

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

310 053

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.:

A61K 31/7076 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2022-44
(22) Přihlášeno: 31.01.2022
(40) Zveřejněno: 09.08.2023
(Věstník č. 32/2023)
(47) Uděleno: 09.05.2024
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 19.06.2024
(Věstník č. 25/2024)

(56) Relevantní dokumenty:
Voller, Jiří et al. Anticancer activity of natural cytokinins: A structure-activity relationship study. Phytochemistry. Elsevier, Amsterdam, NL, 01.08.2010, 2010, Vol. 71, No. 11, p. 1350, ISSN 0031-9422; Strnad, Miroslav et al. Ortho-topolin-9-glucoside, an aromatic cytokinin from Populus x canadensis cv Robusta leaves. Phytochemistry. Elsevier Science Ltd., 07.11.1994, 1994, Vol. 37, No. 4, p. 1059, ISSN 0031-9422.
US 2003206893 A1; US 2011230503 A1.

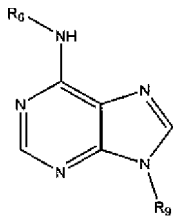
(73) Majitel patentu:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ

(72) Původce:
Mgr. Lucie Rárová, Ph.D., Příbor, CZ
Olga Hustáková, Olomouc, Nové Sady, CZ
Mgr. Karel Doležal, Dr., DrSc., Hlubočky, CZ
prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., DSc., Olomouc,
Neředín, CZ

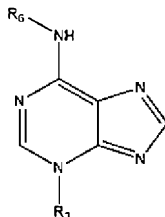
(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
**Heterocyklické purinové deriváty
cytokininů, jejich použití při hojení ran a
farmaceutické kompozice obsahující tyto
deriváty**

(57) Anotace:
Řešení se týká použití heterocyklických purinových derivátů cytokininů obecného vzorce I a II při hojení ran, přičemž R6 je vybrán ze skupiny sestávající z: furfurylu, 4-hydroxybenzylu, 3,3-dimethylallylu, (Z)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylu a (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylu, a R3 a R9 je glukopyranosylová skupina. Řešení se dále týká použití farmaceutických přípravků obsahujících tyto deriváty. Uvedené sloučeniny stimulují migraci endotelových buněk, angiogenezi a vaskularizaci a vykazují také protizánětlivé vlastnosti.



(I)



(II)

Heterocyklické purinové deriváty cytokininů, jejich použití při hojení ran a farmaceutické kompozice obsahující tyto deriváty

5 Oblast techniky

Vynález se týká heterocyklických purinových derivátů cytokininů, jejich použití pro hojení ran a farmaceutických přípravků obsahujících tyto deriváty.

10

Dosavadní stav techniky

Cytokinininy jsou fytohormony identifikované původně jako látky, které podporují dělení rostlinných buněk v přítomnosti dalšího fytohormonu, auxinu. Pokud jde o jejich chemickou strukturu, rostlinné cytokinininy jsou deriváty adeninu substituované v poloze N⁶ buď isoprenoidním nebo aromatickým postranním řetězcem. Isoprenoidní cytokinininy zahrnují *cis*- a *trans*-zeatin (*tZ*) a jejich analogy s nasyceným postranním řetězcem (dihydrozeatin) nebo bez hydroxylové skupiny (N⁶-isopentenyladenin). Zatímco isoprenoidní cytokinininy jsou přítomny ve všech rostlinách, aromatické cytokinininy s N⁶-benzylovými substituenty byly nalezeny pouze u některých taxonů. Kromě 6-benzylaminopurinu (BAP) byly popsány jeho hydroxylované deriváty, tj. topoliny. Kinetin (K), první identifikovaný cytokinin, má furfurylový postranní řetězec. Kinetin byl poprvé rozpoznán jako látka zodpovědná za cytokininovou aktivitu autoklávovaných spermií sledě, která byla připisována tepelnému poškození DNA.

Protože aktivita K proti stárnutí byla později prokázána na kožních fibroblastech, stejně jako v případě *trans*-zeatinu (*tZ*), byly provedeny četné studie k vyhodnocení užitečnosti cytokininových bázi při ochraně kůže v experimentech *in vitro* a *in vivo*. Experimenty s buněčnými kulturami například naznačují, že *tZ* by mohl zlepšit hydrataci pokožky a také zabránit škodlivým účinkům stárnutí na tyto procesy (Ji *et al.* 2010, Int J Mol Med 26:257-263). Ošetření *tZ* bylo také schopné do značné míry zlepšit UV-indukovaný pokles koncentrací AQP3 proteinu a propustnosti vody membránou. Ukázalo se, že přírodní cytokinininy (např. kinetin a zeatin) a 6,9-disubstituované deriváty cytokininů mají biologické aktivity související se stárnutím. Viz například patenty US 5021422 (4. června 1991), US 5371089 (6. prosince 1994), US 5602139 (11. února 1997), patent US 5614407 (zveřejnění 8. března a 25. března 2005), z nichž všechny jsou zde zahrnuty odkazem. Bylo také prokázáno, že cytokininové báze podporují diferenciaci keratinocytů. Kinetin (40 až 200 μM) indukoval zastavení růstu a změny v několika markerech diferenciace v lidských keratinocytech pěstovaných v buněčné kultuře (Berge *et al.* 2006, Ann N Y Acad Sci 1067: 332-336). Účinek byl zesílen přítomností Ca²⁺ iontů. Ostatní markery diferenciace (trans-glutamináza) byly nezměněny, což naznačuje, že diferenciace indukovaná K je pravděpodobně zprostředkována cestami odlišnými od cest aktivovaných jinými činidly indukujícími diferenciaci. V navazující studii Berge *et al.* (Exp Gerontol 43: 658-662, 2008) uvádí, že ošetření K zlepšila citlivost stárnoucích keratinocytů na diferenciační účinky iontů Ca²⁺. Pozitivní vliv K na hladiny filaggrinu, dalšího markeru diferenciace keratinocytů, byl pozorován u *in vitro* rekonstruovaného kožního ekvivalentu (Vičanová *et al.* 2006, Ann N Y Acad Sci 1067: 337-342). Na rozdíl od 2D kultury, K podporoval růst keratinocytů, jak je indikováno zvýšením počtu Ki67-pozitivních buněk. Další dermatologické/kosmetické aplikace cytokininů se týkají terapie poruch pigmentace. Zatímco se uvádí, že K snižuje hyperpigmentaci u psů (Kimura a Doi 2004, Rejuvenation Res 7: 32-39), BAP byl rozpoznán jako stimulator melanogeneze (Kim *et al.* 2009, Arch Dermatol Res 301: 253-258).

50

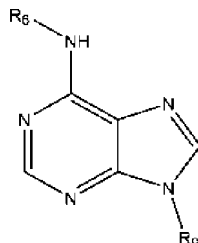
Ačkoli heterocyklické purinové cytokinininy, zejména kinetin a zeatin, mají významné vlastnosti proti stárnutí a další vlastnosti, bylo by žádoucí poskytnout další biologické aktivity a použití těchto přírodních sloučenin. Stále zůstává totiž žádoucí poskytnout další cytokininové sloučeniny, které mohou být použity v široké škále terapeutických a kosmetických aplikací a pokud tyto sloučeniny mají zlepšenou selektivitu a účinnost (tj. méně toxické a/nebo účinnější)

55

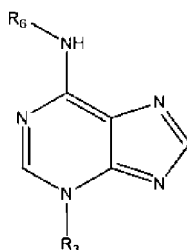
než v současnosti používané 6-substituované aminopuriny. Předkládaný vynález poskytuje takové sloučeniny pro hojení ran.

5 Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu jsou heterocyklické purinové deriváty obecného vzorce **I** a **II**



(I)



(II)

- 15 nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniem nebo aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních izomerů cukrů (β -D, α -D, β -L, α -L), pro použití při hojení ran, kde

20 R6 je vybrán ze skupiny sestávající z: furfurylu, 4-hydroxybenzylu, 3,3-dimethylallylu, (Z)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylu a (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylu, a

R3 a R9 je glukopyranosylová skupina.

- 25 Zvláště výhodnými jsou heterocyklické purinové deriváty cytokininů obecného vzorce **I** a **II** vybrané ze skupiny sestávající z: 6-furfurylamino-3- β -D-glukopyranosylpurin, 6-(4-hydroxybenzylamino)-3- β -D-glukopyranosylpurin, 6-(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-3- β -D-glukopyranosylpurin, 6-(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-3- β -D-glukopyranosylpurin, 6-furfurylamino-9- β -D-glukopyranosylpurin, 6-(4-hydroxybenzylamino)-9- β -D-glukopyranosylpurin, 6-(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9- β -D-glukopyranosylpurin, 6-(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9- β -D-glukopyranosylpurin

30 a jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniakem nebo aminy, ve formě racemátů nebo izomerů opticky aktivních cukrů (β -D, α -D, β -L, α -L), jakož i jejich adiční soli s kyselinami pro použití při hojení ran.

- 35 Heterocyklické deriváty cytokininů obecného vzorce **I** a **II** se používají k podpoře migrace endotelových buněk. Proto se vynález v jedné nebo více formách zaměřuje, i když ne výlučně, na léčbu ran a podporu hojení ran.

Heterocyklický cytokininový derivát obecného vzorce **I** a **II** je vhodný pro použití k léčbě stavů kožních chorob.

5 Dále je heterocyklický cytokininový derivát obecného vzorce **I** a **II** vhodný pro použití při stimulaci angiogeneze endotelových buněk, pro urychlení a podporu angiogeneze, a tedy pro poskytnutí v podstatě okamžité úlevy od bolesti a hojení ran.

10 Příklady typů endotelových buněk, které mohou být indukovány k migraci heterocyklickým derivátem cytokininů obecného vzorce **I** a **II** zahrnují endotelové buňky lidské pupečnickové žíly, lidské mikrovaskulární endotelové buňky a endotelové buňky aorty. Mohou mít i různý savčí původ.

15 Ještě dalším aspektem vynálezu je heterocyklický derivát cytokininů obecného vzorce **I** a **II** pro použití pro hojení ran a/nebo činidla modifikující vzdálenost propojení při léčbě ran, včetně akutních, subakutních, chronických ran a ran se zpožděným hojením.

20 Předkládaný vynález také poskytuje heterocyklické deriváty cytokininů obecného vzorce **I** a **II** pro zvýšení rychlosti, rozsahu a/nebo kvality hojení ran použitím jednoho nebo více heterocyklických derivátů cytokininů a jednoho nebo více terapeutických činidel, činidel užitečných pro hojení ran a/nebo činidla upravující zacelení ran.

25 Heterocyklický derivát cytokininů obecného vzorce **I** a **II** je rovněž vhodný pro použití při stimulaci migrace fibroblastů, vaskulárních endotelových buněk nebo epitelových buněk do rány, přičemž použití zahrnuje chemokinezi a stimulaci fibroblastů, vaskulárních endotelových buněk, epitelových buněk, nebo jejich kombinace.

30 V ještě dalším aspektu vynález poskytuje použití heterocyklických derivátů cytokininů obecného vzorce **I** a **II** pro podporu nebo zlepšení hojení ran, léčení, prevenci a zmírnění fibrózy nebo jiných fibrotických stavů ran, zahrnující podávání jednoho nebo více heterocyklických cytokininových agens a jednoho nebo více terapeutických činidel, činidel užitečných pro hojení ran a/nebo činidel modifikujících zacelení ran u nemocných pacientů.

35 Ve výhodném provedení má kombinované použití jednoho nebo více heterocyklických derivátů cytokininů a jednoho nebo více terapeutických činidel, činidel užitečných pro hojení ran a/nebo činidel modifikujících zacelení ran aditivní, synergický nebo superaditivní účinek při podpoře léčení ran.

40 Ve výhodném provedení se heterocyklický derivát cytokininů obecného vzorce **I** a **II** používá jako léčivo a/nebo kosmetika pro podporu migrace endoteliálních buněk u subjektu, který to potřebuje, zahrnující léčbu subjektu alespoň jedním derivátem cytokininu.

45 Dalším aspektem vynálezu jsou heterocyklické deriváty cytokininů obecného vzorce **I** a **II** pro použití při regeneraci kůže, zahrnující podávání účinného množství sloučeniny podle vynálezu subjektu, které zvyšuje sekreci proteinů, čímž podporuje regeneraci kůže.

50 Tkáňová místa a rány, které mohou být léčeny v souladu s vynálezem, zahrnují akutní a chronické rány, popáleniny včetně popálenin vzniklých vystavením ionizujícímu záření, chemické rány, chirurgické rány, orální rány, poranění kůže a svalů, otevřené kožní rány, diabetické kožní vředy včetně diabetických vředů na noze, diabetických naturopatických vředů na noze, ischemické tkáně včetně ischemických naturopatických vředů na noze, vředů ze stáze žil, dekubitů a hypoxické tkáně. Příklady ischemických a hypoxických tkání zahrnují ischemickou srdeční tkáň a hypoxické tkáně spojené s mrtvicí. Stavy, při kterých může být proces hojení ran podporován podáváním heterocyklických derivátů cytokininů, zahrnují i okolnosti opožděného hojení ran, kdy je hojení narušeno nebo je mu zabráněno například hypoxií tkání, opakovaným traumatem nebo systémovými příčinami, jako je diabetes a cévní mozkové

příhody. Jak je zde použito, chronická rána může označovat například ránu, která je charakterizována alespoň částečně jedním nebo více z následujících stavů: 1) chronickým samopřetrvávajícím stavem zánětu rány, 2) deficitním a defektním extracelulární matrix (ECM) rány, 3) špatně reagující (senescentní) poraněné buňky, zejména fibroblasty, omezující produkci ECM a 4) selhání reepitelizace částečně kvůli nedostatku nezbytných složek ECM a nedostatku tkáňové infrastruktury pro migraci. Chronické rány zahrnují bérce vředy, arteriální vředy, dekubity, vaskulitické vředy a diabetické vředy.

Kromě výše uvedené definice může termín rána také zahrnovat například poranění kůže a podkožní tkáň iniciovaná různými způsoby (např. otlaky z prodlouženého odpočinku na lůžku a rány způsobené traumatem) a s různými charakteristikami. Rány mohou být klasifikovány do jednoho ze čtyř stupňů v závislosti na hloubce rány: i) Stupeň I: rány omezené na epitel; ii) Stupeň II: rány zasahující do dermis; iii) Stupeň III: rány zasahující do podkožní tkáň; a iv) Stupeň IV (nebo rány plně tloušťky): rány, kde jsou odhaleny kosti. Termín „rána s částečnou tloušťkou“ se týká ran, které zahrnují stupně I až III; příklady ran s částečnou tloušťkou zahrnují popáleniny, otlaky, vředy ze stáze žil a diabetické vředy. Termín „hluboká rána“ zahrnuje rány III. i IV. stupně. Prostředky a způsoby podle předkládaného vynálezu uvažují o léčbě všech typů ran, včetně hlubokých ran a chronických ran. Termín "chronická" rána se týká rány, která se nezhojila. Mezi chronické kožní rány patří například dekubity, vředy, břišní vředy, diabetické vředy, bérce vředy, vaskulitické vředy, arteriální vředy a smíšené vředy. Chronická rána může být arteriální vřed, který obsahuje ulcerace vyplývající z úplné nebo částečné arteriální blokády. Chronická rána může být venózní stázový vřed, který zahrnuje ulcerace způsobené poruchami funkce žilní chlopně a související vaskulární onemocnění. Chronická rána může být traumatem vyvolaný vřed, diabetický vřed nebo vaskulitický vřed.

Ve výhodném provedení je předmětem vynálezu farmaceutický přípravek pro použití při hojení ran, obsahující jeden nebo více heterocyklických derivátů cytokininů obecného vzorce **I** a **II** nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí s alkalickými kovy, amoniem nebo aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních izomerů nebo jejich adiční soli s kyselinami, a jeden nebo více excipientů.

Použití pro hojení ran má rovněž kompozice obsahující jeden nebo více heterocyklických derivátů cytokininu obecného vzorce **I** a **II** nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniem nebo aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních izomerů, nebo jejich adiční soli s kyselinami a jeden nebo více excipientů určených pro léčbu stavů kožních chorob.

Uvedená kompozice je také užitečná pro léčbu stavů souvisejících se zánětem, jako je zánět, léze (např. urychlení jejich hojení), bolest a další imunologické reakce vyplývající ze zánětu (např. poskytnutí jeho úlevy) a/nebo léčbu zánětu kůže.

Další vhodné použití látek podle vynálezu je pro léčbu chorobných stavů u savců, přičemž uvedené použití zahrnuje aplikaci množství nového heterocyklického derivátu cytokininů obecného vzorce **I** a **II** podle tohoto vynálezu na savčí buňky a tkáň.

Použití pro hojení ran má rovněž kompozice obsahující jeden nebo více heterocyklických cytokininových derivátů obecného vzorce **I** a **II** nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí s alkalickými kovy, amoniem nebo aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních izomerů, nebo jejich adiční soli s kyselinami a jeden nebo více excipientů určených pro hojení ran savčích epitelových buněk.

Předmětem předkládaného vynálezu jsou rovněž heterocyklické deriváty cytokininů obecného vzorce **I** a **II** pro použití při hojení ran, přičemž se použije kombinace alespoň dvou výše definovaných heterocyklických purinových derivátů cytokininů.

Předmětem předkládaného vynálezu jsou rovněž heterocyklické deriváty cytokininů obecného vzorce I a II pro použití při hojení ran, přičemž se použije kombinace 6-furfurylamino-3-β-D-glukopyranosylpurinu s *trans*-zeatinem a/nebo 6-furfurylamino-3-β-D-glukopyranosylpurinu s 6-(*E*)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9-β-D-glukopyranosylpurinem a/nebo 6-furfurylamino-9-β-D-glukopyranosylpurin s 6-(*E*)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9-β-D-glukopyranosylpurinem.

Farmaceutické a kosmetické přípravky

Farmaceutický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou např. masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0,05 g do 1,0 g aktivní látky.

Výhodně jsou činidla podle vynálezu kombinována s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem za vzniku farmaceutické kompozice. Vhodné nosiče a ředidla zahrnují izotonické solné roztoky, například fosfátem pufrovaný fyziologický roztok. Vhodná ředidla a excipienty také zahrnují například vodu, fyziologický roztok, dextrózu, glycerol a podobně a jejich kombinace. Kromě toho, pokud je to žádoucí, mohou být přítomny také látky, jako jsou smáčedla nebo emulgátory, stabilizační pufrovací činidla.

Termín "farmaceuticky přijatelný nosič" se týká jakéhokoliv farmaceutického nosiče, který sám o sobě neindukuje produkci protilátek škodlivých pro jedince, kterému je kompozice podávána, a který může být podáván bez nežádoucí toxicity. Vhodné nosiče mohou být velké, pomalu metabolizované makromolekuly, jako jsou proteiny, polysacharidy, polymléčné kyseliny, polyglykolové kyseliny, polymerní aminokyseliny a kopolymery aminokyselin. Mohou být také přítomny farmaceuticky přijatelné soli, např. soli minerálních kyselin, jako jsou hydrochloridy, hydrobromidy, fosfáty, sulfáty a podobně; a soli organických kyselin, jako jsou acetáty, propionáty, malonáty, benzoáty a podobně.

Vhodné nosičové materiály zahrnují jakýkoli nosič nebo vehikulum běžně používané jako základ pro krémy, pleťové vody, gely, emulze, pleťové vody nebo barvy pro topické podávání. Příklady zahrnují emulgátory, inertní nosiče včetně uhlovodíkových bází, emulgační báze, netoxická rozpouštědla nebo ve vodě rozpustné báze. Zvláště vhodné příklady zahrnují pluronics, HPMC, CMC a další složky na bázi celulózy, lanolin, tvrdý parafin, tekutý parafin, měkký žlutý parafin nebo měkký bílý parafin, bílý včelí vosk, žlutý včelí vosk, cetostearylalkohol, cetylalkohol, dimethikony, emulgační vosky, isopropyl myristát, mikrokrytalický vosk, oleylalkohol a stearylalkohol.

Výhodně je farmaceuticky přijatelným nosičem nebo vehikulem gel, výhodně neiontový polyoxyethylen-polyoxypropylenový kopolymerový gel, například gel Pluronic, výhodně Pluronic F-127 (BASF Corp.). Tento gel je zvláště výhodný, protože je kapalný při nízkých teplotách, ale rychle tuhne při fyziologických teplotách, což omezuje uvolňování činidla na místo aplikace nebo bezprostředně sousedící s tímto místem.

Pomocná látka, jakými jsou kasein, želatina, albumin, lepidlo, alginát sodný, karboxymethylcelulóza, methylcelulóza, hydroxyethylcelulóza nebo polyvinylalkohol, mohou být také zahrnuty do formulace podle vynálezu. Další vhodné formulace zahrnují pluronic gel, formulace na bázi karboxymethylcelulózy (CMC) a formulace na bázi hydroxypropylmethylcelulózy (HPMC). Kompozice může být formulována pro jakoukoliv požadovanou formu podávání, včetně topického, instilačního, parenterálního, intramuskulárního, subkutánního nebo transdermálního podávání. Další užitečné formulace zahrnují přípravky s pomalým nebo zpožděným uvolňováním.

Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známým způsobem, např. běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

- 5 Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze nebo disperze, které mohou být připraveny před použitím, např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je mannitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují excipienty, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla,
- 10 soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufry. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspence mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu.
- 15 Olejové suspence obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalně estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8 až 22, s výhodou pak 12 až 22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou
- 20 a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brsidovou a linoleovou, případně s přídavkem antioxidantů, např. vitaminu E, β -karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, např. mono-, di- nebo trihydričké alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale
- 25 hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoscé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholózou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoscé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholózou TCM a složené z
- 30 glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoscé, Paříž) a/nebo „Miglyol 812“ (triglycerid nasycených mastných kyselin s délkou řetězce C₈ až C₁₂ od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejné. Gely nebo želé mohou být vyrobeny za použití vhodného gelovacího činidla, včetně, ale bez omezení na uvedené, želatiny, tragantu nebo
- 35 derivátu celulózy a mohou zahrnovat glycerol jako zvlhčovačlo, změkčovačlo a konzervační činidlo. Masti jsou polotuhé přípravky, které se skládají z aktivní složky začleněné do mastného, voskového nebo syntetického základu. Příklady vhodných krémů zahrnují, aniž by byl výčet omezující, emulze vody v oleji a olej ve vodě. Krémy typu voda v oleji mohou být formulovány za použití vhodného emulgačního činidla s vlastnostmi podobnými vlastnostmi mastných
- 40 alkoholů, jako je cetylalkohol nebo cetostearylalkohol, a emulgačním voskem. Krémy typu olej ve vodě mohou být formulovány za použití emulgačního činidla, jako je emulgační vosk cetomacrogol. Vhodné vlastnosti zahrnují schopnost modifikovat viskozitu emulze a jak fyzikální, tak chemickou stabilitu v širokém rozmezí pH. Ve vodě rozpustný nebo mísitelný krémový základ může obsahovat stlačovací systém Vative a může být také pufrován pro udržení
- 45 přijatelného fyziologického pH.

Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, např. plněním do ampulí nebo lahviček a uzavíráním obalů.

- 50 Např. farmaceutické přípravky pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno, zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přídavkem dalších neutrálních látek.

- Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktóza, sacharóza, mannitol nebo sorbitol, celulóзовé preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítěný polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát hořečnatý a/nebo vápenatý, polyethylen glykol nebo jeho deriváty.
- Jádra potahovaných tablet mohou být potažena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylen glykol a/nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulóзовých preparátů jako acetylcelulózaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulózaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávány do tablet nebo potahovaných tablet např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.
- Farmaceutické přípravky, které mohou být užívány orálně, jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovačů jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou např. s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojiva nebo lubrikanty jako talek nebo stearát hořečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazací tuk, parafinový olej nebo kapalný polyethylen glykol či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylen glykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty např. typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin.
- Další formy orálního podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo 10 % nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou např. práškové nebo kapalně koncentráty pro přípravu koktejlů, např. v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.
- Farmaceutické přípravky, které mohou být používány rektálně, jsou např. čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou např. přírodní nebo syntetické triglyceridy, parafinové uhlovodíky, polyethylen glykoly nebo vyšší alkoholy.
- Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, např. ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující viskozitu, např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, sorbitol a/nebo dextran, a stabilizátory tam, kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s excipienty, kde je to vhodné, a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Roztoky, které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity např. i pro infuzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.
- Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70 %, ale přednostně 20 až 50 % vody nebo vodné fáze. Tukovou fází tvoří zejména uhlovodíky, např. vazelína, parafinový olej nebo tvrdé parafiny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, např. cetyl alkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spany), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k

vodné fázi jsou např. smáčedla jako polyalkoholy, např. glycerol, propylen glykol, sorbitol a/nebo polyethylen glykol, nebo konzervační prostředky či příjemně vonící látky.

5 Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, např. parafin, vazelinu nebo parafinový olej, a dále přírodní nebo semisyntetické tuky, např. hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo, s výhodou, hydrogenované oleje, např. hydrogenovaný ricínový olej nebo olej z podzemnice olejné, a dále částečné glycerolové estery mastných kyselin, např. glycerol mono- a/nebo distearát. Dále obsahují např. mastné alkoholy, emulgátory a/nebo aditiva zmíněná v souvislosti s mastmi, která zvyšují příjem vody.

10 Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50 % vody. Používané olejové báze jsou zejména mastné alkoholy, např. lauryl, cetyl nebo stearyl alkoholy, mastné kyseliny, například palmitová nebo stearová kyselina, kapalné a pevné vosky, například isopropyl myristát, lanolin nebo včelí vosk, a/nebo uhlovodíky, například vazelina (petrolátum) nebo parafinový olej.

15 Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, např. estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, např. estery polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery (Tween) dále polyoxyethylenové estery mastných alkoholů nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných

20 alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylsulfát sodný nebo stearylsulfát sodný, které jsou obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, např. cetyl stearyl alkoholu nebo stearyl alkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, např. polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylen glykol a polyethylen glykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

25 Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, např. oxidy titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.

30 Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako polyhalogenované alkany, např. dichlorfluormethan a dichlortetrafluorethan, nebo přednostně nehalogenované plynné uhlovodíky, vzduch, N₂O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a krémy a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

35 Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně-etanolickou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovačla pro snížení odpařování, jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylen glykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylen glykolů, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže etanolem, a pokud je to nutné, i ostatní excipienty a aditiva.

40

Tento vynález dále poskytuje veterinární přípravky obsahující nejméně jednu aktivní složku společně s veterinárním nosičem. Veterinární nosiče jsou materiály pro aplikaci přípravku a mohou to být látky pevné, kapalné nebo plynné, které jsou inertní nebo přijatelné ve veterinární medicíně a jsou kompatibilní s aktivní složkou. Tyto veterinární přípravky mohou být podávány orálně, parenterálně nebo jakoukoli jinou požadovanou cestou.

45

Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě farmaceutických přípravků, přednostně v množství, které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných živočichů, např. člověka, vyžadujícího takovéto ošetření, je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0,1 až 5 g, s výhodou 0,5 až 2 g. Vhodné cesty pro aplikaci jsou orální, rektální, vazální místní (zahnující okulární, bukalní a sublinguální), vaginální a parenterální (zahnující subkutánní, intramuskulární, intravitreózní, nitrožilní, intradermální,

50

55

intratekální a epidurální). Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta, toxicitě sloučeniny a místě infekce, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

5 Objasnění výkresů

Obr. 1 ukazuje stimulaci migrace normálních lidských fibroblastů (BJ) *in vitro* cytokininy. V rýhových testech stimuluje *trans*-zeatin (tZ), *trans*-zeatin-9-glukosid (tZ9G) a kinetin-3-glukosid (K3G) při 10 μ M migraci buněk po 24 hodinách. Neošetřené buňky jsou označeny jako kontrolní (Ko). Výsledky jsou porovnány s kontrolními buňkami stimulovanými vaskulárním endotelovým růstovým faktorem (VEGF, pozitivní kontrola) nebo buňkami ošetřenými 2-methoxyestradiolem (MeO, negativní kontrola).

Obr. 2 znázorňuje zvýšenou migraci normálních lidských fibroblastů (BJ) *in vitro* po aplikaci cytokininů v různých kombinacích. V rýhovém testu jak 10 μ M *trans*-zeatin-9-glukosidu (tZ9G), tak kinetin-3-glukosidu (K3G) a zejména jejich kombinace silně stimulují migraci buněk po 24 hodinách. Neošetřené buňky jsou označeny jako kontrolní (Ko). Výsledky jsou porovnány s kontrolními buňkami stimulovanými vaskulárním endotelovým růstovým faktorem (VEGF, pozitivní kontrola) nebo buňkami ošetřenými 2-methoxyestradiolem (MeO, negativní kontrola).

Obr. 3 ukazuje stimulaci migrace hladovějících normálních lidských fibroblastů (BJ) *in vitro* po 24 hodinách ošetření kinetinem. Buňky byly ponechány hladovět po dobu 48 hodin a poté byl k buňkám přidán kinetin (K). V rýhovém testu 10 μ M K silně stimuluje buňky po dalších 24 hodinách. Výsledky jsou porovnány s buňkami s/bez fetálního bovinního séra (FBS) ve dvou různých médiích (DMEM nebo M199). Neošetřené buňky jsou označeny jako kontrolní (Ko). Buňky ošetřené 2-methoxyestradiolem (MeO) byly použity jako negativní kontrola.

Obr. 4 ukazuje, že kinetin snižuje expresi cyklooxygenázy-2 (COX-2) v BJ buňkách stimulovaných tumor nekrotizujícím faktorem- α (TNF- α) po dobu 30 minut, 1, 6, 12 a 24 hodin. Pokles COX-2 může být spojen s protizánětlivou aktivitou a byl detekován analýzou Western Blot. α -Tubulin indikuje rovnoměrné nanesení proteinů. Neošetřené buňky jsou označeny jako kontrolní (Ko). Alaptid (A) byl použit jako pozitivní kontrola (sloučenina známá z dosavadního stavu techniky pro stimulaci hojení ran u savců).

Obr. 5 ukazuje indukci migrace endotelových buněk z lidské pupečnickové žíly (HUVEC) *in vitro* po aplikaci cytokininů v různých kombinacích. V rýhovém testu již po 8 hodinách silně stimuluje migraci buněk kombinace dvou cytokininů, a to 10 μ M K (kinetin) a tZ (*trans*-zeatin) nebo K9G (kinetin-9-glukosid) a tZ9G (*trans*-zeatin-9-glukosid). Výsledky jsou porovnány s kontrolními buňkami stimulovanými vaskulárním endotelovým růstovým faktorem (VEGF, pozitivní kontrola) nebo buňkami ošetřenými 2-methoxyestradiolem (MeO, negativní kontrola).

Obr. 6 ukazuje stimulaci vaskularizace *in vitro* cytokininy. Tvorba trubicovitých struktur byla indukována K, K3G, tZ, tZ9G a jejich kombinacemi. Buňky byly nasazeny na Matrigel® a ošetřeny cytokininy (10 μ M nebo 10 μ M + 10 μ M). Indukce tvorby tubulů byla porovnána s pozitivní kontrolou (buňky s vaskulárním endotelovým růstovým faktorem – VEGF) nebo negativní kontrolou (buňky s 10 μ M 2-methoxyestradiolu – MeO). Snímky byly pořízeny po 16 hodinách.

Obr. 7 ukazuje, jak cytokininy stimulují adhezi buněk HUVEC *in vitro*. VE-cadherin nezbytný pro kontakty endotelových buněk byl upregulován vlivem aplikace K a K3G. Buňky byly ošetřeny cytokininy (10 M) po dobu 24 hodin, fixovány a obarveny pomocí primární monoklonální protilátky a sekundární konjugované protilátky. Indukce exprese VE-cadherinu byla porovnána s kontrolními buňkami.

Obr. 8 ukazuje vaskularizační účinky heterocyklických cytokininů v testu choriolantoidní membrány (CAM). Oplodněná slepičí vejce byla stimulována samotným VEGF (1 ng) nebo nebo testovanými cytokininy (45 µg), v daném pořadí. Všechny sloučeniny významně indukovaly vaskularizaci v porovnání s VEGF.

5

Příklady uskutečnění vynálezu

Následující příklady slouží k objasnění vynálezu, aniž by omezovaly jeho rozsah. Veškeré cytokininové deriváty podle tohoto vynálezu jsou běžně se vyskytující látky, jejichž příprava je odborníkovi v oboru známá.

Zkratky a chemické názvy

- 15 3G: 3-β-D-glukopyranosyl;
9G: 9-β-D-glukopyranosyl;
K: kinetin (6-furfurylaminopurin);
K3G: kinetin-3-glukosid
2iP: 6-isopentenylaminopurin;
20 BAP: 6-benzylaminopurin;
Z: zeatin
Z3G: zeatin-3-glukosid
tZ: *trans*-zeatin;
tZ9G: *trans*-zeatin-9-glukosid
25 cZ: *cis*-zeatin;
pT: *para*-topolin (6-(4-hydroxybenzylamino)purin);
pT9G: *para*-topolin-9-glukosid
mT: *meta*-topolin (6-(3-hydroxybenzylamino)purin);
mT9G: *meta*-topolin-9-glukosid
30 oT: *ortho*-topolin (6-(4-hydroxybenzylamino)purin);
MeoT: *para*-methoxytopolin (6-(4-methoxybenzylamino)purin);
MeoT: *ortho*-methoxytopolin (6-(2-methoxybenzylamino)purin);
iP 6-(3,3-dimethylallylamino)purin;
4MeOK: 4-methoxykinetin; 6-(4-methoxyfurfurylamino)purin;
35 HUVEC: endotelové buňky lidské pupečnickové žíly;
FCS: fetální telecí sérum;
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium;
VEGF: vaskulární endotelový růstový faktor;
SEM, SE: střední chyba průměru;
40 SDS: dodecylsírán sodný;
RIPA pufr: Radio Immuno Precipitation Assay buffer;
Tris-HCl: Tris (hydroxymethyl) aminomethan hydrochlorid;
EDTA: kyselina ethylendiamintetraoctová;
EGTA: ethylenglykol bis(2-aminoethyl ether)-N,N',N',N'-tetraoctová kyselina;
45 NaCl: chlorid sodný;
NaF: fluorid sodný;
PMMSF: fenylnethylsulfonyl fluorid;
BSA: Bovine Serum Albumin;
TBS: Tris buffered saline;
50 PBS: Phosphate buffered saline;
BJ: normální lidské fibroblasty;
COX-2: cyklooxygenáza-2;
TNF-α: tumor nekrotizující faktor α;
DMSO: dimethylsulfoxid;
55 CAM: kuřecí chorioalantoidální membrána;

TCS: tumor cells survival;
cAMP: cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát.

Buněčné kultury

5

HUVEC byly připraveny štěpením pupečnickových žil pomocí 0,1 g/l kolagenázy A (Roche, Mannheim, Německo), jak bylo popsáno dříve, a kultivovány v médiu pro růst endoteliálních buněk (ECGM, Provitro, Berlín, Německo) obsahujícím 10 % FCS (Biochrom, Berlín, Německo). Experimenty byly provedeny s použitím buněk v pasáži 3.

10

Statistická analýza

Počet nezávisle provedených experimentů a použité statistické testy jsou uvedeny v příslušné legendě obrázku. Jsou ukázány reprezentativní experimenty. Údaje z grafu představují průměry $\pm$ SEM. Statistická analýza byla provedena pomocí Microsoft Excel. Statistická významnost se předpokládá, pokud $p \leq 0,05$.

15

Příklad 1

20

Rýhový migrační test

Konfluentní HUVEC byly seškrábány pipetovací špičkou a okamžitě ošetřeny buď plným endotelovým růstovým médiem (HUVEC) nebo DMEM (BJ) obsahujícím různé cytokininy podle vynálezu nebo médiem bez růstových faktorů M199 (bez séra, negativní kontrola; PAN Biotech, Aidenbach, Německo). Po 16 hodinách inkubace byly buňky fixovány pomocí 4% formaldehydu a obarveny Coomassie Blue. Snímky byly pořízeny mikroskopem (IX51, Olympus, Tokio, Japonsko). Migrace byla vypočtena pomocí vlastního softwaru a vyjádřena jako poměr mezi pixely pokrytými buňkami a celkovým počtem pixelů v oblasti rány. Buňky ošetřené cytokininy v různých časových bodech byly porovnány s buňkami neošetřenými, stimulovanými (pozitivní kontrola – 10 ng/ml vaskulárního endotelového růstového faktoru, VEGF) nebo inhibovanými (negativní kontrola – 10 μ M 2-methoxyestradiol, MeO). Relativní plocha rány byla hodnocena po dobu 16 hodin po škrábnutí. Uvedené údaje jsou průměry $\pm$ standardní chyba (SE) získané z alespoň tří nezávislých experimentů provedených v triplicátech.

30

35

Tvorba trubek

Ibidi 15-jamková μ -sklíčka (ibidi, Mnichov, Německo) byla potažena Matrigelem® (Corning, Tewksbury, MA, USA). 1×10^4 buněk HUVEC bylo ošetřeno cytokininy a vyseto na Matrigel. Po 16 hodinách inkubace byly snímky zachyceny pomocí mikroskopu (IX51, Olympus, Japonsko). Uvedená data jsou průměry $\pm$ SE získané ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátech.

40

SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza a imunoblotování

Pro imunoblotování byly sklizené buňky lyzovány v RIPA pufru (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 100 mM NaCl, 2 mM NaF, 0,2 % Nonidet P-40, 30 mM PMMSF, 1 mM 10 mg/ml aprotininu a leupeptinu). Proteiny v lyzátech byly kvantifikovány Bradfordovou metodou a poté zředěny Laemmliho elektroforézním pufrem. Proteiny byly poté separovány na SDS-polyakrylamidových gelech, přeneseny na nitrocelulózové membrány (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) a obarveny Ponceau S, aby se zkontrolovalo rovnoměrné nanesení proteinu. Membrány byly blokovány 5% (hmotn./obj.) BSA a 0,1% Tween-20 v TBS po dobu 2 hodin a inkubovány přes noc se specifickými primárními protilátkami. Po promytí v TBS a TBS obsahujícím 0,1 % Tween-20 byly membrány inkubovány se sekundárními protilátkami konjugovanými s křenuvou peroxidázou a vizualizovány chemiluminiscenčním detekčním činidlem West Pico Supersignal (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Pro potvrzení

50

55

rovnoměrného nanesení proteinů byla provedena imunodetekce s anti- α -tubulinovou monoklonální protilátkou. Experimenty byly opakovány třikrát. Expres proteinu v ošetřených buňkách byly porovnány s neošetřenými kontrolami.

5 Metody imunofluorescenčního značení

Ošetřené buňky v 8-jamkových ibidi μ -sklíčkách (ibidi, Mnichov, Německo) byly promyty PBS, fixovány na sklíčkách 10% formaldehydem (obj./obj.) po dobu 10 minut, označeny primární protilátkou (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a fluorescenčně konjugovanou sekundární protilátkou (Thermo Fisher Scientific) a fixovány pomocí média FluorSave (Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Německo). Buňky byly poté vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu (IX51, Olympus, Japonsko).

Výsledky

Několik cytokininů zvýšilo migraci lidských fibroblastů a endotelových buněk *in vitro* (obr. 1 až 6). V rýhovém testu stimulovaly tZ, tZ9G, K3G, pT9G, Z3G a mT9G v 10 μ M migraci buněk po 24 hodinách (obr. 1). Kromě toho cytokininy v různých kombinacích výrazně zvýšily migraci normálních lidských fibroblastů (BJ). Při použití rýhového testu stimulovala kombinace 10 μ M K3G a tZ9G silně migraci buněk (3-krát ve srovnání s kontrolními buňkami s VEGF) po 24 hodinách (obr. 2). Navíc byla kinetinem silně indukovaná migrace hladovějících normálních lidských fibroblastů (BJ) *in vitro* po 24 hodinách. Buňky byly ponechány hladovět po dobu 48 hodin. Poté byl k buňkám přidán kinetin (K). V rýhových testech 10 μ M K silně stimuluje buňky po dalších 24 hodinách (obr. 3). Výsledky jsou porovnány s buňkami s/bez fetálního bovinního séra (FBS) ve dvou různých médiích (DMEM nebo M199), aby se prokázal stimulační potenciál cytokininů. Kromě toho cytokininy v různých kombinacích zvýšily také migraci endotelových buněk lidské pupečnickové žíly (HUVEC) *in vitro*. V rýhových testech kombinace obou 10 μ M K a tZ nebo K9G a tZ9G silně stimuluje migraci buněk již po 8 hodinách (obr. 5). Výsledky ve srovnání s kontrolními buňkami stimulovanými VEGF (pozitivní kontrola) opět potvrdily indukcí buněčné migrace.

Pomocí testu tvorby tubulů byla měřena schopnost buněk tvořit trojrozměrné struktury. Ve srovnání s kontrolními buňkami s 10 ng/ml VEGF byla tvorba trubic u buněk ošetřených cytokininem významně indukována (obr. 6). Silný účinek byl detekován pro 10 μ M K, K3G, tZ, tZ9G a jejich kombinace. Síťování buněk (spojení), jejich tloušťka, počet trubiček a tedy i celková délka trubiček se projevila po 16 hodinách od ošetření cytokininem. Cytokininy také zvyšovaly buněčnou adhezi HUVEC *in vitro*. VE-cadherin, endotelově specifická adhezni molekula umístěná na spojích mezi endotelovými buňkami, nezbytná pro kontakty endotelových buněk, byla viditelnější v buňkách s 10 μ M K a K3G po 24 hodinách (obr. 7). Kromě svých adhezivních funkcí VE-cadherin reguluje různé buněčné procesy, jako je buněčná proliferace a apoptóza, a moduluje funkce receptoru vaskulárního endotelového růstového faktoru. V důsledku toho je VE-cadherin nezbytný během embryonální angiogeneze (Vestweber, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008:223-32).

Kromě toho kinetin snižoval expresi cyklooxygenázy-2 (COX-2) v BJ buňkách stimulovaných tumor nekrotizujícím faktorem- α (TNF- α) po dobu 12 hodin (obr. 4). Pokles COX-2 může být spojen s protizánětlivou aktivitou a byl detekován analýzou Western blotting.

Tabulka 1: Stimulační aktivity vybraných heterocyklických cytokininů pro endotelové buňky HUVEC po 11 hodinách ošetření 10 nebo 100 μ M testovaných sloučenin.

AMINOPURINOVÝ SUBSTITUENT				Stimulace migrace HUVEC	
Zkratka	R6	R3	R9	10 μ M (% kontrola + VEGF)	100 μ M (% kontrola + VEGF)
	Control			61	61
	Co+DMSO			55	55
	Co+VEGF (pozitivní kontrola)			100	100
	Co+MeO (negativní kontrola)			34	34
K	furfurylamino	H	H	69	60
2iP	isopentenylamino	H	H	61	56
BAP	benzylamino	H	H	62	57
tZ	(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	H	H	106	56
cZ	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	H	H	87	64
pT	4-hydroxybenzylamino	H	H	82	73
mT	3-hydroxybenzylamino	H	H	75	58
oT	2-hydroxybenzylamino	H	H	60	56
MemT	3-methoxybenzylamino	H	H	61	58
MeoT	2-methoxybenzylamino	H	H	58	58
iP	3,3-dimethylallylamino	H	H	102	72
4MeOK	4-methoxyfurfurylamino	H	H	63	60
K9G	furfurylamino	β -D-glukopyranosyl	H	106	56
BAP9G	benzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	58	56
tZ9G	(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	β -D-glukopyranosyl	H	75	94
cZ9G	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	β -D-glukopyranosyl	H	55	64
pT9G	4-hydroxybenzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	72	63
mT9G	3-hydroxybenzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	61	56
oT9G	2-hydroxybenzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	58	55
MeomT9G	3-methoxybenzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	57	56
MeopT9G	2-methoxybenzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	56	58
iP9G	3,3-dimethylallylamino	β -D-glukopyranosyl	H	58	59
4MeOK9G	4-methoxyfurfurylamino	β -D-glukopyranosyl	H	56	60
K3G	furfurylamino	H	β -D-glukopyranosyl	185	750
BAP3G	benzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	58	57
tZ3G	(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	H	β -D-glukopyranosyl	301	159
cZ3G	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	H	β -D-glukopyranosyl	72	74
pT3G	4-hydroxybenzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	76	68
mT3G	3-hydroxybenzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	62	61
oT3G	2-hydroxybenzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	59	56
MeomT3G	4-hydroxy-3-methoxybenzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	56	55
MeopT3G	3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	57	54
iP3G	3,3-dimethylallylamino	H	β -D-glukopyranosyl	58	56
4MeOK3G	4-methoxyfurfurylamino	H	β -D-glukopyranosyl	59	60

HUVEC – endotelové buňky, % kontrol: kontrola =100%; 3G: 3- β -D-glukopyranosyl; 9G: 9- β -D-glukopyranosyl; K: kinetin(6-furfurylaminopurin); 2iP: 6-isopentenylaminopurin; BAP: 6-benzylaminopurin; tZ: *trans*-zeatin; cZ: *cis*-zeatin; pT: *para*-topolin (6-(4-hydroxybenzylamino)purin); mT: *meta*-topolin (6-(3-hydroxybenzylamino)purin); oT: *ortho*-topolin (6-(4-hydroxybenzylamino)purin); MemT: *para*-methoxytopolin (6-(4-methoxybenzylamino)purine); MeoT: *ortho*-methoxytopolin (6-(2-methoxybenzylamino)purin); iP: 6-(3,3-dimethylallylamino)purin; 4MeOK: 4-methoxykinetin: 6-(4-methoxyfurfurylamino)purin.

Příklad 2

Ex vivo a in vivo vaskularizační účinky

5

Vaskularizační účinky heterocyklických cytokininů byly také testovány na složitějších modelech *ex vivo* a *in vivo*. V tomto ohledu byl použit test tvorby cév v zárodečném terčíku vajíček slepic (CAM test – choriolantoidní membrány). Choriolantoidní membrána, známá také jako chorioalantois, je vysoce vaskularizovaná membrána nacházející se ve vejcích některých amniotů, jako jsou ptáci a plazi. Je tvořena fúzí mezodermálních vrstev dvou extra membrán – chorionu a alantois. Test choriolantoidní membrány (CAM): Oplodněná slepičí vejce White Leghorn (Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, Německo) byla inkubována při 37 °C po dobu 72 hodin při konstantní vlhkosti. Vejce byla přenesena do misek, inkubována dalších 72 hodin a stimulována VEGF (1 ng/disk) nebo VEGF a uvedenými sloučeninami (45 µg) za použití malých celulóзовých disků. Následující den byly CAM fotografovány pomocí stereomikroskopu (Olympus, Mnichov, Německo). Cytokiny v závislosti na dávce zvýšily pučení endoteliálních buněk z prstenců aorty (obr. 8). Aplikací CAM testů jsme zjistili silnou indukci tvorby cév vlivem vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), který byl také stimulován při kombinovaném ošetření cytokininy (obr. 8). Jako konečný *in vivo* důkaz principu byl použit mikrokapkový test myši rohovky. Intraperitoneálně podávaný kinetin silně indukoval neovaskularizaci *in vivo*.

10

15

20

Příklad 3

In vitro cytotoxická aktivita nových sloučenin

25

Nízká cytotoxicita sloučenin je hlavní vlastností určující jejich kosmetické a terapeutické použití. Jedním z parametrů používaných jako základ pro testy cytotoxicity je metabolická aktivita životaschopných buněk. Například mikrotitrační test, který používá Calcein AM, je nyní široce používán ke kvantifikaci buněčné proliferace a cytotoxicity. Tento test se například používá v programech screeningu léků a při testování chemosenzitivity. Protože Calcein AM štěpí pouze metabolicky aktivní buňky, tyto testy detekují výhradně životaschopné buňky. Množství redukovaného Calceinu AM odpovídá počtu vitálních buněk v kultuře.

30

35

40

45

Buněčné linie: lidské T-lymfoblastické leukémie CEM; promyelocytární HL-60 a monocytární U937 leukémie; buněčné linie karcinomu prsu MCF-7, BT549, MDA-MB-231; glioblastomové buňky U87MG; buňky cervikálního karcinomu HELA; sarkomové buňky U2OS a Saos2; hepatocelulární karcinom HepG2; myší fibroblasty NIH3T3; BJ, lidské fibroblasty; myší imortalizované makrofágy kostní dřeně B2.4 a B10A.4; leukémie P388D1 a L1210; melanomy B16 a B16F10; lidský osteosarkom HOS; lidská myeloidní leukémie K-562; melanom lidské kůže G-361 byly použity pro rutinní screening sloučenin. Buňky byly udržovány v TPP 80 cm² plastových lahvích pro tkáňové kultury a kultivovány v buněčném kultivačním médiu (DMEM s 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 x g/ml streptomycinu, 10 % fetálního telecího séra a hydrogenuhličitanem sodným).

Buněčné suspenze, které byly připraveny a naředěny podle konkrétního buněčného typu a očekávané cílové buněčné hustoty (2500 až 30 00 buněk na jamku na základě charakteristik růstu buněk), byly přidány pipetou (80 µl) do 96-jamkových mikrotitračních destiček. Inokulátům byla ponechána předinkubační doba 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂ pro stabilizaci. Čtyřnásobná ředění zamýšlené testované koncentrace byla přidána v čase nula ve 20 µl alikvotech do jamek mikrotitrační destičky. Obvykle byla testovaná sloučenina hodnocena v šesti 4-násobných ředěních. Při rutinním testování byla nejvyšší koncentrace v jamce 166,7 µM, ale lze ji změnit v závislosti na látce. Všechny koncentrace léčiv byly zkoumány v duplikátech. Inkubace buněk s testovanými sloučeninami trvala 72 hodin při 37 °C, v atmosféře 5% CO₂ a 100 % vlhkosti. Na konci inkubační doby byly buňky testovány pomocí Calceinu AM. Sto mikrolitrů zásobního

50

55

roztoku bylo napipetováno do každé jamky a inkubováno po dobu 1 hodiny. Fluorescence (FD) byla měřena pomocí Labsystem FIA Reader Fluoroscant Ascent (UK). Přežití nádorových buněk (IC_{50}) bylo vypočteno za použití následujícího výpočtu: $TCS = (FD_{\text{jamka vystavená léčivu}} / \text{průměr } FD_{\text{kontrolních jamek}}) \times 100 \%$. Hodnota GI_{50} , koncentrace léčiva letální pro 50 % nádorových buněk, byla vypočtena ze získaných křivek odezvy na dávku.

Nulová cytotoxicita nových sloučenin je základním předpokladem pro aplikace při hojení ran. Cytotoxicita nových sloučenin byla testována na panelu buněčných linií různého histogenetického a druhového původu (tabulka 2). Ukazujeme zde, že stejné aktivity byly nalezeny ve všech testovaných nádorových buněčných liniích, avšak nemaligní buňky, např. NIH3T3 fibroblasty a normální lidské fibroblasty byly odolné vůči cytotoxické indukované heterocyklickými cytokininy. Sloučeniny uvedené v tab. 2 lze rozdělit do 2 skupin. První skupina obsahuje „klasické volné cytokininové báze“ reprezentované 6-substituovanými aminopuriny (které jsou známé ze stavu techniky). Druhá skupina obsahuje nové heterocyklické deriváty cytokininu substituované buď v poloze 3 nebo 9 glukózou. Výsledky ukazují, že substituce v poloze 3 nebo 9 purinového skeletu obecně vedla k úplné ztrátě cytotoxické aktivity ve srovnání s analogy „klasických cytokininových bazí“. Jak ukazuje tabulka 2, IC_{50} pro fibroblasty BJ (normální lidské fibroblasty) a myši fibroblasty NIH3T3 byla vždy vyšší než 166,7 μM . Nové deriváty nevykazují žádnou toxicitu pro normální a nádorové buňky v koncentracích do 166,7 μM , a proto jsou pro kosmetické a farmaceutické aplikace dokonce vhodnější než přírodní cytokininy (6-substituované deriváty aminopurinu).

Tabulka 2: Cytotoxicita nových sloučenin pro různé normální a rakovinné buněčné linie

	Testovaná buněčná linie / IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)						
R6	R3	R9	HOS	K-562	MCF7	BJ	NIH-3T3
furfurylamino	H	H	>166,7	164,1	>166,7	>166,7	155,1
isopentenylamino	H	H	>166,7	146,9	>166,7	>166,7	102,2
benzylamino	H	H	>166,7	138,9	166,1	>166,7	145,7
(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	H	H	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	H	H	>166,7	128,4	>166,7	>166,7	>166,7
4-hydroxybenzylamino	H	H	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	149,2
3-hydroxybenzylamino	H	H	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
2-hydroxybenzylamino	H	H	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7
3-methoxybenzylamino	H	H	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
2-methoxybenzylamino	H	H	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
3,3-dimethylallylamino	H	H	>166,7		>166,7	>166,7	
4-methoxyfurfurylamino	H	H	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7
furfurylamino	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7
benzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7
(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7
(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7
4-hydroxybenzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7
3-hydroxybenzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7
2-hydroxybenzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	>166,7
3-methoxybenzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	
2-methoxybenzylamino	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	
3,3-dimethylallylamino	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	
4-methoxyfurfurylamino	β -D-glukopyranosyl	H	>166,7		>166,7	>166,7	
furfurylamino	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
benzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7

(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7		>166,7	>166,7	
(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7		>166,7	>166,7	
4-hydroxybenzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7		>166,7	>166,7	
3-hydroxybenzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7		>166,7	>166,7	
2-hydroxybenzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7		>166,7	>166,7	
3-methoxybenzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7		>166,7	>166,7	
2-methoxybenzylamino	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7		>166,7	>166,7	
3,3-dimethylallylamino	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7		>166,7	>166,7	
4-methoxyfurfurylamino	H	β -D-glukopyranosyl	>166,7		>166,7	>166,7	

BJ: normální lidské fibroblasty; NIH-3T3: buněčné linie myších embryonálních fibroblastů; HOS: lidský osteosarkom; MCF7: buněčné linie karcinomu prsu; K-562: lidská myeloidní leukémie.

Příklad 4

5

Protizánětlivá aktivita

Krysí gliom C6 (ATCC č. CCL107) byl kultivován jako monovrstva v bezsérovém chemicky definovaném médiu obsahujícím Hamovo F10-minimální základní médium (1:1 v/v), 2 mM L-glutamin, 1 % (v/v) minimální esenciální médium vitamíny (100x), 1 % (v/v) minimální esenciální médium neesenciální aminokyseliny (100x), 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin a 30 nM seleničitan sodný. Inkubace byla provedena při 37 °C ve zvlhčené atmosféře. Testy byly prováděny v logaritmické růstové fázi při hustotě $2,5 \times 10^5$ buněk/cm². Intracelulární syntéza cAMP byla indukována přidáním 5 µM (-)isoproterenolu. Po 30 minutách inkubace při 37 °C bylo médium odstraněno a buněčné množství cAMP bylo stanoveno pomocí cAMP-enzymového imunotestu Amersham kit. Hodnota I₅₀ byla stanovena z křivky dávka-odpověď v duplikátech. Účinek nových heterocyklických purinů byl měřen po současném přidání isoproterenolu. Klasické cytokininy, známé v dosavadním stavu techniky, byly neaktivní.

20 Tabulka 3: Modulační aktivita β -adrenergických receptorů substituovanými puriny

Testovaná sloučenina		I ₅₀ (µM)	Účinek
R6	R9		
H	H		n.a.
H	9- β -D-glukopyranosyl		n.a.
furfurylamino	H	47 mM	0,7-násobná aktivace
4-hydroxybenzylamino	H	42 mM	0,8-násobná aktivace
(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	H	27 mM	1,7-násobná aktivace
furfurylamino	9- β -D-glukopyranosyl	7,8 mM	2,3-násobná aktivace
(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)	9- β -D-glukopyranosyl	5,6 mM	2,6-násobná aktivace

n. a. znamená neaktivní

25 Protože purinogenní receptory podobné P2Y₁ a A₂, negativně a pozitivně navázané na adenylátcyklázu, v tomto pořadí, jsou přítomny v potkaním gliomu C6, zbývá určit, zda je modulační syntéza cAMP způsobena inhibicí aktivace β -adrenergických receptorů isoproterenolem, nebo v důsledku aktivace purinogenních receptorů. Sloučeniny vzorce I a II, které mají protizánětlivé aktivity, mohou být použity pro léčbu zánětlivých poranění.

Příklad 5

Suché tobolky

5

5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0,25 g jedné ze sloučenin zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

Složení

10

Aktivní složka	1250 g
Talek	180 g
Pšeničný škrob	120 g
Magnesium stearát	80 g
Laktóza	20 g

15

Postup přípravy: Rozetřené látky jsou protlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Dávka 0,33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí přístroje na plnění tobolek.

20

Příklad 6

Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné z látek zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

25

Složení

Aktivní složka	250 g
Lauroglykol	2 litry

30

Postup přípravy: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu® (propylenglykol laurát, Gattefoscé S. A., Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

35

Příklad 7

Měkké tobolky

40

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné ze sloučenin obecného vzorce I zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

45

Složení

Aktivní složka	250 g
PEG 400	1 litr
Tween 80	1 litr

50

Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v PEG 400 (polyethylenglykol o Mr mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween® 80 (polyoxyethylen sorbitan monolaurát, Atlas Chem. Ind., Inc., USA, dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na částice o velikosti 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

55

Příklad 8

Vývoj mastí

5

Formulace masti byla testována během pilotní klinické studie na 4 dobrovolnících s psoriatickými kožními poruchami. Názvy složek formulace jsou uvedeny podle terminologie registrujících orgánů a jejich množství je v gramech na 100 g.

10	Mast	/100 g
	<i>trans</i> -zeatin (<i>tZ</i>)	1,0 g
	butylhydroxytoluen (Nipanox BHT)	0,2 g
	butylparaben (Nipabutyl)	0,2 g
	diethyleneglykolmonoethylether (Transcutol P)	10,0 g
15	glycerol dibehenát (Compritol 888 ATO)	22,0 g
	propylenglykol laurát (Lauroglycol FCC)	66,6 g

Dobrovolníci hodnotili: Případnou konzistenci masti lze dále upravit přidáním vaselinum album. Očekává se, že transdermální systém Transcutol P/Lauroglycol FCC zvýší účinnost *trans*-zeatinu.

20

Příklad 9

Gelový přípravek

- 25 Formulace mastí byla testována během pilotní klinické studie se 4 dobrovolníky různých, což je onemocnění kůže. Složky jsou uvedeny v gramech na 100 g.

Látka	Obsah
<i>trans</i> -zeatin	1,0 g
butylhydroxytoluenum	0,2 g
butylparaben	0,2 g
diethyleneglykol monoethyl ether	10,0 g
silica colloidalis anhydrica	5,0 g
propylen glykol laurát	83,6 g

- 30 Gel této konzistence může být navíc modifikován přidáním oxidu křemičitého, silica colloidalis anhydrica. Také se opět předpokládá, že transdermální systém Transcutol P/Lauroglycol FCC zvýší účinnost mesylátové soli *para*-topolinu. Oxid křemičitý colloidalis anhydrica pravděpodobně zpomalí penetraci účinné látky.

Příklad 10

35

Postup přípravy kožní masti

Složky masti jsou uvedeny v gramech na 200 g:

Látka	Obsah
<i>trans</i> -zeatin	2,0 g
butylhydroxytoluenum	0,4 g
butylparaben	0,4 g
diethyleneglykol monoethyl ether	20,0 g
glycerol dibehenát	44,0 g
propylene glycol laurate	132,2 g

40

Doporučený postup

Fáze A: 2 g mesylátové soli para-topolinu se rozpustí ve 20 g Transcutol P za stálého míchání při teplotě místnosti v oddělené skleněné nebo nerezové nádobě. Proces rozpouštění může být urychlen zahříváním roztoku na maximální teplotu 40 °C.

5

Fáze B: 0,4 g Nipanox BHT a 0,4 g Nipabutyl se rozpustí za stálého míchání ve 133,2 g Lauroglycolu FCC při teplotě přibližně 70 °C, v další samostatné skleněné nebo nerezové nádobě. Čirý olejovitý roztok se zahřívá na teplotu přibližně 80 °C a 44 g Compritol 888 ATO se taví v něm, za stálého míchání. Čirý olejovitý roztok se ochladí na cca 60 °C za stálého míchání a ochlazení a smísí se s fází A. Vzniklá bělavá mast je rozdělena na přibližně 15 g porce a plní se do předem připravených plastových nádob.

10

Příklad 11

15 Formulace přípravku pro lokální aplikaci na kůži

Prostředek pro místní aplikaci na kůži obsahuje následující složky podle hmotnostních %:

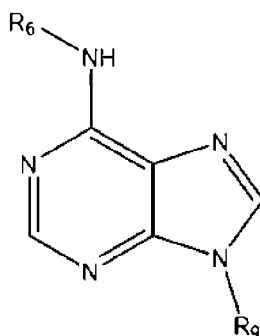
Aktivní složka:	<i>trans</i> -zeatin	0,1 %
Olejová fáze:	Cetylalkohol	5,0 %
	Glycerylmonostearát	15,0 %
	Sorbitanmonooleát	0,3 %
	Polysorbát 80 USP	0,3 %
	Methylcelulóza 100 cps	1,0 %
Vodná fáze:	Methylparaben	0,25 %
	Propylparaben	0,15 %
	Vyčištěná voda q.s. na	77,9 %

20 Methylparaben a propylparaben se rozpustí v horké vodě a následně se v ní disperguje i methylcelulóza. Směs se pak ochladí na 60 °C, dokud se methylcelulóza nerozpustí. Směs se potom zahřívá na 72 °C a přidá se do olejové fáze, která se zahřívá na teplotu 70 °C za stálého míchání. Mesylátová sůl *para*-topolinu se přidá při teplotě 35 °C a výsledná směs se míchá až do okamžiku rozptýlení. Tento prostředek se aplikuje na kůži přinejmenším každý den, dokud se nedosáhne požadovaného zmírnění stárnutí kůže (proti stárnutí).

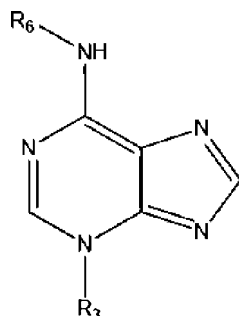
25

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Heterocyklické purinové deriváty cytokininů obecného vzorce I a II



(I)



(II)

nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniakem nebo aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních izomerů cukrů (b-D, a-D, b-L, a-L), pro použití při hojení ran,

příčemž

R6 je vybrán ze skupiny sestávající z: furfurylu, 4-hydroxybenzylu, 3,3-dimethylallylu, (Z)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylu a (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylu,

R3 a R9 je glukopyranosyllová skupina.

2. Heterocyklické deriváty cytokininů obecného vzorce I a II pro použití podle nároku 1, vybrané ze skupiny sestávající z: 6-furfurylamino-3-β-D-glukopyranosylpurin, 6-(4-hydroxybenzylamino)-3-β-D-glukopyranosylpurin, 6-(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-3-β-D-glukopyranosylpurin, 6-(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-3-β-D-glukopyranosylpurin, 6-furfurylamino-9-β-D-glukopyranosylpurin, 6-(4-hydroxybenzylamino)-9-β-D-glukopyranosylpurin, 6-(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9-β-D-glukopyranosylpurin a 6-(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9-β-D-glukopyranosylpurin.

3. Heterocyklické deriváty cytokininů obecného vzorce I a II pro použití dle nároku 1, kde uvedená rána je popálenina, ischemický vřed, proleženina, vřed vzniklý infekčním procesem, vřed vzniklý v důsledku zánětlivého procesu, poraněná ústní tkáň, zánětlivá poranění kůže.

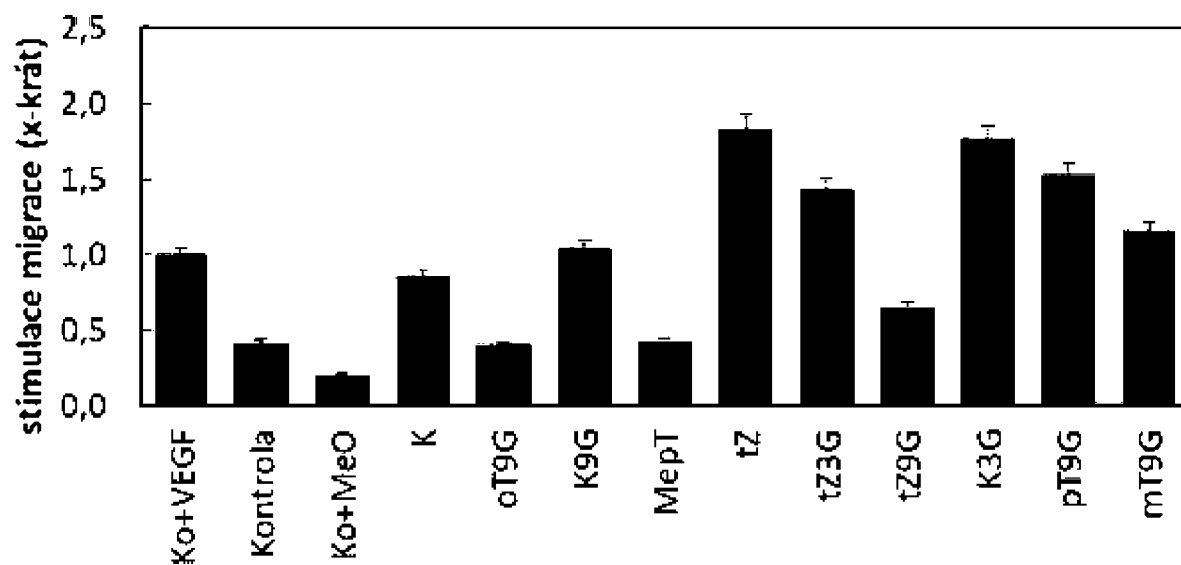
4. Heterocyklické deriváty cytokininů obecného vzorce I a II pro použití podle nároku 1, přičemž se použije kombinace alespoň dvou heterocyklických purinových derivátů cytokininů definovaných v nároku 1 nebo 2.

5. Heterocyklické deriváty cytokininů obecného vzorce I a II pro použití podle nároku 1, přičemž se použije kombinace 6-furfurylamino-3-β-D-glukopyranosylpurinu s *trans*-zeatinem a/nebo 6-furfurylamino-3-β-D-glukopyranosylpurinu s 6-(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9-β-D-glukopyranosylpurinem a/nebo 6-furfurylamino-9-β-D-glukopyranosylpurin s 6-(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9-β-D-glukopyranosylpurinem.

6. Farmaceutický přípravek pro použití při hojení ran, který obsahuje alespoň jeden heterocyklický purinový derivát cytokininů obecného vzorce I a II nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniakem nebo aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních izomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, definované v nároku 1 nebo 2, a dále alespoň jeden farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředidlo.

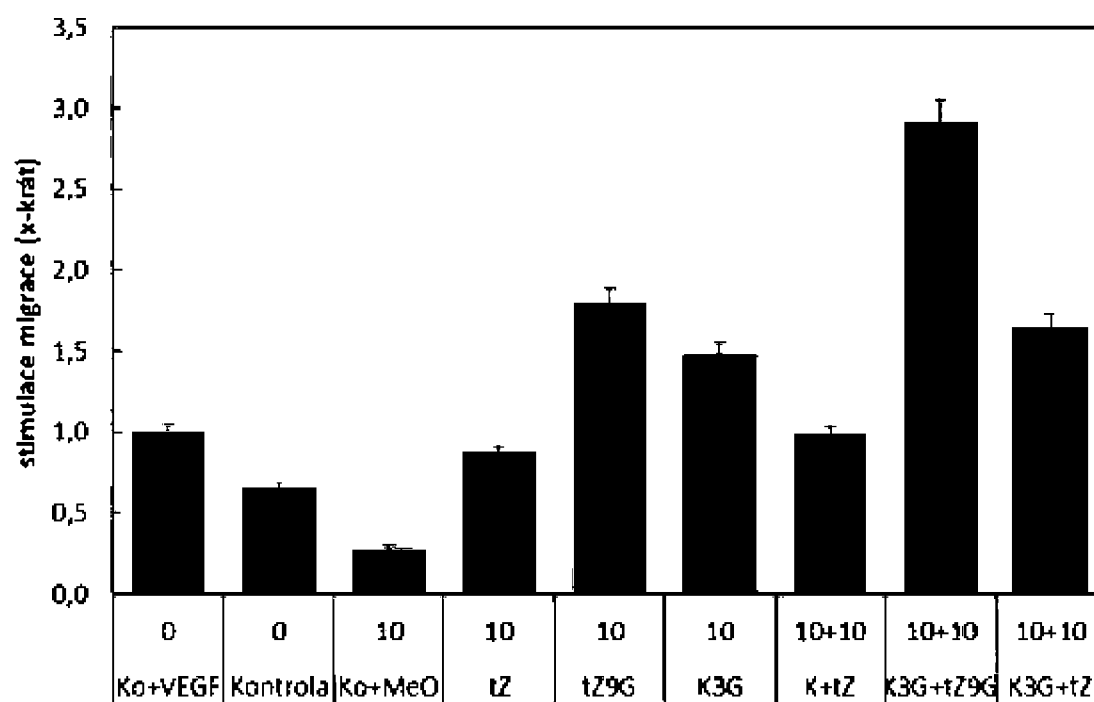
4 výkresy

Migrace BJ 24 h

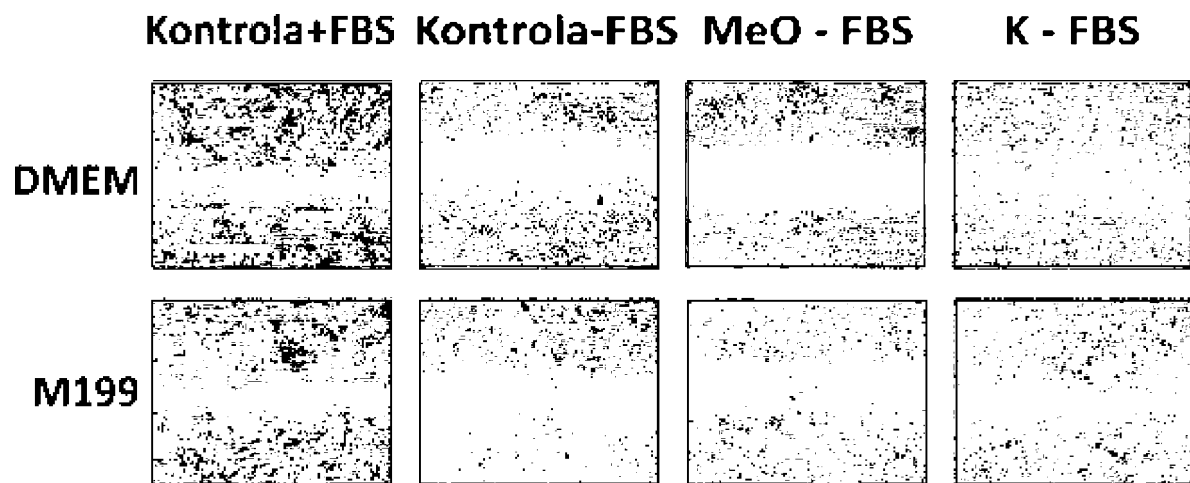


Obr. 1

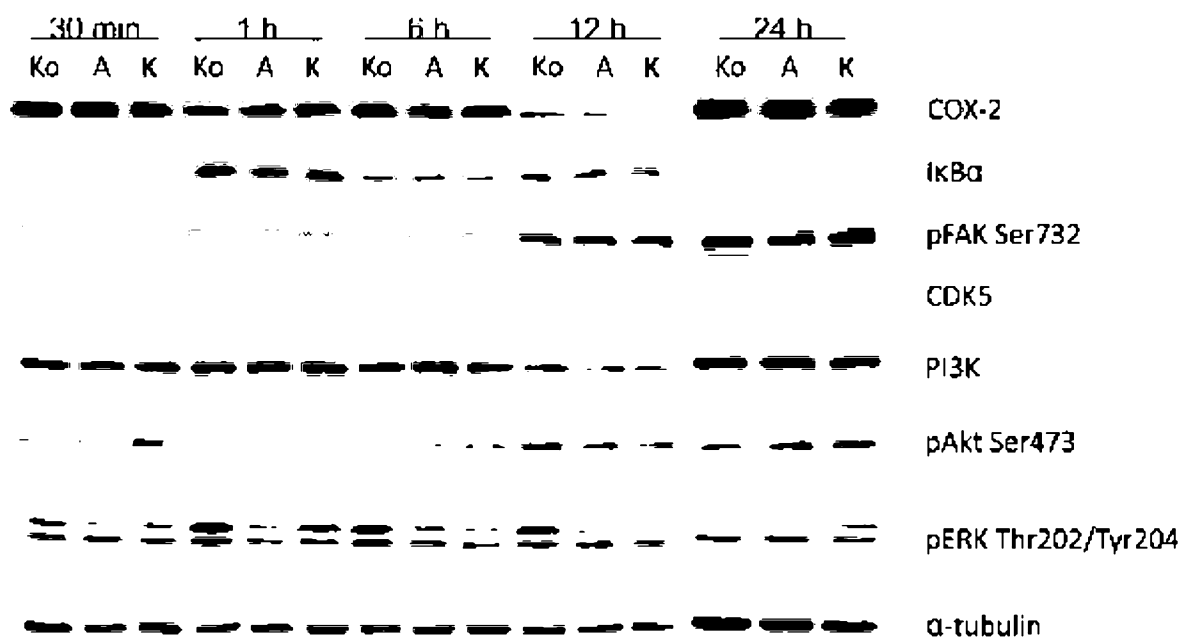
Migrace BJ 24 h



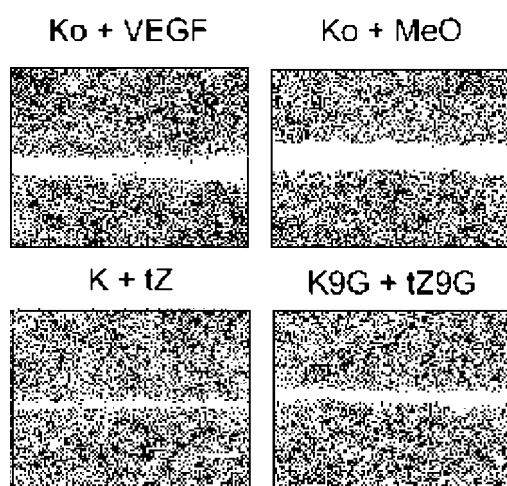
Obr. 2



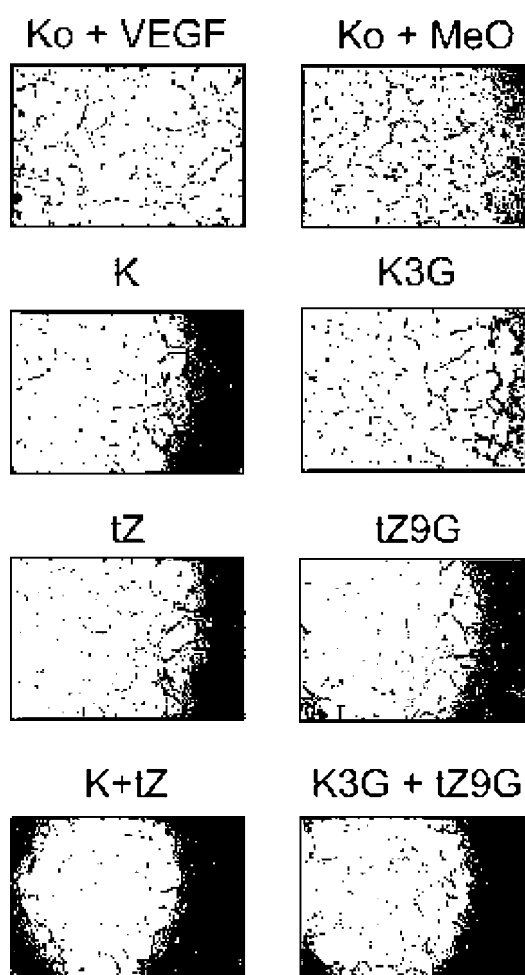
Obr. 3



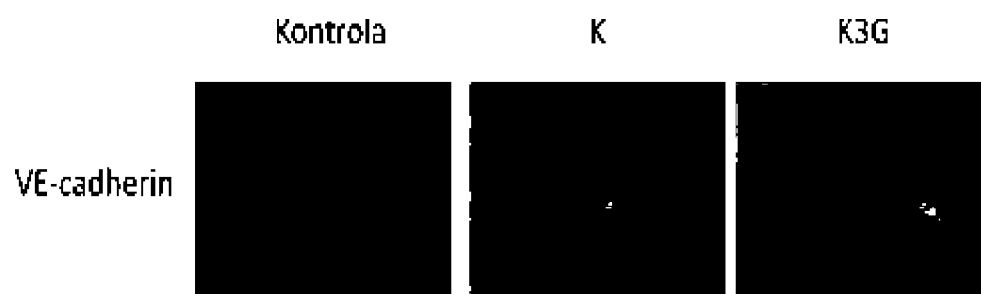
Obr. 4



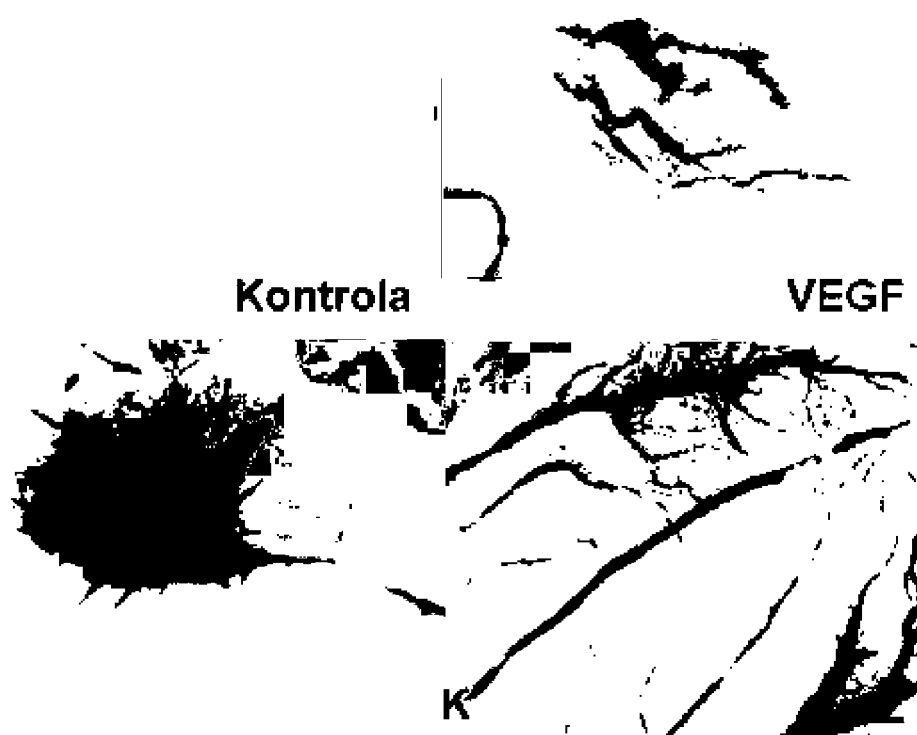
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8