



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104187** (13) **C2**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 35/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2011 15172</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Етріх Томас (CZ),</b> <b>Ульбріх Карел (CZ),</b> <b>Ріхова Бланка (CZ),</b> <b>Сірова Мілада (CZ)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>09.02.2010</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ЗЕНТИВА, К.С.,</b> U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Czech Republic (CZ)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.01.2014</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Пахаренко Антоніна Павлівна, реєстр. №4</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>PV 2009-85</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2007/110003 A2, 04.10.2007 WO 2008/017277 A2, 14.02.2008 WO 2008/034391 A1, 27.03.2008 MEERUM TERWOGT J M ET AL: "Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel" ANTI-CANCER DRUGS 2001 GB LNKD- DOI:10.1097/00001813-200104000-00003, vol. 12, no. 4, 2001, pages 315-323 ETRYCH T ET AL: "SYNTHESIS OF HPMA COPOLYMERS CONTAINING DOXORUBICIN BOUND VIA A HYDRAZONE LINKAGE. EFFECT OF SPACER ON DRUG RELEASE AND IN VITRO CYTOTOXICITY" MACROMOLECULAR BIOSCIENCE, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, DE LNKD- DOI:10.1002/1616-5195(20020101)2:1<43::AID-MABI43>3.0.CO;2-8, vol. 2, no. 1, 1 January 2002 (2002-01-01) , pages 43-52 ETRYCH, TOMAS ET AL: "HPMA Copolymer Conjugates of Paclitaxel and Docetaxel with pH-Controlled Drug Release" MOLECULAR PHARMACEUTICS ACS ASAP CODEN: MPOHBP; ISSN: 1543-8384, [Online] XP002591477 Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/mp100119f">http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/mp100119f</a> [retrieved on 2010-07-12]
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>13.02.2009</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: <b>CZ</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заяву: <b>10.02.2012, Бюл.№ 3</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.01.2014, Бюл.№ 1</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>PCT/CZ2010/000014, 09.02.2010</b>	

**(54) ПОЛІМЕРНІ КОН'ЮГАТИ ПАКЛІТАКСЕЛЮ ТА ДОЦЕТАКСЕЛЮ З PH-КОНТРОЛЬОВАНИМ ВИВІЛЬНЕННЯМ ЗАСОБУ, ЯКИЙ МАЄ СТАТИЧНУ ДІЮ НА ЗЛОЯКІСНІ НОВОУТВОРЕННЯ**

**(57) Реферат:**

В даному винаході описаний полімерний кон'югат, який складається з похідної цитостатичного агента, вибраного із групи таксанів, особливо паклітакселю (PTX), доцетакселю (DTX) або ларотакселю (LTX), та полімерного носія, приготовленого на основі лінійного або біорозкладного прищепленого співполімеру, який складається з одиниць основного

UA 104187 C2

співполімеру N-(2-гідроксипропіл)метакроїламід (HPMA) та одиниць, які включають метакроїловані гідрозони амінокислот або олігопептиди. Винахід також стосується способу приготування вищевказаного полімерного кон'югату, в якому полімерний носій піддають полімер-аналогічній трансформації носія шляхом реакції із складним етером оксокислоти та цитостатичним агентом. Полімерний кон'югат застосовують для приготування лікарського засобу для лікування пухлинних захворювань.

## Галузь техніки

Винахід стосується структури та властивостей водорозчинних полімерних терапевтичних агентів (проліків) на основі похідних паклітакселю (PTX), доцетакселю (DTX) та ларотакселю (LTX), створених переважно для лікування солідних пухлин при терапії пухлинних захворювань для лікування людей.

## Рівень техніки

На даний час, тенденції розробки лікарських засобів дуже часто сфокусовані на розробці форм лікарських засобів, які надають можливість специфічного ефекту лікарського засобу замість лише бажаного терапевтичного ефекту. Біологічно активні речовини з таким цільовим ефектом застосовуються в основному в галузях, де небажані побічні ефекти лікарського засобу можуть ушкоджувати здорові частини організму. Ця небезпека особлива актуальна при лікуванні цитостатичною речовиною при хіміотерапії пухлинних захворювань. Відомо, що приєднання цитостатичного агента до водорозчинного полімерного носія за допомогою хімічного зв'язку надає можливість підвищити розчинність в інших випадках нерозчинних або погано розчинних лікарських засобів та суттєво зменшити безпосередню токсичність. Високомолекулярні полімери запобігають швидкій екскреції лікарського засобу з організму шляхом клубочкової фільтрації, забезпечуючи подовжений час циркуляції в крові та присутність в організмі, та таким чином, довший час біодоступності лікарського засобу.

Останнім часом, було приготовлено багато полімерних кон'югатів засобів, які мають статичну дію на злоякісні новоутворення, із розчинними полімерами та було проведено дослідження, де лікарський засіб із протираковою дією приєднували до полімеру за допомогою нерозчеплюваного ковалентного зв'язку, гідролітично нестабільного іонного зв'язку та/або ковалентного зв'язку, що надає можливість контролювати вивільнення лікарського засобу і, таким чином, його активацію на основі та ферментативного або площинного хімічного гідролізу цього зв'язку. Системи полімерного носія, як правило, створюють таким чином, щоб забезпечити вивільнення терапевтично активного засобу, який має статичну дію на злоякісні новоутворення, з носія або в пухлині, або, більш специфічно, безпосередньо в пухлинній клітині. Важлива група полімерних терапевтичних засобів представлена полімерними лікарськими засобами, приготовленими на основі співполімерів N-(2-гідроксипропіл)метакриламід (HPMA), представники яких активно безпосередньо досягають пухлин за допомогою цільової структури, приєднаної до полімеру (антитіло, лецитин, гормон). [Duncan 1985, Říhová 2000, Kopeček 2001, 2000, Duncan, 2005; Satchi-Fainaro та ін., 2006]. Проте їх синтез є надзвичайно комплексним. Також при розробці полімерних засобів, які мають статичну дію на злоякісні новоутворення, було доведено, що для специфічного транспорту лікарського засобу в місце розташування пухлини нема потреби застосовувати активний націлюючий носій, але при цьому значно підвищується накопичення полімерних цитостатичних засобів, особливо в солідних пухлинах, але цього можна досягти шляхом підвищення молекулярної маси полімерного терапевтичного засобу вище межі екскреції носія нирками (тобто, пасивне націлювання на солідні пухлини). Цю здатність макромолекул накопичуватися в солідних пухлинах називають EPR ефект (підвищена проникність та утримання) та було доведено, що цей ефект часто проявляється також носіями на основі HPMA співполімерів [Noguchi та ін., 1998; Seymour та ін., 1995].

Одна з основних проблем застосування HPMA співполімерів як пасивно націлюваних високомолекулярних носіїв обумовлена їх нерозчеплюваним вуглецевим ланцюгом і лише полімери, молекулярна маса яких не перевищує 40 - 50 тис. г/моль, можуть екскретуватися з організму. Це означає, що коли накопичення полімеру в організмі після повторного введення лікарського засобу не відбувається та, коли молекулярна маса носія є настільки максимальною, наскільки це можливе для забезпечення пасивного націлювання з максимально можливою ефективністю, то полімерний носій слід створювати як такий, який здатний розщеплюватися в організмі. Такі полімерні носії на основі HPMA співполімерів недавно були розроблені та їх структура була запатентована [Chytil та ін., 2008; Etrych та ін., 2008, Chytil PV 2006-207, Etrych PV 2006 - 592].

В літературі представлено багато інформації про приготування та дослідження властивостей полімерів, які несуть засіб, який має статичну дію на злоякісні новоутворення, приєднаного до полімеру за допомогою зв'язку, здатного до гідролізу в водному середовищі [Kratz 1999]. Серед них, важливе місце відводиться HPMA співполімерам, які несуть засіб, який має статичну дію на злоякісні новоутворення, доксорубіцин, зв'язаний із полімерним ланцюгом за допомогою гідролітично розщеплюваного гідразонового зв'язку [Etrych 2002, Ulbrich 2004a, Ulbrich 2004b, Ulbrich пат. CZ 293787 B6]. Цей зв'язок є відносно стабільним в кровотоці (при транспортуванні в організмі) та гідролітично нестабільним в незначно кислому середовищі

живої клітини. Швидкість гідролізу цього зв'язку також регулює швидкість вивільнення лікарського засобу і, отже, концентрацію активної речовини в місці бажаного ефекту. При дослідженні в умовах *in vitro*, а також *in vivo* на мишах такі полімерні засоби, які мають статичну дію на злоякісні новоутворення, проявляють суттєво підвищену протипухлинну ефективність по відношенню до різних клітинних ліній в порівнянні з вільним лікарським засобом та в багатьох випадках їх застосування призводить до повного видужання піддослідних тварин навіть у випадку терапевтичного методу введення. [Říhová 2001, Etrych 2001]. Підвищення молекулярної маси носія (біорозкладні привиті полімери, міцелярні та наногелеві системи) завжди проводить до підвищення ефективності протипухлинної активності лікарського засобу, що підтверджується системами *in vivo*.

Паклітаксель та доцетаксель належать до групи таксанів, протиракових лікарських засобів, які загально прийнятно застосовуються для лікування пухлини яєчників та пухлин молочної залози, легень, передміхурової залози та інших пухлин [Vanhoefer та ін., 1997]. Крім їх вторинної токсичності, загальної для засобів, які мають статичну дію на злоякісні новоутворення, вони також мають інший недолік - дуже низьку розчинність у водних розчинах, що призводить до необхідності введення в різноманітних наповнювачах, зокрема, в Cremophor EL, що також призводить до інших побічних дій дозованої форми. У деяких схемах введення, введення таксанів в Cremophor EL може навіть суттєво знижувати ефективність терапії [Ng та ін., 2006].

Шляхом зв'язування цих лікарських засобів із полімерними носіями (PEG, HPMA співполімер, полі(глутамінова кислота)), були отримані дуже хороші водорозчинні проліки, які мають подовжений час циркуляції в організмі та підвищене накопичення в солідних пухлинах. Їх протиракова активність була підтверджена на тваринних моделях в умовах *in vivo* та в деяких випадках також клінічно. Таким чином, паклітаксель (PTX) був ковалентно зв'язаний із полі(етилєнглїколем) (PEG) за допомогою не-розщеплюваного естерного або 7-карбаматного зв'язків (C2-OH група), або за допомогою гідролітично нестабільного амінокислотного спейсеру (Ala, Gly) [Greenwald та ін., 1995; Greenwald, 2001; Greenwald та ін., 2003; Pendri та ін., 1998]. Було показано, що протипухлинна активність кон'югату залежить від структури зв'язку, використовуюваного між полімером та лікарських засобом, і молекулярна маса носія є іншим важливим фактором. Кон'югат із PTX тестували в фазі I клінічних випробувань [Satchi-Fainaro та ін., 2006], але, ймовірно, не дуже успішно.

Кон'югат паклітакселю полі(глутаміновою кислотою) (Hyotax) виявився більш ефективним в клінічних випробуваннях [Winter 2005, Kratz та ін., 2008]. В цьому кон'югаті PTX зв'язаний із поліамінокислотним носієм за допомогою естерного зв'язку через -ОН групу в положенні 2. Лікарський засіб вивільняється внаслідок розпаду полімерного ланцюга, утворення Glu похідної PTX та його подальшого гідролізу. На даний час, цей кон'югат знаходиться в фазі III клінічних випробувань.

Паклітаксель також зв'язували із HPMA співполімерами за допомогою естерного зв'язку із використанням біорозкладного олігопептидного GlyPheLeuGly спейсеру. Було показано, що PTX, після інкубування із лізосомальними ферментами, вивільняється з носія та це вивільнення є важливим для досягнення протиракової активності в умовах *in vivo*. PNU166945 представляє собою кон'югат HPMA співполімеру із естерно-зв'язаним PTX, який клінічно тестували в фазі I [Terwogt та ін., 2000; Terwogt та ін., 2001], проте, після цієї фази подальше тестування було зупинено. Вищевказані результати свідчать про те, що кон'югація паклітакселю із полімерним носієм приводить до суттєвого поліпшення властивостей лікарського засобу (розчинність, покращена біодоступність). Проте, якщо лікарський засіб знайде своє застосування для лікування людей, то структура та молекулярна маса носія, а також структура спейсеру між полімером та лікарським засобом, контролювання швидкості і, отже, концентрації лікарського засобу в місці бажаного ефекту, слід обережно вибирати та спеціально готувати. При розробці оптимальних структур необхідно підтверджувати функціонування цих структур на доступних моделях *in vivo*.

Суть винаходу

Полімерний лікарський засіб відповідно до даного винаходу характеризується тим, що засіб, який має статичну дію на злоякісні новоутворення із групи таксанів, паклітакселю (PTX), доцетакселю (DTX), або ларотакселю (LTX) (далі в даному винаході позначаються як лікарські засоби) зв'язаний з водорозчинним полімерним носієм, приготуванням на основі лінійного або прищепленого HPMA співполімеру. Лікарський засіб зв'язаний з полімерними ланцюгами за допомогою естерної групи, отриманої шляхом ацилювання -ОН групи в положенні 2 за допомогою спейсерів, що містять рН-чутливі гідролітично розщеплювані гідразонові зв'язки. Ці спейсери можуть містити амінокислотні залишки різних оксокислот, за допомогою яких карбонільну групу вводять в структуру лікарського засобу, зв'язані із залишками окремих

амінокислот, олігопептидів, або інших структур, надаючи можливість закінчувати бокові ланцюги полімерного носія гідразоною групою. У випадку лінійного полімеру молекулярну масу полімерного ланцюга вибирають нижче межі екскреції HPMA співполімерів з організму, переважно в діапазоні 10 - 50 тис. г/моль. У випадку привитого співполімеру молекулярну масу вибирають в діапазоні 50 - 250 тис. г/моль.

Полімерний лікарський засіб відповідно до винаходу призначений для внутрішньовенного (ін'єкційного або інфузійного) введення в розчині, але також може вводиться внутрішньопухлинно або внутрішньоочеревинно та призначений для лікування солідних пухлин. Полімер із хімічно зв'язаним цитостатичним засобом конструюють таким чином, щоб він був стабільним при циркуляції в кровотоці та запобігав гідролізу гідразонового зв'язку між даним таксаном та полімером, або, можливо, підтримував швидкість гідролізу впродовж транспортування в організмі на максимально можливому низькому рівні (при значенні рН 7,4 в кровотоці), таким чином не буде проявлятися цитотоксичного ефекту вивільненого лікарського засобу або його похідної. Всю систему конструюють у вигляді двофазної системи. У зв'язку із придатним вибором молекулярної маси носія, надається можливість просочування, а також ефективного накопичення в пухлинній тканині, взаємодія із клітинною мембраною повинна відбуватися після початкового накопичення лікарського засобу в пухлинній тканині та молекулярно розчинений полімерний лікарський засіб буде проникати в індивідуальні пухлинні клітини шляхом піноцитозу. Всередині клітин-мішеней, швидкий гідроліз гідразонового зв'язку та вивільнення лікарського засобу або його похідної із носія буде відбуватися внаслідок падіння значення рН із зовнішнього значення (7,4) до внутрішньоклітинного значення (5 – 6). На подальшому етапі гідроліз естерного зв'язку похідної лікарського засобу, вже вивільненого з полімеру, буде відбуватися шляхом хімічного гідролізу, або, більш специфічно, під впливом внутрішньоклітинних ферментів, наприклад, карбоксиестераз. Реалізація запропонованого вище механізму дії полімерних лікарських засобів відповідно до винаходу підтверджується за допомогою експериментів на моделі вивільнення лікарських засобів з полімерного носія. Результати цих тестів, включаючи тести протиракової активної активності, представлені в експериментальному розділі заявки.

Полімерні кон'югати із націленим протираковим ефектом відповідно до винаходу характеризуються тим, що цитостатичний агент (таксол, доцетаксель, ларотаксель), приєднаний за допомогою естерного зв'язку та спейсеру, до полімерного носія, утвореного за допомогою лінійного [Etrych патент CZ 297827 B6, publ. 2008], або привитого [Etrych патент CZ 298945 (B6), опубл. 2008] HPMA співполімеру через гідролітично нестабільну гідразонову групу, отриману шляхом реакції карбонільної групи молекули похідної лікарського засобу із гідразидною групою полімерного носія. Полімерні носії зазвичай готують шляхом співполімеризації радикального розчину HPMA із співмономерами відповідно до бажаної композиції. Зв'язування відповідного таксану із полімерним носієм приводить до суттєвого зменшення його цитотоксичності, суттєвого підвищення молекулярної маси лікарського засобу, і, таким чином, подовження часу циркуляції в кровотоці; тобто подовження загального часу знаходження лікарського засобу в організмі і, отже, підвищення його біодоступності. Полімерний лікарський засіб відповідно до винаходу додатково характеризується тим, що зв'язування лікарського засобу із полімерним носієм є відносно стабільним впродовж транспортування в кровотоці та в рідинах організму та здатний до гідролітичного розщеплення в слабо кислому середовищі пухлини та, зокрема, всередині цільових пухлинних клітин в ендосомах, які характеризуються слабо кислим значенням рН. Це означає, що лікарський засіб транспортується через кровоток в неактивній формі, зв'язаний із полімером, і він вивільняється та активується переважно після проникнення в цільові пухлинні клітини. Той факт, що лікарський засіб активується лише в клітинах-мішенях, виключає побічні ефекти в інших випадках токсичних цитостатичних засобів та націлює їх ефект переважно на пухлинні клітини. Полімерний носій, приготовлений на основі HPMA співполімерів, молекулярна маса яких, тобто ефективність накопичення в пухлинній тканині, можна контролювати за допомогою змін скелету полімерного носія (нездатний до розкладу лінійний полімер, високомолекулярний біорозкладний привитий полімер), який відповідає за націлений (пасивний) транспорт в пухлину або пухлинні клітини.

Сфера використання представленого винаходу включає застосування полімерних лікарських засобів відповідно до винаходу для лікування солідних пухлин при злоякісних захворюваннях в терапії людини.

Синтез та структури полімерних кон'югатів

Синтез полімерних кон'югатів відповідно до винаходу здійснюють за декілька стадій; детальна кінцева структура кон'югату суттєво залежить від вибраного шляху синтезу.

На першій стадії синтезу синтезують основні мономери: HPMA, метакроїловані похідні амінокислот та олігопептидів, які закінчуються гідразидною ( $\text{CONHNH}_2$ ) групою, або можливо, закінчуються гідразидною групою, захищеною за допомогою трет-бутилоксикарбонільної групи (Boc).

На другій стадії синтезують полімерні попередники, тобто HPMA співполімери, які несуть функціональні групи (випадкові співполімери), що служать як полімерні носії для лікарських засобів.

Полімерний попередник, який несе функціональні гідразидні групи на ланцюзі, може бути приготовлений або шляхом радикальної співполімеризації вказаних вище функціональних мономерів із HPMA, або шляхом полімер-аналогічної трансформації основного співполімеру, що несе функціональні групи.

Прищеплені співполімери готують із мультивалентних та напівтелехелатних HPMA співполімерів відповідно до процедури, описаної в [Etrych 2008 патентна публікація].

Основний співполімер (попередник) представляє собою співполімер HPMA та метакроїлованих гідразидів амінокислот або олігопептидів, вибраних групи гліцилу, гліцилгліцилу,  $\beta$ -аланілу, 6-аміногексаноїлу (АН), 4-амінобензоїлу, або змішаного ацильного похідної із олігопептидів GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly та GlyPheLeuGly), який характеризується тим, що він містить 70 - 98 моль % HPMA та 2 - 30 моль % одиниць з гідразидними функціональними групами (див. Схему 2 із спейсером, що містить 6-аміногексаноїл).

Похідна лікарського засобу представляє собою сполуку лікарського засобу (PTX, DTX або LTX), отриману шляхом ацилювання гідроксильної групи в положенні 2 лікарського засобу із відповідної оксокислотою. Переважно застосовують наступні оксокислоти: левулінову кислоту, 4-(2-оксопропіл)бензойну кислоту, 4-оксо-пент-2-енову кислоту та 5-оксо-гекс-2-енову та 6-оксо-гепт-2-енові кислоти (див. Схему 1).

Полімерний кон'югат представляє собою сполуку полімерного попередника із похідною лікарського засобу, де похідна лікарського засобу зв'язана з полімерним попередником за допомогою гідразонного зв'язку, отриманого шляхом реакції карбонільної групи похідної лікарського засобу із гідразидними групами полімеру, який характеризується тим, що він містить 70 - 98 моль % HPMA, 1,5 - 29,5 моль % одиниць з гідразидними функціональними групами та 0,5 - 10 моль % одиниць із гідразон-зв'язаною похідною лікарського засобу (див. Схему 3; із спейсером, що містить 6-аміногексаноїл та левулінову кислоту).

Опис фігур

Фігура 1: Діаграма швидкості вивільнення PTX та його похідних із лінійних полімерних кон'югатів в буфері при значенні pH 5 (модель внутрішньоклітинного середовища).

Фігура 2: Діаграма швидкості вивільнення PTX та його похідних із лінійних полімерних кон'югатів в буфері при значенні pH pH 7,4 (модель кровотоку).

Фігура 3: Коефіцієнт виживання C57BL/6 мишей із EL-4 лімфою, яким вводили DTX, LEV-DTX похідну та RHPMA-АН-NH-N=DTX-LEV лінійний полімерний кон'югат. Дози лікарського засобу становили  $2 \times 20$  мг DTX еквівалент/кг, RHPMA-АН-NH-N=DTX-LEV кон'югат вводили в дозах  $2 \times 20$  та  $2 \times 40$  мг DTX еквівалент/кг.

Фігура 4: Коефіцієнт виживання C57BL/6 мишей із EL-4 лімфою, яким вводили похідну LEV-PTX паклітаксель та RHPMA-АН-NH-N=PTX-LEV лінійний полімерний кон'югат. Внаслідок обмеженої розчинності PTX не можна вводити у вільній формі.

Фігура 5: Коефіцієнт виживання BALB/c мишей із 4T1 карциною молочної залози, яким вводили паклітаксель, похідну LEV-PTX паклітаксель та RHPMA-АН-NH-N=PTX-LEV лінійний полімерний кон'югат. PTX та PTX-LEV ін'єктували в дозах  $2 \times 30$  мг PTX еквівалент/кг в дні 8 та 12 (див. текст) та RHPMA-АН-NH-N=PTX-LEV кон'югат в дозах  $2 \times 60$  мг PTX еквівалент/кг в дні 8 та 12.

Фігура 6: Коефіцієнт виживання C57BL/6 мишей з EL-4 лімфою, яким вводили RHPMA-АН-NH-N=DTX-LEV лінійні полімерні кон'югати із DTX вмістом 8,2 % та 16,3 % в дозах  $2 \times 30$  мг DTX еквіваленту DTX в/в, в дні 9 та 13.

Приклади

Приклади здійснення синтезу проміжних сполук та кон'югатів відповідно до винаходу

Приклад 1: Синтез мономерів та похідних лікарських засобів

HPMA готували відповідно до раніше описаної методики [Ulbrich та ін., 2000]. Елементний аналіз: розраховано 58,8 % C, 9,16 % H, 9,79 % N; знайдено 58,98 % C, 9,18 % H, 9,82 % N. Продукт був хроматографічно чистим.

6-(Метакрилоїламіно)гексаноїл гідразин ( $N^1$ -(6-гідразино-6-оксогексил)-2-метакриламід) (MA-AN-NHNH<sub>2</sub>) готували відповідно до раніше описаної методики [Ulbrich патенти, Etrych патент].

Естер левулинової кислоти та паклітакселю (в -ОН 2 положенні) (LEV-PTX) готували шляхом реакції левулинової кислоти із паклітакселем за допомогою карбодіїмідного методу (дициклогексилкарбодіїмід, DCC) в N, N'-диметилформаміді (ДМФА).

Левулинову кислоту (19,4 мг, 0,167 ммоль) та DCC (37,5 мг, 0,182 ммоль) розчиняли кожен в 0,15 мл ДМФА при лабораторній температурі. Обидва розчини охолоджували до -18 °C та змішували. Через 20 хвилин розчин паклітакселю (100 мг, 0,117 ммоль) та N, N'-диметиламінопіридину (DMAP) (14 мг, 0,117 ммоль) в 0,3 мл ДМФА додавали до цього розчину. Реакцію здійснювали при -18 °C протягом 30 хвилин та при 4 °C протягом 16 годин. За перебігом реакції спостерігали за допомогою ТШХ - 60 F<sub>254</sub> силікагелеві пластини (етилацетат: гексан 1:1, Rf(PTX)= 0,25, Rf(LEV-PTX)= 0,15, Rf(Левулинова кислота)= 0,45). Продукт очищали від низькомолекулярних сумішей за допомогою хроматографії на колонці (60 см x 4 см), заповненій силікагелем в етилацетаті. Фракцію, що містить PTX-LEV, продукт збирали та концентрували до 0,4 мл та продукт осаджували за допомогою 20 мл діетилового етеру. Продукт відсмоктували, промивали за допомогою невеликої кількості діетилового етеру та висушували в вакуумі до постійної маси. Вихід становив 98 мг продукту (84 %) з точкою плавлення 136-138 °C. ТШХ (етилацетат: гексан 1:1): в одній посудині при Rf = 0,15. MALDI-TOF MS: 970 (M+Na).

Чистоту всіх мономерів та похідних лікарських засобів визначали за допомогою ВЕРХ системи [Shimadzu ВЕРХ система, обладнана колонкою із оберненою фазою Chromolith Performance RP-18e (100x 4,6 мм) та УФ-вид. детектором - Shimadzu SPD-10AVvp (230 нм); елюент: вода-ацетонітрил із градієнтом 50-100 об. % ацетонітрилу, швидкість потоку 0,5 мл·хв<sup>-1</sup>].

Естер левулинової кислоти та доцетаксель (в -ОН 2 положенні) (LEV-DTX) готували аналогічно до LEV-PTX шляхом реакції левулинової кислоти із доцетакселем за допомогою карбодіїмідного методу (DCC) в ДМФА.

Левулинову кислоту (38 мг, 0,327 ммоль) та DCC (100 мг, 0,487 ммоль) розчиняли кожен в 0,25 мл ДМФА при лабораторній температурі. Обидва розчини охолоджували до -18 °C та змішували. Через 20 хвилин розчин доцетакселю (200 мг, 0,247 ммоль) та N, N'-диметиламінопіридину (DMAP) (28 мг, 0,229 ммоль) в 0,6 мл ДМФА додавали до цього розчину. Реакцію здійснювали при -18 °C протягом 30 хвилин та при 4 °C протягом 16 годин. За перебігом реакції спостерігали за допомогою ТШХ 60 F<sub>254</sub> силікагелеві пластини (етилацетат: гексан 1:1, Rf(DTX) = 0,3, Rf(LEV-DTX) = 0,2, Rf(Левулинова кислота) = 0,45). Продукт очищали від низькомолекулярних сумішей два рази за допомогою хроматографії на колонці (60 см x 4 см), заповненій силікагелем в етилацетаті. Фракцію, що містить DTX-LEV продукт збирали кожного разу та концентрували до 0,6 мл та продукт осаджували за допомогою 20 мл діетилового етеру. Продукт відсмоктували, промивали за допомогою невеликої кількості діетилового етеру та висушували в вакуумі до постійної маси. Вихід становив 179 мг продукту (80 %) з точкою плавлення 86-89 °C. ТШХ (етилацетат: гексан 1:1): в одній посудині при Rf=0,20. MALDI-TOF MS: 929 (M+Na).

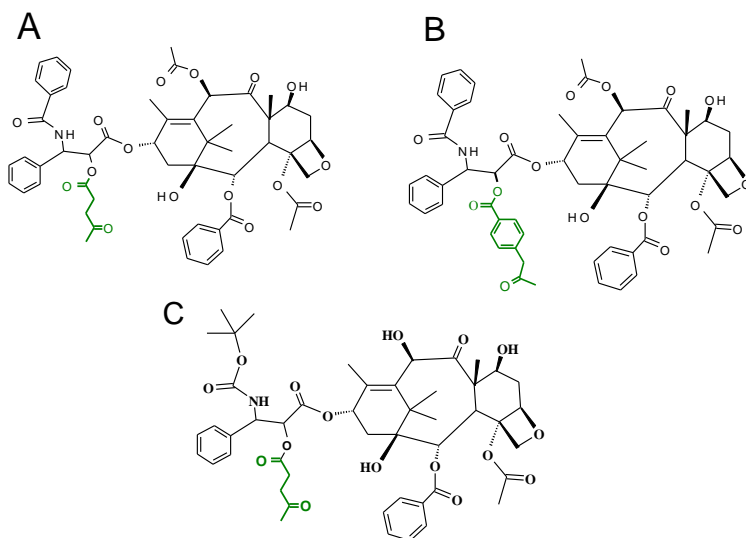


Схема 1. Структура естерів левулінової кислоти та 4-(2-оксопропіл)бензойної кислоти із паклітакселем та доцетакселем: А) Естер левулінової кислоти та паклітакселю, LEV-PTX; В) Естер 4-(2-оксопропіл)бензойної кислоти та паклітакселю, OPB-PTX; С) Естер левулінової кислоти та доцетакселю, LEV-DTX.

Естер 4-(2-оксопропіл)бензойної кислоти та паклітакселю (в -ОН 2 положенні) (OPB-PTX) готували за допомогою методу, аналогічного до описаного вище для приготування LEV-PTX, а саме шляхом реакції 4-(2-оксопропіл) бензойної кислоти із паклітакселем, використовуючи реагент для кон'югації DCC в ДМФА.

Вихід становив 85 %. Температура плавлення 143-145 °С. ТШХ (етилацетат: гексан 1:1): в одній посудині при  $R_f = 0,25$ . MALDI-TOF MS: 1032 (M+Na).

Естер 4-(2-оксопропіл)бензойної кислоти та доцетакселю (в -ОН 2 положенні) (OPB-PTX) готували за допомогою методу, аналогічного до описаного вище для приготування DTX-LEV, а саме шляхом реакції 4-(2-оксопропіл) бензойної кислоти із доцетакселем, використовуючи DCC в ДМФА.

Вихід становив 81 %. Температура плавлення 94-96 °С. ТШХ (етилацетат: гексан 1:1): в одній посудині при  $R_f = 0,28$ . MALDI-TOF MS: 990 (M+Na).

Естер 4-оксо-пентенової [3-ацетилакрилової] кислоти та паклітакселю (в -ОН 2 положенні) (AAK-PTX) готували за допомогою методу, аналогічного до описаного вище для приготування LEV-PTX, а саме шляхом реакції 4-оксо-пентенової кислоти із паклітакселем, використовуючи DCC в ДМФА.

Вихід становив 86 %. Температура плавлення 138-139 °С. ТШХ (етилацетат: гексан 3:1): в одній посудині при  $R_f = 0,6$ . MALDI-TOF MS: 968 (M+Na).

Естер 5-оксо-гексенової кислоти та паклітакселю (в -ОН 2 положенні) (ONE-PTX) готували за допомогою методу, аналогічного до описаного вище для приготування PTX-LEV, а саме шляхом реакції 5-оксо-гексенової кислоти із паклітакселем, використовуючи реагент для кон'югації DCC в ДМФА.

Вихід становив 85 %. Температура плавлення 132-134 °С. ТШХ (етилацетат: гексан 3:1): в одній посудині при  $R_f = 0,65$ . MALDI-TOF MS: 982 (M+Na).

Естер 5-оксо-гексенової кислоти та доцетакселю (в -ОН 2 положенні) (ONE-DTX) готували за допомогою методу, аналогічного до описаного вище для приготування DTX-LEV, а саме шляхом реакції 5-оксо-гексенової кислоти із доцетакселем, використовуючи реагент для кон'югації DCC в ДМФА.

Вихід становив 86 %. Температура плавлення 84-86 °С. ТШХ (етилацетат: гексан 3:1): в одній посудині при  $R_f = 0,7$ . MALDI-TOF MS: 940 (M+Na).

Приклад 2: Синтез полімерного попередника - співполімеру HPMA із MA-AH-NHNH<sub>2</sub> полі(HPMA-спів-MA-AH-NHNH<sub>2</sub>) співполімер готували за допомогою співполімеризації радикального розчину HPMA та MA-AH-NHNH<sub>2</sub> в метанолі при 60 °С відповідно до раніше описаної процедури [Etrych патент].

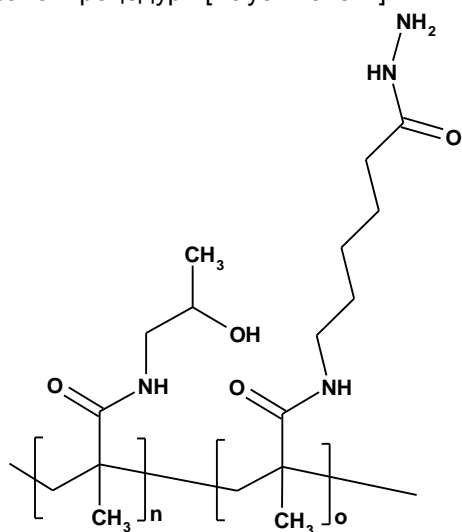


Схема 2. Структури полімерного попередника, полі(HPMA-спів-MA-AH-NHNH<sub>2</sub>) співполімеру.

Приклад 3 Приготування полімерних кон'югатів, що містять похідні лікарських засобів (RHPMA-AH-NH-N=LEV-PTX, RHPMA-AH-NH-N=LEV-DTX, RHPMA-AH-NH-N=OPB-PTX, RHPMA-



АН-NH-N=OPB-DTX, RHPMA-АН-NH-N=ОНЕ-PTX, RHPMA-АН-NH-N=ОНЕ-DTX, RHPMA-АН-NH-N=АКК-PTX та RHPMA-АН-NH-N=АКК-DTX)

Слiвполiмери iз похiдними РТХ, DTX та LTX, зв'язаними iз RHPMA носiєм, за допомогою гiдролiтично розщеплюваногO гiдразоновогO зв'язку, готували шляхом реакцiї полiмерних попередникiв, що мiстять гiдразиновi групи, iз вiдповiдним похiдних лiкарськOгO засобу в метанолi при каталiзi за допомогою оцтової кислоти.

Розчин 100 мг полi(HPMA-слiв-МА-АН-NHNNH<sub>2</sub>) слiвполiмеру в 1,1 мл метанолу змiшували з розчином LEV-PTX в 0,2 мл метанолу. Через 1 хвилину 40 мкл оцтової кислоти додавали до перемiшуваної реакцiйної сумiшi при 25 °С. За здiйсненням реакцiї (втрата LEV-PTX) спостерiгали за допомогою ТШХ (60 F<sub>254</sub> силiкагелевi пластини, етилацетат, Rf(LEV-PTX)= 0,8). Через 2 години реакцiйну сумiш очищали вiд вiльної похiдної лiкарськOгO засобу за допомогою гел'фiльтрацiї на колонцi, заповненiй Sephadex LH-20 в метанолi. Полiмерну фракцiю видiляли, концентрували на вакуумному випарнику та продукт осаджували за допомогою 50 мл етилацетату, видiляли шляхом фiльтрацiї на фритi S4, промивали за допомогою 150 мл етилацетату та висушували до постiйної маси. Вмiст всьогO РТХ або його похiдної в полiмерному кон'югатi визначали за допомогою ВЕРХ методу (ВЕРХ Shimadzu система) пiсля повногO гiдролiзу полiмерного кон'югату в НСl розчинi (рН 2) при 37 °С впродовж 1 години та екстрагування РТХ похiдної за допомогою хлороформу. <M<sub>w</sub>> та розподiл молекулярної маси визначали за допомогою рiдинної хроматографiї (TSKGel 4000 колонка (300 × 10 мм), 20 % 0,3 М ацетатний буфер (CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH; рН 6,5; 0,5 г/л NaN<sub>3</sub>) та 80 % метанол, швидкiсть потоку 0,5 мл/хв, визначення за допомогою диференцiйногO рефрактометра, детектора розсiювання свiтла (DAWN-DSP-F, Wyatt Technology, USA) та УФ-детектора (250 нм). Характеристика полiмерного лiкарськOгO засобу: Загальний вихiд лiкарськOгO засобу, зв'язаногO реакцiєю: 96 мг (88 %), вмiст всьогO LEV-PTX 9,2 % за масою, вмiст вiльного РТХ <0,2 % iз загального вмiсту РТХ. Процедура зв'язування РТХ похiдної iз полiмерними попередникami за допомогою гiдразоновогO зв'язку була аналогiчною для всiх типiв попередникiв та похiдних лiкарськOгO засобiв.

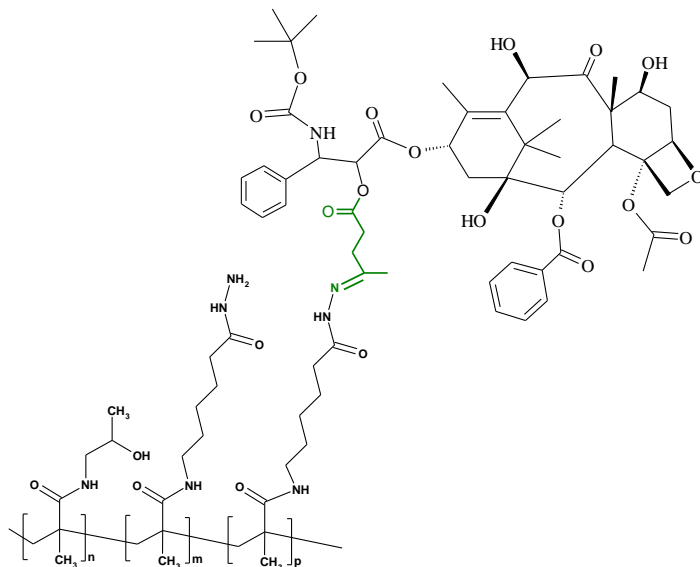


Схема 3. Структури RHPMA-АН-NH-N=DTX-LEV полiмерного кон'югату iз зв'язаною похiдною, естер левулинової кислоти та доцетакселю

Приклад 4: Вивiльнення РТХ, DTX або їх похiдних iз полiмерних кон'югатiв

Кiлькостi РТХ, DTX або їх похiдних, вивiльнених iз полiмерних кон'югатiв, визначали пiсля їх iнкубування в фосфатному буферi iз значенням рН 5,0 (0,1М фосфатний буфер, що мiстить 0,05М NaCl), моделюючи внутрiшньокiтинне середовище, та фосфатний буфер iз значенням рН 7,4, моделюючи середовище кровотоку. Кiлькостi вивiльнених лiкарськOгO засобiв або їх похiдних в iнкубацiйних розчинах визначали за допомогою ВЕРХ (Shimadzu). В заздалегiдь визначенi часовi iнтервали 200 мкл доз iнкубацiйногO розчину вiдбирали та пiсля екстрагування вивiльнених лiкарськOгO засобiв та їх похiдних iз хлороформом, їх кiлькостi визначали за допомогою ВЕРХ системи [Shimadzu ВЕРХ система, обладнана колонкою iз оберненою фазою Chromolith Performance RP-18e (100× 4,6 мм) та УФ-вид. детектор - Shimadzu SPD-10AVvp (230

нм); елюент: вода-ацетонітрил із градієнтом 50- 100 об. % ацетонітрилу, швидкість потоку 0,5 мл·хв<sup>-1</sup>.

Після інкубування кон'югатів (концентрація 5 мг/мл) в фізіологічному середовищі при 37 °С (фосфатний буфер, рН 7,4) лікарські засоби (PTX та DTX) (або їх похідні) вивільнялися суттєво більш повільно (фігура 2), ніж в слабкокислому середовищі із рН 5,0, що моделює середовище ендосом та лізосом пухлинних клітин (фігура 1). В обох лікарських засобах на швидкість вивільнення з полімерного кон'югату та пропорцію вивільнених компонентів (лікарський засіб та його похідна) основним чином впливала структура оксокислоти спейсера. Спейсер, що містить левулінову кислоту або 4-(2-оксопропіл)бензойну кислоту, забезпечував дуже швидке вивільнення похідної лікарського засобу при рН 5; однак, гідроліз естерного зв'язку між лікарським засобом та кислотою відбувався лише дуже повільно. З іншого боку, спейсер, що містить 4-оксо-пентенову кислоту, стабілізує як гідразоновий, та і естерний зв'язок, тому не відбувається істотного вивільнення лікарського засобу або його похідної. При інкубації в фізіологічному середовищі із рН 7,4 відбувається частковий гідроліз гідразонового зв'язку у випадку полімерних кон'югатів із спейсером, що містить левулінову кислоту або 4-(2-оксопропіл)бензойну кислоту, із суттєво нижчою швидкістю в порівнянні із середовищем із значенням рН 5. Стабільність естерного зв'язку між левуліноювою кислотою та лікарським засобом при рН 7,4, ймовірно, нижче та вільний лікарський засіб вивільняється в межах до однієї третьої. З іншого боку, у випадку спейсера, що містить 4-(2-оксопропіл)бензойну кислоту, вивільняється лише похідна лікарського засобу; естер зв'язок залишається стабільним. Розкладання похідної лікарського засобу на вільний лікарський засіб або безпосереднє відщеплення лікарського засобу від полімерного кон'югату, ймовірно, обумовлено впливом ферментів, в основному карбоксиестераз.

Приклад 5: Ілюстрація *in vitro* біологічної активності лінійних полімерних кон'югатів доцетакселю та паклітакселю при інкубації із клітинами пухлинних ліній; EL-4 Т клітинна лімфома та 4T1 карцинома молочної залози.

Таблиця 1

Значення IC<sub>50</sub> (в нг/мл)

	EL 4	4T1
DTX	0,0001	0,0004
DTX-LEV	0,015	0,0031
PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV	3,9	0,750
PTX	0,0013	0,0003
PTX-LEV	0,19	0,0054
PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV	33,6	8,90

Приклад 6: Ілюстрація *in vivo* біологічної активності лінійних полімерних кон'югатів доцетакселю та паклітакселю у мишей, інкульованих EL4 Т клітинною лімфою

Для ілюстрації активності *in vivo* кон'югатів доцетакселю та паклітакселю, застосовували модель мишиної сингенної EL-4 Т клітинної лімфоми. Мишам C57BL/6 штаму (самки) підшкірно імплантували  $1 \times 10^5$  EL-4 пухлинних клітин в день 0. Лікарські засоби вводили внутрішньовенно (в/в), в дводозовому введенні в день 8 та день 12 після трансплантації пухлинних клітин. Першу дозу вводили в той час, коли пухлини були добре розвинутими, пальпованими, із розмірами приблизно 300 мм. В експерименті аналізували розмір пухлини, масу тіла миші, загальний стан здоров'я та коефіцієнт виживання. Вплив кон'югату завжди порівнювали із впливом вільного лікарського засобу (DTX, PTX) та його похідними (DTX-LEV, PTX-LEV). Середня тривалість виживання необробленої контрольної миші із EL-4 лімфою становила 31,3 дня (SD (SD 3,66, середнє значення тривалості виживання 30,5 дня).

DTX, PTX та DTX-LEV, PTX-LEV похідні розчиняли для в/в введення в суміші Cremophor EL (Sigma, USA) та етанолу (1:1); після розчинення лікарського засобу об'єм доповнювали за допомогою 4 об'ємних частин PBS (забуферений фосфатом фізіологічний розчин). PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV, PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV кон'югати розчиняли в PBS. Об'єм кожної індивідуальної дози лікарського засобу становив 0,2 мл. Застосовували наступні дози ліків: DTX та DTX-LEV похідна  $2 \times 20$  мг DTX еквівалент/кг, PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV кон'югат  $2 \times 20$  та  $2 \times 40$  мг DTX еквівалент/кг, PTX та PTX-LEV похідна  $2 \times 30$  мг PTX еквівалент/кг, PHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV кон'югат  $2 \times 60$  мг PTX еквівалент/кг.

А. Протиракова активність PHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV кон'югату (фігура 3)

Вільний DTX індукує повну регресію EL-4 пухлин у 4 мишей із 7 тестованих мишей.

LEV-DTX похідна має менший вплив та індикуює повну регресію EL-4 пухлини у 1 із 8 тестованих мишей. RHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV кон'югат в дозі, еквівалентній вільному DTX ( $2 \times 20$  мг DTX еквівалент/кг), також вилікував 1 мишу із групи 8 мишей. Проте, подвійна доза кон'югату ( $2 \times 40$  мг DTX еквівалент/кг) приводить до вилікування 7 мишей із групи ( $n=8$ ). Ні в однієї з тестованих тварин не спостерігалось втрати маси тіла (що є індикатором токсичності лікарського засобу). Миші, у яких спостерігалася повна регресія пухлини, залишалися без будь-яким симптомів росту пухлини або токсичності до дня 94, коли їм трансплантували EL-4 клітини знову в аналогічній (тобто летальній) дозі та мишей залишали без лікування. Цю вторинну трансплантацію здійснювали за підтвердження імунологічно опосередкованої резистентності до пухлини. Статистично достовірна пропорція мишей, лікованих за допомогою RHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV кон'югату ( $2 \times 40$  мг DTX екв./кг), були резистентними до EL-4 пухлин (5 резистентних мишей із 7, тобто 71 %). Миші, ліковані за допомогою вільного DTX, також проявляли подібну пропорцію резистентних особин (3 мишей із 4 лікованих були резистентними).

Висновок: RHPMA-AH-NH-N=DTX-LEV кон'югат має суттєвий протираковий вплив у C57BL/6 мишей із EL-4 лімфою, його введення не супроводжується токсичними побічними ефектами та дає можливість встановити резистентність до пухлини у 71 % лікованих індивідумів.

В. Протиракова активність RHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV кон'югату (фігура 4)

Неможливо вводити вільний PTX мишам внаслідок його дуже обмеженої розчинності (миші помирали відразу після ін'єкції). PTX-LEV похідна не має будь-якої протиракової активності для EL-4 лімфоми (він не подовжує середньої тривалості виживання, жодну з мишей не було виліковано;  $n=8$ ). RHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV кон'югат в дозах  $2 \times 60$  мг PTX еквівалент/кг не вилікував жодної миші чи не подовжив середньої тривалості виживання ( $n=8$ ). Не спостерігали втрати маси в будь-якій групі як індикатор токсичності лікарського засобу.

Висновок: PTX-LEV похідна ( $2 \times 30$  мг PTX екв./кг) або кон'югат, що містить PTX похідна ( $2 \times 60$  мг PTX екв./кг), не проявляв жодного терапевтичного ефекту при лікуванні сингенної EL-4 лімфоми у мишей.

Приклад 7: Ілюстрація in vivo біологічної активності лінійного полімерного кон'югату паклітакселю у мишей, інюкульованих 4T1 карциною молочної залози (фігура 5)

Використовували мишину сингенну 4T1 карциному молочної залози. Мишам BALB/c штаму (самки) підшкірно імплантували  $1 \times 10^6$  4T1 клітин карциноми в день 0. Лікарські засоби вводили внутрішньовенно (в/в) в дводозовому введенні в день 8 та день 12 після трансплантації пухлинних клітин. Першу дозу вводили в той час, коли пухлини були добре розвинутими, пальпованими, із розмірами приблизно 300 мм<sup>3</sup>. В експерименті аналізували розмір пухлини, масу тіла миші, загальний стан здоров'я та коефіцієнт виживання. Вплив кон'югату завжди порівнювали із впливом вільного лікарського засобу (PTX) та його похідної (PTX-LEV). Середня тривалість виживання необробленої контрольної миші становила 34,9 дні (SD 2,59; середнє значення тривалості виживання 35 днів).

PTX, PTX-LEV та RHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV кон'югат готували для в/в введення аналогічно до описаного вище (див. Приклад 6 А, В). Застосовували наступні дози: PTX та PTX-LEV в дозі  $2 \times 30$  мг PTX еквівалент/кг, RHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV кон'югат в дозах  $2 \times 60$  мг PTX еквівалент/кг.

RHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV кон'югат повністю вилікував 3 із 8 тестованих мишей. Після введення PTX-LEV похідної, регресія 4T1 пухлини спостерігалася у 1 із 8 мишей. Введення вільного лікарського засобу (PTX) супроводжувалося значними побічними діями: в/в введення другої дози індукувало тяжку реакцію (спазми, пізній поганий загальний стан – "наїжачена" шерсть, в'ялість, що тривала принаймні 24 години) в першій із мишей. Для інших мишей в групі другу дозу зменшували на 10 % та вводили внутрішньоочеревинно замість в/в. Лише одна миша була вилікувана, яка отримувала дозу шляхом в/в ін'єкції, у інших мишей не спостерігалось терапевтичного ефекту PTX. В тестованій групі не спостерігали втрати маси, що є індикатором токсичності лікарського засобу.

Для перевірки резистентності лікованих мишей до 4T1 пухлини, лікованим мишам трансплантували через 129 дні знову спочатку трансплантовані пухлинні клітини. Для другого разу, ін'єкували  $1 \times 10^5$  4T1 клітин підшкірно та мишей залишали без лікування. У всіх цих мишей (3 вилікованих за допомогою RHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV кон'югату, 1 вилікувана за допомогою PTX-LEV) пухлини не росли, що свідчить про те, що ці миші були резистентними до даної пухлини.

Висновок: RHPMA-AH-NH-N=PTX-LEV кон'югат має суттєвий протираковий вплив у BALB/c мишей із 4T1 карциною молочної залози, його введення не супроводжується будь-яким

токсичним ефектом та дає можливість встановити резистентність до пухлини у 38 % лікованих індивідумів.

Приклад 8: Ілюстрація *in vivo* біологічної активності лінійних полімерних кон'югатів доцетакселю із різним вмістом лікарського засобу у мишей, інокульованих EL4 Т клітинною лімфою (фігура 6)

Використовували пухлинну модель EL-4 лімфоми, описану вище (Приклад 6). РНРМА-АН-NH-N=DTX-LEV кон'югати із вмістом лікарського засобу 8,2 мас. % DTX (9,1 мас. % DTX-LEV) та 16,3 мас. % DTX (18,0 мас. % DTX-LEV) розчиняли в PBS (0,2 мл) для введення та застосовували субоптимальну дозу  $2 \times 30$  мг DTX еквівалент/кг внутрішньовенно в дні 9 та 13 після трансплантації пухлинних клітин.

Кон'югат із нижчим вмістом лікарського засобу (8,2 % DTX) вилікував 1 із 8 тестованих мишей та в інших він подовжив період виживання на статистично достовірну величину (неліковані контролю: середня тривалість виживання 27,25 дня, SD 1,64, медіана 28 днів; ліковані миші: середнє значення 41,75 дня, SD 6,54, медіана 45 днів;  $p < 0,01$ ). Кон'югат із більш високим вмістом лікарського засобу (16,3 % DTX) також вилікував 1 із 8 тестованих мишей, але виживання інших мишей в групі суттєво не збільшувалося.

Висновок: Вміст похідної лікарського засобу в РНРМА-АН-NH-N=DTX-LEV кон'югаті має суттєвий вплив на протираковий ефект у C57BL/6 мишей із EL-4 лімфою при введенні в субоптимальній дозі  $2 \times 30$  мг DTX еквівалент/кг. Полімерний кон'югат із більш низькою дозою забезпечує кращу протиракову активність.

Посилання.

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

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

T. Etrych, M. Jelínková, B. Říhová, K. Ulbrich K., New HPMa copolymers containing doxorubicin bound via pH sensitive linkage. Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological properties. *J. Controlled Release* 73, 89-102 (2001).

T. Etrych, P. Chytil, M. Jelínková, B. Říhová, K. Ulbrich, Synthesis of HPMa Copolymers Containing Doxorubicin Bound via a Hydrazone Linkage. Effect of Spacer on Drug Release and *in vitro* Cytotoxicity. *Macromolecular Biosci.* 2, 43-52 (2002).

T. Etrych, P. Chytil, M. Pechar, M. Studenovský, B. Říhová, K. Ulbrich, Způsob přípravy polymerních konjugátů doxorubicinu s pH-řízeným uvolňováním léčiva, CZ 297 827 B6.

T. Etrych, P. Chytil, K. Ulbrich, T. Mrkvan, B. Říhová, Polymerní léčivo a způsob jeho výroby. CZ 298945 B6.

T. Etrych, K. Ulbrich: Polymerní konjugáty doxorubicinu s pH-řízeným uvolňováním léčiva a způsob jejich přípravy. CZ PV-2006-505, CZ pat. 299053 B6

T. Etrych, P. Chytil, T. Mrkvan, M. Šírová, B. Říhová, K. Ulbrich, Conjugates of doxorubicin with graft HPMa copolymers for passive tumor targeting: *Journal of Controlled Release* 132, 184-192 (2008)

R.B. Greenwald, PEG drugs: an overview, *Journal of Controlled Release* 74, 159-171 (2001).

R.B. Greenwald, Y. H. Choe, J. McGuire, C.D. Conover, Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates, *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, p. 217-250 (2003).

R.B. Greenwald, A. Pendri, D. Bolikal, Highly Water-Soluble Taxol Derivatives-7-Polyethylene Glycol Carbamates and Carbonates, *Journal of Organic Chemistry* 60, 331-336 (1995).

P. Chytil, T. Etrych, M. Hrubý, K. Ulbrich, B. Říhová: Micelární nosiče léčiv s protinádorovou aktivitou. CZ PV 2006-207.

P. Chytil, T. Etrych, Č. Koňák, M. Šírová, T. Mrkvan, J. Bouček, B. Říhová, K. Ulbrich, New HPMA copolymer-based drug carriers with covalently bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting, *Journal of Controlled Release* 127, 121-130 (2008).

5

J. Kopeček, P. Kopečková, T. Minko, Z. Lu, HPMA Copolymer-Anticancer Drug Conjugates: Design, Activity and Mechanism of Action. *Europ. J. Pharm. Biopharm.* 50, 61-81 (2000).

J. Kopeček, P. Kopečková, T. Minko, Z. Lu, C.M. Peterson, Water soluble polymers in tumor targeted delivery, *J. Controlled Release* 74, 165–173 (2001).

10

F. Kratz, U. Beyer, M.T. Schutte, Drug-polymer conjugates containing acid-cleavable bonds, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 16, 245-288 (1999).

15

F. Kratz, I.A. Muller, C. Ryppa, A. Warnecke, Prodrug strategies in anticancer chemotherapy, *Chemmedchem* 3, 20-53 (2003).

S. Ng, A. Sparreboom, Y. Shaked, C. Lee, S. Man, N. Desai, P. Soon-Shiong, W. D. Figg, R. Korbel, Influence of Formulation Vehicle on Metronomic Taxane Chemotherapy: Albumin-Bound versus Cremophor EL-Based Paclitaxel, *Clin Cancer Res* 26; 4331-4338, 2006

20

Y. Noguchi, J. Wu, R. Duncan, J. Strohalm, K. Ulbrich, T. Akaike, H. Maeda, Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues, *Jpn. J. Cancer Res.* 89, 307-314 (1998).

25

A. Pendri, C.D. Conover, R.B. Greenwald, Antitumor activity of paclitaxel-2'-glycinate conjugated to poly(ethylene glycol): a water-soluble prodrug, *Anti-Cancer Drug Design* 13, 387-395 (1998).

B. Říhová, M. Jelínková, J. Strohalm, V. Šubr, D. Plocová, O. Hovorka, M. Novák, D. Plundrová, Y. Germano, K. Ulbrich, Polymeric Drugs Based on Conjugates of Synthetic and Natural Macromolecules II. Anti-cancer Activity of antibody or (Fab')<sub>2</sub>-targeted Conjugates and Combined Therapy with Immunomodulators. *J. Controlled Rel.* 64, 241-261 (2000)

30

B. Říhová, T. Etrych, M. Pechar, M. Jelínková, M. Šťastný, O. Hovorka, M. Kovář, K. Ulbrich, Doxorubicin bound to a HPMA copolymer carrier through hydrazone bond is effective also in a cancer cell line with a limited content of lysosomes, *J. Controlled Release* 74, 225-232 (2001)

35

R. Satchi-Fainaro, R. Duncan, C. Barnes, Polymer therapeutics for cancer: Current status and future challenges, in R Satchi-Fainaro and R Duncan (eds), *Advances in Polymer Science, Polymer Therapeutics II*: Berlin / Heidelberg, Springer, p. 1-65 (2006).

40

L.W. Seymour, Y. Miyamoto, H. Maeda, M. Brereton, J. Strohalm, K. Ulbrich, R. Duncan, Influence of Molecular-Weight on Passive Tumor Accumulation of A Soluble Macromolecular Drug Carrier, *Eur.J.Cancer* 31A, 766-770 (1995).

45

J.M.M. Terwogt, W.T. Huinink, J.H.M. Schellens, M. Schot, I.A.M. Mandjes, M. Zurlo, M. Rocchetti, H. Rosing, F.J. Koopman, J.H. Beijnen, Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel, *Anti-Cancer Drugs* 12, 315-323 (2001).

50

J.M.M. Terwogt, H. Rosing, M. Rocchetti, E. Frigerio, D. Fraier, F.J. Koopman, J.H.M. Schellens, W.T. Huinink, J.H. Beijnen, High-performance liquid chromatographic methods for the determination of a novel polymer-bound paclitaxel derivative and free paclitaxel in human plasma, *J.Liq.Chromatogr.Relat.Technol.* 23, 1233-1251 (2000).

55

K. Ulbrich, V. Šubr, J. Strohalm, D. Plocová, M. Jelínková, B. Říhová, Polymeric Drugs Based on Conjugates of Synthetic and Natural Macromolecules I. Synthesis and Physico-chemical Characterisation. *J. Controlled Rel.* 64, 63-79 (2000)

K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelínková, B. Říhová, Antibody-Targeted Polymer-Doxorubicin Conjugates with pH-Controlled Activation, J. Drug Targeting 12, 477-489 (2004) (A).

5 K. Ulbrich, V. Šubr, Polymeric Anticancer Drugs with pH-Controlled Activation, Adv. Drug Delivery Rev. 56/7, 1025-1052 (2004) (B).

K. Ulbrich, T. Etrych, B. Říhová, M. Jelínková, M. Kovář: pH Senzitivní polymerní konjugáty antracyklinového kancerostatika pro cílenou terapii. CZ 293787 B6

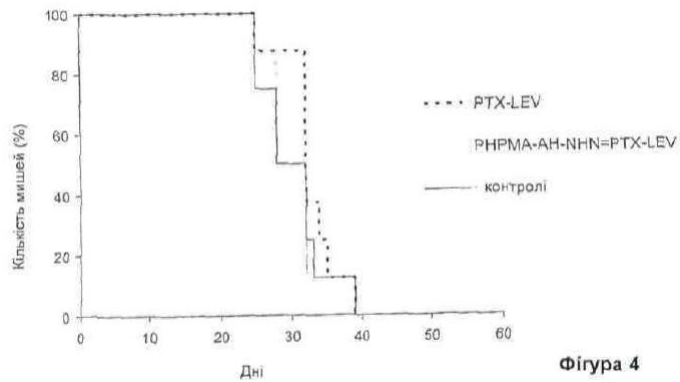
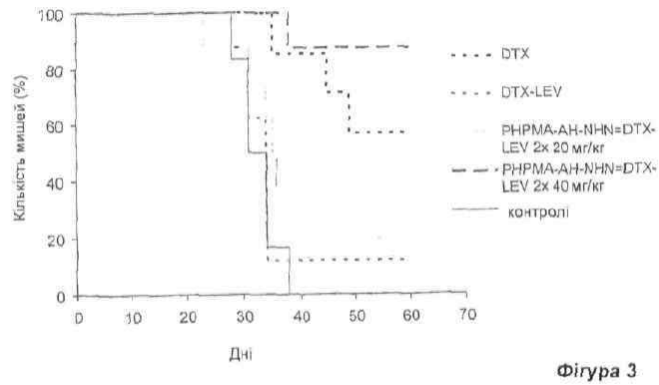
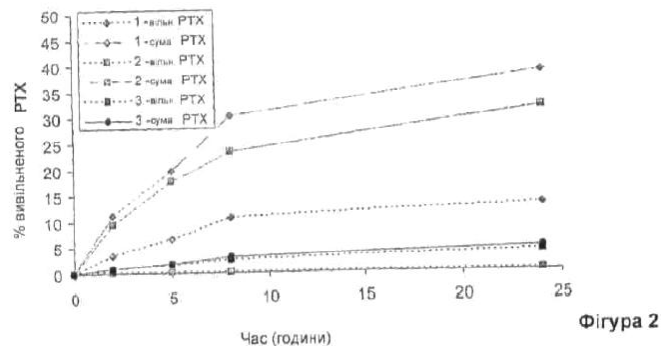
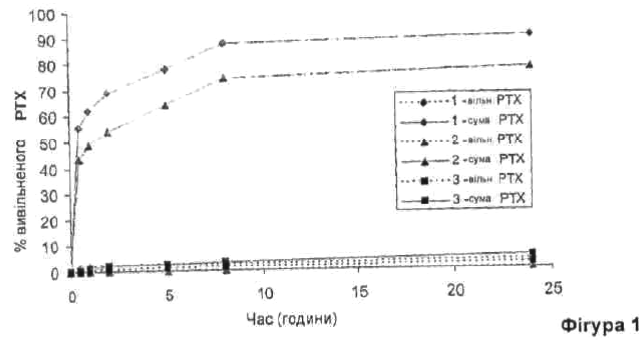
10 U. Vanhoefer, et al., Comparative antitumor efficacy of docetaxel and paclitaxel in nude mice bearing human tumor xenografts that overexpress the multidrug resistance protein (MRP), Annals of Oncology 8, 1221-1228 (1997).

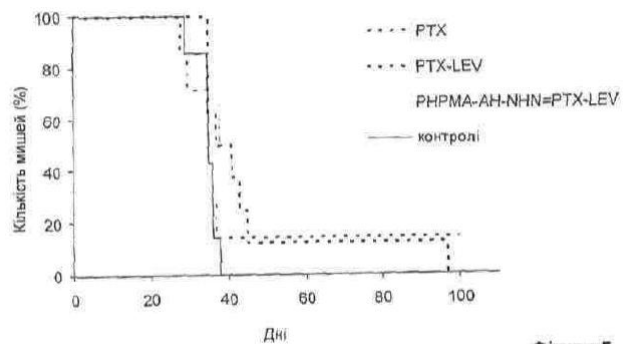
15 J.W. Winter, Paclitaxel poliglumex (XYOTAX, CT-2103): A macromolecular taxane, Journal of Controlled Release 109, 120- 126 (2005).

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

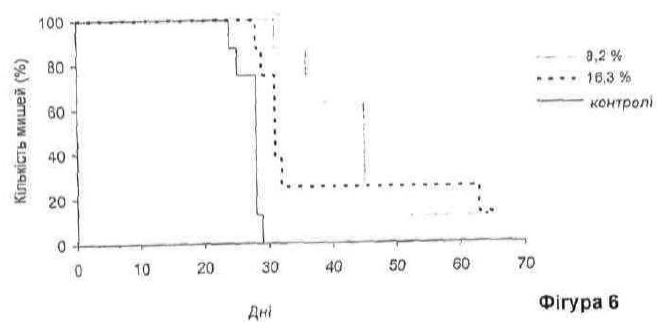
- 20 1. Полімерний кон'югат, який складається із похідної цитостатичного агента, вибраного із групи таксанів, переважно паклітакселю (PTX), доцетакселю (DTX) або ларотакселю (LTX), та полімерного носія, приготовленого на основі лінійного або біорозкладного прищепленого співполімеру, який складається з одиниць основного співполімеру N-(2-гідроксипропіл)метакроїламід (HPMA) та одиниць, які включають метакроїловані гідразони амінокислот або олігопептиди, де згадане похідне цитостатичного агента одержане шляхом ацилювання вторинних гідроксильних груп цитостатичного агента з оксикислотою, яку вибирають з групи, що включає левулінову кислоту і 4-(2-оксопропіл)бензойну кислоту, та зв'язують з носієм за допомогою гідролітично нестабільного гідразонового зв'язку, і де згадані амінокислоти або олігопептиди вибирають з групи, що включає гліцил, гліцилгліцил, β-аланіл, 6-аміногексаноїл (АН), 4-амінобензоїл та змішані ацили, що походять з олігопептидів GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly та GlyPheLeuGly.
- 25 2. Полімерний кон'югат за п. 1, який **відрізняється** тим, що він містить від 70 до 98 моль % основного співполімеру HPMA, від 1,5 до 29,5 моль % одиниць з гідразидними функціональними групами та від 0,5 до 10 моль % одиниць із гідразонзв'язаною похідною цитостатичного агента.
- 35 3. Полімерний кон'югат за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що молярна маса становить від 10 до 50000 г/моль у випадку лінійного полімеру та від 50 до 250000 г/моль у випадку прищепленого співполімеру.
- 40 4. Спосіб приготування полімерного кон'югату за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що застосовують полімер, отриманий шляхом радикальної співполімеризації HPMA із співмономерами, що містять цитостатичний агент, за допомогою оксикислоти в пропорції, що відповідає бажаній композиції.
5. Спосіб приготування полімерного кон'югату за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що полімерний носій піддають полімер-аналогічній трансформації носія шляхом реакції із складним етером оксикислоти та цитостатичним агентом.
- 45 6. Застосування полімерного кон'югату за будь-яким з пп. 1-3 для приготування лікарського засобу для лікування пухлинних захворювань, таких як пухлини яєчників, пухлини молочної залози, легень та передміхурової залози, особливо для лікування лімфом та 4T1 карциноми молочної залози.

- 1 - PHPMA-AN-NH-N=PTX-LEV
- 2 - PHPMA-AN-NH-N=PTX-OPB
- 3 - PHPMA-AN-NH-N=PTX-AAK





Фігура 5



Фігура 6

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601