

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2019-649
(22) Přihlášeno: 18.10.2019
(40) Zveřejněno: 28.04.2021
(Věstník č. 17/2021)
(47) Uděleno: 01.12.2021
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 12.01.2022
(Věstník č. 2/2022)

C08F 20/58 (2006.01)
C08F 20/60 (2006.01)
C08F 220/58 (2006.01)
C08F 220/60 (2006.01)
A61K 47/58 (2017.01)
A61K 31/337 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
M. Bittner: "Hvězdicovité polymerní nosiče léčiv pro cílenou dopravu a pH-řízené uvolňování léčiva" Přírodovědecká fakulta UK, Praha 2013; J. Blažková: „Dopravní systémy na bázi syntetických hydrofilních polymerů pro přenos a řízené uvolňování siRNA“ Přírodovědecká fakulta UK, Praha 2015.
CZ 2016-206 A3.

(73) Majitel patentu:
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.,
Praha 6, Břevnov, CZ
(72) Původce:
RNDr. Petr Chytil, Ph.D., Kladno, Kročehlavy, CZ
PharmDr. Eva Randárová, Ph.D., Středokluky, CZ
RNDr. Tomáš Etrych, Ph.D., DSc., Klíneček, CZ
(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
**Způsob přípravy polymerních nosičů pro
pH-řízené uvolňování léčiv a jejich
konjugátů s léčivy**

(57) Anotace:
Předkládané řešení se týká efektivního způsobu přípravy kopolymerů *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) a methakryloylaminoacylhydrazidu, vhodných pro navázání léčiv obsahujících keto skupinu pro pH-řízené uvolňování léčiva, přičemž tento způsob obsahuje kroky:
a) příprava monomerů statistického lineárního kopolymeru,
b) polymeraci monomerů statistického lineárního kopolymeru,
c) zavedení hydrazidových skupin za současné modifikace koncových skupin statistického lineárního kopolymeru, popřípadě zavedení biologicky aktivních látek na konce polymerních řetězců.
Předkládané řešení se dále týká způsobu přípravy konjugátů statistického lineárního kopolymeru na bázi HPMA kopolymerů a léčiva pomocí pH-senzitivní hydrolyzovatelné hydrazonové vazby.

Způsob přípravy polymerních nosičů pro pH-řízené uvolňování léčiv a jejich konjugátů s léčivy

5 Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy polymerních nosičů léčiv umožňujících cílený transport a řízené uvolňování aktivních látek v organismu, zejména v nádorové tkáni, zánětlivé tkáni, nádorových buňkách a buňkách imunitního systému. Použití těchto polymerních konjugátů je zaměřeno na cílenou terapii nádorových, zánětlivých a autoimunitních onemocnění v humánní medicíně.

Dosavadní stav techniky

15 V rámci vývoje nových léčivých přípravků se věnuje velká pozornost dopravním systémům léčiv, které umožňují zaručit správnou farmakokinetiku a vysokou účinnost léčiv s minimálními vedlejšími účinky. Hojně studovanými jsou systémy na bázi lipozomů, micel, polymerozomů, nanočástic a vodorozpusťných polymerních konjugátů léčiv. Při návrhu a syntéze těchto systémů se uplatňují ve velké míře přírodní nebo syntetické makromolekuly. Ve většině uvedených 20 dopravních systémů léčiv je nezbytné a klíčové pro dosažení kýženého účinku léčiva zajistit uvolnění nesené bioaktivní látky z jejího dopravního systému v daném místě organismu, např. nádoru, zánětlivé části, zatímco během dopravy do místa účinku je celý systém stálý, neuvolňuje aktivní látky a je tedy bez vedlejších účinků. Významnou vlastností uvedených dopravních 25 systémů je větší rozměr ve vodném prostředí, který může zajistit přednostní ukládání dopravního systému s léčivem v nádorové tkáni celé řady pevných nádorů (tzv. EPR efekt) a v zánětlivé tkáni (tzv. ELVIS efekt). Uvolnění aktivního léčiva z dopravního systému může být s výhodou řešeno prostřednictvím biodegradovatelné spojky, použité k vazbě léčiva na polymer, jejíž degradace v cílové tkáni vede k cílené a řízené aktivaci léčiva přednostně v této tkáni. Systémy využívající 30 k aktivaci biodegradovatelné spojky často využívají vodorozpusťných polymerních materiálů, přičemž významnou skupinu takovýchto systémů tvoří polymerní léčiva připravená na bázi kopolymerů *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA). Výrazně vyšší protinádorový účinek ve srovnání s běžně užívanými cytostatiky a podstatné snížení vedlejších, především toxických, účinků na zdravý organismus prokázaly polymerní nosiče na bázi HPMA kopolymerů nesoucí 35 léčivo, navázané na nosič pomocí hydrolyticky labilní hydrazonové vazby. Syntéza takovýchto konjugátů byla prováděna nejdříve pomocí klasické radikálové polymerace, která vedla k přípravě polymerních systémů s poměrně širokou distribucí molárních hmotností polymerů s indexem disperzity $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ okolo 2.

40 Později byla popsána metoda kontrolované radikálové polymerizace (RAFT, reversible addition-fragmentation chain transfer, tedy řízená radikálová polymerace s reverzibilně-fragmentačním přenosem řetězce) umožňující přípravu kopolymerů s významně nižší dispersitou okolo 1,2. (Moad G. et al., Polymer, 2008, 49(5)) Rovněž polymerní nosiče na bázi HPMA kopolymerů obsahující hydrazidové skupiny vhodné pro vazbu léčiv hydrazonovou vazbou byly připraveny 45 pomocí RAFT polymerace (Chytil P. et al., Eur. J. Pharm. Sci., 2010, 41, 73-82). Hydrazidové skupiny je ovšem třeba chránit během polymerace. Autoři publikace proto použili chránění pomocí *tert*-butoxykarbonylové (Boc) skupiny. V následném kroku byly odstraněny dithiobenzoátové skupiny na konci polymerního nosiče redukcí borohydridem sodným a vzniklé -SH skupiny zablokovány reakcí s *N*-ethylmaleinimidem. Teprve poté byly Boc skupiny 50 odstraněny pomocí trifluoroctové kyseliny (TFA). Nevýhodou této syntézy nosiče je potřeba několika následných kroků po polymeraci. Především krok odchránění hydrazidových skupin je krokem obtížně reprodukovatelným a neumožňuje jednoduchou přípravu větších šarží polymeru potřebnou pro průmyslové využití. Rovněž závěrečné čištění polymeru pomocí gelové filtrace znamená komplikace pro přípravu většího množství nosiče. Popsaný postup syntézy nosiče byl 55 použit i v dalších publikacích s tím, že základem je vždy kopolymerace HPMA s monomerem

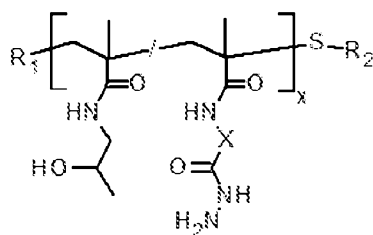
nesoucím Boc chráněné hydrazidové skupiny (např. Šubr V. et al. Biomacromolecules 2014, 15 (8), 3030-3043), Chytil P. et al. Macromol. Biosci. 2015, 15 (6), 839-850, Lomkova E. et al. Biomacromolecules 2016, 17 (11), 3493-3507). Blokace koncových skupin a následné odchránění hydrazidových skupin se mírně lišila. Místo redukce borohydridem bylo použito nadbytku iniciátoru. Nedávno byla publikována práce, ve které je použito k odstranění Boc skupin místo TFA inkubací polymeru rozpuštěného v destilované vodě při 100 °C (Kozíolová E. et al. Biomacromolecules 2018, 19 (10), 4003-4013).

Předkládaný vynález si klade za cíl poskytnout takový postup přípravy nosičů léčiv umožňujících vazbu léčiv pomocí pH labilní hydrolyzovatelné hydrazonové vazby, který by poskytoval vysoké výtěžky, byl dobře reprodukovatelný, dovozoval přesně řídit molární hmotnosti polymerních prekurzorů s nízkou dispersitou a přesně definovanou strukturou. Postup by také měl být snadno převoditelný do průmyslového měřítka.

Podstata vynálezu

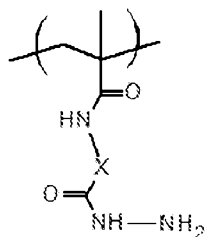
Předmětem předkládaného vynálezu je postup přípravy polymerních nosičů na bázi HPMA kopolymerů, vhodných pro vazbu léčiv pomocí pH-senzitivní hydrolyzovatelné hydrazonové vazby. Postup přípravy polymerního nosiče umožňuje navíc zavést biologicky aktivní látky na konce polymerních řetězců.

Polymerní nosič je tvořen statistickým lineárním kopolymerem obecného vzorce V,



(V),

sestavajícím z alespoň 75 % mol. monomerních jednotek HPMA (75 až 99,5 % mol. HPMA) a od 0,5 do 25 % mol., vztaheno na celkový počet monomerních jednotek, strukturálních jednotek vzorce I:



(I),

kde X je vybrán ze skupiny tvořené alkylenem majícím 1 až 8 atomů uhlíku; fenylenem; $-(CH_2)_q-$ $(C(O)-NH-(CH_2)_r)-$, kde $p = 1$ až 5, a q a r jsou vzájemně nezávisle vybrány z 1, 2 a 3; přičemž X může být popřípadě substituován jedním nebo více postranními řetězci přirozené aminokyseliny, přičemž postranní řetězce mohou být stejné nebo různé; X je s výhodou vybrán ze skupiny zahrnující $-CH_2-CH_2-$ a $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$;

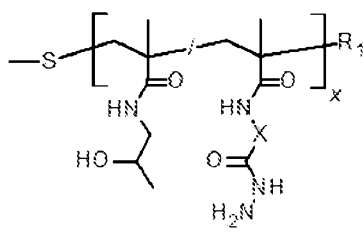
x je celé číslo v rozmezí od 25 do 700;

R₁ je radikálová odstupující skupina použitého přenosového činidla, s výhodou je R₁ vybrán ze skupiny zahrnující 2-kyano-2-propyl a 5-karboxy-2-kyano-2-pentyl;

5

a R₂ je thioetherový derivát daný strukturou použité sloučeniny s dvojnou vazbou (C=C) po adici koncových SH skupin polymerního řetězce nebo vzájemnou reakce koncových SH skupin statistického lineárního kopolymeru za vzniku diblokového polymeru spojeného disulfidovou vazbou; s výhodou je R₂ vybrán ze skupiny zahrnující 2-(ethenylsulfonyl)ethyl, 1-ethyl-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl, 1-(2-hydroxyethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl, 1-(2-propynyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl, 1-(3-karboxy-1-propyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl, 1-(2-aminoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl, 1-(3-aminopropyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl; a

10



15

přičemž molární hmotnost statistického lineárního kopolymeru je v rozmezí od 4000 do 100 000 g/mol, s výhodou 20 000 až 40 000 g/mol.

20

Přirozenými aminokyselinami jsou zde míněny přirozeně se vyskytující kyseliny: histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan, valin, arginin, cystein, glutamin, glycin, prolin, tyrosin, alanin, asparagová kyselina, asparagin, glutamová kyselina, serin, selenocystein. Postranními řetězci jsou řetězce navázané na alfa-uhlíku aminokyseliny, tedy zejména methyl, isopropyl, isobutyl, -CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH₂OH, -CH(OH)(CH₃), -CH₂-(C₆H₄)OH, -(CH₂)₂-S-CH₃, -CH₂SH, -(CH₂)₄-NH₂, -CH₂COOH, -CH₂C(O)NH₂, -(CH₂)₂COOH, -CH₂C(O)NH₂, -(CH₂)₃NH-C(=NH)(NH₂), benzyl.

25

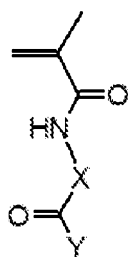
Semitelehelický lineární kopolymer je statistický kopolymer vzniklý radikálovou polymerizací. Koncové skupiny výsledného lineárního kopolymeru tudíž obsahují části molekul iniciátoru polymerizace (například azoiniciátory 2,2'-azobis(2-methylpropionitril) (AIBN), 4,4'-azobis(4-kyanopentanová kyselina) (ACVA), 2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylpentannitril) (V70)), a přenosového činidla (s výhodou vybraného ze skupiny 2-kyano-2-propyl benzodithioát, 4-kyano-4-(thiobenzoylthio)pentanová kyselina, 2-kyano-2-propyl dodecyl trithiokarbonát, 2-kyano-2-propylethyltrithiokarbonát a 4-kyano-4-[(dodecylsulfanylthiokarbonyl)sulfanyl]pentanová kyselina). Koncové skupiny kopolymeru tedy obsahují na jednom konci radikálovou odstupující skupinu přenosového činidla, s výhodou 2-kyano-2-propyl, nebo 5-karboxy-2-kyano-2-pentyl. Na druhém konci je umístěna dithiobenzoátová nebo trithiokarbonátová skupina, která je *in situ* redukována na thiolovou skupinu, která se následně aduje na sloučeninu s dvojnou vazbou (C=C), s výhodou vybranou ze skupiny zahrnující *N*-substituovaný maleinimid, nebo *S*-substituovaný vinylsulfon, výhodněji je sloučenina s dvojnou vazbou (C=C) vybraná ze skupiny zahrnující divinylsulfon, karboxy-PEG vinylsulfon, *N*-ethylmaleinimid, *N*-(2-hydroxyethyl)maleinimid, *N*-propargylmaleinimid, 3-maleinimido propionovou kyselinu, azido-PEG-maleinimid a *N*-(5-fluoresceinyl)-maleinimid, nebo se koncové thiolové skupiny převedou na aminové pomocí *N*-aminoethylmaleinimid trifluoroacetátu, nebo *N*-(3-aminopropyl)maleinimid trifluoroacetátu, přičemž reakce probíhá v inertní atmosféře (například Ar nebo N₂) za teploty místnosti a v rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující methanol, ethanol, dimethylsulfoxid, dimethylacetamid a dimethylformamid.

45

Postup přípravy polymerních nosičů podle předkládaného vynálezu obsahuje následující kroky:

- a) poskytnutí monomerů polymerního nosiče,
 b) polymeraci monomerů polymerního nosiče,
 5 c) zavedení hydrazidových skupin za současné modifikace koncových skupin polymerního nosiče,
 d) volitelně vazba biologicky aktivní látky na koncovou skupinu polymerního řetězce.

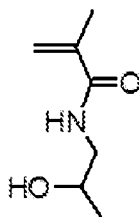
10 Krok a) poskytnutí monomerů polymerního nosiče zahrnuje poskytnutí *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) a přípravu monomeru obecného vzorce II



15 (II),

kde X je definováno výše a Y je hydroxyl, (C1-C6)alkoxy, benzoxy, 4-nitrofenoxy, 2,3,4,5,6-pentafluorfenoxi skupina, sukcinimidová skupina, (C1-C6)alkylthio skupina nebo thiazolidin-2-thionová skupina; s výhodou je Y vybrán ze skupiny methoxy, ethoxy, *ter*.-butoxy nebo *terc*-butylthio nebo thiazolidin-2-thionová skupina.

HPMA je komerčně dostupný a jeho syntéza je publikována (např. Chytil P. et al., Eur. J. Pharm. Sci., 2010, 41, 73-81).

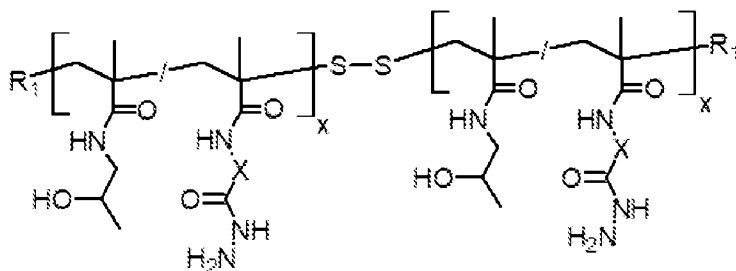


25 HPMA

Syntéza monomerů obecného vzorce II spočívá v reakci esteru, thioesteru, či imidu aminokyselin a sloučenin vzorce $Y-C(O)-X-NH_2$, kde X a Y jsou definované výše, s methakryloylchloridem (tuto reakci lze také nazvat methakroylace) dle Schotten-Baumanovy metody, s výhodou prováděnou v diethyletheru, nebo dichlormethanu v přítomnosti bezvodého uhličitanu sodného, nebo ve vodě v přítomnosti alkalického hydroxidu. Vstupní sloučeniny vzorce $Y-C(O)-X-NH_2$ jsou komerčně dostupné. Volitelně může být zahrnut i krok methakroylace komerčně dostupné sloučeniny vzorce $HO-C(O)-X-NH_2$ následovaný krokem esterifikace, thioesterifikace, či imidace karboxylové skupiny, s výhodou pomocí karbodiimidové metody s použitím dicyklohexylkarbodiimidu, diisopropylkarbodiimidu, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu, nebo jiných činidel s použitím benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinofosfonium hexafluorofosfátu nebo (2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfátu.

a R_2 je daná strukturou použité sloučeniny s dvojnou vazbou ($C=C$) po adici koncových SH skupin polymerního řetězce, s výhodou je R_2 vybrané ze skupiny zahrnující 2-(ethenylsulfonyl)ethyl, 1-ethyl-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl, 1-(2-hydroxyethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl, 1-(2-propynyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl, 1-(3-karboxy-1-propyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl, 1-(2-aminoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl, nebo 1-(3-aminopropyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl skupina.

Variantní součástí přípravy je hydrazinolýza provedená bez blokace koncových SH skupin adicí na dvojnou vazbu, umožňující jejich reakci za tvorby diblokových polymerů spojených disulfidovou vazbou. Strukturu takového nosiče lze vyjádřit obecným vzorcem IV,



(IV),

přičemž X , x i R_1 jsou stejné, jako je definováno výše.

Struktury obecného vzorce III a obecného vzorce IV spadají do definice statistického lineárního kopolymerního obecného vzorce V.

V jednom provedení může volitelně po kroku c) následovat krok d), ve kterém lze na skupinu R_2 obecného vzorce III navázat biologicky aktivní látku (tedy na sloučeninu s dvojnou ($C=C$) vazbou, zavedenou do polymerní struktury reakcí koncových thiolových skupin polymeru s bifunkčním činidlem obsahujícím dvojnou vazbu a další funkční skupinu – primární aminoskupinu (bifunkčním činidlem je *N*-aminoethylmaleinimid trifluoracetát, nebo *N*-(3-aminopropyl)maleinimidtrifluoracetát). Biologicky aktivní látka je například fluorescenční značka, obsahující esterovou skupinu. Vznikne tak polymerní konjugát této biologicky aktivní látky a lineárního polymeru, který lze dále využít k fluorescenčnímu značení. Příkladem takového adice biologicky aktivní látky je reakce koncové aminové skupiny například s esterovými skupinami dalších biologicky aktivních látek, což umožňuje velkou variabilitu a univerzální využití polymeru.

Příkladem vhodné fluorescenční značky je Cyanine 5.5 NHS ester (2-[5-(1,3-dihydro-1,1,3-trimethyl-2H-benz[e]indol-2-yliden)-1,3-pentadien-1-yl]-3-[6-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxy]-6-oxohexyl]-1,1-dimethyl-1H-benz[e]indolium).

Předmětem předkládaného vynálezu je dále postup přípravy konjugátu polymerního nosiče na bázi HPMA kopolymerního a léčiva pomocí pH-senzitivní hydrolyzovatelné hydrazonové vazby. Tento postup spočívá v přípravě polymerního nosiče dle kroků a) až c) uvedených výše, po kterých následuje krok d) vazby léčiva k polymernímu nosiči pomocí hydrazonové vazby za vzniku konjugátu.

Postup přípravy zahrnuje reakci polymerního nosiče z kroku c) s léčivem, nebo jeho derivátem obsahujícím keto skupinu, za katalýzy definovaného množství kyseliny octové vedoucí k tvorbě hydrazonové vazby ($-C(=O)-$ skupina léčiva reaguje s $-NH-NH_2$ skupinou postranního řetězce polymerního nosiče za vzniku hydrazonové vazby mezi léčivem a postranním řetězcem

polymerního nosiče). S výhodou je léčivo vybrané ze skupiny, zahrnující doxorubicin, dexamethason, pirarubicin, epirubicin, ritonavir, docetaxel, paklitaxel, larotaxel, popřípadě jejich oxo-deriváty. Reakce může být prováděna v methanolu, dimethylsulfoxidu, dimethylformamidu, sušeném ethanolu a dimethylacetamidu. Syntéza polymerních konjugátů s léčivem vychází z již dříve popsaného způsobu vazby doxorubicinu (Etrych, T., et al., J. Control. Release, 2001. 73(1): p. 89-102), pirarubicinu (Nakamura, H., et al., J. Control. Release, 2014. 174: p. 81-87.) a ketoderivátů taxolů (Etrych, T., et al., Mol. Pharm., 2010. 7(4): p. 1015-1026.), dexamethasonu (Krakovičová, H., T. Etrych, and K. Ulbrich, Eur. J. Pharm. Sci., 2009. 37(3-4): p. 405-412), mitomycinu C (Kostková, H., et al., Macromol. Biosci., 2013. 13(12): p. 1648-60), ketoderivátů ritonaviru (Koziolová, E., et al., J. Control. Release, 2016. 233: p. 136-146) a dalších léčiv obsahujících amino nebo hydroxylovou skupinu.

Ve výhodném provedení je vstupní koncentrace polymerního nosiče pro reakci s keto skupinami léčiva v rozmezí od 100 do 190 mg/ml, koncentrace ledové kyseliny octové je v rozmezí od 30 do 80 mg/ml a koncentrace léčiva je od 1 do 50 mg/ml, výhodněji je vstupní koncentrace polymeru pro reakci s keto skupinami léčiva 170 mg/ml, koncentrace kyseliny octové je 55 mg/ml a koncentrace léčiva je 20 mg/ml při teplotě 25 °C.

Volitelným dalším krokem e) přípravy konjugátu je finální čištění konjugátu od volného nenavázaného léčiva pomocí gelové filtrace, například za použití kolony naplněné zesítovaným dextranem (například Sephadex LH-20) a methanolu jako mobilní fáze. Gelové filtrace pro čištění polymerů jsou odborníkovi v oboru známé a odborník v oboru by tudíž věděl, jakou stacionární fázi pro gelovou filtraci použít.

Předkládaný vynález tedy poskytuje reprodukovatelný způsob přípravy velice dobře definovaných polymerních nosičů léčiv na bázi kopolymerů HPMA, umožňujících vázat léčiva pH labilní hydrazonovou vazbou k nosiči. Nový způsob přípravy polymerních nosičů pomocí řízené polymerace umožňuje zvýšit výtěžky při polymeraci a díky výhodným kopolymeračním parametrům blízkým jedné dobře řídit obsah komonomerní jednotky (dle vzorce I) v nosiči; syntéza je výrazně jednodušší a levnější, umožňuje „scale-up“ na velké šarže a reprodukovatelnost syntézy je velmi dobrá. Biologická aktivita konjugátů připravených polymerních nosičů s léčivem je stejná jako u konjugátů dříve připravených nosičů.

35 Objasnění výkresů

Obrázek 1. Časová závislost množství uvolněného DEX z konjugátu poly(HPMA-co-AH-NH-N=DEX) inkubovaného v pufrch o pH 5 a 7,4 při 37 °C: DEX, pH 5 (šedá); DEX, pH 7,4 (černá).

40 Příklady uskutečnění vynálezu

Charakterizace polymerních prekurzorů a konjugátů

Připravené kopolymery byly charakterizovány stanovením váhového i početního průměru molárních hmotností (M_w , M_n) a příslušného indexu disperzity ($\mathcal{D}$) pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) na systému vybaveném PDA detektorem (Shimadzu, Japan), RI detektorem (Optilab REX, Wyatt Technology Corp., USA) a víceúhlovým detektorem rozptylu světla (DAWN Heleos-II, Wyatt Technology Corp., USA). Pro charakterizaci byla v případě SEC použita kolona TSK 3000 Super SW a jako mobilní fáze směs methanolu (80 %) a 0,3 M octanového pufru o pH 6,5 (20 %). Koncentrace vzorků byla ve všech případech 3 mg/ml.

Obsah hydrazidových skupin byl stanoven pomocí TNBSA zkoušky. Obsah methylesterových skupin a dalších esterů byl stanoven pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) na

spektrometru Bruker Avance III 600 MHz spectrometer v $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Obsah navázaných léčiv byl buď stanoven spektrofotometricky, nebo pomocí HPLC po celkové hydrolýze, tj. uvolnění z polymerního nosiče.

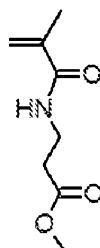
5 Příklad 1: Syntéza monomerů

N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA)

HPMA byl připraven podle dříve popsaného postupu (Chytil P. et al., Eur. J. Pharm. Sci., 2010, 41, 73-82). Produkt byl chromatograficky čistý. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 296 K): δ 1,00-1,02 (d, 3H, CHOH-CH_3), 1,85 (s, 3H, CH_3), 3,00-3,12 (m, 2H, CH_2), 3,64-3,73 (m, 1H, CH), 4,68-4,70 (d, 1H, OH), 5,30 a 5,66 (d, 2H, $\text{CH}_2=$), 7,59 (br, 1H, NH).

Methylester kyseliny *N*-methakryloyl-3-aminopropionové (MA-AP-OMe)

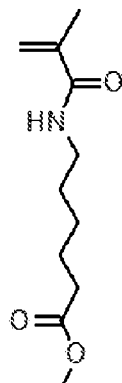
15



Methyl(3-aminopropionát)hydrochlorid (30 g, 0,215 mol) byl za intenzivního míchání při teplotě místnosti rozpuštěn ve 350 ml dichlormethanu. Roztok byl ochlazen na 10 až 15 °C, přidán bezvodý uhličitan sodný (67 g, 0,645 mol), teplota snížena na 5 až 10 °C a poté přikapán roztok methakroylechloridu (22,5 g, 0,215 mol (ekv.)) ve 100 ml dichlormethanu takovou rychlostí, aby teplota reakční směsi nepřesáhla 15 °C. Po spotřebování veškerého methakroylechloridu byla směs míchána ještě 45 min při teplotě 15 až 20 °C, poté byla chladicí lázeň odstavena, suspenze míchána ještě 20 min, odsáta na fritě č. 3, promyta 300 ml dichlormethanu a filtrát odpařen na rotační vakuové odparce do sucha. Výtěžek činil 29,5 g produktu (84 %). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 295 K): 1,83 (s, 3H, CH_3), 3,30-3,43 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-}\alpha$, $\text{CH}_2\text{-}\beta$), 5,33 (s, 3H, OCH_3), 5,60 a 5,96 (d, 2H, $\text{CH}_2=$), 7,97 (br, 1H, NH). Produkt byl chromatograficky čistý.

Methyl ester kyseliny *N*-methakryloyl-6-aminohexanové (MA-AH-OMe)

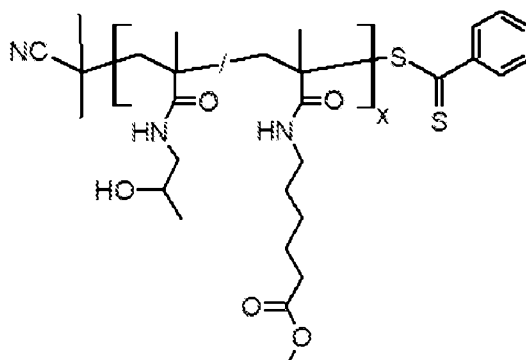
30



MA-AH-OMe byl připraven podle výše popsaného postupu za použití methyl(3-aminohexanoát)hydrochloridu. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 295 K): δ 1,20-1,27 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\gamma$), 1,40-1,54 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-}\beta$, $\text{CH}_2\text{-}\delta$), 1,82 (s, 3H, CH_3), 2,28 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\alpha$), 3,04-3,34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\epsilon$), 3,57 (s, 3H, OCH_3), 5,28 a 5,60 (d, 2H, $\text{CH}_2=$), 7,88 (br, 1H, NH). Produkt byl chromatograficky čistý.

35

Příklad 2a: Syntéza polymerního prekurzoru – kopolymeru HPMA s MA-AH-OMe (poly(HPMA-*co*-MA-AH-OMe))



5

Kopolymer poly(HPMA-*co*-MA-AH-OMe) byl připraven řízenou radikálovou RAFT kopolymerizací HPMA a MA-AH-OMe (připravených dle Příkladu 1) iniciovanou AIBN v přítomnosti RAFT přenosového činidla 2-kyano-2-propyl benzodithioátu ve směsi *tert*-butylalkoholu a dimethyl sulfoxidu při 70 °C.

10

HPMA (4,0 g, 27,9 mmol) a MA-AH-OMe (0,377 g, 1,8 mmol) bylo rozpuštěno v 35,7 ml *tert*-butylalkoholu, k roztoku bylo přidáno 2-kyano-2-propyl benzodithioátu (18,8 mg, 84,9 μmol) a AIBN (7,0 mg, 42,5 μmol) rozpuštěných v 4,0 ml dimethylsulfoxidu. Polymerizační směs byla vložena v argonové atmosféře do polymerizační ampule (objem 50 ml), probublána argonem po dobu 10 min a zatavena. Polymerizační ampule byla umístěna do termostatu s 70 °C.

15

Polymerizační směs byla po 16 h vyjmuta z termostatu, ochlazená v lázni na pokojovou teplotu a polymer byl izolován vysrážením do ethylacetátu (celkem 800 ml). Vysrážený polymer byl ponechán sedimentovat cca 0,5 h, roztok nad sraženinou byl odsát a polymer byl izolován filtrací na fritě S4. Sraženina byla promyta ethylacetátem, přemístěna na velké Petriho misky a sušena při teplotě místnosti za vakua membránové vývěvy cca 1 h.

20

Polymer byl za pomoci ultrazvuku rozpuštěn v 40 ml methanolu (Erlenmayerova baňka o objemu 100 ml) a přesrážen do 800 ml ethylacetátu stejným postupem jako při první izolaci. Vysrážený polymer byl po cca 0,5 h sedimentací izolován filtrací na fritě S4, promyt ethylacetátem a sušen do konstantní hmotnosti (cca 5 h) na membránové vývěvě a dosušen za vakua olejové vývěvy.

25

Charakterizace kopolymeru: Výtěžek 3,07 g (70 %), obsah methylesterových skupin 5,3 % mol., molární hmotnost $M_w = 38800$ g/mol, index disperzity $D = 1,19$.

30

Analogicky byly připraveny další kopolymery poly(HPMA-*co*-MA-AH-OMe) lišící se molárním poměrem monomerních jednotek a RAFT přenosového činidla v polymerizační směsi (viz tabulka 1).

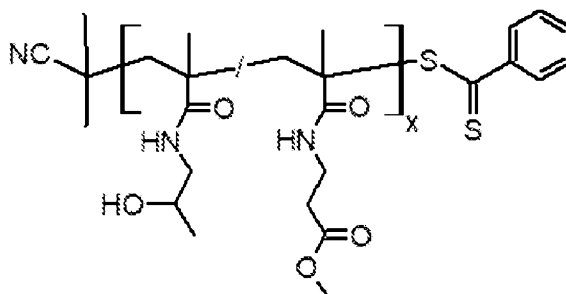
35

Tabulka 1. Charakterizace poly(HPMA-*co*-MA-AH-OMe)

Vzorek č.	[M]:[CTA]:[I]*	Doba polymerace (h)	Koncentrace monomerů (mol/L)	Výtěžek polymerace (%)	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	$\bar{D}$	Obsah OMe (% mol)	
								teor.	exp.
1	400:2:1	6	1	72	23700	22100	1,07	10	9,1
2	600:2:1	16	1	71	41600	34400	1,21	10	9,1
3	650:2:1	16	1	72	44900	37600	1,20	10	9,1
4	700:2:1	16	1	74	49500	38600	1,28	10	9,0
5	600:2:1	16	1	71	40400	35100	1,15	12	10,4
6	700:2:1	16	0,75	70	37900	32200	1,17	6	5,2
7	700:2:1	16	0,75	70	38800	32300	1,20	6	5,1

^{a)} [M]:[CTA]:[I] je molární poměr mezi monomery, přenosovým činidlem a iniciátorem v polymerační směsi

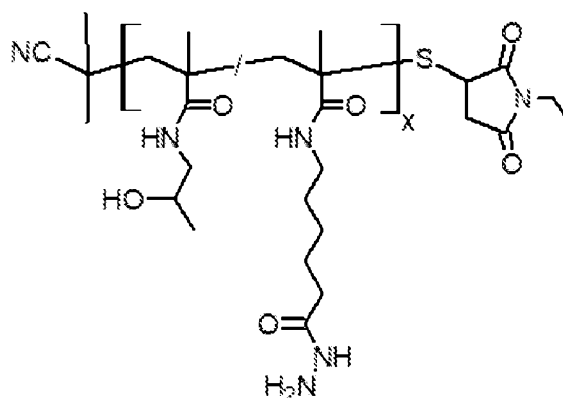
- 5 Analogicky byly připraveny kopolymery za použití jiných RAFT činidel: S-2-kyano-2-propyl-S'-ethyltrithiokarbonát, 4-kyano-4-(thiobenzoylthio)pentanová kyselina, 2-kyano-2-propyl dodecyltrithiokarbonát, 2-kyano-2-propylethyl trithiokarbonát a 4-kyano-4-[(dodecylsulfanylthiokarbonyl)sulfanyl]pentanová kyselina.
- 10 Příklad 2b: Syntéza polymerního prekursoru – kopolymeru HPMA s MA-AP-OMe (poly(HPMA-*co*-MA-AP-OMe))



- 15 Provedení a postup polymerizace poly(HPMA-*co*-MA-AP-OMe) byly stejné jako v příkladu 2a, rozdíl byl ve složení polymerizační směsi. Složení polymerizační směsi bylo následující: HPMA (4,0 g, 27,9 mmol) a MA-AP-OMe (0,308 g, 1,8 mmol) rozpuštěných v 35,7 ml *tert*-butylalkoholu, 2-kyano-2-propyl benzodithioát (18,8 mg, 84,9 μ mol) a AIBN (7,0 mg, 42,5 μ mol) rozpuštěných v 4,0 ml dimethyl sulfoxidu. Teplota polymerizace byla 70 °C, doba
- 20 polymerizace byla 16 h. Polymerní roztok byl srážen do ethylacetátu a srážení polymerního produktu bylo prováděno do 20tinásobného objemu srážedla. Polymer byl zbaven nízkomolekulárních příměsí přesrážením z methanolu do ethylacetátu. Výtěžek byl 3,1 g (72 %), obsah methylesterových skupin 5,1 % mol., molární hmotnost M_w = 37 700 g/mol, index disperzity $\bar{D}$ = 1,17.

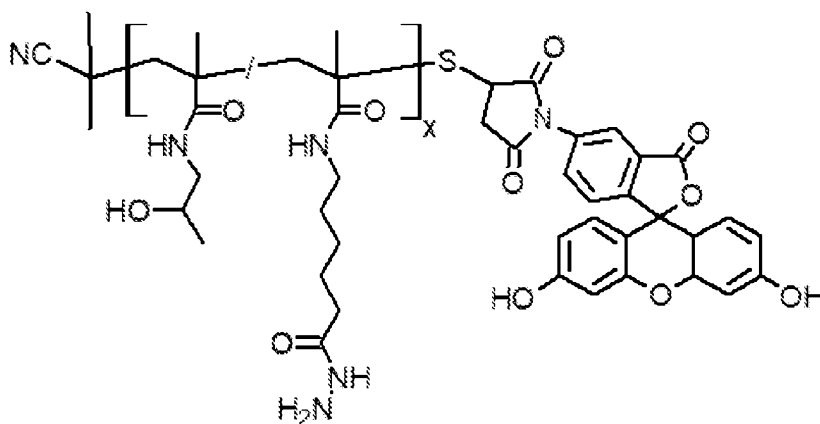
25

Příklad 3a: Syntéza polymerního prekursoru poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) hydrazinolýzou poly(HPMA-*co*-MA-AH-MeO) a současným zablokováním koncové thiolové skupiny polymerního nosiče



- Kopolymer s hydrazidovými skupinami poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) byl připraven hydrazinolýzou kopolymeru s methylesterovými skupinami poly(HPMA-*co*-MA-AH-OMe), připraveného v příkladu 2a, za současného odstranění síru obsahujících koncových skupin pocházejících z přenosového činidla na koncích polymerních řetězců a zablokování vzniklých koncových thiolových skupin pomocí *N*-ethylmaleinimidu.
- Roztok poly(HPMA-*co*-MA-AH-MeO) (500 mg, 0,20 mmol methylesterových skupin) a dithiothreitolu (70 mg, 0,45 mmol) v 3,75 ml sušeného destilovaného methanolu byl probublán argonem po dobu 5 min a následně držen pod argonovou atmosférou. K reakční směsi bylo přidáno 3,75 ml hydrazinhydrátu (77 mmol). Reakce probíhala po dobu 5 min a následně byl hydrazin hydrát společně s rozpouštědlem odstraněn na rotační odparce za vakua olejové vývěvy (1 mbar, 1,5 h). K odparku byl přidán roztok *N*-ethylmaleinimidu (168 mg, 1,35 mmol) v 10 ml methanolu a reakce probíhala po dobu 20 min. Produkt byl izolován vysrážením do ethylacetátu (celkem 200 ml) a následně filtrován a sušen dle výše popsaného postupu. Polymer byl zbaven nízkomolekulárních příměsí přesrážením z methanolu do ethylacetátu. Výtěžek byl 470 mg (94 %), obsah hydrazidových skupin 5,1 % mol., molární hmotnost $M_w = 41\,900$ g/mol, index disperzity $D = 1,19$.

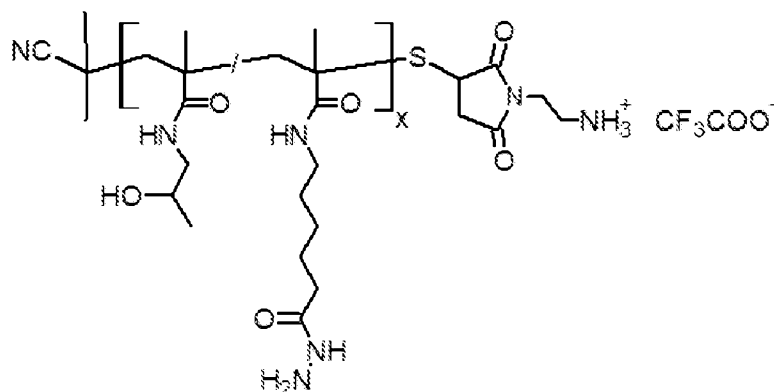
Příklad 3b: Syntéza polymerního prekursoru poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) hydrazinolýzou poly(HPMA-*co*-MA-AH-MeO) a současným zablokováním koncové thiolové skupiny polymerního nosiče a zavedením fluoresceinu na konec polymerního řetězce



- Analogicky k příkladu 3a, byl připraven kopolymer s hydrazidovými skupinami hydrazinolýzou kopolymeru s methylesterovými skupinami poly(HPMA-*co*-MA-AH-OMe) za současného odstranění síru obsahujících koncových skupin pocházejících z přenosového činidla na koncích

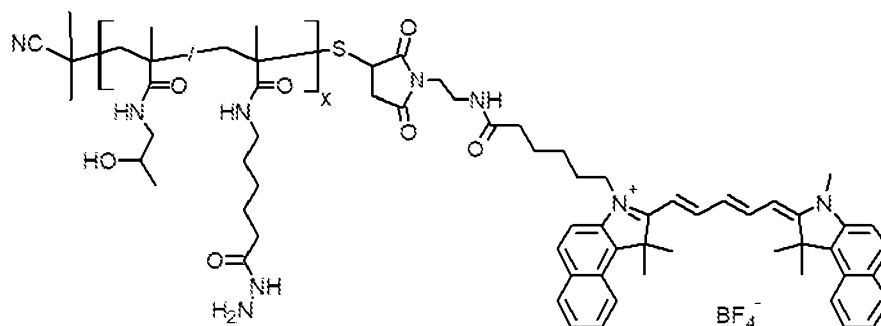
polymerních řetězců a zablokování vzniklých koncových thiolových skupin pomocí *N*-(5-fluoresceinyl)-maleinimidu. Obsah hydrazidových skupin 5,2 % mol., obsah aminoskupin 0,5 % mol., molární hmotnost $M_w = 42\,800$ g/mol, index disperzity $D = 1,20$.

- 5 Příklad 3c: Syntéza polymerního prekurzoru poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) hydrazinolýzou poly(HPMA-*co*-MA-AH-MeO) a současným zablokováním koncové thiolové skupiny polymerního nosiče a zavedením aminoskupiny na konec polymerního řetězce



- 10 Analogicky k příkladu 3a, byl připraven kopolymer s hydrazidovými skupinami hydrazinolýzou kopolymeru s methylesterovými skupinami poly(HPMA-*co*-MA-AH-OMe) za současného odstranění síru obsahujících koncových skupin pocházejících z přenosového činidla na koncích polymerních řetězců a zablokování vzniklých koncových thiolových skupin pomocí *N*-aminoethylmaleinimidtrifluoracetátu. Obsah hydrazidových skupin 5,1 % mol., obsah aminoskupin 0,4 % mol., molární hmotnost $M_w = 38\,500$ g/mol, index disperzity $D = 1,16$.

Příklad 4: Syntéza polymerního konjugátu poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) s fluorescenční značkou Cyanine 5.5 na konci polymerního řetězce



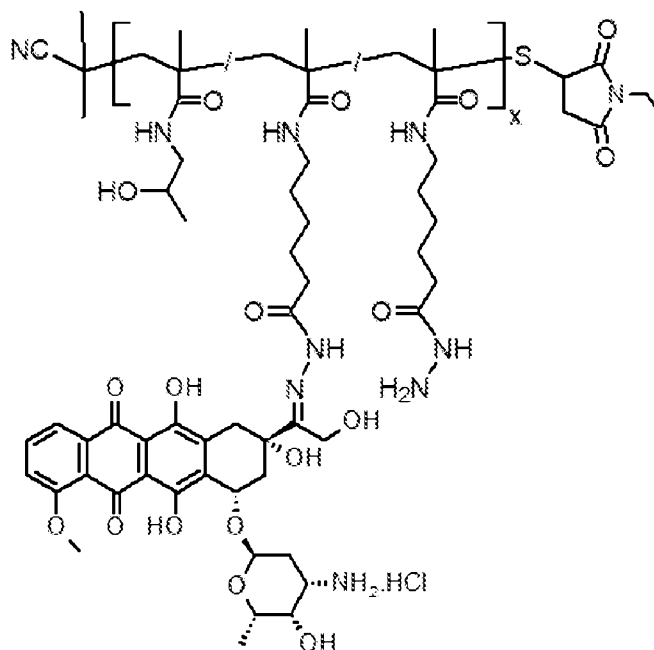
Polymer poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) s koncovými aminoskupinami připravený dle příkladu 3c byl použit k navázání fluorescenční značky Cyanine 5.5 NHS esteru.

- 25 Roztok 100 mg kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) v 0,5 ml dimethylacetamidu (finální koncentrace 100 mg polymeru/ml) byl smíchán s roztokem 1 mg Cyanine 5.5 NHS esteru v 0,5 ml dimethylacetamidu s přídavkem dimethylisopropylaminu (ekvimolárně k Cyanine 5.5 NHS esteru). Po 2 h reakce byl polymerní produkt izolován pomocí gelové filtrace v methanolu.
- 30 Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku na vakuové odparce a produkt byl rozpuštěn ve vodě a lyofilizován. Obsah celkového Cyanine 5.5 byl stanoven spektrofotometricky.

Charakterizace polymerního konjugátu s Cyanine 5.5: Celkový výtěžek reakce vazby fluorescenční značky: 80 mg (80 %), obsah celkového Cyanine 5.5 0,3 % mol.

Příklad 5a: Příprava polymerního konjugátu poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX)

5



Kopolymery s doxorubicinem (DOX) navázaným k PHPMA nosiči hydrolyticky štěpitelnou hydrazonovou vazbou byly připraveny reakcí kopolymerů obsahujících hydrazidové skupiny poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) s doxorubicinhydrochloridem (DOX.HCl) v methanolu za katalýzy octovou kyselinou.

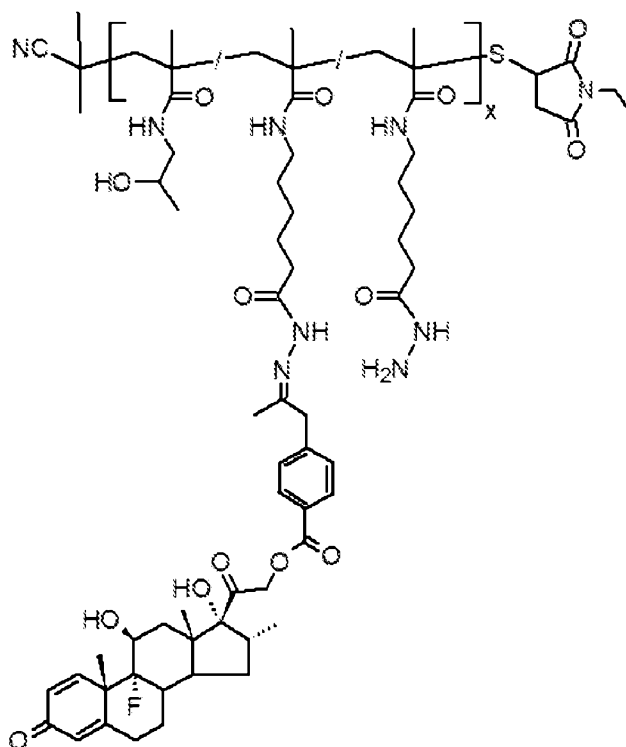
Roztok 1,53 g kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂), připraveného dle příkladu 3a, v 9,2 ml methanolu (167 mg polymeru/ml) byl vložen do termostátované cely, ve které bylo umístěno 0,19 g DOX.HCl (3,3 mmol). Nehomogenní suspenze byla míchána v temnu při 25 °C a po 1 minutě bylo přidáno 0,5 ml kyseliny octové. V průběhu reakce došlo k pozvolnému rozpuštění suspenze, po 22 h reakce byl z homogenního roztoku polymerní produkt izolován srážením do 100 ml ethylacetátu, precipitát polymerního léčiva byl izolován filtrací na fritě S4, promyt 50 ml ethylacetátu a sušen do konstantní hmotnosti.

20

Charakterizace polymerního konjugátu s léčivem: Celkový výtěžek reakce vazby léčiva: 17,2 g (96 %), obsah celkového DOX 11,3 % hmotn., obsah volného DOX méně jak 1,5 % z celkového obsahu DOX.

Příklad 5b: Příprava polymerního konjugátu poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DEX)

25



Kopolymery s dexamethasonem navázaným k PHPMA nosiči hydrolyticky štěpitelnou hydrazonovou vazbou byly připraveny reakcí kopolymerů obsahujících hydrazidové skupiny poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) s derivátem dexamethasonu, dexamethason oxo-propylbenzoátem (DEX), v methanolu za katalýzy octovou kyselinou.

Roztok 1 g kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) v 5 ml methanolu (finální koncentrace 167 mg polymeru/ml) byl smíchán s roztokem 60 mg DEX (0,1 mmol) v 1 ml methanolu. Po 5 h reakce byl polymerní produkt izolován srážením do 200 ml ethylacetátu, precipitát polymerního léčiva byl izolován filtrací na fritě S4, promyt 150 ml ethylacetátu a sušen do konstantní hmotnosti. Obsah celkového DEX byl stanoven pomocí HPLC dle postupu (Krakovičová, H., T. Etrych, and K. Ulbrich, HPMA-based polymer conjugates with drug combination. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. 37(3-4): p. 405-412).

Charakterizace polymerního konjugátu s léčivem: Celkový výtěžek reakce vazby léčiva: 980 mg (92 %), obsah celkového DEX 5,3 % hmotn., obsah volného DEX méně 1,3 % z celkového obsahu DEX.

Analogicky byly připraveny konjugáty poly(HPMA-*co*-MA-AH-NHNH₂) s dalšími léčivy nebo jejich deriváty: pirarubicin, epirubicin, oxo-deriváty ritonaviru, oxo-deriváty docetaxelu, paklitaxelu a larotaxelu.

Příklad 6: Uvolňování dexamethasonu z polymerního konjugátu poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DEX)

Uvolňování dexamethasonu z konjugátu poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DEX) bylo prováděno inkubací v 0,1 M fosfátovém pufru obsahujícím 0,15 M NaCl při 37 °C. pH pufru bylo nastaveno na podmínky v endosomech buněk, tj. mírně kyselé prostředí o pH 5,5. Alikvotní podíl inkubačního media byl odebíráán v příslušných časových intervalech a obsah DEX byl stanoven po extrakci do chloroformu a po odpaření rozpouštědla a převedení do methanolového roztoku pomocí HPLC (Shimadzu 20VP) na koloně Chromolith C18 s reverzní fází (Chromolith

Performance RP-18e; 100 × 4.6 mm) při průtoku eluentu 5 ml/min a s použitím gradientu od 0 do 100 % roztoku B v průběhu 7 min (roztok A: 5 % acetonitril, 94,9 % voda, 0,1 % trifluoroctové kyseliny (TFA); roztok B: 89,9 % acetonitril; 10 % voda; 0,1 % TFA). Pro detekci byl použit PDA detektor (Shimadzu, Japan) ($\lambda = 230$ nm). Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí DEX.

Výsledky měření uvolňování léčiva z konjugátu jsou uvedeny na obrázku 1.

Příklad 7. Ukázka cytostatické aktivity polymerního konjugátu poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX) *in vitro*

Na prokázání cytostatické aktivity polymerního konjugátu nesoucího doxorubicin poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX) z příkladu 5a byly použity buňky několika stabilních nádorových linií různého původu. Byly to myši nádorové linie (CT26 – linie karcinomu střeva, 4T1 – linie karcinomu mléčné žlázy, obě původem z inbredního kmene myši BALB/c, dále EL4.IL-2 – linie T-buněčného lymfomu původem z myšního inbredního kmene C57BL/6) a FaDu - lidská linie dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku. Buňky byly kultivovány v 96-ti jamkových kultivačních destičkách s různými koncentracemi poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX) po dobu 72 h. Proliferace buněk byla pak stanovena standardní metodou inkorporace ^3H -thymidinu, který byl přidán na posledních 6 h kultivace. Následně byly kultury zpracovány pomocí harvestoru Tomtec Mach III, a po usušení byla radioaktivita získaných vzorků změřena beta-scintilačním počítačem Microbeta Trilux (Wallac) s použitím pevného scintilátoru (Meltilex; Perkin Elmer). Výsledky testu jsou vyjádřeny jako hodnota IC_{50} , rovná koncentraci poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX), která je potřebná k indukci právě 50% inhibice růstu (proliferace) daných nádorových buněk (viz tabulka 2). Cytostatická aktivita poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX) z příkladu 5a byla porovnávána s aktivitou poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX), připraveného dle postupu uvedeného v literatuře (Chytil P. et al., Eur. J. Pharm. Sci., 2010, 41, 73-82), a s volným léčivem.

Tabulka 2: Cytostatická účinnost poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX) z příkladu 5a byla porovnávána s aktivitou poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX), připraveného dle postupu uvedeného v literatuře (Chytil P. et al., Eur. J. Pharm. Sci., 2010, 41, 73-82), a volného doxorubicinu u čtyř vybraných nádorových linií. Hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v ng doxorubicinu/ml a byly vypočteny jako průměr z několika nezávislých stanovení.

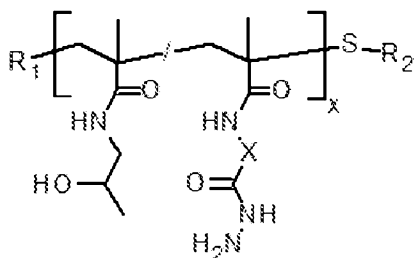
	CT26	4T1	EL4.IL-2	FaDu
Poly(HPMA- <i>co</i> -AH-NH-N=DOX) z příkladu 5a	220,6	103,5	186,5	56
Poly(HPMA- <i>co</i> -AH-NH-N=DOX) z Chytil 2010	232,3	101,6	195,1	63
doxorubicin	42,5	14,3	12,2	4,8

U všech testovaných linií, a to citlivých vůči doxorubicinu (FaDu) nebo málo citlivých (CT26) je patrné, že cytostatická aktivita obou konjugátů poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX) je dle očekávání nižší než aktivita volného léčiva, avšak hodnoty pro konjugáty, jejichž polymerní nosiče jsou připraveny jinými metodami, se od sebe významně neliší. Uvedené hodnoty ukazují na vysokou cytostatickou aktivitu poly(HPMA-*co*-AH-NH-N=DOX) z příkladu 5a vůči nádorovým liniím různého původu *in vitro*.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy statistického lineárního kopolymeru obecného vzorce V

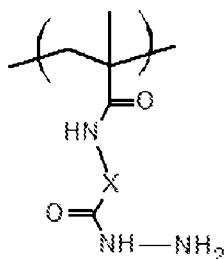
5



(V),

- sestavajícího z alespoň 75 % mol. monomerních jednotek HPMA a od 0,5 do 25 % mol.,
vztaheno na celkový počet monomerních jednotek, strukturních jednotek vzorce I

10



(I),

- kde X je vybrán ze skupiny sestávající z alkylenů o počtu atomů uhlíku od 1 do 8; fenylenů;
 $-(CH_2)_q-(C(O)-NH-(CH_2)_r)_p-$, kde $p=1$ až 5 , a q a r jsou vzájemně nezávisle vybrány z $1, 2$ a 3 ;
 přičemž X může být popřípadě substituován jedním nebo více postranními řetězci přirozené
 aminokyseliny, vybranými ze skupiny zahrnující methyl, isopropyl, isobutyl,
 $-CH(CH_3)(CH_2CH_3)$, $-CH_2OH$, $-CH(OH)(CH_3)$, $-CH_2-(C_6H_4)OH$, $-(CH_2)_2-S-CH_3$, $-CH_2SH$,
 $-(CH_2)_4-NH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2C(O)NH_2$, $-(CH_2)_2COOH$, $-(CH_2)_2C(O)NH_2$, $-(CH_2)_3NH-$
 $C(=NH)(NH_2)$, benzyl, přičemž postranní řetězce mohou být stejné nebo různé;

20

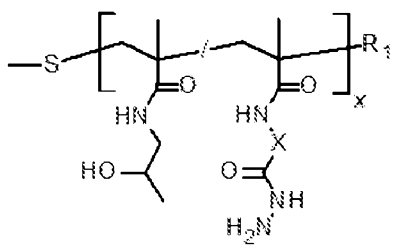
x je celé číslo v rozmezí od 25 do 700;

- R_1 je radikálová odstupující skupina použitého přenosového činidla, s výhodou je R_1 vybrán ze
 skupiny zahrnující 2-kyano-2-propyl a 5-karboxy-2-kyano-2-pentyl;

25

- a R_2 je thioetherový derivát daný strukturou použité sloučeniny s dvojnou vazbou ($C=C$) po adici
 koncových SH skupin polymerního řetězce nebo vzájemnou reakcí koncových SH skupin
 statistického lineárního kopolymeru za vzniku diblokového polymeru spojeného disulfidovou
 vazbou; s výhodou je R_2 vybrán ze skupiny zahrnující 2-(ethenylsulfonyl)ethyl, 1-ethyl-2,5-
 dioxypyrrolidin-3-yl, 1-(2-hydroxyethyl)-2,5-dioxypyrrolidin-3-yl, 1-(2-propynyl)-2,5-
 dioxypyrrolidin-3-yl, 1-(3-karboxy-1-propyl)-2,5-dioxypyrrolidin-3-yl, 1-(2-aminoethyl)-2,5-
 dioxypyrrolidin-3-yl, 1-(3-aminopropyl)-2,5-dioxypyrrolidin-3-yl; a

30

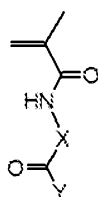


přičemž molární hmotnost statistického lineárního kopolymeru je v rozmezí od 4 000 do 100 000 g/mol;

5

vyznačený tím, že obsahuje následující kroky:

a) příprava monomeru obecného vzorce II



10

(II)

kde X je definováno výše a Y je hydroxyl, (C1-C6)alkoxy, benzoxy, 4-nitrofenoxy, 2,3,4,5,6-pentafluorfenoxy, sukcinimidyllová nebo (C1-C6)alkylthioskupina nebo thiazolidin-2-thionová skupina; s výhodou je Y vybrán ze skupiny methoxy, ethoxy, *terc.*-butoxy nebo *terc.*-butylthio nebo thiazolidin-2-thionová skupina,

15

přičemž monomer obecného vzorce II se připraví reakcí sloučeniny vzorce Y-C(O)-X-NH₂, kde X a Y jsou definované výše, s methakryloylchloridem, nebo esterifikací, thioesterifikací, či imidací karboxylové skupiny sloučeniny vzorce HO-C(O)-X-NH₂, následovaný reakcí výsledného esteru, thioesteru nebo imidu aminokyseliny s methakryloylchloridem, za vzniku monomeru obecného vzorce II;

20

b) řízenou radikálovou polymerací s reverzibilně-fragmentačním přenosem řetězce, RAFT, monomeru obecného vzorce II z kroku a) a HPMA v molárním poměru HPMA ku monomeru obecného vzorce II v rozmezí od 75:25 do 99,5:0,5 a při teplotě v rozmezí od 10 do 100 °C za iniciace iniciátorem, s výhodou vybraným ze skupiny zahrnující 2,2'-azobis(2-methylpropionitril), 4,4'-azobis(4-kyanopentanová kyselina), 2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylpentannitril); a za přítomnosti přenosového činidla, s výhodou vybraného ze skupiny zahrnující 2-kyano-2-propylbenzodithioát, 4-kyano-4-(thiobenzoylthio)pentanovou kyselinu, 2-kyano-2-propyldodecyltrithiokarbonát, 2-kyano-2-propylethyltrithiokarbonát a 4-kyano-4-[(dodecylsulfanylthiokarbonyl)sulfanyl]pentanovou kyselinu;

25

30

c) zavedení hydrazidových skupin za současné modifikace koncových skupin statistického lineárního kopolymeru, přičemž zavedení hydrazidových skupin za současné modifikace koncových skupin statistického lineárního kopolymeru spočívá v převedení skupiny Y na hydrazidovou skupinu reakcí s redukčním činidlem, s výhodou dithiothreitem, a hydrazinem, a *in situ* modifikace síru obsahujících koncových skupin polymerního nosiče reakcí se sloučeninou obsahující dvojnou vazbu (C=C), s výhodou vybranou ze skupiny zahrnující *N*-substituovaný maleinimid, nebo *S*-substituovaný vinylsulfon; výhodněji jsou vybrány ze skupiny zahrnující divinylsulfon, karboxy-PEG vinylsulfon, *N*-ethylmaleinimid, *N*-(2-hydroxyethyl)maleinimid, *N*-propargylmaleinimid, 3-maleinimido propionovou kyselinu, azido-PEG-maleinimid a *N*-(5-

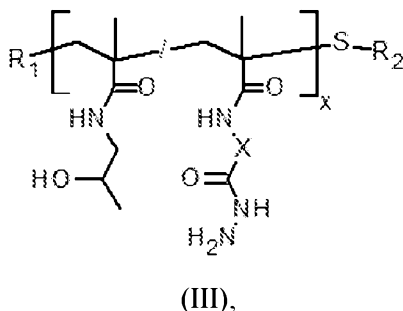
35

40

fluoresceinyl)-maleinimid; nebo se koncové thiolové skupiny převedou na aminové pomocí *N*-aminoethylmaleinimid trifluoracetátu, nebo *N*-(3-aminopropyl)maleinimidtrifluoroacetátu;

- 5 přičemž reakce se provede v inertní atmosféře za teploty místnosti a v rozpouštědle, s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující methanol, ethanol, dimethylsulfoxid, dimethylacetamid a dimethylformamid;

za vzniku statistického lineárního kopolymeru obecného vzorce III



kde X je definováno výše;

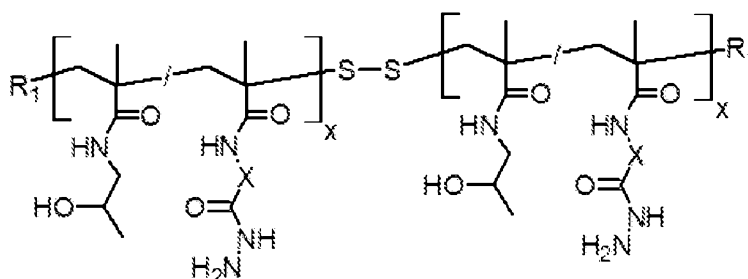
- 15 x je celé číslo v rozmezí od 25 do 700;

R_1 je radikálová odstupující skupina použitého přenosového činidla, s výhodou je R_1 vybraný ze skupiny zahrnující 2-kyano-2-propyl a 5-karboxy-2-kyano-2-pentyl;

- 20 a R_2 je thioetherový derivát daný strukturou použité sloučeniny s dvojnou vazbou (C=C) po adici koncových SH skupin polymerního řetězce, s výhodou je R_2 vybraný ze skupiny zahrnující 2-(ethenylsulfonyl)ethyl, 1-ethyl-2,5-dioxypyrrolidin-3-yl, 1-(2-hydroxyethyl)-2,5-dioxypyrrolidin-3-yl, 1-(2-propynyl)-2,5-dioxypyrrolidin-3-yl, 1-(3-karboxy-1-propyl)-2,5-dioxypyrrolidin-3-yl, 1-(2-aminoethyl)-2,5-dioxypyrrolidin-3-yl, nebo 1-(3-aminopropyl)-2,5-dioxypyrrolidin-3-yl;

25 nebo

- zavedení hydrazidových skupin za současné modifikace koncových skupin statistického lineárního kopolymeru spočívá v převedení skupiny Y na hydrazidovou skupinu reakcí s redukčním činidlem, s výhodou dithiothreitem, a hydrazinem, za současné vzájemné reakce koncových SH skupin statistického lineárního kopolymeru za vzniku diblokových polymerů obecného vzorce IV, spojených disulfidovou vazbou;



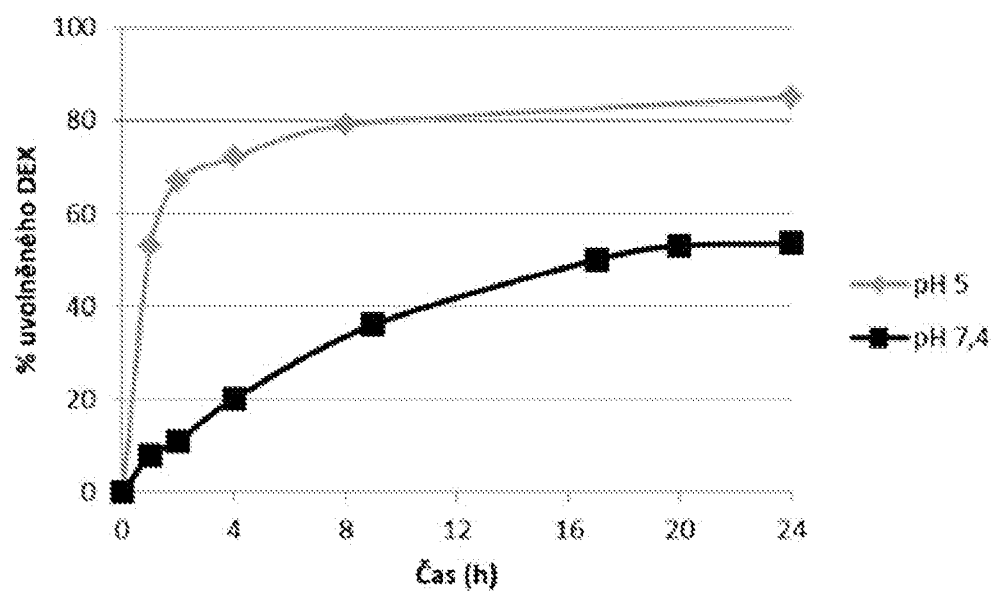
IV,

přičemž X, x i R_1 jsou definované výše;

tedy za vzniku statistického lineárního kopolymeru obecného vzorce (V).

2. Způsob přípravy podle nároku 1, **vyznačený tím**, že krokem b) polymerace monomerů je řízená radikálová RAFT polymerizace HPMA s monomerem obecného vzorce II, která se provede v rozpouštědle vybraném ze skupiny zahrnující dimethylsulfoxid, dimethylacetamid, dimethylformamid, dioxan, *terc.*-butylalkohol, vodu, vodný pufr nebo jejich směsi.
3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že se krok b) provede při molárním poměru iniciátor:přenosové čidlo v rozmezí od 1:1 do 1:10 a/nebo se krok b) provede při molárním poměru přenosové činidlo:monomery od 1:50 do 1:1000.
4. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že po kroku c) následuje krok d), ve kterém skupina R_2 sloučeniny obecného vzorce (III), obsahující aminoskupinu, reaguje za využití aminoskupiny s esterovou skupinou fluorescenční značky, za vzniku polymerního konjugátu fluorescenční značky a statistického lineárního kopolymeru.
5. Způsob podle nároku 4, **vyznačený tím**, že fluorescenční značkou je 2-[5-(1,3-dihydro-1,1,3-trimethyl-2H-benz[e]indol-2-yliden)-1,3-pentadien-1-yl]-3-[6-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxy]-6-oxohexyl]-1,1-dimethyl-1H-benz[e]indolium.
6. Způsob přípravy konjugátu statistického lineárního kopolymeru a léčiva pomocí pH-senzitivní hydrolyzovatelné hydrazonové vazby, **vyznačený tím**, že obsahuje následující kroky:
 - a) připraví se statistický lineární kopolymer podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3;
 - b) ke strukturní jednotce obecného vzorce I statistického lineárního kopolymeru, definované v nároku 1, se pomocí hydrazonové vazby naváže léčivo nebo jeho derivát obsahující keto skupinu, za vzniku konjugátu statistického lineárního kopolymeru a léčiva, přičemž navázání léčiva se provede mezi $-C(=O)-$ skupinou léčiva a $-NH-NH_2$ skupinou postranního řetězce statistického lineárního kopolymeru za katalýzy kyselinou octovou za vzniku hydrazonové vazby.
 7. Způsob přípravy podle nároku 6, **vyznačený tím**, že léčivo je vybrané ze skupiny zahrnující doxorubicin, pirarubicin, epirubicin, taxol, paclitaxel, docetaxel, larotaxel, mitomicin C, dexamethason, ritonavir, nebo jejich oxo-deriváty; nejvýhodněji je léčivo vybrané ze skupiny, zahrnující doxorubicin, dexamethason, pirarubicin, epirubicin, ritonavir, docetaxel, paklitaxel, larotaxel, nebo jejich oxo-deriváty;
- přičemž reakce se provede v rozpouštědle zvoleném z bezvodých alkoholů s počtem uhlíků 1 až 5 nebo polárních aprotických rozpouštědel, s výhodou je rozpouštědlem methanol, ethanol, dimethylformamid, dimethylacetamid nebo dimethylsulfoxid.

I výkres



Obr. 1