

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Bc. Pavel Kashmel**

**Polymerní terapeutika pro imunoinkoterapii**  
Polymer-based therapeutics for immunoinkotherapy

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Tomáš Etrych Ph.D., DSc.

Školitel – konzultant: Ing. Jana Kousalová

Praha 2022

## Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval všem, kteří mi pomohli s vypracováním této diplomové práce. Chtěl bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Tomášovi Etrychovi, Ph.D., DSc. za umožnění provedení této práce na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR a odborné vedení.

Dále patří mé poděkování Ing. Janě Kousalové za věnování hodně času, poskytování rad, pomoc při písemném zpracování a konstantní stimulaci k práci.

Také chci poděkovat RNDr. Miladě Šírové, PhD, za provedení *in vitro* testů.

Můj největší dík patří člověku, bez kterého táto práce nebyla by možná, a to je samému sobě, za trpělivost, snahu a za to, že jsem to zvládl navzdory všemu, kvůli čemu jsem chtěl vše zanechat.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 19.05.2022

Podpis

## **Abstrakt:**

Tato magisterská práce popisuje syntézu, fyzikálně-chemickou charakterizaci a předběžné biologické testování vodorozpustných polymerních konjugátů modelového léčiva ZM241385. Toto léčivo bylo v prvním kroku derivatizováno a poté napojeno na polymerní nosič s cílem připravit systém vhodný pro cílenou dopravu léčiva do nádorových tkání. Zlepšené farmakokinetické parametry připravených polymerních systémů nesoucích ZM241385 by měly být základem pro zvýšenou terapeutickou aktivitu polymerního nanosystému v nádorové imunoterapii. Polymerní prekurzory byly syntetizovány pomocí řízené RAFT polymerizace s cílem připravit vysoce definované nosičové systémy. V rámci této práce byly připraveny dva deriváty vybraného léčiva lišící se použitou karboxylovou kyselinou a možnostmi jejich vazby k polymernímu nosiči. K derivatizaci byla použita 4-(2-oxopropyl)benzoová kyselina, v jejíž případě byl připravený derivát vázán na nosič přes hydrazonovou vazbu. Tato vazba je pH senzitivní a vykazuje vysokou stabilitu v pH 7,4 (odpovídá pH krevního řečiště), a v mírně kyselém pH 5,5 (odpovídá mikroprostředí nádoru, případně endozomům nádorových buněk) dochází k její rychlé hydrolýze. V případě druhého derivátu byla použita 5-azidopentanová kyselina. Pro vazbu tohoto derivátu k polymernímu prekurzoru využita nekatalyzovaná click reakce. ZM241385 je tedy v tomto konjugátu vázán neštepitelně. Funkcionalita polymerních konjugátů, volného derivátu a volného ZM241385 byla testována *in vitro*.

**Klíčová slova:** polymer, biomateriál, cílená doprava, imunitní systém, protinádorová terapie

## **Abstract:**

This master thesis describes the synthesis, physico-chemical characterization and preliminary biological testing of water-soluble polymer conjugates of the model drug ZM241385. This drug was first derivatized and then connected to a polymer carrier in order to prepare a system suitable for targeted drug transport to tumor tissues. Improved pharmacokinetic parameters of the prepared polymeric systems carrying ZM241385 should be the basis for increased therapeutic activity of the polymeric nanosystem in tumor immunotherapy. Polymeric precursors were synthesized by controlled RAFT polymerization in order to prepare highly defined carrier systems. In the framework of this master thesis, two derivatives of the selected drug were prepared, differing in the carboxylic acid used and the mode of their binding to the polymeric carrier. For derivatization, 4-(2-oxopropyl)benzoic acid was used, in which case the prepared derivative was bound to the carrier via a hydrazone bond. This bond is pH sensitive and shows high stability at pH 7.4 (corresponds to the pH of the blood stream), and at a slightly acidic pH 5.5 (corresponds to the microenvironment of the tumor, or endosomes of tumor cells), its rapid hydrolysis occurs. For the second derivative, 5-azidopentanoic acid was used. An uncatalysed click reaction was used to bind this derivative to the polymeric precursor. Thus, ZM241385 is bound in this conjugate uncleavably. The functionality of polymer conjugates, free derivative and free ZM241385 has been tested *in vitro*.

**Keywords:** polymer, biomaterial, controlled delivery, immune system, anticancer therapy

# OBSAH

OBSAH .....	6
Seznam použitých zkratk a symbolů .....	8
Seznam použitých zkratk .....	8
Seznam použitých symbolů .....	9
1. ÚVOD .....	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	11
2.1 Přehled polymerních systémů pro transport léčiv .....	11
2.1.1 Polymerní systémy pro transport léčiv a jejich výhody oproti jiným dopravním systémům .....	11
2.1.2 Polymerní systémy na bázi HPMA pro cílený transport léčiv .....	14
2.2 Biochemie nádorů a komunikace mezi buňkami .....	17
2.2.1 Metabolismus nádorové buňky .....	17
2.2.2 Mikroprostředí nádoru .....	18
2.2.3 Nádory a imunitní systém .....	20
2.3 ZM241385 v imuno-onkoterapii .....	22
2.3.1 Imuno-onkoterapie .....	22
2.3.2 Význam adenosinového A <sub>2A</sub> receptoru při rakovině .....	23
2.3.3 ZM241385 – selektivní antagonist A <sub>2A</sub> receptoru .....	24
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	28
4.1 Použité chemikálie .....	28
4.2 Chemické syntézy .....	30
4.3 Použité přístroje .....	36
4.4 Použité metody .....	38
5. VÝSLEDKY .....	42
5.1 Syntéza a charakterizace derivátů ZM241385 .....	42
5.2 Syntéza a charakterizace polymerních systémů .....	43

5.3	Hydrolytická stabilita polymerních konjugátů.....	45
5.4	Studie <i>in vitro</i> .....	46
6.	DISKUZE .....	49
6.1	Syntéza a charakterizace derivátů ZM241385 .....	49
6.2	Syntéza a charakterizace polymerních systémů.....	51
6.3	Hydrolytická stabilita polymerních konjugátů.....	55
6.4	Studie <i>in vitro</i> .....	56
7.	ZÁVĚR .....	58
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	60

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

## Seznam použitých zkratk

A<sub>2A</sub>R – adenosinový A<sub>2</sub> receptor

ATP – adenosintrifosfát

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

EPR – z angličtiny „Enhanced permeability and retention effect“

ESI-MS – hmotnostní spektrometrie s metodou ionizace elektrospřejem

HMW – z angličtiny „High molecular weight“

HRP – peroxidáza křenu selského

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angličtiny „High performance liquid chromatography“

HPMA – *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid

MDSC – myeloidní supresorové buňky

NAD<sup>+</sup> – nikotinamid adenin dinukleotid

NMR – spektroskopie nukleární magnetické rezonance

*p*HPMA – poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid)

RAFT – z angličtiny „Reversible Addition–Fragmentation chain Transfer polymerization“

RT – laboratorní teplota

SEC – rozměrově vylučovací chromatografie, z angličtiny „Size Exclusion Chromatography“

TAM – makrofágy asociované s nádorem

TCA – cyklus trikarboxylových kyselin, z angličtiny „Tricarboxylic acid cycle“

TGF – transformující růstový faktor

TIL – lymfocyty infiltrující tumor

VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor

## Seznam použitých symbolů

A	—	absorbance
$\varepsilon$	l/mol·cm	molární absorpční koeficient
D	—	disperzita
c	mg/ml	koncentrace
l	cm	optická dráha kyvety
$M_k$	g/mol	molární hmotnost kopolymerní jednotky obsahující skupiny
$M_n$	g/mol	početně průměrná molární hmotnost
$M_w$	g/mol	hmotnostně střední molární hmotnost
$R_h$	—	hydrodynamický poloměr
T	K	teplota
w	%	hmotnostní zlomek

# 1. ÚVOD

Rakovina je jednou z nejčastějších příčin úmrtí. V roce 2020 bylo v rámci celého světa evidováno 19,3 milionu nových případů rakoviny a 10,0 milionu úmrtí v důsledku rakoviny<sup>1</sup>. Navzdory značnému pokroku vědy v oblasti nádorové biologie stále existují formy nádorů, které nejsou léčitelné nebo jejich terapie není efektivní. Jedna z nejčastěji používaných forem léčby rakoviny — chemoterapie — způsobuje kromě zničení nebo zastavení růstu rakovinných buněk také výrazné poškození zdravým rychle proliferujícím buňkám organismu, pokud se do styku s nimi dostane. Proto je hledání nových, efektivnějších a selektivnějších prostředků pro boj s rakovinou aktuální oblastí výzkumu.

V posledních letech se výzkum léčby rakoviny zaměřuje na oblast imunoontoterapie. Velkou výhodou tohoto typu léčby je možnost cílení na různé typy rakoviny. ZM241385 je potenciálním lékem používaným v blokádě imunitních kontrolních bodů, jehož farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti lze zlepšit konjugací s polymerním dopravním systémem. Konjugace protinádorového léčiva s dopravním systémem umožňuje zvýšení biologické dostupnosti léčiva a potencuje využití terapeutik, jako například ZM241385, v imunoontoterapii.

Tato práce je zaměřena na použití polymerních dopravních systémů pro zvýšení imunoterapeutického účinku ZM241385, který spočívá v blokaci adenosinového A<sub>2A</sub> receptoru. Z toho důvodu je v rámci této práce věnována pozornost především polymerním nosičům, interakci nádoru s imunitním systémem organismu a imunoontoterapii.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Přehled polymerních systémů pro transport léčiv

#### 2.1.1 Polymerní systémy pro transport léčiv a jejich výhody oproti jiným dopravním systémům

Chemoterapie patří v současnosti mezi nejvyužívanější metody léčby onkologických onemocnění. Cílem chemoterapie je zasáhnout nádorové buňky a zastavit, respektive zpomalit průběh rakovinného bujení. Velkou nevýhodou léčiv používaných v chemoterapii představuje jejich toxicita vůči buňkám zdravé tkáně vedoucí k celé řadě vedlejších nežádoucích účinků, což omezuje velikost dávek a frekvenci podávání léků, respektive výslednou efektivitu léčby. Jednou z možností zvýšení efektivity léčby a snížení nežádoucích vedlejších účinků protinádorové terapie je použití systémů pro dopravu léčiv. Jedná se o systémy pro cílený transport léčiv do konkrétních tkání, buněk nebo organel s možností řízeného uvolňování terapeutických látek. Velkou výhodou takových dopravních systémů je zlepšení farmakokinetických a farmakodynamických vlastností při významně nižších toxických profilech<sup>2</sup>.

Mezi příklady takových dopravních systémů patří různé nanočásticové systémy, jako např. lipozomy, micely, a vodorozpustné polymerní nosiče s kovalentně vázaným léčivem (Obr. 2.1).



Obrázek 2.1: příklady dopravních systémů léčiv

Lipozom je útvar složený z fosfolipidů, které se v důsledku interakce s vodným prostředím samovolně uspořádávají do útvaru dvouvrstevné membrány. Lipozomy mají příznivé vlastnosti, jako jsou biokompatibilita, biologická rozložitelnost, snadná příprava, nízká toxicita a vysoká kapacita vnitřního prostoru pro enkapsulaci dopravovaných látek. Nevýhodou lipozomů je jejich snadná degradovatelnost v kyselém prostředí, enzymy a imunitním systémem organismu<sup>3,4</sup>. Polymerní micely jsou samouspořádané nanostruktury složené z amfifilních blokových kopolymerů, které tvoří strukturu s hydrofobním jádrem a hydrofilním obalem. Do jádra lze inkorporovat hydrofobní biologické aktivní látky, které uvnitř micely setrvávají pomocí nekovalentních interakcí.

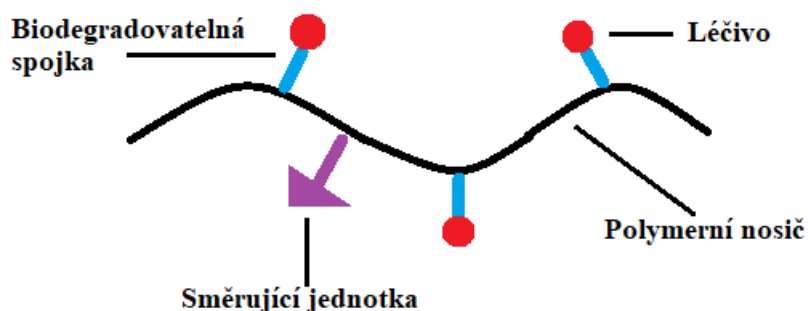
Vnější vrstva takových micel je hydrofilní, což zvyšuje biokompatibilitu těchto nosičů<sup>5</sup>. Jako jedny z prvních polymerních nosičů byly využívány makromolekuly biologického původu, jako jsou polysacharidy (např. dextran, chitin, kyselina hyaluronová, hydroxyethylškrob) nebo proteiny (např. sérový albumin, transferrin, glykoproteiny). Mezi výhody biologických makromolekul patří jejich snadná dostupnost, biokompatibilita a biodegradabilita<sup>2</sup>.

Kromě uvedených výhod je nutné brát v potaz také některé problémy, které mohou být spojeny s podáním těchto dopravních systémů:

- V jistých případech může docházet ke spontánnímu uvolnění velkého podílu navázaného léčiva po jeho podání, což může vést k závažné toxicitě *in vivo* (tzv. burst efekt);
- Je nutné důsledné dodržování syntetických procedur, v některých případech je enkapsulace špatně rozpustných biologicky aktivních složek s tendencí ke krystalizaci doprovázena použitím organických rozpouštědel během finální přípravy, a tato rozpouštědla musí být důkladně odstraněna před použitím;
- U některých biologicky aktivních molekul může docházet k nedostatečné vazbě na samotný nosič, která je často v řádech jen několika procent. Takovýto systém obvykle vyžaduje pro dostatečný terapeutický účinek poměrně vysokých koncentrací polymerního nosiče, což může samo o sobě vést k akumulaci nosiče a s tím spojeným vedlejším účinkům<sup>2</sup>.

Uvedené problémy lze úspěšně minimalizovat pomocí přístupu, ve kterém je léčivo ve formě na míru připraveného proléčiva kovalentně vázáno na vhodný polymerní nosič, který chrání léčivo před degradací během podání do organismu a cirkulace.<sup>2</sup> Neaktivní forma vázaného léčiva se dále metabolizuje *in vivo* za vzniku aktivního léčiva a jeho metabolitů v důsledku odpovědi na endogenní (např. pH, působení enzymů) nebo exogenní (např. teplota) stimuly<sup>6</sup>.

Polymerní nosiče jsou struktury složené z monomerních jednotek s vhodnými funkčními skupinami, které slouží pro připojení léčiv nebo jiných biologicky aktivních komponent (Obr. 2.2 str. 13). Připravené polymerní nosiče musí být netoxické, biokompatibilní, neimunogenní a musí být vylučitelné z organismu, aby se zabránilo jejich dlouhodobé akumulaci<sup>2,6,7</sup>.



Obrázek 2.2: schéma struktury polymerního nosiče s navázaným léčivem

Konjugace léčiva na hydrofilní polymerní nosič ovlivňuje jeho vlastnosti následujícím způsobem:

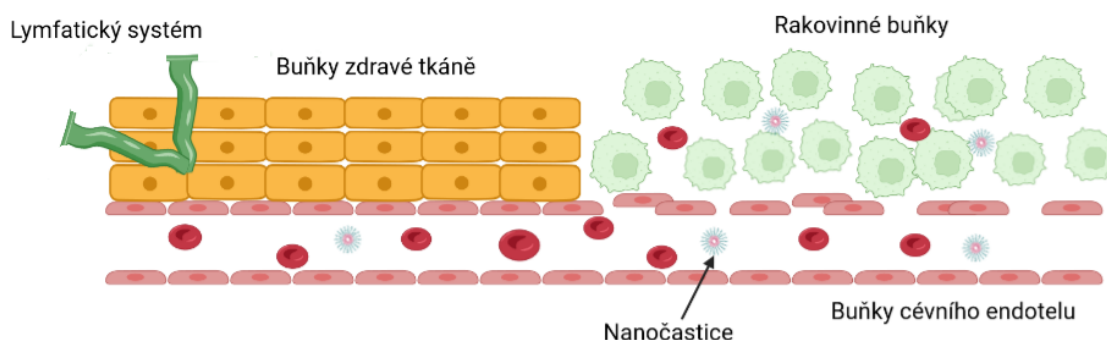
- Zvyšuje rozpustnost hydrofobních léčiv
- Prodlužuje cirkulaci konjugátu polymer-léčivo v krvi
- Ovlivňuje farmakokinetiku, farmakodynamiku a biodistribuci léčiva
- Významně zvyšuje akumulaci léčiva v pevných nádorech
- Snižuje rezistenci rakoviny na terapii
- Snižuje výskyt toxických vedlejších účinků<sup>2</sup>.

Design polymerních nosičů, včetně struktury, molární hmotnosti, struktury spojek atd., silně ovlivňuje celkovou terapeutickou aktivitu léčiva. Aby se zabránilo nežádoucímu hromadění nosičů v organismu, které může vést k závažným dlouhodobým vedlejším účinkům, měly by být synteticky připravené polymerní nosiče odstraněny z organismu po dodání dopravovaných léčiv do cílových buněk nebo tkáně. Polymerní nosiče je možné rozdělit na dvě podskupiny podle biologické rozložitelnosti polymerní kostry: polymery s biologicky rozložitelnou kóstrou a biologicky nerozložitelné polymery. Biodegradabilní polymerní nosiče jsou štěpeny na malé fragmenty, které jsou dále metabolizovány, nebo odstraněny renální filtrací podobně jako sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností<sup>2,6,8</sup>.

Polymerní kostry většiny syntetických polymerních nosičů nejsou biologicky rozložitelné. Syntetické polymerní nosiče tak musí mít možnost vyloučení z organismu přímo, nebo dodatečně po odštěpení biologicky rozložitelných spojek zavedených do struktury polymeru (pH citlivých, enzymaticky nebo reduktivně rozložitelných). Nejjednodušším a nejefektivnějším způsobem eliminace rozložitelných i nerozložitelných nosičů je renální filtrace, proto molární hmotnost nedegradovatelného

nosiče nebo jeho fragmentů musí být nižší, než je limit renální filtrace. Pokud by byla molární hmotnost nedegradovatelného nosiče vyšší, musel by být odstraněn velmi pomalým procesem hepatobiliární cestou, což není optimálním způsobem z důvodu dlouhodobější cirkulaci nosiče v těle<sup>2,6,8</sup>.

Protinádorová aktivita konjugátů polymerního proléčiva může být zlepšena několika způsoby. Jedním z nich je "pasivní" cílení do nádorů v důsledku efektu zvýšené permeability a retence makromolekulárních látek v pevných nádorech (tzn. EPR – z angličtiny «enhanced permeability and retention effect»). Tento efekt je založen na rozdílech endotelu zdravé a maligní tkáně (Obr. 2.3). Tento jev je spojen s vysokou vaskularitou nádoru, zvýšenou permeabilitou nádorových cév a defektní nebo potlačené lymfatické drenáží v nádorovém intersticiu<sup>9</sup>. Stupeň akumulace nosiče léku v nádoru je závislý na molární hmotnosti<sup>10</sup>. Vysoká molární hmotnost (tzn. HMW – z angličtiny «High molecular weight») polymerních nosičů zabraňuje rychlé eliminaci léčiva z organismu renální filtrací, prodlužuje dobu cirkulace léčiva v krevním oběhu a zajišťuje zvýšený příjem a hromadění léčiva v pevných nádorech<sup>2,10</sup>.



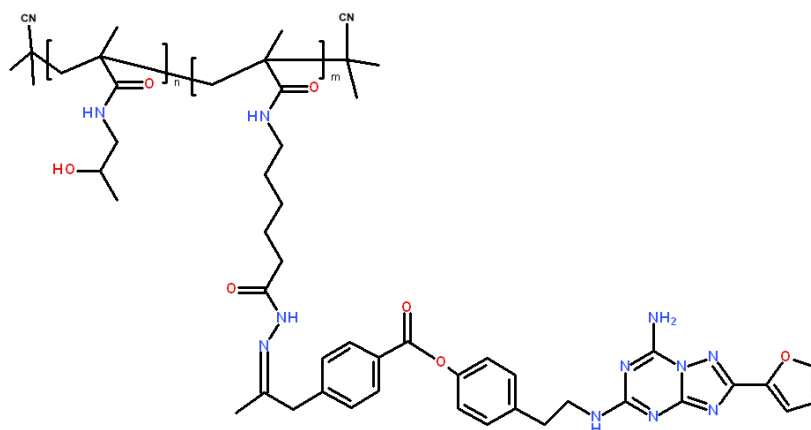
Obrázek 2.3: EPR efekt

### 2.1.2 Polymerní systémy na bázi HPMA pro cílený transport léčiv

Vodorozpustné polymerní nosiče léčiv se obecně používají k dopravě různých biologicky aktivních složek. Nejdůležitější studované aplikace hydrofilních polymerních nosičů spadají do oblasti dopravy protizánětlivých léčiv, antimikrobiálních molekul, inhibitorů mnohočetné lékové rezistence a hlavně protinádorových léčiv, tj. cytostatik. Silná protinádorová účinnost bez podstatné systémové toxicity byla prokázána v protinádorových terapiích založených na konjugátech obsahujících různé typy kopolymerů na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA)<sup>2,8</sup>.

Vodorozpustné kopolymery na bázi HPMA (příklad obr. 2.4 str. 15) v současnosti patří do skupiny nejvíce studovaných a nejčastěji používaných polymerů pro syntézu

polymerních konjugátů s léčiv<sup>11</sup>. Tyto kopolymery jsou biokompatibilní, netoxické a neimunogenní a umožňují připojení léčiva k nosiči pomocí vhodné biologicky rozložitelné spojky nebo vazby citlivé na různé stimuly spojené s nádorem nebo zánětem. Hydrofilní povaha polymerní kostry zvyšuje energetickou bariéru adsorpce bílkovin nebo jiných biomakromolekul kvůli obklopení nosiče hydratačním obalem během krevního oběhu<sup>8</sup>.



Obrázek 2.4: polymerní nosič na bázi HPMA s modifikovaným léčivem ZM241385 navázaným pomocí hydrazonové vazby

Zatímco většina nízkomolekulárních léčiv vstupuje do intracelulárního prostředí difúzí přes plazmatickou membránu, vstup makromolekul je omezen pouze na endocytózu. Makromolekuly zachycené tímto mechanismem jsou směřovány do lyzozomálního kompartmentu buňky. Konjugáty na bázi *p*HPMA jsou ve vodě rozpustné molekuly, a jejich záchyt probíhá pomocí pinocytózy. Pinocytóza označuje proces, při kterém dochází k zachycení extracelulárních tekutin, všech rozpuštěných látek a jakéhokoli materiálu, který je schopný adherovat k povrchu. Po internalizaci polymerního systému ve vodné fázi endozomu může docházet po sloučení endozomu s primárním lyzozomem k uvolnění léčiva, a to vlivem lyzozomálních enzymů nebo sníženým pH v utvořeném sekundárním lyzozomu<sup>10,12</sup>.

Nejjednodušší struktura konjugátu HPMA kopolymer-léčivo je složena z biologicky nerozložitelného lineárního kopolymerního řetězce HPMA nesoucího léčivo připojené pomocí biodegradovatelné spojky nebo jen samostatné vazby. Spojky nebo vazby mohou být tří typů:

- Enzymaticky štěpitelné – zajišťují uvolňování léčiv z nosičů pomocí enzymů asociovaných s nádorem nebo nádorovými buňkami. Většinou se jedná o oligopeptidové spojky. Například uvnitř lyzozomů může dojít ke štěpení

lysosomálními enzymy, po uvolnění léčiva následuje jeho translokace do cytoplasmy. Struktura spojky by měla zajistit stabilitu vazby mezi léčivem a nosičem v krevním řečišti;

- Hydrolyticky štěpitelné – léčivo je vázáno pomocí vazeb citlivých na pH, což umožňuje uvolnění léčiva v důsledku rozdílu pH mezi krví a kompartmentem buněk (endozomy, lysozomy), nebo mezi krví a mikroprostředím nádoru;
- Redukovatelné – používá rozdíl mezi intra- a extracelulárními oxidoreduktivními podmínkami nádorových buněk<sup>12</sup>.

Jednou z nejčastěji používaných a univerzálních technik řízených kopolymerizací pro syntézu polymerních struktur s co nejvíce definovanou molární hmotností a polydisperzitou blíží se jedné je v dnešní době tzv. “Reversible Addition–Fragmentation chain Transfer polymerization“, neboli RAFT polymerizace. RAFT polymerizace využívá přenosové činidlo pro přenos řetězce ve formě thiokarbonylthio sloučeniny (nebo podobné), což umožňuje kontrolu nad molekulovou hmotností a disperzitou vznikajícího polymeru. Tato technika byla použita k syntéze široké škály polymerů s definovanou molekulovou hmotností a nízkou disperzitou<sup>13</sup>.

Existují tři metody syntézy polymerních konjugátů s léčivem:

a) syntéza kopolymeru HPMA nesoucího reaktivní skupiny (polymerní prekurzor) umožňující připojení dalších složek systému kovalentními vazbami, např. aminolytickou reakcí;

b) kopolymerace HPMA s komonomery obsahujícími léčivo nebo jinou biologicky aktivní součást ve své struktuře;

c) kombinace obou metod, tj. kopolymerace HPMA s komonomery obsahujícími bioaktivní molekulu a reaktivní skupiny. Polymerace je následována například aminolytickým připojením druhé biologicky aktivní molekuly<sup>2,11</sup>.

## 2.2 Biochemie nádorů a komunikace mezi buňkami

### 2.2.1 Metabolismus nádorové buňky

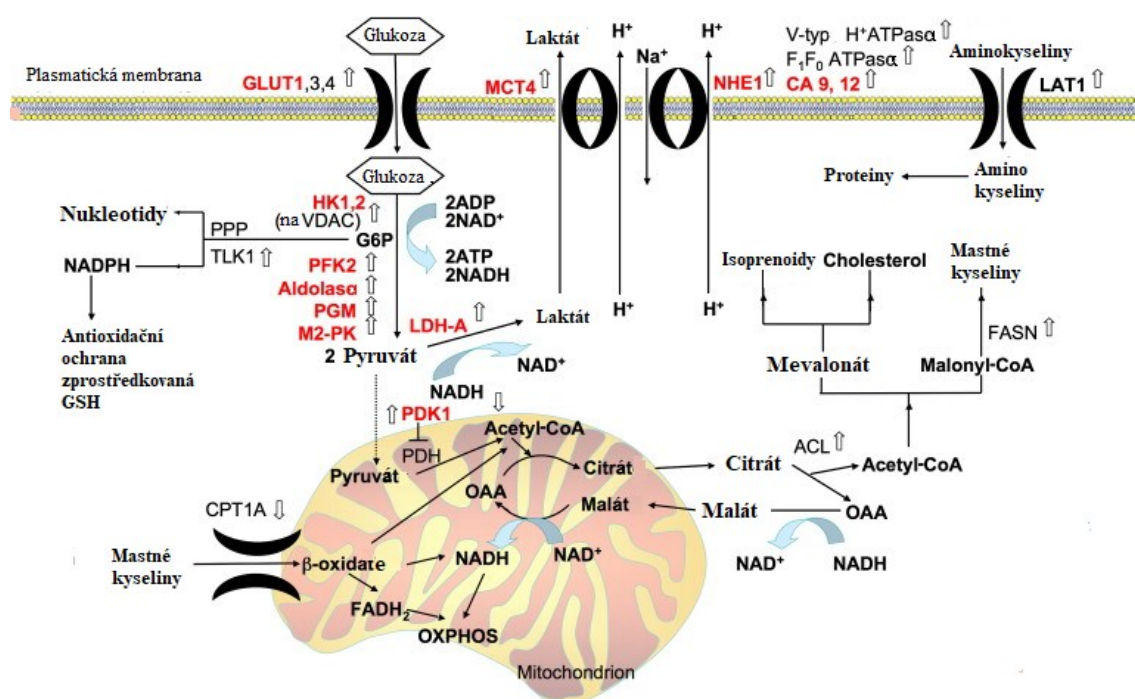
Metabolické procesy rakovinné buňky jsou odlišné od metabolických procesů buňky zdravé. Nádorové buňky reprogramují svůj metabolismus a cesty získávání živin pro splnění bioenergetických, biosyntetických a redoxních požadavků. Tyto změny vedou k získávání a udržování maligních charakteristik buňky, jako jsou dediferenciace, nekontrolovatelná proliferace, zvýšená angiogeneze, ztráta kontaktní inhibice a chromozomální nestabilita<sup>14-16</sup>.

Metabolismus nádorové buňky je charakterizován výrazným posunem v směru anabolismu, což umožňuje buňkám produkovat makromolekuly potřebné pro replikační buněčné dělení a růst nádoru<sup>14,15</sup>. Warburgův efekt, nebo aerobní glykolýza, je jedním z nejvíce studovaných efektů přeměny buněčného metabolismu. Tento jev zahrnuje sklon proliferujících buněk, včetně rakovinných buněk, přijímat glukózu a vylučovat uhlík jako laktát, i když je přítomen kyslík. Aerobní glykolýza produkuje méně ATP na mol glukózy než kompletní oxidace glukózy na oxid uhličitý, nicméně produkce ATP je rychlejší. Tento jev je zajímavý i z toho hlediska, že nádorové buňky zachovávají funkční mitochondrie a defektní respirace není charakteristickým rysem rakovinných buněk. Naopak, respirace a další mitochondriální aktivity jsou podmínkou růstu, progresu a metastazování nádorů<sup>15,16</sup>. Zvýšení glykolytického toku umožňuje glykolytickým meziproductům podporovat anaplerotické reakce, které jsou důležité pro splnění metabolických požadavků proliferujících buněk<sup>15</sup>.

Ačkoli reakce regenerující  $\text{NAD}^+$  přímo neposkytují buňkám energii, jsou důležité právě pro produkci oxidovaného  $\text{NAD}^+$ , který je potřebný ke katabolizaci živin, včetně cukrů a lipidů, k syntéze oxidovaných biomolekul, jako jsou nukleotidy a aminokyseliny, a k podpoře dalších buněčných procesů, jako je syntéza folátu, histonová deacetylase, udržování homeostázy vápníku a poly(ADP-ribosylové) polymerázové aktivity. Pokud poptávka po  $\text{NAD}^+$  na podporu oxidačních reakcí překročí rychlost obratu ATP v buňkách, dochází k omezení regenerace  $\text{NAD}^+$  mitochondriálním dýcháním a podpoře fermentace i navzdory dostupnému kyslíku. Tento mechanismus dokládá, že se rakovinné buňky aktivně zapojují do procesu fermentace až v momentě, kdy poptávka  $\text{NAD}^+$  převyšuje poptávku ATP<sup>17</sup>.

Podobně jako v glykolytickém cyklu, se do syntézy biomolekul potřebných pro růst a vývoj nádoru zapojují i intermediáty cyklu trikarboxylových kyselin (TCA – z angl. «Tricarboxyl Acids»)<sup>15</sup>. V nádorových buňkách probíhá zkrácený cyklus TCA. V tomto zkráceném cyklu TCA je citrát přednostně exportován do cytosolu

přes trikarboxylátový transportér. Jakmile je citrát v cytosolu, štěpí se ATP-citrátlyázou za vzniku oxaloacetátu a acetyl-CoA, který slouží jako stavební blok pro růst a proliferaci buněk. Oxaloacetát je redukován na malát, poté reimportován do mitochondrií, kde je v matrix za současné tvorby NADH, který inhibuje TCA, přeměněn na oxaloacetát. Oxaloacetát následně reaguje s acetyl-CoA a dokončuje tak cyklus<sup>18</sup>. Dvě hlavní dráhy, které anapleroticky navyšují pool potřebných intermediátů rakovinných buněk jsou glutaminolýza, která produkuje  $\alpha$ -ketoglutarát z glutaminu, a karboxylace pyruvátu, která produkuje oxaloacetát z glukózy nebo pyruvátu<sup>15</sup>. Změny metabolismu nádorových buněk jsou zobrazeny na obrázku 2.5.



Obrázek 2.5: přeměny metabolismu v nádorech. Převzato a přeloženo z<sup>18</sup>

Celý metabolismus rakovinných buněk (zejména glykolýza a cyklus TCA) je reorganizován za účelem podpory anabolických reakcí spojených s růstem a proliferací buněk<sup>18</sup>.

### 2.2.2 Mikroprostředí nádoru

Mikroprostředí nádoru je okolí, v němž se v lidském organismu objevuje nádor. Do mikroprostředí zahrnujeme krevní cévy, fibroblasty, imunitní buňky, signální molekuly a extracelulární matrix<sup>19,20</sup>. Proliferující rakovinné buňky ovlivňují okolní zdravé buňky tak, aby spolupracovaly při tvorbě a podpoře specifického nádorového mikroprostředí přispívajícího pro růst nádorů, metastázování do vzdálených orgánů,

heterogenitu nádorů a rezistenci na systémové terapie<sup>9</sup>. Nádor může interagovat s mikroprostředím uvolňováním extracelulárních signálů, čímž může podporovat angiogenezi a indukovat toleranci periferní imunity. Imunitní buňky v mikroprostředí mohou také ovlivnit růst a vývoj rakovinných buněk<sup>19,20</sup>.

Rakovinné buňky ve svém okolí vytvářejí velké oblasti, pro něž je charakteristická hypoxie, acidóza a nedostatek živin. Tyto stresové faktory podporují selekci subpopulací agresivních a invazivních buněk<sup>21</sup>. Hypoxie je stav, ve kterém se k buňkám nedostává dostatečné množství kyslíku, které je důležité pro udržení adekvátní homeostázy. Tento stav je způsoben růstem rakovinných tkání a vede k buněčné dysfunkci<sup>22</sup>. Hypoxie ve zdravé tkáni vyvolává nízkou úroveň proliferace z důvodu nedostatku ATP vznikajícího aerobním metabolismem. V nádorech se buňky dobře zásobené kyslíkem nacházejí vedle funkčních cév a mají vysokou úroveň proliferace, kdežto buňky vzdálené od vaskularity a buňky v nekrotických regionech mají nižší stupeň proliferace<sup>9</sup>. Hypoxie může přispívat k angiogenezi. Krevní cévy vytvořené kolem nádorů se liší od normálních cév genovou expresí a povrchovými buněčnými receptory. Tato abnormální vaskulární síť je charakterizována netěsným endotelem krevního zásobení a špatně vyvinutým lymfatickým systémem v nádoru. Výsledkem těchto podmínek je pohyb nádorových buněk v cyklu hypoxie-reoxygenace. Oba tyto faktory přispívají k vzniku buněk s agresivnějšími fenotypy<sup>9</sup>.

Angiogeneze je fyziologický proces tvorby nových krevních cév z již existujících cév, což zajišťuje buňkám živiny a kyslík. Za normálních podmínek se angiogeneze vyskytuje např. během embryonálního vývoje, ženského reprodukčního cyklu a hojení ran. Proces angiogeneze je v souladu s homeostázou a je řízen různými biologickými signály<sup>22,23</sup>. Angiogenní regulátory lze rozdělit na:

- a) Proangiogenní, mezi které patří vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), bazický růstový faktor fibroblastů, transformující růstový faktor- $\alpha$  a- $\beta$  (TGF- $\alpha$  a - $\beta$ ), epidermální růstový faktor, růstový faktor odvozený od krevních destiček, růstový faktor odvozený od placenty a angiopoetin 1 a 2.
- b) Antiangiogenní, mezi které patří angiostatin, endostatin, tumstatin, faktor destiček-4, interleukin IL-12, trombospodin-1 (TSP-1), tkáňové inhibitory metaloproteináz a interferon- $\alpha$ , - $\beta$  a - $\gamma$ <sup>23</sup>.

V případě poruchy homeostázy může docházet k aktivaci angiogeneze<sup>22,23</sup>. Nádory pro stimulaci svého růstu o více než 1-2 mm potřebují zvýšený příliv krve. Z těchto důvodů rakovinné buňky tvoří nové krevní cévy. Sekrece chemických signálů

rakovinnými buňkami podporuje angiogenezi a tím i růst nádoru. Při absenci vaskulární podpory v nádoru však může docházet k nekróze nebo apoptóze<sup>21,22</sup>.

### 2.2.3 Nádory a imunitní systém

Imunitní systém rozpoznává a odstraňuje maligní buňky, ale zároveň přispívá k selekci nádorových buněk, které mají schopnost uniknout rozpoznání a eliminaci imunitním systémem, a tím podporovat progresi rakoviny. Dynamický proces, který popisuje dvojitou roli imunitního systému má název imunoeditace a popisuje proces vývoje nádoru pomocí tří kroků: eliminace (také známá jako imunitní dozor), rovnováha a únik imunitnímu systému. Tyto fáze nejsou striktně rozděleny, nýbrž se navzájem prolínají<sup>24,25</sup>.

Během eliminační fáze vrozená a získaná, též adaptivní, složka imunitního systému hostitele rozpoznávají antigeny specifické pro nádor a reagují na ně. Imunitní dozor může tímto způsobem zničit významné procento maligních buněk. Některé nádorové buňky přežijí však eliminaci a vstupují do rovnovážné fáze, během níž adaptivní imunitní systém zabraňuje přímému růstu nádoru, ale nepotlačuje zbývající maligní klony. Ačkoli je velké množství původních nádorových buněk zničeno, vznikají také nové varianty klonů nesoucí více mutací, které jim poskytují zvýšenou odolnost proti imunitnímu útoku. Fáze úniku je konečný růst nádorů, které překonaly imunologická omezení rovnovážné fáze. Nádorové buňky unikají imunitní odpovědi, když se u nich vyvine rezistence na protinádorovou imunitní odpověď<sup>23, 25</sup>.

Mezi hlavní mechanismy, kterými se nádory vyhýbají destrukci imunitním systémem, patří

- Ztráta nebo změna antigenů;
- Snížení aktivity komponentů systému zpracování a prezentaci antigenu;
- Produkce faktorů spojených s imunosupresí, jako je TGF- $\beta$  a IL-10;
- Zvýšená produkce ligandů pro receptory, které snižují aktivitu lymfocytů infiltrujících nádory, např. programovaný ligand smrti-1 (PD-L1);
- Atrakce supresorových imunitních buněk, jako jsou regulační T-buňky, myeloidní supresorové buňky a makrofágy spojené s nádorem<sup>25 24</sup>.

Myeloidní supresorové buňky (MDSC) jsou skupina patologicky aktivovaných nezralých myeloidních buněk se silnou imunosupresivní schopností. MDSC nejsou přítomny v organismu zdravých jedinců a objevují se při rakovině a patologických stavech spojených s chronickým zánětem nebo stresem. Mezi funkce MDSC patří

ochrana nádorových buněk před zničením imunitním systémem, vytvoření premetastatického prostředí a usnadnění epiteliálně-mezinichimální tranzice. MDSC jsou schopny podporovat růst nádoru prostřednictvím remodelace mikroprostředí nádoru kvůli produkci VEGF, bFGF, Bv8 a MMP9 – základních mediátorů neoangiogeneze a tkáňové invaze. Potlačení imunity je hlavním rysem MDSC. Hlavními cíli MDSC jsou T-buňky. Mezi hlavní faktory zapojené do imunitní suprese zprostředkované MDSC patří argináza (ARG1), INOS, TGFβ, IL-10, COX2, indoleamin 2,3-dioxygenáza (IDO), snížení exprese I-selektinu T-buňkami a mnoho dalších<sup>27,28</sup>.

Makrofágy asociované s nádorem (TAM) jsou makrofágy, které se podílejí na tvorbě mikroprostředí nádoru. TAM mohou podporovat růst nádoru, invazi, metastázy a rezistenci na léky. Makrofágy podléhají specifické diferenciaci v různých tkáňových prostředích a lze je rozdělit do dvou různých typů: makrofágy typu M1 a makrofágy typu M2. Makrofágy typu M1 obvykle vykazují protinádorové funkce; makrofágy typu M2 mohou podporovat růst a metastázování nádorových buněk, inhibovat protinádorovou imunitní odpověď zprostředkovanou T-buňkami, podporovat angiogenezi nádoru sekrecí proangiogenních faktorů, jako je VEGF a chemokiny (CXCL8 a CXCL12) a vést k progresi nádoru. Populace TAM je ve stavu neustálého přechodu mezi dvěma formami typu M1 a M2. Podíl každé formy je určen typem a koncentrací různých signálů v prostředí nádoru<sup>29,30</sup>.

Lymfocyty infiltrující nádor (TIL) jsou lymfocyty které opustily krevní řečiště a lokalizovaly se v nádorových tkáních. Imunosupresivní faktory v mikroprostředí nádoru inhibují schopnost lymfocytů zabít nádorové buňky. TIL se skládá hlavně z T-buněk, B-buněk a NK-buněk. V klinické praxi byly TIL navrženy jako potenciální prognostické a terapeutické biomarkery, zejména ve spojení s terapií blokady imunitních kontrolních bodů<sup>31,32</sup>.

## 2.3 ZM241385 v imunoontoterapii

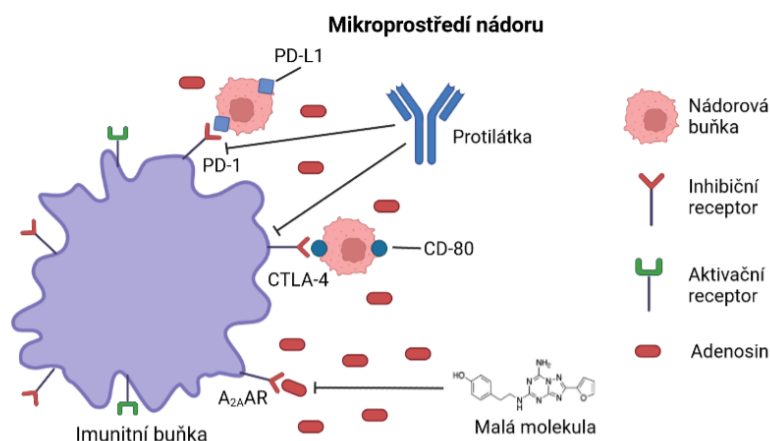
### 2.3.1 Imunoontoterapie

Imunoontoterapie je metoda léčby, která využívá stimulaci imunitního systému organismu pro rozpoznání a odstranění rakovinných buněk. Existuje několik typů imunoontoterapie rakoviny: přímá inhibice rakoviny (např. inhibitory kontrolních bodů), protinádorové vakcíny, nebo zvýšení imunitní odpovědi organismu na rakovinné buňky (např. cytokiny).

**Vakcíny** proti rakovině mohou být několika typů: lyzát nádorových buněk, dendritické buňky, nukleové kyseliny nebo neo-antigeny. V těchto technologiích je DNA nebo mRNA přijímána antigen-prezentujícími buňkami a překládána k indukci exprese antigenu. Cílené antigeny jsou prezentovány T-buňkám, aby vyvolaly jejich aktivaci proti nádorovým buňkám, které exprimují požadovaný antigen<sup>33</sup>.

**Cytokiny** jsou skupina relativně malých proteinů (přibližně 5-20 kDa), které hrají rozhodující roli v buněčné signalizaci umožňující imunitním buňkám komunikovat organizovaným způsobem. Umožňují komunikaci mezi fyzicky vzdálenými buňkami nebo tkáněmi a modulují intenzitu a trvání imunitní odpovědi proti cílovým antigenům. Injektované cytokiny přímo stimulují růst a aktivitu imunitních buněk. Tři hlavní typy cytokinů, které byly sledovány pro imunoontoterapii, jsou interferony, interleukiny a faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF)<sup>33,34</sup>.

Terapie **inhibitory kontrolních bodů** indukuje hlavní odpověď uvolněním inhibičních mechanismů, které řídí imunitu zprostředkovanou T-buňkami. Imunitní kontrolní body představují soubor inhibičních cest imunitních buněk pro regulaci a kontrolu imunitní odpovědi. Dvě nejběžnější strategie inhibice kontrolních bodů jsou blokáda PD-1/PD-L1 a inhibice CTLA-4. CTLA-4 je exprimován na povrchu CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> lymfocytů a kompetuje s T-buněčným kostimulačním receptorem CD28 o vazbu T-buněčných kostimulačních faktorů, které jsou exprimovány na povrchu buněk prezentujících antigeny. Vazba CTLA-4 snižuje produkci IL-2 a proliferaci T-buněk. PD-1 je receptor na povrchu buněk exprimovaný na více typech imunitních buněk, jako jsou T-buňky, B-buňky a NK-buňky<sup>24,25,33-35</sup>. Dráhy kontrolních bodů jsou zobrazeny na obrázku 2.6 na stránce 23.



Obrázek 2.6: dráhy kontrolních bodů a možnosti jejich využití v protinádorové terapii.

Převzato a opraveno z<sup>36</sup>

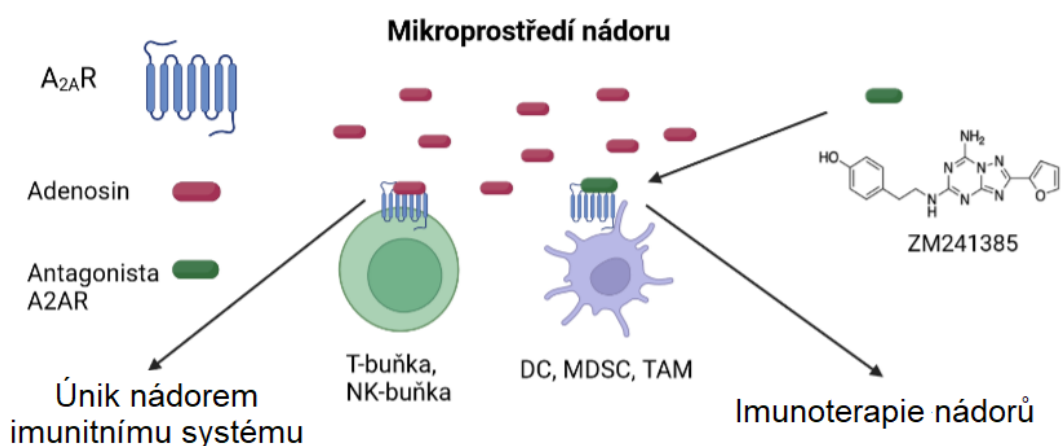
Fyziologicky imunitní kontrolní body kontrolují imunitní odpověď a chrání zdravé tkáně před imunitním útokem. Po aktivaci T-buněk (např. v reakci na zánět) dochází k expresi PD-1, který T-buňkám umožňuje rozpoznat abnormální a rakovinné buňky. Aby nádorové buňky zabránily svému rozpoznání a eliminaci T-buňkami, exprimují PD-L1, který se váže na PD-1 na T-buňkách, čímž dochází k jejich inaktivaci. Blokování interakce mezi nádorovými buňkami a T-buňkami pomocí monoklonálních protilátek, které cílí buď PD-1, nebo PD-L1, umožňuje smrt nádorových buněk zprostředkovanou T-buňkami. Další imunitní kontrolní bod představuje CTLA4. CTLA4 je koinhibiční molekula, která reguluje rozsah aktivace T-buněk. Interakce mezi CTLA4 a jeho ligandy – CD80 a CD86 – inhibuje aktivitu T-buněk a tím podporuje progresi nádoru. Pokud dojde k zablokování interakce mezi CTLA4 a těmito ligandy zůstávají T-buňky aktivní a mohou rozpoznat a zabít nádorové buňky<sup>24,25,33–35</sup>.

### 2.3.2 Význam adenosinového A<sub>2A</sub> receptoru při rakovině

Lidský adenosinový receptor A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>AR) spadá do rodiny adenosinových receptorů (jiné podtypy jsou A<sub>1</sub>, A<sub>2B</sub> a A<sub>3</sub>) patřící do nadskupiny specifických receptorů vázaných na G-protein (GPCR). Po vazbě adenosinu a následné aktivaci se receptory A<sub>2A</sub> a A<sub>2B</sub> spojují s G<sub>s</sub> proteinem a podporují aktivaci adenylátcyklázy a následnou produkci cyklického AMP (cAMP), zatímco A<sub>1</sub>R a A<sub>3</sub>R mají opačné funkce a spojují se s proteinem G<sub>i</sub>, což vede ke snížení intracelulární koncentrace cAMP. Mezi čtyřmi podtypy adenosinových receptorů je A<sub>2A</sub>AR dominantním receptorem pro adenosin vyskytující se v extracelulárním prostředí.<sup>36,37</sup> Receptor A<sub>2A</sub> je receptor s vysokou afinitou k adenosinu

a je exprimován na T-buňkách, NK-buňkách, monocytech, makrofágech a dendritických buňkách<sup>38</sup>.

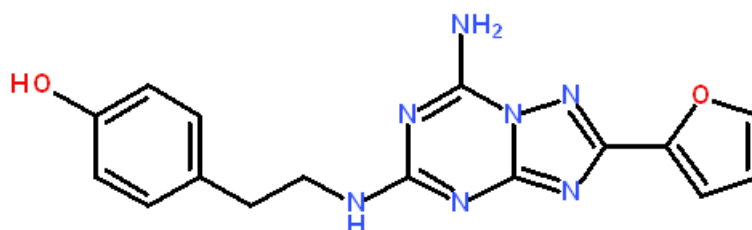
Fyziologicky je extracelulární hladina adenosinu velmi nízká. Koncentrace adenosinu je významně zvýšena ve srovnání se sousedními tkáněmi (~10  $\mu\text{M}$  vs <1  $\mu\text{M}$  v normálních tkáních)<sup>36</sup> v mikroprostředí nádoru, což chrání nádor proti útokům imunitního systému. Zvýšení intracelulárního cAMP vede k funkční inhibici cytolyzy zprostředkované imunitními buňkami, jako jsou  $\text{CD8}^+$  T-buňky a NK-buňky, snížení hladin interleukinu-2 (IL-2), faktoru nekrózy nádorů (TNF $\alpha$ ) a interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Zvýšení intracelulárního cAMP dále brání zrání dendritických buněk, inhibuje jejich schopnost ovlivňovat diferenciaci efektorových buněk, podporuje proliferaci regulačních T-buněk a zvyšuje expresi PD-1 a CTLA-4<sup>36-38</sup>. Efekt blokace receptoru je zobrazen na obrázku 2.7.



Obrázek 2.7: použití A<sub>2A</sub>R v imunoonkoterapii, převzato a opraveno z<sup>36</sup>

### 2.3.3 ZM241385 – selektivní antagonist A<sub>2A</sub> receptoru

4-(2-{{7-Amino-2-(furan-2-yl)[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-5 yl} amino} ethyl) phenol (ZM241385) (Obr. 2.8) je selektivní nexantinový antagonist receptoru A<sub>2A</sub>. ZM241385 je 500 až 1000krát selektivnější vůči A<sub>2A</sub> než A<sub>1</sub> a neinterferuje s receptory A<sub>2B</sub> nebo A<sub>3</sub><sup>37,39,40</sup>.



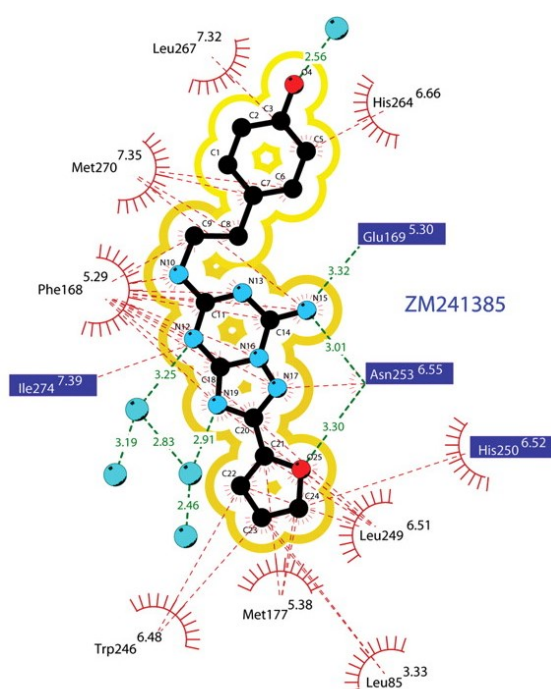
Obrázek 2.8: ZM241385

ZM241385 byl široce používán jako farmakologický nástroj v různých nádorových modelech.<sup>36</sup> Navzdory příznivým vlastnostem jako antagonisty  $A_{2A}R$ , ZM241385 byl použit pouze jako referenční léčivo při vývoji antagonistů  $A_{2A}R$  v mnoha studiích<sup>41</sup>. Vazebné charakteristiky ZM241385 v porovnání s ostatními modelovými ligandy jsou shrnuty v tabulce 2.1.

Tabulka 2.1: antagonisty  $A_{2A}R$  a jejich afinita pro adenosinové receptory<sup>37</sup>

Komponent	$K_i$ , nM			
	$A_1AR$	$A_{2A}AR$	$A_{2B}AR$	$A_3AR$
ZM-241385	255	0,8	50	>10,000
KW-6002	9600	12	1800	>3000
SCH-58261	287	0,6	5011	>10,000
MK-3814	>1000	1,1	>1700	>1000
SYN-115	1350	5	700	1570
AZD-4635	160	1,7	64	>10,000
V-2006	68	1,3	63	1005
CPI-444	192	3,54	1528	2455
AB-928	64	1,5	2,0	489

ZM241385 se váže na receptor v rozšířené konformaci s furanovým cyklem ponořeným hluboko do vazebné dutiny a s fenolovou částí umístěnou na vstupu ortosterického vazebního místa (Obr. 2.9)<sup>37</sup>.



Obrázek 2.9: schematická reprezentace interakcí mezi  $A_{2A}$  receptorem a ZM241385. Aminokyseliny důležité pro vazbu ligandů jsou označeny modrou barvou. Převzato z<sup>42</sup>

Triazoltriazinové jádro ZM241385 se nachází mezi Phe168 a hydrofobním povrchem tvořeným Ile274<sup>7.39</sup>, Leu249<sup>6.51</sup> a Met270<sup>7.35</sup>. Phe168 tvoří stacking interakci s triazoltriazinovým jádrem. Karbonylová skupina Asn253<sup>6.55</sup> tvoří vodíkovou vazbu s NH<sub>2</sub> skupinou ZM241385. Asn253<sup>6.55</sup> a Ile274<sup>7.39</sup> jsou důležité skupiny pro vazbu ligandů.

Furanový cyklus ZM241385 se nachází mezi dvěma hydrofobními aminokyselinami Leu249<sup>6.51</sup> a Met177<sup>5.38</sup>, kde se podílí na hydrofobní interakci s Trp246<sup>6.48</sup> a stacking interakci s His250<sup>6.52</sup>, které se zúčastní vazby agonistů a antagonistů. Kyslík cyklu tvoří vodíkovou vazbu s NH<sub>2</sub> skupinou Asn253<sup>6.55</sup>.

Fenolová skupina ZM241385 se nachází ve štěrbině, která je tvořena Glu13<sup>1.39</sup>, Ala63<sup>2.61</sup>, Ile66<sup>2.64</sup>, Ser67<sup>2.65</sup>, Leu267<sup>7.32</sup>, Met270<sup>7.35</sup>, Ile274<sup>7.39</sup>, His278<sup>7.43</sup> a Tyr271<sup>7.36</sup> (cit. <sup>36,37,42,43</sup>).

### 3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- 1) Syntéza polymerních prekurzorů na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, Ma-Akap-NH-NH-Boc a Ma-β-Ala-TT a jejich fyzikálně-chemická charakterizace:
  - a) Syntéza a čištění dvou různých kopolymerů
  - b) Stanovení molárních hmotností a disperzity těchto kopolymerů
  - c) Stanovení obsahu funkčních skupin
- 2) Návrh a syntéza derivátů léčiva ZM241385 pro možnost spojení s polymerním nosičem
  - a) Syntéza dvou různých derivátů
  - b) Čištění derivátů
  - c) Ověření struktury a čistoty derivátů
- 3) Syntéza polymerních konjugátů
  - a) Konjugace derivátů léčiva a polymerních prekurzorů
  - b) Stanovení molárních hmotností a disperzity polymerních konjugátů
  - c) Stanovení obsahu navázaného léčiva
  - d) Stanovení hydrodynamického průměru
- 4) *In vitro* testování
  - a) Kultivace lymfoblastoidních T-buněk Jurkat
  - b) Testování inhibiční aktivity ZM241385, derivátu léčiva a konjugátů

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

Chemikálie	Čistota	Výrobce
Aceton	99,98 %, sušený destilovaný	Lach-Ner
Acetonitril	99,95 % pro HPLC	VWR Chemicals
4-(2-{[7-Amino-2-(furan-2-yl) [1,2,4]triazolo[1,5- <i>a</i> ][1,3,5]triazin-5-yl] amino}ethyl)phenol (ZM241385)		Medchemexpress
DL-1-Amino-2-propanol	98 %	TCI
5-Azidopentanová kyselina		Bachem
2,2- azobis(isobutyro)nitřil (AIBN)	Rekrystalovaný	Wako Chemicals
2,2-azobis(4-methoxy-2,4- dimethyl)valeronitril (V-70)		Wako Chemicals
Chlorid sodný	99,99 %	Lach-Ner
Dichlormethan	99,95 %	Lach-Ner
Diethylether	99,8 % sušený destilovaný	Lach-Ner
<i>N, N</i> -diisopropylethylamin (DiPEA)		Iris Biotech
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	99,9 %	VWR Chemicals
<i>N, N</i> -dimethylacetamid (DMA)	99,5 % extra suchý	Acros Organics
<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> - ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC HCl)		VWR Life Science
4-dimethylaminopyridin (DMAP)	99 %	Aldrich
Dimethylsulfoxid	99,9 % bezvodý	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid deuterovaný	99,8 %	Euroisotop
Hexamethylsiloxan (HMDSO)	99,5 %, čistota pro NMR	Aldrich
Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát	100 %	VWR Chemicals
Kyselina octová	99,98 %	Lach-Ner
Kyselina trifloroctová		Iris Biotech
Methanol	bezvodý	Macron Fine Chemicals
Methanol	99,9 % pro LC-MS	VWR Chemicals
Octan sodný	p.a.	Merck

4-(2-oxopropyl)benzoová kyselina		Rieke Fine Chemicals
<i>tert</i> -butanol ( <i>t</i> -BuOH)	99,5 % pro analýzy	Acros Organics
Tetraboritan sodný	99,5 %	Fluka Biochemika
Tetramethylsilane (TMS)	99 %	Sigma-Aldrich
2,4,6-Trinitrobenzensulfonová kyselina (TNBS)		Sigma-Aldrich

## 4.2 Chemické syntézy

### 4.2.1 Syntézy monomerů

Monomery *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (**HPMA**), *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*N*-(6 methakrylamidohexanoyl)hydrazin (**Ma-Akap-NHNH-Boc**) a 3-(3-methakryloylamidopropanoyl)thiazolidin-2-thion (**Ma-β-Ala-TT**) byly syntetizovány na oddělení Biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR podle již publikovaných postupů<sup>44,45</sup>.

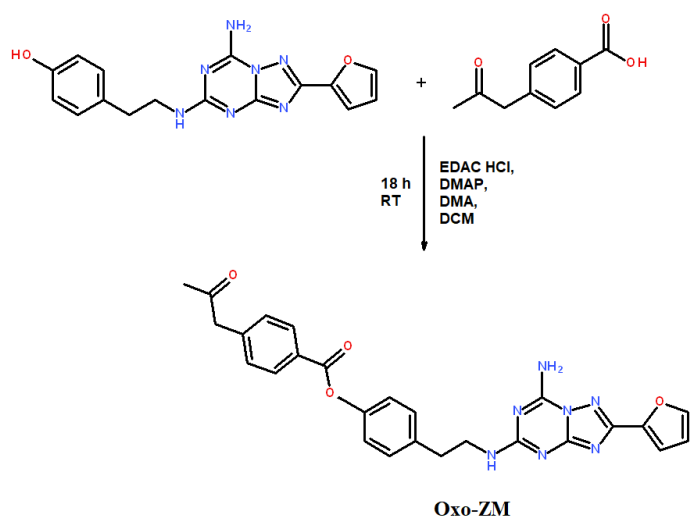
### 4.2.2 Syntézy přenosového činidla

Přenosové činidlo *S*-2-kyano-2-propyl-*S'*-ethyltrithiokarbonát (**CTA-AIBN**) bylo syntetizováno na oddělení Biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR podle již publikovaných postupů<sup>46</sup>.

### 4.2.3 Syntézy derivátů ZM241385

Derivát **Oxo-ZM** byl připraven reakcí ZM241385 a 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny podle následujícího postupu (Obr. 4.1 str. 30):

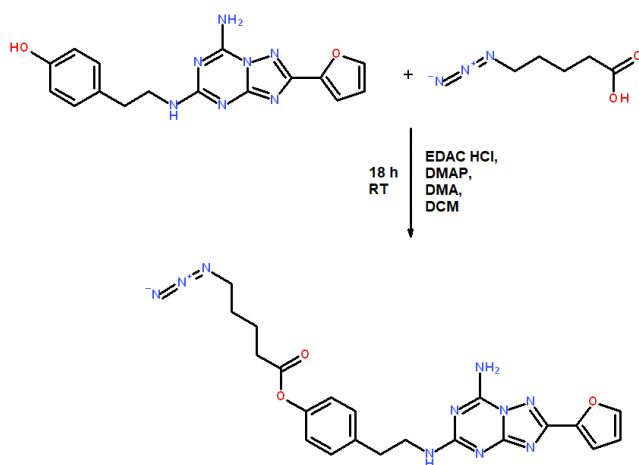
4-(2-oxopropyl)benzoová kyselina (29 mg, 0,163 mmol) a EDAC HCl (42,57 mg, 0,222 mmol) byly rozpuštěny v 2,5 ml DCM a přidáno katalytické množství DMAP, roztok byl míchán při laboratorní teplotě (dále jako RT) 20 minut. Roztok ZM241385 byl připraven rozpuštěním ZM241385 (50 mg, 0,15 mmol) v 0,5 ml bezvodého DMA, roztok byl míchán 20 minut při RT. Po uplynutí této doby roztoky byly smíchány a míchány 18 hodin při RT. Následně do reakční směsi byl přidán další podíl 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny (7 mg, 0,039 mmol), EDAC HCl (10,3 mg, 0,054 mmol) a katalytické množství DMAP, reakční směs míchána dalších 18 hodin při RT. Poté pomocí vakuové odparky byl z roztoku odstraněn DCM, k roztoku bylo přidáno malé množství acetonitrilu a surový produkt byl čištěn pomocí flash-chromatografie podle postupu uvedeného v podkapitole 4.3.2.



Obrázek 4.1: syntéza derivátu **Oxo-ZM**

Derivát **Azido-ZM** byl připraven reakcí ZM241385 a 5-azidopentanové kyseliny podle následujícího postupu (obr.4.2):

5-Azidopentanová kyselina (23,33 mg, 0,163 mmol) a EDAC HCl (42,57 mg, 0,222 mmol) byly rozpuštěny v 2,5 ml DCM a přidáno katalytické množství DMAP, roztok byl míchán při RT 20 minut. Roztok ZM241385 byl připraven rozpuštěním ZM241385 (50 mg, 0,15 mmol) v 0,5 ml bezvodého DMA, roztok byl míchán 20 minut při RT. Po uplynutí této doby roztoky byly smíchány a míchány 18 hodin při RT. Následně do reakční směsi byl přidán další podíl 5-azidopentanové kyseliny (6 mg, 0,042 mmol), EDAC HCl (10,3 mg, 0,054 mmol) a katalytické množství DMAP, reakční směs byla míchána dalších 18 hodin při RT. Poté pomocí vakuové odpary byl z roztoku odstraněn DCM, k roztoku bylo přidáno malé množství acetonitrilu a surový produkt byl čištěn pomocí flash-chromatografie podle postupu uvedeného v podkapitole 4.3.2.



Obrázek 4.2: syntéza derivátu **Azido-ZM**

## 4.2.4 Syntézy polymerních prekurzorů

### Syntéza polymerních prekurzorů P1-NH-NH<sub>2</sub> a P2-BCN

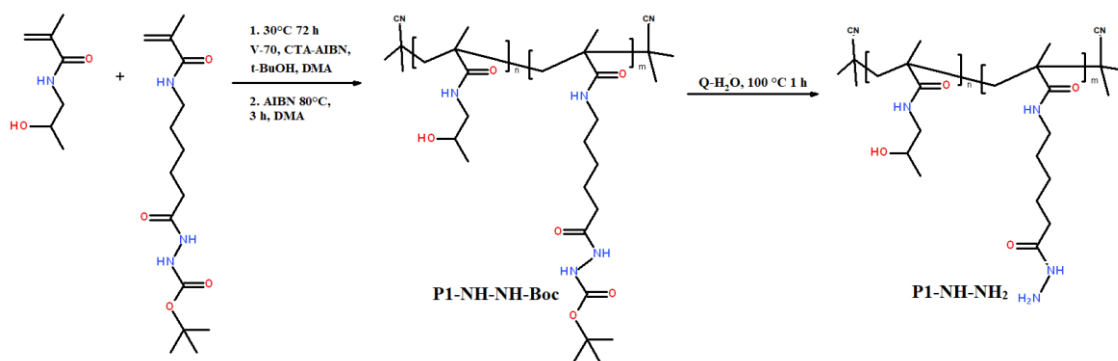
Statistické kopolymery HPMA obsahující náhodně distribuované thiazolidinthionové (TT), respektive hydrazidové skupiny podél řetězce polymerního prekurzoru byly připraveny řízenou (RAFT) kopolymerací HPMA s Ma-β-Ala-TT respektive Ma-Akap-NHNH-Boc ve směsi *t*-BuOH a DMA (85:15 v:v) s použitím V-70 jako iniciátoru (In) a AIBN-TTc jako přenosového činidla (CTA). Použitý molární poměr monomery:CTA:In pro polymerní prekurzor s TT byl 550:2:1 a pro polymerní prekurzor s hydrazidy byl 500:2:1. Molární poměr HPMA k Ma-β-Ala-TT byl 9:1 a HPMA k Ma-Akap-NHNH-Boc byl 11,5:1.

**Syntéza polymerního prekurzoru P1-NH-NH<sub>2</sub>** probíhala následovně:

V prvním kroku byl připraven polymerní prekurzor **P1-NH-NH-Boc** podle následujícího postupu (Obr. 4.3 str. 32): HPMA (1 g, 6,98 mmol) byl rozpuštěn v 8,539 ml *t*-BuOH v polymerizační ampuli, smíchán s Ma-Akap-NH-NH-Boc (190 mg, 0,60 mmol), V-70 (4,682 mg, 0,015 mmol) a CTA-AIBN (6,236 mg, 0,030 mmol) v 0,949 ml DMA. Reakční směs probublána 10 minut argonem a dána do termostatu na dobu 72 hodiny při teplotě 30 °C. Reakční směs byla vysrážena ve směsi diethylether: aceton (1:1, v:v), sraženina izolována centrifugací a vysušena do sucha. Surový produkt byl čištěn přesrážením: sraženina rozpuštěna v methanolu za vzniku roztoku o koncentraci 10 hm% a vysrážena do směsi diethylether: aceton (1:1, v:v). Sraženina byla izolována centrifugací a vysušena do sucha za sníženého tlaku. Výtěžek 920,75 mg (77,3 %).

Koncové TTc skupiny z přenosového činidla byly odstraněny reakcí s AIBN v bezvodém DMA při 80 °C a době reakce 3 h dle modifikovaného lit. postupu.<sup>47</sup> Reakční směs byla opět vysrážena směsí aceton:diethylether (1:1, v:v), centrifugována a vysušena. Následně byl surový produkt čištěn přesrážením, byl rozpuštěn v methanolu za vzniku roztoku o koncentraci 10 hm% a vysrážen směsí diethylether:aceton (1:1, v:v). Výtěžek byl 736,6 mg (80 %).

Polymerní prekurzor **P1-NH-NH<sub>2</sub>** byl získán odstraněním chránících Boc skupin z hydrazidů podle následujícího postupu: prekurzor **P1-NH-NH-Boc** (736,6 mg) byl rozpuštěn v 7,366 ml vody, následně byl roztok přenesen do polymerizační ampule a povařen v termostatu po dobu 1 h při 100 °C. Produkt byl izolován lyofilizací. Obsah hydrazidů byla stanovena spektrofotometricky dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.2. Výtěžek byl 453,8 mg (62 %).



Obrázek 4.3: reakce syntézy polymerního prekurzoru **P1-NH-NH<sub>2</sub>**

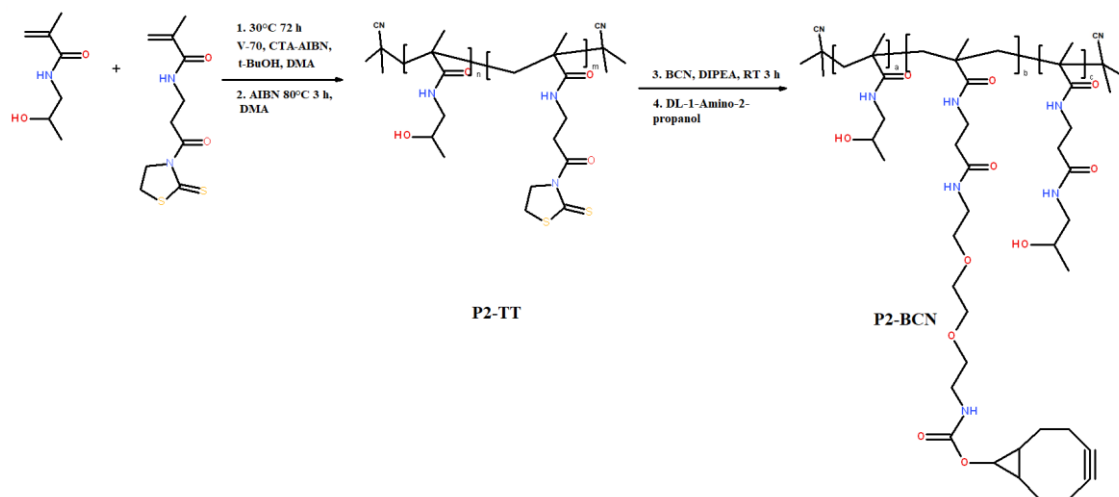
### Syntéza polymerního prekurzoru **P2-BCN** probíhala následovně:

V prvním kroku byl připraven polymerní prekurzor **P2-TT** podle následujícího postupu (Obr. 4.4 str. 33): HPMA (1g, 6,98 mmol) byl rozpuštěn v 9,422 ml *t*-BuOH v polymerizační ampuli, smíchán s Ma-β-ala-TT (200 mg, 0,77 mmol), V-70 (4,348 mg, 0,014 mmol) a CTA-AIBN (6,246 mg, 0,028 mmol) v 1,662 ml DMA. Reakční směs probublána 10 minut argonem a dána do termostatu na dobu 72 hodiny při teplotě 30 °C. Reakční směs byla vysrážena ve směsi diethylether: aceton (1:1, v:v), sraženina izolována centrifugací a vysušena do sucha. Surový produkt byl čištěn přesrážením: sraženina rozpuštěna v methanolu za vzniku roztoku o koncentraci 10 hm% a vysrážena do směsi diethylether: aceton (1:1, v:v). Sraženina byla izolována centrifugací a vysušena do sucha za sníženého tlaku. Výtěžek 775,9 mg (65 %).

Koncové TTc skupiny z přenosového činidla byly odstraněny reakcí s AIBN v bezvodém DMA při 80 °C a době reakce 3 h dle modifikovaného lit. postupu.<sup>47</sup> Reakční směs byla opět vysrážena směsí aceton:diethylether (1:1, v:v), centrifugována a vysušena. Následně byl surový produkt čištěn přesrážením, byl rozpuštěn v methanolu za vzniku roztoku o koncentraci 10 hm% a vysrážen směsí diethylether:aceton (1:1, v:v). výtěžek byl 711 mg (92 %). Obsah TT skupin byl stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 305 nm s využitím molárního extinkčního koeficientu podle postupu uvedeného v podkapitole 4.3.1.

Polymerní prekurzor **P2-BCN** byl syntetizován zavedením BCN skupiny na prekurzor **P2-TT** postpolymerizační modifikací TT skupin podle následujícího postupu: polymerní prekurzor **P2-TT** (500 mg, 0,320 mmol TT) byl rozpuštěn v 5 ml bezvodého DMA, BCN-amin (51,9 mg, 0,160 mmol) byl rozpuštěn v 519 μl bezvodého DMA a oba roztoky smíchány, k nim přidána DiPEA (77,9 μl, 0,455 mmol) a reakční směs míchána 18 h při RT. Poté k roztoku přidán DL-1-Amino-2-propanol (35,26μl, 0,455 mmol) a roztok byl promíchán. Polymerní prekurzor byl izolován srážením do směsi

diethylether: aceton (1:1, v:v), sraženina byla izolována centrifugací a vysušena. Surový produkt byl čištěn přesrážením, sraženina byla rozpuštěna v methanolu a vysrážena do směsi diethylether:aceton (1:1, v:v). Přesrážení bylo provedeno celkem dvakrát, a nakonec byl polymerní prekurzor vysušen do sucha za sníženého tlaku. Výtěžek byl 457 mg (83 %).

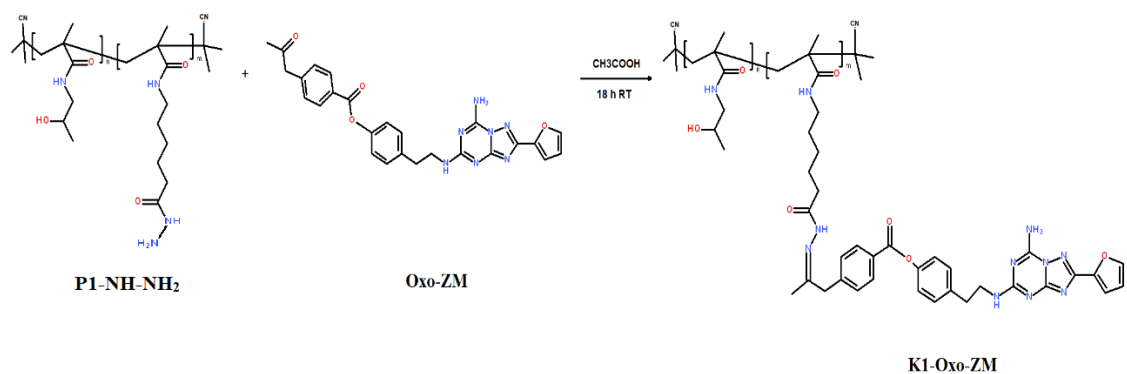


Obrázek 4.4: reakce syntézy polymerního prekurzoru **P2-BCN**

## 4.2.5 Syntézy polymerních konjugátů

### Syntéza konjugátu K1-Oxo-ZM

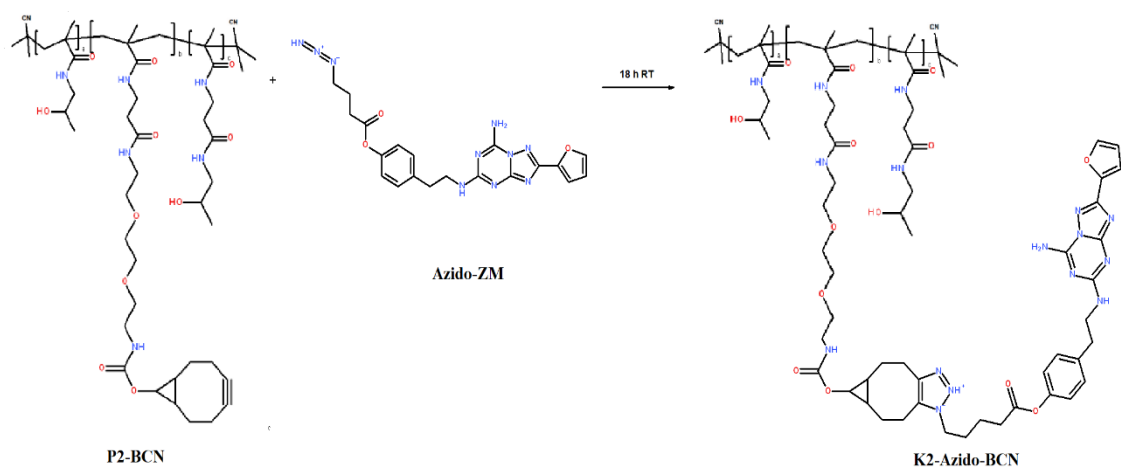
Polymerní prekurzor **P1-NH-NH<sub>2</sub>** (450 mg) byl rozpuštěn v 4,5 ml DMA, derivát **Oxo-ZM** (45 mg, 0,09 mmol) byl rozpuštěn v 1,5 ml DMA, roztoky byly smíchány, poté bylo přidáno 270  $\mu$ l octové kyseliny a reakční směs míchána 18 h při RT (Obr. 4.5 str. 34). Reakční směs byla vysrážena do diethyletheru, sraženina izolována centrifugací a vysušena do sucha. Surový produkt byl čištěn přesrážením: sraženina rozpuštěna v methanolu za vzniku roztoku o koncentraci 10 hm% a vysrážena do diethyletheru. Sraženina byla izolována centrifugací a vysušena do sucha za sníženého tlaku. Produkt byl rozpuštěn v methanolu za vzniku roztoku o koncentraci 5 hm% a izolován sloupcovou chromatografií (Sephadex LH-20, CH<sub>3</sub>OH). Poté pomocí vakuové odparky byl z roztoku odstraněn methanol, sraženina byla rozpuštěna v methanolu za vzniku roztoku o koncentraci 10 hm% a vysrážena do diethyletheru. Sraženina byla izolována centrifugací a vysušena do sucha za sníženého tlaku. Výtěžek 360,5 mg (73 %).



Obrázek 4.5: reakce syntézy konjugátu **K1-Oxo-ZM**

### Syntéza konjugátu **K2-Azido-ZM**

Polymerní prekurzor **P2-BCN** (233 mg, 0,3154 mol. ekvivalent BCN) byl rozpuštěn v 2,33 ml DMA, derivát **Azido-ZM** (34 mg, 0,07 mmol) byl rozpuštěn v 0,3 ml DMA, roztoky byly smíchány a míchány 18 h při RT (Obr. 4.6). Reakční směs byla vysrážena do diethyletheru, sraženina izolována centrifugací a vysušena do sucha. Surový produkt byl čištěn přesrážením: sraženina rozpuštěna v methanolu za vzniku roztoku o koncentraci 10 hm% a vysrážena do diethyletheru. Sraženina byla izolována centrifugací a vysušena do sucha za sníženého tlaku. Produkt byl rozpuštěn v methanolu za vzniku roztoku o koncentraci 2,5 hm% a izolován sloupcové chromatografií (Sephadex LH-20, methanol). Poté pomocí vakuové odparky byl z roztoku odstraněn methanol, sraženina byla rozpuštěna v methanolu za vzniku roztoku o koncentraci 10 hm% a vysrážena do diethyletheru. Sraženina byla izolována centrifugací a vysušena do sucha za sníženého tlaku. Výtěžek 172,2 mg (65 %).



Obrázek 4.6: reakce syntézy konjugátu **K2-Azido-ZM**

### **4.3 Použité přístroje**

#### **Centrifuga**

Centrifuga 5430R od firmy Eppendorf (Německo) s rotorem F-35-6-30 (maximum otáček  $7\,830 \cong 7\,700$  g).

#### **Čtečka mikrotitračních destiček**

Čtečka destiček Infinite M200Pro od firmy Tecan (Švýcarsko).

#### **Flash-chromatograf**

Chromatografický systém PrepChrom C-700 od firmy BÜCHI (Švýcarsko) s kolonou Chromolith RP-C18 25/100 od firmy Merck (Německo).

#### **Hmotnostní spektrometr**

Hmotnostní spektrometr LCQ Fleet od firmy Thermo SCIENTIFIC (USA), metoda ionizace elektrosprejem. Záznam dat realizován softwarem Excalibur.

#### **Lyofilizátor**

Lyofilizátor L4-110 PRO s řídicí jednotkou LyoControl od firmy GREGOR Instruments (Česká republika).

#### **Nano-Zetasizer**

Přístroj použitý k určení hydrodynamického poloměru polymerních systémů od firmy Malvern Panalytica (UK).

#### **NMR**

Spektrometrem Bruker Avance Neo s magnetem Superconducting 400 MHz, UltraShield™, konzolí Avance III 400, zesilovačem BLA2B.

#### **Rotační vakuová odparka**

Systém G3 Heidolph s chladicí jednotkou Heil-CHILL 350.

#### **Rozměrově vylučovací chromatograf**

Rozměrově vylučovací chromatograf 1: od firmy Shimadzu (Japonsko) vybavený pumpou LC-20AD, odplyňovačem DGU-20A5R, kolonou Superose-6-Increase 10/300 GL od firmy Cytiva (USA), fotodiodovým detektorem SPD-M20A a třemi detektory (refraktometrický Optilab, viskozimetrický ViscoStar III a 18-úhlový rozptyl světla DAWN HELIOS II) od firmy WYATT Technology (USA). Systém je řízen jednotkou CBM-20A. Záznam dat je realizován softwary LabSolutions 5.97 a ASTRA 7.3.

Rozměrově vylučovací chromatograf 2: od firmy Shimadzu (Japonsko) vybavený pumpou LC-40D, odplyňovačem DGU-403, kolonou TSK3000 SW od firmy Tosoh Bioscience (Japonsko), fotodiodovým detektorem SPD-M40 a dvěma detektory (rozptylový detektor Dawn 8 a koncentrační detektor Optilab) od firmy WYATT

Technology (USA). Systém je řízen jednotkou CBM-40. Záznam dat je realizován softwary LabSolutions 5.97 a ASTRA 7.3.

#### **UV VIS Spektrofotometr**

Spektrofotometr Jenway 7415 od firmy Jasco (Německo) s xenonovou lampou (198-1000 nm).

#### **Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

Vysokoučinný kapalinový chromatograf firmy Shimadzu (Japonsko) s pumpou LC-20AD, odplyňovačem DGU-20A5, kolonou Chromolith® HighResolution RP-18 Endcapped od firmy Sigma-Aldrich (USA) uloženou v CTO-20AC a kolonou TSK3000 SW Tosoh Bioscience (Japonsko) a detektory (fotodiodový SPD-M20A, fluorescenční RF-20A). Systém je řízen jednotkou CMB-20A. Záznam dat je realizován softwarem LCsolution 1.25.

## 4.4 Použité metody

### 4.3.1 UV-Vis spektroskopie

#### Stanovení obsahu TT-skupin

Obsah skupin byl stanoven spektrofotometricky. Vzorek kopolymeru byl rozpuštěn v methanolu ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ). Absorbance byla změřena při vlnové délce 305 nm. K výpočtu obsahu TT pomocí vzorce 4.1 byl použit molární absorpční koeficient  $\epsilon_{305} = 10800 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

$$w(TT) = \frac{100}{\frac{\epsilon \cdot c \cdot l}{A} \cdot -M_k + 1} \cdot \frac{M_{HPMA}}{M_{HPMA}} \quad (4.1)$$

$\epsilon$  molární absorpční koeficient [ $\text{l/mol}\cdot\text{cm}$ ]

$c$  koncentrace polymeru [ $\text{mg/ml}$ ]

$l$  optická dráha kyvety [ $\text{cm}$ ]

$A$  absorbance roztoku polymeru

$M_k$  molární hmotnost kopolymerní jednotky nesoucí TT skupiny [ $\text{g/mol}$ ]

$M_{HPMA}$  molární hmotnost HPMA [ $\text{g/mol}$ ]

#### Stanovení obsahu hydrazidů

Obsah skupin byl stanoven spektrofotometricky. Vzorek kopolymeru byl rozpuštěn v borátovém pufru ( $c = 2 \text{ mg/ml}$ ,  $\text{pH} = 9,3$ ). Roztok pro měření byl připraven následujícím způsobem: 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku vzorku bylo smícháno s 875  $\mu\text{l}$  borátového pufru, k tomu bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  TNBS. Roztok pro referenční měření byl připraven smícháním 975  $\mu\text{l}$  pufru a 25  $\mu\text{l}$  TNBS. Stanovení bylo provedeno v triplicátu. Roztoky byly promíchány a inkubovány 1 h při RT, po čemž byla měřena absorbance při vlnové délce 500 nm. K výpočtu obsahu hydrazidů pomocí vzorce 4.2 byl použit molární absorpční koeficient  $\epsilon_{500} = 17200 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ .

$$w(\text{hydrazidů}) = \frac{100}{\frac{\epsilon \cdot c \cdot l}{A} \cdot -M_k + 1} \cdot \frac{M_{HPMA}}{M_{HPMA}} \quad (4.2)$$

$\epsilon$  molární absorpční koeficient [ $\text{l/mol}\cdot\text{cm}$ ]

$c$  koncentrace polymeru [ $\text{mg/ml}$ ]

$l$  optická dráha kyvety [ $\text{cm}$ ]

- $A$  absorbance roztoku polymeru  
 $M_k$  molární hmotnost kopolymerní jednotky nesoucí hydrazidy [g/mol]  
 $M_{HPMA}$  molární hmotnost HPMA [g/mol]

### 4.3.2 Kapalinová chromatografie

#### Flash-Chromatografie

Preparativní flash-chromatografie byla využita pro purifikaci připravených nízkomolekulárních derivátů. Složení mobilní fáze A (100 % H<sub>2</sub>O), B (100 % acetonitril) s gradientem mobilní fáze B 0-100 %, průtok 60 ml/min, délkou metody 15 minut, použitá kolona Chromolith Prep RP-18 100x25mm.

#### HPLC

Obecná metoda HPLC byla použita pro detekci, identifikaci a charakterizaci čistoty nízkomolekulárních derivátů a samotného léčiva ZM241385. K těmto účelům byla využita metoda s použitím mobilních fází A (95 % H<sub>2</sub>O, 5 % acetonitril, 0,1 % TFA) a B (95 % acetonitril, 5 % H<sub>2</sub>O, 0,1 % TFA) na koloně Chromolith HighResolution RP-18 e, gradientem mobilní fáze B 0-100 %, průtokem 1 ml/min a délkou měření 17 minut. Stejná metoda byla použita pro ověření nepřítomnosti volného léčiva nebo jeho derivátu v polymerním konjugátu s využitím mobilních fází A (95 % H<sub>2</sub>O, 5 % acetonitril) a B (95 % acetonitril, 5 % H<sub>2</sub>O).

#### Rozměrově vylučovací chromatografie

Metody rozměrově vylučovací chromatografie byly použity pro stanovení  $M_w$ ,  $M_n$  a polydisperzity polymerních prekurzorů a vysokomolekulárních konjugátů.

Měření polymerních prekurzorů bylo uděláno na koloně TSK 3000 SW v mobilní fázi (methanol: 0,3M octan sodný, 80:20, v:v, pH 6,5) s průtokem 0,5 ml/min a časem měření 45 min. Výsledky byly zpracovány v programu Astra.

Měření polymerních konjugátů bylo uděláno na koloně Superose-6-Increase 10/300 GL v mobilní fázi (0,05M fosfát, 0,15M NaCl, pH 7,4) s průtokem 0,5 ml/min a časem měření 100 min. Výsledky byly zpracovány v programu Astra.

### 4.3.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie byla použita pro ověření molekulové hmotnosti nízkomolekulárních derivátů. Vzorky byly rozpuštěny v methanolu v HPLC čistotě o přibližné koncentraci 0,1 mg/ml. Vzorky pomocí Hamiltonové stříkačky byly dány do spektrometru s metodou ionizace ESI s využitím přímého nástřiku.

#### 4.3.4 NMR

NMR byl použit pro ověření struktury nízkomolekulárních derivátů a vypočet množství navázaného na konjugát léčiva. Spektra  $^1\text{H}$  NMR byl získána spektrometrem Bruker Avance Neo 400 pracujícím na frekvenci 400 MHz s použitím deuterovaného DMSO jako rozpouštědla při 25 °C. Chemické posuny jsou relativní k tetramethylsilanu (TMS) s použitím hexamethyldisiloxanu (HMDSO, 0,05 a 2,0 ppm od TMS) jako vnitřního standardu. Šířka 90° pulsu byla 16,5  $\mu\text{s}$ , relaxační zpoždění 10 s, doba porřízení 2,75 s, počet skenů 32-64. Množství navázaného léčiva bylo spočítáno pomocí vzorce:

$$\% \text{ navázání (léč.)} = \frac{\text{integr. (S píku der.)}}{\text{integr. (S píku der.)} + \text{integr. (S píku pol.)}} \cdot 100 \quad (4.3)$$

#### 4.3.5 Hydrolytická stabilita konjugátů ZM241385

Studium uvolňování polymerních konjugátů byl udělán na přístroji HPLC na koloně TSK 3000 SW v mobilní fázi se složením (80 % methanol, 20 % 0,3M octan sodný, pH 6,5), průtok 0,35 ml/min, čas měření 45 minut.

#### 4.3.6 Dynamický rozptyl světla

Hydrodynamický poloměr ( $R_h$ ) polymerních konjugátů byl stanoven za využití dynamického rozptylu světla. Vzorky byly měřeny v 0,15 M chloridu sodného při teplotě 37 °C. Hydrodynamické poloměry byly vypočteny softwarem z naměřených difúzních koeficientů.

#### 4.3.7 Příprava buněčných linií

Pracovali jsme s linií s linií lidskou T lymfoblastoidní linií Jurkat (ATCC TIB-152). Buňky byly kultivovány v doporučeném médiu RPMI-1640 (Sigma) obsahujícím 2 mM L-glutamin, 4500 mg/l glukózu, 10 mM HEPES, 1 mM pyruvát sodný, antibiotika a 10 % FTS. Kultury byly pasážovány standardním způsobem jednou za 2 až 3 dny. Buňky byly kultivovány nebo inkubovány se studovanými substancemi vždy při 37°C a 5 %  $\text{CO}_2$ .

Pro inkubaci s agonisty/inhibitory receptoru  $A_{2A}$  byly buňky sklizeny, promyty, spočítány a stanovena životnost za pomoci trypanové modři. Životnost buněk před použitím byla vždy vyšší než 95 %.

#### 4.3.8 ELISA

Kompetitivní fluorometrická ELISA byla použita pro stanovení změn v hladině intracelulárního cAMP v odpovědi na působení agonistů nebo antagonistů adenosinového receptoru A<sub>2A</sub> v Jurkat buňkách. Za tímto účelem byl použit komerční kit cAMP Assay Kit ab138880 (Abcam, UK). Esej je založen na kompetici o vazbu na protilátku proti cAMP, která je navázána na povrchu detekční destičky, mezi přidávaným cAMP značeným HRP a volným cAMP ze vzorku.

Buňky Jurkat byly inkubovány v kultivační destičce (96 jamek, ploché dno; výrobce Nunc, Dánsko) v kultivačním mediu a byly napipetovány do kultivační destičky tak, aby v jamce bylo  $1 \times 10^5$  buněk v 90  $\mu$ l kultivačního média. Poté k buňkám byly přidány testované látky (ZM241385, Oxo-ZM, K1-Oxo-ZM a K2-Azido-ZM) tak, aby konečné koncentrace odpovídaly 10, 2 a 0,4  $\mu$ M inhibitoru ZM241385 a buňky byly inkubovány 1 h při 37 °C. Poté byl k testovaným buňkám přidán agonista A<sub>2A</sub> receptoru GCS21680 (Sigma) o koncentraci 0,1 mM. Buňky byly inkubovány 1 h při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky odstraněny promytím 200  $\mu$ l fyziologického fosfátového pufru (PBS) a centrifugací. Do jamek byl přidáno 100  $\mu$ l lyzační roztoku, buňky byly inkubovány 10 min při RT, poté buněčný lyzát byl izolován centrifugací a 75  $\mu$ l vzorek přenesen do destičky z kitu. Do jamek byl po 15 min. přidán HRP-konjugát a vzorky byly inkubovány 2 h při RT s mírným mícháním (Vortex). Pak byly vzorky a HRP konjugát odstraněny a destička čtyřikrát promyta opakovaným přidáním 200  $\mu$ l promývacího roztoku. Poté do jamek bylo přidáno detekční činidlo AbRed Indicator obsahující H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a po 30 minutách byla měřena fluorescence (Ex/Em = 540/590 nm). Pozorovaná fluorescence je nepřímo úměrná koncentraci cAMP ve vzorcích. Pro výpočet výsledků byla sestrojena kalibrační křivka pomocí standardních roztoků o koncentracích 10000, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 a 0 nM cAMP.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Syntéza a charakterizace derivátů ZM241385

Během práce byly úspěšně syntetizovány dva odlišné deriváty ZM241385. Samotné léčivo neobsahuje vhodnou skupinu pro navázání na polymerní nosič, a proto bylo potřeba ho před vazbou na nosič modifikovat. K modifikaci byly použity oxokyselina a azidokyselina, sloužící jako spojky mezi léčivem a polymerním prekurzorem.

Derivát **Oxo-ZM** byl připraven reakcí 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny s ZM241385 dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.3. Kyselina byla navázána na léčivo pomocí esterové vazby. Výsledný derivát byl čištěn pomocí flash-chromatografie, díky čemuž bylo dosaženo vysoké čistoty produktu. Čistota byla ověřena pomocí HPLC (jeden pík s retenčním časem 10,27 min, čistota > 99 %), struktura byla ověřena pomocí ESI-MS (pík s  $m/z = 520,22 [M + Na]^+$ , odpovídající teoretické molární hmotnosti  $M_r = 497,5 \text{ g/mol}$ ) a  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO, 298 K):  $\delta$ : 8,17-8,07 (m, 1,4,  $\text{NH}_2$ ), 8,06 (d, 2,3, Ar), 7,86 (s, 1, CHO-furan), 7,49 (t, 0,33,  $\text{NH-CH}_2$ ), 7,41 (t, 0,77,  $\text{NH-CH}_2$ ), 7,4 (d, 2, Ar), 7,33 (d, 2,1, Ar), 7,19 (d, 2, Ar), 7,05 (t, 1,  $\text{CH-CH-CHO}$ ), 6,67 (d, 1,  $\text{CH-CH}$ ), 3,93 (s, 2,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3,52 (m, 2,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2,89 (t, 2,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2,17 (s, 3,  $\text{CH}_3\text{-CO}$ ). Výtěžek reakce byl 70 %.

Derivát **Azido-ZM** byl připraven reakcí 5-azidopentanové kyseliny a ZM241385 dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.3. Kyselina byla vázána na léčivo pomocí esterové vazby. Výsledný derivát byl čištěn pomocí flash-chromatografie, díky čemuž bylo dosaženo vysoké čistoty produktu. Čistota byla ověřena pomocí HPLC (jeden pík s retenčním časem 10,5 min, čistota > 99 %), struktura byla ověřena pomocí ESI-MS (pík s  $m/z = 463,27 [M + H]^+$ , odpovídající teoretické molární hmotnosti  $M_r = 462,18 \text{ g/mol}$ ) a  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO, 298 K):  $\delta$ : 8,17-8,07 (m, 2,  $\text{NH}_2$ ), 7,86 (s, 1,  $\text{CH-O}$ ), 7,6 (t, 0,32,  $\text{NH-CH}_2$ ), 7,5 (t, 0,68,  $\text{NH-CH}_2$ ), 7,28 (d, 2, Ar), 7,04 (t, 3, Ar +  $\text{C-CH-CH}$ ), 6,68 (d, 1,  $\text{CH-CH}$ ), 3,49 (d, 2,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 3,36 (t, 2,  $\text{N}_3\text{-CH}_2$ ), 2,86 (t, 2,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2,6 (t, 2,  $\text{CO-NH}_2$ ), 1,65 (m, 4,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ). Výtěžek reakce byl 46 %.

## 5.2 Syntéza a charakterizace polymerních systémů

### 5.2.1 Polymerní prekurzory

Během práce byly úspěšně syntetizovány dva prekurzory, lišící se skupinami, použitými pro navázání modifikovaného ZM241385. Hydrazidové skupiny na **P1-NH-NH<sub>2</sub>** byly použity pro tvorbu hydrazonové vazby s oxoskupinou derivátu **Oxo-ZM**, a BCN skupiny na **P2-BCN** byly použity pro spojení s azoskupinou derivátu **Azido-ZM** pomocí nekatalyzované click-reakce.

Prekurzor **P2-TT** je meziprodukt syntézy **P2-BCN**. Polymerní prekurzory byly syntetizovány pomocí řízené RAFT kopolymerizace podle postupů uvedených v kapitole 4.2.4.

**P1-NH-NH<sub>2</sub>** byl připraven kopolymerizací HPMA a Ma-Akap-NH-NH-Boc s následujícím odstraněním koncových TTc-skupin a odstraněním chránicí Boc-skupiny. Molární hmotnost syntetizovaného kopolymerů **P1-NH-NH<sub>2</sub>** byla stanovena pomocí rozměrově vylučovací chromatografie spolu s hodnotou disperzity. Obsah hydrazidových skupin na prekurzoru **P1-NH-NH<sub>2</sub>**, na které se v dalším kroku vázal derivát **Oxo-ZM** byl stanoven spektrofotometricky. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 5.1.

**P2-BCN** byl připraven reakcí prekurzoru **P2-TT** s BCN-aminem. Molární hmotnost syntetizovaných kopolymerů **P2-BCN** a **P2-TT** byla stanovena pomocí rozměrově vylučovací chromatografie spolu s hodnotou disperzity. Obsah TT-skupin na prekurzoru **P2-TT**, na které se v dalším kroku vázal derivát BCN-amin, byl stanoven spektrofotometricky. Obsah BCN skupin na prekurzoru **P2-BCN**, na které se vázal **Azido-ZM**, byl spočítán teoreticky ze množství TT-skupin na prekurzoru **P2-TT** v důsledku neexistence metody stanovení skutečného množství BCN v prekurzorech. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 5.1.

Tabulka 5.1: charakterizace polymerních prekurzorů

Prekurzor	Výtěžek, %	M <sub>w</sub> , g/mol	Đ	Obsah skupin, mol%
<b>P1-NH-NH<sub>2</sub></b>	77,3	39700	1,12	Hydrazidy: 5,3
<b>P2-TT</b>	65,0	40800	1,06	TT: 9,89
<b>P2-BCN</b>	83,0	47800	1,07	BCN: 5

Byly úspěšně připraveny polymerní prekurzory **P1-NH-NH<sub>2</sub>** a **P2-BCN** s molární hmotností pod limitem renální filtrace pro tento typ polymerních systémů. Oba prekurzory měly nízkou disperzitu, což znamená, že distribuce molárních hmotností je uniformní. Oba polymery obsahovaly dostatek funkčních skupin pro další reakce.

### 5.2.2 Polymerní konjugáty

Připravené polymerní prekurzory byly použity pro syntézu polymerních konjugátů s derivátu ZM241385 dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.5.

Konjugát **K1-Oxo-ZM** byl připraven reakcí derivátu **Oxo-ZM** s prekurzorem **P1-NH-NH<sub>2</sub>**. Derivát je navázán pH-senzitivní hydrazonovou vazbou a díky tomu ZM241385 by měl být uvolněn v kyselém pH mikroprostředí nádoru ve formě derivátu **Oxo-ZM**. Po uvolnění léčiva přechází konjugát zpět do formy prekurzoru **P1-NH-NH<sub>2</sub>**, který by měl být vyloučitelný glomerulární filtrací. Molární hmotnost syntetizovaného konjugátu byla stanovena pomocí rozměrově vylučovací chromatografie spolu s hodnotou disperzity. Stanovení obsahu navázaného léčiva bylo provedeno pomocí NMR a výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.2.

Konjugát **K2-Azido-ZM** byl připraven reakcí derivátu **Azido-ZM** s prekurzorem **P2-BCN** za vzniku triazolového nedegradovatelného kruhu. Nicméně lze očekávat, že i v tomto případě může k uvolnění samotného léčiva ZM241385 za jistých podmínek docházet, a to v důsledku působení esteráz mikroprostředí nádoru nebo lyzozomálních enzymů. Molární hmotnost syntetizovaného konjugátu byla stanovena pomocí rozměrově vylučovací chromatografie spolu s hodnotou disperzity. Stanovení obsahu navázaného léčiva bylo provedeno pomocí NMR a výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.2.

Tabulka 5.2: charakterizace polymerních konjugátů

Konjugát	Výtěžek, %	M <sub>w</sub> , g/mol	Đ	Obsah léčiva, mol%	R <sub>h</sub> , nm
<b>K1-Oxo-ZM</b>	73,0	46500	1,05	2,0	4,7
<b>K2-Azido-ZM</b>	65,0	45800	1,16	4,8	4,6

Byly úspěšně připraveny polymerní konjugáty **K1-Oxo-ZM** a **K2-Azido-ZM**, vhodné pro dopravu léčiva do nádorových tkání. Oba konjugáty měly nízkou disperzitu, což znamená, že distribuce molekulových hmotností je uniformní. Navázání derivátů léčiva významně neovlivnila molární hmotnost a disperzitu polymerních prekurzorů. Oba konjugáty obsahovaly dostatek navázaného léčiva pro další testování.

### 5.3 Hydrolytická stabilita polymerních konjugátů

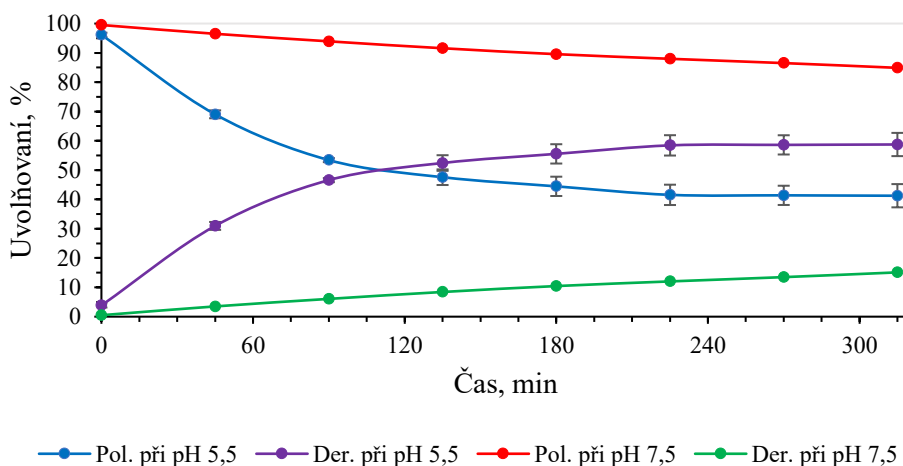
Rychlost uvolňování derivátu léčiva z polymerního konjugátu **K1-Oxo-ZM** byla vyhodnocována pomocí HPLC s SEC kolonou. Pro studium uvolňování byly použity roztoky 0,15 M fosfátového pufru s rozdílnými hodnotami pH, imitujících prostředí během transportu do nádorové tkáně, a to jsou pH 5,5 (mikroprostředí nádoru) a pH 7,4 (krevní řečiště). Polymerní konjugáty byly inkubovány v těchto pufrech, v předem daných časových bodech byla část roztoku odebrána a analyzována pomocí nevodného SEC na obsah uvolněného léčiva. Procento uvolněného léčiva v každém daném časovém bodě bylo vypočítáno jako poměr plochy píku léčiva a polymerního konjugátu při vlnové délce 255 nm na SEC chromatogramu podle vzorce 5.1. Procento poklesu píku odpovídajícího polymernímu konjugátu byly vypočítány podle vzorce 5.2

$$\% \text{ uvolň (der.)} = \frac{S \text{ píku der.}}{S \text{ píku der.} + S \text{ píku pol.}} \cdot 100 \quad (5.1)$$

$$\% \text{ uvolň (pol.)} = \frac{S \text{ píku pol.}}{S \text{ píku der.} + S \text{ píku pol.}} \cdot 100 \quad (5.2)$$

Ze získaných hodnot byl sestaven graf 5.1 porovnávající rychlosti uvolnění derivátu **Oxo-ZM** z konjugátu **K1-Oxo-ZM** při pH 5,5 a 7,4. Bylo zjištěno, že konjugát vykazuje rychlé uvolňování derivátu léčiva při pH mikroprostředí nádoru, kdy bylo za 100 min uvolněno 50 % léčiva. Na rozdíl, při neutrálním pH mimikujícím krevní řečiště bylo uvolněno jen 15 % derivátu léčiva za 5 hodin. Je možné konstatovat, že tento polymerní systém splňoval pH-senzitivní chování při uvolňování derivátu léčiva.

Graf závislosti uvolňování derivátů ZM241385 z polymerních nosičů na čas



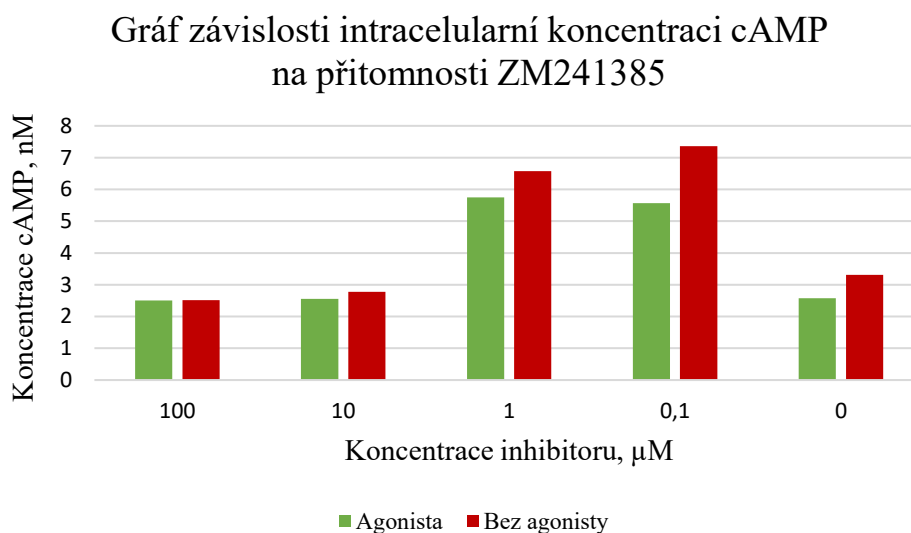
Graf 5.1: hydrolytická stabilita polymerního konjugátu **K1-Oxo-ZM**

Derivát **Azido-ZM** je navázán na konjugát **K2-Azido-ZM** stabilní vazbou přes triazolový kruh, a nebyla pozorována degradace a uvolňování derivátu při inkubaci v obou zmíněných pufrch.

#### 5.4 Studie *in vitro*

Pro testování inhibiční aktivity modelového inhibitoru ZM241385 byly vybrána linie lymfoblastoidních T-buněk Jurkat. Cílem bylo stanovení cAMP v buňkách a ovlivnění její hladiny přidáním samotného inhibitoru nebo jeho polymerního konjugátu, a to v případě samotných buněk, nebo buněk s přidavkem agonisty A<sub>2A</sub> receptoru GCS21680, který by měl zvyšovat hladinu cAMP v buňkách.

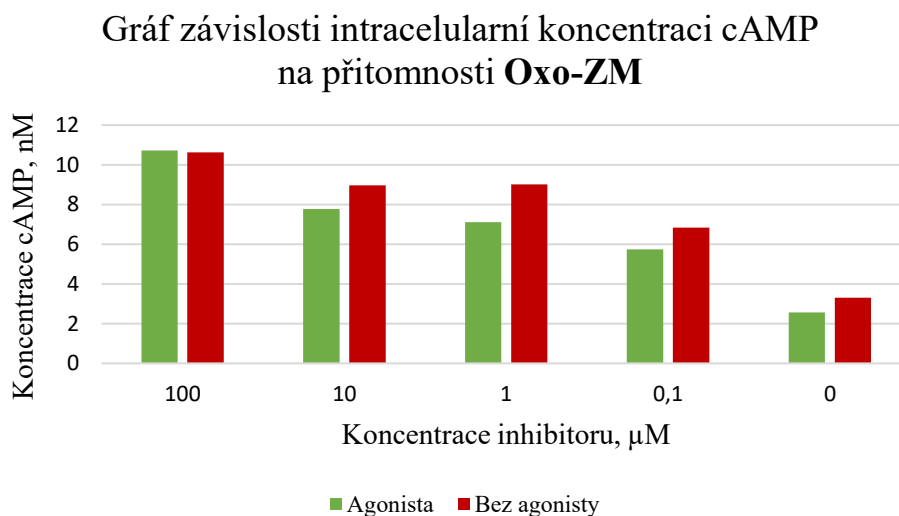
V grafu 5.2. jsou uvedeny výsledky stanovení cAMP v buňkách, a to jak při přidávání samotného ZM241385 v různých koncentracích, tak v případě podání jak inhibitoru, tak agonisty. Bylo zjištěno, že podání agonisty nepůsobí nárůst cAMP, což bylo v rozporu s literárními údaji. Předpokládáme, že zvolená koncentrace agonisty nebyla dostatečná a agonista tedy nepůsobil na hladinu cAMP. V případě podání inhibitoru bylo stanoveno, že nižší koncentrace mezi 0,1 a 1  $\mu\text{M}$  působí nárůst hladiny cAMP v buňkách, což bylo překvapivé zjištění. Při vyšších koncentracích neměl inhibitor vliv na hladinu cAMP. Rovněž nebyla pozorována žádná významná změna hladiny cAMP, pokud byl podán jak inhibitor, tak i agonista.



Graf 5.2: změny v hladině intracelulárního cAMP v odpovědi na působení ZM241385 za přítomnosti a nepřítomnosti agonisty

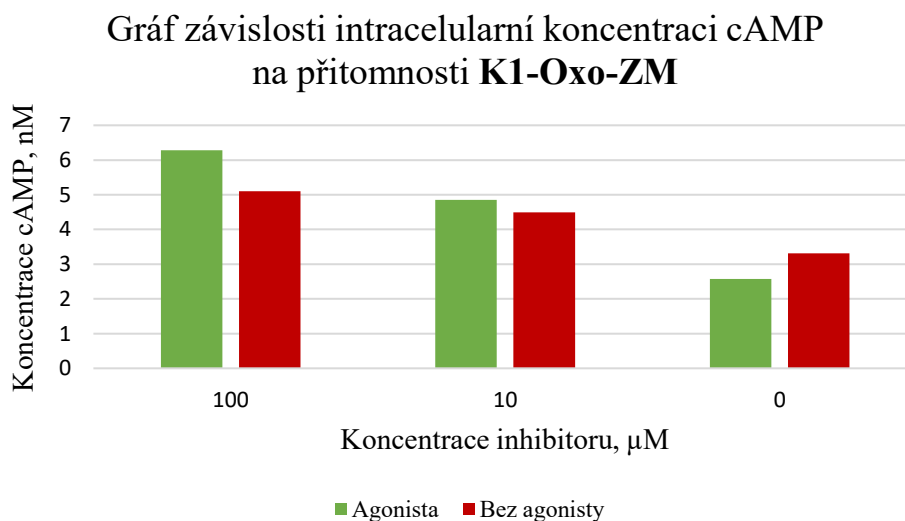
V případě derivátu ZM241385 (graf 5.3 str. 47) bylo zjištěno, že všechny testované koncentrace tohoto derivátu zvyšují hodnotu cAMP v buňkách, a tedy že

derivát inhibitoru působí na buňky odlišně, než tomu bylo u samotného inhibitoru. Bohužel ani u jednoho ze vzorků nebylo možné evaluovat jeho inhibiční potenciál proti navýšení cAMP způsobeném agonistou A<sub>2A</sub> receptoru.



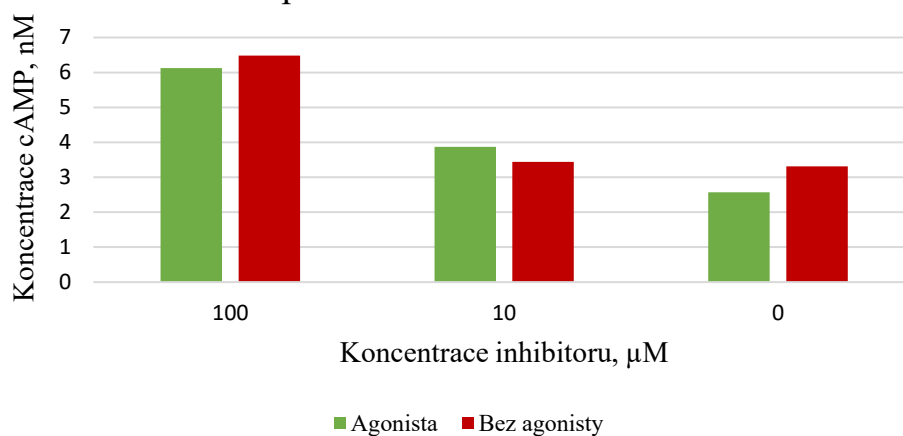
Graf 5.3: změny v hladině intracelulárního cAMP v odpovědi na působení **Oxo-ZM** za přítomností a nepřítomností agonisty

V případě polymerních konjugátů **K1-Oxo-ZM** (graf 5.4) a **K2-Azido-ZM** (graf 5.5 str. 48) nebyl nalezen významný rozdíl mezi hladinami cAMP po podání obou typů polymerních konjugátů, nedegradovatelného a degradovatelného. V obou případech docházelo k mírnému navýšení hladiny cAMP po jejich podání, což je v souladu s trendem u samotného derivátu inhibitoru.



Graf 5.4: změny v hladině intracelulárního cAMP v odpovědi na působení **K1-Oxo-ZM** za přítomností a nepřítomností agonisty

### Gráf závislosti intracelulární koncentraci cAMP na přítomnosti **K2-Azido-ZM**



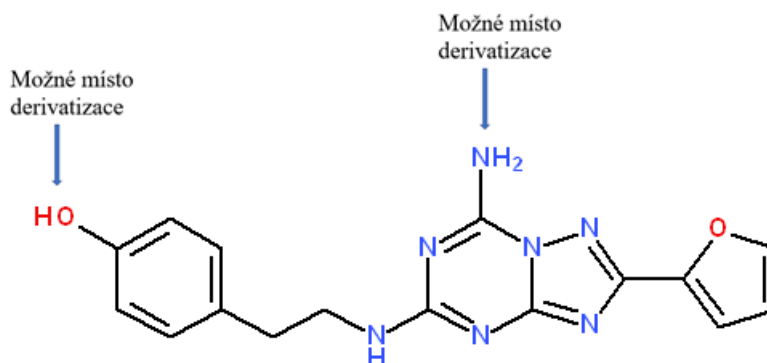
Graf 5.5: změny v hladině intracelulárního cAMP v odpovědi na působení **K2-Azido-ZM** za přítomnosti a nepřítomnosti agonisty

## 6. DISKUZE

### 6.1 Syntéza a charakterizace derivátů ZM241385

Léčivo ZM241385 ve své struktuře nemá vhodné skupiny pro navázání na polymerní nosiče, a proto byla nutná jeho modifikace. K tomu byly použity vybrané organické karboxylové kyseliny, které ve své struktuře obsahují skupinou vhodnou k vazbě na polymer a které budou zmíněny dále.

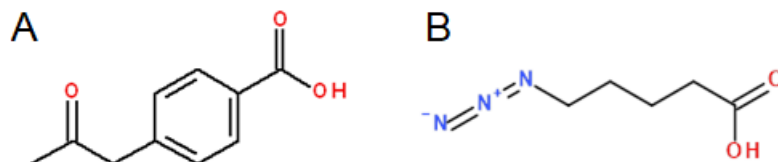
ZM241385 ve své struktuře má dvě skupiny, které mohou být využity k derivatizaci: karboxylová skupina vybraných kyselin používaných pro derivatizaci může tvořit esterovou vazbu s hydroxylem fenolového cyklu nebo amidovou vazbu s aminoskupinou na triazoltriazinovém cyklu. Podle analýzy literatury<sup>36,37,42,43</sup> lze konstatovat, že aminoskupina je nezbytná pro vazbu s receptorem, tedy reakce s ní by vedla ke ztrátě biologické aktivity. Hydroxylová skupina se neúčastní interakcí s receptorem a nachází se na okraji vazebného centra. Také výsledky ukázaly, že derivatizace probíhá preferenčně na hydroxylovou skupinu, což ukazuje na větší reaktivitu OH-skupiny v porovnání s aminoskupinou. Proto tato hydroxy skupina byla vybrána jako jediné místo derivatizace



Obrázek 6.1: znázornění skupin derivatizace ZM241385

Pro derivatizaci byly použity dvě karboxylové kyseliny: 4-(2-oxopropyl)benzoová a 5-azidopentanová (obr. 6.2 str. 43). Tyto kyseliny byly vybrány z důvodu rozdílného způsobu vazby na polymerní nosič. Hydrazonová vazba se často používá pro navázání léčiv na polymerní prekurzory a byla vybrána v této práci jako štěpitelná vazba, která se štěpí v kyselém prostředí nádoru, což vede k uvolnění derivátu, a naopak prokazuje vysokou stabilitu v pH odpovídajícímu pH v krevním řečišti. Tato vazba je tvořena reakcí ketoskupiny 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny s hydrazidovými skupinami na polymeru. V případě 5-azidopentanové kyseliny dochází ke vzniku 1,2,3-

triazolového cyklu reakcí azido skupiny kyseliny a trojné vazby BCN skupiny vázané na polymerním prekurzoru pomocí nekatalyzované click reakce. Tento cyklus není citlivý na pH a může docházet pouze k uvolňování samotného léčiva působením vhodných enzymů v místě napojení azidokyseliny na léčivo, tedy v místě esterové vazby.



Obrázek 6.2: struktura kyselin používaných pro derivatizaci ZM241385: A - 4-(2-oxopropyl)benzoové kyselina, B – 5-azidopentanová kyselina

Průběh derivatizace byl sledován pomocí HPLC. Byl stanoven dominantní pík derivátu, který byl ověřen pomocí MS a NMR, a relativně malé píky vedlejších produktů, které byly odstraněny flash-chromatografií. Pokus o syntézu derivátů ve větších množstvích ukázal, že specifčnost reakcí výrazně klesá při velkém množství reaktantů – to se stalo důvodem nízkého výtěžku syntézy derivátu 5-azidopentanové kyseliny. Derivatizace 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny při stejných podmínkách prokázala větší specifčnost. Další experimenty ukázaly, že je možné se vyhnout tvorbě velkého množství vedlejších produktů v případě, jsou-li derivatizační kyseliny dodávány ve dvou dávkách s intervalem 3-4 hodin. Nižší výtěžky reakcí lze vysvětlit vlivem tvorby vedlejších produktů a ztrátami během čištění.

## 6.2 Syntéza a charakterizace polymerních systémů

### 6.2.1 Polymerní prekurzory

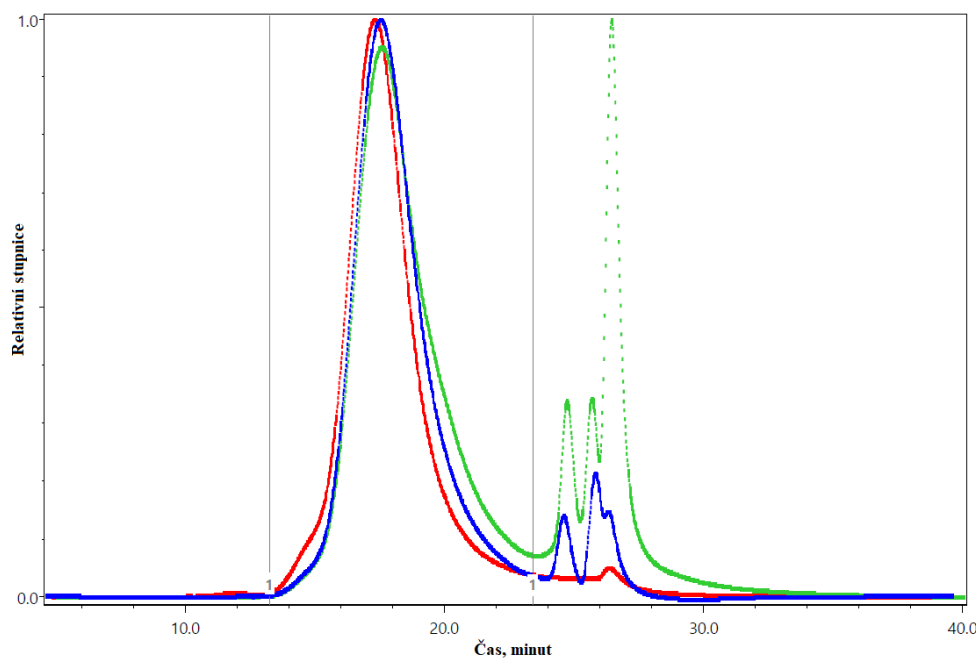
Polymerní prekurzory byly syntetizovány kontrolovanou RAFT kopolymerizací *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu a jednoho ze dvou komonomerů – Ma-Akap-NH-NH-Boc (pro **P1-NH-NH<sub>2</sub>**) a Ma-β-Ala-TT (pro **P2-BCN**). Tyto komonomery se běžně používají pro syntézu polymerních prekurzorů. **Ma-Akap-NH-NH-Boc** po odstranění chránicí skupiny získá volné hydrazidové skupiny, které se v dalším kroku využily pro tvorbu hydrazonové vazby, citlivé na pH, s derivátem **Oxo-ZM**, nesoucím keto skupinu. **Ma-β-Ala-TT** po navázání BCN-aminu má schopnost pevně navázat derivát **Azido-ZM**, nesoucí azidoskupinu, pomocí nekatalyzované click-reakce.

Připravený polymerní prekurzor **P1-NH-NH<sub>2</sub>** má molekulovou hmotnost nižší než 50 000 g/mol (tab. 5.1 str. 40), což je limit renální filtrace pro tento typ polymerních systémů. Lze tedy očekávat, že prekurzor by měl být úspěšně odstraněn z organismu po splnění své funkce. Prekurzor má nízkou disperzitu, což ukazuje na řízený proces polymerizace. Prekurzor obsahuje dostatečné množství skupin pro navázání efektivního množství léčiva.

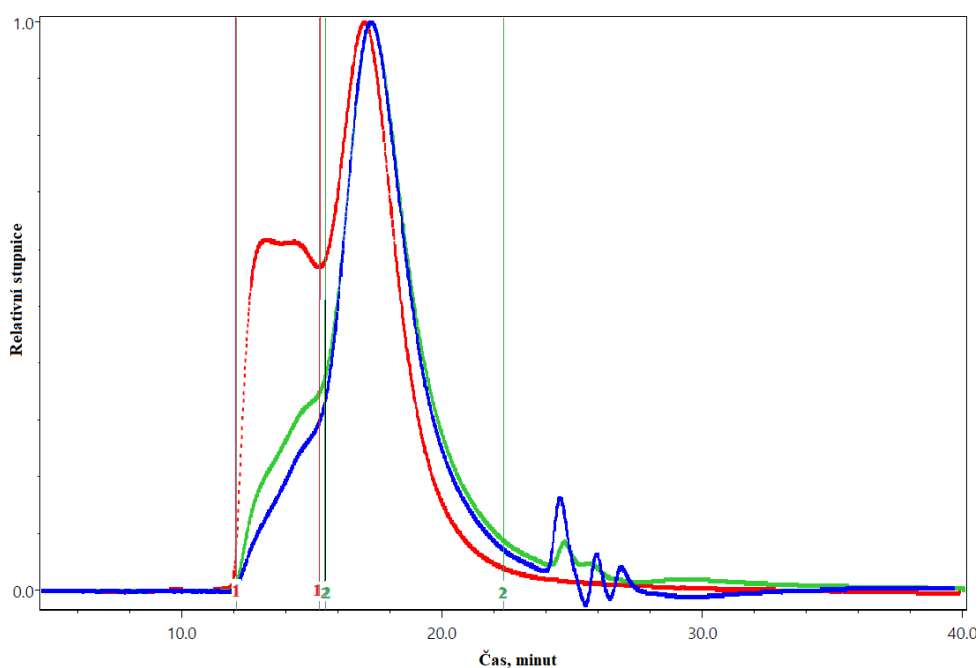
Zajímavé výsledky byly získány pro prekurzor **P2-BCN**. Tento prekurzor byl syntetizován reakcí prekurzoru **P2-TT** s BCN-aminem. **P2-TT** měl vhodnou molární hmotnost a disperzitu a chromatogram SEC (obrázek 6.3 str. 52) ukázal řízený proces polymerizace. Nicméně **P2-BCN** získaný po reakci s BCN-aminem měl větší molární hmotnost a disperzitu, než se očekávalo. Na SEC chromatogramu (obrázek 6.4 str. 52) detektor rozptylu světla ukazuje druhý pík před primárním píkem prekurzoru. Tabulka 6.1 znázorňuje výsledky, získané během syntézy prekurzoru **P2-BCN**.

Tabulka 6.1: porovnání výsledku, získaných přípravou prekurzoru **P2-BCN**

Prekurzor	$M_w$ , g/mol	Đ	% od celk. frakce
<b>P2-TT</b>	40800	1,06	100
<b>P2-BCN, primární pík</b>	47800	1,07	86
<b>P2-BCN, vedlejší pík</b>	162300	1,16	14
<b>P2-BCN, celkem</b>	61300	1,33	100



Obrázek 6.3: SEC chromatogram precursoru **P2-TT**



Obrázek 6.4: SEC chromatogram precursoru **P2-BCN**. Lze vidět vzniklý vedlejší pík

Celková frakce **P2-BCN** má molární hmotnost nad limitem renální filtrace. Z toho by docházelo k tomu, že precursor s určitou mírou pravděpodobností nemůže být vylučován renální filtrací, ale bude odstraňován hepatobiliární cestou, což není optimální dráha kvůli dlouhodobé cirkulaci nosiče v organismu. Disperzita precursoru také je větší, než se očekávalo. Rozdíl v molárních hmotnostech vzniká po modifikaci precursoru BCN

skupinami. Naší hypotézou je, že derivát BCN obsahuje v sobě příměs bifunkčních derivátů obsahujícího dvě aminoskupiny. Během reakce prekurzoru **P2-TT** s BCN aminem dochází k mírnému větvení polymery, což vedlo ke vzniku dvou sub-frakcí prekurzoru **P2-BCN**, lišících se molekulovou hmotností. Do výsledků byly uvedeny hodnoty  $M_w$  a disperzity pro primární pík **P2-BCN**. Vzhledem k tomu, že **P2-BCN** obsahuje dostatečně skupin pro navázání efektivního množství léčiva, lze říct, že tento prekurzor je i přes mírně navýšenou molekulovou hmotnost vhodný pro použití v dalších experimentech.

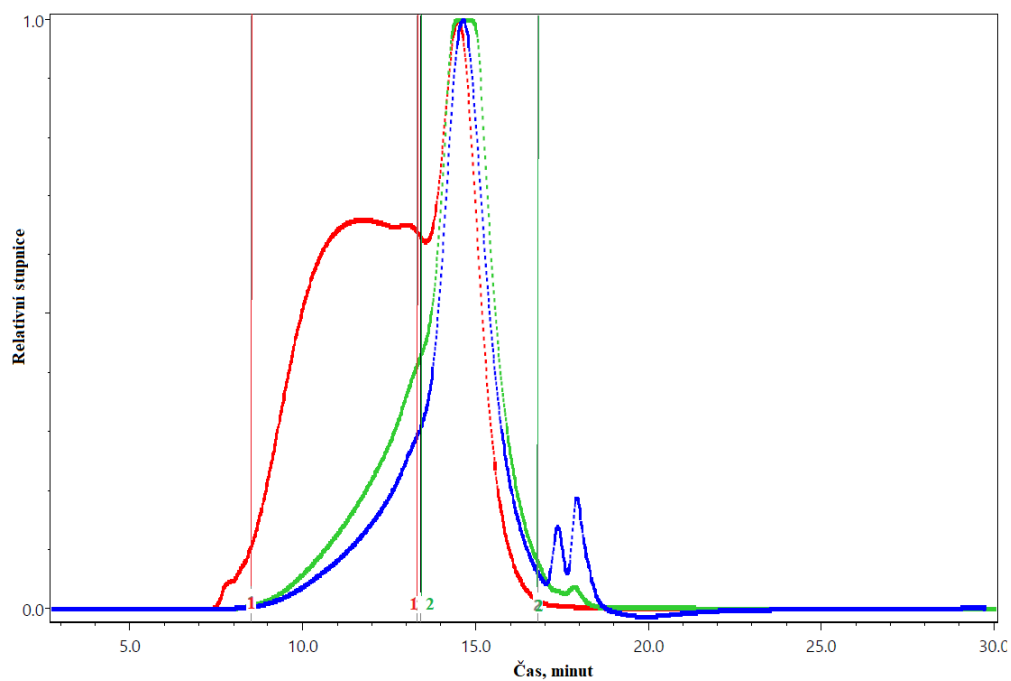
### 6.2.2 Polymerní konjugáty

Polymerní konjugát **K1-Oxo-ZM** byl úspěšně připraven s molární hmotností pod limitem renální filtrace a hydrodynamickém poloměrem 4,7 nm (tab. 5.2 str. 40). Tato velikost splňuje podmínky pro vyloučení z organismu renální filtrací, takže nebude konjugát působit toxický efekt kvůli své dlouhodobé akumulaci. Teoreticky z organismu bude po odštěpení derivátu léčiva vylučován polymerní prekurzor, který stejně má vhodné charakteristiky pro snadnou vyloučitelnost. Konjugát vykazuje nízkou disperzitu, lze tedy usuzovat, že nedochází k žádným vedlejším reakcím při vazbě na polymerní nosič. Obsah navázaného léčiva je 2 mol% (vs. 5,31 mol% skupin pro vazbu léčiva v prekurzoru). Lze předpokládat, že po optimalizaci reakčních podmínek lze dosáhnout většího obsahu navázaného léčiva. Nepřítomnost volného léčiva a derivátů bylo ověřeno pomocí měření na HPLC s mobilní fází bez TFA.

SEC chromatogram **K2-Azido-ZM** (obrázek 6.5) ukazuje dva píky polymerního konjugátu. Možným vysvětlením jsou větvící reakce během syntézy polymerního prekurzoru **P2-BCN** (viz. podkapitola 6.2.1). Tabulka 6.2 znázorňuje výsledky, získané během syntézy konjugátu **K2-Azido-ZM**.

Tabulka 6.2: porovnání výsledku, získaných přípravou konjugátu **K2-Azido-ZM**

Konjugát	$M_w$ , g/mol	Đ	% od celk. frakce
<b>K2-Azido-ZM, primární pík</b>	45800	1,16	80
<b>K2-Azido-ZM, vedlejší pík</b>	252000	1,43	20
<b>K2-Azido-ZM, celkem</b>	95300	1,94	100



Obrázek 6.5: SEC chromatogram konjugátu **K2-Azido-ZM**, znázorňující dvě sub-frakce konjugátů

Nicméně konjugát má vhodný obsah navázaného léčiva (4,8 mol% navázaného léčiva vs. 5 mol% teoreticky spočítaných skupin pro vazbu léčiva). Frakce mají vhodnou molární hmotnost a disperzitu, z čeho lze říct, že tento konjugát je použitelný pro další experimenty. Do výsledků byly zapsány hodnoty  $M_w$  a disperzity pro primární pík.

### 6.3 Hydrolytická stabilita polymerních konjugátů

Hydrolytická stabilita polymerního konjugátu **K1-Oxo-ZM** byla studována ve dvou pufrách, imitujících pH krevního oběhu (7,4) a mikroprostředí nádoru (5,5) (graf 5.1 str. 41). Uvolnění probíhá díky štěpení přítomné pH-senzitivní vazby. Konjugát ukazuje rychlé uvolňování navázaného léčiva při pH 5,5, což odpovídá požadavkům k polymernímu nosiči, který měl by uvolňovat léčivo v okolí nádoru. Naproti tomu v pH mimikujícím pH krevního řečiště byla stanovena rychlost uvolňování významně nižší. Nicméně stabilita konjugátu při pH 7,5 je menší, než se očekávalo. Jedním z možných vysvětlení je vliv elektronegativních atomů heterocyklu ZM241385 na stabilitu pH-senzitivní vazby.

Rychlost uvolňování při pH mikroprostředí nádoru je nejvyšší v intervalu do 1 hodiny, začíná klesat v intervalu od 1 h do 3,5 h a postupně vychází na plato po 3,5 h. Uvolnění 50 % navázaného léčiva je kolem 100 minut, což ukazuje na poměrně rychlé uvolňování vhodné pro aktivaci v nádorové tkáni. Maximum uvolňování, dosaženého během inkubace, je 59 % po 315 minutách inkubace. Z tvaru grafu lze předpokládat, že výrazně větší hodnota uvolňování s časem již nebude. Nicméně je důležité poznamenat, že experiment uvolňování se provádí v uzavřeném systému, který může způsobit arteficiální chování a dosažení plata při uvolňování. V reálném prostředí organismu je polymerní konjugát v omývaném systému a je tedy možné předpokládat, že k tvorbě plata při uvolňování nebude docházet. Léčivo se bude nejspíše uvolňovat rychlostí původní směrnice po celou dobu pobytu v nádorové tkáni.

V pufru s pH 7,4 docházelo k daleko nižšímu uvolňování derivátu. Po cca 5 h bylo uvolněno méně než 15% léčiva. Je tedy možné konstatovat, že polymerní konjugát bude schopen cirkulace v krevním řečišti alespoň 15-20 h, a tedy bude schopen dopravit léčivo do pevného nádoru, kde bude uvolněno po poklesu pH v daleko větší míře.

V případě **K2-Azido-ZM** derivát **Azido-ZM** je spojen s konjugátem stabilní vazbou přes triazolový cyklus a během inkubace nedošlo k degradaci nebo uvolnění derivátu v obou zmíněných pufrách.

## 6.4 Studie *in vitro*

Antagonista A<sub>2A</sub>R ZM241385 byl pro tuto studii vybrán s ohledem na to, že by měl snižovat imunosupresivní vliv adenosinu, který je přirozeným ligandem A<sub>2A</sub>R. Adenosin je produkován přeměnou extracelulárního ATP přes ADP a AMP aktivitou ektonukleotidáz CD73 a CD39, a to zejména populacemi buněk s významnou imunosupresivní funkcí (např. MDSC). Adenosin na rozdíl od ATP působí imunosupresivně prostřednictvím vazby na A<sub>2A/B</sub>R. O blokádě osy CD73-CD39-adenosin se v současné době uvažuje jako o možné checkpoint blokádě, tedy jako o kontrolním bodě, pomocí kterého by bylo možno zvrátit supresivní charakter imunitní odpovědi vůči nádorovým buňkám a podpořit produktivní reakci vedoucí k likvidaci nádorových buněk.

Testování substancí, které mohou osu CD73-CD39-adenosin v různých bodech ovlivňovat, je poměrně složité a pro testování vlivu adenosinu má dvě zásadní části. První je inkubace buněk nesoucích daný receptor s inhibitory a agonistou receptoru. Základní populací, která je přirozeným cílem pro extracelulární adenosin, jsou Treg (T regulační) buňky. Odpovědí na vazbu ligandu na A<sub>2A</sub>R je zvýšení hladiny intracelulárního cAMP. Stanovení hladiny cAMP představuje druhou část testovacího postupu.

Pro první část testování připravených vzorků derivátu inhibitoru a jeho polymerních konjugátů bylo potřeba vybrat reprezentativní nádorovou linii, která charakterem připomíná přirozené cílové buňky pro adenosin, tedy např. linii lymfoblastoidních T buněk Jurkat. Exprese A<sub>2A</sub>R u těchto buněk nicméně nebyla stanovena. Pracovat s izolovanými Treg buňkami v případě screeningu by bylo komplikované náročné zejména na provedení i finančně, a daleko přesahuje možnosti této diplomové práce.

Rovněž kvantifikace cAMP není triviální a některé používané detekční soupravy nejsou pro základní screening vhodné, protože spolehlivě pracují jen v úzkém rozsahu koncentrací cAMP (např. cAMP Glo Assay, výrobce Promega). Zvolili jsme proto kompetitivní ELISU s fluorescenčním produktem, která má podle informací výrobce být schopná detekovat cAMP v širokém rozsahu koncentrací. Tento předpoklad se potvrdil a zjistili jsme, že souprava poskytuje reprodukovatelné výsledky.

Jako dle literatury vhodný agonista receptoru byl vybrán GCS21680. Bohužel při samotných experimentech nebyla pozorována jeho funkce na zvýšení hladiny cAMP. Předpokládáme, že pro dosažení efektu bude nutné provést další experimenty, které již nebylo možné provést v rámci této práce. Samotný inhibitor překvapivě při nízkých koncentracích způsoboval nárůst hladiny cAMP. Při omezeném rozsahu testování nemůžeme usuzovat, jaký měl tento nárůst důvod.

Derivát Oxo-ZM prokázal aktivitu opačnou očekávané ve všech testovaných koncentracích. Předpokládáme, že jeho derivatizací se prohloubil efekt inhibitoru pozorovaný při jeho nízkých koncentracích. Vzhledem k nefunkčnosti agonisty při použité koncentraci, nebylo možné evaluovat inhibiční aktivitu derivátu inhibitoru na funkci agonisty. Lze konstatovat, že modifikace ZM241385 změnila jeho aktivitu.

Působení konjugátů bylo velmi obdobné jako v případě samotného derivátu a nebyl mezi nimi nalezen významnější rozdíl. U obou polymerních konjugátů docházelo se zvyšující se koncentrací k navyšování hladiny cAMP. Vzhledem k tomu, že oba polymerní konjugáty vykazovaly obdobný profil v závislosti na koncentraci, je možné shrnout, že samotné uvolnění derivátu nemá zásadní vliv na jeho aktivitu.

Vzhledem k nefunkčnosti nastaveného experimentu pro podání agonisty je nutné experiment optimalizovat v rámci dalších experimentů přesahujících tuto práci. S výhodou by bylo potřebné optimalizovat výběr buněčné linie, která jednoznačně exprimuje A2A R. Dále bude s výhodou upravit délku kultivace s inhibitory a agonisty a optimum testovaných koncentrací všech inhibitorů i agonistů.

## 7. ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na použití polymerních dopravních systémů na bázi HPMA pro zvýšení imunoterapeutického účinku ZM241385. V rámci práce byly úspěšně syntetizovány a charakterizovány polymerní prekurzory, vhodné pro cílený transport ZM241385 do nádorových tkání. Připravené prekurzory mají příznivou disperzitu a vhodný obsah skupin pro navázání léčiva.

Léčivo bylo modifikováno pomocí dvou organických kyselin, konkrétně 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny a 5-azidopentanové kyseliny. Získané deriváty léčiva byly úspěšně navázány na polymerní prekurzory.

Reakcí polymerních prekurzorů s deriváty ZM241385 byly získány dva polymerní konjugáty, které se lišily typem spojky mezi derivátem a polymerním řetězcem. Připravený pH senzitivní konjugát vykazuje poměrně vysokou hydrolytickou stabilitu v pH, imitujícím krevní řečiště, a je naopak rychle degradován a uvolňuje volné léčivo v pH mikroprostředí nádoru. Syntetizované konjugáty mají vhodné fyzikálně-chemické charakteristiky, jako je hydrodynamický poloměr, umožňující zvýšenou akumulaci léčiva v nádorových tkáních, nebo vysoké procento navázaného léčiva. Konjugát **K1-Oxo-ZM** má molární hmotnost umožňující odstranění renální filtrací, což umožňuje vylučování polymerního nosiče po splnění své cíle a bránění toxicitě kvůli akumulaci nosiče. V případě konjugátu **K2-Azido-ZM** došlo k mírnému navýšení molární hmotnosti po navázání derivátu léčiva, nicméně, i tento polymerní systém byl vhodný pro testování biologické účinnosti.

Byly provedeny experimenty na linii Jurkat, při kterých byly buňky inkubovány s agonistou A<sub>2A</sub>R GCS21680, s připravenými inhibitory receptoru A<sub>2A</sub> nebo jejich kombinace. Při experimentu nebyl prokázán efekt samotného agonisty adenosinu, což významně ovlivnilo samotné testování inhibičního potenciálu samotného inhibitoru, jeho derivátu a potažmo i polymerních konjugátů. Testované polymerní systémy prokázaly podobnou stimulační aktivitu na hladinu cAMP u buněk jako bylo stanoveno v případě samotného derivátu. Z výsledků vyplývá, že samotná aktivita nebyla závislá na uvolnění derivátu inhibitoru z polymerního nosiče, oba systémy vykazaly přibližně stejnou aktivitu na zmíněných buňkách. Pro pochopení získaných výsledků je nutné provedení dalších detailních experimentů přesahujících rozměr této práce.

Závěrem je možné konstatovat, že byly úspěšně připraveny polymerní systémy nesoucí deriváty ZM241385. Pro stanovení podrobné biologické účinnosti těchto

polymerních systémů je však nutná další optimalizace biologických experimentů. V dalším studiu je nutné se zaměřit na důkladný výběr vhodné buněčné linie, na výběr vhodného agonista  $A_{2A}R$  a koncentraci samotných inhibitorů.

- (1) Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview. *Int. J. Cancer* **2021**, *149* (4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.
- (2) Chytil, P.; Kostka, L.; Etrych, T. Structural Design and Synthesis of Polymer Prodrugs. In *Polymers for Biomedicine*; Scholz, C., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp 391–420. <https://doi.org/10.1002/9781118967904.ch13>.
- (3) Sriwidodo; Umar, Abd. K.; Wathoni, N.; Zothantluanga, J. H.; Das, S.; Luckanagul, J. A. Liposome-Polymer Complex for Drug Delivery System and Vaccine Stabilization. *Heliyon* **2022**, *8* (2), e08934. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08934>.
- (4) Cho, E.; Lu, Y. Compartmentalizing Cell-Free Systems: Toward Creating Life-Like Artificial Cells and Beyond. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9* (11), 2881–2901. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00433>.
- (5) Patra, J. K.; Das, G.; Fraceto, L. F.; Campos, E. V. R.; Rodriguez-Torres, M. del P.; Acosta-Torres, L. S.; Diaz-Torres, L. A.; Grillo, R.; Swamy, M. K.; Sharma, S.; Habtemariam, S.; Shin, H.-S. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects. *J Nanobiotechnol* **2018**, *16* (1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- (6) Kostka, L.; Etrych, T. High-Molecular-Weight HPMA-Based Polymer Drug Carriers for Delivery to Tumor. *Physiol Res* **2016**, S179–S190. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933420>.
- (7) Fox, M. E.; Szoka, F. C.; Fréchet, J. M. J. Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer: The Importance of Molecular Architecture. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (8), 1141–1151. <https://doi.org/10.1021/ar900035f>.
- (8) Chytil, P.; Kostka, L.; Etrych, T. HPMA Copolymer-Based Nanomedicines in Controlled Drug Delivery. *JPM* **2021**, *11* (2), 115. <https://doi.org/10.3390/jpm11020115>.
- (9) Li, Y.; Zhao, L.; Li, X.-F. Hypoxia and the Tumor Microenvironment. *Technol Cancer Res Treat* **2021**, *20*, 153303382110363. <https://doi.org/10.1177/15330338211036304>.

- (10) Kopeček, J. HEMA Copolymer–Anticancer Drug Conjugates: Design, Activity, and Mechanism of Action. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *50* (1), 61–81. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00075-8).
- (11) Ulbrich, K.; Šubr, V. Structural and Chemical Aspects of HEMA Copolymers as Drug Carriers☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (2), 150–166. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.10.007>.
- (12) Yang, J.; Kopeček, J. Design of Smart HEMA Copolymer-Based Nanomedicines. *Journal of Controlled Release* **2016**, *240*, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.003>.
- (13) Perrier, S. *50th Anniversary Perspective* : RAFT Polymerization—A User Guide. *Macromolecules* **2017**, *50* (19), 7433–7447. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b00767>.
- (14) Kimmelman, A. C.; White, E. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metabolism* **2017**, *25* (5), 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.004>.
- (15) DeBerardinis, R. J.; Chandel, N. S. Fundamentals of Cancer Metabolism. *Sci. Adv.* **2016**, *2* (5), e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>.
- (16) Vander Heiden, M. G.; DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **2017**, *168* (4), 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>.
- (17) Luengo, A.; Li, Z.; Gui, D. Y.; Sullivan, L. B.; Zagorulya, M.; Do, B. T.; Ferreira, R.; Naamati, A.; Ali, A.; Lewis, C. A.; Thomas, C. J.; Spranger, S.; Matheson, N. J.; Vander Heiden, M. G. Increased Demand for NAD<sup>+</sup> Relative to ATP Drives Aerobic Glycolysis. *Molecular Cell* **2021**, *81* (4), 691–707.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.012>.
- (18) Kroemer, G.; Pouyssegur, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer’s Achilles’ Heel. *Cancer Cell* **2008**, *13* (6), 472–482. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005>.
- (19) Reina-Campos, M.; Moscat, J.; Diaz-Meco, M. Metabolism Shapes the Tumor Microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology* **2017**, *48*, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.05.006>.
- (20) Wang, J.-J.; Lei, K.-F.; Han, F. Tumor Microenvironment: Recent Advances in Various Cancer Treatments. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **2018**, *22* (12), 3855–3864. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201806\\_15270](https://doi.org/10.26355/eurrev_201806_15270).
- (21) Tinganelli, W.; Durante, M. Tumor Hypoxia and Circulating Tumor Cells. *IJMS* **2020**, *21* (24), 9592. <https://doi.org/10.3390/ijms21249592>.

- (22) Al-Ostoot, F. H.; Salah, S.; Khamees, H. A.; Khanum, S. A. Tumor Angiogenesis: Current Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cancer Treatment and Research Communications* **2021**, *28*, 100422. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100422>.
- (23) Li, T.; Kang, G.; Wang, T.; Huang, H. Tumor Angiogenesis and Anti-angiogenic Gene Therapy for Cancer (Review). *Oncol Lett* **2018**. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8733>.
- (24) Kennedy, L. B.; Salama, A. K. S. A Review of Cancer Immunotherapy Toxicity. *CA A Cancer J Clin* **2020**, *70* (2), 86–104. <https://doi.org/10.3322/caac.21596>.
- (25) Yang, Y. Cancer Immunotherapy: Harnessing the Immune System to Battle Cancer. *Journal of Clinical Investigation* **2015**, *125* (9), 3335–3337. <https://doi.org/10.1172/JCI83871>.
- (26) Dunn, G. P.; Old, L. J.; Schreiber, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* **2004**, *21* (2), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>.
- (27) Marvel, D.; Gabrilovich, D. I. Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment: Expect the Unexpected. *Journal of Clinical Investigation* **2015**, *125* (9), 3356–3364. <https://doi.org/10.1172/JCI80005>.
- (28) Gabrilovich, D. I. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* **2017**, *5* (1), 3–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>.
- (29) Cassetta, L.; Pollard, J. W. Tumor-Associated Macrophages. *Current Biology* **2020**, *30* (6), R246–R248. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.031>.
- (30) Pan, Y.; Yu, Y.; Wang, X.; Zhang, T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 583084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>.
- (31) Lin, B.; Du, L.; Li, H.; Zhu, X.; Cui, L.; Li, X. Tumor-Infiltrating Lymphocytes: Warriors Fight against Tumors Powerfully. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2020**, *132*, 110873. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110873>.
- (32) Paijens, S. T.; Vledder, A.; de Bruyn, M.; Nijman, H. W. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in the Immunotherapy Era. *Cell Mol Immunol* **2021**, *18* (4), 842–859. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00565-9>.
- (33) Riley, R. S.; June, C. H.; Langer, R.; Mitchell, M. J. Delivery Technologies for Cancer Immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* **2019**, *18* (3), 175–196. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>.

- (34) Velcheti, V.; Schalper, K. Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* **2016**, No. 36, 298–308. [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_156572](https://doi.org/10.1200/EDBK_156572).
- (35) Abril-Rodriguez, G.; Ribas, A. SnapShot: Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Cell* **2017**, *31* (6), 848-848.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.010>.
- (36) Yu, F.; Zhu, C.; Xie, Q.; Wang, Y. Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Antagonists for Cancer Immunotherapy: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (21), 12196–12212. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00237>.
- (37) Zhang, J.; Yan, W.; Duan, W.; Wüthrich, K.; Cheng, J. Tumor Immunotherapy Using A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Antagonists. *Pharmaceuticals* **2020**, *13* (9), 237. <https://doi.org/10.3390/ph13090237>.
- (38) Leone, R. D.; Emens, L. A. Targeting Adenosine for Cancer Immunotherapy. *J. immunotherapy cancer* **2018**, *6* (1), 57. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0360-8>.
- (39) Cunha, R. A.; Dolores Constantino, M.; Alexandre Ribeiro, J. ZM241385 Is an Antagonist of the Facilitatory Responses Produced by the A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Agonists CGS21680 and HENECA in the Rat Hippocampus: Antagonism of Adenosine A<sub>2A</sub> Receptors in the Hippocampus. *British Journal of Pharmacology* **1997**, *122* (7), 1279–1284. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701507>.
- (40) Jaakola, V.-P.; Lane, J. R.; Lin, J. Y.; Katritch, V.; IJzerman, A. P.; Stevens, R. C. Ligand Binding and Subtype Selectivity of the Human A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (17), 13032–13044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096974>.
- (41) Byeon, J.-J.; Park, M.-H.; Shin, S.-H.; Park, Y.; Lee, B. ill; Choi, J.; Kim, N.; Park, S.; Park, M.; Lim, J.; Na, Y.-G.; Shin, Y. G. In Vitro, In Silico, and In Vivo Assessments of Pharmacokinetic Properties of ZM241385. *Molecules* **2020**, *25* (5), 1106. <https://doi.org/10.3390/molecules25051106>.
- (42) Jaakola, V.-P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y. T.; Lane, J. R.; IJzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science* **2008**, *322* (5905), 1211–1217. <https://doi.org/10.1126/science.1164772>.
- (43) Doré, A. S.; Robertson, N.; Errey, J. C.; Ng, I.; Hollenstein, K.; Tehan, B.; Hurrell, E.; Bennett, K.; Congreve, M.; Magnani, F.; Tate, C. G.; Weir, M.; Marshall, F. H. Structure of the Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor in Complex with ZM241385 and the

Xanthines XAC and Caffeine. *Structure* **2011**, *19* (9), 1283–1293.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2011.06.014>.

(44) Ulbrich, K.; Etrych, T.; Chytil, P.; Jelínková, M.; Říhová, B. HPMA Copolymers with pH-Controlled Release of Doxorubicin. *Journal of Controlled Release* **2003**, *87* (1–3), 33–47. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00348-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00348-6).

(45) Ulbrich, K.; Šubr, V.; Strohalm, J.; Plocová, D.; Jelínková, M.; Říhová, B. Polymeric Drugs Based on Conjugates of Synthetic and Natural Macromolecules. *Journal of Controlled Release* **2000**, *64* (1–3), 63–79. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00141-8).

(46) Ishitake, K.; Satoh, K.; Kamigaito, M.; Okamoto, Y. Stereogradient Polymers Formed by Controlled/Living Radical Polymerization of Bulky Methacrylate Monomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (11), 1991–1994. <https://doi.org/10.1002/anie.200805168>.

(47) Kostka, L.; Kotrchová, L.; Šubr, V.; Libánská, A.; Malátová, I.; Lee, H. J.; Barnhart, T. E.; Engle, J. W.; Cai, W.; Šírová, M.; Etrych, T. HPMA-Based Star Polymer Biomaterials with Tuneable Structure and Biodegradability Tailored for Advanced Drug Delivery to Solid Tumours. *Biomaterials* **2020**, *235*, 119728. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119728>.