

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2009-85**
(22) Přihlášeno: **13.02.2009**
(40) Zveřejněno: **25.08.2010**
(Věstník č. 34/2010)
(47) Uděleno: **08.02.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **21.03.2012**
(Věstník č. 12/2012)

(11) Číslo dokumentu:

303 072

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

CZ PV 1994-620; CZ 298 945; US 2002/0197261 A1; US 2008/0171067 A1; WO 2008/076771; CZ 301 004.

Advanced Drug Delivery Release 56 (2004) s. 1023-1050; Journal of Controlled Release 132 (3) str. e63-e65 (2008); Anticancer Drugs 12 (4) 2001 s. 315-23 (abstrakt); Expert Opin. Investig. Drugs 16 (7) 2007 s. 1037-58; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 13 (2003) s. 355-360 (schema 1 a 2).

(73) Majitel patentu:

Zentiva, k.s., Praha 10 - Dolní Měcholupy, CZ

(72) Původce:

Etrych Tomáš Mgr. Ph.D., Klínek, CZ

Ulbrich Karel Prof. Ing. DrSc., Praha 4, CZ

Říhová Blanka Prof. RNDr., Praha 4, CZ

Šírová Milada RNDr., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:

Rott, Růžička & Guttmann Patentové, známkové a
advokátní kanceláře, Ing. Jana Fuchsová, Vinohradská
37, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:

**Polymerní konjugáty paclitaxelu a docetaxelu s
pH řízeným uvolňováním kancerostatika**

(57) Anotace:

V předloženém řešení je popsán polymerní konjugát, sestávající z derivátu cytostatika zvolených ze skupiny taxanů, jmenovitě paclitaxelu (PTX), docetaxelu (DTX) nebo larotaxelu (LTX) a polymerního nosiče připraveného na bázi lineárního nebo biodegradabilního roubovaného kopolymeru tvořeného jednotkami základního kopolymeru N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) a jednotkami obsahujícími methakryloylovaný hydrazon aminokyselin nebo oligopeptidů. Dále řešení obsahuje způsob přípravy uvedeného polymerního konjugátu, přičemž polymerní nosič je podroben polymeranalogické přeměně nosiče reakcí s esterem oxokyseliny a cytostatika. Polymerní konjugát se používá pro přípravu léčiva k léčbě nádorových onemocnění.

CZ 303072 B6

Polymerní konjugáty paclitaxelu a docetaxelu s pH řízeným uvolňováním kancerostatika

Oblast techniky

Vynález se týká struktury a vlastností vodorozpustných polymerních terapeutik (pro-drug) na bázi derivátu paclitaxelu (PTX), docetaxelu (DTX) a Larotaxelu (LTX) určených především pro léčbu pevných nádorů při terapii nádorových onemocnění v humánní medicíně.

Dosavadní stav techniky

Trendy vývoje léčiv se v poslední době velmi často zaměřují na vývoj lékových forem umožňujících specifický účinek léčiva pouze v místě požadovaného terapeutického efektu. Takto cíleně působící biologicky aktivní látky nalézají uplatnění zejména v oblastech, kdy nežádoucí vedlejší účinky léčiva mohou vést k poškození zdravých částí organismu. Toto nebezpečí je zvláště aktuální při léčbě cytotoxickými látkami při chemoterapii nádorových onemocnění. Je známo, že připojení cytostatika k vodorozpustnému polymernímu nosiči chemickou vazbou umožňuje zvýšit rozpustnost jinak nerozpustných nebo málo rozpustných léčiv a výrazně snížit jejich přímou toxicitu. Vysoká molekulová hmotnost polymerů zabraňuje rychlému vyloučení léčiva z organismu glomerulární filtrací, a tím zajišťuje prodlouženou dobu cirkulace v krvi a setrvání v organismu a tím i časově delší biologickou využitelnost léčiva.

V minulosti bylo připraveno a studováno mnoho polymerních konjugátů kancerostatik s rozpustnými polymery, ve kterých bylo léčivo s protinádorovým účinkem připojeno k polymeru neštěpitelnou kovalentní vazbou, hydrolyticky nestabilní iontovou vazbou a nebo kovalentní vazbou umožňující řízené uvolňování léčiva a tím i jeho aktivaci na základě enzymatické či prostě chemické hydrolýzy této vazby. Obecně jsou polymerní nosiče systému konstruovány tak, aby byly schopné uvolnit terapeuticky aktivní kancerostaticum z nosiče buď v nádoru, nebo i více specificky, přímo v nádorové buňce. Významnou skupinu polymerních terapeutik tvoří polymerní léčiva připravená na bázi kopolymerů N-(2hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA), z nichž je řada aktivně směřována k nádorům prostřednictvím k polymeru připojené směřující struktury (protilátky, lektinu, hormonu). [Duncan 1985, Říhová 2000, Kopeček 2001, 2000, Duncan, 2005; Satchi-Fainako et al., 2006]. Jejich syntéza je však značně složitá. Při vývoji polymerních kancerostatik bylo rovněž ukázáno, že pro specifickou dopravu léčiva do místa výskytu nádoru není nutné použít aktivně směřovaného nosiče, ale výrazně zvýšené akumulace polymerních cytostatik, zvláště v pevných nádorech, může být dosaženo zvýšením molekulové hmotnosti polymerního terapeutika nad vylučovací mez nosiče ledvinami (tzv. pasivní směřování do pevných nádorů). Tato schopnost makromolekul akumulovat se v pevných nádorech byla nazvána EPR efektem (Enhanced Permeability and Retention) a bylo ukázáno, že se tento efekt významně projevuje i u nosičů na bázi kopolymerů HPMA [Noguchi et al., 1998; Seymour et al., 1995].

Jedním z hlavních problémů použití HPMA kopolymerů jako pasivně směřovaných vysokomolekulárních nosičů je jejich neštěpitelný uhlíkatý řetězec a z organismu vylučitelné jsou pouze polymery nepřesahující molekulovou hmotnost 40 až 50 000 g/mol. To znamená, že nemá-li dojít po opakovaném podání léčiva k hromadění polymeru v organismu a má-li být molekulová hmotnost nosiče co nejvyšší, aby bylo pasivní směřování co nejúčinnější, musí být polymerní nosič konstruován jako v organismu degradovatelný. Takové polymerní nosiče na bázi HPMA kopolymerů byly nedávno vyvinuty a jejich struktura byla patentována [Chybil et al. 2008; Etrych et al. 2008, Chytil PV 2006-207, Etrych PV 2006-592].

V literatuře existuje celá řada informací o přípravě a studiu vlastností polymerů nesoucích kancerostaticum připojené k polymeru vazbou náchylnou k hydrolýze ve vodném prostředí [Kratz 1999]. Mezi nimi zaujímají významné postavení kopolymery HPMA, nesoucí kancerostaticum

doxorubicin vázaný k polymernímu řetězci hydrolyticky štěpitelnou hydrozovanou vazbou [Etrych 2002, Ulbrich 2004a, Ulbrich 2004b, Ulbrich pat CZ 293 787 B6]. Tato vazba je relativně stálá v prostředí krevního řečiště (v průběhu transportu v organismu) a hydrolyticky labilní v mírně kyselém prostředí živé buňky. Rychlost hydrolýzy této vazby řídí i rychlost uvolňování léčiva, a tedy i koncentraci aktivní látky v místě požadovaného účinku. Takováto polymerní kancerostatika vykazovala při in vitro i in vivo testech na myších podstatně vyšší protinádorovou účinnost proti řadě nádorových linií nežli volné léčivo a v řadě případů vedlo jejich použití k úplnému vyléčení pokusných zvířat i při terapeutickém způsobu podání. [Říhová 2001, Etrych 2001]. Zvýšení molekulové hmotnosti nosiče (biodegradovatelné roubované polymery, micelární a nanogelové systémy) vždy vedlo ke zvýšení účinnosti protinádorové aktivity léčiva ověřované v in vivo systémech.

Paclitaxel a docetaxel patří do skupiny taxanů, protinádorových léčiv rutině používaných při léčbě ovariálních nádorů a nádorů prsu, plic, prostaty a dalších [Vanhoefer et al., 1997]. Kromě vedlejší toxicity běžné u kancerostatik je jejich další nevýhodou velmi malá rozpustnost ve vodných roztocích a tedy nezbytnost podání v různých excipientech, především v Cremoforu EL, což rovněž vede k dalším vedlejším účinkům lékové formy. Při některých schématech podání může dokonce podání taxanů v Cremoforu EL významně snížit efekt léčby [Ng et al., 2006].

Vazbou těchto léčiv na polymerní nosiče (PEG, HPMa kopolymer, poly(glutamová kyselina)) byla získána ve vodě velmi dobře rozpustná pro-léčiva, s prodlouženou dobou cirkulace v organismu a zvýšenou akumulací v pevných nádorech. Jejich protinádorová aktivita byla ověřována in vivo na zvířecích modelech a v některých případech i klinicky. Tak paclitaxel (PTX) byl kovalentně vázán na poly(ethylenglykol) (PEG) neštěpitelnou esterovou nebo 7-karbamátovou vazbou (C2-OH skupina) a nebo pomocí hydrolyticky labilní aminokyselinové spojky (Ala, Gly) [Greenwald et al., 1995; Greenwald, 2002; Greenwald et al., 2003; Pendri et al., 1998]. Bylo ukázáno, že protinádorová aktivita konjugátu závisí na struktuře použité vazby mezi polymerem a léčivem a že významným faktorem je i molekulová hmotnost nosiče. Konjugát s PTX byl testován ve fázi I klinických testů [Satchi-Fainaro et al., 2006], ale zřejmě s malým úspěchem.

Mnohem úspěšnější v klinických testech se ukazuje být konjugát paclitaxelu s poly(glutamovou kyselinou) (Xyotax) [Winter 2005, kratz et al., 2008]. V tomto konjugátu je PTX vázán na polyaminokyselinový nosič esterovou vazbou přes -OH skupinu v pozici 2. K uvolnění léčiva dochází v důsledku degradace polymerního řetězce, vzniku Glu derivátu PTX a jeho následné hydrolýzy. V současné době je tento konjugát ve fázi III klinických testů.

Paclitaxel byl rovněž vázán na HPMa kopolymery esterovou vazbou za použití biodegradovatelné oligopeptidové GlyPheLeuGly spojky. Bylo ukázáno, že PTX se po inkubaci s lysozomálními enzymy uvolňuje z nosiče a toto uvolnění je důležité pro dosažení protinádorové aktivity in vivo. PNU166945 je konjugát HPMa kopolymeru s esterově vázaným PTX, který byl klinicky testován na fázi I [Tarwogt et al., 2000; Terwogt et al., 2001], po této fázi však bylo další testování zastaveno. Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že konjugace paclitaxelu s polymerním nosičem vede k výraznému zlepšení vlastností léčiva (rozpustnost, zlepšená biologická využitelnost). Má-li však léčivo najít uplatnění v humánní medicíně, je třeba pečlivě volit a na míru připravit jak strukturu a molekulovou hmotnost nosiče, tak i strukturu spojky mezi polymerem a léčivem řídící rychlost a tedy i koncentraci léčiva v místě požadovaného účinku. Při vývoji optimálních struktur je nezbytné ověřit funkci těchto struktur ve vhodných in vivo modelech.

Podstata vynálezu

Polymerní léčiva podle vynálezu se vyznačují tím, že je na vodorozpustný polymerní nosič připravený na bázi lineárního nebo roubovaného kopolymeru HPMa navázáno kancerostatikum ze skupiny taxanů, paclitaxel (PTX), docetaxel (DTX) nebo larotaxel (LTX) (dále léčiva). Léčivo je

připojené k polymerním řetězcům přes esterovou skupinu vzniklou acylací sekundárních –OH skupin v poloze 2 pomocí spojek (spacerů) obsahujících pH–senzitivní hydrolyticky štěpitelné hydrazonové vazby. Tyto spojky mohou být tvořeny kyselinovými zbytky různých oxokyselin, kterými je do struktury léčiv zavedena karbonylová skupina, spojených se zbytky jednotlivých aminokyselin, oligopeptidů a nebo dalšími strukturami dovolujícími zakončení postranních řetězců polymerního nosiče hydrazovanou skupinou. Molekulová hmotnost polymerního řetězce je v případě lineárního polymeru volena pod vylučovací mezí HPMa kopolymerů z organismu, s výhodou v rozmezí 10 až 50 000 g/mol. V případě roubovaného kopolymeru je molekulová hmotnost volena v rozmezí 50 až 250 000 g/mol.

Polymerní léčivo podle vynálezu je připraveno pro intravenózní (injekce nebo infuze) podání v roztoku, může být ale podáno i intratumorálně či intraperitoneálně a je určeno pro léčbu pevných nádorů. Polymer s chemicky vázaným cytostatikem je konstruován tak, aby byl stabilní v průběhu cirkulace v krevním řečišti a nedocházelo k hydrolyze hydrozonové vazby mezi daným taxanem a polymerem, případně, aby byla rychlost hydrolyzy v průběhu transportu organizmem minimální (při pH v krevním řečišti 7,4), tak aby se nemohl projevit cytotoxický efekt uvolněného léčiva či jeho derivátu. Celý systém je konstruován jako systém působící dvoufázově. Díky vhodné volbě molekulové hmotnosti nosiče, umožňující extravasaci ale i účinnou akumulaci v nádorové tkáni, by mělo po počáteční akumulaci léčiva v nádorové tkáni dojít k interakci s buněčnou membránou a k průniku molekulárně rozpuštěného polymerního léčiva do jednotlivých nádorových buněk pinocytózou. Uvnitř cílových buněk by mělo dojít v důsledku poklesu pH z vnějšího pH (7,4) na intracelulární pH (5 až 6) k rychlé hydrolyze hydrazonové vazby a k uvolnění léčiva nebo jeho derivátu z nosiče. V následném kroku by mělo dojít k hydrolyze esterové vazby již z polymeru uvolněného derivátu léčiva chemickou hydrolyzou a nebo specifickými účinkem intracelulárních enzymů, např. karboxyesteráz. Reálnost výše navrženého mechanismu působení polymerních léčiv podle vynálezu je doložena experimenty modelového uvolňování léčiv z polymerního nosiče. Výsledky těchto testů, včetně testů protinádorové aktivity, jsou uvedeny v příkladové části přihlášky.

Polymerní konjugáty s cíleným protinádorovým účinkem podle vynálezu se vyznačují tím, že cytostatikum (taxol, docetaxel, larotaxel) je připraveno prostřednictvím esterové vazby a spaceru na polymerní nosič tvořený lineárním [Etrych pat CZ 297 827 B6, publ 2008] a nebo roubovaným [Etrych pat CZ 298 945 (B6), publ 2008] HPMa kopolymerem prostřednictvím hydrolyticky labilní hydrazonové skupiny vzniklé reakcí karbonylové skupiny derivátu molekuly léčiva s hydrazidovou skupinou polymerního nosiče. Polymerní nosiče jsou připraveny zpravidla radikálovou roztokovou kopolymerizací HPMa s komonomery odpovídajícími požadovanému složení. Vazbou příslušného taxanu na polymerní nosič dojde k výraznému snížení jeho cytotoxicity, výraznému zvýšení molekulové hmotnosti léčiva a tím k prodloužení doby cirkulace v krevním oběhu, dojde k prodloužení celkové doby setrvání léčiva v organismu a tedy i ke zvýšení jeho biologické využitelnosti (bioavailability). Polymerní léčivo podle vynálezu se dále vyznačuje tím, že vazba léčiva k polymernímu nosiči je relativně stálá v průběhu transportu v krevním řečišti a tělních tekutinách a je hydrolyticky štěpitelná v mírně kyselém prostředí nádoru a zejména uvnitř cílových nádorových buněk v endozómech vyznačujících se mírně kyselým pH. To znamená, že léčivo je transportováno krevním řečištěm v neaktivní, na polymer vázané formě, a k jeho uvolnění a aktivaci dojde především až po průniku do cílových nádorových buněk. Aktivace léčiva až v cílových buňkách vede k eliminaci vedlejších účinků jinak toxických cytostatik a k zacílení jejich účinku přednostně na nádorové buňky. Za cílený (pasivní) transport do nádoru či nádorových buněk je odpovědný polymerní nosič připravený na bázi kopolymerů HPMa, jehož molekulová hmotnost a tedy i účinnost akumulace v nádorové tkáni může být řízena změnami ve struktuře skeletu polymerního nosiče (nedegradovatelný lineární polymer, vysokomolekulární biodegradovatelný roubovaný polymer).

Oblastí použití předloženého vynálezu je použití polymerních léčiv podle vynálezu pro léčbu solidních nádorů při maligních onemocněních v humánní medicíně.

Syntéza a struktury polymerních konjugátů

Syntéza polymerních konjugátů podle vynálezu je prováděna v několika krocích, detailní finální struktura konjugátu významně záleží na zvolené syntetické cestě.

5

V prvním kroku syntézy jsou syntetizovány základní monomery: HPMA, methakryloylované deriváty aminokyselin a oligopeptidů zakončené hydrazidovou (CONHNH_2) skupinou, případně zakončené hydrazidovou skupinou chráněnou t.-butyloxykarbonylovou skupinou (Boc).

10

Ve druhém kroku jsou syntetizovány polymerní prekurzory, tj. HPMA kopolymery nesoucí funkční skupiny (random copolymers) sloužící jako polymerní nosiče pro léčiva.

15

Polymerní prekurzor nesoucí podél řetězce funkční hydrazidové skupiny je možné připravit buď radikálovou kopolymerizací výše uvedených funkčních monomerů s HPMA, nebo polymeranalogickou přeměnou základního kopolymeru nesoucího funkční skupiny.

20

Roubované kopolymery jsou připraveny z multivalentních a semitelechelických HPMA kopolymerů podle postupu popsaného Etrychem et al. v CZ 298 945, J. Controlled Release 2008, 132, 184 až 192.

25

Základní kopolymer (prekurzor) je kopolymer HPMA a methakryloylovaných hydrazidů aminokyselin nebo oligopeptidů vybraných ze skupiny glycyl, glycylglycyl, β -alanyl, 6-aminohexanoyl (AH), 4-aminobenzoyl a nebo složený acyl vycházející z oligopeptidů GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyPheLeuGly), vyznačující se tím, že obsahuje 70 až 98 mol % HPMA a 2 až 30 % mol jednotek s hydrazidovými funkčními skupinami (viz Schéma 2. se spojkou tvořenou 6-aminohexanylem).

30

Derivát léčiva je sloučenina léčiva (PTX, DTX nebo LTX) vzniklá acylací hydroxylové skupiny v pozici 2 léčiva příslušnou oxokyselinou. S výhodou byly použity následující oxokyseliny: kyselina levulová, 4-(2-oxopropyl)benzoová kyselina, 4-oxo-pent-2-enová a kyselina 5-oxo-hex-2-enová a 6-oxo-hept-2-enová (viz Schéma 1.).

35

Polymerní konjugát je sloučenina polymerního prekurzoru s derivátem léčiva, kde derivát léčiva je navázán na polymerní prekurzor hydrazonovou vazbou připravenou reakcí karbonylové skupiny derivátu léčiva s hydrazidovými skupinami polymeru, vyznačující se tím, že obsahuje 70 až 98 mol % HPMA, 1,5 až 29,5 mol % jednotek s hydrazidovými funkčními skupinami a 0,5 až 10 mol % jednotek s hydrazonově navázaným derivátem léčiva (viz Schéma 3. se spojkou tvořenou 6-aminohexanylem a kyselinou levulovou).

40

Přehled obrázků na výkresech

45

Obr. 1. Graf rychlosti uvolňování PTX a jeho derivátů z lineárních polymerních konjugátů v pufru o pH 5 (model intracelulárního prostředí).

Obr. 2: Graf rychlosti uvolňování PTX a jeho derivátů z lineárních polymerních konjugátů v pufru o pH 7,4 (model krevního řečiště).

50

Obr. 3: Přežití myši C57BL/6 s lymfomem EL-4, který byl podán DTX, derivát LEV-DTX a lineární polymerní konjugát PHPMA-AH-N=N=DTX-LEV. Dávky léčiv byly 2x20 mg ekvivalentu DTX/kg, konjugát PHPMA-AH-NH=DTX-LEV byl podán v dávce 2x20 a 2x40 mg ekvivalentu DTX/kg.

Obr. 4: Přežití myši 57BL/6 s lymfomem EL-4, kterým byl podán derivát paclitaxelu LEV-PTX a lineární polymerní konjugát PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV. Pro omezenou rozpustnost nemohl být podán PTX ve volné formě.

5 Obr. 5: Přežití myši BALB/c s karcinomem mléčné žlázy 4T1, kterým byl podán paclitaxel, derivát paclitaxelu LEV-PTX a lineární polymerní konjugát PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV. PTX a PTX-LEV byl injikován v dávce 2x30 mg ekvivalentu PTX v den 8 a 12 (viz text), a konjugát PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV v dávce 2x60 mg ekvivalentu PTX/kg v den 8 a 12.

10 Obr. 6: Přežití myši C57BL/6 s lymfomem EL-4, kterým byl podán lineární polymerní konjugát PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV s obsahem DTX 8,2 % a 16,3 %, v dávce 2x30 mg ekvivalentu DTX i.v., den 9 a 13.

15 Příklady provedení vynálezu

Příklady provedení syntézy meziproduktů a konjugátů podle vynálezu

20 Příklad 1: Syntéza monomerů a derivátů léčiv

HPMA byl připraven podle dříve pospaného postupu [Ulbrich a kol. 2000]. Elementární analýza: vypočteno 58,8 % C, 9,16 % H, 9,79 % N; nalezeno 58,98 % C, 9,18 % H, 9,82 % N. Produkt byl chromatograficky čistý.

25 6-(Methakryloylamino)hexanoylhydrazin (N^1 -(6-hydrazino-6-oxohexyl)-2-methylakrylamid (MA-AH-NHNH₂) byl připraven podle dříve popsání postupu (Etrych et al., CZ 297 827 B6).

30 Ester kyseliny levulové a paclitaxelu (v pozici -OH₂) (LEV-PTC) byl připraven reakcí kyseliny levulové s paclitaxelem pomocí karbodiimidové metody (dicyklohexylkarbodiimid, DCC) v N,N' -dimethylformamidu (DMF).

Kyselina levulová (19,4 mg, 0,167 mmol) a DCC (37,5 mg, 0,182 mmol) byly při laboratorní teplotě rozpuštěny každý v 0,15 mL DMF. Oba roztoky byly ochlazeny na -18 °C a smíchány. 35 Po 20 minutách byl k tomuto roztoku přidán roztok paclitaxelu (10 mg, 0,117 mmol) a N,N' -dimethylaminopyridinu (DMAP) (14 mg, 0,117 mmol) v 0,3 mL DMF. Reakce probíhala 30 minut při -18 °C a 16 h při 4 °C. Průběh reakce sledován na TLC – destičky Silikagel 60 F₂₅₄ (ethylacetát: hexan 1:1, R_f(PTX) = 0,25, R_f(LEV-PTX) = 0,15, R_f(Levulic acid) = 0,45). produkt byl vyčištěn od nízkomolekulárních příměsí pomocí chromatografie na koloně (60 cm x 40 4 cm) naplněné Silikagelem v ethylacetátu. Frakce obsahující produkt PTX-LEV byla zachycena a zahuštěna na 0,4 mL a produkt vysrážen do 20 mL diethyleteru. Produkt byl odsát, promyt malým množstvím diethyleteru a vakuově sušen do konstantní hmotnosti. Výtěžek činil 98 mg produktu (84 %) s teplotou tání 136 až 138 °C. TLC (ethylacetát: hexan 1:1) jedna skvrna při R_f = 0,15. MALDI-TOF MS: 970 (M+Na).

45 Čistota všech monomerů a derivátů léčiv byla stanovena pomocí HPLC systému [Schmidzu HPLC systém vybavený kolonou s reverzní fází Chromolith Performance RP-18e (100 x 4,6 mm) a UV-VIS detektorem Shimadzu SPD-10AVvp (230 nm); eluent voda-acetonitril s gradientem 50 až 100 vol. % acetonitrilu, průtok 0,5 mL.min⁻¹].

50 Ester kyseliny levulové a docetaxelu (v pozici -OH 2) (LEV-DTX) byl připraven obdobně jako LEV-PTX reakcí kyseliny levulové s docetaxelem karbodiimidovou metodou (DCC) v DMF. Kyselina levulová (38 mg, 0,327 mmol) a DCC (100 mg, 0,487 mmol) byly při laboratorní teplotě rozpuštěny každý v 0,25 mL DMF. Oba roztoky byly ochlazeny na -18 °C a smíchány. Po 55 20 minutách byl k tomuto roztoku přidán roztok docetaxelu (200 mg, 0,247 mmol) a N,N' -

dimethylaminopyridinu (DMAP) (28 mg, 0,229 mmol) v 0,6 mL DMF. Reakce probíhala 30 minut při -18°C a 16 h při 4°C . Průběh reakce sledován na TLC – destičky Silikagel 60 F₂₅₄ (ethylacetát: hexan 1:1, $R_f(\text{DTX}) = 0,3$, $R_f(\text{LEV-DTX}) = 0,2$, $R_f(\text{Levulic acid}) = 0,45$). produkt byl vyčištěn od nízkomolekulárních příměsí dvakrát pomocí chromatografie na koloně (60 cm x 4 cm) naplněné Silikagelem v ethylacetátu. Frakce obsahující produkt DTX-LEV byla pokaždé zachycena a zahuštěna na 0,6 mL a produkt vysrážen do 20 mL diethyleteru. Produkt byl odsát, promyt malým množstvím diethyleteru a vakuově sušen do konstantní hmotnosti. Výtěžek činil 179 mg produktu (80 %) s teplotou tání 86 až 89°C . TLC (ethylacetát : hexan 1:1) jedna skvrna při $R_f = 0,20$. MALDI-TOF MS: 929 (M+Na).

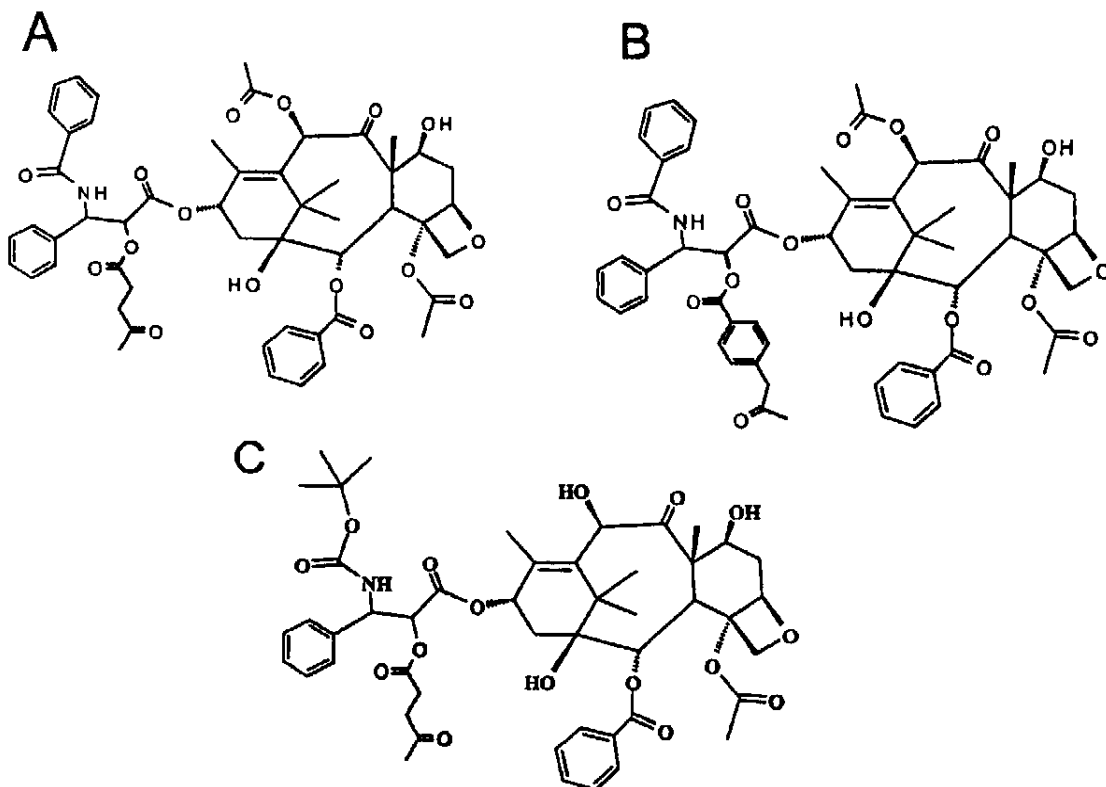


Schéma 1 struktury esterů kyseliny levulové a 4-(2-oxopropyl)benzoové s paclitaxelem a docetaxelem: A) Ester kyseliny levulové a paclitaxelu, LEV-PTX; B) Ester 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny a paclitaxelu, OPB-PTX; C) Ester kyseliny levulové a docetaxelu, LEV-DTX.

Ester 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny a paclitaxelu (v pozici $-\text{OH}$ 2) (OPB-PTX) byl připraven stejným výše popsaným postupem pro přípravu LEV-PTX, a to reakcí 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny s paclitaxelem pomocí konjugačního činidla DCC v DMF.

Výtěžek činil 85 %. Teplota tání 143 až 145°C . TLC (ethylacetát: hexan 1:1) jedna skvrna při $R_f = 0,25$. MALDI-TOF MS: 1032 (M+Na).

Ester 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny a docetaxelu (v pozici $-\text{OH}$ 2) (OPB-DTX) byl připraven stejným výše popsaným postupem pro přípravu DTX-LEV, a to reakcí 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny s docetaxelem pomocí DCC v DMF.

Výtěžek činil 81 %. Teplota tání 94 až 96°C . TLC (ethylacetát: hexan 1:1) jedna skvrna při $R_f = 0,28$, MALDI-TOF MS: 990 (M+Na).

Ester 4-oxo-pentenové [3-acetylakrylové] kyseliny a paclitaxelu (v pozici $-\text{OH}$ 2) (AAK-PTX) byl připraven stejným výše popsaným postupem pro přípravu LEV-PTX, a to reakcí 4-oxo-pentenové kyseliny s paclitaxelem pomocí DCC v DMF.

Výtěžek činil 86 %. Teplota tání 138 až 139 °C. TLC (ethylacetát: hexan 3:1) jedna skvrna při $R_f = 0,6$. MALDI-TOF MS: 968 (M+Na).

Ester 5-oxo-hexenové kyseliny a paclitaxelu (v pozici -OH 2) (OHE-PTX) byl připraven stejným výše popsaným postupem pro přípravu PTX-LEV, a to reakcí 5-oxo-hexenové kyseliny s paclitaxelem pomocí konjugačního činidla DCC v DMF.

Výtěžek činil 85 %. Teplota tání 132 až 134 °C. TLC (ethylacetát: hexan 3:1) jedna skvrna při $R_f = 0,65$. MALDI-TOF MS: 982 (M+Na).

Ester 5-oxo-Hexenové kyseliny a docetaxelu (v pozici -OH 2) (OHE-DTX) byl připraven stejným výše popsaným postupem pro přípravu DTX-LEV, a to reakcí 5-oxo-hexenové kyseliny s docetaxelem pomocí konjugačního činidla DCC v DMF.

Výtěžek činil 86 %. Teplota tání 84 až 86 °C. TLC (ethylacetát: hexan 3:1) jedna skvrna při $R_f = 0,7$. MALDI-TOF MS: 940 (M+Na).

Příklad 2: Syntéza polymerního prekurzoru – kopolymeru HPMA s MA-AH-NHNH₂

Kopolymer poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH₂) byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA a MA-AH-NHNH₂ v methanolu při 60 °C podle dříve popsaného postupu [Etrych patent].

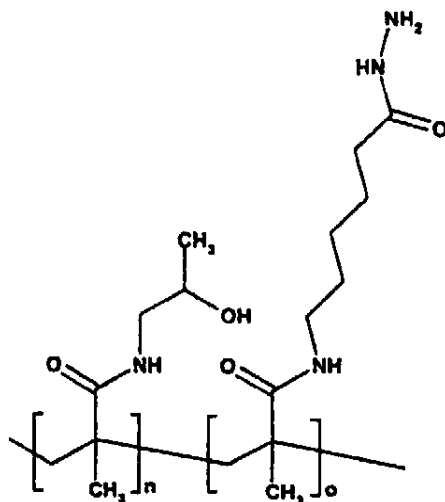


Schéma struktury polymerního prekurzoru, kopolymeru poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH₂).

Příklad 3: Příprava polymerních konjugátů obsahujících deriváty léčiv (PHPMA-AH-NH-N=LEV-PTX, PHPMA-AH-NH-N=LEV-DTX, PHPMA-AH-NH-N=OPB-PTX, PHPMA-AH-NH-N=OPB-DTX, PHPMA-AH-NH-N=OHE-PTX, PHPMA-AH-NH-N=OHE-DTX, PHPMA-AH-NH-N=AKK-PTX a PHMPA-AH-NH-N=AKK-DTX)

Kopolymery s deriváty PTX, DTX a LTX navázanými k PHPMA nosiči hydrolyticky štěpitelnou hydrazonovou vazbou byly připraveny reakcí polymerních prekurzorů obsahujících hydrazidové skupiny s příslušným derivátem léčiva v methanolu za katalýzy kyselinou octovou.

Roztok 100 mg kopolymeru poly (HPMA-co-MA-AH-NHNH₂) v 1,1 mL methanolu byl smíchán s roztokem LEV-PTX v 0,2 ml methanolu. Do míchané reakční směsi bylo při 25 °C po 1 minutě přidáno 40 µL kyseliny octové. Průběh reakce (úbytek LEV-PTX) byl sledován pomocí

TLC (destičky Silikagel 60 F₂₅₄, ethylacetát, R_f(LEV-PTX) = 0,8). Po 2 h byla reakční směs
čištěna gelovou filtrací od volného derivátu léčiva na koloně naplněné Sephadexem LH-20
v methanolu. Polymerní frakce byla izolována, zahuštěna na vakuové odparce a produkt srážen
do 50 ml ethylacetátu, izolován filtrací na fritě S4, promyt 150 mL ethylacetátem a sušen do
konstantní hmotnosti. Obsah celkového PTX nebo jeho derivátu v polymerním konjugátu byl sta-
noven pomocí HPLC stavení (HPLC Shimadzu systém) po úplné hydrolýze polymerního
konjugátu v roztoku HCL (pH 2) po dobu 1 h při 37 °C a extrakci derivátu PTX do chloroformu.
<M_w> a distribuce molekulových hmotností byly zjištěny pomocí kapalinové chromatografie
(kolona TSKGel 400 (3000x10 mm), 20% 0,3 M octanový pufr (CH₃COONa/CH₃COOH; pH
6,5; 0,5 g/L NaN₃) a 80% methanol, průtok 0,5 mL/min, detekce diferenciálním refraktometrem,
detektorem rozptylu světla (DAWN-DSP-F, Wyatt, Technology, USA) a UV detektorem
(250 nm). Charakterizace polymerního léčiva: Celkový výtěžek reakce vazby léčiva: 96 mg
(88 %), obsah celkového LEV-PTX 9,2 % váhových, obsah volného PTX <0,2 % z celkového
obsahu PTX. Postup vazby derivátu PTX na polymerní prekurzory hydrazonovou vazbou byl
stejný pro všechny typy prekurzorů a derivátů léčiv.

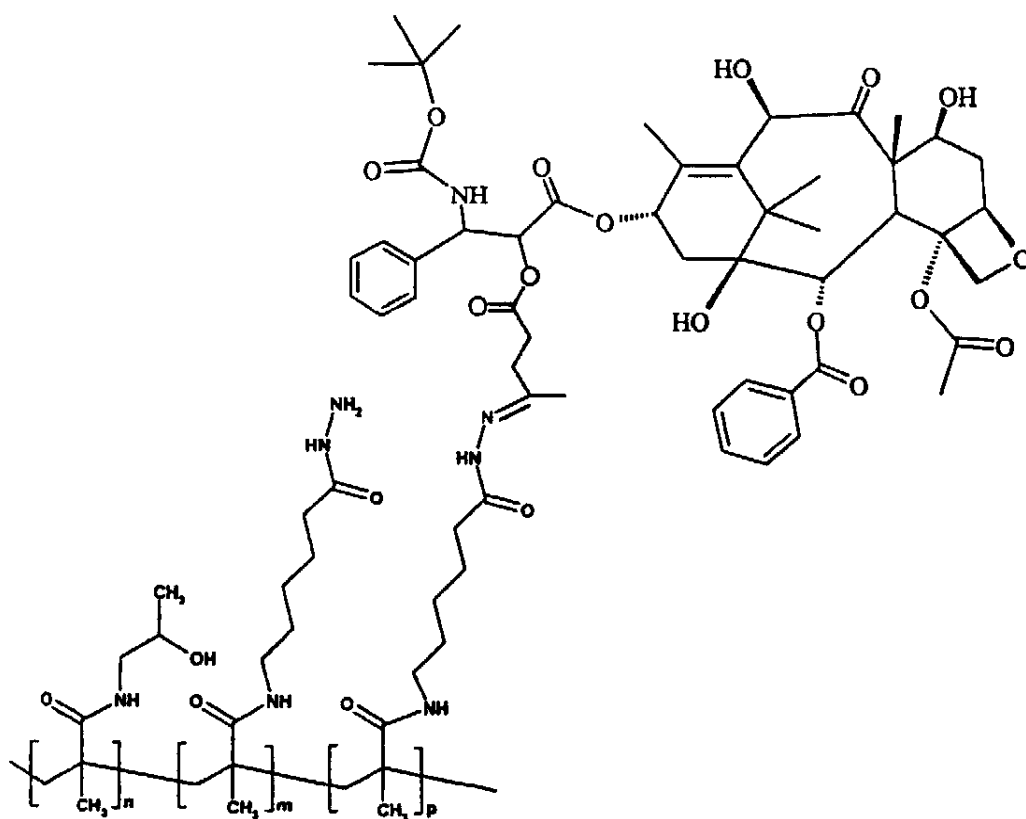


Schéma 3 struktury polymerního konjugátu PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV s navázaným
derivátem, esterem kyseliny levulové a docetaxelu.

Příklad 4: Uvolňování PTX, DTX nebo jejich derivátů z polymerních konjugátů

Bylo měřeno množství PTX, DTX nebo jejich derivátů uvolněných z polymerních konjugátů po
jejich inkubaci ve fosfátovém pufru o pH 5,0 (0,1 M fosfátový pufr obsahujícím 0,05 M NaCl)
modelujícím intracelulární prostředí a fosfátovém pufru pH 7,4 modelujícím prostředí krevního
řečiště. Množství uvolňovaných léčiv nebo jejich derivátů v inkubačním roztoku bylo stanoveno
pomocí HPLC (Shimadzu). V předem určených časových intervalech bylo odebíráno 200 µL
inkubačního roztoku a po extrakci uvolněných léčiv a jejich derivátů do chloroformu bylo jejich
množství stanoveno pomocí HPLC systému [Schimadzu HPLC systém vybavený kolonou

s reverzní fází Chromalith Performance RP-18e (100x 4,6 mm) a UV-VIS detektoru Shimadzu SPD-10AVvp (230 nm); eluent voda-acetonitril s gradientem 50 až 100 vol. % acetonitrilu, průtok 0,5 mL.min⁻¹.

Po inkubaci konjugátů (koncentrace 5 mg/mL) ve fyziologickém prostředí při 37 °C (fosfátový pufr, pH 7,4) se uvolňují léčiva PTX a DTX (či jejich deriváty) významně pomaleji (Obr. 2) než v mírně kyselém prostředí při pH 5,0 modelujícím prostředí v endozomech a lysozomech nádorových buněk (Obr. 1) U obou léčiv má na rychlost uvolňování z polymerního konjugátu a poměr uvolněných složek (léčivo a jeho derivát) zásadní vliv struktura oxokyselinové spojky. Spojka tvořená kyselinou levulovou nebo 4-(2-oxopropyl)benzovou uvolňuje velmi rychlé uvolnění derivátu léčiva v pH 5, k hydrolýzy esterové vazby mezi léčivem a kyselinou ovšem dochází jen velmi pomalu. Naproti tomu spojka tvořená kyselinou 4-oxo-pentenovou stabilizuje jak hydrazonovou vazbu, tak vazbu esterovou, nedochází k významnému uvolnění léčiva ani jeho derivátu. Při inkubaci ve fyziologickém prostředí o pH 7,4 dochází u polymerních konjugátů se spojkou tvořenou kyselinou levulovou nebo 4-(2-oxopropyl)benzoovou k částečné hydrolýze hydrazonové vazby, ve srovnání s prostředím o pH 5 významně nižší rychlostí. V pH 7,4 je patrné, že stabilita esterové vazby mezi kyselinou levulovou a léčivem je nižší a z jedné třetiny se uvolňuje volné léčivo. Naproti tomu v případě spojky tvořené 4-(2-oxopropyl)benzoovou kyselinou se uvolňuje jen derivát léčiva, esterová vazba je stabilní. Rozpad derivátu léčiva na volné léčivo nebo přímé odštěpení léčiva z polymerního konjugátu je předpokládáno účinkem enzymů, a to především karboxy esteráz.

Příklad 5: Ukázka in vitro biologické aktivity lineárních polymerních konjugátů docetaxelu a paclitaxelu při inkubaci s buňkami nádorových linií; T-buněčného lymfomu EL-4 a karcinomu mléčné žlázy 4T1,

Tabulka 1 Hodnoty IC₅₀ (v ng/ml)

	EL 4	4T1
DTX	0.0001	0.0004
DTX-LEV	0.015	0.0031
PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV	3.9	0.750
PTX	0.0013	0.0003
PTX-LEV	0.19	0.0054
PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV	33.6	8.90

Příklad 6: Ukázka in vivo biologické aktivity lineárních polymerních konjugátů docetaxelu a paclitaxelu u myši inokulovaných T buněčných lymfomem EL4.

Pro in vivo demonstraci aktivity konjugátů docetaxelu a paclitaxelu byl použit model myšího syngenního T buněčného lymfomu EL-4. Myším kmene C57BL/6 (samice byl v den 0 subkutánně implantováno 1x10⁵ nádorových buněk EL-4. Léčiva byla podána intravenózně (i.v.), a to ve dvou dávkách podaných v den 8 a den 12 pro transplantaci nádorových buněk. První dávka byla podána v době, kdy byly nádory dobře vyvinuté, hmatatelné, o velikosti zhruba 300 mm³. V pokusu byla sledována velikost nádorů, tělesná váha myši, celkový zdravotní stav a přežití. Efekt konjugátu byl vždy porovnáván s efektem volného léčiva (DTX, PTX) a jeho derivátů

(DTX-LEV, PTX-LEV). Průměrná doba přežití neléčených kontrolních myší s lymfomem EL-4 byla 31,3 dne (SD 3,66, střední doba přežití 30,5 dne).

DTX, PTX a deriváty DTX-LEV, PTX-LEV byly pro i.v. aplikaci rozpouštěny ve směsi Cremophor EL (Sigma, USA) a etanol (1:1), po rozpuštění léčiva byl objem doplněn 4 objemovými díly PBS (fosfátem pufrovaný fyziologický roztok). Konjugát PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV, PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV byly rozpouštěny v PBS. Objem každé jednotlivé dávky léčiva byl 0,2 ml. Aplikovány byly následující dávky léčiv. DTX a derivát DTX-LEV 2x20 ng ekvivalentu DTX/kg, konjugát PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV v dávce 2x20 a 2x40 mg DTX ekvivalentu/kg. PTX a derivát PTX-LEV v dávce 2x30 mg ekvivalentu PTX/kg konjugát PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV v dávce 2x60 mg ekvivalentu PTX/kg.

A. Protinádorová účinnost konjugátu PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV (Obr. 3)

Volný DTX indukoval úplnou regresi nádorů EL-4 u 4 myší ze 7 testovaných. Derivát LEV-DTX měl nižší efekt a indukoval úplnou regresi nádoru EL-4 u 1 z 8 testovaných myší. Konjugát PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV v dávce ekvivalentní volnému DTX (2x20 mg ekvivalentu DTX/kg) vyléčil také 1 myš ze skupiny 8 myší. Zvýšení dávky konjugátu na dvojnásobek (2x40 mg DTX ekvivalentu DTX/kg) však vedlo k vyléčení 7 myší ze skupiny (n=8). V žádné testované skupině nebyl zaznamenán úbytek váhy (jakožto znak toxicity léčiva). Myši, u nichž došlo k úplné regresi nádoru, zůstaly bez známek nádorového růstu či toxicity do dne 94, kdy jim byly znovu transplantovány nádorové buňky EL-S4 ve stejné (tj. letální) dávce, a myši byly ponechány bez léčby. Tato druhá transplantace byla provedena pro průkaz imunologicky zprostředkované resistance proti nádoru. Statisticky významný podíl myší vyléčených konjugátem PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV (2x40 mg qp. DTX/kg) byl resistantní vůči nádoru EL-4 (5 myší resistantních ze 7, tj. 71 %). Odpovídající podíl resistantních jedinců byl i mezi myšmi vyléčenými volným DTX (ze 4 vyléčených myší byly 3 myši resistantní).

Závěr: Konjugát PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV měl významný protinádorový účinek u myší C57BL/6 s lymfomem EL-4, jeho podání nebylo prokázáno vedlejšími toxickými efekty a umožnilo ustavení resistance proti nádoru u 71 % vyléčených jedinců.

B. Protinádorová účinnost konjugátu PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV (Obr. 4)

Volný PTX se pro velmi omezenou rozpustnost nepodařilo myším podat (myši ihned po injekci hynuly). Derivát PTX-LEV neměl protinádorový efekt u lymfomu EL-4 (neprodloužil průměrné přežití, žádná myš se nevyléčila; n=8), Konjugát PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV v dávce 2x60 mg ekvivalentu PTX/kg nevyléčil žádnou myš ani neprodloužil průměrné přežití (n=8). V žádné skupině nebyl zaznamenán pokles váhy jako příznak toxicity léčiva.

Závěr: Derivát PTX-LEV (2x30 mg PTX eq./kg) ani konjugát obsahující derivát PTX (2x60 mg ekvivalentu PTX/kg) neměly při léčbě syngenního myšího lymfomu EL-4 terapeutický efekt.

Příklad 7: Ukázka in vivo biologické aktivity lineárního polymerního konjugátu paclitaxelu u myší inokulovaných karcinomem mléčné žlázy ET1 (obr. 5).

Byl použit model myšího syngenního karcinomu mléčné žlázy 4T1. Myším kmene BALB/C (samice) bylo v den 0 subkutánně implantováno 1×10^6 nádorových buněk 4T1. Léčiva byla podána intravenózně (i.v.), a to ve dvou dávkách podaných v den 8 a den 12 po transplantaci nádorových buněk. První dávka byla podána v době, kdy byly nádory dobře vyvinuté, hmatatelné, o velikosti zhruba 300 mm³. V pokusu byla sledována velikost nádorů, tělesná váha myší, celkový zdravotní stav a přežití. Efekt konjugátu byl porovnáván s efektem volného léčiva (PTX) a jeho

derivátu (PTX-LEV). Průměrné přežití neléčených kontrolních myší bylo 34,9 dní (SD 2,59; střední doba přežití 35 dní).

5 PTX, PTX-LEV a konjugát PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV byly pro i.v. aplikace připraveny stejně jak uvedeno výše (viz. Příklad 6 A, B). Aplikovány byly tyto dávky: PTX a derivát PTX-LEV v dávce 2x30 mg ekvivalentu PTX/kg, konjugát PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV v dávce 2x60 mg ekvivalentu PTX/kg.

10 Konjugát PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV úplně vyléčil 3 z 8 testovaných myší. Po aplikaci derivátu PTX-LEV došlo k regresi nádoru 4T1 u 1 z 8 myší. Aplikace volného léčiva (PTX) byla provázena významnými nežádoucími účinky: aplikace druhé dávky i.v. vyvolala prudkou reakci (křeče, později špatný celkový stav – naježená srst, ochablost, který trval nejméně 24 hodin) u první z myší. Ostatním myším ve skupině pak byla druhá dávka snížena o 10 %, a aplikována intraperitoneálně místo i.v. Vyléčila se pouze jedna myš, které byla dávka injikována i.v., u 15 ostatních se neprojevil žádný léčebný efekt PTX. V žádné pokusné skupině se neprojevovalo snížení váhy jako příznak toxicity léčiva.

Pro zjištění resistance vyléčených myší proti nádoru 4T1 byly vyléčené myši znovu transplantovány 129 dní po první transplantaci nádorových buněk. Podruhé bylo injikováno 1×10^5 buněk 4T1 s.c. a myši byly ponechány bez léčby. U všech těchto myší (3 vyléčené konjugátem PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV, 1 vyléčená PTX-LEV) nádory nerostly, to znamená že tyto 20 myši byly resistantní vůči danému nádoru.

25 Závěr: Konjugát PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV měl významný protinádorový účinek u myší BALB/C s karcinomem mléčné žlázy 4T1, jeho podání nebylo provázeno vedlejšími toxic-
kými efekty a umožnilo ustavení resistance proti nádoru u 38 % vyléčených jedinců

30 Příklad 8: Ukázal in vivo biologické aktivity lineárních polymerních konjugátů docetaxelu s různým obsahem léčiva u měření inokulovaných T buněčným lymfomem EL4 (Obr. 6)

Byl použit nádorový model lymfomu EL-4, popsáný výše (Příklad 6). Konjugáty PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV s obsahem léčiva 8,2 hmotn. % DTX (9,1 hmotn. % DTX-LEV) a 16,3 hmotn. % DTX (18,0 hmotn. % DTX-LEV) byly pro aplikaci rozpuštěny v PBS (0,2 ml) a byla 35 použita suboptimální dávka 2x30 mg ekvivalentu DTX/kg intravenózně, den 9 a 13 po transplan-
taci nádorových buněk.

40 Konjugát s nižším obsahem léčiva (8,2 % DTX) vyléčil 1 myš z 8 testovaných a u ostatních statisticky významně prodloužil přežití (neléčené kontroly průměr přežití 27,25 dne, SD 1,64, medián 28 dní; léčené myši průměr 41,75 dne, SD 6,54, medián 45 dní; $p < 0,01$). Konjugát s vyšším obsahem léčiva (16,3 % DTX) vyléčil také 1 z 8 testovaných myší, ale přežití ostatních myší ve skupině nebylo významně prodlouženo.

45 Závěr: Obsah derivátu léčiva v konjugátu PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV měl významný vliv na protinádorový účinek u myší C57BL/6 s lymfomem EL-4 při podání suboptimální dávky 2x30 mg ekvivalentu DTX/kg. Polymerní konjugát s nižším obsahem prokázal vyšší protinádorovou aktivitu.

Literatura.

50 R. Duncan, J.B. Lloyd, J. Kopeček, P. Rejmanová, J. Stohalm, K. Ulbrich, B. Říhová, V. Chytrý, Synthetic Polymeric Drugs (1985). Czech. PV 0095/85, Australia 589587, Canada 130053, Denmark 164485, Europe 0187547, US 5 037 883, Japan 000137/86.

R. Duncan, N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugates, in J. Swarbrick (ed), Drugs and the Pharmaceutical Sciences: Boca Raton, Taylor & Francis, p. 1 až 92 (2005).

- T. Etrych, M. Jelínková, B. Říhová, K. Ulbrich K., New HPMA copolymers Containing doxorubicin bound via pH sensitive linkage. Synthesis, in vitro and in vivo biological properties. *J. Controlled Release* 73, 89 až 102 (2001).
- 5 T. Etrych, P. Chytil, M. Jelínková, B. Říhová, K. Ulbrich, Synthesis of HPMA Copolymers Containing Doxorubicin Bound via a Hydrazone Linkage. Effect of Spacer on Drug Release and in vitro Cytotoxicity. *Macromolecular Biosci.* 2, 43 až 52 (2002).
- T. Etrych, P. Chytil, M. Pechar, M. Studenovský, B. Říhová, K. Ulbrich, Způsob přípravy polymerních konjugátů doxorubicinu s pH-řízeným uvolňováním léčiva, CZ 297 827 B6.
- 10 T. Etrych, P. Chytil, K. Ulbrich, T. Mrkvan, B. Říhová, Polymerní léčiva a způsob jeho výroby. CZ 298 945 B6.
- T. Etrych, K. Ulbrich: Polymerní konjugáty doxorubicinu s pH-řízeným uvolňováním léčiva a způsob jejich přípravy: CZ PV-2006-505, CZ pat. 299 053 B6.
- T. Etrych, P. Chytil, T. Mrkvan, M. Šírová, B. Říhová, K. Ulbrich, Conjugates of doxorubicin with graft HPMA copolymers for passive tumor targeting: *Journal of Controlled Release* 132, 184 až 192 (2008)
- 15 R.B. Greenwald, PEG drugs: and overview, *Journal of Controlled Release* 74, 159 až 171 (2001).
- R.B. Greenwald, Y. H. Choe, J. McGuire, C.D. Conover, Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates, *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, p. 217 až 250 (2003).
- 20 R.B. Greenwald, A. Pendri, D. Bolikal, Highly Water-Soluble Taxol Derivatives – 7–Polyethylene Glycol Carbamates and Carbonates, *Journal of Organic Chemistry* 60, 331 až 336 (1995).
- P. Chytil, T. Etrych, M. Hrubý, K. Ulbrich, B. Říhová: Micelární nosiče léčiv s protinádorovou aktivitou. CZ PV 2006-207.
- 25 P. Chytil, T. Etrych, Č. Koňák, M. Šírová, T. Mrkvan, J. Bouček, B. Říhová, K. Ulbrich, New HPMA copolymer-based drug carriers with covalently bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting, *Journal of Controlled Release* 127, 121 až 130 (2008).
- J. Kopeček, P. Kopečková, T. Minko, Z. Lu, HPMA Copolymer-Anticancer Drug Conjugates: Design, Activity and Mechanism of Action, *Europ. J. Pharm. Biopharm.* 50, 61 až 81 (2000).
- 30 J. Kopeček, P. Kopečková, T. Minko, Z. Lu, C.M. Peterson, Water soluble polymers in tumor targeted delivery, *J. Controlled Release* 74, 165 až 173 (2001).
- F. Kratz, U. Beyer, M.T. Schutte, Drug-polymer conjugates containing acid-cleavable bonds, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 16, 245 až 288 (1999).
- F. Kratz, I.A. Muller, C. Ryppa, A. Warnecke, Prudrug strategies in anticancer chemotherapy, *Chemmedchem* 3, 20 až 53 (2003).
- 35 S.Ng, A. Sparreboom, Y. Shaked, C. Lee, S. Man, N. Desai, P. Soon-Shiong, W.d. Figg, R. Korb, Influence of Formulation Vehicle on Metronomic Taxane Chemotherapy: Albumin-Bound versus Cremophor EL-Based Paclitaxel, *Clin Cancer Res* 26; 433 až 4338, 2006
- Y. Noguchi, J. Wu, R. Duncan, J. Strohalm, K. Ulbrich, T. Akaike, H. Maeda, Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues, *Jpn. J. Cancer Res.* 89, 307 až 314 (1998).
- 40 A. Pendri, C.D. Conover, R.B. Greenwald, Antitumor activity of paclitaxel-2'-glycinate conjugated to poly(ethylene glycol): a water-soluble prodrug, *Anti-Cancer Drug Design* 13, 387 až 395 (1998).
- B. Říhová, M. Jelínková, J. Strohalm, V. Šubr, D. Plocová, O. Hovorka, M. Novák, D. Plundrová, Y. Germano, K. Ulbrich, Polymeric Drugs Based on Conjugates of Synthetic and Natural Macromolecules II. Anti-cancer Activity of antibody or (Fab')₂-targeted Conjugates and Combined Therapy with Immunomodulators. *J. Controlled Rel.* 64, 241 až 261 (2000).

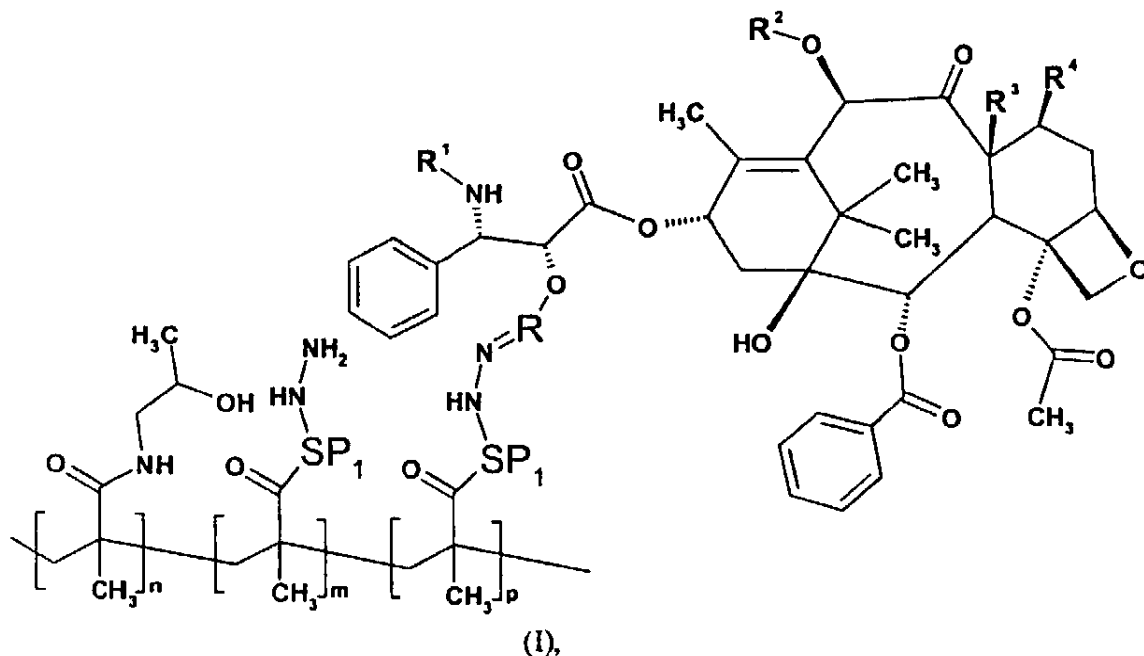
- B. Říhová, T. Etrych, M. Pechar, M. Jelínková, M. Šťastný, O. Hovorka, M. Kovář, K. Ulbrich, Doxorubicin bound to a HPMA copolymer carrier through hydrazone bond is effective also in a cancer cell line with a limited content of lysosomes, *J. Controlled Release* 74, 225 až 232 (2001)
- R. Satchi-Fainaro, R. Duncan, C. Barnes, Polymer therapeutics for cancer: Current status and future challenges, in R Satchi-Fainaro and R Duncan (eds), *Advances in Polymer Science, Polymer Therapeutics II: Berlin / Heidelberg, Springer*, p. 1 až 65 (2006).
- L. W. Seymour, Y. Miyamoto, H. Maeda, M. Brereton, J. Strohalm, K. Ulbrich, R. Duncan, Influence of Molecular-Weight on Passive Tumor Accumulation of A Soluble Macromolecular Drug Carrier, *Eur. J. Cancer* 31A, 766 až 770 (1995).
- J.M.M. Terwogt, W.T. Huinink, J.H.M. Schellens, M. Schot, I.A.M. Mandjes, M. Zurlo, M. Rocchetti, H. Rosing, F.J. Koopman, J.H. Beijnen, Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel, *Anti-Cancer Drugs* 12, 315 až 323 (2001).
- J.M.M. Terwogt, H. Rosing, M. Rocchetti, E. Frigerio, D. Fraier, F.J. Koopman, J.H.M. Schellens, W.T. Huinink, J.H. Beijnen, High-performance liquid chromatographic methods for the determination of a novel polymer-bound paclitaxel derivative and free paclitaxel in human plasma, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23, 1233 až 1251 (2000).
- K. Ulbrich, V. Šubr, J. Strohalm, D. Plocová, M. Jelínková, B. Říhová, Polymeric Drugs Base on Conjugates of Synthetic and Natural Macromolecules I. Synthesis and Physico-chemical Characterisation *J. Controlled Rel.* 64, 63 až 79 (2000)
- K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelínková, B. Říhová, Antibody-Targeted Polymer-Doxorubicin Conjugates with pH-Controlled Activation. *J. Drug Targeting* 12, 477 až 489 (2004) (A).
- K. Ulbrich, V. Šubr, Polymeric Anticancer Drugs with pH-Controlled Activation, *Adv. Drug Delivery Rev.* 56/7, 1025 až 1052 (2004) (B).
- K. Ulbrich, T. Etrych, B. Říhová, M. Jelínková, M. Kovář: pH Senzitivní polymerní konjugáty atracyklinového kancerostatika pro cílenou terapii. CZ 293 787 YB6
- U. Vanhoefer, et al., Comparative antitumor efficacy of docetaxel and paclitaxel in nude mice bearing human tumor xenografts that overexpress the multidrug resistance protein (MRP), *Annals of Oncology* 8, 1221 až 1228 (1997).
- J. W. Winter, Paclitaxel poliglumex (XYOTAX, CT-2103): A macromolecular taxane, *Journal of Controlled Release* 109, 120 až 126 (2005).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polymerní konjugát sestávající ze základního kopolymeru a na tento kopolymer hydrazovanou vazbou kovalentně vázaného derivátu léčiva, kde základní kopolymer je vytvořen monomerními jednotkami N-2-hydroxypropylmethakrylamidu (HPMA) a monomerními jednotkami na aminoskupině methakryloylované aminokyseliny nebo na aminoskupině methakryloylovaného oligopeptidu, kde acyl aminokyseliny tvořící součást monomerní jednotky nebo složený acyl oligopeptidu tvořícího součást monomerní jednotky je vybrán ze skupiny sestávající z glycyly, glycylglycyly, beta-alanyly, 6-aminohexanoyly (AH), 4-aminobenzoyly, GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyPheLeuGly,
- vyznačující se tím, že**
- derivát léčiva je sloučenina léčiva vybraného ze skupiny složené z paclitaxelu (PTX), docetaxelu (DTX) vzniklá acylací hydroxylové skupiny v pozici 2 léčiva oxokyselinou mající 5 až 10 uhlíkových atomů a hydrazonová vazba je vytvořena mezi uhlíkovým atomem původně nesoucím

karbonylovou skupinu oxokyseliny a koncovým dusíkovým atomem hydrazidové skupiny základního kopolymeru.

2. Konjugát podle nároku 1 obecného vzorce I

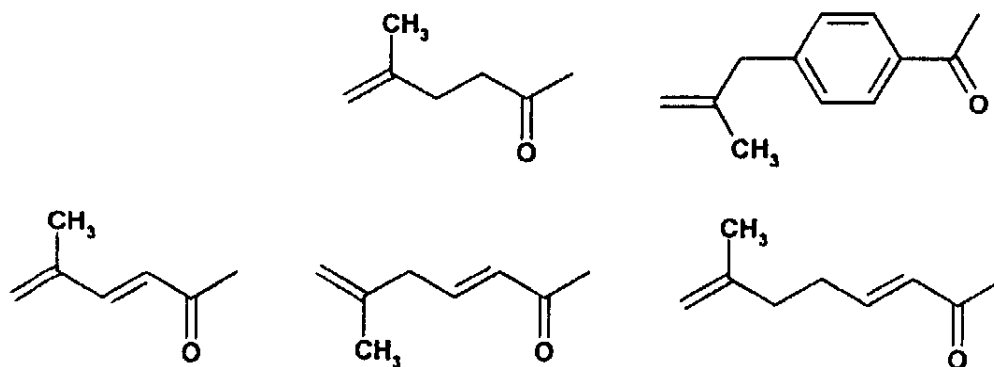


kde symbol SP_1 představuje na aminoskupině methakryloylovanou aminokyselinu nebo na aminoskupině methakryloylovaný oligopeptid, n , m a p jsou přirozená čísla a symboly R^1 až R^4 představují substituenty tvořící jednu ze skupin a), b), c), kde

a) R^1 = benzoyl, R^2 = acetyl, R^3 = methyl, R^4 = hydroxy, takže derivát léčiva je derivátem paclitaxelu,

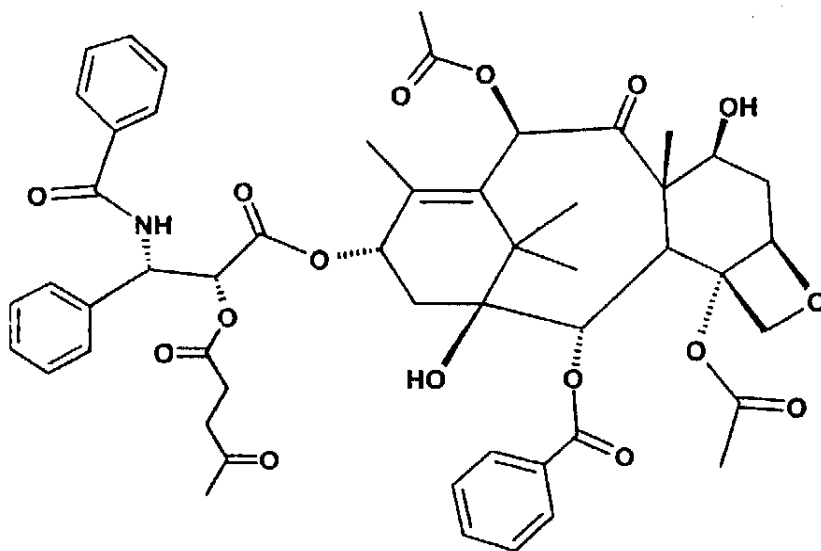
b) R^1 = tert-butoxykarbonyl, R^2 = H, R^3 = methyl, R^4 = hydroxy, takže derivát léčiva je derivátem docetaxelu,

vyznačující se tím, že oxokyselina je vybrána ze skupiny složené z kyseliny levulové, 4-(2-oxopropyl)benzoové, 4-oxo-pent-2-enové, 5-oxo-hex-2-enové a 6-oxo-hept-2-enové, takže symbol = R- znamená



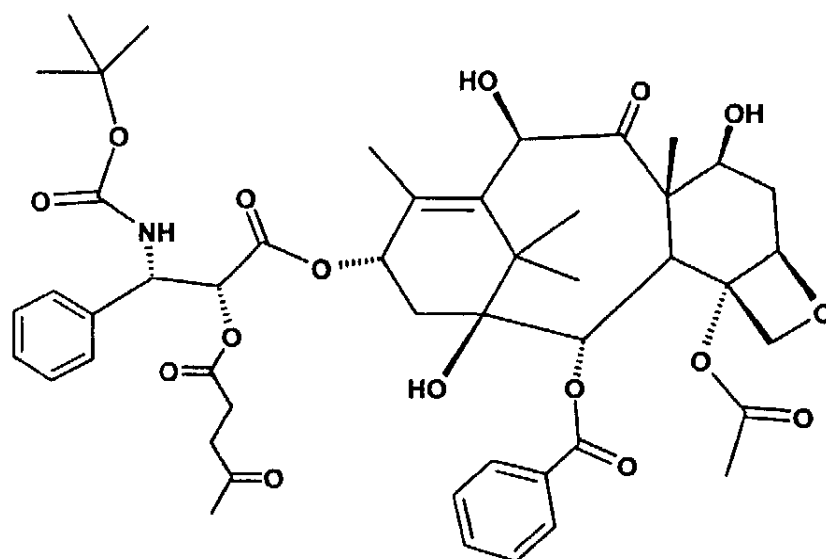
3. Konjugát podle některého z předchozích nároků **vyznačující se tím**, že monomerní jednotky HPMA tvoří 70 až 98 molárních %, monomerní jednotky s hydrazidovými funkčními skupinami 1,5 až 29,5 molárních % a jednotky s navázaným derivátem cytostatika 0,5 až 10 molárních % všech monomerních jednotek konjugátu.

4. Konjugát podle některého z předchozích nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že sestává z hlavního řetězce nesoucího léčivo a dalších řetězců–roubů, které případně rovněž nesou léčivo, přičemž tyto rouby jsou k hlavnímu řetězci připojeny vazbou v organismu štěpitelnou.
5. Konjugát podle některého z předchozích nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že pokud je lineární, spadá jeho molární hmotnost do intervalu 10 000 až 50 000 g/mol a pokud je roubovaný, spadá jeho molární hmotnost do intervalu 50 000 až 250 000 g/mol.
6. Způsob přípravy polymerního konjugátu definovaného některým z nároků 1 až 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se radikálovou kopolymerací připraví základní kopolymer nesoucí hydrazidové funkční skupiny a na ten se připojí derivát léčiva podle nároku 1 reakcí karbonylové skupiny oxokyseliny s hydrazidovou skupinou základního kopolymeru.
7. Derivát léčiva jak je definován v nároku 1 vybraný ze skupiny



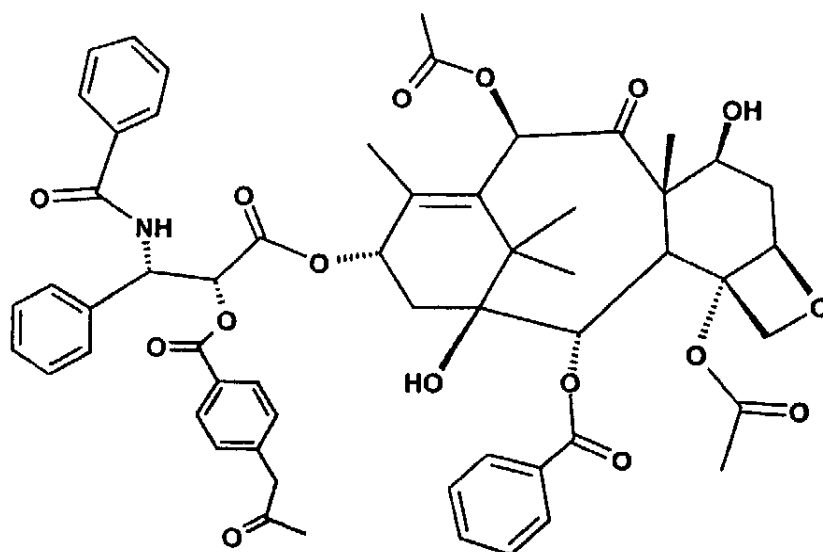
LEV-PTX

(1S,2S,3R,4S,7R,9S,10S,12R,15S)–4,12–Diacetoxy–15–{[(2R,3S)–3–(benzoylamino)–2–(4–oxo pentanoyloxy)–3–fénylpropanoyl]oxy}–1,9–dihydroxy–10,14,17,17–tetramethyl–11–oxo–6–oxa–tetracyklo–[heptadec–13–en–2–yl–benzoát],



LEV-DTX

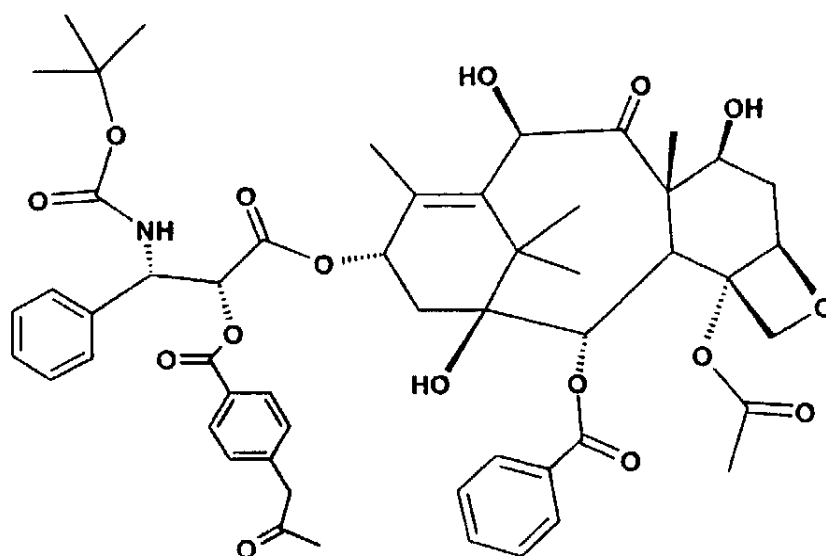
- 5 1,7 β ,10 β -trihydroxy-9-oxo-5 β ,20-epoxytax-11-en-2 α ,4,13 α -triyl-4-acetát-2-benzoát-13-
 {(2R,3S)-3-[(tert-butoxykarbonyl)amino]-2-(4-oxo-pentanoyloxy)-3-fenylpropanoát},



10 OPB-PTX

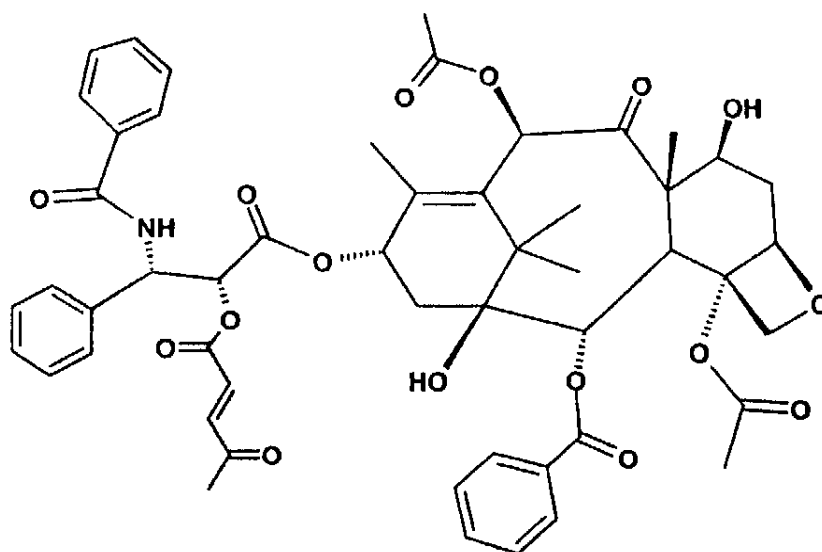
- (1S,2S,3R,4S,7R,9S,10S,12R,15S)-4,12-Diacetoxy-15-[[{(2R,3S)-3-(benzoylamino)-2-[4-(2-oxopropyl)benzoyloxy]-3-fenylpropanoyl]oxy}-1,9-dihydroxy-10,14,17,17-tetramethyl-11-oxo-6-oxatetracyklo-[heptadec-13-en-2-yl]-benzoát],

15



OPB-DTX

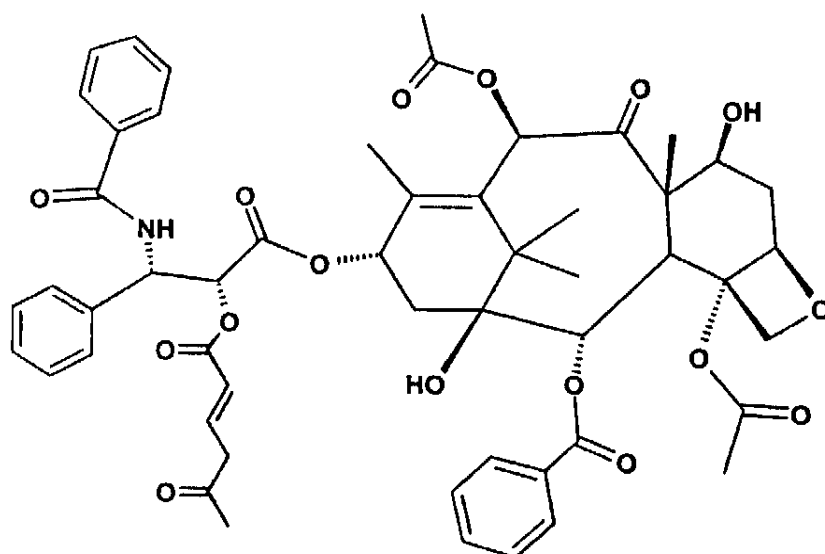
- 5 1,7 β ,10 β -trihydroxy-9-oxo-5 β ,20-epoxytax-11-en-2 α ,4,13 α -triyl-4-acetát-2-benzoát-13-
 {(2R,3S)-3-[(tert-butoxykarbonyl)amino]-2-[4-(2-oxopropyl)-benzoyloxy]-3-fenylpropa-
 noát},



10

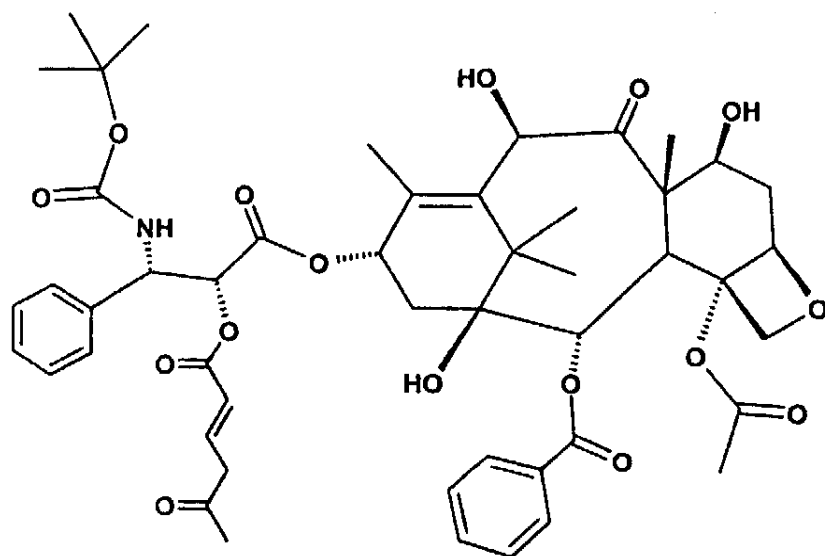
AAK-PTX

- (1S,2S,3R,4S,7R,9S,10S,12R,15S)-4,12-Diacetoxy-15-{{(2R,3S)-3-(benzoylamino)-2-[4-
 15 oxopent-2-enoyloxy]-3-enoyloxy]-3-fenylpropanoyl]-oxy}-1,9-dihydroxy-10,14,17,17-tetra-
 methyl-11-oxo-6-oxatetracyklo-[heptadec-13-en-2-yl]-benzoát},



OHE-PTX

- 5 (1S,2S,3R,4S,7R,9S,10S,12R,15S)-4,12-Diacetoxy-15-[[[(2R,3S)-3-(benzoylamino)-2-[4-oxohex-2-enoyloxy]-3-phenylpropanoyl]oxy]-1,9-dihydroxy-10,14,17,17-tetramethyl-11-oxo-6-oxatetracyclo-[heptadec-13-en-2-yl]-benzoát],



OHE-DTX

1,7β,10β-trihydroxy-9-oxo-5β,20-epoxytax-11-en-2α,4,13α-triyl-4-acetát-2-benzoát-13-
 15 {(2R,3S)-3-[(tert-butoxykarbonyl)amino]-2-[4-oxohex-2-enoylxy]-3-phenylpropanoát}.

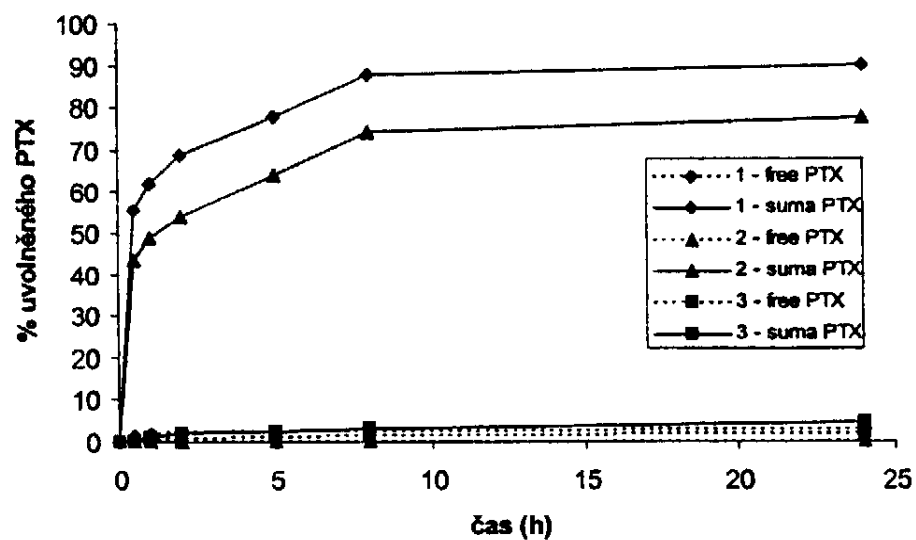
8. Použití polymerního konjugátu podle některého z nároků 1 až 5 k přípravě léčiva pro léčbu
 solidních nádorů při maligních onemocněních v humánní medicíně.

3 výkresy

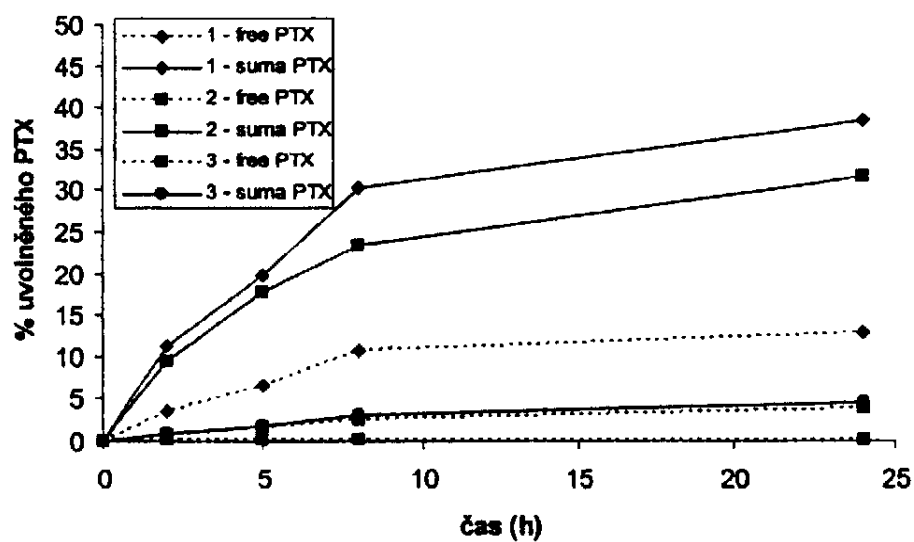
1 - PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV

2 - PHPMA-AH-NH-N=PTX-OPB

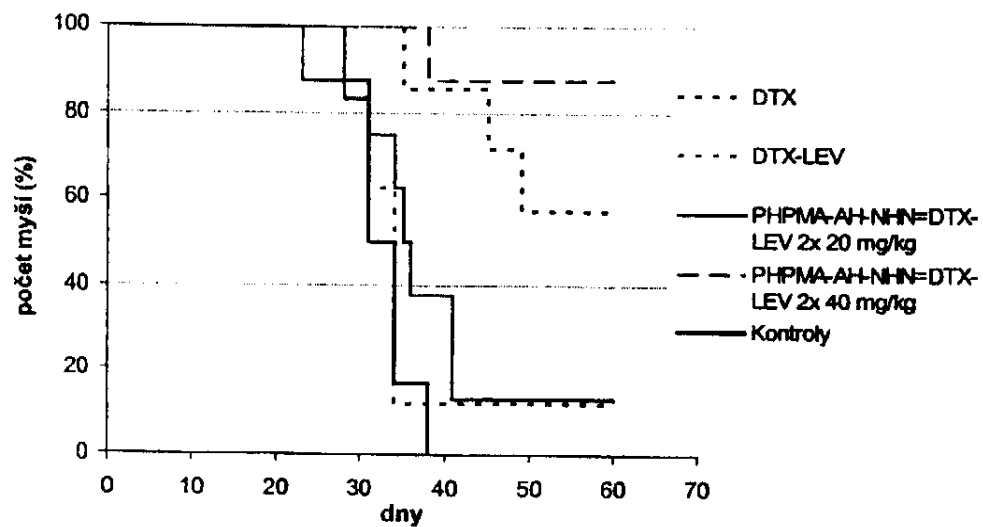
3 - PHPMA-AH-NH-N=PTX-AAK



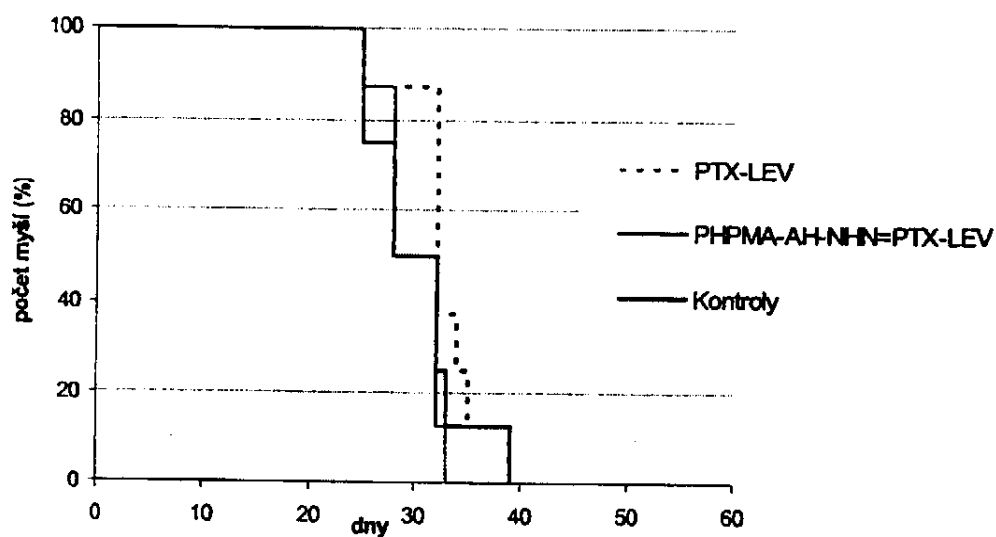
Obr. 1



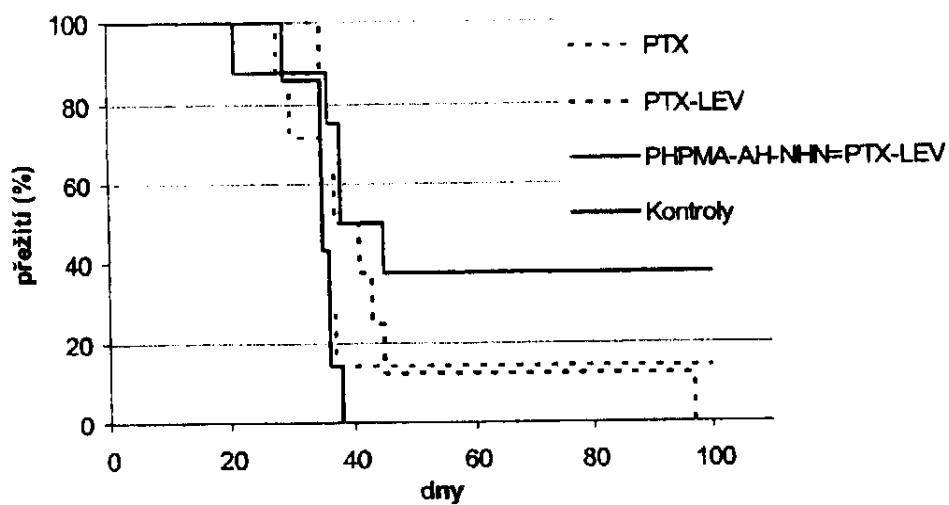
Obr. 2



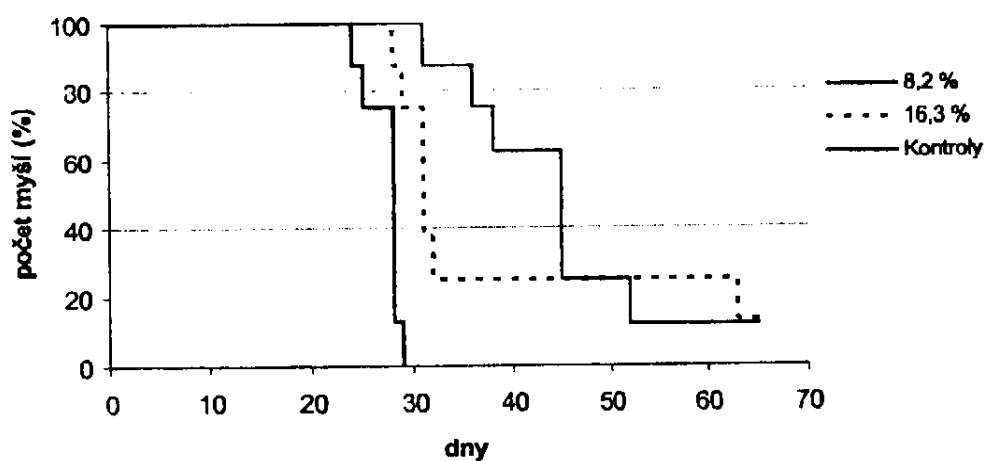
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6

Konec dokumentu