

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 2018-461

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

*A61K 47/61* (2017.01)  
*C08B 15/02* (2006.01)  
*C08B 37/00* (2006.01)  
*A61K 33/243* (2019.01)  
*A61K 31/519* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.09.2018**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.03.2020**  
(Věstník č. 12/2020)

(71) Přihlašovatel:  
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, CZ  
Masarykova univerzita, Brno, Brno-město, CZ

(72) Původce:  
Mgr. Jan Vícha, Ph.D., Luhačovice, CZ  
Ing. Lukáš Münster, Slavičín, CZ  
Ing. Zdeňka Capáková, Ph.D., Nové Město nad  
Váhom, SK  
doc. Ing. et Ing. Ivo Kuřitka, Ph.D.et Ph.D., Brno,  
Staré Brno, CZ  
RNDr. Michal Masařík, Ph.D., Bílovice nad  
Svitavou, CZ  
RNDr. Michaela Fojtů, Vysoké Pole, CZ

(74) Zástupce:  
Ing. Jan Görig, Korábová 98, 763 16 Fryšták, Horní  
Ves

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Způsob přípravy selektivně oxidovaných  
polysacharidů jako nosičů protinádorových  
léčiv**

(57) Anotace:  
Řešení se týká způsobu přípravy 2,3-  
dikarboxypolysacharidů s řiditelnou molekulovou  
hmotností, volitelně modifikovaných biologicky  
aktivními ligandy použitelných jako nosičů  
protinádorových léčiv. Těmi jsou protinádorová  
léčiva založená na přechodných kovech, zejména  
na bázi bidentátně vázaných sloučenin platiny typu  
 $R_2Pt^{II}X_2$ ,  $R_2Pt^{IV}X_2L_2$ , komplexů ruthenia typu  
 $[Ru(aren)L_x(PTA)_y]$ , či monodentátně vázaných  
látek typu  $[R_3Pt^{II}X]Y$ .

## Způsob přípravy selektivně oxidovaných polysacharidů jako nosičů protinádorových léčiv

### Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu přípravy selektivně oxidovaných polysacharidů jako nosičů protinádorových léčiv a dále konjugátů s říditelnou rychlostí uvolňování léčiva, vysokou efektivitou vázání nad 70% a s přenosovou kapacitou léčiva až 60 % hmot., zejména pro terapii a diagnostiku nádorových onemocnění prostaty, vaječnicků, dělohy, plic, hlavy a krku.

10

### Dosavadní stav techniky

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejdůležitějších chorob a představují celosvětový problém. Přibližně 70 % pacientů diagnostikovaných na rakovinu plic, vaječnicků, močového měchýře nebo varlat je v současnosti léčeno sloučeninami platiny v oxidačním stavu II o obecném složení  $R_2Pt^{II}X_2$ ,<sup>1</sup> kde  $R_2$  = dva monodentátní či jeden bidentátní ligand založený na dusíku (typicky amin či diamin) a X reprezentuje aniontový odstupující ligand či dvojici ligandů (typicky halogeny, nitro- skupinu, karboxyláty, dikarboxylát).

20

Nejrozšířenějším a zároveň nejdéle používaným platnatým cytostatikem je cisplatina, *cis*- $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ . Hlavní nevýhodou cisplatiny, stejně jako i dalších generací  $R_2Pt^{II}X_2$  léčiv, jsou vážné vedlejší účinky (neurotoxicita, ototoxicita, nefrotoxicita, myelosuprese), které jsou důsledkem kumulativní toxicity léčiva v organismu a nespecifického mechanismu účinku. Podané léčivo totiž necílí pouze na nádorové buňky, ale napadá také další rychle se dělící buňky zdravé tkáně, jako je kostní dřev, vlasové cibulky nebo spermie. Závažné vedlejší účinky snižují maximální bezpečnou dávku cytostatika, což může vést ke vzniku nádorových buněk rezistentních vůči podávanému léčivu.

25

Další vývoj léčiv na bázi platiny se proto ubíral různými směry ve snaze snížit nežádoucí účinky existujících cytostatik. Došlo například k vývoji monofunkčních komplexů platiny, jako je phenanthriplatina, které pracují na principu inhibice topoisomerázy. Tyto látky obecného složení  $[R_3Pt^{II}X]Y$ , kde  $R_3$  jsou tři dusíkaté ligandy volitelně různého složení, X je odstupující aniontový ligand a Y je aniont anorganické či organické kyseliny, jsou získávány ve formě solí, ve kterých platnatý komplex nese kladný náboj.

35

Další alternativou jsou tzv. proléčiva, tedy sloučeniny založené na mnohem méně toxických platičitých komplexech v oktaedrickém uspořádání sumárního vzorce  $R_2Pt^{IV}L_2X_2$ , kde  $R_2$  = dva monodentátní či jeden bidentátní ligand založený na dusíku (amin, amid) a X reprezentuje anionický odstupující ligand či dvojici ligandů (halogeny, dusičnany, karboxyláty, dikarboxylát) a  $L_2$  axiální ligandy navázané k centrálnímu atomu obvykle přes atom kyslíku.

40

Proléčivo je redukováno za odštěpení  $L_2$  ligandů na aktivní formu  $R_2Pt^{II}X_2$  přímo v nádorových buňkách, což přináší značné snížení vedlejších účinků a zvýšení efektivity – viz např. patentová přihláška USA US 2004/0235712A1. Ligandy  $L_2$  při tom mohou být rovněž biologicky aktivní (terapeutika, biologické vektory).

45

Řada dalších komplexů tranzitních kovů, založených například na bázi osmia, zlata, iridia nebo ruthenia, byla testována jako možná náhrada komplexů platiny. Biologicky aktivní organoruthenité sloučeniny jsou obzvláště zajímavou alternativou s ohledem na jejich specifický profil účinku. Například tzv. RAPTA komplexy sumárního vzorce  $[Ru(aren)L_x(PTA)_y]$ , kde arenem se rozumí aromatický uhlovodík nekovalentně navázaný na ruthenium,  $L_x$  je odstupující aniontový ligand či ligandy, a PTA je (1,3,5-triaza-7-phosphatricyclo[3.3.1.1]dekan) nebo jeho derivát, vykazují vysokou účinnost vůči metastázám – viz mezinárodní patentová přihláška WO0240494A1. Jejich cytotoxicita navíc roste se zvýšením lipofility aromatického ligandu

55

(aren), ovšem na úkor selektivity. Tyto látky jsou předmětem intenzivního výzkumu, ačkoliv dosud nepřekročily stádium klinických zkoušek.

5 Kromě modifikace struktury léčiv založených na přechodných kovech lze jejich vlastnosti zlepšit jejich konjugací na makromolekulární nosič. Tvorba konjugátu přináší řadu výhod v porovnání s podáním samotného léčiva, zejména v oblastech snížení systémové toxicity, prodloužení doby cirkulace v krevním oběhu a zvýšeného vstřebávání buňkami. Další výhodou makromolekulárních nosičů je jejich pasivní akumulace v tumorové tkáni díky tzv. efektu zvýšené permeability a retence (EPR). EPR efekt nastává v oblasti nádoru v důsledku zvýšené propustnosti defektního endotelu, díky čemuž makromolekulární látky snadněji difundují do oblasti nádoru. Tam se samovolně hromadí v důsledku snížené efektivity mízního systému, způsobené nekontrolovaným buněčným bujením. K uvolňování léčiva z nosiče tak dochází přímo v cílové oblasti.

15 Další výhodou makromolekulárních nosičů je jejich snadná modifikovatelnost. Díky množství vazebných míst na každé makromolekule lze totiž nosič kromě léčiva vybavit také biologicky aktivním cílícím vektorem, případně jeho kombinací s kontrastními/zobrazovacími či jinými biologicky aktivními látkami, a to beze změny struktury samotného přenášeného léčiva. Biologicky aktivním cílícím vektorem se rozumí biologicky aktivní látka, která se preferenčně váže na nádorové buňky, např. v důsledku zvýšeného výskytu jejích receptorů v těchto buňkách. Typickým příkladem je kyselina listová, jejíž  $\alpha$  receptory ( $FR\alpha$ ) vykazují zvýšený výskyt v řadě nádorových linií, jelikož se spolupodílejí na řízení buněčného dělení. Aktivní cílení receptorů  $FR\alpha$  pomocí nosičů dekorovaných kyselinou listovou vede ke značnému zvýšení efektivity vstřebávání daného léčiva do nádorové buňky a tím ke zvýšení jeho efektivity.

25 Nejdůležitějšími charakteristikami makromolekulárních nosičů léčiv jsou kromě biokompatibility a nízké toxicity dobrá rozpustnost, dobře definovatelná molekulární hmotnost, počet funkčních (vazebných) skupin na jednu polymerní jednotku, jejich vzájemná orientace a charakter navázání léčiva (kovalentní, iontový, jiný). Hustota, pozice a vzájemná orientace funkčních skupin jsou obzvláště důležité, jelikož určují způsob navázání léčiva a tím nepřímo také transportní kapacitu nosiče a částečně také rychlost uvolňování léčiva. V principu totiž nosič může vystupovat vůči léčivu jako mono- či bidentátní ligand. Například nejrozšířenější  $R_2Pt^{II}X_2$  léčiva a  $R_2Pt^{IV}L_2X_2$  proléčiva obsahují dvě možná vazebná místa. Jejich bidentátní vázání nosičem umožňuje dosáhnout vyšší efektivity konjugace na nosič a nedochází při něm k nežádoucím intermolekulárním síťovacím reakcím, kdy se komplex naváže postupně na dvě molekuly nosiče. Takovéto zesíťování zvyšuje molekulární hmotnost konjugátu, a tím pádem značně snižuje jeho rozpustnost, což ve výsledku vede ke snížení transportní kapacity nosiče.

40 Mezi slibné makromolekulární nosiče léčiv patří polysacharidy. Jejich výhodou je dobrá biokompatibilita, nízká toxicita a snadná modifikovatelnost. To vedlo k širokému využití polysacharidů a na nich založených materiálů, převážně hydrogelů, jako nosičů léčiv - viz např. řešení podle patentů USA US 6338843B 1, US 4931553 A a US 4793986 A, patentové přihlášky USA US 2008300389 A1, mezinárodní patentové přihlášky WO 9637519 A1, či přihlášky Evropského patentu EP 1722714 A1.

45 Pro přenos protinádorových léčiv se využívají zejména kyselé polysacharidy, které ve struktuře obsahují alespoň jednu karboxylovou skupinu. Důvodem je možnost přímého navázání léčiva a relativně snadné modifikace karboxylátu (esterifikační, amidační reakce). Kyselé polysacharidy mohou být přírodní povahy (kyselina hyaluronová, či alginát) – viz řešení podle patentu USA 50 US 4695463A, nebo se může jednat o běžné sacharidy jako je celulóza nebo dextrin, synteticky modifikované  $-COOH$  skupinami. Příkladem může být ester kyseliny jantarové a dextrinu, který byl nárokován v patentu USA US6338843B1 jako nosič organických protinádorových léčiv na bázi doxorubicinu.

Nevýhodou většiny kyselých polysacharidů je poměrně nízká hustota karboxylových skupin. Obvykle se jedná o látky se stupněm substituce  $\geq 1$ , tj. obsahujícím jednu či méně  $-\text{COOH}$  skupin na jednu polymerní jednotku. To omezuje množství přenášeného léčiva a dále vede k nízké efektivitě vázání, jelikož se léčivo váže převážně monodentátně a tudíž dochází k výše zmíněným nežádoucím síťovacím reakcím. Například konjugace cisplatiny (CP) na hyaluronovou kyselinu dosahuje efektivitě pouhých 30 % a přenosové kapacity kolem 25 hmot. % při výchozím poměru reaktantů 16:10 (CP:HA). Nevýhody plynoucí z tohoto uspořádání lze částečně odstranit pomocí tzv. linkerů, krátkých řetězců aminokyselin či peptidů, které jsou na jedné straně navázány na karboxylovou či hydroxylovou skupinu polysacharidu, a na druhém konci k léčivu pomocí bidentátního ligandu – viz řešení podle patentové přihlášky USA US 2008300389. Nevýhodou tohoto řešení je ale vyšší komplexnost syntézy spočívající v dodatečném kroku navázání aminokyseliny na polysacharid a limitace množství přenášeného léčiva počtem možných linkerů, které je závislé na počtu  $-\text{COOH}$  skupin polysacharidu a efektivitě amidační reakce.

Potenciální řešení spočívající ve využití polysacharidů se stupněm substituce vyšším než 1, tj. s více než jednou  $-\text{COOH}$  skupinou na polymerní jednotku, jako je například karboxymethylcelulóza nebo neselektivně oxidovaná celulóza, je ovšem problematické. Tyto polysacharidy totiž vykazují kvůli neselektivní povaze oxidačních reakcí nestechiometrické složení, což komplikuje jejich využití jako nosičů léčiv. Kromě toho, sacharidy s vysokým stupněm substituce karboxylovými skupinami a neporušenou strukturou řetězce výrazně podporují buněčnou proliferaci – viz německá patentová přihláška DE10319808A1, což je činí nevhodnými pro aplikace v protinádorové terapii.

Alternativou je využití vysoce selektivní oxidace  $-\text{OH}$  skupin polysacharidů v pozici 2 a 3 na aldehydy pomocí  $\text{NaIO}_4$  za současného přerušení vazby mezi atomy uhlíku C2 a C3. Lze tak dosáhnout mnohem vyšší hustoty funkčních skupin (2 na každou pyranózovou jednotku). Výsledný dialdehyd je ovšem jako nosič léčiv nevhodný s ohledem na jeho vysoce komplexní strukturu a sklony k degradaci. Přesto byla tato metoda v minulosti použita k aktivaci polysacharidu pro navázání linkerů tvořených aminokyselinami a deriváty dikarboxylových kyselin, na které byla navázána léčiva na bázi Pt(II) a Pt(IV) komplexů, viz řešení podle patentu USA US 4793986 A. Nevýhodou tohoto řešení je diskutabilní toxicita a komplexní struktura dialdehydu, která ještě umocňuje složitost syntézy a použití vysoce toxických solí kyanidu coby redukčních činidel.

Další oxidace dialdehydů pomocí  $\text{NaClO}_2$  vede k přípravě 2,3-dikarboxypolysacharidů. Je-li vstupním materiálem celulóza, výsledným produktem je 2,3-dikarboxycelulóza (DCC). DCC má na rozdíl od běžné oxidované celulózy připravované neselektivní oxidací dobře definované složení a při vyšším stupni oxidace (nad 70 %) je dobře rozpustná ve vodě. Potenciální využití DCC a dalších 2,3-dikarboxypolysacharidů se odvíjelo převážně od jejich polyaniontového charakteru. V minulosti bylo DCC zvažováno jako jedna z možných alternativ alginátů používaných pro přípravu injekčně podávaných biodegradovatelných hydrogelů určených pro dlouhodobé uvolňování proteinů – viz řešení podle patentů USA US 6432449 B1 a US 6656508 B2, či Evropských patentů EP 1079811 B1 a EP 0975333 B1. DCC je zde ale pouze navržena jako jedna z možných složek hydrogelové sítě.

Jako možná náhrada modifikovaných alginátů je DCC zmíněna také v mezinárodní patentové přihlášce WO 2005079703 A1, zabývající se vývojem dvoufázového polymerního systému určeného pro řízené a dlouhodobé uvolňování quinazolinonových derivátů pro léčbu fibrózy. V tomto případě je kladně nabitě léčivo v materiálu zadržováno na základě interakcí se záporně nabitým polymerem.

DCC je také okrajově zmíněna v patentové přihlášce USA US20050208134A1 jako jedna z možných alternativ pro přípravu svrchní hydrofilní vrstvy obalující hydrofobní jádro v systémech určených pro přenos ve vodě nerozpustných látek.

Předmětem značně obecné mezinárodní patentové přihlášky WO8910928A1 je příprava konjugátu léčiv na bázi platiny a polykarboxylových kyselin jak syntetického, tak přírodního původu, které obsahují dvě –COOH skupiny na jednu polymerní jednotku. Zmiňují se zde jako jedna z možností nosiče léčiv na bázi platiny také 2,3-oxidované polysacharidy. Popsaná metoda přípravy nosiče i konjugátů má však řadu nedostatků. Kromě nízkých výtěžků, v průměru okolo 50 %, není možná kontrola molekulové hmotnosti nosiče během syntézy. Účinnost postupu čištění nosičů a jejich konjugátů spočívající v promytí produktů organickým rozpouštědlem (ethanol, methanol, aceton) je pro odstranění nežádoucích produktů a nenavázaných komplexů platiny diskutabilní. Navíc při promytí dochází ke kontaminaci produktů použitými rozpouštědly, která se dají jen velmi obtížně separovat standardními postupy (vakuové sušení) v důsledku tvorby silných vodíkových můstků s polykarboxylovým aniontem.

Z hlediska přenášené látky byl rozsah patentové přihlášky WO8910928A1 omezen na kovalentně vázané látky se sumárními vzorci  $R_2Pt^{II}X_2$  a  $R_2Pt^{IV}L_2X_2$ , přičemž se pozornost věnuje téměř výhradně  $R_2Pt^{II}X_2$  komplexům, kde  $R_2=1,2$ -diaminocyklohexan. Příprava částečně iontově vázaných konjugátů s monofunkční komplexu platiny  $[R_3Pt^{II}X]Y$ , či jinými kovy než je platina, například  $[Ru(aren)L_x(PTA)_y]$ , nebyla nárokována.

Rovněž možnost přípravy materiálů o dané molekulové hmotnosti a různé rychlosti uvolňování léčiva, ani modifikace polysacharidů cílicími vektory, či jinými látkami s terapeutickým nebo diagnostickým efektem nebyly v patentové přihlášce řešeny. Celulóza jako výchozí materiál je zde zmíněna pouze okrajově, pozornost je věnována v základu dobře rozpustným polysacharidům jako je dextran/dextrin.

Ve zkratce, polysacharidy určené pro přenos metaloléciv by měly mít dobře definovanou strukturu a složení, jednoduchou a snadno kontrolovatelnou syntézu, dobře definovanou (a definovatelnou) molekulovou hmotnost a vysokou rozpustnost. Měly by také být netoxické, biodegradovatelné, či alespoň biokompatibilní. Zároveň by měly mít co nejvyšší hustotu vhodných vazebných skupin (-COOH) ve vzdálenosti a orientaci vhodné pro chelaci kovových iontů a nést další funkční skupiny vhodné pro navázání cílicích vektorů a dalších biologických látek, a to ideálně v pozici, která neomezuje množství přenášeného léčiva.

### 35 Podstata vynálezu

K vyřešení výše uvedených problémů přispívá do značné míry způsob přípravy selektivně oxidovaných polysacharidů jako nosičů protinádorových léčiv podle vynálezu. Tento způsob je, obdobně jako postupy již známé, založen na tom, že u polysacharidu s alespoň jedním pyranózovým cyklem nesoucím hydroxylové skupiny v poloze 2 a 3 v základní strukturní jednotce se tyto hydroxylové skupiny alespoň částečně, avšak nejlépe zcela selektivně oxidují v prvním stupni na aldehydy působením jodistanu alkalického kovu za vzniku dialdehydu polysacharidu a následně pak ve druhém stupni na karboxyly působením chloritanu alkalického kovu v prostředí kyseliny octové za vzniku dikarboxypolysacharidu.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že pro přípravu zcela oxidovaného polysacharidu o říditelné molekulové hmotnosti je v prvním kroku při konverzi na aldehydy třeba použít molární poměr jodistanu alkalického kovu ku polysacharidu 1,0 – 1,5 : 1 a dobu reakce v rozmezí 24 až 72 hodin v závislosti na vlastnostech vstupního materiálu, jako je krystalinita, velikost částic atd. a pro následnou kvantitativní konverzi na karboxyly je pak třeba použít molární poměr modifikovaného polysacharidu ku chloritanu alkalického kovu a ku kyselině octové 1 : 2 : 1 až 1 : 8 : 4 a dobu reakce alespoň 7 hodin, přičemž pro přípravu materiálů o nižší molekulové hmotnosti než je molekulová hmotnost výchozího polysacharidu je před započítáním druhého stupně oxidace nutné přidat do reakční směsi kyselinu amidosulfonovou, jelikož je střední molekulová hmotnost ( $M_w$ ) výsledného produktu nepřímo závislá na jejím molárním množství

v reakční směsi. V takovém případě je možné zkrátit dobu sekundární oxidace pro úplnou konverzi na 3,5 h. Po skončení oxidačních reakcí se reakční směs čistí dialýzou proti destilované vodě, titruje roztokem alkalického hydroxidu na neutrální pH a výsledný roztok sodné soli 2,3-dikarboxypolysacharidu se přefiltruje a lyofilizuje.

5

Pro navázání biologicky či diagnosticky aktivní látky na nosič prostřednictvím spaceru se připravený 2,3-dikarboxypolysacharid modifikuje biokonjugační reakcí, při níž nejprve dochází k aktivaci  $-\text{COOH}$  skupiny vektoru pomocí karboimidu jako je EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karboimid) a NHS (N-hydroxysukcinimidu), a následnou amidační reakcí s aminoskupinou spaceru ( $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ ). Molární poměr jednotlivých látek je vektor : EDC : NHS : spacer 1 : 1 : 1 : 1 až 1 : 10 : 1 : 10, pokud vektor obsahuje jedinou  $-\text{COOH}$  skupinu nebo 1 : 0.1 : 1 : 0.1 až 1 : 0.99 : 1 : 0.99, obsahuje-li vektor více  $-\text{COOH}$  skupin. Snížením molárního poměru vektro : EDC : spaceru pod 1 : 1 : 1 je omezen vznik nežádoucích vedlejších produktů. Ve druhém kroku je  $-\text{COOH}$  skupina spaceru nesoucího vektor opět aktivována pomocí karboimidu (EDC) a za přítomnosti DMAP (4-dimethylaminopyridinu) jako katalyzátoru (EDC : DMAP 10 : 1 až 100 : 1) dochází k esterifikační reakci s hydroxylovou skupinou 2,3-dikarboxypolysacharidu.

Pro přímé navázání biologicky či diagnosticky aktivní látky obsahující  $-\text{COOH}$  skupinu na polysacharid se tato  $-\text{COOH}$  skupina aktivuje pomocí karboimidu (EDC), a za přítomnosti DMAP (4-dimethylaminopyridinu) jako katalyzátoru dochází k esterifikační reakci s hydroxylovou skupinou 2,3-dikarboxypolysacharidu.

Konjugát s říditelnou rychlostí uvolňování léčiva podle vynálezu, vykazující vysokou efektivitou vázání nad 70 % a přenosovou kapacitou léčiva až 80 % hmot. pak obsahuje nosič vyrobený způsobem podle vynálezu a na něm vázanou aktivní látku. Tou je protinádorové léčivo založené na přechodných kovech, zejména na bázi bidentátně vázaných sloučenin platiny typu  $\text{R}_2\text{Pt}^{\text{II}}\text{X}_2$ ,  $\text{R}_2\text{Pt}^{\text{IV}}\text{X}_2\text{L}_2$ , komplexů ruthenia typu  $[\text{Ru}(\text{aren})\text{L}_x(\text{PTA})_y]$ , či monodentátně vázaných iontových látek typu  $[\text{R}_3\text{Pt}^{\text{III}}\text{X}]\text{Y}$ , s tím, že řízení rychlosti uvolňování je dosaženo využitím nosiče o různé molekulové hmotnosti, a to i nižší, než má výchozí polysacharid, a použitím různého hmotnostního poměru mezi léčivem a nosičem v rozmezí 1:100 až 10:1 během přípravy.

Použitým 2,3-dikarboxypolysacharidem může být netoxický a biokompatibilní polysacharid, jehož struktura umožňuje selektivní oxidaci hydroxylových skupin na uhlících C2 a C3 pyranózového cyklu na aldehydy pomocí  $\text{NaIO}_4$  a jejich následnou oxidaci na karboxylové kyseliny pomocí  $\text{NaClO}_2$ . Nutnou podmínkou je tedy přítomnost alespoň jednoho pyranózového cyklu nesoucího  $-\text{CHOH}$  skupiny v poloze 2 a 3 v základní strukturní jednotce polysacharidu. Obecný strukturní vzorec 2,3-dikarboxypolysacharidu je na obr. 1, kde  $\text{R}=\text{OH}$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ , biologicky či diagnosticky aktivní substituent, případně další látky či funkční skupiny pozitivně ovlivňující fyzikální či biologické vlastnosti polysacharidu.

Mezi takové materiály patří mimo jiné celulóza, amyulóza, škrob, pektin, dextrin, dextran, xanthan, nebo některé kyselé polysacharidy jako k. hyaluronová, karboxymethylcelulóza, karboxymethyl-dextran, chondroitin, alginát a další, přičemž preferovaným materiálem je celulóza. Materiál může být oxidován zcela nebo částečně, přičemž vyšší stupně oxidace jsou preferovány z hlediska rozpustnosti a vyšší přenosové kapacity, zatímco nižší stupně oxidace mohou přispět ke zlepšení biokompatibility a degradability nosiče v organismu, je-li to vyžadováno.

2,3-dikarboxypolysacharidy mohou být dekorovány dalšími skupinami či ligandy pro zlepšení jejich terapeutických či diagnostických vlastností, přičemž je vhodné cílit substituci na hydroxylovou, karboxylovou, či jinou vhodnou funkční skupinu na uhlíku C6 pyranózového cyklu, je-li tato ve struktuře polysacharidu přítomna. Substituce v této pozici má totiž minimální vliv na tvorbu konjugátu s biologicky aktivní látkou probíhající v poloze 2 a 3.

55

Konjugovanou biologicky aktivní látkou se rozumí terapeuticky využitelný neutrální či kladně nabitý komplex přechodného kovu, který se k nosiči váže buď kovalentně, nebo na základě iontových interakcí či kombinací obou možností. Pro kovalentní vázání je nutná přítomnost minimálně jednoho (monodentátní vázání), nejlépe však dvou snadno odstupujících aniontových ligandů X ve vzájemné *cis* orientaci (bidentátní vázání). Takovým ligandem jsou typicky anionty anorganických či organických kyselin (halogenidy, karboxyláty). Dvojice odstupujících ligandů může být nahrazena jediným bidentátním ligandem, např. dikarboxylátem. Základní podmínkou je dostatečná labilita těchto ligandu(ů), jelikož během tvorby konjugátu dochází k jejich substituci karboxylovou skupinou či skupinami nosiče. Substituce pak může probíhat spontánně. Alternativně lze využít aktivačních činidel jako je dusičnan stříbrný, je-li odstupujícím ligandem halogenid. V případě kombinovaného či iontového vázání musí být látka kladně nabitá s ohledem na polyaniontový charakter nosiče.

Vhodnými biologicky aktivními látkami splňujícími výše uvedené podmínky jsou mimo jiné sloučeniny platiny s protinádorovým účinkem o obecném složení  $R_2Pt^II X_2$ , kde  $R_2$  = dva monodentátní či jeden bidentátní ligand založený na dusíku (typicky amin, diamin) a X reprezentuje aniontový odstupující ligand či dvojici ligandů (typicky halogeny, nitro skupinu, karboxyláty, dikarboxylát), dále proléčiva na bázi platiny  $R_2Pt^IV L_2 X_2$ , kde  $R_2$  = dva monodentátní či jeden bidentátní ligand založený na dusíku (amin, amid) a X reprezentuje anionický odstupující ligand či dvojici ligandů (halogeny, dusičnany, karboxyláty, dikarboxylát) a  $L_2$  axiální ligandy odstupující během redukce platičitého komplexu na platnatý. Ligand  $L_2$  může být biologicky aktivní (protinádorová léčiva, biologické vektory), či využitelný pro diagnostiku (fluorescenční barviva), případně jejich kombinace.

Dále se může jednat o komplexy platiny  $[R_3Pt^II X]Y$ , kde  $R_3$  jsou tři dusíkaté ligandy volitelně různého složení, X je odstupující ligand a Y je aniont anorganické či organické kyseliny.  $[R_3Pt^II X]$  komplex nese kladný náboj.

Mimo komplexy platiny se může jednat například o ruthenité komplexy typu RAPTA sumárního vzorce  $[Ru(aren)L_x(PTA)_y]$ , kde arenem se rozumí aromatický uhlovodík nekovalentně navázaný na ruthenium,  $L_x$  je odstupující aniontový ligand či ligandy a PTA je (1,3,5-triaza-7-phosphatricyclo[3.3.1.1]dekan) či jeho derivát. Další možnosti jsou například čtvercově-planární sloučeniny  $Au^{III}$  s protinádorovým účinkem, tzv. peptidomimetika, a jiné komplexy přechodných kovů, které splňují výše zmíněné strukturální charakteristiky.

Řešení podle vynálezu umožňuje připravit nosiče protinádorových léčiv založených na přechodných kovech o vysoké čistotě a volitelně střední molekulové hmotnosti ( $M_w$ ). Oproti jiným nosičům léčiv, založených na polysacharidech, předkládané řešení umožňuje přenos širokého spektra metaloléčiv, včetně neplatinových cytostatik, přináší vyšší efektivitu vázání léčiva díky možnosti bidentátního vázání a vysokou přepravní kapacitu (vysoká hustota vazebných skupin), a to při zachování dobré rozpustnosti. Umožňuje také pokročilé cílení léčiv díky kombinaci pasivního (EPR efekt) a aktivního cílení tumorů (biologicky aktivní vektory) a říditelné rychlosti uvolňování léčiva. Finální produkt není kontaminován organickými rozpouštědly, protože není používána metoda vysrážení produktu alkoholem a případné kontaminanty včetně nenavázaného léčiva jsou z finálního produktu odstraněna pomocí dialýzy.

### Objasnění výkresů

K bližšímu objasnění podstaty vynálezu přispívají přiložené výkresy, kde představuje:

Obr. 1 - Znázornění obecné struktury 2,3-dikarboxypolychararidu

Obr. 2 - Část  $^1H$  NMR spektra DCC připraveného postupem podle příkladu 1 (25°C,  $D_2O$ ).  
Stupeň oxidace 95 %

- Obr.3 - Schéma oxidace a modifikace celulózy a přípravy konjugátu cisplatina-DCC (CP-DCC). R=OH, OOC-PEG-F
- 5 Obr. 4 - Znárodnění struktury CPDCC vytvořené na základě spektroskopických analýz
- Obr. 5 - a) Efektivita navázání cisplatiny jako funkce poměru reaktantů  
 b) Rychlost uvolňování cisplatiny z nosiče o různé molekulové hmotnosti pro různá  
 10 přenášená množství cisplatiny
- Obr. 6 - Rychlost uvolňování aktivní látky (PhPt<sup>2+</sup>) v závislosti na postupu přípravy
- Obr. 7 - a) Strukturní vzorec sloučeniny RAPTA-C  
 15 b) Model předpokládané struktury konjugátu RAPTA-C a DCC (R-DCC)
- Obr. 8 - Univariální křivka přežití myši léčených CP (modrá barva) a CP-DCC (červená barva), M<sub>w</sub> nosiče 18 kDa, 44 hm. % CP)
- 20 Obr. 9 – Distribuční mapy ilustrují relativní zastoupení platiny v nádorové tkáni myši, kterým byla administrována CP (Obr. 9a) nebo CP-DCC (Obr. 9b).

## 25 Příklady uskutečnění vynálezu

### Příklad 1

#### *Příprava 2,3-oxidovaných polysacharidů na příkladu dikarboxylcelulózy (DCC)*

30 Detailní popis přípravy vysoce čistých, selektivně 2,3-oxidovaných polysacharidů pro účely přenosu léčiv řešení je demonstrován na příkladu 2,3-dikarboxylcelulózy, lze jej však aplikovat na jakékoliv jiné vhodné polysacharidy uváděné výše. Postup vychází ze známých metod přípravy 2,3-dikarboxylcelulózy, je však doplněn o metodu dosažení plně oxidovaného materiálu, řízení  
 35 molekulové hmotnosti produktu a o postup modifikace nosiče biologicky či diagnosticky aktivní látkou a další kroky nutné k přípravě vysoce čistého materiálu pro biologické aplikace.

Vstupním materiálem pro syntézu je polysacharid o vysoké čistotě, ke kterému je přidán roztok jodistanu sodného jako oxidačního činidla. Molární poměr reaktantů a doba oxidace závisí na  
 40 požadovaném stupni konverze a typu polysacharidu. Pro kvantitativní konverzi byla použita oxidace při molárním poměru reaktantů (NaIO<sub>4</sub> : sacharid) 1.2 : 1 probíhající po dobu 72 hodin. Použitím těchto podmínek lze z celulózy při teplotě 30 °C a za nepřístupu světla připravit dialdehyd celulózy (DAC) o stupni konverze nad 90 %. Oxidační reakce byla ukončena po  
 45 uplynutí požadované reakční doby přidávkou ethylenglykolu. Meziprodukt byl následně zbaven zbytků oxidačních činidel a dalších nečistot pomocí filtrace a centrifugace a jeho stupeň konverze stanoven pomocí oxidační reakce a alkalimetrické titrace.

Takto připravený dialdehyd polysacharidu byl dále oxidován pomocí NaClO<sub>2</sub> v přítomnosti kyseliny octové, v optimálním molárním poměru reaktantů (-CHO : NaClO<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>COOH) 1 : 4 :  
 50 2. V případě celulózy je reakce kvantitativně dokončena po 7 h při 30 °C za nepřístupu světla. Doba reakce a reakční poměr reaktantů lze upravit v závislosti na konkrétním materiálu a požadovaných vlastnostech produktu.

55 Reakce byla následně zastavena pomocí přidávky vhodné báze (konkrétně roztok NaOH) a reakční směs byla dialyzována proti destilované vodě po dobu minimálně 48 hodin nebo do



vyrovnání pH. Následně byl produkt titrován roztokem NaOH na neutrální pH a výsledný roztok sodné soli 2,3-dikarboxypolysacharidu přefiltrován a lyofilizován.

5 Takto byl připraven vysoce čistý produkt se stupněm oxidace >95 % o molekulové hmotnosti ( $M_w$ ) odpovídající vstupnímu materiálu, jelikož k degradaci polymerních řetězců při oxidaci prakticky nedochází (viz část  $^1\text{H}$  NMR spektra DCC na obr. 2. Neoznačené signály nízké intenzity patří neoxidovaným anhydroglukózovým jednotkám celulózy).

#### 10 Příklad 2

*Příprava 2,3-oxidovaných polysacharidů o nižší molekulové hmotnosti než výchozí polysacharid na příkladu dikarboxylcelulózy (DCC)*

15 Pro přípravu materiálů o nižší molekulové hmotnosti, než výchozí polysacharid byl před započítím druhého stupně oxidace přidán do reakční směsi roztok kyseliny amidosulfonové. Kromě potlačení vzniků nežádoucích chlornanů v reakční směsi ovlivňuje přítomnost této látky přímo molekulovou hmotnost oxidovaného polysacharidu. Střední molekulová hmotnost ( $M_w$ ) výsledného produktu je totiž nepřímo závislá na molárním množství kyseliny amidosulfonové v reakční směsi.

20 V případě připraveného dialdehyducelulózy (DAC) o  $M_w$  76 kDa vedlo přidání 0,25 molárního ekvivalentu (vůči stanovenému množství  $-\text{CHO}$  skupin) kyseliny amidosulfonové během sekundární oxidace ke snížení  $M_w$  na 55 kDa (70%), zatímco přidání 0,5 molárního ekvivalentu vedlo k materiálu s  $M_w$  18 kDa (25%).

25 To umožňuje přípravu nosičů s různou rychlostí uvolňování léčiva za použití stejného výchozího materiálu. Na rozdíl od dalších metod snižování molekulové hmotnosti, jako je například rozvaňování, nedochází tímto postupem k nekontrolovanému nárůstu indexu polydispersity (PDI) produktu. PDI takto připravených produktů je stejný jako v případě materiálů připravených bez 30 přidavku kyseliny amidosulfonové a může být i lepší než u výchozího materiálu. V případě oxidované celulózy se PDI pohyboval mezi 1,6 – 1,7. Distribuci molekulových hmotností nosiče lze nadále snížit např. pomocí HPLC v separačním módu.

35 Takto připravené sodné soli 2,3-dikarboxypolysacharidů je možné použít přímo k tvorbě konjugátů s metaloléčivem, či je dále modifikovat biologicky aktivními látkami pro lepší cílení tumorů či látkami určenými pro diagnostické účely.

#### Příklad 3

40 *Příprava částečně oxidovaných 2,3-oxidovaných polysacharidů na příkladu dikarboxylkarboxymethylcelulózy (DCCMC)*

Pomocí karboxymethyl celulózy (CMC) je demonstrován postup částečné oxidace kyselého polysacharidu dobře rozpustného ve vodě. K vodnému roztoku CMC byl přidán jodistan sodný 45 molárním poměru reaktantů 1,2 : 1 ( $\text{NaIO}_4$  : CMC) jako oxidační činidlo a reakce probíhala při teplotě 30 °C a za nepřístupu světla po dobu 5 h. Částečně oxidovaná CMC dále vstoupila do sekundární oxidace s upravenou stechiometrií reakce definovanou molárním poměrem CMC ku chloritanu alkalického kovu a ku kyselině octové 1 : 2 : 2 a dobou reakce 3,5 h.

50 V rámci přípravy nosiče lze využít roztok sulfoamidové kyseliny k dalšímu řízení molekulové hmotnosti vzhledem k užitným vlastnostem jako kinetika uvolňování.

Další postup byl identický s přípravou DCC. Výtěžek 94%, stupeň oxidace: 55 %.

#### 55 Příklad 4

*Příprava 2,3-oxidovaných polysacharidů na příkladu dextran, dextrin a xanthan*

Postupem analogickým k příkladu č. 3 lze připravit nosiče protinádorových léčiv i z dalších polysacharidů dobře rozpustných ve vodě – konkrétně např. z dextranu, dextrinu a xanthanu. Pro úplnou konverzi je třeba prodloužit dobu primární oxidace na min. 24 h a sekundární na 7 h, jako v příkladu č. 2.

## Příklad 5

10

*Modifikace polysacharidů biologicky aktivními látkami*

Biologicky či diagnosticky aktivní látku lze na nosič navázat buď přímo, nebo přes tzv. spacer, což je (makro)molekulární řetězec o vhodné délce, například modifikovaný polyethylenglykol (PEG) o  $M_w$  100 až 20000 Da. Jedinou podmínkou je přítomnost karboxylové skupiny ve struktuře vázané látky. První, jednodušší, možnost je vhodná pro navázání látek, které přímo neinteragují s živým organismem, např. fluorescenčních činidel. Druhý způsob je preferovaný u cílicích vektorů, jelikož díky přítomnosti spaceru dochází ke snížení sterického bránění biologického vektoru makromolekulárním řetězcem nosiče a vektor se tak může snadněji navázat na receptor cílové buňky.

Obecně, postup přípravy vektorem modifikovaného 2,3-polysacharidu se opírá o využití tzv. biokonjugačních reakcí, zde optimalizovaných pro modifikace 2,3-polysacharidů. V prvním kroku dochází k aktivaci  $-COOH$  skupiny vektoru pomocí 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karboimidu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) a následné amidační reakci s aminoskupinou spaceru ( $NH_2-PEG-COOH$ ). Ve druhém kroku je pomocí EDC selektivně aktivována karboxylová skupina spaceru za přítomnosti DMAP (4-dimethylaminopyridin) jako katalyzátoru a dochází k esterifikační reakci s hydroxylovou skupinou 2,3-dikarboxypolysacharidu. Pro přímé navázání se lze karboxylovou skupinou vektoru rovnou aktivovat pomocí EDC a v přítomnosti DMAP nechat reagovat s 2,3-dikarboxypolysacharidem.

Celý postup je detailně popsán na příkladu kyseliny listové navázané přes modifikovaný polyethylenglykol  $NH_2-PEG-COOH$  k  $-OH$  skupině 2,3-dikarboxycelulózy (DCC), označované jako F-DCC. Selektivní oxidace hydroxylových skupin polysacharidů na uhlíkových atomech C2 a C3 má za následek substituci téměř výhradně na uhlíku C6. Dochází tak k minimálnímu ovlivnění množství přenášeného léčiva.

Kyselina listová byla při syntéze F-DCC rozpuštěna v suchém DMSO, smíchána s 1 molárním ekvivalentem NHS a aktivována přidávkem EDC. S ohledem na přítomnost dvou  $-COOH$  skupin ve folátu bylo vhodné předejít vzniku vedlejších produktů snížením molárního ekvivalentu EDC vůči substrátu na 0,95 či méně a prodloužit dobu reakce na 6 hodin. Bylo tak dosaženo vyšší čistoty meziprojektu výměnou za drobné snížení výtěžku. Pokud by byla v cílové molekule přítomna jen jedna karboxylová skupina, bylo by vhodné použít větší množství EDC (nejlépe  $>1.2$  ekvivalent) a kratší dobu aktivace. Aktivovaný folát byl následně vysrážen směsí acetonu a etheru 1 : 3, zfiltrován, promyt, vysušen a čistý produkt znovu rozpuštěn v suchém DMSO. K reakční směsi byl přidán 0,95 molární ekvivalent  $NH_2-PEG-COOH$  o vhodné  $M_w$  a směs byla jemně míchána při 40 °C po dobu 18 hodin za nepřístupu světla pod inertní dusíkovou atmosférou. Následně pak byla reakční směs dialyzována pomocí membrány s molecular-weight cut-off, MWCO, 1,5 kDa vůči destilované vodě. Výsledný produkt (F-PEG) byl získán lyofilizací.

F-PEG byl následně rozpuštěn v suchém pyridinu a aktivován pomocí 0,95 ekvivalentu EDC po dobu 24 hodin a do reakční směsi byl následně přidán DMAP (4-dimethylaminopyridin) jako katalyzátor esterifikačních reakcí (molární poměr EDC : DMAP se může pohybovat v rozmezí 10 : 1 až 100 : 1) a 2,3-dikarboxycelulóza rozpuštěná v suchém DMSO. Molární poměr F-PEG :

5 DCC závisí na požadovaném stupni substituce. Vliv folátu na biologickou efektivitu nosiče byl zaznamenán už při 5% a nižší substituci. Reakce byla ukončena po 24 hodinách přidáním vody. Následovala dialýza (MWCO 14 kDa), během které byl odstraněn nezreagovaný F-PEG, a lyofilizace. Zastoupení folátu ve výsledném materiálu lze stanovit pomocí UV/VIS spektroskopie.

## Příklad 6

*Příprava konjugátů s komplexy přechodných kovů na příkladu konjugátu cisplatiny s DCC a F-DCC*

Obecně se 2,3-dikarboxypolysacharid o zvolené  $M_w$  rozpustí v destilované vodě a za stálého míchání se k němu po kapkách přidává roztok biologicky aktivního komplexu přechodného kovu, obsahující minimálně jeden snadno odstupující ligand.

Je-li labilita odstupujícího ligandu dostatečná, reakce probíhá spontánně. Poměr reaktantů závisí na požadovaném množství přenášené látky a ovlivňuje také rychlost jejího počátečního uvolňování. Typicky se může jednat o hmotnostní poměry látka : nosiče od 1 : 100 až po 10 : 1.

Reakční směs byla poté šetrně míchána za nepřístupu světla. Pro dosažení kvantitativního průběhu reakce je možné prodloužit reakční dobu až na 96 hodin. Reakci lze provádět při teplotě mezi 0 až 50 °C v závislosti na reaktivitě léčiva. Snížením teploty je možné zabránit nežádoucímu vysrážení produktů, ke kterému dochází kvůli přesycení řetězců nosiče v důsledku příliš vysoké reaktivity léčiva a nerovnoměrného průběhu reakce.

V případě nízké lability odstupujících ligandů je možné léčivo aktivovat, a to buď jejich eliminací ligandů, či jejich substitucí za labilnější. Jsou-li odstupujícími ligandy halogenidy, je možné použít aktivaci pomocí dusičnanu stříbrného. Po filtraci/centrifugaci vysrážené stříbrné soli je roztok aktivovaného komplexu smíchán s roztokem nosiče, jak je popsáno výše. Po ukončení reakce jsou nenavázané komplexy odstraněny dialýzou.

Doba dialýzy by měla odpovídat 4 až 8 násobku doby, za kterou přes dialyzační membránu projde nenavázaná látka. Typicky se jedná o 2 až 4 hodiny. Delší doba dialýzy vede ke zbytečným ztrátám, zatímco kratší doba nezaručuje dostatečně vysokou čistotu konjugátu.

Celý proces přípravy nosiče a konjugátu dekorovaného folátem je schematicky znázorněn na obr. 3 na příkladu DCC a cisplatiny.

Vodný roztok cisplatiny (2mg/ml) byl za laboratorní teploty a stálého míchání postupně přidáván k rozpuštěnému DCC nebo F-DCC (2mg/ml) a reakční směs byla za nepřístupu světla míchána 72 hodin. Po uplynutí této doby byl roztok dialyzován po dobu 4 hodin vůči destilované vodě (MWCO membrány 3,5 kDa) a následně lyofilizován. Reakce byly prováděny s DCC o  $M_w$  18 a 76 kDa a F-DCC o  $M_w$  18 kDa. Testovaný poměr reaktantů (CP : DCC) se pohyboval mezi 4 : 10 až 12 : 10 (28 až 55 % hmot.). Tvorba konjugátu (CPDCC) byla sledována pomocí infračervené spektroskopie ve vzdálené oblasti (FIR),  $^{13}C$  a  $^{195}Pt$  NMR spektroskopie a rentgenové fluorescenční spektroskopie (XRF). Ve FIR spektrech došlo během konjugace k zániku pásů při 315 a 323  $cm^{-1}$  odpovídajících Cl-Pt-Cl vibracím cisplatiny, za současného vzniku pásů při 338 a 387  $cm^{-1}$ , které odpovídají O-Pt-O vibracím. Ve  $^{13}C$  NMR spektrech se tvorba konjugátu projevila vznikem širokého signálu karboxylových skupin při 175.3 ppm, který byl přiřazen uhlíkům C2 a C3 nesoucím navázaný cisplatinový zbytek. Bidentátní koordinace CP byla pak doložena  $^{195}Pt$  NMR spektry, ve kterých došlo během konjugace k posunu signálu cisplatiny z -2149 ppm na -1605 ppm, tedy do oblasti, kde typicky rezonují čtvercově planární komplexy platiny koordinované dvojicí atomů dusíku a dvojicí atomů kyslíku.

Model předpokládané struktury konjugátu, optimalizované za pomoci teorie funkcionálu hustoty (DFT) s využitím PBE0 funkcionálu a tzv. split-valence bazového setu, je znázorněn na obr. 4.

Množství cisplatiny navázané v konjugátu bylo stanoveno pomocí XRF spektroskopie. Efektivita navázání cisplatiny neklesla pod 90 % ani při poměru reaktantů 12:10. Efektivita navázání cisplatiny jako funkce poměru reaktantů je znázorněna na obr. 5a.

Dále je možné v závislosti na obsahu cisplatinu a střední molekulové hmotnosti ( $M_w$ ) nosiče řídit rychlost uvolňování aktivní látky v rozsahu od  $<10\%/24\text{ h}$  až do  $>70\%/24\text{ h}$ . Vybrané příklady jsou znázorněny na obr. 5b. Rychlost uvolňování cisplatinu byla sledována následujícím způsobem: 20 mg CPDCC o různé molekulové hmotnosti a obsahu cisplatinu bylo rozpuštěno při 37 °C v 5 ml fosfátového pufru (PBS) o pH 7,4 nebo 5,5 a dialyzováno proti 95 ml stejného média (MWCO membrány 3,5kDa). V určených časových intervalech byly odebrány alikvotní vzorky (5 ml) a obsah platiny v nich byl analyzován pomocí XRF. Po každém odběru bylo přidáno 5 ml PBS pro zachování konstantního objemu.

Jednoduchou modifikací syntézy tak lze připravit materiál s dlouhodobým a téměř lineárním průběhem uvolňování aktivní látky (nosič o  $M_w > 70\text{ kDa}$ , poměr CP : DCC od 1:10 do 6 : 10), stejně tak systém s vysokou rychlostí počátečního uvolňování (nosič o  $M_w < 25\text{ kDa}$ , vysoký obsah přenášené látky, poměr CP : DCC od 6 : 10). Rychlost uvolňování je také závislá na pH, např. v případě CPDCC s  $M_w 76\text{ kDa}$  se po 8 h při pH 5,5 uvolní téměř dvojnásobek aktivní látky než při pH 7,4 (viz obr. 5b). To přispívá k lepšímu cílení léčiva a snížení vedlejších účinků, jelikož se aktivní látka může uvolňovat v kyselém mikroprostředí tumorů o poznání rychleji než v jiných tkáních.

#### Příklad 7

##### *Příprava konjugátu phenanthriplatinu s DCC a F-DCC*

Phenanthriplatin, *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(phenanthridin)Cl]NO<sub>3</sub>, PhPt, byla rozpuštěna ve vodě při 0 °C (0,8 mg/ml) a pozvolna přikapávána do roztoku DCC (0 °C, 1 mg/ml). Reakční směs byla za opatrného míchání a bez přístupu světla ponechána v izolované nádobě pozvolna temperovat na laboratorní teplotu po dobu 96 hodin. Roztok byl následně dialyzován a lyofilizován za stejných podmínek jako v případě CP-DCC. Testovaný poměr reaktantů (PhPt : DCC) se pohyboval mezi 2 : 10 až po 8 : 10.

Alternativní způsob přípravy využíval aktivaci PhPt pomocí 0,95 molárního ekvivalentu AgNO<sub>3</sub> při 50 °C po dobu 16 hodin. Roztok byl následně zchlazen na 0 °C, vysrážený AgCl separován pomocí filtrace a centrifugace a roztok obsahující aktivovaný PhPt<sup>2+</sup> použit pro přípravu konjugátu (PhDCC), jak je popsáno výše. Tento postup byl použit i pro přípravu konjugátu s F-DCC ( $M_w 76\text{ kDa}$ ).

Vzniklý konjugát byl charakterizován pomocí <sup>13</sup>C NMR spektroskopie a XRF. Částečně kovalentní charakter konjugace dokládá vznik signálu C2 a C3 karboxylových skupin nesoucích PhPt<sup>2+</sup> při 171 ppm. Efektivita vázání PhPt na DCC je o něco nižší než u bidentátně vázané cisplatinu, ale stále dosahuje vysokých 87 % při reakčním poměru 4 : 10 a 77 % při poměru 8 : 10 (PhPt : DCC).

Rychlost uvolňování aktivní látky závisí v tomto případě kromě množství přenášené látky a molární hmotnosti nosiče také na způsobu přípravy konjugátu (viz obr. 6). Zatímco z konjugátu připraveného přímou reakcí PhPt s DCC se během první hodiny uvolní přes 20 % aktivní látky, u konjugátu připraveného pomocí aktivace AgNO<sub>3</sub> jsou to pouhá 3 %, pravděpodobně kvůli vyššímu zastoupení kovalentně vázané PhPt<sup>2+</sup> v konjugátu připraveném aktivací AgNO<sub>3</sub>. Opožděné uvolňování léčiva přináší potenciál pro snížení vedlejších účinků, protože je omezeno jeho předčasné uvolňování mimo cílovou tkáň.

#### Příklad 8

##### *Příprava konjugátu RAPTA-C s DCC*

Komplex RAPTA-C, Ru<sup>II</sup> komplex reprezentující neplatínová protirakovinná léčiva (viz strukturální vzorec a model předpokládané struktury na obr. 7), nese chloridové ligandy navzájem svírající úhel Cl-Ru-Cl  $\approx 90^\circ$  (*cis* orientace) a ve vzájemné vzdálenosti Cl – Cl 3.3 Å, podobně jako je tomu u cisplatinu. Ligandy se tedy nacházejí v ideální pozici pro substituci karboxylovými skupinami nosiče.

S ohledem na obecně vyšší reaktivitu komplexů ruthenia byl konjugát DCC a RAPTA-C, R-DCC připraven za snížené teploty a za stejných podmínek jako v případě PhDCC, s využitím nižšího vstupního poměru reaktantů 4 : 10 (RAPTA-C : DCC).

Množství navázaného ruthenia bylo stanoveno pomocí XRF analýzy. Efektivita reakce dosahovala 80 %. Uvolňování RAPTA-C komplexu z R-DCC je rychlejší než v případě cisplatinu (85 %/24 h), což je způsobeno vyšší lability vazeb Ru-O.

### Příklad 9

#### *Biologické testy - In vitro studie*

Biologické testy byly provedeny *in vitro* na řadě buněčných linií reprezentující zdravé tkáň, primární a metastatické nádorové buňky. Cytotoxicita testovaných látek vůči jednotlivým buněčným liniím byla stanovena pomocí metabolické testu MTT. Ten je založen na principu redukce tetrazoliové soli MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) mitochondriálními reduktázami na nerozpustný barevný formazan. Po rozpuštění formazanu v organickém rozpouštědle je možno spektrofotometricky kvantifikovat buněčnou viabilitu, neboť ke konverzi MTT na formazan dochází pouze v metabolicky aktivních, tedy živých buňkách.

Zdravé tkáň jsou reprezentovány liniemi NIH/3T3 (myší embryonální fibroblasty), HFF (lidské fibroblasty) a PNT1A (zdravé prostatické buňky). Primární lidské nádorové linie: A2780 (ovariální karcinom), A2780/CP (ovariální karcinom rezistentní vůči cisplatině), A549 (plicní karcinom), 22RV1 (prostatický karcinom). Metastatické nádorové linie: H1299 (plicní), PC-3 (prostatické). Folátem značené konjugáty byly navíc testovány na myši 4T1 a lidské MCF-7 prsní nádorové linii.

S ohledem na pozvolné uvolňování léčiva byla doba inkubace během MTT prodloužena na 48 hodin, výjimku tvoří folátem značené nosiče, u nichž se aktivní biologické cílení projevilo vyšší efektivitou již po 24 hodinách. Uvedené koncentrace odpovídají koncentraci podaného či přenášeného léčiva, které inhibuje viabilitu buněk z 50 % (IC<sub>50</sub>).

#### *Testování DCC (připravené podle příkladu 2) a CP-DCC (připraveného podle příkladu 6)*

Samotná DCC byla necytotoxická v celém rozsahu testovaných koncentrací, a to jak u zdravých, tak nádorových linií, bez ohledu na jeho molekulovou hmotnost či stupeň oxidace. Výsledky prezentované v Tabulce 1 byly získány pro DCC o M<sub>w</sub> 18 kDa. Terapeutické koncentrace konjugátu CP-DCC (M<sub>w</sub> nosiče 18 kDa, 44 hm. % CP) a volné cisplatinu (CP) jsou řádově nižší (Tabulka 1). Vliv cytotoxicity nosiče je tak v reálném systému zanedbatelný.

*Tabulka 1: Hodnoty IC<sub>50</sub> pro čistou DCC (M<sub>w</sub> = 18 kDa), volnou cisplatinu (CP) a konjugát cisplatinu a DCC (CP-DCC, M<sub>w</sub> nosiče 18 kDa, 44 hm. % CP) na zdravých (NIH/3T3, HFF, PNT1A) primárních nádorových (A2780, A2780/CP, A549) a metastatických (H1299, 22RV1) buněčných liniích.*

Linie	DCC	CP	CP-DCC
NIH/3T3	>500	12.0	105.0



<i>HFF</i>	>300	70.0	190.0
<i>PNT1A</i>	>500	5.0	14.7
<i>A2780</i>	>500	9.4	20.4
<i>A2780/CP</i>	>500	4.7	9.3
<i>A549</i>	>500	32.1	52.4
<i>PC-3</i>	>500	20.5	17.5
<i>H1299</i>	>500	53.4	66.9
<i>22RV1</i>	>500	8.0	11.3

5 Cytotoxicita CP-DCC vůči zdravým buňkám je 3 až 9x nižší (3-9x vyšší inhibiční koncentrace,  $IC_{50}$ ) než je tomu u volné CP. Naopak cytotoxicita CP-DCC vůči primárním a metastatickým nádorovým buněčným liniím je v průměru pouze o 40 % nižší než u volné CP. V některých případech (linie PC-3, Tabulka 1) je dokonce mírně vyšší. O 40 % nižší cytotoxicita koresponduje s rychlostí uvolňování léčiva z konjugátu, která v tomto případě dosahuje 60 až 70 % za 48 hodin (viz obr. 5b).

10 Ze získaných dat lze vyvodit, že v případě ekvitoxické dávky CP-DCC dosáhne výrazně vyšší cytotoxicity vůči nádorovým buňkám, než je tomu u volné cisplatinu.

*Testování PhPt a Ph-DCC (připraveného podle příkladu 7)*

15 Hodnoty  $IC_{50}$  vůči zdravým buňkám pro PhPt a Ph-DCC ( $M_w$  nosiče 76 kDa, 26 hm. % PhPt) jsou přibližně srovnatelné, Ph-DCC je ovšem v průměru efektivnější vůči nádorovým liniím než volné PhPt. V případě linie A549 je  $IC_{50}$  Ph-DCC dokonce několikanásobně nižší, viz Tabulka 1. Vyšší účinnost Ph-DCC v porovnání s volným léčivem, tedy opačný trend než v případě CP a CP-DCC, koreluje s rychlejším uvolňováním aktivní látky z Ph-DCC v porovnání s CP-DCC, viz  
20 obr. 5b a 6.

25 *Tabulka 2: Hodnoty  $IC_{50}$  pro volnou phenanthriplatinu (PhPt), konjugát phenanthriplatinu a DCC (Ph-DCC,  $M_w$  nosiče 76 kDa, 26 hm. % PhPt) na zdravých (NIH/3T3, PNT1A), primárních nádorových (A2780, A2780/CP, A549) a metastatických (22RV1) nádorových buněčných liniích.*

<b>Linie</b>	<b>PhPt</b>	<b>Ph-DCC</b>
<i>NIH/3T3</i>	>10	>10
<i>PNT1A</i>	3.3	2.4
<i>A2780</i>	1	1
<i>A2780/CP</i>	1.8	2.6
<i>A549</i>	2.4	0.4
<i>22RV1</i>	2	1.8

*Testování F-DCC (přípr. podle příkladu 5), CP-F-DCC (příklad 6) a Ph-F-DCC (příklad 7)*

30 Zvýšení efektivity konjugátů s aktivním cílením (CP-F-DCC a Ph-F-DCC) v porovnání s CP-DCC a Ph-DCC je pozorovatelné na myších (4T1) i lidských (MCF-7) prsních nádorových liniích, viz Tabulka 3. Výhoda aktivního cílení se projevuje již během prvních 24 hodin, kdy dochází v některých případech až k několikanásobnému snížení  $IC_{50}$  v porovnání  
35 s nemodifikovaným konjugátem, viz Tabulka 3.



Tabulka 3: Hodnoty  $IC_{50}$  pro konjugát CP-DCC ( $M_w$  nosiče 18 kDa, 44 hm. % CP) a jeho folátem dekorovaný ekvivalent CP-F-DCC. Ph-DCC ( $M_w$  nosiče 76 kDa, 26 hm. % PhPt) a jeho folátem dekorovaný ekvivalent Ph-F-DCC, na myších (4T1) a lidských (MCF-7) prsních nádorových liniích.

Linie	$IC_{50}$ (24 h)	
	CP-DCC	CP-F-DCC
4T1	45.7	31.6
MCF-7	42.2	36.7
Linie	Ph-DCC	Ph-F-DCC
4T1	>10	3.7
MCF-7	1.3	3.6

5

### *In vivo experimenty*

*In vivo* testování CP a konjugátu CP-DCC ( $M_w$  nosiče 18 kDa, 44 hm.% CP) bylo provedeno podle experimentálního plánu schváleného Etickou komisí na ochranu zvířat (Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno) na 10 samicích athymických myší Nu/Nu o váze 19,7 až 25,9 g a stáří 8 týdnů. Indukce nádorů byla provedena s.c. injekcí buněk karcinomu ovaria A2780 v interskapulární oblasti (200  $\mu$ l,  $5 \cdot 10^6$  buněk/myš v 100 ml PBS). Po 25 dnech od indukce, kdy nádory dosáhly průměrné velikosti cca 6 x 6 mm, byly myším dvakrát týdně i.v. administrovány CP a konjugát CP-DCC o koncentraci 1,5 mg/ml a 3 mg/ml (v tomto pořadí) v 200  $\mu$ l fyziologického roztoku, což odpovídá stejné výsledné koncentraci účinné látky.

Na základě log-rank testu (viz obr. 8) byl zjištěn statisticky významný rozdíl v přežívání mezi skupinami, kterým byla administrována CP, a nebo CP-DCC ( $p = 0.008$ ). Doba přežití u myší léčených CP-DCC byla výrazně delší než v případě těch, kterým byla administrována volná CP (viz obr. 8).

Na obr. 8 je znázorněna univariální křivka přežití myší léčených CP (modrá barva) a CP-DCC (červená barva,  $M_w$  nosiče 18 kDa, 44 hm. % CP). Multivariální analýza byla provedena s užitím Coxova proporcionálního rizikového modelu.

25

### *Stanovení distribuce platiny v nádoru*

Distribuce platiny v nádorové tkáni byla stanovena s použitím LA-ICP-MS systému UP 213 (NewWave, USA), který se skládá z Q-Switch Nd:YAG laseru o vlnové délce 213 nm a širce pulzu 4,2 nm a z pohyblivé ablační cely (SeperCell™, promývací čas 1.04 s). Ablace materiálu byla provedena v heliové atmosféře s průtokem 1,0 l/min do kvadrupólu ICP-MS 7500ce (Agilent Technologies, Japonsko) vybaveným kolizní celou v módu He (2,3 ml/min) za účelem minimalizace možných polyatomických interferencí a kvadrupólovým analyzátozem. Argon byl přimíchán ještě před vstupem do ICP plamene (0,6 l/min). Bylo sledováno zastoupení izotopu platiny  $^{195}\text{Pt}$ , integrační čas 0,3 s. S přihlédnutím k velikosti vzorku byl průměr laserového paprsku nastaven na 100  $\mu$ m a skenovací rychlost na 200  $\mu$ m/s. Parametry laserového paprsku jako "fluence" a "laser repetition rate" byly nastaveny na 8 J/cm<sup>2</sup> a 10 Hz, v tomto pořadí.

Heatmapy na obr. 9 ilustrují relativní distribuci platiny (lokální koncentrace platiny) v nádorové tkáni myší, kterým byla administrována CP (obr. 9a) nebo CP-DCC (obr. 9b).

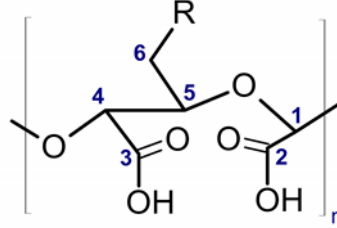
Stanovená barevná škála odpovídá průměrné koncentraci platiny ( $\mu$ g/g) a má rozsah 0-18  $\mu$ g/g (obr. 9a) a 0-25  $\mu$ g/g (obr. 9b). V případě myší, kterým byla administrována CP, tedy dosahovala koncentrace platiny v maximech pouze 18  $\mu$ g/g, zatímco u myší, léčených CP-DCC, byla akumulace výrazně vyšší, až 25  $\mu$ g/g. Konjugace CP na DCC tedy výrazně zvyšuje akumulaci platiny v nádorové tkáni.

45

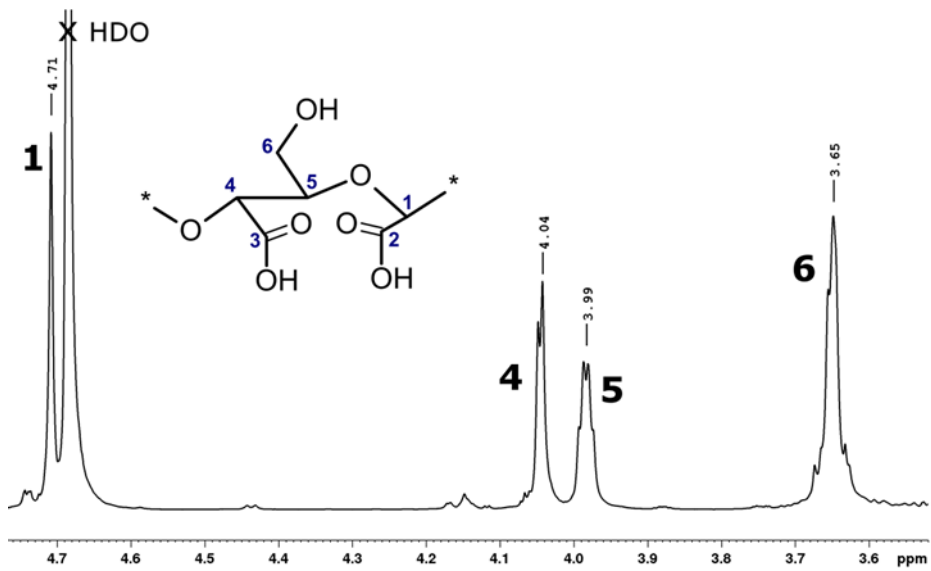
## PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Způsob přípravy selektivně oxidovaných polysacharidů jako nosičů protinádorových léčiv, zejména pro terapii a diagnostiku nádorových onemocnění prostaty, vaječníků, dělohy, plic, hlavy a krku, který spočívá v tom že u polysacharidu s alespoň jedním pyranózovým cyklem nesoucím hydroxylové skupiny v poloze 2 a 3 v základní strukturní jednotce se tyto hydroxylové skupiny alespoň částečně selektivně oxidují v prvním stupni na aldehydy působením jodistanu alkalického kovu za vzniku dialdehydu polysacharidu a následně pak ve druhém stupni na karboxyly působením chloritanu alkalického kovu v prostředí kyseliny octové za vzniku dikarboxypolysacharidu **vyznačující se tím** že pro úplnou konverzi na aldehydy je třeba použít molární poměr jodistanu alkalického kovu ku polysacharidu 1,0 – 1,5 : 1 a dobu reakce v rozmezí 24 až 72 hodin v závislosti na vlastnostech vstupního celulóзовého materiálu, jako je krystalinita, velikost částic atd. a pro následnou kvantitativní konverzi na karboxyly je pak třeba použít molární poměr modifikovaného polysacharidu ku chloritanu alkalického kovu a ku kyselině octové 1 : 2 : 1 až 1 : 8 : 4 a dobu reakce alespoň 7 hodin, případně alespoň 3,5 hodiny, pokud je rovněž přítomna kyselina amidosulfonová, kterou je před započítáním druhého stupně oxidace nutné přidat do reakční směsi pro přípravu materiálů o nižší molekulové hmotnosti než je molekulová hmotnost výchozího polysacharidu za současného zachování stupně polydisperzity, jelikož je střední molekulová hmotnost ( $M_w$ ) výsledného produktu nepřímo závislá na jejím molárním množství v reakční směsi, a dále že po skončení oxidačních reakcí se reakční směs dialyzuje proti destilované vodě, titruje roztokem alkalického hydroxidu na neutrální pH a výsledný roztok sodné soli 2,3-dikarboxypolysacharidu se přefiltruje a lyofilizuje.
- 10 25 2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že pro navázání biologicky či diagnosticky aktivní látky na nosič prostřednictvím spaceru se připravený 2,3-dikarboxypolysacharid modifikuje biokonjugací reakcí, při níž nejprve dochází k aktivaci –COOH skupiny vektoru pomocí karboimidu jako je EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karboimidu) a NHS (N-hydroxysukcinimidu) a následnou amidační reakcí s aminoskupinou spaceru (NH<sub>2</sub>-PEG-COOH), s tím, že molární poměr jednotlivých látek je vektor : EDC : NHS : spacer 1 : 1 : 1 : 1 až 1 : 10 : 1 : 10, pokud vektor obsahuje jedinou –COOH skupinu nebo 1 : 0.1 : 1 : 0.1 až 1 : 0.99 : 1 : 0.99, obsahuje-li vektor více –COOH skupin, načež je pak ve druhém kroku –COOH skupina spaceru nesoucího vektor opět aktivována pomocí karboimidu (EDC), a za přítomnosti DMAP (4-dimethylaminopyridinu) jako katalyzátoru (EDC : DMAP 10 : 1 až 100 : 1) dochází k esterifikační reakci s hydroxylovou skupinou 2,3-dikarboxypolysacharidu.
- 30 35 3. Způsob podle nároku 1 a 2, **vyznačující se tím**, že pro přímé navázání biologicky či diagnosticky aktivní látky obsahující –COOH skupinu na polysacharid se tato –COOH skupina aktivuje pomocí karboimidu (EDC), a za přítomnosti DMAP (4-dimethylaminopyridinu) jako katalyzátoru dochází k esterifikační reakci s hydroxylovou skupinou 2,3-dikarboxypolysacharidu.
- 40 45 4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že polysacharidem je celulóza, amylóza, škrob, pektin, dextrin, dextrans, xanthan, nebo kyselý polysacharid jako je kyselina hyaluronová, karboxymethylcelulóza, karboxymethyldextrans, chondroitin nebo alginát.
- 50 55 5. Konjugát s říditelnou rychlostí uvolňování léčiva, vysokou efektivitou vázání nad 70% a s přenosovou kapacitou léčiva až 80 % hmot., **vyznačující se tím**, že obsahuje nosič vyrobený způsobem podle nároků 1 až 4 a na něm vázanou aktivní látku, již je protinádorové léčivo založené na přechodných kovech, zejména na bázi bidentátně vázaných sloučenin platiny typu R<sub>2</sub>Pt<sup>II</sup>X<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>Pt<sup>IV</sup>X<sub>2</sub>L<sub>2</sub>, komplexů ruthenia typu [Ru(aren)L<sub>x</sub>(PTA)<sub>y</sub>], či monodentátně vázaných látek typu [R<sub>3</sub>Pt<sup>II</sup>X]Y, s tím, že řízení rychlosti uvolňování je dosaženo využitím nosiče o různé molekulové hmotnosti, a to i nižší než má výchozí polysacharid, a použitím různého hmotnostního poměru mezi léčivem a nosičem v rozmezí 1:100 až 10:1 během přípravy.

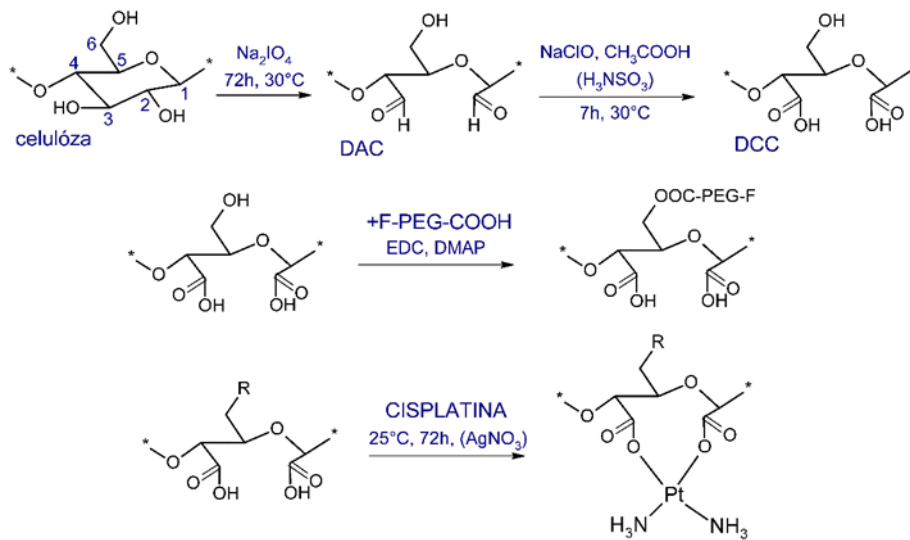
3 výkresy



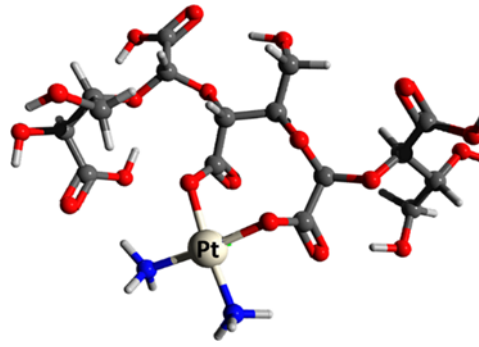
Obr. 1



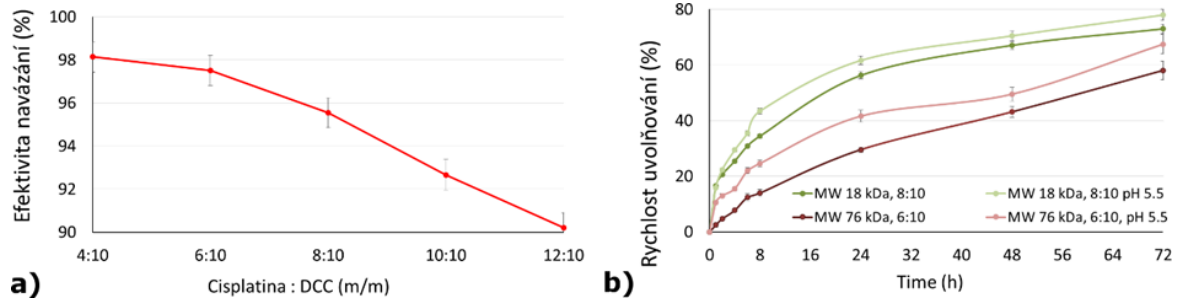
Obr. 2



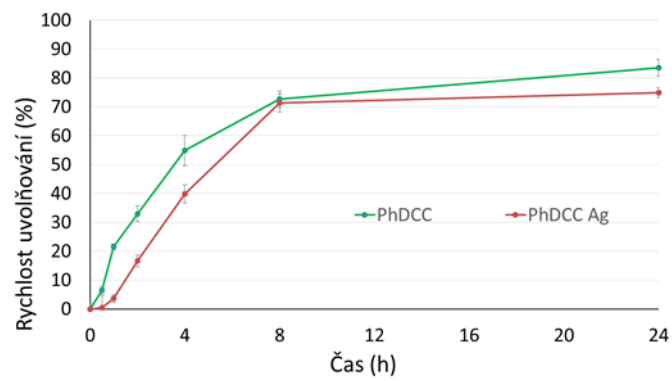
Obr. 3



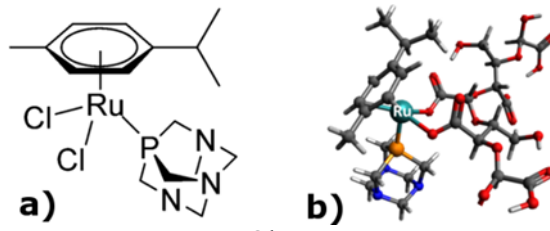
Obr. 4



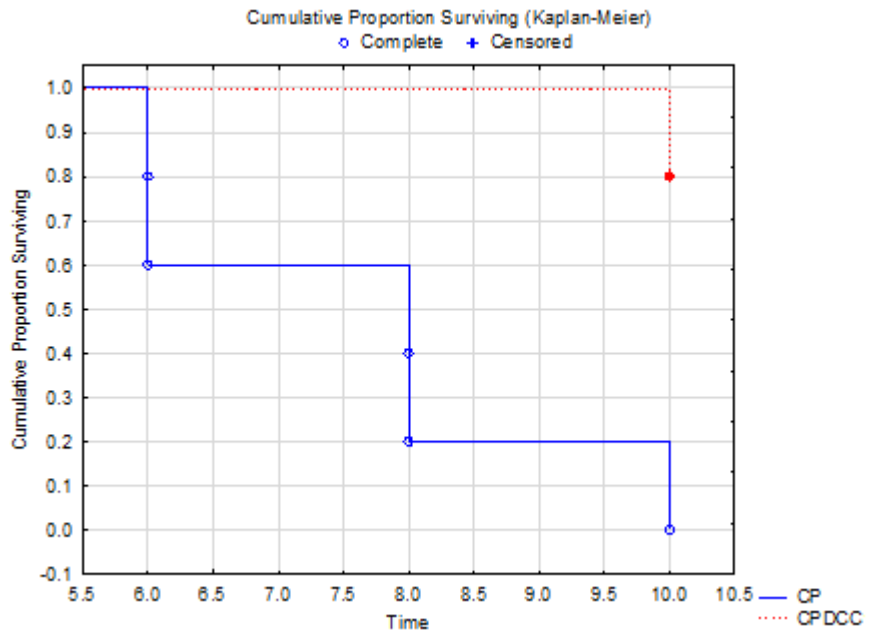
Obr. 5



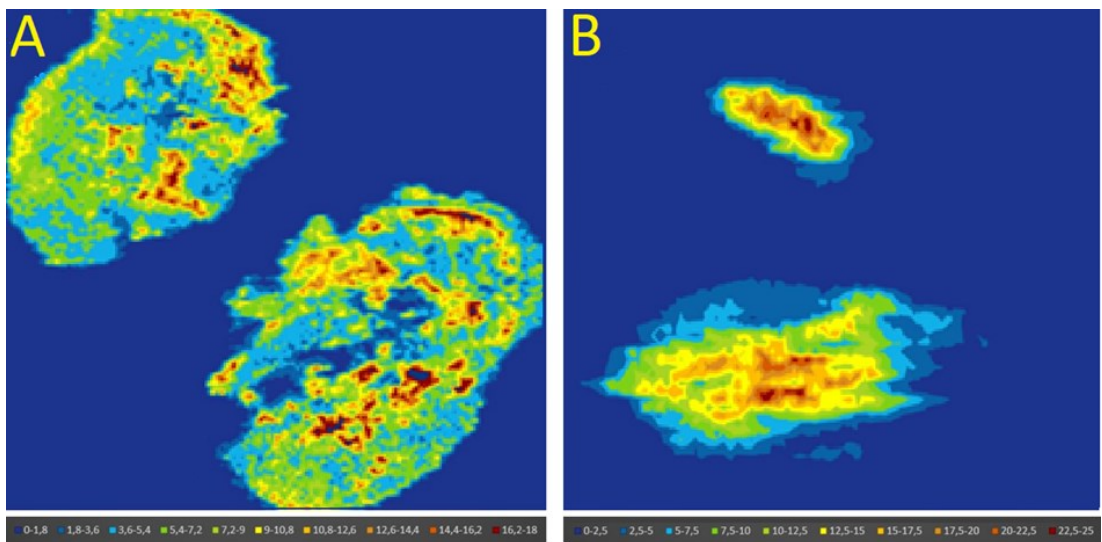
Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9