfíny, spánek indukující peptid delta). Také některé některé vzruřivé a tlumící aminokyseliny slabě pronikají přes BBB. NPs s modifikovaným povrchem mohou být použity k transportu protizánětlivě působících látek do CNS, protože mohou prostupovat přes BBB.

Mechanismus zdokonaleného transportu potahovaných NPs přes BBB je připisován řadě mechanismů: (a) navázání NP na vnitřní stranu endothelu kapiláry v mozku a následný transport LL do mozku usnadněný velkým koncentračním gradientem, který usnadňuje pasivní difuzi, (b) endoteliální uptake fagocyty. [92] Vliv NPs potažených tenzidem na průnik LL přes biologické membrány byl studován a bylo pozorováno zvýšení permeace u částic potahovaných polysorbátem-80. [62] (obr.5-2)

Obrazek 5-2

Schématické znázornění zvýšeného průniku léčiva přes biologickou membránu



(A) Uptake volné léčivé látky přes biologickou membránu

(B) Uptake léčivé látky vázané na nanočástici povrchově modifikovanou polysorbátem-80 přes biologickou membránu

Borchardt et al. [93] studovali vychytávání

polymethylmetakrylátových (PMMA) NPs potahovaných polysorbátem-80 endoteliálními buňkami mikrocév hovězího mozku. Tyto NPs vykazovaly zvýšené vychytávání těmito buňkami. *Troster et al.* [94] popisovali devítinásobné zvýšení radioaktivity v oblasti mozku po aplikování ^{14}C -PMMA NPs obalovaných polysorbátem-80.

Při pokusech transportovat do mozku cytostaticky působící LL pomocí NPs ukázali *Gulyaev et al.* [95], že koncentrace systémově aplikovaného doxorubicinu je v mozku více než 60x vyšší v případě vazby na PBCA NPs potahované polysorbátem-80. Doxorubicin byl vybrán jako modelová LL díky jeho antikancerózní aktivitě a díky tomu, že není schopen překonávat BBB. Částice se dostaly do mozku neporušeny a po endocytose do endotheliálních buněk mozkových cév. Vysoká koncentrace, která byla v této studii dosažena, znamená jasné zlepšení při léčbě mozkových nádorů.

Alyautdin et al. [96] studovali

účinnost PBCA NPs potahovaných polysorbátem-80 při přenášení ve vodě nerozpustného analgetika loperamidu přes BBB u myši. I.v. aplikace NPs potahovaných polysorbátem-80 měla za následek přesvědčivý dlouhotrvající analgetický účinek, zatímco nepotahované NPs jej nebyly schopny vyvolat. Tentýž autor [92] popisoval zvýšenou analgetickou aktivitu u PBCA NPs pokrytých polysorbátem-80 obsahujících delargin, které byly podávány taktéž myším. Zrovna tak popisoval přestup BBB částicemi stejného typu obsahujícími LL malé molekulární hmotnosti a LL polárního a hydrofilního charakteru jako je např. tubokurarin. Aktivita in-vivo perfundovaného mozku krysy byla snímána na elektroencefalogramu. 5min po i.v. aplikaci NPs byly detekovány záchvaty.

6 Využití nanočástic jako nosičů proteinů a peptidů

Díky pokroku učiněnému v biotechnologii a bioengineeringu a lepšímu porozumění úlohy peptidů ve physio-patologických procesech se peptidy stávají velice přitažlivou skupinou LL. Obzvláště vyvinutí DNA-rekombinantních technologií učinilo tyto sloučeniny dostupnější v daleko větší míře nežli tomu bylo v minulosti. Avšak jejich užití v medicíně je částečně limitováno jejich rychlou degradací v gastrointestinálním traktu, takže vyžadují, aby byly podávány parenterální cestou. Biologický poločas peptidů je krátký a vyžaduje časté podávání. Díky jejich nízkému průniku a malému rozdělovacímu koeficientu je jejich průnik přes biologické membrány malý. Proto byly navrženy biodegradabilní částicové transportní systémy, které by umožnily bezpečné a kontrolované parenterální podání peptidů. [99]

Proteiny a peptidy jsou v PLGA díky její hydrofobicitě a aciditě PLGA nestabilní. [100] Dalším problémem je rychlé uvolnění z PLGA matrice. Abychom tento problém obešli, byly zkoumány různé možnosti modifikace vlastností PLGA matric za pomoci hydrogelových NPs. [101,102] To urychlilo vývoj nových transportních systémů proteinů. V této studii byl *hovězí sérový albumin* (BSA) prvně enkapsulován do PVA NPs, které byly následně vpraveny do PLGA makrosfér pomocí metody fázové separace. Složené PLGA-PVA NPs, obsahující protein, byly potom charakterizovány a jejich povrch byl po dobu 2 měsíců pro uvolňování BSA nepropustný.

V nedávné studii provedené *Gasperem et al.* [103] bylo ukázáno, že přítomnost terminálních karboxylových skupin v PLGA má za následek o 4,6% zvýšenou nosnou kapacitu proteinů, a pozvolné uvolňování po dobu cca 20ti dnů. Na druhou stranu přítomnost esterifikovace těchto karboxylů vedla u PLGA ke snížení nosnosti o 2,65% a snížení uvolňování na 14 dní.

Kawashima et al. [105] vyvinuli nový plicní transportní systém založený na enkapsulaci fyziologicky aktivního peptidu v PLGA NPs. Ty byly připraveny modifikovanou metodou "emulgace - difuze rozpouštědla ve vodě." Podání vodné disperze PLGA nanosfér formou nabulizace praseta do plic prokazatelně snižovalo hladinu glukózy v krvi po dobu přesahující 48 hodin, což bylo srovnáváno s nebulizovaným vodným roztokem inzulínu, coby standartu. V roztoku soli o teplotě 37°C bylo během počátečního rozbití NPs uvolněno 85%, následovalo postupné pozvolné uvolňování zbývající látky po dobu několika hodin.

Užitím metody fázově inverzní nanoenkapsulace byl úspěšně enkapsulován *zink-insulín* do četných polyesterových a polyanhydridových nanosfér. [106] Enkapsulovaný insulín si zachoval biologickou aktivitu a nanosféry jej dokázaly uvolňovat po dobu delší než 6h. 1,6%ní zink-insulín v PLGA NPs s oligomerem fumaranhydridu a oxidem železitým se také ukázal být aktivní i po orální aplikaci.

Dalšími peptidy u nichž byly provedeny pokusy s enkapsulací jsou *kalcitonin* (hypokalemický účinek, inhibice resorpce kalcia z kostí), *cyklosporin A* (imunosupresivum), *muramyltripeptid* (látka zabraňující vzniku metastáz), *inhibitory HIV-1 proteáz*. [107]

7 Závěr

Použití biodegradabilních polymerů pro řízené uvolňování léčiva je v současnosti již dobře prozkoumáno. Přesto je nyní na trhu pouze omezené množství léčivých přípravků, které by využívaly této technologie (např. Lupron[®] Depot, Ambroxane[®]). Významným faktorem při optimalizaci NP a tím zprostředkování cíleného působení LL v cílové tkáni a dosažení prodlouženého setrvání v krevním oběhu je modifikace povrchu NPs. Z pohledu polymerní chemie je nutné stále hledat nové polymery s vyváženými hydrofilními a hydrofobními vlastnostmi. Příprava NPs, využívající k životnímu prostředí ohleduplnější postupy jako např. SCF, se zdá být slibnou oblastí vývoje takových produktů, které by neobsahovaly nežádoucí toxické zbytky rozpouštědel.

8 Cíl práce

Cílem předložené práce byla příprava nanočástic různého složení metodou odpaření rozpouštědla a následné testování stability takto připravených částic. Byl zkoumán vliv následujících potenciálních faktorů:

- (a) intenzity míchání při dispergaci
- (b) teploty při dispergaci
- (c) složení inkubačního media

Měřenou veličinou nanočástic byl rozměrový parametr nanočástic a jejich zeta potenciál.

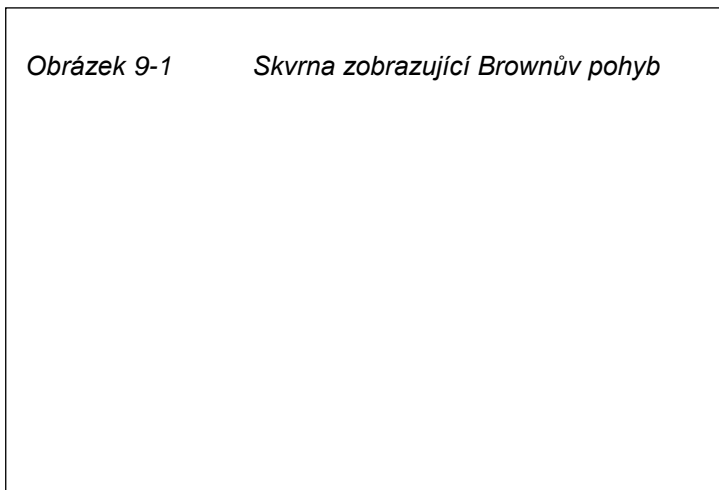
Připravené nanočástice byly po dispergaci v roztoku manitolu sušeny ve sprejové sušárně. Byly zjišťovány tyto charakteristiky:

- (a) velikost vzniklých mikročástic
- (b) vliv tohoto procesu na velikost nanočástic po jejich dispergaci ve vodě

9 Principy měření velikosti nanočástic

9.1 Dynamický rozptyl světla

Obrázek 9-1 Skvrna zobrazující Brownův pohyb



Zetasizer provádí měření velikosti částic a jejich zeta potenciálu pomocí procesu, který se nazývá dynamický rozptyl světla (DLS-dynamic light scattering). DLS proměřuje Brownův pohyb, jehož rychlost souvisí s velikostí částic. Částice prochází laserovým paprskem, rozptyluje záření všemi směry. Detektor umístěný v našem případě na 173° analyzuje dopadající záření. Kolísající intenzita rozptýleného dopadajícího záření se zobrazuje na detektoru

jako soustava černobílých skvrn. Bílé skvrny jsou záznamem pro dopadající rozptýlené záření ve stejné fázi, černé skvrny jsou způsobeny vzájemným vyrušením fází (obr.9-1). Detektor zaznamenává rychlost pohybu skvrn na stínítku v čase a přes korelační funkci a Stokes-Einsteinovu rovnici přepočítává rychlost pohybu částic na jejich velikost.

Brownův pohyb je pohyb částic v důsledku náhodných srážek s molekulami kapaliny. Hlavní rys Brownova pohybu je, že malé částice se pohybují rychleji a velké částice naopak pomaleji. Vztah mezi velikostí částic a rychlostí Brownova pohybu je definován jako Stokes-

Obrázek 9-2 Stokes-Einsteinův zákon

$$r = kT / 6 \pi \eta D$$

η ...viskozita

k ...Boltzmanova konstanta

T ...teplota

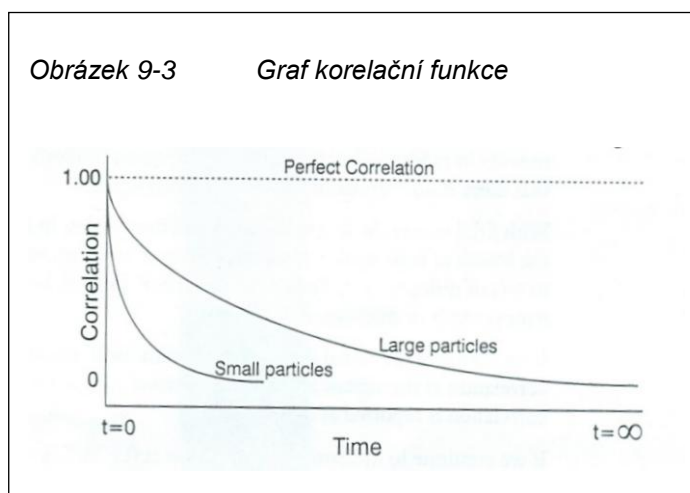
D ...difúzní koeficient

Einsteinův zákon (obr.9-2). Tak jako jsou částice konstantně v pohybu, tak se skvrna jeví také jako pohybující se. Zetasizer nano systém měří poměr intenzity kolísání skvrny a počítá velikost částic podle Stokes-Einsteinova vztahu.

Zetasizer měří intenzitu kolísání laserového paprsku a tato intenzita je přepočítávána na velikost částic uvnitř vzorku. Uvnitř přístroje je součást nazývaná digitální korelátor. Korelátor je program porovnávající kolísání intenzity světelného signálu v časovém období.

9.1.1 Korelační funkce

Jestliže jsou měřeny velké částice, pohybující se pomalu, intenzita porovnávací skvrny bude také kolísat pomalu. Jestliže jsou měřeny malé částice, pohybující se rychle, intenzita porovnávací skvrny bude také kolísat rychle. Graf ukazuje korelační funkci pro velké a malé

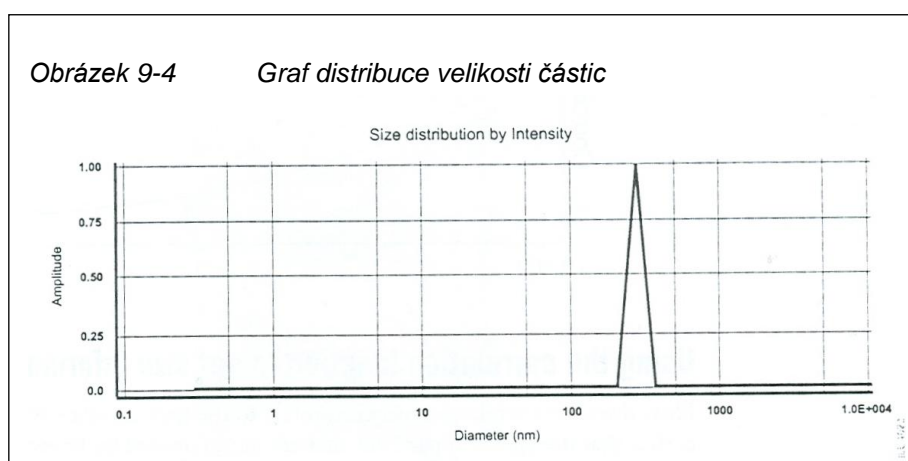


částice (obr.9-3). Rychlost poklesu korelační funkce je závislá na velikosti částic, pokles je strmější pro malé částice.

Po změření korelační funkce přístrojem je tato informace použita pro výpočet distribuce velikosti částic. Zetasizer, jeho software, používá k výpočtu algoritmus, který převádí strmost poklesu korelační funkce na distribuci velikostních skupin částic, tj. velikostní distribuci. Typický graf distribuce velikostí je ukázán na

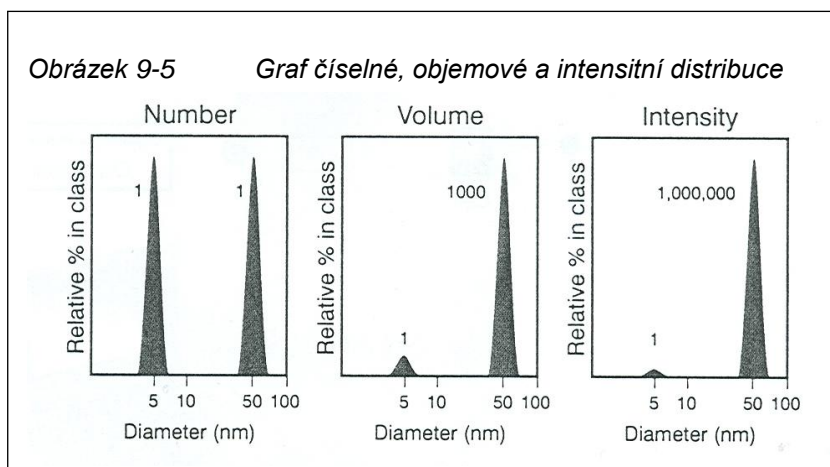
obr.9-4. Na ose X je uvedena distribuce skupin částic o stejné velikosti, zatímco osa Y ukazuje relativní intenzitu rozptýleného světla. Tento graf se proto označuje jako distribuce podle intenzity.

Ačkoliv základní distribuční velikost vytvořená DLS je distribuce intenzity, může být převedena i na objemovou distribuci. Tato objemová distribuce může být také dále převedena na číselnou distribuci. Číselná distribuce v sobě násobí chyby z distribuce intenzity.

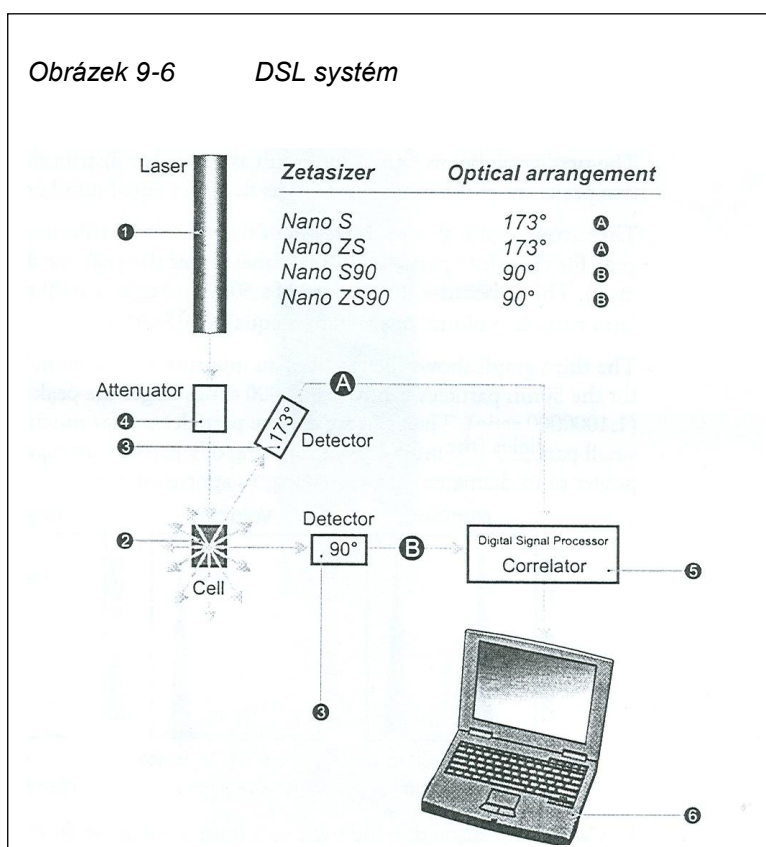


9.1.2 Číselná, objemová a intenzitní distribuce

Zde je popsán rozdíl mezi intenzitní, objemovou a číselnou distribucí. Musíme si představit vzorek obsahující pouze 2 velikosti částic (např. 5 nm a 50 nm), se stejným poměrným zastoupením obou velikostí (obr.9-5). První graf ukazuje výsledky jako číselnou distribuci. Oba píky jsou stejné velikosti (1:1) jako se rovnají počty částic. Druhý graf ukazuje výsledky objemové distribuce, oblast píku pro částice velké 50 nm je tisíckrát větší než pík pro částice velké 5 nm. Takže objem 50 nm částic je tisíckrát větší než 5 nm částic, ve vzorci pro výpočet objemu je třetí mocnina poloměru. Třetí graf ukazuje výsledky distribuce podle intenzity paprsku laseru. Oblast píku pro 50 nm částice je milionkrát větší než pro 5 nm částice. Je to proto, že velké částice rozptylují mnohonásobně více světla než částice malé.



9.1.3 Měření velikosti částic



Typický DLS systém zahrnuje šest hlavních komponent, (obr.9-6). První je laser (1), je používán jako světelný zdroj k ozařování vzorku částic uvnitř kyvety (2). Většina světelného paprsku prochází rovně vzorkem, část záření je rozptýlována částicemi uvnitř vzorku. Další je detektor (3), používaný k měření intenzity rozptýleného světla. Částice rozptylují světlo ve všech směrech, tím je možné teoreticky umístit detektor do téměř jakékoliv polohy, v které bude detekovat rozptýlené záření.

Jestliže je detekováno příliš mnoho světla, detektor se přetíží. Proti přetížení je zde tzv. zeslabovač (4), používaný k redukci intenzity světla laseru, který redukuje sílu rozptýleného záření. Intenzita signálu z

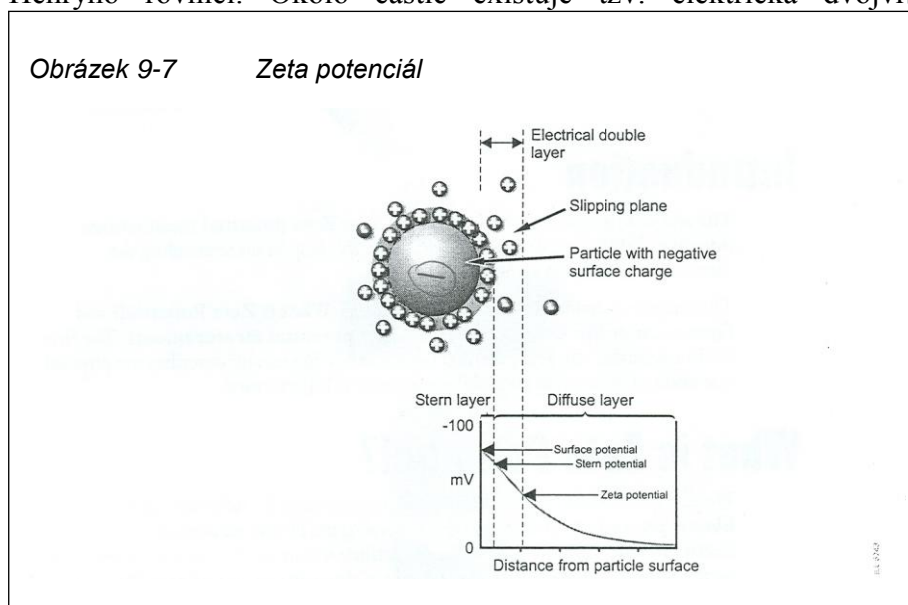
detektoru přechází na digitální signál v přístroji nazývaný korelátor (5), který srovnává rozptýlovanou intenzitu v následujících časových intervalech k odvozování poměru kolísající intenzity. Tyto korelační informace dále prochází přes počítač (6), kde se data analyzují a odvozuje se velikost.

9.2 Měření a principy zeta potenciálu

Pro pochopení principu měření zeta potenciálu je v první řadě nutné pochopit teorii zeta potenciálu a dále fyzikální děje probíhající v průběhu měření.

9.2.1 Teorie zeta potenciálu

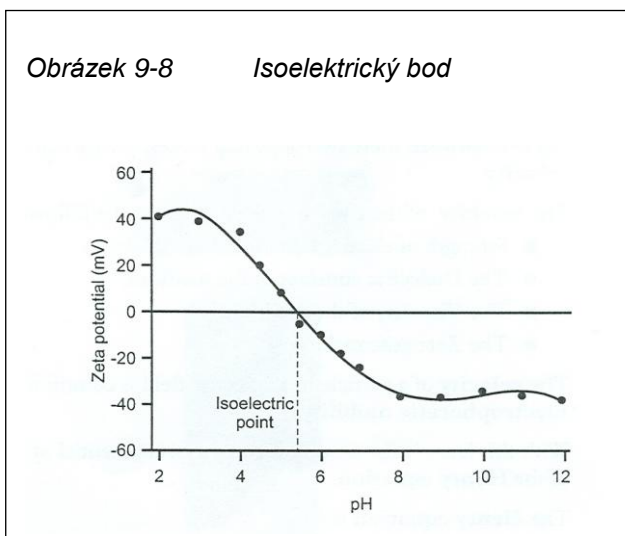
Zetasizer měří elektroforetickou pohyblivost a poté k výpočtu zeta potenciálu používá Henryho rovnici. Okolo částic existuje tzv. elektrická dvojrůžva. První vržva na



bezprostředním povrchu částice, kde jsou ionty pevně vázány, se nazývá „Sternova vržva“. Druhou vržvu tvoří difúzní část, kde jsou ionty připojeny méně pevně, (obr.9-7). Když se částice pohybuje, tyto ionty dvojrůžvy se pohybují spolu s ní. Potenciál nacházející se mezi pohybující se částicí s

elektrickou dvojrůžvou a okolím se nazývá zeta potenciál.

Zeta potenciál je důležitý pro pochopení potenciálové stability a v teorii koloidních systémů. Koloidní a také makrodisperzní systém je definován jako soustava složená nejméně ze dvou fází, látky dispergované a disperzního media. Rozměr koloidních částic se pohybuje v rozmezí 1nm až 1 μ m. V těchto případech nás zajímají dva hlavní stavy, pevná látka dispergovaná v tekutině (suspenze) a tekutina dispergovaná v tekutině, čili emulze. Částice v suspenzích, které mají velký negativní nebo pozitivní zeta potenciál, mají tendenci k odpuzování a není zde tendence k flokulaci. Jestliže však částice mají velmi nízký zeta potenciál a je zde nepřítomnost síly ochraňující částice, spojují se a flokulují. Hlavní dělicí hranice mezi stabilními a nestabilními suspenzemi je +30mV a -30mV. Částice se zeta potenciálem vyšším než +30mV nebo nižším než -30mV jsou normálně považovány za stabilní. Velice důležitý faktor v hodnotě zeta potenciálu je pH. Když si představíme částici v suspenzi s negativním zeta potenciálem, do které přidáme alkalickou látku, částice mají tendenci získat větší negativní náboj. Když přidáme kyselinu do této suspenze, negativní náboj bude snížen až neutralizován. Další přidání kyseliny zapříčiní vzestup pozitivního náboje. Proto zeta potenciál bude pozitivní v nízkém pH a negativní ve vysokém pH.



Hodnota, ve které zeta potenciál je roven nule se nazývá **isoelektrický bod** (obr.9-8). V tomto bodě je koloidní systém nejméně stabilní.

Velice důležitá je existence elektrokinetických efektů, mezi které patří i elektroforéza.

9.2.2 Elektroforéza

Jestliže v elektrolytu použijeme elektrické pole, nabité částice suspendované v elektrolytu jsou přitahovány směrem k elektrodám

opačného náboje. Viskózní síly brzdí pohyb částic. Rovnováha je dosažena mezi těmito

Obrázek 9-9 Henryho rovnice

$$U_E = 2\varepsilon z f(Ka) / 3\eta$$

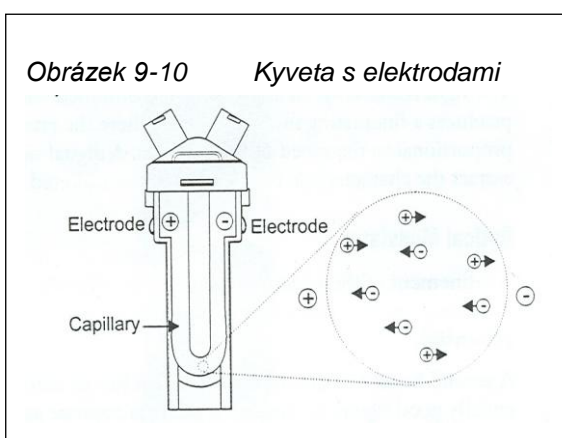
z.....zeta potenciál
U_Eelektroforetická pohyblivost
ε.....dielektrická konstanta
η.....viskozifúzní koeficient
F(Ka)...Henryho hunkce

dvěma opačnými silami, částice se pohybují se stálou rychlostí. Rychlost pohybu částic závisí na následujících faktorech: intenzitě elektrického pole nebo gradientu napětí, dielektrické konstantě media, viskozitě media, zeta potenciálu.

Rychlost částic v elektrickém poli je obvykle popisována jako elektroforetická pohyblivost. Pomocí této hodnoty a na základě rovnice Henryho zákona (obr.9-9) můžeme vypočítat

zeta potenciál částic.

9.2.3 Měření elektroforetické pohyblivosti

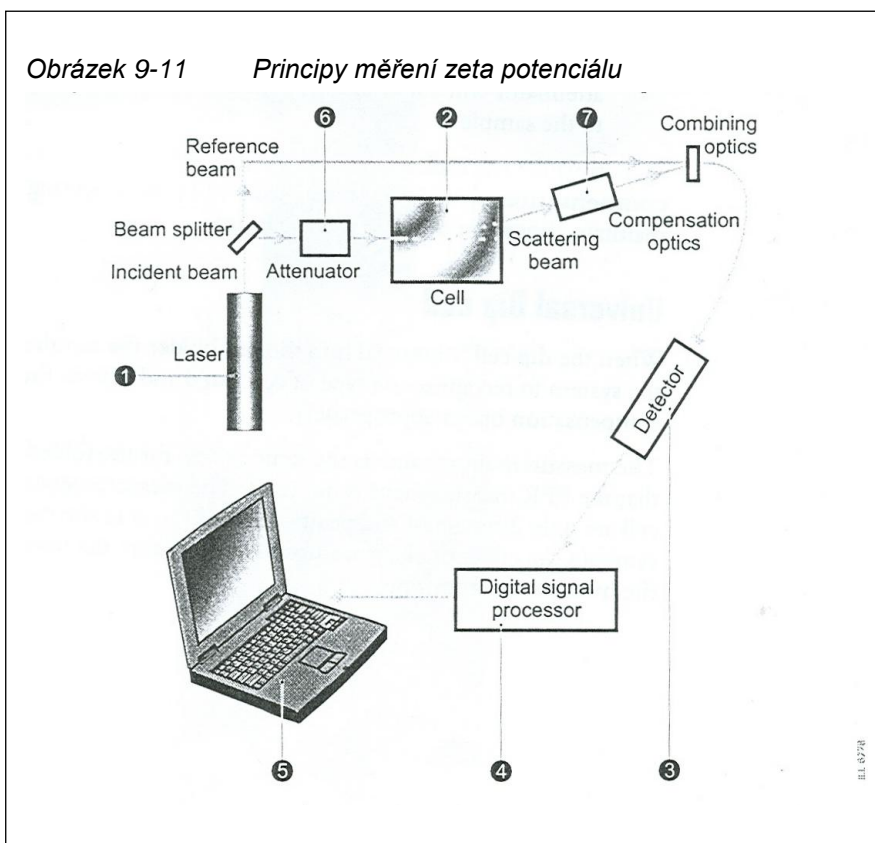


Základ klasické mikroelektroforézy je kyveta s elektrodami (obr.9-10). Částice se pohybují směrem k elektrodám opačného náboje, jejich rychlost je měřena a vyjádřena v jednotce silového pole jako jejich pohyblivost. Technika používaná v měření rychlosti v Malvernově zetasizeru je laserový Dopplerův rychloměr.

9.2.4 Zetasizer, nano a zeta-potenciálové měření

Je zde používáno šest základních komponent

(obr.9-11). Hlavní je laser (1), který zdrojem světelného záření. Během měření zeta potenciálu je zdroj světla rozštěpen na paprsek pro měření a srovnávací paprsek. Srovnávací paprsek je nezbytný v metodě měření zeta potenciálu. Laserový paprsek prochází středem vzorku kvivety (2) a rozptýlený paprsek je měřen pod úhlem 17° . Po aplikaci elektrického pole pohybující se částice způsobí kolísání intenzity detekovaného světla, frekvence takového kolísání je proporcionální k velikosti částice. Další součástí je detektor (3), který posílá informace do digitálního signálního procesoru (4). Tyto informace poté prochází počítačem (5), kde je Zetasizer nano software produkující frekvenční spektrum. Z frekvenčního spektra je



kalkulována elektroforetická mobilita a tudíž též zeta potenciál.

Pro vzorky, které rozptylují více světla, jako velké částice, nebo vzorky vyšší koncentrace, u nich musí být množství rozptýleného světla sníženo zeslabovačem (6), který je používán k redukci intenzity laseru a proto redukuje intenzitu rozptylování. Zeslabovač automaticky redukuje množství světla procházejícího vzorkem. Dále je zde nainstalovaná kompenzační technika (7).

10 Experimentální část

10.1 Použité přístroje

Analytické váhy Kern ABS, max 220g, d=0,1g

Váhy Kern 440-33N max 200g, d=0,01g

Váhy Kern 440-47 max 1200g, d=0,1g

Magnetická míchačka Heidolph MR 3001 100-1250 ot./min

Homogenizátor Diax 900 Heidolph max.8000-26000 otáček / min.,6.pásem

Zetasizer ZS, Malver Instruments, UK Zetasizer ZS 90

Ultrazvuk Sonorex super 10P Bandelin

Büchi Mini Spray Dryer B-290

10.2 Chemikálie

3P, KFT UK FaF Hradec Králové

3D, KFT UK FaF Hradec Králové

3T, KFT UK FaF Hradec Králové

PLGA 50:50, KFT UK FaF Hradec Králové

PDLLA, KFT UK FaF Hradec Králové

5P, KFT UK FaF Hradec Králové

5D, KFT UK FaF Hradec Králové

5T, KFT UK FaF Hradec Králové

Dichlormethan (DCM) p.a. Lachema a.s. Neratovice

Čištěná voda, Destilovaná voda

Lecitin L- α lecitin typ II S, Sigma Aldrich

Polysorbát 20, Lachema a.s. Neratovice

10.3 Příprava nanočástic

Metoda přípravy nanočástic využívá extrakci a odpařování rozpouštědla (viz. teoretická část). Je založena na *principu* přípravy *emulze typu olej ve vodě*. Vnitřní fázi představuje dichlormethanový roztok polymeru. Soustava se v trysce míchá, tím jsou kapky vnitřní fáze v neustálém pohybu. Organické rozpouštědlo přechází do vodné fáze, odkud se postupně odpařuje, přičemž ve vnitřní fázi zůstává polymer a částice se stávají pevnými. Částice byly připravovány z následujících polymerů (jejich roztoku o koncentraci 1%): terpolymer kyselin DL-mléčné a glykolové větvený 3% pentaerythritolem (3P), 3% dipentaerythritolem (3D), 3% tripentaerythritolem (3T), nízkomolekulární kopolymer kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou (PLGA 50:50), polymer kyseliny poly-DL-mléčné (PDLLA), terpolymer kyselin DL-mléčné a glykolové větvený 5% pentaerythritolem (5P), 5% dipentaerythritolem (5D), 5% tripentaerythritolem (5T). Jako rozpouštědla jsme použili dichlormethan (DCM). Jako emulgátory jsme použili lecitin (v 0.75%ní koncentraci) s polysorbátem (v 0.25% konc.).

Příprava vodné (vnější) fáze

Do kádinky navážíme na analytických vahách potřebné množství emulgátorů. Toto množství následně rozpustíme ve stanoveném množství destilované vody. Rozpuštění lecitinu urychlujeme krátkým (cca 30 sekundovým) zahřáním v mikrovlnné troubě a roztíráním o stěny kádinky.

Table 10-1 *Roztok 0.75 % lecitin + 0.25% Pso (vnější fáze)*

Látka	Množství
Lecitin	0,375 g
Polysorbát	0,125g
Destilovaná voda	49,50 g

Příprava organické (vnitřní) fáze

Na analytických vahách odvážíme do skleněné lahvičky s uzávěrem 50mg příslušného polymeru (3P, 3D, 3T, PLGA 50:50, PDLLA, 5P, 5D nebo 5T) a doplníme potřebným množstvím dichlormethanu (4,95g) tak, abychom získali 1% roztoku.

Table 10-2 *Roztok 1% polymeru v DCM (vnitřní fáze)*

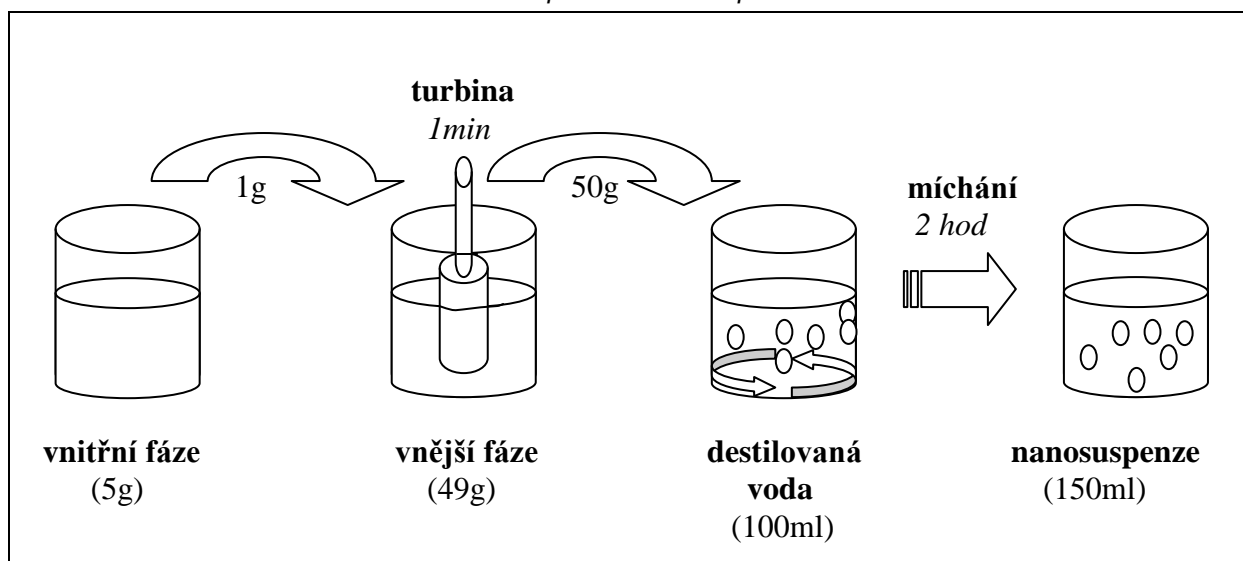
Látka	Množství
Polymer	0,05 g
DCM	4,95 g

Příprava nanočástic

Do 100ml-kádinky obsahující vnější vodnou fázi (50 ml) s rozpuštěným polymerem směřoval do výšky 1cm nad její dno hrot turbíny homogenizátoru. Homogenizátor jsme zapnuli na stupeň 6 (tzn. 26000 otáček/min) a do těsné blízkosti turbíny jsme náraz přidali 1g

organické fáze. Homogenizace probíhala 1 minutu. Poté jsme roztok rychle přelili do 250ml-kádinky se 100ml destilované vody a míchali po dobu 2 hodin (do odpaření rozpouštědla) na magnetické míchačce. Následně jsme měřili na Zetasizeru vlastnosti takto připravených částic (jejich velikost a zeta potenciál). Výsledky jsme zaznamenávali a porovnávali u částic vzniklých z různých polymerů. Dále jsme zkoumali vliv teploty, času, míchání, sušení a opětovné disoluce.

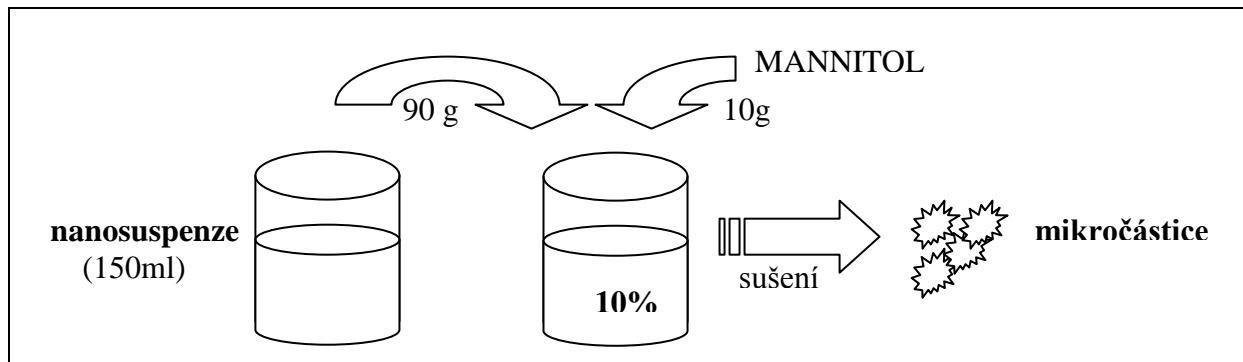
Obrázek 10-1 Schématické znázornění provedeného experimentu



10.4 Příprava mannitolových mikročástic

V 90ti g roztoku nanočástic připraveného dle výše uvedeného postupu rozpustíme 10g mannitolu. Vzniklý roztok sušíme. U mannitolových mikročástic mikroskopicky měříme jejich velikost. Poté částice opětovně rozpustíme (voda anebo plasm. medium) a změříme na Zetasizeru vlastnosti liberovaných nanočástic. U dvou vybraných polymerů (3D, PLGA 50:50) rozpustíme mannitolové částice v plasm. médiu při 37°C, třepeme je v temperované vodní lázni.

Obrázek 10-2 Schématické znázornění provedeného experimentu



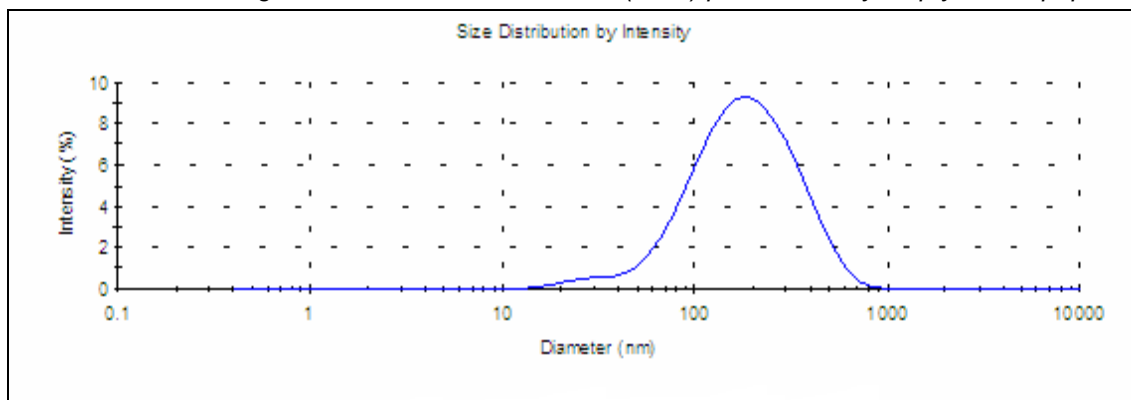
10.5 Měření velikosti částic

Vzorek jsme naplnili do speciální kyvety určené právě pro měření v Zetasizeru a měřili velikost částic. Stejný vzorek byl použit pro měření zeta potenciálu.

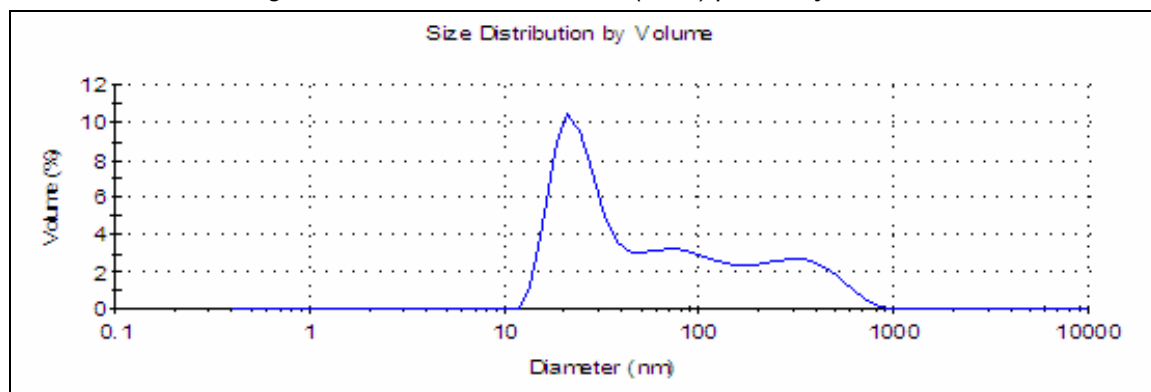
Jak bylo zmíněno již dříve, základní distribuční velikost vytvořená DLS je *distribuce intenzity*, tato může být převedena i na *objemovou distribuci*. Tato objemová distribuce může být také dále převedena na *číselnou distribuci*. Číselná distribuce v sobě násobí chyby z distribuce objemové.

Přístroj zobrazuje velikostní distribuci. Na ose X je zobrazená distribuce třídy velikostí a na ose Y je zobrazená relativní intenzita rozptýleného světla (viz následující grafy).

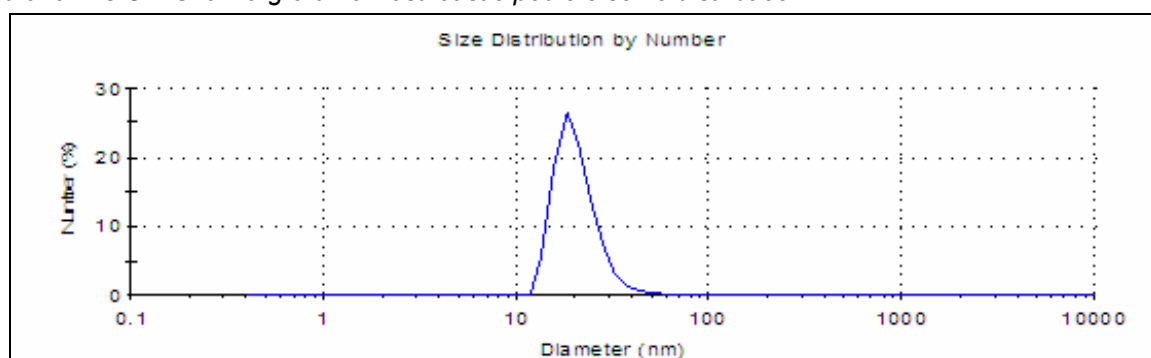
Obrázek 10-3 Ukázka grafu distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku



Obrázek 10-4 Ukázka grafu distribuce velikosti částic (v nm) podle objemu



Obrázek 10-5 Ukázka grafu velikosti částic podle číselné distribuce

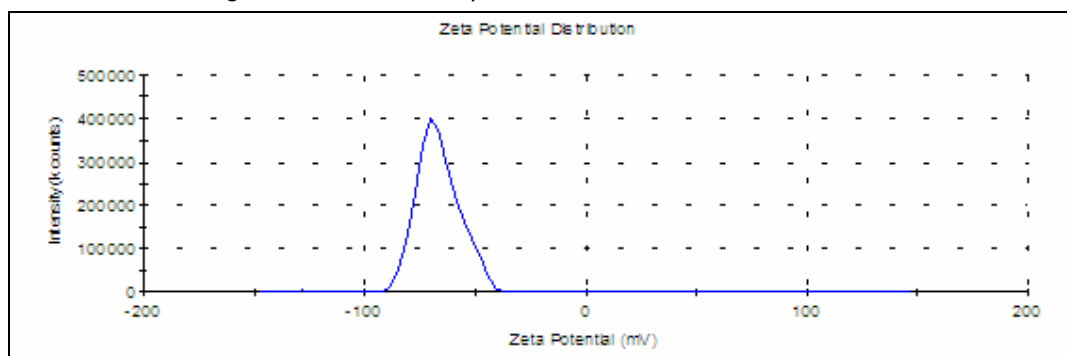


10.6 Měření zeta potenciálu částic

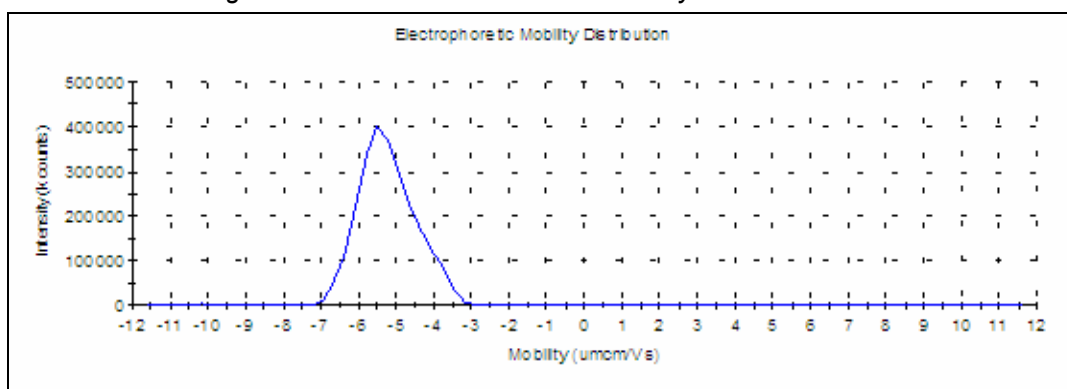
Zeta potenciál jsme měřili na Zetasizeru pro každý vzorek zvlášť, ze stejného vzorku jako velikost částic. Zetasizer zaznamenává výsledky a tyto údaje zpracovává a z výsledků sestruje zeta potenciálovou distribuci a distribuci elektroforetické mobility.

V případě grafu *Distribuce zeta potenciálu* je na ose X zobrazen zeta potenciál v mV a na ose Y je zobrazena intenzita. V grafu *Distribuce elektroforetické mobility* je na ose X zobrazena mobilita, na ose Y je zobrazena intenzita.

Obrázek 10-6 Ukázka grafu distribuce zeta potenciálu

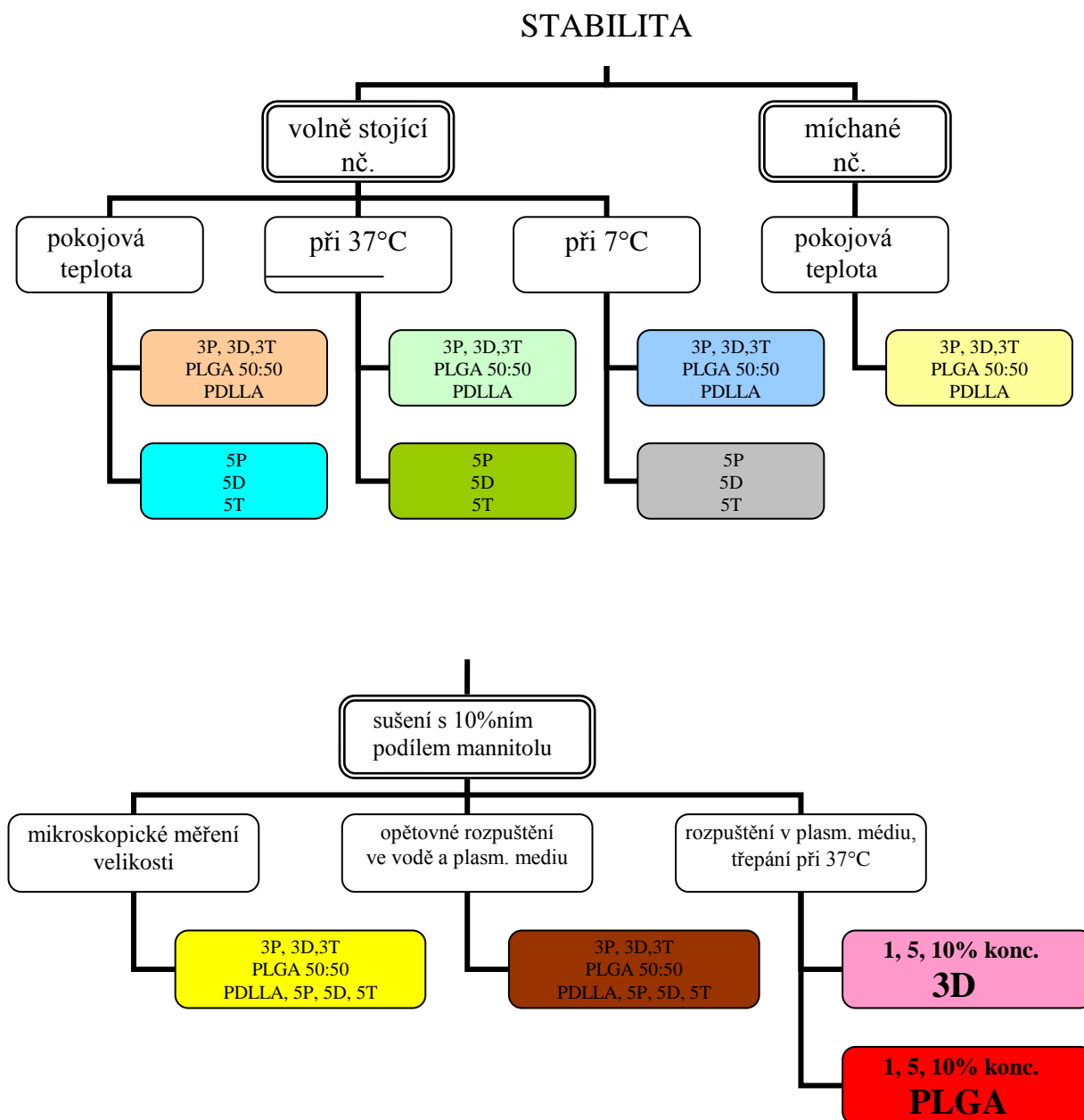


Obrázek 10-7 Ukázka grafu distribuce elektroforetické mobility



10.7 Schématické znázornění provedených pokusů a měření

Obrázek 10-8 Schématické znázornění provedených experimentů (z technických důvodů bylo nutné některá měření provádět opakovaně, proto jsou některé tabulky rozděleny do dvou částí)



10.8 Výsledky – tabulky, grafy a schémata

Výsledky jsou prezentovány v následujících tabulkách a jim odpovídajících grafech.

10.8.1 Sledování stability volně stojících částic za pokojové teploty

Připravené systémy s nanočásticemi jsme nechali volně stát (zakryté hliníkovou folií) za pokojové teploty a v různých časových intervalech jsme z nich odebírali vzorky, u nichž jsme měřili velikost a zeta-potenciál. Z technických důvodů jsme měření jednotlivých polymerů museli rozdělit do dvou serií. Proto se časy odběru všech vzorků neshodují.

Table 10-3 Závislost stability stojících nanočástic na čase za pokojové teploty (I. část)

PDI	0h	5h	19h	24h	29h
DB 3P	0,265	0,259	0,26	0,261	0,257
DB 3D	0,25	0,249	0,249	0,246	0,257
DB 3T	0,257	0,271	0,267	0,263	0,267
DB PLGA 50:50	0,275	0,269	0,273	0,257	0,264
DB PDLLA	0,27	0,269	0,315	0,263	0,267

	43h	50h	72h	96h	168h
DB 3P	0,302	0,251	0,255	0,26	0,34
DB 3D	0,27	0,244	0,266	0,254	0,272
DB 3T	0,261	0,265	0,276	0,272	0,345
DB PLGA 50:50	0,259	0,266	0,282	0,281	0,279
DB PDLLA	0,264	0,264	0,28	0,277	0,269

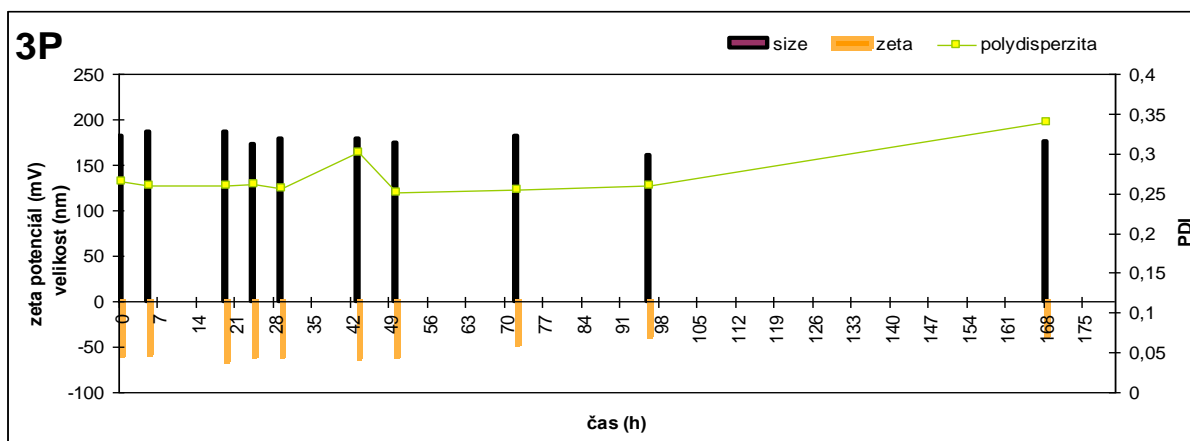
velikost [nm]	0h	5h	19h	24h	29h
DB 3P	182,2	187	186,8	172,4	178,9
DB 3D	183,4	183,4	180,6	179,3	190,1
DB 3T	197,1	190,7	186,4	189,8	183,1
DB PLGA 50:50	188,4	186,8	187,9	178,6	173,5
DB PDLLA	188,2	198,7	166,1	175,3	184,8

	43h	50h	72h	96h	168h
DB 3P	178,9	173,8	182	160,8	176
DB 3D	190,1	175,5	175,4	170,6	185
DB 3T	183,1	193,3	185,9	199,4	185,3
DB PLGA 50:50	173,5	182,8	181,9	184,4	169,5
DB PDLLA	184,8	176,8	179,2	187	185,3

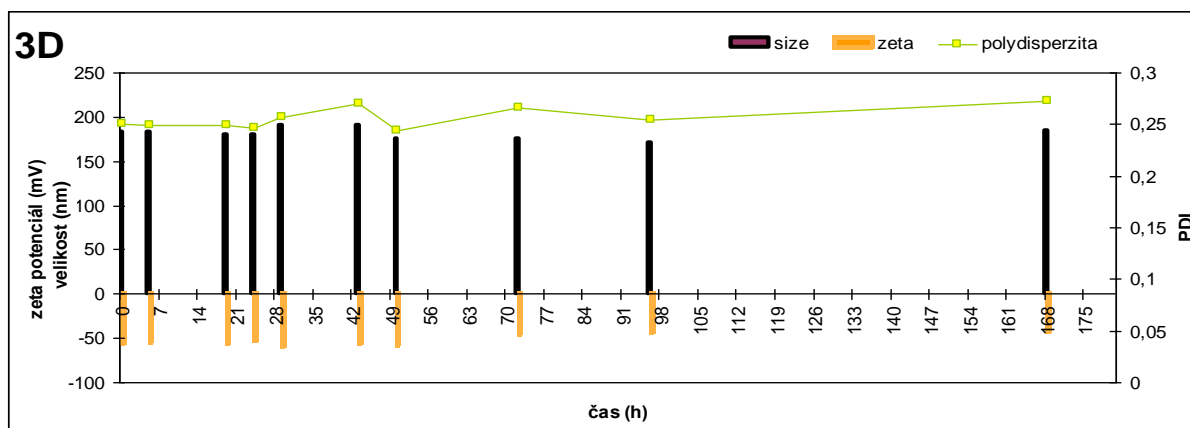
ζ-potenciál [mV]	0h	5h	19h	24h	29h
DB 3P	-58,39	-58,05	-65,2	-60,94	-61,34
DB 3D	-55,4	-54,71	-56,58	-53,25	-58,42
DB 3T	-60,34	-57,33	-60,15	-60,02	-62,76
DB PLGA 50:50	-58,49	-61,53	-57,24	-65,68	-60,32

DB PDLLA	-56,83	-61,45	-59,43	-55,44	-60,31
	43h	50h	72h	96h	168h
DB 3P	-62,78	-59,9	-46,36	-38,3	-38,41
DB 3D	-56,27	-57,03	-44,95	-43,97	-41,78
DB 3T	-62,07	-58,48	-56,79	-48,23	-49,06
DB PLGA 50:50	-51,88	-48,67	-44,84	-44,68	-39,81
DB PDLLA	-60,37	-51,07	-45,27	-53,44	-44,85

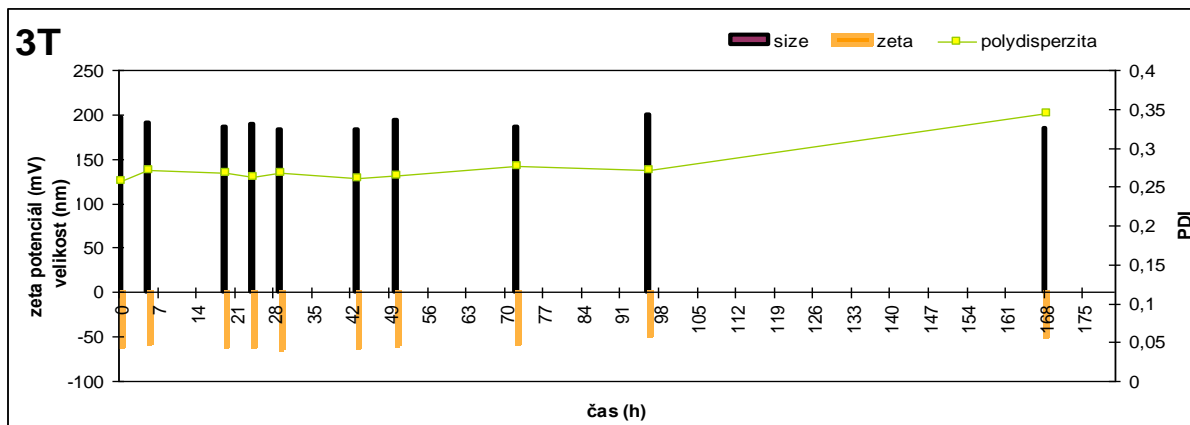
Obrázek 10-9 Závislost stability volně stojících 3P-nanočástic na čase za pokojové teploty



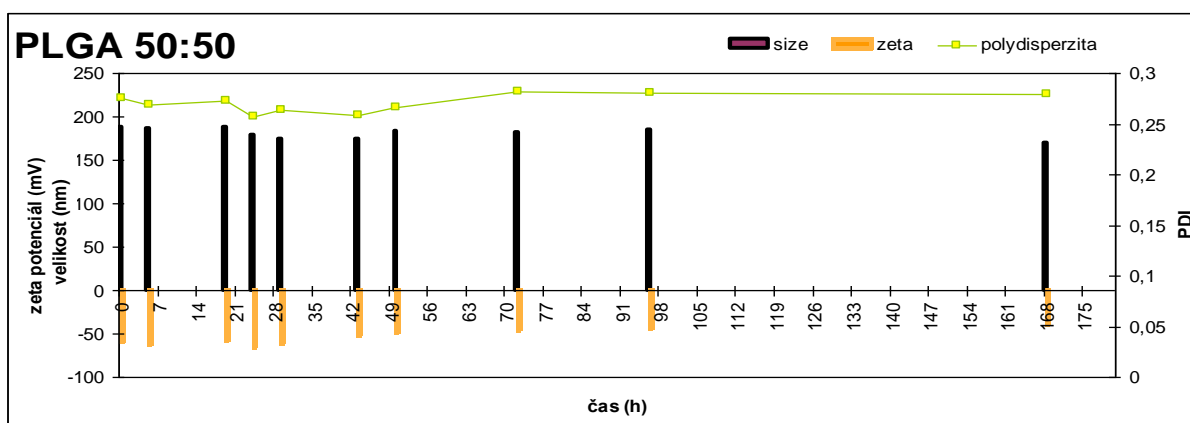
Obrázek 10-10 Závislost stability volně stojících 3D-nanočástic na čase za pokojové teploty



Obrázek 10-11 Závislost stability volně stojících 3T-nanočástic na čase za pokojové teploty



Obrázek 10-12 Závislost stability volně stojících PLGA 50:50-nanočástic na čase za pokojové teploty



Obrázek 10-13 Závislost stability volně stojících PDLLA-nanočástic na čase za pokojové teploty

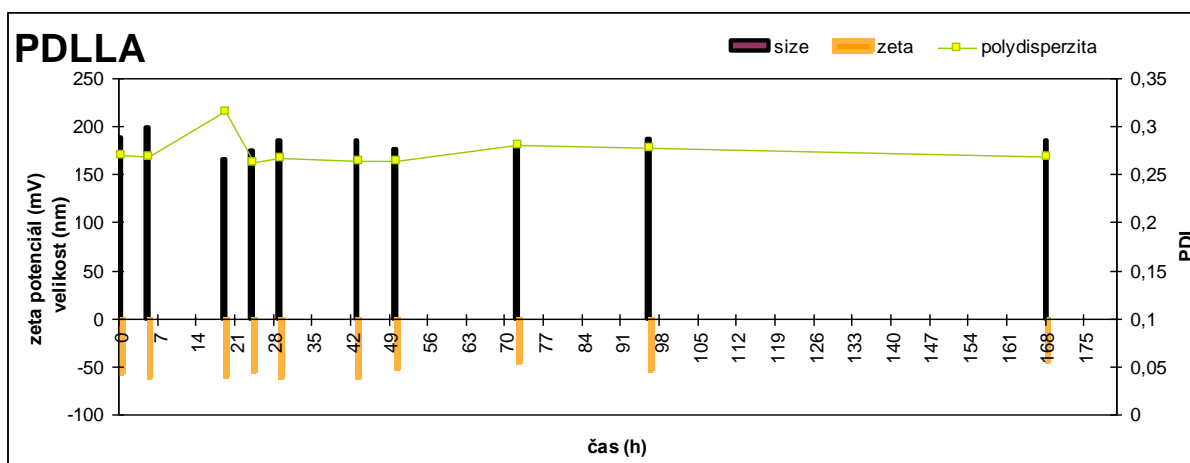


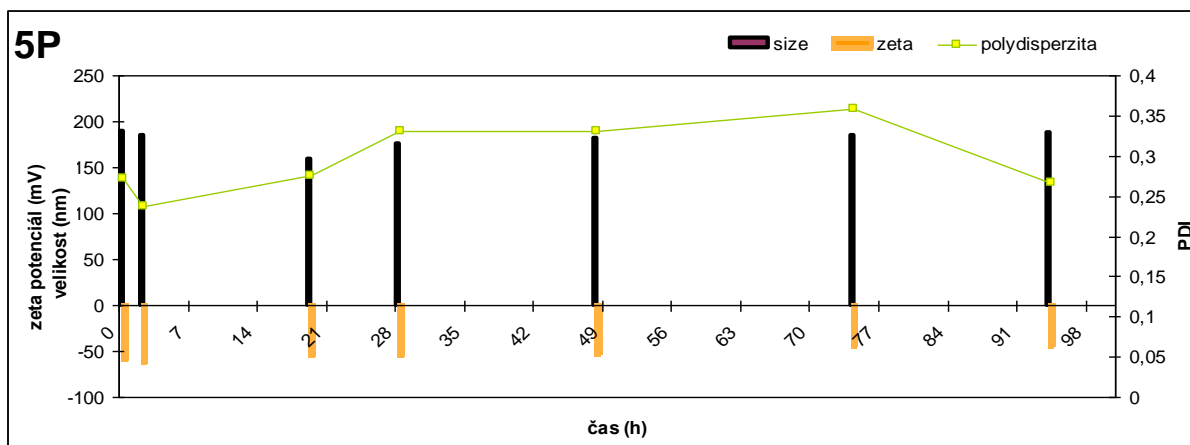
Table 10-4 Závislost stability volně stojících nanočástic na čase za pokojové teploty (II. část)

PDI	0h	2h	19h	28h	48h	74h	94h
DB 5P	0,272	0,238	0,276	0,331	0,331	0,359	0,266
DB 5D	0,316	0,318	0,281	0,257	0,261	0,313	0,427
DB 5T	0,255	0,25	0,259	0,254	0,264	0,266	0,368

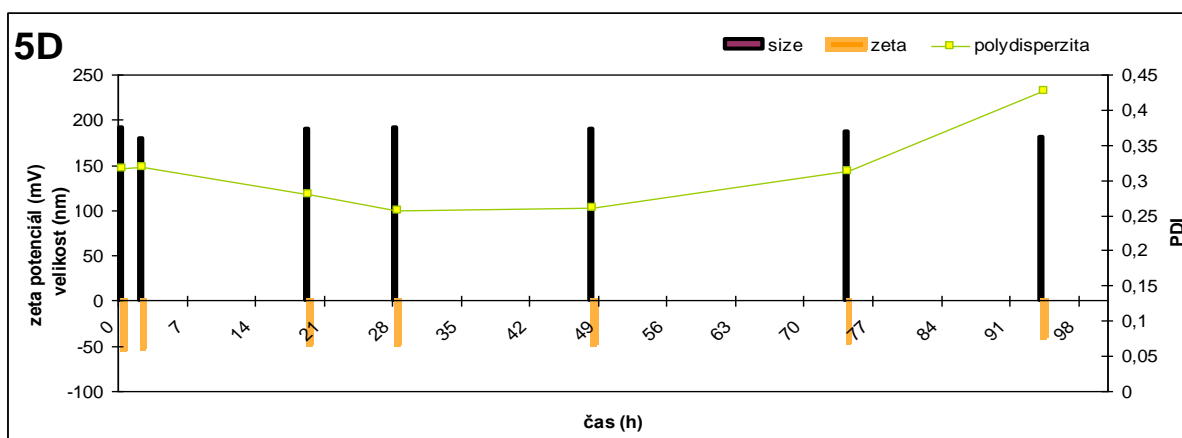
velikost [nm]	0h	2h	19h	28h	48h	74h	94h
DB 5P	189	185	159,7	175,9	181,7	185	187,6
DB 5D	191,2	179,1	190,3	191,1	189,4	187,3	181
DB 5T	189,6	178,7	192,4	193,2	193,1	195,8	182

ζ-potenciál [mV]	0h	2h	19h	28h	48h	74h	94h
DB 5P	-59,11	-62,48	-54,56	-54,8	-52,49	-44,16	-43,24
DB 5D	-53,77	-52,14	-47,51	-47,92	-47,02	-45,55	-39,93
DB 5T	-62,49	-62,26	-64,84	-55,16	-48,11	-41,23	-37,97

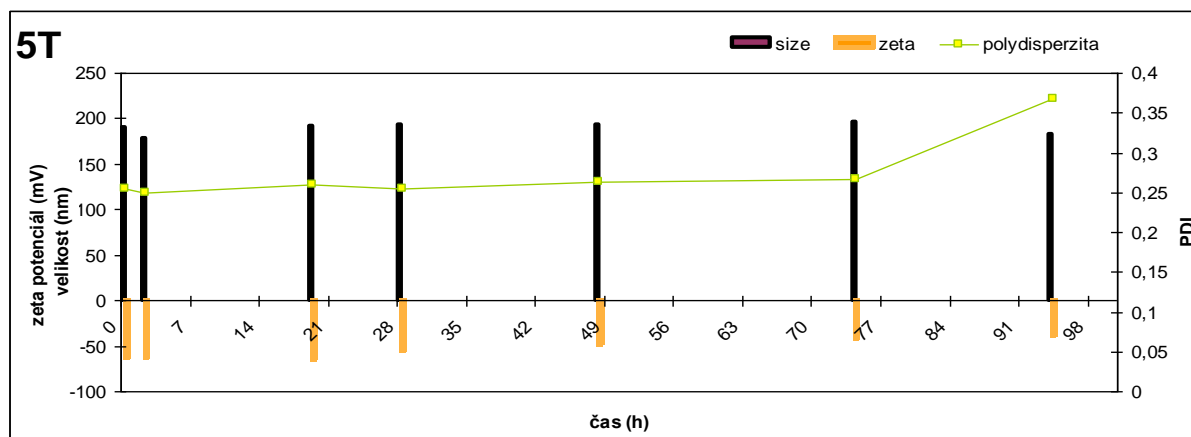
Obrázek 10-14 Závislost stability volně stojících 5P-nanočástic na čase za pokojové teploty



Obrázek 10-15 Závislost stability volně stojících 5D-nanočástic na čase za pokojové teploty



Obrázek 10-16 Závislost stability volně stojících 5T-nanočástic na čase za pokojové teploty



10.8.2 Sledování stability rotujících částic za pokojové teploty

V následující stati jsou shrnuty výsledky měření, kdy byly částice po celou dobu experimentu míchány na magnetické míchače za pokojové teploty.

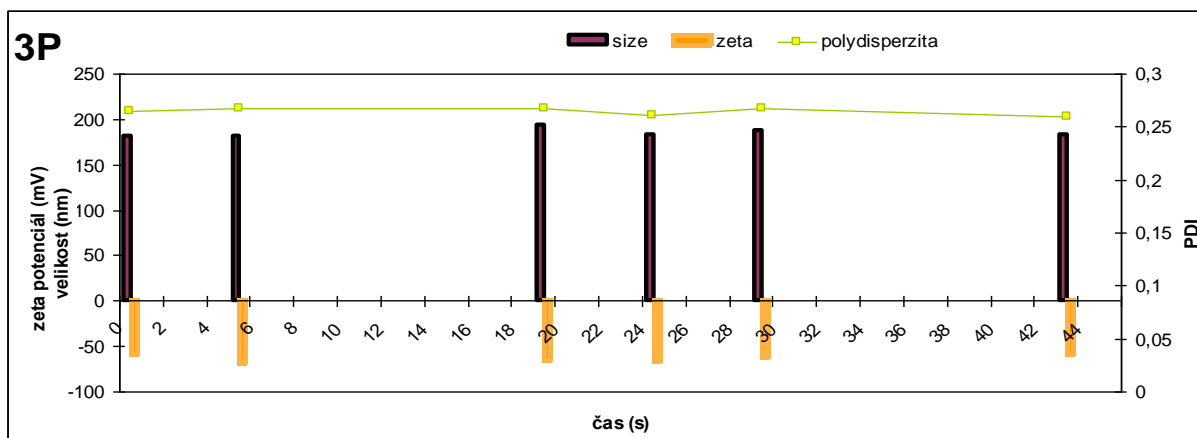
Table 10-5 Závislost stability rotujících nanočástic na čase za pokojové teploty

PDI	0h	5h	19h	24h	29h	43h
DB 3P	0,265	0,267	0,267	0,261	0,268	0,26
DB 3D	0,25	0,258	0,251	0,25	0,254	0,253
DB 3T	0,257	0,274	0,263	0,268	0,279	0,264
DB PLGA 50:50	0,275	0,271	0,269	0,263	0,267	0,269
DB PDLLA	0,27	0,282	0,274	0,28	0,27	0,275

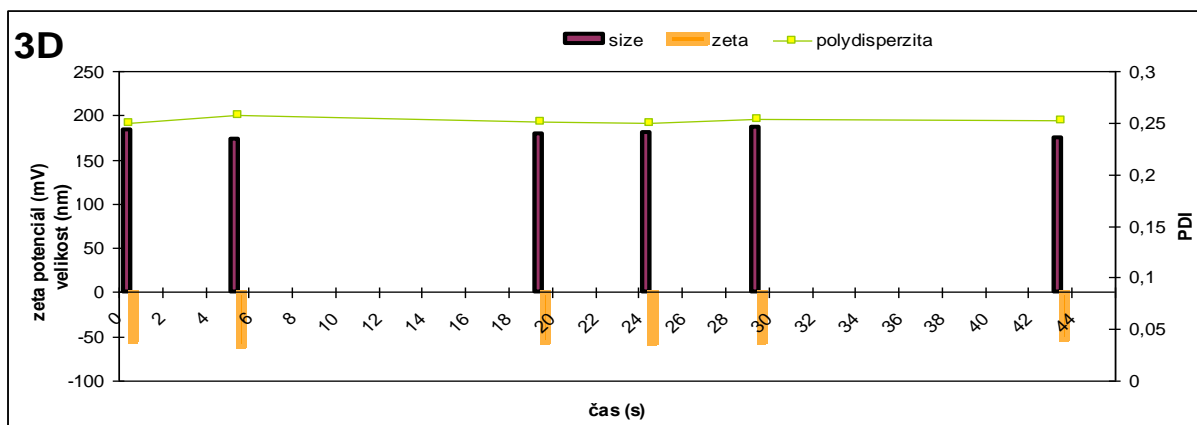
velikost [nm]	0h	5h	19h	24h	29h	43h
DB 3P	182,2	181,3	194,4	183,1	187,5	182,6
DB 3D	183,4	174,1	179,3	181,3	187,2	174,9
DB 3T	197,1	181,2	197,3	202,4	183,6	202,1
DB PLGA 50:50	188,4	182,7	186,5	177,3	189,6	178,5
DB PDLLA	188,2	203,3	198,4	181,4	179,3	196,2

ζ-potenciál [mV]	0h	5h	19h	24h	29h	43h
DB 3P	-58,39	-67,46	-64,41	-66,09	-61,56	-58,23
DB 3D	-55,4	-60,92	-56,19	-58,4	-57,02	-53,79
DB 3T	-60,34	-64,44	-59,72	-62,61	-63,87	-61,6
DB PLGA 50:50	-58,49	-65,69	-53,39	-61,04	-58,88	-45,36
DB PDLLA	-56,83	-62,25	-59,46	-60,32	-62,97	-53,25

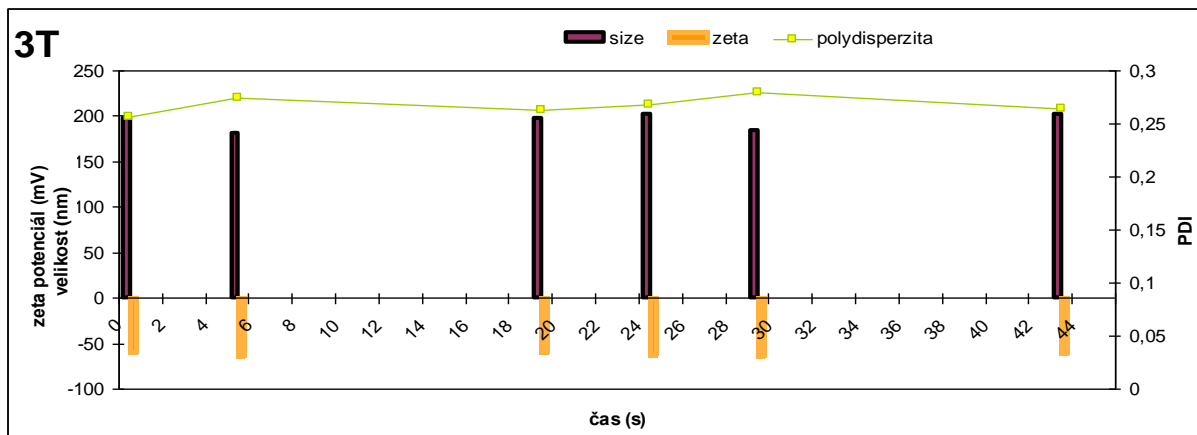
Obrázek 10-17 Závislost stability rotujících 3P-nanočástic na čase za pokojové teploty



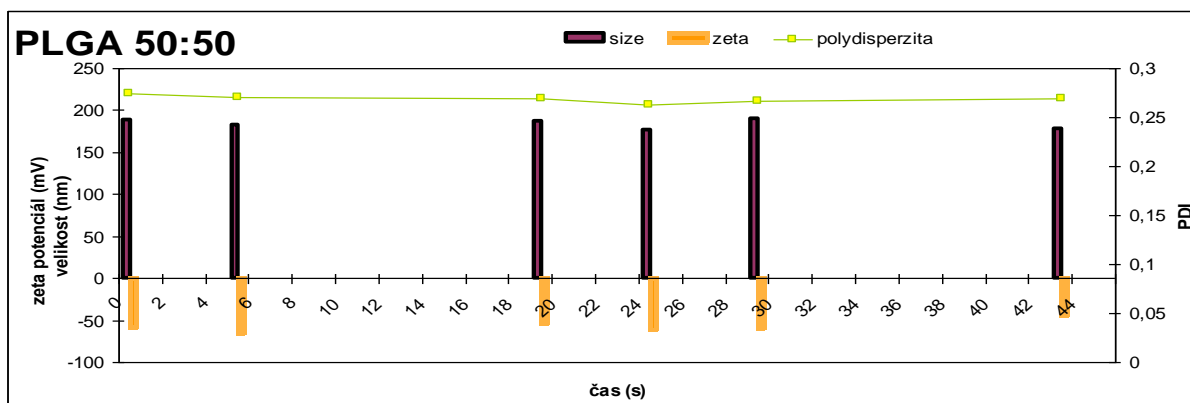
Obrázek 10-18 Závislost stability rotujících 3D-nanočástic na čase za pokojové teploty



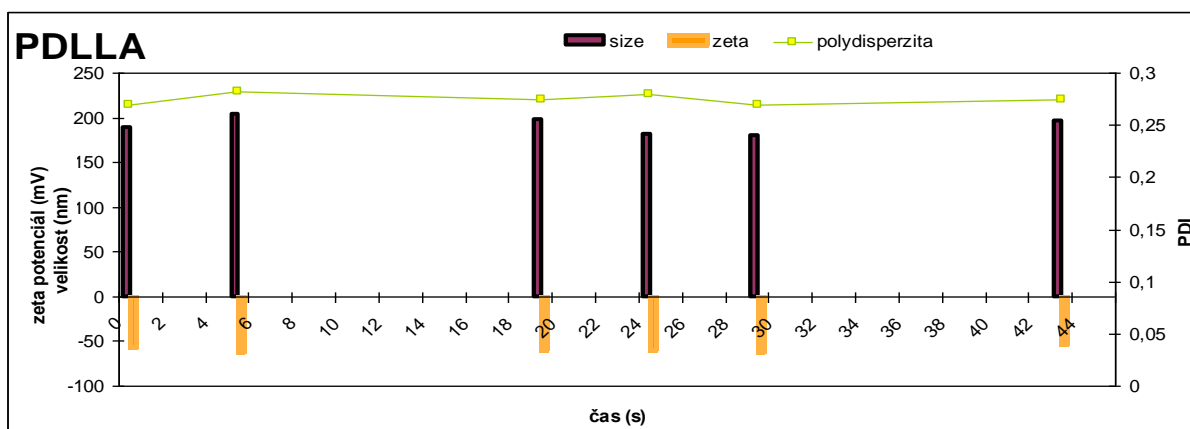
Obrázek 10-19 Závislost stability rotujících 3T-nanočástic na čase za pokojové teploty



Obrázek 10-20 Závislost stability rotujících PLGA 50:50-nanočástic na čase za pokojové teploty



Obrázek 10-21 Závislost stability rotujících PDLLA-nanočástic na čase za pokojové teploty



10.8.3 Sledování stability volně stojících částic za zvýšené teploty

V následující stati jsou shrnuty výsledky měření, kdy byly částice po celou dobu experimentu inkubovány při 37°C.

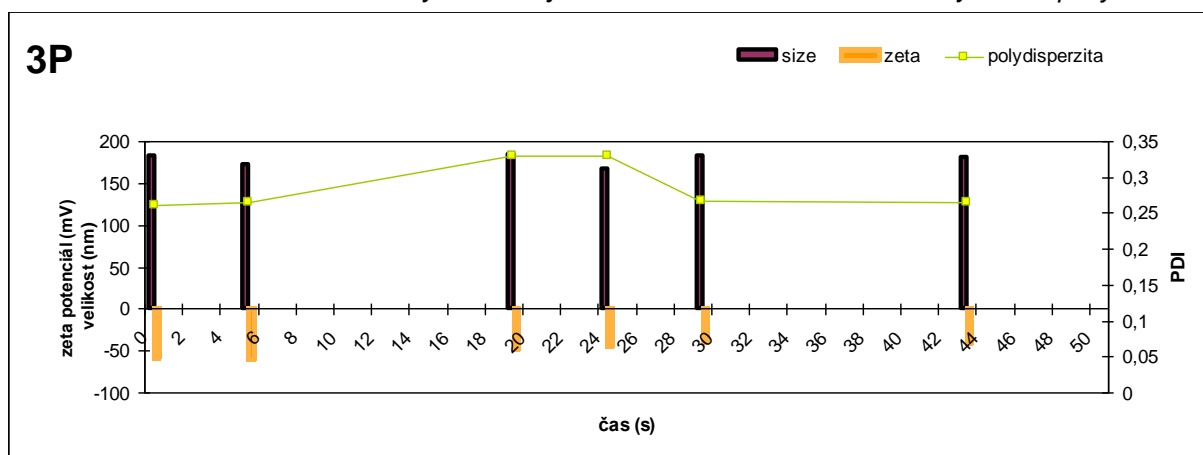
Table 10-6 Závislost stability stojících nanočástic na čase za zvýšené teploty (37°C) (I. část)

PDI	0h	5h	24h	29h	52h	120h
DB 3P	0,26	0,265	0,329	0,329	0,268	0,265
DB 3D	0,253	0,252	0,25	0,25	0,35	0,264
DB 3T	0,264	0,266	0,279	0,279	0,291	0,28
DB PLGA 50:50	0,269	0,274	0,272	0,272	0,27	0,278
DB PDLLA	0,275	0,269	0,275	0,275	0,324	0,284

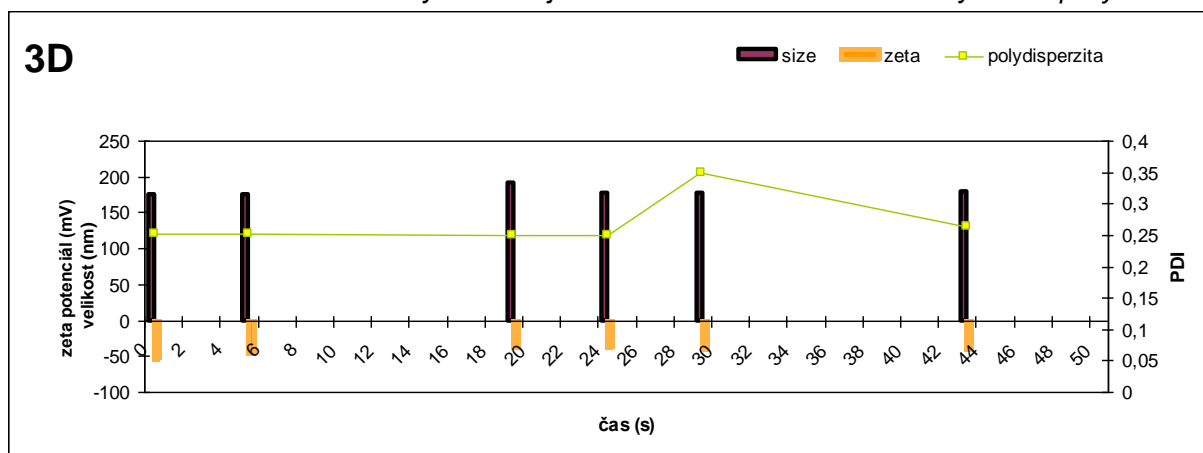
velikost [nm]	0h	5h	24h	29h	52h	120h
DB 3P	182,6	172,7	183,8	167,1	182,7	180,9
DB 3D	174,9	174,4	190,6	176,9	177,9	178,2
DB 3T	202,1	190,1	188,3	184,4	190,7	187,1
DB PLGA 50:50	178,5	174,1	179,2	200	167,1	161,5
DB PDLLA	196,2	187,1	190,3	179,8	183,5	190,3

ζ-potenciál [mV]	0h	5h	24h	29h	52h	120h
DB 3P	-58,23	-59,34	-47,14	-44,69	-38,85	-41,88
DB 3D	-53,79	-44,95	-36,58	-36,52	-39,52	-40,12
DB 3T	-61,6	-50,85	-45,43	-49,22	-38,88	-36,62
DB PLGA 50:50	-45,36	-34,14	-29,66	-36,84	-33,24	-36,73
DB PDLLA	-53,25	-43,49	-38,88	-38,64	-42,76	-43,92

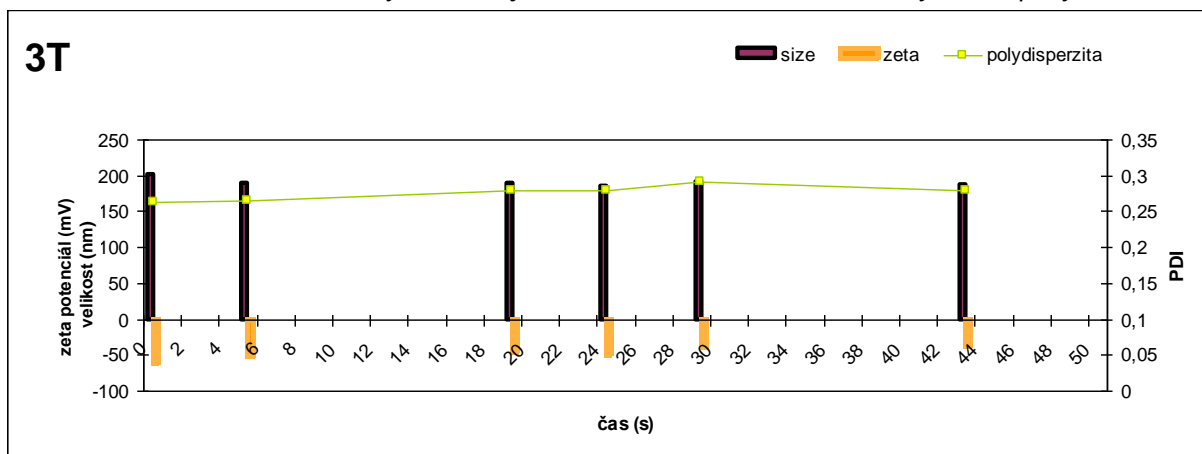
Obrázek 10-22 Závislost stability volně stojících 3P-nanočástic na čase za zvýšené teploty



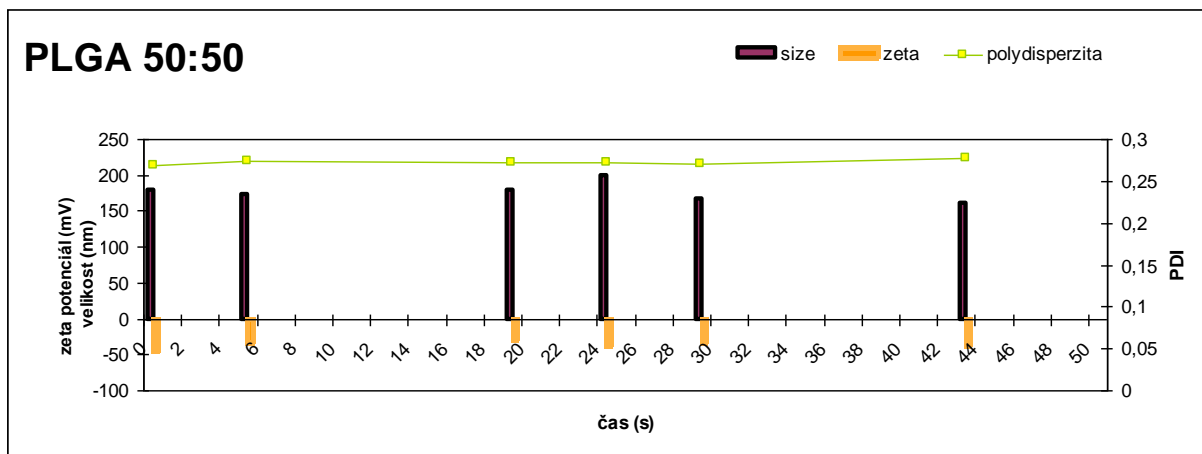
Obrázek 10-23 Závislost stability volně stojících 3D-nanočástic na čase za zvýšené teploty



Obrázek 10-24 Závislost stability volně stojících 3T-nanočástic na čase za zvýšené teploty



Obrázek 10-25 Závislost stability volně stojících PLGA 50:50-nanočástic na čase za zvýšené teploty



Obrázek 10-26 Závislost stability volně stojících PDLLA-nanočástic na čase za zvýšené teploty

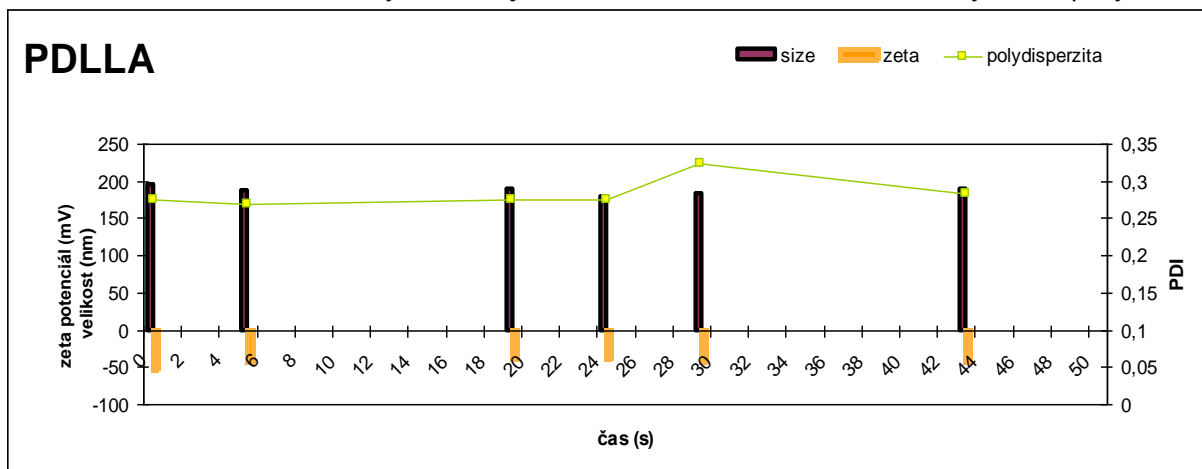


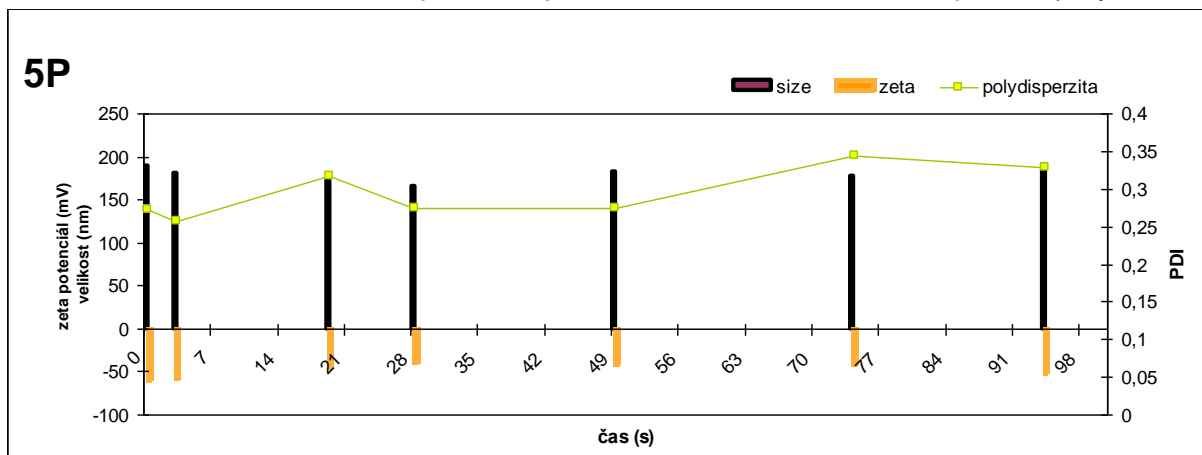
Table 10-7 Závislost stability stojících nanočástic na čase za zvýšené teploty (37 °C) (II. část)

PDI	0h	3h	19h	28h	49h	74h	94h
DB 5P	0,272	0,257	0,317	0,275	0,275	0,343	0,329
DB 5D	0,316	0,254	0,336	0,265	0,257	0,34	0,271
DB 5T	0,255	0,253	0,298	0,257	0,372	0,261	0,302

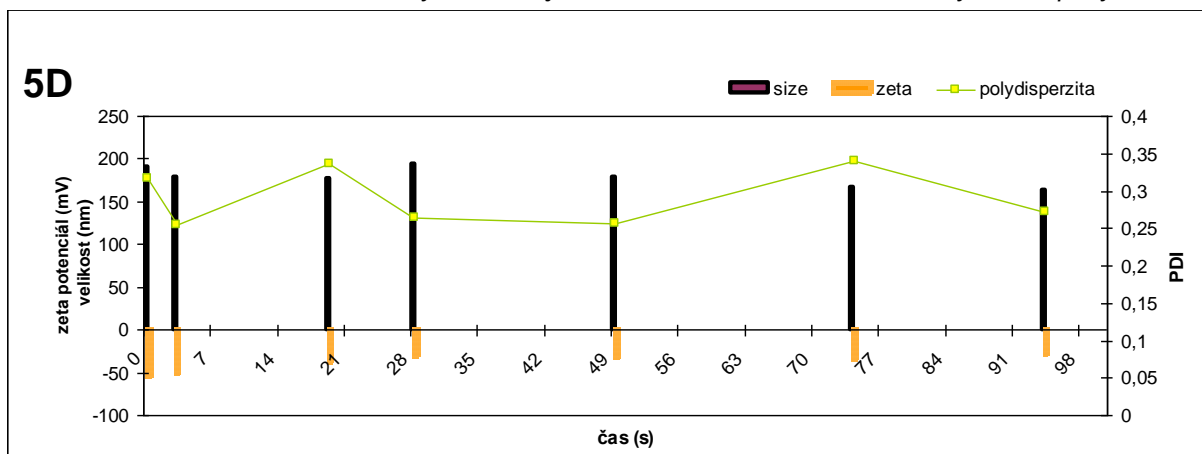
velikost [nm]	0h	3h	19h	28h	49h	74h	94h
DB 5P	189	181,3	171,9	164,7	182,7	178,1	190,2
DB 5D	191,2	178,4	176,8	194,6	179,3	166	163,9
DB 5T	189,6	170,1	207,6	190	192,4	189	178,2

ζ-potenciál [mV]	0h	3h	19h	28h	49h	74h	94h
DB 5P	-59,11	-57,25	-44,94	-39,38	-40,27	-40,63	-50,14
DB 5D	-53,77	-51,02	-37,74	-31,01	-32,65	-33,67	-29,39
DB 5T	-62,49	-57,86	-47,03	-39,76	-43,14	-45,4	-49,83

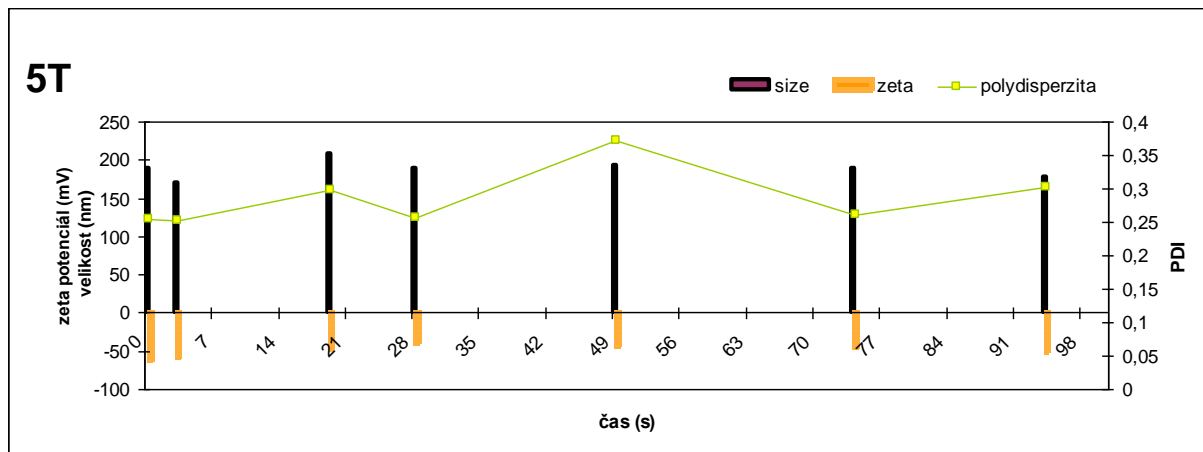
Obrázek 10-27 Závislost stability volně stojících 5P-nanočástic na čase za zvýšené teploty



Obrázek 10-28 Závislost stability volně stojících 5D-nanočástic na čase za zvýšené teploty



Obrázek 10-29 Závislost stability volně stojících 5T-nanočástic na čase za zvýšené teploty



10.8.4 Sledování stability volně stojících částic za snížené teploty

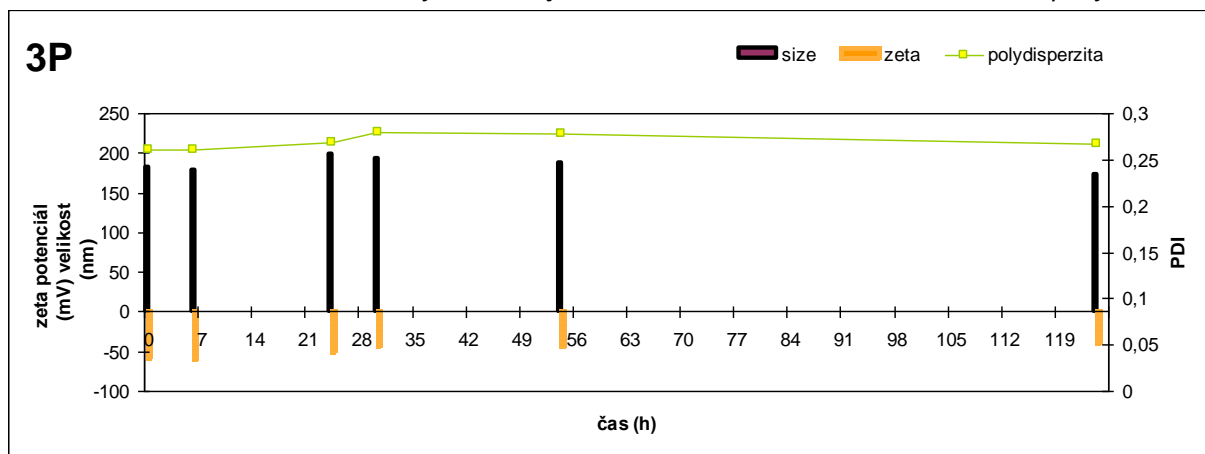
Table 10-8 Závislost stability volně stojících nanočástic na čase za snížené teploty (7°C) (I. část)

PDI	0h	6h	24h	30h	54h	124h
DB 3P	0,26	0,261	0,269	0,279	0,278	0,267
DB 3D	0,253	0,256	0,249	0,264	0,394	0,337
DB 3T	0,264	0,267	0,271	0,271	0,288	0,288
DB PLGA 50:50	0,269	0,342	0,274	0,363	0,282	0,276
DB PDLLA	0,275	0,273	0,322	0,275	0,341	0,365

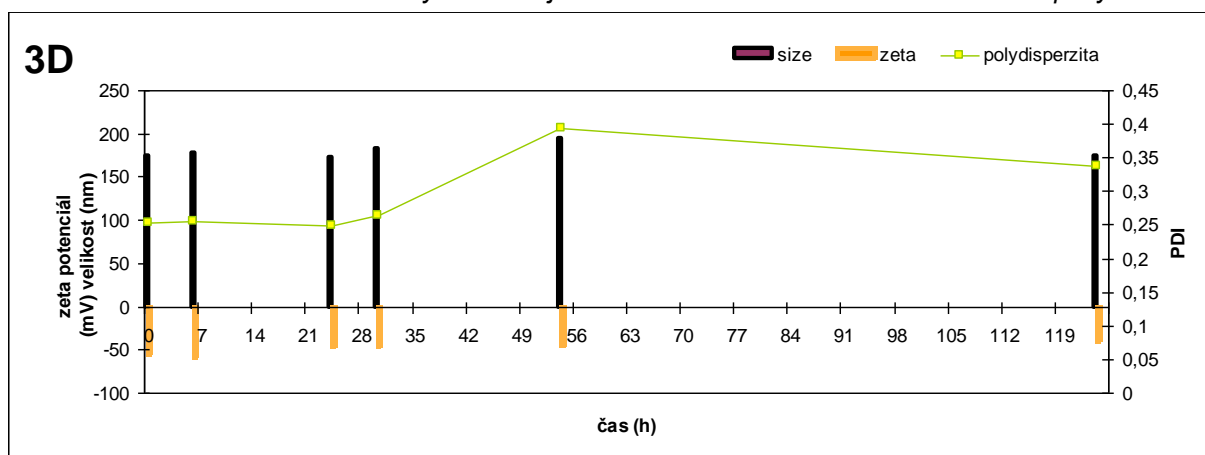
velikost [nm]	0h	6h	24h	30h	54h	124h
DB 3P	182,6	177,7	198,7	193,1	186,8	173,3
DB 3D	174,9	177	172,8	183,3	194,4	173,9
DB 3T	202,1	183,5	197,5	182,4	192,6	185,8
DB PLGA 50:50	178,5	162,8	180,8	168,3	167,1	172,6
DB PDLLA	196,2	184,3	175,1	194,8	174,3	179,5

ζ-potenciál [mV]	0h	6h	24h	30h	54h	124h
DB 3P	-58,23	-59,95	-50,98	-42,64	-43,29	-39,19
DB 3D	-53,79	-57,45	-45,48	-46,98	-44,39	-39,08
DB 3T	-61,6	-64,96	-52,16	-49,73	-44,74	-36,78
DB PLGA 50:50	-45,36	-44,44	-41,64	-39,87	-41,49	-39,31
DB PDLLA	-53,25	-52,33	-44,64	-48,63	-44,34	-43,3

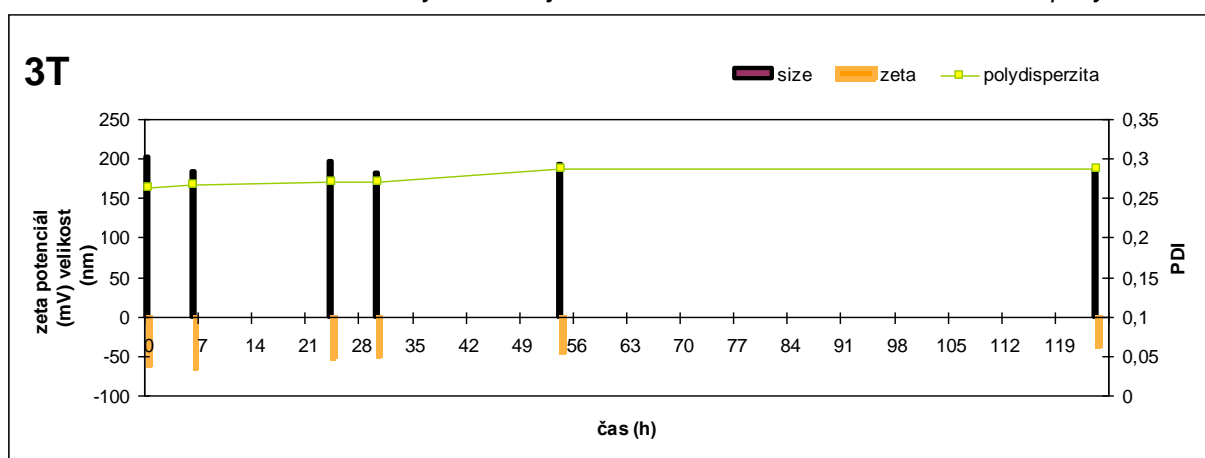
Obrázek 10-30 Závislost stability volně stojících 3P-nanočástic na čase za snížené teploty



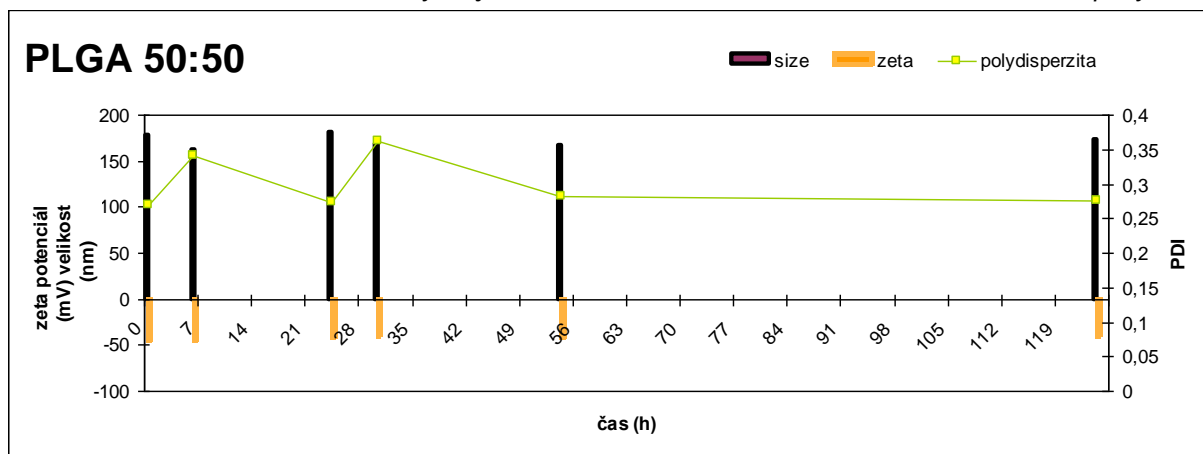
Obrázek 10-31 Závislost stability volně stojících 3D-nanočástic na čase za snížené teploty



Obrázek 10-32 Závislost stability volně stojících 3T-nanočástic na čase za snížené teploty



Obrázek 10-33 Závislost stability stojících PLGA 50:50-nanočástic na čase za snížené teploty



Obrázek 10-34 Závislost stability volně stojících PDLLA-nanočástic na čase za snížené teploty

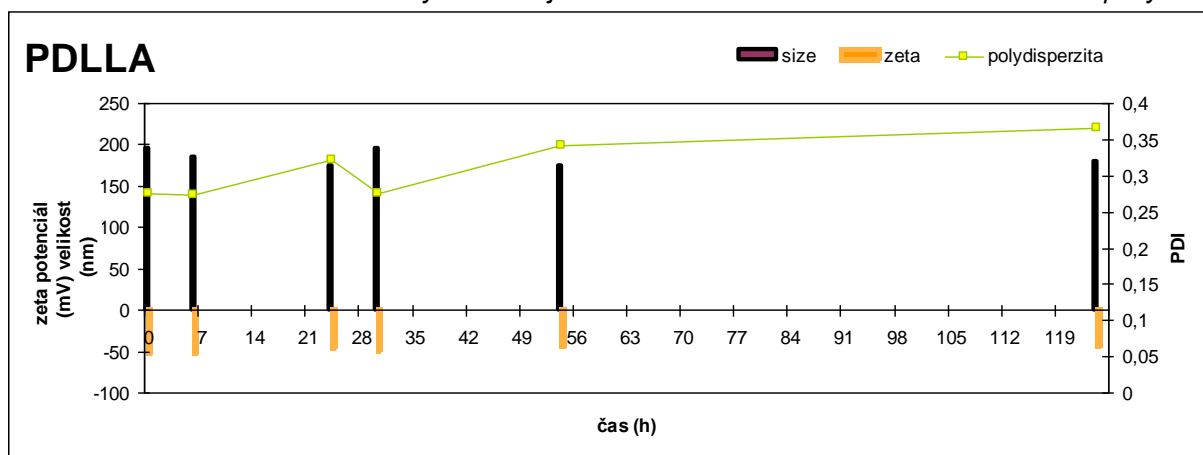


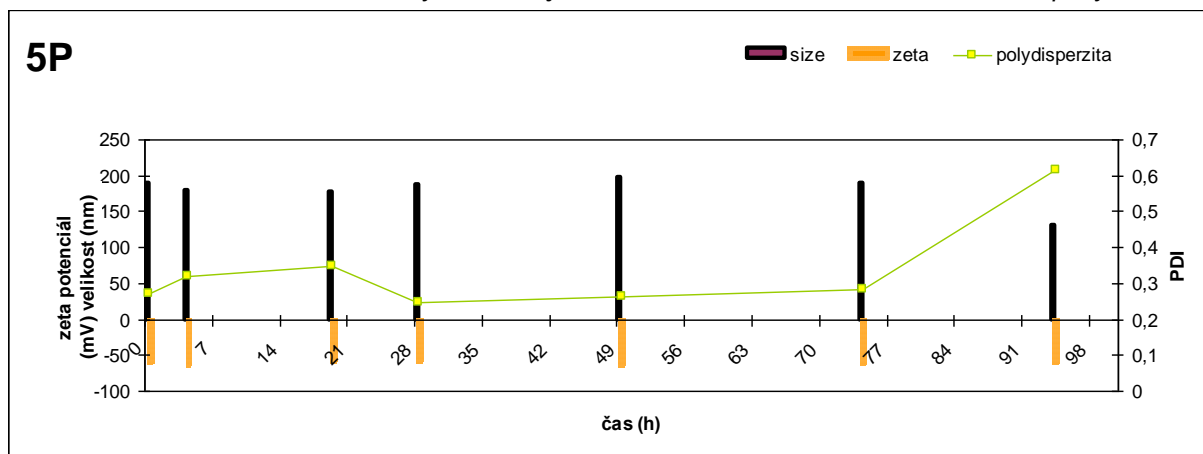
Table 10-9 Závislost stability volně stojících nanočástic na čase za snížené teploty (7°C) (II. část)

PDI	0h	4h	19h	28h	49h	74h	94h
DB 5P	0,272	0,318	0,347	0,246	0,262	0,283	0,617
DB 5D	0,316	0,332	0,26	0,255	0,252	0,259	0,254
DB 5T	0,255	0,249	0,255	0,265	0,248	0,488	0,243

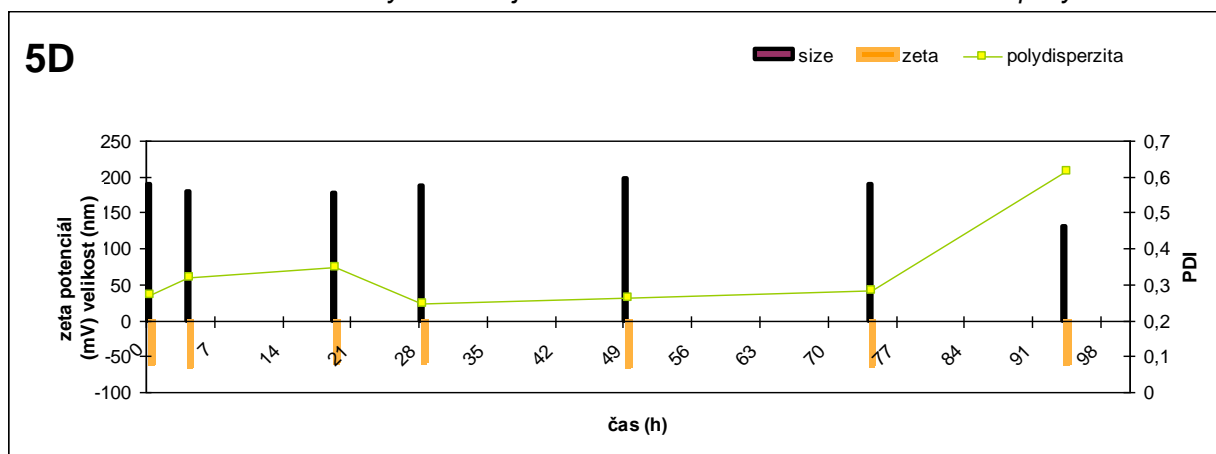
velikost [nm]	0h	4h	19h	28h	49h	74h	94h
DB 5P	189	178,7	176,4	187,3	196,7	188,3	131,4
DB 5D	191,2	180,4	189,2	188,9	181,9	189,6	183,8
DB 5T	189,6	185,6	183,9	191,3	195,3	253,5	192,5

ζ-potenciál [mV]	0h	4h	19h	28h	49h	74h	94h
DB 5P	-59,11	-62,8	-56,97	-58,25	-63,53	-61,67	-60,47
DB 5D	-53,77	-50,19	-49,65	-49,3	-52,53	-53,06	-51,01
DB 5T	-62,49	-63,15	-61,26	-56,98	-64,43	-63,7	-54,9

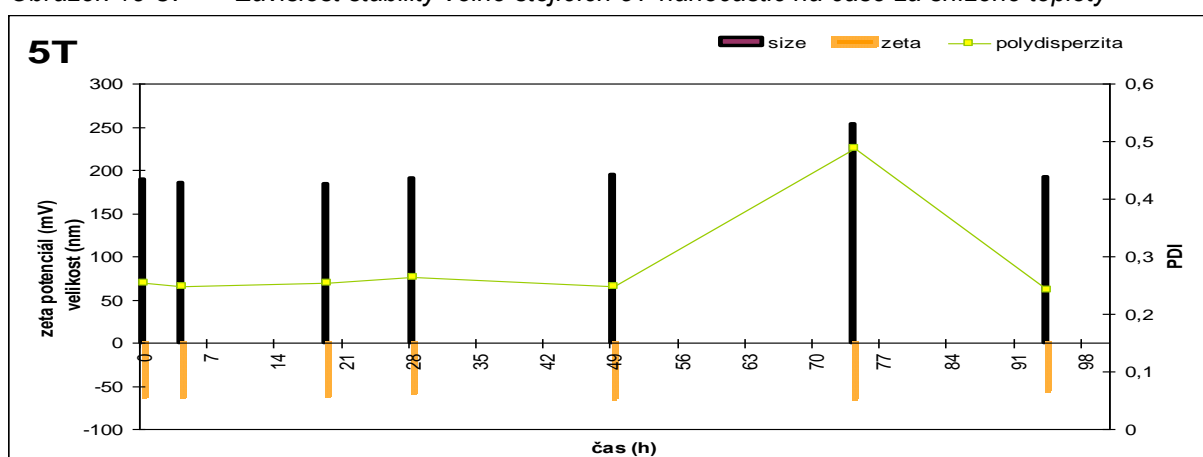
Obrázek 10-35 Závislost stability volně stojících 5P-nanočástic na čase za snížené teploty



Obrázek 10-36 Závislost stability volně stojících 5D-nanočástic na čase za snížené teploty



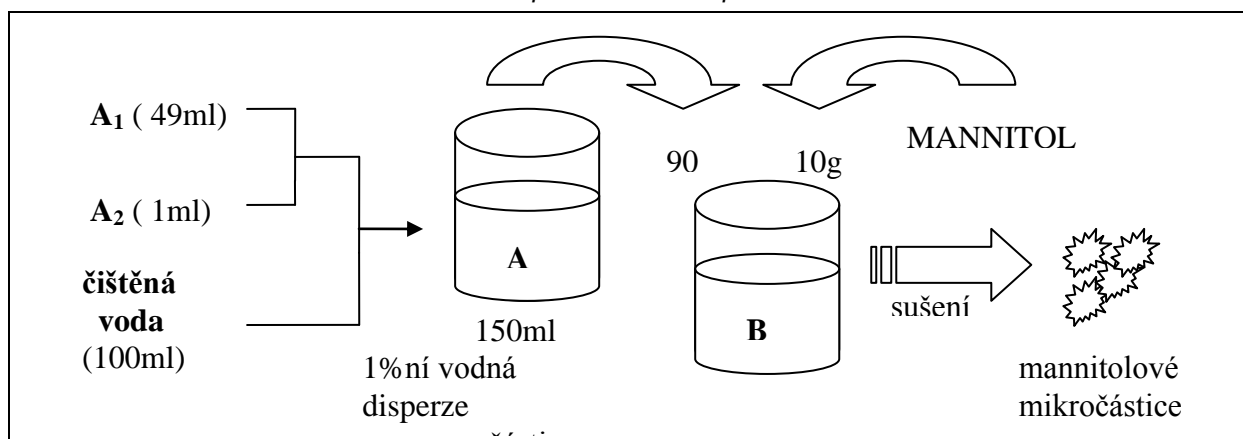
Obrázek 10-37 Závislost stability volně stojících 5T-nanočástic na čase za snížené teploty



10.8.5 Měření velikosti sušených mannitolových mikročástic

Dle výše uvedeného postupu jsme ve vodném roztoku připravili nanočástice. Do disperze pak byl přidán mannitol, a tato disperze byla následně sušena.

Obrázek 10-38 Schématické znázornění provedeného experimentu



Roztok A: 0.75 % lecitin + 0.25% polysorbát + 1% polymer v DCM

Table 10-10 Roztok A₁ (0.75 % lecitin + 0.25% PSO)

Látka	Množství
Lecitin	0,375 g
Polysorbát	0,125g
Čistěná voda	49,50 g

Table 10-11 Roztok A₂ (1% polymeru v DCM)

Látka	Množství
Polymer	0,05 g
DCM	4,95 g

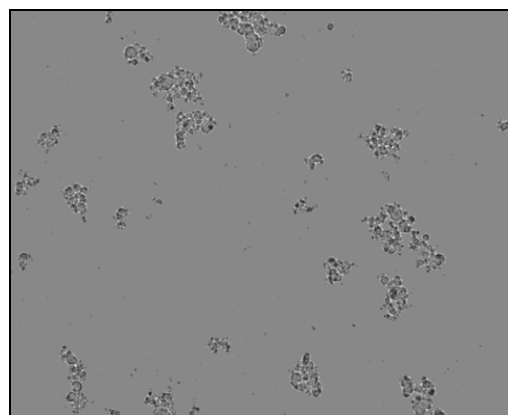
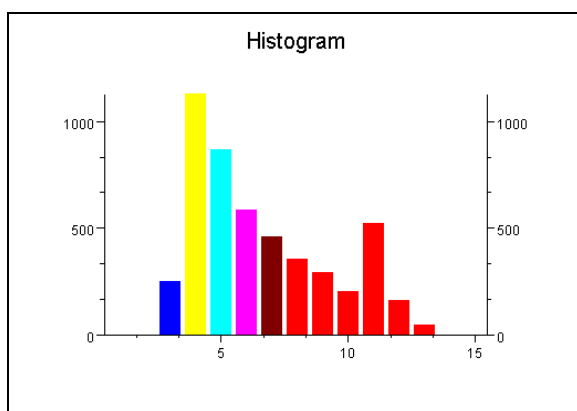
Table 10-12 Statistické funkce charakterizující průměr sušených mannitolových mikročástic (jejich hodnoty jsou uvedeny v mikrometrech)

	3P	3D	3T	PLGA 50:50	PDLLA	5P	5D	5T
Min. průměr:	2,52	2,47	2,47	2,47	2,59	2,50	2,47	2,50
Max. průměr:	31,38	31,60	35,45	25,66	44,28	28,33	40,23	16,00
Střední průměr:	6,53	6,22	4,77	5,41	6,46	5,13	5,67	4,59
Směrodatná odchylka:	3,75	3,43	2,01	2,58	3,04	2,26	2,68	1,54
Medián velikosti:	5,29	5,17	4,23	4,67	5,56	4,47	4,95	4,24

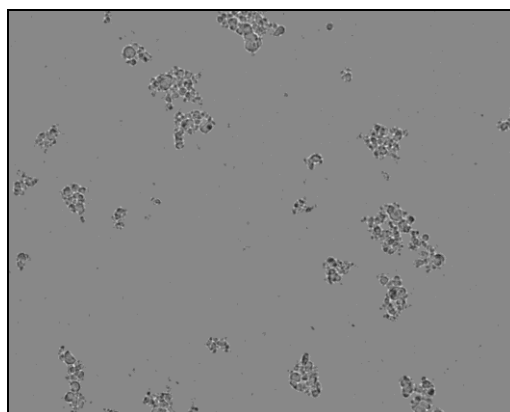
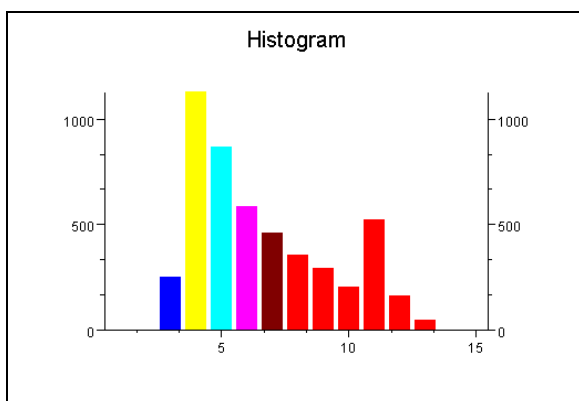
Table 10-13 Hodnoty histogramu

ID Class	rozsah velikosti		množství spočítaných částic							
	od (μm)	do (μm)	3P	3D	3T	PLGA 50:50	PDLLA	5P	5D	5T
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2	3	248	652	526	646	63	504	319	426
4	3	4	1129	2321	2169	1677	846	1947	1167	1548
5	4	5	865	2015	1592	1278	1405	1409	1013	1330
6	5	6	584	1382	863	853	1073	837	695	728
7	6	7	461	1080	469	559	751	653	590	292
8	7	8	353	836	259	453	531	357	334	187
9	8	9	291	587	161	332	386	236	288	105
10	9	10	206	488	100	238	259	157	167	48
11	10	15	523	883	146	293	517	227	307	43
12	15	20	161	219	7	41	109	21	30	1
13	20	30	47	82	0	8	28	4	5	0
14	30	50	2	2	4	0	1	0	4	0
15	50	70	0	0	0	0	0	0	0	0

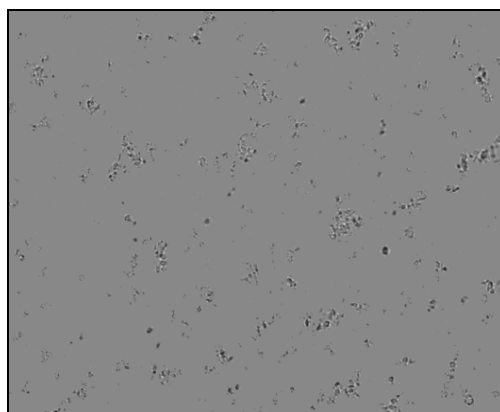
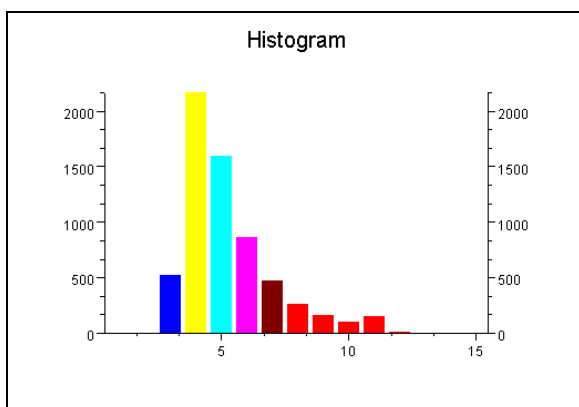
Obrázek 10-39 Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 3P-10%mannitol



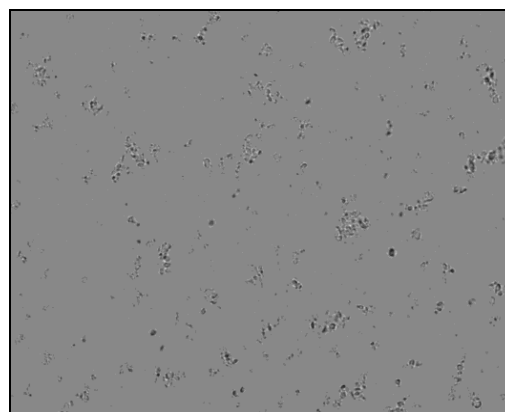
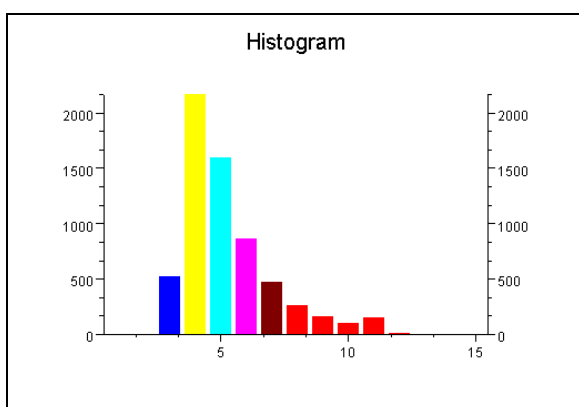
Obrázek 10-40 Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 3D-10% mannitol



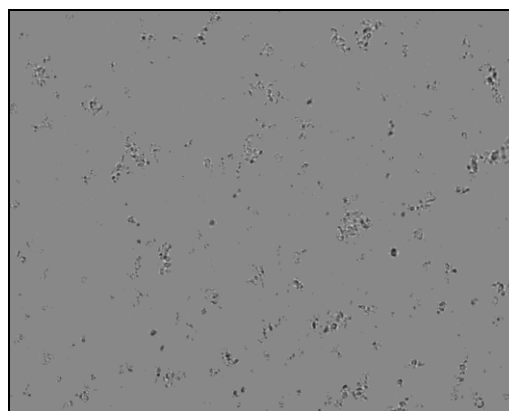
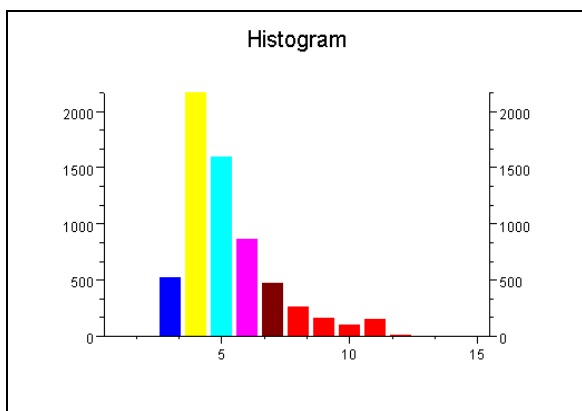
Obrázek 10-41 Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 3T-10% mannitol



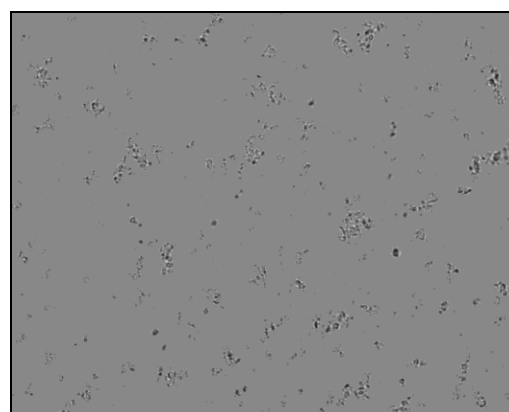
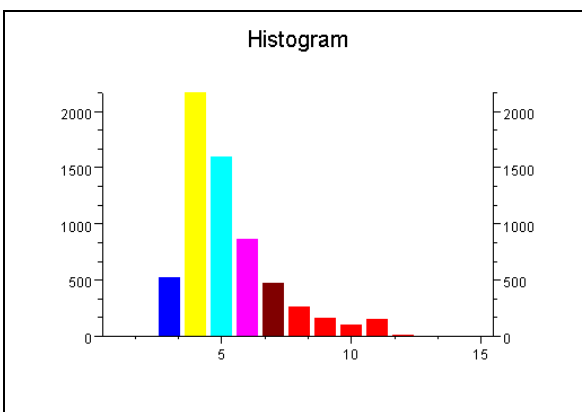
Obrázek 10-42 Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice PLGA 50:50-10% mannitol



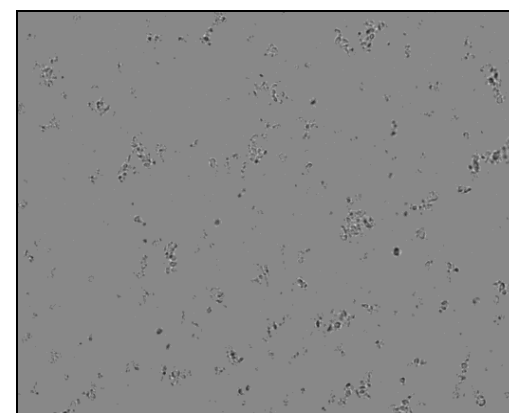
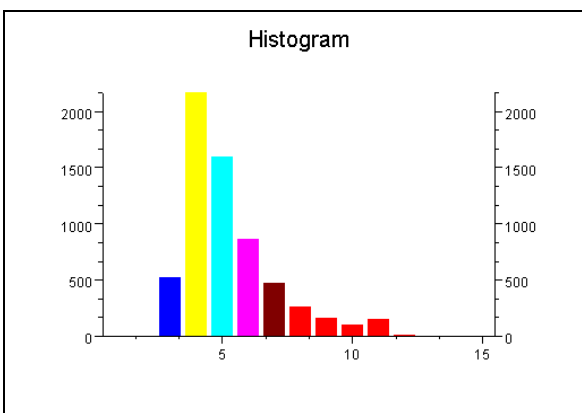
Obrázek 10-43 *Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice PDLLA 50:50-10% mannitol*



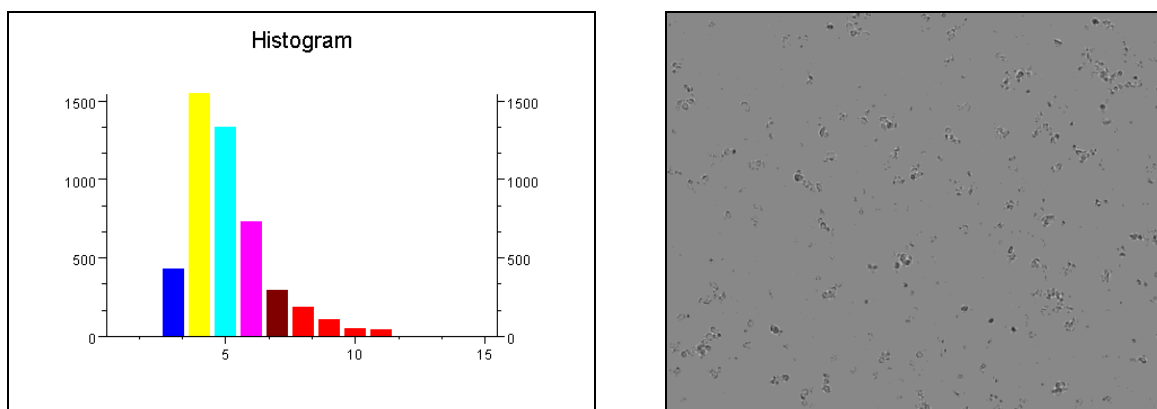
Obrázek 10-44 *Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 5P-10% mannitol*



Obrázek 10-45 *Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 5D-10% mannitol*



Obrázek 10-46 Histogram a fotografie znázorňující sušené mikročástice 5T-10% mannitol



10.8.6 Vliv sušení na velikost nanočástic

Manitolové mikročástice (quantum satis) jsme paralelně rozpustili za pokojové teploty ve vodném roztoku a plasmatickém médiu a změřili jsme velikost a zeta potenciál polymerních nanočástic. V případě plasmatického média však zeta-potenciál měřit nebylo možné, neboť v roztoku docházelo k redukčně-oxidačním procesům ostatních přítomných složek.

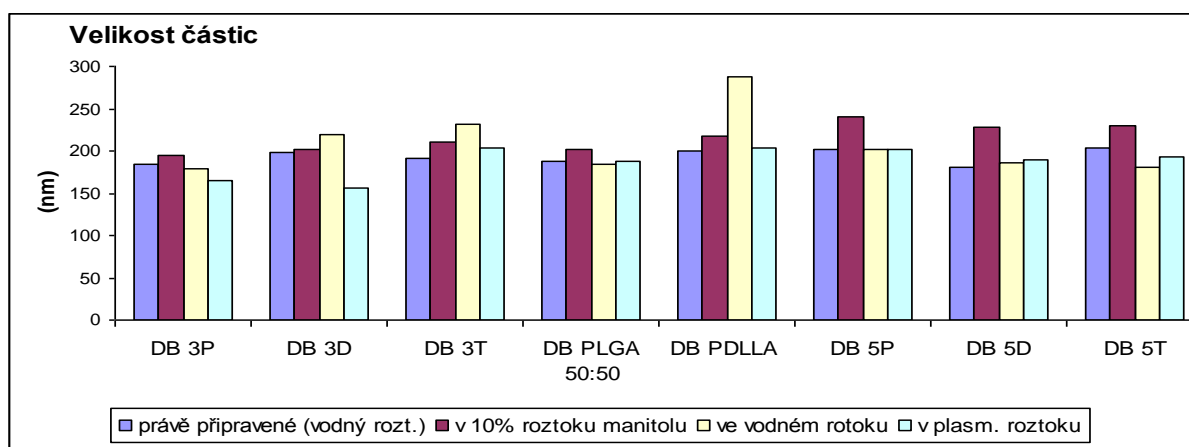
Table 10-12 Nanočástice polymer-10% mannitol, před sušením

	před sušením					
	právě připravené (vodná disperze)			v 10% roztoku mannitolu		
	PDI	size	Zeta	PDI	size	zeta
DB 3P	0,337	183,7	-66,44	0,184	195,2	-32,7
DB 3D	0,253	198,9	-60,35	0,175	201	-30,55
DB 3T	0,274	192,1	-62,11	0,2	209,8	-35,84
DB PLGA 50:50	0,259	187,2	-61,35	0,186	201,4	-39,62
DB PDLLA	0,323	199,9	-61,44	0,225	218,4	-47,81
DB 5P	0,323	200,9	-58,79	0,242	240,8	-38,91
DB 5D	0,315	180,6	-53,9	0,223	227,6	-37,95
DB 5T	0,251	202,8	-60,68	0,193	230,4	-42,05

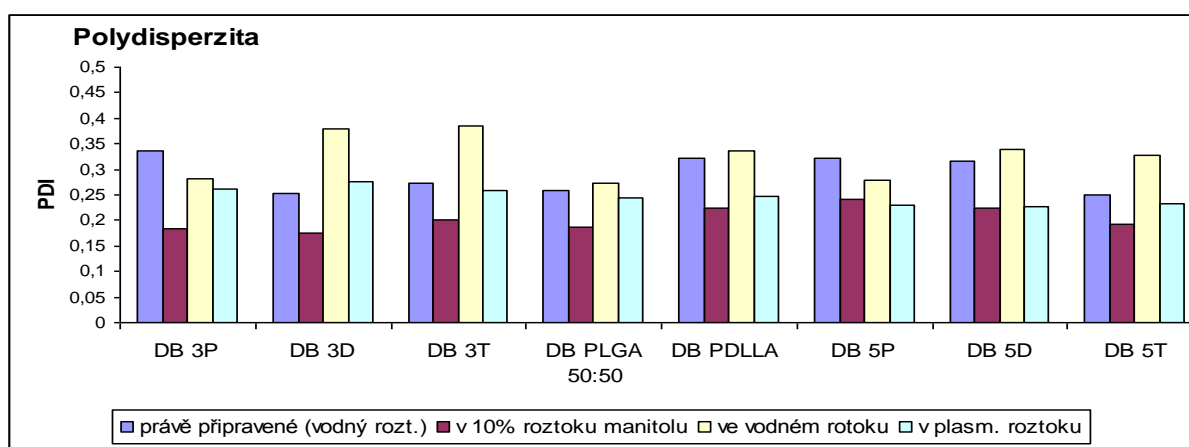
Table 10-15 Nanočástice polymer-10% mannitol, po sušení

	opětovné rozpuštění po sušení				
	ve vodné disperzi			v plasm. roztoku	
	PDI	size	zeta	PDI	size
DB 3P	0,282	179,1	-32,43	0,261	164,4
DB 3D	0,379	219,7	-37,8	0,277	155,5
DB 3T	0,386	231,3	-40,39	0,259	202,9
DB PLGA 50:50	0,273	185	-42,27	0,244	188,5
DB PDLLA	0,337	288,3	-44,23	0,246	203,7
DB 5P	0,279	201	-45,16	0,231	200,9
DB 5D	0,339	185,9	-45,15	0,227	188,6
DB 5T	0,328	180,5	-40,19	0,233	193,3

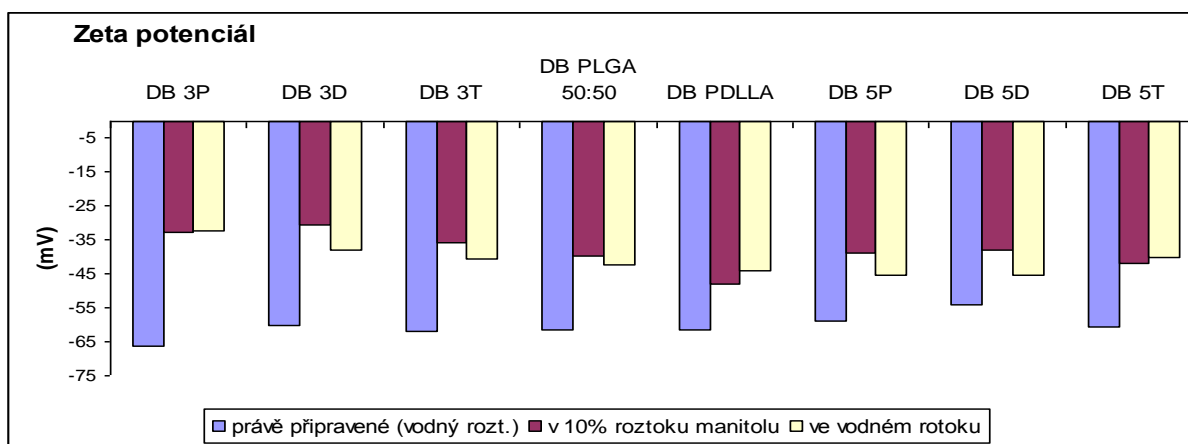
Obrázek 10-47 Změny velikosti nanočástic



Obrázek 10-48 Změny polydisperzity nanočástic



Obrázek 10-49 Změny zeta-potenciálu nanočástic



10.8.7 Sledování stability mannitolových mikročástic třepaných za zvýšené teploty v plasmatickém médiu

Mannitolové mikročástice jsme opětovně rozpustili, tentokrát však již na třepače v plasmatickém médiu za tělesné teploty (37°C) a pozorovali jejich stabilitu po dobu 9ti hodin.

Obrázek 10-50 Schematické znázornění provedeného experimentu

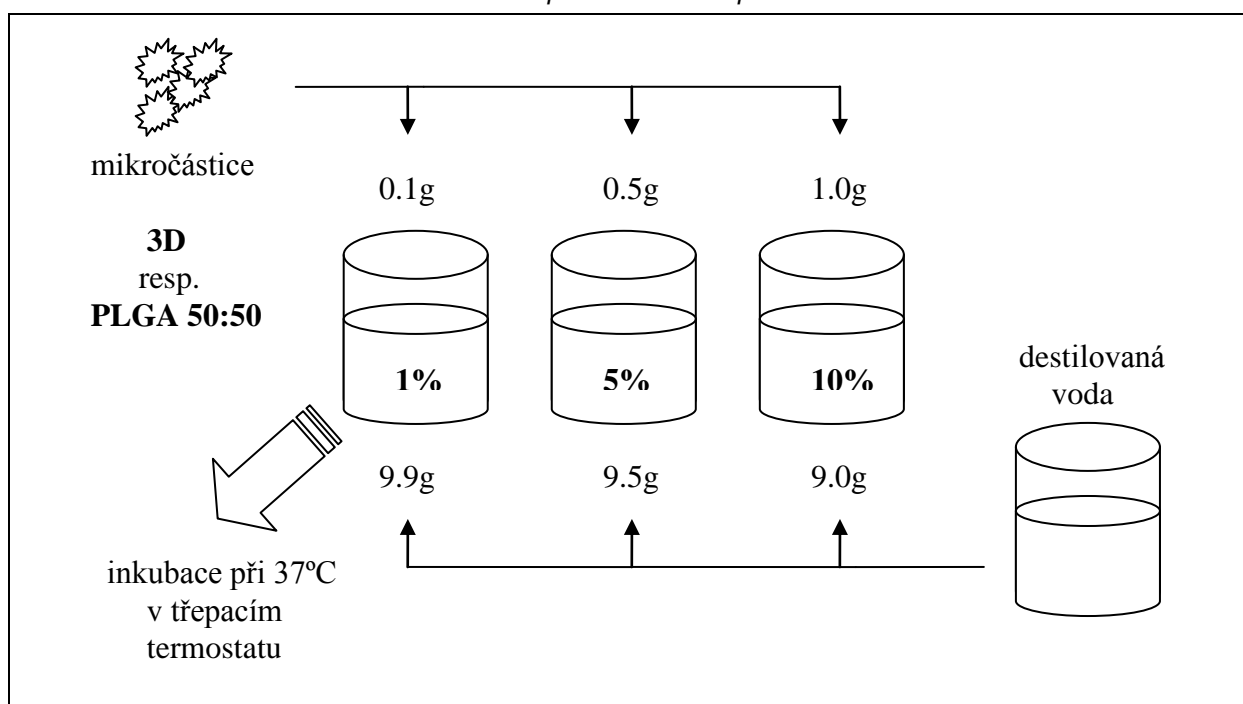


Table 10-16 Závíslost stability usušených 3D-nanočástic vázaných v mannitolu na čase za zvýšené teploty (37 °C) v plasmatickém mediu

3D: velikost [nm]	0h	1h	2h	4h	6h	9h
1% ¹⁾	176,9	178,2	177,1	174,6	193,3	189,2
5%	222,3	186,9	192,5	218	225,7	201,7
10%	226	238,2	227,4	192,9	225	214,3

¹⁾ Koncentrace vyjadřuje podíl rozpuštěného mannitolu s mikročásticemi v mediu

PDI	0h	1h	2h	4h	6h	9h
1% ¹⁾	0,321	0,248	0,276	0,253	0,274	0,277
5%	0,247	0,301	0,336	0,281	0,25	0,271
10%	0,247	0,235	0,251	0,277	0,238	0,249

Obrázek 10-51 Závíslost stability usušených 3D-nanočástic vázaných v mannitolu na čase za zvýšené teploty (37 °C) v plasmatickém mediu

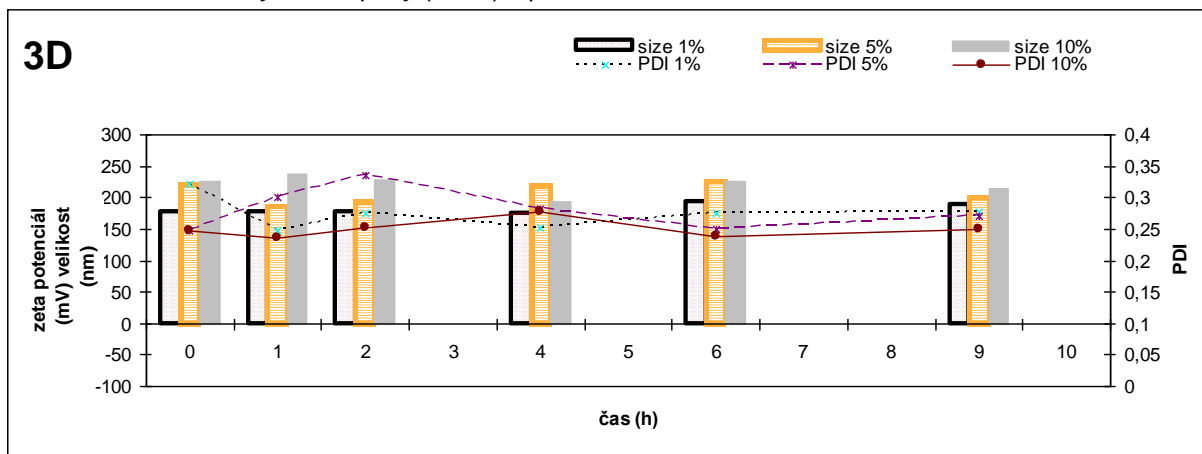
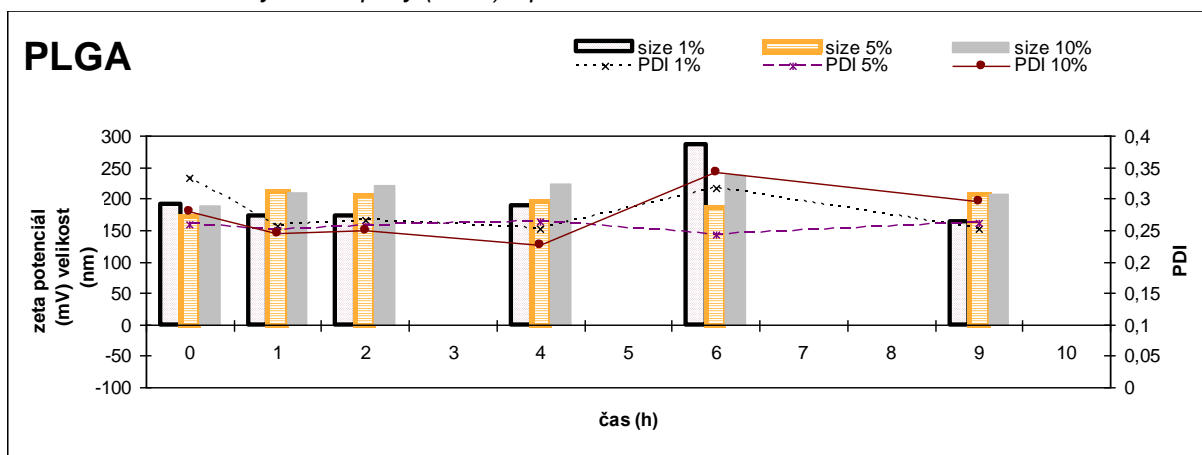


Table 10-17 Závíslost stability usušených PLGA-nanočástic vázaných v mannitolu na čase za zvýšené teploty (37 °C) v plasmatickém mediu

PLGA: velikost [nm]	0,5h	1h	2,5h	4,5h	6,5h	9,5h
1%	191,2	173,3	171,7	188,8	286,3	164,2
5%	173	212,5	206,3	195,1	186,9	208,5
10%	189,2	209,1	221,3	223,4	238,1	206,7

polydisperzita	0,5h	1h	2,5h	4,5h	6,5h	9,5h
1%	0,334	0,257	0,266	0,251	0,317	0,253
5%	0,258	0,249	0,257	0,263	0,242	0,262
10%	0,279	0,246	0,249	0,226	0,343	0,296

Obrázek 10-52 Závíslost stability usušených PLGA-nanočástic vázaných v mannitolu na čase za zvýšené teploty (37 °C) v plasmatickém mediu



11 Diskuse

11.1 Obecné poznámky

Polymerní biodegradabilní nanočástice jsou velmi perspektivní lékovou formou. Kromě jediné výjimky, kterou je preparát Ambroxane, není do této doby registrován žádný přípravek založený na struktuře polymerních nanočástic. Jedním z podstatných důvodů, které mají na tuto situaci vliv, je stabilita systému. Stabilitu je nutno chápat jako neměnnost parametrů jednak ve fázi výroby, dále ve fázi uchovávání a také ve fázi vlastního působení po aplikaci.

Nanočásticové systémy se téměř výhradně zpracovávají lyofilizací. Lyofilizace je postup, který je náročný z hlediska časového a energetického. Byl vyvinut postup sušení nanosuspenze ve sprejové sušárně. Tento postup je limitovaný termickou stabilitou nosičů a léčiv. Jeho výhodou je rychlost a energetická nenáročnost. Nestabilita nanosystému při zpracování sprejovým sušením se kromě výše uvedené termické zátěže může projevit agregací částic, jejich botnáním, erozí nebo desintegrací. Ke změnám může docházet v přípravné fázi sušení, při sušení nebo po převodu skladovací formy prášku na aplikační formu nanosuspenze. Stabilitě nanosystémů při zpracování a po jejich aplikaci nebyla dosud věnována dostatečná pozornost. Je možno očekávat, že nanočástice z biodegradabilních polymerních nosičů se budou projevovat jinak než analogické mikročástice nebo monolitické implantáty. Kromě velikostního parametru je v případě nanočástic nutno zohlednit také parametr polydisperzity, který může také indikovat nežádoucí změny v systému.

Cílem práce bylo zjistit, jestli se nanočástice z oligoesterů alifatických hydroxykyselin nemění z hlediska granulometrického a z hlediska elektrokinetického potenciálu v časovém intervalu, který v dostatečné míře pokrývá praktické aspekty při zpracování a aplikaci nanosystémů. Oba parametry se mohou měnit dvěma procesy, které mají na velikost opačný účinek. Jedním je botnání, které má důsledek ve zvětšení nanočástic, druhý procesem je eroze vedoucí ke zmenšení částic. Přímé sledování obou dějů u nanočástic je velmi obtížné. Proto bylo vybráno několik nosičů, které mají průběh botnání a eroze odlišný. V případě podobných profilů obou dějů v čase je při tomto přístupu možno některé změny v nanosystému zobecňovat. Změny, ke kterým dochází v konkrétních systémech nanočástic si vyžadují podrobnou analýzu včetně posouzení změn jednotlivých píků. Polydisperzita je parametr, který charakterizuje celkové změny v distribuci velikosti nanočástic bez ohledu na jejich podstatu.

11.2 Stabilita nanočástic uchovávaných bez míchání za obvyčejné teploty

Již podstata emulzní metody předurčuje kontakt dispergovaného roztoku biodegradabilního nosiče v semipolárním rozpouštědle s vnější vodnou fází. Po dostatečné solidifikaci nanočástic přestupem rozpouštědla do vodné fáze vždy dojde ke zprodlení při dalším zpracování nanočástic sušením. Eroze nanočástic, jejich desintegrace nebo jejich botnání v intervalu před lyofilizací nebo před sprejovým sušením by mohly vést k nežádoucí liberaci v nich obsaženého léčiva. Byly zvoleny dva parametry při uchovávání sledovaných

nanodisperzí. Jedním byla teplota na třech úrovních v rozmezí snížené (7 °C), teploty místnosti (22 °C) a mírně zvýšené (37 °C) v oblasti teploty tropické. Druhým parametrem byla konvekce disperzního prostředí. Část vzorků byla ponechána v klidu bez míchání. Nanočástice se v nich pohybovaly Brownovým pohybem. Jiná část vzorků byla míchána kývavým pohybem v třepacím termostatu při teplotě 37 °C.

V kap.10.8.1 jsou uvedeny výsledky měření velikosti nanočástic a jejich zeta potenciálu. Nanočástice připravené z nosičů 3P, 3D a 3T obsahujících 3 % větvící složky byly uchovávány jeden týden. Velikost částic mírně kolísala kolem středních hodnot, které byly pod 200 nm. Systematická změna velikosti nebyla zaznamenána. Pozitivní je také fakt, že polydisperzita byla poměrně nízká a v čase se výrazně neměnila. Slabý vzrůst hodnot byl zaznamenán v posledním intervalu mezi 98. a 168. hodinou, což může být indikací degradačních procesů. Hodnota zeta potenciálu byla nejvyšší těsně po přípravě nanočástic, potom byl nevýrazný trend snižování hodnot. Tyto změny mohou také souviset s hydrofilizací povrchu štěpením řetězců a zvyšováním koncentrace koncových skupin.

Větvené nosiče 5P, 5D a 5T s vyšším podílem větvící složky tvořící nanočástice se projevovaly obdobně jako výše uvedené. Také u nanočástic z těchto nosičů se velikost významně neměnila na rozdíl od polydisperzity. Ta se zvyšovala, i když u různých vzorků různým způsobem. U nanočástic z nosičů 5D a 5T došlo k jednoznačnému vzrůstu polydisperzity v posledním sledovaném intervalu mezi 77. a 98. hodinou. Systematické mírné snižování zeta potenciálu se projevilo také v případě těchto vysoce větvených nosičů.

Granulometrické charakteristiky nanočástic připravených z lineárních oligoesterových nosičů PDLA a PLGA se významně nelišily od charakteristik nanočástic z větvených nosičů. U nanočástic z polykondenzované kyseliny DL-mléčné byla prokázána mimořádně stálá hodnota velikosti i polydisperzity s výjimkou patrně náhodného kolísání v okolí jednodenního intervalu. Méně stabilní byly nanočástice z kopolymeru PLGA, které se v posledním intervalu zmenšily. Trend ke snižování hodnot zeta potenciálu byl potvrzen také v případě nanočástic z těchto lineárních nosičů. Rychleji degradující nosič PLGA se v tomto smyslu měnil asi dříve.

11.3 Stabilita nanočástic uchovávaných za míchání při obyčejné teplotě

Vzorky byly mírně míchány v magnetické míchačce při teplotě 22 °C. Podle očekávání nebyla zaznamenána žádná výrazná změna proti vzorkům uchovávaným v klidovém, prakticky statickém stavu. Brownův termokinetický pohyb nanočástic byl intenzivnější než konvekce vnější fáze. Pouze v případě zeta potenciálu je možno si povšimnout snížení hodnoty až v posledním sledovaném časovém intervalu mezi 29. a 43. hodinou.

11.4 Stabilita nanočástic uchovávaných bez míchání za zvýšené teploty

Zvýšenou teplotou byla teplota 37 °C. Při této teplotě degradační hydrolytické procesy v molekulách nosičů probíhají rychleji. Z tabulek 10-6 a 10-7 a z připojených obrázků je možno shrnout, že všechny charakteristiky potenciálních změn v nanočásticích probíhají rychleji než při teplotě 22 °C. U stupně polydisperzity je možno zaznamenat tendenci ke zvyšování hodnot. Velikost nanočástic má nevýraznou tendenci ke snižování hodnot u větvených nosičů. PLGA se chová specificky botnáním a následnou erozí. PDLLA se významně nemění. Zeta potenciál se u všech vzorků během prvních 24 hodin výrazně snížil.

11.5 Stabilita nanočástic uchovávaných bez míchání za snížené teploty

Teplota uchovávání 7 °C byla zvolena pro případ rozsáhlejších změn v nanočásticích jednak z hlediska nestability nosiče nebo nestability léčiva. V tabulce 10-8 a na připojených obrázcích je možno sledovat průběh hodnot charakteristik po dobu 126 hodin.

Stupeň polydisperzity se u všech vzorků zvýšil oproti počátečním hodnotám. Rozdíl byl v rychlosti změn. Nejčastěji došlo k významnějšímu zvýšení hodnot v intervalu po 24. hodině. Výjimkou je kopolymer PLGA, který změnil charakteristiku již v šestihodinovém intervalu.

Velikost nanočástic je parametr, který se měnil u každého nosiče jinak. Spíše než eroze se uplatnilo botnání oligoesterů. Nanočástice z nosičů 3P a 3D byly nejmenší v počáteční fázi uchovávání, kdežto nanočástice z lineárních nosičů PLGA a PDLLA byly zpočátku největší a na konci pokusu nejmenší.

Z hlediska zeta potenciálu se chovaly všechny vzorky souboru stejně. V průběhu prvních šesti hodin dosahovaly hodnoty maxima, potom se snižovaly do minimálních na konci pokusu. Nejnižší počáteční zeta potenciál měly nanočástice z nosiče PLGA (-45 mV), nejvyšší z větveného 3T (mezi -62 a -65 mV). Nejmenší snížení zeta potenciálu bylo zjištěno u nanočástic z nosiče PDLLA (o 10 mV), což je v souladu s nejpomalejší rychlosti degradace tohoto nosiče.

11.6 Stabilita nanočástic v procesu sprejového sušení

Nanočástice byly těsně po jejich přípravě smíchány s mannitolem v 10% koncentraci. Sušený produkt obsahoval kromě mannitolu a nanočástic také emulgátory (přibl. 7 % lecitinu a 2 % polysorbátu 20). V tabulce 10-12 jsou základní parametry sušených mikročástic. Jejich střední průměr se pohyboval mezi 4,5 a 6,5 μm. Největší naměřené byly u jednotlivých vzorků mezi 16 a 44 μm.

V tabulce 10-14 jsou charakteristiky nanočástic naměřené těsně před jejich sušením a těsně po jejich dispergaci v médiu. Polydisperzita se po zpracování nanočástic do mikropartikulární

formy snížila u všech vzorků. Tento zdánlivě paradoxní jev je možno vysvětlit změnou druhé charakteristiky, kterou je jejich velikost. Ve všech případech došlo ke zvětšení nanočástic aglomerací malých. U různých vzorků došlo k různě velkým změnám pohybujícím se od zlomku procenta po 20 %. Také zeta potenciál se významně snížil od 20 % do 50 %. Příčinu snížení zeta potenciálu je možno hledat ve snížení adsorpční vrstvy emulgátorů, především anionického lecitinu po jeho částečném promísení s mannitolem.

11.7 Stabilita nanočástic v podmínkách in vitro

Byly připraveny disperze nanočástic smísením sprejově sušených mikročástic s kapalným médiem simulujícím prostředí krevní plazmy nebo tkáňového moku. Mikročástice byly dispergovány ve třech různých koncentracích – 1%, 5% a 10%. Disperze byly míchány v třepačce termostatované na 37 °C. K tomuto experimentu byly použity dva vzorky nanočástic připravených z nosičů 3D a PLGA.

Nanočástice z větveného oligoesteru 3D byly po dispergaci mikročástic ve vyšší koncentraci větší (tabulka 10-16, obr. 10-51). S dobou jejich uchování parametr do značné míry kolísal. Při nestálosti hodnot je obtížné jednoznačně popsat změny velikosti částic. U všech tří vzorků byly nejvyšší hodnoty naměřeny v 6 hodinovém intervalu, potom se částice zmenšily. Podle těchto výsledků je možno usuzovat na počáteční botnání s pozdější erozí. Také polydisperzita značně kolísala bez zjevného trendu změny hodnot.

Obdobně se projevovaly nanočástice z nosiče PLGA (tabulka 10-17, obr. 10-52). Rozdílný je neprokázaný vliv zvyšující se koncentrace dispergovaných mikročástic na počáteční rozměr nanočástic. V intervalu od 2,5 do 4,5 hodiny se vliv projevil. V další fázi se jednotlivé vzorky chovaly individuálně. Není vyloučen vliv osmotického působení mannitolu. Polydisperzita se také projevovala velkou kolísavostí hodnot. Při nižších hodnotách parametru rozměru se také méně projevila polydisperzita.

12 Závěry

Nanočástice z oligoesterů připravené dispergací emulze typu o/v je po jejich přípravě možno několik hodin uchovávat bez nebezpečí podstatných změn v parametrech jejich velikosti a povrchového náboje. Teplota uchovávání ani míchání systémů nejsou parametry, které by se v rozmezí hodnot využitelných v praxi výrazně projevíly.

Nanosystémy z oligoesterových nosičů různé konstituce řetězce je možno dále zpracovat sprejovým sušením a tak je převést na formu vhodnou pro dlouhodobé uchovávání. Změny v charakteristikách nanočástic po jejich sušení a dispergaci ve vodném médiu není možno pokládat za výrazně snižující jejich kvalitu z hlediska aplikovatelnosti a případných interakcí s biologickými systémy.

Metoda zpracování biodegradabilních oligoesterových nanočástic jejich sprejovým sušením s vhodným nosičem je vhodnou alternativou k běžně využívané metodě lyofilizace. Při omezení na termostabilní léčiva jsou jejími výhodami časová, přístrojová a ekonomická nenáročnost.

13 Souhrn

V předložené rigorózní práci jsou podrobně popsány různé metody přípravy farmaceutických nanočástic, jejich povrchové vlastnosti a uvolňování v nich obsažených léčiv. Jsou prezentovány některé důležité informace týkající se perspektivních možností nanosystémů ve farmakoterapii. Práce je především zaměřena na experiment. Experimenty vyústí do využití zařízení na měření velikosti nanočástic a jejich zeta potenciálu. Byly připraveny nanočástice z různých oligoesterů s lineární a větvenou konstitucí řetězce menší než 200 nm. Hlavní záměr předložené práce je soustředěn na stálost parametrů velikosti částic a jejich povrchového náboje při jejich uchovávání při různých teplotních podmínkách a při statických a dynamických podmínkách ve vnější fázi po přípravě nanočástic. Kapalné systémy s nanočásticemi byly těsně po přípravě sprejové sušeny s mannitolem jako aditivem. Byly zkoumány procesy, které obsahovaly řadu stresových faktorů, jako je rozpouštění mannitolu jako osmotického agens, operace sprejového sušení, dispergace nanočástic obsažených v mikročásticích ve vodném médiu. Tyto procesy byly hodnoceny z hlediska změn velikosti a zeta potenciálu nanočástic. Došlo se k závěru, že metoda založená na sprejovém sušení nanosystémů s inkorporací nanočástic je výhodná a užitečná při stabilizaci těchto nanosystémů.

14 Summary

In the thesis are in details described various methods of pharmaceutical nanoparticles preparation, their surface properties and incorporated drug release. Some relevant data concerning prospective use of nanosystems in pharmacotherapy are presented. The main orientation of the thesis is towards experimental laboratory working. Experiments are supported by the use of Nanosizer and Zetasizer device. Nanoparticles with the size under 200 nm from various oligoesters with the linear and branched constitution of carrier molecules were fabricated. The aim of the thesis was focused on stability of size and surface charge parameters during their storage under different thermal conditions and under static and dynamic state of hydrophilic external phase after preparation process. Liquid systems containing freshly prepared nanoparticles were spray dried with the mannitol used as additive. The processes including range of stress factors, such as mannitol as osmotic agent dissolution, spray drying operation, and nanoparticles contained in microparticles in aqueous medium dispersion were evaluated from the point of view of size and zeta potential parameters. It was concluded from the experimental results that method based on spray drying of nanoparticulate systems and incorporation of nanoparticles into the microspheres is advantageous and fruitful method for liquid nanosystems stabilization.

15 Literatura

[1] J. Kreuter, Nanoparticles, in: J. Kreuter (Ed.), *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, 1994, pp. 219–342.

[2] R. Langer, Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 94–101.

[3] R.P. Lanza, R. Langer, W.L. Chick, Principles of Tissue Engineering, in: Academic Press, Austin, TX, 1997, pp. 405–427.

[4] L.B. Peppas, Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in the controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.* 116 (1995) 1–9.

[5] A. Zimmer, J. Kreuter, Microspheres and nanoparticles used in ocular drug delivery systems, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 16 (1995) 61–73.

[6] P. Couvreur, L. Grislain, V. Lenaerts, F. Brasseur, P. Guiot, in: P. Guiot, P. Couvreur (Eds.), *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986.

[7] D.F. Raney, Biomimetic transport, rational drug delivery, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 105–114.

[8] K.E. Uhrich, S.M. Cannizzaro, R.S. Langer, K.M. Shakesheff, Polymeric systems for controlled drug release, *Chem. Rev.* 99 (1999) 3181–3198.

[9] C. Monfardini, F.M. Veronese, Stabilization of substances in circulation, *Bioconjug. Chem.* 9 (1998) 418–450.

[10] V.P. Torchilin, Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals, *J. Microencapsul.* 15 (1998) 1–19.

[11] D.L. Wise, T.D. Fellman, J.E. Sanderson, R.L. Wentworth, Lactide/glycolide acid polymers, in: G. Geregoriadis (Ed.), *Drug Carriers in Biology and Medicine*, Academic, London, 1979, pp. 237–270.

[12] T.M. Jackanicz, H.A. Nash, D.L. Wise, J.B. Gregory, Poly lactic acid as a biodegradable carrier for contraceptive steroids, *Contraception* 8 (1973) 227–234.

[13] L.C. Andersson, D.L. Wise, J.F. Howes, An injectable sustained release fertility control system, *Contraception* 13 (1976) 375–384.

-
- [14] C.G. Pitt, M.M. Gratzl, A.R. Jeffcot, R. Zweidinger, A. Schindler, Sustained release drug delivery systems II: factors affecting release rate for poly(ϵ -caprolactone) and related biodegradable polyesters, *J. Pharm. Sci.* 68 (1979) 1534–1538.
- [15] C.G. Pitt, T.A. Marks, A. Schindler, Biodegradable drug delivery systems based on aliphatic polyesters: application to contraceptives and narcotic antagonists, in: R. Baker (Ed.), *Controlled Release of Bioactive Materials*, Academic, New York, 1980, pp. 19–43.
- [16] P. Calvo, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions as ocular drug carriers, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 530–536.
- [17] I.C. Aynie, C. Vauthier, E. Fattal, M. Foulquier, P. Couvreur, Alginate nanoparticles as a novel carrier for antisense oligonucleotide, in: J.E. Diederichs, R. Muler (Eds.), *Future Strategies of Drug Delivery With Particulate Systems*, Medpharm Scientific Publisher, Stuttgart, 1998, pp. 5–10.
- [18] M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude, C. Vigneron, Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by double emulsion method, *J. Control. Rel.* 50 (1998) 31–40.
- [19] T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou, Y. Kawashima, Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug release behavior, *J. Control. Rel.* 25 (1993) 89–98.
- [20] P. Wehrle, B. Magenheimer, S. Benita, The Influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution evaluated by means of factorial design, *J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 19–26.
- [21] H. Murakami, H. Yoshino, M. Mizobe, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima, Preparation of poly(D,L-lactide-coglycolide) latex for surface modifying material by a double coacervation method, *Proced. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 23 (1996) 361–362.
- [22] D.T. Birnbaum, J.D. Kosmala, D.B. Henthorn, L.B. Peppas, Controlled release of b-estradiol from PLAGA microparticles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release, *J. Control. Rel.* 65 (2000) 375–387.
- [23] R. Bodmeier, J.W. McGinity, Solvent selection in the preparation of poly(D,L-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method, *Int. J. Pharm.* 43 (1988) 179–186.

- [24] R. Arshaday, Preparation of porous and nonporous biodegradable polymeric hollow microspheres, *J. Control. Rel.* 17 (1991) 1–22.
- [25] E. Allemann, J.C. Leroux, R. Gurnay, E. Doelker, Invitro extended-release properties of drug-loaded poly(D,L-lactic) acid nanoparticles produced by a salting-out procedure, *Pharm. Res.* 10 (1993) 1732–1737.
- [26] J.C. Leroux, E. Allemann, E. Doelker, R. Gurnay, New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification–diffusion method, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 14–18.
- [27] G.D. Quintanar, Q.A. Ganem, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker, Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze drying of poly (DL-lactic acid) nanoparticles prepared by emulsification-diffusion technique, *J. Microencapsulation* 15 (1998) 107–119.
- [28] J.W. Tom, P.G. Debenedetti, Particle formation with super-critical fluids — a review, *J. Aerosol Sci.* 22 (1991) 555–584.
- [29] T.W. Randolph, A.D. Randolph, M. Mebes, S. Yeung, Submicron-sized biodegradable particles of poly(L-lactic acid) via the gas antisolvent spray precipitation process, *Biotechnol. Prog.* 9 (1993) 429–435.
- [30] L. Benedetti, A. Bertucco, M. Lora, P. Pallado, in: *Atti del 38 Congresso I fluidi Supercritici e le Loro Applicazioni*, I. Kikic and P. Alessi (Eds.), Trieste, 1995, p. 221.
- [31] K. Mishima, K. Matsuyama, D. Tanabe, S. Yamauchi, Microencapsulation of proteins by rapid expansion of super-critical solution with a nonsolvent, *AIChE J.* 46 (2000) 857–865.
- [32] J.W. Tom, P.G. Debenedetti, Formation of bioerodible polymeric microspheres and microparticles by rapid expansion of supercritical solution, *Biotechnol. Prog.* 7 (1991) 403–411.
- [33] J.W. Tom, P.G. Debenedetti, R. Jerome, Preparation of poly(L-lactic acid) and composite poly(L-lactic acid)-pyrene by rapid expansion of supercritical solution, *J. Supercrit. Fluids* 7 (1994) 9–29.
- [34] S. Mawson, K.P. Johnston, J.R. Combes, J.M. DeSimone, Formation of poly(1,1,2,2-tetrahydroperfluorodecyl acrylate) submicron fibers and particles from supercritical carbon dioxide solutions, *Macromolecules* 28 (1994) 3182–3191.
- [35] P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, Les perspectives d'utilisa'comme intracelction des formes microdisperses vecteurs lulaires, *Pharm. Acta Helv.* 53 (1978) 341–347.

- [36] P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Goit, P. Bauduin, P. Speiser, Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphology and sorptive properties, *J. Pharm. Pharmacol.* 31 (1979) 331–332.
- [37] J.-L. De Keyser, C.J.C. De Cock, J.H. Poupaert, P. Dumont, Synthesis of ^{14}C labeled acrylic derivatives: diethyl [3- ^{14}C] methylidenemalonate and isobutyl [3- ^{14}C] cyanoacrylate, *J. Lable. Comp. Radiopharm.* 27 (1989) 909–916.
- [38] J.-L. De Keyser, J.H. Poupaert, P. Dumont, Poly(diethyl methylidenemalonate) nanoparticles as a potential drug carrier: preparation, distribution and elimination after intravenous and peroral administration to mice, *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 67–70.
- [39] T.K.M. Mabela, J.H. Poupaert, P. Dumont, A. Haemers, Development of poly(dialkyl methylidenemalonate) nanoparticles as drug carriers, *Int. J. Pharm.* 92 (1993) 71–79.
- [40] N. Bru-Magniez, X. Guillon, P. Breton, P. Couvreur, F. Lescure, C. Roques-Carmes, G. Riess, Method for preparing malonate methylidene nanoparticles, nanoparticles optionally containing one or several biologically active molecules, International Patent PCT WO 98/18455, 1998.
- [41] N. Bru-Magniez, V. Larras, G. Riess, P. Breton, P. Couvreur, C. Roques-Carmes, Novel surfactant copolymers based on methylidene malonate, International Patent PCT WO 99/38898, 1999.
- [42] P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan and chitosan/polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J. Appl. Polym. Sci.* 63 (1997) 125–132.
- [43] P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Chitosan and chitosan/ethylene oxide–propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1431–1436.
- [44] R. Fernandez-urrusuno, P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1576–1591.
- [45] P. Calvo A.S. Boughaba, M. Appel, E. Fattal, M.J. Alonso, P. Couvreur, Oligonucleotide–chitosan nanoparticles as new gene therapy vector, Proc. 2nd World Meeting APGI/APV Paris, 1998, pp. 1111–1112.
- [46] H.-Q. Mao, K. Ray, S.M. Walsh, J.T. August, K.W. Leong, DNA–chitosan nanoparticles for the gene delivery, Proc. Intern. Symp. Control. Release. Bioact. Mater. 23 (1996) 401–402.

-
- [47] K. Ray, H.-Q. Mao, K.Y. Lin, S.-K. Huang, K.W. Leong, Oral immunization with DNA–chitosan nanoparticles, *Proc. Intern. Symp. Control. Release. Bioact. Mater.* 26 (1999) 348–349.
- [48] V.L. Truong-Le, H. Mao, S. Walsh, K.W. Leong, J.T. August, Delivery of DNA vaccine using gelatin–DNA nanoparticles, *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24 (1997) 39–40.
- [49] X.-X. Tian, M.J. Groves, Formulation and biological activity of antineoplastic proteoglycans derived from *Mycobacterium vaccae* in chitosan nanoparticles, *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (1999) 151–157.
- [50] H. Tokumitsu, H. Ichikawa, Y. Fuukumori, Chitosan– gadopenteic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion–droplet coalescence technique and characterization, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1830–1835.
- [51] C. Vautheir, I. Aynie, P. Couvreur, E. Fattal, Pharmacokinetic and tissue disposition of oligonucleotide associated with alginate nanoparticles, *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 25 (1998) 228–229.
- [52] T. Jung, A. Breitenbach, T. Kissel, Sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) facilitate the preparation of small negatively charged biodegradable nanospheres for protein delivery, *J. Control. Rel.* 67 (2000) 157– 169.
- [53] A. Breitenbach, G. Nykamp, T. Kissel, Self-assembling colloidal carriers for protein delivery: nanoparticulate polymer protein conjugates with novel water soluble biodegradable comb polyesters, *Proc. Intern. Symp. Control. Release. Bioact. Mater.* 26 (1999) 159–160.
- [54] M.A. Breitenbach, W. Kamm, K.-D. Hungere, E. Hund, T. Kissel, Oral and nasal administration of tetanus toxoid loaded nanoparticles consisting of novel charged biodegradable polyesters for mucosal vaccination, *Proc. Intern. Symp. Control. Release. Bioact. Mater.* 26 (1999) 348–349.
- [55] M.J. Alenso, C. Losa, P. Calvo, J.L. Vila-Jato, Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly(cyanoacrylate) nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 68 (1991) 69– 76.
- [56] M. Ueda, A. Iwara, J. Kreuter, Influence of the preparation methods on the drying release behavior of loperamide-loaded nanoparticles, *J. Microencapsulation* 15 (1998) 361–372.
- [57] P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Speiser, Adsorption of antineoplastic drugs to polyalkylecyanoacrylate nanoparticles and their release in calf serum, *J. Pharm. Sci.* 68 (1979) 1521–1523.

- [58] H.S. Yoo, J.E. Oh, K.H. Lee, T.G. Park, Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin–PLGA conjugate for sustained release, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1114–1118.
- [59] C. Washington, Drug release from microdisperse systems. A critical review, *Int. J. Pharm.* 58 (1990) 1–12.
- [60] B. Magenheimer, S. Benita, Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach, *S.T.P. Pharm. Sci.* 1 (1991) 221–224.
- [61] M. Fresta, G. Puglisi, G. Giammona, G. Cavallaro, N. Micali, P.M. Furneri, Pefloxacin mesilate-and ofloxacinloaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles; characterization of the colloidal drug carrier formulation, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 895–901.
- [62] G. Cavallaro, M. Fresta, G. Giammona, G. Puglisi, A. Villari, Entrapment of b-lactams antibiotics in polyethylcyanoacrylate nanoparticles: studies on the possible in vivo application of this colloidal delivery system, *Int. J. Pharm.* 111 (1994) 31–41.
- [63] B. Magenheimer, M.Y. Levy, S. Benita, A new in vitro technique for the evaluation of drug release profiles from colloidal carriers-ultrafiltration technique at low pressure, *Int. J. Pharm.* 94 (1993) 115–123.
- [64] J.M. Rodrigues Jr, H. Fessa, C. Bories, F. Pusieux, J.-Ph. Devissaguet, Premaquine-loaded poly(lactide) nanoparticles: physicochemical study and acute tolerance in mice, *Int. J. Pharm.* 126 (1995) 253–260.
- [65] M. Polakovic, T. Gorner, R. Gref, E. Dellacherie, Lidocaine loaded biodegradable nanospheres. II. modeling of drug release, *J. Control. Rel.* 60 (1999) 169–177.
- [66] H. Muller, K.M. Willis, Surface modification of i.v. injectable biodegradable nanoparticles with poloxamer polymers and poloxamine 908, *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 25–31.
- [67] C.J. Van Oss, Phagocytosis as a surface phenomenon, *Annu. Rev. Microbiol.* 32 (1978) 19–39.
- [68] E. Allemann, G. Patricia, J.C. Leroux, B. Luc, R. Gurnay, Kinetics of blood component-adsorption on poly(D,L-lactide) nanoparticles: Evidence of compliment C 3 component involvement, *J. Biomed. Mater. Res.* 37 (1997) 229–234.
- [69] T. Blunk, M. Luck, A. Calvoer, D.F. Hochstrasser, J.C. Sanchez, B.W. Muller, R.H. Muller, Kinetics of plasma protein adsorption on model particles for controlled drug delivery and drug targeting, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42 (1996) 262–268.
- [70] K. Thode, M. Luck, W. Semmler, R.H. Muller, M. Kresse, Influence of sample preparation on plasma protein adsorption patterns on polysaccharide-stabilized iron oxide

particles and end-terminal microsequencing of unknown proteins, *J. Drug Target.* 5 (1997) 35–43.

[71] M. Luck, K.F. Pistel, Y. Li, T. Blunk, R.H. Muller, T. Kissel, Plasma protein adsorption on biodegradable micro-spheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide), poly(L-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene), *J. Control. Rel.* 55 (1998) 107–120.

[72] R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R.H. Muller, J.M. Verbavatz, R. Langer, The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16 (1995) 215–233.

[73] B.D. Ratner, A.B. Johnston, T.J. Lenk, Biomaterial surface, *J. Biomed. Mat. Res. Appl. Biomat.* 21 (1987) 59–90.

[74] H. Carstensen, B.W. Muller, R.H. Muller, Adsorption of ethoxylated surfactants on nanoparticles. I. Characterization by hydrophilic interaction chromatography, *Int. J. Pharm.* 67 (1991) 29–37.

[75] R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, R. Langer, Biodegradable long-circulating polymeric nanoparticles, *Science* 263 (1994) 1600–1603.

[76] S.I. Joen, J.H. Lee, J.D. Andrade, P.G. de Gennes, Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory, *J. Colloid. Interf. Sci.* 142 (1991) 149–158.

[77] R. Gref, G. Miralles, E. Dellacherie, Polyoxyethylenecoated nanospheres: effect of coating on zeta potential and phagocytosis, *Polymer Int.* 48 (1999) 251–256.

[78] M.T. Peracchia, E. Fattal, D. Desmaele, M. Bensard, J.P. Noel, J.M. Gomis, M. Appel, J. d'Angelo, P. Couvreur, StealthO PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting, *J. Control. Rel.* 60 (1999) 121–128.

[79] A. Gessnerl, B.R. Paulke, R.H. Muller, Plasma protein adsorption on poly(ethylene-glycol) (PEG) modified polystyrene nanoparticles: influence of PEG surface density, *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 26 (1999) 597–598.

[80] F.D. Jaeghere, E. Allemann, J.C. Leroux, W. Stevels, J. Feijen, E. Doelker, R. Gurny, Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: Influence on the physical stability and in vitro cell uptake, *Pharm. Res.* 16 (1999) 859–866.

[81] M. Vittaz, D. Razile, G. Spenlehauer, T. Verrecchia, M. Veillard, F. Puisieux, D. Labarre, Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators, *Biomaterials* 17 (1996) 1575–1581.

-
- [82] L. Illum, S.S. Davis, Effect of the nonionic surfactant poloxamer 338 on the fate and deposition of polystyrene microspheres following intravenous administration, *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 1086–1089.
- [83] L. Illum, S.S. Davis, The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (poloxamer 338), *FEBS Letts.* 167 (1984) 79–82.
- [84] S. Rudt, R.H. Muller, In vitro phagocytosis assay of nanoand microparticles by chemiluminescence. III. Uptake of differently sized surface-modified particles, and its correlation to particle properties and in vivo distribution, *Eur. J. Pharm. Sci.* 1 (1993) 31–39.
- [85] L. Illum, S.S. Davis, R.H. Muller, E. Mak, P. West, The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a block copolymer poloxamine 908, *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 25– 31.
- [86] S.M. Moghimi, T.A. Gray, Single dose of iv injected poloxamine coated long-circulating particle triggers macrophage clearance of subsequent doses in rats, *Clin. Sci.* 93 (1997) 371–379.
- [87] C.S. Cho, Y.I. Jeong, T. Ishihara, R. Takei, J.U. Park, K.H. Park, A. Maruyama, T. Akaike, Simple preparation of nanoparticles coated with carbohydrate-carrying polymers, *Biomaterials* 18 (1997) 323–326.
- [88] A. Maruyama, T. Ishihara, S.W. Kim, T. Akaike, Nanoparticle DNA carrier with poly(L-lysine) grafted polysaccharide copolymer and poly(D,L-lactic acid), *Bioconjug. Chem.* 8 (1997) 735–742.
- [89] D. Duchene, D. Wouessidjewe, G. Ponchel, Cyclodextrins and carrier systems, *J. Control. Rel.* 62 (1999) 263–268.
- [90] S. Raeissi, K. Audus, In vitro characterization of blood– brain barrier permeability to delta sleep-inducing peptide, *J. Pharm. Pharmacol.* 41 (1989) 848–852.
- [91] B. Zlokovich, The in vivo approaches for studying peptide interaction at the blood–brain barrier, *Peptides* 10 (1989) 249–254.
- [92] R. Alyautdin, D. Gothier, V. Petrov, D. Kharkevich, J. Kreuter, Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 44–48.
- [93] G. Borchardt, L.A. Kenneth, S. Fenlin, J. Kreuter, Uptake of surfactant-coated poly(methyl methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers, *Int. J. Pharmacol.* 110 (1994) 29–35.

-
- [94] S.D. Troster, U. Muller, J. Kreuter, Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants, *Int. J. Pharm.* 61 (1990) 85–100.
- [95] A.E. Gulyaev, S.E. Gelperina, I.N. Skidan, A.S. Antropov, G.Y. Kivman, J. Kreuter, Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1564–1569.
- [96] R.N. Alyautdin, V.E. Petrov, K. Langer, A. Berthold, D.A. Kharkevich, J. Kreuter, Delivery of lopermide across the blood–brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles, *Pharm. Res.* 14 (1997) 25–328.
- [97] R.N. Alyautdin, E.B. Tezikov, P. Ramga, D.A. Kharkevich, D.J. Begley, J. Kreuter, Significant entry of tubocurarin into the brain of rats by adsorption to polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: in situ brain perfusion study, *J. Microencapsulation* 15 (1998) 67–74.
- [98] U. Schroeder, P. Sommerfeld, S. Ulrich, B.A. Sabel, Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood–brain-barrier, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 1305–1307.
- [99] P. Couvreur, F. Puisieux, Nano- and microparticles for the delivery of peptides and proteins, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5 (1993) 141–162.
- [100] T. Uchida, A. Yagi, Y. Oda, Y. Dakada, S. Goto, Instability of bovine insulin in poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres, *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996) 235–236.
- [101] J.K. Lin, N. Wang, X.S. Wu, A novel biodegradable system based on gelatin NPs and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 891–895.
- [102] N. Wang, X.S. Wu, J.K. Li, A heterogeneously structured composite based on poly(lactic-co-glycolic acid) micro-spheres and poly(vinyl alcohol) hydrogel nanoparticles for long-term protein drug delivery, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1430–1435.
- [103] R.M.M. Gasper, D. Blanco, M.E. Cruz, M.J. Alonso, Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release, *J. Control. Rel.* 52 (1998) 53–62.
- [104] I. Fishbein, M. Chorny, L. Rabinovich, S. Banai, I. Gati, G. Golomb, Nanoparticulate delivery system of a tyrphostin for the treatment of restenosis, *J. Control. Rel.* 65 (2000) 221–229.

[105] Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, S. Fujioka, T. Hino, Pulmonary delivery of insulin with nebulized DLlactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect, *J. Control. Rel.* 62 (1999) 279–287.

[106] G.P. Carino, J.S. Jacob, E. Mathiowitz, Nanosphere based oral insulin delivery, *J. Control. Rel.* 65 (2000) 261–269.

[107] Eric Allemann, Jean-Christophe Leroux, Robert Gurny, Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics, *Advanced Drug Delivery Reviews* 34 (1998) 171–189

[108] M.A. Radwan, In vitro evaluation of polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles as a controlled drug carrier for theophylline, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21 (1995) 2371–2375.