

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2007-710**
(22) Přihlášeno: **11.10.2007**
(40) Zveřejněno: **14.01.2009**
(Věstník č. 1/2009)
(47) Uděleno: **27.11.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.01.2009**
(Věstník č. 2/2009)

(11) Číslo dokumentu:

299 996

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

B82B 1/00	(2006.01)
B82B 3/00	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)
C07D 487/22	(2006.01)
C07H 19/06	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
EP 1532274; WO 03073444.

(73) Majitel patentu:

Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, Praha 6,
CZ

(72) Původce:

Řezanka Pavel Mgr. Ing., Praha 4, CZ
Záruba Kamil Ing. Ph.D., Praha 3, CZ
Král Vladimír Prof. RNDr. DSc., Praha 2, CZ

(74) Zástupce:

Ing. Květoslava Kubičková, Doubravčická 2201, Praha
10, 10000

(54) Název vynálezu:

**Modifikované nanočástice a jejich terapeutické,
diagnostické a analytické použití**

(57) Anotace:

Nanočástice modifikované receptory, které zahrnují deriváty porfyrinů, safyrynů a polymethiniových solí, které mohou být použity pro léčbu rakoviny metodou fotodynamické terapie, pro diagnostické využití, konkrétně pro detekci buněk s nádorem, a pro sledování biologicky významných analytů (například nukleotidy, oligonukleotidy a sacharidy) v roztocích.

CZ 299996 B6

Modifikované nanočástice a jejich terapeutické, diagnostické a analytické použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká modifikovaných nanočástic, které mohou být použity pro léčbu rakoviny metodou fotodynamické terapie, pro diagnostické využití, konkrétně pro detekci buněk s nádorem, a pro sledování biologicky významných analytů (například nukleotidy, oligonukleotidy a sacharidy) v roztocích.

Dosavadní stav techniky

Již při přípravě vlastních nanočástic je třeba uvážit jejich další aplikaci. Nanočástice mohou být připraveny různými metodami a lze tak dosáhnout požadovaných velikostí a tvarů a tím i požadovaných chemických a fyzikálních vlastností. Mezi nejrozšířenější typy patří nanočástice kovů (např. zlata, stříbra), nanočástice oxidů (křemičitého, titaničitého), sulfidů (kademnatého), selenidů (kademnatého) a polymerní nanočástice (kopolymery, dendrimery).

Chemická metoda přípravy nanočástic kovů je založena na nukleaci a růstu atomů kovů. Tento proces je nejčastěji vyvolán chemickou redukcí solí kovů. Ke kontrole růstu nanočástic a k jejich ochraně před agregací je používáno velké množství stabilizátorů, například donorové ligandy (např. thiohy) nebo polymery. První reprodukovatelný standardní návod pro přípravu koloidů kovů publikoval Turkevich (Turkevitch J., Stevenson P. C., Hillier J.: *Discuss. Faraday Soc.* 1951, 11, 55), který také navrhl mechanismus pro tvorbu nanočástic založený na nukleaci, růstu a agregaci, jenž je stále platný.

Redukce solí přechodných kovů v roztoku je nejvíce rozšířená metoda pro přípravu koloidních suspenzí kovů a je velmi jednoduchá na provedení. Umožňuje, aby byly v gramových množstvích připraveny koloidní nanočástice požadované velikosti s malou odchylkou. Za tímto účelem je používán široký rozsah redukčních činidel (Yonezawa T., Onoue S., Kimizuka N.: *Langmuir* 2000, 16, 5218), například hydridy (NaBH_4) a soli (citrát sodný).

Kromě přípravy nanočástic kovů lze získat i nanočástice jejich oxidů, sulfidů a selenidů, jejichž využití ale není tak široké, jako v případě samotných kovů. Syntéza je většinou prováděna ve vodných roztocích, ve kterých se jako redukční činidlo používá hydrazin, hydroxylamin a nebo hydroxid sodný.

Polymerní nanočástice se většinou získávají řízenou polymerací ve vodě působením peroxidu vodíku, tepla a nebo působením ultrazvuku. Lze tak například připravit kopolymery: alginát sodný–chitosan a anthracen–polyakrylamid.

Jak bylo uvedeno dříve, velikost částic a jejich distribuce zásadně ovlivňuje vlastnosti daných nanočástic. K metodám umožňujícím přístup k těmto informacím patří především metody elektronové mikroskopie (Brust M., Fink J., Bethell D., Schiffrin D. J., Kiely C.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, 1655) a metody studia povrchů – skenovací elektronová mikroskopie (SEM), mikroskopie atomárních sil (AFM), rentgenová fluorescenční spektroskopie (XFS), popřípadě spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS). Vedle těchto poměrně sofistikovaných metod lze v řadě případů získat dostačující informaci i například metodou absorpční spektrometrie (UV–Vis spektrometrie) nebo elektrochemickými metodami.

Vzniklé nanočástice lze pro analytické účely použít přímo (nanočástice polymerů), ale většinou se provádí modifikace jejich povrchu (nanočástice kovů). Například u nanočástic zlata, které jsou velmi často používané, se modifikace provádí navázáním thiolem modifikovaných molekul, což vede k tvorbě kovalentních vazeb těchto molekul na nanočástice (obrázek 1).

Fotodynamická terapie (PDT) je jedna ze známých metod používaných pro léčbu rakoviny. Molekuly mající výše popsanou schopnost se nazývají fotosenzitizéry. Typické jsou pro ně konjugované dvojné vazby. Mezi takové struktury lze zařadit také porfyrinové deriváty. Ty jsou

5 předmětem studií týkajících se využití ve fotodynamické terapii. Berg, K.; Selbo, P. K.; Weyergang, A.; Dietze, A.; Prasmickaite, L.; Bonsted, A.; Engesaeter, B. O.; Angell-Petersen, E.; Warloe, T.; Frandsen, N.; Hogset, A. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic Journal of Microscopy (Oxford, United Kingdom) (2005), 218(2), 133–147; Spangler, Charles W.; Starkey, Jean R.; Meng, Fanqing; Gong, Aijun; Drobizhev, Mikhail; Rebane, Aleksander; Moss, B. Targeted two-photon photodynamic therapy for the treatment of sub-

10 cutaneous tumors Proceedings of SPIE–The International Society for Optical Engineering (2005), 5689(Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XIV), 141–148; König, Karsten. Photoproduct formation during porphyrin photodynamic therapy Photomedicine in Gynecology and Reproduction (2000), 86–95; Gorman, Stephen A.; Brown, Stanley B.; Griffiths, John. An overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology (2006), 25(1–2), 79–108; Pandey, Ravindra K.; Zheng, Gang. Porphyrins as photosensitizers in photodynamic therapy. Porphyrin Handbook (2000), 6 157–230. Publisher: Academic Press, San Diego.

20 Pro fotosenzitizéry jsou typické konjugované dvojné vazby, jejichž přítomnost však snižuje rozpustnost ve vodném prostředí. Jako jedním z řešení tohoto problému se jeví imobilizace těchto molekul na povrch nanočástic, neboť ty lze dispergovat ve vodném prostředí a tím je i usnadněno jejich podávání. Takto modifikované nanočástice lze bez obav použít pro PDT, neboť bylo

25 zjištěno, že tento typ nanočástic není cytotoxický (Connor, Ellen E., Mwamuka Judith, Gole, Anand, Murphy Catherine J., Wyatt Michael D., Small, I., 325 (2005)).

Spektrometrické metody patří mezi hlavní metody studia vlastností modifikovaných nanočástic, a proto i analytická stanovení těmito metodami patří mezi nejčastější. Vlastnosti nanočástic, jako

30 jsou jejich průměr, tvar, koncentrace a možnost interagovat s malými molekulami a biomolekulami mají velký vliv na jejich optické vlastnosti.

Z pohledu přiměřené náročnosti přístrojového vybavení jsou využívány vedle již zmíněných metod absorpční spektrometrie (UV–Vis a IR) a spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS), také metody založené na rezonančním rozptylu světla (RLS) a luminiscenční

35 metody. Volba metody závisí především na vlastnostech použitých nanočástic a typu látky použité pro jejich modifikaci. Typický experiment je založen na tvorbě směsi analytu a koloidu vytvořeného předem nebo *in situ*.

40 Další zajímavou oblastí uplatnění modifikovaných nanočástic je diagnostické použití pro rozpoznávání povrchu buněk. Na povrchu buňky se totiž odehrávají klíčové biologické procesy, a proto změna jejich povrchu může vést k podstatným změnám v jejich chování, například k vývoji nádoru a nebo autoimunitní odezvy. Studium látek vyskytujících se na povrchu buněk je proto nezbytné k porozumění chování buněk. Moderní analytická chemie tyto možnosti poskytuje

45 a umožňuje tak selektivně rozpoznat jednotlivé látky na povrchu buněk, což je možné posléze použít v chemii, biologii, lékařství a průmyslu. Hlavním analytickým nástrojem je sledování fluorescence komplexu vytvořeného na povrchu buňky s fluorescenční látkou. Návrh struktury této fluorescenční látky, která se váže selektivně na určitou biomolekulu a která může být potenciální optický senzor, je jedním z mnoha zajímavých úkolů moderní bioanalytické chemie.

50 Látky na povrchu buněk jsou zodpovědné za mezibuněčnou komunikaci, imunitní odezvu, patogenní infekci způsobenou bakterií a nebo virem, růst a metastázi nádoru. Vazby biologických systémů jsou velmi silné a selektivní díky několikavazebné interakci mezi hostem a receptorem. To klade velké nároky na strukturu výše zmíněných fluorescenčních látek. Jednou z možností je

55 využít různých způsobů interakce, například iontové, π – π , hydrofobní a vodíkových vazeb.

Rozpoznávání povrchu buněk je také důležité pro detekci nádoru, neboť povrch zdravé a nemocné buňky je jiný. Je proto snahou vyvinout účinný fluorescenční receptor, který by byl schopen tyto buňky rozpoznat, což by velmi usnadnilo léčbu.

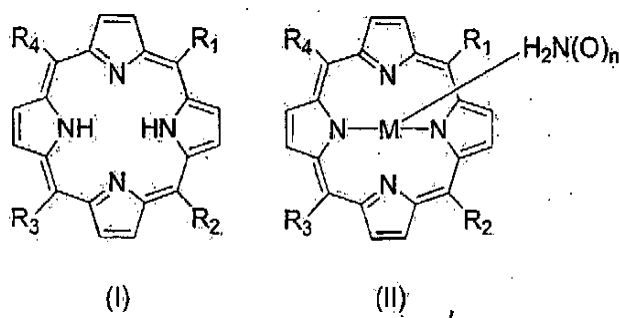
5

Podstata vynálezu

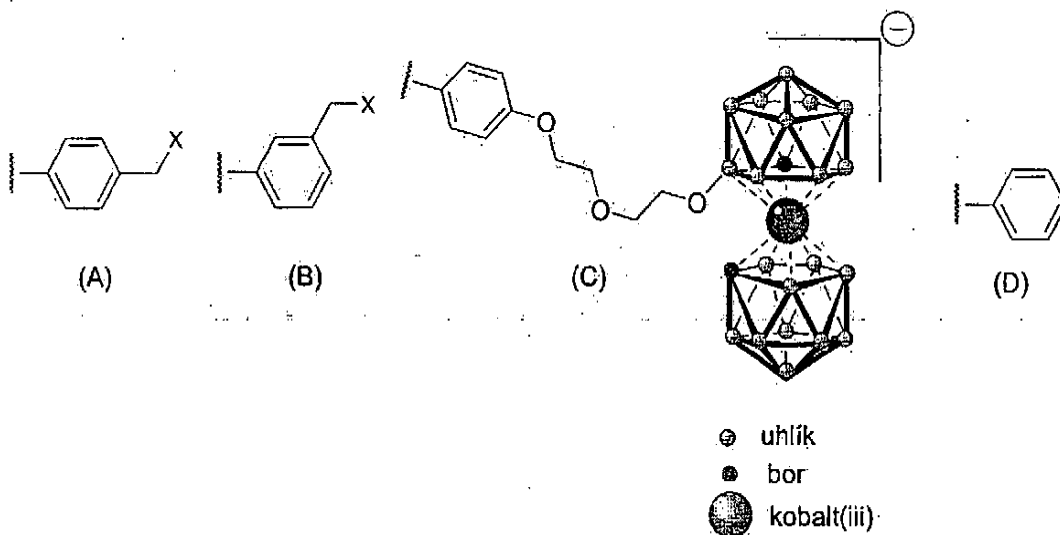
Předmětem vynálezu jsou nové typy modifikovaných nanočástic, kde látky použité k modifikaci jsou vybrány ze skupiny receptem, které zahrnují deriváty porfyrinů, safyrinů a polymethiniových solí, charakterizované obecnými vzorci I, II, III, IV a nebo V.

10

Jedná se o látky obecného vzorce I a II,



15 kde R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle na sobě fenylové skupiny obecného vzorce A, B, C a nebo D a M je Zn^{2+} , Co^{3+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} a nebo Ni^{2+} . $(O)_n$ je oligonukleotid, kde n je přirozené číslo od 5 do 30.

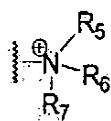


20

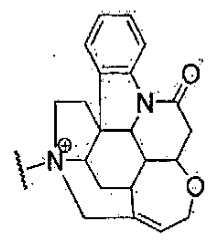
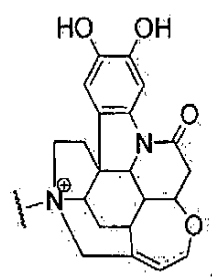
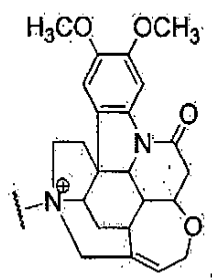
kde X je skupina z tabulky 1, přičemž ve výsledné látce mohou být kombinace kterýchkoliv skupin X.

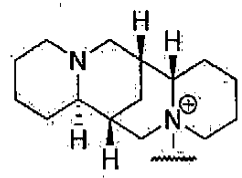
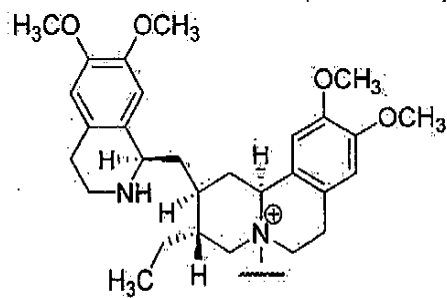
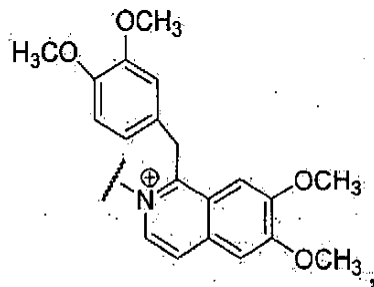
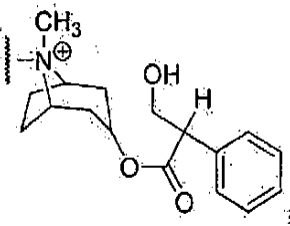
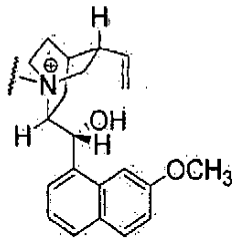
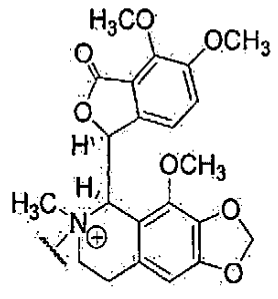
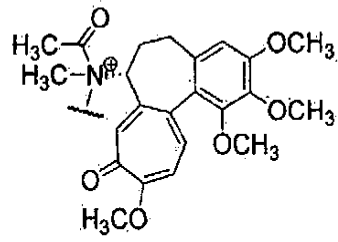
Tabulka I. Funkční skupiny X.

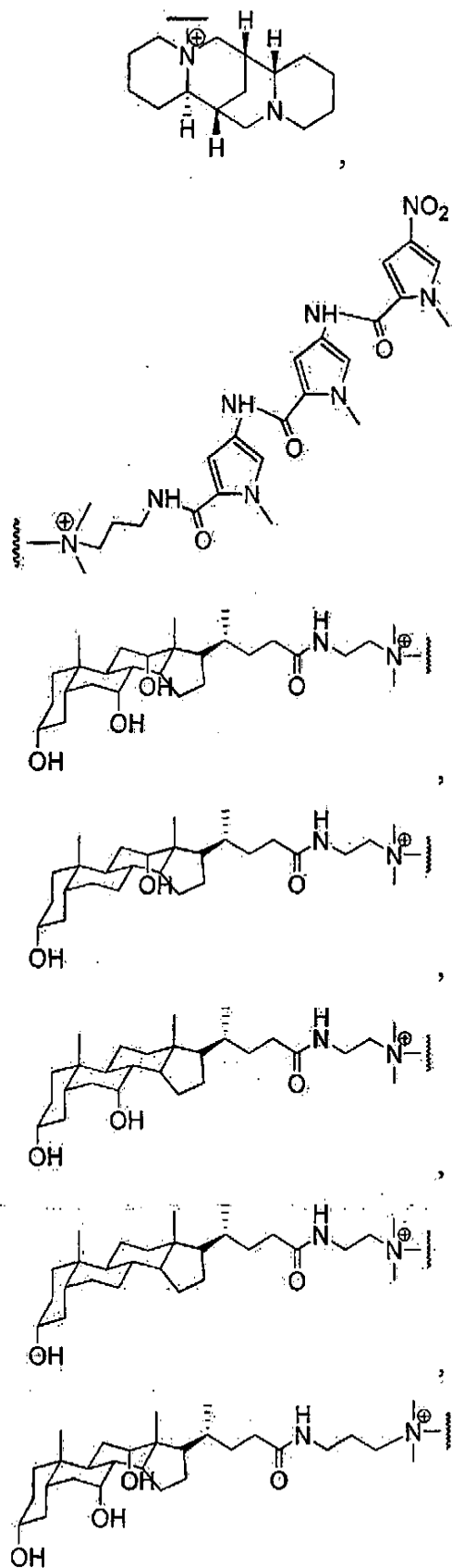
Funkční skupina X

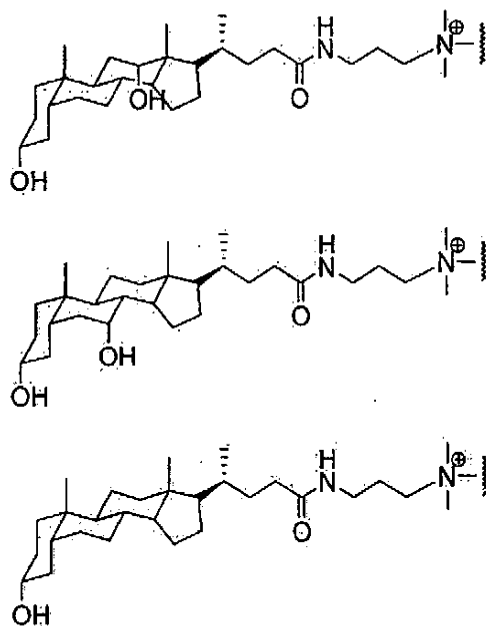


- 5 kde R_5 , R_6 a R_7 jsou nezávisle na sobě lineární, rozvětvené a nebo cyklické alkyly obsahující od jednoho do 16 atomů uhlíku,

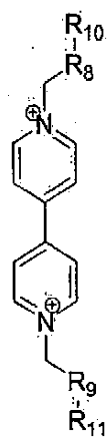






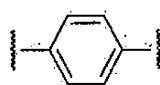


Další látkou ze skupiny receptorů je látka obecného vzorce III,

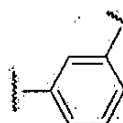


(III),

kde R_8 a R_9 jsou nezávisle na sobě skupiny obecného vzorce E nebo F



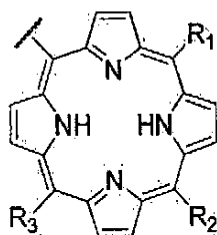
(E)



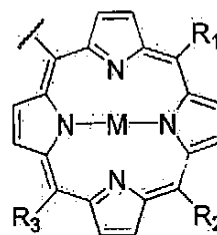
(F)

5

a R_{10} a R_{11} jsou nezávisle na sobě skupiny obecného vzorce G nebo K,



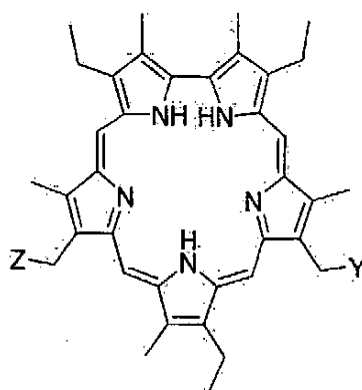
(G)



(K)

kde R_1 , R_2 , R_3 a M jsou definovány výše u látek obecných vzorců I a II.

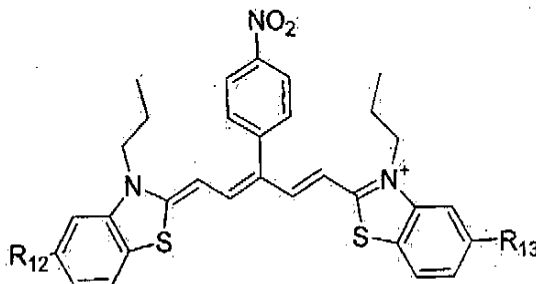
Další látkou patřící do skupiny receptorů je látka obecného vzorce IV,



(IV),

kde Z a Y jsou nezávisle na sobě buď H a nebo COOH.

Další látkou patřící do skupiny receptorů je látka obecného vzorce V,



(V),

kde R_{12} a R_{13} jsou nezávisle na sobě H, OH a nebo $O(CH_2CH_2O)_3CH_3$.

- 10 Látky charakterizované obecnými vzorci I až V jsou k modifikaci nanočástic použity ve formě solí, vhodné jsou F^- , Cl^- , Br^- , I^- , PF_6^- , $H_2PO_4^-$, ClO_4^- , NO_3^- a SO_4^{2-} , vhodnější Br^- a I^- .

15 Nanočástice mohou být tvořeny zlatem, stříbrem, mědí, zinkem, niklem a kobaltem. Nanočástice tvořené výše uvedenými kovy mají průměr od 2 do 1000 nm, vhodněji od 5 do 200 nm a nejvhodněji od 10 do 20 nm.

20 Kovové nanočástice jsou připravovány redukcí $NaBH_4$, vhodněji citrátem sodným. Modifikace kovových nanočástic může být provedena imobilizací látek I až V přímo na nanočástice, vhodněji přes 3-merkaptopropanovou kyselinu a nejvhodněji přes lipoovou kyselinu. Modifikace je prováděna imobilizací zvedného roztoku a nebo z roztoku ho obsahujícího vodu a methanol v poměru od 99:1 do 50:50, vhodněji od 97:3 do 80:20 a nejvhodněji od 95:5 do 90:10.

25 Příklady syntéz porfirinových derivátů jsou popsány v literatuře (V. Král, S. Pataridis, V. Setnička, K. Záruba, M. Urbanová, and K. Volka, „New chiral porphyrin-brucine gelator characterized by methods of circular dichroism“, Tetrahedron, vol. 61, pp. 5499–5506, 2005, E. Kolehmainen, J. Koivukorpi, E. Sievänen, V. Král, „Novel Porphyrin-Cholic Acid Conjugates as Receptors for Biologically Important Anions“ Supramol. Chem., vol. 17, pp. 437–441, 2005, J. Koivukorpi, E. Sievänen, E. Kolehmainen, V. Král, „Synthesis, Characterization, and Saccharide Binding Studies of Bile Acid – Porphyrin Conjugates“ Molecules, vol 12, pp. 13–24, 2007), ostatní deriváty byly připraveny analogickými postupy.

Zjištění velikosti kovových nanočástic se provádí transmisním elektronovým mikroskopem. Modifikace nanočástic se sleduje pomocí spektrometrie ve viditelné oblasti, Ramanovy spektrometrie, termogravimetrické analýzy, zjištění hydrodynamického průměru nanočástice a vibračního cirkulárního dichroismu.

Dále se tento vynález týká použití modifikovaných nanočástic. Ty mohou být použity pro přípravu prostředku pro fotodynamickou terapii rakovinných nádorů. Tento prostředek obsahuje modifikované kovové nanočástice dispergované ve vhodném rozpouštědle, nejlépe vodě. Prostředek zkoušen a podáván myším majícím nádor.

Předkládaný vynález se dále týká použití modifikovaných nanočástic pro analytické využití. Modifikované nanočástice mohou být využity ke sledování analytů (nukleotidy, oligonukleotidy a nebo sacharidy a jejich deriváty) ve vodě, methanolu a nebo v roztocích obsahujících vodu a methanol v poměru od 99:1 do 1:99. Výše zmíněné roztoky mohou obsahovat pufr, jako je fosfátový, citrátový, acetátový, HEPES a TRIS o koncentraci od $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, vhodněji od $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Sledování analytů je možné provádět spektroskopii v ultrafialové a viditelné oblasti, elektronovým cirkulárním dichrosimem a nebo fluorescencí.

Dále se tento vynález týká použití modifikovaných nanočástic pro diagnostické využití, konkrétně pro studium interakce nanočástic modifikovanými látkami obecného vzorce I až V s povrchem buněk. Bylo zjištěno, že zmíněné modifikované nanočástice jsou schopny rozpoznat normální buňky od buněk s nádorem, což velmi usnadní léčbu.

Příklady provedení vynálezu

Vlastnosti nově připravených látek a způsob přípravy jsou doloženy následujícími příklady, aniž by jimi byly jakkoliv omezeny.

Příklady příprav látek obecných vzorců I až V je možné nalézt v literatuře (V. Král, S. Pataridis, V. Setnička, K. Záruba, M. Urbanová, and K. Volka, „New chiral porphyrin–brucine gelator characterized by methods of circular dichroism“, *Tetrahedron*, vol. 61, pp. 5499–5506, 2005, E. Kolehmainen, J. Koivukorpi, E. Sievänen, V. Král, „Novel Porphyrin–Cholic Acid Conjugates as Receptors for Biologically Important Anions“ *Supramol. Chem.*, vol. 17, pp. 437–441, 2005, J. Koivukorpi, E. Sievänen, E. Kolehmainen, V. Král, „Synthesis, Characterization, and Saccharide Binding Studies of Bile Acid – Porphyrin Conjugates“ *Molecules*, vol 12, pp. 13–24, 2007).

Příklad 1

Příprava nanočástic zlata.

Do dvojhrdlé 250ml baňky bylo dáno 100 ml H_2O (čistota pro HPLC) a voda byla přivedena za míchání k varu. Pak byl do baňky přidán 1 ml 1% (hmotnostní) vodného roztoku $\text{K}[\text{AuCl}_4]$ ($0,0267 \text{ mmol}$) a 2,5 ml 1% (hmotnostní) vodného roztoku $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,085 \text{ mmol}$). Reakční směs byla refluxována 10 minut. Chladný roztok byl zfiltrován přes $0,2 \mu\text{m}$ membránový filtr a roztok nanočástic byl charakterizován pomocí transmisního elektronového mikroskopu (obrázek 2 a 3), Ramanova spektrometre (obrázek 4) a UV–Vis spektroskopu (obrázek 5) a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic (obrázek 6).

Příklad 2

Příprava nanočástic stříbra.

5 Do dvojhrdlé 250ml baňky bylo dáno 100 ml H₂O (čistota pro HPLC) a 18 mg AgNO₃ (0,107 mmol) a voda byla přivedena za míchání k varu. Pak byly do baňky přidány 2 ml 1% (hmotnostní) vodného roztoku Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (0,068 mmol). Reakční směs byla refluxována 10 minut. Chladný roztok byl zfiltrován přes 0,2μm membránový filtr a roztok nanočástic byl
 10 charakterizován pomocí transmisního elektronového mikroskopu, Ramanova spektrometru a UV-Vis spektroskopu a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

Příklad 3

15

Příprava nanočástic mědi.

Do dvojhrdlé 250ml baňky bylo dáno 100 ml H₂O (čistota pro HPLC) a 200 mg CuCl₂ (1,5 mmol) a voda byla přivedena za míchání k varu. Pak bylo do baňky přidáno 8,8 ml 10%
 20 (hmotnostní) vodného roztoku Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (3 mmol). Reakční směs byla refluxována 10 minut. Chladný roztok byl zfiltrován přes 0,2μm membránový filtr a roztok nanočástic byl charakterizován pomocí transmisního elektronového mikroskopu, Ramanova spektrometru a UV-Vis spektroskopu a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

25

Příklad 4

Příprava nanočástic zinku.

30

Do dvojhrdlé 250ml baňky bylo dáno 100 ml H₂O (čistota pro HPLC) a 100 mg ZnCl₂ (0,73 mmol) a voda byla přivedena za míchání k varu. Pak bylo do baňky přidáno 4,4 ml 10% (hmotnostní) vodného roztoku Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (1,5 mmol). Reakční směs byla refluxována 10 minut. Chladný roztok byl zfiltrován přes 0,2μm membránový filtr a roztok nanočástic byl
 35 charakterizován pomocí transmisního elektronového mikroskopu, Ramanova spektrometru a UV-Vis spektroskopu a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

40

Příklad 5

Příprava nanočástic niklu.

Do dvojhrdlé 250ml baňky bylo dáno 100 ml H₂O (čistota pro HPLC) a 100 mg NiCl₂ (0,77 mmol) a voda byla přivedena za míchání k varu. Pak bylo do baňky přidáno 4,4 ml 10% (hmotnostní) vodného roztoku Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (1,5 mmol). Reakční směs byla refluxována 10 minut. Chladný roztok byl zfiltrován přes 0,2μm membránový filtr a roztok nanočástic byl
 45 charakterizován pomocí transmisního elektronového mikroskopu, Ramanova spektrometru a UV-Vis spektroskopu a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.
 50

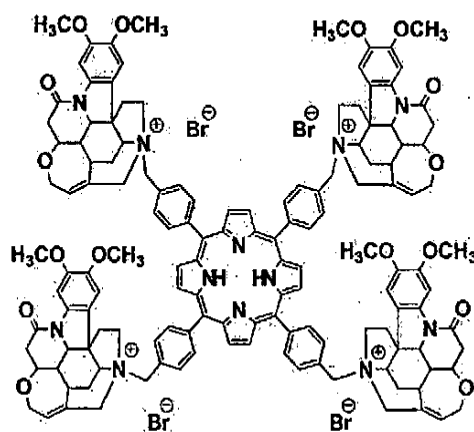
Příklad 6

Příprava nanočástic kobaltu.

- 5 Do dvojhrdlé 250ml baňky bylo dáno 100 ml H_2O (čistota pro HPLC) a 100 mg CoCl_2 (0,77 mmol) a voda byla přivedena za míchání k varu. Pak bylo do baňky přidáno 4,4 ml 10% (hmotnostní) vodného roztoku $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,5 mmol). Reakční směs byla refluxována 10 minut. Chladný roztok byl zfiltrován přes 0,2 μm membránový filtr a roztok nanočástic byl
- 10 charakterizován pomocí transmisního elektronového mikroskopu, Ramanova spektrometru a UV-Vis spektroskopu a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

Příklad 7

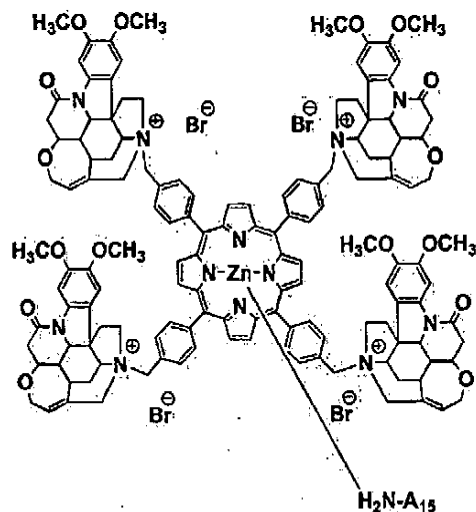
- 15 Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 1 látkou charakterizovanou obecným vzorcem I mající strukturní vzorec:



- 20 Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 1 byl dán roztok látky I připravený rozpuštěním 10 mg látky I v 1 ml MeOH a 1 ml H_2O . Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Potom byl roztok nanočástic centrifugován při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, supernatant byl odsát a nanočástice byly rozpuštěny ve vodě. Tento postup byl ještě 3x opakován. Roztok takto modifikovaných nanočástic byl charakterizován skenovacím elektronovým mikroskopem (Obrázek 7), Ramanovou spektrometrií (Obrázek 8), UV-Vis spektroskopii (Obrázek 9), vibračním cirkulárním dichroismem (ECD) (Obrázek 10), termogravimetrickou analýzou (Obrázek 11) a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných
- 25 nanočástic (Obrázek 12).

Příklad 8

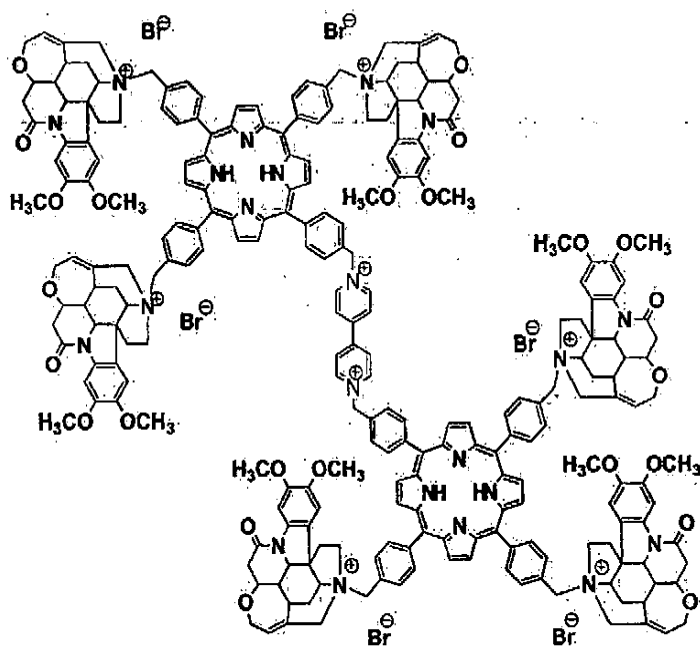
Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 1 látkou charakterizovanou obecným vzorcem II mající strukturní vzorec:



Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 1 byl dán roztok látky II připravený rozpuštěním 10 mg látky II v 1 ml MeOH a 1 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Potom byl roztok nanočástic centrifugován při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, supernatant byl odsát a nanočástice byly rozpuštěny ve vodě. Tento postup byl ještě 3x opakován. Roztok takto modifikovaných nanočástic byl charakterizován skenovacím elektronovým mikroskopem, Ramanovou spektrometrií, UV-Vis spektroskopií, vibračním cirkulárním dichroismem (ECD), termogravimetrickou analýzou a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

Příklad 9

Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 1 látkou charakterizovanou obecným vzorcem III mající strukturní vzorec:

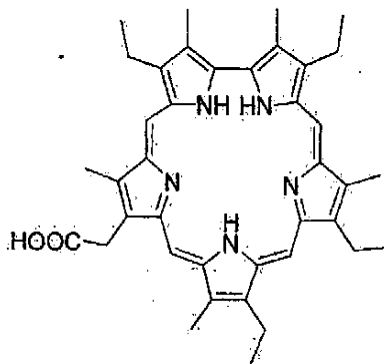


Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 1 byl dán roztok látky III připravený rozpuštěním 10 mg látky III v 1 ml MeOH a 1 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě

při laboratorní teplotě. Potom byl roztok nanočástic centrifugován při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, supernatant byl odsát a nanočástice byly rozpuštěny ve vodě. Tento postup byl ještě 3x opakován. Roztok takto modifikovaných nanočástic byl charakterizován skenovacím elektronovým mikroskopem, Ramanovou spektrometrií, UV-Vis spektroskopií, vibračním cirkulárním dichroismem (ECD), termogravimetrickou analýzou a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

Příklad 10

Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 1 látkou charakterizovanou obecným vzorcem IV mající strukturní vzorec:

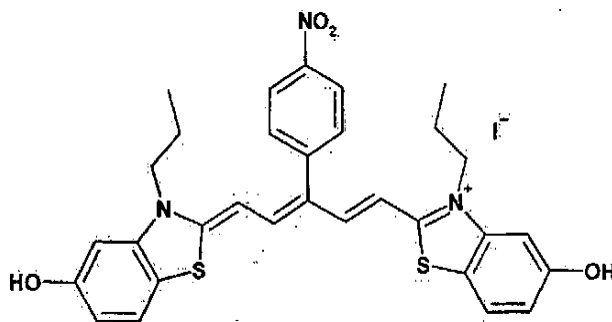


(IV)

Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 1 byl dán roztok látky IV připravený rozpuštěním 10 mg látky IV v 1 ml MeOH a 1 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Potom byl roztok nanočástic centrifugován při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, supernatant byl odsát a nanočástice byly rozpuštěny ve vodě. Tento postup byl ještě 3x opakován. Roztok takto modifikovaných nanočástic byl charakterizován skenovacím elektronovým mikroskopem, Ramanovou spektrometrií, UV-Vis spektroskopií, vibračním cirkulárním dichroismem (ECD), termogravimetrickou analýzou a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

Příklad 11

Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 1 látkou charakterizovanou obecným vzorcem V mající strukturní vzorec:



Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 1 byl dán roztok látky V připravený rozpuštěním 10 mg látky V v 1 ml MeOH a 1 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Potom byl roztok nanočástic centrifugován při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, supernatant byl odsát a nanočástice byly rozpuštěny ve vodě. Tento postup byl ještě 3x opakován. Roztok takto modifikovaných nanočástic byl charakterizován skenovacím

elektronovým mikroskopem, Ramanovou spektrometrií, UV-Vis spektroskopií, vibračním cirkulárním dichroismem (ECD), termogravimetrickou analýzou a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

Příklad 12

Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 1 3-merkaptopropanovou kyselinou.

Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 1 byl dán roztok 3-merkaptopropanové kyseliny připravený smícháním 6,3 μ l 3-merkaptopropanové kyseliny v 0,5 ml MeOH a 0,5 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Roztok nanočástic byl charakterizován pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (Obrázek 13), Ramanova spektrometru (Obrázek 14) a UV-Vis spektroskopu (Obrázek 15) a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic (Obrázek 16).

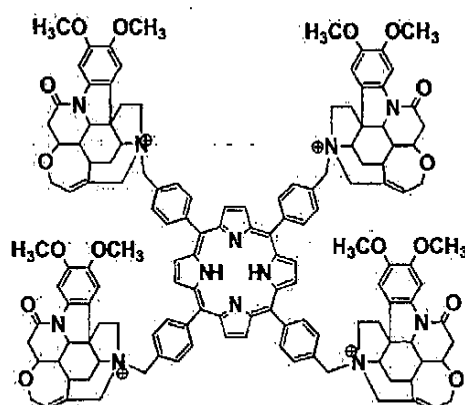
Příklad 13

Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 1 lipovou kyselinou.

Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 1 byl dán roztok lipové kyseliny připravený smícháním 3,75 mg lipové kyseliny v 0,25 ml MeOH a 0,25 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Roztok nanočástic byl charakterizován pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, Ramanova spektrometru a UV-Vis spektroskopu a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

Příklad 14

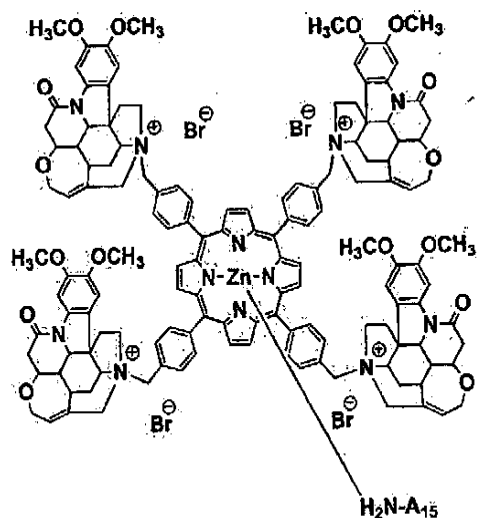
Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 12 látkou charakterizovanou obecným vzorcem I mající strukturní vzorec:



Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 12 byl dán roztok látky I připravený rozpouštěním 10 mg látky I v 1 ml MeOH a 1 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Potom byl roztok nanočástic centrifugován při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, supernatant byl odsát a nanočástice byly rozpouštěny ve vodě. Tento postup byl ještě 3x opakován. Roztok takto modifikovaných nanočástic byl charakterizován skenovacím elektronovým mikroskopem (Obrázek 17), Ramanovou spektrometrií (Obrázek 18), UV-Vis spektroskopií (Obrázek 19), vibračním cirkulárním dichroismem (ECD) (Obrázek 20), termogravimetrickou analýzou (Obrázek 21) a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic (Obrázek 22).

Příklad 15

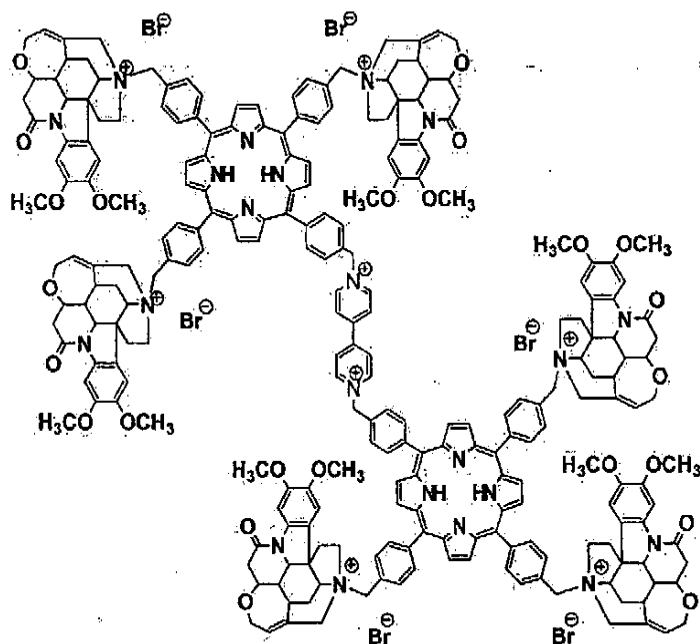
Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 12 látkou charakterizovanou
5 obecným vzorcem II mající strukturní vzorec:



Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 12 byl dán roztok látky II připravený roz-
puštěním 10 mg látky II v 1 ml MeOH a 1 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě
10 při laboratorní teplotě. Potom byl roztok nanočástic centrifugován při 12 000 otáčkách za minutu
po dobu 10 minut, supernatant byl odsát a nanočástice byly rozpuštěny ve vodě. Tento postup byl
ještě 3x opakován. Roztok takto modifikovaných nanočástic byl charakterizován skenovacím
elektronovým mikroskopem, Ramanovou spektrometrií, UV-Vis spektroskopií, vibračním cirkulárním
dichroismem (ECD), termogravimetrickou analýzou a byl změřen hydrodynamický průměr
15 těchto modifikovaných nanočástic.

Příklad 16

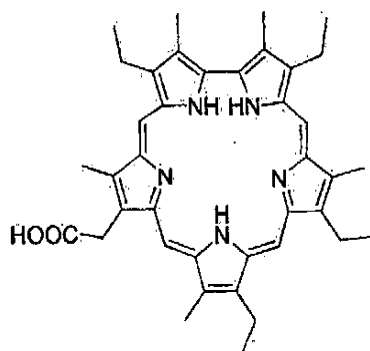
Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 12 látkou charakterizovanou
20 obecným vzorcem III mající strukturní vzorec:



Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 12 byl dán roztok látky III připravený rozpouštěním 10 mg látky III v 1 ml MeOH a 1 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Potom byl roztok nanočástic centrifugován při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, supernatant byl odsát a nanočástice byly rozpuštěny ve vodě. Tento postup byl ještě 3x opakován. Roztok takto modifikovaných nanočástic byl charakterizován skenovacím elektronovým mikroskopem, Ramanovou spektrometrií, UV-Vis spektroskopií, vibračním cirkulárním dichroismem (ECD), termogravimetrickou analýzou a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

Příklad 17

Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 12 látkou charakterizovanou obecným vzorcem IV mající strukturní vzorec:

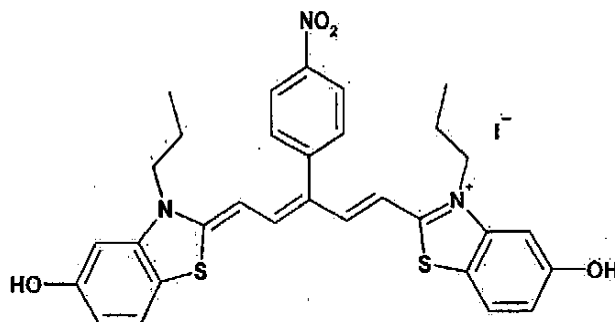


(IV)

Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 12 byl dán roztok látky IV připravený rozpouštěním 10 mg látky IV v 1 ml MeOH a 1 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Potom byl roztok nanočástic centrifugován při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, supernatant byl odsát a nanočástice byly rozpuštěny ve vodě. Tento postup byl ještě 3x opakován. Roztok takto modifikovaných nanočástic byl charakterizován skenovacím elektronovým mikroskopem, Ramanovou spektrometrií, UV-Vis spektroskopií, vibračním cirkulárním dichroismem (ECD), termogravimetrickou analýzou a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

Příklad 18

Příprava modifikovaných nanočástic zlata připravených v příkladu 12 látkou charakterizovanou obecným vzorcem V mající strukturní vzorec:



Do roztoku nanočástic připravených podle příkladu 12 byl dán roztok látky V připravený rozpouštěním 10 mg látky V v 1 ml MeOH a 1 ml H₂O. Výsledný roztok byl nechán stát 3 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Potom byl roztok nanočástic centrifugován při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, supernatant byl odsát a nanočástice byly rozpuštěny ve vodě.

Tento postup byl ještě 3x opakován. Roztok takto modifikovaných nanočástic byl charakterizován skenovacím elektronovým mikroskopem, Ramanovou spektrometrií, UV-Vis spektroskopií, vibračním cirkulárním dichroismem (ECD), termogravimetrickou analýzou a byl změřen hydrodynamický průměr těchto modifikovaných nanočástic.

Aplikace připravených látek

Nové sloučeniny podle vynálezu lze využít pro fotodynamickou terapii, diagnostické použití a analytické aplikace.

Analytické aplikace

Pro využití modifikovaných nanočástic pro diagnostické použití a fotodynamickou terapii je potřeba nejprve zjistit jejich chování v roztocích, konkrétně sledovat interakce mezi modifikovanými nanočásticemi a různými analyty, v tomto případě například nukleotidy, oligonukleotidy a sacharidy.

Obecná metodika:

Interakce modifikovaných nanočástic s různými analyty byla sledována UV-Vis a fluorescenčními spektroskopickými titracemi. Titrace byly prováděny většinou ve vodném prostředí při daném pH, aby byly výsledky použitelné pro další stupeň aplikace (diagnostické použití). Při samotném experimentu byly do kyvety odpipetovány 2 ml roztoku modifikovaných nanočástic a k němu byl postupně přidáván roztok analytů, který vznikl jeho rozpuštěním ve stejném zásobním roztoku. Při každé titraci bylo provedeno devět přidávek (0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 10 a 20 ekvivalentů).

Zjišťování stechiometrie vznikajícího komplexu při UV-Vis spektroskopické titraci bylo prováděno Jobovou metodou podle postupu uvedeného v literatuře (Hirose K.: *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2001, 39, 193). Nakonec byly z titračních křivek spočteny konstanty stability (Hirose K.: *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2001, 39, 193).

Diagnostické použití

Použití modifikovaných nanočástic pro diagnostiku nádoru v buňkách umožňuje jeho včasné odhalení a tím i větší šanci na jeho zneškodnění, například fotodynamickou terapií.

Obecná metodika:

Buňky s nádorem (PRRSBL, CEF/RSV a SW480) a normální buňky (NIH3T3, CEF a FHC) byly inkubovány s modifikovanými nanočásticemi. Po inkubaci byla naměřena fluorescence pouze u buněk s nádorem, což vypovídá o selektivitě modifikovaných nanočástic a možnosti diagnostikovat buňky s nádory.

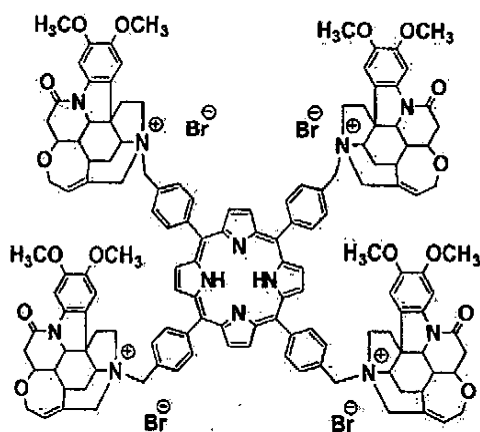
Fotodynamická terapie

Schopnost selektivní akumulace v nádorových buňkách a účinnost látek při fotodynamické terapii (PDT) byla testována na lidském melanomu C-32, který byl implantován do myši.

Obecná metodika:

Lidský melanom C-32 byl implantován do myši a nechán vyrůst na objem přibližně 0,2 cm³. Pak byl podán vodný roztok nanočástic zlata připravený podle příkladu 14 a po 6 hodinách bylo pro-

vedeno osvětlení. Pro kontrolu byl podán roztok nemodifikovaných nanočástic (připraveny podle příkladu I), roztok čisté látky charakterizované obecným vzorcem I mající strukturní vzorec:



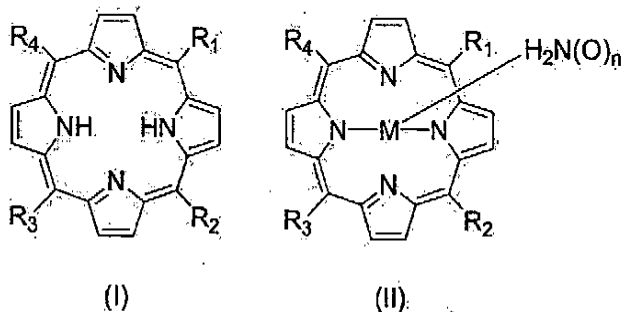
Při posledním experimentu nebyl podán myším žádný roztok. Objem nádoru byl měřen 2x týdně až do 28. dne. Z výsledků (Obrázek 23) plyne, že pokud nebyl podán myším žádný roztok, objem nádoru se stále zvětšuje. Pokud byl myším podán roztok nemodifikovaných nanočástic, zabránilo se růstu nádoru. V případě roztoku čisté látky se objem nádoru několik dní zmenšil pod měřitelnou hodnotu, pak ovšem nastal jeho růst. Pouze v případě, že byl myším podán roztok modifikovaných nanočástic, došlo k úplnému vymizení nádoru.

Průmyslová využitelnost

Vynález je využitelný v analytické chemii, ve farmaceutickém průmyslu a v lékařství.

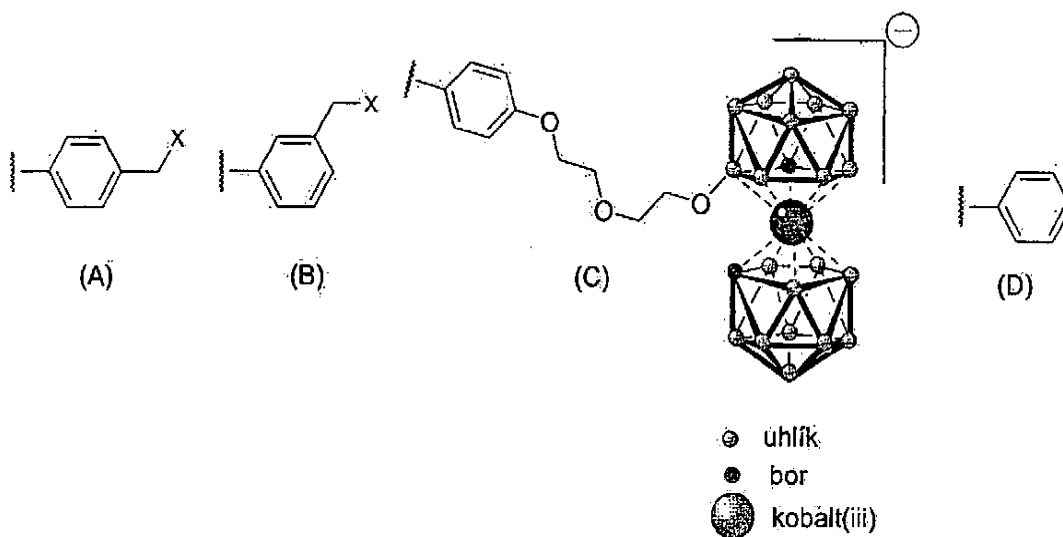
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Nanočástice kovů vybraných ze skupiny tvořené zlatem, stříbrem, mědí, zinkem, niklem a nebo kobaltem o průměru od 2 do 1000 nm modifikované receptory, které zahrnují deriváty porfyrinů, safyrinů a polymethiniových solí, vybranými ze skupiny obsahující látky obecného vzorce I nebo II,



kde M je Zn^{2+} , Co^{3+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} a nebo Ni^{2+} , $(\text{O})_n$ je oligonukleotid, kde n je přirozené číslo od 5 do 30,

a kde R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle na sobě fenylové skupiny obecného vzorce A, B, C a nebo D a

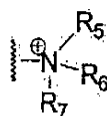


kde X je skupina z tabulky 1, přičemž ve výsledné látce mohou být kombinace kterýchkoliv skupin X .

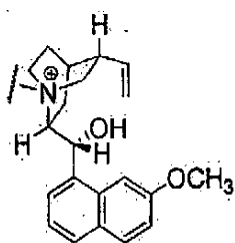
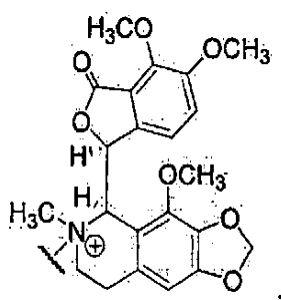
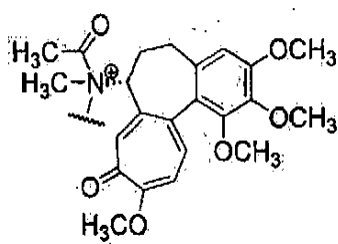
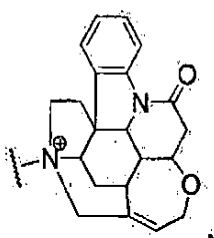
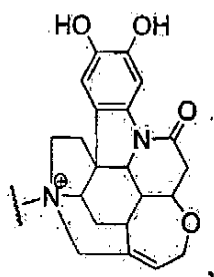
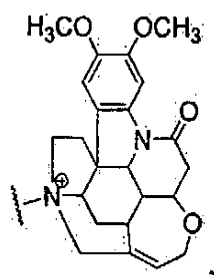
5

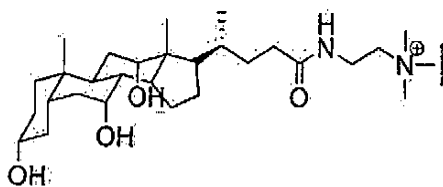
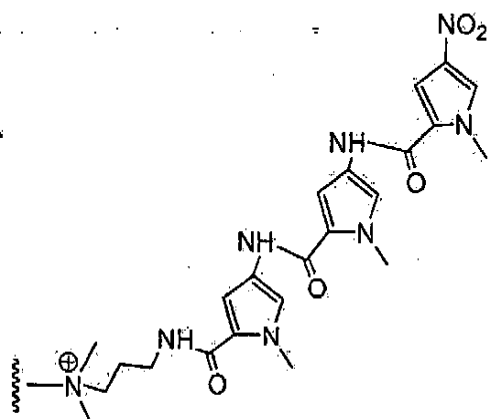
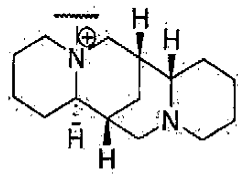
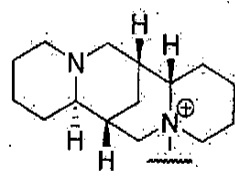
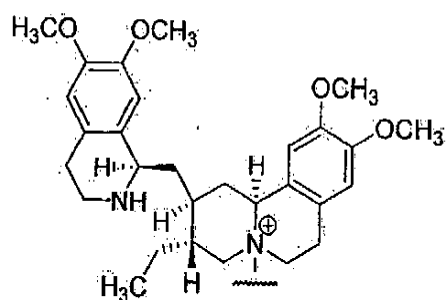
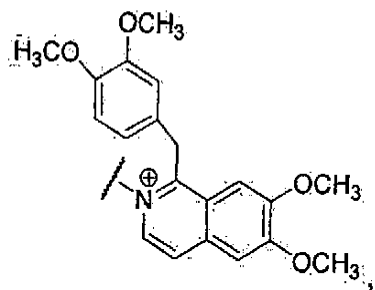
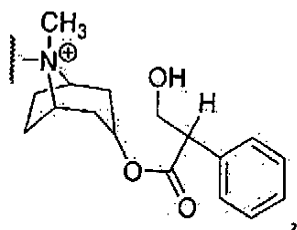
Tabulka 1. Funkční skupiny X.

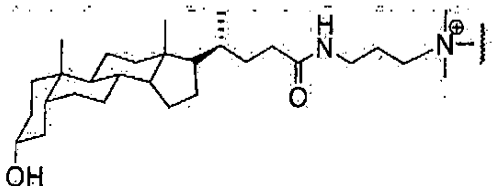
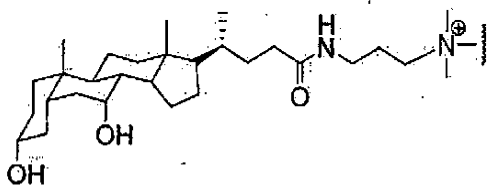
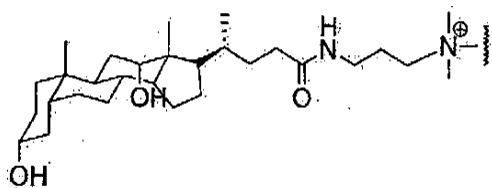
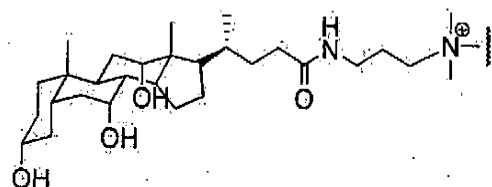
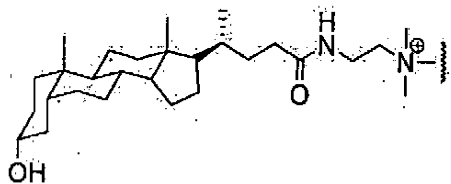
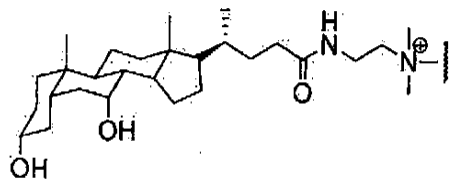
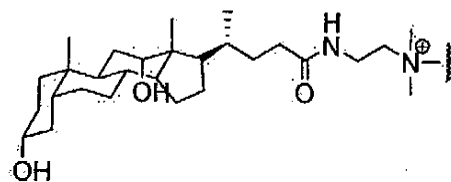
Funkční skupina X



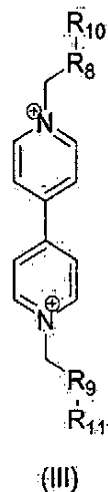
10 kde R₅, R₆ a R₇ jsou nezávislé na sobě lineární, rozvětvené a nebo cyklické alkyly obsahující od jednoho do 16 atomů uhlíku,



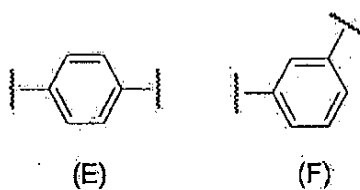




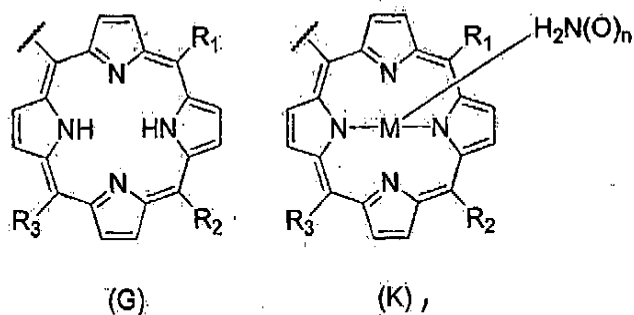
nebo obecného vzorce III,



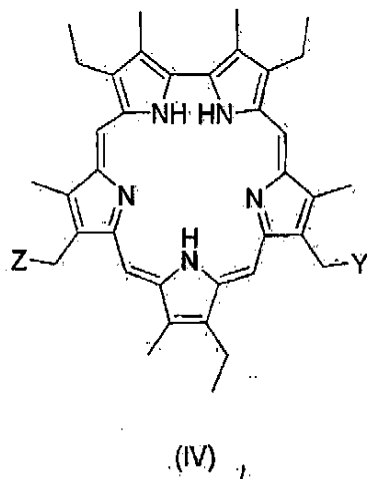
kde R_8 a R_9 jsou nezávisle na sobě skupiny obecného vzorce E nebo F



5 a R_{10} a R_{11} jsou nezávisle na sobě skupiny obecného vzorce G nebo K



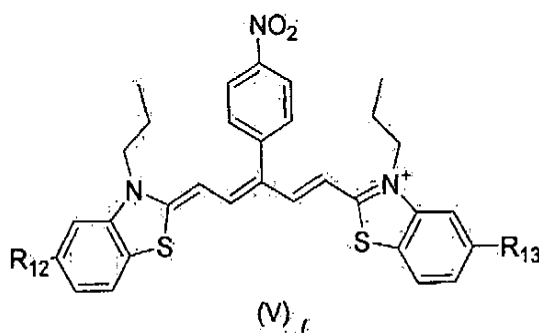
kde R_1 , R_2 , R_3 , M a $(O)_n$ jsou definovány výše u látek obecných vzorců I a II,
nebo obecného vzorce IV,



10

kde Z a Y jsou nezávisle na sobě buď H a nebo $COOH$,

nebo obecného vzorce V,



kde R_{12} a R_{13} jsou nezávisle na sobě H, OH a nebo $O(CH_2CH_2O)_3CH_3$.

5

2. Způsob přípravy modifikovaných nanočástic podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se na povrch nanočástic z vodného roztoku a nebo z roztoku obsahujícího vodu a methanol naváže látka obecného vzorce I až V ve formě solí.

10

3. Způsob přípravy modifikovaných nanočástic podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že nanočástice jsou nejprve modifikovány 3-merkaptopropanovou kyselinou a nebo lipoovou kyselinou a potom se na ně následně naváže látka obecného vzorce I až V ve formě solí.

15

4. Způsob přípravy modifikovaných nanočástic podle nároků 2 a 3, **vyznačující se tím**, že vhodné soli jsou vybrány ze skupiny tvořené F^- , Cl^- , Br^- , I^- , PF_6^- , $H_2PO_4^-$, ClO_4^- , NO_3^- a SO_4^{2-} .

20

5. Použití modifikovaných nanočástic podle nároku 1 pro přípravu prostředku pro fotodynamickou terapii rakovinných nádorů.

6. Použití modifikovaných nanočástic podle nároku 1 pro analýzu roztoků biologických analytů zahrnujících nukleotidy, oligonukleotidy a nebo sacharidy.

25

7. Použití modifikovaných nanočástic podle nároku 1 pro přípravu prostředku pro diagnostické použití, konkrétně pro odlišení mezi nádorovými a normálními buňkami.

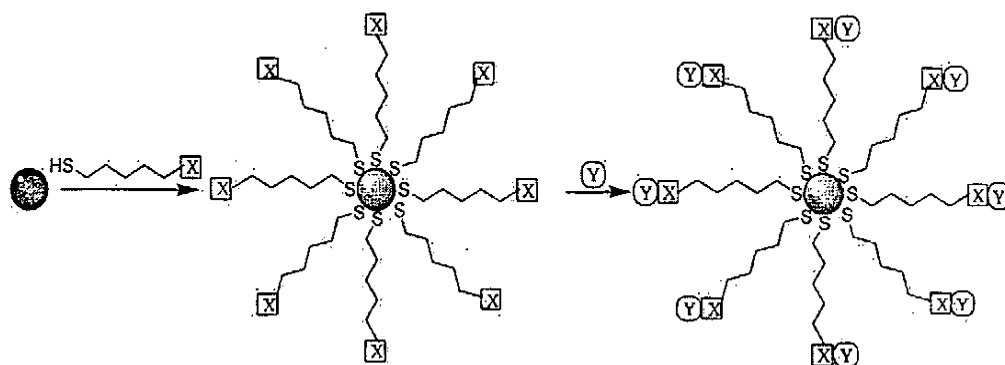
8. Farmaceutický prostředek pro fotodynamickou terapii rakovinných nádorů, **vyznačující se tím**, že obsahuje nanočástice podle nároku 1.

30

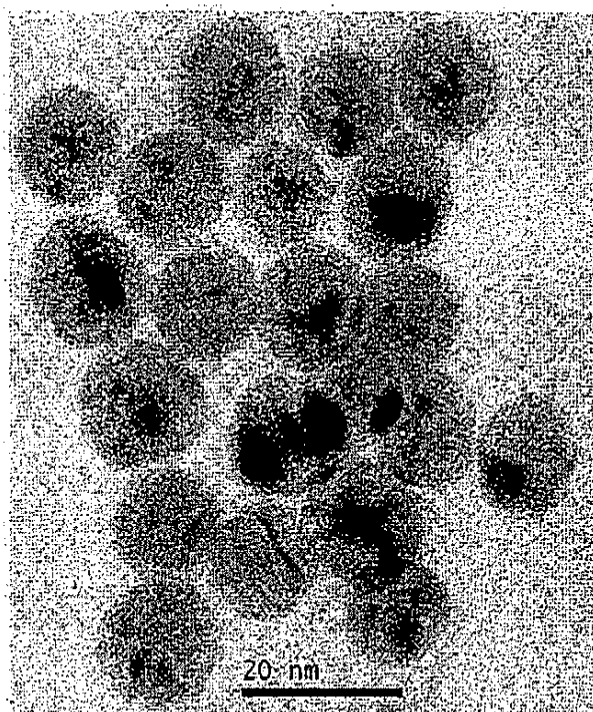
9. Farmaceutický prostředek pro diagnostické použití, zejména pro odlišení nádorových a normálních zdravých buněk, **vyznačující se tím**, že obsahuje nanočástice podle nároku 1.

35

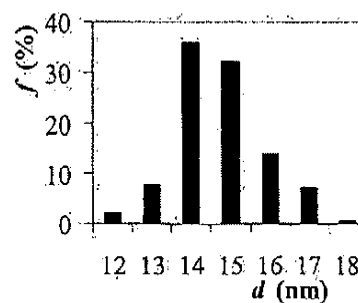
11 výkresů



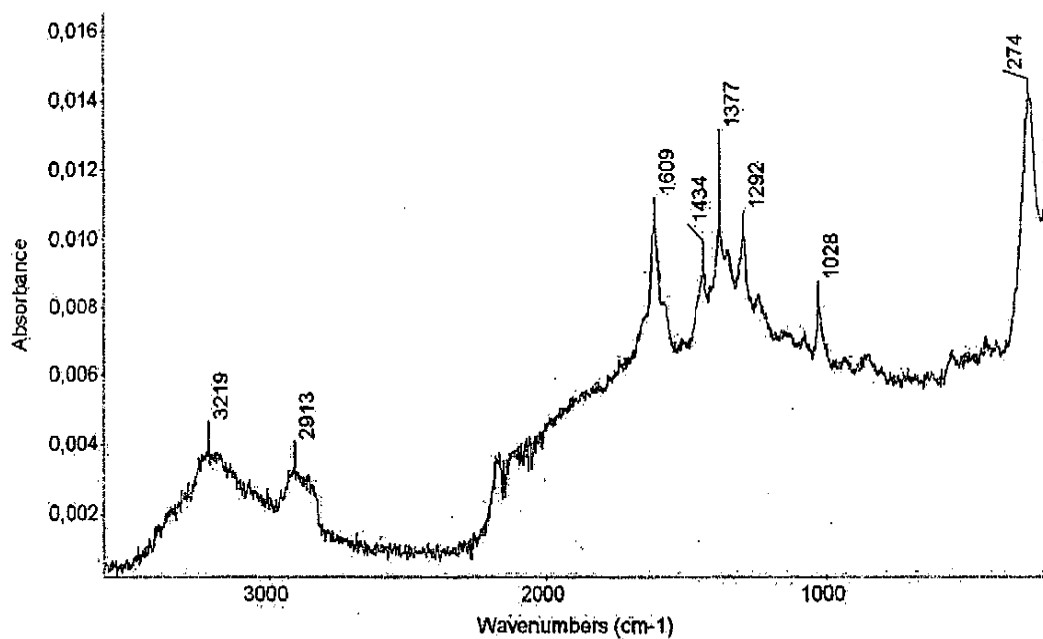
Obrázek 1. Schéma modifikace povrchu nanočástice, X – funkční skupina, Y – látka mající funkční skupinu interagující s X



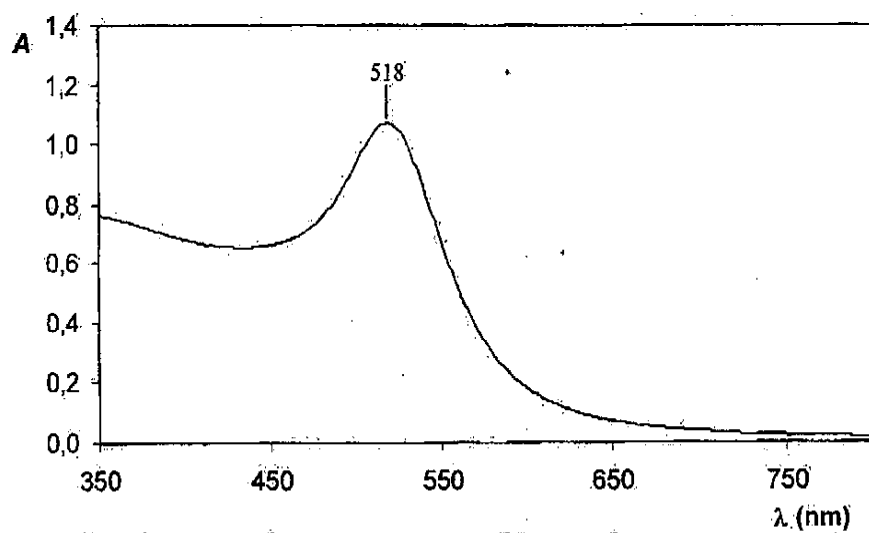
Obrázek 2. Snímek z TEM nanočástic zlata získaných redukcí citrátem



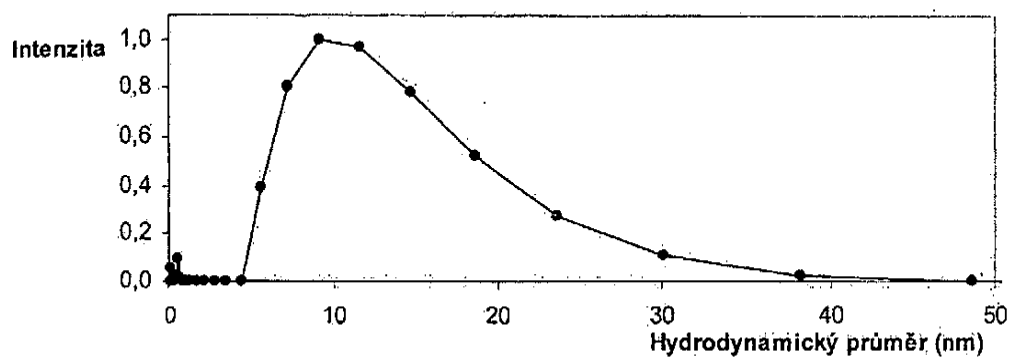
Obrázek 3. Rozdělení průměrů nanočástic zlata získaných redukcí citrátem; analýza průměrů byla provedena změřením 500 nanočástic v náhodných oblastech snímků z TEM



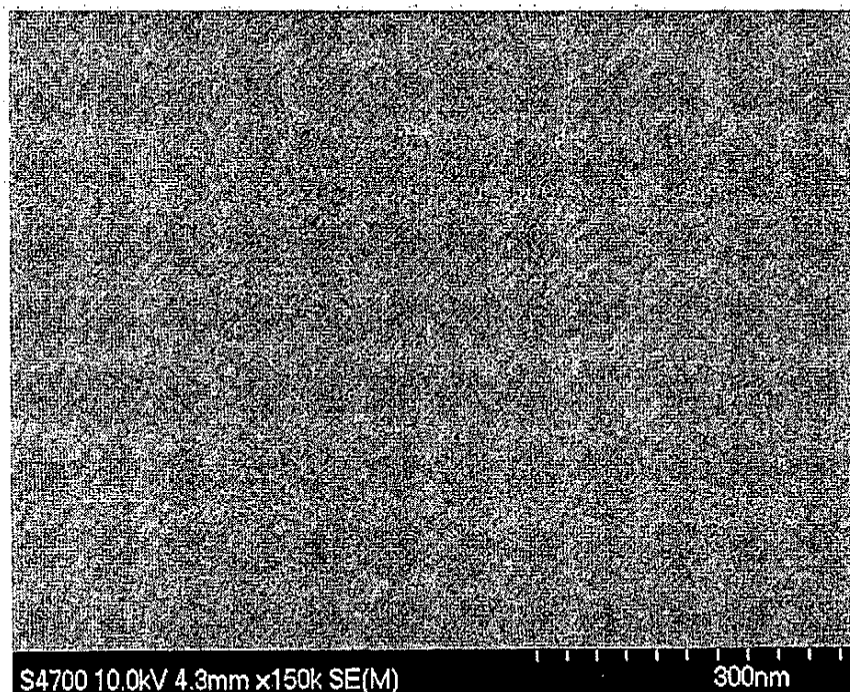
Obrázek 4. Ramánovo spektrum nanočástic zlata získaných redukcí citrátem



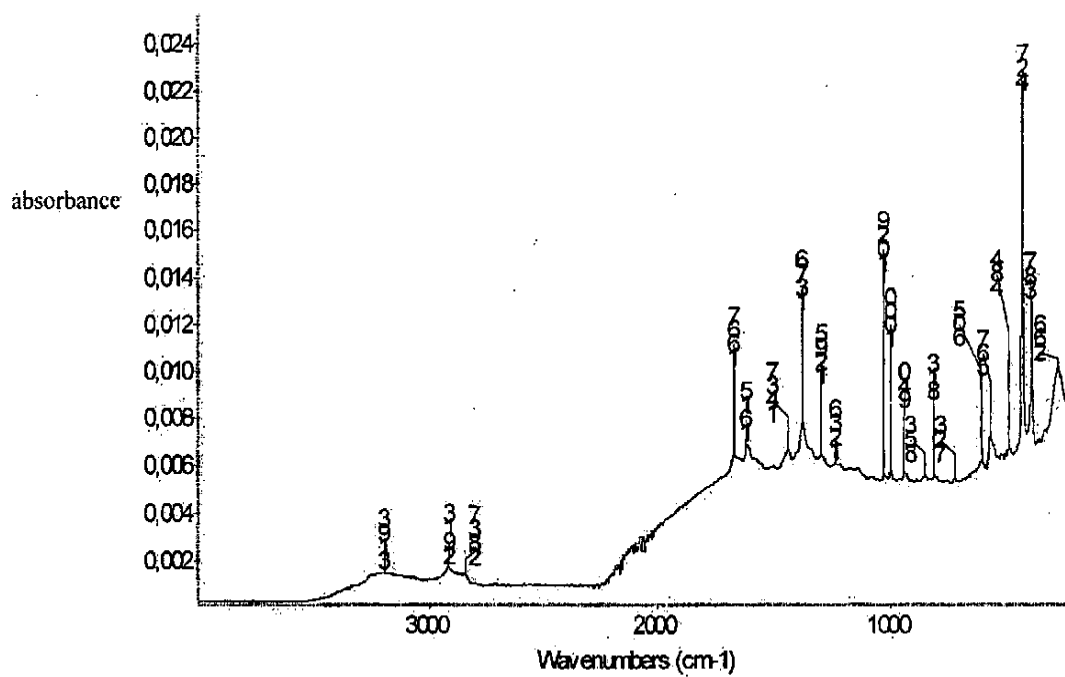
Obrázek 5. UV-Vis spektrum nanočástic zlata získaných redukcí citrátem



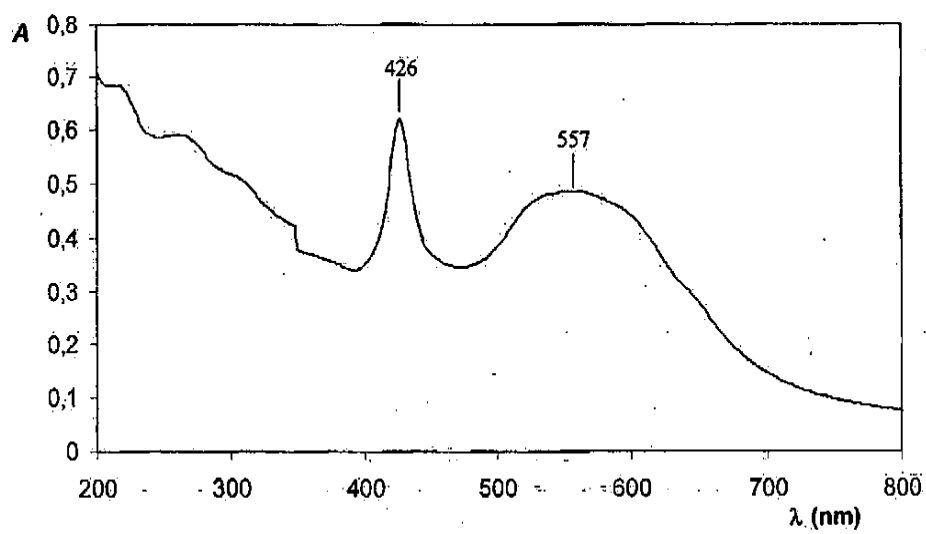
Obrázek 6. Závislost intenzity rezonančního rozptylu laserového záření na hydrodynamickém průměru nanočástic zlata získaných redukcí citrátem



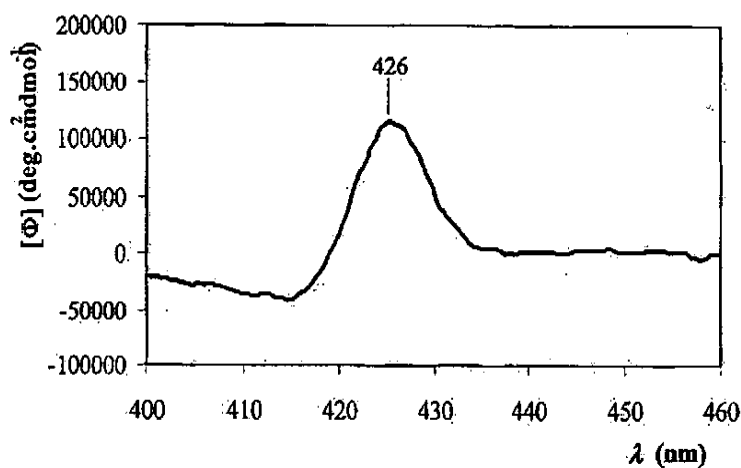
Obrázek 7. Snímek modifikovaných nanočástic zlata ze skenovacího elektronového mikroskopu



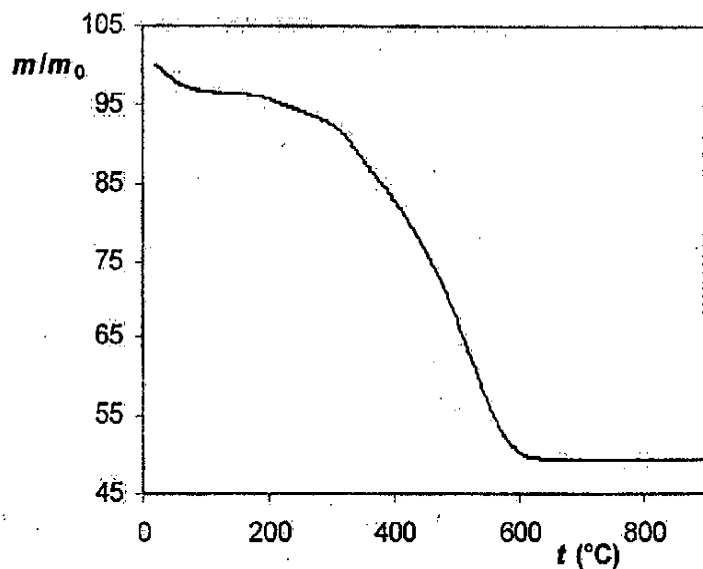
Obrázek 8. Ramanovo spektrum modifikovaných nanočástic zlata



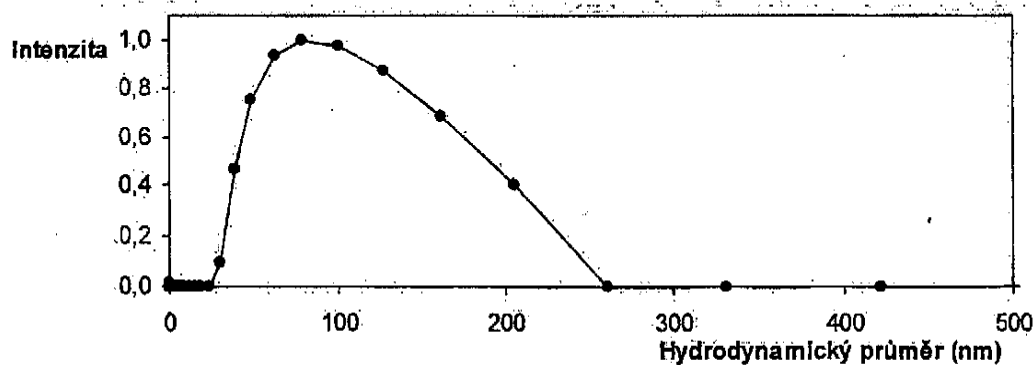
Obrázek 9. UV-Vis spektrum modifikovaných nanočástic zlata



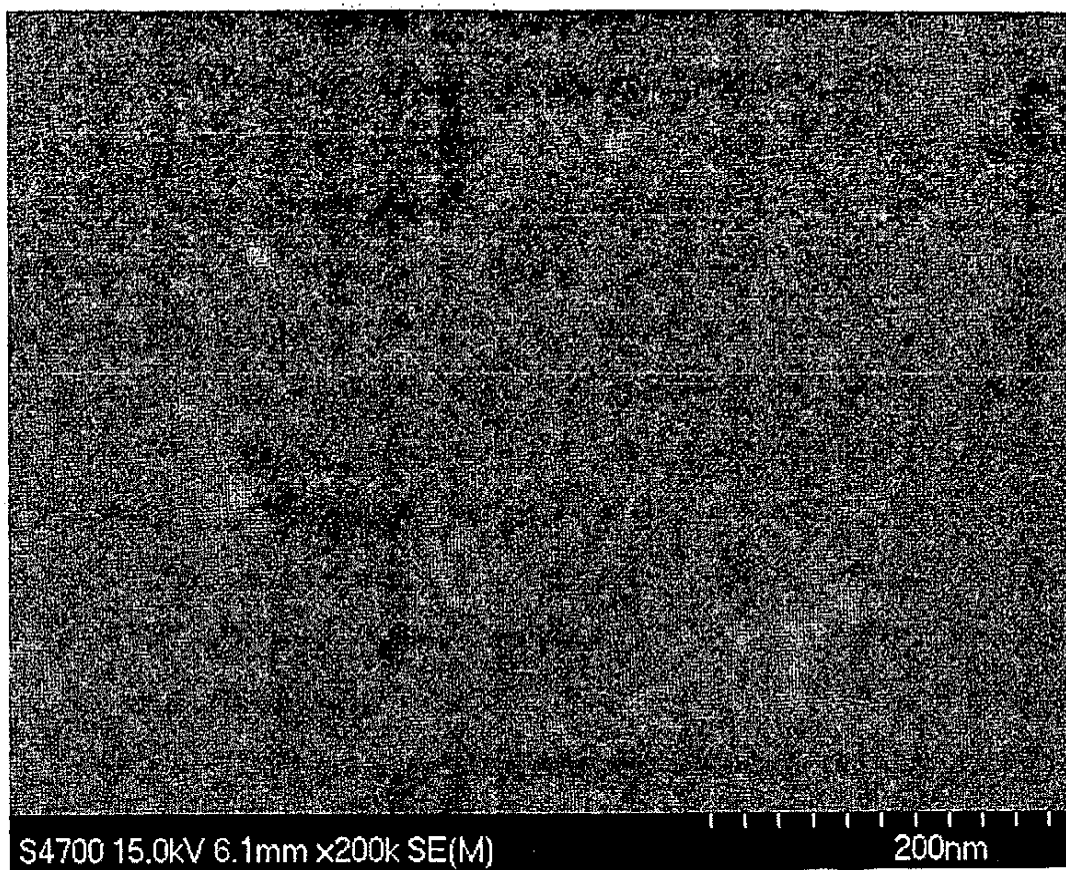
Obrázek 10. ECD spektrum modifikovaných nanočástic zlata



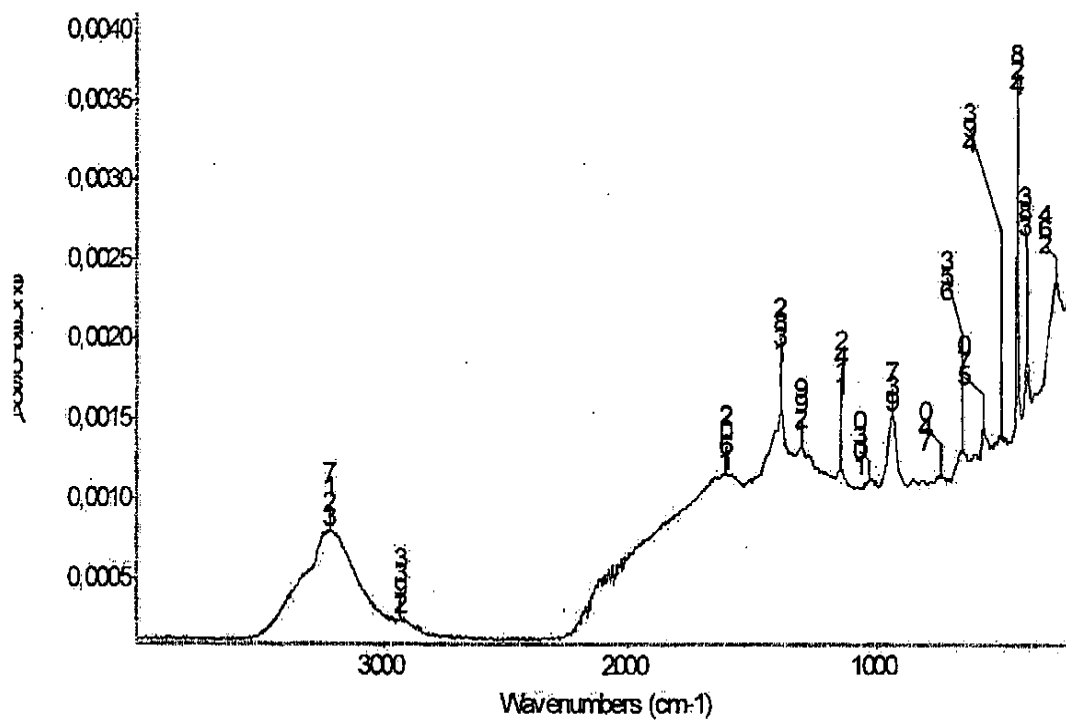
Obrázek 11. Záznam z diferenční termogravimetrické analýzy.



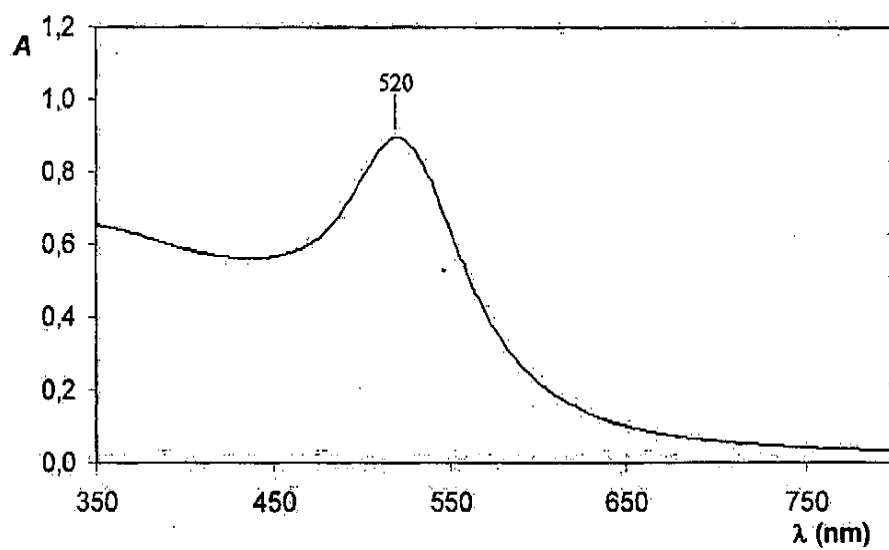
Obrázek 12. Závislost intenzity rezonančního rozptylu laserového záření na hydrodynamickém průměru modifikovaných nanočástic zlata



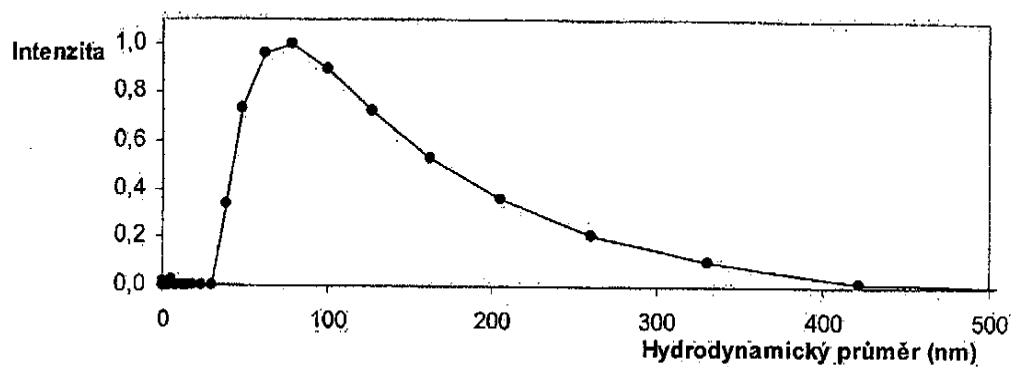
Obrázek 13. Snímek modifikovaných nanočástic zlata ze skenovacího elektronového mikroskopu



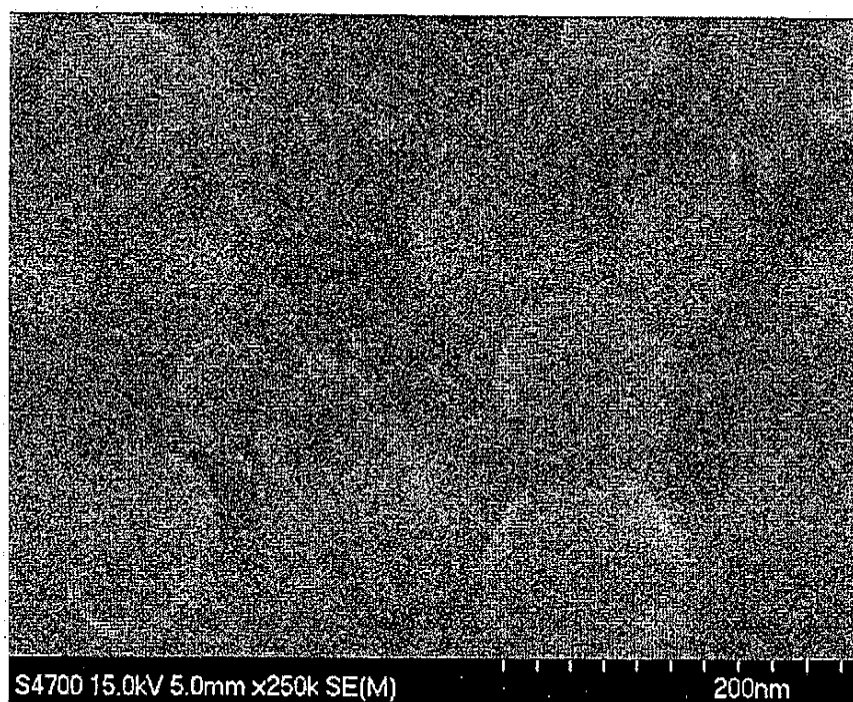
Obrázek 14. Ramanovo spektrum modifikovaných nanočástic zlata



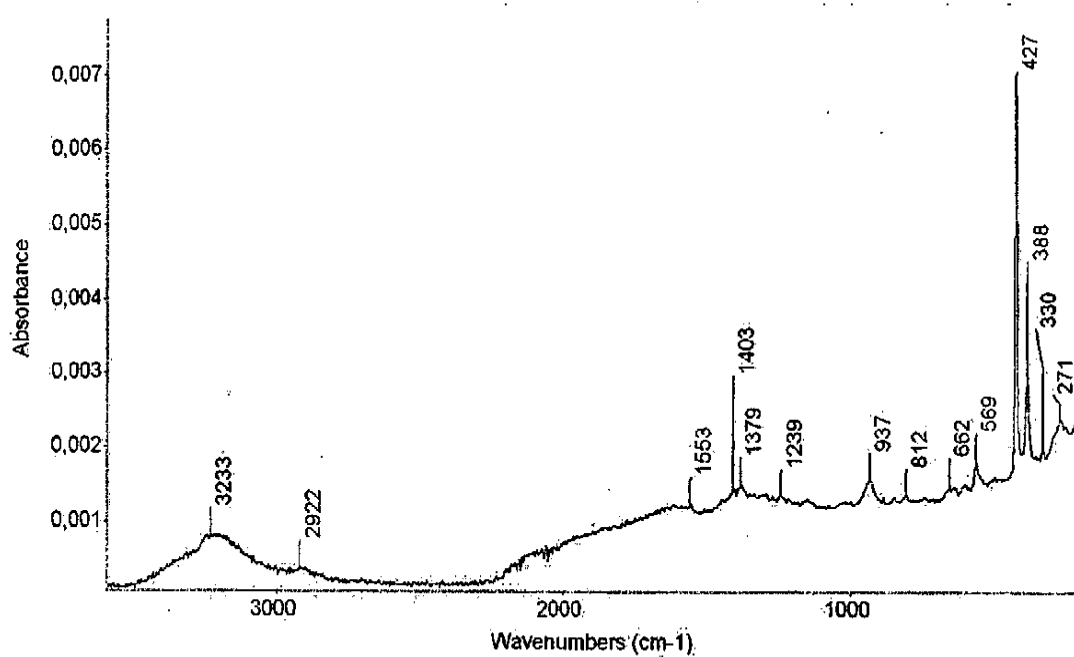
Obrázek 15. UV-Vis spektrum modifikovaných nanočástic zlata



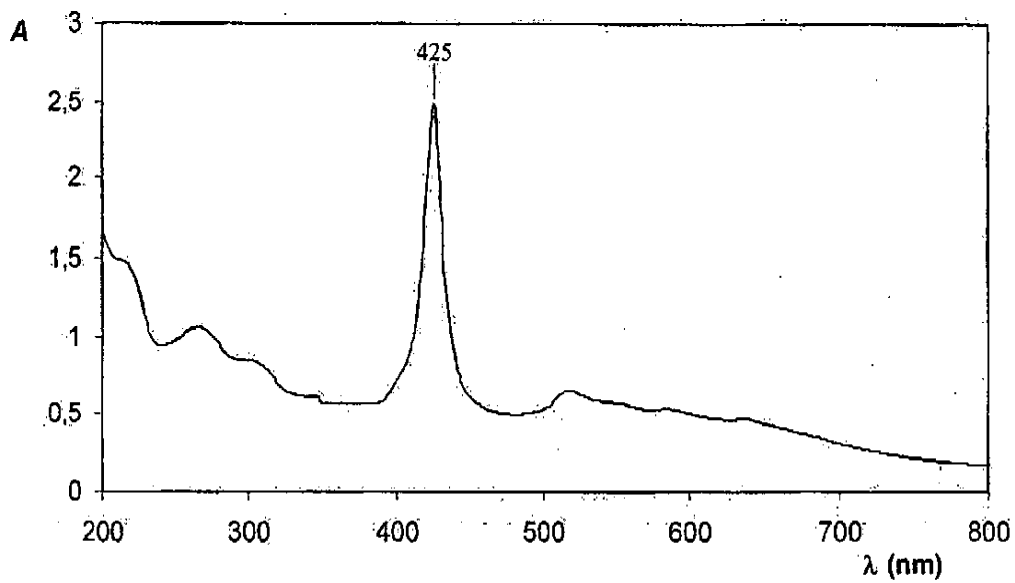
Obrázek 16. Závislost intenzity rezonančního rozptylu laserového záření na hydrodynamickém průměru modifikovaných nanočástic zlata



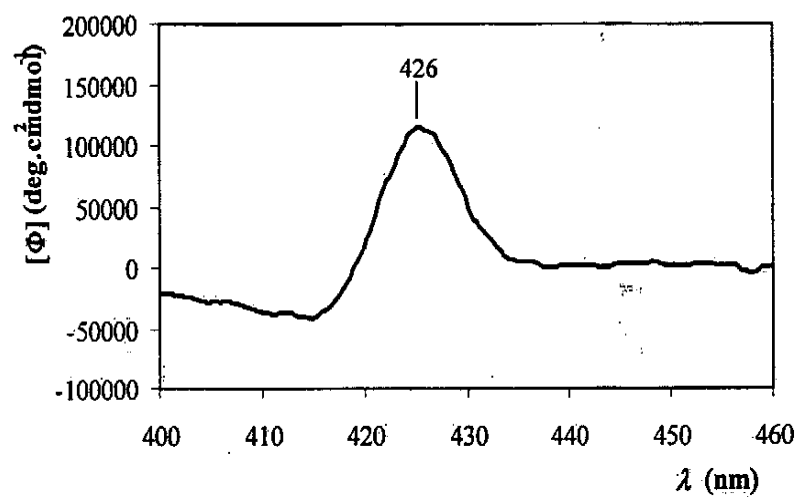
Obrázek 17. Snímek modifikovaných nanočástic zlata ze skenovacího elektronového mikroskopu



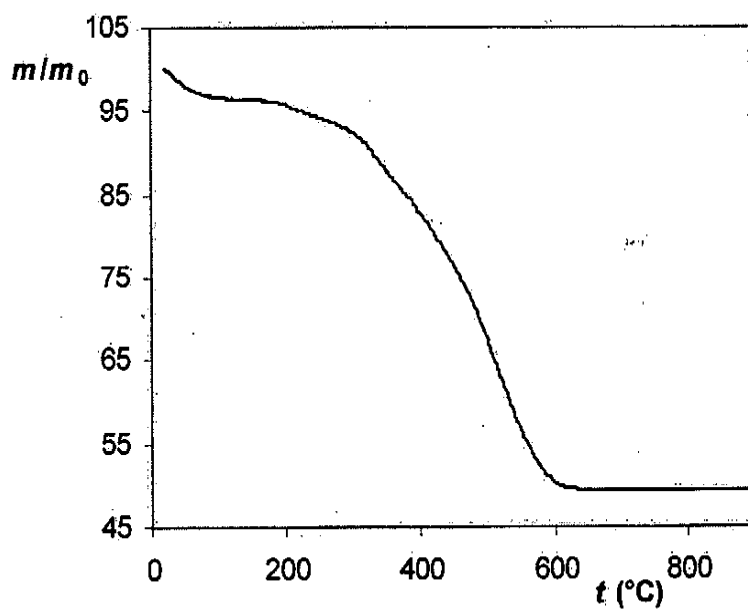
Obrázek 18. Ramanovo spektrum modifikovaných nanočástic zlata



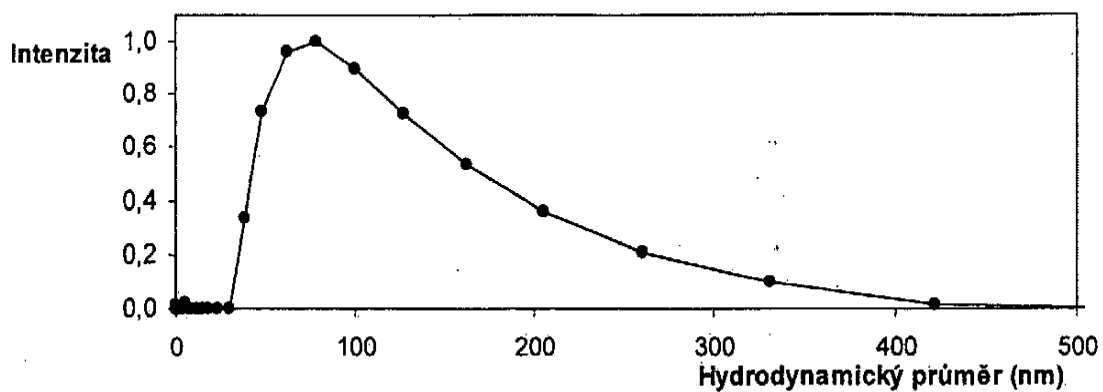
Obrázek 19. UV-Vis spektrum modifikovaných nanočástic zlata



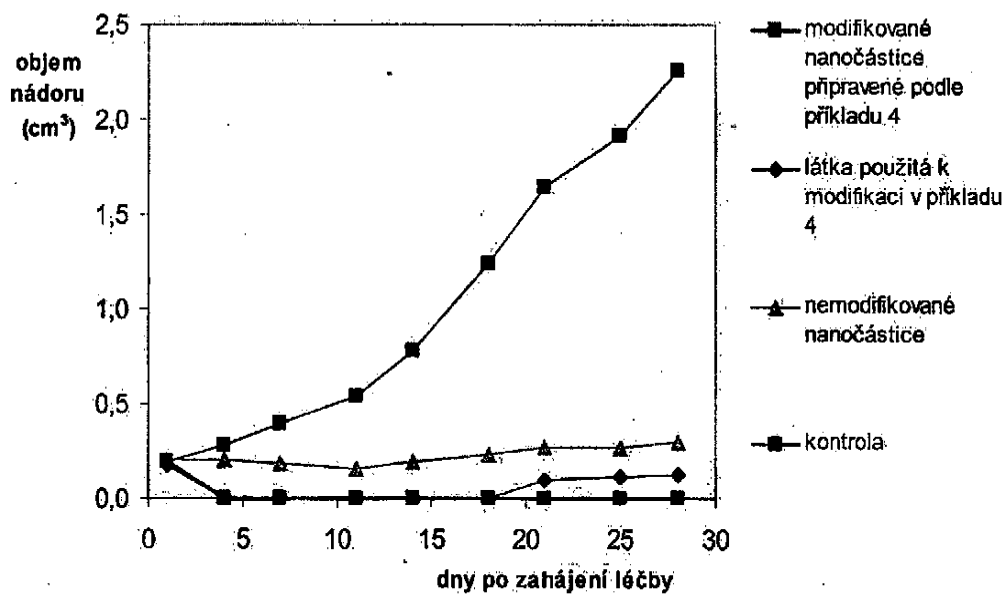
Obrázek 20. ECD spektrum modifikovaných nanočástic zlata



Obrázek 21. Záznam z diferenční termogravimetrické analýzy.



Obrázek 22. Závislost intenzity rezonančního rozptylu laserového záření na hydrodynamickém průměru modifikovaných nanočástic zlata



Obrázek 23. Závislost objemu nádoru na čase pro jednotlivé roztoky podané myším