PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:
308 594
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:

A61K 9/19	(2006.01)
A61K 9/70	(2006.01)
A61K 9/127	(2006.01)
A61K 47/30	(2006.01)
A61K 47/34	(2006.01)
A61K 47/42	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61J 3/07	(2006.01)
B82B 1/00	(2006.01)
B82B 3/00	(2006.01)
B82Y 5/00	(2011.01)
A61K 47/10	(2017.01)
A61K 47/32	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-665**
(22) Přihlášeno: **29.09.2014**
(40) Zveřejněno: **06.04.2016**
(Věstník č. 14/2016)
(47) Uděleno: **12.11.2020**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **23.12.2020**
(Věstník č. 52/2020)

(56) Relevantní dokumenty:
M. Spurná: Průnik nanočástic sublingvální membránou, UK v Praze, FF Hradec Králové.
WO 2012/070028 A1; US 2005/0276836 A1; US 2001/0019719 A1; WO 2006/133349 A2; WO 2014/089649 A1; US 2011/0229551 A1; WO 91/06289 A1.

(73) Majitel patentu:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno, CZ
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
Technická univerzita v Liberci, Liberec 1, CZ

(72) Původce:
Pharm. Dr. Josef Mašek, Ph.D., Brno - Lesná, CZ
Pharm. Dr. Róbert Lukáč, Ph.D., 02062 Horovce, SK
doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D., Olomouc, CZ
MVDr. Pavlína Turánek Knötigová, Ph.D., Brno, CZ
Ing. Daniela Lubasová, Ph.D., Jablonec nad Nisou, CZ
RNDr. Jaroslav Turánek, CSc., Brno - Lesná, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
Mukoadhezivní nosiče částic, způsob přípravy a použití

(57) Anotace:
Předkládaný vynález se týká mukoadhezivního nosiče částic, který obsahuje nanoscaffold, jímž může být například nanovlákenná vrstva o tloušťce v rozmezí 0,1 až 1000 μm, nesoucí látku ve formě částic a dále mukoadhezivní vrstvu, přičemž mukoadhezivní vrstva alespoň v části svého povrchu přesahuje nanoscaffold. Dále se týká způsobu jeho přípravy a jeho použití pro aplikaci vakcín a terapeutik na slizniční povrchy.

CZ 308594 B6

Mukoadhezivní nosiče částic, způsob přípravy a použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká mukoadhezivních nosičů vhodných pro podávání látek ve formě částic na sliznici pacienta – člověka nebo zvířete.

Dosavadní stav techniky

Částicové nosiče vakcín, léčiv a dalších fyziologicky aktivních látek (například plazmidová DNA, siRNA, terapeutické peptidy a proteiny, antigeny, alergeny) jsou v různém stupni vývoje nebo se uplatňují v léčbě a profylaxi řady onemocnění u člověka i zvířat. Preparáty na bázi nanočástic a mikročástic jsou podávány perorálně i parenterálně. Podání mikročástic a nanočástic na různé typy sliznic představuje moderní způsob, který má řadu výhod, a to především neinvazivní a bezbolestnou aplikaci, rychlé vstřebání látek, minimalizované riziko infekce, obejití trávicího systému a portálního krevního oběhu (De Jong WH, Borm PJ, Int. J. Nanomedicine. 2008; 3(2): 133-149., Micro- and nanoparticles--medical applications, Jătariu A, Peptu C, Popa M, Indrei A, Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. 2009 Oct-Dec; 113(4):1160-9).

Celková plocha orální sliznice u člověka je okolo 100 cm^2. Orální sliznice se dělí na sliznici bukální, sublinguální a patrovou. Jednotlivé typy sliznice se anatomicky liší svojí tloušťkou, stupněm keratinizace epitelu, a tedy i v prostupnosti pro léčiva, částice a další fyziologicky aktivní látky. Tyto sliznice se také významně odlišují zastoupením jednotlivých typů imunitních buněk. U člověka je nejtenčí sliznicí bez známek keratinizace sliznice sublinguální, bukální sliznice je silnější bez známek keratinizace. Nejsilnější a keratinizovaná, a tedy nejméně prostupná pro léčiva a částice, je sliznice patrová. Orální sliznice se skládá z několika vrstev. Jde o vrstvu epitelu, jehož buňky se směrem k povrchu oplošťují, bazální membránu, vrstvu lamia propria a submukózní tkáň, která je prokrvená a obsahuje četná nervová zakončení. Vrchní vrstvy epitelu obsahují mezi buňkami materiál lipofilní povahy intracelulárního původu tvořící bariéru pro prostup částic a látek přes sliznici (Gandhi RB, Robinson JR, Adv. Drug Deliv. Rev., 1994; 13: 43-74).

Hlavními bariérami bránícími prostupu částic a léčiv do a přes orální sliznici jsou (1) vrstva mucinu na povrchu sliznice (Cone RA. Adv. Drug Deliv. Rev., 2009; 61: 75-85), (2) vrstva keratinu, (3) intercelulární lipidy epitelu (Chen LL, Chetty DJ, Chien YW. Int. J. Pharm. 1999; 184: 63-72), (4) bazální membrána a (5) tzv. enzymatická bariéra (Madhav NVS, Shakya AK, Shakya P, Singh K. J. Control. Release. 2009; 140: 2-11) Významnými vnějšími faktory ovlivňujícími průnik částic přes sliznici je neustálá produkce slin, které omývají povrch sliznic a vytvářejí tenký film, dále pohyb orální sliznice a jazyka při mluvení, jídle, pití či žvýkání. Vzhledem k podobnosti struktury sliznice a stupně keratinizace s člověkem je v současné době nejužívanější zvířecí model pro sledování přestupu látek a částic přes orální sliznici prasete (jak *in-vivo*, tak *ex-vivo* experimenty). V současné době není zcela jasné, zda účinnost některých částicových nosičů mukózních vakcín selhává kvůli jejich nedostatečnému účinku na imunitní buňky a imunitní systém, či je způsobena nedostatečným průnikem těchto částic přes sliznici zejména u zmíněných modelových druhů živočichů.

Vzhledem k zmíněným barierám a fyziologickým podmínkám v dutině ústní jsou dnes léčivé látky připraveny a aplikovány s využitím řady lékových forem. Mezi tradiční orální lékové formy patří bukální a sublinguální tablety, pastilky, sublinguální spreje a orální gely a roztoky. Tyto lékové formy neumožňují s ohledem na celkovou uvolněnou dávku léčiva během uvolňování léčiva jíst, pít a v případě sublinguálních sprejů ani mluvit. Současný stav techniky pomocí těchto lékových forem řeší aplikaci nízkomolekulárních látek a insulinu. Mezi moderní mukoadhezivní lékové formy patří roztoky, které tvoří viskózní gel přímo na sliznici, mukoadhezivní mikročástice, sublinguální šumivé tablety, nanočástice a mukoadhezivní bukální a sublinguální filmy.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je mukoadhezivní nosič, který obsahuje nanoskafold, ve výhodném provedení nanovlákennou vrstvu, nesoucí látku (tj. jednu látku nebo směs látek) ve formě částic a mukoadhezivní vrstvu, přičemž mukoadhezivní vrstva alespoň zčásti přesahuje nanoskafold. Při použití nosiče je nanoskafold přivrácený ke sliznici a mukoadhezivní vrstva slouží k přichycení nosiče ke sliznici.

Látka ve formě částic zde zahrnuje samotnou látku, která má být nesena nosičem a dopravena tak na cílovou sliznici, ve formě částic (pokud je látka sama schopna tvořit částice), nebo látku s alespoň jedním nosičem a/nebo pomocnou látkou, které tvoří dohromady částici obsahující tuto látku, nebo směs látek určenou pro dopravení na cílovou sliznici, popřípadě s alespoň jedním nosičem a/nebo pomocnou látkou, které tvoří dohromady částici obsahující tuto směs látek.

Nanoskafold je trojrozměrná struktura tvořená vrstvou biokompatibilních polymerů nebo jejich směsí vyznačující se obsahem pórů o velikosti v řádu desítek nanometrů až stovek mikrometrů (např. 10 nm až 1000 μm, s výhodou 0,1 až 100 μm). Vrstva může mít strukturu nanovláken, pěnovou strukturu, nebo je hmota uspořádána do plátů, krystalů, nebo jiných tvarů.

Nanovlákenná vrstva je vrstva nanovláken o tloušťce v rozmezí 0,1 až 1000 μm, ve výhodném provedení 5 až 50 μm, jež je tvořena nanovlákny z biokompatibilních polymerů nebo jejich směsí s výhodou o tloušťce 20 až 2000 nm, ve výhodném provedení 100 až 800 nm, která vytvářejí síť s velikostí ok tak, aby stericky neomezovaly pohyb nesených nanočástic a mikročástic, ve výhodném provedení s velikostí pórů 0,1 až 100 μm.

Látky vhodné k přípravě nanovláken či nanoskafoldu jsou polyamidy, polyuretan, polyethersulfon, polyvinylalkohol, polyvinylbutyral, polyakrylonitril, polyethylenoxid, polystyren, polyvinylidenfluorid, polyvinylpyrrolidon, jódovaný povidon, alginát, silk fibroin, kyselina polyakrylová, kyselina polyglykolová, kyselina polyakrylová, želatina, chitosan, kolagen, polyaramid, kyselina polymléčná, poly-ε-kaprolakton, kyselina hyaluronová. Povrch nanovláken může být fyzikálně či chemicky modifikován pro účely navázání a uvolňování částic látek, tedy makromolekulárních částic (např. proteiny, DNA/RNA konstrukty, polysacharidy) a/nebo nanočástic či mikročástic nízkomolekulárních látek. Modifikacemi jsou například změna povrchového náboje a jeho hustoty, změna míry smáčivosti povrchu, vazba ligandů pro selektivní navázání, jako jsou například metalochelatační komplexy, specifické ligandy – biotin, monoklonální protilátky a jejich fragmenty, peptidy atd.

Mukoadhezivní vrstva je vrstva připravená z biokompatibilních látek nebo jejich směsí, která má schopnost přilnout k povrchu sliznic díky interakcím s vrstvou mucinu přítomnou na povrchu sliznice. Vrstva může být tvořena látkou vybranou ze skupiny zahrnující tyto látky: polyakryláty (karbomery, Carbopol, polykarbofil), kyanoakryláty, tragant, xanthanová klovatina, hyaluronová kyselina, guma guar, želatina, pektin, polyvinylpyrrolidon, polyethylenoxid, alginát sodný, chitosan, dextran, deriváty celulózy (např. hydroxypropylmethylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, hydroxyethylcelulóza, hydroxymethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy, oxycelulóza), poloxamery, kopolymery esterů akrylové a methakrylové kyseliny (Eudragit), lektiny, thiolované polymery-thiomery (např. chitosan-N-acethylcystein, chitosan-cystein, chitosan-thioglykolová kyselina, karboxymethylcelulóza-cystein, alginát-cystein).

Mukoadhezivní vrstva dále může obsahovat tzv. plastifikátory, tj. látky zajišťující deformovatelnost a plasticitu vrstvy (např. glycerol, polyethylenglykol, propylenglykoly, látky ze skupiny ftalátů (např. dibutylftalát), citrátů (např. triethylcitrát), popřípadě povrchově aktivní látky (laurylsulfát sodný, deoxycholát sodný, cholát sodný, triton a podobně)

Součástí mukoadhezivní vrstvy a/nebo nanoskafoldu mohou být také pomocné látky usnadňující penetraci částic do sliznice, ve výhodném provedení látky snižující viskozitu hlenové vrstvy

(mukolytika, např. acethylcystein), a/nebo látky povrchově aktivní (deoxycholát sodný, glykocholát sodný, glykodeoxycholát sodný, taurocholát sodný, taurodeoxycholát, cholát sodný, laurylsulfát sodný, polysorbáty (TWEEN80), polyoxyethylen, cethyltrimethylamonium bromid, cethylpyridinium chlorid, benzalkonium chlorid a podobně) a/nebo chelatační látky (např. kyselina ethylendiamintetraoctová, EDTA) a/nebo mastné kyseliny (např. olejová kyselina, kaprinová kyselina, laurová kyselina, methyloleát) a/nebo polyoly (např. propylenglykol, polyethylenglykol) a/nebo dextransulfát a/nebo sufoxidy (např. dimethylsulfoxid) a/nebo Azone® (1-dodecylazacykloheptan-2-on), fosfatidylcholin, lysofosfatidylcholin, methoxysalicylát, menthol, aprotinin, dextransulfát, cyklodextriny, 23-laurylether a podobně.

Součástí mukoadhezivní vrstvy a/nebo nanoskafoldu mohou být také inhibitory proteolytických enzymů.

Dále může mukoadhezivní nosič obsahovat krycí vrstvu. V takovém případě je buď pořadí vrstev nanoskafold – mukoadhezivní vrstva přesahující alespoň v části svého povrchu nanoskafold – krycí vrstva, nebo je s krycí vrstvou v části jejího povrchu spojen nanoskafold a v části jejího povrchu mukoadhezivní vrstva.

Krycí vrstva je vrstva, která nemá mukoadhezivní vlastnosti. Je tvořena filmotvornou látkou, nebo látkou, kterou je možno zvláknit. Buď se použije látka samotná nebo ve směsi s dalšími vyjmenovanými látkami a/nebo látkami upravujícími vlastnosti vrstvy (plastifikátory, povrchově aktivní látky, látky upravující pH, iontovou sílu apod.)

Příkladem vhodných látek pro vytvoření krycí vrstvy jsou deriváty celulózy (ethylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, hydroxyethylcelulóza, hydroxymethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy, methylcelulóza, oxycelulóza, ftalan a octan celulózy, celacefát), kopolymery esterů akrylové a methakrylové kyseliny (Eudragit®), polyakryláty (karbomery, Carbopol, polykarbofil), kyanoakryláty, hyaluronová kyselina, želatina, pektin, polyvinylpyrrolidon, polyethylenoxid, algináty, arabská klovatina, šelak, chitosan, vosky, kyselina stearová, dextran, poloxamery, polykaprolakton.

Jako plastifikátory lze použít například polyoly (glycerol, polyethylenglykol, propylenglykol), látky ze skupiny ftalátů (př. dibutylftalát), citrátů (př. triethylcitrát).

Tloušťka krycí vrstvy může být variabilní, ve výhodném provedení 0,1 až 100 μm a je uspořádána ve formě polymerního filmu nebo nanovláken. Tato vrstva zabraňuje penetraci částic a molekul směrem od sliznice a zajišťuje dosažení vysoké lokální koncentrace částic a molekul na sliznici po dostatečně dlouhou dobu (časový interval v řádu desítek minut až hodin) Krycí vrstva může být nanesena například sprejováním roztoku polymeru na mukoadhezivní vrstvu, nebo může být roztok polymeru nanášen metodou elektrostatického zvlákňování. Krycí vrstva svými vlastnostmi zabrání ulpívání systému na aplikátor nebo na prst během procesu aplikace, a/nebo dodává potřebné mechanické vlastnosti celému systému, které zajistí jednoduchou manipulaci s lékovou formou, a/nebo po aplikaci zabraňuje mukoadhezi na jiné než zamýšlené místo aplikace, a/nebo prodlouží interval adheze a zabrání uvolňování nanočástic z nanoskafoldu do dutiny ústní.

Krycí vrstva může být zcela nerozpustná nebo se může postupně rozpouštět. Zcela nerozpustná vrstva prodlouží interval adheze nosiče a zabrání úniku částic během setrvání nosiče na místě aplikace. Ve výhodném provedení je krycí vrstva mukoadhezivního nosiče připravena z rozpustných materiálů, které se rozpouštějí takovou rychlostí, aby nedošlo k rozpuštění jednotlivých vrstev dříve, než dojde k uvolnění částic z nosiče. Po uvolnění částic a následné dezintegraci nosiče mechanismem eroze a rozpouštění jednotlivých složek již v tomto případě není nutné nosič odstraňovat. V případě nedokonalého rozpuštění jsou po požadovaném aplikačním intervalu jednotlivé fragmenty posunuty do dalších částí trávicí soustavy společně se slinami, případně jídlem či pitím.

Kromě toho může mukoadhezivní nosič ve výhodném provedení obsahovat mezivrstvu, která přiléhá k nanoskafoldu. Při použití nosiče je mezivrstva na té straně nanoskafoldu, která nepřiléhá ke sliznici.

Mezivrstva je vrstva polymeru nebo jiné látky, která nemá mukoadhezivní vlastnosti. Její tloušťka může být variabilní, ve výhodném provedení 0,1 až 100 µm a je uspořádána ve formě polymerního filmu nebo nanovláken. Je umístěna mezi nanoskafoldem a mukoadhezivní a/nebo krycí vrstvou, s nimiž je pevně spojena. Mezivrstva je neprostupná pro částice nesené v nanoskafoldu a zabraňuje jejich vymytí z nosiče směrem od sliznice. Nerozpustná nebo pomalu rozpustná mezivrstva je připravená s výhodou z polymerních filmotvorných látek běžně používaných ve farmaceutické technologii nebo je připravená ze zvlákňovatelných polymerů uspořádaných do nanovláken. Příkladem vhodných látek pro vytvoření mezivrstvy jsou deriváty celulózy (ethylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, hydroxyethylcelulóza, hydroxymethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy, methylcelulóza, oxycelulóza, ftalan a octan celulózy, celacefát), kopolymery esterů akrylové a methakrylové kyseliny (Eudragit®), polyakryláty (karbomery, Carbopol, polykarbofil), kyanoakryláty, hyaluronová kyselina, želatina, pektin, polyvinylpyrrolidon, polyethylenoxid, algináty, arabská klovatina, šelak, chitosan, vosky, kyselina stearová, dextran, poloxamery, polykaprolakton.

Jako plastifikátory lze použít například polyoly (glycerol, polyethylenglykol, propylenglykol), látky ze skupiny ftalátů (př. dibutylftalát), citrátů (př. triethylcitrát).

Mezivrstva brání úniku částic z nanoskafoldu do a/nebo přes mukoadhezivní vrstvu. Tento únik by mohl nastat vlivem bobtnání mukoadhezivního polymeru, působením osmotických sil a difuzí částic.

Jednotlivé vrstvy jsou předem připraveny a spolu navzájem pevně spojeny, nebo jsou naneseny ve formě spreje roztoku látky, pevných částic dané látky, nebo látky ve formě nanovláken, přičemž spojení tak probíhá zároveň s tvorbou vrstvy.

Látka je ve formě částic, které jsou do nanoskafoldu vloženy po jeho vytvoření (nejsou tedy součástí nanovláken nebo součástí vlastního nanoskafoldu), tedy ukotveny či naadsorbovány. Částicemi mohou být liposomy, nanočástice, mikročástice nebo makromolekuly. Nanočástice jsou částice o velikosti 1 až 1000 nm tvořené biokompatibilní látkou. Látky nejčastěji používané pro přípravu nanočástic jsou například alifatické polyestery (kyselina polymléčná, polyglykolová a kopolymery kyseliny mléčné a glykolové, poly-ε-kaprolakton), polyalkylkyanoakryláty, polyhydroxyalkanoáty, hydroxymethylmetakryláty, polystyrensulfonová kyselina, polystyrene-poly(ethylenglykol), poly(organofosfazen), polyethylenoxid, želatina a polysacharidy (chitosan, hyaluronová kyselina, alginová kyselina). Pro přípravu liposomů se použijí lipidy a fosfolipidy.

Tyto částice mohou nést léčivo, antigen, alergen, fyziologicky aktivní látku, nukleovou kyselinu, protein, peptid, polysacharid. Částice mohou být tvořeny přímo některou z vyjmenovaných látek (např. léčivo, antigen, protein, polysacharid, nukleová kyselina), nebo jsou částicemi například viry, virům podobné částice (virus-like particles), polymerní částice, lipidové částice. Vhodnými částicemi jsou zejména liposomy, polymerní nanočástice, dendrimery, niosomy, konjugáty nízkomolekulárních látek a polymerů, komplexy látek s cyklodextriny, nanoemulze, bakteriální obaly. Nanočásticemi se rozumí i micely připravené z povrchově aktivních látek nebo jejich směsí. Mikročástice jsou částice o velikosti 1 až 20 µm tvořené biokompatibilní látkou vhodnou k přípravě mikročástic a mohou nést léčivo, antigen, alergen, fyziologicky aktivní látku, nukleovou kyselinu, protein, peptid, polysacharid, nebo mohou být nanočástice tvořeny přímo některou z vyjmenovaných látek (např. léčivo, antigen, protein, polysacharid, nukleová kyselina) nebo jsou částicemi bakterie, jiné patogeny či jejich části/fragmenty. Látky vhodné pro přípravu mikročástic jsou například alifatické polyestery (kyselina polymléčná, polyglykolová a jejich kopolymery, poly-ε-kaprolakton), polyalkylkyanoakryláty, polyhydroxyalkanoáty, hydroxymethylmetakryláty, polystyrensulfonová kyselina, polystyren-poly(ethylenglykol), poly(organofosfazen),

polyethylenoxid, želatina a polysacharidy (chitosan, hyaluronová kyselina, alginová kyselina). Pro přípravu liposomů se použijí lipidy a fosfolipidy.

Částice mohou být upraveny tak, aby měly schopnost penetrovat vrstvou mucinu, aniž by byla rychlost jejich difuzního pohybu výrazně omezena vzhledem k rychlosti difuzního pohybu částice ve vodném prostředí o viskozitě blízké vodě. Nejčastěji je takové vlastnosti dosaženo povrchovou modifikací částice pomocí polyethylenglykolu nebo jiného hydrofilního elektroneutrálního polymeru, který částici udílí povrchový náboj blízký nule a povrch částice má hydrofilní charakter (Fröhlich E, Roblegg E. J. Nanosci. Nanotechnol. 2014 Jan; 14(1): 126-36).

Nanoskafold může kromě aktivní látky obsahovat, popřípadě i urychlovače absorpce a/nebo pomocné látky, zejména pomocné látky usnadňující uvolnění nesených částic k povrchu sliznice a/nebo průnik částic přes vrstvu mucinu a/nebo průnik částic do sliznice. Urychlovače absorpce (například acethylcystein) v místě aplikace rozvolní strukturu přiléhající vrstvy mucinu a/nebo rozvolní mezibuněčné struktury epitelu, zejména extracelulárních lipidů obsažených ve vrchní třetině epitelu. Pomocné látky zahrnují dále například kryoprotektivní látky, antioxidanty, stabilizátory, antimikrobní přísady, povrchově aktivní látky, např. detergenty, tenzidy, emulgátory, mukolytika, sacharózu, deoxycholát. Kryoprotektivní látky umožní stabilizaci částic v procesu lyofilizace. Formulace částic a nanočástic do mukoadhezivního nosiče umožňuje kombinovat celou řadu látek nutných pro funkčnost preparátu a stabilitu komponent v průběhu výrobního procesu a skladování produktu.

Nanoskafold slouží jako rezervoár pro mikročástice nebo nanočástice, které jsou k nanovláknům reverzibilně adsorbovány fyzikálně, chemicky a/nebo jsou volně rozprostřeny mezi vlákny. Částice jsou samovolně uvolňovány z nanoskafoldu po aplikaci mukoadhezivního nosiče na sliznici. Nanoskafold sloužící jako rezervoár pro částice má vhodné rozměry pórů ve struktuře nebo ok mezi jednotlivými nanovlákny, které neomezují difuzní pohyb nesených částic. Výhodou je, že viskozita roztoku uvnitř nanoskafoldu, v němž se částice pohybují, není ovlivněna vlastnostmi nosiče. S tímto problémem se setkáváme u současných systémů, které využívají mukoadhezivní gely s vysokou vnitřní viskozitou. Pro uvolnění částic z gelové vrstvy je také nejprve nutná hydratace gelu a rozvolnění jeho struktury, což sníží efektivitu přenosu nesených částic ke sliznici. Rychlost difuzního pohybu částic v nanoskafoldu je závislá pouze na viskozitě vnějšího vodného prostředí. Současně velmi velký povrch nanovláken nebo pórů představuje matrici s velkou kapacitou pro adsorpci částic. Zároveň je k dispozici velký prostor pro umístění nanočástic.

Míra a rychlost uvolňování částic z mukoadhezivního nosiče částic je ovlivněna jednak povrchovými vlastnostmi nanovláken či pórů v nanoskafoldu, jednak povrchovými vlastnostmi nesených částic. Mezi tyto vlastnosti patří hydrofilní/hydrofobní charakter povrchu nanočástic a nanovláken či pórů, povrchový náboj nanočástic a nanovláken či pórů, tvar a velikost částic, a struktura nosných nanovláken či pórů. Rychlost a míra uvolňování nanočástic z nanoskafoldu je s výhodou zvýšena povrchovou úpravou nanovláken či pórů (například zvýšení míry smáčivosti oxidací povrchu nanovláken či pórů v plasmě, ošetřením nanoskafoldu roztokem hydroxidu sodného, nebo adsorpcí vhodných povrchově aktivních látek (například soli žlučových kyselin, laurylsulfát sodný, a další) a také povrchovou úpravou nanočástic, například ovlivněním náboje částic nebo s výhodou povrchovou modifikací částic polyethylenglykolem. Povrch částic může být modifikován adsorpcí povrchově aktivní látky.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy mukoadhezivního nosiče, jehož podstata spočívá v tom, že se připraví nanoskafold, následně se spojí s mukoadhezivní vrstvou a/nebo krycí vrstvou. Ve výhodném provedení se před spojením mezi nanoskafold a mukoadhezivní a/nebo krycí vrstvu vřadí mezivrstva. V jednom výhodném provedení se mukoadhezivní a/nebo krycí vrstva a/nebo mezivrstva vytvoří například sprejováním roztoku polymeru a sušením rozpouštědla. V dalším výhodném provedení se mukoadhezivní vrstva a/nebo mezivrstva a/nebo krycí vrstva vytvoří ve formě nanovláken (například elektrostatickým zvlákňováním), a poté se pevně spojí s příslušnými

vrstvami v požadovaném pořadí. V jiném provedení způsobu přípravy se nanoskafold připraví *in situ* na mukoadhezivní a/nebo krycí vrstvě a/nebo mezivrstvě.

Je-li nanoskafoldem nanovlákenná vrstva, může se připravit například elektrostatickým zvlákňováním.

Na nanoskafold se buď po jeho připravení nebo až po zkompletování všech vrstev mukoadhezivního nosiče nanese látka, s výhodou ve formě roztoku, koloidu nebo suspenze.

Ve výhodném provedení může být mukoadhezivní nosič s nanesenou látkou následně lyofilizován. To umožňuje dlouhodobé bezproblémové skladování, důležité v případě, např. vakcín.

Předmětem vynálezu je dále neinvazivní způsob aplikace látky ve formě částic na sliznice, zejména na sublinguální, bukální orální a/nebo vaginální sliznici, jehož podstata spočívá v tom, že se mukoadhezivní nosič podle předkládaného vynálezu aplikuje manuálně nebo pomocí aplikační pomůcky přímo na cílovou sliznici přiložením, nebo přitlačením po dobu 1 až 30 sekund, s výhodou 3 až 10 sekund tak, že nanoskafold je přivrácený ke sliznici. Po odstranění tlaku nosič adheruje k slizničnímu povrchu pomocí mukoadhezivních sil vzniklých mezi mukoadhezivní vrstvou a vrstvou mucinu na sliznici.

V porovnání s běžně používanými postupy a nosiči (zejména aplikace částic s mukoadhezivními vlastnostmi) umožňuje tento způsob neinvazivní aplikace nosiče dosáhnout vysoké lokální koncentrace nanočástic a mikročástic v těsné blízkosti povrchu sliznice po dostatečnou dobu, aby se dosáhlo požadovaného účinku aktivní látky. Tyto faktory jsou rozhodující pro efektivnější přenos částic do sliznice, což umožní navození terapeutického či profylaktického účinku při podání nižší celkové dávky částic i substancí nesených částicemi. Díky aplikaci částic pomocí uvedeného nosiče je eliminován vliv pohybu sliznice a jazyka na odstranění částic ze sliznice při běžných činnostech jako je příjem potravy, pití a mluvení a je výrazně omezen vliv ředění aplikovaných částic slinami a přijímanými tekutinami. Tím je řešen problém zajištění rovnoměrného dávkování částic a substancí nesených částicemi, neboť jsou výrazně potlačeny mechanismy eliminace částic z mukózního povrchu. Navržené řešení odstraňuje nedostatky současných systémů pro aplikaci na slizniční povrchy. Tyto systémy jsou založeny na aplikaci částic s mukoadhezivní úpravou povrchu, která na druhou stranu díky interakcím s mucinem negativně ovlivní průnik částic k povrchu sliznice. Tím částice sice zůstává na místě aplikace, kde může uvolňovat nesenou látku, ale není schopna efektivně pronikat do sliznice přes vrstvu mucinu. V dosavadním stavu techniky jsou v některých případech aplikovány tzv. mucin penetrující částice, ale ty se naopak neudrží po delší časový interval na místě aplikace, protože mohou být pohyby jazyka a tekutinami přítomnými v dutině ústní odstraněny a neseny do dalších částí trávicí soustavy. Podmínkou rovnoměrného dávkování, stejně jako u dalších orálních lékových forem, je omezení příjmu potravy, pití, nebo omezení pohybů jazyka v určitém časovém intervalu po aplikaci lékové formy. Využití mukoadhezivních gelů, které se vyznačují vysokou viskozitou, může zbrzďovat prostup nanočástic tímto gelem ke sliznici.

Objasnění výkresů

Obr. 1 ukazuje několik provedení mukoadhezivního nosiče ve tvaru kulatého terče podle příkladu 1.

Obr. 2 ukazuje graf rychlosti rozpouštění krycí vrstvy (příklad 1).

Obr. 3. Impregnace liposomů povrchově modifikovaných polyethylenglykolem (PEG liposomy) do nanovlákenné vrstvy připravené ze směsi polymerů chitosan/polyethylenoxid (PEO) (příklad 4). A) Snímek z transmisní elektronové mikroskopie ukazuje liposomy adsorbované na povrchu nanovláken. B) Ilustrativní snímek z rastrovací elektronové mikroskopie ukazuje liposomy

adsorbované na povrchu nanovláken. C) Průřez mukoadhezivním nanovlákenným nosičem částic s impregnovanými liposomy v nanovlákenné vrstvě. D) Detail nanovlákenné vrstvy penetrované PEG liposomy (snímek z rastrovací elektronové mikroskopie ve zmrazeném stavu).

Obr. 4. Penetrace a adsorpce liposomů s povrchově vázaným modelovým zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) do nanovlákenné vrstvy připravené z polykaprolaktonu (PCL). Snímky liposomů a nanovláken byly pořízeny metodou konfokální mikroskopie (příklad 4). A) Nanovlákna značená pomocí fluorescenčního markeru lyssamin-rhodamin. B) Adsorbované liposomy s povrchově vázaným GFP. C) Překryv obrázků A a B. D) detailní zobrazení liposomů s GFP.

Obr. 5. Velikost a zeta-potenciál nanočástic tvořených kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové povrchově modifikovaných polyethylenglykolem (PLGA-PEG) (příklad 4). A) Velikost nanočástic (Z-průměr 135 nm, index polydisperzity: 0,144). B) Zeta potenciál PLGA-PEG nanočástic (-2,21 mV).

Obr. 6. Penetrace hydrofilního nízkomolekulárního fluorescenčního markeru 6-karboxyfluorescein a značených PLGA-PEG nanočástic do nanovlákenné vrstvy (příklad 4). A) Penetrace fluorescenčního markeru 6-karboxyfluorescein do nanovlákenné vrstvy připravené ze směsi chitosan/PEO značené fluorescenčním markerem lyssamin-Rhodamin. B) Penetrace fluorescenčního markeru 6-karboxyfluorescein do nanovlákenné vrstvy vyrobené z PCL. C) Penetrace PLGA-PEG nanočástic značených chloristanem 3,3´-dioktadecyloxakarbokyaninem (DiOC18) do nanovlákenné vrstvy PCL.

Obr. 7. Penetrace a adsorpce PLGA-PEG nanočástic do nanovlákenné vrstvy (příklad 4). A) Nanovlákenná vrstva připravená ze směsi polymerů chitosan/PEO. B, C) adsorbované PLGA-PEG nanočástice na nanovláknech. D) Detailní zobrazení. E) PLGA-PEG nanočástice značené fluorescenční značkou lyssamin-rhodamin adsorbované na nanovláknech. F) PLGA-PEG nanočástice impregnované v nanovlákenné vrstvě, částice jsou umístěny v prostoru mezi nanovlákny, nejsou adsorbovány přímo na nanovlákna.

Obr. 8. Vliv použitého materiálu, modifikace povrchu nanovláken a vliv přítomnosti povrchově aktivních látek na množství uvolněných PLGA částic z nanovláken (%) (příklad 5).

Obr. 9. Vliv použitého materiálu, modifikace povrchu nanovláken na množství uvolněných lyssamin-rhodamin liposomů z nanovláken (%) (příklad 5).

Obr. 10. Adsorpce mikročástic typu „bacterial ghosts“ (BG) na nanovlákenné vrstvě vyrobené z PCL (příklad 6). A) Mikročástice typu „bacterial ghosts“ impregnované v nanovlákenné vrstvě (skenovací elektronová mikroskopie, SEM). B) Detailní snímek mikročástice adsorbované na povrchu nanovlákna (SEM). C) Fluorescenčně značené mikročástice typu „bacterial ghosts“ impregnované v nanovlákenné vrstvě (konfokální mikroskop). D) Příčný pohled, lze pozorovat impregnaci částic v celé šířce nanovlákenné vrstvy.

Obr. 11. Příčný řez sublinguální prasečí sliznicí. Lze pozorovat penetraci PEG liposomů do prasečí sublinguální sliznice (příklad 7). A) Jádra, B) Fluorescenčně značené liposomy, C) Překryv A) a B), dále je označen actin.

Obr. 12. Příčný řez mukoadhezivním nosičem částic aplikovaným na sliznici – lze pozorovat jednotlivé vrstvy nosiče a penetraci PEG liposomů do prasečí bukální sliznice (kryo-SEM) (příklad 7). A) Mukoadhezivní nanovlákenný nosič adherovaný na bukální sliznici. B) Detail A), vrchní odchlipující se vrstva je mukoadhezivní vrstva připravená ze směsi polymerů hydroxypropylmethylcelulózy (HPMC) a Carbopol 934P, spodnější odchlipující se vrstva je nanovlákenná vrstva sloužící jako rezervoár pro nanočástice, pod oběma vrstvami je vrchní část sliznice. C) Detail mukoadhezivní vrstvy. D) Detail nanovlákenné vrstvy. E) Na snímku lze

pozorovat těsný kontakt nanovlákenné vrstvy se sliznicí. F) Detail E), na snímku lze pozorovat nanočástice adherované k nanovláknům a částice procházející přes vrstvu mucinu.

Obr. 13. Příčný řez bukální prasečí sliznicí. Lze pozorovat penetraci PEG liposomů do prasečí bukální sliznice (příklad 7). A) Jádra, B) fluorescenčně značené liposomy, C) překryv A) a B), dále je označen actin.

Obr. 14. Příčný řez sublinguální prasečí sliznicí. Lze pozorovat penetraci PLGA-PEG nanočástic do prasečí sublinguální sliznice (formulace připravena s obsahem 1% deoxycholátu sodného jako urychlovače absorpce nanočástic) (příklad 7). A) Jádra, B) fluorescenčně značené liposomy, C) překryv A) a B), dále je označen actin.

Obr. 15. Příčný řez sublinguální prasečí sliznicí. Lze pozorovat vliv přídavku 1% deoxycholátu sodného na průnik PLGA-PEG nanočástic do sublinguální prasečí sliznice (příklad 7). A) Penetrace PLGA-PEG nanočástic z nanovlákenné vrstvy do sublinguální sliznice. B) Penetrace PLGA-PEG nanočástic z nanovlákenné vrstvy s přídavkem 1% deoxycholátu sodného do sublinguální sliznice.

Obr. 16. Nanovlákenný mukoadhezivní nosič částic použitý pro experimenty na myších (příklad 8). A) Celý systém s nanovlákennou vrstvou uprostřed a překrývajícím adhezivním okrajem. B) Detail nanovlákenné vrstvy s adsorbovanými PLGA-PEG nanočásticemi.

Obr. 17. Příčný řez myší sublinguální sliznicí po aplikaci PLGA-PEG nanočástic in-vivo (příklad 8). A) Specializované buňky imunitního systému jsou přítomné ve velkém množství v sublinguální oblasti. Buňky jsou označené anti HLA-DR protilátkou (žlutá barva). B) Bílé šipky naznačují PLGA-PEG částice (červená), které byly pohlceny fagocytujícími buňkami (modrá – jádra buněk). C) Detailní snímek potvrzuje internalizaci částic uvnitř fagocytující buňky.

Obr. 18. Množství nanočástic uvolněných z lyofilizované nanovlákenné vrstvy (příklad 9). Vliv 20% sacharózy, 1% deoxycholátu a směsi sacharózy a deoxycholátu (finální koncentrace 20% a 1%) přítomné v nanášeném roztoku na počet částic uvolněných z nanovlákenné vrstvy po lyofilizaci.

Obr. 19. Celkový pohled na mukoadhezivní systém s nanovlákennou vrstvou pro aplikaci nanočástic (příklad 1). A – V pravé části obrázku je patrný přesahující adhezivní okraj systému pro aplikaci nanočástic. Nanovlákenná vrstva uprostřed slouží jako rezervoár pro nanočástice. B – Detail nanovlákenné vrstvy nanesené na povrchu mukoadhezivního filmu.

Obr. 20. Průřez mukoadhezivním nosičem částic s nanovlákennou vrstvou fixovanou na adhezivní vrstvu polymeru (příklad 1). Snímky jsou pořízeny metodou kryoelektronové mikroskopie. Snímky ukazují příčný řez systémem, který byl pozorován po zlomení při -170 °C. A) Celkový pohled na příčný lom zobrazuje všechny tři vrstvy systému – krycí vrstvu, mukoadhezivní vrstvu a nanovlákennou vrstvu B) Detail krycí polymerní vrstvy z ethylcelulózy na povrchu mukoadhezivní vrstvy (černá šipka), C) detail spojení nanovlákenné vrstvy a mukoadhezivní vrstvy, černá šipka ukazuje pevné těsné spojení, zároveň ukazuje, že při zvoleném způsobu spojení vrstev nedochází k průniku ani poškození obou vrstev.

Obr. 21. Aplikace mukoadhezivního nosiče částic na sublinguální sliznici u člověka (příklad 2). Snímek byl pořízen 3 hodiny po aplikaci, pohyby jazykem při mluvení ani při jídle neovlivnily adhezivní vlastnosti.

Obr. 22. Příčný řez sublinguální prasečí sliznicí a přilehlým mukoadhezivním nosičem nanočástic (příklad 3). A), B) Přehledný snímek, na povrchu sublinguální prasečí sliznice je patrná nanovlákenná vrstva po 4 hodinové inkubaci. Na povrchu nanovlákenné vrstvy jsou patrny zbytky

mukoadhezivní vrstvy. C) Detail povrchu epitelu s nanovlákennou vrstvou, mezi nanovlákennou vrstvou a epiteliální sliznicí je patrná vrstva mucinu.

Obr. 23. Penetrace PLGA-PEG nanočástic do prasečí sublinguální sliznice a do regionální mízní uzliny po *in vivo* aplikaci (příklad 10). A) PLGA-PEG nanočástice ve vrstvě epitelu sublinguální sliznice, A1) – jádra, A2) - fluorescenčně značené částice, A3) – překryv. B) PLGA-PEG nanočástice v submukózní vrstvě, B1) – jádra, B2) – fluorescenčně značené částice, B3) – překryv. C) PLGA-PEG nanočástice v regionální mízní uzlině, C1) – jádra, C2) – fluorescenčně značené částice, C3) – překryv.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Příprava nanovlákenného mukoadhezivního nosiče částic

Mukoadhezivní nanovlákenný nosič pro aplikaci částic na mukózní povrch se skládá z několika vrstev. Mukoadhezivní vrstva 2 je vrstva zajišťující adhezi celého systému na sliznici a je tvořena filmem o různé tloušťce připraveným z látek s mukoadhezivními vlastnostmi, nebo jejich směsí. Zpravidla je tato vrstva ze strany určené pro orientaci do dutiny ústní kryta krycí vrstvou 3, která je buď pozvolna rozpustná, nebo nerozpustná v prostředí dutiny ústní a nemá adhezivní vlastnosti. Je tvořena některou z filmotvorných látek používaných ve farmacii. Filmotvorná látka se na mukoadhezivní vrstvu nanáší ve formě spreje směsi polymerního roztoku a dalších látek (např. změkčovadla). Nanovlákenná vrstva 1 slouží jako rezervoár pro nanočástice, kde jsou nanočástice umístěny v prostoru mezi nanovlákny a/nebo na povrchu nanovláken, odkud jsou uvolňovány do sliznice. Nanovlákenná vrstva je nanesena na adhezivní vrstvu a) *in situ* vytvořením s využitím procesu elektrostatického zvlákňování, b) nanesením předem připravené nanovlákenné vrstvy na mukoadhezivní vrstvu.

Obr. 1 ukazuje několik provedení mukoadhezivního nosiče ve tvaru kulatého terče, přičemž pro první dvě provedení je v řezu A-A, resp. v řezu B-B ukázáno několik možností sesazení vrstev (1 – nanovlákenná vrstva, 2 – mukoadhezivní vrstva, 3 – krycí vrstva, 4 – mezivrstva). Třetí a čtvrté provedení (řezy C-C a D-D) ukazují situaci, kdy je nanovlákenná vrstva nanesena přímo na krycí vrstvě a mukoadhezivní vrstva je nanesena rovněž přímo na krycí vrstvě, v těch částech, kde není nanesena nanovlákenná vrstva.

Příprava mukoadhezivní vrstvy*:* Vrstva zajišťující adhezi celého systému k cílové orální sliznici byla připravena ze směsi biokompatibilních mukoadhezivních polymerů Carbopol 934P (Noveon, Inc., USA) a Methocel K4M (HPMC) (Colorcon, GB). 300 mg Carbopolu 934P a 100 mg HPMC se rozpustilo ve 25 ml vody. Do roztoku polymerů bylo přidáno 20 µl glycerolu sloužící jako změkčovadlo. Metodou odpaření rozpouštědla z polymerního roztoku se při 45 °C připravil adhezivní film s vhodnými mechanickými vlastnostmi. Tloušťka takto připraveného filmu je přibližně 85 µm (viz obr. 4A).

Příprava nanovlákenné vrstvy*:* Jako příklad lze uvést výrobu dvou typů nanovlákenných vrstev:

Chitosan/polyethylenoxid (PEO):

Roztok 8% chitosanu a 4% roztok PEO byly připraveny odděleně. Chitosan byl rozpuštěn v 10% kyselině citrónové a PEO byl rozpuštěn v destilované vodě. Oba roztoky byly míchány odděleně (po dobu 10 hodin) na elektromagnetickém míchadle. V následující operaci se do roztoku PEO přidal chlorid sodný v koncentraci 0,85 mol/l. Následně se polymerní roztok chitosanu a PEO smíchal tak, aby se získal roztok v hmotnostním poměru 8:2 chitosan/PEO. Polymerní roztok byl následně elektrostaticky zvlákňován jednak na netkanou textilii typu spun-bond (PEGATEX S 30 g/m^2, antistatická, modrá), tak na mukoadhezivní vrstvu a to tak, aby se vytvořila nanovlákenná vrstva ve třech různých plošných hmotnostech a to 5, 10 a 15 g/m^2. K získání

různých plošných hmotností nanovlákenné vrstvy bylo zapotřebí elektrostaticky zvlákňovat polymerní roztok po různou dobu. Podmínky elektrostatického zvlákňování byly: vzdálenost uzemněného sběrného kolektoru od elektrody 10 cm, elektrické napětí 50 kV, teplota 21 °C, vlhkost 60 %.

Polykaprolakton (PCL):

Komerčně dostupný PCL byl rozpuštěn ve směsi rozpouštědel aceton/ethanol (7/3 v/v) v koncentraci 16%. Elektrostatické zvlákňování probíhalo za těchto podmínek: vzdálenost uzemněného sběrného kolektoru od elektrody 10 cm, elektrické napětí 50 kV, teplota 21 °C. Elektrostatické zvlákňování probíhalo na netkanou textilii typu spun-bond (PEGATEX S 30 g/m^2, antistatická, modrá). Plošná hmotnost výsledné nanovlákenné vrstvy dosahovala 5 g/m^2 nebo 15 g/m^2. Tloušťka nanovlákenné vrstvy polykaprolaktonu s plošnou hmotností 15 g/m^2 se pohybuje v rozmezí 55 až 70 µm. Tloušťka nanovlákenné vrstvy polykaprolaktonu s plošnou hmotností 5 g/m^2 se pohybuje v rozmezí 10 až 18 µm.

Nanášení krycí neadhezivní vrstvy: Připravená mukoadhezivní vrstva byla z jedné strany potažena krycí neadhezivní vrstvou. Krycí neadhezivní vrstva zlepšila mechanické vlastnosti, díky ní se zamezilo adhezi nanovlákenného mukoadhezivního nosiče na jiné než cílové místo při aplikaci. Krycí vrstva usnadní aplikaci celého systému na cílové místo a manipulaci s ním, prodlouží interval setrvání systému na sliznici a omezí nebo zcela zabrání difuzi nanočástic z místa aplikace směrem do prostoru dutiny ústní.

Krycí vrstva může být tvořena polymerem rozpustným v prostředí dutiny ústní anebo polymerem nerozpustným. Mechanické vlastnosti a rychlost rozpouštění nosiče jsou ovlivněny volbou krycí vrstvy.

Jako příklad v prostředí dutiny ústní rozpustného potahu s vhodnými mechanickými vlastnostmi byl zvolen Eudragit® 100-55L. Eudragit® 100-55L byl nanesen sprejováním ve formě 1% ethanolového roztoku s přídavkem propylenglykolu jako změkčovadla (0,25 g Eudragit 100-55L, 35 µl propylenglykol, 25 ml ethanol (96%)). Výsledná tloušťka potahu se v závislosti na množství naneseného roztoku polymeru pohybovala v řádu několika set nanometrů až jednotek µm (viz obr. 20).

Pro přípravu v prostředí dutiny ústní nerozpustné krycí vrstvy se jako příklad použil polymer ethylcelulóza. Polymer byl nanesen ve formě spreje 2,5% roztoku ethylcelulózy v ethanolu (0,25 g ethylcelulóza, 17,5 µl propylenglykol, 10 ml ethanol (96 %)) na povrch mukoadhezivní vrstvy. Pro rychlejší odpaření rozpouštědla byla mukoadhezivní vrstva umístěna na vyhřívanou desku o teplotě 50 °C. Ethylcelulóza i Eudragit® 100-55L se běžně používají při přípravě humánních farmaceutických formulací, jsou netoxické a bezpečné.

Stanovení rychlosti rozpouštění krycího polymerního filmu: Pro stanovení rychlosti rozpouštění krycího polymerního filmu byla do roztoku polymeru přidána fluorescenční hydrofilní značka 6-karboxyfluorescein, kterou byla označena krycí vrstva nanovlákenného mukoadhezivního nosiče. Nosič byl umístěn na dno nádoby o objemu 100 ml. Jako disoluční médium byl zvolen fosforečnanový pufr o pH 6,0. Rychlost rozpouštění krycí vrstvy se stanovila jako zvyšující se koncentrace 6-karboxyfluoresceinu v pufru v čase.

Zatímco potah připravený z Eudragitu 100-55L se kompletně rozpustil přibližně za 30 minut, potah připravený z ethylcelulózy se během sledovaného časového intervalu téměř nerozpouštěl. (viz obr. 2).

Spojení nanovlákenné vrstvy a mukoadhezivní vrstvy*:* Nanovlákenná vrstva tvořená směsí polymerů chitosan/PEO o tloušťce cca 10 µm byla připevněna přitlačením na mukoadhezivní vrstvu (směs HPMC a Carbopol 934P v hmotnostním poměru 1:3) po mírném navlhčení

mukoadhezivní vrstvy pomocí vodní páry. Nedochází k průniku mukoadhezivní vrstvy do vrstvy nanovláken, ale k jejich těsnému a mechanicky odolnému spojení. Pružnost obou vrstev zajistí těsný kontakt s cílovou tkání.

Příprava nanovlákenné vrstvy procesem elektrostatického zvlákňování na mukoadhezivní vrstvu: Nanovlákennou vrstvu lze připravit procesem elektrostatického zvlákňování polymerního roztoku přímo na mukoadhezivní vrstvě.

Mukoadhezivní vrstva byla umístěna na sběrný kolektor, pod kterým byla umístěna zvlákňovací elektroda. Polymerní roztok byl nadávkován na zvlákňovací elektrodu v objemu 1,5 ml a zvlákněn přímo na mukoadhezivní vrstvu za těchto podmínek: vzdálenost uzemněného sběrného kolektoru od elektrody 10 cm, elektrické napětí 30 kV.

V obou příkladech spojení vrstev nosiče je dosaženo mechanicky odolného spojení bez vlivu na strukturu a funkci obou vrstev.

Obr. 19 znázorňuje systém nanovlákenné vrstvy a mukoadhezivní vrstvy, obr. 20 průřez systémem nanovlákenné vrstvy, nanovlákenné vrstvy a krycí vrstvy.

Příklad 2: Způsob aplikace mukoadhezivního nosiče na sliznici

Mukoadhezivní nanovlákenný nosič částic se aplikuje na orální sliznici, zejména sublinguální a bukální, která není u člověka keratinizovaná. Nanovlákenný mukoadhezivní nosič částic se umístí na prst neadhezivní stranou a lehkým tlakem se přitiskne na cílové místo v dutině ústní, například na spodní stranu jazyka (sublinguální sliznici) nebo na bukální sliznici, po dobu cca 5 sekund, než dojde k vytvoření adheze mezi mukoadhezivní stranou systému a sliznicí. Alternativně je možné použít vhodnou aplikační pomůcku. Aplikační pomůcka je zvláště výhodná v případě veterinárních aplikací. Bylo ověřeno, že ještě 3 hodiny po aplikaci pohyby jazyka při mluvení ani při jídle neovlivnily adhezivní vlastnosti nosiče (obr. 21).

Příklad 3: *Ex-vivo* aplikace mukoadhezivního nosiče na sliznici

Sublinguální prasečí sliznice představuje model, který je svým vlastnosti velmi blízký člověku. Sublinguální a bukální sliznice byla po vyjmutí čerstvě usmrcenému zvířeti omyta fyziologickým roztokem a byla bezprostředně použita pro aplikaci nanočástic pomocí nosiče. Nejprve se nanovlákenná vrstva nosiče nasytila roztokem liposomů nebo nanočástic připravených ze směsi polymerů PLGA a PLGA-PEG o koncentraci 20 mg/ml. Dále se nosič s liposomy nebo nanočásticemi umístil na prst neadhezivní stranou a mírným tlakem po dobu asi 5 sekund se přitisknul na cílové místo. Pro studium průniku liposomů a PLGA nanočástic do tkáně se takto aplikovaný systém na sliznici inkuboval ve vlhké komůrce při 37 °C po dobu 4 hodin. Povrch sliznice byl průběžně vlhčen fyziologickým roztokem tak, aby simuloval tvorbu slin. Stav po 4-hodinové inkubaci je znázorněn na obr. 22.

Příprava liposomů*:* Liposomy byly připraveny metodou hydratace lipidního filmu. Finální velikosti liposomů bylo dosaženo extruzí přes polykarbonátové filtry s póry definované velikosti 100 nm.

Složení liposomů (fluorescenčně značené): 10 % mol 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin-N-[amino(polyethylenglykol)-2000] (DSPE-PEG); 89,5 % mol vaječný fosfatidylcholin (EPC); 0,5 %mol lyssamin-Rhodamin.

Příklad 4: Impregnace nanovlákenné vrstvy nanočásticemi

Do nanovlákenné vrstvy se impregnovala suspenze nanočástic (liposomy nebo PLGA-PEG nanočástic). V závislosti na vlastnostech nanočástic, nanovlákenné vrstvy a metodě přípravy se

nanočástice adsorbovaly na povrch nanovláken, nebo tvořily inkluze v prostoru mezi nanovlákny. Takto připravený nosič pro nanočástice se aplikuje ihned po nanesení nanočástic. Možná je i stabilizace částic v nanovlákenné vrstvě pro dlouhodobé skladování. Částice jsou v nanovlákenné vrstvě uchovány po odpaření kapaliny, jako výhodnější se však jeví stabilizace částic pomocí procesu lyofilizace s přídavkem kryoprotektivních látek do roztoku nanočástic.

Jedním ze způsobů nanášení nanočástic na nanovlákennou vrstvu je nanášení nanočástic v roztoku po spojení nanovlákenné vrstvy s vrstvou adhezivní. To bylo provedeno tak, že byl systém otočen svojí neadhezivní stranou dolů a roztok nanočástic byl aplikován na povrch nanovlákenné vrstvy. Tímto způsobem dojde samovolně k rovnoměrnému rozprostření a impregnaci nanočástic do nanovlákenné vrstvy. Pro impregnaci nanovlákenné vrstvy o ploše 0,5 cm^2 a tloušťce 15 µm bylo použito 2 µl suspenze částic. Koncentrace nanočástic (liposomů nebo PLGA-PEG) byla 20 mg/ml.

Druhým způsobem nanášení je namáčení nanovlákenné vrstvy v roztoku nanočástic. To bylo provedeno tak, že nanovlákenná vrstva byla ponořena do roztoku nanočástic o požadované koncentraci. Tam, kde to vyžadují vlastnosti nanovláken, lze použít vaničková ultrazvuková lázeň pro usnadnění impregnace částic. Pro impregnaci nanovlákenné vrstvy o ploše 0,5 cm^2 a tloušťce 15 µm bylo použito 100 µl roztoku nanočástic (liposomů, liposomů s povrchově vázaným modelovým proteinem nebo PLGA-PEG nanočástic) o koncentraci 20 mg/ml. Do tohoto roztoku byla ponořena nanovlákenná vrstva po dobu 5 minut. V případě penetrace PLGA-PEG nanočástic byla nádobka s roztokem nanočástic ponořena do vaničkové ultrazvukové lázně pro usnadnění impregnace.

Usnadnění impregnace částic do nanovlákenné vrstvy a ovlivnění míry adsorpce nanočástic na povrch nanovláken lze také dosáhnout fyzikální nebo chemickou modifikací povrchu nanovláken.

Příprava liposomů*:* Liposomy byly připraveny metodou hydratace lipidního filmu. Finální velikosti liposomů bylo dosaženo extruzí přes polykarbonátové filtry s póry definované velikosti 100 nm. V případě přípravy liposomů s povrchově vázaným proteinem se připravené liposomy smíchaly v definovaném poměru s rekombinantním His-tagovaným proteinem GFP. Protein se navázal na povrch liposomů pomocí metalochelatace.

Složení PEG liposomů: 10 % mol DSPE-PEG; 90 % mol EPC.

Složení liposomů pro povrchovou modifikaci proteinem *GFP:* 5 % mol 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-karboxypentyl)iminodiaceticacid)sukcinyl] (sůl niklu) (DOGS-NTA-Ni); 19 % mol 1-hexadekanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-fosfo-(1'-rac-glycerol) (POPG); 76 % mol EPC.

Příprava PLGA-PEG nanočástic: Nanočástice byly připraveny rozpuštěním 25 mg polymeru PLGA (mléčná kyselina: glykolová kyselina (50:50), Mw 30,000 až 60,000) (Sigma-Aldrich) a 25 mg polymeru PLGA-PEG (PEG Mw 5,000, PLGA Mw 55,000) (Sigma-Aldrich) v 1 ml dichlormethanu. 1 ml organické fáze byl emulgován v 5 ml 0,7% roztoku cholátu sodného pomocí ultrazvuku o amplitudě 70 %, 1 sekundové pulzy po dobu 5 min. Takto připravená emulze byla zředěna do 20 ml 0,5% roztoku cholátu sodného a organická fáze byla z emulze odstraněna na odparce za sníženého tlaku. Velké agregované částice byly odstraněny centrifugací při 500 otáčkách/min. Ze vzniklé suspenze nanočástic byl přebytečný cholát odstraněn metodou diafiltrace (Spectrum). Stejným způsobem byly částice zkoncentrovány na požadovanou koncentraci. Velikost (A) a zeta-potenciál (B) PLGA-PEG nanočástic byly měřeny metodou dynamického rozptylu světla, výsledek je uveden na obr. 5.

Příklad 5: Uvolňování nanočástic z nanovlákenné vrstvy – vliv použitého materiálu a vliv povrchové modifikace nanovláken na uvolňování nanočástic

Interakce nanočástic a nanovláken v nosné matrici je ovlivněna povrchovými vlastnostmi nanočástic i nanovláken. Rychlost uvolňování i uvolnitelné množství nanočástic je možné ovlivnit polymerem použitým pro výrobu nanovláken i jeho následnou povrchovou modifikací. Povrchové vlastnosti nanočástic je také možné modifikovat pro lepší uvolňování z nanovlákenné vrstvy. Nanočástice musí splnit řadu kritérií pro to, aby byly schopny projít přes mukózní bariéry, a proto je velmi výhodné upravit povrchové vlastnosti nanovláken chemickou nebo fyzikální cestou. Jako příklady možných modifikací jsou uvedeny:

1) chemická úprava nanovláken připravených z PCL
2) fyzikální adsorpce povrchově aktivních látek na povrch nanovláken připravených z PCL

Byl sledován uvolněný počet PLGA-PEG nanočástic a PEG liposomů z nanovlákenné vrstvy penetrované daným typem nanočástic.

Některé povrchové látky (např. laurylsulfát sodný, deoxycholát sodný a další tzv. urychlovače absorpce) mají navíc pozitivní vliv na zvýšení propustnosti sliznice pro léčiva a nanočástice.

Pak přítomné povrchově aktivní látky mohou plnit dvě funkce – zvýšení průniku nanesených nanočástic do sliznice jak vlivem změny bariérových funkcí sliznice, tak zlepšeným uvolňováním nanočástic z nanovlákenné vrstvy.

Chemická úprava nanovláken: Nanovlákna připravená z PCL mají hydrofobní charakter. Pro zvýšení smáčivosti a omezení hydrofobních interakcí s nanočásticemi se jejich povrch upravil namočením nanovlákenné vrstvy do 3 molárního roztoku hydroxidu sodného po dobu 10 min. Po ukončení byla nanovlákenná vrstva několikrát propláchnuta vodou.

Nanesení roztoku nanočástic na nanovlákennou vrstvu: Nanovlákenná vrstva PCL se penetrovala ponořením do roztoku PLGA-PEG nanočástic nebo PEG liposomů o koncentraci 20 mg/ml po dobu 5 min.

Uvolnění nanočástic z nanovlákenné vrstvy do roztoku: Nanovlákenná vrstva PCL kruhového tvaru o ploše 0,5 cm^2 penetrovaná roztokem PLGA-PEG nanočástic se bezprostředně umístila do 0,5 ml vodného roztoku. Za mírného třepání se nanovlákenná vrstva inkubovala po dobu 30 minut. Takto získaný roztok se naředil podle potřeby tak, aby odpovídal parametrům pro měření koncentrace nanočástic zvolenou metodou.

Stanovení počtu uvolněných nanočástic: Uvolněné množství a velikost PLGA-PEG nanočástic byla stanovena metodou „Nanoparticle tracking analysis“ (NanoSight, Malvern, UK). Uvolněné množství liposomů se stanovilo jako intenzita fluorescence roztoku po inkubaci nanovlákenné vrstvy měřená při excitaci 560 nm a emisi 583 nm. Získaná data se přepočetla podle faktoru ředění měřeného roztoku a vypočítalo se množství uvolněných částic (%).

Adsorpce povrchově aktivních látek: Vliv adsorpce povrchově aktivních látek na povrch nanovláken byl studován po penetraci nanovlákenné vrstvy roztokem nanočástic, který navíc obsahoval deoxycholát sodný o koncentraci 1 %. Při druhém způsobu provedení byla nanovlákenná vrstva nejprve namočena do roztoku 1% deoxycholátu sodného, několikrát opláchnuta vodou a osušena. Poté byla impregnována roztokem nanočástic.

Příklad 6: Adsorpce mikročástic typu „bacterial ghosts“

Jako vakcinační systémy jsou aplikovatelné i mikročástice. Jedním takovým typem mikročástic jsou tzv. bakteriální prázdné obaly „bacterial ghosts“ (BG).

BG jsou nepatogenní částice odvozené od bakteriální buňky. Obsahují buněčnou stěnu bakterií včetně antigenních struktur, proti kterým se indukuje specifická imunitní odpověď. Intracelulární

obsah je odstraněn například osmotickým šokem, a proto jsou takto připravené částice neschopné se dále množit. Díky přirozené přítomnosti celé řady látek, které rozpoznává imunitní systém, jako takzvané signály nebezpečí, poskytuje taková částice komplexní signál pro vyvolání specifické imunitní odpovědi proti přítomným antigenním strukturám. Bacterial ghosts mohou být potenciálně využity jako vakcinační částice pro mukózní aplikace.

Fluorescenční značení „bacterial ghosts“: Bacterial ghosts (připravené z *Escherichia Coli*) byly pomocí ultrazvuku dispergovány ve vodě. Fluorescenční marker DiOC18 rozpuštěný v ethanolu byl přidán k suspenzi bakteriálních částic, směs se ultrazvukovala po dobu 1 min tak, aby se fluorescenční marker inkorporoval do stěny částic. Centrifugací a promytím se odstranil přebytek fluorescenčního markeru.

Fluorescenční značení nanovláken*:* Nanovlákenná vrstva připravená z PCL byla označena fluorescenční značkou lyssamin-rhodamin. Označené bakteriální částice byly penetrovány do nanovlákenné vrstvy. Adsorpce bakteriálních částic na nanovlákenné vrstvě byla potvrzena technikou rastrovací elektronové mikroskopie a konfokální mikroskopie (obr. 10).

Příprava nanovlákenné vrstvy s mikročásticemi typu „bacterial ghosts*“:* Suspenze „bacterial ghosts“ se připravila z 1 mg lyofilizátu BG v 1 ml vody pomocí vaničkového ultrazvuku. Do takto připravené suspenze byla ponořena nanovlákenná vrstva a lahvička byla umístěna do vaničkového ultrazvuku na 5 minut.

Příklad 7: Průnik nanočástic (PLGA nebo liposomů) do sublinguální a bukální prasečí sliznice po uvolnění z nanovlákenného mukoadhezivního nosiče částic

Průnik nanočástic z nanovlákenného mukoadhezivního nosiče do sliznice byl potvrzen na příčných řezech po inkubaci nosiče adherovaného na čerstvě vyjmuté prasečí sublinguální a bukální sliznici.

Příprava nosiče nanočástic: Nosič pro nanočástice byl připraven tak jak je popsáno v příkladu 1. Nanovlákenná vrstva byla impregnována roztokem PLGA-PEG nanočástic nebo PEG liposomů značených lyssaminem-rhodaminem. Pro usnadnění průniku nanočástic do sliznice byla pro impregnaci nanovlákenné vrstvy použita suspenze PLGA-PEG nanočástic v 1% deoxycholátu sodném.

Aplikace nanočástic pomocí mukoadhezivního systému: Na čerstvě vyjmutou sublinguální sliznici byl mírným dotykem aplikován nanovlákenný mukoadhezivní nosič s fluorescenčně značenými nanočásticemi (PLGA-PEG rhodamin nebo PEG liposomy barvené lyssaminem-rhodaminem) (viz obr. 4). Vzorky tkáně byly inkubovány při 37 °C po dobu 4 hodin. Poté byly rychle zmrazeny v tekutém dusíku a byly uchovávány při teplotě -75 °C.

Příprava příčných řezů tkáně: Příčné řezy byly nařezány na přístroji Cryo-cut (Leica) na tloušťku 10 µm, fixovány acetonem a podle potřeby byly obarveny jádra (modrá, značka Sytox Blue) a aktin (zelená, Alexa Fluor® 488 Phalloidin)

Příklad 8: Penetrace PLGA-PEG nanočástic do sublinguální myší sliznice

Sublinguální sliznice obsahuje řadu typů imunitních buněk zodpovědných za vyvolání obranné imunitní odpovědi organismu nebo za navození tolerance vůči přítomným antigenům. Řada typů částic (nanočástice/mikročástice) jsou vhodným nosičem antigenů. Částice umožňují kombinovat antigeny s imunomodulačními látkami schopnými ovlivnit výslednou imunitní odpověď.

Struktura sublinguální sliznice hlodavců je odlišná od lidské a prasečí. Liší se zejména ve stupni keratinizace, který představuje bariéru pro penetraci nanočástic do sliznice.

Na *in-vivo* myším modelu nebyla pozorována spontánní penetrace PLGA nanočástic do sublinguální sliznice tak, jak bylo pozorováno u prasečí sliznice (viz obr. 17). Při *in-vivo* experimentu nejsou potlačeny fyziologické funkce buněk imunitního systému jako v případě experimentů prováděných *ex-vivo* na prasečí sliznici (viz obr. 14) a je možné pozorovat internalizaci částic fagocytujícími buňkami zodpovědnými za řízení imunitní odpovědi/navození tolerance.

V experimentu byl potvrzen výskyt velkého množství MHC II pozitivních buněk schopných fagocytózy v sublinguální oblasti u myši, kam se aplikoval mukoadhezivní systém pro nanočástice (obr. 17A). Byla také potvrzena fagocytóza PLGA-PEG nanočástic specializovanými buňkami.

Příprava PLGA-PEG nanočástic*:* viz příklad provedení 3

Aplikace nanočástic pomocí nosiče do sublinguálního prostoru myši: Adhezivní systém o průměru 4 mm byl mírným přitlačení aplikován na sliznici myši v sublinguální oblasti. Doba aplikace byla 4 hodiny. Po uplynutí této doby byla myš usmrcena a zamražena v n-heptanu o teplotě – 70 °C.

Příprava příčného řezu tkáně: viz příklad provedení 7

Vyhodnocení experimentu: Internalizace nanočástic ve specializovaných buňkách byla lokalizována metodou konfokální mikroskopie.

Příklad 9: Lyofilizace nanovlákenné vrstvy s impregnovanými nanočásticemi

Pokud to povaha nanočástic a/nebo jimi nesených fyziologicky aktivních látek vyžaduje, může být pomocí lyofilizace nebo prostým vysušením dosaženo dlouhodobé stability nanočástic a/nebo jimi nesených fyziologicky aktivních látek penetrovaných v nanovlákenné vrstvě.

Množství uvolnitelných částic z nanovlákenné vrstvy může být v závislosti na povaze nanočástic výrazně ovlivněno přídavkem dalších látek do roztoku nanočástic. Jako výhodný se jeví přídavek kryoprezervačních látek (například sacharidy jako sacharóza, trehalóza) a/nebo povrchově aktivních látek (obr. 18).

Příprava suspenze PLGA-PEG nanočástic: PLGA-PEG nanočástice (příprava nanočástic viz příklad provedení 3) byly připraveny jako suspenze ve vodě, 1% deoxycholátu sodném, 20% sacharóze či směsi 1% deoxycholátu sodného a 20% sacharózy.

Příprava nanovlákenné vrstvy: Množství uvolnitelných částic z matrice po lyofilizaci bylo sledováno na nanovlákenných vrstvách připravených z PCL.

Penetrace PLGA-PEG nanočástic do nanovlákenné matrice*:* Nanovlákenná matrice z polykaprolaktonu o tloušťce vrstvy 15 µm a ploše 0,5 cm^2 byla penetrována PLGA-PEG nanočásticemi ponořením do připraveného roztoku a sonikací v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.

Lyofilizace nanovlákenné vrstvy s PLGA-PEG nanočásticemi: Po penetraci byly jednotlivé vzorky okamžitě zmraženy na suchém ledu tak, aby bylo zabráněno vyschnutí roztoku. Vzorky ve zmrazeném stavu byly lyofilizovány. Byl testován vliv kryoprezervantů a surfaktantů na množství uvolnitelných nanočástic z nanovlákenné vrstvy.

Uvolnění PLGA-PEG nanočástic z nanovlákenné vrstvy*:* Jednotlivé lyofilizované nanovlákenné vrstvy s nanočásticemi byly přeneseny do 500 µl MilliQ filtrované vody (filtr 20nm Anotop, Millipore). Uvolňování nanočástic probíhalo po dobu 30 min za stálého míchání pomocí třepačky.

Stanovení počtu uvolněných nanočástic: Uvolněné množství a velikost PLGA-PEG nanočástic byla stanovena metodou „Nanoparticle tracking analysis“ (NanoSight, Malvern, UK).

Příklad 10: Průnik nanočástic (PLGA a liposomů) do sublinguální sliznice selete in vivo po jejich aplikaci pomocí nanovlákenného mukoadhezivního nosiče

Příprava nosiče nanočástic: Nosič pro nanočástice byl připraven tak jak je popsáno v příkladu provedení 1. Nanovlákenná vrstva byla impregnována roztokem PLGA-PEG nanočástic nebo PEG liposomů značených lyssaminem-rhodaminem. Pro usnadnění průniku nanočástic do sliznice byla pro impregnaci nanovlákenné vrstvy použita suspenze PLGA-PEG nanočástic v 1% deoxycholátu sodném.

Aplikace nanočástic pomocí mukoadhezivního systému*:* Seleti (15 kg) se na sublinguální sliznici nebo bukální sliznici mírným tlakem prstu aplikoval nanovlákenný mukoadhezivní nosič s fluorescenčně značenými nanočásticemi (PLGA-PEG rhodamin nebo PEG liposomy). Prase bylo po dobu aplikace v celkové anestezii (injekční aplikace krátkodobě působícího anestetika). Po dvou hodinách bylo prase opět uvedeno do celkové anestezie a utraceno. Přilehlá tkáň s nosičem částic a regionální mízní uzlina byla vyjmuta a připravily se příčné řezy tkání pro hodnocení.

Průnik částic in-vivo: Průnik nanočástic z nanovlákenného mukoadhezivního nosiče do sliznice a regionálních mízních uzlin byl potvrzen na příčných řezech po orální mukózní aplikaci nosiče na sublinguální nebo bukální sliznici prasete (obr. 23).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Mukoadhezivní nosič pro podávání látek vybraných ze skupiny zahrnující léčivo, antigen, alergen, fyziologicky aktivní látku, nukleovou kyselinu, protein, peptid, polysacharid, ve formě částic na sliznici pacienta, **vyznačený tím**, že sestává z nanoskafoldu tvořeného vrstvou biokompatibilních polymerů nebo jejich směsi, s obsahem pórů o velikosti v rozmezí 10 nm až 1000 μm, nesoucího látku ve formě částic, a mukoadhezivní vrstvy, přičemž mukoadhezivní vrstva alespoň zčásti přesahuje nanoskafold, a přičemž je nosič upraven pro aplikaci na cílovou sliznici tak, že nanoskafold je přivrácený ke sliznici.

2. Mukoadhezivní nosič podle nároku 1, **vyznačený tím**, že nanoskafoldem je nanovlákenná vrstva o tloušťce v rozmezí 0,1 až 1000 μm.

3. Mukoadhezivní nosič podle nároku 1 nebo 2, **vyznačený tím**, že mukoadhezivní vrstva překrývá nanoskafold a okraje mukoadhezivní vrstvy přesahují okraj nanoskafoldu nebo mukoadhezivní vrstva nanoskafold obklopuje po jeho okrajích, přičemž mukoadhezivní vrstva obsahuje látky vybrané ze skupiny zahrnující polyakryláty, kyanoakryláty, tragant, xanthanová klovatina, hyaluronová kyselina, guma guar, želatina, pektin, polyvinylpyrrolidon, polyethylenoxid, alginát sodný, chitosan, dextran, deriváty celulózy, poloxamery, kopolymery esterů akrylové a methakrylové kyseliny, lektiny a thiolované polymery-thiomery a jejich kombinace.

4. Mukoadhezivní nosič podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že dále obsahuje krycí vrstvu nemající mukoadhezivní vlastnosti a nedovolující prostup látky, přičemž je pořadí vrstev buď nanoskafold – mukoadhezivní vrstva – krycí vrstva, nebo je s krycí vrstvou zčásti spojen nanoskafold a zčásti mukoadhezivní vrstva, a přičemž krycí vrstva obsahuje látky vybrané ze skupiny zahrnující deriváty celulózy, kopolymery esterů akrylové a methakrylové kyseliny, polyakryláty, kyanoakryláty, hyaluronová kyselina, želatina, pektin, polyvinylpyrrolidon, polyethylenoxid, algináty, arabská klovatina, šelak, chitosan, vosky, kyselina stearová, dextran, poloxamery, polykaprolakton a jejich směsi, případně krycí vrstva dále obsahuje plastifikátory vybrané ze skupiny zahrnující polyoly, ftaláty, citráty.

5. Mukoadhezivní nosič podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že dále obsahuje mezivrstvu nemající mukoadhezivní vlastnosti a nedovolující prostup látky, umístěnou mezi nanoskafoldem a mukoadhezivní a/nebo krycí vrstvou, s nimiž je pevně spojena, a přičemž mezivrstva obsahuje látky vybrané ze skupiny zahrnující deriváty celulózy, kopolymery esterů akrylové a methakrylové kyseliny, polyakryláty, kyanoakryláty, hyaluronová kyselina, želatina, pektin, polyvinylpyrrolidon, polyethylenoxid, algináty, arabská klovatina, šelak, chitosan, vosky, kyselina stearová, dextran, poloxamery, polykaprolakton.

6. Mukoadhezivní nosič podle nároku 4 nebo 5, **vyznačený tím**, že krycí vrstva a/nebo mezivrstva jsou nerozpustné nebo s prodlouženým uvolňováním.

7. Mukoadhezivní nosič podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že částice jsou ve formě liposomů, nanočástic, mikročástic nebo makromolekul vybraných ze skupiny zahrnující proteiny, DNA/RNA konstrukty, polysacharidy, a jsou naadsorbované na nanovláknech nanoskafoldu nebo umístěné v prostoru mezi nanovlákny nanoskafoldu.

8. Mukoadhezivní nosič podle nároku 7, **vyznačený tím**, že kterákoliv z jeho součástí obsahuje pomocné látky, vybrané ze skupiny zahrnující urychlovače absorpce, jako je acethylcystein, kryoprotektivní látky, antioxidanty, stabilizátory, antimikrobní přísady, povrchově aktivní látky, emulgátory, mukolytika.

9. Mukoadhezivní nosič podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že povrch nanovláken nanoskafoldu je upraven ošetřením fyzikálním či chemickým oxidačním činidlem či postupem, vybraným ze skupiny zahrnující ošetření plasmou, roztokem hydroxidu sodného, potažením polyethylenglykolem, adsorpcí povrchově aktivních látek a/nebo ovlivněním povrchového náboje či míry smáčivosti částic.

10. Mukoadhezivní nosič podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že biokompatibilní polymery jsou vybrané ze skupiny zahrnující polyamidy, polyuretan, polyethersulfon, polyvinylalkohol, polyvinylbutyral, polyakrylonitril, polyethylenoxid, polystyren, polyvinylidenfluorid, polyvinylpyrrolidon, jódovaný povidon, alginát, silk fibroin, kyselinu polyakrylovou, kyselinu polyglykolovou, kyselinu polyakrylovou, želatinu, chitosan, kolagen, polyaramid, kyselinu polymléčnou, poly-ε-kaprolakton, kyselinu hyaluronovou.

11. Způsob přípravy mukoadhezivního nosiče podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že se připraví nanoskafold, následně se spojí s mukoadhezivní vrstvou a/nebo krycí vrstvou, s výhodou se před spojením vrstev mezi tyto vrstvy vřadí mezivrstva.

12. Způsob přípravy mukoadhezivního nosiče podle nároku 11, **vyznačený tím**, že se nejprve vytvoří mukoadhezivní vrstva a/nebo mezivrstva a/nebo krycí vrstva, s výhodou ve formě nanovláken metodou elektrostatického zvlákňování, a poté se pevně spojí v požadovaném pořadí, a nanoskafold se připraví *in situ* na mukoadhezivní a/nebo krycí vrstvě a/nebo mezivrstvě.

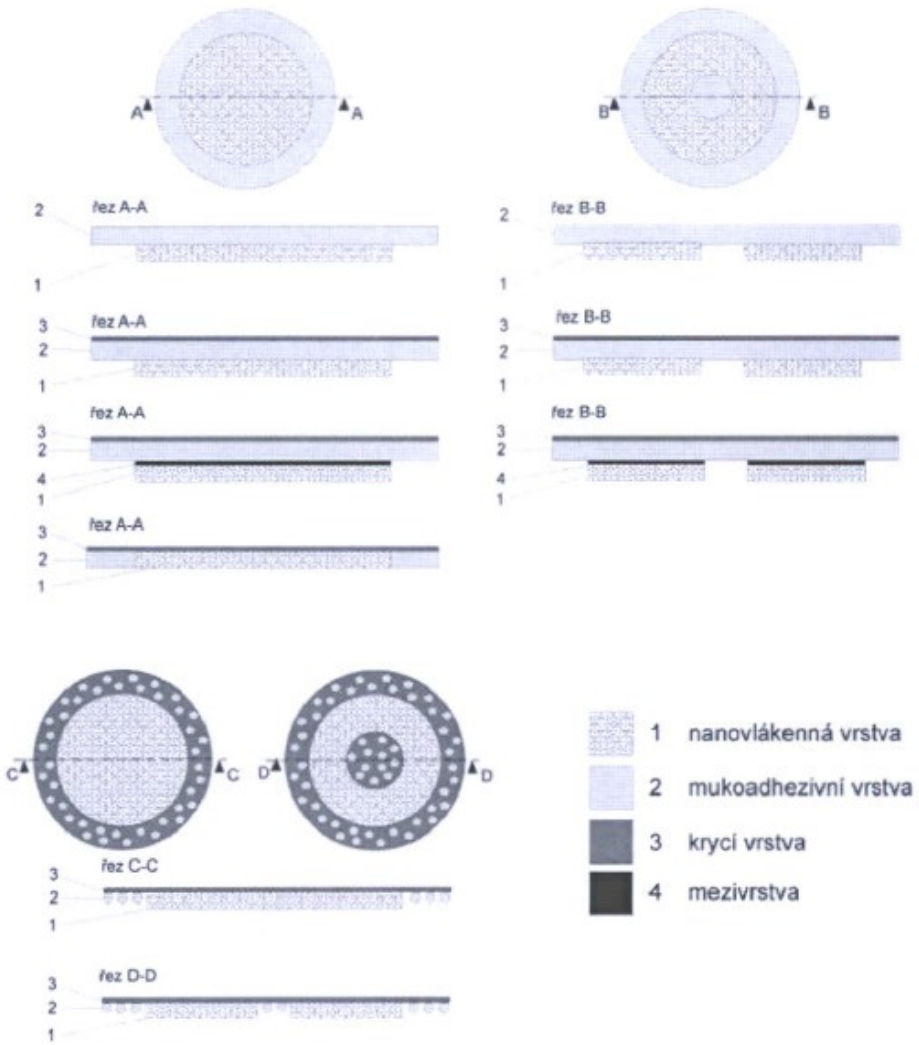
13. Způsob podle nároku 11 nebo 12, **vyznačený tím**, že se na nanoskafold buď po jeho připravení nebo až po zkompletování všech vrstev mukoadhezivního nosiče nanese látka a případně i pomocné látky, s výhodou ve formě roztoku, koloidu nebo suspenze.

14. Způsob podle nároku 13, **vyznačený tím**, že mukoadhezivní nosič s látkou se následně lyofilizuje.

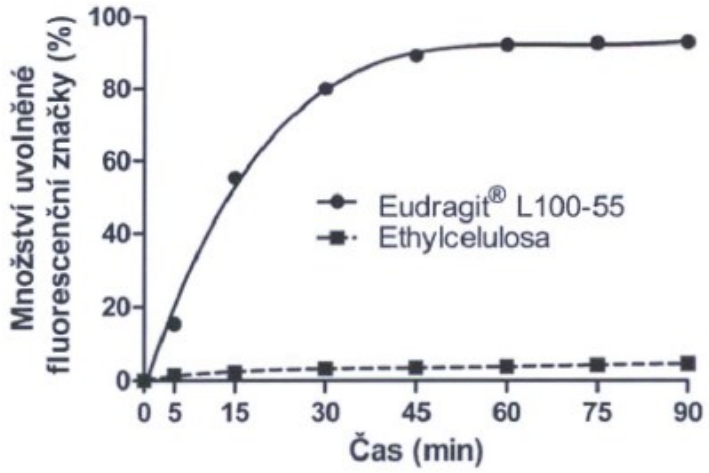
15. Mukoadhezivní nosič podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, **vyznačený tím,** že je upraven pro aplikaci manuálně nebo pomocí aplikační pomůcky přímo na cílovou sliznici přitlačením tak, že nanoskafold je přivrácený ke sliznici.

16. Mukoadhezivní nosič částic podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, pro použití pro aplikaci vakcín na mukózní povrchy, zejména pro sublinguální vakcinaci a imunoterapii.

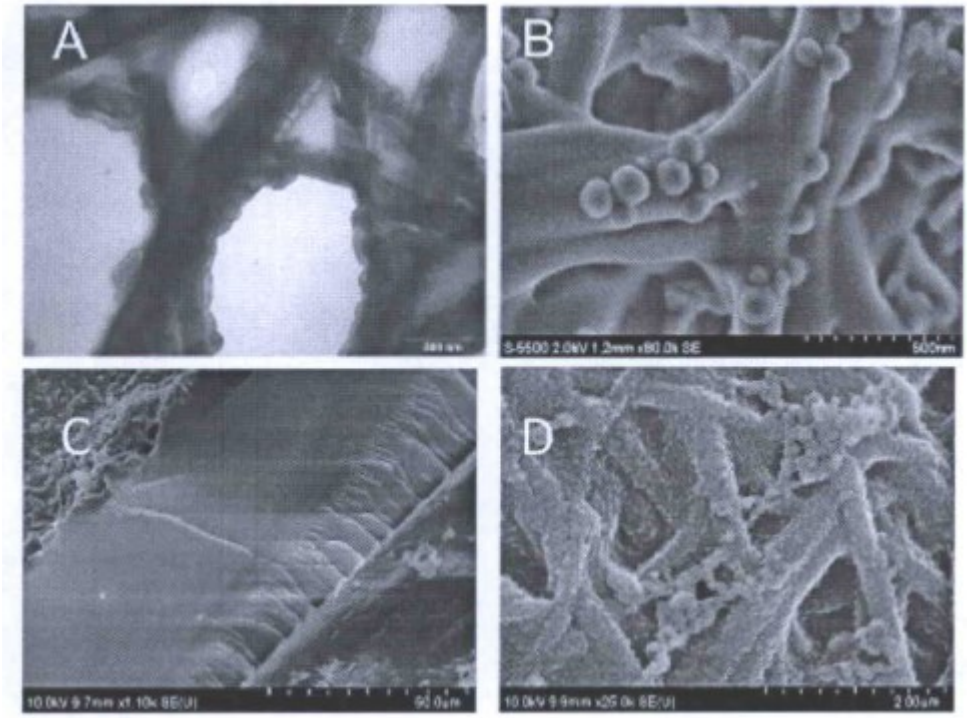
11 výkresů


A
A
B
B
řez A-A
řez B-B
řez A-A
řez B-B
řez A-A
řez B-B
řez A-A
C
C
D
D
řez C-C
řez D-D
1 nanovlákenná vrstva
2 mukoadhezivní vrstva
3 krycí vrstva
4 mezivrstva

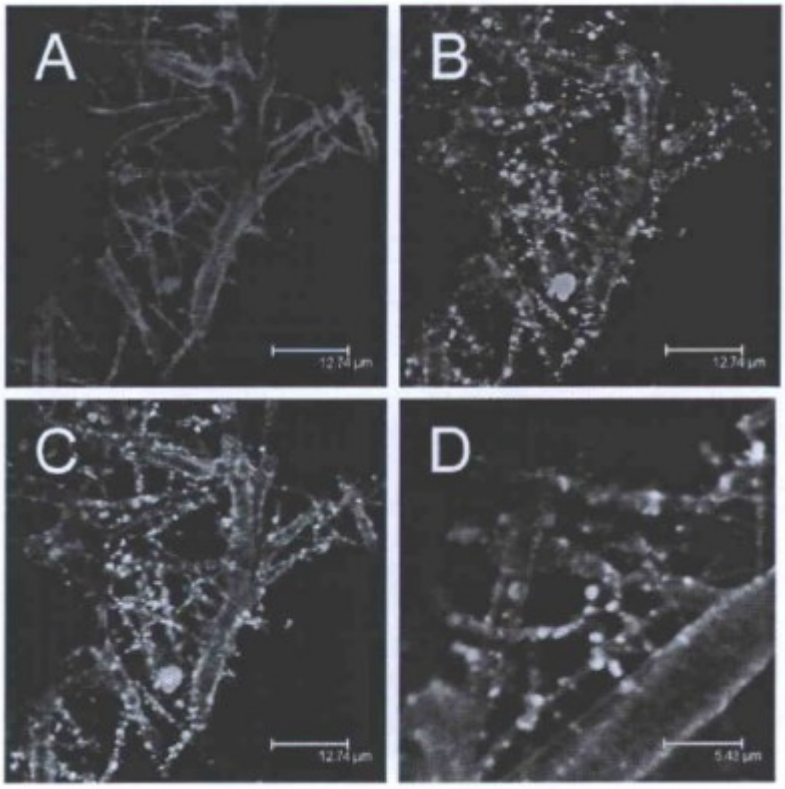
Obr. 1


Množství uvolněné fluorescenční značky (%)
100
80
60
40
20
0
0 5 15 30 45 60 75 90
Čas (min)
Eudragit® L100-55
Ethylcelulosa

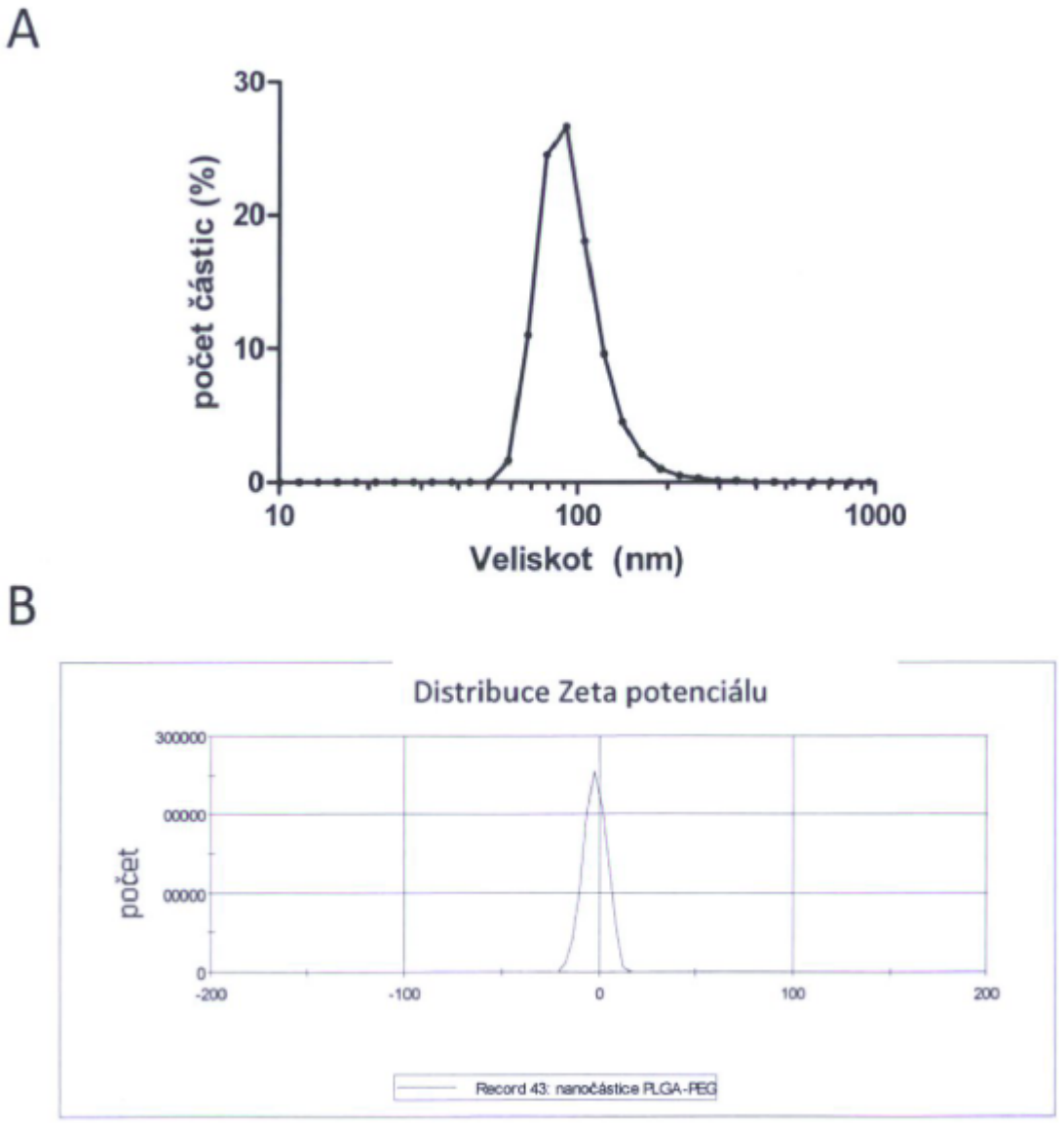
Obr. 2



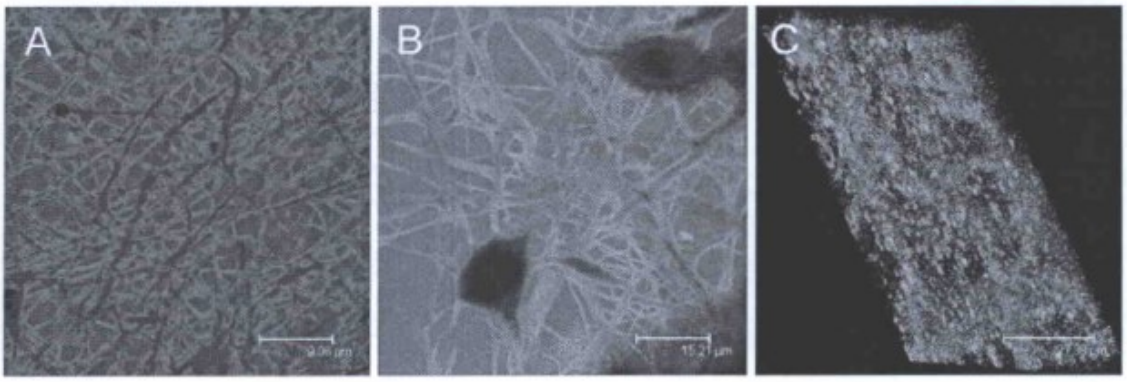
Obr. 3



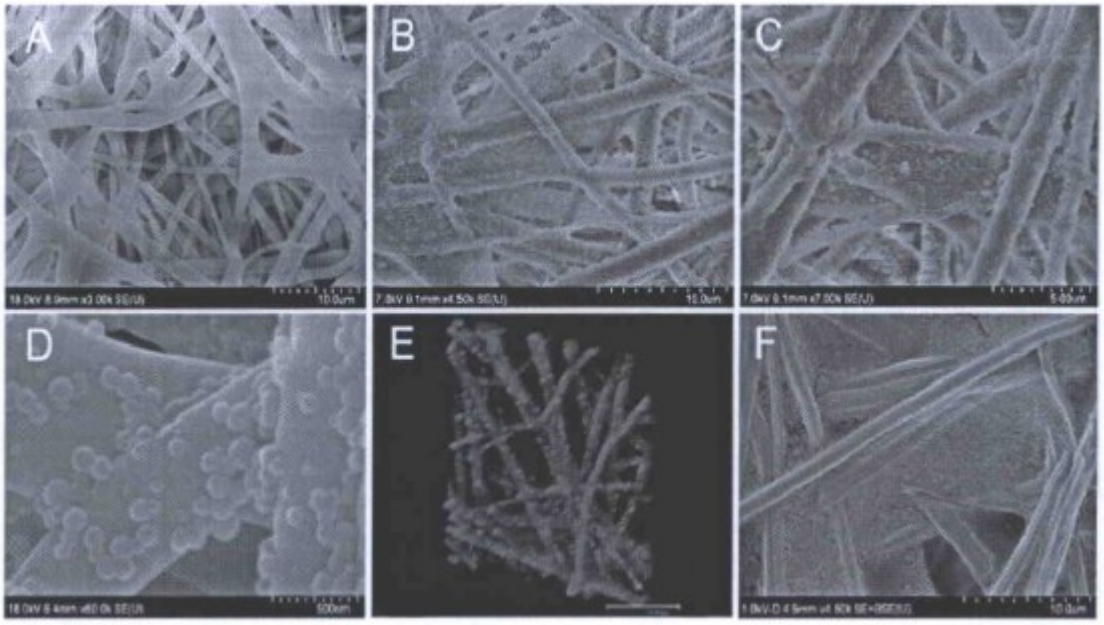
Obr. 4


A
30
20
10
0
počet částic (%)
10
100
1000
Veliskot (nm)
B
Distribuce Zeta potenciálu
300000
00000
00000
0
počet
-200
-100
0
100
200
Record 43: nanočástice PLGA-PEG

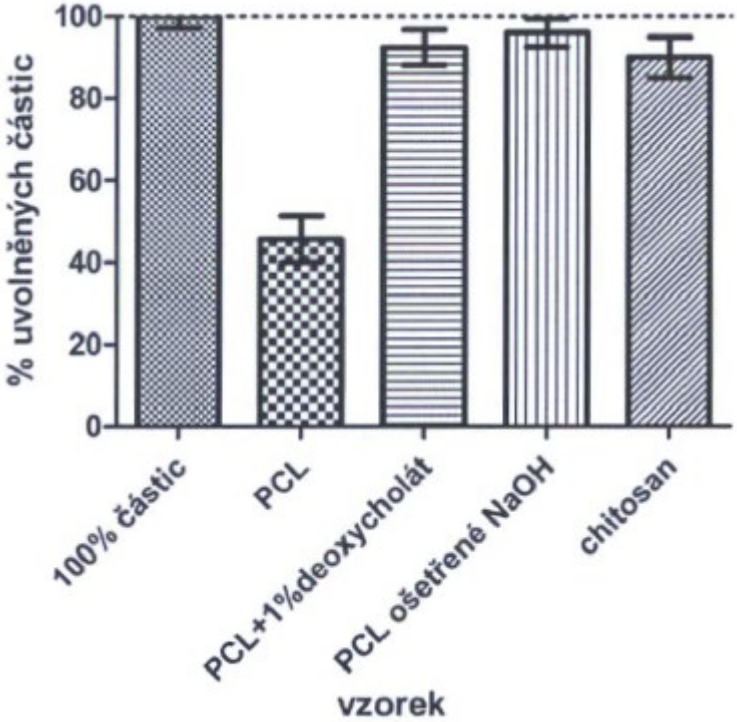
Obr. 5


A
B
C

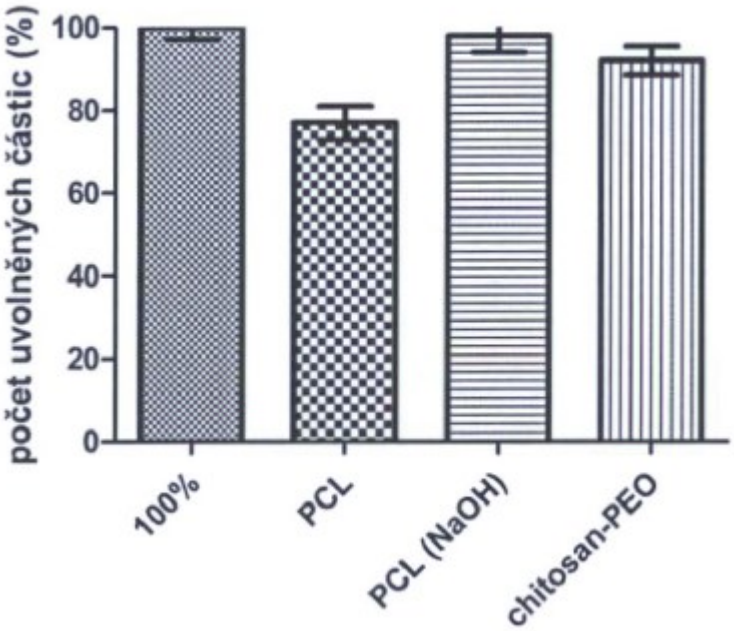
Obr. 6


A
B
C
D
E
F

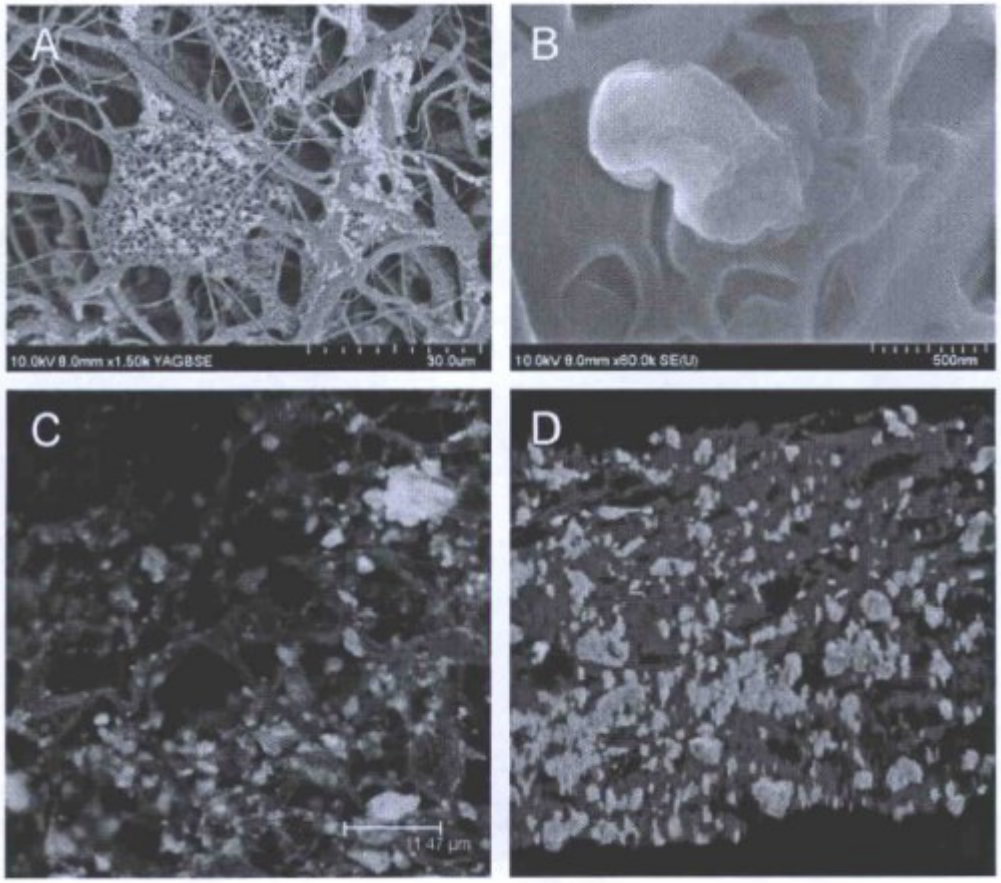
Obr. 7


% uvolněných částic
100
80
60
40
20
0
100% částic
PCL
PCL+1%deoxycholát
PCL ošetřené NaOH
chitosan
vzorek

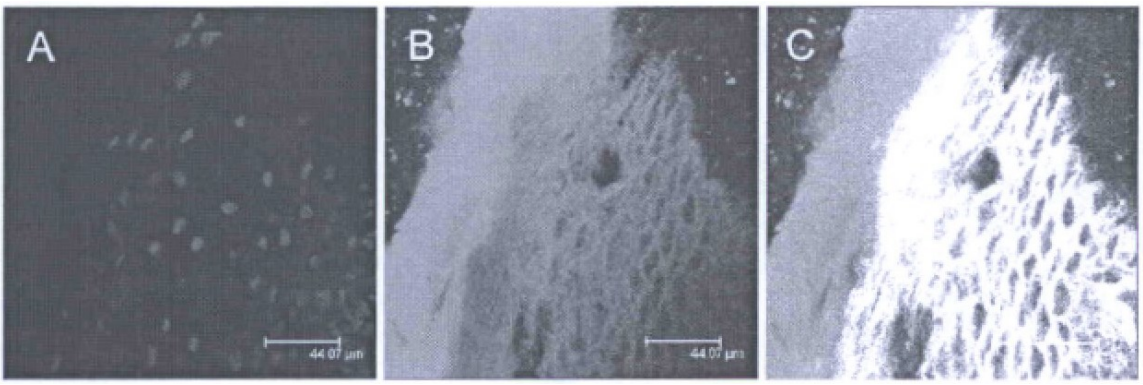
Obr. 8


počet uvolněných částic (%)
100
80
60
40
20
0
100%
PCL
PCL (NaOH)
chitosan-PEO

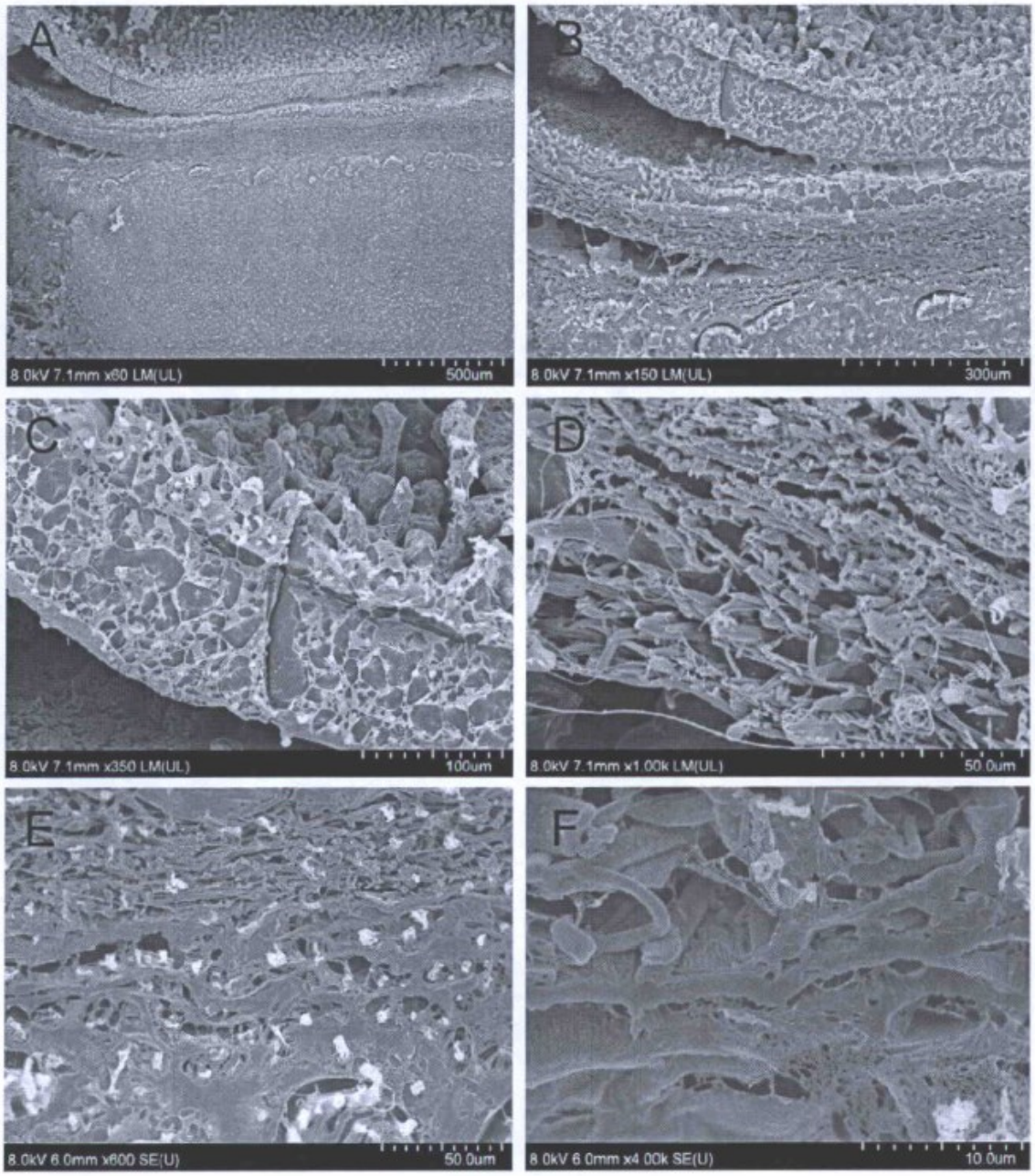
Obr. 9


A
B
C
D

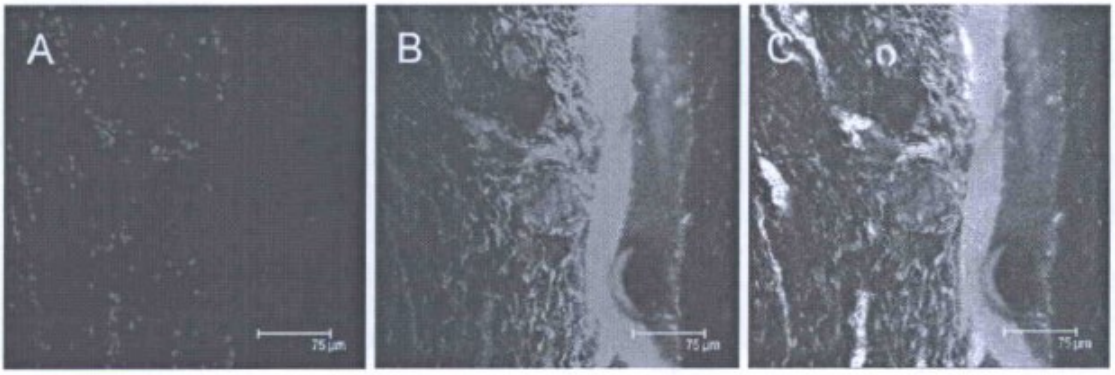
Obr. 10


A
B
C

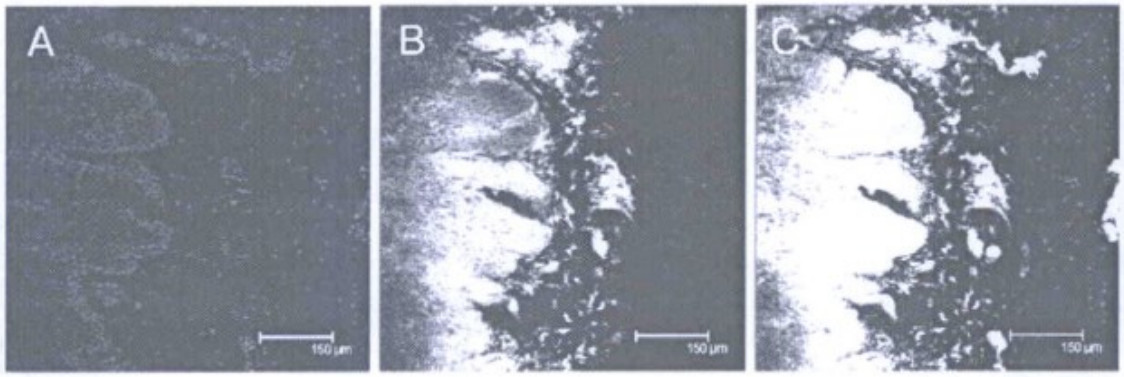
Obr. 11


A
8.0kV 7.1mm x60 LM(UL)
500um
B
8.0kV 7.1mm x150 LM(UL)
300um
C
8.0kV 7.1mm x350 LM(UL)
100um
D
8.0kV 7.1mm x1.00k LM(UL)
50.0um
E
8.0kV 6.0mm x600 SE(U)
50.0um
F
8.0kV 6.0mm x4.00k SE(U)
10.0um

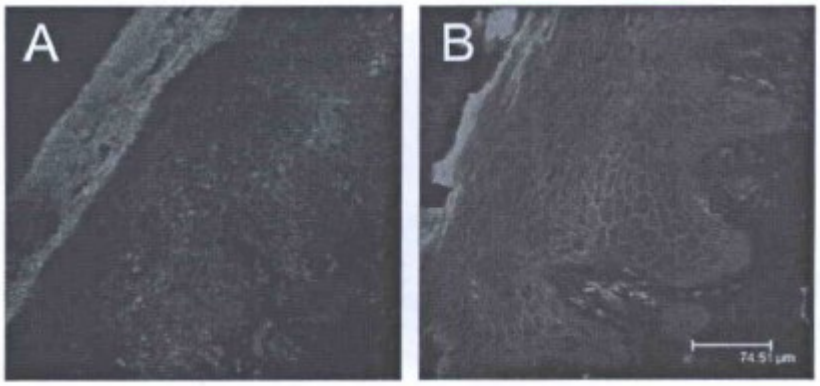
Obr. 12



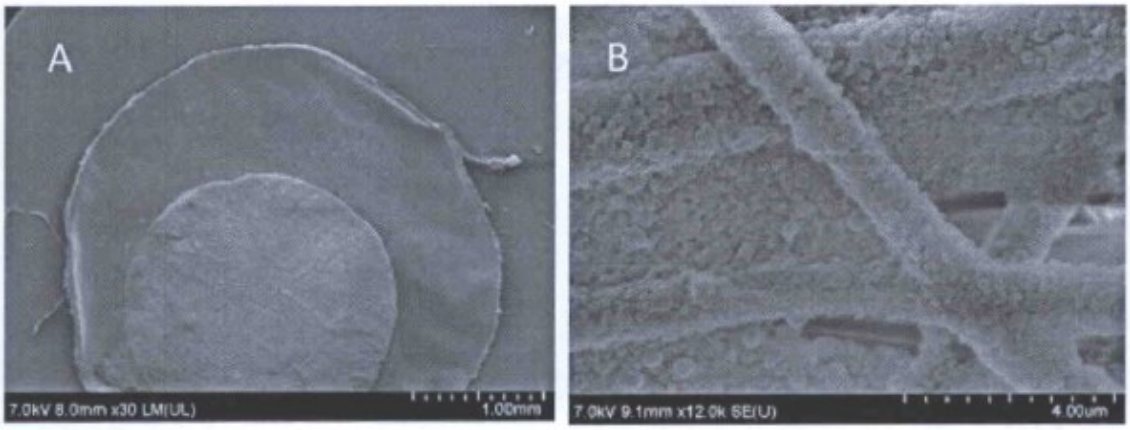
Obr. 13



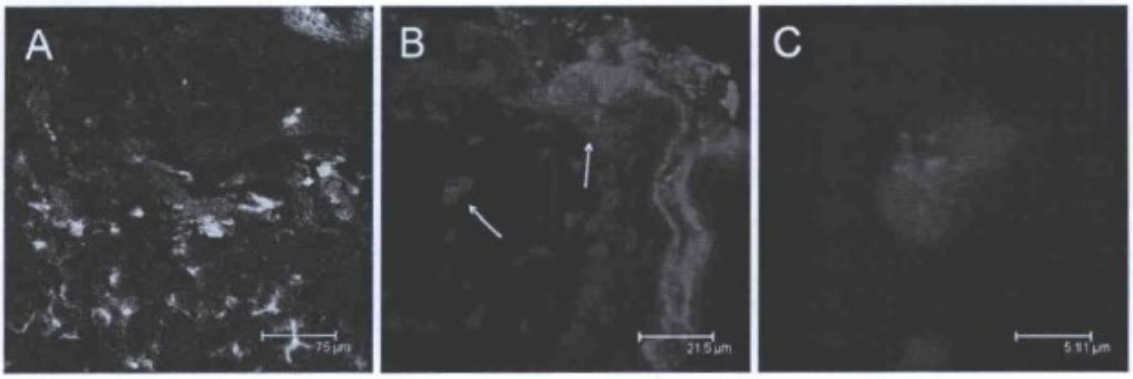
Obr. 14



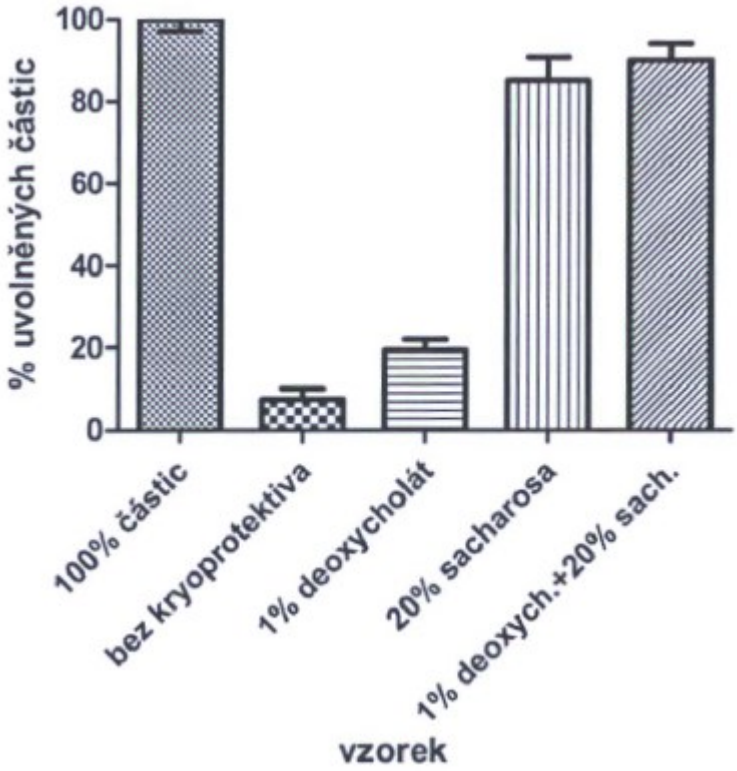
Obr. 15



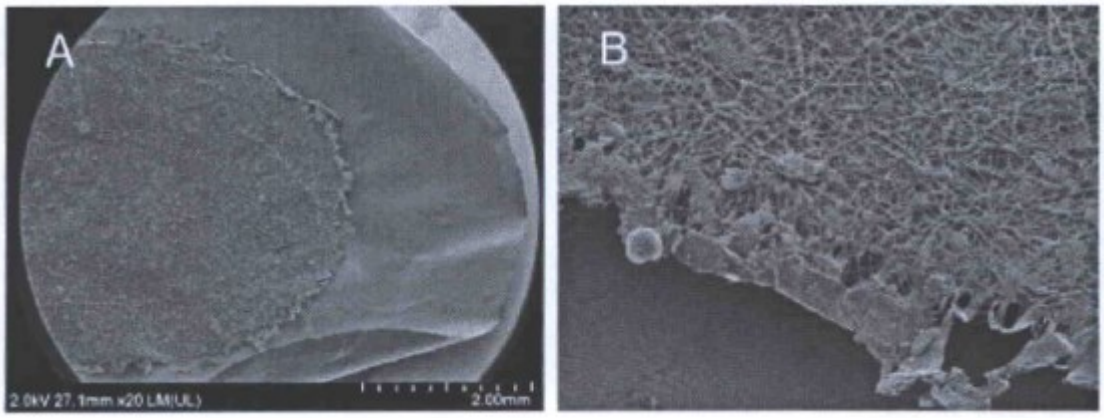
Obr. 16



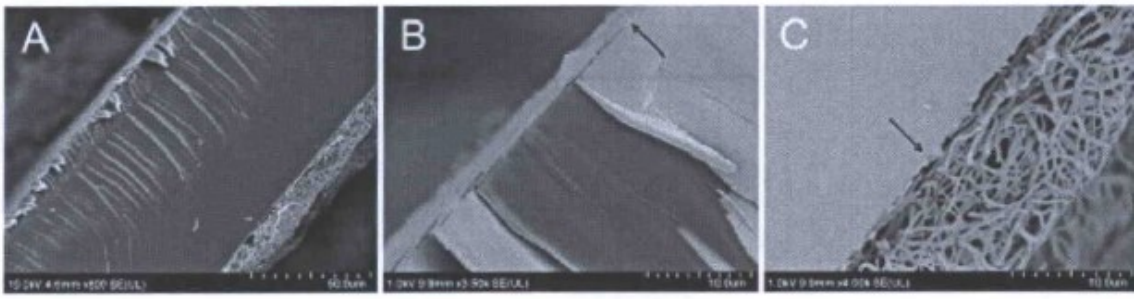
Obr. 17



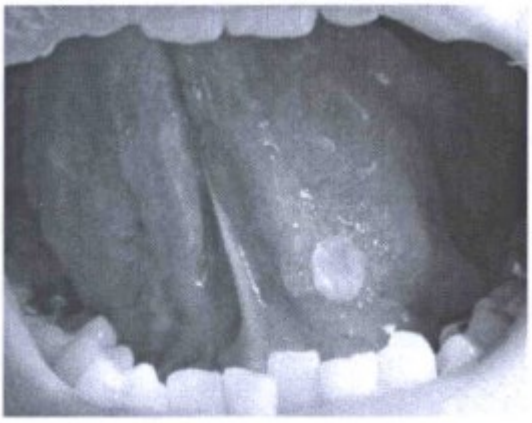
Obr. 18



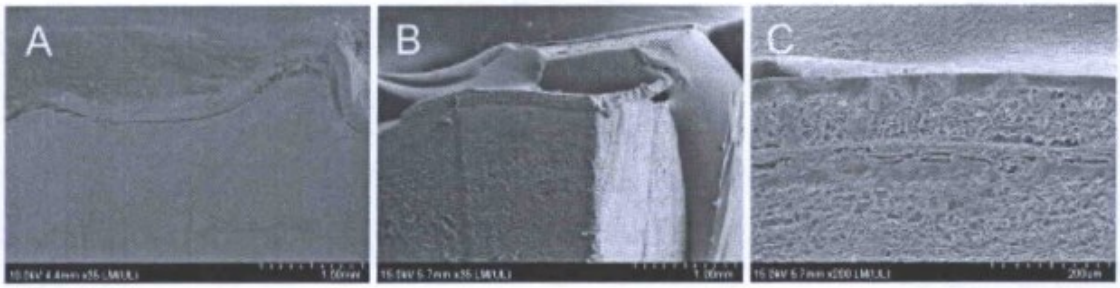
Obr. 19



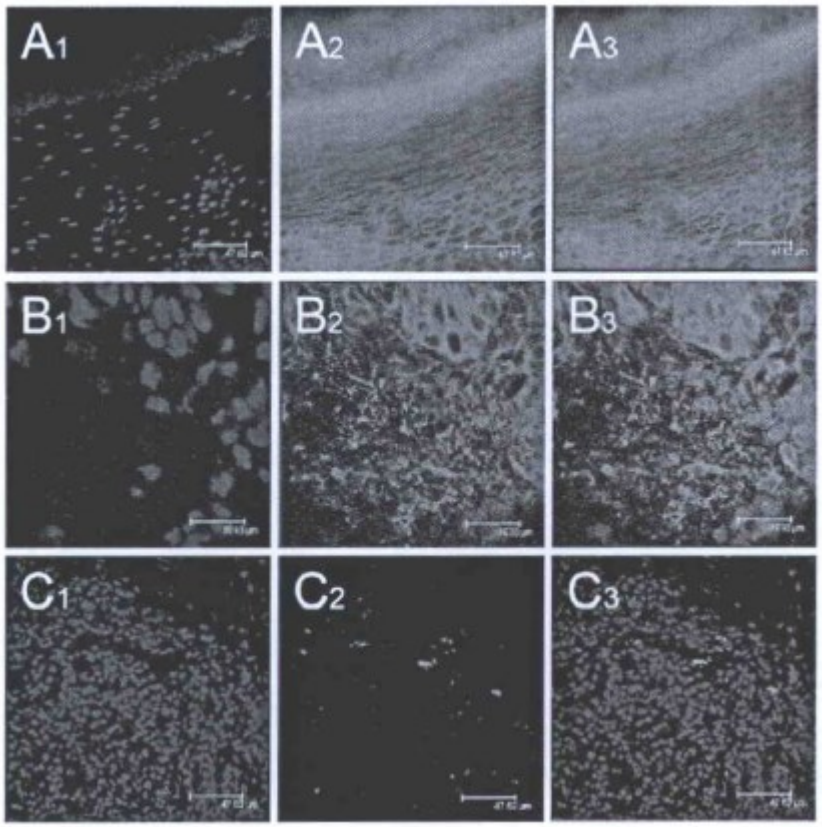
Obr. 20



Obr. 21



Obr. 22



Obr. 23