

WSTĘPNE BADANIA NAD SYNTEZĄ I CHARAKTERYSTYKĄ WIELKOCZĄSTECZKOWYCH KONIUGATÓW KAMPTOTECYNY

MARCIN SOB CZAK^{1*}, EWA OLEDZKA¹, ANDRZEJ P LICHTA²,
JOANNA KOLMAS¹, URSZULA PIOTROWSKA¹

¹ WARSZAWSKI UNIWERSYTETY MEDYCZNY,
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY,
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,
BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA, POLSKA

² POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WYDZIAŁ CHEMICZNY,
KATEDRA CHEMII I TECHNOLOGII POLIMERÓW,
NOAKOWSKIEGO 3, 00-664 WARSZAWA, POLSKA

* E-MAIL: MARCIN.SOB CZAK@WUM.EDU.PL

Streszczenie

Otrzymano nowe wielkocząsteczkowe koniugaty kamptotecyny. Matryce polimerowe zostały otrzymane w wyniku polimeryzacji z otwarciem pierścienia ϵ -kaprolaktonu, glikolidu, rac-laktydu oraz węglanu trimetylenu. Zsyntezowane matryce i kamptotecynę połączono za pomocą 1,6-diizocyjanianu heksametylenu. Otrzymane koniugaty wielkocząsteczkowe scharakteryzowano za pomocą spektroskopii ¹H i ¹³C NMR oraz FTIR. Toksyczność otrzymanych produktów polimerycznych oceniono na podstawie testów przeprowadzonych przy użyciu bakterii luminescencyjnych oraz pierwotniaków. Ponadto, przeprowadzono badania kinetyki uwalniania kamptotecyny w warunkach *in vitro*.

Słowa kluczowe: kamptotecyna, koniugaty wielkocząsteczkowe, uwalnianie w warunkach *in vitro*, polimery biodegradowalne, polimery bioresorbowalne
[*Engineering of Biomaterials*, 128-129, (2014), 36-39]

Wprowadzenie

20(S)-kamptotecyna ((S)-4-etylo-4-hydroksy-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolino-3,14-(4H,12H)-dionu, CAMPT) jest pentacyklicznym alkaloidem, który został po raz pierwszy wyizolowany przez Wall'a i współpracowników w 1966 roku z chińskiego drzewa *Camptotheca acuminata* [1]. Szeroki zakres aktywności przeciwnowotworowej CAMPT zweryfikowano na modelach zwierzęcych w odniesieniu do raka płuc, prostaty, piersi, jelita grubego, żołądka, pęcherza moczowego, czerniaka oraz jajnika [1-2]. Jednakże, zastosowanie terapeutyczne CAMPT jest utrudnione ze względu na jej niską rozpuszczalność w wodzie, wysoką toksyczność i szybką dezaktywację pierścienia laktonowego w wyniku hydrolizy w fizjologicznym pH [1-2].

Polimery biodegradowalne i bioresorbowalne są szeroko cenione w opracowywaniu systemów kontrolowanego uwalniania substancji leczniczych. Takie systemy dostarczania substancji czynnych są bardzo efektywne i charakteryzują się zdolnością precyzyjnego transportu substancji leczniczej do określonych tkanek lub komórek [3-5]. Z tego punktu widzenia, wady CAMPT można ograniczyć poprzez jej przyłączenie do matrycy wielkocząsteczkowej. Polimerowe koniugaty CAMPT mogą polepszać jej biodystrybucję.

PRELIMINARY STUDY UNDER SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MACROMOLECULAR CONJUGATES OF CAMPTOTHECIN

MARCIN SOB CZAK^{1*}, EWA OLEDZKA¹, ANDRZEJ P LICHTA²,
JOANNA KOLMAS¹, URSZULA PIOTROWSKA¹

¹ MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY,
DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,
1.BANACHA STR., 02-097 WARSAW, POLAND

² WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF CHEMISTRY,
CHAIR OF POLYMER CHEMISTRY AND TECHNOLOGY,
3 NOAKOWSKIEGO STR., 00-664 WARSAW, POLAND

* E-MAIL: MARCIN.SOB CZAK@WUM.EDU.PL

Abstract

New macromolecular conjugates of camptothecin were prepared. The polymeric matrixes were obtained by the ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone, glycolide, rac-lactide or trimethylene carbonate. The synthesized polymers and camptothecin were coupled via 1,6-hexamethylene diisocyanate. The synthesized macromolecular conjugates of camptothecin were characterized by ¹H and ¹³C NMR or FTIR spectroscopy. Toxicity of the obtained polymeric products were evaluated with bacterial luminescence test and two protozoan assays. Furthermore, the *in vitro* release of camptothecin from the obtained conjugates was investigated.

Keywords: camptothecin, macromolecular conjugates, *in vitro* release, biodegradable polymers, bioresorbable polymers

[*Engineering of Biomaterials*, 128-129, (2014), 36-39]

Introduction

20(S)-Camptothecin ((S)-4-ethyl-4-hydroxy-1H-pyran[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,14-(4H,12H)-dione, CAMPT), a pentacyclic alkaloid was first isolated by Wall and co-workers in 1966 from the Chinese tree *Camptotheca acuminata* [1]. CAMPT has been verified as a broad range of anti-cancer activity in animal models including lung, prostate, breast, colon, stomach, bladder, ovarian and melanoma cancers [1-2]. However, its therapeutic application is hindered by a low solubility, high toxicity and rapid inactivation through lactone ring hydrolysis at a physiological pH [1-2].

The biodegradable or bioresorbable polymers are very desirable for the controlled drug delivery systems. Such delivery systems are not toxic and can transport the drug molecule to the specific tissue or cell more efficiently and more specifically [3-5]. From this point of view, the disadvantage of CAMPT might be overcome by its attaching to the macromolecular matrix. The polymeric conjugates of CAMPT could act as a transport form for this drug and enhance its biodistribution.

W ciągu ostatnich kilku lat, koniugaty CAMPT na bazie rozpuszczalnych w wodzie polimerów, takich jak glikol polioksyetylenowy [6-8], poli(kwas L-glutaminowy) [9-10], polimerów opartych na β -cyklodekstrynie [11], poli[N-(2-hydroksypropylo)metakrylamidzie] [12] poli[(N-karboxybutylo)-L-aspartamidzie] [13-14] i poli(amidoaminach) [15-16] zostały zsyntezowane i scharakteryzowane.

Głównym celem niniejszej pracy było otrzymanie poliestrowych i poli(estro-węglanowych) koniugatów kamptotecyny. Przeprowadzono wstępne badania nad wpływem struktury łańcucha polimeru na proces uwalniania CAMPT. Toksyczność otrzymanych produktów polimerycznych oceniono na podstawie testów przeprowadzonych przy użyciu bakterii luminescencyjnych oraz pierwotniaków.

Materialy i metody

Uwalnianie substancji leczniczej w warunkach in vitro

Otrzymane wielkocząsteczkowe koniugaty kamptotecyny (10 mg) zostały umieszczone w 10 mL PBS (0.01 M, pH 7.4) w 37°C. Stężenie uwalnianej substancji leczniczej oznaczano przy użyciu spektrofotometru UV-Vis. W określonych odstępach czasu, 10 mL mieszaniny usuwano z układu, zastępując ją świeżą porcją buforu (10 mL). Procent uwolnionej CAMPT obliczano na podstawie krzywej kalibracji otrzymanej uprzednio w tych samych warunkach w jakich prowadzono proces uwalniania. Pomiar absorbancji prowadzono przy długości fali 355 nm (postać laktonowa) lub 368 nm (postać karboksylowa). Wszystkie eksperymenty powtórzono trzykrotnie.

Koniugaty: CON-CAMPT-1 (został otrzymany z kopolimeru CL/GL), CON-CAMPT-2 (CL/rac-LA), CON-CAMPT-3 (CL/TMC), CON-CAMPT-4 (GL/rac-LA), CON-CAMPT-5 (GL/TMC), CON-CAMPT-6 (rac-LA/TMC).

Charakterystyka spektroskopowa

Otrzymane poliestry, poli(estro-węglany) oraz wielkocząsteczkowe koniugaty CAMPT scharakteryzowano za pomocą spektroskopii ^1H i ^{13}C NMR (Varian 300 MHz) oraz FTIR (Perkin-Elmer).

Widma NMR rejestrowano w CDCl_3 i DMSO-d_6 . Próbkę do analizy FTIR przygotowano w postaci tabletek z KBr.

Wyniki i dyskusja

Głównym celem niniejszej pracy była synteza nowych wielkocząsteczkowych koniugatów CAMPT. Jako matryce polimerowe użyto biodegradowalne i bioresorbowalne poliestry i poli(estro-węglany). Matryce wielkocząsteczkowe otrzymano w wyniku polimeryzacji z otwarciem pierścienia cyklicznych estrów (ϵ -kapolaktonu (CL), glikolidu (GL), rac-laktydu (rac-LA)) oraz cyklicznego węglanu (węglan trimetyleny (TMC)). Proces prowadzono w obecności glikolu polioksyetylenowego (PEG 200) jako makroinicjatora oraz oktanianu cyny (II) (SnOct_2) jako katalizatora.

Dokonano oceny cytotoksyczności otrzymanych polimerów stosując w tym celu bakterie luminescencyjne *V. Fischeri* oraz pierwotniaki *S. Ambiguum* i *T. Thermophila*. Stwierdzono, że wszystkie otrzymane poliestry i poli(estro-węglany) są nietoksyczne, zarówno względem bakterii jak i pierwotniaków.

In the past few years, the covalent conjugates of CAMPT with water-soluble polymers, such as polyethylene glycol [6-8], poly(L-glutamic acid) [9-10], β -cyclodextrin based polymers [11], poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] [12], poly[(N-carboxybutyl)-L-aspartamide] [13-14], poly(amidoamine) [15-16] have been developed and characterized.

The aim of this study was to prepare polyesters or poly(ester-carbonate)s conjugates containing CAMPT. The preliminary studies of the influence of polymeric chain structure on the release process of CAMPT were described. The toxicity test of the obtained polymeric matrixes were evaluated with bacterial luminescence test and two protozoan assays.

Materials and methods

In vitro Evaluation of Drug Release

The obtained macromolecular conjugates of CAMPT (10 mg) were put into 10 mL of PBS (0.01 M, pH 7.4) at 37°C, and the initial UV measurement was carried out. The mixture was stirred and a 10 mL sample was removed at selected intervals followed by 10 mL of a fresh buffer replacing. The quantity of the released CAMPT was determined from the calibration curve previously obtained under the same conditions and analyzed by means of UV-Vis spectrophotometer. The percentage of the drug released was calculated based on a peak area of UV absorbance at 355 (lactone form) or 368 nm (carboxyl form). Each experiment was carried out in triplicate.

The conjugates: CON-CAMPT-1 (was obtained from CL/GL copolymer), CON-CAMPT-2 (CL/rac-LA), CON-CAMPT-3 (CL/TMC), CON-CAMPT-4 (GL/rac-LA), CON-CAMPT-5 (GL/TMC), CON-CAMPT-6 (rac-LA/TMC).

Characterizations

The polyesters, poly(ester-carbonate)s and polymeric conjugates of CAMPT were characterized by means of ^1H and ^{13}C NMR (Varian 300 MHz), and FTIR spectroscopy (Perkin-Elmer). The NMR spectra were recorded in CDCl_3 and DMSO-d_6 . The IR spectra were measured from KBr pellets.

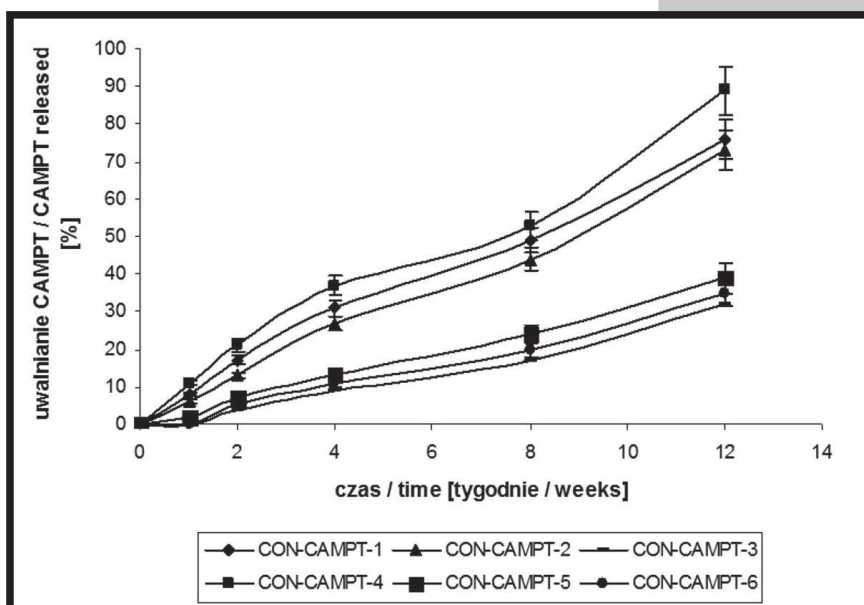
Results and Discussions

The main aim of this study was to obtain new macromolecular conjugates of CAMPT. As polymeric matrixes biodegradable and bioresorbable polyesters or poly(ester-carbonate)s were used. The macromolecular matrixes were obtained by the ring-opening polymerization (ROP) of cyclic esters (ϵ -caprolactone (CL), glycolide (GL) and rac-lactide (rac-LA)) and cyclic carbonate (trimethylene carbonate (TMC)). The ring-opening polymerization (ROP) process was carried out in the presence of poly(ethylene glycol) (PEG-200) as macro-co-initiators and tin (II) 2-ethylhexanoate (SnOct_2) as a catalyst.

The cytotoxicity evaluation of the received polymers was studied using the luminescent bacteria *V. Fischeri* and two ciliated protozoans *S. Ambiguum* and *T. Thermophila*. It was found that the obtained polyesters or poly(ester-carbonate)s are not toxic to all test bionts, both bacteria and protozoa because of the sample is considered toxic when the percent of a toxic effect (PE) is higher than 20.

W następnym etapie pracy, otrzymano wielkocząsteczkowe koniugaty CAMPT. Matryce polimerowe i substancja lecznicza zostały połączone za pomocą 1,6-diizocyjanianu heksametylenu. Strukturę zsyntezowanych koniugatów wielkocząsteczkowych potwierdzono techniką NMR. Na widmach NMR widoczne były charakterystyczne sygnały pochodzące od CAMPT (bez grupy hydroksylowej, która przereagowała z grupą izocyjanianową), tym samym potwierdzając obecność wiązania kowalencyjnego pomiędzy cząsteczką substancji czynnej a makrocząsteczką.

Uwalnianie CAMPT z otrzymanych koniugatów polimerowych w warunkach *in vitro* przeprowadzono w buforze PBS w temperaturze 37°C w ciągu 1-12 tygodni. Procent uwolnionej substancji leczniczej w pH 7.4 przedstawiono na RYS. 1. Stwierdzono, że struktura zsyntezowanych kopolimerów, zawartość jednostek komonomeru w łańcuchu polimeru oraz M_n PEG stosowanego jako makroinicjator, mają istotny wpływ na szybkość uwalniania CAMPT z otrzymanych koniugatów wielkocząsteczkowych.



RYS. 1. Uwalnianie CAMPT z otrzymanych koniugatów wielkocząsteczkowych.

FIG. 1. Release of CAMPT from the obtained macromolecular conjugates.

Wnioski

W pracy przedstawiono wstępne wyniki badań nad syntezą nowych wielkocząsteczkowych koniugatów CAMPT. Substancja lecznicza została kowalencyjnie związana z łańcuchem kopolimerów (CL, GL, rac-LA, TMC i PEG) poprzez wiązanie uretanowe. Otrzymane poliestry lub poli(estro-węglany) okazały się być nietoksyczne. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że szybkość uwalniania CAMPT jest bezpośrednio zależna od struktury otrzymanych kopolimerów. Szybkość uwalniania CAMPT była większa dla koniugatów otrzymanych z kopolimerów CL, rac-LA i GL, w porównaniu do kopolimerów zawierających segmenty TMC. Uzyskane wyniki wskazują, że zsyntezowane matryce poliestrowe i poli(estro-węglanowe) są obiecujące w technologii systemów kontrolowanego uwalniania CAMPT.

Podziękowania

Praca została sfinansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego (MNiSzW OPUS-5 2013/09/B/ST5/03480: „Opracowanie implantacyjnych systemów dozowania leku o działaniu antynowotworowym immobilizowanego na matrycy polimerowej”).

In the next step of this study, the macromolecular conjugates of CAMPT were obtained. The polymers and CAMPT were coupled via 1,6-diisocyanatohexane (HDI). The chemical structures of the prepared polymeric conjugates of CAMPT was confirmed by NMR studies. All the conjugate spectra have revealed the characteristic signals originated from CAMPT (without hydroxyl group which has reacted with isocyanate group) indicating successful preparation of the macromolecular conjugates of CAMPT.

In vitro CAMPT release from the macromolecular conjugates was carried out in PBS buffer at 37°C for 1-12 weeks. The kinetic rates of CAMPT released from polymer conjugates at pH 7.4 were shown in FIG. 1. It has been found that many factors are influencing the release of CAMPT from the obtained macromolecular conjugates, namely the copolymers structure, co-monomer unit content in the polymer chain and M_n of PEG used as macro-coinitiator.

Conclusions

The synthesis of novel macromolecular conjugates of CAMPT is reported in this study. The drug was covalently attached to the copolymers of CL, GL, rac-LA, TMC or PEG chain ends of via urethane linkage. The obtained polyesters or poly(ester-carbonate)s matrixes are not toxic. The rates of CAMPT release were shown to be directly dependent on the nature of the received copolymers. The kinetic rates of CAMPT released was seen to be faster for the polymeric conjugates contained CL, rac-LA or GL units as compared to those with TMC units. The obtained results demonstrate that the polyesters or poly(ester-carbonate)s are interesting and promising materials for the controlled release of CAMPT.

Acknowledgements

This work was supported by the research programme (Project MNiSzW OPUS-5 2013/09/B/ST5/03480: “Elaboration of anti-cancer drug implantational delivery system immobilized on polymer matrix”) of the Ministry of Science and Higher Education in Poland.

Piśmiennictwo

References

- [1] Li Q.-Y., Zu Y.-G., Shi R.-Z., Yao L.-P.: Review Camptothecin: Current Perspectives. *Curr. Med. Chem.* 13(17) (2006) 2021-2039.
- [2] Liew S.T., Yang L.-X.: Design, synthesis and development of novel camptothecin drugs. *Curr. Pharm. Design.* 14(11) (2008) 1078-1097.
- [3] Hoste K., De Winne K., Schacht E.: Polymeric prodrugs. *Int. J. Pharm.* 277 (2004) 119-131.
- [4] Uhrich K.E., Cannizzaro S.M., Langer R.S., Shakesheff K.M.: Polymeric systems for controlled drug release. *Chem. Rev.* 99 (1999) 3181-3198.
- [5] Ouchi T., Ohya Y.: Macromolecular prodrugs. *Prog. Polym. Sci.* 20 (1995) 211-257.
- [6] Fleming A.B., Haverstick K., Saltzman W.M.: In vitro cytotoxicity and in vivo distribution after direct delivery of PEG-camptothecin conjugates to the rat brain. *Bioconjugate Chem.* 15(6) (2004) 1364-1375.
- [7] Warnecke A., Kratz F.: Maleimide-oligo(ethylene glycol) derivatives of camptothecin as albumin-binding prodrugs: Synthesis and antitumor efficacy. *Bioconjugate Chem.* 14 (2003) 377-387.
- [8] Greenwald R.B., Zhao H., Xia J.: Tripartate poly(ethylene glycol) prodrugs of the open lactone form of camptothecin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11(12) (2003) 2635-2639.
- [10] Singer J.W., Bhatt R., Tulinsky J., Buhler K.R., Heasley E., Klein P., De Vries P.: Water-soluble poly-(L-glutamic acid)-Gly-camptothecin conjugates enhance camptothecin stability and efficacy in vivo. *J. Control. Release* 74 (2001) 243-247.
- [9] De Vries P., Tulinsky J., Bellamy G., Baker B., Singer J.W., Klein P.: Synthesis and in vivo antitumor activity of poly(L-glutamic acid) conjugates of 20(S)-camptothecin. *J. Med. Chem.* 46(1) (2003) 190-193.
- [11] Cheng J.J., Khin K.T., Jensen G.S., Liu A., Davis M.E.: Synthesis of linear, β -cyclodextrin-based polymers and their camptothecin conjugates. *Bioconjugate Chem.* 14(5) (2003) 1007-1017.
- [12] Caiolfa V.R., Zama M., Fiorino A., Frigerio E., Pellizzoni C., D'Argy R., Ghiglieri A., Castelli M.G., Farao M., Pesenti E., Gigli M., Angelucci F., Suarato, A.: Polymer-bound camptothecin: Initial biodistribution and antitumour activity studies. *J. Control. Release* 65(1-2) (2000) 105-119.
- [13] Fan N., Duan K., Wang C., Liu S., Luo S., Yu J., Huang J., Li Y., Wang, D.: Fabrication of nanomicelle with enhanced solubility and stability of camptothecin based on α, β -poly[(N-carboxybutyl)-l-aspartamide]-camptothecin conjugate. *Colloids and Surf. B Biointerfaces* 75 (2010) 543-549.
- [14] Zhang W., Huang J., Fan N., Yu J., Liu Y., Liu S., Wang D., Li Y.: Nanomicelle with long-term circulation and enhanced stability of camptothecin based on mPEGylated α, β -poly (l-aspartic acid)-camptothecin conjugate. *Colloids and Surf. B Biointerfaces* 81(1) (2010) 297-303.
- [15] Chun C., Kuh H.-J., Song S.-C.: Injectable poly(organophosphazene)-camptothecin conjugate hydrogels: Synthesis, characterization, and antitumor activities. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81(3) (2012) 582-590.
- [16] Fan H., Huang J., Li Y., Yu J., Chen, J.: Fabrication of reduction-degradable micelle based on disulfide-linked graft copolymer-camptothecin conjugate for enhancing solubility and stability of camptothecin. *Polymer* 51(22) (2010) 5107-5114.