

HABILITAČNÍ PRÁCE

**SAMOASOCIOVANÉ POLYMERNÍ SYSTÉMY  
CITLIVÉ NA VNĚJŠÍ PODNĚTY**

Mgr. Martin Hrubý, Ph.D., DSc.

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Univerzita Karlova v Praze  
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.

2019

## **Poděkování**

Děkuji mnoha skvělým lidem, kteří mi odborně pomohli a lidsky mě podpořili jak při vědecké práci, která je zde prezentována, tak i v pedagogické činnosti. Pokus o úplný jmenovitý výčet těchto lidí by nutně znamenal neúplnost a tudíž by nebyl zcela spravedlivý, tak bych pouze rád speciálně vyzdvihl dr. Petra Štěpánka, manželku Ľubku a mámu.

Prohlašuji, že tuto habilitační práci jsem vypracoval samostatně a všechny použité literární zdroje řádně cituji.

## Abstrakt

Samouspořádání molekul do komplexních supramolekulárních celků s kvalitativně novými vlastnostmi je v chemických základech života a je i podstatou schopnosti živých organismů reagovat na vnější prostředí - dráždivosti. Klasickými příklady takových nadmolekulárních struktur jsou cytoplazmatická membrána tvořená fosfolipidy, nukleové kyseliny nebo multienzymové komplexy tvořené několika enzymy katalyzujícími následné reakce na jednom substrátu. Pochopením těchto mechanismů na fyzikální úrovni umožňuje cílenou chemickou syntézu analogických systémů na bázi polymerů šitých na míru nejen biomedicínským aplikacím.

Specifický případ nastává, pokud hydrofóbní část, respektive část molekuly zodpovědná za samouspořádání, významně či skokově působením vnějšího stimulu (změnou teploty, pH apod.) mění svoje fyzikálně chemické vlastnosti, jako je rozpustnost ve vodě. Pak je samouspořádání takového systému říditelné tímto vnějším stimulem a mluvíme o systémech citlivých na vnější podněty. Je to určitá, byť jednodušší varianta jedné z vlastností definujících život – dráždivosti.

Práce je dělena podle charakteru studovaných systémů plynoucí ze stabilizace vznikajícího (nano)heterogenního systému po změně vnějších podmínek na i) polymerní systémy, kde je výsledná separovaná fáze disperzně nestabilizovaná („makroskopická sraženina“), ii) systémy koloidně stabilizované vnějším činidlem a systémy, kde samotná struktura má buď anorganické nebo nanoprecipitací změnou složení rozpouštědla tvořené polymerní jádro a polymerní stabilizační obal není kovalentně připojen k jádru a iii) Samouspořádané systémy blokových a roubovaných polymerních architektur stabilizované strukturou samotného polymeru, kde hydrofilní stabilizující obal je kovalentní součástí nanočástice.

Z hlediska vnějšího podnětu, který způsobí změnu samoasociačního chování, jsou v habilitaci diskutovány vybrané příklady samouspořádaných polymerních systémů citlivých ke změně pH, teploty, koncentraci železitých respektive draselných iontů, změně složení rozpouštědla a přítomnosti reaktivních forem kyslíku respektive enzymů v okolním prostředí s vlastnostmi výhodnými pro aplikace v medicíně. Z hlediska aplikačního jsou tyto příklady směřovány zejména na  $^{19}\text{F}$  magnetickou rezonanci, radio- a radioimunoterapii nádorových onemocnění a dopravu protinádorových a antibakteriálních léčiv.

## Abstract

The self-assembly of molecules into complex supramolecular units with qualitatively new properties is in the chemical foundations of life and is the essence of the ability of living organisms to react to the external environment - irritability. Classical examples of such supramolecular structures are the cytoplasmic membrane formed by phospholipids, nucleic acids or multienzyme complexes formed by several enzymes catalysing subsequent reactions on a single substrate. Understanding these mechanisms at the physical level enables targeted chemical synthesis of analogous systems based on tailored polymers not only for biomedical applications.

A specific case occurs when the hydrophobic part of the molecule, or the part of the molecule responsible for self-assembly significantly changes its physico-chemical properties, such as solubility in water, by the action of an external stimulus (changing temperature, pH, etc.). Then the self-assembly of such a system is controlled by this external stimulus and we are talking about systems sensitive to external stimuli. It is a certain, albeit much simpler variant of one of the life-defining qualities - irritability.

The habilitation thesis is divided according to the character of the studied systems resulting from the stabilization of the emerging (nano)heterogeneous system after applying the external stimulus on i) polymer systems where the resulting separated phase is not disperse-stabilised ("macroscopic precipitate"), ii) systems colloidally stabilized by an external agent, the structure has either an inorganic or nanoprecipitation-formed polymer core and the polymer coating is not covalently attached to the core; and iii) self-assembled systems of block and graft polymer architectures colloidally stabilized by the polymer structure itself, where the hydrophilic stabilizing coating is a covalent part of the nanoassembly.

In terms of external stimulus, which causes the change in self-association behavior, selected examples of self-organized polymer systems sensitive to pH, temperature, ferric or potassium ion concentration, solvent composition and the presence of reactive oxygen species or enzymes in the surrounding environment are discussed in the habilitation thesis. In terms of application, these examples are directed in particular at  $^{19}\text{F}$  magnetic resonance imaging, radio- and radioimmunotherapy of cancer and delivery of antitumor and antibacterial drugs.

## Předmluva

Tato habilitační práce je současně jistým ohlédnutím za dosavadním souborem prací publikovaných po odevzdání mé doktorské dizertační práce jako podkladu pro získání titulu doktor věd (DSc.), tj. v období 2016 – srpen 2019, které jsem publikoval jako (spolu)autor. Důraz je kladen zejména na publikace, kde jsem korespondenčním autorem a které rukama udělali studenti, které jsem vedl a vedu jako školitel nebo jako školitel konzultant/specialista. V práci je také demonstrován můj myšlenkový a názorový posun za toto období, takže kromě prací které jsou přímo zařazeny do této habilitace z let 2016+ tam kde je to účelné cituji i práce starší pro ilustraci tohoto myšlenkového vývoje, ovšem tyto starší práce nejsou přímo zařazeny do habilitace jako takové. V první části prezentuji obecný úvod do problematiky samouasociovaných systémů, v druhé části přehled prací, kterými jsme přispěli k rozvoji této problematiky. Velká část úvodu habilitace („Úvod do problematiky“) je již publikována ve (v habilitaci samozřejmě citovaném) přehledovém článku v Chemických listech z roku 2018, [1] jehož jsem jediným autorem a který byl oceněn v roce 2019 cenou Karla Preise za nejlepší přehledový článek publikovaný v Chemických listech v roce 2018.

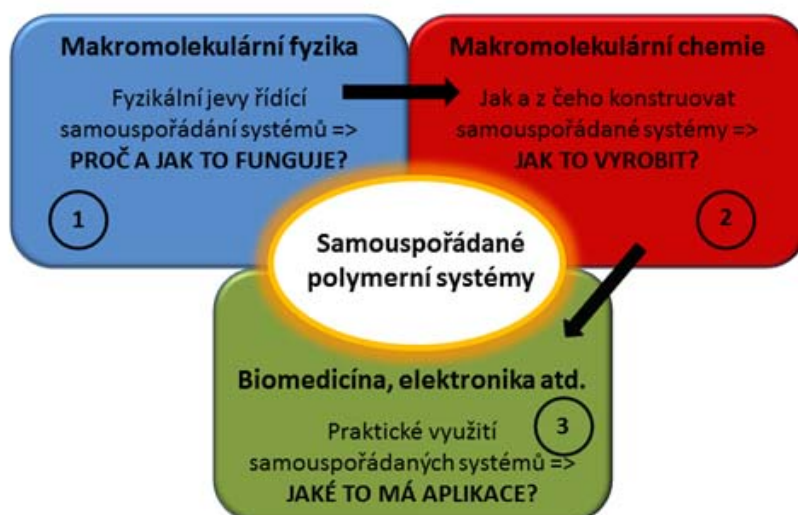
## Obsah

1.	Úvod do problematiky	7
1.1	Základní principy samouspořádání polymerů	8
1.2	Sterické aspekty samouspořádání polymerů	9
1.3	Termodynamika versus kinetika jako řídicí faktor	10
1.4	Polymery citlivé na vnější podněty	11
2.	Výsledky a diskuse	16
2.1	Polymerní systémy tvořící depa nestabilizovanou makroskopickou fázovou separací vlivem změny vnějších podmínek	16
2.2	Systémy, kde polymerní stabilizační obal není kovalentně připojen k jádru	26
2.3	Samouspořádané systémy blokových a roubovaných polymerních architektur stabilizované strukturou samotného polymeru, kde hydrofilní stabilizující obal je kovalentní součástí nanočástice	31
2.3.1.	Termoresponsivní systémy	31
2.3.2.	Enzymaticky degradovatelné systémy	32
3.	Závěry	34

## 1. Úvod do problematiky

Samovolné uspořádání molekul do organizovaných supramolekulárních struktur nekovalentními interakcemi je základem [1]. Striktně vzato je vhodné rozlišovat mezi samouspořádáním (kde vzniklé supramolekulární útvary mají definovanou vnitřní strukturu vytvořenou soupeřením přitažlivých sil krátkého dosahu a odpudivých sil dlouhého dosahu v prostoru) a širším pojmem samoasociace, kde jsou sice molekuly drženy pohromadě nekovalentními interakcemi, ale vnitřní struktura asociované fáze může být do určité míry chaotická.

Klasickými příklady samouspořádaných nadmolekulárních struktur jsou cytoplazmatická membrána tvořená fosfolipidy, nukleové kyseliny nebo multienzymové komplexy tvořené několika enzymy katalyzujícími následné reakce na jednom substrátu. Ve všech takových případech platí, že samouspořádáním nabyde systém oproti izolovaným molekulám kvalitativně nových vlastností, klíčových pro funkčnost v živé buňce, například bariérové funkce (cytoplazmatická membrána), možnosti zapsat informaci díky párování bází (nukleové kyseliny) nebo řádového urychlení katalýzy a možnosti regulace látkového toku metabolismem u multienzymových komplexů. Protože živý organismus je tvořen především vodou a polymery (proteiny, polysacharidy a nukleovými kyselinami), jsou živé systémy nevyčerpatelnou studnicí inspirace pro polymerní vědu.[2] Stejně principy umožňují konstrukci pokročilých polymerních materiálů s komplexní funkcí a na míru nastavenou odezvou na vnější podněty. Studium takovýchto supramolekulárních struktur je z principu multidisciplinární, zahrnuje jak teoretické poznatky a metodiky studia fyziky samouspořádání (*proč funguje?*), chemii (*jak a z čeho vyrobit?*) tak aplikační oblasti (zejména biologie, fotoniky a elektroniky – *k čemu je to dobré?*) (**Obrázek 1**).[3, 4]



**Obrázek 1.** Obory přispívající ke studiu supramolekulárních polymerních systémů. Upraveno podle ref. [1].

Přibližme si na několika příkladech základní principy a možnosti využití takových systémů.

### 1.1 Základní principy samouspořádání polymerů

Samouspořádání polymerů probíhá díky nekovalentním interakcím mezi polymerními řetězci (například hydrofobní, van der Waalsovské,  $\pi$ - $\pi$ , coulombické, dipól-dipólové, vodíkové můstky nebo koordinace kovových iontů). Klasickým příkladem je samouspořádání amfifilních AB diblokových kopolymerů tvořených hydrofobním, s vodou nemísitelným blokem a hydrofilním, ve vodě rozpustným polymerním blokem ve vodě jako selektivním rozpouštědlem. Ve vodě se vytvoří samouspořádané útvary, jejichž cílem je minimalizovat kontakt hydrofobního bloku s vodou, neboť to je energeticky výhodné. Hydrofobní části jsou pak skryty uprostřed takového útvaru a celý útvar je ve vodném roztoku stabilizován hydrofilními částmi molekul obrácenými do okolního roztoku. Jaký konkrétní útvar ale vznikne, závisí na celé řadě faktorů.[3] Jedním z takových faktorů je délka hydrofobní, respektive hydrofilní části polymerní molekuly. Příliš malá hydrofobní část molekuly nestačí k efektivnímu složení makromolekul do supramolekulárního útvaru. Její stabilitu lze vyjádřit kritickou asociační koncentrací (často užívanou u micel pod názvem kritická micelární koncentrace - CMC), tedy koncentrací, pod kterou jsou v roztoku pouze volné molekuly (unimery) a nad ní kromě unimerů i supramolekulární útvary.[5, 6] S rostoucí délkou hydrofobního řetězce roste stabilita supramolekulárního útvaru, tj. klesá kritická asociační koncentrace. S lineárním nárůstem délky hydrofobního řetězce při konstantní délce hydrofilní části molekuly obvykle lineárně roste interakční energie a tedy exponenciálně klesá CMC. Pokud je hydrofobní část příliš velká na to, aby ji hydrofilní část „stabilizovala“ ve vodném roztoku, přestane polymer být rozpustný ve vodě. Hydrofilní část molekuly pak částici stabilizuje v roztoku stericky, případně i nábojově (stejně nabitě částice se v roztoku odpuzují, což omezuje agregaci).[7]

Klasickým použitím micel je solubilizace lipofilních (v tučích rozpustných) látek ve vodě tím, že se takové látky rozpustí v hydrofobním jádře micely<sup>5</sup>. Praktickým použitím jsou detergenty nebo excipienty umožňující podat ve vodné injekci hydrofobní léčiva (např. Cremophor<sup>®</sup>, což je ricinový olej s připolymerovaným polyethylenoxidem používaný pro injekční aplikaci protinádorového léčiva paklitaxelu). U takového použití, zejména při injekčním podání do organismu, je třeba uvážlivě volit materiál jak hydrofilního, tak hydrofobního bloku. Hydrofobní blok by neměl být mísitelný s uhlovodíky, protože pak způsobuje poškození membrán interakcí s uhlovodíkovými částmi fosfolipidů a jejich komicelizací, obvykle měřeném pomocí hemolýzy červených krvinek.[8] Hydrofilní blok by měl mít minimální nebo naopak selektivní interakci s buňkami, výhodné jsou elektroneutrální nebo jen velmi slabě záporně nabitě polymery; polykationty jsou obvykle cytotoxické poškozením cytoplazmatické membrány buněk, která je díky složení fosfolipidů převážně anionická. Příkladem takového vhodného



blokového kopolymeru je poly(ethylenoxid-*block*-propylenoxid-*block*-ethylenoxid) (Pluronic<sup>®</sup>, Poloxamer<sup>®</sup>), kde hydrofóbní polypropylenoxidový blok solubilizuje léčivo, zatímco hydrofilní polyethylenoxidové bloky stabilizují micely v roztoku a skrývá jádro micely před nespecifickými interakcemi v organismu (i když díky nadužívání detergentů s hydrofilní částí na bázi polyethylenoxidu v poslední době přibývá v západní populaci lidí s protilátkami proti polyethylenoxidu).[9, 10] Tento kopolymer má navíc díky amfifilitě a vlastnostem centrálního polypropylenoxidového bloku schopnost inhibovat P-glykoprotein, takže potlačuje „multidrug“ rezistenci nádorových buněk a obnovuje jejich citlivost k chemoterapii.[11]

Klíčovým pro správnou funkci amfifilních systémů pro biomedicínské aplikace je správné nastavení CMC a tím stability supramolekulárního systému vhodnou volbou délky bloků. Příliš stabilní micely se mohou pomalu vylučovat z organismu, protože mají obvykle větší rozměry než je limit renální filtrace ledvinami, zatímco unimery jsou obvykle pod tímto limitem a mohou tedy být do moči vyloučeny. Takto lze nastavením CMC nastavit kinetiku eliminace z organismu. Naopak málo stabilní micely se mohou rozpadnout po naředění do objemu krve (kde je třeba si uvědomit, že krev není voda a řada krevních proteinů, jako např. sérový albumin, má hydrofóbní domény, takže tyto proteiny destabilizují micely). U dostatečně stabilních micel můžeme konstruovat molekulární skládačky, kde smísíme několik různých amfifilních kopolymerů s kompatibilním hydrofóbním blokem a můžeme volně kombinovat funkční vlastnosti takových směsných micel.[7]

## 1.2 Sterické aspekty samouspořádání polymerů

Důležitým aspektem samouspořádání polymerů jsou sterické vlivy, které hrají roli zejména pokud jde o morfologii a velikost takto vzniklých objektů. Kritickým je v tomto aspektu tzv. „packing factor“,  $p$ , [3] definovaný **Rovnicí 1**:

$$p = v / a_0 l_c$$

**Rovnice 1**

kde  $v$  je objem hydrofóbního segmentu,  $a_0$  je kontaktní plocha hydrofilní části segmentu a  $l_c$  je délka hydrofóbní části. Velikostí a tvarem hlavně hydrofóbní části molekuly tak lze nastavit, jaký typ objektu vznikne. Pro  $p < 1/3$  vznikají sférické micely s hydrofóbním jádrem a hydrofilním obalem, pro  $p$  mezi  $1/3$  a  $1/2$  vznikají cylindrické – červovité („worm-like“) micely s hydrofóbním jádrem a hydrofilním obalem, při  $p$  mezi  $1/2$  a  $1$  vznikají vezikly s hydrofilním vnitřkem ohraničené dvojrůstvou membránou, která je na povrchu hydrofilní a uvnitř hydrofóbní (obvykle nazývané liposomy, respektive polymerosomy), při  $p = 1$  vznikají planární lamely a při  $p > 1$  vznikají inverzní struktury s hydrofilním vnitřkem a hydrofóbním vnějškem. Zatímco micely lze bez kovalentního navázání léčiva použít pouze k transportu hydrofóbních léčiv, liposomy/polymerosomy umožňují zabudovat jak hydrofóbní léčivo (rozpuštěním do hydrofóbní mezivrstvy) tak hydrofilní léčivo (do vnitřního prostoru).[12]

Díky sterickému napětí je v micelách obecně i v jádře vysoký obsah vody. Například i pokud je hydrofóbní částí polystyren, jsou v jádře desítky hmotnostních procent vody. Micely tak lze, například za účelem micelární katalýzy, použít jako nanoreaktory zakoncentrovávající hydrofóbní reaktanty v jádře, ale nikoliv jako „suché prostředí uprostřed vody“.[13] Pokud jsou sférické micely v termodynamické rovnováze, mají poměrně úzkou distribuci velikostí, protože tato distribuce je dána rovnováhou, kdy malé micely rychleji rostou interkalací unimerů díky většímu povrchu a zakřivení povrchu, kdežto u větších převažuje uvolňování unimerů do roztoku. Značně uniformní velikost umožňuje, že micely jsou ve vysokých koncentracích schopné ve vodném roztoku tvořit kvazikrystalické gelové struktury s kubickou mřížkou – příkladem jsou injikovatelne termoresponsivní gely poly(ethylenoxid-*block*-propylenoxid-*block*-ethylenoxid)u nebo mýdlový gel sodných solí mastných kyselin. Naopak vezikly ohraničené dvojrstevnou membránou tvořené samouspořádáním polymerů (polymerozomy) jsou obvykle polydisperzní, protože zakřivení membrány veziklu je malé a tak se příliš neliší zabudování a uvolňování unimerů do roztoku u malých a velkých vezikul.[12]

Specifický případ nastane, pokud do sebe stericky přesně zapadá hydrofóbní část amfifilní molekuly a rozpouštěné hydrofóbní látky. Takový amfifil pak může být velmi selektivní pro solubilizaci dané látky. Příkladem jsou rostlinné saponiny, amfifilní molekuly obsahující steroidní, případně triterpenickou hydrofóbní část a hydrofilní oligosacharidickou část.[14] Hydrofóbní část molekul saponinů je přesně stericky komplementární s živočišnými steroly jako je cholesterol stabilizující membrány živočišných buněk, ale není komplementární díky odlišné chiralitě s rostlinnými steroly. Saponiny tak jsou vysoce toxické pro živočichy, ale jen málo pro rostliny, které se takto jejich produkcí brání pozeru. Některé přírodní národy proto rostliny s vysokým obsahem saponinů používaly k přípravě šípových jedů. Zasažené zvíře pak bylo požitelné, protože saponiny se u člověka z trávicího traktu špatně vstřebávají. Podobně polypeptidické antibakteriální antibiotikum polymyxin B je přesně komplementární s lipopolysacharidy (endotoxiny) stabilizujícími bakteriální buněčné stěny.[15] Někdy, pokud je struktura polymeru komplexní, mohou samouspořádáním vznikat pozoruhodné struktury – například polysacharid  $\beta$ -glukan z houby *Auricula auricularia-judae* (ucho jidášovo, v Asii kulinářsky velmi oblíbené, ale roste i u nás na bezu) s hřebenovitou strukturou tvořenou D-glukózou spontánně tvoří ve vodě samouspořádáním nanovlákná s hydrofóbním vnitřkem umožňujícím enkapsulovat hydrofóbní molekuly.[16]

### 1.3 Termodynamika versus kinetika jako řídící faktor

Zatím jsme se zabývali systémy, které jsou v termodynamické rovnováze. Tak to ale nemusí být vždy. Typickým příkladem jsou struktury blokových kopolymerů, jejichž hydrofóbní bloky mají teplotu skelného přechodu ( $T_g$ ) nad teplotou, při které je systém běžně studován, a které tak nemají dostatečnou konformační mobilitu hydrofóbní části. To je typické například pro micely s polystyrenem jako hydrofóbním řetězcem. Micely

tak jsou “zamrzlé“ bez možnosti vyměňovat si navzájem hydrofóbní řetězce.[17] Elegantním nástrojem studia kinetiky výměny řetězců jsou fluorescenční techniky.

Krystalinitou jádra je možné nastavit dynamiku degradace micely. Klasickým příkladem je biodegradovatelný polymer polyethylenoxid-*block*-polymléčná kyselina; pokud je použita mléčná kyselina racemická, vzniklý polyesterový blok je velmi málo krystalický, více hydratovaný a degraduje řádově rychleji, než pokud je ke konstrukci polyesterového bloku použit jeden chirálně čistý enantiomer kyseliny mléčné tvořící vysoce krystalický polyester. Nejvíce krystalický je pak komplex homopolymery *R*-enantiomeru kyseliny mléčné s homopolymerem *S*-enantiomeru kyseliny mléčné v poměru 1:1 (cit.).[17]

To je ostatně jeden z důvodů proč příroda, pokud někde vystupují chirální molekuly, z nich využívá - obvykle velmi selektivně - pouze jeden enantiomer (např. pouze L-aminokyseliny). Teoreticky totiž například racemizace jednoho aminokyselinového zbytku v molekule bílkoviny stačí na to, aby se změnila konformace celé molekuly a tím zlikvidovala funkčnost enzymu (kde se neposkládá správně aktivní místo) nebo silně poškodila možnost interagovat s jiným proteinem. Lze spočítat, že takto bychom bez chirální selektivity na přípravu několika miligramů funkčního enzymu běžné velikosti museli připravit podstatně více nefunkčního odpadního materiálu než váží planeta Země.

Další možností, jak zabezpečit kinetickou zamrzlost systému, je zesíťovat jádro micely koordinačními vazbami s pomalou kinetikou ligandové výměny (tvorba koordinačního nanogelu). Takto byl jako dopravní systém pro protinádorové léčivo cisplatinu (*cis*-diaminodichloroplatinatan) použit blokový kopolymer polyethylenoxid-*block*-polyglutamová kyselina, kde koordinační vazba  $-\text{COO}\dots\text{Pt(II)}$  má přesně optimální kinetiku hydrolýzy pro dané použití. [18]

#### 1.4 Polymery citlivé na vnější podněty

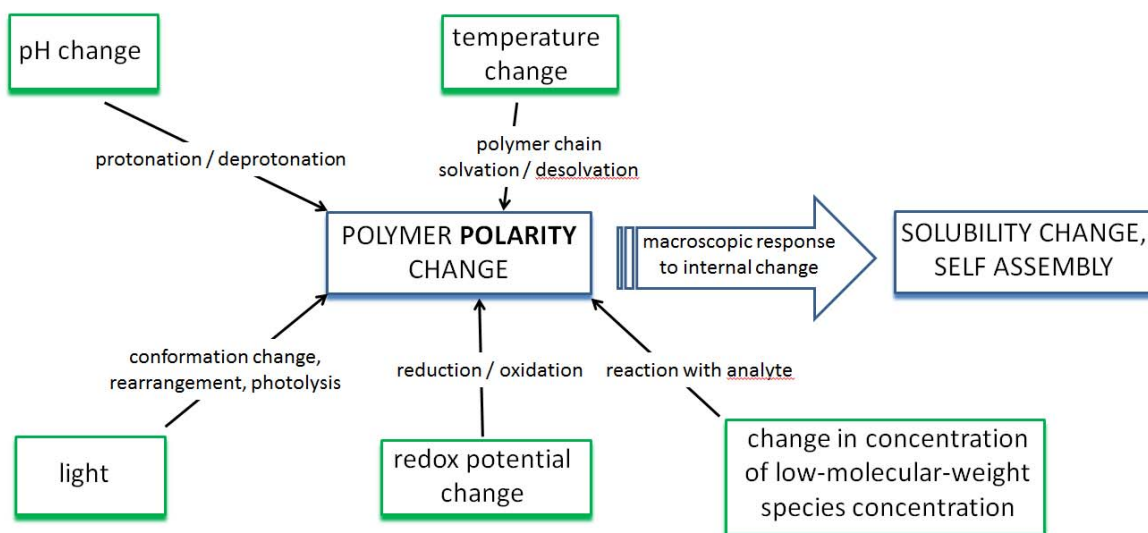
Specifický případ nastává, pokud hydrofóbní část, respektive část molekuly zodpovědná za samouspořádání, významně či skokově působením vnějšího stimulu (změnou teploty, pH apod.) mění svoje fyzikálně chemické vlastnosti, jako je mísitelnost s vodou. Pak je samouspořádání takového systému říditelné tímto vnějším stimulem a mluvíme o systémech citlivých na vnější podněty. Je to určitá, byť mnohem primitivnější varianta jedné z vlastností definujících život – dráždivosti.

Četné biomakromolekuly jsou multireponsivní, tj. reagují na několik podnětů současně - např. receptor TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1), neselektivní kationtový kanál zapojený v těle hlavně při snímání tělesné teploty, ale také v nocicepcce (vnímání bolesti).[19] Receptor TRPV1 reaguje na změny teploty (otevře se při překročení kritické teploty, která je bez přítomnosti allosterického ligandu 43 °C), pH (kyselé pH otevírá kanál) a přítomnost alosterických ligandů (které mohou zvýšit nebo snížit kritickou teplotu otevření kanálu). Významným příkladem posledně uvedeného mechanismu je, že kapsaicin z chilli papriček [20], nejznámější

ligand tohoto kanálu, snižuje kritickou teplotu, takže se kanál otevírá a signalizuje „příliš horko“ i při normální tělesné teplotě, což způsobuje pálivou chuť feferonek.

Mechanismus odpovědi (bio)makromolekuly může být také různý - může to být konformační změna, např. otevření iontového kanálu (což je případ převládající pro receptor TRPV1) nebo, velmi často zejména pro syntetické makromolekuly, změna polaroty polymerního řetězce. Změna polaroty polymerního řetězce má zvláštní význam ve vodném prostředí, kde vede ke změně solvatace polymerního řetězce a následné separaci / rozpuštění fázi nebo spuštění samouspořádání / rozpadu supramolekulárních polymerních architektur. V mnoha případech je polarita stejného polymerního řetězce ovlivněna několika stimuly různými způsoby, což vede k polymerní architektuře s významným vzájemným ovlivněním mezi odpověďmi na různé stimuly. Spouštěče a způsoby, jak různé stimuly ovlivňují polaritu polymerního řetězce, jsou shrnuty na **Obrázku 2**.

Polymery tedy mohou být takto citlivé na celou řadu podnětů, například teplotu (termoresponsivita).[22] Takové polymery mohou být buď rozpustné při nízké teplotě a ohřátím se fázově separovat (pak mluvíme o dolní kritické rozpouštěcí teplotě, LCST, u vodorozpustných polymerů častější případ) nebo naopak být rozpustné od určité teploty výše (pak mluvíme o horní kritické rozpouštěcí teplotě, UCST). V obou případech jde o kompetici sil držících řetězce pohromadě a bránících rozpouštění (hydrofobní interakce, entalpcko-entropická rovnováha nebo například vodíkové vazby) na jedné straně, a solvatace řetězců rozpouštědlem, například vodou, které rozpouštění umožňují, na straně druhé. Tyto síly mají rozdílnou teplotní závislost, a proto existuje u mnoha polymerů teplota, kdy se právě kompenzují, což je LCST respektive UCST.



**Obrázek 2.** Spouštěče a způsoby, jak různé stimuly mohou ovlivňovat polaritu polymerního řetězce. Převzato z ref. [21]

Pro faktickou fázovou separaci pak platí více či méně výrazná koncentrační závislost teploty fázové separace, v příslušném fázovém diagramu je LCST teplotním minimem, respektive UCST teplotním maximem. Polymery s LCST, například poly(*N*-isopropylakrylamid), poly(2-isopropyl-2-oxazolin), poly(*N*-vinylkaprolaktam) nebo poly(methyl vinyl ether) mají celou řadu realizovaných nebo potenciálních využití v biomedicíně.[23, 24] Užívají se pro pokrytí misek pro kultivaci buněk ve tkáňovém inženýrství, kde umožňují oddělení vrstvy přisedlých buněk prostým ochlazením, lze je použít pro tvorbu injikovatelných dep a „scaffoldů“ („lešení“) pro tkáňové inženýrství vytvořených v místě vpichu díky teplotě lidského těla, pro tvorbu micel akumulujících se v nádoru, kde se micely vytvoří z molekulárního roztoku ohřátím na tělesnou teplotu (blokové kopolymery hydrofilní blok-termoresponsivní blok, případně hydrofilní blok-termoresponsivní blok-hydrofilní blok) atd. Teplotu fázové separace lze nastavit u polymerů s LCST v poměrně širokém rozmezí kopolymerací hydrofilního monomeru (posiluje solvataci a zvyšuje tak LCST), nebo hydrofóbního komonomeru (posiluje hydrofóbní interakce a snižuje tak LCST). Kopolymerací monomeru s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem lze zavést hysterezi fázové separace, protože po fázové separaci se v rámci separované fáze vytvoří asociáty dlouhých uhlovodíkových řetězců, které brání rozpouštění polymeru po opětovném ochlazení pod LCST.[25] Polymery s UCST, především přírodního původu, jsou užívány jako kultivační média, kde teplotní závislost usnadňuje manipulaci s gelem (želatina, agar). Pozoruhodné jsou diblokové kopolymery termoresponsivní blok s UCST – termoresponsivní blok s LCST, které pod UCST tvoří tzv. „schizofrenní“ micely s jádrem z polymeru s UCST a obalem z polymeru s LCST, při zvýšení teploty se tyto micely rozpustí na molekulární roztok a při dalším zvýšení teploty nad LCST bloku s LCST se opět vytvoří micely, ale obrácené, s jádrem z polymeru s LCST a obalem z polymeru s UCST.[26, 27]

Polymery citlivé na změnu pH jsou založené na zavedení slabé kyseliny (např. karboxylové) nebo báze (např. amin) do struktury částečně hydrofobního kopolymeru. U takových polymerů spolu opět soupeří hydrofóbní interakce se solvatací řetězce, ovšem díky přítomnosti pH-aktivní skupiny je solvatace řetězce závislá na pH – např. u karboxylové kyseliny je podstatně polárnější její aniont při pH nad pKa než volná karboxylová kyselina v kyselém prostředí a u aminu je naopak polárnější protonovaná forma v kyselém prostředí než volný amin při pH nad pKa. Navíc u polárnějších nabitých forem k posunu rozpustnosti směrem k rozpouštění napomáhají repulzní coulombické interakce mezi stejně nabitými řetězci.[28]

Klasickou aplikací pH-responsivních polymerů v medicíně jsou kopolymery užívané pro pokrývání tablet, které jsou nerozpustné při pH 2 – 4, které je v žaludku, a tím ochrání tabletu před uvolněním účinné látky, která může být v kyselém žaludečním prostředí nestabilní nebo dráždit žaludek. Ve střevě, kde je pH kolem 6,8, se polymer rozpustí a umožní uvolnění aktivní složky. Typickým příkladem takového kopolymeru je Eudragit® L100-55 (kopolymer kyseliny methakrylové a ethylakrylátu 1:1) .[29] Analogicky lze takové polymery použít nejen k pokrytí tablet, ale i vytvoření surfaktanty stabilizovaných nanočástic stabilních v žaludku a rozpouštějících se ve střevě.[30] Jiné slibné medicínské aplikace jsou založené na blokových kopolymerech hydrofilní

kopolymer-hydrofobní polyamin, například poly[ethylenoxid-*block*-2-(diisopropylamino)ethyl methakrylát], které v mírně alkalickém prostředí krevní plazmy (pH 7,40) tvoří micely, do kterých lze vložit léčivo, které se při okyselení na pH 5-6,5 (nádorová tkáň respektive endozóm po endocytóze mají kyselější prostředí) rozpadnou a řízeně uvolní enkapsulované léčivo.[31] Jinou aplikací je cílený vstup takového nosiče do nádorové buňky díky přítomnosti krátkého poly(L-histidinového) bloku, který je hydrofobní a skrytý uvnitř micely v alkalickém pH, ale v kyselém pH nádorové tkáně se kationizuje díky protonaci, vynoří z jádra micely a - díky polykationtovému charakteru a navázanému TAT peptidu a z toho plynoucí membránové aktivitě - usnadní průnik micely do buňky.[32] Polyaminy lze použít i jako senzory pro oxid uhličitý, protože se v tomto případě využívá kyselého charakteru tohoto plynu, přesněji jeho hydratace na kyselinu uhličitou, kdy jde vlastně o pH senzor.[33] Elegantly lze kombinovat, jak je poslední dobou často studováno, pH- a termoresponsivitu.

Jak bylo uvedeno výše, LCST kopolymerů lze nastavit polaritou komonomeru a pokud tento komonomer má polaritu nastavitelnou pH, lze zkonstruovat polymer, kde lze nastavit LCST změnou pH.[34] Příkladem systému, kde pH responsivita není dána hydrofobicitou, je komplex kyselina polyakrylová-polyethylenoxid, který je ve vodě nerozpustný díky síti intermolekulárních vodíkových vazeb, ale tento komplex je schopná tvořit pouze volná kyselina polyakrylová, nikoliv její soli. Proto se komplex zalkalizováním rozpadne a rozpustí.[35]

Další často studovanou citlivostí na vnější podněty je citlivost na světlo, konkrétně jde o změnu polarity fotocitlivé monomerní jednotky po osvětlení. Často využívanou funkční skupinou tohoto typu je azobenzen,[36] který osvětlením krátkovlnným světlem přechází z normálně majoritní konformace vazby  $-N=N-$  (*E*)- na podstatně polárnější konformaci (*Z*)-, což lze využít např. pro světlem řízený rozpad micel. Silnější odezvy lze docílit zabudováním azobenzenu ne do bočních řetězců, ale do hlavního řetězce polymeru, takže osvětlení změní konformaci celého řetězce. Analogický konformační přechod  $-C(H)=C(H)-$  vazby indukovaný světlem v 11-(*Z*)-retinalu je podstatou vidění v lidském oku.[37] Jinou často využívanou skupinou je spiropyran, který světlem vytvoří z nenabitě struktury podstatně polárnější zwitteriont, nebo skupiny, které fotochemicky degradují, například 2-nitrobenzylové ethery a estery, které fotochemicky degradují na příslušný podstatně polárnější alkohol, respektive karboxylovou kyselinu.[38] Obecnou nevýhodou polymerů citlivých na světlo pro medicínské účely je to, že většinou vyžadují použití krátkovlnného světla, které je živou tkání silně absorbováno. Proto se v biomedicíně postupně přechází na hybridní struktury, kde fotocitlivou složkou je anorganická nanočástice (např. zlatá nanoslupka), která silně absorbuje v blízké infračervené oblasti, pro kterou jsou tkáně podstatně průhlednější, a takové struktury jsou pak používány např. pro fototermální nebo fotoakustické aplikace, při použití upconverze i pro fotodynamickou terapii.[39]

Řada polymerů je ve vodném roztoku citlivá na přítomnost solí, což platí zejména pro polyelektrolyty. Ionty soli totiž stíní odpuzivé i přitažlivé interakce mezi nabitými skupinami na polymerním řetězci. Zvláště citlivé na soli jsou interpolyelektrolytové komplexy polykationt-polyaniont, často užívané pro transfekci nukleových kyselin do

buněk v genovém inženýrství (kde polyaniontem je příslušná nukleová kyselina a polykationem syntetický kationický polymer), které se mohou dostatečnou koncentrací soli zcela rozpadnout. V buňce je přirozeným interpolyelektrolytovým komplexem např. chromatin v jádře buňky, v němž je aniontová DNA namotána na polykationické histony. Vyšší koncentrace solí interferují s např. s termoresponsivitou, protože sůl snižuje hydrataci polymeru přítomného v roztoku.[40]

Citlivost na redoxpotenciál má mimořádný význam pro biomedicínu, protože v těle jsou velké rozdíly v redoxpotenciálu zejména mezi vnitřkem buňky (kde je redukující prostředí udržované stálou koncentrací tripeptidu glutathionu v redukované-thiolové formě) a prostředí vně buňky, kde je díky zásobení kyslíkem spíše oxidační prostředí. Určitou výjimkou jsou větší pevné nádory, kde je střed nádoru hypoxický. Lze tak vytvořit systém, který se cíleně rozpadne až po vstupu do buňky.[41] V přírodě toto využívá řada virů, kde se kapsida viru rozpadne a uvolní nukleovou kyselinu redukcí disulfidických vazeb spojujících kapsidu. Viry však často kombinují tuto redoxní responsivitu s pH responsivitou a citlivostí na vápenaté ionty, aby zajistily maximální selektivitu uvolnění genetického materiálu až uvnitř buňky.[42] Naopak zanícená a často nádorová tkáň – (nádorová onemocnění často provází zánět) má silně oxidující prostředí díky přítomnosti makrofágů a dalších složek imunitního systému aktivně sekretujících silná oxidační činidla, jako peroxid vodíku, superoxid a chlornan pro boj s mikroorganismy. Toho lze využít pro cílený transport léčiv do zanícené/nádorové tkáně pomocí nanočástic (obvykle na bázi boronátových esterů nebo polyoxalátů) cíleně degradovatelných těmito oxidačními činidly.[43] Jinou zajímavou skupinou pro toto použití je relativně hydrofobní elektroneutrální ferrocen, který se oxiduje na kationické, polární ferricinium.[41, 42]

Polymery mohou být citlivé i na celou řadu dalších podnětů, jako je přítomnost určitých látek (např. vápenaté ionty, D-glukóza apod.) v prostředí (chemoresponsivita). Chemoresponsivita je založena na selektivní reakci vhodných funkčních skupin na polymeru s detekovanou sloučeninou, která změní polaritu, případně náboj řetězce. Tyto responsivity jsou nad rámec této habilitační práce a existuje řada přehledových článků (např. refs. [28, 42, 44]) diskutujících detailně tato témata.

## 2. Výsledky a diskuse

Kapitola Výsledky a diskuse je dělena podle charakteru studovaných systémů plynoucí ze stabilizace vznikajícího (nano)heterogenního systému po změně vnějších podmínek na i) polymerní systémy, kde je výsledná separovaná fáze disperzně nestabilizovaná („makroskopická sraženina“), ii) systémy koloidně stabilizované vnějším činidlem a systémy, kde samotná struktura má buď anorganické nebo nanoprecipitací změnou složení rozpouštědla tvořené polymerní jádro a polymerní stabilizační obal není kovalentně připojen k jádru a iii) Samospořádané systémy blokových a roubovaných polymerních architektur stabilizované strukturou samotného polymeru, kde hydrofilní stabilizující obal je kovalentní součástí nanočástice.

### 2.1 Polymerní systémy tvořící depa nestabilizovanou makroskopickou fázovou separací vlivem změny vnějších podmínek

Většina v současnosti studovaných nosičových dopravních systémů pro cílenou interní radioterapii je založena na aktivním cílícím činidle, např. protilátce[45], která obvykle působí současně i jako nosič daného radionuklidu. Někdy, např. v případě radiosynovektomie nebo brachyterapii, je úlohou nosiče lokalizovat radionuklid v dobře definovaném a omezeném objemu těla. Tyto radionuklidové aplikace se týkají hlavně léčby kloubů poškozených zánětem nebo artrózou pomocí radiosynovektomie, [46, 47] což snižuje bolest a potlačuje zánět, ale také intratumorální aplikace, jako je brachyterapie [48, 49] nebo lokální adjuvantní radioterapie po chirurgickém odstranění maligních tkání.

Brachyterapie se nejčastěji provádí pomocí uzavřených zářičů, které jsou chirurgicky implantovány do cílového místa. Po rozpadu radionuklidu je zářič ponechán v místě aplikace nebo chirurgicky odstraněn. Výhoda brachyterapii spočívá ve vysokých radiačních dávkách pro tkáň v nejbližším sousedství při nízké celotělové radiační zátěži. V takových případech je však nezbytný chirurgický zákrok.[50] Alternativně jsou mikrosféry nebo nanočástice, které jsou označeny, aplikovány pomocí vstříkávání. [51, 52]. Jejich samotná velikost jim brání v úniku z místa aplikace. Je však možný i jiný přístup. Termoresponsivní polymery umožňují značení nosiče v pravém roztoku při teplotě místnosti (např.  $<25$  ° C). Nosič se pak převede na nerozpustnou formu až po aplikaci do organismu, kde je teplota 37 °C.

Kombinace radionuklidů jako vlastních terapeutik s termoresponsivními polymery jako jejich nosiči lze získat nový slibný terapeutický nástroj. Konkrétně takový polymer značený vhodným beta zářičem s teplotou zákalu („cloud point temperature“, CPT, tj. teplota, nad kterou je makroskopicky v daném roztoku pozorována fázová separace) těsně pod tělesnou teplotou umožňuje depozici poměrně vysokých dávek přímo v místě aplikace, protože k srážení dochází téměř okamžitě a s vysokou účinností. Roztok polymeru může být aplikován injekcí, což je výrazně jednodušší než chirurgická



implantace. Protože se sraženina velmi pomalu rozpustí a (meth)akrylamidové kopolymery obvykle nezpůsobují žádnou významnou lokální imunitní odpověď[53], zůstává radioaktivita v místě aplikace po dostatečně dlouhou dobu vzhledem k poločas radionuklidu. Kromě toho může být velikost polymerních molekul upravena pod renální prahovou hodnotu [ca 45 kDa pro methakrylamidové polymery [54], takže znovu rozpuštěný polymer je rychle vylučován močí. Jedním z klíčových faktorů je pak stabilita radioaktivního značení.

Termoresponsivní polymery mohou proto sloužit jako vhodné nosiče pro lokální radioterapii. Pro toto použití jsme navrhli a syntetizovali termoresponsivní polymer značený radioaktivním jódem  $^{131}\text{I}$ . Roztok tohoto značeného polymeru v dimethylsulfoxidu (4,4 MBq / ml; 1,8 hm. % polymeru) byl injikován do femorálního svalu samců myši Balb / C (50 ul na zvíře). Bioldistribuce a vylučování radioaktivity bylo sledováno za 2 hodiny a 1, 7, 14, 28 a 42 dnů po injekci. Jak se očekávalo, značený polymer zůstal v místě aplikace (cca 90% 2 h po injekci) a pomalu se odplavoval na ca 80% původní aktivity (korigováno na radioaktivní rozpad) během 14 dnů. Po 28 dnech po injekci bylo na místě aplikace stále nalezeno asi 70% injikované aktivity, která se po 42 dnech snížila na asi 60%. Nebyla pozorována žádná orgánově akumulovaná radioaktivita uvolněná z místa aplikace, včetně štítné žlázy. Většina uvolněné radioaktivity byla vylučována močí a stolicí. Tato studie [55] naznačuje, že termoresponsivní polymery mohou být použity jako účinný systém pro lokalizovanou radioterapii.

Výrazného snížení růstu nádoru závislého na dávce pak bylo dosaženo jedinou dávkou injikovatelné intratumorální brachyterapie termoresponsivním polymerem značeným  $^{131}\text{I}$  [poly *N*-isopropylakrylamid) jako nosič] v myším nádorovém xenograftovém modelu (PC3 lidský adenokarcinom prostaty).[56] Byly použity dvě dávky radionuklidu, 2 MBq / myš a 25 MBq / myš. Vyšší dávka způsobila postupné snižování objemu nádoru a úplně byly vyléčeny 2 ze 6 myší z této skupiny. Nižší dávka způsobila pouze zpomalení růstu nádoru. V obou případech nebyly zaznamenány žádné lokální známky zánětu. Účinky obou dávek byly statisticky významné ve srovnání s neošetřenými kontrolními zvířaty. Takový injekční systém by měl zachovat výhody brachyterapie a současně umožnit méně invazivní podávání léčiva (injekce namísto implantace), přizpůsobit léčbu konkrétnímu pacientovi (rozdělení dávek do několika depotů) a umožnit eliminaci depa po splnění funkce bez nutnosti chirurgického vyjmutí bioerozí.

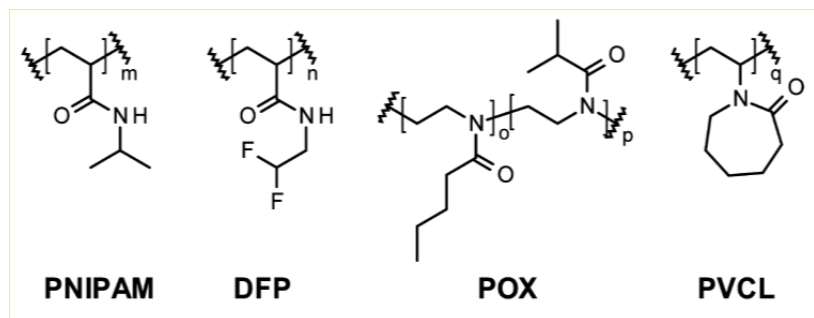
Bylo však nutné doladit rychlost degradace depotního poločasu použitého radionuklidu. Proto byla vyvinuta pokročilá verze takového systému.[25] V tomto systému je komplex kovového radionuklidu hydrofóbně zachycen v termoponsivním polymeru lokálně vysráženém při tělesné teplotě po injekci roztoku do tkáně, kde je vyžadován terapeutický účinek. Životnost systému je řízena rychlostí hydrolýzy polymeru, jeho rozpouštěním a vylučováním z těla. Termoresponsivní polymer s teplotou zákalu pod tělesnou teplotou je založen na kopolymerech *N*-isopropylmethakrylamidu s komonomerem methakrylamidového typu, který obsahuje hydrofóbní *n*-alkylové skupiny tří různých velikostí ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_6$  a  $\text{C}_{12}$ ) vázané hydrolyticky labilní hydrazonovou

vazbou.[25] Hydrolýza hydrazonové vazby má za následek zvýšení polaritativity takové monomerní jednotky jí obsahující, tím zvýšení teploty zákalu nad teplotu lidského těla a v důsledku rozpuštění kopolymeru. Kopolymer obsahující 27,5 mol % komonomeru se skupinou C<sub>6</sub>, který byl vybrán pro další studium, má CPT 22 ° C a jeho fázová separace je dokončena při 34 ° C. Rozpuštění polymeru je dokončeno během 48 hodin při pH 5,0 i 7,4. Modelový terapeutický radionuklid, <sup>64</sup>Cu, ve formě svého hydrofobního chelátu dvojmocné mědi s 8-hydroxychinolinem je účinně zadržován hydrofobně zachycený ve fázově separovaném polymeru do rozpuštění depa hydrolýzou polymeru. Polymer s alkylovou skupinou C<sub>12</sub> vykazuje významnou hysterezi fázové separace, pravděpodobně tvorbou asociovaných nanodomén C<sub>12</sub> řetězců po fázové separaci znesnadňujícím opětovné rozpuštění při ochlazení.

Některá protinádorová léčiva vykazují významný synergický účinek s ionizujícím zářením. Připravili jsme polymerní termoresponsivní systém pro synergickou chemoradioterapii využívající tento jev. Systém je založen na injektovatelném termoresponsivním polymeru, který nese radionuklid a jako odštěpitelnou hydrofobní skupinu doxorubicin.[57, 58] V systému DOX slouží jako cytostatické činidlo se známými synergickými účinky s ionizujícím zářením a zároveň jako hydrofobní skupina řídicí bioerozi a eliminaci systému po splnění funkce. DOX je vázán k polymernímu nosiči hydrolyticky labilní *N*-glykosylaminovou vazbou. Hydrolýza *N*-glykosylaminové vazby tedy řídí uvolňování DOX a rozpouštění systému v modelovém vodním prostředí. DOX se pomalu uvolňuje během inkubace ve vodném prostředí při 37 ° C, což způsobuje úplné rozpuštění biologicky rozložitelného polymeru během přibližně 2 týdnů. Modelový radionuklid <sup>125</sup>I, vázaný na malé množství poly(*N*-isopropylakrylamid-*co*-*N*-methakryloyltyrosinamid), byl zadržen v oddělené fázi a během inkubace také pomalu rozpuštěn.

Při dalším postupu na termoresponsivních depech pro radioterapeutické aplikace bylo dále nutné zjistit radiační odolnost polymerů vůči radiolýze, protože u terapeutických β<sup>-</sup>zářičů fázově separovaný depot dostává značné radiační dávky z vlastní radiace. Informace o radiační stabilitě jsou dále užitečné pro radiační sterilizaci polymerních systémů.

Studovali jsme vliv ionizujícího záření – 10 MeV elektronového svazku na fyzikálně-chemické a fázově separační vlastnosti vybraných termoresponsivních polymerů (viz **Obrázek 3**) s CPT mezi pokojovou a tělesnou teplotou.[59] Polymery jsou ve vodném prostředí podstatně citlivější na ozáření než v suchém stavu, protože ve vodě radiolýza vody generuje radikály podílející se na degradaci polymerů. Stabilita polymerů vůči ozáření (dávky 0 - 20 kGy) ve vodných roztocích se zvyšuje v pořadí poly(*N*-vinylkaprolaktam) (PVCL, nejméně stabilní) << poly[*N*-(2,2-difluoroethyl)akrylamid] (DFP) < poly(*N*-isopropylakrylamid) (PNIPAM) << poly(2-isopropyl-2-oxazolin-*co*-2-*n*-butyl-2-oxazoline) (POX, nejstabilnější).



**Obrázek 3.** Termoresponsivní polymery použité pro studium radiační stability. Převzato z ref.[59]

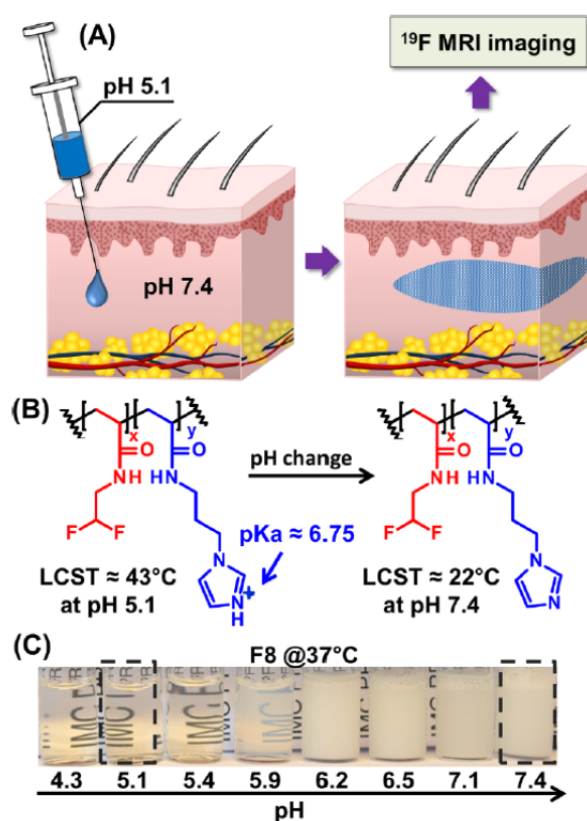
I nízké dávky  $\beta$ -záření (1 kGy), které jsou zcela relevantní pro skladování polymerních radioterapeutik a sterilizaci biomedicínských systémů, způsobují významné zvýšení molekulové hmotnosti polymerů díky zesítní (s výjimkou POX, kde je tento účinek slabý). V případě PVCL ozářeného nízkými dávkami vyvolalo zvýšení molekulové hmotnosti a tím ke snížení CPT polymeru. U PNIPAM a DFP nastává silná hydrofilizace řetězce, která vede ke zvýšení CPT. Z tohoto pohledu je POX nejvhodnějším polymerem pro konstrukci dodávacích systémů, u kterých dochází k vystavení záření, zatímco PVCL je nejméně vhodný a PNIPAM a DFP jsou vhodné pouze pro nízké radiační dávky.

Dalším praktickým problémem kromě radiolýzy polymerů pro lokální aplikaci termoresponsivního depa je ucpávání jehly zejména při hlubších injekcích, protože fázová separace teplotou organismu je velmi rychlá a může proběhnout i v kovové jehle dobře vedoucí teplo. Řešením tohoto problému může být aplikace roztoku v organickém biokompatibilním rozpouštědle jako je dimethylsulfoxid (kde je polymer rozpustný, ale bez LCST), nebo jak jsme studovali [34] použitím multiresponsivního polymeru, který umožňuje aplikaci systému ve vodném roztoku. U polymerů obsahujících imidazol umožňuje citlivost imidazolu na pH (pKa cca 7 v závislosti na funkcionalizaci) injekci systému v mírně kyselém, ale biologicky stále přijatelném prostředí (pH 4,5–5,5), kde je imidazol protonován a vysoce hydrofilní. Nabitý stav imidazolových jednotek posune teplotu přechodu polymerního roztoku na vyšší hodnoty.[60] Při zvýšení pH na 7,4 v tkáni je imidazol většinou deprotonován, což vede k fázové separaci systému při teplotách výrazně nižších než v předchozím případě. Teplota fázové separace tak klesá a je možné vytvořit systém, který je injikovatelný bez fázové separace v jehle (nízká hodnota pH injektovaného roztoku, CPT nad tělesnou teplotou), zatímco vytvoří nanostrukturované depot v tkáni, kde je vyšší hodnota pH a CPT polymeru je tak pod tělesnou teplotou.

Zatímco kombinace pH- a termoresponsivity obecně byla již dobře popsána v řadě publikací,[61, 62] zde jsme provedli syntézu a studium fyzikálně-chemických vlastností kopolymerů *N*-isopropylakrylamidu (NIPAM) a *N*-(3-imidazolylpropyl) methakrylamidu (ImPM), které jsou specificky určeny pro parenterální depotní aplikace. Bylo zjištěno, že už relativně nízký obsah ImPM skupin (1,6 mol %) je dostatečný k zavedení pH-responsivity. Turbidimetrií a dynamickým rozptylem světla bylo zjištěno,

že změna pH z 9 na 4 vedla ke zvýšení CPT z 32 na 70°C. Proces fázové separace je také doprovázen tvorbou nanočástic o rozměru cca 150–300 nm nad teplotou fázového přechodu. Zjištěná kritická hodnota pH, kde se vlastnosti systému významně mění je cca 6,5 a je tak možné systém aplikovat v kyselém pH kolem 5 zatímco se v místě aplikace vytvoří depot ohřátím při zvýšení pH na fyziologickou hodnotu 7,4. Experiment na *in vivo* zvířecím modelu s použitím polymeru v PBS (pH = 5,0) s paliperidonem jako modelovým léčivem ukázal vynikající výsledky pokud jde o řízené uvolňování léčiva z depotu.

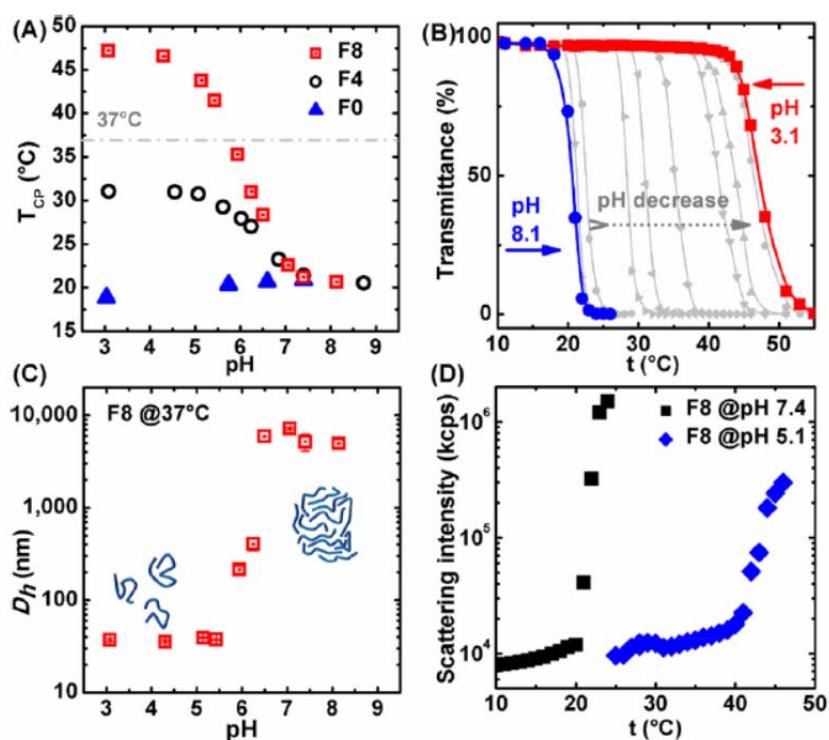
V současné době je kladen důraz na možnost monitoringu efektivity terapie v reálném čase neinvazivními medicínskými zobrazovacími technikami (teranostika), v tomto případě například sledování degradace depa. Zatímco u polymerů pro radioterapii lze případně použít teranostický zářič přímo zobrazitelný metodami nukleární medicíny (pozitronová emisní tomografie - PET, jednofotonová emisní tomografie - SPECT), pro některé aplikace jako jsou depa chemických léčiv nebo injikovatekné implantáty je použití radioaktivity nežádoucí. Pak lze s výhodou použít metod  $^{19}\text{F}$  nukleární magnetické rezonance (MRI) pro zobrazení depa a jeho degradace.



**Obrázek 4.** (A) Schematické znázornění vytvoření implantátu sledovatelného  $^{19}\text{F}$  MRI. Fluorovaný polymer se vstříkuje jako vodný roztok v mírně kyselém pufru a při změně pH a zvýšení teploty *in vivo* se tvoří depot. (B) Struktura a multiresponsivita fluorovaného kopolymeru F8 (obsahujícího 8 mol % imidazolových jednotek) reagujícího na změnu pH a teploty. (C) Makroskopický vzhled roztoků kopolymeru F8 v pufrch s různým pH při 37 °C (koncentrace polymeru  $c_{\text{pol}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Převzato z ref. [64].

V posledních letech se objevil vývoj a význam zobrazování  $^{19}\text{F}$  MRI v klinické praxi. MRI pomocí fluorovaných kontrastních látek umožňuje dosáhnout specifického signálu s velmi nízkým (ve skutečnosti v organismu zanedbatelným) pozadím a vysokým kontrastem v MRI obrazech. Ke zajištění dostatečné citlivosti MRI  $^{19}\text{F}$  jsou však zapotřebí fluorová kontrastní činidla s vysokým obsahem chemicky ekvivalentních atomů fluoru, jak jsme shrnuli v přehledovém článku ref.[63]

Proto jsme vytvořili variantu pH- a termoresponsivního polymeru, které je sledovatelná  $^{19}\text{F}$ -MRI a kde je místo hlavního monomeru *N*-isopropylakrylamidu použit *N*-(2,2-difluoroethyl)akrylamid (**Obrázek 4 a 5**).[64] Prokázali jsme, že taková depa jsou snadno zobrazitelná na  $^{19}\text{F}$ -MRI.



**Obrázek 5.** pH- a termoresponsivní chování polymerů v pufovaných roztocích při  $c_{\text{pol}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ . (A) Závislost CPT polymerů na pH stanovená turbidimetrií; (B) teplotně indukovaná změna transmittance ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) polymeru F8 při uvedených hodnotách pH; (C) hydrodynamický průměr polymeru F8 při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  stanovený dynamickým rozptylem světla; (D) teplotní závislost intenzity rozptýlené pro polymer F8 při různých pH. Převzato z ref. [64].

Hybridní kopolymery obsahující přírodní a syntetické stavební bloky jsou stále důležitější třídou funkčních materiálů.[34, 65-67]. Kombinují udržitelnou ekologii, biologickou rozložitelnost a architekturu přírodních polymerů se zpracovatelností a variabilitou syntetických polymerů.

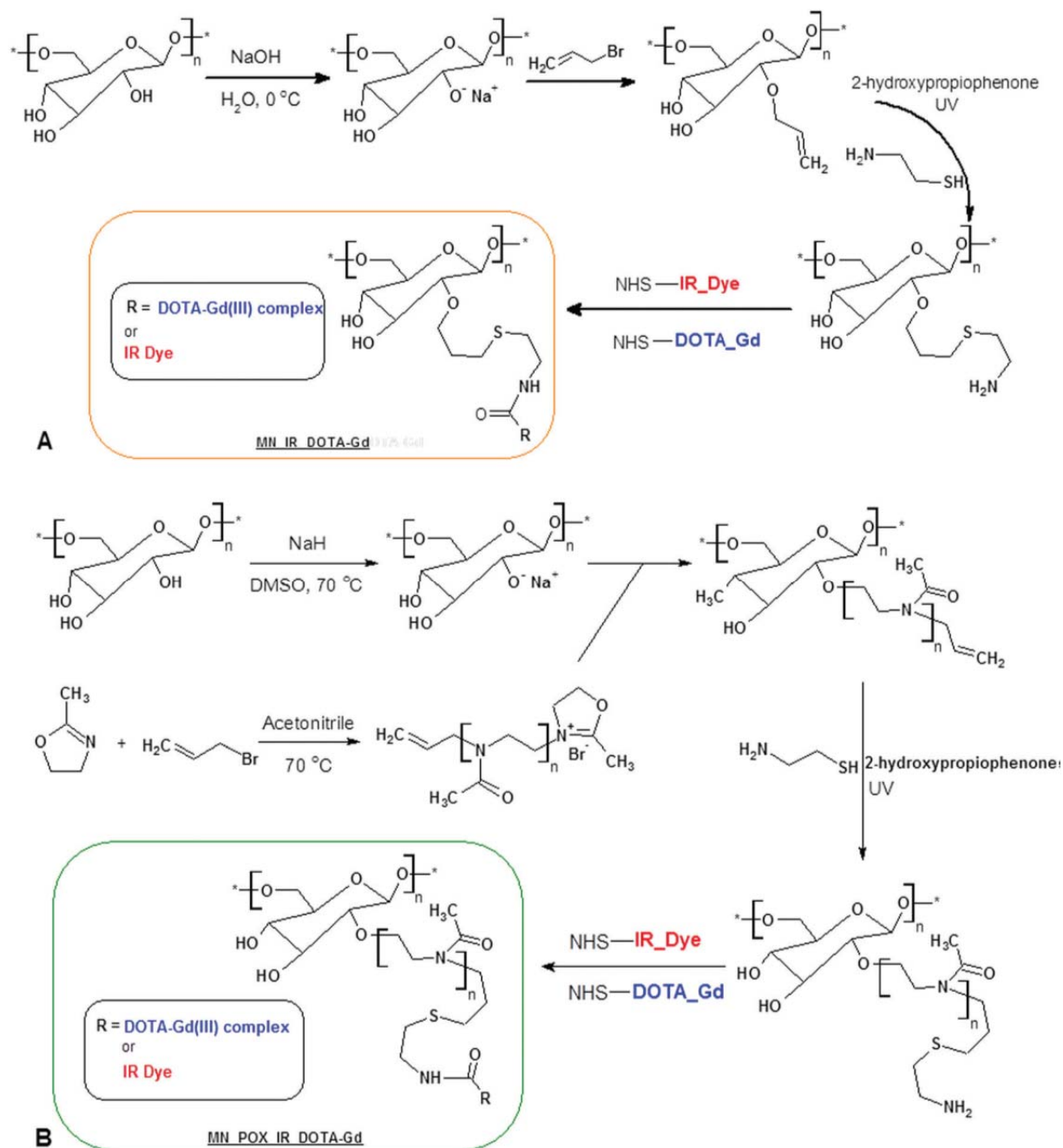
Vyvinuli jsme nový koncept biokompatibilních hybridních kopolymerů na bázi polysacharidů roubovaných poly(2-alkyl-2-oxazolin)y.[68] Poly (2-alkyl-2-oxazolin)y byly připraveny živou kationtovou polymerizací s iniciačním alkylačním činidlem umožňujícím zvolit jeden konec a molekulovou hmotnost nastavitelnou poměrem iniciátor:monomer. Živý kationtový konec po této polymeraci byl použit k alkylaci alkoholátu polysacharidu vytvářejícího tak polysacharid roubovaný poly(2-alkyl-2-oxazolin)ovými řetězci etherovou vazbou.

Prvním takovým polymerem tohoto typu byl glykogen-*graft*-poly(2-alkyl-2-oxazolin).[69] Glykogen (GG), živočišný zásobní polysacharid složený z D-glukózových jednotek přirozeně přítomný zejména ve svalech a játrech, poskytuje četné výhody pro použití jako polymerní nosič bioaktivních komponent. GG je vysoce rozvětvený kulovitý přírodní polymer.[70] Hydrodynamický průměr  $D_H$  GG je cca. 50 nm [71], což je výhodné pro akumulaci v pevných nádorech EPR efektem,[72-74] tj. akumulací makromolekulárních objektů v pevném nádoru pod velikostí přibližně 200 nm způsobená zvýšenou permeabilitou nádorové neovaskulatury pro makromolekuly a nanočástice a také špatnou nebo chybějící lymfatickou drenáží v nádorové tkáni.[73, 74] Velikost molekuly GG dále způsobuje, že GG nelze vyloučit ledvinami přímo. Proto musí být GG biodegradován na D-glukózu než může být eliminován renální filtrací, což prodlužuje poločas cirkulace GG v krevním řečišti. Další hlavní výhodou GG je jeho intracelulární degradace a relativní inertnost vůči amylázám v krevním řečišti.[70] Tyto dvě vlastnosti dávají GG vyšší stabilitu v krevním řečišti po intravenózním podání.

Roubování polysacharidů kyselinou jantarovou nebo biokompatibilními syntetickými polymery může předvídatelným a nastavitelným způsobem snížit rychlost biodegradace pro případnou akumulaci nádoru založenou na EPR efektu a také umožnit další chemickou modifikaci nosiče. Tento účinek byl prokázán pouze u polysacharidů jiných než glykogen (např. chitosan a dextrin);[75] proto jsme připravili hybridní kopolymerovou platformu založenou na biologicky rozložitelném glykogenovém jádru roubovaném biokompatibilními hydrofilními poly (2-methyl-2-oxazolinovými) rouby.

Kopolymery byly modifikovány fluorescenčními barvivy pro průtokovou cytometrii, konfokální mikroskopii a *in vivo* fluorescenční zobrazování. Kromě toho byl zkoumán vliv oxazolinových roubů na rychlost biodegradace. Na buněčné linii HepG2 byla zkoumána intracelulární lokalizace, cytotoxicita a internalizace těchto hybridních kopolymerů. Biodistribuce kopolymerů byla studována *in vivo* fluorescenčním zobrazením na myších kmene C57BL/6. Naše výsledky ukazují na biokompatibilitu, biologickou rozložitelnost a netoxicitu hybridních kopolymerů na bázi glykogenu. Kopolymery jsou endocytovány do cytoplazmy, pravděpodobně prostřednictvím kaveolami zprostředkované endocytózy. Vyšší obsah polyoxazolinu v polymerech zpomalil příjem buňkami. Nebyla pozorována žádná silná kolokalizace sondy na bázi glykogenu s lysosomy; zdá se tedy, že modifikovaný externě podávaný glykogen je degradován stejným způsobem jako endogenní glykogen. Experiment *in vivo* ukázal relativně rychlou kinetiku biodistribuce a biodegradace. Závěrem lze říci, že tyto kopolymery nabízí jedinečné chemické a biologické vlastnosti pro použití jako účinné teranostické nosiče pro onkologická léčiva s multimodálními zobrazovacími vlastnostmi.

Dalším polysacharidem, který byl analogicky použit, je lineární polysacharid mannan[76], tvořený D-manóзовými sacharidickými jednotkami. V živém organismu se mannan váže na D-manóзовé receptory (zejména na DC-SIGN receptor), což je třída multilektinových receptorových proteinů zprostředkovávajících spojení mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Mannan se tímto mechanismem hromadí v imunitních buňkách hyperexprimujících DC-SIGN receptor jako jsou makrofágy a dendritické buňky, což by mohlo být užitečné pro detekci sentinelových lymfatických uzlin a zánětů, které jsou silně infiltrovány takovými buňkami.



Obrázek 6. Příprava konjugátů mannanu. Převzato z ref. [76].

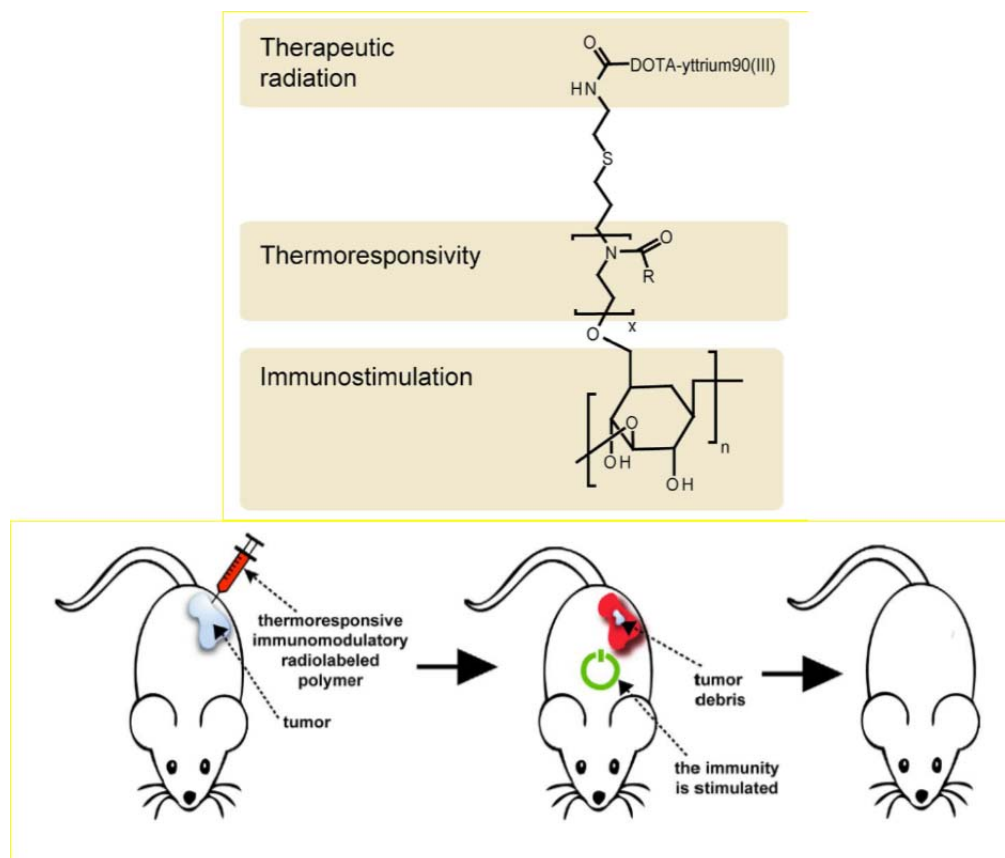
To umožňuje použití mananu jako polymerní zobrazovací činidla pro zkoumání patologických procesů a vývoj odpovídajících terapií. Prokázali jsme, že konjugáty na bázi mananu mají výjimečné vlastnosti pro multimodální zobrazování kvůli jejich biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti a vlastnostem cílení. Byly připraveny dva nové konjugáty mananu obsahující komplex gadolinia a fluorescenční sondu, jeden založený pouze na polysacharidu a druhý obsahující polysacharid s poly(2-methyl-2-oxazolin)ovými rouby. Polymery byly současně vizualizovány *in vitro* a *in vivo* magnetickou rezonancí a fluorescenčním zobrazením. Syntéza těchto komplexů na bázi mananu byla založena na alkylaci polysacharidu allylbromidem nebo na roubování s poly(2-methyl-2-oxazolinovými) řetězci, následovanou thiol-en click reakcí s cysteaminem pro zavedení primární aminoskupiny do jejich struktury (**Obrázek 6**). Nakonec byly získané konjugáty funkcionalizovány kontrastními značkami za použití odpovídajících *N*-hydroxysukcinimidových esterů. Při použití k detekci lymfatických uzlin vykazovaly polymery lepší zobrazovací vlastnosti než komerčně dostupné kontrastní látky.

Poté byla použita tato chemie pro přípravu konjugátů [67], kde polysacharidickou kostrou hybridního kopolymeru je  $\beta$ -glukan, houbový polysacharid s velmi výraznými imunomodulačními účinky prostřednictvím Toll-like receptorů. Poly(2-alkyl-2-oxazolin)ové grafty jsou termoresponsivní a podílejí se na vytvoření depotu. Zároveň konjugát nese skupiny radioznačitelné  $^{90}\text{Y}$ . Jako termoresponsivní polymer byl zvolen POX, protože je, jak jsme dříve prokázali, vysoce rezistentní k radiolýze.[59]

Tyto kopolymery jsme navrhli pro koncepčně novou léčbu - bimodální imunoradioterapii pomocí termoresponsivního imunostimulačního radioaktivně značeného polymeru. Princip léčby je uveden na **Obrázku 7**, radiace ničí nádorové buňky a po rozpadu radionuklidu imunomodulátor zvyšuje imunitní odpověď elicitovanou radiací odumřelými zbytky nádorových buněk proti metastázám. Taková léčba vykazuje následující výhody: Nechirurgické podávání léčiva injekcí polymerního roztoku, lokální radiační terapie s minimálním ozářením zbytku těla a zesílená lokální imunoterapie s využitím T buněk proti nádorovým buňkám a metastázám. Navíc je polymer v těle degradovatelný, protože ho glykosidázy přeměňují na metabolity, které jsou menší než prahová hodnota renální filtrace ( $\sim 45$  kDa), a jsou tedy vyloučitelné ledvinami.

Bylo studováno termoresponsivní chování těchto polymerů ve vodných roztocích a *in vitro* byly detailně testovány jejich biologické vlastnosti (cytotoxicita, oxidativní vzplanutí leukocytů, produkce cytokinů, internalizace). Pro detailní studii byl vybrán  $\beta$ -glukan extrahovaný z houby ucha jidášova (*Auricularia auricula-judae*) roubovaný poly(2-isopropyl-2-oxazolin-co-2-butyl-2-oxazolin)ovými rouby nesoucími komplexy 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctové kyseliny (DOTA) s  $^{90}\text{Y}$  na koncích roubů ( $M_n$  roubů 2,5 kDa, s maximální dosažitelnou hustotou roubů). Biodistribuce a protinádorová účinnost byly studovány na *in vivo* zvířecím modelu na myších nesoucích lymfom EL4. Byla prokázána vynikající synergie imunoradioterapie, v této skupině bylo zcela vyléčeno  $\sim 50\%$  myši bez významných vedlejších účinků.





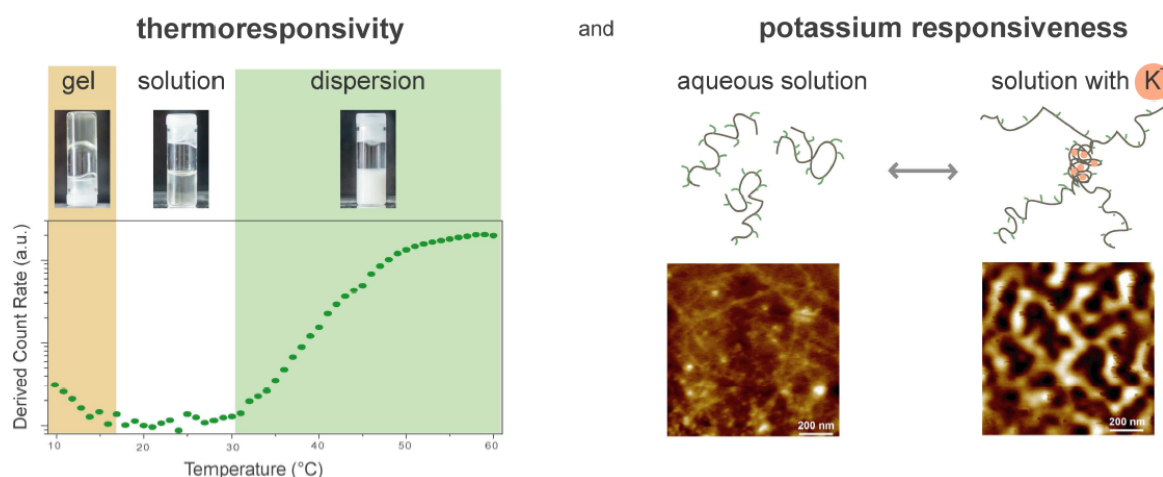
**Obrázek 7.** Princip bimodální imunoradioterapie: Záření ničí nádorové buňky; po rozpadu radionuklidu zvyšuje imunomodulátor následující imunitní odpověď proti zbývajícím nádorovým buňkám a metastázám. Převzato z ref. [67].

V další studii [66] jsme detailněji studovali fázovou separaci a další vlastnosti těchto kopolymerů v závislosti na jejich struktuře pro další optimalizaci tohoto systému se slibnými biologickými vlastnostmi. Byly syntetizovány čtyři vzorky polymerů, lišící se délkou štěpu polyoxazolinu (500–5000 Da), s použitím  $\beta$ -glukanů extrahovaných z *Auricularia auricula-judae*. Termoresponsivní chování připravených polymerů bylo důkladně studováno pomocí dynamického rozptylu světla, fluorescence a magnetické rezonance, což demonstruje snadné nastavení teploty bodu zákalu podle délky roubu. Navíc všechny vzorky vykazují netoxicitu *in vitro*. Ukázali jsme pomocí oxidačního rozpadu polymorfonukleárních jader, že požadované imunostimulační vlastnosti nejsou polyoxazolinovým roubováním  $\beta$ -glukanů sníženy, ani nejsou ovlivněny délkou roubů polyoxazolinových řetězců. Proto pro zamýšlenou aplikaci může být konečná délka štěpu zvolena pouze s ohledem na termoresponsivní vlastnosti polymeru, aniž by to ovlivnilo jejich imunostimulační vlastnosti.

Dalším krokem bylo použití polysacharidu z řas,  $\kappa$ -karagenanu [65], ke konstrukci analogického systému s poly(2-alkyl-2-oxazolin)ovými rouby vykazujícími LCST.  $\kappa$ -Karagenan má podobné imunomodulační účinky jako houbový  $\beta$ -glukan, ale navíc vykazuje termoresponsivitu s opačným trendem – má horní kritickou rozpouštěcí

teplotu – UCST, a navíc geluje v přítomnosti draselných iontů. Takový systém pak vykazuje zajímavou teplotní responsivitu ve vodných roztocích. Za nízké teploty je fázově separován díky UCST  $\kappa$ -karagenanové části, v okolí laboratorní teploty je molekulárně rozpuštěn a při teplotě lidského těla a výše je opět fázově separován díky LCST poly(2-alkyl-2-oxazolin)ových roubů. Fázová separace je dále umocněna responsivitou  $\kappa$ -karagenanové části k přítomnosti draselných iontů způsobujících gelaci, což v případě použití pro tvorbu depa synergicky vylepší stabilitu takového depa (injekce jako sodná sůl + fázová separace vlivem zvýšení teploty a přítomnosti draselných iontů ve tkáni, viz **Obrázek 8**).

Molekulární principy stojící za tímto multistimuli-responsivním chováním byly objasněny pomocí dynamického rozptylu světla, měření magnetickou rezonancí a fluorescencí a mikroskopie atomové síly. Tyto polymery by mohly být použity v celé řadě biologických aplikací vyžadujících responsivitu ke změně teploty a draselným iontům.



**Obrázek 8.** Hybridní systém na bázi  $\kappa$ -karagenanu vykazující responsivitu ke změně teploty a draselným iontům. Převzato z ref. [65].

## 2.2 Systémy, kde polymerní stabilizační obal není kovalentně připojen k jádru

Dalšími studovanými systémy jsou nanočásticové systémy, které jsou koloidně stabilizované vnějším činidlem nebo kde samotná struktura má buď anorganické nebo nanoprecipitací změnou složení rozpouštědla tvořené polymerní jádro a polymerní stabilizační obal není kovalentně připojen k jádru. Takové, obvykle snadno připravitelné nanočástice mají řadu výhod, například vhodnou velikost pro pasivní nádorovou akumulaci EPR efektem.

Fotodynamická terapie (PDT) je široce studována a používána zejména k léčbě kožních malignit a dalších dermatologických onemocnění. PDT spočívá v aplikaci fotosenzibilizátoru s následným laserovým ozářením nádorových lézí.[77,78] Fotosenzibilizátor po ozáření světlem aktivuje kyslík přítomný v tkáních na singletový kyslík, který je vysoce destruktivní v důsledku poškozuje důležité biomolekuly, jako jsou proteiny, lipidy, DNA a blízké buněčné membrány. Temoporfin (Foscan<sup>®</sup>) je hydrofobní derivát porfyrinu schválený jako fotosenzibilizátor pro fotodynamickou terapii

spinoceulárního karcinomu hlavy a krku.[79] Temoporfin je transportován v krvi, adsorbován na krevní proteiny a následně translokován do lipoproteinů.[80]

Účinnost fotodynamické terapie je často omezena nedostatečnou akumulací fotosenzibilizátorů v nádorové tkáni a nepříznivou retencí v kůži, což vede k fotosenzibilizaci pacientů na celém povrchu těla.[81] Proto je dodávání fotosenzibilizátorů specifických pouze pro nádorovou tkáň stále výzvou.

Vyvinuli jsme [82] plně biologicky odbouratelný nanosystém založený na termoresponsivních tuhých lipidových nanočásticích (solid lipid nanoparticles, SLNP) stabilizovaných polymerní povrchově aktivní látkou s nekovalentně vázaným fotocitlivým temoporfinem (T-SLNP) s velikostí částic pod 50 nm. Systém obsahuje lipidické jádro složené z mastného alkoholu 1-tetradekanolu. 1-Tetradekanol byl nově použit kvůli jeho bodu tání (35–39 ° C) a také proto, že je polárnější než např. triacylglyceroly, takže lépe solubilizuje temoporfin. Kromě toho je plně metabolizovatelný přes kyselinu tetradekanovou  $\beta$ -oxidací na acetyl-CoA a následně Krebsův cyklus na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Pro stabilizaci a pokrytí povrchu nanočástic, aby se zabránilo zachycení do retikuloendoteliálního systému byl použit netoxický polymerní povrchově aktivní kopolymer poly(ethylenoxid-*block*- $\epsilon$ -kaprolakton) (PEO-*block*-PCL). Samotná povrchově aktivní látka je také degradována na kyselinu 6-hydroxyhexanovou a polyethylenoxid, které jsou eliminovatelné ledvinami díky relativně nízké molekulové hmotnosti pod renálním prahem.[54] T-SLNP jsou pevné a stabilní proti agregaci při skladovací teplotě 4 ° C. Teplota tání jádra je nastavena na 38–40 ° C, aby se uvolnil temoporfin až v nádorové tkáni, která je v důsledku intenzivního metabolismu hypertermická (analogie s termoresponsivními liposomy) a SLNP tam roztají na kapičky stabilizované povrchově aktivní látkou.

Účinnost T-SLNP byla porovnávána s komerčním přípravkem temoporfinu v podmínkách fototoxicity *in vitro* v buňkách 4T1 (karcinom prsu) a MDA-MB-231 (lidský adenokarcinom prsu). Studie *in vitro* prokázala rychlejší kinetiku akumulace v buňkách pro T-SLNP, což vedlo k vyšší fototoxicitě proti nádorovým buňkám. *In vivo* protinádorová účinnost na Nu/Nu myších nesoucích nádory MDA-MB-231 byla značně lepší pro T-SLNP ve srovnání s komerčními formulacemi temoporfinu. Ukázali jsme, že náš systém je účinnější ve srovnání s publikovanými dopravními systémy pro temoporfin.

Tento systém se ukázal mít lepší vlastnosti (zejména stabilitu, ale i možnost uvolnění aktivního nákladu změnou teploty a terapeutickou účinností) než námi dříve studované nanočástice připravené iontovou gelací alginátu a chitosanu, respektive oligomerů chitosanu pro dopravu těžce aktivní látky (temoporfinu).[83] Zde jsme připravili elektrostatickými interakcemi mezi kationtovým chitosanem a aniontovým alginátem stabilizované polyplexové nanočástice a identifikovali jsme klíčové procesní parametry pro nastavení vlastností. Distribuce velikosti částic, dispergovatelnost a  $\zeta$ -potenciál byly stanoveny dynamickým rozptylem světla (DLS) a průměr a morfologie jednotlivých částic byly vizualizovány transmisí elektronovou mikroskopií (TEM). Bylo zjištěno, že distribuce velikosti polyplexních nanočástic závisí na koncentraci zásobních roztoků chitosanu a alginátu a na pořadí a poměru přidání zásobních roztoků, jakož i na pH výsledné směsi. Zdá se, že nanočástice jsou homogenní, i když mikrofotografie

naznačují jistou strukturu jádro-obal. Nanočástice jsou stabilní při pH 7,4 (pH krevní plazmy) a vykazují jen velmi malý únik léčiva v experimentálních modelových podmínkách transportu krevního řečiště do cílových tkání.

Princip intové interakce mezi opačně nabitými polymery byl nicméně efektivně využit pro inkorporaci proteinů do nanočástic hydrofóbního polyaniontu – kopolymeru methakrylové kyseliny a ethylakrylátu, který je ve vodě rozpustný v neutrálním a alkalickém pH, kde je kyselina ionizována, a je nerozpustný v kyselém pH.[30] Zde jsme studovali polymerní nanokontejnery citlivé na změny pH založené na aniontovém polymeru Eudragit L 100-55<sup>®</sup> (poly(methakrylová kyselina-co-ethylakrylát) 1: 1), schváleném Food and Drug Administration, povrchově stabilizované detergentem Brij98<sup>®</sup>. Charakteristiky interakce mezi Eudragitem L100-55<sup>®</sup> a Brij98<sup>®</sup> při různých hodnotách pH a jejich optimální poměr pro tvorbu nanočástic byly studovány pomocí izotermální titrační kalorimetrie. Vliv poměru polymeru k povrchově aktivní látce na velikost a strukturu částic byl studován při různých hodnotách pH za použití metod dynamického rozptylu světla a malouhlového rozptylu rentgenového záření. Ukázalo se, že stabilní nanočástice se vytvářejí při kyselém pH při molárních poměrech polymer-surfaktant od 1:43 do 1: 139. Trypsin byl úspěšně enkapsulován do nanočástic jako modelová bioaktivní složka. Účinnost enkapsulace byla stanovena značením trypsinu radioaktivním <sup>125</sup>I. Nanočástice účinně chrání trypsin před štěpením pepsinem. Výsledky ukázaly, že trypsin enkapsulovaný do nových nanokontejnerů citlivých na pH si po ošetření pepsinem udržel více než 50 % své aktivity ve srovnání s neenkapsulovaným trypsinem. Popsaný koncept přispěje jak k pochopení principů, tak k návrhu nanokontejnerů nové generace pro perorální použití.

Aplikačně velmi zajímavou responsivitou je citlivost k reaktivním formám kyslíku (reactive oxygen species, ROS). ROS hrají klíčovou roli ve fyziologických a patofyziologických procesech člověka. ROS, zejména pak peroxid vodíku, jsou součástí buněčných signalizačních drah, které jsou nezbytné pro růst, vývoj a zdraví živých organismů.[84] Na druhé straně vede nadprodukce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> k oxidačnímu stresu a zánětlivým projevům, které poškozují tkáňový a orgánový systém souvisí s rozvojem různých nemocí, včetně nádorů, diabetu, kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob.[85] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je silně nadprodukován v nádorech ve srovnání s normálními buňkami, kde hladiny intracelulární koncentrace mohou být v rozsahu čtyř řádů od 10<sup>-8</sup> M při proliferaci do 10<sup>-4</sup> M při apoptóze.[84, 85]. V souladu s tím jsou v několika studiích popsány zvýšené hodnoty ROS téměř ve všech lidských nádorových buňkách ve srovnání s jejich normálními protějšky.[86-88] Proto se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stal běžným markerem oxidačního stresu, hraje důležitou roli v karcinogenezi a je také spojen s apoptózou, buněčnou proliferací a DNA mutacemi. Zapojení ROS do buněčné signalizace a chorobných stavů tedy motivovalo konstrukci chytrých chemických nástrojů, jako jsou mikro- a nanočástice reagující na ROS coby nosiče bioaktivních složek.[89-92] Možnost cílené degradace nanonosiče a uvolnění nákladu v mikroprostředí bohatém na ROS je zvláště zajímavá, např. pro cílené dodávání léčiva do nádorů a míst zánětu.

Boronové estery pinakolového typu se ukázaly jako nejselektivnější a nejcitlivější pro detekci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve fyziologických koncentracích s vysokou

specificitou.[91, 92] Tuto chemii jsme využili pro konstrukci ROS-responsivního (respektive selektivně ROS selektivně degradovatelného) nanočásticového systému [93] nesoucího boronové estery a alkynové zbytky, kde hlavní řetězec degraduje koncentracemi peroxidu vodíku typickými pro nádorové mikropostředí. *In vitro* jsme prokázali, že jako nosič protinádorového léčiva paklitaxelu je tento ROS-degradovatelný systém efektivnější než analogické nanočástice nedegradovatelné ROS.

Dalším typem selektivně ROS-degradovatelného systému jsou aromatické polyoxaláty, polyestery kyseliny šťavelové a fenolů. Jejich reakce s peroxidem vodíku produkuje jako vedlejší produkt oxid uhličitý, který je v první fázi produkován jako cyklický elektronově excitovaný dimer, který, pokud je v okolí přítomen fluorofor, způsobí při rozpadu na CO<sub>2</sub> chemiluminiscenci, monitorující místo degradace. Jevu se využívá např. u tyčinek pro „chladné světlo“ - chemiluminiscenci. Takto jsme připravili polyoxalátové nanočásticové proléčivo [94] založené na protinádorově účinném analogu hormonu diethylstilbestrolu jedнокrokovou polykondenzací, kde léčivo je součástí hlavního řetězce a uvolní se jeho degradací ROS v účinné formě, což vede ke specifitějšímu uvolňování léčiva a minimalizaci toxických vedlejších účinků na buňky nevyrábějící ROS, jak bylo prokázáno experimenty *in vitro*. Tato strategie umožňuje opětovné využití úspěšného chemoterapeutického činidla, které bylo klinicky málo využíváno z důvodu vedlejších účinků.

Dalším, koncepčně odlišným systémem jsou nanočástice s anorganickým jádrem koloidně stabilizované polymerním obalem, který je k anorganickému jádru vázán koordinační vazbou. Nanočástice kombinují výhody anorganického jádra (chemiluminiscence, možnost zabudování radionuklidu, opacita v rentgenové oblasti – kontrastní činidlo) s výhodami polymeru, hlavně jeho hydrofilicity a biokompatibilitou spolu se schopnostmi koloidně stabilizovat systém. Koordinační vazba mezi kovovým iontem tvořícím jádro (zde Ge<sup>4+</sup>, Ca<sup>2+</sup> a W<sup>6+</sup>) a ligandem na polymeru umožňuje snadné pokrytí takových nanočástic prostým smícháním nanočástic a polymeru ve vhodném prostředí, případně kombinovat v různém poměru a kombinacích jádra a polymery na molekulární stavebnice. Jako ligandy na polymeru jsme použili jednak 1,2- a 1,3-dioly (inherentně obsažené v polysacharidech použitých pro pokrytí nanočástic), jednak terminální 1-hydroxy-1,1- bisfosfonáty, se kterými jsme dosáhli mimipřádné koloidní stability polymerů.[95]

Jako první jsme jako jádro použili oxid germaničitý [96], kde čtyřmocné germanium je známo tvorbou stabilních cyklických komplexů s 1,2- a 1,3-dioly, a jako polymery pro pokrytí jádra vybrané přírodní polysacharidy. Nanočástice jsou založeny na krystalickém jádru z oxidu germaničitého o velikosti v rozmezí 20–30 nm a 300–900 nm. Jádro na bázi čtyřmocného germania umožňuje připojení polysacharidů *in situ* přímou chelatací. Kromě toho byly nanočástice alternativně potaženy tenkou vrstvou oxidu křemičitého. Po potažení byl na povrch naroubován 3-(triethoxysilyl)propylisokyanát a polysacharidy byly imobilizovány na povrchu částic kovalentní uretanovou vazbou, což umožňuje ještě stabilnější polysacharidový povlak, než který byl získán chelatací. Tento přístup poskytuje přístup k nové materiálové platformě pro biologické stopy a zobrazovací aplikace.

Dalším použitým materiálem pro anorganické jádro byl jednak wolfram vápenatý (dopovaný lanthanoidy pro nastavení fluorescenčních vlastností), kde jak vápenaté ionty tak šestimocný wolfram komplexují 1,2- a 1,3-dioly v přírodních polysacharidech, jednak oxid wolframový.[97] V této studii jsme popsali syntézu nanokrystalických  $\text{WO}_3$  a  $\text{CaWO}_4$  dopovaných  $\text{Eu}^{3+}$  nebo  $\text{Tb}^{3+}$  (rozsah velikostí 10–160 nm) potažených polysacharidy. Tyto nanočástice představují univerzální snadno konstruovatelný modulární nástrojový soubor pro multimodální zobrazování. Částice adsorbují významné množství polysacharidů z roztoku, čímž získají biokompatibilitu a mohou sloužit jako platforma pro značení. Pro  $\text{WO}_3$  je sorpce reverzibilní, pro  $\text{CaWO}_4$  prakticky ireverzibilní.  $\text{CaWO}_4/\text{Tb}^{3+}$  potažený chemisorbovaným dextrinem, mannanem, guarovou gumou a alginátem sodným byl úspěšně zobrazen konfokálním mikroskopem na buněčné kultuře linie HepG2.

Pokud jde o systém zamýšlený pro použití v organismu, je vždy nutné myslet na biodegradabilitu, která je v některých případech anorganických jader problémem, jakkoliv může být částice zdánlivě bioinertní. Jením z prokazatelně biodegradovatelných materiálů je hydroxyapatit (fosforečnan hydroxid vápenatý tvořící minerální složku kostí). Pro pokrytí nanočástic hydroxyapatitu jsme použili biokompatibilní polymery s terminálními 1-hydroxy-1,1-bisfosfonátovými skupinami. Zde jsme dosáhli mimořádné koloidní stability získaných hybridních částic.[98] Akumulace nanočástic v nádorech EPR efektem obvykle trvá, aby byla plně účinná, alespoň desítky hodin. To je v rozporu s požadavkem na minimalizaci radiační dávky pacienta pomocí diagnostických radionuklidů s co nejkratším možným poločasem rozpadu. Vyvinuli jsme dvoustupňový diagnostický systém, který umožňuje monitorovat dlouhodobé cílicí efekty jako je EPR efekt pomocí radioaktivních značek s krátkým poločasem rozpadu pomocí biokompatibilních nanočástic hydroxyapatitu potažených polymery pro koloidní stabilizaci. V první fázi předběžného cílení („pretargetingu“) mohou neoznačené nanočástice cirkulovat v krvi. Poté se podá radiofarmakum s afinitou k hydroxyapatitu ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -1-hydroxy-1,1-difosfonát,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HDP schválený pro SPECT diagnostiku kostí) pro *in situ in vivo* značení nanočástic a následnou vizualizaci SPECT/CT. Nanočástice nejsou *in vitro* cytotoxické, jak bylo prokázáno na několika buněčných liniích. Jak nanočástice předem značené  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HDP, tak neoznačené nanočástice podané 1 nebo 24 hodin před injekcí  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HDP byly vizualizovány *in vivo* pomocí SPECT/CT u myši, což jasně prokázalo účinné *in vivo* radioaktivní značení nanočástic.

Vzhledem k mimořádné stabilitě pokrytí vázaného přes geminální 1-hydroxy-1,1-bisfosfonátové skupiny byla tato chemie využita i pro pokrytí upkonverzních částic lanthanoidy dopovaného tetrafluoroyttritanu sodného [95] a titanátových nanočástic pro zabudování do epoxidových pryskyřic jako plniva (kompatibilizátor plnivo-matrice).[99]

## 2.3 Samouspořádané systémy blokových a roubovaných polymerních architektur stabilizované strukturou samotného polymeru, kde hydrofilní stabilizující obal je kovalentní součástí nanočástice

Specifickým případem jsou samouspořádané systémy amfifilních blokových a roubovaných polymerních architektur stabilizované strukturou samotného polymeru, kde hydrofilní stabilizující obal je kovalentní součástí samouspořádaného nanoobjektu. V těchto systémech jsou hydrofilní proti agregaci stabilizující bloky kovalentně vázány na bloky řídící samouspořádání (hydrofóbní respektive citlivé na vnější podněty), což stericky silně ovlivňuje, jaké nanostruktury mohou ve vodě jako selektivním rozouštědlem vzniknout a jak jsou stabilní vůči disociaci na jednotlivé řetězce rozpuštěné ve vodě (unimery). Pokud je blok řídící samouspořádání responsivní na vnější podněty respektive může selektivně degradovat určitým vnějším podnětem, pak je i celý systém citlivý na vnější podnět a lze toho využít.

### 2.3.1 Termoresponsivní systémy

Základním biologicky relevantním podnětem, který může řídit samouspořádání nebo rozpad nanoobjektu je změna teploty (např. laboratorní teplota (cca 23 °C) – teplota organismu (37 °C)).

Blokové a roubované kopolymery s jedním blokem vyjizujícím LCST a jedním nebo více hydrofilními bloky jsou snadno rozpustné pod CPT termoresponsivního bloku jako molekulární roztoky. Když se teplota zvýší nad CPT termoresponsivního bloku, vytvoří se samouspořádané nanoobjekty typu jádro-obal s jádrem sestávajícím z fázově separovaných termosensitivních bloků obklopených obalem hydrofilních bloků.[23, 24, 53, 100-102] Samouspořádání vyvolané teplotou je řízeno difuzí a tyto micely mají z termodynamických důvodů velmi úzké rozdělení velikostí. Velmi důležitou výhodou ve srovnání s jinými typy nanočástic je to, že se dají mnohem snadněji připravit (pouhým zahřátím roztoku polymeru), není nutná žádná dialýza nebo jiné další operace.

Pro přípravu termoresponsivních nanočástic jsme využili blok vyvinutý pro termoresponsivní depoty sledovatelná  $^{19}\text{F}$  MRI, poly[*N*-(2,2difluoroethyl)akrylamid] (viz výše) a spojili ho s biokompatibilními hydrofilními bloky.[103] V této pilotní studii jsme vyvinuli nové biokompatibilní, teplotně citlivé a snadno syntetizované samoasociované nanočástice typu jádro-obal obsahující dostatečnou koncentraci magneticky ekvivalentních atomů fluoru pro účely  $^{19}\text{F}$  MRI. Struktura nanočástic je založena na amfifilních kopolymerech obsahujících dva bloky, hydrofilní poly [*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid]ový (PHPMA) nebo poly(2-methyl-2-oxazolin)ový (PMeOx) blok a termoresponsivní blok poly[*N*-(2,2difluorethyl)akrylamid]u (PDFEA). Termoresponsivní vlastnosti bloku PDFEA nám umožňují kontrolovat proces samoskládání nanočástic po jeho zahřátí ve vodném roztoku. Velikost částic závisí na složení kopolymery a nejslibnější kopolymery s delšími termoresponsivními bloky tvoří nanočástice vhodné velikosti pro zobrazování angiogeneze nebo značení buněk (přibližně

120 nm). Experimenty *in vitro*  $^{19}\text{F}$  MRI odhalily dobrou citlivost těchto kopolymerních kontrastních činidel a bylo prokázáno, že jsou necytotoxická pro několik buněčných linií.

### 2.3.2 Enzymaticky degradovatelné systémy

Dalším typem studovaných systémů jsou polymerní systémy se samoasociovaným jádrem degradovatelným vysoce specifickými biokatalyzátory – enzymy, konkrétně založenými na alifatických polyesterech degradovatelných lipázami.[104-106]

Vyvinuli jsme biodegradovatelný biokompatibilní systém pro dopravu antituberkulotického antibiotika rifampicinu se zabudovaným fluorescenčním senzorem pro sledování uvolňování léčiva a degradace nanočástic. Do polymerních nanočástic na bázi polyethylenoxid monomethyl ether-*block*-poly( $\epsilon$ -kaprolakton)u byl nekovalentně navázán rifampicin. Nanočástice obsahují kumarinový FRET (Förster resonance energy transfer) senzor, který umožňuje hodnocení uvolňování léčiva v reálném čase nejen *in vitro*, ale také v živých makrofágech, kde mykobakterie obvykle žijí jako těžko eliminovatelní intracelulární parazité. Fluorofor také umožňuje *in situ* monitorování enzymatické degradace nanočástic v makrofázích díky závislosti fluorescence na polaritě okolního prostředí.

Hydrodynamický poloměr nanočástic byl ve všech případech udržován pod 35 nm, aby se umožnila účinná distribuce v organismu pro aplikaci buď intravenózně nebo jako aerosol do dýchacích cest, což může být jinak problém pro větší nanočástice a mikročástice.

Bylo prokázáno, že nanočástice jsou účinně absorbovány makrofágy, kde jsou velmi rychle spojeny s lyzozomálním kompartmentem a uvolní se z nich léčivo. Po uvolnění léčiva jsou nanočástice v makrofágech enzymaticky degradovány s poločasem ca. 88 minut.

Na zavedených zvířecích *in vivo* modelech tuberkulózy na myších kmene BALB/c a dániu pruhovaném bylo prokázáno, že nanočástice mají zlepšenou farmakokinetiku a farmakodynamiku, jsou dobře tolerovány a jsou mnohem účinnějšími terapeutiky ve srovnání s ekvivalentem volného rifampicinu.

Pro další úpravu vlastností systému jsme použili pro konstrukci jádra i jiný hydrofóbní alifatický polyester – polypropylensukcinát.[107] Amfifilní blokový kopolymer poly(ethylenoxid-*block*-propylensukcinát) (mPEO-*block*-PPS) byl připraven polykondenzací kyseliny jantarové a 1,3-propandiolu a následným navázáním polyethylenoxid monomethyl etheru.

Analýza *in vitro* chování připravených nanočástic na buněčné kultuře (příjem a intracelulární lokalizace v buňkách, enzymatická degradace studovaná pomocí FRET senzoru) byla provedena pomocí fluorescenčních studií. Protinádorové léčivo paklitaxel (PTX) byl zabudován do nanočástic různých velikostí (30, 70 a 150 nm) a bylo hodnoceno jeho uvolňování *in vitro* v různých buněčných modelech a porovnáváno s komerčními formulacemi PTX. Analýza kopolymeru mPEO-*block*-PPS ukazuje teplotu



skelného přechodu < tělesnou teplotu < teplotu tání, nižší toxicitu (včetně toxicity produktů rozkladu), vyšší účinnost solubilizace léčiva nanočásticemi, vyšší stabilitu vůči spontánní hydrolýze během transportu v krevním řečišti a současnou lepší enzymatickou rozložitelnost po absorpci do buněk ve srovnání s analogickými kopolymery na bázi poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu) a polylaktidu. Podrobné studie cytotoxicity *in vitro* a v *in vivo* nádorovém modelu ukázaly vyšší účinnost nanočástic ve srovnání s komerčními formulacemi PTX.

### 3. Závěry

Při kritickém zhodnocení a ohlédnutí zpět za vybranými klíčovými publikacemi publikovanými po obhájení titulu doktora věd (tj. 2016 – srpen 2019), které tvoří základ této habilitační práce, mohu konstatovat, že nekovalentní samoasociace polymerů na supramolekulární nanoobjekty je fenoménem, jehož detailní studium a pochopení umožňuje efektivní využití v mnoha nejen medicínských aplikacích. Ze systémů zahrnutých do této práce považuji do budoucna za nejslibnější a které bych rád v budoucnu dále rozvíjel, následující:

- U polymerů vytvářejících injikovatelná depa hybridní kopolymery pro imunoradioterapii nádorů, které mají velmi slibné biologické chování jako terapeutika i vzhledem ke způsobu aplikace. Zde bude stávající systém na bázi konjugátu imunomodulující polysacharid-termoresponsivní polymer-radionuklid kombinován se systémem obsahujícím atomy fluoru pro možnost neinvazivního sledování depa  $^{19}\text{F}$ -MRI a a pH-responsivními imidazolovými funkčními jednotkami pro snadnou injekci. Dále bude detailněji studován mechanismus účinku tohoto systému *in vivo*, hlavně protinádorové složky imunitního systému, které jsou jím aktivovány.
- U neprotonových polymerních MRI kontrastů se soustředíme na  $^{19}\text{F}$ , ale i  $^{31}\text{P}$  MRI, kde kontrastní činidlo umožní funkční zobrazení fyziologických procesů díky paramagnetiku vázanému na systém vazbou selektivně štěpitelnou v patologicky poškozené tkáni.
- U selektivně degradovatelných systémů se budeme zabývat zejména systémy degradovatelnými ROS, které jednak umožní selektivní aktivaci v nádorové a zanícené tkáni, jednak na systémy ROS generující za účelem lokální imunomodulace.

Zároveň je třeba podotknout, že některé přístupy nanomedicíny do budoucna nejsou až tak slibné, například jde o systémy založené čistě na EPR efektu nádorové akumulace (který má, jak je poslední dobou v literatuře někdy zdůrazňováno, řadu omezení). Dále jistou skepsi pro praktické využití *in vivo* v organismu (nikoliv *in vitro*!) si pravděpodobně zaslouží systémy s anorganickým jádrem, jednak kvůli koloidní stabilitě, ale hlavně kvůli biodegradabilitě, která je sice někde prokázána (hydroxypatit), ale někde je značně kontroverzní (superparamagnetické částice oxidů železa) a v řadě případů je jasné, že jde o materiál sice možná bioinertní, ale rozhodně nebiodegradovatelný (nanočástice zlata, nanodiamanty atd.).

U některých systémů je dokonce biodegradace nežádoucí, protože by vedla k silně toxickým produktům (upkonvertující částice lanthanoidy dopovaného tetrafluoroytritranu sodného). Pro teoretické studie je nicméně lákavá snadná připravenost často velmi definovaných materiálů majícími často unikátní fyzikální vlastnosti.

## Seznam publikací zahrnutých do habilitační práce (\* - korespondenční autor)

- A. M. Hrubý\*: Samouspořádání v polymerních systémech inspirované živou přírodou. *Chemické listy*. Roč. 112, č. 5 (2018), s. 294-300.
- B. O. Sedláček, P. Černoch, J. Kučka, R. Konefal, P. Štěpánek, M. Vetrík, T. P. Lodge, M. Hrubý\*: Thermoresponsive polymers for nuclear medicine: which polymer is the best? *Langmuir*. Roč. 32, č. 24 (2016), s. 6115-6122.
- C. A. Bogomolova, L. Kaberov, O. Sedláček, S. K. Filippov, P. Štěpánek, V. Král, X.Y. Wang, S.L. Liu, X .D. Ye, M. Hrubý\*: Double stimuli-responsive polymer systems: how to use crosstalk between pH- and thermosensitivity for drug depots. *European Polymer Journal*. Roč. 84 (2016), s. 54-64.
- D. D. Jiráček\*, A. Gálisová, K. Kolouchová, D. Babuka, M. Hrubý: Fluorine polymer probes for magnetic resonance imaging: quo vadis? *Magnetic Resonance Materials in Physics Biology and Medicine*. Roč. 32, č. 1 (2019), s. 173-185.
- E. O. Sedláček\*, D., Jiráček, A. Gálisová, E., Jager, J. E. Laaser, T., P. Lodge, P., Štěpánek, M. Hrubý\*: <sup>19</sup>F magnetic resonance imaging of injectable polymeric implants with multiresponsive behavior. *Chemistry of Materials*. Roč. 30, č. 15 (2018), s. 4892-4896.
- F. M. Jirátová, A., Pospíšilová, M., Rabyk, M. Pařízek, J., Kovář, A. Gálisová,, M. Hrubý, D. Jiráček\*: Biological characterization of a novel hybrid copolymer carrier system based on glycogen. *Drug Delivery and Translational Research*. Roč. 8, č. 1 (2018), s. 73-82.
- G. M. Rabyk, A., Gálisová, M., Jirátová, V. Patsula, L. Srbová, L., Loukotová, J., Parnica, D. Jiráček, P. Štěpánek, M. Hrubý\*: Mannan-based conjugates as a multimodal imaging platform for lymph nodes. *Journal of Materials Chemistry B*. Roč. 6, č. 17 (2018), s. 2584-2596.
- H. L. Loukotová, J. Kučka, M. Rabyk, A.Höcherl, K. Venclíková, O. Janoušková, P. Páral, V. Kolářová, T. Heizer, L. Šefc, P. Štěpánek, M. Hrubý\*: Thermoresponsive b-glucanbased polymers for bimodal immunoradiotherapy - Are they able to promote the immune system? *Journal of Controlled Release*. Roč. 268, 2017, s. 78-91.
- I. L. Loukotová, R., Konefal, K., Venclíková, D., Machová, O. Janoušková, M., Rabyk, M. Netopilík, E. Mázl Chánová, P. Štěpánek, M. Hrubý\*: Hybrid

thermoreponsive graft constructs of fungal polysaccharide .beta.-glucan: physico-chemical and immunomodulatory properties. *European Polymer Journal*. Roč. 106, 2018, s. 118-127.

- J. L. Loukotová, A. Bogomolova, R. Konefal, M. Špírková, P. Štěpánek, M. Hrubý\*: Hybrid  $\kappa$ -carrageenan-based polymers showing "schizophrenic" lower and upper critical solution temperatures and potassium responsiveness. *Carbohydrate Polymers*. Roč. 210, 2019, s. 26-37.
- K. I. Brezaniová, M. Hrubý\*, J. Králová, V. Král, Z. Černochová, P. Černocho, M. Šlouf, J. Kredatusová, P. Štěpánek: Temoporfin-loaded 1-tetradecanol-based thermoresponsive solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*. Roč. 241, 2016, s. 34-44.
- L. I. Brezaniová, J. Trousil, Z. Černochová, V. Král, M. Hrubý\*, P. Štěpánek, M. Šlouf: Self-assembled chitosan-alginate polyplex nanoparticles containing temoporfin. *Colloid and Polymer Science*. Roč. 295, č. 8 (2017), s. 1259-1270.
- M. A. Riabtseva, L. I. Kaberov, J. Kučka, A. Yu. Bogomolova, P. Štěpánek, S. K. Filippov\*, M. Hrubý\*: Polyelectrolyte pH-responsive protein-containing nanoparticles: the physicochemical supramolecular approach. *Langmuir*. Roč. 33, č. 3 (2017), s. 764-772.
- N. E. Jäger\*, A. Höcherl, O. Janoušková, A. Jäger, M. Hrubý, R. Konefal, M. Netopilík, J. Pánek, M. Šlouf, K. Ulbrich, P. Štěpánek: Fluorescent boronate-based polymer nanoparticles with reactive oxygen species (ROS)-triggered cargo release for drugdelivery applications. *Nanoscale*. Roč. 8, č. 13 (2016), s. 6958-6963.
- O. A. Höcherl\*, E. Jäger\*, A. Jäger, M. Hrubý, R. Konefal, O. Janoušková, J. Spěváček, Y. Jiang, P. W. Schmidt, T. P. Lodge, P. Štěpánek: One-pot synthesis of reactive oxygen species (ROS)-selfimmolative polyoxalate prodrug nanoparticles for hormone dependent cancer therapy with minimized side effects. *Polymer Chemistry*. Roč. 8, č. 13 (2017), s. 1999-2004.
- P. V. Lobaz\*, M. Rabyk, J. Pánek, E. Doris, F. Nallet, P. Štěpánek, M. Hrubý: Photoluminescent polysaccharidecoated germanium(IV) oxide nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*. Roč. 294, č. 7 (2016), s. 1225-1235.
- Q. V. Lobaz\*, M. Hladík, M. Steinhart, A. Paruzel, P. Černocho, J. Pánek, M. Vetrík, D. Jiráček, M. Jirátová, O. Pop-Georgievski, M. Šlouf, S. Garcia- Argote, G. Pieters,

- E. Doris, M. Hrubý: Tungsten (VI) based "molecular puzzle" photoluminescent nanoparticles easily covered with biocompatible natural polysaccharides via direct chelation. *Journal of Colloid and Interface Science*. Roč. 512, 2018, s. 308-317.
- R. V. Lobaz\*, R. Konefal, J. Pánek, M. Vlk, J. Kozempel, M. Petřík, Z. Nový, S. Gurska, P. Znojek, P. Štěpánek, M. Hrubý: In situ *in vivo* radiolabeling of polymer-coated hydroxyapatite nanoparticles to track their biodistribution in mice. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Roč. 179, 2019, s. 143-152.
- S. K. Kolouchová, O. Sedláček, D. Jiráček, D. Babuka, J. Blahut, J. Kotek, M. Vít, J. Trousil, R. Konefał, O. Janoušková, B. Podhorská, M. Šlouf, M. Hrubý\*: Self-assembled thermoresponsive polymeric nanogels for <sup>19</sup>F MR imaging. *Biomacromolecules*. Roč. 19, č. 8 (2018), s. 3515-3524.
- T. M. Rabyk, A. Destephen, A. Lapp, S. King, L. Noirez, L. Billon, M. Hrubý, O. Borisov, P. Štěpánek\*, E. Deniau\*: Interplay of thermosensitivity and pH sensitivity of amphiphilic block-gradient copolymers of dimethylaminoethyl acrylate and styrene. *Macromolecules*. Roč. 51, č. 14 (2018), s. 5219-5233.
- U. J. Trousil, S. K. Filippov, M. Hrubý\*, T. Mazel, Z. Syrová, D. Cmarko, S. Svidenská, J. Matějková, L. Kováčik, B. Porsch, R. Konefał, R. Lund, B. Nyström, I. Raška, P. Štěpánek: System with embedded drug release and nanoparticle degradation sensor showing efficient rifampicin delivery into macrophages. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. Roč. 13, č. 1 (2017), s. 307-315.
- V. J. Trousil, M. Hrubý\*: Novel nanoparticle delivery systems for rifampicin: an effective strategy against tuberculosis? *Nanomedicine*. Roč. 12, č. 12 (2017), s. 1359-1361.
- W. J. Trousil\*, Z. Syrová, N.-J. Knudsen Dal, D. Rak, R. Konefal, E. Pavlova, J. Matějková, D. Cmarko, P. Kubíčková, O. Pavliš, T. Urbánek, M. Sedlak, F. Fenaroli, I. Raška, P. Štěpánek, M. Hrubý\*: Rifampicin nanoformulation enhances treatment of tuberculosis in zebrafish. *Biomacromolecules*. Roč. 20, č. 4 (2019), s. 1798-1815.
- X. A. Jager\*, E. Jäger\*, Z. Syrová, T. Mazel, L. Kováčik, I. Raška, A. Höcherl, J. Kučka, R. Konefal, J. Humajová, P. Poučková, P. Štěpánek, M. Hrubý: Poly(ethylene oxide monomethyl ether)-block-poly(propylene succinate) nanoparticles. synthesis and characterization, enzymatic and cellular degradation,

micellar solubilization of paclitaxel and *in vitro* and *in vivo* evaluation.  
Biomacromolecules. Roč. 19, č. 7 (2018), s. 2443-2458.

## Literatura

- [1] Hruby M. Self-assembly in Polymer Systems Inspired by Living Nature. *Chem Listy*. 2018;112(5):294-300.
- [2] Ashkenasy G, Hermans TM, Otto S, Taylor AF. Systems chemistry. *Chem Soc Rev*. 2017;46(9):2543-2554.
- [3] Mai YY, Eisenberg A. Self-assembly of block copolymers. *Chem Soc Rev*. 2012;41(18):5969-5985.
- [4] Hruby M, Filippov SK, Stepanek P. Supramolecular Structures and Self-Association Processes in Polymer Systems. *Physiol Res*. 2016;65:S165-S178.
- [5] Hruby M. Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery purposes. In: *Smart Polymer Materials for Biomedical Applications* (Li S, Tiwari A, Prabakaran M., Aryal S. Eds.). Hauppauge: Nova Science Publishers, Inc; 2010.
- [6] Kulthe SS, Choudhari YM, Inamdar NN, Mourya V. Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery. *Des Monomers Polym*. 2012;15(5):465-521.
- [7] Javadian S, Kakemam J. Intermicellar interaction in surfactant solutions; a review study. *J Mol Liq*. 2017;242:115-128.
- [8] Manaargadoo-Catin M, Ali-Cherif A, Pougna JL, Perrin C. Hemolysis by surfactants - A review. *Adv Colloid Interface Sci*. 2016;228:1-16.
- [9] Bludau H, Czapar AE, Pitek AS, Shukla S, Jordan R, Steinmetz NF. POxylation as an alternative stealth coating for biomedical applications. *Eur Polym J*. 2017;88:679-688.
- [10] Zhang P, Sun F, Liu SJ, Jiang SY. Anti-PEG antibodies in the clinic: Current issues and beyond PEGylation. *J Control Release*. 2016;244:184-193.
- [11] Alakhova DY, Kabanov AV. Pluronics and MDR Reversal: An Update. *Mol Pharm*. 2014;11(8):2566-2578.
- [12] Zhang XY, Zhang PY. Polymersomes in Nanomedicine - A Review. *Curr Nanosci*. 2017;13(2):124-129.
- [13] Deraedt C, Astruc D. Supramolecular nanoreactors for catalysis. *Coord Chem Rev*. 2016;324:106-122.
- [14] Zhao DY. Challenges associated with elucidating the mechanisms of the hypocholesterolaemic activity of saponins. *J Funct Food*. 2016;23:52-65.
- [15] Terayama T, Yamakawa K, Umemura Y, Aihara M, Fujimi S. Polymyxin B Hemoperfusion for Sepsis and Septic Shock: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Surg Infections*. 2017;18(3):225-233.
- [16] Xu SQ, Lin Y, Huang J, Li Z, Xu XJ, Zhang LN. Construction of high strength hollow fibers by self-assembly of a stiff polysaccharide with short branches in water. *J Mater Chem A*. 2013;1(13):4198-4206.
- [17] Abyaneh HS, Vakili MR, Shafaati A, Lavasanifar A. Block Copolymer Stereoregularity and Its Impact on Polymeric Micellar Nanodrug Delivery. *Mol Pharm*. 2017;14(8):2487-2502.

- [18] Plummer R, Wilson RH, Calvert H, Boddy AV, Griffin M, Sludden J, et al. A Phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours. *Br J Cancer*. 2011;104(4):593-598.
- [19] Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A Target for Rational Drug Design. *Pharmaceuticals*. 2016;9(3):52.
- [20] Yang F, Zheng J. Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein Cell*. 2017;8(3):169-177.
- [21] Hruby M SP, Panek J, Papadakis C.M. Crosstalk between responsivities to various stimuli in multiresponsive polymers: Change in polymer chain and external environment polarity as the key factor. *Colloid Polym Sci.*, *submitted*.
- [22] Wei ML, Gao YF, Li X, Serpe MJ. Stimuli-responsive polymers and their applications. *Polym Chem*. 2017;8(1):127-143.
- [23] Hruby M, Filippov SK, Panek J, Novakova M, Mackova H, Kucka J, et al. Thermoresponsive micelles for radionuclide delivery. *J Control Release*. 2010;148(1):E60-E62.
- [24] Hruby M, Filippov SK, Panek J, Novakova M, Mackova H, Kucka J, et al. Polyoxazoline Thermoresponsive Micelles as Radionuclide Delivery Systems. *Macromol Biosci*. 2010;10(8):916-924.
- [25] Hruby M, Kucka J, Lebeda O, Mackova H, Babic M, Konak C, et al. New bioerodable thermoresponsive polymers for possible radiotherapeutic applications. *J Control Release*. 2007;119(1):25-33.
- [26] Arotcarena M, Heise B, Ishaya S, Laschewsky A. Switching the inside and the outside of aggregates of water-soluble block copolymers with double thermoresponsivity. *J Am Chem Soc*. 2002;124(14):3787-3793.
- [27] Can A, Zhang QL, Rudolph T, Schacher FH, Gohy JF, Schubert US, et al. Schizophrenic thermoresponsive block copolymer micelles based on LCST and UCST behavior in ethanol-water mixtures. *Eur Polym J*. 2015;69:460-471.
- [28] Gao YF, Wei ML, Li X, Xu WW, Ahiabu A, Perdiz J, et al. Stimuli-responsive polymers: Fundamental considerations and applications. *Macromol Res*. 2017;25(6):513-527.
- [29] De Robertis S, Bonferoni MC, Elviri L, Sandri G, Caramella C, Bettini R. Advances in oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer non-covalent interactions. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12(3):441-453.
- [30] Riabtseva A, Kaberov LI, Kucka J, Bogomolova A, Stepanek P, Filippov SK, et al. Polyelectrolyte pH-Responsive Protein-Containing Nanoparticles: The Physicochemical Supramolecular Approach. *Langmuir*. 2017;33(3):764-772.
- [31] Jager A, Jager E, Surman F, Hoherl A, Angelov B, Ulbrich K, et al. Nanoparticles of the poly( N-(2-hydroxypropyl) -methacrylamide)-b-poly 2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate diblock copolymer for pH-triggered release of paclitaxel. *Polym Chem*. 2015;6(27):4946-4954.



- [32] Lee ES, Gao ZG, Kim D, Park K, Kwon IC, Bae YH. Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH(e) specific TAT exposure and multidrug resistance. *J Control Release*. 2008;129(3):228-236.
- [33] Han DH, Tong X, Boissiere O, Zhao Y. General Strategy for Making CO<sub>2</sub>-Switchable Polymers. *ACS Macro Lett*. 2012;1(1):57-61.
- [34] Bogomolova A, Kaberov L, Sedlacek O, Filippov SK, Stepanek P, Kral V, et al. Double stimuli-responsive polymer systems: How to use crosstalk between pH- and thermosensitivity for drug depots. *Eur Polym J*. 2016;84:54-64.
- [35] Murugan KD, Natarajan P. Studies on the structural transitions and self-organization behavior of polyacrylic acids with complementary polymers in aqueous solution by laser flash photolysis method using the triplet state of covalently bound phenosafranine. *Eur Polym J*. 2011;47(8):1664-1675.
- [36] Bandara HMD, Burdette SC. Photoisomerization in different classes of azobenzene. *Chem Soc Rev*. 2012;41(5):1809-1825.
- [37] D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients*. 2011;3(1):63-103.
- [38] Marturano V, Cerruti P, Giamberini M, Tylkowski B, Ambrogi V. Light-Responsive Polymer Micro- and Nano-Capsules. *Polymers*. 2017;9(1):8.
- [39] Zhou F, Wang HJ, Chang J. Progress in the Field of Constructing Near-Infrared Light-Responsive Drug Delivery Platforms. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016;16(3):2111-2125.
- [40] Izumrudov VA. Soluble polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Polym Sci Ser A*. 2012;54(7):513-520.
- [41] Zhang XY, Han L, Liu MY, Wang K, Tao L, Wan Q, et al. Recent progress and advances in redox-responsive polymers as controlled delivery nanoplatfroms. *Mat Chem Front*. 2017;1(5):807-822.
- [42] Hruby M, Filippov SK, Stepanek P. Smart polymers in drug delivery systems On crossroads: Which way deserves following? *Eur Polym J*. 2015;65:82-97.
- [43] Xu XD, Saw PE, Tao W, Li YJ, Ji XY, Bhasin S, et al. ROS-Responsive Polyprodrug Nanoparticles for Triggered Drug Delivery and Effective Cancer Therapy. *Adv Mater*. 2017;29(33).
- [44] Cao ZQ, Wang GJ. Multi-Stimuli-Responsive Polymer Materials: Particles, Films, and Bulk Gels. *Chemical Record*. 2016;16(3):1398-1435.
- [45] Murdoch D, Sager J. Will targeted therapy hold its promise? An evidence-based review. *Curr Opin Oncol*. 2008;20(1):104-111.
- [46] Jha P, Arora G, Shamim SA, Mukherjee A, Gautam D, Ballal S, et al. Lutetium-177 tin colloid radiosynovectomy in patients with inflammatory knee joint conditions intractable to prevailing therapy. *Nucl Med Commun*. 2018;39(9):803-808.
- [47] Rodriguez-Merchan EC. Radiosynovectomy in haemophilia. *Blood Rev*. 2019;35:1-6.

- [48] Xu MJ, Chen KS, Chang AJ, Lazar A, Shinohara K, Cunha JAM, et al. Single-fraction brachytherapy as monotherapy for early-stage prostate cancer: The UCSF experience. *Brachytherapy*. 2019;18(4):470-476.
- [49] Yuan DY, Gao Z, Zhao J, Zhang HT, Wang J. I-125 seed implantation for hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus: A systematic review and meta-analysis. *Brachytherapy*. 2019;18(4):521-529.
- [50] Beitsch PD, Hodge CW, Dowlat K, Francescatti D, Gittleman MA, Israel P, et al. The Surgeon's Role in Breast Brachytherapy. *Breast J*. 2009;15(1):93-100.
- [51] Chrapko B, Zwolak R, Nocun A, Golebiewska R, Majdan M. Radiation synovectomy with Y-90 colloid in the therapy of recurrent knee joint effusions in patients with inflammatory joint diseases. *Rheumatology Int*. 2007;27(8):729-734.
- [52] Zwolak R, Majdan M, Skorski M, Chrapko B. Efficacy of radiosynoviorthesis and its impact on chosen inflammatory markers. *Rheumatology Int*. 2012;32(8):2339-2344.
- [53] Liu RX, Fraylich M, Saunders BR. Thermoresponsive copolymers: from fundamental studies to applications. *Colloid Polym Sci*. 2009;287(6):627-643.
- [54] Kissel M, Peschke P, Subr V, Ulbrich K, Schuhmacher J, Debus J, et al. Synthetic macromolecular drug carriers: Biodistribution of poly (N-2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers and their accumulation in solid rat tumors. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2001;55(3):191-201.
- [55] Kucka J, Hruby M, Lebeda O. Biodistribution of a radiolabelled thermoresponsive polymer in mice. *Appl Radiat Isot*. 2010;68(6):1073-1078.
- [56] Hruby M, Pouckova P, Zadinova M, Kucka J, Lebeda O. Thermoresponsive polymeric radionuclide delivery system-An injectable brachytherapy. *Eur J Pharm Sci*. 2011;42(5):484-488.
- [57] Hruby M, Kucka J, Mackova H, Konak C, Vetrik M, Kozempel J, et al. New Binary Thermoresponsive Polymeric System for Local Chemoradiotherapy. *J Appl Polym Sci*. 2009;111(5):2220-2228.
- [58] Hruby M, Kucka J, Konak C, Vetrik M, Lebeda O, Ulbrich K. Thermoresponsive polymer for local chemoradiotherapy with doxorubicin bound via a newly developed hydrolytically labile bond. *J Control Release*. 2008;132(3):E40-E41.
- [59] Sedlacek O, Cernoch P, Kucka J, Konefal R, Stepanek P, Vetrik M, et al. Thermoresponsive Polymers for Nuclear Medicine: Which Polymer Is the Best? *Langmuir*. 2016;32(24):6115-6122.
- [60] Maeda Y, Yamamoto H, Ikeda I. Effects of ionization of incorporated imidazole groups on the phase transitions of poly(N-isopropylacrylamide), poly(N,N-diethylacrylamide), and poly(N-vinylcaprolactam) in water. *Langmuir*. 2001;17(22):6855-6859.
- [61] Matsumoto NM, Buchman GW, Rome LH, Maynard HD. Dual pH- and temperature-responsive protein nanoparticles. *Eur Polym J*. 2015;69:532-539.
- [62] Zhang QL, Hou ZY, Louage B, Zhou DY, Vanparijs N, De Geest BG, et al. Acid-Labile Thermoresponsive Copolymers That Combine Fast pH-Triggered Hydrolysis and

High Stability under Neutral Conditions. *Angew Chem-Int Edit.* 2015;54(37):10879-10883.

[63] Jirak D, Galisova A, Kolouchova K, Babuka D, Hruby M. Fluorine polymer probes for magnetic resonance imaging: quo vadis? *Magn Reson Mat Phys Biol Med.* 2019;32(1):173-185.

[64] Sedlacek O, Jirak D, Galisova A, Jager E, Laaser JE, Lodge TP, et al. F-19 Magnetic Resonance Imaging of Injectable Polymeric Implants with Multiresponsive Behavior. *Chem Mat.* 2018;30(15):4892-4896.

[65] Loukotova L, Bogomolova A, Konefal R, Spirkova M, Stepanek P, Hruby M. Hybrid kappa-carrageenan-based polymers showing "schizophrenic" lower and upper critical solution temperatures and potassium responsiveness. *Carbohydr Polym.* 2019;210:26-37.

[66] Loukotova L, Konefal R, Venclikova K, Machova D, Janouskova O, Rabyk M, et al. Hybrid thermoresponsive graft constructs of fungal polysaccharide beta-glucan: Physico-chemical and immunomodulatory properties. *Eur Polym J.* 2018;106:118-127.

[67] Loukotova L, Kucka J, Rabyk M, Hocherl A, Venclikova K, Janouskova O, et al. Thermoresponsive beta-glucan-based polymers for bimodal immunoradiotherapy - Are they able to promote the immune system? *J Control Release.* 2017;268:78-91.

[68] Pospisilova A, Filippov SK, Bogomolova A, Turner S, Sedlacek O, Matushkin N, et al. Glycogen-graft-poly(2-alkyl-2-oxazolines) - the new versatile biopolymer-based thermoresponsive macromolecular toolbox. *RSC Adv.* 2014;4(106):61580-61588.

[69] Jiratova M, Pospisilova A, Rabyk M, Parizek M, Kovar J, Galisova A, et al. Biological characterization of a novel hybrid copolymer carrier system based on glycogen. *Drug Deliv Transl Res.* 2018;8(1):73-82.

[70] Tirone TA, Brunicardi FC. Overview of glucose regulation. *World J Surg.* 2001;25(4):461-467.

[71] Filippov SK, Sedlacek O, Bogomolova A, Vetrik M, Jirak D, Kovar J, et al. Glycogen as a Biodegradable Construction Nanomaterial for in vivo Use. *Macromol Biosci.* 2012;12(12):1731-1738.

[72] Kalyane D, Raval N, Maheshwari R, Tambe V, Kalia K, Tekade RK. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. *Mater Sci Eng C.* 2019;98:1252-1276.

[73] Man F, Lammers T, de Rosales RTM. Imaging Nanomedicine-Based Drug Delivery: a Review of Clinical Studies. *Mol Imaging Biol.* 2018;20(5):683-695.

[74] Su YL, Hu SH. Functional Nanoparticles for Tumor Penetration of Therapeutics. *Pharmaceutics.* 2018;10(4):193.

[75] Duncan R, Gilbert HRP, Carbajo RJ, Vicent MJ. Polymer masked-unmasked protein therapy. 1. Bioresponsive dextrin-trypsin and -melanocyte stimulating hormone conjugates designed for alpha-amylase activation. *Biomacromolecules.* 2008;9(4):1146-1154.

- [76] Rabyk M, Galisova A, Jiratova M, Patsula V, Srbova L, Loukotova L, et al. Mannan-based conjugates as a multimodal imaging platform for lymph nodes. *J Mat Chem B*. 2018;6(17):2584-2596.
- [77] Avci P, Erdem SS, Hamblin MR. Photodynamic Therapy: One Step Ahead with Self-Assembled Nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(9):1937-1952.
- [78] Lim CK, Heo J, Shin S, Jeong K, Seo YH, Jang WD, et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Lett*. 2013;334(2):176-187.
- [79] O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*. 2009;85(5):1053-1074.
- [80] Sasnouski S, Zorin V, Khludeyev I, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Investigation of Foscan (R) interactions with plasma proteins. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj*. 2005;1725(3):394-402.
- [81] Moore CM, Emberton M, Bown SG. Photodynamic Therapy for Prostate Cancer-An Emerging Approach for Organ-Confined Disease. *Lasers Surg Med*. 2011;43(7):768-775.
- [82] Brezaniova I, Hruba M, Kralova J, Kral V, Cernochova Z, Cernoch P, et al. Temoporfin-loaded 1-tetradecanol-based thermoresponsive solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. *J Control Release*. 2016;241:34-44.
- [83] Brezaniova I, Trousil J, Cernochova Z, Kral V, Hruba M, Stepanek P, et al. Self-assembled chitosan-alginate polyplex nanoparticles containing temoporfin. *Colloid Polym Sci*. 2017;295(8):1259-1270.
- [84] D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):813-824.
- [85] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-444.
- [86] Bauer G. Tumor Cell-protective Catalase as a Novel Target for Rational Therapeutic Approaches Based on Specific Intercellular ROS Signaling. *Anticancer Res*. 2012;32(7):2599-2624.
- [87] Bauer G. Targeting Extracellular ROS Signaling of Tumor Cells. *Anticancer Res*. 2014;34(4):1467-1482.
- [88] Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol*. 2015;4:184-192.
- [89] Kim YS, Kim S, Kang HC, Shim MS. ROS-responsive thioether-based nanocarriers for efficient pro-oxidant cancer therapy. *J Ind Eng Chem*. 2019;75:238-245.
- [90] Li XD, Zhang C, Zheng QQ, Shi XJ. ROS-responsive targeting micelles for optical imaging-guided chemo-phototherapy of cancer. *Colloid Surf B-Biointerfaces*. 2019;179:218-225.
- [91] Xiang JJ, Liu X, Zhou ZX, Zhu DC, Zhou Q, Piao Y, et al. Reactive Oxygen Species (ROS)-Responsive Charge-Switchable Nanocarriers for Gene Therapy of Metastatic Cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(50):43352-43362.

- [92] Xin XF, Lin F, Wang QY, Yin LF, Mahato RI. ROS-Responsive Polymeric Micelles for Triggered Simultaneous Delivery of PLK1 Inhibitor/miR-34a and Effective Synergistic Therapy in Pancreatic Cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(16):14647-14659.
- [93] Jager E, Hocherl A, Janouskova O, Jager A, Hruba M, Konefal R, et al. Fluorescent boronate-based polymer nanoparticles with reactive oxygen species (ROS)-triggered cargo release for drug-delivery applications. *Nanoscale*. 2016;8(13):6958-6963.
- [94] Hocherl A, Jager E, Jager A, Hruba M, Konefal R, Janouskova O, et al. One-pot synthesis of reactive oxygen species (ROS)-self-immolative polyoxalate prodrug nanoparticles for hormone dependent cancer therapy with minimized side effects. *Polym Chem*. 2017;8(13):1999-2004.
- [95] Kostiv U, Lobaz V, Kucka J, Svec P, Sedlacek O, Hruba M, et al. A simple neridronate-based surface coating strategy for upconversion nanoparticles: highly colloiddally stable I-125-radiolabeled NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup>@PEG nanoparticles for multimodal in vivo tissue imaging. *Nanoscale*. 2017;9(43):16680-16688.
- [96] Lobaz V, Rabyk M, Panek J, Doris E, Nallet F, Stepanek P, et al. Photoluminescent polysaccharide-coated germanium(IV) oxide nanoparticles. *Colloid Polym Sci*. 2016;294(7):1225-1235.
- [97] Lobaz V, Hladik M, Steinhart M, Paruzel A, Cernoch P, Panek J, et al. Tungsten (VI) based "molecular puzzle" photoluminescent nanoparticles easily covered with biocompatible natural polysaccharides via direct chelation. *J Colloid Interface Sci*. 2018;512:308-317.
- [98] Lobaz V, Konefal R, Panek J, Vlk M, Kozempel J, Petrik M, et al. In Situ In Vivo radiolabeling of polymer-coated hydroxyapatite nanoparticles to track their biodistribution in mice. *Colloid Surf B-Biointerfaces*. 2019;179:143-152.
- [99] Benes H, Popelkova D, Sturcova A, Popelka S, Juza J, Pop-Georgievski O, et al. Aqueous-Based Functionalizations of Titanate Nanotubes: A Straightforward Route to High-Performance Epoxy Composites with Interfacially Bonded Nanofillers. *Macromolecules*. 2018;51(15):5989-6002.
- [100] Bordat A, Boissenot T, Nicolas J, Tsapis N. Thermoresponsive polymer nanocarriers for biomedical applications. *Adv Drug Delivery Rev*. 2019;138:167-192.
- [101] Qiao SL, Wang H. Thermoresponsive Polymeric Assemblies and Their Biological Applications. In: *In Vivo Self-Assembly Nanotechnology for Biomedical Applications* (Wang H, Li LL Eds.). Springer Inc. 2018.
- [102] Zarrintaj P, Jouyandeh M, Ganjali MR, Hadavand BS, Mozafari M, Sheiko SS, et al. Thermo-sensitive polymers in medicine: A review. *Eur Polym J*. 2019;117:402-423.
- [103] Kolouchova K, Sedlacek O, Jirak D, Babuka D, Blahut J, Kotek J, et al. Self-Assembled Thermoresponsive Polymeric Nanogels for F-19 MR Imaging. *Biomacromolecules*. 2018;19(8):3515-3524.

- [104] Trousil J, Filippov SK, Hruby M, Mazel T, Syrova Z, Cmarko D, et al. System with embedded drug release and nanoparticle degradation sensor showing efficient rifampicin delivery into macrophages. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*. 2017;13(1):307-315.
- [105] Trousil J, Hruby M. Novel nanoparticle delivery systems for rifampicin: an effective strategy against tuberculosis? *Nanomedicine*. 2017;12(12):1359-1361.
- [106] Trousil J, Syrova Z, Dal NJK, Rak D, Konefal R, Pavlova E, et al. Rifampicin Nanoformulation Enhances Treatment of Tuberculosis in Zebrafish. *Biomacromolecules*. 2019;20(4):1798-1815.
- [107] Jager A, Jager E, Syrova Z, Mazel T, Kovacik L, Raska I, et al. Poly(ethylene oxide monomethyl ether)-block-poly(propylene succinate) Nanoparticles: Synthesis and Characterization, Enzymatic and Cellular Degradation, Micellar Solubilization of Paclitaxel, and in Vitro and in Vivo Evaluation. *Biomacromolecules*. 2018;19(7):2443-2458.