

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organizmů



**Laura Vinklerová**

Vodorozpuštné polymerní nanomateriály v protinádorové terapii

Watersoluble polymer nanomaterials tailored for anti-tumor therapy

Bakalářská práce

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

Praha, 2020

**Prohlášení**

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

V Praze, 5.6.2020

.....

Laura Vinklerová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Etrychovi, PhD., DSc. za umožnění vypracování bakalářské práce na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, za skvělé vedení, rady, ochotu a trpělivost. Také chci poděkovat panu Ing. Šubrovi, CSc. za cenné rady, Albertu Koválikovi za pomoc a vstřícnost při zpracovávání úloh a celému Ústavu makromolekulární chemie za vytvoření hezké pracovní atmosféry.

Děkuji i své rodině za podporu a trpělivost během mého studia.

## **Abstrakt**

Protinádorová léčba zahrnuje několik terapeutických postupů. Jedním z nich je chemoterapie využívající nízkomolekulární cytostatická léčiva, jejichž nevýhodou je celosystémový projev cytostatických účinků i ve zdravé tkáni. V důsledku toho se na konci minulého století přišlo s novým konceptem vysokomolekulárních polymerních nanomateriálů, které minimalizují vedlejší účinky léčby. Vazba léčiva na polymerní nanomateriál umožňuje zlepšit biodistribuci léčiva v těle a tím snížit jeho toxicitu, a zároveň často vede k významnému navýšení protinádorové aktivity.

Struktura zmíněných vysokomolekulárních polymerních nanomateriálů a jejich konjugátů s léčivou využívá rozdílů mezi zdravou a nádorovou tkání. Jednou z významných odlišností je produkce enzymů matrix metaloproteináz v nádorovém mikroprostředí, která se zejména využívá k uvolňování léčiva vázaného na polymerní nosič v nádorové tkáni.

**Klíčová slova:** polymerní nanomateriál, matrix metaloproteináza, uvolnění léčiva, penetrace, efekt EPR

## **Abstract**

Anti-tumor treatment involves several therapeutic approaches. One of them is chemotherapy with low-molecular-weight cytostatic drugs, whose disadvantage is the systemic manifestation of cytostatic effects even in healthy tissue. Nevertheless, at the end of the last century, a new concept of high molecular weight polymer nanomaterials with minimized the side effects of treatment was introduced. The binding of the drug to the polymeric nanomaterial makes it possible to improve the biodistribution of the drug in the body and thereby reduce its toxicity, while often leading to a significant increase in anti-tumor activity. The application of the high-molecular-weight polymer nanomaterials and their drug conjugates in treatment utilizes the differences between healthy and tumor tissue. One of the important difference is increased production of matrix metalloproteinases enzymes in the tumor microenvironment, which is mainly used to tumor site-controlled release of polymer-bound drug.

**Keywords:** polymer nanomaterial, matrix metalloproteinase, release of the drug, penetration, EPR effect

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>VODOROZPUSTNÉ POLYMERNÍ NANOMATERIÁLY V PROTINÁDOROVÉ LÉČBĚ</b> .....	<b>2</b>
2.1	FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI POLYMERNÍCH NANOMATERIÁLŮ .....	2
2.2	STRUKTURA VODOROZPUSTNÝCH POLYMERNÍCH NANOMATERIÁLŮ .....	3
2.2.1	<i>Vysokomolekulární polymerní nanomateriály</i> .....	5
2.2.1.1	<i>Hvězdicovité polymery</i> .....	6
2.2.1.2	<i>Micely</i> .....	7
2.3	PASIVNÍ AKUMULACE A AKTIVNÍ CÍLENÍ POLYMERNÍCH NANOMATERIÁLŮ V NÁDOROVÉ TKÁNI .....	9
2.4	VAZBA A UVOLNĚNÍ LÉČIVA Z POLYMERNÍHO NOSIČE.....	11
2.4.1	<i>Vazba přes redukčně senzitivní spojky</i> .....	11
2.4.2	<i>Vazba přes pH senzitivní spojky</i> .....	11
2.4.3	<i>Vazba přes enzymaticky degradovatelné spojky</i> .....	12
<b>3</b>	<b>PROTINÁDOROVÁ TERAPIE S VYUŽITÍM MATRIX METALOPROTEINÁZ</b> .....	<b>13</b>
3.1	STRUKTURA A VLASTNOSTI MATRIX METALOPROTEINÁZ.....	13
3.2	ROLE MATRIX METALOPROTEINÁZ V PROGRESI NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ .....	15
3.2.1	<i>Regulace růstu nádorových buněk</i> .....	15
3.2.2	<i>Role MMP při regulaci apoptózy nádorových buněk</i> .....	15
3.2.3	<i>Role MMP při expanzi nádorových buněk</i> .....	16
3.2.4	<i>Role MMP při „maskování“ nádorových buněk před imunitní odpovědí organismu</i> .....	16
3.3	VYUŽITÍ MATRIX METALOPROTEINÁZ V CÍLENÉ DOPRAVĚ S POMOCÍ POLYMERNÍCH NOSIČŮ A PŘI AKTIVACI LÉČIVA VÁZANÉHO NA NOSIČÍCH .....	17
3.3.1	<i>Uvolnění léčiva</i> .....	17
3.3.2	<i>„Odmaskování“ polymerního nosiče</i> .....	19
3.3.3	<i>Cílená degradace polymerního nosiče</i> .....	21
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>24</b>

## Seznam použitých zkratek

BAL	biologicky aktivních molekul (biologically active molecules)
bis-MPA	2,2-bis(hydroxymethyl)propionové kyseliny (2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid)
bz	benzoylová skupina (benzoyl group)
CPPs	peptidy prostupující buňkou (cell-penetrating peptides)
Dox	doxorubicin
DODMA	2-dioleoyloxy-N,N-dimetyl-3-aminopropan (2-dioleoyloxy-N,N-dimethyl-3-aminopropane)
<i>D</i> - $\alpha$ -TOS	<i>D</i> - $\alpha$ -tokoferol ( <i>D</i> - $\alpha$ -tokopherol)
ECM	extracelulární matrix (extracellular matrix)
EPR	zvýšená propustnost a zadrž (enhanced permeability and retention)
FA	kyselina listová (folic acid)
FR	receptor kyseliny listové (folate receptor)
GSH	glutathion (glytathione)
HA	kyselina hyaluronová (hyaluronic acid)
HB-EGF	heparin vázající epidermální růstový faktor (heparin-binding epidermal growth factor)
HER2	humánní epidermální receptor 2 (human epidermal growth factor receptor 2)
IGF	inzulínu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor)
IGFBP	vazebný protein pro inzulínu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor-binding protein)
miRNA	mikro ribonukleové kyseliny (micro ribonucleic acid)
MMP	matrix metaloproteináza (matrix metalloproteinase)
mPEG	methoxy-polyetylen glykol (methoxy-polyethylene glycol)
MT-MMP	membránová matrix metaloproteináza (membrane-type matrix metalloproteinase)
NK	nukleová kyselina (nucleic acid)
PAMAM	poly(aminoamid) (poly(amidoamine))
PE	fosfoethanolaminu (phosphoethanolamine)

PEG	poly(etylenglykol) poly(ethylenglycol))
PEI	polyetylenimin (polyethylenimine)
PHPMA	polymer N-(2-hydroxypropyl)metacrylamidu (polymer N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide)
RES	retikuloendoteliálního systému (reticuloendothelial system)
siRNA	malé interferující ribonukleové kyseliny (small interfering ribonucleic acid)
TAT	trans-aktivační transkripční aktivátor (trans-activator of transcription)
TIMP	tkáňový inhibitor matrix metaloproteinázy (tissue inhibitor of metalloproteinase)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)



# 1 Úvod

Především v posledních dvou dekádách druhé poloviny dvacátého století se v nádorové terapii začaly studovat přístupy, které využívaly nových znalostí o roli imunitního systému u nádorových onemocnění. Současně se rozšířil i výzkum nosičových systémů léčiv založených na rozličných materiálech, například vysokomolekulárních polymerních nanomateriálech.

Farmakokinetika léčiva je u těchto nosičových systémů řízena strukturou a vlastnostmi nosiče jak po celou dobu transportu, tak i v okamžiku uvolnění aktivního léčiva v požadovaném místě v organismu. Léčivo je buď zachyceno uvnitř nanomateriálu na základě hydrofobních a elektrostatických interakcí, nebo kovalentně navázáno na polymerní nosič. Tím je docíleno výhodnější biodistribuce léčiva v organismu, jeho stabilizace proti degradaci, zvýšení rozpustnosti a snížení vedlejších účinků léčiva na zdravé části organismu.

Při designu polymerních nanomateriálů se využívá rozdílů mezi mikroprostředím nádoru a prostředím zdravé tkáně. Rozdíly můžeme najít v konstrukci nádorového mikroprostředí, v buněčném metabolismu a zvýšené expresi některých molekul nádorovými buňkami. Zvýšená exprese specifických molekul může být využita k aktivaci nosičových systémů, například k uvolnění léčiva v prostředí nádoru enzymatickým působením matrix metaloproteináz.

Cílem bakalářské práce je popis vodorozpustných polymerních nanomateriálů a jejich využití v protinádorové terapii. Důraz je kladen na systémy využívající stimuly asociované s nádorovým mikroprostředím. Především je diskutováno využití matrix metaloproteináz při uvolnění léčiva z nanomateriálu, při jeho degradaci a při jeho odmaskování, které je spojené s aktivací směřujících komponent vyskytujících se na nanomateriálu.

## 2 Vodorozpustné polymerní nanomateriály v protinádorové léčbě

### 2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti polymerních nanomateriálů

Fyzikálně-chemické vlastnosti polymerních nanomateriálů jsou určujícím faktorem při jejich využití v protinádorové léčbě. „Ideální“ polymerní nanomateriál by měl být biokompatibilní, netoxický a neimunogenní. V krevním řečišti by měl cirkulovat po dostatečně dlouhou dobu, aby mohlo dojít k jeho akumulaci v nádorové tkáni, nikoliv ve tkáni zdravé. Po dopravě a uvolnění léčiva, které nese, by měl být nanomateriál následně odstraněn z organismu.

K době cirkulace polymerního nanomateriálu v krevním řečišti přispívá jeho velikost, povrch a jeho celkový náboj. Tyto faktory hrají úlohu při interakci s buňkami retikuloendoteliálního systému (RES) a při jeho eliminaci ledvinami (Ohlson, Sörensson, and Haraldsson 2000; Rennke and Venkatachalam, 1979). Nanomateriály o hydrodynamickém rozměru<sup>1</sup> vyšším než cca 10 nm nejsou odstraňovány glomerulární filtrací ledvinami do moči a cirkulují v organismu po významně delší dobu. Je také omezeno vylučování negativně nabitých molekul glomerulární filtrací. Filtrace pozitivně nabitých molekul je naopak zvýšena. Navíc, pozitivně nabité polymerní molekuly mohou, díky svým interakcím s membránami zdravých buněk, být pro organismus toxické (Etrych et al. 2011; Rennke and Venkatachalam, 1979; Chen et al. 2017).

Úlohou buněk RES je rozpoznat a odstraňovat cizí látky z organismu. Rozpoznávání nanomateriálů buňkami RES vzrůstá s jejich narůstajícím kladným či negativním povrchovým nábojem a s jejich velikostí. Proto by měla být struktura polymerních nanomateriálů navržena tak, aby nedocházelo k nežádoucí interakci s buňkami RES. Nanomateriály by měly mít hydrofilní povrch, rozměr menší jak 150 nm a mírně záporný až neutrální povrchový náboj (Müller et al. 1992; He et al. 2010; Chen et al. 2017). Vhodné vlastnosti mohou nanomateriály získat také s pomocí úpravy svého povrchu, například potažením hydrofilními polymery. Často je využíván poly(etylenglykol) (PEG), který díky svým vlastnostem může jiným nanomateriálům zlepšit jejich biokompatibilitu (Gref et al. 2000).

---

<sup>1</sup> Průměr koule se stejným difúzním koeficientem jako daná částice ve stejném roztoku

K dosažení zvýšené akumulace polymerního nanomateriálu v pevných nádorech se využívá tzv. efektu zvýšené propustnosti a zádrže (EPR), založeného na abnormalitách nádorové tkáně. EPR efekt byl poprvé popsán Matsumurou a Maedou v osmdesátých letech dvacátého století (Matsumura and Maeda 1986) (viz kapitola 2.3).

V neposlední řadě, po doručení léčiva na cílové místo, a tedy splnění úkolu nosiče, musí být zajištěno odstranění polymerního nanomateriálu z organismu. Z tohoto důvodu musí být polymerní nanomateriál buď biodegradovatelný, nebo jeho molekulová hmotnost nesmí překročit limit renální filtrace. Jen tak je možné zabránit jeho nechtěné akumulaci v organismu (Etrych et al. 2011).

## 2.2 Struktura vodorozpustných polymerních nanomateriálů

Vodorozpustné polymerní nanomateriály, které jsou velmi často studovány jako nosiče biologicky aktivních molekul, jsou lineární molekuly s dlouhým polymerním řetězcem. Tento řetězec může obsahovat funkční skupiny, které mohou být využity pro navázání biologicky aktivních molekul (BAL), například nízkomolekulárních, často hydrofobních molekul léčiva. Konjugáty polymerních nanomateriálů s léčivem jsou nejčastěji připravovány jako rozpustné ve vodě, které dokáží ochránit léčivo proti biodegradaci nebo biotransformaci a významně ovlivnit farmakokinetiku nesené BAL tím, že se prodlouží cirkulace v krevním oběhu, nedochází k nežádoucí akumulaci ve zdravé tkáni během transportu a nesené léčivo má nižší toxicitu.

Vodorozpustné polymerní nosiče se většinou skládají z hlavního vodorozpustného polymerního řetězce, BAL, například nízkomolekulárního hydrofobního léčiva nebo peptidu, biodegradovatelné spojky nacházející se mezi polymerním řetězcem a BAL, a případně i ze směřující komponenty (viz obr. 1).

Zmíněné polymerní nanomateriály můžeme rozdělit do dvou skupin podle biologické degradovatelnosti hlavního polymerního řetězce. První skupinu tvoří polymery s biologicky rozložitelným hlavním řetězcem, druhou skupinu tvoří polymery s biologicky rozložitelnými vazbami mezi základními polymerními bloky. Tyto základní bloky mají molekulovou hmotnost pod limitem renální filtrace a stávají se podkladem pro stavbu vysokomolekulárních polymerních nanomateriálů (viz níže), jejichž následná degradace

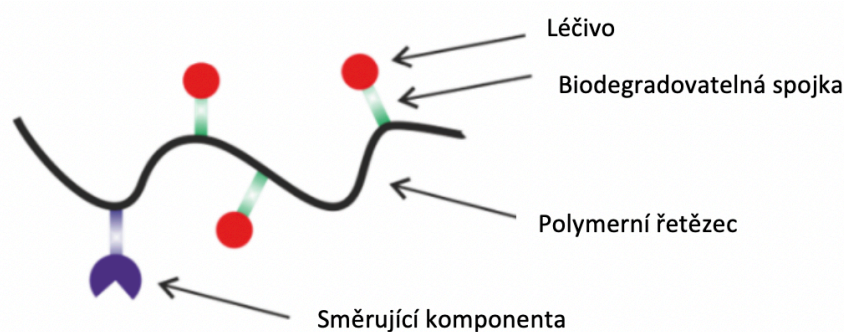
probíhá prostou hydrolýzou, enzymatickým štěpením či redukční degradací (Chytil, Kostka, and Etrych 2017).

Do skupiny s biologicky rozložitelným hlavním řetězcem patří polymery založené na peptidech, syntetických poly( $\alpha$ -aminokyselinách), například poly(L-glutamové kyselině) (Van et al. 2011), poly(L-lysinu) (Couffin-Hoarau et al. 2009) nebo polymery založené na polysacharidech, jako jsou dextran (Chau et al. 2006a) nebo kyselina polysialová (Bader et al. 2011).

Do skupiny s biologicky rozložitelnými vazbami mezi základními polymerními bloky patří například často studovaný PEG (Pechar et al. 2016), kopolymery na bázi N-(2-hydroxypropyl)metacrylamidu (PHPMA) nebo poly(2-oxazolíny) (Sedlacek et al. 2017).

PEG je vysoce hydratovaný lineární polyeter s jednou či dvěma koncovými funkčními skupinami na řetězci, které mohou být použity k připojení jiné molekuly. Využívá se jako polymerní nosič biologicky aktivních proteinů či glykoproteinů nebo nízkomolekulárních léčiv (Abuchowski et al. 1977; Greenwald et al. 1995). Nejvíce se však používá k modifikaci povrchu hydrofobních nebo nebiokompatibilních nanomateriálů, k tzv. PEGylaci (Altankov, 2000). Tím dochází k prodloužení jejich cirkulace v krevním oběhu a k jejich „skrytí“ před RES. Nevýhodou PEG je přítomnost jen jedné či dvou funkčních skupin, které neumožňují navázání většího množství léčiva (Gref et al. 2000).

Naproti tomu PHPMA kopolymery jsou multivalentní polymerní nanomateriály s více náhodně rozmístěnými funkčními skupinami podél polymerního řetězce, které umožňují navázání většího množství léčiva. PHPMA se pro využití v medicíně začaly studovat kvůli jejich dobré biokompatibilitě, neimunogením a netoxickým vlastnostem (Šprincl et al. 1971).



Obr. 1: Schématický obrázek polymerního nosiče – upraveno (Chytil, Kostka, and Etrych 2017).

### 2.2.1 Vysokomolekulární polymerní nanomateriály

S cílem prodloužit krevní cirkulaci, zvýšit akumulaci léčiva v nádorové tkáni díky EPR efektu, a tedy zvýšit jeho terapeutický účinek, se začaly jako nosiče léčiv využívat vysokomolekulární polymerní nanomateriály. Aby nedocházelo k jejich nechtěné akumulaci v organizmu, jsou připraveny tak, aby se po doručení léčiva rozložily na bloky o velikosti, která umožní jejich odstranění renální filtrací.

Jako vhodné vysokomolekulární struktury se nejčastěji studují větvené, roubované, multiblokové a hvězdicovité vodorozpustné kopolymery, jejichž jednotlivé bloky mají mezi sebou biodegradovatelné spojky (viz obr. 2), které mohou být degradovány enzymaticky, hydrolyticky nebo reduktivně. Obdobné biodegradovatelné spojky se zároveň využívají i k navázání nízkomolekulárního léčiva (Chytil, Kostka, and Etrych 2017).

K syntéze vysokomolekulárních polymerních nanomateriálů se často používají tzv. telechelické kopolymery (Chytil, Kostka, and Etrych 2017), které mají reaktivní skupiny na obou koncích svého řetězce a jejichž prostřednictvím mohou reagovat s jinými molekulami. Podle počtu a typu jejich funkčních skupin je dělíme na semitelechelické (reaktivní skupina na jednom konci řetězce), heterotelechelické (dvě různé reaktivní skupiny na obou koncích řetězce) a homotelechelické (stejně reaktivní skupiny na obou koncích).

Větvené, roubované a multiblokové kopolymery na bázi PHPMA jsou příkladem vysokomolekulárních polymerů. Větvený kopolymer je tvořen lineárními řetězci PHPMA spojenými přes enzymaticky degradovatelné tetrapeptidové spojky GFLG a má molekulovou hmotnost 160 000 – 1 200 000 g/mol (Dvořák, Kopečková, and Kopeček 1999) podle stupně větvení. Po doručení léčiva do nádorových buněk dochází k jeho degradaci prostřednictvím lysozomálních enzymů, které jsou přítomny v těchto buňkách.

Roubované kopolymery jsou složeny ze semitelechelických lineárních PHPMA kopolymerů „naroubovaných“ na hlavní multivalentní řetězec kopolymeru přes enzymaticky (GFLG) nebo redukčně (S-S vazba) degradovatelné spojky (viz obr. 2). Jejich molekulová hmotnost je cca 90 000 – 120 000 g/mol (Etrych et al. 2008). Nevýhodou roubovaných a rozvětvených kopolymerů se ukázala jejich poměrně široká distribuce molárních hmotností a nesnadná reprodukovatelnost syntézy. Vývoj dalších forem vysokomolekulárních systémů se věnoval spíše multiblokovým nebo hvězdicovitým systémům.

Multiblokové PHPMA kopolymery jsou připraveny vzájemným propojením homotelechelických nebo heterotelechelických lineárních polymerů či kopolymerů přes enzymaticky, reduktivně nebo hydrolyticky degradovatelné spojky (Yang et al. 2011). Nevýhodou multiblokových kopolymerů je metoda jejich přípravy odpovídající polykondenzaci, což limituje jejich distribuci molárních hmotností na hodnoty okolo 2.

Výhodnými vysokomolekulárními nosiči léčiv se jeví i samouspořádávající se micelární struktury tvořené amfifilními kopolymery (Chytil, Kostka, and Etrych 2017).

### **2.2.1.1 Hvězdčité polymery**

Hvězdčité polymerní konjugáty jsou tvořeny navázáním lineárních polymerů na vícefunkční jádro, například na dendrimer. Struktura dendrimerů se obecně skládá ze tří složek; z iniciátorového jádra, vnitřní vrstvy složené z opakujících se jednotek, které jsou napojeny k jádru, a z externí vrstvy s funkčními skupinami, mezi které patří například hydroxylové nebo amino skupiny (Tomalia et. al 1985; Lapiens 2009). Mezi běžně dostupné dedrimery, které se používají k syntéze hvězdčitých polymerů, patří polyamidoaminový dendrimer (PAMAM) nebo polyestery na bázi 2,2-bis(hydroxymetyl)propionové kyseliny (bis-MPA).

Konkrétním příkladem hvězdčitých polymerů jsou polymerní konjugáty na bázi PHPMA, které mohou obsahovat dendrimerové jádro na bázi PAMAM. Na jádro jsou přes enzymaticky, reduktivně nebo hydrolyticky degradovatelnou spojku připojeny semitelechelické lineární kopolymery (Šírová et al. 2017; Kostka et al. 2020). Jiným příkladem je hvězdčitý polymer na bázi PHPMA s biodegradovatelným dendrimerovým jádrem na bázi bis-MPA, na které jsou navázány napřímo semitelechelické kopolymery (Kostka et al. 2020).

Na hvězdčitý polymerní konjugát složený z PAMAM dendrimerového jádra a kopolymerů PHPMA bylo při pokusu navázáno léčivo přes pH-senzitivní hydrazonovou vazbu. Konjugát po navázání léčiva doxorubicinu (Dox) zůstal při pH 7,4, které modelovalo prostředí krevního řečiště, v *in vitro* experimentu relativně stabilní a léčivo se uvolňovalo rychlostí do 10 % za den. Naopak při pH 5,0, které modeluje prostředí v lysozomech nádorových buněk, došlo k uvolnění kolem 75–90 % léčiva za den. To potvrdilo teorii o stabilitě konjugátu s navázaným léčivem při transportu v krevním řečišti a teorii o uvolnění léčiva až na

požadovaném cílovém místě. Při pokusu *in vivo* vykazoval konjugát zvýšenou akumulaci v nádorové tkáni, přičemž došlo k potlačení růstu modelového lymfomu EL4 a u 75 % myší došlo i k regresi tohoto nádorového onemocnění (Šírová et al. 2017).

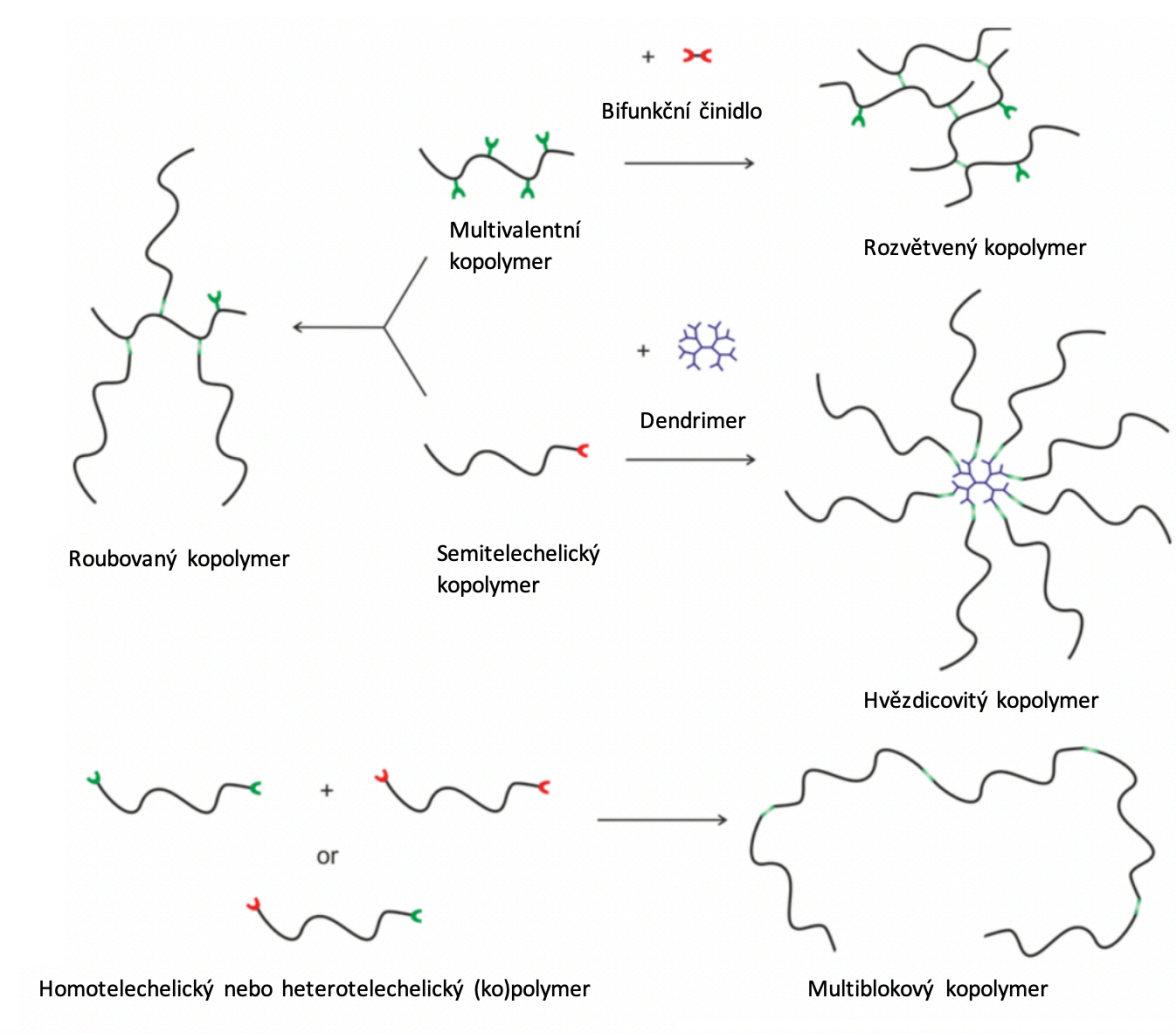
Hvězdicovitý polymerní konjugát složený z bis-MPA biodegradovatelného dendrimerového jádra a kopolymerů PHPMA s navázaným léčivem Dox podléhá hydrolytické degradaci, která byla ověřena *in vitro* v prostředí, které modelovalo lidskou plazmu. Výhodou tohoto konjugátu je jeho rozpad na menší fragmenty polymerů, které mohou lépe prostupovat nádorovou tkání, čímž dojde k vyšší nebo rovnoměrnější distribuci léčiva v nádorovém mikroprostředí. Při experimentální léčbě myšího lymfomu konjugát vykazoval velmi vysokou protinádorovou účinnost už při podání nízké dávky, 7,5 mg ekvivalentu Dox/kg (Kostka et al. 2020).

### **2.2.1.2 Micely**

Polymerní micelární systémy jsou tvořeny tzv. unimery neboli amfifilními kopolymerem, které se ve vodných prostředích samsopřádávají do nadmolekulárních micelárních struktur o rozměrech 10–100 nm. Supramolekulární strukturu je možné si představit jako hydrofobní jádro obklopené hydrofilními polymery. Příkladem je micela složená z  $\omega$ -metoxypoly(etylglycol)-b-(N-(2-benzoyloxypropyl)metacrylamidu) (PEG-HPMA-bz) o rozměrech okolo 60 nm, kde PEG tvoří hydrofilní blok a HPMA-Bz hydrofobní blok (Naksuriya et al. 2015).

Obecně může být léčivo zachyceno do hydrofobního jádra micely buď hydrofobními interakcemi nebo navázáno přes kovalentní vazbu na hydrofobní nebo hydrofilní část amfifilního kopolymeru. Tyto micelární nosiče mohou být z organismu vyloučeny renální filtrací v podobě unimerů po poklesu jejich koncentrace pod tzv. kritickou micelární koncentraci (Talelli et al. 2013; Naksuriya et al. 2015).

Příkladem může být micela na bázi PHPMA obsahující hydrofobní složky, cholesterolové zbytky, které jsou náhodně rozmístěné podél polymerního řetězce. Léčivo Dox bylo v experimentu navázáno přes hydrazonovou vazbu a jeho uvolňování kopírovalo uvolňování z výše zmíněného hvězdicovitého systému. Micelární systém vykazoval významně zvýšenou nádorovou akumulaci a došlo k uzdravení většiny myší nesoucí lymfom EL4 při dávce léčiva 10 mg ekvivalentu Dox/kg (Chytil et al. 2008).



Obr. 2: Schématické znázornění vysokomolekulárních polymerních nanomateriálů – upraveno (Chytil et al. 2017)



## 2.3 Pasivní akumulace a aktivní cílení polymerních nanomateriálů v nádorové tkáni

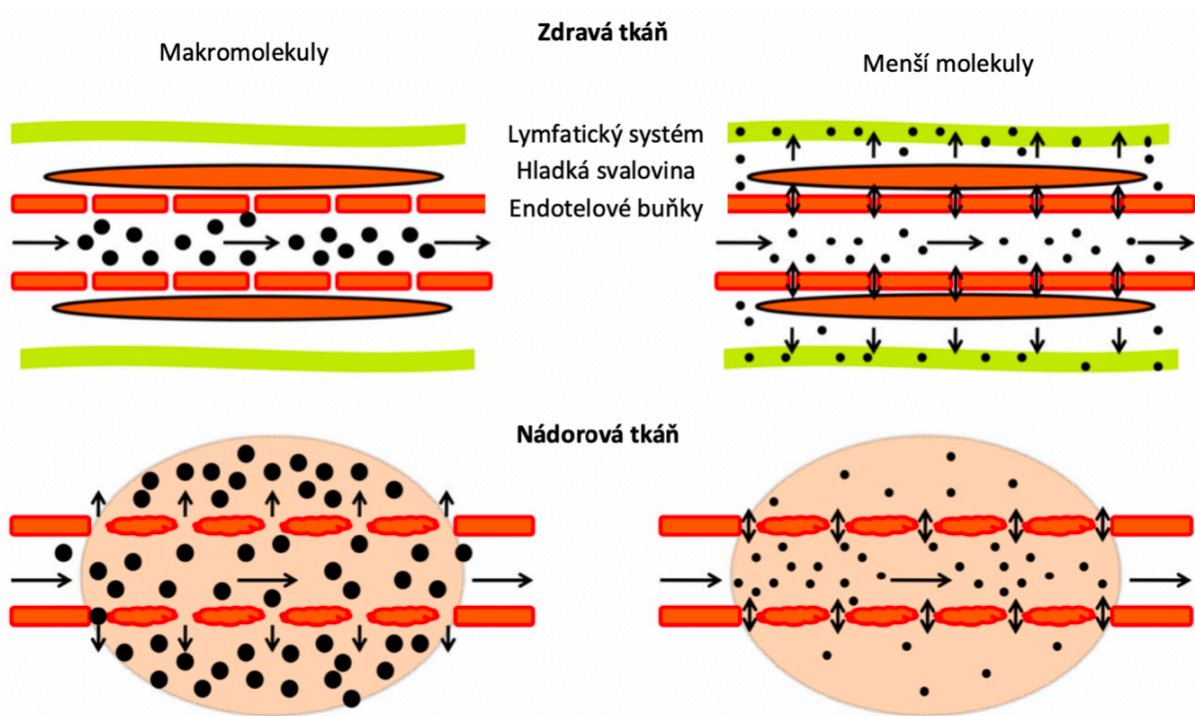
Nádorová tkáň se vyznačuje abnormalitami, které jsou dané zvýšenou vaskulární propustností, absencí nebo sníženou funkčností lymfatických cév, což ve svém důsledku vede k akumulaci a neefektivnímu odvádění vysokomolekulárních látek z nádorové oblasti. Této skutečnosti využívá EPR efekt v jehož důsledku dochází k pasivní akumulaci polymerních nanomateriálů v nádorové tkáni (Matsumura and Maeda 1986).

Na EPR efekt mají vliv vlastnosti polymerního nanomateriálu i vlastnosti nádorové tkáně. Pasivní akumulace nanomateriálu v nádorové tkáni je dána jeho velikostí. K akumulaci dochází u nanomateriálů s hydrodynamickým rozměrem nad cca 5 nm. Menší nanomateriály mají tendenci difundovat zpět do nádorové krevní cévy, čímž nedochází k jejich akumulaci (viz obr. 3) (Noguchi et al. 1998). Roli však hrají i další vlastnosti polymerního nanomateriálu, jeho celkový náboj a tvar, které mohou vést k prodloužení jeho transportu krevním řečištěm a tedy i k navýšení jeho záchytu v nádoru pomocí EPR efektu (viz kapitola 2.1).

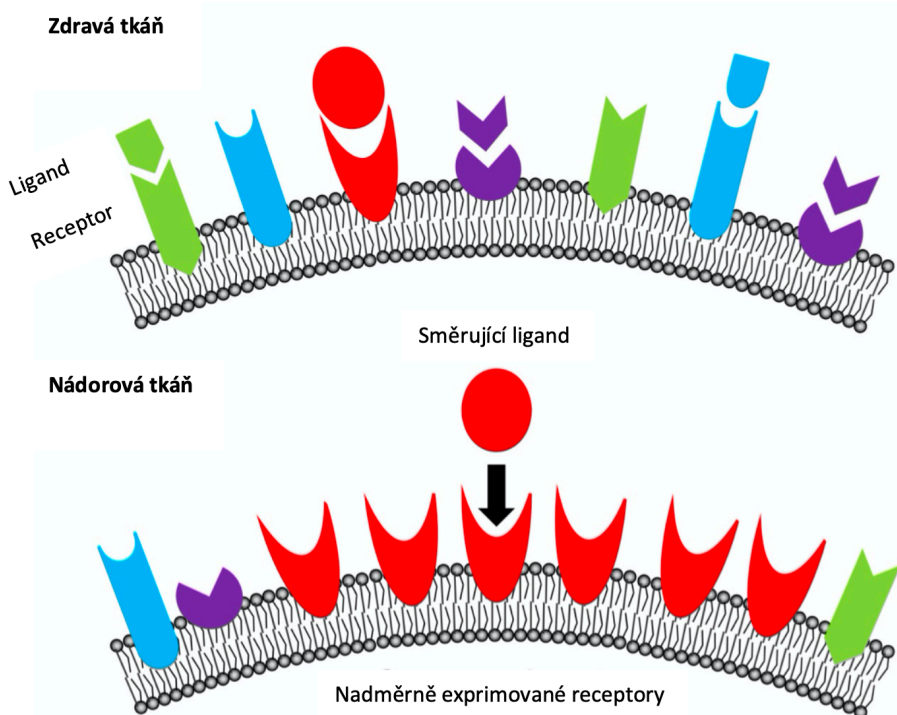
Nádorová tkáň, která je bohatá na krevní cévy, obvykle vykazuje vyšší účinky efektu EPR, zatímco v nádorech se zhoršeným průtokem krve je deponování léčiva sníženo. Příkladem může být rakovina ledvinových buněk u níž je tkáň hypervaskulární, čímž vykazuje zvýšený EPR efekt. Naopak rakovina prostaty, rakovina pankreatu a metastazující rakovina jater jsou hypovaskulární (Konno et al. 1984; Shojiro, Konno, and Maeda 1985), což vede ke sníženému průtoku krve a následně k nedostatečnému dodávání polymerních nosičů léčiv do nádorů a k neuspokojivým terapeutickým účinkům. Zvýšení dodání polymerních nosičů léčiv, a tedy zvýšení jejich pasivní akumulace se docílí za pomoci vaskulárních mediátorů, tj. například oxidu dusnatého (Islam et al. 2018).

Ke specifické dopravě polymerního nanomateriálu s navázaným léčivem do místa účinku se využívá aktivní cílení, se kterým u pevných nádorů vždy souběžně dochází i k pasivní akumulaci. K aktivnímu cílení se využívá směřující komponenta připojená k polymernímu nanomateriálu s vysokou afinitou k receptorům nacházejícím se v nádorové tkáni (viz obr. 4). Směřující komponenty mohou být monoklonální protilátky a jejich fragmenty, oligopeptidy nebo oligosacharidy. Specifické receptory, na které směřující komponenty cílí, by neměly být exprimovány ve velké míře ve tkáni zdravé (Adams et al.

2001; Gosk et al. 2008). Mezi využívané receptory patří například humánní epidermální receptor 2 (HER2) (Kirpotin, 2006) a receptor kyseliny listové (FR) (Parker et al 2005).



Obr. 3: Schématické znázornění rozdílů mezi zdravou a nádorovou tkání, v propustnosti molekul – upraveno (Li et al. 2017)



Obr. 4: Schématické znázornění rozdílů mezi zdravou a nádorovou tkání, v expresi receptorů – upraveno (Li et al. 2017)

## 2.4 Vazba a uvolnění léčiva z polymerního nosiče

Nízká specifita, toxicita pro zdravé tkáně a s tím spojené vedlejší účinky jsou nevýhodou protinádorových nízkomolekulárních léčiv, například Dox nebo paclitaxelu. U polymerních nosičů dosáhneme omezení nežádoucí toxicity a vyšší specifity neseného léčiva jeho navázáním s pomocí biodegradovatelné spojky na polymerní nanomateriál, čímž dojde k deaktivaci jeho účinků na organismus. Biodegradovatelná spojka umožňuje jeho uvolnění a aktivaci až na požadovaném místě účinku v nádorové tkáni nebo buňkách.

Při návrhu biodegradovatelných spojek pro kontrolované uvolnění léčiva se využívá znalostí fyziologických procesů v cílovém organismu a rozdílů mezi zdravou a nádorovou tkání. Biodegradovatelné spojky jsou navrhovány tak, aby léčivo zůstalo navázáno na polymerním nanomateriálu po dobu transportu a bylo z něj uvolněno až v cílovém místě. Jako perspektivní se ukazují spojky, které podléhají specifickému enzymatickému štěpení, chemické hydrolyze řízené hodnotou pH nebo redukční reakci (Pechar et al. 2000; Chytil et al. 2010).

### 2.4.1 Vazba přes redukčně senzitivní spojky

Glutathion (GSH) je tri-peptid glutamátu, cysteinu a glycinu, který se často vyskytuje v cytoplazmě, a je hlavním redukujícím ligandem v biochemických procesech. Jeho vyšší koncentrace v nádorových buňkách se využívá k vazbě léčiva přes redukčně senzitivní spojku na polymerní nanomateriál (Skrzydłowska 2005). V tomto případě je léčivo uvolňováno především v nádorových buňkách namísto v krevním řečišti či v buňkách zdravých. Často využívanou redukčně senzitivní spojkou je spojka disulfidová (Santra et al. 2011).

### 2.4.2 Vazba přes pH senzitivní spojky

Systém pH senzitivních spojek využívá rozdílů mezi fyziologickým pH krve (7,4), pH v nádorové tkáni (6,5 – 7,2), v endozomech (pH 5 – 6,5) a v lysozomech (pH 4,5 – 5) nádorových buněk. Změny pH v nádorovém mikroprostředí jsou spjaty s abnormalitami nádorové vaskularizace a změnami buněčného metabolismu nádorových buněk, které vedou

ke zvýšené produkci laktátu a CO<sub>2</sub> a ke vzniku hypoxických oblastí a oblastí se sníženým pH (Helmlinger et al. 2002).

Léčivo navázané na polymerní nanomateriál přes pH senzitivní spojku (vazba hydrazonová, vazba *cis*-akonylová), by mělo být během transportu polymerního nosiče v krvi vázané na dopravní systém a tedy neaktivní. V okamžiku kdy polymerní nosič dosáhne oblasti o sníženém pH, léčivo by mělo být uvolněno a aktivováno (Chytil et al. 2010; Ulbrich et al. 2003).

Jako příklad klinického použití zmíněných polymerních konjugátů je možné uvést následující příklad. V roce 2013 byla provedena léčba pacienta s rakovinou prostaty a metastázemi v plicích, pánvi a stehenní kosti. Léčba se skládala z protonové terapie, terapie polymerním konjugátem kopolymeru na bázi PHPMA s navázaným léčivem pirarubicinem přes hydrazonovou vazbu a byla doprovázena podáním isosorbid dinitrátu, za účelem uvolňování oxidu dusnatého s cílem navýšit EPR efekt a s ním spojenou akumulaci polymerního konjugátu. Už po třech měsících léčby bylo pozorováno zmenšení metastáz v plicích a po osmi měsících došlo k významné redukci metastáz v oblasti pánve a stehenní kosti. Po skončení léčby byla po dvaceti měsících provedena kontrola (začátkem roku 2015), jejímž výsledkem bylo vymizení metastáz. Nepotvrdil se ani jejich relaps (Dozono et al. 2016).

### 2.4.3 Vazba přes enzymaticky degradovatelné spojky

Potenciál pro využití enzymaticky senzitivních spojek v protinádorové terapii navázaných na polymerní nosiče, vytváří rozdílná exprese enzymů v nádorové tkáni a jejich nízký výskyt v krevním řečišti. Nejvíce studovanými enzymy jsou proteázy<sup>2</sup>, u kterých dochází ke zvýšené expresi v nádorové tkáni.

Převážně studovanými proteázami jsou katepsiny a matrix metaloproteinázy (MMP). K uvolnění léčiva v nádorových buňkách se využívají například peptidové spojky senzitivní na katepsiny, především na katepsin B. K němu se jako vhodná peptidová sekvence jeví GFLG (Pechar et al. 2000). MMP-senzitivní spojky pro vazbu léčiva jsou blíže rozebrány v kapitole 3.3.1.

---

<sup>2</sup> Proteázy katalyzují rozštěpení proteinů hydrolýzou peptidových vazeb.

Dalším příkladem použité proteázy je serinová proteáza plazmin, která hraje roli při invazi nádorových buněk do okolních tkání. Pro vazbu léčiva byla navrhnut spojka s dipeptidovou sekvencí GP (Manabe et al. 2013).

### **3 Protinádorová terapie s využitím matrix metaloproteináz**

V protinádorové terapii a diagnostice je možné využít poznatku, že u některých nádorových onemocnění dochází k navýšení exprese MMP. Tyto zvýšené hladiny MMP mají reálný potenciál být využity jako biomarkery pro diagnostiku a prognózu nádorového onemocnění. Zvýšená exprese MMP-2 a MMP-9 byla zachycena v tkáni rakoviny prsu u cca 83 % (MMP-2) a 78 % (MMP-9) pacientek a je zároveň dávána do souvislosti s pravděpodobností metastázování do lymfatických uzlin (Li et al. 2017). Rovněž u pacientek s rakovinou děložního čípku byla nalezena zvýšená exprese MMP-7 v porovnání se zdravými pacientkami (Zhu et al. 2018).

V oboru cílené dopravy léčiv se začalo v posledních dekáдах studovat využití interakce MMP s nanomateriály, která by mohla vést k cílené změně vlastností nanomateriálů s navázaným léčivem v nádorovém prostředí. Toto by mohlo aktivovat terapeutické účinky nanomateriálů přímo v nádorové tkáni a snížit jejich vedlejší účinky během cirkulace v organismu. Interakce nanomateriálu s MMP by mohla umožnit například řízené uvolňování léčiva nebo rozpad nanomateriálu na produkty se zvýšenou penetrací do nádorových buněk (viz níže).

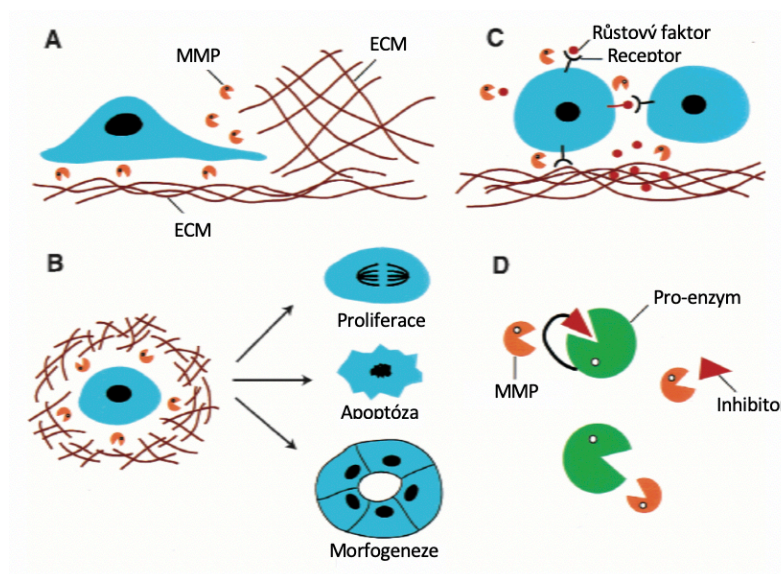
#### **3.1 Struktura a vlastnosti matrix metaloproteináz**

MMP jsou endopeptidázy závislé na iontech zinku a vápníku. Jejich funkcí je degradace extracelulární matrix (ECM) a modulace aktivity biologicky aktivních molekul, například růstových faktorů nebo receptorů růstových faktorů, jejich štěpením nebo uvolněním z ECM (viz obr. 5).

MMP lze rozdělit podle preference substrátu či podobnosti strukturních domén na podskupiny; kolagenázy, gelatinázy, stromelyzinázy, membránové matrix metaloproteinázy (MT-MMP). MMP mají tři základní domény; N-terminální propeptid, katalytickou doménu a C-terminální doménu.

Za udržení enzymu v inaktivní formě a později i za jeho aktivaci je zodpovědná N-terminální propeptidová doména. Hlavní roli zde hraje aminokyselina cystein, která prostřednictvím thiolové skupiny interaguje se zinkovým iontem a udržuje tak enzym v inaktivním stavu (Springman et al. 1990). Katalytická doména obsahuje ionty zinku a vápníku, kde ionty vápníku stabilizují tuto doménu (Dhanaraj et al. 1996). C-terminální doména slouží k protein-proteinové interakci (Gomis-Rüth et al. 1996). MMP mohou být z buněk vyplavovány v inaktivní formě, tedy ve formě tzv. pro-enzymu, nebo mohou být membránově-asociované (MT-MMP).

Za normálních fyziologických podmínek jsou MMP regulovány aktivací pro-enzymů nebo s pomocí specifických inhibitorů MMP (Nagase et al. 2002). Mezi inhibitory patří tkáňové inhibitory matrix metaloproteináz (TIMP) a  $\alpha$ 2-makroglobulin (Greene et al. 1996; Werb et al. 1974).



Obr. 5: Způsoby působení matrix metaloproteináz: (A) MMP mohou ovlivnit buněčnou migraci změnou buněk z adhezních na neadhezní a degradací ECM. (B) MMP mohou změnit mikroprostředí ECM, což vede k buněčné proliferaci, apoptóze nebo morfogenezi. (C) MMP mohou modulovat aktivitu BAL, jako jsou růstové faktory nebo receptory růstových faktorů, jejich štěpením nebo uvolněním z ECM. (D) MMP mohou změnit proteázovou aktivitu štěpením enzymů nebo jejich inhibitorů – upraveno (Vu and Werb, 2000).

## 3.2 Role matrix metaloproteináz v progresi nádorového onemocnění

Jak již bylo zmíněno výše, u nádorových onemocnění byla zaznamenána zvýšená exprese MMP a byla popsána jejich role při růstu pevných nádorů a jejich schopnosti metastázovat. MMP jsou produkovány buď přímo nádorovými buňkami (MMP-7) (Yoshimoto et al. 1993), nebo buňkami stromálními (MMP-2) (Sato 2004), které jsou v nádoru přítomné

Původně se předpokládalo, že působení MMP je omezeno především na metastázující proces. Postupně bylo prokázáno, že se MMP zapojují i do dalších procesů vývoje nádoru jako jsou regulace růstu, apoptóza, angiogeneze a maskování nádorových buněk před imunitním systémem.

### 3.2.1 Regulace růstu nádorových buněk

MMP mohou podporovat proliferaci nádorových buněk tím, že modulují aktivity růstových faktorů. Například inzulínu podobné růstové faktory (IGF) hrají roli při řízení růstu buněk. IGF spouští signální dráhy uvnitř buňky prostřednictvím vazby na příslušný receptor. Tato vazba může být inhibována tvorbou komplexu IGF s IGF vazebnými proteiny (IGFBP). MMP-7 v tomto případě slouží jako aktivátor IGF tím, že štěpením IGFBP uvolní IGF, který se naváže na příslušný receptor a spustí signální dráhy uvnitř buňky, které vedou k proliferaci buněk (Nakamura et al. 2005). Na podobném principu funguje MMP-3, která štěpením transmembránového proteinu heparin vázající epidermální růstový faktor (HB-EGF) uvolní rozpustnou formu HB-EGF z povrchu nádorových buněk (Suzuki et al. 1997; Ongusaha et al. 2004). MMP mohou také nepřímo regulovat růstové signály prostřednictvím integrinů<sup>3</sup> (Agrez et al. 1994).

### 3.2.2 Role MMP při regulaci apoptózy nádorových buněk

MMP umožňují přežití nádorovým buňkám zablokováním apoptózy, tj. programované buněčné smrti. MMP-7 snižuje citlivost nádorových buněk vůči Fas zprostředkované apoptóze tak, že štěpí Fas receptor na jejich povrchu. Tím se sníží jeho exprese na

---

<sup>3</sup> Povrchové buněčné receptory, které přenášejí signál mezi ECM a buňkami a ovlivňují tak buněčný cyklus, proliferaci a diferenciaci.

nádorových buňkách, čímž se sníží citlivost nádorových buněk na Fas ligand cytotoxických T-lymfocytů, které jeho prostřednictvím indukují buněčnou smrt dané buňky (Strand et al. 2004).

### 3.2.3 Role MMP při expanzi nádorových buněk

Nádorové onemocnění během svého růstu expanduje do okolních tkání a orgánů. K jeho růstu a expanzi je stěžejní angiogeneze<sup>4</sup>. K rozvoji angiogeneze napomáhají MMP, především MMP-2, MMP-9 a MMP-14, s pomocí degradace extracelulární matrix a zvýšením dostupnosti angiogenního vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) (Seandel et al. 2001; Devy et al. 2009; Webb et al. 2017).

S expanzí nádorových buněk úzce souvisí tvorba metastáz<sup>5</sup>. Nádorová buňka musí při tomto procesu projít z nádorové tkáně do krevních či lymfatických cév pochodem nazývaným intravazace. Pro tento proces jsou opět důležité MMP (Kim et al. 1998). Například MMP-2 štěpí a reguluje funkci glykoproteinu lamininu-5, který je jednou ze složek ECM. Nachází se v epitelové bazální membráně, kde váže epitelové buňky (Giannelli 1997; Carpenter et al. 2009). Rovněž MMP-3 a MMP-7, které štěpí transmembránový protein e-kadherin podílející se na udržování mezibuněčných spojů, mohou jeho štěpením na povrchu nádorových buněk narušit jeho funkci, která může vyústit v expanzi nádorových buněk (Noe et al. 2001).

### 3.2.4 Role MMP při „maskování“ nádorových buněk před imunitní odpovědí organismu

Buňky imunitního systému, především T-lymfocyty, přirození zabíječi, neutrofilů a makrofágy jsou schopny rozpoznat a eliminovat nádorové buňky. Nádorové buňky si však vyvinuly „obranu“, která je založená na jejich maskování před imunitním systémem. Role MMP produkovaných nádorem spočívá v tom, že potlačí proliferaci nebo diferenciaci buněk imunitního systému, aktivují jejich inhibitory a inhibují chemoatraktanty pro neutrofilů a makrofágy (Yu and Stamenkovic 2000; Boulay et al. 2001; Sheu et al. 2001).

---

<sup>4</sup> Proces, během něhož dochází k tvorbě nových krevních cév.

<sup>5</sup> Ložiska zhoubných nádorů. Nádorové buňky se přesunou z primárního místa vzniku nádorového onemocnění do okolních tkání či orgánů.



### 3.3 Využití matrix metaloproteináz v cílené dopravě s pomocí polymerních nosičů a při aktivaci léčiva vázaného na nosičích

Principem využití MMP v rámci cílené dopravy léčiv je aplikace MMP-senzitivní oligopeptidové spojky do polymerního nosiče buď jako štěpitelnou spojku mezi nosič a léčivo, nebo jako štěpitelnou spojku mezi částí nosiče, což umožní jeho degradaci na části vyloučitelné z organismu. Motiv štěpného místa proteinu pro proteázu se nachází mezi rezidui N-konce a C-konce proteinu. Štěpná místa pro proteázu jsou definována jako ...P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'..., kdy P1 a výše se nachází v reziduu N-konce a P1' a výše na reziduu C-konci proteinu. Štěpení proteázou probíhá mezi místy P1 a P1' (Schechter and Berger 1967). MMP na místě P1' preferují hydrofobní aminokyseliny a na místě P2' aminokyseliny, které jsou hydrofobní či bazické. Navíc MMP-2, MMP-3, MMP-9, MT1-MMP vyžadují aminokyseliny fenylalanin a tyrozin na pozici P1'. Na pozici P3' jsou preferovány v případě MMP-1, MMP-2 a MMP-9 aminokyseliny alanin, glycin a serin a pro MMP-7 a MT1-MMP metionin (Turk et al. 2001). Na pozici P1 je preferovanou aminokyselinou serin a na pozici P3 prolin, dále valin a izoleucin. Na pozici P2 jsou zvýhodňovány hydrofobní aminokyseliny (Turk et al. 2001).

Níže jsou shrnuty strategie užití MMP v protinádorové léčbě v rámci řízeného uvolňování a aktivace léčiva, odmaskování polymerního nosiče či jeho cílené degradace. Často se cílí na MMP-2 a MMP-9, které jsou exprimovány u mnoha lidských nádorových onemocněních. Patří sem například rakoviny prsu (Davies et al. 1993a), prostaty (Hamdy et al. 1994), tlustého střeva (Levy et al. 1991), vaječníků (Naylor et al. 1994), močového měchýře (Davies et al. 1993b) a žaludku (D'Errico et al. 1991). Pro tyto MMP byly použity oligopeptidové sekvence například GPLGIAGQ (Zhu, Kate, and Torchilin 2012), GPLGV (Lee et al. 2007), GPLGVRG (Li et al. 2013) a PVGLIG (Chau et al. 2006a).

#### 3.3.1 Uvolnění léčiva

Jak již bylo zmíněno, cílem využití polymerních nosičů léčiv je dopravit aktivní složku tak, aby byla během transportu neaktivní, vázaná na nosič a byla aktivována, tedy uvolněna, až na požadovaném místě v organismu. Z tohoto důvodu jsou při protinádorové léčbě upřednostňovány polymerní nosiče, které umožňují zvýšenou nádorovou akumulaci a

nádorovým prostředím řízené uvolňování léčiva. Jsou popsány tři způsoby, jak využít MMP k uvolnění léčiva v cílovém místě.

V prvním případě je léčivo navázáno přes MMP-senzitivní peptidovou spojku na polymerní nanomateriál. Peptidová spojka je štěpena v přítomnosti MMP v mikroprostředí nádoru. U konjugátu dextran-PVGLIG-metotrexát byla použita peptidová sekvence PVGLIG, která je štěpená MMP-2 a MMP-9 pro kontrolované uvolnění léčiva (Chau et al. 2006b).

Vzhledem k tomu, že MMP štěpí převážně daný substrát uprostřed řetězce aminokyselin, vzniká po rozštěpení peptidové spojky ve většině případů konjugát oligopeptid-léčivo s jednou až čtyřmi aminokyselinovými zbytky připojenými k léčivu. Proto je při designu tohoto systému nutné otestovat aktivitu uvolněného derivátu léčiva oproti volnému léčivu a prokázat, zda není modifikací aminokyselinami jeho aktivita snížena. Zbylé aminokyseliny totiž mohou účinnost léčiva snižovat, což se může projevit v nutnosti navýšit dávku polymerního nosiče s navázaným léčivem. Oligopeptidová sekvence, která zbyde na léčivu po štěpení MMP, může být navržena tak, že je dále štěpena dalšími enzymy přítomnými v nádorovém mikroprostředí (Kline et al. 2003; Chau et al. 2006a) na samotné původní léčivo.

Při designu tohoto typu polymerního nanomateriálu musí být brána v potaz substrátová specifita MMP, protože použitý oligopeptid by měl být rozpoznán pouze MMP, aby se zabránilo nespecifickému uvolnění léčiva jinými enzymy ve zdravých tkáních a nedocházelo k nežádoucím vedlejším účinkům (Chau et al. 2006b).

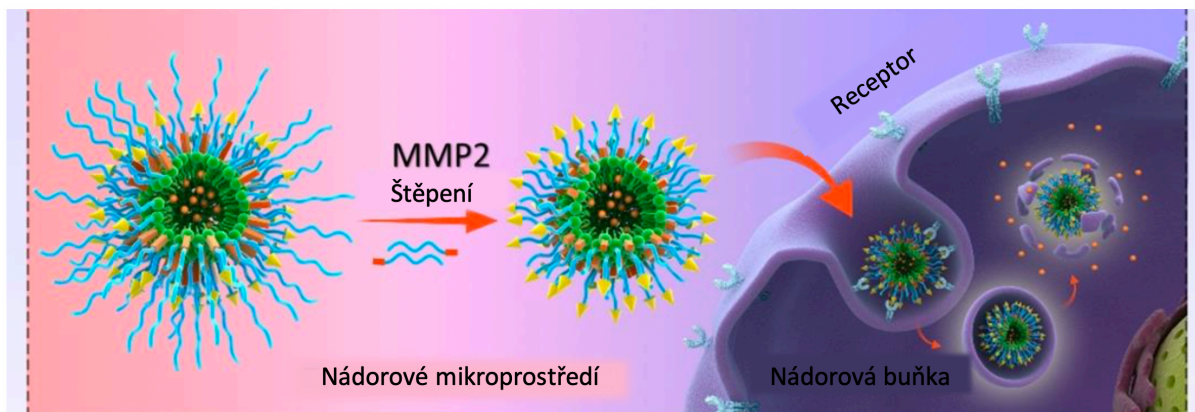
Při druhém způsobu uvolňování léčiva se využívá micel tvořených amfifilním kopolymerem s peptidovými spojkami mezi hydrofilními a hydrofobními částmi polymeru, které jsou v přítomnosti MMP rozštěpeny. K uvolnění léčiva nekovalentně vázaného v jádře micely by mělo dojít až specificky v nádoru, kde se po degradaci spojek micela rozpadne a léčivo se uvolní. Příkladem je micela mPEG(2kDa)-GPVGLIGK- $\alpha$ -TOS, která byla vytvořena z polymerních bloků metoxy-polyetylen glykolu a D- $\alpha$ -tokoferolu, mezi něž byla vložena MMP-senzitivní oligopeptidová spojka GPVGLIGK (Fang et al. 2016)

Třetí způsob uvolnění léčiva byl studován na lipozomech, ve kterých může být léčivo umístěno, buď ve vodné kapse, nebo v hydrofobní části lipozomální dvojvrstvy. K uvolnění léčiva se využila MMP-9-senzitivní lipopeptidová spojka, která byla štěpená za přítomnosti MMP. Následně došlo k narušení lipozomu a následnému uvolnění léčiva (Elegbede et al. 2008).

### 3.3.2 „Odmaskování“ polymerního nosiče

Polymerní nanomateriály, které nejsou biokompatibilní, mohou během transportu organizmem podléhat opsonizaci a následné fagocytóze buňkami RES. Rozpoznání těchto nanomateriálů, potažmo opsonizaci, lze snížit použitím vodorozpustných biokompatibilních polymerů, s jejichž pomocí se může modifikovat povrch nanomateriálu s cílem ho „zamaskovat“ a prodloužit tak i jeho dobu krevní cirkulace. Je-li nanomateriál potencionálně toxický, sníží se zároveň i jeho toxicita. Nejčastěji se pro „maskování“ používá kovalentně vázaný PEG (tzv. PEGylace). Nevýhodou tohoto „maskování“ je však následně snížená prostupnost polymerního nosiče do nádorových buněk poté, co je nanomateriál akumulován v nádorové tkáni (Zhu et al. 2010; Chaudhari et al. 2012). Jednou z možností, jak překonat nízkou prostupnost „maskovaného“ nanomateriálu, je navýšení rychlosti vstupu PEG–chráněného nanomateriálu s pomocí zavedení směřujících komponent pro receptory na nádorových buňkách nebo peptidů, které umožňují penetrovat přes buněčnou membránu (CPPs). V tomto případě je pro aktivní cílení možné využít velké množství receptorů. Problémem však může být exprese receptorů i na zdravých buňkách.

Příklad micelárního systému, který překonává uvedený problém, je micela, která byla složena ze tří polymerů: i) z MMP-2-senzitivního (PEG(5kDa)-GPLGIAGQ-PE) polymeru složeného z PEGu o molární hmotnosti 5 kDa, MMP-2-senzitivní oligopeptidové spojky GPLGIAGQ a fosfoetanolaminu (PE) ii) směřujícího polymeru (FA-PEG(2kDa)-PE) složeného z kyseliny listové (FA), PEGu o molární hmotnosti 2 kDa a polymeru PE; iii) a hlavního bloku zodpovědného za stabilitu tvořících se micel (PEG(2kDa)-PE) složeného z PEG o molární hmotnosti 2kDa a polymeru PE. V nádorové tkáni v přítomnosti MMP dochází k odstranění PEGu o molární hmotnosti 5 kDa a odhalení směřující komponenty, čímž se aktivuje směřování micely k nádorovým buňkám, které jí následně internalizují (viz obr. 6) (Yao et al. 2017).



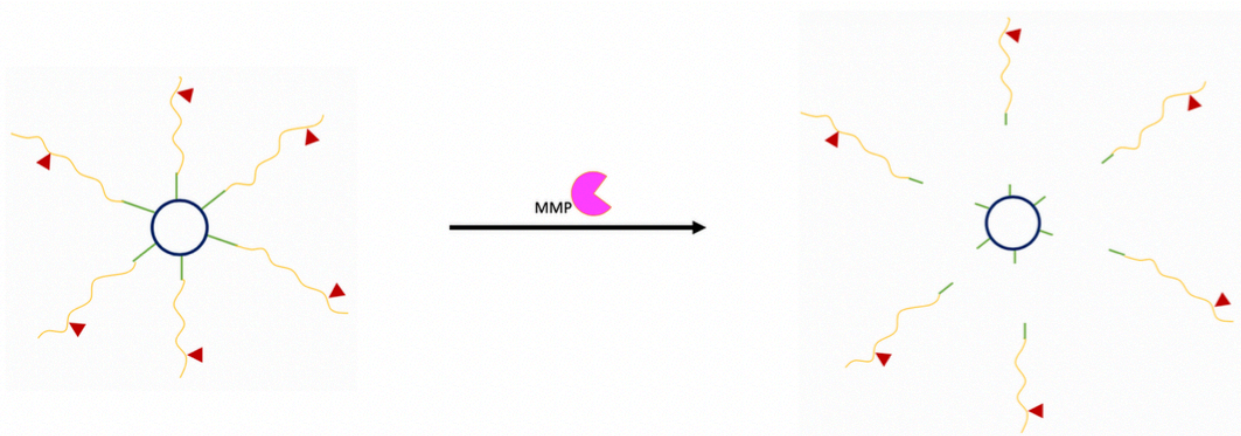
Obr. 6: Odmaskování směřující komponenty pomocí MMP-2 – upraveno (Yao et al. 2017).

Stejná strategie se dá využít i u CPPs ke zvýšení jejich specifity vůči nádorovým buňkám. Jak bylo zmíněno, CPPs jsou peptidy, které zrychlují vstup molekul přes plazmatickou membránu buňky. Příkladem CPPs je trans-aktivační transkripční aktivátor (TAT) odvozený ze struktury HIV viru (Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein 1988). TAT peptid a PEG byly využity například pro přípravu konjugátu PEG-GPLGIAGQ-TAT-Dox, kde GPLGIAGQ je MMP-2-senzitivní oligopeptid GPLGIAGQ (Tu and Zhu 2015). V přítomnosti MMP byl PEG odštěpen, čímž se došlo k odkrytí TAT peptidu.

PEG a MMP se zkoušely využít i při dopravě nukleových kyselin (NK), například pro dopravu malé interferující ribonukleové kyseliny (siRNA) nebo mikro ribonukleové kyseliny (miRNA) (Hsu et al. 2013). Negativní náboj NK však limituje jejich dopravu a snižuje jejich příjem nádorovou buňkou. Vytvořením komplexu NK a kationového polymeru, například polyetyleniminu (PEI) (Zhu et al. 2014), nebo kationového lipidu, například 2-dioleoyloxy-N,N-dimetyl-3-aminopropanu (DODMA) (Hsu et al. 2013), lze docílit jejich zvýšené internalizace nádorovou buňkou. Nevýhodou komplexu však je celkový pozitivní náboj, který může být pro organismus toxický a může zvyšovat opsonizaci komplexu (viz kapitola 2.1). S cílem obejít tento problém byla studována micela PEG-GPLGIAGQ-PEI-PE. Micela byla složena z PEGu, MMP-2-senzitivní oligopeptidové spojky GPLGIAGQ a polyetylenimin-1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamin (PEI-PE) (Zhu et al. 2014). PEG-GPLGIAGQ snížil pozitivní náboj PEI-PE, který byl opět navýšen po štěpení oligopeptidu GPLGIAGQ v přítomnosti MMP a odstranění PEGu.

### 3.3.3 Cílená degradace polymerního nosiče

Nanomateriály s větším hydrodynamickým rozměrem vykazují významně navýšený EPR efekt. Jejich výhoda, která spočívá ve vysoké akumulaci vázané na jejich velký rozměr, se stává v cílovém místě distribuce nevýhodou, protože jejich velikost jim znesnadňuje následný vstup do nádorové tkáně (Netti et al. 2000). Hlubší penetrace polymerního nosiče do nádorové tkáně lze docílit s pomocí navazující degradace s využitím MMP. V tomto případě by, po dosažení vysoké akumulace polymerního nosiče v nádorové oblasti, došlo v druhém kroku k degradaci nosiče s pomocí MMP, které rozštěpí oligopeptidové spojky v polymerním nosiči. Nosič se rozpadne na menší fragmenty, které lépe penetrují do nádorové masy. Například byl popsán hvězdicovitý polymerní nanomateriál složený z PAMAM dendrimerového jádra, na který byly přes MMP-2-senzitivní oligopeptidovou spojku PLGLAG navázány lineární polymery kyseliny hyaluronové. Léčivo bylo zachyceno uvnitř dendrimerového jádra. Hvězdicovitý polymer měl velikost přibližně 200 nm a v přítomnosti MMP byl degradován na produkt o velikosti cca 10 nm (Han et al. 2017). Jiným příkladem může být hvězdicovitý polymerní konjugát složený z PAMAM dendrimerového jádra, na který byly přes MMP-senzitivní oligopeptidovou spojku GPVGLIG navázány lineární PHPMA kopolymery. Ty by měly být po akumulaci konjugátu v nádorové tkáni v přítomnosti MMP odděleny od dendrimerového jádra a měly by hlouběji penetrovat (viz. obr 7).



Obr. 7: Schématické znázornění cílené degradace polymerního nosiče. Polymerní dopravní systém je složen z: dendrimerového jádra (tmavě-modře), MMP-senzitivní oligopeptidové spojky (zeleně), lineárního polymerního řetězce (žlutě) s navázaným léčivem (červeně) (zdroj: vlastní zpracování).

Byla popsána i opačná strategie cílené degradace nanomateriálu, která spočívala v následné agregaci a zvětšení velikosti nanomateriálu za účelem zvýšení jeho doby zadržet v nádorové tkáni. MMP-senzitivní micelární struktura, o hydrodynamickém rozměru přibližně 20 nm, byla složena z hydrofilního peptidového bloku (GPLGLAGGWGERDGS) a bloku hydrofobního polymeru. V přítomnosti MMP došlo k odštěpení části peptidového bloku a porušení rovnováhy mezi hydrofilním a hydrofobním blokem, která byla zodpovědná za micelární chování tohoto systému. Vzhledem k nárůstu hydrofobního charakteru materiálu po štěpení MMP, se micela přeorganizovala do formy agregátů o velikosti nad cca 200 nm. Její akumulace a retence v nádoru byla porovnána s micelou, která byla MMP-nesenzitivní, nedocházelo k jejímu štěpení, a tedy nedocházelo k reorganizaci do agregátů. MMP-senzitivní micela byla v nádorové tkáni zadržována až týden, naopak MMP-nesenzitivní micela byla z nádorové tkáně vyplavena během hodiny od podání (Chien et al. 2013).

## 4 Závěr

Vysokomolekulární polymerní dopravní systémy, které využívají MMP mají potenciál v překonávání bariér při léčbě nádorových onemocnění. Mohou umožnit kontrolované uvolňování léčiva, zvýšení specifity „maskovaných“ polymerních nosičů vůči nádorovým buňkám nebo hlubší penetraci polymerního nosiče nádorovou tkání po jeho degradaci. Těmito přístupy lze docílit snížení nežádoucích vedlejších účinků léčby a zvýšení její efektivity.

Vzhledem k významné roli MMP v progresi nádorových onemocnění a jejich zvýšené koncentraci ve většině nádorových onemocnění, je potřebné pokračovat v jejich studiu a zabývat se jejich dalším využitím při navrhování struktur polymerních nosičů léčiv.

Je možné předpokládat, že reálného využití by mohly nalézt polymerní nanomateriály, které budou aktivovány štěpením s pomocí MMP při uvolňování léčiva a při jejich cílené degradaci na degradační produkty. Degradační produkty tak získají lepší vlastnosti pro průchod nádorovou tkání nebo pro průnik do nádorových buněk. Léčba takovými systémy by mohla účinně zasáhnout velkou masu postižených buněk a tím zabránit relapsu nádorového onemocnění.

Jiným přístupem protinádorové terapie může být kombinace založená na inhibici MMP při současné léčbě léčivem navázaným na polymerní nosič, které je aktivovatelné v nádorovém prostředí. Tento postup by mohl vést jak k inhibici růstu nádoru cestou inhibice štěpení ECM, tak přímým efektem léčiva na nádorové buňky.

## 5 Seznam použité literatury

Abuchowski, A, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, and F. F. Davis. 1977. "Effect Of Covalent Attachment Of Polyethylene Glycol On Immunogenicity And Circulating Life Of Bovine Liver Catalase". Online. *The Journal Of Biological Chemistry* 252 (11): 3582-6.

<https://www.jbc.org/content/252/11/3582.long>.

Adams, G.P., R. Schier, A.M. McCall, H.H. Simmons, E.M. Horak, R.K. Alpaugh, J.D. Marks, and L.M. Weiner. 2001. "High Affinity Restricts The Localization And Tumor Penetration Of Single-Chain Fv Antibody Molecules". Online. *Cancer Research* 61 (12): 4750-5.

<https://cancerres.aacrjournals.org/content/61/12/4750>.

Agrez, M, A. Chen, R. I. Cone, R. Pytela, and D. Sheppard. 1994. "The Alpha V Beta 6 Integrin Promotes Proliferation Of Colon Carcinoma Cells Through A Unique Region Of The Beta 6 Cytoplasmic Domain". Online. *The Journal Of Cell Biology* 127 (2): 547-556.

<https://doi.org/10.1083/jcb.127.2.547>.

Altankov, G., V. Thom, T. Groth, K. Jankova, G. Jonsson, and M. Ulbricht. 2000. "Modulating The Biocompatibility Of Polymer Surfaces With Poly(Ethylene Glycol): Effect Of Fibronectin". Online. *Journal Of Biomedical Materials Research* 52 (1): 219-230.

[https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200010\)52:1<219::AID-JBM28>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200010)52:1<219::AID-JBM28>3.0.CO;2-F)

Bader, R. A., A. L. Silvers, and N. Zhan. 2011. "Polysialic Acid-Based Micelles For Encapsulation Of Hydrophobic Drugs". Online. *Biomacromolecules* 12 (2): 314-320.

<https://doi.org/10.1021/bm1008603>.

Boulay, A., R. Masson, M. P. Chenard, M. El Fahime, L. Cassard, C. Sautès-Fridman, P. Basset, and M. C. Rio. 2001. "High Cancer Cell Death In Syngeneic Tumors Developed In Host Mice Deficient For The Stromelysin-3 Matrix Metalloproteinase". Online. *Cancer Research* 61 (5): 2189-2193. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11280785>.



Carpenter, P. M., A. V. Dao, Z. S. Arain, M. K. Chang, H. P. Nguyen, S. Arain, J. Wang-Rodriguez, S.-Y. Kwon, and S. P. Wilczynski. 2009. "Motility Induction In Breast Carcinoma By Mammary Epithelial Laminin 332 (Laminin 5)". Online. *Molecular Cancer Research* 7 (4): 462-475. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0148>.

Couffin-Hoarau, A. C., A. M. Aubertin, M. Boustta, S. Schmidt, J. A. Fehrentz, J. Martinez, and M. Vert. 2009. "Peptide-Poly(L-Lysine Citramide) Conjugates And Their In Vitro Anti-Hiv Behavior". Online. *Biomacromolecules* 10 (4): 865-876. <https://doi.org/10.1021/bm801376v>.

Davies, B, D. W. Miles, L. C. Happerfield, M. S. Naylor, L. G. Bobrow, R. D. Rubens, and F. R. Balkwill. 1993a. "Activity Of Type Iv Collagenases In Benign And Malignant Breast Disease". Online. *British Journal Of Cancer* 67 (5): 1126-1131. <https://doi.org/10.1038/bjc.1993.207>.

Davies, B., J. Waxman, H. Wasan, P. Abel, G. Williams, T. Krausz, D. Neal, D. Thomas, A. Hanby, and F. Balkwill. 1993b. "Levels Of Matrix Metalloproteases In Bladder Cancer Correlate With Tumor Grade And Invasion". Online. *Cancer Research* 53 (22): 5365-5369. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/53/22/5365.long>.

D'Errico, A., S. Garbisa, L. A. Liotta, V. Castronovo, W. G. Stetler-Stevenson, and W. F. Grigioni. 1991. "Augmentation Of Type Iv Collagenase, Laminin Receptor, And Ki67 Proliferation Antigen Associated With Human Colon, Gastric, And Breast Carcinoma Progression". Online. *Cancer Research* 4 (2): 239-246. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1646457/>.

Devy, L., L. Huang, L. Naa, N. Yanamandra, H. Pieters, N. Frans, E. Chang, et al. 2009. "Selective Inhibition Of Matrix Metalloproteinase-14 Blocks Tumor Growth, Invasion, And Angiogenesis". Online. *Cancer Research* 69 (4): 1517-1526. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3255>.

Dhanaraj, V., Q. Z. Ye, L. L. Johnson, D. J. Hupe, D. F. Ortwine, J. B. Dunbar Jr, J. R. Rubin, A. Pavlovsky, C. Humblet, and T. L. Blundell. 1996. "X-Ray Structure Of A Hydroxamate Inhibitor

Complex Of Stromelysin Catalytic Domain And Its Comparison With Members Of The Zinc Metalloproteinase Superfamily". Online. *Structure* 4 (4): 375-386.  
[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00043-3).

Dozono, H., S. Yanazume, H. Nakamura, T. Etrych, P. Chytil, K. Ulbrich, J. Fang, et al. 2016. "Hpma Copolymer-Conjugated Pirarubicin In Multimodal Treatment Of A Patient With Stage Iv Prostate Cancer And Extensive Lung And Bone Metastases". Online. *Targeted Oncology* 11 (1): 101-106. <https://doi.org/10.1007/s11523-015-0379-4>.

Dvořák, M., P. Kopečková, and J. Kopeček. 1999. "High-Molecular Weight Hpma Copolymer–Adriamycin Conjugates". Online. *Journal Of Controlled Release* 60 (2-3): 321-332.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00087-5).

Elegbede, A. I., J. Banerjee, A. J. Hanson, S. Tobwala, B. Ganguli, R. Wang, X. Lu, D. K. Srivastava, and S. Mallik. 2008. "Mechanistic Studies Of The Triggered Release Of Liposomal Contents By Matrix Metalloproteinase-9". Online. *Journal Of The American Chemical Society* 130 (32): 10633-10642. <https://doi.org/10.1021/ja801548g>.

Etrych, T., P. Chytil, T. Mrkvan, M. Šířová, B. Říhová, and K. Ulbrich. 2008. "Conjugates Of Doxorubicin With Graft Hpma Copolymers For Passive Tumor Targeting". Online. *Journal Of Controlled Release* 132 (3): 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.04.017>.

Etrych, T., L. Kovář, J. Strohalm, P. Chytil, B. Říhová, and K. Ulbrich. 2011. "Biodegradable Star Hpma Polymer–Drug Conjugates: Biodegradability, Distribution And Anti-Tumor Efficacy". Online. *Journal Of Controlled Release* 154 (3): 241-248.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.015>.

Fang, X., X. Zhang, X. Wang, W. Zhong, X. Ren, and X. Sha. 2016. "Matrix Metalloproteinases-2/9-Sensitive Peptide-Conjugated Polymer Micelles For Site-Specific Release Of Drugs And Enhancing Tumor Accumulation: Preparation And In Vitro And In Vivo Evaluation". Online. *International Journal Of Nanomedicine* 11: 1643–1661.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S101030>.

Frankel, A. D., and C. O. Pabo. 1988. "Cellular Uptake Of The Tat Protein From Human Immunodeficiency Virus". Online. *Cell* 55 (6): 1189-1193. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90263-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90263-2).

Giannelli, G. 1997. "Induction Of Cell Migration By Matrix Metalloprotease-2 Cleavage Of Laminin-5". Online. *Science* 277 (5323): 225-228. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.225>.

Gomis-Rüth, F.X., U. Gohlke, M. Betz, V. Knäuper, G. Murphy, C. López-Otín, and W. Bode. 1996. "The Helping Hand Of Collagenase-3 (Mmp-13): 2.7 Å Crystal Structure Of Its C-Terminal Haemopexin-Like Domain". Online. *Journal Of Molecular Biology* 264 (3): 556-566. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0661>.

Gosk, S., T. Moos, C. a Gottstein, and G. Bendas. 2008. "Vcam-1 Directed Immunoliposomes Selectively Target Tumor Vasculature In Vivo". Online. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes* 1778 (4): 854-863. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.12.021>.

Greene, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen, and Y. E. Shi. 1996. "Molecular Cloning And Characterization Of Human Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase 4". Online. *Journal Of Biological Chemistry* 271 (48): 30375-30380. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30375>.

Green, M., and P. M. Loewenstein. 1988. "Autonomous Functional Domains Of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein". Online. *Cell* 55 (6): 1179-1188. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0).

Greenwald, R. B., A. Pendri, and D. Bolikal. 1995. "Highly Water Soluble Taxol Derivatives: 7-Polyethylene Glycol Carbamates And Carbonates". Online. *The Journal Of Organic Chemistry* 60 (2): 331-336. <https://doi.org/10.1021/jo00107a010>.

Gref, R., M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, and R.H Müller. 2000. “‘Stealth’ Corona-Core Nanoparticles Surface Modified By Polyethylene Glycol (Peg): Influences Of The Corona (Peg Chain Length And Surface Density) And Of The Core Composition On Phagocytic Uptake And Plasma Protein Adsorption”. Online. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces* 18 (3-4): 301-313. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00156-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00156-3).

Hamdy, F. C., E. J. Fadlon, D. Cottam, J. Lawry, W. Thurrell, P. B. Silcocks, J. B. Anderson, J. L. Williams, and R. C. Rees. 1994. “Matrix Metalloproteinase 9 Expression In Primary Human Prostatic Adenocarcinoma And Benign Prostatic Hyperplasia”. Online. *British Journal Of Cancer* 69 (1): 177-182. <https://doi.org/10.1038/bjc.1994.30>.

Han, M., M-Y. Huang-Fu, W-W.Guo, N-N. Guo, J. Chen, H-N.Liu, Z-Q. Xie, M-T. Lin, Q-C. Wei, and J-Q. Gao. 2017. “Mmp-2-Sensitive Ha End-Conjugated Poly(Amidoamine) Dendrimers Via Click Reaction To Enhance Drug Penetration Into Solid Tumor”. Online. *Acs Applied Materials & Interfaces* 9 (49): 42459-42470. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b10098>.

He, C., Y. Hu, L. Yin, C. Tang, and C. Yin. 2010. “Effects Of Particle Size And Surface Charge On Cellular Uptake And Biodistribution Of Polymeric Nanoparticles”. Online. *Biomaterials* 31 (13): 3657-3666. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065>.

Helmlinger, G., A. Sckell, M. Dellian, N. S. Forbes, and R. K. Jain. 2002. “Acid Production In Glycolysis-Impaired Tumors Provides New Insights Into Tumor Metabolism”. Online. *Clin Cancer Research* 8 (4): 1284–1291. <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/8/4/1284.long>.

Hsu, S., B. Yu, X. Wang, Y. Lu, C. R. Schmidt, R. J. Lee, L. J. Lee, S. T. Jacob, and K. Ghoshal. 2013. “Cationic Lipid Nanoparticles For Therapeutic Delivery Of Sirna And Mirna To Murine Liver Tumor”. Online. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology And Medicine* 9 (8): 1169-1180. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.05.007>.

Chaudhari, K. R., M. Ukawala, A. S. Manjappa, A. Kumar, P. K. Mundada, A. K. Mishra, R. Mathur, J. Mönkkönen, and R. S. R. Murthy. 2012. "Opsonization, Biodistribution, Cellular Uptake And Apoptosis Study Of Pegylated PbcA Nanoparticle As Potential Drug Delivery Carrier". Online. *Pharmaceutical Research* 29 (1): 53-68. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0510-x>.

Chau, Y., N. M. Dang, F. E. Tan, and R. Langer. 2006a. "Investigation Of Targeting Mechanism Of New Dextran-Peptide-Methotrexate Conjugates Using Biodistribution Study In Matrix-Metalloproteinase-Overexpressing Tumor Xenograft Model". Online. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 95 (3): 542-551. <https://doi.org/10.1002/jps.20548>.

Chau, Y., R. F. Padera, N. M. Dang, and R. Langer. 2006b. "Antitumor Efficacy Of A Novel Polymer-Peptide-Drug Conjugate In Human Tumor Xenograft Models". Online. *International Journal Of Cancer* 118 (6): 1519-1526. <https://doi.org/10.1002/ijc.21495>.

Chen, L., J. D. Simpson, A.V. Fuchs, B. E. Rolfe, and K. J. Thurecht. 2017. "Effects Of Surface Charge Of Hyperbranched Polymers On Cytotoxicity, Dynamic Cellular Uptake And Localization, Hemotoxicity, And Pharmacokinetics In Mice". Online. *Molecular Pharmaceutics* 14 (12): 4485-4497. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00611>.

Chien, M. P., A. S. Carlini, D. Hu, C. V. Barback, A. M. Rush, D. J. Hall, G. Orr, and N. C. Gianneschi. 2013. "Enzyme-Directed Assembly Of Nanoparticles In Tumors Monitored By In Vivo Whole Animal Imaging And Ex Vivo Super-Resolution Fluorescence Imaging". Online. *Journal Of The American Chemical Society* 135 (50): 18710-18713. <https://doi.org/10.1021/ja408182p>.

Chytil, P., T. Etrych, J. Kříž, V. Šubr, and K. Ulbrich. 2010. "N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide-Based Polymer Conjugates With Ph-Controlled Activation Of Doxorubicin For Cell-Specific Or Passive Tumour Targeting. Synthesis By Raft Polymerisation And Physicochemical Characterisation". Online. *European Journal Of Pharmaceutical Sciences* 41 (3-4): 473-482. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.003>.

Chytil, P., T. Etrych, Č. Koňák, M. Šírová, T. Mrkvan, J. Bouček, B. Říhová, and K. Ulbrich. 2008. "New Hpmc Copolymer-Based Drug Carriers With Covalently Bound Hydrophobic Substituents For Solid Tumour Targeting". Online. *Journal Of Controlled Release* 127 (2): 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.01.007>.

Chytil, P., L. Kostka, and T. Etrych. 2017. "Structural Design And Synthesis Of Polymer Prodrugs". Online. In *Polymers For Biomedicine*, 2017 ed., 391-420. Hoboken, NJ, USA: John Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118967904.ch13>.

Islam, W., J. Fang, T. Imamura, T. Etrych, V. Subr, K. Ulbrich, and H. Maeda. 2018. "Augmentation Of The Enhanced Permeability And Retention Effect With Nitric Oxide-Generating Agents Improves The Therapeutic Effects Of Nanomedicines". Online. *Molecular Cancer Therapeutics* 17 (12): 2643-2653. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0696>.

Kim, J., W. Yu, K. Kovalski, and L. Ossowski. 1998. "Requirement For Specific Proteases In Cancer Cell Intravasation As Revealed By A Novel Semiquantitative Pcr-Based Assay". Online. *Cell* 94 (3): 353-362. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81478-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81478-6).

Kirpotin, D. B., D. C. Drummond, Y. Shao, M. R. Shalaby, K. Hong, U. B. Nielsen, J. D. Marks, C. C. Benz, and J. W. Park. 2006. "Antibody Targeting Of Long-Circulating Lipidic Nanoparticles Does Not Increase Tumor Localization But Does Increase Internalization In Animal Models". Online. *Cancer Research* 66 (13): 6732-6740. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4199>.

Kline, T., M. Y. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. G. Cervený, and P. D. Senter. 2003. "Novel Antitumor Prodrugs Designed For Activation By Matrix Metalloproteinases-2 And -9". Online. *Molecular Pharmaceutics* 1 (1): 9-22. <https://doi.org/10.1021/mp0340183>.

Konno, T., H. Maeda, K. Iwai, S. Maki, S. Tashiro, S. Tashiro, M. Uchida, and Y. Miyauchi. 1984. "Selective Targeting Of Anti-Cancer Drug And Simultaneous Image Enhancement In Solid Tumors By Arterially Administered Lipid Contrast Medium". Online. *Cancer* 54 (11): 2367-74. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19841201\)54:11<2367::aid-cncr2820541111>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19841201)54:11<2367::aid-cncr2820541111>3.0.co;2-f)

Kostka, L., L. Kotrchová, V. Šubr, A. Libánská, C. A. Ferreira, I. Malátová, H. J. Lee, et al. 2020. "Hpma-Based Star Polymer Biomaterials With Tuneable Structure And Biodegradability Tailored For Advanced Drug Delivery To Solid Tumours". Online. *Biomaterials* 235. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119728>.

Lapienis, G. 2009. "Functionalized Star-Shaped Polymers Having PEO And/Or Polyglycidyl Arms And Their Properties". Online. *Polymer* 50 (1): 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.10.034>.

Lee, G. Y., K. Park, S. Y. Kim, and Y. Byun. 2007. "Mmps-Specific Pegylated Peptide–Dox Conjugate Micelles That Can Contain Free Doxorubicin". Online. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics* 67 (3): 646-654. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.03.023>.

Levy, A. T., V. Cioce, M. E. Sobel, S. Garbisa, W. F. Grigioni, L. A. Liotta, and W. G. Stetler-Stevenson. 1991. "Increased Expression Of The Mr 72,000 Type Iv Collagenase In Human Colonic Adenocarcinoma". Online. *Cancer Research* 51 (1): 439-444. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/51/1/439>.

Li, H., Z. Qiu, F. Li, and C. Wang. 2017. "The Relationship Between Mmp-2 And Mmp-9 Expression Levels With Breast Cancer Incidence And Prognosis". Online. *Oncology Letters* 14 (5): 5865–5870. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6924>.

Li, J., Z. Ge, and S. Liu. 2013. "Peg-Sheddable Polyplex Micelles As Smart Gene Carriers Based On Mmp-Cleavable Peptide-Linked Block Copolymers". Online. *Chemical Communications* 49 (62). <https://doi.org/10.1039/c3cc43576h>.

Matsumura, Y., and H. Maeda. 1986. "A New Concept For Macromolecular Therapeutics In Cancer Chemotherapy: Mechanism Of Tumorotropic Accumulation Of Proteins And The Antitumor Agent Smancs". Online. *Cancer Research*, no. 46: 6387-6392.

[https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/46/12\\_Part\\_1/6387.full.pdf](https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/46/12_Part_1/6387.full.pdf).

Manabe, S., H. Machida, Y. Aihara, M. Yasunaga, Y. Ito, and Y. Matsumura. 2013.

"Development Of A Diketopiperazine-Forming Dipeptidyl Gly-Pro Spacer For Preparation Of An Antibody-Drug Conjugate". Online. *Medchemcomm* 4 (5): 792-796.

<https://doi.org/10.1039/c3md00075c>.

Müller, R. H., K. H. Wallis, S. D. Tröster, and J. Kreuter. 1992. "In Vitro Characterization Of Poly(Methyl-Methacrylate) Nanoparticles And Correlation To Their In Vivo Fate". Online.

*Journal Of Controlled Release* 20 (3): 237-246. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(92\)90126-C](https://doi.org/10.1016/0168-3659(92)90126-C).

Nagase, H., J. J. Enghild, K. Suzuki, and G. Salvesen. 2002. "Stepwise Activation Mechanisms Of The Precursor Of Matrix Metalloproteinase 3 (Stromelysin) By Proteinases And (4-Aminophenyl)Mercuric Acetate". Online. *Biochemistry* 29 (24): 5783-5789.

<https://doi.org/10.1021/bi00476a020>.

Nakamura, M., S. Miyamoto, H. Maeda, G. Ishii, T. Hasebe, T. Chiba, M. Asaka, and A. Ochiai. 2005. "Matrix Metalloproteinase-7 Degrades All Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins And Facilitates Insulin-Like Growth Factor Bioavailability". Online. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 333 (3): 1011-1016.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.010>.

Naksuriya, O., Y. Shi, C. F. van Nostrum, S. Anuchapreeda, W.E. Hennink, and S. Okonogi.

2015. "Hpma-Based Polymeric Micelles For Curcumin Solubilization And Inhibition Of Cancer Cell Growth". Online. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics* 94: 501-

512. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.010>.



Naylor, M. S., G. W. Stamp, B. D. Davies, and F. R. Balkwill. 1994. "Expression And Activity Of Mmps And Their Regulators In Ovarian Cancer". Online. *International Journal Of Cancer* 58 (1): 50-56. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910580110>.

Netti, P. A., D. A. Berk, M. A. Swartz, A. J. Grodzinsky, and R. K. Jain. 2000. "Role Of Extracellular Matrix Assembly In Interstitial Transport In Solid Tumors". Online. *Cancer Research* 60 (9): 2497-2503. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/60/9/2497.long>.

Noe, V., B. Fingleton, K. Jacobs, H. C. Crawford, S. Vermeulen, W. Steelant, E. Bruyneel, L. M. Matrisian, and M. Mareel. 2001. "Release Of An Invasion Promoter E-Cadherin Fragment By Matrilysin And Stromelysin-1". Online. *Journal Of Cell Science* 114: 111-118. <https://jcs.biologists.org/content/114/1/111.long>.

Noguchi, Y., J. Wu, R. Duncan, J. Strohalm, K. Ulbrich, T. Akaike, and H. Maeda. 1998. "Early Phase Tumor Accumulation Of Macromolecules: A Great Difference In Clearance Rate Between Tumor And Normal Tissues". Online. *Jpn. J. Cancer Res.* 89 (3): 307-314. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5921799/pdf/CAS-89-307.pdf>.

Ohlson, M., J. Sörensson, and B. Haraldsson. 2000. "Glomerular Size And Charge Selectivity In The Rat As Revealed By Fitc-Ficoll And Albumin". Online. *American Journal Of Physiology-Renal Physiology* 279 (1): F84-F91. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.1.F84>.

Ongusaha, P. P., J. C. Kwak, A. J. Zwible, S. Macip, S. Higashiyama, N. Taniguchi, L. Fang, and S. W. Lee. 2004. "Hb-Egf Is A Potent Inducer Of Tumor Growth And Angiogenesis". Online. *Cancer Research* 64 (15): 5283-5290. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0925>.

Parker, N., M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low, and C. P. Leamon. 2005. "Folate Receptor Expression In Carcinomas And Normal Tissues Determined By A Quantitative Radioligand Binding Assay". Online. *Analytical Biochemistry* 338 (2): 284-293. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.026>.

Pechar, M., A. Braunová, K. Ulbrich, M. Jelínková, and B. Ríhová. 2016. "Poly(Ethylene Glycol)-Doxorubicin Conjugates With Ph-Controlled Activation". Online. *Journal Of Bioactive And Compatible Polymers* 20 (4): 319-341. <https://doi.org/10.1177/0883911505055161>.

Pechar, M., K. Ulbrich, V. Šubr, L. W. Seymour, and E. H. Schacht. 2000. "Poly(Ethylene Glycol) Multiblock Copolymer As A Carrier Of Anti-Cancer Drug Doxorubicin". Online. *Bioconjugate Chemistry* 11 (2): 131-139. <https://doi.org/10.1021/bc990092l>.

Rennke, H. G., and M. A. Venkatachalam. 1979. "Glomerular Permeability Of Macromolecules. Effect Of Molecular Configuration On The Fractional Clearance Of Uncharged Dextran And Neutral Horseradish Peroxidase In The Rat". Online. *Journal Of Clinical Investigation* 63 (4): 713-717. <https://doi.org/10.1172/JCI109354>.

Santra, S., C. Kaittanis, O. J. Santiesteban, and J. M. Perez. 2011. "Cell-Specific, Activatable, And Theranostic Prodrug For Dual-Targeted Cancer Imaging And Therapy". Online. *Journal Of The American Chemical Society* 133 (41): 16680-16688. <https://doi.org/10.1021/ja207463b>.

Sato, T. 2004. "Tumor–Stromal Cell Contact Promotes Invasion Of Human Uterine Cervical Carcinoma Cells By Augmenting The Expression And Activation Of Stromal Matrix Metalloproteinases". Online. *Gynecologic Oncology* 92 (1): 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.09.012>.

Seandel, M., K. Noack-Kunnmann, D. Zhu, R. T. Aimes, and J. P. Quigley. 2001. "Growth Factor–Induced Angiogenesis In Vivo Requires Specific Cleavage Of Fibrillar Type I Collagen". Online. *Blood* 97 (8): 2323-2332. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.8.2323>.

Sedlacek, O., B. D. Monnery, J. Mattova, J. Kucka, J. Panek, Ol. Janouskova, A. Hocherl, et al. 2017. "Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) Conjugates With Doxorubicin For Cancer Therapy: In Vitro And In Vivo Evaluation And Direct Comparison To Poly[N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide] Analogues". Online. *Biomaterials* 146: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.003>.

Sheu, B. C., S. M. Hsu, H. N. Ho, H. C. Lien, S. C. Huang, and R. H. Lin. 2001. "A Novel Role Of Metalloproteinase In Cancer-Mediated Immunosuppression". Online. *Cancer Research* 61 (1): 237-242. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11196168>.

Shojiro, S., T. Konno, and H. Maeda. 1985. "Image Enhancement In Computerized Tomography For Sensitive Diagnosis Of Liver Cancer And Semiquantitation Of Tumor Selective Drug Targeting With Oily Contrast Medium". Online. *Cancer* 56 (4): 751-757. <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-0142%2819850815%2956%3A4%3C751%3A%3AAID-CNCR2820560409%3E3.0.CO%3B2-Y>.

Schechter, I., and A. Berger. 1967. "On The Size Of The Active Site In Proteases. I. Papain". Online. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 27 (2): 157-162. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(67\)80055-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(67)80055-X).

Skrzydłewska, E. 2005. "Lipid Peroxidation And Antioxidant Status In Colorectal Cancer". Online. *World Journal Of Gastroenterology* 11 (3): 403-406. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i3.403>.

Springman, E. B., E. L. Angleton, H. Birkedal-Hansen, and H. E. Van Wart. 1990. "Multiple Modes Of Activation Of Latent Human Fibroblast Collagenase: Evidence For The Role Of A Cys73 Active-Site Zinc Complex In Latency And A "Cysteine Switch" Mechanism For Activation". Online. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 87 (1): 364-368. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.1.364>.

Strand, S., P. Vollmer, L. van den Abeelen, D. Gottfried, V. Alla, H. Heid, J. Kuball, M. Theobald, P. R. Galle, and D. Strand. 2004. "Cleavage Of Cd95 By Matrix Metalloproteinase-7 Induces Apoptosis Resistance In Tumour Cells". Online. *Oncogene* 23 (20): 3732-3736. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207387>.

Suzuki, M., G. Raab, M. A. Moses, C. A. Fernandez, and M. Klagsbrun. 1997. "Matrix Metalloproteinase-3 Releases Active Heparin-Binding Egf-Like Growth Factor By Cleavage At A Specific Juxtamembrane Site". Online. *Journal Of Biological Chemistry* 272 (50): 31730-31737. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31730>.

Šírová, M., J. Strohalm, P. Chytil, O. Lidický, J. Tomala, B. Říhová, and T. Etrych. 2017. "The Structure Of Polymer Carriers Controls The Efficacy Of The Experimental Combination Treatment Of Tumors With Hpma Copolymer Conjugates Carrying Doxorubicin And Docetaxel". Online. *Journal Of Controlled Release* 246: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.004>.

Šprincl, L., J. Vacík, J. Kopeček, and D. Lím. 1971. "Biological Tolerance Of Poly( N - Substituted Methacrylamides)". Online. *Journal Of Biomedical Materials Research* 5 (3): 197-205. <https://doi.org/10.1002/jbm.820050307>.

Talelli, M., S. Oliveira, C. J.F. Rijcken, E. H.E. Pieters, T. Etrych, K. Ulbrich, R. C.F. van Nostrum, G. Storm, W. E. Hennink, and T. Lammers. 2013. "Intrinsically Active Nanobody-Modified Polymeric Micelles For Tumor-Targeted Combination Therapy". Online. *Biomaterials* 34 (4): 1255-1260. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.064>.

Tomalia, D. A., H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith. 1985. "A New Class Of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules". Online. *Polymer Journal* 17 (1): 117-132. <https://www.nature.com/articles/pj198510.pdf?origin=ppub>.

Turk, B. E., L. L. Huang, E. T. Piro, and L. C. Cantley. 2001. "Determination Of Protease Cleavage Site Motifs Using Mixture-Based Oriented Peptide Libraries". Online. *Nature Biotechnology* 19 (7): 661-667. <https://doi.org/10.1038/90273>.

Tu, Y., and L. Zhu. 2015. "Enhancing Cancer Targeting And Anticancer Activity By A Stimulus-Sensitive Multifunctional Polymer-Drug Conjugate". Online. *Journal Of Controlled Release* 212: 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.024>.

Ulbrich, K., T. Etrych, P. Chytil, M. Jelínková, and B. Říhová. 2003. "H<sub>12</sub> Copolymers With Ph-Controlled Release Of Doxorubicin". Online. *Journal Of Controlled Release* 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).

Van, S., D. Yang, J. Wang, J. Liu, Y. Wang, X. Jiang, and L. Yu. 2011. "Physicochemical Properties And Biocompatibility Of A Polymer-Paclitaxel Conjugate For Cancer Treatment". Online. *International Journal Of Nanomedicine* 6: 2557–2566. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25044>.

Vu, T. H., and Z. Werb. 2000. "Matrix Metalloproteinases: Effectors Of Development And Normal Physiology". Online. *Genes & Development* 14 (17): 2123-2133. <https://doi.org/10.1101/gad.815400>.

Webb, A. H., B. T. Gao, Z. K. Goldsmith, A. S. Irvine, N. Saleh, R. P. Lee, J. B. Lendermon, et al. 2017. "Inhibition Of Mmp-2 And Mmp-9 Decreases Cellular Migration, And Angiogenesis In In Vitro Models Of Retinoblastoma". Online. *Bmc Cancer* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3418-y>.

Werb, Z., M. C. Burleigh, A. J. Barrett, and P. M. Starkey. 1974. "The Interaction Of  $\alpha$ 2-Macroglobulin With Proteinases. Binding And Inhibition Of Mammalian Collagenases And Other Metal Proteinases". Online. *Biochemical Journal* 139 (2): 359-368. <https://doi.org/10.1042/bj1390359>.

Yang, J., K. Luo, H. Pan, P. Kopečková, and J. Kopeček. 2011. "Synthesis Of Biodegradable Multiblock Copolymers By Click Coupling Of Raft-Generated Heterotelechelic Polyhpma Conjugates". Online. *Reactive And Functional Polymers* 71 (3): 294-302. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2010.10.005>.

Yao, Q., J. H. Choi, Z. Dai, J. Wang, D. Kim, X. Tang, and L. Zhu. 2017. "Improving Tumor Specificity And Anticancer Activity Of Dasatinib By Dual-Targeted Polymeric Micelles". Online. *Acs Applied Materials & Interfaces* 9 (42): 36642-36654. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b12233>.

Yoshimoto, M., F. Itoh, H. Yamamoto, Y. Hinoda, K. Imai, and A. Yachi. 1993. "Expression Of Mmp-7(Pump-1) Mrna In Human Colorectal Cancers". Online. *International Journal Of Cancer* 54 (4): 614-618. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910540415>.

Yu, Q., and I. Stamenkovic. 2000. "Cell Surface-Localized Matrix Metalloproteinase-9 Proteolytically Activates Tgf-B And Promotes Tumor Invasion And Angiogenesis". Online. *Genes Development* 14 (2): 163-176. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316345/>.

Zhu, L., P. Kate, and V. P. Torchilin. 2012. "Matrix Metalloprotease 2-Responsive Multifunctional Liposomal Nanocarrier For Enhanced Tumor Targeting". Online. *Acs Nano* 6 (4): 3491-3498. <https://doi.org/10.1021/nn300524f>.

Zhu, L., F. Perche, T. Wang, and V. P. Torchilin. 2014. "Matrix Metalloproteinase 2-Sensitive Multifunctional Polymeric Micelles For Tumor-Specific Co-Delivery Of Sirna And Hydrophobic Drugs". Online. *Biomaterials* 35 (13): 4213-4222. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.060>.

Zhu, L., X. Zheng, Y. Du, Y. Xing, K. Xu, and L. Cui. 2018. "Matrix Metalloproteinase-7 May Serve As A Novel Biomarker For Cervical Cancer". Online. *Oncotargets And Therapy* 11: 4207-4220. <https://doi.org/10.2147/OTT.S160998>.

Zhu, S., M. Hong, L. Zhang, G. Tang, Y. Jiang, and Y. Pei. 2010. "Pegylated Pamam Dendrimer-Doxorubicin Conjugates: In Vitro Evaluation And In Vivo Tumor Accumulation". Online. *Pharmaceutical Research* 27 (1): 161-174. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9992-1>.