PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 419

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/48	(2006.01)
C08F 20/56	(2006.01)
C08F 20/58	(2006.01)
C08G 65/02	(2006.01)
C08G 65/329	(2006.01)
A61K 38/06	(2006.01)
A61K 38/07	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 35/02	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-206**
(22) Přihlášeno: **11.04.2016**
(40) Zveřejněno: **01.11.2017**
(Věstník č. 44/2017)
(47) Uděleno: **01.07.2020**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **12.08.2020**
(Věstník č. 33/2020)

(56) Relevantní dokumenty:
http://slideplayer.com/slide/8097208/ obr 7, 9 a 10. A. Braunová „Block copolymers of poly(N-2-hydroxypropyl methacrylamide) and poly(propyleneglycol) – the way to inhibit P-Glycoprotein?"; A. Braunová a kol.: Block copolymers of poly(N-2-hydroxypropyl methacrylamide and poly(propyleneglycol) – The way to inhibit P-Glycoprotein?" Pharm. Anal. Acta 2015, 6 (1) 30.; R. Wei a kol.: „Reduction- responsive disassembable core-cross-linked micelles based on poly(ethyleneglycol)-b-poly(N-2-hydroxypropyl methacrylamide)-lipoic acid conjugates for triggered intracellular anticancer drug release." Biomacromolecules 13 (8) 2429-38 (2012); A. Braunova: „Block copolymers of poly(N-2-hydroxypropyl methacrylamide) and poly(propyleneglycol) – the way to inhibit P-Glycoprotein?" 5th International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems 16-18.3.2015 Crowne Plaza, Dubai, http://generic-market.pharmaceuticalconferences.com/abstract/2015/block-copolymers-of-poly-n-2-hydroxypropyl-methacrylamide-and-poly-propylene-glycol-the-way-to-inhibit-p-glycoprotein; T. Etrych a kol.: „New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties" Journal of Controlled Release 73, 89-102 (2001); T. Etrych a kol.: „HPMA Copolymer Conjugates of Paclitaxel and Docetaxel with pH-controlled Drug Release" Mol. Pharmaceutics, 2010, 7(4) 1015-1026.

(73) Majitel patentu:
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i., Praha 6, Břevnov, CZ
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, Krč, CZ

(72) Původce:
RNDr. Tomáš Etrych, Ph.D., Mníšek pod Brdy, CZ
Ing. Libor Kostka, Ph.D., Řevničov, CZ
Ing. Alena Braunová, Ph.D., Praha 10, CZ
Mgr. Lucie Cuchalová, Ph.D., Praha 3, CZ
RNDr. Milada Šírová, Ph.D., Praha 4, CZ
Mgr. Olga Janoušková, Ph.D., Brandýs nad Labem, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:

Blokový kopolymer pro překonání lékové rezistence nádorů k chemoterapii, jeho polymerní konjugát s léčivem, farmaceutická kompozice je obsahující, způsob jejich přípravy a jejich použití

(57) Anotace:
Předkládané řešení se týká blokového kopolymeru pro překonání lékové rezistence nádorů k chemoterapii, zahrnujícího bloky A a B navzájem spojené kovalentní vazbou nebo hydrolyticky či enzymaticky biodegradovatelnou spojkou, přičemž hydrofilní blok A je tvořen poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidem), popřípadě s příměsí komonomerů umožňujících kovalentní navázání léčiv, a hydrofobní blok B je tvořen polypropylenoxidem. Řešení se dále týká polymerního konjugátu, obsahujícího blokový kopolymer a nízkomolekulární léčivo, farmaceutické kompozice je obsahující a jejich použití v medicíně.

CZ 308419 B6

Blokový kopolymer pro překonání lékové rezistence nádorů k chemoterapii, jeho polymerní konjugát s léčivem, farmaceutická kompozice je obsahující, způsob jejich přípravy a jejich použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká blokového kopolymeru pro překonání lékové rezistence nádorů k chemoterapii, jeho polymerního konjugátu s léčivem, farmaceutické kompozice je obsahující, způsobů jejich přípravy a jejich použití jako micelárních nosičů léčiv, umožňujících překonání vícečetné lékové rezistence nádorů.

Dosavadní stav techniky

V současné době je v oblasti léčby různých onemocnění, zejména nádorových, snaha využít ve větší míře látky na bázi polymerů, které mohou sloužit jako tzv. polymerní nosiče léčiv. Podmínkou jejich použití pro lékařské účely je jejich biokompatibilita, schopnost snížení nespecifické toxicity navázaného léčiva oproti nízkomolekulárnímu léčivu, prodloužení cirkulace léčiva v krevním řečišti, možnost vyloučení polymerního nosiče z organismu (nejlépe pomocí glomerulární filtrace) po dopravení léčiva do místa určení a v neposlední řadě i akumulace léčiva v cílové tkáni a jeho řízené uvolňování z polymerního nosiče. Již dříve bylo zjištěno, že vysoká molární hmotnost polymerních nosičů a jejich konjugátů s léčivy významně ovlivňuje a přispívá k tzv. pasivní akumulaci léčiva v pevných nádorech. Tento jev se nazývá EPR efekt (Enhanced Permeability and Retention effect). Na jeho základě jsou v pevných nádorech přednostně akumulovány vysokomolekulární látky jak ve vodě rozpustné, tak i tvořící ve vodě částice o rozměrech několik desítek až stovek nanometrů. Tento fakt je dnes již ve velké míře využíván pro přípravu polymerních konjugátů s kovalentně vázaným kancerostatikem, specificky se akumulujících ve většině pevných nádorů. Nízkomolekulární kancerostatikum je na polymerní nosič navázáno degradovatelnou vazbou umožňující řízené uvolnění dopravovaného léčiva z nosiče v jeho původní aktivní formě buď v nádorové tkáni, nebo přímo v nádorové buňce.

V posledních letech se velmi rozšířil výzkum a vývoj polymerních nosičů léčiv na bázi kopolymerů *N*-(2-hydroxypropylmethakryl)amidu (PHPMA), které jsou vodorozpustné, netoxické pro živý organismus, zcela biokompatibilní s živými tkáněmi, a navíc umožňují vazbu např. léčiva, inhibitoru ABC transportérů, struktur směrujících k buněčným receptorům a dalších biologicky aktivních molekul. PHPMA umožňují modifikaci hlavního řetězce jiným polymerním řetězcem, a to jak na koncích řetězce, tak i podél tohoto řetězce tzv. roubováním. Jinými typy polymerů, studovanými i využívanými v klinické praxi jako různé typy či formy polymerních nosičů léčiv, jsou např. různé deriváty poly(ethylenoxid)u, kopolymery poly(ethylenoxid)u a poly(propylenoxid)u (Pluronic nebo Poloxamer), poly(N-vinylpyrrolidon)u, kopolymery kyseliny mléčné a glykolové, deriváty polyfosfazenů, polyanhydridů, poly(ε-kaprolakton)u, polyfosfoesterů, poly(kyanoakrylát)u, poly(methylakrylát)ů a poly(methakrylové kyseliny), poly(N-isopropylakrylamid)u a další. Pro vazbu nízkomolekulárního kancerostatika na polymerní nosič kovalentní vazbou jsou využívány biodegradovatelné vazby, např. amidová, hydrazonová, acetalová, disulfidová apod. Tyto vazby jsou obvykle stálé v krevním řečišti a jsou specificky štěpeny v prostředí nádoru či nádorové buňky. Není zde proto riziko, že se nízkomolekulární kancerostatikum uvolní nespecificky již při cirkulaci v krevním řečišti, kde by působilo toxicky, a navíc by se ve velmi krátké době vyloučilo z organismu, aniž by dosáhlo požadovaného místa určení (např. nádoru).

Doprava kancerostatika do místa požadovaného účinku je však jedním, nikoli jediným předpokladem pro úspěšnou léčbu nádorových onemocnění. Při opakované léčbě cytostatiky často dochází ke snížení její účinnosti v důsledku rezistence nádorových buněk vůči strukturně i funkčně odlišným cytotoxickým léčivům, zejména pak antracyklinovým antibiotikům, mezi něž

patří např. doxorubicin (DOX). Rezistence nádorových buněk (anglicky multidrug resistance; MDR) vůči léčivům je vyvolána většinou dlouhodobým působením cytotoxických látek na tyto buňky a jejich obrannou reakcí je proto snižování intracelulární koncentrace léčiva pomocí různých mechanismů. Jedním z nejvýznamnějších, a proto také často studovaných mechanismů, je eflux léčiva, při němž dochází prostřednictvím speciálních transmembránových proteinů k „vypumpovávání“ cytostatik ven z buňky, a to dříve, než léčivo může v buňce působit. Ve velké většině případů je tento jev způsoben membránovým vysokomolekulárním glykoproteinem, nazvaným P-glykoprotein (P-gp). P-gp patří do velké rodiny tzv. ABC transportérů, které jsou charakterizovány dvěma ATP doménami, na nichž probíhá hydrolýza ATP za uvolnění energie, potřebné k transportu substrátu ven z buňky. P-gp je ATP dependentní efluxní pumpou endogenních či exogenních látek s širokou substrátovou specifitou, která jej značně odlišuje od ostatních ABC transportérů, jejichž substráty bývají úzké skupiny látek. P-glykoprotein je součástí plazmatické membrány buněk a nachází se v buňkách řady důležitých orgánů, např. jater, ledvin, střev a dalších, kde se účastní aktivního transportu iontů, aminokyselin, peptidů, cukrů, ale právě i léčiv a jejich metabolitů zevnitř buňky do extracelulárního prostředí. Zatímco ve zdravých buňkách P-gp funguje jako ochrana proti průniku xenobiotik do organismu, v případě nádorových buněk, kde je tento protein exprimován v mnohem větším množství, přispívá díky této své vlastnosti k odolnosti nádorových buněk vůči působení léčiv. Inhibicí tohoto procesu je možné docílit lepšího pronikání léčiv do buněk a udržet zde dostatečně vysokou hladinu léčiva potřebnou pro účinnější terapii.

Jedním z možných řešení, jak docílit inhibice funkce P-gp, a tím i umožnění vstupu léčiva do buňky a jeho působení uvnitř, je strukturní modifikace léčiv, nebo použití speciálních inhibitorů P-gp v kombinaci s terapeutikem. Použití samotného inhibitoru však mívá velmi závažné vedlejší účinky. Navíc hrozí inhibice funkce P-gp i v normálních, tedy zdravých buňkách. V současnosti se vědci snaží řešit otázku vedlejších účinků P-gp inhibitorů (např. na bázi Ritonaviru či Reversinu) jejich vazbou na makromolekulární nosič, na který je rovněž navázáno cytostatikum, případně kombinací polymerního inhibitoru s polymerním kancerostatikem.

Jinou alternativu nabízí použití polymerního konjugátu s léčivem, kdy část polymerního nosiče působí zároveň jako P-gp inhibitor. Z literatury je známo studium micelárních nosičů na bázi Pluronicu, triblokového kopolymeru poly(ethylenoxid)u (PEO) a poly(propylenoxid)u (PPO) PEO-PPO-PEO, u kterého bylo zjištěno, že je schopen inhibovat P-gp. Micelární systémy na bázi Pluronicu mohou být používány jako solubilizátory ve vodě nerozpustných léčiv (např. DOX) a zároveň jako „nanokontejnery“ pro tato léčiva, která mají být uvolněna pouze ve specifickém místě působení (např. v pevném nádoru). Polymerní micely, polymerosomy nebo jiné formy nanočástic, např. nanosystémy na bázi dendrimerů, jsou typem polymerního nosiče, který by měl být schopen (vlivem EPR efektu) pasivně směrovat celý systém do vaskularizovaných pevných nádorů, kde by mělo dojít ke zvýšené akumulaci vysokomolekulárního léčiva. Micely se skládají z hydrofobního jádra, do kterého je buď fyzikálními interakcemi, nebo kovalentně inkorporováno nízkomolekulární léčivo, a z hydrofilního obalu (slupky), která je většinou tvořena hydrofilními polymery (nejčastěji na bázi PEO) chránicími celý systém před agregací a před interakcemi s komponentami živého organismu (makrofágy a buňky imunitního systému, buňky RES) a zachycováním v játrech. Systémy na bázi vysokomolekulárních látek, ať již ve formě vodorozpustných nosičů, micel, liposomů, polymerosomů či jiných nanosystémů, slibují účinnější a bezpečnější použití kancerostatik oproti současné klasické chemoterapii.

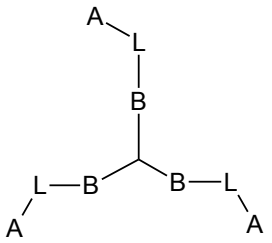
Léčiva, která obchází mnohačetnou lékovou rezistenci inhibicí funkce P-glykoproteinu (P-gp) blokovými kopolymery PPO s PEO (US 2013/0195964 (A1); Batrakova, E.V.; Kabanov, A.V., J. *Control. Release* 2008; *130*: 988 až 106; Chen, L.; Sha, X.; Jiang, X.; Chen, Y.; Ren, Q.; Fang, X., *Int. J. Nanomedicine* 2013; *8*: 73 až 84; Alakhova, D.Y.; Rapoport, N.Y.; Batrakova, E.V.; Timoshin, A.A.; Li, S.; Nicholls, D.; Alakhov, V.Y., Kabanov, A.V.; J. *Control. Release* 2010; *142(1):* 89 až 100; Alakhova, D.Y.; Zhao, Y.; Li, S.; Kabanov, A.V., *PLOS ONE*, 2013; *8(8):* e72238) a která současně používají tyto amfifilní kopolymery jako micelární nosiče léčiva, mají hydrofobní léčivo zachyceno v hydrofobním jádře micely pouze hydrofobními interakcemi a

k jeho uvolnění dochází kombinací difuze a rozpadu micely při snížení koncentrace kopolymeru v tělních tekutinách pod kritickou micelární koncentraci (CMC). Nevýhodou systémů s nekovalentně inkorporovanými léčivy je neustálé uvolňování léčiva způsobené difuzí, a to i ve zdravých částech organismu, v průběhu transportu systému do cílové tkáně.

Podstata vynálezu

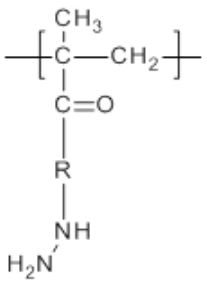
Předkládaný vynález se týká blokového kopolymeru, jeho biodegradovatelného konjugátu s nízkomolekulárním léčivem a přípravků pro léčbu zejména nádorových onemocnění. Výsledná polymerní kancerostatika umožňují cílenou terapii zejména špatně léčitelných rezistentních nádorových onemocnění v humánní medicíně. Tato polymerní kancerostatika umožňují cílený účinek kancerostatik (zejména doxorubicinu) na pevné nádory při současném překonání vícečetné lékové rezistence (MDR) nádorů k chemoterapii. Vynález se týká amfifilního blokového kopolymeru, popřípadě jeho konjugátu s léčivem, který ve vodném prostředí vytváří polymerní micely, jejichž velikost a struktura se řídí hydrofilicitou a hydrofobicitou jednotlivých bloků, jejich délkou a poměrem hydrofilní a hydrofobní části molekuly. Polymerní micely, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, se skládají z hydrofilní obalové vrstvy, tvořené hydrofilním polymerem na bázi *N*-(2-hydroxypropylmethakryl)amidu (HPMA), a z hydrofobního jádra, tvořeného polymerem na bázi poly(propylenoxid)u (PPO). Případné léčivo je k polymeru vázáno pH-senzitivní kovalentní vazbou, což zamezuje samovolnému uvolňování léčiva v tělních tekutinách difuzí nebo při rozpadu micely při snížení koncentrace kopolymeru pod kritickou micelární koncentraci (CMC). Blokový kopolymer podle předkládaného vynálezu působí sám o sobě jako inhibitor P-glykoproteinu, lze jej proto využít i samostatně (bez konjugovaného léčiva) v kombinaci s nízkomolekulárními léčivy pro překonání vícečetné lékové rezistence nádorů k chemoterapii.

Předmětem předkládaného vynálezu je blokový kopolymer pro překonání lékové rezistence nádorů k chemoterapii, zahrnující alespoň jeden blok A a alespoň jeden blok B, ve kterém alespoň jeden blok A a alespoň jeden blok B jsou navzájem spojeny hydrolyticky nebo enzymaticky biodegradovatelnou spojkou L, kterou je oligopeptid o počtu aminokyselin od 2 do 5, navázaný k blokům A a B amidovou vazbou, přičemž bloky A a B jsou uspořádané v pořadí A-L-B nebo A-L-B-L-A nebo B-L-A-L-B, nebo podle obecného vzorce III,



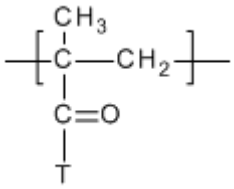
(III),

a přičemž hydrofilní blok A je tvořen poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidem), popřípadě obsahujícím do 20 mol. % monomerních jednotek obecného vzorce I,



(I),

kde R je aminoacyl vybraný ze skupiny sestávající z glycylu, glycylglycylu, *β*-alanylu, 6-aminohexanoylu, *4*-aminobenzoylu, acylů vycházejících z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, zejména GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyPheLeuGly; navázaný aminoskupinou aminoacylu R ke karbonylové skupině monomerní jednotky obecného vzorce I, a/nebo do 15 mol. % monomerních jednotek obecného vzorce II,



(II),

kde T je oligopeptid vybraný ze skupiny sestávající z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, navázaný aminoskupinou oligopeptidu ke karbonylové skupině monomerní jednotky obecného vzorce II, s výhodou je oligopeptidem GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly, GlyPheLeuGly, AspProLys, AspProSer a AspProGly;

a hydrofobní blok B je tvořen polypropylenoxidem;

přičemž blok A má molekulovou hmotnost M_n v rozmezí od 4000 do 60 000 g/mol (což odpovídá 25 až 400 monomerním jednotkám), s výhodou je M_n v rozmezí od 5500 do 40 000 g/mol (37 až 260 monomerních jednotek), a blok B má molekulovou hmotnost M_n v rozmezí od 1000 do 17 600 g/mol (což odpovídá 23 až 400 monomerním jednotkám), s výhodou má molekulovou hmotnost 1500 až 12 000 g/mol (34 až 270 monomerních jednotek);

a přičemž molekulová hmotnost blokového kopolymeru je v rozmezí od 5000 do 95 000 g/mol.

V dalším provedení je spojka L vybraná ze skupiny zahrnující oligopeptidy AspProLys, AspProLysProAsp, GlyLeuGly, GlyPheGly, GlyPheLeuGly, GlyLeuPheGly.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž polymerní konjugát, který obsahuje blokový kopolymer podle předkládaného vynálezu, a který dále obsahuje od 1 do 25 % hmotn. nízkomolekulárního léčiva, kovalentně vázaného hydrazonovou vazbou hydrazidové skupiny monomerní jednotky obecného vzorce (I) s karbonylovou skupinou nízkomolekulárního léčiva a/nebo amidovou vazbou aminoskupiny nízkomolekulárního léčiva ke karboxylu skupiny T monomerní jednotky obecného vzorce (II) bloku A, přičemž léčivem je nízkomolekulární cytostatikum vybrané ze skupiny obsahující doxorubicin, docetaxel, paklitaxel, pirarubicin, mitomycin C, daunorubicin, larotaxel. Nízkomolekulárním léčivem se rozumí léčivo, které má molekulovou hmotnost v rozmezí od 200 do 1000 g/mol.

Molekula nízkomolekulárního léčiva je k monomeru bloku A polymerního konjugátu vázána hydrolyticky štěpitelnou kovalentní vazbou, s výhodou hydrazonovou nebo peptidovou vazbou.

V jednom provedení je blokový kopolymer podle předkládaného vynálezu a/nebo polymerní konjugát podle předkládaného vynálezu ve formě micely. Velikost a struktura micel závisí na hydrofilicitě a hydrofobicitě bloků A a B a na jejich délce. Hydrofilní obalová vrstva micely je tvořena blokem A, s případně navázaným léčivem, a hydrofobní jádro je tvořeno blokem B.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž způsob přípravy blokového kopolymeru podle předkládaného vynálezu, s vyloučením přípravy látek obecného vzorce (III), který obsahuje následující kroky:

- krok radikálové polymerizace *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, popřípadě s obsahem do 20 mol. % monomeru obecného vzorce I, kde R je aminoacyl vybraný ze skupiny sestávající z glycylu, glycylglycylu, *ß*-alanylu, 6-aminohexanoylu, 4-aminobenzoylu, acylů vycházejících z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, zejména GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyPheLeuGly, chráněného na hydrazidových skupinách *terc*-butyloxykarbonylovými (Boc) skupinami, a/nebo popřípadě s obsahem do 15 mol. % monomeru obecného vzorce II, kde T je oligopeptid vybraný ze skupiny sestávající z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, s výhodou je oligopeptidem GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly, GlyPheLeuGly, AspProLys, AspProSer a AspProGly;

při teplotě v rozmezí od 40 do 100 °C, s výhodou 50 až 80 °C, a rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující DMSO, vodné pufry, dimethylacetamid, dimethylformamid, methanol, ethanol, dioxan, tetrahydrofuran, propanol, *terc*-butanol nebo jejich směsí, za iniciace iniciátorem, s výhodou vybraným ze skupiny zahrnující ABIK-TT a ABIK-N_3, kde ABIK-TT je 2-[(Z)-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl]azo]-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxothiazolidin-3-yl)pentannitril a ABIK-N_3 je *N*-(3-azidopropyl)-4-[(Z)-[4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]azo]-4-kyano-pentanamid, popřípadě za přítomnosti přenosového činidla, s výhodou vybraného ze skupiny CTA-TT a CTA-N_3, kde CTA-TT je [1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl] benzenkarbodithioát a CTA-N_3 je [4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]benzenkarbodithioát, za vzniku hydrofilního bloku A jakožto semitelechelického hydrofilního polymerního bloku A;

- krok, ve kterém reaguje semitelechelický hydrofilní polymerní blok A z předchozího kroku se semitelechelickým hydrofobním polymerním blokem B obecného vzorce Y-PPO-Y, kde Y je –NH_2, oligopeptid o počtu aminokyselin od 2 do 5, sukcinimidylkarbonát nebo dibenzocyklooktinová skupina, za vzniku amfifilního blokového kopolymeru podle předkládaného vynálezu, který se může, popřípadě dále podrobit odstranění chránicích Boc skupin např. kyselinou trifluoroctovou, a lyofilizaci. Lyofilizace výsledného produktu umožňuje skladování amfifilního kopolymeru bez rizika jeho dekompozice a okamžitou tvorbu micel po jeho rozpuštění. Typy reakcí, které se s výhodou použijí pro přípravu amfifilního blokového kopolymeru podle předkládaného vynálezu, jsou polykondenzace (např. při použití komerčního NH_2-PPO-NH_2 nebo PPO-(oligopeptid)$_2$), klik reakce (např. při použití koncových skupin dibenzylcyklooktinu, resp. azidu, u semitelechelických bloků A, resp. B), RAFT polymerizace (s využitím předem připraveného přenosového činidla, např. PPO-(CTA)$_2$). Zatímco NH_2-PPO-NH_2 je komerčně dostupný, ostatní deriváty obecného vzorce Y-PPO-Y lze připravit aktivací koncových OH skupin komerčně dostupného PPO, která se provede reakcí s fosgenem, *N*-hydroxysukcinimidem a *N,N*-diisopropylethylaminem, čímž se koncové skupiny převedou na sukcinimidylkarbonátové skupiny, které se mohou případně dále převést na dibenzocyklooktinové skupiny reakcí s DBCO-aminem a *N,N*-diisopropylethylaminem, nebo které se mohou modifikovat trifluoracetátem oligopeptidu, s výhodou o počtu aminokyselin od 2 do 5, a *N,N*-diisopropylethyliaminem.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž způsob přípravy polymerního konjugátu podle předkládaného vynálezu, s vyloučením přípravy látek obecného vzorce (III), který obsahuje následující kroky:

- krok radikálové polymerizace *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, popřípadě s obsahem do 20 mol. % monomeru obecného vzorce I, kde R je aminoacyl vybraný ze skupiny sestávající z glycylu, glycylglycylu, *β*-alanylu, 6-aminohexanoylu, 4-aminobenzoylu, acylů vycházejících z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, zejména GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyPheLeuGly, chráněného na hydrazidových skupinách *terc*-butyloxykarbonylovými (Boc) skupinami, a/nebo popřípadě s obsahem do 15 mol. % monomeru obecného vzorce II, kde T je oligopeptid vybraný ze skupiny sestávající z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, s výhodou je oligopeptidem GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly, GlyPheLeuGly, AspProLys, AspProSer a AspProGly; přičemž monomer obecného vzorce I a/nebo monomer obecného vzorce II může popřípadě obsahovat kovalentně navázánou molekulu nízkomolekulárního léčiva, s výhodou vybraného ze skupiny obsahující doxorubicin, docetaxel, paklitaxel, pirarubicin, mitomycin C, daunorubicin, larotaxel;

při teplotě v rozmezí od 40 do 100 °C, a výhodou 50 až 80 °C, a rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující DMSO, vodné pufry, dimethylacetamid, dimethylformamid, methanol, ethanol, dioxan, tetrahydrofuran, propanol, *terc*-butanol a jejich směsí, za iniciace iniciátorem, s výhodou vybraným ze skupiny zahrnující ABIK-TT a ABIK-N_3, kde ABIK-TT je 2-[(Z)-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl]azo]-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxothiazolidin-3-yl)pentannitril a ABIK-N_3 je *N*-(3-azidopropyl)-4-[(Z)-[4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]azo]-4-kyano-pentanamid, popřípadě za přítomnosti přenosového činidla, s výhodou vybraného ze skupiny CTA-TT a CTA-N_3, kde CTA-TT je [1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl] benzenkarbodithioát a CTA-N_3 je [4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]benzenkarbodithioát, za vzniku hydrofilního bloku A, popřípadě obsahujícího kovalentně navázané nízkomolekulární léčivo, jakožto semitelechelického hydrofilního polymerního bloku A, popřípadě obsahujícího kovalentně navázané nízkomolekulární léčivo;

- krok, ve kterém reaguje semitelechelický hydrofilní polymerní blok A, popřípadě obsahující kovalentně navázané nízkomolekulární léčivo, z předchozího kroku se semitelechelickým hydrofobním polymerním blokem B obecného vzorce Y-PPO-Y, kde Y je $–NH_2$, oligopeptid o počtu aminokyselin od 2 do 5, sukcinimidylkarbonát nebo dibenzocyklooktinová skupina, za vzniku amfifilního blokového kopolymeru podle vynálezu nebo popřípadě, pokud hydrofilní blok A z předchozího kroku již obsahuje kovalentně navázané léčivo, za vzniku polymerního konjugátu podle vynálezu. Zatímco NH_2-PPO-NH_2 je komerčně dostupný, ostatní deriváty obecného vzorce Y-PPO-Y lze připravit aktivací koncových OH skupin komerčně dostupného PPO se provede reakcí s fosgenem, *N*-hydroxysukcinimidem a *N,N*-diisopropylethylaminem, čímž se koncové skupiny převedou na sukcinimidylkarbonátové skupiny, které se mohou případně dále převést na dibenzocyklooktinové skupiny reakcí s DBCO-aminem a *N,N*-diisopropylethylaminem, nebo které se mohou modifikovat trifluoracetátem oligopeptidu, s výhodou o počtu aminokyselin od 2 do 5, a *N,N*-diisopropylethylaminem.

- popřípadě krok odstranění chránicích Boc skupin, kdy výsledný amfifilní blokový kopolymer nebo polymerní konjugát z předchozího kroku reaguje např. s kyselinou trifluoroctovou;

- popřípadě krok konjugace volných hydrazidových skupin a/nebo amidových skupin amfifilního blokového kopolymeru, vzniklého v jednom z předchozích dvou kroků, s nízkomolekulárním léčivem v jeho volné formě nebo ve formě jeho soli s kyselinou, např. HCl, nebo derivátu, např. s kyselinou levulovou; přičemž nízkomolekulárním léčivem je léčivo, které má molekulovou hmotnost v rozmezí od 200 do 1000 g/mol, s výhodou je nízkomolekulárním léčivem doxorubicin, docetaxel, paklitaxel, pirarubicin, mitomycin C, daunorubicin, larotaxel;
- popřípadě krok lyofilizace výsledného produktu z předchozího kroku.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž farmaceutická kompozice pro léčbu pevných nádorů a/nebo lymfomu a/nebo leukémie, která obsahuje:

blokový kopolymer podle předkládaného vynálezu a nízkomolekulární léčivo v jeho volné formě, které má molekulovou hmotnost v rozmezí od 200 do 1000 g/mol, s výhodou je léčivem nízkomolekulární cytostatikum, nejvýhodněji je nízkomolekulární cytostatikum vybrané ze skupiny obsahující doxorubicin, docetaxel, paklitaxel, pirarubicin, mitomycin C, daunorubicin, larotaxel, v jeho volné formě; a/nebo polymerní konjugát podle předkládaného vynálezu;

přičemž farmaceutická kompozice dále obsahuje alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou přísadu, vybranou ze skupiny zahrnující antiadheziva, pojiva, potahovací látky, barviva, bobtnadla, ochucovadla, maziva, konzervanty, sladidla, sorbenty. S výhodou je blokový kopolymer a/nebo polymerní konjugát ve farmaceutické kompozici přítomen v lyofilizované formě, která umožní jeho rychlou rekonstituci do micelární formy po rozpuštění ve vodném prostředí.

Předmětem předkládaného vynálezu je také blokový kopolymer podle předkládaného vynálezu pro použití jako adjuvans k léčivu pro inhibici vícečetné lékové rezistence nádorů k chemoterapii, s výhodou pro použití jako adjuvans k cytostatikům, výhodněji pro použití jako adjuvans k léčivu pro léčbu pevných nádorů a/nebo lymfomu a/nebo leukémie.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále polymerní konjugát podle předkládaného vynálezu pro použití jako léčivo k léčbě pevných nádorů a/nebo lymfomu a/nebo leukémie.

Předmětem předkládaného vynálezu je také farmaceutická kompozice podle předkládaného vynálezu pro použití jako léčivo k léčbě pevných nádorů a/nebo lymfomu a/nebo leukémie.

Objasnění výkresů

Obr. 1: Ukázka distribuční křivky velikosti částic v závislosti na intenzitě rozptýleného světla.

Obr. 2: Uvolňování léčiva doxorubicinu z diblokového polymerního konjugátu s doxorubicinem, připraveným v příkladu 21, při 37 °C v pufrech o pH 5,0 a 7,4.

Obr. 3: Závislost rychlosti uvolňování derivátu docetaxelu (Dtx-LEV) z roztoku micelárního polymerního konjugátu s navázaným Dtx-LEV podle příkladu 22 pomocí pH-labilní hydrazonové vazby ve fosfátových pufrech o pH 5,0 a pH 7,4 při 37 °C.

Obr. 4: Kalceinová zkouška u NB3/DOX linie: Míra inhibice P-gp zprostředkovaného efluxu různými koncentracemi diblokového polymeru PHPMA-PPO 20 (DB). Vyjádřeno jako procenta MFI kontroly, 10 µM CsA (cyklosporin A).

Obr. 5: Kalceinová zkouška u NB4/DOX linie: Míra inhibice P-gp zprostředkovaného efluxu různými koncentracemi diblokového polymeru PHPMA-PPO 20 (DB). Vyjádřeno jako procenta MFI kontroly, 10 µM CsA (cyklosporin A).

Obr. 6: Kalceinová zkouška u P388/MDR linie: Míra inhibice P-gp zprostředkovaného efluxu různými koncentracemi diblokového polymeru PHPMA-PPO 20 (DB). Vyjádřeno jako procenta MFI kontroly, 10 µM CsA (cyklosporin A).

Obr. 7: Stoupající řada koncentrací doxorubicinu při jednotné koncentraci diblokového prekurzoru z příkladu 20 (DB; 62,5 µg/ml). V rámečcích jsou IC_{50} označeny příslušným symbolem dle křivky (čtverečky – DOX; kosočtverce – kopolymer na bázi PPO-PHPMA

z příkladu 20). Provedeno na P388/MDR buněčné linii. Hodnoty jsou vyneseny jako procenta kontrol.

Obr. 8: Průměrný růst nádorů (a) a přežití (b) myší C57BL/6 s lymfomem EL4 po léčbě micelárním diblokovým konjugátem dle příkladu 21 (DB-DOX) nebo lineárním konjugátem s doxorubicinem (PHPMA-DOX) nebo volným doxorubicinem (jak je popsáno v tabulce 4). Velikost nádorů je udána jako objem V=a*b2/2, kde „a“ je delší průměr nádorového ložiska, „b“ je kratší průměr.

Obr. 9: Závislost množství DOX, akumulovaného v pevných nádorech EL4 T-buněčného lymfomu u myší, na čase po podání diblokového polymerního konjugátu s DOX dle příkladu 21 (DB-DOX). Jako kontrolní skupiny byl využit lineární konjugát na bázi PHPMA s DOX (PHPMA-DOX) a volné léčivo (DOX), dávka 10 mg Dox/ kg, volné léčivo 2 x 5 mg DOX/kg.

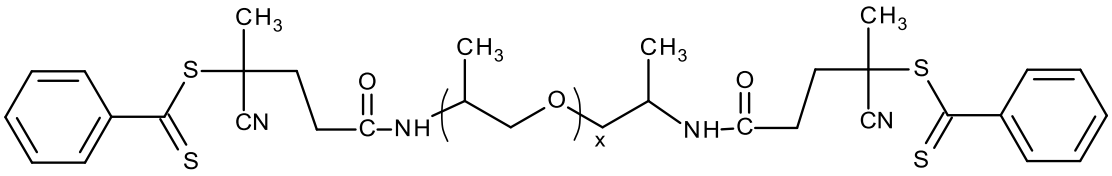
Obr. 10: Závislost množství DOX cirkulujícího v krevním oběhu myší s inokulovaným EL4 T-buněčným lymfomem na čase po podání diblokového polymerního konjugátu s DOX dle příkladu 21 (DB-DOX). Jako kontrolní skupiny byl využit lineární konjugát na bázi PHPMA s DOX (PHPMA-DOX) a volné léčivo (DOX), dávka 10 mg Dox/ kg, volné léčivo 2 x 5 mg Dox/kg.

Obr. 11: Schéma micely tvořené diblokovým amfifilním kopolymerem typu A-L-B s kovalentně navázaným léčivem doxorubicinem (DOX).

Obr. 12: Schéma micely tvořené triblokovým amfifilním kopolymerem typu A-L-B-L-A s kovalentně navázaným léčivem doxorubicinem (DOX).

Příklady uskutečnění vynálezu

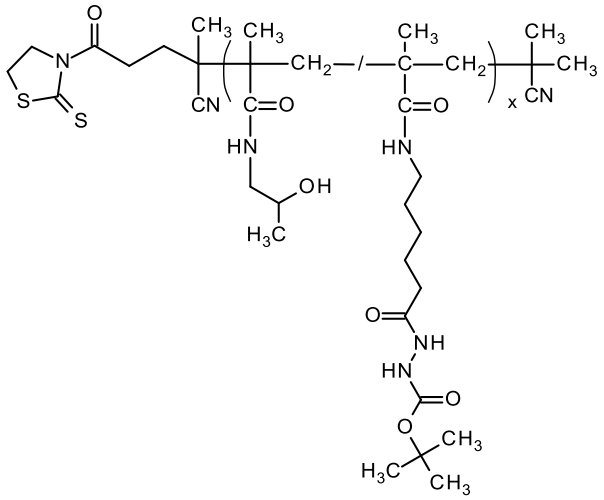
Příklad 1: Syntéza přenosového činidla PPO-$(CTA)_2$ pro RAFT polymerizaci



PPO-$(CTA)_2$

Polymerní přenosové činidlo PPO-$(CTA)_2$ využitelné pro řízenou radikálovou polymerizaci bylo připraveno reakcí poly(propylenoxid)-bis-2-aminopropyletheru (NH_2-PPO-NH_2; M ~ 4000 g/mol; 48,43 mg; 24,2 x 10^{-3} mmol -NH_2) s 2,5násobným přebytkem komerčně dostupného sukcinimidového esteru 4-kyan-4-(fenylkarbonothioylthio)pentanové kyseliny (CTA-NHS; 22,8 mg; 60,5 x 10^{-3} mmol). NH_2-PPO-NH_2 byl rozpuštěn v 0,5 ml dichlormethanu (DCM) a tento roztok byl přidán k suspenzi CTA-NHS v 0,2 ml DCM. Reakční směs byla ponechána za míchání reagovat přes noc. Surový produkt byl přečištěn na silikagelu ve směsi rozpouštědel chloroform/ethylacetát (5/1) a chloroform/methanol (5/1). Rozpouštědlo bylo odpařeno a produkt byl sušen za vakua do konstantní hmotnosti. Produkt byl charakterizován pomocí TLC, HPLC a GPC. Výtěžek 46 mg (80 % hmotn.). Funkcionalita koncových DTB skupin výsledného produktu byl 1,96. Pokud není dále uvedeno jinak, jedná se u všech výchozích monomerů a připravených polymerů vždy o racemické směsi.

Příklad 2: Syntéza semitelechelického statistického kopolymeru poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT (hydrofilní blok A) roztokovou radikálovou kopolymerací



poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT

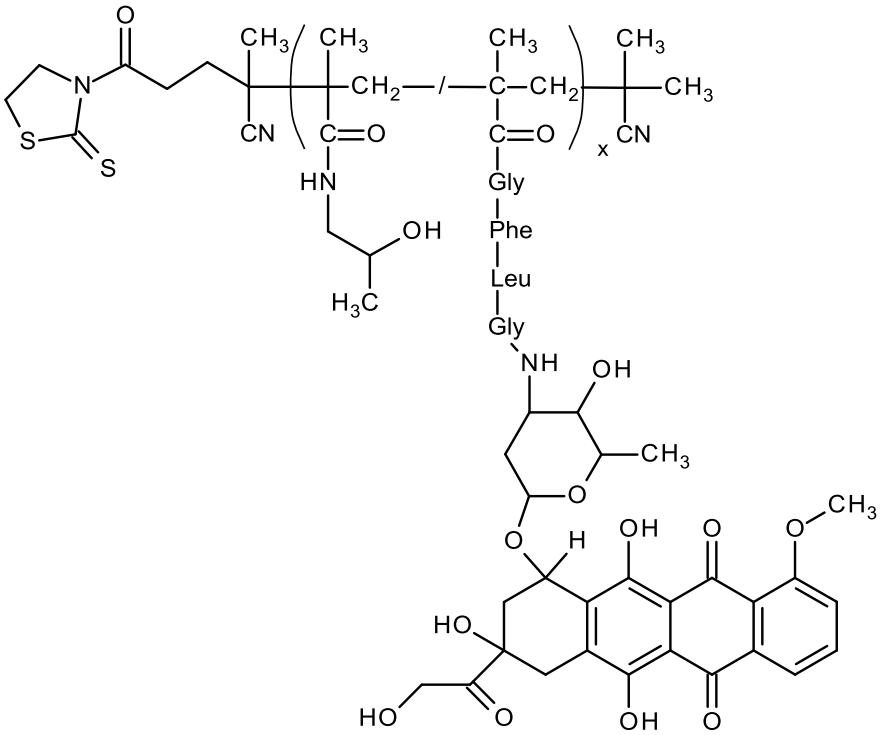
Semitelechelický statistický kopolymer poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT, obsahující koncové thiazolidin-2-thionové skupiny (TT) a chráněné hydrazidové skupiny (-NHNH-Boc) podél polymerního řetězce, byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) a methakryloyl-6-aminohexanoylhydrazidu chráněného na hydrazidových skupinách *terc*-butyloxykarbonylovými skupinami (MA-AH-NHNH-Boc) v DMSO při 60 °C za iniciace iniciátorem ABIK-TT (2-[(Z)-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl]azo]-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxothiazolidin-3-yl)pentannitril) (CZ 298945). Charakterizace výsledného kopolymeru: M_n (SEC) 12 400 g/mol; $Đ$ ~ 1,60; $F_{(TT)}$ 1,18; obsah ($NHNH_2$) ~ 5,4 mol%; R_h ~ 4.4 nm.

Podle postupu v příkladu 2 byly analogicky připraveny další kopolymery poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT s různými molárními hmotnostmi M_n v intervalu od 4000 do 58 000 g/mol, přičemž index polydisperzity Đ byl ve všech případech v rozmezí 1,5 až 1,8. Funkcionalita koncových skupin TT byla v rozmezí 110 až 120 % ($F_{(TT)}$ = 1,10-1,20). Obsah –$NHNH_2$ skupin podél řetězce (0,5 až 19,5 mol %). Viz tabulka 1.

Tabulka 1: Fyzikálně-chemická charakterizace semitelechelických statistických kopolymerů poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT připravených podle příkladu 2

Vzorek	Mn (g/mol)	Đ	$F_{(TT)}$	$NHNH_2$ skupin (mol%)	Rh (nm)
2-1	12400	1,60	1,18	5,4	4,4
2-2	19800	1,65	0,96	0,5	4,4
2-3	4200	1,72	0,95	15,6	3,9
2-4	34500	1,79	0,94	10,6	4,5
2-5	57900	1,66	0,96	19,5	4,9

Příklad 3: Syntéza semitelechelického statistického kopolymeru poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-TT (hydrofilní blok A) roztokovou radikálovou kopolymerací



poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-TT

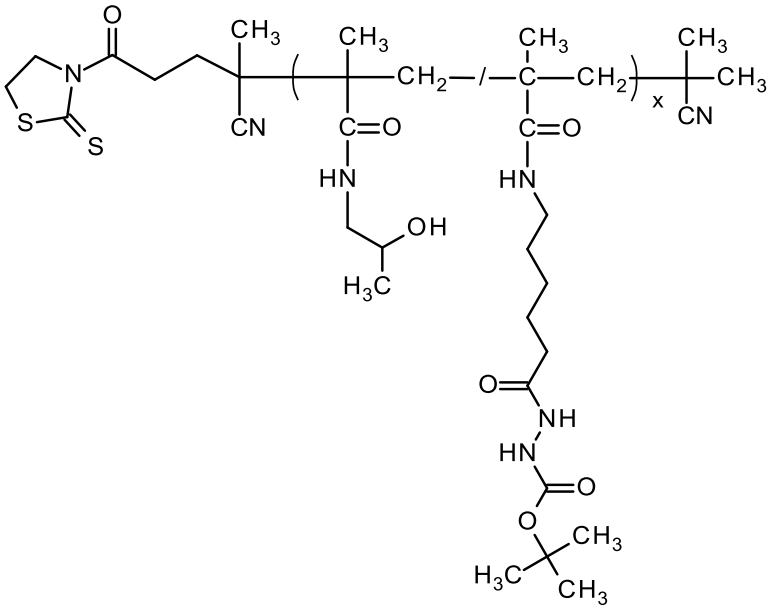
Semitelechelický statistický kopolymer poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-TT byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA a monomeru obsahujícího doxorubicin (N-methacryloylglycyl-DL-phenylalanylleucylglycyl)doxorubicin (Ma–GFLG–DOX), který byl připraven reakcí ekvivantního množství *N*-methakryloylglycyl-DL-fenylalanyl-L-leucylglycin 4-nitrofenyl esteru (Ma-GFLG-ONp) s DOX.HCl v DMF při 4 °C, v DMSO při 60 °C za iniciace iniciátorem ABIK-TT (2-[(Z)-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl]azo]-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxothiazolidin-3-yl)pentannitril). 220 mg (1,54 mmol) HPMA, 25 mg (0,025 mmol) MA-GFLG-DOX bylo rozpuštěno v 1,7 ml DMSO a tento roztok byl umístěn do polymerační ampule, ve které již bylo naváženo 84 mg (0,170 mmol) ABIK-TT (4 % hmotn.). Roztok v ampuli byl 15 min probubláván dusíkem, ampule byla zatavena a umístěna do termostatu vyhřívaného na 60 °C. K rozpuštění iniciátoru došlo po 3 min při teplotě 60 °C. Po 6 h byla reakční směs vysrážena do 50 ml směsi aceton : diethylether 2:1. Kopolymer byl rozpuštěn ve 3 ml methanolu a opět vysrážen do 50 ml stejné srážecí směsi. Vysrážený kopolymer byl odfiltrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti. Charakterizace kopolymeru poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-TT: M_n (SEC) 13 200 g/mol; $Đ$ ~ 1,61; $F_{(TT)}$ 1,20; Obsah GFLG monomerních jednotek: 3 mol %; obsah (DOX) ~ 8,9 % hmotn.; R_h ~ 4.4 nm. Podle postupu v příkladu 3 byly analogicky připraveny další kopolymery poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-TT s různými molárními hmotnostmi M_n v intervalu od 4500 do 59 500 g/mol, přičemž index polydisperzity Đ byl ve všech případech v rozmezí 1,5 až 1,8. Funkcionalita koncových skupin TT byla v rozmezí 110 až 125 % ($F_{(TT)}$ = 1,10-1,20). Obsah GFLG skupin podél řetězce (0,5 až 15 mol %). Viz tabulka 2.

Tabulka 2: Fyzikálně-chemická charakterizace semitelechelických statistických kopolymerů poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-TT připravených podle příkladu 3

Vzorek	Mn (g/mol)	Đ	$F_{(TT)}$	GFLG mon.jednotka (mol%)	Rh (nm)
3-1	13200	1,61	1,20	3,0	4,4
3-2	4500	1,63	0,96	5,6	3,8
3-3	16800	1,76	0,95	15,0	4,6

3-4	39800	1,74	0,94	9,8	4,8
3-5	59500	1,61	0,96	0,5	5,2

Příklad 4: Syntéza semitelechelického statistického kopolymeru raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT (hydrofilní blok A) pomocí řízené radikálové RAFT polymerizace



raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT

Semitelechelický statistický kopolymer raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT, obsahující koncové thiazolidin-2-thionové skupiny (TT) a chráněné hydrazidové skupiny (-NHNH-Boc) podél polymerního řetězce, byl připraven pomocí řízené radikálové RAFT polymerizace, kdy molární poměr iniciátoru/přenašeče/komonomerů byl 1/2/150. Poměr komonomerů HPMA/MA-AH-NHNH-Boc byl 92/8 mol %. HPMA byl rozpuštěn v *terc*-butanolu (6,747 ml), MA-AH-NHNHBoc, iniciátor 2-[(Z)-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl]azo]-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxothiazolidin-3-yl)pentannitril (ABIK-TT) a přenašeč [1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl] benzenkarbodithioát (CTA-TT) byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO; 1,687 ml). Tyto roztoky byly smíchány dohromady v polymerizační ampuli. Polymerizační směs byla probublávána 10 min argonem. Kopolymerizace probíhala při 70° C po dobu 16 h v zatavené ampuli. Produkt byl izolován srážením do směsi aceton/diethylether v poměru 1:1, zfiltrován a sušen do konstantní hmotnosti. Reaktivní ω-koncové dithiobenzoátové skupiny (DTB) byly odstraněny pomocí 2,2´-azobisisobutyronitrilu (AIBN). Charakterizace kopolymeru raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT: M_n (SEC) 8 400 g/mol; $Đ$ ~ 1,20; $F_{(TT)}$ 0,98; obsah ($NHNH_2$) ~ 5,9 mol %; konverze ~ 46 % (833 mg); R_h ~ 4,5 nm.

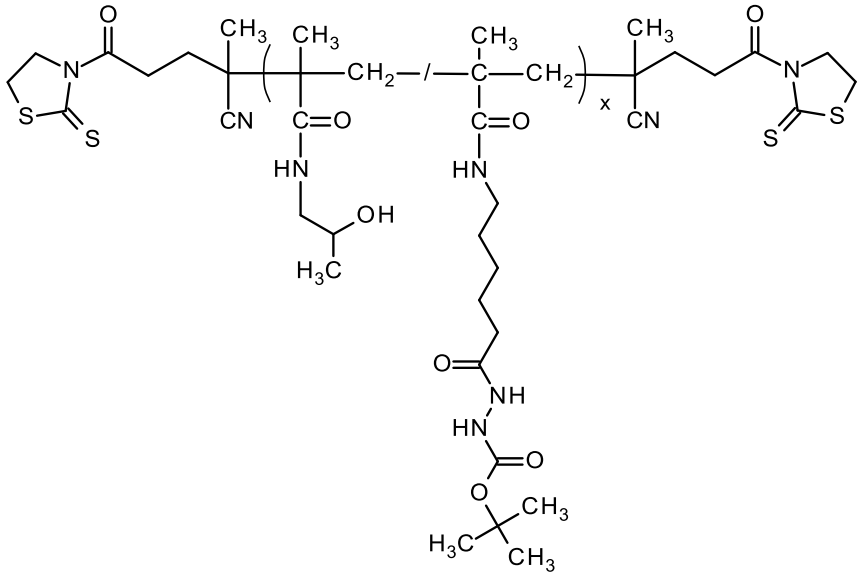
Podle postupu v příkladu 4 byly analogicky připraveny další kopolymery raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT s různými molárními hmotnostmi M_n v intervalu od 4000 do 60 000 g/mol, přičemž index polydisperzity $Đ$ byl ve všech případech v rozmezí 1,1 až 1,2. Funkcionalita koncových skupin TT byla v rozmezí 90 až 99 % ($F_{(TT)}$ = 0,90 až 0,99). Obsah – $NHNH_2$ skupin podél řetězce (0,5 až 20,5 mol %). Viz tabulka 3.

Tabulka 3: Fyzikálně-chemická charakterizace semitelechelických statistických kopolymerů raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT připravených podle příkladu 4

Vzorek	Mn (g/mol)	Đ	$F_{(TT)}$	$NHNH_2$ skupin (mol%)	Rh (nm)
4-1	8400	1,20	0,98	5,9	4,5

4-2	16200	1,15	0,96	12,3	4,9
4-3	38000	1,12	0,95	0,6	5,3
4-4	58900	1,19	0,94	6,8	5,6
4-5	4100	1,16	0,96	19,8	3,8

Příklad 5: Syntéza telechelického statistického kopolymeru raft-TT-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT (hydrofilní blok A) pomocí řízené radikálové RAFT polymerizace



raft-TT-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT

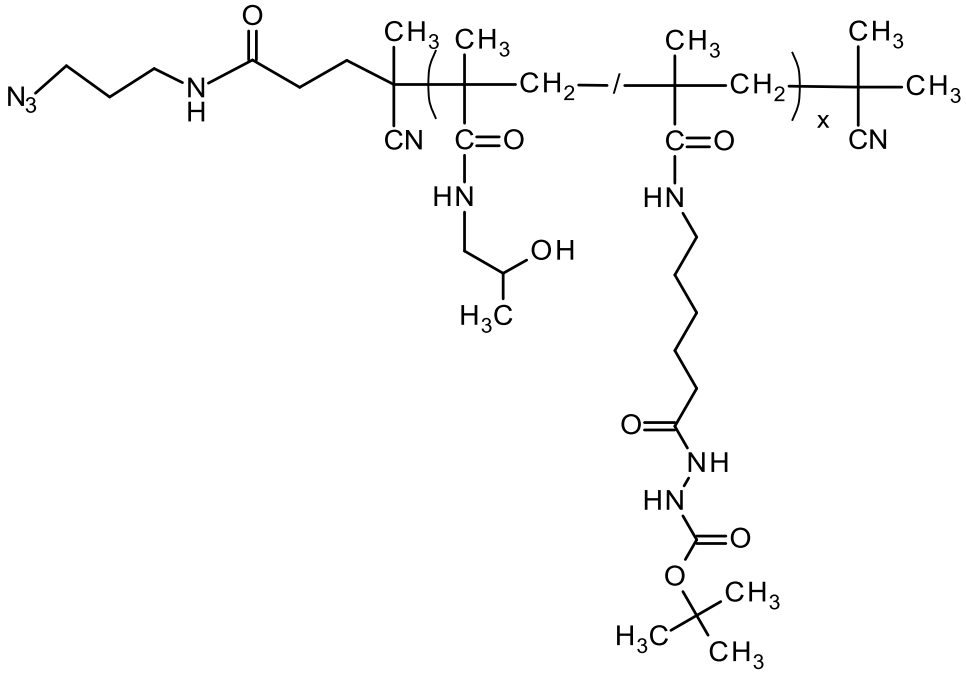
Telechelický statistický kopolymer raft-TT-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT, obsahující koncové thiazolidin-2-thionové skupiny (TT) a chráněné hydrazidové skupiny (-NHNH-Boc) podél polymerního řetězce, byl připraven pomocí řízené radikálové RAFT polymerizace obdobně jako v příkladu 4. Pouze ω-koncové dithiobenzoátové skupiny (DTB) nebyly odstraněny pomocí AIBN, ale byly převedeny na TT následujícím způsobem. Byl připraven 15% roztok polymeru s ABIK-TT (10 % hmotn.) v DMSO. Roztok v ampuli byl probublán 10 minut argonem, zataven a ponechán 3 h při 80 °C. Produkt byl izolován srážením do směsi aceton/diethylether v poměru 1:1, zfiltrován a sušen do konstantní hmotnosti. Charakterizace: M_n (SEC) 8 500 g/mol; Đ = 1,19; $F_{(TT)}$ 1,7; obsah ($NHNH_2$) = 5,9 mol %; R_h = 4,8 nm.

Podle postupu v příkladu 5 byly analogicky připraveny další kopolymery raft-TT-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT s různými molárními hmotnostmi M_n v intervalu od 5000 do 59 000 g/mol. Viz tabulka 4.

Tabulka 4: Fyzikálně-chemická charakterizace telechelických statistických kopolymerů raft-TT-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT připravených podle příkladu 5

Vzorek	Mn (g/mol)	Đ	$F_{(TT)}$	$NHNH_2$ skupin (mol%)	Rh (nm)
5-1	8500	1,19	1,70	5,9	4,8
5-2	5000	1,18	1,75	15,6	4,2
5-3	18200	1,16	1,76	0,9	5,0
5-4	35600	1,15	1,69	18,6	5,3
5-5	58600	1,16	1,67	9,8	5,6

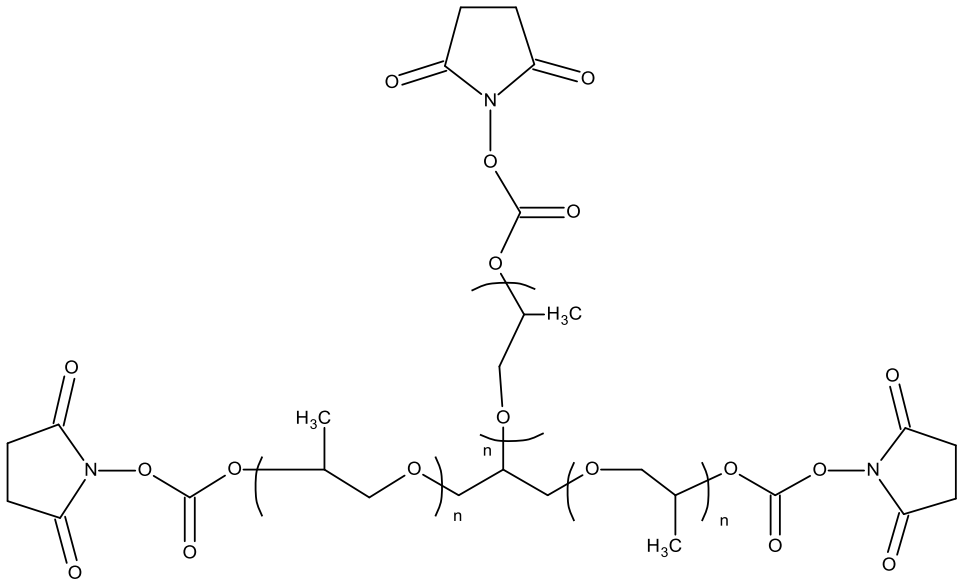
Příklad 6: Příprava semitelechelického statistického kopolymeru raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-N_3 (hydrofilní blok A) pomocí RAFT polymerizace



raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-N_3

Semitelechelický statistický kopolymer raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-N_3 s koncovými azidovými skupinami, byl připraven obdobným způsobem jako semitelechelický kopolymer raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT na bázi PHPMA v příkladu 4. Molární poměr iniciátoru/přenašeče/komonomerů byl 1/2/180. Poměr komonomerů HPMA/MA-AH-NHNH-Boc byl 92/8 mol %. HPMA byl rozpuštěn v *terc*-butanolu (6,747 ml), MA-AH-NHNH-Boc, iniciátor *N*-(3-azidopropyl)-4-[(Z)-[4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]azo]-4-kyano-pentanamid (ABIK-N_3) a přenašeč [4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]benzenkarbodithioát (CTA-N_3) byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO; 1,687 ml). Tyto roztoky byly smíchány dohromady v polymerizační ampuli. Polymerizační směs byla probublávána 10 min argonem. Kopolymerizace probíhala při 70 ° C po dobu 16 h v zatavené ampuli. Produkt byl izolován srážením do směsi aceton/diethylether v poměru 1:1, zfiltrován a sušen do konstantní hmotnosti. Reaktivní ω-koncové dithiobenzoátové skupiny (DTB) byly odstraněny pomocí 2,2´-azobisisobutyronitrilu (AIBN). Charakterizace produktu: M_n (SEC) 9100 g/mol; $Đ$ ~ 1,21; $F_{(N3)}$ 0,99; obsah ($NHNH_2$) ~ 5,4 mol%; konverze ~ 63% (750 mg); R_h ~ 4,5 nm.

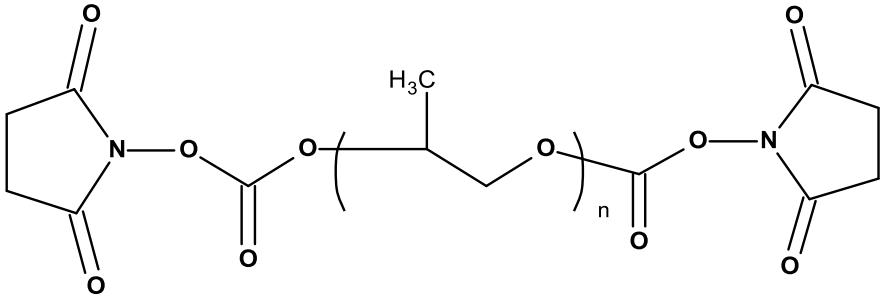
Příklad 7: Příprava poly(propylenoxid)-tris(sukcinimidylkarbonát)u (PPO-TSC; hydrofobní blok B)



PPO-TSC

Poly(propylenoxid)-tris(sukcinimidylkarbonát) (PPO-TSC) byl připraven dle následujícího postupu: komerčně dostupný poly(propylenoxid)triol $PPO(OH)_3$ (CAS 25791-96-2, Aldrich; M ~ 5000 g/mol; 85 mg; 51 x 10^{-3} mmol -OH) byl nejprve dvakrát přesušen azeotropickou destilací ze sušeného destilovaného toluenu, poté byl rozpuštěn ve směsi toluen/DCM (0,637 ml/0,213 ml) a k roztoku PPO byl přidán 20% roztok fosgenu v toluenu (0,5 ml). Reakční směs byla ponechána reagovat přes noc. Ráno byl fosgen odpařen za vakua do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi rozpouštědel toluen/DCM (0,240 ml/0,120 ml), do směsi byl přidán pevný *N*-hydroxysukcinimid (58 mg; 0,504 mmol) a *N,N*-diisopropylethylamin (DIEA; 0,02 ml; 0,117 x 10^{-3} mmol) a směs byla ponechána reagovat při laboratorní teplotě na třepačce do druhého dne. Rozpouštědlo bylo odpařeno a produkt byl sušen za vakua do konstantní hmotnosti. Produkt byl použit do další reakce (viz příklad 9) bez dalšího čištění.

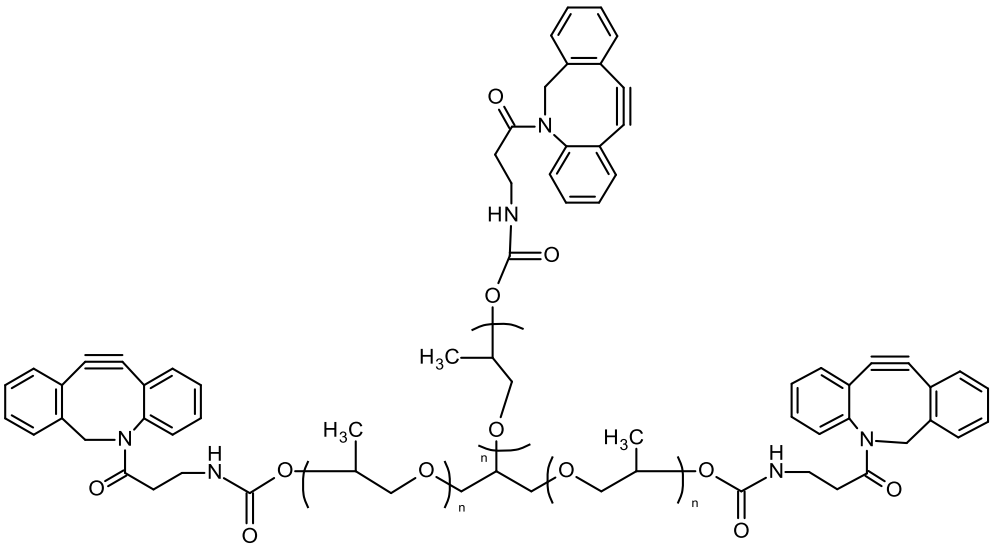
Příklad 8: Příprava poly(propylenoxid)-bis(sukcinimidylkarbonát)u (PPO-BSC; hydrofobní blok B)



PPO-BSC

Při syntéze poly(propylenoxid)-bis(sukcinimidylkarbonát)u (PPO-BSC) byl jako výchozí polymer použit komerčně dostupný poly(propylenoxid) (HO-PPO-OH) s M ~ 4000 g/mol. Postup přípravy byl analogický jako v případě syntézy PPO-TSC (viz příklad 7). Postup v příkladu 8 byl analogicky použit pro aktivaci koncových OH skupin poly(propylenoxid)u s molárními hmotnostmi M_n 2000 až 17 000 g/mol.

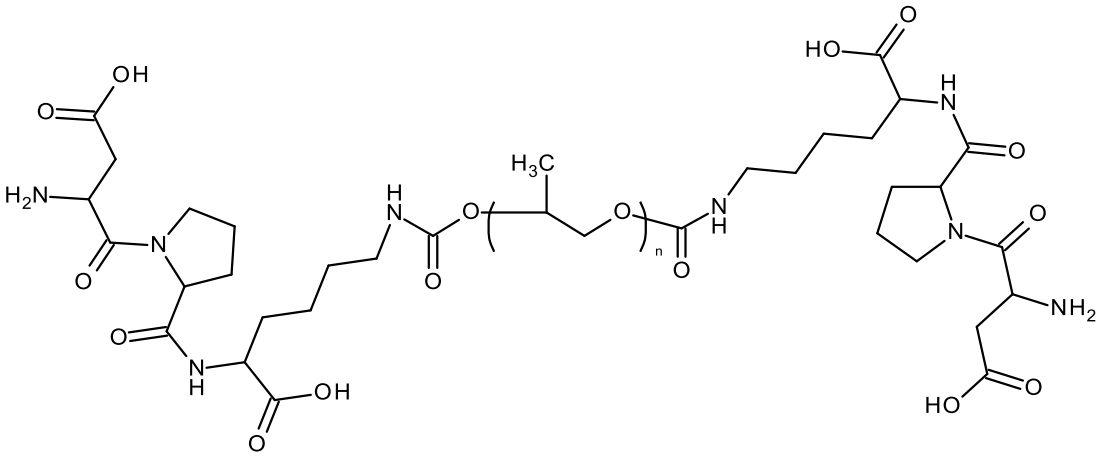
Příklad 9: Příprava $PPO-(DBCO)_3$ (hydrofobní blok B)



PPO-(DBCO)$_3$

Pro přípravu poly(propylenoxid)u s koncovými dibenzocyklooktinovými skupinami (PPO-(DBCO)$_3$) byl jako výchozí polymer použit PPO-TSC, připravený v příkladu 7, (85 mg; 51 x 10^{-3} mmol TSC) který byl rozpuštěn v DCM. Do roztoku polymeru byl přidán roztok DBCO-aminu (21,14 mg; 76,5 x 10^{-3} mmol NH_2) v DCM spolu s DIEA (0,026 ml; 153 x 10^{-3} mmol). Reakční směs byla ponechána reagovat za stálého míchání přes víkend. Rozpouštědlo bylo odpařeno za vakua a výsledný produkt PPO-(DBCO)$_3$ byl přečištěn kolonovou chromatografií (Sephadex LH20, methanol). Frakce se vzorkem byla odpařena za vakua a produkt byl sušen do konstantní hmotnosti. Výtěžek 81 % (80 mg). Obsah DBCO skupin byl 71 % (2,12 skupin na polymerní řetězec). Podle postupu v příkladu 9 byl analogicky modifikován i PPO-BSC, připravený v příkladu 8, na výsledný PPO-(DBCO)$_2$.

Příklad 10: Příprava poly(propylenoxid)u modifikovaného tripeptidem Asp-Pro-Lys (PPO-(Asp-Pro-Lys)2; hydrofobní blok B)

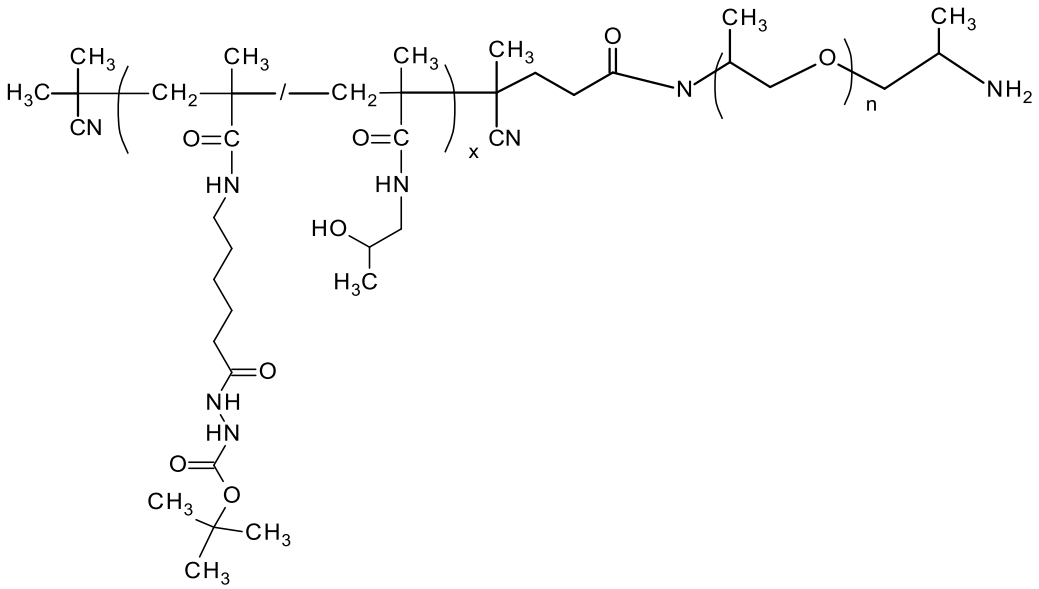


PPO-(Asp-Pro-Lys)$_2$

PPO-(Asp-Pro-Lys)$_2$ byl připraven modifikací PPO-BSC (příklad 8) tripeptidem Asp-Pro-Lys. Trifluoracetát tripeptidu Asp-Pro-Lys byl připraven syntézou peptidů na pevné fázi. PPO-BSC (50 mg; 0,05 mmol SC skupin) byl rozpuštěn v dimethylformamidu (DMF) a přidán k nadbytku tripeptidu Asp-Pro-Lys .TFA (34 mg; 0,1 mmol). Do reakční směsi byl ihned přidán přebytek DIEA (51 µl; 0,3 mmol). Reakční směs byla ponechána reagovat při laboratorní teplotě přes noc. Produkt byl triturován s etherem a dále čištěn na koloně LH20 v MeOH. Polymerní frakce byla

za vakua odpařena do sucha a produkt byl sušen do konstantní hmotnosti. Výtěžek 47 mg (70 %). Obdobně byly na PPO-BSC, případně PPO-TSC, navázány další biodegradovatelné spojky, např. Asp-Pro-Leu, Asp-Pro-Ser, GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyPheLeuGly.

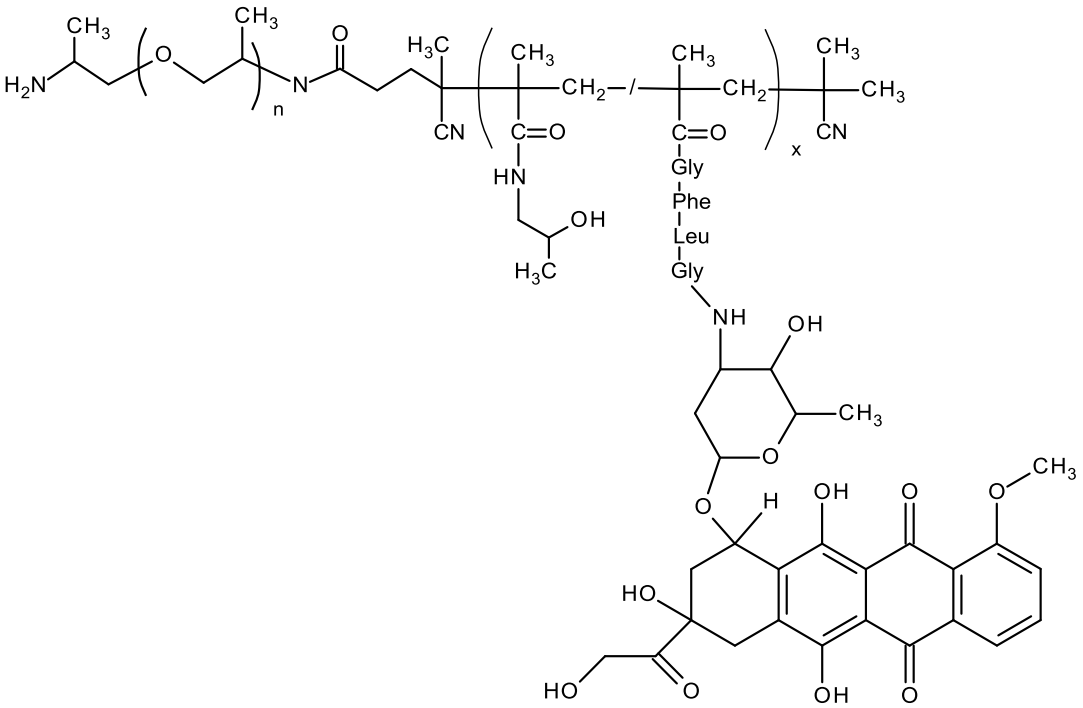
Příklad 11: Syntéza diblokového amfifilního kopolymeru typu A-L-B ([raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-b-PPO-NH_2)



[raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-b-PPO-NH_2

Při syntéze Boc-chráněného diblokového kopolymeru [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH_2 jsme vycházeli z komerčně dostupného poly(propylenoxid)-bis-2-aminopropyletheru (NH_2-PPO-NH_2; M ~ 4000 g/mol; 33,2 mg; 16,6 x 10^{-3} mmol –NH_2), který byl rozpuštěn v 1 ml dimethylacetamidu (DMA). Rovněž semitelechelický kopolymer raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT, připravený v příkladu 4, (71 mg; 8,3 x 10^{-3} mmol, M_n ~ 7614, F_{TT} ~ 0,89) byl rozpuštěn v 1 ml DMA. Roztok kopolymeru raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT byl pomalu za stálého míchání přidáván do roztoku NH_2-PPO-NH_2 a reakční směs byla ponechána reagovat za stálého míchání při laboratorní teplotě přes noc. Po cca 16 h reakce byla reakční směs naředěna methanolem (MeOH) a přečištěna kolonovou chromatografií přes Sephadex LH-20 v MeOH s detekcí RI a UV (230 nm) a TLC. Přečištěný produkt byl poté odpařen za vakua do konstantní hmotnosti. Výtěžek 80 mg (77 %). Charakterizace Boc-chráněného diblokového polymeru [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH_2: M_w ~ 15 230 g/mol, M_n ~ 12 950 g/mol (v organické mobilní fázi 0, Đ ~ 1,18, R_h ~ 14 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS). Obdobným postupem byl připraven diblokový amfifilní kopolymer z polymeru příkladu 2.

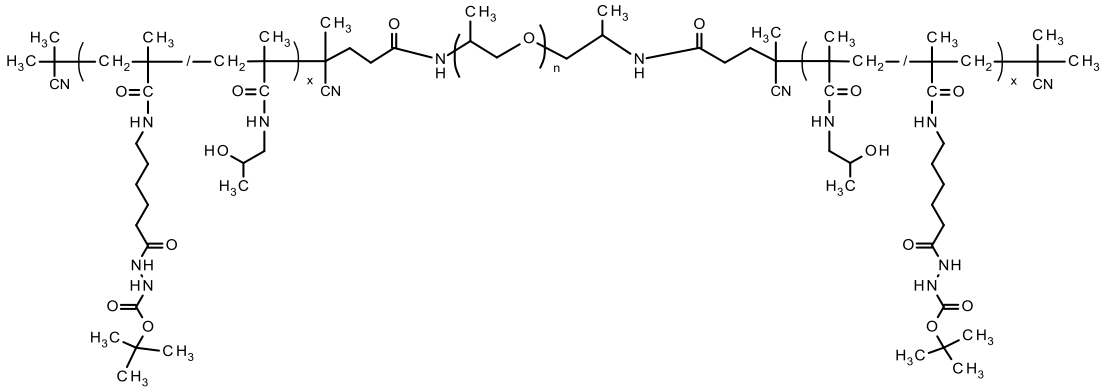
Příklad 12: Syntéza diblokového amfifilního kopolymeru poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-PPO-NH_2 s léčivem vázaným přes enzymaticky štěpitelný oligopeptid



poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-PPO-NH_2

Při syntéze diblokového kopolymeru poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-PPO-NH_2 jsme postupovali obdobným postupem jako v příkladu 11. Poly(propylenoxid)-bis-2-aminopropyletheru (NH_2-PPO-NH_2; M ~ 4000 g/mol; 33,2 mg; 16,6 x 10^{-3} mmol –NH_2) byl rozpuštěn v 1 ml dimethylacetamidu (DMA). Rovněž semitelechelický kopolymer poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-TT z příkladu 3 (69 mg; 8,3 x 10^{-3} mmol) byl rozpuštěn v 1 ml DMA. Roztok kopolymeru poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-TT byl pomalu za stálého míchání přidáván do roztoku NH_2-PPO-NH_2 a reakční směs byla ponechána reagovat za stálého míchání při laboratorní teplotě přes noc. Po cca 16 h reakce byla reakční směs naředěna methanolem (MeOH) a přečištěna kolonovou chromatografií přes Sephadex LH-20 v MeOH s detekcí RI a UV (230 nm) a TLC. Přečištěný produkt byl poté odpařen za vakua do konstantní hmotnosti. Výtěžek 82 mg (78 %). Charakterizace diblokového polymeru poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-PPO-NH_2 : M_w ~ 20 230 g/mol, M_n ~ 14 950 g/mol (v organické mobilní fázi), R_h ~ 15 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS).

Příklad 13: Syntéza triblokového amfifilního kopolymeru [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]$_2$-PPO

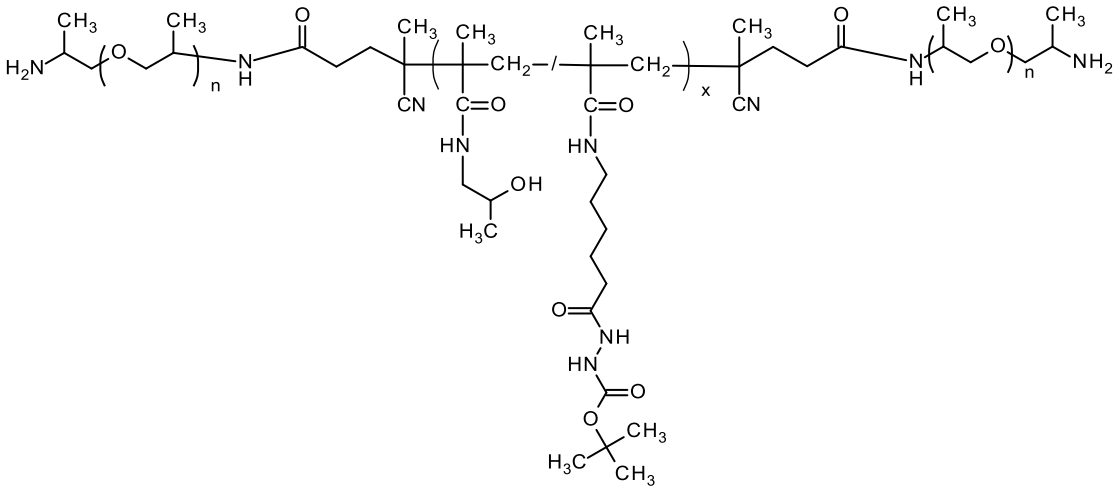


[raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]$_2$-PPO

Triblokový amfifilní kopolymer typu A-L-B-L-A, kopolymer [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]$_2$-PPO, byl připraven obdobným postupem jako jeho diblokový analog [raft-

poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH_2 z příkladu 11, a to polykondenzací NH_2-PPO-NH_2 a semitelechelického kopolymeru raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT. NH_2-PPO-NH_2 (M ~ 4000 g/mol; 28 mg; $14x10^{-3}$ mmol -NH_2) a raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT (115 mg; $14x10^{-3}$ mmol, M_n ~ 8450, F_{TT} ~ 0,98) byly rozpuštěny odděleně v DMA (1,575 mL). Roztok NH_2-PPO-NH_2 byl pomalu za stálého intenzivního míchání přikapáván do roztoku semitelechelického kopolymeru raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT a reakční směs byla ponechána reagovat za stálého míchání při laboratorní teplotě. Po 24 h reakce byla reakční směs vysrážena do diethyletheru (47 ml). Jemná sraženina byla odstředěna a rozpouštědlo bylo dekantováno. Polymerní produkt byl sušen za vakua do konstantní hmotnosti. Výtěžek 120 mg (84 %). Charakterizace připraveného Boc-chráněného triblokového kopolymeru [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]$_2$-PPO: M_w ~ 22 200 g/mol, M_n ~ 18 790 g/mol (v organické mobilní fázi), Đ ~ 1,18, R_h ~ 15 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS). Obdobným postupem byl připraven triblokový amfifilní polymer s využitím semitelechelického polymeru poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT.

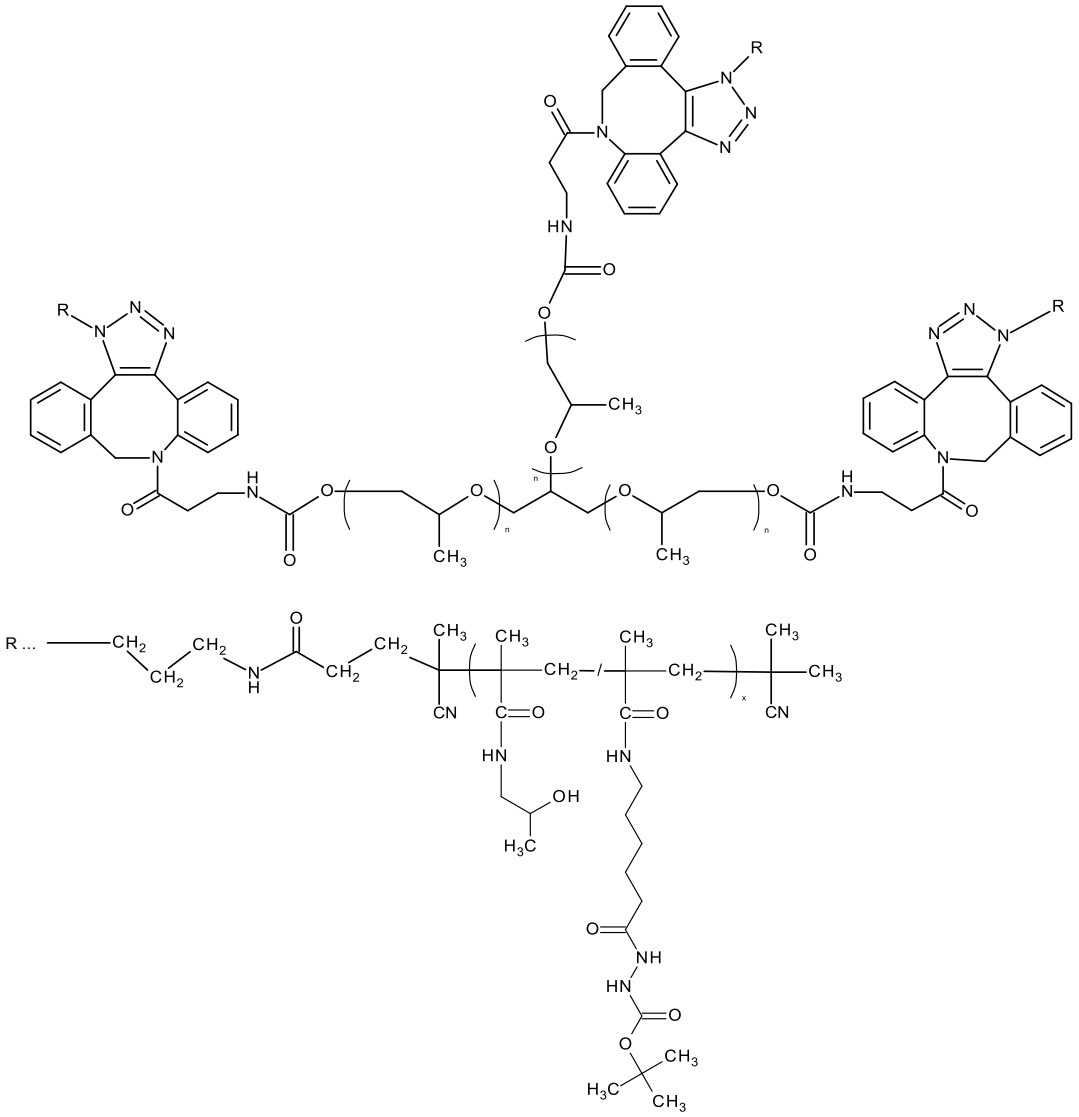
Příklad 14: Syntéza triblokového amfifilního kopolymeru NH_2-PPO-[raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH_2



NH_2-PPO-[raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH_2

Triblokový amfifilní kopolymer typu B-L-A-L-B, tj. NH_2-PPO-[raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH_2, byl připraven analogicky jako triblok typu A-L-B-L-A polykondenzací NH_2-PPO-NH_2 a Boc-chráněného telechelického kopolymeru raft-TT-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT v molárním poměru bloků polymerů NH_2-PPO-NH_2 : raft-TT-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT) 2:1. Roztok Boc-chráněného telechelického kopolymeru raft-TT-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT byl pomalu za stálého míchání přidáván do roztoku PPO a reakční směs byla ponechána reagovat za stálého míchání při laboratorní teplotě přes noc. Druhý den byla reakční směs naředěna MeOH a přečištěna kolonovou chromatografií přes Sephadex LH-20 v MeOH s detekcí RI a UV (230 nm) a TLC. Přečištěný produkt byl poté odpařen za vakua do konstantní hmotnosti. Výtěžek 100 mg (74 % hmotn.). Charakterizace připraveného Boc-chráněného triblokového kopolymeru NH_2-PPO-[raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH_2: M_w ~ 15 200 g/mol, M_n ~ 13 390 g/mol (v organické mobilné fázi), Đ ~ 1,14, R_h ~ 16 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS).

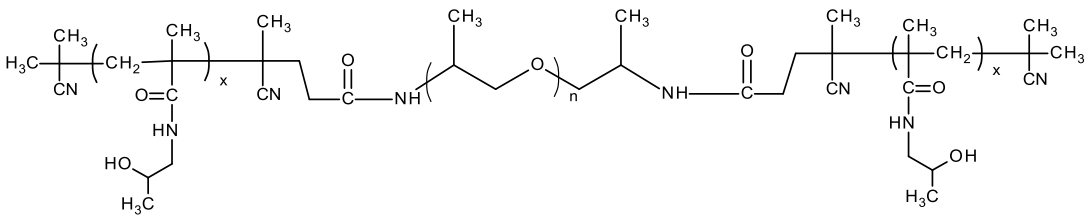
Příklad 15: Příprava blokového kopolymeru na bázi PPO-raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)$_3$ pomocí klik reakce



PPO-raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)$_3$

Pro přípravu větveného blokového kopolymeru typu obecného vzorce III, kopolymeru PPO-raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)$_3$, byl využit polymer PPO-(DBCO)$_3$ (3,12 mg; 1,606 x 10^{-3} mmol DBCO skupin) a kopolymer HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-N_3 (52 mg; M_n 27 000 g/mol; 1,926 x 10^{-3} mmol N_3 skupin). Polymery byly rozpuštěny ve směsi rozpouštědel MeOH (80 %)/0,3M octanový pufr pH 6,5 (20 %) a ponechány reagovat přes noc při laboratorní teplotě za stálého míchání. Reakce byla sledována pomocí SEC. Produkt byl poté přečištěn kolonovou chromatografií přes kolonku PD10 (Sephadex G25) ve vodě. Polymerní frakce byla zamražena a zlyofilizována. Charakterizace připraveného Boc-chráněného blokového kopolymeru PPO-raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)$_3$: M_w ~ 29 380 g/mol, M_n ~ 22 600 g/mol (v organické mobilné fázi), Đ ~ 1,30, R_h 19 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS).

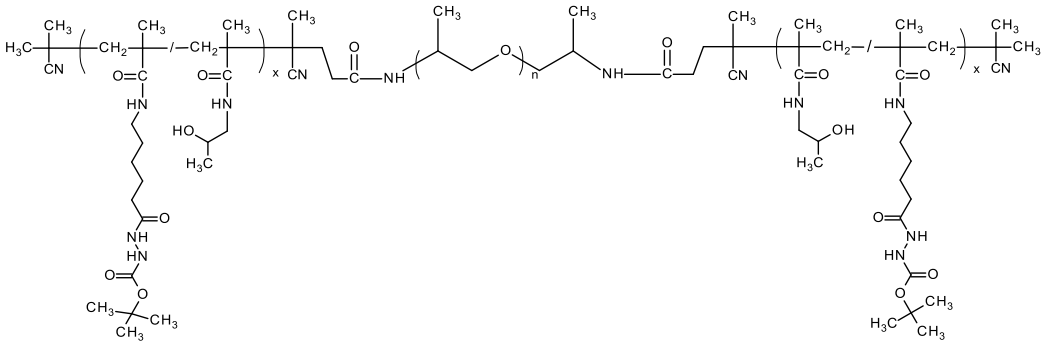
Příklad 16: Příprava triblokového kopolymeru raft-(polyHPMA)$_2$-PPO pomocí RAFT polymerizace s využitím polymerního přenosového činidla PPO-(CTA)$_2$



raft-(polyHPMA)$_2$-PPO

Triblokový kopolymer typu A-L-B-L-A, kopolymer raft-(polyHPMA)$_2$-PPO, byl připraven řízenou radikálovou RAFT polymerizací za použití PPO-(CTA)$_2$, připraveného v příkladu 1, jako přenosového činidla. Molární poměr iniciátoru/přenašeče/monomeru byl 1/2/150. HPMA (33,64 mg; 0,235 mmol) byl rozpuštěn v *terc*-butanolu (0,232 ml), PPO-(CTA)$_2$ (10 mg; 4,35 x 10^{-3} mmol) a AIBN (0,36 mg; 2,18 x 10^{-3} mmol) byly rozpuštěny v DMSO (0,026 ml). Tyto roztoky byly smíchány dohromady v polymerizační ampuli. Polymerizační směs byla probublávána 10 min argonem a poté byla ampule zatavena. Kopolymerizace probíhala při 70 ° C po dobu 16 h. Produkt byl izolován vysrážením do směsi aceton/ether v poměru 3/1. Jemná sraženina byla zcentrifugována, odfiltrována a za vakua sušena do konstantní hmotnosti. Reaktivní ω-koncové DTB skupiny byly odstraněny pomocí AIBN. Charakterizace: M_n (SEC) ~ 14 600 g/mol (v organické mobilné fázi), Đ ~ 1,13; konverze ~ 60 % (26 mg); R_h ~ 14,5 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS).

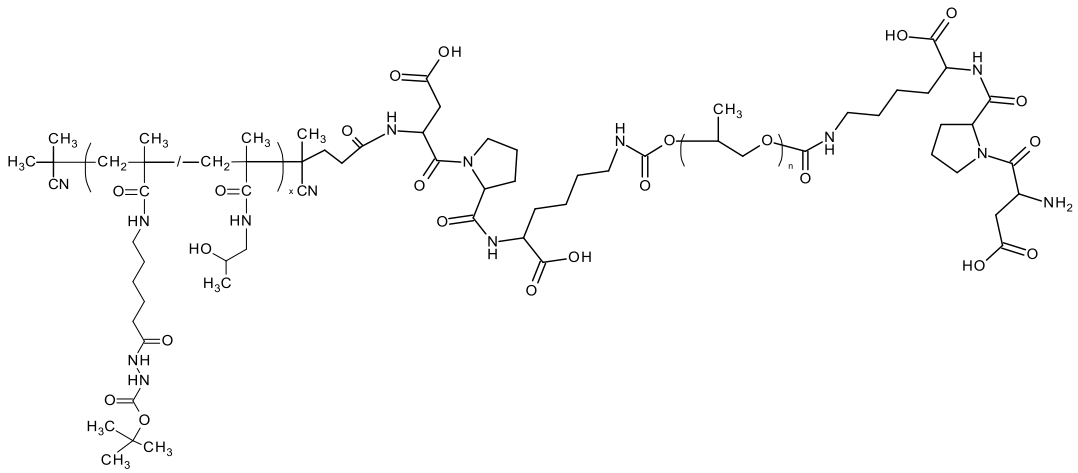
Příklad 17: Příprava triblokového kopolymeru raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)$_2$-PPO pomocí RAFT polymerizace s využitím polymerního přenosového činidla PPO-(CTA)$_2$



raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNHBoc)$_2$-PPO

Triblokový kopolymer raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNHBoc)$_2$-PPO byl připraven obdobně jako triblokový kopolymer poly(HPMA)$_2$-PPO v příkladu 16. Molární poměr iniciátoru/přenašeče/komonomerů byl 1/2/150. Poměr komonomerů HPMA/MA-AH-NHNH-Boc byl 90/10 mol %. Reaktivní ω-koncové DTB skupiny byly odstraněny pomocí AIBN. Charakterizace: M_n (SEC) = 8 750 g/mol (v organické mobilné fázi); Đ 1,56; konverze 50 % (8,3 mg); R_h 14,0 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS).

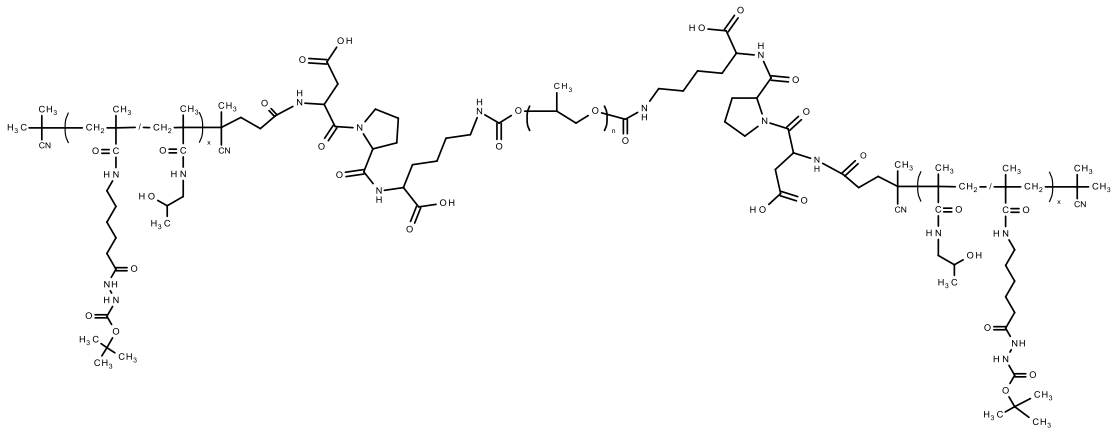
Příklad 18: Příprava Boc-chráněného diblokového kopolymeru obsahujícího ve své struktuře biodegradovatelné spojky Asp-Pro-Lys



Blokový kopolymer raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT a PPO-(Asp-Pro-Lys)$_2$

Diblokový biodegradovatelný kopolymer byl připraven polykondenzací kopolymeru raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT a PPO-(Asp-Pro-Lys)$_2$ obdobným způsobem jako diblokový amfifilní kopolymer [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH$_2$ (viz Příklad 11). Obdobným způsobem byly připraveny diblokové kopolymery obsahující další biodegradovatelné oligopeptidové spojky, vyjmenované v příkladu 10.

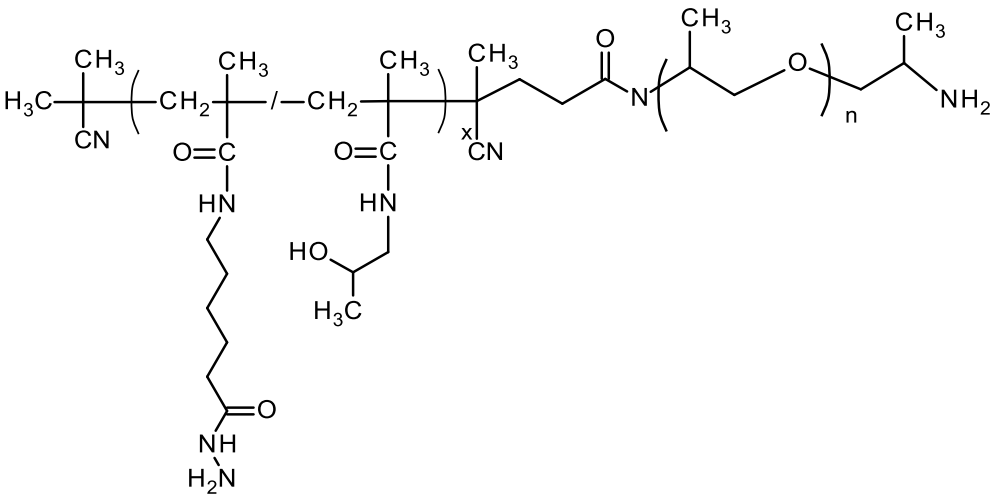
Příklad 19: Příprava triblokového biodegradovatelného kopolymeru typu A-L-B-L-A na bázi raft-poly(HPMA-co MA-AH-NHNH-Boc)-TT a PPO-(Asp-Pro-Lys)$_2$



Blokový kopolymer raft-poly(HPMA-co MA-AH-NHNH-Boc)-TT a PPO-(Asp-Pro-Lys)$_2$

Triblokový biodegradovatelný kopolymer na bázi raft-poly(HPMA-co MA-AH-NHNH-Boc)-TT a PPO-(Asp-Pro-Lys)$_2$, obsahující mezi hydrofilním blokem A a hydrofobním blokem B hydrolyticky i enzymaticky biodegradovatelnou peptidovou sekvencí Asp-Pro-Lys, byl připraven obdobným způsobem jako triblokový amfifilní kopolymer [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]$_2$-PPO (viz příklad 13), tj. polykondenzací kopolymeru raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT a polymeru PPO-(Asp-Pro-Lys)$_2$. Obdobným způsobem byly připraveny triblokové kopolymery obsahující další biodegradovatelné oligopeptidové spojky, vyjmenované v příkladu 10.

Příklad 20: Odstranění chránicí skupiny Boc na hydrazidových skupinách diblokového polymerního prekurzoru [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH$_2$



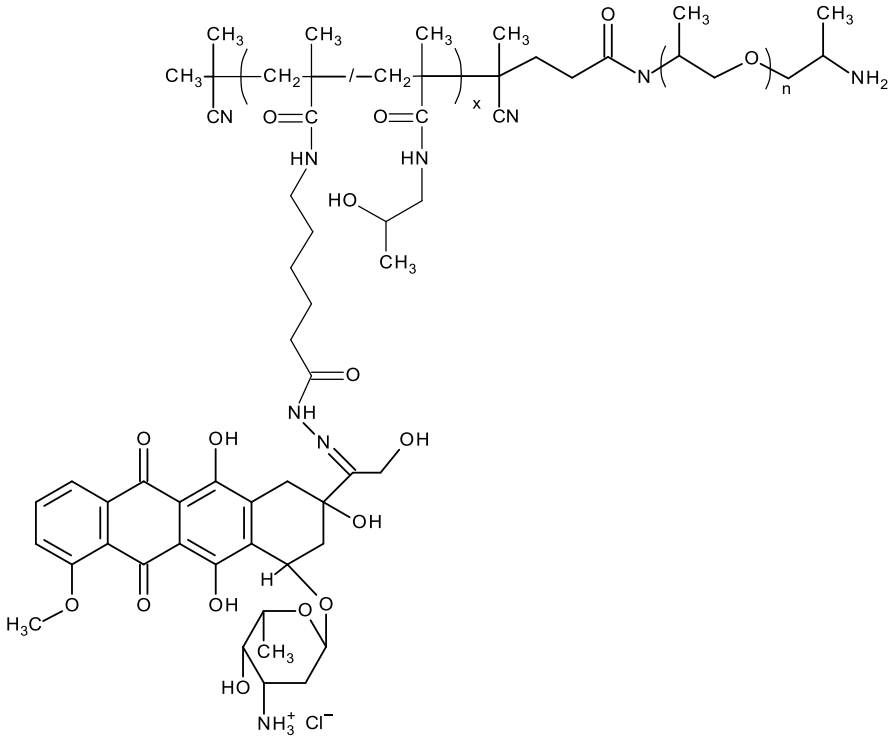
[raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH$_2$)]-PPO-NH$_2$

Diblokový polymerní prekurzor [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH$_2$)]-PPO-NH$_2$ byl připraven z diblokového kopolymeru [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH$_2$ (50 mg), který obsahoval hydrazidové skupiny chráněné *terc*-butyloxykarbonylovou skupinou (Boc). Diblokový kopolymer [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)]-PPO-NH$_2$ byl rozpuštěn v 1,08 ml směsi trifluoroctové kyseliny (TFA) / triisopropylsilanu (TIS) / vody (95/2,5/2,5). Ihned po rozpuštění byla tato směs za vakua odpařena do sucha. Odparek byl poté rozpuštěn v borátovém pufru (pH 8,0; 200 µl) a pH roztoku bylo upraveno titrací nasyceným roztokem NaOH na pH 6,5 až 8,0. Surový produkt byl odsolen a přečištěn na kolonce PD10 (Sephadex G25) ve vodě a zlyofilizován. Výtěžek 40 mg (78 %). Chrakterizace: M_w = 16 200 g/mol, M_n = 13 500 g/mol (v organické mobilní fázi), R_h ~ 14,5 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS).

Stejným způsobem byly tyto chránicí skupiny odstraněny i z polymerních prekurzorů připravených v příkladech 13 až 15 a 17 až 19.

Příklad 21: Příprava diblokového polymerního konjugátu s léčivem, navázaným hydrolyticky labilní hydrazonovou vazbou:

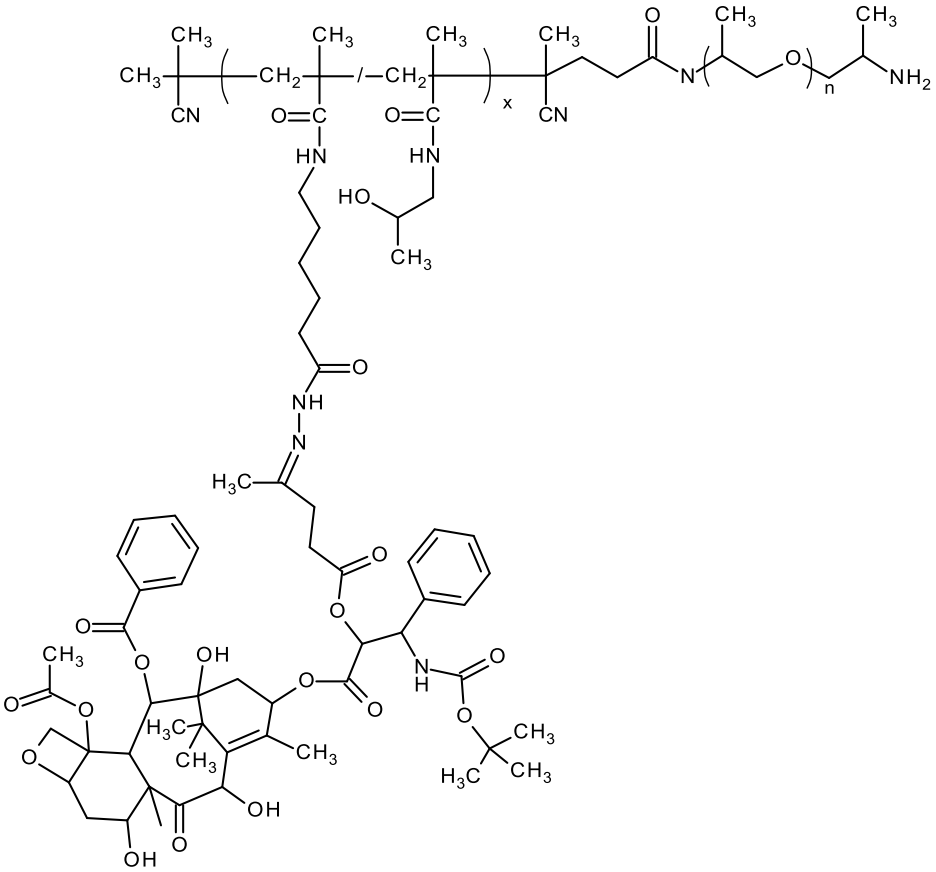
(A) Diblokový polymerní konjugát [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHN-DOX)]-PPO-NH$_2$ s hydrazonově navázaným doxorubicinem



[raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHN-DOX)]-PPO-NH_2

Diblokový polymerní prekurzor [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-$NHNH_2$)]-PPO-NH_2, připravený v příkladu 20, s volnými hydrazidovými skupinami (120 mg) byl rozpuštěn v MeOH (960 µl). Roztok polymeru byl přidán k pevnému doxorubicin hydrochloridu (DOX . HCl; 12,94 mg) a do suspenze bylo přidáno 38,4 µl koncentrované kyseliny octové. Reakční směs byla třepána na třepačce ve tmě při laboratorní teplotě přes noc. Reakce byla sledována pomocí TLC ($CHCl_3$/MeOH/kyselina octová ~ 8/2/1). Po 24 h reakce byla reakční směs naředěna MeOH a surový produkt byl přečištěn kolonovou chromatografií v MeOH přes Sephadex LH-20. Polymerní frakce byla za vakua odpařena do sucha a sušena do konstantní hmotnosti. Obsah navázaného doxorubicinu byl stanoven spektroskopicky (λ ~ 488 nm, voda, ε ~ 9800 l x mol^{-1} x cm^{-1}). Výtěžek byl 110,8 mg (83 %), obsah léčiva na polymeru 8,9 % hmotn. Charakterizace: M_w = 18 300 g/mol, M_n = 14 100 g/mol (v organické mobilní fázi), R_h ~ 14,2 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS). Obdobným způsobem byl připraven diblokový polymerní konjugát s léčivem pirarubicinem nebo daunorubicinem, obsah léčiva na těchto konjugátech byl 9,9 % hmotn. pirarubicinu nebo 9,5 % hmotn. daunorubicinu. Charakterizace konjugátu s pirarubicinem: M_w = 19 200 g/mol, M_n = 14 300 g/mol (v organické mobilní fázi), R_h ~ 14,4 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS). Charakterizace konjugátu s daunorubicinem: M_w = 18 800 g/mol, M_n = 14 500 g/mol (v organické mobilní fázi), R_h ~ 13,9 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS).

(B) Diblokový polymerní konjugát s hydrazonově navázaným derivátem docetaxelu



[raft-poly(HPMA-co-MA-AH-NHN-Dtx)]-PPO-NH_2

Docetaxel, derivatizovaný kyselinou levulovou (Dtx-LEV), byl připraven reakcí docetaxelu s kyselinou levulovou za přítomnosti diisopropylkarbodidimidu v DMSO. Diblokový polymerní prekurzor [raft-poly(HPMA-co-MA-AH-$NHNH_2$)]-PPO-NH_2 připravený v příkladu 20 (191,5 mg) a derivát léčiva Dtx-LEV (22,9 mg) byly rozpuštěny v MeOH (172 µl) a do reakční směsi byla ihned přidána koncentrovaná kyselina octová (70 µl). Reakční směs byla míchána 2,5 h. Poté byla naředěna MeOH a produkt byl přečištěn kolonovou chromatografií v MeOH (Sephadex LH-20, MeOH; detekce UV-230 nm, RI]. Frakce polymerního konjugátu s Dtx-LEV byla zachycena, odpařena za vakua do sucha a sušena do konstantní hmotnosti. Výtěžek byl 172 mg (80 %). Charakterizace: M_w = 17 500 g/mol, M_n = 13 600 g/mol (v organické mobilní fázi), R_h ~ 14 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS). Obsah derivátu Dtx-LEV, po kompletní kyselé hydrolýze (HCl o pH ~ 2,0) a extrakci do chloroformu stanoven chromatograficky (HPLC), byl 9,0 % hmotn.). Obdobným způsobem byl derivatizován také paklitaxel a larotaxel a posléze byla obě léčiva obdobným postupem popsaným výše navázána na polymerní nosič. Charakterizace konjugátu s paklitaxelem: M_w = 18 500 g/mol, M_n = 14 100 g/mol (v organické mobilní fázi), R_h ~ 14,3 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS). Obsah derivátu paklitaxel-LEV byl 9,6 % hmotn.). Charakterizace konjugátu s larotaxelem: M_w = 17 800 g/mol, M_n = 14 200 g/mol (v organické mobilní fázi), R_h ~ 14,1 nm (ve fyziologickém roztoku nebo PBS). Obsah derivátu larotaxel-LEV byl 9,4 % hmotn).

Po odstranění chránicích Boc skupin podle příkladu 20 je možné obdobným postupem jako v příkladu 21 navázat výše uvedená léčiva i na polymerní prekurzory připravené v příkladech 13 až 15 a 17 až 19.

Příklad 22: Příprava lyofilizované formy polymerních konjugátů s léčivem

Blokové polymerní konjugáty s léčivy, připravené podle příkladu 21, a blokové polymerní prekurzory bez léčiv byly pomocí lyofilizace s přídavnými látkami převedeny na lyofilizovanou formu, která usnadňuje převedení pevné formy polymerního léčiva do roztoku i vznik nanočásticových micelárních struktur do 1 minuty od přídavku příslušného pufru nebo fyziologického roztoku. Diblokový polymerní konjugát s léčivem, připravený v příkladu 21 (100 mg; 8,7 % hmotn. DOX navázaných na polymeru), NaH_2PO_4 x 2 H_2O (2,40 mg), Na_2HPO_4 x $2H_2O$ (9,54 mg) a laktóza (332 mg) byly rozpuštěny v destilované vodě, roztok byl zamražen a zlyofilizován. Výsledný lyofilizát (100 mg původního polymerního konjugátu s léčivem) byl rozpuštěn v 17,2 ml vodného roztoku NaCl o koncentraci 9 g/l (fyziologický roztok). Lyofilizační koláče polymerních prekurzorů a jejich konjugátů s léčivy byly rozpouštěny ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl), který byl před použitím přefiltrován přes membránu Whatman (PVDF) s velikostí pórů 0,20 μm.

Příklad 23: Příklad charakterizace polymerních prekurzorů a konjugátů

Připravené kopolymery, polymerní prekurzory i jejich konjugáty s léčivy byly charakterizovány stanovením váhového i početního průměru molárních hmotností (M_w, M_n) a příslušného indexu polydisperzity (Đ) pomocí rozměrově vylučovací chromatografie (SEC) na systému vybaveném UV detektorem (Shimadzu, Japan), RI detektorem (Optilab REX, Wyatt Technology Corp., USA) a víceúhlovým detektorem rozptylu světla (DAWN Heleos-II, Wyatt Technology Corp., USA). Některé systémy byly charakterizovány pomocí FFF systému (Eclipse 3+ modul) vybaveného DLS (DAWN 8+; Wyatt Technology Corp., USA), UV a RI (Optilab REX; Wyatt Technology Corp., USA) detekcí. Pro charakterizaci byla v případě SEC použita kolona TSK 3000 Super SW a jako mobilní fáze směs MeOH (80 %) a 0,3M octanového pufru o pH 6,5 (20 %), v případě FFF byla pro dělení použita membrána z regenerované celulózy (10 kDa) a jako mobilní fáze voda s NaN_3. Koncentrace vzorků byla ve všech případech 3 mg/ml.

Obsah koncových –DTB, –DBCO, –TT skupin a hydrazidových skupin, zakopolymerovaných statisticky podél polymerního řetězce, byl stanoven spektrofotometricky. Všechna měření byla prováděna na UV-VIS spektrofotometru Specord 205 (Analytik Jena, Německo). Obsah –TT skupin byl stanoven podle literatury (Šubr, V.; Koňák, Č.; Laga, R.; Ulbrich, K. Biomacromolecules 2006, *7(1)*: 122 až 130) v methanolu (ε_{305} = 10 800 l . mol^{-1} . cm^{-1}). Obsah hydrazidových skupin (po deprotekci směsí TFA (95 %), triisopropylsilan (2,5 %) a voda (2,5 %)) byl stanoven dle metody popsané v Etrych, T.; Jelínková, M., Říhová, B. and Ulbrich, K., J. Control. Release 2001; *73*: 89 až 102 (ε_{500} = 17 200 l . $mol^{-1}.cm^{-1}$). Obsah koncových -DBCO nebo -DTB skupin byl stanoven spektrofotometricky v MeOH (-DTB: ε_{302} = 12 400 l . $mol^{-1}.cm^{-1}$, -DBCO: ε_{302} = 13 000 l . $mol^{-1}.cm^{-1}$).

Velikosti nanočástic, tvořených polymerní prekurzory a konjugáty s léčivy ve vodném prostředí, byly stanoveny dynamickým rozptylem světla (Nano-ZS Zetasizer, Malvern) a statickým rozptylem světla (ALV instrument, Německo) ve vodném roztoku pufru (PBS, pH 7,4). Statický rozptyl světla byl měřen v rozsahu 30 až 140° s krokem 10° při koncentracích 0,5 až 10 mg/ml a teplotách, 25 °C a 37 °C. Ukázka distribuční křivky velikosti částic je uvedena na obr. 1.

Příklad 24: Uvolňování léčiva

(A) Polymerní konjugáty s doxorubicinem, připravené podle příkladu 21A:

Množství doxorubicinu uvolněného z polymerních micel bylo stanoveno po inkubaci polymerních konjugátů s DOX při 37 °C ve fosfátovém pufru o pH 5,0 (0,1 M fosfátový pufr obsahujícím 0,05 M NaCl), modelujícím prostředí v endosomech a lysozomech nádorových buněk, a fosfátovém pufru o pH 7,4 (0,1 M fosfátový pufr obsahujícím 0,05 M NaCl), který modeluje prostředí krevního řečiště. V předem stanovených časových intervalech byla odebírána část inkubačního roztoku a množství uvolněného DOX bylo stanoveno pomocí SEC (Shimadzu, Japan; izokratický průtok 0,3 ml/min; mobilní fáze: MeOH (80 %) / 0,3M octanový pufr o pH 6,5

(20 %)) na koloně TSK 3000 Super SW. Množství uvolněného DOX bylo vypočítáno z ploch píků volného a vázaného DOX, detekovaných při vlnové délce 488 nm. Zatímco při inkubaci polymerních micel v pH 5,0 docházelo k rychlému uvolňování DOX z nosiče (více než 70 % DOX uvolněno za 9 h inkubace), při inkubaci polymerních konjugátů ve fyziologickém prostředí (pH 7,4) k hydrolýze hydrazonové vazby téměř nedochází a léčivo je uvolňováno jen velmi zvolna (do 9 % za 24 h). Rychlost uvolňování léčiva DOX pro obě prostředí (pH 5,0 a pH 7,4) z námi připravených nanočásticových systémů je ukázána na obr. 2.

(B) Polymerní konjugáty s derivátem docetaxelu, připravené podle příkladu 21B:

Množství docetaxelu (Dtx) nebo jeho 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 (0,1 M fosfátový pufr obsahujícím 0,05 M NaCl), modelujícím prostředí krevního řečiště, bylo stanoveno pomocí HPLC. 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 (Shimadzu HPLC systém vybavený kolonou s reverzní fází Chromolith Performance RP-18e (100 × 4,6 mm) a UV–VIS detektoru Shimadzu SPD- 10AVvp (230 nm); eluent voda–acetonitril s gradientem 50 až 100 obj. % acetonitrilu, průtok 0,5 ml x min^{-1}). Po inkubaci konjugátů (koncentrace 5 mg/ml) ve fyziologickém prostředí při 37 °C (fosfátový pufr, pH 7,4) se uvolňuje léčivo Dtx (či jeho deriváty) významně pomaleji (obr. 3) než v mírně kyselém prostředí při pH 5,0, modelujícím prostředí v endozomech a lysozomech nádorových buněk (obr. 3). Rozpad derivátu léčiva na volné léčivo nebo přímé odštěpení léčiva z polymerního konjugátu je předpokládáno účinkem enzymů, a to především karboxyesteráz.

Příklad 25: Rozpad micel na bázi PHPMA-PPO

Rozpad micel na bázi PHPMA-PPO na polymerní řetězce vyloučitelné z organismu je možný dvěma způsoby: i) po snížení koncentrace vzorku pod hodnotu kritické micelární koncentrace (CMC), nebo ii) po rozpadu biodegradovatelných spojek mezi bloky kopolymeru, popřípadě kombinací obou postupů. Kopolymer připravený podle příkladu 18 byl (po odstranění chránicích Boc skupin podle příkladu 20) rozpuštěn v PBS pufru (0,15 $mol.l^{-1}$, pH 7,4) na micelární roztok o koncentraci 2 mg/ml a následně ředěn. Velikost micel byla sledována metodou dynamického rozptylu světla (QELS). CMC byla stanovena pomocí izotermální kalorimetrie (ITC). CMC pro odchráněný diblokový kopolymer z příkladu 18 byla stanovena jako 0,01 až 0,02 mg/ml. Pod touto koncentrací se micely rozpadají na jednotlivé polymerní řetězce vyloučitelné z organismu. Enzymatické degradace odchráněného polymerního dibloku z příkladu 18 byly studovány v 0,1 M fosfátovém pufru (NaH_2PO_4/NaOH, pH = 6,0; 5 mM glutathion; 1 mM EDTA), obsahujícím lysosomální enzym katepsin B, tj. v prostředí modelujícím prostředí sekundárního lysosomu v nádorových buňkách při koncentraci substrátu 10 mg/ml. Odchráněný diblokový kopolymer z příkladu 18, byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru v koncentraci 10 mg/ml a těsně před umístěním do termostatu (teplota 37 °C) byl přidán zásobní roztok katepsinu B tak, aby výsledná koncentrace katepsinu B byla 5.10^{-7} M. V předem určených intervalech byly z inkubačních roztoků odebírány alikvotní podíly (200 µl), které byly odsoleny na kolonách PD-10 a zlyofilizovány. Molekulová hmotnost degradačních produktů byla změřena stejným způsobem popsaným výše (příklad 23). Konjugát obsahující oligopeptidový spacer Asp-Pro-Lys, případně GFLG aj., byl v roztoku obsahujícím katepsin B (5.10^{-7} M) pozvolna degradován. Po 48h inkubaci s katepsinem B bylo stanoveno, že 40 % polymerních podílů je ve formě rozpustných podílů s molekulovou hmotností pod limitem renální filtrace. Zmíněný experiment potvrdil biodegradabilitu blokových polymerních konjugátů na degradační produkty vyloučitelné z organismu.

Příklad 26: *In vitro* cytotoxická aktivita diblokových a triblokových polymerů na bázi PHPMA-PPO kopolymerů

Cytotoxická aktivita diblokových a triblokových polymerních prekurzorů na bázi PHPMA-PPO byla studována na několika nádorových liniích, především na neuroblastomových liniích NB3, NB4 a od nich odvozených linií rezistentních na DOX (NB3/DOX a NB4/DOX), dále na liniích T-buněčného lymfomu EL4, lymfomu P388 a od něj odvozené rezistentní linie P388/MDR. V *in vitro* pokusech byla stanovena viabilita buněk po 72h inkubaci s různými koncentracemi diblokového a triblokového polymerního prekurzoru metodou AlamarBlue. Bylo zjištěno, že ani koncentrace 500 µg/ml těchto polymerních systémů není pro buňky toxická, nezpůsobuje pokles jejich viability.

Příklad 27: *In vitro* biologická aktivita diblokových a triblokových polymerů na bázi PHPMA-PPO jako inhibitorů P-gp

Schopnost diblokových a triblokových polymerů inhibovat transmembránové pumpy, jmenovitě P-gp, které jsou jednou z hlavních příčin lékové rezistence, byla prokázána pomocí kalceinové zkoušky. Experimenty byly provedeny na neuroblastomových liniích NB3, NB4 a od nich odvozených liniích rezistentních na doxorubicin NB3/DOX a NB4/DOX a na lymfomové linii P-388/MDR. U zmíněných buněčných linií bylo prokázáno, že léková rezistence je způsobena zvýšenou expresí P-gp.

V *in vitro* pokusech byly buňky inkubovány s různými koncentracemi diblokových a triblokových polymerů po různou dobu (0,5 h, 2 h a 6 h nebo 4 h, 8 h a 24 h) a poté k nim byl na 20 minut přidán Kalcein^{AM}, který je v buňkách rozštěpen na fluorescenčně aktivní Kalcein (excitace 485 nm / emise 530 nm). Kalcein je zároveň odstraňován z buněk se zvýšenou aktivitou P-gp. Míra schopnosti inhibice P-gp byla stanovena jako fluorescenční aktivita Kalceinu vztažená ke kontrole (10mM Cyclosporin A – CsA, nízkomolekulární inhibitor P-gp). Významná schopnost inhibice P-gp byla detekována u všech studovaných DOX rezistentních linií, a to NB3/DOX (obr. 4), NB4/DOX (obr. 5) a P388/MDR (obr. 6). V případě NB3/DOX a NB4/DOX linií byla nejvyšší míra inhibice P-gp zjištěna pro nejvyšší koncentrace 250 a 500 µg/ml a klesala se snižující se koncentrací použitých polymerů. U linie P388/MDR byla nejvyšší míra inhibice nalezena pro koncentrace 31 až 125 µg/ml. U parentálních linií NB3, NB4 a P388 nebyla detekována žádná směrodatná změna, což je v souladu s velmi nízkou expresí P-gp u těchto linií. Studované koncentrace v rozmezí 30 až 250 µg/ml polymerů jsou plně v souladu s předpokládanými koncentracemi polymerních systémů, použitých při léčbě solidních nádorů vykazujících vícečetnou lékovou rezistenci.

Příklad 28: *In vitro* biologická aktivita diblokových a triblokových konjugátů – ovlivnění cytotoxického účinku

Byl sledován vliv inhibice P-gp u buněk neuroblastomových linií pomocí diblokového kopolymeru poly(HPMA-co-MA-GFLG-DOX)-PPO-NH_2 z příkladu 11 (DB) a triblokového kopolymeru připraveného v příkladu 19 (TB), s volnými hydrazidovými skupinami odstraněnými podle příkladu 20, na změnu IC_{50} léčiv: i) DOX; ii) polymerního doxorubicinu PHPMA-DOX (lineární hydrazonový konjugát s DOX na bázi PHPMA); iii) diblokového polymerního konjugátu z příkladu 21 (DB-DOX). V *in vitro* pokusech byly buňky nejprve inkubovány 1h s/bez DB nebo TB v koncentracích 125 a 250 µg/ml a poté k nim byla přidána výše uvedená léčiva v koncentrační řadě. Po 72h inkubaci byla stanovena metabolická aktivita buněk metodou AlamarBlue a z ní určena IC_{50} jednotlivých léčiv. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Zvýšení cytotoxicity léčiv: doxorubicinu (DOX), lineárního hydrazonového konjugátu s DOX na bázi PHPMA (PHPMA-DOX) a diblokového konjugátu z příkladu 21 (DB-DOX) způsobené zablokováním transmembránových pump P-gp u neuroblastomových linií rezistentních na doxorubicin: NB3/DOX a NB4/DOX, měřené metodou AlamarBlue. V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty IC_{50}, t.j. koncentrace v µg/ml, při které dochází ke snížení viability u poloviny testovaných buněk.

IC_{50} po 72h inkubaci	NB3/DOX	NB4/DOX
DOX	0,215 ± 0,004	2,61 ± 0,17
DOX + DB (125ug/ml)	0,025 ± 0,010	0,49 ± 0,01
DOX + DB (250ug/ml)	0,020 ± 0,001	0,42 ± 0,03
IC_{50} po 72h inkubaci	NB3/DOX	
DOX	0,168 ± 0,005	
DOX + TB (125ug/ml)	0,036 ± 0,009	
DOX + TB (250ug/ml)	0,032 ± 0,003	

IC_{50} po 72h inkubaci	NB3/DOX	NB4/DOX
PHPMA-DOX	2,596 ± 0,132	35,00 ± 2,79
PHPMA-DOX + DB (125ug/ml)	0,381 ± 0,001	6,99 ± 0,14
PHPMA-DOX + DB (250ug/ml)	0,340 ± 0,006	5,60 ± 0,32
IC_{50} po 72h inkubaci	NB3/DOX	
PHPMA-DOX	3,338 ± 0,110	
PHPMA-DOX + TB (125ug/ml)	1,028 ± 0,010	
PHPMA-DOX + TB (250ug/ml)	0,521 ± 0,006	

IC_{50} po 72h inkubaci	NB3/DOX	NB4/DOX
DB-DOX	0,919 ± 0,020	7,07 ± 0,11
DB-DOX + DB (125ug/ml)	0,181 ± 0,019	4,60 ± 0,32
DB-DOX + DB (250ug/ml)	0,152 ± 0,007	3,92 ± 0,13

Z tabulky 5 vyplývá, že jak koncentrace DB (kopolymer z příkladu 20), tak TB (kopolymer z příkladu 19 s volnými hydrazidovými skupinami) 250 µg/ml, tak již téměř 125 µg/ml, zajistila zvýšení cytotoxicity, tj. snížení hodnoty IC_{50}, polymerního konjugátu PHPMA-DOX a volného DOX o jeden řád. Mírně vyšší efekt byl pozorován u DB než u TB. Pro DB byl pozorován vyšší efekt na nádorové rezistentní linii NB3/DOX, která exprimuje vyšší množství transmembránové P-gp pumpy. Z výše zmíněného je možné usuzovat, že inhibiční efekt DB a TB na rezistentní nádorové buňky bude tím vyšší, čím vyšší je hladina P-gp transmembránových pump. Samotný diblokový polymerní konjugát z příkladu 21 (DB-DOX) vykazuje 3 až 5krát vyšší cytotoxicitu u obou rezistentních neuroblastomových linií než PHPMA-DOX, tedy lineární hydrazonový konjugát s DOX (koncentrace DB nosiče při IC_{50} je přibližně 10 µg/ml). Přidání DB kopolymeru z příkladu 20 ke konjugátu DB-DOX z příkladu 21 zvýšilo cytotoxicitu DB-DOX (konjugát z příkladu 21) méně než v případě PHPMA-DOX nebo volného DOX. Efekt DB (kopolymer z příkladu 20) je patrný již při biologické aktivitě *in vitro* samotného DB-DOX (konjugát z příkladu 21) a přidání samotného DB nosiče (kopolymer z příkladu 20) již má jen doplňující efekt.

Tabulka 6 (viz níže) znázorňuje efekt stoupající řady koncentrace diblokového prekurzoru z příkladu 20 (DB) na cytostatický efekt volného (nízkomolekulárního) doxorubicinu při testování na rezistentní linii P388/MDR, detekce proliferace pomocí inkorporace thymidinu. Koncentrace dibloku PHPMA-PPO z příkladu 20 (DB) byly odvozeny na základě kalceinové zkoušky popsané výše. Nejúčinnější koncentrace 62,5 µg/ml a 31,25 µg/ml inhibují růst buněk (zvyšují cytostatickou aktivitu doxorubicinu) 3,6krát (viz obrázek 30) a 2,7krát. Polymerní konjugát z příkladu 21 (DB-DOX) vykázal při srovnání IC_{50} s lineárním konjugátem s DOX vázaným hydrazonovou vazbou přibližně 10krát vyšší cytostatický efekt.

Bylo prokázáno, že diblokový polymer DB na bázi PHPMA-PPO (kopolymer z příkladu 20) je schopný u vybraných rezistentních nádorových linií zvyšovat cytotoxický efekt, a to až o jeden řád. Tento efekt se prokázal jak pro jiná polymerní dlouho cirkulující léčiva (např. PHPMA-DOX), tak pro klasické nízkomolekulární léčivo DOX. Samotný polymerní konjugát s léčivem na bázi blokových kopolymerů PHPMA-PPO z příkladu 21 (DB-DOX) vykazuje významně vyšší cytostatický účinek na rezistentní nádorové linie než obdobné polymerní systémy na bázi PHPMA.

Tabulka 6: Vliv zvyšující se koncentrace přídavku diblokového polymeru na bázi PHPMA-PPO z příkladu 20 (DB) na cytostatický efekt nízkomolekulárního léčiva DOX při *in vitro* testování na linii P388/-MDR

Koncentrace DB (μg/ml)	IC_{50} DOX+DB (μg/ml)
0 (DOX)	4,3
7,8	2,9
15,6	2,2
31,25	1,6
62,5	1,2
125	1,7
250	1,3

Příklad 29. Ukázka cytostatické aktivity micelárního diblokového konjugátu s doxorubicinem z příkladu 21 (DB-DOX) *in vitro* při působení na buňky nádorových linií

Na prokázání cytostatické aktivity micelárního diblokového polymerního konjugátu nesoucího doxorubicin z příkladu 21 (DB-DOX) byly použity buňky několika stabilních nádorových linií různého původu. Byly to myší nádorové linie (CT26 - linie karcinomu střeva, 4T1 - linie karcinomu mléčné žlázy, obě původem z inbredního kmene myší BALB/c, dále EL4.IL-2 - linie T-buněčného lymfomu původem z myšího inbredního kmene C57BL/6) a FaDu - lidská linie dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku. Buňky byly kultivovány v 96-ti jamkových kultivačních destičkách s různými koncentracemi DB-DOX po dobu 72 hodin. Proliferace buněk byla pak stanovena standardní metodou inkorporace ^{3}H-thymidinu, který byl přidán na posledních 6 hodin kultivace. Následně byly kultury zpracovány pomocí harvestoru Tomtec Mach III, a po usušení byla radioaktivita získaných vzorků změřena beta-scintilačním počítačem Microbeta Trilux (Wallac) s použitím pevného scintilátoru (Meltilex; Perkin Elmer). Výsledky testu jsou vyjádřeny jako hodnota IC_{50}, rovná koncentraci DB-DOX (udává se pomocí obsahu doxorubicinu v konjugátu), která je potřebná k indukci právě 50% inhibice růstu (proliferace) daných nádorových buněk (viz tabulka 7). Cytostatická aktivita DB-Dox byla porovnávána s aktivitou jiného micelárního konjugátu na bázi HPMA s doxorubicinem, dále s aktivitou lineárního HPMA kopolymeru s doxorubicinem, a s volným léčivem.

Tabulka 7: Cytostatická účinnost DB-DOX z příkladu 21, dalších konjugátů na bázi HPMA a volného doxorubicinu u čtyř vybraných nádorových linií. Aktivita konjugátů byla stanovena pomocí inkorporace ^{3}H-thymidinu po 72 hodinách kultivace buněk s různými koncentracemi léčiv. Hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v ng doxorubicinu/ml a byly vypočteny jako průměr z několika nezávislých stanovení.

	CT26	4T1	EL4.IL-2	FaDu
DB-DOX (konjugát 21)	108,7	56,3	104,6	28,8
micelární konjugát	117,6	56,1	125,4	31,7
lineární konjugát	232,3	101,6	195,1	63
doxorubicin	42,5	14,3	12,2	4,8

U všech testovaných linií, a to citlivých vůči doxorubicinu (FaDu) nebo málo citlivých (CT26) je patrné, že cytostatická aktivita DB-DOX (konjugát dle příkladu 21) je stejná nebo dokonce mírně vyšší než aktivita jiného typu micelárního konjugátu na bázi HPMA. Lineární konjugát s doxorubicinem (PHPMA-DOX) vykazoval u všech linií aktivitu podstatně nižší než DB-DOX (konjugát dle příkladu 21). U linie s vysokou mírou přirozené rezistence proti cytostatiku (CT26) se cytostatický efekt doxorubicinu snížil navázáním léčiva na diblokový nosič (konjugát dle příkladu 21) pouze 2,6krát, zatímco u linií citlivějších na léčivo 6 až 8,6krát (EL4.IL-2 a FaDu) (viz tabulka 7). V celé škále použitých koncentrací bylo přitom množství diblokového polymerního systému nižší, než jsou koncentrace prokazatelně fungující při blokádě ABC transportérů viz výše. Diblokový micelární konjugát s doxorubicinem (konjugát z příkladu 21) vykazuje významnou cytostatickou aktivitu proti nádorovým liniím různého původu *in vitro*.

Příklad 30: In vivo biologická aktivita micelárního diblokového konjugátu s doxorubicinem z příkladu 21 (DB-DOX) při léčbě myšího T-buněčného lymfomu EL4

In vivo protinádorový efekt micelárního diblokového polymerního konjugátu z příkladu 21 nesoucího doxorubicin (DB-DOX) byl studován na modelu myšího T-buněčného lymfomu EL4 u inbredního kmene myší C57BL/6. Konjugát byl myším podán intravenózně (i.v.) ve formě jednorázové dávky ekvivalentní 7,5 mg doxorubicinu/kg. Léčivo bylo injikováno 8 dní po s.c. podání 1 x 10^5 nádorových buněk EL4, tedy v době, kdy už jsou nádory vyvinuty a velikost nádorového ložiska je zhruba 6 až 8 mm v průměru. Pro srovnání terapeutického účinku diblokového kopolymeru z příkladu 21 (DB-DOX) jsme podali lineární HPMA kopolymer s doxorubicinem (PHPMA-DOX) ve stejné dávce. Jak diblokový micelární konjugát z příkladu 21 (DB-DOX), tak lineární konjugát (PHPMA-DOX) nesly doxorubicin navázaný hydrazonovou vazbou. Dále byl k léčbě použit volný doxorubicin (DOX), injikovaný v celkové dávce 10 mg/kg, která byla z důvodu rozdílné farmakokinetiky nízkomolekulárního léčiva, a s tím souvisejícího nebezpečí vysoké systémové toxicity, injikována ve dvou dílčích i.v. dávkách 8. a 12. den po transplantaci nádorových buněk (každá dávka 5 mg doxorubicinu).

Myši ve skupině léčené diblokovým konjugátem z příkladu 21 (DB-DOX) vykázaly ve srovnání s neléčenými kontrolami stagnaci růstu nádorů do tří dnů a významnou redukci růstu mezi třetím a šestým dnem po aplikaci léčiva. Podobnou stagnaci růstu nádorů vykázala i skupina léčená lineárním konjugátem (PHPMA-DOX), do šesti dnů zde došlo ke zmenšení nádorů, které ale bylo méně výrazné ve srovnání se skupinou léčenou DB-DOX (konjugát z příkladu 21). Naproti tomu ve skupině léčené volným doxorubicinem (DOX) byl průměrný růst nádorů sice pomalejší než u neléčených myší, ale vykazoval stabilní progresi. Už 8 dní po podání léčby se ve skupině léčené DB-DOX objevila první myš s úplnou regresí nádoru, 13 dní po podání léčby byly bez zjevného nádoru v místě podání 4 myši ve skupině (z celkových 8), zatímco u dalších myší nádory postupně rostly, ovšem jejich velikost byla vždy významně menší než u neléčených kontrol v téže době. K znovuobjevení malého nádorového ložiska v původní lokalizaci došlo u jedné ze 4 myší, u níž byla předtím pozorována úplná regrese nádoru, a to velmi pozdě (po 40. dnu pokusu, tedy za 32 dní po podání léčby). Neléčené myši mají přitom průměrné přežití 29 dní (SD 2,0 dny, střední doba přežití 29 dní). Diblokový konjugát DB-DOX (konjugát z příkladu 21) tedy nakonec indukoval úplné vyléčení u 3 z 8 jedinců (37,5 %) s tím, že přežití ostatních myší bylo významně prodlouženo ve srovnání s neléčenými kontrolami (viz tabulka 4). Prodloužení přežití ve skupině léčené DB-DOX (konjugát z příkladu 21) je statistický významné, medián přežití je 47,5 dne proti 29 dnům ve skupině neléčených myší. Lineární konjugát s doxorubicinem (PHPMA-DOX) vyléčil pouze 1 myš (12,5 %), zatímco volný doxorubicin (DOX) nevyléčil žádnou. Průměrný růst nádorů je uveden na obr. 8a, přežití myší po léčbě v tabulce 8 a na obr. 8b.

Tabulka 8: Přežívání C57B/6 myší s inokulovaným myším lymfomem EL4, léčených micelárním diblokovým konjugátem DB-Dox dle příkladu 21 po i.v. podání jedné dávky 7,5 mg/kg, nebo lineárním konjugátem s doxorubicinem (PHPMA-DOX) ve stejné dávce, nebo volným doxorubicinem (DOX) podaným ve dvou dávkách (2 x 5 mg/kg). Dny znamenají dobu úhynu

zvířat po podání nádorových buněk (1x10^5 buněk EL4 s.c. v den 0), LTS („long term survivor“) znamená myši dlouhodobě přežívající bez známek nádoru (nejméně do dne 70 po podání nádorových buněk). Poslední řádek obsahuje údaj o střední době (medián) přežití ve skupinách.

DB-DOX	Lineární konjugát	doxorubicin	Neléčené kontroly
1x7,5 mg DOX ekv./kg	1x7,5 mg DOX ekv./kg	2x5 mg DOX/kg	0 mg DOX/kg
37	30	35	27
39	34	38	27
42	35	39	27
42	37	42	28
60	42	53	30
LTS	44	53	30
LTS	45	--	31
LTS	LTS	--	32
47,5	39,5	40,5	29

Podání DB-DOX (konjugát dle příkladu 21) neindukovalo u léčených myší žádné pozorovatelné známky systémové toxicity (např. snížení tělesné váhy, naježenou srst, nahrbené postavení, poruchy příjmu potravy). Bez rizika systémové toxicity lze podávat i vyšší dávku tohoto léčiva. Důležitým rysem léčby diblokovým konjugátem dle příkladu 21 (DB-DOX) je ustavení rezistence proti nádoru, která je nádorově specifická, dlouhodobá a je zprostředkována imunitními protinádorovými mechanismy. Byla prokázána retransplantací vyléčených myší (LTS) stejnou dávkou živých nádorových buněk EL4, jaká byla použita pro indukci onemocnění, ale při ponechání těchto myší bez jakékoli léčby. Rezistentní jedinci po této retransplantaci nevyvinuli žádný nádor a dlouhodobě přežívají. Myši vyléčené v popsaném pokusu (LTS) byly retransplantovány až 119 dnů po podání prvního nádoru, a z těchto tří myší dvě byly rezistentní. Micelární konjugát dle příkladu 21 (DB-DOX) prokázal vysokou aktivitu jako transportní systém pro cytotoxické léčivo (doxorubicin) při léčbě experimentálního myšího lymfomu.

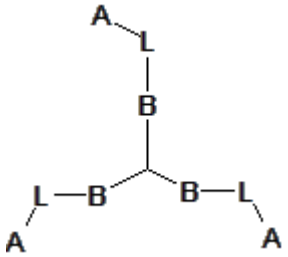
Příklad 31: Akumulace léčiva v pevných nádorech a doba cirkulace v krevním oběhu

Akumulace léčiva v pevném nádoru a doba jeho cirkulace v krvi byla stanovena na myších s inokulovaným T-buněčným lymfomem EL4. V předem stanovených časových intervalech byla myším odebírána krev a rovněž vzorky nádorů. Tyto vzorky byly zhomogenizovány a následně analyzovány na obsah léčiva. Obsah léčiva byl stanoven po kyselé hydrolýze v 1M HCl při 50 °C, kdy dochází k rozpadu DOX na aglykon, který je následně vytřepán do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou a stanoven na HPLC (Shimadzu HPLC systém vybavený kolonou s reverzní fází Chromolith Performance RP-18e (100 × 4,6 mm) a UV–VIS detektorem Shimadzu SPD-10AVvp (230 nm); eluent voda–acetonitril s gradientem 50 až 100 obj.% acetonitrilu, průtok 0,5 ml·min^{-1}).

Po podání diblokového konjugátu na bázi PHPMA-PPO s DOX navázaným hydrazonovou vazbou (DB-DOX, tj. konjugát dle příkladu 21) bylo stanoveno 4krát vyšší množství léčiva v nádorové tkáni než u lineárního PHPMA konjugátu (PHPMA-DOX), viz obr. 9. Rovněž bylo zjištěno, že akumulace v nádorové tkáni je více jak 20tinásobná v porovnání s akumulací léčiva po podání volného léčiva v maximální tolerované dávce. Také při stanovení doby cirkulace v krevním oběhu bylo zjištěno, že léčivo navázané na diblokový PHPMA-PPO polymerní systém (konjugát dle příkladu 21) cirkuluje v krevním oběhu významně déle, než v případě lineárního PHPMA konjugátu (PHPMA-DOX) a volného léčiva (DOX) (viz obr. 10). Oba experimenty prokázaly schopnost blokových kopolymerů na bázi PHPMA-PPO být vysoce účinnými dopravními systémy pro léčiva s významně lepšími farmakokinetickými parametry.

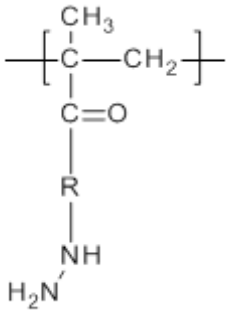
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Blokový kopolymer, obsahující alespoň jeden blok A a alespoň jeden blok B, kde alespoň jeden blok A a alespoň jeden blok B jsou navzájem spojeny hydrolyticky nebo enzymaticky biodegradovatelnou spojkou L, kterou je oligopeptid o počtu aminokyselin od 2 do 5, navázaný k blokům A a B amidovou vazbou, přičemž bloky A a B jsou uspořádané v pořadí A-L-B nebo A-L-B-L-A nebo B-L-A-L-B, nebo podle obecného vzorce III,



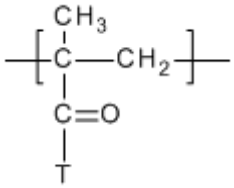
(III),

a přičemž hydrofilní blok A je tvořen poly(N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidem), popřípadě obsahujícím do 20 mol. % monomerních jednotek obecného vzorce I



(I),

kde R je aminoacyl ze skupiny sestávající z glycylu, glycylglycylu, *β*-alanylu, 6-aminohexanoylu, 4-aminobenzoylu, acylů vycházejících z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, zejména GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyPheLeuGly; navázaný aminoskupinou aminoacylu R ke karbonylové skupině monomerní jednotky obecného vzorce I, a/nebo do 15 mol. % monomerních jednotek obecného vzorce II



(II),

kde T je oligopeptid vybraný ze skupiny sestávající z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, navázaný aminoskupinou oligopeptidu ke karbonylové skupině monomerní jednotky obecného vzorce II, s výhodou je oligopeptidem GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly, GlyPheLeuGly, AspProLys, AspProSer a AspProGly;

a hydrofobní blok B je tvořen polypropylenoxidem;

přičemž blok A má molekulovou hmotnost M_n od 4000 do 60 000 g/mol, a blok B má molekulovou hmotnost M_n od 1000 do 17 600 g/mol ;
a přičemž molekulová hmotnost blokového kopolymeru je v rozmezí od 5000 do 95 000 g/mol.

2. Blokový kopolymer podle nároku 1, kde spojka L je vybraná ze skupiny zahrnující oligopeptidy AspProLys, AspProLysProAsp, GlyLeuGly, GlyPheGly, GlyPheLeuGly, GlyLeuPheGly.

3. Polymerní konjugát, který obsahuje blokový kopolymer podle nároku 1 nebo 2, který dále obsahuje od 1 do 25 % hmotn. nízkomolekulárního léčiva, kovalentně vázaného hydrazonovou vazbou hydrazidové skupiny monomerní jednotky obecného vzorce (I) s karbonylovou skupinou nízkomolekulárního léčiva a/nebo amidovou vazbou aminoskupiny nízkomolekulárního léčiva ke karboxylu skupiny T monomerní jednotky obecného vzorce (II) bloku A, přičemž léčivem je nízkomolekulární cytostatikum vybrané ze skupiny obsahující doxorubicin, docetaxel, paklitaxel, pirarubicin, mitomycin C, daunorubicin, larotaxel.

4. Použití blokového kopolymeru podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 k tvorbě micel ve vodném prostředí.

5. Použití polymerního konjugátu podle nároku 3 k tvorbě micel ve vodném prostředí.

6. Způsob přípravy blokového kopolymeru podle nároku 1 nebo 2, s vyloučením přípravy látek obecného vzorce (III), **vyznačený tím,** že obsahuje následující kroky:

- krok radikálové polymerizace *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, popřípadě s obsahem do 20 mol. % monomeru obecného vzorce I, kde R je aminoacyl vybraný ze skupiny sestávající z glycylu, glycylglycylu, *β*-alanylu, 6-aminohexanoylu, 4-aminobenzoylu, acylů vycházejících z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, zejména GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyPheLeuGly, chráněného na hydrazidových skupinách *terc*-butyloxykarbonylovými skupinami, a/nebo popřípadě s obsahem do 15 mol. % monomeru obecného vzorce II, kde T je oligopeptid vybraný ze skupiny sestávající z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, s výhodou je oligopeptidem GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly, GlyPheLeuGly, AspProLys, AspProSer a AspProGly;

při teplotě v rozmezí od 40 do 100 °C, s výhodou 50 až 80 °C, a rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující DMSO, vodné pufry, dimethylacetamid, dimethylformamid, methanol, ethanol, dioxan, tetrahydrofutan, propanol, *terc*-butanol nebo jejich směsi, za iniciace iniciátorem, s výhodou vybraným ze skupiny zahrnující ABIK-TT a ABIK-N_3, kde ABIK-TT je 2-[(Z)-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl]azo]-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxothiazolidin-3-yl)pentannitril a ABIK-N_3 je *N*-(3-azidopropyl)-4-[(Z)-[4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]azo]-4-kyano-pentanamid, popřípadě za přítomnosti přenosového činidla, s výhodou vybraného ze skupiny CTA-TT a CTA-N_3, kde CTA-TT je [1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl] benzenkarbodithioát a CTA-N_3 je [4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]benzenkarbodithioát, za vzniku hydrofilního bloku A jakožto semitelechelického hydrofilního polymerního bloku A;

- krok, ve kterém reaguje semitelechelický hydrofilní polymerní blok A z předchozího kroku se semitelechelickým hydrofobním polymerním blokem B obecného vzorce Y-PPO-Y, kde Y je –NH_2, oligopeptid o počtu aminokyselin od 2 do 5, sukcinimidylkarbonát nebo dibenzocyklooktinová skupina, za vzniku amfifilního blokového kopolymeru podle kteréhokoliv

z nároků 1 až 2, který se může, popřípadě dále podrobit odstranění chránicích Boc skupin kyselinou trifluoroctovou a lyofilizaci.

7. Způsob přípravy polymerního konjugátu podle nároku 3, s vyloučením přípravy látek obecného vzorce (III), vyznačený tím, že obsahuje následující kroky:

- krok radikálové polymerizace *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, popřípadě s obsahem do 20 mol. % monomeru obecného vzorce I, kde R je aminoacyl vybraný ze skupiny sestávající z glycylu, glycylglycylu, *β*-alanylu, 6-aminohexanoylu, 4-aminobenzoylu, acylů vycházejících z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, zejména GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyPheLeuGly, chráněného na hydrazidových skupinách *terc*-butyloxykarbonylovými skupinami, a/nebo popřípadě s obsahem do 15 mol. % monomeru obecného vzorce II, kde T je oligopeptid vybraný ze skupiny sestávající z oligopeptidů o počtu aminokyselin od 2 do 5, s výhodou je oligopeptidem GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly, GlyPheLeuGly, AspProLys, AspProSer a AspProGly; přičemž monomer obecného vzorce I a/nebo monomer obecného vzorce II může popřípadě obsahovat kovalentně navázánou molekulu nízkomolekulárního léčiva;

při teplotě v rozmezí od 40 do 100 °C, s výhodou 50 až 80 °C a rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující DMSO, vodné pufry, dimethylacetamid, dimethylformamid, methanol, ethanol, dioxan, tetrahydrofutan, propanol, *terc*-butanol nebo jejich směsi, za iniciace iniciátorem, s výhodou vybraným ze skupiny zahrnující ABIK-TT a ABIK-N_3, kde ABIK-TT je 2-[(Z)-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl]azo]-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxothiazolidin-3-yl)pentannitril a ABIK-N_3 je *N*-(3-azidopropyl)-4-[(Z)-[4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]azo]-4-kyano-pentanamid, popřípadě za přítomnosti přenosového činidla, s výhodou vybraného ze skupiny CTA-TT a CTA-N_3, kde CTA-TT je [1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl] benzenkarbodithioát a CTA-N_3 je [4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]benzenkarbodithioát, za vzniku hydrofilního bloku A, popřípadě obsahujícího kovalentně navázané nízkomolekulární léčivo, jakožto semitelechelického hydrofilního polymerního bloku A, popřípadě obsahujícího kovalentně navázané nízkomolekulární léčivo;

- krok, ve kterém reaguje semitelechelický hydrofilní polymerní blok A, popřípadě obsahující kovalentně navázané nízkomolekulární léčivo, z předchozího kroku se semitelechelickým hydrofobním polymerním blokem B obecného vzorce Y-PPO-Y, kde Y je $–NH_2$, oligopeptid o počtu aminokyselin od 2 do 5, sukcinimidylkarbonát nebo dibenzocyklooktinová skupina, za vzniku amfifilního blokového kopolymeru podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 nebo popřípadě za vzniku polymerního konjugátu podle nároku 3;

- popřípadě krok odstranění chránicích Boc skupin;

- popřípadě krok konjugace volných hydrazidových skupin a/nebo amidových skupin s nízkomolekulárním léčivem;

- popřípadě krok lyofilizace.

8. Farmaceutická kompozice pro léčbu pevných nádorů a/nebo lymfomu a/nebo leukémie, **vyznačená tím**, že obsahuje:

blokový kopolymer podle nároku 1 nebo 2 a nízkomolekulární léčivo v jeho volné formě, s výhodou je nízkomolekulárním léčivem nízkomolekulární cytostatikum, nejvýhodněji je nízkomolekulární cytostatikum vybrané ze skupiny obsahující doxorubicin, docetaxel, paklitaxel, pirarubicin, mitomycin C, daunorubicin, larotaxel;

a/nebo polymerní konjugát podle nároku 3;

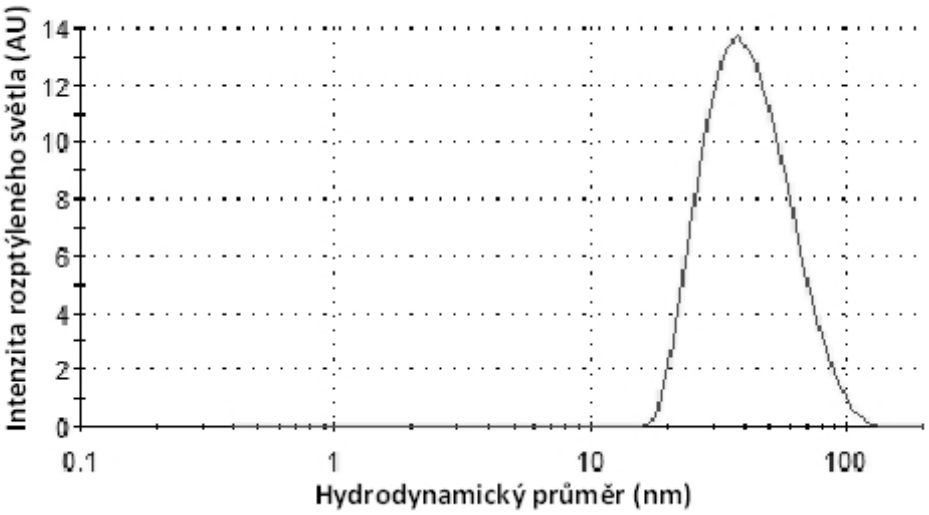
přičemž farmaceutická kompozice dále obsahuje alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou přísadu, vybranou ze skupiny zahrnující antiadheziva, pojiva, potahovací látky, barviva, bobtnadla, ochucovadla, maziva, konzervanty, sladidla, sorbenty.

9. Blokový kopolymer podle nároku 1 nebo 2 pro použití jako adjuvans k léčivu pro inhibici vícečetné lékové rezistence nádorů k chemoterapii, s výhodou pro použití jako adjuvans k cytostatikům, výhodněji pro použití jako adjuvans k léčivu pro léčbu pevných nádorů a/nebo lymfomu a/nebo leukémie.

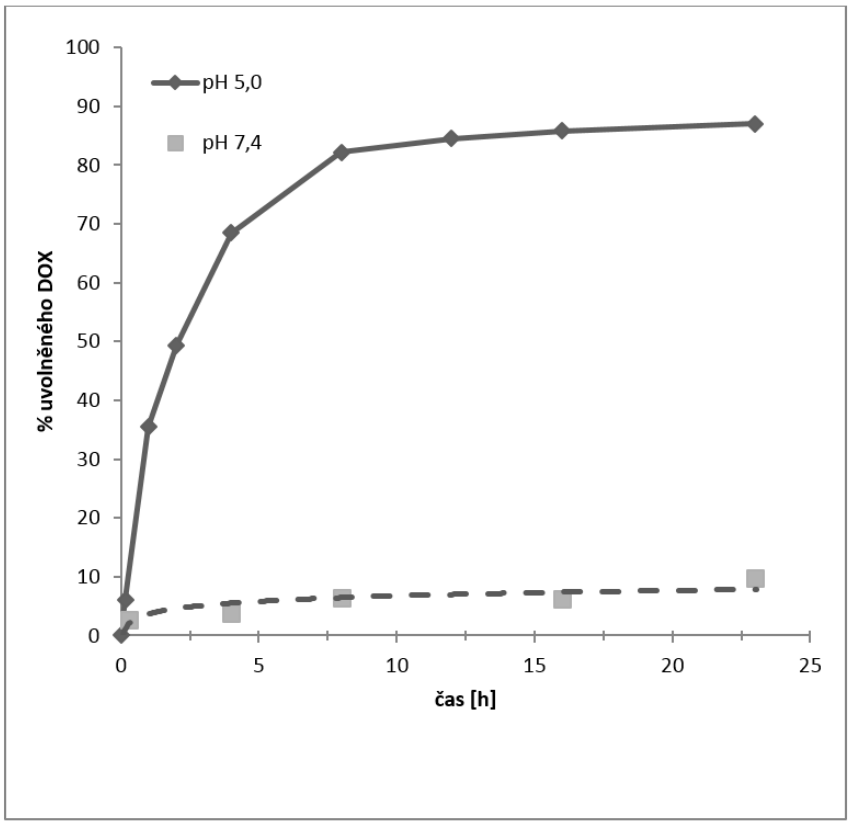
10. Polymerní konjugát podle nároku 3 pro použití jako cytostatikum, s výhodou pro použití jako léčivo k léčbě pevných nádorů a/nebo lymfomu a/nebo leukémie.

11. Farmaceutická kompozice podle nároku 8 pro použití jako cytostatikum, s výhodou pro použití jako léčivo k léčbě pevných nádorů a/nebo lymfomu a/nebo leukémie.

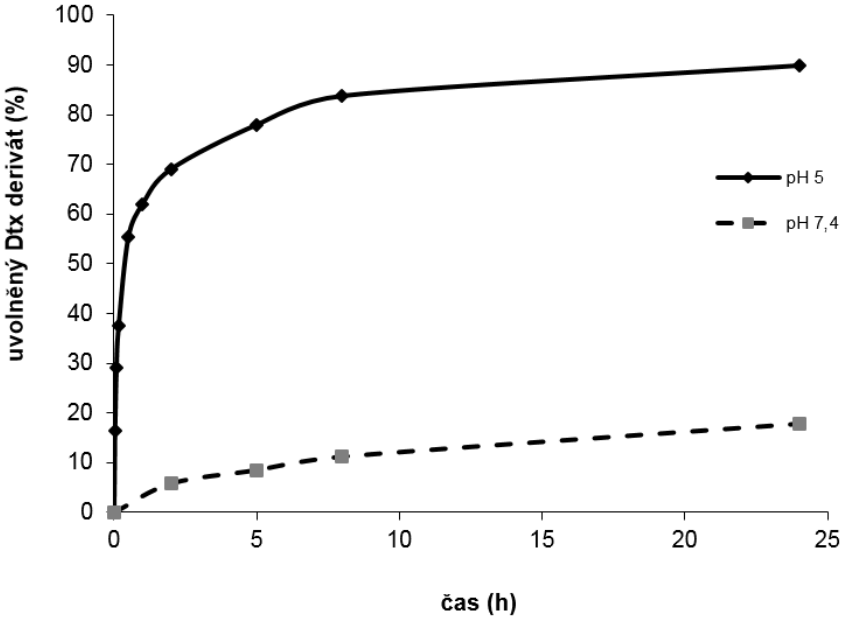
8 výkresů


Intenzita rozptýleného světla (AU)
14
12
10
8
6
4
2
0
0.1
1
10
100
Hydrodynamický průměr (nm)

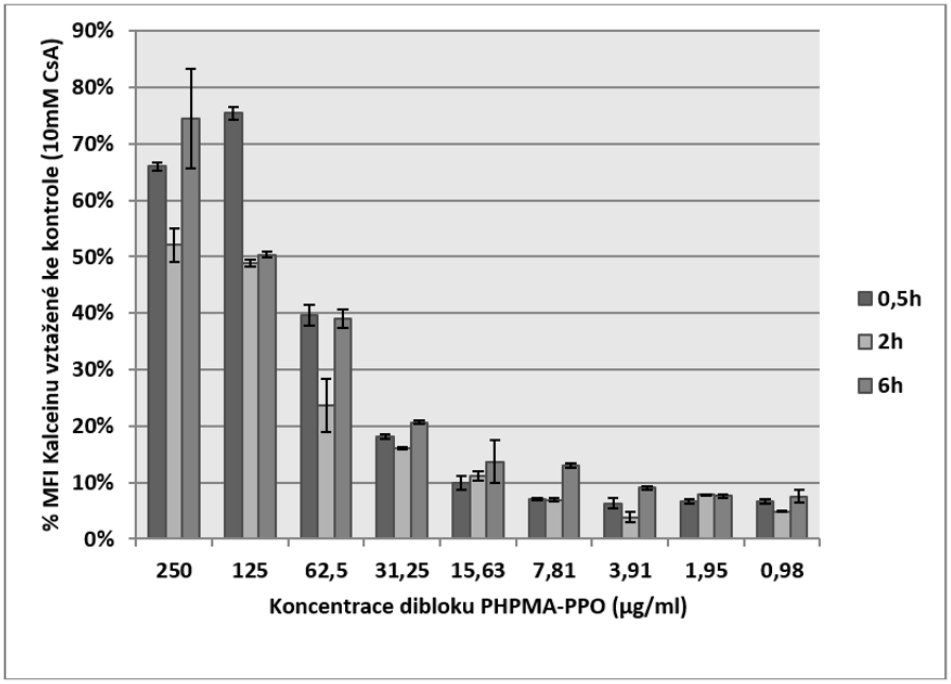
Obr. 1


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% uvolněného DOX
pH 5,0
pH 7,4
0
5
10
15
20
25
čas [h]

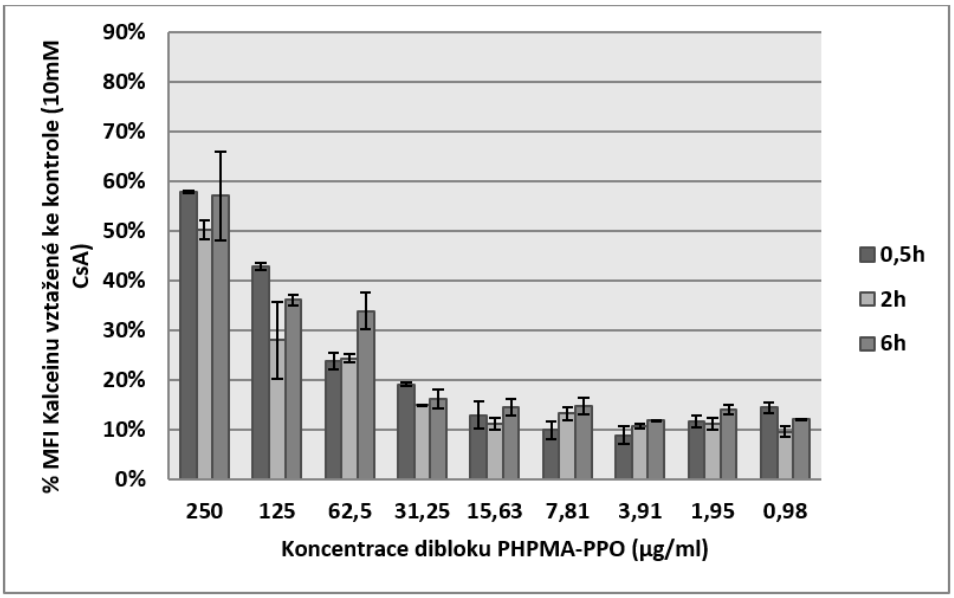
Obr. 2


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
uvolněný Dtx derivát (%)
pH 5
pH 7,4
0
5
10
15
20
25
čas (h)

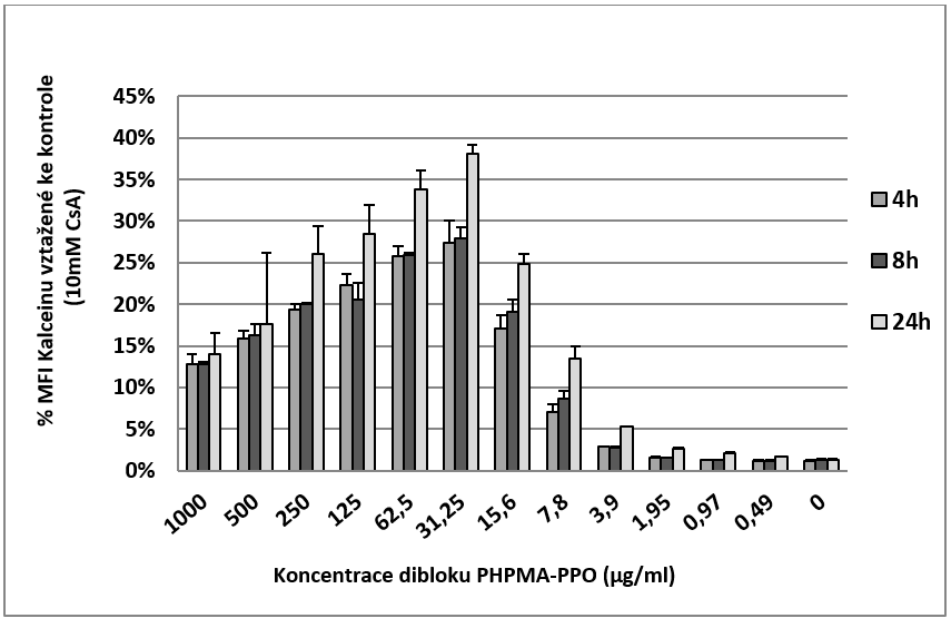
Obr. 3


90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
% MFI Kalceinu vztažené ke kontrole (10mM CsA)
250
125
62,5
31,25
15,63
7,81
3,91
1,95
0,98
Koncentrace dibloku PHPMA-PPO (µg/ml)
0,5h
2h
6h

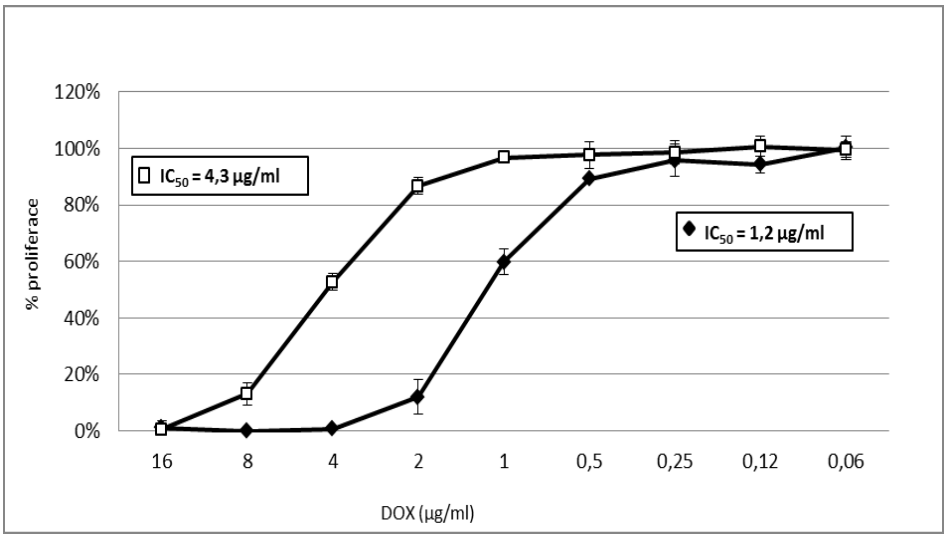
Obr. 4


% MFI Kalceinu vztažené ke kontrole (10mM CsA)
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
250
125
62,5
31,25
15,63
7,81
3,91
1,95
0,98
Koncentrace dibloku PHPMA-PPO (µg/ml)
0,5h
2h
6h

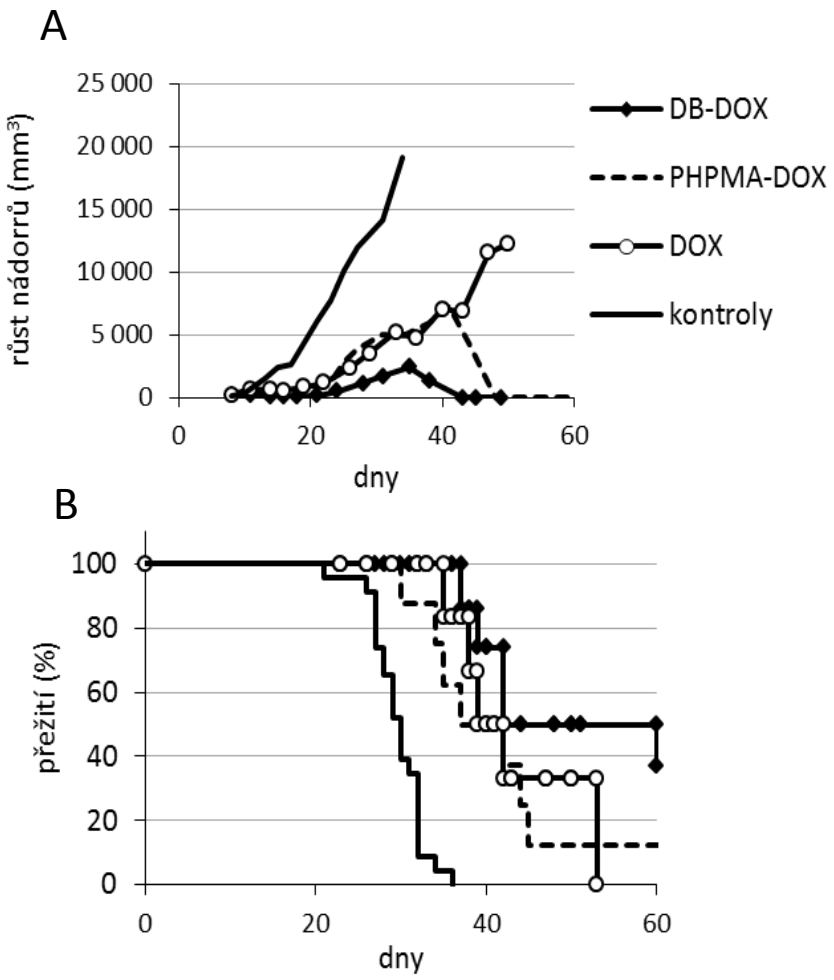
Obr. 5


% MFI Kalceinu vztažené ke kontrole (10mM CsA)
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
1000
500
250
125
62,5
31,25
15,6
7,8
3,9
1,95
0,97
0,49
0
Koncentrace dibloku PHPMA-PPO (µg/ml)
4h
8h
24h

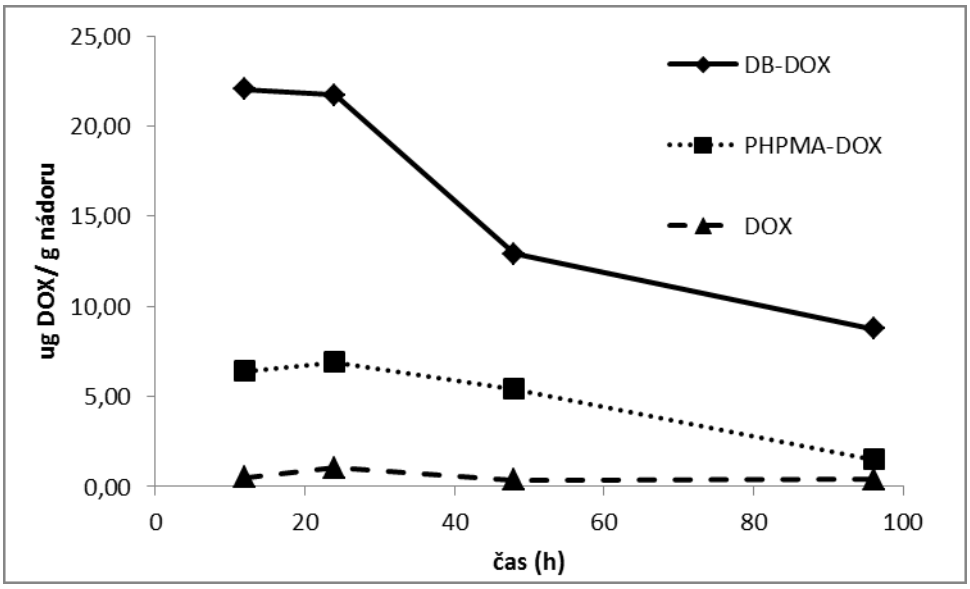
Obr. 6


120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
% proliferace
IC50 = 4,3 µg/ml
IC50 = 1,2 µg/ml
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,12
0,06
DOX (µg/ml)

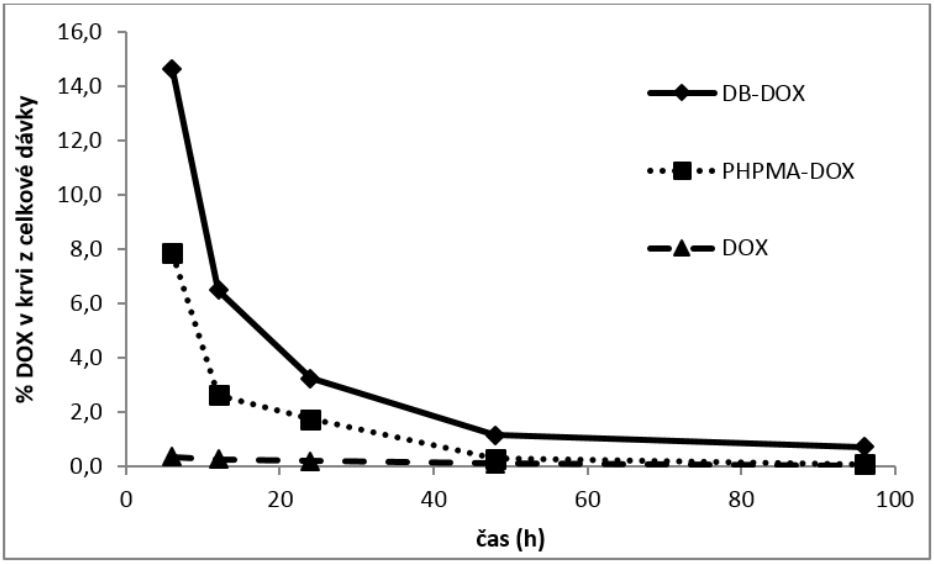
Obr. 7


A
25 000
20 000
15 000
10 000
5 000
0
růst nádorrů (mm³)
0
20
40
60
dny
DB-DOX
PHPMA-DOX
DOX
kontroly
B
100
80
60
40
20
0
přežití (%)
0
20
40
60
dny

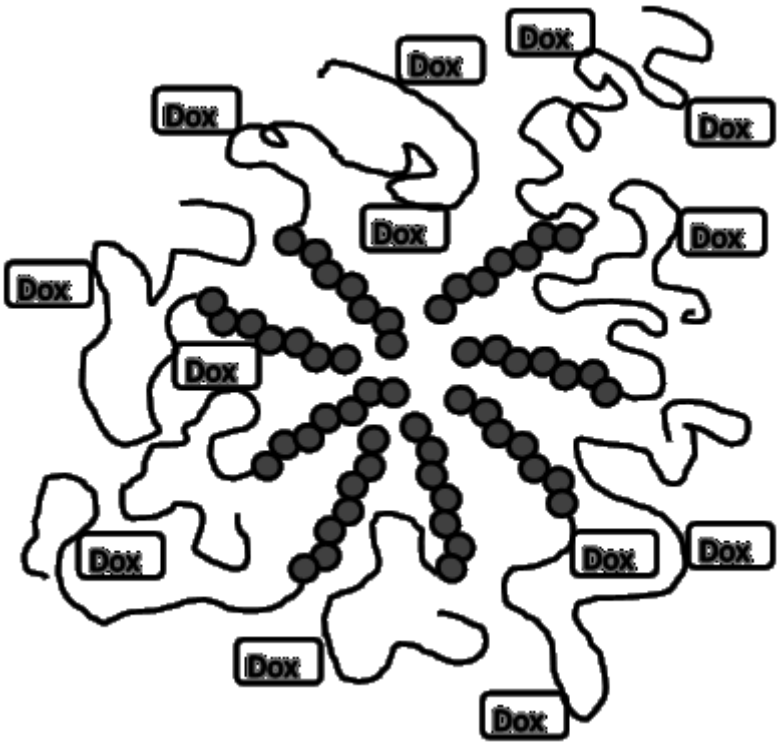
Obr. 8


25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
ug DOX/ g nádoru
0
20
40
60
80
100
čas (h)
DB-DOX
PHPMA-DOX
DOX

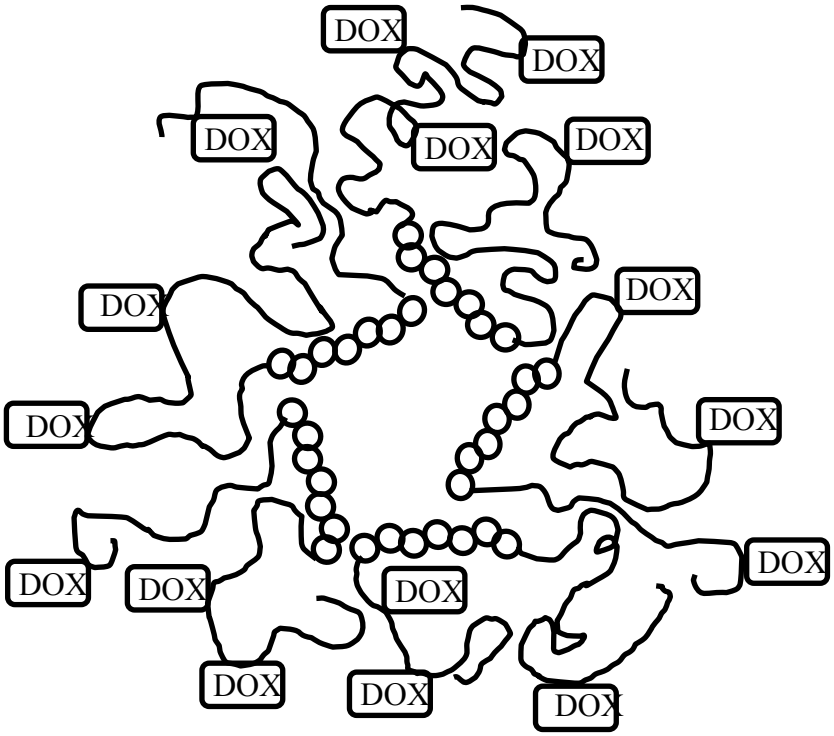
Obr. 9


16,0
14,0
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
% DOX v krvi z celkové dávky
0
20
40
60
80
100
čas (h)
DB-DOX
PHPMA-DOX
DOX

Obr. 10


Dox
Dox
Dox
Dox
Dox
Dox
Dox
Dox
Dox
Dox
Dox
Dox
Dox
Dox

Obr. 11


DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX
DOX

Obr. 12