

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2017-634

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/38 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.10.2017**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **22.05.2019**
(Věstník č. 21/2019)

(71) Přihlašovatel:
Synthesia, a.s., Pardubice, CZ

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

(74) Zástupce:
PATENT SKY s.r.o., Karlovarská 814/115, 161 00
Praha 6, Řepy

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Supramolekulární komplex oxycelulózové
matrice s platinovým metalokomplexem
s postupným uvolňováním platinového
metalokomplexu a jeho použití**

(57) Anotace:
Předmětem řešení je supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s platinovým metalokomplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu, který obsahuje 5 až 30 % hmotn. platinového metalo-komplexu, který je s výhodou cisplatina, nekovalentně vázaného na oxycelulózovou matici, která je tvořena oxidovanými formami celulózy s vysokými terapeutickými účinky při topických vnitrotělových aplikacích do reziduální nádorové tkáně po chirurgickém odstranění.

CZ 2017 - 634 A3



Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s platinovým metalokomplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu a jeho použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových supramolekulárních komplexů oxycelulózových matic s protinádorovými léčivými na bázi platinových metalo-komplexů a jejich pooperační vnitrotělové aplikace pro eliminaci reziduálních nádorových buněk/tkáně po chirurgickém zákroku. Předložená metodika eliminuje riziko jak metastáz tak opakovaného růstu nádoru v původním místě.

15 Stav techniky

Komplikace při chirurgickém odstranění solidních tumorů jsou jak metastázy (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.

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 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 různě 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 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 jakou jsou taxolové deriváty (např. docetaxel) a tudíž omezenou aplikovatelností nebo s vysokými vedlejšími účinky 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 cisplatinu a podstatnou redukci kardiotoxicity doxorubicinu.

55 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

volného léčiva. Na bázi polysacharidových polymerů, včetně oxycelulózy byla připravena a studována celá řada slibných excipientů včetně multifunkčních (někdy zvaných smart excipients). Potencionální výhodou 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 chronickým ran, modulace imunitního systému a pro své protinádorové účinky.

10

(Jan Gajdziok, David Vetchý *Oxidized Cellulose and its Pharmaceutical and Medical Application Cellulose and Cellulose Derivatives Syntheses, Modification and Applications Nova Science Publishers, Inc New York 2015; Schmidt, R., Bogan, D., Moore, J. (2001). Use of oxidized cellulose as free radical scavenger. European Patent EP1153618; Watt, P. W., Harvey, W., Lorimer, E., Wiseman, D. (1998). Use of oxidized cellulose and complexes thereof for chronic wound healing. World Patent WO9800180. ; Jelínková, M., Briestenský, J., Santar, I., Říhová, 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. (1998). Cellulose derivatives. World Patent WO9833822; 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. United States Patent US5405953; Otterlei, M., Espvik, T., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O. (1992) Diequatorially bound beta 1-4 polyuronates and use of same for cytokine stimulation. United States Patent US5169840; Doyle P. J., Saferstein L., Lorimer E., Watt P. W. (1998). Oxidized Oligosaccharides. World Patent WO9800446; Bajerová, M., Krejčová, K., Rabišková, M., Gajdziok, J., Masteiková, R. (2009). Oxycellulose – significant characteristics in relation to its pharmaceutical and medical applications. Adv. Polym. Tech. 28(3), 199-208; Banker, G. S., Kumar, V. (1998) Oxidized cellulose. United States Patent US5780618), (Leidgens V, Seliger C, Jachnik B, Welz T, Leukel P, Vollmann-Zwerenz I, Bogdahn U, Kreutz M, Grauer OM, Hau P *Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. PLoS One. 2015 Oct 20;10(10):e0140613; Chai AC, Robinson AL, Chai KX, Chen LM. Ibuprofen regulates the expression and function of membrane-associated serine proteases prostasin and matriptase BMC Cancer. 2015 Dec 29;15:1025. doi: 10.1186/s12885-015-2039-6; da Silveira EF1, Chassot JM, Teixeira FC, Azambuja JH, Debom G, Beira FT, Del Pino FA, Lourenço A, Horn AP, Cruz L, Spanevello RM, Braganhol E. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme Invest New Drugs. 2013 Dec;31(6):1424-35. doi: 10.1007/s10637-013-0016-y. Epub 2013 Sep 27; 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 culture of colon and cervix cancer cell lines Bratisl Lek Listy. 2015;116(4):227-32), Kněžková, Barbora. Moderní protinádorová léčiva. 2008. PhD Thesis. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.**

35

40

45

Aplikace oxycelulózoých 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; 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*

55

and eukaryotic cells Grumezescu, Alexandru Mihai; Andronescu, Ecaterina; Ficai, Anton; Bleotu, Coralia; 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 léčivými (Soo, B. Chia; Ting, Kang; Wu, Ben; Zhang, Kevin *Transcutaneous multimodal delivery systems comprising dissolvable microneedles* PCT Int. Appl. (2012), WO 2012103257 A2 20120802), nebo její kombinaci s chitosanem (Viieira, D. B.; Kim, V.; Petri, D. F. S.; Menck, C. F. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. Edited By: 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, United States, June 13-16, 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* U.S. Pat. Appl. Publ. (2014), US 20140105884 A1 20140417)

Patentový dokument WO 2007147052 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, amorolfin, butenafin, jejich deriváty, acyklovir, nepolymerní inhibitor krystalizace - hydroxykarboxylovou kyselinu, těkavé 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; kopolymeru kyseliny polyglykolové a kyseliny glykolové; polifeprosan; ethylen-vinylacetátu; di-mastná kyselina a kopolymer kyseliny sebakové; poly(erukové dimer kyseliny - kyselina sebaková) kopolymer; poly (kyselina fumarová - kopolymer kyseliny sebakové). Suspendední činidla 0.0-30%: sodné soli karboxymethylcelulózy, jodu glycerin, dimethikon, propylenglykol, karbomer, mannitol, sorbitol, povrchově aktivní látky, jeden z Tween 20, Tween 40 a Tween 80, nebo jejich kombinace, inhibitor je vybrán z gefitinib, erlotinib, lapatinib, karboxy-amino-triazolu, thalidomid, angiostatin, endostatin, endostatin, imatinib mesylát, kanamycin, erlotinib, sorafenib, imatinib. Cytotoxické činidlo se vybralo z platiny Nida, melfalan, cyklofosamid, 4H peroxid vinorelbin, tamoxifen, metotrexát, doxorubicin, epirubicin, aktinomycin D, estramustin, semustin nebo ranimustin.

Příhláška vynálezu EP1491188 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, preneoplastických kožních onemocnění, zánětů kůže a / nebo sliznice a photoaging.

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 platinových metalo-komplexů, nekovalentně vázaného na oxycelulóзовou matici, a to topicky přímo do rány po odstranění tumoru.

Vynález se týká nové metody topické vnitřetělové aplikace stabilních supra-molekulárních komplexů oxycelulózových matic s platinovými metalo-komplexy – cytostatiky, jako je s výhodou Cisplatina, Karboplatina nebo Oxaliplatina.

5 Byla vytvořena kompozice pro pooperační vnitřetělové topické aplikace sestávající z modifikované oxycelulózy a platinových metalo-komplexů pro eliminaci nádorové tkáně/buněk po chirurgickém zákroku. Kompozice umožňuje řízené postupné uvolňování léčiva v nádoru nebo jeho reziduí a tím vede k eliminaci zbytkové nádorové tkáně a zabraňuje jejímu rapidnímu nárůstu po klasickém i laparoskopickém zákroku.

10 Kompozice je tvořena supra-molekulárními komplexy oxycelulózových matic s výhodou ve formě HD, HL a CaL s platinovými metalo-komplexy s výhodou s cisplatinou (cis-Pt).

15 Oxycelulózová 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 oxycelulózové matrice vstřebávají bez jakýchkoli zbytků, jsou biologicky odbouratelné, v průběhu rozkladu vznikají netoxické produkty a jsou plně biokompatibilní. Díky nízkému pH působí antibakteriálně.
20 Pomáhají s regenerací tkáně, tedy i se zvýšením léčebných účinků.

Platinové komplexy jsou jedním z neúčinnějších a nejběžněji používaných cytostatik v léčbě řady karcinomů, zejména karcinomů varlat, ovaria, hlavy, krku, močového měchýře a malobuněčného karcinomu plic. Jedná se o jednoduchou anorganickou sloučeninu –
25 $[cisPt(NH_3)_2Cl_2]$, tedy cis-diamino-dichlor platnatý komplex, řadící se mezi tzv. alkylační cytostatika. Chloridové ligandy mohou být nahrazovány za karboxyláty (karboplatina, oxaliplatina), character ligandu ovlivňuje lipofilitu a distribuci léčiva v organismu (iproplatina). Hlavní mechanismus protinádorového účinku cisplatiny spočívá v její interakci s DNA a v tvorbě kovalentních vazeb mezi cytostatikem a purinovými bázemi, nejčastěji s guaninem. Vzniklé
30 kovalentní vazby mezi řetězci brání jejich separaci při replikaci a zároveň dochází k inhibici transkripce. Tím cisplatina indukuje apoptózu. Přesto, že je cisplatina jedním z nejčastěji používaných cytostatik, její použití je limitováno kvůli vysoké toxicitě.

35 Karboplatina je méně toxická, než cisplatina. Mechanismus účinku je stejný jako u cisplatin, aktivace molekuly je však pomalejší. Oproti cisplatině má mírnější nežádoucí účinky, avšak přispívá k poškození kostní dřeně a je vysoce hematotoxická.

Oxaliplatina má nízkou nefrotoxicitu, vyvolává ale časté nevolnosti, průjemy a zvracení, u
40 léčených pacient způsobuje periferní neuropatii senzitivních nervů.

V případě platinových metalo-komplexů je proces přípravy supra-molekulárního komplexu založen na aktivaci absorpční schopnosti oxycelulózové matrice ponořením do vody a následném
45 přidání roztoku rozpouštědla obsahujícího dané léčivo. Rozpouštědlo je vybráno ze skupiny obsahující methanol, etanol, isopropanol, 2-methoxyethanol, *N,N*-dimethylformamid, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran, acetonitril, aceton nebo jejich směs a jako další voda. 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 oxycelulózovou matici a dané léčivo třepány s výhodou
50 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 oxycelulózových matic nebo jejich roztoků nebyla vyšší než 20 °C.

55 Připravené kompozice sestávají z supramolekulárních struktur oxycelulózových matic a platinových metalo-komplexů, přičemž platinové metalo-komplexy jsou v matici v množství 5

až 30 % hm. Ze strukturních analýz vyplynulo, že platinové metalo-komplexy jsou skutečně nedílnou součástí oxycelulózové 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 platinových metalo-komplexů nedochází předčasně do
5 okolní zdravé tkáně. Dále byla ověřena zvýšená průchodnost přes simulované biologické membrány oproti průchodnosti samotných platinových metalo-komplexů, což je přisuzováno právě supra-molekulární struktuře a zvyšuje se efektivita transportu léčiva přímo dovnitř nádorové tkáně.

10 Pro celulózu 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). V následné fázi dojde k hydrataci povrchu matrice, zvýšení pohyblivosti polymerových řetězců a vzniku nabobtnalého
15 gelu. 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). 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.
20 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.

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

K výhodnosti vnitřetělové topické aplikace bylo dospěno 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 následně aplikaci kompozice jak orálně,
30 v každodenních dávkách, tak jednorázově topicky přímo do místa po vyoperovaném nádoru ve stejné dávce. Porovnání aplikace ve formě orální a vnitřetělové topické pooperační aplikace prokázal výhodnost topické aplikace, protože orální aplikace byla spojena s mortalitou o 9-33 % vyšší a především pozorovaný nárůst velikosti tumoru byl o 34 až 70 % vyšší.

35 Bylo zjištěno, že supermolekulární komplex oxycelulózy s cisplatinou při vnitřetělové topické aplikaci má schopnost inhibovat nárůst karcinomu prsu a pankreatu až na 29 % oproti pouze chirurgické léčbě a na 56 % oproti chirurgické léčbě s následným podáním samotné cisplatiny. Také mortalita pokusných myší při vnitřetělové topické aplikaci komplexu byla o 18 až 37 %
40 nižší oproti podání samotné cisplatiny.

Teprve na základě těchto výsledků bylo dospěno k závěrům použití pouze vnitřetělové topické aplikace platinových metalo-komplexů a pouze ve formě supramolekulárních oxycelulózových struktur, které byly prokázány jako nejšetnější a nejúčinnější.
45

Přehled obrázků na výkresech

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

55 Obr. 2. Tabulka přehledu navážek cisplatin vzhledem k navážkám oxycelulózy, procentuální obsah léčiva v oxycelulóze a loading léčiva do oxycelulózy, kdy jako rozpouštědlo byla použita voda

- 5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
- Obr. 3. Tabulka přehledu navážek cisplatiny vzhledem k navážkám oxycelulózy, procentuální obsah léčiva v oxycelulóze a loading léčiva do oxycelulózy, kdy jako rozpouštědlo byla použita směs aceton/voda (1:1, V/V)
- Obr. 4. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu HL cisplatinou („Cis-Pt-voda“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („HL“)
- Obr. 5. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu HL cisplatinou („Cis-Pt-voda/EtOH“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („HL“)
- Obr. 6. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu HL cisplatinou („Cis-Pt-voda/Acet.“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („HL“)
- Obr. 7. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu HL cisplatinou („Cis-Pt-voda/THF“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („HL“)
- Obr. 8. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu HD cisplatinou („Cis-Pt-voda“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („HD“)
- Obr. 9. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu HD cisplatinou („Cis-Pt-voda/EtOH“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („HD“)
- Obr. 10. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu HD cisplatinou („Cis-Pt-voda/Acet.“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („HD“)
- Obr. 11. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu HD cisplatinou („Cis-Pt-voda/THF“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („HD“)
- Obr. 12. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu CaL cisplatinou („Cis-Pt-voda“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („CaL“)
- Obr. 13. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu CaL cisplatinou („Cis-Pt-voda/EtOH“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („CaL“)
- Obr. 14. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu CaL cisplatinou („Cis-Pt-voda/Acet.“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („CaL“)
- Obr. 15. Porovnání Ramanových spekter pro modifikovanou oxycelulosu CaL cisplatinou („Cis-Pt-voda/THF“, obsah 5 hm. % cisplatiny), čistého léčiva („cisplatina“) a nemodifikované oxycelulózy („CaL“)
- Obr. 16. Vnitrotělová topická aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matic s cisplatinou po chirurgické léčbě nu-nu myši s PATU lidský karcinomem pankreatu

- Obr. 17. Orální aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matric s cisplatinou po chirurgické léčbě nu-nu myši s PATU lidský karcinomem pankreatu
- 5 Obr. 18. Vnitrotělová topická aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matric s cisplatinou po chirurgické léčbě nu-nu myši s BT-474 lidský karcinomem prsu
- Obr. 19. Orální aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matric s cisplatinou po chirurgické léčbě nu-nu myši s BT-474 lidský karcinomem prsu a její porovnání se
10 samotnou cisplatinou a oxycelulózových matric
- Obr. 20. In vitro studie mortality nádorových buněk tkáňových kultur působením samotné cisplatinou v porovnání s jejich oxycelulózovým komplexem
- 15 Obr. 21. Výsledky elementární analýzy modifikované celulózy (CaL, HL a HD) cisplatinou (5 hm. %) pro různé rozpouštědlové systémy

Příklady provedení vynálezu

20

Příklad 1

Příprava a charakterizace supra-molekulárních komplexů oxycelulózových matric (HD, HL a CaL) s cisplatinou

25

Příklad 1A

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

30 6 mg cisplatinou bylo rozpuštěno ve směsi ethanol/voda (1:1, 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 (1:1, 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 % cisplatinou s přesnými hodnotami hmotnostních
35 koncentrací dle obr. 1.

13 mg cisplatinou bylo rozpuštěno ve směsi ethanol/voda (1:1, 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 (1:1, V/V; 3 ml), vodou (3 ml) a následně
40 vysušena za vysokého vakua při teplotě 20 °C. Elementární analýzou bylo stanoveno, že na oxycelulózu bylo navázáno přibližně 9,5 % cisplatinou s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 1.

43 mg cisplatinou bylo rozpuštěno ve směsi ethanol/voda (1:1, 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 (1:1, V/V; 3 ml), vodou (3 ml) a následně
45 vysušena za vysokého vakua při teplotě 19 °C. Elementární analýzou bylo stanoveno, že na oxycelulózu bylo navázáno přibližně 28 % cisplatinou s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 1.

50

Pro takto připravené modifikované oxycelulózy byla změřena jejich Ramanova spektra a porovnána se spektrem čisté cisplatinou a nemodifikované oxycelulózy. Porovnáním pozice piků a jejich poměru intenzit modifikovaných oxycelulóz, samotného cisplatinou a nemodifikovaných oxycelulóz, lze usoudit, že účinná látka cisplatinou není vázána čistě fyzikální absorpcí, ale tvoří
55 inkluze s danou maticí.

Během rozpadu celulózových matic dochází k uvolňování jednotlivých vláken do roztoku. Daný jev se projeví změnou absorpčního spektra oproti spektru naměřenému v čase t_0 . Pokud nejsou v daném čase pozorovány významné změny oproti t_0 , lze danou matici považovat v tomto čase za stabilní. Stabilita testovaných matic je dostatečně velká pro uplatnění obou mechanismů uvolňování léčiv. Kompletní uvolnění léčiva v organismu lze očekávat do jednoho měsíce po aplikaci oxycelulózy do organismu.

10 Příklad 1B

Použití rozpouštědla voda

15 6 mg cisplatin 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 4 % cisplatin s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 2.

20 13 mg cisplatin 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 8,5 % cisplatin s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 2.

25 43 mg cisplatin 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 26 % cisplatin s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 2.

30 Pro takto připravené modifikované oxycelulózy byla změřena jejich Ramanova spektra a porovnána se spektrem čisté cisplatin a nemodifikované oxycelulózy. Porovnáním pozice piků a jejich poměru intenzit modifikovaných oxycelulóz, samotné cisplatin a nemodifikovaných oxycelulóz, lze usoudit, že účinná látka cisplatin není vázána čistě fyzikální absorpcí, ale tvoří inkusní komplex s danou maticí.

40 Příklad 1C

Použití rozpouštědla aceton:voda (1:1, V/V)

45 6 mg cisplatin bylo rozpuštěno ve směsi aceton/voda (1:1, 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 aceton/voda (1:1, 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 % cisplatin s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 3.

50 13 mg cisplatin bylo rozpuštěno ve směsi aceton/voda (1:1, 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 aceton/voda (1:1, 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 % cisplatin s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 3.

43 mg cisplatiny bylo rozpuštěno ve směsi aceton/voda (1:1, 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 aceton/voda (1:1, V/V; 3 ml), vodou (3 ml) a následně
 5 vysušena za vysokého vakua při teplotě 19 °C. Elementární analýzou bylo stanoveno, že na oxycelulózu bylo navázáno přibližně 30 % cisplatiny s přesnými hodnotami hmotnostních koncentrací dle obr. 3.

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

15

Příklad 2

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

20 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.

25 Buněčné rakovinné linie (lidský nádor prsu – BT-474, slinivky - PATU) byly vytvořeny transfekcí buněk. Buňky karcinomu prsu a slinivky byly udržovány v T-medium 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.

30 Podkožní implantace buněk lidského karcinomu do boků imunodeficientních nahých nu-nu myši (Samice, bezthymové, věk 6 týdnů, váha 18-20 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.

35 Jakmile dosáhla nádorová masa velikosti cca 200 mm³ (cca 10 dní po transplantaci, odpovídá 0,1-0,2 g nádorové tkáně), bylo zahájeno operativní chirurgické odstranění nádoru z 95-97 % a měření velikosti nádorů.

40 Příklad 3

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

45

Příklad 3 A

Vnitrotělová topická aplikace

50 Imunodeficientní holé nu-nu myši, připravené a chirurgicky léčené dle příkladu 2, 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 byla podána samotná cisplatina v množství 0,5 mg, tvořila také 2 experimenty, skupině C byla v experimentu
 55 1 podána oxycelulóza HL a v experimentu 2 oxycelulóza CaL, vždy v množství 4,5 mg. Skupině

D6 byl ve dvou experimentech podán supermolekulární komplex oxycelulózy CaL s cisplatinou a ve skupině D7 ve dvou experimentech podán supermolekulární komplex oxycelulózy HL s cisplatinou, v množství 5 mg s 10 % hm. obsahem cisplatinou, což odpovídá množství samotné cisplatinou.

5

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 vnitřetělové topické aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózy s cytostatiky, samotnou oxycelulózou a samotnými cytostatiky na opětovný růst nádoru, resp. případnou eliminaci residuální nádorové tkáně. Výrazný terapeutický efekt byl pozorován pro topickou vnitřetělovou aplikaci oxycelulózy s cytostatiky, která 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 supermolekulární komplex oxycelulózy s cisplatinou při vnitřetělové topické aplikaci má schopnost inhibovat nárůst karcinomu až na 46 % oproti pouze chirurgické léčbě a na 75 až 80 % oproti chirurgické léčbě s následným podáním samotné cisplatinou. Také mortalita pokusných myši při vnitřetělové topické aplikaci komplexu byla o 18-35 % nižší oproti podání samotné cisplatinou. Podrobné výsledky prezentuje tabulka na obr 16.

20

Příklad 3 B

Perorální aplikace

25

Imunodeficientní holé nu-nu myši, připravené a chirurgicky léčené dle příkladu 2, tedy s odstraněním nádoru 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 byla podávána samotná cisplatin 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 D6 byl podáván supermolekulární komplex oxycelulózy CaL s cisplatinou a ve skupině D7 podán supermolekulární komplex oxycelulózy HL s cisplatinou, v množství 5 mg s 10 % hm. obsahem cisplatinou, což odpovídá množství samotné cisplatinou.

35

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

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

40

Byl vyhodnocen vliv orální a vnitřetělové topické aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózy 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 supermolekulární komplex oxycelulózy s cisplatinou při orální aplikaci má inhibici nárůstu karcinomu oproti pouze chirurgické léčbě 77 %. Mortalita komplexu při orálním podání byla poměrně značná a to 85-88 %. Podrobné výsledky prezentuje tabulka na obr. 17.

45

Porovnání aplikace ve formě orální a vnitřetělové topické kooperativní aplikace prokázal výhodnost topické aplikace, protože orální aplikace byla spojena s mortalitou o 20-33 % vyšší a především pozorovaný nárůst velikosti tumoru byl cca 74 až 77% oproti kontrole.

50

Příklad 4

Aplikace supramolekulárních komplexů oxycelulózových matic s cisplatinou po chirurgické léčbě nu-nu myši s BT-474 lidský karcinomem prsu

Příklad 4 A

5

Vnitrotělová topická aplikace

Imunodeficientní holé nu-nu myši, připravené a chirurgicky léčené dle příkladu 8, 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 byla podána samotná cisplatinu 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 D6 byl ve dvou experimentech podán supermolekulární komplex oxycelulózy CaL s cisplatinou a ve skupině D7 ve dvou experimentech podán supermolekulární komplex oxycelulózy HL s cisplatinou, v množství 5 mg s 10 % hm. obsahem cisplatinou, což odpovídá množství samotné cisplatinu.

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

20

Byla sledována inhibice opětovného růstu nádoru s 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 supermolekulární komplex oxycelulóz s cisplatinou při vnitrotělové topické aplikaci má schopnost inhibovat nárůst karcinomu až na 29 % oproti pouze chirurgické léčbě a na 56 % oproti chirurgické léčbě s následným podáním samotné cisplatinu. Mortalita pokusných myši při vnitrotělové topické aplikaci komplexu je v rozmezí 55 až 63 %. Podrobné výsledky prezentuje tabulka na obr. 18

35

Příklad 4 B

Perorální aplikace

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 byla podávána samotná cisplatinu 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 D6 byl podáván supermolekulární komplex oxycelulózy CaL s cisplatinou a ve skupině D7 podán supermolekulární komplex oxycelulózy HL s cisplatinou, v množství 5 mg s 10 % hm. obsahem cisplatinu, což odpovídá množství samotné cisplatinu.

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.

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. Výrazný terapeutický efekt byl pozorován pro topickou vnitrotělovou aplikaci oxycelulózových komplexů projevující

55

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 supermolekulární komplex oxycelulóz s cisplatinou při orální aplikaci má schopnost inhibovat nárůst karcinomu pouze na 34 až 45 % oproti pouze chirurgické léčbě a orální aplikace cisplatin v supramolekulárním komplexu s oxycelulózou má schopnost inhibovat nárůst karcinomu na 46 až 60 %. Mortalita komplexu byla poměrně značná a to 72 až 75 %. Podrobné výsledky prezentuje tabulka na obr. 19

Porovnání aplikace ve formě orální a vnitrotělové topické pooperační aplikace prokázal výhodnost topické aplikace, protože orální aplikace byla spojena s mortalitou o 11 až 20 % vyšší a především pozorovaný nárůst velikosti tumoru byl cca 0-10% oproti topické aplikaci.

Příklad 5

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 16ti hodin pro dosažení exponenciální fáze růstu. Poté bylo naočkováno 5×10^5 buněk do 1,8-2 cm jamek a inkubováno 16 hodin v růstovém médiu se supermolekulárním komplexem oxycelulózy CaL a cisplatinou. 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 samotnou cisplatinou v porovnání s CaL oxycelulózovým komplexem s 10 % hm. cisplatinou v čase 24 hodin po aplikaci. CaL oxycelulózový komplex s cisplatinou byl v koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ růstového média. Buněčná mortalita byla stanovena sulforhodamine B (SRB) testem, alternativně vylučovacím barvením trypanovou modří, výsledky vyjádřeny jako % usmrcených buněk z celkového počtu jednotlivých buněčných linií (jak dokládá obrázek 20).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s platinovým metalokomplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu **vyznačující se tím**, že obsahuje 5 až 30 % hm. platinového metalo-komplexu, nekovalentně vázaného na oxycelulózovou matici.

2. Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s platinovým metalokomplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že oxycelulózová matrice je oxidovaná celulóza.

3. Supramolekulární komplex oxycelulózové matrice s platinovým metalokomplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu podle nároku 2 **vyznačující se tím**, že oxidovaná celulóza je v lintrové kyselé formě.

4. Supramolekulární komplex oxycelulóзовé matrice s platinovým metalokomplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu podle nároku 2 **vyznačující se tím**, že oxidovaná celulóza je ve formě vápenaté soli.
5. Supramolekulární komplex oxycelulóзовé matrice s platinovým metalokomplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu podle nároku 2 **vyznačující se tím**, že oxidovaná celulóza je v textilní pletené formě.
6. Supramolekulární komplex oxycelulóзовé matrice s platinovým metalokomplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že obsahuje 10 až 20 % hm. platinového metalo-komplexu.
7. Supramolekulární komplex oxycelulóзовé matrice s platinovým metalokomplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že platinovým metalo-komplexem je cisplatina.
8. Použití supramolekulárního komplexu oxycelulóзовé matrice s platinovým metalo-komplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro topickou cytostatickou léčbu nádorové tkáně.
9. Použití supramolekulárního komplexu oxycelulóзовé matrice s platinovým metalo-komplexem s postupným uvolňováním platinového metalokomplexu podle nároku 8, kdy topickou cytostatickou léčbou nádorové tkáně je pooperační vnitrotělová topická aplikace na reziduální nádorové buňky/tkáň po chirurgickém zákroku.

8 výkresů

EtOH/voda (1:1)				
Obsah cisplatiny v modifikované celulóze				
modifikovaná celulóza	navážka cisplatina (mg)	hm. %	mg	% z navážky
HL	6	4,81	5,05	84,18
HD	6	4,68	4,91	81,90
CaL	6	4,9	5,15	85,75
HL	13	9,23	10,15	78,10
HD	13	9,19	10,11	77,76
CaL	13	9,8	10,78	82,92
HL	43	28,4	36,92	85,86
HD	43	27,1	35,23	81,93
CaL	43	28,2	36,66	85,26

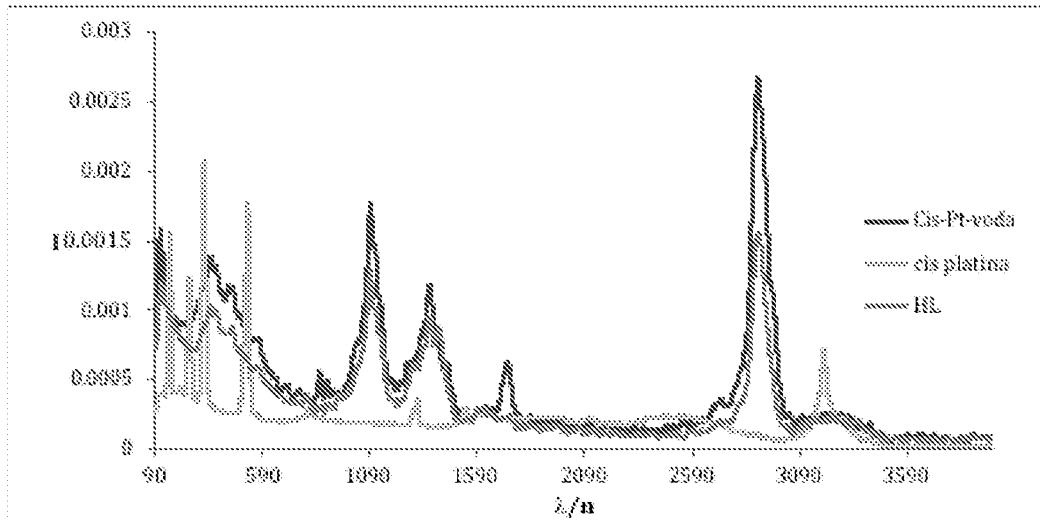
Obr. 1

voda				
Obsah cisplatiny v modifikované celulóze				
modifikovaná celulóza	navážka cisplatina (mg)	hm. %	mg	% z navážky
HL	6	4,2	4,41	73,50
HD	6	4,12	4,33	72,10
CaL	6	4,32	4,54	75,60
HL	13	8,52	9,37	72,09
HD	13	8,41	9,25	71,16
CaL	13	8,6	9,46	72,77
HL	43	26,24	34,11	79,33
HD	43	25,98	33,77	78,54
CaL	43	26,3	34,19	79,51

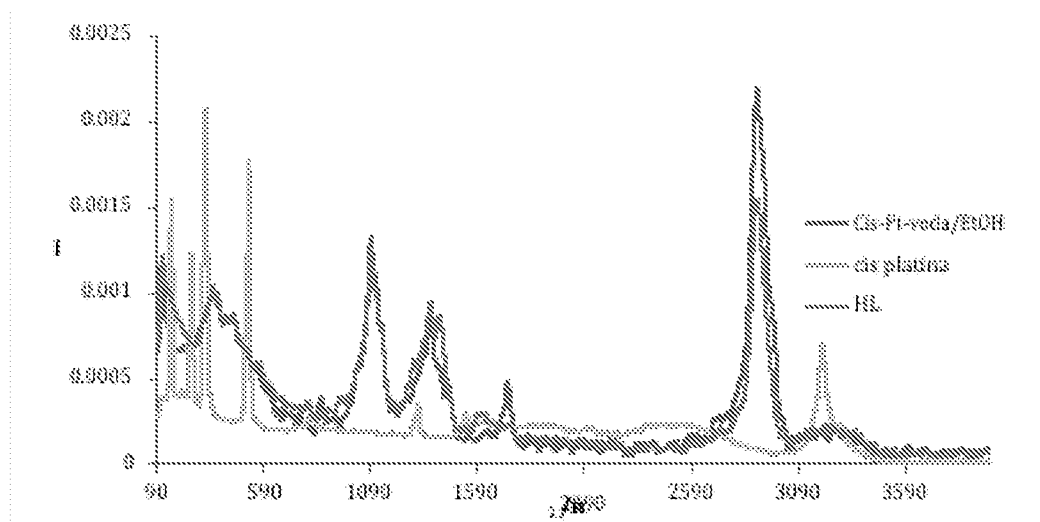
Obr. 2

aceton/voda (1:1)				
Obsah cisplatiny v modifikované celulóze				
modifikovaná celulóza	navážka cisplatina (mg)	hm. %	mg	% z navážky
HL	6	5,01	5,26	87,68
HD	6	4,92	5,17	86,10
CaL	6	5,12	5,38	89,60
HL	13	9,98	10,98	84,45
HD	13	10,2	11,22	86,31
CaL	13	10,06	11,07	85,12
HL	43	30,12	39,16	91,06
HD	43	29,95	38,94	90,55
CaL	43	30,02	39,03	90,76

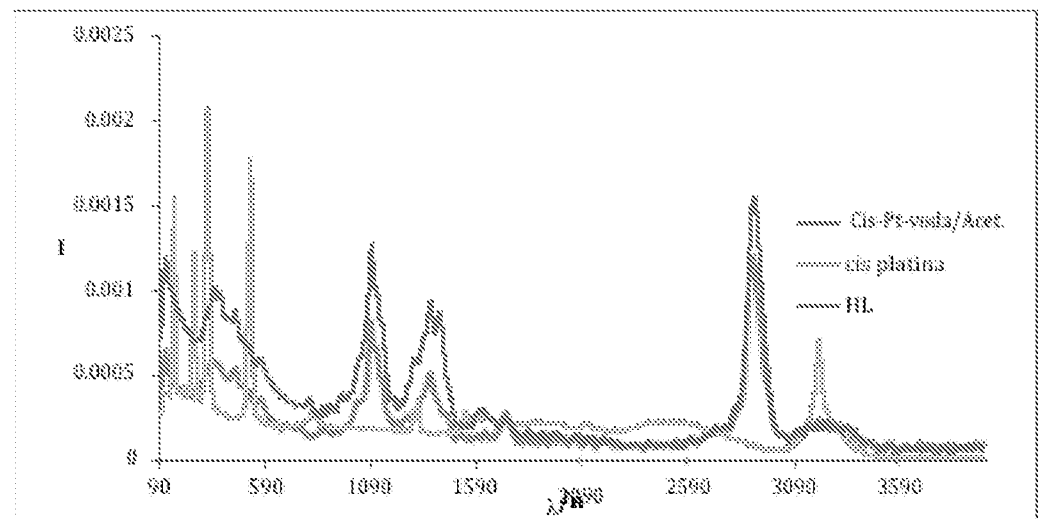
Obr. 3



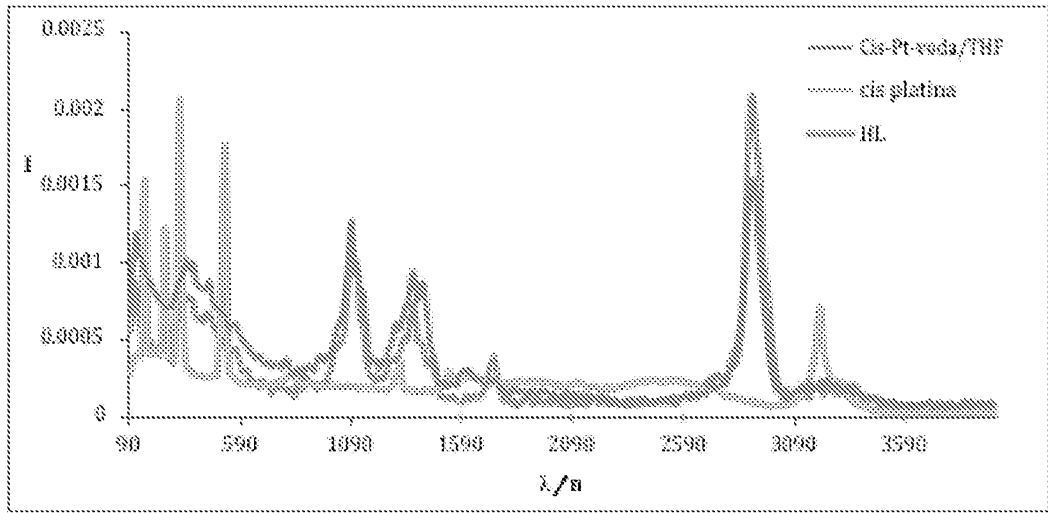
Obr. 4



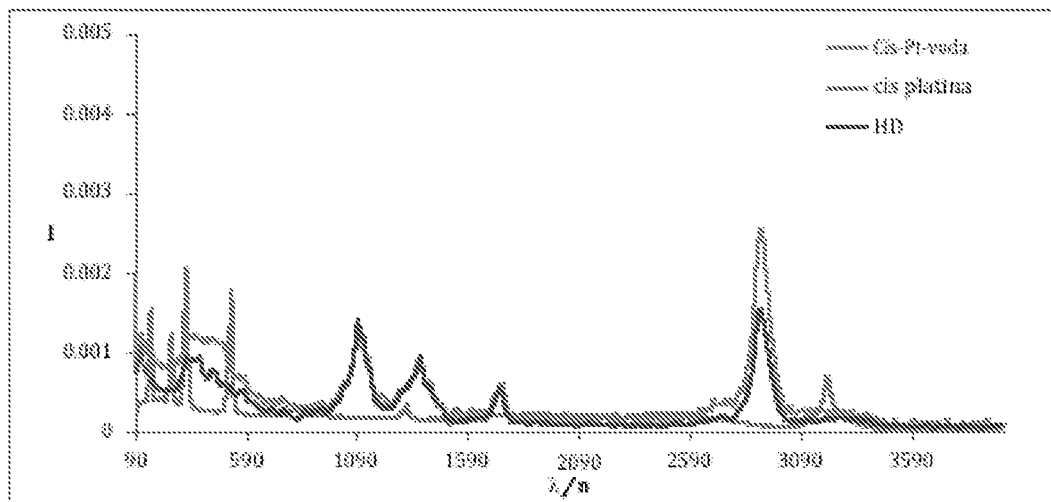
Obr. 5



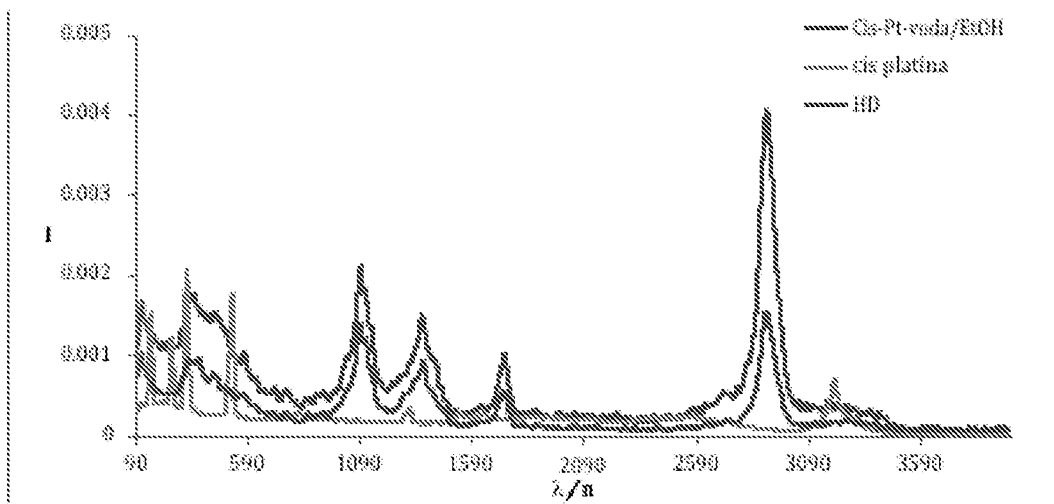
Obr. 6



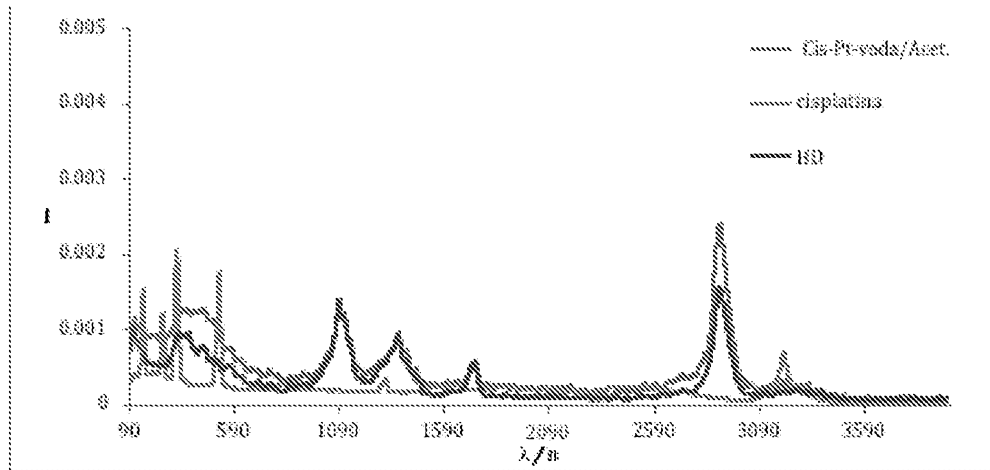
Obr. 7



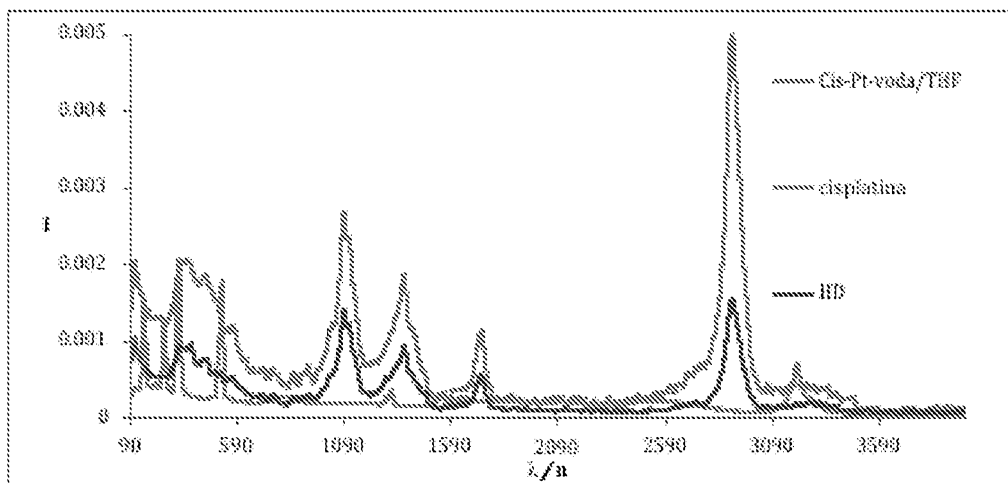
Obr. 8



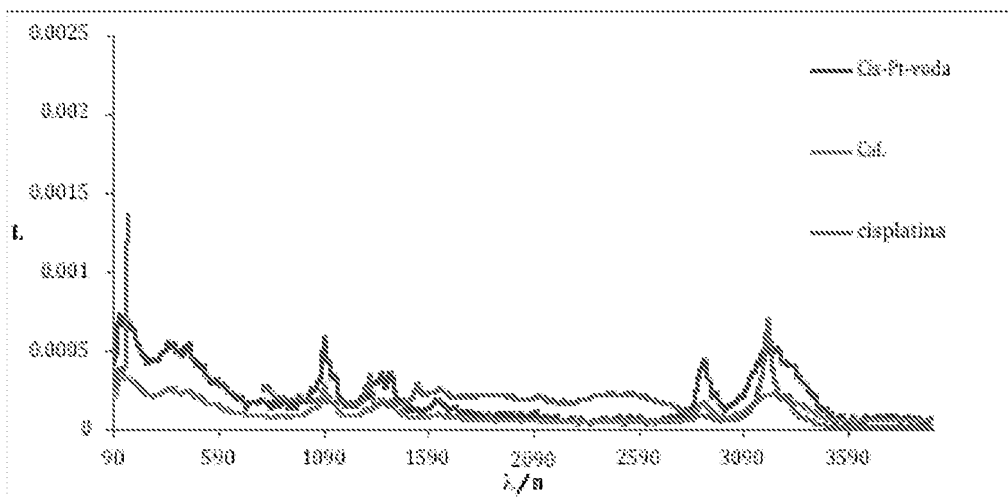
Obr. 9



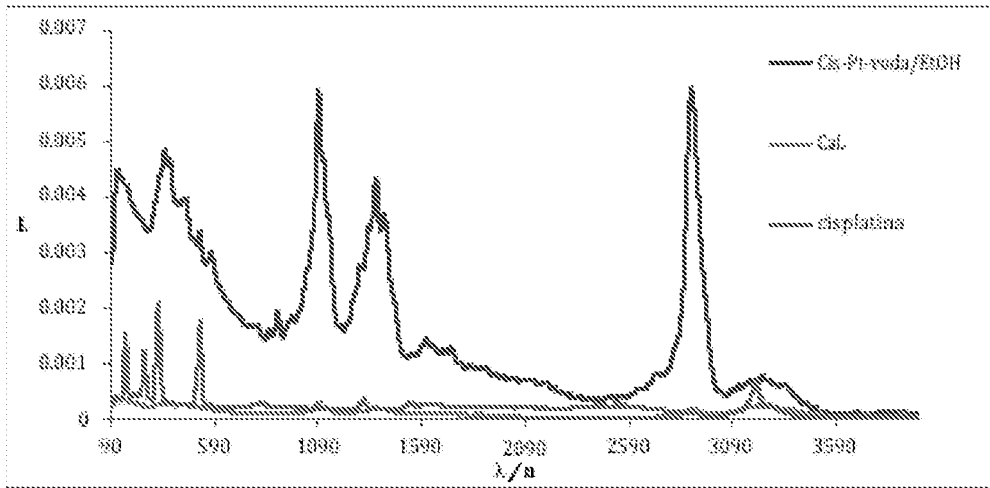
Obr. 10



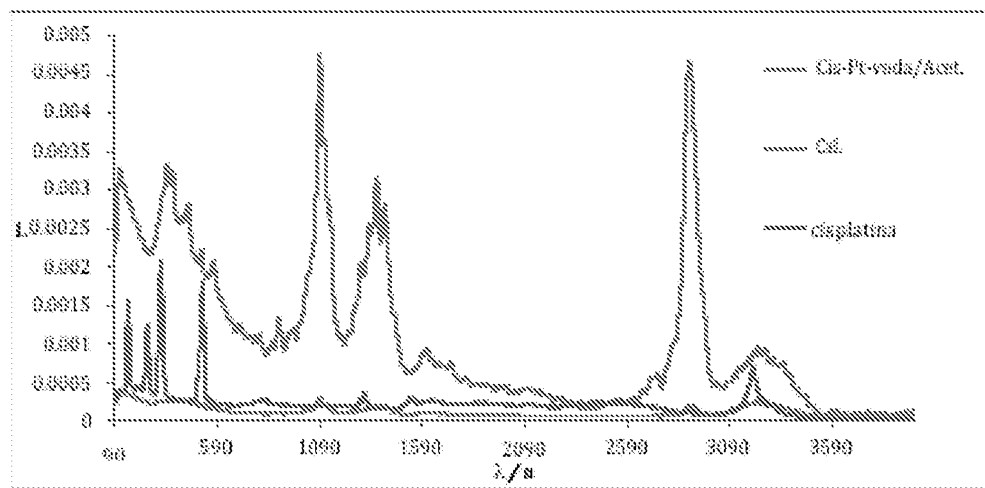
Obr. 11



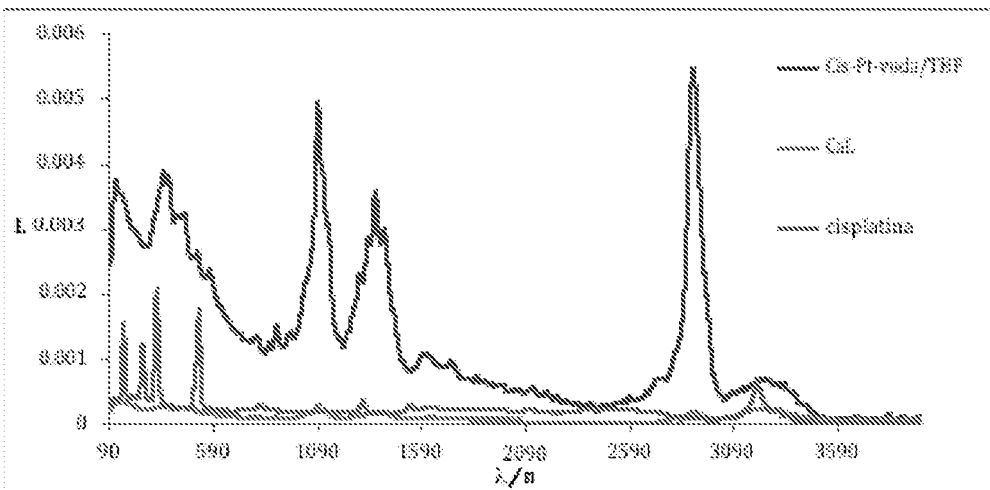
Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14



Obr. 15

OXYCELULOZA S CISPLATINOU TOPICKÁ APLIKACE na PATU									
nunu-myši, carcinom pankreatu PATU									
pokusná skupina	aplikovaná látka	exp číslo	hmotnost nádoru (g)		% nárůst nádoru oproti		mortalita %	snížení mortality supramolekulárního komplexu léčiva oproti samotnému léčivu %	průměr snížení mortality %
			na začátku pokusu	odebraného na konci pokusu	kontrole	cisplatině			
A1	kontrola, bez aplikace	1	0,1323	8,56			100		
		2	0,1471	8,12			100		
B2	cisplatina - 0,5mg	1	0,1355	5,24	61,21		85		
		2	0,1289	5,10	62,81		82		
C5	OKCEL-HL 4,5 mg OKCEL-Cal 4,5 mg	1	0,1483	5,65			85		
		2	0,1341	5,59			86		
D6	OKCEL-Cal + cisplatina (5mg)	1	0,1339	4,17	48,71	79,58	65	24	
		2	0,1417				63	23	23
D7	OKCEL-HL + cisplatina (5mg)	1	0,1503	3,95	46,14	75,38	55	35	
		2	0,1468				67	18	27

Obr. 16

OXYCELULOZA S CISPLATINOU ORÁLNÍ APLIKACE na PATU									
Orální aplikace (přímo do žaludku, pro srovnání s topickou aplikací) nunu-myši, carcinom pankreatu PATU									
pokusná skupina	aplikovaná látka	exp číslo	hmotnost nádoru (g)		% nárůst nádoru oproti		mortalita %	snížení mortality supramolekulárního komplexu léčiva oproti samotnému léčivu %	průměr snížení mortality %
			na začátku pokusu	odebraného na konci pokusu	kontrole	cisplatině			
A1	kontrola, bez aplikace	1	0,13	8,27			100		
		2					100		
B2	cisplatina - 0,5mg	1	0,15	4,59	55,50		89		
		2							
C5	OKCEL-HL 4,5 mg OKCEL-Cal 4,5 mg	1	0,15	6,12			91		
		2	0,15	5,99			89		
D6	OKCEL-Cal + cisplatina (5mg)	1	0,13	6,14	74,24	133,77	85	4	
		2							
D7	OKCEL-HL + cisplatina (5mg)	1	0,15	6,34	76,66	138,13	88	1	
		2							

Obr. 17

OXYCELULOZA S CISPLATINOU TOPIKÁ APLIKACE na BT-474									
nunu-myši, carcinom prsu BT-474									
pokusná skupina	aplikovaná látka	exp číslo	hmotnost nádoru (g)		% nárůst nádoru oproti		mortalita %	snížení mortality supramolekulárního komplexu léčiva oproti samotnému léčivu %	průměr snížení mortality %
			na začátku pokusu	odebraného na konci pokusu	kontrole	cisplatině			
A1	kontrola, bez aplikace	1	0,188	9,56			100		
		2	0,21	8,88			100		
B2	cisplatina - 0,5mg	1	0,145	4,98	52,09		89		
		2	0,132	4,45	50,11		88		
C5	OKCEL HL 4,5 mg OKCEL-Cal 4,5 mg	1	0,153	6,95			88		
		2	0,161	6,44			89		
D6	OKCEL-Cal + cisplatina (5mg)	1	0,145	2,78	29,08	55,82	61	31	
		2	0,147	3,12	35,14	70,11	63	28	30
D7	OKCEL-HL + cisplatina (5mg)	1	0,159	3,38	35,36	67,87	55,00	38	
		2	0,15	3,21	36,15	72,13	56	36	37

Obr. 18

Srovnávací orální aplikace, přímo do žaludku, stejné množství jako jako topicky

OKYCELULÓZA S CISPLATINOU ORÁLNÍ APLIKACE NA BT-474

nunu-myši, carcinom prsu

BT-474

pokusná skupina	aplikovaná látka	exp číslo č.	hmotnost nádoru (g) na začátku pokusu	odebraného na konci pokusu	% nárůst nádoru oproti		mortalita %	snížení mortality supramolekulárního komplexu léčiva oproti samotnému léčivu %
					kontrola	cisplatině		
A1	kontrola, bez aplikace	1	0,18	9,16			100	
		2					100	
B2	cisplatina - 0,5mg	1	0,14	6,85	74,78		92	
		2						
C5	OKCEL-HL, 4,5 mg OKCEL-Cal 4,5 mg	1	0,15	7,12			91	
		2						
D6	OKCEL-Cal + cisplatina (5mg)	1	0,12	3,15	34,39	45,99	72	22
		2						
D7	OKCEL-HL + cisplatina (5mg)	1	0,15	4,12	44,98	60,15	75	18
		2						

Obr. 19

Typ nádoru	cisplatina	komplex
	Mortalita buněk v %	
MDA-MB-231 lidský adenokarcinom prsu	24	68
A431 lidský epidermoidní karcinom	36	54
A549 lidský adenokarcinom plic	39	59
LNCaP lidský karcinom prostaty	48	69
HCT 116 lidský karcinom tlustého střeva	41	69
CAPAN-2 lidský karcinom pankreatu	27	65
PATU lidský karcinom pankreatu	45	71
BT-474 lidský nádor prsu	51	79
U-2 OS lidský osteosarkom	14	54
HeLa lidský karcinom děložního čípku	45	78

Obr 20

Vzorek	Navážka vzorku (mg)	C (%)	H (%)	N (%)
	2,352	16,97	7,91	0,10
CaL cis-Pt.Voda	1,832	17,36	8,10	0,10
	1,696	31,97	5,34	0,16
CaL cis-Pt.Voda:EtOH	1,849	32,18	5,29	0,23
	1,899	31,41	5,42	0,15
CaL cis-Pt.Voda:Acet	1,741	31,21	5,36	0,12
	1,757	31,79	5,33	0,17
CaL cis-Pt.Voda:THF	1,707	32,14	5,29	0,14
	1,643	37,54	5,53	0,44
HL cis-Pt.Voda	1,672	37,57	5,52	0,41
	1,978	37,82	5,54	0,36
HL cis-Pt.Voda:EtOH	1,894	38,02	5,54	0,32
	1,700	36,66	5,44	0,28
HL cis-Pt.Voda:Acet	1,573	36,81	5,44	0,27
	1,765	38,12	5,54	0,29
HL cis-Pt.Voda:THF	1,860	38,10	5,54	0,32
	2,454	35,71	5,31	0,50
HD cis-Pt.Voda	1,960	35,56	5,05	0,47
	1,541	36,01	5,21	0,33
HD cis-Pt.Voda:EtOH	2,088	36,17	5,24	0,30
	2,145	36,31	5,22	0,33
HD cis-Pt.Voda:Acet	1,676	36,51	5,11	0,31
	2,426	36,31	5,31	0,33
HD cis-Pt.Voda:THF	2,272	36,31	4,99	0,31

Obr. 21