

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2016-119

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.02.2016**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.09.2017**

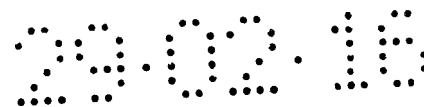
(Věstník č. 37/2017)

A61K 31/409 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 47/44 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
A61K 47/48 (2006.01)

- (71) Přihlašovatel:
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.,
Praha 6, Břevnov, CZ
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6 - Dejvice, CZ
- (72) Původce:
Mgr. Martin Hrubý, Ph.D., Praha 6, CZ
Mgr. Ingrid Brezániová, Praha 2, CZ
prof. RNDr. Vladimír Král, DSc., Praha 2, CZ
- (74) Zástupce:
RNDr. Kateřina Hartvichová, INVENTIA s.r.o., Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Fotoaktivovatelná nanočástice pro
fotodynamické aplikace, způsob její
přípravy, farmaceutická kompozice ji
obsahující a jejich použití**

- (57) Anotace:
Předkládané řešení se týká fotoaktivovatelných nanočástic pro fotodynamické aplikace, obsahující fotosenzibilizátor, (C₈ až C₂₂) mastný alkohol a polymerní surfaktant, s výhodou polyethylenoxid monomethyléter-*block*-poly(ε-kaprolaktonu), přičemž velikost nanočástic je v rozmezí od 1 do 1000 nm, a jádro nanočástice je při 4 °C pevné a při 39 °C kapalné. Řešení se dále týká způsobu přípravy fotoaktivovatelných nanočástic, farmaceutické kompozice je obsahující a jejich použití.



Fotoaktivovatelná nanočástice pro fotodynamické aplikace, způsob její přípravy, farmaceutická kompozice ji obsahující a jejich použití

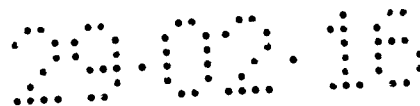
Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká fotoaktivovatelných nanočástic pro fotodynamické aplikace, způsobu jejich přípravy, farmaceutické kompozice je obsahující a jejich použití jako léčiva při fotodynamické terapii.

Dosavadní stav techniky

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT) je relativně novou metodou léčby různých onemocnění, zaměřenou zejména na léčbu nádorů, např. spinocelulárního karcinomu hlavy a krku. PDT spočívá v kombinaci fotosenzibilizátoru (photosensitizer, PS), molekuly kyslíku a následného laserového ozáření nádorových lézí. Po laserovém ozáření nádoru absorbují molekuly fotosenzibilizátoru fotony světla a následně excitují kyslík za vzniku singletového kyslíku, který je vysoce destruktivní kvůli poškození buněčných struktur, jako jsou DNA nebo membrány v blízkém okolí. Účinnost PDT z větší části závisí na fotochemických, fotobiologických a fototerapeutických vlastnostech PS. Kritickým faktorem je formulace PS, která zajišťuje, že účinek je selektivně zaměřen na cílovou nádorovou tkáň. PDT je výhodným způsobem léčby nejen v nádorových, i v mnoha nenádorových aplikacích, např. v kosmetice, kde se fotosenzibilizátor kombinuje s biologickým výplňovým materiálem (zahrnujícím kolagen, kyselinu hyaluronovou a další syntetické nebo přírodní produkty) a formulace se následně vstříkují do ošetřovaného místa (US20110021973 A1). PDT se využívá i jako způsob ošetření nežádoucí celulitidy (US8414880 B2) či při prevenci a léčení vaskulárních nebo zánětlivých chorob (US20090306032 A1), kde autoři popisují pevné lipidické nanočástice získané mikroemulzifikací za tepla, obsahující cholesteryl-propionát a/nebo cholesteryl butyrát.

Nanomedicína je rychle se rozvíjející oblastí lékařského výzkumu, která je zaměřena zejména na vývoj nanočástic (nanoparticles, NPs) pro profylaktické, diagnostické a terapeutické aplikace. V oblasti farmacie je obecně velikost nanočástic obvykle definována v rozsahu 1 nm až 1000 nm. Nanomedicína funguje na stejném principu jako mnoho biologických procesů a buněčných mechanismů. Fotosenzibilizátory inkorporované v nanočásticích poskytují velice slibný přístup v řešení jak problému biodostupnosti, tak cíleného transportu do nádorové tkáně. Metody a



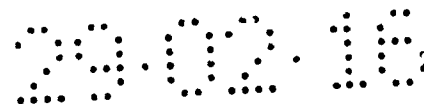
postupy pro syntézu, funkcionalizaci a použití NPs jsou dnes široce studovány a představují nové strategie pro molekulární cílení, individuální terapii a minimálně invazivní diagnostické techniky.

Obecně jsou PS podávány pacientovi různými cestami, např., topicky (US20090081281 A1), perorálně (US20100273803 A1) nebo intravenózně, přičemž každá má své výhody a nevýhody. Zejména intravenózní podání je problematické, protože mnoho PS jsou hydrofóbní nebo amfifilní látky obvykle nerozpustné ve vodě. V některých případech jsou PS (zejména temoporfin) podávány v alkoholickém roztoku (ethanol, propylenglykol). Pro PDT byly testovány zejména porfyriny a chloriny. Temoporfin (Biotech Pharma, Skotsko, Spojené království) byl v EU schválen pro paliativní nádory hlavy a krku, nádory prostaty a pankreatu (US20060040912 A1).

Povrchově stabilizované pevné lipidické nanočástice (solid lipid nanoparticles, SLNP) s nekovalentně vázaným léčivem představují nový typ formulace léčiv. V krevním řečišti tyto SLNP po adhezi na apolipoproteiny napodobují lipoproteiny s nízkou hustotou (low-density-lipoprotein, LDL), přepravující lipidy do tkání. Receptory LDL jsou nadměrně exprimovány na povrchu mnoha nádorových buněk (Kretzer, Iara F., Durvanei A. Maria, and Raul C. Maranhão. 2012. *Cellular Oncology* 35 (6): 451–60; Huntosova, Veronika, Diana Buzova, Dana Petrovajova, Peter Kasak, Zuzana Nadova, Daniel Jancura, Franck Sureau, and Pavol Miskovsky. 2012. *International Journal of Pharmaceutics* 436 (1-2): 463–71), což vede k cílenému doručení léčiva do nádoru. Pro specifické doručení PS co možná nejbližší k nádorové tkáni je potřebné potlačit mechanismy omezující účinnost PDT. Z důvodu akumulace PS vedoucí k nežádoucí fotosenzibilizaci celého povrchu těla pacientů je kůže rozhodujícím orgánem (Moore, Caroline M., Mark Emberton, and Stephen G. Bown. 2011. *Lasers in Surgery and Medicine*. 3:768–75). SLNP jsou tedy účinným systémem podávání léčiv zlepšujících biologickou dostupnost i pro látky špatně rozpustné ve vodě. Formulace na bázi SLNP poskytují obecně vyšší biodostupnost a vyšší terapeutický efekt *in vitro* a *in vivo* v porovnání s komerčními formulacemi, zejména pro použití pro intravenózní lékovou aplikační formu.

US5250236 popisuje pevné lipidické sférické částice, které mají průměr menší než jeden mikrometr. Lipidové částice byly získány přidáním zahřátých lipidů (nad bodem tání) do směsi složené z vody, surfaktantu a kosurfaktantu.

Patentová přihláška WO 1993005768 A1 popisuje systém dopravy léčiv založený na pevných částicích lipidických materiálů nebo jejich směsí, s průměrem od 10 nm do 10 µm. Poskytují



delší dobu řízeného uvolňování účinné látky a umožňují inkorporaci hydrofilních léčiv do pevného jádra částice.

US20080090803 A1 popisuje kovalentní konjugáty mastných alkoholů a farmaceutických nosičů pro léčbu nádorových a virových onemocnění a psychiatrických poruch.

US20060127471 A1 popisuje přípravu lipozomálních formulací, obsahujících hydrofobní fotosenzibilizátor (temoporfin) a jejich použití v terapii, zejména za použití intravenózní aplikace. Fosfolipidy jsou modifikovány PEGylací (obsahují polyethylenoxid jako nedílnou součást). Vzniklé PEGylované liposomy obsahují hydrofobní fotosenzibilizátor uvnitř membrány. Tento mechanismus dopraví fotosenzibilizátor do buněčné membrány systému přímo do místa působení.

US7354599 B2 popisuje farmaceutické liposomální formulace pro PDT, které obsahují hydrofobní fotosenzibilizátor porfyrinového typu (temoporfin), monosacharid (fruktózu a glukózu) a jeden nebo více syntetických fosfolipidů. Díky lyofilizačnímu procesu jsou vzniklé formulace při skladování stabilní a vhodné pro intravenózní podání.

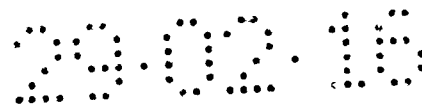
US8709449 B2 popisuje formulaci zvyšující účinnost PDT a snižující fototoxické reakce pokožky zapříčiněné PDT. Lipidová emulze obsahuje sójový olej, triglyceridy se středně dlouhým řetězcem a fosfolipidy z vajec jako hydrofobní složky. PS je vybrán ze skupiny porfyrinů, ftalocyaninů, metalografitových derivátů, barviv a syntetických fotosenzibilizátorů.

US20080311214 A1 popisuje modifikované lipidické nano/ mikročástice, které na svém povrchu obsahují molekulu nebo ligand zaměřující se na specifické vazebné místo a jejich použití pro perorální podání léčiv a antigenů.

Patentová přihláška WO 2006069985 A2 popisuje metody přípravy nanočástic na bázi lipidů pomocí homogenizace za účelem inkorporace sloučeniny do už předem připravených nanočástic pomocí duální asymetrické odstředivky.

Patentová přihláška WO 2010112749A1 popisuje způsob přípravy a složení suspenzí pevných lipidických nanočástic ve vodné fázi, obsahujících minoxidil v lipidové matici (mono-, di- a triglyceridy neobsahující kyselinu stearovou). SLNP obsahují alespoň jednu amfifilní sloučeninu vybranou z fosfolipidů (sojový lecitin, složený převážně z fosfatidylcholinů). SLNP obsahují zejména fosfatidylcholin, lecitin a jeden nebo více surfaktantů (vybraných z esterů mastných kyselin se sorbitany) a vodnou fázi (obsahující vodu, propylenglykol a popřípadě ethanol). Autoři se zaměřují na kosmetické a farmaceutické využití.

Patentová přihláška WO 2011116963 A2 popisuje systém dopravy léčiv pomocí SLNP, které jako lipidické nosiče obsahují alespoň jednu účinnou látku a jsou potaženy polymery. Účinná látka je vybrána ze skupiny kosmetických, farmaceutických a/ nebo alimentárních účinných látek



a/nebo pomocných látek. Polymery (připravené jednoduchou nebo komplexní koacervací) jsou vybrány ze skupiny proteinů, polysacharidů, polyesterů, polyakrylátů, polykyanoakrylátů a/nebo jejich směsí.

US5785976 A popisuje přípravu koloidních suspenzí pevných lipidických částic anizometrických tvarů s lipidovou maticí, která je ve stabilní polymorfní modifikaci. Dále obsahují suspenzi mikro- a submikronových částic bioaktivních látek. Tyto suspenze byly připraveny především pro parenterální podání, které je velmi výhodné pro bioaktivní látky špatně rozpustné ve vodě, zejména léčiva, a jejich použití v kosmetickém, potravinářském a zemědělském průmyslu.

US4880634 A popisuje lipidické nano-pelety obsahující farmakologicky účinné látky, jejichž velikost je v rozmezí od 50 do 1000 nm, a mohou být použity jako pomocné látky v systému dopravy léčiv pro perorální podání.

Pro výběr vhodného typu nanočástic jako transportního média umožňujícího cílenou aplikaci příslušné aktivní farmaceutické ingredience je nutné zvážit i všechny nevýhody a omezení příslušného systému. V případě liposomů použití vysokoenergetického ultrazvuku při přípravě často způsobuje oxidaci a degradaci fosfolipidů (T. P. Chelvi and R. Ralhan, *International Journal of Hyperthermia*, vol. 11, no. 5, pp. 685–695, 1995; S. Batzri and E. D. Korn, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, vol. 298, no. 4, pp. 1015–1019, 1973; J. J. Escobar-Chávez, *Skin*, vol. 19, p. 22, 2012; M. R. Mozafari, *Cellular and Molecular Biology Letters*, vol. 10, no. 4, pp. 711–719, 2005). U micel a liposomů je dále např. riziko rozpadu transportního systému ihned po podání kvůli nedostatečné stabilitě (M. Malmsten, *Soft Matter*, vol. 2, no. 9, pp. 760–769, 2006). Pro systémy využívající enkapsulaci do cyklodextrinů byla prokázána dráždivost a tím obavy o bezpečnost a omezení jejich použití pro parenterální podávání (R. A. Rajewski and V. J. Stella, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 85, no. 11, pp. 1142–1169, 1996; A. F. Soares, R. D. A. Carvalho, and F. Veiga, *Nanomedicine*, vol. 2, no. 2, pp. 183–202, 2007). U tekutých krystalů jsou kvůli jejich vysoké viskozitě problémy s přípravou a podáním a dále vykazují toxicitu kvůli vysokému obsahu surfaktantů (M. Malmsten, *Soft Matter*, vol. 2, no. 9, pp. 760–769, 2006; P. S. Prestes, M. Chorilli, L. A. Chiavacci, M. V. Scarpa, and G. R. Leonardi, *Journal of Dispersion Science and Technology*, vol. 31, no. 1, pp. 117–123, 2009; M. Rückert and G. Otting, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 122, no. 32, pp. 7793–7797, 2000). Pro různé typy nanočástic mohou být stěžejní i jiné charakteristiky, např. způsob podání léčiva, koloidní stabilita a interakce s krevními bílkovinami, biodegradabilita nosiče, nízká inkorporace a adsorpce léčivé látky, složitý vývoj metodik pro kontrolu kvality transportního systému, problémy se stabilitou po dobu skladování,

toxikologické testy některých typů nanočástic nejsou zcela ukončeny a často je potřeba zvýšení efektivity výroby (W. Mehnert and K. Mäder, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 47, no. 2-3, pp. 165–196, 2001; E. B. Souto, P. Severino, M. H. A. Santana, and S. C. Pinho, *Quimica Nova*, vol. 34, no. 10, pp. 1762–1769, 2011).

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje plně biologicky odbouratelnou formulaci fotoaktivovatelných nanočástic pro fotodynamické aplikace s minimálními vedlejšími účinky. Je založen na pevných lipidických nanočásticích (SLNP) fotosenzibilizátoru a mastných alkoholů, přičemž povrch těchto pevných lipidických nanočástic je stabilizován netoxickým povrchově aktivním polymerem, například kopolymerem polyethylenoxid monomethyléter-*block*-poly(ϵ -kaprolaktonem), který zabraňuje zachycování SNLP do retikuloendoteliálního systému. Mastné alkoholy jsou potom při metabolizaci plně odbouratelné β -oxidací, zatímco povrchově aktivní kopolymer je také sám o sobě biologicky odbouratelný na kyselinu 6-hydroxyhexanovou a polyethylenoxid a na základě relativně nízké molekulové hmotnosti jsou oba typy fragmentů odstranitelné ledvinami. SLNP jsou při skladovací teplotě 4 °C pevné, stabilní a nepodléhají agregaci. Teplota tání jádra je 39 °C, což umožňuje uvolňování fotosenzibilizátoru v nádoru kontrolovaným způsobem v důsledku intenzivního hypertermického metabolismu.

Předmětem předkládaného vynálezu je fotoaktivovatelná nanočástice pro fotodynamické aplikace, obsahující jádro a obal, jejíž jádro obsahuje 1 až 50 hmotn. % fotosenzibilizátoru, vztaženo na celkovou sušinu nanočástice, s výhodou 1 až 4 hmotn. % fotosenzibilizátoru, vztaženo na celkovou sušinu nanočástice, a dále 1 až 80 hmotn. % (C_8 až C_{22}) mastných alkoholů, vztaženo na celkovou sušinu nanočástice, s výhodou 12 až 72 hmotn. % (C_8 až C_{22}) mastných alkoholů, vztaženo na celkovou sušinu nanočástice; a obal obsahuje 1 až 80 hmotn. % polymerního surfaktantu, s výhodou polyethylenoxid monomethyléter-*block*-poly(ϵ -kaprolaktonu), vztaženo na celkovou sušinu nanočástice, s výhodou obal obsahuje 14 až 72 hmotn. % polymerního surfaktantu, vztaženo na celkovou sušinu nanočástice; přičemž velikost nanočástice je v rozmezí od 1 do 1000 nm, s výhodou v rozmezí od 11 do 760 nm, nejvýhodněji v rozmezí od 11 do 30 nm, a přičemž jádro nanočástice je při 4 °C pevné a při 39 °C kapalné, stanoveno diferenční skenovací kalorimetrií s proplachováním plynným dusíkem o objemu 50 cm³/min za použití india jako standardu v teplotních cyklech: ohřev - chlazení - ohřev, při 5 °C/min, a odečet teplot tání byl proveden z první křivky ohřevu diferenční skenovací

kalorimetrie, kdy výsledkem byl bimodální termogram se dvěma endotermami, jednou pro eutektickou směs fotosenzibilizátoru a mastného alkoholu a druhou pro mastný alkohol.

Začlenění temoporfinu do lipidové matrice má vést k teplotě tání kolem 26 °C, kdy taje eutektická směs fotosenzibilizátoru a (C_8 až C_{22}) mastného alkoholu, a mezi 35 a 39 °C, s výhodou mezi 37 a 39 °C, nejvýhodněji kolem 39 °C, kdy taje samotný PS. Znamená to, že v lipidovém jádře existují dvě fáze, obsahující fotosenzibilizátor a (C_8 až C_{22}) mastný alkohol. Toto složení umožňuje stabilitu pevných lipidických nanočástic při skladování při teplotě 4 °C a zároveň teplotu tání jádra při 39 °C.

Ve výhodném provedení je fotosenzibilizátor vybrán z derivátů chlorinu a/nebo porfyrinu a/nebo antrachinonu, výhodněji je fotosenzibilizátor vybrán ze skupiny zahrnující temoporfin, verteporfin, lutecium texafyrin, hypericin a porficen.

V jednom provedení vynálezu obsahuje jádro fotoaktivovatelné nanočástice jeden typ (C_8 až C_{22}) mastného alkoholu, s výhodou je mastným alkoholem (C_{14}) mastný alkohol.

V jiném provedení vynálezu obsahuje jádro fotoaktivovatelné nanočástice kombinaci (C_8 až C_{22}) mastných alkoholů.

V jednom provedení vynálezu je polymerním surfaktantem polyethylenoxid monomethyléter-*block*-poly(ϵ -kaprolakton), s výhodou o polymerizačním stupni polyethylenoxidového bloku 10 až 100 a o polymerizačním stupni poly(ϵ -kaprolaktonového) bloku 3 až 60, výhodněji je polymerizační stupeň polyethylenoxidového bloku 20 až 50 a poly(ϵ -kaprolaktonového) bloku 3 až 20, nejvýhodněji je polymerizační stupeň polyethylenoxidového bloku 45 a poly(ϵ -kaprolaktonového) bloku 7.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž způsob přípravy fotoaktivovatelné nanočástice podle předkládaného vynálezu, kdy:

- fotosenzibilizátor se rozpustí v rozpouštědle, s výhodou v dichlormethanu, a přidá se k (C_8 až C_{22}) mastnému alkoholu zahřátému na 45 °C za vzniku první fáze;
- polymerní surfaktant se rozpustí v organickém rozpouštědle, s výhodou v dichlormethanu, přidá se voda a směs se zahřeje na 45 °C za vzniku druhé fáze;
- obě zahřáté fáze se smíchají a homogenizují, s výhodou po dobu 2 min při 8000 otáčkách/min;

- výsledná emulze se podrobí působení ultrazvuku;
- výsledná emulze se ochladí na laboratorní teplotu.

Působení ultrazvuku lze provádět například při laboratorní teplotě a amplitudě ultrazvuku mezi 50 % a 75 %, s výhodou při amplitudě ultrazvuku 50 % po dobu 35 min a potom při amplitudě ultrazvuku 70 % po dobu 5 min.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž farmaceutická kompozice, která obsahuje fotoaktivovatelnou nanočástici podle předkládaného vynálezu, a dále obsahuje farmaceuticky přijatelné přísady, vybrané ze skupiny zahrnující antiadheziva, pojiva, potahovací látky, barviva, bobtnadla, ochucovadla, maziva, konzervanty, sladidla, sorbenty.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž fotoaktivovatelná nanočástice podle předkládaného vynálezu a/nebo farmaceutická kompozice podle předkládaného vynálezu pro použití jako léčivo.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž fotoaktivovatelná nanočástice podle předkládaného vynálezu a/nebo farmaceutická kompozice podle předkládaného vynálezu pro použití jako léčivo pro intravenózní aplikaci. Intravenózní aplikací se rozumí vpravení tekuté formy léčiva přímo do žíly nebo tepny pacienta.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž fotoaktivovatelná nanočástice podle předkládaného vynálezu a/nebo farmaceutická kompozice podle předkládaného vynálezu pro použití při fotodynamické terapii a/nebo fotodynamické diagnostice.

Předkládaný vynález systému pevných lipidických nanočástic poskytuje řešení k překonání všech výše zmíněných omezení ze stavu techniky, jako je např. jednoduchá příprava, stabilita po dobu skladování, jádro nanočástice je při skladovací teplotě (4 °C) pevné, stabilní a nepodléhá agregaci při fyziologickém pH (pH ~ 7,4), přičemž teplota tání jádra 39 °C umožňuje uvolňování fotosenzibilizátoru v nádoru kontrolovaným způsobem v důsledku intenzivního hypertermického metabolismu. Nanosystém o jedinečném složení je plně biodegradovatelný a poskytuje zvýšení biodostupnosti a terapeutického efektu *in vitro* a *in vivo* (porovnání s komerční formulací). Použití nanoformulace je jak pro perorální, tak intravenózní lékovou aplikační formu.

Stručný popis obrázků

Obrázek 1: ^1H -NMR spektrum kopolymeru polyethylenoxid-*block*-poly(ϵ -kaprolakton), (PEO-*b*-PCL). Intenzity protonových signálů označených: **a** ($\delta = 3,63$ ppm, odpovídá PEO bloku) a **c** ($\delta = 1,64$ ppm, odpovídá bloku PCL) v ^1H -NMR spektru.

Obrázek 2: Termogramy DSC analýzy vzorků bez obsahu temoporfinu (označeny jako SLNP s příslušným PEO_xPCL_y), s inkorporovaným temoporfinem (připraveny dle Příkladů 1, 2 a 3) a čistý temoporfin (10 až 20 mg).

Obrázek 3: Transmisní elektronové mikrofotografie vzorků pevných lipidických nanočástic s inkorporovaným temoporfinem, připravených dle Příkladů 1, 2 a 3.

Obrázek 4: Časový profil *in vitro* uvolňování temoporfinu (%) z pevných lipidických nanočástic připravených dle Příkladů 1, 2 a 3, při pH 7,4. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SD ($n = 3$).

Obrázek 5: Vliv „one-shot“ PDT na růst lidského karcinomu prsu linie MDA-MB-231. Skupině Nu/Nu myší ($n=5$) byly intravenózně aplikovány formulace pevných lipidických nanočástic s inkorporovaným temoporfinem připravených dle Příkladů 1, 2, 3 (dávka temoporfinu 0,8 mg/kg myš, i.v.), které jsou ve srovnání s neléčenou skupinou myší (v grafech jako kontrolní skupina) a v porovnání s komerční formulací (Originátor, 4 mg temoporfinu, 376 mg ethanolu a 560 mg propylenglykolu). Tři hodiny po podání byly nádorové oblasti ozářeny (100 J/cm^2) a následně byly v pravidelných intervalech měřeny velikosti nádoru.

Obrázek 6: Křivka inhibice růstu nádoru – TGI % (tumor growth inhibition) jako funkce času po intravenózní aplikaci (i.v.) testovaných formulací pevných lipidických nanočástic s inkorporovaným temoporfinem připravených dle Příkladů 1, 2, 3 (dávka temoporfinu 0,8 mg/kg myš) v porovnání s komerční formulací (Originátor, 4 mg temoporfinu, 376 mg ethanolu a 560 mg propylenglykolu). Graf znázorňuje inhibici růstu lidského karcinomu prsu linie MDA-MB-231 ve skupině Nu/Nu myší ($n=5$).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Syntéza kopolymeru polyethylenoxid-*block*-poly(ϵ -kaprolaktonu) (PEO-*b*-PCL) je založena na polymerizaci s otevíráním kruhu ϵ -kaprolaktonu bez přítomnosti katalyzátoru, iniciovaná pomocí polyethylenoxid monomethyleteru (MPEO). Do 50 ml odměrné baňky s magnetickým míchadlem byly vloženy 3 g (1,49 mmol) MPEO. Systém byl odplyněn v 5 cyklech vakuum - argon. V atmosféře argonu bylo přidáno 3,4 g (30 mmol) ϵ -kaprolaktonu. Následně byl systém



ochlazen suchým ledem/ethanol, evakuován a zahřát na 185 °C. Polymerizace s otevíráním kruhu trvala 33 hodin. Po polymeraci byl systém naplněn argonem a vychlazen na laboratorní teplotu. Pevné látky v baňce byly rozpuštěny v 10 ml dichlormethanu a vysráženy do 350 ml diethyletheru. Po vysušení byl polymer suspendován ve vodě a dialyzován proti vodě v dialyzační membráně MWCO 2 kDa. Příklad ¹H-NMR spektra kopolymeru PEO-*b*-PCL je zobrazen na Obrázku 1. Poměr monomerních jednotek jednotlivých produktů byl vypočten za použití intenzit protonových signálů označených **a** (δ = 3,63 ppm, odpovídá PEO bloku) a **c** (δ = 1,64 ppm, odpovídá bloku PCL) v ¹H-NMR spektru podle rovnice (1):

$$DP(PCL) = DP(PEO) * \frac{c}{a} \quad (1)$$

kde DP(PCL) je stupeň polymerizace poly(ε-kaprolaktonového) bloku, DP(PEO) je stupeň polymerizace polyethylenoxidového bloku a *c* a *a* jsou integrální intenzity signálů příslušných protonů (viz Obrázek 1).

Délka bloku PEO makroiniciátoru v kopolymeru se stupněm polymerace byla DP = 45 monomerních jednotek. Délka bloku PCL se stupněm polymerace DP = 7 monomerních jednotek. Výsledný kopolymer (polymerní surfaktant) má průměrný vzorec: PEO₄₅PCL₇.

Pevné lipidické nanočástice s inkorporovaným fotosenzibilizátorem temoporfinem byly připraveny pomocí vysokovýkonné homogenizační a ultrazvukové metody. Lipidická fáze složená z 1-tetradekanolu (10 mg/ml) byla vložena do skleněné lahvičky a zahřáta na 45 °C. Temoporfin (10 mg/ml) byl rozpuštěn v 1 ml dichlormetanu a přidán k lipidové fázi pro získání směsi lipid-léčivo po odpaření dichlormetanu. Vodná fáze byla získána rozpuštěním kopolymeru PEO₄₅PCL₇ (50 mg/ml) v 1 ml dichlormetanu, následným přidáním 5 ml H₂O a zahřátím na 45 °C. Horká lipidová fáze byla přidána k horké vodné fázi a následně byla směs homogenizovaná po dobu 2 min při 8000 otáčkách/min. Výsledná emulze byla ultrazvukovaná za použití standardního ultrazvukového hrotu (T25 digital Ultra-Turrax, IKA, Schoeller instruments, s.r.o., Czech Republic). Amplituda ultrazvuku byla nastavena na 50 % po dobu 35 min a na 70 % po dobu 5 min. Vzniklá emulze byla okamžitě ochlazená na laboratorní teplotu.

Pro měření velikosti částic (hydrodynamický poloměr, R_H), indexu polydisperzity (PDI) a zeta potenciálu (ZP) testovaných pevných lipidických nanoformulací s inkorporovaným temoporfinem byl použit Zetasizer (Zen 3600, Malvern Instruments Ltd.) pomocí dynamického rozptylu světla (DLS). Pro dosažení vhodné koncentrace před samotným měřením byly vzorky zředěny redestilovanou vodou (pH~5 výsledného roztoku). Veškerá měření probíhala při teplotě

25 °C. K reprezentaci dat distribuce velikosti NPs byla použita intenzitně vážená distribuce. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1.

Pro analýzu pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) byl použit kalorimetr (Q2000, V24.11 Build 124, TA Instruments) s proplachováním plynným dusíkem (50 cm³/min.). Přístroj byl kalibrován pro měření teploty a tepelného toku za použití india jako standardu. Analyzované byly vzorky jednak bez obsahu temoporfinu (označeny jako SLNP s příslušným PEO_xPCL_y), tak s inkorporovaným temoporfinem (připraveny dle Příkladu 1, 2, 3) a samotný temoporfin (pevná látka, 10 až 20 mg), (viz Obrázek 2). Nanoformulace byly umístěny do T-zero hermetických hliníkových pánviček a analýza probíhala v teplotních cyklech: ohřev - chlazení - ohřev, od 10 °C do 50 °C, při 5 °C/min. Teploty tání těchto vzorků byly odečteny z 1. DSC-křivky ohřevu. Začlenění temoporfinu do lipidové matrice má za výsledek bimodální termogram se dvěma endotermami: kolem 26 °C (eutektická směs temoporfinu a 1-tetradekanolu) a kolem 39 °C (1-tetradekanol). To znamená, že v lipidovém jádře existují dvě fáze, obsahující temoporfin a 1-tetradekanol. Toto složení umožňuje stabilitu pevných lipidických nanočástic při skladování při teplotě 4 °C a zároveň teplotu tání jádra při 39 °C.

Testované nanoformulace byly ve skleněných lahvičkách skladovány v chladničce při teplotě 4 - 8 °C, po dobu 1 měsíce. V den 1, 14 a 30 byla pomocí DLS měřena velikost částic (R_H , nm), PDI a ZP (mV) a to při pH ~ 5 a 7,4. Na základě statistické analýzy rozptylu jednoduchého třídění (one-way ANOVA) nebyl během skladování (den 1, 14, 30) zjištěn žádný významný rozdíl. Hodnota $\alpha=0,05$ byla použita jako prahová hodnota statistické významnosti.

Obsah temoporfinu v lipidové matrici byl stanoven pomocí UV-VIS spektrometrie (Evolution 220, Thermo Scientific™) následovně: Vzorky nanoformulací (1 µl) byly rozpuštěny v methanolu (0,999 ml) a analyzovány při 652 nm. Koncentrace temoporfinu byla vypočtena použitím Lambert-Beerova zákona, $A_{\max} = 652 \text{ nm}$, $\epsilon_{652} = 22\,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (2). Účinnost enkapsulace temoporfinu (EE %) a obsah temoporfinu v systému nanočástic (DL %) byly vypočteny podle rovnic (3) a (4) a výsledky jsou zobrazeny v Tabulce 2,

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l \quad (2)$$

$$EE (\%) = \frac{W_{\text{léčivo v SLNP}}}{W_{\text{total}}} \times 100 \% \quad (3)$$

$$DL (\%) = \frac{W_{\text{léčivo v SLNP}}}{W_{\text{léčivo v SLNP}} + W_{\text{lipid}} + W_{\text{surfaktant}}} \times 100 \% \quad (4)$$



(1) A = absorbance; ϵ_{λ} = molární absorpční koeficient při vlnové délce λ (652 nm); c = molární koncentrace absorpční složky v mol/L; l = délka absorpční vrstvy. (2) EE (%) = účinnost enkapsulace; $w_{\text{léčivo v SLNP}}$ = hmotnost temoporfinu v pevných lipidických nanočásticích; w_{total} = celková hmotnost temoporfinu použitá při přípravě testovaných nanoformulací; (3) DL (%) = obsah temoporfinu v nanočásticovém systému (drug loading); w_{lipid} = hmotnost 1-tetradekanolu; $w_{\text{surfactant}}$ = hmotnost PEO₄₅PCL₇.

Testované vzorky byly analyzovány a vizualizovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM) (Tecnai G2 Spirit Twin 12, FEI). Vzorek (2 μ l) byl nakapán na dírkovanou, uhlíkem potaženou mřížku a přebytek roztoku byl odsát dotykem úzkého pruhu filtračního papíru (1 min). Nanočástice byly při laboratorní teplotě ponechány zcela oschnout a následně byly pozorovány pomocí TEM mikroskopu (zobrazení ve světlém poli, urychlovací napětí 120 kV). Částice jsou zobrazeny jako černé skvrny na šedém pozadí (pozitivní kontrast), mají kulovitý tvar a velikost korelující s hydrodynamickým poloměrem, měřeným pomocí DLS, jak je znázorněno na Obrázku 3.

Pro studium *in vitro* uvolňování temoporfinu z testovaných formulací byla použita metoda dialýzy přes dialyzační membránu (viz Obrázek 4). Dialyzační membrána (3,5 kDa) byla na 20 min ponořena do destilované vody. Alikvotní objem formulace (2 ml) byl nejprve zředěn 2 ml 2 x koncentrovanějšího PBS. Tato směs byla přemístněna do dialyzačních membrán a následně vložena do předehřátého (37 °C) roztoku PBS o pH ~ 7,4 (200 ml) a ponechána míchat na magnetické míchačce (200 otáček za minutu). Alikvotní podíly (0,1 ml) vzorků byly v časových intervalech 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 24 a 72 hodin odebrané z vnitřního prostoru dialyzační membrány a analyzovány pomocí UV-VIS spektrometrie (po vhodném zředění methanolem). Následně byl vypočten procentuální obsah uvolněného temoporfinu a to na základě rozdílu jeho koncentrace použité pro přípravu roztoku SLNP (10 mg/ml) a stanové koncentrace pomocí UV-VIS spektrometrie v odebraném roztoku vzorku z vnitřku dialyzační membrány.

Buňky nádorové linie 4T1 (karcinom mléčné žlázy myši) a MDA-MB-231 (lidský adenokarcinom prsu) byly udržovány v exponenciální fázi růstu za sterilních podmínek v mediu RPMI 1640 obohaceném o 10% bovinního fetálního séra (FCS), penicilinu (100 jednotek/ml), streptomycinu (0,1 mg/ml) a L-glutaminu (2 mmol). Inkubovány byly při 37 °C v atmosféře z 95% vzduchu a 5% CO₂. Buněčné linie byly pasážovány každý druhý nebo třetí den.

Pro analýzu *in vitro* cytotoxicity testovaných formulací byly buňky 4T1 (2×10^5) nasazeny na Petriho misky (35 mm) a inkubovány přes noc při 37°C. K buňkám pak byly přidány testované formulace tak, aby finální koncentrace temoporfinu byly v rozmezí 0,25 - 2 μM a následně byly dále 16 hodin inkubovány. Koncentrace temoporfinu v SLNP byla zvolena tak, aby sama o sobě nezpůsobila více než 10% mortalitu buněk. Testovací misky s buňkami byly propláchnuty médiem bez fenolové červeně (FČ) a po přidání kultivačního media bez FČ byly 30 min ozařovány pomocí halogenové lampy (75 W) vybavené filtrem pro vlnové délky 620 až 680 nm (Andover, Salem, NH). Maximum excitace temoporfinu odpovídá $\lambda_{\text{ex}} = 652 \text{ nm}$. Intenzita ozařování buněk byla $3,7 \text{ mW/cm}^2$ s celkovou dávkou ozáření $6,6 \text{ J/cm}^2$. V Bürkerově komůrce byl 24 hodin po ozáření stanoven pomocí vstřebávání trypanové modři poměr živých a mrtvých buněk (% , buňky/ml) a tím byly získány křivky dávka – účinek, z kterých byly číselně vyhodnoceny hodnoty IC 50. Hodnota IC 50 představuje koncentraci temoporfinu, která je potřebná k usmrcení 50 % buněk a byla vypočtena pro každou křivku (Tabulka 3). V kontrolních experimentech byl hodnocen jejich toxický efekt bez ozáření (tzv. „dark toxicity“, toxicita bez fotodynamického efektu) a taktéž toxicita formulací SLNP bez obsahu temoporfinu ("prázdných", tj. 1-tetradekanol a PEO_xPCL_y) při stejných koncentračních podmínkách. Byla zjištěna velmi nízká toxicita bez ozáření stejně jako u SPLP bez temoporfinu (pod 10 % v celém koncentračním rozsahu).

Subcelulární lokalizace fotosenzibilizátoru temoporfinu byla zkoumána pomocí fluorescenční mikroskopie v porovnání s formulací originátora (komerční, 4 mg temoporfinu, 376 mg ethanolu a 560 mg propylenglykolu). Nádorové buňky 4T1 nasazené na krycí sklíčka, umístěné v Petriho miskách (průměr 35 mm) byly inkubovány s formulacemi temoporfinu o konečné koncentraci 2 μM (1 h nebo 4 h inkubace) nebo 1 μM (16 hod inkubace) v kultivačním médiu při 37 °C. Po inkubaci byly misky s buňkami promyty třikrát PBS, zality bezbarvým médiem bez FČ a zkoumány pod mikroskopem (DM IRB, Leica) vybaveným fotoaparátem (DFC 480) při použití objektivu s 63x olejovou imerzí a filtrační kostkou (N2.1, Leica), excitace: BP 515-560 nm, emise: LP 590 nm). Fluorescence formulací fotosenzibilizátoru temoporfinu v nádorových 4T1 buňkách byla měřena 1, 4 a 16 hodin po přidání formulace do kultivačního media. Testovaná nanoformulace, v porovnání s formulací originátora, vykazovala významně rychlejší kinetiku nárůstu fluorescence (po 4 h).

Pro sledování subcelulární kolokalizace byly buňky inkubovány s testovanou nanoformulací temoporfinu a k buňkám byl postupně přidán na 30 min 100 nM MitoTracker Green (pro značení mitochondrií) nebo 250 nM ER-Tracker Blue pro značení endoplazmatického retikula (ER). Pro

označení lysozomů byl do kultivačního média (1 h) přidán 500 nM LysoTracker Green. Filtrační kostka typu A (Leica, excitace: BP 340-380 nm a emise: LP 400 nm) byla použita pro analýzu ER Tracker Blue; filtrační kostka I3 (Leica, excitace: BP 450-490 a emise: LP 515) byla použita pro MitoTracker Green a LysoTracker Green. Testovaná nanormulace byla lokalizována především v ER.

Terapeutická účinnost pro cílený transport léčiva s PDT aplikací byla testována na nádorovém modelu Nu/Nu myši *in vivo* a byla srovnána s originalní formulací (komeční, označena jako originátor). Buňky lidského karcinomu prsu linie MDA-MB-231 (1×10^7 buněk) byly suspendovány v 0,1 ml PBS a 0,1 ml Matrigelu a následně subkutánně (s.c.) injikovány do zadních boků myši. Když hmotnost tumoru dosáhla objemu 200 až 300 mm³ (7 až 10 dnů po transplantaci), testována formulace byla v objemu 0,1 ml na 20 g myši intravenózně (i.v.) injikována do ocasní žíly v dávce temoporfinu 0,8 mg/kg myši. Po třech hodinách byla plocha nádoru (2 cm²) ozářena pomocí xenonové lampy, (500-700 nm, λ_{ex} 652 nm), o celkové maximální dávce světla 100 J/cm² a intenzitě ozáření 200 mW/cm². Kontrolní skupina myši byla za stejných podmínek ozářena, ale bez působení léčiva (viz Obrázek 5). Každá experimentální skupina se skládala z 5 myši. Čtyřicet dva dnů po podání testovaných nanoformulací byly myši usmrceny předávkováním ketaminem a nádory byly histologicky vyhodnoceny. Všechny aspekty zvířecích experimentů a chovu byly prováděny v souladu s národními a evropskými předpisy a byly schváleny ústavním výborem (Bríza, Tomáš, Jarmila Králová, Petr Cígler, Zdeněk Kejík, Pavla Poučková, Petr Vašek, Irena Moserová, Pavel Martásek, and Vladimír Král. 2012. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (1): 82–84; Králová, Jarmila, Tomáš Bríza, Irena Moserová, Bohumil Dolenský, Petr Vasek, Pavla Poučková, Zdenek Kejík, et al. 2008. *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (19):5964–73). Získaná data pro každou testovanou skupinu jsou vyjádřena jako aritmetický průměr (n=5), chyba měření byla vypočtena jako směrodatná odchylka ($\pm$ SD) a zobrazena jako funkce času. Zmenšení objemu nádoru bylo ve srovnání s neošetřenou kontrolnou skupinou statisticky významné na hladině významnosti $\alpha=0.01$ (Tabulka 4).

Inhibice růstu nádoru (tumor growth inhibition, % TGI) jako měřítko účinnosti terapie byla srovnána s komerční formulací (4 mg temoporfinu, 376 mg ethanolu a 560 mg propylenglykolu), (viz Obrázek 6). Vypočtena byla podle rovnice (5), kde V je střední objem nádoru konkrétní testované skupiny v daném časovém bodě, V_0 je střední objem nádoru konkrétní testované skupiny na začátku experimentu, V_k je střední objem nádoru kontrolní

skupiny (s aplikací fyziologického roztoku) v daném časovém bodě a V_{ko} je střední objem nádoru kontrolní skupiny na začátku experimentu:

$$TGI (\%) = 100 - \left[\frac{V/V_0}{V_k/V_{ko}} \times 100 \right] \quad (5)$$

Příklad 2

Formulace byla analogická Příkladu 1, obměna spočívala v jiném složení (stupeň polymerace poly(ϵ -kaprolaktonového) bloku) použitého kopolymery (PEO₄₅PCL₁₇). Výsledky z DLS analýzy (R_H , PDI, ZP) uvedeny v Tabulce 1. Výsledky z DSC jsou uvedeny na Obrázku 2. Výsledky pro účinnost enkapsulace temoporfinu (%) a obsah temoporfinu (%) v SLNP jsou uvedeny v Tabulce 2. Transmisní elektronové mikrografy testovaných vzorků jsou zobrazeny na Obrázku 3. Časový profil *in vitro* uvolňování temoporfinu (%) z nanoformulací je zobrazen na Obrázku 4. Analýza *in vitro* cytotoxicity probíhala dle Příkladu 1, obměna spočívala v použití finálních koncentrací temoporfinu inkorporovaného v testovaných SLNP, které byly v rozmezí 1 - 20 μ M. Výsledky z mortality buněk (%), IC 50 (μ M) jsou uvedeny v Tabulce 3. Postup subcelulární lokalizace fotosenzibilizátoru temoporfinu pomocí fluorescenční mikroskopie proběhl dle Příkladu 1. Postup stanovení subcelulární kolokalizace nanoformulací pomocí fluorescenční mikroskopie proběhl dle Příkladu 1, obměna spočívala v její lokalizaci - především v lysozomech. Výsledky terapeutické účinnosti pro cílený transport temoporfinu s PDT aplikací *in vivo* jsou zobrazeny na Obrázku 5 a jejich statistické vyhodnocení je uvedeno v Tabulce 4. Graf znázorňující inhibici růstu nádoru je zobrazen na Obrázku 6.

Příklad 3

Formulace dle Příkladu 1, obměna spočívala v jiném složení (stupeň polymerace poly(ϵ -kaprolaktonového) bloku) použitého kopolymery (PEO₄₅PCL₃₄). Výsledky z DLS analýzy (R_H , PDI, ZP) uvedeny v Tabulce 1. Výsledky z DSC jsou uvedeny na Obrázku 2. Výsledky pro účinnost enkapsulace temoporfinu (%) a obsah temoporfinu (%) v SLNP jsou uvedeny v Tabulce 2. Transmisní elektronové mikrografy testovaných vzorků jsou zobrazeny na Obrázku 3. Časový profil *in vitro* uvolňování temoporfinu (%) z nanoformulací je zobrazen na Obrázku 4. Analýza *in vitro* cytotoxicity dle Příkladu 1, obměna spočívala v použití finálních koncentrací temoporfinu inkorporovaného v testovaných SLNP, které byly v rozmezí 1 - 20 μ M. Výsledky z mortality buněk (%), IC 50 (μ M) jsou uvedeny v Tabulce 3. Postup subcelulární lokalizace fotosenzibilizátoru temoporfinu pomocí fluorescenční mikroskopie dle Příkladu 1. Výsledky terapeutické účinnosti pro cílený transport temoporfinu s PDT aplikací *in vivo* jsou zobrazeny na

Obrázku 5, obměna spočívala ve statistické analýze dat, kde zmenšení objemu nádoru bylo ve srovnání s neošetřenou kontrolnou skupinou statisticky nevýznamné na hladině významnosti $\alpha=0.01$, jak je uvedeno v Tabulce 4. Graf znázorňující inhibici růstu nádoru je zobrazen na Obrázku 6.

Příklad 4

Formulace dle Příkladu 1, obměna spočívala v hmotnostím složení lipidické fáze, kde navážka 1-tetradekanolu byla 50 mg/ml a ve hmotnostím složení vodné fáze, kde navážka PEO₄₅PCL₇ byla 10 mg/ml. Výsledky z DLS analýzy (R_H , PDI, ZP) uvedeny v Tabulce 1. Výsledky pro účinnost enkapsulace temoporfinu (%) a obsah temoporfinu (%) v SLNP jsou uvedeny v Tabulce 2.

Příklad 5

Formulace dle Příkladu 1, obměna spočívala v hmotnostím složení lipidické fáze, kde navážka 1-tetradekanolu byla 50 mg/ml a ve hmotnostím složení vodné fáze, kde navážka PEO₄₅PCL₁₇ byla 10 mg/ml. Obměna dále spočívala dále v jiném složení (stupeň polymerace poly(ϵ -kaprolaktonového) bloku) použitého kopolymeru (PEO₄₅PCL₁₇). Výsledky z DLS analýzy (R_H , PDI, ZP) uvedeny v Tabulce 1. Výsledky pro účinnost enkapsulace temoporfinu (%) a obsah temoporfinu (%) v SLNP jsou uvedeny v Tabulce 2.

Příklad 6

Formulace dle Příkladu 1, obměna spočívala v hmotnostím složení lipidické fáze, kde navážka 1-tetradekanolu byla 50 mg/ml a ve hmotnostím složení vodné fáze, kde navážka PEO₄₅PCL₃₄ byla 10 mg/ml. Obměna dále spočívala v jiném složení (stupeň polymerace poly(ϵ -kaprolaktonového) bloku) použitého kopolymeru (PEO₄₅PCL₃₄). Výsledky z DLS analýzy (R_H , PDI, ZP) uvedeny v Tabulce 1. Výsledky pro účinnost enkapsulace temoporfinu (%) a obsah temoporfinu (%) v SLNP jsou uvedeny v Tabulce 2.

Příklad 7

Formulace dle Příkladu 1, obměna spočívala v navážce temoporfinu použité při přípravě testovaných nanoformulací, která byla 20 mg/ml. Výsledky z DLS analýzy (R_H , PDI, ZP) uvedeny v Tabulce 1. Výsledky pro účinnost enkapsulace temoporfinu (%) a obsah temoporfinu (%) v SLNP jsou uvedeny v Tabulce 2.

Příklad 8

Formulace dle Příkladu 1, obměna spočívala v navážce temoporfinu použité při přípravě testovaných nanoformulací, která byla 20 mg/ml. Další obměna spočívala v jiném složení (stupeň polymerace poly(ϵ -kaprolaktonového) bloku) použitého kopolymeru (PEO₄₅PCL₁₇). Výsledky z DLS analýzy (R_H , PDI, ZP) uvedeny v Tabulce 1. Výsledky pro účinnost enkapsulace temoporfinu (%) a obsah temoporfinu (%) v SLNP jsou uvedeny v Tabulce 2.

Příklad 9

Formulace dle Příkladu 1, obměna spočívala v navážce temoporfinu použité při přípravě testovaných nanoformulací, která byla 20 mg/ml. Další obměna spočívala v jiném složení (stupeň polymerace poly(ϵ -kaprolaktonového) bloku) použitého kopolymeru (PEO₄₅PCL₃₄). Výsledky z DLS analýzy (R_H , PDI, ZP) uvedeny v Tabulce 1. Výsledky pro účinnost enkapsulace temoporfinu (%) a obsah temoporfinu (%) v SLNP jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 1: Velikost částic (R_H , nm), index polydisperzity (PDI), zeta potenciál (ZP, mV) vzorků pevných lipidických nanoformulací s inkorporovaným temoporfinem (průměr $\pm$ SD, $n = 3$), při pH~5.

Formulace	Koncentrace (mg / ml)			Hmotnostní procenta (obsah látky v sušině systému)		R_H (nm) $\pm$ SD	PDI $\pm$ SD	ZP (mV) $\pm$ SD
	1-tetradekanol	PEO _x PCL _y	temoporfin	1-tetradekanol	PEO _x PCL _y			
Příklad 1						13,3 $\pm$ 0,8	0,7 $\pm$ 0,3	-8,2 $\pm$ 1,7
Příklad 2	10	50	10	14,3	71,4	7,8 $\pm$ 2,3	0,4 $\pm$ 0,2	-17,8 $\pm$ 3,2
Příklad 3						8,9 $\pm$ 1,1	0,9 $\pm$ 0,2	-13,1 $\pm$ 0,5
Příklad 4						316,2 $\pm$ 22,5	0,9 $\pm$ 0,01	-9,2 $\pm$ 1,6
Příklad 5	50	10	10	71,4	14,3	349,2 $\pm$ 15,1	0,6 $\pm$ 0,01	-7,5 $\pm$ 1,3
Příklad 6						353,2 $\pm$ 25,3	0,9 $\pm$ 0,01	-6,5 $\pm$ 1,3
Příklad 7						6,3 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,02	-9,2 $\pm$ 1,3
Příklad 8	10	50	20	12,5	62,5	10,4 $\pm$ 1,6	0,9 $\pm$ 0,003	-4,5 $\pm$ 1,6
Příklad 9						20,6 $\pm$ 1,4	0,5 $\pm$ 0,01	-14,6 $\pm$ 1,2

20.03.18

Tabulka 2: Účinnosti enkapsulace temoporfinu (EE %) a obsah temoporfinu (DL %) v testovaných pevných lipických nanočástic s inkorporovaným temoporfinem (průměr ± SD, n = 3).

Formulace	DL (%) ± SD	EE (%) ± SD
Příklad 1	3,92 ± 0,06	22,22 ± 0,3
Příklad 2	3,93 ± 0,09	22,65 ± 0,1
Příklad 3	3,96 ± 0,08	23,06 ± 0,4
Příklad 4	2,98 ± 0,11	14,83 ± 0,6
Příklad 5	3,08 ± 0,05	17,02 ± 1,1
Příklad 6	3,12 ± 0,08	18,13 ± 0,8
Příklad 7	1,70 ± 0,34	5,26 ± 0,3
Příklad 8	1,82 ± 0,12	7,15 ± 0,4
Příklad 9	1,90 ± 0,02	9,12 ± 0,3

Tabulka 3: Mortalita buněk (%) a IC 50 (μM) po podání pevných lipidických nanočástic s inkorporovaným temoporfinem připravených dle Příkladů 1, 2 a 3 (průměr ± SD, n = 5).

Formulace	Koncentrace (μM) (temoporfinu)	Mortalita buněk (%) (mean ± SD)	IC 50 (μM) (temoporfin)
Příklad 1	0,25	24 ± 6,8	0,39
	0,5	67 ± 24,7	
	1	88 ± 0,9	
	2	93 ± 2,4	
Příklad 2	1	47 ± 12,9	2,41
	2,5	44 ± 4,2	
	10	66 ± 7,7	
	20	61 ± 11,5	
Příklad 3	1	21 ± 1,6	>20
	2,5	22 ± 7,6	
	10	26 ± 15,7	
	20	29 ± 9,7	

Tabulka 4: Statistická analýza *in vivo* dat („one-shot“ PDT) za použití statistické analýzy rozptylu jednoduchého třídění (one-way ANOVA) z programu Origin 9 (OriginLab software), při prahových hodnotách hladiny významnosti $\alpha = 0,05$ a $0,01$.

	Kontrola	Originátor	Příklad 1	Příklad 2	Příklad 3
Kontrola		++	++	++	+
Originátor	++		0	0	0
Příklad 1	++	0		0	++
Příklad 2	++	0	0		+
Příklad 3	+	0	++	+	

0 Žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami, $\alpha = 0.05$.

+ Statisticky významné rozdíly mezi skupinami, $\alpha = 0.05$.

++ Statisticky významné rozdíly mezi skupinami, $\alpha = 0.01$.

Příklad 10

Formulace dle Příkladu 1, s tím, že fotosenzibilizátor byl verteporfin.

Příklad 11

Formulace dle Příkladu 1, s tím, že fotosenzibilizátor byl lutecium texafyrin.

Příklad 12

Formulace dle Příkladu 1, s tím, že fotosenzibilizátor byl hypericin.

Příklad 13

Formulace dle Příkladu 1, s tím, že fotosenzibilizátor byl porficen.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Fotoaktivovatelná nanočástice pro fotodynamické aplikace, obsahující jádro a obal, **vyznačená tím, že** jádro obsahuje 1 až 50 hmotn. % fotosenzibilizátoru, vztaženo na celkovou sušinu nanočástice, s výhodou 1 až 4 hmotn. % fotosenzibilizátoru, vztaženo na celkovou sušinu nanočástice, a dále 1 až 80 hmotn. % (C_8 až C_{22}) mastných alkoholů, vztaženo na celkovou sušinu nanočástice, s výhodou 12 až 72 hmotn. % (C_8 až C_{22}) mastných alkoholů, vztaženo na celkovou sušinu nanočástice; a obal obsahuje 1 až 80 hmotn. % polymerního surfaktantu, s výhodou polyethylenoxid monomethyléter-*block*-poly(ϵ -karoplaktonu), vztaženo na celkovou sušinu nanočástice, s výhodou obal obsahuje 14 až 72 hmotn. % polymerního surfaktantu, vztaženo na celkovou sušinu nanočástice; přičemž velikost nanočástice je v rozmezí od 1 do 1000 nm, s výhodou v rozmezí od 11 do 760 nm, nejvýhodněji v rozmezí od 11 do 30 nm, a přičemž jádro nanočástice je při 4 °C pevné a při 39 °C kapalné, stanoveno diferenční skenovací kalorimetrií s proplachováním plynným dusíkem o objemu 50 cm³/min za použití india jako standardu v teplotních cyklech: ohřev - chlazení - ohřev, při 5 °C/min, a odečet teplot tání byl proveden z první křivky ohřevu diferenční skenovací kalorimetrie, kdy výsledkem byl bimodální termogram se dvěma endotermami, jednou pro eutektickou směs fotosenzibilizátoru a mastného alkoholu a druhou pro mastný alkohol.
2. Fotoaktivovatelná nanočástice podle nároku 1, **vyznačená tím, že** fotosenzibilizátor je vybráný z derivátů chlorinu a/nebo porfyrinu a/nebo antrachinonu, s výhodou je fotosenzibilizátor vybráný ze skupiny zahrnující temoporfin, verteporfin, lutecium texafyrin, hypericin a porficen.
3. Fotoaktivovatelná nanočástice podle nároku 1 nebo 2, **vyznačená tím, že** jádro obsahuje jeden typ (C_8 až C_{22}) mastného alkoholu, s výhodou je mastným alkoholem (C_{14}) mastný alkohol.
4. Fotoaktivovatelná nanočástice podle nároku 1 nebo 2, **vyznačená tím, že** jádro obsahuje kombinaci (C_8 až C_{22}) mastných alkoholů.
5. Fotoaktivovatelná nanočástice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačená tím, že** polymerního surfaktant je polyethylenoxid monomethyléter-*block*-poly(ϵ -karoplaktonu), s výhodou o polymerizačním stupni polyethylenoxidového bloku 10 až 100 a o polymerizačním

stupni poly (ϵ -karoplaktonového) bloku 3 až 60, výhodněji je polymerizační stupeň polyethylenoxidového bloku 20 až 50 a poly (ϵ -karoplaktonového) bloku 3 až 20, nejvýhodněji je polymerizační stupeň polyethylenoxidového bloku 45 a poly (ϵ -karoplaktonového) bloku 7.

6. Způsob přípravy fotoaktivovatelné nanočástice podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačený tím, že:**

- fotosenzibilizátor se rozpustí v rozpouštědle, s výhodou v dichlormethanu, a přidá se k (C_8 až C_{22}) mastnému alkoholu zahřátému na 45 °C za vzniku první fáze;
- polymerní surfaktant se rozpustí v organickém rozpouštědle, s výhodou v dichlormethanu, přidá se voda a směs se zahřeje na 45 °C za vzniku druhé fáze;
- obě zahřáté fáze se smíchají a homogenizují, s výhodou po dobu 2 min při 8000 otáčkách/min;
- výsledná emulze se podrobí působení ultrazvuku;
- výsledná emulze se ochladí na laboratorní teplotu.

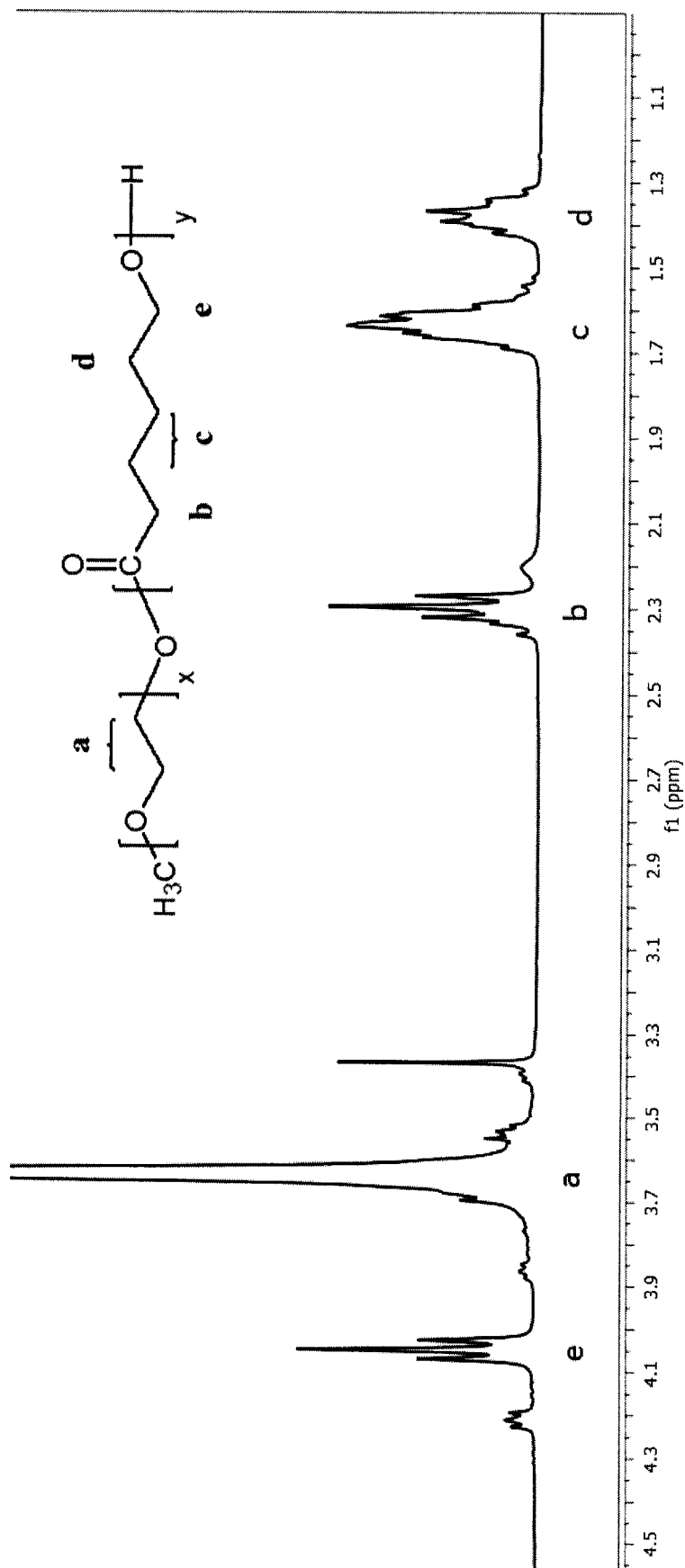
7. Farmaceutická kompozice, **vyznačená tím, že** obsahuje fotoaktivovatelnou nanočástici podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5 a dále obsahuje farmaceuticky přijatelné přísady, vybrané ze skupiny zahrnující antiaheziva, pojiva, potahovací látky, barviva, bobtnadla, ochucovadla, maziva, konzervanty, sladidla, sorbenty.

8. Fotoaktivovatelná nanočástice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5 a/nebo farmaceutická kompozice podle nároku 7 pro použití jako léčivo.

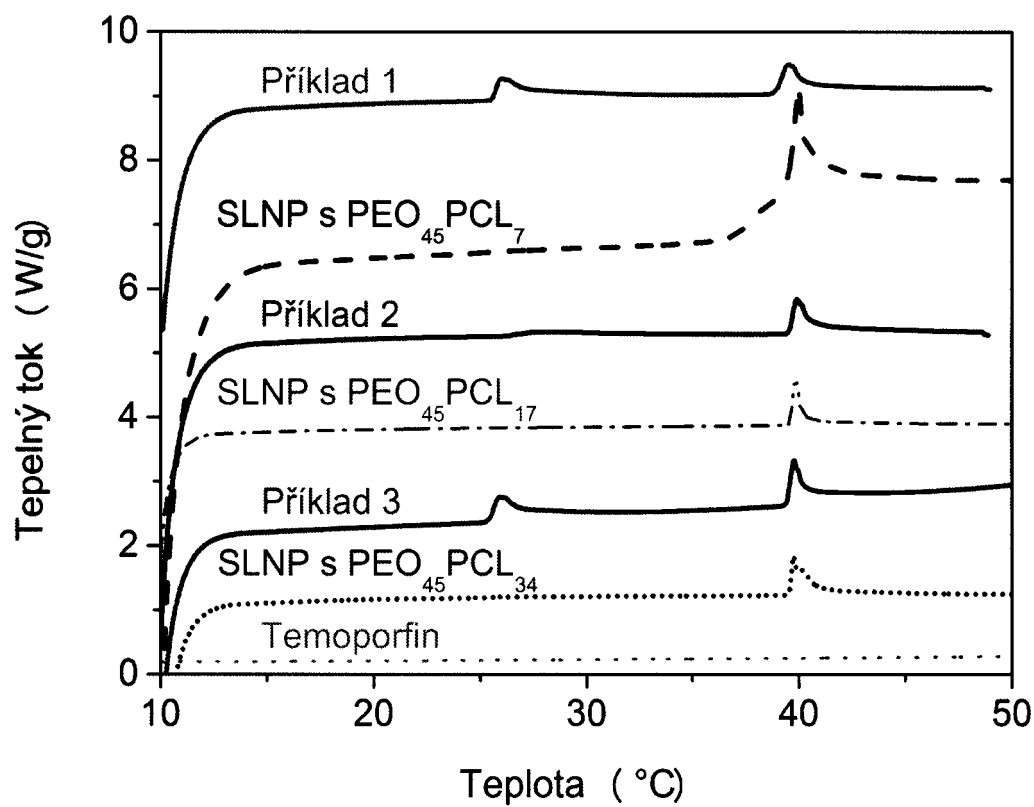
9. Fotoaktivovatelná nanočástice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5 a/nebo farmaceutická kompozice podle nároku 7 pro použití jako léčivo pro intravenózní aplikaci.

10. Fotoaktivovatelná nanočástice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5 a/nebo farmaceutická kompozice podle nároku 7 pro použití při fotodynamické terapii a/nebo fotodynamické diagnostice.

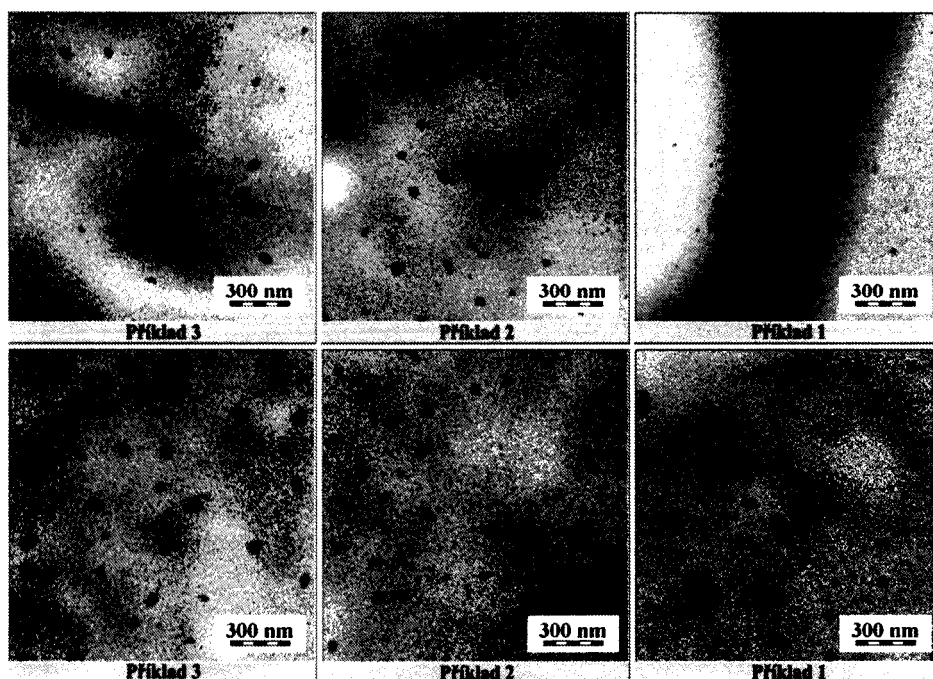
1/5
23



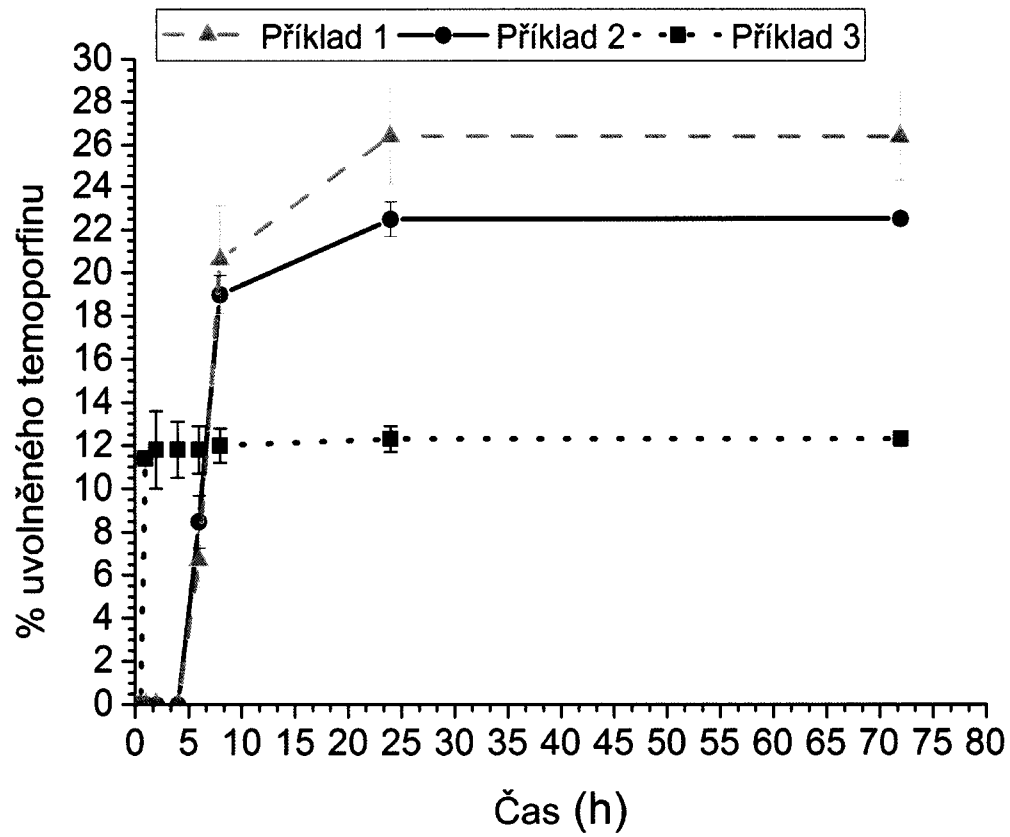
Obrázek 1



Obrázek 2



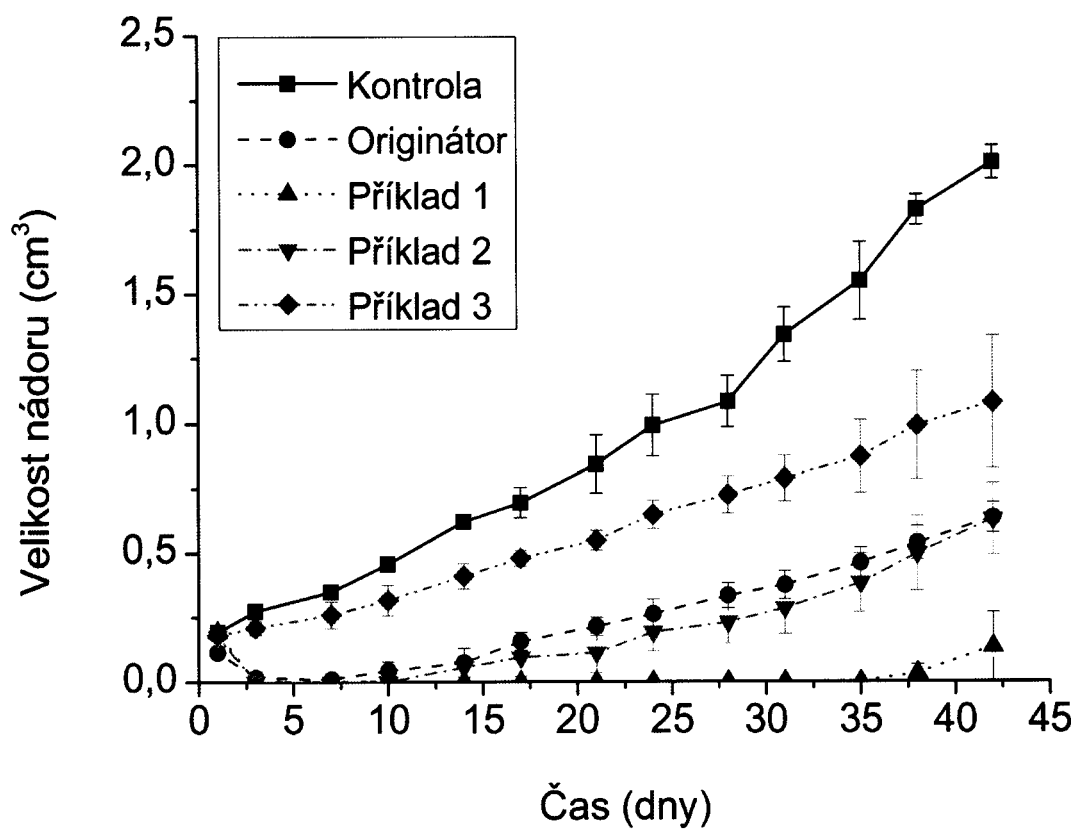
Obrázek 3



Obrázek 4

4/5
26

PV2016-119
29.02.15

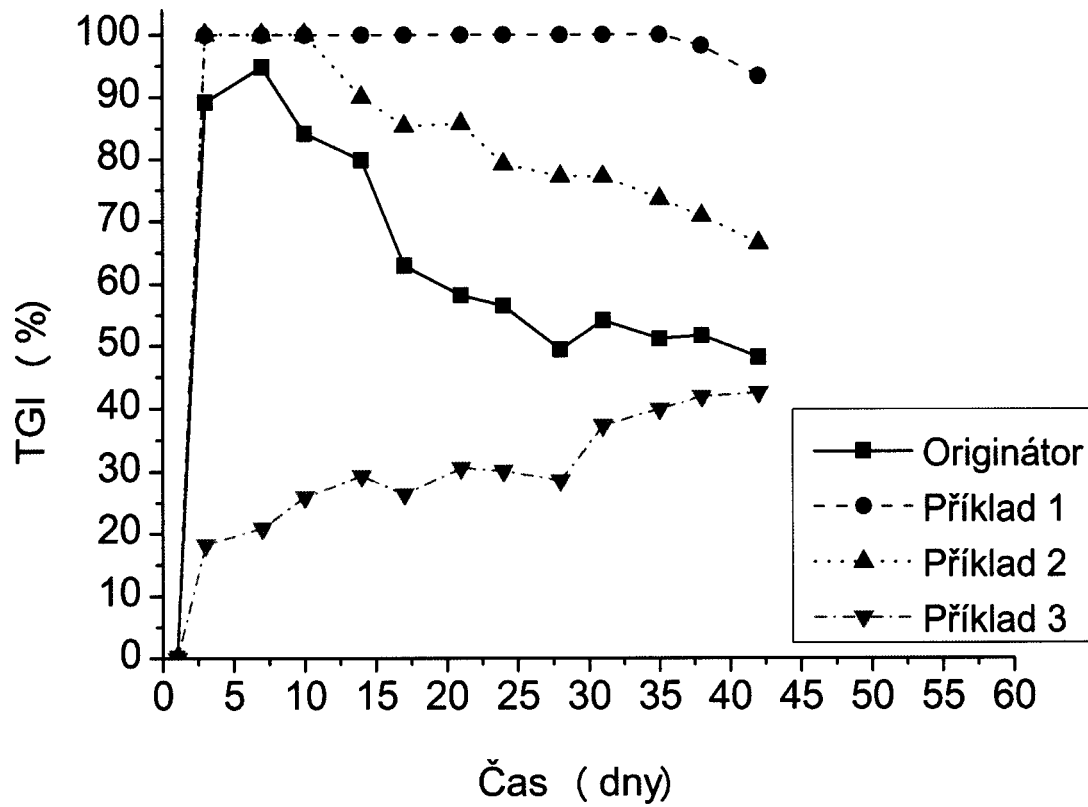


Obrázek 5

5/5
27

29.02.15

PV 2016-119



Obrázek 6