

*Možnosti použití syntetických
polymerů při vývoji léčiv: od
protinádorové ke genové terapii.*

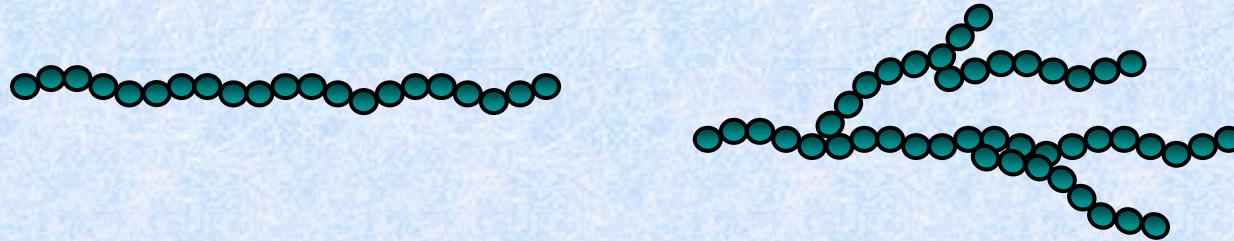
**Projekt je řešen ve spolupráci ÚMCH AV ČR s MBÚ AV ČR,
University of Oxford a Krebsforschungsinstitut Heidelberg**

Obsah přednášky

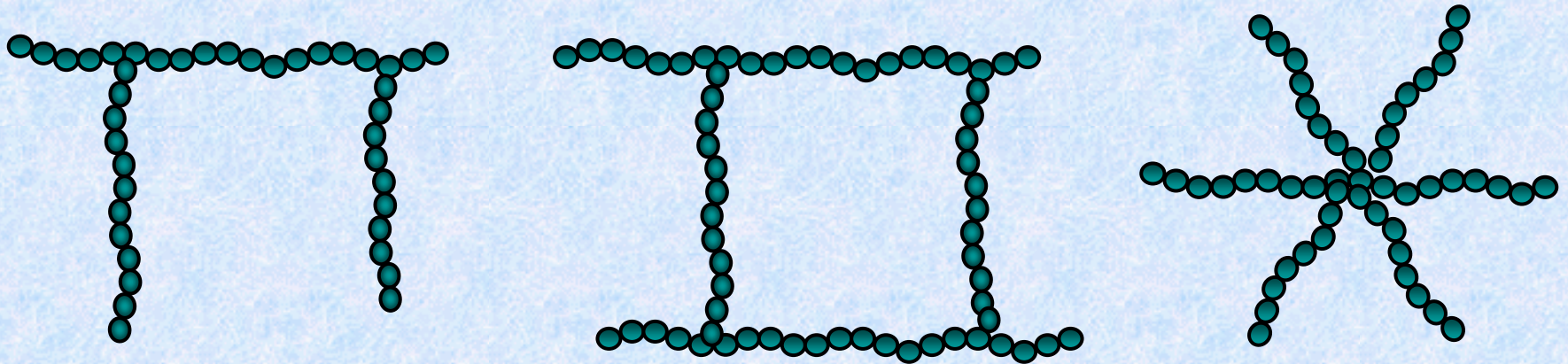
- **Úvod do problematiky polymerních nosičů biologicky aktivních molekul**
- **Polymerní konjugáty nízkomolekulárních léčiv**
- **Polymery pro diagnostiku**
- **Polymery při přípravě vektorů pro genové terapie**
- **Závěr a výhledy**

- **Základní výzkum: Studium vztahu mezi strukturou, fyzikálně-chemickými a biologickými vlastnostmi makromolekul tvoří teoretický základ, ze kterého vycházíme při výběru konkrétní aplikace polymerů ve farmacii - návrhu struktur a syntéze nových generací léčiv (lékových forem)**
- **Co jsou makromolekuly, syntetické polymery, jejich fyzikální a chemická struktura**

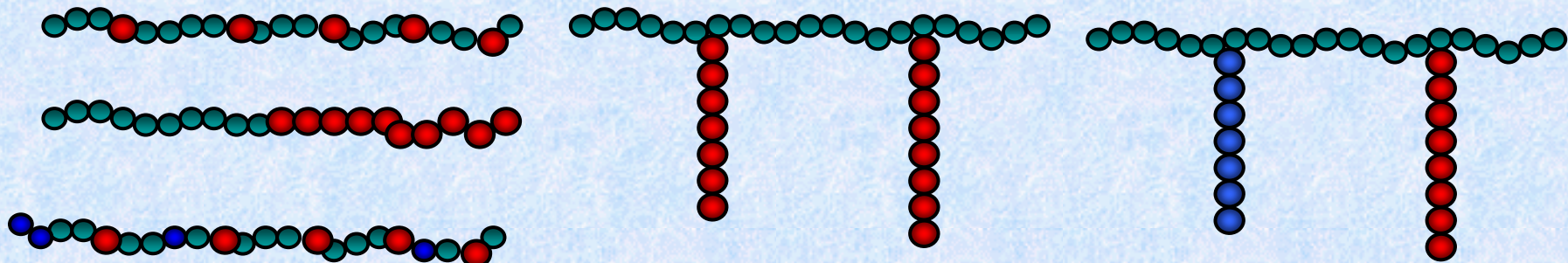
Fyzikální a chemická struktura syntetických polymerů



Lineární a větvená struktura



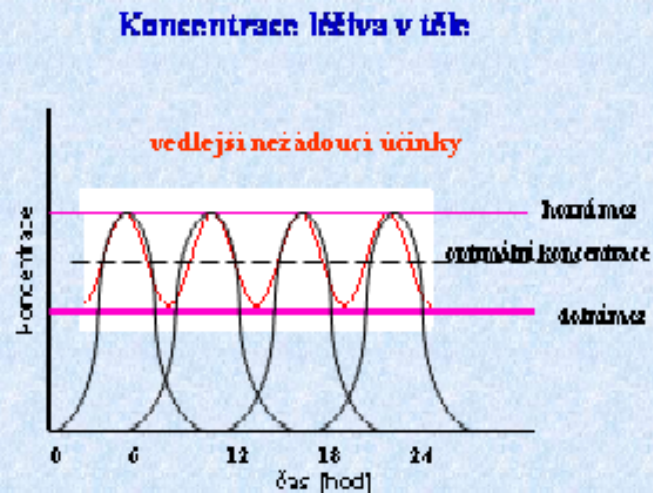
Roubovaná struktura, polymerní síť a hvězdicová struktura makromolekul



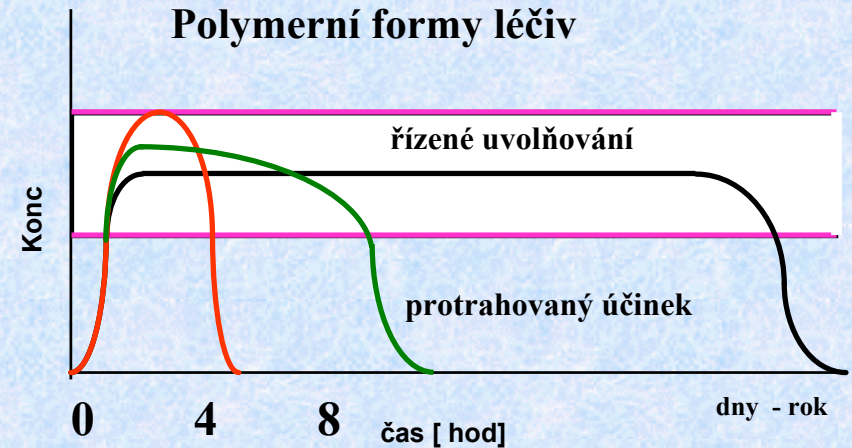
Kopolymery a terpolymery

Proč polymery? Co umožní použití syntetických polymerů při přípravě léčiv a lékových forem?

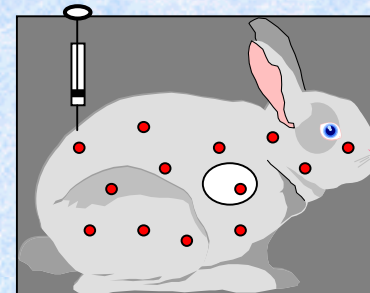
Klasické nízkomolekulární léčivo



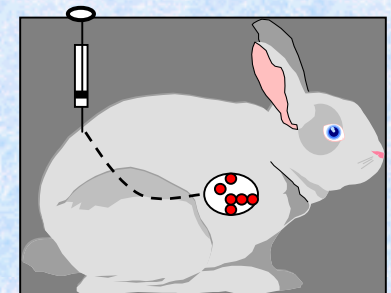
Polymerní formy léčiv



řízené uvolňování



cílený transport



Požadavky na „ideální“ léčivo

- **Biologicky aktivní látka (BAL, léčivo) je v lékové formě neaktivní, bez jakéhokoliv vlivu na organismus (buňky imunitního systému, neukládá se v játrech, není vyloučeno ledvinami)**
- **v této formě je specificky dopraveno do místa požadovaného účinku (orgán, tkáň, buňka)**
- **aktivuje se pouze v místě požadovaného účinku, působí v požadované koncentraci**
- **působí po dobu optimální pro dosažení maximálního léčebného účinku**
- **léčivo, metabolity a všechny komponenty nosičového systému jsou po dosažení efektu eliminovány z organismu**

**Vodorozpuštné polymerní
konjugáty s léčivy, polymerní
diagnostika**

Obecné schéma polymerního léčiva

(H. Ringsdorf, Angewandte Macromolekulare Chemie, 1975)

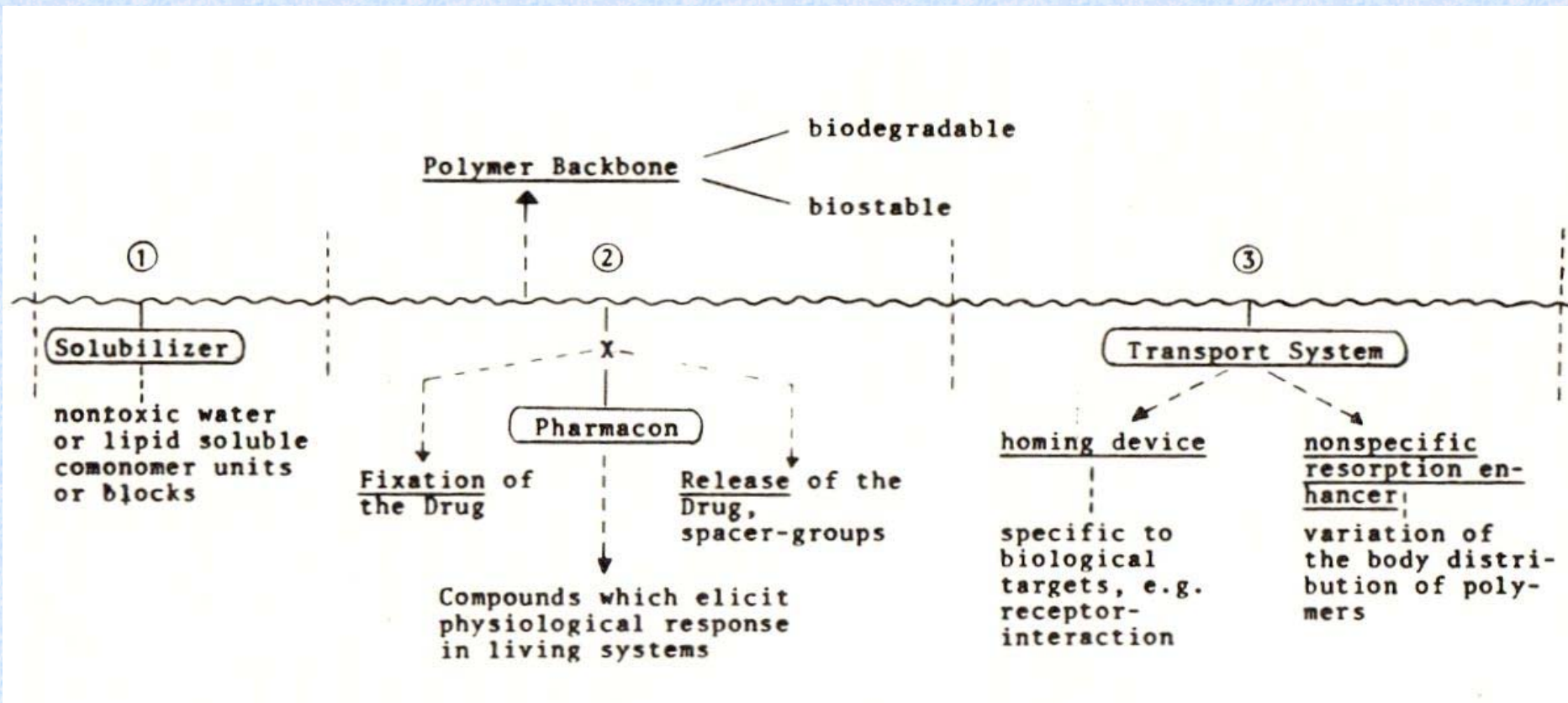
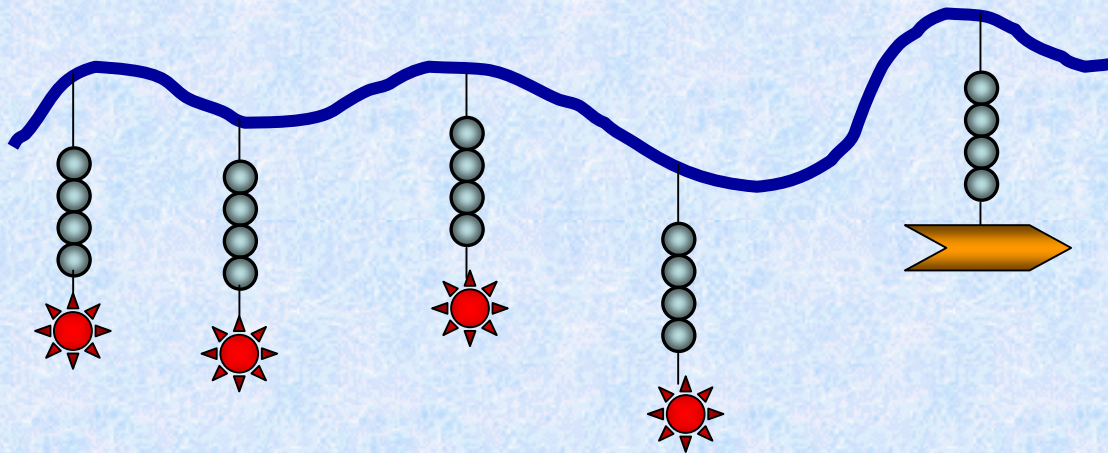


Schéma klasického polymerního léčiva (konkretizovaná struktura navržena J. Kopečkem)



Léčivo (model Nap)

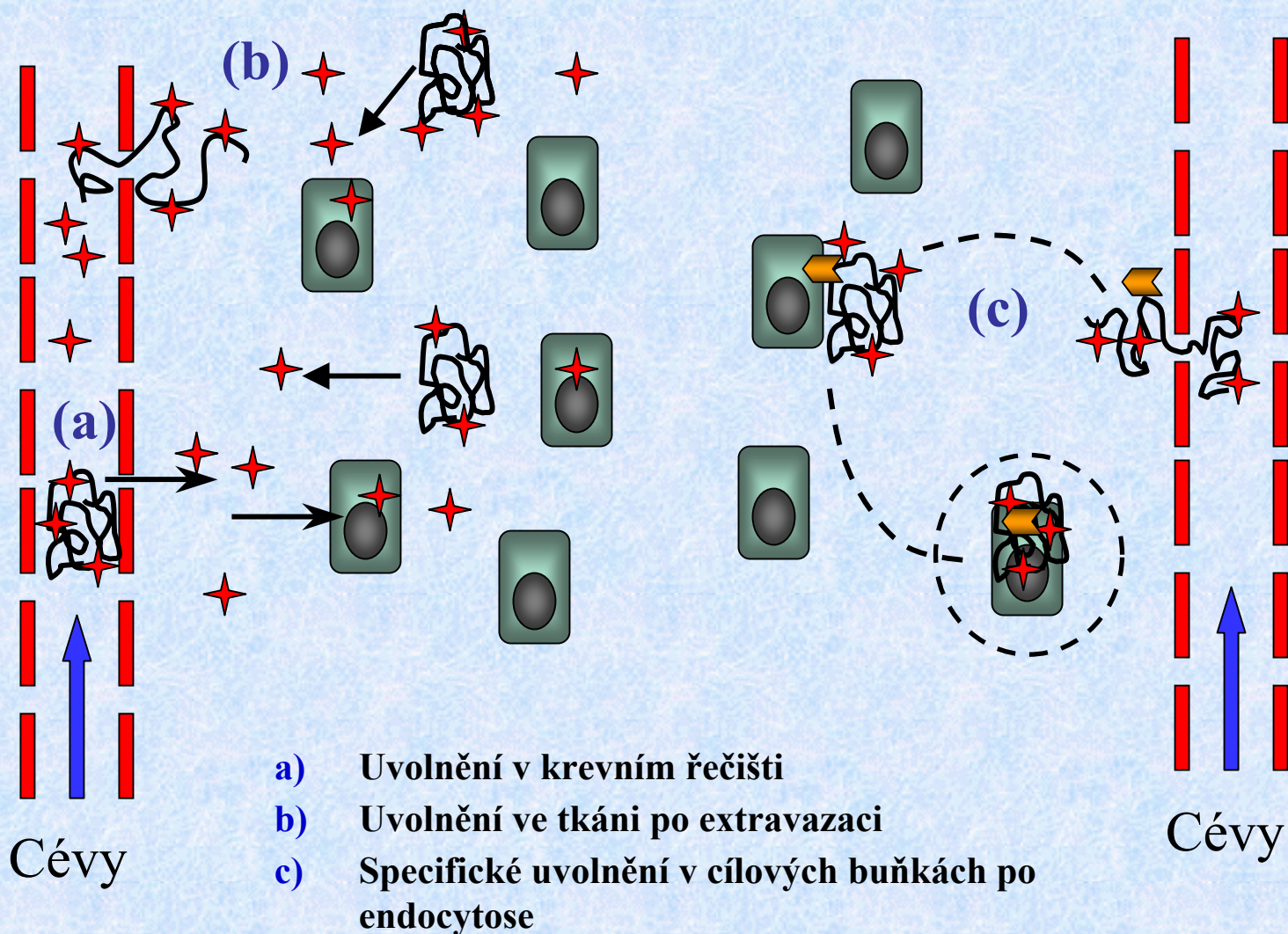


Biodegradovatelná spojka
(fosfát, cukr, oligopeptid,
hydrolyticky štěpitelná spojka)



Směřující struktura: sacharid, lektin, protilátka
(IgG a fragmenty), hormon, specifický oligopeptid

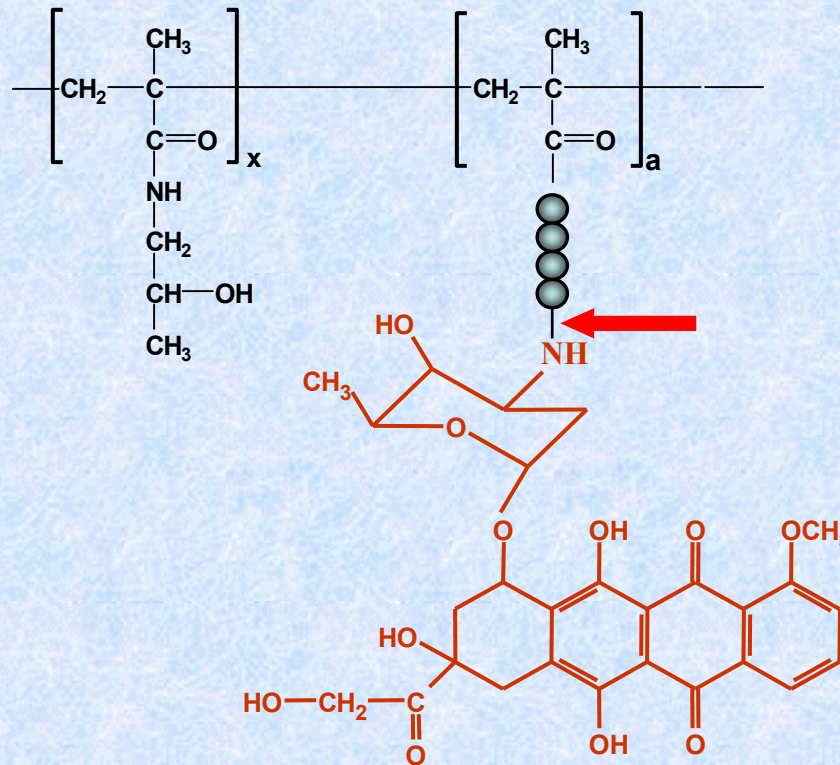
Možnosti uvolňování léčiva z polymerního nosiče



Hlavní požadavky kladené na polymerní nosiče léčiv

- **Stabilita v průběhu transportu = chemická vazba léčiva na nosič**
- **Řízené uvolnění léčiva z nosiče (chemická hydrolýza, enzymolýza)**
- **Cílený transport k nádoru, nádorovým buňkám (pasivní směřování pomocí EPR efektu, aktivní směřování směřující strukturou)**
- **Eliminace nosiče z organismu (degradovatelný nosič, micelární nosič)**

Schéma klasického konjugátu poly(HPMA) s kancerostatikem doxorubicin (enzymatická aktivace léčiva)

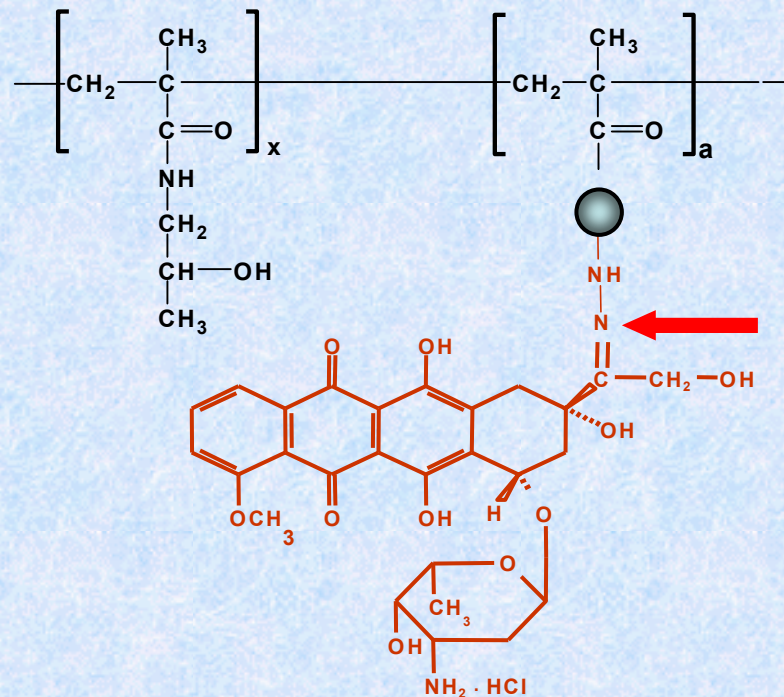


Enzymaticky degradovatelný
oligopeptid: -GlyPheLeuGly-



Místo enzymatického štěpení

Schéma hydrazonového konjugátu poly(HPMA) s kancerostatikem doxorubicin (pH závislá hydrolytická aktivace léčiva)



Jednoduchá vazba nebo spacer

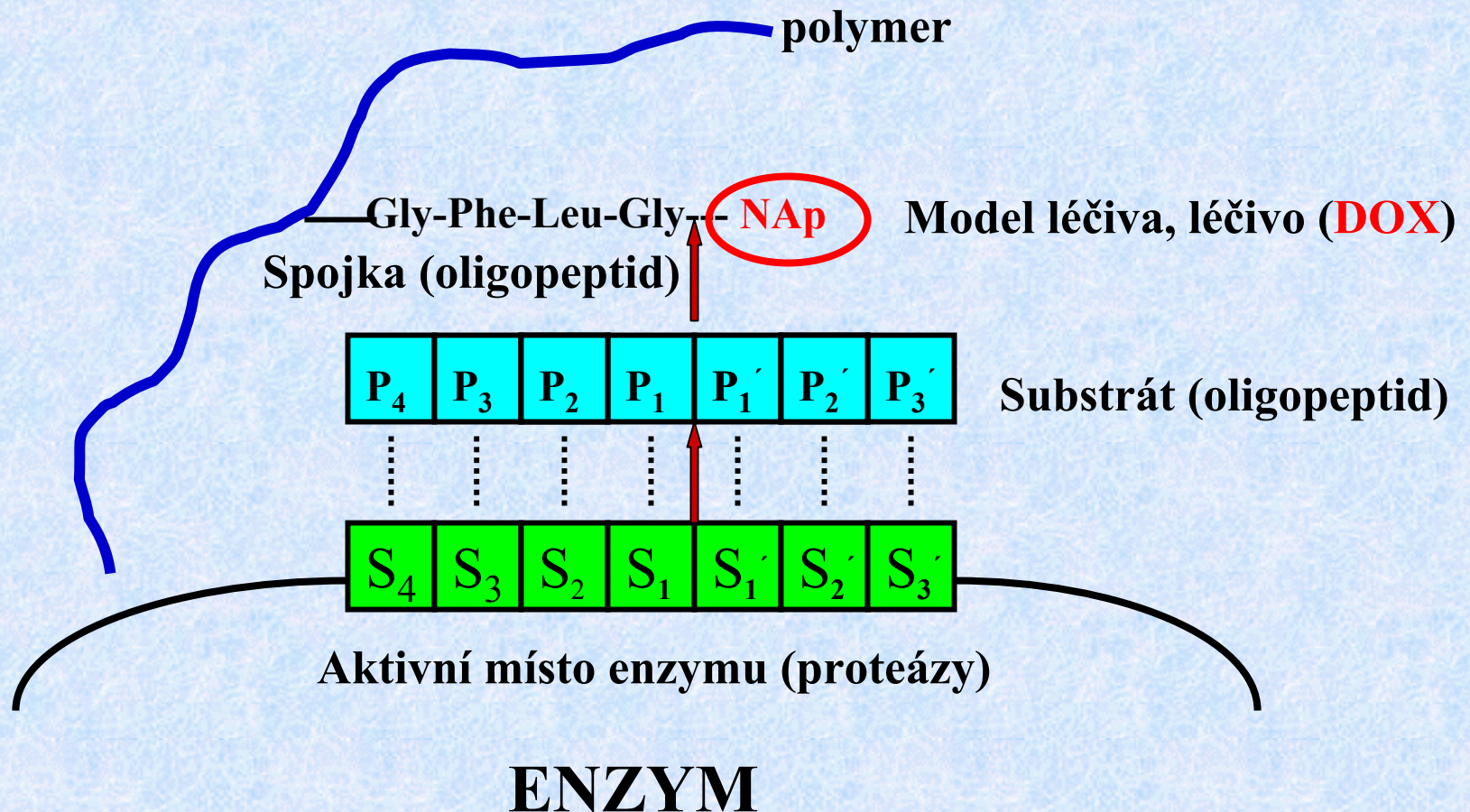


Místo hydrolytického štěpení

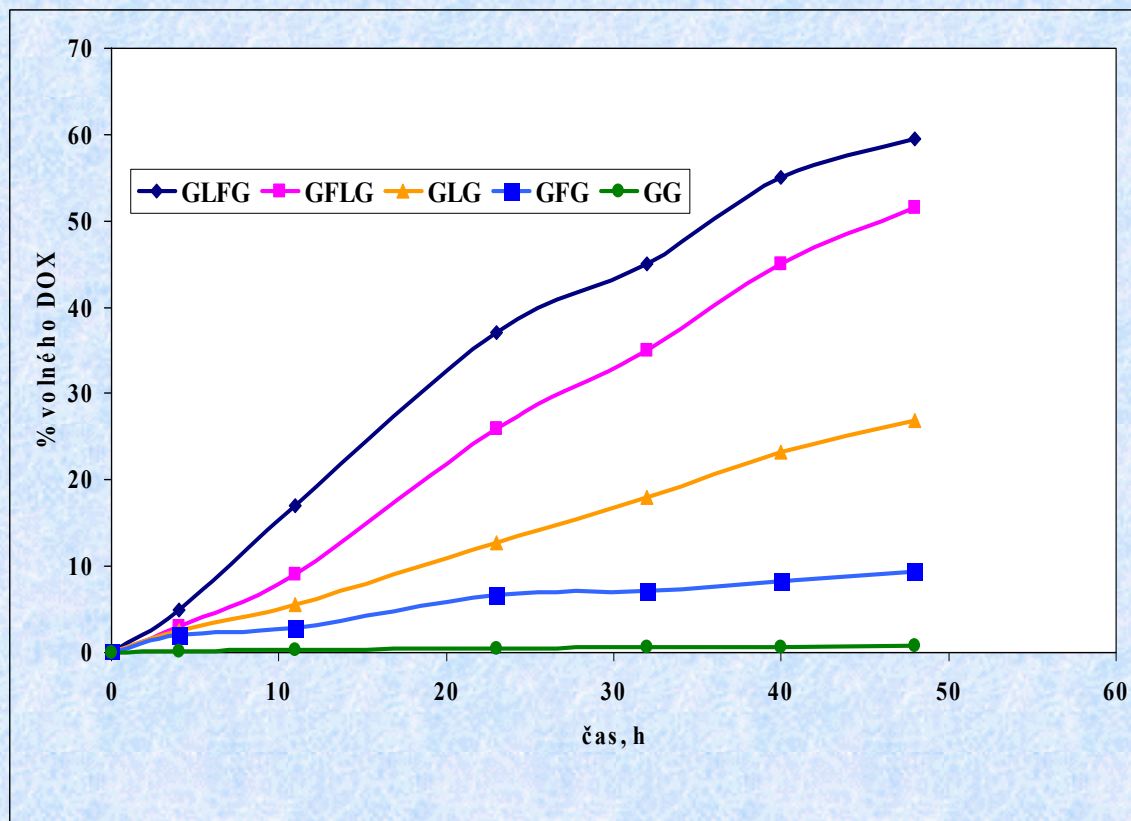
Hlavní požadavky kladené na polymerní nosiče léčiv

- **Stabilita v průběhu transportu (chemická vazba léčiva na nosič)**
- **Řízené uvolnění léčiva z nosiče (chemická hydrolýza, enzymolýza)**
- **Cílený transport k nádoru, nádorovým buňkám (pasivní směřování pomocí EPR efektu, aktivní směřování směřující strukturou)**
- **Eliminace nosiče z organismu (degradovatelný nosič, micelární nosič)**

Princip enzymaticky řízeného uvolňování léčiva z polymerního nosiče

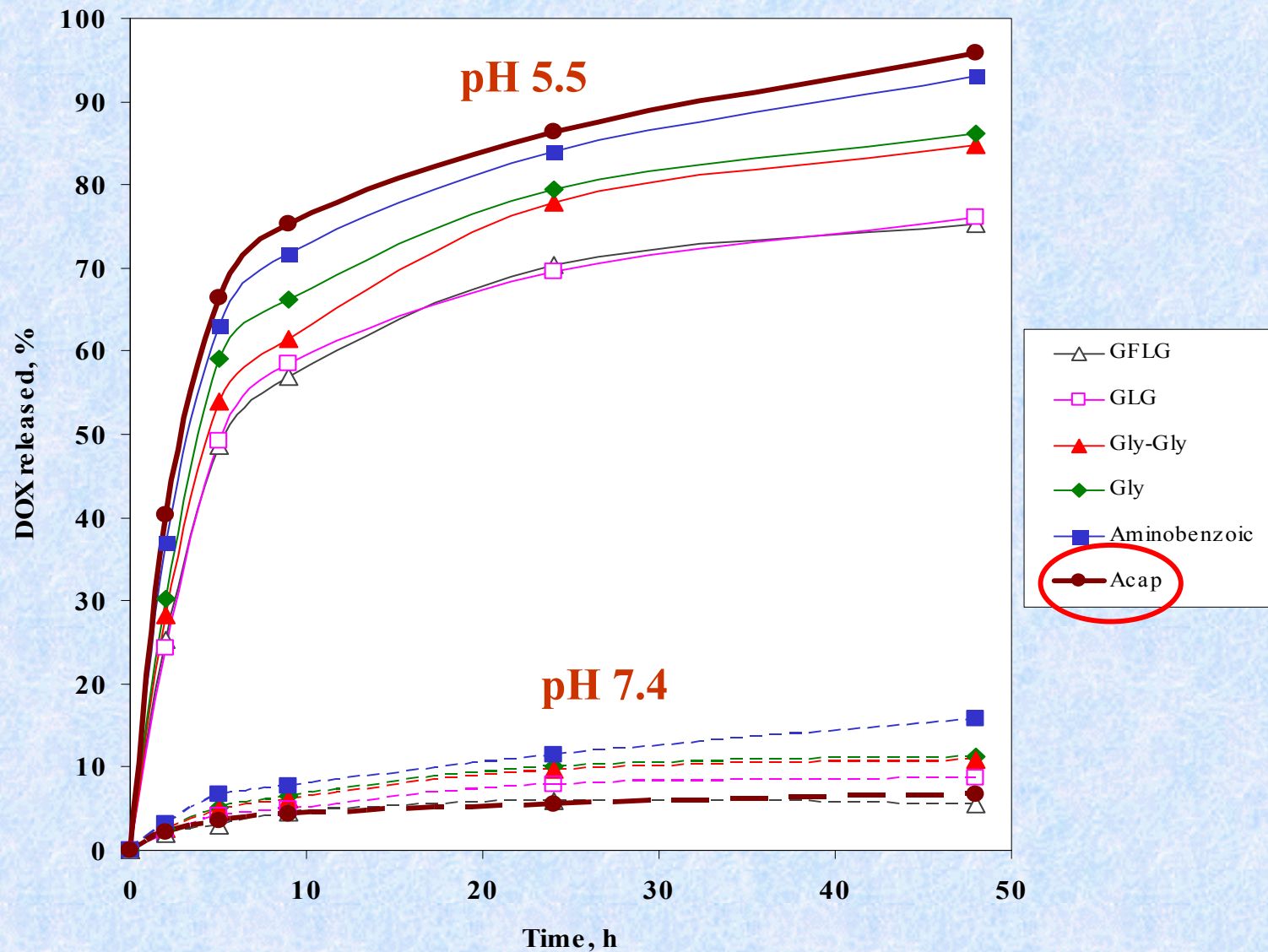


Uvolňování DOX z polymerů při inkubaci PHPMA-X-DOX konjugátů se směsí lysosomálních enzymů - tritosomů



STRUKTURA	% UVOLNĚNÉHO DOXORUBICINU V SÉRU		
	3 h	6 h	24 h
-GFLG-	0.7	0.8	1.9
-GLFG-	0.5	0.5	1.5
-GG-	0	0.1	0.2

Uvolňování DOX z hydrazonových polymerů inkubovaných ve fosfátových pufrch o různém pH

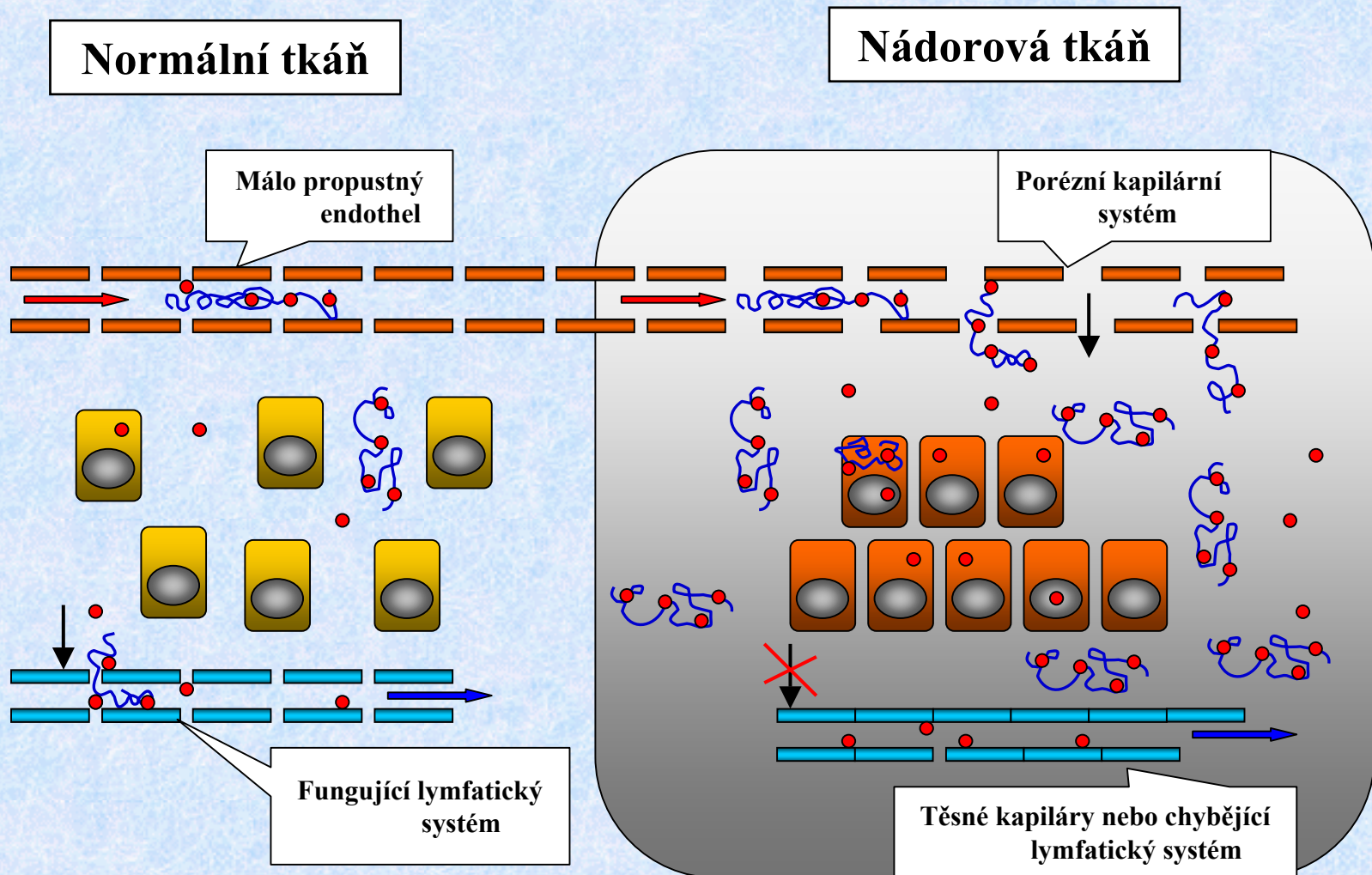


Hlavní požadavky kladené na polymerní nosiče léčiv

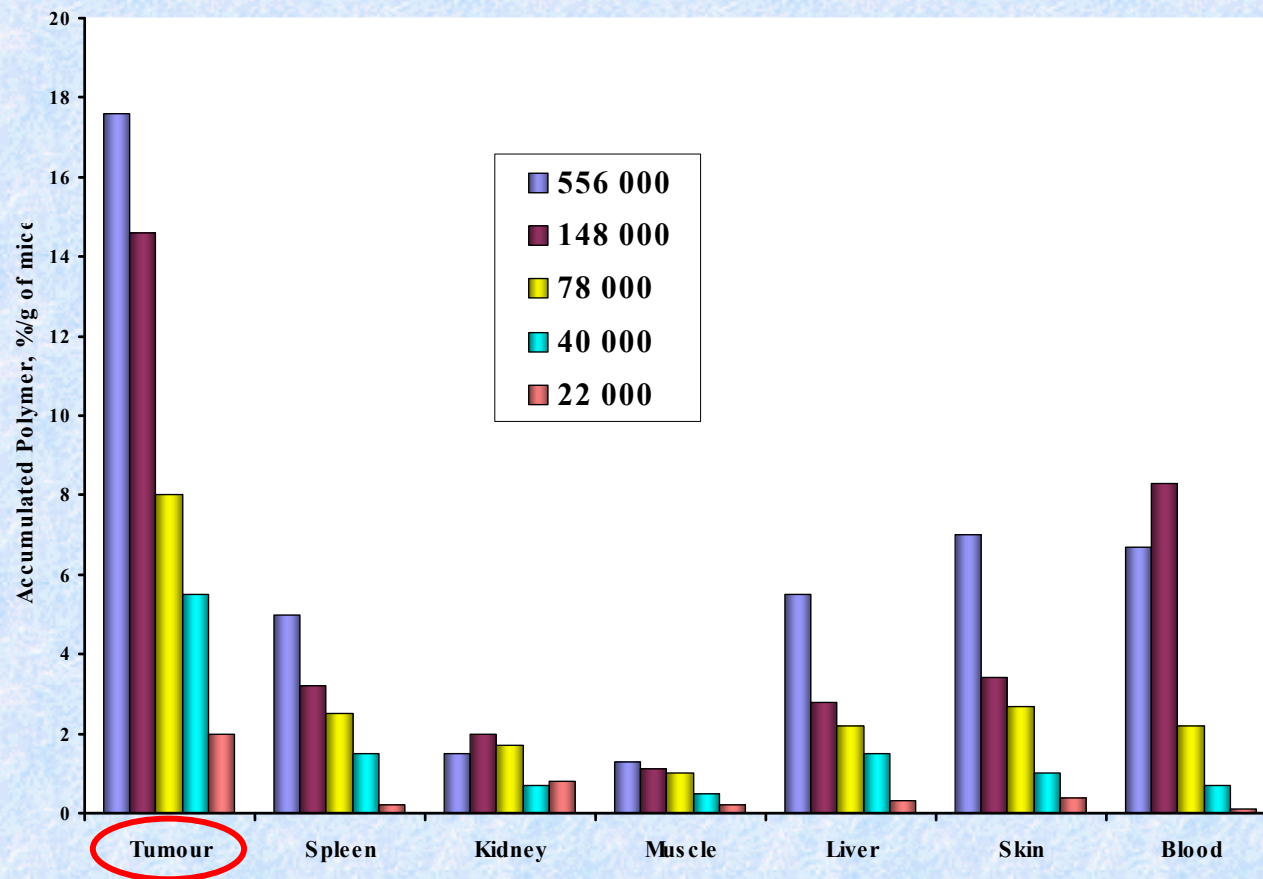
- **Stabilita v průběhu transportu (chemická vazba léčiva na nosič)**
- **Řízené uvolnění léčiva z nosiče (chemická hydrolýza, enzymolýza)**
- **Cílený transport k nádoru, nádorovým buňkám (pasivní směřování pomocí EPR efektu, aktivní směřování směřující strukturou)**
- **Eliminace nosiče z organismu (degradovatelný nosič, micelární nosič)**

Princip pasivního směřování – akumulace polymerů v pevných nádorech (EPR efekt)

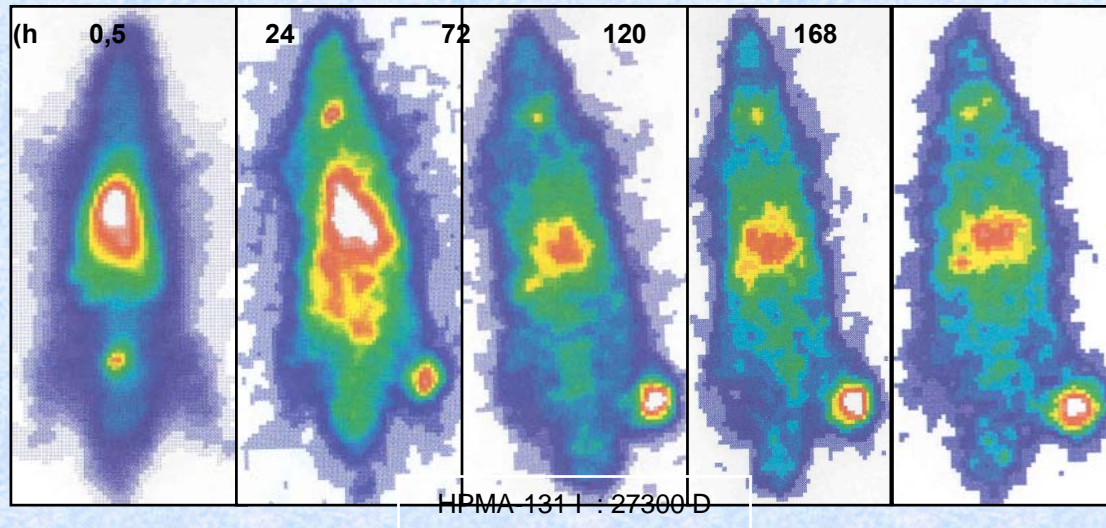
(H. Maeda a kol.)



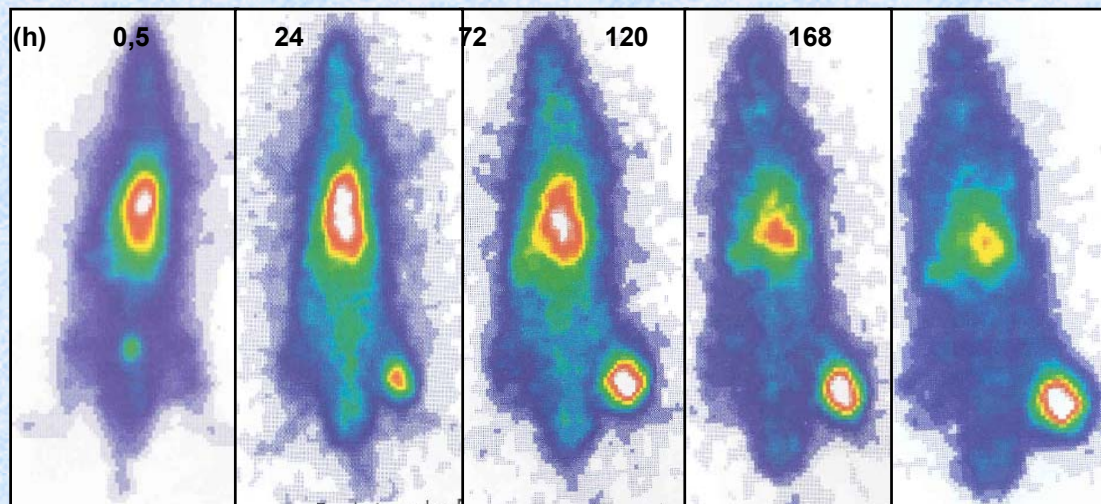
Distribuce poly(HPMA) v myších (EPR efekt), Sarkom 180 (melanom B16F10) (i.v. injekce polymeru)



Biodistribuce poly(HPMA) nosiče v kryse (EPR) s prostáctickým AT1 nádorem

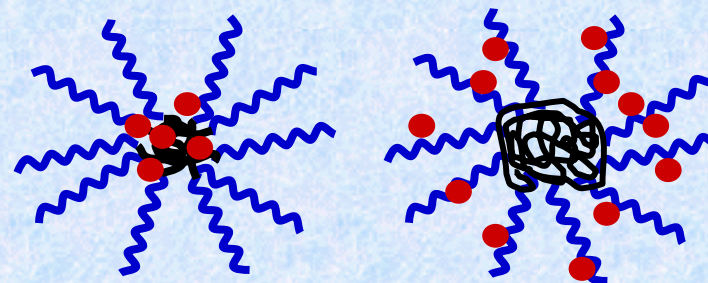
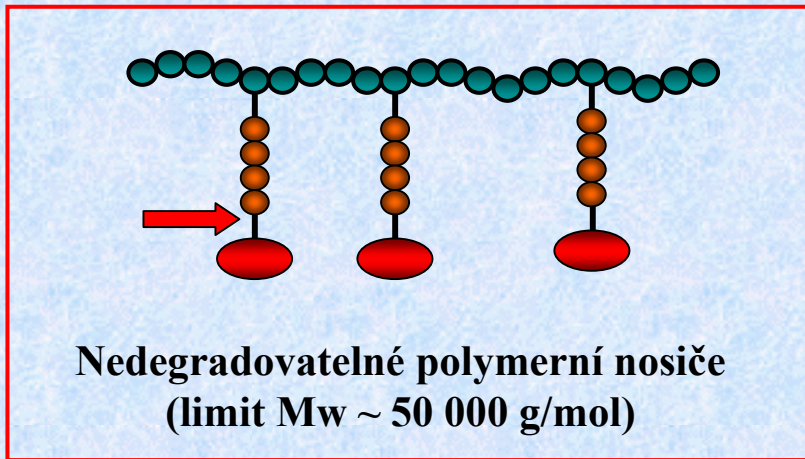


$M_w = 27\ 300$

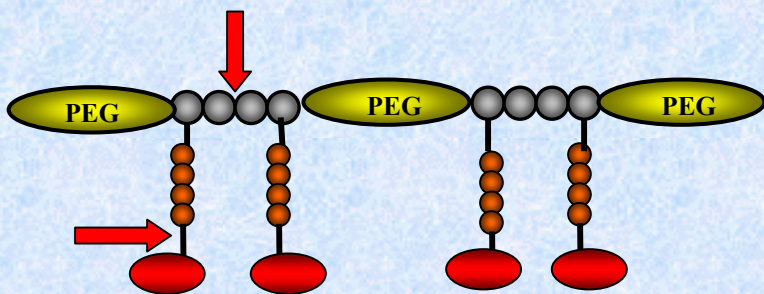


$M_w = 60\ 100$

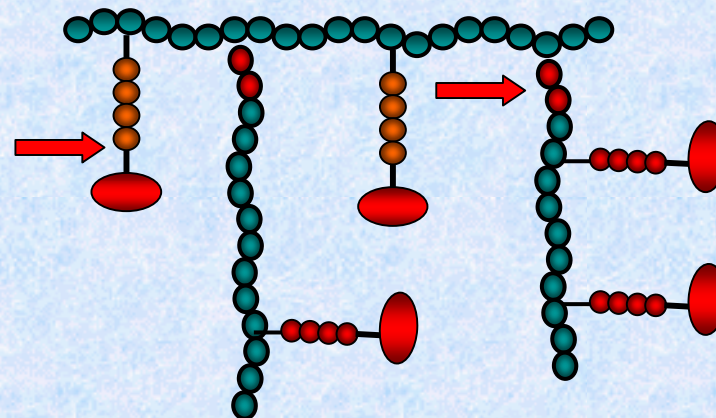
Konjugáty umožňující pasivní směřování do nádorů



Micelární nosiče léčiv

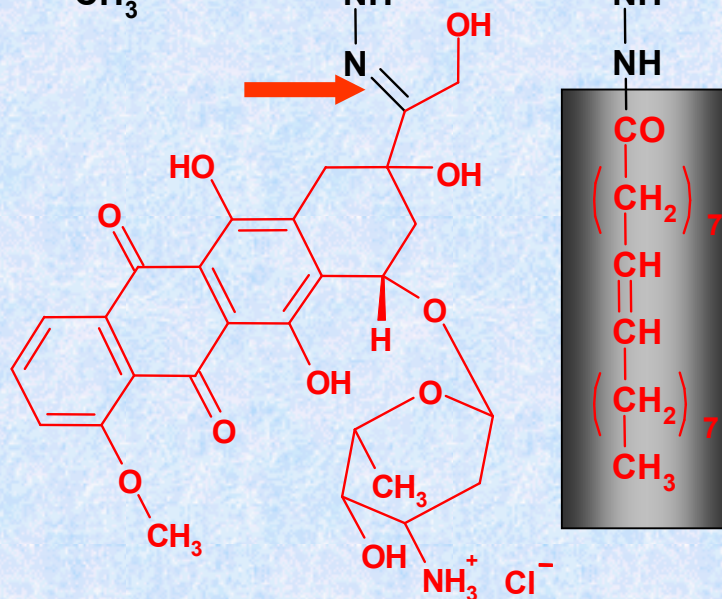
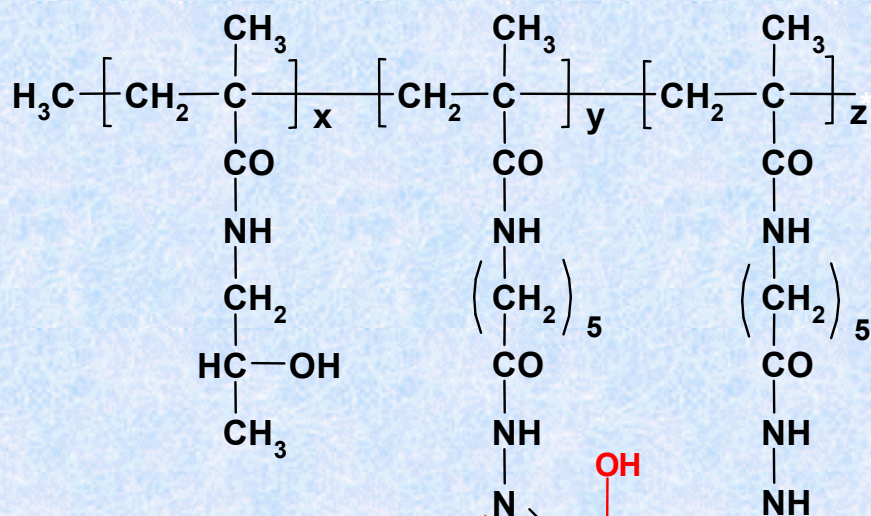


Multiblokové biodegradovatelné nosiče



Biodegradovatelné vysokomolekulární polymerní nosiče

Struktura micel tvořených konjugátem PHPMA-DOX-oleyl ve vodě



$M_w(\text{pol}) = 32 \text{ kDa}$

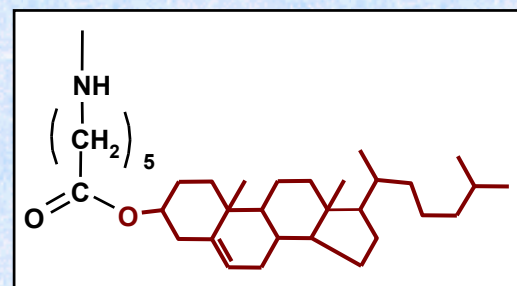
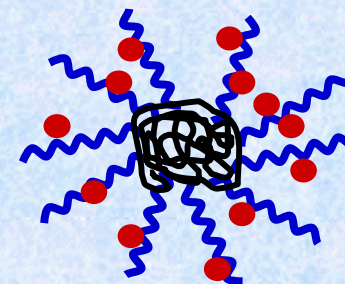
$I = 1.8$

$M_w(\text{mic}) = 170 \text{ kDa}$

$[\text{DOX}] = 7 \text{ wt}\%$

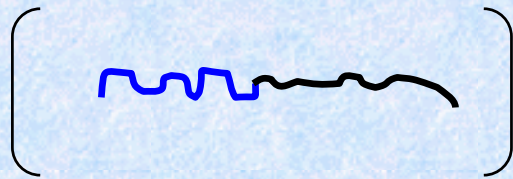
$[\text{oleyl}] = 3.5 \text{ \%mol}$

$d_{\text{mic}} = 22 \text{ nm}$

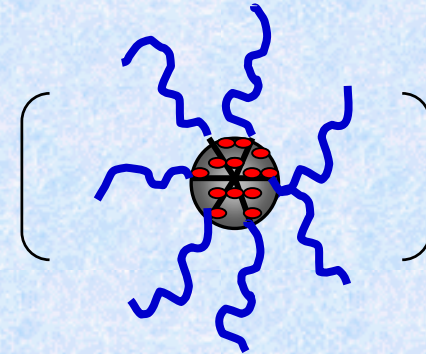


Hydrofobní substituent;
oleyl,
cholesteryl, etc.

Polymerní micela na bázi kopolymeru poly(ethylenglykol-b-allyl glycidylether)



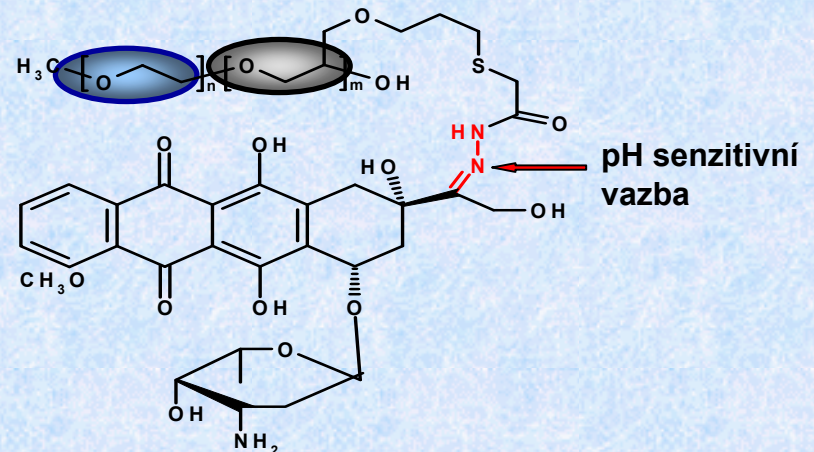
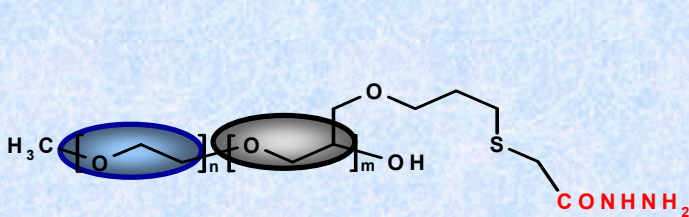
DOX, pH ~7.4



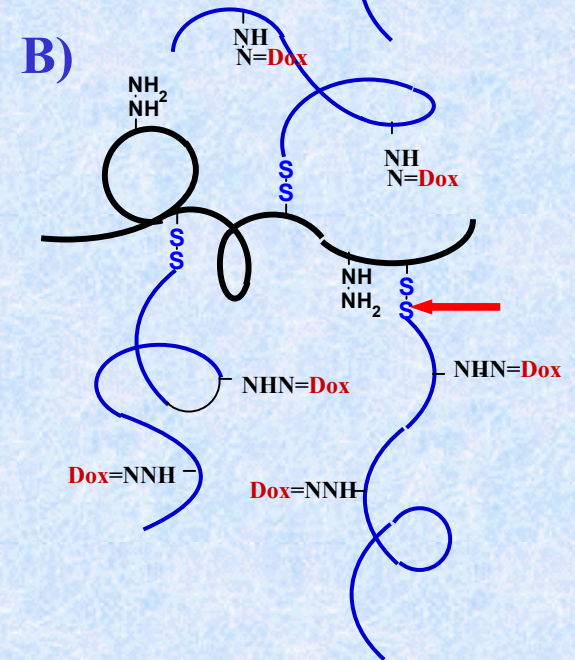
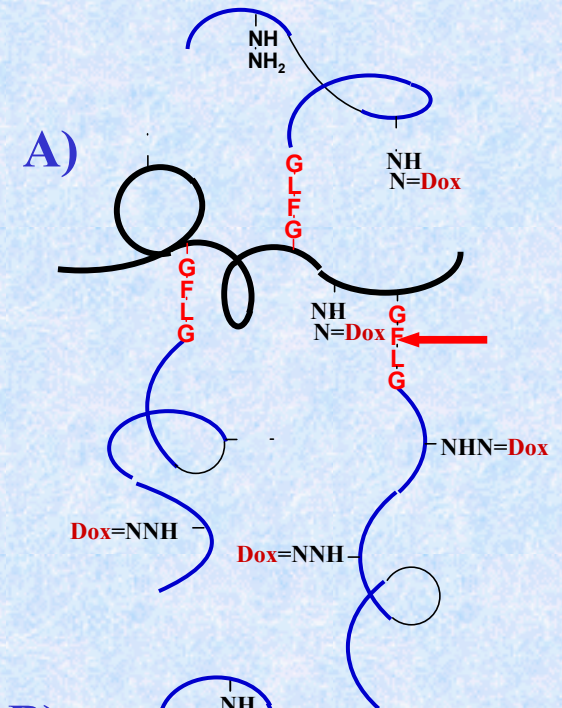
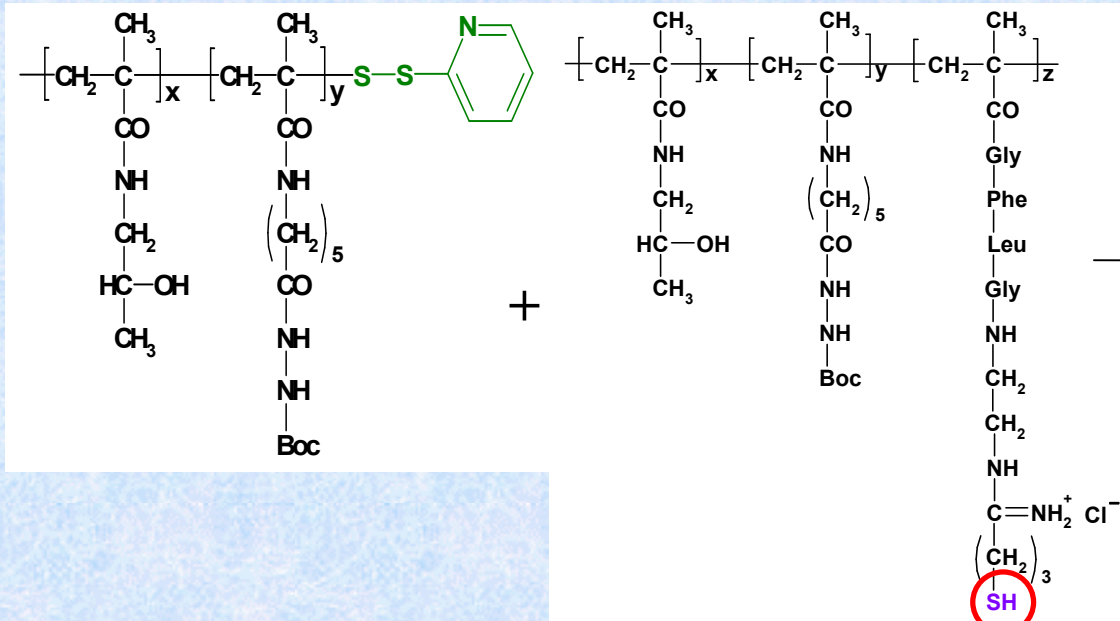
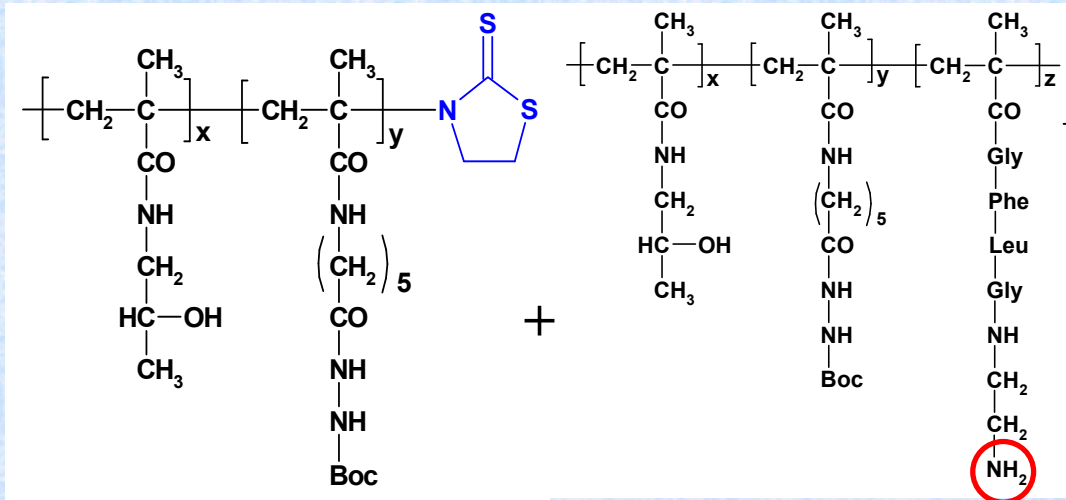
Vodorozpustný polymer
vyloučitelný z organismu,
blokový kopolymer
(hydrazid) (4-5 nm)

pH ~ 5

Supramolekulární polymerní
micela s hydrazonovou vazbou
vázaným DOX (~ 20-30 nm)

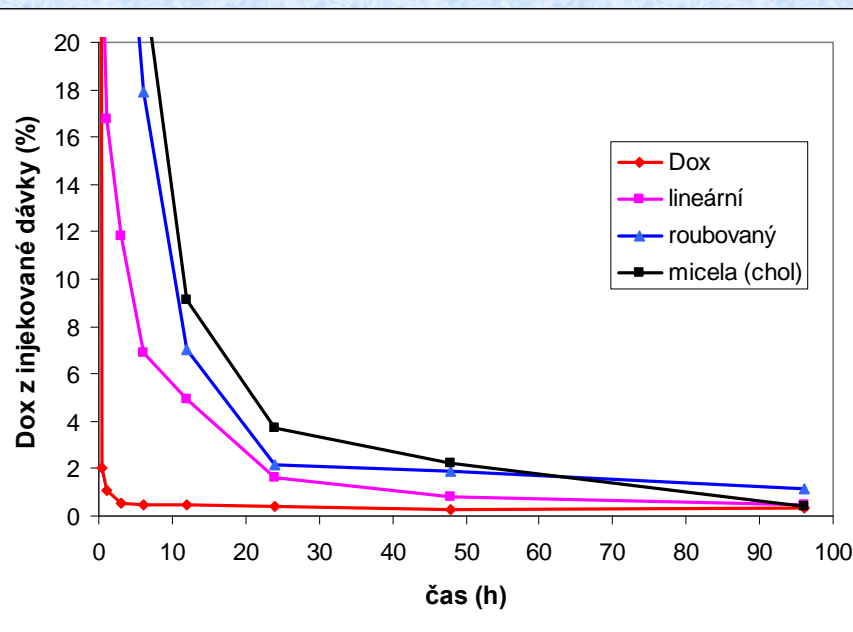


Syntéza roubovaných konjugátů s řízeným uvolňováním Dox a řízenou biodegradací

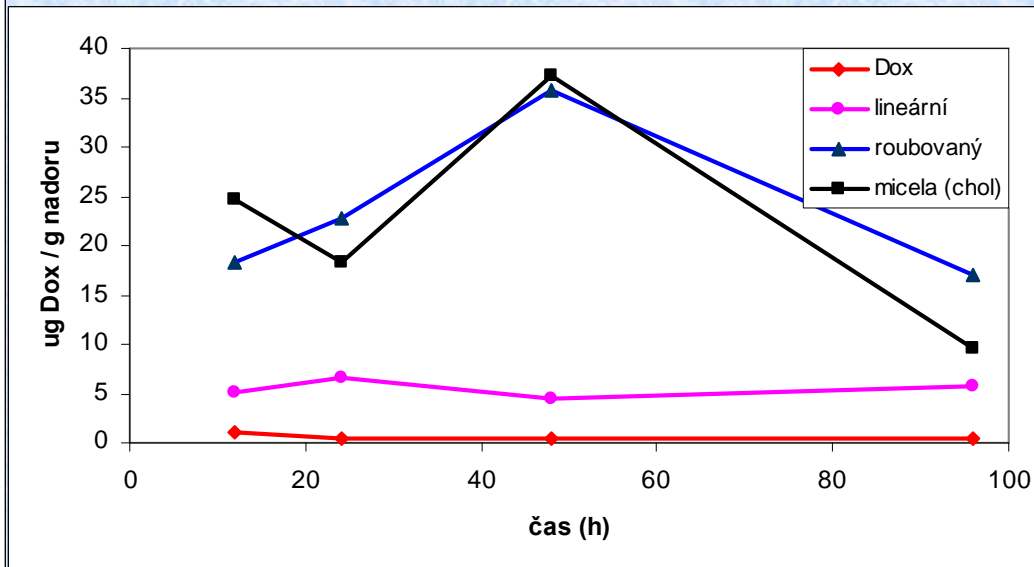


Eliminace polymerních léčiv z krevního řečiště a akumulace do nádoru u B/6 myši nesoucích myší lymfom EL4. Porovnání s volným léčivem.

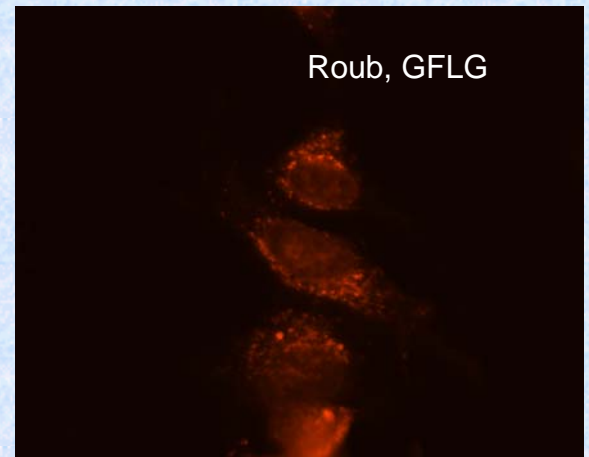
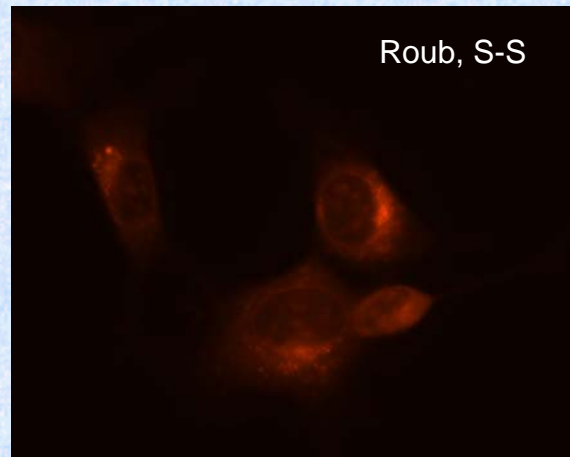
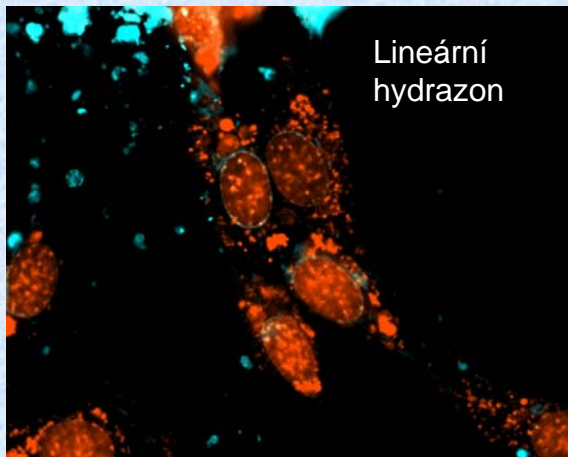
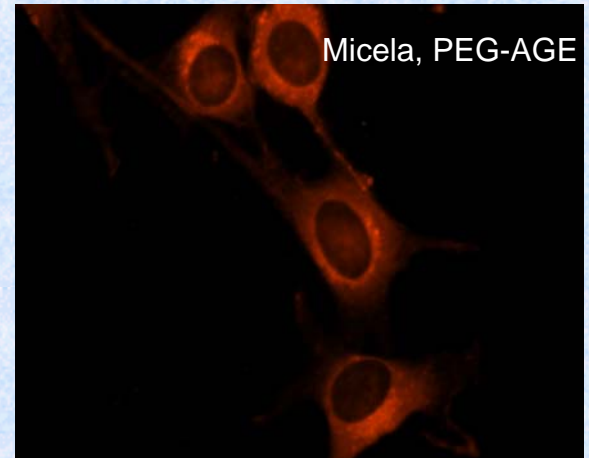
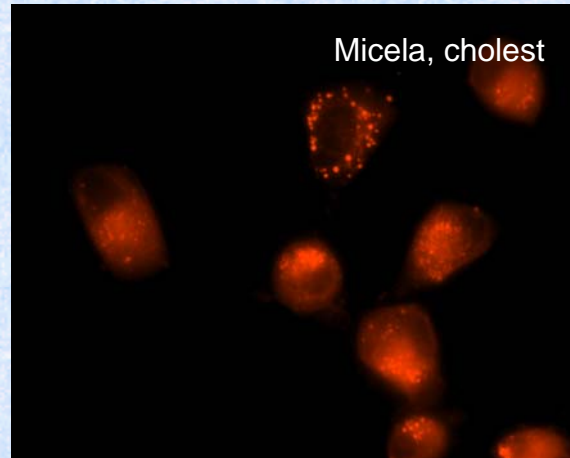
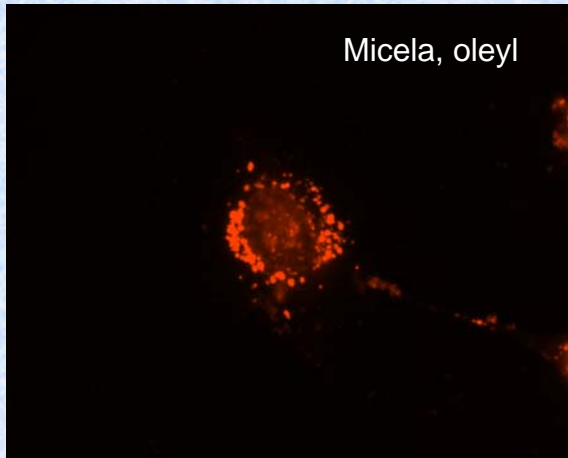
Eliminace z oběhu



Akumulace v nádoru



Fluorescenční microscopie buněk myšího EL4 lymphomu inkubovaných s micelami HPMA-hydrazone-DOX, PEG-PAGE-DOX a roubovanými konjugáty, 10 μg DOX equiv/mL, 24 h, 37 $^{\circ}\text{C}$



Aktivní směrování – internalizace polymerních léčiv v buňkách

Uvolnění léčiva (a) **hydrolýza v endosomech,**
(b) **enzymolýza v sekundárních lysosomech**

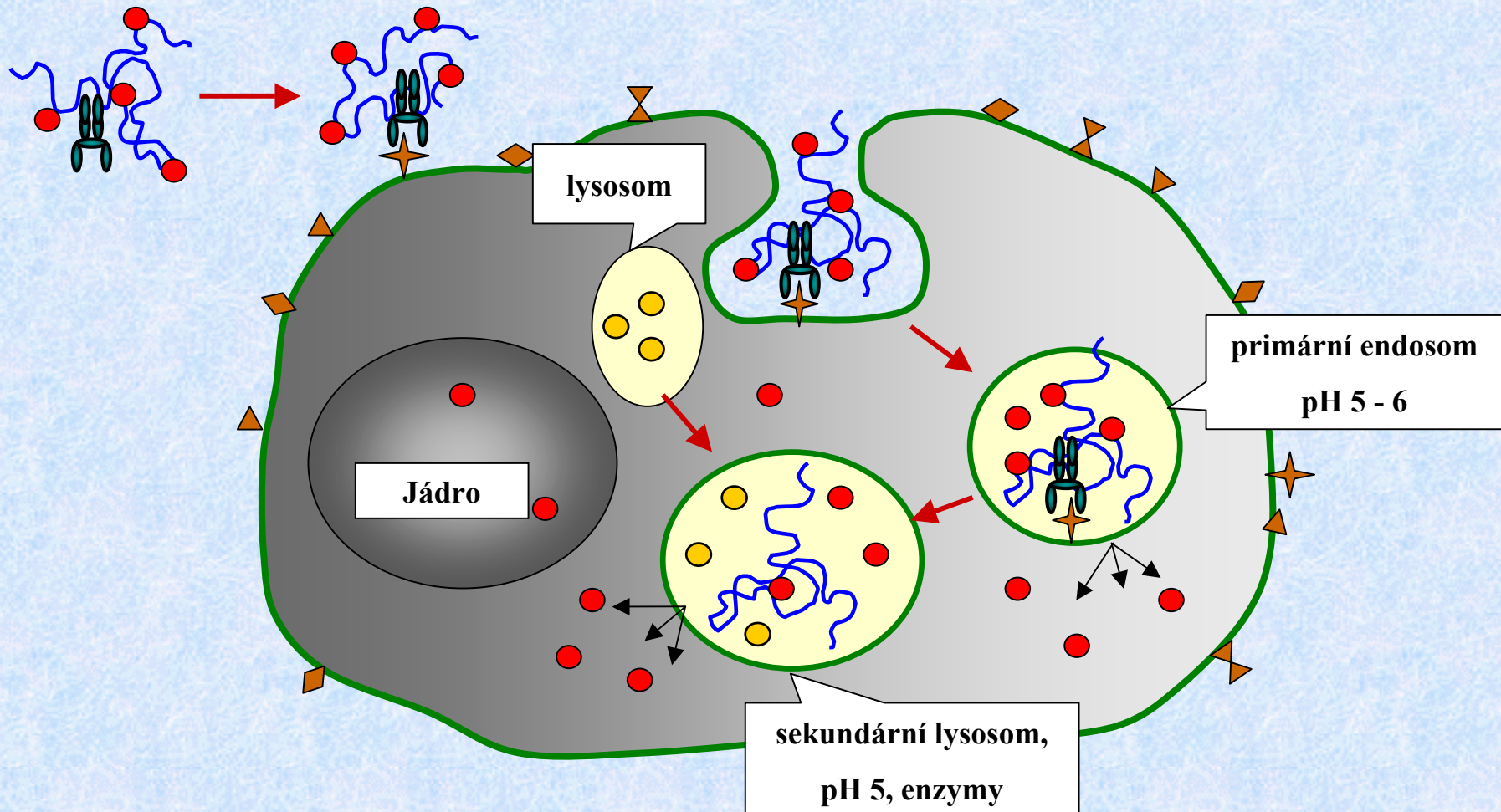
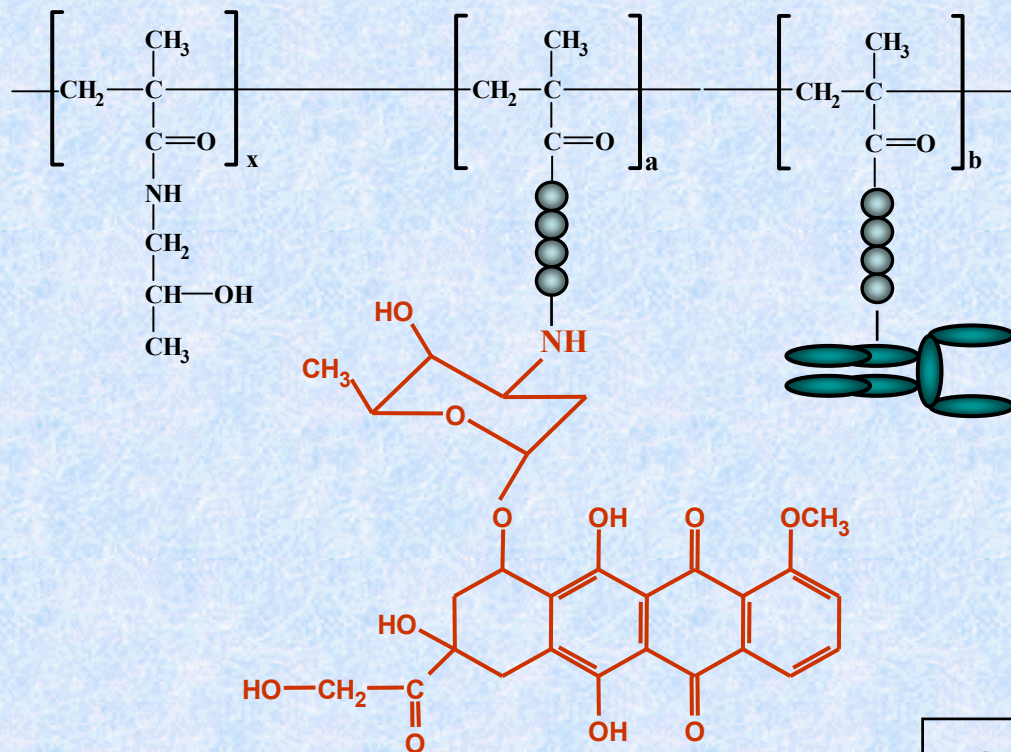


Schéma klasického protilátkou směřovaného konjugátu doxorubicinu (enzymatická aktivace)



Oligopeptid -GlyPheLeuGly-

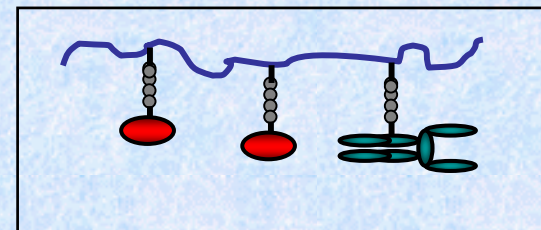
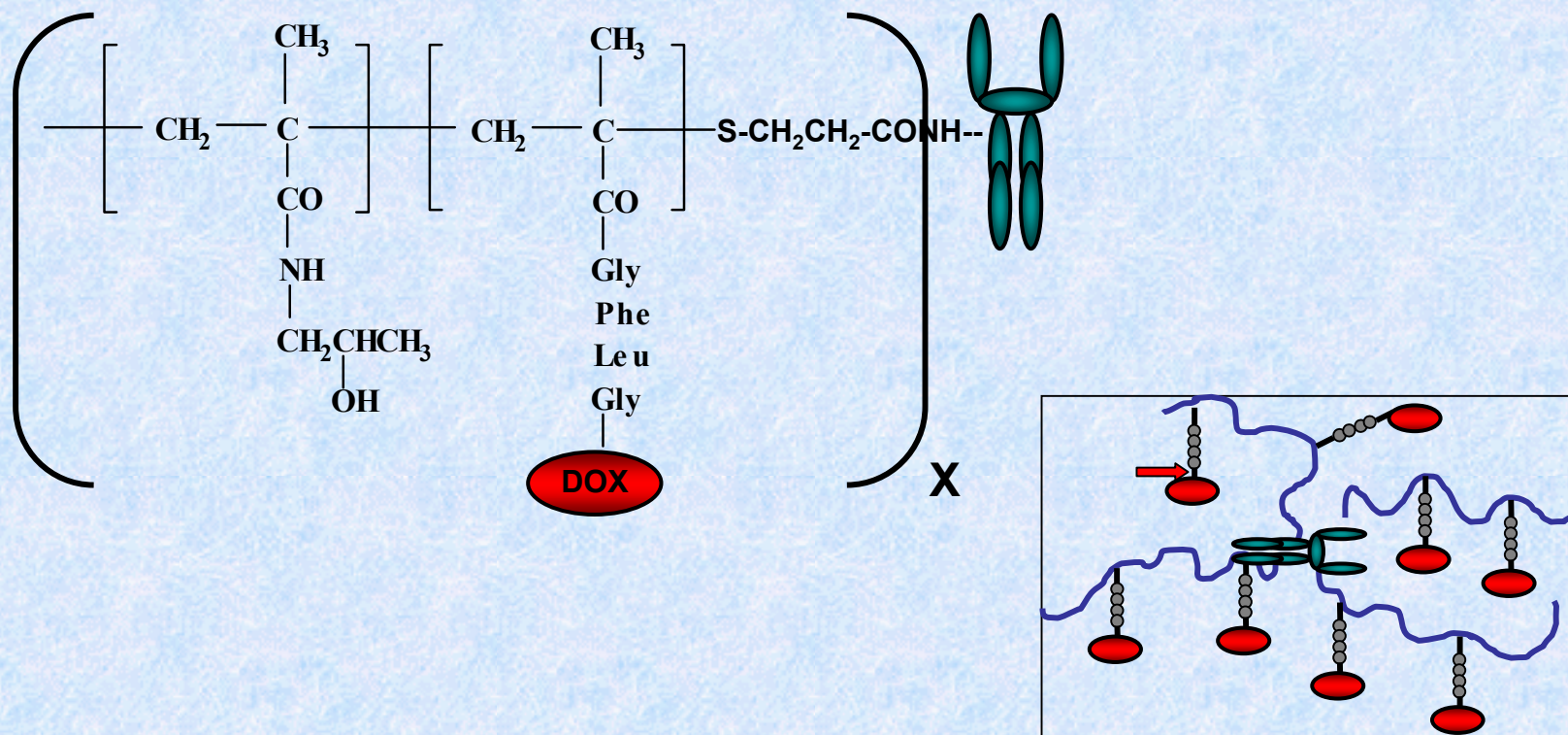


Schéma hvězdicového protilátkou směrovaného konjugátu doxorubicinu (enzymatická aktivace)

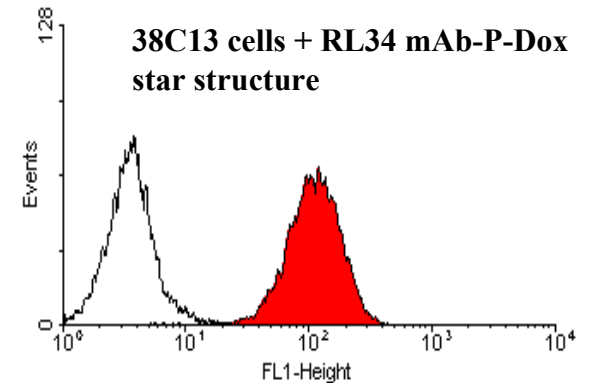
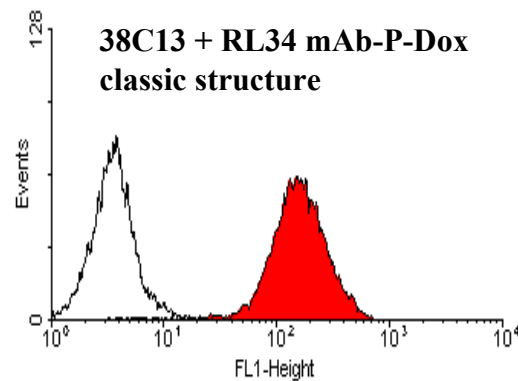
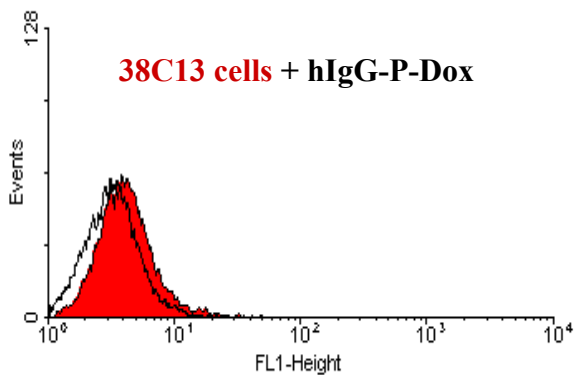
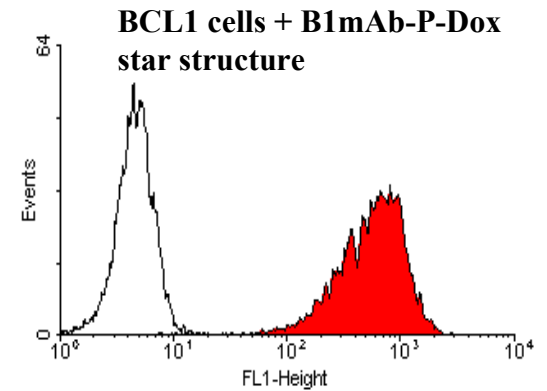
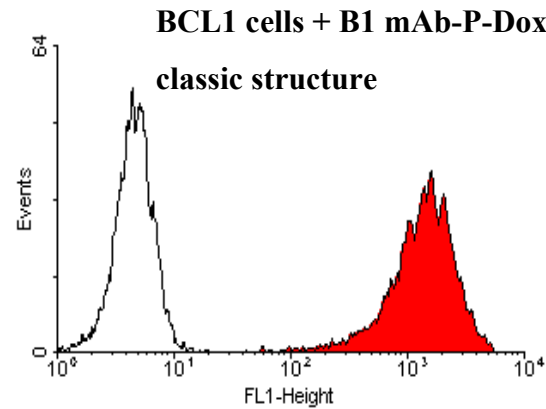
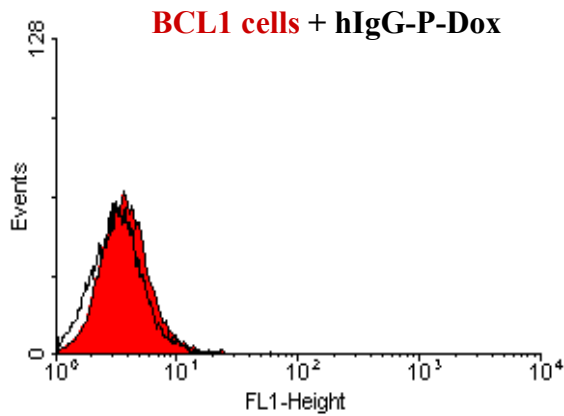


FACS analýza protilátkou směrovaných konjugátů

Směrování

(a) Nespecifickou protilátkou

(b) Specifickou protilátkou

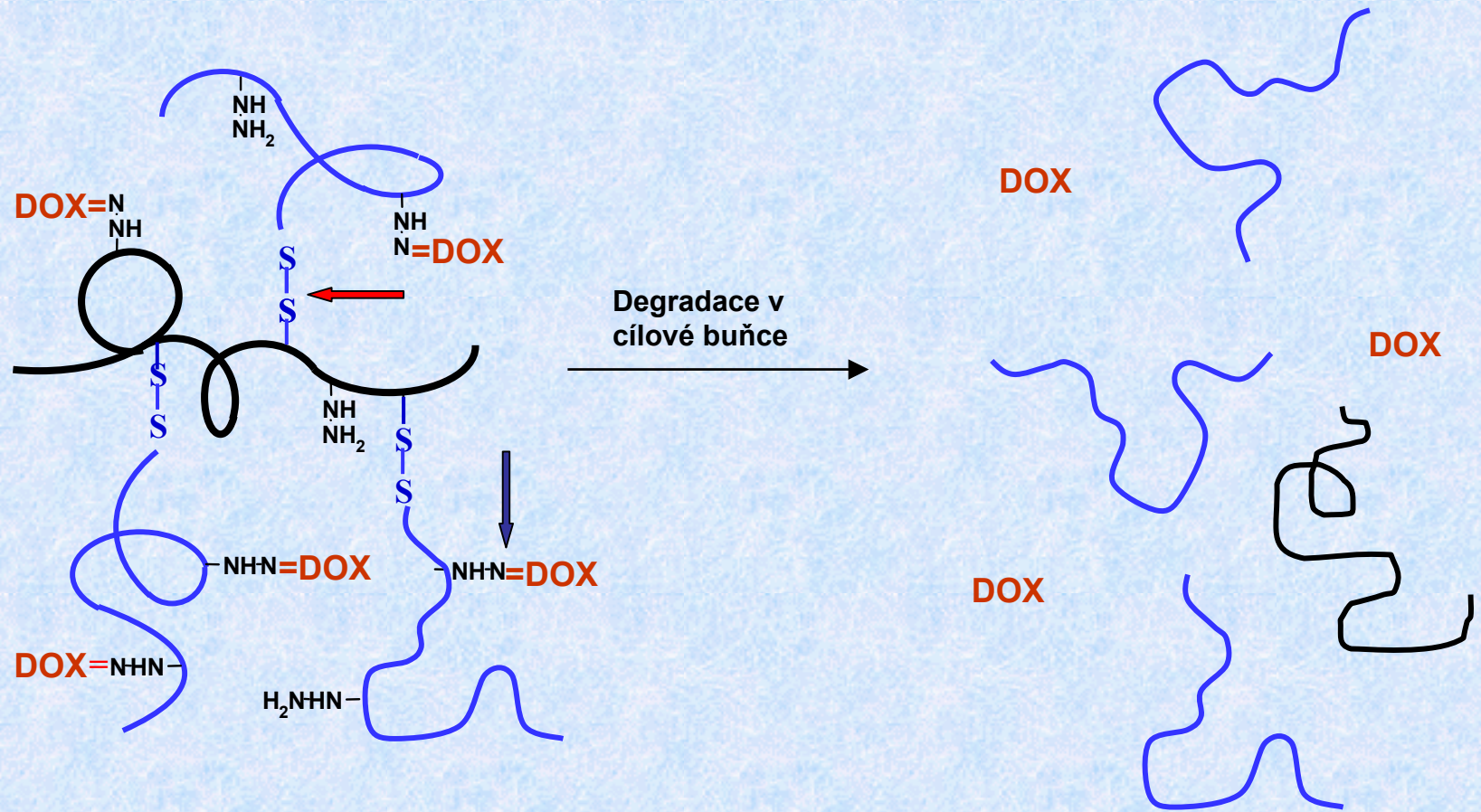


Hlavní požadavky kladené na polymerní nosiče léčiv

- **Stabilita v průběhu transportu (chemická vazba léčiva na nosič)**
- **Řízené uvolnění léčiva z nosiče (chemická hydrolýza, enzymolýza)**
- **Cílený transport k nádoru, nádorovým buňkám (pasivní směřování pomocí EPR efektu, aktivní směřování směřující strukturou)**
- **Eliminace nosiče z organismu (degradovatelný nosič, micelární nosič)**

Schéma degradace roubovaného konjugátu

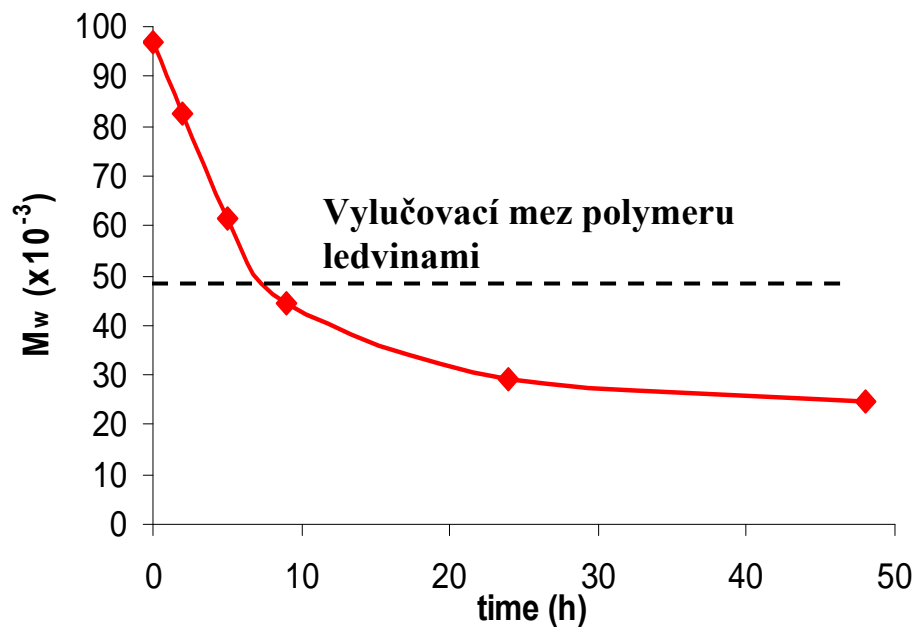
(degradace v reduktivním prostředí buňky)



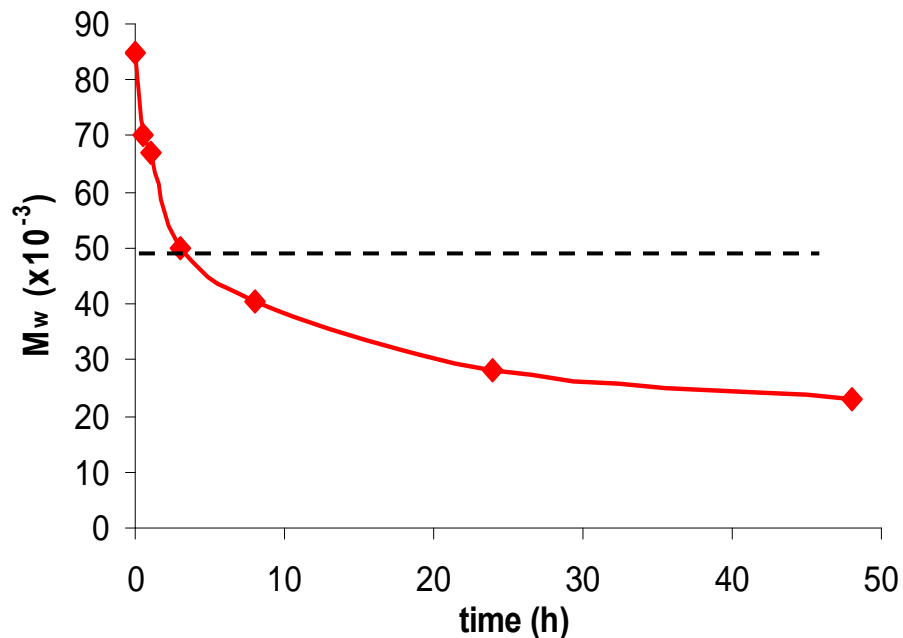
Vysokomolekulární léčivo s akumulací
v pevném nádoru

Nízemolekulární fragmenty
vyloučitelné z organismu

**Degradace roubovaného
PHPMA konjugátu se spojkou
GFLG po inkubaci s
kathepsinem B**
 $c(\text{kathepsin B}) = 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$



**Degradace roubovaného
PHPMA konjugátu se
spojkou -S-S- po inkubaci
s glutathionem**
 $c(\text{glutathion}) = 3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$



In vivo aktivita polymerních léčiv studovaná na modelových nádorech u myší

(růst nádoru, doba přežití, váha)

(a) ochranný režim aplikace léčiva

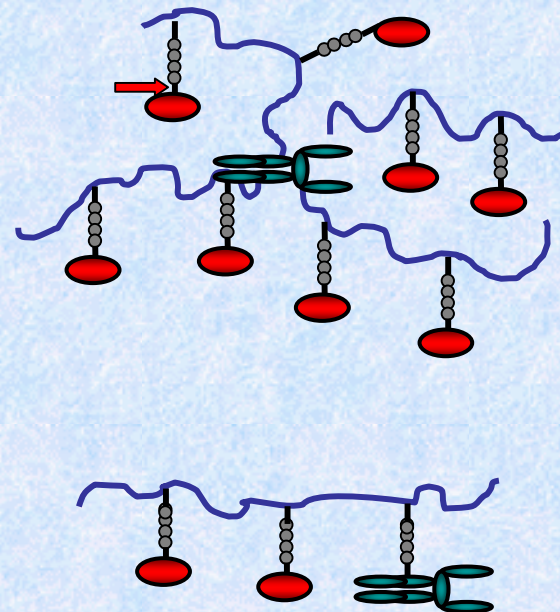
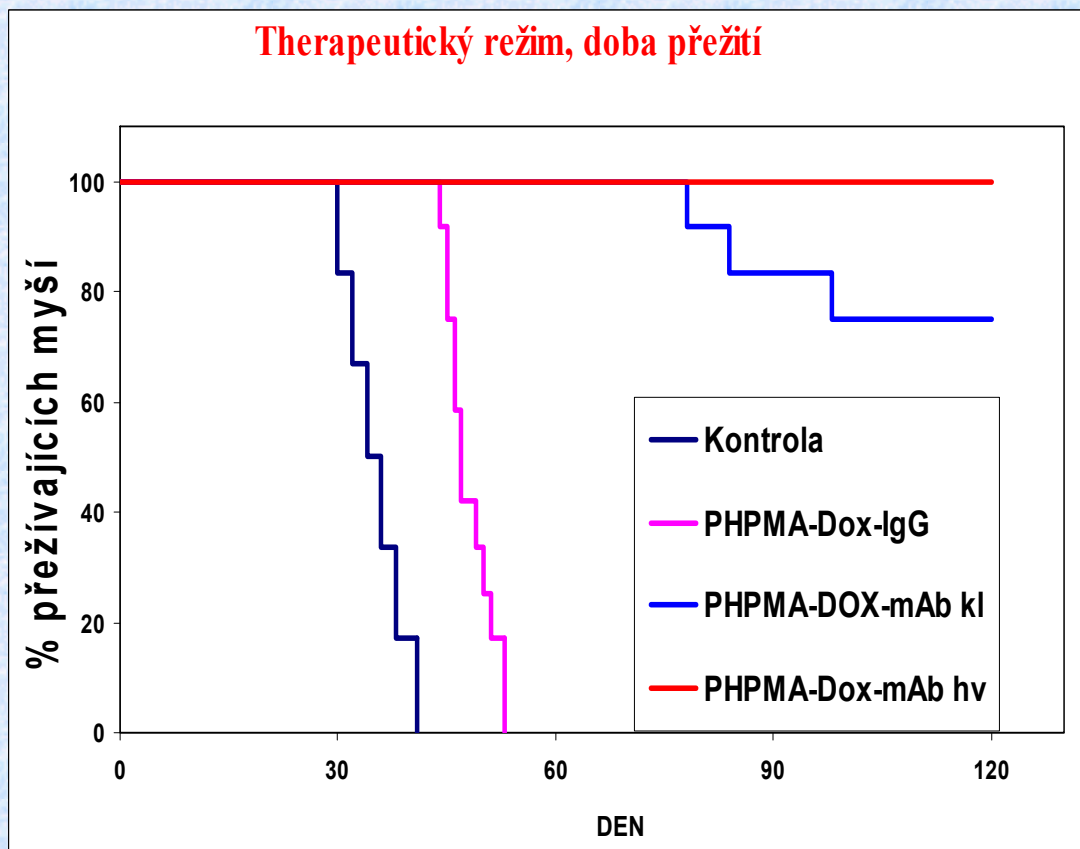
(aplikace 1,3,5,7,9 den po inokulaci nádoru)

(b) terapeutický režim aplikace léčiva

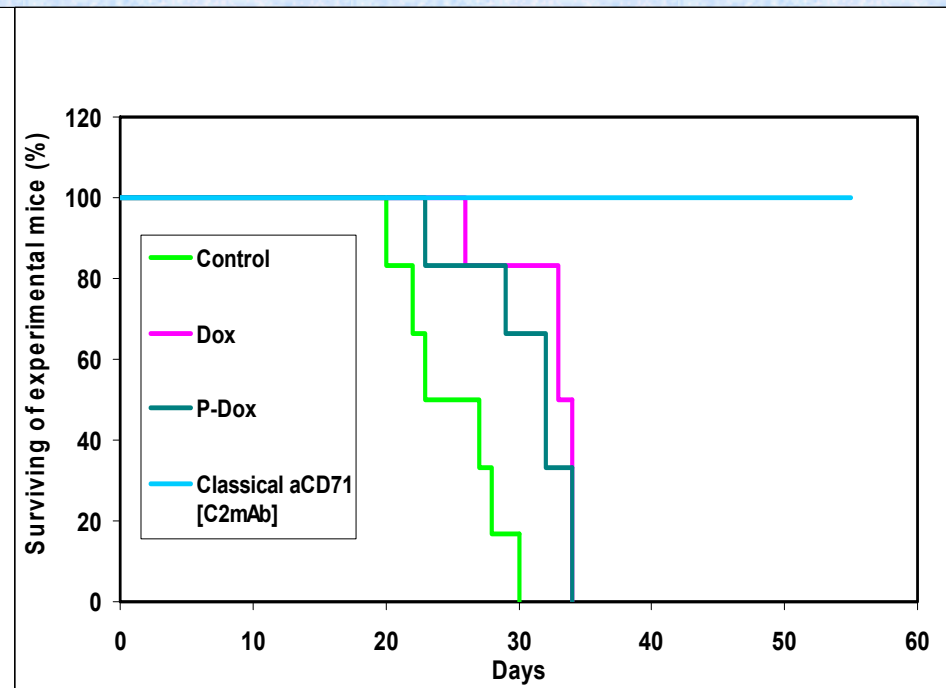
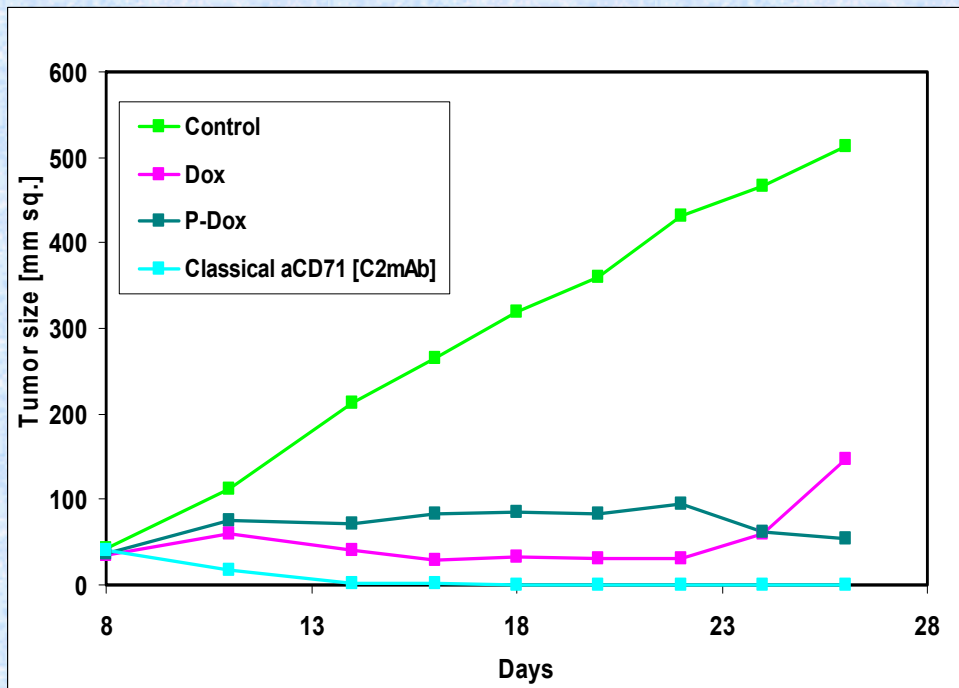
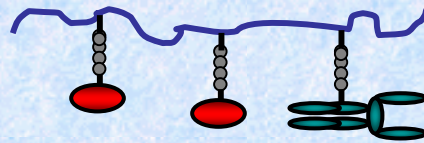
(první aplikace po vytvoření nádoru, nejčastěji po 8 – 11 dnech od inokulace)

Směřované PHPMA-DOX konjugáty, výsledky *in vivo* testů (Balb/c myši, BCL1 leukemie i.p., léčba i.v.), **terapeutický režim podání**

a) jedna dávka 5mg/kg, (hv 11 den) b) dvě dávky 11 a 14 den, 2x5mg/kg (kl)

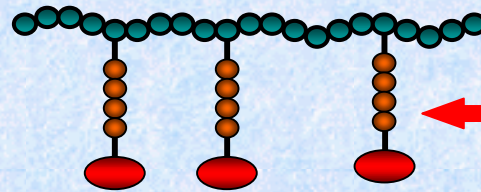


**Léčba C3H/HeN myši s 38C13 lymfomem (1×10^5 , s.c.)
doxorubicinem (5×2.5 mg/kg) nebo polymer-DOX konjugáty
(ekvivalent 5 mg/kg DOX) aplikovanými 8 a 11 den
(terapeutický režim podání)**



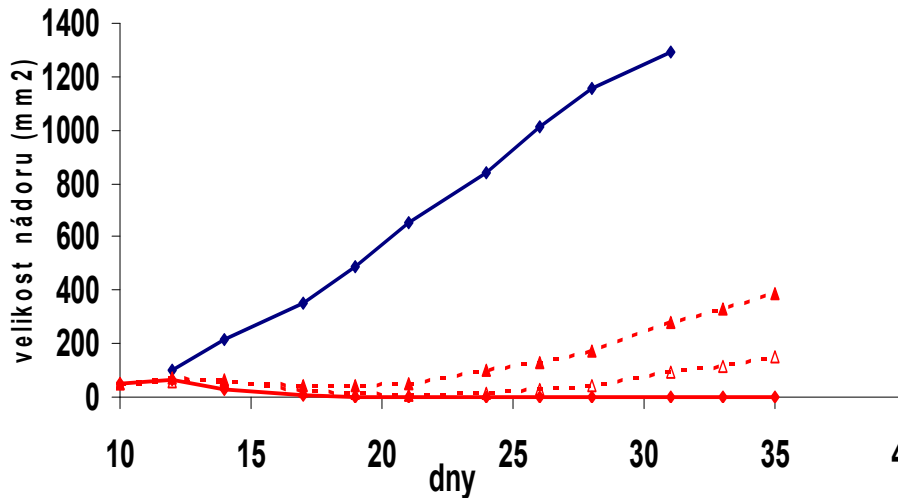
Lineární konjugáty PHPMA-DOX s hydrazonovou vazbou: výsledky *in vivo* testů, nesměrovaný lineární konjugát - terapeutický režim podání

Myši T-buněčný lymfom EL4, myši C57BL/6, léčba i.p. 10 nebo 10 a 20 den

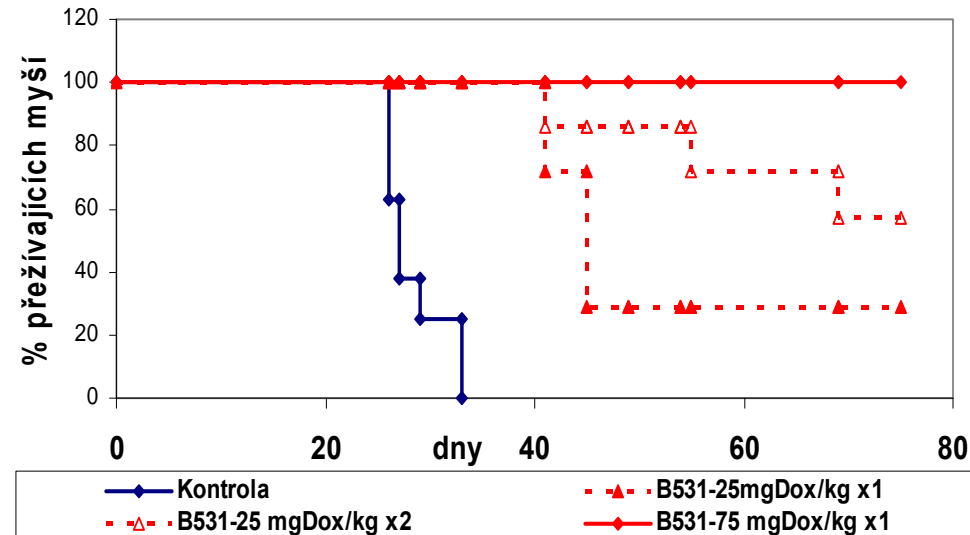


Hydrolyticky štěpitelná vazba, pH závislá rychlost štěpení

Růst nádoru

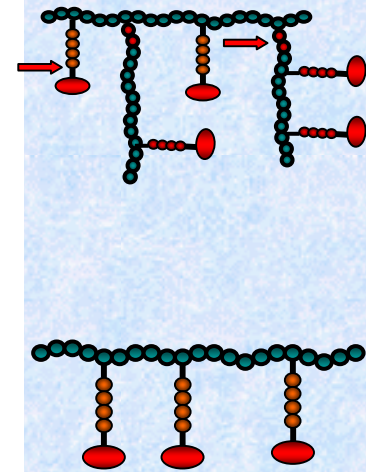
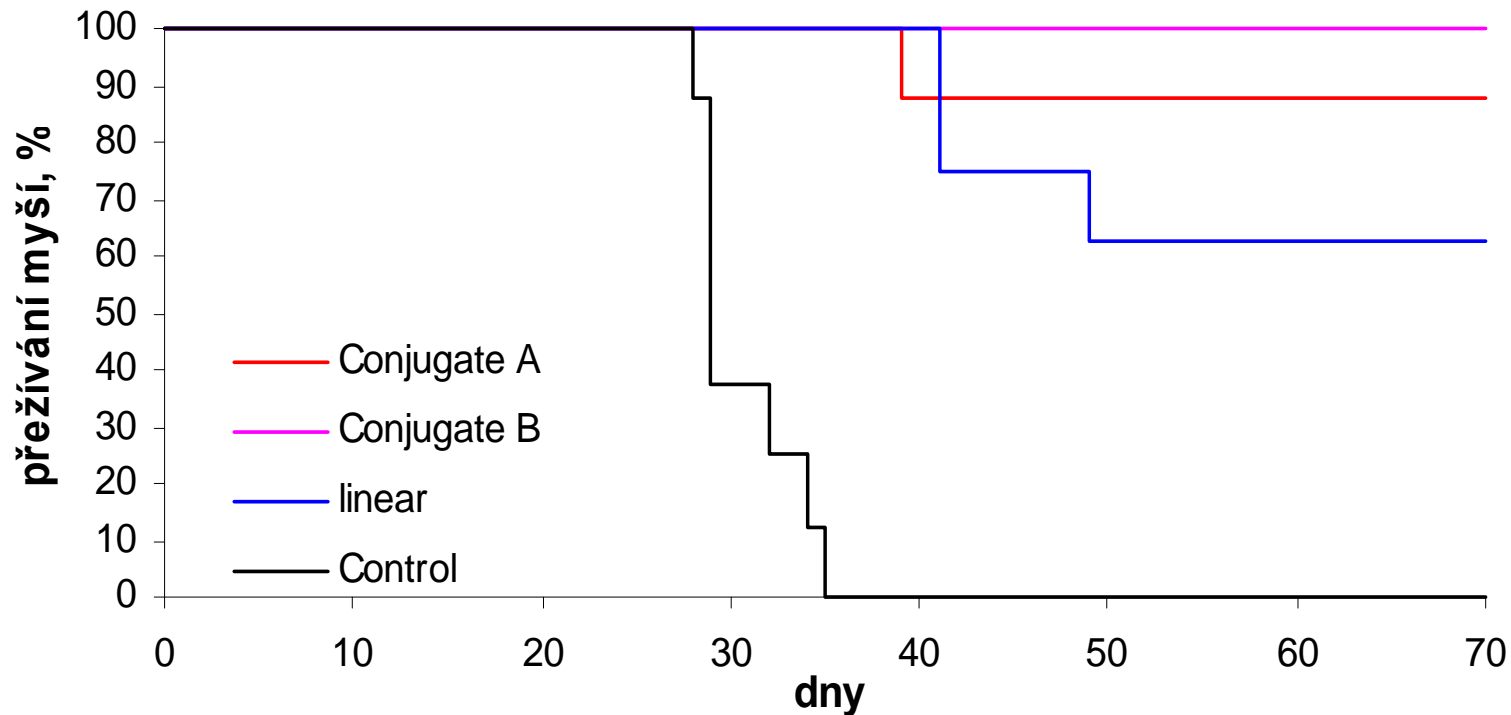


Přežívání myši



Vysokomolekulární **roubované** polymerní konjugáty DOX (Hydrazon) – *In vivo* protinádorová aktivita

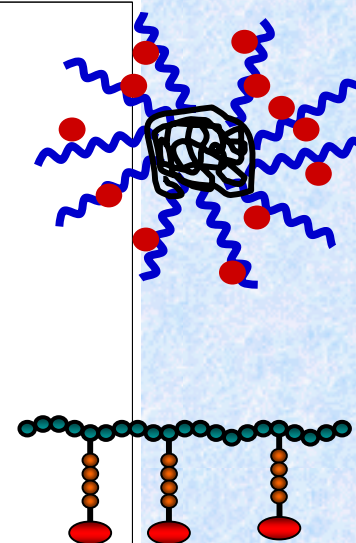
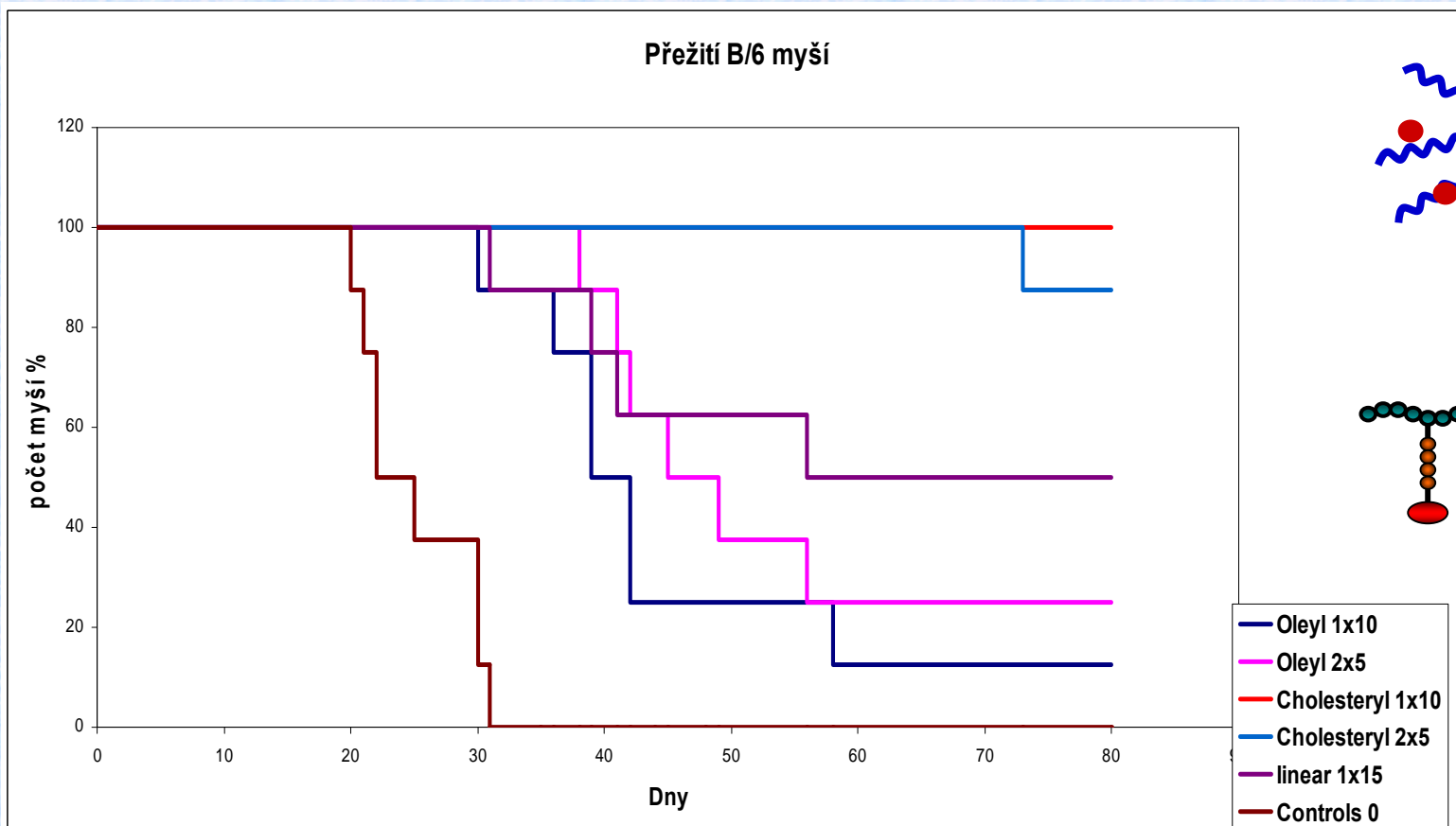
10^5 buněk T-buněčného lymfomu EL4 inokulovaných myším B/6 v den 0. Léčba: den 11. i.v. ,
jednoduchá dávka 15 mg DOX ekv./kg



A – konjugát s enzymatickou degradací **B** – konjugát s reduktivní degradací

Vysokomolekulární **micelární** konjugáty PHPMA-DOX

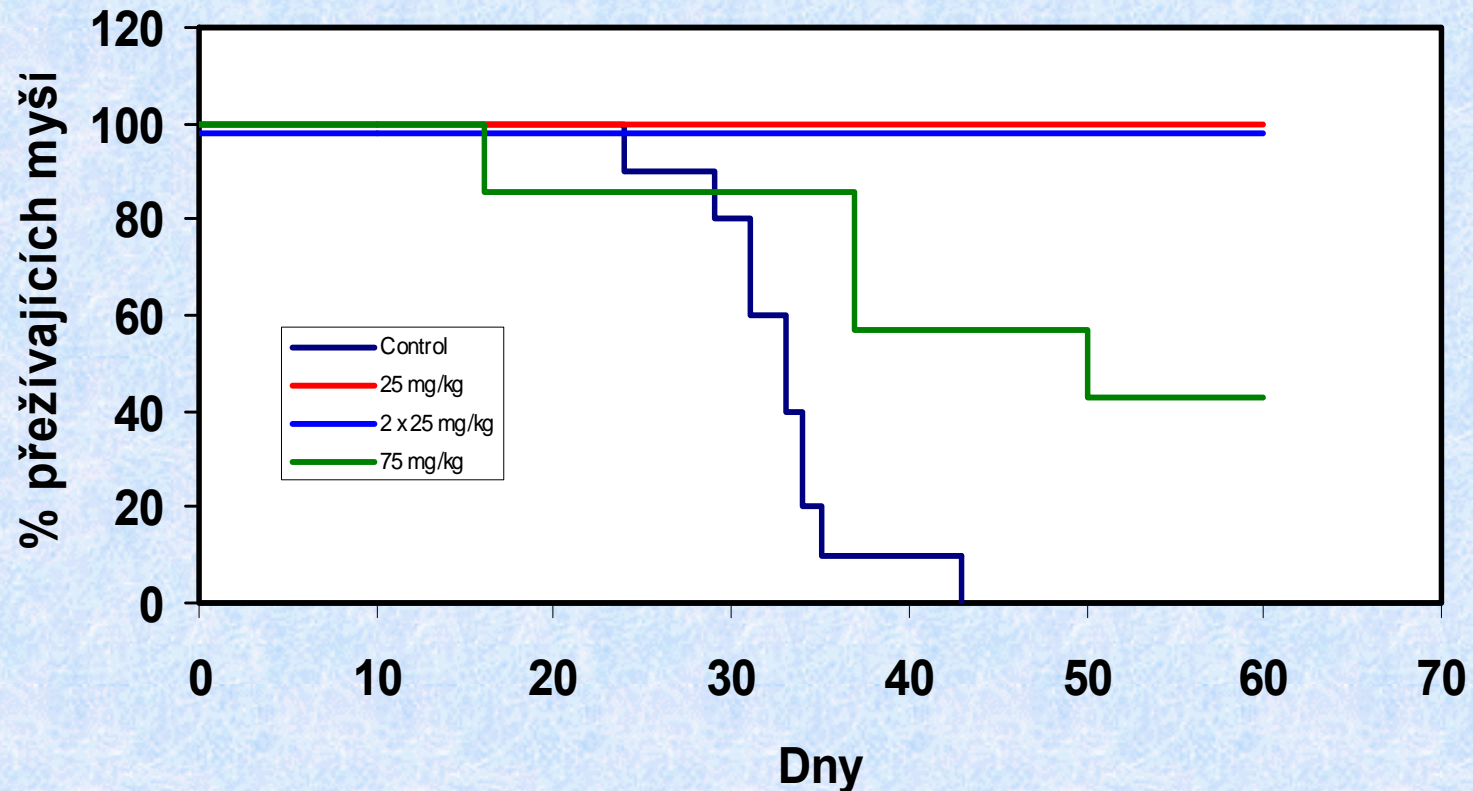
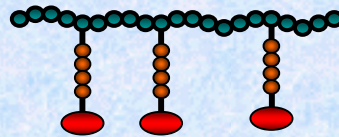
Doba přežití B/6 myši s inokulovaným EL-4 T-buněčným lymfomem (s.c.)
léčených 8 (a příp. 12) den po inokulaci jednou nebo dvěma dávkami léčiva



- Oleyl 1x10
- Oleyl 2x5
- Cholesteryl 1x10
- Cholesteryl 2x5
- linear 1x15
- Controls 0

Přežití C57BL/6 myši s retransplanovanými buňkami (10^5) myšího lymfomu EL-4, bez následné léčby

Původní léčba: hydrazonový konjugát



Kombinovaná radio a chemoterapie

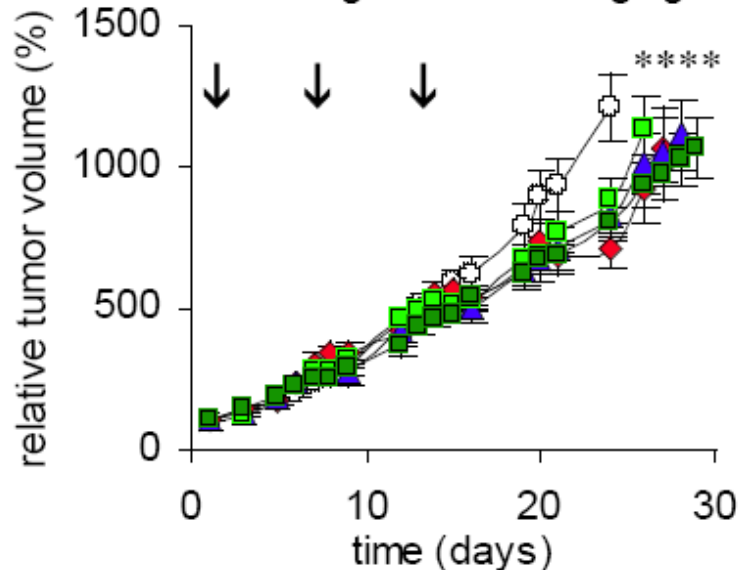
Kombinovaná radio a chemoterapie Dunningova AT1 nádoru prostaty u krys. Podání volného Dox, polymerního Dox (PK1) a protilátkou (IgG) směrovného polymerního konjugátu Dox bylo kombinováno s radioterapií (2 Gray/dávka)

Samotná chemoterapie

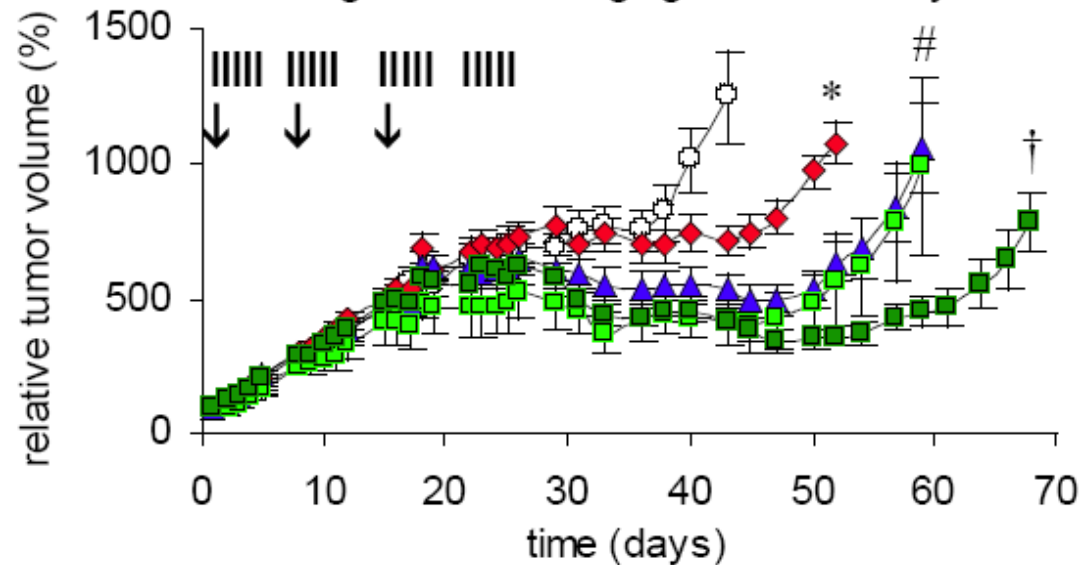
Kombinovaná radiochemoterapie

A

- Control
- ◆ Dox: 3x2.5 mg/kg
- ▲ PK1: 3x5 mg/kg
- IgG-PK1: 3x2.5 mg/kg
- IgG-PK1: 3x5 mg/kg

**B**

- Control RT: 20x2 Gy
- ◆ Dox: 3x2.5 mg/kg + RT: 20x2 Gy
- ▲ PK1: 3x5 mg/kg + RT: 20x2 Gy
- IgG-PK1: 3x2.5 mg/kg + RT: 20x2 Gy
- IgG-PK1: 3x5 mg/kg + RT: 20x2 Gy

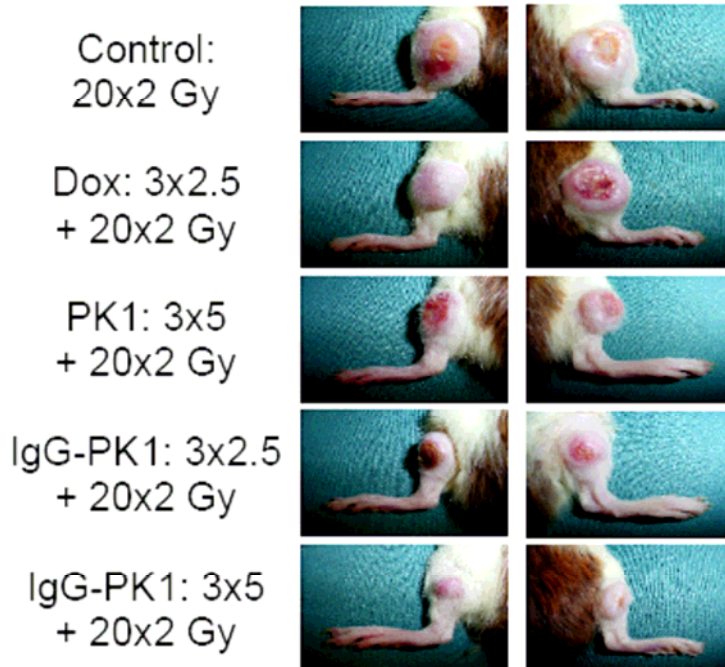


Kombinovaná radio a chemoterapie Dunningova AT1 nádoru prostaty u krys. Podání volného Dox, polymerního Dox (PK1) a protilátkou (IgG) směrovného polymerního konjugátu Dox bylo kombinováno s radioterapií (2 Gray/dávka)

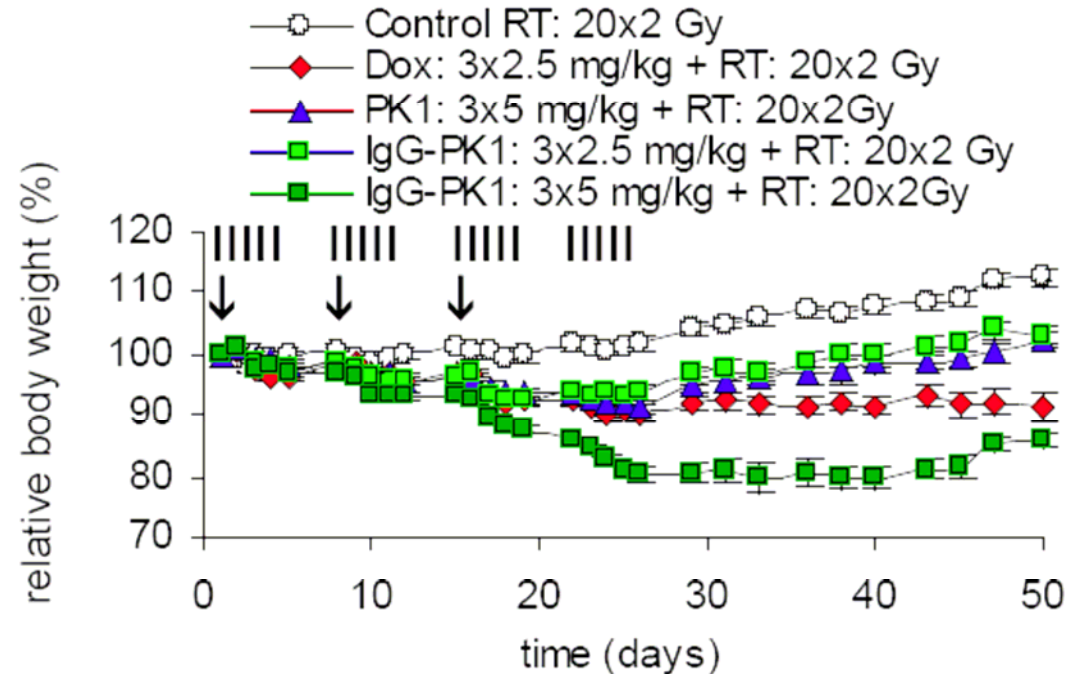
Kombinovaná terapie

Váha krys v průběhu terapie

C

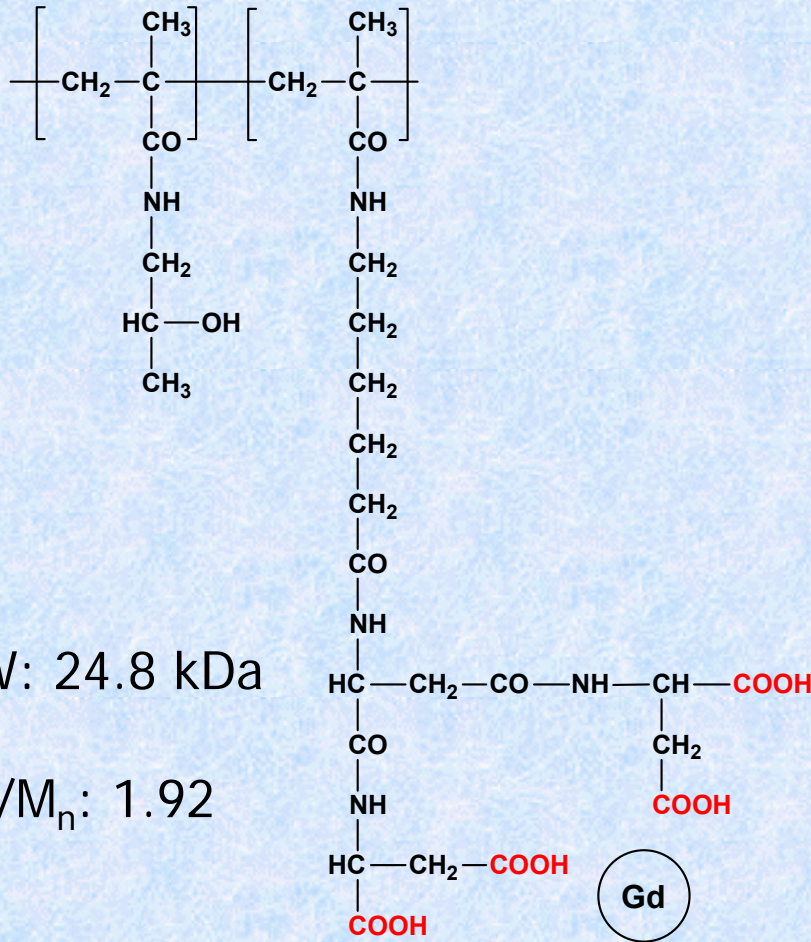


D



Využití rozpustných polymerních konjugátů v diagnostice

Konjugát gadolinia pro diagnostiku (angiografii) magnetickou resonancí



MW: 24.8 kDa

M_w/M_n : 1.92

Hmotová spektroskopie:

(5.19±0.28) %váh. Gd

Kontrastní látka:

0.5 M (78 mg/ml Gd)

Komplex je stabilní

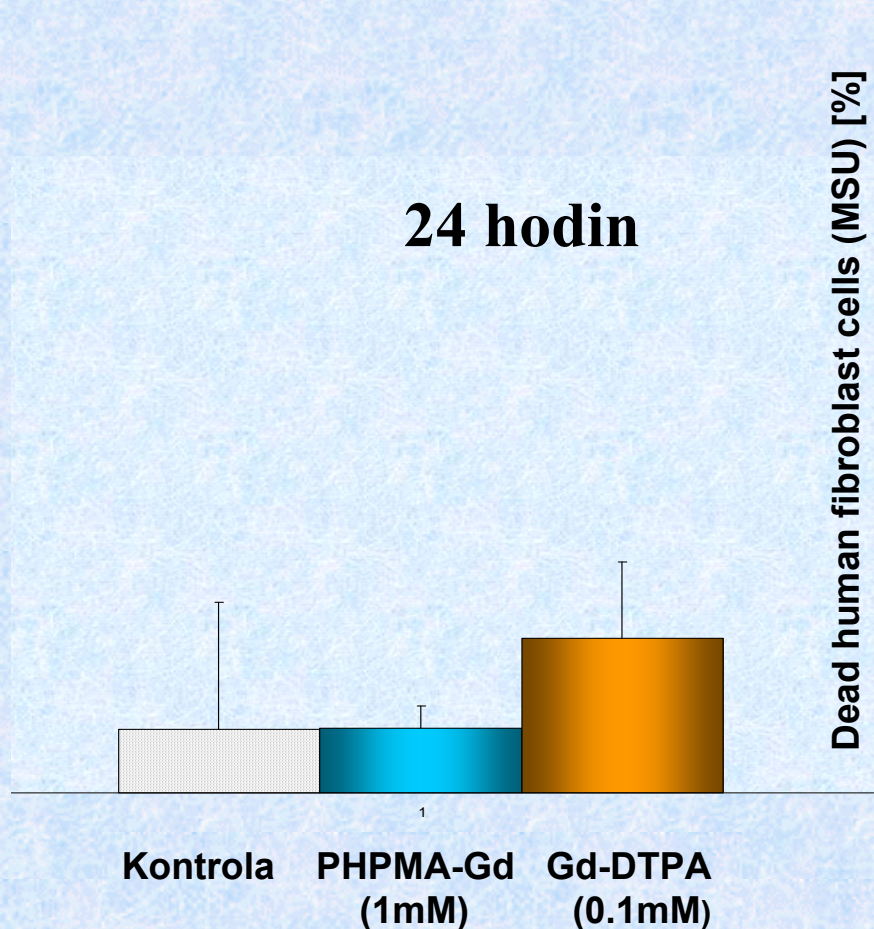
(neuvolňuje Gd) minimálně po dobu 2 měsíců inkubace

Cytotoxicita konjugátů gadolinia

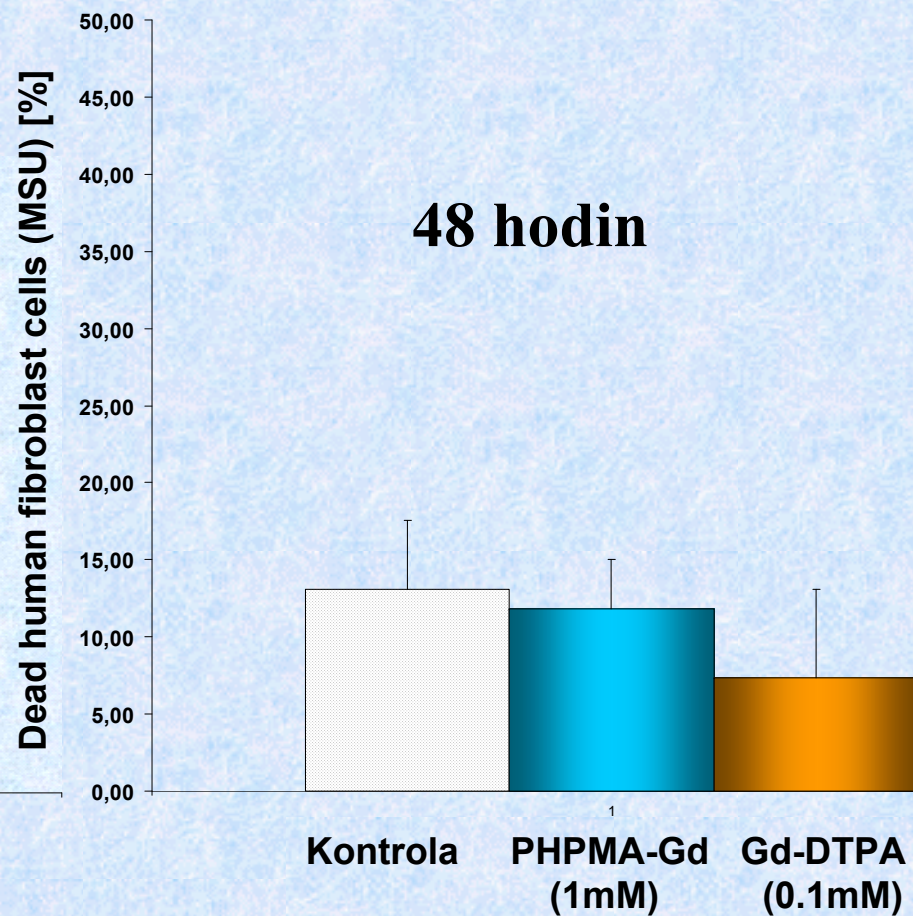
(lidské fibroblasty, trypan blue, kontrola Gd-DTPA (Magnevist) od firmy Schering)

Doba inkubace

24 hodin



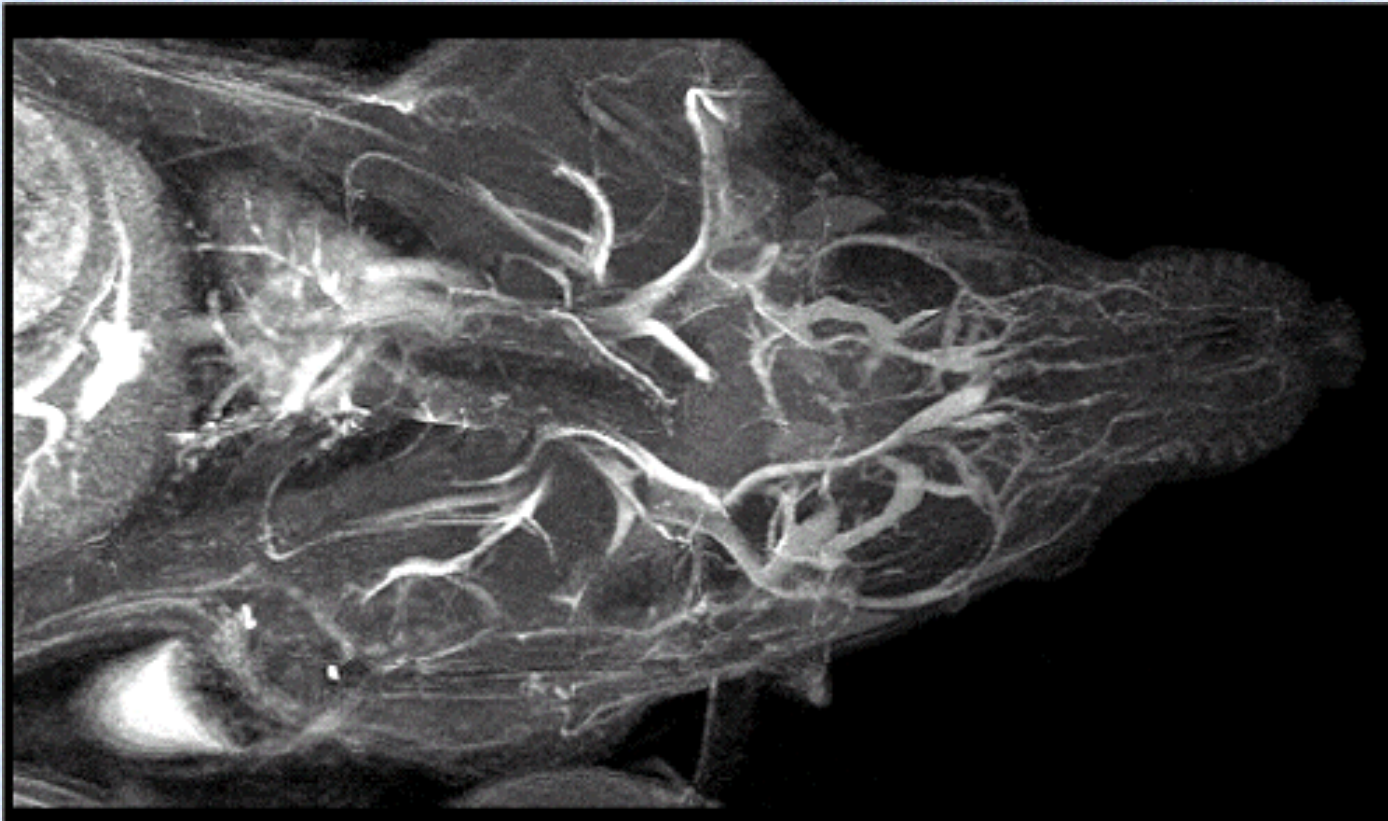
48 hodin



MR-Angiografie, komplex poly(HPMA)-Gd

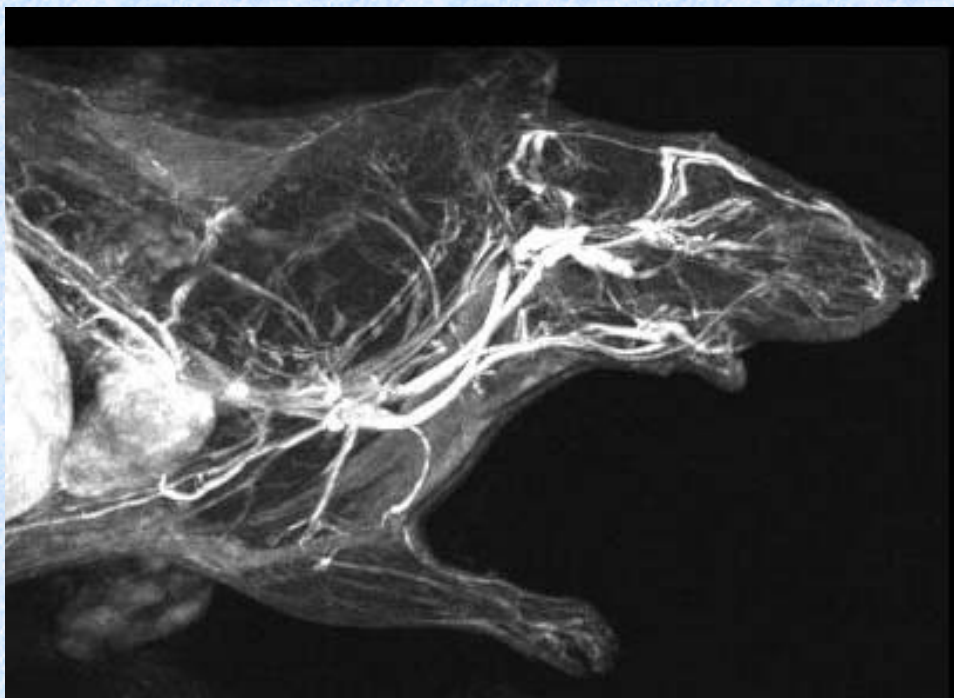
Krysa, 1.5 T MR scanner:

0.02 mmol/kg HE45

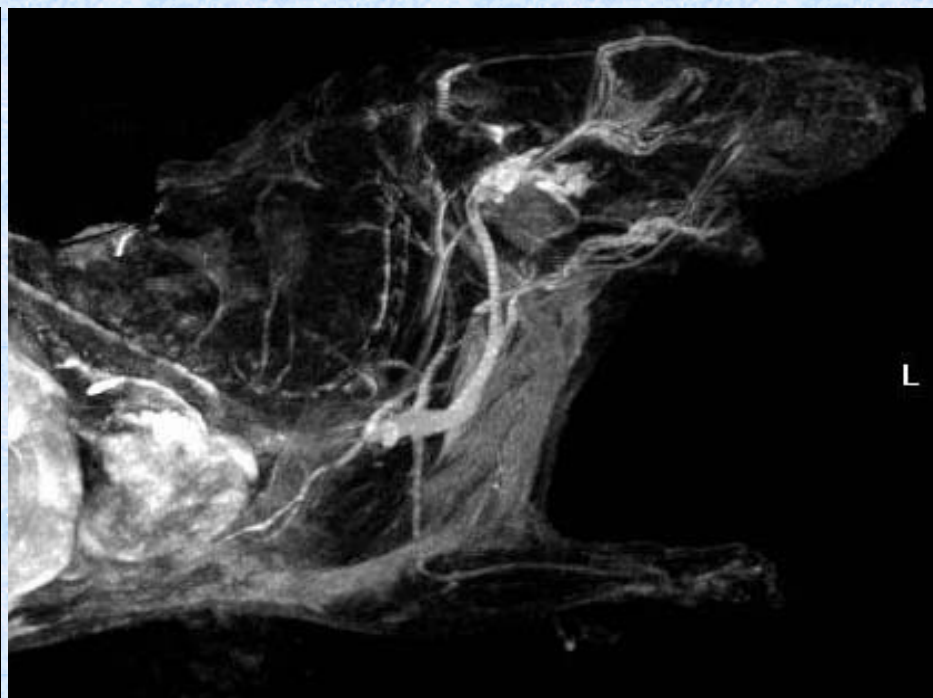


MR-Angiografie u krysy, porovnání komplexu poly(HPMA)-Gd s Gd-DTPA, 1.5 T MR scanner: 0.02 mmol/kg

poly(HPMA)-Gd



Magnevist firmy Schering



ZÁVĚRY I.

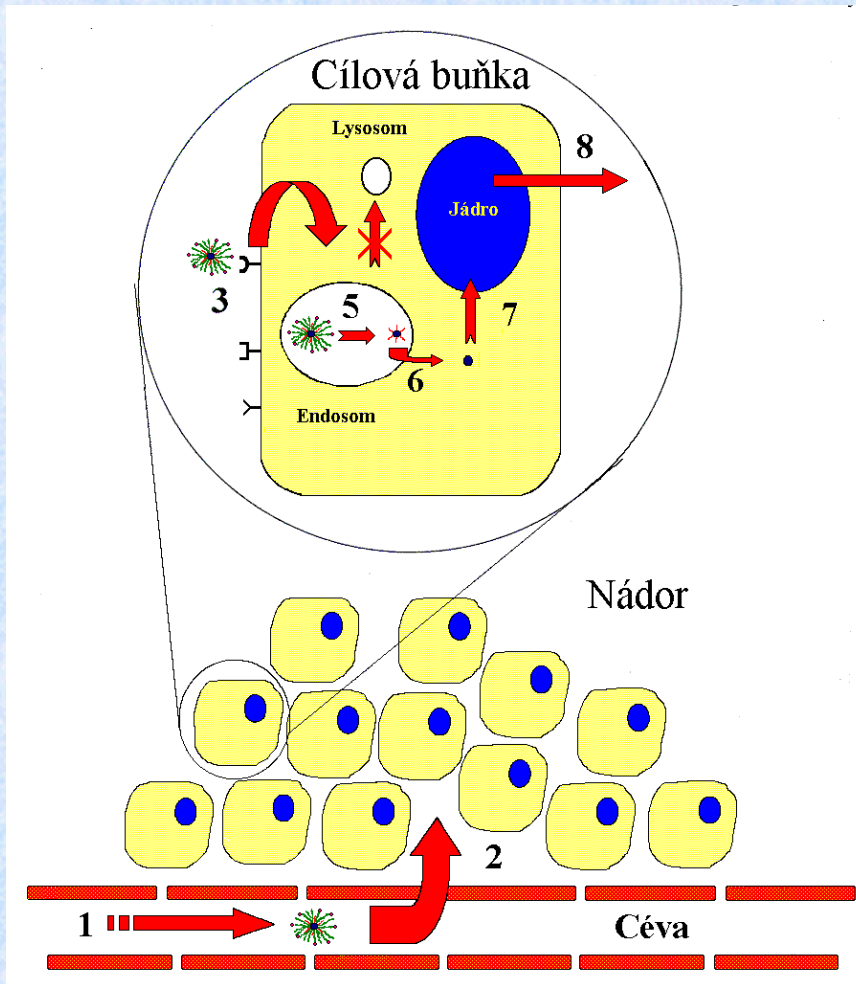
Vodorozpustné polymerní nosiče léčiv mohou najít významné uplatnění při přípravě na nádor směřovaných kancerostatik. Polymerní cytostatika mají minimální vedlejší účinky, nepoškozují imunitní systém jako klasická cytostatika a vykazují, na rozdíl od klasické chemoterapie, **kromě výrazně zlepšeného chemoterapeutického efektu i efekt imunostimulační.** Tento efekt se uplatňuje u různých typů nádorů (u myší i u lidských pacientů).

Kombinací chemoterapie s radioterapií je možné terapeutický účinek polymerních léčiv zvýšit.

Polymerní nosičové systémy mají širokou škálu použití i v jiných oblastech medicíny, např. v diagnostice (MR zobrazení).

Syntetické polymery jako součást vektorů pro genovou terapii

Požadavky na systém pro dopravu genu účinný v *in vivo* podmínkách



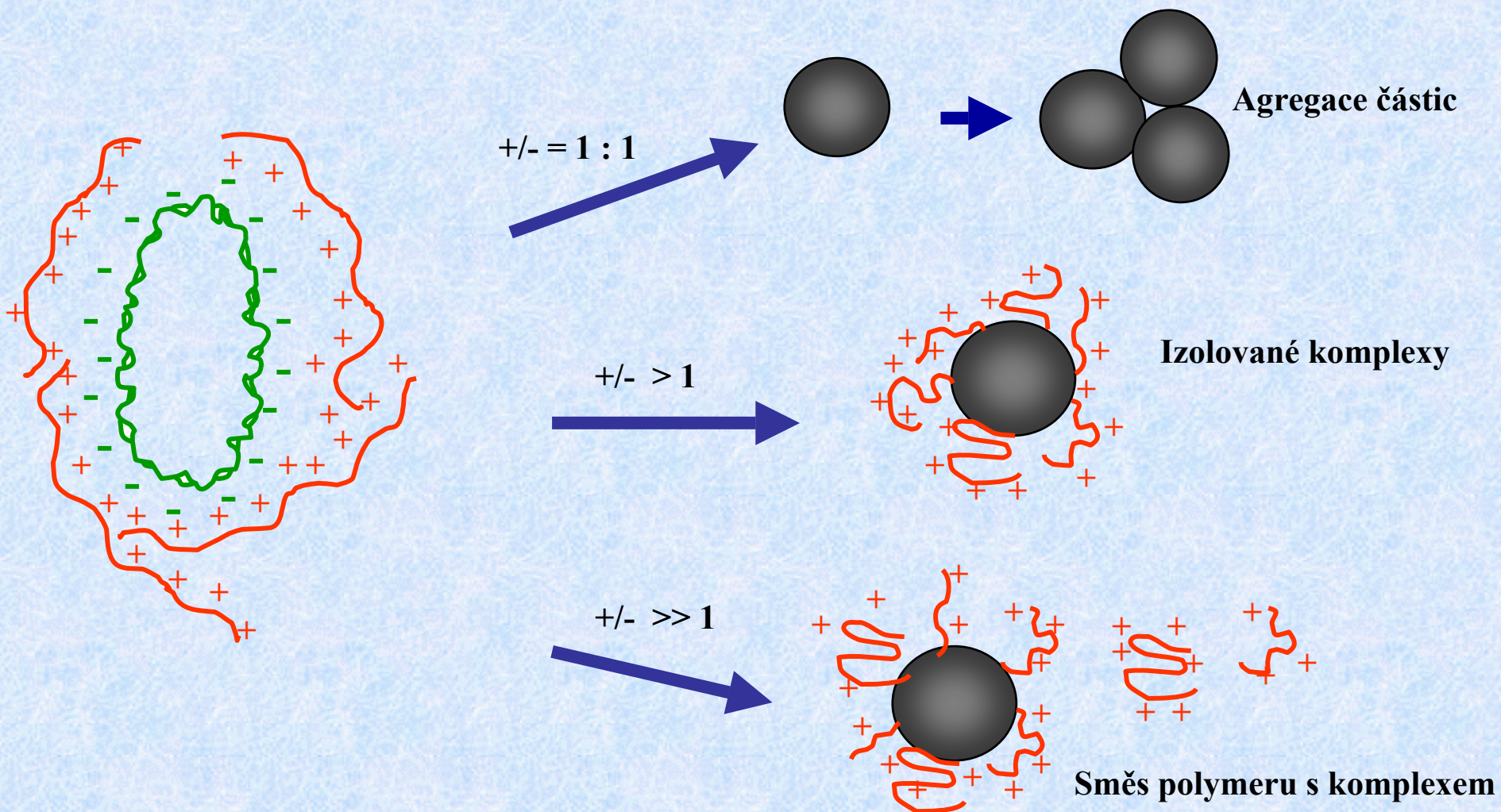
1. Stabilita v krevním řečišti, minimální interakce s buňkami imunitního systému
2. Extravazace do cílové tkáně
3. Interakce s receptory cílových buněk
4. Endocytoza
5. Únik z endosomu do cytoplasmy
6. Transport k buněčnému jádru
7. Účinná transfekce a produkce aktivního proteinu

Systemy pro in vivo dopravu genu

- **Biodegradovatelné nanočástice**
- **Kationtové liposomy**
- **Kationtové lipidy (lipoplexy)**
- **Interpolyelektrolytové (polykationtové) komplexy DNA (polyplexy)**
- **Virální systémy: retroviry, polymerem modifikované rekombinantní adenoviry**

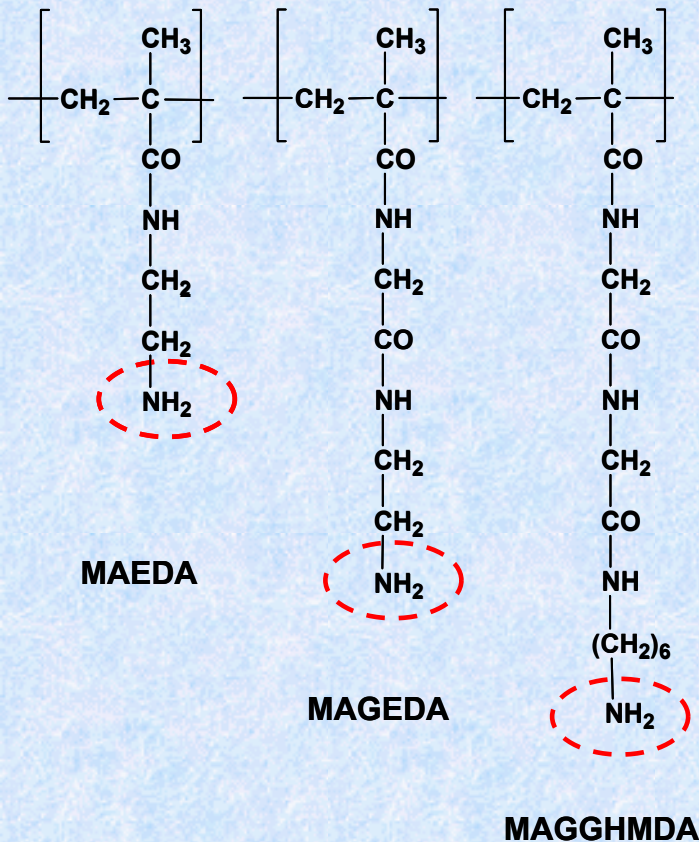
**Interpolyelektrolytové komplexy
(IPEC) polykationtů s DNA
plasmidy (polyplexy)**

Tvorba komplexu polykation-DNA

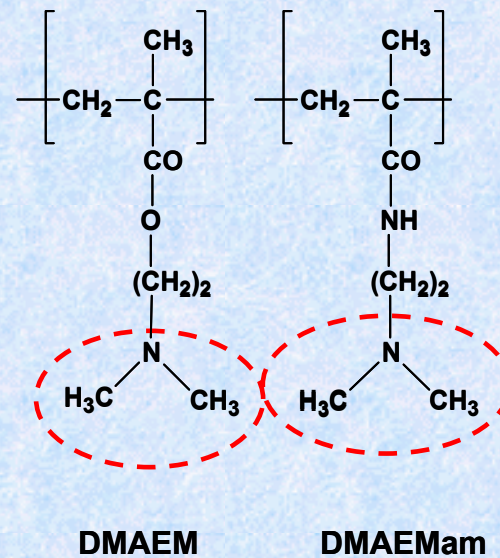


Polykationty použité pro přípravu IPEC

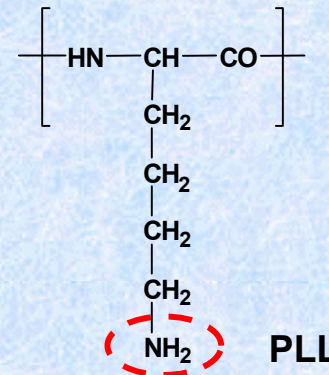
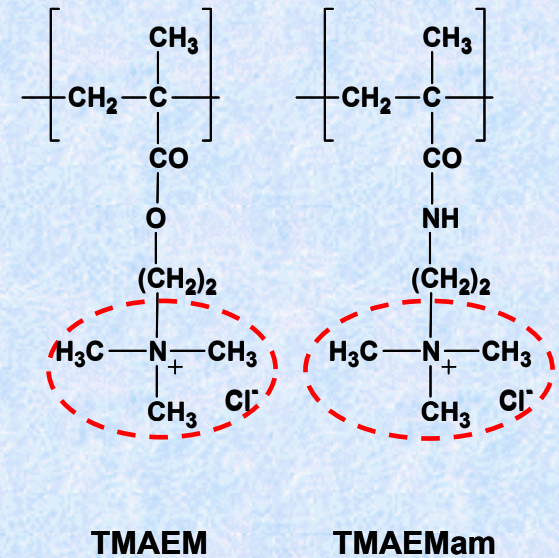
a) Primární amíny



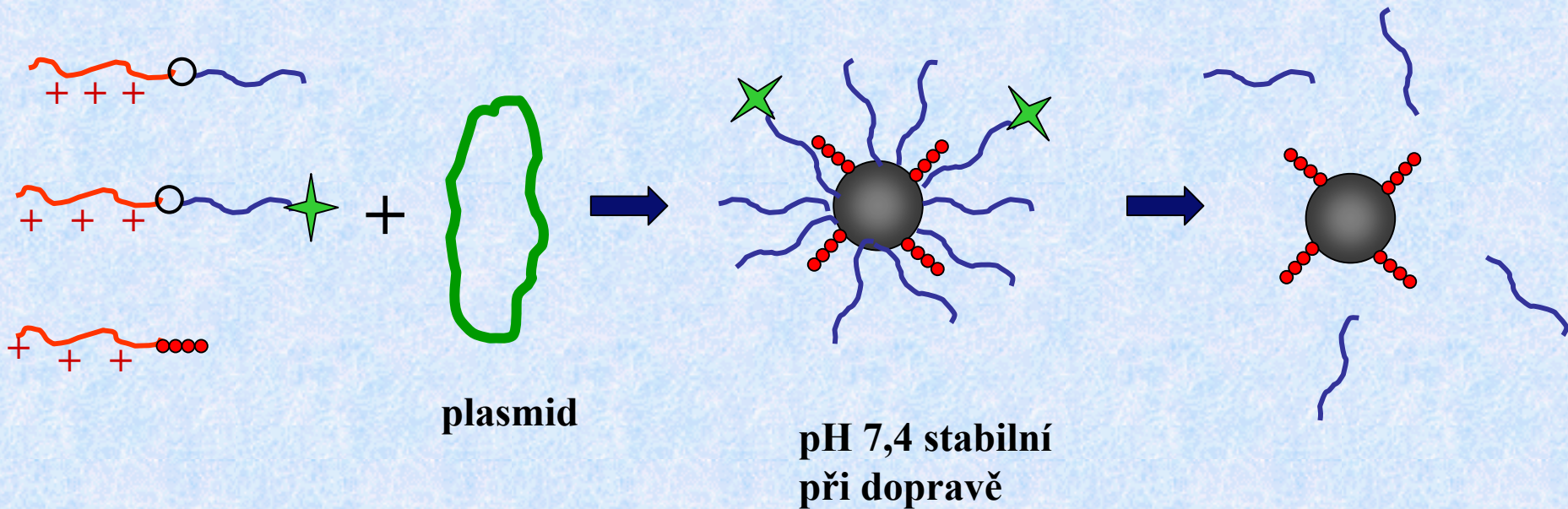
b) Terciární amíny



c) Kvarterní amoniové soli



Multifunkční polykationtový vektor pro dopravu genu připravený kondensací DNA s blokovými kopolymery polykationtů a hydrofilních polymerů



●●● Fusogenní molekula (peptid)

★ Směřující jednotka

○ Hydrolyticky labilní vazba (při $pH < 6$)

Uvnitř buňky při $pH < 6$ se plasmid uvolní z endosomu

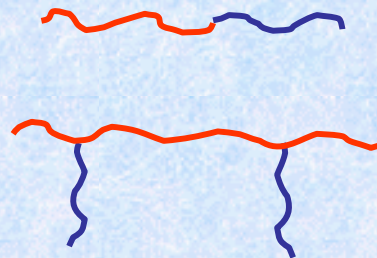
Stabilizace komplexů DNA/PLL hydrofilním polymerem

**Blokový nebo
roubovaný kopolymer**

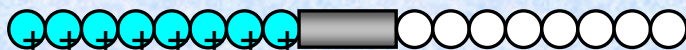
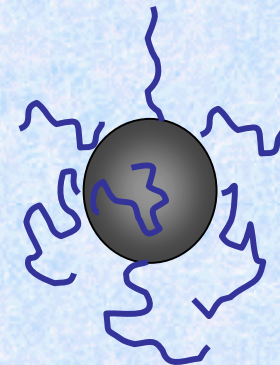
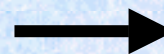


DNA plamid

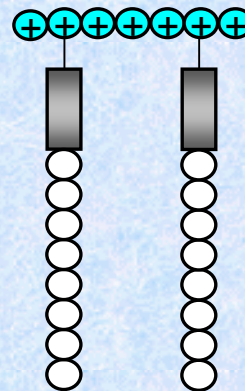
+



+/- = 1 : 1



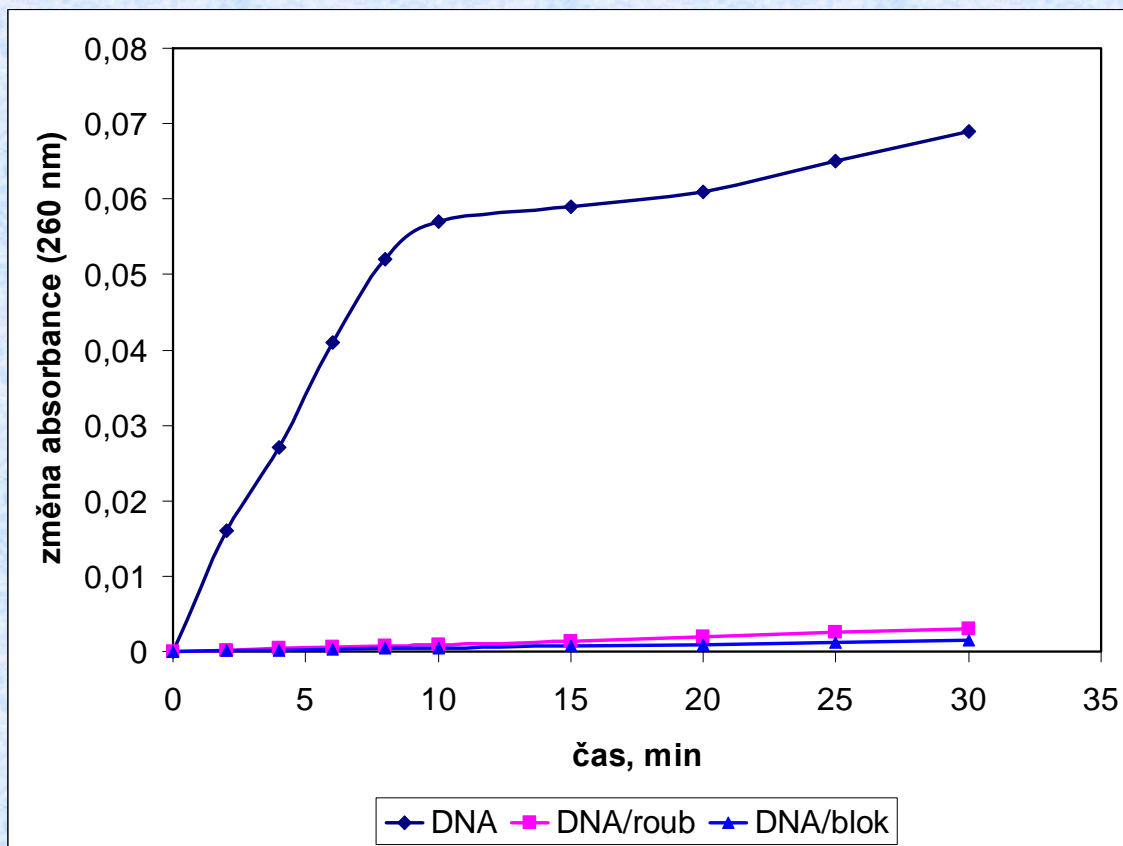
poly(TMAEM-b-HPMA)



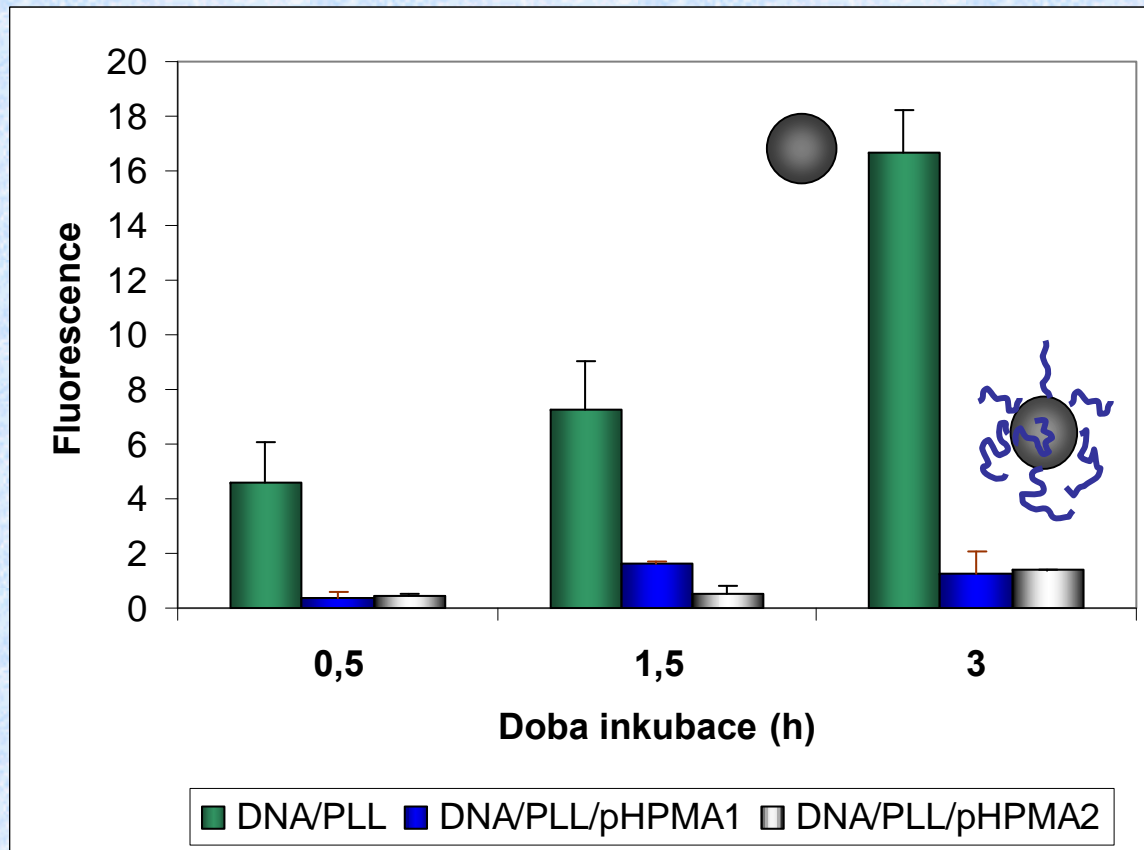
**Biodegradovatelná
spojka: oligopeptid,
hydrazon, disulfid**

Stabilita polykationtového komplexu DNA stabilizovaného hydrofilním PHPMA kopolymerem při inkubaci s DNazou

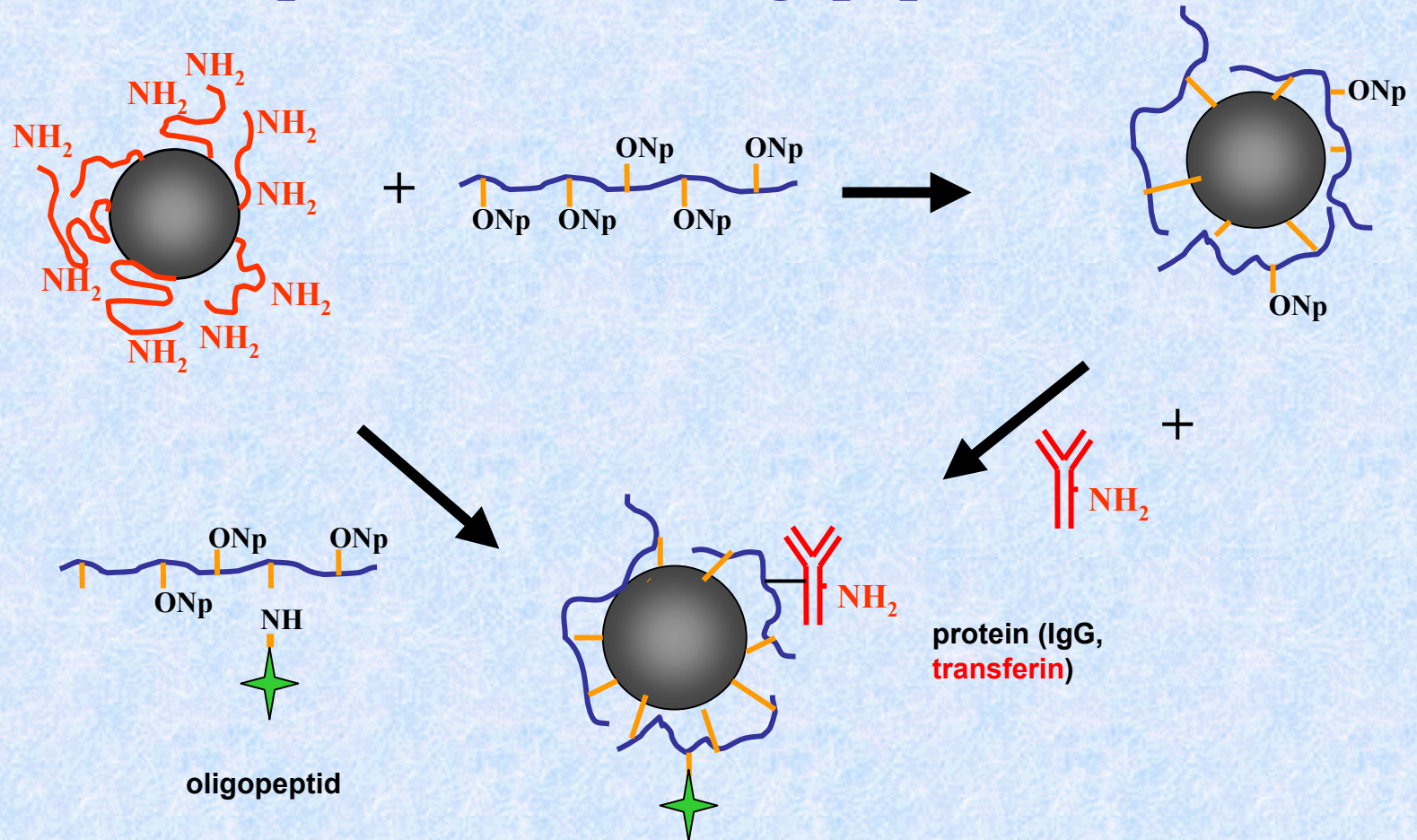
(fosfátový pufr, pH 7.4, 37 °C)



Asociace polymerem (pHPMA) modifikovaného komplexu pLL/plasmid DNA s myšimi peritoneálními makrofágy v 50% telecím séru

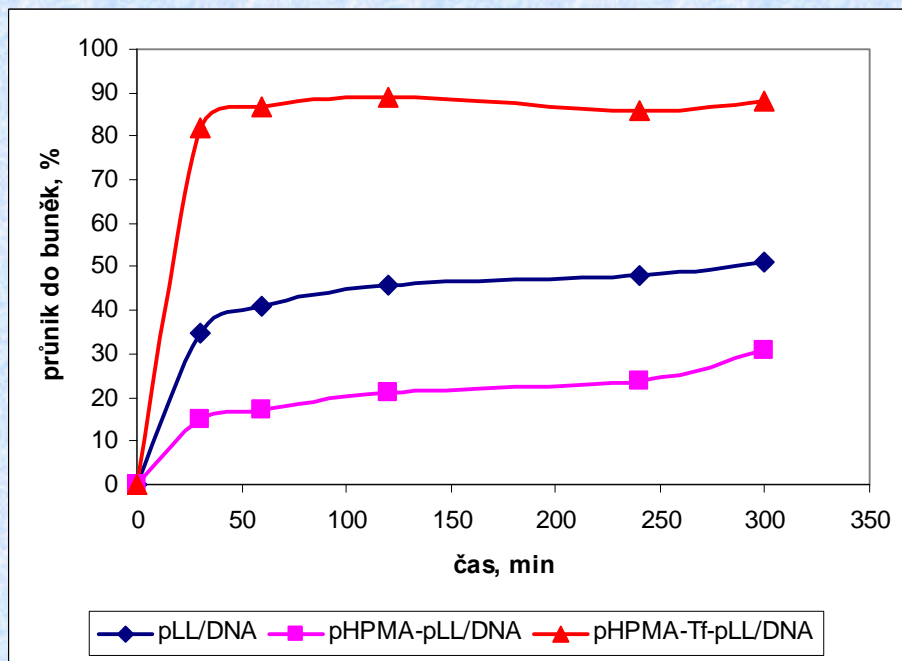


Povrchová úprava IPEC pomocí HPMA kopolymeru, využití pro cílenou dopravu IPEC pomocí aktivních proteinů nebo oligopeptidů

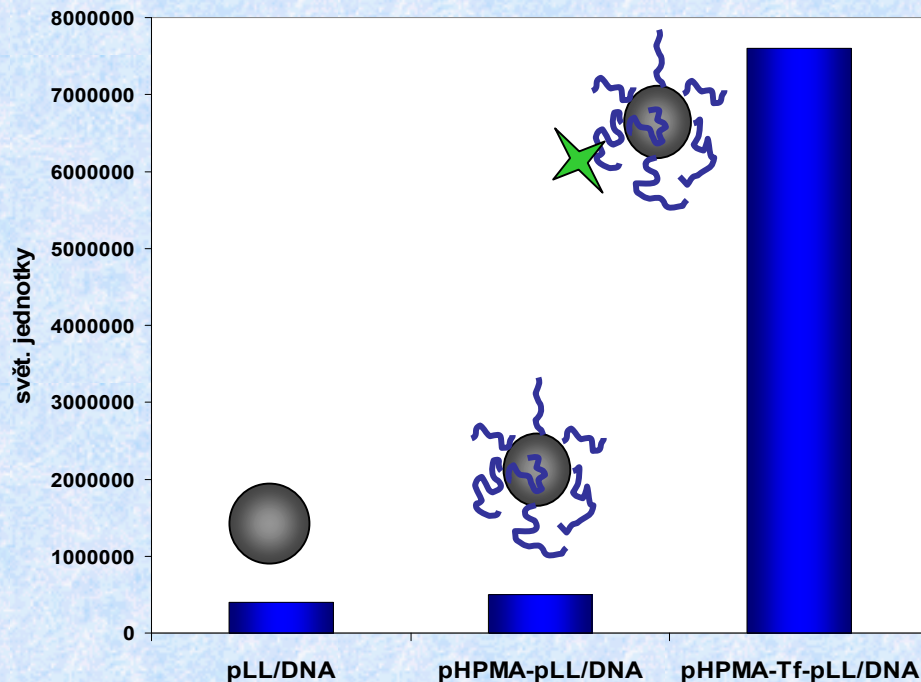


Průnik do buněk K562 (lidská leukemie) a účinnost transfekce komplexů pLL/DNA (gen kódující β -Gal). Směrování transferinem.

Průnik PL/DNA komplexu do buněk, vliv směrování



Účinnost přenosu genu v in vitro podmínkách

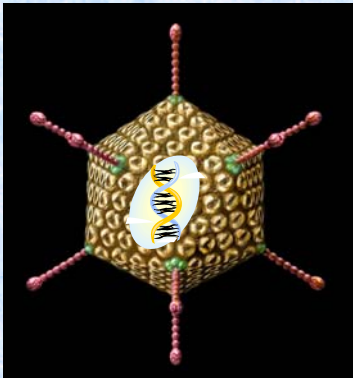


Virální systémy, rekombinantní adenoviry

Adenovir: Potenciální vektor pro nádorovou genovou terapii

Požadavky na intravenózní aplikaci:

- Virus se nesmí vázat na erythrocyty a neutrofilly
- Nesmí napadat makrofágy a buňky RES
- Nesmí docházet k neutralizaci protilátkami a komplementem
- Nesmí docházet k záchytu viru v jaterních buňkách
- Musí být schopen specifického směřování k vybraným buňkám (retargeting)

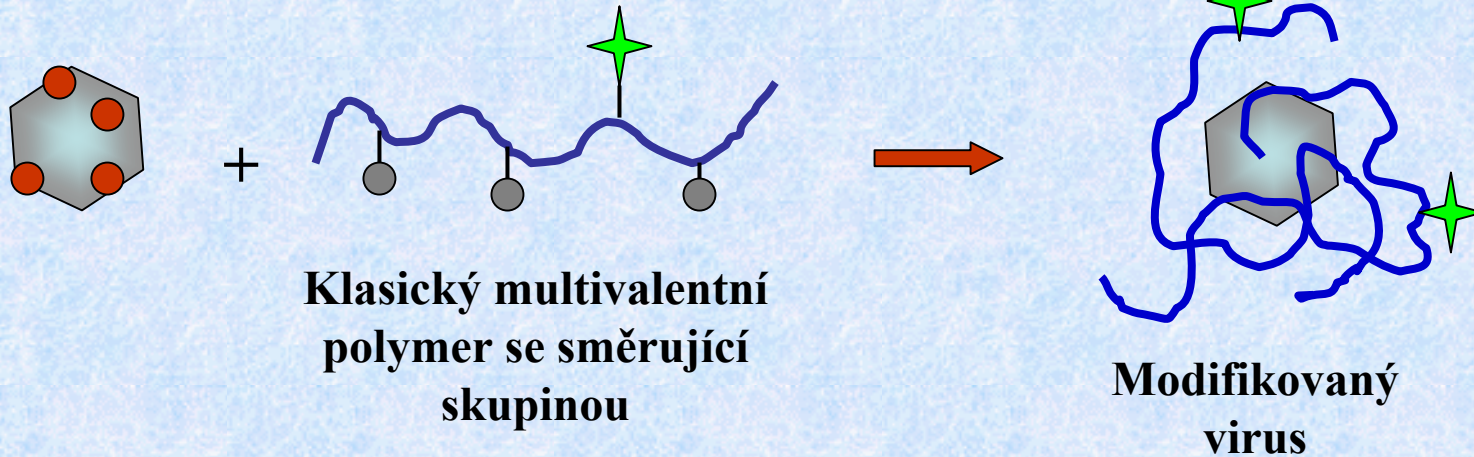
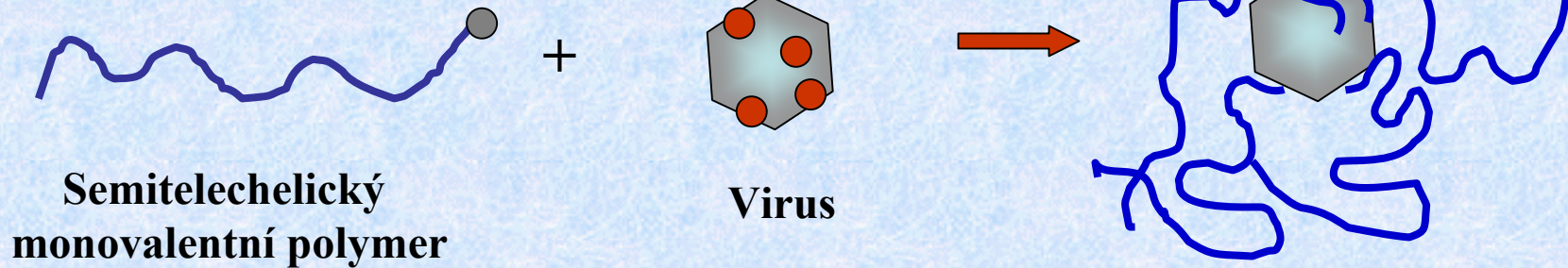


Receptory: coxsackie a adenovirus receptory (CAR), receptory pro „fibre knob“ ligandy

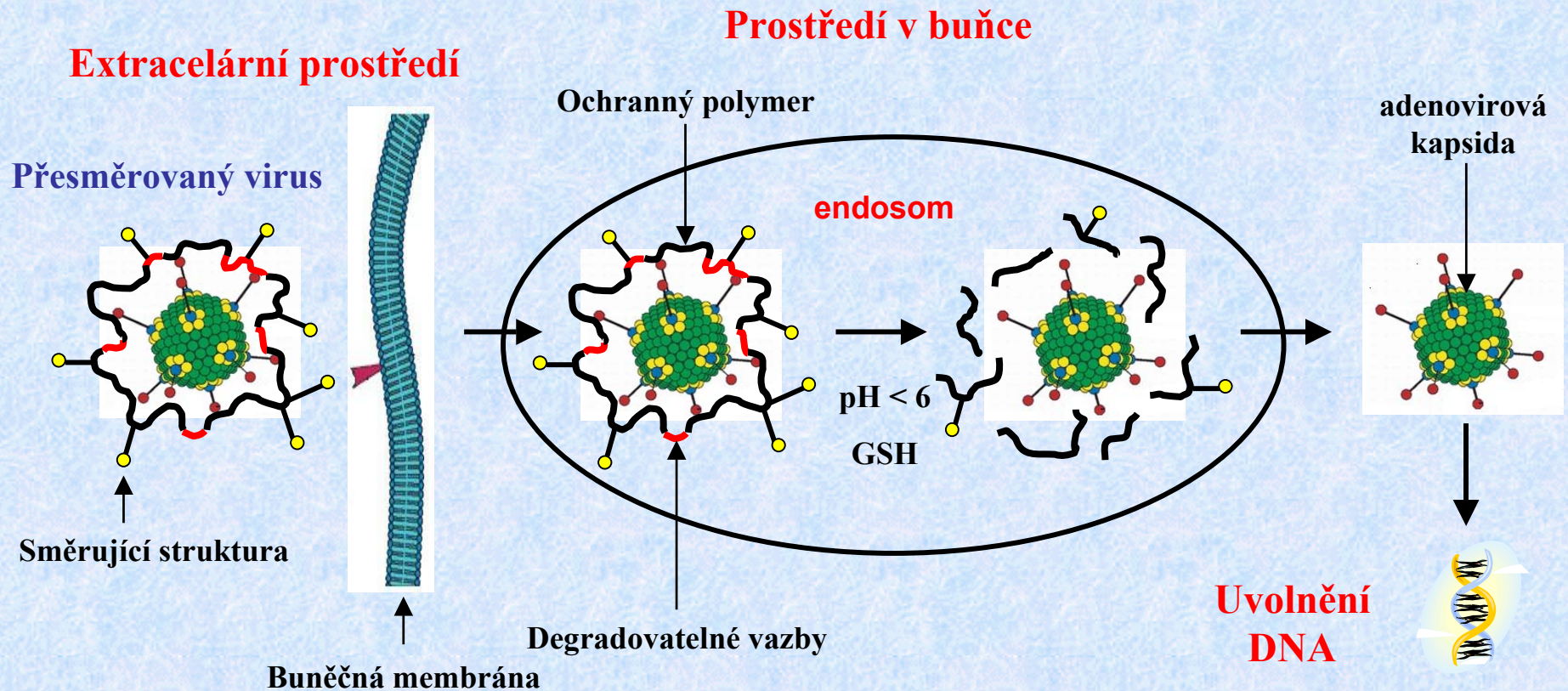
Povrchová modifikace viru hydrofilním polymerem

● Aminoskupina

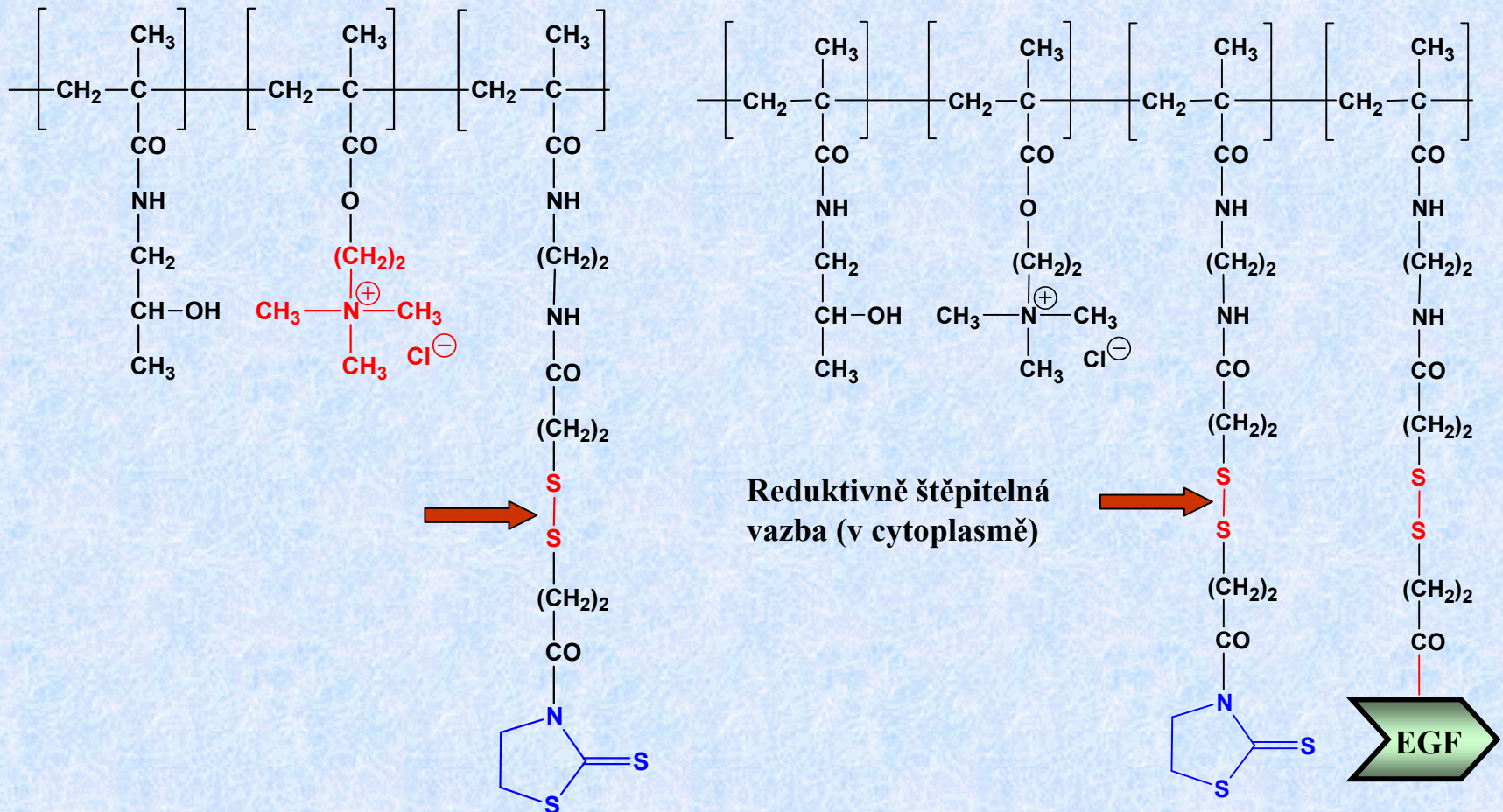
● Reaktivní esterová skupina



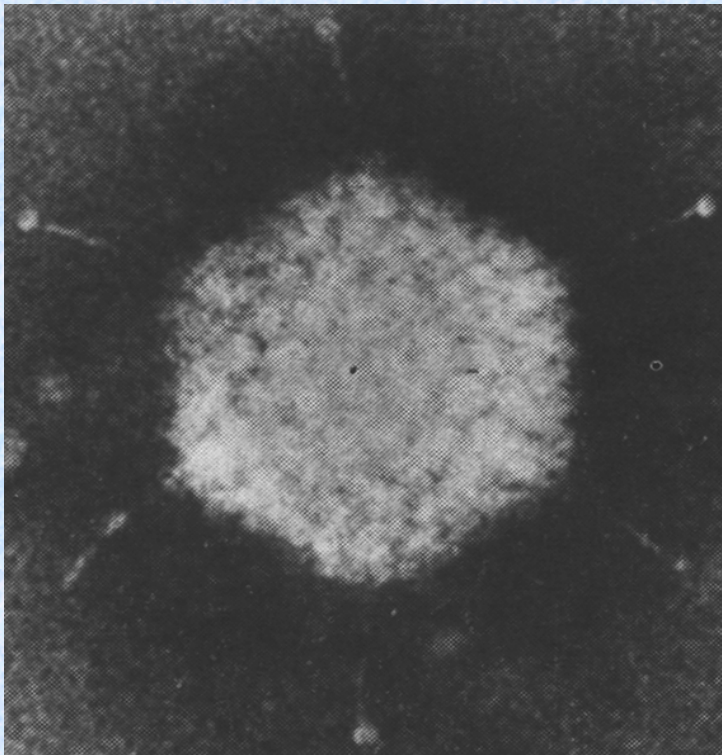
Osud povrchově modifikovaného viru v cílové buňce



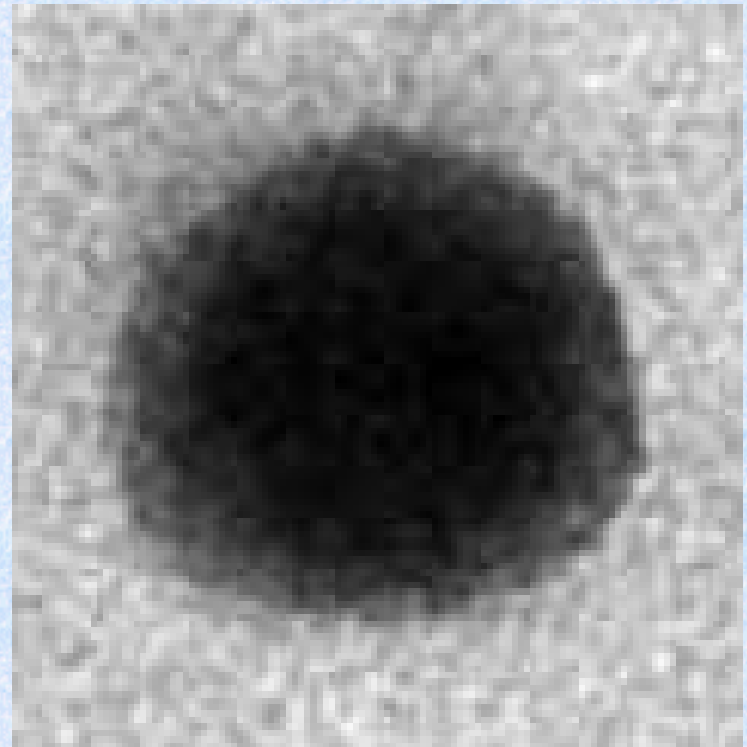
Příklad HPMA kopolymerů určených pro povrchovou úpravu virálních nosičů genu



Modifikace virů kopolymerem HPMA obsahujícím směrující skupinu

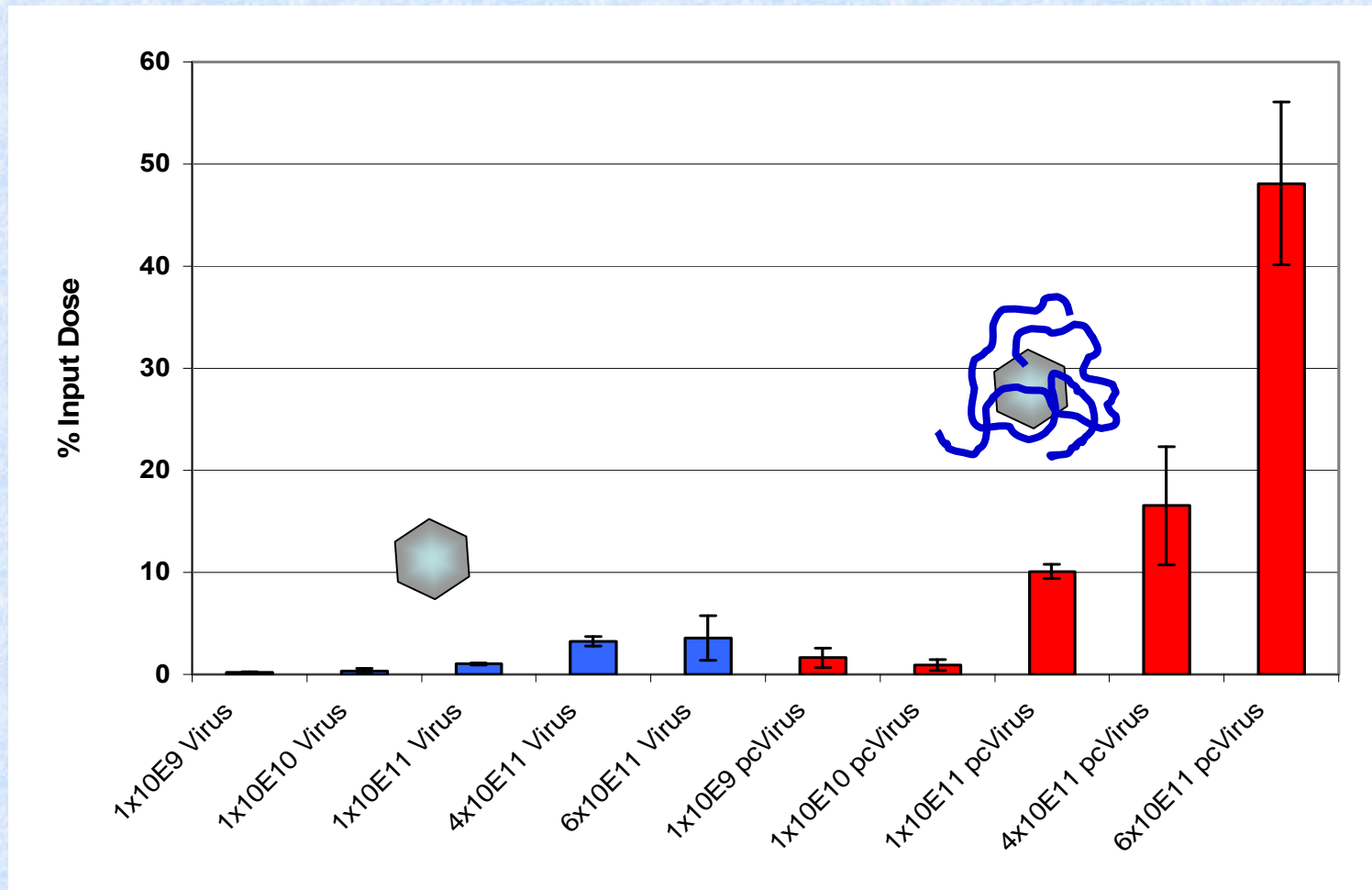


Nemodifikovaný virus



Polymerem modifikovaný virus

Množství nemodifikovaných a polymerem modifikovaných virů v krvi po 30 min od aplikace (% vstupní dávky, myši BALB/C)



Modifikace viru polymerem a vhodná dávka vede ke snížení poměru počtu virů v játrech vers. krev z poměru >2000 na <1.

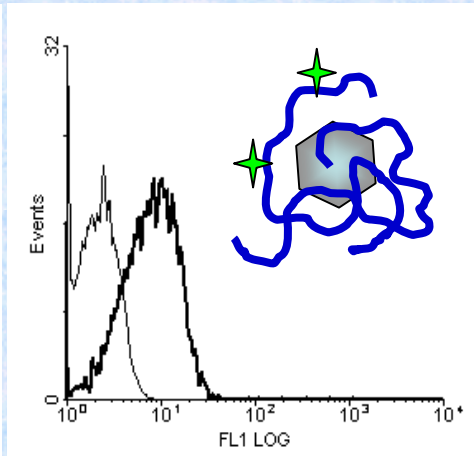
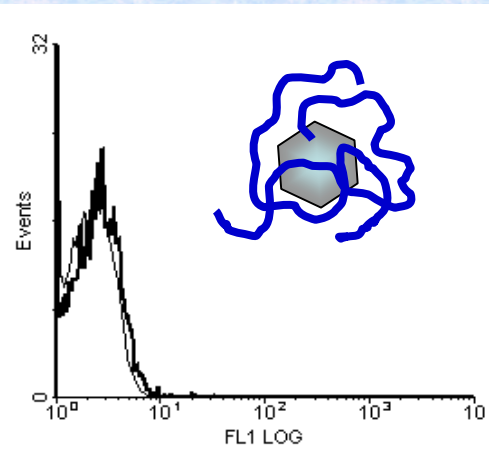
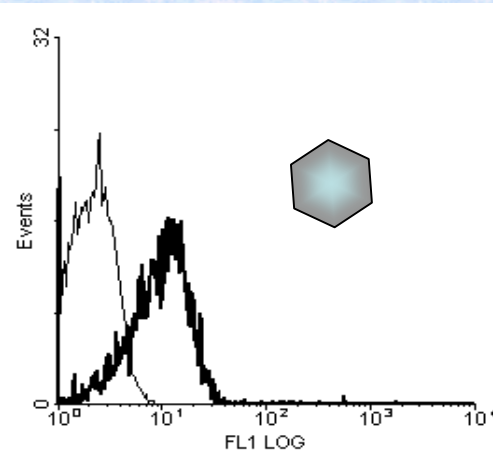
Polymerem modifikovaný nesměrovaný adenovirus Ad5-GFP ztrácí schopnost účinně infikovat buňky (A549 – plicní nádor), připojením směřující struktury se aktivita specificky obnoví

Nemodifikovaný virus

Polymerem modifikovaný virus

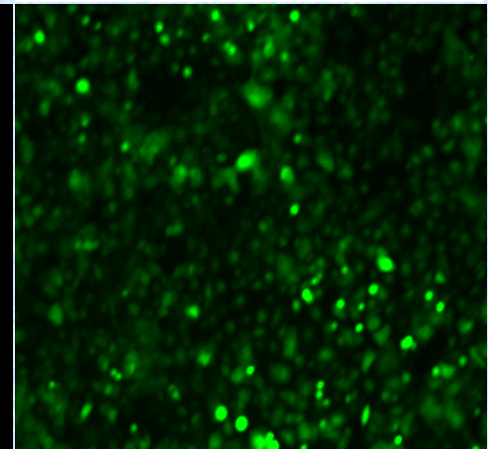
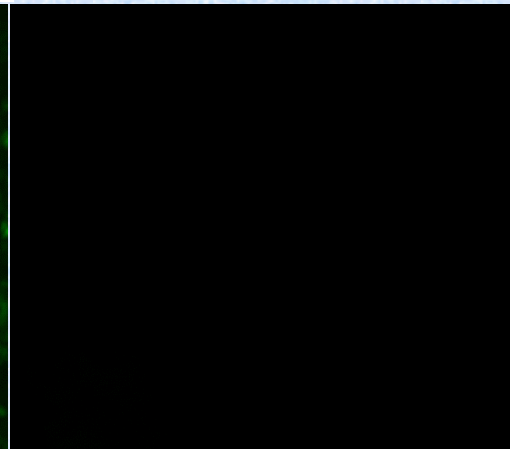
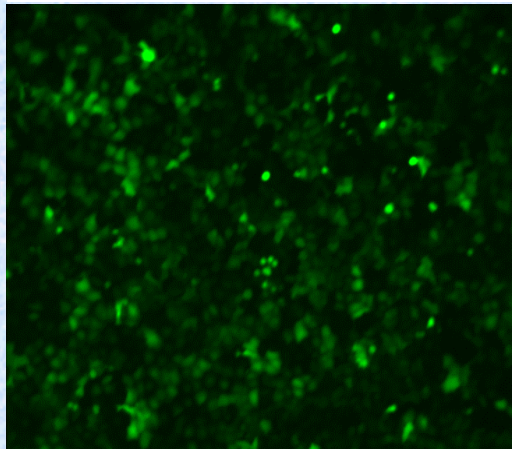
Virus retargetovaný pomocí bFGF

Asociace s buňkami (FACS)



Transgenní exprese genu

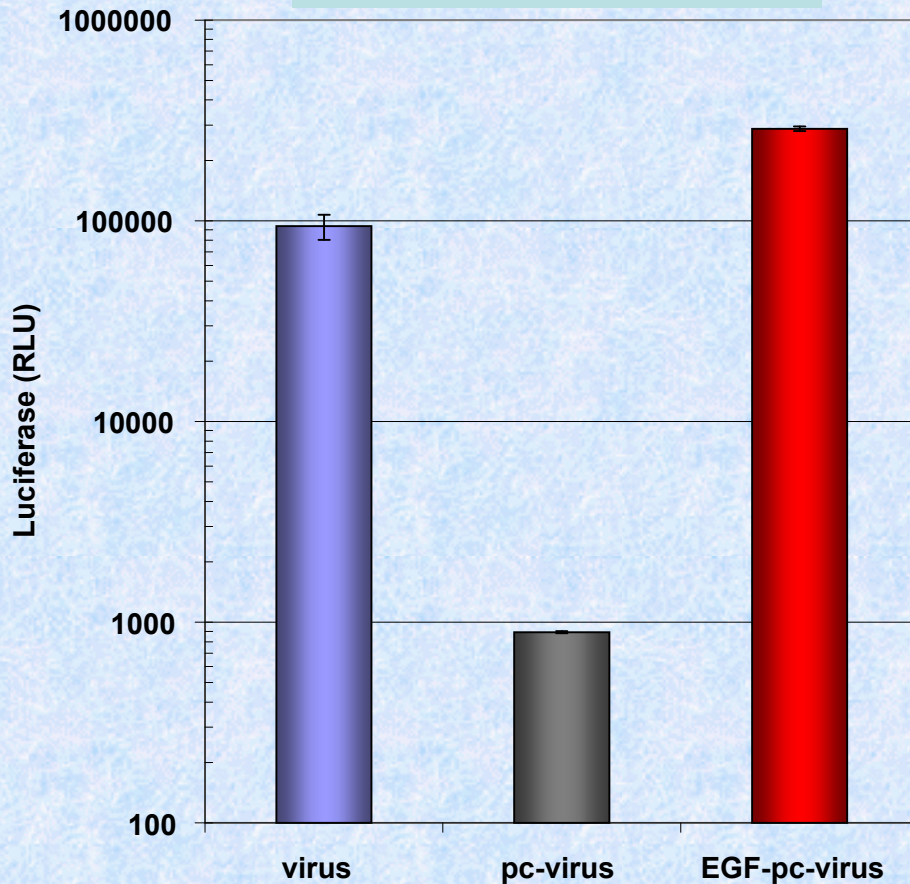
Ad5-GFP



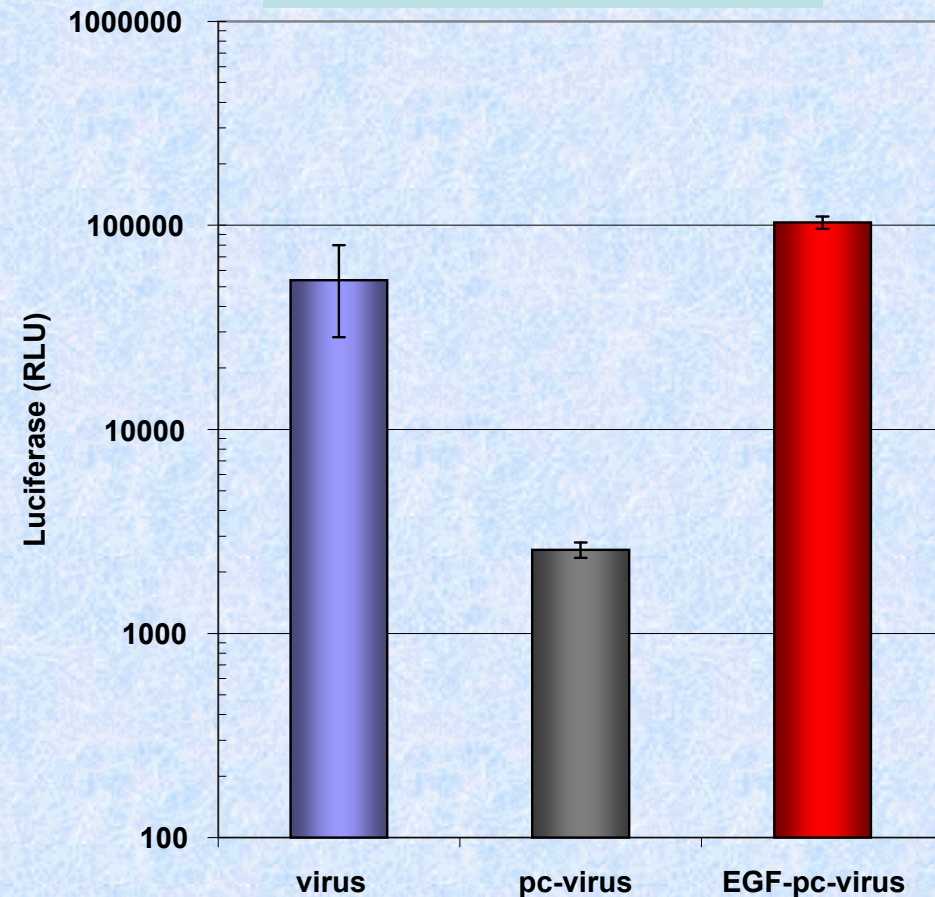
Retargeting adenoviru (Ad5-luc) pomocí **EGF**

(epidermální růstový faktor)

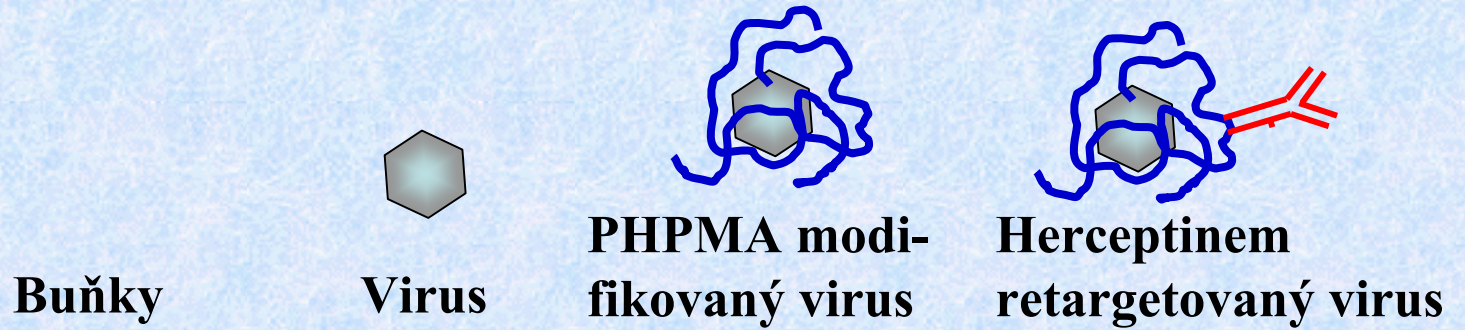
Vaginální nádor A431



Ovariální nádor SKOV 3

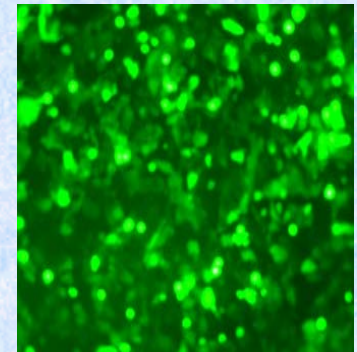
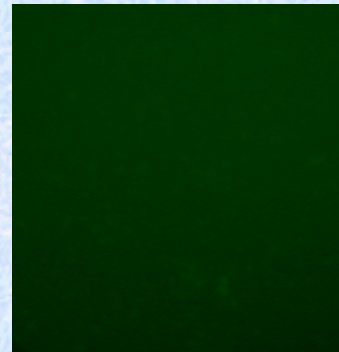
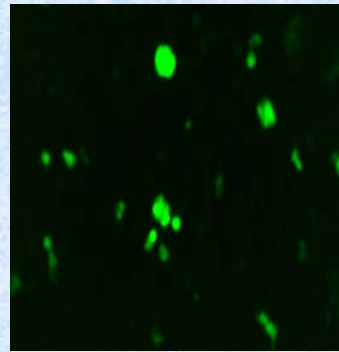


Expresse polymerem modifikovaného viru Ad5-GFP směřovaného humanizovanou protilátkou **herceptinem**



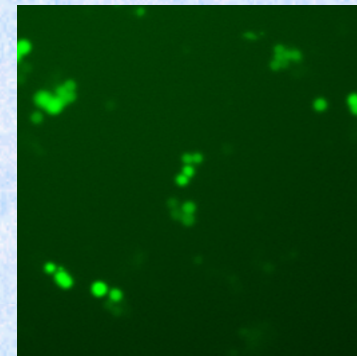
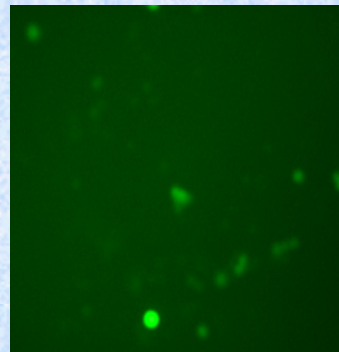
SKOV3

Ovariální
nádor



K562

Lidská
leukemie



Závěry II

- **Polykationty tvoří dostatečně malé a stabilní komplexy s DNA a plasmidy**
- **Stabilitu polykationt/DNA komplexu je možné ovlivňovat strukturou polykationtu a modifikací povrchu komplexu hydrofilním polymerem**
- **Účinnost transfekce IPE komplexů může být ovlivňována změnami struktury komplexu a zavedením funkčních molekul (směrování)**
- **Modifikace adenoviru hydrofilním HPMA kopolymerem vede k prodloužené cirkulaci viru v krvi a až k 1000 násobné redukci exprese genu (poklesu nespecifické infekivity).**
- **Expresi genu je možné obnovit specifickým směrováním polymerem modifikovaného viru pomocí specifických oligopeptidů i proteinů (transferin, herceptin).**
- **Specifita směrování virálního vektoru je výrazně závislá na struktuře směrující molekuly**
- **IPEC i polymerem modifikované viry jsou slibnými vektory s potenciálním využitím v genové terapii**

Poděkování

- Všem spolupracovníkům Oddělení biolékařských polymerů, ÚMCH AV ČR (*návrhy struktur, syntéza všech konjugátů a jejich fyzikálně chemická charakterizace*)
- MBÚ AV ČR, kolektivu vedenému prof. RNDr. B. Říhovou, DrSc., (*biologické vlastnosti polymerních směrovaných léčiv*)
- Krebsforschungsinstitut Heidelberg, kolektivu Dr. P. Peschkeho (*biologické hodnocení polymerních diagnostik a terapeutik*)
- University of Oxford, kolektivu prof.L.W. Seymoura (*virální a nevirální vektory pro genovou terapii*)
- Poděkování GA ČR, AV ČR, grantu EU a firmě ZENTIVA a.s. za finanční podporu výzkumu



