



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00632

(22) Data de depozit: 14/10/2022

(41) Data publicării cererii:
30/04/2024 BOPI nr. 4/2024

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE CHIMIE ORGANICĂ ȘI SUPRAMOLECULARĂ "COSTIN D.NENIȚESCU" AL ACADEMIEI ROMÂNE(ICOS), SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.202B, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE MEDICO-MILITARĂ "CANTACUZINO", SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.103, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• JERCA FLORICA ADRIANA, BD.UNIRII, NR.37, BL.A4, SC.4, ET.4, AP.89, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• JERCA VALENTIN VICTOR, BD.UNIRII, NR.37, BL.A4, SC.4, ET.4, AP.89, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• GHIBU EMILIAN, BD.CHIȘINĂU, NR.26, BL.M15, SC.B, ET.2, AP.67, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• BANU DORIANA NICOLETA, STR.RĂSCOALA 1907, NR.10, BL.14, SC.1, ET.2, AP.11, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• GIOL ELENA-DIANA, VALEA CETĂȚII, NR.25, BL.A32B, SC.A, AP.28, BRAȘOV, BV, RO;
• CARAȘ IULIANA, STR. VLĂDEASA, NR.4, BL.C75, SC.1, ET.3, AP.18, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• ȚUCUREANU CĂTĂLIN, STR. CETATEA HISTRIA NR.5, BL.MIIB8/15, AP.22, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• TOFAN VLAD- CONSTANTIN, STR.DRUMUL BINELUI, NR.19-21, BL.5, SC.1, AP.44, ET.5, AP.4, BUCUREȘTI, B, RO;
• SALAGEANU AURORA, STR. MARIA ROSETTI NR. 10, AP. 28, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• VASILE VALENTIN, STR.DR. VICTOR BABEȘ, NR.4, BUZĂU, BZ, RO;
• PALADE BIANCA, STR.BRIZEI, NR.1F, BL.OB5, ET.3, AP.22, CONSTANȚA, CT, RO

(54) CONJUGATE POLIMERICE PE BAZĂ DE POLI(2-IZOPROPENIL-2-OXAZOLINĂ) ȘI DOXORUBICINĂ PENTRU IMUNO-CHIMIO-TERAPIA CANCERULUI ȘI PROCEDEU DE OBTINERE AL ACESTORA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor conjugate polimerice degradabile pe bază de poli(2-izopropenil-2-oxazolină) (PiPOx) și doxorubicină (DOX) și utilizarea lor în imuno- chimio-terapie cancerului. Procedeu, conform invenției, constă în etapele:

I) sinteza de polimeri de PiPOx cu diverse grade de polimerizare prin polimerizare anionică,

II) modificarea acestora prin reacție polimer analogă a PiPOx, cu esteri ai acizilor omega-mercapto carboxilici, rezultând copolimeri care conțin grupări esterice în catena laterală

III) hidrazinoliza grupărilor esterice din catena laterală pentru a introduce grupări hidrazidă și respectiv

IV) tratarea cu clorhidrat de DOX pentru a obține conjugatul polimeric PiPOx-DOX, folosit în tratamentul celulelor tumorale pentru a induce moarte celulară imunogenă.

Revendicări: 5

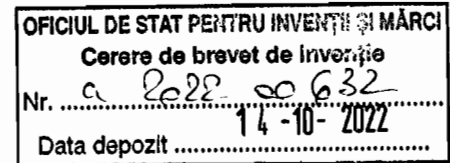
Figuri: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



CONJUGATE POLIMERICE PE BAZĂ DE POLI(2-IZOPROPENIL-2-OXAZOLINĂ) ȘI DOXORUBICINĂ PENTRU IMUNO-CHIMIO-TERAPIA CANCERULUI ȘI PROCEDU DE OBTINERE AL ACESTORA

Florica Adriana JERCA, Valentin Victor JERCA, Emilian GHIBU, Nicoleta Doriană BANU, Elena Diana GIOL, Iuliana CARAȘ, Cătălin ȚUCUREANU, Vlad Constantin TOFAN, Aurora SĂLĂGEANU, Valentin VASILE, Bianca PALADE



1. Domeniul tehnic în care poate fi folosită invenția

Prezenta invenție se referă la dezvoltarea unor conjugate polimerice degradabile pe bază de poli(2-izopropenil-2-oxazolină) (PiPOx), ca sistem avansat de eliberare a doxorubicinei (DOX), ce pot fi folosite în imuno-chimio-terapia cancerului. Principiul de eliberare a DOX, după internalizarea conjugatului polimeric în celulele afectate, se bazează pe hidroliza selectivă a legăturilor hidrazonă în condiții fiziologice relevante de temperatură și pH specifice locului tumorii. Conjugatele polimerice pe bază de PiPOx-DOX sunt sisteme avansate de administrare a agentului chimio-terapeutic deoarece sunt concepute să își mențină stabilitatea chimică în circulația sistemică pentru o perioadă prelungită și să elibereze DOX la locul țintă, după internalizarea în celulele tumorale, având un efect citotoxic minim asupra celulelor sănătoase. Acest tip de sistem de eliberare controlată a agentului chimio-terapeutic prezintă diferite căi de endocitare, spre deosebire de difuzia pasivă prin membranele celulare caracteristică DOX liberă, fiind capabil să amelioreze unele mecanisme de rezistență întâlnite la medicamente cunoscute, și induce moartea celulară imunogenă.

2. Descrierea stadiului actual

La nivel mondial, cancerul este cea de-a doua cauză de deces care afectează grav sănătatea umană fiind responsabil pentru aproximativ 9,6 de milioane dintre cazurile de deces înregistrate în 2018. [1] Tratamente convenționale ale cancerului includ chirurgia, chimioterapia, imunoterapia și radiatiile, în timp ce abordările moderne de combatere a cancerului se bazează pe terapia cu celule stem, hipertermia, terapia fotodinamică, tratamentul cu laser, și altele. [2-5] Dintre acestea, chimioterapia, singură sau în combinație cu alte tratamente precum chirurgia sau radiatiile, este cea mai utilizată metodă terapeutică. Chimioterapia neoadjuvantă este utilizată pentru a micșora tumorile înainte de operație [5], în timp ce chimioterapia adjuvantă este utilizată după intervenția chirurgicală sau radiatii pentru a ucide celulele canceroase rămase. Chiar și așa, chimioterapia convențională este adesea asociată cu o fereastră terapeutică scăzută

din cauza proprietăților farmaco-cinetice slabe ale medicamentelor utilizate. [5] Totodată, agenții chimioterapeutici folosiți nu prezintă selectivitate pentru celulele tumorale și afectează în cele mai multe cazuri și celulele sănătoase cu rate mitotice ridicate. Acestea pot duce la reacții adverse care ridică riscul de deces la pacienții cu cancer. Severitatea efectelor secundare și dezavantajele asociate cu formele de dozare convenționale ale agenților chimioterapeutici, inclusiv evacuarea renală rapidă, degradarea enzimatică, etc. pot fi ameliorate prin conjugare cu diferite tipuri de polimeri. [6, 7]

În prezent, cea mai de succes strategie de conjugare implică atașarea agentului terapeutic pe lanțuri polimerice de poli(etilenglicol) (PEG), cunoscută sub numele de metoda "PEG-ilării". [8] S-a demonstrat că PEG-ilarea îmbunătățește eficacitatea terapeutică prin protejarea agenților (chimio)terapeutici de sistemul imunitar și de degradarea acestora în circulația sistemică. [9] Astfel, au fost dezvoltate diverse aplicații comerciale ce au la bază conjugate pe bază de PEG cu enzime, citokine, anticorpi, și lipozomi. [10, 11] Cu toate acestea, riscurile asociate folosirii PEG-ului, cum ar fi formarea de anticorpi împotriva PEG, hipersensibilitate la PEG și vacuolare, ridică anumite rețineri în folosirea PEG-ilării în continuare. [12,13] De asemenea, datorită structurii sale chimice PEG-ul nu permite decât introducerea a maximum două unități de agent terapeutic pe lanț polimeric, ceea ce conduce la o încărcare foarte mică a conjugatelor cu agent terapeutic.

În consecință, au fost dezvoltate noi strategii pentru prepararea conjugatelor polimerice care au la bază bloc-copolimeri sau copolimeri statistici funcționali ce conțin în catena laterală unități reactive ce permit încorporarea unei cantități mai mari de agent terapeutic. [14-16] Astfel, folosind polimerizarea radicalică liberă sau controlată s-au sintetizat conjugate polimerice pe bază de poli(N-2-hidroxiopropil metacrilamidă), poli(metacrililoxietyl fosforilcolină) sau polipeptide. [7, 17-19] Cu toate acestea, reacțiile de polimerizare controlată nu asigură un control suficient de precis asupra distribuției masei moleculare, sau a grupărilor terminale, aceștia fiind factori esențiali în eliberarea eficientă a medicamentului.

Poli(2-alkil/aryl-2-oxazolinele) (PAOx) sunt o clasă de polimeri recent folosită în sinteza conjugatelor polimerice, [20] ce prezintă o mai bună biocompatibilitate și hidrofilie în fluidele corpului, și permit multiple posibilități de funcționalizare ortogonală în comparație cu PEG-ul. [21-23] Totuși, sinteza de PAOx cu masă moleculară înaltă controlată este foarte dificilă și chiar imposibilă în cazul anumitor monomeri datorită reacțiilor de transfer de lanț intrinseci care au loc în timpul reacției de polimerizare, limitând astfel aplicațiile *in vivo*, unde este nevoie de polimeri cu masă moleculară relativ înaltă pentru o circulație sistemică extinsă pe o perioadă prelungită. [24]

3. Problema tehnică

În ultimii 30 de ani, au fost raportate și studiate conjugate polimerice ce au la bază polimeri hidrosolubili în care medicamentul cu efect anticancerigen a fost legat de polimer prin legături covalente nescindabile, legături ionice instabile hidrolitic sau legături covalente susceptibile la hidroliză enzimatică sau chimică simplă. Cu toate acestea, foarte puține conjugate polimerice raportate au ajuns în stadiul clinic, datorită gradului ridicat de dificultate al procesului de sinteză și problemelor legate de eficiența procesului de obținere la scară (semi)industrială. De asemenea, influența unor parametri vitali, cum ar fi: (i) cantitatea de agent citostatic, (ii) selectivitatea în recunoașterea materialului biologic afectat, (iii) dezvoltarea unui legături stabile în circulația sistemică, dar susceptibilă la degradare hidrolitică/enzimatică la locul tumorii, (iv) identificarea situsului de conjugare și (v) tehnologia de conjugare, nu a fost suficient de mult studiată. Totodată nu s-au stabilit modele și corelații cantitative între acești parametri și eficiența și modul de acțiune al conjugatelor obținute. [5] Prin urmare, există o cerere mare pentru dezvoltarea unei platforme de conjugate polimerice alternative, adecvată și capabilă să depășească provocările și limitările actuale.

DOX este un medicament binecunoscut folosit în chimioterapie pentru a trata cancerul de sân, cancerul vezicii urinare, sarcomul Kaposi, limfomul și leucemia limfocitară acută etc. Studii recente au demonstrat că, deși administrarea sistemică de agenți chimio-terapeutici este în general imunosupresoare, tratamentele *in situ* cu antracicline, cum ar fi *DOX* și mitoxantrona, pot induce moartea imunogenă a celulelor tumorale și activa răspunsul imun antitumoral. [25] Imunogenitatea celulelor tumorale reprezintă un factor critic pentru eficiența terapiei în cancer, succesul anumitor terapii antitumorale fiind strâns dependent de capacitatea de a induce moartea celulară imunogenă care presupune eliberarea/expunerea la suprafața celulelor afectate a semnalelor de pericol endogene de tip „damage-associated molecular pattern molecules” (DAMP), cum ar fi HSP70, HSP90, HMGB1, calreticulina, ATP, ceea ce conduce la declanșarea unui răspuns imun anti-tumoral eficient și la stabilirea memoriei imunologice. [26] Pentru majoritatea terapiilor anticancer bazate pe imuno-chimio-terapie utilizarea medicamentelor sub formă de formulări libere, prezintă o eficiență limitată de metabolismul și excreția lor rapidă din organism precum și de distribuția slabă a medicamentelor în cadrul tumorii din cauza aranjamentului haotic al vaselor de sânge în țesutul tumoral și a presiunii interstițiale ridicate, cauzate de lipsa eficiență a drenajului limfatic al lichidului seros infiltrat din vasele din jur. Mai mult, toxicitatea sistemică ridicată a medicamentelor citotoxice limitează beneficiile clinice ale acestora. [27] Diferite studii au arătat că conjugatele polimerice cu diametre hidrodinamice adecvate, pot asigura livrarea agenților terapeutici purtători, preferențial în țesuturile tumorale,

datorită efectului de permeabilitate și retenție crescută a endoteliului vascular din tumori. Polimerii previn eliberarea rapidă a agentului anti-tumoral prin filtrare glomerulară și permit o circulare prelungită în sânge și, astfel, o biodisponibilitate ridicată a agentului. Mai mult, prin legarea chimică a agentului terapeutic de un polimer hidrosolubil se obține o creștere a solubilității agentului terapeutic insolubil sau puțin solubil în mediu apos, toxicitatea acestora fiind redusă semnificativ. De asemenea natura legăturii chimice dintre agentul terapeutic și lanțul polimeric poate asigura eliberarea agentului terapeutic în mod țintit și controlat în prezența anumitor stimuli precum pH, temperatura, sau enzime. [6, 7, 16, 19]

4. Soluția tehnică

Soluția tehnică propusă se bazează pe folosirea poli(2-izopropenil-2-oxazolinei) (PiPOx) ca polimer hidrosolubil purtător și conjugarea doxorubicinei (DOX) în catena laterală a acestuia prin intermediul unei legături de tip hidrazonă degradabilă la pH acid specific locului tumorii, pentru a obține un sistem injectabil de eliberare de medicament de tip conjugat polimeric folosit în imuno-chimio-terapia cancerului.

În continuare sunt prezentate punctual rolurile componentelor sistemului de eliberare propus:

- a) *Polimerul PiPOx:* Este un polimer funcțional, biocompatibil și hidrofil așa cum s-a demonstrat în diferite articole recente din literatură. [28-34] Acesta poate fi sintetizat cu masă moleculară înaltă controlată prin polimerizare anionică adecvată aplicației țintă, [28] este inert din punct de vedere chimic la umiditate, apă și oxigen în timpul depozitării ca pulbere sau soluție [34], și poate fi modificat cu ușurință în condiții simple de reacție prin reacții de deschidere de inel a grupărilor 2-oxazolină din catena laterală.
- b) *Gruparea de legătură degradabilă:* Gruparea hidrazonă este una dintre cele mai investigate legături chimice sensibile la pH acid, cu stabilitate chimică demonstrată în circulația sistemică (pH 7,4). Această grupare prezintă avantajul hidrolizei în compartimentele acide lizozomale (pH 4,8) și endozomale (pH 5–6) ca urmare a procesului de internalizare în celulele vizate. [35] Legarea covalentă a DOX în catena laterală a polimerului PiPOx prin intermediul unui legături hidrazonă va conduce la obținerea de conjugate PiPOx-DOX cu eficacitate crescută și eliberare țintită în țesutul tumoral.
- c) *Agentul chimio-terapeutic:* DOX legată chimic, prin gruparea de legătură degradabilă de polimer, va avea un efect citotoxic semnificativ scăzut în drumul acesteia către țesuturile afectate, de interes, datorită eliberării controlate de agent chimio-terapeutic în locurile tumorale țintite, caracterizate de un pH ușor acid față de țesuturile sănătoase. Mai mult, internalizarea, traficul celular, acumularea și locul eliberării citostaticului pot îmbunătăți eficiența chimio-terapeutică.

- d) *Solubilitatea ridicată în fluidele corpului*: Datorită hidrofiliei ridicate și a posibilității de modificare parțială, PiPOx permite controlul precis al solubilității conjugatelor în fluidele corporale prin varierea raportului dintre grupările 2-oxazolină și DOX.
- e) *Stabilitatea vs. Degradabilitatea* conjugatelor PiPOx-DOX se datorează prezenței legăturii hidrazonă ce face legătura între DOX și catena de bază a polimerului PiPOx. Aceste conjugate sunt capabile să elibereze cancerostaticul din purtător în forma sa activă, fie în tumoră, fie, mai specific, direct în celula tumorală. Legătura hidrazonă asigură o stabilitate chimică a conjugatului în fluidele corpului în timpul circulației sistemice, iar, ulterior internalizării, aceasta este scindată, datorită pH-ului mai acid din țesutul tumoral, eliberând agentul terapeutic, DOX.
- f) *Moartea celulară imunogenă indusă de conjugatele PiPOx-DOX*, cu mecanism și cinetică de internalizare și acumulare în celule, diferit față de DOX liberă, dar care poate favoriza răspunsul imun antitumoral.

5. Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii

În continuare sunt prezentate principalele avantaje ale conjugatelor polimerice, propuse ca sisteme de eliberare controlată:

- a) *Versatilitate* în compoziția conjugatelor polimerice dezvoltate conform acestei invenții pentru a se adresa unui interval de dozare adecvat pentru tratament.
- b) *Toxicitatea sistemică* scăzută prin conjugarea DOX în catena laterală a polimerului PiPOx, oferind în plus avantajul unei activități eficiente prin utilizarea dozelor terapeutice mai mici.
- c) *Reproductibilitate* în protocolul de sinteză ce asigură reproductibilitate de la compoziția inițială până la proprietățile de material finale: *specificațiile dorite ale produsului*.
- d) *Hidrosolubilitatea ridicată* permite stocarea conjugatelor polimerice sub formă de pulbere și prepararea acestora sub formă injectabilă în momentul administrării.
- e) *Eficiență biologică și biodistribuție controlată* datorită posibilității conjugatului PiPOx-DOX să ocolească unele mecanisme de rezistență întâlnite la medicamentele cunoscute.
- f) *Aplicabilitate viitoare* pentru sistemul dezvoltat conform acestei invenții și pentru conjugarea altor agenți terapeutici folosiți în tratamentul cancerului sau al altor afecțiuni, în cazul în care transportul și/sau eliberarea controlată/țintită reprezintă un avantaj.

6. Descriere

1. În vederea obținerii de conjugate polimerice PiPOx-DOX folosite în tratamentul cancerului conform acestei invenții, au fost realizate multiple compoziții pe bază de PiPOx cu grad de polimerizare cuprins între 100÷350 și DOX ce sunt sintetizate în 4 etape care au la bază procedeul de obținere după cum urmează:

În prima etapă de sinteză au fost obținuți polimeri de poli(2-izopropenil-2-oxazolină) cu diverse mase moleculare prin polimerizare anionică. În a doua etapă s-a efectuat modificarea acestora, prin reacție polimer analoagă, cu esteri ai acizilor ω -mercapto carboxilici, obținându-se copolimeri ce conțin grupări esterice în catena laterală (Figura 1a). În a treia etapă grupările esterice au fost supuse hidrazinolizei prin reacție cu hidratul de hidrazină, pentru a fi transformate în grupări acil hidrazide (Figura 1b). În ultima etapă s-au obținut conjugatele polimere cu doxorubicină prin reacție în catalizată acidă a clorhidratului de doxorubicină cu polimerii ce conțineau grupările funcționale acil hidrazidă (Figura 1c). Conținutul de doxorubicină a fost optimizat astfel încât să se obțină la final conjugate polimerice solubile în apă. Conjugatul polimeric final este purificat prin precipitare și prin cromatografie pe coloană.

Exemplu de obținere a unei compoziții de conjugat polimeric PiPOx-DOX

Etapa 1. Sinteza de poli(2-izopropenil-2-oxazolină)

PiPOx s-a sintetizat prin procedeul de polimerizarea anionică în soluție. Toți reactanții au fost purificați și uscați folosind procedee clasice. [28, 32] Manipularea tuturor reactanților s-a efectuat sub flux de argon. Astfel, sub flux de argon, s-a preparat o soluție conținând 10 g (95,4 mmol) de iPOx dizolvat în 50 mL de tetrahidrofuran. Soluția a fost răcită la -40°C și s-au injectat 0.254 mL *n*-butil litiu (0.636 mmol). Amestecul de reacție a fost menținut timp de 10 minute la această temperatură, iar apoi au fost adăugați 5 mL de metanol pentru terminarea reacției. În final amestecul de reacție este lăsat să se încălzească la temperatura camerei, precipitat în eter etilic și uscat în etuva de vid la 50°C peste noapte. Prin varierea raportului molar iPOx: *n*-butil litiu s-a obținut o serie de polimeri cu grade de polimerizare cuprinse între 100 și 350.

Etapa 2. Sinteza copolimerilor de poli(2-izopropenil-2-oxazolină) ce conțin grupări ester metilice (PiPOx-MMP)

Copolimerul PiPOx-MMP a fost preparat prin reacția de modificare polimer analogă a PiPOx cu metil 3-mercapto propionat. 200 mg de PiPOx au fost dizolvate în 3,4 mL N,N'-dimetilformamidă. Peste soluția obținută s-au adăugat 0,2 mL metil 3-mercapto propionat.

Amestecul de reacție a fost încălzit la 100 °C timp de 1h. În cazul în care se dorește obținerea unor copolimeri cu un grad de modificare mai mare se poate prelungi durata reacției la 2 sau 3 ore. După timpul adecvat amestecul de reacție s-a răcit la temperatura camerei, s-a diluat cu 2 mL de clorură de metilen și s-a precipitat în 35 mL de eter etilic. Precipitatul obținut a fost filtrat și spălat pe filtru cu eter etilic. Apoi copolimerul a fost uscat în etuva de vid la 50°C peste noapte.

Etapa 3. Sinteza copolimerilor de poli(2-izopropenil-2-oxazolină) ce conțin grupări hidrazinice (PiPOx-H)

Într-un flacon de sticlă echipat cu un agitator magnetic s-au dizolvat 160 mg PiPOx-MMP în 2,3 mL de metanol. După 10 minute s-au adăugat 0,5 mL de hidrat de hidrazină. Soluția astfel obținută s-a lăsat la amestecat la temperatura camerei peste noapte. A doua zi solventul a fost îndepărtat folosind un evaporator rotativ și pulberile albe obținute au fost utilizate în continuare în următorul pas de reacție.

Etapa 4. Sinteza conjugatelor de poli(2-izopropenil-2-oxazolină)-doxorubicină (PiPOx-DOX)

O soluție preparată din 120 mg PiPOx-H, 10,5 mg clorhidrat de doxorubicină, și 0,03 mL acid acetic în 2 mL de metanol a fost agitată la temperatura camerei în întuneric timp de 3 zile. Copolimerul obținut a fost izolat prin cromatografie pe coloană, folosind Sephadex LH-20 ca fază staționară și metanol ca eluant. Conjugatul polimeric PiPOx-DOX a fost obținut sub formă de solid roșu solubil în apă.

2. În vederea testării eficienței biologice și a vizualizării biodistributivității au fost efectuate studii *in vitro* pe trei linii celulare tumorale de interes, mai exact RAW267.4 murin, Jurkat uman și B16F10 murin, pentru a evalua interacția celulară și toxicitatea conjugatelor PiPOx-DOX cu celulele tumorale, precum și mecanismele de internalizare și acumulare intracelulară în momentul inducerii morții celulare imune. Tehnica imunoenzimatică de tip ELISA, citometrie în flux, microscopie și MTT au fost folosite.

Exemplu de testare a interacției conjugatelor PiPOx-DOX cu celule tumorale

Dinamica acumulării conjugatului polimeric PiPOx-DOX în celule tumorale derivate din melanom a fost evaluată în experimente de imagistică pe celule vii. Celulele B16 F10 au fost cultivate în camere pentru imagistica Lab-Tek II (Nunc) și incubate în condiții fiziologice

(temperatura 37 °C, umiditate > 95%) pe parcursul experimentului, într-un incubator „stage-top” (Tokai Hit) montat pe un microscop Nikon TE-2000 motorizat. Imagini de microscopie au fost achiziționate la fiecare 30 de minute în câte 4 poziții pentru fiecare condiție experimentală în contrast de fază, pentru observarea morfologiei celulare, și în epifluorescență pentru monitorizarea doxorubicinei acumulate. Intensitatea medie de fluorescență măsurată pe canalul pentru doxorubicină în spațiile neacoperite cu celule (segmentate pe baza imaginilor de contrast de fază) a fost scăzută din fiecare cadru pentru a compensa semnalul fluorescent nespecific și pe cel al doxorubicinei din mediu. Media intensității de fluorescență a doxorubicinei măsurată în zonele acoperite cu celule, obținută după scăderea semnalului fluorescent nespecific, a fost folosită pentru monitorizarea dinamicii de acumulare a agentului antitumoral în celule.

Doxorubicina liberă se acumulează rapid în celule, cu localizare preponderent nucleară, atingând un maxim la 20-24 de ore de la începutul incubării (Figura 2, jos – DOX 10). Ulterior, semnalul fluorescent corespunzător doxorubicinei începe să scadă, datorită mortalității celulare ridicate. În schimb, tratarea celulelor B16 F10 cu un conjugat polimeric PiPOx-DOX cu o concentrație de 0,29 mg/mL DOX conduce la o acumulare mai lentă, dar de lungă durată a doxorubicinei în celule (Figura 2, jos – PiPOx-DOX 10). O mare parte din semnalul fluorescent este localizat în regiunea perinucleară și nu în nucleu, sugerând un mecanism diferit de acces în celulă comparativ cu DOX, bazat pe endocitoză și transport activ către organitele membranare. Rezultatele sugerează că PiPOx-DOX se acumulează în celule sub forma conjugată, prin mecanism diferit decât doxorubicina liberă.

În plus, conjugatele nu au atins efect citotoxic de 50% în 72h pe cele trei linii celulare diferite, nici măcar la concentrații de peste 10 ori mai mari decât echivalentul de DOX liberă.

Exemplu de protocol de inducere de moarte imunogenă a celulelor tumorale

Pentru a induce moartea celulară imunogenă a fost utilizată linia celulară de limfoblaste T umane Jurkat. Celulele au fost tratate timp de 24 - 72 de ore cu DOX liberă respectiv conjugate PiPOx-DOX cu o concentrație de DOX de 0,29 mg/mL după care s-a determinat procentul celulelor apoptotice (Anexina V+) respectiv expresia calreticulinei (CRT) la suprafața celulelor apoptotice precum și nivelul de HSP70 în supernatantele de cultură. Tratamentul celulelor Jurkat cu conjugat PiPOx-DOX 10 μg/mL a indus creșterea semnificativă a procentului de celule apoptotice care exprimă calreticulina la suprafață precum și a secreției de HSP70 similar tratamentului cu DOX liberă 1μg/mL ceea ce sugerează că tratamentul cu PiPOx-DOX induce moarte celulară imunogenă (Figura 3).

BIBLIOGRAFIE

1. WHO: Cancer World Health Organization, available online: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. CA: *Cancer J. Clin.*, 2011, 61, (4), 250-281.
3. Falzone, L.; Salomone, S.; Libra, M., *Front. Pharmacol.*, 2018, 9, (1300).
4. Ciardiello, D.; Vitiello, P. P.; Cardone, C.; Martini, G.; Troiani, T.; Martinelli, E.; Ciardiello, F., *Cancer Treat. Rev.*, 2019, 76, 22-32.
5. Dan, N.; Setua, S.; Kashyap, V. K.; Khan, S.; Jaggi, M.; Yallapu, M. M.; Chauhan, S. C., *Pharmaceuticals*, 2018, 11, (2), 32.
6. Etrych T.; Subr V.; Laga R.; Říhová B.; Ulbrich K.; *Eur J Pharm Sci.*, 2014, 16, (58), 1-12.
7. Etrych T.; Ulbrich K., WO2008017277A2, February 24, 2008
8. Veronese, F. M.; Pasut, G., *Drug Discov.* 2005, 10, (21), 1451-1458.
9. Harris, J. M.; Chess, R. B., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, 2, (3), 214-221.
10. Alconcel, S. N. S.; Baas, A. S.; Maynard, H. D., *Polym. Chem.*, 2011, 2, (7), 1442-1448.
11. Fishburn, C. S., *J. Pharm. Sci.*, 2008, 97, (10), 4167-4183.
12. Obermeier, B.; Wurm, F.; Mangold, C.; Frey, H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50, 7988-7997.
13. Zhang, F.; Liu, M.-r.; Wan, H.-t., *Biol. Pharm. Bull.*, 2014, 37, (3), 335-339.
14. Wei, H.; Zhuo, R.-X.; Zhang, X.-Z., *Prog. Polym. Sci.*, 2013, 38, (3), 503-535.
15. Duncan, R.; Vicent, M. J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, 62, (2), 272-282.
16. Ulbrich, K., Etrych, T., Chytil, P., Jelínková, M., Říhová, B., *J. Control. Release*, 2003, 87, 33-47.
17. Lazny, R., Hydrazone Linker Units. In *Linker Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis*, Scott, P., Ed. John Wiley & Sons: 2009; pp 303-315.
18. Howard, M. D.; Ponta, A.; Eckman, A.; Jay, M.; Bae, Y., *Pharm. Res.*, 2011, 28, 2435-2446.
19. Etrych, T.; Chytil, P.; Studenovský, M.; Pechar, M.; Ulbrich, K.; Rihova, B., WO2007028347A2, March 15, 2007
20. Viegas, T. X.; Bentley, M. D.; Harris, J. M.; Fang, Z.; Yoon, K.; Dizman, B.; Weimer, R.; Mero, A.; Pasut, G.; Veronese, F. M., *Bioconjugate Chem.*, 2011, 22, (5), 976-986.
21. Hoogenboom, R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, (43), 7978-7994.
22. Luxenhofer, R.; Han, Y.; Schulz, A.; Tong, J.; He, Z.; Kabanov, A. V.; Jordan, R., *Macromol. Rapid Commun.*, 2012, 33, (19), 1613-1631.
23. Lorson, T.; Lübtow, M. M.; Wegener, E.; Haider, M. S.; Borova, S.; Nahm, D.; Jordan, R.; Sokolski-Papkov, M.; Kabanov, A. V.; Luxenhofer, R., *Biomaterials*, 2018, 178, 204-280.
24. Verbraeken, B.; Monnery, B. D.; Lava, K.; Hoogenboom, R., *Eur. Polym. J.*, 2017, 88, 451-469.
25. Fan Y.; Moon J. J., *Vaccines (Basel)* 2015, 27, 3(3), 662.
26. Zhou, J.; Wang, G.; Chen, Y.; Wang, H.; Hua, Y.; Cai, Z., *J. Cell Mol. Med.* 2019; 23, 4854-4865.
27. Janicka M.; Gubernator J., *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2017, 14(9), 1059.
28. Jerca, F. A.; Jerca, V. V.; Anghelache, A. M.; Vuluga, D. M.; Hoogenboom, R., *Polym. Chem.*, 2018, 9, (25), 3473-3478.
29. Jerca, V. V.; Nicolescu, F. A.; Trusca, R.; Vasile, E.; Baran, A.; Anghel, D. F.; Vasilescu, D. S.; Vuluga, D. M., *React. Funct. Polym.*, 2011, 71, (4), 373-379.
30. Spiridon, M. C.; Jerca, F. A.; Jerca, V. V.; Vasilescu, D. S.; Vuluga, D. M., *Eur. Polym. J.*, 2013, 49, (2), 452-463.
31. Jerca, F. A.; Jerca, V. V.; Hoogenboom, R., *J. Polym. Sci., Part A*, 2019, 57, (3), 360-366.
32. Jerca, F. A.; Anghelache, A. M.; Ghibu, E.; Cecoltan, S.; Stancu, I.-C.; Trusca, R.; Vasile, E.; Teodorescu, M.; Vuluga, D. M.; Hoogenboom, R.; Jerca, V. V., *Chem. Mater.*, 2018, 30, 7938-7949.
33. Xu, X.; Jerca, F. A.; Jerca, V. V.; Hoogenboom, R., *Adv. Funct. Mater.*, 2019, 29 (48), 1904886.
34. Jerca, F.A.; Jerca, V.V.; Hoogenboom, R.; *Biomacromolecules*, 2021, 22 (12), 5020-5032.
35. Casi G., Neri D., *J. Control. Release*, 2012, 161 (2), 422.

CONJUGATE POLIMERICE PE BAZĂ DE POLI(2-IZOPROPENIL-2-OXAZOLINĂ) ȘI DOXORUBICINĂ PENTRU IMUNO-CHIMIO-TERAPIA CANCERULUI ȘI PROCEDEU DE OBTINERE AL ACESTORA

Florică Adriana JERCA, Valentin Victor JERCA, Emilian GHIBU, Nicoleta Doriană BANU, Elena Diana GIOL, Iuliana CARAȘ, Cătălin ȚUCUREANU, Vlad Constantin TOFAN, Aurora SĂLĂGEANU, Valentin VASILE, Bianca PALADE

Revendicări

Prin prezentul brevet solicităm dreptul de protecție asupra:

1. *Conjugatelor polimerice PiPOx-DOX degradabile dezvoltate* pentru imunochimioterapie cancerului, **caracterizate prin aceea că:** prezintă proprietăți (chimio)terapeutice și pot fi folosite sub formă de soluții injectabile având ca *ingredient principal:* (i) poli(2-izopropenil-2-oxazolină) cu grad de polimerizare cuprins între 100-350, modificată chimic cu (ii) 1-5% molar DOX prin intermediul unei grupări de legătură chimică, degradabilă de tip hidrazonă.
2. *Procedeului de obținere al conjugatelor polimerice PiPOx-DOX degradabile* conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** pot fi obținute în 4 pași de sinteză, iar metodologia propusă oferă versatilitate în dozare și reproductibilitate în compoziția chimică. Compozițiile diferite ale conjugatelor polimerice permit o dozare controlată a agentului antitumoral la locul tumorii.
3. *Conjugatelor polimerice PiPOx-DOX degradabile dezvoltate* conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** pot elibera agentul chimio-terapeutic DOX prin hidroliză la pH acid în contact cu fluidele celulare în urma procesului de internalizare.
4. *Conjugatelor polimerice PiPOx-DOX degradabile dezvoltate* conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** prezintă un mecanism și o cinetică de internalizare și acumulare în celule, diferite comparativ cu doxorubicina liberă. Acumularea conjugatului are loc în regiunea perinucleară, față de acumularea în nucleu a DOX liberă.
5. *Conjugatelor polimerice PiPOx-DOX degradabile dezvoltate* conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** au un efect citotoxic diminuat față de DOX liberă, urmează un mecanism diferit de internalizare față de DOX liberă și pot induce moartea celulară imunogenă după internalizare.

DESENE

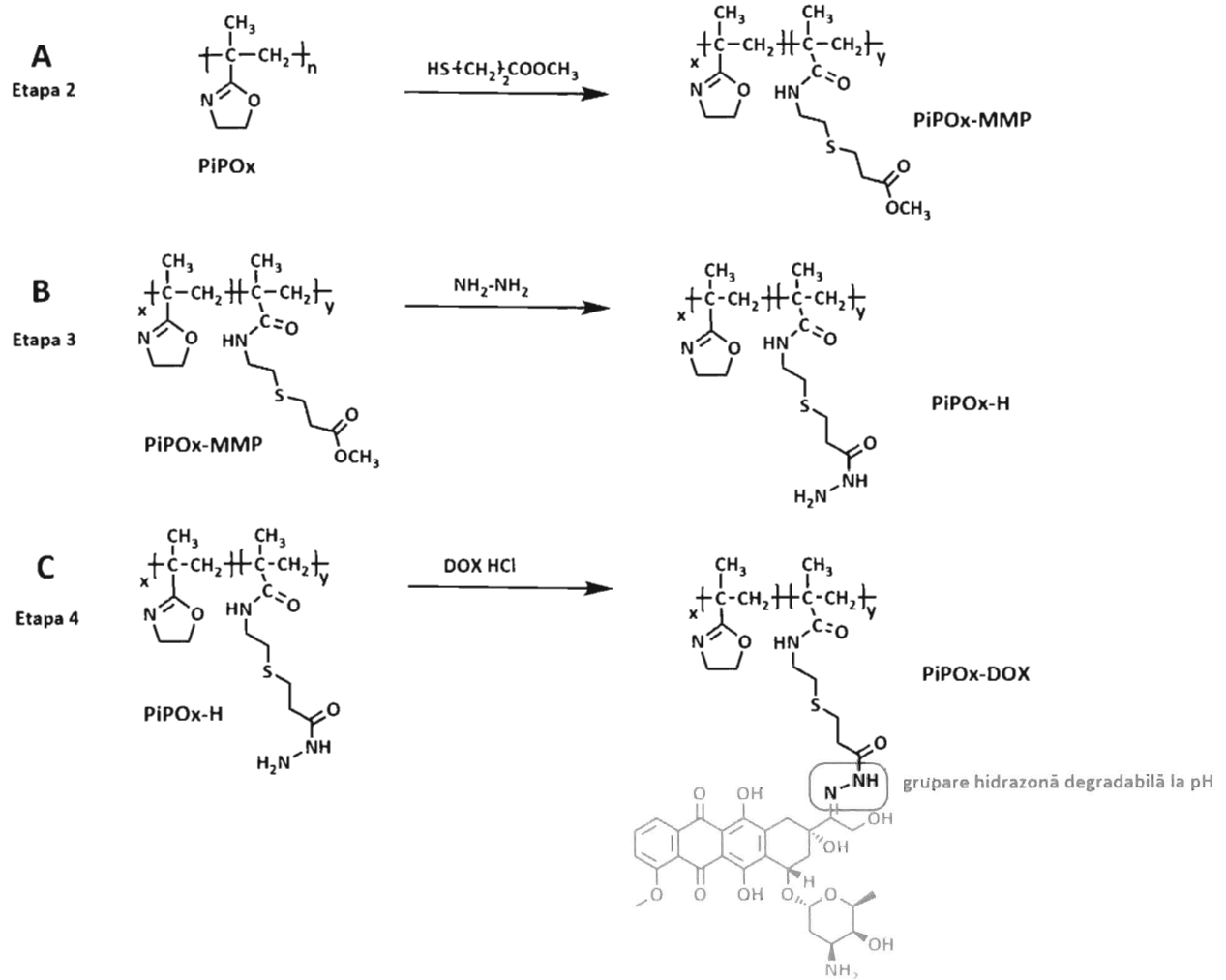


Figura 1. Sinteza conjugatelor polimerice PiPOx-DOX.

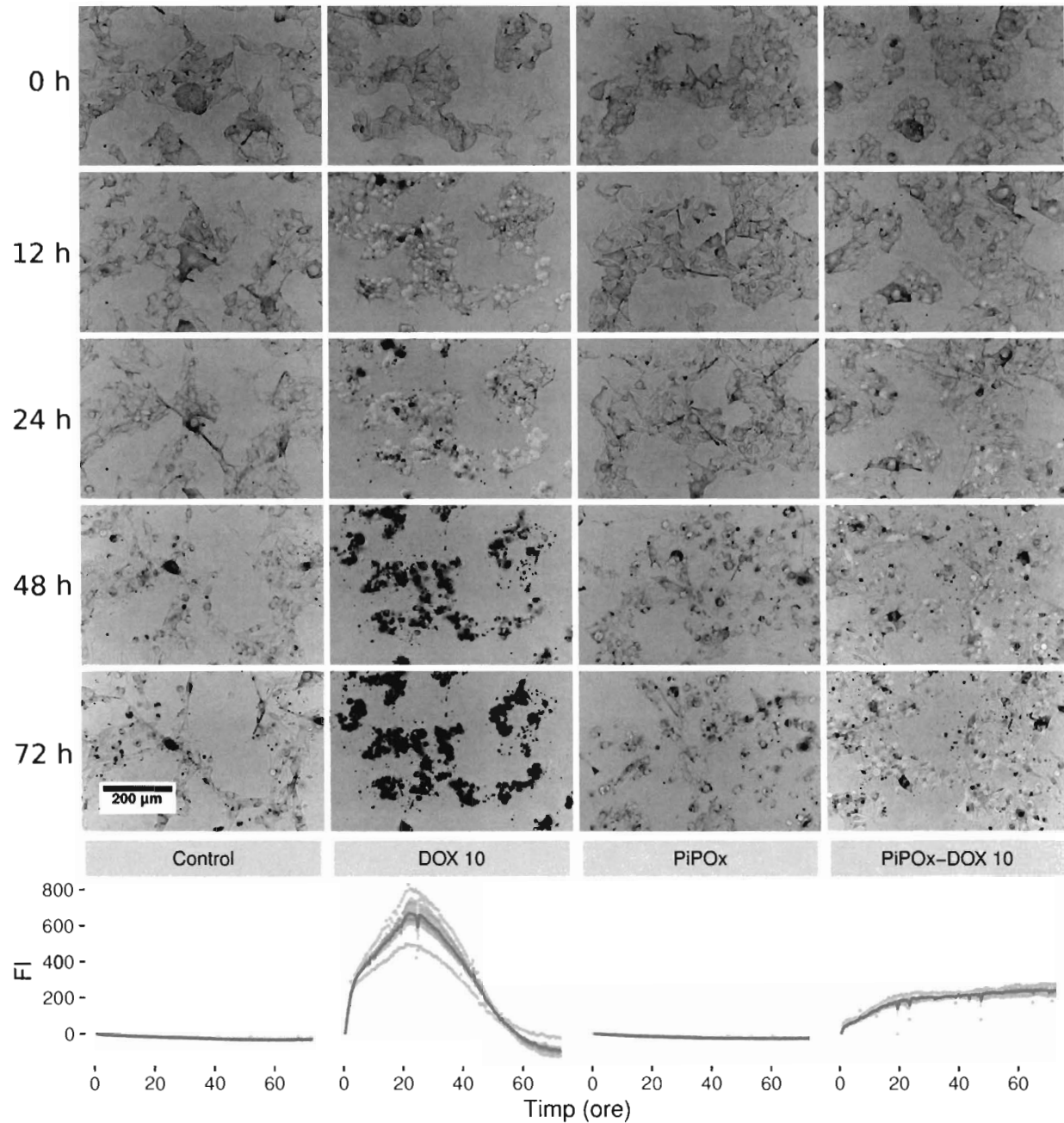


Figura 2. Dinamica acumulării de doxorubicină liberă sau conjugată în celulele de melanom murin B16 F10. Sus – imagini reprezentative achiziționate în contrast de fază (gri) și fluorescență (roșu) la diferite intervale de timp cu celule B16 F10 netratate – control, tratate cu 10 μg/mL doxorubicină liberă – DOX 10, PiPOx singur, sau 10 μg/mL doxorubicină conjugată cu PiPOx – PiPOx-DOX 10; Jos – intensitatea de fluorescență (FI) a doxorubicinei acumulate în celule pe parcursul experimentului – interval de măsurare 30 de minute; graficele reprezintă media (linie roșie) ± SE și valorile individuale măsurate (puncte gri) în câte 4 replicate / condiție.

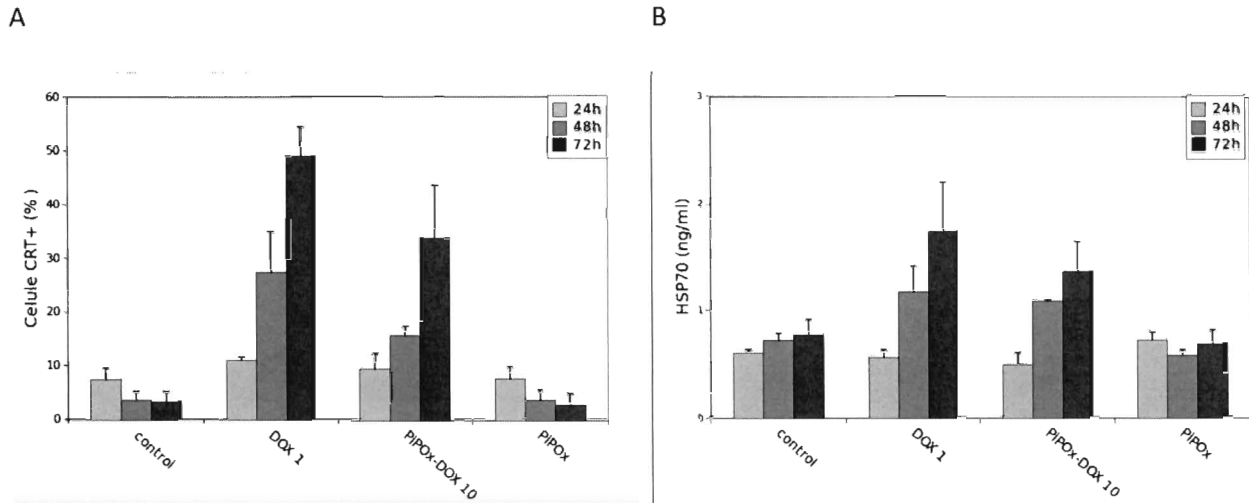


Figura 3. Celulele Jurkat tratate 24-72 h cu DOX 1 $\mu\text{g/ml}$, conjugat PiPOx-DOX 10 $\mu\text{g/ml}$ și PiPOx neconjugat. (A) Expresia calreticulinei (CRT) la suprafața celulelor sub forma de procent al celulelor apoptotice (Anexina V+). Rezultatele reprezintă media % a celulelor, exprimată ca raport între calreticulina \pm deviația standard și izotipul control, din 2 experimente efectuate în condiții similare. (B) Nivelul extracelular de HSP70 în supernatantele de cultură. Rezultatele reprezintă media concentrației HSP70 \pm deviația standard din 2 experimente efectuate în condiții similare.