UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Biodegradace větvených oligoesterů

Vypracovala: Renáta Čambalová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Hradec Králové, 2008

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

OBSAH

1. ÚVOD 5

2. TEORETICKÁ ČÁST 6

2.1 BIODEGRADACE POLYMERŮ 6
2.1.1 Faktory ovlivňující biodegradaci 6
2.1.2 Biodegradace PLGA 7
2.2 BIODEGRADABILNÍ POLYESTERY 8
2.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti PLGA 9
2.2.2 Větvené polyestery 10
2.3 IMPLANTÁTY IN SITU 11
2.3.1 Termoplastické polymerní systémy 12
2.3.2 Systémy zesítěné in situ 13
2.3.3 Gelační systémy vyvolané teplem 14
2.3.4 Precipitace polymerů in situ 15
2.4 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 17

3. CÍL PRÁCE 18

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 19

4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE 19
4.1.1 Chemikálie 19
4.1.2 Přístroje 19
4.1.3 Charakteristika použitého oligosterového nosiče 19
4.2 STANOVENÍ STUPNĚ BOTNÁNÍ A EROZE TESTOVANÉHO NOSIČE 20
4.2.1 Příprava vzorků testovaných nosičů 20
4.2.2 Příprava testovacích médií 21
4.2.3 Postup při stanovení stupně botnání a eroze 22
4.2.4 Vzorce na výpočet botnání a eroze 23

5. VÝSLEDKY – TABULKY A GRAFY 24

6. DISKUSE 50

6.1 OBECNÉ POZNÁMKY **50**
6.2 TERMOPOLYMERY VĚTVENÉ PENTAERYTRITOLEM **51**
6.3 TERMOPOLYMERY VĚTVENÉ DIPENTAERYTRITOLEM **52**
6.4 TERMOPOLYMERY VĚTVENÉ TRIPENTAERYTRITOLEM **54**

7. ZÁVĚRY **56**

8. SOUHRN **57**

SUMMARY **58**

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **59**

1. ÚVOD

Ve zdravotnictví jsou polymery jako pomocné látky používány již desítky let. Nejprve to byly nevstřebatelné materiály, ze kterých byly vyráběny katetry, cévní štěpy nebo kontaktní čočky. Později byly objeveny polymery absorbovatelné, které našly využití především v chirurgii jako šicí materiál a postupně našly uplatnění také jako depotní systémy léčiv. Těch se využívá například při terapii chronických onemocnění, kdy polymerní implantát může uvolňovat léčivo až po dobu několika měsíců.

Výhoda takových dávkovacích systémů spočívá v kontrole rychlosti uvolňování léčiva za současné degradace polymerní matrice. Jednou z jejich hlavních předností pak je, že mohou být tvarovány do nejrůznějších forem a velikostí od implantátů po injekční nanočástice.

Při degradaci dochází ke štěpení molekuly polymeru na menší oligomery a monomery, které jsou následně vylučovány z těla.

Nejčastěji se jako nosiče účinných látek užívají polyestery alifatických hydroxykyselin.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 BIODEGRADACE POLYMERŮ

Biodegradace je definována jako přeměna materiálu v menší komplex meziproduktů nebo konečných produktů. Je způsobena solubilizací, jednoduchou hydrolýzou nebo enzymově katalyzovanou hydrolýzou. Pasivní hydrolýza hraje důležitou roli hlavně u syntetických polymerů, s enzymatickou degradací se setkáváme převážně u polymerů přírodního původu.

Biodegradace polymerů nastává ve třech stupních. Začíná hydratací, ztrátou pevnosti a integrity a dále ztrátou hmoty[1,2].

U biodegradabilních polymerů vznikají degradací vedlejší produkty, biokompatibilní, toxikologicky bezpečené, které jsou dále eliminované metabolickými cestami[3]. Léčivo vložené do polymeru je jednak uvolňováno difůzí přes bariéru polymeru, erozí polymerního materiálu nebo kombinací obou mechanismů[4].

2.1.1 Faktory ovlivňující biodegradaci

Pasivní hydrolýzu ovlivňuje z velké části chemické složení a konfigurace polymeru. Degradační rychlost závisí na typu chemické vazby, na typu zastoupených monomerů[5], přítomnosti kopolymerní složky[6], vlivu sousedních funkčních skupin[7].

Svou roli také hraje morfologie a krystalinita. Rychlost degradace se obvykle zvyšuje s klesající krystalinitou. Nejprve proniká voda do amorfních částí a dochází k hydrolytickému štěpení esterových vazeb. Dále pak nastává hydrolýza uvnitř krystalických oblastí.

Teplota je dalším důležitým faktorem. Bylo zjištěno, že rychlost degradace závisí většinou přímo úměrně na teplotě.

K cílenému uvolnění léčiva lze také využít odlišné pH v různých částech trávicího traktu. K ovlivnění degradační rychlosti se ukázalo jako užitečné přidávání látek regulujících pH. Např. u polyorthoesterů se používá hydroxid hořečnatý a anhydridy karboxylových kyselin[8]. Anhydridy urychlují hydrolýzu vlivem kyselé katalýzy, naopak hydroxid hořečnatý snižuje degradační rychlost vlivem zvýšení stability orthoesterů v bazickém prostředí.

V neposlední řadě má na degradaci vliv přítomnost léčiva především svými acidobazickými vlastnostmi a hydrofilitou. Bazická léčiva se mohou chovat jako katalyzátory a zvyšovat stupeň degradace. Nebo také mohou neutralizovat konečná karboxylová rezidua polyesterů a tím redukovat degradaci. Léčiva s hydrofilními vlastnostmi jsou uvolňována rychleji než hydrofobní.

Některé polymery mohou také podléhat enzymaticky katalyzované degradaci. Ta byla identifikována hlavně u polymerů vyskytujících se v přírodě, jako je kolagen a celulosa[9], ale i u některých inertních syntetických polymerů, jako je nylon, poly(tereftalát), poly(hydroxybutyrát) atd. Enzymy vykazují nejvyšší aktivitu při podmínkách podobných fyziologickému prostředí. Změna těchto přirozených podmínek vede ke snížení enzymatické aktivity a tím také ke snížení stupně enzymatické degradace polymeru.

2.1.2 Biodegradace PLGA

In vitro i in vivo kopolymer PLGA podléhá degradaci ve vodném prostředí (hydrolytická degradace nebo biodegradace) štěpením esterové vazby[3,10,12]. Polymerní řetězce podléhají objemové degradaci, která se vyskytuje ve stejném rozsahu v celé PLGA matrix. Thies a Bissery uvádějí, že biodegradace PLGA nastává přes náhodné hydrolytické štěpení řetězce nabotnaného polymeru[14].

Počet karboxylových koncových skupin přítomných v řetězci PLGA se zvyšuje během biodegradabilního procesu a vede tak k urychlení tohoto děje[3,11]. Rychlost biodegradace kopolymeru PLGA je závislá na molárním poměru kyselin mléčné a glykolové v polymerním řetězci, molekulární hmotnosti polymeru, stupni krystalinity a na teplotě skelného přechodu (Tg)[3,11,13].

Pro PLGA byly stanoveny tři fáze mechanismu biodegradace:

1. Proces nahodilého štěpení řetězce. Molekulová hmotnost polymeru významně klesá, ale nejsou pozorovány žádné znatelné ztráty hmotnosti a nevznikají monomerní produkty.
2. Ve střední fázi se snižuje molekulová hmotnost doprovázená rychlou ztrátou hmoty a tvorbou rozpustných oligomerních a monomerních produktů.
3. Z rozpustných oligomerních fragmentů se vytváří rozpustné monomery. Tato fáze je fází celkového rozpuštění (solubilizace) polymeru.

Role enzymů při degradaci je nejasná[3,11]. Většina autorů uvádí, že biodegradace PLGA probíhá pouze hydrolýzu. Někteří vědci usuzují na enzymatickou roli při štěpení PLGA na základě rozdílných rychlostí degradace in vivo a in vitro[11].

PLGA degraduje na kyselinu mléčnou a glykolovou[3,10,11]. Kyselina mléčná vstupuje do cyklu trikarboxylových kyselin a je metabolizována a následovně eliminována z těla jako oxid uhličitý a voda[3,10,11]. Kyselina glykolová je buď vylučována ledvinami jako nezměněná, nebo vstupuje do cyklu trikarboxylových kyselin a nakonec je vylučována jako oxid uhličitý a voda[3].

2.2 BIODEGRADABILNÍ POLYESTERY

Díky svým příznivým vlastnostem vzbudilo velký zájem studium termoplastických alifatických polyesterů, mezi něž patří např. kyselina

poly(mléčná) (PLA), kyselina poly(glykolová) (PGA) a hlavně kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA). Tyto polymery se vyznačují dobrou biokompatibilitou, biodegradabilitou a mechanickou pevností. Také se dají lehce tvarovat do nejrůznějších forem vhodných pro transport rozličných skupin léčiv jako jsou např.: vakcíny, peptidy, proteiny a jiné mikromolekuly.

PLGA je nejvíce používaným polymerem pro dodávání léčiv. Vykazuje třífázovou kinetiku uvolnění proteinů - na počátku je značný burst efekt, následovaný lag fází a poté konečnou uvolňovací fází v závislosti na erozi polymeru[15].

2.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti PLGA

Polymer kyseliny mléčné (PLA) se může vyskytovat v opticky aktivní stereoformě (L-PLA) a v opticky neaktivní racemické formě (D,L-PLA)[10,11,16]. L-PLA je v přírodě semikrystalická díky vysoké pravidelnosti řetězce. Zatímco D,L-PLA je amorfní kvůli nepravidelnostem ve struktuře[3,16]. Z toho důvodu se preferuje používání D,L-PLA, protože umožňuje více homogenní disperzi léčiva v polymerní matrix[13,16].

Kyselina poly(glykolová) (PGA) je vysoce krystalická, protože postrádá postranní methylovou skupinu[3,16]. Kyselina glykolová je méně hydrofóbní než kyselina mléčná a proto kopolymery PLGA bohaté na kyselinu mléčnou jsou méně hydrofilní, absorbují méně vody a následně degradují pomaleji[3,10,13].

Fyzikální vlastnosti jako molekulární hmotnost a index polydispersity ovlivňují mechanickou odolnost polymeru a jeho schopnost být tvarován do lékových forem vhodných k dodávání léčiv[3,11,12]. Tyto vlastnosti mohou také řídit rychlost biodegradace a hydrolýzu[3,12]. Komerčně dostupné PLGA kopolymery jsou obvykle charakterizované vnitřní viskozitou, která je přímo úměrná jejich molekulární hmotnosti[3].

Mechanická pevnost, botnání, schopnost podléhat hydrolýze a následně rychlost biodegradace jsou přímo ovlivněné krystalinitou PLGA[3]. Výsledná

krystalinita kopolymeru PLGA je závislá na typu a molárním procentu jednotlivých komponent řetězce[10]. PLGA polymery obsahující 50:50 procent mléčné a glykolové kyseliny jsou hydrolyzovány rychleji než ty obsahující větší poměr jednoho ze dvou monomerů[11,12]. PLGA připraveny z L-PLA a PGA jsou krystalické kopolymery, zatímco ty připravené z D,L-PLA a PGA mají amorfní povahu. Stupeň krystalinity a bod tání polymerů je přímo úměrný molekulární hmotnosti polymerů[3,11].

Teplota skelného přechodu (Tg) kopolymerů PLGA je nad 37°C a proto se přirozeně vyskytují jako sklovité[3,11]. Tímto mají docela rigidní strukturu řetězce, který jim poskytuje významnou mechanickou pevnost, aby mohly být tvarovány do forem vhodných pro dodávání léčiv[3,11]. Teplota skelného přechodu (Tg) PLGA se snižuje s klesajícím obsahem kyseliny mléčné v kopolymeru a se snižováním molekulární hmotnosti[17].

Mechanickou pevnost polymeru významně ovlivňují různé faktory jako např. molekulová hmotnost, poměr kyseliny mléčné ke glykolové v kopolymeru, krystalinita a geometrická pravidelnost řetězců[3,10,11].

2.2.2 Větvené polyestery

Větvené polyestery vznikly z myšlenky vytvořit systém pro uvolňování léčiv, který by splňoval požadavky hlavně na stabilitu účinné látky. Na rozdíl od svých lineárních protějšků totiž vykazují větvené polyestery rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti jako např. chování v roztoku, mechanické vlastnosti a krystalinitu.

Nevýhodou lineární PLGA je, že degraduje náhodným štěpením esterových vazeb v objemu polymerní matrice[18]. Léčivo zbylé v systému je vystaveno kyselému prostředí a snižujícímu se pH. Toto kyselé prostředí v kombinaci s zvýšenou teplotou a hydrofóbním povrchem může poskytovat podmínky, které mohou vést k denaturaci proteinu.

Hlavní proces, jak překonat problémy pozorované s PLGA, je vytvořit polymer více hydrofilní než je PLGA. Modifikace vlastností polymeru může také mít značný pozitivní efekt na teplotu skelného přechodu (Tg) polymeru, na mechanismus biodegradace a na kinetiky uvolňování proteinů[19]. Několik typů modifikovaných polymerů už bylo syntetizováno, nejvýznačnější byl blok kopolymerů z PLA nebo PLGA střídající se s hydrofilními bloky jako poly(ethylenoxid) (PEO), poly(ethylenglykol) (PEG)[20,21]. Byly vyvinuty větvené struktury včetně síťovaných větvených kopolymerů za použití cukrů nebo dextranu jako základu s roubovaným polymerem PLGA[19,22].

Breitenbach a Kissel zmiňují syntézu větvených polyesterů na základě polyvinylalkoholu (PVA) s postranným řetězcem PLGA. PVA poskytoval hydrofilní bázi kopolymeru, zatímco stupeň hydrofobicity kopolymeru se mohl měnit podle délky vedlejšího řetězce PLGA. Tyto řetězce se vyznačovaly nižším burst efektem spojeným s lineárním profilem uvolňování proteinů podle kinetiky nultého řádu a dobou, která může být řízena strukturou a molekulovou hmotností kopolymeru. U PLGA byla pozorována objemová eroze, zatímco u PVA-g-PLGA kopolymerů se projevovala povrchová eroze způsobena biodegradačními mechanismy[23,24].

2.3 IMPLANTÁTY IN SITU

Parenterální systémy typu implantátů in situ představují v současné době alternativu k mikro- a nanočásticím, užívaným jako depotní implantáty. Jejich výhoda tkví jednak v možnostech aplikace, která je méně invazivní a méně bolestivá. Dále lze jimi dosáhnout dlouhodobého uvolňování a to od jednoho po několik měsíců.

Zájem o studium implantátů in situ exponenciálně narostl v posledních letech souběžně s objevy peptidů a bílkovin vhodných k terapii. Porozumění funkce proteinů u některých současných neléčitelných onemocnění vedlo k novým

terapeutickým přístupům. Proto byl výzkum nových parenterálních lékových forem zaměřen na ty, které ochrání proteiny před jejich denaturací tělními tekutinami a umožní jejich dlouhodobé podání.

Parenterální depotní systémy mohou minimalizovat vedlejší efekt k dosažení konstantních plazmatických hladin, jenž jsou obzvláště důležité u látek s nízkým terapeutickým indexem. Také náklady na jejich výrobu jsou menší než je tomu např. u mikrosfér.

Počátek implantátů in situ lze vysledovat v práci Southern Research Institute na začátku 80. let 20. století, kde se použily depotní systémy antibiotik k lokální léčbě parodontózy[25,26].

Ve studiu implantátů pokračovaly dále v ATRIX Laboratories, Fort Collins, CO, USA, které vytvořily produkt Eligard™[27].

Injekční in situ implantáty lze klasifikovat do čtyř kategorií podle jejich mechanismu vytváření depa a to: termoplastické polymerní systémy, in situ zestítěné polymerní systémy, gelační systémy vyvolané teplem, implantáty in situ vytvořené precipitací polymeru.

2.3.1 Termoplastické polymerní systémy

Jsou polotuhé polymery, které mohou být aplikovány v roztavené formě vytvářející depo při ochlazování na tělní teplotu.

Požadavky pro tyto polymery, jako dávkovací systémy, zahrnují: nízkou teplotu tání nebo teplotu skelného přechodu v rozmezí 25 – 65°C a vnitřní viskozitu v rozmezí 0,05 – 0,8 dl/g[28,29]. Při této teplotě se polymery chovají jako viskózní kapaliny.

Léčiva jsou zabudovaná do roztaveného polymeru mícháním bez použití rozpouštědel. Termoplastické polymery dovolují lokální dávkování antibiotik a cytostatik v místech chirurgického zásahu. Alternativně mohou být použity

k vytvoření subkutánního rezervoáru léčiva, ze kterého se do systémové cirkulace uvolní difuzí.

Pro přípravu prvních aplikačních systémů z termoplastických polymerů byly použity polyanhydridy[30], polykaprolaktony[31] a ABA triblok kopolymer PLA-PEG-PLA[32]. Tyto systémy měly následující nevýhody: pomalou rychlost uvolňování léčiva a bolestivou aplikaci injekcí, kdy vznikala nekróza, která zhoršovala difuzi léčiva.

Mnoho nevýhod těchto systémů bylo překonáno novou generací poly(orthoesterů) vyvinuté AP Pharma. Tyto polymery jsou polotuhé při pokojové teplotě. Proto pro zabudování léčivé látky a zavedení injekce není nutné delší zahřívání. Proteiny mohou být vmíchány do systému v suchém stabilním stavu. Nedochází tedy k degradaci bílkovin ve vodném roztoku a systém neobsahuje organická rozpouštědla, která by při aplikaci dráždila. Další výhodou je autokatalitická degradace povrchovou erozí[33].

2.3.2 Systémy zesítěné in situ

Zesítěné polymery mohou být polymery obsahující dvojné vazby a pro jejich vznik je nutná iniciace volnými radikály. Vytvářet tyto systémy je výhodné, protože lze takto kontrolovat difuzi hydrofilních makromolekul. Takto může teoreticky uvolňovat peptidy a proteiny po prodlouženou dobu trvání.

Použití volných radikálů pro iniciaci polymerizace je však sporné nejméně ze dvou důvodů. Za prvé je zde riziko podpory růstu nádoru a za druhé je zde možnost degradace biologicky aktivních látek volnými radikály. Je proto nutná ochrana bioaktivních látek při zesíťovací reakci např. enkapsulací proteinů.

Byly studovány také hydrogely z makromerů PEG-oligoglykolylakrylátu, které využívaly foto-iniciace[28,29].

Qiu et al. vyvinuli nový kopolymer založený na polyethylenglykolu obsahující několikanásobné -SH thiolové skupiny[36,37] nevyžadující radikálovou

iniciační polymerizaci. Zesítění vzniká pomocí vinylsulfonů, které reagují thiolovými skupinami a vytvářejí thioetherové vazby. Výsledkem je hydrogel DepoGel™, obsahuje více než 90% vody a je proto schopný uzavírat proteiny. Problémem je, že tento polymer není biodegradabilní a po uvolnění léčiva je nutné ho chirurgicky vyjmout.

2.3.3 Gelační systémy vyvolané teplem

Četné polymery ukazují náhlé změny rozpustnosti v závislosti na teplotě prostředí. Této vlastnosti bylo využito pro přípravu systémů gelujících při teplotě těla. Příkladem jsou triblokové kopolymery poly(ethylenoxid) – poly(propylenoxid) – poly(ethylenoxid) (PEO-PPO-PEO) známé jako poloxamery nebo Pluronics®, vykazující gelaci při teplotě těla po aplikaci injekce obsahující vysokou koncentraci polymerních roztoků /více než 15% (w/w)/[38,39]. Avšak taková koncentrace činidla vede ke značné cytotoxicitě[40] a mimo to zvyšuje hladiny plazmatického cholesterolu a triglyceridů u krys[41].

MacroMed vyvinulo termosensitivní biodegradabilní polymery založené na ABA a BAB tribloků kopolymerů, kde A označuje hydrofóbní polyesterový blok (PLA) a B hydrofilní polyethylenglykolový blok (PEG). Nízkomolekulární polymery této třídy jsou rozpustné ve vodě a mají teplotně závislou reverzibilní přeměnu gel-roztok. Vodné roztoky polymerů PEG-PLA-PEG /Mr 5000-2040-5000/ s léčivem jsou zaváděny do těla zvířat při teplotě 45°C. Při tělesné teplotě pak vznikne gel průběžně uvolňující hydrofilní substanci po dobu deseti až dvaceti dnů[42,43]. Jejich výhoda tkví také v jednoduché aplikaci běžnými injekčními stříkačkami.

2.3.4 Precipitace polymerů in situ

Koncept implantátů in situ byl poprvé vyvinut v roce 1990[26]. Biodegradabilní, ve vodě nerozpustný polymer byl rozpuštěn v biokompatiblním organickém rozpouštědle, do kterého byla přidána léčivá látka. Vznikl tak roztok nebo suspenze, která byla zavedena do těla. Po aplikaci tohoto implantátu se ve vodě rozpustné organické rozpouštědlo rozptýlilo a voda mohla pronikat do organické fáze. Tento jev vedl k fázové separaci a precipitaci polymeru v místě aplikace.

Tato metoda byla poprvé využita ve firmě ARTIX Laboratories, a byla pojmenována jako Atrigel™ technology[44,45]. Nejrozvinutějším produktem využívajícím Atrigel™ byl Eligard™ obsahující agonistu LHRH (luteinizační – releasing hormon), leuprolid acetát a PLGA (75/25) vše rozpuštěno v N-methyl-2-pyrrolidonu (NMP). Tento systém vedl k potlačení produkce testosteronu u psů přibližně na 91 dní. Doba působení tohoto systému byla ovlivněna spíše molekulární hmotností PLGA, než změnou koncentrace polymeru (40 – 50 %) nebo množstvím léčiva (4 – 6 %).

Změna fázového stavu roztoků PLGA je velmi komplikovaným jevem, přímo ovlivněným vlastnostmi rozpouštědla. Bylo zkoumáno několik dalších organických rozpouštědel např. – propylenglykol, aceton, dimethylsufoxid (DMSO), tetrahydrofuran, 2-pyrrolidon a glykofurol. Nicméně výběr rozpouštědla nebyl přesně definován. Zdá se, že hlavními faktory ovlivňujícími změnu fázového stavu a struktury jsou typ polymeru a molekulární hmotnost. Je třeba poznamenat, že většina organických rozpouštědel je špatně organizmem tolerována a způsobují bolest v místě aplikace.

Možnost snížení nežádoucího lokálního dráždění implantátů in situ pozoroval Kranz et al., který připravil O/O emulzi. Ve vnitřní fázi byl polymerní systém (léčivo, biodegradabilní polymer, organické rozpouštědlo) a ve vnější fázi byl podzemnicový olej. Vznikla tak soustava mikrosfér[46]. Takto připravený implantát způsoboval menší lokální poškození než soustava voda/léčivo.

Se změnou skupenství je rovněž přímo spojen burst efekt. Brodbeck et al. ukázali, že kinetika uvolňování z implantátů byla ovlivněna termodynamickou rozpustností – např. rozpouštěcí silou a mísitelností s vodou[47,48]. Studovali NMP, triacetin, ethylbenzoát s PLGA a vodou jako trojité systémy. NMP vykazovala rychlou změnu skupenství spojenou s vysokým burst efektem, v důsledku vytváření struktury porézního elastického gelu. Na rozdíl od ostatních rozpouštědel jako triacetin a ethylbenzoát, které slabě rozpouštěly PLGA a měli nízkou hodnotu tuhnutí. To mělo za následek pomalou gelaci, která významně snižovala burst efekt.

Z výzkumu vyplývá, že typ rozpouštědla a koncentrace polymeru jsou rozhodujícími faktory určujícími profil uvolňování. K potlačení iniciační drug burst je obvykle nutná vysoká koncentrace polymeru. Toto lze pozorovat při podmínkách in vitro a pravděpodobně i in vivo.

2.4 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

D,L-PLA	D,L konfigurace kyseliny poly(mléčné)
DMSO	dimethylsulfoxid
L-PLA	L konfigurace kyseliny poly(mléčné)
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
O/O emulze	emulze typu olej v oleji
PEG	poly(ethylenglykol)
PEO	poly(ethylenoxid)
PGA	kyselina poly(glykolová)
PLA	kyselina poly(mléčná)
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
PPO	poly(propylenoxid)
PVA	polyvinylalkohol
SABER	acetát isobutyrát sacharózy
Tg	teplota skelného přechodu

3. CÍL PRÁCE

Téma rigorózní práce, metodika jeho řešení a předpokládané cíle byly formulovány v návaznosti na výsledky prezentované v diplomové práci obhájené v červnu 2007. V této diplomové práci byly studovány interakce dvou velmi podobných oligoesterů s větvenou konstitucí molekuly lišících větvící složkou. Jedním z nich byl terpolymer ekvimolekulární směsi kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a 3 % mannitolu, druhým byl obdobný terpolymer obsahující 3 % dipentaerytritolu. Značné rozdíly v chování těchto dvou biodegradabilních nosičů v hydrofilním médiu především při jejich botnání vedlo k rozšíření tématu o soubor dalších nosičů lišících se počtem větví v hvězdicovité struktuře. Zadání tématu k řešení je možno rozčlenit do následujících bodů:

- Vybrat terpolymer kyselin DL-mléčné a glykolové s pentaerytritolem, dipentarytritolem a tripentaerytritolem, které mají čtyři, šest nebo osm hydroxylů schopných tvořit esterové vazby. Stupeň větvení, molekulová hmotnost a polydisperzita byly parametry, které byly ovlivněny různou koncentrací větvící složky.
- Z vybraných oligoesterů a polyesterů připravit vzorky a měřit jejich hmotnost ve zbotnalém a vysušeném stavu a vypočítat z výsledků hodnoty stupně botnání a eroze.
- Jako hydrofilní médium vyzkoušet čištěnou vodu a fosfátcitrátový pufr pH 7,0.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

4.1.1 Chemikálie

Oligoesterové nosiče (viz tab. 1), Katedra farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta v Hradce Králové
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a., Lachema a.s.
Kyselina citrónová p.a., Lachema a.s.
Azid sodný, Fluka
Destilovaná voda, Farmaceutická fakulta

4.1.2 Přístroje

Analytické digitální váhy, KERN ABS (max. 220 g, d = 0,1 mg)
Digitální váhy, KERN 440 – 53 (max. 6000 g, d = 1 g)
Horkovzdušná sušárna, HSPT.200
Biologický termostat, BT 120, Laboratorní přístroje Praha
Potenciometr digitální s pH – metrem, Mini Lab, Model IQ 125 Profesional

4.1.3 Charakteristika použitého oligosterového nosiče

Syntéza: stupňová kopolymerace ternární směsi složené z ekvimolárního podílu kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové doplněné pentaerytritolem nebo dipentaerytritolem nebo tripentaerytritolem v koncentracích 1 %, 2 %, 3 %, 5 %.

Tab.1

označ.	M_n	M_w	M_z	M_{z+1}	Polydisp.	Tg_1	Cp	Tg_2	Cp
1P	2944	8422	14568	20771	2,86	26,6	0,600		
3P	2440	5231	8342	11778	2,14	22,2	0,416		
5P	1711	2869	4084	5397	1,68	12,7	0,453		
1D	1889	5306	9669	13825	2,81	-42,5	3,686	16,1	0,912
2D	2645	6174	9271	12391	2,33	-34,3	3,674	17,9	1,618
3D	3600	5300	8100	11050	1,47	27,2	0,652		
5D	1900	2300	5600	7100	1,21	16,3	0,540		
1T	2877	12035	26284	41062	4,18	25,3	0,656		
3T	3355	13334	27152	43224	3,97	21,7	0,508		
5T	3016	8555	15025	22625	2,84	17,2	0,471	41,9	0,280

Vysvětlivky k tab. 1:

Použité symboly: P – pentaerytritol; D – dipentaerytritol; T- tripentaerytritol;

M_n – číselně střední relativní molekulová hmotnost; M_w – hmotnostně střední relativní molekulová hmotnost; Polydisp. – stupeň polydisperzity; T_{g1} – první teplota skelného přechodu; T_{g2} – druhá teplota skelného přechodu; Cp – měrné teplo

4.2 STANOVENÍ STUPNĚ BOTNÁNÍ A EROZE TESTOVANÉHO NOSIČE

4.2.1 Příprava vzorků testovaných nosičů

Z testovaného polymeru byla skalpelem připravena tělíska požadované hmotnosti 150 mg ± 5 %. Tělísko bylo přeneseno do scintilační lahvičky označené štítkem.

Pro označování štítků byla použita následující symbolika:

druh polymeru / **V** (voda) *nebo* **7** (pufr) / opakování vzorku

Vysvětlivky zkratek:

1P	oligoesterový nosič s přídavkem pentaerytritolu
3P	oligoesterový nosič s přídavkem pentaerytritolu
5P	oligoesterový nosič s přídavkem pentaerytritolu
1D	oligoesterový nosič s přídavkem dipentaerytritolu
2D	oligoesterový nosič s přídavkem dipentaerytritolu
3D	oligoesterový nosič s přídavkem dipentaerytritolu
5D	oligoesterový nosič s přídavkem dipentaerytritolu
1T	oligoesterový nosič s přídavkem tripentaerytritolu
3T	oligoesterový nosič s přídavkem tripentaerytritolu
5T	oligoesterový nosič s přídavkem tripentaerytritolu
7	izotonický fosfátcitrátový pufr o pH 7
V	voda
A	opakování vzorku
B	opakování vzorku

4.2.2 Příprava testovacích médií

Pro studium botnání a eroze byla jako média použita voda a fosfátcitrátový pufr.

Fostátcitrátový pufr byl připraven podle chemických tabulek[49], kde se pufr o daném pH připraví smísením x-dílů roztoku A a (100-x) dílů roztoku B. Roztok A představuje roztok kyseliny citrónové o koncentraci 21,014 g/l, roztok B je

roztok hydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci 35,60 g/l, počítáno jako dihydrát.

Pro pH 7 je roztok A 190 ml 0,1 M monohydrátu kyseliny citrónové a roztok B 810 ml 0,2 M dihydrátu hydrogenfosforečnanu disodného.

Po důkladném rozpuštění byla hodnota pH zkontrolována digitálním pH-metrem a eventuální odchylky byly upraveny malým množstvím kyseliny citrónové nebo hydrogenfosforečnanu disodného na požadovanou hodnotu. Na závěr bylo pro stabilizaci přidáno 0,2 g/l azidu sodného, který v pufru tvoří 0,02 % celkové koncentrace.

4.2.3 Postup při stanovení stupně botnání a eroze

Požadované množství vzorku bylo dáno do vytárované označené scintilační lahvičky a zváženo. Tato hmotnost byla zaznamenána jako m_0 . Označené scintilační lahvičky se vzorkem byly zality médiem v množství 15,0 g, uzavřeny a vloženy do biologického termostatu s nastavenou hodnotou teploty na 37°C. Ve stanovených časových intervalech (po 1, 3, 7, 14, 21, 28mi dnech) byly vyjmuty z termostatu a médium opatrně vylito. Stěny lahviček byly osušeny pomocí buničité vaty namotané na špejli a pomocí fénu. Poté byly lahvičky zváženy na analytických vahách a tato hmotnost byla zaznamenána jako m_b. Lahvičky pak byly vloženy do horkovzdušné sušárny, kde se sušily 1 den při teplotě 70°C do konstantní hmotnosti. Po vysušení byly lahvičky zváženy na analytických vahách a tato hmotnost zaznamenána jako m_s. U ostatních lahviček bylo médium měněno ve stejných intervalech jako probíhaly odběry vzorků. Testovaly se vždy dva vzorky pro každé médium.

4.2.4 Vzorce na výpočet botnání a eroze

Stupeň botnání:

$$B = \frac{m_b - m_s}{m_s} \cdot 100 \quad [\%]$$

B …stupeň botnání v %

m_b …hmotnost vzorku po vylití pufru

m_s …hmotnost vzorku po vysušení

Stupeň eroze:

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

E …stupeň eroze v %

m_0 …hmotnost původní navážky polymeru

m_s …hmotnost vzorku po vysušení

5. VÝSLEDKY – TABULKY A GRAFY

Tab. Ia - Časový průběh stupně botnání polymeru 1P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
1P/V/A	16,02	32,55	54,60	22,38	59,51	807,14
1P/V/B	26,51	21,98	46,82	23,75	51,38	546,15
1P/7/A	29,04	58,28	145,49	200,95	308,37	502,36
1P/7/B	35,06	37,48	116,19	198,28	304,80	326,88

Tab. Ib - Časový průběh stupně eroze polymeru 1P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
1P/V/A	99,93	99,22	89,68	46,33	10,79	0,83
1P/V/B	100,00	99,68	86,73	47,45	12,23	0,90
1P/7/A	99,87	99,87	92,41	45,07	26,61	14,78
1P/7/B	100,58	100,06	92,05	48,31	25,29	16,32

Tab. IIa - Časový průběh stupně botnání polymeru 3P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
3P/V/A	12,28	15,93	28,88	22,47	20,26	58,71
3P/V/B	19,37	15,14	26,39	24,12	28,51	64,63
3P/7/A	16,02	28,36	108,58	106,04	51,36	52,46
3P/7/B	8,51	20,00	125,94	109,15	50,18	29,02

Tab. IIb - Časový průběh stupně eroze polymeru 3P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
3P/V/A	99,81	98,74	89,22	58,13	28,81	10,57
3P/V/B	99,87	98,23	88,43	59,28	31,78	15,23
3P/7/A	99,80	101,16	85,77	62,34	35,41	27,77
3P/7/B	100,58	99,68	88,75	61,20	39,78	32,88

Tab. IIIa - Časový průběh stupně botnání polymeru 5P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
5P/V/A	9,37	17,96	36,52	14,50	21,31	40,10
5P/V/B	7,86	15,29	15,00	13,17	16,75	31,62
5P/7/A	16,92	28,25	17,58	18,34	25,09	15,19
5P/7/B	17,53	34,65	27,94	20,44	38,33	16,85

Tab. IIIb - Časový průběh stupně eroze polymeru 5P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
5P/V/A	96,32	92,36	77,22	65,80	48,38	31,03
5P/V/B	97,38	91,03	80,83	68,37	48,78	25,97
5P/7/A	98,09	93,28	80,36	66,96	58,54	50,98
5P/7/B	97,48	92,44	79,68	65,26	60,37	54,00

Tab. IVa - Časový průběh stupně botnání polymeru 1D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
1D/V/A	16,70	31,09	15,59	27,19	129,33	28,57
1D/V/B	16,10	27,21	14,57	29,12	103,26	17,65
1D/7/A	104,93	144,78	284,75	187,53	293,81	27,27
1D/7/B	94,58	147,18	297,00	225,57	327,48	47,98

Tab. IVb - Časový průběh stupně eroze polymeru 1D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
1D/V/A	99,06	95,28	74,32	26,72	4,95	0,90
1D/V/B	98,73	97,46	77,18	26,42	6,06	1,15
1D/7/A	96,32	93,91	62,48	30,72	19,22	9,83
1D/7/B	95,27	93,48	62,67	29,90	20,99	14,65

Tab. Va - Časový průběh stupně botnání polymeru 2D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
2D/V/A	9,75	44,09	29,61	35,43	103,49	557,14
2D/V/B	18,23	37,37	45,06	42,15	106,32	420,00
2D/7/A	61,49	142,63	89,23	100,71	51,55	80,09
2D/7/B	73,89	130,05	76,34	69,59	59,18	97,35

Tab. Vb - Časový průběh stupně eroze polymeru 2D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
2D/V/A	98,40	81,41	61,46	22,61	5,96	0,93
2D/V/B	97,37	84,88	61,13	23,56	6,03	0,95
2D/7/A	93,31	83,17	52,40	28,45	21,00	14,48
2D/7/B	92,30	88,13	53,58	29,00	20,35	15,76

Tab. VIa - Časový průběh stupně botnání polymeru 3D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
3D/V/A	33,21	16,64	38,52	22,26	37,79	65,86
3D/V/B	32,61	30,38	41,19	19,91	48,25	85,17
3D/7/A	27,74	34.68	117,20	127,48	76,14	113,50
3D/7/B	40,41	65,89	86,23	110,74	67,55	119,96

Tab. VIb - Časový průběh stupně eroze polymeru 3D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
3D/V/A	98,18	97,57	84,3	60,58	32,9	13,63
3D/V/B	96,52	97,2	86,08	61,67	31,46	15,7
3D/7/A	97,58	99,49	90,64	65,16	39,46	32,43
3D/7/B	98,31	103,78	91,72	62,72	40,23	37,38

Tab. VIIa - Časový průběh stupně botnání polymeru 5D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
5D/V/A	13,76	24,96	14,88	15,14	18,15	21,88
5D/V/B	14,89	15,54	13,16	14,69	18,99	30,51
5D/7/A	17,89	9,24	10,79	11,85	22,44	30,55
5D/7/B	14,94	10,59	13,58	15,93	22,41	37,12

Tab. VIIb - Časový průběh stupně eroze polymeru 5D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
5D/V/A	87,61	81,12	73,96	65,78	61,55	50,41
5D/V/B	88,16	80,00	73,48	63,82	57,97	49,93
5D/7/A	93,64	82,42	72,66	67,52	64,55	63,42
5D/7/B	91,16	82,64	74,68	67,53	58,93	57,36

Tab. VIIIa - Časový průběh stupně botnání polymeru 1T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
1T/V/A	20,52	27,41	61,74	25,54	44,09	125,00
1T/V/B	19,69	29,96	67,40	13,90	72,07	129,09
1T/7/A	56,56	97,74	160,59	400,27	541,10	383,47
1T/7/B	54,17	102,84	208,74	404,03	525,93	374,94

Tab. VIIIb - Časový průběh stupně eroze polymeru 1T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
1T/V/A	99,49	99,44	81,55	42,26	14,16	3,58
1T/V/B	99,16	99,36	82,01	42,38	11,39	0,85
1T/7/A	99,87	95,87	80,82	50,17	30,95	24,97
1T/7/B	100,73	95,17	80,82	49,90	30,80	28,24

Tab. IXa - Časový průběh stupně botnání polymeru 3T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
3T/V/A	16,81	17,15	54,63	19,89	34,96	1,57
3T/V/B	19,28	28,44	66,26	26,53	35,22	1,70
3T/7/A	18,98	27,75	94,47	141,51	61,18	32,11
3T/7/B	24,19	22,95	118,58	169,35	98,28	33,95

Tab. IXb - Časový průběh stupně eroze polymeru 3T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
3T/V/A	98,99	99,16	88,73	57,69	33,03	13,68
3T/V/B	99,35	99,60	89,40	57,12	28,77	12,39
3T/7/A	99,43	98,99	89,59	57,03	35,45	31,55
3T/7/B	100,65	99,04	88,01	60,84	39,86	31,89

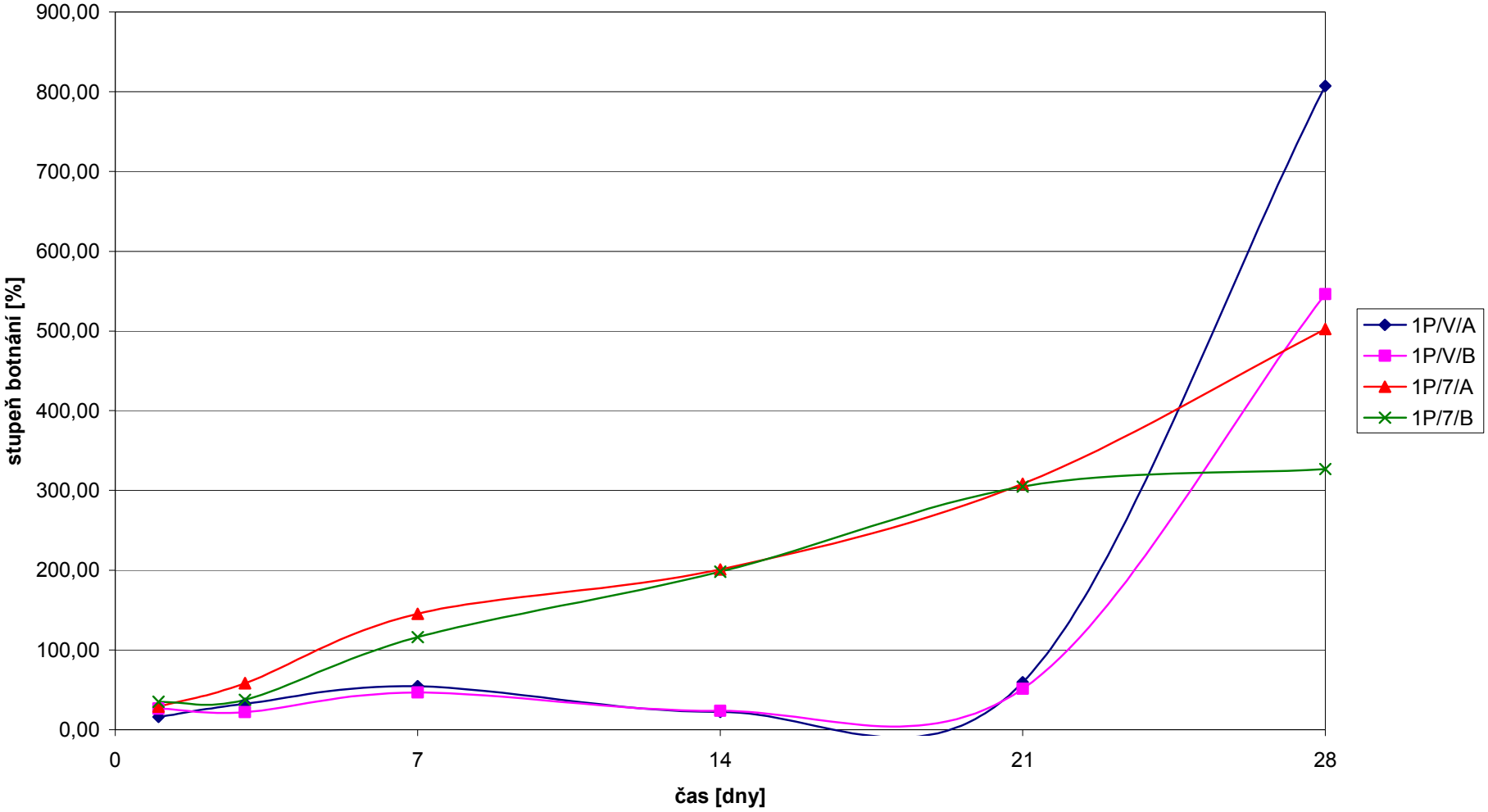
Tab. Xa - Časový průběh stupně botnání polymeru 5T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
5T/V/A	17,70	20,98	38,19	15,50	23,91	6,80
5T/V/B	12,51	21,46	45,65	22,40	23,92	13,95
5T/7/A	10,40	47,56	157,56	143,35	52,02	55,44
5T/7/B	12,08	44,02	121,94	128,31	47,84	35,21

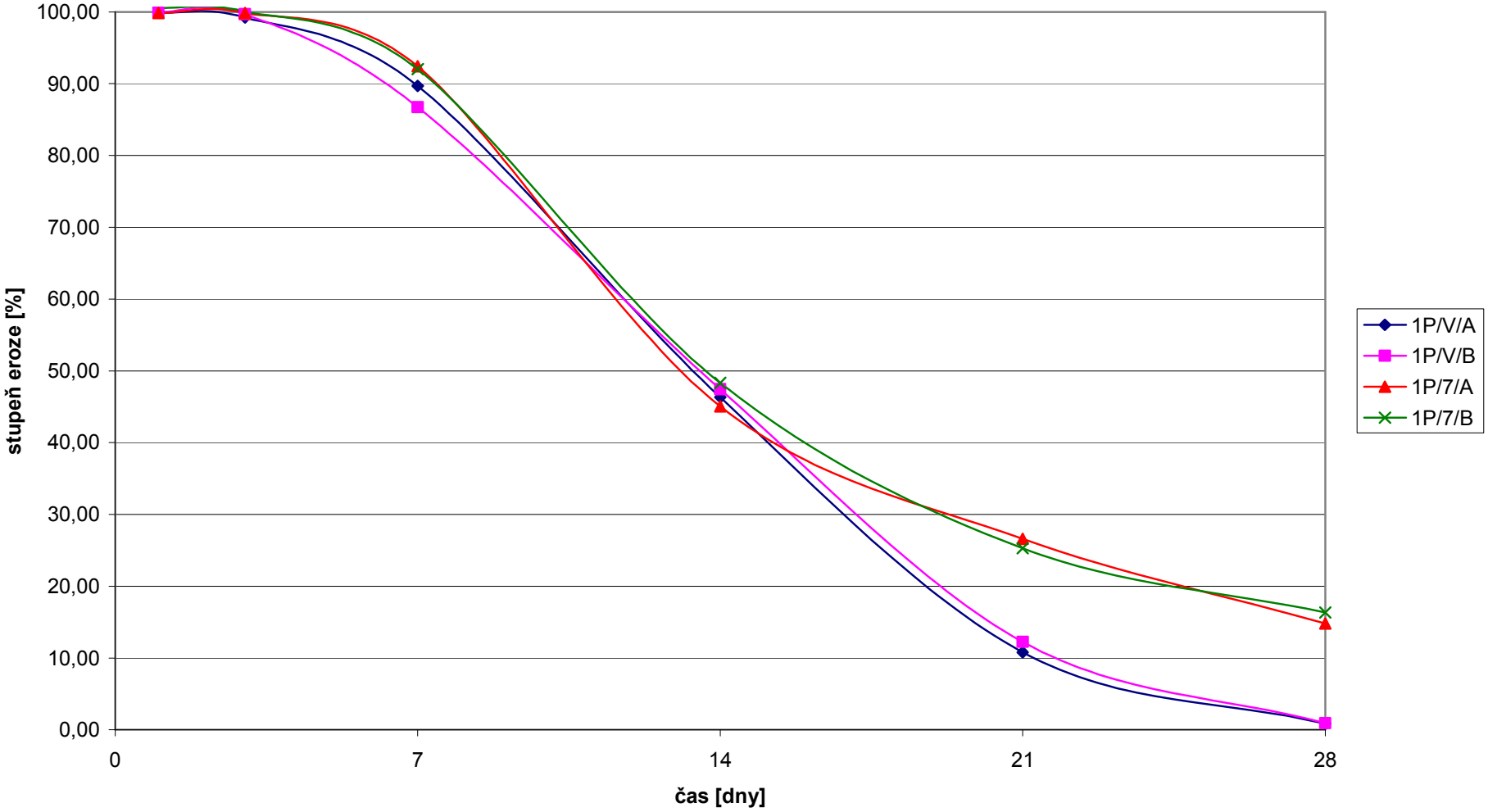
Tab. Xb - Časový průběh stupně eroze polymeru 5T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru

	Čas (dny)					
	1	3	7	14	21	28
5T/V/A	98,46	99,05	87,03	67,51	45,22	28,43
5T/V/B	99,14	99,22	86,74	66,84	41,42	25,90
5T/7/A	99,87	99,61	90,56	67,21	45,62	44,53
5T/7/B	100,29	99,54	86,86	66,73	49,09	46,62

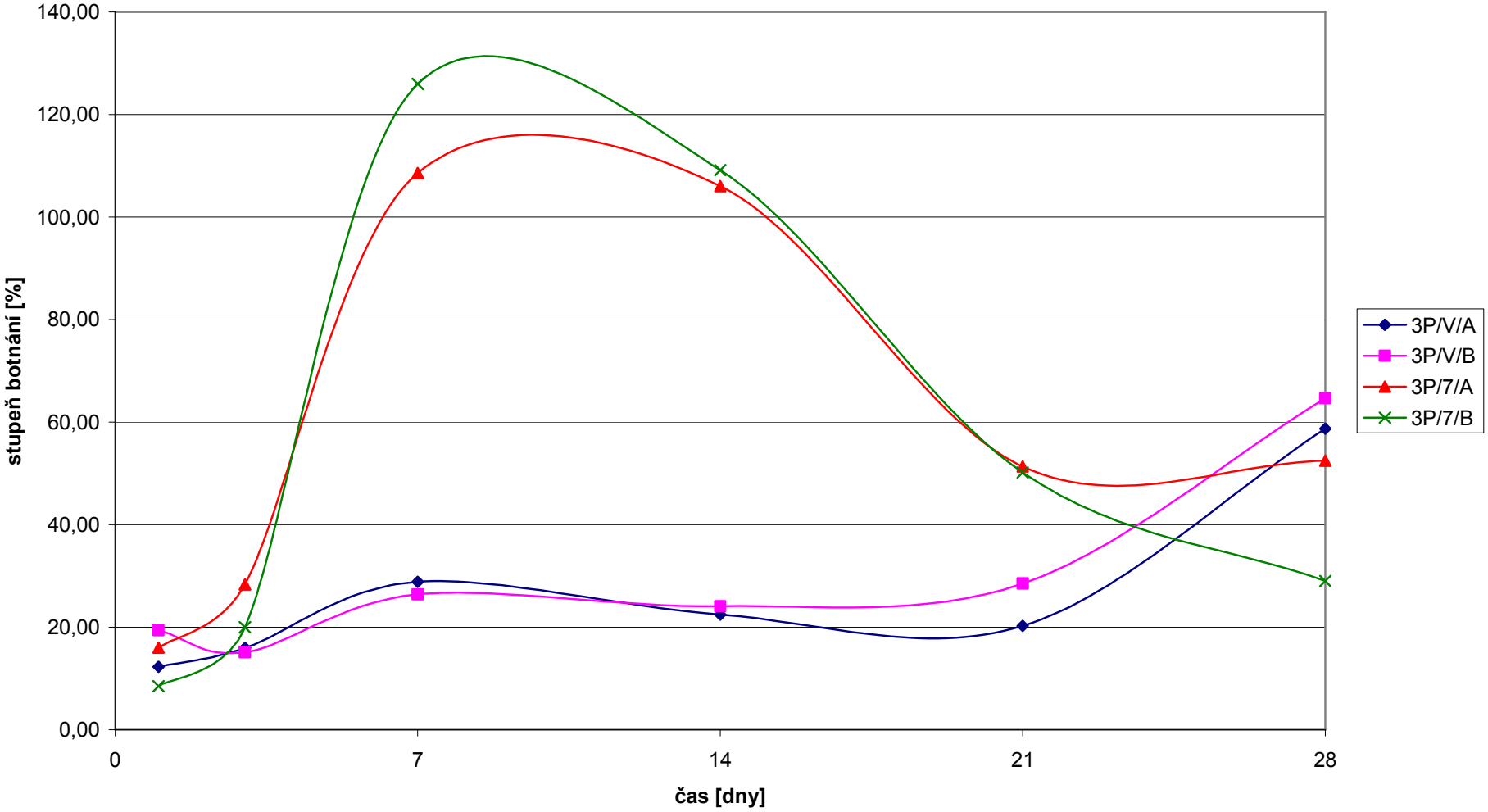
Obrázek 1a - Časový průběh stupně botnání polymeru 1P ve vodě a fostátcitrátovém pufru



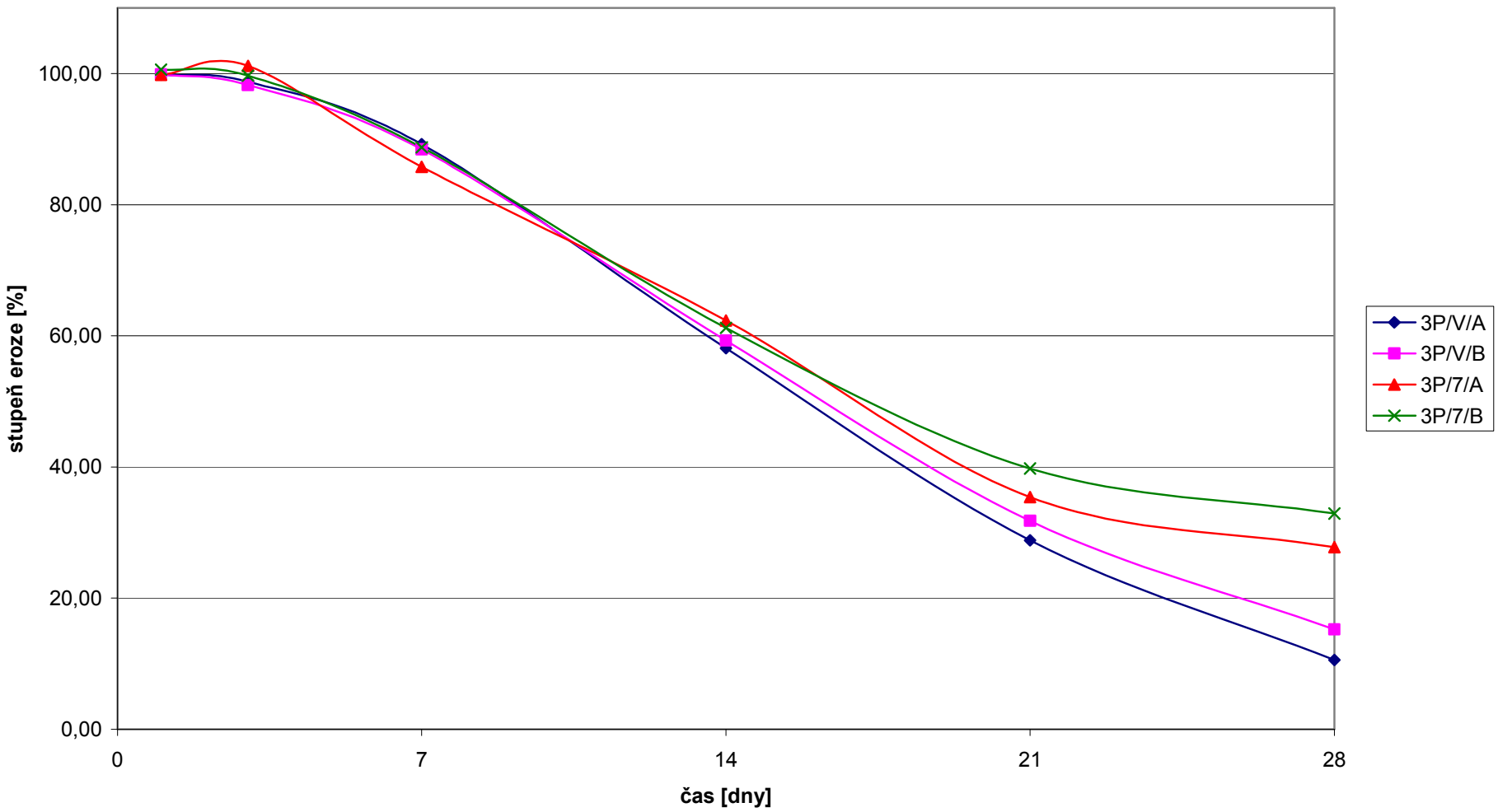
Obrázek 1b - Časový průběh stupně eroze polymeru 1P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



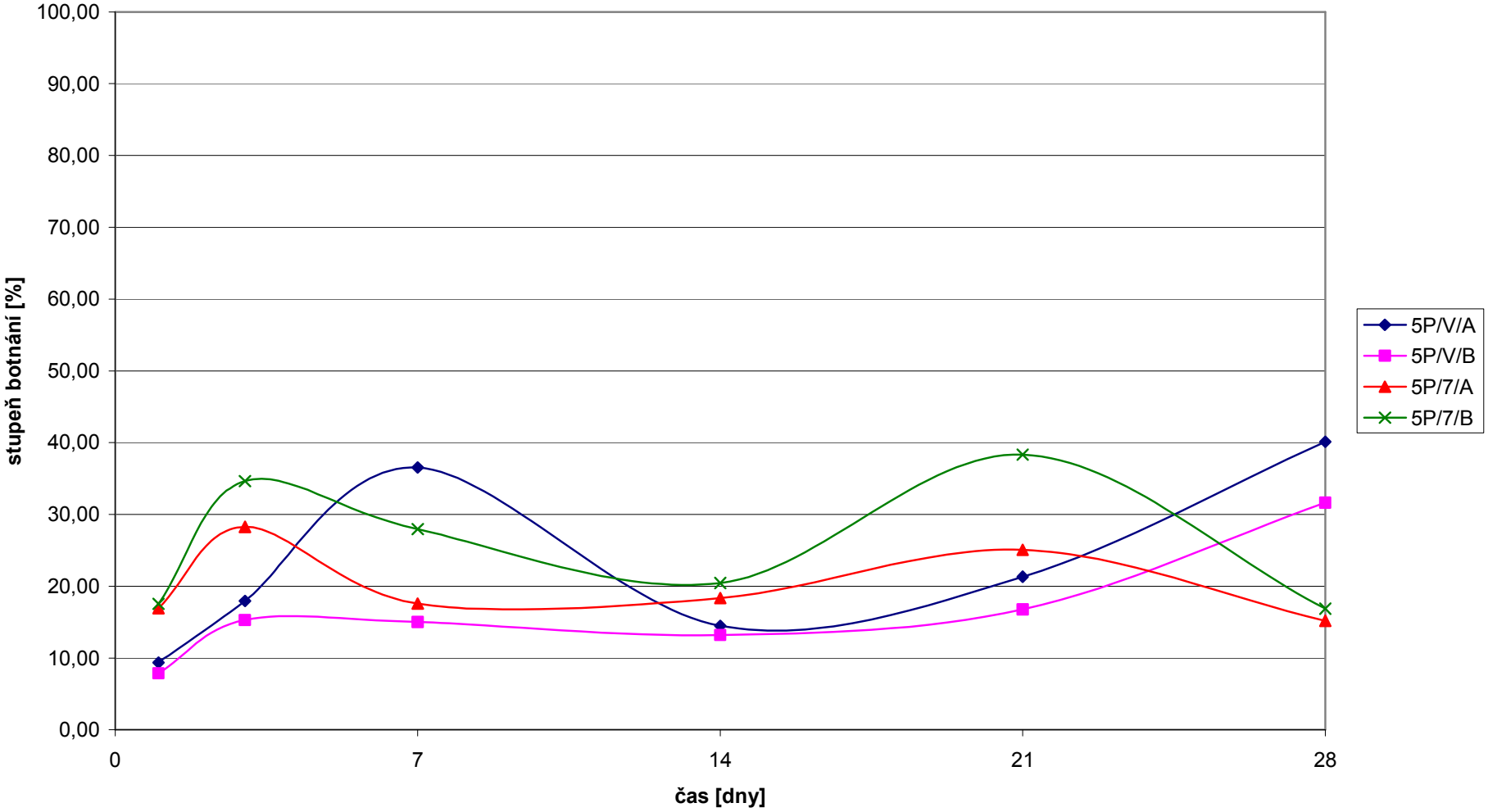
Obrázek 2a - Časový průběh stupně botnání polymeru 3P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



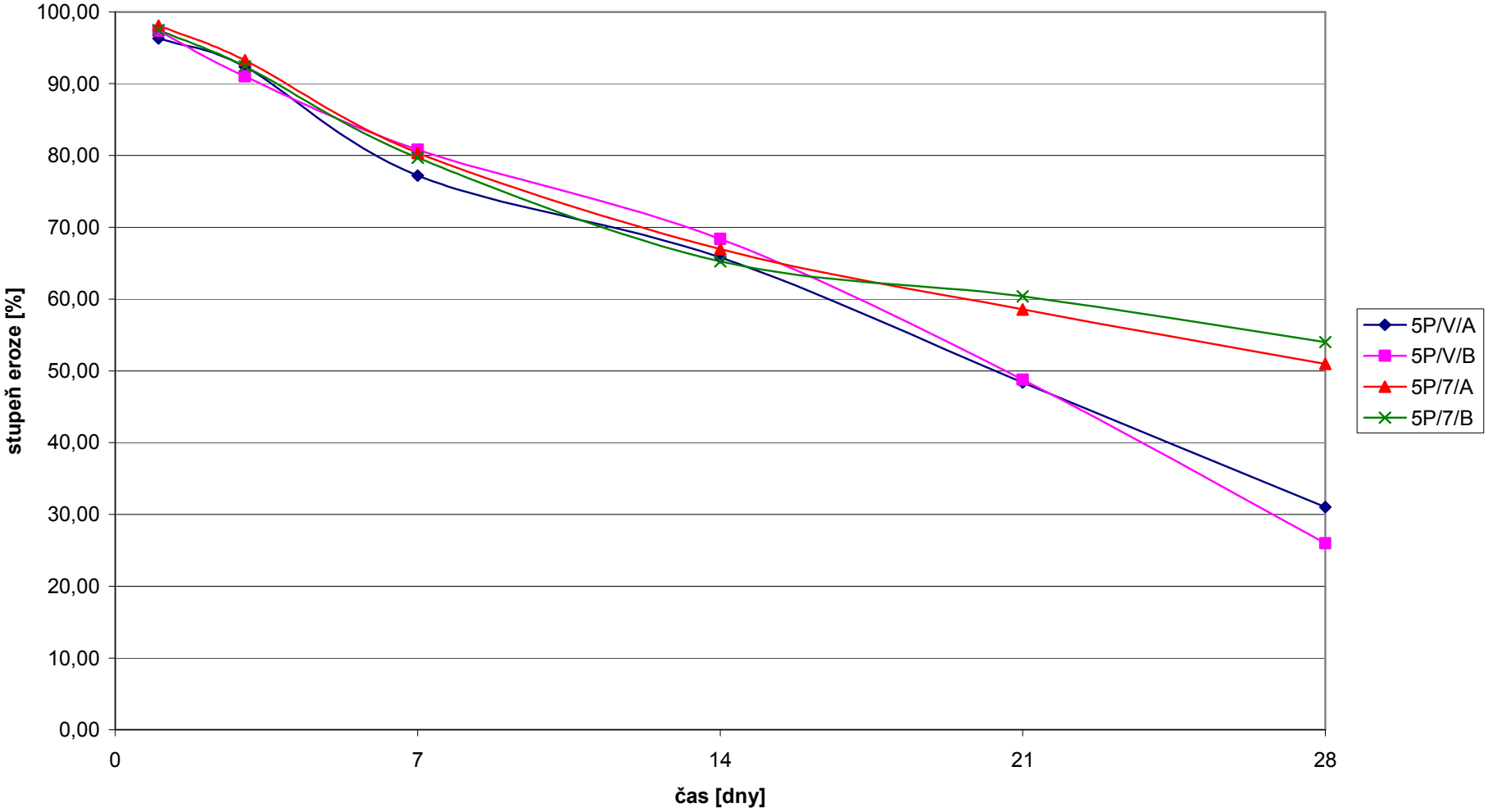
Obrázek 2b - Časový průběh stupně eroze polymeru 3P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



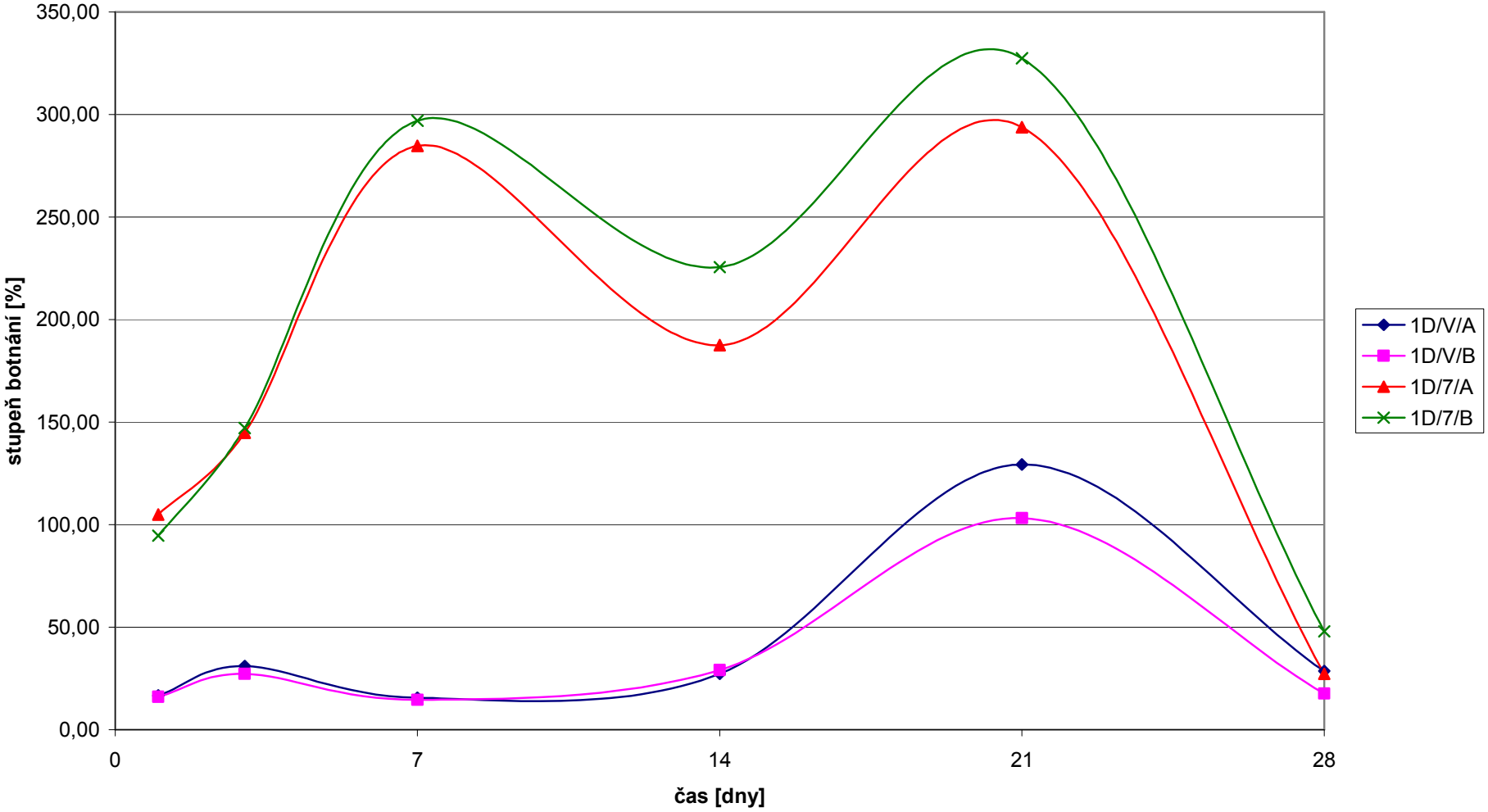
Obrázek 3a - Časový průběh stupně botnání polymeru 5P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



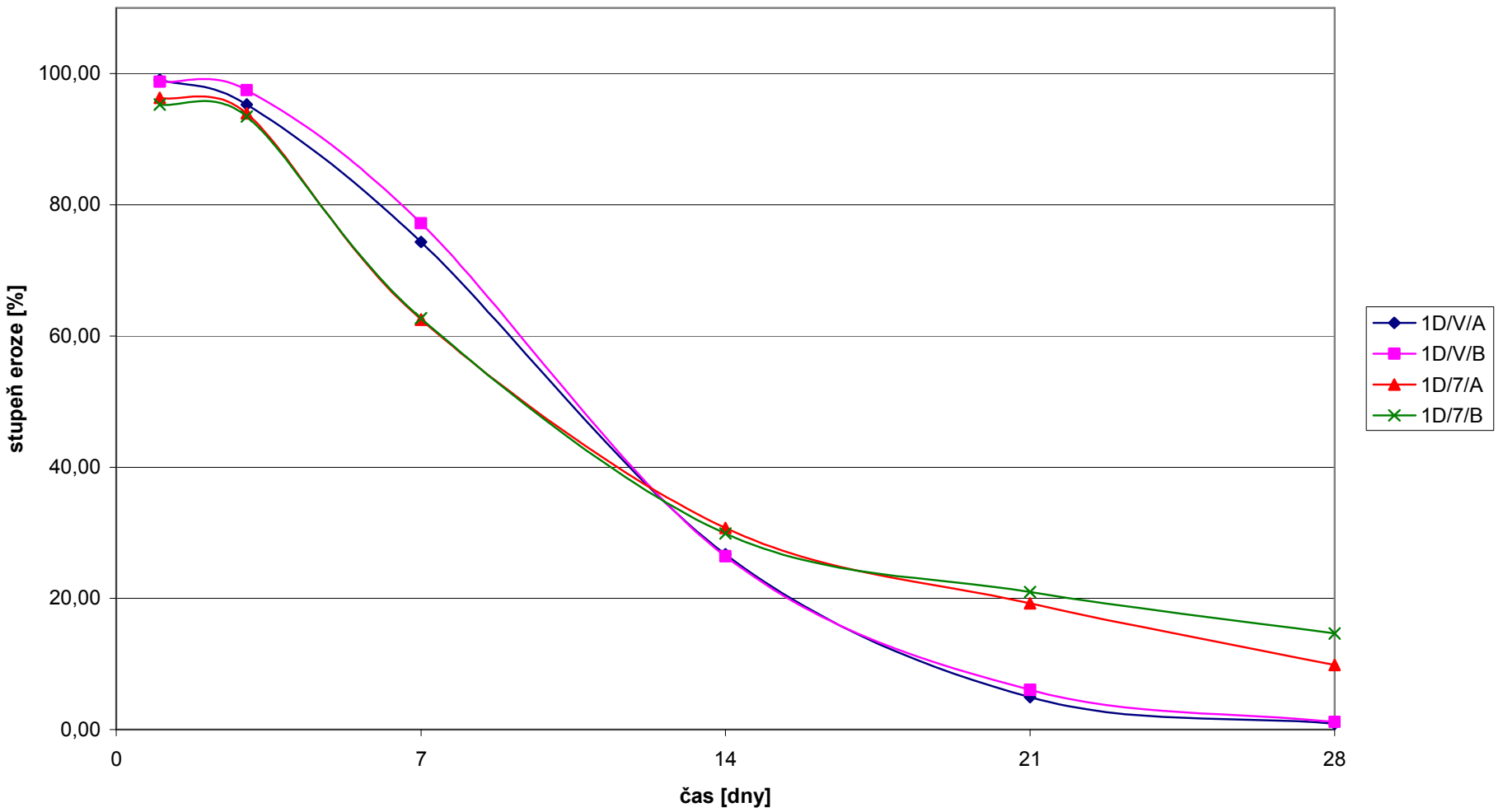
Obrázek 3b - Časový průběh stupně eroze polymeru 5P ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



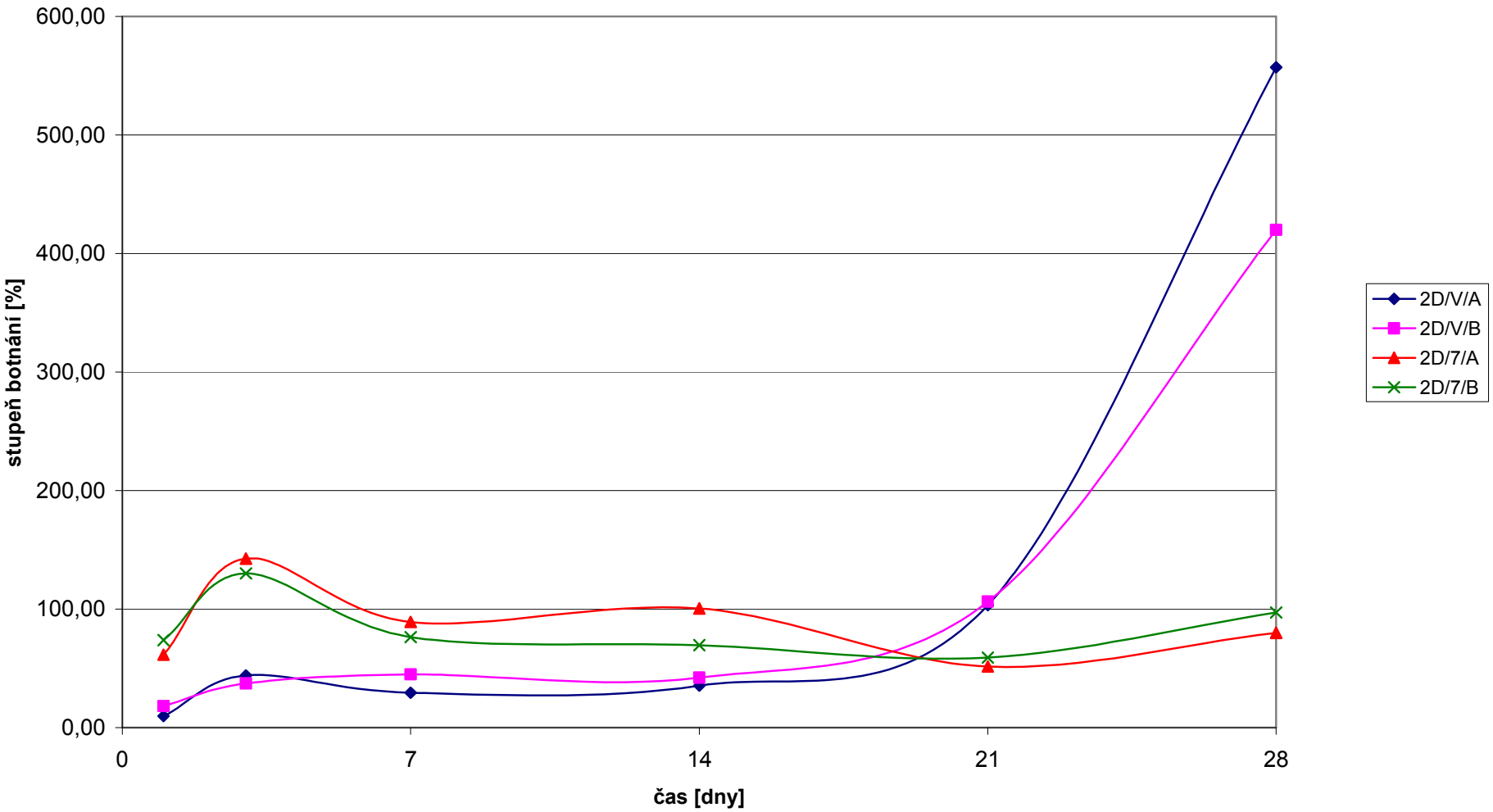
Obrázek 4a - Časový průběh stupně botnání polymeru 1D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



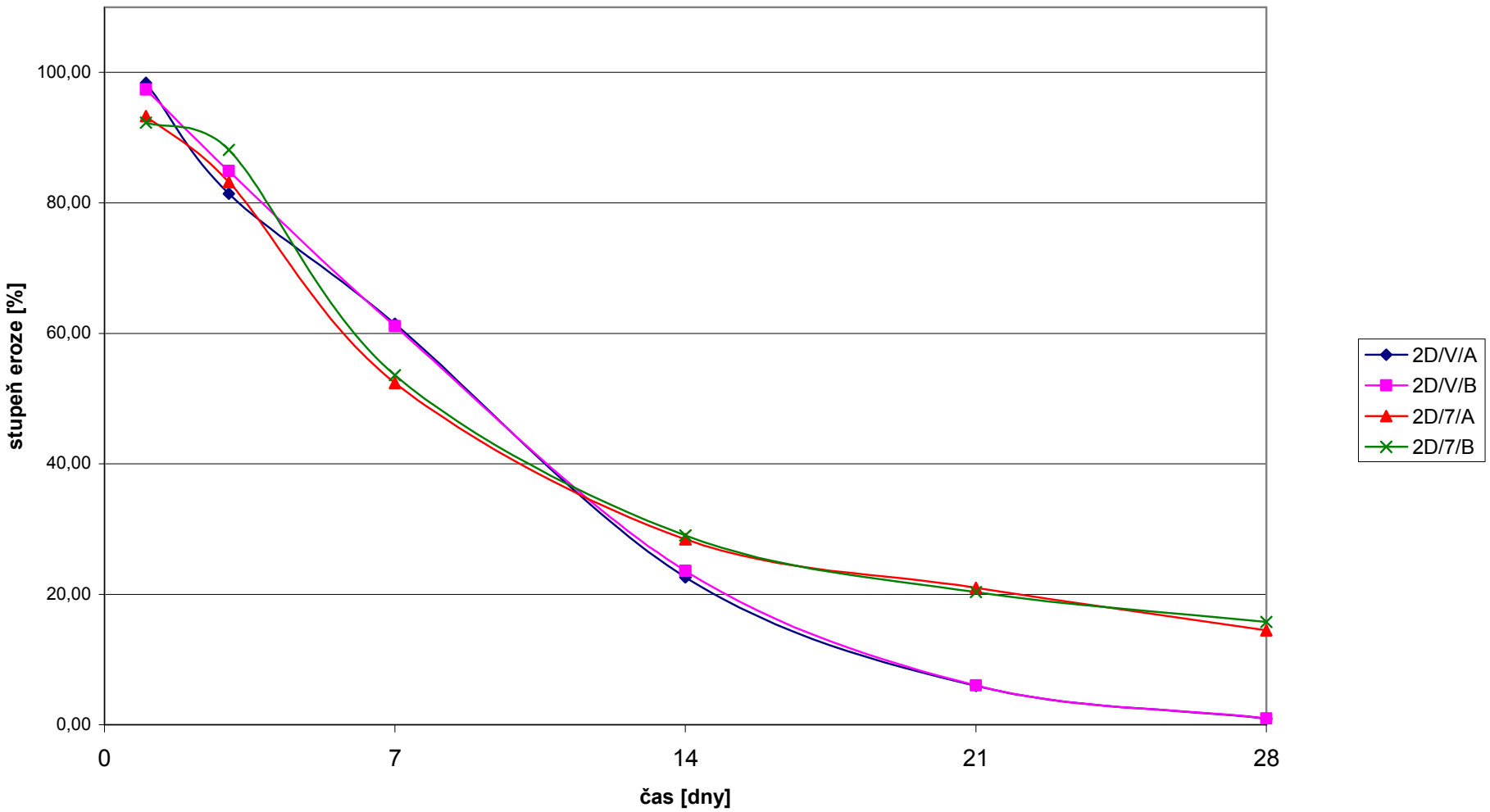
Obrázek 4b - Časový průběh stupně eroze polymeru 1D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



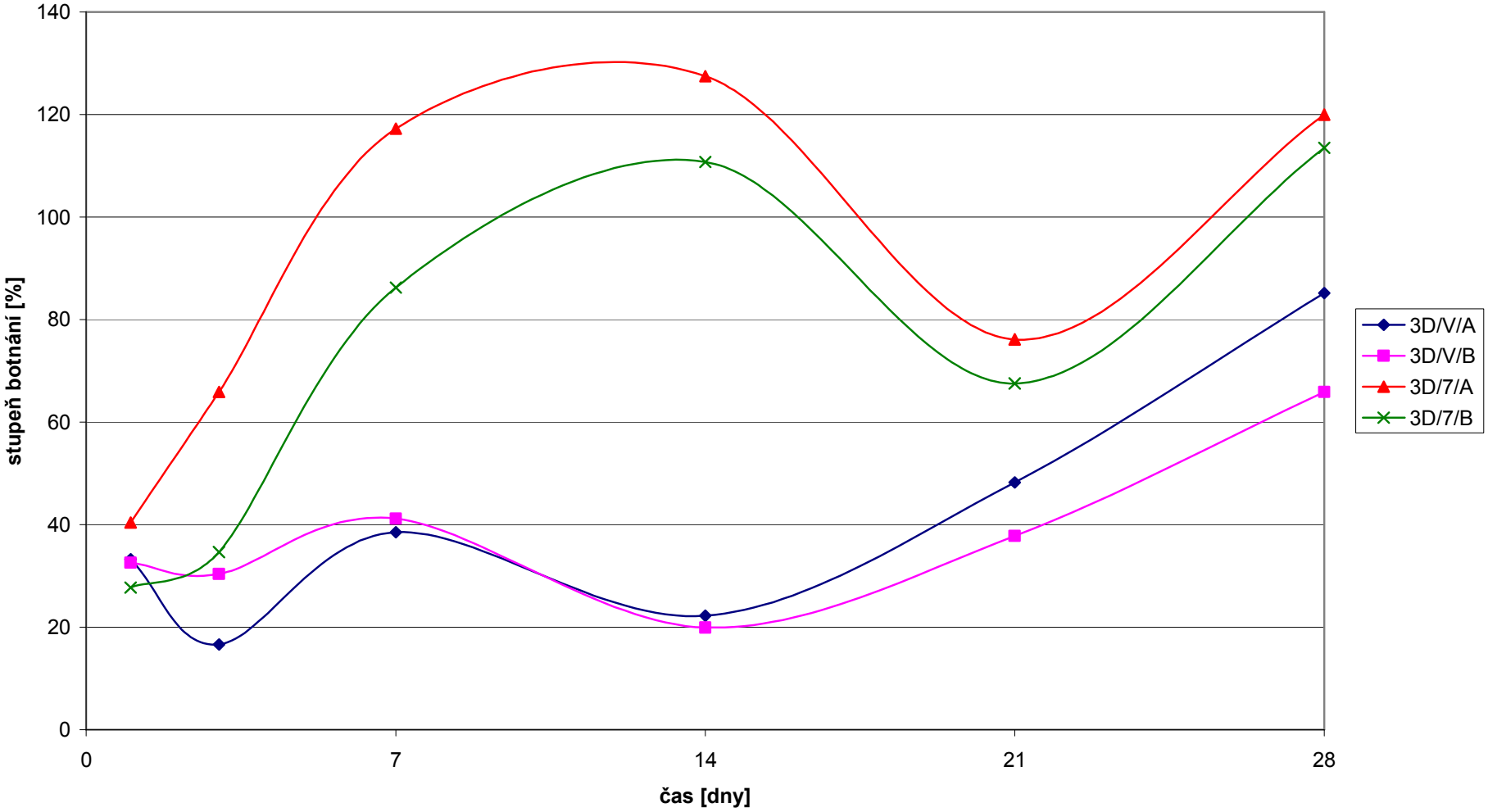
Obrázek 5a - Časový průběh stupně botnání polymeru 2D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



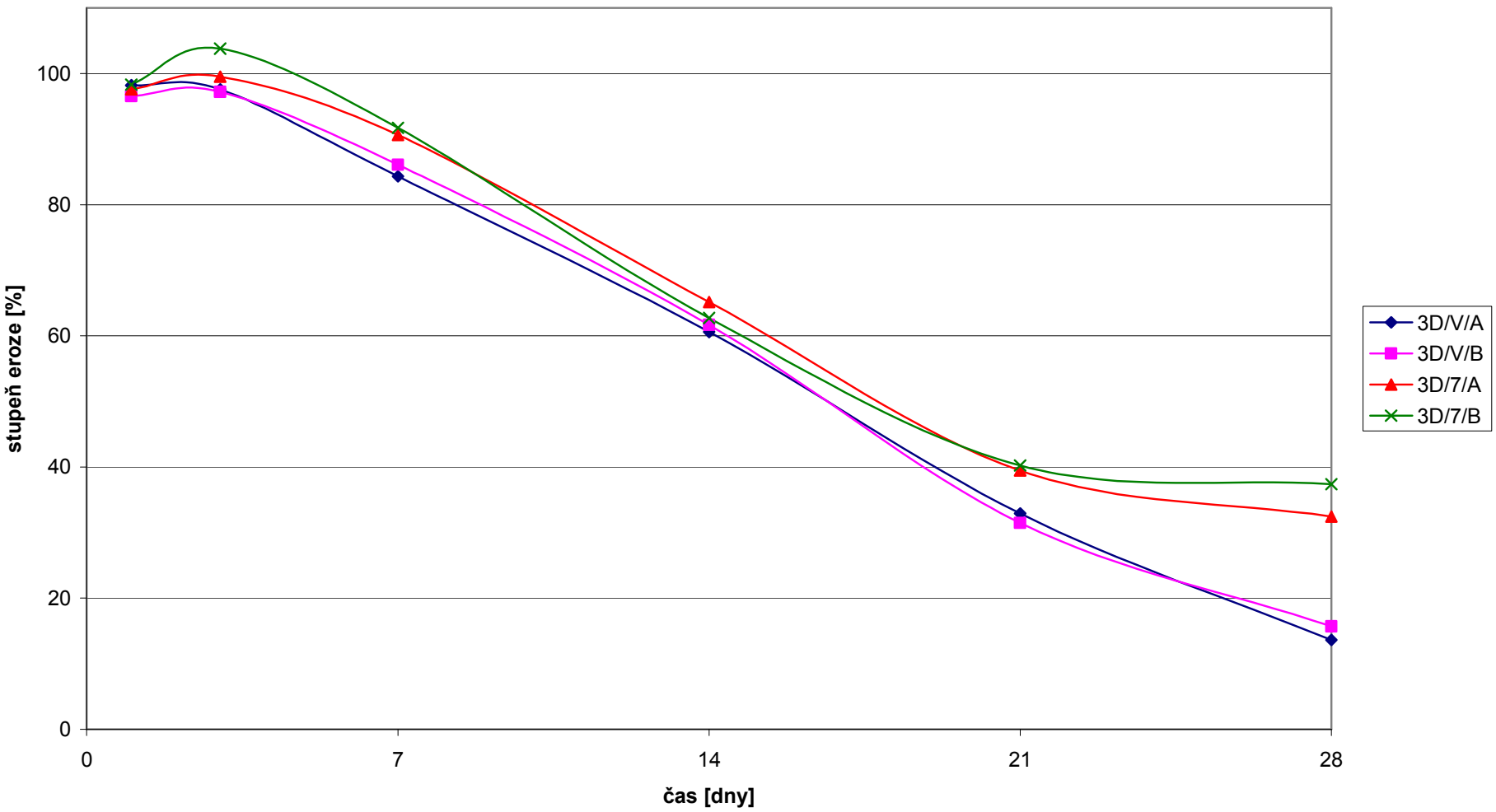
Obrázek 5b - Časový průběh stupně eroze polymeru 2D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



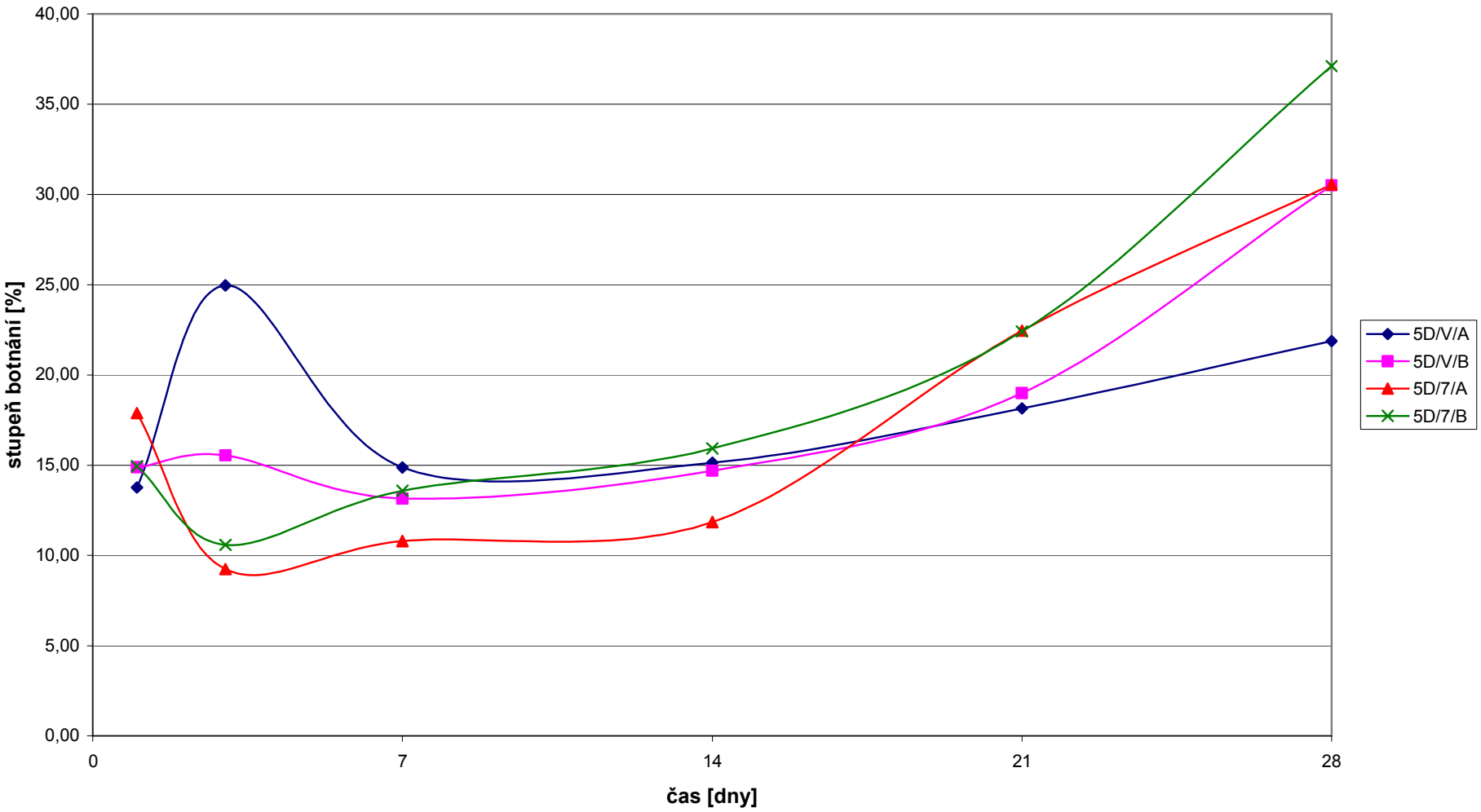
Obrázek 6a - Časový průběh stupně botnání polymeru 3D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



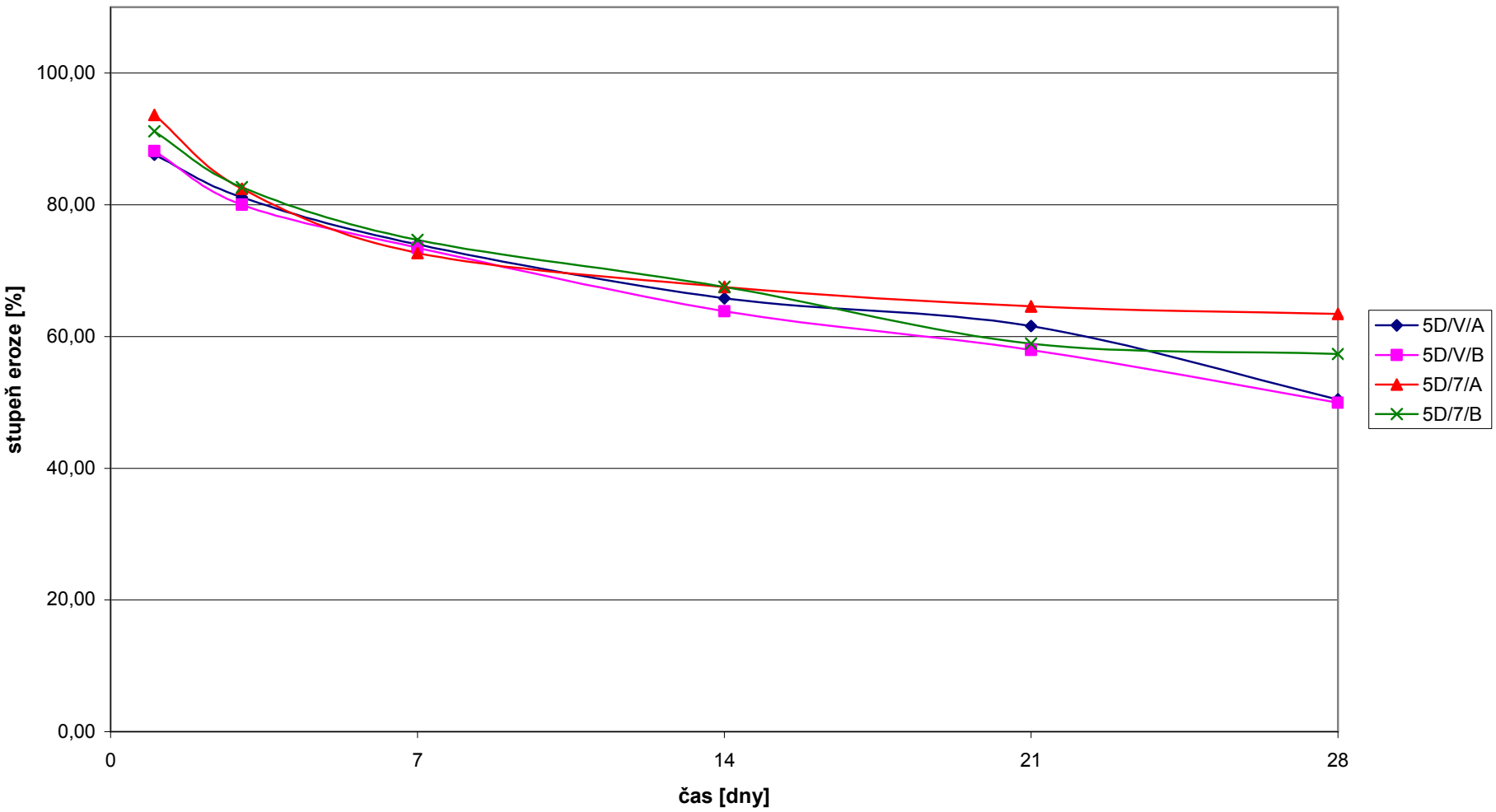
Obrázek 6b - Časový průběh stupně eroze polymeru 3D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



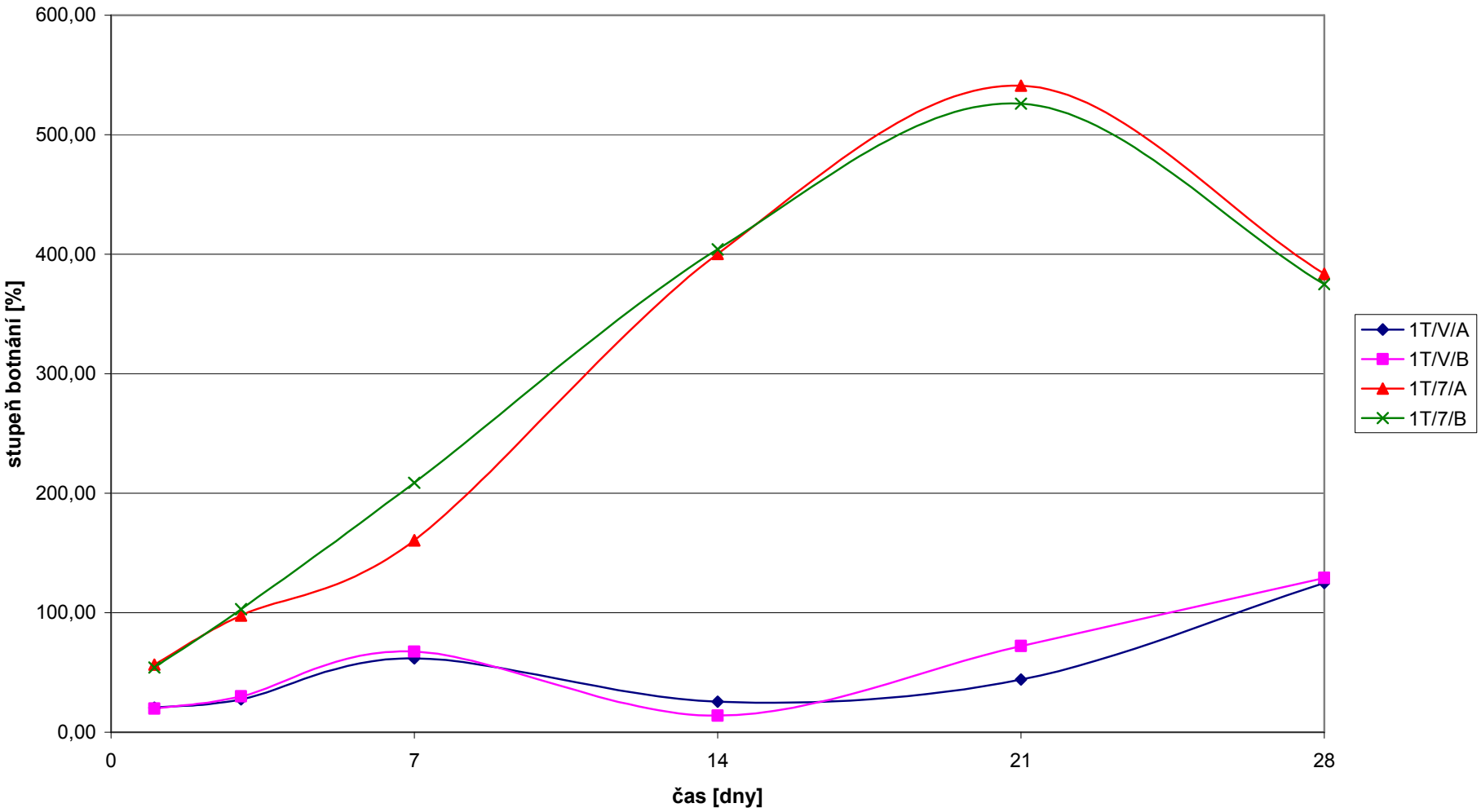
Obrázek 7a - Časový průběh stupně botnání polymeru 5D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



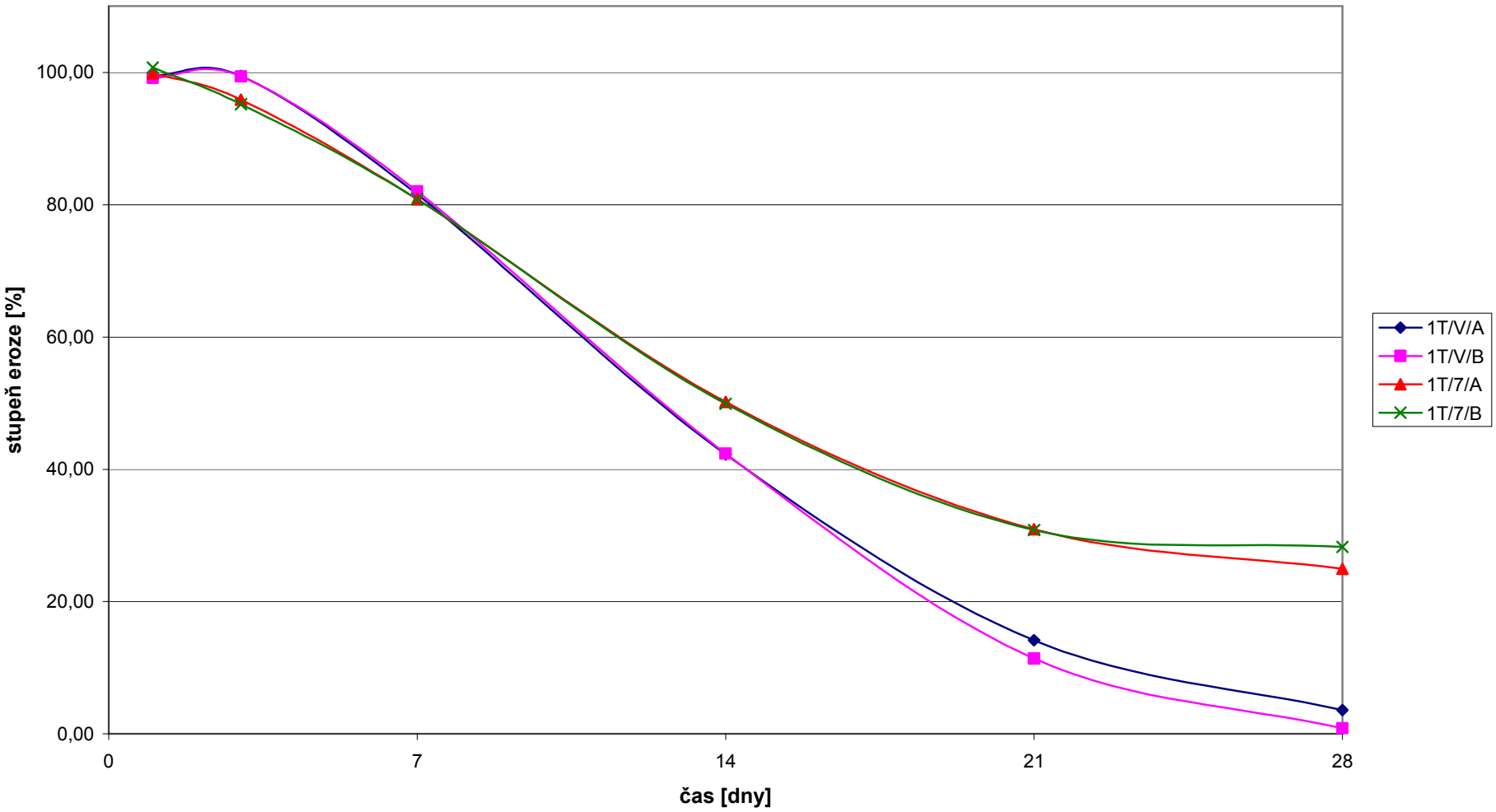
Obrázek 7b - Časový průběh stupně eroze polymeru 5D ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



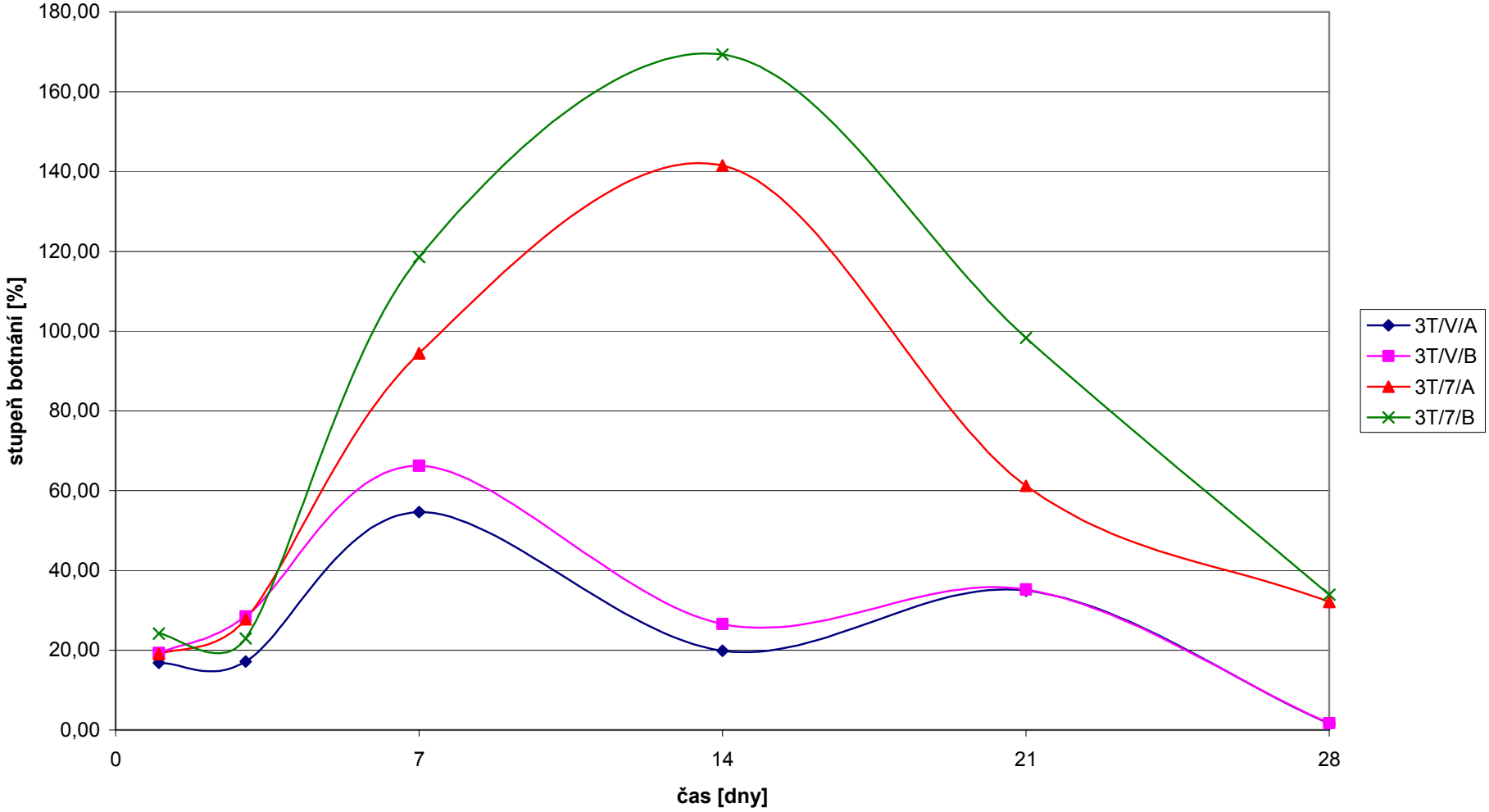
Obrázek 8a - Časový průběh stupně botnání polymeru 1T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



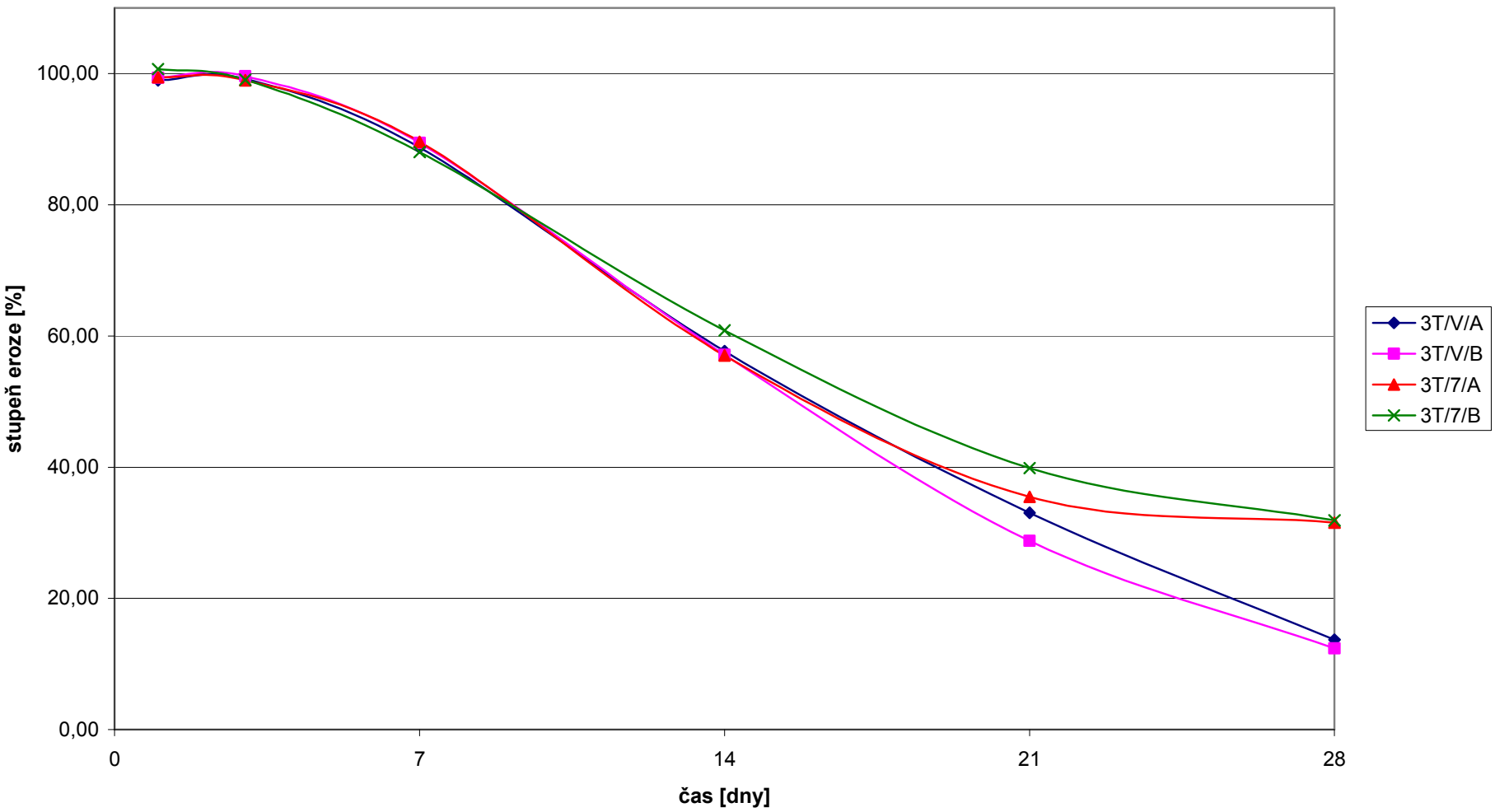
Obrázek 8b - Časový průběh stupně eroze polymeru 1T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



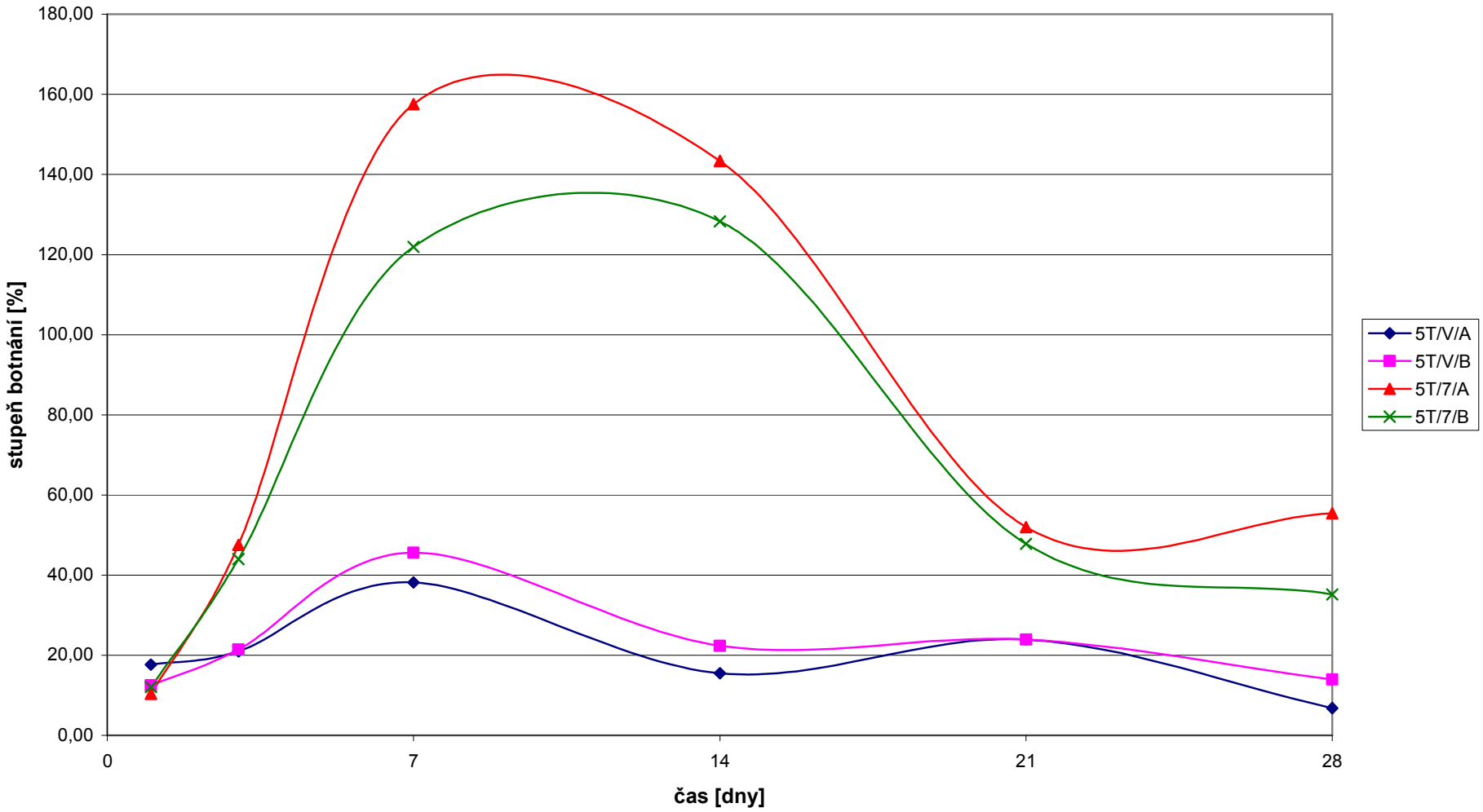
Obrázek 9a - Časový průběh stupně botnání polymeru 3T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



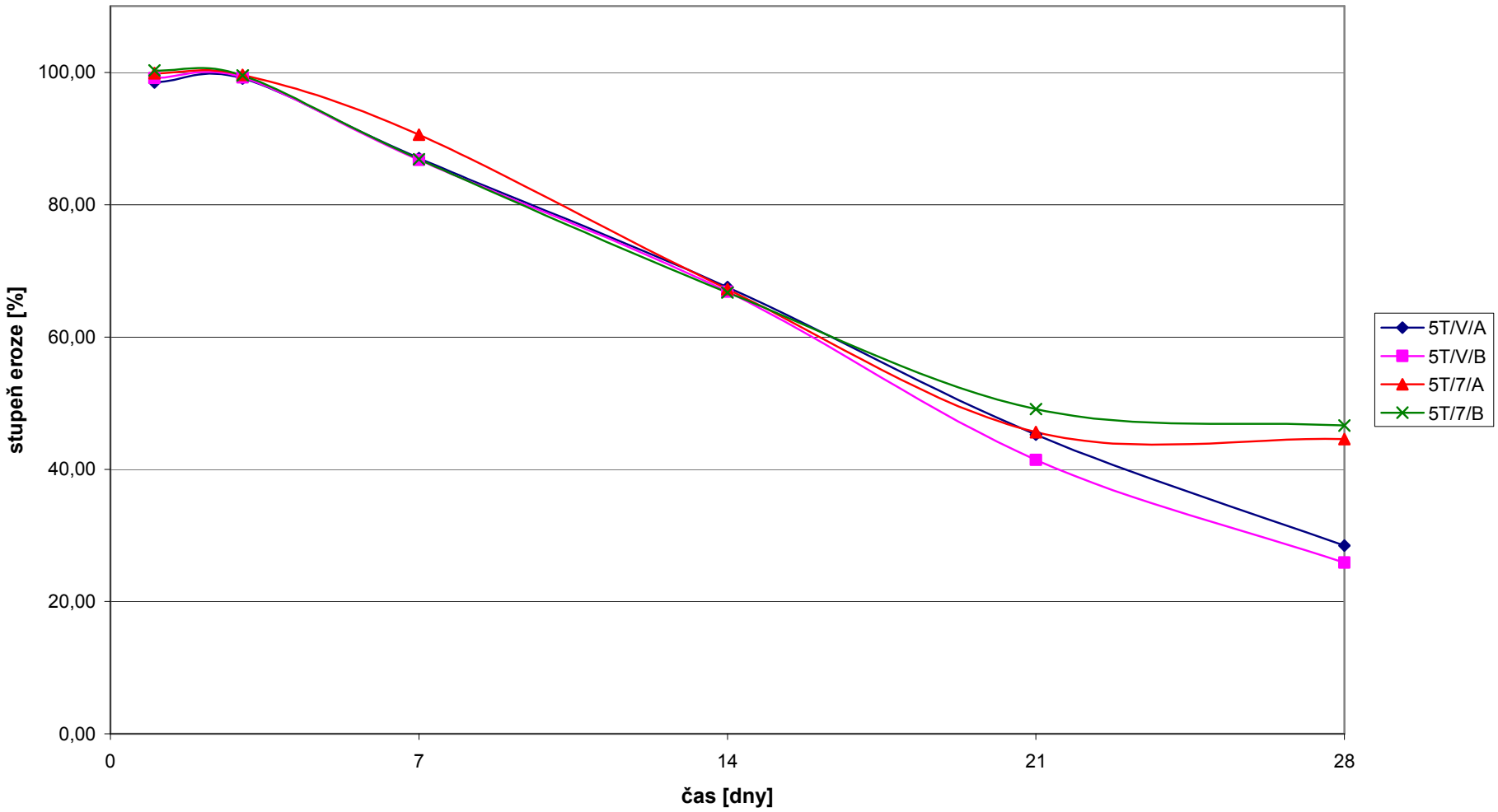
Obrázek 9b - Časový průběh stupně eroze polymeru 3T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



Obrázek 10a - Časový průběh stupně botnání polymeru 5T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



Obrázek 10b - Časový průběh stupně eroze polymeru 5T ve vodě a fosfátcitrátovém pufru



6. DISKUSE

6.1 OBECNÉ POZNÁMKY

Metodika řešení tématu popsaná v experimentální části tohoto spisu formulovaného v části „Cíl práce“ byla postupně zdokonalována a upřesňována v řadě diplomových prací a rigorózních prací obhájených na katedře farmaceutické technologie FaF UK v Hradci Králové. Téma navazuje úzce na problematiku řešenou v diplomové práci obhájené v červnu 2007. V této diplomové práci byly studovány interakce dvou strukturálně velmi podobných oligoesterů s větvenou konstitucí molekuly lišících se zjevně pouze typem větvící složky. Jedním z těchto oligoesterů byl terpolymer tvořený kyselinou DL-mléčnou, kyselinou glykolovou. Řetězce byly spojeny polykondenzační reakcí 3 % mannitolu, druhým byl obdobný terpolymer obsahující 3 % dipentaerytritolu. Výrazné rozdíly v chování těchto dvou zdánlivě analogických oligoesterových nosičů především při jejich botnání vedlo k navázání na řešení tématu rozšířením o soubor dalších lišících se stupněm větvení a molekulovou hmotností.

Byla zvolena dvě značně odlišná média – čištěná voda a fosfát citrátový pufr pH 7,0. Vzorky ponořené v médiu byly uchovávány v termostatu ve statických podmínkách při teplotě 37 °C. Intervaly odběru vzorků byly 1 den, 3 dny, 7 dní, 14 dní, 21 dní a 29 dní, tedy stejné jako v diplomové práci. V každém z intervalů byly vždy dva stejné vzorky odebrány k destrukční gravimetrické zkoušce spočívající v povrchovém osušení, zvážení ve zbotnalém stavu, vysušení do konstantní hmotnosti a opětovném zvážení. Z takto získaných dat byly počítány dvě charakteristiky – stupeň botnání a stupeň eroze. Stupeň botnání popisoval relativní přírůstky hmotnosti matric v procentech vztažené k aktuální hmotnosti vysušených matric. Stupeň eroze popisoval relativní úbytek původní hmotnosti tělesa matrice

v suchém stavu. Výsledky byly ovlivněny difúzí a ukládáním nevysušitelných složek z média, jako jsou např. soli z pufrů.

6.2 TERMOPOLYMERY VĚTVENÉ PENTAERYTRITOLEM

Pentaerytritol je čtyřsytný alkohol, který je netoxický, byl historicky používán jako sladidlo. Byl použit jako jeden z reaktantů při syntéze nosičů v koncentracích 1 %, 3 % a 5 %. Pro polykondenzační reakci je tato sloučenina zajímavá jednak z důvodu stejné reaktivity všech hydroxylů, jednak z důvodu velmi dobré stérické dostupnosti těchto hydroxylů při polykondenzační reakci. Je možné očekávat, že v produktech reakce bude vysoký podíl molekul se čtyřmi rameny v hvězdicovitých strukturách. Vzhledem k současnému růstu a štěpení vazeb při polykondenzaci je jisté, že délka jednotlivých řetězců, neboli ramen, bude v polyesterech nebo oligoesterech různá.

Na obr. 1a jsou dva velmi odlišné průběhy hodnot stupně botnání nosiče 1P v intervalu od 1. dne do 28. dne. V prostředí čištěné vody jsou hodnoty charakteristiky v časovém úseku do 21. dne poměrně nízké, nejvyšší hodnota byla zjištěna po 7 dnech působení média. Po 21. dnu do 28. dne došlo k náhlému zvýšení hodnot. Toto botnání se však týká velmi malého zbytku oligomeru, jak je patrné z obr. 1b. V prostředí roztoku pufru probíhalo botnání tělísek zcela odlišně. Hodnota charakteristiky plynule rostla, za 28 dní dosáhla hodnoty 400 %. To znamená, že materiál přijal do své struktury gelu čtyřnásobek vody. V tomto intervalu zbývalo, jak je vidět z obrázku 1b, ještě 15 % nerozloženého oligoesteru.

Další z nosičů, syntetizovaný v reakční směsi obsahující 3 % pentaerytritolu, označený 3P, se od nosiče 1P lišil kromě jiného podílem větvených molekul a stupněm jejich větvení. Jeho botnání probíhalo v prostředí vody podobně jako u nosiče 1P (obr. 2a). V sedmém dni bylo naměřeno nevýrazné maximum a po 21.

dni došlo k výraznějšímu růstu hodnot stupně botnání. Rozdílné byly nižší hodnoty pohybující se kolem 20 %. Ještě výraznější rozdíl byl v prostředí pufru v intervalu po 7. dni. Na rozdíl od nosiče 1P se gelová struktura smršťovala. Kolaps gelové struktury pokračoval až do konce pokusu, kdy zbývala nerozložená třetina nosiče. Uvedené chování souvisí patrně s vyšším zastoupením větvených molekul v oligomeru 3P. Potvrzením hypotézy je pomalejší eroze tohoto nosiče ve vodě i v pufru (obr. 2b).

Poslední z řady oligoesterů větvených na pentaerytritolu obsahoval tuto větvící složku ve vysoké, 5% koncentraci. Je možno předpokládat velmi vysoký podíl větvených struktur. Nízké hodnoty parametrů Mz a Mz+1 v řade s výše popsanými potvrzují předpoklad. Nosič 5P se vyznačoval velmi nízkými hodnotami stupně botnání ve vodě i v pufru (obr. 3a). Jednotlivá měření nepřesáhla hodnotu 40 %, průměrné hodnoty byly zpravidla do 30 %. Variabilita hodnot může být způsobena vlivem tvarového faktoru na botnání. O vysoce větvených strukturách svědčí také pomalá eroze (obr. 3b). V pufru i ve vodě měla kontinuální průběh. Po 14. dni byla pomalejší v pufru, za 28 dní zbyla více než polovina původní hmotnosti.

6.3 TERMOPOLYMERY VĚTVENÉ DIPENTAERYTRITOLEM

Dipentaerytritol má šest hydroxylových skupin schopných reagovat s karboxylem hydroxykyselin. Byla syntetizována řada terpolymer větvených na dipentarytritolu, z ní byly v experimentu vyzkoušeny zástupci obsahující 1%, 2% a 5% podíl složky v reakční směsi.

Průběh botnání dipentaerytritolu ve vodě a v roztoku pufru je na obr. 4a. je patrný značný vliv složení média na průběh děje. Ve vodě stoupal stupeň botnání mezi 14.a 21. dnem, potom došlo k poklesu hodnot. Kromě výrazného píku kolem 21. dne byl zaznamenán velmi nenápadný pík kolem 3. dne. V roztoku pufru pH 7,0 se také projevily dva píky, jejichž maximum (hodnota kolem 300 %) bylo v blízkosti 7. a 21. dne, mezi nimi bylo výrazné minimum. Stupeň botnání dosahoval po celou dobu degradace značně vyšší hodnoty než v prostředí vody. Také eroze byla složením média ovlivněna. V pufru se projevil větší rozdíl mezi vyšší rychlostí do 7.dne a nižší v následující fázi po 7. dni. Ve vodě došlo za 28 dní k úplné hydrolýze materiálu, v pufru zbylo asi 15 % neerodovaného nosiče (obr. 4b).

Ve vzorku nosiče 2D probíhaly změny v botnání v roztoku pufru odlišně od výše popsaného nosiče 1D. Pík byl nalezen dříve, přibližně v intervalu 3 dny, potom hodnoty charakteristiky pomalu klesaly k 21. dni do minimální hodnoty přibližně 50 %. V prostředí vody se choval oligoester 2D podobně jako 1D s výjimkou finální fáze po 21. dni, kdy hodnoty stupně botnání vzrostly na 500 % (obr. 5a). Eroze ve vodě se lišila rychlejším nástupem v počáteční fázi, potom nebyly prokázány rozdíly (obr. 5b).

Srovnání průběhu botnání nosiče 3D v prostředí vody a pufru je na obr. 6a. V prostředí pufru rostly hodnoty charakteristiky rychleji. V prostředí vody začalo intenzivní botnání až po intervalu 14 dní. Ve finálních stádiích degradace se hodnoty stupně botnání v obou prostředích přiblížily. Rozdíly v průběhu eroze jsou na obr. 6b. Po tomto časovém intervalu se projevila pomalejší eroze nosiče 3D. Rychlejší eroze obou nosičů v prostředí vody může být způsobena kyselou hydrolýzou esterových vazeb. Snižující se rychlost hydrolýzy může souviset se zkracováním střední difúzní dráhy kyselých degradačních produktů a jejich snížené účinnosti při hydrolýze.

Změna složení oligoesteru zvýšením podílu dipentaerytritolu z 2% na 5% měla důsledek ve značně sníženém botnání (obr. 7a). Výraznější snížení je v prostředí pufru. Hodnota charakteristiky se v časovém intervalu 3 dny snížila pod hodnotu charakteristiky botnání ve vodě. V pozdějších intervalech nebyl mezi bobtnáním ve vodě a pufru výrazný rozdíl. Zajímavá je také výrazně pomalejší eroze (obr. 7b). V krátké jednodenní počáteční periodě se suchá hmotnost tělísek snížila o asi 10 %. Jednalo se pravděpodobně o nízkomolekulární frakci velmi větvených vysoce hydrofilních molekul. Po přibližně třídenním intervalu došlo k pomalému snižování suché hmotnosti tělísek přibližně podle kinetiky nultého řádu. Za 28 dní zbyla více než polovina neerodovaného oligoesterového tělíska.

6.4 TERMOPOLYMERY VĚTVENÉ TRIPENTAERYTRITOLEM

Tripentaerytritol je sloučenina, která má velký potenciál pro větvení, obsahuje celkem osm hydroxylových skupin. O velké reaktivitě této sloučeniny s kyselinou glykolovou a kyselinou DL-mléčnou svědčí jednak vysoké hodnoty parametrů molekulové hmotnosti, jednak snížení jejich hodnot po zvýšení koncentrace větvící složky z 3 % na 5 %. Další indikací vzrůstu stupně větvení s koncentrací tripentaerytritolu je snižování hodnot teploty skelného přechodu.

Na obr. 8a je průběh hodnot stupně botnání oligoesteru s 1% tripentaerytritolem. Tento nosič označený symbolem 1T byl značně ovlivněn v botnání složením média. Ve vodě bylo zaznamenáno maximum v sedmidenním intervalu a minimum ve čtrnáctidenním intervalu. V prostředí roztoku pufru nosič botnal do maxima asi 550 %, poté začala druhá fáze odbotnání. Eroze nosiče ve vodě byla velmi rychlá, trvala jeden měsíc (obr. 8b). Eroze v roztoku pufru byla od 7. dne pomalejší, za 28 dní zbylo téměř 30 % neerodovaného materiálu.

Průběh botnání v nosiči 3T se 3 % tripentaerytritolu byl od výše popsaného 1T poněkud odlišný v prostředí vody až v intervalu po 21. dni, kdy došlo k odbotnání posledních zbytků (obr. 9a). V prostředí pufru bylo maximum hodnot stupně botnání dříve, asi za necelých 14 dní, potom se hodnoty prudce a systematicky snižovaly. Hodnota píku byla u nosiče 1T 550 %, u nosiče 3T byla nižší, přibližně 150 %. Eroze je na obr. 9b. Její průběh je v prostředí pufru a vody do 14. dne vzácně shodný, potom se liší vyšší rychlostí v prostředí vody. Doba eroze mírně přesahuje dobu jednoho měsíce.

Průběh hodnot stupně botnání nosiče 5T v intervalu do 28. dne je velmi podobný datům naměřeným u nosiče 3T (obr. 10a a obr. 9a). Drobné odlišnosti se týkají především posunu maxima do časového intervalu o několik dní kratšího v prostředí roztoku pufru a také snížení hodnoty maxima stupně botnání z 60 % na 40 %. Další odlišností byla rychlost eroze, která byla v obou médiích u nosiče 5T oproti nosiče 3T nižší. V pufru byla v intervalu mezi 21. dnem a 28. dnem prokázána prakticky nulová rychlost eroze. Není vyloučeno, že ve zbylý nosič je tvořen vysoce větvenými molekulami. O větvených strukturách je známo, že degradují pomaleji než analogické lineární.

7. ZÁVĚRY

Bylo prokázáno, že botnání je důležitá vlastnost oligoesterů a polyesterů alifatických hydroxykyselin s konstitucí řetězců větvenou polyhydroxylovými sloučeninami, která velmi citlivě reflektuje změny ve struktuře molekul. Je také ovlivněno složením hydrofilního média, jeho iontovou silou a aktuální aciditou. Změny hodnot stupně botnání souvisí s hydrolytickým štěpením esterových vazeb při degradací molekul. U mnohých sloučenin se hodnoty parametru mění tak, že dosahují extrém. Hodnoty příslušných píků a jejich hodnoty mohou být ovlivněny jednak osmotickými poměry v molekule, dále schopností molekuly hydratovat se a v neposlední řadě efektivními rozměry řetězců uplatňujícími se při botnání. Intenzita botnání je nepřímo úměrná stupni větvení. Stupeň větvení je dán počtem reaktivních složek větvící složky, koncentrací větvící složky a stupněm konverze polykondenzační reakce. Eroze oligoesterových a polyesterových nosičů je ovlivněna molekulovou hmotností nosiče, stupněm jeho větvení a parametry média.

8. SOUHRN

Teoretická část popisuje biodegradaci polymerů jako proces, zabývá se polyestery alifatických hydroxykyselin a implantáty in situ. V experimentální části práce byly studovány interakce oligoesterů s větvenou konstitucí molekuly lišících větvící složkou s hydrofilním médiem. Alifatické oligoestery měly čtyři, šest nebo osm hydroxylů schopných tvořit esterové vazby. Jednalo se o terpolymery kyselin DL-mléčné a glykolové s pentaerytritolem, dipentarytritolem a tripentaerytritolem. Interakce byly studovány v podobě botnání a eroze. Bylo prokázáno, že botnání velmi citlivě reflektuje změny ve struktuře molekul. Je také ovlivněno složením hydrofilního média, jeho iontovou silou a aktuální aciditou, souvisí s hydrolytickým štěpením esterových vazeb při degradací molekul. U mnohých sloučenin se hodnoty parametru mění tak, že dosahují extrém. Intenzita botnání je nepřímo úměrná stupni větvení. Eroze oligoesterových a polyesterových nosičů je ovlivněna molekulovou hmotností nosiče, stupněm jeho větvení a parametry média.

SUMMARY

Theoretical part of this thesis describes biodegradation process of polymers, this part concerns also aliphatic hydroxyacids polyesters and implants in situ. In the experimental part interactions of the oligoesters with branched constitution of molecules with hydrophilic media were studied. These compounds have been differring by branching agent; pentaerytritol, dipentaerytritol, and tripentaerytritol ; having potentially of four, six or eight hydroxyl groups able to make ester bonds. Interactions were studied in the form of swelling and erosion characteristics time course. There was revealed, that the swelling process reflects very sensible the changes of the molecular structure. It is influenced by the composition of hydrophilic medium, its ionic force and actual acidity, it is in the relation with the ester bonds hydrolytic scission. Many oligoesters swelling parameters changes with extremes (pics of maximas and minimas). Swelling process extent is proportionally changed with branching degree. Oligoester and polyester erosion is greatly influenced by molecular weight of oligoester, its branching degree, and media composition.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1) K. Park, S.W. Shalaby, H. Park, Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery, Technomic Publishing, Lancaster, PA, 1993.
2) S.W. Shalaby, Biomedical Polymers, Designed to Degrade Systems, Hanser Publishers, New York, 1994.
3) X.S. Wu, Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In. Wise et al., editors. Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioenggineering. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 1015-54.
4) X.S. Wu, Preparation, characterization, and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In: Wise et al., editors. Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioenggineering. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 1151-200.
5) T.G. Park, Degradation of poly(lactic-coglycolic acid) microsheres: Effect of copolymer composition. Biomaterials, 16, 1995, p. 1123-1130.
6) J. Dahlmann, G. Rafler, K. Fechner, B. Melis, Synthesis and properties of biodegradable aliphatic polyesters. Br. Polymer J. 23, 1990, p. 235-240. Compendex.
7) A.J. Kirby, Hydrolysis and formation of esters of organic acids. In: Bamford CH and Tipper CFH., eds. Ester Formation and Hydrolysis and Related Reactions Comprehensive Chemical Kinetics Vol. 10, Elsevier, Amsterdam, 1972, p. 57-202.
8) C. Shih, T. Higuchi, K.J. Himmelstein, Drug delivery from catalysed erodible polymeric matrices of poly(ortho esters). Biomaterials, 1984, 5, p. 237-240.
9) D.F. Williams, Mechanism of biodegradaton of implantable polymers. Clin. Mater.,1992, 10, p. 9-12.
10) R. Jalil, J.R. Nixon, Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. J Microencapsulation 1990; 7: 297-325.

11) D.H. Lewis, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: M. Chasin, R. Langer, editors. Biodegradable polymers as drug delivery systems. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 1-41.
12) J.P. Kitchell, D.L. Wise, Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymer matrix systems. Methods Enzymol 1985;112;436-48.
13) S. Cohen, M.J. Alonso, R. Langer, Novel approaches to controlled-release antigen delivery. Int J Technol Assessment Health Care 1994;10(1):121-30.
14) C. Thies, M.C. Bissery, Biodegradable microspheres for parenteral administration. In: F. Lim, editor. Biomedical applications of microencapsulation. Boca Raton, FL: CRC Press, 1984. p. 53-74.
15) L.M. Sanders, B.A.Kell, G.I. McRae, G.W. Whitehead, Prolonged controlled-release of nafarelin, a luteinizing hormone-releasing hormone analogue, from biodegradable polymeric implants: influence of composition and molecular weight of polymer, J. Pharm. Sci. 75 (4) (1986) 356-360.
16) T.R. Tice, D.R. Cowsar, Biodegradable controlled-release parenteral systems. Pharm Technol 1984;11:167-77.
17) K. Jamshidi, S.H. Hyon, Y. Ikada, Termal characterization of polylactides. Polymer 1988;29:2229-34.
18) M. van de Weert, W.E. Hennink, W. Jiskoot, Protein instability in poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles, Pharm. Res. 17 (10) (2000) 1159-1167.
19) A. Breitenbach, Y. Li, T. Kissel, Branched biodegradable polyesters for parenteral drug delivery systems, J. Control. Release 64 (200) 167-178.
20) M.L. Adams, A. Lavasanifar, G.S. Kwon, Amphilic block copolymers for drug delivery, J. Pharm. Sci. 92 (7) (2003) 1343-1355.
21) T. Kissel, Z.Li, F. Unger, ABA-triblok copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins, Adv. Drug Deliv. Rev. 54 (1) (2002) 99-134.

22) K.F. Pistel, B. Bittner, H. Koll, G. Winter, T. Kissel, Biodegradable recombinant human erythropoetin loaded microspheres prepared from linear and star-branched block copolymers: influence of encapsulation technique and polymer composition on particle characteristics, J. Control. Release 59 (3) (1999) 309-325.
23) A. Breitenbach, K.F. Pistel, T. Kissel, Biodegradable comb polyesters: Part II. Erosion and release properties of poly(vinyl alcohol)-g-poly(lactic-co-glycolic acid), Polymer 41 (2000) 4781-4792.
24) F.K. Pistel, A. Breitenbach, R. Zange-Volland, T. Kissel, Brush-like branched biodegradable polyesters: Part III. Protein release from microsheres of poly(vinyl alcohol)-graft-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid), J. Control. Release 73 (1) (2001) 7-20.
25) R.L. Dunn. A.J. Tipton, R.J. Harkrader, J.A. Rogers, Intragingival delivery systems containing chemotherapeutic agents for treatment of periodontal diseases, PCT Int. Appl., 9,200,718,(1992).
26) R.L. Dunn, J.P. English, D.R. Cowsar, D.P. Vanderbilt, Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same, US Patent 4,938,763 (1990).
27) O. Sartor, Eligard: leuprolide acetate in a novel sustained- release delivery system, Urology 61 (2 Suppl 1) (2003) 25-31.
28) R.S. Bezwada, Preparation of liquid copolymers of e-caprolactone and lactide, US Patent 5,442,033 (1995).
29) K. Schwach-Abdellaoui, M. Moreau, M. Schneider, B. Boisramc, R. Gurny, Controlled delivery of metoclopramide using an injectable semi-solid poly(ortho ester) for veterinary application, Int. J. Pharm. 248 (1-2) (2002) 31-37.
30) K.A. Walter, M.A. Cahan, A. Gur, B. Tyler, J. Hilton, O.M. Colvin, P.C. Burger, A. Domb, H. Brem, Interstitial taxol delivered from a biodegradable

polymer implant against experimental malignant glioma, Cancer Res. 54 (8) (1994) 2207-2212.

31) C.I. Winternitz, J.K. Jackson, A.M. Oktaba, H.M. Burt, Development of a polymeric surgical paste formulation for taxol, Pharm. Res 13 (3) (1996) 368-375.

32) X. Zhang, J.K. Jackson, W. Wong, W. Min, T. Cruz, W.L. Hunter, H.M. Brut, Development of biodegradable polymeric paste formulations for taxol: an in vitro and in vivo study, Int. J. Pharm. 137 (2) (1996) 199-208.

33) M. van de Weert, M.J. van Steenbergen, J.L. Cleland. J. Heller, W.E. Hennink, D.J.A. Crommelin, Semisolid, self-catalyzed poly(ortho esters) as controlled-release systems: protein release and protein stability issues, J. Pharm. Sci 91 (4) (2002) 1065-1074

34) D. Annavajjula, K. Yim, S.C. Rowe, J.A.Rokovich, J.A. Hubbell, A Novel Drug Delivery System for Recombinant Human Growth Hormone with Photopolymerized Hydrogels, Proceedings–28th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials and Fourth Consumer and Diversified Products Conference, vol. 2,2001, pp. 985-986.

35) A.S. Sawhney, C.P. Pathak, J.A. Hubbell, Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly(alpha-hydroxy acid) diacrylate macromers, Macromolecules 26 (4) (1993) 581-587.

36) B. Qiu, S. Stefanos, J. Ma, A. Lalloo, B.A. Perry, M.J. Leibowitz, P.J. Sinko, S. Stein, A hydrogel prepared by in situ cross-linking of a thiol containing poly(ethylene glycol)-based copolymer: a new biomaterial for protein drug delivery, Biomaterials 24 (1) (2002) 11-18.

37) B. Qiu, S. Stefanos, M. Leibowitz, P. Sinko, S. Stein, A Novel Injectable Polymer Hydrogel System–Depogel for Controlled Delivery of Small and Large Molecule Drugs, Proceedings–28th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials and Fourth Consumer and Diversified Products Conference, vol. 2,2001, pp. 1009-1010.

38) A. Bochot, E. Fattal, A. Gulik, G. Couarraze, P. Couvreur, Liposomes dispersed within a thermosensitive gel: a new dosage form for ocular delivery of oligonucleotides, Pharm. Res. 15 (9) (1998) 1364-1369.
39) C.S. Young, J.S. Choi, Q.Z. Quan, J.D. Rhee, C.K. Kim, S.J. Lim, K.M. Kim, P.S. Oh, H.G. Choi, Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium, Int. J. Pharm. 226 (1-2) (2001) 195-205.
40) R.H. Muller, D. Ruhl, S. Runge, K. Schulze-Forster, W. Mehnert, Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant, Pharm. Res. 14 (4) (1997) 458-462.
41) K.M. Wasan, R. Subramanian, M. Kwong, I.J. Goldberg, T. Wright, T.P. Johnston, Poloxamer 407-mediated alterations in the activites of enzyme regulating lipid metabolism in rats. J. Pharm. Pharm. Sci 6 (2) (2003) 189-197.
42) B. Jeong, Y.H. Bae, D.S. Lee, S.W. Kim, Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems, Nature 388 (6645) (1997) 860-862.
43) B. Jeong, Y.K. Choi, Y.H. Bae, G. Zentner, S.W. Kim, New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems, J. Control. Release 62 (1-2) (1999) 109-114.
44) R.L. Dunn, The Atrigel Drug Delivery System, in: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, vol. 126, Dekker, New York, MA, 2003, pp. 647-655.
45) H.B. Ravivarapu, K.L. Moyer, R.L. Dunn, Sustained activity and release of leuprolide acetate from an in situ forming polymeric implant, AAPS PharmSciTech 1 (1) (2000).
46) H. Kranz, G.A. Brazeau, J. Napaporn, R.L. Martin, W. Millard, R. Bodmeier, Myotoxicity studies of injectable biodegradable in-situ forming drug delivery systems, Int. J. Pharm. 212 (1) (2001) 11-18.
47) K.J. Brodbeck, J.R Desnoyer, A.J. Mchugh, Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery. Part II. The role of solution

thermodynamics and bath-side mass transfer, J. Control. Release 62 (3) (1999) 333-344.

48) P.D. Graham, K.J. Brodbeck, A.J. Mchugh, Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery, J. Control. Release 58 (2) (1999) 233-245.

49) Merk, Tables for the laboratory, [B.r.], s. 57