

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Formulace a (trans)dermální podání imiquimodu

Rigorózní práce

Konzultant: *PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.*

Hradec Králové 2017

Mgr. Kateřina RUDECKÁ

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové 25. 8. 2017

Mgr. Kateřina Rudecká

PODĚKOVÁNÍ

Velké díky patří především mé školitelce PharmDr. Barboře Školové, Ph.D. za skvělý přístup, odborné, a přesto přátelské vedení a neocenitelnou pomoc, kolektivu laboratoře Doc. PharmDr. Kateřiny Vávrové, Ph.D., dále mým kolegyním a vedoucím z lékárny, přátelům (Peťce a Jiřímu) a rodině za ochotu poradit, za poskytnuté zázemí a podporu.

Moc děkuji Vám všem!

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Kandidát: *Mgr. Kateřina Rudecká*

Konzultant: *PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.*

Název rigorózní práce: *Formulace a (trans)dermální podání imiquimodu.*

Imiquimod (IMQ), látka ze třídy heterocyklických imidazochinolinů, vykazuje po topickém kožním podání významné imunomodulační účinky. Toho se s výhodou využívá při léčbě různých virových či neoplastických onemocnění kůže. Na trhu dostupný léčivý přípravek Aldara[®], obsahující 5 % účinné látky IMQ, však má přes své nesporné benefity při léčbě i řadu negativ: cena, nutnost jednorázového použití, nežádoucí účinky...

Cílem této práce bylo zformulovat stabilní lékovou formu pro dermální podání IMQ s nižším obsahem látky (1 %) a porovnat míru penetrace a permeace IMQ do lidské kůže *in vitro*. Pro zlepšení průniku léčiva bylo použito permeačních akceleračních látek.

Pokusy byly prováděny ve Franzových difuzních celách na lidské kůži, se snahou o vytvoření podmínek podobných co nejvíce těm fyziologickým. Pomocí adhezivních pásek byly odnímány jednotlivé vrstvy nejsvrchnější části kůže (*stratum corneum*), zároveň byla oddělena epidermis od dermis i tkáň ošetřená od neošetřené, následně proběhla analýza množství léčiva v jednotlivých vrstvách kůže metodou HPLC.

Hodnocení probíhalo ve dvou aplikačních schématech: po osmi a čtyřiaadvaceti hodinách od nanesení vzorků. Většina vzorků vykazovala po osmi hodinách i při polovičním aplikovaném množství IMQ minimálně stejné či vyšší koncentrace IMQ v epidermis v porovnání s kontrolou (Aldara[®]), slibné se jevily formulace s převahou vodné složky (voda či octanový pufr), s akceleračním činidlem 2-Pro a sorbitanem oleátem coby emulgátorem (nárůst vůči Aldare[®] 2,5 resp. 1,7x). Toto potvrdila i analýza kůže po 24 hodinách, kdy se rozdíl vůči kontrole u disperze IMQ se sorbitanem a 2-Pro ještě prohloubil a v porovnání s analýzou po osmi hodinách koncentrace v epidermis vzrostla 7,8x.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Candidate: *Mgr. Kateřina Rudecká*

Consultant: *PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.*

Title of Thesis: *Formulation and (trans)dermal application of imiquimod.*

Imiquimod (IMQ) is a compound of the class of heterocyclic imidazoquinolines. It exhibits significant immunomodulatory effects after topical dermal application, thus it is used advantageously in the treatment of various viral or neoplastic skin diseases. The traded preparation Aldara[®] containing 5% of the active substance IMQ has, despite its undeniable benefits in treatment, also a number of negative features: the price, the need for single use packets, side effects...

The aim of this work was to formulate a stable dosage form for dermal administration of lower IMQ content (1%) and to compare the penetration and permeation rate of IMQ to human skin *in vitro*. To improve those qualities, permeation accelerants were used.

Experiments were carried out in Franz's diffusion cells on human skin, with the aim of creating conditions as close as possible to those physiological. Using adhesive tapes, individual layers of the uppermost skin section (*stratum corneum*) were stripped, epidermis was separated from dermis and the treated tissue from the untreated one. The amount of IMQ in separated skin layers was analysed by HPLC.

The evaluation was carried out in two application schemes: eight and twenty-four hours after the sample was applied. Most samples showed at least the same or higher IMQ levels in the epidermis after eight hours, compared with the control (Aldara[®]), even at half the amount of IMQ loaded. Promising formulations were those with predominant aqueous component (water or acetate buffer) with 2-Pro as an accelerant of and sorbitan oleate as an emulsifier (increase over Aldara[®] 2.5 and 1.7x respectively). This was confirmed by skin analysis after 24 hours when the difference in control vs. the IMQ dispersion with sorbitan and 2-Pro increased 7.8x, compared to epidermis concentration of IMQ after eight hours.

SEZNAM ZKRATEK

2-Pro	Dodecylester N-acetylprolinu
Ab	Protilátka
Ag	Antigen
c _{IMQ}	Koncentrace IMQ
DDAK	Dodecylester kyseliny N,N-dimethyl-6-aminohexanové
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GM-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPV	Lidský papilomavirus
IL	Interleukin
IMQ	Imiquimod
INF	Interferon
IPM	Isopropylmyristát
NF-κB	Nukleární faktor kappa B, transkripční faktor ovlivňující imunitní pochody
NK	"Natural killer" buňky imunitního systému
PAMP	Molekulární struktury typické pro patogeny (Pathogen-associated molecular patterns)
S(1-6)	Strip (1-6)
SC	Stratum corneum
SEM	Standardní chyba průměru
SPC	Souhrn údajů o léčivém přípravku (Summary of Product Characteristics)
TLRs	Toll-like receptor(y)
TNF	Tumor-nekrotizující faktor

OBSAH

1	Úvod a cíle práce	1
2	Teoretická část.....	2
2.1	Léčivá látka imiquimod	2
2.1.1	Mechanismus účinku.....	3
2.1.2	Indikace	7
2.1.3	Nežádoucí účinky.....	8
2.1.4	Aplikační cesty IMQ	8
2.2	Kožní tkáň a proces absorpce.....	10
2.2.1	Stratum corneum.....	12
2.2.2	Prostup léčiva kůží a faktory, které jej ovlivňují	12
2.2.3	Mechanismy zlepšování penetrace	15
3	Experimentální část	20
3.1	Chemikálie a přístroje	20
3.2	Příprava aplikačních forem	21
3.3	Mikroskopické hodnocení vzorků	22
3.4	Kůže	22
3.5	Franzovy difuzní cely	22
3.6	Akceptorová fáze.....	23
3.7	Donorová fáze	24
3.8	Stanovení průniku léčiva kůží	25
3.9	HPLC analýza	26
3.9.1	Parametry metody	26
3.9.2	Kalibrace	26
3.10	Analýza dat	27
4	Výsledky a diskuze	28
4.1	Mikroskopické hodnocení aplikačních forem.....	28

4.2	Obsah IMQ v kůži po 8 hodinách.....	31
4.2.1	Stripy SC	31
4.2.2	Epidermis.....	34
4.2.3	Dermis	35
4.2.4	Okolní tkáň	37
4.2.5	Akceptorová fáze	39
4.3	Obsah IMQ v kůži po 24 hodinách.....	40
4.3.1	Stripy SC	40
4.3.2	Epidermis.....	43
4.3.3	Dermis	44
4.3.4	Okolní tkáň	46
4.3.5	Akceptorová fáze	47
5	Závěr	48
6	Citovaná literatura	49

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Kožní onemocnění mohou znamenat pro postižené pacienty i jejich blízké problém nejen zdravotní, ale v určitých případech hlavně společenský a estetický. To se týká především různých kožních výrůstků či novotvarů, ať už způsobených viry (jako třeba bradavice), či neoplastickými procesy (melanomy). Léčba takových stavů většinou zahrnuje metody invazivní (vyříznutí, leptání či vypalování). Netřeba dodávat, že komfort takových zákroku pro pacienta je nulový, obzvláště je-li postižená partie kůže na citlivějších či intimních místech.

Určitým průlomem v této oblasti se zdá být výzkum topicky působících imunomodulátorů. Těmi z nejvíce potenciálních se jeví být třída heterocyklických imidazochinolinů, v čele s imiquimodem (IMQ) a jeho dalšími homology - rozpustnější resiquimod (1), či pouze záměnou atomu kyslíku za dusík vzniklý gardiquimod (2). Zmíněné látky jsou vyvíjeny ve formách pro dermální aplikace (emulze, suspenze, gely...) nebo jako adjuvantní vakcíny. Tyto novější způsoby topické imunoterapie poskytují efektivní a pro pacienty přijatelnější způsob léčby kožních virových infekcí a non-melanomových kožních novotvarů. Svými adjuvantními vlastnostmi zároveň podporují konvenční léčbu vakcínami (3).

Jelikož kůže plní funkci bariéry proti vstupu látek do organismu, je třeba aplikovat léčiva ve větších koncentracích a tím pádem i zvyšovat riziko nežádoucích účinků. Ty logicky vyplývají z mechanismu působení těchto imunomodulátorů a patří mezi ně především vystupňovaná zánětlivá reakce (zarudnutí, edém, svědění, pálení...). To vede k výzkumu formulací s vylepšeným průnikem do tkáně s možností snížit koncentraci aplikovaného léčiva. Lze říci, že krom benefitu pro pacienta, existuje zde i šance na finanční úsporu v podobě menší spotřeby léčivých látek a s tím spojená např. kontaminace odpadních vod.

Cílem této práce tedy bylo formulovat nové topické lékové formy (emulze a suspenze) s nižším (1 %) obsahem IMQ, než na trhu dostupný krém Aldara® (5 % IMQ), a permeačními pokusy na lidské kůži porovnat míru pronikání IMQ do jednotlivých vrstev kůže. Součástí práce bylo i mikroskopické hodnocení připravených vzorků.

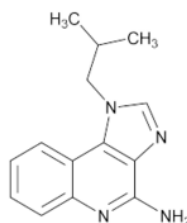
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Léčivá látka imiquimod

Imiquimod (IMQ), látka s chemickým názvem 1-isobutyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]chinolin-4-amin (obr. 1), byla patentována r. 1987 ve Spojených státech amerických (4). Jedná se o planární aromatickou molekulu, která má tendenci interagovat s ostatními molekulami IMQ za tvorby agregátů. Silné intermolekulární síly a tendence ke shlukování činí IMQ zcela nerozpustný ve vodě i v organických rozpouštědlech, zároveň činí nestabilními i roztoky IMQ, jelikož spolu molekuly v roztoku reagují a společně se z roztoku vylučují (5).

Imiquimod

v.1 Authorized May 1, 2011



$C_{14}H_{16}N_4$ 240.30
1*H*-Imidazo[4,5-*c*]quinolin-4-amine, 1-(2-methylpropyl)-;
4-Amino-1-isobutyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinoline [99011-02-6].

Obr. 1: Molekula IMQ (převzato z The United States Pharmacopeia (6)).

V současnosti je IMQ na českém trhu dostupný ve formě krému Aldara® (3M Health Care Limited, Leicestershire, Velká Británie). Roku byl 1997 americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) schválen pro léčbu vnějších perianálních a genitálních bradavic (7) a po dalších klinických studiích schválen (2004) pro léčbu non-hypertrofických aktinických keratóz u imunokompetentních jedinců a povrchového bazocelulárního karcinomu - viz kap. 2.1.2, tab. 1 (8, 9).

2.1.1 Mechanismus účinku

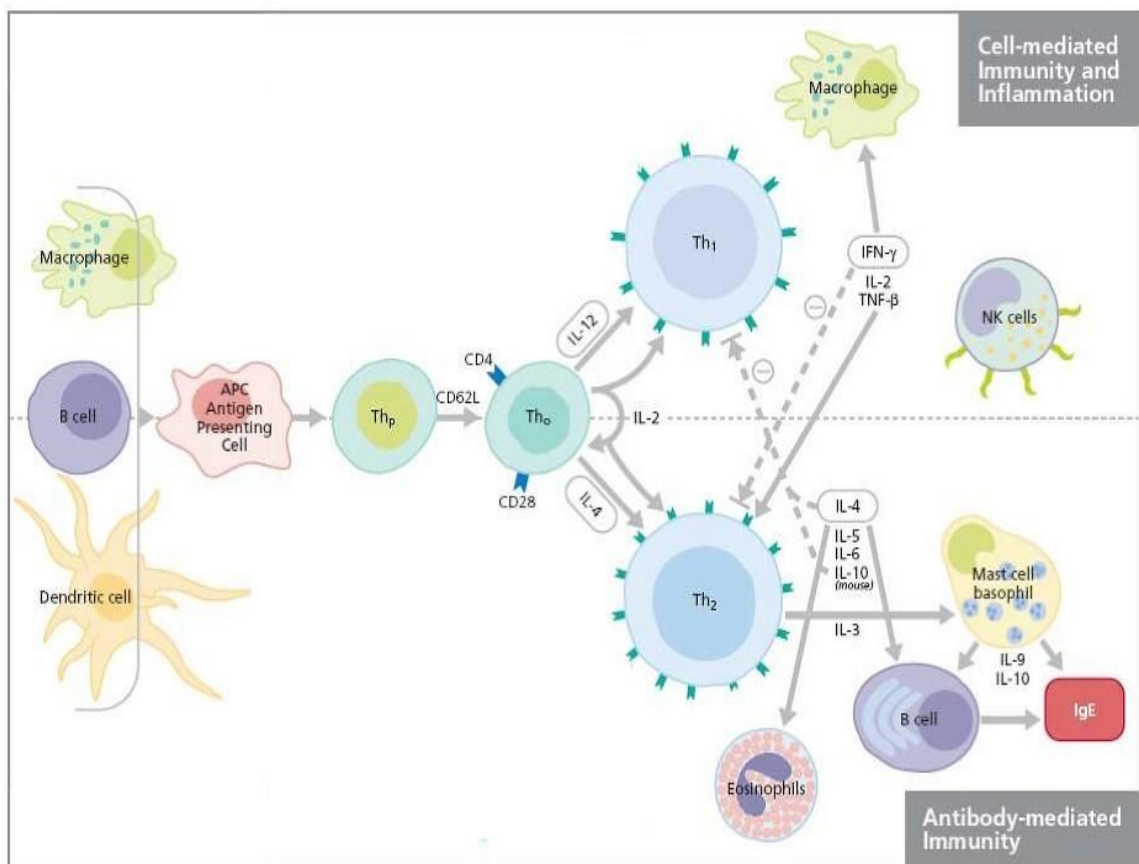
Imunitní systém – obecné připomenutí

Imunitní systém patří mezi základní homeostatické mechanismy organismu. Nejviditelnějším projevem je schopnost obrany proti patogenům a jejich toxickým produktům a ochrana proti vnějším škodlivinám. Imunitní mechanismy lze rozdělit do dvou základních větví: nespecifická (přírozená/vrozená/vnitřní) imunita a imunita specifická (adaptivní/získaná/vnější) (10).

Nespecifická složka je evolučně starší. V organismu jsou přítomny molekuly a buňky reagující na strukturní či funkční rysy charakteristické pro různé patogeny (PAMP – pathogen associated patterns). Spadají sem procesy humorální (látkové): komplement (soubor sérových a membránových proteinů, jež je schopen svou kaskádovitou aktivizací opsonizace, chemotaxe a lýzy patogenu), interferony (INF), lektiny a jiné sérové proteiny; a buněčné (fagocyty: neutrofilů, eozinofilů, monocytů - makrofágů, NK (natural killer) buňky). Tyto buňky produkují speciální působky – cytokiny, které dále zprostředkují systémovou odpověď na zánět (interleukiny (IL): IL-1 – „endogenní pyrogen“ a IL-6, tumor-nekrotizující faktor – TNF), amplifikují zánětlivou reakci (IL-8), regulují hematopoezu (IL-3, faktor stimuluje kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF)) a diferenciaci T-lymfocytů (IL-12) (10). Fagocyty jsou také důležitým zdrojem lokální produkce složek komplementu a projevují se i jako antigen-předkládající buňky. Tím upozorní specifické složky imunitního systému – T-lymfocyty – na fagocytovaný materiál a propojí oba mechanismy imunity (11). Tyto vrozené reakce jsou relativně rychlé, spouští se v řádu minut, nejsou však schopny uložení informací do imunologické paměti (10).

Imunita specifická funguje na bázi reakce protilátky (Ab) s částicí, kterou imunitní systém považuje za cizorodou – antigenem (Ag). Využívá antigenně vysoce specifické mechanismy (Ab, Ag-specifické receptory T-lymfocytů) a aktivuje se až po setkání s Ag. Opět se dělí na podsložky humorální (Ab produkované B-lymfocyty) a buněčné (T-lymfocyty). Působení se projevuje v řádu dnů až týdnů, každé setkání s novým Ag se uchovává v imunologické paměti (10).

Imunita vrozená i získaná jsou ve vzájemné interakci a komunikaci (obr. 2). Funguje zde tzv. klonální a anticipační princip: v organismu je předem připraveno řádově 10^7 individuálně odlišných T- a B-lymfocytů, které se navzájem liší detaily struktury vazebných míst svých Ag-specifických povrchových receptorů (10). Pro „probuzení“ T- a B-lymfocytů jsou vždy zapotřebí dva signály (11), proto je nezbytných několik druhů fagocytů k zahájení Ag-specifických imunologických procesů. Jednotlivý zralý T-lymfocyt a celé jeho potomstvo tvoří Ab proti jediné Ag determinantě (11).



Obr. 2: Schéma buněčné a látkové imunity (12).

IMQ jako imunomodulátor

Klinický efekt IMQ a jeho homologů spočívá v cytokiny indikované aktivaci imunitního systému – po topické aplikaci dochází především k vazbě na Toll-like receptory (TLRs) 7 a 8, čímž se mimo jiné zvyšuje produkce interferonu α (INF- α) (13), nejdůležitějšího působku antivirových reakcí. Tento děj spouští imunologickou kaskádu ústící ve stimulaci specifické i nespecifické imunity (tzv. pleiotropní efekt) a zároveň zprostředkuje nepřímé antivirotické, antiproliferativní a protinádorové působení IMQ *in vivo* (14).

In vitro studie na myších buňkách sleziny také ukázaly schopnost IMQ podpořit syntézu a uvolnění IL-6 a tumor-nekrotizujícího faktoru α (TNF- α). Při pokusech na buňkách z lidské periferní krve byly produkovány IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , antagonistu receptoru IL-1 a GM-CSF (7).

Klíčová role Toll-like receptorů

Vědecké pokusy na octomilce *Drosophila melanogaster* (která nemá T- a B-buňky specifické imunity) pomohly odhalit, že IMQ v lidském těle působí přes vysoce specifický proces aktivace klíčových imunitních buněk zprostředkovaný Toll-like receptory (TLRs). Na ty se váží určité produkty mikroorganismů a výsledná interakce spouští transkripci mnoha prozánětlivých genů (7).

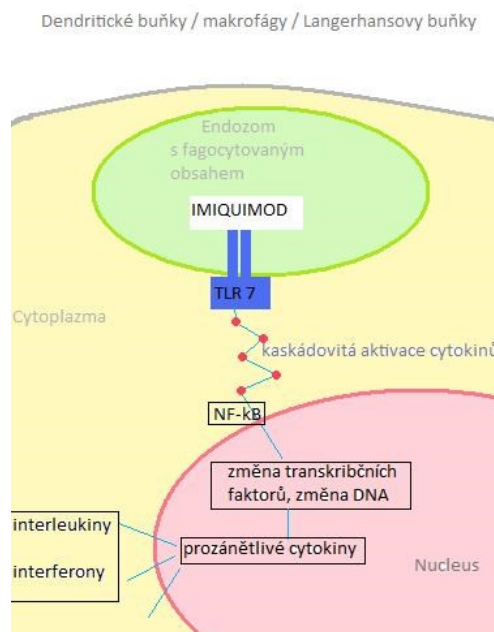
TLRs jsou proteiny povrchu buněk s extracelulární doménou, rozpoznávající ligandy, a cytoplasmatickou doménou, která vysílá do jádra signály pro spuštění exprese genů důležitých pro obranyschopnost organismu. Intracelulární doména se podobá receptoru pro IL-1, cytokin známý pro své široké prozánětlivé působení. U lidí je známo nejméně 11 druhů TLRs, z nichž každý se jeví být specifický pro určitý patogen nebo skupinu patogenů. IMQ vystupuje hlavně jako ligand TLR7. Přírozený ligand tohoto receptoru zatím není znám (7).

Cílové místo působení IMQ jsou Langerhansovy buňky kůže (Ag-prezentující buňky monocyto-makrofágové řady) (11, 15). Tam se váže na TLRs, přítomné na dendritických buňkách, makrofázích a monocytech, což vede k jejich aktivaci a stimulaci syntézy nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B). Toto vyvolává sekreci prozánětlivých cytokinů, které aktivují Th1-buňky (h = helper, druh T-lymfocytů)

a inhibují Th2-buňky (obr. 3). Aktivace Th1-buněk má za následek mimo jiné i ovlivnění makrofágů či spuštění sekrece IFN- γ , tedy hlavně imunitních pochodů cílících proti intracelulárním mikroorganismům, zatímco Th2-buňky mají za úkol hlavně boj s extracelulárními patogeny, aktivují žírné buňky a podílejí se hlavní měrou na vzniku alergií a hypersenzitivních reakcí; tato část imunity je tedy IMQ spíše tlumena.

Terapeutická úloha IMQ jako antivirového a protinádorového léčivého přípravku spočívá i v jeho schopnosti indukovat 2'5'-oligoadenylát syntázu, která aktivuje buňky NK a perforin v cytotoxických T-buňkách, což má za následek rozpoznání a zacílení škodlivých buněk a jejich zneškodnění spuštěním lýzy a následně apoptózou („buněčnou sebevraždou“). Kromě toho IMQ přímo vyvolává apoptózu virem napadených či mutovaných buněk aktivací proapoptotických Bcl-2 proteinů mitochondriální dráhy (8), indukuje zároveň migraci Langerhansových buněk do regionálních lymfatických uzlin a zlepšuje prezentaci Ag na tzv. naivních T-buňkách (tj. prozatím neaktivovaných T-lymfocytech) (16). Všechny tyto děje přispívají k účinnější obraně organismu vůči infekcím a nádorovým bujením.

IMQ navíc pravděpodobně podněcuje imunitní paměť pro lidský papilomavirus, což má za následek snížený výskyt recidiv (14). Zvýšením buněčné imunity je poskytována dlouhodobá ochrana před recidivami nebo reinfekcemi (16, 17).



Obr. 3: Schematické znázornění působení IMQ na TLR 7 (18).

2.1.2 Indikace

Tab. 1: Terapeutické indikace Aldary® dle souhrnu údajů o přípravku (the Summary of Product Characteristics, SPC) (19).

Krém s IMQ je určen pro topickou léčbu:

- Zevních genitálních a perianálních vegetací (*condylomata accuminata*) u dospělých.
- Malých povrchových bazocelulárních karcinomů u dospělých.
- Klinicky typických, nehyperkeratotických, nehypertrofických aktinických keratóz v oblasti obličeje nebo kštiny u imunokompetentních dospělých pacientů, u nichž by z důvodu velikosti nebo počtu lézí byla kryoterapie nedostatečně účinná a/nebo nepřijatelná a jiné terapeutické možnosti jsou kontraindikovány nebo méně vhodné.

IMQ je prvním ze členů třídy modifikátorů imunologické odpovědi, funguje jako imunitní enhancer (někdy též česky zesilovač) (14). Prokázaným lékem je při virem (HPV, lidský papilomavirus) způsobených kožních onemocněních jako jsou ploché bradavice, sexuálně přenosné anogenitální bradavice (20) a *molluscum contagiosum* (16), demonstrovány byly úspěšné pokusy na intraepiteliálních neoplasmatech:

- Bowenova nemoc – spinocelulární karcinom *in situ*, invazivní karcinom skvamózních buněk (7, 16)

- *lentigo maligna* – pigmentový névus s morfoloickými rysy maligního melanomu, ve který časem přechází (již se jedná o alterovaný stav tkáně označovaný jako prekanceróza) (21)

- Pagetova extramammární choroba scrota či vulvy – vzácný nádor epitelu vývodu potních žláz s prorůstáním karcinomových buněk do epidermis a do konečných úseků žlázek. Klinicky se onemocnění projevuje jako dosti ostře ohraničené většinou erytémové ložisko s povrchovými erozemi nebo s keratózou (22) .

Nedávné studie prokázaly účinnost při léčbě lymfomu T-buněk a zároveň byl IMQ efektivní i při ostatních neoplastických onemocněních (aktinická keratóza, superficiální karcinom bazálních buněk, či nodulární bazocelulární karcinom). Většina klinických případů hlásila úplné vyloučení bez důkazu opakovaného výskytu (7, 8, 16).

Schopnost IMQ využívat hostitelského imunitního systému k léčbě kožních virových infekcí a tumorů vedlo k průzkumu mnoha off-label použití (tj. užití léčiva v jiných než schválených indikacích, obvykle na základě vědeckých poznatků), např. u keloidních jizev (1, 8, 16, 23).

2.1.3 Nežádoucí účinky

IMQ vykazuje silné terapeutické výsledky, má však i svá nebezpečí. Stejně jako u všech léků se mohou vyskytnout vedlejší účinky. Závažnost účinku závisí na dávce, ta se liší v závislosti na typu onemocnění (8). IMQ není samozřejmě ideální lék pro všechny případy a vždy musí být zváženy všechny výhody a nevýhody pro konkrétního pacienta (20). Použití topického krému s IMQ je zjevně bezpečné u kojenců a starších dětí ačkoli bezpečnost a účinnost nebyla u pacientů mladších 12 let stanovena (16).

Většina pacientů užívala krém 3krát týdně do úplného vymizení projevů (většinou po dobu 4 až 7 měsíců) (8). Krém by měl být aplikován před spaním a ponechán na kůži po dobu šesti až deseti hodin, následně by měl být odstraněn omytím jemným mýdlem a vodou (16).

Nejčastějším nežádoucím účinkem je reakce v místě aplikace jako je erytém (u 33-80 % pacientů) (16), svědění, pálení, krvácení, píchání, bolest, indurace, citlivost a podráždění. Mezi další vedlejší účinky patří infekce horních cest dýchacích, sinusitida a bolest hlavy. Je třeba brát v potaz i riziko změn pigmentace (8). Mezi další omezení komfortu pacienta může spadat nezbytnost vyhnout se sluneční expozici z důvodu zvýšené náchylnosti k spálení, zhoršeny mohou být zánětlivé stavy kůže (16).

2.1.4 Aplikační cesty IMQ

Současný přípravek s IMQ, krém Aldara[®], je emulze o/v založená na popisu výrobku dle Wicka (24) (obr. 4), který obsahuje 5 % IMQ a 25 % kyseliny isostearové a představuje několik problémů, které je třeba řešit. Roztok IMQ v olejové fázi emulze není stabilní a v průběhu času má tendenci se vysrážet (5). Předpokládá se, že nedostatečná fyzikální stabilita této emulze je jedním z důvodů, proč se Aldara[®]

prodává v balíčcích pro jedno použití a proč se doporučuje, nespotřebované sáčky zlikvidovat. To se však vzhledem k ceně v praxi často neděje.

Za druhé, léčivá látka z krému proniká špatně přes lidskou kůži. Kožní bradavice, které se vyskytují na jiných místech než v genitálních a perianálních oblastech, jsou více keratinické než bradavice genitální a perianální a to snižuje penetraci ještě více.

Krém Aldara® je také spojen s velmi vysokým výskytem podráždění v místě podání. To se zdá být způsobeno vysokou koncentrací kyseliny isostearové, která je nutná pro rozpuštění IMQ v olejové fázi emulze. Druhou příčinou podráždění je léčivo samotné, přítomno v koncentraci 5 %. Taková vysoká koncentrace je však zapotřebí kvůli zmíněné špatné penetraci IMQ lidskou kůží (5).

Example	
13	
% by Weight	
1-Isobutyl-1H-imidazo[4,5-c]-quinolin-4-amine	5.0
Isostearic acid	25.0
Benzyl alcohol	2.0
Cetyl alcohol	2.2
Stearyl alcohol	3.1
Petrolatum	3.0
Polysorbate 60	3.4
Sorbitan monostearate	0.6
<u>Aqueous Phase</u>	
Glycerin	2.0
Methylparaben	0.2
Propylparaben	0.02
Purified water	53.48

Obr. 4: Složení krému s IMQ dle Pat. No. US5238944 (24).

Kromě přípravku Aldara® (obr. 5) je v ČR registrovaný i 3,75% krém Zyclara® (od stejného držitele o registraci jako Aldara®: MEDA AB, Solna, Švédsko), tento přípravek je však na českém trhu nedostupný (19, 25).

Místní aplikace IMQ je dále studována nejen ve formě kožních emulzí, ale také např. čípků k zabránění recidiv po ablaci kondylomat konečníku (26), emulzních gelů pro transkutánní vakcinační imunizaci (IMI-Gel vhodný pro léčbu rakoviny nebo persistentních virových infekcí) (27), intravesikálně pro léčbu karcinomu močového měchýře *in situ* (28) či intrakraniálně (29).



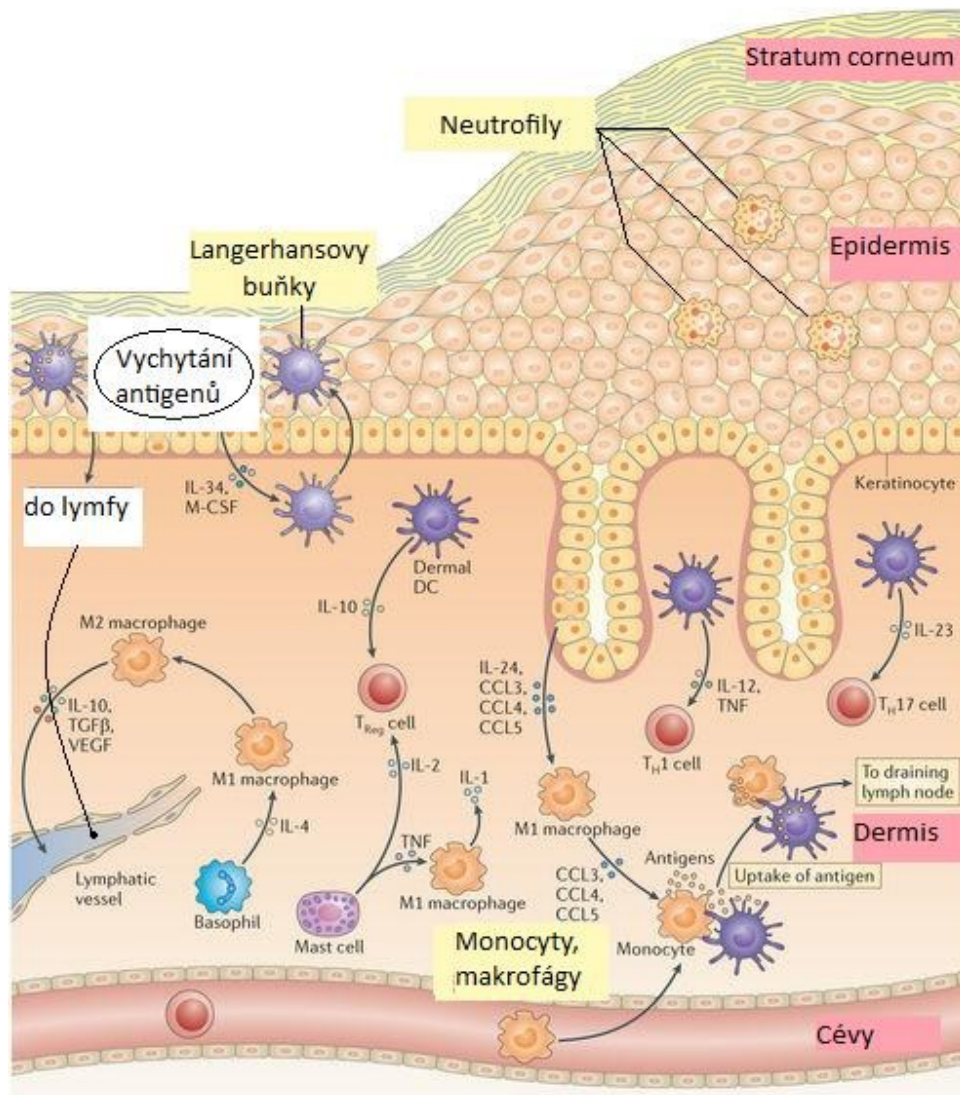
Obr. 5: Krém Aldara® (MEDA AB) (30).

2.2 Kožní tkáň a proces absorpce

Kůže je komplexní orgán zodpovědný za primární obranu suchozemských savců před vnějším prostředím, regulaci teploty a senzorické funkce. Jedná se o unikátní a účinnou bariéru, která je určena k minimalizaci vstupu cizorodých látek a UV záření do těla a zamezení výstupu vody. Kůže však zabraňuje nejen vnikání škodlivých sloučenin, ale také záměrně aplikovaných látek, např. léků. Bariérová funkce kůže je přisuzována organizaci a složení nejsvrchnější vrstvy kůže, *stratum corneum* (SC), nicméně i spodnější vrstvy pokožky hrají důležitou úlohu při pronikání a distribuci léčiv, např. tuková tkáň může sloužit jako depot léčiv (31).

Kůže představuje aplikační cestu pro podání účinných látek, které mají působit místně (lokálně, hovoříme o kožním nebo také dermálním podání), i látek, které musí projít tkání a být absorbovány v systémové cirkulaci, aby dosáhly svého místa působení jinde v organismu (transdermální podání). Výhody kožní aplikace jsou zřejmé, neboť skýtají převážně možnost lokalizace léčiva přímo v jeho místě působení. Výhody transdermální cesty jsou také dobře známy a zahrnují např. prodloužené uvolňování a zabránění jaternímu metabolismu. K nesporným plusům obou zmíněných způsobů aplikace patří i flexibilita dávkování (32).

Kůže je složena ze dvou hlavních vrstev (obr. 6): epidermis - vrchní vrstva pokožky pokrývající dermis - aktivní část pokožky, zásobenou krví a kotvící folikuly chlupů a vlasů, mazové žlázy a nervové receptory. Pod ní leží hypodermis - subkutánní pojivová tkáň zahrnující také podkožní tuk (33). Epidermis pak můžeme dále rozlišit na neživou epidermis (SC) a živou epidermis (31).



Obr. 6: Průřez kůže včetně znázornění možných imunitních dějů (dle Nature Reviews Immunology (34)).

2.2.1 Stratum corneum

Strukturálně je SC tenká (~ 15 µm) vrstva obsahující 10 až 20 vrstev plochých, terminálně diferencovaných a keratinizovaných epidermálních buněk oddělených intercelulární lipidovou matrix (35). Toto uspořádání korneocytů uvnitř lipidové hmoty je často srovnáváno s cihlovou stěnou. Husté překrývající se mrtvé buňky (cihly) s obsahem 75-85 % bílkovin, převážně keratinu, jsou propojeny korneodesmosomy a jsou uloženy v mezibuněčné matici – maltě. Ta se skládá z komplexní směsi lipidů (5-15 % (w/w) SC) zejména sfingolipidů (především ceramidů), volných mastných kyselin a jejich esterů a cholesterolu a jeho derivátů, které jsou uspořádané ve dvouvrstvách (31, 36).

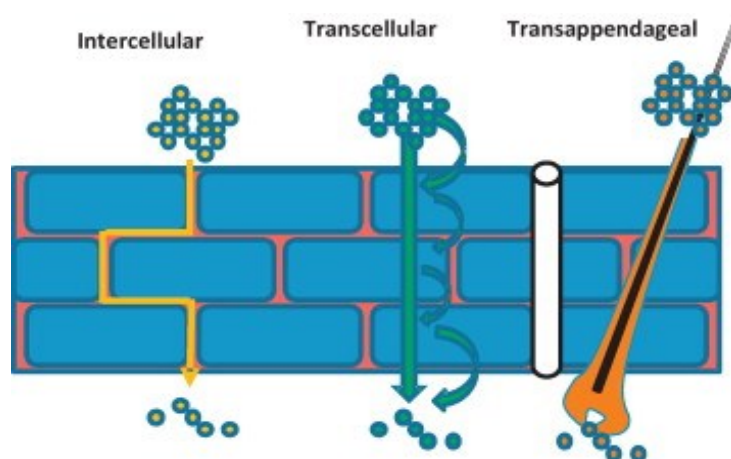
Řada léčiv může během prostupu kůží interagovat s různými vrstvami pokožky, což vede k omezené absorpci. Tyto interakce mohou být ve formě reverzibilní i nevratné vazby na struktury v biologické tkáni, jako je keratin v SC anebo specifická místa v kůži. Vazba léčiva se liší v různých kompartmentech, pozorována může být např. akumulace nebo retence léku jako následek nízké difuzivity nebo krystalizace léčiva. Tyto způsoby mohou přispívat ke zvýšení zásobní kapacity kůže pro určité sloučeniny (depa), např. steroidy. Navíc mohou být léky ovlivněny kožním metabolismem (36).

2.2.2 Prostup léčiva kůží a faktory, které jej ovlivňují

Protože je kůže z větší části dynamická živá tkáň, její absorpční charakteristiky jsou náchylné k neustálým změnám. Schopnost absorpce je ovlivněna vlastnostmi pokožky i aplikovaného produktu.

V závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech přípravků i léčiv, požadovaném místě působení a strategiích formulace léčiva mohou látky zabudované do různých aplikačních forem vykazovat svou aktivitu v povrchových vrstvách tkání (hovoříme také o penetraci nebo dermálním podání = průniku léčiva do kůže), nebo pro dosažení místa působení proniknout do hlubších vrstev, či působit systémově, neboli přes kůži (hovoříme též o permeaci, či transdermálním podání léčiva) (37).

Průchod léčiva kůží má několik cest: transcelulární (syn. intracelulární), mezibuněčná (intercelulární) a průnik skrze mazové a potní žlázy nebo vlasové folikuly (obr. 7). Vzhledem k tomu, že adnexa zaujímají velmi malý povrch, je tento způsob průniku za normálních podmínek méně významný (31).



Obr. 7: Možné cesty průniku látek skrze SC: intracelulární, transcelulární, skrze žlázy (dle Lane, 2013).

V experimentálních studiích se zdá, že převládající cesta penetrace probíhá přes intercelulární prostory. Bylo zjištěno, že difuzní délka dráhy je mnohem delší než tloušťka SC ($20\ \mu\text{m}$) a odhaduje se přibližně na $300\text{-}900\ \mu\text{m}$ (33).

Nejprve musí být léčivo uvolněno z vehikula, molekuly se následně rozptýlí (v důsledku koncentračního gradientu) napříč SC a dále difundují přes viabilní epidermis směrem k dermis. Cévní a lymfatické cévy dermis mohou transportovat léčivo z kůže (36).

Faktory ovlivňující průnik léčiv kůží

Kůže: její struktura se liší mezidruhově (např. SC je silnější u druhů bez ochlupení) a dokonce v rámci stejného druhu (rozdíly absorpce pro různé části těla). V rámci dermis se liší počet a hustota kolagenových a elastických vláken a hustota a fyziologie cévního systému (38).

Poškození kůže: odstranění vnějších vrstev pokožky (např. adhezivní páskou) může dramaticky zvýšit absorpci kůže (39).

Nemoci kůže, jako je atopická dermatitida, psoriáza a bradavice, mohou ovlivnit bariérové vlastnosti kůže, což je třeba vzít v úvahu nejen pro léčivé přípravky zaměřené na tyto kožní nemoci (37).

Rychlost absorpce látky v kůži je úměrná jak **koncentraci látky**, tak ploše, na níž je aplikována (39). Z hlediska podávání léčiva vytváří koncentrační gradient mezi formulací a místem působení hnací sílu pro průnik léčiva kůží. Léčivem saturované vehikulum tedy poskytuje větší hnací sílu pro transport skrze kůži než formulace s nižším podílem nasycení (37).

Složení vehikula také ovlivňuje absorpci. Nepochárné nosiče zvyšují penetraci, látky rozpustné v tucích se absorbují lépe. Léčiva, které mají nižší rozpustnost v nosiči, se do pokožky vstřebávají snadněji, nezanedbatelný je i vliv některých dalších přítomných molekul, např. vody, která výrazně průnik podporuje (38). Pomocné látky, které inhibují penetraci kůží, mohou být použity k udržení léčiva na povrchové vrstvě pokožky.

Vlastnosti účinných látek: fyzikální a chemické vlastnosti mají rozhodující vliv na průnik molekul přes kůži. Jako ideální vlastnosti molekuly, která by dobře pronikla SC, se jeví:

- optimální liposolubilita (rozdělovací koeficient $\log P$ rozpuštěné látky mezi membránou a roztokem, obvykle maximální mezi +1 a +3)
- nízká molekulová hmotnost (nejlépe <600 Da)
- nízký bod tání, korelující s dobrou rozpustností.

Důležitá je i elektronová struktura a disociační konstanta (pK_a): vysoce ionizované produkty pronikají méně (31).

2.2.3 Mechanismy zlepšování penetrace

Různé potenciální mechanismy pro zvýšení penetrace léku skrze kůži zahrnují přímo ovlivnění kůže a modifikaci formulace tak, aby se změnil logP, difúze nebo rozpustnost (40, 41). S největší pravděpodobností je to celková kombinace různých mechanismů, které vedou k účinku zvyšujícímu penetraci, a žádný izolovaný mechanismus nemusí být dostačující.

Jedna z vlastností se může týkat malé **velikosti kapének a poměru velkého povrchu/objemu (mikro- a nanočásticové systémy)**, či zvětšení kapacity vehikula pro pojmutí léčivých látek (**loading capacity**). Strukturní uspořádání olejové a vodné fáze a přítomnost rozhraní obsahujícího surfaktanty vytváří další oblasti rozpustnosti, což zvyšuje saturaci, „load“, takto formulovaných vehikul ve srovnání s vehikuly nestrukturovanými (42). Rovněž je předpokládáno, že formulace s nepřetržitě kolísavými rozhraními může **zvýšit mobilitu léků** a přispět k jejich pronikání. (18)

Určité **povrchově aktivní látky**, složky olejové fáze a jiné prostředky pro zvýšení penetrace zabudované do systému (podrobněji v následující podkapitole Akceleranty (trans)dermální penetrace), mohou difundovat na povrch kůže a zvyšovat permeaci léčiv buď **narušením lipidové struktury stratum corneum** (usnadňující difúzi přes kožní bariéru) nebo **zvýšením rozpustnosti léčiva v kůži** (tj. zvyšování rozdělovacího koeficientu léčiva mezi kůží a vehikulem). Bylo zjištěno, že složky narušují tuto vrstvu do té míry, která je přímo úměrná úrovni zastoupení příslušné složky v kůži (42).

Zvýšení **hydratace** pokožky: vzhledem k tomu, že voda je považována za permeační akcelerant (41), může přispět ke zlepšení penetrace. Zároveň je i díky okluzivním vlastnostem sloučenin používaných v olejové fázi možné, že tyto složky změni vodní gradient v horních vrstvách pokožky a tím se vyhneme odpařování (32).

Akceleranty (trans)dermální penetrace

Ke zlepšení trans- nebo dermálního podávání léčiv jsou využívány látky zvyšující jeho prostup kůží (také nazývané sorpční promotory, enhancery, urychlovače nebo akceleranty), které pronikají do kůže a reverzibilně snižují její bariérovou rezistenci. Pro aktivitu zvyšující penetraci bylo hodnoceno mnoho sloučenin, včetně sulfoxidů (jako je dimethylsulfoxid), azonů (např. laurocapram), pyrrolidonů (například 2-pyrrolidonu), alkoholů (ethanol nebo dekanol), glykolů (například propylenglykol, běžný excipient v topicky aplikovaných dávkových formách), povrchově aktivních látek a terpenů (41).

V praxi se ukázalo, že by se mělo jednat o látky snadno dostupné, levné a se známým mechanismem účinku zaručujícím jejich bezpečné terapeutické použití (43). Existují sloučeniny, které prokazují některé z výše uvedených atributů, avšak žádná taková, splňující požadavky na ideální akcelerant, nebyla dosud objevena (31). Prozatím je tedy volen kompromis mezi terapeutickým přínosem a rizikem nežádoucích účinků (43).

Ideální vlastnosti permeačních akceleračtů

Požadovaná činidla zvyšující penetraci by měla reverzibilně snižovat bariérovou odolnost SC bez poškození životaschopných buněk. Měla by být netoxická, nedráždivá a nealergická, v ideálním případě rychle působící. Aktivita a trvání účinku by měly být předvídatelné a reprodukovatelné. Neměla by mít žádnou farmakologickou aktivitu v těle (tzn., neměla by se vázat na místa receptorů), měla by působit jednosměrně, tj. umožňovat podání léčiv do těla a zároveň nezpůsobovat ztráty endogenních látek z těla. Při odstranění z kůže by se bariérové vlastnosti měly vrátit rychle a úplně do normálu.

Zesilovače penetrace by měly být vhodné pro přípravu různých topických přípravků, a proto by měly být kompatibilní jak s excipienty, tak s léčivy. Měly by být kosmeticky přijatelné a příjemné (s dobrým sensorickým hodnocením na kůži) (31, 41).

Působení urychlovačů permeace

Jak již bylo uvedeno, většina molekul prochází kůží intercelulární cestou. Techniky zlepšování permeace či penetrace se tudíž zaměřují na dočasné narušení nebo obejití za běžných okolností funkční molekulární a buněčné architektury pokožky, převážně SC (31).

Působení akceleračů na kůži může být rozčleněno na dvě úrovně. První z nich je penetrace látek do místa účinku a druhou je vlastní působení ve SC. Přesný mechanismus účinku akceleračů není dosud znám. Je však patrně založen na jejich nespecifických interakcích se strukturami kůže (43). Možné mechanismy účinku zesilovačů jsou různé a mohou se pohybovat od přímých účinků na kůži až po modifikaci formulace. Tím, že působí přímo na pokožku, mohou zesilovače (41):

a) Interagovat s intercelulárními lipidy: Většina akceleračů interaguje s intercelulárními lipidovými doménami SC. Malé polární molekuly mohou přerušit vodíkové vazby, které drží u sebe molekuly ceramidů. Amfifilní akceleračy mají schopnost vmezeřit se mezi lipidové lamely tak, že polární hlava se umístí do polární části a hydrofobní řetězce mezi hydrofobní řetězce lipidů. Toto má za následek narušení uspořádání lipidů a fluidizaci lamelární struktury, což vede ke snížení odporu kožní bariéry. Některá rozpouštědla, jako je ethanol nebo dimethylsulfoxid, působí extrakci lipidů (33, 43).

Narušení lipidových dvojvrstev pravděpodobně není homogenní – enhancery se nedistribují rovnoměrně, ale jsou heterogenně koncentrovány v intercelulárních lipidových doménách. Takový fenomén "sdužování" byl prokázán u kyseliny olejové a azonové a je pravděpodobné, že se vzhledem k různým možným konformacím lipidů SC, vyskytne u většiny enhancerů (41).

b) Interagovat s proteinovými strukturami: Některé akceleračy mohou ovlivňovat konformaci keratinu v korneocytech nebo proteinů v desmozomech (struktury specializované na adhezi buněk mezi sebou), které udržují soudržnost mezi korneocyty. V porovnání s akceleračy, které interagují s kožními lipidy, je jejich účinek poměrně slabý. Nutno podotknout, že většina konformačních změn proteinů je nevratných (43). Denaturací intracelulárního keratinu nebo modifikací jeho konformace může nastat zvýšená hydratace a otok (33).

c) Ovlivňovat rozdělovací rovnováhy, logP léčiva, koenhanceru nebo rozpouštědla: Některé akceleranty, především nízkomolekulární (např. ethanol či propylenglykol), mají schopnost měnit logP mezi (trans)dermálním systémem a SC (měnit vlastnosti SC jako solventu pro permeant) a usnadňují tak prostup léčiva (31, 43).

Jako další možné varianty jsou uváděny například i permeační akceleranty působící na změny metabolické aktivity v kůži (41).

Kromě toho může být zvýšení penetrace nepřímé.

1. Modifikace termodynamické aktivity vehikula. Rychlá permeace dobrého rozpouštědla z donorového roztoku, jako je ethanol, může opouštět permeant v termodynamicky aktivnějším stavu, než když je přítomno rozpouštědlo - dokonce až do bodu přesycení.

2. Kopermeační efekt: rozpouštědlo pronikající přes membránu může "táhnout" permeant s sebou.

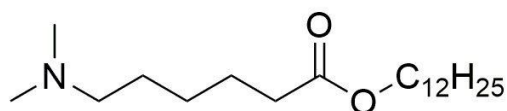
3. Solubilizace permeantu (například s povrchově aktivními látkami), zvláště tam, kde je rozpustnost velmi nízká, jako u steroidů ve vodných roztocích donoru, může prodloužit uvolňování léčiv (41).

Deriváty aminokyselin

Deriváty aminokyselin se zdají být slibnou třídou zesilovačů difuzivity léčiv, zejména ty, které mají hydrofobní "ocas" připojený k aminokyselinové "hlavě" přes biodegradovatelnou vazbu (např. estery). Po dosažení enzymaticky aktivních vrstev pokožky by mohla být vazba hydrolyzována, čímž by se uvolnily známé netoxické sloučeniny s mnohem nižším potenciálem pro dráždění (44).

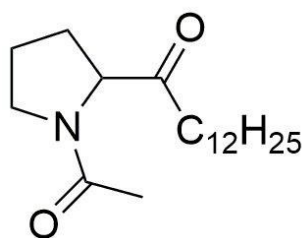
Dodecylester kyseliny N,N-dimethyl-6-aminohexanové (DDAK, obr. 8) je nejvýznamnějším představitelem skupiny N,N-disubstituovaných esterů 6-aminohexanové kyseliny. Je poměrně rychle štěpen esterázou ($t_{1/2} = 17$ min) a jeho účinek je reverzibilní (4 hodiny po ukončení aplikace DDAK se elektrická impedance kůže vrátila na hodnoty pozorované u kontroly). V práci Vávrové a kol. byl DDAK účinným akcelerantem při všech hodnotách pH s maximem kolem pH 6, kde urychloval flux adefovirusu prasečí kůže 42x. Výsledky byly potvrzeny i na viabilní lidské kůži, kde

DDAK urychloval permeaci adefoviru 179x (54). Při terapeutických dávkách (1 %) nebyl zaznamenán žádný projev kožní alergizace (morče), žádný projev akutní kožní toxicity (potkan) a dokonce nebyl toxický po perorálním podání (potkan) (43).



Obr. 8: DDAK.

Dodecylester N-acetylprolinu (2-Pro, obr. 9) významně zvyšuje propustnost kůže pro relativně široké spektrum léčiv lipofilní i hydrofilní povahy. Toto činidlo bylo ve studii Janůšové a kol. schopno zvýšit propustnost dvou modelových léků s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (hydrokortizon, theofylin): při koncentraci 1 % dosáhl 2-Pro až 40násobného zvýšení propustnosti, což je vyšší než u dobře zavedených a standardních akcelerantů. Nebyla pozorována žádná stereoselektivita, potvrzeno bylo synergické působení 2-Pro s propylenglykolem. Infračervené studie ukázaly, že 2-Pro tvoří separovanou tekutou uspořádanou fázi v lipidech SC a nemá významný vliv na proteiny. Aktivita 2-Pro byla alespoň částečně reverzibilní, měřeno elektrickou impedancí kůže. 2-Pro byl rychle rozložen v plazmě, ale byl stabilní ve fosfátovém pufru, což naznačovalo enzymatickou povahu této reakce. Studie transdermální absorpce *in vivo* u potkanů naznačily zanedbatelnou kožní toxicitu a minimální účinek na transepidermální ztrátu vody, systémová expozice je pravděpodobně velmi nízká. Tyto vlastnosti spolu s výhodnou kombinací vysoké aktivity a reverzibilního účinku činí 2-Pro slibným kandidátem pro potenciální klinické použití (45, 46).



Obr. 9: 2-Pro.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a přístroje

IMQ byl zakoupen od firmy TCI (Tokio, Japonsko). Ostatní komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo), Dr. Kulich Pharma, s.r.o. (Hradec Králové; polysorbát 80, sorbitan oleát) a Penta (Chrudim; absolutní ethanol, kyselina octová 99%). Akceleranty DDAK a 2-Pro byly syntetizovány na Katedře anorganické a organické chemie (FaF UK). Jejich totožnost a čistota byla potvrzena infračervenou spektroskopií, spektroskopií nukleární magnetické rezonance a hmotnostní spektrometrií. Přípravek Aldara[®] (vázaný na recept) byl dodán Nemocniční lékárnou Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Ultračistá voda byla destilována, deionizována a filtrována systémem Millipore Q (Katedra biochemických věd FaF UK).

Přístrojové vybavení zahrnovaly analytické váhy OHAUS Discovery DV 215 CD (Greifensee, Švýcarsko), váhy KERN ABJ 220-4M (KERN & SOHN, Balingen, Německo), pH metr Hanna Instruments model 210 (Leighton Buzzard, Velká Británie), ultrazvuková lázeň KRAINTEK, typ K-12LM (Hradec Králové), třepačky Minishaker MS2 IKA[®] (Staufen, Německo) a LT3 NEDFORM s.r.o. (Benešov), vyhřívaná lázeň Memmert, typ WNB 29 (Schwabach, Německo) opatřena magnetickou míchačkou Variomat a telemodulem 20 C (Thermo Electron LED, Langenselbold, Německo), termostat Memmert INB 300 a sušárna Memmert UN55 (Schwabach, Německo). Připravené vzorky byly hodnoceny pomocí optického mikroskopu Olympus BX51 a softwaru AnalySIS auto 5.1 (Tokio, Japonsko).

3.2 Příprava aplikačních forem

Všechny vzorky (složení viz tab. 2) byly připravovány v množství 1 g.

Tab. 2: Složení zkoušených vzorků s účinnou látkou IMQ (1 %), udáno v % (w/w), IPM = isopropylmyristát.

Vzorek č.	Vehikulum	Emulgátor (1 %)	Akcelerant (1 %)
1	IPM	-	-
2	IPM	-	DDAK
3	IPM	-	2-Pro
4	IPM:octanový pufr 1:3	sorbitan oleát	-
5	IPM:octanový pufr 1:3	sorbitan oleát	DDAK
6	IPM:octanový pufr 1:3	sorbitan oleát	2-Pro
7	IPM:voda 1:3	sorbitan oleát	-
8	IPM:voda 1:3	sorbitan oleát	DDAK
9	IPM:voda 1:3	sorbitan oleát	2-Pro
10	IPM:voda 3:1	polysorbát 80	-
11	IPM:voda 3:1	polysorbát 80	DDAK
12	IPM:voda 3:1	polysorbát 80	2-Pro

Octanový pufr ($c = 0,01$ M, iontová síla $0,001$ M) byl připraven rozpuštěním bezvodé kyseliny octové ($m = 0,6$ g) v ultračisté vodě (do 1000 ml) a titrován do hodnoty pH 4 koncentrovaným roztokem hydroxidu sodného.

Chemikálie byly naváženy v potřebném množství do vialek (2 ml), protřepány a podrobeny pěti cyklům po 10 minutách při 60 °C v ultrazvukové lázni. Mezi každým

cyklem byla ponechána pauza na zchladnutí a opětovné protřepání. Připravené formulace byly před aplikací skladovány v termostatu při 32 °C.

3.3 Mikroskopické hodnocení vzorků

Po důkladném protřepání bylo odebráno plastovou špičkou co nejmenší množství vzorku, aplikováno na podložní sklíčko a po přikrytí sklíčkem krycím zatíženo po dobu několika minut pro získání co nejslabší vrstvy. Vzorky byly postupně pozorovány při zvětšení 100, 200 a 400násobném, pokaždé bylo pořízeno několik snímků z různých míst.

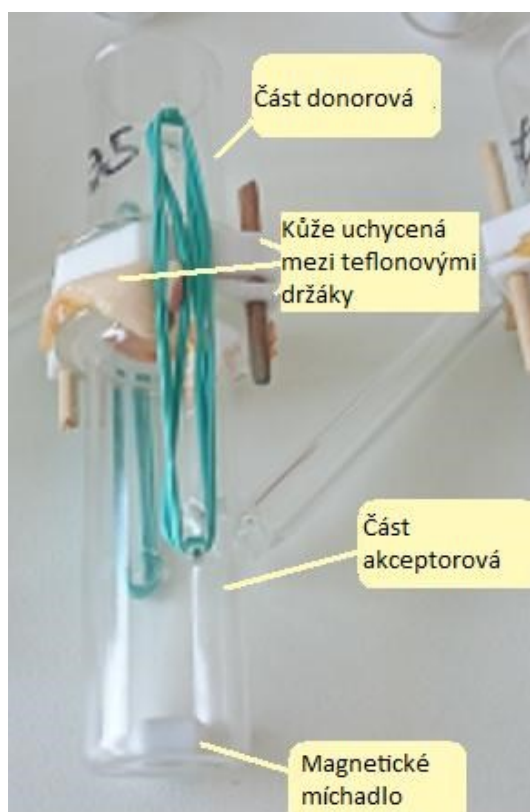
3.4 Kůže

Pro všechny pokusy byla použita kůže pacientů bělošské rasy, kteří podstoupili plastickou operaci v oblasti břicha či prsu v Sanatoriu Sanus (První privátní chirurgické centrum s.r.o.) v Hradci Králové. Veškerý proces odběru lidské kůže probíhal v souladu s pravidly schválenými Etickou komisí při Prvním privátním chirurgickém centru s.r.o. Sanus, Hradec Králové a dle principů Helsinské deklarace. Po transportu byly kůže zbaveny pomocí skalpelu tukové tkáně, omyty vodou a po osušení uloženy do polyethylenových sáčků a skladovány při teplotě – 20 °C až do zahájení pokusu. Pro umístění do Franzových cel se kůže nařezávala na čtverečky o přibližné velikosti 2 x 2 cm.

3.5 Franzovy difuzní cely

Pro *in vitro* hodnocení prostupu léčiva z připravených vzorků kůží byly použity skleněné Franzovy difuzní cely (obr. 10). Cely se skládá z donorového (horního) a akceptorového (spodního) dílu. Části kůže byly umístěny rohovou vrstvou nahoru mezi obě komory, přichyceny pomocí špejlí do dvou teflonových držáků o tloušťce 0,6 a 0,2 cm, s otvorem ve střední části vymezující difúzní plochu 2,0 cm². Držáky byly z obou stran předem lehce namazány silikonovou vazelínou, aby se zajistila lepší přilnavost všech komponent. Skleněné díly Franzových cel k sobě byly přichyceny gumičkami. Spodní díl cely, opatřen teflonovým míchadlem, byl přes raménko opatrně

naplněn injekční stříkačkou fosfátovým pufrém (viz kap. 3.6) s důrazem na zamezení tvorby bublin a kontrolu případných průsaků. Cely byly umístěny do vodní lázně temperované na 32 °C se zapnutým mícháním pro zajištění homogenity a cirkulace akceptorové fáze a vytvoření co nejbližšího fyziologického prostředí lidského organismu. Lázeň byla překryta alobalem a ponechána přes noc k ustálení.



Obr. 10: Sestavená Franzova difúzní cela.

3.6 Akceptorová fáze

Akceptorová fáze slouží k simulaci krevního oběhu v lidské kůži. Pro tento účel byl použit isotonický 10 mM fosfátový pufr o pH upraveném na hodnotu 7,4. Složení pufru na 1 l je uvedeno v tab. 3. Pufr byl připraven z komerčně dostupných lisovaných tablet Phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich) při doporučeném postupu výrobce: 1 tableta na 200 ml rozpouštědla (ultračistá voda), v objemu 800 ml (4 tablety) s přidáním 10 % (v/v) absolutního ethanolu a 44 mg gentamicinu pro mikrobiální stabilitu.

Tab. 3: Složení fosfátového pufru.

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,312 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,865 g
NaCl	8,000 g
KCl	0,201 g
Gentamicin	0,050 g
Ethanol (absolutní)	100 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

3.7 Donorová fáze

Pomocí pipety s upravenou špičkou bylo naneseno vždy 25 µl vzorku 1-12 (viz kap. 3.2) přes donorovou komoru přímo na kůži a rozetřeno na celou difuzní oblast. Jako standard byl použit hromadně vyráběný léčivý přípravek Aldara[®] (tab. 4) a pro kontrolu a redukci chyb měření byla ponechána kůže neošetřená (blank). Každý vzorek byl při jednom permeačním pokusu replikován 3x. Celkem byly provedeny čtyři permeační pokusy.

Tab. 4: Složení krému Aldara[®] dle SPC (19).

Jeden sáček obsahuje imiquimodum 12,5 mg ve 250 mg krému (5 %).

kyselina isostearová
benzylalkohol
cetylalkohol
stearylalkohol
bílá vazelína
polysorbát 60
sorbitan-stearát
glycerol
methylparaben (E218)
propylparaben (E216)
xanthanová klovatina
čištěná voda

3.8 Stanovení průniku léčiva kůží

Hodnocení permeačních pokusů probíhalo ve 2 schématech:

a) po 8 hodinách od aplikace - permeační pokus byl ukončen, kůže byla opláchnuta destilovanou vodou a lehce otřena vatovým tampónem napuštěným ethanolem.

b) po 24 hodinách od aplikace – po osmihodinovém působení vzorku byly nevstřebané zbytky opláchnuty destilovanou vodou a vysušeny vatovými tyčinkami, cely byly dále ponechány na vodní lázni přes noc do druhého dne, kdy byla kůže lehce otřena vatovým tampónem napuštěným ethanolem.

Po ukončení permeačního pokusu a vyjmutí Francových cel z lázně, bylo stříkačkou odebráno 500 μ l vzorku akceptorových fází, případně změřen přesný objem akceptorového média a následovalo rozmontování cel.

Pro zjištění koncentrace účinných látek ve SC (nejsvrchnější vrstvě kůže) byla použita metoda tape stripping (z anglického tape = páska, strip = odejmout, odebrat; stanovení léčiv jako funkce hloubky jeho průniku).

Na difuzní plochu byly následně konstantním tlakem a rychlostí aplikovány kusy adhezivní pásky (přibližně 2x2 cm) pro separaci jednotlivých vrstev SC. Vždy první strip vzorku byl zlikvidován, protože by mohl ještě obsahovat přebytečnou formulaci. Další odebrávání probíhalo ve schématu 2-2-3-3-5-5 s tím, že hodnota vždy značí počet přiložení jednoho kousku pásky na kůži, neboli v ideálním případě počet odebraných vrstev SC. Jednotlivé stripy byly ukládány do 4ml vialek s přidáním 1 ml extrakčního roztoku o složení methanol:octanový pufr ($c = 0,01$ M, $pH = 4$) v poměru 7:3 (v/v).

Za účelem analýzy obsahu léčiva v hlubších vrstvách kůže byla ošetřená oblast vyseknuta korkovrtem, zakápnuta vodou a v aluminiové folii a vystavena teplotě 60 °C po dobu 1-2 min. Po vyjmutí z alobalu a otření vatovou tyčinkou byla opatrně oddělena epidermis od dermis, obě části kůže byly zváženy a samostatně umístěny do skleněných vialek. Každý vzorek epidermis byl opět extrahován v 1 ml směsi methanol:octanový pufr (7:3, v/v) pro vzorky z dermis bylo použito 2 ml směsi. Extrakce probíhala přes noc na třepačkách při laboratorní teplotě.

Následný den byla každá vialka protřepána a extrakty zfiltrány přes smotek vaty v pipetové špičce do 2ml vialek určených pro HPLC analýzu. Takto byl určen obsah léčiva v jednotlivých vrstvách kůže a také celková koncentrace léčiva v kůži po přepočtu na její hmotnost.

3.9 HPLC analýza

3.9.1 *Parametry metody*

System se skládal z vysokotlakého čerpadla LC-20AD s odplynovače (degaseru) DGU-20A3, dávkovače vzorků (autosampleru) SIL-20A HT, kolonového termostatu CTO-20AC, UV (diode-array) detektoru SPD-M20A, komunikačního modulu CBM-20A včetně integračního softwaru LCsolutions verze 1.22 (vše Shimadzu Kyoto, Japonsko). Separace IMQ bylo dosaženo na koloně Supelco Discovery[®] HS C18 (15 cm x 4,6 mm, 5 μm) při teplotě kolony 40 °C. Mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina fosforečná (30:70:1, v/v, pH 2,7), průtok: 1 ml/min, nástřik: 10 μl, detekce: UV (242 nm), retenční čas: 3,2 min, délka analýzy: 5,0 min.

3.9.2 *Kalibrace*

Standardy pro validaci metody a tvorbu kalibrační křivky byly naředěny z čerstvě připraveného zásobního roztoku IMQ rozpuštěného v ultrazvukové lázni v extrakčním médiu (methanol:octanový pufr 7:3, v/v) o koncentraci $c_{\text{IMQ}} = 1 \mu\text{g/ml}$. Byla připravena kalibrační řada dle tab. 5, vždy v objemu 1 ml. Odezva po nástřiku kalibračních standardů byla odečtena jako plocha pod píkem, kalibrační křivka byla stanovena metodou lineární regrese ($r^2 = 0,9998$).

Tab. 5: Kalibrační řada pro HPLC analýzu IMQ.

	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	K ₉	K ₁₀
c_{IMQ} (ng/ml)	1	2	5	10	20	50	100	200	400	600

3.10 Analýza dat

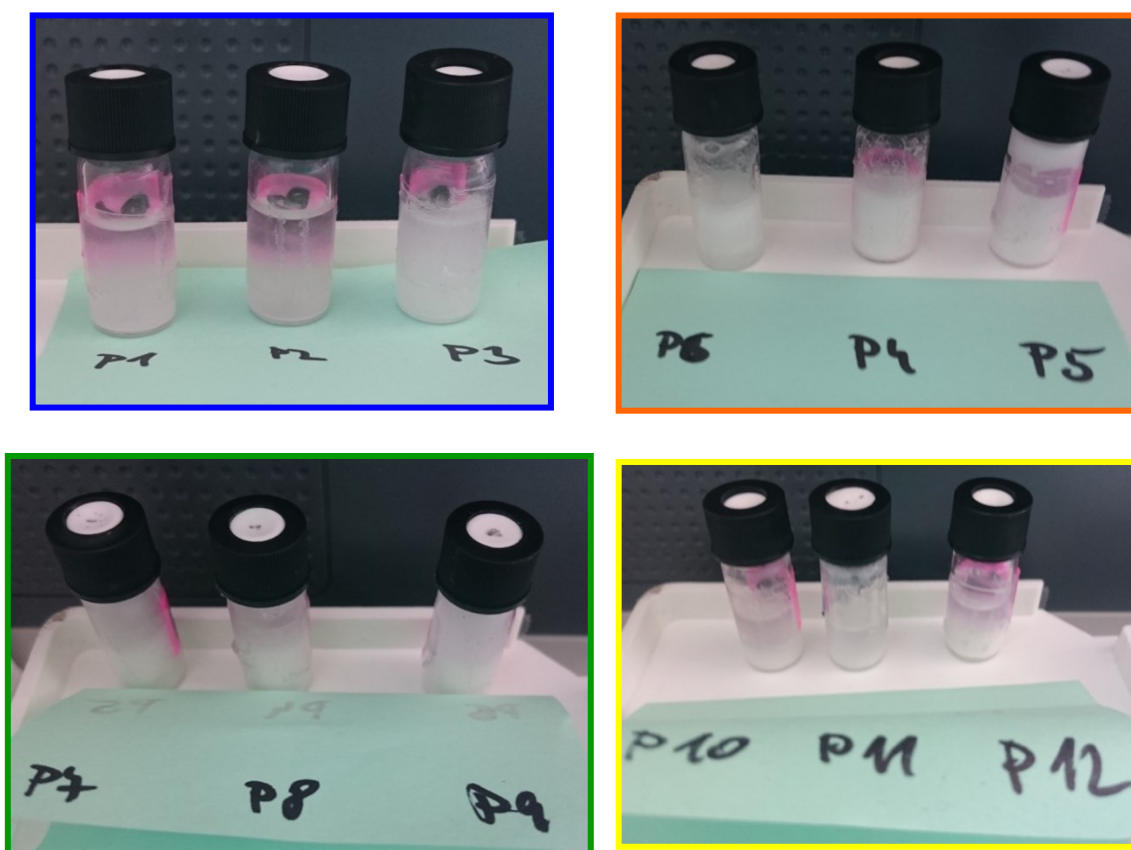
Množství léčiva v jednotlivých vrstvách kůže je vyjádřena buď jako a) koncentrace IMQ v objemu extrakčního činidla ($\mu\text{g/ml}$) – akceptorová fáze a stripy nebo jako b) koncentrace IMQ přepočtena na hmotnost tkáně ($\mu\text{g/mg}$) – epidermis, dermis, okolí permeční plochy po jejím vyseknutí.

Ke statistickému zpracování dat byl použit test jednofaktorová (one-way) ANOVA s Dunnettovým post testem. Výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm SEM (standardní chyba průměru).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Mikroskopické hodnocení aplikačních forem

Aplikační formy byly složeny z fáze lipofilní reprezentované IPM (zároveň s výhodou používán pro své vlastnosti emulgátoru a permeačního akceleračního; $\log P = 7,17$ (47)), vodné – voda ($\text{pH} = 7$) či octanový pufr ($\text{pH} = 4$), emulgátorů – hydrofobní sorbitan oleát nebo hydrofilní polysorbát 80 a permeačních akceleračních DDAK a 2-Pro. Připravené suspenze (IPM + IMQ s i bez akceleračních) i suspenzní emulze byly neprůhledné, mléčně bílé, časem docházelo k sedimentaci částic a oddělování fází, viz obr. 11. Ze studií zabývajících se formulací topických přípravků s IMQ vyplývá doporučení použít pro zvýšení fyzikální stability viskozifikanty jako deriváty celulózy, xanthanovou gumu či karbomery (15). Xanthanová guma je i součástí složení přípravku Aldara®. Do našeho pokusu nebyly tyto stabilizátory zahrnuty.



Obr. 11: Vzorky P1-P3: suspenze IMQ v IMP, P4-P6: IMQ ve směsi IPM:octanový pufr (25:75 + sorbitan oleát, P7-P9: IPM:voda (25:75) + sorbitan oleát, P10-P12: IPM:voda (75:25) + polysorbát 80; vždy ve variantě bez akceleračního, + DDAK, + 2-Pro.

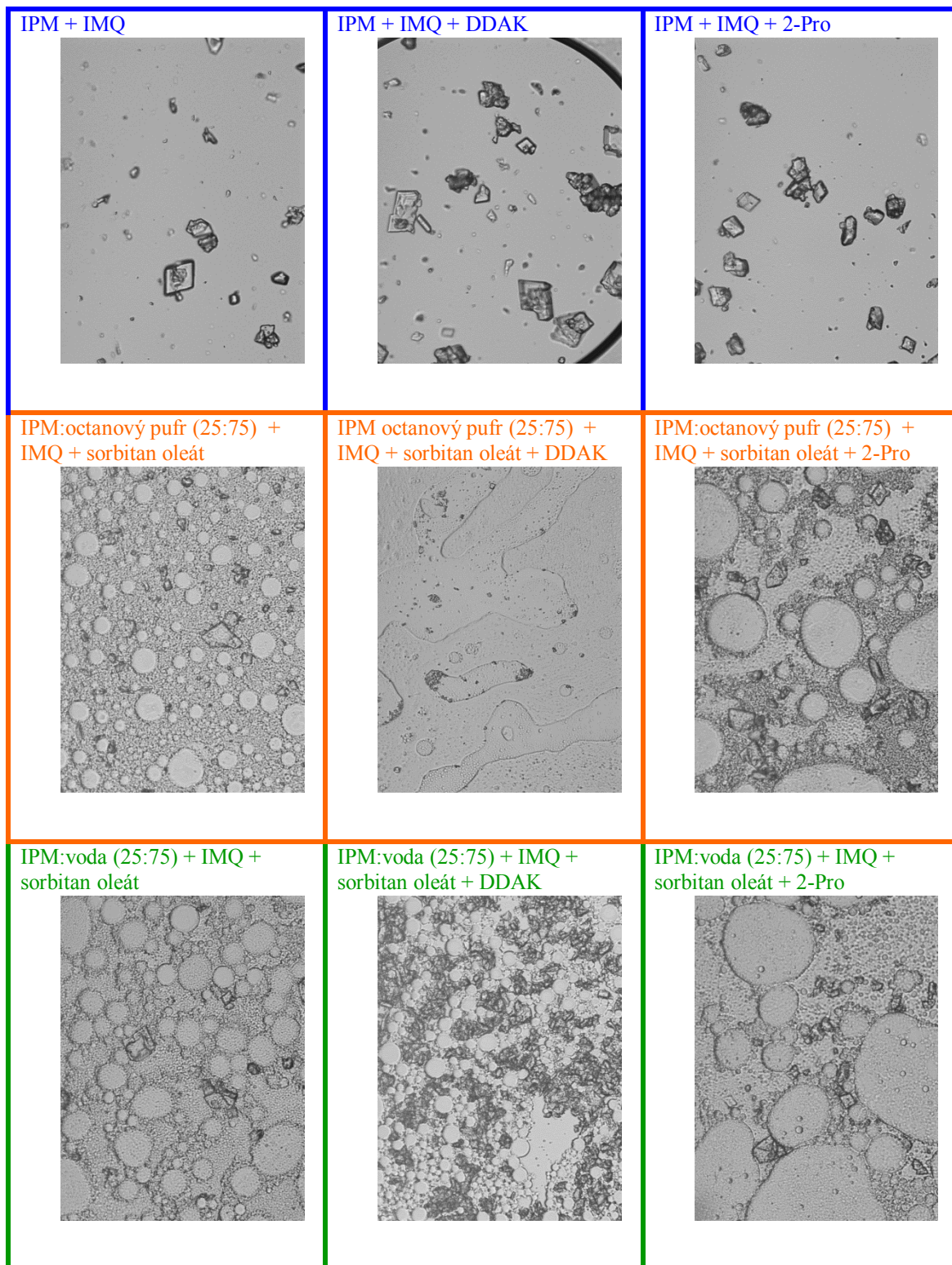
Obr. 12 ukazuje srovnání jednotlivých vzorků při 400násobném zvětšení. Optometrickým zhodnocením nejsou patrné žádné rozdíly mezi suspenzemi IMQ v IPM, ať už s akceleranty či bez nich. Množství i velikost nerozpuštěných krystalů IMQ je podobné, strukturně se neliší.

Jelikož je IMQ slabá base ($pK_a = 7,3$) (15), dá se předpokládat, že se bude lépe rozpouštět v kyselejších prostředích. To potvrdilo především srovnání vzorků suspenzních emulzí obsahujících IPM a octanový pufr nebo vodu v poměru 25:75 se sorbitanem a DDAK: vzorek s pufrům obsahuje menší a méně četné krystaly IMQ, než vzorek, jehož hlavní složkou je voda. Naopak tomu je při srovnání vzorků obsahujících akcelerant 2-Pro, kde větší a četnější krystaly jsou pozorovány ve vzorku s vehikulem obsahujícím octanový pufr. Formulace bez akcelerantů nevykazují při optometrickém hodnocení rozdíly (pufr vs. voda).

IMQ je ve vodě zcela nerozpustný, lepší rozpustnosti lze dosáhnout zvýšením acidity prostředí, avšak dle studie Cholleta a kol. (15) ani při $pH < 2$ nebylo možné dosáhnout rozpuštěním IMQ ve vodném prostředí alespoň 5% koncentrace. Dále bylo uvedeno, že za nejlepší rozpouštědla pro IMQ jsou považovány mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (olejová, linolová, isostearová) (15).

Právě kyselina isostearová je jednou z hlavních komponent krému Aldara®. Ani touto formulací však nebyly dosaženy ideální vlastnosti topického přípravku. Emulze není stabilní, krystaly IMQ časem precipitují a kvůli vyšší potřebné koncentraci IMQ spojené s vyšším obsahem dráždivé mastné kyseliny dochází často k iritacím kůže pacienta (5).

Řešením těchto problémů by mohla být mikronizace IMQ, popř. použití nejlépe bezvodých rozpouštědel a vehikul spolu se sloučeninami tvořícími vodíkové vazby – nekovalentní vazbou s IMQ je vytvořen komplex v bezvodém prostředí lépe rozpustný (5).



Obr. 12: Aplikční formy s obsahem IMQ 1 % při 400x zvětšení.

4.2 Obsah IMQ v kůži po 8 hodinách

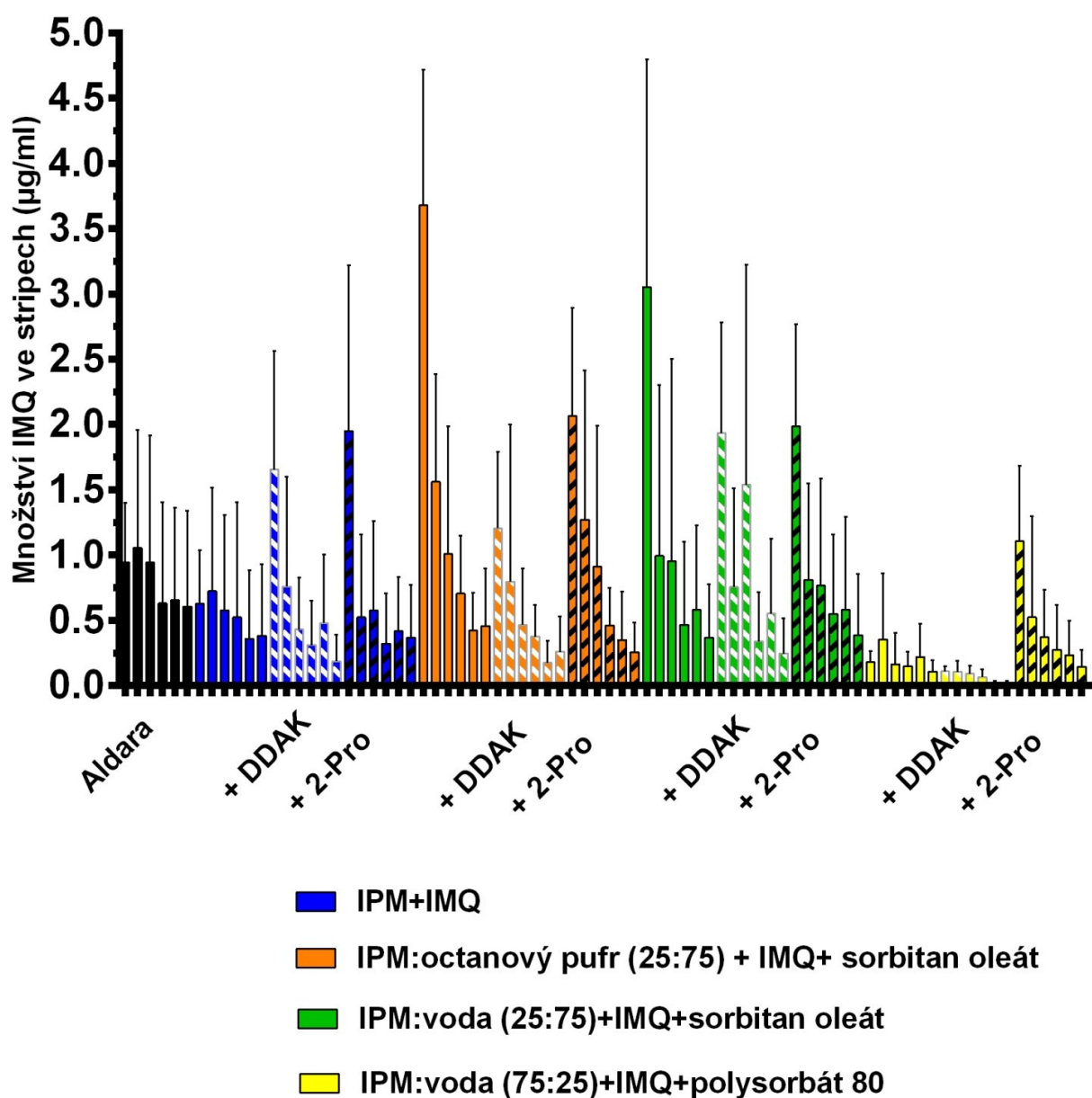
4.2.1 *Stripy SC*

Graf na obr. 13 znázorňuje množství IMQ (μg) naměřené v 1 ml extrakčního media z jednotlivých stripů po 8 hodinách od nanesení vzorků. Aplikováno bylo vždy 25 μl , což přepočteno na hmotnost odpovídá cca 10 mg krému Aldara[®]. Ve zmíněném objemu dávky je pak v kontrole (5% Aldara[®]) 0,50 mg IMQ a ve všech ostatních formulacích (obsah 1 % látky) 0,25 mg IMQ, čili poloviční množství. V hodnotách koncentrací IMQ v jednotlivých stripech mezi formulacemi nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$). Koncentrace IMQ obecně klesá s rostoucím počtem stripů, největší množství bylo získáno ze stripu 1 (S1) vzorku 4 (IPM:octanový pufr (25:75) + sorbitan oleát + IMQ): $3,678 \pm 1,041 \mu\text{g/ml}$, následován S1 vzorku 7 (IPM:voda (25:75) + sorbitan oleát + IMQ) se $3,053 \pm 1,746 \mu\text{g/ml}$. Vůči Aldare[®] ($c_{\text{IMQ}} = 0,943 \pm 0,456 \mu\text{g/ml}$) je to nárůst 3,9 resp. 3,2násobný. Můžeme konstatovat, že většina vzorků (mimo č. 10 a 11 – vehikula s polysorbátem bez a s DDAK) vykazuje vždy vyšší hodnoty u S1 a naopak nižší c_{IMQ} u posledních stripů S6 v porovnání s kontrolou.

Transdermální propustnost léčiva je ovlivněna převážně třemi faktory: mobilitou léčiva ve vehikulu, uvolněním léčiva z nosiče a pronikáním léčiva kůží (42). Vyšší koncentrace IMQ v nejsvrchnějších vrstvách kůže mohou být způsobeny obtížným pronikáním léčiva přes kožní bariéru (retence, interakce s tkání), pomalejším uvolněním z vehikula (tudiž vlastnostmi aplikačních forem), nebo nedostatečnou dobou pro vstřebání látky. Je nutno podotknout, že IMQ byl ve vzorcích přítomen v podobě krystalů, takže je pravděpodobně potřeba delší čas na jeho solubilizaci (na rozdíl od Aldary[®], kde by se měl IMQ vyskytovat rozpuštěný – riziko precipitace bylo zmiňováno výše).

Srovnáme-li průměrný výtěžek ze všech stripů, v Aldare[®] bylo souhrnně detekováno $4,843 \pm 0,175 \mu\text{g/ml}$ IMQ, což předčily vzorky 4, 6, 7, 8 a 9 s $c_{\text{IMQ}} = 7,833 \pm 0,877 \mu\text{g/ml}$; $5,313 \pm 0,530 \mu\text{g/ml}$; $6,409 \pm 0,661 \mu\text{g/ml}$; $5,363 \pm 0,561 \mu\text{g/ml}$; $5,077 \pm 0,380 \mu\text{g/ml}$. V tomto pořadí to činí nárůst 1,6, 1,1, 1,3 a 1,1x (u vzorků 8 i 9) Výsledky shrnuje tab. 6. Pro zmíněné formulace je společné, že vehikulum je tvořeno

IPM a vodou resp. acetátovým pufrém v poměru 25:75 s přidavkem sorbitanu oleátu. Tudíž slabě kyselé až kyselé pH vehikula a přítomnost hydrofobního emulgátoru mohou být příčinou zvýšené koncentrace IMQ ve SC (kde je pH taktéž fyziologicky kyselé). Vzorky 10-12 s hydrofilním polysorbátem 80 naproti tomu obsahovaly koncentrace mnohem nižší než kontrola: u S1 5,2, 8,5 a 0,6x, u S6 u vzorku bez akceleraantu 14,8x, s 2-Pro 11,5x a s DDAK dokonce 108,0x, což potvrzuje domněnku, že hydrofilní emulgátor absorpci IMQ ve SC pravděpodobně nezvyšuje.



Obr. 13: Množství IMQ (µg/ml) v jednotlivých vrstvách SC po 8 hod.

Tab. 6: Součet množství IMQ ($\mu\text{g/ml}$) získaného ze všech stripů.

	Vzorek	$\Sigma(S1;S6)$ $\mu\text{g/ml}$	\pm SEM
	Aldara [®]	4,831	0,175
1	IPM + IMQ	3,189	0,110
2	IPM + IMQ + DDAK	3,818	0,380
3	IPM + IMQ + 2-Pro	4,156	0,419
4	IPM:octanový pufr (25:75) + IMQ + sorbitan oleát	7,822	0,877
5	IPM:octanový pufr (25:75) + IMQ + sorbitan oleát + DDAK	3,277	0,302
6	IPM:octanový pufr (25:75) + IMQ + sorbitan oleát + 2-Pro	5,313	0,530
7	IPM:voda (25:75) + IMQ + sorbitan oleát	6,409	0,661
8	IPM:voda (25:75) + IMQ + sorbitan oleát + DDAK	5,363	0,561
9	IPM:voda (25:75) + IMQ + sorbitan oleát + 2-Pro	5,077	0,380
10	IPM:voda (75:25) + IMQ + polysorbát 80	1,187	0,064
11	IPM:voda (75:25) + IMQ + polysorbát 80 + DDAK	0,425	0,033
12	IPM:voda (75:25) + IMQ + polysorbát 80 + 2-Pro	2,638	0,249

4.2.2 *Epidermis*

Aby mohl IMQ působit, musí projít SC a interagovat s Langerhansovými buňkami epidermis (48). Množství IMQ v epidermis, jakožto hlavním místě působení látky, nás proto zajímala nejvíce. Hodnoty (c_{IMQ}) jsou vždy uváděny v přepočtu na mg tkáň ($\mu\text{g}/\text{mg}$) \pm SEM, rozdíly mezi aplikovanými vzorky ve srovnání s Aldarou[®] nejsou statisticky významné ($p > 0,05$), avšak musíme mít na paměti, že koncentrace IMQ jsou v připravených aplikačních formách poloviční než v Aldaře[®].

V kontrolních vzorcích obsahujících krém Aldara[®] bylo průměrně detekováno $0,124 \pm 0,046 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ. Kromě vzorků 7, 11 a 12 (IMQ dispergovaný ve vehikulu IPM:voda (25:75) s přísávkem sorbitanu a ve směsi IPM:voda (75:25) s polysorbátem a oběma akceleranty) byly vždy naměřeny hodnoty vyšší. Po aplikaci vzorku 6, v němž byl IMQ dispergován ve směsi IPM a octanového pufru (25:75) s přísávkem sorbitanu a 2-Pro, byla v epidermis zjištěna dokonce 2,5krát vyšší koncentrace IMQ ($0,314 \pm 0,132 \mu\text{g}/\text{mg}$) než v kontrole. To si můžeme vysvětlit kyselejším prostředím, tudíž lepší rozpustností IMQ a lipofilnějším emulgátorem. Naopak hydrofilní emulgátor polysorbát 80 (vzorky 10-12) se ukázal být méně vhodný. Co se týče použití permeačních akceleraátů, účinnost nebyla vždy patrná. Výsledky jsou zobrazeny v grafu A (obr. 14). Za povšimnutí stojí formulace s převahou vodné složky (voda či octanový pufr 75% w/w) a sorbitanem oleátem s akceleraát 2-Pro – zde pozorujeme jisté zvýšení c_{IMQ} a můžeme naznačit, že oba vzorky (tedy 6 a 9) vykazují zajímavé hodnoty i v ostatních měřeních.

In vitro studie Teló a kol. na kultivovaných buňkách ukázaly, že nejnižší účinná koncentrace IMQ indukující tvorbu cytokinů je mezi 0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, zatímco vyšší koncentrace (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) jsou nutné k pozorování přímé pro-apoptické (48). Této minimální koncentrace bylo u naprosté většiny vzorků po osmihodinovém působení IMQ dosaženo. Lze tedy předpokládat nejen prostup látky do požadovaného místa účinku, ale i pravděpodobné projevení účinku v cílových strukturách. Dalším logickým krokem by tedy bylo zkoumání farmakologického efektu IMQ z těchto aplikačních forem.

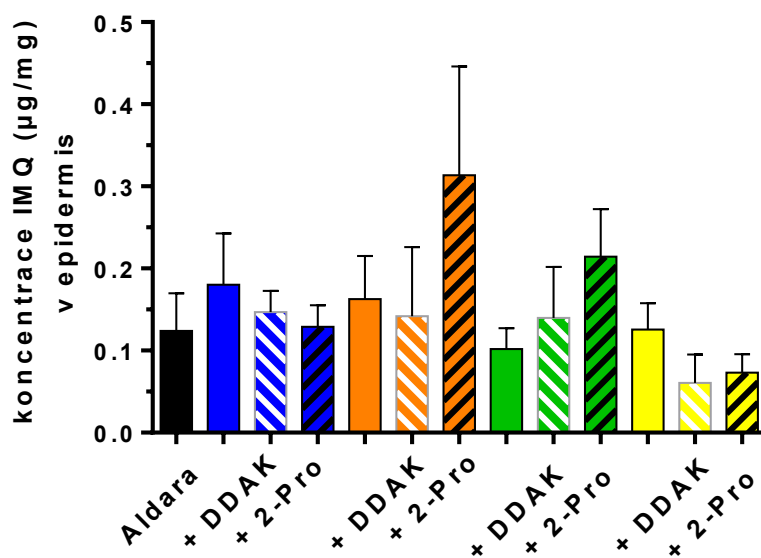
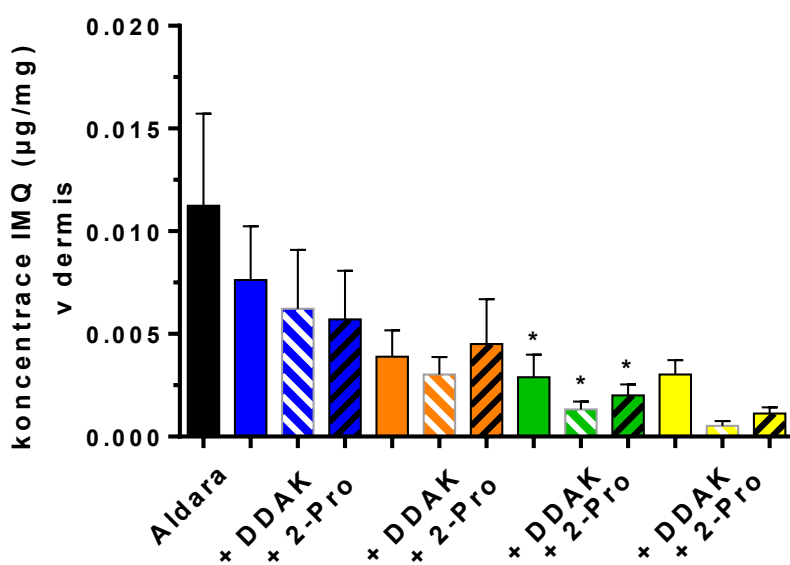
Studie Teló a kol. i patenty autorů Yosha a kol. či Winckle a kol. vždy předpokládají rozpuštění IMQ ve formulacích, diskutují pak problémy se špatnou

rozpuštěností, zpětnou precipitací a nestabilitou látky (48, 52). V našich pokusech jsme IMQ nerozpouštěli, pouze podrobili šesti cyklům po deseti minutách v ultrazvukové lázni a nechali tak vzniknout spíše formulacím suspenzního charakteru. V porovnání s krémem Aldara® můžeme konstatovat, že krystalická forma IMQ v našich vzorcích, a tedy nutnost rozpuštění IMQ přímo po aplikaci, před vstupem do kůže, rozhodně neomezuje ani nesnižuje penetraci látky především do epidermis, spíše naopak. Odpovídá to i teoretickému předpokladu, že léčivem saturované vehikulum poskytuje větší hnací sílu pro transport skrze kůži než formulace s nižším podílem nasycení (37).

4.2.3 Dermis

Míru prostupu látky kůží do hloubky jsme mohli hodnotit analýzou c_{IMQ} ($\mu\text{g}/\text{mg}$) v dermis. Průchod léčiva hlouběji do dermis již není žádoucí, může zde totiž dojít k systémové absorpci do krevního oběhu, což je v případě místně působícího IMQ jev nevídaný. V tomto ohledu si vedly všechny vzorky lépe než Aldara®, neboli naměřené c_{IMQ} (ng/mg) byly vždy nižší než v kontrole. Statisticky nejvýznamnější byly rozdíly u všech třech vzorků s vehikulem IPM:voda (25:75) se sorbitanem oleátem a s i bez akceleračních látek. Rozdíl vůči kontrole byl 4násobný u vzorku bez akcelerační látky, 8,5násobný s DDAK a 5,5násobný s 2-Pro. V grafu B (obr. 14) je znázorněno srovnání suspenzí a suspenzních emulzí IMQ, zároveň je možné porovnat koncentrace IMQ v epidermis a v dermis.

Mezi těmito dvěma vrstvami kůže klesla koncentrace IMQ více než 10tinásobně (11x u Aldary® na $0,0113 \pm 0,0045 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ, což zároveň udává nejvyšší průměrně naměřenou hodnotu IMQ v dermis), v případě vzorků 8, 9 a 11 až 100násobně: disperze IMQ ve směsi IPM a vody (25:75) se sorbitanem oleátem a akceleračními látkami DDAK a 2-Pro vykazovala hodnoty $0,0013 \pm 0,0004$, resp. $0,0020 \pm 0,0005 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ ($p < 0,05$) a formulace IMQ + IPM:voda (75:25) + polysorbát 80 + DDAK vykazovala pokles 116krát (na $0,0005 \pm 0,0002 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ).

A**B**

- IPM + IM Q
- IPM : octanový pufr (25:75) + IM Q + sorbitan oleát
- IPM : voda (25:75) + IM Q + sorbitan oleát
- IPM : voda (75:25) + IM Q + polysorbát 80

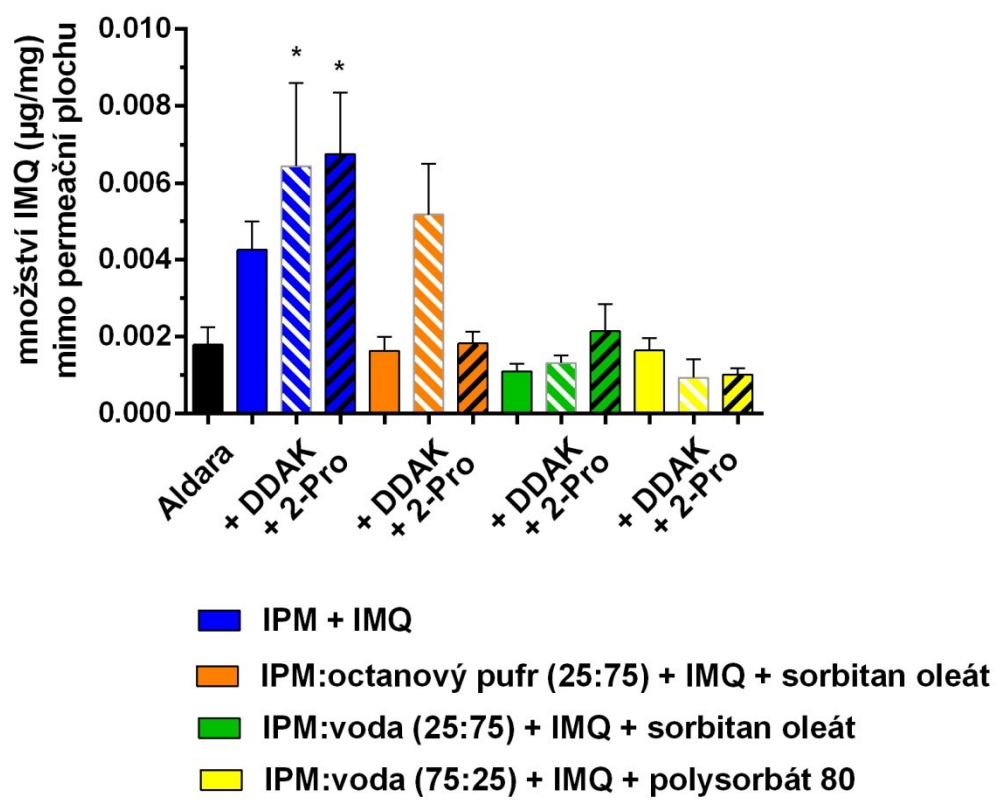
Obr. 14: Znázornění množství IMQ (µg/mg) v epidermis (A) a dermis (B).

4.2.4 Okolní tkáň

Analýze byla podrobena i okolní tkáň, zbytek mimo ošetřenou plochu. Bylo zjištěno, že léčivo difunduje i směrem horizontálním, což, stejně jako prostup do dermis a fáze akceptorové, není zcela žádoucí. Řádově se koncentrace IMQ v okolní tkáni blíží množství léčiva v dermis. Nejvyšší množství IMQ v okolní tkáni bylo zjištěno ve vzorku 3 (IPM + IMQ + 2-Pro): $0,007 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ ($p < 0,05$). Ve srovnání s kontrolou je to výsledek vyšší více jak 3x: vzorky tkáně po aplikaci Aldary® obsahovaly průměrně $0,002 \pm 0,000 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ. Vyšší hodnoty byly dále naměřeny i u obou dalších vzorků s vehikulem IPM: $0,004 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ bez akceleraantu a $0,006 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ s 1 % DDAK a v disperzi IMQ ve směsi IPM:octanový pufr (25:75) + sorbitan oleát + DDAK ($0,005 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ). Vyšší c_{IMQ} u vzorků s IPM by se dala vysvětlit lipofilitou vehikula, tudíž jistou „neochotou“ prostoupit do vodné akceptorové fáze a difuzí do okolí. Tento předpoklad však nebyl potvrzen (výsledky viz níže).

Výsledky srovnatelné s kontrolou přinesly vzorky IMQ ve směsi IPM:octanový pufr (25:75) + sorbitan oleát s 2-Pro i bez něj, vehikula IPM:voda (25:75) + sorbitan oleát + 2-Pro a IPM:voda (75:25) + polysorbát 80.

Hodnoty $0,001 \pm 0,000 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ vykazovaly také 4 vzorky – vehikula IPM:voda (25:75) + sorbitan oleát s DDAK i bez něj a IPM:voda (75:25) + polysorbát 80 s oběma akceleranty. Výsledky znázorňuje graf (obr. 15).

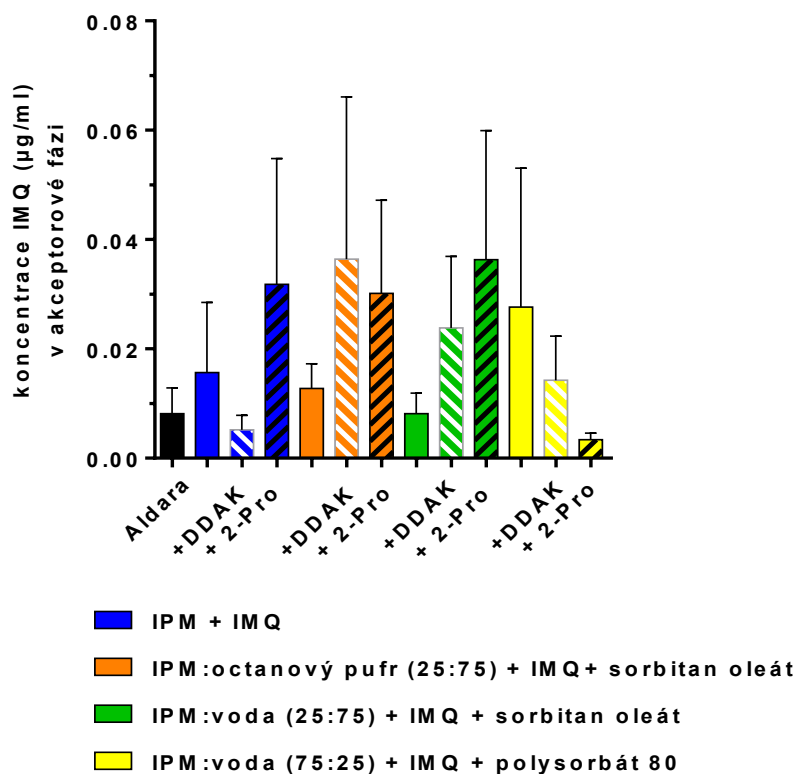


Obr. 15: Množství IMQ (µg/mg) proniklého mimo ošetřenou plochu.

4.2.5 Akceptorová fáze

Analýza akceptorové fáze nám poskytla možnost vyhodnocení penetrability IMQ kůží (transdermální průnik, c_{IMQ} udán v $\mu\text{g/ml}$). Určité množství bylo detekováno ve všech vzorcích (viz obr. 16), nejméně po aplikaci formulace IPM + IMQ + DDAK: $0,005 \pm 0,003 \mu\text{g/ml}$ a IPM:voda (75:25) + IMQ + polysorbát 80 + 2-Pro: $0,003 \pm 0,001 \mu\text{g/ml}$. Ostatní vzorky vykazovaly hodnoty stejné (formulace IPM:voda (25:75) + IMQ + sorbitan) a vyšší (1,6x - 4,5x) než kontrola ($0,008 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$ IMQ). Vyšší hodnoty byly zároveň zatíženy velkými chybovými hodnotami.

Ke vzorkům s hodnotami vyššími než kontrola obecně patřily formulace s akceleranty a polysorbátem jako hydrofilním emulgátorem. Vyplynulo z toho, že akceleranty sice (ne vždy) mohou zvýšit c_{IMQ} v cílené tkáni – epidermis, ale zároveň přispívají k vyššímu průchodu léčiva do systémové cirkulace. Poměr přínosu a rizika je třeba zvážit. Tento pokus nám také pomohl eliminovat pro další hodnocení vzorky s polysorbátem 80, neboť při prostupu do epidermis nevykazovaly lepší výsledky než kontrola, zato byl pozorován vyšší prostup do akceptoru.



Obr. 16: Množství IMQ ($\mu\text{g/ml}$) proniklé do akceptorové fáze.

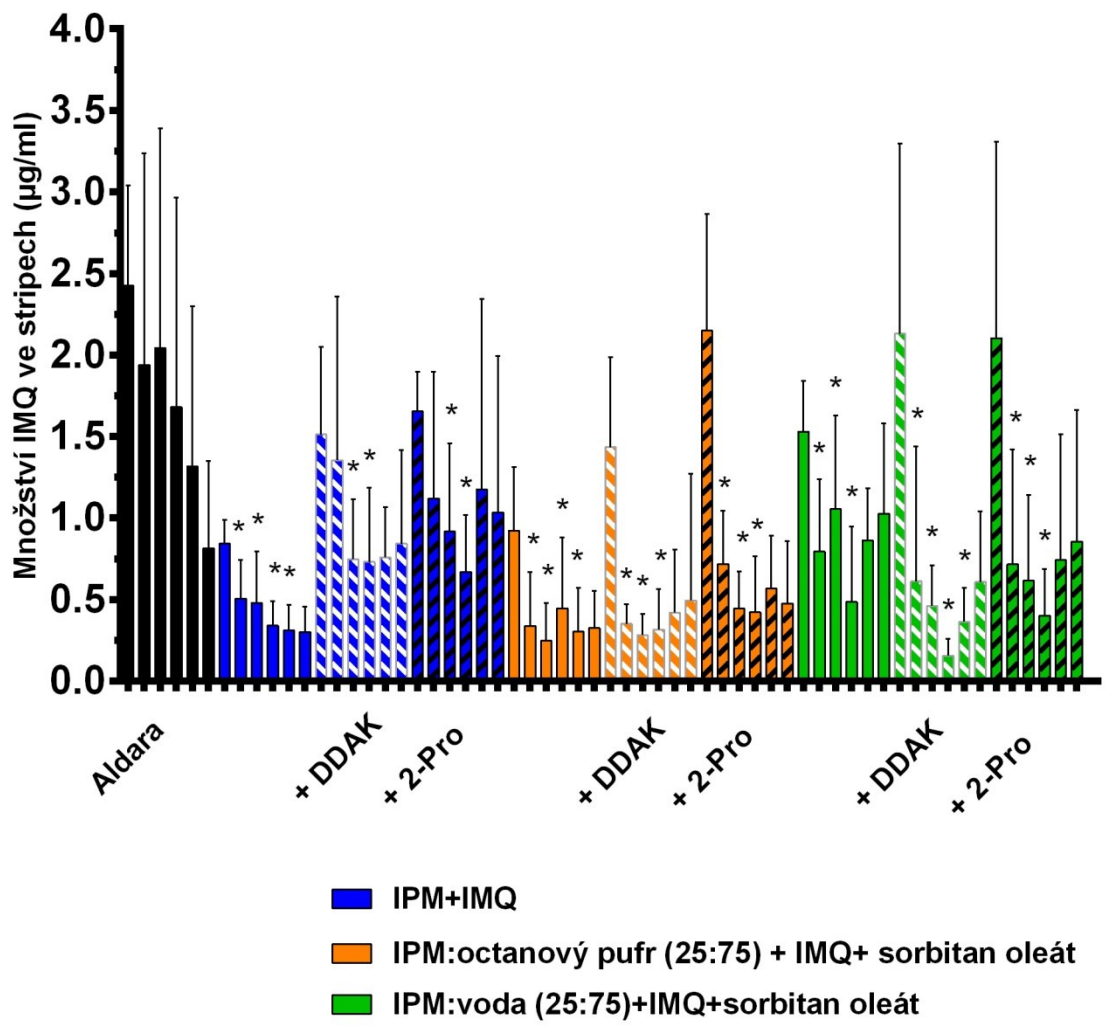
4.3 Obsah IMQ v kůži po 24 hodinách

4.3.1 *Stripy SC*

Jelikož IMQ (potažmo krém Aldara®) má být v souladu s SPC aplikován na noc a po 8-10 hodinách šetrně omyt (19), byly hodnoceny i koncentrace IMQ, v kůži ošetřené dle tohoto schématu, po 24 hodinách (= 16 hodin po odstranění formulací). S ohledem na výsledky předchozích pokusů, byly pro toho aplikační schéma vybrány vzorky 1-9. Všechny výsledky (mimo S1) vykazují ve srovnání s kontrolou statistickou signifikanci ($p < 0,05$) a jsou srovnány v grafu (obr. 17). Nejvíce se ve svrchních vrstvách SC udržel krém Aldara® s hodnotami od $2,426 \pm 0,616 \mu\text{g/ml}$ u S1 po $0,815 \pm 0,219 \mu\text{g/ml}$ u S6 a celkovým součtem $c_{\text{IMQ}} \Sigma\text{S1-S6}$ $10,221 \pm 0,433 \mu\text{g/ml}$, což představuje nejvyšší hodnotu. Přehled celkového množství IMQ v S1-S6 shrnuje tab. 7. Je zde zároveň naznačen i trend pozorovaný v dalších vrstvách tkáně: vyšší hodnoty vykazují vzorky s akceleranty, z nichž formulace s 2-Pro obsahují hodnoty vyšší, než ty s DDAK.

Srovnáme-li výsledky dobou aplikačních schémat, je pozorován 1,3 (S6) až 2,6násobný (S1) nárůst c_{IMQ} ($\mu\text{g/ml}$) u Aldary® a 0,4-4,5násobný, resp. 0,4-2,8násobný nárůst u vzorků č. 2 a 3. U vzorku 4 je zaznamenán pokles o 28,0 % (S5) až 78,3 % (S2) hodnot získaných po 8 hodinách.

Již zde také neplatí, že S1 je u vždy vyšší než kontrola, jak tomu bylo po 8 hodinách. Zatímco c_{IMQ} u Aldary® vzrostla s časem 2,6x, u hodnocených formulací nárůst nepřesáhl 1,3násobek (vzorek 1), u vzorku 4 klesla dokonce na čtvrtinu hodnot změřených po 8 hodinách. Obecně můžeme říci, že, kromě Aldary® a suspenzí IMQ v IPM s oběma akceleranty, množství IMQ ve svrchních vrstvách SC s časem klesá. Zajímavý je i pozorovaný trend zvýšení c_{IMQ} v hlubších vrstvách (hlavně S6): u většiny vzorků (mimo vzorky č. 1 a 4) je pozorován průměrně 2násobný nárůst c_{IMQ} oproti hodnotám naměřeným po 8 hodinách. Je tedy patrné, že IMQ je v nejsvrchnějších vrstvách kůže dočasně deponován a pro překonání kožní bariéry potřebuje delší čas. To by se dalo opět vysvětlit suspenzním charakterem formulací – potřeba delšího času pro rozpuštění krystalů a zároveň vytvoření vyššího koncentračního gradientu pro prostup léčiva do kůže.



Obr. 17: Množství IMQ (µg/ml) v jednotlivých stripech 16 hod. po ukončení aplikace.

Tab. 7: Součet množství IMQ ($\mu\text{g/ml}$) získaného ze všech stripů po 24 hodinách.

	Vzorek	$\Sigma(S1;S6)$ $\mu\text{g/ml}$	\pm SEM
	Aldara [®]	10,221	0,433
1	IPM + IMQ	2,777	0,147
2	IPM + IMQ + DDAK	5,951	0,295
3	IPM + IMQ + 2-Pro	6,570	0,221
4	IPM:octanový pufr (25:75) + IMQ + sorbitan oleát	2,582	0,169
5	IPM:octanový pufr (25:75) + IMQ + sorbitan oleát + DDAK	3,298	0,295
6	IPM:octanový pufr (25:75) + IMQ + sorbitan oleát + 2-Pro	4,775	0,451
7	IPM:voda (75:25) + IMQ + sorbitan oleát	5,752	0,245
8	IPM:voda (75:25) + IMQ + sorbitan oleát + DDAK	4,331	0,470
9	IPM:voda (75:25) + IMQ + sorbitan oleát + 2-Pro	5,432	0,399

4.3.2 *Epidermis*

Zajímavé srovnání nabízí analýza epidermis (obr. 18A). Všechny vzorky vykazovaly vyšší hodnoty než $0,302 \pm 0,080 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ v kontrole ($p > 0,05$). Opět lze určit i jistou souvislost s rostoucí koncentrací IMQ a použitím akceleračtů, a sice v následné vzestupné tendenci: formulace bez akceleračtů < s DDAK < s 2-Pro. Potvrdil se tedy trend pozorovaný již po 8 hodinách, a sice že nejvyšší hodnoty vykazovaly vzorky s IPM:voda či pufr (25:75) + sorbitan oleát + 2-Pro.

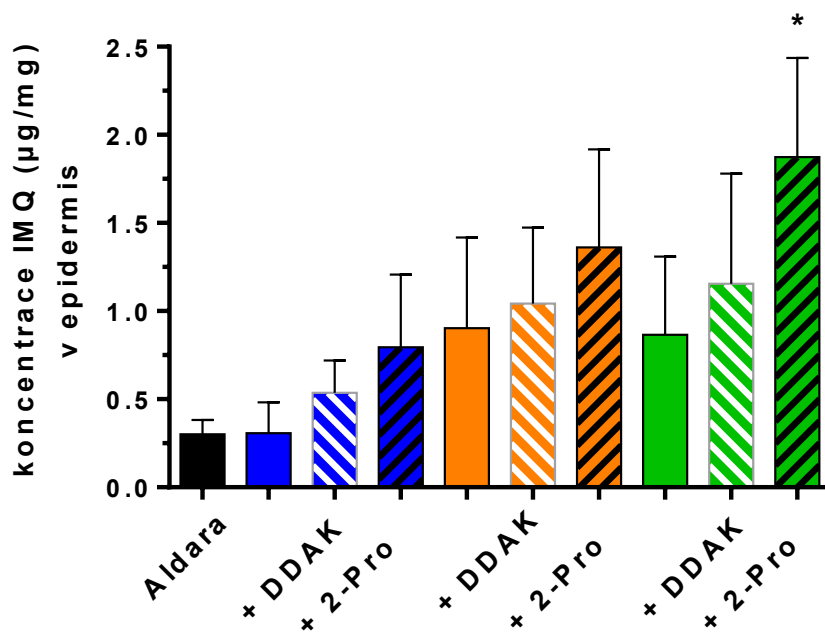
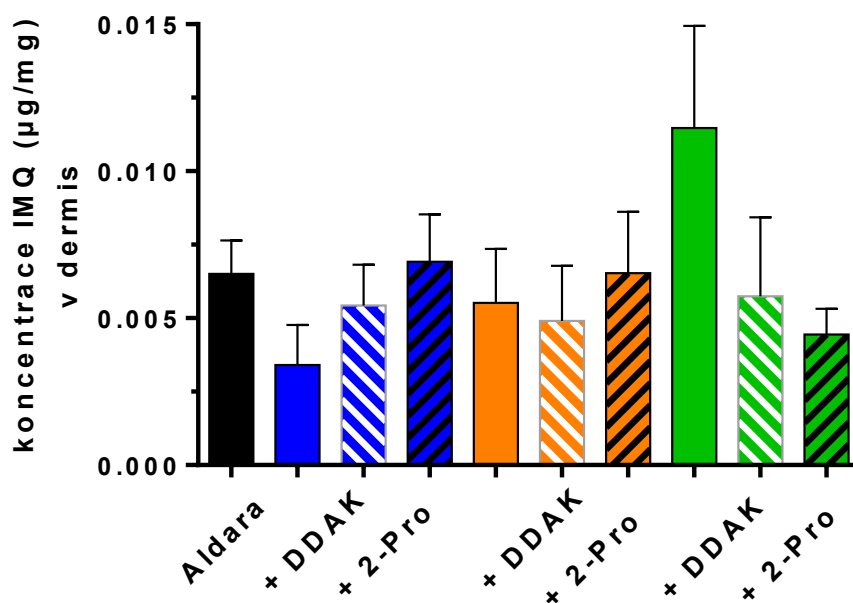
Ve srovnání s Aldarou® byly naměřeny 6,2x a 4,5x vyšší c_{IMQ} ve tkáních po aplikaci IMQ ve vehikulu IPM:voda (25:75) se sorbitanem a 2-Pro ($1,874 \pm 0,563 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ) a kombinaci IPM:octanový pufr (25:75) se sorbitanem a 2-Pro ($1,362 \pm 0,555 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ). Pokud jde o formulace s přidaným DDAK, vzestup byl 3,8 až 3,5násobný vůči kontrole, konkrétně tedy $1,156 \pm 0,625 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ ve vzorku IPM:voda, resp. $1,042 \pm 0,432 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ za použití octanového pufru.

Porovnáme-li výsledky získané po 8 hodinách od aplikace, stoupá po 24 hodinách c_{IMQ} u všech vzorků: u kontroly 2,4x, u disperzí IMQ ve směsi IPM:voda (25:75) se sorbitanem, akceleračtů i bez nich 8,3x (+ DDAK) až 8,7x (+ 2-Pro). To znamená, že za použití topické formulace o tomto složení je možné dosáhnout až 3,6x vyššího množství IMQ v cílové tkáni, a to při poloviční c_{IMQ} než v registrovaném léku Aldara®. Opět nám tedy nejlépe vycházejí již výše zmiňované vzorky 6 a 9.


4.3.3 *Dermis*


Hodnoty IMQ naměřené v dermis se po 8 a 24 hodinách nelišily. Tentokrát bylo v kontrole naměřeno $0,007 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{mg}$ IMQ, více pouze ve vzorku 7 ($0,011 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{mg}$). Nejmenší c_{IMQ} byla zjištěna u suspenze IPM+IMQ ($0,003 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{mg}$) a u vzorku 9 (IPM:voda (25:75) se sorbiatnem a 2-Pro: $0,004 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{mg}$), což, vezmeme-li v úvahu i dobré výsledky po 24 hodinách v epidermis, naznačuje slibný permeační profil této formulace. Ostatní vzorky vykazovaly hodnoty od $0,005 \pm 0,001$ do $0,007 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($p > 0,05$).

Rozdíl epidermis vs. dermis byl opět značný, obsah IMQ v dermis se pohyboval od 2,2 % (Aldara[®]) po 0,2 % (vzorek 9) hodnot naměřených v epidermis, což činí 46tinásobný pokles u Aldara[®] a 421násobný pokles u vzorku 9, viz obr 19.

A**B**

 IPM + IMQ

 IPM:octanový pufr (25:75) + IMQ + sorbitan oleát

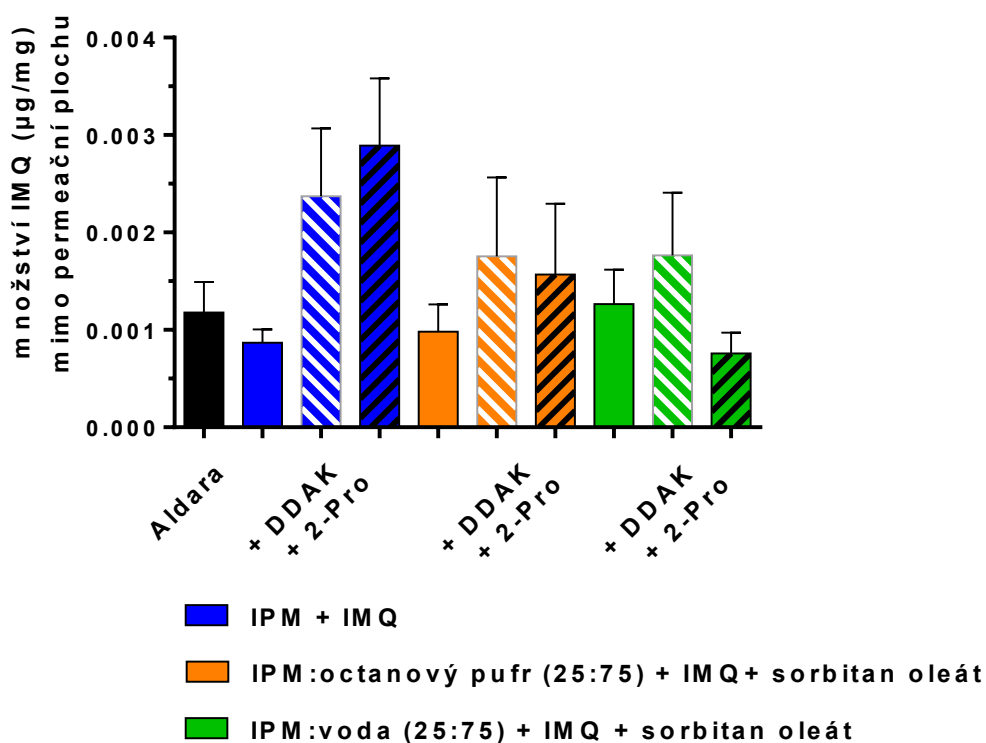
 IPM:voda (25:75) + IMQ + sorbitan oleát

Obr. 18: Srovnání c_{IMQ} ($\mu\text{g}/\text{mg}$) v epidermis (A) a dermis (B) po 16ti hodinách od ukončení aplikace.

4.3.4 Okolní tkáň

16 hodin od ukončení aplikace byla pozorována difuze do okolí u všech vzorků (obr. 19): kontrola a vzorky 1, 4 a 7 (tedy všechny formulace bez akceleračních složek) a vzorek 9 (IPM:voda (25:75) + sorbitan + 2-Pro) obsahovaly $0,001 \pm 0,000 \mu\text{g}$ IMQ na 1 mg tkáně, naopak nejvíce IMQ obsahoval vzorek 3, a sice $0,003 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($p < 0,05$).

Překvapivě, v porovnání s 8hodinovým pokusem jsou to hodnoty zhruba poloviční, pouze u vzorků 6-8 vycházejí stejné. Usuzujeme, že IMQ za daný čas pronikl z části až do akceptorové fáze, zároveň mohl být i díky koncentračnímu gradientu více „tažen“ do epidermis.

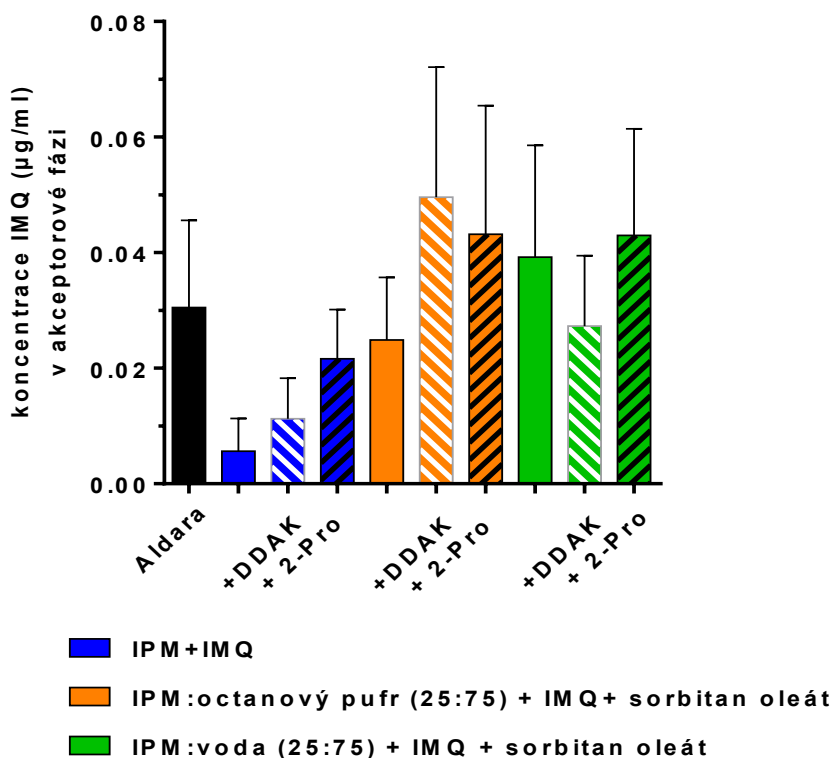


Obr. 19: Množství IMQ ($\mu\text{g}/\text{mg}$) v okolní tkáni po 16ti hodinách od ukončení aplikace.

4.3.5 Akceptorová fáze

Po 24 hodinách byla opět detekována určitá hladina IMQ ve všech vzorcích (obr. 20). Nejméně bylo naměřeno u vzorku 1: $0,006 \pm 0,006 \mu\text{g/ml}$ IMQ, nejvíce u vzorku 5: $0,050 \pm 0,022 \mu\text{g/ml}$ IMQ ($p > 0,005$). Ve srovnání s daty získanými po 8 hodinách je pozorován nárůst hladin u všech formulací mimo vzorky 1 (pokles na 36,1 %) a 3 (68,1 %). Nejvyšší rozdíl byl zjištěn u vzorku 7 (4,8x) a u Aldary® (3,7x), zhruba dvojnásobně narostla c_{IMQ} za 24 hodin u vzorků 2 a 4, u vzorků 5 a 6 je rozdíl 1,4x vyšší, u vzorku 9 téměř stejný (1,1násobek c_{IMQ} po 8 hodinách).

Srovnáme-li průnik vrstvami směrem vertikálním a horizontálním, směrem dolů proniká až 16x více látky, než směrem do stran. Analogicky můžeme usoudit, že do krevního oběhu by se po 24 hodinách od aplikace dostala nejvíce 1/5000 množství aplikovaného IMQ.



Obr. 20: Množství IMQ ($\mu\text{g/ml}$) v akceptorové fázi po 24 hodinách.

5 ZÁVĚR

Tato práce měla za cíl formulaci nových lékových forem s IMQ ke kožnímu podání a stanovení míry permeace a penetrace této látky kůží ve srovnání s komerčně dostupným přípravkem Aldara[®], obsahujícím 5 % IMQ ve formě kožního krému.

Bylo připraveno celkem 12 topických aplikačních forem obsahujících 1 % účinné látky IMQ. Tři z nich byly suspenze IMQ v IPM bez a s přídatkem 1 % permeačního akcelantu DDAK a 2-Pro, další formulace byly suspenzně-emulzního charakteru, připravené opět ve třech variantách (bez akcelantu, s DDAK a s 2-Pro). Jako vehikula byly použity směsi IPM:voda a IPM:acetátový pufr o pH = 4, obě v poměru 25:75 za použití 1 % sorbitanu oleátu jako hydrofobního emulgátoru (dává vzniknout emulzím typu v/o) a směs IPM:voda 75:25 s 1 % hydrofilního emulgátoru polysorbátu 80, tvořící emulze typu o/v.

Z výsledků vyplývá, že jako nejslibnější se jeví formulace s převahou vodné složky (voda či octanový pufr:IPM, 75:25), s akcelantem 2-Pro a sorbitanem oleátem coby emulgátorem. Tyto dvě suspenzní emulze vykazovaly po 8 i 24 hodinách nejvyšší hodnoty IPM v epidermis. Po 8 hodinách to bylo u vzorku s vodou 2,5x více než u kontroly, u vzorku s pufrem 1,7x více, po 24 hodinách ještě 4,3 a 8,7x více IMQ v porovnání s 8hodinovým měřením. V úvahu je třeba brát i menší aplikované množství IMQ u vzorků (0,25 mg) než u Aldary[®] (0,50 mg).

6 CITOVANÁ LITERATURA

1. **Khandpur S., Sharma V.K., Sumanth K.** Topical imunomodulators in dermatology. *J Postgrad Med.* 2004, Sv. 50, stránky 131-9.
2. Vaccine Adjuvants - Review. [Online] 2011. [Citace: 14. květen 2017.] <http://www.invivogen.com/review-vaccine-adjuvants>.
3. **Stanley M. A.** Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol.* Říjen 2002, Sv. 27, 7, stránky 571-7.
4. **Gerster J.F.** *1H-Imidazo[4,5-c]quinolin-4-amines and antiviral use.* US4689338 A U.S., 25. Srpen 1987. Původní nabyvatel: Riker Laboratories, Inc.
5. **Winckle G., Osborne D.W.** *Imiquimod formulation.* US20090182004 A1 US, 16. červenec 2009.
6. The United States Pharmacopeia. [Online] 2011. [Citace: 13. květen 2017.] http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/pendingStandards/m5237.pdf.
7. **Hurwitz D.J., Pincus L., Kupper T.S.** Imiquimod: A Topically Applied Link Between Innate and Acquired Immunity. *Arch Dermatol.* 139(10):1347-1350, 2003.
8. **Ganjian S. a kol.** Off-label indications for imiquimod. *Dermatol Online J.* 2009, Sv. 15, 5, str. 4.
9. **Vidal D.** Topical imiquimod: mechanism of action and clinical applications. *Mini Rev Med Chem.* Květen 2006, Sv. 6, 5, stránky 499-503.
10. **Hořejší V., Bartůňková J.** *Základy imunologie.* 3. vydání. Praha : TRITON, 2005. stránky 21-44. ISBN 80-7254-686-4.
11. **Jílek P.** *Základy imunologie.* Praha : Anyway, 2002. stránky 37-48. ISBN 80-238-8594-4.
12. *My Notes for USMLE.* [Online] [Citace: 7. srpen 2017.] <https://mynotes4usmle.tumblr.com/post/35106278491/sidratime-th1-and-th2-balance-regulation-and#.WZhZHNSLQ1I>.

13. **Dummer R. a kol.** Imiquimod in basal cell carcinoma: how does it work? *Br J Dermatol.* Listopad 2003, Sv. 149, 66, dopl., stránky 57-8.
14. **Tyring S. a kol.** Imiquimod; an international update on therapeutic uses in dermatology. *Int J Dermatol.* únor 2002, Sv. 41(11):810-6.
15. **Chollet J.L. a kol.** Development of a topically active imiquimod formulation. *Pharm Dev Technol.* Leden 1999, Sv. 4, 1, stránky 35-43.
16. **Jobanputra K.S., Rajpal A.V., Nagpur N.G.** Imiquimod. *Indian J Dermatol Venereol Leprol [serial online].* 2006, Sv. 72, stránky 466-9.
17. **Eedy D.J.** Imiquimod: A potential role in dermatology? *Br J Dermatol.* 2002, Sv. 147, stránky 1-6.
18. *ResearchGate.* [Online] [Citace: 8. srpen 2017.]
https://www.researchgate.net/figure/221759971_fig1_FIG-1-Signaling-cascade-following-TLR2TLR4-TLR7TLR8-and-TLR3-activation-with-envelope.
19. **EMA, Evropská agentura pro léčivé přípravky.** Souhrn údajů o přípravku - Aldara. [Online] 2015. [Citace: 12. duben 2017.] <http://www.ema.europa.eu>.
20. **Edwards L.** Imiquimod in clinical practice. *J Am Acad Dermatol.* 2000, Sv. 43, 1, stránky 12 - 17.
21. Velký lékařský slovník. [Online] [Citace: 13. květen 2017.] lekarske.slovniky.cz/pojem/lentigo-maligna.
22. *Onko-gynekologie.cz* [Online] [Citace: 13. květen 2017.]. <http://www.onko-gynekologie.cz/pagetova-choroba/>.
23. **Skinner R.B. Jr.** Imiquimod as an immune response modulator in infectious conditions. *Postgrad Med.* Prosinec 2002, Sv. 112, 6 dopl., stránky 8-16.
24. **Wick S.M. a kol.** *Topical formulations and transdermal delivery systems containing 1-isobutyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amine.* US5238944 A U.S., 24. Srpen 1993. Původní nabyvatel: Riker Laboratories, Inc.
25. Databáze AISLP (Automatizovaný informační systém léčivých přípravků). *Mikro-verze AISLP 2016.1.* 2016.

26. **Kaspari M. a kol.** Application of imiquimod by suppositories (anal tampons) efficiently prevents recurrences after ablation of anal canal condyloma. *Br J Dermatol.* 2002, Sv. 147, 4, stránky 757–759.
27. **Stein P. a kol.** Efficacy of Imiquimod-Based Transcutaneous Immunization Using a Nano-Dispersed Emulsion Gel Formulation. *PLoS One.* 2014, Sv. 9, 7.
28. **Donin N.M. a kol.** A phase 2 study of TMX-101, intravesical imiquimod, for the treatment of carcinoma in situ bladder cancer. *Urol Oncol.* 26. Říjen 2016, Epub.
29. **Xiong Z., Ohlfest J.R.** Topical imiquimod has therapeutic and immunomodulatory effects against intracranial tumors. *J Immunother.* 2011 Apr;34(3):264-9. doi: 10.1097/CJI.0b013e318209eed4. Duben 2011, Sv. 34, 3, stránky 264-9.
30. <http://www.medapharma.cz/aldara.php>. [Online] [Citace: 14. květen 2017.]
31. **Pathan I.B., Setty C.M.** Chemical Penetration Enhancers for Transdermal. *Trop J Pharm Res.* Duben 2009, Sv. 8, 2, stránky 173-179.
32. **Lopes L.B.** Overcoming the Cutaneous Barrier with Microemulsions. *Pharmaceutics.* Únor 2014, Sv. 6, 1, stránky 52-77.
33. **Kogan A., Garti N.** Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci.* Listopad 2006, Sv. 123–126, stránky 369–385.
34. **Pasparakis M., Haase I., Nestle F.O.** Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2014, 14, stránky 289–301.
35. **Menon G.K., Cleary G.W., Lane M.E.** The structure and function of the stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 2012, Sv. 435, stránky 3-9.
36. **Lane M.E.** Skin penetration enhancers. *Int J Pharm.* Duben 2013, Sv. 447, 1-2, stránky 12-21.
37. **Chang R.K. a kol.** Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products. *The AAPS Journal.* January, January 2013, Vol. 15, 1, stránky 41-52.

38. **European Commission, Health & Consumer Protection Directorate.** Guidance Document on Dermal Absorption. [Online] 19. březen 2004. [Citace: 14. květen 2017.] http://ec.europa.eu/food/plant/resources/publications_en.htm.
39. CAPE. Dermal Absorption as an Exposure Route. [Online] Canadian Association of Physicians for the Environment, 2000. [Citace: 21. duben 2017.] <http://www.cape.ca/children/derm2.html>.
40. **Hadgraft J.** Skin, the final frontier. *Int J Pharm.* Srpen 2001, Sv. 224, 1-2, stránky 1-18.
41. **Williams A.C., Barry B.W.** Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev.* Březen 2004, Sv. 56, 5, stránky 603-18.
42. **Kreilgaard M.** Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002, Sv. 54, 1 dopl., stránky 77-98.
43. **Novotný M.** Akceleranty transdermální permeace: studie vlivu struktury na akcelerační účinek. *Doktorská disertační práce.* Hradec Králové : Červenec 2010.
44. **Vávrová K., Hrabálek A.** Amino Acid-Based Transdermal Penetration Enhancers. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Modification of the Stratum Corneum.*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016, 20, stránky 325-336.
45. **Janůšová B. a kol.** Amino acid derivatives as transdermal permeation enhancers. *J. Control. Release.* Leden 2013, Sv. 165, 2, stránky 91–100.
46. **Janůšová B.** Vliv derivátů aminokyselin a ceramidů na bariérovou funkci kůže. *Doktorská disertační práce.* Hradec Králové : Červenec 2012.
47. Pubchem, Open Chemistry Database. [Online] [Citace: 6. červenec 2017.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/isopropyl_myristate#section=Density.
48. **Teló I. a kol.** Mechanisms of imiquimod skin penetration. *Int J Pharm [online].* 2016, Sv. 511, 1, stránky 516-523.
49. **Muller R.H., Keck C.M.** Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J Biotechnol.* 2004, Sv. 113, str. 151.

50. **Lawrence M.J., Rees G.D.** Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Prosinec 2000, Sv. 45, 1, stránky 89-121.

51. **Barry B.W.** Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement. *J. Control. Release.* 1991, Sv. 15, stránky 237–248.

52. **Yosha I. a kol.** *Imiquimod cream formulation.* US 20070264317 A1 US, 15. listopad 2007. Původní nabyvatel: Perrigo Israel Pharmaceuticals Ltd..

53. **Diblíková D.** Studium transdermální a dermální absorpce acyklických nukleosidfosfonátů ze skupiny 2,6-diaminopurinu. *Diplomová práce.* Hradec Králové : 2013.

54. **Vávrová K. a kol.** Transdermal and dermal delivery of adefovir: effects of pH and permeation enhancers. *Eur J Pharm Biopharm.* Červen 2008, Sv. 69, 2, stránky 597-604.