

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2007-599**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **31.08.2007**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.03.2009**  
(Věstník č. 10/2009)

(51) Int. Cl.:

<i>A61K 47/40</i>	(2006.01)
<i>A61K 41/00</i>	(2006.01)
<i>A61K 31/724</i>	(2006.01)
<i>A61K 31/409</i>	(2006.01)
<i>A61N 5/06</i>	(2006.01)
<i>A61P 35/00</i>	(2006.01)
<i>C07D 487/22</i>	(2006.01)
<i>A61K 33/30</i>	(2006.01)
<i>A61K 33/32</i>	(2006.01)
<i>A61K 33/34</i>	(2006.01)
<i>A61K 33/26</i>	(2006.01)
<i>A61K 33/24</i>	(2006.01)
<i>A61K 33/38</i>	(2006.01)
<i>A61K 48/00</i>	(2006.01)

(71) Přihlašovatel:

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

Univerzita Karlova v Praze, Praha 1, CZ

Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha 6, CZ

(72) Původce:

Král Vladimír Prof. RNDr. DrSc., Praha 2, CZ

Bříza Tomáš Ing. Ph.D., Praha 4, CZ

Kejík Zdeněk Ing., Sokolov, CZ

Králová Jarmila RNDr. CSc., Praha 2, CZ

Poučková Pavla Doc. RNDr. CSc., Dobřichovice, CZ

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití multimodálních systémů pro přípravu  
přípravků k léčbě a diagnostikování  
nádorových onemocnění**

(57) Anotace:

Použití multimodálního systému pro přípravu k léčbě a diagnostikování nádorových onemocnění, tvořeného cykloextrinem substituovaným oligopyrrolovým makrocylem (porfyrinem, calixfyrinem nebo korinem) ve formě inkluzního komplexu s léčivem ze skupiny tvořené doxorubicinem, taxolem, mitomycinem C, paraplatinem, zitostopem, zitazoniem, methotrexatem, ieukeranem, florafurem, bicnuem, deticenem nebo jiným léčivem s aromatickou skupinou. Multimodální systém může být dále tvořen metalokomplexem oligopyrrolvého makrocylu, na němž je vázán jako axiální ligand mono- nebo polyklonální protilátka.

všude "pyrrol"  
všude stejná veličnost  
jedna a  
stejná řádlování

Použití multimodálních systémů pro přípravu přípravků k léčbě a diagnostikování nádorových onemocnění.

Oblast techniky

Vynález se týká použití multimodálních systémů určených pro cílený transport léčiv do nádorových buněk pro přípravu přípravků k léčbě a diagnostikování nádorových onemocnění.

Tyto systémy jsou založeny na porfyrinovém, korinovém skeletu nebo calixfirinovém skeletu, který je vhodně substituován cyklodextrinovými jednotkami (CD), které tvoří s vybraným léčivem supramolekulární komplex. Navíc tyto komplexy mohou být rozšířeny o příslušné metalokomplexy porfyrinů s axiálně vázanou protilátkou.

Dosavadní stav techniky

Kombinovaná terapie byla už několikrát popsána, a to především v oblasti protinádorových léků. Základem kombinované terapie je vyvolání synergického účinku jednotlivých dílčích léčebných metod. Obvykle se jedná o kombinace účinku samotného léčiva s terapeutickým účinkem jeho nosiče. Může jít o fotodynamickou terapii, imunostimulaci či hormonální terapii. Je popsána celá řada konjugátů jak přírodních, tak syntetických polymerů s cytostatiky např. doxorubicinem. Takovou možnost kombinované terapie představují také transportní systémy na bázi porfyrinu s cytostatiky. Vazba porfyrinu na makromolekulární nosič (polymer, protein) vede ke zvýšení pasivního transportu, neboť výrazně větší molekuly jsou zadržovány v nádoru podstatně lépe než malé molekuly. Díky snadné vazbě metaloporfyrinu na heteroaromatický systém může být tento systém použit pro cílený transport celé řady derivátů a analogů hormonů, peptidů, <sup>acid</sup> báží (M. J. Vicent, F. Greco, R.I. Nicholson, A. Paul, P. C. Griffiths, and R. Duncan. Polymer therapeutics designed for a combination therapy of hormone-dependent cancer *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2005, 44, 4061-4066; B. Rihova, J. Strohalm, J. Prausova, K. Kubackova, M. Jelinkova, L. Rozprimova, M. Sirova, D. Plocova, T. Etrych, V. Subr, T. Mrkvan, M. Kovar, K. Ulbrich. Cytostatic and immunomobilizing activities of polymer-bound drugs: experimental and first clinical data *J. Control. Release*, 2003, 91, 1-16)

Závažným problémem řady zajímavých protinádorových látek je jejich nízká rozpustnost ve vodném prostředí, což negativně ovlivňuje jejich distribuci. Jedním z možných řešení nízké rozpustnosti je komplexace těchto léčiv s vysoce rozpustnými sloučeninami jako jsou cyklodextriny. Cyklodextriny jsou cyklické oligoglukózové jednotky s hydrofóbní kavitou pro komplexaci léčiva a hydrofilním povrchem zajišťující dobrou rozpustnost komplexu. (Y. Liu, G. S. Chen, L. Li, H.Y. Zhang, D. X. Cao, Y. J. Yuan. Inclusion complexation and solubilization of paclitaxel by bridged bis(beta-cyclodextrin)s containing a tetraethylenepentaamino spacer. *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 4634-4637; S. Alcaro, D. Battaglia, F. Ortuso Docking experiments showing similar recognition patterns of paclitaxel when interacting with different macromolecular targets. *Farmaco*, 2003, 58, 691-698; S. K. Dordunoo, H. M. Burt Solubility and stability of taxol: effects of buffers and cyclodextrins *Int. J. Pharm.*, 1996, 133, 191-201)

Porfyriny, koriny a calixfiriny substituované různými substituenty v poloze *meso*- byly zatím více či méně úspěšně využity jako fotosenzitizéry pro fotodynamickou terapii (C. N. Lunardi, A. C. Tedesco. Synergic photosensitizers: a new trend in photodynamic therapy. *Current Org. Chem.*, 2005, 9, 813-821; D. Kessel. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, 1, 837-840).

Cyklodextriny spolu s léčivy byly zkoumány jako možné transportní systémy (T. Cserhfiti, J. Holló. Interaction of taxol and other anticancer drugs with hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, 1994, 108, 69-75), přičemž některé tyto systémy jsou dnes studovány a využívány pro transport léčiv do nádorových buněk. Dosud však nebyl publikován ani patentován přístup, který by propojoval vlastnosti porfyrinů s inkluzními komplexy cyklodextrin-léčivo.

### **Využití porfyrinových derivátů v PDT**

Podstatou léčby rakoviny pomocí fotodynamické terapie (PDT) je produkce vysoce reaktivních druhů kyslíku (singletový kyslík, kyslíkové radikály), které reagují s důležitými biomolekulami a výsledně dochází k poškození nádorové buňky. Jedny z nejrozšířenějších fotosenzitizérů jsou porfyriny (K. Berg, P. K. Selbo, A. Weyergang, A. Dietzel, L. Prasmickaite, A. Bonsted, B. Ø. Engesaeter, E. Angelpetersen, T. Waorle, N. Frandsen, A. Hogset Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications *J. Microscopy*, 2005, 218, 133-147; K. Lang, J. Mosinger, D.M. Wagnerová. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.*, 2004, 248, 321-350; I. Scalise, E. N. Durantini.

Photodynamic effect of metallo 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tris(4-methylphenyl) porphyrins in biomimetic AOT reverse micelles containing urease. *J Photochem. Photobiol. A, Chem.*, 2004, 162, 105–113)

### **Využití protilátky**

Použití vhodné protilátky, např. proti nádorovým receptorům (Anti-HER2/neu) při cíleném transportu léčiv vede k výraznému zvýšení selektivity systému. Kromě toho již samotná hmotnost konjugátu zajišťuje pasivní transport do nádoru. Navíc dochází k výraznému prodloužení doby pobytu léčiva v krevním řečišti. Významný účinek protilátky se může projevit i při fotodynamické terapii, fotosensitizer vázaný na protein je deagregován a účinnost PDT systému je větší (G. P. Adams, L. M. Weiner. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23, 1147-57; V. S. Jisha, K. T. Arun, M. Hariharan, D. Ramaiah. Site-selective binding and dual mode recognition of serum albumin by a squaraine dye *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 6024-6025; J. A. Kim. Targeted therapies for the treatment of cancer. *Am. J. Surg.*, 2003, 186, 264–268).

Pro přípravu supramolekulárních metalokomplexů slouží odpovídající zinečnaté, mědnaté, cobalnaté, železnaté cademnaté, nikelnaté a další sole přechodných kovů, protilátka a vybraný cyklodextrin-porfyrinový derivát využívaný pro přípravu supramolekulárních komplexů.

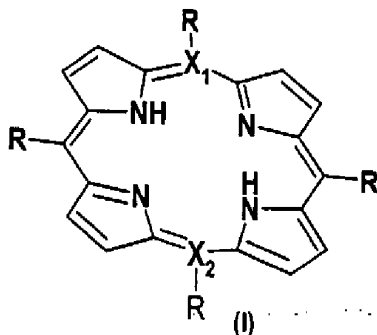
Metalokomplexy porfyrinů a korinů jsou již popsány ( Y. Wang<sup>1</sup>, Q.-Y He<sup>1</sup>, C. M. Chel, J. F. Chiu. Proteomic characterization of the cytotoxic mechanism of gold (III) porphyrin 1a, a potential anticancer drug. *Proteomics*, 2006, 6, 131–142; N. Rubio, F. Prat, N. Bou, J. Borrell, J. Teixido, A. Villanueva, A. Juarranz, M. Can<sup>2</sup>ete, J. C. Stockert<sup>b</sup>, S. Nonell. A comparison between the photophysical and photosensitising properties of tetraphenyl porphycenes and porphyrins. *New J. Chem.*, 2005, 29, 378-384; J. J. Shiang, A. G. Cole, R. J. Sension, K. Hang, Y. Weng, J. S. Trommel, L. G. Marzilli, T. Lian. Ultrafast excited-state dynamics in vitamin B12 and related Cob(III)alamins. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 801-808), tak jako využití možnosti na ně axiálně vázat různé ligandy (E. Gibbs, W. R. Skowronek, W. T. Morgan, U. Müller-Eberhard, R. F. Pasternack. Reactions of water-soluble metalloporphyrins with the serum protein, hemopexin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102 3939-3944; H. M. Marques, K. L. Brown. Molecular mechanics and molecular dynamics simulations of porphyrins, metalloporphyrins, heme proteins and cobalt corrinoids. *Coord. Chem. Rev.*, 2002, 225, 123–158). Dosud však nebyl publikován ani patentován <sup>k</sup>Komplexní přístup, který by zkombinoval teraperutické možnosti metaloporfyrinů (PDT) s účinkem protilátky ( Cílený transport, stimulace imunitního systému), k níž je nekovalentně navázán

(77)  
 oligopyrolový metalokomplex ( porfyrín, korín, calixfyrín) s antinádorovým účinkem léčiva komplexovaným cyklodextrinem.

Proto bylo naším cílem připravit takové oligopyrolové-cyklodextrin systémy , u kterých by došlo k synergii jednotlivých dílčích terapeutických účinků, které nabízí porfyrinový skelet – (fotodynamický efekt – PDT) a inkluzní komplex cyklodextrinové jednotky s léčivem (cytotoxicita) a tyto systémy dále expandovat na příslušné multimodální systémy (supramolekulární metalokomplexy), které umožňují terapeutický účinek tohoto systému (metalooligopyrolový-cyklodextrin-léčivo) systémů rozšířit o účinek koordinačně navázané protilátky. Příprava těchto systémů a biologické studie jsou předmětem tohoto patentu. Hlavní myšlenkou je využití takovýchto systémů pro cílený transport léčiva do nádorových buněk.

#### Podstata vynálezu

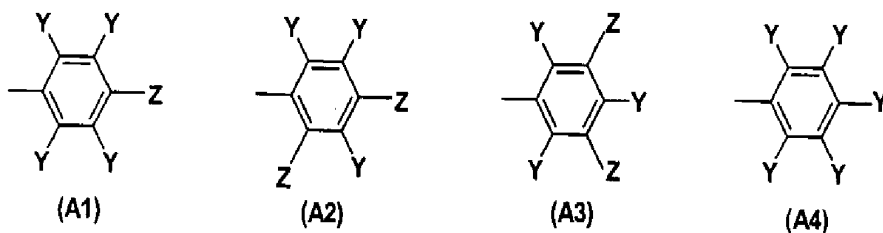
Předmětem vynálezu je použití multimodálního systému pro přípravu přípravků k léčbě a diagnostikování nádorových onemocnění, přičemž tento systém se sestává ze substituovaného makrocyklu **obecného vzorce I**,



vybraným ze skupiny tvořené . porfyrinem, calixfyrinem nebo korinem,

kde v případě tetrasubstituovaného porfyrinu v polohách *meso* platí, že  $X_1, X_2$  je C, v případě korinu  $X_2$  netvoří žádný atom a  $X_1$  je C a v případě calixfyrinu je X a  $X_1$  tvořeno buď  $CR^1R^1$  (uhlík nese dva stejné substituenty), nebo  $CR^1R^2$  (uhlík je substituován dvěma odlišnými substituenty) a kde substituenty  $R^1$  a  $R^2$  představují alkyl vybraný ze skupiny methyl, ethyl, propyl, butyl, i-propyl, i-butyl, fenyly,

kde R jsou substituenty znázorněné obecným vzorcem A1, A2, A3, nebo A4,



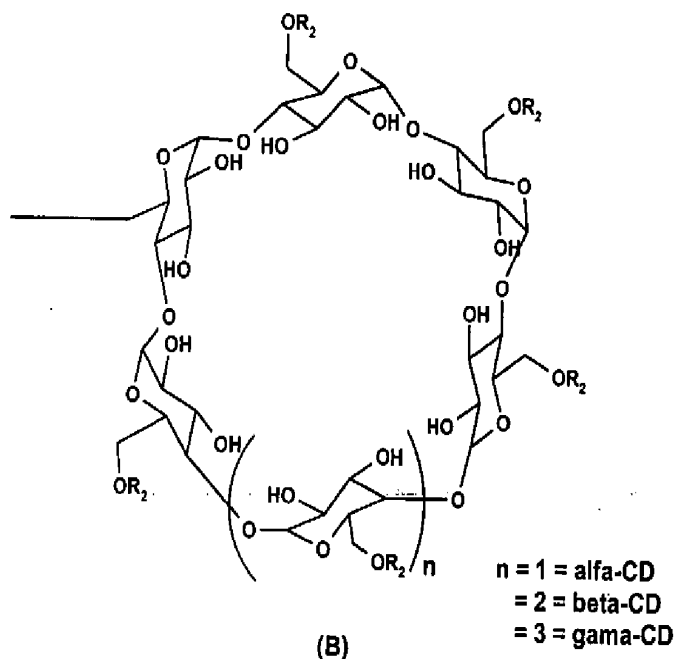
kde Y představuje atom H nebo atom F,

kde Z v případě substituentu znázorněným obecným vzorcem A1 znamená skupinu O-R<sub>1</sub>, S-R<sub>1</sub>, NH-R<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>O-R<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>S-R<sub>1</sub> nebo CH<sub>2</sub>NH-R<sub>1</sub>,

kde Z v případě obecného vzorce A2 je stejný nebo různý a znamená skupinu O-R<sub>1</sub> nebo S-R<sub>1</sub> nebo NH-R<sub>1</sub>

a kde Z v případě obecného vzorce A3 znamená skupinu NH-R<sub>1</sub>,

kde R<sub>1</sub> je cyclodextrin obecného vzorce B, kde n je 1 až 3,

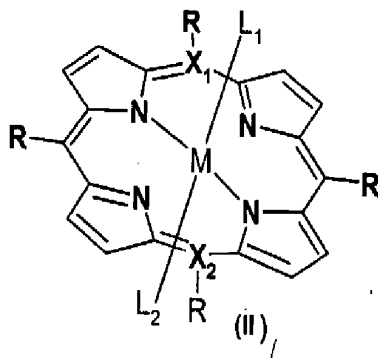


kde R<sub>2</sub> představuje alkyl skupinu o počtu uhlíků 1 až 10, například methyl (Me), ethyl (Et), propyl (Pr), která může být navíc větvená jako například isopropyl (i-Pr), cyclodextrinový kruh obecného vzorce B je různé velikosti od alfa-cyclodextrinu n = 1 (alfa-CD), beta-cyclodextrinu n = 2 (beta-CD) až po gama-cyclodextrin n = 3 (gama-CD),

přičemž cyclodextrinový kruh obecného vzorce B tvoří inkluzní komplex s léčivem vybraným ze skupiny tvořené doxorubicinem, taxolem, mitomycinem C, paraplatinem,

zitostopem, zitazoniem, methotrexatem, icukeranem, florafurem, bicnuem, deticenem nebo jiným léčivem s aromatickou skupinou.

Předmětem vynálezu je dále metalokomplex oligopyrolového makrocyklu, který je v logické souvislosti ze substituovaným makrocyklem **obecného vzorce I**, a je z něho vytvořen insercí M a navázáním axiálních ligandů, obecného vzorce (II)



kde R, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> mají vpředu uvedený význam a L<sub>1</sub> a L<sub>2</sub> jsou monoklonální protilátka (MABs) nebo polyklonální protilátka (PABs) a M je kov, vybraný ze skupiny tvořené zinkem, kobaltem, niklem, stříbrem, manganem, železem nebo mědí.

Metalokomplex oligopyrolového makrocyklu obecného vzorce (II) lze rovněž použít pro přípravu přípravku k léčbě a diagnostikování nádorových onemocnění, zejména jako stabilního transportního systému selektivního vůči nádoru.

Prekurzory pro přípravu supramolekulárních komplexů a metalokomplexů jsou:

1. porfyrinové, korinové a calixfyrinové deriváty substituované v *meso*-poloze vhodnou fenylovou skupinou.
2.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -cyklodextriny s vhodnou funkční skupinou - HN<sub>2</sub>, SH, OH, CH<sub>2</sub>Br, OTs.
3. acetáty vybraných kovů (Zn, Co, Ni, Mn, Fe, Cu) nebo acetylacetonáty těchto kovů.
4. vhodné léčivo například doxorubicin, taxol
5. monoklonální nebo polyklonální protilátka

Celý multimodální (supramolekulární) systém tedy tvoří makrocyclický skelet, který je preferenčně akumulován v nádorových tkáních a má fotofyzikální vlastnosti umožňující fotodynamickou terapii (PDT). Další komponenta systému- cyklodextrin (kovaletně vázaný



na makrocyklus) tvoří stabilní inkluzní komplexy s cytostatiky, a tím je vytvářen další léčebný mod. Vedle toho, díky tvorbě metalokomplexů makrocyklického systému (porfyrin, korin, calixfirin) vnášíme další selektivní transportní a léčebný mod založený na použití mono- a polyklonálních protilátek vázaných jako axiální ligand na metalomakrocyklu. Výsledkem je tedy systém, který je selektivně akumulován v nádorové tkáni, umožňuje PDT terapii, dále umožňuje selektivní transport cytostatik do nádorových buněk a v neposlední řadě terapeutické využití mono- a polyklonálních protilátek ve smyslu cíleného transportu supramolekulárního systému do nádorových buněk.

Supramolekulární komplexy jsou založeny na porfyrinovém, korinovém nebo calixfirinovém skeletu, který tvoří fotoaktivní jádro celého komplexu, jehož CD substituent umožní komplexaci vloženého léčiva formou inkluzního komplexu.

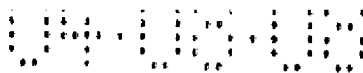
Porfyrin nebo korin může být substituovaný ve všech nebo ve vybraných *meso*-polohách fenylovou skupinou. Fenylová skupina může být ve všech nebo ve vybraných polohách substituována halogeny, hydroxylovými skupinami, methoxylovými, ethoxylovými nebo jinými alkoxylovými skupinami, alifatickým lineárním či větveným uhlovodíkem, glykolovou či oligoethylenglykolovou skupinou.

Ve všech případech, alespoň jedna tato fenylová skupina nese v poloze *para* cyklodextrinovou jednotku různé velikosti ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), která je k fenylové skupině připojena pomocí methylenové spojky a nebo pomocí heteroatomu O, N nebo S. Cyklodextrinová jednotka navíc může být substituována ve všech nebo ve vybraných polohách různými substituenty jako je amino skupina, methyl skupina, lineární či větvené alkylové řetězce různé délky, karboxylová skupina, fosfátová nebo sulfátová skupina.

Dále je k tomuto porfyrinu nekovalentně vázáno léčivo jako je taxol, doxorubicin, mitomycin C, paraplatin, zitostop, zitazonium, methotrexate, ieukeran, florafur, bicnu, deticene, nebo jiné léčivo nesoucí aromatickou skupinu. Tato nekovalentní vazba je zprostředkována pomocí jedné nebo více cyklodextrinových jednotek (v závislosti na stupni substituce heteroaromatického jádra cyklodextrinovou jednotkou) Cyklodextrinová jednotka tvoří s daným léčivem inkluzní komplex a celý systém lze tak označit jako supramolekulární komplex.

Další skupinou multimodálních systémů jsou supramolekulární metalokomplexy s proteiny, které jsou odvozeny od výše popsaných cyklodextrin-porfyrinových derivátů tím





způsobem, že příslušný derivát (porfyrin, korin nebo calixfirín) tvoří s vybraným kovem odpovídající metalokomplex, na který se axiálně váže protilátka.

Tímto kovem může být například zinek, měď, mangan, cobalt, železo, nikl a další přechodné kovy, jejíž prostorová orientace orbitalů umožňuje zaujmout geometrii tetragonální pyramidy nebo tetragonální bipyramidy. V případě metalokomplexu využívajícího kov, který zaujímá geometrii tetragonální pyramidy, bude na tento kov vázán axiálně pouze jeden ligand. V případě kovu, který zaujímá geometrii tetragonální bipyramidy, budou na kov axiálně vázány dva ligandy.

Axiálním ligandem je v tomto případě myšlena vybraná lidská monoklonální polyklonální protilátka, například - Endoglobulin S/D od firmy Baxter.

Základním výchozím materiálem pro vytvoření stabilních supramolekulárních komplexů jsou *meso*-fenyl-substituované porfyriny, cyklodextrinové deriváty, vhodná léčiva, monoklonální a polyklonální protilátky.

Hlavní myšlenkou je využití takovýchto systémů pro cílený transport léčiva do nádorových buněk. Vlastní destrukce nádorové buňky je potom výsledkem synergického účinku cytotoxicity léčiva a fotodynamického efektu porfyrinového skeletu aktivovaného ozářením světlem dané vlnové délky. Zapojení protilátky do tohoto systému výrazně zvýší jeho selektivitu vůči nádorovým buňkám. Navíc posílení imunitního systému účinkem protilátky výrazně omezí riziko recidivy nádoru.

Příprava oligopyrolových makrocyklů, respektive cyklodextrin-porfyrinových derivátů probíhá tak, že na příslušný porfyrin se působí vhodným cyklodextrinem elektrofilního charakteru (derivát s tosylátovou (OTs) skupinou) nebo nukleofilního charakteru (derivát s OH, SH nebo NH<sub>2</sub> skupinou) v rozpouštědle vybraném ze skupiny dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu, glymu, diglymu, triglymu a tetraglymu. Teplota při které je substituce prováděna se pohybuje v rozmezí 20 až 160 °C, doba reakce se pohybuje v rozmezí 1 až 10 dnů.

V případě cyklodextrinových a porfyrinových derivátů nesoucích OH funkční skupiny se na jednu z nich před započítím jejich vlastní reakce působí hydridem sodným, hydridem draselným, uhličitanem draselným nebo uhličitanem cesným v prostředí suchého rozpouštědla vybraného ze skupiny dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu, glymu, diglymu, triglymu a tetraglymu. Po vygenerování příslušné sodné, draselné nebo cesné soli, se na tuto sůl (porfyrinu nebo cyklodextrinu) působí odpovídajícím porfyrinovým

derivátem [porfyrinové deriváty s pentafluorfenylovou skupinou nebo *para*- či *meta*-(brommethyl)fenyl skupinou v *meso* poloze] korinovým, calixfyrinovým nebo cyklodextrinovým derivátem (cyklodextriny s funkční skupinou OTs). Teplota, při které je substituce prováděna se pohybuje v rozmezí 20 až 160 °C, doba reakce se pohybuje v rozmezí 1 až 10 dnů.

V případě porfyrinových a cyklodextrinových derivátů nesoucích SH, NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub> nebo OTs funkční skupiny, se do reakční směsi přidává báze, kterou je například pyridin, triethylamin nebo jiná vhodná báze. Připravené produkty se izolují a čistí pomocí macerace, chromatografie a krystalizace.

Stejný způsob lze použít na přípravu korin-cyklodextrinových derivátů a calixfyrin-cyklodextrinových derivátů.

Příprava metalokomplexů je založena na reakci příslušného porfyrin-cyklodextrin derivátu korin-cyklodextrin derivátu nebo calixfyrin-cyklodextrin derivátu s odpovídajícím acetylacetonátem nebo octanem kovu (Zn, Ni, Co, Fe atd.). Výsledná reakční směs je poté odpařena do sucha a promyta dichlormethanem. Produkt je vakuově sušen.

Příprava supramolekulárních komplexů (inkluzní komplexy porfyrin-cyklodextrin, korin-cyklodextrin a calixfyrin-cyklodextrin) s léčivem je založena na působení léčiva na porfyrin-cyklodextrin, korin-cyklodextrin a calixfyrin-cyklodextrin derivát, případně na příslušný metalokomplex, přičemž výsledný supramolekulární komplex je uchováván ve formě roztoku.

Metalokomplexy s axiálně vázanou protilátkou na kovu se připravují tak, že se na příslušný metalokomplexový derivát porfyrin-cyklodextrin, korin-cyklodextrin nebo calixfyrin-cyklodextrin s léčivem působí vybranou protilátkou v prostředí dimethylsufoxidu.

#### Příklady provedení

Příklady připravených systémů jsou uvedeny v následující tabulce I, kde Z = OR<sub>1</sub> = (a), SR<sub>1</sub> = (b), NHR<sub>1</sub> = (c), CH<sub>2</sub>OR<sub>1</sub> = (d), CH<sub>2</sub>SR<sub>1</sub> = (e), CH<sub>2</sub>NHR<sub>1</sub> = (f), kde malá písmena v závorce vyjadřují tyto skupiny v tabulce jednotlivých derivátů a kde substituent R<sub>1</sub> znamená cyklodextrin obecného vzorce B s počtem sacharidových jednotek 6-alfa, 7-beta, 8-gama.

Sloučenina	X	R	Y	Z	R2	CD-kruh	Počet CD	M	L1	L2	Léčivo
1	CH	A1	F	a	H	beta	1	0	0	0	0
2	CH	A1	F	a	H	beta	2	0	0	0	0
3	CH	A1	F	a	H	beta	4	0	0	0	0
4	CH	A1	F	a	H	beta	1	0	0	0	taxol
5	CH	A1	F	a	H	beta	2	0	0	0	taxol
6	CH	A1	F	a	H	beta	4	0	0	0	taxol
7	CH	A1	F	a	H	beta	1	Zn	0	0	0
8	CH	A1	F	a	H	beta	2	Zn	0	0	0
9	CH	A1	F	a	H	beta	4	Zn	0	0	0
10	CH	A1	F	a	H	beta	1	Zn	0	0	taxol
11	CH	A1	F	a	H	beta	2	Zn	0	0	taxol
12	CH	A1	F	a	H	beta	4	Zn	0	0	taxol
13	CH	A1	F	a	H	beta	1	Zn	PABs	PABs	0
14	CH	A1	F	a	H	beta	2	Zn	PABs	PABs	0
15	CH	A1	F	a	H	beta	4	Zn	PABs	PABs	0
16	CH	A1	F	a	H	beta	1	Zn	PABs	PABs	taxol
17	CH	A1	F	a	H	beta	2	Zn	PABs	PABs	taxol
18	CH	A1	F	a	H	beta	4	Zn	PABs	PABs	taxol
19	CH	A1	F	a	H	gama	2	0	0	0	0
20	CH	A1	F	a	H	gama	2	0	0	0	doxorubicin
21	CH	A1	F	a	H	gama	2	Zn	0	0	0
22	CH	A1	F	a	H	gama	2	Zn	0	0	doxorubicin
23	CH	A1	F	a	H	gama	2	Zn	PABs	PABs	0
24	CH	A1	F	a	H	gama	2	Zn	PABs	PABs	doxorubicin

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

#### Příklad 1

Příprava porfyrin mono- $\beta$ -cyklodextrin konjugátu (Porf- $\beta$ -CD-1), sloučeniny typu 1 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $OR_1$ , kde  $R_1$  je cyklodextrinový kruh). 5, 10, 15, 20-tetrakis(perfluorfenyl)porfyrin byl rozpuštěn v dimethylformamidu a smíchán se sodnou solí  $\beta$ -cyklodextrinu v poměru 1:8. Směs byla míchána při 20 °C po dobu 5 dní. Poté byl

dimethylformamid odpařen a pevný zbytek promyt dichlormethanem. Surový produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie na reverzní fázi C-18 (eluent-voda/methanol 5:95 (v/v)). Získaný produkt, Porf- $\beta$ -CD-1 typu 1, ve formě tmavě červené pevné látky byl vakuově sušen.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO)  $\delta$  -3.2 (bs 2H, NH), 3.2-3.9 (m, H-CD), 4.4-5.0 (m, H-CD), 5.5-6.0 (m, H-CD), 9.4 (bs, 8H, Ar-py);  $^{19}\text{F-NMR}$  (DMSO)  $\delta$  -135 (m), -137.5 (m), -149.5 (m), -152 (m), -158.5 (m); MALDI-TOF vypočteno 2106, nalezeno: 2108

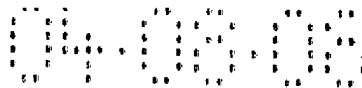
### Příklad 2

Příprava porfyrin bis- $\beta$ -cyklodextrin konjugátu (Porf- $\beta$ -CD-2), sloučeniny typu 2 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $\text{OR}_1$ , kde  $\text{R}_1$  je cyklodextrinový kruh). 5, 10, 15, 20-tetrakis(perfluorfenyl)porfyrin byl rozpuštěn v dimethylformamidu a smíchán se sodnou solí  $\beta$ -cyklodextrinu v poměru 1:2. Směs byla zahřívána na 50 °C po dobu 12 hodin. Poté byl dimethylformamid odpařen a pevný zbytek promyt dichlormethanem. Surový produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie na reverzní fázi C-18 (eluent-voda/methanol 25:75 (v/v)). Získaný produkt, Porf- $\beta$ -CD-2 typu 2, ve formě tmavě červené pevné látky byl vakuově sušen.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO)  $\delta$  -3.2 (bs 2H, NH), 3.2-3.9 (m, H-CD), 4.4-5.0 (m, H-CD), 5.5-6.0 (m, H-CD), 9.4 (bs, 8H, Ar-py);  $^{19}\text{F-NMR}$  (DMSO)  $\delta$  -135 (m), -137.5 (m), -149.5 (m), -152 (m), -158.5 (m); MALDI-TOF vypočteno 3290, nalezeno: 3285

### Příklad 3

Příprava porfyrin tetrakis- $\beta$ -cyklodextrin konjugátu (Porf- $\beta$ -CD-4), sloučeniny typu 3 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $\text{OR}_1$ , kde  $\text{R}_1$  je cyklodextrinový kruh). 5, 10, 15, 20-tetrakis(perfluor-fenyl)porfyrin byl rozpuštěn v dimethylformamidu a smíchán se sodnou solí  $\beta$ -cyklodextrinu v poměru 1:8. Směs byla zahřívána na 90 °C po dobu 6 hodin. Poté byl dimethylformamid odpařen a pevný zbytek promyt dichlormethanem. Surový produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie na reverzní fázi C-18 (eluent-voda/methanol 50:50 (v/v)). Získaný produkt, Porf- $\beta$ -CD-4 typu 3, ve formě tmavě červené pevné látky byl vakuově sušen.



Charakterizace :

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO)  $\delta$  -3.1 (bs 2H, NH), 3.1-3.80 (m, H-CD), 4.4-4.9 (m, H-CD), 5.5-5.8 (m, H-CD), 9.2 (bs, 8H, Ar-py);  $^{19}\text{F-NMR}$  (DMSO)  $\delta$  -142 (m), -156.7 (m); MALDI-TOF vypočteno: 5431, nalezeno: 5437.

Příklad 4

Příprava porfyrin bis- $\gamma$ -cyklodextrin konjugátu (Porf- $\gamma$ -CD-2), sloučeniny typu 19 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $\text{OR}_1$ , kde  $\text{R}_1$  je cyklodextrinový kruh). 5, 10, 15, 20-tetrakis(perfluor-fenyl)porfyrin byl rozpuštěn v dimethylformamidu a smíchán se sodnou solí  $\gamma$ -cyklodextrinu v poměru 1:2. Směs byla zahřívána na 50 °C po dobu 12 hodin. Poté byl dimethylformamid odpařen a pevný zbytek promyt dichlormethanem. Surový produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie na reverzní fázi C-18 (eluent-voda/methanol 25:75 (v/v)). Získaný produkt, Porf- $\gamma$ -CD-2 typu 19, ve formě tmavě červené pevné látky byl vakuově sušen

Charakterizace :

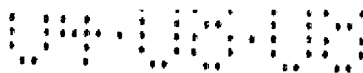
$^1\text{H-NMR}$  (DMSO)  $\delta$  -3.2 (bs 2H, NH), 3.2-3.9 (m, H-CD), 4.4-5.0 (m, H-CD), 5.5-6.0 (m, H-CD), 9.4 (bs, 8H, Ar-py);  $^{19}\text{F-NMR}$  (DMSO)  $\delta$  -135 (m), -137.5 (m), -149.5 (m), -152 (m), -158.5 (m); MALDI-TOF vypočteno 3471, nalezeno: 3470

Příklad 5

Příprava zinečnatého metalokomplexu mono- $\beta$ -cyklodextrin porfyrin konjugátu (MPorf- $\beta$ -CD-1) typu 7 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $\text{OR}_1$ , kde  $\text{R}_1$  je cyklodextrinový kruh).

Porfyrin-cyklodextrin konjugát typu 1 (dle tabulky 1) byl rozpuštěn v DMSO a k roztoku byl přidán acetylacetonát zinečnatý. Směs byla při laboratorní teplotě míchána 7 dní. Reakce byla monitorována pomocí UV-VIS spektroskopie. Poté byla přidána voda a dichlormethan a provedena extrakce. Vodná fáze obsahující MPorf- $\beta$ -CD-1 typu 7 byla odpařena. Získaný produkt, MPorf- $\beta$ -CD-1 typu 7, ve formě tmavě fialové pevné látky byl vakuově sušen.

Sloučeniny typu 8, 9 a 21 byly připraveny analogickým postupem s tím rozdílem, že v případě sloučeniny typu 8 (dle tabulky 1) byl použit konjugát typu 2 (dle tabulky 1), v případě



sloučeniny typu 9 (dle tabulky 1) byl použit konjugát typu 3 a v případě sloučeniny typu 21 (dle tabulky 1) byl použit konjugát typu 19.

#### Příklad 6

Příprava inkluzního komplexu porfyrin cyklodextrin konjugátu a léčiva (Porf-CD-léčivo), sloučeniny typu 4 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $OR_1$ , kde  $R_1$  je cyklodextrinový kruh).

K  $0,2 \mu\text{M}$  vodnému roztoku Porf-CD typu 1 s 2% DMSO(v/v) bylo přidáno odpovídající množství roztoku taxolu ( $c=28,6 \text{ mM}$ ) v DMSO. Pro Porf-CD typu 1 byla výsledná koncentrace cytostatika v roztoku  $0,198 \mu\text{M}$ . Výsledný Porf-CD-léčivo typu 4 byl lyofilizován, vakuově sušen a získán ve formě světle červené látky.

Analogickým postupem byly připraveny inkluzní komplexy Porf-CD-léčivo typu 5, 6 a 20 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $OR_1$ , kde  $R_1$  je cyklodextrinový kruh), přičemž pro Porf-CD typu 5, 6 byl použit taxol jako léčivo a pro Porf-CD typu 20 byl použit doxorubicin jako léčivo. Koncentrace léčiva byla  $0,337 \mu\text{M}$  pro Porf-CD typu 5 a 20, a  $0,675 \mu\text{M}$  pro Porf-CD typu 6.

V případě cyclodextrin porfyrinu dokazují vznik komplexů níže uvedené skutečnosti. Taxol je látka s velmi nízkou rozpustností ve vodě ( $\text{ng/l}$ ) bez přítomnosti cyclodextrin-porfyrinu se nerozpustí za námi užívaných koncentrací ( $0,2 \mu\text{M}$ ) nerozpustí, v přítomnosti cyclodextrin-porfyrinu snadno.

Komplexace taxol a doxorubicinu cyclodextrin porfyriny byla také ověřena pomocí UV-Vis spektroskopie (graf. 7).

UVIS spektroskopie byla použita také pro stanovení vazebných konstant komplexu.

System	Log Ks	Komplex
1+taxol	3,4	1:1
2+taxol	5,1	1:1
19+doxorubicin	10,5	2:1
3+taxol	11,8	2:1

Porovnáme-li sílu těchto s<sup>a</sup> silou konstant uváděné komplexy samotného cyclodextrinu s taxolem a doxorubicinem Log Ks jsou 2 pro taxol a 3 pro doxorubicin je zřejmé cyclodextrin porfyrin dosáhly výrazného zlepšení.

## Příklad 7

Příprava metalokomplexu s protilátkou (MPorf-CD-protilátka), sloučeniny typu 13 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $OR_1$ , kde  $R_1$  je cyklodextrinový kruh). K příslušnému vodnému roztoku MPorf-CD typu 7 o koncentraci  $0,2 \text{ mM}$  s obsahem DMSO  $2,5\% (v/v)$  byla přidána polyklonální lidská protilátka (Endoglobulin S/D od firmy Baxter) tak, aby její celková koncentrace byla  $0,1 \text{ mM}$ . Tyto roztoky byly připraveny těsně před použitím.

Metalokomplexy s protilátkou typu 14, 15 a 23 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $OR_1$ , kde  $R_1$  je cyklodextrinový kruh) byly připraveny stejným způsobem, pouze byl použit jiný porfyrinový derivát; v případě látky MPorf-CD-protilátka typu 14 byl použit Porf-CD typu 2, dle tabulky 1, v případě látky MPorf-CD-protilátka typu 15 byl použit Porf-CD typu 3, dle tabulky 1 a v případě látky MPorf-CD-protilátka typu 23 byl použit Porf-CD typu 19, dle tabulky 1.

## Příklad 8

Příprava inkluzních komplexů s metaloporfyrinem (MPorf-CD-léčivo) typu 7, 8, 9 a 21 dle tabulky 1. K vodnému roztoku MPorf-CD se  $2\% \text{ DMSO}(v/v)$  o koncentraci  $0,2 \text{ mM}$  byla přidána odpovídající množství  $28,6 \text{ mM}$  roztoku cytostatika (taxol pro MPorf-CD typu 7, 8, 9 dle tabulky 1 a doxorubicin pro MPorf-CD typu 21 dle tabulky 1) v DMSO. Celková koncentrace cytostatika v roztoku pro MPorf-CD typu 7 byla  $0,198 \text{ mM}$ , pro MPorf-CD typu 8 a 21 byla  $0,337 \text{ mM}$  a pro MPorf-CD typu 9 byla  $0,675 \text{ mM}$ . Roztoky byly lyofilizovány a ve formě světle červené látky sušeny.

## Příklad 9

Příprava inkluzního komplexu s protilátkou a léčivem (MPorf-CD-protilátka-léčivo), sloučeniny typu 16 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $OR_1$ , kde  $R_1$  je cyklodextrinový kruh). K příslušnému vodnému roztoku inkluzního komplexu MPorf-CD-léčivo typu 10, dle tabulky 1 s obsahem DMSO  $2-5\% (v/v)$  byla přidána polyklonální lidská protilátka (Endoglobulin S/D od firmy Baxter) tak, aby její celková koncentrace byla  $0,1 \text{ mM}$ . Tyto roztoky byly připraveny těsně před použitím.

Sloučeniny typu 17, 18 a 24 (dle tabulky 1, kde  $a$  představuje  $OR_1$ , kde  $R_1$  je cyklodextrinový kruh) byly připraveny stejným způsobem, pouze byly použity jiné výchozí inkluzní komplexy

MPorf-CD-léčivo. V případě systému MPorf-CD-protilátka-léčivo typu 17, byl použit inkluzní komplex MPorf-CD-léčivo typu 11 (dle tabulky 1), v případě látky systému MPorf-CD-protilátka-léčivo typu 18, byl použit inkluzní komplex MPorf-CD-léčivo typu 12 (dle tabulky 1) a v případě systému MPorf-CD-protilátka-léčivo typu 24, byl použit inkluzní komplex MPorf-CD-léčivo typu 22 (dle tabulky 1).

Tyto komplexy lze podle patentu využít následovně:

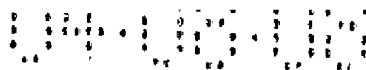
#### Cílený transport léčiv a jeho spojení s fotodynamickou terapií

Možnost využít inkluzního komplexu porfyrin-cykodextrin-léčivo jako kombinace dvou různých metod protinádorové terapie (cílený transport léčiv a fotodynamické terapie) byla testována na modelu myších inbredních kmenů se syngenním karcinomem prsní žlázy a karcinomem tlustého střeva a nebo na modelu imunodeficientních nu/nu myši s aplikovanými lidskými nádory různého původu (viz seznam). Nitrožilní aplikace supermolekulárního komplexu a následné ozařování bylo prováděno první a sedmý den experimentu. Myši byly sledovány po dobu 30 dní. V průběhu pokusu byly nádory měřeny (délka a, výška b, šířka c tumoru) a výsledný objem byl vypočten podle vzorce  $V = \pi/6 * a * b * c$ . Jak je patrné z našich výsledků (viz. Graf. 1 až 4) kombinace těchto dvou metod za použití našich komplexů může vést k výraznému potlačení růstu nádoru oproti kontrole a proti účinku samotného léčiva, nebo samotné fotodynamické terapie.

#### Seznam použitých nádorových linií

- adenokarcinom pankreatu (pancreas adenocarcinoma) – Capan-2
- adenokarcinom prostaty (prostate adenocarcinoma) PC-3
- adenokarcinom mléčné žlázy (mammary gland adenocarcinoma) MDA-MB-231
- nádor mléčné žlázy (mammary tumor gland) 4T1
- kolorektální adenokarcinom (colorectal adenocarcinoma) SW-480, SW-620, HCT116
- karcinom tlustého střeva (colon carcinoma) CT26.CL25
- neuroblastom (neuroblastoma) SK-N-AS
- plicní karcinom (lung carcinoma) A549
- adenokarcinom cervixu (cervix adenocarcinoma) HeLa
- epidermální karcinom (epidermoid carcinoma) A431NS
- melanom (melanoma) SK-MEL-3, C32, B16-F1
- karcinom vaječníku (ovarian carcinoma) A 2780





### Kombinovaná terapie

Dalšího zesílení protinádorového účinku, zejména potlačení recidivy nádorů lze dosáhnout využitím multimodálních systémů (supramolekulárních metalokomplexů), které vlastnosti porfyrin-cyklodextrinových systémů navíc rozšiřují o účinek navázané protilátky.

Použití takovýchto komplexů v kombinované terapii bylo testováno na různých typech nádorů jak myších, tak lidských, jak se zmíněno výše a dle seznamu. Nitrožilní aplikace supermolekulárního komplexu a následné ozařování bylo prováděno první a sedmý den experimentu. Myši byly sledovány po dobu 30 dní. V průběhu pokusu byly nádory měřeny

(délka a, výška b, šířka c tumoru) a výsledný objem byl vypočten podle vzorce  $V = \pi/6 * a * b * c$ .

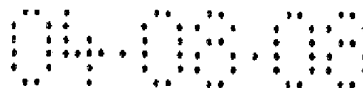
Úspěšnost kombinované terapie je doložena nejvýraznějším potlačením růstu nádoru (Graf-5, 6 látky 17 a 24). Tyto komplexy MPorf-CD-protilátka-léčivo se ukázaly jako nejúspěšnějším léčebným systémem z námi připravených. Umožňují jednak cílený transport léčiva kombinovaný s PDT a navíc výrazně potlačují recidivu nádoru, a to tak, že nádor po úspěšné terapii se již zpětně neobjevuje jak to dokládají obrázky 1-3.

### Využití porfyrinového jádra jako transportního systému pro radioaktivní isotopy kovů do nádorových buněk

Je velmi dobře známo, že porfyriny mají selektivitu vůči nádorovým buňkám. Jejich další vlastností je tvorba velmi silných komplexů s celou řadou kovů. Použitím radioaktivních isotopů vede k jejich cílenému transportu do nádorových buněk a zefektivnění protinádorové terapie (M. Q. Islam, P. Hambright. Lithium complexes and the kinetics of interactions of zinc ions with tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphyrins in basic solution. *Transition Met. Chem.*, 1998, 23, 727-733; R. Z. Renno, J. W. Miller. Photosensitizer delivery for photodynamic therapy of choroidal neovascularization. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 52, 63-78; Gan no Rinsho he affinity of malignant tumors and organs of tumor-bearing animals for porphyrin compounds. II. Staining with  $^{65}\text{Zn}$ - and  $^{203}\text{Hg}$ -labeled fluorescent porphyrin. (1959), 5, (9), 513. CODEN:GANRAE ISSN:0021-4949.)

### Diagnostika nádorů

Výše popsané porfyriny a jejich komplexy jsou akumulovány ve vyšší koncentraci v rakovinových buňkách než ve zdravých. Výhodou je rovněž vysoká fluorescence porfyrinů. Na těchto jejich vlastnostech je založena jejich více než dobrá použitelnost pro výše zmíněnou oblast. (J. Kralova, A. Synytsya, P. Pouckova, M. Koc, M. Dvorak, V. Kral. Novel porphyrin



conjugates with a potent photodynamic antitumor effect: differential efficacy of mono- and bis- $\beta$ -cyclodextrin derivatives *in vitro* and *in vivo*. *Photochem. Photobiol.*, 2006, 82, 432-438; Kral V, Davis J, Andrievsky A, Kralova J, Synytsya A, Pouckova P, Sessler JL. Synthesis and biolocalization of water-soluble sapphyrins. *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 1073-8).

#### Využití metalokomplexu cyklodextrin-porfyrin s kladným nábojem pro transport nukleových kyselin do buněk

Kladně nabité porfyrinové metalokomplexy přechodných kovů jsou nekovalentně vázány k bážím nukleových kyselin. Supramolekulární systémy s kladným nábojem jako např. aminocyklodextriny, se používají pro transport nukleových kyselin do buněk. Cyklodextrin-porfyrinový metalokomplex by tudíž byl velmi dobrým systémem pro tento účel. (B. Ward, A. Skorobogaty, J. C. Dabrowiak. DNA binding specificity of a series of cationic metalloporphyrin complexes. *Biochemistry*, 1986, 25, 7827-7833; Y. Choi, T. Thomas, A. Kotlyar, M. T. Islam, J. R. Baker. Synthesis and functional evaluation of DNA-assembled polyamidoamine dendrimer clusters for cancer cell-specific targeting. *Chem. Biol.*, 2005, 12, 35-43).

#### Výsledky kombinované terapie pomocí multimodálních systémů

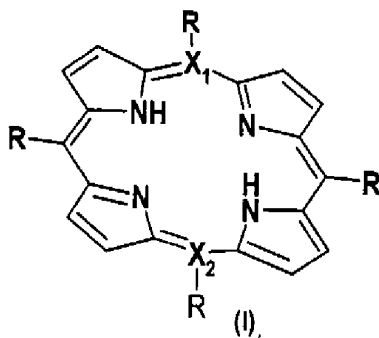
Připravené látky byly testovány na myších s karcinomem mléčné žlázy. Výsledky terapií pro různé látky jsou uvedeny v následujících grafech 1 – 4.

#### Průmyslová využitelnost

Multimodální systémy podle vynálezu jsou využitelné ve zdravotnictví a ve farmaceutickém průmyslu pro přípravu přípravků k léčbě a diagnostikování nádorových onemocnění.

### Patentové nároky

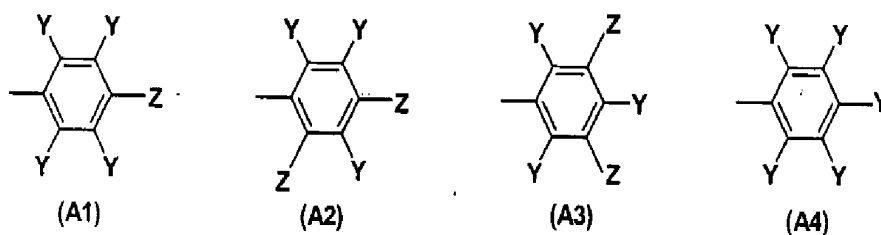
1. Použití multimodálního systému pro přípravu přípravků k léčbě a diagnostikování nádorových onemocnění, přičemž tento systém se sestává ze substituovaného makrocyklu obecného vzorce I,



vybraným ze skupiny tvořené  $\chi$  porfyrinem, calixfyrinem nebo korinem,

kde v případě tetrasubstituovaného porfyrinu v polohách *meso* platí, že  $X_1, X_2$  je C, v případě korinu  $X_2$  tvoří žádný atom a  $X_1$  je C a v případě calixfyrinu je X a  $X_1$  tvořeno buď  $CR^1R^1$ , uhlík nese dva stejné substituenty nebo  $CR^1R^2$ , uhlík je substituován dvěma odlišnými substituenty a kde substituenty  $R^1$  a  $R^2$  představují alkyl vybraný ze skupiny methyl, ethyl, propyl, butyl, i-propyl, i-butyl, fenyl,

kde R jsou substituenty znázorněné obecným vzorcem A1, A2, A3, nebo A4,



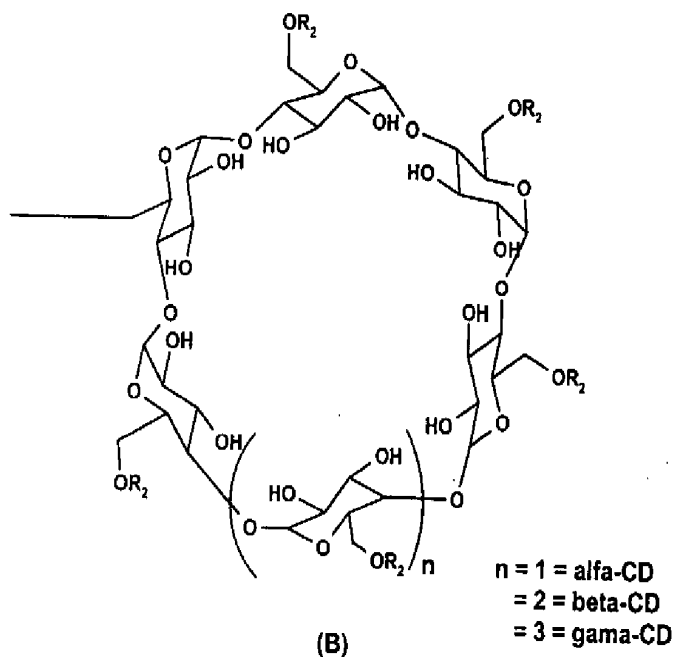
kde Y představuje atom H nebo atom F,

kde Z v případě substituentu znázorněným obecným vzorcem A1 znamená skupinu O- $R_1$ , S- $R_1$ , NH- $R_1$ , CH<sub>2</sub>O- $R_1$ , CH<sub>2</sub>S- $R_1$  nebo CH<sub>2</sub>NH- $R_1$ ,

kde Z v případě obecného vzorce A2 je stejný nebo různý a znamená skupinu O- $R_1$  nebo S- $R_1$  nebo NH- $R_1$ ,

a kde Z v případě obecného vzorce A3 znamená skupinu NH- $R_1$ ,

kde  $R_1$  je cyclodextrin obecného vzorce B, kde n je 1 až 3,



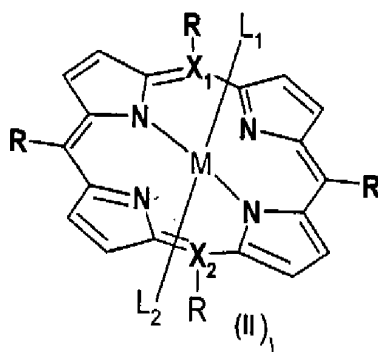
kde  $R_2$  představuje alkyl skupinu o počtu uhlíků 1 až 10, například methyl, ethyl, propyl, která může být navíc větvená jako například isopropyl, cyclodextrinový kruh obecného vzorce B je různé velikosti od alfa-cyclodextrinu  $n = 1$ , beta-cyclodextrinu  $n = 2$  až po gama-cyclodextrin  $n = 3$ ,

přičemž cyclodextrinový kruh obecného vzorce B tvoří inkluzní komplex s léčivem vybraným ze skupiny tvořené doxorubicinem, taxolem, mitomycinem C, paraplatinem, zitostopem, zitazoniem, methotrexatem, ieukeranem, ftorafurem, bicnuem, deticenem nebo jiným léčivem s aromatickou skupinou.

2. Použití cyclodextrin-porfyrin, cyclodextrin-korin, cyclodextrin-calixfirin derivátů obecného vzorce I podle nároku 1 pro přípravu přípravku umožňující transport vybraných léčiv, pro kombinaci fotodynamické terapie a léčby nádorových onemocnění vybraným léčivem.

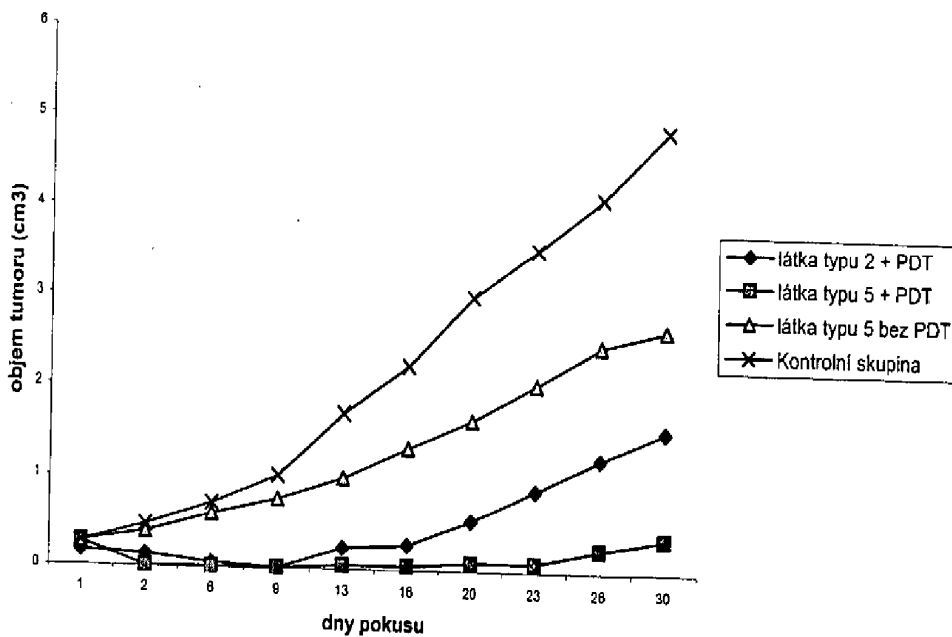
3. Metalokomplex oligopyrrolvého makrocyklu, který je v logické souvislosti <sup>A</sup> substituovaným makrocyklem obecného vzorce I, podle nároku 1 a je z něho vytvořen insercí M a navázáním axiálních ligandů, obecného vzorce (II)

↑  
střední velikost písma

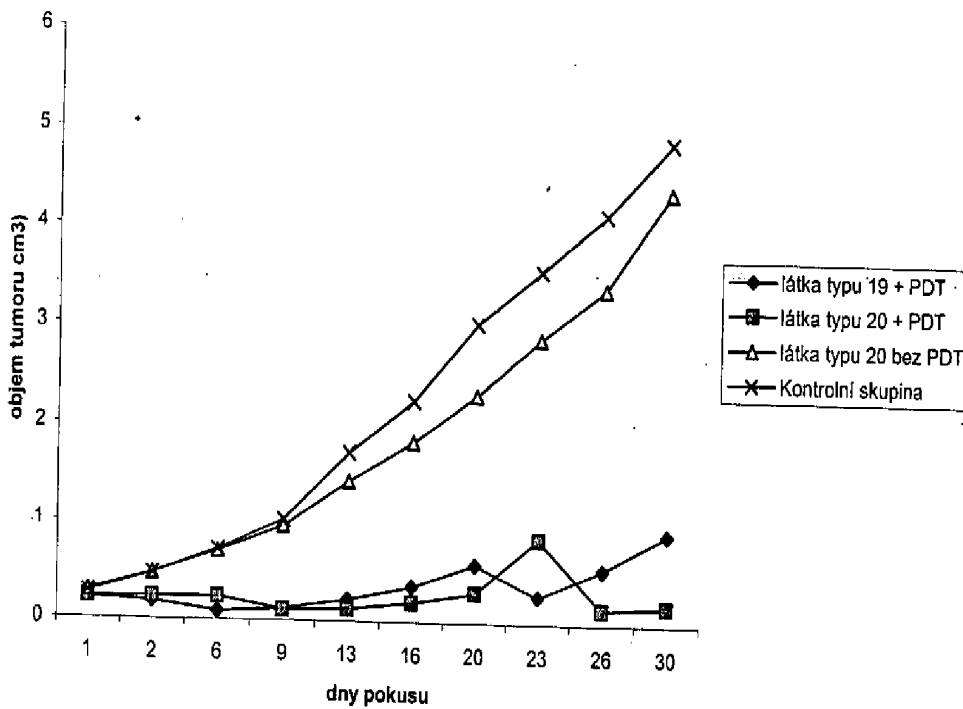


kde R, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> mají vpředu uvedený význam a L<sub>1</sub> a L<sub>2</sub> jsou monoklonální protilátka (MABs) nebo polyklonální protilátka (PABs) a M je kov, vybraný ze skupiny tvořené zinkem, kobaltem, niklem, stříbrem, manganem, železem nebo mědí.

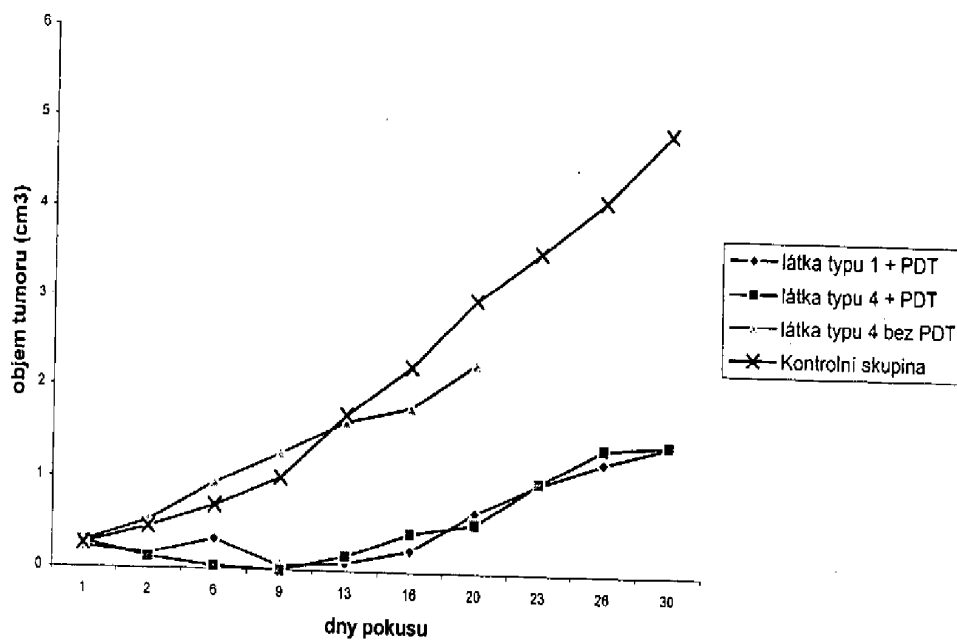
4. Použití metalokomplexu oligopyrolového makrocyklu obecného vzorce (II), podle nároku 3 pro přípravu přípravku k léčbě a diagnostikování nádorových onemocnění, zejména jako stabilního transportního systému selektivního vůči nádoru.
5. Použití podle nároků 1 a 2 a 4 ve spojení s proteiny, polymery, nukleovými kyselinami, nukleotidy, oligonukleotidy, sacharidy, polysacharidy, oligasacharidy, bázemi nukleových kyselin, peptidy, hormony, analogy a deriváty výše uvedených pro přípravu přípravků pro kombinovanou terapii nádorových onemocnění.
6. Použití cyklodextrin-porfyrinů, cyklodextrin-korinů, cyklodextrin-calixfirinů podle nároků 1, 2 a 4 pro přípravu přípravků pro cílený transport radioaktivních izotopů kovů.
7. Použití cyklodextrin-porfyrinů, cyklodextrin-korinů, cyklodextrin-calixfirinů podle nároků 1, 2 a 4 pro přípravu přípravků pro diagnostiku nádorových buněk.
8. Použití cyklodextrin-porfyrin, cyklodextrin-korin, cyklodextrin-calixfirin podle nároků 1, 2 a 4 pro přípravu přípravků pro transport nukleových kyselin do buněk.
9. Použití podle nároků 1, 2 a 4 až 8, vyznačující se tím, že nádorovými onemocněními se míní: adenokarcinom pankreatu – Capan-2, adenokarcinom prostaty PC-3, adenokarcinom mléčné žlázy MDA-MB-231, nádor mléčné žlázy 4T1, kolorektální adenokarcinom SW-480, SW-620, HCT116, karcinom tlustého střeva CT26.CL25, neuroblastom SK-N-AS, plicní karcinom A549, adenokarcinom cervixu HeLa, epidermální karcinom A431NS, melanom SK-MEL-3, C32, B16-F1 karcinom vaječníku A 2780.



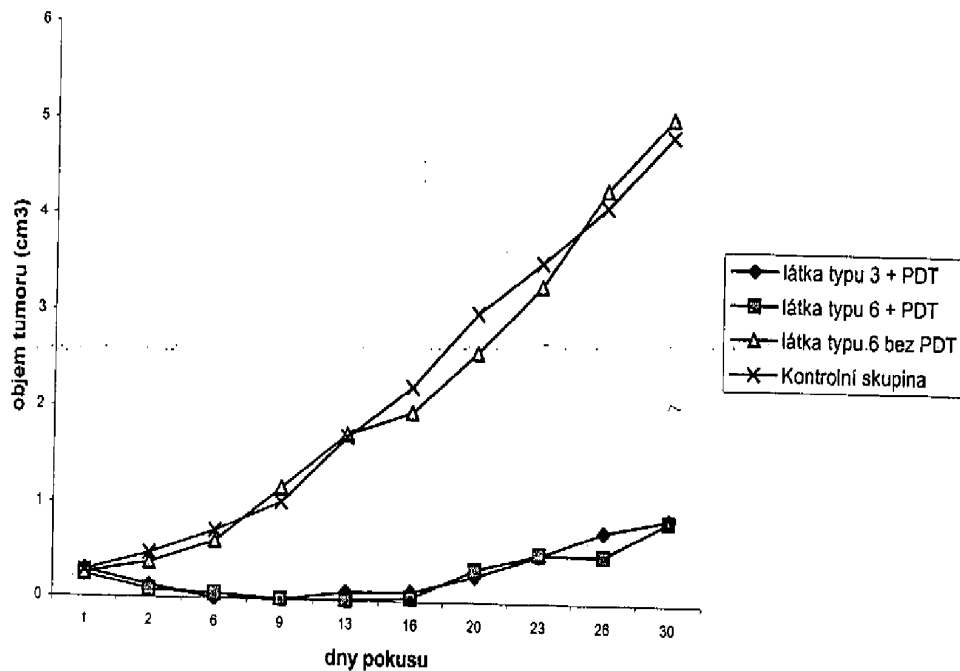
Graf 1- Vliv PDT na růst karcinomu mléčné žlázy (4T1) u inbredních myší BALB/c při použití látek typu 2 a 5, dle tabulky 1.



Graf 2- Vliv kombinované terapie na růst karcinomu mléčné žlázy (4T1) u inbredních myší BALB/c při použití látek typu 19 a 20, dle tabulky 1.

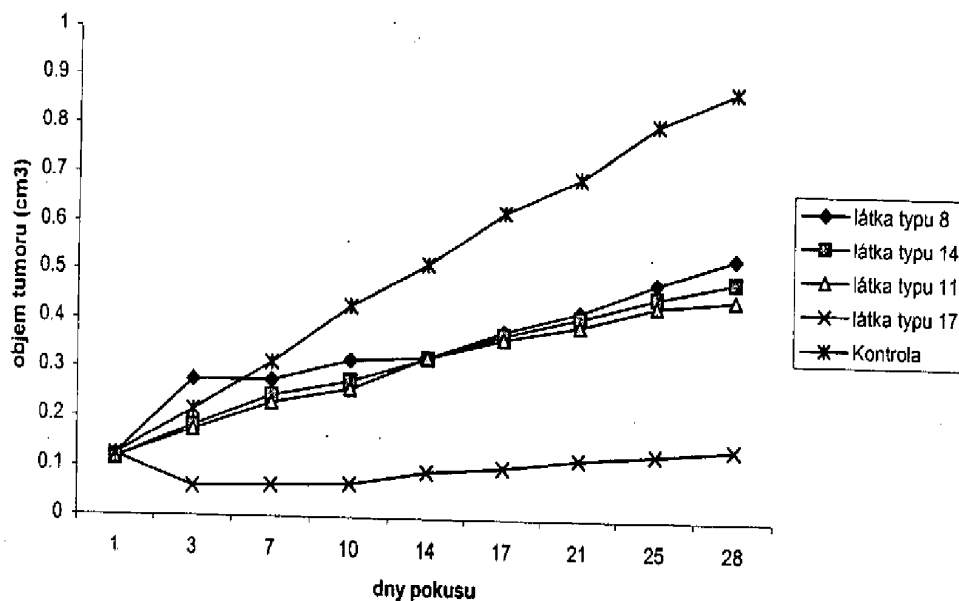


Graf 3- Vliv kombinované terapie na růst karcinomu mléčné žlázy (4T1) u inbredních myší BALB/c při použití látek typu 1 a 4, dle tabulky 1.

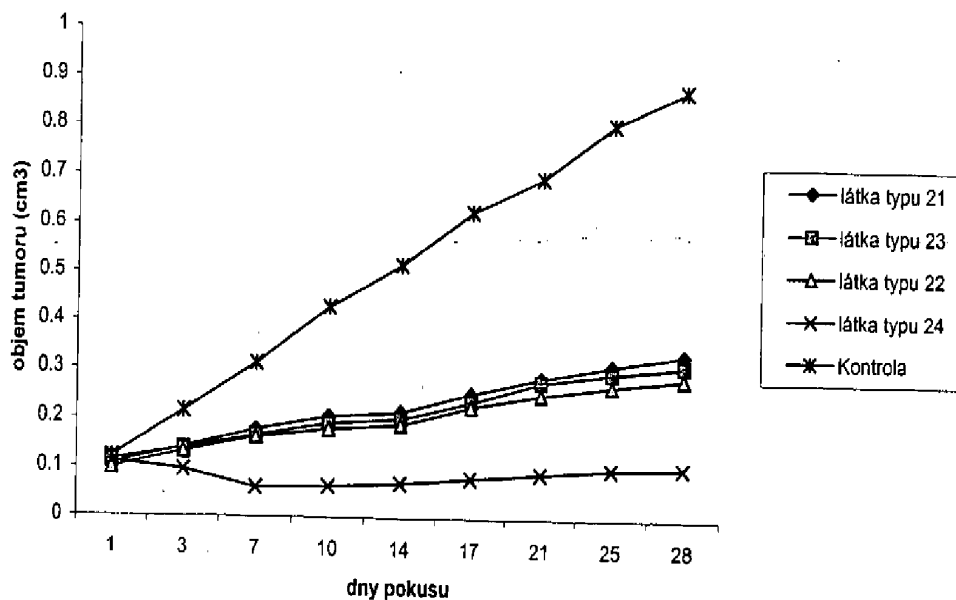


Graf 4- Vliv kombinované terapie na růst karcinomu mléčné žlázy (4T1) u inbredních myší BALB/c při použití látek 3 a 6 dle tabulky 1.

3/5

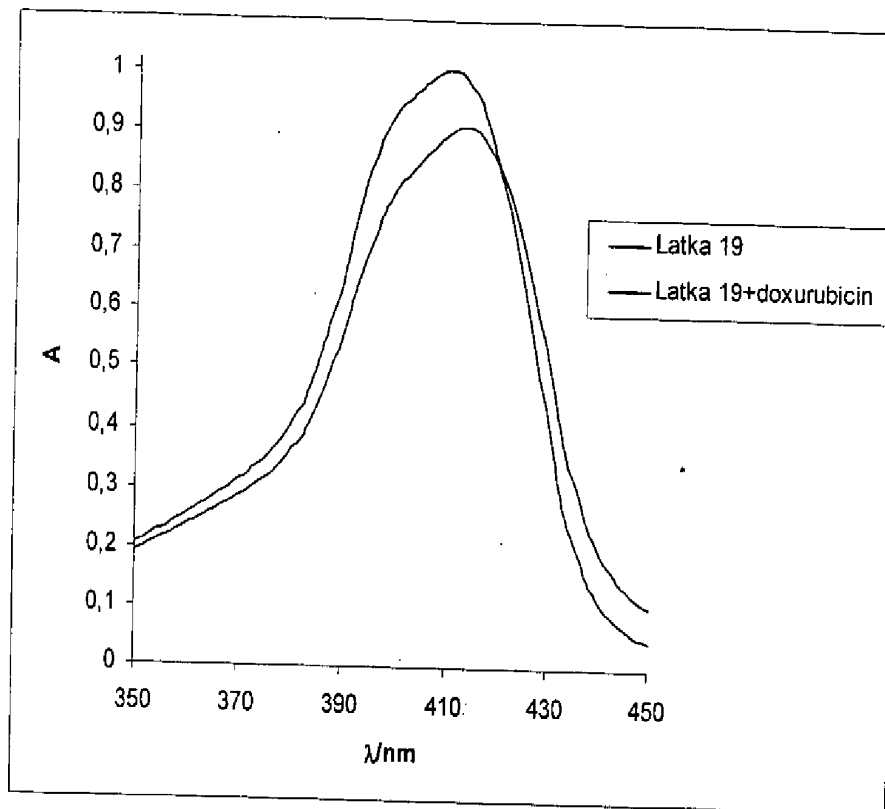


Graf 5- Vliv konjugovaných porfyrinů a následné PDT na růst lidského melanomu (C-32) u nu/nu myši



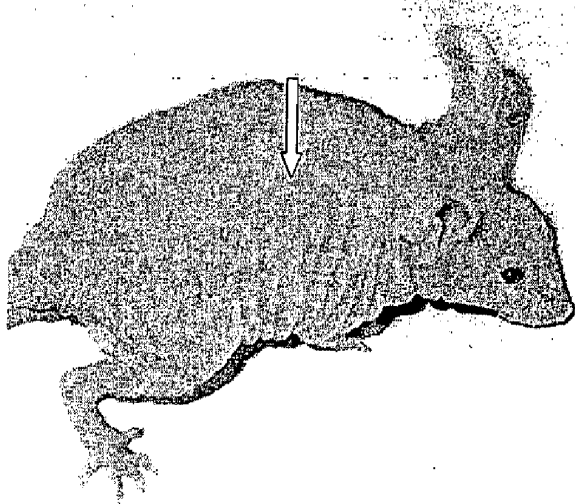
Graf 6- Vliv konjugovaných porfyrinů a následné PDT na růst lidského melanomu (C-32) u nu/nu myši





Gráf UV-Vis spektroskopie byla použita pro stanovení vazebných konstant komplexu.

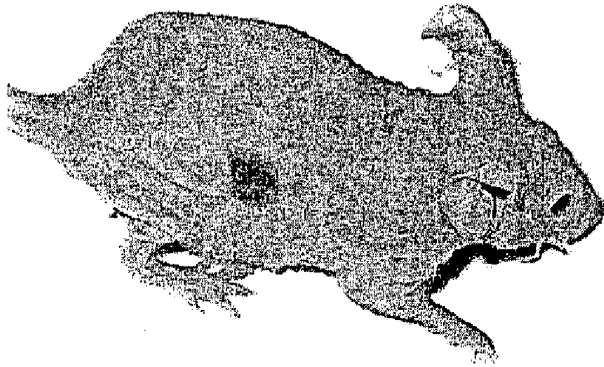
Obr. 1 Melanom C - 32, před zahájením léčby



5/5 22

104.00.00

Obr.2 Nekróza melanomu C-32 vyvolaná kombinovanou terapií po podání komplexu MPorf-CD-léčivo-protilátka a aplikaci světelné dávky  $120 \text{ Jcm}^{-2}$  (PDT). 7. den po aplikaci PDT.



Obr. 3 Po úspěšné léčbě – nádor zcela zmizel a již se neobjevuje (30 dnů po terapii)

