

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



Dizertační práce

**IMUNOPROTEKTIVNÍ VLASTNOSTI
POLYMERNÍCH CYTOSTATIK
IMMUNOPROTECTIVE CHARACTER
OF POLYMER CYTOTOXIC DRUGS**

RNDr. Milada Šírová

Školitelka: prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.

Sektor imunologie a gnotobiologie

Mikrobiologický ústav

Akademie věd České republiky

Praha, květen 2010

DOKTORSKÉ STUDIJNÍ PROGRAMY V BIOMEDICÍNĚ

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
A AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

PROGRAM: IMUNOLOGIE

PŘEDSEDA OBOROVÉ RADY: DOC. RNDR. VLADIMÍR HOLÁŇ, DRSc.

ŠKOLICÍ PRACoviŠTĚ: MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV AVČR, v. v. i.

AUTOR: MILADA ŠÍROVÁ

ŠKOLITEL: PROF. RNDR. BLANKA ŘÍHOVÁ, DRSc.

ŠKOLITEL KONSULTANT (BYL-LI): NE

S DISERTACÍ JE MOŽNO SE SEZNÁMIT NA DĚKANÁTĚ
PŘÍRODOVĚDECKÉ FAKULTY UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

OBSAH

I. ÚVOD	3
I.1. Cílená léčba nádorových onemocnění.....	3
I.2. Nízkomolekulární protinádorová léčiva	3
I. 3. Léčiva směřovaná ligandem	4
I. 3. 1. Protilátky.....	4
I. 4. Vysokomolekulární systémy pro dopravu léčiv	5
I. 4. 1. Nanoterapeutika pro pasivní akumulaci	5
I. 4. 2. Vodorozpuštěné polymery jako nosiče protinádorových léčiv.....	6
I. 4.2. 1. Konjugáty polymeru s proteinem	6
I. 4. 2. 2. Konjugáty polymeru a léčiva	7
I. 5. Polymerní léčiva na bázi HPMA.....	7
I. 5. 1. Nesměrované konjugáty na bázi HPMA.....	8
I. 5. 2. Směřované konjugáty na bázi HPMA	8
II. CÍLE PRÁCE.....	8
III. METODY.....	9
IV. VÝSLEDKY A DISKUSE	9
IV. 1. Aktivace imunitních mechanismů u pacientek léčených konjugátem na bázi HPMA s navázaným doxorubicinem a obsahujícím lidský intravenózní imunoglobulin	9
IV. 2. Protinádorový efekt konjugátu Dox ^{AM} -PHPMA-HuIg u nádorového modelu EL4 lymfomu.....	11
IV. 3. Preklinický vývoj polymerních terapeutik na bázi HPMA s pH-kontrolovanou vazbou Dox.....	12
IV. 4. Protinádorová aktivita polymerních proléčiv s pH-kontrolovaným uvolňováním léčiva, obsahujících paklitaxel nebo docetaxel	15
V. ZÁVĚRY	16
VI. POUŽITÁ LITERATURA.....	31
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ SE VZTAHEM K DIZERTAČNÍ PRÁCI	35

CONTENTS

I. INTRODUCTION	18
I. 1. Targeted therapy of cancer.....	18
I. 2. Low-molecular weight anticancer drugs.....	18
I. 3. Ligand-targeted therapies	19
I. 3. 1. Antibodies	19
I. 4. High-molecular-weight delivery systems	20
I. 4. 1. Nanosized devices for passive drug targeting	20
I. 4. 2. Water-soluble polymers as carriers for anti-cancer drugs	20
I. 4. 2. 1. Polymer-protein conjugates	21
I. 4. 2. 2. Polymer-drug conjugates.....	22
I. 5. HPMA copolymer-bound drugs	22
I. 5. 1. Non-targeted HPMA copolymer conjugates	23
I. 5. 2. Targeted HPMA copolymer conjugates.....	23
II. AIMS OF THE STUDY	23
III. METHODS	23
IV. RESULTS AND DISCUSSION.....	24
IV. 1. Activation of immune mechanisms in patients treated with HPMA copolymer-bound doxorubicin conjugate containing human intravenous immunoglobulin	24
IV. 2. Anti-cancer effect of Dox ^{AM} -PHPMA-HuIg conjugate in a model of murine T cell lymphoma.....	25
IV. 3. Preclinical development of HPMA-based polymer therapeutics with pH-controlled release of Dox	27
IV. 4. Anti-cancer activity of polymer prodrugs with pH-controlled drug release, containing paclitaxel or docetaxel	29
V. CONCLUSIONS	30
VI. REFERENCES.....	31
VII. LIST OF PUBLICATIONS RELATING TO THE THESIS	35

I. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou obecným problémem všude na světě. V ekonomicky rozvinutých zemích představují druhou nejzávažnější příčinu smrti po kardiovaskulárních onemocněních, a počet onkologicky nemocných pacientů roste s rostoucím průměrným věkem obyvatelstva.

Základními prostředky léčby nádorů je kombinace chirurgické léčby, ozařování a chemoterapie. Zatímco chirurgické zásahy a ozařování jsou relativně přesné a lze jimi dosáhnout odstranění nádoru v daném místě, chemoterapie působí systémově. Při vhodné kombinaci a načasování těchto tří způsobů léčby lze dosáhnout úplného vyléčení velmi podstatné části nemocných s hematologickými malignitami, a v menší, ovšem stále významné míře i vyléčení různých typů solidních nádorů.

Většina cytostaticky/cytotoxicky působících léčiv, které se dnes běžně používají, působí na intenzivně se dělící buňky. Tento neselektivní charakter chemoterapeutik má za následek zvýšenou toxicitu vůči normálním rychle proliferujícím buňkám. To znamená, že tato léčiva je nutné používat v suboptimálních dávkách, a to vede k vývoji (mnohočetné) resistance vůči lékům, metastatickému šíření nádoru, a nakonec až k selhání léčby. K tomu, aby se dosáhlo lepších výsledků léčby je třeba vyvinout nové léčebné strategie. Vývoj se ubírá zhruba třemi směry. Za prvé, sofistikovaný výzkum genomu a proteomu je schopen vyhledávat nové vhodné molekulární cíle specifické pro nádory. Za druhé, vytvářejí se systémy dopravující léčiva (drug delivery systems) buď tak, aby se dosáhlo přesnější „dopravy“ léčiva do zvolených cílových tkání a buněk a naopak se snížila koncentrace léčiva v místech potenciálního poškození (normálních tkání), nebo aby se dosáhlo koncentrace léčiva dostatečně vysoké pro vyvolání léčebného efektu v příslušné lokalizaci po delší dobu. Zatřetí, velká pozornost je věnována vypracovávání strategií, které posílí protinádorovou odpověď imunitního systému.

I.1. Cílená léčba nádorových onemocnění

Cílenou léčbou se rozumí takové strategie léčby, které jsou založeny na rozdílech mezi buňkami nádorovými a normálními („molekulární cíle léčby“), nebo na rozdílech mezi zdravými tkáněmi a tkáněmi s maligním procesem. Cílená léčba využívá několik typů léčiv a strategií a) malé molekuly blokující enzymy působící pouze v nádorových buňkách b) cílená – směřovaná léčiva s využitím specifického ligandu c) vysokomolekulární systémy pro dopravu léčiv.

I.2. Nízkomolekulární protinádorová léčiva

Reprezentantem tohoto typu léčiv je imatinib mesylát (Gleevec/Glivec), selektivně působící kompetitivní inhibitor BCR-ABL tyrozin kinázy, která

je konstitutivně aktivována v nádorových buňkách chronické myeloidní leukémie (CML), Klinické využití imatinibu významně zlepšilo výsledky léčby pacientů s CML, jelikož u většiny z nich (90 %) lze dosáhnout úplné hematologické remise [1]. I přesto se ale u některých pacientů objevují mutace *BCR-ABL* genu, takže imatinib se přestane vázat na tyrozin kinázu. Byla vyvinuta nová generace inhibitorů, jako např. nilotinib a dasatinib, které se mohou vázat i na některé mutované formy tyrozin kinázy, a vyvolávají lepší léčebný efekt [2].

Další nízkomolekulární léčiva působí cíleně na receptor pro epidermální růstový faktor (rodina EGFR), např. gefitinib a erlotinib, oba inhibitory aktivního místa tyrozin kinázy EGFR/ErbB1/Her1. lapatinib je inhibitor působící na dva cíle, EGFR/ErbB1/Her1 a ErbB2/Her2/Neu.

U naprosté většiny nádorových onemocnění se ovšem vyskytují četné abnormality, které by bylo potřeba najednou postihnout léčbou tak, aby bylo dosaženo významného léčebného účinku. Je velmi málo pravděpodobné, že léčiva (jako je imatinib mesylát), která jsou specificky cílena vůči produktu jednoho (nádorově specifického) genu budou významněji účinná v léčbě více typů nádorových onemocnění.

I. 3. Léčiva směřovaná ligandem

Léčiva směřovaná za pomoci ligandu neboli aktivně směřovaná léčiva zakládají svůj účinek na rozdíl v expresi cílových molekul mezi nádorovými a normálními buňkami. Ligand nebo protilátka (tedy směrovací struktura) se specificky váže na příslušnou strukturu přítomnou na nádorové buňce. To znamená, že takováto směřovaná terapie může vést ke zvýšenému selektivnímu efektu protinádorových léčiv. Prvními takto využívanými směrovacími strukturami byly protilátky, ale využívají se i další proteiny, lektiny, peptidy nebo aptamery.

I. 3. 1. PROTILÁTKY

Od té doby, kdy Köhler a Milstein popsali monoklonální protilátky (mAb) [3], je k dispozici již značný počet protilátek specifických vůči „nádorově specifickým“ antigenům (exprimovaným pouze na nádorových buňkách), nebo vůči „nádorově asociovaným“ antigenům (které jsou většinou exprimovány i na normálních buňkách, a jejich exprese u nádorové populace buněk je buď patologicky zvýšena, nebo deregulována).

Počáteční potíže vyplývající z imunogenicity myších mAb podávaných lidem (zejména tvorba lidských anti-myších protilátek, HAMA), a snížená schopnost myších mAb spouštět na protilátkách závislé efektorové mechanismy v lidských buňkách (tj. na protilátkách závislá cytotoxicita, ADCC, nebo komplementem zprostředkovaná cytotoxicita, CDC) byly v podstatě

vyřešeny vývojem chimerických, humanizovaných a plně lidských protilátek [4]. Nyní se v praxi využívá už přes 20 terapeutických mAb, mnohé z nich v léčbě maligních onemocnění. Jako příklady můžeme jmenovat rituximab (anti-CD20), trastuzumab (anti-ErbB2/Her2/Neu) cetuximab (anti-), nebo bevacizumab (anti-VEGF). Výhodou použití terapeutických protilátek je možná synergie s chemoterapií, takže léčba může postihovat nádorové buňky dvěma nezávislými prostředky.

Ab reagující s molekulami přítomnými na nádorových buňkách lze konjugovat nebo fúzovat na úrovni DNA s různými dalšími molekulami a získat tak produkty s dalšími funkcemi. Takové „vyzbrojené“ Ab mohou vyvolávat lepší léčebnou odezvu než původní „nevyzbrojené“ Ab.

- Imunotoxiny jsou konjugáty sestávající z molekuly (subjednotky) vysoce účinného toxinu a internalizující Ab, nebo jiného ligandu (např. cytokinu)
- Konjugáty protilátek s léčivem (imunokonjugáty) většinou využívají léčivo s vysokou cytotoxicitou, které je navázáno na molekulu Ab nebo její fragment
- Radioimunoterapie používá konjugáty Ab s vhodným radionuklidem, takže cílové buňky jsou zabíjeny radioaktivním zářením
- Protilátkami řízená terapie využívající enzym a proléčivo (antibody-directed enzyme-prodrug therapy, ADEPT) je dvoustupňový proces, kdy se nejprve aplikuje konjugát Ab s enzymem, který se hromadí v nádoru, pak se aplikuje nízkomolekulární proléčivo, které je přeměněno v aktivní léčivo účinkem enzymu lokalizovaného v nádoru

I. 4. Vysokomolekulární systémy pro dopravu léčiv

Tyto systémy jsou založeny na rozdílech v biochemických a fyziologických vlastnostech normální a nádorové tkáně. Vyvíjejí se a testují různé systémy pro dopravu nízkomolekulárních léčiv, které buď fyzikálně, nebo (typičtěji) chemicky vážou dané léčivo na nějaký vysokomolekulární nosič.

Vysokomolekulární prostředky pro dopravu léčiv se hromadí v tkáni solidních nádorů díky tzv. EPR (Enhanced Permeability and Retention) efektu, který popsali Matsumura a Maeda [5]. Vaskulatura v nádorech je více propustná pro makromolekuly než je vaskulatura v normálních tkáních. Nádory navíc mají velmi sporou lymfatickou drenáž (nebo téměř chybí). Makromolekuly tedy mohou snadno prostupovat do intersticia v nádorech, ale akumulují se zde, protože nejsou odstraňovány lymfatickými cestami. EPR efekt je závislý na molekulové hmotnosti (M_w) a velikosti daných makromolekul.

I. 4. 1. NANOTERAPEUTIKA PRO PASIVNÍ AKUMULACI

Existuje celá řada vysokomolekulárních systémů, které jsou založeny buď na koloidních partikulích, nebo využívají vodorozpustné polymery jako nosiče léčiv.

Nejčastěji využívanými vysokomolekulárními systémy dopravy léčiv jsou dendrimery, lipozomy, emulze a pevné lipidové nanočástice, dále micely a další spontánně se formující nanočástice, a také polymerní nanočástice.

I. 4. 2. VODOROZPUSTNÉ POLYMERY JAKO NOSIČE PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV

Konjugace léčiv s vysokomolekulárními polymery může být výhodná z několika důvodů:

- Udílí vodorozpuštěnost i léčivům, která mají vysoce hydrofobní charakter. Tím lze dosáhnout vyšší biologické dostupnosti léčiva a vhodné distribuce v organismu.
- Chrání léčivo alespoň dočasné před vazbou na sérové proteiny, před enzymatickým rozštěpením nebo proti odklízecímu efektu. V důsledku toho se významně zvyšuje poločas léčiva v organismu i jeho biologická dostupnost, a zároveň je omezeno vylučování ledvinami
- Polymerní konjugáty se akumulují v solidní nádorové tkáni díky EPR efektu. Navíc lze využít i směrování, protože konjugáty mohou nést také směřující strukturu, která specificky rozpoznává cílovou molekulu na nádorové buňce
- Konjugace významně ovlivňuje kinetiku léčiva v těle. Dosahuje se vyššího nahromadění v žádaném místě (v nádoru) a redukuje se vstup léčiva do normálních tkání. To omezuje nežádoucí systémovou toxicitu příslušného nízkomolekulárního léčiva.
- Konjugace léčiva a nosiče mění také osud léčiva na buněčné úrovni. Většina nízkomolekulárních léčiv vstupuje do buněk rychle (minuty) přes plasmatickou membránu. Polymerní konjugáty se do buněk obvykle dostávají pomaleji endocytickou cestou [6]. Endocytóza může alespoň částečně obejít eflux léčiv zprostředkovaný P-glykoproteinem, a tak se zabraňuje vzniku (mnohočetné) resistance.

Jako nosiče léčiv se využívají přirozeně se vyskytující i syntetické polymery. Syntetické polymery mají ve srovnání s biopolymery některé výhody, jako je např. možnost cíleně ovlivňovat složení a strukturu polymerního nosiče, možnost zavádět různé funkční skupiny, které umožňují navázání léčiva, nebo velmi nízká imunogenicita.

Koncept použití vysokomolekulárních polymerů jako nosičů léčiv navrhl Ringsdorf už v roce 1975 [7]. Od té doby byla vyvinuta a studována celá řada polymerů, nesoucích buď protein, nebo nízkomolekulární léčivo.

I. 4.2. 1. Konjugáty polymeru s proteinem

Do této kategorie spadají dva hlavní typy konjugátů: pegylované proteiny a SMANCS.

- Pegylované proteiny: princip konjugace bílkovin a poly(etylen glykolu) (PEG) popsali v roce 1977 Davis a Abuchowski [8], a od té doby se

používá termínu „pegylace“. Konjugace proteinu a PEGu a) zvyšuje rozpustnost a stabilitu proteinu, redukuje jeho imunogenicitu a antigenicitu b) zabrání rychlému vyloučení malých proteinů renální cestou, u velkých proteinů sníží jejich odstraňování vazbou na receptory v retikuloendoteliálním systému, a c) prodlužuje poločas v plasmě. PEG samotný je netoxický a neimunogenní.

Pegylace se uplatnila u řady peptidů a proteinů, zejména enzymů a cytokinů. Některé jsou využívány v klinické praxi (např. adenosin deamináza, L-asparagináza, interferony, erythropoietin, kolonie-stimulující faktory).

● SMANCS je konjugát neokarcinostatinu (NCS) a poly(styren-*ko*-maleinové kyseliny) (SMA), nazývaný SMANCS [9,10]. Jeho Mw je 16 kDa, ale protože se nekovalentně váže na albumin, chová se jako protein o vysoké Mw kolem 80 kDa. Ve srovnání s NCS má konjugát některé významné farmakologické výhody, zejména prodloužený biologický poločas, zvýšené hromadění v nádorové tkáni, a sníženou systémovou toxicitu. SMANCS byl povolen v Japonsku pro léčbu hepatocelulárního karcinomu [11].

I. 4. 2. 2. Konjugáty polymeru a léčiva

Podobně jako u ostatních vysokomolekulárních systému pro dopravu léčiv, cílem u těchto konjugátů je dosáhnout a) lepšího směřování léčiva do nádorové tkáně, b) redukovat nežádoucí toxicitu tím, že se omezí přístup léčiva do míst možného poškození, a c) překonání mechanismů, které mohou vést k resistenci na léčiva.

Většina těchto až dosud studovaných konjugátů využívala rutinně používaná protinádorová léčiva. Různé konjugáty byly testovány, některé z nich už obdržely povolení pro klinické využití, např. PEG, poloxamer-188, poly(laktid-*ko*-glykolid), PLGA, nebo poly(α -glutamová kyselina), PGA.

I. 5. Polymerní léčiva na bázi HPMA

N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid (HPMA) je jeden z nejvíce prostudovaných syntetických polymerů využívaných jako nosiče léčiv. Homopolymer (HPMA) vyvinul Kopeček se spolupracovníky na Ústavu makromolekulární chemie AVČR [12,13]. Později byly zavedeny do struktury homopolymeru funkční skupiny tak, aby to umožnilo konjugaci polymeru s různými léčivy a také směřujícími strukturami [14]. Spojka GlyPheLeuGly (GFLG) byla vybrána proto, že umožňuje odštěpení léčiva pouze v uvnitř buněk aktivitou lysozomálních proteáz [15,16].

Preklinické testy prokázaly biokompatibilitu homopolymeru (HPMA) i kopolymeru (PHPMA), dále to, že je netoxický a neimunogenní [17]. Podobně jako u pegylace, vazba proteinů na HPMA kopolymer snižuje imunogenicitu příslušného proteinu [18,19]. Studium bio- a imunokompatibility konjugátů

na bázi HPMA bylo od počátku spojeno se jménem B. Říhové – přehled viz. [20].

Pro přípravu polymerních konjugátů na bázi HPMA byla použita už celá řada nízkomolekulárních léčiv, např. chlorin e_6 , derivát elipticinu, puromycin, wortmanin, geldanamycin, camptothecin, metotrexát a jeho deriváty, paklitaxel, 5-fluorouracil, TNP-470, cyklosporin A, a několik léčiv ze skupiny antracyklinů: epirubicin, daunorubicin a doxorubicin.

Polymerní konjugáty na bázi HPMA mohou vázat léčivo buď enzymaticky štěpitelnou (amidickou) vazbou [21,22], nebo pomocí vazby štěpitelné v závislosti na pH [23,24]. Oba typy konjugátů se pasivně akumulují v tkáni solidních nádorů díky EPR efektu. Byly připraveny i konjugáty směrované, a to s amidickou i hydrazonovou (pH-závislou) vazbou léčiva.

I. 5. 1. NESMĚROVANÉ KONJUGÁTY NA BÁZI HPMA

Prvním konjugátem tohoto typu byl konjugát obsahující doxorubicin (Dox) navázaný enzymaticky štěpitelnou vazbou přes GFLG spojku (Dox^{AM}-HPMA, také nazývaný PK1 FCE28068). Konjugát vstoupil do klinického testování, fáze I v roce 1984 [22], a později pokročil ještě do fáze II [25]. Byla prokázána pasivní akumulace v nádoru prostřednictvím EPR efektu [27], a také určitý klinický účinek u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC), kolorektálním a mamárním karcinomem.

Klinicky byly testovány i další konjugáty na bázi HPMA, nesoucí jiná léčiva, např. paklitaxel, camptothecin, nebo platináty.

I. 5. 2. SMĚROVANÉ KONJUGÁTY NA BÁZI HPMA

Konjugáty na bázi HPMA byly postupně připraveny jako specificky směrované různými směrovacími strukturami, jako je galaktosamin, další ligandy které se vážou na nádorové buňky (např. transferin nebo folát), protilátky nebo peptidy.

Galaktosaminem směrovaný konjugát (také označovaný jako PK2; FCE28069) vstoupil do fází I/II klinického testování jako léčivo pro terapii hepatocelulárního karcinomu (galaktosamin se váže na asialoglykoproteinový receptor, který je vysoce exprimován na nádorových buňkách, ale také se vyskytuje na normálních hepatocytech). Nebyla pozorována vyšší akumulace tohoto konjugátu v nádorové tkáni ve srovnání s normální jaterní tkání, a další klinické testování bylo ukončeno.

II. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem studie bylo přispět k vývoji polymerních proléčiv na bázi HPMA určených k léčbě nádorových onemocnění. Tento záměr byl rozdělen do několika dílčích cílů a kroků:

1. Přispět k provedení pilotní klinické studie, do níž byly zahrnuty pacientky s generalizovaným karcinomem mléčné žlázy, zejména testovat aktivitu přirozených zabíječských buněk
2. Prostudovat protinádorovou aktivitu konjugátu Dox^{AM}-PHPMA-HuIg, který byl navržen pro klinickou studii, v experimentálním myším nádorovém modelu
3. Přispět k preklinickému vývoji Dox^{HYD}-PHPMA konjugátů s vazbou léčiva závislou na pH, zejména prostudovat vztah fyzikálně-chemických vlastností konjugátů a protinádorové účinnosti *in vivo*
4. Ověřit protinádorovou účinnost konjugátů na bázi HPMA, které nesou paklitaxel nebo docetaxel navázaný vazbou závislou na pH

III. METODY

Všechny studované konjugáty byly syntetizovány v Laboratoři biomedicínálních polymerů, Ústav makromolekulární chemie AVČR, v.v.i.

Syntéza a charakterizace konjugátů na bázi HPMA byla popsána v několika publikacích - přehled viz. [28,29]. Nový typ konjugátů vázajících paklitaxel (PTX) nebo docetaxel (DTX) jako biologicky aktivní léčivo je popsán v poslední publikaci (sekce IV. 4.).

Základem testování protinádorových účinků konjugátů byly myší modely s využitím transplantovatelných nádorů: T buněčný lymfom EL4 (C57BL/6, *H-2b*, samci i samice), karcinom mléčné žlázy 4T1 (BALB/c, *H-2d*, samice), B buněčný lymfom 38C13 (C3H/He, *H-2y*, samice), a B buněčná leukémie BCL1 (BALB/c, *H-2d*, samice).

Pilotní klinická studie byla započata v roce 2000 a provedena v Praze, ve Fakultní nemocnici v Motole. Proběhla se informovaným písemným souhlasem pacientek. Testování biochemických, hematologických a imunologických markerů (využívaných v klinické praxi) prováděla akreditovaná laboratoř (Agilab, Praha).

Detailní popisy všech metod jsou uvedeny v jednotlivých publikacích, které jsou součástí disertační práce.

IV. VÝSLEDKY A DISKUSE

IV. 1. Aktivace imunitních mechanismů u pacientek léčených konjugátem na bázi HPMA s navázaným doxorubicinem a obsahujícím lidský intravenózní imunoglobulin

Konjugát s lineární polymerní kostrou na bázi HPMA, k níž bylo připojeno léčivo - doxorubicin (Dox), a lidský imunoglobulin (HuIg) prostřednictvím tetrapeptidové spojky GLFG, byl vytvořen se záměrem použít jej pro kli-

nické testování. Jde o vysokomolekulární konjugát (Mw 500 až 100 kDa), pasivně směřovaný do nádorové tkáně EPR efektem [5,30]. Předpokladem bylo, že malá část polymerního konjugátu by mohla být směřována i aktivně, jelikož lidské imunoglobuliny (autologního původu, nebo intravenózní imunoglobulin) mohou obsahovat i takové protilátky, které reagují s antigeny exprimovanými na nádorových buňkách. Experimentální i klinické studie skutečně ukázaly, že samotný intravenózní imunoglobulin může mít protinádorový efekt.

Konjugát byl testován v pilotní klinické studii v Praze u pacientek s generalizovaným karcinomem mléčné žlázy. Podobný konjugát s epirubicinem byl ale v už léčbě použit dříve, a to u jedné pacientky s generalizovaným angiosarkomem v roce 1992.

Klinická studie prokázala, že konjugát Dox^{AM}-PHPMA-HuIg byl v v krevním oběhu stabilní, doba cirkulace byla významně prodloužena, a nebyl imunogenní. Nepozorovali jsme žádnou tvorbu protilátek proti konjugátu ani proti imunoglobulinu samotnému [31]. Podání konjugátu bylo velmi dobře snášeno i po opakovaném podávání (až 5 dávek) všemi pacientkami (dosud 9). Byla zaznamenána částečná klinická odpověď nebo stabilizace nemoci, a tento stav trval po dobu několika měsíců. Kvalita života se u pacientek v důsledku léčby významně zvýšila.

Během léčby jsme monitorovali širokou paletu biochemických, hematologických a imunologických parametrů. Hodoty řady nádorových markerů se posunuly k normálu nebo se úplně dostaly do normálního rozmezí. V průběhu léčby vzrostly počty CD4⁺, CD8⁺, a CD16⁺56⁺ buněk.

Testovali jsme aktivitu přirozených zabíječů (NK) a lymfokiny-aktivovaných zabíječských buněk (LAK). Jako cílové buňky byly použity K562 (citlivé vůči NK), Raji a Daudi (citlivé vůči LAK buňkám). Přizpůsobili jsme metodu JAM testu [32] tak, abchom mohli detekovat NK a LAK aktivitu v malém vzorku nesrážlivé periferní krve. U několika pacientek jsme našli zvýšení NK a LAK aktivity v závislosti na aplikaci léčby, s maximem 3 dny po podání léčby. Tento náález svědčí pro aktivaci imunologických protinádorových mechanismů [31].

Stimulační vliv konjugátu Dox^{AM}-PHPMA-HuIg byl naznačen našimi dřívějšími výsledky, kterými jsme dokumentovali zvýšenou aktivitu NK buněk u athymických myši s lidským metastazujícím kolorektálním karcinomem SW 620 po podání 5 dávek nesměrovaného konjugátu Dox^{AM}-PHPMA (PK1; FCE28068) [33]. Myši léčené konjugátem PK1 měly zpomalený růst nádorů a prodloužené přežití ve srovnání s neléčenými kontrolami, ale léčbou nebylo možno dosáhnout úplného vyléčení. V pozdějších experimentech jsme prokázali, že podmínkou úplného vyléčení je intaktní imunitní systém [34].

Publikace:

Říhová B., Strohalm J., Prausová J., Kubáčková K., Jelínková M., Rozprimová L., Šírová M., Plocová D., Etrych T., Šubr V., Mrkvan T., Kovář M., Ulbrich K. (2003) Cytostatic and immunomobilizing activities of polymer-bound drugs: experimental and clinical data J. Control. Rel. 91: 1-16

Říhová B., Strohalm J., Kubáčková K., Jelínková M., Hovorka, O., Kovář, M., Plocová, D., Šírová, M., Štastný M., Rozprimová L., Ulbrich K. (2002) Acquired and specific immunological mechanisms co-responsible for efficacy of polymer-bound drugs. J. Control. Rel. 78: 97-114

IV. 2. Protinádorový efekt konjugátu Dox^{AM}-PHPMA-HuIg u nádorového modelu EL4 lymfomu

Abychom získali další údaje o protinádorové aktivitě konjugátu Dox^{AM}-PHPMA-HuIg, byla provedena podrobná studie s použitím několika myších nádorových modelů. Předpokládali jsme, že jako hlavní mechanismus se uplatní přímý cytotoxický vliv konjugátu na nádorové buňky, který je umožněn akumulací konjugátu v nádorové tkáni vlivem EPR efektu [5,30].

Konjugát Dox^{AM}-PHPMA-HuIg měl *in vitro* jen mírný cytostatický vliv na nádorové buňky EL4. Nesměrovaný konjugát Dox^{AM}-PHPMA (PK1; FCE28068) byl ještě méně aktivní. Volný Dox inhiboval buněčnou proliferaci při koncentraci o 3 řády nižší než byla koncentrace léčiva vázaného v konjugátech (s obsahem HuIg nebo bez něj) [34].

Naopak, konjugát Dox^{AM}-PHPMA-HuIg měl vysokou protinádorovou aktivitu při léčbě již rozvinutých nádorů EL4 u imunokompetentních myší kmeny C57BL/6 (B/6; *H-2b*). U význaného počtu léčených myší lze dosáhnout úplného vyléčení v závislosti na dávce a režimu léčby. V následujících pokusech jsme využili další syngenní nádorové modely, melanom B16-F10 (B/6; *H-2b*), B buněčný lymfom 38C13 (C57H/He, *H-2y*), a karcinom mléčné žlázy 4T1 (BALB/c, *H-2d*). Při léčbě B lymfomu 38C13 a mamárního karcinomu 4T1 byl protinádorový efekt konjugátu menší než u lymfomu EL4, ale přesto se část myší úplně vyléčila [35]. U melanomu B16-F10 bylo možno dosáhnout významně prodlouženého přežití v důsledku zpomalení růstu nádorů, ale nezaznamenali jsme úplné vyléčení [34].

Kompletní vyléčení nebylo nikdy možné u imunodeficitních nu/nu myší s nádorem EL4, nebo s jinou B buněčnou leukémií BCL1 [36]. Regrese nádorů po léčbě je závislá především na nádorově specifických CD8⁺ buňkách, jak jsme prokázali testem neutralizace nádorových buněk *in vivo* (Winnův test) [34].

Po úplném vyléčení myši po léčbě konjugátem Dox^{AM}-PHPMA-HuIg následuje vývoj dlouhodobé resistance proti danému nádoru, a to u významného počtu vyléčených jedinců. U těchto resistantních myši nevyrostou žádné nádory po podání další letální dávky stejných nádorových buněk, již bez léčby. Podíl resistantních jedinců je v obráceném poměru k efektu léčby prvního nádoru [34]. Stejný vztah byl dokumentován také v případě, kdy byl lymfom EL4 vyléčen podáním konjugátu s pH-citlivou vazbou léčiva [37], i po léčbě nesměrovaným konjugátem Dox^{AM}-PHPMA (PK1) [38]. Resistance byla dokumentována také u dalších nádorových modelů, jako je leukémie BCL1 po léčbě konjugátem směrovaným specifickou protilátkou B1 [36], nebo u metastazujícího mamárního karcinomu 4T1 (Šírová, nepublikováno). Ukazujeme, že resistance je nádorově specifická [3], a její vývoj je závislý na dostatečně velkém kvantu nádorových antigenů [39]. Resistance byla vždy dokumentována jen u myši léčených konjugáty na bázi HPMA, které nepoškozují imunitní systém.

Publikace:

Šírová M., Strohalm J., Šubr V., Plocová D., Rossmann P., Mrkvan T., Ulbrich K., Říhová B. (2007) Treatment with HPMA copolymer-based doxorubicin conjugate containing human immunoglobulin induces long-lasting systemic anti-tumour immunity in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 56: 35-47

IV. 3. Preklinický vývoj polymerních terapeutik na bázi HPMA s pH-kontrolovanou vazbou Dox

Biologické testy ukázaly zásadní rozdíl v mechanismu působení mezi konjugáty, kde je léčivo vázáno amidickou vazbou, a konjugáty s pH-závislou vazbou léčiva. pH-citlivá vazba zajišťuje rychlé uvolnění léčiva při sníženém pH (5-6). Znamená to, že Dox může být uvolňován z polymerního nosiče dokonce extracelulárně v intersticiu nádoru (pH v nádorovém mikroprostředí je nižší než v mikroprostředí normálních tkání), ale především se uvolňuje intracelulárně v pozdních endozómech a lysozómech. Byla prokázána lokalizace Dox do jádra po uvolnění z polymerního nosiče uvnitř buněk [40,41]. Naopak bylo prokázáno, že uvolnění léčiva z polymeru nemusí představovat striktní podmínku aktivity konjugátů na bázi HPMA, kde léčivo je navázáno amidickou vazbou [42-44].

Konjugáty s hydrazonovou vazbou léčiva prokázaly vysokou cytotoxickou aktivitu vůči řadě nádorových linií *in vitro* [24,45,29]. Významné je, že vysoká cytotoxicita byla nalezena i u linie buněk s nízkým počtem lysozómů [46]. Značná protinádorová aktivity byla dokumentována *in vivo* [24,47] u několika

nádorových modelů. Akumulace v nádoru, prodloužená doba cirkulace a T/B poměr (tumor-to blood) zvyšující se s časem svědčí pro to, že konjugát byl pasivně akumulován v nádoru EPR efektem.

V první publikaci ukazujeme, že konjugát Dox^{HXD}-PHPMA může indukovat i úplné vyléčení již rozvinutých nádorů EL4 u významného podílu léčebných myší. Jedna dávka konjugátu (75 mg Dox eq./kg) injikovaná mezi dny 8 a 10 po inokulaci nádorových buněk s.c. navodila kompletní vyléčení u všech myší, a zároveň nebyla zaznamenána žádná nežádoucí toxicita. Specifická protinádorová imunitní odpověď se vyvinula v závislosti na účinnosti léčby. I zde byl dokumentován stejný vztah mezi efektivitou léčby prvního nádoru a podílem resistantních jedinců.

V druhé publikaci prezentujeme vliv modifikace konjugátu přidáním pozitivně nebo negativně nabitých skupin nebo hydrofobního substituentu (oleoyl) do postranních řetězců polymeru [48]. Záměrem bylo získat konjugáty s větším hydrodynamickým poloměrem a proto také vyšší akumulaci v nádorové tkáni. Přítomnost nabitých skupin může způsobit zvětšení hydrodynamického poloměru tak, že konjugát „bobtná“ díky elektrostickým repulsním interakcím, nebo samovolným uspořádáním kratších polymerních řetězců do micel. Obsah nabitých skupin zavedených do polymeru (méně než 8 mol%) byl pravděpodobně příliš nízký na to, aby způsobil významné zvětšení hydrodynamického poloměru. Konjugát obsahující oleoylové skupiny tvořil stabilní micely s úzkou distribucí velikostí.

Všechny tyto konjugáty při všech testovaných koncentracích měly postatně vyšší terapeutickou účinnost než volný Dox. Konjugát s negativně nabitými GFLG skupinami vykazoval mírně vyšší protinádorovou účinnost v modelu EL4 *in vivo* než nemodifikovaný konjugát Dox^{HXD}-PHPMA. U konjugátu tvořícího micely (tj. u konjugátu s oleoylovými skupinami) se projevila nežádoucí toxicita při podání vysoké dávky (1×25 mg Dox eq./kg), a ta byla patrná i při snížené dávce konjugátu (1×15 mg Dox eq./kg).

Další série konjugátů obsahovala hydrofobní substituenty dodecylu, oleoylu a cholesterylu [49]. Tyto konjugáty ve vodě tvořily micely nebo stabilní asociáty s velkým hydrodynamickým poloměrem (R_H až 18 nm), a proto jsme mohli předpokládat lepší akumulaci do nádorové tkáně vlivem EPR efektu [5]. Konjugáty substituované cholesterylovými skupinami spontánně tvořily supramolekulární struktury s největším R_H (9-18 nm). Takový konjugát měl vysoký protinádorový efekt i při snížených dávkách (1×10 a 1×5 mg Dox eq./kg). V důsledku léčby se u vyléčených jedinců vyvinula rezistence proti nádoru stejně, jako to bylo pozorováno při léčbě lineárním konjugátem Dox^{HXD}-PHPMA. Účinnost konjugátu substituovaného cholesterylovými skupinami byla vyšší než účinnost nesubstituovaného konju-

gátu, tento konjugát měl také pomalejší úbytek z krve (blood clearance) než lineární polymerní konjugát, a byla potvrzena i jeho vyšší akumulace v nádoru.

Dále je popsán jiný konjugát na bázi HPMA, přizpůsobený ke zvýšené pasivní akumulaci do nádorové tkáně [50], tvořený polymerní kostrou kopolymeru HPMA, která nese štěpy tvořené podobnými, ovšem semitechelickými polymerními řetězci. Polymerní řetězce vážou Dox hydrazonovou vazbou. U tohoto konjugátu jsme prokázali zvýšenou akumulaci v tumoru, a také zvýšenou účinnost *in vivo* při léčbě nádorů 38C13 a EL4.

V poslední publikaci je popsáno preklinické hodnocení lineárních konjugátů na bázi HPMA s pH-kontrolovaným uvolňováním Dox, s použitím myších modelů [51]. Testovali jsme konjugáty s různým obsahem vázaného léčiva (Dox). Obsah vázaného léčiva je důležitý parametr ve vztahu k účinnosti léčby. Nejvyšší protinádorový efekt byl zaznamenán u konjugátů s obsahem léčiva kolem 10 wt%. Konjugáty s vyšším obsahem vázaného léčiva měly sníženou účinnost *in vivo*. Tato nízká účinnost konjugátů s vysokým obsahem vázaného léčiva (16-22 wt%) se dá vysvětlit nižší biologickou dostupností léčiva *in vivo*, která vyplývá z vyšší hydrofobicity konjugátu.

Prokázali jsme také, že obsah volného Dox, který je pravidelně přítomen v preparátech (obvykle je nižší než 0,2 % celkového obsahu léčiva vázaného v konjugátu) se pohybuje ve zcela bezpečných mezích, protože obsah volného Dox minimálně do 4,6 % neměl žádný vliv na účinnost léčby ani na projevy nespecifické toxicity. Tyto konjugáty indukovaly kompletní vyléčení léčených myší a následný vývoj resistance proti nádoru, stejně, jako to bylo prokázáno dříve. Ani při použití vysoké dávky konjugátu Dox^{HXD}-PHPMA (75 mg Dox eq./kg) nebyla zaznamenána myelosuprese ani poškození orgánů.

Publikace:

Mrkvan T., Šírová M., Etrych T., Chytil P., Strohalm J., Plocová D., Ulbrich K., Říhová B. (2005) Chemotherapy based on HPMA copolymer conjugates with pH-controlled release of doxorubicin triggers anti-tumor immunity. *J. Control. Rel.* 110: 119-129

Chytil P., Etrych T., Koňák Č., Šírová M., Mrkvan T., Říhová B., Ulbrich K. (2006) Properties of copolymer-doxorubicin conjugates with pH-controlled activation. Effect of polymer chain modification. *J. Control. Rel.* 115: 26-36

Chytil P., Etrych T., Koňák Č., Šírová M., Mrkvan T., Bouček J., Říhová B., Ulbrich K. (2008) New HPMA copolymer-based drug carriers with covalently

bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting. J. Control. Rel. 127: 121-130

Etrych T., Chytil P., Mrkvan T., Šírová M., Říhová B., Ulbrich K. (2008) Conjugates of doxorubicin with graft HPMA copolymers for passive tumor targeting. J. Control. Rel. 132: 184-92

Šírová M., Mrkvan T., Etrych T., Chytil P., Rossmann P., Ibrahimová M., Kovář L., Ulbrich K., Říhová B. (2010) Preclinical evaluation of linear HPMA-doxorubicin conjugates with pH-sensitive drug release: anti-tumor efficacy, safety, and immunomodulating activity in murine model. Pharm. Res. 27: 200-208

IV. 4. Protinádorová aktivita polymerních proléčiv s pH-kontrolovaným uvolňováním léčiva, obsahujících paklitaxel nebo docetaxel

Taxany, např. paklitaxel (PTX) a docetaxel (DTX), jsou moderní protinádorová léčiva s vysokou klinickou účinností při léčbě různých typů solidních nádorů i některých hematologických malignit. Hlavní překážkou jejich využití v praxi je velmi nízká rozpustnost ve vodě, a ovšem i systémová toxicita, která je víceméně typické pro nízkomolekulární protinádorová léčiva. Postupně bylo vyvinuto několik vysokomolekulárních systémů pro dopravu těchto léčiv, např. lipozómy, nanočástice, nebo polymerní proléčiva, kde je vyřešen problém nízké vodorozpustnosti [52,53]. Většina těchto systémů ale ukázala jen omezenou terapeutickou účinnost, nebo byl zaznamenán výskyt závažných vedlejších účinků. Paklitaxel připravený ve formě nanočástic s vnějším obalem tvořeným albuminem je povolen pro léčbu metastazujícího karcinomu mléčné žlázy pod názvem Abraxane (ABI-007) od roku 2006 [54].

Popisujeme syntézu, charakterizaci a výsledky základního biologického testování konjugátů obsahujících PTX nebo DTX. Protinádorová účinnost byla testována *in vivo* pomocí syngenních myších nádorových modelů T buněčného lymfomu EL4 a mamárního karcinomu 4T1. Myší nádor 4T1 je považován za vhodný model lidského karcinomu mléčné žlázy, a je charakterizován nízkou imunogenicitou a omezenou léčitelností. Podobně jako konjugáty na bázi HPMA s Dox navázaným pH-sensitivní vazbou, i konjugáty s PTX nebo DTX prokázaly vysokou protinádorovou účinnost *in vivo*. Jejich terapeutický účinek převyšoval efekt dosažitelný podáním příslušného volného léčiva, a přitom nevykazoval závažnější systémovou toxicitu. Významné je, že konjugáty s PTX a DTX indukovaly i kompletní regresi nádoru a vyvolávaly vývoj resistance proti nádoru, tedy ukazovaly stejné cenné vlastnosti typické pro konjugáty na bázi HPMA, které obsahují Dox.

V. ZÁVĚRY

1. Konjugát na bázi HPMA s navázaným doxorubicinem a autologním nebo lidským intravenózním imunoglobulinem byl testován při léčbě pacientek s generalizovaným karcinomem prsu, které nereagovaly na žádnou dostupnou konvenční léčbu. Podání konjugátu se vyznačovalo velmi dobrou snášenlivostí u všech pacientek. Značná část biochemických a imunologických markerů onemocnění, které před léčbou měly patologické hodnoty, vykazala po léčbě zlepšení směrem k normálním hodnotám. Bylo zaznamenáno zlepšení klinického stavu pacientek, a kvalita života během léčby i po ní byla vysoká.

Podání konjugátu Dox^{AM}-PHPMA-HuIg pacientkám v klinické studii vedlo ke zvýšení aktivity NK a LAK v periferní krvi v závislosti na léčbě. Lidský intravenózní imunoglobulin tak ukazuje použitelnost pro pasivní/aktivní směřování konjugátů na bázi HPMA při léčbě různých typů solidních nádorů.

Zvýšená NK aktivita detekovaná v periferní krvi svědčí o aktivaci imunitních odpovědi proti nádoru v důsledku podání konjugátu Dox^{AM}-PHPMA-HuIg.

2. Konjugát Dox^{AM}-PHPMA-HuIg prokázal významnou protinádorovou aktivitu u několika myších nádorových modelů. Konjugát indukuje kompletní regresi již dobře vyvinutých nádorů, v závislosti na dávce a léčebném režimu. Předpokladem úplné regrese nádoru je funkční imunitní systém. U imunokompetentních myší se po léčbě vyvíjí dlouhodobá rezistence proti nádoru. Vývoj rezistence je ve vztahu k použité dávce léčiva a účinnosti léčby. Tato dvojí protinádorová aktivita, tj. přímý protinádorový efekt a vyvíjení rezistence proti nádoru, je pravděpodobně nejdůležitější vlastností léčby konjugátem Dox^{AM}-PHPMA-HuIg.

Tento konjugát je potenciálně využitelný pro léčbu různých typů solidních nádorů. Léčba je účinná, bezpečná, nemá závažnější nežádoucí efekty typické pro nízkomolekulární protinádorové léky, a má pravděpodobně také imunomodulační vliv, který příznivě ovlivňuje výsledek léčby.

3. Preklinické studie biologických vlastností polymerních konjugátů na bázi HPMA, s léčivem navázaným pH-senzitivní vazbou dokládají, že účinná polymerní proléčiva jsou výsledkem racionálních postupů při jejich vývoji. Parametry, jako je obsah navázaného léčiva, Mw konjugátu, substituce postranních řetězců různými skupinami a stabilita vazby kterou je léčivo připojeno k polymerní kostře jsou klíčové a určují fyzikálně chemické parametry, a následně i biologickou aktivitu daného konjugátu. Relativně jednoduchá syntéza konjugátu Dox^{HYD}-PHPMA a jeho významná terapeutická bezpečnost, účinnost, a schopnost indukovat úplné vyléčení již vyvinutých nádorů činí z tohoto konjugátu slibného kandidáta pro klinické testování.

4. Navázání hydrofobních léčiv PTX a DTX na polymerní nosič na bázi HPMA přes hydrazonovou a pH-závislou vazbu vedlo k získání polymerních proléčiv s vynikající rozpustností ve vodě a vodných roztocích. Tyto konjugáty mají přesvědčivou protinádorovou aktivitu u myších nádorových modelů a indukovaly úplnou regresi plně rozvinutých nádorů lymfomu EL4 a mamárního karcinomu 4T1. U obou modelů jsme prokázali vývoj protinádorové resistance, závislý na předešlé léčbě.

Výsledky demonstrují vysokou účinnost, bezpečnost, a imunomodulační kapacitu již dříve prokázanou u různých typů konjugátů na bázi HPMA s navázaným Dox jakožto bioaktivním léčivem. To opět poukazuje na potenciální vynikající použitelnost konjugátů na bázi HPMA při léčbě solidních nádorů.