

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Daniil Starenko

Biokompatibilní polymerní nanomateriály s dexamethasonem v protizánětlivé terapii
Biocompatible polymer nanomaterials with dexamethasone tailored for anti-
inflammatory therapy

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Tomáš Etrych, DSc.

Školitel konzultant: RNDr. Júlia Kudláčová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

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

V Praze dne

Daniil Starenko

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli RNDr. Tomášovi Etrychovi, DSc. za poskytnutí možnosti vypracovat bakalářskou práci na oddělení Biolékařských polymerů Ústavu Makromolekulární Chemie AV ČR, v.v.i. a vedení mé práce. Velké poděkování také patří RNDr. Júlii Kudláčové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a všestrannou pomoc s provedením experimentální činnosti během mého vypracování tohoto projektu. Kromě toho bych chtěl poděkovat Mgr. Lucii Čtveráčkové z oddělení Biologických modelů ÚMCH AV ČR, v.v.i. za pomoc s provedením testování konjugátu pomocí metody ELISA. Nakonec mé velké díky patří celému kolektivu obou oddělení za přátelské prostředí a velkou ochotu pomoci s jakýmkoli problémem.

Abstrakt

Chronická zánětlivá onemocnění jsou velmi rozšířená a ovlivňují život mnoha lidí po celém světě. Jejich dlouhodobá přítomnost v organismu může vést k rozvoji jiných nemocí, jako je diabetes, ateroskleróza a onkologická onemocnění. Současná terapie zpravidla nevede k úplnému uzdravení pacientů, ale je zaměřena na potlačení imunity s cílem zmírnit symptomy onemocnění. Nevýhodou této imunosuprese je mnoho nežádoucích vedlejších účinků v důsledku dlouhodobého a neselektivního působení léčiv. Jedním z aktivně zkoumaných směrů pro vylepšení efektivity léčby zánětlivých onemocnění je použití polymerních systému pro dopravu léčiv, které umožňují delší cirkulaci léčiv, jejich lepší distribuci, cílení a řízené uvolňování. Dexamethason je jedním z nejčastěji používaných glukokortikoidů při léčbě zánětlivých onemocnění, jehož vlastnosti mohou být použitím polymerních dopravních systémů zlepšeny. Kromě toho v poslední době nachází širší uplatnění v léčbě zánětů tzv. biologická léčba, při které se využívají protilátky schopné specificky rozeznávat a vázat se na antigen. Jednou z nich je chimérická monoklonální protilátka infliximab, inhibitor prozánětlivého tumor-nekrotizujícího faktoru α (TNF- α).

Představována bakalářská práce se zabývá syntézou a charakterizací polymerního konjugátu na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) obsahujícího protilátku infliximab a dexamethason vázaný přes štěpitelnou pH senzitivní vazbu. Připravený systém byl následně charakterizován řadou analytických a biochemických metod. Zvláštní důraz byl v průběhu experimentální činnosti kladen na sledování uvolnění protizánětlivého léčiva z polymerního nosiče *in vitro* v prostředí napodobujícím podmínky v organismu a prozkoumání vazebné aktivity protilátky po modifikaci HPMA kopolymery. Získané výsledky ukazují velký potenciál tohoto systému, proto se v blízké budoucnosti plánuje další optimalizace metod *in vitro* charakterizace a ověření účinků konjugátu *in vivo*.

Klíčová slova: protizánětlivá terapie, nanomateriál, dexamethason, polymerní nosič, aktivní směrování.

Abstract

Chronic inflammatory diseases are very common and affect lives of many people around the world. Moreover, in long-term effect chronic inflammation can lead to the development of such complications as diabetes, atherosclerosis and oncological diseases. Temporary therapy does not lead to complete recovery of a patient, but can provide a relief of symptoms by means of immunosuppression, which causes many adverse effects, because of long-term and nonselective drug activity. Application of the polymeric drug delivery systems is one of the actively researched ways for the improvement of inflammatory diseases treatment quality, which enables longer circulation, better distribution and controlled release of the drug. Dexamethasone is one of the commonly used glucocorticoid drugs used for treatment of chronic inflammatory diseases. Properties of this drug can be enhanced via polymeric drug delivery systems. Recently, so-called biological treatment, particularly employing monoclonal antibodies, against inflammation was introduced into the clinical use. One of such is infliximab – chimeric monoclonal antibody, which acts like the inhibitor of tumor necrotizing factor α (TNF- α).

Presented bachelor thesis focuses on the synthesis and characterization of a polymer conjugates based on *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer carrying infliximab and dexamethasone bound via pH-sensitive bond. Prepared system has been subsequently characterized by means of a number of analytical and biochemical methods. The special emphasis of the thesis has been placed on the observation of anti-inflammatory drug release from the polymeric carrier *in vitro* in the environment resembling conditions in organism and the evaluation of the HPMA-copolymer modified antibody binding activity. Obtained results demonstrate high potential of the prepared system, thus further optimalization of *in vitro* characterization methods and *in vivo* study of the conjugate in the nearest future is envisioned.

Keywords: anti-inflammatory therapy, nanomaterial, dexamethasone, polymer carrier, active targeting.

(In Czech)

Obsah

Zkratky.....	13
1 Teoretický úvod.....	16
1.1 Záněty.....	16
1.1.1 Možnosti léčby chronických zánětů	17
1.2 Systémy pro dopravu protizánětlivých léčiv	25
1.2.1 Systémy pro dopravu léčiv	25
1.2.2 Systémy pro dopravu protizánětlivých léčiv	26
1.2.3 Pasivní akumulace nosiče ve tkáních postižených zánětem	27
1.2.4 Aktivní akumulace nosiče ve tkáních postižených zánětem.....	28
1.2.5 HPMA kopolymery jako nosiče léčiv.....	29
2 Cíle	33
3 Použité vybavení a chemikálie	34
3.1 Přístroje	34
3.2 Chemikálie	35
4 Experimentální část	36
4.1 Syntéza monomerů.....	36
4.2 Syntéza polymerního prekurzoru poly(HPMA- <i>co</i> -Ma-Acap-NH-NH ₂) s terminálním azidem	36
4.3 Syntéza derivátu DEX-OPB.....	38
4.4 Syntéza polymerního konjugátu s léčivem DEX-OPB a protilátkou infliximab 38	
4.4.1 Navázání derivátu DEX-OPB na polymerní prekurzor (Příprava konjugátu K-DEX-OPB)	38
4.4.2 Navázání spojky DBCO-MI na konjugát K-DEX-OPB (Příprava konjugátu MI-K-DEX-OPB).....	39
4.4.3 Navázání polymerního MI-K-DEX-OPB na protilátku infliximab (Příprava konjugátu IFX-K-DEX-OPB).....	40
4.5 Analytické metody použité pro charakterizaci připravených látek.....	41
4.5.1 Gelová permeační chromatografie (GPC)	41
4.5.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	42
4.5.3 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	42
4.5.4 Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	42
4.5.5 Absorpční spektrofotometrie	42
4.5.6 Analýza uvolňování DEX-OPB z polymerního nosiče	44

4.5.7	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)	45
4.5.8	ELISA.....	45
5	Výsledky	47
5.1	Syntéza a charakterizace polymerních prekurzorů a konjugátů	47
5.1.1	Syntéza derivátu DEX-OPB.....	47
5.1.2	Polymerní prekurzor.....	49
5.1.3	Polymerní konjugáty	50
5.2	Elektroforéza protilátky infliximab a konjugátu IFX-K-DEX-OPB	54
5.3	Uvolnění DEX-OPB z polymerního nosiče.....	55
5.3.1	Stanovení aktivity protilátky infliximab v konjugátu IFX-K-DEX-OPB pomocí metody ELISA	56
6	Diskuze	57
6.1	Příprava a charakterizace polymerního konjugátu	57
6.2	In vitro testování konjugátu IFX-K-DEX-OPB.....	60
7	Závěr	62
	Použitá literatura	63

Zkratky

ACN	acetonitril
AIBN	2,2-azobis(isobutyronitril)
AP-1	aktivující protein 1
BAFF	faktor aktivující B-buňky (z angl. B cell activating factor)
BOC	terc-butyloxykarbonylová skupina
COX	cyklooxygenáza
CREB	protein vázající element závislý na cAMP (z angl. cAMP response element-binding protein)
CTA	čínidlo přenosu řetězce (z angl. chain transfer agent)
DAMPs	s poškozením spojené molekulární vzory (z angl. damage-associated molecular patterns)
DBCO	dibenzocyklooktynová skupina
DBCO-MI	dibenzocyklooktyn-maleimid
DCM	dichlormethan
DDS	systémy pro dopravu léčiv (z angl. drug delivery systems)
DEX	dexamethason
DEX-OPB	dexamethason modifikovaný kyselinou 4-(2-oxopropyl)benzoovou
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamid
DMAP	dimethylaminopyridin
DMARDs	chorobu modifikující antireumatická léčiva (z angl. disease modifying antirheumatic drugs)
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
ELISA	angl. enzyme-linked immuno sorbent assay
ELVIS	extravazace a sekvestrace zprostředkovaná zánětlivými buňkami (z angl. extravasation through leaky vasculature and subsequent inflammatory cell mediated sequestration)
EPR	zvýšená propustnost a zadrž (z angl. Enhanced permeability and retention)
ESI	ionizace elektrosprejem (z engl. electrospray ionization)
EtAc	ethylacetát
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Administration)

GPC	gelová permeační chromatografie
GR	glukokortikoidní receptor
GRE	element odpovědi na glukokortikoidy (z angl. glucocorticoid response element)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
IFN- γ	interferon γ
IFX	infliximab
IFX-K-DEX-	HPMA polymerní konjugát obsahující dexamethason
OPB	modifikovaný kyselinou 4-(2-oxopropyl)benzoovou a protilátku infliximab
IL-1 β	interleukin 1 β
IL-4	interleukin 4
IL-5	interleukin 5
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IL-13	interleukin 13
IL-17	interleukin 17
IL-23	interleukin 23
K-DEX-OPB	HPMA polymerní konjugát obsahující dexamethason modifikovaný kyselinou 4-(2-oxopropyl)benzoovou
M_w	hmotnostně průměrná molární hmotnost; g·mol ⁻¹
M_n	početně průměrná molární hmotnost; g·mol ⁻¹
MI-K-DEX-OPB	HPMA polymerní konjugát obsahující dexamethason modifikovaný kyselinou 4-(2-oxopropyl)benzoovou a maleimidovou funkční skupinu
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
NF- κ B	nukleární faktor kappa B (z angl. nuclear factor κ B)
NMR	nukleární magnetická rezonance
NSAIDs	nesteroidní antiflogistika (z angl. non-steroidal anti-inflammatory drugs)
OPB	4-(2-oxopropyl)benzoová kyselina
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. Polyacrylamide gel electrophoresis)
PAMPs	molekulární vzory asociované s patogeny (z angl. pathogen-associated molecular patterns)
PBS	fosfátový pufrovací systém (z angl. phosphate buffer system)
PEG	poly(ethylenglykol)

PLGA	kopolymer kyseliny glykolové a mléčné
pHPMA	poly(<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid)
PLA	poly(mléčná) kyselina
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
PRR	receptory rozpoznávající molekulární vzory (z angl. pattern recognition receptors)
RA	revmatoidní artritida
RAFT	reverzibilní adičně fragmentační přenos řetězce (z angl. reversible addition-fragmentation chain transfer)
SDS	dodecylsulfát sodný
TFA	trifluoroctová kyselina
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (z angl. thin layer chromatography)
TLRs	receptory podobné genu Toll (z angl. Toll-like receptors)
TNBS	2,4,6-trinitrobenzensulfonová kyselina
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa (z angl. tumor necrosis factor α)
TTC	trithiokarbonát

1 Teoretický úvod

1.1 Záněty

Zánět je souhrn fyziologických reakcí, které jsou vyvolány porušením celistvosti organismu. Tyto reakce organismu při normálním průběhu přispívají k ochraně poškozené oblasti proti infekcím, lokalizaci daného poškození, a nakonec k zahojení a uzdravení jedince. Zánět může být vyvolán velkou škálou různorodých podnětů, jako je bakteriální či virová infekce, fyzické či chemické poškození tkání [1]. Proto je zánětlivá reakce jedním z nezbytných mechanismů ochrany lidí, která byla vyvinuta během rozvoje života [2]. Už v prvním století popsal římský lékař Cornelius Celsius čtyři hlavní charakteristické projevy zánětu: zčervenání, otok, zvýšení místní teploty a bolestivost. Později ve devatenáctém století se k nim přidal pátý znak – ztráta funkcí [3].

Zmíněné symptomy jsou způsobeny rozmanitou škálou mezibuněčných a mezimolekulárních interakcí, které se odehrávají v organismu během zánětlivého procesu. Přesný sled dějů, které se v těle odehrají po vzniku zánětlivého podnětu, závisí na původu a lokalizaci daného podnětu v těle. Nicméně je možné naznačit určité společné mechanismy tohoto procesu. Při objevení jakéhokoli zánětlivého podnětu v organismu dojde k jeho rozpoznávání pomocí receptorů rozpoznávajících molekulární vzory (z angl. *pattern recognition receptors – PRR*) nacházejícími se na povrchu bílých krvinek [2]. Signálem pro zahájení zánětlivé reakce mohou být různé látky, jako jsou například specifické molekulární struktury na povrchu buněk patogenních mikroorganismů známé jako molekulární rysy asociované s patogeny (z angl. *pathogen-associated molecular patterns - PAMPs*), různé endogenní látky uvolněné z poškozených tkání při neinfekčním zánětu nebo molekuly uvolňující se z buněk podstupujících nekrózu – molekulové rysy asociované s poškozením (z angl. *damage-associated molecular patterns – DAMPs*) [2]. Interakce PAMPs a DAMPs s PRR na rezidentních makrofázích tkáně vyvolává intracelulární signální pochody, které způsobují aktivaci a produkci zánětlivých mediátorů [2]. Do skupiny mediátorů můžeme zařadit velké množství biomolekul, které se podílejí na regulaci průběhu zánětlivé reakce. Patří sem například cytokiny, vasoaktivní aminy (histamin, serotonin), peptidy (bradykinin), eikosanoidy a reaktivní formy kyslíku a dusíku [4].

Tyto mediátory (histamin, bradykinin, prostaglandiny) následně vyvolávají vazodilataci, což vede ke zvýšení prostupnosti buněk imunitního systému spolu s krví do zanícené tkáně. Dojde k otoku a zčervenání, což jsou jedny z hlavních znaků zánětu [1,4]. Složky buněčné imunity nahromaděné v místě zánětu tak zahájí produkci cytokinů a dalších mediátorů, které přispívají k rozvoji zánětu [1]. Některé z prozánětlivých mediátorů (hlavně prostaglandiny a bradykinin) působí na receptory bolesti, a tím snižují práh bolesti, což vede k projevu dalšího typického symptomu zánětu - bolestivosti [3,5].

1 Teoretický úvod

Prostaglandin E₂ a cytokiny interleukin 1 (IL-1), interferon γ (IFN- γ) a tumor-nekrotizující faktor α (TNF- α) přispívají k dalšímu projevu zánětu, horečce, a to tím, že působí na hypotalamové centrum zodpovědné za termoregulaci [1,4].

Záněty se můžou rozdělit na akutní a chronické. Akutní zánět je relativně rychlou reakcí na infekci nebo na porušení integrity tkáně, obvykle odezní bez následků a poraněná tkáň se kompletně zhojí [1]. Nicméně při chybném řízení akutního zánětu se objevuje riziko přeměny tohoto procesu na zánět chronický, jenž je stavem patologickým, a může vést ke vzniku zánětlivých onemocnění [1,2].

Chronický zánět může vzniknout jako důsledek neléčeného akutního zánětu, kde zánětlivý podnět buď není zcela eliminován nebo jsou z nějakých důvodů porušené opravné mechanismy organismu, čím dochází k dlouhodobě přetrvávajícím infekčním procesům vedoucím k neustálému podněcování prozánětlivých reakcí. Daný stav může být indukován chronickou infekcí, nezhojenou poškozenou tkání, přetrvávajícím alergenem v organismu, cizorodými částicemi nebo endogenními krystaly (urát sodný) a autoimunní poruchou, při které organismus obvykle rozpoznává vlastní zdravé tkáně jako cizí antigen a zaútočí na ně [3,6–8]. Při chronickém zánětu dochází vždy v určité míře k destrukci tkáně a jejímu nahrazování vazivem [1]. Zatímco akutní zánět je fyziologickou obrannou reakcí, chronický zánět je již patologickým procesem a musí se terapeuticky řešit, aby nedocházelo k dalšímu poškozování organismu [1]. K nejčastějším znakům chronického zánětu patří následující symptomy [7]: bolest v těle, kloubech a svalech, chronická únava a nespavost, deprese, úzkost a poruchy nálad, gastrointestinální poruchy, zvětšení nebo ztráta váhy a časté infekce.

Chronické záněty představují zdraví ohrožující stav, který vyžaduje léčbu. Chronický zánět také může vést do rozvinutí autoimunitně podmíněných onemocnění – chronických zánětlivých onemocnění (revmatoidní artritida, roztroušená skleróza, Crohnova choroba, lupénka, exém, alergie) a některých typů rakoviny [4].

1.1.1 Možnosti léčby chronických zánětů

Zánět je velmi komplexním procesem, zahrnujícím velké množství molekulárních a mezibuněčných interakcí a biochemických dějů vzájemně propojených signálními kaskádami. Proto je nejčastější léčba zánětu zaměřená na blokaci nebo ovlivnění určitého kroku v procesu zánětlivé reakce [10]. Současná léčba chronických zánětlivých onemocnění zahrnuje použití imunosupresiv, jako jsou glukokortikoidy, nesteroidních protizánětlivých léčiv (z angl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs – NSAIDs*), chorobu modifikujících léčiv (z angl. *disease modifying antirheumatic drugs – DMARDs*) a terapeutických protilátek (tzv. biologická léčba) [9] (

Tab. 1, str. 19). Jejich použití však vede často jen k potlačení některých symptomů, kompletní odstranění onemocnění nastává u pacientů jen v některých případech [9].

1 Teoretický úvod

Kromě této velké škály relativně bezpečných a účinných, převážně symptomatických léků se v současné době upíná pozornost na vývoj dalších forem terapií, jako je anticytokinová terapie a nízkomolekulární látky, které blokují kinasy zúčastňující se v zánětlivých signálních kaskádách [10].

1 Teoretický úvod

Tab. 1. Skupiny protizánětlivých léčiv a jejich nežádoucí účinky.

Imunosupresiva	Příklady jednotlivých léčiv	Možné nežádoucí účinky
Kortikosteroidy	Dexamethason, hydrokortizon, methylprenizolon, prednizon, prednizolon.	Atrofie pokožky a škáry, zhoršení zhojení po poranění, zhoršení růstu a zpožděná puberta u dětí, osteoporóza, atrofie svalů, katarakta, glaukom, deprese, hyperglykemie až cukrovka, hypertenze, Cushingův syndrom, zvýšené riziko infekcí [11,12].
NSAIDs	Aspirin, ibuprofen, sulfasalazin, diclofenak, piroxikam, indomethacin, naproxen.	Poškození gastrointestinálního traktu, zvracení, poruchy glomerulární filtrace, nefritidy, zvýšené riziko krvácení, hepatické poruchy, hypertenze, bolesti hlavy [13].
Antimalarika	Chinin, chlorochin, hydroxychlorochin, meflochin, artesunát, proguanil, piperachin, pyrimethamin.	Poruchy optické akomodace, svědění, nevolnost, alopecie, podráždění žaludku [14].
DMARDs	Methotrexat, hydroxychlorochin, sulfasalazin, tofacitinib, baricitinib.	Nevolnost, hepatotoxicita, alopecie, průjem, únava, zvýšené riziko infekcí, zvýšení hladiny cholesterolu, perforace střev [15].
Biologická léčba (protilátky)	Infliximab, afelimomab, adalimumab, siltuximab, tocilizumab, rituximab, abatacept.	Zvýšené riziko infekcí, pneumonia, únava, bolest hlavy, rýma, trombocytopenie, nevolnost [15].

1 Teoretický úvod

1.1.1.1 *Nesteroidní antiflogistika (NSAIDs)*

NSAIDs patří mezi nejpoužívanější léčiva ve světě při léčbě mnohých chronických zánětlivých onemocnění, jako je například revmatoidní artritida [13,16,17]. Tyto látky mají analgetický a antipyretický účinek. Potlačují symptomy onemocnění, ale neeliminují příčinu zánětu [13,17]. Prvním známým a široce využívaným léčivem je kyselina acetylsalicylová. Chemicky jsou NSAIDs většinou slabé kyseliny velmi rozmanité struktury, což zahrnuje i deriváty kyseliny salicylové [17]. Nesteroidní antiflogistika působí inhibičně na enzym cyklooxygenasu (COX) [10], která katalyzuje přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandiny, thromboxany a prostacykliny, z nichž hlavními prozánětlivými mediátory jsou prostaglandiny [18]. Mechanismus inhibice je založen na blokadě přístupu kyseliny arachidonové k aktivnímu místu enzymu. Kromě toho prokazují nesteroidní antiflogistika některé cytotoxické účinky spočívající v ovlivnění mitochondriálního metabolismu a následně k indukci apoptotických pochodů [17].

1.1.1.2 *Chorobu modifikující antireumatické léky (DMARDs)*

DMARDs jsou skupinou léčivých látek, do které se mohou zařazovat i léčiva z jiných skupin (*Tab. 1*, str. 19) například hydroxychlorochin, sulfasalazin, nebo protilátky [15]. Chorobu modifikující léky se nejčastěji používají pro léčbu revmatoidní artritidy. Jejich hlavní charakteristickou vlastností je to, že nejen potlačují symptomy zánětu (jak je tomu třeba u NSAIDs), ale zabráňují dalšímu rozvoji onemocnění a poškození tkání a dokonce stimulují návrat fyziologických funkcí v dané tkáni [15]. Jedním z nejznámějších léčiv patřících do dané skupiny je methotrexát. Mechanismus působení některých DMARDs zatím není zcela jasný. U některých (tofacitinib, baricitinib) se ví, že inhibují janusové kinasy a zabráňují přenos signálu na receptory pro IL-2 a IFN- γ , které jsou právě s těmito kinasami spřaženy [15].

1.1.1.3 *Glukokortikoidy*

Glukokortikoidy jsou díky svým antiflogistickým a imunosupresivním účinkům jedním z nejvíce používaných typů léčiv pro terapii chronických zánětlivých onemocnění. Jejich hlavní působení spočívá v omezení zánětlivých pochodů v organismu a podpoření efektů tlumících imunitu [19]. Terapie pomocí glukokortikoidů se používá při takových onemocněních jako je např. astma, revmatoidní artritida, chronická obstruktivní plicní nemoc a Crohnova choroba [20].

Účinky glukokortikoidů jsou výsledkem jejich působení na různých úrovních, od regulace exprese genů, přes přenos signálu až po jejich vliv na posttranskripční a posttranslační modifikace. Z nich je asi nejvýznamnějším mechanismem účinků regulace genů kódujících cytokiny prostřednictvím glukokortikoidních receptorů (GR) [10]. Glukokortikoidy jsou schopné procházet přes vnitřní hydrofobní vrstvu fosfolipidů

1 Teoretický úvod

cytoplazmatické membrány díky své hydrofobní povaze, a tak působit na cytoplazmatické GR. V cytoplazmě jsou na GR vázané chaperony, konkrétně protein tepelného šoku 90 a FK vázající protein (je pojmenován podle své schopnosti vázat imunosupresivní lék FK506), které chrání receptor a zabraňují jeho translokaci do jádra. Po navázání glukokortikoidu na receptor, dané bílkoviny disociují od GR, čímž umožní jeho translokaci [20,21]. Po vniknutí do jádra se komplex glukokortikoid-GR naváže na DNA v místě speciální sekvenci v oblasti promotoru genů citlivých na kortikosteroidy, známých jako GRE (Glucocorticoid response elements). Po navázání dvou molekul GR na GRE ve formě homodimeru dojde k ovlivnění transkripce genů [20]. Vazba GR na GRE kódující protizánětlivé bílkoviny (annexin-1, $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ – inhibitor $\text{NF-}\kappa\text{B}$) způsobí zvýšení jejich syntézy, zatímco vazba na negativní GRE způsobí snížení exprese genů kódujících bílkoviny, které jsou například spojené s vedlejšími účinky glukokortikoidů. Příkladem takové bílkoviny je kolagen VII, transkripce kterého je inhibována navázáním GR na GRE promotoru. Inhibována tvorba kolagenu VII může vést k projevení jednoho z nežádoucích účinků glukokortikoidů – zhoršení zhojení poranění [11]. Kromě toho komplex glukokortikoid-GR může ovlivňovat genovou expresi nepřímo, bez vazby na DNA, navázáním na molekuly koaktivátorů exprese (například CREB vázající protein), které jsou aktivovány prozánětlivými transkripčními faktory ($\text{NF-}\kappa\text{B}$, AP-1), a tímto způsobem bránit jejich aktivaci, což bude potlačovat syntézu prozánětlivých cytokinů [11,20]. Předpokládá se, že právě poslední uvedený mechanismus je zodpovědný za protizánětlivé účinky glukokortikoidů, což potvrzují mnohé experimenty [11,22].

Další studie ukazují, že existují další mechanismy působení glukokortikoidních látek potlačující zánět. Tyto mechanismy jsou spojené s nepřímou inhibicí nebo potlačením aktivity enzymů, které katalyzují reakce vedoucí k tvorbě molekul s prozánětlivými účinky. Jedním z těchto enzymů je fosfolipasa A_2 (PLA_2), která je důležitá při syntéze eicosanoidů (prostanoidů a leukotrienů). PLA_2 katalyzuje hydrolytické uvolnění kyseliny arachidonové z cytoplazmatické membrány, z této kyseliny se působením COX, lipooxygenasy nebo enzymů cytochromu P450 tvoří eikosanoidy [23], nezbytné signální molekuly s krátkým poločasem, které regulují produkce cytokinů, vznik protilátek, diferenciaci a proliferaci buněk, jejich migraci a prezentaci antigenů. Tyto látky působí autokrinně a parakrinně a mohou ovlivňovat funkci sousedních buněk [18]. Uvolnění kyseliny arachidonové je pro biosyntézu eicosanoidů rychlost limitujícím krokem [24]. PLA_2 se aktivuje po zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} ionů a látky jako IL-1, angiotenzin II, bradykinin, thrombin stimulují její aktivitu [25–28]. Účinky eicosanoidů jsou spojené s jejich vazbou na receptory spřažených s G-proteiny. Hrají nezbytnou roli v modulaci fyziologických procesů při udržení homeostázy, a zvláště při zánětech, kde jako mediátory zánětu způsobují vazodilataci, zvýšení permeability cév a regulují bolest a horečku [18].

1 Teoretický úvod

Přesný mechanismus působení glukokortikoidů na inhibici PLA₂ není zcela objasněn, avšak různé studie poukazují na dva možné mechanismy.

Jedním z nich je regulace aktivity PLA₂ glukokortikoidy přes speciální proteiny známé jako annexiny. Annexiny jsou rozsáhlou a rozšířenou rodinou proteinů (až do 2 % všech intracelulárních proteinů), které se zúčastňují mnoha buněčných procesů (membránový transport, inhibice PLA₂, inhibice koagulace) a prokazují schopnost se vázat na fosfolipidy v závislosti od přítomnosti Ca²⁺ iontů [29]. Studie předpokládající účast annexinů v mechanismu inhibice PLA₂ použitím glukokortikoidů říkají o tom, že glukokortikoidy aktivují expresi genů kódujících annexiny, které se následně vážou na kyselinu arachidonovou, čímž znemožní přístup enzymu ke substrátu [29]. Přímá závislost mezi koncentrací annexinů a glukokortikoidů se však pozorovala jen za určitých podmínek u některých typů buněk [29,30]. Kromě toho existují data, že annexiny, indukované podáním glukokortikoidů inhibují expresi enzymu NO-syntasy, která v makrofázích a neutrofilních granulocytech v průběhu zánětlivých reakcí produkuje oxid dusnatý (NO) mající vazodilatační účinek [31].

Druhým předpokládaným mechanismem působení glukokortikoidů na aktivitu PLA₂ je přímá regulace její genové exprese. Existují studie, které ukazují efekt glukokortikoidů na bazální expresi cytoplasmatické PLA₂ (cPLA₂) v buněčných kulturách a 75% pokles v koncentraci mRNA enzymu během 12 hodin po jejich použití [24]. Mechanismus dané inhibice exprese může být shodný s mechanismem inhibice prozánětlivých cytokinů – inhibici NF-κB. Bylo zjištěno, že lidské geny kódující cPLA₂ obsahuje vazebné místo právě pro tento faktor [11,32].

Do proteinové rodiny NF-κB zařazujeme velice významné a evolučně konzervované transkripční faktory [33]. Jejich prostřednictvím se uskutečňuje regulace pochodů specifické a nespecifické imunity, iniciuje se exprese takových nezbytných složek imunitního systému jako prozánětlivé cytokiny, chemokiny, COX-2, NO syntasa, komponenty majoritního histokompatibilitního komplexu. Kromě toho má NF-κB význam při regulaci buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy [34,35].

1.1.1.3.1 Dexamethason

Dexamethason (DEX) je jedním z nejčastěji používaných glukokortikoidních protizánětlivých léčiv pro léčbu jak akutních, tak i chronických zánětů. Daná látka byla schválena pro protizánětlivou léčbu v roce 1961. DEX je syntetický glukokortikoid, který vzniká modifikací struktury kortizolu zavedením 9- α -fluorskupiny a 16- α -methylové skupiny a také nové dvojně vazby mezi uhlíky 1 a 2 A-kruhu steroidní struktury kortizolu. Výhodou DEX je, že se na glukokortikoidní receptor váže lépe než kortizol. Zavedení atomu fluoru zvyšuje jeho lipofilicitu a methylová skupina zvyšuje jeho afinitu k mineralokortikoidnímu receptoru. Navzdory daným výhodám má použití DEX i určité nedostatky – pro dosažení požadovaného terapeutického efektu jsou potřebné vyšší

1 Teoretický úvod

koncentrace. Zvýšení dávky však současně vyvolává určité nežádoucí vedlejší účinky charakteristické pro glukokortikoidy (*Tab. 1*, str. 19) [19]. Kvůli rozsáhlým nežádoucím účinkům tohoto léčiva se proto velká pozornost obrací na nalezení nových způsobů jeho podání a distribuci do organismu [36], které by vedly k omezení těchto negativních účinků.

1.1.1.4 Biologická léčba

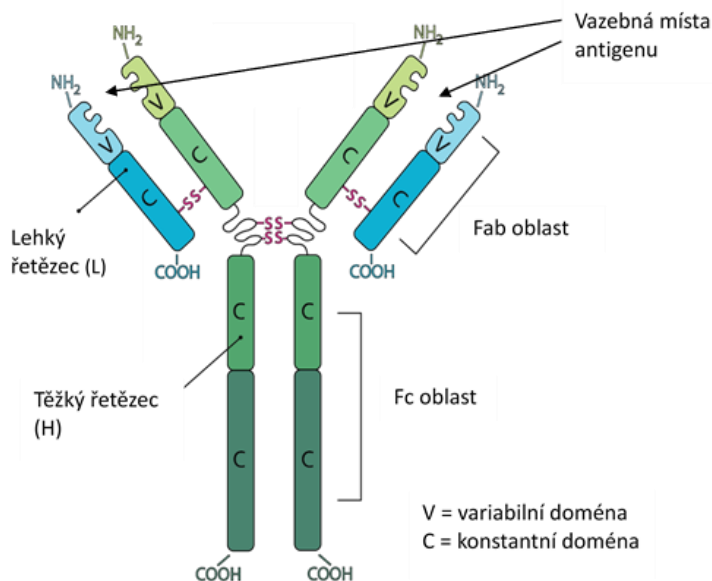
Biologická léčba je typ terapie, při které se využívají látky biologického původu. V současnosti se při léčbě chronických zánětů v rámci biologické terapie využívají různé typy monoklonálních protilátek, které se specificky vážou na molekuly podílející se na rozvoji zánětů, a tím potlačují zánětlivou reakci. Patří sem protilátky fungující jako inhibitory TNF- α , inhibitory faktoru aktivujícího B-buňky (z angl. *B cell activating factor* – *BAFF*), inhibitory kostimulace T-lymfocytů vázající se na receptor CD-80/CD-86 (modifikována protilátka abatacept), protilátky vázající se na CD-20 receptor B-buněk, protilátky interagující s receptory CD-52, CD-6, CD-154, integrinem $\alpha_4\beta_7$, blokátory receptoru IL-6, inhibitory IL-1, IL-17, IL-23, IL-5, IL-12, IL-6, inhibitory komplementu (*Tab. 2*).

Tab. 2. Příklady terapeutických protilátek a jejich ligandů [15,37,38].

Terapeutická protilátka (protilátky)	Cílový ligand
Infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab, golimumab, afelimomab	TNF- α
Belimumab	BAFF
Abatacept	CD-80/CD-86
Rituximab, ocrelizumab	CD-20
Aletuzumab	CD-52
Itolizumab	CD-6
Ruplizumab	CD-154
Vedolizumab, natalizumab	Integrin $\alpha_4\beta_7$
Tocilizumab, sarilumab	Receptor pro IL-6
Anakinra, canakinumab	IL-1
Secukinumab, brodalumab	IL-17
Tildrakizumab, guselkumab, ustekinumab, briakinumab, risankizumab	IL-23
Mepolizumab, reslizumab	IL-5
Ustekinumab, briakinumab	IL-12
Sarilumab	IL-6
Eculizumab	C5 složka komplementu

1 Teoretický úvod

Protilátky jsou proteiny se specifickou strukturou v tvaru písmena Y (*Obr. 1*). Mají velmi velký význam v imunitních procesech organismu, proto se používají i jako terapeutika při autoimunitních a nádorových onemocněních. Jsou to látky schopné vázat určité struktury, antigeny, s velkou afinitou a specifitou. Typickým strukturním rysem společným pro všechny protilátky je přítomnost dvou těžkých (H) řetězců o hmotnosti 50-75 kDa, které jsou spojené disulfidickými můstky. Ke každému H řetězci je pomocí disulfidických můstku připojen jeden lehký (L) řetězec o hmotnosti cca 25 kDa [1].



Obr. 1. Struktura protilátky. Na obrázku jsou vyznačeny řetězce, domény a oblasti, které jsou charakteristické v struktuře protilátky. Převzato z [39] a upraveno.

Mechanismy, kterými mohou působit terapeutické protilátky jsou velice různorodé. Mohou zabránovat navázání látek přítomných v cytoplasmě na příslušné receptory interakcí buď s těmito látkami (blokace ligandů) nebo s receptory (blokace receptorů), mohou kromě toho zprostředkovaně (blokací induktoru) regulovat expresi buněčných povrchových receptorů. Dalším mechanismem je navázání na antigeny buněčného povrchu, a tím aktivace komplementu, což způsobuje buď opsonizaci buňky nebo její lýzi, nebo zničení buňky pomocí složek buněčné imunity (fagocytů). Kromě toho navázání protilátky na určité povrchové antigeny může způsobit přenos intracelulárních signálů, které vyvolají určité metabolické změny (například může takto dojít ke změně funkcí a diferenciaci T-buněk) [40].

1.1.1.4.1 Infliximab

Infliximab (IFX) je monoklonální chimérická protilátka, která obsahuje myší variabilní a lidské konstantní domény. Mechanismus působení IFX je založený na blokaci TNF- α (mechanismus blokace ligandu), jednoho z hlavních prozánětlivých cytokinů. IFX se váže jak na volný, tak i na membránový TNF- α s vysokou afinitou za vzniku stabilních

1 Teoretický úvod

imunokomplexů [41]. Navázání IFX na TNF- α znemožňuje vazbu TNF- α na příslušné receptory a následnou iniciaci signální kaskády, která vede ke transkripci genů [41]. TNF- α zvyšuje expresi prozánětlivých cytokinů jako jsou IL-6, IL-8 a faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů [42].

Tato protilátka je spolu s jinými TNF-antagonisty považována za jednu z nejvíce prospěných protizánětlivých terapeutik, které se používají pro léčbu Crohnovy choroby, revmatoidní artritidy, psoriatické artritidy, ankylozující spondylitidy, psoriázy a ulcerózní kolitidy [40]. Úřadem FDA je schválena od roku 1998. Samotný IFX se podává intravenózně infuzí [43]. Standardní dávka podávána během 2 hodin je dle protokolu 5 mg·kg⁻¹ [43]. Mezi hlavní možné nežádoucí účinky IFX patří zvýšení rizika různorodých infekcí, opětovaná aktivace hepatitidy B, malignity [44]. Kromě toho při aplikaci daného léčiva je riziko vzniku nemocí, které jsou vyvolané imunitní odpovědí organismu na lék a tvorbou protilátek proti IFX, jako je například lupus-like syndrom a hypersenzitivita spojená s tvorbou imunoglobulinů typu E a G [43,44].

1.2 Systémy pro dopravu protizánětlivých léčiv

1.2.1 Systémy pro dopravu léčiv

Vývoj systému pro dopravu léčiv (z angl. *drug delivery system* – DDS) je v současné době jedním z velmi zkoumaných témat v rámci chemických a medicínálních oborů. Po podání léčiva do organismu je důležité, aby léčivo působilo určitým mechanismem na nějakou složku organismu v požadovaném místě, tedy vykazovalo optimální distribuci a akumulaci v požadovaném místě. Právě proto je optimalizaci dopravy léčiv věnována velká pozornost. Kromě toho, vývoj efektivního DDS, který zvýší léčebnou účinnost již existujícího léčiva a zlepší bezpečnost díky snížení vedlejších účinků neseného léčiva může být méně časově a finančně náročný, než vývoj nového nízkomolekulárního léčiva s vylepšenými vlastnostmi [45].

Použitím nosičů léčiv lze dosáhnout mnoha výhod ve srovnání s aplikací samotného původního léčiva. DDS pozitivně ovlivňuje distribuci léčiva v organismu a zvyšuje jeho biologickou dostupnost. Samotný lék se distribuuje v těle nespecificky a může toxicky působit i na zdravé tkáně, čímž vyvolává nežádoucí účinky. Díky DDS se léčivo může pasivně, ale i aktivně akumulovat v místě, kde se vyžaduje jeho působení. DDS zároveň může významně prodloužit cirkulaci léčiva v krvi. Správně navržený nosič by se měl po splnění funkce vyloučit z těla ven [46].

Existuje velká řada různých DDS, které se liší hlavně podle své struktury. Prvními široce využívanými DDS se staly systémy založené na schopnosti amfifilních lipidových struktur vytvářet micely a lipozómy. Především lipozomální systémy jsou schválené FDA a jsou v současnosti široce využívány v klinické praxi. Struktura a vlastnosti micel a

1 Teoretický úvod

lipozómů umožňují jejich interakci s cytoplasmatickou membránou a následnou dopravu neseného léčiva dovnitř buňky [47].

V současné době se studují jako vhodné nosiče také různé polymerní biomateriály. Výzkum možnosti využití polymerních látek jako DDS má svůj začátek již v 60. letech minulého století [48]. Tento výzkum vedl k přípravě takzvaných polymerních terapeutik, které buď mají biologickou aktivitu sami od sobě, nebo mohou být použité jako vhodné DDS [37]. Příkladem polymerů používaných pro přípravu DDS jsou například *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA), 2-hydroxyethylmethakrylát, polyethylenglykol (PEG) a polyoxazolíny. Každý z těchto syntetických polymerů má určité vlastnosti a určité specifikum použití. Kromě těchto polymerů se mohou jako systémy pro dopravu léčiv používat přírodní biopolymery a jejich deriváty, jako je například chitosan (produkt deacetylace chitinu), kyselina hyaluronová, alginát a některé proteiny [47,50]. Produkty polymerací některých organických kyselin, jako například kyselina poly (glykolová) a poly (mléčná) a jejich kopolymery se také využívají jako hydrofobní složky při přípravě amfifilních DDS [50]. Existují i složitější polymerní DDS, například polymerní micely, nanočástice, dendrimery (polymerní DDS hvězdicového tvaru) a kombinované systémy, jako jsou lipozomy konjugované s PEG pro zlepšení rozpustnosti a snížení nechtěného záchytu ve zdravých částech organismu [47].

Vedle organických DDS existují i nosiče anorganického původu. Nejčastěji jsou studovány nanočástice na bázi železa, zlata nebo oxidu křemičitého. Interakce s léčivem se u nich uskutečňuje na základě adsorpce nebo využitím elektrostatických a kovalentních interakcí. Zatím se ale v praxi nevyužívají, jsou ve stadiu testování [47].

1.2.2 Systémy pro dopravu protizánětlivých léčiv

DDS se vyvíjí pro různá léčiva a látky s protizánětlivými účinky nejsou výjimkou. Jako zajímavý polymerní nosič byl například studován kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (PLGA) a PEGu tvořící amfifilní kopolymer vytvářející micely nebo nanočástice. Tyto micelární systémy jsou modifikovány PEGem pro zvýšení stability a rozpustnosti ve vodních roztocích. Také jsou studovány dendrimerní nosiče (hlavně polyamidoaminové – PAMAM dendrimery). Nejrozšířenější volbou DDS pro zvýšení efektivity léčby revmatoidní artritidy jsou lipozomy, které obsahují cholesterol nebo fosfatidylcholin. Podávají se intravenózně a následně díky jejich velkému hydrodynamickému rozměru jsou akumulovány v kloubu postiženém artritidou [51].

Mezi velmi zajímavé a důležité DDS patří systémy, které se používají jako nosiče glukokortikoidních protizánětlivých léčiv (hlavně dexametazonu). Vývoj DDS pro danou třídu protizánětlivých látek je zvláště důležitý vzhledem k tomu, že glukokortikoidy projevují výrazné nežádoucí účinky a nespécifickou distribuci při dlouhodobém použití a použití větších dávek [52]. Pro glukokortikoidy se mohou použít všechny systémy, které

1 Teoretický úvod

již byly zmíněné (PEG, PLGA, chitosan a jeho deriváty, poly(ϵ -kaprolakton-PEG) [19]. Detailně byly také testovány lipozomy modifikované PEG a polymerní nosiče, které tvoří micely. Poměrně často jsou také studovány HPMA kopolymery, na které se může dexamethason přímo navázat za vzniku konjugátů, které mají lepší rozpustnost než samotný lék a cíleně se akumulují v místě zánětu. Můžeme se setkat i s pokusy využívajícími anorganické DDS pro glukokortikoidy, jak jsou například polymethylsiloxany – polymery na bázi křemíku s velkou porozitou, na které se může léčivo navázat pomocí adsorpce [52].

1.2.3 Pasivní akumulace nosiče ve tkáních postižených zánětem

Při použití systémů pro dopravu léčiv se využívá dvou strategií pro dosažení větší akumulace biologicky aktivní látky ve tkáních, ve kterých musí léčivo poskytnout svůj terapeutický efekt. Jedná se o strategie pasivní a aktivní akumulace. Konjugát může být připraven tak, aby se využilo jedné nebo i obou strategií.

Pasivní akumulace je založená hlavně na dvou vlastnostech tkání postižených zánětem – zvýšené permeabilitě cév daných tkání a záchytem DDS pomocí buněk přítomných v zánětu.

Zvýšená permeabilita cév může být vysvětlena na příkladu chronického zánětlivého onemocnění revmatoidní artritidy (RA). Při RA je zánětem postižená synoviální tkáň kloubů a je přitom vyvolána intenzivní angiogeneze – tvorba nových odvětvění od existujících kapilár. Proto dochází ke přílivu zánětlivých leukocytů k místu zánětu [53].

Tyto rychlé procesy při RA přispívají ke vzniku abnormálně propustné vaskulatury, což velice napodobuje procesy, které se odehrávají v nádorech [53]. V případě zánětů se tento jev označuje jako ELVIS efekt (z angl. *extravasitation through leaky vasculature and subsequent inflammatory cell mediated sequestration*). ELVIS efekt má společné rysy s mnohem více prozkoumaným efektem zvýšené propustnosti a zadržky (z angl. *enhanced permeability and retention – EPR*) u pevných nádorů, nicméně se nejedná o úplnou analogii. Ve případě ELVIS efektu stejně jako u EPR efektu dochází k zvýšení propustnosti tkáně postižené zánětem, protože imunitní odpověď organismu vyvolává vazodilataci v zanícené oblasti a tím zvyšuje její prokrvení a propustnost především pro buňky imunitního systému, ale i jiné složky, které se mohou nacházet v krvi. Makromolekuly, tedy i DDS, jsou tedy propouštěny ve větší míře do zánětlivé tkáně, kde do jisté míry jsou zachyceny přítomnými buňkami imunitního systému [9,53,54]. Záchyt je nicméně daleko méně zřetelný, a to především díky dobře fungujícímu lymfatickému systému v zánětech, který nezachycené makromolekuly opět odvádí ze zanícené tkáně.

1 Teoretický úvod

V návaznosti na pasivní akumulaci polymerního nosiče díky zvýšené propustnosti tkáně působí na použitý DDS snížené pH ve tkáních, v nichž probíhá zánětlivý proces. Kyselější prostředí může způsobit intenzivnější uvolnění léčiva navázaného na DDS prostřednictvím pH-senzitivní spojky, můžeme teda konstatovat, že snížené pH je faktorem aktivace léčiva v cílové tkáni. K danému jevu – acidóze – dochází částečně kvůli nízkému obsahu kyslíku ve tkáních se zánětem, což vede k posunu podmínek blíž k anaerobním a tvorbě většího množství kyseliny mléčné při glykolýze. Příčiny hypoxie ve tkáních postižených zánětem jsou poškozená vaskulatura, metabolismus bakterií nebo jiných patogenů a také poměrně značná spotřeba kyslíku buňkami imunitního systému, které vnikají do zanícené tkáně. Tyto faktory mohou snížit parciální tlak kyslíku na hodnoty nižší než 1 % přičemž v zdravé tkáni je rozmezí obsahu kyslíku 2,5 – 9 %. Hypoxie je značně přítomna při takových onemocněních jako je Crohnova nemoc a revmatoidní artritida [55].

1.2.4 Aktivní akumulace nosiče ve tkáních postižených zánětem

Strategie aktivní akumulace může ještě více zlepšit terapeutickou efektivitu léčiva [56]. Jako aktivní cílení neboli akumulaci léčiva rozumíme proces, při kterém se na samotný nosič léčivé látky připojí jiná biologicky aktivní molekula, která je ligandem pro určitý receptor, jehož exprese je zvýšena v místě působení léku. Mezi molekuly, které je možné použít pro aktivní směřování nosiče, patří například oligosacharidy, lektiny, protilátky, fragmenty protilátek, oligopeptidy a peptidy [57].

Výhoda aktivního cílení spočívá v aktivním mechanismu vyhledávání cílových receptorů, následné silné vazbě na receptor s možností vniknutí nosiče s léčivem do dané buňky. Cílení tím pádem může být použito také za účelem maximalizace efektu pasivní akumulace zabezpečením zadržení konjugátů v místě určeném pro jejich působení [58].

Receptory, které jsou specifické pro postiženou tkáň a jsou v ní hojně exprimovány mohou být ideálním cílem pro aktivní cílení a akumulaci. Výhodou je, pokud po reakci s ligandem na nosiči dojde k endocytóze konjugátu do cílové buňky s následným terapeutickým působením. Většina strategií aktivního cílení se spoléhá na zvýšenou expresi určitého receptoru buněčného povrchu postižených buněk, což zvyšuje pravděpodobnost vstřebání nosiče s léčivem do buněk v cíleném místě. Při samotném využití aktivního směřování je důležité důkladně zhodnotit, zda vybrané směřování je dostatečně specifické pro cílovou tkáň a je možné tedy dostatečně využít relativního rozdílu exprese daného receptoru mezi zdravou a postiženou tkání pro efektivní směřování [58].

Při terapii zánětu může být aktivní cílení založeno na interakce směřující molekuly s folátovým receptorem, který je ve zvýšené míře exprimován aktivovanými makrofágy, přítomnými v místě zánětu. Kromě toho jsou zrychlená angiogeneze a

1 Teoretický úvod

zvýšený vstup buněk do postižené tkáně spojené se zvýšenou expresí adhezivních molekul, například integrinů, na povrchu makrofágů a endoteliálních buněk neovaskulatury [9]. Další možností je využití protilátky, která se bude specificky vázat určitý cytokin, jenž bude v místě zánětu přítomný. Příkladem je využití protilátek, které interagují s TNF- α , jehož exprese a koncentrace v oblasti zánětu je značně zvýšena.

1.2.5 HPMA kopolymery jako nosiče léčiv

Studium kopolymerů HPMA a možnosti jejich využití jako nosičů léčiv bylo zahájeno v sedmdesátých letech na Ústavě makromolekulární chemie Akademie Věd v Praze Jindřichem Kopečkem [57].

V současnosti jsou ve vodě rozpustné HPMA kopolymery jednou z nejvíce studovaných skupin hydrofilních polymerů, které se nejčastěji používají pro syntézu konjugátů polymer-léčivo. Existuje mnoho studií zabývajících se hlavně HPMA konjugáty s protinádorovými léčivy pro léčbu zhoubných nádorů, ale studují se také možnosti použití HPMA-konjugátů pro dopravu antibiotik a imunosupresiv pro léčbu jiných typů onemocnění. Velký potenciál mají také při návrhu a studiu tzv. polymerních vakcín [59]. Dále mohou sloužit jako nosiče různých fluorescenčních značek, a tak mají velký potenciál i jako sondy v oblastech jako je například fluorescenčně naváděná chirurgie během operačních zákroků díky akumulaci fluorescenčně značeného polymeru do nádorové tkáně.

HPMA polymery jsou ve vodě rozpustné a biokompatibilní, což umožňuje jejich použití jako nosičů léčiv. Po podání nevyvolávají žádné nežádoucí obranné reakce organismu [60].

Studium imunogenicity HPMA polymerů o průměrné molekulové hmotnosti 30000 g·mol⁻¹ na myších prokázalo, že organismus polymery rozeznává stejně jako syntetické peptidy jedné nebo dvou α -aminokyselin, které jsou neimunogenní a biokompatibilní. Nebyla pozorována ani odpověď organismu na přítomnost polymeru na buněčné úrovni, ani reakce s komplementem při podání terapeutických dávek kopolymerů. Slabší imunitní odezva byla prokázána vznikem protilátek jen u HPMA polymeru, který obsahoval kovalentně navázaný oligopeptidový řetězec sloužící jako spojka pro navázání léčiva na polymer [61].

HPMA kopolymery mají řadu specifických vlastností, jež jsou velice výhodné při jejich použití jako systémů pro dopravu léčiv. Jsou biokompatibilní, nejsou toxické ani imunogenní, což umožňuje podání jejich konjugátů s léčivy do organismu. Řízená syntéza umožňuje přípravu HPMA kopolymerů s nízkou disperzitou a molekulovou hmotností, která nepřekročí renální práh, a tak mohou být jednoduše vyloučeny z těla glomerulární filtrací po splnění funkce nosiče. Hydrofilnost polymerního řetězce je velmi důležitou vlastností zvláště v případě konjugátů s DEX jako biologicky aktivní látkou.

1 Teoretický úvod

DEX je steroidního původu, což znamená, že jde o vysoce hydrofobní látku. Tato skutečnost představuje významnou nevýhodu při jeho podání pacientovi. Konjugace DEX s hydrofilním HPMA kopolymerem způsobuje významné zvýšení rozpustnosti léčiva a tím zvětšení jeho dostupnosti pro organismus. DEX se po aplikaci jeho volné formy do organismu rychle biotransformuje a eliminuje z organismu, stejně jako jiná glukokortikoidní léčiva. Proto další výhodou konjugace DEX s HPMA polymerem je jeho ochrana před předčasnou eliminací z organismu a s tím spojené prodloužení jeho cirkulace v krvi. Toto prodloužení cirkulace je dáno vysokou molekulovou hmotností a zvýšeným hydrodynamickým poloměrem konjugátu, což zpomaluje renální vyloučení léčiva z organismu [9]. Současně je ale důležité, aby se polymerní konjugát navrhl tak, aby jeho molekulová hmotnost nepřesáhla cca 50 kDa, tedy hydrodynamický průměr cca 10 nm, a vyloučení konjugátu z organismu ledvinami bylo vůbec možné. Biodegradovatelná spojka mezi léčivem a kopolymerem, s výhodou pH-senzitivní navíc umožňuje jeho postupné uvolňování v místě zánětu [56]. Konjugace léčiva s HPMA kopolymerem také výrazně snižuje vedlejší účinky DEX, protože nosič není obecně schopen pronikat do zdravých tkání do té míry co nízkomolekulární léčivo. Tím je průnik léčiva do zdravých tkání omezen, čímž se omezí i toxicita DEX [9].

Určitou nevýhodou použití lineárních kopolymerů na bázi HPMA je to, že nejsou sami o sobě biodegradovatelné. S touto skutečností je spojeno riziko jejich intracelulární akumulace v lysozomálním kompartmentu, zvláště v případě podávání vysokých dávek nebo dlouhodobého podávání. Proto je nezbytně nutné zajistit jejich vylučování z organismu. V případě HPMA kopolymerů se to dá jednoduše docílit použitím řetězců, jejichž molekulová hmotnost je pod renálním prahem ($<50\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, obvykle kolem $30\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), čím se zajistí eliminace polymeru glomerulární filtrací [62].

Na druhou stranu, nedegradovatelnost HPMA polymerů má v mnohých ohledech výhodu v porovnání s biodegradovatelnými materiály. Například z hlediska snadnosti charakterizace produktů degradace jsou HPMA polymery s biodegradovatelnou spojkou mnohem lepší volbou než biodegradovatelné polymery, které se mohou rozpadnout na několik degradačních produktů, jež bude následně velmi komplikované charakterizovat a stanovit rychlost určující krok uvolňování léčiva [62].

Ve srovnání s jinými polymerními systémy pro dopravu léčiv mají HPMA-kopolymery určité výhody. Například ve srovnání s PEG – jiným velmi rozšířeným hydrofilním polymerem – jsou HPMA-kopolymery multifunkční a umožňují významnou variabilitu při vazbě léčiva, než je tomu u PEG. HPMA kopolymery díky své multifunkčnosti mají mnohem širší škálu možností konjugace léčiva se směřujícími látkami a také umožňují kombinační terapii navázáním i několika různých molekul léčiv na jeden řetězec [62].

1 Teoretický úvod

1.2.5.1 Strategie syntézy konjugátů na bázi HPMA

Aby HPMA-kopolymery, které se následně použijí pro konjugaci s léčivem, plnily svou funkci a odpovídaly všem specifickým požadavkům, které jsou na ně kladeny v souvislosti s danou funkcí, je nutné při jejich syntéze využívat nejmodernější techniky kontrolované polymerizace a postpolymerizačních modifikací. Správné navržení, délka a struktura polymerního nosiče mají zásadní vliv na distribuci celého systému s léčivem v těle a tím i jeho biologickou aktivitu [59]. Důležitým parametrem při charakterizaci polymerních nosičů je disperzita, která udává míru neuniformity polymerních řetězců [61]. Čím je hodnota disperzity bližší jedné, tím je připravený polymer lépe definovaný. Tohoto lze u HPMA-kopolymerů dosáhnout použitím speciální kontrolované polymerizační techniky, která je nazývána polymerizace s reverzibilně adičně fragmentačním přenosem řetězce (z angl. *reversible addition-fragmentation chain transfer – RAFT*) [63].

Pro dosažení vyhovující biologické aktivity musí být většina léčiv konjugovaných s polymerem uvolněna v místě působení. Nejčastěji se využívá enzymatická či chemická hydrolýza spojky mezi léčivem a kopolymerem. Uvolnění molekuly léčiva může tedy nastat v buňce díky enzymatickému rozštěpení spojky například v lysosomech pomocí lysosomálních enzymů, nebo její hydrolýzou díky poklesu pH při přechodu konjugátu z krevního řečiště (pH 7,4) do prostředí postižené zánětem (pH 5-6) [59].

Jako enzymaticky štěpitelná spojka se nejčastěji studoval oligopeptid G-F-L-G (glycin – fenylalanin – leucin – glycin), který může být rozštěpen v přítomnosti lysosomálních enzymů, například katepsinu B [59]. Nevýhodou použití dané spojky je to, že oligopeptidové postranní řetězce mohou být pro pacienta mírně imunogenní [60].

V předložené práci byla využita hydrazonová vazba podléhající hydrolýze za sníženého pH. Hydrazonová vazba je relativně stabilní v neutrálním pH (včetně fyziologického pH $\approx 7,4$) a její rychlost hydrolýzy významně stoupá s klesající hodnotou pH. Stabilita hydrazonové vazby a její citlivost vůči kyselé hydrolýze silně závisí na struktuře použité spojky a nejbližším okolí hydrazonové vazby. Použití hydrazonové vazby místo oligopeptidové spojky umožňuje v některých případech navázat na polymerní nosič významně větší množství aktivní látky. Nedostatkem použití kopolymeru obsahujícího hydrazidové skupiny je to, že při syntéze je potřeba chránit hydrazidovou skupinu. Právě proto při syntéze takových kopolymerů se používají monomery obsahující hydrazidovou skupinu, která je chráněna terc-butyloxykarbonylem (BOC) [61].

Hydrazonová vazba vzniká reakcí hydrazidové skupiny na kopolymeru a aldehydové nebo keto-skupiny léčiva. Pro konjugaci kopolymerů s léčivem, které ve své struktuře neobsahují dané skupiny, se využívá modifikace léčiva pomocí různých

1 Teoretický úvod

oxokyselin, jako jsou například kyselina 4-oxopentanová, kyselina 4-(2-oxopropyl)benzoová a kyselina 5-methyl-4-oxohexanová. Na kopolymer jsou tak navázány deriváty výchozích léčiv, konkrétně jejich estery či amidy, které jsou navrženy tak, aby léčivo neztratilo svou biologickou aktivitu. V místě působení (s nižším pH) dojde k uvolnění derivátů z polymerního řetězce a předpokládá se, že samotné deriváty se následně hydrolyticky degradují na původní volné léčivo. Struktura oxokyselinové spojky značně ovlivňuje rychlost uvolnění léčiva v neutrálním a slabě kyselém pH, čímž může ovlivnit i účinnost konjugátů jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Některé z těchto derivátů prokázali svou aktivitu při testech *in vivo* i když byly aplikovány jako volné formy bez konjugace na polymerní nosič [61].

Jako další pH-senzitivní spojku je možné využít cis-akonityl [59,61]. Tato spojka vykazuje rovněž vyšší stability v neutrálním prostředí a je hydrolyzována rychleji při nižším pH [61].

Syntéza semitelechelického HPMA kopolymeru s jednou specifickou funkční skupinou na konci hlavního řetězce dovoluje kromě navázání molekul léčiva podél řetězce navázat na zmíněný konec polymerního řetězce jinou molekulu, která mimo jiné může plnit funkce směřující skupiny. Často se jako směřující molekuly používají protilátky, které specificky rozeznávají receptory na povrchu buněk a vážou se na nich. Protilátka obsahuje několik funkčních skupin umožňujících její konjugaci s polymerním nosičem. Jsou to primární a sekundární aminoskupiny a karboxylové skupiny. Kromě toho se pro konjugaci mohou do struktury protilátky vnést další skupiny, jako jsou například aldehydové skupiny oxidací sacharidových jednotek protilátky nebo thiolové skupiny selektivní redukcí disulfidických můstků [59].

2 Cíle

Cílem bakalářské práce bylo navrhnout, připravit a předběžně otestovat polymerní konjugát na bázi HPMA-kopolymeru s protizánětlivým léčivem dexamethasonem a protilátkou infliximab. Systém byl navržen pro využití v terapii zánětlivých onemocnění s cílem dosáhnout zesíleného léčebného účinku.

Cílem bylo charakterizovat připravený konjugát z hlediska jeho fyzikálně-chemických vlastností, ověřit biologickou aktivitu protilátky a stanovit rychlost uvolňování léčiva dexamethasonu z konjugátu v pufrch s různými pH, které napodobují pH v krevním řečišti (pH = 7,4), v místě zánětu (pH = 6,5) a v intracelulárních lyzozomech (pH = 5,0).

3 Použité vybavení a chemikálie

3.1 Přístroje

centrifuga 5430 R	Eppendorf, USA
detektor rozptylu světla DAWN HELEOS II	Wyatt Technology Co., USA
diferenciální refraktometr Optilab [®] -rEX	Wyatt Technology Co., USA
hmotnostní spektrometr LCQ Fleet ESI-MS	Thermo Fischer Scientific, USA
HPLC systém Shimadzu VP	Shimadzu, Japonsko
kolona Chromolith RP-18e	Merck, Německo
kolona superose 6	Cytiva, USA
kolona TSKgel G3000SWXL	Tosoh Bioscience, Japonsko
mikrocentrifuga Force 1618	Labnet International, USA
mikrocentrifuga Mini Star	VWR, ČR
multidetekční čtecí zařízení Synergy H1	BioTek, USA
přístroj pro NMR analýzu AvanceCore	Bruker, USA
sada pro provedení ELISA lidského TNF- α Invitrogen	Thermo Fischer Scientific, USA
souprava pro elektroforézu Biotech PhastSystem	Pharmacia, Švedsko
souprava pro přípravu ultračisté vody Mili-Q	Millipore, Francie
spektrofotometr SPECORD 205	Analytik Jena, Německo
UV detektor absorbancí Azura UVD 2.1S	Knauer, Německo
zobrazovací systém SYNGENE PXi	Syngene, UK
UV-vis detektor s fotodiodovým polem SPD-30AM	Shimadzu, Japonsko

3 Použité vybavení a chemikálie

3.2 Chemikálie

aceton	Lachner, Česká Republika
acetonitril	Fluka, Německo
2,2'-azobis(2,4-dimethyl-4-methoxyvaleronitril)	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Německo
azobisisobutyronitril	Sigma-Aldrich, Česká Republika
bromfenolová modř	Pharmacia, USA
dexamethazon	Sigma-Aldrich, Česká Republika
dibenzocyklooktyn-maleinimid	Click Chemistry Tools, USA
dichlormethan	Sigma-Aldrich, Česká Republika
diethylether	Sigma-Aldrich, Česká Republika
dimethylacetamid	Fluka, Německo
dimethylaminopyridin	Fluka, Německo
dimethylsulfoxid	Merck, Německo
dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Česká Republika
dodecylsulfát sodný	Sigma-Aldrich, Česká Republika
glycerol	Lachner, Česká Republika
ethylendiamintetraacetát	Fluka, Německo
ethylacetát	Sigma-Aldrich, Česká Republika
ethylmaleimid	Sigma-Aldrich, Česká Republika
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid	GenScript, UK
infiximab	Janssen Biologics B.V., Nizozemsko
kyselina octová	Sigma-Aldrich, Česká Republika
kyselina trifluoroctová	Iris Biotech GmbH, Německo
kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová	Sigma-Aldrich, Česká Republika
kyselina 4-(2-oxopropyl)benzoová	Sigma-Aldrich, Česká Republika
merkptoethanol	Sigma-Aldrich, Česká Republika
methanol	Fluka, Německo
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Fluka, Německo
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Fluka, Německo
NaOH	Sigma-Aldrich, Česká Republika
octan sodný	Fluka, Německo

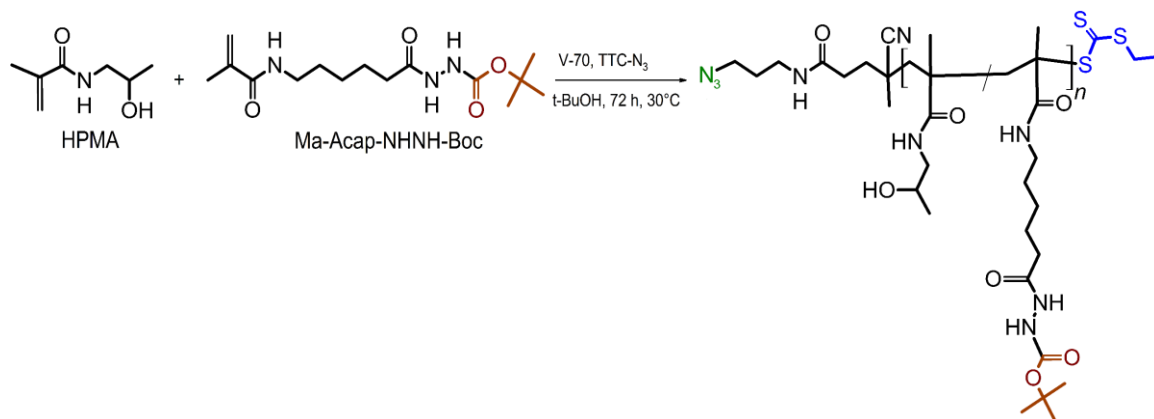
4 Experimentální část

4.1 Syntéza monomerů

Monomery *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA), 1-(*tert*-butoxykarbonyl)-2-(6-methakrylamidohexanoyl)hydrazin (Ma-Acap-NH-NH-Boc), CTA přenosové činidlo pro polymeraci trithiokarbonát-azid (TTC-N₃) byli syntetizované na oddělení Biolékařských polymerů na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i. podle dříve popsané syntézy [64,65].

4.2 Syntéza polymerního prekurzoru poly(HPMA-co-Ma-Acap-NH-NH₂) s terminálním azidem

Kopolymer poly(HPMA-co-MA-Acap-NH-NH-Boc)-N₃ s azidem na konci řetězce a hydrazidovými skupinami chráněnými *tert*-butylkarbonylovou skupinou (Boc) podél řetězce byl připraven z monomerů HPMA (96 mol%) a MA-Acap-NH-NH-Boc (4 mol%) pomocí řízené radikálové RAFT polymerace (*Obr. 2*) s využitím 2,2'-azobis(2,4-dimethyl-4-methoxyvaleronitril) (V-70) jako iniciátoru polymerace a TTC-N₃ jako přenosového činidla. Molární poměr monomerů : CTA : iniciátoru byl 250 : 1 : 0,5. Monomer HPMA (1 g; $6,98 \cdot 10^{-3}$ mol) byl rozpuštěn v 8,83 ml *t*-butanolu, monomer MA-Acap-NH-NH-Boc (91,2 mg; $2,91 \cdot 10^{-4}$ mol) v 0,984 ml DMA, iniciátor V-70 (4,49 mg; $1,46 \cdot 10^{-5}$ mol) v 0,2965 ml DMA a TTC-N₃ (10,1 mg; $2,91 \cdot 10^{-5}$ mol) v 0,2785 ml DMA. Roztoky byly smíchány a přeneseny do skleněné ampule. Reakční směs byla probublána argonem 10 minut a ponechána v termostatu 72 hodin při teplotě 30 °C. Polymer byl vysrážen do dvacetinásobného objemu směsi aceton-diethylether (3 : 1), profiltrován přes fritu S4 a sušen v exsikátoru do konstantní hmotnosti. Po vysušení byl polymer rozpuštěn v methanolu (15% w/v roztok polymeru) a opět vysrážen do směsi aceton-diethylether (3 : 1), profiltrován přes fritu S4 a vysušen v exsikátoru do konstantní hmotnosti.

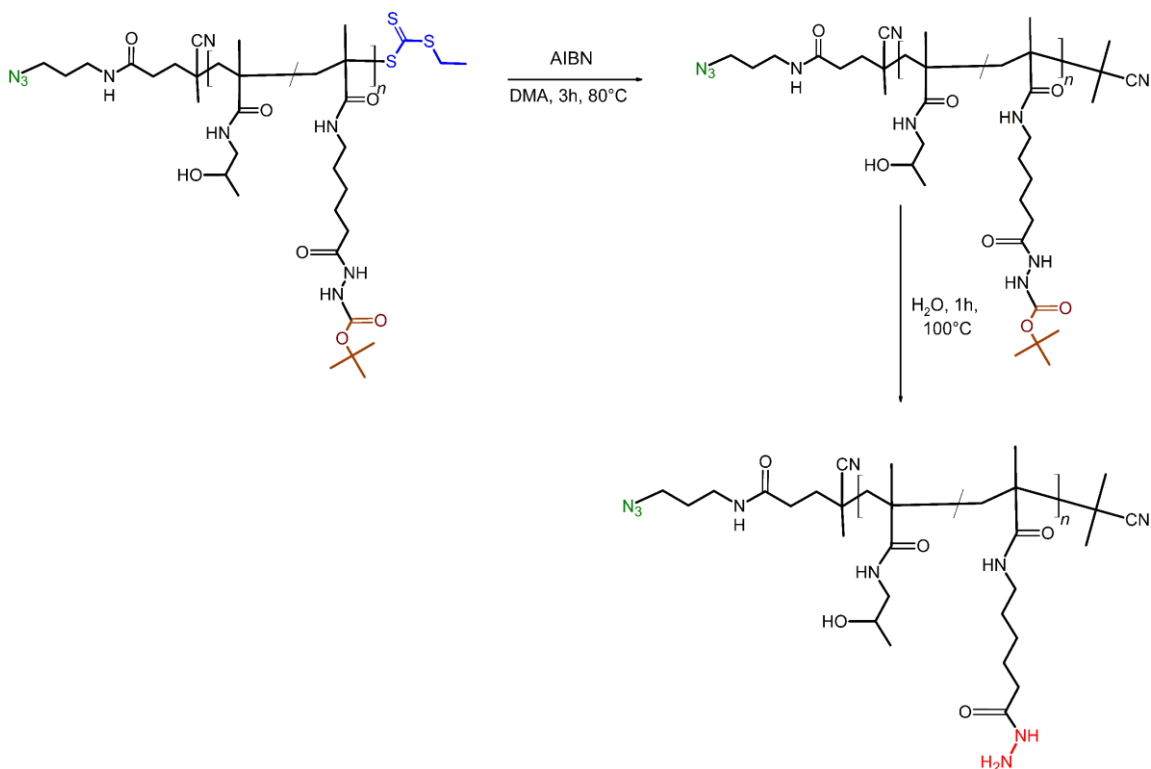


Obr. 2. Reakční schéma syntézy kopolymeru poly(HPMA-co-MA-Acap-NH-NH-Boc)-N₃ pomocí RAFT polymerace.

4 Experimentální část

Odstranění TTC skupin na konci kopolymeru se provádělo jeho reakcí s nadbytkem AIBN (*Obr. 3*). Kopolymer (472 mg; $1,82 \cdot 10^{-6}$ mol) a 20% (w/w) AIBN (94,4 mg; $5,20 \cdot 10^{-5}$ mol) byly rozpuštěny v DMA (3,147 ml, $6,89 \cdot 10^{-5}$ mol) na 15% (w/v) roztok polymeru. Roztok byl přenesen do skleněné ampule, probublán argonem 10 minut a ampule zatavena. Reakce probíhala v termostatu při teplotě 80°C během 3,5 hodin. Po proběhnutí reakce byl polymer vysrážen do dvacetinásobného objemu směsi aceton-diethylether (3 : 1), profiltrován přes fritu S4 a vysušen v exsikátoru do konstantní hmotnosti. Po vysušení byl polymer rozpuštěn v methanolu (15% w/v roztok polymeru), vysrážen do směsi aceton-diethylether (3 : 1) a vysušen v exikátoru do konstantní hmotnosti. Chránicí skupina hydrazidů (Boc) byla odstraněna rozpuštěním kopolymeru ve vodě (10% w/v roztok) při teplotě 100°C během 1 hodiny (*Obr. 3*). Kopolymer byl po reakci vyizolován pomocí lyofilizace.

Kopolymer byl po polymeraci a po odstranění Boc skupin charakterizován pomocí GPC (viz 4.5.1, str. 41). Množství volných hydrazidů bylo stanoveno spektrofotometricky pomocí TNBS při 500 nm a funkcionalita azidů pomocí fluorescenční značky DBCO-Sulfo-Cy3 při 548 nm (viz 4.5.5, str. 42).



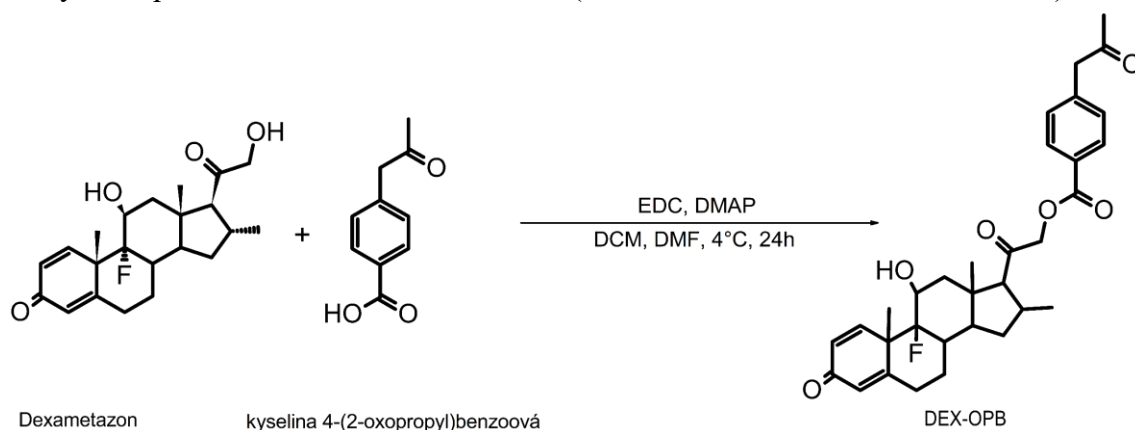
Obr. 3. Reakční schéma znázorňující odstranění TTC skupiny z konce řetězce kopolymeru a Boc skupin z hydrazidů.

4 Experimentální část

4.3 Syntéza derivátu DEX-OPB

Derivát dexamethasonu s kyselinou 4-(2-oxopropyl)benzoovou (DEX-OPB) byl připraven následovně: EDC (146,7 mg; $7,7 \cdot 10^{-4}$ mol) byl rozpuštěn v 0,5 ml DCM a přidán k OPB (99,8 mg; $5,5 \cdot 10^{-4}$ mol). K směsi byl přidán 1,5 ml DMF a směs se nechala inkubovat 30 minut v mrazáku při teplotě -18 °C. Po inkubaci byl k reakční směsi přidán DEX (200 mg; $5,1 \cdot 10^{-4}$ mol) a DMAP (62,33 mg; $5,1 \cdot 10^{-4}$ mol), předem rozpuštěný v 1,5 ml DMF. Reakční směs byla následně ponechána v lednici při teplotě 4 °C na dobu 24 hodin (*Obr. 4*). Vznik požadovaného produktu byl ověřován analýzou reakční směsi pomocí HPLC (viz 4.5.2, str. 42).

Vzniklý derivát DEX-OPB byl od nezreagovaných nízkomolekulárních látek oddělen na koloně plněné silikagelem se směsí ethylacetát (EtAc) : DCM v poměru 3 : 1 jako mobilní fáze. K nanesení na kolonu se používal 5% roztok reakční směsi. Jednotlivé frakce se sbíraly do 5 ml zkumavek. Přítomnost DEX-OPB se stanovila po nanesení kapky vzorku na destičku potaženou silikagelem a provedením chromatografie na tenké vrstvě (TLC) s mobilní fází EtAc : DCM (2 : 1). Skvrna charakteristická pro produkt se detekovala pomocí UV lampy s 254 nm světlem. Frakce obsahující produkt DEX-OPB byly slité do baňky a rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí vakuové odparky. Produkt se analyzoval pomocí HPLC, NMR a ESI-MS (viz 4.5.2, str. 41; 4.5.3., 4.5.4, str. 42)



Obr. 4. Reakční schéma znázorňující syntézu derivátu DEX-OPB.

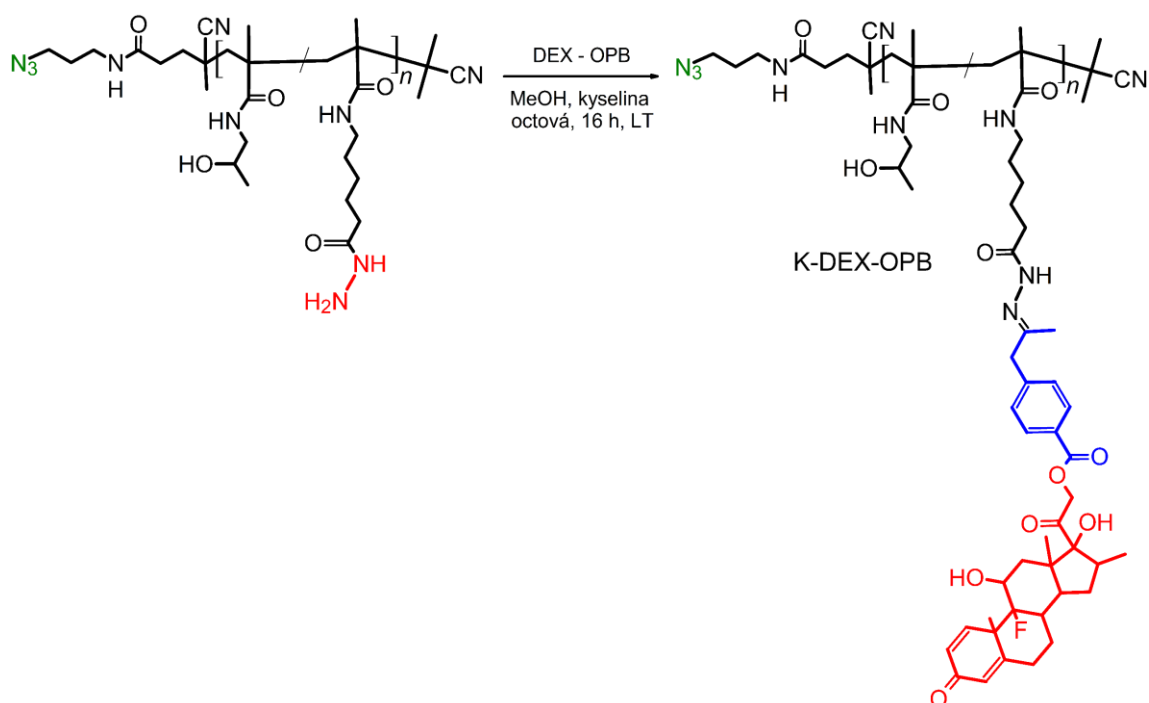
4.4 Syntéza polymerního konjugátu s léčivem DEX-OPB a protilátkou infliximab

4.4.1 Navázání derivátu DEX-OPB na polymerní prekurzor (Příprava konjugátu K-DEX-OPB)

Na přípravu polymeru s 5 hm% DEX-OPB byl roztok polymeru (101 mg; $3,9 \cdot 10^{-6}$ mol) v methanolu (5% w/v roztok) míchán s DEX-OPB (7 mg; $1,27 \cdot 10^{-5}$ mol, 7 % w/w) a kyselinou octovou (0,1 ml) 16 hodin při laboratorní teplotě (*Obr. 5*, str. 39). Průběh reakce byl sledován na HPLC (viz 4.5.2, str. 42). Polymerní konjugát DEX-OPB byl přečištěn

4 Experimentální část

pomocí gelové permeační chromatografie na koloně s náplní Sephadex LH-20 v metanolu. Vzorek byl zředěn na 2% roztok a nanesen na kolonu. Látky vycházející z kolony byly detekovány pomocí detektoru při vlnové délce 240 nm. První frakce vycházející z kolony (vzrůst absorbance) odpovídající polymernímu konjugátu DEX-OPB byla odebrána do baňky. Methanol byl odpařen na vakuové odparce do objemu přibližně 0,660 ml (15% w/v roztok) a polymerní konjugát byl vysrážen do EtAc. Sedimentace byla urychlena pomocí centrifugace (7000 rpm, 10 °C, 10 min). Supernatant byl odlit, sediment přemyt dietylehemem a vysušen ve vakuovém exikátoru do konstantní hmotnosti. Množství navázaného DEX-OPB na polymerní konjugát se stanovilo pomocí HPLC (viz 4.5.2, str. 42).



Obr. 5. Reakční schéma konjugace polymerního prekurzoru s derivátem DEX-OPB za vzniku konjugátu K-DEX-OPB.

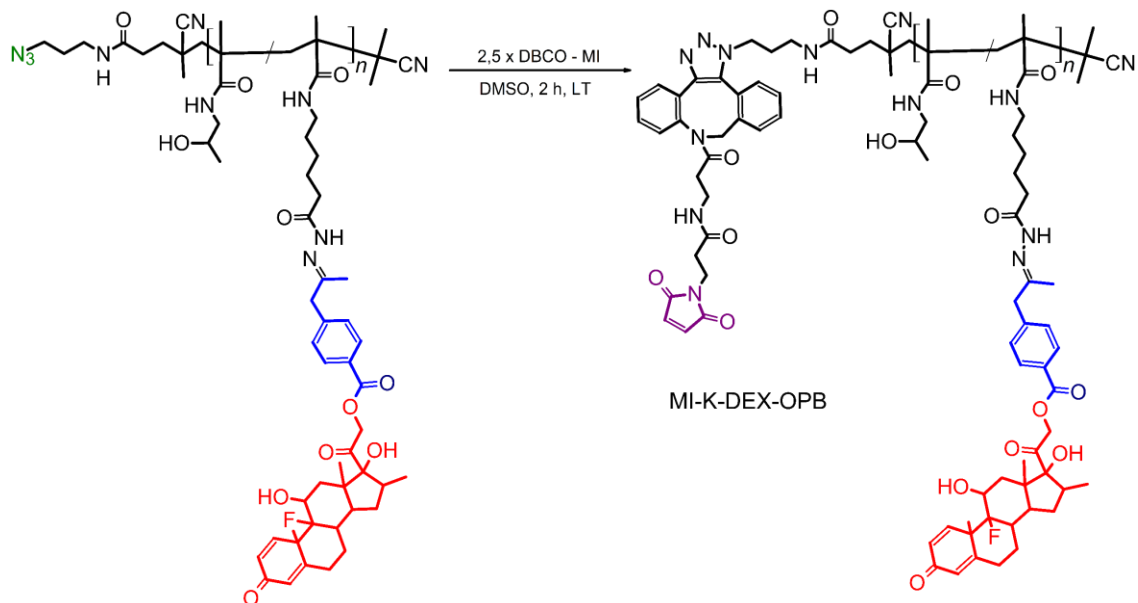
4.4.2 Navázání spojky DBCO-MI na konjugát K-DEX-OPB (Příprava konjugátu MI-K-DEX-OPB)

Pro navázání spojky DBCO-MI na konec polymeru přes reakci azid-DBCO se konjugát K-DEX-OPB (80 mg; $2,53 \cdot 10^{-6}$ mol) nechal inkubovat s 2,5-x molárním nadbytkem DBCO-MI (2,9 mg; $6,78 \cdot 10^{-6}$ mol) v DMSO (15% w/v roztok) při laboratorní teplotě na třepačce 2 hodiny (Obr. 6, str. 40).

Po reakci byl konjugát modifikovaný s DBCO-MI spojkou přečištěný od nenavázané spojky na koloně naplněné s LH-20 v methanolu s detekcí při 240 nm.

4 Experimentální část

Methanol z frakce modifikovaného polymerního konjugátu DEX-OPB byl odpařen na vakuové odparce do objemu přibližně 0,55 ml (15% w/v roztok) a konjugát byl precipitován do EtAc. Po centrifugaci (7000 rpm, 10 °C, 10 min) byl supernatant odlit a sraženina se ještě promyla diethyletherem mírným protřepáním. Usazená sraženina po centrifugaci (7000 rpm, 10 °C, 10 min) byla sušena ve vakuovém exsikátoru do konstantní hmotnosti a vzniklý konjugát MI-K-DEX-OPB se analyzoval pomocí GPC (viz 4.5.1, str. 41).



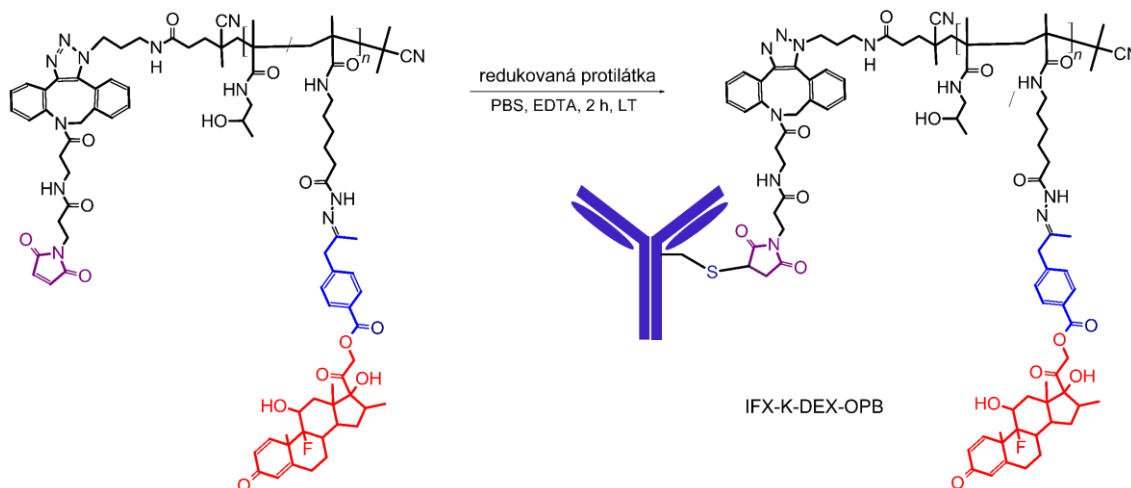
Obr. 6. Reakční schéma znázorňující přípravu MI-K-DEX-OPB reakcí K-DEX-OPB s DBCO-MI.

4.4.3 Navázání polymerního MI-K-DEX-OPB na protilátku infliximab (Příprava konjugátu IFX-K-DEX-OPB)

Vazba protilátky infliximab (IFX) s polymerním konjugátem K-DEX-OPB byla provedena po redukcí protilátky IFX. Koncentrát IFX pro infuzní roztok s koncentrací 10 mg·ml⁻¹ (1 ml) probubláný argonem po dobu 10 minut byl inkubován 1 hodinu při laboratorní teplotě za mírného míchání na třepačce s 1 ml roztoku DTT připraveného rozpuštěním 15,5 mg v 1 ml 100 mM fosfátového pufru (1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,5). Dithiothreitol byl následně odstraněn pomocí gelové filtrace na koloně PD-10 s argonem probubláným fosfátovým pufrům. Koncentrace protilátky v roztoku po odstranění DTT na PD-10 byla stanovena spektrofotometricky z absorbance při 280 nm (viz 4.5.5, str. 42) a množství volných tiolových skupin spektrofotometricky pomocí Ellmanova činidla při 412 nm (viz 4.5.5, str. 42). K roztoku redukované protilátky byl postupně přidán roztok polymerního konjugátu MI-K-DEX-OPB se zavedenou maleimidovou skupinou (16 mg v 1 ml fosfátového pufru) za stálého probublávání

4 Experimentální část

roztoku argonem (*Obr.* 7). Molární poměr protilátky k polymernímu konjugátu byl 1 : 9. Reakce byla prováděná 1 hodinu při laboratorní teplotě za mírného míchaní na třepače. Před přečištěním vzorku byl do reakční směsi přidán ethylmaleimid. Následně byl vzniklý konjugát IFX-K-DEX-OPB přečištěný pomocí gelové filtrace na PD-10 ve vodě. Výsledný konjugát byl vyizolován pomocí lyofilizace a charakterizován pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superose6 (viz. 4.5.1, str. 41).



Obr. 7. Reakční schéma konjugace MI-K-DEX-OPB s monoklonální terapeutickou protilátkou infliximab za vzniku IFX-K-DEX-OPB.

4.5 Analytické metody použité pro charakterizaci připravených látek

4.5.1 Gelová permeační chromatografie (GPC)

Pomocí GPC analýzy se zjistila početně průměrná molární hmotnost (M_n), hmotnostně (M_w) průměrná molární hmotnost a disperzita polymerů a konjugátů (poměr M_w/M_n). Pro analýzy se využíval HPLC systém Shimadzu s UV-vis detektorem (Shimadzu), detektorem rozptylu světla (DAWN HELEOS II; Wyatt Technology Co.) a diferenciálním refraktometrem (Optilab[®]-rEX; Wyatt Technology Co.).

Pro analýzu polymerních prekurzorů a konjugátů bez protilátky se použila kolona TSKgel 3000SWXL (7,8 mm I.D.x. × 30 cm, 5 μ m; Tosoh Bioscience) promývaná směsí methanolu a acetátového pufru (0,3 M; pH 6,5) v poměru 80:20 s průtokem 0,5 ml·min⁻¹. Konjugát IFX-K-DEX-OPB se analyzoval na koloně Superose6 s mobilní fází obsahující 50 mM fosfátového pufru a 50 mM NaCl (pH 7,4) s průtokem 0,5 ml·min⁻¹. Koncentrace analyzovaných vzorků byla 3 mg·ml⁻¹ a na kolonu se nastříkvalo 100 μ l. Naměřená data se vyhodnocovali pomocí programu ASTRA VII (Wyatt Technology Co.) s inkrementem indexu lomu $dn/dc = 0,167 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$, který byl stanovený pro HPMA homopolymer.

4 Experimentální část

4.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*) se využila na sledování průběhu reakce během syntézy DEX-OPB, ověření čistoty derivátu DEX, stanovení množství navázaného DEX-OPB na polymeru a při analýze uvolňování léčiva z polymerního nosiče v různých pH. Analýzy se prováděly na HPLC systému Shimadzu s UV-vis detektorem (Shimadzu) buď na koloně s reverzní fází Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm; 5 μ m; Merck) s průtokem 1 ml·min⁻¹ (17 min metoda) nebo na koloně s reverzní fází Chromolith Performance RP-18e (150 mm x 4,6 mm; 5 μ m) s průtokem 2,5 ml·min⁻¹ (12 min metoda). V průběhu dělení byl použit gradient mobilní fáze s eluenty A (95% voda, 5% acetonitril (ACN), 0,1% TFA) a B (95% ACN, 5% voda, 0,1% TFA) od 0% do 100% eluentu B. Vzorek se na kolonu nastříkoval v objemu 20 μ l.

4.5.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Derivát dexamethasonu DEX-OPB se analyzoval na hmotnostním spektrometru Thermo scientific LCQ Fleet s ionizací elektrosprejem (ESI-MS) v pozitivním módu v methanolu.

4.5.4 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

¹H NMR spektrum DEX-OPB se měřilo na přístroji Bruker s frekvencí 400 MHz v deuterovaném DMSO.

4.5.5 Absorpční spektrofotometrie

Všechna spektrofotometrická měření byla provedena na přístroji Specord 205 ve skleněných kyvetách.

Funkcionalita azidů na konci semitelechalického kopolymeru po polymeraci byla stanovena spektrofotometricky z absorpce fluorescenční značky modifikované DBCO skupinou po reakci s polymerem. Roztok polymeru (6 mg v 0,1 ml methanolu) byl smíchan s roztokem fluorescenční značky DBCO-Sulfo-Cy3 (0,6 mg v 0,04 ml methanolu) a inkubován 30 minut při laboratorní teplotě. Po reakci se k roztoku přidal 0,5 ml methanolu a 0,5 ml PBS. Takto naředěná reakční směs byla nanesená na kolonu s náplní LH-20 a fluorescenčně značený polymer byl eluován s methanolem. První frakce vycházející z kolony byla odebrána do baňky, zahuštěná na vakuové odparce a opětovně nanesená na kolonu s LH-20 v methanolu. Značený polymer byl odebrán po odpaření methanolu na vakuové odparce rozpuštěn ve vodě (3 ml), zmrazen a lyofilizován. Nepřítomnost volné fluorescenční značky ve vzorku byla ověřena pomocí GPC s detekcí při 548 nm, kde absorbuje DBCO-Sulfo-Cy3. Následně se připravil roztok polymeru s koncentrací 0,5 mg·ml⁻¹ ve vodě a jeho absorpční spektrum se změřilo v kyvetě

4 Experimentální část

s délkou optické dráhy 1 mm v rozsahu vlnových délek 400-600 nm. Hodnota absorbance v maxime (548 nm) se použila na výpočet funkcionality azidů na konci kopolymeru podle rovnice (1).

$$\text{funkcionalita} = \frac{M_n \cdot A \cdot V}{m \cdot \varepsilon \cdot l} \quad (1)$$

kde M_n je hodnota početně průměrní molární hmotnosti polymeru stanovená pomocí GPC [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$], A je absorbance při 548 nm, V je objem [l], m je hmotnost [g], ε je molární absorpční koeficient [$\varepsilon = 162\,000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] a l je délka optické dráhy kyvety [0,1 cm].

Obsah hydrazidových funkčních skupin podél polymerního řetězce byl stanoven spektrofotometricky po reakci s TNBS, při které dochází k vzniku produktu, který absorbuje při 500 nm. Tři navážky polymeru byly rozpuštěny v borátovém pufru na koncentraci $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Pro reakci se použil roztok TNBS s koncentrací $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do kyvety bylo přidáno 875 μl destilované vody, 25 μl roztoku TNBS a 100 μl roztoku polymeru. Jako reference se použila směs 25 μl roztoku TNBS a 975 μl destilované vody. Po 1 hodinové inkubaci se změřila absorbance roztoků při 500 nm v kyvetách s délkou optické dráhy 1 cm a průměrná hodnota z třech měření se použila na výpočet obsahu hydrazidových skupin na polymeru podle rovnice (2).

$$\text{molární \%} = \frac{100}{1 + \frac{\frac{\varepsilon \cdot l \cdot c}{A} - M_2}{M_1}} \quad (2)$$

kde ε je molární absorpční koeficient ($\varepsilon = 17\,200 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l je optická dráha paprsku (1 cm), c je koncentrace polymeru v roztoku v kyvetě ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), A je absorbance při 500 nm, M_1 je molární hmotnost HPMA ($M_1 = 143,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) a M_2 je molární hmotnost komonomeru obsahujícího hydrazidové skupiny (Ma-Acap-NH-NH₂, $M_2 = 212,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Volné sulfhydrylové skupiny po redukci protilátky IFX s DTT se stanovili spektrofotometricky využitím Ellmanova činidla (DTNB), které reaguje s thiolovými skupinami za vzniku thionitrobenzoátu, který absorbuje při 412 nm. Do kyvety ($l = 1 \text{ cm}$) byl přidán 750 μl fosfátového pufru, 50 μl Ellmanova činidla ($4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v pufru) a 200 μl roztoku redukované protilátky po přečištění na PD-10 od DTT. Jako reference byla použita kyveta obsahující 950 μl fosfátového pufru a 50 μl Ellmanova činidla. Absorbance při 412 nm byla použita pro výpočet obsahu volných tiolových skupin podle rovnice (3) (str. 44). Koncentrace protilátky v roztoku po redukci s DTT potřebná pro

4 Experimentální část

výpočet tiolových skupin se stanovila z absorbance při 280 nm. Do kyvety byl přidán 800 μl fosfátového pufru a 180 μl roztoku protilátky po přečistění na PD-10 od DTT. V referenční kyvetě byl fosfátový pufr.

$$\text{počet SH skupin} = \frac{\frac{A_1 \cdot n_1}{\varepsilon_1}}{\frac{A_2 \cdot n_2}{\varepsilon_2}} \quad (3)$$

kde je ε_1 [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$] je molární absorpční koeficient thiolové skupiny ($\varepsilon_1 = 14\,150\ \text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), ε_2 [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$] je molární absorpční koeficient protilátky ($\varepsilon_2 = 210\,000\ \text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), A_1 je absorbance při 412 nm změřena při stanovení koncentrace thiolů pomocí DTNB, A_2 je absorbance při 280 nm změřena při stanovení koncentrace protilátky a n_1 a n_2 jsou korekční faktory ředění při stanovení thiolů ($n_1 = 5$) a protilátky ($n_2 = 5,4$).

4.5.6 Analýza uvolňování DEX-OPB z polymerního nosiče

Celkové množství navázaného DEX-OPB na HPMA polymeru bylo stanoveno pomocí HPLC s detekcí při 240 nm. Konjugát K-DEX-OPB (1,5 mg) byl rozpuštěný v 0,3 ml mobilní fáze A (95% voda, 5% ACN, 0,1% TFA) a inkubovaný v termostatu při 37°C. Po 2 hodinách se přidalo 0,3 ml methanolu, promíchalo a 20 μl nastříklo na kolónu Chromolith Performance RP-18e (viz. 4.5.2, str. 41). Množství navázaného DEX-OPB se stanovilo z integrované plochy píku při 240 nm, který odpovídá volnému nenavázanému DEX-OPB a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou z různých koncentrací DEX-OPB.

Obsah navázaného DEX-OPB byl určen z průměrní hodnoty třech nezávislých stanovení. Stanovení množství uvolněného DEX-OPB v 10 mM fosfátových pufrách s různým pH (7,4; 6,5; 5,0) v různých časech se stanovil analogicky pomocí HPLC. Byly připravené zásobní roztoky konjugátu s koncentrací $1,5\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, po rozpuštění ihned rozpipetovány do malých mikrozkušavek po 0,2 ml a inkubované v termostatu při 37°C. V čase 30 minut, 1, 2, 6, 8 a 24 hodin se k 0,2 ml roztoku konjugátu přidal 0,8 ml DCM, do kterého se vyextrahoval uvolněný DEX-OPB. Vodná a DCM fáze se oddělily pomocí centrifugace (12 000 rpm, 10 minut) a ze spodní (DCM) fáze se odebralo 0,6 ml. DCM se odpařil, přidalo se 0,1 ml methanolu, pořádně promíchalo a zanalyzovalo na HPLC (viz. 4.5.2, str. 42).

Efektivita vytřepávání se stanovila z třech navážek DEX-OPB (1 mg) rozpuštěných ve 300 μl fosfátového pufru (10 mM, pH 7,4). K roztokům se přidal 1 ml DCM a po třepání a centrifugaci (12 000 rpm, 10 minut) se odebralo 200 μl DCM s vyextrahovaným DEX-OPB. Po odpaření DCM se DEX-OPB rozpustil v methanolu na koncentraci $0,2\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a vzorky se analyzovaly pomocí HPLC (viz 4.5.2, str. 41). Porovnáním integrovaných ploch píků při 240 nm těchto tří vzorků s integrovanými

4 Experimentální část

plochami píků při 240 nm získaných po analýze roztoků DEX-OPB o stejné koncentraci se stanovil koeficient efektivity vytřepávání, který koriguje chybu, která se při stanovení koncentrace DEX-OPB objevuje během vytřepávání a extrakce do DCM.

Po stanovení uvolněného množství DEX-OPB z konjugátu z třech různých stanoveních se dopočítalo procentuální uvolnění léčiva z polymerů v jednotlivých časech v daném pH a výsledky byly korigovány koeficientem, který se získal po stanovení efektivity vytřepávání.

4.5.7 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – SDS-PAGE*) byla provedena na přístroji PhastSystem, který umožňuje plnou automatizaci aplikování vzorku na gel, elektroforetickou separaci a barvení gelu. Pro analýzu protilátky a IFX-K-DEX-OPB se použil polyakrylamidový Phast gel s gradientem 4-15 %, na který se aplikovali vzorky s koncentrací 1 mg·ml⁻¹ (infliximab) a 4 mg·ml⁻¹ (IFX-K-DEX-OPB) ve fosfátovém pufru (10 mM, pH 7,4) v přítomnosti SDS (2,5%) a nebo i s 2-merkaptoethanolem (1%) po 5 min inkubaci při 95 °C. Před nanesením vzorků na gel se ke vzorkům přidala bromfenolová modř (0,01%). Separace v gelu probíhala s použitím komerčně připraveného systému pufrů jako elektrolytu (PhastGel SDS buffer strips: 0,2 M tricin, 0,2 M Tris, 0,55% SDS, pH 8,1) při teplotě 15°C. Program pro separaci sestával ze tří kroků s následujícími podmínky: 1 (pre-inkubace): 250 V, 10 mA, 3W, 1 Vh; 2 (aplikace vzorků): 250 V, 1 mA, 3 W, 1 Vh; 3 (separace): 250 V, 10 mA, 3 W, 63 Vh. Po separaci (30 min) se protilátka v gelu obarvila barvivem Coomasie Blue následovně: gel se nejdříve namáčel 30 minut v barvicím roztoku (40 ml základní roztok PhastGel Blue R, 8 ml kyselina octová, 32 ml voda), následně se asi 1 hodinu promýval v odbarvovacím roztoku (60 ml voda, 30 ml methanolu, 10 ml kyselina octová) a nakonec se stabilizoval v stabilizačním roztoku (80 ml voda, 10 ml kyselina octová, 10 ml glycerol). Základní roztok PhastGel Blue R se připravil rozpuštěním tablety s barvivem PhastGel Blue R v 80 ml vody a po 10 min míchání se přidal ještě 120 ml methanolu. Obarvený gel se vyfotil pomocí dokumentačního systému Syngene PXi (Syngene UK).

4.5.8 ELISA

Specificita a funkčnost protilátky v konjugátu byla ověřena pomocí metody ELISA (z angl. *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*). Tato metoda je založená na interakci specifické protilátky s antigenem, v tomto případě TNF- α . Po navázání specifické protilátky s antigenem se přidá nespecifická sekundární protilátka konjugovaná

4 Experimentální část

s enzymem křenovou peroxidasou vázající se na antigen a dohromady tvoří tzv. sendvičový komplex. Následně se přidá chromogen, který se přemění enzymem na barevný produkt, jehož koncentraci můžeme stanovit spektrofotometricky a bude přímo úměrná množství antigenu.

Pro ověření zachování specificity protilátky v konjugátu byla do jamky na 96 jamkovou desku (Nunc Polysorp C8) nakoutována specifická protilátka infliximab a pro porovnání do jiných jamek byl navázán konjugát IFX-K-DEX-OPB v takové koncentraci, aby finální koncentrace protilátky v jamce byla stejná. Na takto nakoutovanou desku s protilátkou i konjugátem IFX-K-DEX-OPB v různých koncentracích, byl přidán TNF- α a následně metodou ELISA (TNF alpha Human ELISA Kit, Invitrogen) ověřena interakce protilátka-antigen. Výsledek se zpracoval ze dvou měření.

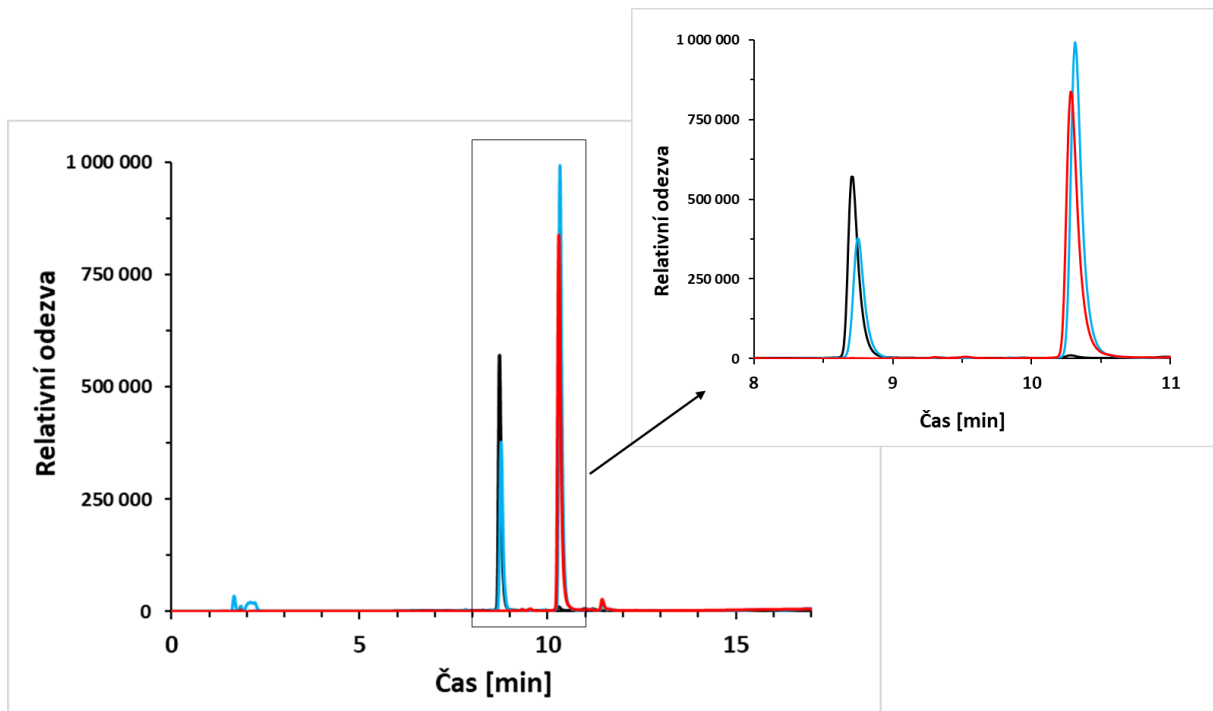
5 Výsledky

5.1 Syntéza a charakterizace polymerních prekurzorů a konjugátů

5.1.1 Syntéza derivátu DEX-OPB

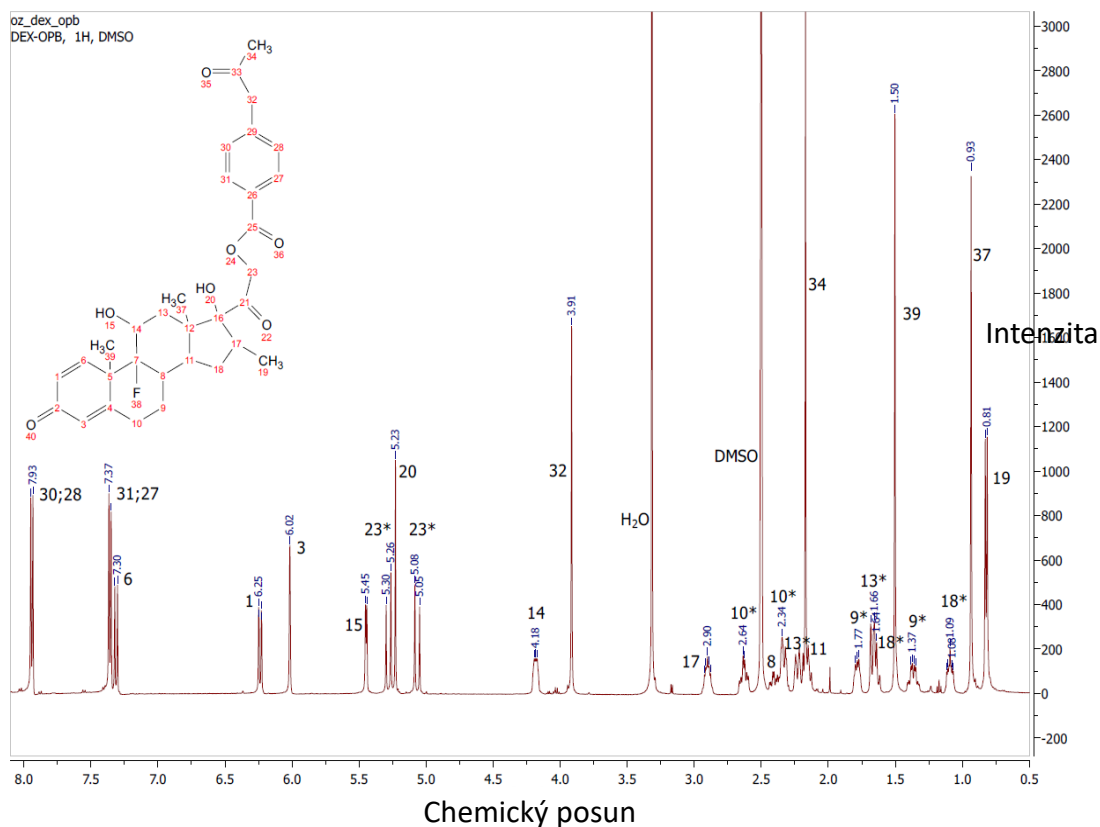
S cílem zavést do molekuly DEX reaktivní keto skupinu pro vazbu na polymerní nosič byl DEX modifikován pomocí oxo-kyseliny OPB. Průběh syntézy derivátu DEX-OPB byl průběžně sledován analýzou reakční směsi pomocí HPLC (*Obr. 8*, str. 48). Reakční směs obsahovala i po 16 hodinách dva významné píky, první pík se nacházel na místě volného DEX (r.č. 8,7 min), druhý odpovídající DEX-OPB byl pozorován při r.č. 10,4 min. Po 16 hodinách se již složení reakční směsi neměnilo, a směs obsahovala 27,3 % DEX a 72,7 % derivátu. Derivát byl od volného DEX vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie a produkt byl charakterizován pomocí HPLC, MS, NMR. Výtěžek syntézy derivátu DEX-OPB byl 239,8 g (80 %). Analýza produktu na hmotnostním spektrometru s ionizací elektrosprejem potvrdila očekávanou molekulovou hmotnost DEX-OPB (vypočtená: 552,25; nalezená 553,08 DEX-OPB+H⁺, 575,17 DEX-OPB+Na⁺, 1127,5 DEX-OPB+DEX-OPB+Na⁺, 1679,17 DEX-OPB+DEX-OPB+DEX-OPB+Na⁺). Pomocí ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) byly zjištěny následující píky: δ 7,93 (d, C-28, C-30), δ 7,37 (d, C-27, C-31), δ 7,3 (d, C-6), δ 6,25 (d, C-1), δ 6,02 (s, C-3), δ 5,45 (d, C-15), δ 5,3 - 5,26 (d, C-23), δ 5,23 (s, C-20), δ 5,08 - 5,05 (d, C-23), δ 4,18 (m, C-14), δ 3,91 (s, C-32), δ 2,9 (m, C-17), δ 2,64 (m, C-10), δ 2,40 (m, C-8), δ 2,34 (m, C-10), δ 2,20 (m, C-13), δ 2,17 (s, C-34), δ 2,0 (m, C-11), δ 1,77 (m, C-9), δ 1,66 (m, C-13), δ 1,64 (m, C-18), δ 1,5 (s, C-39), δ 1,37 (m, C-9), δ 1,09 (m, C-18), δ 0,93 (s, C-37), δ 0,81 (d, C-19) (*Obr. 9*, str. 49).

5 Výsledky



Obr. 8. HPLC záznam DEX (černá křivka), reakční směsi (modrá křivka) a DEX-OPB (červená křivka) při 240 nm po nastříknutí na kolonu Chromolith s reverzní fází Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm; 5 μm ; Merck) s průtokem $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (17 min metoda).

5 Výsledky



Obr. 9. Výsledek analýzy DEX-OPB pomocí ^1H NMR v deuterovaném DMSO. Čísla při jednotlivých signálech v NMR spektru příslouchají atomům označených čísly v chemické struktuře derivátu DEX-OPB.

5.1.2 Polymerní prekurzor

Polymerní prekurzor poly(HPMA-*co*-MA-Acap-NH-NH-Boc)-N₃ byl syntetizován z monomerů HPMA a MA-Acap-NH-NH-Boc pomocí RAFT polymerace s použitím iniciátoru V-70 a CTA TTC-N₃. Výtěžek Pol-1 (TTC,Boc) po polymeraci byl 52,6%. U polymeru byla stanovena M_w a disperzita. V následujícím kroku byly odstraněny TTC koncové skupiny polymerního prekurzoru pomocí inkubace s AIBN při teplotě 80°C. Odstranění koncových TTC skupin bylo prokázáno vymizením absorpčního pásu při vlnové délce 310 nm odpovídající absorpci TTC skupin. Po odstranění TTC skupin byla stanovena M_w a disperzita polymeru Pol-1 (Boc). V posledním kroku byly ochráněny hydrazidové skupiny, a to při inkubaci polymeru po dobu 1 h ve vodě při teplotě 100°C. Pol-1 byl charakterizován pomocí GPC a množství hydrazidových skupin se stanovilo pomocí absorpční spektrofotometrie (viz 4.5.5, str. 42). Zjistilo se, že ze 4 mol% komonomeru Ma-Acap-NH-NH-Boc, který byl v násadě polymerizační násady, bylo nakonec ve výsledném polymerním prekurzoru zabudováno 2,9 mol% volných hydrazidů. Funkcionalita koncových azidů stanovená spektrofotometricky byla 0,81. Charakterizace všech polymerních prekurzorů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3, str. 51).

5 Výsledky

5.1.3 Polymerní konjugáty

Polymerní konjugát nesoucí léčivo DEX-OPB navázané přes pH-senzitivní spojku (K-DEX-OPB) byl připraven reakcí polymerního prekurzoru poly(HPMA-*co*-MA-Acap-NH-NH₂) (Pol 1) s derivátem DEX-OPB. Průběh reakce byl sledován pomocí HPLC. Nenavázané léčivo bylo odstraněno pomocí sloupcové chromatografie a finální konjugát K-DEX-OPB byl charakterizován pomocí GPC. Konjugát K-DEX-OPB obsahoval 5,26 hm% léčiva DEX-OPB, výtěžek reakce byl 82,1 %. Molekulová hmotnost ani disperzita polymeru se po navázání derivátu DEX výrazně nezměnila.

V dalším kroku byl K-DEX-OPB modifikován na koncové azidové skupině pomocí spojky DBCO-MI s využitím cykloadiční reakce. Reakce DBCO skupiny s azidem se detekovala na HPLC při 310 nm, kde se pozoroval pokles intenzity signálu patřícímu DBCO-MI. Vzniklý konjugát MI-K-DEX-OPB se analyzoval pomocí GPC a stanovily se jeho molekulové hmotnosti (M_n , M_w) a disperzita (Tab. 3, str. 51).

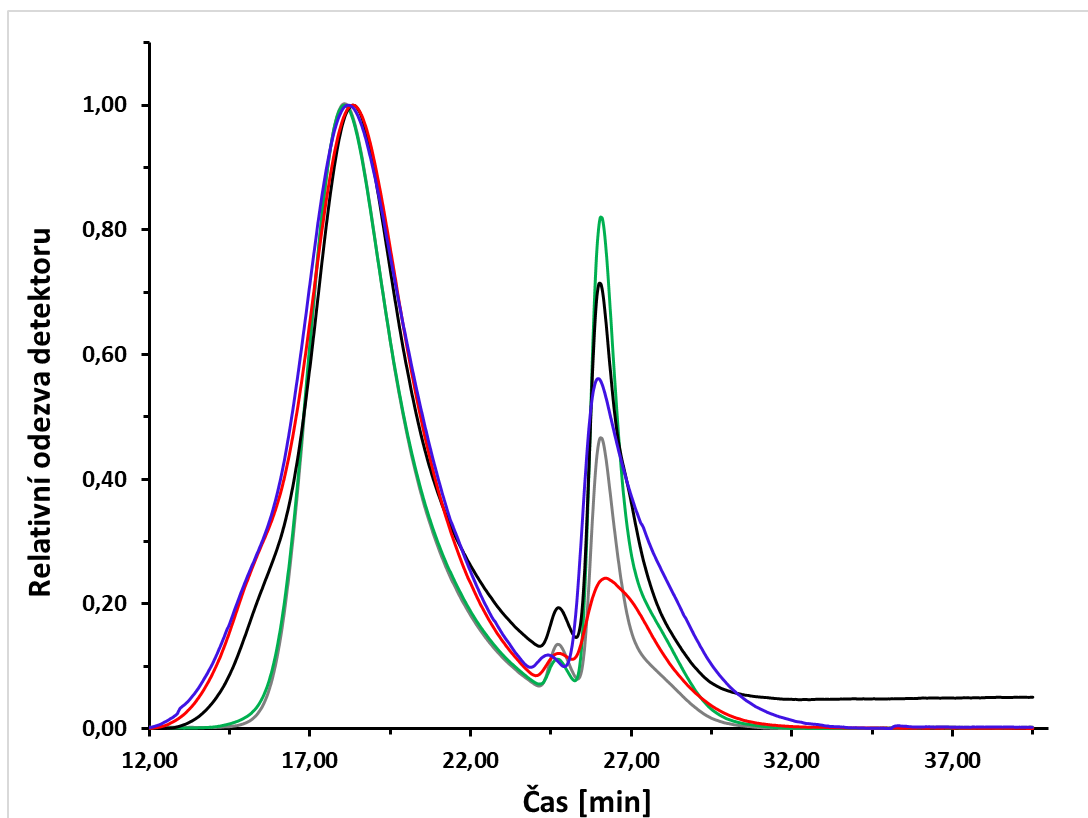
Výsledný konjugát IFX-K-DEX-OPB, kde na protilátce infliximab jsou vázané polymerní řetězce nesoucí léčivo DEX-OPB, se připravil reakcí MI skupiny na konci polymerního řetězce konjugátu MI-K-DEX-OPB s thiolovými skupinami na protilátce infliximab po její redukci s DTT. Molekulová hmotnost konjugátu IFX-K-DEX-OPB se stanovila pomocí GPC (viz. 4.5.1, str. 41) a porovnáním s molekulovou hmotností samotné protilátky se zjistilo, že 46,3 hm% konjugátu IFX-K-DEX-OPB představuje infliximab a na jednu molekulu protilátky se podařilo navázat 5-6 polymerů nesoucích DEX-OPB. GPC záznamy jsou zobrazené na Obr. 10 (str. 52) a Obr. 11 (str. 53). Výslední konjugát IFX-K-DEX-OPB obsahoval 3,9 hm% DEX-OPB.

5 Výsledky

Tab. 3. Charakteristiky polymerního prekurzoru a polymerních konjugátů.

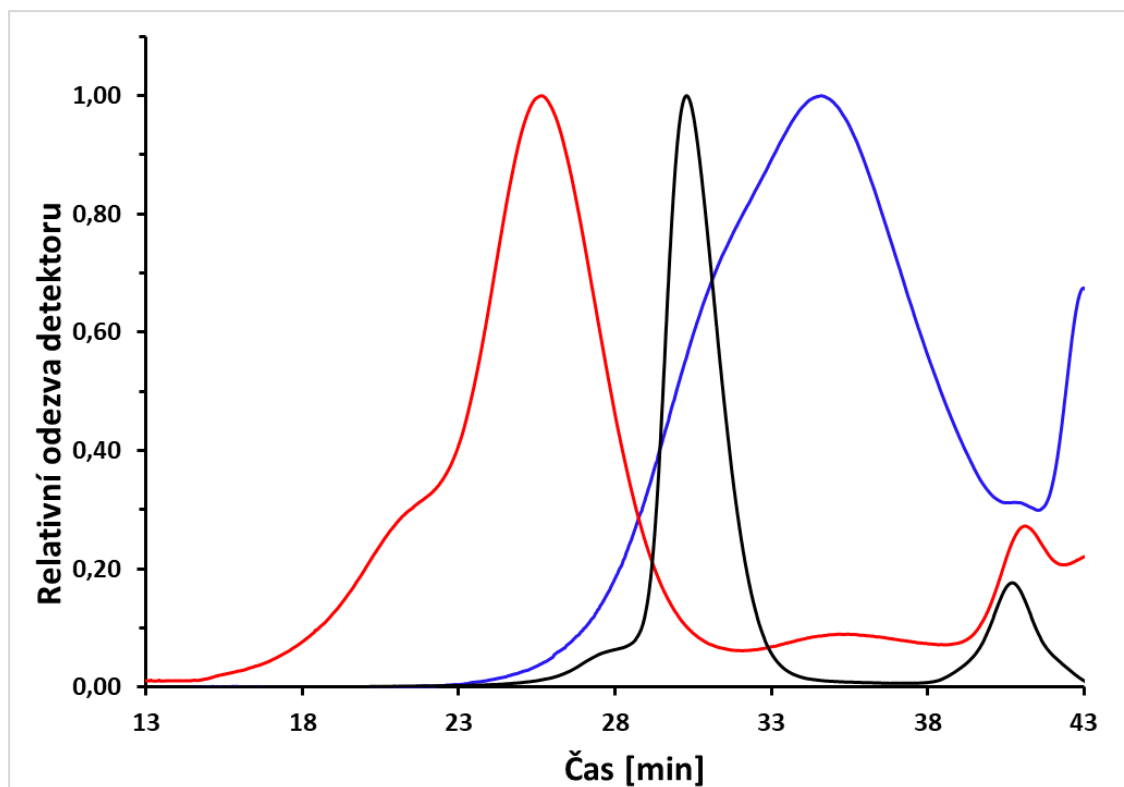
	M_n [g·mol ⁻¹]	Disperzita Đ	Výtěžek [hm%]	Charakterizace		
				Funkcionalita azidů	Obsah hydrazidových skupin [mol%]	Obsah navázanéh o léčiva [hm%]
Pol-1 (TTC,Boc)	26 000	1,08	52,6	-	-	-
Pol-1 (Boc)	26 200	1,07	94,9	0,81	-	-
Pol-1	28 000	1,19	-	-	2,9	-
K-DEX- OPB	31 600	1,18	82,1	-	-	5,26
MI-K-DEX- OPB	36 800	1,19	94,6	-	-	-
IFX-K- DEX-OPB	366 800	-	95,0	-	-	3,9

5 Výsledky



Obr. 10. GPC chromatogramy polymerního prekurzoru bezprostředně po RAFT polymeraci (šedá křivka), polymerního prekurzoru po odstranění TTC (zelená křivka), polymerního prekurzoru s odstraněnými Boc chránicími skupinami (černá křivka), K-DEX-OPB (červená křivka) a MI-K-DEX-OPB (modrá křivka). Záznamy jsou relativní odezvy refraktometrického detektoru. Kolona: TSKgel 3000SWXL, mobilní fáze: směs methanolu a acetátového pufru (0,3 M; pH 6,5) v poměru 80 : 20 s průtokem $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

5 Výsledky

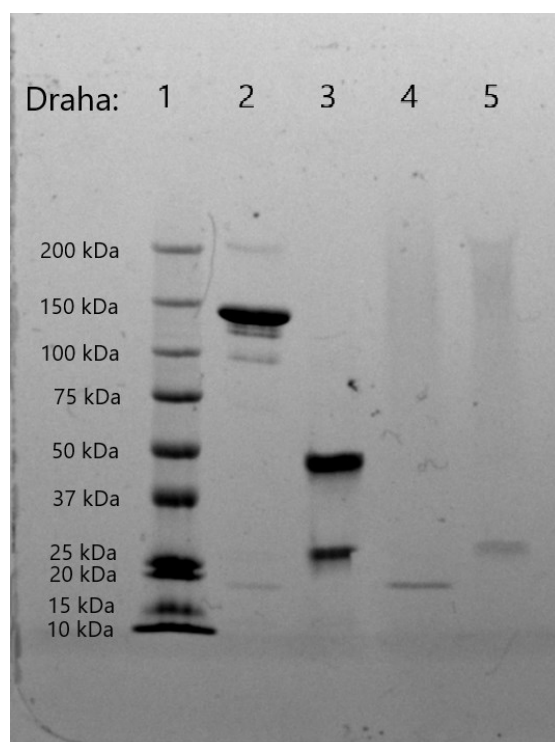


Obr. 11. GPC chromatogramy MI-K-DEX-OPB (modrá křivka), IFX-K-DEX-OPB (červená křivka) a protilátky infliximab (černá křivka). Záznamy jsou relativní odezvy refraktometrického detektoru. V čase po 40. minutě vychází z kolony pufrový pík. Kolona: Superose6, mobilní fáze: 50 mM fosfátového pufru a 50 mM NaCl (pH 7,4) s průtokem $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

5 Výsledky

5.2 Elektroforéza protilátky infliximab a konjugátu IFX-K-DEX-OPB

Elektroforetická charakterizace konjugátu IFX-K-DEX-OPB a samotné monoklonální protilátky byla provedena pomocí SDS-PAGE elektroforézy při redukujících i neredukujících podmínkách. Na obrázku 12 je vidět, že v neredukujících podmínkách má protilátka infliximab velikost přibližně 150 kDa (2. dráha), zatímco v redukujících podmínkách je možné pozorovat dva výrazné proužky o velikosti 50 kDa a 25 kDa, které odpovídají těžkému a lehkému řetězci protilátky (3. dráha). V případě analýzy konjugátu IFX-K-DEX-OPB za neredukujících podmínek již proužek odpovídající 150 kDa pozorován nebyl (4. dráha). Je možné konstatovat, že ve vzorku se nenachází nemodifikovaná volná protilátka. Redukční podmínky ve vzorku s konjugátem IFX-K-DEX-OPB (5. dráha) vedly v porovnání s třetí dráhou k úplnému vymizení proužku pro těžký řetězec IFX. V případě analýzy konjugátu se pozorovalo značné rozmytí pásů na polyakrylamidovém gelu.

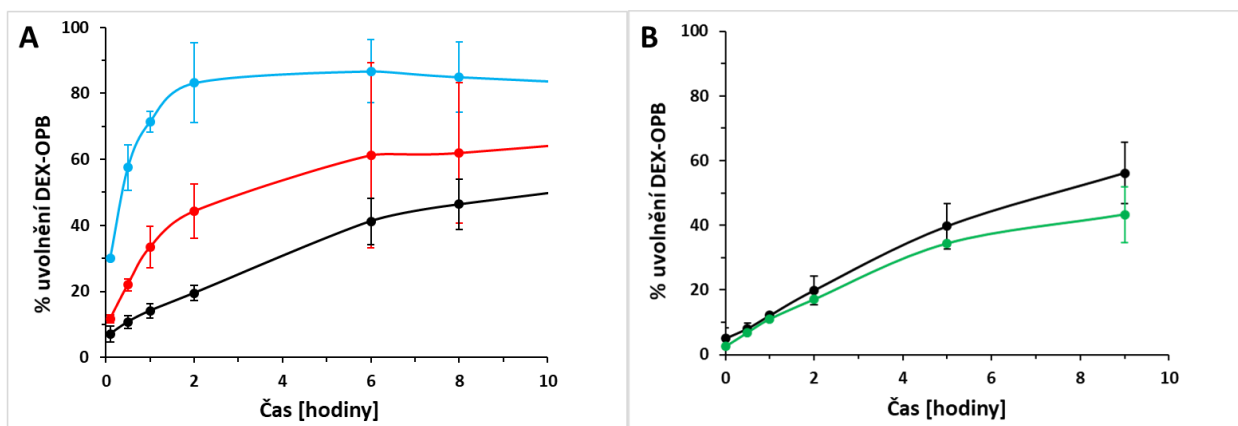


Obr. 12. SDS-PAGE elektroforetická analýza infliximabu a IFX-K-DEX-OPB v neredukujících a redukujících podmínkách. Dráha 1: standard proteinů o známé molekulové hmotnosti, dráha 2: IFX, dráha 3: IFX s 2-merkaptethanolem, dráha 4: IFX-K-DEX-OPB, dráha 5: IFX-K-DEX-OPB s 2-merkaptethanolem.

5 Výsledky

5.3 Uvolnění DEX-OPB z polymerního nosiče

Podíl uvolněného léčiva DEX-OPB z K-DEX-OPB a z IFX-K-DEX-OPB v závislosti od času se studoval v pufrch s různými hodnotami pH (7,4; 6,5 a 5,0). Průběh uvolňování byl sledován pomocí HPLC s detekcí při 240 nm a následně vyjádřen jako procento uvolněného léčiva. V průběhu analýzy se sledovali dva píky s retenčními časy 6 minut a 6,2 minut. Pro vyhodnocení množství uvolněného DEX-OPB se bral v potaz pouze druhý pik (r.č. 6,2 min), který odpovídá DEX-OPB. Obrázek 13A znázorňuje procentuální podíl uvolněného DEX-OPB z polymerního konjugátu K-DEX-OPB. Je vidět, že s klesajícím pH se zvyšuje množství uvolněného DEX-OPB. V průběhu 8 hodin se v pufru s pH 7,4, model krevního řečiště, uvolnilo přibližně 50 % DEX-OPB, zatímco v pufru s nejnižším pH (pH = 5,0, model lyzozomů buněk) se uvolnilo již během 2 h okolo 80 % léčiva. Přítomnost protilátky v konjugátu zásadně neovlivnil rychlost uvolňování DEX-OPB z polymerního řetězce, jak je znázorněno na obrázku 13B.

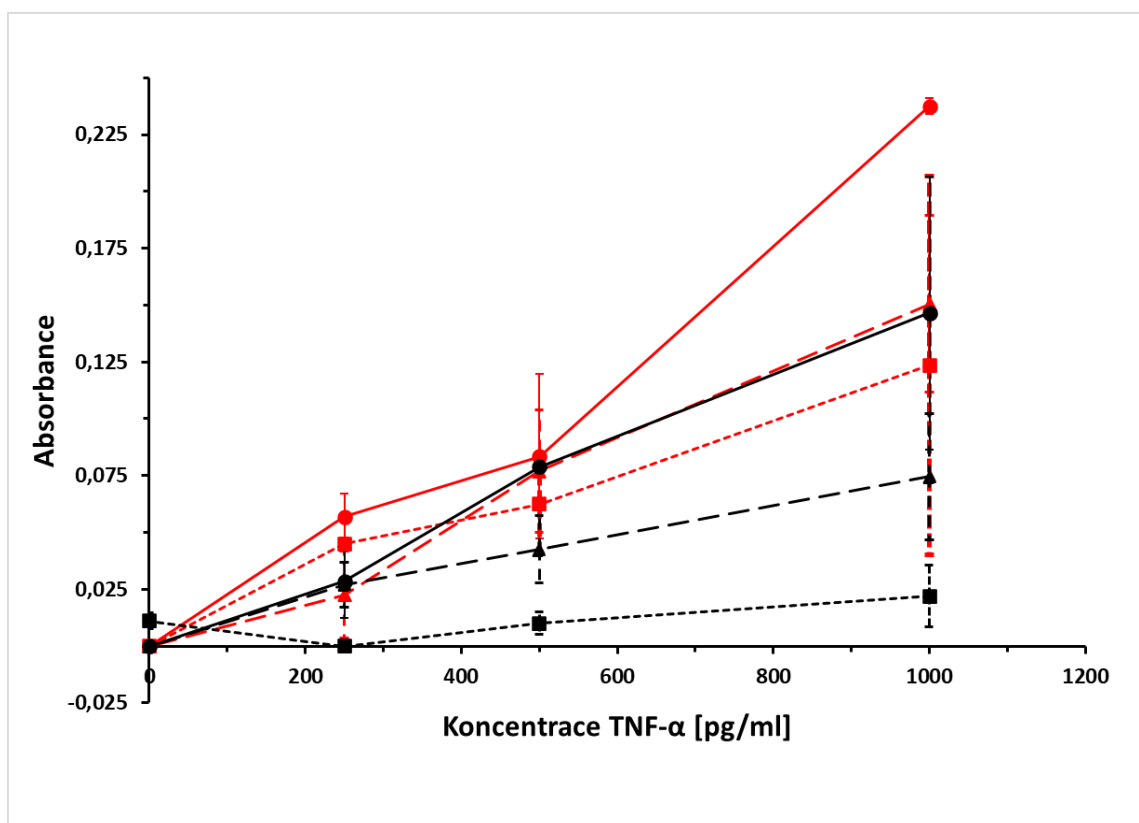


Obr. 13. A) Uvolňování DEX-OPB z polymerního nosiče (K-DEX-OPB) ve fosfátovém pufru s pH = 7,4 (černá křivka), pH = 6,5 (červená křivka) a pH = 5,0 (modrá křivka). B) Uvolňování DEX-OPB z K-DEX-OPB (černá křivka) a z IFX-K-DEX-OPB (zelená křivka) ve fosfátovém pufru s pH = 7,4.

5 Výsledky

5.3.1 Stanovení aktivity protilátky infliximab v konjugátu IFX-K-DEX-OPB pomocí metody ELISA

Schopnost vázat TNF- α byla studována pro samotnou protilátku IFX a její polymerní konjugát IFX-K-DEX-OPB (Obr. 14). Z výsledku uvedeném na grafu vyplývá, že schopnost vázat TNF- α , přesněji stanovená absorbance sekundární protilátky, je přímo úměrná množství přidaného TNF- α při stanovení. S vyšším obsahem protilátky (červené křivky) nebo konjugátu (černé křivky) v jamce je množství zachyceného TNF- α , a tedy i absorbance vyšší. Při porovnání křivek pro stejnou koncentraci IFX v jamce je patrné, že absorbance pro konjugát je přibližně dvakrát nižší při všech studovaných koncentracích. Rovněž intenzita signálu se snižuje rychleji s klesající koncentrací IFX-K-DEX-OPB v porovnání se samotným IFX.



Obr. 14. Závislost absorbance na koncentraci TNF- α . Jednotlivé červené křivky znázorňují různé koncentrace IFX v jamce (plná: 2,5 mg·ml⁻¹, čárkovaná: 1 mg·ml⁻¹, tečkovaná: 0,5 mg·ml⁻¹) a černé křivky různé koncentrace IFX-K-DEX-OPB v jamce (plná: 5 mg·ml⁻¹, čárkovaná: 2,5 mg·ml⁻¹, tečkovaná: 1 mg·ml⁻¹).

6 Diskuze

V rámci předkládané práce jsme se zaměřili na návrh struktury, syntézy a fyzikálně-chemické a předběžné biologické hodnocení polymerního konjugátu monoklonální protilátky infliximab a polymeru nesoucího léčivo DEX navázané přes pH-senzitivní hydrazonovou vazbu. V prvním kroku byla do struktury léčiva zavedena keto skupina derivatizací pomocí OPB, což umožnilo tvorbu hydrazonové vazby mezi derivátem DEX-OPB a polymerním prekurzorem. Výhodou této pH-senzitivní vazby patří poměrně dobrá stabilita ve fyziologickém prostředí s pH 7,4, které se nachází v krevním řečišti, a rychlé štěpení v nižším pH, které se nachází v zánětlivé tkáni. Toto umožňuje zajistit delší cirkulaci v krevním oběhu a omezit účinek léčiva pouze na cílové tkáně s kyselějším prostředím [66]. Výsledný konjugát IFX-K-DEX-OPB navíc obsahuje ve své struktuře terapeutickou protizánětlivou protilátku infliximab (IFX) inhibující TNF- α . Tato protilátka byla zavedena do struktury konjugátu s cílem aktivního směrování konjugátu do oblasti zánětu, ve které je zvýšená exprese TNF- α , s následným zesílením terapeutického efektu polymerního systému obsahujícího jak samotné léčivo DEX, tak i anti-TNF- α protilátku.

6.1 Příprava a charakterizace polymerních prekurzorů a polymerního konjugátu s DEX

Syntéza kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA-Acap-NH-NH-Boc) byla provedena pomocí kontrolované RAFT polymerace s cílem získat polymerní prekurzor o vhodné molekulové hmotnosti, která ještě dovoluje HPMA-kopolymerům se vyloučit z těla glomerulární filtrací, a úzké disperzitě \bar{D} . Analýza kopolymeru na GPC prokázala, že se podařilo připravit polymer s velmi úzkou distribucí molekulových hmotností ($\bar{D} = 1,08$) a molekulovou hmotností $M_n = 26\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, což je pod hranicí renálního prahu [62]. Použité přenosové činidlo TTC-N₃ umožnilo přípravu semitelechelického kopolymeru s azidovou funkční skupinou na jednom konci hlavního řetězce. Vzhledem k poměrně velké termální nestabilitě druhé koncové funkční skupině TTC, která může reagovat s nukleofilními a redukčními činidly [67], nebyla tato skupina v dalších krocích využita a byla odstraněna pomocí AIBN při vysoké teplotě. Funkcionalita koncové azidové skupiny připraveného kopolymeru dosahovala 0,81 a je možné konstatovat, že byla dostatečná pro další syntetické kroky. Obsah hydrazidových skupin po odstranění chránicích skupin z komonomeru Ma-Acap-NH-NH-Boc byl 2,9 mol%, což bylo dostatečné množství pro navázání 7 hm% derivátu DEX-OPB (1,4 mol%) v dalším syntetickém kroku. Molekula DEX obsahuje ve své struktuře dvě keto skupiny, přes které by se teoreticky mohla navázat na hydrazidové skupiny polymerního řetězce. Nicméně, obě tyto keto skupiny jsou poměrně nereaktivní a jejich využití pro tvorbu hydrazonové

6 Diskuze

vazby vyžaduje významně zvýšené teploty a dlouhých reakčních časů. Dalšími nevýhodami využití těchto keto skupin DEX je tvorba vedlejších degradačních produktů DEX při reakci za vyšších teplot a uvolňování takto vázaného léčiva je velmi pomalé, proto pro efektivní léčbu artritidy by se museli podávat velmi vysoké dávky polymerního léčiva [68]. Z toho důvodu se volil jiný přístup a na DEX se zavedla nová keto skupina derivatizací pomocí 4-(2-oxopropyl)benzoové kyseliny (OPB). Přes zavedenou keto skupinu byl následně na HPMA polymer za tvorby hydrazonové vazby navázán derivát DEX-OPB, u kterého bylo zjištěno, že podléhá pH-senzitivní hydrolýze vyhovující rychlostí, viz níže. Účinnost vazby derivátu na polymerní prekurzor při laboratorní teplotě během 16 hodin byla 75 % (násada 7 hm%, navázáno 5,26 hm%). Dosažený výsledek vazby léčiva na polymerní prekurzor byl postačujícím pro následující in vitro testování. Po navázání derivátu DEX-OPB a modifikující skupiny DBCO-MI na polymerní prekurzor byl pozorován mírný nárůst molekulové hmotnosti polymeru vyvolaný zavedením těchto skupin. Nicméně, nárůst byl poměrně malý a nikterak neomezoval další využití polymerního konjugátu v navazujících syntetických krocích ($M_w = 31\,600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pro K-DEX-OPB, $M_w = 36\,800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pro MI-K-DEX-OPB). Ani v jednom případě molekulová hmotnost polymerů nepřekračovala hodnotu renálního prahu pro jejich vyloučení z organismu po splnění funkce pomocí glomerulární filtrace.

Je možné konstatovat, že připravený polymerní konjugát dexamethasonu měl vhodné charakteristiky pro další navazující syntetické kroky.

6.2 Směřovaný polymerní konjugát dexamethasonu

Způsob konjugace HPMA polymerů nesoucích DEX-OPB na protilátku byl zvolen tak, aby se minimalizovalo riziko navázání polymerních řetězců přes funkční skupiny, které jsou součástí vazebného místa IFX pro cytokin TNF- α . Na povrchu molekuly protilátky se nacházejí různé funkční skupiny, které se dají využít pro jejich modifikaci a kovalentní připojení dalších molekul. Nejdostupnějšími a nejpočetnějšími skupinami jsou primární aminy lyzinových zbytků. Konjugace přes tyto skupiny má však nevýhodu v tom, že aminy se nacházejí taky ve vazebném místě protilátky, čím se po navázání polymerů může výrazně snížit vazebná aktivita protilátky na antigen [66]. Proto byly pro vazbu s protilátkou vybrány sulfhydrylové skupiny, které je možné do struktury protilátky zavést mírnou redukcí disulfidických můstků ve struktuře protilátky, které se nacházejí mimo vazebné místo protilátky. Pro umožnění navázání polymerů na redukovanou protilátku IFX byla na konec polymerního řetězce zavedena maleimidová skupina, a to nekatalyzovanou click reakcí s využitím bifunkčního činidla DBCO-MI s terminálním azidem kopolymeru.

Redukce protilátky před konjugací s HPMA polymery pomocí redukčního činidla DTT vedla ke štěpení 4 disulfidických můstků, a k tvorbě 8 volných thiolových skupin,

6 Diskuze

kteřé mohly reagovat s MI na konci polymeru. Vzhledem k počtu dostupných thiolových skupin byl do reakce použit molární poměr 9 : 1 (polymer : IFX). Molekulová hmotnost výsledného konjugátu byla $366\ 800\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Zvýšení molekulové hmotnosti systému je zapříčiněno tím, že na molekulu protilátky se kovalentně navázalo 5-6 polymerních řetězců s derivátem DEX-OPB. Průměrný počet navázaných na protilátku polymerních řetězců byl zjištěn analýzou molekulových hmotností protilátky a konjugátů získaných pomocí GPC. Můžeme konstatovat, že při samotné syntéze směrovaného konjugátu nedošlo k žádným vedlejším reakcím, které by bránily využití tohoto polymerního konjugátu pro biologické hodnocení. Všechny fyzikálně-chemické charakteristiky byly vyhovující.

Vysokomolekulární systém IFX-K-DEX-OPB by se měl na základě ELVIS efektu pasivně akumulovat v místě zánětu [53,54], což by mělo zajistit synergické působení obou terapeutických modalit, jak léčiva DEX, tak protilátky IFX. Následné bezpečné vyloučení tak velkého konjugátu z organismu se uskuteční díky tomu, že IFX bude po splnění své funkce v organismu degradován jako běžný protein pomocí lysozomální degradace [69] a uvolněné polymerní řetězce o velikosti $28\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ se vyloučí z těla glomerulární filtrací. Obsah DEX-OPB v konjugátu se stanovil na 3,9 hm%. Snížený obsah léčiva po konjugaci s protilátkou je možné přiřadit inkubaci konjugátu s IFX během dvouhodinové konjugace ve fosfátovém pufru s pH 7,5, kde se podle našich výsledků uvolní přibližně 20 % léčiva (*Obr. 13A*, str. 55). Analýza konjugátu pomocí GPC, kde se jednotlivé složky dělí na základě velikosti molekul, ukázal, že v konjugátu jsou přítomné i volné nenavázané polymerní řetězce (*Obr. 11*, str. 53, 35. min červené křivky), což je v souladu s tím, že polymerní prekurzory měly funkcionalitu koncové azidové, později MI skupiny, nižší než jedna. Toto znamená, že ne všechny polymerní řetězce obsahovaly funkční skupinu pro vazbu na IFX. Zda došlo k modifikaci každé molekuly IFX není z tohoto GPC záznamu zřejmé, protože polymerní nosič s DEX-OPB má poměrně širokou distribuci molekulových hmotností a částečně se překrývá s píkem protilátky. Proto se konjugát dále charakterizoval i pomocí SDS-PAGE za redukujících i neredukujících podmínek (*Obr. 12*, str. 54). Výhodou této metody je, že umožňuje rozlišit jednotlivé proteinové řetězce na základě jejich velikosti. Proto je možné po obarvení gelu bromfenolovou modří vidět jak lehký, tak těžký řetězec protilátky, když se zredukuje redukčním činidlem, v našem případě 2-merkptoethanolem. Pro dostatečnou detekci a analýzu výsledku se na gel nanášel IFX-K-DEX-OPB v čtyři krát vyšší koncentraci, než byla koncentrace IFX ($1\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), protože konjugát obsahoval 46 hm% IFX. Teoretická molekulová hmotnost monoklonálních protilátek je okolo 150 kDa [68,69], což se potvrdilo i analýzou IFX v neredukujících podmínkách (*Obr. 12*, str. 54, 2. dráha). Redukce protilátky vedla k jejímu rozpadu na lehký a těžký řetězec s velikostmi kolem 25 kDa a 50 kDa (*Obr. 12*, str. 54, 3. dráha). Po modifikaci IFX s polymery se se v gelu nepozoroval žádný proužek s přesně definovanou molekulovou hmotností

6 Diskuze

(Obr. 12, str. 54, 4. dráha). V dráze, kde se nanese konjugát po inkubaci s merkaptoethanolem se pozoroval jenom slabý proužek pro lehký řetězec, zatímco proužek pro těžký řetězec úplně vymizel. Nepřítomnost proužku pro těžký řetězec IFX za redukujících podmínek dokazuje, že se na něj polymerní řetězce přednostně vázaly. Popsaný výsledek potvrzuje, že se při přípravě konjugátu IFX-K-DEX-OPB podařilo modifikovat HPMA polymerními řetězci všechny molekuly IFX. Pro konjugáty protilátky s HPMA polymerem je typické, že se v gelu nezobrazují jako jeden výrazný proužek, ale jako slabá protáhlá skvrna. Tohle může být způsobeno jednak z důvodu distribuce HPMA polymerů na molekulách protilátky, ale hlavně tím, že HPMA polymer je rozpustný v methanolu, který je součástí odbarvovacího roztoku, a proto se z gelu během jeho barvení s bromfenolovou modří vymývají.

6.3 In vitro testování

Připravené konjugáty K-DEX-OPB a IFX-K-DEX-OPB byly podrobeny in vitro experimentům, při kterých se sledovala rychlost uvolňování léčiva DEX-OPB z polymerního nosiče a ověřila se vazebná schopnost protilátky na TNF- α .

Uvolňování DEX-OPB z polymerního nosiče bylo provedeno v pufrch s pH 5,0; 6,5 a 7,4 pro konjugát K-DEX-OPB a pro konjugát IFX-K-DEX-OPB jen při pH 7,4. Tyto hodnoty pH byly zvoleny tak, aby simulovaly fyziologické pH (7,4), mírně kyselé pH zanícené tkáně (6,5) a nižší pH lyzozomálního kompartmentu buňky (5,0). Množství uvolněného léčiva se po vytřepání do DCM analyzovalo pomocí HPLC. Výsledkem analýzy byly dva píky. První pík v čase 6 minut se pro vyhodnocení množství uvolněného léčiva nebral v potaz z toho důvodu, že se s časem jeho integrovaná plocha neměnila. Předpokládáme, že se pravděpodobně jednalo o jeden z mnoha degradačních produktů DEX, které mohou běžně vznikat při skladování léčiva vlivem světla, tepla a vlhkosti [70,71]. Množství uvolněného DEX-OPB z HPMA polymeru se získalo z integrované plochy druhého píku s retenčním časem 6,2 minut. Po 6 hodinách se v pufru s pH = 5,0 uvolnilo asi 80 % navázaného léčiva, při pH = 6,5 kolem 60 % a při pH = 7,4 to bylo přibližně 40 % (Obr. 13A, str. 55). Výrazně rychlejší uvolnění léčiva z polymerního nosiče v pufrch s nižším pH se pozorovalo i v jiných studiích [36,46]. Tento trend uvolňování je v souladu s vlastnostmi hydrazonové vazby. Rychleji se štěpí při nižších pH a je relativně stabilní při pH fyziologickém [66]. Tyto dvě vlastnosti jsou nezbytné pro správnou funkci konjugátu v organismu, protože během transportu konjugátu do místa zánětu v krevním řečišti musí být vazba mezi polymerním nosičem a léčivem stabilní, ale pro vykázání terapeutického efektu se léčivo musí z polymeru odštěpit, což díky nižšímu pH v místě zánětu hydrazonová vazba umožňuje. Při porovnání uvolnění DEX-OPB z konjugátu K-DEX-OPB a konjugátu IFX-K-DEX-OPB

6 Diskuze

(Obr. 13B, str. 55) můžeme dospět k závěru, že přítomnost protilátky zásadně rychlost uvolnění DEX-OPB neovlivňuje.

Navázání HPMA kopolymerů na molekulu protilátky mohlo teoreticky vést k poškození nebo zablokování vazebného místa pro TNF- α , což je klíčový cytokin v rozvoji zánětu. Studie ukazují, že má prozánětlivý účinek. Podání IFX vede k blokaci TNF- α , a tím tlumí zánětlivou odpověď organismu. Proto je nezbytné, aby se schopnost IFX vázat TNF- α v konjugátu zachovala. S cílem ověřit jeho aktivitu se využila metoda ELISA. Na povrch jamek 96-jamkové deštičky se nakoutoval samotný IFX a připravený konjugát v různých koncentracích. Jelikož konjugát obsahuje 46 hm% protilátky, tak se efektivita vázání cytokinu konjugátu porovnávala s dvakrát nižší koncentrací samotné protilátky. Následně se přidal lidský TNF- α a po inkubaci a vymytí nenavázaného cytokinu se přidala sekundární protilátka konjugovaná s biotinem, na který se mohl vázat v dalším kroku streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidasou. Množství navázaného TNF- α na samotný IFX nebo IFX v konjugátu se stanovilo spektrofotometricky z absorbance při 450 nm, která je přímo úměrná koncentraci cytokinu. Z výsledku (Obr. 14, str. 56) je zřejmé, že k poškození vazebního místa IFX v konjugátu nedošlo, jelikož se naměřila stoupající absorbance s rostoucí koncentrací přidaného TNF- α , a tedy došlo k navázání antigenu na protilátku. Porovnáním absorbance samotné protilátky s konjugátem při stejné koncentraci IFX (např. 5 mg·ml⁻¹ konjugát a 2,5 mg·ml⁻¹ IFX) je však vidět, že množství navázaného TNF- α v konjugátu je menší. Vzhledem k charakteru použité metody stanovení předpokládáme, že ke snížení množství navázaného TNF- α mohlo dojít ze dvou důvodů. Mohlo to být způsobeno mírným sterickým bráněním polymerních řetězců navázaných na protilátku, čímž se může pravděpodobně ovlivnit přístup cytokinu k vazebnému místu protilátky, a tím dojít ke snížení navázaného cytokinu. Dalším důvodem může být fakt, že při nanesení konjugátu na povrch jamek nedošlo k naadsorbování veškerého množství IFX-K-DEX-OPB na povrch jamek deštičky. V případě konjugátu můžeme předpokládat, že se na povrch jamek navázalo méně konjugátu než v případě samotné protilátky, jelikož přítomné polymerní řetězce mohou opět stéricky bránit v úplném pokrytí jamek polymerním konjugátem. Důležitým závěrem nicméně je, že si IFX v konjugátu zachoval svou specificitu a funkčnost a po navázání polymerů nedošlo k porušení jeho vazebního místa pro TNF- α .

7 Závěr

Byla úspěšně provedena syntéza polymerního prekurzoru na bázi HPMA obsahujícího hydrazidové skupiny podél řetězce a jednu koncovou azidovou skupinu na konci hlavního řetězce. Vzhledem k využití řízené RAFT radikálové polymerizace byl úspěšně připraven kopolymer s úzkou distribucí molekulových vah a molekulovou hmotností pod limitem renálního prahu ($< 50\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), což umožňuje jeho vyloučení z organismu po splnění nosičové funkce. Zastoupení příslušných funkčních skupin bylo dostatečné pro další modifikace prekurzoru a navázání derivátu dexamethasonu (DEX-OPB) přes pH-štěpitelnou hydrazonovou vazbu za vzniku konjugátu K-DEX-OPB. Modifikací terminálního azidu spojkou DBCO-MI se podařilo zavést na konec polymerního řetězce maleimidovou skupinu, která reagovala s thiolovými skupinami na protilátce infliximab po redukci jejích disulfidických můstků. Detailní fyzikálně-chemickou analýzou bylo potvrzeno, že byl úspěšně připraven konjugát IFX-K-DEX-OPB, kde na jedné molekule IFX je navázaných 5-6 polymerních řetězců. Elektroforézou SDS-PAGE bylo potvrzeno, že došlo k vazbě polymerů přednostně na těžký řetězec infliximabu a že se podařilo modifikovat veškeré molekuly protilátky.

V rámci předběžného *in vitro* testování připravených konjugátů, jenž bylo dalším cílem práce, bylo zjištěno, že léčivo se uvolňuje rychleji při nižší hodnotě pH, které je charakteristické pro zánět. V průběhu cirkulace v krvi je hydrazonová vazba více stabilní, čím by mělo dojít k minimalizaci negativních vedlejších účinků DEX. Vazebná aktivita protilátky v konjugátu IFX-K-DEX-OPB byla ověřena pomocí metody ELISA s použitím lidského TNF- α . Bylo prokázáno, že IFX si po konjugaci s polymerním nosičem zachovává vazebnou aktivitu pro TNF- α . Samotná aktivita protilátky v konjugátu byla ve srovnání s čistým infliximabem mírně snížena. Závěrem můžeme konstatovat, že se podařilo úspěšně připravit, charakterizovat a předběžně otestovat směrovaný polymerní konjugát určený k léčbě chronických zánětlivých stavů s potenciálním synergickým účinkem nízkomolekulárního léčiva a monoklonální protilátky.

Předpokládáme, že výsledný polymerní konjugát nesoucí dva typy aktivních molekul s rozdílným protizánětlivým mechanismem účinků, by mohl být přínosem z pohledu zesílení terapeutického efektu při léčbě zánětlivých onemocnění. Vzhledem k tomu, že se jedná o přípravu a zkoumání zcela nového polymerního konjugátu výsledky z *in vitro* experimentů musíme zatím chápat jako předběžné. V blízké budoucnosti se plánuje testování konjugátu i *in vivo*, kde se ukáže, či navázání IFX a DEX na polymerní nosič vedlo k synergickému efektu léčiv a či daný konjugát má potenciál uplatnit se v terapii zánětlivých onemocnění.

Použitá literatura

1. Hořejší, V., Bartůňková, J. (2009) *Základy imunologie* (TRITON, Praha). 4th ed.
2. Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L. (2017) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204–18.
3. Medzhitov, R. (2010) Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* **140**, 771–76.
4. Abdulkhaleq, L.A., Assi, M.A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y.H., Hezme, M.N.M. (2018) The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World* **11**, 627–35.
5. Vane, J., Botting, R. (1987) Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB j.* **1**, 89–96.
6. Majno, G., Joris, I. (2004) *Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology* (Oxford University Press, Oxford, New York). 2nd ed..
7. Pahwa, R., Goyal, A., Bansal, P., Jialal, I. (2020) in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)).
8. Robbins, S., Cotran, R., Kumar, V. (2000) *Robbins Basic Pathology - 7th edition* (Elsevier, Philadelphia). 7th ed.
9. Koziolová, E., Venclíková, K., Etrych, T. (2018) Polymer-Drug Conjugates in Inflammation Treatment. *Physiol Res* **67**, 281–92.
10. Dinarello, C.A. (2010) Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell* **140**, 935–50.
11. Schacke, H. (2002) Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**, 23–43.
12. Williams, D.M. (2018) Clinical Pharmacology of Corticosteroids. *Respir Care* **63**, 655–70.
13. James, D.S. (1999) The multisystem adverse effects of NSAID therapy. *J Am Osteopath Assoc* **99**, S1-7.
14. Peto, T.E. (1989) Toxicity of antimalarial drugs. *J R Soc Med* **82 Suppl 17**, 30–33; discussion 33-34.
15. Lin, Y.-J., Anzaghe, M., Schülke, S. (2020) Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells* **9**.
16. Grosser, T., Ricciotti, E., FitzGerald, G.A. (2017) The Cardiovascular Pharmacology of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 733–48.
17. Bindu, S., Mazumder, S., Bandyopadhyay, U. (2020) Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol* **180**, 114147.

Použitá literatura

18. Harizi, H., Corcuff, J.-B., Gualde, N. (2008) Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine* **14**, 461–69.
19. Urbańska, J., Karewicz, A., Nowakowska, M. (2014) Polymeric delivery systems for dexamethasone. *Life Sciences* **96**, 1–6.
20. Barnes, P.J. (2006) How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005: Corticosteroids and inflammation. *British Journal of Pharmacology* **148**, 245–54.
21. Nicolaides, N.C., Chrousos, G., Kino, T. (2000) in *Endotext*, Feingold, K.R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., de Herder, W.W., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J.M., Hofland, J., Kaltsas, G., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., McLachlan, R., Morley, J.E., New, M., Purnell, J., Singer, F., Stratakis, C.A., Trencce, D.L., Wilson, D.P. (MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA)).
22. Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P., Schütz, G. (1998) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**, 531–41.
23. Sampey, A.V., Hutchinson, P., Morand, E.F. (2000) Annexin I and dexamethasone effects on phospholipase and cyclooxygenase activity in human synoviocytes. *Mediators of Inflammation* **9**, 125–32.
24. Dolan-O’Keefe, M., Nick, H.S. (1999) Inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 expression by glucocorticoids in rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **116**, 855–64.
25. Chao, H., Liu, Y., Lin, C., Xu, X., Li, Z., Bao, Z., Fan, L., Tao, C., Zhao, L., Liu, Y., Wang, X., You, Y., Liu, N., Ji, J. (2018) Activation of bradykinin B2 receptor induced the inflammatory responses of cytosolic phospholipase A2 after the early traumatic brain injury. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1864**, 2957–71.
26. Leslie, C.C. (2015) Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *J Lipid Res* **56**, 1386–1402.
27. Dulin, N.O., Alexander, L.D., Harwalkar, S., Falck, J.R., Douglas, J.G. (1998) Phospholipase A2-mediated activation of mitogen-activated protein kinase by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8098–8102.
28. Grewal, S., Smith, J., Ponnambalam, S., Walker, J. (2004) Stimulation-dependent recruitment of cytosolic phospholipase A2- α to EA.hy.926 endothelial cell membranes leads to calcium-independent association. *European Journal of Biochemistry* **271**, 69–77.
29. Raynal, P., Pollard, H.B. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1197**, 63–93.

Použitá literatura

30. D'Acquisto, F., Perretti, M., Flower, R.J. (2008) Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems: Anx-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *British Journal of Pharmacology* **155**, 152–69.
31. Parente, L., Solito, E. (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm. res.* **53**, 125–32.
32. Morri, H., Ozaki, M., Watanabe, Y. (1994) 5'-flanking region surrounding a human cytosolic phospholipase A2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 6–11.
33. Hayden, M.S., Ghosh, S. (2012) NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* **26**, 203–34.
34. Mitchell, S., Vargas, J., Hoffmann, A. (2016) Signaling via the NF κ B system: Signaling via the NF κ B system. *WIREs Syst Biol Med* **8**, 227–41.
35. Moynagh, P.N. (2005) The NF- B pathway. *Journal of Cell Science* **118**, 4589–92.
36. Libánská, A., Randárová, E., Lager, F., Renault, G., Scherman, D., Etrych, T. (2020) Polymer Nanomedicines with Ph-Sensitive Release of Dexamethasone for the Localized Treatment of Inflammation. *Pharmaceutics* **12**, 700.
37. Yamada, T. Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Therapeutic Monoclonal Antibodies* , 10.
38. Castelli, M.S., McGonigle, P., Hornby, P.J. (2019) The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res Perspect* **7**.
39. Antibody Structure. Dostupné z URL: <<https://bxccl.com/antibody-structure/>> [cit. 3.03.2021].
40. Chan, A.C., Carter, P.J. (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* **10**, 301–16.
41. Maini, R.N., Feldmann, M. How does infliximab work in rheumatoid arthritis? **4**, 22-23.
42. Andreakos, E.T., Foxwell, B.M., Brennan, F.M., Maini, R.N., Feldmann, M. (2002) Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **13**, 299–313.
43. Lichtenstein, L., Ron, Y., Kivity, S., Ben-Horin, S., Israeli, E., Fraser, G.M., Dotan, I., Chowers, Y., Confino-Cohen, R., Weiss, B. (2015) Infliximab-Related Infusion Reactions: Systematic Review. *ECCOJC* **9**, 806–15.
44. Smolen, J.S., Emery, P. (2011) Infliximab: 12 years of experience. *Arthritis Res Ther* **13**, S2.
45. Tiwari, G., Tiwari, R., Bannerjee, S., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., Sriwastawa, B. (2012) Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharma Investig* **2**, 2-11.
46. Krakovičová, H., Etrych, T., Ulbrich, K. (2009) HPMA-based polymer conjugates with drug combination. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **37**, 405–12.
47. Patra, J.K., Das, G., Fraceto, L.F., Campos, E.V.R., Rodriguez-Torres, M. del P., Acosta-Torres, L.S., Diaz-Torres, L.A., Grillo, R., Swamy, M.K., Sharma, S.,

Použitá literatura

- Habtemariam, S., Shin, H.-S. (2018) Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology* **16**.
48. Hoffman, A.S. (2008) The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **132**, 153–63.
49. Yang, J., Kopeček, J. (2014) Macromolecular therapeutics. *Journal of Controlled Release* **190**, 288–303.
50. Sung, Y.K., Kim, S.W. (2020) Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomater Res* **24**, 12.
51. Mohanty, S., Panda, S., Bhanja, A., Pal, A., Chandra, S.S. (2019) Novel Drug Delivery Systems for Rheumatoid Arthritis: An Approach to Better Patient Compliance. *Biomedical and Pharmacology Journal* **12**, 157–70.
52. Lühder, F., Reichardt, H.M. (2017) Novel Drug Delivery Systems Tailored for Improved Administration of Glucocorticoids. *Int J Mol Sci* **18**.
53. Mitragotri, S., Yoo, J.-W. (2011) Designing micro- and nano-particles for treating rheumatoid arthritis. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 1887–97.
54. Yuan, F., Quan, L., Cui, L., Goldring, S.R., Wang, D. (2012) Development of macromolecular prodrug for rheumatoid arthritis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 1205–19.
55. Lin, N., Simon, M.C. (2016) Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation. *Journal of Clinical Investigation* **126**, 3661–71.
56. Yang, M., Feng, X., Ding, J., Chang, F., Chen, X. (2017) Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release* **252**, 108–24.
57. Kopeček, J., Kopečková, P. (2010) HPMA copolymers: Origins, early developments, present, and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 122–49.
58. Larson, N., Ghandehari, H. (2012) Polymeric Conjugates for Drug Delivery. *Chem. Mater.* **24**, 840–53.
59. Ulbrich, K., Šubr, V. (2010) Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 150–66.
60. Říhová, B. (2007) Biocompatibility and immunocompatibility of water-soluble polymers based on HPMA. *Composites Part B: Engineering* **38**, 386–97.
61. Chytil, P., Koziolová, E., Etrych, T., Ulbrich, K. (2018) HPMA Copolymer-Drug Conjugates with Controlled Tumor-Specific Drug Release. *Macromol. Biosci.* **18**, 1700209.
62. Duncan, R., Vicent, M.J. (2010) Do HPMA copolymer conjugates have a future as clinically useful nanomedicines? A critical overview of current status and future opportunities. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 272–82.
63. Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S.H. (2013) RAFT Polymerization and Some of its Applications. *Chem. Asian J.* **8**, 1634–44.

Použitá literatura

64. Ulbrich, K., Etrych, T., Chytil, P., Jelínková, M., Říhová, B. (2004) Antibody-targeted Polymer–doxorubicin Conjugates with pH-controlled Activation. *Journal of Drug Targeting* **12**, 477–89.
65. Etrych, T., Mrkvan, T., Chytil, P., Koňák, Č., Říhová, B., Ulbrich, K. (2008) N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-based polymer conjugates with pH-controlled activation of doxorubicin. I. New synthesis, physicochemical characterization and preliminary biological evaluation. *Journal of Applied Polymer Science* **109**, 3050–61.
66. Yoshida, T., Lai, T.C., Kwon, G.S., Sako, K. (2013) pH- and ion-sensitive polymers for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **10**, 1497–1513.
67. Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S.H. (2011) End-functional polymers, thiocarbonylthio group removal/transformation and reversible addition–fragmentation–chain transfer (RAFT) polymerization. *Polymer International* **60**, 9–25.
68. Quan, L., Zhang, Y., Crielaard, B.J., Dusad, A., Lele, S.M., Rijcken, C.J.F., Metselaar, J.M., Kostková, H., Etrych, T., Ulbrich, K., Kiessling, F., Mikuls, T.R., Hennink, W.E., Storm, G., Lammers, T., Wang, D. (2014) Nanomedicines for Inflammatory Arthritis: Head-To-Head Comparison of Glucocorticoid-Containing Polymers, Micelles and Liposomes. *ACS Nano* **8**, 458–66.
69. Temrikar, Z.H., Suryawanshi, S., Meibohm, B. (2020) Pharmacokinetics and Clinical Pharmacology of Monoclonal Antibodies in Pediatric Patients. *Pediatr Drugs* **22**, 199–216.
70. Matter, B., Ghaffari, A., Bourne, D., Wang, Y., Choi, S., Kompella, U.B. (2019) Dexamethasone Degradation in Aqueous Medium and Implications for Correction of In Vitro Release from Sustained Release Delivery Systems. *AAPS PharmSciTech* **20**, 320.
71. Binson, G., Venisse, N., Bacle, A., Beuzit, K., Dupuis, A. (2017) Preparation and Physico-Chemical Stability of Dexamethasone Oral Suspension. *Pharmaceutical Technology in Hospital Pharmacy* **2**, 193–201.