



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94594 (13) C2
(51) МПК
A61K 47/48 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОЛІМЕРНИХ КОН'ЮГАТІВ ДОКСОРУБІЦИНУ З рН-КОНТРОЛЬОВАНИМ ВИВІЛЬНЕННЯМ ЛІКАРСЬКОЇ РЕЧОВИНИ

1

2

(21) а200804282

(22) 05.09.2006

(24) 25.05.2011

(86) PCT/CZ2006/000056, 05.09.2006

(31) PV 2005-558

(32) 05.09.2005

(33) CZ

(46) 25.05.2011, Бюл.№ 10, 2011 р.

(72) ЕТРИХ ТОМАС, CZ, ХИТИЛ ПЕТЕР, CZ, СТУДЕНОВСКИ МАРТИН, CZ, ПЕХАР МИХАЛ, CZ, УЛЬБРИХ КАРЕЛ, CZ, РІГОВА БЛАНКА, CZ

(73) ЗЕНТИВА, А.С., CZ

(56) WO 2005/007798 A; 27.01.2005

WO 03/053473 A; 03.07.2003

WO 2004/045647 A; 03.06.2004

WO 2005/123676 A; 29.12.2005

WO 2005/117932 A; 15.12.2005

WO 2006/003014 A; 12.01.2006

(57) 1. Спосіб одержання полімерних кон'югатів N-(2-гідроксипропіл)метакриламідів і метакрилоїламіноацилгідразону з доксорубіцином з рН-контрольованим вивільненням лікарської речовини, який **відрізняється тим**, що здійснюють наступні три стадії синтезу:

а) одержання мономерного метакрилоїламіноацилгідразину, де аміноацил - похідна амінокислоти або олігопептиду, реакцією метакрилоїлгаліду з відповідним пептидом, амінокислотою або їх похідними і подальшим гідразинолізом,

б) синтез полімерного прекурсор безпосередньою співполімеризацією N-(2-

гідроксипропіл)метакриламідів з метакрилоїламіноацилгідразиним, і

с) зв'язування доксорубіцину з полімерним прекурсором реакцією їх з гідрохлоридом доксорубіцину.

2. Спосіб за пунктом 1, який **відрізняється** тим, що ацилювання на стадії (Ia) здійснюють реакцією гідрохлориду метилового естеру відповідної амінокислоти або олігопептиду з метакрилоїлхлоридом в хлорованому вуглеводні у присутності безводного карбонату натрію.

3. Спосіб за пунктом 1 або 2, який **відрізняється** тим, що гідразиноліз здійснюють реакцією метилового естеру метакрилоїлової амінокислоти або олігопептиду з гідразингідратом у присутності сильної основи.

4. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що на стадії (Ib) радикальну співполімеризацію N-(2-

гідроксипропіл)метакриламідів з метакрилоїламіноацилгідразиним здійснюють з ініціюванням здатними до терморозкладання ініціаторами на основі азо- або пероксиініціаторів, переважно азо-біс(ізобутиронітрилом), або азо-біс(ізоціановалеріановою кислотою) або діізопропілперкарбонатом.

5. Спосіб за пунктом 4, який **відрізняється** тим, що полімеризацію здійснюють в розчиннику, вибраному з нижчих C₁-C₅ спиртів або апротонного полярного розчинника.

6. Спосіб за пунктом 5, який **відрізняється** тим, що розчинник вибирають з метанолу, етанолу, диметилформамідів або диметилсульфоксиду.

7. Спосіб за пунктом 6, який **відрізняється** тим, що, коли ініціатор вибраний із азо-біс(ізобутиронітрилу) або азо-біс(ізоціановалеріанової кислоти), полімеризацію здійснюють при 45-70 °C, а коли як ініціатор використовують діізопропілперкарбонат, полімеризацію здійснюють при 30-60 °C.

8. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що реакцію полімерного прекурсор на стадії (Ic) здійснюють у розчиннику, вибраному з безводних C₁-C₅ спиртів або полярних апротонних розчинників, з каталізом оцтовою кислотою, і одержаний кон'югат осаджують етилацетатом.

9. Спосіб за пунктом 8, який **відрізняється** тим, що розчинник вибирають із метанолу, сухого етанолу, диметилформамідів або диметилсульфоксиду.

10. Спосіб за пунктом 9, який **відрізняється** тим, що вихідну концентрацію полімеру вибирають в діапазоні 100-190 мг/мл і концентрацію оцтової кислоти - в діапазоні 30-80 мг/мл.

11. Спосіб за пунктом 10, який **відрізняється** тим, що концентрація полімеру складає 170 мг/мл і оцтової кислоти - 55 мг/мл при 25 °C.

12. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що одержаний продукт очищують гель-фільтрацією.

(13) C2

(11) 94594

(19) UA

Винахід відноситься до способу одержання водорозчинних полімерних протиракових лікарських засобів, здатних до цільової доставки і контрольованого вивільнення цитостатиків в організмі, переважно в тканині і клітинах пухлини. Використання полімерних кон'югатів зосереджено на цілеспрямованій терапії пухлинних захворювань у людей.

Розвиток нових фармакологічно-активних субстанцій, особливо протиракових лікарських засобів, все більш і більш був зосереджений на таких формах, які забезпечують можливість специфічної дії активної субстанції тільки в специфічній тканині, або навіть тільки в специфічному типі клітин. Природні або синтетичні макромолекули - полімери - все більш і більш використовувалися для одержання таких субстанцій. Було одержано і досліджено багато протиракових полімерних кон'югатів і показано, що в більшості випадків необхідно, щоб цитотоксична субстанція вивільнялась з її полімерної форми, якщо полімерна форма лікарського засобу повинна бути фармакологічно-ефективною. Крім того, показано, що прийнятна молекулярна вага полімерного носія може гарантувати переважне розташування полімерної лікарської речовини в тканині багатьох солідних пухлин (так званий EPR ефект) [Maeda та інші. 2000]. Вивільнення цитостатичного агента із його полімерного носія може бути забезпечене з використанням здатного до біодеструкції зв'язку, що використовується для зв'язування лікарської речовини з полімером, деструкція якого в цільовій тканині приводить до цільового і контрольованого активування лікарської речовини переважно в згадуваній тканині. Полімерні лікарські засоби на основі співполімерів N-(2-гідроксипропіл)метакриламід (HPMA) - важлива група таких медикаментів. Дуже хороший короткий огляд результатів дослідження в цій галузі аж до представлених може бути знайдений монографії G. S. Kwon і в публікації J. Коресек та інші. [Коресек та інші. 2000, Kwon 2005]. Недавно були опубліковані дослідження активності полімерних лікарських засобів, в яких протиракова лікарська речовина - доксорубіцин, зв'язана з полімерним носієм на основі HMPA співполімерів за допомогою гідролітично нестабільного гідразонового зв'язку [Etrych та інші. 2001 і 2002, Rihova та інші. 2001, Ulbrich та інші. 2003, 2004], і ці субстанції були запатентовані [Ulbrich та інші.]. Ці лікарські засоби показали істотне зменшення побічних, особливо токсичних, ефектів на здоровий організм, водночас збільшуючи протираковий ефект, порівняно із зазвичай використовуваними цитостатиками [Rihova та інші. 2001, Kovar та інші. 2004, Novorka та інші. 2002]. Синтез таких кон'югатів вперше здійснювався полімер-аналогічною реакцією полімерних естерів 4-нітрофенілу (ONp) з гідразоном, і пізніше співполімеризацією HMPA з N-Вос (трет-бутилоксикарбонілом), захищеним метакрилоїлованими гідрازیдами. Жоден із способів не приводив до утворення цілком визначених препа-

ратів (у разі естерів ONp, мають місце реакції передачі ланцюга і гідролізу частини груп ONp в процесі гідразінолізу; у разі Вос-гідразидів відбуваються реакції деструкції зустрічаються протягом депротектування гідразидних груп), і жоден з способів не здатний підібрати широкий інтервал молекулярної ваги полімерного ланцюга; синтез не зробив можливим одержання великих партій, і відтворюваність одержання індивідуальних партій була відносно низькою. Крім того, синтези включали декілька стадій, які збільшили їх час і фінансові витрати.

Даний винахід забезпечує оптимізований і відтворюваний спосіб одержання полімерних цитостатиків на основі HMPA співполімерів, що містять доксорубіцин, зв'язаний рН-лабільним гідразоном зв'язком з полімерним носієм, який виключає практично всі вищезазначені недоліки згаданих раніше способів одержання; зокрема, робить можливим збільшення виходу протягом синтезу як мономерів, так і полімерних прекурсорів, точне контролювання молекулярної ваги полімерних прекурсорів і кінцевого продукту; структура, завдяки переважним параметрам співполімеризації, є цілком визначеною, синтез є значно легшим і дешевшим, можливим збільшення його до великих партій, і відтворюваність синтезу є дуже хорошою. Протипухлинна активність полімерних цитостатиків, одержаних згідно з винаходом, така ж, або навіть краща, ніж, цитостатиків, одержаних попередніми способами.

Предмет винаходу полягає в способі одержання полімерного кон'югату HMPA співполімеру, що містить зв'язаний з полімером доксорубіцин за допомогою різних зв'язків, що містять гідролітично розщеплювані гідразононі зв'язки. Спосіб одержання базується на трьох-етапному синтезі, що включає синтез мономерів, синтез полімерних прекурсорів і кінцеве зв'язування доксорубіцину з полімерним носієм ковалентним гідразоном зв'язком.

Синтез мономерів починається з синтезу мономера HPMA згідно описаному раніше способу [Ulbrich 2000]. Синтез метакрилоїл-(аміноацил)гідразинів, що відрізняються структурою ацильного компонента, був дуже схожим для всіх одержаних мономерів і починається з метакрилоїлування гідрохлориду метилового естеру відповідної амінокислоти або олігопептиду з метакрилоїлхлоридом, здійснюваного в дихлорметані у присутності безводного карбонату натрію. Одержаний продукт перетворювали у метакрилоїлований аміноацилгідразин гідразінолізом відповідного метилового естеру з гідратом гідразину, здійснюваним у метанольному розчині у присутності NaOH. Гліцил, гліцилгліцил, β-аланіл, 6-аміногексаноїл, 4-амінобензоїл або складний ацил, утворений з олігопептидів GlyPheGly, GlyLeuGly, або GlyPheLeuGly, переважно використовувався як аміноацил в метакрилоїл(аміноацил)гідразинах. Як приклади синтезу метакрило-

їл(аміноацил)гідразину, Приклад 1 ілюструє синтез 6-метакроїл(аміногексаноїл)гідразину як приклад синтезу простого ацилу (спейсеру), метакроїлгліцилгіцилгідразину як мономера з дипептидним спейсером, і метакроїлгліцилфенілаланіллейцилгіцилгідразину як мономера з ензиматично деструктуючим олігопептидом.

Синтез полімерних прекурсорів - НРМА співполімерів з метакрилоїлованими аміноацилгідразинами - заснований на безпосередній радикальній співполімеризації НРМА з відповідними метакрилоїлованими гідразинами. Полімеризація здійснюється в розчині, використовуючи метанол, етанол, диметилсульфоксид або диметилформамід як середовище полімеризації. В обох випадках полімеризацію ініціюють здатними до терморозкладання ініціаторами радикальної полімеризації на основі азо- або перокси- ініціаторів. Переважно, використовувалися азобіс(ізобутиронітрил) (AIBN), азобіс(ізоціановалеріанова кислота) (ABIC), або діізопропілперкарбонатом (DIP). Температура полімеризації залежить від використовуваного ініціатора і розчинника (для AIBN, ABIC в метанолі, етанолі, DMF, і DMSO, температура складає 50 - 60 °C; для DIP - 40 - 50 °C). Полімеризація зазвичай триває 15-18 годин. Одержання всіх полімерних прекурсорів радикальною полімеризацією - аналогічне; приклади співполімеризації НРМА з метакрилованими гідразинами надаються в Прикладах 2а - 2с. Порівняно з раніше використовуваним гідразінолізом реактивних естерів або співполімеризацією Вос-захисених гідразидів, пряма співполімеризація приводить до чистих і відтворено-одержуваних полімерів, які можуть бути одержані у великих партіях і з високим виходом.

Зв'язування доксорубіцину з полімерним прекурсором - результат реакції зв'язування гідрохлориду доксорубіцину з полімерним ацилгідрaziном, що приводить до гідразонового зв'язку. Реакція переважно здійснюється в метанолі, каталізується певною кількістю оцтової кислоти. Реакція може також здійснюватися в диметилсульфоксиді, диметилформаміді, сухому етанолі і диметилацетаміді. Використовуючи розчинники інші, ніж метанол, реакція відбувається добре, але вихід нижчий. Вплив структури зв'язку на хід реакції зв'язування мінімальний. Щоб досягти оптимального виходу реакції зв'язування і мінімальної кількості незв'язаного доксорубіцину в продукті, важливо, у всіх випадках, підтримувати наступні концентрації полімеру і оцтової кислоти в реакційній суміші: концентрація полімеру 170 мг/мл, концентрація оцтової кислоти 55 мг/мл. Оптимальний час реакції складає 22 години при 25 °C. Полімерний лікарський засіб відокремлюється від реакційної суміші осаджуванням в етилацетаті і повторним осаджуванням з метанолу і знову в етилацетаті. Одержання полімерного доксорубіцину, зв'язаного з полімерним прекурсором - співполімером Полі(НРМА-Со-МА-АН-NHNH₂) - гідразоном зв'язком (НРМА-АН-NH-N=DOX) надається в Прикладі 3.

Одержання також включає, хоча це не є необхідним, кінцеве очищення кон'югату від незв'язаного вільної лікарської речовини фільтрацією на гелі,

використовуючи Sephadex колонку LH-20 з метанолом як мобільною фазою.

Фіг. 1 представляє графік, що показує вивільнення DOX з полімерних кон'югатів, що відрізняються структурою зв'язку між лікарською речовиною і полімером.

Температура: 37 °C, фосфатний буфер, pH 5,5, GFLG - зв'язок, утворений послідовністю - GlyPheLeuGly-, GLG є -GlyLeuGly-, амінобензойний - 4-амінобензоїл, і Асар є 6-аміногексаноїл.

Приклади

Приклад 1: Синтез мономерів

НРМА одержували відповідно до попереднього описаного способу [Ulbrich та інші. 2000]. Елементний аналіз: Обчислено: С 58,8 %, Н 9,16 %, N 9,79 %. Одержано: С 58,98 %, Н 9,18 %, N 9,82 %. Продукт був хроматографічно чистий.

6-(Метакроїламіно)гексаноїлгідразин (МА-АН-NHNH₂)

Метил (6-аміногексаноат)гідрохлорид (30 г, 0,165 моль) при інтенсивному перемішуванні при кімнатній температурі розчиняли в 350 мл дихлорметану з додаванням приблизно 100 мг гідроксиду. Розчин охолоджували до 10-15 °C, додавали безводний карбонат натрію (50 г, 0,48 моль), температуру знижували до 5 - 10 °C, і потім додавали краплями розчин метакроїлхлориду (17,3 г, 0,165 моль (екв.)) в 100 мл дихлорметану з такою швидкістю, щоб температура реакційної суміші не перевищувала 15 °C. Після того як увесь метакроїлхлорид вступав в реакцію, суміш перемішували при 15 - 20 °C протягом додаткових 45 хвилин, потім охолоджуючу ванну вилучали, суспензію перемішували ще 20 хвилин, відсмоктували на фільтрі із пористого скла № 3, промивали 300 мл дихлорметану і фільтрат випарювали до сухого залишку в ротаційному вакуумному випарнику. Залишок випарювання розчиняли в 150 мл метанолу, потім додавали гідразингідрат (13 мл, 13,4 г, 0,267 моль) і NaOH (1,5 г, 37,5 ммоль), і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 3 годин. Після того, як гідразіноліз був завершений, pH розчину коригували до 6,2 -6,5 додаванням 35% HCl (приблизно 12 мл), додавали 300 г безводного сульфату натрію і суміш, включаючи десикант, випарювали до сухого залишку. Додавали до залишку випарювання 500 мл дихлорметану, суспензію інтенсивно перемішували протягом 2 годин, відсмоктували на фільтрі із пористого скла № 4, повністю промивали додатковими 500 мл дихлорметану, і фільтрат концентрували до 150 - 200 мл у випарнику. Розчин розбавляли 1500 мл етилацетату, концентрували для кристалізації до об'єму 300 - 350 мл у випарнику, і кристалізували в крижаному боксі протягом 24 годин. Продукт відсмоктували, промивали невеликою кількістю холодного етилацетату, висушували у вакуумі. Вихід після першої кристалізації склав 29,5 г продукту (84%) з температурою плавлення 79-81 °C; повторна кристалізація, використовуючи той же спосіб, надала 27,0 г продукту (77 %) з температурою плавлення 80-82 °C.

Елементний аналіз: Обчислено: С 56,32 %, Н 8,98 %, N 19,70 %. Одержано: С 56,49 %, Н 8,63 %, N 19,83%.

$^1\text{H-NMR}$ 300 МГц (CDCl_3 , 297 К): 1,35 м (2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{-N}$); 1,50-1,69 м (4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-N}$); 1,95 дд (3H, CH_3); 2,17 т (2H, $(\text{C}=\text{O})\text{-CH}_2$); 3,26 дт (2H, N-CH_2); 3,91 с (2H, NH_2); 5,30 т (1H, $\text{C}=\text{CH}_2$ E); 5,67 т (1H, $\text{C}=\text{CH}_2$ Z); 6,10 с (1H, NHNH_2); 7,45 с (1H, NH-CH_2). Продукт був хроматографічно чистий, 1 пік на 4,72 хв (зворотно-фазова колонка Tessek SGX C_{18} (7 мкм, 125×4 мм), швидкість потоку 0,5 мл/хв, градієнт з 40 до 100 % розчину В за 35 хв (розчин А: 10 % метанол, 89,9 % вода, 0,1 % трифтороцтова кислота (TFA); розчин В: 89,9 % метанол; 10 % вода; 0,1 % TFA), ультрафіолетове виявлення).

Метакроїлгліцилгліцилгідразин (MA-GlyGly-NHNH₂)

Одержання MA-GlyGly-NHNH₂ здійснювали в подібних умовах, як для MA-AN-NHNH₂. Метилловий естер гліцилгліцину (21,4 г, 0,1 моль) був розчинений в 250 мл дихлорметану з додаванням 60 мг гідроксину. Після охолодження до приблизно 12 °С додавали безводний карбонат натрію (30,2 г, 0,29 моль), і при охолодженні до 5-10 °С додавали повільно краплями розчин метакроїлхлориду (10,4 г, 0,1 моль) в 60 мл дихлорметану. Після завершення реакції, фільтрування і промивання осаду з приблизно 230 мл дихлорметану, розчинник повністю випарювали. Залишок випарювання розчиняли в 120 мл метанолу і піддавали гідразинолізу гідразингідратом (7,9 мл, 8,1 г, 0,166 моль) в присутності NaOH (0,91 г, 22,7 ммоль). Після завершення гідразинолізу, рН розчину коригували до 6,2 - 6,5 додаванням 35% HCl (приблизно 12 мл), додавали 230 г безводного сульфату натрію, і суміш, включаючи десикант, випарювали до сухого залишку. Після екстрагування з 300 мл дихлорметану, суспензію відсмоктували на фільтрі із пористого скла, промивали додатково 300 мл дихлорметану, і фільтрат концентрували до приблизно 120 мл. Розчин розбавляли 900 мл етилацетату і після концентрування до 250 мл у випарнику, кристалізували в морозильному боксі. Після перекристалізації продукт відокремлювали фільтрацією, промивали невеликою кількістю холодного етилацетату і сушили у вакуумі. Вихід продукту становив 15,0 г (70 %), температура плавлення 172-174 °С. Елементний аналіз: Обчислено: С 44,86 %, Н 6,54 %, N 26,16 %. Одержано: С 45,01 %, Н 6,57 %, N 26,02 %. Продукт був хроматографічно чистий, один пік на 21,97 хв.

Метакроїлгліцилфенілаланіл-лейцилгліцилгідразин (MA-Gly-D,L-PheLeuGly-NHNH₂).

Синтез цього мономера здійснювався аналогічним шляхом, як в обох попередніх випадках (див. вище). Склад реакційної суміші і умови були, як вказано нижче: метиловий естер гліцилфенілаланіллейцилгліцину (22,32 г, 0,05 моль), дихлорметан 510 мл (270 + 240 мл), гідроксінон (60 мг), карбонат натрію (15,1 г, 0,145 моль) і метакроїлхлорид 5,2 г (0,05 моль) використовували для одержання метакрилованого метилового естеру. Для гідразинолізу використовували 4,1 г (0,085 моль) гідразингідрату в 120 мл метанолу і 0,46 г (11,3 ммоль) NaOH. Для висушування використовували 210 г безводного сульфату натрію, і 2

× 290 мл дихлорметану використовували для екстрагування. Продукт кристалізували із суміші дихлорметан-етилацетат. Вихід продукту становив 60 %, температура плавлення 139-140 °С. Елементний аналіз: Обчислено: С 58,10 %, Н 7,36 %, N 17,68 %. Одержано: С 58,21 %, Н 7,39 %, N 17,54 %. Продукт був хроматографічно чистий, два піки, що мають однакову площу при 19,39 (L-Phe, що містить мономер) і 19,91 хв (D-Phe).

Приклад 2a: Синтез полімерного прекурсора - співполімера HPMA з 6-(метакроїламіно)-гексаноїлгідразином (полі(HPMA-спів-MA-AN-NHNH₂))

Співполімер полі(HPMA-спів-MA-AN-NHNH₂) одержували радикальною співполімеризацією розчину HPMA і MA-AN-NHNH₂, ініційованою AIBN в метанолі при 60 °С. 122,8 г HPMA і 13,94 г MA-AN-NHNH₂ (18 мас% мономерів) розчиняли в 780 мл метанолу і додавали до розчину 6,06 г AIBN (0,8 мас%). Після фільтрації полімеризаційну суміш поміщали в атмосфері аргону в реактор полімеризації (об'ємом 1,5 л), розташований в термостаті. Полімеризаційну суміш перемішували при швидкому обертанні (близько 100 обертів у хвилину). Азот вводили над поверхню протягом ще декількох хвилин. Температуру полімеризаційної суміші доводили до 60 °С, і полімеризацію продовжували при перемішуванні (50 об./хв.) в атмосфері азоту. Азот видаляли через барботувальний пристрій.

Через 17 годин полімеризаційну суміш виймали з термостату, охолоджували у ванні до кімнатної температури і полімер відокремлювали осадженням в етилацетаті (8 л в цілому). Осаджений полімер піддавали седиментації приблизно 0,5 годин, розчин над осадом видаляли відсмоктуванням і полімер відокремлювали фільтрацією через фільтр із пористого скла S4. Осад промивали етилацетатом, переносили у великі чашки Петрі, і висушували при кімнатній температурі в вакуумі, використовуючи мембранний вакуумний насос, приблизно 1 годину.

Використовуючи ультразвук, полімер розчиняли в 550 мл метанолу (однolitрова колба Erlenmeyer) і осаджували 7,5 л етилацетату таким же чином, як протягом першого виділення. Осаджений полімер після седиментації протягом приблизно 0,5 годин виділяли фільтрацією через фільтр із пористого скла S4, промивали етилацетатом і висушували до постійної ваги, використовуючи мембранний вакуумний насос (до приблизно 5 годин), і сушильний процес завершували з використанням масляно-дифузійного насосу.

Характеристика співполімера:

Вихід 114 г (83 %), вміст гідразидних груп 5,83 моль %, молекулярна вага $M_w = 28500$ г/моль, індекс полідисперсності $I_n = 1,9$.

Приклад 2b: Синтез полімерного прекурсора - співполімера HPMA з метакроїлгліцилгліцилгідразином (полі(HPMA-спів-MA-GlyGly-NHNH₂))

Конфігурація і процедура полімеризації були такими ж, як в Прикладі 2a, різниця була в складі полімеризаційної суміші. Склад полімеризаційної суміші був таким, як вказано нижче: HPMA 10 г, (70 ммоль), MA-GlyGly-NHNH₂ 1,5 г (7 ммоль), діізопропілперкарбонатом 1,15 г (0,91 мас%), і димети-

лформамід 115 мл. Температура полімеризації - 50 °C, і полімеризація відбулася за 16 годин. Полімеризаційний розчин перед осаджуванням в надлишку етилацетату концентрували до приблизно 2/3 його початкового об'єму у вакуумному випарнику, і осадження полімерного продукту здійснювали в 20-кратному об'ємі осаджувача. Полімер позбавляли від низькомолекулярних сумішей осаджуванням з метанолу в етилацетаті. Вихід склав 8,5 г (70 %), вміст гідрозидних груп - 9,5 моль %, молекулярна вага $M_w = 41700$ г/моль, індекс полідисперсності $I_n = 2,1$.

Приклад 2с: Синтез полімерного прекурсора - співполімера HPMA з метакроїлгліцилфенілаланіллейцилгліцил гідразинном (полі(HPMA-спів-MA-ClyPheLeuCly-NHNNH₂)).

Процедура полімеризації була тією ж, як в Прикладі 2а, різниця була знову тільки в складі полімеризаційної суміші. Склад полімеризаційної суміші був таким, як вказано нижче: HPMA 10 г, (70 ммоль), HPMA-спів-MA-GlyPheLeuGly-NHNNH₂ 2,5 г, (5,6 ммоль), азобіс(ізоціановалеріанова кислота) 1,125 г (1 мас%), і диметилсульфоксид 100 мл. Полімеризацію здійснювали при 55 °C і завершували через 18 годин. Полімер виділяли із полімеризаційної суміші осаджуванням в 20-кратному надлишку етилацетату. Полімер очищували повторним осаджуванням з метанолу в етилацетаті.

Вихід склав 9,75 г (78 %), вміст гідрозидних груп 5,5 моль %, молекулярна вага $M_w = 43200$ г/моль, індекс полідисперсності $I_n = 2,1$.

Приклад 3: Одержання полімерного кон'югату RHPMA-AH-NH-N=DOX

Співполімери з DOX, зв'язаним з RHPMA носієм гідролітичним розщепленням гідразонового зв'язку, були одержані реакцією гідрозидмістких груп співполімерів полі(HPMA-спів-MA-AH-NHNNH₂) з DOX.HCl в метанолі, каталізованою оцтовою кислотою.

Розчин 15,384 г співполімера полі(HPMA-спів-MA-AH-NHNNH₂) в 92,1 мл метанолу (167 мг полімеру/мл) поміщали в кювету термостату, в якому було розміщено 2,5 г DOX.HCl (4,3 ммоль). Неоднорідну суспензію перемішували в темноті при 25 °C і через одну хвилину додавали 4,9 мл оцтової кислоти (загальний об'єм 116 мл). Суспензію поступово розчиняли в ході реакції, і через 22 години реакції полімерний продукт виділяли із гомогенного розчину осаджуванням в 1 л етилацетату; осад полімерного медикаменту відокремлювали фільтрацією через фільтр із пористого скла S4, промивали 150 мл етилацетату і висушували до постійної ваги. Загальну кількість DOX визначали спектрально. M_w і M_n визначали рідинною хроматографією (LC АКТА) з аналізом світлорозсіювання (DAWN DSP багато ракурсний детектор, Wyatt).

Характеристика полімерного медикаменту. Загальний вихід реакції зв'язування медикаменту: 17,2 г (96 %), загальний вміст DOX: 11,3 мас%, вільний DOX: 1,52 % поза загальним вмістом DOX.

Приклад 4: Вивільнення доксорубіцину з полімерних кон'югатів.

Вивільнення доксорубіцину з кон'югатів, відмінних за структурою зв'язку між лікарською речовиною і полімером, здійснювали інкубуванням в

0,1 М фосфатному буфері, що містив 0,15 М NaCl при 37 °C. pH буфера коригували до умов ендосоми клітини, тобто до злегка кислотного середовища з pH 5,5. Аліквотні частини інкубувального середовища випробовували з відповідними проміжками, і вміст DOX визначали - після додавання карбонатного буфера (0,1 М Na₂CO₃ + 4 М NaCl), після екстрагування у хлороформі і після випаровування розчинника і переносу у метанольний розчин - за допомогою BEPX (Shimadzu VP), використовуючи зворотно-фазову колонку (Tessek SGX C₁₈, 7 μ m, 125 \times 4 мм), швидкість потоку елюента: 0,5 мл/хв, градієнт з 40 до 100 % розчину В за 35 хвилин (розчин А: 10 % метанол, 89,9 % вода, 0,1 % трифтороцтова кислота (TFA); розчин В: 89,9 % метанол; 10 % вода; 0,1 % TFA). Використовували для визначення флуоресцентний детектор (Shimadzu RF-IOAXL) ($\lambda_{exc} = 480$ нм, $\lambda_{em} = 560$ нм). Криву калібрування будували, використовуючи доксорубіцин.

Результати вимірювання вивільнення медикаменту із кон'югатів, відмінних за структурою використованого зв'язку (спейсера), показані на Fig. 1.

Джерела інформації:

T. Etrych, M. Jelinkova, B. Rihova, K. Ulbrich, Нові співполімери HPMA, що містять зв'язаний доксорубіцин через pH сенситивний зв'язок. Синтез, біологічні властивості in vitro і in vivo. J. Controlled Rel. 73, 89-102 (2001)

T. Etrych; P. Chytil, M. Jelinkova, B. Rihova, K. Ulbrich, Синтез HMPA співполімерів, що містять доксорубіцин, зв'язаний через гідразононий зв'язок. Вплив спейсера на вивільнення медикаменту і цитотоксичність in vitro. Macromolecular Biosci. 2, 43-52 (2002).

O. Hovorka, T. Etrych, M. Subr, J. Strohalm, K. Ulbrich, B. Rihova, Відмінності у внутрішньоклітинній дії вільного і полімер-зв'язаного доксорубіцину. J. Controlled Release 80, 101-117(2002).

J. Kopecek, P. Kopeckova, T. Minko, Z. Lu, Кон'югат HMPA співполімер-протиракова лікарська речовина: Дизайн, Активність і Механізм Дії. Euror. J. Pharm. Biopharm. 50, 61 - 81 (2000)

M. Kovar, L. Kovar, V. Subr, T. Etrych, K. Ulbrich, T. Mrkvan, J. Loucka, і B. Rihova, HMPA співполімери, що містять доксорубіцин, зв'язаний протеолітично або гідролітично розщеплюваним зв'язком: порівняння біологічних властивостей in vitro. J. Controlled Release 99, 301- 314 (2004).

G. S. Kwon, Полімерні системи доставки медикаменту, серії: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, том 148, Dekker, Marcel Incorporated, 2005.

H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Судинна проникність пухлини і EPR ефект в макромолекулярній терапії: огляд. J Control Release 65, 271-284 (2000)

B. Rihova, T. Etrych, M. Pechar, M. Jelinkova, M. Stastny, O. Hovorka, M. Kovar, K. Ulbrich, Ефективність зв'язаного доксорубіцину з носієм HPMA співполімера через гідразононий зв'язок на клітинній лінії раку з обмеженим вмістом лізосом. J. Controlled Release 74, 225-232 (2001).

K. Ulbrich, V. Subr, J. Strohalm, D. Plocova, M.. Jelinkova, B. Rihova, Полімерні медикаменти на основі синтетичних і природних макромолекул I. Синтез і фізико-хімічні показники. *J. Controlled Rel.* 64, 63-79 (2000).

K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M.. Jelinkova, B. Rihova, Кон'югати антитіло-цільовий полімер-доксорубіцин з pH-контрольованим активуванням. *J. Drug Targeting*, 12, 477-490 (2004).

K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelinkova, B. Rihova, HMPA співполімери з pH-контрольованим

вивільненням доксорубіцину. Цитотоксичність in vitro та протипухлинна активність in vivo. *J. Controlled Release* 87, 33-47 (2003).

K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M.. Pechar, M. Jelinkova, B. Rihova, Полімерні протиракові лікарські засоби з pH-контрольованим активуванням. *Int. J. Pharm.* 277/1-2 67-72 (2004).

K. Ulbrich, T. Etrych, B. Rihova, M. Jelinkova, M.. Kovar: pH-сенситивний полімерний кон'югат антрациклінового цитостатика для цілеспрямованої терапії. CZ 293787; WO 03/053473.

Фиг.1

