



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej

Paweł Stasiak

**BIOFARMACEUTYCZNE WŁAŚCIWOŚCI KONIUGATU
IBUPROFENU Z OLIGOMEREM KWASU
3-HYDROKSYMASŁOWEGO I MOŻLIWOŚCI JEGO
WYKORZYSTANIA**

Praca wykonana
w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
i przedstawiona
Radzie Wydziału Farmaceutycznego
w celu uzyskania stopnia
doktora nauk farmaceutycznych

Promotor:

prof. dr hab. Małgorzata Sznitowska,
Kierownik Katedry i Zakładu Farmacji Stosowanej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2009

Praca w części wykonana w ramach stypendium Galenos Fellowship - projekt Unii Europejskiej "Towards a European PhD in Advanced Drug Delivery", Marie Curie Contract MEST-CT-2004-4049922 w Trinity College Dublin

Współpraca:

dr Carsten Ehrhardt,

School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

Trinity College Dublin, Irlandia

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE	7
SUMMARY	9
I. WSTĘP	11
1. POLIMERY W POZAJELITOWYCH POSTACIACH LEKU	12
1.1. PEGylacja	15
1.2. Inne polimery do biokoniugacji	19
2. KWAS β -HYDROKSYMASŁOWY I JEGO POLIMERY	22
3. PRZEDŁUŻONE UWALNIANIE Z PREPARATÓW DO PODANIA POZAJELITOWEGO	24
4. NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWZAPALNE (NLPZ) I ICH KONIUGATY Z POLIMERAMI	27
4.1. Drogi podania i działania niepożądane NLPZ	27
4.2. Koniugaty NLPZ z polimerami	28
5. SYNTETYCZNE OLIGOMERY KWASU 3-HYDROKSYMASŁOWEGO (OHB)	31
5.1. Synteza koniugatów NLPZ z oligo(kwasem 3-hydroksymasłowym)	31
5.2. Badania biologiczne OHB i jego koniugatów	32
6. HODOWLE KOMÓRKOWE W BADANIACH MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH	33
6.1. Mechanizmy wchłaniania substancji przez błony biologiczne	33
6.2. Linia komórkowa Caco-2	34
6.3. Linia komórkowa Calu-3	36
6.4. Wpływ wybranych polimerów na transport ksenobiotyków przez modele barier biologicznych	37
II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY	39
III. METODY	42
1. ODCZYNNIKI	43
2. SPRZĘT	46
3. MATERIAŁY	48

4. ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA	49
4.1. Warunki analizy	49
4.2. Analiza zawartości ibuprofenu i koniugatu ibuprofenu z oligo(kwasem 3-hydroksymasłowym)	49
4.3. Analiza zawartości ibuprofenu w osoczu	50
4.3.1. Metoda analizy	50
4.3.2. Badanie odzysku	51
4.3.3. Przygotowanie próbek osocza do analizy metodą HPLC	51
4.3.4. Krzywa wzorcowa	51
5. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE DC	52
5.1. Badanie rozpuszczalności	52
5.2. Wyznaczanie log P	53
5.3. Wyznaczanie pK _a	53
5.4. Badanie hydrolizy i stabilności termicznej DC	54
6. BADANIA Z WYKORZYSTANIEM KULTUR KOMÓRKOWYCH	55
6.1. Linia komórkowa Caco-2	55
6.2. Linia komórkowa Calu-3	56
6.3. Analiza ilościowa metodą spektrofluorymetryczną	57
6.4. Badanie transportu przezkomórkowego	57
6.5. Badanie wychwytu komórkowego	59
6.6. Badanie cytotoksyczności OHB, DC i IB	62
6.7. Analiza metodą Western Blot (WB)	62
7. SPORZĄDZANIE POSTACI FARMACEUTYCZNYCH Z DC	64
7.1. Roztwór olejowy DC	64
7.2. Emulsje typu o/w z DC	65
7.3. Trwałość sporządzonych preparatów	66
7.4. Badanie <i>in vitro</i> uwalniania DC i IB z preparatów	66
7.5. Preparaty porównawcze	66
8. BADANIA <i>in vivo</i>	67
8.1. Badania wstępne	68
8.2. Właściwe badanie farmakokinetyki DC	69
8.3. Analiza wyników	71
IV. WYNIKI	72
1. OCENA METOD ANALIZY ILOŚCIOWEJ IBUPROFENU I KONIUGATU	73
1.1. Oznaczanie zawartości IB i DC w roztworach	73
1.2. Oznaczanie zawartości IB w osoczu	75
2. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE KONIUGATU	77
2.1. Rozpuszczalność	77
2.2. Wartość log P	78
2.3. Wartość pK _a	78
2.4. Hydroliza i stabilność termiczna	79

3. DOŚWIADCZENIA Z WYKORZYSTANIEM KULTUR KOMÓRKOWYCH	84
3.1. Badanie transportu przez monowarstwy komórkowe	84
3.2. Badanie wychwytu Rh-123, 4-Di-1-ASP oraz FNa przez komórki Caco-2	88
3.3. Test przeżywalności komórek	93
3.4. Wykrywanie P-gp metodą Western Blot	95
4. WŁAŚCIWOŚCI SPORZĄDZONYCH PREPARATÓW	96
4.1. Wybór metody wyjaławiania	96
4.2. Trwałość preparatów	98
4.3. Uwalnianie DC z postaci leku - badania <i>in vitro</i>	99
5. BADANIA <i>in vivo</i>	103
V. OMÓWIENIE WYNIKÓW	107
VI. WNIOSKI	121
VII. PIŚMIENNICTWO	124

WYKAZ SKRÓTÓW

AUC	pole powierzchni pod krzywą czas/stężenie w osoczu
C	cyklosporyna A
CMC	krytyczne stężenie micelarne
DC	koniugat ibuprofenu z oligo(kwasem 3-hydroksymasłowym)
10DC/E20%	20% emulsja o/w zawierająca 10% (m/m) DC
25DC	25% (m/m) roztwór DC w oleju Miglyol 812
4-Di-1-ASP	4-(4-dimetyloamino)stearylo)-N-metylopirydynian jodu
EBA	względna dostępność biologiczna
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy
EGTA	kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy
FDA	Agencja ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration)
FNa	sól sodowa fluoresceiny
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPMA	kopolimer N-(2-hydroksypropylo)-metakrylamidu
IB	ibuprofen
5%IB	5% roztwór IB w oleju Miglyol 812
IND	indometacyna
LIZ10%	10% wodny roztwór lizynianu ibuprofenu
MDR	oporność wielolekowa (Multidrug Resistance)
MRP	białko związane z opornością wielolekową (Multidrug Resistance - Associated Protein)
MTT	formazan błękitu tiazolowego
NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
OHB	oligo(kwas 3-hydroksymasłowy)
PEG	polietylenoglikol
P-gp	poliglikoproteina
PHB	kwas polihydroksymasłowy
PLA	kwas polimlekowy
PLGA	kopolimer kwasu polimlekowego z kwasem poliglikolowym
Rh-123	rodamina-123
SD	odchylenie standardowe
SPE	ekstrakcja do fazy stałej (Solid Phase Extraction)
Tris	tris(hydroksymetylo)aminometan
USP	Farmakopea Amerykańska (United States Pharmacopeia)
V	chlorowodorek werapamilu
WB	Western Blot

STRESZCZENIE

Biozgodne i nietoksyczne polimery używane są w technologii postaci leku jako nośniki substancji podawanych doustnie, pozajelitowo lub wykazujących działanie miejscowe. Nośnik polimerowy może tworzyć matrycę, w której lek jest rozpuszczony lub zdyspergowany, lub, rzadziej, może być kowalencyjnie związany z cząsteczką substancji leczniczej. W wielu przypadkach wprowadzony polimer zapewnia przedłużone uwalnianie, które prowadzi do wydłużenia czasu działania i poprawy skuteczności procesu terapeutycznego. Podstawowym wymaganiem stawianym nośnikom polimerowym pozostaje zawsze biozgodność i wykazany brak toksyczności.

Przedmiotem badań był zsyntezowany w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze koniugat ibuprofenu z oligomerem kwasu 3-hydroksymasłowego (DC). Celem prowadzonych badań było określenie jego podstawowych właściwości fizykochemicznych, które mają istotne znaczenie dla technologii postaci leku i farmakokinetyki *in vivo* potencjalnego proleku. Określono wpływ koniugatu na przeżywalność komórek linii Caco-2 i Calu-3 oraz na funkcję obecnej w błonach komórkowych P-glikoproteiny (P-gp). Prowadzone badania miały także służyć opracowaniu składu i metody sporządzania właściwych postaci leku, które następnie poddano ocenie biofarmaceutycznej *in vitro* i *in vivo*.

W pierwszym etapie pracy opracowano i dokonano walidacji metody analitycznej (HPLC) służącej do oznaczania ilościowego DC. Następnie zbadano rozpuszczalność koniugatu w wodzie, 0,1 mol/l kwasie solnym, buforach fosforanowych oraz wybranych rozpuszczalnikach organicznych i płynach fizjologicznych. Wykazano słabą rozpuszczalność DC w wodzie, obserwowano jednak wzrost rozpuszczalności wraz ze wzrostem pH. Potwierdzono jednocześnie bardzo dobrą rozpuszczalność w metanolu, oleju rącznikowym i oleju Miglyol 812. W związku z wysoką stabilnością koniugatu w roztworach wodnych oraz znaczną odpornością na działanie enzymów hydrolitycznych (pankreatyna), zaproponowano podanie proleku w formie iniekcji domięśniowych.

Wykazano, że w obecności DC zwiększeniu ulega szybkość transportu przezkomórkowego rodminy-123, modelowego substratu dla P-glikoproteiny (P-gp), jak też jej wychwyt przez komórki Caco-2. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem substratów innych układów transporterowych wykazały specyficzność działania DC na

P-gp/MDR1. Ze względu na brak toksyczności wobec komórek Caco-2 oraz ograniczoną cytotoksyczność względem komórek Calu-3, DC może być wykorzystany jako modelowy inhibitor P-gp, zwiększający absorpcję niektórych leków.

Sporządzono i poddano ocenie *in vitro* dwa preparaty z DC: roztwór olejowy i emulsję typu o/w stabilizowaną polisorbatem 80. Wykazano stabilność obu układów po wyjałowieniu, a następnie przeprowadzono badanie *in vivo* na królikach. Stężenie IB w osoczu krwi oznaczono metodą HPLC odwróconych faz z zastosowaniem wzorca wewnętrznego (indometacyna) i ekstrakcji do fazy stałej (SPE).

Wobec podanego grupie kontrolnej olejowego roztworu IB wykazano znacząco spowolnione uwalnianie ibuprofenu z DC. Lek wykrywano w osoczu 24 h po dokonaniu wstrzyknięcia, nie wykrywano go natomiast już w 12 h po podaniu IB w formie nieskoniugowanej. Brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy profilami farmakokinetycznymi obu preparatów z DC sugeruje, że czynnikiem decydującym o uwalnianiu jest przede wszystkim szybkość hydrolizy koniugatu.

Ze względu na powolną hydrolizę koniugatu stwierdzono, że może on być traktowany jako substancja modelowa dla pozajelitowego podawania leków o charakterze kwasów karboksylowych wykazujących aktywność farmakologiczną w niskich stężeniach. Zasadne wydaje się być także wykorzystanie badanego związku jako modelowej substancji zwiększającej absorpcję leków będących substratami dla P-gp (np. doksorubicyna, taksol).

SUMMARY

Biocompatible and non-toxic polymers in pharmaceutical technology serve as drug carriers for substances administered orally, parenterally and topically. The carrier could either create a matrix in which the drug is dissolved or dispersed or, less likely, can be covalently linked to the drug molecule. Frequently, the polymer ensures sustained drug release which leads to prolonged action and improves the efficiency of the treatment. In every case the prerequisite requirement to fulfill is the carrier's biocompatibility and lack of toxicity.

The research was focused on a conjugate of ibuprofen with 3-hydroxybutyric acid oligomers (DC) which was synthesised in the Centre of Polymer and Carbon Materials in Zabrze. The aim of the study was to determine basic physicochemical properties of the novel prodrug, significant for pharmaceutical technology and *in vivo* pharmacokinetics. An influence of the conjugate on the survival of Caco-2 and Calu-3 cells as well as on the activity of P-glicoprotein (P-gp) present in the cell membranes were also determined. Finally, the research was aimed at development of possible drug formulations, which were subsequently subjected to biopharmaceutical evaluation in *in vitro* and *in vivo* conditions.

At the first stage of the study a HPLC method for determination of DC concentration was developed and validated. Then, the solubility in water, 0.1 mol/l hydrochloric acid, phosphate buffer solutions and selected organic solvents and physiological fluids was determined. The conjugate proved to be poorly soluble in water, however its solubility was increasing together with an increase of pH values. On the other hand very good solubility in methanol, castor oil and Miglyol 812 was found. Due to good stability of DC in aqueous environment and significant resistance against hydrolytic enzymes (pancreatin), parenteral delivery has been suggested for the conjugate (intramuscular injections).

The conjugate was found to accelerate rhodamine-123 (P-gp substrate) transport across Caco-2 cell monolayers and the cellular uptake of a model compound. The experiments involving substrates for different membrane transporters confirmed an exclusive influence of DC on P-gp/MDR1 transporters. Showing no toxicity towards Caco-2 cells and limited cytotoxicity towards Calu-3, DC has been suggested as a potential P-gp inhibitor increasing absorption of selected drugs.

Two different DC formulations: oily solution in Miglyol and o/w emulsion stabilized with Tween 80 were prepared and evaluated in *in vitro* conditions. Having proven to be stable after sterilization, the preparations were used in *in vivo* experiment involving rabbits. The DC formulations were compared with IB oily solution administered intramuscularly. A HPLC method was employed to determine IB concentrations in plasma spiked with indomethacin as an internal standard and subjected to a solid phase extraction (SPE).

Drug release from the conjugate was much slower than from the free form of IB resulting in detectable plasma concentrations 24 h after administration. Contrarily, no IB has been found 12 h after administration of a free form of the drug. No statistically significant differences in pharmacokinetics between DC oily solution and emulsion have been detected suggesting hydrolysis rate as a key factor influencing pharmacokinetic profile of the drug.

Due to slow hydrolysis of the conjugate it was concluded that DC could be a model substance for parenteral delivery of carboxylic acid derivatives demonstrating pharmacological activity at low concentrations. The conjugate could be also considered as a substance used to enhance uptake of drugs being P-gp substrates (e.g. doxorubicin, taxol).

I. WSTEP

W ostatnich latach zaobserwować można znaczący wzrost zainteresowania polimerami, które po koniugowaniu z nimi substancji leczniczych, znajdują zastosowanie w technologii postaci leku, jako proleki, czyli związki uwalniające substancje lecznicze w następstwie procesów metabolicznych. Celem stosowania koniugatów - proleków jest otrzymanie biozgodnych i nietoksycznych związków do terapii celowanej, lub też uzyskanie kontrolowanego uwalniania substancji czynnej. Najlepiej poznanym polimerem tego typu jest polietylenoglikol (PEG), który znalazł zastosowanie w znacznej ilości już zarejestrowanych i z powodzeniem stosowanych pozajelitowych preparatów farmaceutycznych. Uwagę poświęca się także innym polimerom, które wywierają podobny wpływ na właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne związanej substancji. Jednym z takich związków może być oligomer kwasu 3-hydroksymasłowego, którego koniugaty z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ), takich jak ibuprofen, są przedmiotem niniejszej rozprawy. Przedstawione zostaną przykłady koniugatów różnych polimerów z substancjami leczniczymi, a także omówione zostaną sposoby uzyskiwania przedłużonego uwalniania substancji czynnej po podaniu pozajelitowym. Ponieważ znaczną część badań przeprowadzono z wykorzystaniem kultur komórkowych Caco-2 i Calu-3, omówione zostanie ich znaczenie w prowadzonych współcześnie badaniach z zakresu biofarmacji, zwłaszcza w kontekście oznaczania cytotoksyczności i transportu transmembranowego, którego mediatorem dla wielu substancji leczniczych jest poliglikoproteina (P-gp).

1. POLIMERY W POZAJELITOWYCH POSTACIACH LEKU

Zgodnie z definicją Farmakopei Polskiej VIII (FP VIII), preparaty pozajelitowe są to jałowe postacie leku przeznaczone do podania do organizmu człowieka lub zwierzęcia przez wstrzyknięcie, infuzję lub implantację.

Poza substancjami czynnymi i pomocniczymi regulującymi pH, ciśnienie osmotyczne, zwiększającymi rozpuszczalność substancji aktywnych oraz środkami konserwującymi, w skład tych preparatów wchodzić też mogą nośniki polimerowe. Sposób połączenia polimeru z cząsteczką substancji aktywnej może być dwojaki:

1. Za pomocą wiązania kowalencyjnego (np. eterowego, estrowego, amidowego, dwusiarczkowego), przez co cząsteczka leku uzyskuje odmienne właściwości fizykochemiczne i farmakokinetyczne. Utworzony koniugat lek – polimer nie

musi wykazywać aktywności farmakologicznej, stanowi wtedy prolek, który w wyniku rozpadu wiązania w warunkach *in vivo* uwalnia substancję aktywną, a związany polimer ulega dalszemu metabolizmowi i eliminacji. Do współcześnie stosowanych związków tego typu należą połączenia PEG z substancjami leczniczymi (uzyskuje się w ten sposób tzw. substancje pegylowane),

2. Za pomocą inkorporacji w matrycy polimerowej, bez udziału wiązań chemicznych. Tego typu rozwiązanie znalazło zastosowanie w technologii implantów i mikrosfer, gdzie substancja lecznicza jest zawieszona lub rozpuszczona w materiale polimerowym (najczęściej jest to kwas polimlekowy lub kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego) [1].

Niezależnie od charakteru połączenia z cząsteczką substancji aktywnej, nośnik polimerowy musi spełnić kilka podstawowych warunków, do których należą:

- biogodność,
- brak toksyczności,
- poznana droga metabolizmu,
- metabolizm prowadzący najlepiej do substancji występujących w organizmie w warunkach fizjologicznych,
- niski indeks polidispersji, świadczący o porównywalnej długości łańcuchów polimerowych w uzyskanej mieszaninie,
- w przypadku koniugatów posiadających wiązanie kowalencyjne, konieczne jest udowodnienie, że substancja czynna ulega uwolnieniu po podaniu preparatu.

Polimery jako związki wielkocząsteczkowe w znaczący sposób zwiększają masę cząsteczkową koniugowanej substancji leczniczej. Zjawisko to nie zawsze jest pożądane. Dotyczy to zwłaszcza leków działających w relatywnie wysokich dawkach, kiedy wprowadzenie łańcuchów polimerowych spowodowałaby konieczność jednorazowego podawania nawet kilku gramów preparatu. Stąd zainteresowanie oligomerami, czyli związkami zbudowanymi, podobnie jak polimery, z powtarzających się jednostek (merów), jednak posiadających mniejszą ich liczbę, a także nie manifestującymi wszystkimi właściwościami fizykochemicznymi w pełni wykształconego polimeru.

Koniugaty substancji leczniczych z polimerami mogą ulegać hydrolizie enzymatycznej, w wyniku której dochodzi do uwolnienia cząsteczki leku, często osiągnąć też można efekt przedłużonego działania [2]. Wiązanie z nośnikiem powinno zabezpieczać przed przedwczesnym uwolnieniem substancji czynnej, z drugiej jednak strony wprowadzenie wiązań zbyt stabilnych może utrudniać uwolnienie leku, a tym samym może nie wystąpić pożądaný efekt terapeutyczny. Uwalnianie leku z koniugatów z polimerami może być dodatkowo promowane poprzez wprowadzenie pomiędzy cząsteczkę leku a łańcuch polimerowy wiązań niestabilnych hydrolitycznie lub ulegających reakcjom enzymatycznym, tzw. spejserów [3].

W zależności od zastosowanego polimeru, dzięki koniugacji, uzyskać można zwiększenie rozpuszczalności w wodzie, lepszą biodostępność, wyższą odporność względem enzymów hydrolitycznych oraz zwiększenie kumulacji w chorobowo zmienionych tkankach, a także zmniejszenie immunogenności leku. Uzyskuje się jednocześnie dłuższy okres półtrwania związany ze zwiększeniem objętości hydrodynamicznej i zmniejszeniem klirensu nerkowego [3, 4].

Z punktu widzenia bezpieczeństwa terapii istotne jest, aby nośnik polimerowy ulegał eliminacji z organizmu. Eliminacja następuje w formie niezmienionej (np. PEG) lub też, w większości przypadków, poprzedzona jest metabolizmem polimeru poprzez jego degradację enzymatyczną.

Wyróżnić można dwie drogi rozkładu: hydrolizę i oksydację. Rozkład przez hydrolizę jest dość powszechny w przypadku poliestrów, poliamidów, polibezwodników i innych pochodnych kwasów karboksylowych. Rozkładu w drodze oksydacji spodziewać się należy w przypadku pochodnych kwasu węglowego jak np. poliuretany i poliwęglany [5]. Pierwsza z wymienionych dróg rozkładu jest raczej szybka, podczas gdy druga przebiega znacznie wolniej. W przypadku rozkładu przez hydrolizę, szybkość procesu może być modyfikowana poprzez dołączenie do łańcucha polimerowego jednostek monomerowych o różnych właściwościach hydrolitycznych. W tym też przypadku na etapie wyboru polimeru do koniugacji należy uwzględnić możliwość lokalnego obniżenia pH (uwolnienie grup karboksylowych), co ma znaczenie dla leków wrażliwych na odczyn kwaśny. W przypadku rozkładu przez oksydację najczęściej konieczny jest udział czynników utleniających. W warunkach *in vivo* związki takie wytwarzane są przez makrofagi [5].

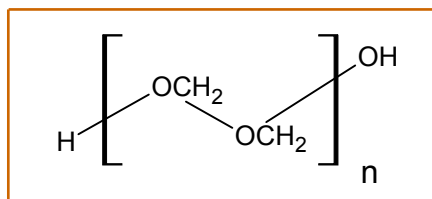
Niezależnie od chemicznego charakteru procesu rozkładu, erozja polimeru następować może na jego powierzchni lub wewnątrz matrycy materiału (degradacja)

[6, 7]. Erozja powierzchniowa jest mechanizmem bardziej pożądanym ze względu na powtarzalną kinetykę procesu, którą można w dość prosty sposób kontrolować poprzez odpowiednie rozdrobnienie preparatu farmaceutycznego (mikrocząstki), a przez to zmianę powierzchni kontaktu z materiałem biologicznym [6]. Jednocześnie w przypadku tego typu rozkładu, masa cząsteczkowa polimeru pozostaje niezmienna przez dłuższy okres czasu, maleje natomiast masa preparatu. Z kolei dominacja erozji matrycy w mechanizmie rozkładu prowadzi do gwałtownego spadku masy cząsteczkowej przy zachowaniu masy preparatu [5].

Jako potencjalne nośniki leku próbowano wykorzystywać różne klasy polimerów, jednak większość zarejestrowanych koniugatów zawiera łańcuchy PEG [4]. W kolejnych dwóch rozdziałach (1.1 i 1.2) przedstawiony zostanie dokładniejszy opis tych związków, jak też zaprezentowane zostaną inne polimery, interesujące z punktu widzenia technologii postaci leku.

1.1. PEGylacja

Polietylenoglikole (PEG, Ryc. 1), ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie oraz brak toksyczności [3, 7] znalazły szerokie zastosowanie w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych. Stanowią składniki roztworów, tabletek, czopków, maści oraz kremów. Polietylenoglikole są związkami niebiodegradowalnymi, wydalnymi z moczem (łańcuchy o masie cząsteczkowej poniżej 20 kDa) lub drogą eliminacji wątrobowej (łańcuchy dłuższe, nie znajdujące zastosowania w technologii postaci leku) [3]. Zależnie od długości łańcucha, PEG występują w formie płynnej (m. cz. 200 – 600), półstałej (m. cz. 1000 – 1500) lub stałej (m. cz. > 4000). W farmacji wykorzystuje się szereg dostępnych pochodnych różniących się właściwościami fizykochemicznymi i aplikacyjnymi. PEG stosuje się w technologii stałych postaci leku jako substancje poślizgowe, smarujące, wiążące na sucho oraz hydrofilizujące, jako podłoża czopkowe, w postaciach półstałych jako podłoża maściowe, a także jako niejonowe stabilizatory emulsji oraz rozpuszczalniki [8].

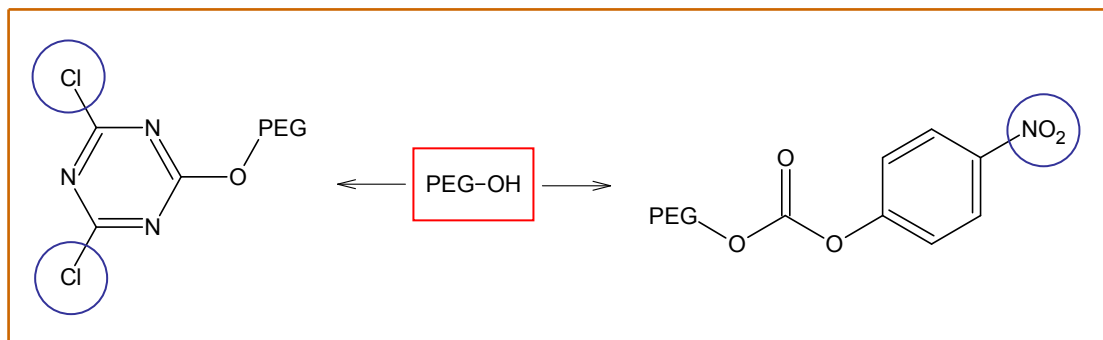


Ryc. 1. Struktura chemiczna PEG.

Oprócz zastosowań PEG jako samodzielnych substancji pomocniczych, są one także wykorzystywane w preparatach pozajelitowych jako nośniki skoniugowane z substancjami czynnymi. W ten sposób modyfikują właściwości fizykochemiczne i farmakokinetyczne substancji czynnych. Synteza takich koniugatów określana jest mianem PEGylacji i polega na powstaniu wiązania chemicznego pomiędzy łańcuchem PEG a cząsteczką leku, lub też na połączeniu łańcuchów PEG z powierzchnią nośnika (np. liposomu) zawierającego substancję czynną [9].

PEG dostępne są jako struktury liniowe i rozgałęzione, o różnych masach molowych. Jednocześnie, zależnie od typu PEGylowanej substancji leczniczej, istnieje możliwość przyłączania jednej lub kilku cząsteczek PEG [10]. Substancje wielkocząsteczkowe (np. białka) z reguły łączą się z wieloma cząsteczkami PEG, co jednak wiąże się z ryzykiem zaistnienia oddziaływań sterycznych z substancją aktywną i obniżenia jej aktywności. W celu uniknięcia tego zagrożenia stosuje się rozgałęzione łańcuchy PEG, dzięki którym w znaczący sposób zwiększa się masa koniugatu, a liczba wiązań lek – PEG pozostaje niewielka. Wykazano ponadto, że zastosowanie struktur rozgałęzionych pozwala na zwiększenie odporności termicznej oraz lepiej chroni przed działaniem enzymów niż wprowadzenie polimeru liniowego [11].

PEGylacja możliwa jest po uprzednim aktywowaniu polimeru, polegającym na modyfikacji wolnej grupy hydroksylowej za pomocą aktywnych grup chemicznych, jak np. grupy estrowej, aldehydowej lub innej. Przykładowy sposób aktywacji PEG przedstawiony jest na ryc. 2. Podstawiona w miejsce grupy hydroksylowej grupa aktywna, posiadająca powinowactwo do ugrupowań np. sulfhydrylowych lub aminowych, tworzy następnie wiązania z cząsteczką substancji aktywnej. Utrzymanie wprowadzonych poprzez PEGylację zmian we właściwościach farmakologicznych substancji leczniczej uzależnione jest od stabilności wiązania z polimerem.



Ryc. 2. Przykładowy sposób aktywacji PEG [10].

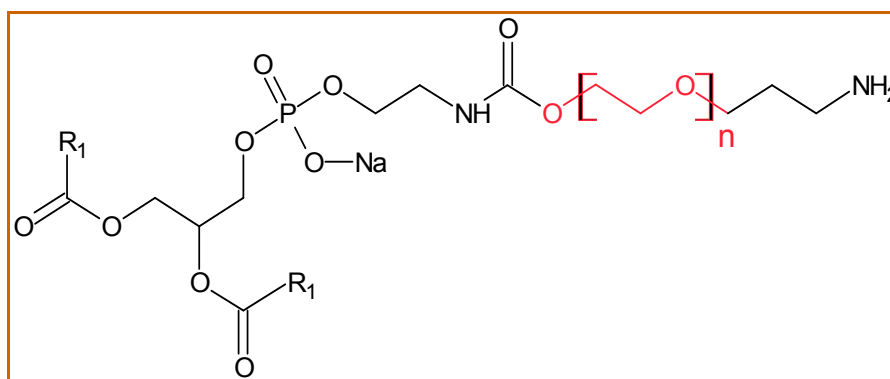
Grupą substancji leczniczych, dla której koniugowanie z PEG ma szczególnie istotne znaczenie, ze względu na ich fizyczną labilność oraz słabą rozpuszczalność w wodzie, są białka. PEGylacja białek polega najczęściej na utworzeniu wiązania pomiędzy grupą aminową cząsteczki białka, a aktywną grupą chemicznie zmodyfikowanego polietylenoglikolu.

W większości przypadków, kowalencyjne połączenie PEG z cząsteczką białka następuje w obrębie grup aminowych lizyny oraz wolnej grupy aminowej ostatniego aminokwasu w sekwencji. W zależności od rodzaju modyfikacji polimeru, PEGylacja polega na utworzeniu jednego lub kilku wiązań amidowych, aminowych lub uretanowych pomiędzy aktywowaną cząsteczką PEG, a substancją leczniczą.

PEGylacja zmienia strukturę chemiczną leku oraz jego właściwości fizykochemiczne jak polarność, rozpuszczalność i właściwości powierzchniowe, jak też właściwości farmakokinetyczne – okres półtrwania, wychwyty komórkowy i szybkość eliminacji [9, 12]. Technika PEGylacji pozwala ponadto uniknąć, częściej w przypadku białkowych substancji leczniczych, gwałtownej odpowiedzi immunologicznej organizmu, prowadzącej do szybkiej eliminacji leku z ustroju. Udowodniono, że PEGylacja zwiększa rozpuszczalność w wodzie, a poprzez modyfikację steryczną cząsteczki, zapobiega jej degradacji przez enzymy proteolityczne, poprawiając również stabilność fizyczną. Jednocześnie zmniejsza się odpowiedź immunologiczna organizmu. Istotne z punktu widzenia zmian właściwości fizykochemicznych białka jest także znaczne zwiększenie masy cząsteczkowej [9, 10, 13].

Poza koniugatami PEG z substancjami leczniczymi, w produkcji liposomów wykorzystuje się także PEGylowane lipidy. Uzyskane z nich liposomy wykazują odmienne, korzystne właściwości farmakokinetyczne. Ryc. 3 przedstawia strukturę

chemiczną przykładowego koniugatu PEG z fosfolipidem, wykorzystywanego do otrzymywania modyfikowanych liposomów.



Ryc. 3. Struktura chemiczna PEGylowanego aktywowanego fosfolipidu [14].

W przypadku PEGylacji liposomów wykazano, że PEGylowane nośniki leku charakteryzują się lepszymi właściwościami farmakokinetycznymi (np. w terapii nowotworów), objawiającymi się głównie zwiększeniem kumulacji w tkankach chorobowo zmienionych oraz wydłużeniem okresu krążenia we krwi [15]. Zwiększenie kumulacji tłumaczy się zmniejszonym wychwytem liposomów przez układ siateczkowo – śródbłonkowy (RES), a w szczególności zablokowaniem oddziaływania z opsoniną oraz wiązaniem wody na powierzchni modyfikowanego nośnika, co z kolei hamuje wiązanie z białkami osocza [15].

Przykładami stosowanych w leczeniu preparatów zawierających PEGylowane liposomy są Caelyx (Schering-Plough) i Doxil (Sequus Pharm.) zawierające jako substancję czynną chlorowoderek doksorubicyny [16, 17]. Preparaty te stosuje się w leczeniu raka jajnika, mięsaka Kaposi’ego w przebiegu AIDS oraz zaawansowanego raka sutka.

PEGylacja została z powodzeniem zastosowana w technologii kilku zarejestrowanych biotechnologicznych produktów leczniczych, których krótką charakterystykę przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Charakterystyka PEGyloowanych leków stosowanych w lecznictwie

Produkt (producent)	Substancja czynna	Zastosowanie	Literatura
PegIntron (SP Europe)	Rekombinowany interferon alfa-2b	WZW C	13, 18
Pegasys (Roche)	Rekombinowany interferon alfa-2a	WZW C	19
Somavert - Pegvisomant (Pfizer)	Analog ludzkiego hormonu wzrostu	Akromegalia	20
Neulasta - Pegfilgrastim (Amgen)	Filgrastym	W skojarzeniu z chemioterapią – zmniejszenie ryzyka infekcji spowodowanej obniżeniem ilości leukocytów	21, 22
Adagen - Pegademase (ENZON)	Deaminaza adenozykowa	Ciężki złożony niedobór odporności	23
Oncaspar - Pegaspargase (ENZON)	L-asparaginaza	Ostra białaczka limfoblastyczna	24 - 26
Macugen – Pegaptanib (Eyeteck/Pfizer)	Pegaptanib sodu	Zwyrodnienie plamki żółtej	27, 28

Ze względu na nietoksyczność PEG i szeroki wachlarz korzyści, jakie zapewniają PEGylowane preparaty, zainteresowanie PEGylacją w sposób ciągły rośnie. Obecnie prowadzi się prace mające na celu zastosowanie tej techniki w preparatach stosowanych w leczeniu zakażeń wirusem HIV [29] oraz w terapii genowej [30]. Jednocześnie pojawia się wiele doniesień dotyczących postępu w syntezie PEGyloowanych leków przeciwnowotworowych [3, 31-33].

1.2. Inne polimery do biokoniugacji

Poza opisanymi wcześniej polietylenoglikolami, pod kątem wykorzystania jako nośników leku w formie koniugatów badano także inne biozgodne polimery. Chociaż w zastosowaniu klinicznym takie koniugaty praktycznie nie istnieją, obserwuje się ciągły wzrost zainteresowania pracami nad nośnikami (prolekami) tego typu. Niektóre z nich

znajdują się na etapie badań klinicznych [34]. Do najczęściej opisywanych i najdokładniej przebadanych polimerów do biokoniugacji, obok PEG, zaliczyć można:

- polisacharydy np. dekstran,
- polimery winylowe np. kopolimery N-(2-hydroksypropylo)-metakrylamidu (HPMA),
- poliaminokwasy i ich analogi np. poli(L-lizyna),
- dendrymery.

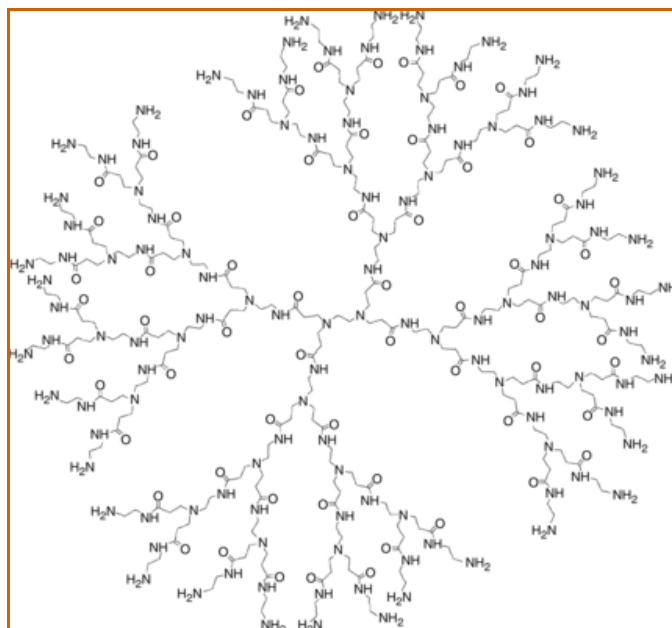
Polisacharydy znalazły zastosowanie zarówno w tworzeniu koniugatów z lekami niskocząsteczkowymi, jak też z białkami, w tym insuliną, immunoglobulinami oraz ludzkim hormonem wzrostu [35]. Najczęściej używanym polimerem tej grupy jest dekstran. Ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie, brak toksyczności i łatwą dostępność odmian o różnych masach cząsteczkowych, przy jednoczesnym zachowaniu niskiego indeksu polidispersji, związek ten może być wykorzystywany jako modelowy polisacharyd do koniugacji substancji leczniczych [2]. Koniugat dekstranu ze streptokinazą był pierwszym na rynku koniugatem z cząsteczką białka [3], wykazywał jednak niekorzystną farmakologicznie heterogenność związaną z występującym w nim usieciowaniem. Z dekstranem był także koniugowany ketorolak [36], a powstały związek został poddany badaniom *in vitro* i *in vivo*. Po podaniu *per os* wykazano, że w porównaniu z wolnym ketorolakiem, koniugat pozwolił na ograniczenie niepożądanego działania wrzodotwórczego przy zachowaniu właściwości przeciwzapalnego leku.

Polimery winylowe, w związku ze znaczną ilością reaktywnych grup funkcyjnych, są w stanie związać dużą liczbę cząsteczek leku. Ponieważ ta grupa polimerów nie podlega biodegradacji, aby zapewnić eliminację z ustroju, masa cząsteczkowa polimeru powinna wynosić nie więcej niż 50 kDa [2]. Wśród polimerów tej grupy największe zainteresowanie wzbudza HPMA, który z powodzeniem został zastosowany w koniugacie z doksorubicyną. W badaniach na myszach wykazano wyższą, w stosunku do nieskoniugowanego leku, aktywność przeciwnowotworową [37]. Zjawisko to tłumaczy się pokonywaniem przez koniugaty mechanizmów obronnych komórki (pompy błonowe), zmniejszaniem przez nie aktywności cytoplazmatycznych enzymów detoksykacyjnych oraz indukowaniem nekrozy i apoptozy komórek nowotworowych [4]. Koniugacja z HPMA może okazać się korzystna także dla innych substancji, które poprzez przyłączenie hydrofilowego

polimeru pokonają powszechnie spotykany problem słabej rozpuszczalności w wodzie. Podjęto próby zastosowania koniugatu z kamptotecyną [38] oraz podstawionej dikarboksylovym ligandem cisplatyny i wykazano wyższą kumulację substancji czynnych w zmienionych nowotworowo tkankach, a także wyższą aktywność przeciwnowotworową w porównaniu do cisplatyny [39].

Poliaminokwasy, np. poli(L-lizyna), poli(aspartamid), poli(N-hydroksyetylo-L-glutamina), kwas poliglutaminowy (PGA), cieszą się zainteresowaniem jako potencjalne nośniki leku dzięki możliwości jednoczesnego wiązania większej liczby cząsteczek oraz biodegradowalności. Kwas poliaspartamowy już w roku 1982 został użyty w celu koniugacji daunorubicyny, co w modelu z użyciem guza litego, zaowocowało wyższą, w stosunku do doksorubicyny, aktywnością przeciwnowotworową [40]. W 2003 r koniugat PGA z paklitaksem (Xyotax, Cell Therapeutics) znalazł się na szybkiej ścieżce rejestracji przez FDA [41]. Obecnie badaniom klinicznym poddawany jest, zawierający tę samą substancję, preparat Opaxio [42].

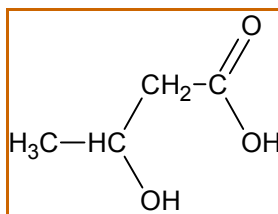
Dendrymery stanowiące grupę polimerów wielokrotnie rozgałęzionych charakteryzują się dużą liczbą grup funkcyjnych, niskim indeksem polidispersji oraz łatwością modyfikacji ich struktury, a także, związaną z budową cząsteczkową, potencjalną łatwością koniugacji z innymi substancjami [4]. Związki te podlegają też funkcjonalizacji w celu uzyskania efektu celowanego uwalniania w terapii przeciwnowotworowej. Poliamidoaminy z rdzeniem etylenodiaminowym (PAMAM, Ryc. 4), należące do opisywanej klasy polimerów koniugowane były z kwasem 5-acetylosalicylowym oraz naproksenem [43, 44]. Opisywane są też badania z udziałem koniugatów dendrymerów z lekami przeciwnowotworowymi np. metotreksatem [45]. Pomimo możliwości koniugacji większej liczby cząsteczek, dendrymery zwykle są w stanie związać maksymalnie 4 – 5 molekuły leku [4]. Istnieje także możliwość jednoczesnego połączenia z cząsteczką dendrymeru cząsteczki leku oraz cząsteczki o wysokim powinowactwie do właściwego receptora. Dendrymery próbuje się także wykorzystywać jako nośniki w terapii genowej [46] oraz fotodynamicznej [47], gdzie po zastosowaniu koniugatu z kwasem 5-aminolewulonowym wykazano przedłużoną i podwyższoną produkcję porfiryn po pozajelitowym podaniu leku.



Ryc. 4. Struktura chemiczna PAMAM [4].

2. KWAS β -HYDROKSYMASŁOWY I JEGO POLIMERY

Kwas β -hydroksymasłowy (Ryc. 5) jest jednym z trzech związków określanych jako ciała ketonowe. Obok niego są to acetoctan i aceton. Ciała ketonowe syntezowane są w warunkach fizjologicznych w przypadku niedostatecznego poziomu glukozy we krwi. Synteza ta rozpoczyna się od acetylo-CoA i przebiega w matriks mitochondrium komórek wątroby. Ciała ketonowe transportowane są z wątroby do pozostałych tkanek, gdzie acetoctan i β -hydroksymasłan zostają włączone do cyklu Krebsa.

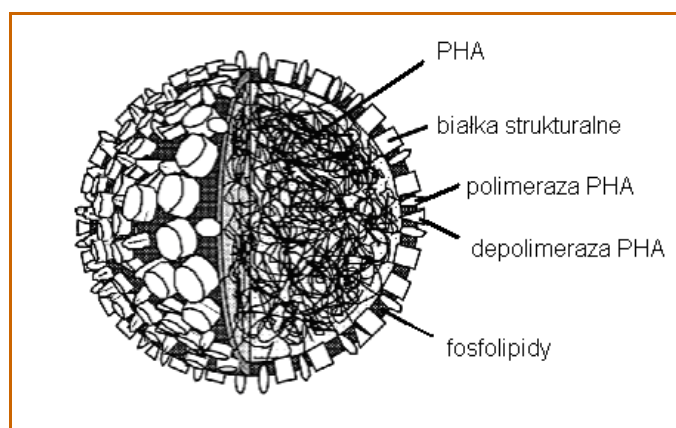


Ryc. 5. Struktura chemiczna kwasu β -hydroksymasłowego.

Kwas polihydroksymasłowy (PHB) został po raz pierwszy odkryty jako naturalny polimer magazynowany w komórkach bakterii *Bacillus megaterium* [48]. Następnie z błony komórkowej *E. coli* wyizolowano krótkołańcuchową odmianę tego

polimeru tworzącą kompleks z polifosforanem wapnia [49]. Od czasu tego odkrycia, znaleziono ponad 90 gatunków eubakterii i archeonów zdolnych do syntezy polihydroksyalkanów (PHA) zarówno w środowiskach tlenowych, jak i beztlenowych. PHB jest najbardziej rozpowszechnionym przykładem tej grupy związków [50, 51].

Wykazano, że polihydroksyalkany magazynowane są w komórkach w postaci ziaren (Ryc. 6) [52]. Rdzeń ziarna zawiera PHA o różnej długości łańcucha i otoczony jest warstwą lipidów, pomiędzy którymi występują zintegrowane białka, w tym enzymy: polimeraza i depolimeraza PHA. W efekcie działania enzymów PHA rozkładają się do oligomerów i monomeru, czyli kwasu 3-hydroksymasłowego [53, 54].



Ryc. 6. Schemat ziarna PHB [50].

Wielkocząsteczkowe odmiany PHB służą jako zapasowy materiał energetyczny, natomiast odmiany niskocząsteczkowe są zaangażowane w transport jonów i DNA przez błonę komórkową bakterii. Obecność odmian niskocząsteczkowych (<14.000 Da) została także potwierdzona w komórkach eukariotycznych, przede wszystkim w błonie mitochondrium [55], również w komórkach zwierzęcych [56]. Związki te okazały się być biozgodne w badaniach na zwierzętach [57], co nie jest zaskakujące, gdyż kwas R-3-hydroksymasłowy jest naturalnym składnikiem krwi, w której występuje w stężeniu poniżej 1 nmol/l [58].

Kwasy polihydroksymasłowe są cennym materiałem, którego zastosowanie w medycynie jest przedmiotem wielu badań [59, 60]. W jednym z nich próbowano wykorzystać PHB w procesie kapsułkowania leków [61, 62]. Wykazano wprawdzie, że związek ten ($M_n \sim 2300$) może być toksyczny dla pierwotnych makrofagów szczura, jednak doświadczenia z wykorzystaniem fibroblastów myszy tej toksyczności nie

potwierdziły [63]. Z drugiej strony wskazuje się na zaistnienie znacznej odpowiedzi zapalnej po implantacji do organizmu zwierzęcego wielkocząsteczkowego PHB w formie stentów [64]. Prowadzi się badania nad wykorzystaniem PHB w terapii urazów rdzenia kręgowego, gdzie wykazano pozytywny wpływ materiału polimerowego na nasilenie podziałów komórek Schwanna [65]. Ponadto pojawiają się próby wykorzystywania tych polimerów w regeneracji naczyń krwionośnych i leczeniu defektów przewodu pokarmowego [66]. Wielkocząsteczkowy krystaliczny PHB otrzymywany drogą fermentacji może być z kolei używany jako biodegradowalny materiał opakowaniowy, kontrowersyjne jest natomiast jego wykorzystywanie w medycynie [50].

3. PRZEDŁUŻONE UWALNIANIE Z PREPARATÓW DO PODANIA POZAJELITOWEGO

Przedłużone uwalnianie substancji leczniczej z postaci leku ma na celu utrzymanie przez dłuższy czas stałego poziomu substancji czynnej we krwi, a przez to poprawę skuteczności terapii. W pozajelitowych postaciach leku przedłużone uwalnianie jest nie tylko gwarancją utrzymania stężenia terapeutycznego leku we krwi, lecz także zmniejsza ilość dokonywanych wstrzyknięć, co znacznie poprawia komfort pacjenta i polepsza subiektywną ocenę procesu terapeutycznego.

Preparaty pozajelitowe o przedłużonym działaniu podaje się podskórnie (s.c.) lub domięśniowo (i.m.) [67]. Wybór drogi podania zależy od wielu czynników, w tym od pożądanego czasu rozpoczęcia działania terapeutycznego (szybsze po podaniu domięśniowym niż podskórnym) oraz od postaci fizykochemicznej podawanego preparatu [68]. Pewien problem stwarza określenie limitu objętości wstrzykiwanego preparatu płynnego, co zależy w znacznej mierze od rodzaju użytego rozpuszczalnika (zwłaszcza jego lepkości) i właściwości tkanki w miejscu wstrzyknięcia [67].

Wstrzyknięcie domięśniowe prowadzi do utworzenia się zbiornika leku, z którego uwalniana jest substancja czynna. Wielkość oraz właściwości tego zbiornika determinowane są takimi czynnikami jak skład preparatu, jego objętość i właściwości reologiczne, rodzaj użytego rozpuszczalnika, a także siły, jakim jest on poddany na skutek ruchu otaczającej tkanki mięśniowej [69]. Szybkość absorpcji leku limitowana

jest szybkością uwalniania z postaci farmaceutycznej, stopniem ukrwienia tkanki w miejscu wstrzyknięcia oraz właściwościami substancji czynnej [70]. Zabiegi technologiczne przy sporządzaniu preparatów do podania domięśniowego mają na celu wyeliminowanie czynników zmiennych, do których należą ukrwienie tkanki oraz aktywność ruchowa tak, aby o szybkości uwalniania decydowały jedynie właściwości postaci leku [67].

Ważnym zagadnieniem przy projektowaniu preparatów do podania domięśniowego jest ocena ich wpływu na tkankę. Zaistnienie interakcji tkanka – preparat może wymusić ograniczenie objętości preparatu, jak też zmienić szybkość absorpcji substancji czynnej [67]. Do najczęstszych reakcji tkanki na podanie leku należą: reakcja zapalna, granulacja tkanki, reakcja immunologiczna i fibroza [67]. Przykładowo, wykazano, że wokół systemu implantacyjnego może tworzyć się włóknikowa „kapsuła” ograniczająca wchłanianie leku uwalnianego z systemu terapeutycznego [71].

Pozajelitowe preparaty o przedłużonym działaniu mogą mieć postać płynną, półstałą (żele) lub stałą (implanty i mikrosfery).

Do tradycyjnie stosowanych płynnych preparatów do podania pozajelitowego, wykazujących przedłużone działanie należą roztwory olejowe oraz zawiesiny.

Wstrzyknięcie **zawiesiny** skutkuje powstaniem w miejscu wstrzyknięcia zbiornika, w którym substancja czynna występuje w postaci nierozpuszczonych cząstek, rozpuszczających się z szybkością zależną od jej rozpuszczalności w otaczającym płynie tkankowym [72]. Przykładem zawiesiny wodnej są zawiesiny z insuliną [67]. Czas działania tego typu preparatów wynosi zwykle od kilku do kilkudziesięciu godzin. Zaletą zawiesin wodnych w porównaniu do roztworów i zawiesin olejowych jest rzadsze wywoływanie miejscowych podrażnień [73].

Substancje lecznicze rozpuszczalne w tłuszczach mogą być podawane w postaci **roztworów olejowych** lub **emulsji typu o/w**. W technologii farmaceutycznej zastosowanie znalazły np. olej rącznikowy, sezamowy i Miglyol [74]. Zastąpienie wody rozpuszczalnikami lipofilowymi (oleje) pozwala na podawanie w formie roztworów substancji lipofilowych, a także ogranicza możliwość rozwoju mikroorganizmów. Zastosowanie formy roztworu lub zawiesiny olejowej przede wszystkim umożliwia wydłużenie do 2 - 4 tygodni czasu działania leku. Z drugiej strony wstrzykiwanie preparatów olejowych jest bolesne, pojawia się także problem wyższej lepkości, a co za tym idzie konieczne jest stosowanie igieł o większej średnicy. Innym niekorzystnym

zjawiskiem jest możliwość powstania trudnego do ponownego rozproszenia zbitego osadu. Z problemem tym próbuje się walczyć poprzez wprowadzanie do układu niewielkiej ilości wody [75].

Szybkość absorpcji substancji leczniczej z roztworu olejowego uzależniona jest od kilku czynników. Jednym z nich jest wartość współczynnika podziału olej/woda. Im wyższe powinowactwo do fazy olejowej, tym wolniej przebiega proces absorpcji, stąd wchłanianie substancji silnie lipofilowych z roztworów olejowych jest ograniczone. Innym istotnym parametrem determinującym absorpcję leku jest objętość wstrzykiwanego preparatu. W przeciwieństwie do roztworów wodnych, na szybkość absorpcji z preparatów olejowych w niewielkim tylko stopniu wpływa stężenie substancji czynnej w preparacie [74].

W odróżnieniu od roztworów olejowych, po domięśniowym podaniu emulsji substancja lecznicza rozpuszczona w oleju (faza wewnętrzna) na zasadzie podziału przedostaje się częściowo do fazy wodnej, która jest jednocześnie rozcieńczana płynem tkankowym. Z kropeł olejowych emulsji uwalniana jest dalsza ilość leku, która po szybkiej absorpcji fazy wodnej przedostaje się wprost do płynu tkankowego, na zasadzie podobnej do absorpcji z roztworu olejowego, czyli w oparciu o mechanizmy podziału i dyfuzji.

Efekt przedłużonego działania preparatów, których fazę ciągłą stanowi woda uzyskać też można przez dodatek substancji zwiększających lepkość, ograniczających dyfuzję leku w utworzonym zbiorniku [76]. Do substancji tych należą rozpuszczalne w wodzie polimery jak karmeloza sodowa, powidon, dekstran. Opisywane są też doświadczenia z wykorzystaniem żeli fosfolipidowych [77], które w kontakcie ze środowiskiem wodnym ulegają powolnej erozji pozwalającej na uwalnianie substancji leczniczej. Preparaty charakteryzujące się znaczną lepkością znajdują zastosowanie, gdy podawane są bezpośrednio do tkanki chorobowo zmienionej. Ogranicza się w ten sposób ilość leku dostającą się do krążenia ogólnego, zapewniając wysokie stężenie w miejscu działania. Dotyczy to w szczególności leków przeciwnowotworowych, jak cisplatyna czy fluorouracyl [77].

Do stałych preparatów podawanych pozajelitowo, charakteryzujących się przedłużonym działaniem zaliczyć można mikrosfery, implanty oraz preparaty żelujące po wstrzyknięciu na skutek zmiany temperatury [67].

Mikrosfery są to cząstki o wielkości 1 – 50 μm zbudowane z matrycy polimerowej (najczęściej PLA lub PLGA), w której rozpuszczona lub zawieszona jest

substancja lecznicza. Czas uwalniania leku z tego typu nośników po podaniu podskórnym lub domięśniowym wynosi zwykle od 1 do 3 miesięcy i zależy jest od szybkości biodegradacji polimeru, która odbywa się na zasadzie jego hydrolizy oraz erozji [8]. Mikrosfery znalazły zastosowanie jako nośniki leków o właściwościach przeciwnowotworowych (goserelina, leuprorelina) oraz stosowanej w chorobie Parkinsona bromokryptyny. Mikrosfery przechowuje się w formie suchej, a fazę rozpraszającą dodaje bezpośrednio przed dokonaniem wstrzyknięcia.

Implanty wytwarzane są z polimerów biodegradowalnych (PLA, PLGA) lub niebiodegradowalnych - silikonu lub gum silikonowych. Zapewniają one przedłużone uwalnianie substancji czynnej trwające od roku do 7 lat [8, 67].

W najnowszych badaniach [78-82] obserwuje się duże zainteresowanie **preparatami tworzącymi *in situ*** żele lub struktury stałe poprzez spontaniczne sieciowanie pochodnych aminokwasów w środowisku hydrofobowym. Preparaty te wstrzykiwane są jako postać płynna, a proces żelowania zachodzi w miejscu aplikacji na skutek zmiany temperatury i utraty organicznego rozpuszczalnika obecnego w preparacie, poprzez jego dyfuzję lub hydratację w miejscu wstrzyknięcia [67]. Wykazano, że czas uwalniania leku z tego typu preparatów może wynosić do kilku tygodni [83].

4. NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWZAPALNE (NLPZ) I ICH KONIUGATY Z POLIMERAMI

4.1. Drogi podania i działania niepożądane NLPZ

Niesteroidowe leki przeciwzapalne są powszechnie stosowane w terapii bólu o małym i średnim nasileniu, w leczeniu stanów zapalnych i gorączki, jak też w chorobach przewlekłych np. w chorobie reumatoidalnej i zwyrodnieniowej stawów [84]. Są składnikami szerokiej gamy preparatów farmaceutycznych, wliczając postacie stałe (np. tabletki), płynne preparaty do podawania doustnego (zawiesiny), czopki, iniekcje domięśniowe, krople do oczu i preparaty do użytku zewnętrznego.

NLPZ, pomimo swojej popularności, cechują się licznymi działaniami niepożądanymi [85-87], do których można zaliczyć:

- wywoływanie lub zaostrzanie choroby wrzodowej żołądka z możliwością krwawień,
- hamowanie agregacji płytek krwi (działanie często wykorzystywane w prewencji okołozawałowej),
- złe samopoczucie, wymioty, bóle głowy, wysypki.

Niekorzystne działania NLPZ na błonę śluzową żołądka mogą być ograniczane lub częściowo wyeliminowane poprzez stosowanie postaci leku uwalniających substancję leczniczą dopiero w jelicie cienkim. W preparatach doustnych, w celu zminimalizowania podrażnienia żołądka, często stosuje się powlekanie polimerami (np. pochodnymi kwasu metakrylowego – Eudragit®) nierozpuszczalnymi w środowisku soku żołądkowego. Prowadzone są także intensywne badania nad koniugatami NLPZ z polimerami kontrolującymi szybkość uwalniania, które mogłyby być stosowane również drogą pozajelitową.

Obecnie dostępne pozajelitowe preparaty z ibuprofenem (Pedeia, Imbun) stosuje się w leczeniu przetrwałego przewodu tętniczego u wcześniaków urodzonych 6 tygodni lub więcej przed czasem [88, 89]. Piśmiennictwo opisuje sporadyczne próby zastosowania ibuprofenu jako leku przeciwbólowego i przeciwzapalnego w formach parenteralnych. Zhao i wsp. [90] opracowali skład mikroemulsji z ibuprofenem do podania dożylnego. Zastosowali oni ibuprofen w postaci związku z eugenolem, który, w porównaniu z wolną cząsteczką leku wykazywał znacznie wyższą lipofilowość. W badaniach *in vivo* wykazano, że otrzymany prolek uwalniający ibuprofen pozwala na uzyskanie przedłużonego działania, a zaproponowana technologia może być wykorzystana także dla innych leków o wysokiej lipofilowości.

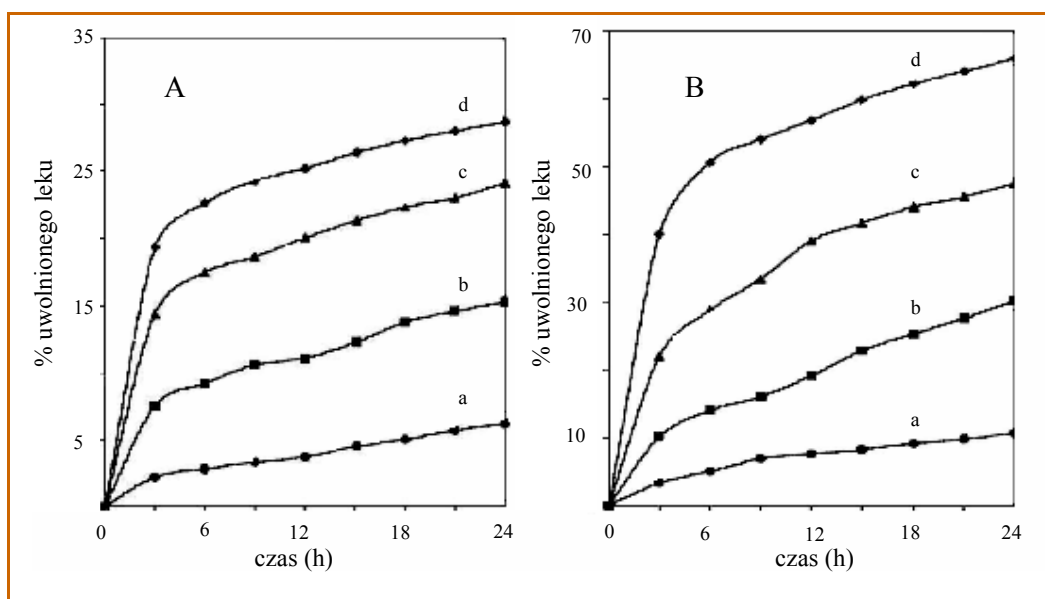
4.2. Koniugaty NLPZ z polimerami

Współczesne piśmiennictwo jako metodę na uzyskanie efektu przedłużonego działania podaje metodę inkorporowania w matrycy, względnie powlekania wielkocząsteczkowymi substancjami błonotwórczymi (podanie doustne). Poza tym istnieje możliwość stosowania koniugatów leków przeciwzapalnych z polimerami o dowiedzionej biogodności. Stosunkowo łatwo ulegają koniugacji cząsteczki leków posiadające w swojej strukturze reaktywne grupy chemiczne, jak grupa hydroksylowa

czy karboksylowa. Związki takie jak np. ibuprofen wykazują zdolność do koniugacji z polimerami poprzez wytworzenie wiązania estrowego [91]. Koniugaty takie otrzymywane są na drodze bezpośredniej reakcji polimeru z substancją leczniczą, lub przez funkcjonalizację monomeru cząsteczką substancji aktywnej, a następnie połączenie jej z kolejnymi monomerami [92].

Synteza proleków zbudowanych z łańcucha polimerowego połączonego podatnymi na hydrolizę wiązaniami z cząsteczką leku z grupy NLPZ pozwolić może na ograniczenie działań niepożądanych, zapewniając jednocześnie dłuższe utrzymywanie się we krwi stężeń terapeutycznych. Preparaty tego typu projektowano nie tylko do użytku wewnętrznego, ale także do podania na skórę [93]. W ostatnim czasie obserwuje się znaczne zainteresowanie syntezą nowych polimerowych pochodnych NLPZ, w szczególności ibuprofenu [91, 93-95], naproksenu [96], ketoprofenu [94], indometacyny [97] i diklofenaku [98].

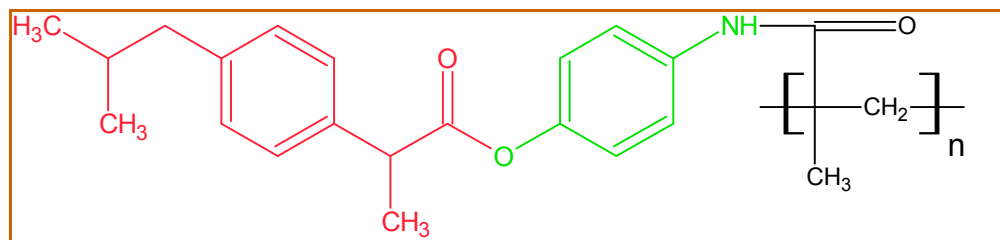
Różnorodne połączenia ibuprofenu z polimerami typu akrylowego [91] pozwalają na uzyskanie w warunkach *in vitro* efektu przedłużonego uwalniania, którego profil zależy od pH środowiska oraz typu użytego monomeru (Ryc. 7).



Ryc. 7. Profile uwalniania ibuprofenu z koniugatów z polimerami – pochodnymi: *n*-butylometakrylanu (a); 2-hydroksyetylometakrylanu (b); *N*-winylo-2-pirolidonu (c); metakrylamidu (d) w zależności od pH: **A** – pH 1; **B** – pH 8 [91].

Poprzez koniugację z polimerem uzyskać można uwalnianie leku w środowisku soku jelitowego. Jednocześnie zależnie od typu wybranego polimeru otrzymać można koniugaty uwalniające substancję czynną z różną szybkością.

Liso i wsp. [99] prowadzili badania koniugatów ibuprofenu z kwasem polimetakrylowym, w których jako spejsery łączące cząsteczkę polimeru z lekiem wykorzystywano p-aminofenol (Ryc. 8).



Ryc. 8. Struktura chemiczna koniugatu ibuprofenu z polimetakrylamidem. Kolorem czerwonym zaznaczono ibuprofen, zielonym – p-aminofenol (spejser).

W eksperymencie na myszach wykazano, po podaniu dootrzewnowym, przedłużone uwalnianie ibuprofenu z koniugatu. Ponadto stwierdzono, że działanie analgetyczne wykazuje również forma skoniugowana. W porównaniu z preparatem zawierającym wolny ibuprofen uzyskano niższą wartość c_{max} (odpowiednio 41 i 28 $\mu\text{g/ml}$), znacząco zwiększyła się natomiast wartość AUC (ze 143 do 338 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$).

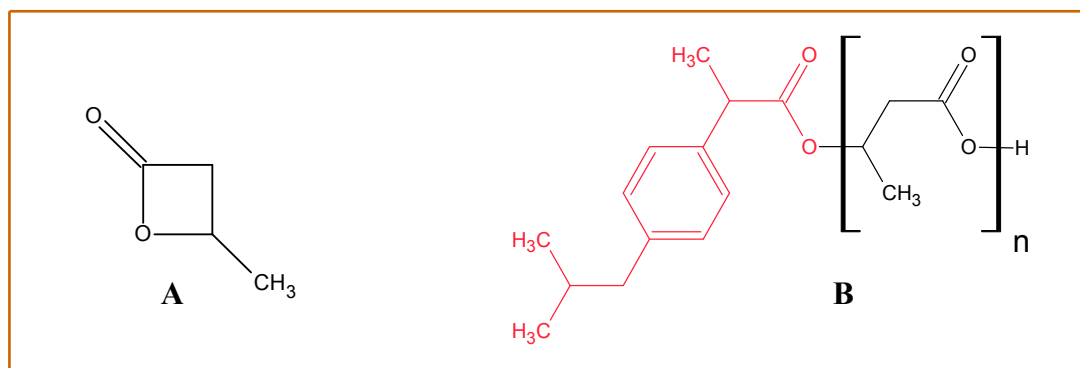
Interesujące dane dotyczące możliwości wykorzystania polimerowych pochodnych ibuprofenu uzyskano także w innych pracach. Wykorzystywano połączenie z poliuretanem [93], które pozwoliło na uzyskanie efektu przedłużonego uwalniania w wyniku hydrolizy wiązania estrowego pomiędzy cząsteczką substancji aktywnej, a polimerem. Opisano także metodę syntezy i właściwości fizykochemiczne koniugatów z metakrylanami [94].

5. SYNTETYCZNE OLIGOMERY KWASU 3-HYDROKSYMASŁOWEGO (OHB)

5.1. Synteza koniugatów NLPZ z oligo(kwasem 3-hydroksymasłowym)

Metoda syntezy koniugatów NLPZ z OHB została opracowana przez Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze.

Substancją wyjściową do syntezy koniugatu ibuprofenu z OHB jest β -butyrolakton (Ryc. 9). Ulega on polimeryzacji w DMSO, który zawiera rozpuszczony wcześniej ibuprofen w postaci soli potasowej [100].



Ryc. 9. Struktura chemiczna β -butyrolaktonu (A) i koniugatu (DC) ibuprofenu z oligo(kwasem 3-hydroksymasłowym) (B). Kolorem czerwonym zaznaczono ibuprofen, $n=3-6$.

Po zakończeniu reakcji, czego potwierdzeniem jest zanik pasma absorpcji przy 1835 cm^{-1} (spektroskopia w podczerwieni) i pojawienie się pasma przy 1735 cm^{-1} charakterystycznego dla węgla karbonylowego w poliestrze, usuwa się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszcza w chloroformie. Następnie produkt ekstrahuje się w układzie chloroform – DMSO – woda. Po rozdzieleniu układu, fazę organiczną przemywa się kilkakrotnie wodą, a produkt wytrąca w heksanie i suszy w eksykatorze próżniowym do stałej masy. Otrzymany produkt jest bezbarwną, bezpostaciową substancją półstałej konsystencji. Czystość koniugatu potwierdza się za pomocą analizy spektralnej (FT-IR) oraz ^1H NMR, a jego masę określa się stosując

chromatografię żelową z wykorzystaniem wzorców polistyrenowych oraz wykorzystując technikę spektrometrii masowej ESI-MS.

5.2. Badania biologiczne OHB i jego koniugatów

Naturalnie występujący w komórkach bakteryjnych PHB jest związkiem nietoksycznym, biokompatybilnym i biodegradowalnym (p. 2). Wykazano jednak, że zawiera on niewielkie ilości zanieczyszczeń białkowych [101], które w przypadku wykorzystania polimeru jako nośnika substancji leczniczych, mogłyby odpowiadać za wystąpienie reakcji alergicznej. W badaniach prowadzonych przez Piddubnyak i wsp. [102] syntetyczne oligomery kwasu 3-hydroksymasłowego, pozbawione zanieczyszczeń, okazały się nietoksyczne wobec linii komórkowych V79 (fibroblasty chomika chińskiego) oraz B16 (mysie komórki czerniaka), zwłaszcza w przypadku łańcuchów o niższych masach cząsteczkowych (<1000). Wprowadzenie OHB o wyższych masach cząsteczkowych skutkowało zwiększeniem toksyczności (test MTT). Negatywny wpływ OHB na żywotność komórek nie został jednak potwierdzony w dalszych badaniach, stąd autorzy spekulują, że jest on ograniczony do odwracalnego hamowania procesów metabolicznych, co nie ma istotnego znaczenia dla przeżywalności komórek. Doustne podanie szczurom 2,0 g koniugatu niskocząsteczkowego OHB z kwasem acetylosalicylowym nie wywołało klinicznie obserwowalnych efektów niepożądanych ani śmiertelności [100]. W przeprowadzanych badaniach wykazano natomiast wystąpienie efektu cytostatycznego koniugatu wobec ludzkich komórek nowotworowych HT-29 i HCT 116. Podobnego efektu nie zaobserwowano jednak po zastosowaniu nieskoniugowanego OHB. Otrzymane wyniki zachęcają do dwukierunkowych badań nad OHB oraz jego koniugatami z NLPZ - jako proleków i jako związków modyfikujących funkcję komórek.

6. HODOWLE KOMÓRKOWE W BADANIACH MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH

6.1. Mechanizmy wchłaniania substancji przez błony biologiczne

Przenikanie substancji przez błony biologiczne odbywa się na zasadzie:

- dyfuzji biernej,
- dyfuzji ułatwionej,
- transportu czynnego,
- pinocytozy, fagocytozy lub persorpcji [87].

W dyfuzji biernej leku, transport opisany jest prawem Ficka i zależy od gradientu stężeń, powierzchni błony, współczynnika podziału, a także współczynnika dyfuzji. Ponieważ substancje chemiczne ulegając absorpcji pokonują lipofilowe błony komórkowe, istotną cechą ułatwiającą wchłanianie jest dobra rozpuszczalność w lipidach [87]. Wchłanianiu opartemu na dyfuzji biernej ulegają przede wszystkim rozpuszczalne w tłuszczach niskocząsteczkowe i niezjonizowane substancje chemiczne.

Biernym procesem transportu jest też zachodząca przy udziale nośnika dyfuzja ułatwiona. Podobnie, jak w przypadku dyfuzji biernej, zależy ona od różnicy stężeń między sąsiadującymi ze sobą kompartmentami. Dyfuzja ułatwiona umożliwia wchłanianie substancji o dużej hydrofilności, które bez udziału nośnika nie byłyby w stanie pokonać zbudowanej z lipidów błony komórkowej [87].

Wchłanianie substancji wbrew istniejącemu gradientowi stężeń zachodzi na drodze transportu aktywnego, który jest procesem wymagającym nakładu energii [103] i w przeciwieństwie do dyfuzji może być hamowany przez substancje o podobnej budowie chemicznej. Transport aktywny, dzięki obecności w błonie ATP-zależnych nośników, przebiegać może w kierunku do wewnątrz oraz na zewnątrz komórki [87]. Do substancji wchłanianych dzięki mechanizmowi transportu aktywnego należą między innymi: D-glukoza i L-fenylalanina [104].

Pinocytoza (wchłanianie kropeł płynu) oraz fagocytoza (wchłanianie cząstek stałych) przebiegają poprzez wytworzenie w błonie komórkowej „kieszeni”, która stopniowo zamykana jest przez tę błonę. Zarówno te procesy, jak i persorpcja, czyli

transport substancji stałych przez przestrzenie międzykomórkowe, zachodzą stosunkowo rzadko jako istotne dla transportu leków. Zjawiska te nasilają się jednak w przebiegu niektórych procesów chorobowych [103].

6.2. Linia komórkowa Caco-2

Według definicji, kulturą komórkową nazywa się hodowlę, w której komórki prokariotyczne lub eukariotyczne rozwijają się w kontrolowanych warunkach. Linie komórkową stanowi natomiast populacja komórek powstająca z hodowli pierwotnej po pierwszym pasażu [105]. Hodowle komórkowe wykorzystywane są w wielu pracach eksperymentalnych, w tym w badaniach substancji leczniczych – ich przenikania, metabolizmu, wpływu na procesy komórkowe. W celu badania transmembranowego transportu leków, linie komórkowe hodowane są w monowarstwach, na półprzepuszczalnych filtrach, a także w plastikowych pojemnikach lub na płytkach wielodołkowych (Ryc. 10) [105, 106].



Ryc. 10. Hodowla komórkowa na płytce wielodołkowej w trakcie wymiany pożywki.

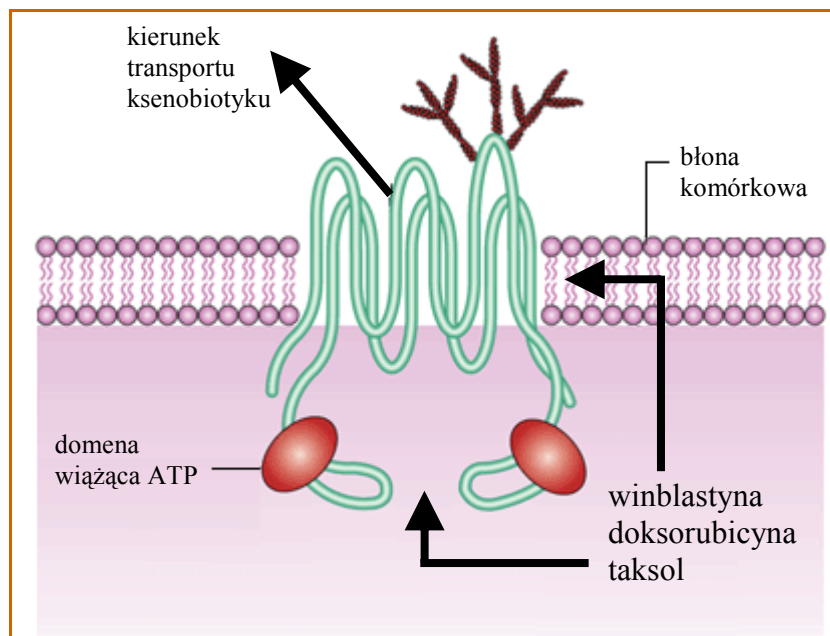
W ciągu ostatnich lat w badaniach farmaceutycznych szczególnie często używano komórek nabłonkowych, do których należą komórki Caco-2 stanowiące najlepiej scharakteryzowany model wykazujący obecność enzymów i transporterów typowych dla komórek nabłonka jelitowego [104]. Komórki te pochodzą z ludzkiego gruczołaka okrężnicy, jednak zachowują właściwości podobne do enterocytów [107], które w głównej mierze odpowiadają za absorpcję zachodzącą w jelicie cienkim [108]. Ścisłe połączenia pomiędzy enterocytami, jak też lipofilowy charakter nabłonka, tworzą barierę fizyczną dla leków podanych doustnie. Ze względu na fakt, że przenikanie

substancji aktywnych przez monowarstwy komórek Caco-2 wykazuje korelację z przenikaniem obserwowanym w warunkach *in vivo*, zostały one zaakceptowane przez instytucje regulacyjne jako odpowiednie do określania przenikania leków przez błony biologiczne u ludzi [108, 109].

Model komórek Caco-2 umożliwia także dokonanie oceny cytotoksyczności leków [110]. Jest to szczególnie istotne w postępie prac nad nowymi lekami, gdyż pozwala na wyeliminowanie substancji toksycznych z dalszych etapów badań, przed przystąpieniem do prób klinicznych [111]. Badanie to wykonać można stosując gotowe zestawy odczynników, których zasada działania polega np. na zmianie zabarwienia medium przez produkty powstające w wyniku metabolizmu składników odczynnika przez żywe komórki lub na oznaczaniu produktów działania enzymów (np. ATP) uwalnianych z komórek uszkodzonych [111, 112].

Absorpcja substancji leczniczych przez nabłonek jelitowy odbywa się głównie w transporcie biernym. Na zasadzie transportu aktywnego wchłaniają się takie substancje jak: glukoza, jony dwuwartościowe, aminokwasy czy kwas foliowy. W błonach komórkowych Caco-2 funkcjonują białka transportowe z rodziny MRP (*multidrug resistance – associated protein*), które odgrywają kluczową rolę w transporcie leków [108, 113]. P-Glikoproteina (P-gp, Ryc. 11) o masie cząsteczkowej 170 kD, odkryta w 1976 r przez Juliano i Linga [114, 115], jest jednym z transporterów ulokowanych powierzchniowo w komórkach. Jest ona produktem genu MDR1 i uznawana jest za strukturę ograniczającą transport wielu ksenobiotyków do wnętrza komórek [116, 117]. P-gp, wykorzystując energię zgromadzoną w ATP, uczestniczy w procesie usuwania z wnętrza komórki wielu leków, szczególnie o właściwościach cytostatycznych (taksany, winblastyna, doksorubicyna) [118, 119], a także atrowastatyny i erytromycyny [117], co jest przyczyną zjawiska zwanego opornością wielolekową (MDR, *multidrug resistance*) [115]. Mechanizm ten funkcjonuje w komórkach nabłonka jelit (enterocyty), a także w komórkach kory nadnerczy, kanalikach żółciowych, śródbłonku naczyń tworzących barierę krew – mózg, w komórkach łożyska oraz nabłonka dróg oddechowych [113]. Znanymi inhibitorami funkcji MDR są werapamil, cyklosporyna A, rezerpina, diltiazem, terfenadyna i trifluperazyne [115, 120, 121]. Należy podkreślić, że w przypadku hodowli komórkowych na filtrach, P-gp znajduje się na apikalnej stronie komórek ograniczając transport substratów wędrujących ku kompartmentowi bazolateralnemu i ułatwiając transport w kierunku „ku górze” [104, 115]. Udowodniono, że P-gp obecna w komórkach nabłonka jelitowego wykazuje wpływ na

biodostępność leków po podaniu doustnym, a jej funkcja może być modyfikowana obecnością dodatków do żywności oraz substancji pomocniczych używanych w przemyśle farmaceutycznym [115].



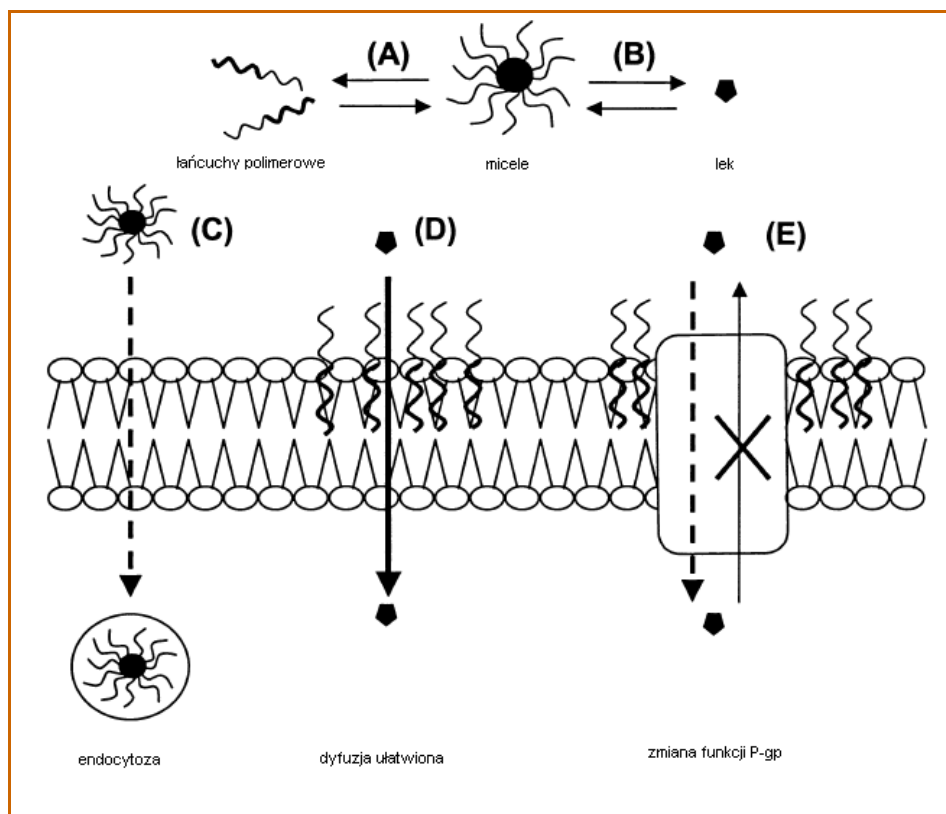
Ryc. 11. Schemat budowy P-gp oraz drogi usuwania z jej udziałem ksenobiotyków z komórki [122].

6.3. Linia komórkowa Calu-3

Komórki Calu-3 wywodzą się z komórek surowiczych gruczołów podśluzówkowych ludzkich dróg oddechowych [123]. Komórki te mają pochodzenie gruczolakowe i są zdolne do formowania monowarstw nabłonkowych, stąd wykazują użyteczność w badaniach transportu leków i jonów [124-126]. Kultury Calu-3 złożone są z komórek o różnych fenotypach wykazujących, po zróżnicowaniu, właściwości barier ścisłych, których istnienie potwierdza wysoka wartość oporu elektrycznego (powyżej $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Monowarstwy komórek Calu-3 wykazują właściwości podobne do prawidłowego nabłonka układu oddechowego, włącznie z ekspresją zależnych od Na^+ transporterów glukozy, a także powierzchniowych transporterów jonów chlorkowych i dwuwęglanów [126]. Komórki Calu-3 używane są także do badania cytotoksyczności leków [127].

6.4. Wpływ wybranych polimerów na transport ksenobiotyków przez modele barier biologicznych

Jak wspomniano w p. 6.2, P-glikoproteina będąca białkiem transportowym mieszczącym się w błonie komórkowej enterocytów jest odpowiedzialna za ograniczoną absorpcję wybranych leków. Stąd zahamowanie jej aktywności pozwolić może na zwiększenie biodostępności np. niektórych leków przeciwnowotworowych. Zaobserwowano, że oprócz małowczątkowych inhibitorów funkcji P-gp, jej aktywność hamują też często stosowane w technologii postaci leku polimery, jak polisorbaty, czy PEG, odwracalnie zwiększając transport leków będących substratami dla P-gp [128, 129]. Wykazano, że w obecności polisorbatów dochodzi do zwiększonej kumulacji epirubicyny w komórkach Caco-2. Kumulacja ta jest wyższa niż obserwowana w obecności werapamilu, którego zdolność do hamowania funkcji P-gp była wielokrotnie opisywana [130]. W szczególności podkreśla się, że właściwości amfifilnych polimerów blokowych (np. poloksamery), tworzących micelle w środowisku wodnym, pozwalają na modyfikowanie funkcji P-gp w kierunku zależnym od stężenia polimeru. Wykazano, że kierunek modyfikacji zależy od tego, czy stężenie poloksameru przekracza, czy też nie, krytyczne stężenie micelarne (CMC) [131, 132]. W opublikowanej w 2002 r pracy Zastre i wsp. [131] dowiedli, że istnieje silna zależność między obecnością w medium kopolimerów blokowych – pochodnych polioksyetylenoglikolu i poli(kaprolaktonu), a kumulacją w komórkach Caco-2 rodaminy (Rh-123), stosowanej jako modelowy substrat dla P-gp. Uzyskane wewnątrzkomórkowe stężenia Rh-123 przy stężeniach poloksamerów przekraczających nieco krytyczne stężenie micelarne były znacząco (około dwukrotnie) wyższe niż przy zastosowaniu inhibitorów P-gp – werapamilu i cyklosporyny A. Wykazano też, że dalsze zwiększanie stężenia kopolimerów powoduje ponowny spadek kumulacji Rh-123. Zjawisko to wiąże się ze zwiększeniem cytotoksyczności bardziej stężonych roztworów, jak też ze zmniejszeniem frakcji wolnej substancji w stosunku do ilości zamkniętej w micelach. W oparciu o wyniki eksperymentu zaproponowano mechanizmy odpowiadające za obserwowane zjawiska (Ryc. 12).



Ryc. 12. Mechanizmy zwiększonej kumulacji substratu dla P-gp w obecności poloksamerów [131].

Zwiększenie kumulacji Rh-123 w komórkach jest wynikiem kilku procesów. W medium obok wolnego leku istnieją także micelle stanowiące rezerwuar substratu i wchłaniane na zasadzie endocytozy (Ryc. 12C). Wraz ze zmniejszającą się ilością wchłanianego substratu, uwalniają one kolejne jego porcje. Jednocześnie powstają wolne łańcuchy polimerowe, które wskutek interakcji z błoną komórkową (Ryc. 12D) ułatwiają transport leku do wnętrza komórki, a ponadto powodują inhibicję funkcji P-gp (Ryc. 12E).

Podobne właściwości wobec transportu P-gp zależnych substratów wykazują polisorbata 80 oraz Cremophor EL [132, 133], dla których maksymalny efekt promujący transport transmembranowy obserwuje się przy stężeniu bliskim CMC.

II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Zasadniczym celem pracy jest wskazanie i opracowanie odpowiedniej postaci leku dla koniugatu oligo(kwasu 3-hydroksymasłowego) z ibuprofenem (DC) jako modelowej formy również dla innych koniugatów niesteroidowych leków przeciwzapalnych z OHB.

Należy wymienić następujące cele szczegółowe niniejszej pracy:

1. Opracowanie i ocena metody analitycznej służącej do ilościowej analizy DC.
2. Określenie właściwości fizykochemicznych DC, takich jak: rozpuszczalność w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych, współczynnik podziału olej/woda ($\log P$) i pK_a .
3. Wyznaczenie kinetyki hydrolizy w warunkach imitujących środowisko fizjologiczne.
4. Określenie cytotoksyczności DC i OHB z wykorzystaniem kultur komórkowych Caco-2 i Calu-3.
5. Sporządzenie i ocena właściwości wytypowanych postaci leku zawierających DC.
6. Ocena *in vivo* zoptymalizowanych postaci leku.

W toku prowadzonych badań zaobserwowano możliwość wpływu DC na transport przez błony komórkowe wybranych substratów dla P-glikoproteiny. Dodatkowym celem pracy stało się więc także określenie transportu i wychwytu wybranych substratów w obecności DC, OHB i IB, z wykorzystaniem kultur komórkowych Caco-2.

Założono, kierując się informacjami uzyskanymi z Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN (właściciela patentu dotyczącego syntezy DC), że badany koniugat, a także wolny oligomer, są związkami nietoksycznymi i mogą stanowić nośnik substancji leczniczej. Na podstawie budowy chemicznej założono, że koniugat może stanowić modelowy związek uwalniający w sposób kontrolowany cząsteczkę NLPZ posiadającą grupę karboksylową, co jest również sugerowane przez dostępne piśmiennictwo [102]. Ponieważ poszukiwanie metody syntezy oraz potencjalnych zastosowań OHB i jego koniugatów z substancjami leczniczymi było przedmiotem wieloletnich badań PAN, zasadne stało się podjęcie wysiłku

wprowadzenia koniugatu do postaci leku, a także określenie jego właściwości biologicznych, a następnie ocena w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* właściwości sporządzonych preparatów farmaceutycznych.

III. METODY

Opisano metody oceny właściwości fizykochemicznych i farmaceutycznych koniugatu. Zaproponowano i opisano metodę analizy ilościowej i jakościowej koniugatu i ibuprofenu (HPLC). Przedstawiono metodę analizy cytotoksyczności z użyciem komórek Caco-2 i Calu-3, a także analizy wpływu obecności koniugatu, oligomeru kwasu 3-hydroksymasłowego oraz ibuprofenu na wychwyt rodaminy-123 i innych substratów dla P-gp przez komórki linii Caco-2. Scharakteryzowano metodę badania transportu tych substratów przez konfluentną monowarstwę zróżnicowanych komórek Caco-2 w obecności analizowanych substancji. Przedstawiono opis przygotowania dwóch różnych postaci leku – roztworu olejowego i emulsji typu o/w. W celu oceny tych preparatów zaproponowano badania zarówno w warunkach in vitro, jak i in vivo.

1. ODCZYNNIKI

- Acetonitryl (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Akrylamid (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Akrylamid 30% do Western Blot (WB)

Akrylamid	30 g
N,N'-metylenobisakrylamid	0,8 g
Woda	do 100 ml
- Amonu nadsiarozan (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Aprotynina uzyskana z płuc wołowych (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Acetonitryl (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Błękit bromofenolowy (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Bufor ekstrakcyjny *Cell Extraction Buffer* (Biosource, Camorillo, USA):

Tris, pH 7,4	10 mmol/l
NaCl	100 mmol/l
EDTA	1 mmol/l
EGTA	1 mmol/l
NaF	1 mmol/l
Na ₄ P ₂ O ₇	20 mmol/l
Na ₃ VO ₄	2 mmol/l
Triton X-100	1% (m/m)
Glicerol	10% (m/m)
Sodu laurylosiarczan (SDS)	0,1% (m/m)
Deoksyholan	0,5% (m/m)
Fenylometylosulfonowy fluorek	1 mmol/l
Inhibitory proteaz	250 µl/5 ml
- Bufor fosforanowy pH 7,4 (PBS, 0,0067 mol/l, BioWhittaker, Walkersville, USA)

- Bufor fosforanowy pH 6,0; 100 mmol/l (100 ml):

potasu diwodorofosforan (KH ₂ PO ₄)	1,36 g
kwask ortofosforowy 2%	do pH 6,0
- Bufor Krebsa-Ringera (KRB, 100 ml):

Glukoza	100 mg
Kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetylosulfonowy (HEPES)	128 mg
Magnezu siarczan	9,8 mg
Potasu chlorek	40,3 mg
Sodu diwodorofosforan	9,4 mg
Sodu chlorek	681 mg
Sodu węglan	265 mg
Wapnia chlorek	20 mg
- Bufor do WB:

Tris	30,2 g
Glicyna	144 g
SDS	10 g
Woda	do 1000 ml
- Bufor redukujący do WB:

Tris	0,73 g
β-merkaptoetanol ddH ₂ O	2 ml
Glicerol	6 ml
SDS	1 g
Błękit bromofenolowy	50 mg
- Bufor myjący do WB:

20% Tween 20	5 ml
Tris-HCl, 2 mol/l	5 ml
Sodu chlorek	5,844 g
Woda	do 1000 ml
- Bufor transferowy do WB:

Tris	12,12 g
Glicyna	57,6 g
SDS	2 g
Metanol	800 ml
Woda	do 4000 ml
- Cyklosporyna A (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- D-(+)-glukoza (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 4-(4-dimetyloamino)stearylo)-N-metylopirydynian jodu (4-Di-1-ASP, Molecular Probes, Eugene, USA)
- Faza ruchoma do chromatografii ibuprofenu i koniugatu:

66% (obj./obj.) acetonitryl (70% w analizie osocza)

34% (obj./obj.) 10 mmol/l bufor fosforanowy pH 7,0 (30% w analizie osocza)

o składzie (na 500 ml):

potasu diwodorofosforan (KH ₂ PO ₄)	0,26 g
sodu wodorofosforan (Na ₂ HPO ₄)	0,44 g
- Fluoresceiny sól sodowa (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

- Fosforowy kwas 85% (Fluka, Buchs, Szwajcaria)
- Glicerol 86% (Laboratorium Galenowe, Olsztyn)
- Glicyna (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Ibuprofen (Shasun, Chennai, Indie)
- Ibuprofenu lizynian (Welding, Hamburg, Niemcy)
- Indometacyna (otrzymano z ZF Jelfa, Jelenia Góra)
- Koniugat (DC) oligo(kwasu 3-hydroksymasłowego) z IB (Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze), średnia masa cząsteczkowa ($\overline{M}_n = 570 - 581$ g), indeks polidispersji (PDI) = 1,14 – 1,22
- Kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetylosulfonowy (HEPES, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kwas solny 36% (POCh, Gliwice)
- Leupeptyny hemisiarczan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Magnezu siarczan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Medium odżywcze Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Medium odżywcze Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Metanol (POCh, Gliwice)
- 2-merkptoetanol (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Miglyol 812 – triglicerydy kwasów tłuszczowych C₈ – C₁₂ (Caesar & Loretz, Hilden, Niemcy)
- N,N'-metylenobisakrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- n-oktanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Oligo(kwas 3-hydroksymasłowy) (OHB, $\overline{M}_n = 600$ g, PDI = 1,13, Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze)
- Osocze krwi ludzkiej pobrane od zdrowych ochotników
- Pankreatyna o aktywności 4 × USP (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Penicylina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Polisorbat 80 (Fluka, Buchs, Szwajcaria)
- Potasu chlorek (BDH Laboratory Supplies, Poole, Wielka Brytania)
- Potasu diwodorofosforan (Fluka, Buchs, Szwajcaria)

- Przeciwciała monoklonalne przeciwko P-gp (MDR klon F4, Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Przeciwciała wtórne Anti – Mouse IgG (Fab specific) – Peroxidase (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Rodamina-123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Roztwór endogennych aminokwasów 1% (Nonessential aminoacids, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Roztwór wizualizujący (Millipore Immobilon Western Chemiluminescent MRP Substrate, Millipore Corporation, Billerica, USA)
- Sodu chlorek (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Sodu diwodorofosforan (Riedel-de Haen, Seelze, Niemcy)
- Sodu diwodorofosforan, dwuwodny (POCh, Gliwice)
- Sodu laurylosiarczan (SDS, Bio-Rad, Hercules, USA)
- Sodu pirogronian, 1% roztwór (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Sodu węglan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Sodu wodorofosforan (POCh, Gliwice)
- Sodu wodorotlenek (POCh, Gliwice)
- Streptomycyna (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Surowica płodowa (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Wapnia chlorek (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Werapamilu chlorowodorek (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Woda oczyszczona otrzymana przez wymianę jonową i odwróconą osmozę – system Elix3 (Millipore, Bedford, USA)
- Tris(hydroksymetylo)aminometan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

2. SPRZĘT

- Autoklaw typ ASHE (Spółdzielnia Pracy Mechaników, Warszawa)
- Chromatograf cieczowy Merck Hitachi (Darmstadt, Niemcy) połączony z detektorem UV-Vis L-7420, autosamplerem L-7200 i pompą L-7100

- Chromatograf cieczowy Shimadzu LC-10AT VP (Kyoto, Japonia) z detektorem UV-Vis SPD-10AVP, autosamplerem SIL-10AD VP oraz jednostką centralną SCL-10A VP
- Dyfraktometr laserowy Mastersizer E – Malvern Instruments (Malvern, Wielka Brytania)
- Fluorescencyjny czytnik płytek Fluorostar Optima (BMG Labtech, Chicago, USA)
- Inkubator (Nuair, Plymouth, USA)
- Łoża z laminarnym nawiewem jałowego powietrza typ KLSH (Polon, Poznań)
- Łaźnia ultradźwiękowa UM-1 (Unitra Unima, Olsztyn)
- Mieszadło szybkoobrotowe Ultra-Turrax T-25 (Janke & Kundel, Staufen, Niemcy)
- Mikroskop B1 220A Motic (Wetzlar, Niemcy) wyposażony w kamerę cyfrową Panasonic GP-KR 222E - Matsushita Communication Industrial (Osaka, Japonia)
- Mikroskop optyczny Wilovert (Wetzlar, Niemcy)
- Omomierz Millicell - ERS (Millipore, Billerica, USA)
- pH-metr Orion 350 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- pH-metr Orion 420A+ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Pompa próżniowa KnF Neuberger–Laboport N810FT18 (KNF Neuberger, Freiburg-Munzingen, Niemcy)
- Sonikator Microson Ultrasonic Cell Disruptor (Misonix, Farmingdale, USA)
- Spektrofotometr Jasco V-530 (Jasco, Oklahoma City, USA)
- Sterylizator powietrzny (Wytwórnia Aparatury Medycznej i Elektronicznej, Warszawa)
- System do ekstrakcji spe-12G (J.T. Baker, Phillipsburg, USA)
- Transblotter Transblot SD (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Waga analityczna WAX 62 (Radwag, Radom)
- Waga laboratoryjna WPS 210/C/2 (Radwag, Radom)
- Wirówka laboratoryjna (Heraeus Christ, Osterode, Niemcy)
- Wirówka laboratoryjna IEC Centra MP4R (IEC, Needham, USA)
- Wirówka Sorvall RT6000B z termostatem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

- Wytrząsarka do probówek Vortex (DHN, Warszawa)
- Wytrząsarka z łaźnią wodną Elpan 357 (Elpan, Lubawa)

3. MATERIAŁY

- Celulozowa błona dializacyjna M. W. cut-off 12400 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Kondycjonowanie błony:
*Umieszczenie we wrzącej wodzie, ogrzewanie w temperaturze 90°C.
Przeniesienie do zimnej wody, przechowywanie w temperaturze 4°C.*
- Film fotograficzny Clear Blue X-ray
- Hodowla komórek Caco-2 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wielka Brytania)
- Hodowla komórek Calu-3 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wielka Brytania)
- Kolumny chromatograficzne: Luna 5 μm C18(2) (Phenomenex, Torrance, USA), LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Kolumny do ekstrakcji do fazy stałej (SPE) Strata X 33 μm (Phenomenex, Torrance, USA)
- Króliki kalifornijskie, 12 samców w badaniu wstępnym oraz 9 samców i 9 samic w badaniu właściwym (Hodowla królików rasowych, Marcin Kaletka, Wielichowo)
- Membrany Immun-BlotTM (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Płytki 6-cio dołkowe, jałowe (Cellstar, Greiner Bio – One, Niemcy)
- Płytki 24-dołkowe, jałowe (Cellstar, Greiner Bio – One, Niemcy)
- Płytki 96-cio dołkowe, jałowe (Corning Inc., NY, USA)
- Probówki z tworzywa sztucznego, heparynizowane (50 μg soli sodowej heparyny) poj. 2,5 ml (Medlab Products, Raszyn)
- Sączi z estrów celulozy o średnicy porów 5 μm (Sartorius, Goettingen, Niemcy)

- Sączi z octanu celulozy o średnicy porów 0,2 μm , jednorazowe, z oprawką (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- Test cytotoksyczności CellQuanti-MTT (BioAssay Systems, Hayward, USA)
- Wkłady membranowe (1,13 cm^2 , Corning Inc., NY, USA)

4. ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA

4.1. Warunki analizy

Analiza jakościowa i ilościowa IB i DC prowadzona była z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) odwróconych faz. Wykorzystano dwa chromatografy cieczowe.

Zastosowano następujące warunki analizy:

- faza ruchoma: mieszanina 10 mmol/l buforu fosforanowego pH 7,0 i acetonitrylu w stosunku 66:34 (obj/obj) lub 70:30 (obj/obj) w analizie osocza,
- faza stacjonarna: kolumna o wymiarach 250×4 mm z wypełnieniem oktadecylokrzemowym
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min,
- objętość nastrzyku: 20 μl ,
- detekcja (długość fali): 220 nm.

4.2. Analiza zawartości ibuprofenu i koniugatu ibuprofenu z oligo(kwasem 3-hydroksymasłowym)

Roztwory IB oraz DC (20 μl) nanoszono na kolumnę za pomocą autosamplera. Stężenie IB oraz DC w analizowanych roztworach obliczano na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej w zakresie stężeń IB 1 – 50 $\mu\text{g/ml}$ oraz DC 0,25 – 5 mg/ml . W celu określenia powtarzalności i liniowości metody wyznaczanie krzywej wzorcowej powtarzano trzykrotnie.

4.3. Analiza zawartości ibuprofenu w osoczu

4.3.1. Metoda analizy

Analizę próbek osocza metodą HPLC (Metody, p. 4.1) przeprowadzono z użyciem indometacyny (IND) jako wzorca wewnętrznego, wykorzystywanego wcześniej w oznaczeniach IB w osoczu [134]. Wstępne analizy z zastosowaniem IND potwierdziły przydatność substancji jako wzorca wewnętrznego.

W analizie osocza wykorzystano metodę ekstrakcji do fazy stałej. Procedurę ekstrakcji IB i IND z przygotowanych próbek prowadzono z użyciem kolumn do ekstrakcji Strata-X według częściowo zmodyfikowanej procedury zaproponowanej przez ich producenta [135]. Do analizowanego osocza po dodaniu wzorca wewnętrznego (20 μ l roztworu IND w metanolu o stężeniu 25 μ g/ml) dodawano 100 μ l 2% roztworu kwasu ortofosforowego, mieszano, a następnie dodawano 600 μ l 100 mmol/l buforu fosforanowego pH 6,0. Kolumny kondycjonowano za pomocą 1 ml metanolu, następnie przepłukiwano stosując 1 ml wody. Na kolumny nanoszono analizowane próbki, a po zebraniu nieadsorbowanej części roztworu sorbent przemywano za pomocą 0,7 ml 5% metanolu, po czym, w celu usunięcia pozostałości wody, na 1 min podłączano próżnię. Zaadsorbowany analit wraz z wzorcem wewnętrznym wymywano za pomocą 1 ml metanolu. Otrzymany eluent odparowywano do sucha w łagodnym strumieniu powietrza w temperaturze 37°C, a pozostałość rozpuszczano w 200 μ l metanolu i poddawano analizie chromatograficznej. Procedura pozwoliła na 2,5 – krotne zmniejszenie objętości rozpuszczalnika w próbce. Komora ekstrakcyjna z założonymi kolumnami przedstawiona jest na ryc. 13.



Ryc. 13. Ekstrakcja próbek metodą SPE.

4.3.2. Badanie odzysku

Odzysk analitu oraz wzorca wewnętrznego badano z użyciem osocza pobranego od zwierząt po zakończeniu eksperymentu, do którego dodawano znane ilości IB oraz IND, a następnie ekstrahowano zgodnie z opisem zamieszczonym powyżej. Odzysk badano dla trzech stężeń IB (5×10^{-7} , 2×10^{-6} , 5×10^{-6} g/ml) w obecności jednakowego stężenia IND (1 μ g/ml) przeprowadzając dla każdego stężenia cztery niezależne ekstrakcje, skutkujące teoretycznie 2,5-krotnym zagęszczeniem próbki. Uzyskane pola powierzchni pików chromatograficznych pochodzących od IB i IND porównywano z powierzchniami pików uzyskanymi w wyniku analizy roztworów metanolowych IB o stężeniach $1,25 \times 10^{-6}$, 5×10^{-6} oraz $1,25 \times 10^{-5}$, zawierającymi dodatkowo 2,5 μ g/ml IND.

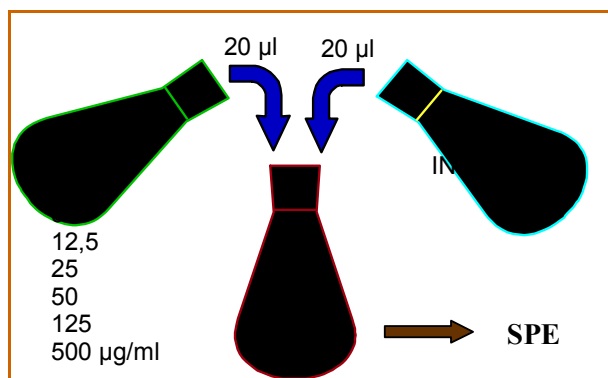
Odzysk analitu (IB) dla każdego ze stężeń obliczano dzieląc sumę pól powierzchni pików IB po ekstrakcji przez sumę pól powierzchni pików IB uzyskanych z wzorców metanolowych ($n = 4$). Analogicznie wyznaczono odzysk wzorca wewnętrznego (IND).

4.3.3. Przygotowanie próbek osocza do analizy metodą HPLC

Pobrane od zwierząt próbki krwi po oddzieleniu przez wirowanie ($3000 \times g$, 15 min) elementów morfotycznych przechowywano w temperaturze $-40^{\circ}C$. W dniu analizy osocze rozmrażano i ponownie wirowano (2 min, $1000 \times g$) celem ewentualnego oddzielenia pozostałych białek. Następnie do fiolek poj. 1,5 ml pobierano 0,5 ml osocza i dodawano 20 μ l roztworu IND w metanolu o stężeniu 25 μ g/ml. Następnie dokonywano ekstrakcji zgodnie z procedurą opisaną w p. 4.3.1.

4.3.4. Krzywa wzorcowa

Do próbek osocza pobranego od zwierząt po zakończeniu eksperymentu (500 μ l) dodawano po 20 μ l roztworów IB (5 – 500 μ g/ml) oraz IND (25 μ g/ml) w metanolu (Ryc. 14, Tabela 2). Po dodaniu roztworów wzorcowych postępowano zgodnie z procedurą ekstrakcji opisaną w p. 4.3.1. Uzyskiwano stężenia w osoczu 0,2 – 20 μ g/ml (IB) i 1 μ g/ml (IND). Do analizy HPLC przygotowano także próbki osocza niezawierające analitu, ani wzorca wewnętrznego.



Ryc.14. Schemat przygotowywania próbki osocza do analizy (krzywa wzorcowa).

Tabela 2. Skład próbek osocza do ekstrakcji (krzywa wzorcowa)

Objętość próbki osocza (µl)	Stężenie roztworu wzorcowego IB (µg/ml)	Objętość roztworu wzorcowego IB (µl)	Stężenie roztworu wzorcowego IND (µg/ml)	Objętość roztworu wzorcowego IND (µl)	IB/osocze (µg/ml)	IND/osocze (µg/ml)
500	5	20	25	20	0,2	1
	12,5				0,5	
	25				1	
	50				2	
	125				5	
	500				20	

W oparciu o uzyskane wyniki wyznaczono krzywą zależności stosunku powierzchni IB do powierzchni IND w funkcji stężenia IB. W celu potwierdzenia liniowości i powtarzalności metody, krzywą wzorcową wyznaczono trzykrotnie.

5. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE DC

5.1. Badanie rozpuszczalności

Rozpuszczalność DC badano w wodzie, 0,1 mol/l HCl oraz roztworach buforowych pH 6,0; 7,0; 7,5 i 8,0 w temperaturze 37°C. Próbkę DC o masie 100 mg umieszczono w probówkach, dodawano po 2 ml rozpuszczalników i wytrząsano w łaźni wodnej przez 24 h. Następnie, po stwierdzeniu, że w każdej z probówek pozostała nierozpuszczona substancja, pobierano próbki zawiesiny, które wirowano (10 min,

2000×g). Pobrany supernatant, po odpowiednim rozcieńczeniu metanolem (2 – 50 razy), poddawano analizie HPLC (Metody, p. 4.1, 4.2). Otrzymane wartości porównywano z rozpuszczalnością IB.

Badanie rozpuszczalności IB prowadzono w analogiczny sposób, natomiast stężenie, po dokonaniu stosownych rozcieńczeń metanolem lub mieszaniną metanolu i buforu fosforanowego pH 7,5, oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=264$ nm. Powyższe badania wykonano trzykrotnie.

Krzywą wzorcową wykonano badając spektrofotometrycznie roztwory wzorcowe IB (w mieszaninie metanolu i buforu fosforanowego pH 7,5 1+1) w zakresie stężeń 50-500 $\mu\text{g/ml}$. Rozcieńczeń próbek roztworów badanych dokonywano w sposób zapewniający jednakowy (50%) udział metanolu i buforu fosforanowego.

5.2. Wyznaczanie log P

Współczynnik podziału olej/woda (log P) dla DC obliczony został jako stosunek stężenia DC w n-oktanolu do stężenia w wodzie w stanie równowagi. W tym celu sporządzono roztwór DC w n-oktanolu o stężeniu 1,0 mg/ml. Do rozdzielacza przeniesiono 10,0 ml tego roztworu i wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 3 h ze 100,0 ml wody. Po rozdzieleniu warstw pobrano próbki obu faz i po rozcieńczeniu metanolem dokonano ich analizy chromatograficznej. Badanie powtórzono trzykrotnie.

5.3. Wyznaczanie pK_a

Wartość pK_a koniugatu określono na podstawie trzykrotnego miareczkowania pH-metrycznego wodnego roztworu DC (0,1 mg/ml) za pomocą roztworu NaOH (2,5 mmol/l). Punkt końcowy miareczkowania wyznaczono bezpośrednio, korzystając z zależności $pH = f(V_{NaOH})$ oraz metodą Hostettera i Robertsa wykorzystując równanie $\frac{dpH}{dV_{NaOH}} = f(V_{NaOH})$ [136, 137]. Ponieważ miareczkowany koniugat jest słabym kwasem jednoprotanowym, jego wartość pK_a jest równa pH roztworu, jakie występuje po dodaniu połowy objętości silnej zasady, którą zużyto do całkowitego zmiareczkowania [138]. Punkt końcowy miareczkowania wyznaczano metodą graficzną oraz metodą pierwszej pochodnej [150].

5.4. Badanie hydrolizy i stabilności termicznej DC

Hydrolizę DC badano w roztworach buforowych pH 6,0; 6,8; 7,5; 8,0 (50 mmol/l), w sztucznym płynie jelitowym zawierającym pankreatynę, sporządzonym wg przepisu USP 30 oraz w osoczu krwi pobranej od zdrowych ochotników. Skład używanych płynów przedstawiony jest w tabeli 3.

W każdym z badanych płynów sporządzono roztwory DC o stężeniu 1 mg/ml. Roztwory, po pobraniu próbek, poddano łagodnemu wytrząsaniu przez 72 h w temperaturze 37°C. Po 6, 24, 48 i 72 h pobierano próbki obj. 1 ml, które po rozcieńczeniu metanolem poddawano analizie chromatograficznej (Metody, p. 4.1, 4.2). Rozcieńczone próbki osocza dodatkowo wirowano. Na podstawie otrzymanych chromatogramów wyznaczano zawartość wolnego IB w próbce, jak też, na podstawie pików pochodzących od koniugatów o różnych masach cząsteczkowych, analizowano przebieg procesu hydrolizy. Całość procedury przeprowadzono trzykrotnie.

Tabela 3. Skład płynów wykorzystywanych w badaniu hydrolizy i stabilności termicznej DC (g/1000 ml)

Substancja	Bufor pH 6,0	Bufor pH 6,8	Bufor pH 7,5	Bufor pH 8,0	Sztuczny płyn jelitowy (pH 6,8)
Na₂HPO₄	0,775		6,58	6,83	
NaH₂PO₄×2H₂O	6,71		0,694	0,296	
KH₂PO₄		6,8			6,8
NaOH (roztwór 0,2 mol/l)		77			77
pankreatyna					2,5

W celu oznaczenia trwałości DC w warunkach podwyższonej temperatury i pH, sporządzono roztwory DC (1 mg/ml) w roztworach buforowych pH 7,0 i 8,0, a także w 0,01 i 0,1 mol/l NaOH. Otrzymane roztwory wytrząsano 1 h w łaźni wodnej, w temperaturze 90°C, a następnie po ochłodzeniu i rozcieńczeniu metanolem (1+1) poddawano analizie chromatograficznej. Podobnie jak wyżej, na podstawie uzyskanych chromatogramów wnioskowano o przebiegu hydrolizy koniugatu wyrażonej zmianami

powierzchni pików wolnego IB oraz DC o różnych długościach łańcucha oligomerowego.

Proces hydrolizy DC badano także przy okazji badania uwalniania koniugatu z roztworu w oleju Miglyol 812, który umieszczono w worku dializacyjnym (Metody, p. 7.4). W pobranych po 3, 6, 24 i 48 h eksperymentu próbkach oznaczano stężenie wolnego IB.

6. BADANIA Z WYKORZYSTANIEM KULTUR KOMÓRKOWYCH

*Poniższe badania wykonano w School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences
Trinity College Dublin*

6.1. Linia komórkowa Caco-2

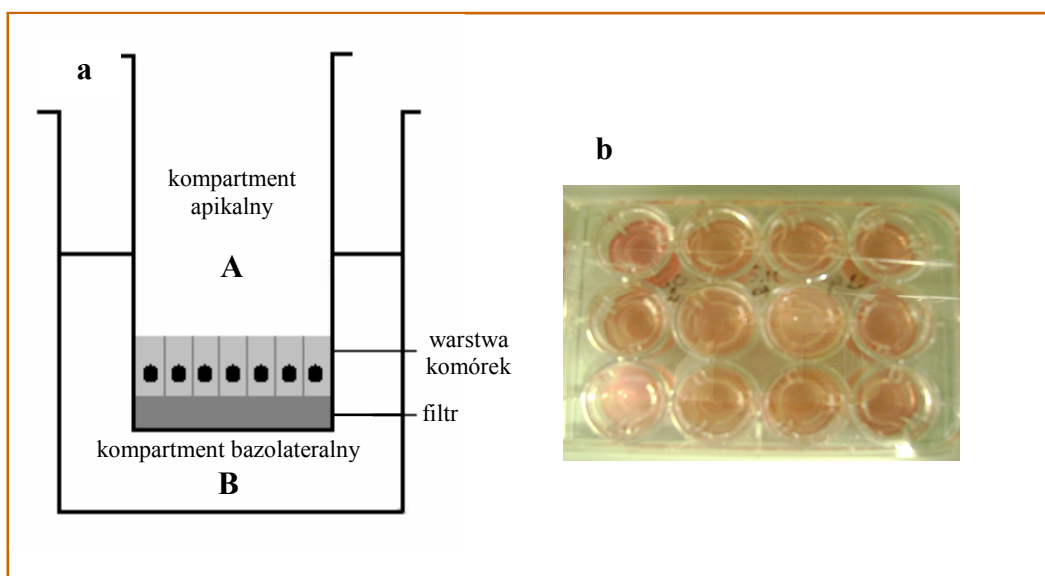
W celu wykonania badania transportu i wychwytu, jak też analizy w oparciu o technikę Western Blot, wykorzystywano różnicujące się komórki Caco-2 pasażowane 22 - 45 razy. Wymiany pożywki oraz dzielenia hodowli dokonywano w warunkach aseptycznych z wykorzystaniem jałowego sprzętu. Dotyczy to wszystkich procedur z wykorzystaniem kultur komórkowych opisanych poniżej. Inkubację hodowli komórkowych prowadzono w temp. $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (5% CO_2). Przed użyciem pożywki i roztwory ogrzewano do 37°C .

Hodowle komórkowe wzrastały na insertach z filtrami (12 insertów na płytce, Ryc. 15) lub płytkach 6-cio i 24-dołkowych. Konfluentność uzyskiwano w ciągu 21 dni [108]. Używano pożywkę Dulbecco's Modified Eagle's Medium wzbogaconą bydlęcą surowicą płodową (FBS, 20%), pirogronianem sodowym (1%), roztworem endogennych aminokwasów (1%) oraz antybiotykami (penicylina oraz streptomycyna w stężeniach odpowiednio 100 U i 0,1 mg/ml). Pożywkę zmieniano co dwa dni. W każdym przypadku stosowano podobną gęstość posiewu 60 000 komórek/cm². Wzrost kultury monitorowano za pomocą mikroskopu optycznego. Hodowle na insertach wykorzystywano do badania przezkomórkowego transportu rodaminy-123 (Rh-123) i fluoresceiny sodowej (FNa), natomiast hodowle na płytkach służyły do badania

wychwytu Rh-123, FNa i 4-Di-ASP oraz pozyskania materiału do analizy metodą Western Blot (WB).

Konfluentność komórek hodowanych na filtrach potwierdzano za pomocą pomiaru oporu elektrycznego pomiędzy kompartmentami (transepithelial electrical resistance, TEER).

Do badania cytotoksyczności DC wykorzystywano komórki hodowane przez 7 dni na płytkach 96-dołkowych.



Ryc. 15. Hodowla komórkowa na insertach w badaniu transportu transmembranowego: schemat (a) oraz płytka z hodowlą na filtrach (b).

6.2. Linia komórkowa Calu-3

Komórki linii Calu-3 wykorzystywano w badaniu cytotoksyczności DC. Komórki (gęstość posiewu 75 000/cm²) utrzymywano w kulturze przez 7 dni. Medium odżywcze - Minimum Essential Medium Eagle zawierało dodatkowo bydlęcą surowicę płodową (10%), pirogronian sodowy (1%), roztwór endogennych aminokwasów (1%) oraz antybiotyki. Pożywkę wymieniano co dwa dni.

6.3. Analiza ilościowa metodą spektrofluorymetryczną

Pomiar intensywności fluorescencji wykorzystywano do analizy ilościowej Rh-123, FNa oraz 4-Di-1-ASP. Za pomocą fluorescencyjnego czytnika płytek mierzono intensywność fluorescencji pobranych próbek stosując długości fal wzbudzenia i emisji odpowiednio 485 i 520 nm dla Rh-123 lub FNa oraz 485 nm i 590 nm dla 4-Di-1-ASP.

Krzywe wzorcowe Rh-123 oraz FNa w KRB wyznaczone zostały w zakresie stężeń 0,05 – 6,25 $\mu\text{mol/l}$, natomiast 4-Di-1-ASP w zakresie 0,4-10 $\mu\text{mol/l}$, w trzykrotnych powtórzeniach. Równania krzywych wraz z współczynnikami regresji przedstawione są w tabeli 4.

Tabela 4. Równania krzywych wzorcowych Rh-123, FNa, oraz 4-Di-1-ASP w KRB; FI – intensywność fluorescencji, c – stężenie ($\mu\text{mol/l}$), R^2 – współczynnik determinacji

Substancja	Równanie krzywej	R^2
Rh-123	$FI = 414,46 c - 9,6871$	0,9994
FNa	$FI = 479,04 c + 45,425$	0,9972
4-Di-1-ASP	$FI = 274 c + 76,01$	0,9786

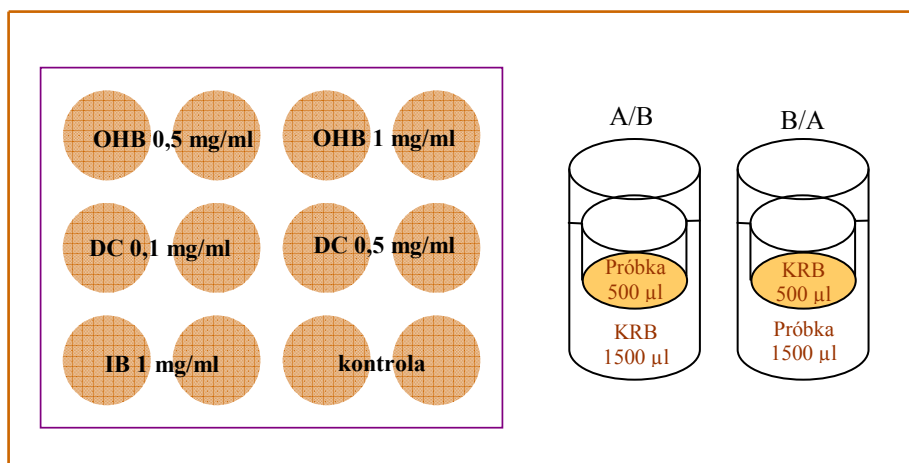
6.4. Badanie transportu przezkomórkowego

Badano transport Rh-123 będącej substratem dla P-gp oraz, w celach porównawczych, soli sodowej fluoresceiny (FNa). Badanie prowadzono jednocześnie na dwóch płytkach wykorzystując na każdej z nich po dwa inserty do analizy transportu w obecności tego samego stężenia każdej z badanych substancji: jedna płytka służyła do pomiaru szybkości transportu Rh-123 lub FNa z roztworów znajdujących się po stronie apikalnej w kierunku strony bazolateralnej (A/B), na drugiej analizowano kierunek przeciwny (B/A). Wykorzystano monowarstwy komórek Caco-2 hodowane na insertach membranowych przez 21 dni.

Sporządzono roztwory OHB (0,5 i 1 mg/ml), DC (0,1 i 0,5 mg/ml) oraz IB (1 mg/ml) w buforze Krebsa - Ringera (KRB, pH 7,4). Do roztworów tych wprowadzono Rh-123 lub FNa w stężeniu 50 $\mu\text{mol/l}$. Medium, w którym komórki

utrzymywane były w kulturze zastępowano świeżo przygotowanym roztworem KRB i inkubowano w temp. 37°C. Po 1 h roztwory wymieniano, umieszczając po stronie A lub B (Ryc. 16) odpowiednią objętość roztworów badanych lub KRB jako płyn akceptorowy. Prowadzono także doświadczenie kontrolne, w którym badano transport Rh-123 lub FNa w nieobecności OHB, DC i IB. Po 0,5; 1; 2; 3 i 4 h pobierano 200 µl próbki płynu akceptorowego, wprowadzając w zamian KRB. Eksperyment wykonano trzykrotnie.

Integralność komórek Caco-2 monitorowana była za pomocą pomiaru oporu elektrycznego (TEER) dokonywanego przed wymianą KRB na badane roztwory oraz po zakończeniu badania. Zmierzone wartości obniżano o TEER filtra (100 Ω·cm²).



Ryc. 16. Schemat badania przezkomórkowego transportu Rh-123 lub FNa - układ próbek na płycie i układ roztworów w insercie w badaniu transportu w kierunku A/B oraz B/A.

Korzystając z równań przedstawionych w tabeli 4 obliczono stężenie Rh-123 lub FNa w płynie akceptorowym w każdej z pobranych próbek. Na podstawie stężenia Rh-123 lub FNa po 4 h eksperymentu oraz stężenia substratów w momencie jego rozpoczęcia, wyznaczano współczynnik przenikania P_{app} [cm×s⁻¹]:

$$P_{app} = \frac{M / t}{c_0 \times S}$$

gdzie M oznacza ilość Rh-123 lub FNa w płynie akceptorowym po 4 h ($t = 14\,400$ s), c_0 - stężenie Rh-123 lub FNa na początku badania, a S – powierzchnię filtra (1,13 cm²).

6.5. Badanie wychwytu komórkowego

Dokonano pomiaru wychwytu Rh-123, FNa oraz 4-Di-1-ASP (substrat dla OCT – Organic Cation Transporter [139]) przez komórki Caco-2 w obecności OHB, DC i IB. Komórki utrzymywane były w kulturze na płytkach 24 – dołkowych przez 21 dni. W badaniach wstępnych ustalono zależność między wychwytem a czasem inkubacji z wybranym substratem (Rh-123).

Komórki przemyto stosując 0,5 ml KRB, a następnie inkubowano z KRB przez 15 min. Po usunięciu KRB, na powierzchnię komórek nanoszono po 0,5 ml 50 $\mu\text{mol/l}$ roztworu Rh-123 w KRB. Medium usuwano jednocześnie z trzech gniazd po 5, 10, 15, 30, 45, 60 i 90 minutach, komórki przemywano dwukrotnie lodowatym KRB i inkubowano w 1% wodnym roztworze Tritonu X-100 przez 20 min, co pozwoliło na lizę struktury błon komórkowych. Zawiesiny przenoszono do probówek i wirowano (5 min, 2000 \times g). Pobierano supernatant (200 μl) i oznaczano intensywność fluorescencji metodą opisaną w p. 6.3.

Eksperyment wykazał, że optymalny czas inkubacji wynosi 15 – 30 min (Wyniki, p. 3.2), stąd kolejne badania prowadzono w tym przedziale czasowym.

Następnym etapem badań wstępnych był wybór najbardziej odpowiedniego stężenia substratu, które pozwoliłoby w najdokładniejszy sposób ustalić jaka jest zależność między obecnością w roztworze badanych substancji, a stopniem wychwytu substratu. W przypadku Rh-123 wyboru tego dokonano eksperymentalnie. Komórki inkubowano przez 15 min z roztworami Rh-123 w KRB o stężeniach 3,125 – 50 $\mu\text{mol/l}$. W przypadku FNa wykorzystano stężenie sugerowane w piśmiennictwie [140], natomiast dla 4-Di-1-ASP zastosowano stężenie wykorzystywane we wcześniejszych eksperymentach prowadzonych przez grupę badawczą.

Po zakończeniu badań wstępnych przeprowadzono następujące eksperymenty:

a) Wpływ badanych substancji na wychwyty Rh-123 (15 i 30 min inkubacji z roztworami w 50 $\mu\text{mol/l}$ roztworze Rh-123 w KRB)

Sporządzono następujące roztwory w 50 $\mu\text{mol/l}$ Rh-123 w KRB: IB (1 mg/ml), DC (0,1 i 0,5 mg/ml) i OHB (0,5 i 1 mg/ml). Na komórki na płytkach 24 – dołkowych, po przemyciu i 15 min inkubacji z KRB, wprowadzono 0,5 ml w/w

roztworów lub 50 $\mu\text{mol/l}$ Rh-123 (kontrola), przeznaczając po 3 gniazda na każdy badany roztwór. Jedną płytkę inkubowano następnie 15 min, a drugą 30 min. Po tym czasie roztwory z nad komórek odwirowano (5 min, 2000 \times g), a następnie po 8 – krotnym rozcieńczeniu za pomocą KRB poddano pomiarowi intensywności fluorescencji (485/520 nm). Pozostałe na płytce komórki, po przemyciu lodowatym KRB, zadano 0,5 ml 1% roztworu Tritonu X-100 i inkubowano przez 20 min. Zawiesiny wirowano (5 min, 2000 \times g), a pobrane próbki supernatantu analizowano za pomocą fluorescencyjnego czytnika płytek. Eksperyment wykonano 3-krotnie.

b) Wpływ badanych substancji na wychwyt Rh-123 lub FNa z etapem preinkubacji (30 min preinkubacji w roztworach badanych substancji w KRB i 30 min inkubacji w roztworach zawierających dodatkowo 50 $\mu\text{mol/l}$ Rh-123 lub FNa)

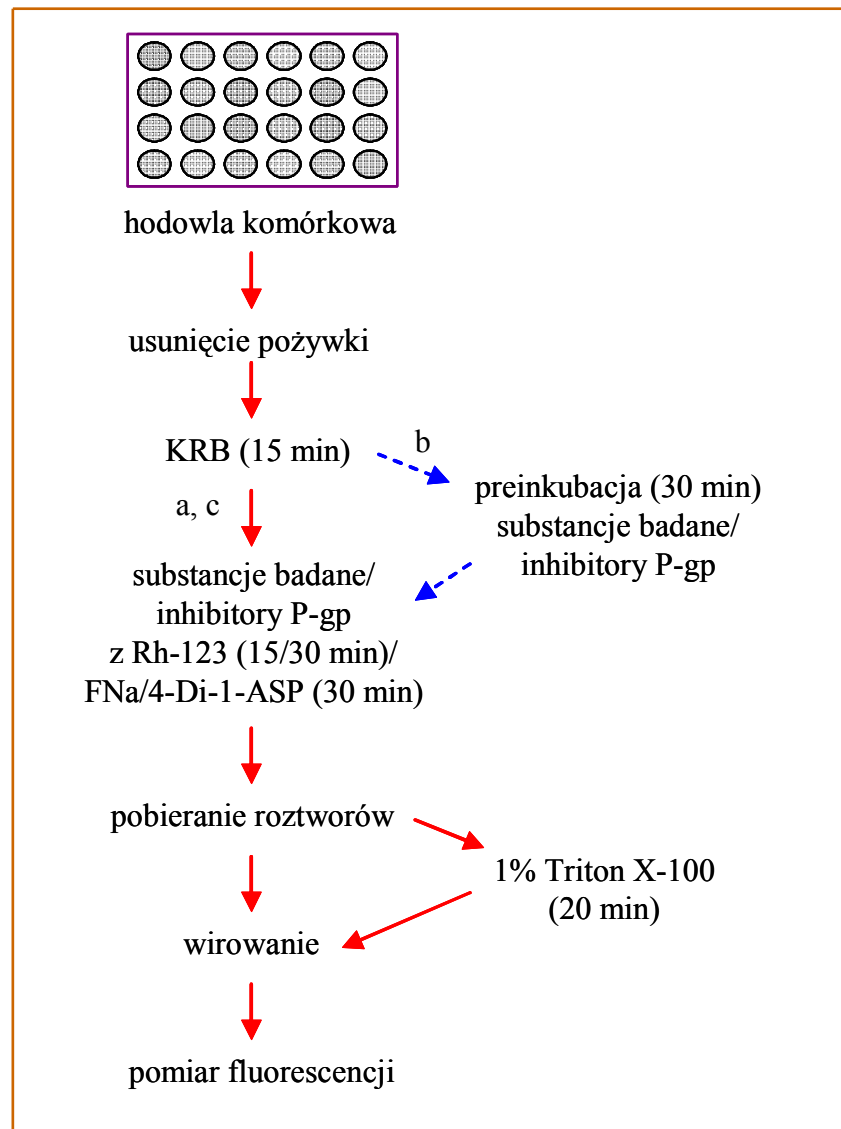
W celu dokładniejszego zbadania wpływu badanych substancji na funkcję P-gp przeprowadzono także doświadczenia, w których wprowadzono etap preinkubacji kultur komórkowych z roztworami IB, DC, OHB oraz z wybranymi inhibitorami MDR i P-gp: chlorowodorkiem werapamilu (V), cyklosporyną A (C) oraz indometacyną (IND). Po 15 min inkubacji z KRB, na powierzchnię komórek aplikowano następujące roztwory: V (100 $\mu\text{mol/l}$), C (10 $\mu\text{mol/l}$), IND (10 $\mu\text{mol/l}$), IB (1 mg/ml), DC (0,1; 0,25 i 0,5 mg/ml), OHB (0,5 i 1 mg/ml) oraz KRB (kontrola). Po 30 min inkubacji roztwory usuwano z gniazd i zastępowano takimi samymi roztworami zawierającymi dodatkowo Rh-123 lub FNa (50 $\mu\text{mol/l}$). Po kolejnych 30 min inkubacji oznaczano stężenie Rh-123 lub FNa w roztworach inkubacyjnych oraz w treści komórkowej uzyskanej za pomocą lizy membrany (1% roztwór Tritonu X-100, 20 min). Badanie powtórzono trzykrotnie. Nie badano wychwytu FNa w obecności IB i OHB.

c) Wpływ badanych substancji na wychwyt 4-Di-1-ASP (30 min inkubacji z roztworami w 10 $\mu\text{mol/l}$ roztworze 4-Di-1-ASP w KRB)

W celu potwierdzenia lub wykluczenia specyficzności oddziaływania DC na P-gp badano wpływ obecności koniugatu na funkcję obecnego w błonie

komórek Caco-2 białka transportowego OCT, którego znanym substratem jest 4-Di-1-ASP [139, 141]. Doświadczenie przeprowadzono podobnie jak opisano w punkcie a.

Schemat doświadczeń opisanych w punktach a – c przedstawiony jest na ryc. 17.



Ryc. 17. Schemat badania wychwytu Rh-123/FNa/4-Di-1-ASP przez komórki Caco-2.

6.6. Badanie cytotoksyczności OHB, DC i IB

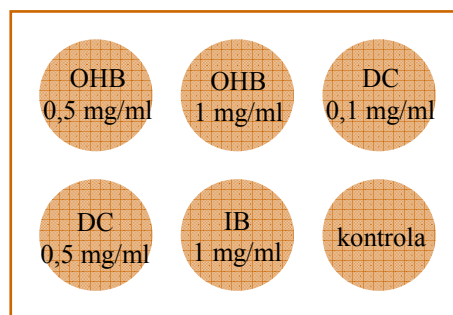
Cytotoksyczność DC badano stosując test CellQuanti-MTT, wykorzystując zmianę barwy MTT (formazan błękitu tiazolowego) zachodzącej z udziałem NADH/NADPH i świadczącej o żywotności komórek [142]. Dokonanie pomiaru absorbancji roztworów, w których inkubowano komórki w obecności badanych substancji i porównanie uzyskanych wartości z absorbancją prób kontrolnych pozwoliło na określenie liczby żywych komórek. Przeżywalność wyrażono jako % pierwotnej liczby komórek.

W celu wykonania testu, komórki Caco-2 i Calu-3 inkubowano przez 7 dni na płytkach 96-dołkowych. W dniu eksperymentu, medium zastępowano analizowanymi roztworami (100 μ l roztworu OHB, DC i IB w medium w stężeniach 0,1; 0,25; 0,5; 0,75, 1,0 mg/ml) i pozostawiano na 1 h. Próbę kontrolną stanowiły komórki, do których dodawano 100 μ l medium nie zawierającego analizowanych substancji. Następnie, zgodnie z instrukcją testu [143], dodawano 15 μ l roztworu reagentu (MTT), a po kolejnych 4 h 100 μ l roztworu solubilizującego i łagodnie mieszano przez 1 h. Końcowym etapem testu był pomiar absorbancji ($\lambda = 570$ nm) za pomocą czytnika fluorescencji. Eksperymenty wykonano 4-krotnie dla każdego stężenia badanych substancji.

6.7. Analiza metodą Western Blot (WB)

Analizę techniką Western Blot przeprowadzono w celu określenia wpływu DC, OHB i IB na funkcję P-gp. P-gp, jak zaznaczono wyżej, występuje w błonie komórkowej Caco-2 i może podlegać inhibicji pod wpływem niektórych substancji chemicznych.

Komórki Caco-2 hodowano na płytkach 6-dołkowych. Używano komórek pomiędzy 20 a 45 pasażem. Zastosowano gęstość posiewu 60000/cm², komórki inkubowano przez 21 dni. Pożywkę wymieniało co drugi dzień i obserwowano wzrost kultury przy pomocy mikroskopu optycznego. Po 21 dniach pożywkę usunięto i wprowadzono na jej miejsce po 1,5 ml roztworów OHB, DC i IB w pożywce nie zawierającej surowicy lub 1,5 ml samej pożywki (kontrola), zgodnie ze schematem przedstawionym na ryc. 18.



Ryc. 18. Skład układu z roztworami inkubacyjnymi w analizie metodą Western Blot.

Po 2 i 4 h z nad komórek pobierano próbki płynu (0,5 ml). Próbkę pobraną po 2 h zastępowano świeżym roztworem, a po pobraniu drugiej próbki, pozostały płyn usuwano i komórki przemywano dwukrotnie zimnym buforem fosforanowym (PBS). Na powierzchnię komórek dodawano 300 μ l buforu ekstrakcyjnego zawierającego inhibitory proteaz: hemisarczan leupeptyny (0,25 mg/25 ml) oraz aprotyninę (1,5 mg/25 ml). Następnie komórki wraz z buforem zbierano i przenoszono do probówek typu eppendorf. W celu zniszczenia błon komórkowych i uwolnienia obecnych białek, zawiesiny poddawano sonikacji (10 s), po czym wirowano (20 min, 2000 \times g, 4°C). Supernatant pobierano do probówek i do czasu dalszej analizy przechowywano w temperaturze -80°C. Po odpowiednim rozcieńczeniu [144], 18 μ l roztworu mieszano z 6 μ l buforu redukującego. Otrzymane roztwory umieszczano na 3 min we wrzącej łaźni wodnej w celu denaturacji białek, wirowano (3000 \times g, 30 s), a następnie 20 μ l próbki przenoszono do „studzienek” utworzonych w 5% żelu poliakrylamidowym (Ryc. 19), przy czym do jednej z nich wprowadzano 10 μ l próby kontrolnej (*Precision Plus Protein dual color standards, Bio-Rad*).

Komorę wypełniono buforem do WB i przeprowadzano rozdział elektroforetyczny (150 V, 2 h), a następnie żele umieszczano w buforze transferowym na 0,5 h. Po dokonaniu transferu żeli na membranę (25 V, 30 min), membrany zanurzano w buforze blokującym (5% odtłuszczone mleko w proszku w buforze myjącym) i pozostawiano na kołysce laboratoryjnej na 12 h w 4°C. Następnie bufor blokujący zastępowano 5 ml roztworu pierwotnych mysich przeciwciał monoklonalnych przeciwko P-gp w stężeniu 1:500 w buforze blokującym i pozostawiano na 2 h. Membrany czterokrotnie przemywano buforem myjącym i poddawano łagodnemu kołysaniu w roztworze przeciwciał wtórnych w stężeniu 1:4000 przez 1 h. Po przemyciu membrany, umieszczano na niej na 5 min 1 ml roztworu

wizualizującego. Następnie membrany umieszczano w zaciemnionym pomieszczeniu na 30 – 60 s na kliszy fotograficznej. Końcowym etapem było wywoływanie fotografii.



Ryc. 19. Komora do analizy metodą Western Blot przed wprowadzeniem próbek.

7. SPORZĄDZANIE POSTACI FARMACEUTYCZNYCH Z DC

Do badań fizykochemicznych, farmaceutycznych i farmakokinetycznych wytypowano i sporządzono następujące preparaty:

25DC	roztwór DC o stężeniu 25% (m/m) w oleju Miglyol 812,
5DC/E20%	emulsję typu o/w (10% oleju Miglyol) o zawartości DC 5% (m/m),
10DC/E20%	emulsję typu o/w (20% oleju Miglyol) o zawartości DC 10% (m/m).

7.1. Roztwór olejowy DC

Skład [g]:

DC	2,5
Miglyol 812	do 10,0

Roztwór DC sporządzono w warunkach aseptycznych stosując wyjałowiony sprzęt. Odważoną ilość DC rozpuszczono w podwyższonej temperaturze (50°C) w Miglyolu. Roztwór wyjałowiono przez sączenie (sączki z octanu celulozy). Dozowano do fiolek poj. 10 lub 20 ml, które zamykano korkami i kapslami. Tak otrzymany roztwór przechowywano w temperaturze 4°C.

7.2. Emulsje typu o/w z DC

Skład przygotowanych układów emulsyjnych przedstawiony jest w tabeli 5. DC rozpuszczono w Miglyolu 812. W osobnej zlewce sporządzono wodny roztwór zawierający polisorbat 80 i glicerol. Po doprowadzeniu obu roztworów do temperatury 60°C, roztwór wodny dodawano kroplami do olejowego roztworu DC i intensywnie mieszano za pomocą mieszadła szybkoobrotowego.

Otrzymaną emulsję rozdozowano do fiolek sącząc przez sączek o średnicy porów 5 µm, zamknięto korkami i zabezpieczono kapslami. Po wyjałowieniu termicznym (autoklaw, 121°C, 15 min) preparaty przechowywano w temperaturze 4°C. Wygląd wyjałowionych emulsji przedstawia ryc. 20.

Tabela 5. Skład [g] emulsji z DC

Substancja	5DC/E10%	10DC/E20%
DC	0,5	1,0
Miglyol 812	1,0	2,0
Polisorbat (Tween 80)	0,2	
Glicerol 86%	0,32	
Woda	do 10,0	



Ryc. 20. Emulsje o/w (10% DC, 20% oleju) po wyjałowieniu.

7.3. Trwałość sporządzonych preparatów

Badano trwałość sporządzonych preparatów w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C. Prowadzono obserwację mikroskopową emulsji bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 7, 30 i 90 dniach. Jednocześnie mierzono pH oraz, za pomocą dyfraktometru laserowego, wielkość kropeł olejowych. Po odpowiednim rozcieńczeniu metanolem oznaczano także zawartość DC w sporządzonych układach: emulsji i roztworze olejowym.

7.4. Badanie *in vitro* uwalniania DC i IB z preparatów

Badanie uwalniania ze sporządzonych preparatów do roztworu buforowego pH 7,5 prowadzono z wykorzystaniem błony dializacyjnej. Do worka utworzonego ze spiętej klipssem błony dializacyjnej wprowadzano ilość badanego preparatu odpowiadającą 250 mg DC. Drugi koniec worka również zabezpieczano klipssem, po czym worek umieszczano w kolbce zawierającej 50 ml płynu akceptorowego i poddawano łagodnemu wytrząsaniu (50 cykl/min) w temperaturze $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Badanie uwalniania prowadzono 48 h. W ustalonych odstępach czasu (3, 6, 24 i 48 h) pobierano próbki o obj. 1 ml do analizy chromatograficznej (Metody, p. 4.1, 4.2). Ubytek płynu akceptorowego związany z kolejnymi pobraniami uzupełniano świeżym płynem akceptorowym temp. 37°C . Obliczono stężenia uwolnionego DC (na podstawie powierzchni dwóch pików chromatograficznych: $t_R = 7,3$ i $7,6$ min), a także stężenia wolnego IB.

Jednocześnie w podobny sposób przeprowadzono badanie z wykorzystaniem DC w formie substancji umieszczonej w worku dializacyjnym.

7.5. Preparaty porównawcze

Jako preparaty porównawcze do badań *in vivo* sporządzono: 5% roztwór olejowy IB w Miglyolu 812 (5%IB) oraz 10% roztwór wodny lizynianu ibuprofenu w buforze fosforanowym pH 7,5 (LIZ10%). Roztwór olejowy wyjałowiono przez sączenie

(0,22 μm), natomiast roztwór wodny wyjałowiono termicznie w autoklawie (121 °C, 15 min).

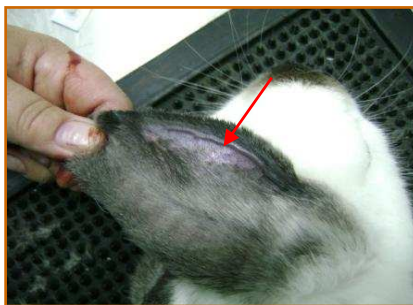
Metodą spektroskopii UV-Vis zbadano wpływ etapu wyjaławiania termicznego na zawartość lizynianu ibuprofenu w roztworze. Porównywano przebieg widm oraz absorbancję roztworów lizynianu ibuprofenu przed i po wyjaławianiu przy maksimum długości fali $\lambda = 264 \text{ nm}$.

8. BADANIA *in vivo*

Badania w warunkach *in vivo* przeprowadzone zostały we współpracy z Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk im. M. Mossakowskiego w Warszawie. Na przeprowadzenie eksperymentu uzyskano zgodę właściwej komisji etycznej (IV Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie).

Przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzęta poddawano 7-dniowej kwarantannie w pomieszczeniu zwierzętarni. Przed oraz w trakcie badania króliki otrzymywały dwa razy dziennie standardową karmę, zapewniono także nieograniczony dostęp do wody.

Badanie podzielono na dwa etapy: wstępny – z wykorzystaniem 12 zwierząt i właściwy – z wykorzystaniem 18 zwierząt. Stosowano roztwory olejowe DC oraz IB, emulsję z DC i wodny roztwór lizynianu IB. Używano preparatów przechowywanych nie dłużej niż 10 dni. Preparaty podawano jednorazowo w postaci wstrzyknięcia w mięsień półbłoniasty. Objętość podawanego preparatu zależna była od masy ciała zwierzęcia i wynosiła 25 mg IB/kg m.c., 72,7 mg lizynianu ibuprofenu/kg m.c. (co odpowiada 25 mg IB) lub 120 mg DC/kg m.c. Próbkę krwi o obj. 1 ml pobierane były z żyły brzeżnej ucha (Ryc. 21) do heparynizowanych probówek. Osocze oddzielono od pełnej krwi poprzez wirowanie, a następnie zamrażano w temperaturze -40°C do czasu analizy.



Ryc. 21. Żyła brzeżna ucha królika.

8.1. Badania wstępne

Wykorzystano 12 dorosłych, jednak nie starszych niż 1-roczych, samców królika kalifornijskiego. Średnia masa ciała wynosiła $2,88 \pm 0,34$ kg. Podział zwierząt na poszczególne grupy otrzymujące różne preparaty oraz objętości wstrzyknięć przedstawione są w tabeli 6.

Tabela 6. Podział zwierząt na grupy oraz objętości podawanych preparatów (badanie wstępne)

Numer królika	Masa ciała (kg)	Podany preparat	Objętość podanego preparatu (ml)	Dawka* (mg/kg m.c.)
1	2,7	25DC	1,3	120
2	3,2		1,6	
3	2,8		1,4	
4	3,2	10DC/E20%	3,9	120
5	2,5		3,0	
6	2,7		3,3	
7	2,8	5%IB	1,5	25
8	2,2		1,2	
9	3,1		1,7	
10	3,2	LIZ10%	1,4	72,7
11	3,4		1,5	
12	2,8		1,2	

* dawka substancji (DC, IB lub lizynian IB)

Zależnie od podanego preparatu, próbki pobierano w czasie do 72 lub 168 h, według schematu przedstawionego w tabeli 7. Zaniechanie poborów po czasie dłuższym

niż 72 h po podaniu preparatów zawierających nieskoniugowane formy ibuprofenu podyktowane było niskim okresem półtrwania leku, wynoszącym około 2 h [87].

Analizę wybranych próbek krwi prowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w p. 4.3 (Metody).

Tabela 7. Schemat poboru próbek we wstępnym etapie badań in vivo

Preparat	Czas (h)											
	0	1	3	6	12	24	36	48	72	96	120	168
25DC	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
10DC/E20%	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5%IB	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-
LIZ10%	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-

8.2. Właściwe badanie farmakokinetyki DC

Po przeprowadzeniu wstępnych analiz, do dalszego, właściwego etapu badań wytypowano:

- roztwór olejowy DC (25DC),
- emulsję typu o/w z DC (10DC/E20%),
- roztwór olejowy IB (5%IB), jako preparat kontrolny.

Badanie przeprowadzono w sposób analogiczny do opisanego w p. 8.1, modyfikując czasy pobrań próbek krwi.

Grupę 18 dorosłych, nie starszych niż 1 rok, królików (9 samców i 9 samic) podzielono na 3 podgrupy po 6 zwierząt tak, aby w każdej z nich znalazła się równa ilość królików obu płci. Każda z podgrup otrzymała inny preparat.

Średnia masa ciała zwierząt wynosiła $2,73 \pm 0,32$ kg. Dane dotyczące poszczególnych zwierząt oraz podawanych preparatów przedstawione są w tabeli 8, natomiast schemat poboru próbek krwi prezentuje tabela 9.

Analizę próbek krwi prowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w p. 4.3 (Metody).

Tabela 8. Podział zwierząt na grupy oraz objętości podawanych preparatów
(badanie właściwe)

Numer królika	Płeć	Masa ciała (kg)	Podany preparat	Objętość podanego preparatu (ml)	Dawka* (mg/kg m.c.)
1	♀	2,50	25DC	1,20	120
2	♀	2,70		1,25	
3	♀	2,45		1,15	
4	♂	2,75		1,30	
5	♂	3,05		1,40	
6	♂	2,50		1,15	
7	♂	2,30	10DC/E20%	2,65	120
8	♂	3,05		3,50	
9	♂	2,75		3,20	
10	♀	3,00		3,45	
11	♀	2,75		3,20	
12	♀	2,40		2,80	
13	♀	3,20	5%IB	1,70	25
14	♀	3,10		1,60	
15	♀	3,25		1,70	
16	♂	2,50		1,30	
17	♂	2,70		1,40	
18	♂	2,20		1,20	

* dawka substancji (DC lub IB)

Tabela 9. Schemat poboru próbek we właściwym etapie badań in vivo

Preparat	Czas (h)						
	1	3	6	12	24	36	48
25DC	√	√	√	√	√	√	√
10DC/E20%	√	√	√	√	√	√	√
5%IB	√	√	√	√	√	-	-

8.3. Analiza wyników

Parametry farmakokinetyczne c_{\max} , t_{\max} oraz AUC obliczano na podstawie stężeń ibuprofenu uzyskanych w osoczu poszczególnych zwierząt. Wartości otrzymane w poszczególnych punktach czasowych poddane były analizie statystycznej testem Kruskala-Wallisa oraz Dunna (post-hoc) dla wielu prób o nierównych wariancjach lub Manna-Whitneya (dla dwóch grup o nierównych wariancjach) z zastosowaniem programu komputerowego SigmaStat. Przyjęto poziom istotności $p = 0,05$. Porównywano wyniki uzyskane dla roztworu IB z wynikami otrzymanymi po podaniu preparatów DC, a także wyniki uzyskane dla obu preparatów z DC.

Względną dostępność biologiczną (EBA) IB z preparatów DC obliczano w stosunku do roztworu olejowego IB uwzględniając wyznaczone wartości AUC i podaną dawkę D (w przeliczeniu na IB, tzn. odpowiednio 25 i 40 mg/kg m.c. dla roztworu olejowego IB i preparatów DC):

$$EBA = \frac{AUC_{DC} \times D_{IB}}{AUC_{IB} \times D_{DC}} \times 100\%$$

IV. WYNIKI

1. OCENA METOD ANALIZY ILOŚCIOWEJ IBUPROFENU I KONIUGATU

Opracowana metoda analizy ilościowej DC i IB pozwoliła na oznaczenie zawartości tych substancji w roztworach, w przygotowanych preparatach, w osoczu, a także na wyznaczenie kinetyki hydrolizy DC.

1.1. Oznaczanie zawartości IB i DC w roztworach

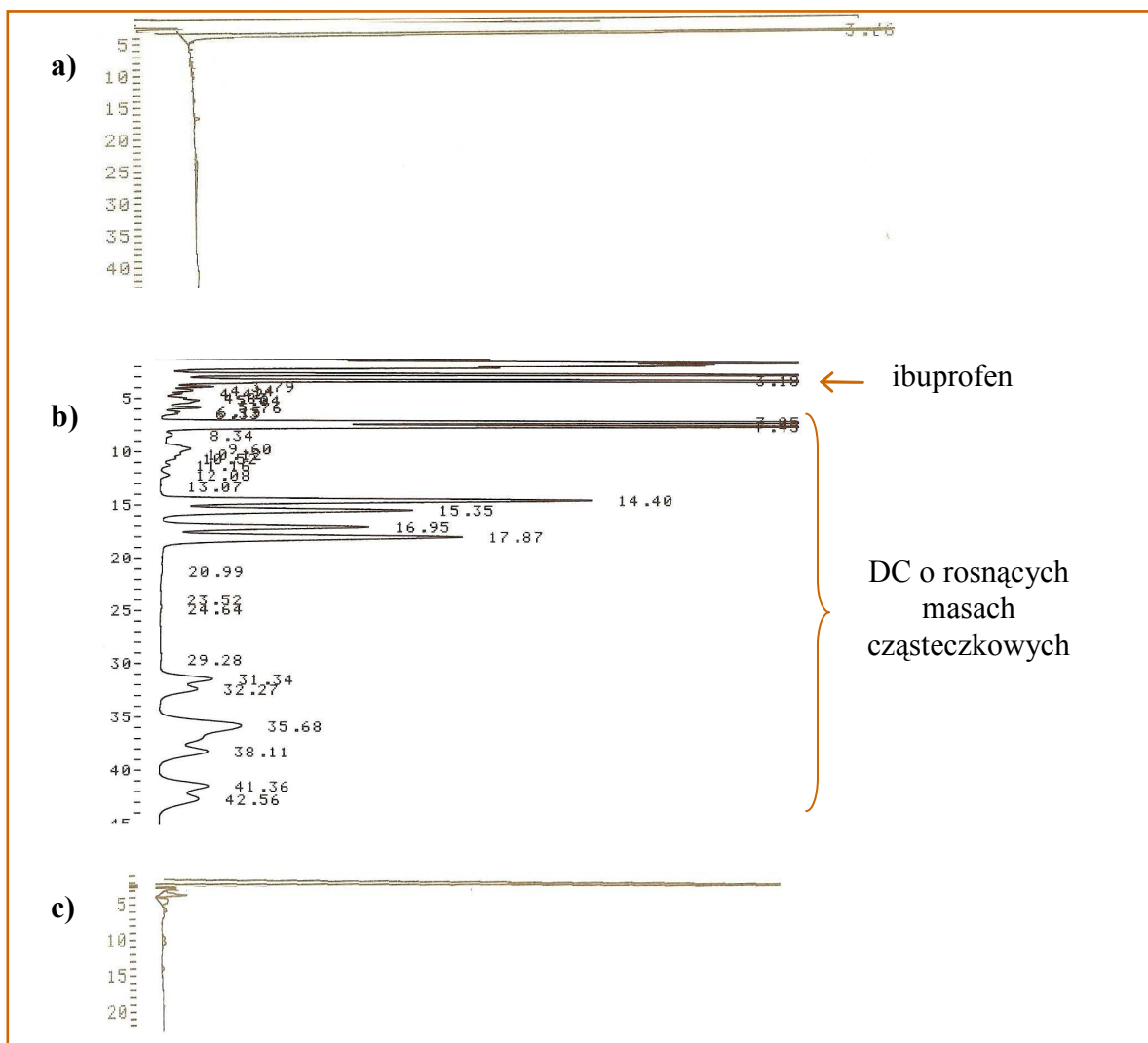
Zawartość IB oraz DC oznaczano w roztworach metanolowych lub metanolowo-wodnych wykorzystując metodę HPLC (Metody, p. 4.1, 4.2).

Czas retencji dla IB wynosił około 3,2 min (Ryc. 22a). Na chromatogramach DC, obok pików wolnego, nieskoniugowanego IB, który stanowił ok. 2,5% deklarowanej ilości IB w koniugacie, obecne były piky pochodzące od DC. Ponieważ koniugat zawierał łańcuchy oligomerowe o różnej długości, rejestrowano kilka pików chromatograficznych (Ryc. 22b).

Piki o czasach retencji od 7,3 do 42,6 min reprezentują koniugaty o rosnących masach cząsteczkowych. Wykazano, że nieskoniugowany oligomer w zastosowanych warunkach analizy nie daje pików chromatograficznych (Ryc. 22c).

Równanie regresji prostoliniowej dla krzywej wzorcowej IB w metanolu przedstawione jest w tabeli 10.

Liniową korelację pomiędzy stężeniem DC (0,5 – 5 mg/ml), a powierzchnią pików obserwowano w przypadku pików o czasie retencji $t_R = 7,3; 7,6; 15,3; 16,9$ min. Równania krzywych wzorcowych wyznaczonych na podstawie powierzchni pików o czasie retencji $t_R = 7,3$ i $7,6$ min przedstawione są w tabeli 10. Charakterystyka stosowanych metod przedstawiona jest w tabeli 11.



Ryc. 22. Chromatogramy roztworów metanolowych: **a)** IB (10 $\mu\text{g/ml}$), **b)** DC (1 mg/ml) i **c)** OHB (1 mg/ml).

Tabela 10. Równania krzywych wzorcowych IB ($t_R = 3,2$ min) oraz DC (na podstawie dwóch pików chromatograficznych), A – pole powierzchni pików, c – stężenie IB ($\mu\text{g/ml}$) lub DC (mg/ml), R^2 – współczynnik determinacji

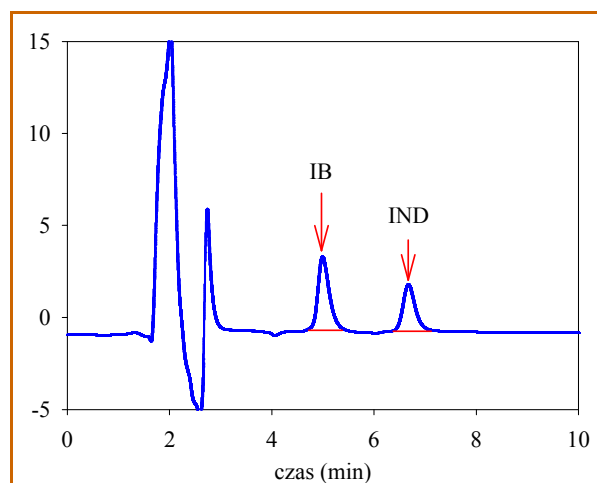
Czas retencji (min)	Równanie krzywej	R^2
IB (3,2 min)	$A = 27,873 c + 25,043$	0,9979
DC (7,3)	$A = 289,53 c - 6,2417$	0,9987
DC (7,6)	$A = 428,04 c + 88,847$	0,9922

Tabela 11. Ocena metody oznaczania chromatograficznego IB i DC w roztworach metanolowych

Oznaczana substancja (t_R)	Zakres stężeń	Liniowość (współczynnik determinacji)	Oznaczalność [$\mu\text{g/ml}$]	Czułość [$\mu\text{g/ml}$]	Dokładność [%]
IB (3,2 min)	1-50 $\mu\text{g/ml}$	0,9979	0,5	0,1	106,1 \pm 14,4
DC (7,3 min)	0,25-5 mg/ml	0,9987	50	10	99,6 \pm 5,1
DC (7,6 min)	0,25-5 mg/ml	0,9922	50	10	97,4 \pm 9,5

1.2. Oznaczanie zawartości IB w osoczu

Oznaczenia stężenia ibuprofenu w osoczu królików dokonano metodą HPLC (Metody, p. 4.3) stosując wzorec wewnętrzny - indometacynę. W warunkach analizy czas retencji IND (około 7,2 min) różni się o 2 minuty od czasu retencji IB (5,3 min). Modyfikacja składu fazy ruchomej pozwoliła na uzyskanie właściwego rozdziału pików analitu i wzorca wewnętrznego (Ryc. 23).



Ryc. 23. Przykładowy chromatogram roztworu wzorcowego IB i IND w metanolu (IB 2 $\mu\text{g/ml}$, IND 2,5 $\mu\text{g/ml}$).

Stężenie IB w osoczu oznaczano na podstawie krzywej wzorcowej opisanej równaniem:

$$IB/IND = 0,6185 c + 0,0236$$

$$R^2=0,9999$$

gdzie: IB/IND – stosunek powierzchni pików analitu (IB) do wzorca wewnętrznego (IND),

c – stężenie IB ($\mu\text{g/ml}$),

R^2 – współczynnik determinacji

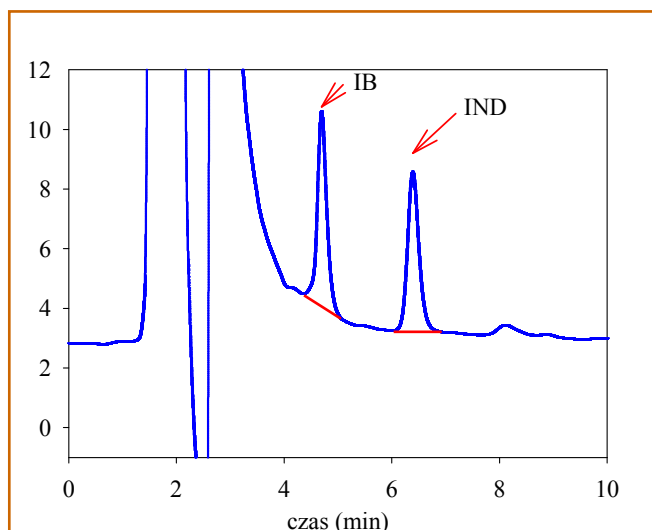
Analiza chromatograficzna poprzedzona była etapem ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Wykazano brak interferencji pików pochodzących od innych składników z pikami oznaczanych związków.

Określono odzysk analitu oraz wzorca wewnętrznego, a także oznaczono dokładność, czułość, liniowość oraz powtarzalność między dniami. Wyniki przedstawiono w tabeli 12, natomiast przykładowy chromatogram ekstrahowanej próbki osocza krwi przedstawia ryc. 24.

Tabela 12. Ocena metody oznaczania IB w osoczu metodą HPLC

	Wartość
Odzysk ibuprofenu [%]	73,5 \pm 10,6
Liniowość w zakresie 0,2-20 $\mu\text{g/ml}$* (współczynnik regresji)	0,9999
Oznaczalność [$\mu\text{g/ml}$]	0,10
Czułość [$\mu\text{g/ml}$]	0,05
Dokładność [%]	99,3 \pm 1,5
Powtarzalność między dniami [%]	<10,0
Odzysk indometacyny [%]	83,2 \pm 12,7

* stężenie w osoczu przed ekstrakcją



Ryc. 24. Przykładowy chromatogram ekstrahowanej próbki osocza (stężenie IB około 2 µg/ml)

2. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE KONIUAGATU

2.1. Rozpuszczalność

DC oraz IB bardzo dobrze rozpuszczają się w metanolu, etanolu, chloroformie, oleju rącznikowym i oleju Miglyol 812 (> 500 µg/ml). Rozpuszczalność DC oraz IB w kwasie solnym, wodzie oraz buforach fosforanowych (Metody, p. 5.1) przedstawia tabela 13. Rozpuszczalność DC w środowisku wodnym rośnie wraz ze wzrostem pH, podobnie jak rozpuszczalność IB.

Rozpuszczalność IB oznaczono spektrofotometrycznie wykorzystując krzywą wzorcową wyznaczoną jako zależność absorbancji (A) i stężenia (c, µg/ml), opisaną równaniem: $A = 0,0019 c - 0,0114$ ($R^2 = 0,9981$).

Tabela 13. Rozpuszczalność DC oraz IB w środowiskach wodnych (mg/ml)

Rozpuszczalnik	DC	IB
0,1 mol/l HCl	0,036 ± 0,006	0,07 ± 0,001
Woda	0,10 ± 0,03	0,196 ± 0,03
Bufor pH 6,0	4,20 ± 0,20	0,723 ± 0,06
Bufor pH 7,0	21,0 ± 0,10	2,77 ± 0,05
Bufor pH 7,5	31,0 ± 0,10	5,53 ± 0,14
Bufor pH 8,0	38,50 ± 0,05	5,90 ± 0,13

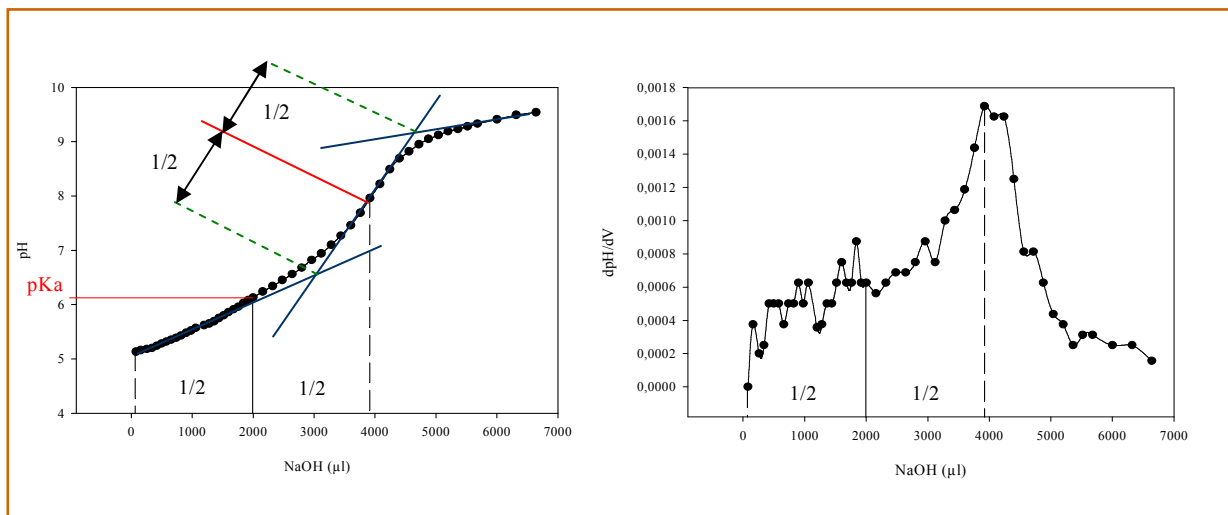
2.2. Wartość log P

Współczynnik podziału oktanol - woda (Metody, p. 5.2) został wyznaczony na podstawie piku chromatograficznego o czasie retencji $t_R = 7,6$ min (Ryc. 22b). Stężenie DC w fazie organicznej (n-oktanol) wyniosło 0,717 mg/ml, natomiast w fazie wodnej 0,043 mg/ml. Stąd wartość współczynnika podziału obliczona jako stosunek stężenia DC w fazie organicznej do stężenia w fazie wodnej ($c_{n-oktanol} / c_{woda}$) w stanie równowagi wynosiła 16,55 (log P = 1,22).

2.3. Wartość pKa

Ryc. 25 przedstawia krzywą miareczkowania DC za pomocą roztworu wodorotlenku sodu, a także stosunek dpH/dV w funkcji objętości dodawanej zasady (Metody, p. 5.3).

Wyznaczona wartość pK_a wynosi 6,1.



Ryc. 25. Miareczkowanie wodnego roztworu DC (0,1 mg/ml) za pomocą 2,5 mmol/l roztworu NaOH.

2.4. Hydroliza i stabilność termiczna

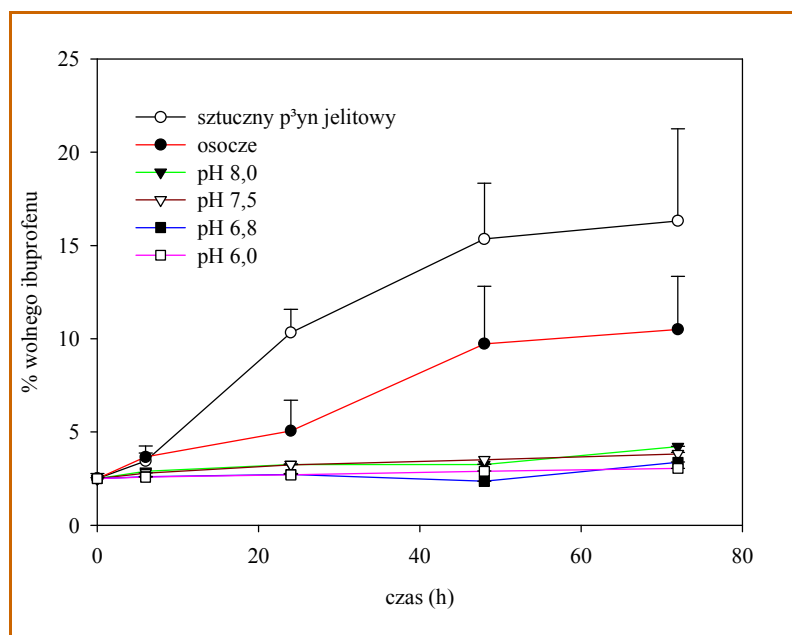
W tabeli 14 i na ryc. 26 przedstawiono szybkość hydrolizy DC w buforach fosforanowych pH 6,0 – 8,0 (Metody, p. 5.4), a także w osoczu i sztucznym płynie jelitowym (pH 6,8). Początkowa ilość DC w każdym z roztworów wynosiła 20 mg, co odpowiada całkowitej zawartości ibuprofenu 7,24 mg, z czego około 2,5% istnieje w formie nieskoniugowanej.

Przy nieobecności enzymów, niezależnie od pH, hydroliza DC praktycznie nie następowała (Ryc. 26). Obliczone wyniki wskazują, że DC ulegał hydrolizie enzymatycznej w sztucznym płynie jelitowym oraz osoczu, jednak proces ten przebiegał powoli - po 72 h inkubacji uwolnieniu uległo 13,8% IB (sztuczny płyn jelitowy), a średnia szybkość uwalniania wynosiła 0,2 %/h.

Profil uwalniania IB z DC w osoczu wskazuje na nieznacznie wolniejszą hydrolizę od obserwowanej w sztucznym płynie jelitowym (po 48 h uwolnieniu uległo ok. 10% IB).

Tabela 14. Szybkość hydrolizy DC (% wolnego IB, wartości średnie \pm SD) w buforowanych roztworach wodnych, w sztucznym płynie jelitowym (roztwór pankreatyny pH 6,8) i w osoczu (temp. 37°C)

Czas (h)	pH 6,0	pH 6,8	pH 7,5	pH 8,0	Osocze	Sztuczny płyn jelitowy
0 (ilość nieskoniugowanego IB)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
6	2,58 \pm 0,01	2,60 \pm 0,01	2,81 \pm 0,01	2,9 \pm 0,01	3,66 \pm 0,6	3,44 \pm 0,05
24	2,70 \pm 0,07	2,72 \pm 0,02	3,24 \pm 0,04	3,25 \pm 0,01	5,06 \pm 1,65	10,33 \pm 0,43
48	2,91 \pm 0,01	2,35 \pm 0,02	3,51 \pm 0,02	3,25 \pm 0,01	9,73 \pm 3,08	15,35 \pm 1,25
72	3,05 \pm 0,02	3,37 \pm 0,02	3,83 \pm 0,08	4,21 \pm 0,02	10,50 \pm 2,84	16,32 \pm 4,94
Szybkość hydrolizy (%/h)	0,008	0,012	0,018	0,024	0,110	0,192

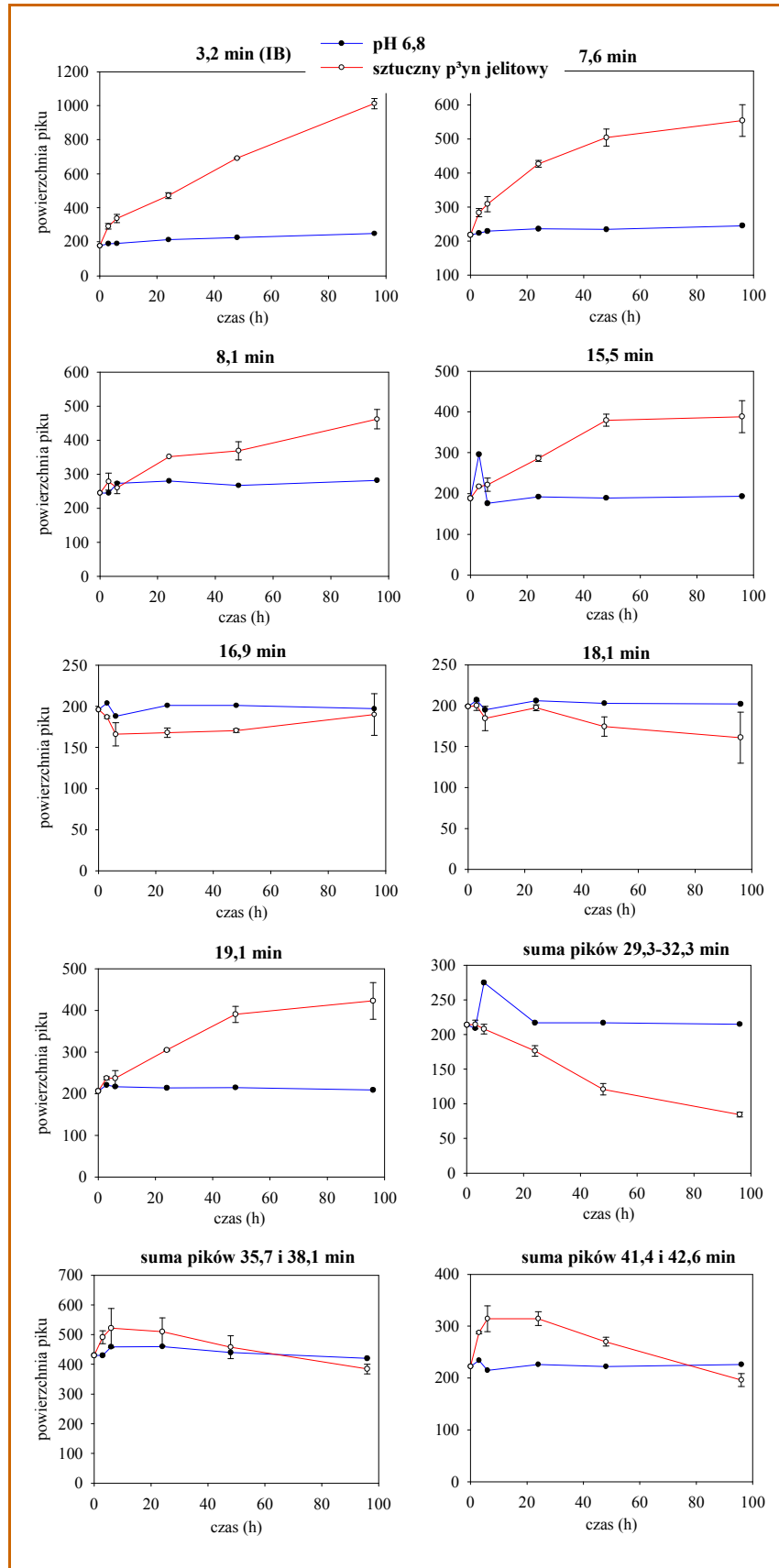


Ryc. 26. Przebieg hydrolizy DC w temp. 37°C w buforowanych roztworach wodnych (pH 6,0 – 8,0) oraz w osoczu i w sztucznym płynie jelitowym (pH 6,8).

Ryc. 27 przedstawia zmiany powierzchni wybranych pików chromatograficznych koniugatu w czasie, w zależności od tego, czy hydroliza zachodzi w sztucznym płynie jelitowym, czy w buforze pH 6,8. Ze względu na niedostateczny

rozdział, grupy pików o czasach retencji $t_R = 29,3 - 32,3$ min, 35,7 i 38,1 min oraz 41,4 i 42,6 min (Ryc. 22b) traktowano łącznie obliczając sumę powierzchni.

W roztworze buforowym pH 6,8 pole powierzchni pików IB i DC o różnych długościach łańcucha kwasu oligo(3-hydroksymasłowego), w roztworze buforowym pH 6,8 nie podlega istotnym zmianom w czasie. W sztucznym płynie jelitowym pole powierzchni pików IB wzrasta w czasie, a podobny trend można zaobserwować dla krótkołańcuchowych cząsteczek DC, zawierających 2-3 jednostki kwasu 3-hydroksymasłowego ($t_R = 7,6 - 15,5$ min), a także dla pików o czasie retencji $t_R = 19,1$ min. Powierzchnia pików reprezentujących DC o wyższych masach cząsteczkowych (czas retencji $t_R > 29,0$ min) maleje w czasie inkubacji w roztworze pankreatyny.



Ryc. 27. Zmiany powierzchni wybranych pików DC w buforze pH 6,8 oraz w sztucznym płynie jelitowym.

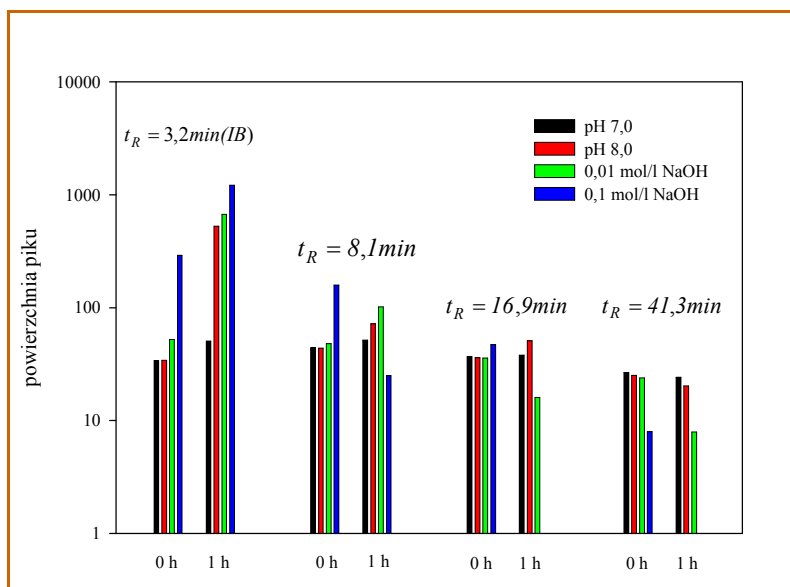
Tabela 15 przedstawia dane dotyczące hydrolizy DC w warunkach podwyższonej temperatury w środowisku obojętnym i alkalicznym.

Tabela 15. Wpływ temperatury (90°C) i stężenia wodorotlenku sodu na hydrolizę DC (% całkowitej ilości IB w DC)

Medium	t_0	$t_{1h, 90^\circ C}$
pH 7,0	2,5	5,0
pH 8,0	2,5	50,0
0,01 mol/l NaOH	5,0	65,0
0,1 mol/l NaOH	28,0	100,0

Wraz ze wzrostem pH rosła szybkość hydrolizy DC. W roztworze buforowym pH 7,0 podwyższona temperatura tylko nieznacznie zwiększyła szybkość hydrolizy DC, podczas gdy w pH 8,0, po 1 h uwolnione zostało 50% ibuprofenu. W 0,1 mol/l, bezpośrednio po przygotowaniu roztworu obserwowano szybką hydrolizę DC prowadzącą do uzyskania wysokich stężeń wolnego IB. Ponadto w roztworze tym całkowitą hydrolizę zaobserwowano po 5 h w temperaturze pokojowej (wyników nie przedstawiono). W tym przypadku na chromatogramie zanotowano brak jakichkolwiek pików pochodzących od DC. Ryc. 28 przedstawia zmiany wielkości wybranych pików chromatograficznych po 1 h inkubacji w 90°C w roztworach obojętnych i alkalicznych.

Znaczne zmiany powierzchni pików następują w roztworach alkalicznych. W przypadku roztworu DC w 0,1 mol/l NaOH, po 1 h brak jest pików reprezentujących koniugaty o wyższych masach cząsteczkowych ($t_R = 16,9$ i $41,3$ min), podczas gdy w pH 7,0 i 8,0 nie obserwowano istotnych zmian ich wielkości. Spadek wielkości tych pików odbywa się równolegle ze wzrostem powierzchni pików ibuprofenu, a w przypadku 0,01 mol/l roztworu NaOH, także pików pochodzących od koniugatu niskocząsteczkowego ($t_R = 8,1$ min).

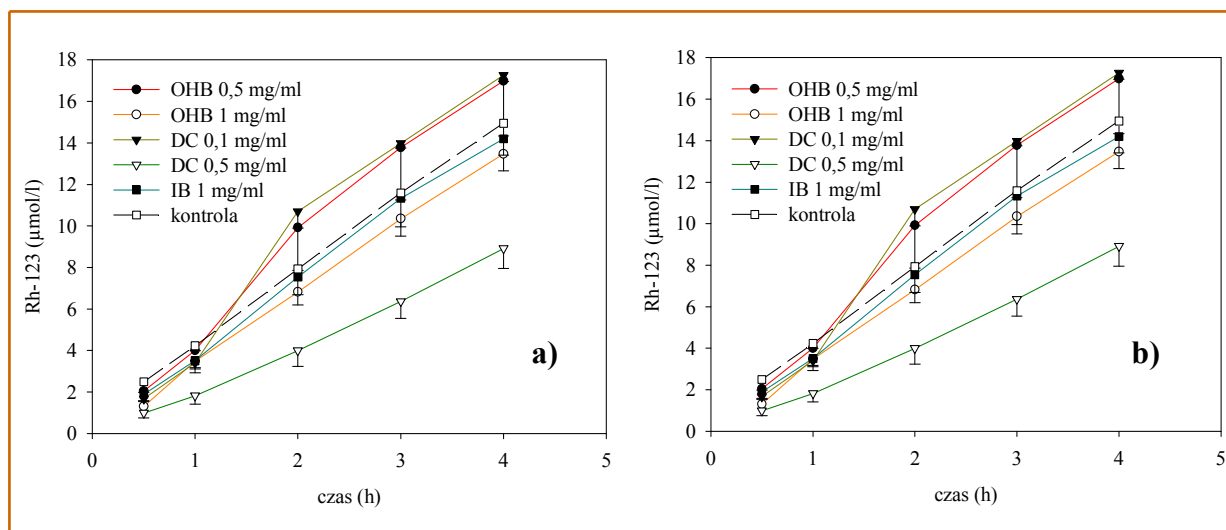


Ryc. 28. Zmiany powierzchni wybranych pików chromatograficznych DC po 1h inkubacji (temp. 90°C) w roztworach o odczynie obojętnym i alkalicznym.

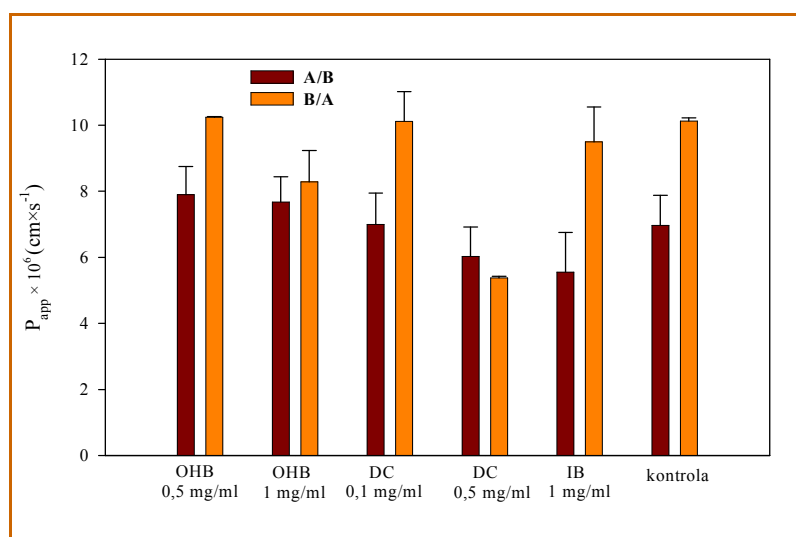
3. DOŚWIADCZENIA Z WYKORZYSTANIEM KULTUR KOMÓRKOWYCH

3.1. Badanie transportu przez monowarstwę komórkowe

Na ryc. 29 przedstawiono szybkość transportu Rh-123 z kompartmentu apikalnego do bazolateralnego oraz z bazolateralnego do apikalnego w obecności badanych związków przez warstwę komórek Caco-2 (Metody, p. 6.4). Wartości P_{app} oznaczone dla transportu Rh-123 przedstawione są na ryc. 30.



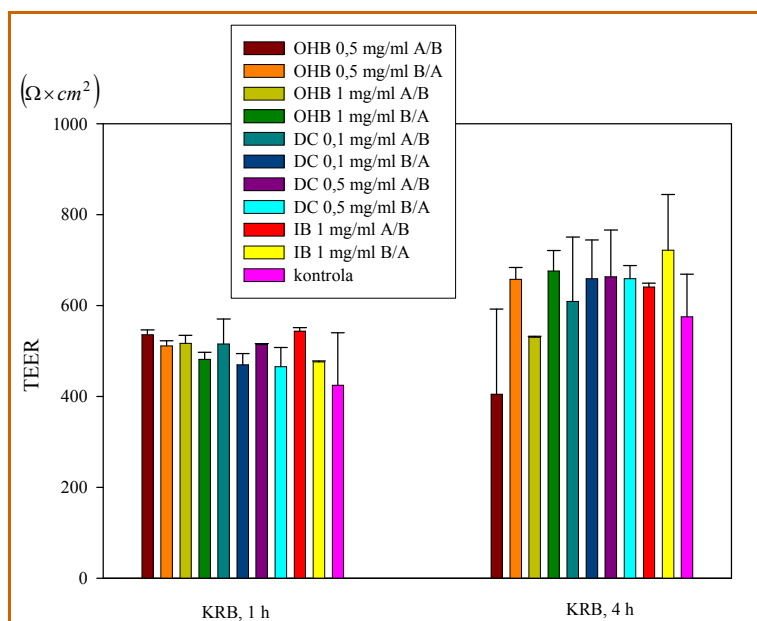
Ryc. 29. Wpływ badanych substancji na transport Rh-123 przez monowarstwę Caco-2: **a)** z kompartmentu apikalnego do bazolateralnego (A/B) i **b)** z kompartmentu bazolateralnego do apikalnego (B/A).



Ryc. 30. Współczynnik przenikania, P_{app} dla transportu Rh-123 przez monowarstwę Caco-2 w obecności OHB, DC i IB (transport w kierunku A/B i B/A).

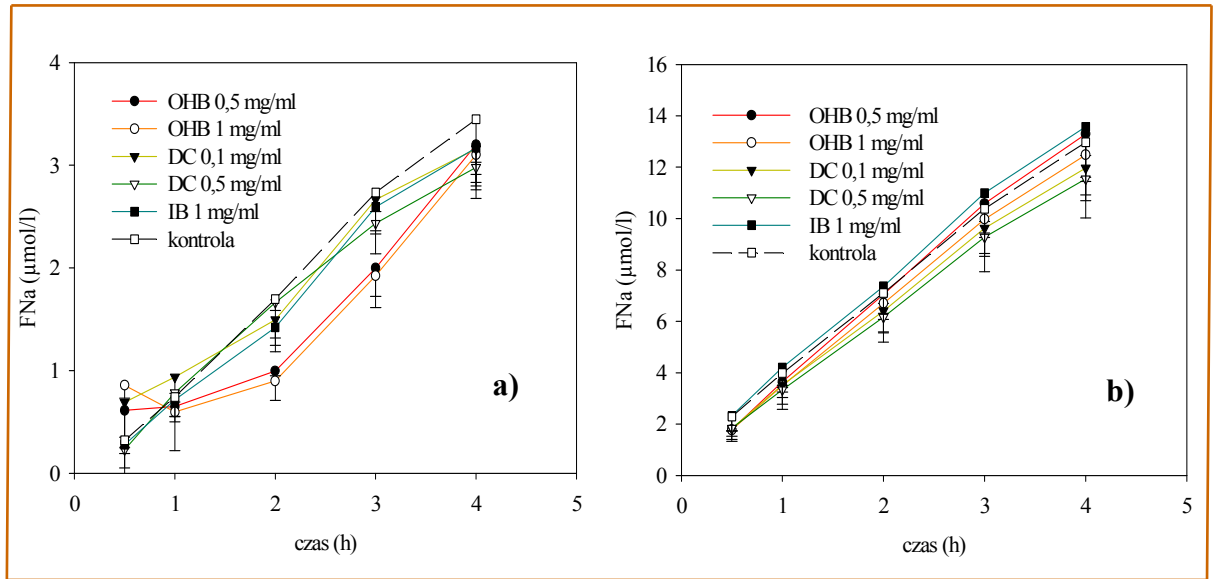
Szybkość transportu Rh-123 w kierunku kompartmentu apikalnego była wyższa niż w kierunku kompartmentu bazolateralnego. Wyjątek stanowił transport B/A w obecności DC w stężeniu 0,5 mg/ml (Ryc. 30). Obecna po stronie apikalnej monowarstwy komórek P-glikoproteina hamuje transport Rh-123 do ich wnętrza poprzez wypompowywanie jej z cytoplazmy na zewnątrz, w kierunku kompartmentu apikalnego. W obecności DC w stężeniu 0,5 mg/ml, funkcja P-gp jest zaburzona, stąd

większe ilości DC absorbowanego z kompartmentu donorowego pozostają w komórkach i nie podlegają transportowi na zewnątrz, do kompartmentu apikalnego. Jednocześnie, na podstawie pomiaru TEER (Metody, p. 6.4) stwierdzono, że warstwa komórek zachowała integralność w czasie trwania eksperymentu we wszystkich analizowanych roztworach (Ryc. 31).

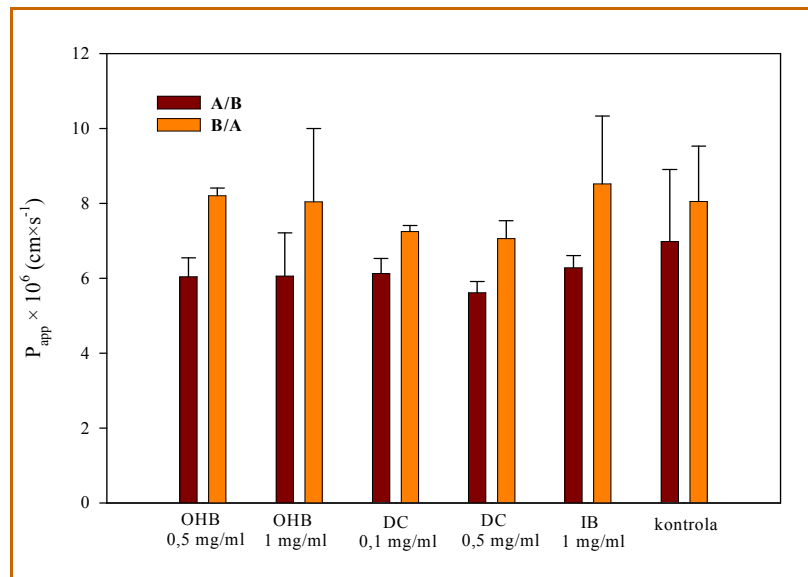


Ryc. 31. Wartości TEER mierzone po 1 h inkubacji w KRB oraz po zakończeniu badania przenikania (Rh-123).

Profile transportu FNa (Metody, p.6.4) przez monowarstwy komórek Caco-2 z kompartmentu apikalnego do bazolateralnego i w kierunku przeciwnym przedstawione są na ryc. 32, natomiast wartości P_{app} przedstawione zostały na ryc. 33.



Ryc. 32. Wpływ badanych substancji na transport FNa przez monowarstwę Caco-2: a) z kompartmentu apikalnego do bazolateralnego (A/B) i b) z kompartmentu bazolateralnego do apikalnego (B/A).

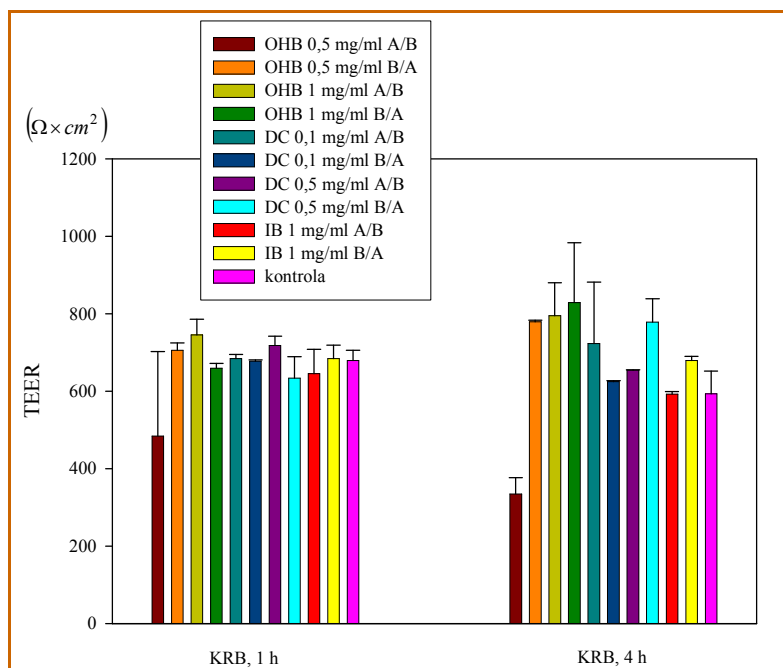


Ryc. 33. Współczynnik przenikania, P_{app} dla transportu FNa przez monowarstwę Caco-2 w obecności OHB, DC i IB (transport w kierunku A/B i B/A).

Odmienne niż dla transportu Rh-123, szybkość transportu FNa w każdym analizowanym przypadku była wyższa z kompartmentu bazolateralnego do apikalnego, jednak w obecności DC stwierdzono, że transport B/A jest nieco spowolniony.

Podobnie jak w przypadku komórek Caco-2, konfluentność została potwierdzona poprzez pomiar TEER (Ryc. 34).

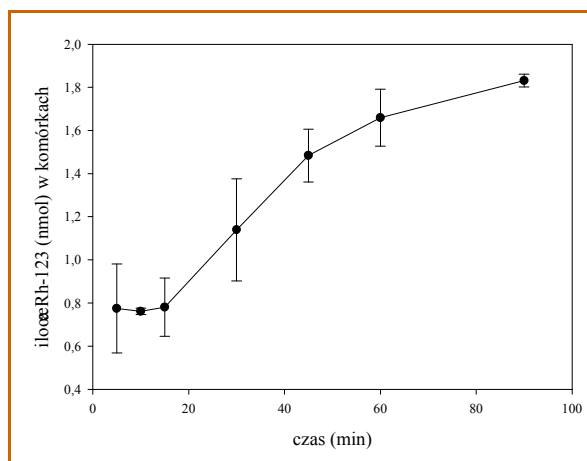
Podobieństwo wyników otrzymanych przed rozpoczęciem oraz po zakończeniu eksperymentu świadczy o zachowaniu właściwości monowarstw komórek Caco-2.



Ryc. 34. Wartości TEER mierzone po 1 h inkubacji w KRB oraz po zakończeniu eksperymentu (FNa).

3.2. Badanie wychwytu Rh-123, 4-Di-1-ASP oraz FNa przez komórki Caco-2

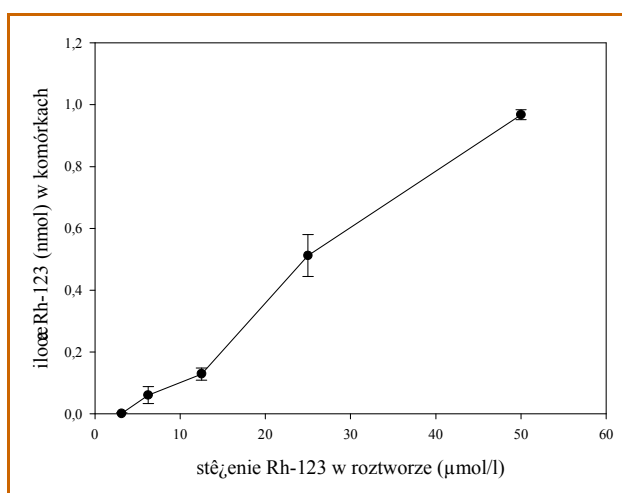
Zależność między ilością pobranej przez komórki Rh-123 a czasem inkubacji (Metody, p. 6.5) przedstawia ryc. 35.



Ryc. 35. Wpływ czasu inkubacji na wychwyty Rh-123 przez komórki Caco-2.

W czasie do 15 min nie następuje zwiększanie wychwyty, co jest związane z aktywnością P-gp. W przedziale czasowym 15 – 45 min ilość pobranej Rh-123 rośnie proporcjonalnie do czasu. Po 45 min, prawdopodobnie w związku z wysyceniem transporterów membranowych, szybkość transportu spada. Z tego względu dokonano wyboru czasu analizy transportu Rh-123 i innych substratów w zakresie 15 – 30 min, uznając ten przedział za najbardziej znaczący.

Zależność ilości Rh-123 oznaczonej w komórkach od stężenia Rh-123 w roztworze inkubacyjnym po 15 min inkubacji przedstawiona jest na ryc. 36.



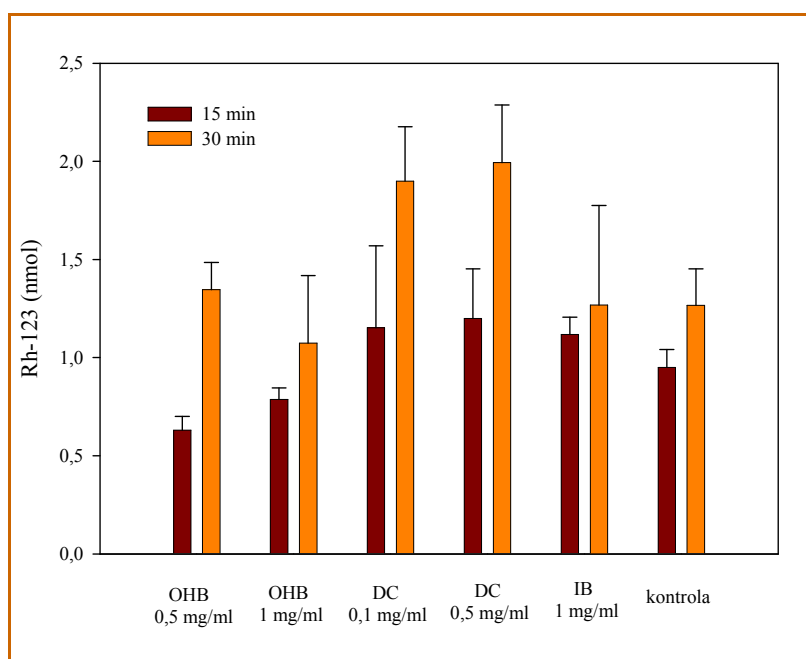
Ryc. 36. Wpływ stężenia Rh-123 w roztworze inkubacyjnym na ilość Rh-123 wykrywaną w komórkach Caco-2

Badanie wychwytu Rh-123 prowadzono przy stężeniu tego związku w medium 50 $\mu\text{mol/l}$. Stwierdzono liniową zależność pomiędzy stężeniem Rh-123 w medium, a ilościami znajdującymi w komórkach.

Poniżej przedstawiono wyniki eksperymentów prowadzonych w celu określenia wpływu badanych substancji na transport do komórek modelowych związków (Rh-123, FNa i 4-Di-1-ASP):

a) Wychwyt Rh-123 - 15 i 30 min inkubacji bez etapu preinkubacji (Metody, p. 6.5.a)

Wychwyt Rh-123 przez komórki w obecności OHB (0,5 i 1 mg/ml), DC (0,1 i 0,5 mg/ml) oraz IB (1 mg/ml) po 15 i 30 min eksperymentu przedstawiono na ryc. 37.



Ryc. 37. Wychwyt Rh-123 przez komórki Caco-2 w obecności OHB, DC i IB.

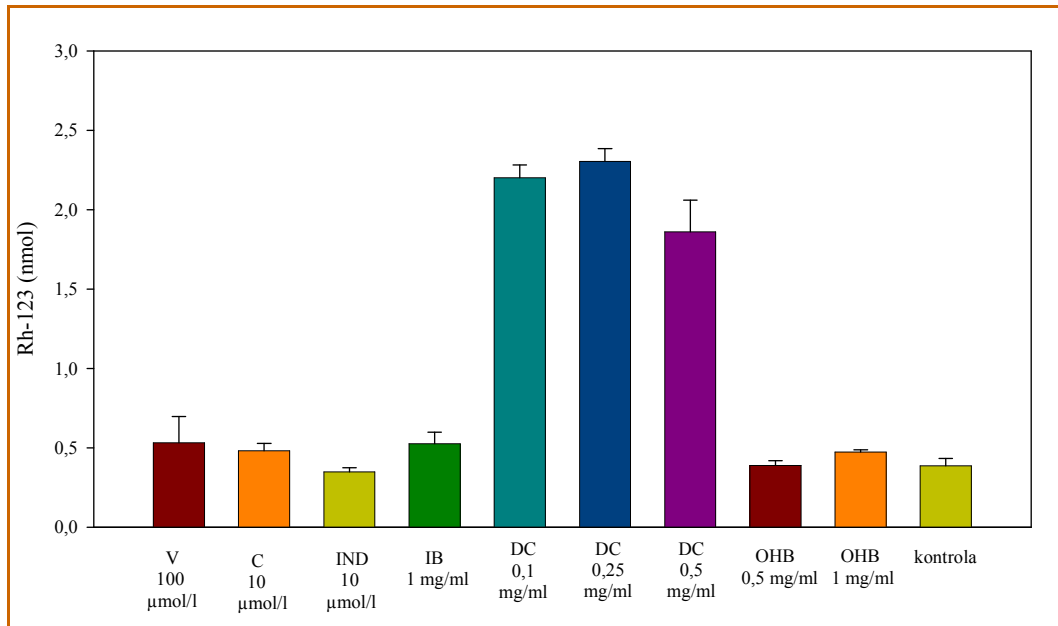
Podobnie jak w przypadku badania transportu transmembranowego, wychwyt Rh-123 przez komórki Caco-2 jest większy w obecności DC. Jest to zjawisko szczególnie wyraźne po 30 min eksperymentu, prawdopodobnie ze względu na fakt, iż transport Rh-123 jest zależny przede wszystkim od aktywności P-gp, która wymaga kilkuminutowej aktywacji poprzedzającej proces usuwania

ksenobiotyków z wnętrza komórki (Ryc. 35). Obecność OHB i IB pozostała bez wyraźnego wpływu na wychwyty Rh-123.

Pomiar stężenia Rh-123 w medium pobranym przed dokonaniem lizy komórek wykazał ok. 10% spadek stężenia po 30 min inkubacji.

b) Wychwyty Rh-123 lub FNa - 30 min preinkubacji i 30 min inkubacji (Metody, p. 6.5.b)

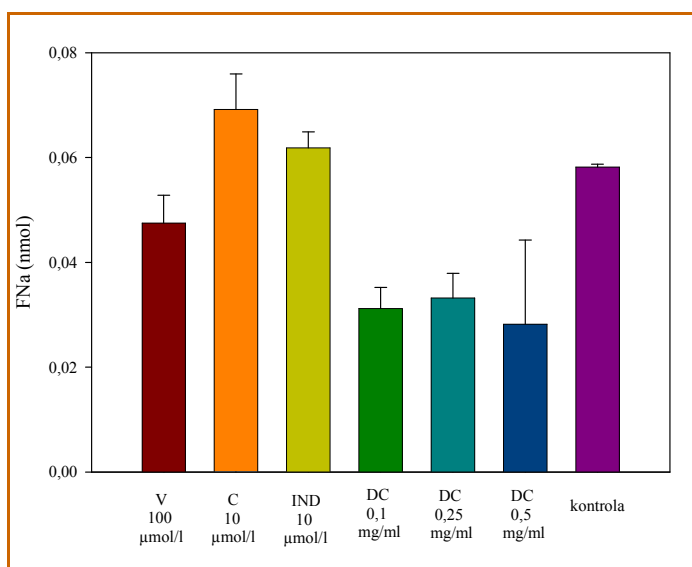
W celu dokładniejszego zbadania wpływu DC na wychwyty Rh-123, powtórzono eksperyment z zastosowaniem tego substratu zmieniając protokół analizy. Preinkubacja z badanymi związkami pozwoliła na aktywację P-gp zanim jeszcze do układu wprowadzono Rh-123. Tym sposobem uzyskano wyraźniejsze różnice w stosunku do kontroli. Wychwyty Rh-123 w obecności DC były znacząco większe w porównaniu z wychwytem Rh-123 w obecności znanych inhibitorów funkcji P-gp i MRP – chlorowodoru werapamilu, cyklosporyny A oraz indometacyny (Ryc. 38).



Ryc. 38. Wychwyty Rh-123 przez komórki Caco-2 w obecności IB, DC oraz OHB oraz chlorowodoru werapamilu (V), cyklosporyny A (C) i indometacyny (IND).

Wychwył FNa w obecności DC przedstawia ryc. 39. W związku z faktem, że w badaniach z udziałem Rh-123 nie stwierdzono wpływu obecności IB i OHB na wychwył komórkowy substratu, w doświadczeniach z FNa substancji tych nie uwzględniono.

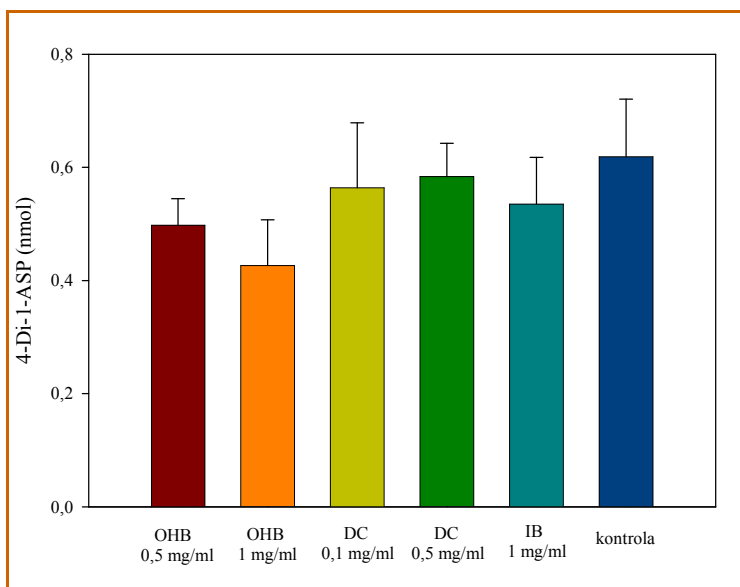
Mała ilość FNa wykrywana w lizacie komórek inkubowanych z DC świadczy, że obecność DC nie zwiększa przepuszczalności błon komórkowych. Zauważono nawet spadek wychwył FNa przez Caco-2 w obecności koniugatu.



Ryc. 39. Wychwył FNa przez komórki Caco-2 w obecności DC oraz chlorowodoru werapamilu (V), cyklosporyny A (C) i indometacyny (IND).

c) Wchwył 4-Di-1-ASP – 30 min inkubacji (Metody, p. 6.5.c)

Wyniki badania (Ryc. 40) świadczą, że w przeciwieństwie do wychwył Rh-123, w przypadku 4-Di-1-ASP nie wystąpiły znaczące różnice zależne od obecności DC w roztworze inkubacyjnym.



Ryc. 40. Wychwył 4-Di-1-ASP przez komórki Caco-2 w obecności OHB, DC i IB.

3.3. Test przeżywalności komórek

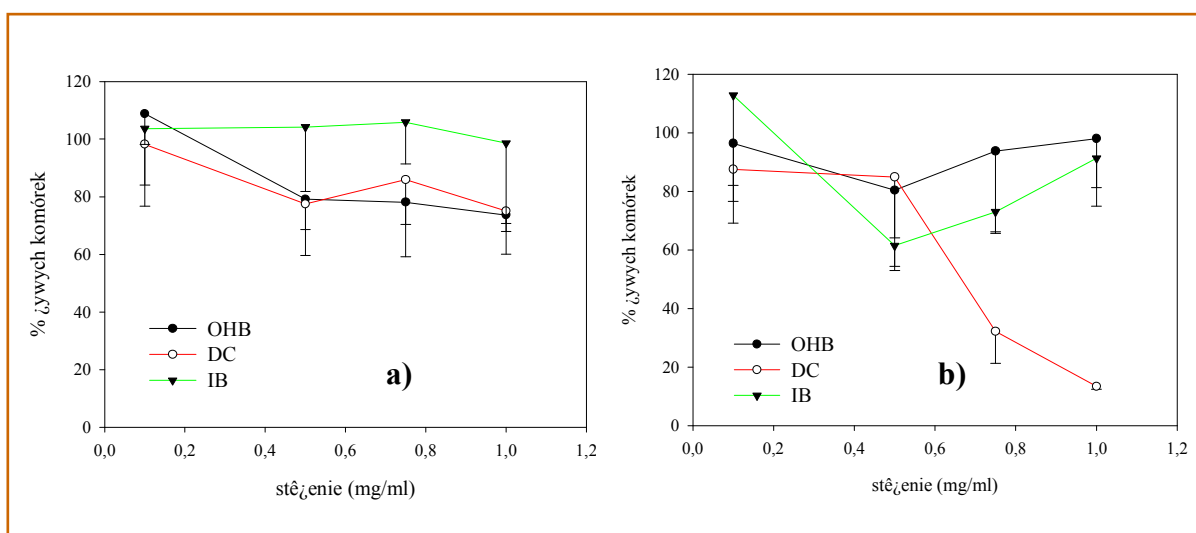
Wartości absorbancji ($\lambda = 570$ nm) roztworów inkubacyjnych (Metody, p. 6.6) przedstawiono w tabeli 16. Wartości zostały skorygowane przez odjęcie absorbancji prób kontrolnych (w nieobecności komórek) – 250,7 dla Caco-2 i 209,0 dla Calu-3.

Otrzymane wartości porównano z uzyskanymi dla kontroli – komórek inkubowanych w buforze niezawierającym substancji badanych. Na ich podstawie wyznaczono wyrażoną w % ilość żywych komórek (Ryc. 41).

Obecność OHB, DC i IB w medium w stężeniach 0,1 – 1 mg/ml nie wykazała wpływu na przeżywalność około 80% komórek Caco-2. W przypadku kultur Calu-3, zaobserwowano znaczny spadek przeżywalności w stężeniu DC > 0,5 mg/ml.

Tabela 16. Wartości absorbancji (\pm SD) uzyskane w teście przeżywalności komórek CellQuanti-MTT™ Cell Viability Assay Kits ($\lambda = 570 \text{ nm}$)

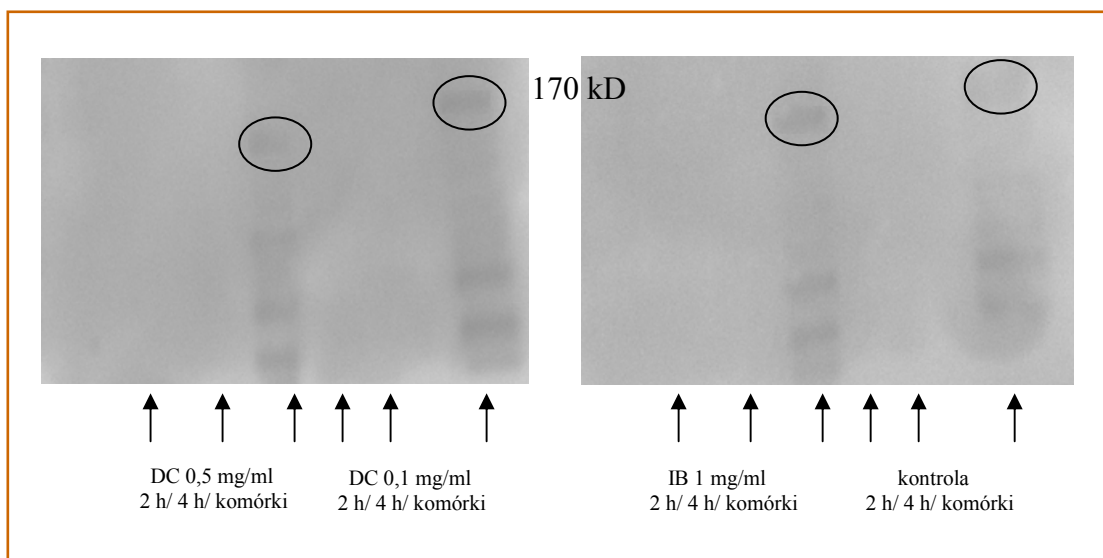
Substancja	Stężenie (mg/ml)	Caco-2	Calu-3
OHB	0,1	839 \pm 191	648 \pm 133
	0,5	610 \pm 151	541 \pm 175
	0,75	602 \pm 146	631 \pm 189
	1	568 \pm 105	659 \pm 156
DC	0,1	757 \pm 166	589 \pm 124
	0,5	597 \pm 68	571 \pm 140
	0,75	662 \pm 120	216 \pm 74
	1	578 \pm 55	90 \pm 7
IB	0,1	799 \pm 42	759 \pm 207
	0,5	803 \pm 172	413 \pm 58
	0,75	816 \pm 112	491 \pm 46
	1	760 \pm 215	614 \pm 67
kontrola	-	771 \pm 85	673 \pm 86



Ryc. 41. Przeżywalność komórek (Caco-2 – a i Calu-3 – b) w obecności różnych stężeń OHB, DC i IB.

3.4. Wykrywanie P-gp metodą Western Blot

Ryc. 42 przedstawia przykładowe sygnały otrzymane w wyniku analizy metodą Western Blot z mediów inkubacyjnych oraz ekstraktów komórkowych (Metody, p. 6.7). Przedstawiono wyniki uzyskane dla komórek inkubowanych z DC i IB.



Ryc. 42. Przykładowe sygnały P-gp uzyskane dla medium (2 i 4 h) i lizatu komórek Caco-2 poddanych inkubacji z DC lub IB.

Nie wykazano obecności P-gp w mediach inkubacyjnych. Obecność P-gp została natomiast potwierdzona w lizatach komórkowych (sygnał dla wartości 170 kDa). Nie stwierdzono różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi z komórek inkubowanych z DC, IB, OHB a próbą kontrolną. Obserwacje wskazują, że wpływ DC na P-gp nie polega na jej uwalnianiu z membrany na zewnątrz komórek, a jedynie na zmianie jej funkcji.

4. WŁAŚCIWOŚCI SPORZĄDZONYCH PREPARATÓW

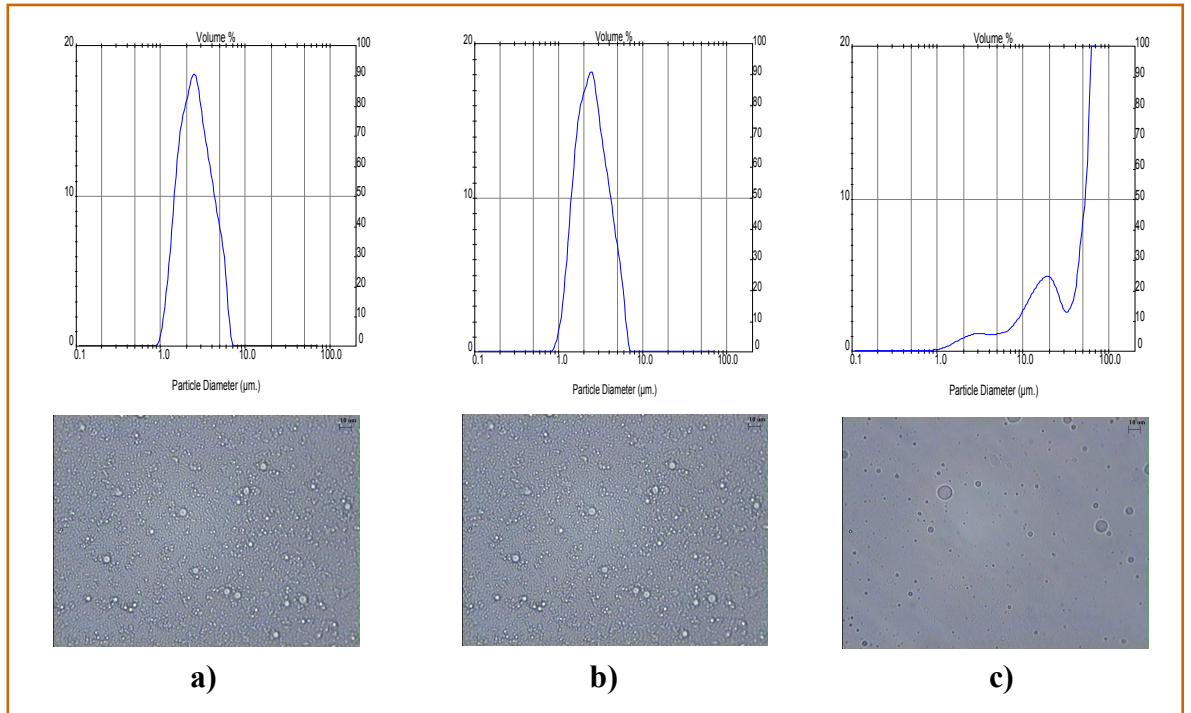
4.1. Wybór metody wyjaławiania

W celu spełnienia wymagań farmakopealnych dotyczących preparatów pozajelitowych, wobec sporządzonych preparatów (olejowy roztwór DC oraz emulsja z DC), zastosowano sączenie wyjaławiające (sączek o średnicy porów 0,22 μm), oraz, w przypadku emulsji, wyjaławianie termiczne w autoklawie (Metody, p. 7.1 i 7.2). W obu przypadkach technicznie możliwe było zastosowanie sączenia wyjaławiającego, jednak zastosowanie tej metody w odniesieniu do emulsji, prowadziło do zwiększania wielkości kropelek olejowych (Ryc. 43), a nawet do łączenia się ich i rozdziału faz. Zmian tych nie zauważono po wyjałowieniu termicznym emulsji.

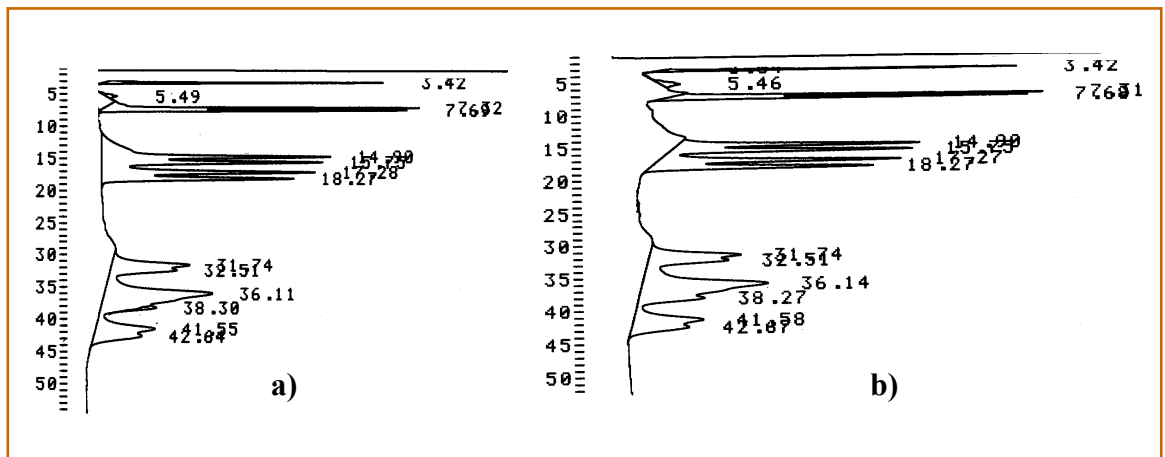
W celu wykazania trwałości DC podczas wyjaławiania termicznego, próbki emulsji poddano analizie HPLC. Przykładowe chromatogramy preparatu przed i po wyjaławianiu przedstawiono na ryc. 44.

Wpływ wyjaławiania termicznego na wielkość reprezentatywnych pików DC przedstawiony jest na ryc. 45. Zarówno wygląd, jak i wielkość pików nie uległy zmianie, co wskazuje, że podczas wyjaławiania termicznego nie dochodzi do rozkładu DC.

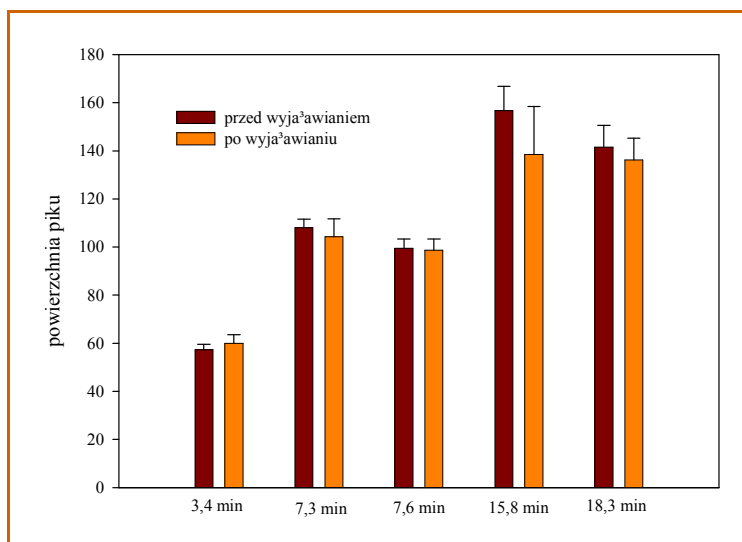
Sączenie wyjaławiające zastosowane wobec olejowego roztworu DC nie spowodowało żadnych zmian wizualnych i mikroskopowych. Podobnie, powierzchnia pików chromatograficznych nie uległa istotnym zmianom. Obserwowane różnice wielkości pików nie przekraczały 3 - 5% i nie tworzyły wyraźnego trendu w jakimkolwiek kierunku.



Ryc. 43. Wielkość kropelek olejowych zmierzona przy pomocy dyfraktometru laserowego oraz obraz mikroskopowy emulsji: a – bezpośrednio po sporządzeniu, b – po wyjaławianiu w autoklawie, c – po wyjaławianiu przez sączenie.



Ryc. 44. Chromatogramy rozcieńczonych emulsji z DC przed (a) i po (b) wyjaławianiu termicznym.



Ryc. 45. Porównanie powierzchni wybranych pików chromatograficznych DC przed i po wyjaławianiu w autoklawie.

4.2. Trwałość preparatów

Emulsje i roztwory olejowe z DC przechowywano w temperaturze 4°C i w ciągu 90 dni poddawano analizie fizykochemicznej (Metody, p. 7.3).

W czasie obserwacji roztwór olejowy nie wykazywał żadnych widocznych zmian, natomiast po 14 dniach zauważono oznaki śmietankowania emulsji. Łagodne wstrząśnięcie fiolek pozwalało na odtworzenie jednorodności układu. Ponadto ocena wizualna obu typów preparatów przeprowadzona po 6 miesiącach od ich sporządzenia nie wykazała oznak utraty trwałości. Tabela 17 przedstawia porównanie wielkości kropeł olejowych i pH emulsji w okresie badania oraz stężenie DC w roztworze olejowym i emulsji. Wielkość kropeł olejowych, pH emulsji, a także stężenie DC w preparatach pozostawały bez zmian w okresie badania stabilności.

Tabela 17. Charakterystyka roztworu olejowego DC i emulsji 10% w okresie przechowywania (temp. 4°C)

Preparat	Okres przechowywania (dni)	Stężenie DC (mg/ml)	pH	Wielkość kropeł olejowych (µm)	
				d(0,5)	d(0,9)
Roztwór olejowy DC (250 mg/ml)	0	248,7 ± 6,50*	nb	nb	nb
		246,2 ± 6,35**			
	7	242,9 ± 10,15			
	30	243,0 ± 8,50			
	90	239,9 ± 9,95			
Emulsja z DC (100 mg/ml)	0	100,3 ± 0,90*	6,12 ± 0,05*	1,46 ± 0,09*	2,59 ± 0,18*
		100,1 ± 1,05**	6,0 ± 0,06**	1,35 ± 0,05**	2,5 ± 0,2**
	7	99,1 ± 1,00	6,05 ± 0,08	1,72 ± 0,15	2,75 ± 0,25
	30	88,6 ± 8,05	6,11 ± 0,07	1,35 ± 0,14	2,82 ± 0,21
	90	97,0 ± 7,5	6,10 ± 0,09	1,38 ± 0,14	2,98 ± 0,25

* przed wyjaławianiem, ** po wyjaławianiu, nb – nie badano
d(0,5) – mediana średnicy, d(0,9) – maksymalna średnica 90% kropeł

Stężenie lizynianu ibuprofenu w roztworze wodnym zastosowanym jako preparat referencyjny, poddany podobnie jak emulsje wyjaławianiu termicznemu, oznaczano za pomocą spektroskopii UV-Vis. Wykazano, że wyjaławianie termiczne nie prowadziło do zmiany wartości absorbancji przy długości fali $\lambda=264$ nm.

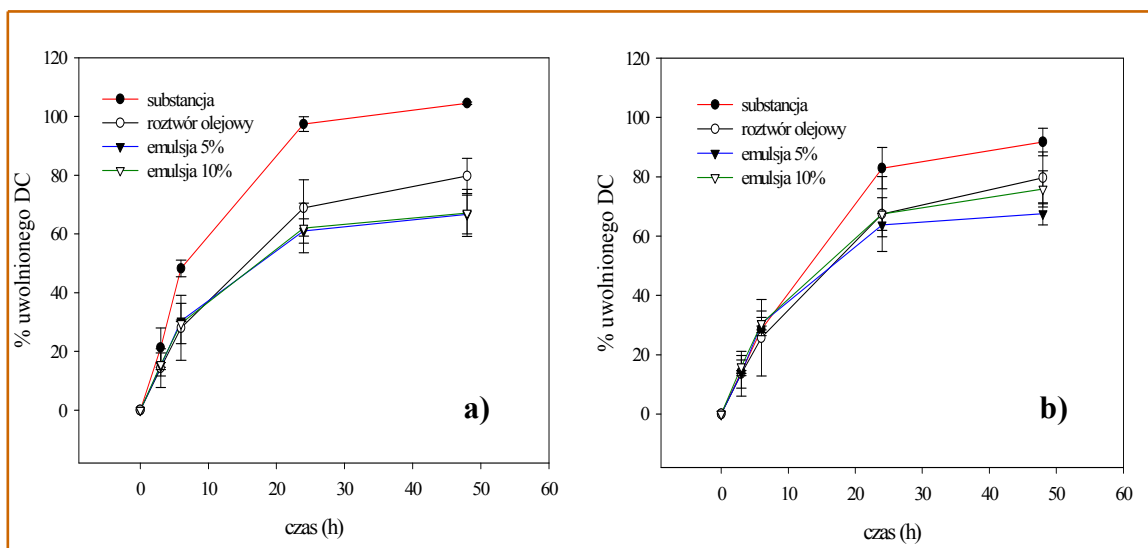
4.3. Uwalnianie DC z postaci leku - badania *in vitro*

Profile uwalniania DC ze sporządzonych preparatów do buforu pH 7,5 (Metody p. 7.4) przedstawione są w tabeli 18 i na ryc. 46. Porównawczo przedstawiono też szybkość rozpuszczania i dyfuzji przez błonę dializacyjną DC (substancji). Profile te zostały wyznaczone w oparciu o powierzchnię dwóch pików o czasie retencji $t_R = 7,3$ i

7,6 min (Ryc. 22b). Na podstawie piku o czasie retencji $t_R = 3,2$ min wyznaczono także szybkość uwalniania IB.

Tabela 18. Uwalnianie IB oraz DC z substancji, roztworu olejowego oraz emulsji do buforu pH 7,5 – obliczenia dla DC wykonano na podstawie pików chromatograficznych $t_R = 7,3$ i $7,6$ min

Czas retencji piku	Czas (h)	% uwolnionej dawki			
		Substancja	Roztwór olejowy	Emulsja 5%	Emulsja 10%
IB (3,2 min)	3	1,2	1,0	0,8	0,8
	6	1,9	1,6	1,1	1,2
	24	3,8	2,8	1,7	2,8
	48	3,9	3,1	1,8	3,1
DC (7,3 min)	3	21,3	14,3	15,1	15,6
	6	48,2	28,0	30,4	29,5
	24	97,4	68,9	61,0	62,0
	48	104,5	79,7	66,6	67,2
DC (7,6 min)	3	14,2	13,6	13,8	16,0
	6	28,6	25,8	30,5	30,6
	24	82,9	67,4	63,8	67,5
	48	91,7	79,7	67,5	75,9

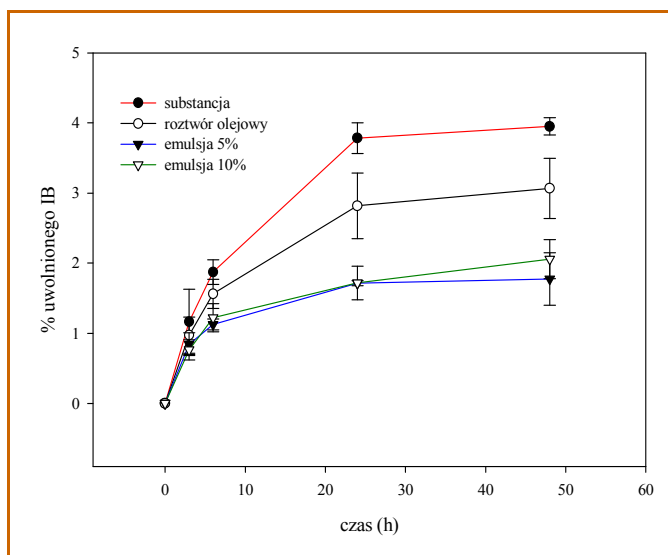


Ryc. 46. Profile uwalniania DC obliczone na podstawie pików: **a)** 7,3 min i **b)** 7,6 min.

Stężenia DC w płynie akceptorowym obliczone na podstawie powierzchni obu pików są porównywalne. Jedynie w przypadku DC w formie substancji obserwowano różnice w zależności od wykorzystywanego w obliczeniach pików. Ponieważ jednak we wszystkich pozostałych przypadkach uzyskiwano, niezależnie od czasu retencji pików, zbliżone wartości stężeń, nie traktowano stwierdzonej niezgodności jako negującej prawidłowość metody.

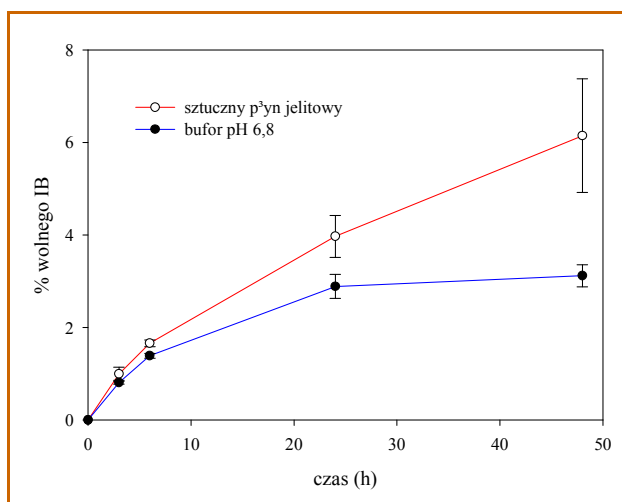
W czasie 24 h z każdego analizowanego preparatu uwalnia się ponad 60% DC, a uwalnianie z emulsji jest nieco wolniejsze niż z roztworu olejowego. Nie wykazano różnic pomiędzy szybkością uwalniania DC pomiędzy emulsją 5 i 10%. Jednocześnie obserwowano szybszą dyfuzję DC z substancji (powyżej 80% całkowitej ilości w ciągu 24 h).

Ryc. 47 przedstawia profil uwalniania IB z badanych preparatów oraz z substancji. Po 48 h badania uwolnieniu uległo maksymalnie 4% IB. W ciągu pierwszych godzin trwania eksperymentu barierę błony dializacyjnej pokonywał przede wszystkim wolny IB, którego zawartość w DC wynosi około 2,5% całkowitej ilości IB. Następnie, na skutek powolnej hydrolizy DC powstawały niewielkie ilości IB, co powodowało nieznaczny wzrost stężenia IB w płynie akceptorowym.



Ryc. 47. Profile uwalniania IB z koniugatu w formie substancji, roztworu olejowego oraz emulsji.

Ryc. 48 przedstawia porównanie profilu uwalniania IB z olejowego roztworu DC do buforu pH 6,8 oraz do sztucznego płynu jelitowego (zawierającego pankreatynę, pH 6,8; Metody, p. 5.4).



Ryc. 48. Profile uwalniania IB z olejowego roztworu DC.

W czasie 0 - 12 h, szybkość uwalniania IB jest podobna niezależnie od użytego płynu akceptorowego. Wiąże się to z obecnością w koniugacie 2,5% wolnego IB, który jest w pierwszej kolejności transportowany przez błonę dializacyjną. Po uwolnieniu nieskoniugowanego IB, jego stężenie w użytych buforze pH 6,8 nie zmienia się.

Dopiero w obecności enzymów obserwuje się dalszy wzrost stężenia IB w płynie akceptorowym jako wynik enzymatycznej hydrolizy DC.

5. BADANIA *in vivo*

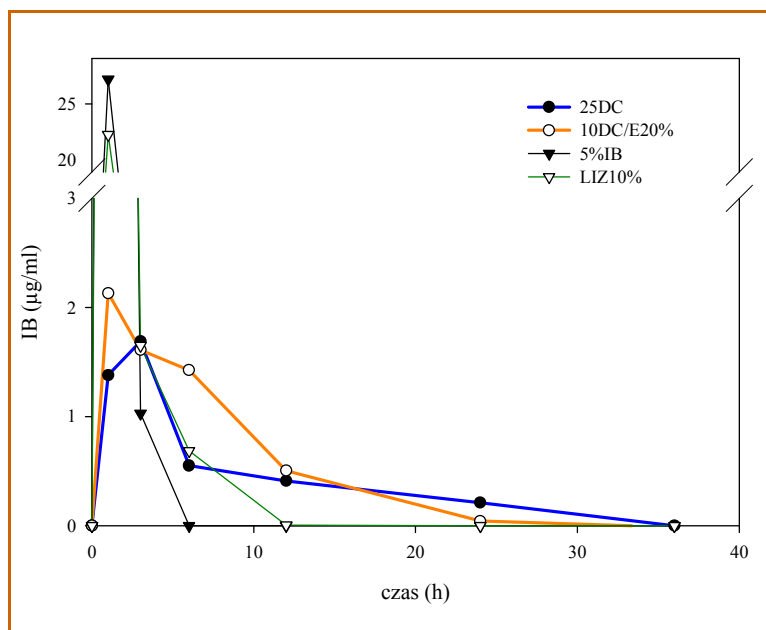
Badania wstępne farmakokinetyki DC (Metody, p. 8.1) przeprowadzono na królikach dla 25% roztworu olejowego DC oraz 20% emulsji typu o/w zawierającej 10% DC. Preparaty te porównywano z 5% roztworem IB w oleju Miglyol oraz 10% wodnym roztworem lizynianu ibuprofenu. Wykorzystując krzywą wzorcową przedstawioną w rozdziale 1.2 (Wyniki), wyznaczono stężenia ibuprofenu w badanych próbkach osocza (Tabela 19, Ryc. 49).

Tabela 19. Stężenia IB ($\mu\text{g/ml}$) w osoczu zwierząt (wartości c_{max} zaznaczono kolorem czerwonym) oraz wartości AUC ($\bar{x} \pm SD, n=3$)

Preparat	D_{IB}	Czas (h)											AUC
		1	3	6	12	24	36	48	72	96	120	168	
25DC	40	1,38 \pm 0,20	1,69 \pm 0,78	0,55 \pm 0,1	0,41 \pm 0,26	0,21 \pm 0,22	0,0	-	0,0	-	0,0	-	15,01 \pm 7,56
10DC/ E20%	40	2,13 \pm 1,13	1,61 \pm 0,74	1,42 \pm 0,27	0,50 \pm 0,22	0,04* \pm 0,01	0,0	0,0	0,0	-	0,0	-	18,69 \pm 6,86
5%IB	25	27,1 4 \pm 6,57	1,03 \pm 0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-	-	43,28 \pm 10,1
LIZ10%	25	22,2 6 \pm 5,80	1,65 \pm 0,89	0,68 \pm 0,33	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-	-	40,65 \pm 12,41

D_{IB} - dawka w przeliczeniu na IB (mg/kg m.c.)

* wartość poniżej granicy oznaczalności



Ryc. 49. Profile stężeń IB w osoczu królików – badanie wstępne.

Maksymalne stężenia IB w osoczu uzyskiwane po podaniu preparatów DC, mimo stosowanej wyższej dawki, są znacząco (około 10-krotnie) niższe niż po podaniu IB w formie wolnej lub w formie lizynianu. Jednocześnie zauważyć można przedłużone uwalnianie IB z DC przez okres do 24 h, kiedy w osoczu oznacza się jeszcze IB pochodzący z rozkładu DC, natomiast nie wykrywa się go w osoczu królików otrzymujących IB w formie nieskoniugowanej. Podobne profile stężeń uzyskano dla obu stosowanych preparatów ibuprofenu: roztworu olejowego IB oraz wodnego roztworu lizynianu ibuprofenu. Wartości EBA preparatów zawierających DC w stosunku do preparatów z IB lub lizynianem IB osiągnęły podobne wartości około 25%. W drugim etapie badań z udziałem większej liczby zwierząt skrócono czas badania, a jako preparat odniesienia stosowano tylko roztwór olejowy IB (5%IB).

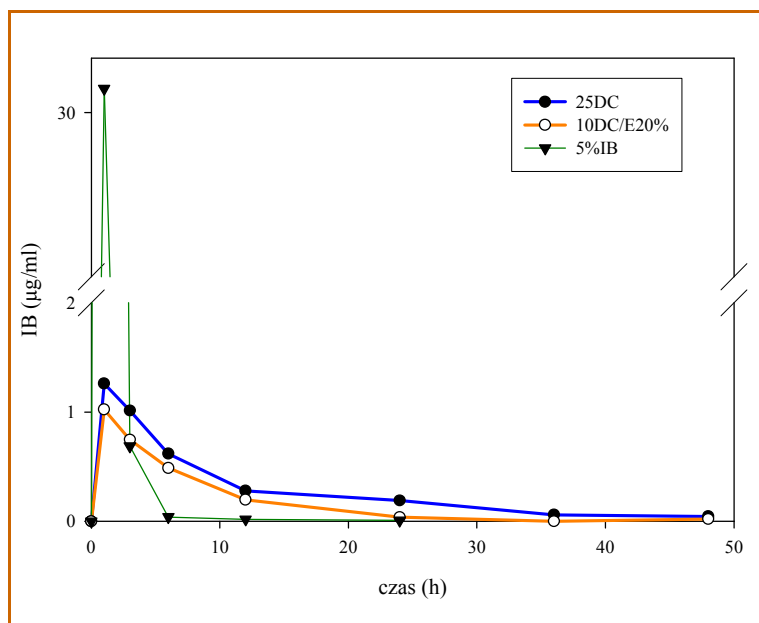
W głównym badaniu ocenie poddano następujące preparaty: 25DC, 10DC/E20% oraz 5% IB (Metody p. 8.2). Profile stężeń ibuprofenu uzyskane w osoczu królików przedstawione są w tabeli 20 i na ryc. 50.

Tabela 20. Stężenia IB ($\mu\text{g/ml}$) w osoczu poszczególnych zwierząt (wartości c_{max} zaznaczono kolorem czerwonym) oraz wartości AUC (wartości z pól zacięniowanych na kolor szary nie uwzględniano)

Nr królika	Płeć	Podany preparat (D_{IB})	Czas (h)							AUC ($\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$)
			1	3	6	12	24	36	48	
1	♀	25DC (40)	1,24	0,58	0,45	0,23	0,71	0	0,00	7,43
2	♀		1,10	1,17	0,61	0,18*	0,25	0	0,00	11,98
3	♀		0,82	0,55	0,46	0,15*	0,11*	0	0,00	7,40
4	♂		0,87	0,79	0,60	0,67	0,29	0	0,00	15,51
5	♂		1,68	1,61	1,00	0,28	0,20	0,36	0,25	25,47
6	♂		1,86	1,38	0,60	0,15*	0,08*	0	0,02*	11,57
Średnia \pm SD			1,26 \pm 0,42	1,01 \pm 0,44	0,62 \pm 0,20	0,28 \pm 0,20	0,19 \pm 0,09	0,06 \pm 0,14	0,04 \pm 0,1	13,23 \pm 6,74
7	♂	10DC/ E20% (40)	1,19	0,72	0,41	0,19*	0,02*	0,00	0,00	7,43
8	♂		0,88	0,38	0,34	0,18*	0,06*	0,00	0,03*	6,58
9	♂		1,58	1,33	0,63	0,13*	0,03*	0,00	0,00	10,18
10	♀		0,28	0,16*	0,20	0,18*	0,03*	0,00	0,09*	
11	♀		0,91	0,97	0,75	0,31	0,03*	0,00	0,00	10,24
12	♀		0,56	0,32	0,30	0,19*	0,04*	0,00	0,00	5,15
Średnia \pm SD			1,02 \pm 0,38	0,74 \pm 0,42	0,49 \pm 0,19	0,20 \pm 0,06	0,04 \pm 0,01	0,00	0,02 \pm 0,04	7,92 \pm 2,25
13	♀	5%IB (25)	37,36	2,07	0,01*	0,00	0,01*			61,47
14	♀		25,28	0,90	0,14*	0,10*	0,00			40,80
15	♀		54,74	0,72	0,08*	0,00	0,00			85,21
16	♂		10,01	0,04*	0,00	0,00	0,00			15,12
17	♂		19,47	0,06*	0,00	0,00	0,00			29,35
18	♂		38,41	0,33	0,00	0,00	0,03*			58,82
Średnia \pm SD			30,88 \pm 15,91	0,69 \pm 0,76	0,04 \pm 0,06	0,02 \pm 0,04	0,01 \pm 0,01			48,46 \pm 25,15

D_{IB} - dawka w przeliczeniu na IB (mg/kg m.c.)

* wartość poniżej granicy oznaczalności



Ryc. 50. Profile stężeń IB w osoczu królików w II etapie badań *in vivo* (wartości średnie dla $n=6$)

Uzyskane parametry farmakokinetyczne pozwalają na stwierdzenie różnic popartych wynikiem analizy statystycznej (Metody, p. 8.3) pomiędzy preparatami DC a olejowym roztworem IB. Dla przyjętego poziomu istotności $p = 0,05$, pomiędzy roztworem olejowym DC a emulsją nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w żadnym z punktów pomiarowych, statystycznie nieistotna jest też różnica pomiędzy wartościami AUC oraz c_{max} uzyskanymi dla obu preparatów zawierających DC.

Uzyskane wartości EBA w stosunku do 5%IB wynosiły odpowiednio 17,0 i 10,0% dla roztworu olejowego DC i emulsji z DC.

V. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Prace, których celem jest tworzenie nowych, potencjalnie „lepszyc” nośników polimerowych należą do najczęściej podejmowanych we współczesnej farmacji. Są one obiektem zainteresowania naukowców, jak też firm farmaceutycznych dążących do posiadania w swoim asortymencie leków nowoczesnych, bezpiecznych, wytwarzanych zgodnie z najbardziej aktualną wiedzą i z zastosowaniem substancji pomocniczych wykazujących odpowiednie właściwości fizykochemiczne i farmaceutyczne. Polimery, zarówno te będące nośnikami niezwiązanej z nimi chemicznie substancji leczniczej, jak też tworzące koniugaty znajdują się niewątpliwie w obszarze ciągle rosnącego zainteresowania ośrodków naukowych i przemysłowych. Koniugaty leków z nośnikami polimerowymi nie wykazują zazwyczaj aktywności farmakologicznej, natomiast ich hydroliza prowadzi do uwolnienia substancji czynnej. Mają więc charakter proleków.

W technologii leku pozajelitowego stosuje się biogodne i biodegradowalne polimery (np. kwas polimlekowy, PEG), które umożliwiają uzyskanie pożądanyc właściwości farmakokinetycznych substancji leczniczych. Istotne jest, także z punktu widzenia technologii, zwiększenie rozpuszczalności w wodzie będące konsekwencją połączenia hydrofobowej cząsteczki aktywnej z hydrofilowym polimerem. Koniugacja z polimerami umożliwia także zwiększenie okresu biologicznego półtrwania, zmniejsza poziom odpowiedzi immunologicznej, co ogólnie przyczynia się do uzyskania wyższej skuteczności terapii [3, 4].

Stosowane współcześnie koniugaty substancji leczniczych z polimerami w przeważającym stopniu oparte są na PEG. Jest to wynik potwierdzonych korzystnych właściwości tej grupy polimerów. Z drugiej jednak strony, w porównaniu do licznych doniesień literaturowyc wskazujących na szerokie możliwości zastosowań PEG [9, 12], ilość zarejestrowanych preparatów jest niewielka. Wynika to niewątpliwie z wysokich kosztów badań rozwojowych, ponieważ koniugaty traktowane są jako nowe substancje lecznicze. W konsekwencji rysuje się pewne ograniczenie, które sprowadza PEGylację do techniki związanej z preparatami stosowanymi w niektórych tylko, z reguły rzadkich schorzeniach, których leczenie jest już i tak kosztowne. Ze względu na wymagane nakłady finansowe, trudne jest wprowadzanie modyfikowanych polimerami cząsteczek leków tańszych, stosowanych w leczeniu powszechnie występujących schorzeń np. o podłożu zapalnym. Podejmowanie takich prób jest jednak wskazane ze względów terapeutycznych i naukowych. W tym kontekście uzasadnione są realizowane przez Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN prace mające na celu otrzymanie koniugatów leków przeciwzapalnych, w tym ibuprofenu, z nietoksycznym i

biozgodnym nośnikiem polimerowym. Funkcję takiego nośnika spełnia oligomer zbudowany z 3–5 jednostek kwasu 3-hydroksymasłowego. Za wyborem tej substancji przemawia fakt, iż jest ona produktem metabolizmu mikroorganizmów naturalnie bytujących w organizmie człowieka oraz poznana jest droga metabolizmu prowadząca do utworzenia nietoksycznych produktów [102].

Realizację tematu zapoczątkowano badając podstawowe właściwości fizykochemiczne otrzymanego w Centrum koniugatu OHB z ibuprofenem. Właściwości te są decydujące przy wyborze potencjalnych dróg aplikacji. Początkowo, oprócz drogi pozajelitowej rozważano także możliwość podania doustnego prowadzącego do uzyskania przedłużonego uwalniania w wyniku hydrolizy w jelicie cienkim. Zbadano rozpuszczalność koniugatu w wodzie, 0,1 mol/l roztworze kwasu solnego oraz w buforach w zakresie pH 6,0 – 8,0 (Wyniki, p. 2.1). Uzyskane wartości rozpuszczalności (Tabela 13) potwierdzają, że DC jako słaby kwas lepiej rozpuszcza się w roztworach alkalicznych, bardzo słabo natomiast w wodzie oraz w roztworze kwasu solnego. W porównaniu z wolnym IB rozpuszczalność jest wyższa w roztworach buforowanych, niższa natomiast w wodzie i 0,1 mol/l roztworze kwasu solnego.

Wobec takich właściwości zasadne wydaje się być rozważanie doustnej drogi podania jako możliwej do wykorzystania. W przypadku koniugatu zawierającego ibuprofen problemem jest jednak konieczność stosowania wysokich dawek, a przez to podawania dużych objętości DC w dawce jednorazowej. Biorąc pod uwagę, że IB stanowi około 35% masy DC, w celu podania przynajmniej 400 mg IB (nie uwzględniając szybkości hydrolizy), ilość koniugatu wynosi około 1200 mg, co wzięwszy pod uwagę półstałą konsystencję substancji sprawiłoby trudności technologiczne i aplikacyjne. Interesująca jednak wydawała się być perspektywa podania proleku nierozpuszczalnego w soku żołądkowym i uzyskania celowanego uwalniania w jelicie cienkim. Rozwiązanie takie, stosowane w przypadku tabletek o opóźnionym uwalnianiu wykorzystuje się powszechnie w technologii niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wykazujących działanie drażniące na błonę śluzową przewodu pokarmowego [87].

Pozostałe parametry fizykochemiczne ($\log P$ i pK_a) potwierdzają, że koniugat ibuprofenu z oligo(kwasem 3-hydroksymasłowym) jest związkiem umiarkowanie lipofilowym ($\log P = 1,22$) o charakterze słabego kwasu. Wyznaczona stała dysocjacji pK_a ma wartość 6,1. Badanie rozpuszczalności wskazuje na bardzo dobrą rozpuszczalność koniugatu w oleju Miglyol 812, oleju rącznikowym oraz w wybranych

rozpuszczalnikach organicznych (metanol, etanol, chloroform), co ma znaczenie w kontekście analitycznym i technologicznym.

Analiza zawartości IB oraz DC w sporządzonych preparatach farmaceutycznych, płynach akceptorowych oraz w osoczu krwi wykonana została metodą HPLC. O ile analizy IB dokonać można stosując różnorodne układy chromatograficzne [145], o tyle problemem było znalezienie metody odpowiedniej do analizy DC i zawartego w nim nieskoniugowanego IB. Po wstępnej selekcji wytypowano kilka układów chromatograficznych różniących się rodzajem zastosowanych kolumn oraz faz ruchomych, a ostatecznie wybrano układ opisany w p. 4.1 (Metody). Zaletą wybranej metody był stosunkowo krótki czas analizy oraz dobre parametry walidacyjne w odniesieniu do oznaczania IB: powtarzalność, liniowość oraz czułość (Tabela 11). W przypadku analizy DC parametry walidacyjne nie były tak dobre jak w odniesieniu do IB (Tabela 11), jednak za zastosowaniem metody przemawia dobry rozdział koniugatów o różnych masach cząsteczkowych. Jednocześnie wykazano, że kwas oligo(3-hydroksymasłowy) nie daje w warunkach metody żadnych pików chromatograficznych (Ryc. 22c). Na chromatogramach DC, obok wyraźnego pików nieskoniugowanego IB, rejestrowane są w czasie do ok. 50 min liczne piki, które odpowiadają cząsteczkom koniugatów o rosnących masach cząsteczkowych. W przypadku koniugatów z dłuższymi łańcuchami oligomerowymi ($t_R > 18$ min) obserwowano gorszy rozdział pików chromatograficznych, stąd nie wykorzystywano ich w obliczeniach stężenia DC. Pozwoliły one natomiast na analizę mechanizmu hydrolizy koniugatu w warunkach przeprowadzanych eksperymentów. Wykazano, że czas retencji poszczególnych cząsteczek koniugatu zależy od długości łańcucha oligomerowego. Badania hydrolizy potwierdziły, że najdłuższy czas retencji charakteryzuje cząsteczki DC o najwyższej masie, a ich ilość w miarę postępu hydrolizy ulega zmniejszeniu w sposób najbardziej zauważalny (Ryc. 27).

Analizę zawartości IB w osoczu przeprowadzono z zastosowaniem podobnej metody, z tą różnicą, że do etapu przygotowania próbki włączono ekstrakcję do fazy stałej (SPE) oraz zastosowano wzorzec wewnętrzny (indometacynę). O wyborze wzorca wewnętrznego zdecydowały doniesienia literaturowe [134], których autorzy wykorzystywali IND. W analizie IB w osoczu próbowano wykorzystać także inne substancje, w tym naproksen [146, 147], jednak ze względu na niewielki odzysk (około 30%), ostatecznie jako wzorzec wewnętrzny wybrano indometacynę. Jednocześnie porównując technikę przygotowania próbki z zastosowaniem procesu ekstrakcji przez

wytrząsanie z rozpuszczalnikiem organicznym z ostatecznie wybraną techniką ekstrakcji do fazy stałej wykazano, że ze względu na bogatą matrycę próbki, zwłaszcza o charakterze białkowym, wprowadzenie etapu ekstrakcji do fazy stałej jest niezbędne. Etap ten umożliwił uzyskanie dobrze rozdzielonych, symetrycznych pików IB (Ryc. 24). Metodę oceniono jako powtarzalną, dokładną, odpowiednio czułą i zapewniającą właściwą wykrywalność analitu (Tabela 12). Obliczony na podstawie odrębnego eksperymentu odzysk analitów (odpowiednio 73 i 83% dla IB i IND) był podobny lub nieco niższy niż podawany w dostępnej literaturze [134, 147, 151].

Testowana wcześniej metoda polegająca na ekstrakcji przez wytrząsanie chloroformem z zakwaszonego osocza, a następnie odparowywaniu rozpuszczalnika i rozpuszczaniu pozostałości w metanolu [134] umożliwiała co prawda rozdział analitu od wzorca wewnętrznego, jednak powtarzalność analiz budziła zastrzeżenia. Problemy analityczne związane były przede wszystkim z żelowaniem osocza w obecności chloroformu oraz trudnością właściwego określenia powierzchni pików analizowanych substancji wskutek pojawiania się pików dodatkowych oraz interferencji z obecnymi w próbce składnikami osocza.

Opracowana metoda analityczna pozwoliła na farmakokinetyczną ocenę sporządzonych postaci leku oraz samego koniugatu. Uzyskanie liniowej i charakteryzującej się wysokim współczynnikiem determinacji ($R^2 = 0,9999$) zależności pomiędzy stosunkiem powierzchni pików IB do IND, a stężeniem IB umożliwiło dokładne wyznaczenie profilu stężeń IB w próbkach osocza, a przez to dokonanie analizy procesu hydrolizy DC w warunkach *in vivo*.

Badanie hydrolizy DC w roztworach o różnych wartościach pH pozwoliło na wytypowanie potencjalnych dróg podania proleku. Wprawdzie pożądanym był efekt przedłużonego działania, jednak ze względu na właściwości farmakokinetyczne i farmakologiczne IB, w celu uzyskania efektu terapeutycznego po podaniu systemowym konieczne jest uzyskanie właściwego stężenia we krwi. W artykule przeglądowym Davies [148] wskazuje, że uzyskiwane maksymalne stężenia IB w osoczu po podaniu doustnym lub doodbytniczym dawki 200 – 600 mg leku osiągają wartość powyżej 20 mg/l. Oznacza to, że w pierwszej godzinie po podaniu leku, we krwi musi znaleźć się około 100 mg wolnego IB. Biorąc pod uwagę szybkość hydrolizy w sztucznym płynie jelitowym można ocenić, że wymagałoby to podania w jednorazowej dawce bardzo dużej ilości koniugatu. Niewielka szybkość hydrolizy enzymatycznej powoduje jednocześnie, że ze względu na ograniczony czas przebywania substancji w przewodzie

pokarmowym, większość podanego proleku uległaby wydaleniowi przed uwolnieniem cząsteczki IB. Przedstawione fakty pozwoliły na wyeliminowanie z dalszych rozważań drogi doustnej jako potencjalnej drogi podania i ocenę drogi pozajelitowej.

Wykazano, że DC nie ulega rozkładowi w roztworach o szerokim zakresie pH, z wyjątkiem roztworów silnie zasadowych, niewystępujących w warunkach fizjologicznych. Dopiero w wysokiej temperaturze (90°C) obserwowano szybką hydrolizę DC (Tabela 15).

Analiza chromatogramów (Ryc. 22b) wykazuje, że proces hydrolizy koniugatu rozpoczyna się od wiązań pomiędzy poszczególnymi jednostkami oligomeru, najtrwalsze pozostaje wiązanie z cząsteczką IB. Takie zachowanie koniugatu jest przyczyną uzyskiwania niewielkich stężeń IB w badaniu hydrolizy enzymatycznej w sztucznym płynie jelitowym oraz w osoczu. Dostępne piśmiennictwo wskazuje, że metodą na przewycięzenie tego zjawiska jest wprowadzenie pomiędzy łańcuch oligomeru a cząsteczkę IB spejsera, czyli niewielkiej cząsteczki tworzącej zarówno z częścią aktywną, jak i polimerową wiązania podatne na hydrolizę [3].

Poza badaniami nad właściwościami fizykochemicznymi, w tym istotnymi dla technologii produktu, przeprowadzono doświadczenia mające na celu określenie wpływu DC na komórki *in vitro*. Do badań wytypowano komórki linii Caco-2 przede wszystkim ze względu na rozważaną początkowo możliwość wykonania postaci leku doustnego z DC oraz opisywane przez wielu autorów właściwości tej linii komórkowej jako niezwykle cennego modelu w badaniach biofarmaceutycznych [106, 108]. Na podstawie dostępnej literatury [131, 133] założono, że OHB lub DC mogą wywierać wpływ na funkcję transporterów błonowych znajdujących się w apikalnej błonie komórkowej. Funkcją tych transporterów, należących do grupy MRP, jest ochrona komórek przed niekorzystnym wpływem ksenobiotyków poprzez związane z nakładem energetycznym wypompowywanie ich z cytoplazmy na zewnątrz. Ponieważ wykazano, że niektóre polimery mają wpływ na funkcję tych białek, a w szczególności P-gp, wykonano serię eksperymentów dotyczących wpływu badanych związków na szybkość transportu i wychwytu substratu P-gp, rodaminy-123. Zgodnie z przewidywaniami, obliczając wartości P_{app} dla Rh-123 (Ryc. 30), wykazano, że w związku z aktywnością P-gp po stronie apikalnej, transport zachodzi intensywniej w kierunku od strony bazolateralnej do kompartmentu apikalnego. Transport do kompartmentu apikalnego jest wspomagany aktywnością P-gp, natomiast gdy substrat przenika do komórek od strony apikalnej, aktywność P-gp wywiera na przenikanie efekt hamujący.

W omawianym przypadku działanie P-gp dotyczy Rh-123, która dostaje się do cytoplazmy na zasadzie transportu biernego [149] od strony bazolateralnej i jest aktywnie transportowana na zewnątrz, do kompartmentu apikalnego, lub wypompowywana z powrotem do kompartmentu apikalnego, w przypadku, gdy płyn donorowy znajduje się po stronie apikalnej warstwy komórek.

Zaobserwowano, że tylko w obecności DC w stężeniu 0,5 mg/ml funkcja P-gp jest zaburzona, a transport Rh-123 przebiega szybciej od strony apikalnej do bazolateralnej. Podobnego zjawiska nie obserwowano zarówno dla nieskoniugowanego IB, jak też dla OHB, co świadczy o wysokiej specyficzności działania DC na białko transportowe. Jednocześnie wykazano, że integralność komórek została zachowana, co pozwala na wnioskowanie, że ich żywotność nie została ograniczona (Ryc. 31). Wykonane doświadczenie kontrolne z udziałem FNa, której transport nie zależy od funkcji P-gp nie wykazało wpływu DC, stąd założono, że działanie DC dotyczy wyłącznie P-gp. W celu potwierdzenia uzyskanych w badaniach transportu wstępnych wniosków, wykonano także badanie wychwytu Rh-123 oraz innych substratów (4-Di-1-ASP oraz FNa) przez komórki Caco-2 w obecności DC, IB, OHB oraz znanych inhibitorów P-gp. Wprowadzono także etap preinkubacji z inhibitorami przed dodaniem Rh-123, co pozwoliło na aktywację P-gp jeszcze przed wprowadzeniem substratu. Eksperyment pozwolił na jednoznaczne potwierdzenie wpływu DC na funkcję nośnika (Ryc. 38). W obecności koniugatu zaobserwowano znaczące (kilkukrotne) zwiększenie kumulacji Rh-123 w komórkach.

Zastre i wsp. [131] wykazali, że niskocząsteczkowe kopolimery PEG z poli(kaprolaktonem) hamują funkcję P-gp silniej od werapamilu. Obserwowany efekt rośnie wraz ze wzrostem stężenia polimeru, a po przekroczeniu pewnej wartości ponownie maleje. Podobny efekt zaobserwowano dla DC (Ryc. 38). Zmniejszenie efektu hamującego, widoczne przy wyższych stężeniach DC, jest między innymi skutkiem śmierci pewnej ilości komórek, która przy stężeniu DC 0,5 mg/ml dotyczy około 20% populacji (Ryc. 41).

Hamowanie funkcji P-gp, białka odpowiedzialnego za ograniczone wchłanianie wielu leków, daje możliwość rozwoju badań nad DC jako substancją zwiększającą absorpcję ksenobiotyków. Dotyczy to zwłaszcza leków o charakterze dużych, hydrofobowych kationów [115], w tym o działaniu przeciwnowotworowym. Należy podkreślić, że hamowanie funkcji P-gp wykazano jedynie dla koniugatu, żadnego efektu nie zaobserwowano natomiast w obecności IB i wolnego oligomeru. Ponadto aktywność

DC w stosunku do P-gp obserwuje się przy stosunkowo niewielkim stężeniu (0,1 mg/ml), a jak wykazano, hydroliza do IB i OHB jest powolna, stąd istnieje szansa wykorzystania DC także jako substancji podawanej równolegle z lekami, których wchłanianie mogłoby ulec zwiększeniu. Konieczne byłoby jednak przeprowadzenie dalszych badań i optymalizacja dawki. Istniejące substancje o podobnych właściwościach wobec P-gp (np. werapamil, cyklosporyna A) nie dają tak silnego efektu hamującego, co tym bardziej zachęca do podjęcia tego kierunku badań. Jednocześnie spodziewać się można, że DC po podaniu doustnym nie posiada własnego działania przeciwzapalnego ze względu na powolną hydrolizę ograniczającą wchłanianie.

Wykazano, że działanie DC nie sprowadza się do niszczenia P-gp lub destrukcji błony komórkowej, co prowadzi do uwolnienia białek transportowych. Analiza metodą Western Blot przeprowadzona po inkubacji komórek Caco-2 w roztworach DC o różnych stężeniach wykluczyła obecność P-gp w płynie inkubacyjnym. Jednocześnie po mechanicznym zniszczeniu błon (sonikacja) wykazano, że uwalnia się z nich białko o masie 170 kD, które odpowiada P-glikoproteinie (Ryc. 42).

Istotnym zagadnieniem, które rozpatruje się wprowadzając do leczenia jakiegokolwiek nowy związek chemiczny, jest jego toksyczność. Badanie toksyczności ostrej poprzedzone jest ze względów etycznych i ekonomicznych badaniem cytotoxyczności wobec odpowiedniego modelu komórkowego. W prowadzonych badaniach wykonano test cytotoxyczności wobec dwóch linii komórkowych (Caco-2 i Calu-3), których przydatność w tego typu eksperymentach była wielokrotnie potwierdzona [110, 127]. Wobec komórek linii Caco-2 nie wykazano toksyczności ani DC, ani OHB, istotny jest natomiast spadek przeżywalności komórek Calu-3 w obecności DC w stężeniu powyżej 0,5 mg/ml. Pohjala i wsp. [111] różnice we wrażliwości tych linii komórkowych wykazali wobec 5-fluorouracylu, podczas gdy nie obserwowano ich np. wobec kamptotecyny. Jednak w przeciwieństwie do DC, cytotoxyczność 5-fluorouracylu zaznaczała się silniej w przypadku komórek Caco-2 niż Calu-3. Oznacza to, że prawidłowe i miarodajne wnioskowanie zapewnia dopiero przeprowadzenie badania cytotoxyczności z udziałem kilku modeli komórkowych. Wykazana wobec komórek Calu-3 cytotoxyczność DC w stężeniu powyżej 0,5 mg/ml (około 0,9 mmol/l) oraz brak cytotoxyczności wobec komórek Caco-2 w stężeniu do około 2 mmol/l wskazują, że DC można uznać za związek nie wykazujący cytotoxyczności. Podkreślić należy również, że wobec żadnej z badanych w niniejszej

oraz poprzednich pracach [100, 102] linii komórkowych nie wykazano toksyczności OHB, co umożliwi rozpatrywanie koniugatów leków z OHB w kategoriach związków bezpiecznych. Juzwa i wsp. [100] wykazali co prawda wysoką cytotoksyczność koniugatu OHB z kwasem acetylosalicylowym, taki efekt nie był jednak obserwowany dla badanego w niniejszej pracy koniugatu OHB z IB (Ryc. 41). Jednocześnie w badaniach *in vivo* koniugatu OHB z kwasem acetylosalicylowym zaobserwowano niższą od wolnego kwasu acetylosalicylowego toksyczność ostrą [100]. Zaznaczyć jednak należy, że badanie toksyczności na szczurach dotyczyło podania *per os*, co, biorąc pod uwagę wyniki przeprowadzonych badań hydrolizy koniugatu, może być efektem wydalenia znacznej ilości podanego związku przed jego wchłonięciem do krwi.

Po zakończeniu badań związanych z określeniem podstawowych właściwości fizykochemicznych DC oraz jego wpływu na linie komórkowe Caco-2 i Calu-3, przystąpiono do technologicznego etapu realizacji tematu. Ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność w wodzie oraz brak zasadności podawania doustnego DC, podjęto próbę wykonania pozajelitowych preparatów do podania domięśniowego. Obecnie w leczeniu stosuje się do podania i.m. nie tylko roztwory wodne, ale też roztwory olejowe i emulsje. Jednym z olejów dopuszczonych do podania pozajelitowego jest półsyntetyczny olej złożony z trójglicerydów nierozgałęzionych kwasów tłuszczowych (Miglyol) [8]. Podanie domięśniowe preparatów olejowych skutkuje utworzeniem w tkance rezerwuaru, z którego lek ulega powolnej dyfuzji. Formy olejowe są odpowiednie zwłaszcza dla substancji nierozpuszczalnych w wodzie. W Polsce dostępne są roztwory olejowe takich substancji leczniczych jak estradiol, testosteron czy dekanonian zuklopentyksolu. W tej formie lek może być podawany raz na dwa lub cztery tygodnie [152]. W przypadku DC, powolnego uwalniania IB z proleku spodziewać się należało nie tylko z powodu nośnika olejowego, ale przede wszystkim na skutek powolnej hydrolizy enzymatycznej w miejscu wstrzyknięcia.

Wytypowano dwie postacie leku z DC: roztwór w oleju Miglyol (25% m/m) oraz emulsję typu o/w (10 lub 20% oleju) zawierającą 5 lub 10% (m/m) koniugatu. Wyboru rozpuszczalnika dokonano w oparciu o przeprowadzone badania, które wykazały, że rozpuszczalność DC jest większa w Miglyolu niż w oleju roślinnym (np. rycynowym), a uzyskany roztwór charakteryzuje się lepkością porównywalną z lepkością roztworów wodnych, co zapewnia dobre właściwości aplikacyjne. W przypadku roztworu olejowego, obok rozpuszczalnika i badanego związku, do układu nie wprowadzano substancji dodatkowych, a sporządzanie preparatu polegało na

rozpuszczaniu DC w oleju w temperaturze około 50°C. W przypadku emulsji dodawano polisorbitat (jako emulgator) oraz glicerol (substancja izotonizująca). Emulsję homogenizowano w temp. 60°C za pomocą mieszadła szybkoobrotowego, co pozwoliło na uzyskanie kropeł olejowych o średnicy < 2 μm, a więc zbliżonych do wielkości kropeł obserwowanych w emulsjach submikronowych [8]. Ponieważ otrzymane układy emulsyjne wykazywały odczyn bliski obojętnemu (Tabela 17), nie było konieczności korekty pH.

W celu spełnienia podstawowego dla leków pozajelitowych wymagania jałowości, sporządzone preparaty poddano wyjaławianiu. W przypadku roztworu olejowego brano pod uwagę wyłącznie możliwość wyjaławiania przez sączenie, natomiast dla emulsji dokonano wyboru pomiędzy sączeniem wyjaławiającym a wyjaławianiem nasyconą parą wodną. Wykorzystanie metody sączenia wyjaławiającego dla emulsji często kończy się niepowodzeniem ze względu na zwiększoną lepkość układu. W przypadku emulsji z DC doszło do koalescencji kropeł fazy olejowej, co uniemożliwiło zastosowanie tej metody. Zjawiska tego nie obserwowano w przypadku wyjaławiania termicznego w autoklawie (Ryc. 43) i tę metodę wytypowano jako właściwą.

Dla wyboru termicznej metody wyjaławiania, kluczowe jest określenie trwałości preparatu i samej substancji leczniczej w warunkach wyjaławiania. Wykazano, że wybrane parametry procesu nie wpływają negatywnie na wielkość kropeł olejowych i pH emulsji, jak też na trwałość samego koniugatu [153]. Nie obserwowano również zmian w czasie przechowywania (90 dni, temp. 4°C, Tabela 17). Obserwowano wprawdzie śmietankowanie układów emulsyjnych po 14 dniach od przygotowania, jednak po wstrząśnięciu powracały one do pierwotnej postaci. Analiza chromatograficzna nie wykazała także powstawania produktów rozkładu, a powierzchnia pików DC nie uległa zmianie (Tabela 17).

Wykonano badanie uwalniania DC ze sporządzonych preparatów w warunkach *in vitro*. Profil uwalniania DC z preparatów porównywano z profilem przenikania przez błonę dializacyjną samej substancji, którą umieszczano bezpośrednio w worku dializacyjnym. Wykazano, że DC jako substancja szybciej rozpuszcza się i ulega dyfuzji przez błonę niż DC rozpuszczony w oleju lub w emulsji – w przypadku tych form po 48 h wykazywano obecność w płynie akceptorowym nie więcej niż 60 – 80% DC (Ryc. 46). Do oznaczenia stężenia DC w płynie akceptorowym wykorzystywano pole powierzchni dwóch pików chromatograficznych pochodzących od koniugatów IB

z monomerem lub dimerem kwasu 3-hydroksymasłowego ($t_R = 7,3$ i $7,6$ min), których przydatność analityczna została wykazana.

Analizie poddano także ilość uwolnionego we wszystkich przypadkach ibuprofenu. Po 48 h uwolnieniu uległo około 1,5 – 4% IB (Ryc. 47), co potwierdza wcześniejsze obserwacje wskazujące na bardzo powolną hydrolizę DC. Przypomnieć należy, że wykazano, iż 2,5% IB zawartego w próbce koniugatu pozostaje w formie niezwiązanej z OHB. Istnienie wolnej frakcji leku jest przyczyną wzrostu stężenia IB w płynie akceptorowym w pierwszych godzinach badania uwalniania. Porównując uwalnianie IB z roztworu olejowego DC do buforu pH 6,8 z uwalnianiem do sztucznego płynu jelitowego (Ryc. 48), zauważyć można w obu przypadkach wzrost ilości uwalnianego IB do osiągnięcia około 3% zawartości deklarowanej, po czym, dla pozbawionego enzymów płynu akceptorowego następuje zasadnicze spowolnienie uwalniania, natomiast dla płynu zawierającego pankreatynę, ilość uwalnianego IB rośnie w czasie, co jest związane z postępującą hydrolizą enzymatyczną DC.

Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie właściwości sporządzonych preparatów w warunkach *in vitro*. Określona w ten sposób charakterystyka produktu nie wystarcza dla przewidzenia farmakokinetyki *in vivo*. Istotnym zagadnieniem w badaniach rozwojowych postaci leku staje się wykazanie korelacji *in vitro/in vivo* [154]. Sporządzone preparaty podawano pozajelitowo (i.m.) królikom. W badaniach wstępnych wykorzystano 12 zwierząt, którym podawano domięśniowo sporządzone postaci leku z DC: 25% roztwór olejowy (25DC) i emulsję o/w zawierającą 10% DC (10DC/E20%). Jako preparaty odniesienia użyto 5% roztwór olejowy IB (5%IB) oraz 10% wodny roztwór lizynianu ibuprofenu (LIZ10%). Wybór preparatów odniesienia związany był z przewidywanym spowolnionym uwalnianiem IB z roztworu olejowego w stosunku do roztworu wodnego. W drugim etapie, na podstawie wyników otrzymanych w badaniu wstępnym, nie podawano preparatu LIZ10%. Jednocześnie skrócono czas badania. Modyfikacja ta uzasadniona była brakiem oznaczalnej ilości IB w osoczu w badaniach wstępnych po 36 h w przypadku podania preparatów DC.

Dawki podawanych preparatów w przeliczeniu na IB dobrano w oparciu o doniesienia literaturowe [134, 146]. W cytowanych doniesieniach podawano jednorazowo 15 – 25 mg IB/kg masy ciała zwierzęcia, co w przeliczeniu na koniugat daje ilość około 40 – 70 mg/kg. Decyzję o zwiększeniu dawki do 120 mg DC/kg (równowartość około 40 mg IB) podjęto ze względu na spodziewaną powolną hydrolizę DC.

Właściwe badanie farmakokinetyczne przeprowadzono z udziałem 18 zwierząt podzielonych na 3 grupy (Tabela 8). Każda grupa zwierząt składała się z równej ilości samic i samców, co pozwoliło na wyeliminowanie ewentualnych różnic w farmakokinetyce związanych z płcią. Aplikowano: 25% roztwór olejowy DC (około 1,3 ml), emulsję typu o/w zawierającą 10% DC (około 3 ml) oraz 5% roztwór olejowy IB (około 1,5 ml). Stosunkowo duże objętości wstrzyknięć wynikały z konieczności osiągnięcia założonej dawki IB. Pomimo tego, w trakcie podawania preparatów nie zaobserwowano trudności, a zachowanie królików nie wskazywało na szczególną bolesność wstrzyknięć. Oznaczone w osoczu stężenia IB dla poszczególnych zwierząt przedstawia tabela 20, natomiast parametry farmakokinetyczne IB wyznaczone po podaniu badanych preparatów przedstawione są w tabeli 21.

Tabela 21. Farmakokinetyczne parametry oznaczone dla IB po podaniu IB lub DC w różnych postaciach farmaceutycznych (wstrzyknięcie i.m.) w badaniu na królikach

Parametr	25DC roztwór olejowy	10DC/E20% emulsja	5%IB roztwór olejowy	LIZ 10%* roztwór wodny
Dawka w przeliczeniu na IB (mg/kg)	40	40	25	25
c_{max} (µg/ml)	1,27 ± 0,4	1,04 ± 0,4	30,88 ± 15,9	22,26 ± 5,8
t_{max} (h)	1	1	1	1
AUC (µg/ml·h)	13,23 ± 6,7	7,92 ± 2,2	48,46 ± 25,1	40,65±12,41
EBA (%)**	17,0	10,0		

* wyniki uzyskane w badaniach wstępnych

** wartości obliczone w stosunku do 5%IB

Po podaniu DC maksymalne wartości stężeń IB w osoczu uzyskiwano po 1 h lub najpóźniej po 3 h (tylko w przypadku dwóch królików, Tabela 20), natomiast po wstrzyknięciu preparatu IB, c_{max} uzyskiwano w każdym przypadku po 1 h. Osiągnięcie maksymalnych stężeń w osoczu już w czasie 1 h po dokonaniu wstrzyknięcia DC jest prawdopodobnie związane z obecnością wolnej frakcji IB (około 2,5%). Można tak wnioskować porównując wartości c_{max} dla preparatów IB i DC. Jeżeli podana byłaby dawka IB 1 mg/kg m.c. (odpowiadająca dawce wolnego IB w DC), to można byłoby się

spodziewać wartości c_{\max} około 1 $\mu\text{g/ml}$ (co wynika z oznaczonego c_{\max} ok. 25 $\mu\text{g/ml}$ po podaniu dawki IB 25 mg/kg m.c.).

Znaczne różnice w stężeniach IB w osoczu wykazywane zwłaszcza w czasie 1 h po podaniu roztworu IB wynikają głównie z różnic osobniczych. Maksymalne stężenie substancji leczniczej obserwowane jest we krwi w pewnym przedziale czasowym [146], a jego dokładne wyznaczenie wymaga częstego próbkowania. Ponieważ celem doświadczenia było porównanie profilu farmakokinetycznego podanego domięśniowo IB z profilem uzyskanym po podaniu proleku o przedłużonym uwalnianiu, próbki pobierano stosunkowo rzadko.

Podobnie jak w badaniach *in vitro*, w warunkach *in vivo* następuje powolna hydroliza DC, wskutek której niewielkie ilości IB oznaczane są w osoczu jeszcze w 12 h po podaniu preparatu. Po 12 h w przypadku preparatów z DC i po 3 – 6 h w przypadku roztworu IB uzyskiwano wartości stężeń poniżej granicy oznaczalności. Wartości te uwzględniano jednak w obliczeniach AUC. Prowadząc analizę chromatograficzną dokonywano dwukrotnego nastrzyku każdej z analizowanych próbek, nie obserwując różnic w wielkości pików IB.

Profile farmakokinetyczne w zależności od rodzaju podanego preparatu z DC (emulsja, roztwór olejowy) były podobne (Ryc. 50). Dla emulsji uzyskano wprawdzie niższą wartość AUC, jednak zastosowane testy statystyczne nie wykazały istnienia istotnych różnic pomiędzy roztworem olejowym, a emulsją z DC, co wynika przede wszystkim z istnienia znacznych odchyłeń od wartości średnich, związanych z różnicami osobniczymi. Również w badaniu pilotowym nie wykazano różnicy wartości AUC po podaniu obu preparatów (Tabela 19).

Efekt przedłużonego uwalniania IB z DC widoczny jest zarówno w przypadku roztworu olejowego, jak i emulsji z DC. Biodostępność IB z formy skoniugowanej z OHB wyrażona wielkością AUC jest jednak znacząco niższa. Porównując średnią wartość AUC wyznaczoną dla roztworu IB (48,5 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) z wartościami uzyskanymi dla preparatów z DC (odpowiednio 13,2 i 7,9 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ dla roztworu olejowego i emulsji), stwierdzono, że względna dostępność biologiczna (EBA) preparatów koniugatu, po uwzględnieniu różnicy dawek, wynosi odpowiednio 10% i 17%. Tak niska wartość EBA po podaniu pozajelitowym może być wytłumaczona obserwowaną w badaniach *in vitro* bardzo powolną hydrolizą DC, który gromadzi się po wstrzyknięciu w tkance mięśniowej i uwalnia IB powoli, tak że po kilkudziesięciu godzinach stężenie IB w osoczu znajduje się poniżej granicy wykrywalności, podczas

gdy znaczna część DC pozostaje nadal w tkance mięśniowej w formie niezmienionej. Na podkreślenie zasługuje, że w tym przypadku powolna hydroliza enzymatyczna obserwowana w warunkach *in vitro*, została potwierdzona *in vivo*. Wykazano brak podatności DC na działanie enzymów zarówno w przewodzie pokarmowym, jak i w tkance mięśniowej. Powstanie w miejscu wstrzyknięcia formy depot umożliwia kontrolowane uwalnianie substancji czynnej, co uwzględniając szybkość procesu, jest możliwe do wykorzystania w przypadku koniugatów OHB z lekami wykazującymi działanie terapeutyczne w niskich dawkach.

Uzyskane wyniki pozwalają na rozpatrywanie DC zarówno w kategoriach proleku uwalniającego w sposób spowolniony substancję czynną, jak też modelowej substancji wpływającej na zwiększenie absorpcji innych leków będących substratami dla P-gp. W pierwszym przypadku, koniugat z ibuprofenem traktować należy raczej jako substancję modelową, gdyż obserwowana szybkość hydrolizy nie pozwoli na uzyskanie odpowiednio wysokich, gwarantujących zaistnienie efektu terapeutycznego, stężeń ibuprofenu we krwi. Zwiększenie biodostępności niektórych leków wskutek hamowania funkcji P-gp może natomiast stanowić interesujący kierunek badań biofarmaceutycznych mających na celu znalezienie metody na efektywniejsze wykorzystanie leków już znanych i stosowanych. Oddziaływanie z P-gp wydaje się być specyficzne dla DC, nie wykazano bowiem podobnych efektów stosując wolny oligomer kwasu 3-hydroksymasłowego (OHB). Poznanie wpływu koniugatów OHB z innymi substancjami o charakterze kwasów karboksylowych na przezkomórkowy transport leków stanowić może interesujący temat będący kontynuacją podjętych w rozprawie badań.

VI. WNIOSKI

1. Opracowano metodę analityczną (RP-HPLC) służącą do analizy jakościowej i ilościowej koniugatu ibuprofenu z oligo(kwasem 3-hydroksymasłowym) i wykazano jej przydatność do oznaczeń obok siebie ibuprofenu w formie wolnej i skoniugowanej. Opracowana metoda była powtarzalna oraz dokładna i pozwoliła określić rozpuszczalność, przebieg procesu hydrolizy DC oraz trwałość sporządzonych preparatów.
2. Wykazano, że właściwości fizykochemiczne DC, zwłaszcza słaba rozpuszczalność w wodzie i bardzo wolna hydroliza w $\text{pH} < 8$ oraz w sztucznym płynie jelitowym sprawiają, że niecelowe jest stosowanie DC w formie doustnej jako proleku.
3. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem linii komórkowych Caco-2 wskazują, że DC jest selektywnym inhibitorem P-glikoproteiny, przez co nawet kilkukrotnie zwiększa absorpcję ksenobiotyków będących substratami P-gp. Możliwe więc jest wykorzystanie tego typu koniugatów jako modelowych związków zwiększających dostępność biologiczną niektórych leków, konieczne są jednak dalsze badania w tym kierunku.
4. Koniugat ibuprofenu z kwasem oligo(3-hydroksymasłowym) należy zaliczyć do związków nietoksycznych. Badania na liniach komórkowych wykazały pewien efekt cytotoksyczny tylko wobec komórek Calu-3, dopiero po przekroczeniu stężenia 0,5 mg/ml. Działania tego nie zaobserwowano dla OHB.
5. Ze względu na bardzo dobrą rozpuszczalność w oleju, zaproponowano i sporządzono charakteryzujące się odpowiednimi właściwościami i trwałością preparaty z DC: roztwór w oleju Miglyol i emulsję typu o/w, służące do podania w formie iniekcji domięśniowych. Wykazano, że zastosowane metody wyjaławiania – sączenie dla roztworu olejowego i wyjaławianie termiczne w autoklawie dla emulsji nie powodują rozkładu DC, ani utraty trwałości preparatów.

6. Podanie DC domięśniowo królikom pozwoliło na uzyskanie przez dłuższy czas (24 h) oznaczalnego stężenia IB w osoczu. Nie wykazano znaczącej różnicy uwalniania IB po podaniu emulsji lub roztworu olejowego z DC. Oznaczona niska wartość EBA (10 - 17%) wskazuje, że w czasie 48 h *in vivo* z koniugatu uwolniła się tylko niewielka część IB. Forma koniugatu może posłużyć przedłużeniu działania leków o charakterze kwasów karboksylowych pod warunkiem, że wymagają podania w niewielkich dawkach.

VII. PIŚMIENNICTWO

1. Kranz H., Bodmeier R.: A novel *in situ* forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery, *Int. J. Pharm.* 332 (2007) 107-114
2. Ahmad S., Tester RF., Corbett A., Karkalas J.: Dextran and 5-aminosalicylic acid (5-ASA) conjugates: synthesis, characterization and enzymic hydrolysis, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 2694-2671
3. Pasut G., Veronese FM.: Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 933-961
4. Khandare J., Minko T.: Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 359-397
5. Acemoglu M.: Chemistry of polymer biodegradation and implications on parenteral drug delivery, *Int. J. Pharm.* 277 (2004) 133-139
6. Uhrich KE., Cannizzaro SM., Langer RS.: Polymeric systems for controlled drug release, *Chem. Rev.* 99 (1999) 3181-3198
7. Fruijtier-Pöllöth C.: Safety assesment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products, *Toxicology* 214 (2005) 1-38
8. Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M. (red.): *Farmacja Stosowana, Podręcznik dla studentów farmacji*, wyd. IV, PZWL Warszawa 2002, ss. 719
9. Hamidi M., Azadi A., Rafiei P.: Pharmacokinetic consequences of pegylation, *Drug Deliv.* 13 (2006) 399-409
10. Harris JM., Chess RB.: Effect of PEGylation on pharmaceuticals, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 214-221
11. Monfardini C., Schiavon O., Caliceti P., Morpurgo M., Harris JM., Veronese FM.: A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification, *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 62-69
12. Bailon P., Berthold W.: Polyethylene glycol – conjugated proteins, *PSST* 8 (1998) 352-356
13. Harris JM., Martin NE., Modi M.: Pegylation: A novel process for modifying pharmacokinetics, *Clin. Pharmacokinet.* 40 (2001) 539-551
14. NOF Corporation DDS Development Dept., *Katalog Ver. 8*
15. Sadzuka Y., Kishi K., Hirota S., Sonobe T.: Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain on cell uptake of PEG – modified liposomes, *J. Liposome Res.* 13 (2003) 157-172
16. www.emea.eu.int/humandocs/PDFs/EPAR/Caelyx/021296pl1.pdf

17. Potemski P., Płużańska A.: Doksorubicyna liposomalna – właściwości i zastosowanie kliniczne, *Onkol. Pol.* 2 (1999) 127-132
18. Gupta SK., Glue P., Jacobs S., Belle D., Affrime M.: Single-dose pharmacokinetics and tolerability of pegylated interferon- α 2b in young and elderly healthy subjects, *J. Clin. Pharmacol.* 56 (2003) 131-134
19. www.pegasys.com
20. www.somavert.com
21. www.neulasta.com
22. Piedmonte DM., Treuheit MJ.: Formulation of Neulasta® (pegfilgrastim), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 50-58
23. www.rxlist.com/cgi/generic2/pegademase_cp.htm
24. www.rxlist.com/cgi/generic2/pegaspargase_ids.htm
25. Holle LM.: Pegaspargase: an alternative?, *Ann. Pharmacoter.* 31 (1997) 616-624
26. Vieira Pinheiro JP.; Müller HJ.; Schwabe D., Gunkel M., Casimiro da Palma J., Henze G., von Schütz V., Winkelhorst M., Würthwein G., Boos J.: Drug monitoring of low-dose PEG-asparaginase (Oncaspar™) in children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia, *Br. J. Haematol.* 113 (2001) 115-119
27. www.macugen.com
28. Frenkel RE., Mani L., Toler AR., Frenkel MP.: Intraocular pressure effects of pegaptanib (Macugen) injections in patients with and without glaucoma, *Am. J. Ophthalmol.* 143 (2007), 1034–1035
29. Zappe H., Snell ME., Bossard MJ.: PEGylation of cyanovirin-N, an entry inhibitor of HIV, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 79-87
30. Mok H., Barry MA.: Evaluating polyethylene glycol (PEG) modified adenoviral vectors for cell targeting and detargeting and reducing vector toxicity, *Mol. Ther.* 11 (2005) S161
31. Kasprowicz NS., Fotopoulou C., Oskay-Ozcelik G., El KK., Boehmer D., Sehouli J.: Brain metastases in relapsed epithelial ovarian cancer after chemotherapy with pegylated liposomal doxorubicin, *Anticancer Res.* 28 (2008) 1943-1946
32. Senthilkumar M., Mishra P., Jain NK.: Long circulating PEGylated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticulate delivery of Docetaxel to solid tumors, *J. Drug Target.* 16 (2008) 424-435

33. Di Lorenzo G., Rea A., Carlomagno C., Pepe S., Palmieri G., Labianca R., Chirianni A., De Stefano A., Esposito V., De Placido S., Montesarchio V.: Activity and safety of pegylated liposomal doxorubicin, 5-fluorouracil and folinic acid in inoperable hepatocellular carcinoma: a phase II study, *World J. Gastroenterol.* 13 (2007) 6553-6557
34. Duncan R., Vicent MJ., Greco F., Nicholson RI.: Polymer–drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer, *Endocr. Relat. Cancer* 12 (2005) 189-199
35. Mehvar R.: Recent trends in the use of polysaccharides for improved delivery of therapeutic agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 4 (2003) 283-302
36. Vyas S., Trivedi P., Chaturvedi SC.: Ketorolac-dextran conjugates: synthesis, *in vitro* and *in vivo* evaluation, *Acta Pharm.* 57 (2007) 441-450
37. Chytil P, Etrych T, Koňák C, Šírová M., Mrkvan T., Říhová B., Ulbrich K.: Properties of HPMA copolymer–doxorubicin conjugates with pH-controlled activation: Effect of polymer chain modification, *J. Control. Release* 115 (2006) 26-36
38. Schoemaker NE., van Kesteren C., Rosing H., Jansen S., Swart M., Lieverst J., Fraier D., Breda M., Pellizzoni C., Spinelli R., Grazia Porro M., Beijnen JH., Schellens JH., ten Bokkel Huinink WW.: A phase I and pharmacokinetic study of MAG-CPT, a water soluble polymer conjugate of camptothecin, *Br. J. Cancer*, 87 (2002) 608-614
39. Gianasi E., Buckley RG., Latigo J., Wasil M., Duncan R.: HPMA copolymers platينات containing dicarboxylate ligands. Preparation, characterisation and *in vitro* and *in vivo* evaluation, *J. Drug Target.* 10 (2002) 549-556
40. Zunino F., Giuliani F., Savi G., Dasdia T., Gambetta R.: Anti-tumor activity of daunorubicin linked to poly-L-aspartic acid, *Int. J. Cancer.* 30 (1982) 465-470
41. <http://www.docguide.com/news/content.nsf/news/8525697700573E1885256D470053F1C8>
42. <http://www.celltherapeutics.com/pgt307>
43. Wiwattanapatapee R., Lomlim L., Saramunee K.: Dendrimers conjugates for colonic delivery of 5-aminosalicylic acid, *J. Control. Release* 88 (2003) 1-9
44. Najlah M., Freeman S., Attwood D., D'Emanuele A.: *In vitro* evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery, *Int. J. Pharm.* 336 (2007) 183-190
45. Gurdag S., Khandare J., Stapels S., Matherly LH., Kannan RM.: Activity of dendrimer–methotrexate conjugates on methotrexate-sensitive and -resistant cell lines, *Bioconjug. Chem.* 17 (2006) 275–283

46. Kim T., Bai C-Z., Nam K., Park J.: Comparison between arginine conjugated PAMAM dendrimers with structural diversity for gene delivery systems, *J. Control. Release* 136 (2009) 132-139
47. Casas A., Battah S., Di Venosa G., Dobbin P., Rodriguez L., Fukuda H., Batlle A., MacRobert A.J.: Sustained and efficient porphyrin generation in vivo using dendrimer conjugates of 5-ALA for photodynamic therapy, *J. Control. Release* 135 (2009) 136-143
48. Lemoigne M.: Produits de dehydration et de polymerization de l'acide β -oxobutyrique, *Bull. Soc. Chem. Biol. (Paris)* 8 (1926) 770-782
49. Reusch R.N., Sadoff H.L.: Putative structure and functions of a poly beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacteria plasma membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85, 41 (1988) 76-80
50. Zinn M., Witholt B., Egli T.: Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2001) 5-21
51. Findlay R.H., White D.C.: Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*, *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983) 71-78
52. Fuller R.C.: Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes, *Int. J. Biol. Macromol.* 25 (1999) 21-29
53. Merrick J.M., Doudoroff M.: Depolymerization of poly- β -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system, *J. Bacteriol.* 88 (1964) 60-71
54. Domb A.J., Kost J., Wiseman D.M. (red.): Handbook of biodegradable polymers, Harwood, Amsterdam 1997, 79-85, ss. 526
55. Reusch R.N.: Non-storage poly (R)-3-hydroxyalkanoates (complexed PHAs) in prokaryotes and eukaryotes. W: Doi Y., Steinbüchel A. (red.): Polyesters II: properties and chemical synthesis, vol. 3b. Weinheim: Viley-VCH (2003) 123-169
56. Reusch R.N.: Low molecular weight complexed poly(3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo, *Can. J. Microbiol.* 41 (1995) 50-54
57. Seebach D., Fritz M.G.: Detection, synthesis, structure, and function of oligo(3-hydroxyalkanoates): contributions by synthetic organic chemists, *Int. J. Biol. Macromol.* 25 (1999) 217-236
58. Yajnik C.S., Sardesai B.S., Bhat D.S., Naik S.S., Raut K.N., Shelgikar K.M., Orskov H., Alberti K.G., Hockaday T.D.: Ketosis resistance in fibrocalculous Pancreatic Diabetes: II. Hepatic ketogenesis after oral medium – chain triglycerides, *Metabolism* 46 (1997) 1-4

59. Kassab AC., Xu K., Denkbass EB., Dou Y., Zhao S., Pişkin E.: Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 8 (1997) 947-961
60. Fang F, Xian-Wei L., Juan X., Han-Qing Y., Yong-Mei L.: Formation of aerobic granules and their PHB production at various substrate and ammonium concentrations, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 59-63
61. Uhrich KE., Cannizzaro SM., Langer RS., Shakesheff KM.: Polymeric systems for controlled drug release, *Chem. Rev.* 99 (1999) 3181-3198
62. Koosha F., Muller RH., Davis SS.: Polyhydroxybutyrate as a drug carrier, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6 (1989) 117-130
63. Saad B., Ciardelli G., Matter S., Welti M., Uhlschmid GK., Neuenschwander P., Suter UW.: Characterization of the cell response of cultured macrophages and fibroblasts to particles of short-chain poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], *J. Biomed. Mater. Res.* 30 (1996) 429
64. Unverdorben M., Spielberger A., Schywalsky M., Labahn D., Hartwig S., Schneider M., Lootz D., Behrend D., Schmitz K., Degenhardt R., Schaldach M., Vallbracht C.: A polyhydroxybutyrate biodegradable stent: preliminary experience in the rabbit, *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 25 (2002) 127-132
65. Novikova LN., Pettersson J., Brohlin M., Wiberg M., Novikov LN.: Biodegradable poly-beta-hydroxybutyrate scaffold seeded with Schwann cells to promote spinal cord repair, *Biomaterials* 29 (2008) 1198-1206
66. Chen G-Q., Wu Q.: The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials, *Biomaterials* 26 (2005) 6565-6578
67. Medlicott NJ., Waldron NA., Foster TP.: Sustained release veterinary parenteral products, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1345-1365
68. Avis KE., Lieberman HA., Lachman L (red.): *Pharmaceutical dosage forms: parenteral medications*, tom I, wyd. II, Marcel Dekker, New York 1992, 21-77, ss. 580
69. Bjerregaard S., Pedersen H., Vedstesen H., Vermehren C., Soderberg I., Frokjaer S.: Parenteral water/oil emulsions containing hydrophilic compounds with enhanced in vivo retention: formulation, rheological characterisation and study of in vivo fate using whole body gamma-scintigraphy, *Int. J. Pharm.* 215 (2001) 13-27
70. Turco S.: *Sterile dosage forms: their preparation and clinical application*, Lea and Febiger, wyd. IV, Philadelphia 1994, 106-110, ss. 521
71. Andersen FD., Archer DF., Harman SM., Leonard RJ., Wilborn WH.: Tissue response to bioerodible subcutaneous implants: a possible determinant of drug absorption kinetics, *Pharm. Res.* 10 (1993) 369-380

72. Chang H-C., Li LC., Marsh KC., Tian Y., Grischeau D.: Parenteral sustained-release dosage forms of butorphanol for dogs, *Int. J. Pharm.* 176 (1999) 147-156
73. Foster TP., Moseley WM., Caputo JF., Alaniz GR., Leatherman MW., Yu X., Claflin WH., Reeves DR., Cleary DL., Zantello M., Krabill LF., Wiest JR.: Sustained elevated serum somatotropin concentrations in Holstein steers following subcutaneous delivery of a growth hormone releasing factor analog dispersed in water, oil or microspheres, *J. Control. Release* 47 (1997) 91– 99
74. Martinez M., Rathbone M., Burgess D., Huynh M.: In vitro and in vivo considerations associated with parenteral sustained release products: A review based upon information presented and points expressed at the 2007 Controlled Release Society Annual Meeting, *J. Control. Release* 129 (2008) 79-87
75. Foster TP., Kiefer DL.: Antibiotic oil suspension, US Patent 5,736,151 (1996)
76. MacLean DS., Robertson JD., Jay M., Stalker DJ.: Noninvasive measurement of protein release from subcutaneous depo formulations in vivo using X-ray fluorescence, *J. Control. Release* 34 (1995) 167-173
77. Tardi C., Brandl M., Schubert R.: Erosion and controlled release properties of semisolid vesicular phospholipid dispersions, *J. Control. Release* 55 (1998) 261–270
78. Shaikh IM., Jadhav KR. Gide PS., Kadam VJ., Pisal SS.: Topical delivery of aceclofenac from lecithin organogels: preformulation study, *Curr. Drug Deliv.* 3 (2006) 417-427
79. Lim PF., Liu XY., Kang L., Ho PC., Chan YW., Chan SY.: Limonene GP1/PG organogel as a vehicle in transdermal delivery of haloperidol, *Int. J. Pharm.* 311 (2006) 157-164
80. Chitkara D., Shikanov A., Kumar N., Domb AJ.: Biodegradable injectable in situ depot-forming drug delivery systems, *Macromol. Biosci.* 6 (2006) 977-990
81. Vintiloiu A., Leroux JC.: Organogels and their use in drug delivery – a review, *J. Control. Release* 125 (2008) 179-192
82. Plourde F., Motulsky A., Couffin-Hoarau AC First report on the efficacy of L-alanine-based in situ-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs, *J. Control. Release* 108 (2005) 433-441
83. Motulsky A., Lafleur M., Couffin-Hoarau AC., Hoarau D., Boury F., Benoit JP., Leroux JC.: Characterization and biocompatibility of organogels based on L-alanine for parenteral drug delivery implants, *Biomaterials* 26 (2005) 6242-6253
84. Tomita T., Ochi T., Sugano K., Uemura S., Makuch RW.: Systemic review of NSAID-induced adverse reactions in patients with rheumatoid arthritis in Japan, *Mod. Rheumatol.* 13 (2003) 143-152

85. Page CP., Curtis MJ., Sutter MC., Walker MJA., Hoffman BB.: *Integrated Pharmacology*, Mosby, London 1997, 147-150, ss. 675
86. Katzung BG.: *Basic & Clinical Pharmacology*, The McGraw-Hill Companies, Inc., NY 2001, 596-623, ss. 1179
87. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer HK., Schäfer-Korting M.: *Farmakologia i toksykologia. Podręcznik, Wydanie I polskie* (red. A. Danysz), Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004, 210-276, ss 1075
88. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/pedea/064204p11.pdf>
89. Chassard D, Geneteau A, Gualano V, Brault M.: Bioequivalence study of two Ibuprofen formulations administered intravenously in healthy male volunteers, *Clin. Drug Investig.* 24 (2004) 739-747
90. Zhao X., Chen D., Gao P., Ding P., Li K.: Synthesis of ibuprofen eugenol ester and its microemulsion formulation for parenteral delivery, *Chem. Pharm. Bull.* 53 (2005) 1246-1250
91. Babazadeh M.: Synthesis and study of controlled release of ibuprofen from the new acrylic type polymers, *Int. J. Pharm.* 316 (2006) 68-73
92. Bonina FP., Motenegro L., Capraii PD., Palagiano F., Trapani G., Liso G.: 1995. In vitro and in vivo evaluation of polyoxyethylene indomethacin esters as dermal prodrugs. *J. Control. Release* 34 (1995) 223-232
93. Davaran S., Entezami AA.: Synthesis and hydrolysis of polyurethanes containing ibuprofen pendent groups, *J. Bioact. Compact. Polym.* 12 (1997) 47-58
94. Chang CH., Sheu YM., Hu WP., Wang LF., Chen JS.: Synthesis and properties of copolymers from 2-hydroxyethyl methacrylate-linked nonsteroidal anti-inflammatory agents with methacrylic acid, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 36 (1998) 1481-1489
95. Kim HW., Chung CW., Hwang SJ., Rhee YH.: Drug release from and hydrolytic degradation of a poly(ethylene glycol) grafted poly(3-hydroxyoctanoate), *Int. J. Biol. Macromol.* 36 (2005) 84-89
96. Bonina FP., Puglia C., Barbuzzi T., Caprariis PD., Palagiano F., Rimoli MG., Saija A.: In vitro and in vivo evaluation of polyoxyethylene esters as dermal prodrugs of ketoprofen, naproxen and diclofenac, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 123-134
97. Kim SY., Shin IG., Lee YM., Cho CS., Sung YK.: Methoxypoly(ethylene glycol) and caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin: II. Micelle formation and drug release behaviours. *J. Control. Release* 51 (1998) 13-22

98. Namazi H., Babazadeh M., Sarabi A., Entezami A.: Synthesis and hydrolysis of acrylic type polymers containing nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Polym. Mater.* 18 (2001) 301–312
99. Liso PA., Rebueta M., San Roman J., Gallardo A., Villar AM.: Antinociceptive and antipyretic properties of a new conjugated ibuprofen-methacrylic polymeric controlled delivery system, *J. Control. Release* 33 (1995) 429-436
100. Juzwa M., Rusin A., Zawidlak-Węgrzyńska B., Krawczyk Z., Obara I., Jedliński Z.: Oligo(3-hydroxybutanoate) conjugates with acetylsalicylic acid and their antitumour activity, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1785-1790
101. Zinn M., Witholt B., Egli T.: Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2001) 5-21
102. Piddubnyak V., Kurcok P., Matuszowicz A., Głowala M., Fiszer-Kierzkowska A., Jedliński Z., Juzwa M., Krawczyk Z.: Oligo-3-hydroxybutyrates as potential carriers for drug delivery, *Biomaterials* 25 (2004) 5271-5279
103. Stryer L.: *Biochemia*, Wydanie IV (red. tłum. J. Augustyniak, J. Michejda), Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997, ss. 1132
104. Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Regarrdh CG., Lipka E., Amidon GL., Langguth P.: Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside- directed carrier-mediated transport, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 63-75
105. Stokłosowa S. (red.): *Hodowla komórek i tkanek*, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2004, ss. 534
106. Artursson P., Palm K., Luthman K.: Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 46 (2001) 27-43
107. Bohets H., Annaert P., Mannens G., Van Beijsterveldt L., Anciaux K., Verboven P., Meuldermans W., Lavrijsen K.: Strategies for absorption screening in drug discovery and development, *Curr. Top. Med. Chem.* 1 (2001) 367-383
108. Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A.: Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 186-198
109. Yamashita S., Furubayashi T., Kataoka M., Sakane T., Sezaki H., Tokuda H.: Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells, *Eur. J. Pharm. Sci.* 10 (2000) 195-204
110. Foss A., Peppas NA.: Investigation of the cytotoxicity and insulin transport of acrylic – based copolymer protein delivery system in contact with Caco-2 cultures, *Eur. J. Biopharm.* 54 (2004) 447-455

111. Pohjala L., Tammela P., Samanta S.K., Yli-Kauhaluoma J., Vuorela P.: Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays, *Anal. Biochem.* 362 (2007) 221-228
112. [https://bcprd.lonza.com/shop/b2c/start/\(xcm=lonza_b2b&care=DCEA15A8A641AAF18C7C001A4B525E10\)/.do](https://bcprd.lonza.com/shop/b2c/start/(xcm=lonza_b2b&care=DCEA15A8A641AAF18C7C001A4B525E10)/.do)
113. Szturmowicz M.: Zjawisko lekooporności w przebiegu raka płuca, *Pneumonol. Alergol. Pol.* 69 (2001) 102-110
114. Anderle P., Niederer E., Rubas W., Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Wunderli-Allenspach H., Merkle HP., Langguth P.: P-Glycoprotein mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 757-762
115. Wang B., Siahaan T., Soltero R.: Drug delivery : principles and applications, Wiley Interscience, Hoboken 2005, ss. 448
116. Hunter J., Jepson MA, Tsuruo T., Simmons NL., Hirst BH.: Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 14991-14997
117. Haslam IS., Jones K., Coleman T, Simmons NL.: Induction of P-glycoprotein expression and function in human intestinal epithelial cells (T84), *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 850-861
118. Korjamo T., Honkakoski P., Toppinen MR., Niva S., Reinisalo M., Palmgrén JJ., Mönkkönen J.: Absorption properties and P-glycoprotein activity of modified Caco-2 cell lines, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (2005) 266-279
119. Elamanchili P., McEachern C., Burt H.: Reversal of multidrug resistance by methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers through the inhibition of P-glycoprotein function, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 945-958
120. Liu F., Xie ZH., Cai GP., Jiang YY.: The effect of surviving on multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in MCF-7 and its adriamycin resistant cells, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 2279-2283
121. Hamilton KO., Topp E., Makagiansar I., Siahaan T., Yazdanian M., Audus KL.: Multidrug resistance-associated protein-1 functional activity in Calu-3 cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 (2001) 1199-1205
122. Sorrentino BP.: Gene therapy to protect haematopoietic cells from cytotoxic cancer drugs, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 431-441
123. MacVinish LJ., Cope G., Ropenga A., Cuthbert AW.: Chloride transporting capability of Calu-3 epithelia following persistent knockdown of the cystic

- fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR, Br. J. Pharmacol. 150 (2007) 1055-1065
124. Winton HL., Wan H., Cannell MB., Gruenert DC., Thompson PJ., Garrod DR., Stewart GA., Robinson C.: Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability, Clin. Exp. Allergy 28 (1998) 1273-1285
125. Florea BI., Cassara ML., Junginger HE., Borchard G.: Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3, J. Control. Release 87 (2003) 131-138
126. Mathia NR., Timoszyk J., Stetsko PI., Megill JR., Smith RL., Wall DA.: Permeability characteristics of Calu-3 human bronchial epithelial cells: *In vitro* – *In vivo* correlation to predict lung absorption in rats, J. Drug Target. 10 (2002) 31-40
127. Matilainen L., Toropainen T., Vihola H., Hirvonen J., Järvinen T., Jarho P., Järvinen K.: In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells, J. Control. Release 126 (2008) 10-16
128. Buckingham LE., Balasubramanian M., Safa AR., Shah H., Komarov P., Emanuele RM., Coon JS.: Reversal of multi-drug resistance in vitro by fatty acid-PEG-fatty acid diesters, Int. J. Cancer 65 (1996) 74-79
129. Woodcock DM., Linsenmeyer ME., Chojnowski G., Kriegler AB., Nink V., Webster LK., Sawyer WH.: Reversal of multidrug resistance by surfactants, Br. J. Cancer 66 (1992) 62-68
130. Lo YL., Hsu CY., Huang JD.: Comparison of effects of surfactants with other MDR reversing agents on intracellular uptake of epirubicin in Caco-2 cell line, Anticancer Res. 18 (1998) 3005-3009
131. Zastre J., Jackson J., Bajwa M., Liggins R., Iqbal F., Burt H.: Enhanced cellular accumulation of a P-glycoprotein substrate, rhodamine-123, by Caco-2 cells using low molecular weight methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers, Eur. J. Pharm. Biopharm. 54 (2002) 299-309
132. Nerurkar MM., Burton PS., Borchardt RT.: The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system, Pharm. Res. 13 (1996) 528-534
133. Nerurkar MM., Ho NF., Burton PS., Vidmar TJ., Borchardt RT.: Mechanistic roles of neutral surfactants on concurrent polarized and passive membrane transport of a model peptide in Caco-2 cells, J. Pharm. Sci. 86 (1997) 813-821
134. Sochor J., Klimes J., Sedlacek J., Zahradnicek M.: Determination of ibuprofen in erythrocytes and plasma by high performance liquid chromatography, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 899-903

135. http://www.phenomenex.com/AppManager/Files/CN-007_Extraction%20of%20Ibuprofen%20from%20Plasma%20using%20strata-X.pdf
136. Szmal ZS., Lipiec T.: *Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej*, wyd. VII poprawione, PZWL Warszawa 1996, ss. 684
137. <http://www.chemia.uni.lodz.pl/~pitsel/docs/2icwiczenieBT.pdf>
138. Cygański A.: *Metody elektroanalityczne*, wyd. II zmienione, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa 1995, ss. 461
139. Rytting E., Bryan J., Southard M., Audus KL.: Low-affinity uptake of the fluorescent organic cation 4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide (4-Di-1-ASP) in BeWo cells, *Biochem. Pharmacol.* 73 (2007) 891-900
140. Endter S., Becker U., Daum N., Huwer H., Lehr C-M., Gumbleton M., Ehrhardt C.: P-glycoprotein (MDR1) functional activity in human alveolar epithelial cell monolayers, *Cell Tissue Res.* 328 (2007) 77-84
141. Bourdet DL., Thakker DR.: Saturable absorptive transport of the hydrophilic organic cation ranitidine in Caco-2 cells: Role of pH-dependent organic cation uptake system and P-glycoprotein, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1165-1177
142. <http://www.genoprice.com/CQMT.doc>
143. http://www.genycell.com/images/productos/protocolos/cqmt-500__90.pdf
144. <http://www.technomedica.com/publikazii/belur/Bio-Rad.pdf>
145. Lunn G., Schmuft NR.: *HPLC methods for pharmaceutical analysis*, Wyd. John Wiley, New York 1997, 741-768, ss. 1609
146. Vermeulen B., Remon JP.: Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen enantiomers in plasma of broiler chickens, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 243-251
147. Farrar H., Letzig L., Gill M.: Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma, *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 341-348
148. Davies NM. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years, *Clin. Pharmacokinet.* 34 (1998) 101-154
149. Eytan GD., Regev R., Oren G., Hurwitz CD., Assaraf YG.: Efficiency of P-glycoprotein-mediated exclusion of rhodamine dyes from multidrug-resistant cells is determined by their passive transmembrane movement rate, *Eur. J. Biochem.* 248 (1997) 104-112

150. Szczepaniak W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej, wyd. III, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1999, 204-205, ss. 420
151. Bonato PS., Del Lama MP., de Carvalho R.: Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 796 (2003) 413-420
152. http://pl.lundbeck.com/pl/PDF/Clopixol/PIL_Clopixol%20Depot_200%20mg_ml_PL_June%202008.pdf
153. Stasiak P., Ehrhardt C., Juzwa M., Sznitowska M.: Characterisation of a novel conjugate of ibuprofen with 3-hydroxybutyric acid oligomers, *J. Pharm. Pharmacol.* 61 (2009) 1-6 (w druku)
154. Emami J.: In vitro - in vivo correlation: from theory to applications, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9 (2006) 169-189