

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 279

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C08L 79/04 (2006.01)
C08G 73/06 (2006.01)
C08L 77/00 (2006.01)
C08K 3/32 (2006.01)
C08K 3/01 (2018.01)
C08K 5/3415 (2006.01)
C08K 5/1545 (2006.01)
B82Y 15/00 (2011.01)
B82B 3/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35276**
(22) Přihlášeno: **21.08.2018**
(47) Zapsáno: **06.11.2018**

- (73) Majitel:
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.,
Praha 6, Břevnov, CZ
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
- (72) Původce:
Mgr. Martin Hrubý, Ph.D., DSc., Praha 6, Dejvice,
CZ
PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D., Olomouc, Nemilany,
CZ
Mgr. Volodymyr Lobaz, Ph.D., Praha 8, Troja, CZ
PharmDr. Zbyněk Nový, Ph.D., Náměšť na Hané,
CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Na bělidle 64/3, 150 00 Praha 5,
Smíchov

- (54) Název užitého vzoru:
**Nanočástice na bázi hydroxyapatitu a
hydrofilního polymeru pro použití v biologii
a medicíně**

CZ 32279 U1

Nanočástice na bázi hydroxyapatitu a hydrofilního polymeru pro použití v biologii a medicíně

5 Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká nanočástic na bázi hydroxyapatitu a hydrofilního biokompatibilního polymeru, díky němuž jsou výsledné nanočástice koloidně stabilní a biokompatibilní vlivem snížení jejich nespécifické interakce s bílkovinami a dalšími biologickými strukturami.

Dosavadní stav techniky

15 Pozorování, že makromolekuly a nanočástice selektivně pronikají vaskulaturou pevných nádorů a zůstávají v interstitiu nádoru po delší časové období vedlo k objevu efektu zvýšené permeability a retence (Enhanced Permeability and Retention - EPR) (Field, L. D.; Nag, O. K.; Sangtani, A.; Burns, K. E.; Delehanty, J. B. *Therapeutic Delivery* **2018**, 9, 527; Zhao, M.; Liu, M. Y. *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, 13). Mnoho výzkumníků vyvíjí protinádorové nanosystémy na
20 bázi EPR efektu, kde je změna farmakokinetiky způsobena pouze fyzikálními vlastnostmi respektive velikostí (Varela-Moreira, A.; Shi, Y.; Fens, M.; Lammers, T.; Hennink, W. E.; Schiffelers, R. M. *Mater. Chem. Frontiers* **2017**, 1, 1485; Ehlerding, E. B.; Grodzinski, P.; Cai, W. B.; Liu, C. H. *ACS Nano* **2018**, 12, 2106). V praxi se používá průměr částic nad 7 nm, aby se zabránilo filtraci ledvinami, a pod 200 nm kvůli rozměru fenestrace v nádorových kapilárách
25 (Ehlerding, E. B.; Grodzinski, P.; Cai, W. B.; Liu, C. H. *ACS Nano* **2018**, 12, 2106; Tiet, P.; Berlin, J. M. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, 145, 18).

Bisfosfonáty (BP), jako je například zolendronát, jsou široce využívány k léčbě onemocnění, které zahrnují patologické odbourávání kostní tkáně, protože tyto látky inhibují aktivitu
30 osteoklastů (Cosman, F. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2018**, 30, 420; Dorff, T. B.; Agarwal, N. *Asian J. Androl.* **2018**, 20). Jen malé množství BP se dočasně zadržuje v játrech a slezině, zatímco akumulace v kostech je silně majoritní a prakticky nezvratná. Rychlá akumulace BP v kostní tkáni je způsobena přímou chelatací (zadržením) BP na povrchu hydroxyapatitu (HAP), inherentně biologicky odbouratelného fosforečnanu vápenatého tvořícího minerální složku kosti.
35 Tento fenomén retence je široce využíván v diagnostické a terapeutické nukleární medicíně (Choi, J. Y. *Nucl. Med. Mol. Imaging* **2018**, 52, 200).

Pro dosažení prodloužené doby cirkulace je obvykle nutné nanočástice biokompatibilizovat, tj. chránit je od nežádoucích nespécifických interakcí s biologickým prostředím hydrofilním obalem
40 odolným proti adsorpci proteinů a interakci s povrchy buněk a tkání. Potahování polyethylenoxidem - PEGylace - je častou strategií. Dalšími kandidáty na biokompatibilizaci povrchu nanočástic jsou poly(*N*-vinylpyrrolidon), poly(2-alkyl-2-oxazoliny), poly(*N*-hydroxyalkyl)methakryláty a methakrylamidy (Sedlacek, O.; Monnery, B. D.; Filippov, S. K.; Hoogenboom, R.; Hruby, M. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, 33, 1648). Nanočástice
45 s anorganickým jádrem vyžadují na polymeru kotvící skupiny s afinitou k anorganickému jádru pro efektivní pokrytí (Ulbrich, K.; Hola, K.; Subr, V.; Bakandritsos, A.; Tucek, J.; Zboril, R. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 5338). Některé příklady typů skupin syntézy a ukotvení jsou thioly a kyselina thioktová pro ukotvení na zlato (Zhao, P. X.; Li, N.; Astruc, D. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257, 638), heterobifunkční silany, jako je aminopropyl triethoxysilan k ukotvení na
50 nanočástice oxidu křemičitého (Kierys, A.; Sienkiewicz, A.; Grochowicz, M.; Kasperek, R. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* **2018**, 85, 114; Hu, F. L.; Chen, K. M.; Xu, H.; Gu, H. C. *Acta Biomater.* **2018**, 72, 239) a katecholové (Stephen, Z. R.; Dayringer, C. J.; Lim, J. J.; Revia, R. A.; Halbert, M. V.; Jeon, M.; Bakthavatsalam, A.; Ellenbogen, R. G.; Zhang, M. Q. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 6320) nebo L-lysinové (Pongrac, I. M.; Dobrivojevic, M.; Ahmed, L. B.; Babic, M.; Slouf, M.; Horak, D.; Gajovic, S. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2016**, 7, 926) skupiny
55

pro ukotvení na superparamagnetické nanočástice oxidu železa.

Podstata technického řešení

5

Předkládané technické řešení se týká stabilního pokrytí předem připravených hydroxyapatitových nanočástic biokompatibilním vodorozpustným polymerem s koncovou 1-hydroxy-1,1-bisfosfonátovou skupinou kotvící polymer na krystalovou strukturu hydroxyapatitu za účelem koloidní stabilizace a biokompatibilizace těchto nanočástic. Výsledné nanočástice jsou koloidně stabilní a neinteragují nespecificky s bílkovinami ani dalšími biologickými strukturami, mohou tedy sloužit např. jako nosiče biologicky aktivních látek (léčiv, kontrastních látek, radioaktivních látek k zobrazení nebo léčbě cílových tkání.

10

Nanočásticemi jsou obecně rozuměny částice mající rozměry od 1 do 1000 nm.

15

Předmětem předkládaného technického řešení je nanočástice na bázi hydroxyapatitu a hydrofilního polymeru, která obsahuje částici hydroxyapatitu o velikosti do 200 nm a hydrofilní polymer vybraný ze skupiny sestávající z polyethylenoxidu, poly(2-ethyl-2-oxazolinu), poly(2-methyl-2-oxazolinu), poly(*N*-vinylpyrrolidonu) a poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu], přičemž hydrofilní polymer obsahuje koncovou 1-hydroxy-1,1-bisfosfonátovou skupinu, pomocí které je k povrchu částice hydroxyapatitu kovalentně navázán, a přičemž obsah hydrofilního polymeru v nanočástici je v rozmezí od 10 do 60 % hmotn., s výhodou v rozmezí od 30 do 50 % hmotn., výhodněji od 32 do 45 % hmotn.,

20

25

a přičemž polymerizační stupeň hydrofilního polymeru je v rozmezí od 30 do 200, s výhodou v rozmezí od 40 do 120, výhodněji od 45 do 110. Polymerní pokrytí podle předkládaného technického řešení umožňuje stabilní pokrytí hydroxyapatitových částic jako nosičů bioaktivních složek a diagnostik biokompatibilními vodorozpustnými polymery a tím zlepšit jejich biologické chování v organismu, zejména zlepšit koloidní stabilitu ve vodné nanosuspenzi a snížit nespecifické interakce s bílkovinami a dalšími biologickými strukturami.

30

V jednom provedení má nanočástice na bázi hydroxyapatitu a hydrofilního polymeru podle předkládaného technického řešení velikost v rozmezí od 7 do 200 nm, s výhodou od 30 do 180 nm, výhodněji od 60 do 160 nm, nejvýhodněji od 90 do 130 nm. Uvedená velikost částice alespoň 7 nm brání její filtraci ledvinami. Horní hranice intervalu 200 nm je zvolena kvůli rozměru fenestrace v nádorových kapilárách.

35

V jednom provedení technického řešení je hydrofilním polymerem polyethylenoxid o molekulové hmotnosti 2 až 5 kDa. Pro kovalentní navázání polyethylenoxidu na hydroxyapatit se k roztoku 6-aminohexyliden-1-hydroxy-1,1-bisfosfonátu přidá polyethylenoxid monomethyl ether monosukcinimidyl ester PEO-NHS (o molekulové hmotnosti 2 až 5 kDa) a nechá se reagovat při 5 °C. Produkt (lze jej přečistit dialýzou proti vodě a lyofilizací) se následně adsorbuje na částice hydroxyapatitu ve vodné suspenzi.

40

45

V jiném provedení je hydrofilním polymerem poly(2-ethyl-2-oxazolin) o molekulové hmotnosti 5 až 10 kDa. Pro kovalentní navázání poly(2-ethyl-2-oxazolinu) na hydroxyapatit se do roztoku α -methyl- ω -hydroxy poly(2-ethyl-2-oxazolinu) (o molekulové hmotnosti 5 až 10 kDa) v bezvodém acetonitrilu přidá desetinasobný molární přebytek (k hydroxylovým skupinám polymeru) anhydridu kyseliny jantarové a triethylaminu. Po zreagování směsi a odpaření rozpouštědel se odparek rozpustí ve vodě a nechá se zreagovat s kyselinou octovou na produkt PEOx-COOH (lze přečistit dialýzou proti vodě a lyofilizací), který následně reaguje s thiazolin-2-thionem a dicyklohexyl karbodiimidem na polymer PEOx-TT. Z něj reakcí s 6-aminohexyliden-1-hydroxy-1,1-bisfosfonátem vznikne PEOx-Ner, který se následně adsorbuje pomocí bisfosfonátové skupiny na částice hydroxyapatitu ve vodné suspenzi.

50

55

V jednom provedení mohou nanočástice podle předkládaného technického řešení dále obsahovat fluorescenční značku, přičemž fluorescenční značka je k povrchu nanočástice hydroxyapatitu kovalentně navázána přes 1-hydroxy-1,1-bisfosfonátovou skupinu a její celkové množství v nanočástici je do 1 % hmotn. S výhodou je fluorescenční značka vybraná ze skupiny zahrnující fluorescein, eosin, rhodamin, dansyl, CF 350, CF 405S, CF 488A, CF 555, CF 568, CF 594, CF 633, CF 640R, CF 647, CF 660C, CF 660R, CF680, fluorochromy ze skupiny polymetinů (zejména cyaniny, jako například Cyanin3 (Cy3) nebo Cyanin3.5 (Cy3.5) nebo Cyanin5 (Cy5) nebo Cyanin5.5 (Cy5.5) nebo Cyanin7 (Cy7) nebo Cyanin7.5 (Cy7.5)), Dy615 (C₃₂H₃₈N₂O₆S), fluorescenční značky emitující v blízkém infračerveném spektru, jako např. NIR 4f, NIR 5e, 1-(3-aminopropyl)-4,5-benzo-11-chlor-1'-(4-sulfobutyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-10,12-trimethylenindotrikarbocyaninbromid (NIR 6a), 4,5-benzo-11-chlor-1-(3-isothiokyanatopropyl)-1'-(4-sulfobutyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-10,12-trimethylenindotrikarbocyanin bromid (NIR 6e), 1,1'-bBis(4-sulfobutyl)-11-(4-isothiokyanatofenoxy)-3,3,3',3'-tetramethyl-10,12-trimethylenindotrikarbocyanin (NIR 7a, NIR 7b), 4,5-benzo-1-(3-isothiokyanatopropyl)-1'-(4-sulfobutyl)-11-fenoxy-3,3,3',3'-tetramethyl-10,12-trimethylenindotrikarbocyanin (NIR 8a, NIR 8b), NIR II, 2,10-bis(3-aminopropoxy)dibenzo[a,j]perylene-8,16-dion, 3,3'-[(8,16-dihydro-8,16-dioxodibenzo-[a,j]perylene-2,10-diyl)dioxy]dipropylamin (NIR 628), NIR 641, fluorescenční červená NIR 680 (C₃₆H₄₆N₂O₆S), fluorescenční červená NIR 700 (C₃₉H₄₄N₂O₆S), fluorescenční červená NIR 730 (C₃₈H₄₈N₂O₆S), fluorescenční červená NIR 781 (C₄₂H₅₀N₃NaO₁₁S₂), NIR 797, NIR 885 (6-(diethylamino)-4-(9,10-dihydro-6H,8H-5,12-dioxatetrafen-11-ylmetylen)xanthylum-perchlorát), nejvýhodněji je fluorescenční značkou fluorescein.

V jednom provedení mohou nanočástice podle předkládaného technického řešení dále obsahovat radioaktivní značku, přičemž radioaktivní značka je k povrchu nanočástice hydroxyapatitu navázána chelatačně a její celkové množství v nanočástici je do 10 GBq/mg. S výhodou je radioaktivní značkou kostní radiofarmakum vybrané ze skupiny zahrnující ^{99m}Tc komplex 1-hydroxyethyliden-1,1-bisfosfonátu, ^{99m}Tc komplex methylyden-1,1-bisfosfonátu, ¹⁸⁶Re komplex 1-hydroxyethyliden-1,1-bisfosfonátu, ¹⁸F-, ⁸⁹SrCl₂, ¹⁵³Sm-ethylendiaminetetramethylen-fosfonovou kyselinu, ²²³RaCl₂, výhodněji je radioaktivní značkou ^{99m}Tc komplex 1-hydroxyethyliden-1,1-bisfosfonátu.

Objasnění výkresů

Obr. 1: TEM mikrofotografie (a) a XRD prášková difrakce (b) částic HAP.

Obr. 2: Syntéza hydroxybisfosfonátem terminovaného polyethylenoxidu.

Obr. 3: Syntéza PEOx-Ner.

Obr. 4: Třídímní SPECT/CT obraz radioznačených nanočástic podle Příkladu 6 stabilizovaných PEO_{2k} v myších 1, 3, 6 a 24 h po injekci (p.i.). H = srdce, L = játra, S = slezina, UB = močový měchýř.

Obr. 5: Třídímní SPECT/CT obraz radiofarmaka ^{99m}Tc-HDP v myších 1, 3, 6 a 24 h po injekci (p.i.). L = játra, B = kosti, UB = močový měchýř.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1

5

Příprava částic HAP: V typickém experimentu bylo ve 250 ml baňce k 80 ml 0,8M vodného roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ přidáno 80 ml 1,2 M vodného roztoku $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Před přidáním roztoku vápenaté soli bylo pH upraveno na 9 až 11 přidávkem vodného amoniaku. Směs byla míchána při teplotě okolí po dobu jedné hodiny a pak byla sraženina dvakrát promyta opakovanou centrifugací, dekantací supernatantu a redispersací v ultračisté vodě a potom sušena ve vakuu.

Částice HAP jsou na mikrofotografiích transmisní elektronové mikroskopie (TEM) zobrazeny jako nanokrystaly s průměrným rozměrem 60x20 nm (Obr. 1). Podle rentgenového difraktogramu (XRD) odpovídají tyto částice struktuře hexagonálního hydroxyapatitu. Rozestupy vypočítané pomocí Scherrerovy rovnice pro nejintenzivnější difrakční píky přiřazené ke krystalovým rovinám {002}, {211}, {300} a {202} byly v rozmezí 22 až 74 nm a výborně odpovídají rozměrům pozorovaným u TEM, což naznačuje, že každá částice na TEM je jediný krystal HAP. Ačkoliv velikost krystalů původního HAP splňuje požadavky na efekt EPR, jejich zeta potenciál 0 mV bez sterické stabilizace povrchu vede ve vodném prostředí k tvorbě agregátů větších než 1 mikrometr, a proto k stabilizaci a zabránění tvorby agregátů byly tyto částice pokryty polymerem.

Syntéza hydroxybisfosfonátem terminovaného polyethylenoxidu, PEO-Ner (schéma viz Obr. 2): K roztoku 6-aminohexylden-1-hydroxy-1,1-bisfosfonátu (Ner, 1,58 g, 5,0 mmol pro polyethylenoxid o molekulové hmotnosti 2000, PEO_{2k}, respektive 0,63 g, 2,0 mmol pro polyethylenoxid o molekulové hmotnosti 5000, PEO_{5k}) v 0,4 M fosfátového pufru pH 7,4 ochlazeném na 5 °C byl přidán polyethylenoxid monomethyl ether monosukcinimidyl ester PEO-NHS (1 g, 0,5 mmol NHS skupin pro PEO_{2k} respektive 0,2 mmol pro PEO_{5k}). Směs byla míchána 5 h při 5 °C a produkt pak byl čištěn dialýzou proti vodě a lyofilizován. ¹H NMR (600 MHz, D₂O, δ): 3,68 (s, -O-CH₂-CH₂-O-, 4H); 3,37 (s, -CH₃, 3H); 3,21-3,17 (t, CH₂, 2H); 2,50 (s, CO-CH₂-CH₂-CO, 4H); 1,99-1,92 (t, CH₂, 2H); 1,59-1,55 (t, CH₂, 2H); 1,53-1,50 (t, CH₂, 2H); 1,33-1,30 (t, CH₂, 2H). ³¹P NMR (242,9 MHz, D₂O, δ): 19,69 ppm. Stupeň přeměny koncových skupin na hydroxybisfosfonát byl vypočten z ¹H NMR spektra jako 58% pro PEO_{2k} respektive 47% pro PEO_{5k}. MS (MALDI-TOF): m/z 2029,23 pro PEO_{2k} respektive 5234,14 pro PEO_{5k}.

Adsorpce PEO-Ner na částice HAP: K roztoku PEO-Ner (0,2 g) ve 4,4 ml vody bylo přidáno 0,07 g částic HAP, směs byla sonikována 5 min a pak míchána 24 h při laboratorní teplotě. Poté byla směs centrifugována při 2647 x g 30 min, supernatant byl dekantován a zfiltrován přes stříkačkový polyvinylidenfluoridový filtr o velikosti pórů 0,22 μm. Polymerem pokryté nanočástice byly třikrát promyty vodou za použití centrifugace při 23907 x g po dobu 30 min a následně redispersovány ve stejném objemu vody. Nanočástice byly skladovány jako disperze ve vodě. Pro termogravimetrickou analýzu (TGA) byly nanočástice sušeny ve vakuu při 60 °C.

Nanočástice tvoří stabilní koloid s intenzitně váženým hydrodynamickým průměrem stanoveným dynamickým rozptylem světla (DLS) 117±69 nm (nanočástice stabilizované PEO_{2k}-Ner) respektive 98±42 nm (nanočástice stabilizované PEO_{5k}-Ner) a příslušnými zeta potenciály 0 a -3,8 mV, svědčící o efektivní sterické stabilizaci částic HAP. Obsah polymeru podle TGA 35 % hmotnostních (nanočástice stabilizované PEO_{2k}-Ner) respektive 33 % hmotnostních (nanočástice stabilizované PEO_{5k}-Ner).

Příklad 2

Výchozí nanočástice HAP pro následné pokrytí polymerem byly připraveny jako v Příkladu 1. Syntéza hydroxybisfosfonátem terminovaného poly(2-ethyl-2-oxazolinu), PEO_x-Ner (viz

Obr. 3):

Do roztoku α -methyl- ω -hydroxy-poly(2-ethyl-2-oxazolinu) (PEOx-OH, 1,00 g, tj. 0,2 respektive 0,1 mmol hydroxylových skupin pro 5 kDa a 10 kDa polymery) ve 4 ml bezvodého acetonitrilu byl přidán anhydrid kyseliny jantarové (200 mg, 2 mmol respektive 100 mg, 1 mmol pro 5 kDa a 10 kDa polymery, tj. desetinásobný molární přebytek k hydroxylovým skupinám polymeru) a triethylamin (0,28 ml, 2 mmol respektive 0,14 ml, 1 mmol pro 5 kDa a 10 kDa polymery, tj. desetinásobný molární přebytek k hydroxylovým skupinám na polymeru). Směs byla míchána 1 h při teplotě místnosti a pak 3 h zahřívána pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo bylo odpařeno a pevná látka byla rozpuštěna ve 4 ml vody. Byla přidána kyselina octová (0,34 ml, 6 mmol respektive 0,17 ml, 3 mmol pro 5 kDa a 10 kDa polymery) a produkt PEOx-COOH byl čištěn dialýzou proti vodě a lyofilizován. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O , δ): 4,22 (s, $\text{CH}_2\text{-O}$, 2H); 3,44 (s, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$, 4H); 2,57 (t, $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$, 4H); 2,40-2,29 (d, CH_2 , 2H); 1,11 (s, CH_3 , 3H). Míra substituce koncových karboxylových skupin podle $^1\text{H NMR}$ spekter byla 77 respektive 84 % mol. pro 5 kDa a 10 kDa poly(2-ethyl-2-oxazolin).

Karboxylem terminovaný PEOx-COOH (1,00 g) byl rozpuštěn ve 1 ml bezvodého acetonitrilu, bylo přidáno 5 ml bezvodého toluenu, směs byla odpařena ve vakuu a následně dosušena ve vakuové sušárně při 80 °C. Suchý produkt byl rozpuštěn ve 2 ml bezvodého acetonitrilu a pak byl přidán thiazolin-2-thion (120 mg, 1,0 mmol respektive 60 mg, 0,5 mmol pro 5 kDa a 10 kDa polymery) a 4-*N,N*-dimethylaminopyridin jako katalyzátor (49 mg, 0,04 mmol respektive 24 mg, 0,02 mmol pro 5 kDa a 10 kDa polymery). Odděleně byl připraven roztok dicyklohexyl karbodiimidu (206 mg, 1,0 mmol respektive 103 mg, 0,5 mmol pro 5 kDa a 10 kDa polymery) ve 3 ml bezvodého acetonitrilu. Oba roztoky byly ochlazeny na -10 °C, smíchány a udržovány při -10 °C po dobu 1 h, a pak při + 5 °C po dobu 24 h. Vysrážená dicyklohexylmočovina byla odfiltrována a polymer PEOx-TT vysrážen studeným suchým diethyletherem a sušen ve vakuu. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , δ): 4,57-4,55 (t, N-CH_2 -, 2H); 4,22 (s, $\text{CH}_2\text{-O}$, 2H); 3,44 (s, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$, 4H); 3,29 (s, $\text{-CH}_2\text{-S}$, 2H); 2,59-2,55 (t, $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$, 4H); 2,40-2,29 (d, CH_2 , 2H); 1,11 (s, CH_3 , 3H). Konverze koncových skupin na TT amid stanovená UV-Vis ($\lambda=305$ nm, $\epsilon_{305}=103$ 00 L/mol*cm) byla 57 a 62 % mol. pro 5 kDa a 10 kDa polymery.

K roztoku Ner (0,33 g, 1,1 mmol respektive 0,18 g, 0,6 mmol pro 5 kDa a 10 kDa polymery) v 0,4 M fosfátovém pufru (pH 7,4) ochlazenému na 5 °C byl přidán 1 g suchého PEOx-TT (0,11 mmol TT skupin pro polymer 5 kDa nebo 0,06 mmol TT skupin pro polymer 10 kDa), směs byla míchána při 5 °C po dobu 5 h a produkt byl čištěn dialýzou proti vodě a lyofilizován. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O , δ): 4,22 (s, $\text{CH}_2\text{-O}$, 2H); 3,44 (s, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$, 4H); 3,21-3,17 (t, CH_2 , 2H); 2,592,55 (t, $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$, 4H); 2,40-2,29 (d, CH_2 , 2H); 1,99-1,92 (t, CH_2 , 2H); 1,59-1,55 (t, CH_2 , 2H); 1,53-1,50 (t, CH_2 , 2H); 1,33-1,30 (t, CH_2 , 2H); 1,11 (s, CH_3 , 3H). $^{31}\text{P NMR}$ (242,9 MHz, D_2O , δ): 21,5 ppm. Konverze koncových skupin na hydroxybisfosfonát podle $^1\text{H NMR}$ spekter byla 52% respektive 50% pro 5 kDa a 10 kDa polymery. SEC: číselně střední molekulová hmotnost $M_n=6,08$ kDa, hmotnostně střední molekulová hmotnost $M_w=6,31$ kDa, disperzita $\text{Đ}=1,04$ respektive $M_n=12,89$ kDa, $M_w=13,15$ kDa, a $\text{Đ}=1,02$ pro 5 kDa a 10 kDa polymery. Pro TGA byly nanočástice sušeny ve vakuu při 60 °C.

Hydroxyapatitové částice syntetizované podle Příkladu 1 byly pokryty PEOx-Ner procedurou popsanou v Příkladu 1. Výsledné nanočástice tvoří stabilní koloid s intenzitně váženým hydrodynamickým průměrem stanoveným DLS 125 ± 68 nm (nanočástice stabilizované polymerem o molekulové hmotnosti 5 kDa) respektive 116 ± 45 nm (nanočástice stabilizované polymerem o molekulové hmotnosti 10 kDa) a příslušnými zeta potenciály 0 a -6,3 mV, svědčící o efektivní sterické stabilizaci částic HAP. Obsah polymeru podle TGA 42 % hmotnostních (nanočástice stabilizované polymerem o molekulové hmotnosti 5 kDa) respektive 41 % hmotnostních (nanočástice stabilizované polymerem o molekulové hmotnosti 10 kDa).

Příklad 3

5 Syntéza hydroxybisfosfonátem terminovaného poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu], PHPMA-Ner:

10 Roztok Ner (30 mg, 0,1 mmol) v 0,4 M fosfátovém pufru pH 7,4 byl ochlazen na 5 °C, bylo přidáno 0,1 g suchého poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu] terminovaného thiazolin-2-thionovými funkčními skupinami ($M_n=11.94$ kDa, $M_w=24.35$ kDa, $\bar{D}=2.04$, funkcionalita koncových skupin 47 % podle UV-VIS, $\lambda=305$ nm, $\epsilon_{305}=103\ 00$ L/mol*cm), směs byla 5 h míchána při 5 °C a produkt byl čištěn dialýzou proti vodě a lyofilizován. ^1H NMR (600 MHz, D_2O , δ): 7,9-7,4 (m, Ar, 5H); 4,0-3,8 (m, C-H, 1H); 3,3-3,0 (m, $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, 2H), 2,0-1,7 (m, C- CH_2 -C, 2H); 1.2-0.8 (m, $-\text{CH}_3$, 6H). ^{31}P NMR (242,9 MHz, D_2O , δ): 19,8 ppm.

15 Výchozí částice HAP pro následné pokrytí polymerem byly připraveny jako v Příkladu 1 a byly pokryty PHPMA-Ner procedurou popsanou v Příkladu 1. Výsledné nanočástice tvoří stabilní koloid s intenzitně váženým hydrodynamickým průměrem stanoveným DLS 133 ± 69 nm a příslušným zeta potenciálem -6,1 mV svědčícím o efektivní sterické stabilizaci částic HAP.

20 Příklad 4

Nanočástice HAP stabilizované polyethylenoxidem o molekulové hmotnosti 2 a 5 kDa připravené podle Příkladu 1 byly fluorescenčně označeny fluoresceinem s hydroxybisfosfonátovou skupinou (fluorescein-Ner) následujícím postupem:

25 K disperzi nanočástic HAP stabilizovaných Ner-zakončeným polymerem (1 ml, 15 mg / ml) bylo přidáno 0,2 ml 80 μM roztoku fluorescein-Ner ve vodě (10,6 μg nebo $1,6 \times 10^{-2}$ μmol). Směs byla míchána ve tmě po dobu 12 h a pak byly značené NPS purifikovány na Sephadexu G25 za použití vody jako elučního činidla, koncentrovány centrifugací a skladovány ve formě disperze ve vodě. Množství adsorbovaného fluoresceinu-Ner bylo stanoveno UV-Vis spektrometrií (30 $\lambda = 440$ nm, $\epsilon_{440\text{nm}} = 61658$ L/mol*cm) po rozpuštění HAP NPS v 1% kyselině octové a úpravě pH pomocí 0,1 M NaOH na 7,0.

35 Nanočástice tvoří stabilní koloid s intenzitně váženým hydrodynamickým průměrem stanoveným dynamickým rozptylem světla (DLS) 92 ± 36 nm (nanočástice stabilizované PEO_{2k}-Ner) respektive 154 ± 82 nm (nanočástice stabilizované PEO_{5k}-Ner). Obsah fluoresceinu odpovídá v obou případech efektivitě značení 36 % (nanočástice stabilizované PEO_{2k}-Ner) respektive 60 % (nanočástice stabilizované PEO_{5k}-Ner).

40 Standardní test cytotoxicity (MTS - test) na buněčných liniích B2#4, BJ, MRC5, HCT116 a CCRF-CEM prokázal, že částice nejsou cytotoxické ani v maximální použité dávce 1000 mg/mL.

45 Buněčná internalizační analýza: Testované buněčné linie (B2#4, HT-29, BJ, MRC5, HCT116 a U2OS) byly naneseny na černé, čiré dno 384-jamkových destiček při hustotě 3000 buněk na jamku v konečném objemu 30 μl . O den později byl k buňkám přidán roztok nanočástic až do konečné koncentrace 100 μg / ml v jamce. Po jedné a šestnácti hodinách od přidání nanočástic byla internalizace vizualizována pomocí automatizovaného konfokálního mikroskopu Yokogawa CellVoyager7000 při 20násobném zvětšení excitací 488 nm laserem a filtru 515 nm s pásmem 30 nm. Při expoziční době 250 ms byly shromážděny 4 snímky zhora a pod rovinou zaostřování 50 s roztečí 0,25 μm . Test internalizace potvrdil, že pokrytí 5 kDa polymerem efektivně potlačí internalizaci do buněk všech testovaných linií, zatímco pokrytí 2 kDa polymerem ho pouze zpomalí.

Příklad 5

Nanočástice HAP stabilizované poly(2-ethyl-2-oxazolinem) o molekulové hmotnosti 5 a 10 kDa připravené podle Příkladu 2 byly fluorescenčně označeny fluorescein-Ner podle Příkladu 3. Nanočástice tvoří stabilní koloid s intenzitně váženým hydrodynamickým průměrem stanoveným DLS 136 ± 79 nm (nanočástice stabilizované polymerem o molekulové hmotnosti 5 kDa) respektive 143 ± 63 nm (nanočástice stabilizované polymerem o molekulové hmotnosti 10 kDa). Obsah fluoresceinu odpovídá v obou případech efektivitě značení 36 % (nanočástice stabilizované polymerem o molekulové hmotnosti 5 kDa) respektive 60 % (nanočástice stabilizované polymerem o molekulové hmotnosti 10 kDa). Standardní test cytotoxicity provedený podle Příkladu 3 na buněčných liniích B2#4, BJ, MRC5, HCT116 a CCRF-CEM prokázal, že částice nejsou cytotoxické ani v maximální použité dávce 1000 mg/mL. Test internalizace do buněk (metodika podle Příkladu 3) potvrdil, že pokrytí 5 i 10 kDa polymerem efektivně potlačí internalizaci do buněk všech testovaných linií.

Příklad 6

Nanočástice připravené podle Příkladu 1 (s PEO_{2k}) byly radioznačeny komerčním radiofarmakem pro kostní diagnostiku založeném na ^{99m}Tc komplexu 1-hydroxyethyliden-1,1-bisfosfonátu (^{99m}Tc-HDP): K různému množství (1,5 a 3,0 mg) nanočástic HAP připravených dle Příkladu 1 (s PEO_{2k}) dispergovaných ve vodě bylo přidáno 20 až 200 μ l ^{99m}Tc-HDP (odpovídající 20 až 200 MBq) a bylo mícháno 1 h při 300 ot / min. Radiochemická čistota radioaktivně značených NPS byla stanovena chromatografií na tenké vrstvě (ITLC-SG) na skleněných vlákních impregnovaných silikagelem za použití 1 M octanu amonného jako mobilní fáze a byla přes 99 %. Retenční faktor (R_f) radioaktivně značených nanočástic byl 0 a R_f ^{99m}Tc- HDP byl 0,2 až 0,8. Radiochemická stabilita při inkubaci v krevní plazmě po dobu 24 h byla přes 95 % (ITLC-SG).

Pokusy na zvířatech byly prováděny v souladu s předpisy a směrnicemi České republiky a Evropské unie. Studie byly prováděny za použití zdravých samic myši Balb/C starých 8 až 10 týdnů. Intravenózní injekce nanočástic a zobrazování byly provedeny za 2% izofluranové anestézie, aby se minimalizovalo utrpení zvířat.

Myši byly injikovány nanočásticemi HAP (3 mg) podle Příkladu 1 (s PEO_{2k}) radioznačenými ^{99m}Tc-HDP nebo samotným ^{99m}Tc-HDP v dávce 50 až 60 MBq na zvíře. Anestetizovaná zvířata byla umístěna do zobrazovacího systému pro malá laboratorní zvířata umožňujícího vyšetření pomocí jednofotonové emisní výpočetní tomografie - výpočetní tomografie (SPECT/CT).

Statické obrazy SPET/CT byly získány během 45 min v časových intervalech 1, 3, 6 a 24 h po aplikaci. Byl proveden 30 min SPECT scan následovaný CT vyšetřením (45 kVp, 400 μ A, při 400 projekcích). Po rekonstrukci získaných dat byly vytvořeny trojrozměrné obrazy vyjadřující biodistribuci testovaných nanočástic (viz Obr. 4 a 5).

^{99m}Tc-HDP značené nanočástice byly postupně ukládány v játrech a slezině s retencí v těchto orgánech až do 24 h (cca 4 poločasy rozpadu ^{99m}Tc) po aplikaci, kdy bylo skenování ukončeno pro nízký SPECT signál kvůli vyměření radionuklidu. V počátečních časových intervalech po injekční aplikaci (1 h a 3 h) bylo pozorováno určité množství radioaktivity v srdci a močovém měchýři. Radioaktivita v srdci odpovídá cirkulaci v krevním řečišti. Vyloučení části radioaktivity do močového měchýře dokládá biologickou rozložitelnost systému.

^{99m}Tc-HDP samotný vykazoval jiné chování *in vivo* s akumulací a retencí v játrech a zejména pro toto kostní radiodiagnostikum typickým vychytáváním v kostech.

Průmyslová využitelnost

Polymerní pokrytí podle předkládaného technického řešení umožňuje stabilní pokrytí hydroxyapatitových nanočástic jako nosičů bioaktivních složek a diagnostik biokompatibilními vodorozpustnými polymery a tím zlepšit jejich biologické chování v organismu, zejména zlepšit koloidní stabilitu ve vodné nanosuspenzi a snížit nespecifické interakce s bílkovinami a dalšími biologickými strukturami.

10

NÁROKY NA OCHRANU

1. Nanočástice na bázi hydroxyapatitu a hydrofilního polymeru, **vyznačená tím, že** obsahuje částici hydroxyapatitu o velikosti do 200 nm a hydrofilní polymer obsahující 1-hydroxy-1,1-bisfosfonátovou skupinu, přes kterou je hydrofilní polymer kovalentně navázán k povrchu částice hydroxyapatitu,

příčemž hydrofilní polymer je vybrán ze skupiny sestávající z polyethylenoxidu, poly(2-ethyl-2-oxazolinu), poly(2-methyl-2-oxazolinu), poly(N-vinylpyrrolidonu) a poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu], a příčemž obsah hydrofilního polymeru v nanočástici je v rozmezí od 10 do 60 % hmotn., s výhodou v rozmezí od 30 do 50 % hmotn., výhodněji od 32 do 45 % hmotn.,

a příčemž polymerní stupeň hydrofilního polymeru je v rozmezí od 30 do 200, s výhodou v rozmezí od 40 do 120, výhodněji od 45 do 110.

2. Nanočástice podle nároku 1, **vyznačená tím, že** má velikost v rozmezí od 7 do 200 nm, s výhodou od 30 do 180 nm, výhodněji od 60 do 160 nm, nejméně výhodněji od 90 do 130 nm.

3. Nanočástice podle nároku 1 nebo 2, **vyznačená tím, že** hydrofilním polymerem je polyethylenoxid o molekulové hmotnosti 2 až 5 kDa.

4. Nanočástice podle nároku 1 nebo 2, **vyznačená tím, že** hydrofilním polymerem je poly(2-ethyl-2-oxazolin) o molekulové hmotnosti 5 až 10 kDa.

5. Nanočástice podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačená tím, že** dále obsahuje fluorescenční značku, příčemž fluorescenční značka je k povrchu částice hydroxyapatitu kovalentně navázána přes 1-hydroxy-1,1-bisfosfonátovou skupinu a její celkové množství v nanočástici je do 1 % hmotn.

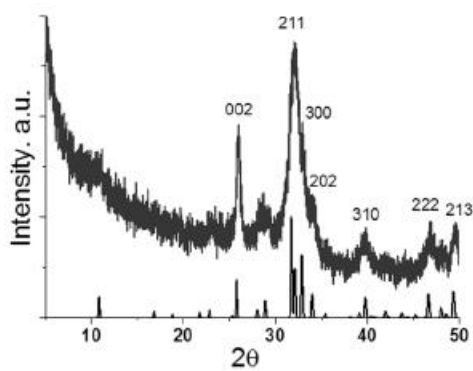
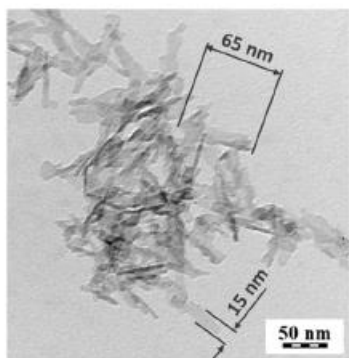
6. Nanočástice podle nároku 5, **vyznačená tím, že** fluorescenční značka je vybrána ze skupiny zahrnující fluorescein, eosin, rhodamin, dansyl, CF 350, CF 405S, CF 488A, CF 555, CF 568, CF 594, CF 633, CF 640R, CF 647, CF 660C, CF 660R, CF 680, Cy3, Cy5, Cy7, Dy615, NIR 4f, NIR 5e, NIR 6a, NIR 6e, NIR 7a, NIR 7b, NIR 8a, NIR 8b, NIR II, NIR 628, NIR 641, NIR 680, NIR 700, NIR 730, NIR 781, NIR 797, NIR 885, s výhodou je fluorescenční značkou fluorescein.

7. Nanočástice podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačená tím, že** dále obsahuje radioaktivní značku, příčemž radioaktivní značka je k povrchu částice hydroxyapatitu navázána chelatací a její celkové množství v nanočástici je do 10 GBq/mg.

8. Nanočástice podle nároku 7, **vyznačená tím, že** radioaktivní značkou je kostní radiofarmakum vybrané ze skupiny zahrnující ^{99m}Tc komplex 1-hydroxyethyliden-1,1-bisfosfonátu, ^{99m}Tc komplex methyliden-1,1-bisfosfonátu, ^{186}Re komplex 1-hydroxyethyliden-1,1-bisfosfonátu, $^{18}\text{F}^-$, $^{89}\text{SrCl}_2$, ^{153}Sm -ethylendiamintetramethylenfosfonovou kyselinu, $^{223}\text{RaCl}_2$,

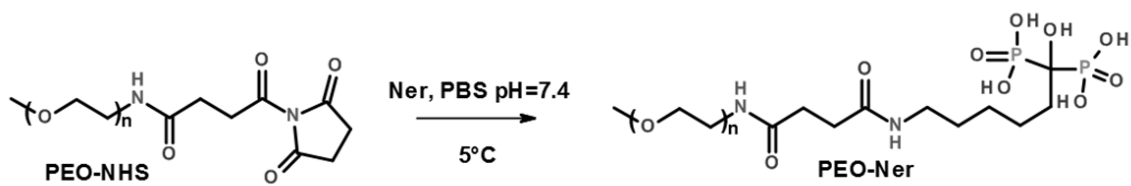
s výhodou je radioaktivní značkou ^{99m}Tc komplex 1-hydroxyethyliden-1,1-bisfosfonátu.

2 výkresy

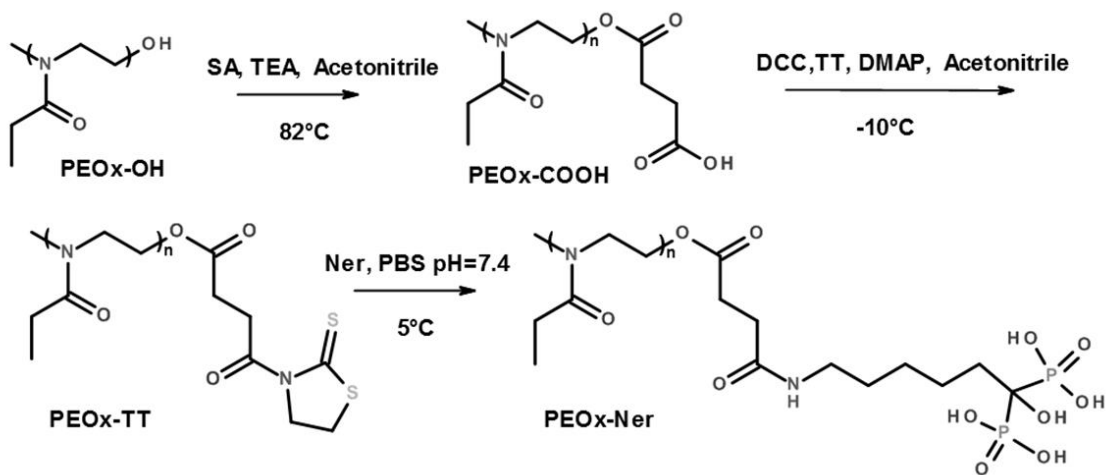


a)
Obr. 1

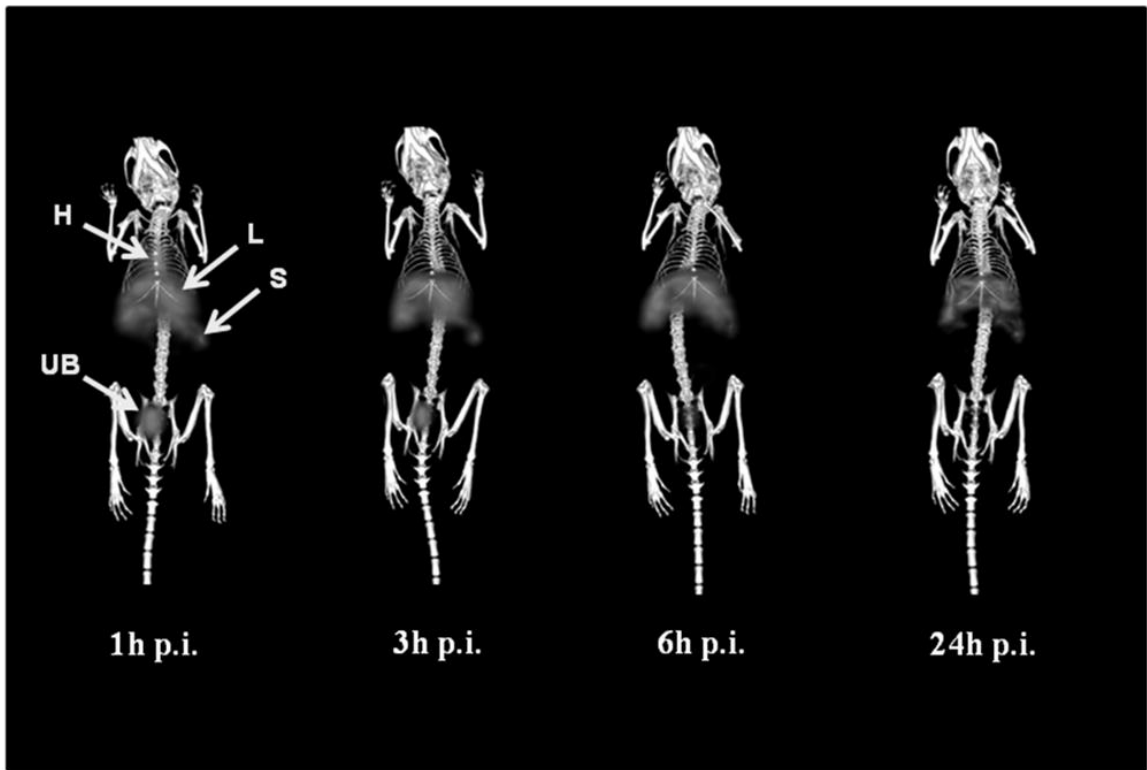
b)



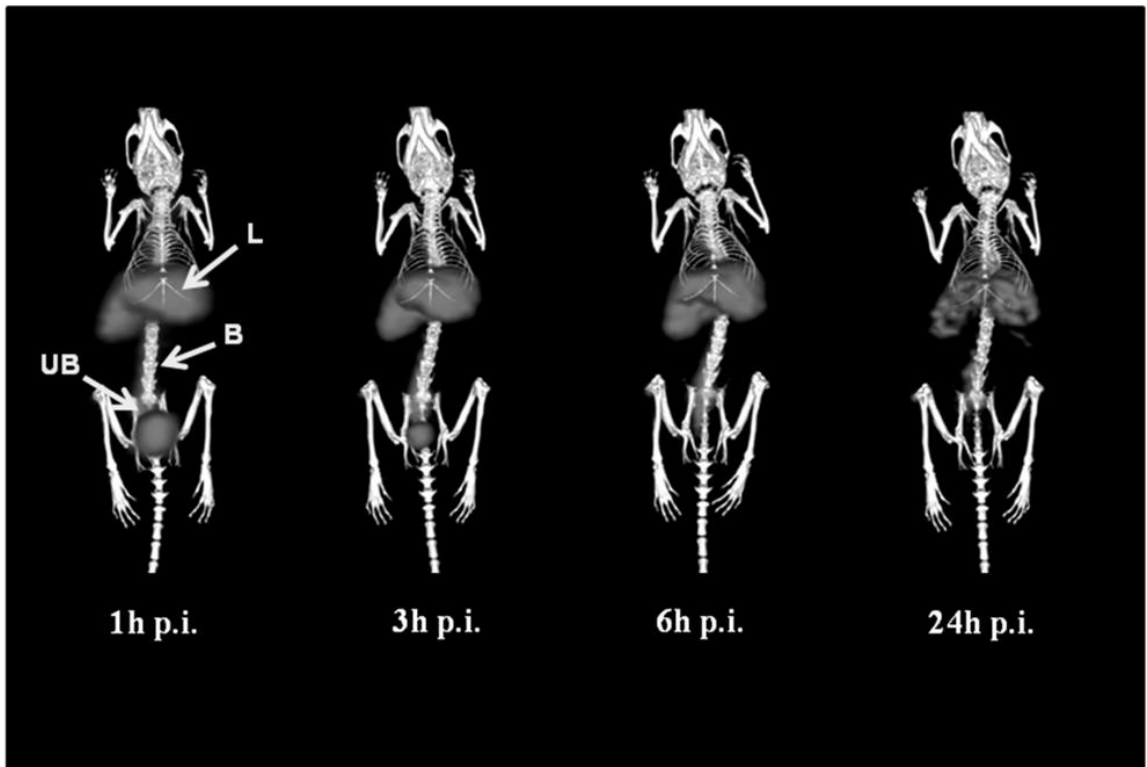
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5