
Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta
Katedra farmaceutické technologie

**Nanočástice ve farmaceutické technologii -
biodegradabilní polymerní částice jako systémy cílené
biodistribuce léčiv**

Autor:	Dana Kováčsová
Datum:	20.09.2006
Vedoucí rigorózní práce	Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.
Odevzdáno:	28.09.2006
Obhajoba:	06.10.2006
Počet stran	57

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu rigorózní práce Doc. RNDr. Milanu Ditrichovi, CSc. za poskytnuté rady a připomínky k této rigorózní práci a Mgr. Evě Valentové za obětavost, trpělivost a pomoc při realizaci.

Obsah

Obsah	3
Seznam tabulek.....	6
Seznam obrázků.....	7
Seznam zkratk.....	8
1 Úvod.....	9
2 Příprava nanočástic.....	9
2.1 Disperze polymeru.....	9
2.1.1 Metoda odpaření rozpouštědla	9
2.1.2 Spontánní emulgace / difuze rozpouštědla.....	10
2.1.3 Vysolování / emulgace, difuzní metoda.....	10
2.1.4 Příprava NP za použití technologie využívající nadkritických kapalin (SCF).....	10
2.1.5 Polymerizační metoda.....	11
2.1.6 Nanočástice připravené z hydrofilních polymerů.....	13
3 Inkorporace léčivé látky (Drug loading).....	13
4 Uvolňování léčivé látky.....	14
5 Povrchové vlastnosti nanočástic.....	14
5.1 Povrchová adsorpce proteinů plazmy a fagocytóza nanočástic	14
5.2 Metody charakterizace povrchu nanočástic	15
5.3 Metody modifikace povrchu nanočástic.....	15
5.3.1 Povrchově modifikované nanočástice za použití PEG a PEO	15
5.3.2 Povrchově modifikované nanočástice za použití poloxameru a poloxaminu.....	16
5.3.3 Cyklodextrin / karbohydrát modifikované nanočástice.....	16
5.3.4 Nanočástice na povrchu modifikované polysorbátem – jejich prostupnost hematoencefalickou bariérou.....	17
6 Nanočástice jako nosiče proteinů a peptidů	18
7 Nanomedicína - nanotechnologie aplikovaná v medicíně	18
7.1 Cílené dodání léčiva včetně řízeného uvolňování (Targeted drug delivery including controlled release).....	18
7.2 Nanočástice a jejich využití v terapii nemocí dýchacích cest.....	21
7.2.1 Pulmonální tuberkulóza	21
7.3 Strategie pro očkování	21
8 Shrnutí teoretické části	21

9	Cíl práce.....	22
10	Principy měření velikosti nanočástic.....	22
10.1	Dynamický rozptyl světla	22
10.1.1	Korelační funkce	23
10.1.2	Číselná, objemová a intenzitní distribuce	25
10.1.3	Měření velikosti částic	25
10.2	Měření a principy zeta potenciálu.....	27
10.2.1	Teorie zeta potenciálu	27
10.2.2	Elektroforéza	28
10.2.3	Měření elektroforetické pohyblivosti	29
10.2.4	Zetasizer, nano a zeta-potenciálové měření	29
11	Experimentální část	31
11.1	Použité přístroje.....	31
11.2	Chemikálie.....	31
11.3	Metoda přípravy nanočástic.....	32
11.3.1	Příprava vodné (vnější) fáze.....	32
11.3.2	Příprava organické (vnitřní) fáze.....	32
11.3.3	Příprava nanočástic	32
11.3.4	Měření velikosti částic	32
11.3.5	Měření zeta potenciálu částic	34
11.3.6	Příprava nanočástic z různých polymerů.....	35
11.3.7	Příprava nanočástic z 1% roztoku různých polymerů za použití různých rozpouštědel.....	37
11.3.8	Příprava nanočástic a jejich modifikace léčivou látkou terbinafinem... 43	
12	Diskuse	48
12.1	Obecné poznámky.....	48
12.2	Vliv nosiče na velikost nanočástic a jejich zeta potenciál	49
12.3	Vliv různých rozpouštědel nosičů na parametry nanočástic z kyseliny poly(DL-mléčné) (PDLLA)	49
12.4	Vliv různých rozpouštědel nosičů na parametry nanočástic z terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a dipentaerytritolu (3D).....	50
12.5	Vliv různých rozpouštědel nosičů na parametry nanočástic z kopolymeru kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové (PLGA).....	50
12.6	Vliv různých rozpouštědel nosičů na parametry nanočástic polyesterurethanu odvozeného z kopolymeru kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové (PEU-1) ...	50

12.7	Vliv lecitinu a terbinafinu na parametry nanočástic připravený z roztoků kyseliny poly(DL-mléčné) v dichlormethanu	51
12.8	Vliv polysorbátu 20 a terbinafinu na parametry nanočástic z roztoků kyseliny poly(DL-mléčné) v dichlormethanu	51
12.9	Vliv poloxameru 407 a terbinafinu na parametry nanočástic z roztoků kyseliny poly(DL-mléčné) v dichlormethanu	52
13	Závěry	52
14	Literatura	53

Seznam tabulek

Table 11-1	Roztok 0.75 % lecitin + 0.25% Pso (vnější fáze).....	35
Table 11-2	Roztok 0.75 % lecitin + 0.25% Px407 (vnější fáze)	35
Table 11-3	Roztok 1% polymeru v DCM(vnitřní fáze).....	36
Table 11-4	0.75% lecitin + 0.25% Pso + 1% polymer v DCM.....	36
Table 11-5	0.75% lecitin + 0.25% Px407 + 1% polymer v DCM.....	37
Table 11-6	Roztok 0.75 % lecitin + 0.25% Pso (vnější fáze).....	37
Table 11-7	Roztok 1% polymeru v rozpouštědle (vnitřní fáze)	38
Table 11-8	Roztok 1% polymeru ve směsi rozpouštědel (vnitřní fáze)	38
Table 11-9	0.75% lecitin + 0.25% Pso + 1% PDLLA v rozpouštědle	39
Table 11-10	0.75% lecitin + 0.25% Pso + 1% 3D v rozpouštědle	40
Table 11-11	0.75% lecitin + 0.25% Pso + 1% PLGA-2 v rozpouštědle	41
Table 11-12	0.75% lecitin + 0.25% Pso + 1% PEU-1 v rozpouštědle	42
Table 11-13	Roztok 0.25 % emulgátor (vnější fáze).....	43
Table 11-14	Roztok 0.5 % emulgátor (vnější fáze).....	43
Table 11-15	Roztok 0.75 % emulgátor (vnější fáze).....	43
Table 11-16	Roztok 1 % emulgátor (vnější fáze).....	43
Table 11-17	Roztok 1% PDLLA v DCM (vnitřní fáze).....	44
Table 11-18	Emulgátor lecitin + 1% PDLLA bez terbinafinu.....	45
Table 11-19	Emulgátor lecitin + 1% PDLLA + 10% terbinafin.....	45
Table 11-20	Emulgátor Pso + 1% PDLLA bez terbinafinu.....	46
Table 11-21	Emulgátor Pso + 1% PDLLA + 10% terbinafin.....	46
Table 11-22	Emulgátor Px407 + 1% PDLLA bez terbinafinu	47
Table 11-23	Emulgátor Px407 + 1% PDLLA + 10% terbinafin	47

Seznam obrázků

Obrázek 2-1	Schematická ukázka produkce polyalkylkyanoakrylátových nanočástic	12
Obrázek 5-1	Efekt PEG density a konformace na opsonizaci (52).....	16
Obrázek 5-2	Uptake léčivé látky přes biologickou membránu (57, 58)	17
Obrázek 7-1	Nosiče léčivé látky jako konjugáty ‚nanočástice- léčivá látka‘ (64).....	19
Obrázek 7-2	Struktura nanočástice s různými funkcemi (64).....	20
Obrázek 10-1	Skvrna zobrazující Brownův pohyb.....	23
Obrázek 10-2	Graf korelační funkce.....	24
Obrázek 10-3	Graf distribuce velikostí částic.....	24
Obrázek 10-4	Graf číselné, objemové a intenzitní distribuce	25
Obrázek 10-5	DLS systém	26
Obrázek 10-6	Zeta potenciál	27
Obrázek 10-7	Isoelektrický bod	28
Obrázek 10-8	Kyveta s elektrodami.....	29
Obrázek 10-9	Princip měření zeta potenciálu	30
Obrázek 11-1	Ukázka grafu distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku	33
Obrázek 11-2	Ukázka grafu distribuce velikosti částic(v nm) podle objemu.....	33
Obrázek 11-3	Ukázka grafu velikosti částic podle číselné distribuce.....	34
Obrázek 11-4	Ukázka grafu distribuce zeta potenciálu	34
Obrázek 11-5	Ukázka grafu distribuce elektroforetické mobility.....	35

Seznam zkratk

3D	terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a dipentaerytritolu
BSA	hovězí sérový albumin, bovine serum albumin
DDS	drug delivery system
ESCA	elektronová spektroskopie pro chemickou analýzu
FDA	Food and Drug Administration
HSA	lidský sérový albumin, human serum albumine
IgG	imunoglobulin G
L	lecitin
NP	nanočástice, nanoparticles
PACA	polyalkylkyanoakrylát
PCA	polykyanoakrylát
PCL	poly (ϵ -)kaprolakton
PDEMM	polymethyldenmalonát
PDLLA	kyselina poly(DL-mléčná)
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PEU-1	polyesterurethan odvozený z kopolymeru kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové
PLA	polymléčná kyselina, poly(lactic acid)
PLG	polyglykolid
PLGA	polylaktid-ko-glykolid
Pso	polysorbát
Px407	poloxamer 407
RESS	Rapid Expansion of Supercritical Solution
SAS	supercritical anti-solvent
SCF	Supercritical fluids

1 Úvod

Nanočástice (nanoparticles, NP) a v souvislosti s nimi i možnost inkorporace léčivé látky do nanosystému jsou předmětem zájmu v posledních několika desítkách let v rámci farmakoterapie a také jako vývojový směr k cílené buněčné terapii. Různé druhy polymerů jsou zkoumány a testovány jako efektivní nosiče, na které je navázána léčivá látka, a které jsou specificky vychytávány buňkami, nádory či orgány a díky tomu může být léčivá látka dopravena na specifické místo účinku. Výsledkem je potom omezení vedlejších účinků spojených se systémem podáním léčiva a jeho nižší toxicita. NP napomáhají zvýšit stabilitu léčivé látky a mají vlastnosti řízeného uvolňování (1).

NP mají velikost od 10 do 1000 nm. Léčivá látka je rozpuštěna, enkapsulována, nebo navázána na NP matrix a v závislosti na metodě přípravy jsou tak získány nanočástice, nanosféry nebo nanokapsle. Nanokapsle jsou vesikulární systémy v nichž je léčivá látka obklopená polymerní membránou, zatímco nanosféry jsou matricovým systémem, v nichž je léčivá látka stejnoměrně dispergována. Biodegradabilní polymerní NPs jsou novým směrem ve vývoji léčiv s řízeným uvolňováním pro jejich schopnost cíleně působit v tkáních a orgánech, jsou zvažovány jako nosiče v DNA genové terapii a jako lékové formy pro podání proteinů, peptidů a genů perorální cestou (2, 3).

Většina publikací se zabývá nanočásticemi vytvořenými z poly(D, L)-laktidu, polymléčné kyseliny PLA, polyglykolidu PLG, polylaktid-ko-glykolidu PLGA a polykryanoakrylátu PCA (1, 4-10).

Nejnovější vývoj se zabývá NP, k jejichž přípravě se používají hydrofilní / biodegradabilní polymery – chitosan, želatina, alginát sodný. PLA; PLG a PLGA byli již dříve využívány ve formulaci léčiv s řízeným uvolňováním k parenterální aplikaci a ve formě implantátu díky jejich kompatibilitě s tkáněmi (11-13). Dále ve vývoji NP jsou využívány polymery poly (ϵ -)kaprolakton PCL a polyalkylcyanoakrylát PACA.

2 Příprava nanočástic

Konvenční jsou dvě metody přípravy nanočástic: (a) disperze polymeru, (b) polymerizace monomeru in situ

2.1 Disperze polymeru

Několik disperzních metod lze použít pro přípravu biodegradabilních NP z PLA, PLG, PLGA a poly (ϵ -)kaprolaktonu.

2.1.1 Metoda odpaření rozpouštědla

Polymer je rozpuštěn v organickém rozpouštědle, např. dichloromethanu, chloroformu nebo ethylacetátu. Léčivá látka je rozpuštěna nebo dispergována v tomto polymerním roztoku, tato směs je emulgována ve vodném roztoku a připravena je emulze olej ve vodě (O/V), emulgátorem může být želatina, polyvinylalkohol, polysorbát-80, poloxamer 188. Po vytvoření stabilní emulze je organické rozpouštědlo odpařeno buď zvýšením teploty/tlaku

nebo kontinuálním mícháním. Metoda přípravy emulze V/O/V byla použita při přípravě NP obsahujících ve vodě rozpustné léčivé látky (14).

2.1.2 Spontánní emulgace / difuze rozpouštědla

V rámci této metody jsou použita s vodou se mísící rozpouštědla jako aceton nebo methanol spolu s ve vodě nerozpustnými rozpouštědly jako dichlormethan nebo chloroform, která slouží jako olejová fáze. Díky spontánní difuzi ve vodě rozpustného rozpouštědla se na rozhraní dvou fází vyvolá interfaciální turbulence, která vede ke vzniku malých částic. S klesající koncentrací ve vodě rozpustného rozpouštědla se docílí snížení velikosti částic.

2.1.3 Vysolování / emulgace, difuzní metoda

Obě předchozí metody využívají organická rozpouštědla, jejichž stopy v léčivech jsou striktně kontrolovány a jsou pro ně stanoveny přísné limity kompetentními úřady pro kontrolu léčiv, včetně FDA (15, 16).

První metodou, která splňuje přísná kritéria stop organických rozpouštědel je vysolování (17, 18), druhou je metoda „emulgace – difuze rozpouštědla“ (19, 20).

2.1.4 Příprava NP za použití technologie využívající nadkritických kapalin (SCF)

Nadkritické kapaliny (SCF) se staly atraktivní alternativou k předchozím metodám, protože nezatěžují životní prostředí a jejich pomocí se dají získat částice vysoké kvality beze stop organických rozpouštědel (21-22).

SCF jsou vysokostlačené plyny, které kombinují vlastnosti plynu a kapaliny. SCF je substance, která překročila kritickou teplotu (T_c) a tlak (P_c). Superkritický bod představuje kombinaci podmínek teploty a tlaku, za kterých substance existuje v rovnováze mezi plynnou a kapalnou fází. Nejběžněji používanou SCF je oxid uhličitý. Když je dosaženo superkritického bodu, CO_2 se změní z kapalného skupenství v SCF kapalinu.

Metoda rychlé expanze superkritického roztoku (Rapid Expansion of Supercritical Solution, RESS) spočívá v tom, že rozpouštěná látka je solubilizována v SCF a takový roztok je expandován přes trysku. V důsledku toho se rozpouštěcí vlastnosti SCF se sníží, přejde do plynného skupenství a rozpouštěná látka precipituje. Precipitovaná látka neobsahuje žádné rozpouštědlo. Bohužel většina polymerů je velice omezeně nebo prakticky nerozpustná v SCF, zvláště ty o větší molekulové hmotnosti a to limituje použití této metody.

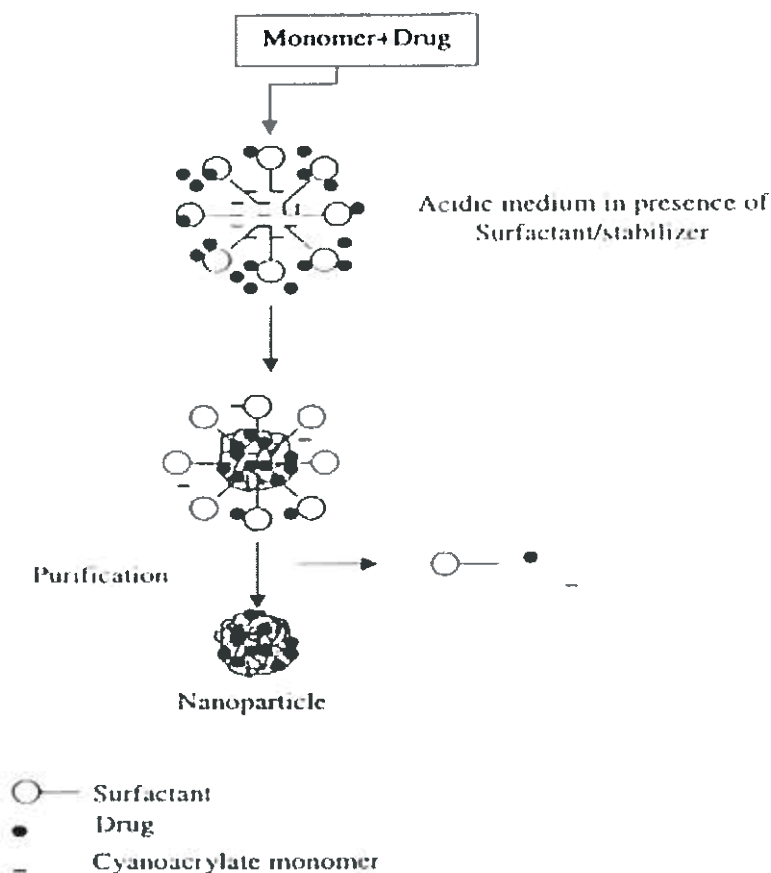
Při využití nadkritických srážedel (SAS) metodě za vysokého tlaku dostatečné množství srážedla vstoupí do kapalně fáze a tím se sníží rozpouštěcí schopnost roztoku a rozpouštěná látka precipituje. Po precipitaci a dosažení konečného pracovního tlaku srážedlo cirkuluje v nádrži a absorbuje zbytky rozpouštědla. Po redukci obsahu rozpouštědla je tlak v nádobě vyrovnán s atmosférickým tlakem a precipitát je izolován.

2.1.5 Polymerizační metoda

NP mohou být též připraveny polymerizací monomerů. Couvreur et. al (23, 24) publikovali přípravu NP o průměru přibližně 200 nm mechanickou polymerizací dispergovaného methyl- nebo ethylkyanoakrylátu ve vodném kyselém prostředí v přítomnosti polysorbátu-20 jako tenzidu bez ozáření nebo bez iniciátoru. Monomer kyanoakrylátu je přidán do vodného roztoku povrchově aktivního media (polymerizačního media) za intenzivního mechanického míchání za účelem polymerizace alkylykyanoakrylátu za běžné pokojové teploty. Léčivá látka je rozpuštěna v polymerizačním mediu buď před přidáním monomeru nebo před ukončením polymerizační reakce. Suspenze NP je purifikována ultracentrifugací nebo resuspenzí částic v isotonickém roztoku neobsahujícím tenzid. Takto připravené částice rychle degradují. Vyhnout se tomuto problému a vyrobit částice o vyšší molekulové hmotnosti lze pokud je polymerizace provedena v kyselém prostředí (pH 1.0-3.5). Polymerizační reakce probíhá po 3-4 hodiny po dispergaci monomeru ve vodném kyselém roztoku obsahujícím surfaktant a stabilizátor.

Během polymerizační reakce jsou přidávány různé stabilizátory jako např. Dextran-70, Dextran-40, Dextran-10, Poloxamer-188, -184, -327, Polysorbát-20, -40 nebo -80, atd. Velikost částic a molekulová hmotnost závisí na typu a koncentraci použitého stabilizátoru a/nebo tenzidu. Schematická ukázka produkce polyalkylkyanoakrylátových NP je na Obrázku 2-1.

Obrázek 2-1 Schematická ukázka produkce polyalkylkryanoakrylátových nanočástic



Velikost a molekulová hmotnost NP také závisí na pH polymerizačního media. Příprava NP není možná za vyššího pH než 3.0, zřejmě díky agregaci a postupnému zvyšování molekulové hmotnosti v prostředí nižšího pH. Dále tvorbu částic ovlivňuje koncentrace monomeru a rychlost míchání.

NP z PACA získaly oblibu i přes jejich nedostatky, kterými jsou jejich nízké pH (okolo 2) a cytotoxicita (25). To vedlo k syntéze nových monomerů typu dialkyl esterů methylen malonové kyseliny a NP z polymethylenmalonátu, PDEMM. Tyto NPs nejsou biodegradabilní in-vitro a ani in-vivo (26, 27). Aby byl vyřešen tento problém, byly syntetizovány nové deriváty PDEMM, jmenovitě ethyl-2-ethoxykarbonylmethylenoxykarbonylakrylát. NP z těchto monomerů byly připraveny stejnou metodou jako PACA NP, tj. anionovou polymerizací (28). pH polymerizačního media zásadně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti NP, částice o minimalní velikosti byly připraveny v prostředí o pH 5.5 – 6.0 ve srovnání s pH 2.0, které je optimální pro NP PBCA a pH 7.6, které je optimální pro PDEMM.

Snahy byly učiněny ve směru omezit tvorbu oligomerů a zvýšit výtěžek PMM. Procesní parametry jako pH, koncentrace tenzidu a koncentrace monomeru byly optimalizovány pro

dosažení NP o vyšší molekulové hmotnosti. Byla publikována metoda přípravy kopolymery ethyl-2-ethoxykarbonyl ethyl methylen malonoátu s polyethylenoxidem (29), tyto blokové kopolymery mají jak hydrofobní tak i hydrofilní vlastnosti a mohou být vhodné pro vývoj dlouhodobých NP v krevním oběhu.

2.1.6 Nanočástice připravené z hydrofilních polymerů

Kromě běžně používaných syntetických hydrofobních polymerů se nyní výzkum zaměřuje i na přípravu NP za použití hydrofilních polymerů jako např. chitosan, alginát sodný, želatina, atd. Calvo a spolupracovníci (30-33) vyvinuli metodu přípravy hydrofilních chitosanových NP. Příprava spočívá v ionické gelaci za použití směsi dvou vodných fází, z nichž jedna obsahuje dvojblokový kopolymer chitosanu a polyethylenoxidu (PEO) a druhá obsahuje polyaniontový tripolyfosfát sodný (TPP). Takto připravené NP vykazují dobré asociační vlastnosti s proteiny, např. hovězím sérovým albuminem (BSA), tetanovým toxoidem, insulinem nebo oligonukleotidy.

Mao a spolupracovníci (34, 35) připravili komplexní koacervační metodou DNA-chitosan NP. Stejnou metodou byly připraveny také DNA-želatina NP (36). Chitosan a léčivá látka byly rozpuštěny ve vodě a v emulzi voda / olej, která byla připravena v tekutém parafínu za použití emulgátoru. K této stabilní emulzi byla přidána druhá emulze hydroxidu sodného v parafínu. Ve styku s NaOH koacervací chitosanu se vytvořily chitosanové NP.

Nové biodegradabilní polyestery sestávající z krátkých polylaktonových řetězců, které jsou připojeny na polyvinylalkohol (PVA) nebo na sulfobutyl-PVA (SB-PVA) byly připraveny polymerizací laktidu a glykolidu za přítomnosti různých polyolů. Modifikované základní struktury vznikly reakcí aktivovaného PVA se sulfobutylovými skupinami. Tak byly připraveny nové ve vodě rozpustné polyestery. Tyto polymery vytváří nanočásticové stabilní komplexy s lidským sérovým albuminem, tetanovým toxoidem a cytochromem C. Vývoj NP z takových polymerů nevyžaduje použití rozpouštědel ani tenzidů (37-39).

3 Inkorporace léčivé látky (Drug loading)

NP systém je úspěšný tehdy, pokud je možné na NP navázat co největší možné množství léčivé látky a zároveň omezit množství nosiče nutného k podání léčiva. Existují dvě metody inkorporace léčivé látky: (a) inkorporace léčivé látky souběžně s přípravou a vznikem NP, (b) absorpce léčivé látky na NP poté, co NP byla již vytvořena a inkubována v roztoku léčivé látky. Je zřejmé, že větší množství léčivé látky je zachyceno metodou inkorporace ve srovnání s absorpční metodou. (40, 41). V případě absorpční metody lze obecně říci, že v případě polyalkylkyanoakrylátu (PACA) čím je delší alkylový řetězec, tím je vyšší afinita léčivé látky. Kapacita absorpce je tudíž závislá na hydrofobicitě polymeru a specifického povrchu částice. V případě inkorporační metody byla vysledována závislost množství inkorporované léčivé látky na její koncentraci v roztoku a koncentraci monomeru v roztoku. Pro optimální výsledek je nutné optimalizovat množství monomeru dostupného pro inkorporaci léčivé látky (42).

4 Uvolňování léčivé látky

Průběh uvolňování léčivé látky a následná biodegradabilita NP jsou důležité faktory pro vývoj úspěšného léčivého přípravku.

Průběh uvolňování léčivé látky závisí na (a) desopci léčivé látky z povrchu, (b) difuzi léčivé látky přes matrici NP, (c) difuzi (v případě nanokapslí) přes stěnu z polymeru, (d) erozi NP matrice, (e) kombinaci eroze a difuze. Tudiž difuze a biodegradace řídí průběh uvolňování léčivé látky.

Metody testování uvolňování in-vitro jsou následující: (a) měření difuze jedné strany na druhou přes umělou biologickou membránu, (b) dialyzační difuzní metoda (c) reverzní dialyzační metoda, (d) ultracentrifugace, (e) ultrafiltrace, (f) centrifugální ultrafiltrační metoda. Přes kontinuální snahy a vývoj v této oblasti testování in-vitro zápasí s technickými problémy praktického provedení. Tyto problémy jsou zapříčiněny složitou separací NP od testovacího disolučního media. Jako rychlá se osvědčila dialyzační metoda, kde jsou využity dialyzační vaky / tubičky, ve kterých je suspenze NP rozdělována na základě jejich odlišné molekulové hmotnosti. Tyto vaky, každý obsahuje NP o specifické molekulové hmotnosti, jsou poté inkubovány spolu s testovacím disolučním médiem. Jiná technika využívá difuzní cely, které mají dva kompartmenty – donor a akceptor. Separace potom probíhá přes umělou nebo biologickou membránu.

Profil uvolňování léčivé látky z NP závisí na charakteru biodistribučního systému (drug delivery system, DDS). V případě matricového systému léčivá látka difunduje z matrice, difuze léčivé látky je rychlejší než rozpad matrice, tj. rychlost uvolňování je závislá na difuzi.

Rychlé počáteční uvolňování souvisí spíše s tou frakcí léčivé látky, která je navázána na povrchu NP, nežli s léčivou látkou inkorporovanou v matrici. Pozdější, exponenciální zpožděný průběh uvolňování je připisován difuznímu uvolňování léčivé látky z matrice. Inkorporace léčivé látky do matrice je účinnější metoda jak docílit postupného uvolňování léčivé látky. Pokud byla léčivá látka konjugována s PLGA NP, uvolňování probíhalo 25 dní, zatímco z NP, které obsahovaly volnou nekonjugovanou léčivou látku probíhalo uvolňování 5 dní (43).

5 Povrchové vlastnosti nanočástic

5.1 Povrchová adsorpce proteinů plazmy a fagocytóza nanočástic

Po i.v. podání jsou NP rychle rozpoznány imunitním systémem a vyloučeny z cirkulace. V rozsahu opsonizace NP, tj. množství adsorbovaných proteinů (opsoninu) na povrchu NP, hraje roli velikost NP a hydrofobicita jejich povrchu. Tyto parametry předurčují osud NP in-vivo (44, 45). Navázání opsoninu na povrch NP, opsonizace, funguje jako spojovací článek mezi NP a fagocyty. Z toho tedy vyplývá, že pro úspěšnou formulaci dlouho cirkulujících NP je nutné porozumět interakci mezi plazmovými proteiny a NP. Prodloužení setrvání NP v krevním oběhu lze dosáhnout jejich povrchovou modifikací.

Alleman et al. (46) provedl studii, v níž zjistil, že po inkubaci PLA NP s lidskou plazmou a sérem hlavními adsorbovanými složkami byly IgG, albumin, apolipoprotein E, stejně jako komponenty komplementu C₃, který je součástí imunitního systému a je zodpovědný za rozpoznání cizích povrchů. IgG a komponenty komplementu C₃ byly nejvýznamnější adsorbované složky. Zajímavé je, že i způsob přípravy NP zřejmě ovlivňuje interakci proteinů a NP. Luck et al. (47) publikoval studii, v níž je patrné, že množství několika apolipoproteinů adsorbovaných na PLGA připravených sprayovým sušením bylo vyšší, ve srovnání s adsorpcí na PLA NP, které byly připraveny emulzní metodou voda/olej/voda. Některé adsorbované proteiny byly specifické pro NP vyrobené stejnou metodou. Přítomnost hydrofilních řetězců polyoxyethylenu v polymeru významně snížila adsorpci proteinů v porovnání s čistými polyestery.

5.2 Metody charakterizace povrchu nanočástic

Jaký efekt má modifikace povrchu NP, můžeme zjistit na základě měření změn povrchového napětí, density funkčních skupin nebo zvýšením hydrofility povrchu. Jednou z metod na měření modifikace povrchu je určení zeta potenciálu vodné suspenze obsahující NP. Touto metodou je sledována mobilita nabitých částic za působení elektrického potenciálu. Míra hydrofility povrchu potom může být odhadnuta na základě hodnot zeta potenciálu.

Jinou běžně používanou metodou je elektronová spektroskopie pro chemickou analýzu (ESCA). Dále může být povrchová hydrofobicitu měřena hydrofobní interakční chromatografií, kde jsou na koloně separovány látky na základě jejich interakce s hydrofobní gelovou maticí (48).

5.3 Metody modifikace povrchu nanočástic

Modifikace povrchu lze provést: (a) metodou pokrytí povrchu hydrofilními polymery / tenzidy a nebo (b) vývojem biodegradabilních kopolymerů s hydrofilními segmenty. Z používaných hydrofilních polymerů lze jmenovat polyethylenglykol (PEG), polyethylenoxid (PEO), poloxamer, poloxamin, polysorbát (Tween-80) a lauryl estery.

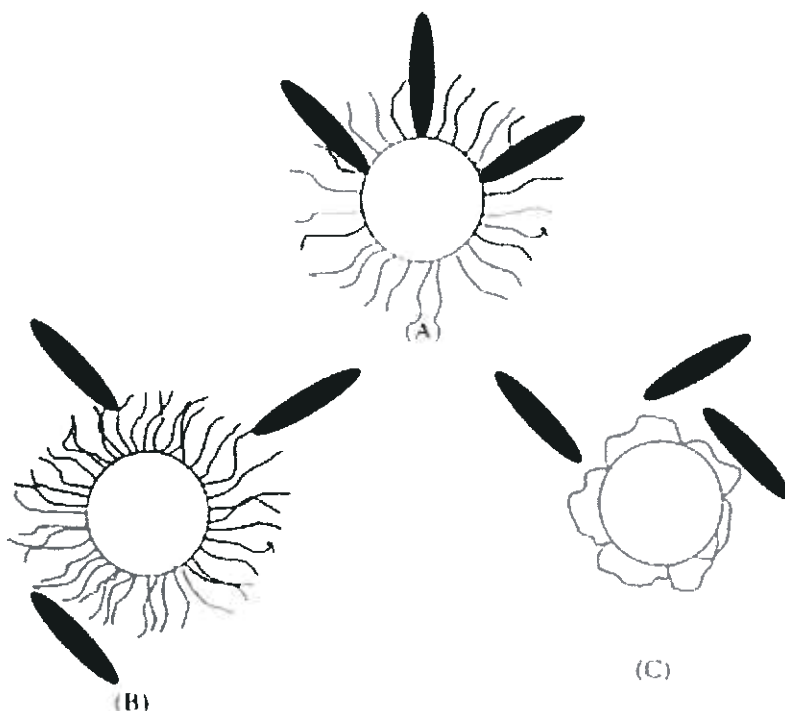
5.3.1 Povrchově modifikované nanočástice za použití PEG a PEO

Nanočásticím pokrytým PEG bylo věnováno mnoho pozornosti. Ochranné vlastnosti PEG na povrchu částic proti činnosti fagocytů závisí na hustotě pokrytí NP a molekulové hmotnosti použitého PEG (49). Vysoká hustota a dlouhé řetězce PEG jsou důležité pro nízkou adsorpci proteinu na povrch NP, tj. nízkou opsonizaci. Zajímavé je, že povrchová hustota hraje významnější roli při sterickém odpuzování a van der Waalsových interakcích než délka řetězce (50).

Vzdálenosti mezi PEG řetězci na povrchu NP jsou kritické a rozhodující pro míru navázání proteinu na jejich povrch. Například snížení vzdálenosti mezi PEG řetězci na povrchu částice z 6.2 na 5.1 nm významně snížila adsorpci apolipoproteinu a to o 90%. To také dokládá tu skutečnost, že hustota hydrofilních segmentů na povrchu je důležitá v procesu opsonizace. Ačkoliv další snižování vzdáleností již nemělo další vliv na adsorpci plazmových proteinů (51).

Na Obrázku 5-1 je schematicky znázorněn efekt hustoty a konformace PEG na opsonizaci (52).

Obrázek 5-1 Efekt PEG density a konformace na opsonizaci (52)



(A) opsonizace probíhá pokud je hustota PEG nízká

(B) opsonizace není možná za vyšší povrchové density PEG

(C) opsonizace není možná pokud se oba konce PEG účastní povrchové modifikace

5.3.2 Povrchově modifikované nanočástice za použití poloxameru a poloxaminu

Povrchová modifikace hraje roli při snižování vychytávání mononukleárním fagocytárním systémem (MPS uptake), tj. vychytávání NP z oběhu makrofágy, což vede ke snižování dostupnosti nanočástic v oběhu. Povrchově modifikované polystyrenové NP o velikosti 60 nm, které mají na povrchu navázaný poloxamin měly prokázanou prodlouženou dobu setrvání v oběhu a snížený uptake v játrech králíků v porovnání s NP o stejné velikosti bez povrchové modifikace (53, 54). Poloxamin je ve srovnání s poloxamerem efektivnější jako modifikátor povrchu a zabraňuje vychytávání NP v játrech králíků (55).

5.3.3 Cyklodextrin / karbohydrát modifikované nanočástice

Karbohydráty navázané na povrchu NP také zabraňují fenoménu MPS uptake (56).

Cyklodextrinové NP jsou využívány ve formulaci ve vodě těžko rozpustných léčivých látek pro perorální tak i parenterální aplikaci. Přítomnost cyklodextrinu v těchto NP významně

ovlivnila povrchové charakteristiky NP, zřejmě díky hydrofilním vlastnostem cyklodextrinu, také tyto NP mohou napomoci vyhnouti se MPS.

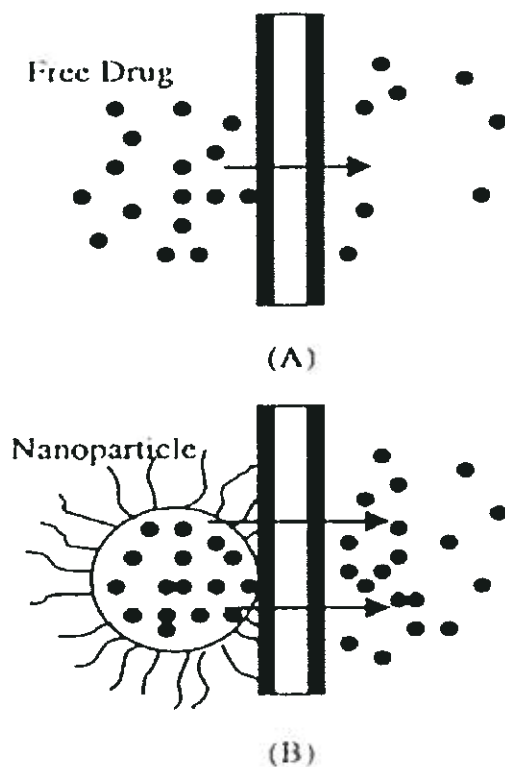
5.3.4 Nanočástice na povrchu modifikované polysorbátem – jejich prostupnost hematoencefalickou bariérou

Povrchově modifikované NP byly použity pro dodání protizánětlivých léčiv do centrálního nervového systému.

Zvýšení prostupnosti léčivých látek obsažených v NP přes hematoencefalickou bariéru je ovlivněno několika mechanismy; (a) navázáním NP na vnitřní stranu endothelia kapiláry v mozku, kde následně částice dodává léčivou látku na základě velkého koncentračního gradientu, čímž podporuje pasivní difuzi; (b) endoteliální uptake fagocyty (57).

Byl zkoumán vliv po navázání tenzidu na povrch NP na permeaci léčivé látky přes biologickou membránu. Byla pozorována zvýšená permeace NP, které měly na povrchu navázaný polysorbát-80, Obrázek 5-2 (57, 58).

Obrázek 5-2 Uptake léčivé látky přes biologickou membránu (57, 58)



(A) Uptake volné léčivé látky přes biologickou membránu

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

Ve snaze dopravit protinádorové léčivo pomocí NP do mozkové tkáně, bylo prokázáno, že koncentrace doxorubicinu v cílové tkáni byla zvýšena 60 –krát navázáním na polysorbátem-80

povrchově modifikované NP PBCA. Samotná léčivá látka neprostupuje hematoencefalickou bariérou. Polysorbátem-80 modifikované NP dosáhly mozkovou tkáň v intaktní formě a léčivá látka byla uvolněna po endocytóze nanočástic endoteliálními buňkami mozkových cév. V této studii bylo dosaženo vysoké koncentrace léčivé látky v mozku, což dává naději na zlepšení terapie mozkových nádorů (59).

6 Nanočástice jako nosiče proteinů a peptidů

NP jako nosiče (DDS - drug delivery systems) pro peptidy a proteiny mají v současnosti několik problémů a slabých stránek. Proteiny a peptidy jsou nestabilní v PLGA díky hydrofobicitě a aciditě PLGA (60). Dalším problémem je rychlé uvolnění z PLGA matrice. Nyní jsou zkoumány způsoby jak ovlivnit tyto negativní vlastnosti PLGA matric za pomoci hydrogelových NP (61, 62). V těchto studiích je hovězí sérový albumin (BSA) nejprve enkapsulován do PVA NP, které jsou začleněny do PLGA mikrosfér. Z této PLGA-PVA kompozitní NP byl uvolňován BSA po dobu 2 měsíců.

7 Nanomedicína - nanotechnologie aplikovaná v medicíně

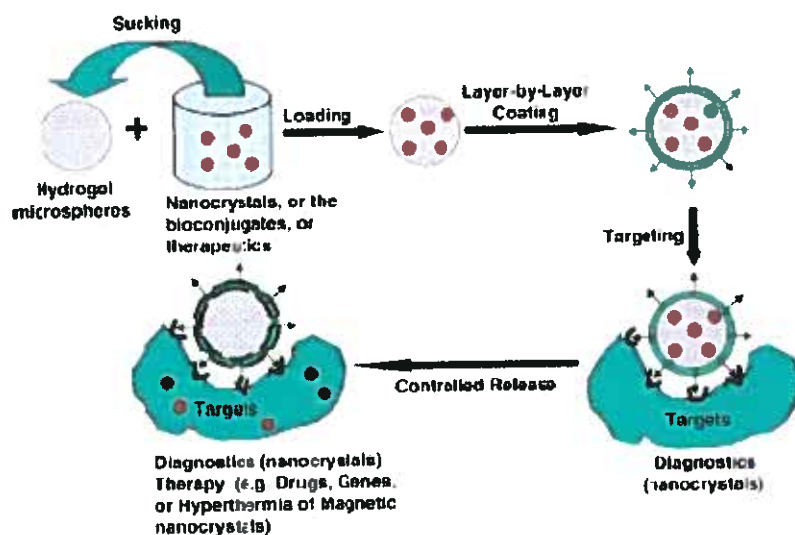
V této části je věnována pozornost několika možnostem využití nanočástic v současné medicíně.

Dva hlavní faktory způsobují, že se nanomateriály liší od ostatních materiálů: (a) větší relativní plocha povrchu a kvantový efekt. Se snižující se velikostí částic se více atomů nachází na povrchu než uvnitř částice. Například částice o velikosti 30 nm má 5% atomů na povrchu, 10 nm částice 20% a 3nm částice 50%. Tudíž nanočástice mají mnohem větší reaktivní povrch ve srovnání s většími částicemi. Vzhledem k tomu, že chemické reakce probíhají na povrchu a vzhledem k dostupné ploše nanočástic je patrné, že NP budou více reaktivní než stejný materiál, který obsahuje větší částice. Toho se současná medicína snaží využít pro cílené dodání léčiva včetně řízeného uvolňování s cílenou distribucí (targeted drug delivery including controlled release) (63).

7.1 Cílené dodání léčiva včetně řízeného uvolňování (Targeted drug delivery including controlled release)

Účelem cíleného působení a řízeného uvolňování léčiva je lepší management farmakokinetiky, farmakodynamiky, nescifické toxicity, imunogenicity a rozpoznání biologickým systémem za účelem zlepšení terapeutického efektu léčiva. Nové nosiče léčivé látky jako konjugáty NP- léčivá látka mohou být vyvinuty za účelem zlepšit jejich specifitu místa účinku, reakce na podnět a zvýšit kontrolu jejich degradace v těle, Obrázek 7-1 (64).

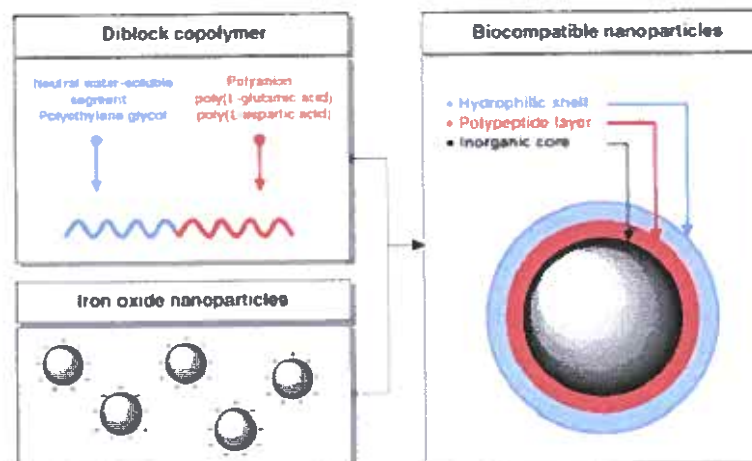
Obrázek 7-1 Nosiče léčivé látky jako konjugáty ,nanočástice- léčivá látka' (64)



Úspěšný NP systém má následující vlastnosti: optimální (dostatečnou) inkorporaci léčivé látky (drug loading), optimální uvolňování léčivé látky, dostatečnou stabilitu, nízkou toxicitu. NP jsou slibným řešením jako nosiče ve vodě těžko rozpustných léčiv. Pokud je taková léčivá látka enkapsulována v NP, může být tak dopravena na místo účinku a až tam uvolněna, aniž by byla předčasně z těla vyloučena nebo degradována. Tento princip také redukuje množství nežádoucích účinků, což je zvláště využitelné pro vysoce účinné léčivé látky, jako např. protinádorová léčiva.

Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, NP využívají polymery, které mají specifické fyzikálně-chemické vlastnosti, jako biodegradabilita, biokompatibilita nebo reaktivita na změny pH a teploty a tím umožňují design NP s různými funkcemi, příklad je uveden na Obrázku 7-2 (64).

Obrázek 7-2 Struktura nanočástice s různými funkcemi (64)



Anorganické jádro obsahující železo poskytuje možnosti MRI imaging, diblokový kopolymer je poskytuje hydrofilní obal a polypeptidovou vrstvu, která zprostředkovává navázání v cílové tkáni.

NP mohou být i řešením pro nové cesty podání léčiv, např. NP mohou řešit prostup léčivé látky hematoencefalickou bariérou, nebo poskytovat řešení pro jiné alternativní podání nových proteinových léčiv a vyhnout se jejich inaktivaci v gastrointestinálním traktu. NP a nanokapsle mohou chránit proteiny před inaktivací v gastrointestinálním traktu tím, že umožní prostup přes mukózu. Perorální podání by tudíž v budoucnosti mohlo být umožněno vhodnými NP.

Dále NP představují možnost, jak vylepšit dostupnost léčivé látky po nasálním a sublinguálním podání, stejně tak jsou dále vyvíjeny jako lékové formy umožňující systémové podání přes plíce. Ačkoliv úspěch podání proteinových léčiv přes plíce omezen díky přítomnosti proteas a makrofágů v plicích, stejně jako je jejich dostupnost snížena díky bariéře mezi kapilárním řečištěm a alveolárním vzduchem.

Řízené uvolňování léčiva může být kontinuální nebo pulzní. Kontinuální uvolňování je funkcí polymeru, který uvolňuje léčivou látku v kontrolovaném režimu díky difuzi z polymeru nebo časově závislé degradaci polymeru. Pulzní uvolňování je preferováno oproti kontinuálnímu, protože toto lépe simuluje způsob jakým tělo přirozeně uvolňuje hormony jako např. insulin. Tento způsob může být dosažen tím, že nosič na nějž je léčivá látka navázána reaguje na specifický stimul (změnu pH, teploty).

Dlouhodobým cílem vývoje DDS (drug delivery system) je možnost cíleně zasáhnout vybrané buňky / receptory v těle.

Jednou z možností využití bioresorbovatelných polymerů je v regenerativní medicíně. Takové biomateriály by reagovaly pozitivně na změny v bezprostředním okolí, stimulovaly specifické regenerativní procesy na molekulární úrovni, řídily buněčnou proliferaci, diferenciaci buněk a tvorbu a organizaci extracelulární matrice.

7.2 Nanočástice a jejich využití v terapii nemocí dýchacích cest

V terapii bronchiálního astmatu byly provedeny studie využívající NP. Byly vyvíjeny NP, které by měly vlastnosti antagonisty P-selektinu se silnými protizánětlivými účinky. P-selektin je zodpovědný za rozvoj a progresi peribronchiálního zánětu v alergickém onemocnění dýchacích cest. Nejdříve byl vytvořen konstrukt, který by se efektivně vázal na P-selektin. Tento konstrukt byl tvořen částicemi, která měla na povrchu ligandy, které se vázaly na elementy, které zprostředkovávaly adhesi P-selektinu na ligandy P-selektin glykoprotein ligand-1. Aktivita této NP byla testována in-vitro, tak i in-vivo a byl prokázán její účinek (65)

Další studie byla provedena s chitosan/interferon (INF) – γ pDNA NP. Bylo prokázáno, že tyto nanočástice mohou cíleně působit v místě zánětu v případě alergického onemocnění dýchacích cest a zároveň, že intranazální aplikace těchto NP může efektivně redukovat alergenem indukované astma v experimentálním modelu. (66).

7.2.1 Pulmonální tuberkulóza

Použití NP v pulmonální tuberkulóze bylo zkoumáno za účelem redukce frekvence podávání antituberkulotik. Byly připraveny NP z kopolymeru kyselin DL mléčné a glykolové (PLG) s enkapsulovanými antituberkulotiky rifampicin, isoniazid a pyrazinamide. Po jednom perorálním podání těchto NP byly léčiva isoniazid a pyrazinamid nalezeny v krevním oběhu po dobu 9 dní a rifampicin po dobu 6 dní, zatímco terapeutické koncentrace v tkáni byly přítomny po dobu 9 až 11 dní. Tyto výsledky vedou k závěru, že podání NP je výhodné a vede k redukci frekvence podání léčiv (67).

7.3 Strategie pro očkování

NP mohou být také využity ke stimulaci dlouhotrvajících a ochranných imunitních odpovědí na respirační virové infekce. Experimentálně byly použity NP z polymléčné kyseliny povrchově modifikované polyethylenglykolem a tetanovým toxoidem (68). Dále byly použity chitosan-DNA nanosféry, které obsahovaly plazmid DNA kódující antigeny respiračního syncytiálního viru (RSV) (69).

8 Shrnutí teoretické části

Použití biodegradabilních polymerů pro řízené uvolňování léčiva je v současnosti již dobře prozkoumáno. Přesto je nyní na trhu pouze omezené množství léčivých přípravků, které by využívaly této technologie (např. Lupron[®] Depot). Modifikace povrchu NP je významným faktorem při optimalizaci NP a tím zprostředkování cíleného působení léčivé látky v cílové tkáni a dosažení prodlouženého setrvání v krevním oběhu. Z hlediska polymerní chemie je nutné stále hledat nové polymery s vyváženými hydrofilními a hydrofobními vlastnostmi.

9 Cíl práce

V rámci výzkumného zaměření katedry farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové bylo zadáno k řešení téma, které je součástí výzkumných aktivit spojených s formulací medikovaných nanočástic. Zadání experimentálně zaměřené rigorózní práce je možno členit do následujících úseků:

- Nanočástice bylo navrženo připravovat emulzní metodou s rozdělováním rozpouštědla do vnější hydrofilní fáze.
- Dřívější zkušenosti s kyselinou poly(DL-mléčnou) jako nosičem bylo snahou rozšířit o další nosiče oligoesterového typu s lineárním řetězcem, případně s větvenou konstitucí molekuly.
- Zájem byl hledat vhodnou koncentraci lecitinu jako již dříve nalezeného účinného emulgátoru. Osvědčená kombinace lecitinu s neionickým tenzidem byla aplikována v podobě poloxameru nebo polysorbátu.
- Nově byly navrženy vysoce těkavé estery kyseliny octové a mravenčí jako alternativa méně toxických rozpouštědel k rozpouštědlům typu chlorovaných uhlovodíků.
- Terbinafin je léčivo, která by mohlo mít vyšší účinnost, kdyby bylo schopno pronikat do buněk v prolongované uvolňované formě z nanočástic. Byly formulovány nanočástice s 10% terbinafinem.
- Pasivní targeting je ovlivněn především velikostí částicových systémů, jednak parametry jejich povrchů. Proto byly jako kvalitativní znaky určeny velikost nanočástic a jejich zeta potenciál.

10 Principy měření velikosti nanočástic

10.1 Dynamický rozptyl světla

Zetasizer provádí měření velikosti částic a jejich zeta potenciálu pomocí procesu, který se nazývá dynamický rozptyl světla (DLS-dynamic light scattering). DLS proměřuje Brownův pohyb, jehož rychlost souvisí s velikostí částic. Částice prochází laserovým paprskem, rozptyluje záření všemi směry. Detektor umístěný v našem případě na 173° analyzuje dopadající záření. Kolísající intenzita rozptýleného dopadajícího záření se zobrazuje na detektoru jako soustava černobílých skvrn. Bílé skvrny jsou záznamem pro dopadající rozptýlené záření ve stejné fázi, černé skvrny jsou způsobeny vzájemným vyrušením fází, viz.obr.10-1. Detektor zaznamenává rychlost pohybu skvrn na stínítku v čase a přes korelační funkci a Stokes-Einsteinovu rovnici přepočítává rychlost pohybu částic na jejich velikost.

Obrázek 10-1 Skvrna zobrazující Brownův pohyb

Brownův pohyb je pohyb částic v důsledku náhodných srážek s molekulami kapaliny. Hlavní rys Brownova pohybu je, že malé částice se pohybují rychleji a velké částice naopak pomaleji. Vztah mezi velikostí částic a rychlostí Brownova pohybu je definován jako Stokes-Einsteinův zákon. Tak jako jsou částice konstantně v pohybu, tak se skvrna jeví také jako se pohybující. Zetasizer nano systém měří poměr intenzity kolísání skvrny a počítá velikost částic.

Stokes-Einsteinův zákon:

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

η ... viskozita

k ... boltzmanova konstanta

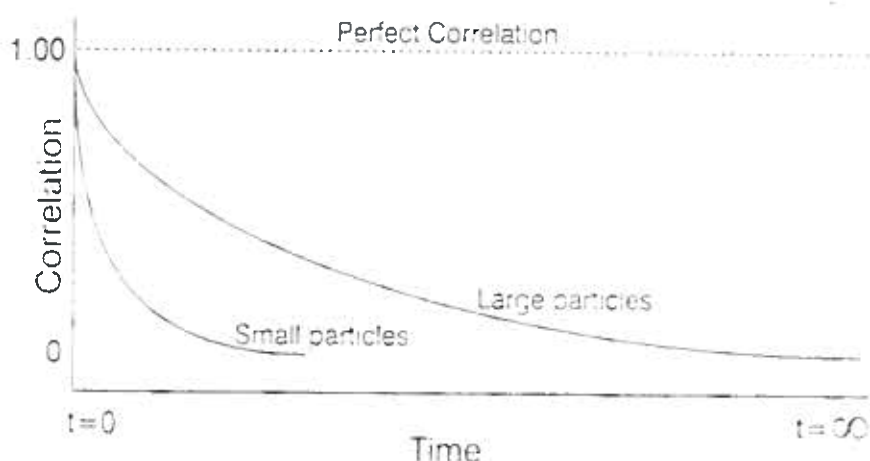
T ... teplota

D ... difúzní koeficient

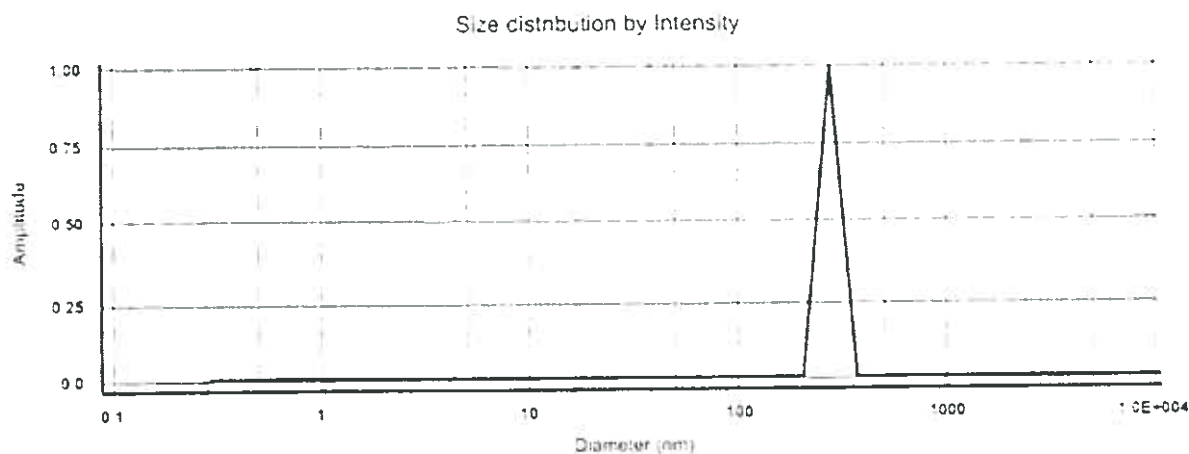
Zetasizer měří intenzitu kolísání laserového paprsku a tato intenzita je přepočítávána na velikost částic uvnitř vzorku. Uvnitř přístroje je součást nazývaná digitální korelátor. Korelátor je program porovnávající kolísání intenzity světelného signálu v časovém období.

10.1.1 Korelační funkce

Jestliže jsou měřeny velké částice, pohybující se pomalu, intenzita porovnávací skvrny bude také kolísat pomalu. Jestliže jsou měřeny malé částice, pohybující se rychle, intenzita porovnávací skvrny bude také kolísat rychle. Graf ukazuje korelační funkci pro velké a malé částice, viz.obr.10-2. Rychlost poklesu korelační funkce je závislá na velikosti částic, pokles je strmější pro malé částice.

Obrázek 10-2 Graf korelační funkce

Po změření korelační funkce přístrojem je tato informace použita pro výpočet distribuce velikosti částic. Zetasizer, jeho software, používá k výpočtu algoritmus, který převádí strmost poklesu korelační funkce na distribuci velikostních skupin částic, tj. velikostní distribuci. Typický graf distribuce velikostí je ukázán na obr.10-3. Na ose X je uvedena distribuce skupin částic o stejné velikosti, zatímco osa Y ukazuje relativní intenzitu rozptýleného světla. Tento graf se proto označuje jako distribuce podle intenzity.

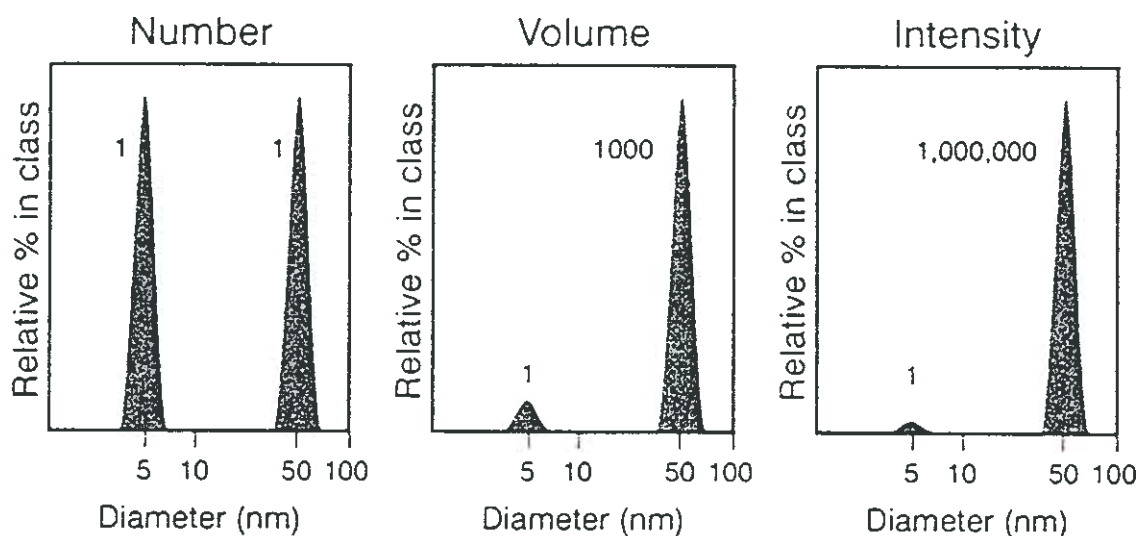
Obrázek 10-3 Graf distribuce velikostí částic

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

10.1.2 Číselná, objemová a intenzitní distribuce

Zde je popsán rozdíl mezi intenzitní, objemovou a číselnou distribucí. Musíme si představit vzorek obsahující pouze 2 velikosti částic (např. 5 nm a 50 nm), se stejným poměrným zastoupením obou velikostí, viz. obr. 10-4. První graf ukazuje výsledky jako číselnou distribuci. Oba píky jsou stejné velikosti (1:1) jako se rovnají počty částic. Druhý graf ukazuje výsledky objemové distribuce, oblast píku pro částice velké 50 nm je tisíckrát větší než pík pro částice velké 5 nm. Takže objem 50 nm částic je tisíckrát větší než 5 nm částic, ve vzorci pro výpočet objemu je třetí mocnina poloměru. Třetí graf ukazuje výsledky distribuce podle intenzity paprsku laseru. Oblast píku pro 50 nm částice je milionkrát větší než pro 5 nm částice. Je to proto, že velké částice rozptylují mnohonásobně více světla než částice malé.

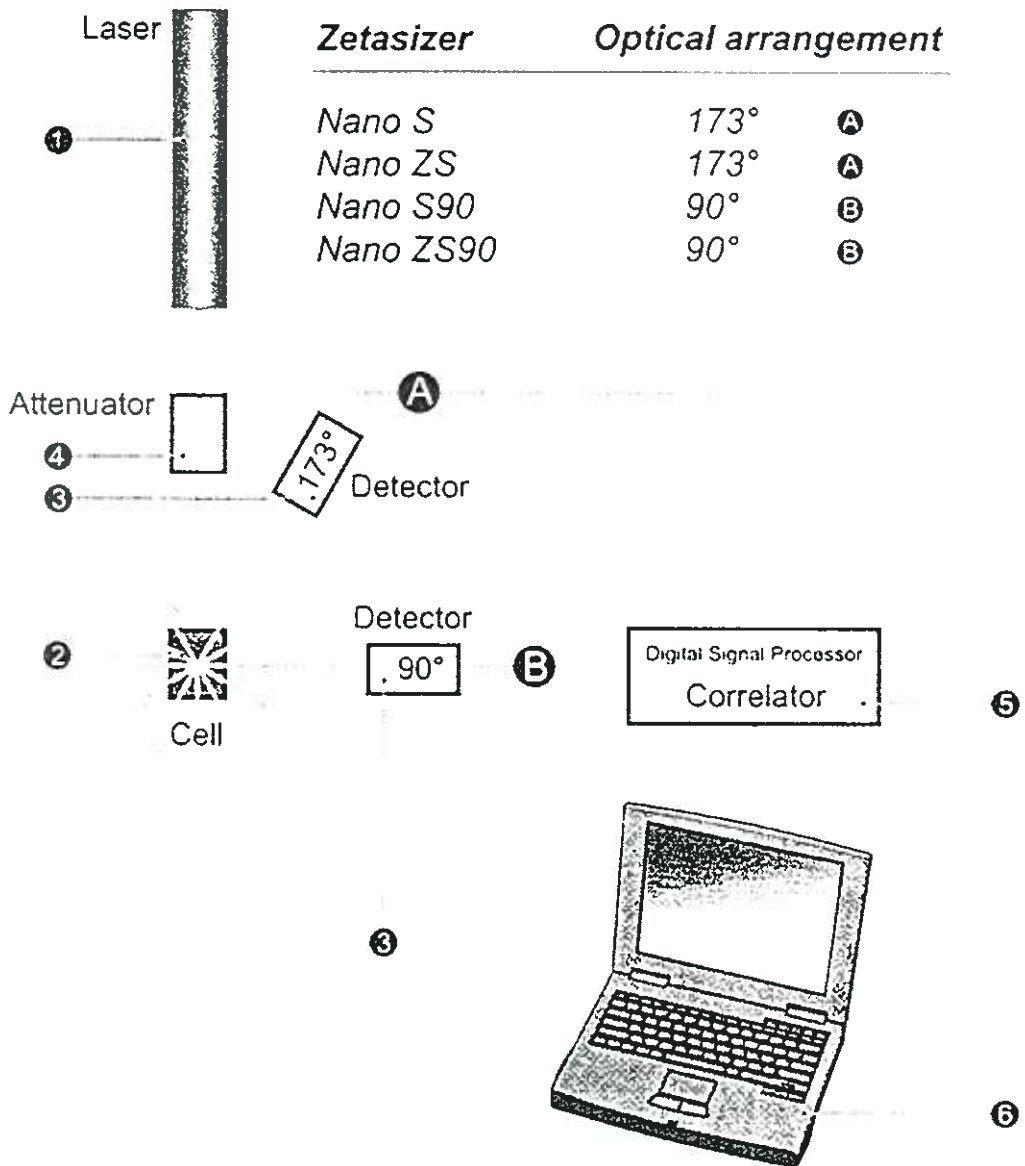
Obrázek 10-4 Graf číselné, objemové a intenzitní distribuce



10.1.3 Měření velikosti částic

Typický DLS systém zahrnuje šest hlavních komponent, viz. obr. 10-5. První je laser(1), je používán jako světelný zdroj k ozařování vzorku částic uvnitř kyvety(2). Většina světelného paprsku prochází rovně vzorkem, část záření je rozptýlená částicemi uvnitř vzorku. Další je detektor(3), používaný k měření intenzity rozptýleného světla. Částice rozptylují světlo ve všech směrech, tím je možné teoreticky umístit detektor do téměř jakékoliv polohy, v které bude detekovat rozptýlené záření.

Obrázek 10-5 DLS systém



Jestliže je detekováno příliš mnoho světla, detektor se přetíží. Proti přetížení je zde tzv. zeslabovač(4), požívaný k redukci intenzity světla laseru, který redukuje sílu rozptýleného záření. Intenzita signálu z detektoru přechází na digitální signál v přístroji nazývaný korelátor(5), který srovnává rozptylovanou intenzitu v následujících časových intervalech k odvozování poměru kolísající intenzity. Tyto korelační informace dále prochází přes počítač(6), kde se data analyzují a odvozuje se velikost.

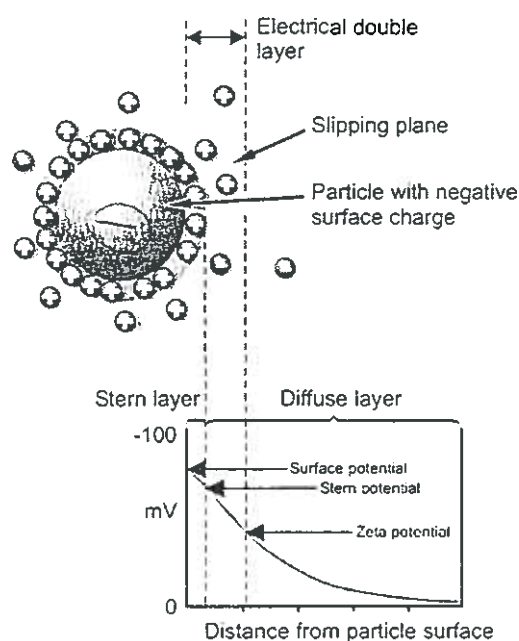
10.2 Měření a principy zeta potenciálu

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

10.2.1 Teorie zeta potenciálu

Zetasizer měří elektroforetickou pohyblivost a poté k výpočtu zeta potenciálu používá Henryho rovnici. Okolo částic existuje tzv. elektrická dvojrůžva. První vrstva na bezprostředním povrchu částice, kde jsou ionty pevně vázány, se nazývá „Sternova vrstva“. Druhou vrstvu tvoří difúzní část, kde jsou ionty připojeny méně pevně, viz obr. 10-6. Když se částice pohybuje, tyto ionty dvojrůžvy se pohybují spolu s ní. Potenciál nacházející se mezi pohybující se částicí s elektrickou dvojrůžvou a okolím se nazývá zeta potenciál.

Obrázek 10-6 Zeta potenciál

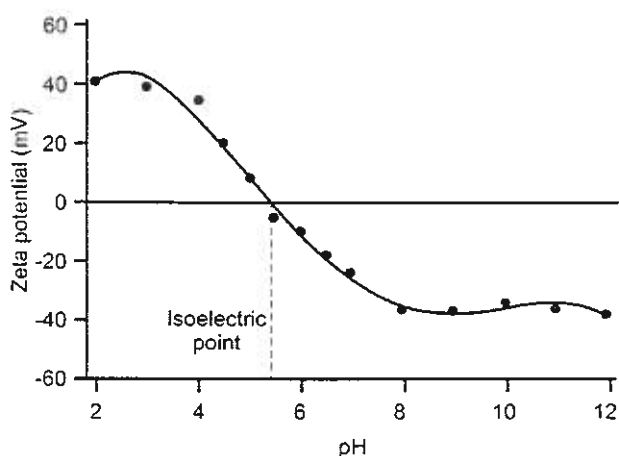


Zeta potenciál je důležitý pro pochopení potenciálové stability a v teorii koloidních systémů. Koloidní a také makrodisperzní systém je definován jako soustava složená nejméně ze dvou fází, látky dispergované a disperzního media. Rozměr koloidních částic se pohybuje v rozmezí 1nm až 1 μ m. V těchto případech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

zeta potenciálem, do které přidáme alkalickou látku, částice mají tendenci získat větší negativní náboj. Když přidáme kyselinu do této suspenze, negativní náboj bude snížen až neutralizován. Další přidání kyseliny zapříčiní vzestup pozitivního náboje. Proto zeta potenciál bude pozitivní v nízkém pH a negativní ve vysokém pH.

Hodnota, ve které zeta potenciál je roven nule se nazývá **isoelektrický bod**, viz.obr.10-7. V tomto bodě je koloidní systém nejméně stabilní.

Obrázek 10-7 Isoelektrický bod



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

10.2.2 Elektroforéza

Jestliže v elektrolytu použijeme elektrické pole, nabitě částice suspendované v elektrolytu jsou přitahovány směrem k elektrodám opačného náboje. Viskózní síly brzdí pohyb částic. Rovnováha je dosažena mezi těmito dvěma opačnými silami, částice se pohybují se stálou rychlostí. Rychlost pohybu částic závisí na následujících faktorech: intenzitě elektrického pole nebo gradientu napětí, dielektrické konstantě media, viskozitě media, zeta potenciálu.

Rychlost částic v elektrickém poli je obvykle popisována jako elektroforetická pohyblivost. Pomocí této hodnoty a na základě rovnice Henryho zákona můžeme vypočítat zeta potenciál částic.

Henryho rovnice:

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

z.....zeta potenciál

U_Eelektroforetická pohyblivost

ϵdielektrická konstanta

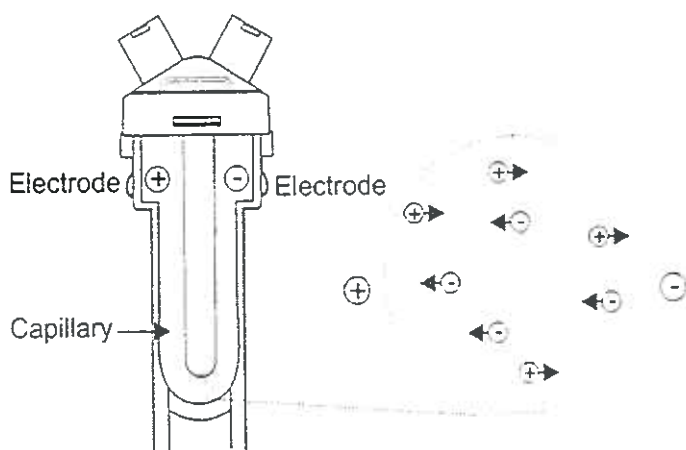
ηviskozita

$f(Ka)$...Henryho funkce

10.2.3 Měření elektroforetické pohyblivosti

Základ klasické mikroelektroforézy je kyveta s elektrodami, viz.obr.10-8. Částice se pohybují směrem k elektrodám opačného náboje, jejich rychlost je měřena a vyjádřena v jednotce silového pole jako jejich pohyblivost. Technika používaná v měření rychlosti v Malvernově zetasizeru je laserový Dopplerův rychloměr.

Obrázek 10-8 Kyveta s elektrodami

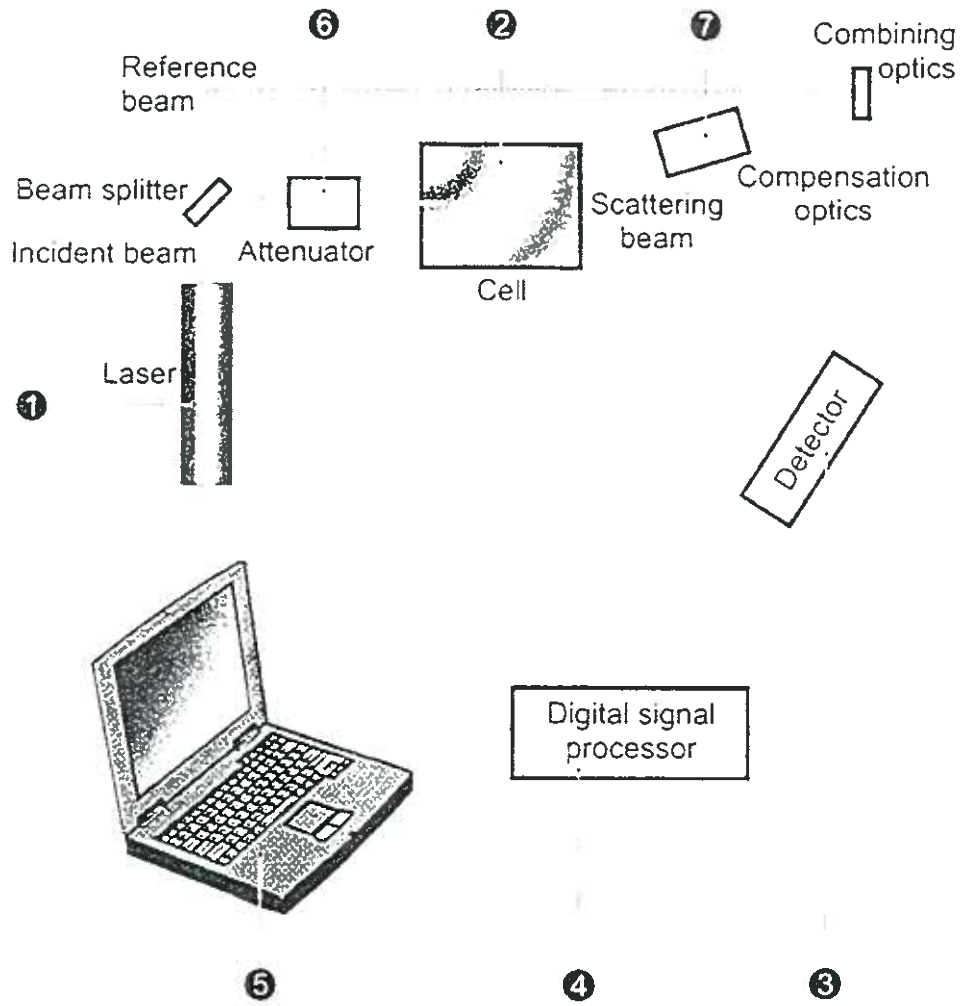


10.2.4 Zetasizer, nano a zeta-potenciálové měření

Je zde používáno šest základních komponent viz obr.10-9, hlavní je laser(1), který zdrojem světelného záření. Během měření zeta potenciálu je zdroj světla rozštěpen na paprsek pro měření a srovnávací paprsek. Srovnávací paprsek je nezbytný v metodě měření zeta potenciálu. Laserový paprsek prochází středem vzorku kyvety(2) a rozptýlený paprsek je měřen pod úhlem 17°. Po aplikaci elektrického pole pohybující se částice způsobí kolísání intenzity detekovaného světla, frekvence takového kolísání je proporcionální k velikosti částice. Další součást je detektor(3), který posílá informace do digitálního signálního procesoru(4). Tyto informace poté prochází počítačem(5), kde je Zetasizer nano software produkující frekvenční spektrum. Z frekvenčního spektra je kalkulována elektroforetická mobilita a tudíž též zeta potenciál.

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

Obrázek 10-9 Princip měření zeta potenciálu



11 Experimentální část

11.1 Použité přístroje

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

Váhy Kern 440-33N max 200g, d=0,01g

Váhy Kern 440-47 max 1200g, d=0,1g

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

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

Malver Instruments, UK Zetasizer ZS 90

Ultrazvuk Sonorex super 10P Bandelin

11.2 Chemikálie

Kyselina Poly(D,L mléčná), KFT UK FaF Hradec Králové

3D, KFT UK FaF Hradec Králové

PLGA-2, KFT UK FaF Hradec Králové

PEU-1, KFT UK FaF Hradec Králové

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

Chloroform (CHCl₃), Lach-Ner s.r.o. Neratovice

Destilovaná voda

Lecitin L- α lecitin typ II S, Sigma Aldrich

Polysorbát, Lachema a.s. Neratovice

Poloxamer 407, ICI Surfactants UK

Terbinafin hydrochlorid, Zentiva a.s.

Ethylacetát, Lachema a.s. Neratovice

Methylacetát, Lachema a.s. Neratovice

Methylformiát, Lachema a.s. Neratovice

11.3 Metoda přípravy nanočástic

Metoda využívá extrakci a odpařování rozpouštědla (viz. Teoretická část). Tato metoda je založena na principu přípravy emulze typu olej ve vodě. Ve vnitřní fázi se nachází roztok polymeru, popřípadě polymeru a léčivé látky – v našem případě byl použit jako LL terbinafin hydrochlorid. Soustava se míchá, tím jsou kapky vnitřní fáze v neustálém pohybu. Rozpouštědlo přechází do vodné fáze, odkud se postupně odpařuje. Ve vnitřní fázi zůstává polymer, popřípadě polymer a LL, a částice se stávají pevnými. Částice byly připravovány z následujících polymerů (jejich roztoku o koncentraci 1%): polymeru kyseliny poly DL-mléčné (PDLLA), PLGA-2, PEU-1 a 3D. Jako rozpouštědla jsme použili chloroform (CHCl_3), dichlormethan (DCM), směs CHCl_3 s DCM 1:1, methylacetát (MA), ethylacetát (EA), směs MA s EA 1:1, methylformiát (MF), směs MA s MF 1:1. Jako emulgátor byl zkoumán lecitin (L), polysorbát (Pso), směs L (0.75%) s Pso (0.25%), poloxamer 407 (Px407), směs L (0.75%) s Px407 (0.25%). Samotné emulgátory byly zkoumány o různých koncentracích - 0.25%, 0.5%, 0.75% a 1%.

11.3.1 Příprava vodné (vnější) fáze

Nejprve jsme navázili na analytických vahách potřebné množství emulgátoru, popřípadě směs dvou emulgátorů. Toto množství jsme rozpustili ve vodě. V případě lecitinu jsme rozpouštění urychlili krátkým (asi 30 sekundovým) zahřáním v mikrovlnné troubě.

11.3.2 Příprava organické (vnitřní) fáze

Na analytických vahách jsme navázili potřebné množství příslušného polymeru (PDLLA, PLGA-2, PEU-1 nebo 3D) a umístili jej na dno skleněné lahvičky s uzávěrem, přidali jsme potřebné množství rozpouštědla k přípravě 1% roztoku polymeru.

11.3.3 Příprava nanočástic

Do kádinky s vodnou fází jsme přidali 1 g 1% organické fáze. Tuto směs jsme umístili na homogenizátor a 1 až 5 minut jsme homogenizovali na stupni 6 (tzn. 26000 otáček/min). Po ukončení homogenizace jsme roztok rychle přelili do předem připravené kádinky se 100 ml destilované vody. Kádinku jsme umístili na magnetickou míchačku na dobu 2-3 hodin (do odpaření rozpouštědla). V případě použití MA a EA byly částice stabilizovány do 1 hodiny. Hotové částice jsme měřili na Zetasizeru (jejich velikost a zeta potenciál). Výsledky jsme si zaznamenávali a porovnávali jsme částice vzniklé z různých polymerů, dále jsme zkoumali vliv použití různých emulgátorů, jejich různých koncentrací a také vliv použitého rozpouštědla na velikost částic.

11.3.4 Měření velikosti částic

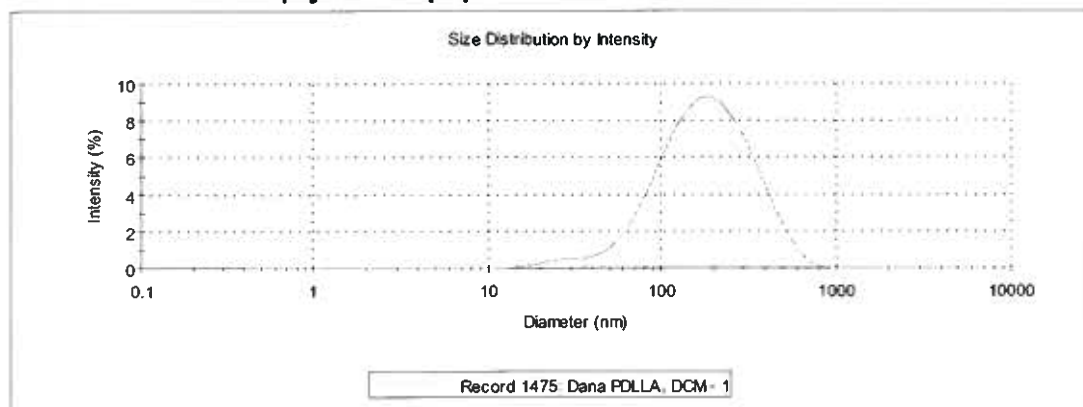
Vzorek jsme naplnili do speciální kyvety určené právě pro měření v Zetasizeru a měřili velikost částic. Stejný vzorek byl použit pro měření zeta potenciálu.

Jak bylo zmíněno již dříve základní distribuční velikost vytvořená DLS je distribuce intenzity, tato může být převedena i na objemovou distribuci. Tato objemová distribuce může být také

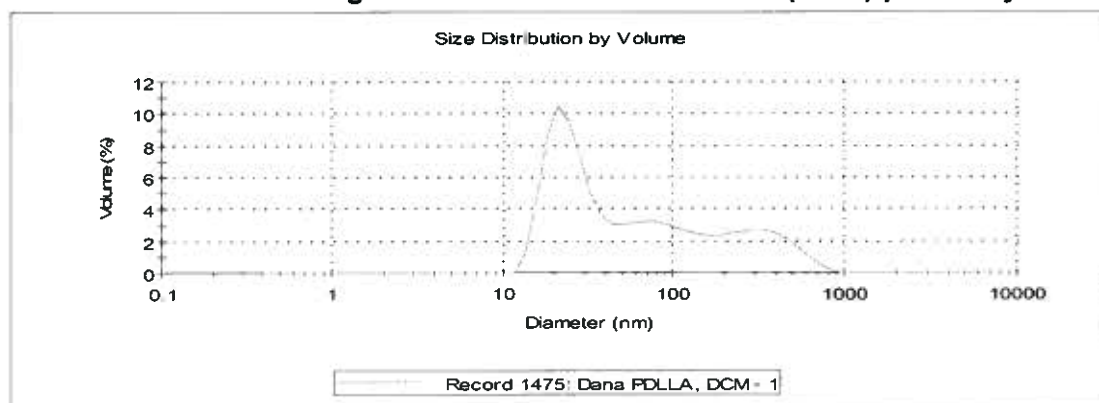
dále převedena na číselnou distribuci. Číselná distribuce v sobě násobí chyby z distribuce intenzity.

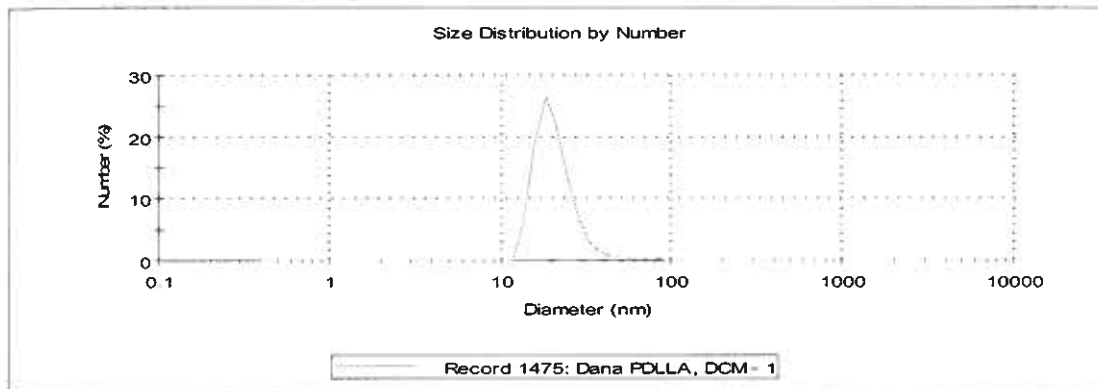
Přístroj zobrazuje velikostní distribuci. Na ose X je zobrazená distribuce třídy velikostí a na ose Y je zobrazená relativní intenzita rozptýleného světla (viz následující grafy)

Obrázek 11-1 Ukázka grafu distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku



Obrázek 11-2 Ukázka grafu distribuce velikosti částic(v nm) podle objemu

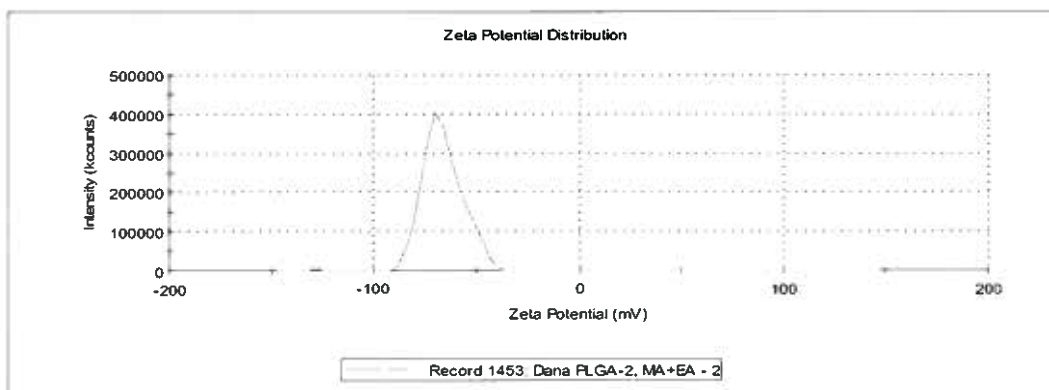


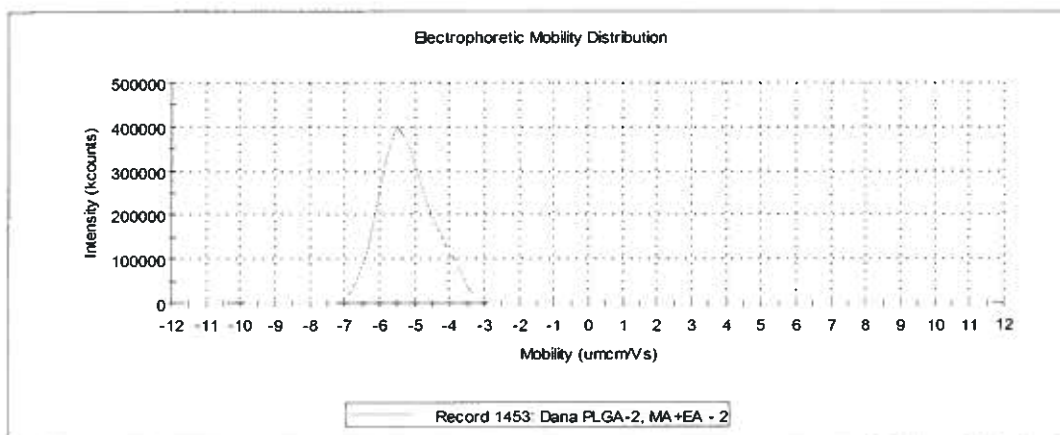
Obrázek 11-3 Ukázka grafu velikosti částic podle číselné distribuce

11.3.5 Měření zeta potenciálu částic

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

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

Obrázek 11-4 Ukázka grafu distribuce zeta potenciálu

Obrázek 11-5 Ukázka grafu distribuce elektroforetické mobility

11.3.6 Příprava nanočástic z různých polymerů

Byly testovány 2 různé vnější fáze - směs lecitinu a Pso a směs lecitinu a Px407. Nanočástice byly postupně připraveny v těchto dvou vnějších fázích za použití polymerů: PDLLA, PLGA-2, PEU-1 a 3D.

0.75 % lecitin + 0.25% Pso + 1% polymer v DCM

Table 11-1 Roztok 0.75 % lecitin + 0.25% Pso (vnější fáze)

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

0.75 % lecitin + 0.25% Px407 + 1% polymer v DCM

Table 11-2 Roztok 0.75 % lecitin + 0.25% Px407 (vnější fáze)

Látka	Množství
Lecitin	0,375 g
Px407	0,125g
Destilovaná voda	49,50 g

Table 11-3 Roztok 1% polymeru v DCM(vnitřní fáze)

Látka	Množství
Polymer ¹	0,1 g
DCM	9,9 g

¹Pro přípravu 1% roztoku polymeru jsme použili postupně polymer PDLLA, PLGA-2, PEU-1 a 3D.

11.3.6.1 Výsledky

Výsledky jsou presentovány v tabulkách 11-4 a 11-5 a v příslušném grafu.

Table 11-4 0.75% lecitin + 0.25% Pso + 1% polymer v DCM

Polymer	Velikost částic [nm]		Velikost částic [nm] průměr	Zeta potencial [mV]		Zeta potencial [mV] průměr
	1. měření	2. měření		1. měření	2. měření	
3D	189	174.8	181.9	-63.75	-67.51	-65.63
PLGA-2	177.9	186.4	182.2	-65.71	-64.08	-64.90
PEU-1	176	177.6	176.8	-66.55	-64.69	-65.62
PDLLA	247.7	206.7	227.2	-63.51	-64.65	-64.08

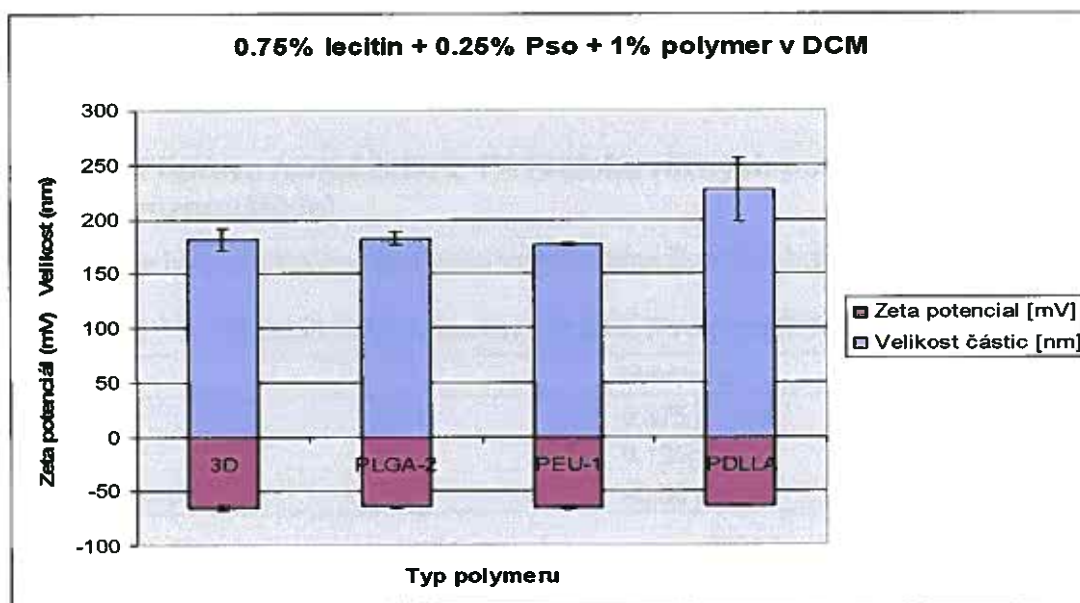
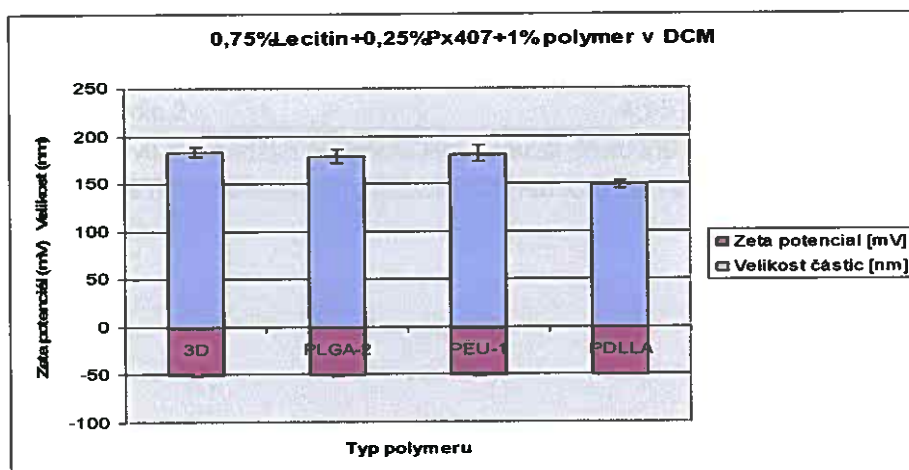


Table 11-5 0.75% lecitin + 0.25% Px407 + 1% polymer v DCM

Polymer	Velikost částic [nm]	Velikost částic [nm]	Velikost částic [nm]	Zeta potencial [mV]	Zeta potencial [mV]	Zeta potencial [mV]
	1. měření	2. měření	průměr	1. měření	2. měření	průměr
3D	187.3	180.1	183.7	-51.32	-50.75	-51.04
PLGA-2	173.7	183.9	178.8	-50.48	-51.71	-51.10
PEU-1	187.7	176	181.85	-51.24	-49.13	-50.19
PDLLA	146.5	151.7	149.1	-50.72	-49.65	-50.19



11.3.7 Příprava nanočástic z 1% roztoku různých polymerů za použití různých rozpouštědel

Nanočástice byly připraveny za použití vnější vodné fáze obsahující 0.75 % lecitin + 0.25% Pso

Table 11-6 Roztok 0.75 % lecitin + 0.25% Pso (vnější fáze)

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

Jako vnitřní fáze byl připraven 1% roztok polymeru (PDLLA, PLGA-2, PEU-1 nebo 3D) v rozpouštědle

Table 11-7 **Roztok 1% polymeru v rozpouštědle (vnitřní fáze)**

Látka	Množství
Polymer ¹	0,1 g
Rozpouštědlo ²	9,9 g

¹Pro přípravu 1% roztoku polymeru jsme použili postupně polymer PDLLA, PLGA-2, PEU-1 a 3D.

²Jako rozpouštědlo jsme použili DCM, CHCl₃, MA, MF

V případě směsi rozpouštědel byl roztok připraven následovně

Table 11-8 **Roztok 1% polymeru ve směsi rozpouštědel (vnitřní fáze)**

Látka	Množství
Polymer ¹	0,1 g
Rozpouštědlo 1 ²	4,95 g
Rozpouštědlo 2	4,95 g

¹Pro přípravu 1% roztoku polymeru jsme použili postupně polymer PDLLA, PLGA-2, PEU-1 a 3D.

²Jako směs rozpouštědel jsme použili DCM+CHCl₃, MA+MF, MA+EA

11.3.7.1 Výsledky

Výsledky jsou presentovány v následujících tabulkách a jim odpovídajících grafech.

Table 11-9 0.75% lecitin + 0.25% Pso + 1% PDLLA v rozpouštědle

Rozpouštědlo	Velikost částic [nm] 1. měření	Velikost částic [nm] 2. měření	Velikost částic [nm] průměr	Zeta potenciál [mV] 1. měření	Zeta potenciál [mV] 2. měření	Zeta potenciál [mV] průměr
DCM	247.7	206.7	227.2	-63.51	-64.65	-64.1
DCM+CHCl ₃	229.4	224.5	227	-61.85	-70.34	-66.1
CHCl ₃	244.6	235.7	240.2	-64	-62.75	-63.4
MA	286.1	196.4	241.3	-72.85	-66.19	-69.5
MF	186	222.2	204.1	-40.33	-41.04	-40.7
MA+MF ¹	360.5	258.4	309.5	-47.24	-47.13	-47.2
MA+EA	189.2	165.1	177.2	-65	-69.46	-67.2

¹za použití směsi těchto rozpouštědel a tohoto polymeru se opakovaně nedařilo vyrobit vzorek o konsistentní kvalitě nanočástic

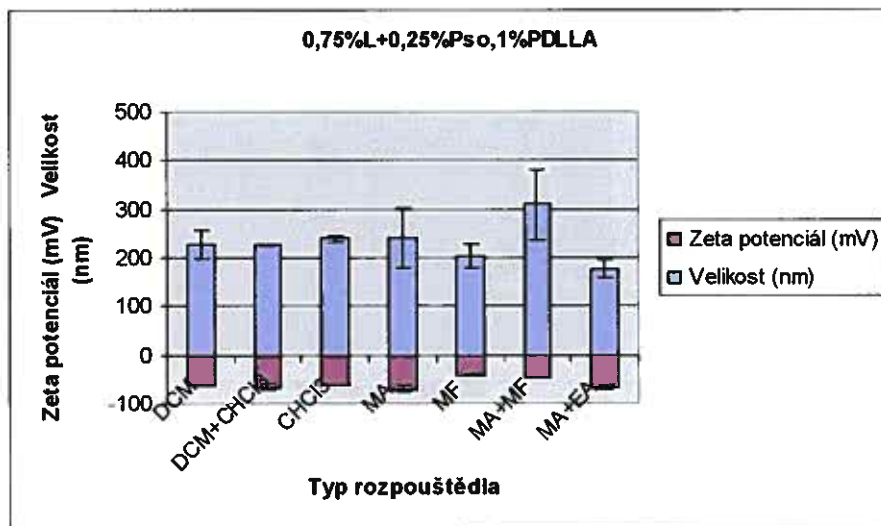


Table 11-10 0.75% lecitin + 0.25% Pso + 1% 3D v rozpouštědle

Rozpouštědlo	Velikost částic [nm]	Velikost částic [nm]	Velikost částic [nm]	Zeta potencial [mV]	Zeta potencial [mV]	Zeta potencial [mV]
	1. měření	2. měření	průměr	1. měření	2. měření	průměr
DCM	189	174.8	181.9	-63.75	-67.51	-65.6
DCM+CHCl ₃	218.3	228.8	223.6	-63.9	-67.66	-65.8
CHCl ₃	246.9	230.9	238.9	-63.27	-64.29	-63.8
MA	285.6	224.1	254.9	-70.87	-76.26	-73.6
MF	231.5	209.5	220.5	-41.04	-39.15	-40.1
MA+MF ¹	441.1	322.3	381.7	-47.45	-43.62	-45.5
		178.8			-41.51	
MA+EA	238.7	252.8	245.8	-68.84	-67.32	-68.1

¹za použití směsi těchto rozpouštědel a tohoto polymeru se opakovaně nedařilo vyrobit vzorek o konsistentní kvalitě nanočástic

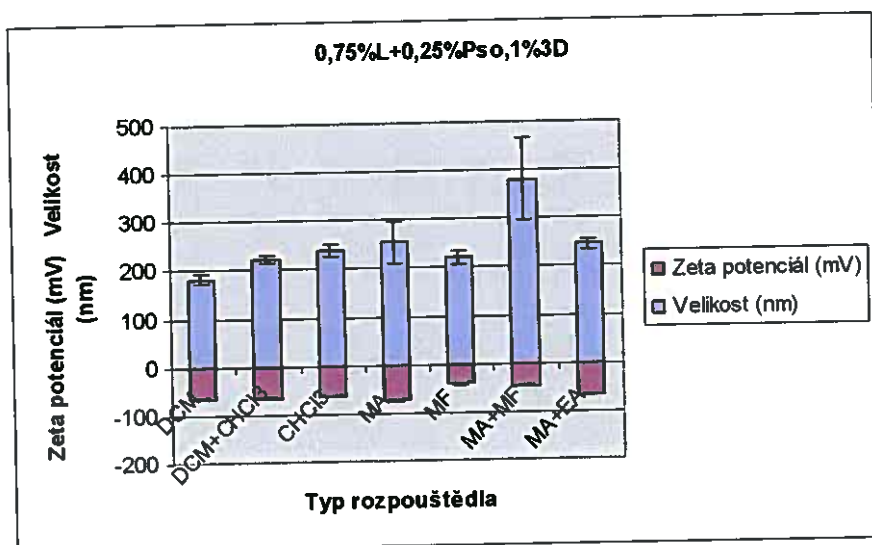


Table 11-11 0.75% lecitin + 0.25% Pso + 1% PLGA-2 v rozpouštědle

Rozpouštědlo	Velikost částic [nm]	Velikost částic [nm]	Velikost částic [nm]	Zeta potencial [mV]	Zeta potencial [mV]	Zeta potencial [mV]
	1. měření	2. měření	průměr	1. měření	2. měření	průměr
DCM	177.9	186.4	182.15	-65.71	-64.08	-64.9
DCM+CHCl ₃	209	207.5	208.3	-59.15	-64.73	-61.9
CHCl ₃	216.2	267.3	241.8	-63.47	-63.09	-63.3
MA	240.1	229.3	234.7	-69.27	-63.92	-66.6
MF	170.4	184.6	177.5	-40.67	-41.11	-40.9
MA+MF	185.8	184.8	185.3	-47.19	-44.19	-45.6
MA+EA	188.2	264.9	226.6	-71.37	-66.3	-68.8

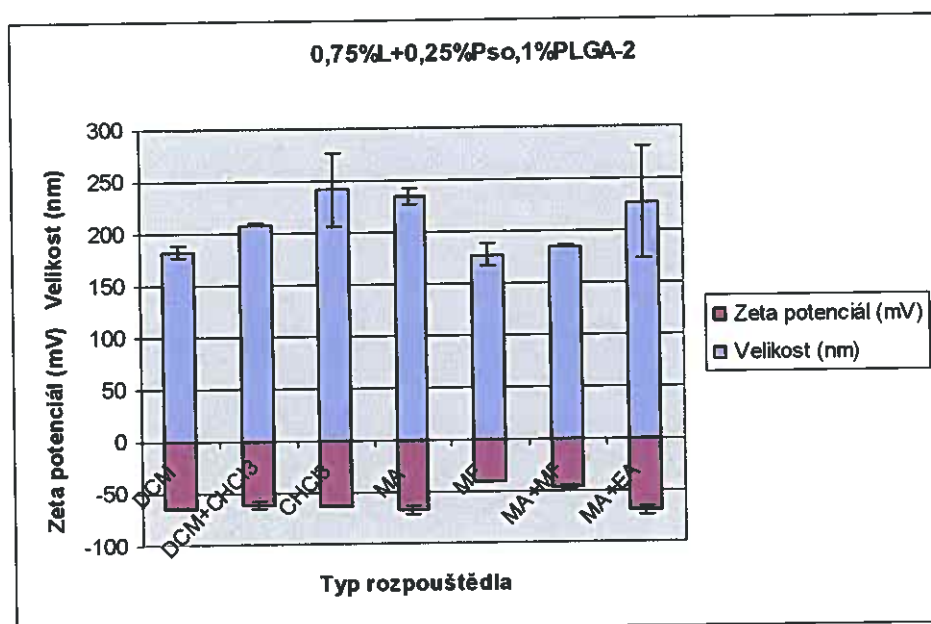
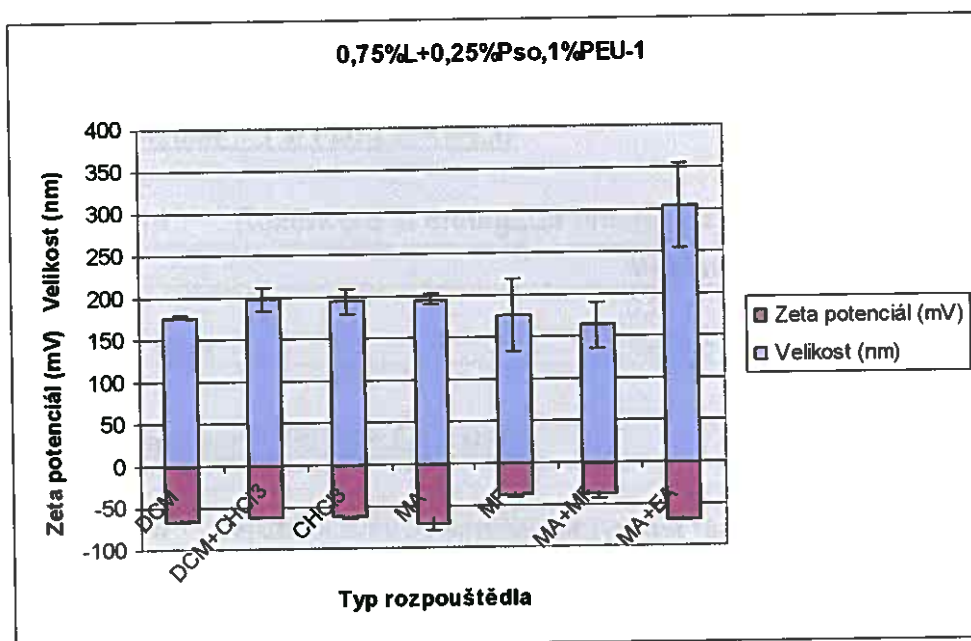


Table 11-12 0.75% lecitin + 0.25% Pso + 1% PEU-1 v rozpouštědle

Rozpouštědlo	Velikost částic [nm] 1. měření	Velikost částic [nm] 2. měření	Velikost částic [nm] průměr	Zeta potencial [mV] 1. měření	Zeta potencial [mV] 2. měření	Zeta potencial [mV] průměr
DCM	176	177.6	176.8	-66.55	-64.69	-65.6
DCM+CHCl ₃	207.5	188.2	197.9	-62.05	-61.82	-61.9
CHCl ₃	205.5	183	194.3	-62.2	-63.94	-63.1
MA	200.2	192.3	196.3	-75.86	-66	-70.9
MF	144.8	205.6	175.2	-36.55	-39.95	-38.3
MA+MF	144.4	181.8	163.1	-36.78	-41.65	-39.2
MA+EA	270.1	339.9	305	-69.33	-67.8	-68.6



11.3.8 Příprava nanočástic a jejich modifikace léčivou látkou terbinafinem

Byly testovány 3 různé vnější fáze obsahující jako emulgátor lecitin, Pso nebo Px407. Emulgátory byly použity o různých koncentracích (0.25%, 0.5%, 0.75%, 1%). Jako vnitřní fáze byl použit 1% roztoku polymeru PDLLA. Vždy byly připraveny částice s a bez léčivé látky, cílem bylo zjistit zda a v jaké míře léčivá látka ovlivní velikost a zeta potenciál vzniklých nanočástic. Jako léčivá látka byl použit 10% roztok terbinafinu.

0.25 % emulgátor + 1% PDLLA v DCM

Table 11-13 **Roztok 0.25 % emulgátor (vnější fáze)**

Látka	Množství
Emulgátor	0,125 g g
Destilovaná voda	49,875 g

0.5 % emulgátor + 1% PDLLA v DCM

Table 11-14 **Roztok 0.5 % emulgátor (vnější fáze)**

Látka	Množství
Emulgátor	0,25 g
Destilovaná voda	49,75 g

0.75 % emulgátor + 1% PDLLA v DCM

Table 11-15 **Roztok 0.75 % emulgátor (vnější fáze)**

Látka	Množství
Emulgátor	0,375 g
Destilovaná voda	49,625

1 % emulgátor + 1% PDLLA v DCM

Table 11-16 **Roztok 1 % emulgátor (vnější fáze)**

Látka	Množství
Emulgátor	0,5 g
Destilovaná voda	49,5

Table 11-17 **Roztok 1% PDLLA v DCM (vnitřní fáze)**

Látka	Množství
PDLLA	0,1 g
DCM	9,9 g

Pro přípravu nanočástic s terbinafinem bylo vždy do vnitřní fáze přidáno 10% terbinafinu oproti polymeru, tzn. Do 10 g vnitřní fáze jsme přidali 0,01 g terbinafinu a 0,1 g polymeru.

11.3.8.1 Výsledky

Výsledky jsou presentovány v následujících tabulkách a jim odpovídajících grafech.

Table 11-18 Emulgátor lecitin + 1% PDLLA bez terbinafinu

Koncentrac e emulgátoru [%]	Velikost částic [nm]		Velikost částic [nm] průměr	Zeta potenciál [mV]		Zeta potenciál [mV] průměr
	1. měření	2. měření		1. měření	2. měření	
0.25	206.1	216.4	211.3	-68.24	-67.76	-68
0.5	231	188.6	209.8	-71.96	-70.57	-71.3
0.75	238	196.5	217.3	-72.37	-66.96	-69.7
1	213.3	204.8	209.1	-70.76	-68.66	-69.7

Table 11-19 Emulgátor lecitin + 1% PDLLA + 10% terbinafin

Koncentrac e emulgátoru [%]	Velikost částic [nm]		Velikost částic [nm] průměr	Zeta potenciál [mV]		Zeta potenciál [mV] průměr
	1. měření	2. měření		1. měření	2. měření	
0.25	211.5	216.9	214.2	-58.71	-53.35	-56.0
0.5	218	228.2	223.1	-64.09	-67.59	-65.8
0.75	187.3	190.2	188.8	-68.26	-67.21	-67.7
1	225.1	199.2	212.2	-69.43	-66.89	-68.2

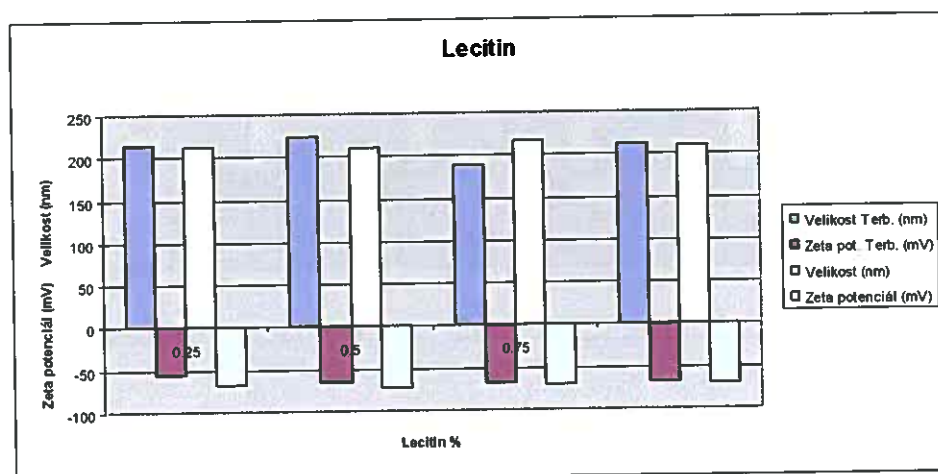


Table 11-20 Emulgátor Pso + 1% PDLLA bez terbinafinu

Koncentrac e emulgátoru [%]	Velikost částic [nm]		Velikost částic [nm] průměr	Zeta potenciál [mV]		Zeta potenciál [mV] průměr
	1. měření	2. měření		1. měření	2. měření	
0.25	103	199.9	151.5	-38.8	-37.39	-38.1
0.5	159.2	159.9	159.6	-33.33	-39.95	-36.6
0.75	166.7	191.9	179.3	-41.72	-41.68	-41.7
1	203.1	229.2	216.2	-38.65	-38.16	-38.4

Table 11-21 Emulgátor Pso + 1% PDLLA + 10% terbinafin

Koncentrac e emulgátoru [%]	Velikost částic [nm]		Velikost částic [nm] průměr	Zeta potenciál [mV]		Zeta potenciál [mV] průměr
	1. měření	2. měření		1. měření	2. měření	
0.25	204.1	251.1	227.6	-34.48	-37.78	-36.1
0.5	166.7	243.3	205	-38.08	-38.58	-38.3
0.75	72.71	123.3	98.0	-37.1	-35.9	-36.5
1	255.8	124.1	189.95	-35.42	-43.03	-39.2

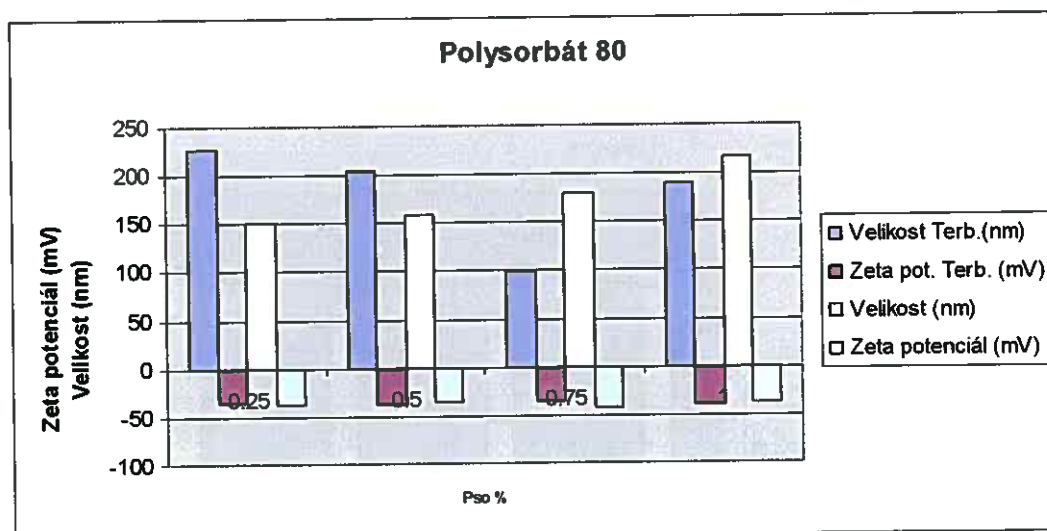
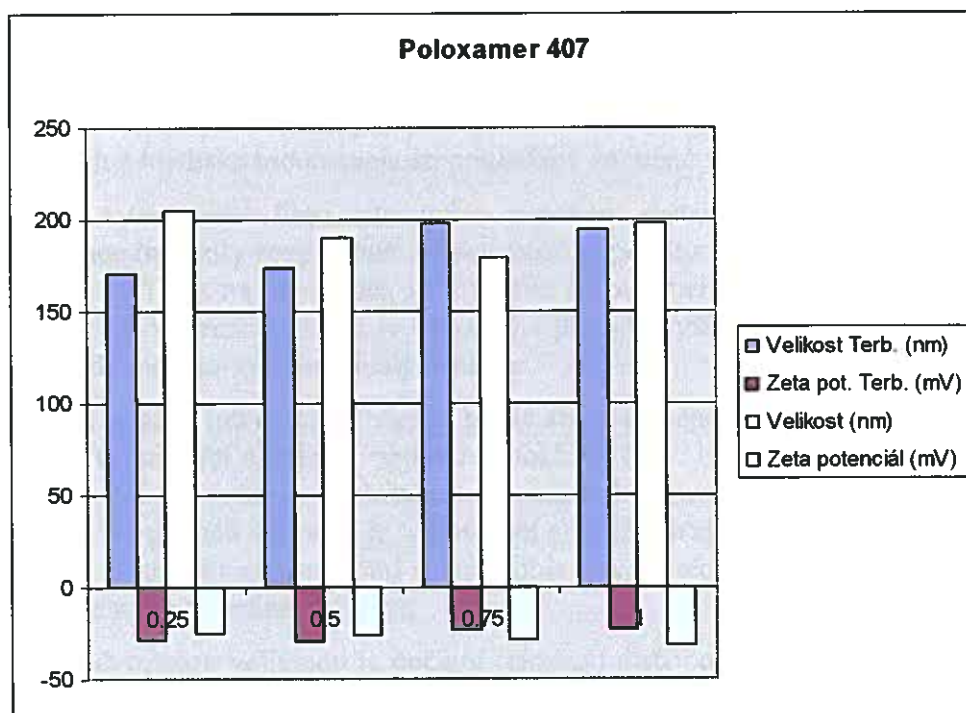


Table 11-22 Emulgátor Px407 + 1% PDLLA bez terbinafinu

Koncentrac e emulgátoru [%]	Velikost částic [nm]		Velikost částic [nm] průměr	Zeta potenciál [mV]		Zeta potenciál [mV] průměr
	1. měření	2. měření		1. měření	2. měření	
0.25	209.1	201.1	205.1	-23.82	-25.68	-24.8
0.5	188.3	192.2	190.3	-28.85	-24.39	-26.6
0.75	183.9	174.3	179.1	-29.91	-27.64	-28.8
1	194.6	200.6	197.6	-33.02	-29.08	-31.1

Table 11-23 Emulgátor Px407 + 1% PDLLA + 10% terbinafin

Koncentrac e emulgátoru [%]	Velikost částic [nm]		Velikost částic [nm] průměr	Zeta potenciál [mV]		Zeta potenciál [mV] průměr
	1. měření	2. měření		1. měření	2. měření	
0.25	153.3	187.6	170.5	-28.77	-27.07	-27.9
0.5	193.8	153	173.4	-31.11	-27	-29.1
0.75	199.3	195.9	197.6	-22.52	-23.99	-23.3
1	199.2	190.8	195	-22.33	-23.37	-22.9



12 Diskuse

12.1 Obecné poznámky

Existuje několik metod přípravy nanočástic. V laboratořích se nejvíce využívá metoda založená na smísení acetonového roztoku nosiče a léčiva s vodným roztokem tenzidů. Na základě intenzivního mísení acetonu s vodou dochází k turbulentním tokům, které vedou k desintegraci kapek vnější fáze na úroveň nanočástic. Postup je rychlý a nenáročný na technické zařízení. Jeho hlavní nevýhodou je nestandardní velikost nanočástic v produktech.

Postupem vypracovaným na pracovišti školitele bylo prokázáno, že pomocí vysokoobrátkového desintegrátoru je možno emulzní metodou připravit nanočástice menší než 200 nm s relativně standardní velikostí. Získat dostatečně malé nanočástice je možno za určitých předpokladů. Kromě výkonného desintegrátoru s kvalitní turbínou je nutný účinný emulgátor, další podmínkou je vnitřní fáze s nízkou viskozitou. Jako velmi vhodný emulgátor byl již dříve nalezen lecitin, případně jeho směsi s neionickými tenzidy. Nízkou viskozitu vnitřní fáze je možno docílit jednak volbou vhodného nosiče a dále volbou nízké koncentrace nosiče. Jako nosiče vhodné pro formulaci biodegradabilních implantovatelných léků nového typu se jeví oligoestery alifatických hydroxykyselin, zvláště jejich varianta řetězců větvených z centrální molekuly polyhydrického alkoholu. Tyto hvězdčovitě (star-like) struktury se vyznačují výhodnější kinetikou hydrolýzy a lepší zpracovatelností souvisící s nižší viskozitou tavenin a roztoků.

Pro měření velikosti a povrchového náboje nanočástic byl využit přístroj Nanosizer ZS firmy Malvern Instruments. Pro účely této rigorózní práce byla jako charakteristika využita intenzitní varianta prezentace měření, tato charakteristika není zatížena chybou transformace na odvozené charakteristiky. Má zvýšenou citlivost pro větší částice, tedy ty, které jsou ve vzorcích z hlediska biodostupnosti pokládány za méně vhodné.

Jak je v teoretické části této práce popsáno, distribuce velikosti částic se odvozuje z distribuce intenzity rozptýleného laserového paprsku světla. Tyto přímo naměřené údaje jsou na obr. 11-1. Je na něm vidět, že intenzita rozptýleného světla ostře stoupá s velikostí částic. Tento způsob prezentace dat je výhodný v případě vyšší důležitosti extrémně velkých částic a v případě malého významu malých částic.

Z této základní intenzitní křivky je podle softwarového programu možno odvodit distribuční křivku vyjadřující distribuci objemu nanočástic (obr. 11-2). Nevýhodou uvedeného programu jsou možné nepřesnosti vycházející ze statisticky zpracovaných do různé míry analogických situací. Nespornou výhodou je vypovídací síla tohoto způsobu prezentace. Čtenář má možnost představit si, jaká procentuální frakce (objemová a tedy i hmotnostní) z celkového množství částic je v určité velikostní třídě.

Další odvozenou veličinou je početní (číselná) distribuce částic. Ukázka pro stejný vzorek je obr. 11-3. Souvisí úzce s velikostí povrchu nanočástic, což pro některé systémy s povrchově navázanými látkami je základní údaj. Tato charakteristika má význam pro informaci o nejmenších částicích ve vzorku. V některých případech je možno z tohoto údaje získat informace o mechanismu nebo o průběhu dějů podmiňujících vznik systému.

Povrchový náboj nanočástic je možno měřit se dvěma různými výstupy naměřených dat. Jedním z nich je distribuce zeta potenciálu určitého velkého souboru měřených částic. Ukázka tohoto výstupu je na obr. 11-4. Je možno posoudit tvar křivky, hodnotu intenzity v bodu píku. Související hodnotou je distribuce hodnot elektroforetické mobility (obr. 11-5).

12.2 Vliv nosiče na velikost nanočástic a jejich zeta potenciál

Nanočástice byly připraveny již dříve vypracovaným postupem rozdělování dichlormethanu z vnitřní fáze emulze do vnější vodné za použití kombinace emulgátorů - lecitinu s polysorbátem nebo lecitinu s poloxamerem. Složení emulzí vyplývá z tabulek 11-1 až 11-3. Byly vyzkoušeny čtyři různé nosiče. S kyselinou poly(DL-mléčnou) PDLLA byly již dříve v dané aplikaci dobré zkušenosti, nízkomolekulární kopolymer kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou (PLGA) byl nově syntetizován. Od něj byl odvozen polyesterurethan PEU-1 reakcí nosiče PLGA modifikovaného hydroxyly (butandiol) s hexamethylendiisokyanátem. Dalším vyzkoušeným nosičem byl větvený terpolymer kyselin DL-mléčné a glykolové s dipentaerythritolem označený 3D.

V tabulce 11-4 a na připojeném obrázku je vidět, že v emulzi stabilizované lecitinem a polysorbátem byly nanočástice z PDLLA největší, ostatní měly zhruba stejnou velikost. Uplatnila se patrně vyšší viskozita roztoku při dispergaci. Hodnoty zeta potenciálu byly pro různé nosiče prakticky stejné, pro stabilitu systému byly dostatečně vysoké.

Pokud byl použit ve směsi emulgátorů poloxamer, byla hodnota zeta potenciálu nižší. Souvisí to patrně s větším rozměrem molekul tohoto neionického tenzidu a jeho stínícím efektem na náboj adsorbovaného lecitinu. Za velmi pozoruhodný výsledek pokládáme výrazné snížení velikosti nanočástic z kyseliny poly(DL-mléčné). Hypotézu o příčině tohoto vlivu poloxameru v kombinaci s lecitinem v této fázi není možno formulovat.

12.3 Vliv různých rozpouštědel nosičů na parametry nanočástic z kyseliny poly(DL-mléčné) (PDLLA)

V tabulkách 11-7 a 11-8 je složení roztoků nosičů. Jednotně byla využita jejich 1% koncentrace. Kromě běžně používaných chlorovaných uhlovodíků byly vyzkoušeny méně toxické estery. Rozpouštědla byla použita jednak samotná, jednak ve směsi v hmotnostním poměru 1:1. V tabulce 11-9 jsou naměřená data. Pokud se jako nejvhodnější rozpouštědlo stanoví takové, které při dané koncentraci nosiče vede k nejmenším nanočásticím, potom je možno jako nejvhodnější pokládat překvapivě methylformiát a směs methylacetátu s ethylacetátem. U methylformiátu je možno očekávat kromě stříhových sil při dispergaci také vliv turbulentního toku rozpouštědla do vnější fáze. Pro všechny systémy bylo velké rozpětí středních hodnot velikosti částic u dvou opakovaně připravených vzorků. Zajímavý je nižší zeta potenciál nanočástic připravených s methylformiátem samotným nebo s jeho směsí s methylacetátem. Tyto výsledky mohou podporovat hypotézu o silných turbulentních tocích rozpouštědla v počáteční fázi přípravy. U nanočástic s methylacetátem byl naopak naměřen nejvyšší zeta potenciál. Nanočástice připravené z tohoto rozpouštědla však měly největší rozpětí velikostního parametru.

12.4 Vliv různých rozpouštědel nosičů na parametry nanočástic z terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a dipentaerytritolu (3D)

Nosič označený symbolem 3D obsahoval 3 % hmotnostní větvící složky. Jeho roztoky měly vysokou koncentraci koncových hydroxylových skupin a nízkou viskozitu. Velmi výrazný vliv různých rozpouštědel na adsorpční vrstvu tenzidů se projevil také v případě nanočástic z větveného terpolymeru (tabulka 11-10). Methylformiát způsoboval menší adsorpci lecitinu, methylacetát naopak vedl k vytvoření velmi kompaktní vrstvy se zeta potenciálem -74 mV.

Pokud jde o velikost nanočástic, stejně jako u kyseliny poly(DL-mléčné) byly výrazně největší nanočástice v případě směsi methylesterů kyselin mravenčí a octové. Systém se v tomto případě choval velmi nestandardně. Nejmenší nanočástice při relativně reprodukovatelných výsledcích byly získány z roztoků nosiče 3D v dichlormethanu.

12.5 Vliv různých rozpouštědel nosičů na parametry nanočástic z kopolymeru kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové (PLGA)

Nosič byl ve vodě nerozpustný, byl relativně hydrofilní, protože měl nízkou molekulovou hmotnost. Na rozdíl od výše uvedeného měl lineární konformaci řetězce.

Přes odlišný typ molekuly je možno konstatovat prakticky stejné elektroforetické chování dané volbou rozpouštědla. Nanočástice připravené z methylformiátového roztoku samotného i ze směsi s methylacetátem měly nižší hodnoty zeta potenciálu, kdežto nanočástice z methylacetátového roztoku nebo ze směsi s ethylacetátem měly výrazně vyšší hodnoty zeta potenciálu (tabulka 11-11).

V případě poly(laktidu-ko-glykolidu) byly připraveny standardním způsobem velmi malé nanočástice s průměrem 182 nm (tabulka 11-11). Příčinou je patrně velmi nízká viskozita roztoku nízkomolekulárního oligoesteru a optimální rychlost rozdělování rozpouštědla do vnější fáze. U nanočástic z methylformiátu mohlo jít o kombinaci stříhových dispergačních jevů s turbulentními toky. Nanočástice připravené z chloroformového a z methylacetátového roztoku byly kupodivu největší.

12.6 Vliv různých rozpouštědel nosičů na parametry nanočástic polyesterurethanu odvozeného z kopolymeru kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové (PEU-1)

Tento nosič byl použit těsně po jeho syntéze, která byla realizována ve třech krocích. V prvním byla získána PLGA. Její koncové karboxyly byly převedeny na hydroxyly reakcí s butandiolem v přítomnosti ethylhexanoátu cínatého. Ve třetím stupni byly vytvořeny urethanové vazby reakcí koncových hydroxylů s hexamethylendisokynátem. Produkt měl relativně nízkou molekulovou hmotnost a zjevně nízkou hodnotu teploty skelného přechodu. Měření metodou DSC nebylo do zahájení této práce provedeno.

I přes odlišný typ nosiče PEU-1 byly relace vlivů různých rozpouštědel postulované u nanočástic z výše popsaných nosičů prakticky stejné. Zeta potenciál byl nejnižší u nanočástic připravených z methylformiátových roztoků, nejvyšší u nanočástic z methylacetátových roztoků. Rozdíl byl velmi výrazný, činil 30 mV (tabulka 11-12). Téměř všechny vzorky z tohoto nosiče měly rozměr do 200 nm. Odlišovaly se pouze výrazně největší nanočástice (305 nm), které byly připraveny ze směsi methylacetátu s ethylacetátem. Nejmenší v daném souboru byly takové, které byly připraveny záměnou ethylacetátu za výrazně hydrofilní methylformiát ve směsi s methylacetátem. Nanočástice z methylformiátového roztoku vznikaly nestandardně, první vzorek měl hodnotu charakteristiky 144 nm, druhý 182 nm. Převažoval mechanismus turbulentních mísicích toků z vnější fáze (tabulka 11-12).

12.7 Vliv lecitinu a terbinafinu na parametry nanočástic připravených z roztoků kyseliny poly(DL-mléčné) v dichlormethanu

Lecitin je velmi účinný emulgátor a stabilizátor hydrofilních nanoemulzí. Je složkou první volby při formulaci emulzní parenterální výživy. Je to amfolytická látka botnanjící ve vodě.

V tabulce 11-18 jsou data zjištěná při zvyšování koncentrace lecitinu v roztoku od 0,25% do 1,0%. Je patrné, že v daném rozmezí koncentrací se hodnota elektrokinetického potenciálu nemění. Nejnižší, 0,25% koncentrace tenzidu je dostatečná k tomu, aby nanočástice měly dostatečný náboj. O vlivu koncentrace lecitinu na velikost částic je obtížné z daných výsledků spekulovat, protože ve dvakrát opakovaných vzorcích byla poměrně značná variabilita.

Stejná série experimentů byla provedena s jednou změnou. Tou byla báze terbinafinu přidána do systému spolu s nosičem v jeho 10% podílu. Významnou změnou je snížení zeta potenciálu, které bylo zvláště výrazné u vzorku s nejnižší (0,25%) koncentrací lecitinu. Snížení bylo o 12 mV, z 68 mV na 56 mV. Patrně dochází k interakci mezi bází terbinafinu a lecitinem, který má nízkou hodnotu isoionického bodu. Při vyšších koncentracích nad 0,75 % lecitinu se již vliv terbinafinu neprojevil.

12.8 Vliv polysorbátu 20 a terbinafinu na parametry nanočástic z roztoků kyseliny poly(DL-mléčné) v dichlormethanu

Záměna lecitinu za neionický polysorbát měla podle očekávání vliv na zeta potenciál nanočástic. V tabulce 11-20 je uvedeno, že hodnoty tohoto parametru se pohybují mezi 37 mV a 42 mV. Nebyl prokázán jednoznačný trend změn hodnot se změnou koncentrace tenzidu.

Pokud jde o velikost nanočástic, je možno i při jisté variabilitě dat sledovat vzrůst velikosti nanočástic se zvyšováním koncentrace polysorbátu od 0,25 % do 1,00 %. Po přidání 10% báze terbinafinu jsme zaznamenali u většiny vzorků stejné hodnoty zeta potenciálu jako u nanočástic bez terbinafinu. Velikost nanočástic se do 0,75% tenzidu výrazně snižovala. Jedná se o podstatný rozdíl oproti nanočásticím bez báze terbinafinu (tabulka 11-20 vs. tabulka 11-21). Po dalším zvýšení koncentrace tenzidu na 1,00% bylo zaznamenáno výrazné zvětšení nanočástic z 98 nm na 190 nm. Příčinou může být plastifikace vnitřní fáze systému rozdělováním polysorbátu s následným zvýšením viskozity.

12.9 Vliv poloxameru 407 a terbinafinu na parametry nanočástic z roztoků kyseliny poly(DL-mléčné) v dichlormethanu

Poloxamer 407 je další lékopisná substance použitelná pro formulaci parenterálně aplikovatelných nanosystémů. Tento neionický triblokový polymerní tenzid má molekuly větších rozměrů. Proto se jeho stínící efekt na hodnoty zeta potenciálu projevil výrazněji než tomu bylo u polysorbátu (tabulka 11-22 vs. tabulka 11-20). Překvapivé však je, že s koncentrací tohoto stabilizátoru hodnoty zeta potenciálu stoupají. Pokud jde o velikost nanočástic, při zvyšování koncentrace tenzidu do 0,75 % se nanočástice zmenšovaly, u 1,00% emulgátoru bylo zaznamenáno zvětšení. Může docházet ke stejnému jevu plastifikace jako u polysorbátu 20.

Terbinafin snižuje hodnoty zeta potenciálu v případě vyšších koncentrací tenzidu. Může docházet k synergismu poloxameru s tímto léčivem. Kationický tenzid může částečně eliminovat negativní náboj koncových karboxylů nosiče, poloxamer může tento náboj částečně stínit. Zvyšování koncentrace poloxameru vedlo překvapivě ke zvyšování velikosti nanočástic (tabulka 11-23).

13 Závěry

Z oligoesterových nosičů s různou konstitucí řetězce je možno metodou rozdělování rozpouštědla připravit nanočástice s velmi dobrými parametry velikosti a povrchového náboje. Velikost nanočástic byla ovlivněna molekulovou hmotností, která souvisí především s viskozitou roztoků.

Jako emulgátor se osvědčil lecitin, který je účinný již v koncentraci 0,25 %. Výhodnější je kombinovat lecitin s neionickými tenzidy, jako je polysorbát nebo poloxamer.

Také samotný polysorbát 20 a samotný poloxamer 407 se projevily jako účinné emulgátory od koncentrace 0,25 % do koncentrace 0,75 %. Zvýšení koncentrace na 1,00 % u obou těchto emulgátorů vedlo ke zhoršení parametrů produktů patrně jejich plastifikačním účinkem na nosiče.

Volba emulgátoru a jeho koncentrace má vliv na hodnotu zeta potenciálu. Nejvyšší zeta potenciál měl amfoterní lecitin, nejnižší polymerní poloxamer.

Jako velmi vhodné rozpouštědlo pro přípravu nanočástic byl potvrzen dichlormethan. Bylo nalezeno další vhodné, méně toxické rozpouštědlo, kterým byl methylacetát. Nanočástice připravené z methylacetátových roztoků dispergovaných v roztoku lecitinu měly velmi dobré parametry velikosti a překvapivě vysoké hodnoty zeta potenciálu.

Jako nevhodné rozpouštědlo se projevily methylformiát. Turbulentní toky snížily kompaktnost adsorpční vrstvy lecitinu a tak došlo ke snížení hodnot zeta potenciálu. Z methylformiátových roztoků byly získány malé nanočástice, jejich velikost byla nestandardní.

Do nanočástic je možno přidat 10% bazi terbinafinu. Tato složka má interakce prvního řádu s vlivem různých emulgátorů na velikost a povrchový náboj nanočástic. Účinnost enkapsulace této substance nebyla v této práci studována.

14 Literatura

- [1] J. Kreuter, Nanoparticles, in: J. Kreuter (Ed.), *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, 1994, pp. 219–342.
- [2] R. Langer, Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 94–101.
- [3] R.P. Lanza, R. Langer, W.L. Chick, Principles of Tissue Engineering, in: Academic Press, Austin, TX, 1997, pp. 405–427.
- [4] L.B. Peppas, Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in the controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.* 116 (1995) 1–9.
- [5] A. Zimmer, J. Kreuter, Microspheres and nanoparticles used in ocular drug delivery systems, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 16 (1995) 61–73.
- [6] P. Couvreur, L. Grislain, V. Lenaerts, F. Brasseur, P. Guiot, in: P. Guiot, P. Couvreur (Eds.), *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986.
- [7] D.F. Raney, Biomimetic transport, rational drug delivery, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 105–114.
- [8] K.E. Uhrich, S.M. Cannizzaro, R.S. Langer, K.M. Shakesheff, Polymeric systems for controlled drug release, *Chem. Rev.* 99 (1999) 3181–3198.
- [9] C. Monfardini, F.M. Veronese, Stabilization of substances in circulation, *Bioconjug. Chem.* 9 (1998) 418–450.
- [10] V.P. Torchilin, Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals, *J. Microencapsul.* 15 (1998) 1–19.
- [11] D.L. Wise, T.D. Fellman, J.E. Sanderson, R.L. Wentworth, Lactide / glycolide acid polymers, in: G. Geregriadis (Ed.), *Drug Carriers in Biology and Medicine*, Academic, London, 1979, pp. 237–270.
- [12] T.M. Jackanicz, H.A. Nash, D.L. Wise, J.B. Gregory, Poly lactic acid as a biodegradable carrier for contraceptive steroids, *Contraception* 8 (1973) 227–234.
- [13] L.C. Andersson, D.L. Wise, J.F. Howes, An injectable sustained release fertility control system, *Contraception* 13 (1976) 375–384.
- [14] M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude, C. Vigneron, Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by double emulsion method, *J. Control. Rel.* 50 (1998) 31–40.
- [15] R. Bodmeier, J.W. McGinity, Solvent selection in the preparation of poly(D,L-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method, *Int. J. Pharm.* 43 (1988) 179–186.
- [16] R. Arshaday, Preparation of porous and nonporous biodegradable polymeric hollow microspheres, *J. Control. Rel.* 17, (1991) 1–22.

- [17] E. Allemann, R. Gurnay, E. Doelker, Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size, *Int. J. Pharm.* 87 (1992) 247–253.
- [18] E. Allemann, J.C. Leroux, R. Gurnay, E. Doelker, *In vitro* extended-release properties of drug-loaded poly(D,L-lactic) acid nanoparticles produced by a salting-out procedure, *Pharm. Res.* 10 (1993) 1732–1737.
- [19] J.C. Leroux, E. Allemann, E. Doelker, R. Gurnay, New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification–diffusion method, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 14–18.
- [20] G.D. Quintanar, Q.A. Ganem, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker, Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze drying of poly(DL-lactic acid) nanoparticles prepared by emulsification-diffusion technique, *J. Microencapsulation* 15 (1998) 107–119.
- [21] T.W. Randolph, A.D. Randolph, M. Mebes, S. Yeung, Sub-micron-sized biodegradable particles of poly(L-lactic acid) via the gas antisolvent spray precipitation process, *Biotechnol. Prog.* 9 (1993) 429–435.
- [22] L. Benedetti, A. Bertucco, M. Lora, P. Pallado, in: *Atti del 38 Congresso I fluidi Supercritici e le Loro Applicazioni*, I. Kikic and P. Alessi (Eds.), Trieste, 1995, p. 221.
- [23] P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, Les perspectives d'utilisation des formes microdispersées comme vecteurs intracellulaires, *Pharm. Acta Helv.* 53 (1978) 341–347.
- [24] P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Goit, P. Bauduin, P. Speiser, Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphology and sorptive properties, *J. Pharm. Pharmacol.* 31 (1979) 331–332.
- [25] C. Lherm, R.H. Muller, F. Puiseux, P. Couvreur, Alkylcyanoacrylate drug carriers: II. Cytotoxicity of cyanoacrylate nanoparticles with different alkyl chain length, *Int. J. Pharm.* 84 (1992) 13–22.
- [26] J.-L. De Keyser, J.H. Poupaert, P. Dumont, Poly(diethyl methylenemalonate) nanoparticles as a potential drug carrier: preparation, distribution and elimination after intravenous and peroral administration to mice, *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 67–70.
- [27] T.K.M. Mabela, J.H. Poupaert, P. Dumont, A. Haemers, Development of poly(dialkyl methylenemalonate) nanoparticles as drug carriers, *Int. J. Pharm.* 92 (1993) 71–79.
- [28] P. Breton, D. Roy, L. Marchal-Heussler, C. Seguin, P. Couvreur, F. Lescure, New poly(methylidene malonate 2.1.2) nanoparticles: Recent developments, in: G. Gregoriadis, B. McCormack, G. Poste (Eds.), *Targeting of Drugs, Advances in System Constructs*, Vol. 4, Plenum Press, New York, 1994, pp. 161–172.
- [29] N. Bru-Magniez, V. Larras, G. Riess, P. Breton, P. Couvreur, C. Roques-Carmes, Novel surfactant copolymers based on methylidene malonate, *International Patent PCT WO 99 / 38898*, 1999.

- [30] P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan and chitosan / polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J. Appl. Polym. Sci.* 63 (1997) 125–132.
- [31] P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Chitosan and chitosan / ethylene oxide–propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1431–1436.
- [32] R. Fernandez-urrusuno, P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1576–1591.
- [33] P. Calvo A.S. Boughaba, M. Appel, E. Fattal, M.J. Alonso, P. Couvreur, Oligonucleotide–chitosan nanoparticles as new gene therapy vector, *Proc. 2nd World Meeting APGI /APV Paris, 1998*, pp. 1111–1112.
- [34] H.-Q. Mao, K. Ray, S.M. Walsh, J.T. August, K.W. Leong, DNA–chitosan nanoparticles for the gene delivery, *Proc. Intern. Symp. Control. Release. Bioact. Mater.* 23 (1996) 401–402.
- [35] K. Ray, H.-Q. Mao, K.Y. Lin, S.-K. Huang, K.W. Leong, Oral immunization with DNA–chitosan nanoparticles, *Proc. Intern. Symp. Control. Release. Bioact. Mater.* 26 (1999) 348–349.
- [36] V.L. Truong-Le, H. Mao, S. Walsh, K.W. Leong, J.T. August, Delivery of DNA vaccine using gelatin–DNA nanoparticles, *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24 (1997) 39–40.
- [37] T. Jung, A. Breitenbach, T. Kissel, Sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) facilitate the preparation of small negatively charged biodegradable nanospheres for protein delivery, *J. Control. Rel.* 67 (2000) 157–169.
- [38] A. Breitenbach, G. Nykamp, T. Kissel, Self-assembling colloidal carriers for protein delivery: nanoparticulate polymer protein conjugates with novel water soluble biodegradable comb polyesters, *Proc. Intern. Symp. Control. Release. Bioact. Mater.* 26 (1999) 159–160.
- [39] M.A. Breitenbach, W. Kamm, K.-D. Hungere, E. Hund, T. Kissel, Oral and nasal administration of tetanus toxoid loaded nanoparticles consisting of novel charged biodegradable polyesters for mucosal vaccination, *Proc. Intern. Symp. Control. Release. Bioact. Mater.* 26 (1999) 348–349.
- [40] M.J. Alenso, C. Losa, P. Calvo, J.L. Vila-Jato, Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly-(cyanoacrylate) nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 68 (1991) 69–76.
- [41] M. Ueda, A. Iwara, J. Kreuter, Influence of the preparation methods on the drying release behavior of loperamide-loaded nanoparticles, *J. Microencapsulation* 15 (1998) 361–372.
- [42] M.A. Radwan, In vitro evaluation of poly-isobutylcyanoacrylate nanoparticles as a controlled drug carrier for theophylline, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21 (1995) 2371–2375.
- [43] H.S. Yoo, J.E. Oh, K.H. Lee, T.G. Park, Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin–PLGA conjugate for sustained release, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1114–1118.

- [44] H. Muller, K.M. Willis, Surface modification of i.v. inject- able biodegradable nanoparticles with poloxamer polymers and poloxamine 908, *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 25–31.
- [45] C.J. Van Oss, Phagocytosis as a surface phenomenon, *Annu. Rev. Microbiol.* 32 (1978) 19–39.
- [46] E. Allemann, G. Patricia, J.C. Leroux, B. Luc, R. Gurnay, Kinetics of blood component-adsorption on poly(_{D,L}-lactide) nanoparticles: Evidence of compliment C component involvement, *J. Biomed. Mater. Res.* 37 (1997) 229–234.
- [47] M. Luck, K.F. Pistel, Y. Li, T. Blunk, R.H. Muller, T. Kissel, Plasma protein adsorption on biodegradable micro- spheres consisting of poly(_{D,L}-lactide-co-glycolide), poly(L- lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxy- ethylene), *J. Control. Rel.* 55 (1998) 107–120.
- [48] H. Carstensen, B.W. Muller, R.H. Muller, Adsorption of ethoxylated surfactants on nanoparticles. I. Characterization by hydrophilic interaction chromatography, *Int. J. Pharm.* 67 (1991) 29–37.
- [49] R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, R. Langer, Biodegradable long-circulating polymeric nanoparticles, *Science* 263 (1994) 1600–1603.
- [50] S.I. Joen, J.H. Lee, J.D. Andrade, P.G. de Gennes, Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory, *J. Colloid. Interf. Sci.* 142 (1991) 149–158.
- [51] A. Gessnerl, B.R. Paulke, R.H. Muller, Plasma protein adsorption on poly(ethylene-glycol) (PEG) modified polystyrene nanoparticles: influence of PEG surface density, *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 26 (1999) 597–598.
- [52] Soppimath, K.S. et al., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices / *Journal of Controlled Release* 70 (2001) 1–20.
- [53] L. Illum, S.S. Davis, Effect of the nonionic surfactant poloxamer 338 on the fate and deposition of polystyrene microspheres following intravenous administration, *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 1086–1089.
- [54] L. Illum, S.S. Davis, The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (poloxamer 338), *FEBS Letts.* 167 (1984) 79–82.
- [55] L. Illum, S.S. Davis, R.H. Muller, E. Mak, P. West, The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a block copolymer poloxamine 908, *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 25– 31.
- [56] C.S. Cho, Y.I. Jeong, T. Ishihara, R. Takei, J.U. Park, K.H. Park, A. Maruyama, T. Akaike, Simple preparation of nanoparticles coated with carbohydrate-carrying polymers, *Biomaterials* 18 (1997) 323–326.
- [57] R. Alyautdin, D. Gothier, V. Petrov, D. Kharkevich, J. Kreuter, Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 44–48.

- [58] G. Cavallaro, M. Fresta, G. Giammona, G. Puglisi, A. Villari, Entrapment of β -lactams antibiotics in poly-ethylcyanoacrylate nanoparticles: studies on the possible in vivo application of this colloidal delivery system, *Int. J. Pharm.* 111 (1994) 31–41.
- [59] A.E. Gulyaev, S.E. Gelperina, I.N. Skidan, A.S. Antropov, G.Y. Kivman, J. Kreuter, Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1564–1569.
- [60] T. Uchida, A. Yagi, Y. Oda, Y. Dakada, S. Goto, Instability of bovine insulin in poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres, *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996) 235–236.
- [61] J.K. Lin, N. Wang, X.S. Wu, A novel biodegradable system based on gelatin NPs and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 891–895.
- [62] N. Wang, X.S. Wu, J.K. Li, A heterogeneously structured composite based on poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres and poly(vinyl alcohol) hydrogel nanoparticles for long-term protein drug delivery, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1430–1435.
- [63] Torchilin, V.P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 145–160.
- [64] Pison, U., Welte, T., Giersig, M., Groneberg, D.A., Nanomedicine for respiratory diseases, *European Journal of Pharmacology* 533 (2006) 341–350
- [65] John, A.E., Lukacs, N.W., Berlin, A.A., Palecanda, A., Bargatze, R.F., Stoolman, L.M., Nagy, J.O. Discovery of a potent nanoparticle P-selectin antagonist with anti-inflammatory effects in allergic airway disease. *FASEB J.* 17, (2003) 2296–2298.
- [66] Kumar, M., Kong, X., Behera, A.K., Hellermann, G.R., Lockey, R.F., Mohapatra, S.S., Chitosan IFN-gamma-pDNA nanoparticle (CIN) therapy for allergic asthma. *Genet. Vaccines Ther.* 1, 3 (2003).
- [67] Pandey, R., Sharma, A., Zahoor, A., Sharma, S., Khuller, G.K., Prasad, B., Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, (2003) 981–986.
- [68] Vila, A., Sanchez, A., Evora, C., Soriano, I., Vila Jato, J.L., Alonso, M.J., PEG-PLA nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *J. Aerosol Med.* 17 (2004) 174–185.
- [69] Kumar, M., Behera, A.K., Lockey, R.F., Zhang, J., Bhullar, G., De La Cruz, C.P., Chen, L.C., Leong, K.W., Huang, S.K., Mohapatra, S.S., Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection. *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 1415–1425.