

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998-2908**
(22) Přihlášeno: **11.03.1997**
(30) Právo přednosti: **12.03.1996 US 1996/13184**
(40) Zveřejněno: **14.07.1999**
(Věstník č. 7/1999)
(47) Uděleno: **02.04.2007**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **16.05.2007**
(Věstník č. 20/2007)
(86) PCT číslo: **PCT/US1997/003687**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1997/033552**

(11) Číslo dokumentu:

297 979

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)
A61M 36/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
US 4 356 166 B; US 5 362 831; US 5 473 055; WO 93/24476 A.

(73) Majitel patentu:
PG-TXL COMPANY, L. P., Houston, TX, US

(72) Původce:
Li Chun, Missouri City, TX, US
Wallace Sidney, Houston, TX, US
Yu Dong-Fang, Houston, TX, US
YANG David J., Houston, TX, US

(74) Zástupce:
JUDr. Pavel Zelený, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:
**Kompozice obsahující protinádorové léčivo
konjugované s ve vodě rozpustným polymerem,
její použití pro výrobu léčiva a implantovatelná
lékařská pomůcka**

(57) Anotace:
Je popsána kompozice obsahující protinádorové léčivo konjugované s polymerem ve vodě rozpustným, kde protinádorovým léčivem je paclitaxel, docetaxel, etoposid, teniposid, camptothecin nebo epothilon a ve vodě rozpustným polymerem je poly(l-glutamová kyselina), poly(d-glutamová kyselina), poly(dl-glutamová kyselina), poly(d-asparagová kyselina), poly(l-asparagová kyselina), poly(dl-asparagová kyselina), polyakrylová kyselina, poly(2-hydroxyethyl-1-glutamin), karboxymethyl-dextran, hyaluronová kyselina, lidský sérový albumin, alginová kyselina nebo jejich kombinace; použití takové kompozice pro výrobu léčiva pro léčení rakoviny, systémového autoimunitního onemocnění, arteriální restenózy nebo arteriální okluze po vaskulárním traumatu, jakož i implantovatelné lékařské pomůcky, zvláště stent.

CZ 297979 B6

Kompozice obsahující protinádorové léčivo konjugované s ve vodě rozpustným polymerem, její použití pro výrobu léčiva a implantovatelná lékařská pomůcka

5 Oblast techniky

Tento vynález se týká kompozice obsahující přesně vymezené protinádorové léčivo konjugované s polymerem ve vodě rozpustným, použití takové kompozice pro výrobu léčiva pro léčení rakoviny, systémového autoimunitního onemocnění, arteriální restenozy nebo arteriální okluze po vaskulárním traumatu, jakož i implantovatelné lékařské pomůcky, zvláště stentu.

Dosavadní stav techniky

15 Paclitaxel, antimikrotubulový přípravek extrahovaný z jehličí a kůry tisu krátkolistého, *Taxus brevifolia*, má prokazatelně antineoplastický účinek při pokusech na lidech trpících rakovinou ve stadiu I a časně fázi II a III (Horwitz a kol., 1993). To bylo popsáno nejprve u pokročilé rakoviny vaječníků a prsu. Signifikantní účinek byl zjištěn u malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu hlavy a krku a metastázujícího melanomu. Největším nedostatkem vývoje paclitaxelu pro zkoušky klinického použití je však jeho nerozpustnost ve vodě.

Docetax je semisynteticky vyráběn z 10-deacetylu bacatinu III, necytotoxického prekurzoru, který je extrahován z jehličí *Taxus baccata* a esterifikován pomocí chemicky syntetizovaného postranního řetězce (Cortes a Pazdur, 1995). Různé linie nádorových buněk včetně karcinomu prsu, plic, ovarií a kolorektálního karcinomu a melanomů jsou citlivé na doxorubicin. Při klinických testech se docetaxel používá k dosažení úplné nebo parciální odezvy na karcinom prsu, ovarií, hlavy a krku a maligního melanomu.

Paclitaxel je typicky připraven jako koncentrovaný roztok obsahující 6 mg paclitaxelu na 1 mililitr Cremophoru EL (polyoxyethylenový ricinový olej) a dehydratovaného alkoholu (50 % objemových) a před použitím musí být nejprve rozředěn (Goldspiel, 1994). Množství Cremophoru EL, který je nutno dodat k požadované dávce paclitaxelu, je signifikantně vyšší než množství, které je podáváno s jinou terapeutickou látkou, která je formulována s Cremophorem. Cremophoru je přisuzováno mnoho toxických účinků, včetně vazodilatace, dušnosti a hypotenze. Toto vehikulum také vykazuje silnou hypersenzitivitu u laboratorních zvířat a lidí (Weis a kol., 1990). Ve skutečnosti maximální dávka paclitaxelu, která může být podána myši injekčně v i.v. bolusu je dána akutní letální toxicitou Cremophorového vehikula (Eiseman a kol., 1994). Cremophor EL, surfaktant, je kromě toho znám vyluhováním ftalátových plastifikátorů, jako di-(2-ethylhexyl)ftalátu (DEHP) z polyvinylchloridových pytlíků a i.v. zavedených kanyl. Je známo, že DEHP je příčinou hepatotoxicity u zvířat a je karcinogenní u hlodavců. Ukazuje se také, že při tomto způsobu přípravy paclitaxelu časem vznikají pevné kousky, a proto je před podáním nutno látku přefiltrovat (Goldspiel, 1994). Proto se pro přípravu a podání paclitaxelových roztoků vyžadují speciální procedury k zajištění bezpečného dodání léčivé látky pacientovi, které nevyhnutelně vedou k vysokým nákladům.

45 Předchozí pokusy získat ve vodě rozpustný paclitaxel zahrnovaly přípravu prekurzoru paclitaxelu pomocí umístění solubilizující části jako je sukcinát a aminokyselin na 2-hydroxyskupinu nebo 7-hydroxyskupinu (Deutsch a kol., 1989; Methew a kol., 1992). Dosud se však tyto prekurzory neukázaly dostatečně chemicky stabilní pro vývoj. Deutsch a kol. (1989) například popsal 2-sukcinátový derivát paclitaxelu, ale rozpustnost ve vodě jeho sodné soli je asi jen 0,1% a Triethanolaminová a N-methylglukaminová sůl jsou rozpustné asi jen z 1 %. Kromě toho estery aminokyselin jsou uvedeny jako nestabilní. Podobné výsledky byly popsány i Mathewem a kol. (1992). Grienwald popsal syntézu ve vodě vysoce rozpustných 2'- a 7-polyethylenglykolových esterů taxolu (Grienwald a kol., 1994). U těchto sloučenin však nebyly popsány údaje týkající se antitumorového účinku těchto sloučenin in vivo (Grienwald a kol. 1995).

Další pokusy o vyřešení tohoto problému zahrnovaly opouzdření paclitaxelu jak do liposomů, tak do nanosfér (Bartoni a Boitard, 1990). Uvádí se, že liposomové formulace jsou tak účinné, jako volný paclitaxel, ale jen liposomové formulace, které obsahují méně než 2 % paclitaxelu, jakou fyzikálně stabilní (Sharma a Streubinger, 1994). Na neštěstí se ukazuje, že nanosferové formulace jsou toxické. Proto existuje stále potřeba ve vodě rozpustné paclitaxelové formulace, která je schopna dopravit účinné množství paclitaxelu a docetaxelu bez nevýhod způsobených nerozpustností léčiva látky.

Další překážkou širokého použití paclitaxelu jsou limitované zdroje, z kterých je paclitaxel produkován, co způsobuje, že terapie paclitaxelem je nákladná. Cena léčení může přijít například na několik tisíc dolarů. Další nevýhodou je, že ne všechny tumory odpovídající na paclitaxelovou léčbu, což může být způsobeno tím, že se paclitaxel nedostane do nádorové tkáně. Proto je bezprostřední potřeba účinných formulací paclitaxelu a s nimi příbuzných léků, které by byly rozpustné ve vodě s dlouhým poločasem séra pro léčení tumorů a autoimunitních onemocnění, jako je revmatická artritida, stejně jako pro prevenci restenózy cév, které byly vystaveny poranění, jako při angioplastice a stentingu.

Patent US 5 473 055, patent US 5 362 831, dokument WO 94/00156, dokument WO 93/24476 a patent US 4 356 166 nejen nepopisují, ale dokonce ani nenaznačují konjugáty léčiva s polymerem. Nikde se neuvádí nebo alespoň vzdáleně nenaznačuje použití kompozice založené na takových konjugátech.

Patent US 5 362 831, patent US 5 473 055 a dokument WO 94/00156 patří do stejné patentové rodiny. Patent US 5 473 055 byl udělen na vyloučenou část z patentové přihlášky, na kterou byl později udělen patent US 5 362 831. Patent US 5 473 055 chrání konjugát paclitaxelu „vzorce II“, zatímco patent US 5 362 831 chrání konjugát paclitaxelu „vzorce I“. Tyto patenty popisují, že konjugáty polymeru mohou zlepšit rozpustnost paclitaxelu ve vodě. Žádný z polymerů, se kterými je paclitaxel konjugován, jak je popsáno v jakémkoli z těchto patentů, není součástí konjugátu, který je popsán v části týkající se předmětného vynálezu.

Naproti tomu ve výše zmíněných patentech je uvedeno, že konjugát polymeru obsahuje jako kopolymer 1-methakroylamino-2-hydroxypropan, (methakroylglycylfenylalanylleucylglycyl)-3-amino-2-hydroxypropan a 2'-(methakroylglycylfenylalanylleucylglycyl-β-alanyl)paclitaxel (viz sl. 2, řádky 28 až 34 z patentu US 5 362 831 a sl. 2, řádky 34 až 38 z patentu US 5 473 055). Zvláště je uveden kopolymer 1-methakroylamino-2-hydroxypropanu, 1-(methakroylglycylfenylalanylleucylglycyl)amino-2-hydroxypropanu a 2'-(methakroylglycylfenylalanylleucylglycyl)paclitaxelu, 2'-(N-tritylphenylalanylleucylglycyl) paclitaxel, 2'-(fenylalanylleucylglycyl)paclitaxel, kopolymer 1-methakroylamino-2-hydroxypropanu, 1-(methakroylglycyl)amino-2-hydroxypropanu a 2'-(methakroylglycylfenylalanylleucylglycyl)paclitaxelu, kopolymer 1-methakroylamino-2-hydroxypropanu, 1-(methakroylglycyl)amino-2-hydroxypropanu a 2'-(methakroylglycyl)paclitaxelu, kopolymer 1-methakroylamino-2-hydroxypropanu, 1-(methakroylglycyl)amino-2-hydroxypropanu a 2'-(methakroylglycyl)paclitaxelu, 2',7-di(karbobenzyl oxy-β-alanyl)paclitaxel, 7-(karbobenzyl oxy-β-alanyl)paclitaxel a 7-(β-alanyl)paclitaxel.

Údaje obsažené v předchozím odstavci se také v přiměřené míře týkají dokumentu WO 94/00156, kde je popsán taxol konjugovaný s polymerem rozpustným ve vodě, jako je PEG, polyvinylalkohol, polyhydroxyethyl-methakrylát, polyakrylamid, kyselina polyakrylová, polyethyloxazolin, polyvinylpyrrolidinon a polysacharidy, jako chitosa, algináty, kyselina hyaluronová, dextransy atd. (viz str. 4, řádky 25 až 29 a str. 7, řádky 10 až 20).

Žádný z popsaných polymerů neodpovídá polymerům, které jsou obsaženy v nárocích tohoto patentu. V dokumentu WO 93/24476 není také nikde navrženo, aby nyní zde nárokované polymery byly konjugovány s kterýmkoli z léčiv majících protinádorový účinek.

- 5 V patentu US 4 356 166 je navrženo implantační zařízení pro řízení rychlosti uvolňování léčiv za použití „polymerního systému“, která má proměnný stupeň hydrofilnosti a různé náplně léčiva.

Podle patentu US 4 356 166 se může používat kyselina poly-(L-glutamová) a kyselina poly-(L-asparagová) jako výhodné „kondenzační polymery“, ale je uvedeno upozornění, že polymery
10 vysoce rozpustné ve vodě jsou obecně nežádoucí. Jak je tomu proto, že patent US 4 356 166 uvádí, že takové polymery mohou vytvářet problémy s toxicitou a mohou ovlivňovat rychlost absorpce biologicky aktivní sloučeniny, se kterou jsou vázány.

V patentu US 4 356 166 není zmíněno žádné z léčiv popsaných v předmětném vynálezu, tedy
15 paclitaxel, docetaxel, etoposid, teniposid, camptothecin nebo epothilon.

Vše, co patent US 4 356 166 uvádí o společně vázaných „biologicky aktivních sloučeninách“, je že sloučeniny musejí patřit do skupiny, která vytváří vazby se sousedící nebo prostorovou skupinu. Konkrétně je uvedeno, že „vazba je výhodně hydrolyzovatelná a zvláště jde o vazby esterů,
20 včetně sulfátových nebo fosfátových esterů, amidů, karbonátů a urethanů“. Jednu skupinu takových biologicky aktivních sloučenin tvoří progestiny.

Nikde v patentu US 4 356 166 není popsáno nebo alespoň specificky navrženo konjugování polymeru rozpustného ve vodě s alespoň jedním léčivem s protinádorovým účinkem. Ve skutečnosti v patentu US 4 356 166 není rovněž zmíněno jakékoli léčivo s protirakovinným nebo
25 protinádorovým účinkem.

Implantace stentu pro léčení onemocnění koronární artérie je běžná procedura. Intraluminální koronární stent je malá samoexpandující kovová trubička s okem, která se umístí do koronární
30 artérie pro dosažení otvoru v řečišti. Může se používat při chirurgickém zhotovení by-passu, po balónové angioplastice pro zabránění opětovného uzavření krevního řečiště nebo během jiných srdečních operací.

Stent uvolňující léčivo tvoří trubička s okem, povlečená léčivem (sirolimus nebo paclitaxel),
35 které zabraňuje restenóze. Tento stent je určen pro použití během angioplastiky. Ponechává se v artérii a pomalu uvolňuje léčivo, které brání vytváření tkáně, jež by vedla k restenóze.

Tento vynález se pokouší překonat výše uvedené a další nevýhody dosavadního stavu techniky.

40

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je kompozice obsahující protinádorové léčivo konjugované s polymerem ve vodě rozpustným, jehož podstata spočívá v tom, že protinádorovým léčivem je
45 paclitaxel, docetaxel, etoposid, teniposid, camptothecin nebo epothilon a ve vodě rozpustným polymerem je poly(l-glutamová kyselina), poly(d-glutamová kyselina), poly(dl-glutamová kyselina), poly(D-asparagová kyselina), poly(l-asparagová kyselina), poly(dl-asparagová kyselina), polyakrylová kyselina, poly(2-hydroxyethyl-l-glutamin), karboxymethyldextran, hyaluronová kyselina, lidský sérový albumin, alginová kyselina nebo jejich kombinace.

50

Výhodnou formou tohoto vynálezu je svrchu uvedená kompozice jejíž protinádorové léčivo je vybráno z paclitaxelu, docetaxelu a camptothecinu.

Výhodnou formou tohoto vynálezu je svrchu uvedená kompozice, jejíž polymer je dále definován
55 jako kopolymer poly(2-hydroxyethyl-l-glutaminu), karboxymethyldextranu, hyaluronové

kyseliny, lidského sérového albuminu, polyalginové kyseliny nebo jejich kombinace s polykaprolaktonem, kyselinou polyglykolovou a kyselinou polymléčnou.

Jinou výhodnou formou tohoto vynálezu je svrchu uvedená kompozice, jejíž polymer má molekulovou hmotnost od přibližně 5000 do zhruba 100 000, s výhodou od přibližně 20 000 do zhruba 80 000.

Jinou výhodnou formou tohoto vynálezu je svrchu uvedená kompozice, jejíž ve vodě rozpustný polymer je konjugován s 2'– nebo se 7–hydroxypaclitaxelem nebo docetaxelem.

Jinou výhodnou formou tohoto vynálezu je svrchu uvedená kompozice, která obsahuje od 2 do 35 % hmotnostních protinádorového léčiva.

Ještě jinou výhodnou formou tohoto vynálezu je svrchu vedená kompozice, jejíž ve vodě rozpustným polymerem je poly(l–glutamová kyselina), poly(d–glutamová kyselina), poly(dl–glutamová kyselina), poly(d–asparagová kyselina), poly(l–asparagová kyselina) nebo poly(dl–asparagová kyselina).

Předmětem tohoto vynálezu je dále použití svrchu uvedené kompozice pro výrobu léčiva pro léčení rakoviny, systémového autoimunitního onemocnění, arteriální restenózy nebo arteriální okluze po vaskulárním traumatu.

Při výhodném předmětném použití je rakovinou rakovina prsu, vaječníků, maligní melanom, plicní rakovina, rakovina žaludku, rakovina tračniku, rakovina hlavy a hrdla, leukémie nebo Kaposiho sarkom.

Předmětem tohoto vynálezu je konečně implantovatelná lékařská pomůcka, zvláště stent, jehož podstata spočívá v tom, že je povlečena kompozicí obsahující paclitaxel konjugovaný s polymerem rozpustným ve vodě vymezeným svrchu v množství účinném pro inhibici proliferace buněk hladkého svalstva.

Dále se uvádějí podrobnější údaje, které souvisejí s předmětnými řešeními.

Poskytnutí kompozic (dále též přípravků) obsahujících chemiterapeutika a antiangiogenní látky, jako je například paclitaxel nebo docetaxel konjugovaný s ve vodě rozpustným polymerem, jako je například polyglutamová či polyasparagová kyselina. Podobných výsledků lze dosáhnout, pokud se nahradí ve vodě rozpustné polymery ve vodě rozpustnými cheláty (chelátotvornými činidly, též chelátory) kovu. Kompozice podle vynálezu jsou překvapivě účinné jako protinádorové prostředky (dále též přípravky) působící proti příkladným tumorovým modelům a očekává se, že jsou přinejmenším tak účinné, jak paclitaxel nebo docetaxel proti jakýmkoli chorobám nebo stavům, pro které je známo, že proti nim jsou účinné taxany a taxoidy. Kompozice podle tohoto vynálezu poskytují ve vodě rozpustné taxoidy, které překonávají nevýhody spojené s nerozpustností samotné léčivé látky a tak skýtají výhody z řízeného uvolňování aktivní látky tak, že tumory zde ukázané jsou odstraněny na zvířecích modelech po jednom intravenózním podání.

Metody vyplývající z předloženého popisu mohou být použity k výrobě ve vodě rozpustných polymerních konjugát, kontrastních látek a dalších léčiv, mezi které je zahrnut etoposid, teniposid, fludarabin, doxorubicin, daunomycin, emodin, 5–fluorouracil, FUDR, estradiol, kamptotecin, retinové kyseliny, verapamin, epotilony a cyklosporin. Zvláště látky s volnou hydroxyskupinou mohou být konjugovány s polymery pomocí podobných chemických reakcí, které je zde dále popsány pro piclitaxel. Konjugace tohoto typu je dobře známa odborně vzdělaným rutinním praktikům z chemického oboru. Takové léčiva zahrnují, aniž by byly na ně omezeny, etoposid, teniposid, kamptotecin a epotilony.

Pokud se zde používá výrazu konjugován s polymerem ve vodě rozpustným, tento výraz znamená kovalentní vázání terapeutické látky k polymeru nebo chelátu.

Je třeba vzít v úvahu, že ve vodě rozpustné konjugáty podle tohoto vynálezu mohou být podávány společně s jinými léky včetně protinádorových nebo protirakovinných léků. Takové kombinace jsou známy v oboru. Ve vodě rozpustný paclitaxel a docetaxel podle tohoto vynálezu může být v určitých typech léčby kombinován s platinovými léky, antibiotiky, jako je doxorubicin nebo daunorubicin, nebo léky, které jsou používány v kombinaci s taxolem.

Konjugace chemoterapeutických léčiv k polymerům je vhodným postupem, jak redukovat systémovou toxicitu a zvýšit terapeutický index. Polymery s molekulární hmotností větší než 30 kDa nedostatečně difundují přes normální kapilární stěnu a glomerulární endotelium, což ušetří normální tkáň před nežádoucí toxicitou způsobenou léčivem (Maeda a Matsumura, 1989; Reynolds, 1995). Naproti tomu je známo, že maligní tumory často rozrušují kapilární endotel a zvyšují kapilární permeabilitu oproti normálně vyskularizované tkáni (Maeda a Matsumura, 1989; Fidler a kol, 1987). Tento konjugát polymer–lék, který by se normálně mohl udržovat na vaskulatuře, může selektivně pronikat z krevních cév do nádorů, což má za výsledek akumulaci určitého terapeutického množství léčiva v tumoru. Kromě toho konjugáty polymer–lék mohou působit jako depotní léčiva pro vhodné uvolnění, čímž působí prodloužené vystavení buněk tumoru léku. Konečně ve vodě rozpustné polymery mohou být používány ke stabilizaci léčiva, stejně jako k solubilizaci jiných nerozpustných sloučenin. Nyní existuje mnoho syntetických i přírodních polymerů, které byly vyzkoušeny na svou schopnost zvyšovat dodávání specifického léčiva do tumoru (Kopeček, 1990; Maeda a Matsumura, 1989). Avšak pouze několik z nich bylo podrobeno klinickému testování, například v SMANCS v Japonsku a HPMa–Dox ve Velké Británii (Maeda, 1991; Kopeček a Kopeckova, 1993).

Nyní bylo zjištěno, že taxoidem je třeba rozumět sloučeniny, které zahrnují paclitaxel a docetaxel a další chemické látky, které mají taxanový skelet (Cortez a Pazdur, 1995) a mohou být izolovány přírodních zdrojů jako je tis okrouhlolistý, nebo z buněčné kultury nebo jde o chemicky syntetizované molekuly. Patří mezi ně sloučeniny s chemickým vzorcem $C_{47}H_{51}NO_4$ včetně 6,12b-bis(acetyloxy)-12-(benzyloxy)-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-dodekahydro-4,11-dihydroxy-4a,8,13,13-tetramethyl-5-oxo-7,11-metano-1H-cyklodeka[3,4]benz-[1,2-b]oxet-9-ylesteru [2aR-[2a α ,4 β ,4 $\alpha\beta$,6 β ,9 α (α R*, β S*),11 α ,12 α ,12 α ,12b α]]- β -(benzoylamino)- α -hydroxybenzenpropionové kyseliny. Je třeba rozumět, že paclitaxel a docetaxel jsou každý účinnější než jiné určité specifické typy působící proti nádorům a že se při provádění tohoto vynálezu ty tumory, které jsou citlivější na zvláštní taxoid, mohou být také léčeny ve vodě rozpustným konjugátem taxoidu.

Při provádění, kdy paclitaxel je konjugován s kovovým chelátorem rozpustným ve vodě, kompozice může dále zahrnovat chelátový kovový iont. Tento chelátový iont podle tohoto vynálezu může být v iontové formě kteréhokoli z dále uvedených kovů, kterými je hliník, bor, vápník, chrom, kobalt, měď, dysprosium, erbium, europium, gadolinium, gallium, germanium, holmium, indium, iridium, železo, hořčík, mangan, nikl, platina, rhenium, rubidium, ruthenium, samarium, sodík, technecium, thallium, cín, yttrium nebo zinek. V určitých výhodných případech chelátovým kovovým iontem bude radionuklid, tzn. radioaktivní izotop některého ze zmíněných prvků. Mezi ně patří například ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y , $^{114\text{m}}\text{In}$ a $^{139\text{m}}\text{Pt}$, na které výčet není omezen.

Mezi vhodné ve vodě rozpustné cheláty k použití podle tohoto vynálezu patří diethyletri-aminpentaacetová kyselina (DTPA), ethylendiamintetraacetová kyselina (EDTA), 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N,N',N'',N'''-tetraacetát (DOTA), tetraazacyklododekan-N,N',N'',N'''-tetraacetová kyselina (TETA), hydroxyethylidendifosfonát (HEDP), dimerkaptojangtarová kyselina (DMSA), diethylentriamintetramethylenfosfonová kyselina (DTTP) a 1-(p-aminobenzyl)DTPA, 1,6-diaminohexan-N,N',N'',N'''-tetraacetová kyselina, DPDT a ethylenbis(oxyethylenitrolo)-

tetraoctová kyselina, na které výčet není omezen, přičemž DTPA je nejvíce optimální. Vhodnou sloučeninou podle tohoto vynálezu může být také kompozice obsahující ^{111}In -DTPA-paclitaxel.

V určitých provedeních podle tohoto vynálezu paclitaxel a docetaxel může být konjugován s ve
 5 vodě rozpustným polymerem a výhodně polymer je konjugován s 2'- nebo 7-hydroxypaclitaxelem a -docetaxelem nebo jejich analogy s obsahem obou substituentů. Když funkční skupiny jsou pro konjugaci léku, jako uvedeno výše u C2'-hydroxypaclitaxelu, degradovatelná skupina, v tomto případě ester, se používá k zajištění, aby aktivní látka byla uvolňována z polymerního
 10 nosiče. Mezi vhodné polymery patří, aniž by na ně byly omezeny, například polyethylenglykol, poly(1-glutamová kyselina), poly(d-glutamová kyselina), poly(dl-asparagová kyselina), poly(1-asparagová kyselina), poly(d-asparagová kyselina), poly(dl-asparagová kyselina), polyethylenglykol, kopolymery výše zmíněných polyaminokyselin s polyethylenglykolem, polykaprolaktonem, polyglykolovou kyselinou, polymléčnou kyselinou, stejně jako polyakrylovou kyselinou poly(2-hydroxyethyl-1-glutaminem), methoxykarbonyldextranem, hyaluronovou kyselinou, lidský sérový albumin a alginová kyselina s polyethylenglykolem, polyasparagovou kyselinou a polyglutamovou kyselinou, která jsou zvláště vhodné sloučeniny. Polyglutamová a polyasparagová kyselina podle tohoto vynálezu mají molekulovou hmotnost přibližně 5000 až asi
 15 100 000 nebo zhruba 20 000 až asi 80 000 nebo rovněž asi 30 000 až asi 60 000, což je zvláště výhodné.

20 Je třeba rozumět, že kompozice podle tohoto vynálezu mohou být dispergovány v roztoku farmaceuticky přijatelného nosiče, jak je popsáno výše. Takový roztok musí být sterilní nebo aseptický a může obsahovat vodu, pufrý a isotonické látky nebo další složky známé odborníkovi v oboru, které lidí ani u zvířat nesmějí při podání vyvolávat žádné nežádoucí nebo alergické
 25 reakce. Tento vynález může být také popsán jako farmaceutická kompozice, která obsahuje chemoterapeutikum nebo protirakovinné léčivo, jako je paclitaxel nebo docetaxel konjugované s vysoko molekulárním ve vodě rozpustným polymerem nebo chelátorem. Farmaceutické kompozice mohou obsahovat polyethylenglykol, polyglutamové kyseliny, polyasparatové kyseliny nebo chelátory, výhodně DTPA. Je třeba rozumět, že radionuklid může být použit jako
 30 antitumorosní přípravek nebo lék a tak farmaceutická kompozice může obsahovat terapeutické množství chelátovaného radioaktivního izotopu.

V určitém provedení tento vynález popisuje i způsob stanovení příjmu chemoterapeutika jako je paclitaxel nebo docetaxel tumorosní tkáni. Tato metoda zahrnuje získání konjugátu léku a kovo-
 35 vého chelátoru, chelátový kovový iontem kontaktováním tumorosní tkáně s kompozicí a detekci přítomnosti tohoto iontu v tumorosní tkáni. Přítomnost chelátového kovového iontu v tumorosní tkáni indikuje příjem tumorosní tkáni. Chelátovým kovovým iontem může být radionuklid a detekce může být scintigrafická. Tumorová tkáň je také obsažena u lidských i zvířecích subjektů, a tak kompozice mohou být podávány lidským i zvířecím subjektům.

40 Prezentovaný vynález může být také popsán v provedení jako způsob léčení rakoviny u pacientů. Tato metoda zahrnuje získání kompozice obsahující chemoterapeutika, jako paclitaxel nebo docetaxel konjugovaný s ve vodě rozpustným polymerem nebo chelátorem, dispergování ve farmaceuticky vhodném roztoku a podávání roztoku pacientům v množství účinném pro cyto-
 45 statickou léčbu. Vhodné kompozice obsahují paclitaxel nebo docetaxel konjugované s polyglutamovými nebo polyasparagovými kyselinami a výhodněji s poly(1-glutamovou kyselinou) nebo poly(1-asparagovou kyselinou). Kompozicí podle tohoto vynálezu je třeba rozumět kompozice, které jsou účinné při léčbě specifických typů tumorů, pro které se ukazuje nekonjugovaný taxoid účinný a mezi které se zahrnuje, bez mezení na ně, rakovina prsu, ovaria, plic a maligní melanom, rakovina žaludku, kolonu, hlavy a krku nebo leukémie.

Metoda terapie tumorů může zahrnovat předpoklad, že paclitaxel nebo docetaxel je zachycen tumorem před podáním terapeutického množství léku nebo jeho prekursoru. Součástí metody jsou i zobrazovací techniky již zmíněné, kdy komplex paclitaxel-chelátor-chelátovaný je podán
 55 subjektu a detekován v nádorové tkáni. tento krok poskytuje cenově vhodný způsob detekce, kdy

zvláštní tumor odpovídá na DTPA–paclitaxelovou kúru v případě, kdy lék do nádorové tkáně proniká. Je pozorováno, že zobrazovací technika se může použít k predikci odezvy na paclitaxel a identifikaci pacientů, kteří na terapii pravděpodobně nereagují, přičemž se ušetří pacientům velké náklady a doba strávená neúčinnou terapií. Má se za to, že pokud se v tumorové tkáni neuloží dostatečné množství chemotapeutika, pak je odpověď tumoru na tuto terapii relativně malá.

Určité ztělesnění prezentovaného vynálezu může být popsáno jako způsob získání obrazu těla subjektu. Obraz těla se dostane podáním účinného množství radioaktivního kovového iontu chelátovaného na konjugát paclitaxel–chelát subjektu a mění se scintografické signály radionuklidového kovu k získání obrazu.

Prezentovaný vynález může být také popsán v některých širších aspektech, jak o je způsob snížení alespoň jednoho symptomu systémového autoimunitního onemocnění tím, že se pacientům systémovým autoimunitním onemocněním podává účinné množství kompozice obsahující paclitaxel nebo docetaxel konjugovaný s poly–1–glutamovou nebo poly–1–asparagovou kyselinou. Zvláštní pozornost v této souvislosti je věnována i léčbě revmatoidní artritidy, o které je známo, že v některých případech může odpovídat na terapii taxolem, pokud je podáván ve standartním prostředku Cromeophor (patent US 5 583 153). Jako při léčbě rakoviny se předpokládá, že efektivita ve vodě rozpustného taxoidu podle tohoto vynálezu nebude snížena konjugací s ve vodě rozpustnou složkou a že ve vodě rozpustný prekurzor léčiva může působit jako kompozice s řízeným uvolňováním, která bude postupně po určitou dobu uvolňovat aktivní látku. Předpokládá se proto, že kompozice podle tohoto vynálezu budou při léčbě revmatoidní artritidy stejně aktivní jako taxol, ale nabízejí výhodu řízeného. Předpokládá se tak, že uvedené taxoidové preparáty podle tohoto vynálezu budou používány v kombinaci s ostatními léky, jako je například inhibitor angiogene (AGM–1470) (Oliver a kol, 1994) nebo metotrexat.

Paclitaxel také inhibuje restenozu po balonové angioplastice a toto zjištění znamená, že ve vodě rozpustný paclitaxel a docetaxel podle tohoto vynálezu bude moci být použit nadto k přímému paraterálnímu podání (WO 96/25176). Například se předpokládá, že ve vodě rozpustný paclitaxel bude vhodný jako potah lékařských implantátů jako jsou například různé katetry, shunt, kanily, arteriální implantáty, jehly, elektrické implantáty jako pacemakery a zejména arteriální a venosní stenty včetně balonového expanzního stentu. U těchto ztělesnění se předpokládá, že ve vodě rozpustný paclitaxel může být navázán na implantát nebo může být pasivně adsorbován na povrchu implantátu. Například stenty mohou být potaženy konjugáty polymer–lék pomocí dippingu na stent roztokem polymer–lék nebo tímto roztokem nasprejovány. Vhodné materiály pro implantační zařízení by měly být biokompatibilní a netoxické a mohly by být zvoleny z kovů, jako je slitina niklu s titanem, ocel, biokompatibilní polymery, hydrogely, polyuretany, polyethylen, ethylenvinyl–acetové kopolymery atd. Při vhodném provedení je ve vodě rozpustný paclitaxel, zejména PG–paclitaxelový konjugát, nanesen na stent pro zavedení do arterie nebo vény používaný při balonové angioplastice. Vynález proto může být popsán v určitých širších aspektech jako způsob inhibice arteriální restenozy nebo arteriální okluze po vaskulárním traumatu zahrnující podání subjektu, který to potřebuje, kompozice obsahující paclitaxel nebo docetaxel konjugovaný ke poly–1–glutakové nebo poly–1–asparagové kyselině. V praktickém provedení metody subjektem může být pacientův koronární bypass, vaskulární chirurgie, transplantace orgánu a koronární či arteriální angioplastika a kompozice může být podána například přímo, i.v., nebo může být nanesena na stentu a ten poté implantován v místě vaskulárního traumatu.

Ztělesnění vynálezu jsou též implantovatelné lékařské pomůcky, které jsou potaženy kompozicí obsahující paclitaxel či docetaxel konjugovaný s polyglutamovými či polyasparagovými kyselinami v množství, které je účinné k inhibici proliferace buněk hladké svaloviny. Mezi výhodné pomůcky patří stent potažený kompozicí podle tohoto vynálezu, jak je zde popsána při výhodném ztělesnění a stent je uzpůsoben k použití po balonové angioplastice a potah je účinný k zabránění restenozy.

V určitých výhodných provedeních vynálezu může být popsán jako kompozice obsahující polyglutamové kyseliny konjugované s 2'- či 7-hydroxypaclitaxelem nebo sloučeninou obsahující obě tyto skupiny nebo rovněž kompozice obsahující polyasparagovou kyselinu konjugovanou s 2'- či 7- nebo 2',7-dihydroxypaclitaxelem. Termíny zde používané „polyglutamová kyselina“ či „polyglutamová kyselina“ znamená poly(1-glutamovou kyselinu), poly(d-glutamovou kyselinu) a poly(dl-glutamovou kyselinu). Termíny „polyasparagová kyselina“ či „polyasparagová kyselina“ znamenají poly(1-asparagovou kyselinu), poly(d-asparagovou kyselinu) a poly(dl-asparagovou kyselinu).

Všechny použité termíny technického a vědeckého rázu, pokud nejsou definovány jinak, mají význam, jak mu běžně rozumí odborník v oboru, kam, vynález náleží. I když metody a materiály zde popisované mohou být shodné nebo podobné s metodami používanými v praxi či při testování tohoto vynálezu, výhodné metody a materiály budou nyní popsány.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1A. Chemická struktura paclitaxelu, PEG-paclitaxelu a DTPA-paclitaxelu.

Obr. 1B. Chemická struktura a reakční schéma produkce PG-paclitaxelu.

Obr. 2. Účinek paclitaxelu, PEG-paclitaxelu a DTPA-paclitaxelu na proliferaci buněk B16 melanomu.

Obr. 3. Tumorsupresivní vliv DTPA-paclitaxelu na tumory MCA-4 buňky savce.

Obr. 4. Střední doba (dny) k dosažení průměru tumoru 12 mm po léčbě paclitaxelem, DTPA-paclitaxelem a PEG-paclitaxelem.

Obr. 5. Gamma-scintigrafie myši s nesoucí MCA-4 tumory po intravenosní injekci ^{111}In -DTPA-paclitaxelu a ^{111}In -DTPA. Šipka ukazuje tumor.

Obr. 6. Hydrolytická degradace PG-paclitaxelu stanovená v PBS při pH 7,4 a teplotě 37 °C. Čtverec znázorňuje procento paclitaxelu, které zbývá připojeno k rozpustnému paclitaxelu, trojúhelník označuje procento uvolněného paclitaxelu, kruh označuje procento vzniklého metabolitu-1.

obr. 7A. Tumorsupresivní vliv PG-paclitaxelu na krysy s myším tumorem prsu [13762F]. Čtverec označuje odpověď na jednu i.v. dávku PG (0,3 g/kg); trojúhelník označuje odpověď na paclitaxel (40 mg/kg); kruh označuje odpověď na PG-paclitaxel (60 mg ekviv. paclitaxelu/kg).

Obr. 7B. Tumorsupresivní účinek PG-paclitaxelu a paclitaxelu u myši s MCA-1 tumorem. Čtverec představuje odpověď na jednu i.v. dávku PG (0,8 g/kg); trojúhelník představuje odpověď na paclitaxel (80 mg/kg); černá tečka představuje odpověď na PG-paclitaxel (80 mg ekviv. paclitaxelu/kg); nevybarvený kruh představuje odpověď na PG-paclitaxel (160 mg ekviv. paclitaxelu/kg).

Obr. 7C. Tumorsupresivní účinek PG-paclitaxelu u myši s MCA-4 karcinomem prsu. Čtverec představuje odpověď na jednu i.v. dávku fyziologického roztoku; trojúhelník představuje odpověď na jedinou i.v. dávku PG (0,6 g/kg); černá tečka představuje odpověď na PG-paclitaxel (40 mg/kg); nevybarvený kruh představuje odpověď na PG-paclitaxel (60 mg ekviv. paclitaxelu/kg); nevybarvený kruh představuje odpověď na PG-paclitaxel (120 mg/kg).

Obr. 7D. Tumorsupresivní účinek PG-paclitaxelu u myši proti tumorovému sarkomu měkkých tkání (FSA-II). Čtverec představuje odpověď na jednu i.v. dávku fyziologického roztoku; kosočtverec představuje odpověď na jednu i.v. dávku PG (0,8 g/kg); kruh představuje odpověď na paclitaxel (80 mg/kg); kruh představuje odpověď na PG-paclitaxel (160 mg ekviv. paclitaxelu/kg).

Obr. 7E. Tumorsupresorový účinek PG-paclitaxel u myši proti syngenovému hepatokarcinomu (HCA-I). Čtverec představuje odpověď na jednu i.v. dávku fyziologického roztoku

trojúhelník představuje odpověď na jednu i.v. dávku PG (0,8 g/kg); kruh představuje odpověď na PG–paclitaxel (80 mg/kg); trojúhelník představuje odpověď na PG–paclitaxel (160 mg ekv. paclitaxelu/kg).

Obr. 8. Profil uvolnění paclitaxelu z PEG–paclitaxelu ve fosfátovém pufru (pH 7,4). Paclitaxel je označen křížkem; PEG–paclitaxel je označen kruhem.

Obr. 9. Tumorsupresivní účinek PG–paclitaxelu na prsní tumor Mca–4. Čtverec představuje odpověď na jednu i.v. injekci fyziologického roztoku PEG (60 mg/ml); čtverec představuje odpověď na Cromophor/alkoholové vehikulum; kruh představuje odpověď na jedinou dávku paclitaxelu (40 mg/kg tělesné hmotnosti); černá tečka představuje odpověď na PEG–paclitaxel (40 mg ekv. paclitaxelu/kg tělesné hmotnosti).

Podrobný popis vynálezu

Tento vynález vychází z nalezení nové, ve vodě rozpustné formy paclitaxelu a docetaxelu a dále překvapivé účinnosti těchto forem proti tumorovým buňkám *in vivo*. Poly–(1–glutamová kyselina) konjugovaná s paclitaxelem (PG–paclitaxel) byla podávána myším s karcinomem ovaria (MCA–I). Tato terapie měla signifikantní vliv na zpomalení růstu tumoru v porovnání se stejnou dávkou paclitaxelu bez PG. U myší léčených samotným paclitaxelem nebo kombinací volného paclitaxelu a PG došlo zpočátku je zpomalení růstu tumoru, ale po deseti dnech došlo k novému nádoru na úrovni srovnatelné se neléčenou kontrolní skupinu. Při maximálně tolerované dávce (MTD) PG–paclitaxelového konjugátu (160 mg ekv. paclitaxelu/kg) byl kromě toho růst tumoru zcela suprimován a došlo ke zmenšení tumoru. Dva měsíce po přeběhlé terapii nebyl u myší nádor vůbec detekován (MTD je definována jako maximální dávka, po jejímž podání dojde k redukci tělesné hmotnosti o 15 % či méně během dvou týdnů po jedné i.v. injekci). V paralelní studii u krys s krysím adenokarcinomem prsu (13762F) byla testována antitumorová aktivita PG–paclitaxelu. I v tomto případě došlo k úplné eradikaci tumoru po podání PG–paclitaxelu (40 až 60 m ekv. paclitaxelu/kg). Tyto překvapující výsledky demonstrují, že konjugát polymer–léčivo, PG–paclitaxel, má schopnost signifikantně eradikovat i již existující solidní tumory jak u myší, tak u krys po jednotlivé i.v. injekci. PG–paclitaxel je kromě toho se svým poločasem 40 dnů při pH 7,4, jedním z nejstabilnějších známých ve vodě rozpustných paclitaxelových derivátů (Deutsch a kol. 1989; Methew a kol., 1992; Zhao a Kingston, 1991).

Ukazuje se, že DTPA–paclitaxel je *in vitro* v tumorsupresivním testu používajícím linii melanomových buněk B16 stejně účinný jako paclitaxel. DTPA–paclitaxel neprojevoval jakoukoli signifikantní odlišnost v antitumorovém účinku v porovnání s paclitaxelem u MCA–4 tumoru prsu při podání jednotlivé dávky 40 mg/kg tělesné hmotnosti. Pomocí gamma–scintigrafie bylo kromě toho zjištěno, že ¹¹¹indiem značený DTPA–paclitaxel byl akumulován nádorovými buňkami MCA–4. To znamená, že s chelátorem konjugované tumorsupresivní léky podle tohoto vynálezu jsou vhodné a účinné pro zobrazení tumoru.

Nové kompozice a metody prezentované v tomto vynálezu vykazují zřetelně lepší výsledky než dříve používané metody a kompozice, ježto ve vodě rozpustné paclitaxely jsou určeny k lepší účinnosti protirakovinné terapie na bázi paclitaxelu tím, že poskytují kompozice s rozpustností ve vodě a řízeným uvolňováním paclitaxelu. Takové kompozice eliminují potřebu rozpouštědel, která jsou spojena s nežádoucími účinky zřejmými u dříve podávané kompozice paclitaxelu. Kromě toho radioaktivně značený paclitaxel, u kterého se ukazuje uchování protinádorové aktivity, bude také vhodný při zobrazování tumorů. Dále tento vynález dovoluje scintigraficky zjistit, zda paclitaxel akumuluje zvláštní tumor za použití scintigrafie, metody SPECT (single photon emission computed tomography) nebo metody PET (positron emission tomography). Toto stanovení se může použít k rozhodnutí o účinnosti protirakovinné terapie. Tato informace může pomoci vést praktického pomocníka při výběru pacientů vhodných pro terapii paclitaxelem.

Paclitaxel může dosáhnout rozpustnosti ve vodě dvěma cestami, konjugováním paclitaxelu na ve vodě rozpustné polymery, které slouží jako nosiče léku, a dále derivatizováním protinádorového

léku s ve vodě rozpustnými chelátovými agens, čímž je možno dosáhnout značení radionuklidu (např. ^{111}In , ^{90}Y , ^{166}Ho , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$) a této možnosti využít při nukleárním zobrazování a/nebo pro radioterapeutické studie. Obr. 1 znázorňuje strukturu paclitaxelu, polyethylenglykol–paclitaxelu (PEG–paclitaxel), konjugátu polyglutamové kyseliny a paclitaxelu (PG–paclitaxel) a diethyletri-

aminopentaoctové kyseliny a paclitaxelu (DTPA–paclitaxel).

V určitých ztělesněních tohoto vynálezu DTPA–paclitaxel nebo jiné konjugáty paclitaxel–chelatační činidlo, jako například EDTA–paclitaxel, DTTP–paclitaxel nebo DOTA–paclitaxel mohou být připraveny ve formě ve vodě rozpustných solí (sodná sůl, draselná sůl, tetrabutylamonná sůl, vápenatá sůl, železitá sůl atd.). Tyto soli pak mohou být vhodné jako terapeutické prostředky pro léčbu rakoviny. Dále pak může být DTPA–paclitaxel nebo další paclitaxel–chelátové agens vhodné pro diagnostické prostředky, které se mohou používat pro radioaktivní detekce určitých tumorů v kombinaci s nukleární zobrazovací technikou, když jsou značeny radionuklidy, jako ^{111}In nebo $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Je třeba rozumět, že přidáním paclitaxelu (taxolu) či docetaxelu (taxeteru) a dalších derivátů taxanu se mohou upravit pro použití v kompozicích a při metodách podle tohoto vynálezu a že všechny takové kompozice a metody jsou zahrnuty do nároků.

Studie toxicity, farmakokinetiky a tkáňové distribuce DTPA–paclitaxelu ukázaly, že LD_{50} (50% letální dávka) je po jednotlivé i.v. injekce u myši asi 110 mg/kg tělesné hmotnosti. Přímé srovnání s paclitaxelem je obtížné pro rozdíly v dávce a objemu způsobené nízkou rozpustností paclitaxelu a toxicitou vehikula při iv. podání. Ve světle těchto informací však odborník v oboru chemoterapie stanoví efektivní a maximálně tolerované dávky při klinických studiích na lidech jako pacientech.

Při určitém provedení vynálezu se stent potažený paclitaxelovým konjugátem může použít v prevenci restenózy, tzn. okluze arterií po balonové angioplastice. Uvedené studie klinických testů zavedení balonem expandovatelných stentů při koronární angioplastice ukázaly signifikantně lepší výsledky a snížení restenózy oproti skupině, kde byla provedena angioplastika s běžným balonovým stentem (Serruys a kol., 1994). Podle teorie „reakce na poškození“, neointimové formy jsou spojeny se zvýšenou proliferací buněk. Obecně se nyní předpokládá, že kritickým procesem, který vede k vaskulární lézi jak spontánní, tak akcelerované, aterosklerózy je proliferace buněk hladkého svalstva (Pholips–Hughes a Kandarpa, 1996). Protože SMC fenotypová proliferace po poškození cévy je podobná neoplastickým buňkám, je možné, že protirakovinné léky mohou být vhodné k prevenci neointimní SMC akumulace. Stenty potažené na polymer vázaných antiproliferačním agens schopné uvolnit tyto agens během prodlouženého časového období v dostatečné koncentraci budou tak bránit nárůstu hyperplazmické intimy a prostředí v lumenu, čímž se sníží restenóza.

Protože se ukázalo, že paclitaxel suprimuje kolagenem indukovanou arteritidu u myšního modelu (Oliver a kol., 1994) je součástí vynálezu též použití uvedených kompozic při léčbě autoimunních a/nebo zánětlivých onemocnění, jako je například revmatoidní artritida. Vazba paclitaxelu na tubulin posouvá rovnováhu ke stabilnímu mikrotubulovému polymeru, a proto je tento lék silným inhibitorem replikace eukaryotické buňky blokováním buněk pozdní G2 mitotické fáze. Arteritidu paclitaxel suprimuje několika mechanismy. Například specifické cytotoxické účinky fáze paclitaxelu mohou postihovat rychle proliferující zánětlivé buňky. Paclitaxel dále suprimuje buněčnou migraci, mitosu, chemotaxi, intracelulární transport a H_2O_2 produkci v neutrofilech. Kromě toho paclitaxel může mít také antiangiogenetické vlastnosti způsobené blokáží koordinace migrace endoteliálních buněk (Oliver a kol., 1994). Proto se předpokládá, že prekursor léčiva podle tohoto vynálezu konjugované s polymerem jsou vhodné jako volný proclitaxel při terapii revmatoidní artritidy. Kompozice konjugované s polymerem zde popsané také nabízejí zpomalené nebo odložené uvolňování léku a jsou lépe rozpustné. Znakem tohoto léčení artritidy tedy je, kompozici tohoto lze úspěšně injikovat nebo implantovat do postižené oblasti kloubu.

Farmaceutické kompozice na bázi paclitaxelu nebo docetaxelu vhodné pro injekční použití zahrnuje sterilní vodné roztoky nebo disperse a sterilní prášky pro výrobu sterilního roztoku nebo

disperse vhodné pro i.v. podání. Ve všech případech forma musí být sterilní a musí jít o kapalinu pro injekce. Kompozice musí být také stabilní v podmínkách během výroby a skladování a musí být chráněna před kontaminací mikroorganismy jako jsou bakterie či houby. Nosičem může být rozpouštědlo nebo disperzní médium obsahující například vodu, ethanol, polyol (jako je glycerol, propylen, glykol, kapalný polyethylenglykol apod.), dále jejich směsi a rostlinné oleje. K prevenci účinku mikroorganismů může být přidán některý baktericidní či fungicidní prostředek jako jsou parabeny, chlorbutanol, fenol, kyselina sorbitová, thimarosal apod. V některých případech je přidáno i izotonické agens, například cukr nebo chlorid sodný.

Sterilní injekční roztoky jsou připravovány inkorporací požadované aktivní složky do vhodného rozpouštědla s mnoha dalšími ingrediencemi vyjmenovanými výše, jak je potřeba, a poté následující filtrační sterilizací. Disperze jsou běžně připravovány inkorporací různých sterilizovaných aktivních látek do sterilního vehikula, které obsahuje bazické dispersní médium a vyžaduje jiné složky, které jsou uvedeny výše. V případě sterilních prášků vhodných pro přípravu sterilního injekčního roztoku výhodný postup spočívá v sušení pod vakuem a sušení vymrazováním, kdy vzniká prášek aktivní látky plus některých příměsí z předchozího sterilně filtrovaného roztoku.

Pokud se zde používá výrazu „farmaceuticky přijatelný nosič“, zahrnuje jakákoli rozpouštědla, dispersní prostředí, potahy, baktericidy, fungicidy a izotonické látky a podobně, jakož i jejich směsi. Použití takového média a agens pro farmaceuticky aktivní látky je velmi dobře zpracováno v oboru. S výjimkou nějakého média nebo agens nekompatibilního s aktivní látkou je uvažováno se všemi takovými látkami pro použití v terapeutické kompozici. V kompozici může být také vhodně doplněna aktivní složka.

Termín „farmaceuticky vhodný“ se týká molekulárních entit a kompozic, které po podání lidem či zvířatům nevyvolávají žádnou alergickou nebo podobnou reakci.

Pro parenterální podání ve vodném roztoku, má být roztok například účelně pufrován, pokud je to zapotřebí, a kapalné ředidlo se nejprve stane izotonické úpravou pomocí fyziologického roztoku nebo glukózy. Tyto zvláštní vodné roztoky jsou vhodné zejména pro intravenózní či intra-peritoneální podání. V této souvislosti se uvádí, že sterilní vodné prostředí, které se může použít, je známo odborníkovi v oboru ve světle přítomných zjištění.

Následující příklady jsou zahrnuty k doložení výhodných ztělesnění vynálezu. Předpokládá se, že odborník v oboru ocení, že techniky použité v následujících příkladech jsou běžně užívané techniky nalezené původcem pro provádění vynálezu a tak mohou být pokládány za výhodné pro praxi. Odborník v oboru však ve světle zjištěného též ocení, že mohou být provedeny mnohé změny těchto zvláštních ztělesnění, která jsou popsána, a stále se budou dosahovat stejné nebo podobné výsledky, aniž by se odchýlilo od smyslu nebo rozsahu tohoto vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

DTPA–paclitaxel

Syntéza DTPA–paclitaxelu:

K roztoku paclitaxelu (100 mg, 0,117 mmol) bylo v suchém DMF (2,2 ml) přidáno (210 mg, 0,585 mmol) diethylentriaminpentaoctové kyseliny (DTPA A) při 0 °C. Reakční směs byla míchána při 4 °C přes noc. Suspenze byla filtrována (0,2 µm Millipore filtr) tak, aby byl odstraněn nezreagovaný DTPA anhydrát. Filtrát byl vylit do destilované vody, míchán při 4 °C po 20 min a precipitát poté sesbírán. Surový produkt byl čištěn pomocí preparativní TLC přes noc na C18 silikagelových deskách a vyvinut v acetonitrilu a vodě (1:1). Paclitaxel měl R_f hodnotu 0,34.

Pruh nad paclitaxelem s hodnotu R_f mezi 0,65 a 0,75 byl odstraněn a eluován acetonitrilem a vodou (1:1) a rozpouštědlo bylo odsáto tak, že se dostalo 15 mg DTPA–paclitaxelu jako produktu (výtěžek 10,4 %), teplota tání: $>226^\circ\text{C}$ (rozklad). UV spektrum (sodná sůl ve vodě) ukázala maximální absorpci při vlnové délce 228 nm, která je charakteristická také pro paclitaxel.

5 Hmotnostní spektrum: (FAB) m/e 1229 (M+H)⁺, 1251 (M+Na), 1267 (M+K). V ¹H NMR spektru (DMSO- d_6) vypadala rezonance $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ a CH_2COOH z DTPa jako komplexní série signálů o δ 2,71–2,96 ppm a jako multiplet při δ 3,42 ppm. Rezonance C 7–H při 4,10 ppm v paclitaxelovém posunu na 5,51 ppm naznačuje esterifikaci v poloze 7. Zbytek spektra byl konsistentní se strukturou paclitaxelu.

10 Sodná sůl DTPA–paclitaxelu byla také připravena přidáním roztoku DTPA–paclitaxel v ethanolu do ekvivalentního množství 0,05M NaHCO_3 a následně lyofilizací za vzniku ve vodě rozpustného pevného prášku (rozpustnost >20 mg ekviv. paclitaxelu/ml).

15 Hydrolytická stabilita DTPA–paclitaxelu:

Hydrolytická stabilita DTPA–paclitaxelu byla studována v akcelerovaných podmínkách. Uvedeno v krátkosti, 1 mg DTPA–paclitaxelu byl rozpuštěn v 1ml 0,5M vodného roztoku NaHCO_3 (pH 9,3) a analyzován pomocí HPLC. HPLC systém se skládá z Waters 150 x 3,9 (vnitřní průměr) mm Nova–Pak kolony vyplněné C18 4 μm silikagelem, Perkin–Elmer izokratického LC čerpadla, PE Nelson 900 sériového rozhraní, Spektra–Physics UV/Vis detektoru a datové stanice. Eluent (acetonitril/methanol/0,02M octanu amonného = 4:1:5) se vedle rychlostí 1,0 ml/min s UV detekcí při 228 nm. Retenční čas DTPA–paclitaxelu a paclitaxelu byl 1,38 a 8,83 min. Píkové hodnoty byl kvantifikovány a porovnány se standardními křivkami k určení koncentrace DTPA–paclitaxelu a paclitaxelu. Stanovený poločas DTPA–paclitaxelu v 0,5M NaHCO_3 roztoku byl

25 přibližně 16 dní při pokojové teplotě.

Účinky DTPA–paclitaxelu na růst myších B16 buněk melanomu in vitro:

Buňky byly inokulovány do 24 jamkových ploten o koncentraci $2,5 \times 10^4$ buněk/ml a nechány růst v 50:50 Dulbeccově modifikovaném esenciálním médiu (DEM) a F12 médiu obsahujícím 10 % bovinního telecího séra při 37°C po 24 hodin v 97% vlhké atmosféře s obsahem 5,5% CO_2 . Médium bylo poté nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím paclitaxel nebo DTPA–paclitaxel v koncentračním rozmezí od 5×10^{-9} M do 75×10^{-9} M. Po 40 hodinách byly buňky uvolněny pomocí trypsinizace a spočítány v Coulter čítači. Konečně koncentrace DMSO (používaný k rozpuštění paclitaxelu) a 0,05 M roztoku hydrogenuhličitanu sodného (používaný k rozpuštění DTPA–paclitaxelu) v buněčném médiu byly menší než 0,01 %. Toto množství rozpouštědla nemělo žádný vliv na buněčný růst, jak bylo zřejmé z výsledků kontrolních studií.

Účinky DTPA–paclitaxelu na růst buněk melanomu B16 je znázorněn na obrázku 2. Po 40 hodinách inkubace s různými koncentracemi DTPA–paclitaxelu a paclitaxelu byly srovnány jejich cytotoxické účinky. IC_{50} pro paclitaxel a DTPA–paclitaxel jsou $15 \mu\text{M}$ v $7,5 \mu\text{M}$.

Tumorsupresivní účinek na tumorovém modelu karcinomu prsu (Mca–4):

Samičím myši kmene C3Hf/Kam byl inokulován karcinom prsu (Mca–4) do pravého stehenního svalu (5×10^5 buněk/myš). Když tumory narostly do velikosti 8 mm (asi za dva týdny) byla myším podána jednotlivá dávka paclitaxelu nebo DTPA–paclitaxelu o velikosti 10, 20 a 40 mg ekvivalent paclitaxelu/kg tělesné hmotnosti. V kontrolních studiích bylo použito fyziologického roztoku a absolutního alkoholu/Cremophor 50/50 zředěného fyziologickým roztokem (1:4). Růst tumoru byl denně sledován měřením tří ortogonálních průměrů. Když velikost tumoru dosáhla průměru 12 mm, pak byl určen růstový nárůst tumoru. Myši byly usmrceny, když tumor dosáhl

50 velikosti 15 mm.

Křivka růstu tumoru je znázorněna na obr. 3. V porovnání s kontrolami vykazuje jak paclitaxel, tak DTPA–paclitaxel tumorsupresivní účinky při dávce 40 mg/kg. Data také byla analyzována ke

stanovení středního počtu dní, za které tumory dosáhly průměru 12 mm. Statistická analýza ukázala, že DTPA–paclitaxel signifikantně suprimuje růst tumoru v porovnání s kontrolní skupinou, která dostávala fyziologický roztok v dávce 40 mg/kg ($p < 0,01$). Střední doba, za kterou tumory dosáhly průměru 12 mm byla 12,1 dní pro DTPA–paclitaxel v porovnání s dobou 9,4 dní pro paclitaxel (obr. 4).

Radioaktivně značený DTPA–paclitaxel s ^{111}In :

Do 2 ml V–lékovky bylo přidáno postupně 40 μl 0,6M octanu sodného jako pufru (pH 5,3), 40 μl 0,06M citrátu sodného jako pufru (pH 5,5), 20 μl roztoku DTPA–paclitaxelu v etanolu (2 % hmotnost/objem) a 20 μl $^{111}\text{InCl}_3$ roztoku (o aktivitě 37 Mbq = 1,0 mCi) v pufru octanu sodného (pH 5,5). Po 30min inkubace při pokojové teplotě byl ^{111}In – DTPA–paclitaxel vyčištěn pomocí pasáže směsi přes C18 Sep–Pac kapsli s použitím fyziologického roztoku a postupně i ethanolu jako mobilní fáze. Volný ^{111}In –DTPA (<3%) byl přemístěn pomocí fyziologického roztoku, zatímco ^{111}In –DTPA–paclitaxel byl posbírán etanolovým promytím. Ethanol byl odpařen pod plyným dusíkem a navázaný produkt rekonstituován ve fyziologickém roztoku. Radiochemický výtěžek byl 84 %.

Analýza ^{111}In – DTPA–paclitaxelu:

HPCL byl použit při analýze reakční směsi a určení čistoty ^{111}In – DTPA–paclitaxelu. Systém se skládal z LDC binárního čerpadla, 100 x 8.0 mm (vnitřní průměr) Waters kolony vyplněné ODS 5 μm silikagelem. Sloupec byl eluován při průtoku 1 ml/min pomocí gradientní směsi vody a methanolu (gradient od 0 % až 85 % methanolu během 15 min). Gradientní systém byl monitorován pomocí NaI krystalového detektoru a Spektra–Physics UV/Vis detektoru. Jak bylo HPLC analýzou zjištěno, byla čištěním na Sep–Pak koloně přemístěna většina ^{111}In –DTPA, který měl retenční čas 2,7 min. ^{111}In –DTPA pocházel pravděpodobně ze stop kontaminace DTPA z DTPA–paclitaxelu. Radiochromatografie ^{111}In –DTPA–paclitaxelu. Radiochromatografie ^{111}In –DTPA–paclitaxelu korelovala s UV chromatogramem, což znamená, že pík 12,3 min jistě označuje cílovou sloučeninu. Za stejných chromatografických podmínek paclitaxel měl retenční čas 17,1 min. Radiochemická čistota konečného produktu byla 90 %, stanoveno pomocí HPLC analýzy.

Celotělová scintigrafie:

Samicím myším kmene C3Hf/Kam byl inokulován karcinom prsu (MCA–4) do pravého stehenního svalu (5×10^5 buněk). Když tumory narostly do průměru 12 mm, myši byly rozděleny do dvou skupin. První skupina dostala jako anestezii intraperitoneální injekci fenobarbitalu sodného a poté do MCasní žíly ^{111}In –DTPA–paclitaxel (aktivita 3700 až 7400 Mbq = 100 až 200 mCi). Gamma–kamera vybavená středně energetickým kolimátorem byla umístěna nad myši (3 ve skupině). Byly pořízeny série 5 min snímků 5, 30, 60, 120, 240 min a 24 hodin po injekci. Ve druhé skupině byla provedena stejná procedura kromě toho, že myším byla aplikován ^{111}In –DTPA jako kontrola. Obr. 5 ukazuje gamma–scintigrafii zvířat injikovaným ^{111}In –DTPA a ^{111}In –DTPA–paclitaxelem. ^{111}In –DTPA měl velmi rychlou clearance z plazmy, rychlou a mohutnou extrakci do moči s minimální retencí v ledvinách a zanedbatelnou retencí v tumoru, játrech, intestinálním traktu a dalších orgánech. Naopak ^{111}In –DTPA–paclitaxel měl farmakologický profil podobný jako paclitaxel (Eiseman a kol., 1994). Radioaktivita v mozku byla zanedbatelná. Játra a ledviny měly největší pomět tkáň:plazma. Hepatobiliární exkrece radioaktivně značeného DTPA–paclitaxelu nebo jeho metabolitů představovala jednu z hlavních cest clearance léčiva z krve. Na rozdíl od paclitaxelu bylo signifikantní množství ^{111}In –DTPA–paclitaxelu vyloučeno také ledvinami, které hrají jen malou roli v clereance paclitaxelu. Tumor signifikantně akumuloval ^{111}In –DTPA–paclitaxel. Tyto výsledky ukazují, že ^{111}In –DTPA–paclitaxel je schopen detekovat určité tumoru a že je možno kvantifikovat akumulaci ^{111}In –DTPA–paclitaxelu tumorem, co naopak může posloužit při výběru vhodných pacientů pro terapii paclitaxelem.

Příklad 2

Polyglutamová kyselina–paclitaxel

5 Tento příklad ukazuje konjugaci paclitaxelu na ve vodě rozpustný polymer, poly(1–glutamovou kyselinu (PG)). Možnost použití ve vodě rozpustného polymeru jako farmakologického nosiče je již dobře známá (Kopecek, 1990; Maeda a Metsumura, 1989). Kromě schopnosti solubilizovat

jednak nerozpustné léky, může konjugát léčivo–polymer působit jako depot pomalého uvolnění léku.

10 Syntéza paclitaxelu

PG byl vybrán jako nosič paclitaxelu, protože může být snadno degradován lysosomálními enzymy, je stabilní v plazmě a má dostatek funkčních skupin pro vazbu léčiva. na PG bylo konjugováno již několik protinádorových léků včetně adriamycinu (Van Heeswijk a kol., 1985; Hoes a kol., 1985), cyklofosfamid (Hirano a kol., 1979), a Ara–C (Kato a kol., 1984).

15 PG sodná sůl (MW 34 K, Sigma, 0,35 g) byla rozpuštěna ve vodě. pH vodného roztoku bylo nastaveno na 2 pomocí 0,2M HCl. Precipitát byl sebrán, dialyzován proti destilované vodě a lyofilizován tak, aby se dostalo 0,29g PG.

20 K roztoku PG (75 mg, opakovaně jednotka FW 170, 0,44 mmol) v suchém DMF (1,5 ml) bylo přidáno 20 mg paclitaxelu (0,023 mmol, molární poměr PG/paclitaxel = 19), 15 mg dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) (0,073 mmol) a stopové množství dimethylaminopyridinu (DMAP). Reakce probíhala 4 hodiny při pokojové teplotě. Chromatografie na tenké vrstvě (TCl, silika), ukázala kompletní konverzi paclitaxelu ($R_f = 0,55$) na polymerní konjugát ($R_f = 0$, mobilní fáze,

25 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$). Reakční směs byla vylita na chloroform. Výsledný precipitát byl odebrán a vysušen ve vakuu ta, aby se získalo 65 mg konjugátu polymer–lék. Změnou hmotnostního poměru paclitaxelu a PG v počáteční látce lze synteticky vyrobit polymerní konjugáty paclitaxelu o různé koncentraci.

30 Sodná sůl PG–paclitaxel konjugátu byla získána rozpuštěním produktu v 0,5M NaHCO_3 . Vodný roztok PG–paclitaxel byl dialyzován proti destilované vodě (MWCO 1,000) tak, aby byly odstraněny částice o malé molekulové hmotnosti, které roztok kontaminovaly, a dále přebytek NaHCO_3 . Lyofilizací dialyzovaného produktu vzniklo 88,6 mg bílého prášku. Paclitaxelová komponenta tohoto konjugátu byla ve vzorku stanovena pomocí UV (popsáno níže) jako 21 % (hmotnost/hmotnost). Výtěžek (konverze na polymer vážící paclitaxel, UV) : 93 %. PG–paclitaxel s vyšším obsahem paclitaxelu (až do 35 %) může být syntetizován pomocí této metody

35 jednoduchým zvýšením poměru paclitaxelu k použitému PG.

^1H –NMR (GE model GN 500 spekrometr, 500 MHz, v D_2O) : δ 7,75 až 7,35 ppm (aromatická komponenta paclitaxelu); δ = 6,38 ppm (C10–H), 5,97 ppm (C13–H), 5,63 a 4,78 ppm (C2'–H), 5,55–5,36 ppm (C3'–H a C2–H, m), 5,10 ppm (C5–H) 4,39 ppm (C7–H), 4,10 (C20–H), 1,97 ppm (OCOCH_3) a 1,18–1,20 ppm (C–CF) jsou uváděny jako alifatické komponenty paclitaxelu. Ostatní resonance paclitaxelu byly nejasné kvůli PG. PG rezonance při 4,27 ppm (H– α), 2,21 ppm (H– γ) a 2,04 ppm (H– β) jsou v souladu s čistým PG spektrem. Páry polymeru

45 konjugovaného s paclitaxelem jsou příliš málo zřejmé než aby mohly být dostatečně přesně změřeny. Rozpustnost ve vodě byla >20 mg paclitaxelu na ml.

Charakteristika PG–paclitaxelu

50 UV spektrum bylo získáno na spektrofotometru Beckman DU–640 (Fullerton, CA). Obsah paclitaxelového konjugátu s PG byl určen pomocí UV, vztaženou na standardní křivku odvozenou od známých koncentrací paclitaxelu v methanolu ($\lambda = 228$ nm) s předpokladem, že konjugát polymeru ve vodě a volný lék v methanolu mají stejné molární extinkční koeficienty a že oba splňují Lambert Beerův zákon. Jak je vidět z jejich UV spektra, PG–paclitaxel má

charakteristickou absorpci paclitaxelu s λ posunem z 228 na 230 nm. Koncentrace paclitaxelu v PG-paclitaxelu byla určena podle běžné křivky vytvářené se známými koncentracemi paclitaxelu v methanolu při absorpci 228 nm. Předpokládá se, že polymerový konjugát ve vodě při 230 nm a volný lék v methanolu při 228 nm mají stejnou molární extinkci a oba splňují Lambert Beerův zákon.

Studie PG-paclitaxelu pomocí gelové chromatografie

Relativní molekulová hmotnost PG-paclitaxelu byla stanovena pomocí gelové chromatografie (GPC). GPC systém se skládá ze dvou LDC modelových čerpadel III spojených s prvkem řídícím LDC gradient, PL gelové GPC kolony a Waters 990 šikmého fotodiodového detektoru. Elutant (DMF) procházel rychlostí 1,0 ml/min UV detekčním setem při 270 nm. Konjugace paclitaxelu na pG byla provázána nárůstem molekulové hmotnosti PG-paclitaxelu, což ukazuje posun retenčního času z 6,4 min u PG na 5,0 min u konjugátu PG-paclitaxelu, jak bylo zjištěno pomocí GPC. Vypočítaná molekulová hmotnost PG-paclitaxelu s obsahem 15 až 25% paclitaxelu (uvedeno hmotnostně) je v rozmezí 45 až 55 kDa. Surový produkt kontaminující látka o malé molekulové hmotnosti (retenční čas 8,0 až 10,0 min a 11,3 min) může být účinně odstraněna konverzí PG-paclitaxelu na jeho sodnou sůl a následnou dialýzou.

Hydrolytická degradace konjugátu PG-paclitaxelu

PG-paclitaxel byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru roztoku (PBS, 0,01M) pro pH 6,0, pH 7,4 a pH 9,6 při ekvivalentní koncentraci paclitaxelu 0,4 mM. Roztoky byly inkubovány při 37 °C za jemného třepání. Ve vybraných časových intervalech byly odebírány vzorky (100 μ l), poté byly smíchány se stejným množstvím methanolu a analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). HPLC systém se skládá z reversní fáze v silikou naplněné koloně (Nova-Pac, Waters, CA), mobilní fáze methanol-voda (2:1, objemově) přenášené rychlostí průtoku 1,0 ml/min a fotodiodového detektoru. Koncentrace PG vázaného na paclitaxel, volný paclitaxel a další degradační produkty v každém vzorku byly vypočteny pomocí porovnání nárůstu plochy píků se separátně získanou standardní křivkou připravenou z paclitaxelu. Předpokládá se, že molární extinkční koeficient každého píku při 228 nm je stejný jako pro paclitaxel. Poločas konjugátu určený jako 132, 40 a 4 dny při pH 6,0, 7,4 a 9,6 byl stanoven pomocí regresní analýzy nejmenších čtverců. HPLC analýza ukázala, že inkubace PG-paclitaxelu v PBS roztocích vzniklých z paclitaxelu a několika dalších species, jsou hydrofobnější než paclitaxel (metabolit-1). Ve skutečnosti množství metabolitu-1, což je zřejmě 7-epipacletaxel získaný v PBS při pH 7,4, předčí množství paclitaxelu po 100 hodinách inkubace (obr. 6).

In vitro studie

Vzorky získané z PBS roztoku při pH 7,4 byly podrobeny tubulinové polymerizační analýze. Tubulinová kondenzační reakce byla provedena při 32 °C v PEM pufru (pH 6,9) na tubulinu (hovězí mozek, Cytoskeleton Inc., Boulder, CO) o koncentraci 1 mg/ml (10 μ M) v přítomnosti testovacích vzorků (1,0 μ M ekviv. paclitaxelu) a 1,0 mM GTP. Po tubulinové polymeraci bylo měření absorpce roztoku při 340 nm. Po 15 min byl přidán chlorid vápenatý (125 mM) a byla změřena CaCl_2 -indukovaná depolymerace mikrotubulů. Zatímco čerstvě rozpuštěný PG-paclitaxel v PBS byl vznikajícími mikrotubuly inaktivován, alikvot PG-paclitaxelu inkubovaného po tři dny nezpůsobil známky tubulinové polymerace. Zformované mikrotubuly byly stabilní proti CaCl_2 -indukované depolymeraci.

Vliv PG-paclitaxelu na buněčný růst byl také testován pomocí testu s tetrazoliovou solí (MTT), (Mosmann, 1983). MCF-7 buňky nebo 13762F buňky byly inokulovány na 96jamkové mikrotitrační plotny o koncentraci 2×10^4 buněk/ml. 24 hodin poté byly do jamek přidány různé koncentrace PG-paclitaxelu, paclitaxelu nebo PG a inkubovány na dalších 72 hodin. MTT roztok (20 μ l, 5 mg/ml) byl poté přidán do každé jamky a inkubován po 4 hodiny. Supernatant byl poté aspirován a díky metabolicky aktivním buňkám vznikl MTT formazan, který byl kvantifikován mikroplošným fluorescenčním analyzátozem při vlnové délce 590 nm. Po třech dnech

inhiboval PG-paclitaxel proliferaci tumorových buněk stejně efektivně jako v případě podávání volného paclitaxelu. Pro lidský tumor prsu buněčné linie MCF-7 byla výhodná hodnota IC_{50} 0,59 μ M pro paclitaxel a 0,82 μ M pro PG-paclitaxel (měřeno v paclitaxelových ekvivalentních jednotkách). Senzitivita proti 13762F buněčné linii na PG-paclitaxel (IC_{50} = 1,86 μ M) je porovnatelná s citlivostí paclitaxelu (IC_{50} = 6,79 μ M). Pro obě linie buněk je IC_{50} samotného PG větší než 100 μ M.

In vivo tumorsupresorová aktivita

Veškeré práce se zvířaty byly prováděny podle materiálových možností M.D. Anderson Cancer Center v souladu s předpisy instituce. CH₃/Kam myši chovány v podmínkách bez výskytu patogenu na oddělení experimentální radiační onkologie. Soliterní tumory byly produkovány v oblasti pravého stehna samic kmene C3H/Kam (25 až 30 g) zavedením injekce 5×10^5 buněk myšího ovariálního karcinomu (OCA-I), karcinomu prsu (MCA-4), hepatokarcinomu (HCA-I) nebo fibrózního sarkomu (FSA-II). V paralelní studii bylo samicím krys kmene Fische 344 (125 až 150 g) injikováno $1,0 \times 10^5$ živých nádorových buněk linie 13762F v 0,1 ml PBS. Léčba byla započata, když myší tumory dosáhly objemu 500 mm³ (10 mm v průměru) nebo pokud tumor krys dosáhl velikosti 2400 mm³ (střední průměr 17 mm). Jednotlivá dávka PG-paclitaxelu ve fyziologickém roztoku nebo paclitaxelu v Cremophoru EL vehikulu byla aplikována v dávkách pohybujících se od 40 až 160 mg ekviv. paclitaxelu/kg tělesné hmotnosti. V kontrolních experimentech bylo použito fyziologického roztoku, Cremophorového vehikulu (50/50 Cremophor/ethanol zředěný fyziologickým roztokem (1:4)), PG (MW 38K) roztoku ve fyziologickém roztoku a PG/paclitaxelové směsi. Růst tumorů byl denně detekován (obr. 7A, 7B, 7C, 7D a 7E) pomocí měření tří ortogonálních průměrů tumoru. Objem tumoru byl spočítán podle vzorce $(A \times B \times C)/2$. Absolutní růstové zpoždění (AGD = Absolute Growth Delay) u myší je definováno jako čas (dny), kdy tumor léčený různými typy léků zvětší u myší svůj objem z 500 na 200 mm³ minut čas (dny), po který tumor kontrolní skupiny ošetřený fyziologickým roztokem zvětší svůj objem z 500 na 2000 mm³. Tabulka 1 shrnuje akutní toxicitu PG paclitaxelu u krys v porovnání s paclitaxel/Cremophorem. Tabulka 2 shrnuje hodnoty týkající se účinku PG-paclitaxelu proti MCA-4, FSA-II a HCA-I tumorům myší. Data jsou také vynesena na obr. 7A až 7E.

Tabulka 1

Akutní toxicita PG-paclitaxelu u krys kmene Fischer•

Skupina	Dávka (mg/kg)	# Toxická smrti	Ztráta tělesné hmotnosti v %	Čas v nejtěžší fázi (dny)	Čas úplného zotavení (dny)
PG-paclitaxel ^a	60	1/4	15,7	7	14
PG-paclitaxel ^a	40	0/4	11,1	6	11
Paclitaxel ^b	60	1/4	16,7	6	15
Paclitaxel ^b	40	0/3	17,9	6	16
Fyziologický roztok 1,0 ml		0/2	5,2	1	7
PG ^c	0,3 g/kg	0/2	4,3	2	8
Cremophor Vehikulu ^d	2.0 ml	0/2	6,9	1	9

• Krysám kmene Fische (samice, 130 g), které měly 13762F tumor, byly intravenózně podány léky jednou injekcí.

a – Roztok PG-paclitaxelu byl připraven rozpuštěním konjugátu ve fyziologickém roztoku (8 mg ekviv. paclitaxelu/ml). Jedné kryse bylo injekčně podáno 60 mg/kg, tzn. 0,975 ml.

b – Roztok paclitaxelu a Cromophoru byl připraven rozpuštěním paclitaxelu ve směsi ethylalkoholu a Cremophoru v poměru 1:1 (30 mg/ml). Před injekcí byl tento zásobní roztok dále zředěn

fyzilogickým roztokem (1:4). Konečná koncentrace paclitaxelu v roztoku byla 6 mg/ml. Injikovaný objem při 60 mg/ml 1,3 ml na krysu.

c – PG roztok byl připraven rozpuštěním polymeru ve fyziologickém roztoku (22 mg/ml). Indikovaná dávka byla 0,3 g/kg (1,8 ml na krysu), což je ekvivalent dávky paclitaxelu 60 mg/kg.

- 5 d – Cremophorové vehikulum bylo připraveno zředěním směsí ethylalkoholu a Cremophoru (1:1) a s fyziologickým roztokem (1:4).

Tabulka 2

Tumorsupresivní účinek PG–paclitaxelu na různé typy tumorů myši *in vivo*

Tumor	Lék ^a	Čas růstu ^{ab} 500 - 2000 mm ³	AGD ^c	t-test ^d
MCA-4	Fyziologický roztok	4,8±0,8 (5)	-	-
	PG (0,6 g/kg)	9,3±1,1 (4)	4,5	0,0114
	Cremophor vehikulum	6,1±0,7 (5)	1,3	0,265
	PG-Pacl (40 mg/kg)	8,6±1,2 (4)	3,8	0,026
	PG-Pacl (60 mg/kg)	14,2±1,1 (5)	9,4	0,0001
	PG-Pacl (120 mg/kg)	44,4±2,9 (5)	39,6	<0,0001
	Paclitaxel (40 mg/kg)	9,0±0,6 (4)	4,2	0,0044
	Paclitaxel (60 mg/kg)	9,3±0,3 (5)	4,5	0,0006
FSa-II	Fyziologický roztok	1,9±0,1 (5)	-	-
	PG (0,8 g/kg)	2,8±0,2 (6)	0,9	0,0043
	Cremophor vehikulum	2,2±0,2 (6)	0,3	0,122
	PG-Pacl (80 mg/kg)	3,8±0,4 (6)	1,9	0,0016
	PG-Pacl (160 mg/kg)	5,1±0,3 (13)	3,2	<0,0001
	Paclitaxel (80 mg/kg)	4,2±0,3 (6)	2,3	0,0002
	PG+Paclitaxel	3,0±0,2 (6)	1,1	0,0008
HCa-I	Fyziologický roztok	7,3±0,3 (5)	-	-
	PG (0,8 g/kg)	7,7±0,4 (4)	0,4	0,417
	Cremophor vehikulum	6,8±0,8 (5)	-0,5	0,539
	PG-Pacl (40 mg/kg)	8,2±0,7 (5)	0,9	0,218
	PG-Pacl (80 mg/kg)	8,6±0,2 (5)	1,3	0,0053
	PG-Pacl (160 mg/kg)	11,0±0,8 (4)	3,7	0,0023
	Paclitaxel (80 mg/kg)	6,4±0,5 (5)	-0,9	0,138
	PG+Paclitaxel	6,7±0,4 (5)	-0,6	0,294

10

a – Myši s 500 mm³ tumory v pravé dolní končetině byly léčeny různými jednotlivými i.v. injekčními dávkami PG–paclitaxelu (40–120 mg ekviv. paclitaxelu/kg) ve fyziologickém roztoku nebo paclitaxelu v cremophorovém vehikulu. Kontrolní zvířata byla léčena fyziologickým roztokem (0,6 ml), Cremophorovým vehikulem (0,5 ml), PG roztokem ve fyziologickém roztoku
15 nebo PG (g/kg) plus paclitaxelem (80 mg/kg).

b – Růst tumoru byl zjišťován denním měřením tří ortogonálních rozměrů kaliperem a objem byl počítán jako (a x b x c)/2. V závorce je uveden vždy počet myší použitých v určité skupině. Časy růstu (dny) k dosažení změny objemu od 500 do 2000 mm³ jsou uvedeny jako průměr +/- směrodatná odchylka.
20

c – Absolutní denní přírůstek (AGD = Absolute growth daily) je definován jako počet dnů, během kterých tumor léčený různým léčivem vyrostl z 500 na 2000 mm³ minus počet dnů, během kterých tumor vyrostl z 500 a 2000 mm³ při aplikaci pouze fyziologického roztoku.

d – Počet dnů, během kterých tumor vyrostl z 500 na 2000 mm³, byl porovnán u léčených kontrolních skupin (aplikace pouze fyziologický roztoku) pomocí Studentova *t*-testu. Hodnota *p* je dvoumístná a za signifikantní byla považována, pokud byla nižší než 0,05.

5 Příklad 3

Polyethylenglykol–paclitaxel

Syntéza polyethylenglykol–paclitaxelu (PEG–paclitaxel)

Syntéza probíhala ve dvou krocích. V prvním 2'–sukcinyl–paclitaxel byl připraven podle popsaného postupu (Deutsch a kol., 1989). Paclitaxel (200 mg, 0,23 mmol) a anhydrid kyseliny jantarové (288 mg, 2,22 mmol) byly ponechány reagovat v bezvodém pyridinu (6 ml) při pokojové teplotě po tři hodiny. Pyridin byl poté odpařen a zbytek byl smíchán s vodou, míchán během 20 min a filtrován. Precipitát byl rozpuštěn v acetonu, postupně byla přidávána voda a jemné krystaly byly zachovány tak, že se dostalo 180 mg 2'–sukcinyl–paclitaxeu. PEG–paclitaxel byl syntetizován pomocí N–ethoxykarbonyl–2–ethoxy–1,2–dihydrochinolinem (EEDQ) zprostředkované kondenzační reakce. K roztoku 2'–sukcinyl–paclitaxelu (160 mg, 0,18 mmol) a methoxypolyoxyethylenaminu (PEG–NH₂, molekulová hmotnost 5000, 900 mg, 0,18 mmol) v methylenchloridu byl přidán EEDQ (180 mg, 0,72 mmol). Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě po 4 hodiny. Surový produkt byl chromatografován na silikagelu s ethylacetátem a poté směsí chloroformu s methanolem (10:1). Vzniklo tam 350 mg produktu. ¹H NMR (CDCl₃) δ 2,76 (m, jantarová kyselina, COCH₂CH₂CO₂), δ 3,63 (PEG, OCH₂CH₂O), δ 4,42 (C7–H) a δ 5,51 (C2'–H). Maximální UV absorpce byla dosažena při 288 nm, což je charakteristická hodnota pro paclitaxel. Kondenzací s PEG došlo k výraznému zlepšení rozpustnosti paclitaxelu ve vodě (>20 mg ekviv. paclitaxelu na ml vody).

25

Hydrolytická stabilita PEG–paclitaxelu

PEG–paclitaxel byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru (0,01 M) při různých hodnotách pH a při koncentraci 0,4 mM. roztoky byly inkubovány při 37 °C za opatrného míchání. Ve zvolených intervalech byly odebírány vzorky (200 µl), které pak byly lyofilizovány. Vzniklý suchý prášek byl poté rozředěn v methylenchloridu pro gelovou chromatografii (GPC analýza). GPC systém se skládá z Perkin–Elmer PL kolony s lóžem naplněným směsným gelem, Perkin–elmer izokratického LC čerpadla, PE Nelson 900 sériového rozhraní, Spektra–Physics UV/Vis detektoru a datové stanice. Elutant (methylenchlorid) procházel rychlostí 1,0 ml/min UV detektorem nastaveným na 228 nm. Retenční časy PEG–paclitaxelu a paclitaxelu byly 6,1 a 8,2 min. Oblasti píků byly kvantifikovány a bylo spočítáno procento zbývajících PEG–paclitaxelu a procento uvolněného paclitaxelu. Poločas PEG–paclitaxelu byl určený regresní analýzou nejmenším čtvercům při pH 7,4 byl 54 min. Poločas při pH 9,0 byl 7,6 min. Profil uvolňování paclitaxelu z PEG–paclitaxelu při pH 7,4 je znázorněn na obrázku 8.

40 Studie cytotoxicity PEG–paclitaxelu s použitím buněk myšího melanomu B16 *in vitro*

Podle postupu popsaného při studiích cytotoxicity s DTPA–paclitaxelem buňky melanomu byly inokulovány na 24–jamkové plotny o koncentraci 2,5 x 10⁴ buněk/ml a kultivovány v 50:50 Dubeccově modifikovaném minimálním esenciálním médiu (DME) a F12 médiu, které obsahuje 10% bovinní telecí sérum, při 37 °C po 24 hodin v 97% vlhké atmosféře s 5,5% CO₂. Médium poté bylo nahrazeno čerstvým médiem s paclitaxelem nebo s jeho deriváty o koncentraci mezi 5 x 10⁻⁹ N a 75 x 10⁻⁹ M. Po 40 hodinách byly buňky uvolněny trypsinizací a spočítány v Coulter čítači. Konečná koncentrace DMSO (používaný k rozpouštění paclitaxelu) a 0,05M roztoku hydrogenuhličitanu sodného (používaný k rozpouštění PEG–paclitaxelu) v buněčném médiu byla nižší než 0,001 %. Toto množství rozpouštědla nemá žádný vliv na buněčný růst jak dokazují ostatně výsledky kontrolních studií. Kromě toho PEG v koncentračním rozmezí použité k dosažení ekvivalentní koncentrace paclitaxelu od 5 x 10⁻⁹ do 75 x 10⁻⁹ M, neměl žádný vliv na buněčnou proliferaci.

Tumorsupresivní účinek PEG–paclitaxel na MCa–4 tumor u myší

Ke zhodnocení tumorsupresivního účinku PEG–paclitaxelu na solidní karcinom prsu, MCa–4 buňky (5×10^5 buněk) byly injikovány do pravého stehenního svalu samic myší kmene C3Hf/Kam. Stejně jak je popsáno v příkladu 1 s DTPA–paclitaxelem, byl po nárůstu nádorů na 8 mm (asi dva týdny) nasazen paclitaxel nebo PEG–paclitaxel v jednotlivé dávce 10, 20 a 40 mg ekviv. paclitaxelu/kg tělesné hmotnosti. Paclitaxel byl zpočátku rozpuštěn v absolutním ethanolu s ekvivalentním objemem Cremophoru. Tento zásobní roztok byl dále zředěn (1:4, uvedeno objemově) sterilním fyziologickým roztokem 15 minut před injekcí. PEG–paclitaxel byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku (6 mg ekviv. paclitaxelu/ml) a filtrován přes sterilní filtr (milipore, 4,5 μ m). Fyziologický roztok, paclitaxelové vehikulum, absolutní alkohol:Cremophor (1:1) byl zředěn fyziologickým roztokem (1:4) a PEG roztok ve fyziologickém roztoku (600 mg/kg tělesné hmotnosti) byl použit při kontrolních experimentech. Růst tumoru byl denně stanovován měřením ortogonálních průměrů tumoru. Když dosáhla velikost tumoru průměr 12 mm, bylo vyčítáno zdržení nárůstu tumoru.

Růstová křivka tumoru je znázorněna na obr. 9. Při dávce 40 mg/kg jak PEG–paclitaxelu, tak paclitaxelu byl růst tumoru účinně snížen. Paclitaxel je účinnější než PEG–paclitaxel, ačkoli rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Paclitaxelem léčené tumory potřebovaly 9,4 dní, aby dosáhly velikosti 12 mm v průměru, zatímco tumory léčené PEG–paclitaxelem pouze 8,5 dní. Tyto hodnoty již byly statisticky signifikantní ($p > 0,05$) v porovnání s korespondujícími kontrolami, které potřebovaly pouze 6,7 dní v případě paclitaxelového vehikula a 6,5 dní u PEG ve fyziologickém roztoku (obr. 4).

Třebaže kompozice a metody podle tohoto vynálezu byly již popsány s ohledem na výhodná provedení, je zřejmé, že odborník v oboru může aplikovat variace na kompozice, metody a kroky u metod zde popsaných, aniž by vybočil z pojmů, ducha a rozsahu vynálezu. Uvedeno přesněji, je zřejmé, že určité substance chemicky a fyziologicky příbuzné, mohou nahradit substance zde popsané, při dosažení stejných nebo podobných výsledků. Všechny takové podobné náhrady a modifikace zřejmě odborníkovi v oboru, jak se zdá, spadají do pojmů, rozsahu a smyslu tohoto vynálezu, jak je definován v připojených patentových nárocích.

Seznam literatury

Následující literární reference a rozsah poskytující příklady metod nebo jiné podrobnosti, které doplňují údaje zde uvedené, jsou specificky vloženy formou odkazů.

Bartoni a Boitard, „*In vitro* and *in vivo* antitumoral activity of free, and encapsulated taxol,“ *J. Microencapsulation*, 7:191–197, 1990.

Cortes, J.E. a Pazdur, R., „Docetaxel“, *Journal of Clinical Oncology*, 13:2643–2655, 1995.

Deutsch *et al.*, „Synthesis of congeners and prodrugs. 3. water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity,“ *J. Med. Chem.* 32:788–792, 1989.

Eiseman *et al.*, „Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice,“ *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 34:465–471, 1994.

Fidler, *et al.*, „The biology of cancer invasion and metastasis,“ *Adv. Cancer Res.*, 28:149–250, 1987.

Goldspiel, „Taxol pharmaceutical issues: preparation, administration, stability, and compatibility with other medication“, *Ann. Pharmacotherapy*, 28:S23–26, 1994.

Greenwald *et al.*, „Highly water soluble Taxol derivatives, 7–polyethylene glycol esters as potential products,“ *J. Org. Chem.*, 60:331–336, 1995.

Greenwald *et al.*, „Highly water soluble taxol derivative: 2'–polyethylene glycol esters as potential products“, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4:2465–2470, 1994.

- Hirano *et al.*, „Polymeric derivatives of activated cyclophosphamide as drug delivery systems in antitumor therapy“, *Makromol. Chem.*, 180:1125–1130, 1979.
- Hoes *et al.*, „Optimization of macromolecular prodrugs of the antitumor antibiotic adriamycin“, *J. Controlled Release*, 2:205–213, 1985.
- 5 Hofle *et al.*, DE 38942.
- Horwitz *et al.*, „Taxol, mechanisms of action and resistance“, *J. Natl. Cancer Inst. Monograph* No. 15, 55–61, 1993.
- Kato *et al.*, „Antitumor activity of 1- β -arabinofuranosylcytosine conjugated with polyglutamic acid and its derivative“, *Cancer Res.*, 44:25, 1984.
- 10 Kopecek, „The potential for water-soluble polymeric carriers in targeted and site-specific drug delivery“, *J. Controlled Release*, 11:279–290, 1990.
- Kopecek and Kopeckova, „Targetable water-soluble polymeric anticancer drugs, achievements and unsolved problems“, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 20:190–191, 1993.
- Meada and Matsumura, „Tumortropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs“, *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:193–210, 1989.
- 15 Magri and Kingston, „Modified taxols. 2. Oxidation products of taxol“, *J. Org. Chem.*, 51:797–802, 1986.
- Mathew *et al.*, „Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of taxol with antitumor activity“, *J. Med. Chem.*, 35:145–151, 1992.
- 20 Mosmann, T., „Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay“, *J. Immunol. Methods*, 65:55–63, 1983.
- Olier, S. J. *et al.*, „Suppression of collagen-induced arthritis using an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, and a microtubule stabilizer, Taxol“, *Cellular Immunology*, 157:291–299, 1994.
- Phillips-Hughes and Kandarpa, „Restenosis: pathophysiology and preventive strategies“, *JVIR*, 7:321–333, 1996.
- 25 Reynolds, T., „Polymers help guide cancer drugs to tumor targets— and keep them there“, *J. Natl. Cancer Institute*, 87:1582–1584, 1995.
- Scuciero *et al.*, „Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines“, *Cancer Research*, 48:4827–4833, 1988.
- 30 Serruys *et al.*, „A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease“, *N. Engl. J. Med.* 331:489–495, 1994.
- Sharma and Straubinger, „Novel taxol formulations: Preparation and Characterization of taxol-containing liposomes“, *Pharm. Res.*, 11:889–896, 1994.
- 35 US patent 5 583 153
- van Heeswijk *et al.*, „The synthesis and characterization of polypeptide-adriamycin conjugate and its complexes with adriamycin. Part 1“, *J. Controlled Release*, 1:301–315, 1985.
- Weiss *et al.*, „Hypersensitivity reactions from Taxol“, *J. Clin. Oncol.*, 8:1263–1268, 1990.
- WO 96/25176
- 40 Zhao, Z. and Kingston, D.G.I., „Modified taxols, 6. Preparation of water-soluble taxol phosphates“, *J. Natl. Prod.*, 54:1607–1611, 1991.

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Kompozice obsahující protinádorové léčivo konjugované s polymerem ve vodě rozpustným, **vyznačující se tím**, že protinádorovým léčivem je paclitaxel, docetaxel, etoposid, teniposid, camptothecin nebo epothilon a ve vodě rozpustným polymerem je poly(1–glutamová kyselina), poly(d–glutamová kyselina), poly(dl–glutamová kyselina), poly(d–asparagová kyselina), poly(1–asparagová kyselina), poly(dl–asparagová kyselina), polyakrylová kyselina, poly(2–hydroxyethyl–1–glutamin), karboxymethyldextran, hyaluronová kyselina, lidský sérový albumin, alginová kyselina nebo jejich kombinace.

10

2. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že protinádorové léčivo je vybráno z paclitaxelu, docetaxelu a camptothecinu.

15

3. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že uvedený polymer je dále definován jako kopolymer poly(2–hydroxyethyl–1–glutaminu), karboxymethyldextranu, hyaluronové kyseliny, lidského sérového albuminu, polyalginové kyseliny nebo jejich kombinace s polykaprolaktonem, kyselinou polyglykolovou a kyselinou polymléčnou.

20

4. Kompozice podle jakéhokoli z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že polymer má molekulovou hmotnost od přibližně 5000 do zhruba 100 000, s výhodou od přibližně 20 000 do zhruba 80 000.

25

5. Kompozice podle jakéhokoli z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že ve vodě rozpustný polymer je konjugován s 2'– nebo se 7–hydroxypaclitaxelem nebo docetaxelem.

30

6. Kompozice podle jakéhokoli z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že obsahuje od 2 do 35 % hmotnostních protinádorového léčiva.

7. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že ve vodě rozpustným polymerem je poly(1–glutamová kyselina), poly(d–glutamová kyselina), poly(dl–glutamová kyselina), poly(d–asparagová kyselina), poly(1–asparagová kyselina) nebo poly(dl–asparagová kyselina).

35

8. Použití kompozice podle některého z nároků 1 až 7 pro výrobu léčiva pro léčení rakoviny, systémového autoimunitního onemocnění, arteriální restenózy nebo arteriální okluze po vaskulárním traumatu.

40

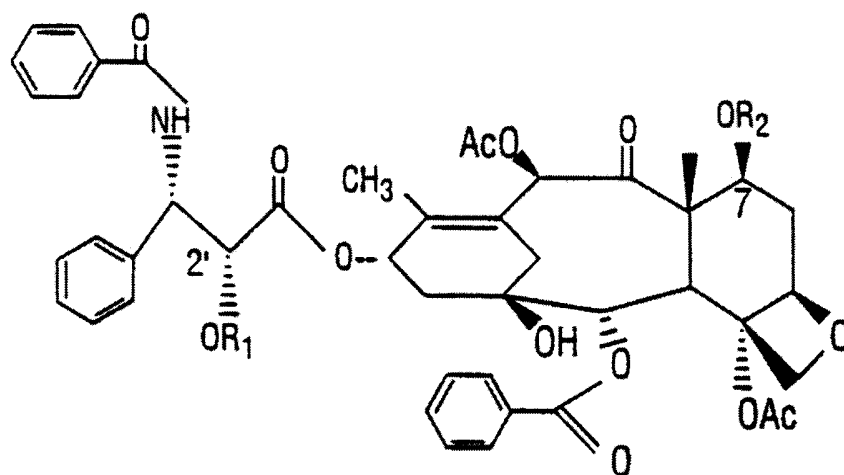
9. Použití podle nároku 8, kde rakovinou je rakovina prsu, vaječníků, maligní melanom, plicní rakovina, rakovina žaludku, rakovina tračnicku, rakovina hlavy a hrdla, leukémie nebo Kaposiho sarkom.

10. Implantovatelná lékařská pomůcka, zvláště stent, **vyznačující se tím**, že je povlečena kompozicí obsahující paclitaxel konjugovaný s polymerem rozpustným ve vodě vymezeným v nároku 1 v množství účinném pro inhibici proliferace buněk hladkého svalstva.

45

50

11 výkresů



Paclitaxel: $R_1 = R_2 = H$

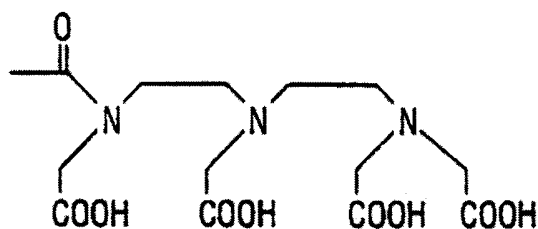
PEG-Paclitaxel:

$R_1 = COCH_2CH_2CONHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nOCH_3$
 $R_2 = H$

7-DTPA-paclitaxel:

$R_1 = H$

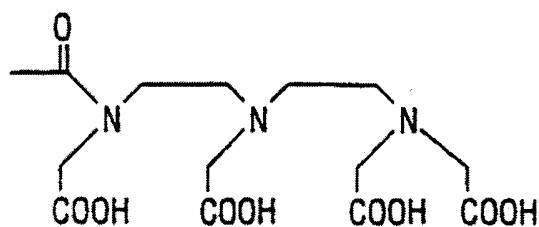
$R_2 =$



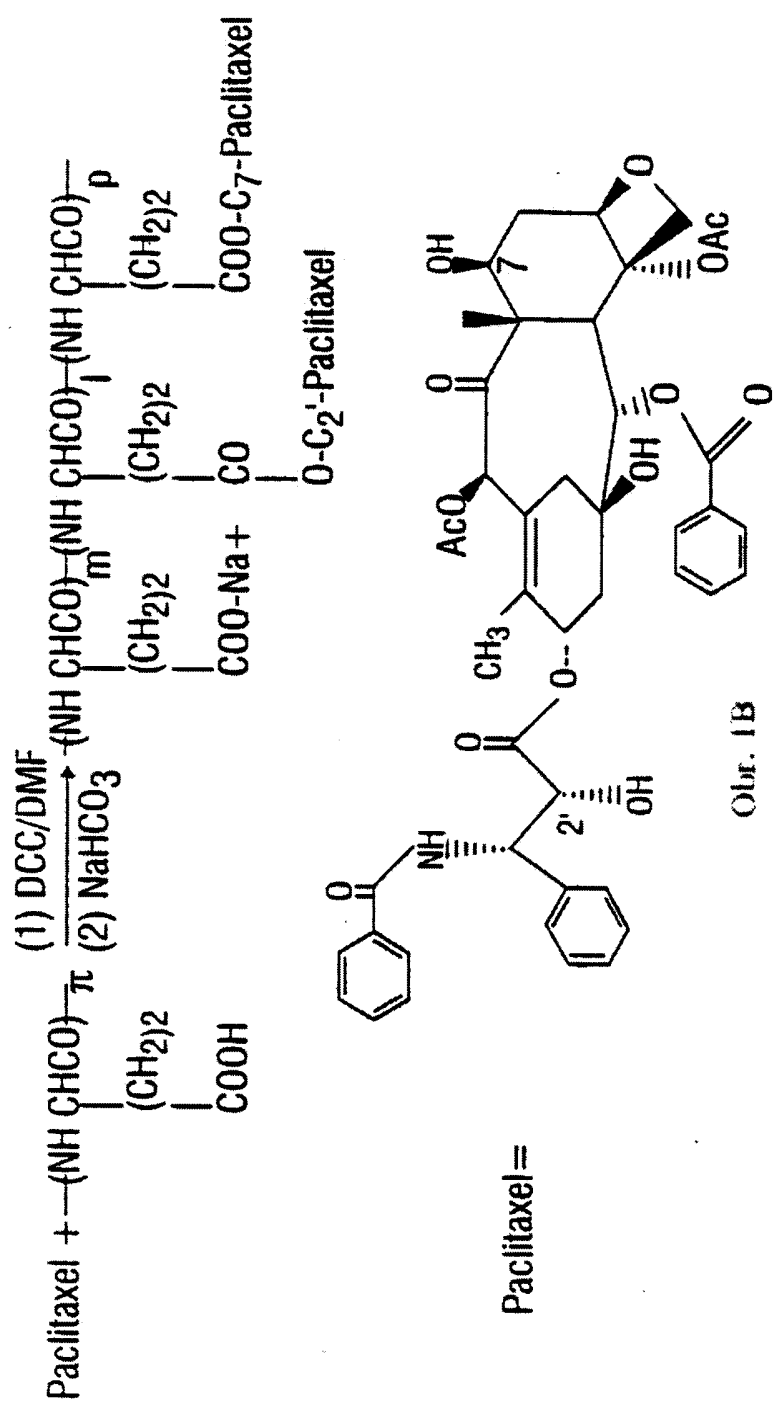
2'-DTPA-paclitaxel:

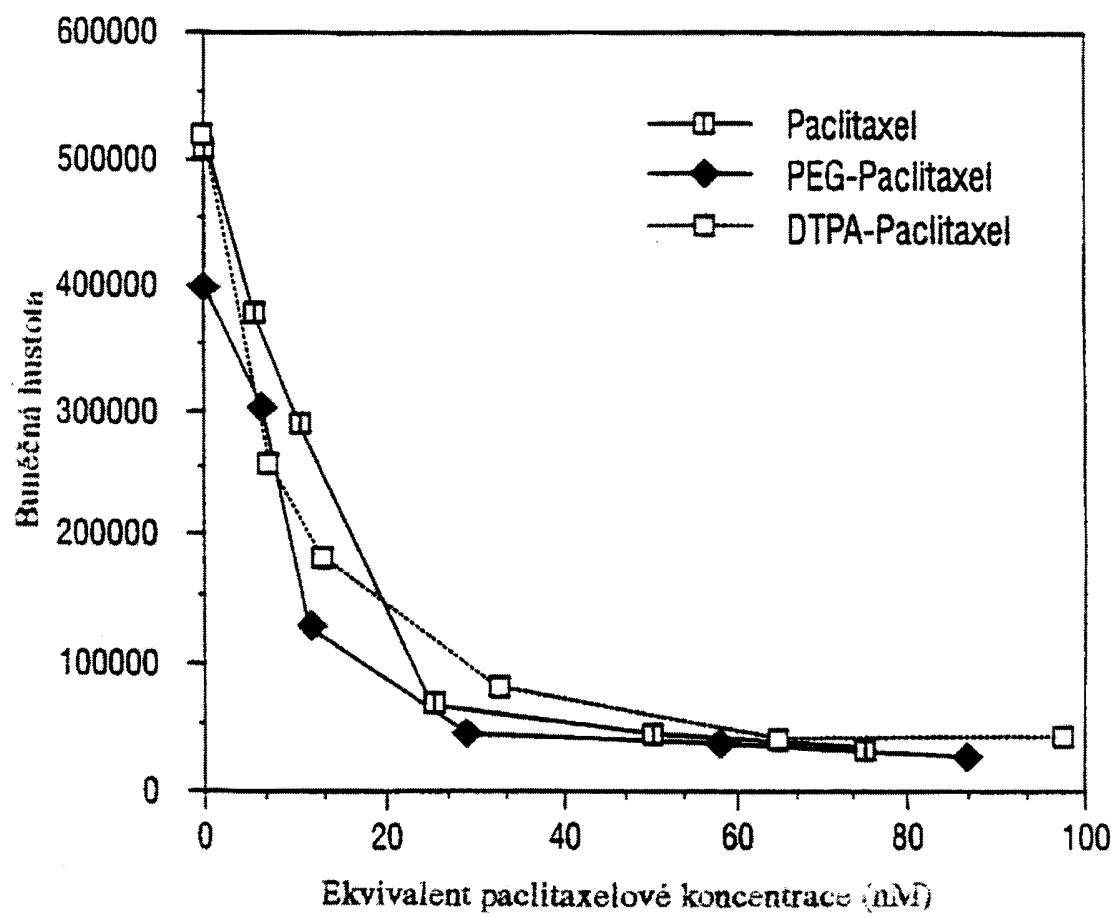
$R_1 =$

$R_2 = H$

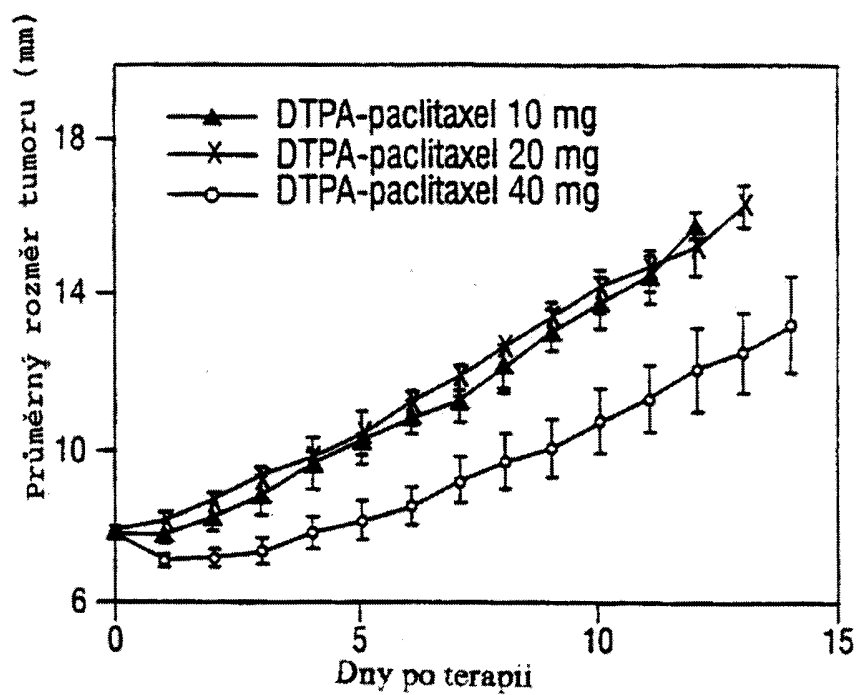


Obt. 1A

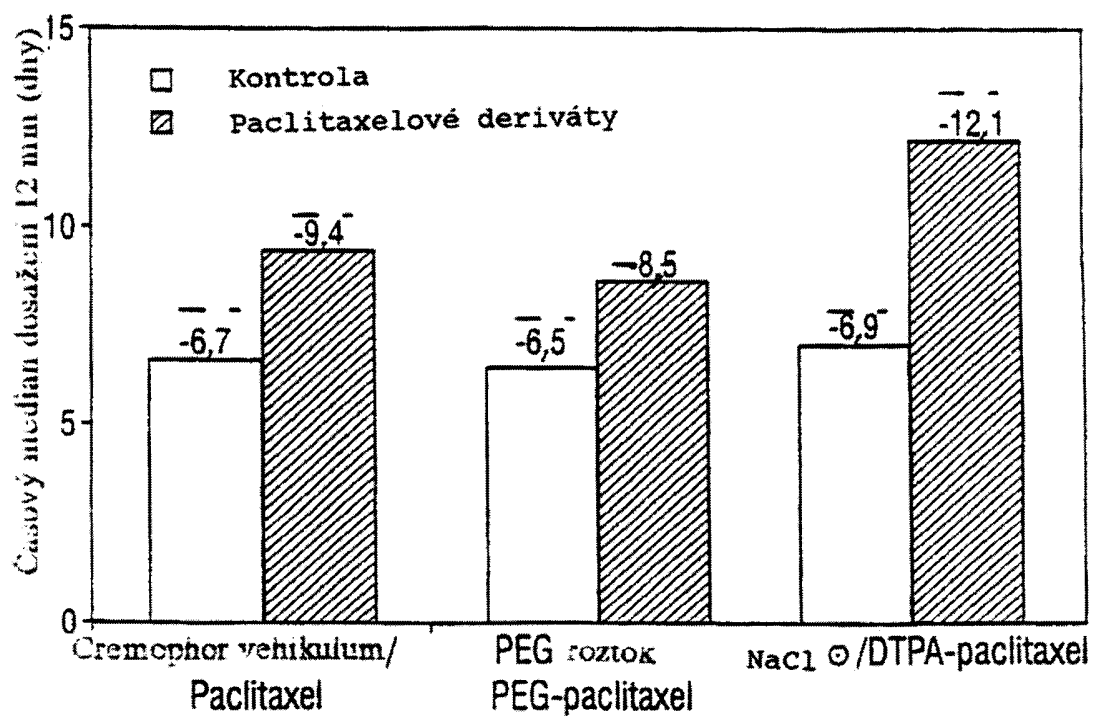




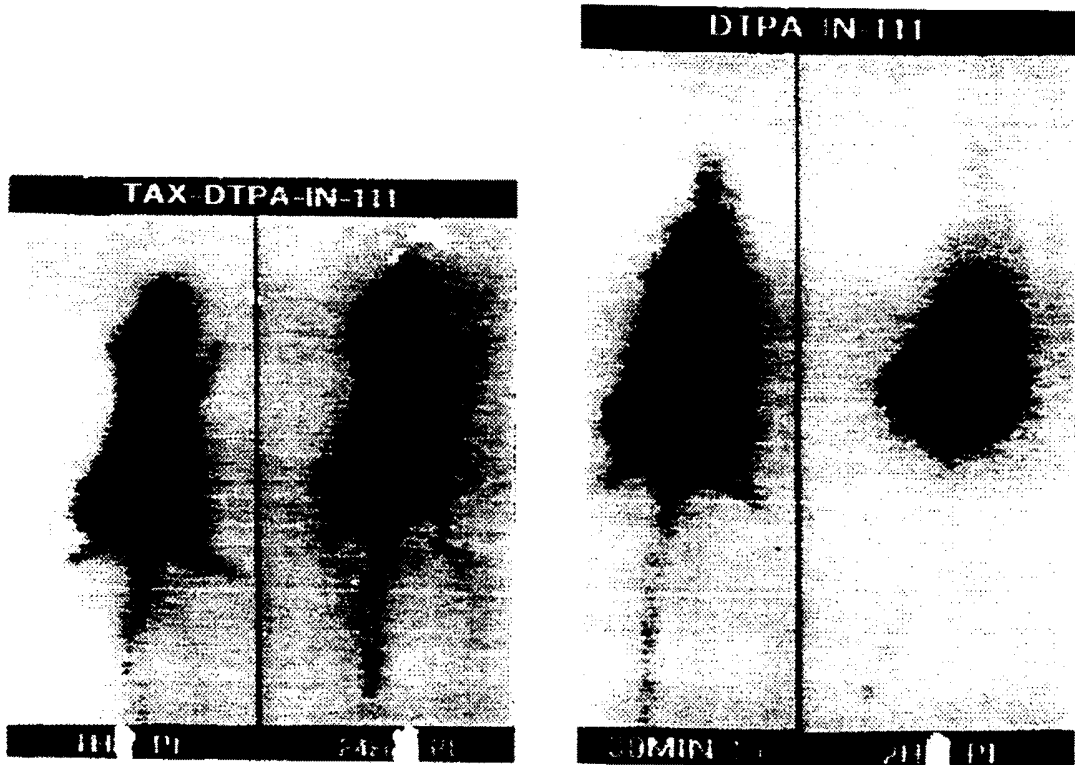
Obr. 2



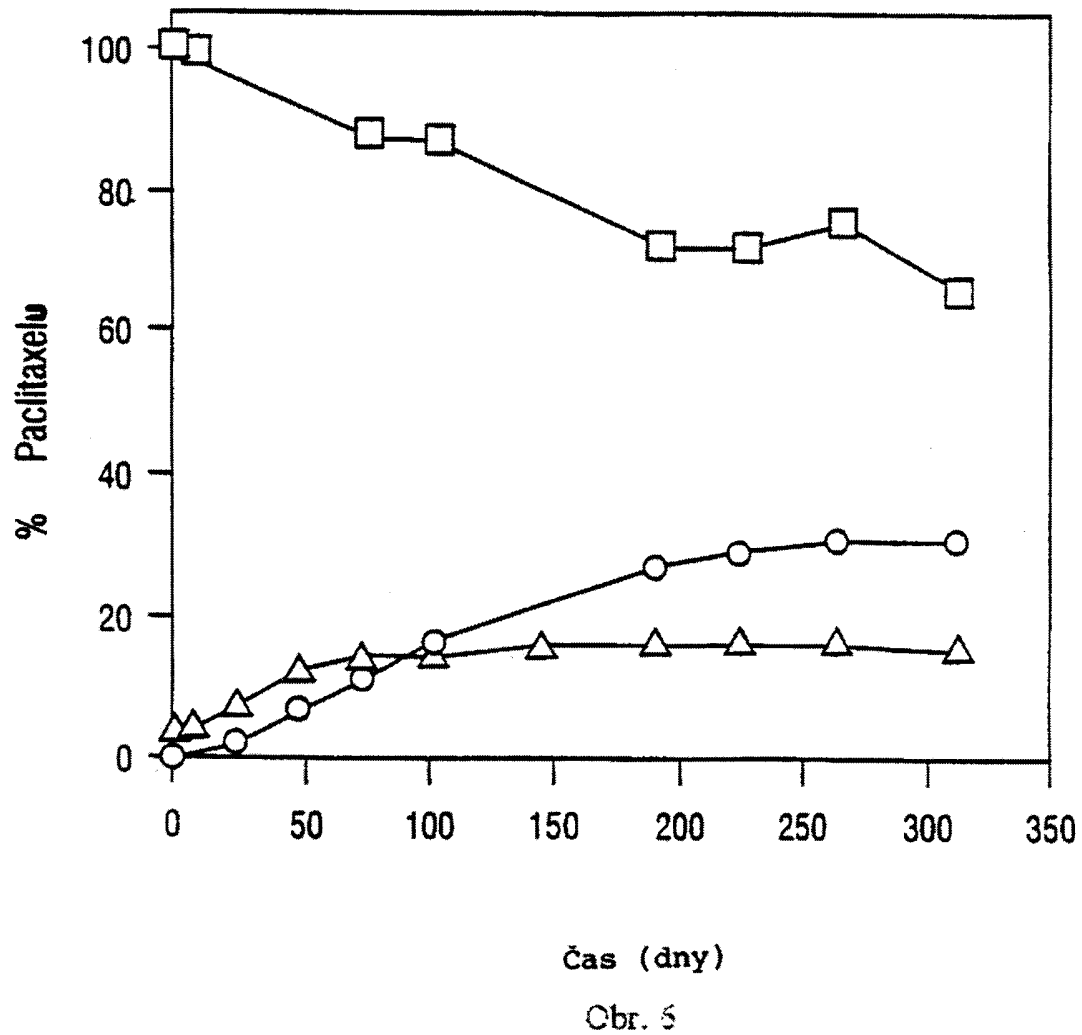
Obr. 3

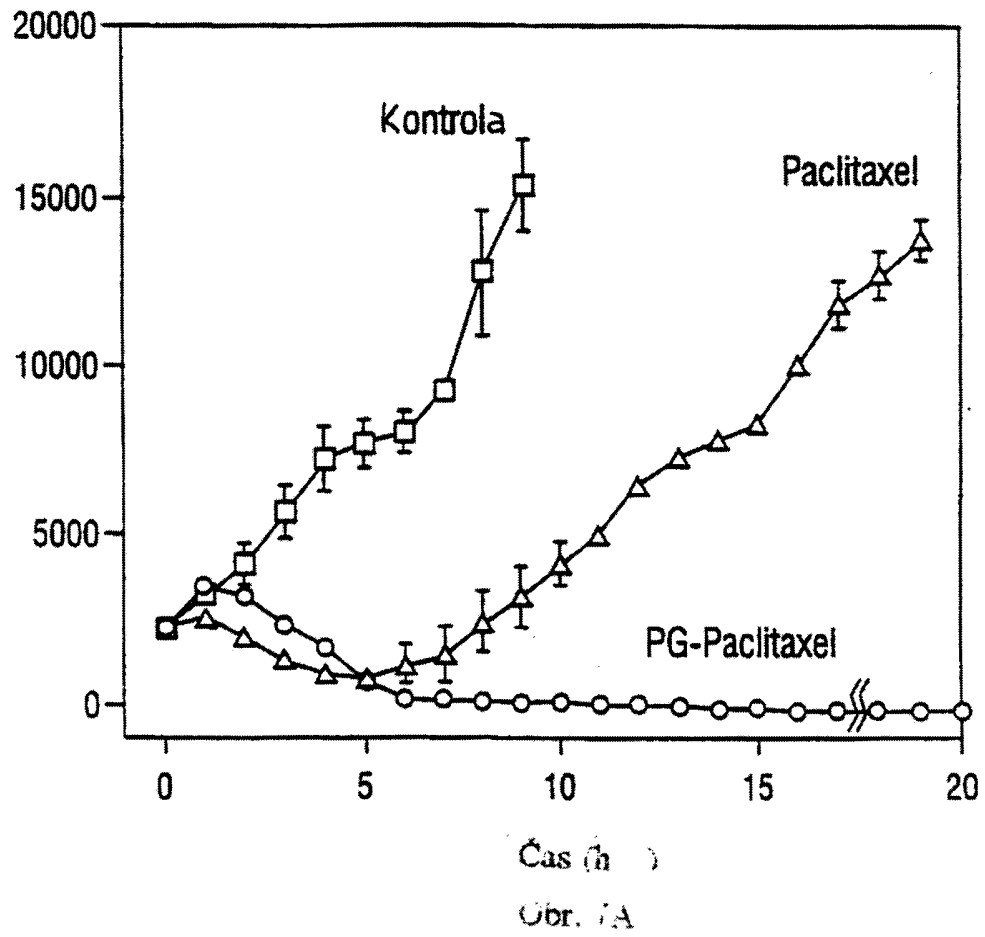


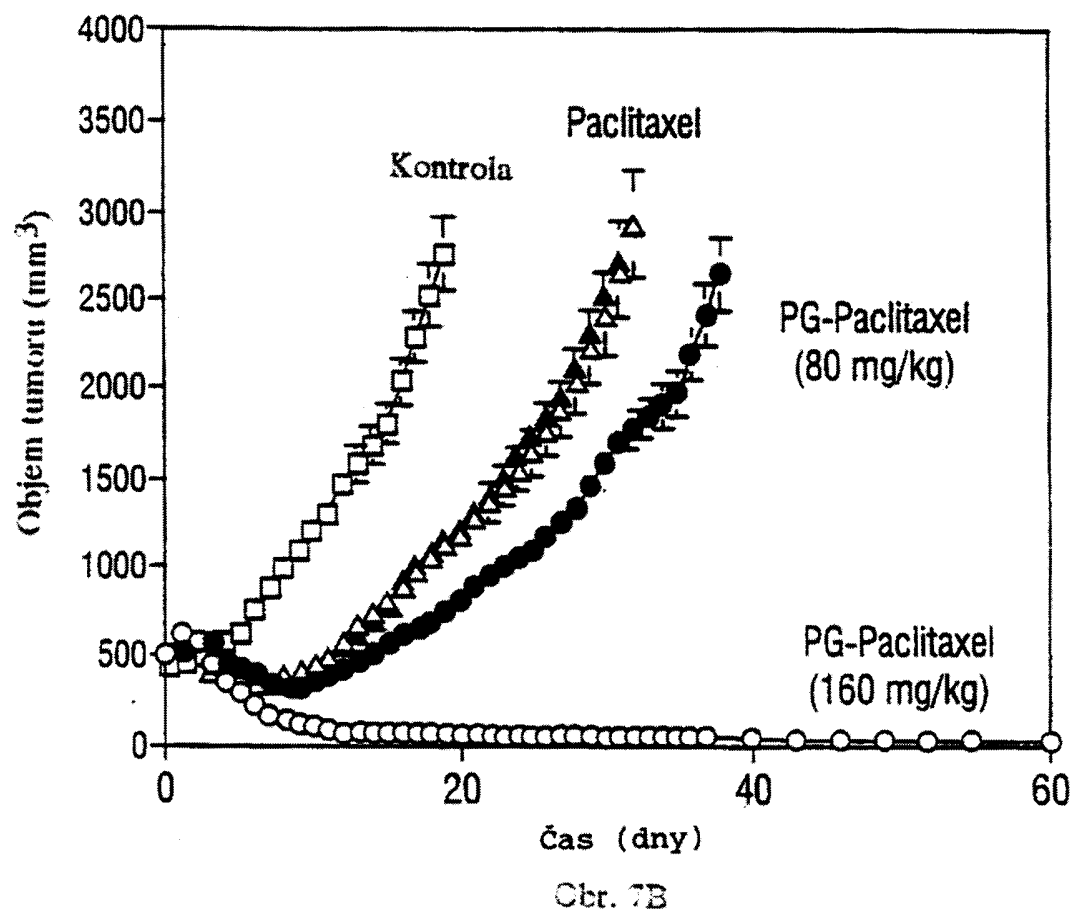
Obr. 4

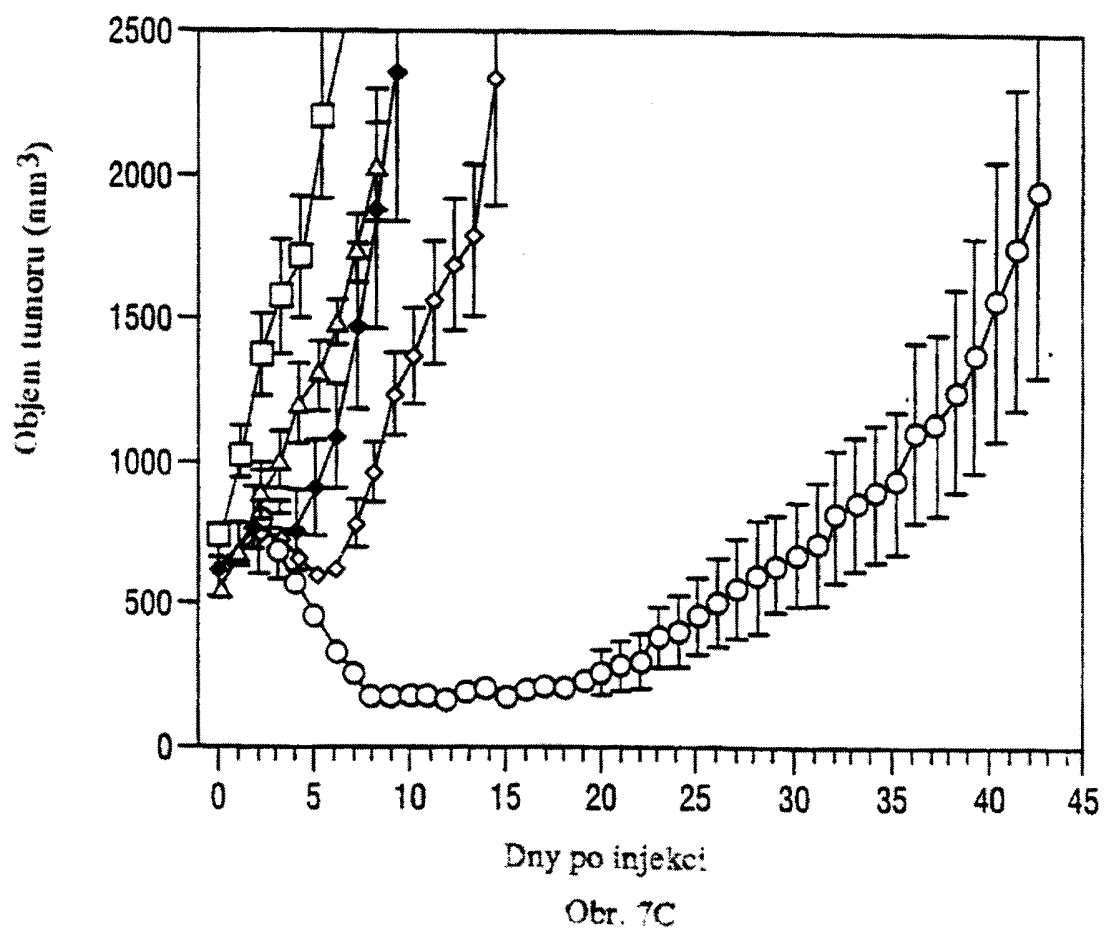


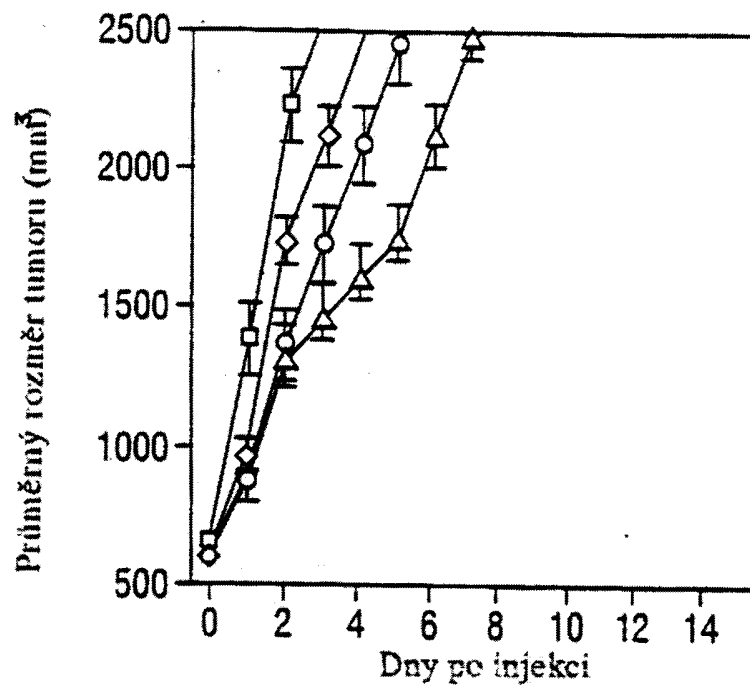
Chr. 5



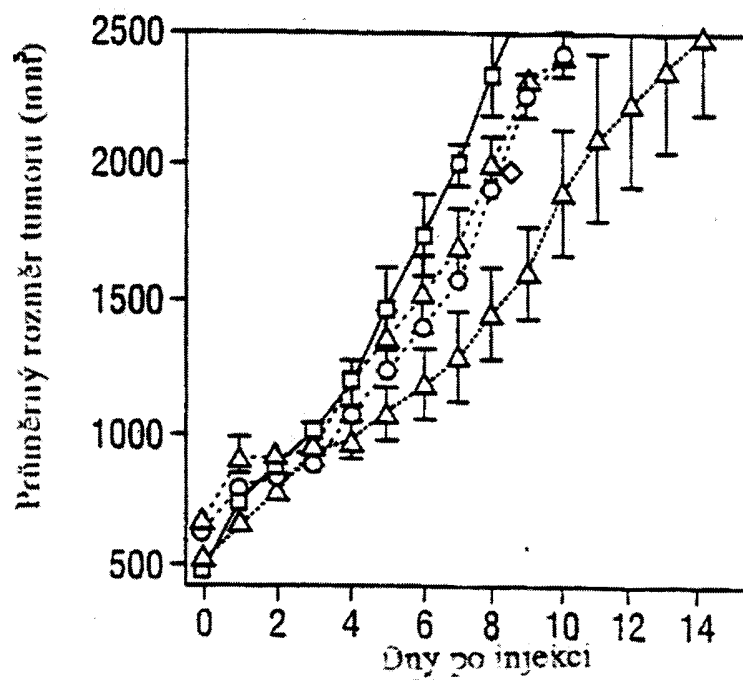




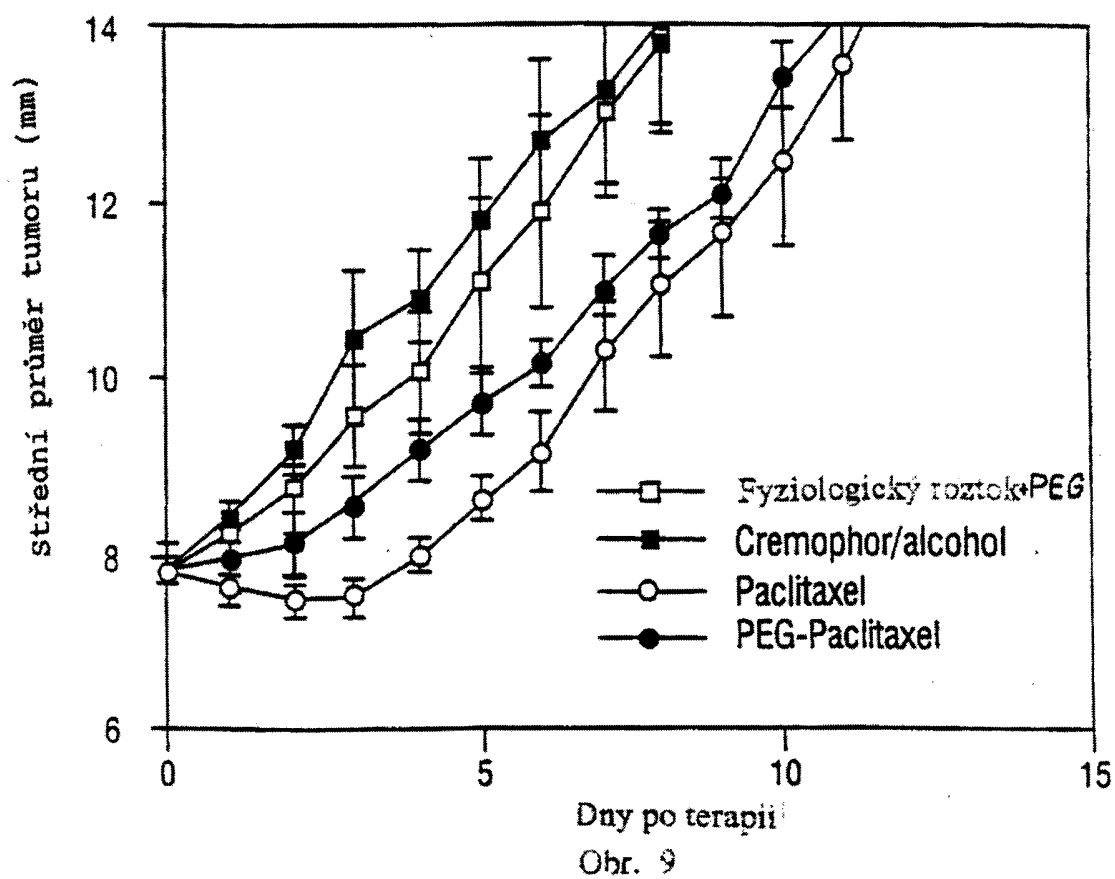
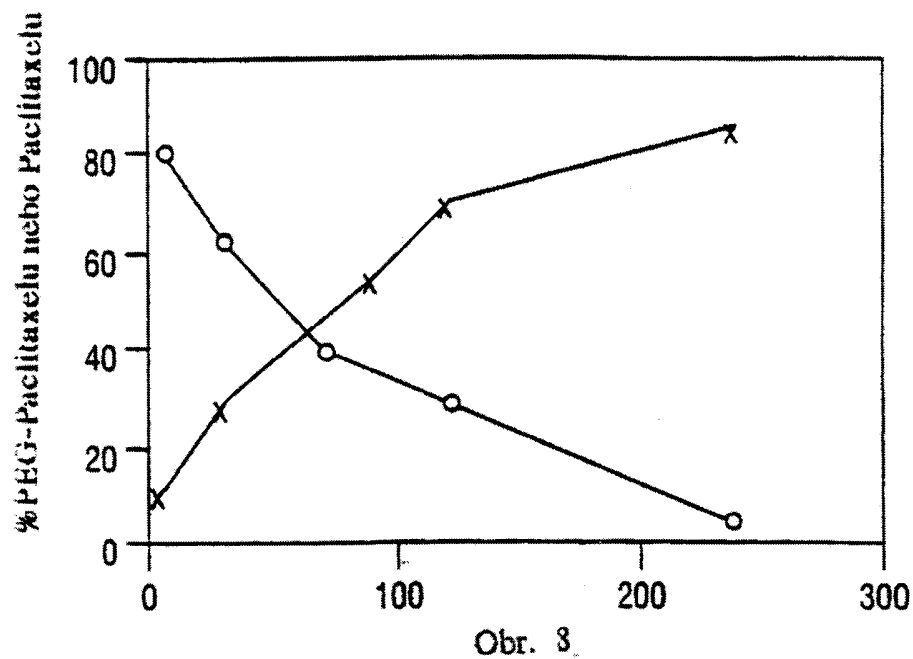




Obr. 7D



Obr. 7E



Konec dokumentu