

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 237

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/38 (2006.01)

A61K 47/61 (2017.01)

A61K 31/337 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-804**

(22) Přihlášeno: **16.12.2016**

(40) Zveřejněno: **18.04.2018**

(Věstník č. 16/2018)

(47) Uděleno: **07.03.2018**

(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **18.04.2018**

(Věstník č. 16/2018)

(56) Relevantní dokumenty:
Legnani F. G. et al.: "Local delivery of antineoplastic agents using biodegradable polymers for the treatment of malignant brain tumors" Expert Rev. Neurotherapeutics, 2003, 3(4), str. 533-546, ISSN 1473-7175.
US 2014/274 945 A1; WO 96/03 984 A1; US 2011/223 255 A1; WO 2017/019 829 A1.

(73) Majitel patentu:
Synthesia, a. s., Pardubice, CZ

(72) Původce:
Ing. Pavla Staňková, Ph.D., Pardubice, CZ
Ing. Jaroslav Štěpán, Medlešice, CZ
Ing. Jiří Demele, Pardubice VI., CZ
Ing. Zdeněk Slováček, Kolín IV., CZ
RNDr. Jarmila Králová, CSc., Praha 2, CZ
prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Praha 4, CZ
prof. RNDr. Vladimír Král, DSc., Praha 2, CZ

(74) Zástupce:
PATENT SKY s. r. o., Ing. Petra Gottwald, Dušní
8/11, 110 00 Praha 1

(54) Název vynálezu:
**Supramolekulární komplex oxycelulózové
matrice s taxolovým derivátem s postupným
uvolňováním taxolového derivátu a jeho
použití**

(57) Anotace:
Řešení se týká supramolekulárního komplexu oxycelulózové matrice s taxolovým derivátem s postupným uvolňováním taxolového derivátu, který obsahuje 5 až 30 % hmotn. taxolového derivátu, kterým je s výhodou docetaxel, nekovalentně vázaného na oxycelulózovou matici, která je tvořena oxidovanými formami celulózy s vysokými terapeutickými účinky při topických vnitřetělových aplikacích do reziduální nádorové tkáně po chirurgickém odstranění.

CZ 307237 B6

Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s taxolovým derivátem s postupným uvolňováním taxolového derivátu a jeho použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových supramolekulárních komplexů oxycelulózových matric s protinádorovými léčivy na bázi taxolových sloučenin a jejich pooperační vnitrotělové aplikace pro eliminaci reziduálních nádorových buněk/tkáně po chirurgickém zákroku. Předložená
10 metodika eliminuje riziko jak metastáz, tak opakovaného růstu nádoru v původním místě.

Dosavadní stav techniky

15 Komplikace při chirurgickém odstranění solidních tumorů jsou jak metastáze (pozdní diagnosa), tak neúplné odstranění tumoru. Obě vedou k následným komplikacím a často končí úmrtím pacienta. Obvyklá následná terapie zahrnuje ozařování, fotodynamickou terapii, cytostatickou léčbu s použitím jiných léčiv.

20 Metastázy, tedy šíření nemocných buněk z nádoru do celého těla, mohou podle odhadů až za 90 procent všech úmrtí spojených s rakovinou. Cílem je tak najít cestu, jak jejich šíření po těle omezit nebo mu zabránit úplně. Nová ložiska nádorů na dalších místech těla (často to bývají například plíce, játra nebo kosti) mají obvykle dvě nepříjemné vlastnosti - bývají agresivnější (rychleji rostou) a jsou hůře léčitelné.

25 V závislosti na typu a stadiu karcinomu obecně léčíme chirurgicky, pomocí chemoterapie nebo radioterapie. U každého pacienta připadá v úvahu jedna nebo kombinace více uvedených léčebných metod. Chemoterapie se používá jako systémová léčba, která postihuje nádorové buňky v celém těle a je možno ji aplikovat po chirurgickém odstranění nádorové tkáně za účelem
30 zabránění vzniku metastáz. Tato léčba se nazývá doplňková neboli adjuvantní. Chemoterapii používáme také ke zmírnění příznaků nemoci, pokud nelze nádor chirurgicky odstranit a ke kontrole jeho růstu. Chemoterapii podáváme v cyklech, mezi jednotlivými sériemi následuje různé dlouhé období na zotavení.

35 V současné době byla vyvinuta řada účinných protinádorových léčiv. Nicméně velmi vážný problém jejich klinické aplikace jsou velmi silné nepříznivé vedlejší účinky. Jednou z možností, jak daný problém řešit je jejich formulace pomocí vhodných excipientů. Tato strategie by mohla potencionálně zlepšit terapeutické vlastnosti řady používaných protinádorových léčiv. Systémy pro cílený transport léčiv s řízeným uvolňováním a účinkem léčiva představují velmi slibné látky
40 pro současnou farmakoterapii. Cílem jejich aplikace je dosáhnout použití správného množství léčiva, ve správném čase a na správném místě. Mají schopnost přivést léčivo v nezměněné podobě na místo jeho účinku při snížené distribuci do nežádoucích částí organismu. Cílením léčiva na místo interakce se snižuje jeho podaná dávka a s tím nežádoucí vedlejší účinky. Vzniká tak možnost aplikace vysoce účinných léčiv, ale s velmi nízkou rozpustností, jako jsou taxolové deriváty (např. docetaxel), a tudíž omezenou aplikovatelností nebo s vysokými vedlejšími účinky,
45 jako jsou antracykliny (např. doxorubicin) nebo platinové metalokomplexy. Docetaxel (L01CD02) a doxorubicin (L01DB01) patří mezi velmi intenzivně studovaná léčiva pro tyto aplikace. Jejich vhodná formulace by mimo jiné umožnila jejich šetrnější podávání v případě docetaxelu a cisplatiny a podstatnou redukci kardiotoxicity doxorubicinu.

50 V současné době patří mezi nejvíce perspektivní excipienty pro formulaci protinádorových léčiv polysacharidové polymery, např. oxycelulóza. Aktivní látka je v nich přítomna jako disperze v polymerní matici, nebo lépe jako komplexované léčivo polymerní maticí. Jejich aplikace vede k snadnější kontrole hladiny léčiva v krvi a tím i jeho efektivnějšímu dávkování oproti podání
55 volného léčiva. Na bázi polysacharidových polymerů včetně oxycelulózy byla připravena a

studována celá řada slibných excipientů včetně multifukčních (někdy zvaných smart excipients). Potencionální výhoda vhodně aplikovaných polymerních excipientů, např. polysacharidových, by mohla být také snadnější kontrola vstupu léčiva do cílové nádorové buňky.

- 5 Oxidovaná celulóza (Oxycelulóza, Okcel) je známa jako vysoce slibná látka pro nejrůznější farmaceutické a medicínské aplikace. Oxycelulóza vykazuje vysokou biokompatibilitu a biodegradovatelnost za fyziologických podmínek vedoucí k netoxickým produktům. Oxycelulóza je dlouhodobě studována a používána v medicíně pro podporu krevní srážlivosti, jako prevence pro adhezi tkání po chirurgickém zákroku, pro zlepšení hojení chronických ran, modulace
10 imunitního systému.

- (Jan Gajdziok, David Vetchý, *Oxidized Cellulose and its Pharmatetical and Medical Application, Cellulose and Cellulose Derivatives Syntheses, Modification and Applications*, Nova Science Publishers, Inc New York 2015; Schmotn.idt, R., Bogan, D., Moore, J. (2001). Use of oxidized
15 cellulose as free radical scavenger. Evropský Patent EP 1 153 618; Watt, P. W., Harvey, W., Lorimer, E., Wiseman, D. (1998). Use of oxidized cellulose and complexes thereof for chronic wound healing. Mezinárodní patentová přihláška WO 98/00 180.; Jelínková, M., Briestenský, J., Santar, I., Řihová, B. (2002). In vitro and in vivo immunomodulatory effects of microdispersed oxidized cellulose. *Int. Immunopharmacol.* 2 (10), 1429-1441; Santar, I., Kiss, F., Briestensky, J.
20 (1998). Cellulose derivatives. Mezinárodní patentová přihláška WO 98/33 822; Dimitrijevič, S. D., Tatarko, M., Gracy, R. W. (1990). Biodegradation of oxidized regenerated cellulose. *Carbohydr. Res.* 195 (2), 247-256; Dimitrijevič, S. D., Tatarko, M., Gracy, R. W., Wise, G. E., Oakford, L. X. (1990). In vivo degradation of oxidized, regenerated cellulose. *Carbohydr. Res.* 198 (2), 331-341; Banker, S. G., Kumar, V. (1995). Microfibrillated oxycellulose. Patent
25 Spojených států US 5 405 953; Otterlei, M., Espvik, T., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O. (1992) Diequatorially bound beta 1-4 polyuronates and use of same for cytokine stimulation. Patent Spojených států US 5 169 840; Doyle P. J., Saferstein L., Lorimer E., Watt P. W. (1998). Oxidized Oligosaccharides. Mezinárodní patentová přihláška WO 98/00 446; Bajarová, M., Krejčová, K., Rabišková, M., Gajdziok, J., Masteiková, R. (2009). Oxycellulose – significant
30 characteristics in relation to its pharmaceutical and medical applications. *Adv. Polym. Tech.* 28(3), 199-208; Banker, G. S., Kumar, V. (1998) Oxidized cellulose. Patent Spojených států US 5 780 618, Leidgens V., Seliger C., Jachnik B., Welz T., Leukel P., Vollmann-Zwerenz I., Bogdahn U., Kreutz M., Grauer O. M., Hau P., Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. *PLoS One.* 2015 20.
35 říjen;10(10):e0140613; Chai A. C., Robinson A. L., Chai K. X., Chen L. M. Ibuprofen regulates the expression and function of membrane-associated serine proteases prostasin and matriptase, *BMC Cancer.* 2015, 29.prosinec;15:1025. doi: 10.1186/s12885-015-2039-6; da Silveira E. F1., Chassot J. M., Teixeira F. C., Azambuja J. H., Debom G., Beira F. T., Del Pino F. A., Lourenço A., Horn A. P., Cruz L., Spanevello R. M., Braganhol E. Ketoprofen-loaded polymeric
40 nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme *Invest New Drugs.* 2013, prosinec; 31(6):1424-35. doi: 10.1007/s10637-013-0016-y. Epub 2013, 27. září; Damnjanovic I., Najman S., Stojanovic S., Stojanovic D., Veljkovic A., Kocic H., Langerholc T., Damnjanovic Z., Pesic S. Crosstalk between possible cytostatic and antiinflammatory potential of ketoprofen in the treatment of
45 culture of colon and cervix cancer cell lines *Bratisl Lek Listy.* 2015; 116(4):227-32)

- Aplikace oxycelulózových derivátů pro cílený transport léčiv byly popsány v jejich kombinaci s magnetickými nanočásticemi (Sivakumar, Balasubramanian; Aswathy, Ravindran Girija; Nagaoka, Yutaka; Suzuki, Masashi; Fukuda, Takahiro; Yoshida, Yasuhiko; Maekawa, Toru;
50 Sakthikumar, Dasappan Nair, Multifunctional Carboxymethyl Cellulose-Based Magnetic Nanovector as a Theragnostic System for Folate Receptor Targeted Chemotherapy, Imaging, and Hyperthermia against Cancer, *Langmuir* (2013), 29(10), 3453-3466), nebo jejich kombinaci s chitosanem a magnetickými nanočásticemi (Synthesis, characterization and in vitro assessment of the magnetic chitosan-carboxymethylcellulose biocomposite interactions with the prokaryotic and eukaryotic cells, Grumezescu, Alexandru Mihai; Andronesco, Ecaterina; Ficai, Anton;
55

Bleotu, Coralía; Mihaiescu, Dan Eduard; Chifiriuc, Mariana Carmen, *International Journal of Pharmaceutics* (Amsterdam, Netherlands) (2012), 436(1-2), 771-777), nebo kombinaci oxycelulózy s nanočásticemi, či její konjugáty s léčivý (Soo, B. Chia; Ting, Kang; Wu, Ben; Zhang, Kevin, *Transcutaneous multimodal delivery systems comprising dissolvable microneedles* PCT mez. přihl. (2012), WO 2012/103 257 A2, 20120802), nebo její kombinaci s chitosanem (Viieira, D. B.; Kim, V.; Petri, D. F. S.; Menck, C. F. M.; Carmona-Ribeiro, A. M., editor: Laudon, Matthew; Romanowicz, Bart, *Polymer-based delivery vehicle for cisplatin*, *Nanotech Conference & Expo 2011: An Interdisciplinary Integrative Forum on Nanotechnology, Biotechnology and Microtechnology*, Boston, MA, Spojené státy, 13.-16. června 2011 (2011), 3, 382-385), nebo aplikace oxycelulóзовého hydrogelu pro uvolňování léčiv pro léčbu močových cest (Konorty, Marina; Hakim, Gil, *Mucoadhesive thermoreversible topical hydrogels and method for treating internal cavities*, zveř. US pat. přihl. (2014), US 2014/0 105 884 A1, 20140417).

Patentová přihláška WO 2007/147 052 popisuje farmaceutickou kompozici pro topické použití tvořenou filmem z celulózy nebo jejich derivátů, obsahující biologicky aktivní činidlo v přesyceném stavu, kterým je např. terbinafin, naftifin, amorolfín, butenafin, jejich deriváty, acyklovir, nepolymerní inhibitor krystalizace - hydroxykarboxylovou kyselinu, též také rozpouštědlo. Kompozice je určena pro antifugální léčbu, pro léčbu nebo prevenci varicella zoster infekce, HSV-1 infekce nebo HSV-2 infekce, nebo prevenci onychomykózy.

Vynález CN 1843332 A popisuje protinádorové injekce s prodlouženým uvolňováním obsahující angiogenezní inhibitory a cytotoxická činidla, které sestávají z mikrokuliček obsahujících protinádorové účinné látky 0,5 až 60 %, pomocné látky s prodlouženým uvolňováním 40 až 99 %, jako je kyselina polymléčná; kopolymer kyseliny polyglykolové a kyseliny glykolové; polifeprosan; ethylen-vinylacetát; di-mastná kyselina a kopolymer kyseliny sebakové; poly(dimer kyseliny erukové - kyselina sebaková) kopolymer; poly(kyselina fumarová - kopolymer kyseliny sebakové). Suspendední činidla 0,0-30 %: sodné soli karboxymethylcelulózy, jod, glycerin, dimetikon, propylenglykol, karbomer, mannitol, sorbitol, povrchově aktivní látky, jeden z Tween 20, Tween 40 a Tween 80, nebo jejich kombinace, inhibitor je vybrán z gefitinibu, erlotinibu, lapatinibu, karboxy-amino-triazolu, thalidomidu, angiostatinu, endostatinu, endostatinu, imatinib mesylátu, kanamycinu, erlotinibu, sorafenibu, imatinibu. Cytotoxické činidlo se vybralo z platiny Nida, melfalanu, cyklofosfamidu, 4H peroxidu vinorelbinu, tamoxifenu, metotrexátu, doxorubicinu, epirubicinu, aktinomycinu D, estramustinu, semustinu nebo ranimustinu.

Přihláška vynálezu EP 1 491 188 A1 popisuje farmaceutický prostředek pro prevenci nebo léčbu kožních poruch s obsahem alespoň 0,1 % účinné látky, tvořené VPA a nebo jejich solí, která obsahuje také chemoterapeutické léčivo, kterým je 5-fluorouracil, a dále obsahuje nosiče ve formě krémů, mastí, past a gelů. Přípravku má být použito pro léčbu kožních nádorů, pre-neoplastických kožních onemocnění, zánětů kůže a / nebo sliznice a fotostárnutí.

Výběžky nádoru do okolní tkáně a jeho složitá topologie v praxi téměř znemožňují chirurgické odstranění celého nádoru. Následná chemoterapie nebo systémové podávání léčiv je často neúčinné, jelikož koncentrace léčiva v místě původního nádoru je příliš nízká.

Podstata vynálezu

Kvůli málo účinné postoperační léčbě reziduální nádorové tkáně byly vyvinuty nové postupy aplikace cytotoxického léčiva, na bázi taxolových sloučenin, nekovalentně vázaných na oxycelulóзовou matici, a to topicky přímo do rány po odstranění tumoru.

Vynález se týká nové metody topické vnitřní aplikace stabilních supramolekulárních komplexů oxycelulóзовých matic s taxolovými deriváty – cytostatiky, jako je docetaxel a paclitaxel.

Byla vytvořena kompozice pro pooperační vnitrotělové topické aplikace sestávající z modifikované oxycelulózy s taxolovými deriváty pro eliminaci nádorové tkáně/buněk po chirurgickém zákroku. Kompozice umožňuje řízené postupné uvolňování léčiva v nádoru nebo jeho reziduích, a tím vede k eliminaci zbytkové nádorové tkáně a zabraňuje jejímu rapidnímu nárůstu po klasickém i laparoskopickém zákroku.

Kompozice je tvořena supramolekulárními komplexy oxycelulóзовých matic s výhodou ve formě HD, HL a CaL s taxoly, s výhodou docetaxelem a paclitaxelem.

Oxycelulóзовá matrice CaL je prášková forma vápenaté soli oxidované celulózy, je organismem dobře snášena a rychle se vstřebává, HD je pletená verze vstřebatelného hemostatického materiálu oxidované celulózy v textilní formě a HL je lintrová kyselá forma oxidované celulózy ve formě prášku, který je nerozpustný ve vodě. V lidském těle se oxycelulóзовé matrice vstřebávají bez jakýchkoli zbytků, jsou biologicky odbouratelné, v průběhu rozkladu vznikají netoxické produkty a jsou plně biokompatibilní. Díky nízkému pH působí antibakteriálně. Pomáhají s regenerací tkáně, tedy i se zvýšením léčebných účinků.

Docetaxel a paclitaxel je rostlinný alkaloid ze skupiny taxanů, používaných v medicíně jako cytostatikum. Jedná se o anti-mitotické léčivo pro chemoterapii používané zejména pro léčbu rakoviny prsu, vaječníků a nemalobuněčného karcinomu plic. Docetaxel a paclitaxel se váží reverzibilně na mikrotubuly buněk, čímž zabrání jejich depolymeraci během buněčného dělení, a tím transportu chromosomů. Výsledkem je inhibice mitózy. Docetaxel je považován za dvakrát silnější léčivo než paclitaxel. V dnešní době se dá připravovat semisynteticky z látek obsažených v kůře různých druhů tisů.

V případě hydrofobních taxolových derivátů je proces přípravy supramolekulárního komplexu založen na aktivaci absorpční schopnosti oxycelulóзовé matrice ponořením do vody a následném přidání roztoku rozpouštědla obsahujícího dané léčivo. Rozpouštědlo je vybráno ze skupiny obsahující methanol, ethanol, isopropanol, 2-methoxyethanol, N,N-dimethylformamid, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran, acetonitril, aceton nebo jejich směs a jako další vodu. Dané mísení je kontrolovaně prováděno tak, aby léčivo obsažené v rozpouštědle zůstalo rozpuštěné i ve vzniklé směsi vody případně s daným organickým rozpouštědlem. Následně jsou vodné systémy s organickým rozpouštědlem obsahující oxycelulóзовou matici a dané léčivo třepány s výhodou po dobu 24 hodin. Poté je modifikovaná matrice, tedy s nekovalentně vázaným léčivem, izolovaná pomocí filtrace, následně promyta použitým rozpouštědlovým systémem a nakonec vakuově sušena. Celý proces přípravy je kontrolovaně prováděn tak, aby teplota oxycelulóзовých matic nebo jejich roztoků nebyla vyšší než 20 °C.

Připravené kompozice sestávají z supramolekulárních struktur oxycelulóзовých matic a taxolových derivátů, přičemž taxolové deriváty jsou v matici v množství 5 až 30 % hmotn. Ze strukturních analýz vyplynulo, že taxolové deriváty jsou skutečně nedílnou součástí oxycelulóзовé matrice a nejedná se tedy o pouhou mechanickou směs, ale supramolekulární strukturu. Také byly ověřeny vysoké stability vytvořených struktur, což dokazuje, že k uvolnění cytotoxických taxolů nedochází předčasně do okolní zdravé tkáně. Dále byla ověřena zvýšená průchodnost přes simulované biologické membrány oproti průchodnosti samotných taxolů, což je přisuzováno právě supramolekulární struktuře, a zvyšuje se efektivita transportu léčiva přímo dovnitř nádorové tkáně.

Pro celulóзовé matrice jsou známy dva základní mechanismy uvolňování léčiv. Ve vodném prostředí se nejprve matrice zvlhčí vodou, čímž dojde k uvolnění počáteční koncentrace rozpuštěného léčiva z povrchu matrice. Díky této gelové vrstvě může voda z matrice uvolňovat léčivo, aniž by došlo k jejímu rozrušení (preferováno hydrofilními léčivy, jako je doxorubicin). V následné fázi dojde k hydrataci povrchu matrice, zvýšení pohyblivosti polymerových řetězců a vzniku nabobtnalého gelu. V další fázi dochází k rozvolnění polymerových řetězců a jejich uvolnění do okolí. Na novém povrchu matrice vznikne další gelová vrstva a celý proces se

opakuje až do jejího zániku (preferováno pro hydrofobní léčiva, např. docetaxel). V případě omezeně rozpustných léčiv se na jejich uvolnění z matrice podílejí oba mechanismy. Na daný proces má velký vliv stabilita použité matrice. V případě stabilnějších matric bude preferováno vymývání léčiva. Naproti tomu v případě méně stabilních matric dojde k uvolnění většiny vázaného léčiva již během rozpadu samotné matrice. Dochází tedy k postupnému uvolňování léčiva z modifikované oxycelulózy, a to pouze v místě po vyoperovaném nádoru, čímž se rapidně snižují nežádoucí účinky použitých cytostatik.

Bylo prokázáno, že při standardních testech za podmínek $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a relativní vlhkosti $60\% \pm 5\%$ i při zrychlených testech (podmínky $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RV} \pm 5\% \text{ RV}$) jsou připravené komplexy modifikovaných celulóзовých matric stabilní po dobu nejméně 6 měsíců.

K výhodnosti vnitřetelové topické aplikace se dospělo až na základě řady experimentů, kdy byly prováděny preklinické testy na myších nu-nu modelech po odstranění nádorové tkáně karcinomu prsu a karcinomu pankreatu a následné aplikaci kompozice jak orálně, v každodenních dávkách, tak jednorázově topicky přímo do místa po vyoperovaném nádoru ve stejné dávce. Porovnání aplikace ve formě orální a vnitřetelové topické pooperační aplikace prokázalo výhodnost topické aplikace, protože orální aplikace byla spojena s mortalitou o 24 až 35 % vyšší a především pozorovaný nárůst velikosti tumoru byl o 27 až 48 % vyšší.

Bylo zjištěno, že supramolekulární komplex oxycelulóz s docetaxelem při vnitřetelové topické aplikaci má schopnost inhibovat nárůst karcinomu prsu a pankreatu až na 11 % oproti pouze chirurgické léčbě a až na 21 % oproti chirurgické léčbě s následným podáním samotného docetaxelu. Také mortalita komplexu je poměrně nízká v rozmezí 11 až 14 %.

Teprve na základě těchto výsledků se dospělo k závěrům použití pouze vnitřetelové topické aplikace taxolových derivátů a pouze ve formě supramolekulárních oxycelulózových struktur, které byly prokázány jako nejšetnější a nejúčinnější.

Objasnění výkresů

Obr. 1. Tabulka přehledu navážek docetaxelu vzhledem k navážkám oxycelulózy, procentuální obsah léčiva v oxycelulóze a vpravení léčiva do oxycelulózy, kdy jako rozpouštědlo byla použita voda

Obr. 2. Tabulka přehledu navážek docetaxelu vzhledem k navážkám oxycelulózy, procentuální obsah léčiva v oxycelulóze a vpravení léčiva do oxycelulózy, kdy jako rozpouštědlo byla použita směs EtOH/voda (2:1, V/V)

Obr. 3. Kinetika uvolňování docetaxelu pro HD s 10 % docetaxelu při pH 7,4 (A) a 5,5 (B)

Obr. 4. Kinetika uvolňování docetaxelu pro HL s 10 % docetaxelu při pH 7,4 (A) a 5,5 (B)

Obr. 5. Kinetika uvolňování docetaxelu pro CaL s 10 % docetaxelu při pH 7,4 (A) a 5,5 (B)

Obr. 6. Vliv oxycelulózové matrice na transport docetaxelu přes fosfolipidovou PAMPA membránu

Obr. 7. Vnitřetelová topická aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matric s docetaxelem po chirurgické léčbě nu-nu myši s PATU lidským karcinomem pankreatu

Obr. 8. Orální aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matric s docetaxelem po chirurgické léčbě nu-nu myši s PATU lidským karcinomem pankreatu

- Obr. 9. Vnitrotělová topická aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matic s docetaxelem po chirurgické léčbě nu-nu myši s BT-474 lidským karcinomem prsu
- 5 Obr. 10. Orální aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matic s docetaxelem po chirurgické léčbě nu-nu myši s BT-474 lidským karcinomem prsu a její porovnání se samotným docetaxelem a oxycelulózovými maticemi
- 10 Obr. 11. In vitro studie mortality nádorových buněk tkáňových kultur působením samotného docetaxelu v porovnání s jeho oxycelulózovým komplexem
- Obr. 12. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulózu CaL docetaxelem („doce.Voda:EtOH“, obsah 5 % hmotn. docetaxelu), čisté léčivo („docetaxel“) a nemodifikovanou oxycelulózu („CaL“)
- 15 Obr. 13. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulózu HD docetaxelem („doce.Voda:EtOH“, obsah 5 % hmotn. docetaxelu), čisté léčivo („docetaxel“) a nemodifikovanou oxycelulózu („HD“)
- 20 Obr. 14. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulózu HL docetaxelem („doce.Voda:EtOH“, obsah 5 % hmotn. docetaxelu), čisté léčivo („docetaxel“) a nemodifikovanou oxycelulózu („HL“)
- 25 Obr. 15. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulózu HD docetaxelem („doce.Voda“, obsah 5 % hmotn. docetaxelu), čisté léčivo („docetaxel“) a nemodifikovanou oxycelulózu („HD“)

Příklady uskutečnění vynálezu

30

Příklad 1

Příprava a charakterizace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matic (HD, HL a CaL) s docetaxelem

35

Příklad 1A

Použití rozpouštědla ethanol/voda (2:1, V/V)

40

6 mg docetaxelu bylo rozpuštěno ve směsi ethanol/voda (2:1, V/V; 5 ml) a přidáno k oxycelulóze (HL, HD nebo CaL) (100 mg). Po 24 hodinách třepání při teplotě 20 °C byla modifikovaná oxycelulóza odfiltrována, promyta směsí ethanol/voda (2:1, V/V; 3 ml), vodou (3 ml) a následně vysušena za vysokého vakua při teplotě 20 °C. Elementární analýzou bylo stanoveno, že na oxycelulózu bylo navázáno přibližně 5 % docetaxelu s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 2.

45

13 mg docetaxelu bylo rozpuštěno ve směsi ethanol/voda (2:1, V/V; 5 ml) a přidáno k oxycelulóze (HL, HD nebo CaL) (100 mg). Po 24 hodinách třepání při teplotě 20 °C byla modifikovaná oxycelulóza odfiltrována, promyta směsí ethanol/voda (2:1, V/V; 3 ml), vodou (3 ml) a následně vysušena za vysokého vakua při teplotě 20 °C. Elementární analýzou bylo stanoveno, že na oxycelulózu bylo navázáno přibližně 10 % docetaxelu s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 2.

50

43 mg docetaxelu bylo rozpuštěno ve směsi ethanol/voda (2:1, V/V; 5 ml) a přidáno k oxycelulóze (HL, HD nebo CaL) (100 mg). Po 36 hodinách třepání při teplotě 19 °C byla modifikovaná oxycelulóza odfiltrována, promyta směsí ethanol/voda (2:1, V/V; 3 ml), vodou (3 ml) a následně vysušena za vysokého vakua při teplotě 19 °C. Elementární analýzou bylo stanoveno, že na oxycelulózu bylo navázáno přibližně 30 % docetaxelu s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 2.

Příklad 1B

Použití rozpouštědla voda

6 mg docetaxelu bylo rozpuštěno ve vodě 5 ml a přidáno k oxycelulóze (HL, HD nebo CaL) (100 mg). Po 24 hodinách třepání při teplotě 20 °C byla modifikovaná oxycelulóza odfiltrována, promyta vodou (6 ml) a následně vysušena za vysokého vakua při teplotě 20 °C. Elementární analýzou bylo stanoveno, že na oxycelulózu bylo navázáno přibližně 5 % docetaxelu s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 1.

13 mg docetaxelu bylo rozpuštěno ve vodě 5 ml a přidáno k oxycelulóze (HL, HD nebo CaL) (100 mg). Po 24 hodinách třepání při teplotě 20 °C byla modifikovaná oxycelulóza odfiltrována, promyta vodou (6 ml) a následně vysušena za vysokého vakua při teplotě 20 °C. Elementární analýzou bylo stanoveno, že na oxycelulózu bylo navázáno přibližně 10 % docetaxelu s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 1.

43 mg docetaxelu bylo rozpuštěno ve vodě 5 ml a přidáno k oxycelulóze (HL, HD nebo CaL) (100 mg). Po 36 hodinách třepání při teplotě 19 °C byla modifikovaná oxycelulóza odfiltrována, promyta vodou (6 ml) a následně vysušena za vysokého vakua při teplotě 19 °C. Elementární analýzou bylo stanoveno, že na oxycelulózu bylo navázáno přibližně 30 % docetaxelu s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 1.

Pro takto připravené modifikované oxycelulózy byla změřena jejich Ramanova spektra a porovnána se spektrem čistého docetaxelu a nemodifikované oxycelulózy. Porovnáním pozice píků a jejich poměru intenzit modifikovaných oxycelulóz, samotného docetaxelu a nemodifikovaných oxycelulóz lze usoudit, že účinná látka docetaxel není vázána čistě fyzikální absorpcí, ale tvoří inklusní komplex s danou matricí.

Příklad 2 A

Stabilita supramolekulárních komplexů celulóзовých matric HD s docetaxelem

Kinetika uvolňování docetaxelu z celulóзовých matric HD a jejich stabilita byla sledována pomocí absorpční spektroskopie v intervalu 220 až 500 nm. Délka kroku byla 1 nm a rychlost 100 nm/min. Pro měření byly použity plastové kyvety pro UV oblast. Měření bylo provedeno při pH 7,4 a 5,5 v PBS (10mM fosfátový pufr, 0,137M NaCl a 0,0027M KCl). Do jednotlivých kyvet bylo naváženo 8 mg modifikovaných matric s obsahem 10 % hmotn. docetaxelu, zalito 19,2 ml PBS a následně uzavřeno parafilmem. Byla pozorována vysoká stabilita vázaného docetaxelu (viz obr. 3).

Příklad 2 B

Stabilita supramolekulárních komplexů oxycelulóзовých matric HL s docetaxelem a kinetika uvolňování docetaxelu v HL s 10 % docetaxelu

Kinetika uvolňování docetaxelu z celulózových matric HL a jejich stabilita byla sledována pomocí absorpční spektroskopie v intervalu 220 až 500 nm. Délka kroku byla 1 nm a rychlost 100 nm/min. Pro měření byly použity plastové kyvety pro UV oblast. Měření bylo provedeno při pH 7,4 a 5,5 v PBS (10mM fosfátový pufr, 0,137M NaCl a 0,0027M KCl). Do jednotlivých kyvet

5 bylo naváženo 8 mg modifikovaných matric s obsahem 10 % hmotn. docetaxelu, zalito 19,2 ml PBS a následně uzavřeno parafilmem. Byla pozorována stabilita vázaného docetaxelu (viz obr. 4).

10 Příklad 2 C

Stabilita supramolekulárních komplexů oxycelulózových matric CaL s docetaxelem a kinetika uvolňování docetaxelu v CaL s 10 % docetaxelu

15 Kinetika uvolňování docetaxelu z celulózových matric CaL a jejich stabilita byla sledována pomocí absorpční spektroskopie v intervalu 220 až 500 nm. Délka kroku byla 1 nm a rychlost 100 nm/min. Pro měření byly použity plastové kyvety pro UV oblast. Měření bylo provedeno při pH 7,4 a 5,5 v PBS (10mM fosfátový pufr, 0,137M NaCl a 0,0027M KCl). Do jednotlivých kyvet bylo naváženo 8 mg modifikovaných matric s obsahem 10 % hmotn. docetaxelu, zalito 19,2 ml

20 PBS a následně uzavřeno parafilmem. Byla pozorována vysoká stabilita vázaného docetaxelu (viz obr. 5).

Během rozpadu celulózových matric dochází k uvolňování jednotlivých vláken do roztoku. Daný jev se projeví změnou absorpčního spektra oproti spektru naměřenému v čase t_0 . Pokud nejsou

25 v daném čase pozorovány významné změny oproti t_0 , lze danou matici považovat v tomto čase za stabilní. Stabilita testovaných matric je dostatečně velká pro uplatnění obou mechanismů uvolňování léčiv. Kompletní uvolnění léčiva v organismu lze očekávat do jednoho měsíce po aplikaci oxycelulózy do organismu.

30 Pro všechny typy matric byla pozorována vysoká stabilita vázaného docetaxelu. Během studované doby bylo pozorováno uvolnění docetaxelu z oxycelulózy pouze pro HL při pH 5,5, a to v průběhu 94 hodin (viz obrázek 4B). Množství volného docetaxelu odpovídající dané absorbanci se však v PBS rozpustí již během 2 hodin.

35

Příklad 3

PAMPA studie supramolekulárních komplexů celulózových matric (HD, HL a CaL) s docetaxelem

40

Vliv oxycelulózových matric na propustnost léčiv přes buněčnou membránu byl studován pomocí PAMPA testu (Paralelní umělý membránový systém pro stanovení propustnosti). PAMPA obsahuje umělou fosfolipidovou membránu používanou jako model buněčné membrány. Propustnost látek, např. léčiv přes PAMPA membránu silně koreluje s propustností přes

45 buněčnou membránu. Do spodní (akceptorové) části PAMPA bylo přidáno 300 μ l PBS (10mM fosfátový pufr, 0,137 M NaCl a 0,0027M KCl). Poté do vrchní (donorové) části PAMPA byla přidána modifikovaná oxycelulóza s 10 % hmotn. docetaxelu, nebo nemodifikovaná oxycelulóza či samotný docetaxel a 200 μ l PBS. Po 5 hodinách experimentu byl odebrán alikvotní podíl roztoků z akceptorové a donorové části PAMPA a poté byla změřena jejich absorbance v maximu vlnové délky docetaxelu. Procentuální obsah prošlého léčiva, nebo oxycelulózové matrice byl

50 spočítán pomocí následující rovnice. $A_{\text{spodního roztoku}} / (A_{\text{spodního roztoku}} + A_{\text{horního roztoku}})$

Výsledky provedených experimentů ukazují, že oxycelulózová matrice má pozitivní vliv na průchod léčiv přes PAMPA membránu (viz obrázek 6), a tudíž i velmi pravděpodobně přes

55 buněčnou membránu. Tím pádem lze očekávat, že in vivo po enzymatickém rozkladu

oxycelulózové matrice taxolové léčivo ve formě supramolekulárního rozpustného komplexu bude efektivně vstřebáváno buňkami tumorové tkáně i z toho důvodu, že rakovinné buňky, které tvoří menšinu z celkové buněčné populace, mají lepší prostupnost pro biopolymery než normální zdravé buňky. Dá se tedy předpokládat, že tato formulace může dále výrazně přispět k selektivitě použitých léčiv. Výše jednoznačně ukazuje výrazně pozitivní vliv testovaných oxycelulózových matric na terapeutickou efektivitu použitých léčiv. Propustnost docetaxelu v supramolekulárním komplexu s oxycelulózou byla zvýšena o 6 %.

10 Příklad 4

Příprava Nu-nu myši s lidským karcinomem a následná chirurgická léčba.

15 Holé imunodeficientní myši postrádají T-lymfocyty v důsledku absence brzlíku, takže nemohou vytvořit imunologickou odezvu na cizí tkáň. Proto je možná xenotransplantace buněk lidského karcinomu.

20 Buněčné rakovinné linie (lidský nádor prsu – BT-474, slinivky - PATU) byly vytvořeny transfekcí buněk. Buňky karcinomu prsu a slinivky byly udržovány v T-mediu doplněném 5% fetálním bovinním sérem. Všechny buňky byly udržovány při 5 % CO₂ (V/V) při 37 °C ve zvlhčené atmosféře. Všechny experimenty byly prováděny na buňkách v exponenciální růstové fázi.

25 Podkožní implantace buněk lidského karcinomu do boků imunodeficientních nahých nu-nu myši (samice, bezthymové, věk 6 týdnů, váha 18 až 20 g). Nádorové buňky (1×10^7) byly resuspendovány v 0,1 ml PBS a 0,1 ml Matrigelu (BD Biosciences) a aplikovány podkožně do boku myši pomocí inzulinové stříkačky a jehly velikosti 27.

30 Jakmile dosáhla nádorová masa velikosti cca 5x5 až 5x8 mm, bylo zahájeno operativní chirurgické odstranění nádoru z 95 až 97 % a měření velikosti nádorů.

Příklad 5

35 Aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matric s docetaxelem po chirurgické léčbě nu-nu myši s PATU lidským karcinomem pankreatu

Příklad 5 A

40

Vnitrotělová topická aplikace

45 Imunodeficientní holé nu-nu myši, připravené a chirurgicky léčené dle příkladu 4, tedy s odstraněným nádorem pankreatu, byly rozděleny do 10 experimentů po 6 myších. Skupina A tvořila 2 experimenty, byla jako kontrolní bez jakékoli další aplikace. Ostatním skupinám byly látky podány lokálně, ve formě prášku do místa vyoperovaného nádoru. Skupině B byl podán samotný docetaxel v množství 0,5 mg, tvořila také 2 experimenty. Skupině C byla v experimentu 1 podána oxycelulóza HL a v experimentu 2 oxycelulóza CaL, vždy v množství 4,5 mg. Skupině D8 byl ve dvou experimentech podán supramolekulární komplex oxycelulózy CaL s docetaxelem a ve skupině D9 ve dvou experimentech podán supramolekulární komplex oxycelulózy HL s docetaxelem, v množství 5 mg s 10 % hmotn. obsahem docetaxelu, což odpovídá množství samotného docetaxelu.

55 Následně byla velikost nádoru monitorována a měřena po 50 dnech po chirurgickém zákroku.

Byla sledována inhibice opětovného růstu nádoru v závislosti na podané látce. Byl vyhodnocen vliv lokální vnitrotělové topické aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matic s cytostatiky, samotnou oxycelulózou a samotnými cytostatiky na opětovný růst nádoru, resp. případnou eliminaci residuální nádorové tkáně. Výrazný terapeutický efekt byl pozorován pro topickou vnitrotělovou aplikaci oxycelulózových komplexů projevující se výrazně omezeným růstem nádoru. Tento přístup představuje významný přínos oproti kontrolním experimentům v konečném objemu nádoru. Změny ve velikosti tumoru byly použity pro stanovení protinádorové aktivity. Bylo zjištěno, že supramolekulární komplex oxycelulóz s docetaxelem při vnitrotělové topické aplikaci má schopnost omezovat nárůst karcinomu až na 18 % oproti pouze chirurgické léčbě a až na 29 % oproti chirurgické léčbě s následným podáním samotného docetaxelu. Také mortalita komplexu je poměrně nízká v rozmezí 22 až 28 %. Podrobné výsledky prezentuje tabulka na obr 7.

15 Příklad 5 B

Perorální aplikace

Imunodeficientní holé nu-nu myši, připravené a chirurgicky léčené dle příkladu 4, tedy s odstraněným nádorem pankreatu, byly rozděleny do 5 experimentů po 3 myších. Skupina A byla jako kontrolní bez jakékoli další aplikace. Ostatním skupinám byly látky podávány orálně přímo do žaludku. Skupině B byl podáván samotný docetaxel v množství 0,5 mg, skupině C byla v experimentu 1 podána oxycelulóza HL a v experimentu 2 oxycelulóza CaL, vždy v množství 4,5 mg. Skupině D8 byl podáván supramolekulární komplex oxycelulózy CaL s docetaxelem a v skupině D9 byl podán supramolekulární komplex oxycelulózy HL s docetaxelem, v množství 5 mg s 10 % hmotn. obsahem docetaxelu, což odpovídá množství samotného docetaxelu.

Velikost nádoru byla monitorována a měřena po 50 dnech po chirurgickém zákroku.

30 Byla sledována inhibice opětovného růstu nádoru především jako porovnání vůči vnitrotělové topické aplikaci.

Byl vyhodnocen vliv orální a vnitrotělové topické aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matic s cytostatiky, samotnou oxycelulózou a samotnými cytostatiky na opětovný růst nádoru, resp. případnou eliminaci residuální nádorové tkáně. Změny ve velikosti tumoru byly použity pro stanovení protinádorové aktivity. Bylo zjištěno, že supramolekulární komplex oxycelulóz s docetaxelem při orální aplikaci má pouze 48% schopnost omezovat nárůst karcinomu oproti pouze chirurgické léčbě a inhibice nárůstu karcinomu oproti aplikaci docetaxelu v supramolekulárním komplexu s oxycelulózou se snížila pouze na 76 %. Mortalita komplexu při orálním podání byla poměrně značná, a to 52 %. Podrobné výsledky prezentuje tabulka na obr. 8.

45 Porovnání aplikace ve formě orální a vnitrotělové topické pooperační aplikace prokázalo výhodnost topické aplikace, protože orální aplikace byla spojena s mortalitou o 24 až 30 % vyšší a především pozorovaný nárůst velikosti tumoru byl cca 25 až 31 % oproti topické aplikaci.

Příklad 6

50 Aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matic s docetaxelem po chirurgické léčbě nu-nu myši s BT-474 lidským karcinomem prsu

Příklad 6 A

Vnitrotělová topická aplikace

5 Imunodeficientní holé nu-nu myši, připravené a chirurgicky léčené dle příkladu 4, tedy s odstraněním nádoru prsu, byly rozděleny do 10 experimentů po 6 myších. Skupina A tvořila 2 experimenty, byla jako kontrolní bez jakékoli další aplikace. Ostatním skupinám byly látky podány lokálně, ve formě prášku do místa vyoperovaného nádoru. Skupině B byl podán samotný docetaxel v množství 0,5 mg, tvořila také 2 experimenty. Skupině C byla v experimentu 1 podána oxycelulóza HL a v experimentu 2 oxycelulóza CaL, vždy v množství 4,5 mg. Skupině D8 byl ve dvou experimentech podán supramolekulární komplex oxycelulózy CaL s docetaxelem a ve skupině D9 ve dvou experimentech podán supramolekulární komplex oxycelulózy HL s docetaxelem, v množství 5 mg s 10 % hmotn. obsahem docetaxelu, což odpovídá množství samotného docetaxelu.

15 Následně byla velikost nádoru monitorována a měřena po 50 dnech po chirurgickém zákroku.

Byla sledována inhibice opětovného růstu nádoru v závislosti na podané látce. Byl vyhodnocen vliv lokální vnitrotělové topické aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulóзовých matic s cytostatiky, samotnou oxycelulózou a samotnými cytostatiky na opětovný růst nádoru, resp. případnou eliminaci residuální nádorové tkáně. Výrazný terapeutický efekt byl pozorován pro topickou vnitrotělovou aplikaci oxycelulóзовých komplexů projevující se výrazně omezeným růstem nádoru. Tento přístup představuje významný přínos oproti kontrolním experimentům v konečném objemu nádoru. Změny ve velikosti tumoru byly použity pro stanovení protinádorové aktivity. Bylo zjištěno, že supramolekulární komplex oxycelulóz s docetaxelem při vnitrotělové topické aplikaci má schopnost omezovat nárůst karcinomu až na 11 % oproti pouze chirurgické léčbě a až na 21 % oproti chirurgické léčbě s následným podáním samotného docetaxelu. Také mortalita pokusných myši po vnitrotělové topické aplikaci komplexu je poměrně nízká, v rozmezí 24 až 28 %. Podrobné výsledky prezentuje tabulka na obr. 9.

30

Příklad 6 B

Perorální aplikace

35

Imunodeficientní holé nu-nu myši, připravené a chirurgicky léčené dle příkladu 8, tedy s odstraněním nádoru prsu, byly rozděleny do 5 experimentů po 3 myších. Skupina A byla jako kontrolní bez jakékoli další aplikace. Ostatním skupinám byly látky podávány orálně přímo do žaludku. Skupině B byl podáván samotný docetaxel v množství 0,5 mg, skupině C byla v experimentu 1 podána oxycelulóza HL a v experimentu 2 oxycelulóza CaL, vždy v množství 4,5 mg. Skupině D8 byl podáván supramolekulární komplex oxycelulózy CaL s docetaxelem a ve skupině D9 byl podán supramolekulární komplex oxycelulózy HL s docetaxelem, v množství 5 mg s 10 % hmotn. obsahem docetaxelu, což odpovídá množství samotného docetaxelu.

45 Velikost nádoru byla monitorována a měřena po 50 dnech po chirurgickém zákroku.

Byla sledována inhibice opětovného růstu nádoru především jako porovnání vůči vnitrotělové topické aplikaci.

50 Byl vyhodnocen vliv orální a vnitrotělové topické aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulóзовých matic s cytostatiky, samotnou oxycelulózou a samotnými cytostatiky na opětovný růst nádoru, resp. případnou eliminaci residuální nádorové tkáně. Výrazný terapeutický efekt byl pozorován pro topickou vnitrotělovou aplikaci oxycelulóзовých komplexů projevující se výrazně omezeným růstem nádoru. Tento přístup představuje významný přínos oproti kontrolním experimentům v konečném objemu nádoru. Změny ve velikosti tumoru byly použity

55

pro stanovení protinádorové aktivity. Bylo zjištěno, že supramolekulární komplex oxycelulóz s docetaxelem při orální aplikaci má pouze 27% schopnost inhibovat nárůst karcinomu oproti pouze chirurgické léčbě a o 47 až 53 % vyšší schopnost inhibovat nárůst karcinomu oproti aplikaci samotného docetaxelu. Mortalita komplexu při orálním podání byla poměrně značná, a to 59 až 61 %. Podrobné výsledky prezentuje tabulka na obr. 10.

Porovnání aplikace ve formě orální a vnitrotělové topické pooperační aplikace prokázalo výhodnost topické aplikace, protože orální aplikace byla spojena s mortalitou o 33 až 35 % vyšší a především pozorovaný nárůst velikosti tumoru byl cca 1 až 10 % oproti topické aplikaci.

Příklad 7

Studium efektivity terapie komplexu oxycelulózové matrice s cytostatiky na tkáňových kulturách nádorových buněk *in vitro*

Linie nádorových buněk solidních tumorů byly získány od ETCC. Všechny buňky byly pěstovány exponenciálně v médiu RPMI 1640 s 10 % fetálního telecího séra v 35mm Petriho miskách. Pro experimenty byly buňky kultivovány v čistém růstovém médiu po dobu 16 hodin pro dosažení exponenciální fáze růstu. Poté bylo naočkováno 5×10^5 buněk do 1,8 až 2 cm jamek a inkubováno 16 hodin v růstovém médiu se supramolekulárním komplexem oxycelulózy CaL a docetaxelu. Po promytí byla buněčná smrt pozorována s DM IRB Leica mikroskopem s DFC 480 fotoaparátem pomocí imerzního X63 oleje a filtru Leica krychle N2.1.

Sledována byla mortalita buněk v tkáňových kulturách po ovlivnění samotným docetaxelem v porovnání s CaL oxycelulózovým komplexem s 10 % hmotn. docetaxelu v čase 24 hodin po aplikaci. CaL oxycelulózový komplex s docetaxelem byl v koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ růstového média. Buněčná mortalita byla stanovena sulforhodamin B (SRB) testem, alternativně vylučovacím barvením trypanovou modří, výsledky vyjádřeny jako % usmrcených buněk z celkového počtu jednotlivých buněčných linií na obr. 11, kde je viditelné, že protinádorová aktivita v daných podmínkách je u CaL oxycelulózového komplexu s docetaxelem u některých nádorových buněčných linií až třikrát vyšší.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s taxolovým derivátem s postupným uvolňováním taxolového derivátu, vyznačující se tím, že obsahuje 5 až 30 % hmotn. paclitaxelu nebo docetaxelu nekovalentně vázaného na oxycelulózovou matrici.

2. Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s taxolovým derivátem s postupným uvolňováním taxolového derivátu podle nároku 1, vyznačující se tím, že oxycelulózová matrice je oxidovaná celulóza.

3. Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s taxolovým derivátem s postupným uvolňováním taxolového derivátu podle nároku 2, vyznačující se tím, že oxidovaná celulóza je v lintrové kyselé formě.

4. Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s taxolovým derivátem s postupným uvolňováním taxolového derivátu podle nároku 2, vyznačující se tím, že oxidovaná celulóza je ve formě vápenaté soli.

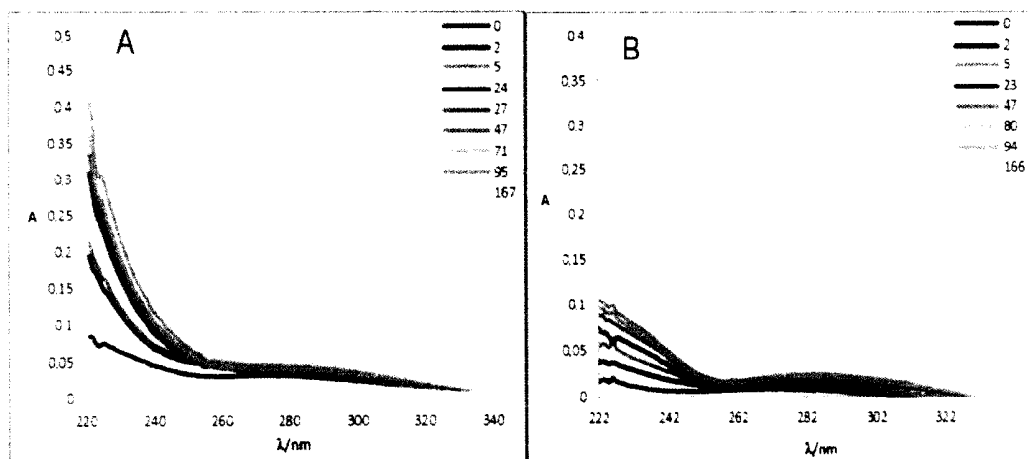
5. Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s taxolovým derivátem s postupným uvolňováním taxolového derivátu podle nároku 2, vyznačující se tím, že oxidovaná celulóza je v textilní pletené formě.
- 5 6. Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s taxolovým derivátem s postupným uvolňováním taxolového derivátu podle nároku 1, vyznačující se tím, že obsahuje 10 % hmotn. taxolového derivátu.
- 10 7. Použití supramolekulárního komplexu oxycelulózové matrice s taxolovým derivátem s postupným uvolňováním taxolového derivátu podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro topickou cytostatickou léčbu nádorové tkáně.
- 15 8. Použití supramolekulárního komplexu oxycelulózové matrice s taxolovým derivátem s postupným uvolňováním taxolového derivátu podle nároku 7, kdy topickou cytostatickou léčbou nádorové tkáně je pooperační vnitrotělová topická aplikace na reziduální nádorové buňky/tkán po chirurgickém zákroku.

voda				
Obsah docetaxelu v modifikované celulóze				
modifikovaná celulóza	navážka docetaxel (mg)	hm. %	mg	% z navážky
HL	6	5,03	5,28	88,03
HD	6	4,87	5,11	85,23
CaL	6	4,96	5,21	86,80
HL	13	10,11	11,12	85,55
HD	13	9,97	10,97	84,36
CaL	13	10,06	11,07	85,12
HL	43	30,02	39,03	90,76
HD	43	29,99	38,99	90,67
CaL	43	30,16	39,21	91,18

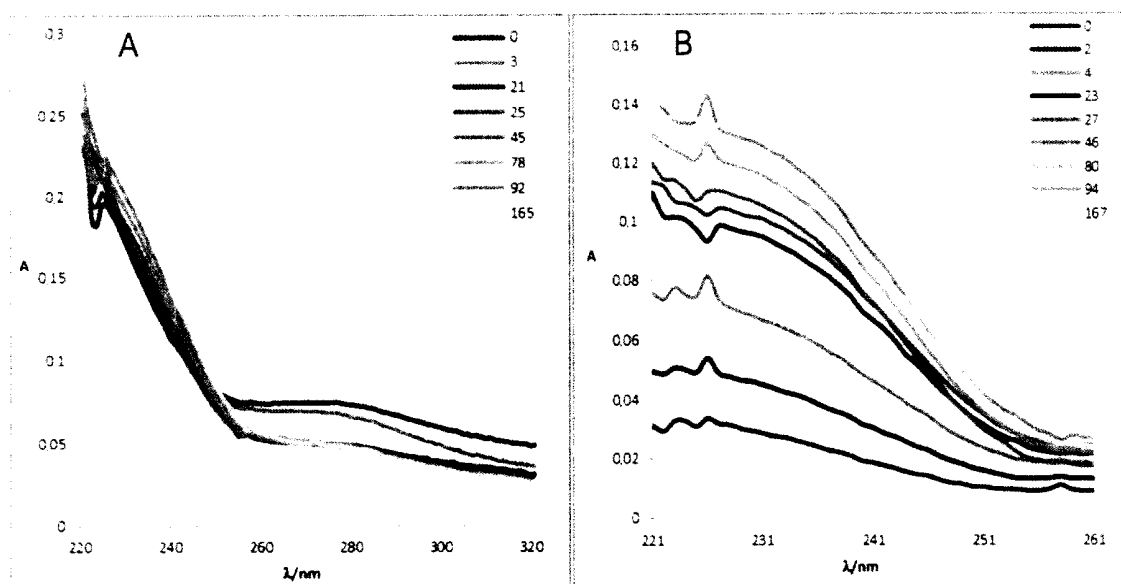
Obr. 1

EtOH/voda (2:1)				
Obsah docetaxelu v modifikované celulóze				
modifikovaná celulóza	navážka docetaxel (mg)	hm. %	mg	% z navážky
HL	6	4,83	5,07	84,53
HD	6	4,72	4,96	82,60
CaL	6	4,93	5,18	86,28
HL	13	10,03	11,03	84,87
HD	13	9,33	10,26	78,95
CaL	13	9,82	10,80	83,09
HL	43	30,34	39,44	91,73
HD	43	29,87	38,83	90,30
CaL	43	30,19	39,25	91,27

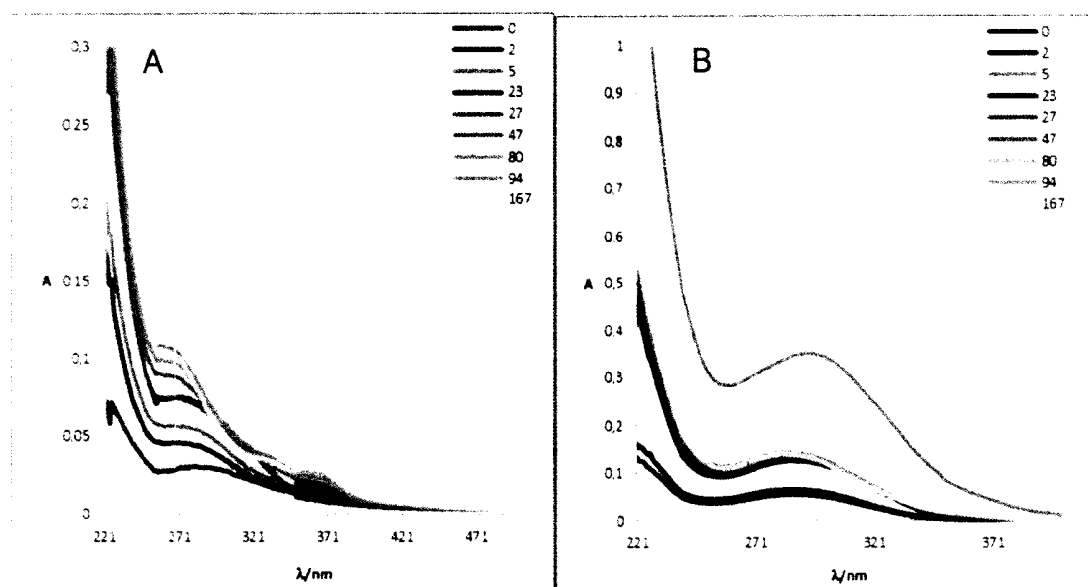
Obr. 2



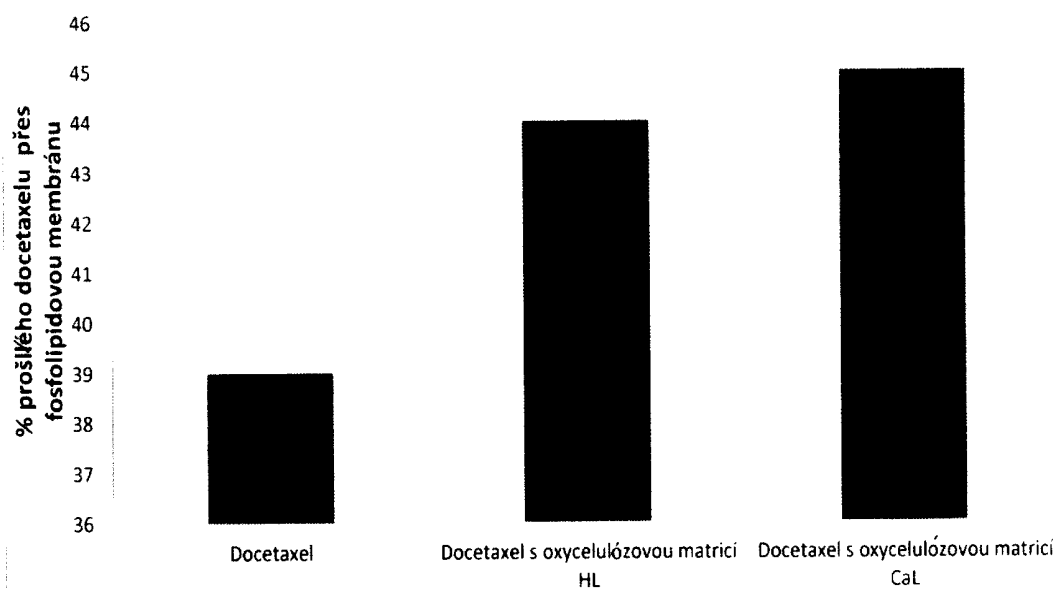
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6

OXYCELULOZA S DOCETAHELEM TOPICKÁ APLIKACE NA PATU

nunu myši, carcinom pankreatu

PATU

pokusná skupina	aplikovaná látka	exp. číslo	hmotnost nádoru (g)		% nárůst nádoru oproti		mortalita	snížení mortality		průměr snížení mortality
			na začátku pokusu	na konci pokusu	kontrola	docetaxelu	%	supramolekulárního komplexu	lečiva oproti samotnému léčivu	%
A1	kontrola, bez aplikace	1	0,1323	8,56			100			
		2	0,1471	8,12			100			
B3	docetaxel 0,5mg	1	0,1406	5,10	59,58		75			
		2	0,1509	4,90	60,34		72			
C5	OKCEL-HL 4,5 mg	1	0,1483	5,65			85			
		2	0,1341	5,59			86			
D8	OKCEL-Cal + docetaxel (5mg)	1	0,1274	1,99	23,25	39,02	25	67		
		2	0,1427	1,44	17,73	29,39	23	68		67
D9	OKCEL-HL + docetaxel (5mg)	1	0,1339	1,99	23,25	39,02	27	71		
		2	0,1523	1,93	23,77	39,39	28	61		66

Obr. 7

OXYCELULOZA S DOCETAXELEM ORÁLNÍ APLIKACE na PATU

Orální aplikace (přímo do žaludku, pro srovnání s topickou aplikací)
nunu-mýši, karcinom pankreatu PATU

pokusná skupina	aplikovaná látka	exp číslo	hmotnost nádoru (g) odebraného		% nárůst nádoru oproti		mortalita %	snížení mortality supramolekulárního komplexu léčiva oproti samotnému léčivu %
			na začátku pokusu	na konci pokusu	kontrola	docetaxelu		
A1	kontrola, bez aplikace	1	0,13	8,27			100	
		2					100	
B3	docetaxel - 0,5mg	1	0,12	5,23	63,24		85	
C5	OKCEL-HL 4,5 mg OKCEL-Cal 4,5 mg	1	0,15	6,12			91	
		2	0,15	5,99			89	
D8	OKCEL-Cal + docetaxel (5mg)	1	0,13	3,99	48,25	76	52	39
D9	OKCEL-HL + docetaxel (5mg)	1	0,16	4,01	48,49	77	52	39

Obr. 8

OXYCELULOZA S DOCETAXELEM TOPICKÁ APLIKACE na BT-474

nunu-mýši, karcinom prsu

BT-474

pokusná skupina	aplikovaná látka	exp číslo	hmotnost nádoru (g) odebraného		% nárůst nádoru oproti		mortalita %	snížení mortality supramolekulárního komplexu léčiva oproti samotnému léčivu, průměr snížení mortality %	
			na začátku pokusu	na konci pokusu	kontrola	docetaxelu		%	%
A1	kontrola, bez aplikace	1	0,188	9,56			100		
		2	0,21	8,88			100		
B3	docetaxel - 0,5mg	1	0,152	4,29	44,87		61		
		2	0,154	4,99	56,19		63		
C5	OKCEL-HL 4,5 mg OKCEL-Cal 4,5 mg	1	0,153	6,95			88		
		2	0,161	6,44			89		
D8	OKCEL-Cal + docetaxel (5mg)	1	0,137	1,27	13,28	29,60	28	54	
		2	0,147	1,04	11,71	20,84	27	57	56
D9	OKCEL-HL + docetaxel (5mg)	1	0,149	1,09	11,40	25,41	25	59	
		2	0,161	1,11	12,50	22,24	24	62	60

Obr. 9

OXYCELLULOZA S DOCETAHELEM ORÁLNÍ APLIKACE na BT 474

Orální aplikace přímo do žilního proudu nádoru v žilní síti aplikace
mucopolysacharidový kationomerní

BT 474

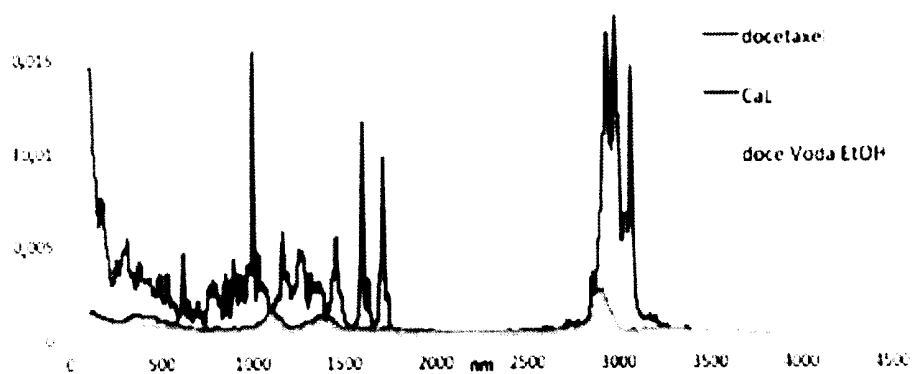
přijímání léčiva	aplikovaná dávka	exp. číslo (C)	hmotnost nádoru (g)		% hmotnosti nádoru (kontrola)		mortalita (%)	
			na začátku pokusu	na konci pokusu	kontrola	doctaxel + oxy	kontrola	oxy
A1	kontrola bez aplikace	1	0,18	9,16			100	
B3	doctaxel 0,5mg	1	0,15	5,25	57,81		75	
C5	OXYCEL HL 4,5 mg OXYCEL Ca 4,5 mg	1	0,15	7,12			91	
D8	OXYCEL Ca + doctaxel (0,5mg)	1	0,18	2,79	30,46	53	62	64
D9	OXYCEL HL + doctaxel (0,5mg)	1	0,14	2,49	27,18	47	54	55

Obr. 10

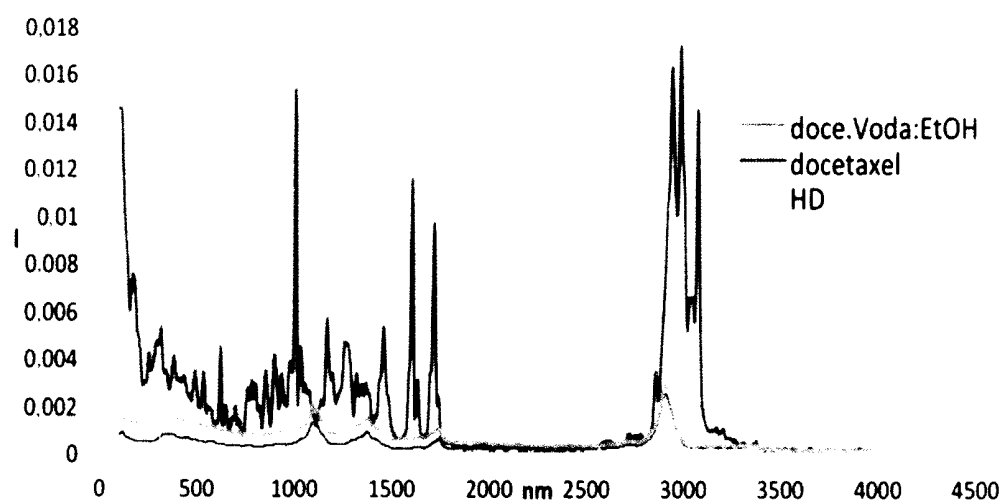
Typ nádoru	docetaxel + komplex	
	Mortalita buněk v %	
MDA-MB-231 lidský adenokarcinom prsu	38	52
A431 lidský epidermoidní karcinom	42	68
A549 lidský adenokarcinom plic	28	59
LNCaP lidský karcinom prostaty	42	71
HCT 116 lidský karcinom tlustého střeva	48	82
CAPAN-2 lidský karcinom pankreatu	21	72
PATU lidský karcinom pankreatu	48	79
BT-474 lidský nádor prsu	49	81
U-2 OS lidský osteosarkom	17	44
HeLa lidský karcinom děložního čípku	52	80

Obr. 11

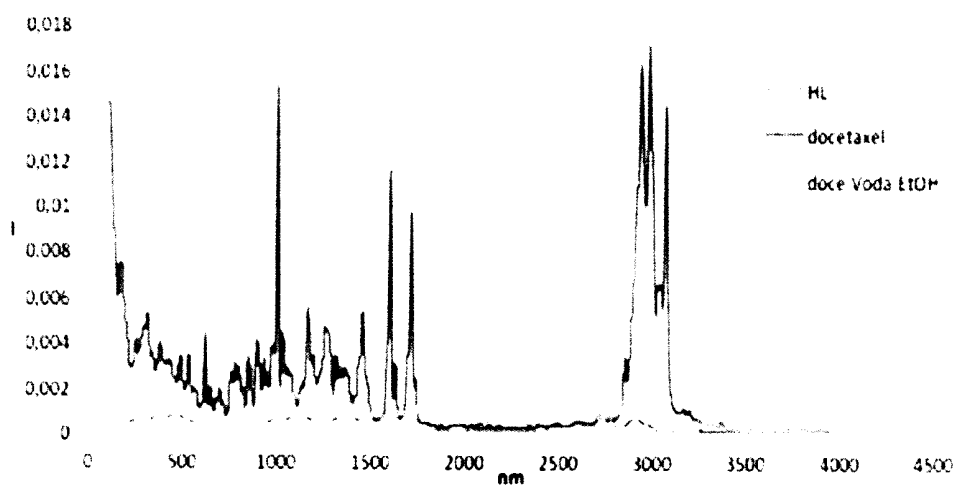
102



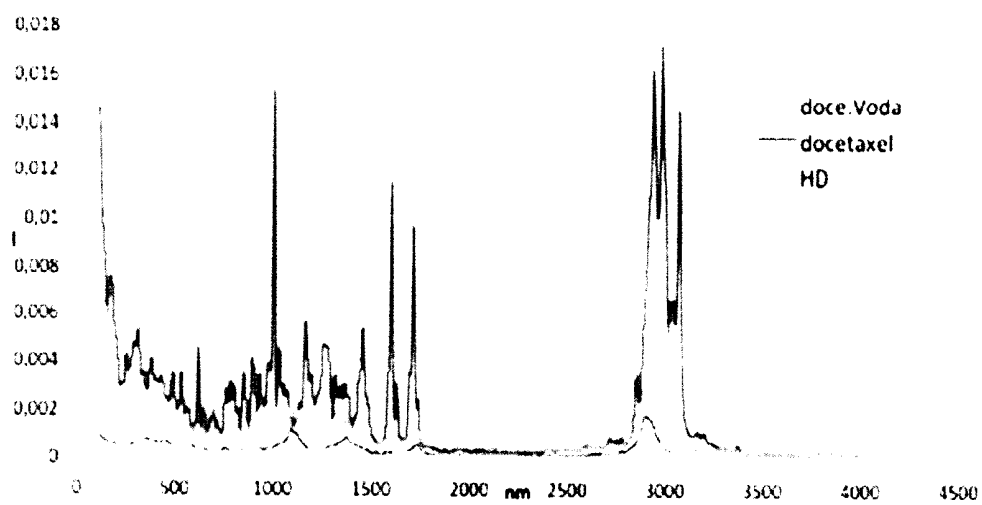
Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14



Obr. 15