

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 580

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/409 (2006.01)
A61K 33/16 (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01)
C01F 17/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-657**
(22) Přihlášeno: **16.10.2017**
(40) Zveřejněno: **19.12.2018**
(Věstník č. 51/2018)
(47) Uděleno: **07.11.2018**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **19.12.2018**
(Věstník č. 51/2018)

(56) Relevantní dokumenty:

CZ 2006-743 A3; WO 2010/123993 A1; CZ 27963 U1; WO 2016/028680 A1; WO 2009/015056 A1; WO 02/096417 A1.

(73) Majitel patentu:
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, Krč,
CZ

RCD spol. s r.o., Dobřichovice, CZ

(72) Původce:
Mgr. Hana Engstová, Ph.D., Praha 6, Bubeneč, CZ
RNDr. Miloš Nekvasil, Praha 3, Žižkov, CZ
RNDr. Petr Ježek, DrSc., Praha 9, Čakovice, CZ
RNDr. Pavla Poučková, Csc., Dobřichovice, CZ

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

(54) Název vynálezu:
**Liposomová léková forma se světlo-
konvertujícími nanočásticemi, její příprava
a použití**

(57) Anotace:
Tato liposomová léková forma se světlo-konvertujícími
částicemi je aplikovaná intravenózně a následně ozářena
laserem o vlnové délce infračerveného spektra, které
prostupuje hluboko do tkání. Infračervené záření je
nanočásticemi konvertováno na vlnovou délku 670 nm,
která aktivuje ftalocyaniny a následně způsobí
dezintegraci nádorové tkáně.

CZ 307580 B6

Liposomová léková forma se světlo-konvertujícími nanočásticemi, její příprava a použití

Oblast techniky

5

Injekční přípravek obsahující světlo-konvertující látky v podobě nanočástic a liposomy s obsahem ftalocyaninu pro fotodynamickou terapii v infračervené oblasti záření.

10 Dosavadní stav techniky

Fotodynamická terapie (PDT) využívaná při léčbě tkáňových nádorů spočívá v tom, že účinná látka je kumulována v nádorové tkáni v důsledku vyšších nároků nádorové tkáně na vyživování. Nádorová tkáň je v některých případech velmi dobře prokrvená, protkaná fenestrovanými
15 vlasečnicemi, a tedy veškeré látky se k ní krevním řečištěm snadněji a rychle dostávají. Po aplikaci účinné látky a jejím zakoncentrování v nádoru dochází při PDT k ozáření nádorové tkáně světlem o určité vlnové délce.

Pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění bylo ve světě vyvinuto množství
20 hydrofobních preparátů, klinicky vyzkoušených (některé jen pre-klinicky) pro intervaly mezi aplikací a ozářením (T_{DL}) v oblasti od jedné hodiny výše: benzyl ester kyseliny delta aminolevulové, Benzvix (T_{DL} 4 až 6 hodin) registrován v EU pro léčbu gastrointestinálních nádorů, patent U. S. 6492420, (firma Photocure, Oslo, Norsko); Temoporfin či Foscan (metyl-
25 tetrahydroxyfenyl chlorin, (T_{DL} 96 hodin), WO 0166550, Biolitec Pharma, Skotsko, Velká Británie) schválený v EU pro paliativní nádory v oblasti hlavy a krku, nádorů prostaty a pankreatu; derivát Benzoporfyrinu, čili Verteporfin (BPD-MA, Visudyne, Novartis, UK), který je ve fázi klinických zkoušek pro kožní amelanotické nádory; a křemíkový ftalocyanin rovněž ve fázi klinického testování pro léčbu kožních nádorů, včetně tzv. Bowenovy nemoci, aktinické keratosy, s dosud nejkratší T_{DL} 1 hodina.

30

Americká patentová přihláška US 5616602 popisuje farmaceutickou kompozici pro topickou aplikaci ftalocyaninů, které díky vlastnostem kompozice vstupují do povrchových nádorů a lézí a mohou být následně ozářeny. Americký patent US 6527759 popisuje zařízení pro aplikaci světlem aktivovaných účinných látek. Díky tomuto zařízení je možné aplikovat účinnou látku a zároveň ozářit nádory umístěné hlouběji ve tkáních, kam světlo laseru o vlnových délkách běžně
35 používaných v PDT nedosáhne. I s použitím tohoto zařízení je však aplikace účinných látek poměrně složitá.

Nejbližším stavem techniky našeho současného vynálezu je patent CZ 298978, který byl jakýmsi
40 mezistupněm vývoje současné patentové přihlášky. Dokument popisuje přípravu liposomálního gelového přípravku s ftalocyaninem pro topické použití ve fotodynamické terapii. Nevýhodou tohoto provedení byla špatná prostupnost záření o vlnové délce 670 nm, potřebné k aktivaci ftalocyaninu, do tkání. Další nevýhodou přípravku byla jeho gelová formulace, která umožňovala taktéž pouze povrchové použití. Proto byl přípravek omezen pouze na topická podání a ozařování
45 novotvarů těsně pod pokožkou.

Podstata vynálezu

Navrhované řešení vzniklo po náhodné kombinaci ftalocyaninových liposomů, rutinně
50 připravovaných pro výrobu topického gelového přípravku, a světlo-konvertujících (upkonverzních) nanočástic, připravovaných v širokém spektru na sousedním pracovišti. Pilotní testování lékové formy ukázalo velký potenciál pro využití při fotodynamické terapii (PDT) nádorových onemocnění. V soustavě liposom-ftalocyanin-nanočástice ytterbia dopované Yb^{3+} a
55 Er^{3+} dochází k zatím neznámé interakci nanočástic s povrchem liposomu a tak celá soustava po

intravenózním podání společně cestuje krevním řečištěm. Z důvodu vyšší afinity nádorových tkání je léková forma v nádorech kumulována velmi rychle, řádově v jednotkách minut od podání. Po ozáření tumoru světlem o vlnové délce infračerveného (IR) spektra (nejčastěji 980 nm), které prochází hluboko do tkání, dochází díky upkonverzním nanočásticím k absorpci světla vyšších vlnových délek a vyzáření světla o kratší vlnové délce, nutného k aktivaci ftalocyaninů a eliminaci nádorové tkáně.

Výhoda navrhovaného řešení tkví v možnosti použití světla o vlnové délce IR spektra, které proniká hlouběji do tkání než dříve používané světlo o vlnové délce 670 nm. Navrhovaná léková forma tak umožňuje rozšíření indikací infračervené fotodynamické terapie.

Technické řešení se týká lékové formy injekčního přípravku s upkonverzními nanočásticemi a ftalocyaninovými liposomy, využitelného pro infračervenou fotodynamickou terapii nádorových onemocnění. Léková forma obsahuje:

- liposomy, s výhodou lecitinové, o velikosti $<1 \mu\text{m}$,
- hydrofobní formu ftalocyaninu, s výhodou hydroxyhlinitého (resp. hydrofobní ftalocyanin hlinitý, hydrofobní ftalocyanin zinečnatý, hydrofobní ftalocyanin křemičitý či organokřemičitý - dále označenou jako FCH), v podobě mikrokryсталů o velikosti $<1 \mu\text{m}$ nebo modifikovaných mikrokryсталů (povrstvených farmaceuticky akceptovatelným cukrem, polymerem, lipidem nebo solí v poměru 5 až 10 % hmotn.), přičemž ftalocyanin je inkorporován v lipidové dvojvrstvě liposomu,
- světlo konvertující nanočástice (po ozáření světlem o vlnové délce IR spektra – přibližně 980 nm emitují světlo o vlnové délce nutné pro aktivaci ftalocyaninů – přibližně 630 až 720 nm), s výhodou povrstvené neporézní silikou a typicky složené z NaYF_4 dopovaného Yb^{3+} a Er^{3+} , o optimální velikosti okolo 40 nm.

Jelikož se ukázalo, že ne všechny komerčně dostupné hydroxyhlinité ftalocyaniny mají stejný účinek při použití podle předkládaného řešení, bylo nutné účinnou látku blíže specifikovat. Obsah nečistot ftalocyaninů byl stanoven pomocí HPLC na maximálně 5 %, obsah kovu v účinné látce byl stanoven titrací na 3,8 až 4,6 %, přičemž vzorek nesmí obsahovat více než 0,1 % ftalocyaninu bez centrálního atomu kovu. I přes to, že procesem mikrofluidizace se unifikuje krystalová struktura účinné látky za tvorby nepravého roztoku, důležitá pro funkčnost celé soustavy se ukázala i forma použitého ftalocyaninu. Ftalocyanin byl převeden na α formu přesrážením z roztoku koncentrované kyseliny sírové. Následně byl produkt neutralizován a volně sušen do konstantní hmotnosti při 105 °C. Díky preklinickým testům se ukázaly nejvýhodnější kombinace směsi α a β modifikací, přičemž by směs neměla obsahovat více než 20 % hmotn. β modifikace. Forma krystalů byla sledována metodou práškové rentgenové difrakce, kdy jednotlivé formy vykazovaly odlišné odezvy.

Upkonverzní nanočástice byly připraveny mikrovlonnou metodou nebo metodou fluoridace při 240 °C. Nanočástice byly s výhodou povrstveny tetraethylortosilikátem (TEOS). Optimalizace přípravy upkonverzních nanočástic tkvěla v nalezení vhodných podmínek pro přípravu nanočástic o požadovaných vlastnostech – velikost a fotofyzikální vlastnosti. Díky optimální velikosti, tvaru a uniformitě nanočástic je maximalizována účinnost upkonverze a zároveň jsou nanočástice v rámci lékové formy schopné pronikat do tumorové tkáně, např. fenestrovánými kapilárami. Nanočástice $\text{YF}_3:\text{YbEr}$ byly připravené za pomoci chloridů kovů, NaBF_4 a iontové kapaliny bmimCl. Velikost vzniklých nanokryсталů je ovlivněna reakčním časem, přičemž jako optimální se ukázal reakční čas 260 minut při teplotě 240 °C s výslednou velikostí nanokryсталů okolo 40 nm a s požadovanými fotofyzikálními vlastnostmi, které jsou taktéž závislé na reakčním čase. Připravené nanočástice mohou být excitovány světlem o vlnové délce 980 nm, přičemž emitují záření 670 nm nutné pro aktivaci ftalocyaninů.

Liposomová léková forma se světlo-konvertujícími nanočásticemi se připraví tak, že se lecitin (či jiný lipid) v čistotě pro farmakologii v koncentraci 1 až 40 mg na mililitr tekutiny, s výhodou sterilního isotonického roztoku, fluidizuje na mikrofluidizéru v příslušné komoře na finální

- velikost částic menších než 1000 nanometrů za teploty vyšší než 0 °C a tlaku 1000 až 2000 Bar. Poté je za stálého míchání přidána účinná látka nebo upravená účinná látka (hydrofobní ftalocyanin hydroxyhlinitý, hydrofobní ftalocyanin hlinitý, hydrofobní ftalocyanin zinečnatý, hydrofobní ftalocyanin křemičitý či organokřemičitý nebo hydrofobní ftalocyanin bez kovu) v poměru mezi 0,1:1 až 3:1 ve vztahu k lecitinu (lipidu) a připravené upkonverzních nanočástice v hmotnostním poměru 0,1:1 až 0,25:1 ve vztahu k lecitinu. Vzniklá suspenze se opět fluidizuje na mikrofluidizéru v příslušné menší komoře na konečnou velikost částic menších než 500 nanometrů za tlaku 1000 až 2000 Bar a za teploty vyšší než 0 °C.
- 10 Dalším možným postupem přípravy liposomové lékové formy se světlo-konvertujícími nanočásticemi je fluidizace lecitinu či jiného lipidu (v čistotě pro farmakologii, v koncentraci 1 až 40 mg na mililitr tekutiny - s výhodou sterilního isotonického roztoku) na mikrofluidizéru v příslušné komoře. Finální velikost částic je menší než 1000 nanometrů. Fluidizace probíhá při tlaku nejméně 1000 až 2000 Bar, za teploty větší než 0 °C. Poté se samostatně fluidizuje na mikrofluidizéru v příslušné komoře účinná látka (hydrofobní ftalocyanin hydroxyhlinitý, hydrofobní ftalocyanin hlinitý, hydrofobní ftalocyanin zinečnatý, hydrofobní ftalocyanin křemičitý či organokřemičitý nebo hydrofobní ftalocyanin bez kovu) nebo upravená účinná látka (s výhodou povrstvena glukózou, NaCl, polyethylenglykolem nebo lecitinem). Účinná látka je použita v poměru mezi 0,1:1 až 3:1 ve vztahu k lecitinu (lipidu) ve shodném objemu tekutiny, s výhodou isotonického roztoku. Konečná velikost částic po fluidizaci je menší než 1000 nanometrů při tlaku nejméně 1000 až 2000 Bar. Obě fluidizované složky se poté smísí společně se světlokonvertujícími nanočásticemi v hmotnostním poměru 0,1:1 až 0,25:1 ve vztahu k lecitinu a společně se fluidizují na mikrofluidizéru v příslušné menší komoře při tlaku nejméně 1000 až 2000 Bar za teploty větší než 0 °C na konečnou velikost částic maximálně 500 nanometrů.
- 25 Neposlední možností přípravy liposomové lékové formy se světlo-konvertujícími nanočásticemi je postup, kdy se lecitin či jiný lipid (v čistotě pro farmacii, v koncentraci 1 až 40 mg na mililitr tekutiny, s výhodou sterilního isotonického roztoku) zpracuje mikrofluidizací společně s účinnou látkou (hydrofobní ftalocyanin hydroxyhlinitý, hydrofobní ftalocyanin hlinitý, hydrofobní ftalocyanin zinečnatý, hydrofobní ftalocyanin křemičitý či organokřemičitý nebo hydrofobní ftalocyanin bez kovu) nebo upravenou účinnou látkou (s výhodou povrstvena glukózou, NaCl, polyethylenglykolem nebo lecitinem) v poměru mezi 0,1:1 až 3:1 ve vztahu k lecitinu (lipidu). Vzniklá suspenze se dále smísí se světlo-konvertujícími nanočásticemi v hmotnostním poměru 0,1:1 až 0,25:1 ve vztahu k lecitinu a všechny složky se poté společně fluidizují na mikrofluidizéru v příslušné komoře na finální velikost částic maximálně 500 nanometrů při tlaku nejméně 1000 až 2000 Bar za teploty větší než 0 °C. Konečná velikost částic je menší než 500 nanometrů při tlaku nejméně 1000 až 2000 Bar za teploty větší než 0 °C.
- 40 Různé kombinace zpracování lipidu, světlo-konvertujících nanočástic yterbia a účinné látky pomocí mikrofluidizace za daných podmínek poskytují lékovou formu s obdobnými vlastnostmi, jak dokazují příklady provedení vynálezu.
- 45 Během procesu mikrofluidizace jsou nejčastěji používány mikrofluidizační komory typu Z a Y. Označení komor ukazuje na jejich geometrický tvar, přičemž se jedná o dlouhou kapiláru s danou světlostí, nejčastěji 100 až 200 nm, která obsahuje velké množství diamantových čepelí, skrz které je mikrofluidizovaná suspenze proháněna pod tlakem. Přítomnost zákrutů a zatáček v komorách umožňuje promíchávání mikrofluidizované suspenze a znemožňuje vznik nežádoucího laminárního proudění suspenze kapilárou.
- 50 Výsledná liposomová léková forma se světlo-konvertujícími nanočásticemi je intravenózně aplikována pro terapii nádorů či metastáz. Přirozenými pochody těla je preparát dopraven a zakoncentrován v indikovaných tumorech. Proces od aplikace po zakoncentrování preparátu v nádoru (nádorech) se pohybuje v řádu minut. Poté je nádor ozářen světlem o vlnové délce 980 nm a intenzitě nejméně 1 J/cm². Navržená léková forma v preklinických testech na athymických nu/nu myších s xenotransplantovanými lidskými tumory vykazovala dezintegrační účinek na
- 55

nádor a indukovala remisi nádorů.

Objasnění výkresů

5

Obr. 1: Mikroskopická kontrola účinnosti mikrofluidizace. Tmavé krystalky představují neinkorporovaný ftalocyanin, průhledné útvary představují liposomy.

10

Obr. 2: Upkonverzní nanočástice povrstvené neporézní silikou. Zobrazení elektronovým mikroskopem.

Obr. 3: Výsledek infračervené PDT pro jednotlivé T_{DL} (1-5), pro lékovou formu bez FCH (6), pro aplikaci samotných nanočástic (7).

15

Obr. 4: Porovnání změny objemu tumoru při aplikacích různých lékových forem s FCH podle příkladů 7a-9b intratumorálně. T_{DL} 10 minut.

20

Obr. 5: Porovnání změny objemu tumoru při aplikacích různých lékových forem s FCH. T_{DL} 10 minut. Kontrolní skupina xenotransplantovaných myší bez léčby ("kontrola"), skupina myší léčených gelovým topickým preparátem dle patentu CZ 298978 („fc+lipo, topicky“), skupina myší léčených lékovou formou dle tohoto patentu intratumorálně („fc+lipo+nano i.t.“), skupina myší léčených lékovou formou dle tohoto patentu intravenózně (fc+lipo+nano i.v.“).

25

Obr. 6: Porovnání velikosti upkonverzních nanočástic připravených podle příkladu 5 v závislosti na obsahu vody v reakční směsi.

Obr. 7: Porovnání velikosti upkonverzních nanočástic připravených podle příkladu 6 v závislosti na reakčním čase a poměru sodíku ke směsi chloridů.

30

Obr. 8: Porovnání změny objemu tumoru při aplikacích různých lékových forem s FCH. T_{DL} 10 minut. UCN označuje upkonverzní nanočástice, FC označuje ftalocyanin, m1-8 označuje jednotlivé pokusné myši, C označuje kontrolní myši pouze ozářené laserem.

35

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklady postupu úpravy práškového FCH:

40

Příklad 1

Práškový jemně mletý FCH je povrstven glukózou v poměru 5 až 10 % hmotn. vzhledem k FCH.

45

a) 50 mg glukózy bylo smícháno s 10 ml destilované vody. Za stálého míchání byl k roztoku přidán práškový ftalocyanin hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 až 500 nm a celá směs byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený glukózou v 5% poměru.

50

b) 75 mg glukózy bylo smícháno s 10 ml destilované vody. Za stálého míchání byl k roztoku přidán práškový ftalocyanin hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a celá směs byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený glukózou v 7,5% poměru.

55

- 5 c) 100 mg glukózy bylo smícháno s 10 ml destilované vody. Za stálého míchání byl k roztoku přidán práškový ftalocyanin hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a celá směs byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený glukózou v 10% poměru.

Příklad 2

- 10 Práškový jemně mletý FCH je povrstven polyethylenglykolem PEG 600 v poměru 5 až 10 % hmotn. vzhledem k FCH.

- 15 a) 50 mg polyethylenglykolu PEG 600 bylo smícháno s 10 ml destilované vody. Za stálého míchání byl k roztoku přidán práškový ftalocyanin hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a celá směs byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený PEG v 5% poměru.

- 20 b) 75 mg polyethylenglykolu PEG 600 bylo smícháno s 10 ml destilované vody. Za stálého míchání byl k roztoku přidán práškový ftalocyanin hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a celá směs byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený PEG v 7,5% poměru.

- 25 c) 100 mg polyethylenglykolu PEG 600 bylo smícháno s 10 ml destilované vody. Za stálého míchání byl k roztoku přidán práškový ftalocyanin hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a celá směs byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený PEG v 10% poměru.

30

Příklad 3

- 35 Práškový jemně mletý FCH je povrstven lecitinem pro farmakologii v poměru 5 až 10 % hmotn. vzhledem k FCH.

- 40 a) 50 mg práškového lecitinu bylo smícháno s 10 ml ethanolu zahřáté na 40 °C. Za stálého míchání byl k suspenzi přidán práškový FCH hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a celá směs byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený lecitinem v 5% poměru.

- 45 b) 75 mg práškového lecitinu bylo smícháno s 10 ml ethanolu zahřáté na 40 °C. Za stálého míchání byl k suspenzi přidán práškový FCH hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a celá směs byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený lecitinem v 7,5% poměru.

- 50 c) 100 mg práškového lecitinu bylo smícháno s 10 ml ethanolu zahřáté na 40 °C. Za stálého míchání byl k suspenzi přidán práškový FCH hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a celá směs byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený lecitinem v 10% poměru.

55

Příklad 4

a) Práškový jemně mletý FCH je povrstven NaCl v poměru 5 až 10 % hmotn. vzhledem k FCH.

5 50 mg NaCl bylo smícháno s 10 ml destilované vody. Za stálého míchání byl k roztoku přidán
práškový FCH hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a celá směs
byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na
teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený NaCl v 5%
poměru.

10

b) 75 mg NaCl bylo smícháno s 10 ml destilované vody. Za stálého míchání byl k roztoku přidán
práškový FCH hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a celá směs
byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze na
teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený NaCl v 7,5%
poměru.

15

c) 100 mg NaCl bylo smícháno s 10 ml destilované vody. Za stálého míchání byl k roztoku
přidán práškový FCH hydroxyhlinitý (1g) s velikostí částic pohybující se mezi 250 a 500 nm a
celá směs byla míchána minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo zahřátí suspenze
na teplotu 37 °C a postupné odpaření veškeré vody. Výsledkem byl FCH povrstvený NaCl v 10%
poměru.

20

Příklady výroby upkonverzních nanočástic:

25

Příklad 5

Do 25ml teflonové nádoby bylo umístěno 80 mg směsi chloridů lanthanoidů (YCl_3 , $YbCl_3$, $ErCl_3$,
30 $GdCl_3$ ve formě hexahydrátů, v molárním poměru prvků Y:Yb:Er:Gd = 80:16:2:2) a smícháno
s 300 mg NaOH. Do nádoby byla přidána destilovaná voda v množství 500 až 6000 mg a 1 ml
(1050 mg) iontové kapaliny 1-Butyl-3-methylimidazolium chlorid (bmimCl) roztavené při 50 °C.
Směs byla míchána po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 30 mg NH_4F a směs byla míchána další 2
minuty. Nádoba byla poté umístěna do mikrovlnné trouby DAEVO KOC-1B5K. Reakce
35 probíhala při výkonu 1000 W po dobu 1 minuty. Po proběhnutí reakce byla směs přemístěna do
20 ml methanolu a nanočástice byly odděleny centrifugací. Produkt byl přečištěn promýváním
v 10 ml methanolu a 10 ml horké destilované vody.

35

Množství destilované vody přidané do reakční směsi má vliv na velikost krystalů. Čím více vody,
40 tím menší výsledné nanočástice. Větší obsah vody v reakční směsi má za následek rychlejší
zahřátí celé směsi a tím pádem i rychlejší fluoridaci. Zvýšení hmotnosti vody v reakční směsi nad
4000 mg už nemá na velikost částic valný vliv (viz obrázek 6).

40

Získané upkonverzní nanočástice vykazovaly požadované fotochemické vlastnosti, nevykazovaly
45 však požadovanou uniformitu částic.

45

Příklad 6

50 Iontová kapalina bmimCl (1-Butyl-3-methylimidazolium chlorid) byla nejprve roztavena
v nádobě z fluoropolymeru (PFA) při teplotě 60 °C. Hexahydráty chloridů YCl_3 , $YbCl_3$ a $ErCl_3$
byly smíchány v molárním poměru prvků Y:Yb:Er = 80:18:2. Jako fluorizační agents byl použit
 $NaBF_4$, který byl ke směsi chloridů přidán ve stechiometrickém poměru 1:1 nebo 2:1, sodík ku
směsi chloridů. Připravený prášek byl přidán k roztavené iontové kapalině a celá směs byla
55 promíchána. Následně byla směs umístěna do sušicí pece předehřáté na 240 °C po dobu 40, 70,

55

140, 180, 260 minut a 22 hodin.

Reakční doba a poměr sodíku ku směsi chloridů měly vliv na velikost připravených nanočástic i na kvantový výtěžek upkonverze a tudíž fotochemické vlastnosti nanočástic. Neoptimálnější se ukázala reakční doba 260 minut při teplotě 240 °C s výslednou velikostí nanočástic okolo 40 nm a účinnou upkonverzí světla o vlnové délce 980 nm na emisní vlnovou délku 670 nm. Optimální upkonverze bylo dosaženo také poměrem sodíku ku směsi chloridů 1:1. Při reakční době 22 hodin při teplotě 240 °C a poměru sodíku ku směsi chloridů 2:1 bylo taktéž dosaženo požadovaných vlastností nanočástic. Z důvodu časové náročnosti byly ale pro přípravu lékové formulace zvoleny nanočástice připravené za podmínek: 240 °C, 260 minut, 1:1 sodík:směsi chloridů. Přehled vlivu reakčního času a poměru sodíku ku směsi chloridů na velikost nanočástic ukazuje obrázek 7.

Část získaných nanočástic byla dále upravena povrstvením křemičitanovou polymerní vrstvou pomocí tetraethylorthosilikátu (TEOS). V plastové nádobě bylo smícháno 6,6 ml Tritonu X-100 (Sigma Aldrich), 6,6 ml HNO₃ (1M), 32,6 ml acetylacetonu, 88 ml TEOS a 66 ml ethanolu za vzniku povrstvovacího roztoku. Tento roztok byl míchan po dobu 6 hodin. Do 25 ml míchaného povrstvovacího roztoku bylo přidáno 0,4 g připravených nanočástic. Suspenze byla míchána v digestoři při laboratorní teplotě až do odpaření povrstvovacího roztoku.

Příklady postupu mikrofluidizace:

25 Příklad 7

a) Na chlazeném mikrofluidizéru (tj. zařízení firmy Microfluidics, Inc., USA, poloprovozního typu) byl nejprve fluidizován práškový lecitin v čistotě pro farmakologii v koncentraci 10 mg na mililitr sterilního isotonického roztoku, 100mM draselnofosfátového pufru (KPI). Fluidizace byla prováděna v komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů 60 cykly tak, aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou při tlaku 1000 Bar. Poté byly za stálého míchání přidávány světlo-konvertující nanočástice připravené v příkladu 5 za použití 500 mg vody, v hmotnostním poměru 0,2:1 ve vztahu k lecitinu, a dále byl za stálého míchání a zahřátí celé směsi na teplotu 35 °C přidáván neupravený mikrokrystalický prášek ftalocyaninu (FCH o velikosti částic pohybující se mezi 250 a 500 nm) v hmotnostním poměru 1:1 ve vztahu k lecitinu. Dále byla suspenze zpracována opět na mikrofluidizační komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů, a to celkem 100 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 1500 Bar a za průběžného chlazení ledovou tříští.

Byla připravena léková forma 7a s koncentrací FCH hydroxylinitého 34,7 mg/ml.

b) Na chlazeném mikrofluidizéru (tj. zařízení firmy Microfluidics, Inc., USA, poloprovozního typu) byl nejprve fluidizován práškový lecitin v čistotě pro farmakologii v koncentraci 30 mg na mililitr sterilního isotonického roztoku KPI. Fluidizace byla prováděna v komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů 60 cykly tak, aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou, při tlaku 1000 Bar. Poté byly za stálého míchání přidávány světlo-konvertující nanočástice připravené v příkladu 6, povrstvené TAOS, v hmotnostním poměru 0,15:1 ve vztahu k lecitinu, a dále byl za stálého míchání a zahřátí celé směsi na teplotu 37 °C přidáván prášek mikrokrystalického FCH povrstveného glukózou připraveného v příkladu 1b, přičemž účinná látka byla v hmotnostním poměru 2:1 ve vztahu k lecitinu. Dále byla suspenze zpracována opět na mikrofluidizační komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů, a to celkem 110 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 1600 Bar a za průběžného chlazení ledovou tříští.

Byla připravena léková forma 7b s koncentrací FCH hydroxylinitého 36,2 mg/ml.

Účinnost celého procesu byla sledována mikroskopicky tak, aby se ve výsledné směsi již

nevyskytovaly tmavomodré krystalky ftalocyaninu, a veškerý ftalocyanin byl inkorporován do liposomů nebo byl z lékové formy vymyt.

5 Příklad 8

a) Na chlazeném mikrofluidizéru (tj. zařízení firmy Microfluidics, Inc., USA, poloprovozního typu) byl nejprve fluidizován práškový lecitin v čistotě pro farmakologii o koncentraci 10 mg na mililitr sterilního isotonického fyziologického roztoku. Fluidizace byla prováděna v komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů 60 cykly tak, aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou při tlaku 1200 Bar. Poté byl samostatně fluidizován neupravený prášek mikrokrystalického FCH (o velikosti částic pohybující se mezi 250 a 500 nm, v hmotnostním poměru 2:1 ve vztahu k lecitinu v témž objemu isotonického roztoku), a to v mikrofluidizační komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů 50 cykly a poté s průměrem 75 mikrometrů také alespoň 50 cykly, celkem 100 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 1500 Bar. Obě fluidizované složky byly předehřáty na teplotu 37 °C, smíchány a za stálého míchání byly přidávány světlo-konvertující nanočástice připravené v příkladu 6, nepovrstvené, v hmotnostním poměru 0,1:1 ve vztahu k lecitinu. Celá směs byla poté opět zpracována na mikrofluidizační komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů, a to celkem 100 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 2000 Bar za průběžného chlazení ledovou tříští.

Byla připravena léková forma 8a s koncentrací FCH hydroxyhlinitého 33,6 mg/ml.

b) Na chlazeném mikrofluidizéru (tj. zařízení firmy Microfluidics, Inc., USA, poloprovozního typu) byl nejprve fluidizován práškový lecitin v čistotě pro farmakologii o koncentraci 30 mg na mililitr sterilního isotonického fyziologického roztoku. Fluidizace byla prováděna v komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů 50 cykly tak, aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou, při tlaku 1500 Bar. Poté byl samostatně fluidizován prášek mikrokrystalického FCH povrstvený NaCl připravený v příkladu 4a, v hmotnostním poměru 1:1, účinná látka ve vztahu k lecitinu v témž objemu isotonického roztoku), a to v mikrofluidizační komoře typu Z s průměrem 75 mikrometrů celkem 100 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 1600 Bar. Obě fluidizované složky byly po zahřátí na 37 °C smíchány a za stálého míchání byly přidávány světlo-konvertující nanočástice připravené v příkladu 5 za použití 4000 mg vody, v hmotnostním poměru 0,15:1 ve vztahu k lecitinu. Celá směs byla poté opět zpracována na mikrofluidizační komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů, a to celkem 120 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 2000 Bar za průběžného chlazení ledovou tříští.

Byla připravena léková forma 8b s koncentrací FCH hydroxyhlinitého 33,1 mg/ml.

Účinnost celého procesu byla sledována mikroskopicky tak, aby se ve výsledné směsi již nevyskytovaly tmavomodré krystalky ftalocyaninu, a veškerý ftalocyanin byl inkorporován do liposomů nebo byl z lékové formy vymyt.

Příklad 9

a) Na chlazeném mikrofluidizéru (tj. zařízení firmy Microfluidics, Inc., USA, poloprovozního typu) byl nejprve fluidizován práškový lecitin v čistotě pro farmakologii v koncentraci 10 mg na mililitr sterilního isotonického roztoku KPi. Fluidizace je prováděna v komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů 60 cykly tak, aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou, při tlaku 1000 Bar. Poté byly k fluidizovanému lecitinu za stálého míchání přidávány světlo-konvertující nanočástice připravené podle příkladu 6, nepovrstvené, v hmotnostním poměru 0,25:1 ve vztahu k lecitinu. Ke směsi byl za stálého míchání přidáván neupravený prášek mikrokrystalického FCH v hmotnostním poměru 2:1 ve vztahu k lecitinu. Dále byla suspenze zpracována na mikrofluidizační komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů 60 cykly a poté s průměrem 75 mikrometrů alespoň 40 cykly, celkem nejméně 100 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 1700 Bar a za průběžného chlazení ledovou tříští.

Následovalo zpracování na mikrofluidizační komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů, a to celkem 100 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 2000 Bar a chlazení ledovou tříští. Byla připravena léková forma 9a s koncentrací FCH hydroxyhlinitého 35,9 mg/ml.

- 5 b) Na chlazeném mikrofluidizéru (tj. zařízení firmy Microfluidics, Inc., USA, poloprovozního typu) byl nejprve fluidizován práškový lecitin pro v čistotě pro farmakologii v koncentraci 30 mg na mililitr sterilního isotonického roztoku KPi. Fluidizace je prováděna v komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů 50 cykly tak, aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou, při tlaku 1200 Bar. Poté byly k fluidizovanému lecitinu za stálého
10 míchání přidávány světlo-konvertující nanočástice připravené v příkladu 6, povrstvené TAOS, v hmotnostním poměru 0,1:1 ve vztahu k lecitinu g. Ke směsi byl za stálého míchání a zahřátí na teplotu 30 °C přidáván prášek mikrokystalického FCH povrstvený polyethylenglykolem připravený v příkladu 2c) v hmotnostním poměru 0,5:1, účinná látka ve vztahu k lecitinu. Dále byla suspenze zpracována na mikrofluidizační komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů
15 celkem 100 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 1800 Bar a za průběžného chlazení ledovou tříští. Následovalo zpracování na mikrofluidizační komoře typu Z s průměrem 75 mikrometrů a to celkem 100 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 2000 Bar a chlazení ledovou tříští.
Byla připravena léková forma 9b s koncentrací FCH hydroxyhlinitého 33,8 mg/ml.

- 20 Účinnost celého procesu byla sledována mikroskopicky tak, aby se ve výsledné směsi již nevyskytovaly tmavomodré krystalky ftalocyaninu, a veškerý ftalocyanin byl inkorporován do liposomů nebo byl z lékové formy vymyt.

25 **Příklad 10**

- a) Na chlazeném mikrofluidizéru (tj. zařízení firmy Microfluidics, Inc., USA, poloprovozního typu) byl nejprve fluidizován práškový lecitin v čistotě pro farmakologii v koncentraci 10 mg na mililitr sterilního fyziologického roztoku. Fluidizace je prováděna v komoře typu Z s průměrem
30 100 mikrometrů 60 cykly tak, aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou, při tlaku 1200 Bar. Poté byl separátně fluidizován neupravený prášek mikrokystalického FCH hydroxyhlinitého v hmotnostním poměru 2:1 ve vztahu k lecitinu. Fluidizace je prováděna v komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů 40 cykly tak, aby celý
35 objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou, při tlaku 1000 Bar. Fluidizovaný lecitin byl smíchán s fluidizovaným FCH a k jejich směsi byly za stálého míchání přidávány světlo-konvertující nanočástice připravené podle příkladu 6, povrstvené TAOS, v hmotnostním poměru 0,25:1 ve vztahu k lecitinu. Dále byla suspenze zpracována na mikrofluidizační komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů, a to celkem 100 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku
40 2000 Bar a chlazení ledovou tříští.
Byla připravena léková forma 10a s koncentrací FCH hydroxyhlinitého 35,1 mg/ml.

- b) Na chlazeném mikrofluidizéru (tj. zařízení firmy Microfluidics, Inc., USA, poloprovozního typu) byl nejprve fluidizován práškový lecitin v čistotě pro farmakologii v koncentraci 30 mg na mililitr sterilního fyziologického roztoku. Fluidizace je prováděna v komoře typu Z s průměrem
45 100 mikrometrů 50 cykly tak, aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou, při tlaku 1500 Bar. Poté byl separátně fluidizován prášek mikrokystalického FCH povrstvený polyethylenglykolem připravený v příkladu 2a v hmotnostním poměru 2:1 ve vztahu k lecitinu. Fluidizace je prováděna v komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů 60 cykly tak,
50 aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou, při tlaku 1200 Bar. Fluidizovaný lecitin byl smíchán s fluidizovaným FCH a k jejich směsi byly za stálého míchání přidávány světlo-konvertující nanočástice připravené podle příkladu 6, povrstvené TAOS, v hmotnostním poměru 0,2:1 ve vztahu k lecitinu. Dále byla suspenze zpracována na mikrofluidizační komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů, a to 60 cykly průchodu kapaliny
55 komorou při tlaku 1500 Bar a následně na komoře typu Y s průměrem 75 mikrometrů 40 cykly a

chlazení ledovou tříští.

Byla připravena léková forma 10b s koncentrací FCH hydroxyhlinitého 34,2 mg/ml.

5 Účinnost celého procesu byla sledována mikroskopicky tak, aby se ve výsledné směsi již nevyskytovaly tmavomodré krystalky ftalocyaninu, a veškerý ftalocyanin byl inkorporován do liposomů nebo byl z lékové formy vymyt.

10 Příklad 11

a) Na chlazeném mikrofluidizéru (tj. zařízení firmy Microfluidics, Inc., USA, poloprovozního typu) byl nejprve fluidizován práškový lecitin v čistotě pro farmakologii v koncentraci 10 mg na mililitr sterilního fyziologického roztoku spolu s práškem mikrokrytalického FCH povrstveného NaCl připraveného v příkladu 4b, přičemž účinná látka byla v hmotnostním poměru 1:1 ve vztahu k lecitinu. Fluidizace byla prováděna v komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů 60 15 cykly tak, aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou, při tlaku 1200 Bar. Poté byly za stálého míchání přidávány světlo-konvertující nanočástice připravené v příkladu 6, povrstvené TAOS, v hmotnostním poměru 0,1:1 ve vztahu k lecitinu. Dále byla suspenze zpracována na mikrofluidizační komoře typu Z s průměrem 100 mikrometrů, a to 20 celkem 100 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 1800 Bar a za průběžného chlazení ledovou tříští.

Byla připravena léková forma 11a s koncentrací FCH hydroxyhlinitého 34,2 mg/ml.

b) Na chlazeném mikrofluidizéru (tj. zařízení firmy Microfluidics, Inc., USA, poloprovozního 25 typu) byl nejprve fluidizován práškový lecitin v čistotě pro farmakologii v koncentraci 30 mg na mililitr sterilního isotonického roztoku KPi spolu s práškem mikrokrytalického FCH povrstveného glukózou připraveného v příkladu 1b, přičemž účinná látka byla v hmotnostním poměru 2:1 ve vztahu k lecitinu. Fluidizace byla prováděna v komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů 60 cykly tak, aby celý objem tekutiny několikrát prošel mikrofluidizační komorou, 30 při tlaku 1000 Bar. Poté byly za stálého míchání přidávány světlo-konvertující nanočástice připravené v příkladu 6, povrstvené TAOS, v hmotnostním poměru 0,15:1 ve vztahu k lecitinu. Dále byla suspenze zpracována opět na mikrofluidizační komoře typu Y s průměrem 100 mikrometrů a to celkem 110 cykly průchodu kapaliny komorou při tlaku 1500 Bar a za průběžného chlazení ledovou tříští.

35 Byla připravena léková forma 11b s koncentrací FCH hydroxyhlinitého 35,2 mg/ml.

Účinnost celého procesu byla sledována mikroskopicky tak, aby se ve výsledné směsi již 40 nevyskytovaly tmavomodré krystalky ftalocyaninu, a veškerý ftalocyanin byl inkorporován do liposomů nebo byl z lékové formy vymyt.

Příklady testování terapeutické účinnosti připravených lékových forem:

45 Příklad 12

Pro účely pilotního testování (screeningu) lékových forem připravených v příkladech 7 až 11 byla zvolena intratumorální aplikace lékové formy přímo do nádoru athymických holých nu/nu 50 myši s xenotransplantovanými lidskými tumory, konkrétně s amelanotickým nepigmentovaným melanomem linie C-32. Po implantaci lidských nádorových buněk do podkoží athymických nu/nu myši byl tumor monitorován a jakmile dosáhl velikosti cca 100 až 150 mm³ (cca 8 dní po transplantaci), bylo přikročeno k intratumorální aplikaci lékové formy. Léková forma připravená dle příkladů 7 až 11 byla nejprve filtrována přes filtry s 1 mikrometrovými póry, poté bylo 200 mikrolitrů lékové formy injekčně aplikováno přímo do tumoru pokusných myši. Po časovém 55 intervalu 10 minut (T_{DL}) byla nádorová tkáň ozářena laserem o vlnové délce 980 nm při výkonu

3W a celkové energii 160 J/cm².

Výsledek pokusu byl hodnocen na základě změny objemu tumoru a velikosti povrchové nekrózy. Všechny připravené lékové formy podle příkladů 7 až 11 vykazovaly při intratumorální aplikaci podobné výsledky (viz obrázek 4). Pro následné testování terapeutické účinnosti však musela být z důvodu velkého počtu pokusných zvířat zvolena pouze jedna léková forma, a tak byla namátkou vybrána léková forma připravená podle příkladu 7b.

10 Příklad 13

Pro testování terapeutické účinnosti liposomové lékové formy byly zvoleny athymické holé nu/nu myši s xenotransplantovanými lidskými tumory, konkrétně s amelanotickým nepigmentovaným melanomem linie C-32. Po implantaci lidských nádorových buněk do podkoží athymických nu/nu myší byl tumor monitorován a jakmile dosáhl velikosti cca 200 mm³ (cca 10 dní po transplantaci), bylo přikročeno k intravenózní aplikaci lékové formy. Léková forma připravená dle příkladu 7b byla nejprve filtrována přes filtry s 1 mikrometrovými póry, poté bylo 200 mikrolitrů lékové formy injekčně aplikováno do ocasní žíly pokusných myší. Po různých časových intervalech byla nádorová tkáň ozářena laserem o vlnové délce 980 nm při výkonu 3W a celkové energii 160 J/cm².

Myši po léčbě vykazovaly remisi tumorů a zjevné hojení provázené povrchovými nekrózami. Pro hodnocení experimentu byly použity právě tyto dva parametry: velikost tumoru v čase po ozáření a velikost povrchových nekróz. Jako kontrolní panely byly použity athymické holé nu/nu myši s xenotransplantovanými lidskými tumory ozářené pouze laserem, myši s aplikací lékové formy bez ozáření anebo s aplikací lékové formy bez FCH a následným ozářením. Výsledky testování ukazuje obrázek 8.

Bylo zjištěno, že účinnost PDT, velikost nekróz a velikost tumoru je závislá na T_{DL} – intervalu mezi aplikací přípravku a ozářením laserem, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při aplikaci lékové formy 10 minut před ozářením laserem, naopak při aplikaci lékové formy 12 hodin před ozářením laserem byla léčba neúčinná, nádor nebyl ovlivněn a rostl dál (viz obrázek 3). Graf terapeutické účinnosti lékové formy podávané i.v. v porovnání s kontrolní skupinou, s gelovým topickým preparátem podle patentu CZ 298978 a s aplikací lékové formy i.t. podle příkladu 10 ukazuje obrázek 5.

Průmyslová využitelnost

Liposomová léková forma se světlo-konvertujícími nanočásticemi je využitelná pro infračervenou fotodynamickou terapii nádorových onemocnění.

PATENTOVÉ NÁROKY

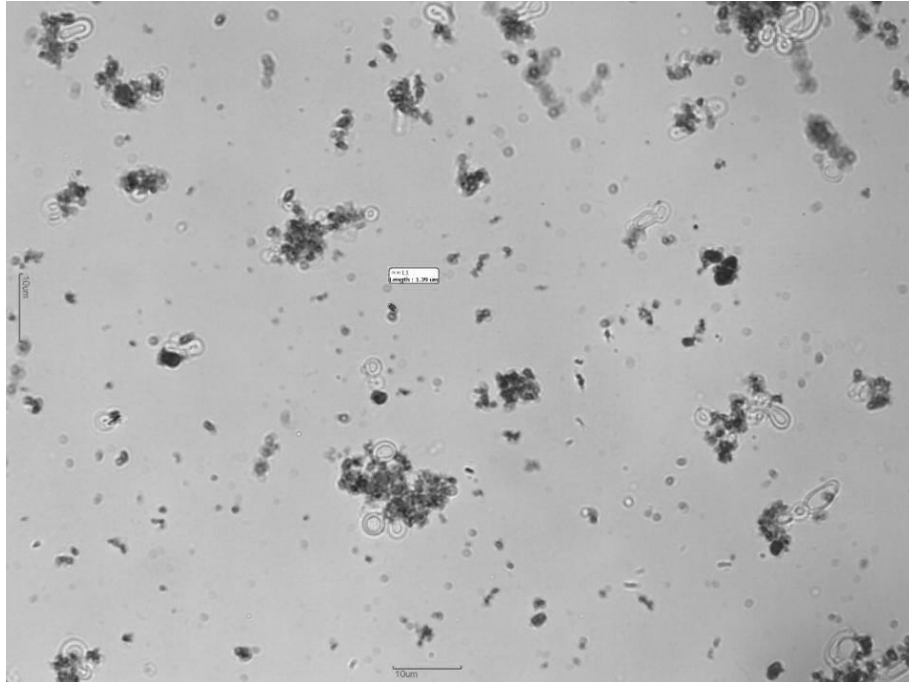
1. Liposomová léková forma se světlo-konvertujícími nanočásticemi, **vyznačující se tím**, že obsahuje lecitin, světlo-konvertující nanočástice NaYF₄ dopované Yb³⁺ a Er³⁺ v hmotnostním poměru 0,1:1 až 0,25:1 ve vztahu k lecitinu, a účinnou látku v hmotnostním poměru 0,1:1 až 3:1 ve vztahu k lecitinu, přičemž účinná látka je vybrána ze skupiny zahrnující hydrofobní ftalocyanin hydroxyhlinitý, hydrofobní ftalocyanin hlinitý, hydrofobní ftalocyanin zinečnatý, hydrofobní ftalocyanin křemičitý či organokřemičitý.

2. Liposomová léková forma podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že světlo-konvertující nanočástice NaYF_4 dopovaného Yb^{3+} a Er^{3+} mají molární poměr sodíku ku ytterbiu a erbiu je 1:1 až 2:1.
- 5 3. Liposomová léková forma podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že světlo-konvertující nanočástice NaYF_4 dopované Yb^{3+} a Er^{3+} mají molární poměr yttria ku ytterbiu ku erbiu 80:18:2.
- 10 4. Liposomová léková forma podle nároku 1 nebo 2 nebo 3, **vyznačující se tím**, že světlo-konvertující nanočástice NaYF_4 dopované Yb^{3+} a Er^{3+} jsou povrstveny neporézní silikou.
- 15 5. Liposomová léková forma podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že účinná látka je ve formě mikrokystalů nebo modifikovaných mikrokystalů, které jsou povrstveny farmaceuticky akceptovatelným cukrem, polymerem, lipidem nebo solí, který tvoří 5 až 10 % hmotn. modifikovaného mikrokystal
- 20 6. Způsob přípravy liposomové lékové formy podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že lecitin a účinná látka se smísí s vodou nebo vodným roztokem v koncentraci 10 až 30 mg na mililitr a vzniklá suspenze se aplikuje do mikrofluidizéru osazeného mikrofluidizační komorou o průměru 75 až 100 mikrometrů za teploty vyšší než 0 °C, mikrofluidizér se nastaví na tlak 100 až 200 MPa a fluidizace se spustí alespoň na 40 cyklů průchodu suspenze mikrofluidizační komorou, poté se k suspenzi přidají světlo-konvertující nanočástice NaYF_4 dopované Yb^{3+} a Er^{3+} .
- 25 7. Způsob přípravy liposomové lékové formy podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že suspenze se světlo-konvertujícími nanočásticemi NaYF_4 se fluidizuje alespoň 50 cykly.
- 30 8. Způsob přípravy liposomové lékové formy podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že se lecitin před smísením s účinnou látkou smísí s vodou nebo vodným roztokem v koncentraci 10 až 30 mg na mililitr a vzniklá emulze se aplikuje do mikrofluidizéru osazeného mikrofluidizační komorou o průměru 100 mikrometrů za teploty vyšší než 0 °C, mikrofluidizér se nastaví na tlak 100 až 200 MPa a fluidizace se spustí alespoň na 50 cyklů průchodu emulze mikrofluidizační komorou.
- 35 9. Způsob přípravy liposomové lékové formy podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že se účinná látka před smísením s lecitem smísí s vodou nebo vodným roztokem v koncentraci 10 až 30 mg na mililitr a vzniklá směs se aplikuje do mikrofluidizéru osazeného mikrofluidizační komorou o průměru 75 až 100 mikrometrů za teploty vyšší než 0 °C, mikrofluidizér se nastaví na tlak 100 až 200 MPa a fluidizace se spustí alespoň na 40 cyklů průchodu směsi mikrofluidizační komorou.
- 40 10. Způsob přípravy liposomové lékové formy podle nároku 7 nebo 8 nebo 9 nebo 10, **vyznačující se tím**, že vodný roztok je sterilní isotonický roztok, fyziologický roztok nebo pufr.
11. Liposomová léková forma podle nároku 1 pro použití jako léčivo.

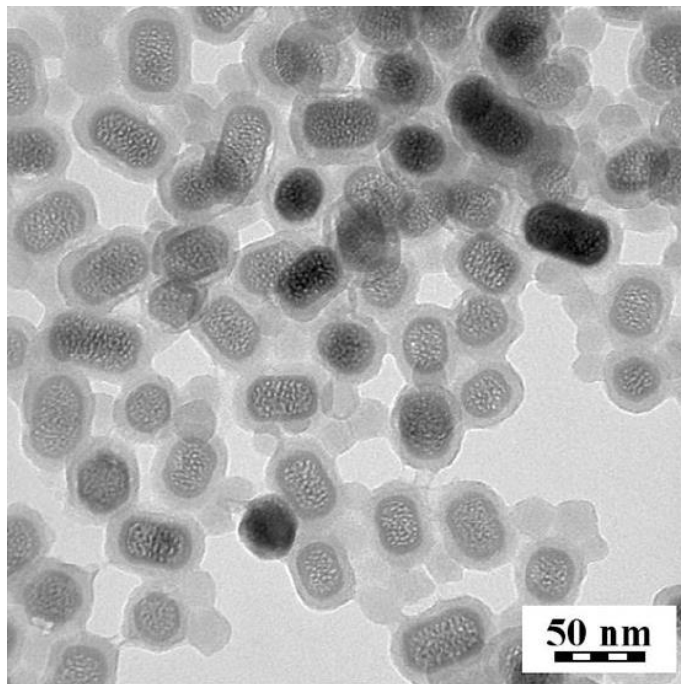
12. Liposomová léková forma podle nároku 1 pro použití při léčení nádorových onemocnění infračervenou fotodynamickou terapií.

5

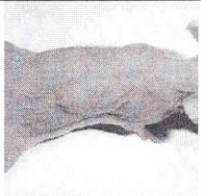
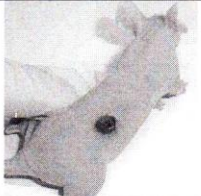
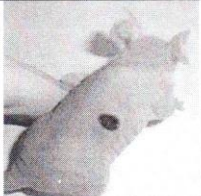
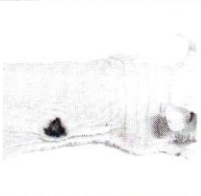

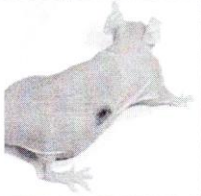
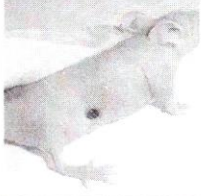
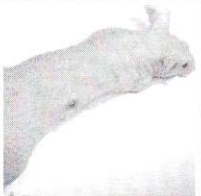

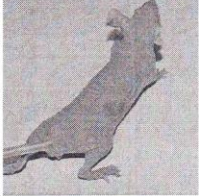




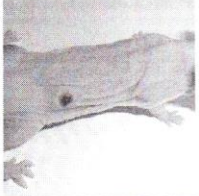


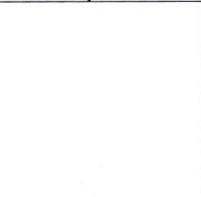

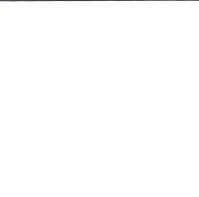
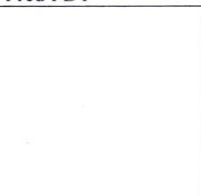
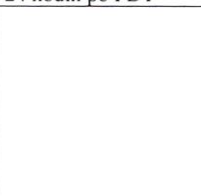
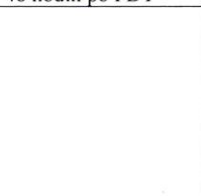
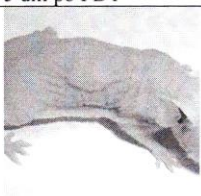
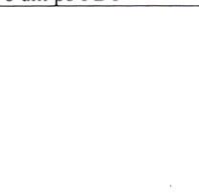
6 výkresů







Obr. 1

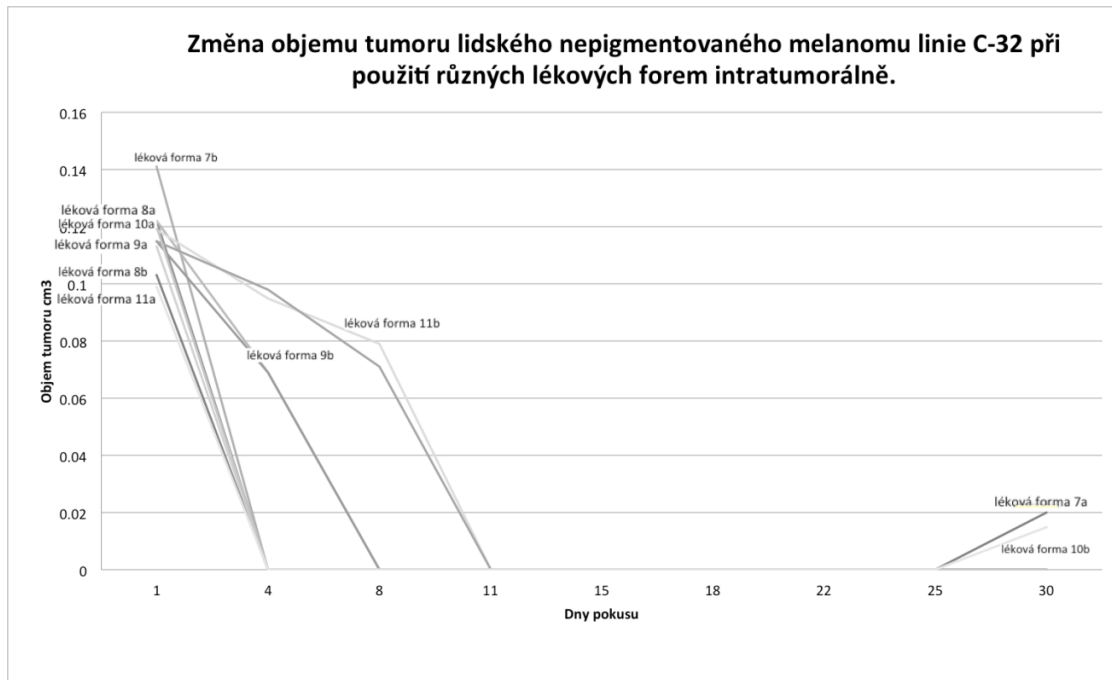


Obr. 2

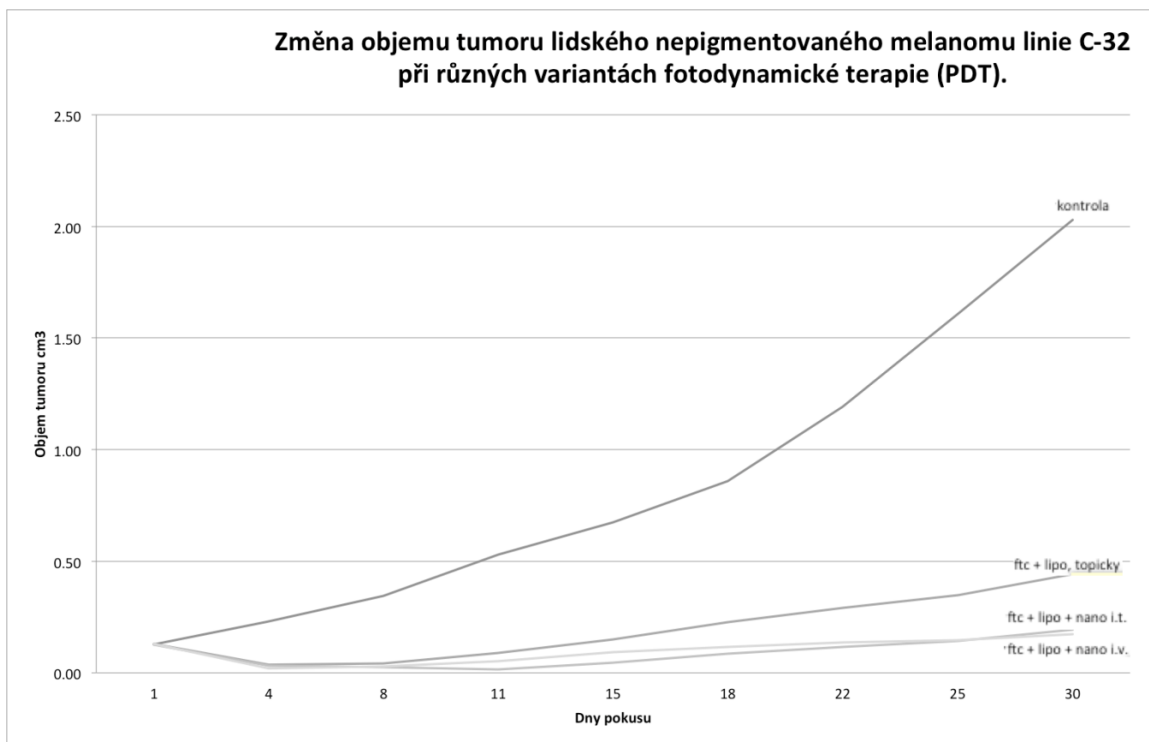
1) intravenózní aplikace lékové formy, T_{DL} 10 minut				
Před PDT	24 hodin po PDT	48 hodin po PDT	5 dní po PDT	8 dní po PDT
				
10 dní po PDT	16 dní po PDT	25 dní po PDT	35 dní po PDT	40 dní po PDT
				
				Optimální výsledek.
2) intravenózní aplikace lékové formy, T_{DL} 30 minut				
Před PDT	24 hodin po PDT	48 hodin po PDT	5 dní po PDT	8 dní po PDT
				
				Nádor začíná opět růst.
3) intravenózní aplikace lékové formy, T_{DL} 60 minut				
Před PDT	24 hodin po PDT	48 hodin po PDT	5 dní po PDT	8 dní po PDT
				
			Nádor začíná opět růst.	
4) intravenózní aplikace lékové formy, T_{DL} 6 hodin				
Před PDT	24 hodin po PDT	48 hodin po PDT	5 dní po PDT	8 dní po PDT
				
			Nekróza se nerozvinula, nádor roste dál.	
5) intravenózní aplikace lékové formy, T_{DL} 12 hodin				
Před PDT	24 hodin po PDT	48 hodin po PDT	5 dní po PDT	8 dní po PDT

				
			Nekróza se nerozvinula, nádor roste dál.	
6) intravenózní aplikace lékové formy bez FCH. T_{DL} 30 minut				
Před PDT	24 hodin po PDT	48 hodin po PDT	5 dní po PDT	8 dní po PDT
				
			Nekróza se nerozvinula, nádor roste dál.	
7) intravenózní aplikace nanočástic. T_{DL} 10 minut				
Před PDT	24 hodin po PDT	48 hodin po PDT	5 dní po PDT	8 dní po PDT
				
	Nekróza se nerozvinula, nádor roste dál.			

Obr. 3



Obr. 4



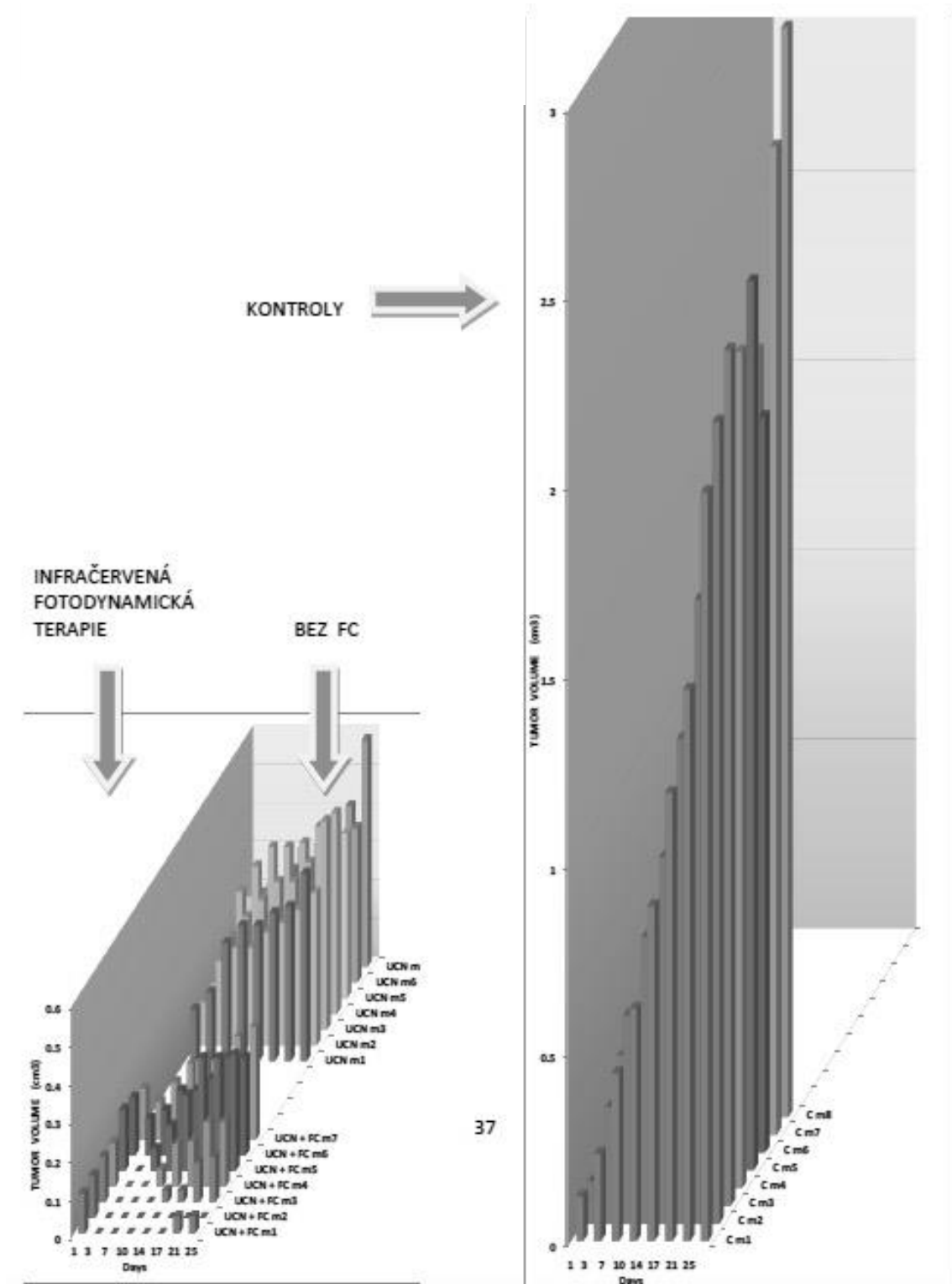
Obr. 5

Směs chloridů (mg)	NaOH (mg)	BmimCl (mg)	NH ₄ F (mg)	voda (mg)	celkem (mg)	Obsah vody (%)	Průměr částic (nm)
80	300	1050	30	500	1960	26	33.8
80	300	1050	30	1000	2460	41	29.9
80	300	1050	30	2000	3460	58	29.5
80	300	1050	30	3000	4460	67	27.7
80	300	1050	30	4000	5460	73	22.9
80	300	1050	30	6000	7460	80	23.2

Obr. 6

Čas (min)	Průměr částic (nm)	
	Na	2Na
40	28.0	24.8
70	29.3	28.3
140	29.9	30.7
180	46.9	30.8
260	40.8	32.5
1320	34.4	36.5

Obr. 7



Obr. 8