

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



Formulace PLGA nanočástic s vankomycinem pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí II.

Formulation of vancomycin loaded PLGA nanoparticles for local treatment of musculoskeletal infections II.

Diplomová práce

Hradec Králové 2023

Karolína Ptáčková

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

V Hradci Králové 29.8.2023

Karolína Ptáčková

Poděkování

Ráda bych poděkovala PharmDr. Evě Šnejdové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a rady poskytnuté při zpracování této diplomové práce. Poděkování patří také Mgr. Vladislavu Frolovovi za pomoc a rady v rámci experimentální části. Také bych chtěla poděkovat za spolupráci Ivaně Petrášové, diplomantce katedry farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK a Mgr. Janu Loskotovi, Ph.D. z katedry fyziky Přírodovědecké fakulty UHK.

OBSAH

OBSAH.....	4
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
ZADÁNÍ.....	9
ÚVOD.....	10
SEZNAM ZKRATEK	11
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1.1 Muskuloskeletální infekce a jejich léčba	12
1.1.1 Antibiotika pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí.....	13
1.2 Polymerní nanočástice	17
1.2.1 PLGA polymery	17
1.3 Metody přípravy polymerních nanočástic s léčivou látkou	18
1.3.1 Nanoprecipitace	19
1.3.2 Fázová separace	19
1.3.3 Sprejové sušení	20
1.3.4 Metoda vysolování	20
1.3.5 Emulzní odpařovací metody	21
1.4 Metoda dvojité emulze.....	21
1.4.1 Kritické parametry dvojité emulzní metody	22
1.5 Pomocné látky pro formulaci PLGA nanočástic s vankomycin-hydrochloridem	
24	
1.5.1 Organická rozpouštědla používaná při přípravě PLGA nanočástic.....	24
1.5.2 Stabilizátory používané při dvojité emulzní metodě	25
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29

2.1	Materiály	29
2.2	Pomůcky	29
2.3	Přístroje	30
2.4	Příprava nanočástic	31
2.4.1	Příprava nanočástic s různým množstvím Van-HCl nebo různým organickým rozpouštědlem	32
2.4.2	Příprava nanočástic s různým stabilizátorem primární emulze	32
2.4.3	Příprava nanočástic při různé homogenizaci primární a/nebo sekundární emulze	33
2.4.4	Příprava nanočástic s různou koncentrací hydrofilního stabilizátoru.....	34
2.5	Měření velikosti a polydisperzity nanočástic	34
2.6	Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)	34
2.7	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	35
2.8	Kalibrační přímky	35
2.9	Stanovení enkapsulační účinnosti přímou metodou	37
2.10	Disoluce vankomycin-hydrochloridu z nanočástic	38
2.11	Statistická analýza	39
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
3.1	Obecná diskuze k zadání diplomové práce	40
3.2	Velikost, polydisperzita a enkapsulační účinnost	42
3.2.1	Vliv množství vankomycin-hydrochloridu	42
3.2.2	Vliv organického rozpouštědla	44
3.2.3	Vliv stabilizátoru primární emulze	44
3.2.4	Vliv homogenizace primární a sekundární emulze	46
3.2.5	Vliv hydrofilního stabilizátoru	48
3.3	DSC	50

3.4	SEM.....	52
3.5	Disoluce vankomycin-hydrochloridu z nanočástic.....	53
4	ZÁVĚRY.....	55
5	LITERATURA.....	56

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autorka: Karolína Ptáčková

Název práce: Formulace PLGA nanočástic s vankomycinem pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí II.

Školitelka: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Vladislav Frolov

Cílem práce bylo formulovat PLGA nanočástice (NČ) s vankomycin-hydrochloridem (Van-HCl) dvojitě emulzní metodou pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí. Byly modifikovány vybrané kritické formulační faktory a studován jejich vliv na charakteristiky nanočástic. Velikost nanočástic stanovená metodou DLS se pohybovala v rozmezí 200 až 800 nm, PDI byla u většiny šarží nižší než 0,2. Enkapsulační účinnost (EE) stanovená přímou metodou se pohybovala v rozmezí 2 % až 9 %. Jako vhodný stabilizátor primární emulze se ukázal glycerol-monostearát v koncentraci 15 mg/ml. Optimální koncentrace PVA pro stabilizaci nanosuspenze byla 30 mg/ml. Velikost nanočástic byla ovlivněna intenzitou homogenizace a koncentrací PVA. Koncentrace Van-HCl, použité organické rozpouštědlo a intenzita homogenizace vedly ke zvýšení EE. Metodou DSC bylo potvrzeno, že Van-HCl zůstává v NČ molekulárně dispergován. Pomocí SEM byl potvrzen sférický tvar NČ. Disoluční test za podmínek simulujících podmínky v místě aplikace nanočástic ukázal burst ve výši přibližně 20 %, následovaný fází lineárního uvolňování do časového intervalu 48 hod, kdy došlo k uvolnění přibližně 85 % inkorporovaného Van-HCl.

Na základě výsledků získaných v této práci bude v dalších experimentech řešena nízká enkapsulace, daná rychlým rozdělováním hydrofilního Van-HCl do vnější vodné fáze.

Klíčová slova: vankomycin-hydrochlorid, PLGA, polymerní nanočástice, dvojitě emulzní metoda, enkapsulační účinnost, DSC, SEM, disoluce

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Karolína Ptáčková

Title of thesis: Formulation of vancomycin loaded PLGA nanoparticles for local treatment of musculoskeletal infections II.

Supervisor: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Vladislav Frolov

The aim of the work was to formulate vancomycin hydrochloride (Van-HCl) loaded PLGA nanoparticles (NPs) using a double emulsion method for the local treatment of musculoskeletal infections. During preparation, selected critical formulation factors were modified and their influence on the characteristics of nanoparticles was studied. The size of the NPs determined by the DLS method ranged from 200 to 800 nm, the PDI was lower than 0.2 in most batches. The encapsulation efficiency (EE) determined by the direct method ranged from 2 % to 9 %. Glycerol monostearate at a concentration of 15 mg/ml proved to be a suitable primary emulsion stabilizer. The optimal concentration of PVA for stabilizing the nanosuspension was 30 mg/ml. The size of the NPs was influenced by the intensity of homogenization and the concentration of PVA. The concentration of Van-HCl, the organic solvent used and the intensity of homogenization led to an increase in EE. The DSC method confirmed that Van-HCl remains molecularly dispersed in the NPs. The spherical shape of the NPs was confirmed using SEM. A dissolution test under conditions simulating the site of nanoparticle application showed a burst of approximately 20 %, followed by a linear release phase up to a time interval of 48 hours, when approximately 85 % of the incorporated Van-HCl was released. Based on the results obtained in this work, low encapsulation, given by the rapid distribution of hydrophilic Van-HCl into the external aqueous phase, will be solved in further experiments.

Key words: vancomycin-hydrochloride, PLGA, polymeric nanoparticles, double emulsion method, encapsulation efficiency, DSC, SEM, dissolution

ZADÁNÍ

Zadáním diplomové práce byla formulace PLGA nanočástic s vankomycin-hydrochloridem a jejich charakterizace.

Zadání práce lze konkretizovat do následujících dílčích kroků:

1. Pro přípravu PLGA nanočástic použít dvojitě emulzní metodu, která je vhodná pro enkapsulaci hydrofilních léčiv.
2. Ve funkci polymerního nosiče použít poly(laktid-*ko*-glykolid) 50:50 větvený tripentaerythritolem.
3. Na základě literární rešerše optimalizovat formulační faktory s cílem získat stabilní nanočástice o velikosti v rozmezí 200 až 800 nm a hodnotou PDI nižší než 0,2.
4. Metodou DLS určit velikost a polydisperzitu nanočástic.
5. Velikost, tvar a agregační stabilitu ověřit pomocí SEM.
6. Pomocí DSC stanovit termické charakteristiky PLGA derivátu, vankomycin-hydrochloridu a nanočástic.
7. Přímou metodou stanovit enkapsulační účinnost.
8. U optimalizované šarže nanočástic studovat průběh disoluce vankomycin-hydrochloridu.

ÚVOD

Muskuloskeletální infekce jsou jednou z hlavních komplikací ortopedické chirurgie. Infekční komplikace se vyskytují u pacientů, kteří podstupují kloubní náhradu nebo fixaci zlomeniny, zejména v případě těžké otevřené zlomeniny. Při prevenci muskuloskeletálních infekcí se systémová aplikace širokospektrých antibiotik kombinuje s lokální aplikací úzkospektrých antibiotik. Příkladem je vankomycin, který je účinný pouze na grampozitivní mikroby, zejména na bakterie *Staphylococcus aureus* včetně kmenů rezistentních na meticilin. Vankomycin je považován za poměrně toxické antibiotikum, proto se hledají takové aplikační formy, které by eliminovaly negativní vliv na hojení a zároveň by zajistily efektivní lokální terapii. Jednou z možností je enkapsulovat vankomycin do degradovatelného PLGA polymeru a formulovat nanočástice. Bioadhezivní PLGA nanočástice optimální velikosti mohou efektivně impregnovat kostní štěpy požívané v ortopedii jako spacers, zajistit prodloužené uvolňování vankomycin-hydrochloridu a účinnou lokální terapii muskuloskeletálních infekcí.

Předložená diplomová práce tematicky navazuje na dříve realizované studie, které se zabývaly využitím nekomerčních PLGA derivátů jako nosičů léčiv.^{1,2,3,4,5} Práce je pilotní studií v oblasti využití těchto polymerů pro formulaci nanočástic s výrazně hydrofilním léčivem, vankomycin-hydrochloridem, pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí.

SEZNAM ZKRATEK

DCM	dichlormethan
DLS	dynamický rozptyl světla
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
EA	ethylacetát
EE	enkapsulační účinnost (%)
EMA	European Medicine Agency – Evropská léková agentura
FDA	Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GA	kyselina glykolová
GMS	glycerol-monostearát 40-55
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha
LA	kyselina mléčná
NČ	nanočástice
PBS	phosphate buffered saline – fosfátový pufr
PDI	polydisperzita
PGPR	polyglyceryl-3 polyricinoleát
PLGA	poly(mléčná- <i>ko</i> -glykolová) kyselina
PVA	polyvinylalkohol
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SS	sorbitan-stearát
T _g	teplota skelného přechodu (°C)
T _m	teplota tání (°C)
Van-HCl	vankomycin-hydrochlorid

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Muskuloskeletální infekce a jejich léčba

Muskuloskeletální infekce jsou jednou z hlavních komplikací ortopedické chirurgie. Infekční komplikace se vyskytují u pacientů, kteří podstupují kloubní náhradu, fixaci zlomeniny, zejména těžké otevřené zlomeniny nebo u pacientů se zvýšeným rizikem vzniku infekcí z důvodu jejich špatného zdravotního stavu. Infekci, která se usadí v kloubech nebo kostech, je těžké vymýt, a to může prodloužit dobu hojení. K infekci po ortopedické operaci dochází průnikem bakterií do operovaného místa, a to způsobuje patologické stavy. Rizikové faktory, které mají vliv na rozvoj muskuloskeletální infekce se dělí na faktory související s pacientem a faktory související s operací. Zvýšená náchylnost k infekci se může objevit u pacientů s nově voperovaným implantátem a infekce může být způsobena nedostatkem fagocytózy bakterií v blízkosti implantátu nebo nárůstem bakterií v biofilmu, který se nachází na povrchu implantátu. Předoperační intravenózní antibiotická terapie, která je účinná proti často se objevujícím bakteriím způsobující muskuloskeletální infekce, může vést ke snížení vzniku těchto infekcí po operaci. Důležité je správně načasovat podání této antibiotické terapie. Mělo by být dosaženo minimální baktericidní koncentrace antibiotika pro určité druhy bakterií a tato koncentrace by měla zůstat i několik hodin po operaci. Lokálním podáváním antibiotik dochází k maximalizaci koncentrace léčiva v cílové tkáni a minimalizaci rizika systémové toxicity a snižuje se tak i riziko reinfekce. Profylakticky podávaná antibiotika by měla mít široké spektrum účinku, aby působila jak na grampozitivní, tak i na gramnegativní bakterie. Širokospektrá antibiotika se profylakticky aplikují systémově (perorálně nebo injekčně). Vankomycin, jehož spektrum účinku zahrnuje grampozitivní mikroby, se používá lokálně přímo do místa chirurgického zákroku.⁶

Impregnace kosti biodegradabilními aplikačními systémy pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí je výhodnější než použití antibiotika ve formě prášku nebo vodného roztoku. Depotní aplikační formy s vankomycinem (emulze typu V/O, hypromelosový gel, PLGA mikročástice) mohou minimalizovat vznik nežádoucích účinků a lokální toxicitu, zvýšit stabilitu léčiva a zajistit modifikované uvolňování léčiva. Při použití PLGA derivátů s nižší molární hmotností a větvenou strukturou ve funkci nosiče vankomycinu byl zjištěn 15 % jednodenní burst efekt, což zajišťuje

adekvátní počáteční dávku antibiotika a zároveň nedochází k toxickým vedlejším účinkům na kostní štěpy a okolní tkáň. Uvolňování vankomycinu kinetikou nultého řádu bylo pozorováno po dobu 12 dnů současně s probíhající hydrolytickou degradací PLGA polymeru.⁷

1.1.1 Antibiotika pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí

Problémem při léčbě muskuloskeletálních infekcí systémově podávanými antibiotiky (cefalosporiny, piperacilin/tazobaktam nebo karbapenem) je nedostatečná koncentrace antibiotika v místě zlomeniny nebo jiného poškození tkáň. Zvýšení dávky není vhodné, protože dlouhodobě vysoké koncentrace antibiotik mohou způsobit systémovou toxicitu. Lokálně podávaná léčiva maximalizují koncentraci léčiva v cílové tkáni a minimalizují rizika systémové toxicity. Pro lokální terapii muskuloskeletálních infekcí se používá nebo zkoumá řada antibiotik jako například vankomycin, gentamicin, tobramycin⁶, cefazolin, ciprofloxacín, rifampicin⁸ nebo nafcilin.⁹

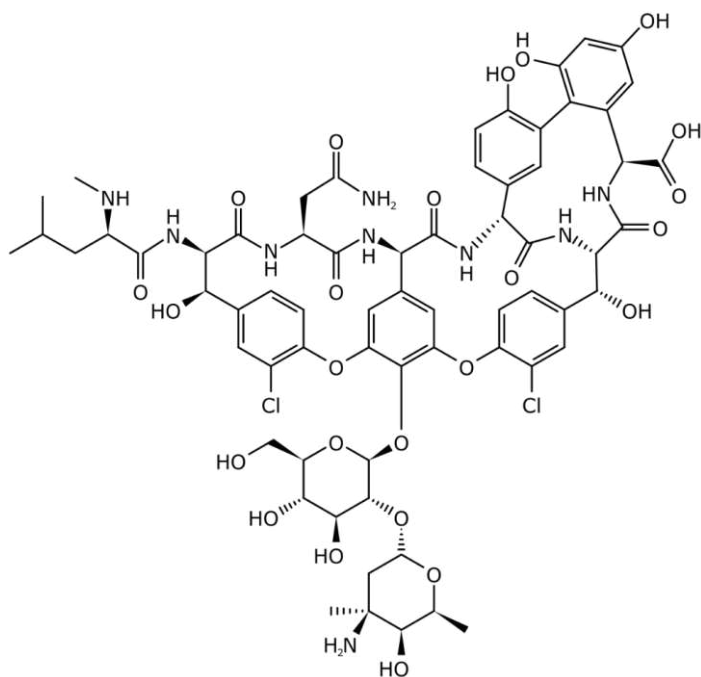
Vankomycin

Registrační číslo CAS: 1404-90-6

Molární hmotnost: 1449,25 g/mol

Sumární vzorec: C₆₆H₇₅Cl₂N₉O₂₄

Bod tání: 190 °C¹⁰



Obr. 1: Strukturální vzorec vankomycinu¹¹

Vankomycin (Obr. 1) je glykopeptidové antibiotikum, které se používá pro léčbu bakteriálních infekcí. Řadí se mezi heteromerní polypeptidy obsahující glykosidicky vázané cukry. Vankomycin má baktericidní účinek, který je dán inhibicí biosyntézy peptidoglykanových mureinů, které jsou základní stavební jednotkou buněčné stěny. Vankomycin je metabolitem *Streptomyces orientalis*. V praxi se používá ve formě hydrochloridu a má úzké spektrum účinku. Účinkuje pouze na grampozitivní mikroby, především na stafylokoky včetně kmenů rezistentních na meticilin. Je vysoce polární a z trávicího traktu se prakticky nevstřebává. V perorální formě se používá k léčbě průjmů způsobených bakterií *Clostridium difficile*. K léčbě těžkých systémových infekcí jako je sepse, endokarditida a infekcí kůže, kostí nebo dolních cest dýchacích se podává v intravenózní formě. Mezi závažné nežádoucí účinky vankomycinu patří ototoxicita a nefrotoxicita, proto je považován za poměrně toxické antibiotikum a používá se pouze v případech, kdy selže léčba jinými, méně toxickými antibiotiky.¹² Mezi léčivé přípravky registrované v České republice s obsahem vankomycin-hydrochloridu patří například Edicin, Vancomycin Kabi a Vankomycin Mylan. Všechny tyto léčivé přípravky jsou ve formě prášku pro přípravu infuzního roztoku o síle 500 mg nebo 1000 mg.¹³

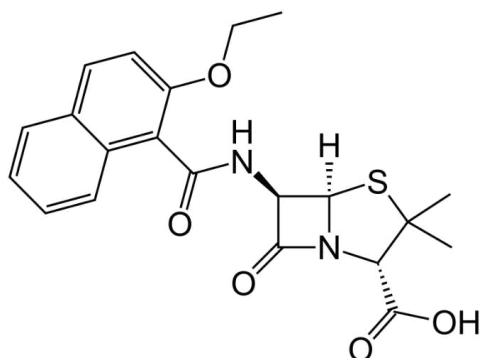
Vankomycin má nízkou cytotoxicitu na osteoblasty člověka, proto je vhodný k prevenci bakteriální infekce vzniklé bakteriemi vyskytujícími se na povrchu kovových implantátů. Vankomycin se využívá v ortopedické chirurgii také k léčbě u pacientů infikovaných bakterií *Staphylococcus aureus* s rezistencí na meticilin.¹⁴ Enkapsulace hydrofilního antibiotika vankomycinu může být problematická vzhledem k jeho vysoké hydrofilitě. Často používanou metodou pro enkapsulaci hydrofilního léčiva je metoda dvojité emulze za vzniku násobné emulze voda v oleji ve vodě (V1/O/V2).¹⁵ Enkapsulace vankomycinu do polymerních PLGA nanočástic se jeví jako vhodný způsob poskytování terapie díky lepšímu přístupu a akumulaci antibiotika v místě infekce a také snížení toxicity a degradace léčiva.¹⁶ Systém založený na enkapsulaci vankomycinu do nanočástic je snadné aplikovat injekčně a tento systém prokázal potenciál pro antibiotickou terapii osteomyelitidy.¹⁷

Nafcilin

Registrační číslo CAS: 147-52-4

Molární hmotnost: 414,5 g/mol

Sumární vzorec: C₂₁H₂₂N₂O₅S¹⁸



Obr. 2: Strukturní vzorec nafcilinu¹⁹

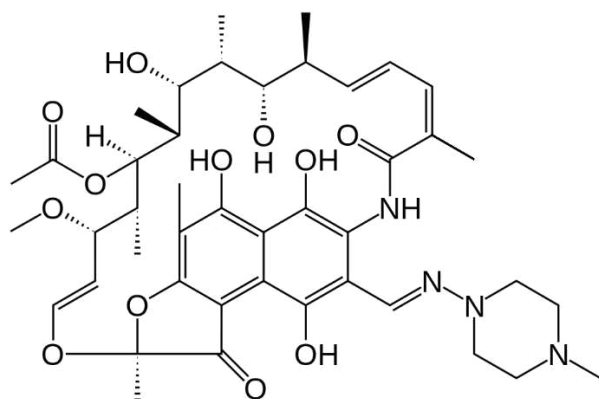
Nafcilin (Obr. 2) patří mezi penicilinová antibiotika 2.generace. Peniciliny jsou acylderiváty 6-aminopenicilánové kyseliny, jejichž základním skeletem je penam, což je β-laktamový kruh kondenzovaný s thiazolidinem. Nafcilin má baktericidní účinek a jeho mechanismus účinku je inhibice bakteriální buněčné stěny.¹² Nafcilin je semisyntetické antibiotikum s úzkým spektrem účinku, které se v praxi používá ve formě sodné soli. Je odolný vůči beta-laktamáze a je indikovaný k léčbě stafylokokových infekcí způsobených kmeny rezistentními na jiné peniciliny. Může být také použit jako terapie infekcí způsobených bakterií *Staphylococcus aureus* citlivých na meticilin.²⁰ Podává se intramuskulárně nebo intravenózně.²¹ PLGA nanočástice s nafcilinem byly připraveny metodou jednoduché emulze. Nafcilin má hydrofobní povahu a inkorporovaný do PLGA nanočástic se používá k léčbě osteomyelitidy neboli zánětu kosti.⁹

Rifampicin

Registrační číslo CAS: 13292-46-1

Molární hmotnost: 822,9 g/mol

Sumární vzorec: C₄₃H₅₈N₄O₁₂²²



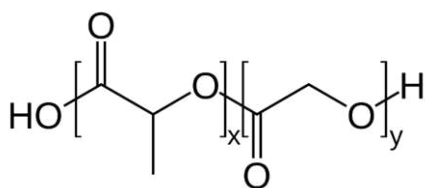
Obr. 3: Strukturální vzorec rifampicinu²³

Rifampicin (Obr. 3) patří do skupiny ansamycinových antibiotik, jejichž strukturu tvoří makrocykl, který obsahuje laktamovou vazbu. Aromatickou část rifampicinu tvoří naftalenové jádro. Rifampicin je prvním polosyntetickým derivátem, který se využívá klinicky. Rifampicin má široké spektrum účinku, působí na grampozitivní i gramnegativní bakterie.¹² Rifampicin je hydrofobní zwitteriontové antibiotikum. Mechanismem účinku je inhibice DNA-dependentní RNA polymerázy a má baktericidní účinky. Mezi nevýhody použití rifampicinu patří například špatná rozpustnost, nízká biologická aktivita a hepatotoxicita. Formulování rifampicinu do polymerních nanočástic má určité výhody, mezi které patří lepší biologická dostupnost, minimalizace lokálních nežádoucích účinků a řízené uvolňování léčiva, které snižuje potřebu časté aplikace léčiva a zlepšuje compliance pacienta. Nanočástice s rifampicinem byly připraveny nanoprecipitační metodou a používají se lokálně k léčbě muskuloskeletálních infekcí.⁸

1.2 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice jsou pevné částice nejčastěji sférické struktury o velikosti v rozmezí 1-1000 nm. Ve formě nanočástic mohou být dodávána hydrofilní i hydrofobní léčiva do cílových tkání nebo orgánů.²⁴ Mezi výhody polymerních nanočástic patří zlepšení enkapsulace malých molekul léčiva, zabránění degradace nebo deaktivace účinné látky v krvi, cílená distribuce a řízené uvolňování léčiva v cílových tkáních nebo buňkách, zvýšená biologická dostupnost léčiva, snížená frekvence dávkování, snížení nežádoucích účinků.²⁵ Pro výsledný terapeutický efekt jsou důležité fyzikálně-chemické a biofarmaceutické vlastnosti nanočástic. Mezi fyzikálně-chemické vlastnosti patří velikost částic, polydisperzita (PDI), náboj a hydrofobicita nanočástic. Z biofarmaceutických vlastností je to zejména množství léčiva enkapsulovaného do nanočástic, disoluční profil a biologická dostupnost. Jako polymerní nosiče léčiv formulovaných do nanočástic se používají biokompatibilní a biodegradovatelné polymery, které se v těle enzymaticky nebo neenzymaticky rozkládají na netoxické degradační produkty.²⁶ Jedním z nejčastěji využívaným polymerem je PLGA, který byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropskou lékovou agenturou (EMA).²⁵ Mezi nevýhody PLGA nanočástic patří relativně nízká enkapsulace léčivé látky a vysoké náklady na výrobu.²⁴

1.2.1 PLGA polymery



Obr. 4: Strukturální vzorec PLGA, kde x = počet jednotek kyseliny mléčné a y = počet jednotek kyseliny glykolové²⁷

PLGA jsou kopolymery kyseliny mléčné (LA) a kyseliny glykolové (GA) (Obr. 4), lišící se zejména poměrem laktidu a glykolidu, molární hmotností, koncovými skupinami, architekturou polymerního řetězce a krystalinitou. Jsou biokompatibilní, biodegradovatelné neenzymatickou hydrolýzou, rozpustné v řadě organických rozpouštědlech (např. acetonu, ethylacetátu nebo dichlormethanu). Typ a poměr

jednotlivých monomerních složek v kopolymerním řetězci přímo ovlivňuje mechanickou pevnost, schopnost hydrolyzy a rychlost biodegradace polymeru. Teplota skelného přechodu (T_g) je u většiny PLGA polymerů nad fyziologickou teplotou 37 °C, a proto je PLGA za normálních podmínek ve stavu sklovitém. Teplota skelného přechodu PLGA klesá s obsahem LA v kopolymerním řetězci a s molární hmotností.²⁸ Při teplotě skelného přechodu polymer přechází ze stavu sklovitého do stavu kaučukovitého. Zvyšuje se mobilita polymerních řetězců, snižuje se tuhost polymeru, a tím se zlepšuje jejich zpracovatelnost. Hodnota T_g určuje fyzikálně-chemické vlastnosti amorfních polymerů PLGA.²⁹

Rychlost degradace závisí na hydrofilite polymeru. Čím je polymer hydrofilnější, tím je vyšší rychlost degradace.²⁶ PLGA se může vyskytovat v různých poměrech monomerních složek LA:GA jako například poměr 50:50, 65:35, 75:25, 85:15, které mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti. Poměr monomerů v kopolymerním řetězci ovlivňuje lipofilitu PLGA derivátů.³⁰ Zpravidla vyšší obsah GA vede k rychlejší degradaci s výjimkou poměru 50:50 LA:GA, který vykazuje nejrychlejší degradaci.²⁸ PLGA kopolymery se v těle hydrolyticky rozkládají štěpením esterové vazby na endogenní monomery, kyselinu mléčnou a glykolovou, které jsou v těle snadno metabolizovány prostřednictvím Krebsova cyklu a eliminovány jako oxid uhličitý a voda. Rychlost hydrolyzy polymerního řetězce je závislá na pH nebo teplotě.²⁶

Lineární PLGA s nižší molární hmotností a větvené deriváty jsou vhodné nosiče léčiv díky jejich kratší době degradace, která se pohybuje v řádu několika hodin nebo dnů. Jako větvicí agens může být použit mannitol, pentaerythritol, dipentaerythritol, tripentaerythritol nebo kyselina polyakrylová. Větvení může vést k většímu počtu koncových skupin (hydroxylů nebo karboxylů), které zvyšují kapacitu polymeru pro aktivní farmaceutické složky. Významným parametrem větvených polyesterů je nižší hydrofobicita vzhledem k většímu počtu koncových skupin. Větvená struktura polymeru a nižší hydrofobicita vede ke vzniku mukoadhezivních vlastností.³¹

1.3 Metody přípravy polymerních nanočástic s léčivou látkou

Enkapsulace je proces, při kterém dochází k inkorporaci léčivé látky v pevném, kapalném nebo plynném stavu do polymeru za vzniku částic, které se navzájem odlišují velikostí, polydisperzitou, morfologií a vnitřní stavbou. Enkapsulací dochází k ochraně léčivé látky před vnějším prostředím, k umožnění řízeného uvolňování léčivé látky,

k zabránění nepříznivým účinkům jako může být podráždění žaludku nebo k maskování organoleptických vlastností.³² Metoda přípravy nanočástic má také vliv na jejich stabilitu, enkapsulační účinnost a na rychlost uvolňování enkapsulovaného léčiva.²⁵

Metody přípravy nanočástic jsou klasifikovány jako *top-down* a *bottom-up*. U metody *top-down* dochází k zmenšování částic (např. mletím) na úroveň nanometrů. Nevýhodou této metody je obtížné získání nanočástic požadované velikosti a tvaru. U metody *bottom-up* dochází ke vzniku nanočástic postupným spojováním jednoduchých molekul. Takto vzniklé nanočástice mají dobře definovaný tvar, velikost a chemické složení.³³

1.3.1 Nanoprecipitace

Metoda nanoprecipitace se používá především pro enkapsulaci ve vodě špatně rozpustných léčiv. Nanoprecipitace je jednostupňový proces, při kterém se polymer a hydrofobní léčivo rozpustí v organickém rozpouštědle mísitelném s vodou. Roztok se pomalu přidává do vodné fáze při vysokorychlostním míchání. Dojde k rychlé spontánní difúzi organické fáze do vodné fáze a rychlému vysrážení nanočástic.²⁵ Nejčastěji používaným organickým rozpouštědlem pro nanoprecipitační metodu je aceton, ale je možné také použít ethanol nebo methanol. Získané nanočástice se vyznačují dobře definovanou velikostí. Vlastnosti nanočástic jsou dané poměrem organické a vodné fáze a rychlostí míchání nebo rychlostí vstřikovávání organické fáze do vodné fáze. Tato metoda je celkem snadná a dobře reprodukovatelná.³⁴ Nanoprecipitací byly připraveny PLGA nanočástice s rifampicinem⁸, terbinafinem³⁵, pioglitazonem³⁶, celekoxibem³⁷ nebo piroxikamem.³⁸

1.3.2 Fázová separace

Fázová separace neboli koacervace je metoda, kdy po změně podmínek (např. pH, teplota) dochází k separaci fáze bohaté na polymer (koacervát) a fáze obsahující malé množství polymeru (supernatant). Koacervace může být jednoduchá nebo komplexní.³⁹ Jednoduchá koacervace nastává v přítomnosti jednoho polymeru a koacervát se vytvoří přidáním desolvatačního činidla. Při jednoduché koacervaci se často využívá roztok želatiny, do kterého se jako desolvatační činidlo přidává ethanol nebo síran sodný. Nanočástice jsou stabilizovány úpravou pH nebo přidáním síťovacího činidla (např. glutaraldehyd).^{40,41} Komplexní koacervace využívá dva i více polymerů s opačným nábojem. Jako kladně nabitý polykationt je možné použít želatinu typu A

nebo chitosan a jako polyaniont se často využívá alginát, arabská klovatina nebo karmelosa sodná sůl. Podstatou metody je vyrovnání nábojů na koloidech při vhodně zvoleném pH. Dochází k iontové interakci mezi opačně nabitými polymery, a to vede ke tvorbě koacervátu.^{39,40}

1.3.3 Sprejové sušení

Sprejové sušení je jednoduchá, rychlá a jednostupňová metoda, při které dochází k přeměně roztoku, suspenze nebo emulze na nanočástice. Léčivá látka a polymer jsou dispergovány v kapalném médiu a tato disperze je nastříkována do sušící komory, kde dochází k odpaření rozpouštědla a formování částic. Mezi tři hlavní kroky sprejového sušení patří atomizace kapalně soustavy, dehydratace/sušení atomizované kapky a separace tuhých částic ze vzduchu. Při atomizaci kapalně látky nastává enormní zvětšení povrchu, což vede k rychlému odpaření disperzního média a formulaci tuhých částic. K separaci částic prášku ze vzduchu dochází na dně sušící komory a částice jsou dále transportovány do cyklonového separátoru, odkud se odebírá výsledný produkt. Velikost částic je ovlivněna řadou parametrů, zejména rychlostí nástřiku, velikostí atomizační trysky nebo teplotou vzduchu.⁴² Sprejovým sušením byly připraveny PLGA nanočástice s cyklosporinem nebo dexametasonem.⁴³

1.3.4 Metoda vysolování

U metody vysolování dochází nejprve k rozpuštění polymeru PLGA a hydrofobní léčivé látky v organickém rozpouštědle, které je mísitelné s vodou (např. tetrahydrofuran nebo aceton). Organická fáze se přidá za míchání k vodné fázi, která je tvořena stabilizátorem a vysolovacím činidlem. Vysolovacím činidlem mohou být elektrolyty (např. chlorid hořečnatý, chlorid vápenatý nebo octan hořečnatý) nebo neelektrolyty (např. sacharosa). Organická fáze se emulguje do vodné fáze a vysoká koncentrace vysolovacích činidel brání mísitelnosti organické fáze s vodnou fází tím, že se obklopuje molekulami vody. Do vytvořené emulze se přidá přebytečné množství vody. Organické rozpouštědlo se začne rychle mísit s vodnou fází, což vede ke vzniku nanočástic, které jsou stabilizované molekulami stabilizátoru.^{25,44}

1.3.5 Emulzní odpařovací metody

Tyto metody jsou založeny na emulgaci organického roztoku polymeru do vodné fáze s následným odpařením organického rozpouštědla.⁴⁴ Polymer se rozpustí v organickém rozpouštědle nemísitelném s vodou. V tomto roztoku se disperguje nebo rozpustí léčivo a vzniklý roztok, suspenze nebo emulze se poté emulguje do kontinuální vodné fáze s povrchově aktivní látkou zajišťující stabilizaci. K emulgaci nebo suspendaci se využívají různé typy homogenizátorů (např. ultrazvukový, vysokotlaký, rotor-stator nebo mikrofluidizační homogenizátor). Organické rozpouštědlo nejprve difunduje do vodné fáze a poté na rozhraní voda/vzduch dochází k jeho odpařování. Odpařením organického rozpouštědla dojde ke vzniku nanočástic. Mezi emulzní odpařovací metody patří metoda jednoduché emulze a metoda dvojité emulze.^{39,45}

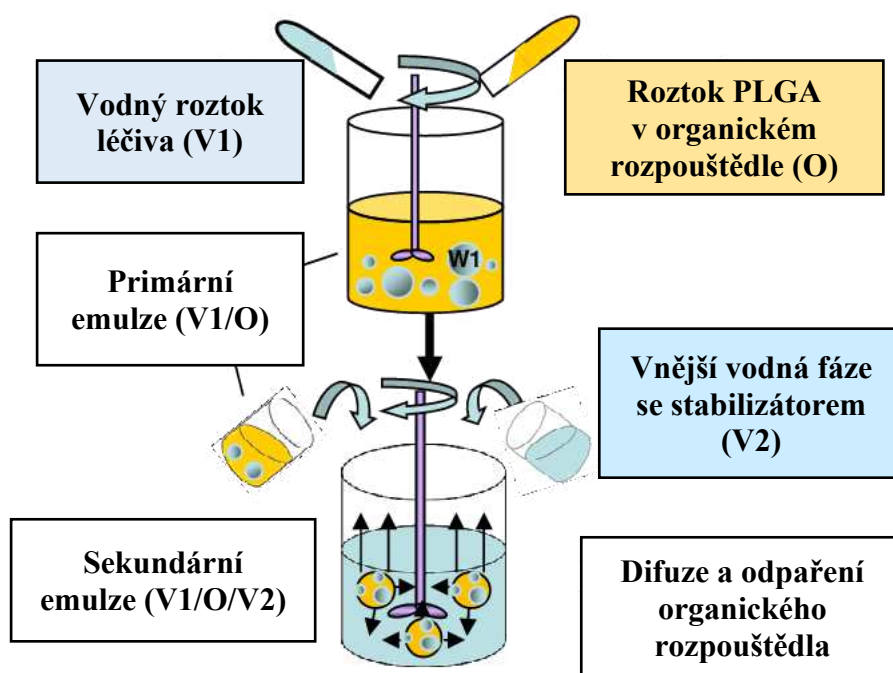
U metody jednoduché emulze se v organickém rozpouštědle (např. dichlormethanu nebo chloroformu) rozpustí polymer i léčivo.³⁹ Mezi výhody této metody patří dobrá enkapsulace lipofilních léčiv a možnost ovlivnění velikosti částic změnou intenzity homogenizace nebo množstvím stabilizátoru. Nevýhodou je, že se touto metodou špatně enkapsulují hydrofilní léčiva.⁴⁶ Metodou jednoduché emulze byly připraveny PLGA nanočástice s nafcilinem⁹, rutinem⁴⁷ nebo indometacinem.⁴⁸

Při metodě dvojité emulze se vodný roztok léčiva emulguje do organického roztoku polymeru za vzniku primární emulze, která se následně emulguje do vnější vodné fáze za vzniku sekundární emulze.⁴⁶ Tato metoda byla v předložené práci použita pro přípravu PLGA nanočástic s vankomycin-hydrochloridem a je podrobněji popsána v následující kapitole.

1.4 Metoda dvojité emulze

Metoda dvojité emulze (Obr. 5) je vhodná pro enkapsulaci hydrofilních léčiv. Prvním krokem je příprava vodné a organické fáze. Vnitřní vodná fáze vzniká rozpuštěním hydrofilního léčiva ve vodě a organická fáze vzniká rozpuštěním polymeru PLGA v organickém rozpouštědle (např. dichlormethanu nebo chloroformu). Obě fáze se homogenizují za použití ultrazvukového homogenizátoru a dojde ke vzniku primární emulze. Primární emulze se emulguje do vnější vodné fáze, která obsahuje vhodný stabilizátor (např. PVA) a vznikne sekundární emulze. Po vytvoření sekundární emulze následuje odpařování organického rozpouštědla za stálého míchání na magnetické míchačce. Výhodou metody dvojité emulze je, že umožňuje enkapsulaci hydrofilního

i hydrofobního léčiva. Mezi nevýhody této metody patří vznik velkých částic nepravidelného tvaru nebo únik hydrofilního léčiva do vnější vodné fáze.⁴⁶ U metody dvojité emulze bylo prokázáno, že zajišťuje vysokou enkapsulační účinnost ve vodě rozpustných léčiv a tato metoda přípravy také umožňuje manipulaci s faktory působícími na velikost částic, distribuci a uvolňování léčiva. Proto byla tato metoda zvolena pro přípravu PLGA nanočástic s vysoce hydrofilním léčivem vankomycinem.⁴⁹ Metodou dvojité emulze byly také připraveny PLGA nanočástice s gentamicinem⁵⁰, ciprofloxacinem, norfloxacinem, erytromycinem, cefazolinem, klindamycinem nebo doxycyklinem.⁴⁶



Obr. 5: Schéma přípravy nanočástic metodou dvojité emulze. Upraveno dle⁵¹

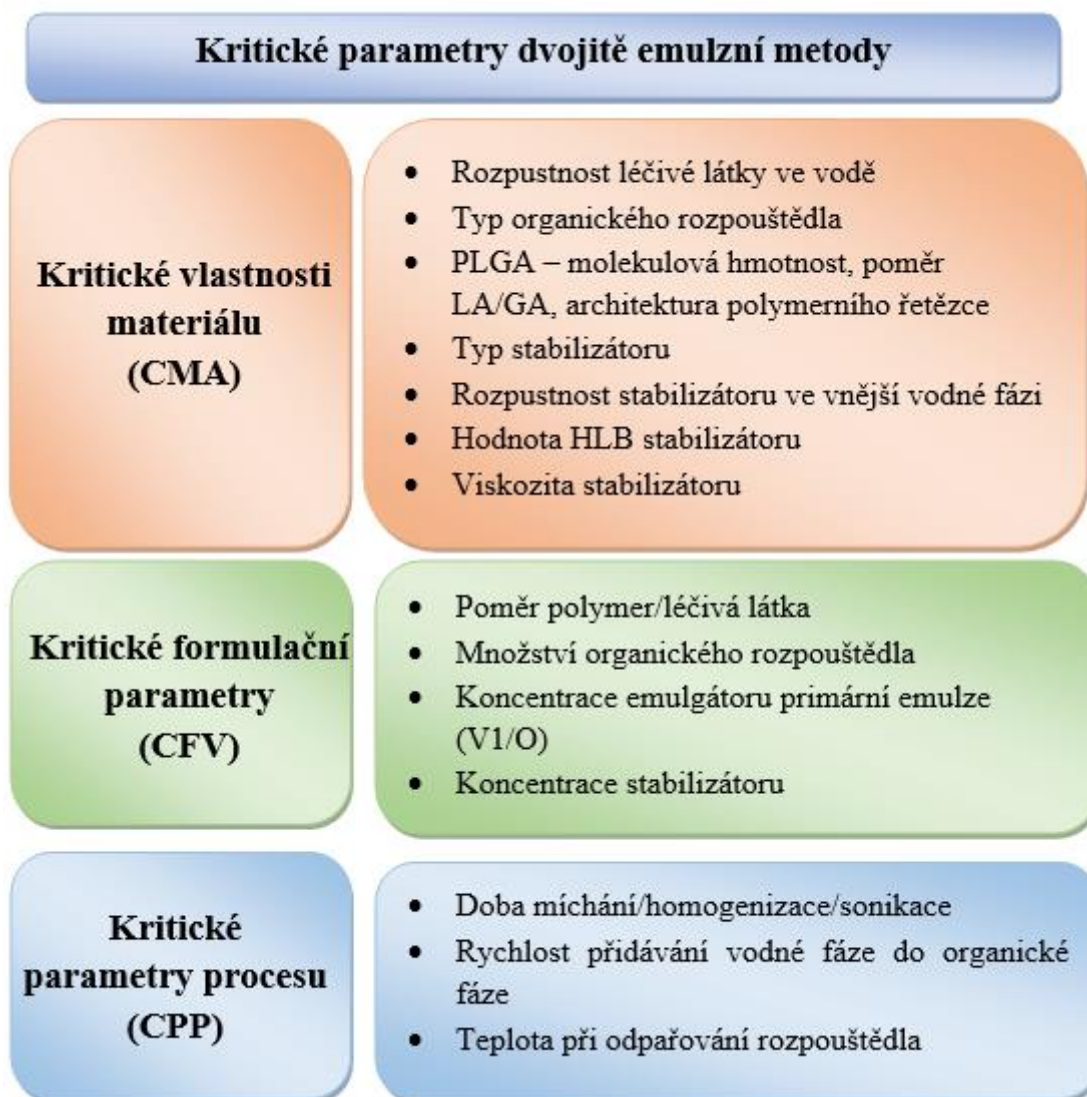
1.4.1 Kritické parametry dvojité emulzní metody

Nanočástice připravené dvojité emulzní metodou jsou ovlivněny fyzikálními, chemickými nebo biologickými vlastnostmi léčivé látky i pomocných látek, které mají vliv na výslednou velikost, polydisperzitu, enkapsulační účinnost a disoluci. Mezi kritické materiálové vlastnosti (*Critical Material Attributes CMA*) patří vlastnosti PLGA polymeru jako je poměr kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (LA:GA), molekulová hmotnost nebo teplota skelného přechodu. U léčivé látky je důležitá zejména rozpustnost ve vodě nebo krystalinita. U stabilizátorů primární a sekundární emulze

jsou kritickými vlastnostmi hodnota hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB), iontový charakter, u polymerních stabilizátorů pak molekulová hmotnost nebo stupeň zesílení. K dosažení stabilní dvojité emulze je potřeba vyhodnotit všechny kritické vlastnosti léčivé látky, polymeru PLGA a stabilizátoru, které mohou ovlivnit kvalitu léčivých přípravků.⁵²

Kritickými formulačními parametry (*Critical Formulation Parameters CFV*) jsou pro PLGA nanočástice připravené dvojité emulzní metodou koncentrace léčiva, PLGA polymeru a stabilizátoru, dále poměr organické a vodné fáze. Koncentrace polymeru je považována za rozhodující faktor ovlivňující vlastnosti částic. Hydrofobní emulgátor zvyšuje stabilitu primární emulze (V1/O). Hydrofilní emulgátor stabilizuje sekundární emulzi (V1/O/V2). Koncentrace obou typů stabilizátoru a poměr organické fáze k vodné fázi ovlivňují velikost částic a jejich stabilitu.⁵²

Pro efektivitu dvojité emulzní metody a požadovanou kvalitu nanočástic by měly být optimalizovány kritické procesní parametry (*Critical Process Parameters CPP*). Mezi ně patří zejména rychlost přidávání vodné fáze do organické fáze, doba a rychlost míchání, doba a rychlost homogenizace a teplota. Tyto kritické parametry procesu mají vliv na velikost částic a polydisperzitu.⁵² Přehled kritických parametrů dvojité emulzní metody schematicky prezentuje Obr. 6.



Obr. 6: Kritické parametry dvojité emulzní metody. Upraveno dle⁵²

1.5 Pomocné látky pro formulaci PLGA nanočástic s vankomycin-hydrochloridem

Kromě PLGA jako konstitutivní pomocné látky se při dvojité emulzní metodě přípravy nanočástic používají organická rozpouštědla, hydrofobní stabilizátory pro stabilizaci primární emulze a hydrofilní stabilizátory pro stabilizaci sekundární emulze.

1.5.1 Organická rozpouštědla používaná při přípravě PLGA nanočástic

Organická rozpouštědla se používají k rozpuštění PLGA polymeru a hydrofobních léčiv. Mísitelnost organického rozpouštědla s vodou a jeho schopnost rozpouštět polymer a léčivo má vliv na velikost částic, polydisperzitu a enkapsulační účinnost. Při výběru rozpouštědla je potřeba brát v úvahu jeho toxicitu, protože ve finálně

připravených nanočásticích zůstane stopové množství rozpouštědla. Výběr organického rozpouštědla závisí i na zvolené metodě přípravy PLGA nanočástic.²⁶

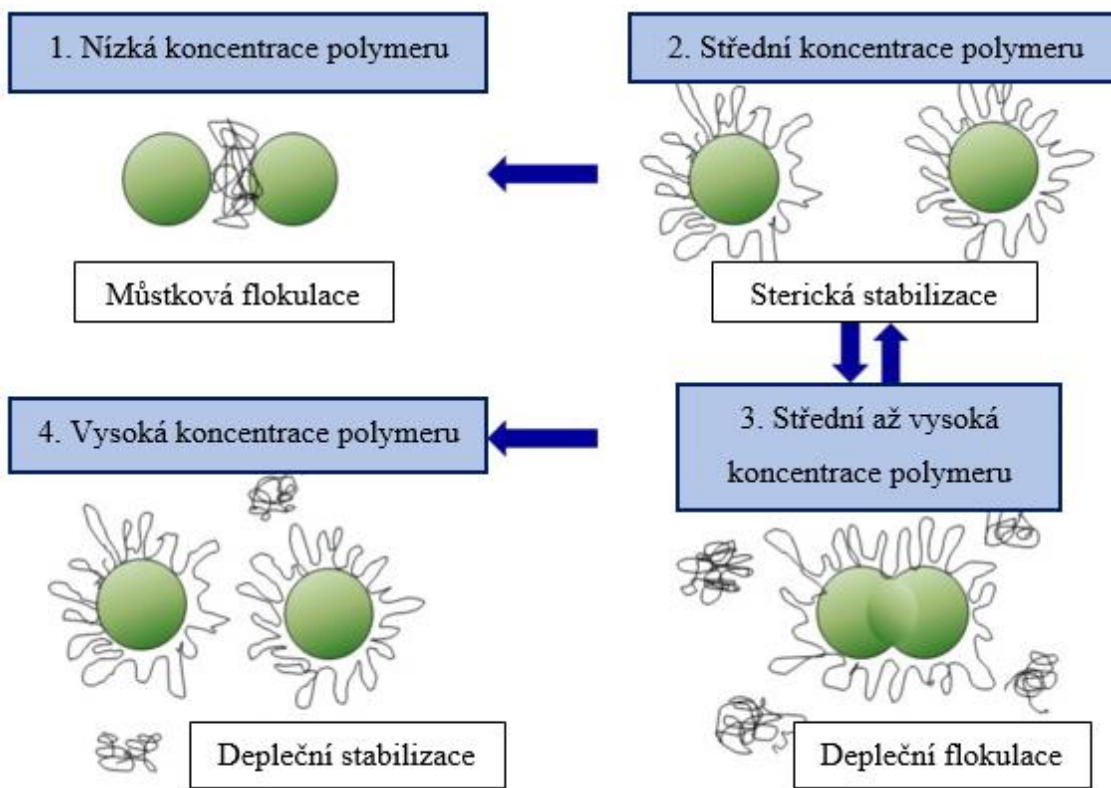
Aceton je organické rozpouštědlo mísitelné s vodou. Při přípravě PLGA nanočástic se používá u nanoprecipitační metody³⁴ a u metody vysolování.⁴⁴ Dichlormethan (DCM) je organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou. Při přípravě nanočástic se používá u emulzních odpařovacích metod jako je metoda jednoduché emulze a metoda dvojité emulze.⁵³ DCM byl použit při přípravě PLGA nanočástic s rutinem⁴⁷, indometacinem⁴⁸, vankomycinem⁴⁹ nebo gentamicinem.⁵⁰ Běžná je i kombinace organických rozpouštědel. Např. ekvimolární směs dichlormethanu, který je s vodou nemísitelný a ethylacetátu (EA), který je dobře rozpustný ve vodě, vede ke zvýšení enkapsulační účinnosti a mírnému snížení velikosti částic oproti použití samotného DCM. Kombinace dichlormethanu a ethylacetátu v poměru 1:1 byla použita při přípravě PLGA nanočástic s vankomycinem¹⁶ nebo rivastigminem.⁵⁴

1.5.2 Stabilizátory používané při dvojité emulzní metodě

Stabilizátory se při přípravě nanočástic dvojité emulzní metodou používají za účelem stabilizace primární (V1/O) a sekundární (V1/O/V2) emulze. Typ a koncentrace zvoleného stabilizátoru ovlivní charakteristiky nanočástic (velikost, polydisperzitu, zeta potenciál), stabilitu nanočástic, biodistribuci, buněčnou absorpci a průběh uvolňování léčiva. Stabilizátor je při tvorbě nanočástic přítomen na mezifázi V1→O resp. V1/O→V2 a může zůstat začleněn na povrchu nanočástic. Tím může dojít k modifikaci vlastností částic jako je zeta potenciál a mukoadheze. Velikost i hodnota zeta potenciálu jsou důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, protože určují fyzikální stabilitu a biofarmaceutické vlastnosti přípravku.⁵⁵

Stabilizace nanočástic může být sterická nebo elektrostatická. Sterická stabilizace (Obr. 7) je dána adsorpcí molekul neiontové povrchově aktivní látky nebo polymeru (např. PVA) na povrchu nanočástic, která zabrání agregaci. Sterická stabilita závisí na koncentraci polymeru, teplotě, rozpustnosti polymeru a na průměrné délce řetězce. Zvýšením koncentrace adsorbovaných molekul dochází ke zvýšení osmotické odpudivé síly, která zabrání agregaci a zvýší stabilitu nanočástic.⁵⁶ Elektrostatická stabilizace je důsledkem přítomnosti elektrické dvojvrstvy, která vzniká poutáním opačně nabitých iontů k částicím, které nesou na povrchu náboj. Přiblížením částic se stejným nábojem dochází k vzájemnému odpuzování, které je určeno velikostí povrchového náboje

a koncentrací elektrolytu.⁵⁷ Elektrostatické stabilizátory jsou obvykle aniontové povrchově aktivní látky (např. soli organických kyselin).⁵⁸



Obr. 7: Zjednodušené znázornění sterické stabilizace emulze. Upraveno dle.⁵⁹

Stabilizátory primární emulze

Primární emulze (V1/O) vzniká v průběhu přípravy nanočástic emulgací vodného roztoku léčiva do organické (olejové) fáze, která je tvořena roztokem polymeru a stabilizátoru v organickém rozpouštědle, a následnou homogenizací. Ve funkci stabilizátorů primární emulze se používají hydrofobní tenzidy s HLB v rozsahu 1-10.⁶⁰ Jako hydrofobní stabilizátory primární emulze při přípravě PLGA nanočástic mohou být použity sorbitan-stearát (SS) (Span[®] 60)⁶¹, glycerol-monostearát (GMS)^{62,63}, polyglyceryl-3 polyricinoleát (PGPR).^{64,65}

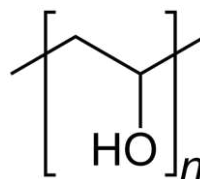
Stabilizátory sekundární emulze

Polyvinylalkohol (PVA)

Registrační číslo CAS: 9002-89-5

Molární hmotnost: 44,05 g/mol

Sumární vzorec: C₂H₄O⁶⁶



Obr. 8: Strukturní vzorec PVA⁶⁷

PVA (Obr. 8) je syntetický, ve vodě rozpustný, biokompatibilní a biodegradabilní polymer, který má krystalickou strukturu. Vyrábí se hydrolýzou z polyvinylacetátu a je chemicky odolný. Vysoká univerzálnost tohoto polymeru nabízí široké spektrum využití v biotechnologických a biomedicínských oborech pro své dobré chemické a fyzikální vlastnosti a snadnou zpracovatelnost. Využívá se k výrobě kontaktních čoček, jako biomateriál ve zdravotnických prostředcích nebo jako nosič léčiv.^{68,69} PVA je neionický emulgátor s hodnotou HLB 18⁷⁰, který lze použít ke stabilizaci sekundární emulze a který snižuje mezipovrchové napětí mezi organickým roztokem PLGA a vnější vodnou fází. Je známo, že koncentrace PVA ve vodné fázi je klíčovým faktorem, který ovlivňuje velikost nanočástic.¹⁵ PVA má vysoký stupeň bobtnání a tím může zkreslit distribuci velikosti nanočástic.⁷¹

Bylo dokázáno, že zvýšením koncentrace PVA ve vnější vodné fázi se velikost částic zmenšuje. Tento pokles velikosti části je pravděpodobně způsoben rozdíly ve stabilitě emulzí formulovaných s různými koncentracemi PVA. Se zvýšenou koncentrací PVA se zvyšuje jeho povrchová aktivita a zvyšuje se i viskozita roztoku PVA. To vede k vytvoření stabilní emulze s menšími kapičkami a následně k tvorbě menších nanočástic s nízkou polydisperzitou.⁷²

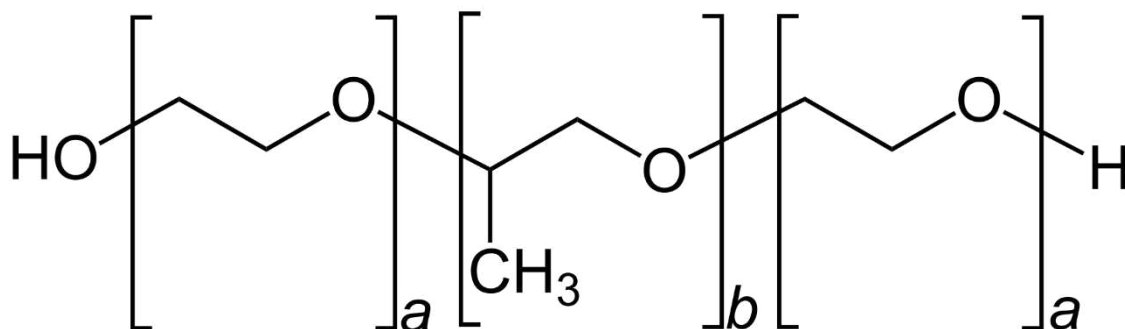
Polarita organického rozpouštědla použitého při tvorbě emulze během formulace PLGA nanočástic může ovlivnit množství PVA adsorbovaného na rozhraní organické a vodné fáze. Byly formulovány nanočástice se třemi organickými rozpouštědly (aceton, dichlormethan a chloroform). Bylo zjištěno, že množství PVA deponované na povrchu nanočástic se zvyšovalo se zvyšující se mísitelností organického rozpouštědla s vodou. Výsledkem je, že se více PVA mohlo rozdělit do polymerní fáze obsahující organické rozpouštědlo, které je lépe mísitelné s vodnou fází a díky tomu dochází k vyššímu usazování PVA na povrchu nanočástic. Z použitých organických rozpouštědel je nejvíce

mísitelný s vodou aceton, následuje dichlormethan (1:50) a nejméně mísitelný s vodou je chloroform (1:200).⁷² PVA byl použit v koncentracích v rozmezí 2-50 mg/ml pro stabilizaci nanočástic s nafcilinem⁹, vankomycinem^{16,49}, pioglitazonem³⁶, rutinem⁴⁷, gentamicinem⁵⁰ a gefitinibem.⁷³

Poloxamer 407

Registrační číslo CAS: 691397-13-4

Molární hmotnost: 12,6 g/mol⁷⁴



Obr. 9: Strukturální vzorec poloxameru 407, kde délky bloků jsou $a = 101$ a $b = 56$ ⁷⁵

Poloxamery jsou trojblokové kopolymery, které se skládají ze středového hydrofobního bloku polypropylenoxidu a dvou postranních hydrofilních bloků polyethylenoxidu. Poloxamer 407 (Obr. 9) je neiontová povrchově aktivní látka, která vykazuje termoreverzibilní vlastnosti. Formulace obsahující poloxamer 407 vedly ke zvýšené rozpustnosti léčiv špatně rozpustných ve vodě a k prodlouženému uvolňování léčivé látky. Poloxamer 407 může být složkou léčivých přípravků jako jsou např. perorální roztoky, suspenze, inhalační, intravenózní, oftalmologické nebo topické přípravky. Koncentrované vodné roztoky poloxameru 407 gelovají. Termogelace je způsobena interakcí mezi různými segmenty kopolymeru. Bioadhezivní vlastnosti poloxameru 407 jsou požadovány zejména u rektálních, kožních nebo oftalmologických přípravků. Bioadhezivní síla roste s pevností gelu a je modifikována teplotou a koncentrací poloxameru 407. Vliv na bioadhezi má také přítomnost různých rozpouštědel nebo iontových činidel.^{76,77} Poloxamer 407 slouží také jako sterický stabilizátor při přípravě nanočástic. Poloxamer 407 byl použit pro stabilizaci PLGA nanočástic s rifampicinem.⁸

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiály

Čištěná voda, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, Česká republika

Dichlormethan čistý, Penta, Česká republika

Ethylacetát, Penta, Česká republika

Fosfátový pufr pH 7,4 tablety, Merck Darmstadt, Německo

Glycerol-monostearát 40-55, Merck Darmstadt, Německo

Chloroform, Penta, Česká republika

Poly(D,L-laktid-*ko*-glycolid) větvený na tripentaerythritolu, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, Česká republika

Polyglyceryl-3 polyricinoleát, Evonic, Německo

Poly(vinyl alcohol), stupeň hydrolyzy 87–89 %, M_w 72 000 g/mol, Merck Darmstadt, Německo

Sorbitan-stearát (Span[®] 60), Merck Darmstadt, Německo

Vankomycin Kabi 500 mg, prášek pro koncentrát pro infuzní roztok, vankomycin-hydrochlorid, Fresenius Kabi, Česká republika

Voda na injekci, Fagron, Česká republika

2.2 Pomůcky

Dialyzační hadička, Merck Darmstadt, Německo

z regenerované celulosy, mezní molekulová hmotnost 14 000 g/mol

Hliníkové kelímky Netzsch 100 DSC, Netzsch-Geratebau GmH, Německo

set kelímek a víčko, 25 μ l, teplotní rozsah -180 °C do 600 °C

Pipety s nastavitelným objemem Research, Eppendorf, Německo

Polystyrenová jednorázová kyveta DTS0012, Malvern Panalytical, Velká Británie

Skleněná kyveta, Hellma Analytics, Německo

2.3 Přístroje

Analytické digitální váhy, Ohaus Discovery, Ohaus, Švýcarsko

Centrifuga MPW – 260R, MPW Med. Instruments, Polsko

DSC 200 F3 Maia, Netzsch, Německo

Horkovzdušná sušárna, Memmert, Německo

Magnetická míchačka, IKA – WERKERT, Německo

Ruční lis pro uzavření hliníkových kelímků, Netzsch-Geratebau GmhH, Německo

Spektrofotometr, Specord 205, Analytik Jena, Německo

Třepací vodní lázeň, Julabo SW22, Německo

Ultrazvukový homogenizátor SONOPULS HD 2070, Bandelin, Německo

Váhy Kern 440-53N, Kern, Německo

Zetasizer Nano ZS90 Malvern Panalytical, Velká Británie

2.4 Příprava nanočástic

Všechny PLGA nanočástice byly připraveny dvojitě emulzní metodou, jejíž základní kroky jsou následující:

1. Příprava vnitřní vodné fáze (V1)
2. Příprava organické fáze (O)
3. Příprava vnější vodné fáze (V2)
4. Emulgace V1 → O a homogenizace primární emulze V1/O
5. Emulgace V1/O → V2 a homogenizace sekundární emulze V1/O/V2
6. Evaporace organického rozpouštědla (přechod V1/O/V2 na nanosuspenzi)
7. Úprava nanosuspenze (centrifugace, promývání, resuspendace)

Vnitřní vodná fáze (V1) byla tvořena roztokem vankomycin-hydrochloridu. Dané množství Van-HCl bylo rozpuštěno ve 200 μ l vody na injekci. Byly rovněž připraveny blank nanočástice bez Van-HCl, kde byla vnitřní vodná fáze tvořena vodou na injekci.

Organická fáze (O) byla tvořena roztokem PLGA v organickém rozpouštědle, popř. s přidavkem hydrofobního stabilizátoru. 50 mg PLGA, popř. dané množství hydrofobního stabilizátoru primární emulze, bylo rozpuštěno ve 2,0 ml organického rozpouštědla mícháním na magnetické míchače při pokojové teplotě.

Vnější vodná fáze (V2) byla tvořena roztokem PVA. Dané množství PVA bylo rozpuštěno v čištěné vodě mícháním na magnetické míchače při teplotě 90 °C po dobu 10 minut a následně při pokojové teplotě po dobu 60 min. Byly připraveny 4 ml roztoku s vyšší koncentrací PVA a 40 ml roztoku s nižší koncentrací PVA. Po rozpuštění PVA byla dovážena odpařená voda.

200 μ l vnitřní vodné fáze bylo emulgováno do 2,0 ml organické fáze a vytvořená primární emulze (V1/O) byla při chlazení na ledu homogenizována ultrazvukovým homogenizátorem po dobu 90 s při amplitudě 40 % a intenzitě 70 %. Při stejném způsobu homogenizace byla primární emulze přidána do 4 ml vnější vodné fáze s vyšší koncentrací PVA za vzniku sekundární emulze (V1/O/V2). Tato koncentrovaná složená emulze byla následně přidána do 40 ml roztoku PVA s nižší koncentrací.

Sekundární emulze byla míchána na magnetické míchače v digestoři po dobu 2 hodin, aby došlo k odpaření organického rozpouštědla a přechodu složené emulze V1/O/V2 na nanosuspenzi.

V průběhu přípravy byly měněny tyto formulační faktory:

- ✓ Koncentrace vankomycin-hydrochloridu ve vnitřní vodné fázi
- ✓ Typ organického rozpouštědla
- ✓ Typ a/nebo koncentrace hydrofobního stabilizátoru primární emulze
- ✓ Metoda emulgace primární emulze a/nebo sekundární emulze
- ✓ Koncentrace PVA ve vnější hydrofilní fázi

2.4.1 Příprava nanočástic s různým množstvím Van-HCl nebo různým organickým rozpouštědlem

Dle obecného postupu dvojité emulzní metody viz. kap. 2.4 byla připravena šarže nanočástic bez Van-HCl (blank nanočástice – F1) a dvě šarže (F2 a F3) lišící se množstvím Van-HCl. Složení uvádí Tab.1. Od každé šarže byly paralelně připraveny tři vzorky. Byla připravena šarže nanočástic (F4), při jejichž přípravě byla ve funkci organického rozpouštědla použita směs dichlormethanu a ethylacetátu v poměru 1:1. Byly paralelně připraveny tři vzorky. Složení šarží uvádí Tab. 1.

Tab. 1: Šarže nanočástic s různým množstvím vankomycin-hydrochloridu nebo různým organickým rozpouštědlem

K Ó D ↓	VODNÁ FÁZE (V1)	ORGANICKÁ FÁZE (O)		VODNÁ FÁZE (V2)
	Van-HCl	PLGA	Rozpouštědlo	PVA
F1	blank	25 mg/ml	DCM	30 mg/ml → 3 mg/ml
F2	5 mg/ml	25 mg/ml	DCM	30 mg/ml → 3 mg/ml
F3	10 mg/ml	25 mg/ml	DCM	30 mg/ml → 3 mg/ml
F4	5 mg/ml	25 mg/ml	DCM/EA 1:1	30 mg/ml → 3 mg/ml

2.4.2 Příprava nanočástic s různým stabilizátorem primární emulze

Dle obecného postupu dvojité emulzní metody viz. kap. 2.4 bylo připraveno pět šarží nanočástic (F5 – F9), při jejichž přípravě byl jako stabilizátor primární emulze V1/O použit sorbitan-stearát (F5), glycerol-monostearát 40-55 ve dvou různých koncentracích

(F6-F7), nebo polyglyceryl-3 polyricinoleát ve dvou různých koncentracích (F8-F9). Složení uvádí Tab. 2. Od každé šarže byly paralelně připraveny tři vzorky.

Tab. 2: Šarže nanočástic s různým stabilizátorem primární emulze

K Ó D ↓	VODNÁ FÁZE (V1)	ORGANICKÁ FÁZE (O)			VODNÁ FÁZE (V2)
	Van-HCl	PLGA	Stabilizátor	Rozpouštědlo	PVA
F5	5 mg/ml	25 mg/ml	SS 5 mg/ml	DCM/EA	30 mg/ml → 3 mg/ml
F6	5 mg/ml	25 mg/ml	GMS 7,5 mg/ml	DCM/EA	30 mg/ml → 3 mg/ml
F7	5 mg/ml	25 mg/ml	GMS 15 mg/ml	DCM/EA	30 mg/ml → 3 mg/ml
F8	5 mg/ml	25 mg/ml	PGPR 50 mg/ml	DCM/EA	30 mg/ml → 3 mg/ml
F9	5 mg/ml	25 mg/ml	PGPR 100 mg/ml	DCM/EA	30 mg/ml → 3 mg/ml

2.4.3 Příprava nanočástic při různé homogenizaci primární a/nebo sekundární emulze

Byly připraveny šarže nanočástic F10 a F11, které složením odpovídají šarži F7 (viz. Tab. 2), ale při jejich přípravě byl změněn způsob homogenizace primární a/nebo sekundární emulze. Podmínky homogenizace použité při přípravě PLGA nanočástic dvojité emulzní metodou uvádí Tab. 3. U šarží F1 až F9 byla primární i sekundární homogenizace provedena za podmínek střední intenzity. U šarže F10 byla zvýšena intenzita homogenizace primární emulze, u šarže F11 byla zvýšena intenzita homogenizace primární i sekundární emulze (Tab. 4). Od každé šarže byly paralelně připraveny tři vzorky.

Tab. 3: Podmínky homogenizace při přípravě nanočástic

Střední intenzita	amplituda 40 %	intenzita 70 %	doba 90 s
Vysoká intenzita	amplituda 40 %	intenzita 100 %	doba 120 s

Tab. 4: Intenzita homogenizace primární a sekundární emulze

Šarže nanočástic	Homogenizace V1/O	Homogenizace V1/O/V2
F1 – F9	střední intenzita	střední intenzita
F10	vysoká intenzita	střední intenzita
F11	vysoká intenzita	vysoká intenzita

2.4.4 Příprava nanočástic s různou koncentrací hydrofilního stabilizátoru

Byly připraveny šarže nanočástic, které složením a způsobem homogenizace odpovídají šarži F11, ale u kterých byla použita nižší koncentrace PVA (šarže F12) resp. vyšší koncentrace PVA (šarže F13). Příprava vnější vodné fáze a postup sekundární emulgace byly realizovány dle postupu uvedeném v kap. 2.4. Přesné složení šarží F12 a F13 uvádí Tab. 5. Od každé šarže byly připraveny tři vzorky.

Tab. 5: Šarže nanočástic s různou koncentrací hydrofilního stabilizátoru

K Ó D ↓	VODNÁ FÁZE (V1)	ORGANICKÁ FÁZE (O)			VODNÁ FÁZE (V2)
	Van-HCl	PLGA	Stabilizátor	Rozpouštědlo	PVA
F12	5 mg/ml	25 mg/ml	GMS 15 mg/ml	DCM/EA	10 mg/ml → 1 mg/ml
F13	5 mg/ml	25 mg/ml	GMS 15 mg/ml	DCM/EA	50 mg/ml → 5 mg/ml

2.5 Měření velikosti a polydisperzity nanočástic

Byla měřena velikost a polydisperzita šarží nanočástic F1 – F13 (složení viz. Tab. 1-5) metodou dynamického rozptylu světla (DLS) na zetasizeru (Nano ZS90 Malvern Panalytical, Velká Británie). Od každé šarže byly připraveny paralelně tři vzorky. Bezprostředně po přípravě bylo ze středu kádinky odebráno pomocí injekční stříkačky potřebné množství nanosuspenze a injektováno do kyvet. Tímto postupem bylo zamezeno vnesení vzduchu do vzorku měřeného na zetasizeru. Každý vzorek byl proměřen třikrát a byl vypočten průměr. Výsledné hodnoty velikosti a PDI nanočástic jsou v tabulkách nebo grafech prezentovány jako průměr a směrodatná odchylka tří vzorků.

2.6 Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)

Metoda DSC byla použita pro charakterizaci PLGA, vankomycin-hydrochloridu a nanočástic šarže F11 (složení viz. Tab. 2-4), u kterých byla zjištěna velikost $401 \pm 2,1$ nm, PDI $0,141 \pm 0,004$ (Obr. 15) a EE $8,2 \pm 0,64$ % (Tab. 9). Nanosuspenze byla centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. Sedimenty byly sušeny v horkovzdušné sušárně při 25 °C po dobu jedné hodiny. Vzorky pro DSC v množství přibližně 10 mg byly naváženy do hliníkových kelímků a hermeticky

uzavřeny pomocí ručního lisu. Jako referenční vzorek byl použit prázdný hliníkový kelímek. Teplotní režim byl zvolen dle vlastností jednotlivých vzorků (Obr. 10). Teplota tání (T_m) vankomycin-hydrochloridu byla odečtena na křivce prvního ohřevu. Teplota skelného přechodu PLGA byla určena v inflexním bodě na křivce druhého ohřevu. Z DSC skenu nanočástic byl zjištěn fyzikální stav léčiva v polymerním nosiči.

Total Selection	Dynamic	Heating	Cooling	Isothermal
<input checked="" type="checkbox"/>	1 Dynamic	-20.0 °C	-10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	2 Isothermal	-20.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	3 Dynamic	60.0 °C	10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	4 Isothermal	60.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	5 Dynamic	-20.0 °C	-20.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	6 Isothermal	-20.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	7 Dynamic	60.0 °C	10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	8 Isothermal	60.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	9 Dynamic	20.0 °C	-10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	10 Isothermal	20.0 °C	5 min	

(a)

Total Selection	Dynamic	Heating	Cooling	Isothermal
<input checked="" type="checkbox"/>	1 Dynamic	-20.0 °C	-10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	2 Isothermal	-20.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	3 Dynamic	250.0 °C	10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	4 Isothermal	250.0 °C	3 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	5 Dynamic	-20.0 °C	-20.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	6 Isothermal	-20.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	7 Dynamic	250.0 °C	10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	8 Isothermal	250.0 °C	3 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	9 Dynamic	20.0 °C	-10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	10 Isothermal	20.0 °C	5 min	

(b)

Obr. 10: Teplotní režimy DSC pro (a) polymer PLGA a pro (b) vankomycin-hydrochlorid a nanočástice

2.7 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Metodou skenovací elektronové mikroskopie byl zjištěn tvar nanočástic a orientačně i velikost. Pro SEM byla připravena šarže nanočástic F11 (složení viz. Tab. 2–4). Nanosuspenze byla centrifugována při 15 000 otáčkách a teplotě 4 °C po dobu 20 minut. Sedimenty byly sušeny v horkovzdušné sušárně při 25 °C po dobu jedné hodiny. Byly přidány 2 ml vody na injekci a pomocí ultrazvukového homogenizátoru došlo k resuspendaci. Nanosuspenze byla umístěna na uhlíkovou adhezivní pásku a vysušena při laboratorní teplotě. SEM provedl Mgr. Jan Loskot, Ph.D. na Katedře fyziky Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové skenovacím elektronovým mikroskopem FlexSEM 1000 Hitachi, Japan v režimu sekundárních elektronů v urychlovacím napětí 15 kV.

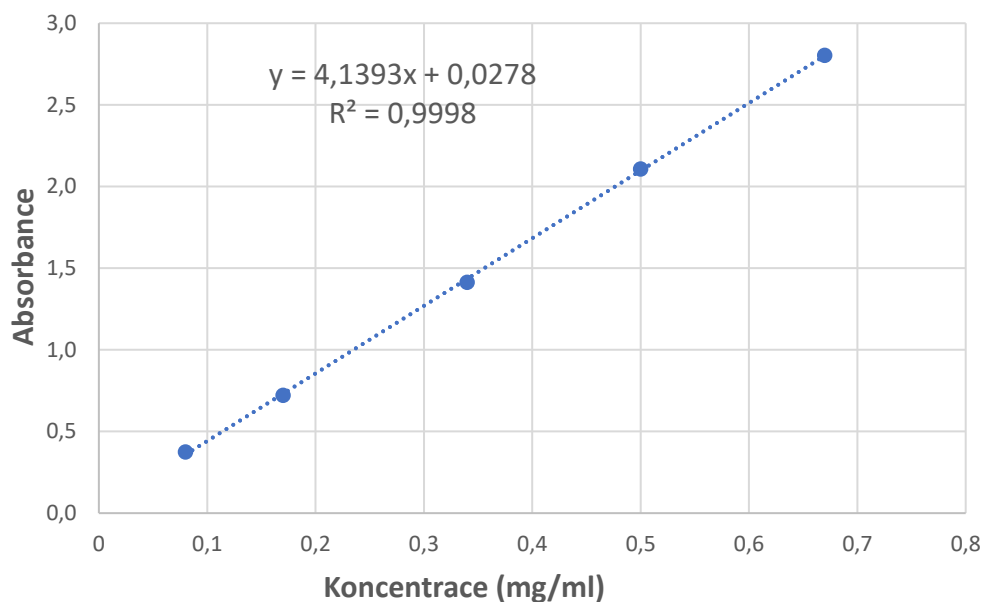
2.8 Kalibrační přímky

Pro stanovení enkapsulační účinnosti byly připraveny roztoky vankomycin-hydrochloridu v čištěné vodě a byla měřena jejich absorbance při vlnové délce 280 nm proti čištěné vodě (Tab. 6). Pro stanovení vankomycin-hydrochloridu

uvolněného z nanočástic v průběhu disolučního testu byly připraveny roztoky vankomycin-hydrochloridu ve fosfátovém pufru (PBS) pH 7,4 a byla změřena absorbance při vlnové délce 280 nm proti PBS pH 7,4 (Tab. 7). Stanovení probíhalo spektrofotometricky na přístroji Specord 205 (Analytik Jena, Německo). Byly sestaveny kalibrační přímky (Obr. 11 a 12) a zjištěny rovnice lineární regrese.

Tab. 6: Absorbance vodných roztoků Van-HCl při vlnové délce 280 nm

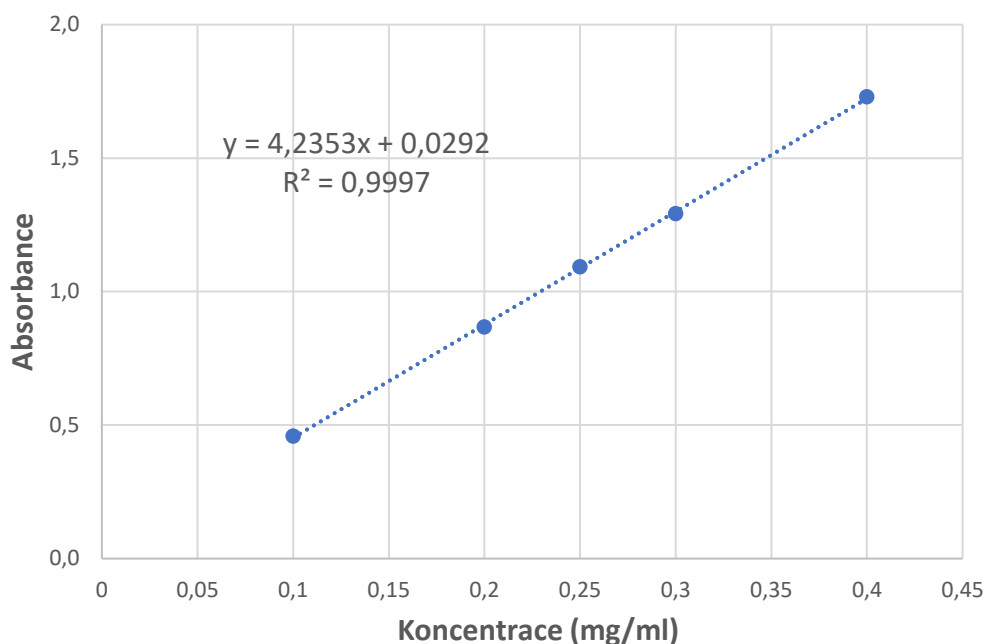
c (mg/ml)	0,08	0,17	0,34	0,5	0,67
A (280 nm)	0,3755	0,7218	1,4149	2,1077	2,8041



Obr. 11: Kalibrační přímka vankomycin-hydrochloridu v čištěné vodě

Tab. 7: Absorbance roztoků Van-HCl v PBS pH 7,4 při vlnové délce 280 nm

c (mg/ml)	0,10	0,20	0,25	0,30	0,40
A (280 nm)	0,4588	0,8674	1,0932	1,2917	1,7291



Obr. 12: Kalibrační přímka vankomycin-hydrochloridu ve fosfátovém pufru pH 7,4

2.9 Stanovení enkapsulační účinnosti přímou metodou

Enkapsulační účinnost byla stanovena přímou metodou u šarží nanočástic F2 – F4, F7, F10 – F11 a F13 (složení viz. Tab. 1-5). Nanosuspenze byla rozdělena do čtyř centrifugačních zkumavek a centrifugována postupně při 3 000, 6 000, 12 000 a 15 000 otáčkách po dobu 15 minut při teplotě 4 °C. Po každé centrifugaci byl odlit supernatant a k sedimentu byl přidán 1 ml čištěné vody, aby došlo k odstranění vankomycin-hydrochloridu, který není inkorporován v nanočásticích. Po poslední centrifugaci byla nanosuspenze sušena v horkovzdušné sušárně při 25 °C po dobu 1 hod. Byly přidány 2 ml chloroformu a 6 ml čištěné vody a obsah 4 centrifugačních zkumavek byl slit do jedné vialky, která byla vložena na 5 hodin na magnetickou míchačku, aby došlo k redispergaci sedimentu. Vialka byla sundána z magnetické míchačky a po dobu 30 minut se nechala odstát, aby došlo k oddělení fází. Byly odebrány 4 ml vodné fáze a centrifugovány při 15 000 otáčkách a teplotě 4 °C po dobu 30 min, aby se odstranil zbytek precipitovaného PLGA. Po centrifugaci byl odebrán

čirý roztok a byla měřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 280 nm proti čištěné vodě.

Bylo zjištěno množství vankomycin-hydrochloridu v nanočásticích na základě rovnice kalibrační přímky (Obr. 11) a z toho byla vypočítána enkapsulační účinnost podle vzorce (1):

$$EE = \frac{m_v}{m} \times 100 \quad (1)$$

EE enkapsulační účinnost (%)

m_v množství vankomycin-hydrochloridu stanovené v částicích (mg)

m množství vankomycin-hydrochloridu použitého při přípravě (mg)

2.10 Disoluce vankomycin-hydrochloridu z nanočástic

Pro disoluční test byly paralelně připraveny tři vzorky nanočástic šarže F11 (složení viz. Tab. 2-4). Získané nanosuspenze byly centrifugovány při 15 000 otáčkách a teplotě 4 °C po dobu 20 minut a sedimenty získané centrifugací byly resuspendovány v čištěné vodě za pomoci ultrazvukového homogenizátoru. 2 ml nanosuspenze byly přidány do dialyzační trubičky, uzavřeny na obou koncích a vloženy do skleněných vialek. Jako disoluční médium byly použity 4 ml fosfátového pufru pH 7,4 předem zahřátého na 37 °C. Do třepací vodní lázně vytemperované na teplotu 37 °C s frekvencí 80 rpm a amplitudou 15 mm bylo vloženo celkem 9 vialek. V předem stanovených intervalech (3, 12, 24, 36, 48, 72, 96 a 120 hod) bylo odebráno disoluční médium a nahrazeno novým. Množství Van-HCl v disolučním médiu bylo stanoveno spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 280 nm proti fosfátovému pufru pH 7,4. Každý vzorek se proměřil třikrát a byla vypočítána průměrná absorbance. Na základě rovnice kalibrační přímky (Obr. 12) byla vypočtena koncentrace Van-HCl v disolučním médiu v mg/ml. Pomocí známého objemu nanosuspenze použité pro test, stanovené enkapsulační účinnosti a objemu disoluční kapaliny byl vypočten procentuální podíl Van-HCl, uvolněný v daný časový interval. Byla vyjádřena kumulativní procenta a sestrojena disoluční křivka.

2.11 Statistická analýza

Statistické vyhodnocení získaných dat bylo provedeno pomocí šablony T-TESTY, která je dostupná na intranetu Farmaceutické fakulty UK. Byl zvolen nepárový t-test a intervalové odhady rozdílu středních hodnot na hladině spolehlivosti 95 %. Automaticky proběhla kontrola odlehlých hodnot.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Obecná diskuze k zadání diplomové práce

Předložená práce je pilotní studií v oblasti formulace PLGA nanočástic s inkorporovaným vankomycin-hydrochloridem pro impregnaci kostních štěpů, používaných jako spacery při ortopedických operacích. Enkapsulací vankomycin-hydrochloridu do nanočástic je možno zajistit modifikované uvolňování léčiva, minimalizovat nežádoucí účinky a lokální toxicitu a zlepšit stabilitu léčiva.

Příprava PLGA nanočástic s výrazně hydrofilním léčivem (pro experiment použit Vancomycin Kabi prášek pro koncentrát pro infuzní roztok) je v porovnání s enkapsulací ve vodě nerozpustných léčiv (terbinafin, acyklovir, rifampicin) problematická. Prvotním cílem práce bylo připravit relativně stabilní nanočástice. Na základě literární rešerše byla zvolena dvojitě emulzní metoda a byly hledány formulační faktory, které povedou k tomuto prvotnímu cíli (*“funnel approach in research”*). Proto nebyly všechny formulační faktory testovány na všech úrovních.

Metoda dvojitě emulze je v literatuře prezentována jako vhodná pro přípravu nanočástic s hydrofilním léčivem.⁴⁶ Obecně jsou emulzní metody vždy spojeny s problémy stability nanočástic, které souvisí s koalescencí částic, rupturou částic vnitřní fáze a separací fází.⁶⁴ Rovněž efektivita metod zůstává sporná kvůli mnoha formulačním a procesním parametrům.⁷⁸ Hydrofilní léčiva vykazují nízkou enkapsulační účinnost z důvodu difuze do vnější vodné fáze. Při formulaci PLGA nanočástic technikou dvojitě emulze se pro získání kvalitního produktu aplikuje přístup Quality by Design.⁵² V předložené diplomové práci byl studován vliv koncentrace Van-HCl ve vnitřní vodné fázi, vliv typu organického rozpouštědla, typu a koncentrace stabilizátoru primární emulze, vliv intenzity homogenizace primární a sekundární emulze a vliv koncentrace hydrofilního stabilizátoru sekundární emulze.

Pro přípravu polymerních nanočástic s vankomycin-hydrochloridem byl použit nekomerční derivát PLGA. Jedná se o kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové v poměru 50:50, který je větvený na tripentaerythritolu. Číselný průměr molární hmotnosti M_n je 5 300 g/mol, hmotnostní průměr molární hmotnosti M_w je 17 400 g/mol, hmotnostní průměr vnitřní viskozity $[\eta]_w$ je 7,7 mL/g a větvicí poměr $g'(M_w)$ 0,43.³¹ Pro rozpuštění polymeru PLGA byl použit dichlormethan nebo kombinace dichlormethanu a ethylacetátu v poměru 1:1. Jako emulgátory primární

emulze byly testovány sorbitan-stearát, glycerol-monostearát a polyglyceryl-3 polyricinoleát. Jako stabilizátor sekundární emulze byl použit PVA. Vankomycin-hydrochlorid byl zvolen z důvodu, že se používá k léčbě infekcí způsobených grampozitivními mikroby, zejména k léčbě infekcí způsobených bakterií *Staphylococcus aureus* s rezistencí na meticilin. V ortopedické chirurgii se používá lokálně při kloubních náhradách a operacích složitých zlomenin. Vankomycin-hydrochlorid má nízkou cytotoxicitu na osteoblasty, proto je vhodný k prevenci bakteriální infekce vzniklé na povrchu kovových implantátů.¹⁴ Vankomycin-hydrochlorid byl zadán do studie doc. Kučerou a dr. Prokešem z ortopedické kliniky FN HK.

Jedním z důležitých parametrů úspěšnosti metody přípravy nanočástic je enkapsulační účinnost. Enkapsulační účinnost může být stanovena metodou nepřímou, nebo metodou přímou. Při nepřímé metodě se analyzuje léčivo v supernatantu, který se získá centrifugací nanosuspenze a vypočítá se množství neenkapsulovaného léčiva. Nepřesná analýza množství léčiva v supernatantu vede k falešně vysoké hodnotě enkapsulační účinnosti. Přímá metoda je spolehlivější, neboť je založena na stanovení léčiva v sedimentu získaném centrifugací nanosuspenze. V tomto případě málo citlivá analýza léčiva vede k nižším hodnotám enkapsulační účinnosti. Na druhé straně falešně vysoké hodnoty EE stanovené přímou metodou mohou být dány nedostatečnou purifikací nanočástic. Rozpuštěné, ale neenkapsulované léčivo zůstává v nedostatečně vysušeném sedimentu. Léčivo může rovněž precipitovat a při centrifugaci zůstat v sedimentu.

Enkapsulační účinnost je rovněž ovlivněna použitým objemem vnitřní vodné fáze, tj. koncentrací primární emulze. Při použití většího objemu V1 dochází ke snížení bariérové funkce organické fáze, většímu kontaktu mezi vnitřní a vnější vodnou fází, a tím k vyššímu úniku léčiva do vnější vodné fáze.⁷⁹ Jak uvádí řada studií, základním předpokladem pro úspěšné zachycení hydrofilního léčiva do polymerních nanočástic připravených dvojitě emulzní metodou je dobrá stabilita primární emulze.^{80,81,82,83} Z literatury je znám vliv objemu V1 na účinnost enkapsulace. Při vyšším objemu vnitřní vodné fáze V1 je větší kontakt s vnější vodnou fází V2, a tím i vyšší ztráta léčiva. Organická fáze s rozpuštěným polymerem působí jako difúzní bariéra pro molekuly léčiva mezi vnitřní a vnější vodnou fází; tloušťka této vrstvy se zmenšuje, když

se zvětšuje objem V1. To může vést k méně stabilní primární emulzi V1/O s většími kapičkami vnitřní vodné fáze.⁸⁴

3.2 Velikost, polydisperzita a enkapsulační účinnost

Velikost je jednou ze základních charakteristik nanočástic, určuje jejich fyzikální stabilitu a farmakokinetiku. Velikost nanočástic musí být ve specifickém rozmezí, pokud je požadovaná cílená distribuce v organismu (targeting) nebo účinnost a bezpečnost při lokální aplikaci léčivé látky inkorporované do nanočástic. Pro efektivní impregnaci kostních štěpů PLGA nanočásticemi s vankomycin-hydrochloridem není velikost nanočástic striktně definována. Bylo zadáno formulovat nanočástice v rozsahu 200 až 800 nm.

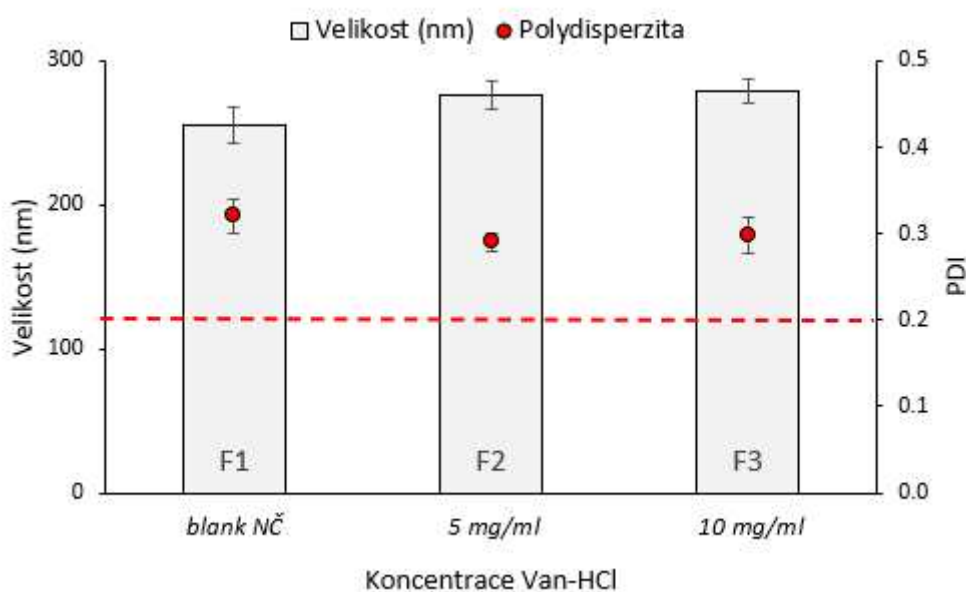
Polydisperzita je bezrozměrná veličina, která určuje šíři distribuce velikosti částic. Hodnoty PDI se pohybují od nuly do jedné. Hodnotou PDI 0 se vyznačují monodisperzní systémy s jednotnou velikostí částic, hodnoty v rozmezí 0 až 0,2 označují úzkou distribuci částic a hodnoty 0,5 a vyšší širokou distribuci částic. Hodnota PDI definuje nestabilitu nanočástic v důsledku aglomerace nebo zvyšování velikosti nanočástic v průběhu času. U polymerních nanočástic se za kvalitní hodnotu PDI považuje hodnota nižší než 0,2.⁵² V předložené práci bylo cílem formulovat stabilní nanosuspensi s hodnotou PDI nižší než 0,2.

Mezi kritické faktory, které ovlivňují velikost formulovaných nanočástic a polydisperzitu, se řadí koncentrace hydrofobního emulgátoru použitého pro stabilizaci primární emulze V1/O, koncentrace hydrofilního emulgátoru pro stabilizaci sekundární emulze V1/O/V2 a poměry organické a vodné fáze. Hydrofobní emulgátor se při dvojité emulzní metodě přípravy nanočástic používá ve vyšších koncentracích, a tím dochází ke zvyšování stability dvojité emulze a také ke zvýšení enkapsulační účinnosti.⁵²

3.2.1 Vliv množství vankomycin-hydrochloridu

Byl zkoumán vliv koncentrace vankomycin-hydrochloridu ve vnitřní vodné fázi na velikost a polydisperzitu PLGA nanočástic. Byly připraveny blank nanočástice bez Van-HCl (F1) a nanočástice s Van-HCl v koncentracích 5 mg/ml (F2) a 10 mg/ml (F3). Složení NČ uvádí Tab. 1. Množství Van-HCl bylo zvoleno na základě předchozích prací⁷ a konzultace s lékaři ortopedické kliniky FN HK, a rovněž dle publikovaných studií.^{16,85,86}

Velikost blank nanočástic byla 255 nm, nanočástice s inkorporovaným Van-HCl byly větší (275 nm, resp. 279 nm) (Obr. 13). Rozdíl ve velikosti blank nanočástic a nanočástic s Van-HCl však není statisticky významný. Stejně tak nebyl zjištěn statisticky významný vliv koncentrace Van-HCl na velikost nanočástic. Stejně výsledky byly zjištěny v předešlých experimentech realizovaných na pracovišti.⁵ Získané nanosuspenze byly polydisperzní, neboť hodnoty PDI byly přibližně 0,3. Z hlediska velikosti je možno pro přípravu nanočástic použít obě testované koncentrace Van-HCl. Bude ovšem nutné řešit stabilitu nanosuspenze. Pro volbu optimální koncentrace Van-HCl pak bude rozhodující případný vliv koncentrace Van-HCl na enkapsulační účinnost.



Obr. 13: Vliv množství Van-HCl na velikost a polydisperzitu nanočástic

U šarží nanočástic F2 a F3 byla přímou metodou stanovena enkapsulační účinnost. Jak vyplývá z hodnot uvedených v Tab. 8, vyšší enkapsulační účinnost byla při použití nižší koncentrace Van-HCl, proto byla koncentrace 5 mg/ml zvolena pro přípravu dalších šarží nanočástic. Přesto, že je metoda dvojitě emulze prezentována jako optimální pro enkapsulaci ve vodě rozpustných léčiv, je obecně EE metody relativně nízká z důvodu úniku léčiva do vnější vodné fáze.¹⁵ Podobné výsledky byly získány při přípravě PLA mikročástic s naltrexonem dvojitě emulzní metodou.⁷⁹

Tab. 8: Enkapsulační účinnost (% EE) při použití různé koncentrace Van-HCl

Vzorek	EE (%)	
	F2	F3
	Van-HCl 5 mg/ml	Van-HCl 10 mg/ml
1	3,84	1,68
2	2,57	1,99
3	3,34	2,23
průměr	3,25	1,97
SD	0,64	0,28

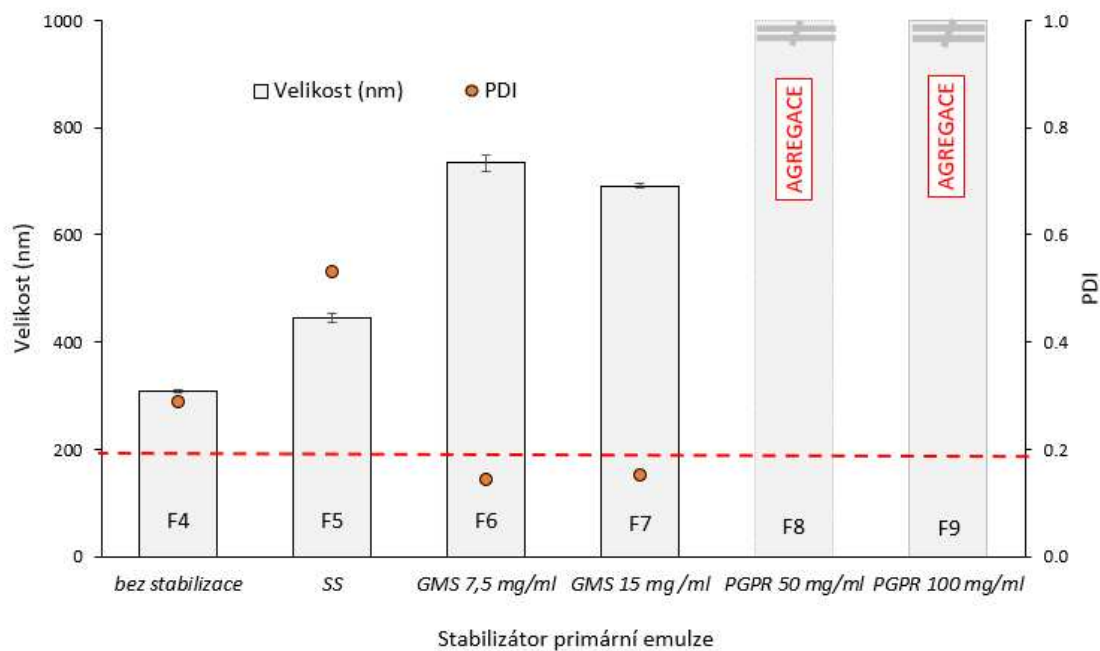
3.2.2 Vliv organického rozpouštědla

Jednou z možností, jak zvýšit enkapsulační účinnost, je použití kombinace organických rozpouštědel.¹⁶ Na základě citované studie byla místo DCM použita směs DCM a EA v poměru 1:1. Byla připravena šarže nanočástic F4 (složení viz. Tab. 1). Velikost těchto NČ (291 ± 12 nm) ani PDI ($0,30 \pm 0,02$) se významně nelišily od NČ připravených za použití DCM (šarže F2), ale enkapsulační účinnost byla vyšší ($5,21 \pm 0,27$ %). Z toho důvodu byla směs DCM/EA v poměru 1:1 použita při přípravě dalších šarží nanočástic. Srovnatelných výsledků bylo dosaženo při přípravě PLGA NČ s obsahem rivastigmin-tartrátu, kde záměna DCM za směs DCM/EA vedla ke dvojnásobnému zvýšení enkapsulace.⁵⁴

3.2.3 Vliv stabilizátoru primární emulze

Kritickým parametrem při přípravě NČ metodou dvojitě emulze je stabilita primární emulze V1/O, kterou lze zajistit zejména použitím hydrofobních tenzidů a/nebo efektivní homogenizací. Na základě literární rešerše byly pro stabilizaci primární emulze vybrány sorbitan-stearát⁶¹, glycerol-monostearát^{62,63} a polyglyceryl-3 polyricinoleát.^{64,65} Jedná se o neionické tenzidy s hodnotou HLB v rozmezí přibližně 3 až 5, které stabilizují heterogenní soustavy stericky. Složení NČ uvádí Tab. 2. Vliv typu a koncentrace hydrofobního stabilizátoru na velikost a polydisperzitu nanočástic je prezentován na Obr. 14. Velikost nanočástic připravených bez použití hydrofobního stabilizátoru (šarže F4) byla přibližně 300 nm, ale hodnota PDI $\sim 0,3$ ukazuje na tendenci k agregaci nanosuspenze. Podobné výsledky byly zjištěny při použití sorbitan-stearátu (šarže F5). Velikosti nanočástic byla přibližně 450 nm, ale PDI 0,5

znamená širokou distribuci velikosti částic. Takové nanočástice nejsou vhodné z hlediska stability, ani pro řízené uvolňování Van-HCl do tkáně. Pokud byl pro stabilizaci primární emulze použit glycerol-monostearát (šarže F6 a F7), vznikly větší nanočástice (přibližně 730 nm, resp. 690 nm), ale s optimální hodnotou PDI ~ 0,15. Byl prokázán statisticky významný rozdíl koncentrace GMS na velikost nanočástic. Vyšší koncentrace GMS vedla k menším nanočásticím, a proto byly takto připravené nanočástice zvoleny pro testování vlivu intenzity homogenizace na velikost a polydisperzitu nanočástic a enkapsulační účinnost. Při použití PGPR došlo k agregaci nanosuspenze, proto tento polymerní tenzid není vhodný pro stabilizaci primární emulze.



Obr. 14: Vliv stabilizátoru primární emulze na velikost a polydisperzitu nanočástic (SS sorbitan-stearát; GMS glycerol-monosterát; PGPR polyglyceryl-3 polyricinoleát)

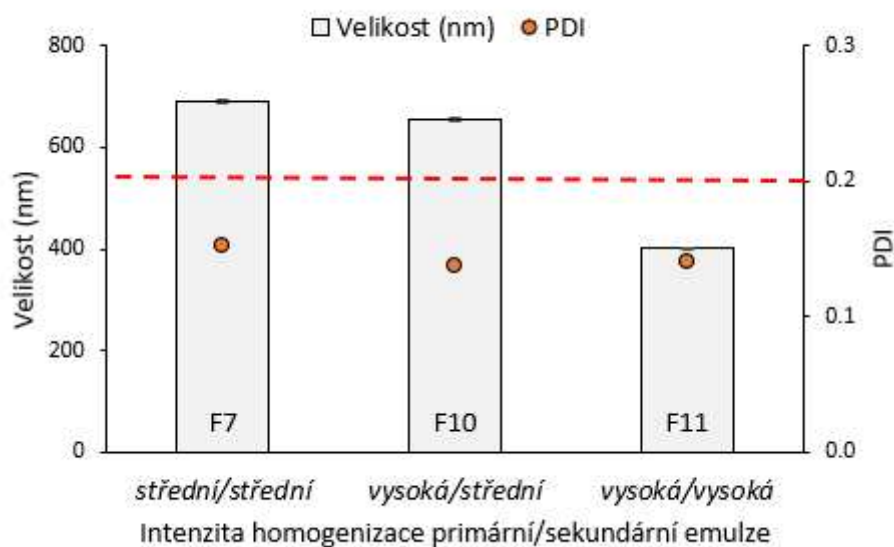
Dle publikovaných studií je velikost nanočástic významněji ovlivněna jinými faktory, než je typ hydrofobního stabilizátoru, např. vyšší viskozitou a přítomností hydroxylových skupin při použití směsi vody a glycerolu jako vnější vodné fáze⁸⁷ nebo zvýšením osmotického tlaku vnější vodné fáze přidávkem NaCl.⁷⁹

Byla stanovena enkapsulační účinnost u šarže nanočástic F7 a byl hodnocen vliv přidavku glycerol-monostearátu v koncentraci 15 mg/ml na stabilitu primární emulze. Enkapsulační účinnost se zvýšila pouze přibližně o 1 %.

3.2.4 Vliv homogenizace primární a sekundární emulze

Mezi kritické formulační faktory přípravy NČ dvojitě emulzní metodou patří rovněž faktory procesní, jako je rychlost přidávání vodné fáze do organické fáze, doba míchání, rychlost míchání, rychlost sekundární emulgace, doba homogenizace, amplituda sonikace/rychlost homogenizace a teplota.^{73,88,89} V literatuře jsou popsány různé metody homogenizace, lišící se typem homogenizátoru, intenzitou ultrazvuku, resp. rychlostí otáček nebo dobou. Porovnání intenzity a vlivu na charakteristiky nanočástic je obtížné.^{78,90} Intenzita primární homogenizace ovlivňuje velikost částic a stabilitu primární emulze. Intenzita homogenizace při sekundární emulgaci významně ovlivňuje velikost a distribuci velikosti částic.^{91,92}

Byl sledován vliv intenzity homogenizace primární a sekundární emulze na velikost a polydisperzitu nanočástic. Složení NČ (šarže F7) použitých pro hodnocení tohoto parametru je uvedeno v Tab. 2–4. Vizuální kontrolou bylo zjištěno, že při použití stejné koncentrace hydrofobního emulgátoru a při stejném poměru fází V1 a O je primární emulze stabilní při střední i vysoké intenzitě homogenizace. Jak je vidět na Obr. 15, při vyšší intenzitě homogenizace primární emulze se velikost nanočástic snížila ze 700 nm na 650 nm (šarže F10). Pokud byla intenzivněji homogenizována i sekundární emulze, velikost nanočástic se snížila na 400 nm (šarže F11). Hodnota PDI byla nižší než 0,2 a vliv intenzity homogenizace na polydisperzitu připravených nanočástic zjištěn nebyl.



Obr. 15: Vliv intenzity homogenizace na velikost a polydisperzitu PLGA nanočástic s vankomycin-hydrochloridem

Byla stanovena enkapsulační účinnost nanočástic šarže F10 a F11 a byl hodnocen vliv intenzity homogenizace. Zatímco vysoká intenzita homogenizace primární emulze nevedla k významnému zvýšení EE, účinnější homogenizací sekundární emulze V1/O/V2 se EE zvýšila (Tab. 9), proto byly nanočástice šarže F11 zvoleny pro testování vlivu koncentrace hydrofilního stabilizátoru PVA.

Tab. 9: Vliv intenzity homogenizace na enkapsulační účinnost (EE%) Van-HCl

Vzorek	EE (%)		
	F7	F10	F11
1	6,21	5,76	7,60
2	5,98	6,08	8,87
3	6,11	6,23	8,13
průměr	6,10	6,02	8,20
SD	0,12	0,24	0,64

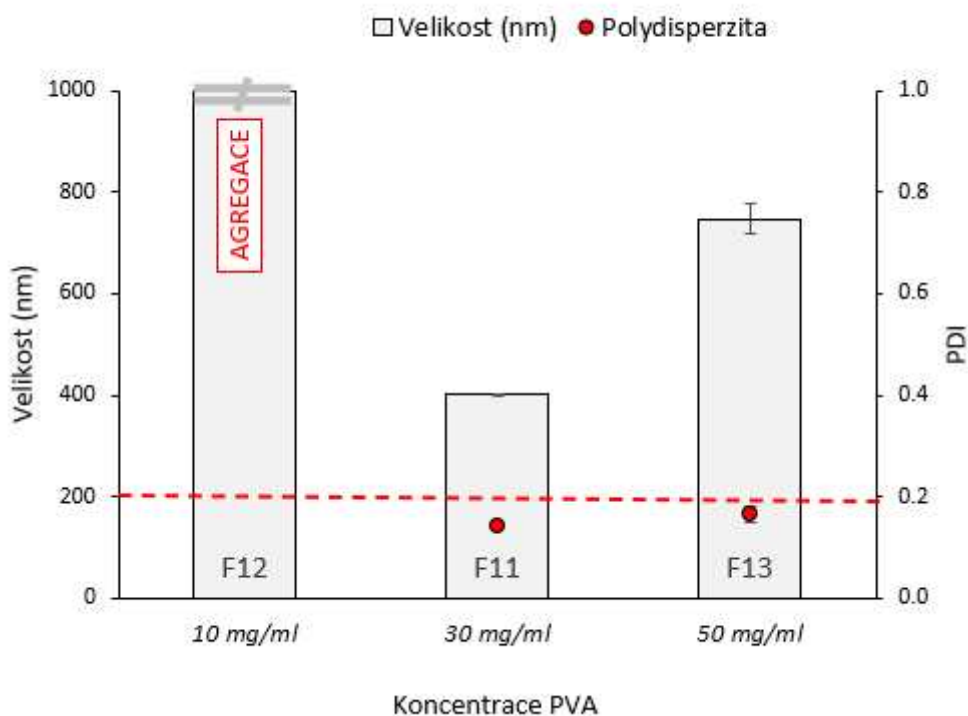
3.2.5 Vliv hydrofilního stabilizátoru

Pro stabilizaci složené emulze V1/O/V2 se používají hydrofilní tenzidy, které se při přípravě rozpustí ve vnější vodné fázi. Díky své povrchové aktivitě se orientovaně adsorbují na mezifázi V1/O a V2 a brání agregaci a koalescenci částic V1/O. Koncentrace hydrofilního tenzidu musí být optimální, aby právě saturovala mezifázi vytvořenou při dané metodě homogenizace. Polymer adsorbovaný na povrchu částic působí jako „ochranný štít“, který zabrání agregaci částic. Odpudivá síla vznikající při přiblížení částic překoná přitažlivé van der Waalsovy síly a udrží částice oddělené. Nedostatečná koncentrace tenzidu vede ke vzniku nestabilní složené emulze. Na druhé straně vysoká koncentrace hydrofilních povrchově aktivních látek může mít nepříznivý dopad na enkapsulační účinnost.⁹³

Na základě literární rešerše byl pro sterickou stabilizaci zvolen PVA. Koncentrace PVA použité při dvojitě emulzní metodě se v prezentovaných studiích pohybují v širokém rozmezí, a to přibližně od 2 mg/ml až do 50 mg/ml. Pro účinnou stabilizaci složené emulze by vrstva polymerního tenzidu adsorbovaná na mezipovrchu neměla být menší než 5 nm až 10 nm.^{93,94,95} Například při přípravě PLGA nanočástic s obsahem linamarinu dvojitě emulzní metodou byla jako optimální vyhodnocena koncentrace PVA 30 až 50 mg/ml. Koncentrace nižší než 30 mg/ml vedly k tvorbě mikročástic, koncentrace vyšší než 50 mg/ml poskytly nanočástice s vysokým povrchovým reziduálním PVA, který bylo obtížné odstranit.⁹³

Sekundární emulgace, tj. inkorporace V1/O do V2, byla realizována ve dvou krocích. Nejprve byla primární emulze V1/O emulgována do menšího objemu roztoku PVA o vyšší koncentraci a vytvořená koncentrovaná emulze V1/O/V2 následně ředěna roztokem PVA o desetkrát nižší koncentraci. Tato metoda byla použita v několika publikovaných studiích, a to z důvodu snadnější a efektivnější homogenizace, snížení úniku léčiva, rychlejší difuze a evaporace organické fáze.¹⁶

Pro hodnocení vlivu koncentrace PVA na velikost a PDI nanočástic byly použity šarže nanočástic F11, F12 a F13 (složení viz. Tab. 2-5), které se lišily právě množstvím použitého PVA. Snížení koncentrace PVA z 30 mg/ml (šarže F1 – F11) na 10 mg/ml (F12) došlo k agregaci nanosuspenze. Zvýšením koncentrace na 50 mg/ml (F13) se zvýšila velikost nanočástic ze 400 nm na 750 nm, přičemž hodnota PDI zůstala pod hodnotou 0,2 (Obr. 16).



Obr. 16: Vliv koncentrace PVA na velikost a polydisperzitu nanočástic

Použití PVA může snížit migraci Van-HCl z vnitřní fáze do vodné fáze, což by mohlo zvýšit enkapsulační účinnost.^{15,46,85} Zakeri-Milani a kol.¹⁵ a Lotfipour a kol.⁴⁹ pomocí metody dvojité emulze a použití PVA získali PLGA nanočástice o velikosti 459 ± 31 nm, u kterých byla účinnost enkapsulace vankomycin-hydrochloridu v širokém rozmezí 12 % až 78 %.

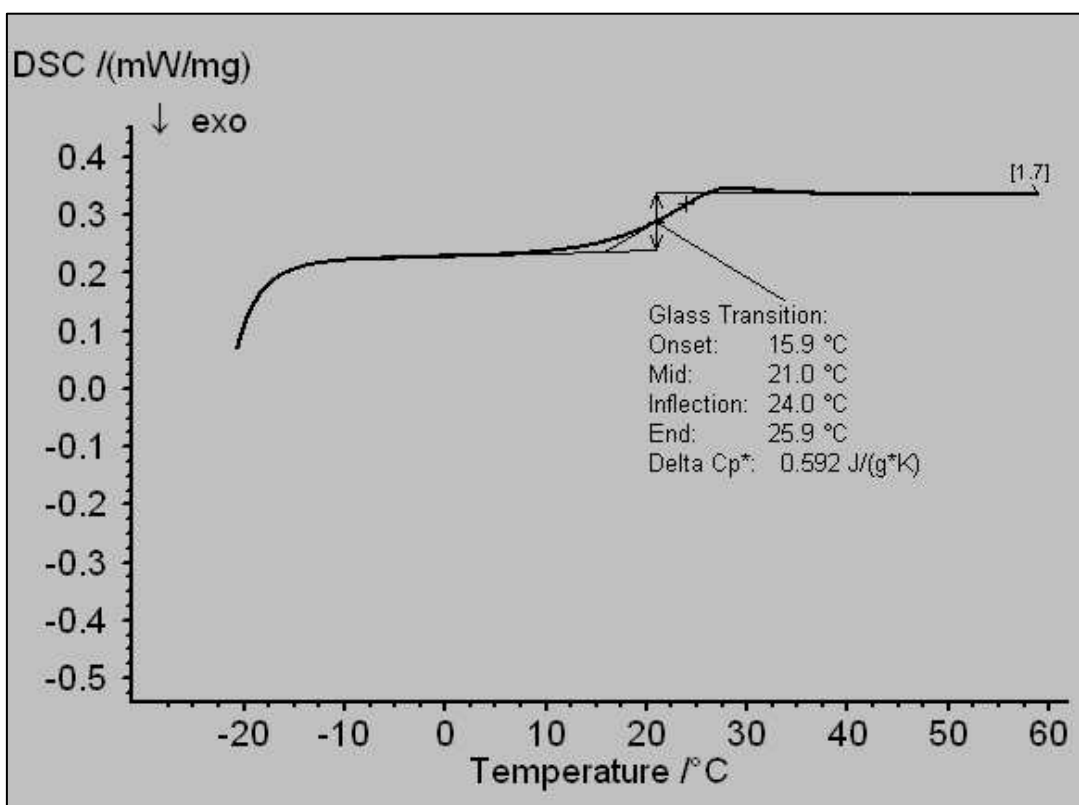
Byla stanovena EE u šarže nanočástic F13 a porovnána s EE šarže F11. Vyšší koncentrace PVA nevedla k významně vyšší enkapsulaci vankomycin-hydrochloridu. Šarže F11 vykazovala nejvyšší hodnotu EE ze všech formulovaných šarží, proto byla zvolena pro testování metodami DSC, SEM a pro disoluční testy.

V literatuře je popsána řada účinných způsobů, jak zvýšit enkapsulaci hydrofilních léčiv do polymerních nanočástic připravených metodou dvojité emulze. Např. účinnější, než optimalizace koncentrace PVA je zvýšení viskozity a přítomnost hydroxylových skupin při použití směsi glycerolu a vody jako vnější vodné fáze V2.⁸⁷ Jinou možností je zvýšení osmotického tlaku vnější vodné fáze V2 přidáním NaCl (10 % w/w), což vede k migraci vody z V1 do V2 a k rychlému kolapsu kapiček V1/O.⁷⁹ Obecně byl

pozorován významný vztah mezi enkapsulační účinností a koncentrací PVA i polymeru PLGA, přičemž větší vliv na EE měla koncentrace PLGA.^{85,93}

3.3 DSC

DSC je termodynamická metoda, kterou lze použít pro hodnocení čistoty a stability různých materiálů a soustav, tedy i nanočástic.⁹⁶ Při zahřívání krystalické látky je na záznamu DSC patrný endotermní pík tání, u amorfních látek dochází ke skelnému přechodu. Dle ČSN EN ISO 11357-2⁹⁷ by z prvního ohřevu měla být patrná tepelná historie vzorku, z ochlazování a druhého ohřevu pak tepelné vlastnosti materiálu. Polymer PLGA je amorfní, proto byl na DSC skenu detekován skelný přechod a na křivce druhého ohřevu byla v inflexním bodě odečtena hodnota teploty skelného přechodu T_g 24 °C (Obr. 17).

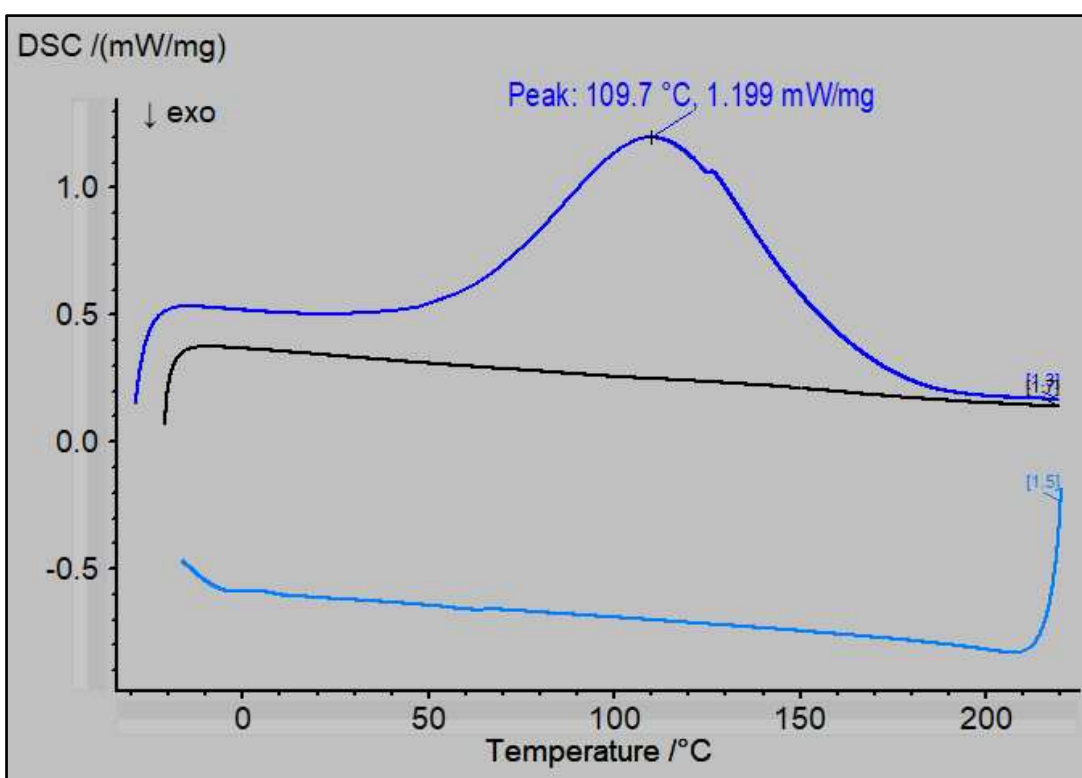


Obr. 17: DSC sken PLGA polymeru větveného na tripentaerythritolu

Skelný přechod je vratná změna v amorfním polymeru a je spojen se změnou vnitřní struktury materiálů, což se projeví zejména na mechanických vlastnostech. Pod teplotou skelného přechodu je materiál křehký a tvrdý, nad teplotou T_g se materiál stává

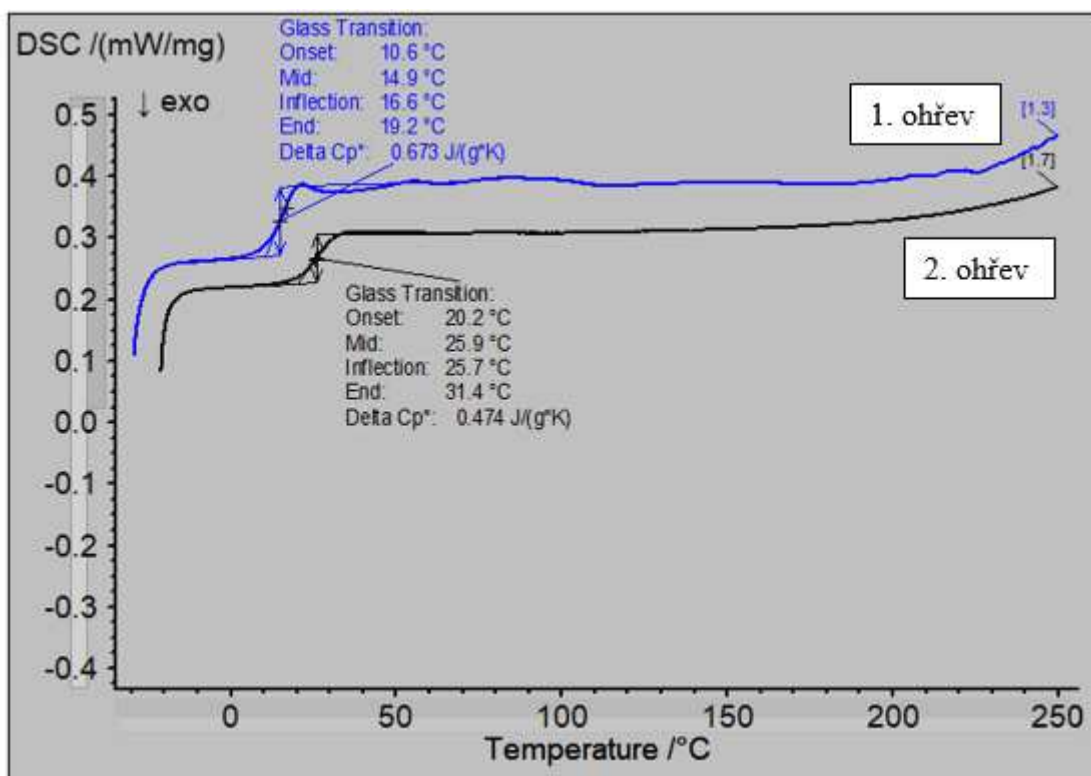
pružným. Polymer PLGA větvený na tripentaerythritolu, který byl použit pro formulaci nanočástic s vankomycin-hydrochloridem, je tedy při teplotách nižších než 24 °C ve stavu sklovitém. Při teplotách nad 24 °C se zvýší mobilita polymerních řetězců, polymer přechází do stavu kaučukovitého.

Vankomycin-hydrochlorid je krystalická látka s teplotou tání vyšší než 190 °C.⁹⁸ U čistých látek se teplota tání stanoví v bodě nástupu píku (onset) jako T_{on} . Pokud je však pík široký, nelze počáteční teplotu přesně určit a ztrácí svůj fyzikální význam. K definování teploty tání se pak používá teplota píku.⁹⁹ Teplota tání Van-HCl, který byl pro formulaci PLGA nanočástic použitý ve formě prášku pro koncentrát pro infuzní roztok, byla stanovena na 109,7 °C. Na křivce chlazení není patrný exotermní pík krystalizace (Obr. 18). Výsledek koresponduje s publikovanými DSC skeny Van-HCl, které mají rovněž značně široké píky a hodnoty T_m , popř. T_g nižší, a to 83,4 °C¹⁰⁰, resp. 60 °C.¹⁰¹



Obr. 18: DSC sken vankomycin-hydrochloridu

Na DSC skenu PLGA nanočástic s vankomycin-hydrochloridem (šarže F11) (Obr. 19) je na křivce prvního ohřevu patrný pouze jeden skelný přechod při teplotě 16,6 °C a žádný pík krystalické fáze. Při dvojitě emulzní metodě je Van-HCl použit ve formě vodného roztoku a ve vytvořených PLGA nanočásticích zůstává molekulárně dispergován. Stejně výsledky byly získány např. při formulaci PLA mikročástic s metformin-hydrochloridem.⁷⁸ Nižší hodnota T_g na křivce 1. ohřevu ukazuje na plastifikaci PLGA pravděpodobně fyzikálně vázanou vlhkostí. Na křivce druhého ohřevu je naopak patrný skelný přechod při mírně vyšší teplotě, indikující patrně antiplastifikační účinek Van-HCl.

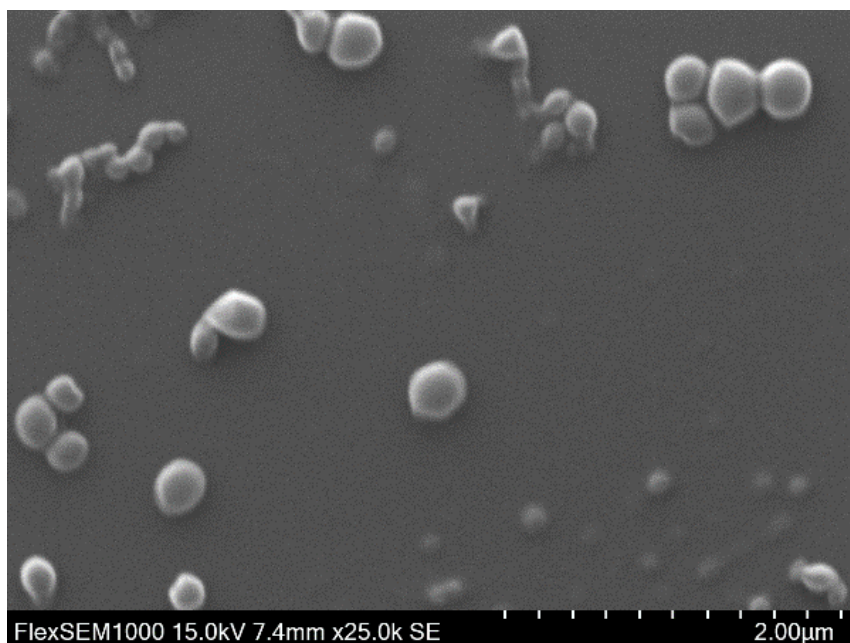


Obr. 19: DSC sken PLGA nanočástic s vankomycin-hydrochloridem

3.4 SEM

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byla ověřena morfologie PLGA nanočástic s vankomycin-hydrochloridem (šarže F11). Snímání v režimu sekundárních elektronů (SE) se jeví jako vhodnější než v režimu zpětně odražených elektronů (BSE). Bylo potřeba pracovat opatrně, protože vysoká energie paprsku při vyšších hodnotách urychlovacího napětí by mohla po určitém čase způsobit destrukci vzorků, což je

popsáno i v literatuře.⁵ Snímek prokázal přibližně sférický tvar nanočástic (Obr. 20). Pomocí softwarového vyhodnocení byla ověřena velikost částic, která do jisté míry korelovala s výsledky zjištěnými metodou dynamického rozptylu světla.



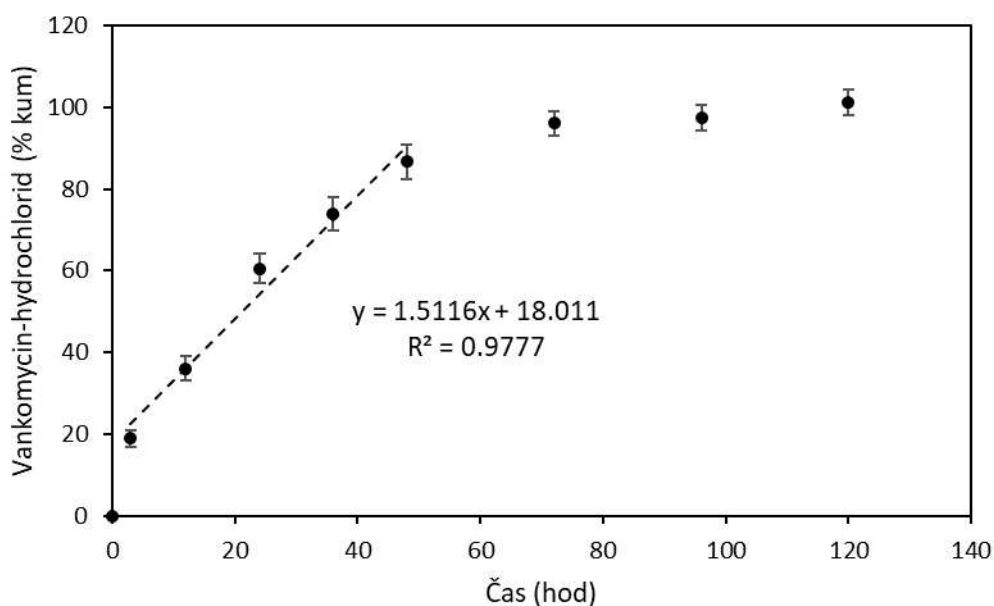
Obr. 20: SEM snímek PLGA nanočástic s vankomycin-hydrochloridem

3.5 Disoluce vankomycin-hydrochloridu z nanočástic

Byl studován průběh uvolňování Van-HCl z PLGA nanočástic připravených dvojitě emulzní metodou. Pro disoluční testy byly vybrány nanočástice šarže F11 (složení viz. Tab. 2-4). Velikost těchto NČ byla přibližně 400 nm, PDI 0,14 (Obr. 15) a enkapsulační účinnost 8 % (Tab. 9). Disoluční test byl realizován, aby bylo prokázáno, že Van-HCl enkapsulovaný do PLGA nanočástic, se za fyziologických podmínek z polymerního nosiče uvolní. Podmínky testu byly tedy zvoleny tak, aby co nejvíce simulovaly prostředí v místě aplikace nanočástic, které budou použity pro impregnaci kostních štěpů jako spacerů při ortopedických operacích. Jako disoluční médium byl použit fosfátový pufr pH 7,4. Tato hodnota pH byla preferována před nižšími hodnotami pH, které by simulovaly zánětlivé ložisko, ve kterém je vlivem peristatické hyperémie nedostatek kyslíku a hromadí se kyselé metabolity (laktát). Lokální aplikace PLGA nanočástic s Van-HCl v průběhu chirurgického zákroku je profylaktická, v místě aplikace ještě k rozvoji zánětu nedochází. Rovněž malý objem disolučního média a intenzita frekvence míchání reflektují podmínky v místě aplikace.

Teplota byla udržována na 37 °C po celou dobu testu. Nanosuspenze byly umístěny do semipermeabilních dialyzačních trubiček s mezní hodnotou molekulové hmotnosti MWCO 14 000 g/mol. Intervaly odběru disolučního média byly stanoveny tak, aby byl podchycen celý disoluční profil.

Průběh uvolňování Van-HCl z PLGA nanočástic v prostředí fosfátového pufru pH 7,4 u triplicitně připravených vzorků je na Obr. 21. Po 3 hodinách došlo k uvolnění přibližně 20 % léčiva. Následovala fáze lineárního uvolňování podle rovnice $y = 1,5116x + 18,011$ do časového intervalu 48 hod, kdy došlo k uvolnění přibližně 85 % inkorporovaného léčiva. Počáteční vyšší množství uvolněného Van-HCl z nanočástic může být způsobeno přítomností Van-HCl na povrchu nanočástic.



Obr. 21: Disoluce vankomycin-hydrochloridu z PLGA nanočástic

4 ZÁVĚRY

Byly úspěšně připraveny PLGA nanočástice s vankomycin-hydrochloridem metodou dvojité emulze. Velikost nanočástic stanovená metodou dynamického rozptylu světla se pohybovala v rozmezí 200 až 800 nm, což je v souladu s cílem práce. Požadovaná hodnota PDI nižší než 0,2 byla u většiny šarží dosažena. Enkapsulační účinnost stanovená přímou metodou byla v rozmezí 2 % až 9 %.

Bylo zjištěno, že koncentrace Van-HCl ve vnitřní vodné fázi nemá vliv na velikost nanočástic. Vyšší enkapsulace byla dosažena při nižší koncentraci Van-HCl, proto byla v dalších formulačních studiích zvolena koncentrace 5 mg/ml. Náhrada DCM za směs DCM a EA v poměru 1:1 neovlivnila velikost ani PDI nanočástic, ale vedla k vyšší enkapsulaci Van-HCl. Jako vhodný stabilizátor primární emulze se ukázal glycerol-monostearát v koncentraci 15 mg/ml. Velikost nanočástic byla sice větší než při použití sorbitan-stearátu, ale významně byla snížena polydisperzita nanočástic. Stanovením enkapsulační účinnosti nebyl zjištěn vliv na její zvýšení. Při použití polyglyceryl-3 polyricinoleátu došlo k agregaci nanosuspenze, proto není tento polymerní tenzid vhodný pro stabilizaci primární emulze. Při vyšší intenzitě homogenizace primární i sekundární emulze došlo ke snížení velikosti nanočástic na 400 nm a nanočástice vykazovaly nejvyšší hodnotu EE ze všech formulovaných šarží. Pro stabilizaci sekundární emulze se jako optimální jeví koncentrace PVA 30 mg/ml. Při použití koncentrace 10 mg/ml došlo k agregaci nanosuspenze, při koncentraci 50 mg/ml se velikost nanočástic zvýšila z 400 nm na 750 nm. Vliv koncentrace PVA na enkapsulaci nebyl zjištěn.

Při dvojité emulzní metodě je Van-HCl použit ve formě vodného roztoku a ve vytvořených PLGA nanočásticích zůstává molekulárně dispergován, což potvrzuje absence píku krystalické fáze a existence pouze jednoho skelného přechodu na DSC skenu nanočástic. Pomocí SEM byl potvrzen sférický tvar PLGA nanočástic s Van-HCl. Disoluční test za podmínek simulujících podmínky v místě aplikace nanočástic ukázal v čase 3 hod burst ve výši přibližně 20 %, následovaný fází lineárního uvolňování do časového intervalu 48 hod, kdy došlo k uvolnění přibližně 85 % inkorporovaného Van-HCl.

Na základě výsledků získaných v této práci bude v dalších experimentech řešena nízká enkapsulace, daná rychlým rozdělováním hydrofilního Van-HCl do vnější vodné fáze.

5 LITERATURA

- ¹ HAMPLOVÁ, K. Polymerní nanočástice s rifampicinem. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2020, 78 s.
- ² BIELESZOVÁ, D. Studium liberace terbinafinu z PLGA nanočástic. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2019, 73 s.
- ³ HOLAS, A. Hodnocení inkorporace terbinafinu do polyesterových nanočástic. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2019, 54 s.
- ⁴ PETRÁŠOVÁ, I. Formulace PLGA nanočástic s vankomycinem pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí I. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2023, 68 s.
- ⁵ MARTIŠKA, J. Medikované polymerní systémy založené na větvených derivátech PLGA. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2020, 131 s.
- ⁶ TER BOO, G.-J.A., GRIJPMAN, D.W., MORIARTY, T.F., RICHARDS, R.G., EGLIN, D. Antimicrobial delivery systems for local infection prophylaxis in orthopedic – and trauma surgery. *Biomaterials*. 2015, 52, 113-125. ISSN 01429612. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.020
- ⁷ PROKES, L., SNEJDROVA, E., SOUKUP, T., MALAKOVA, J., FROLOV, V., LOSKOT, J., ANDRYS, R., KUCERA, T. Allogeneic Bone Impregnated with Biodegradable Depot Delivery Systems for the Local Treatment of Joint Replacement Infections: An In Vitro Study. *Molecules*. 2022, 27(19). ISSN 1420-3049. doi:10.3390/molecules27196487
- ⁸ SNEJDROVA, E., LOSKOT, J., MARTIŠKA, J., SOUKUP, T., PROKES, L., FROLOV, V., KUCERA, T. Rifampicin-loaded PLGA nanoparticles for local treatment of musculoskeletal infections: Formulation and characterization. *Journal of Drug*

Delivery Science and Technology. 2022, 73. ISSN 17732247.
doi:10.1016/j.jddst.2022.103435

⁹ PILLAI, R.R., SOMAYAJI, S.N., RABINOVICH, M., HUDSON, M.C., GONSALVES, K.E. Nafcillin-loaded PLGA nanoparticles for treatment of osteomyelitis. *Biomedical Materials*. 2008, 3(3). ISSN 1748-6041.
doi:10.1088/1748-6041/3/3/034114

¹⁰ Dostupné 30.10.2022 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vancomycin>

¹¹ Dostupné 30.10.2022

<https://en.wikipedia.org/wiki/Vancomycin#/media/File:Vancomycin.svg>

¹² HARTL, J., DOLEŽAL, M., MILETÍN, M., OPLETALOVÁ V., ZIMČÍK, P. *Farmaceutická chemie IV.*, 3. vydání, Karolinum Praha. 2019, 62–116. ISBN 9788024642642.

¹³ Dostupné 23.7.2023 https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/

¹⁴ LIU, Z., ZHU, Y., LIU, X., YEUNG, K.W.K., WU, S. Construction of poly (vinyl alcohol)/poly (lactide-glycolide acid)/vancomycin nanoparticles on titanium for enhancing the surface self-antibacterial activity and cytocompatibility. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, 151, 165-177. ISSN 09277765.
doi:10.1016/j.colsurfb.2016.12.016

¹⁵ ZAKERI-MILANI, P., LOVEYMI, B.D., JELVEHGARI, M., VALIZADEH, H. The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, 103, 174-181. ISSN 09277765. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.10.021

¹⁶ SIMON, A., MOREIRA, M.L.A., COSTA, I.F. de J.B., et al. Vancomycin-loaded nanoparticles against vancomycin intermediate and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Nanotechnology*. 2020, 31(37). ISSN 0957-4484.
doi:10.1088/1361-6528/ab97d7

¹⁷ POSADOWSKA, U., BRZYCHCZY-WLOCH, M., PAMULA, E. Injectable gellan gum-based nanoparticles-loaded system for the local delivery of vancomycin in osteomyelitis treatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2016, 27(1). ISSN 0957-4530. doi:10.1007/s10856-015-5604-2

¹⁸ Dostupné 4.3.2023 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nafcillin>

¹⁹ Dostupné 4.3.2023 <https://en.wikipedia.org/wiki/Nafcillin#/media/File:Nafcillin.svg>

²⁰ TOADER, G., PODARU, I.A., RUSEN, E. Nafcillin-Loaded Photocrosslinkable Nanocomposite Hydrogels for Biomedical Applications. *Pharmaceutics*. 2023, 15(6). ISSN 1999-4923. doi:10.3390/pharmaceutics15061588

²¹ CASTLE, S.S. Nafcillin. In: *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier. 2007, 1-4. ISBN 9780080552323. doi:10.1016/B978-008055232-3.62233-0

²² Dostupné 6.3.2023 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rifampicin>

²³ Dostupné 6.3.2023

<https://cs.wikipedia.org/wiki/Rifampicin#/media/Soubor:Rifampicin.svg>

²⁴ DANHIER, F., ANSORENA, E., SILVA, J.M., COCO, R., LE BRETON, A., PRÉAT, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012, 161(2), 505-522. ISSN 01683659. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043

²⁵ CHATTERJEE, M., CHANDA, N. Formulation of PLGA nano-carriers: specialized modification for cancer therapeutic applications. *Materials Advances*. 2022, 3(2), 837-858. ISSN 2633-5409. doi:10.1039/D1MA00600B

²⁶ BALA, I., HARIHARAN S., KUMAR, MNV.R. PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2004, 21(5), 387-422. ISSN 0743-4863. doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v21.i5.20

-
- ²⁷ Dostupné 27.11.2022 <https://en.wikipedia.org/wiki/PLGA#/media/File:PLGA.svg>
- ²⁸ MAKADIA, H.K., SIEGEL, S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*. 2011, 3(3), 1377-1397. ISSN 2073-4360. doi:10.3390/polym3031377
- ²⁹ LIU, G., MCENNIS, K. Glass Transition Temperature of PLGA Particles and the Influence on Drug Delivery Applications. *Polymers*. 2022, 14(5). ISSN 2073-4360. doi:10.3390/polym14050993
- ³⁰ MIR, M., AHMED, N., REHMAN, A. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, 159, 217-231. ISSN 09277765. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.038
- ³¹ SNEJDROVA, E., PODZIMEK, S., MARTISKA, J., HOLAS O., DITTRICH, M. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. *Acta Pharmaceutica*. 2020, 70(1), 63-75. ISSN 1846-9558. doi:10.2478/acph-2020-0011
- ³² JYOTHI, N.V.N., PRASANNA, P.M., SAKARKAR, S.N., PRABHA, K.S., RAMAIAH P.S., SRAWAN, G.Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*. 2010, 27(3), 187-197. ISSN 0265-2048. doi:10.3109/02652040903131301
- ³³ ABID, N., KHAN, A.M., SHUJAIT, S., et al. Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2022, 300. ISSN 00018686. doi:10.1016/j.cis.2021.102597
- ³⁴ CRUCHO, C.I.C., BARROS, M.T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, 80, 771-784. ISSN 09284931. doi:10.1016/j.msec.2017.06.004
- ³⁵ MARTISKA, J., SNEJDROVA, E., DRASTIK, M., MATYSOVA, L., DITTRICH, M., LOSKOT, J., JILEK, P. Terbinafine-loaded branched PLGA-based cationic nanoparticles with modifiable properties. *Pharmaceutical Development and*

Technology. 2019, 24(10), 1308-1316. ISSN 1083-7450.
doi:10.1080/10837450.2019.1667387

³⁶ TODARO, B., MOSCARDINI, A., LUIN, S. Pioglitazone-Loaded PLGA Nanoparticles: Towards the Most Reliable Synthesis Method. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23(5). ISSN 1422-0067. doi:10.3390/ijms23052522

³⁷ KIM T.H., JEONG Y.I., JIN S.G., PEI J., JUNG T.Y., MOON K.S., KIM I.Y., KANG S.S., JUNG S. Preparation of polylactide-co-glycolide nanoparticles incorporating celecoxib and their antitumor activity against brain tumor cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2011, 6, 2621-2631. ISSN 1178-2013. doi:10.2147/IJN.S19497

³⁸ TOK, K.C., GUMUSTAS, M., SENDEL-TURK, C.T., AMASYA, G., BAYRAM, B., ARIOGLU-INAN, E. Development of salting-out extraction methodology for the determination of piroxicam from polymeric based nanocarriers and biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022, 219. ISSN 07317085. doi:10.1016/j.jpba.2022.114966

³⁹ BAJEROVÁ, M., DVOŘÁČKOVÁ, K., GAJDZIOK, J., MASTEIKOVÁ, R., RABIŠKOVÁ, M. Metody přípravy mikročástic ve farmaceutické technologii. *Česká a slovenská farmacie*. 2009, 58, 191-199.

⁴⁰ TIMILSENA, Y.P., AKANBI, T.O., KHALID, N., ADHIKARI, B., BARROW, C.J. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, 121, 1276-1286. ISSN 01418130. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144

⁴¹ SWARBRICK, J., *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Informa Healthcare. 2007, 1(3), 600-612. ISBN 9780849393969.

⁴² CHOPDE, S., DATIR, R., DESHMUKH, G., DHOTRE, A., PATIL, M. Nanoparticle formation by nanospray drying & its application in nanoencapsulation of food bioactive

ingredients. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2020, 2. ISSN 26661543. doi:10.1016/j.jafr.2020.100085

⁴³ SCHAFFROTH, N., ARPAGAUS, C., JADHAV, U.Y., MAKNE, S., DOUROUMIS, D. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, 90, 8-15. ISSN 09277765. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.038

⁴⁴ WANG, Y., LI, P., TRUONG-DINH TRAN, T., ZHANG J., KONG, L. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials*. 2016, 6(2). ISSN 2079-4991. doi:10.3390/nano6020026

⁴⁵ O'DONNELL, P.B., MCGINITY, J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997, 28(1), 25-42. ISSN 0169409X. doi:10.1016/S0169-409X (97)00049-5

⁴⁶ IQBAL, M., ZAFAR, N., FESSI, H., ELAISSARI, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, 496(2), 173-190. ISSN 03785173. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.057

⁴⁷ KIZILBEY, K., Optimization of Rutin-Loaded PLGA Nanoparticles Synthesized by Single-Emulsion Solvent Evaporation Method. *ACS Omega*. 2019, 4(1), 555-562. ISSN 2470-1343. doi:10.1021/acsomega.8b02767

⁴⁸ ALKHOLIEF, M., KALAM, M.A., ANWER, M.K., ALSHAMSAN, A. Effect of Solvents, Stabilizers and the Concentration of Stabilizers on the Physical Properties of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticles: Encapsulation, In Vitro Release of Indomethacin and Cytotoxicity against HepG2-Cell. *Pharmaceutics*. 2022, 14(4). ISSN 1999-4923. doi:10.3390/pharmaceutics14040870

⁴⁹ LOTFIPOUR, F., ABDOLLAHI, S., JELVEHGARI, M., VALIZADEH, H., HASSAN, M., MILANI, M. Study of Antimicrobial Effects of Vancomycin Loaded

PLGA Nanoparticles Against Enterococcus Clinical Isolates. *Drug Research*. 2014, 64(07), 348-352. ISSN 2194-9379. doi:10.1055/s-0033-1358747

⁵⁰ POSADOWSKA, U., BRZYCHCZY-WŁOCH, M., PAMUŁA, E. Gentamicin loaded PLGA nanoparticles as local drug delivery system for the osteomyelitis treatment. *Acta of bioengineering and biomechanics*. 2015, 17(3), 41-48. doi:10.5277/ABB-00188-2014-02

⁵¹ LIU, G., MIAO, X., FAN, W., CRAWFORD R., XIAO, Y. Porous PLGA Microspheres Effectively Loaded with BSA Protein by Electrospraying Combined with Phase Separation in Liquid Nitrogen. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Tissue Engineering*. 2010, 6, 1-18. ISSN 1662-100X. doi:10.4028/www.scientific.net/JBBTE.6.1

⁵² PANIGRAHI, D., SAHU, P.K., SWAIN S., VERMA, R.K. Quality by design prospects of pharmaceuticals application of double emulsion method for PLGA loaded nanoparticles. *SN Applied Sciences*. 2021, 3(6). ISSN 2523-3963. doi:10.1007/s42452-021-04609-1

⁵³ SONG, K.C., LEE, H.S., CHOUNG, I.Y., CHO, K.I., AHN, Y., CHOI, E.J. The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006, 276(1-3), 162-167. ISSN 09277757. doi: 10.1016/j.colsurfa.2005.10.064

⁵⁴ TAMILSELVAN, N., RAGHAVAN, C.V., BALAKUMAR, K., KARTHIK, S. Preparation of Plga nanoparticles for encapsulating hydrophilic drug: modifications of standard methods and it's in vitro biological evaluation. *Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2014, 2(3), 121–132. ISSN 2349 – 4492

⁵⁵ VANDERVOORT, J., LUDWIG, A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, 238(1-2), 77-92. ISSN 03785173. doi:10.1016/S0378-5173(02)00058-3

-
- ⁵⁶ SELVAMANI, V. Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. In: Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery. Elsevier. 2019, 425-444. ISBN 9780128140314. doi:10.1016/B978-0-12-814031-4.00015-5
- ⁵⁷ TADROS, T.F. Colloid Stability: the role of surface forces. Wiley-VCH. 2006, 1-22. ISBN 9783527314621.
- ⁵⁸ RUDIN, A., CHOI, P. Dispersion and Emulsion Polymerizations. In: The Elements of Polymer Science & Engineering. Elsevier. 2013, 427-447. ISBN 9780123821782. doi:10.1016/B978-0-12-382178-2.00010-9
- ⁵⁹ HUNTER, R.J. Foundations of Colloid Science. Oxford University Press. 1986, 1. ISBN 9780198551874.
- ⁶⁰ ŠKLUBALOVÁ, Z., a kol. Základní praktická cvičení z farmaceutické technologie. Univerzita Karlova, Karolinum. 2020, 66-68. ISBN 978-80-246-4561-2.
- ⁶¹ DE OLIVEIRA PACHECO, C., DE GOMES, M.G., DA SILVA NETO, M.R., et al. Surface-functionalized curcumin-loaded polymeric nanocapsules could block apomorphine-induced behavioral changes in rats. Pharmacological Reports. 2022, 74(1), 135-147. ISSN 1734-1140. doi:10.1007/s43440-021-00331-2
- ⁶² LEWIS, L., BONI, R., ADEYEYE, C.M. Effect of emulsifier blend on the characteristics of sustained release diclofenac microspheres. Journal of Microencapsulation. 2008, 15(3), 283-298. ISSN 0265-2048. doi:10.3109/02652049809006858
- ⁶³ KIM, H.S., LEE, S.H., EUN, C.J., YOO, J., SEO, Y.S. Dispersion of chitosan nanoparticles stable over a wide pH range by adsorption of polyglycerol monostearate. Nanomaterials and Nanotechnology. 2020, 10. ISSN 1847-9804. doi:10.1177/1847980420917260
- ⁶⁴ SCHUCH, A., DEITERS, P., HENNE, J., KÖHLER, K., SCHUCHMANN, H.P. Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and

release of water. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013, 402, 157-164. ISSN 00219797. doi:10.1016/j.jcis.2013.03.066

⁶⁵ SCHERZE, I., KNOTH, A., MUSCHIOLIK, G. Effect of Emulsification Method on the Properties of Lecithin – and PGPR-Stabilized Water-in-Oil-Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2006, 27(4), 427-434. ISSN 0193-2691. doi:10.1080/01932690500357081

⁶⁶ Dostupné 12.11.2022 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polyvinyl-alcohol>

⁶⁷ Dostupné 12.11.2022

https://en.wikipedia.org/wiki/Polyvinyl_alcohol#/media/File:Polyvinyl_Alcohol_Structural_Formula_V1.svg

⁶⁸ GAAZ, T., SULONG, A., AKHTAR, M., KADHUM, A., MOHAMAD, A., AL-MIERY, A. Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. *Molecules*. 2015, 20(12), 22833-22847. ISSN 1420-3049. doi:10.3390/molecules201219884

⁶⁹ RESCIGNANO, N., FORTUNATI, E., MONTESANO, S., EMILIANI, C., KENNY, J.M., MARTINO, S., ARMENTANO, I. PVA bio-nanocomposites: A new take-off using cellulose nanocrystals and PLGA nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 99, 47-58. ISSN 01448617. doi:10.1016/j.carbpol.2013.08.061

⁷⁰ TURK, C.T.S., OZ, U.C., SERIM, T.M., HASCICEK, C. Formulation and Optimization of Nonionic Surfactants Emulsified Nimesulide-Loaded PLGA-Based Nanoparticles by Design of Experiments. *AAPS PharmSciTech*. 2014, 15(1), 161-176. ISSN 1530-9932. doi:10.1208/s12249-013-0048-9

⁷¹ LI, J.K., WANG, N., WU, X.S. Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing–thawing process for protein/peptide drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 1998, 56(1-3), 117-126. ISSN 01683659. doi:10.1016/S0168-3659(98)00089-3

⁷² SAHOO, S.K., PANYAM, J., PRABHA, S., LABHASETWAR, V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects

their physical properties and cellular uptake. *Journal of Controlled Release*. 2002, 82(1), 105-114. ISSN 01683659. doi:10.1016/S0168-3659(02)00127-X

⁷³ KOLA SRINIVAS, N.S., VERMA, R., PAI KULYADI, G., KUMAR, L. A quality by design approach on polymeric nanocarrier delivery of gefitinib: formulation, in vitro, and in vivo characterization. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 12, 15-28. ISSN 1178-2013. doi:10.2147/IJN.S122729

⁷⁴ Dostupné 6.3.2023 https://en.wikipedia.org/wiki/Poloxamer_407

⁷⁵ Dostupné 17.2.2023

https://en.wikipedia.org/wiki/Poloxamer_407#/media/File:Poloxamere_General_Formula_V2.svg

⁷⁶ DUMORTIER, G., GROSSIORD J.L., AGNELY, F., CHAUMEIL, J.C. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research*. 2006, 23(12), 2709-2728. ISSN 0724-8741. doi:10.1007/s11095-006-9104-4

⁷⁷ FAKHARI, A., CORCORAN, M., SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon*. 2017, 3(8). ISSN 24058440. doi:10.1016/j.heliyon.2017.e00390

⁷⁸ BOURICHE, S., CÓZAR-BERNAL, M.J., REZGUI, F., RABASCO ÁLVAREZ, A.M., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.L. Optimization of preparation method by W/O/W emulsion for entrapping metformin hydrochloride into poly (lactic acid) microparticles using Box-Behnken design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019, 51, 419-429. ISSN 17732247. doi:10.1016/j.jddst.2019.03.011

⁷⁹ DINARVAND, R., MOGHADAM, S.H., SHEIKHI, A., ATYABI, F. Effect of surfactant HLB and different formulation variables on the properties of poly-D,L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique. *Journal of Microencapsulation*. 2008, 22(2), 139-151. ISSN 0265-2048. doi:10.1080/02652040400026392

-
- ⁸⁰ NIHANT, N., SCHUGENS, C., GRANDFILS, C., JÉRÔME, R., TEYSSIÉ, P. Polylactide Microparticles Prepared by Double Emulsion/Evaporation Technique. I. Effect of Primary Emulsion Stability. *Pharmaceutical Research*. 1994, 11(10), 1479-1484. ISSN 07248741. doi:10.1023/A:1018912426983
- ⁸¹ BLANCO-PRÍETO, M.J., LEO, E., DELIE, F., GULIK, A., COUVREUR, P., FATTAL, E. Study of the Influence of Several Stabilizing Agents on the Entrapment and In Vitro Release of pBC 264 from Poly(Lactide-Co-Glycolide) Microspheres Prepared by a W/O/W Solvent Evaporation Method. *Pharmaceutical Research*. 1996, 13(7), 1127-1129. ISSN 07248741. doi:10.1023/A:1016087530812
- ⁸² MAA, Y.F., HSU, C.C. Effect of primary emulsions on microsphere size and protein-loading in the double emulsion process. *Journal of Microencapsulation*. 2009, 14(2), 225-241. ISSN 0265-2048. doi:10.3109/02652049709015335
- ⁸³ ROJAS, J., PINTO-AIPHANDARY, H., LEO, E., PECQUET, S., COUVREUR, P., GULIK, A., FATTAL, E. A polysorbate-based non-ionic surfactant can modulate loading and release of beta-lactoglobulin entrapped in multiphase poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharmaceutical Research*. 1999, 16(2), 255-260. ISSN 07248741. doi:10.1023/A:1018880409254
- ⁸⁴ HERRMANN, J. Somatostatin containing biodegradable microspheres prepared by a modified solvent evaporation method based on W/O/W-multiple emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 1995, 126(1-2), 129-138. ISSN 03785173. doi:10.1016/0378-5173(95)04106-0
- ⁸⁵ TEWES, F., MUNNIER, E., ANTOON, B. Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007, 66(3), 488-492. ISSN 09396411. doi:10.1016/j.ejpb.2007.02.016
- ⁸⁶ MANHARTOVÁ, K. Antibakteriální nanovlákněné vrstvy pro prevenci infekcí z důvodu kolorektálního leaku. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní, Katedra netkaných textilií a nanovlákněných materiálů, 2022, 89 s.

-
- ⁸⁷ LU, Z., BEI, J., WANG, S. A method for the preparation of polymeric nanocapsules without stabilizer. *Journal of Controlled Release*. 1999, 61(1-2), 107-112. ISSN 01683659. doi:10.1016/S0168-3659(99)00112-1
- ⁸⁸ ACHARYA, S.R, REDDY, P.R.V., ACHARYA, N.S. Optimization of size controlled poly (lactide-co-glycolic acid) nanoparticles using quality by design concept. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2015, 9(3), 152-161. ISSN 0973-8398. doi:10.4103/0973-8398.160310
- ⁸⁹ KOZAKI, M., KOBAYASHI, S.I., GODA, Y., OKUDA, H., SAKAI-KATO, K. Evaluating the Properties of Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticle Formulations Encapsulating a Hydrophobic Drug by Using the Quality by Design Approach. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2017, 65(3), 218-228. ISSN 0009-2363. doi:10.1248/cpb.c16-00415
- ⁹⁰ MARINELLI, L., CIULLA, M., RITSEMA, J.A.S. Preparation, Characterization, and Biological Evaluation of a Hydrophilic Peptide Loaded on PEG-PLGA Nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2022, 14(9), 1821. ISSN 1999-4923. doi:10.3390/pharmaceutics14091821
- ⁹¹ JEFFERY, H., DAVIS, S.S., O'HAGAN, D.T. The Preparation and Characterization of Poly(lactide-co-glycolide) Microparticles. II. The Entrapment of a Model Protein Using a (Water-in-Oil)-in-Water Emulsion Solvent Evaporation Technique. *Pharmaceutical Research*. 1993, 10(3), 362-368. ISSN 07248741. doi:10.1023/A:1018980020506
- ⁹² YANG, Y. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*. 2001, 22(3), 231-241. ISSN 01429612. doi:10.1016/S0142-9612(00)00178-2
- ⁹³ HUSSEIN, A.S., ABDULLAH, N., FAKRU'L-RAZI, A. Optimizing the Process Parameters for Encapsulation of Linamarin into PLGA Nanoparticles Using Double

Emulsion Solvent Evaporation Technique. *Advances in Polymer Technology*. 2013, 32(S1), 486-504. ISSN 07306679. doi:10.1002/adv.21295

⁹⁴ LEE, Y., LEE, D., PARK, E., JANG, S.Y., CHEON, S.Y., HAN, S., KOO, H. Rhamnolipid-coated W/O/W double emulsion nanoparticles for efficient delivery of doxorubicin/erlotinib and combination chemotherapy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2021, 19(1). ISSN 1477-3155. doi:10.1186/s12951-021-01160-4

⁹⁵ NOVIENDRI, D., JASWIR, I., TAHER, M. Fabrication of Fucoxanthin-Loaded Microsphere(F-LM) By Two Steps Double-Emulsion Solvent Evaporation Method and Characterization of Fucoxanthin before and after Microencapsulation. *Journal of Oleo Science*. 2016, 65(8), 641-653. ISSN 1345-8957. doi:10.5650/jos.ess16018

⁹⁶ SEILEROVÁ, L., BRUSOVÁ, H., KRATOCHVÍL, B., KREJČÍK, L. Využití metod termické analýzy ve výzkumu a vývoji léčiv. *Chemické listy*. 2012, vol. 106, 890-895.

⁹⁷ ČSN EN ISO 11357-2. Diferenciální snímací kalorimetrie (DSC): Část 2: Stanovení teploty a výšky skoku skelného přechodu. 2016.

⁹⁸ Dostupné 28.7.2023 https://www.chemsrc.com/en/cas/1404-93-9_259903.html

⁹⁹ Dostupné 28.7.2023

https://www.mt.com/ch/it/home/supportive_content/matchar_apps/MatChar_UC232.htm

¹⁰⁰ ABDELLATIF, M.M., AHMED, S.M., EL-NABARAWI, M.A., TEAIMA, M. Oral Bioavailability Enhancement of Vancomycin Hydrochloride with Cationic Nanocarrier (Leciplex): Optimization, In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Studies. *Scientia Pharmaceutica*. 2023, 91(1). ISSN 2218-0532. doi:10.3390/scipharm91010001

¹⁰¹ MOHAMED, H.B., EL-SHANAWANY, S.M., HAMAD, M.A., ELSABAHY, M. Niosomes: A Strategy toward Prevention of Clinically Significant Drug Incompatibilities. *Scientific Reports*. 2017, 7(1). ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-017-06955-w