UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Bc. Ondrej Bača

Biokompatibilní polymerní systémy pro medicinální použití

Biocompatible polymer systems for medical application

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Etrych, Ph.D., DSc.

Konzultant: RNDr. Petr Chytil, Ph.D.

Praha 2025

Prohlášení:

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

V Praze, dne 22.08.2025 Podpis: Ondrej Bača

Abstrakt

Tato diplomová práce se zaměřuje na přípravu a charakterizaci polymerních nosičů na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) a *N*-(1,3-dihydroxypropyl)methakrylamidu (DHPMA) určených pro dopravu a řízené uvolňování léčiv, derivátů kyseliny betulinové (BA), v nádorové tkáni. Byly syntetizovány a detailně fyzikálně-chemicky charakterizovány polymerní prekurzory, obsahující hydrazidové skupiny nebo primární aminoskupiny. Dále byly studovány jejich konjugáty s funkčními deriváty BA nesoucí oxo skupinu, které byly navázané na polymery pomocí pH-senzitivní hydrazonové vazby nebo ve formě Shiffovy báze. V dalším kroku byla ověřena hydrolytická stabilita uvedených konjugátů ve fyziologickém pH (7,4) a zároveň jejich schopnost uvolnit léčivo v pH simulujícím nádorové mikroprostředí (5,0).Rovněž byla ověřena cytotoxická aktivita derivátů BA i jejich polymerních konjugátů na buněčné linii lidského kolorektálního adenokarcinomu DLD-1. Výsledky ukazují, že polymerní nosiče na bázi HPMA a DHPMA představují slibný nástroj pro cílenou dopravu derivátů BA, přičemž jejich biologická účinnost je výrazně ovlivněna strukturou samotného léčiva i typem chemické vazby.

Klíčová slova: polymerní nosiče léčiv, HPMA, DHPMA, kyselina betulinová, *in vitro* testování

Abstract

This thesis focuses on the preparation and characterization of polymer carriers based on *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) and *N*-(1,3-dihydroxypropyl)methacrylamide (DHPMA) designed for the delivery and controlled release of betulinic acid (BA) derivatives in tumor tissue. Polymer precursors containing hydrazide or primary amino groups were synthesized and thoroughly physico-chemically characterized, along with their conjugates with functional BA derivatives bearing an oxo group, attached via a pH-sensitive hydrazone bond or a Schiff base. The hydrolytic stability of these conjugates was evaluated at physiological pH (7.4) as well as their ability to release the drug at pH simulating the tumor microenvironment (5.0). Furthermore, the cytotoxic activity of BA derivatives and their polymer conjugates was assessed *in vitro* on the human colorectal adenocarcinoma cell line DLD-1. The results demonstrate that polymer carriers based on HPMA and DHPMA are a promising platform for the targeted delivery of BA derivatives, with their biological efficacy being significantly influenced by the structure of the drug and the type of chemical linkage.

Keywords: polymer drug carriers, HPMA, DHPMA, betulinic acid, *in vitro* testing

Poděkování

Rád bych vyjádřil upřímné poděkování vedoucímu své diplomové práce, RNDr. Tomáši Etrychovi, Ph.D., DSc., za jeho vedení, trpělivost a cenné rady, které mi poskytl během celé práce. Velké poděkování patří rovněž konzultantovi RNDr. Petru Chytilovi, Ph.D., za odbornou pomoc a podporu.

Zvláštní dík chci vyjádřit Ing. Sáře Pytlíkové za její významnou pomoc a podporu během experimentální části práce a za mimořádnou ochotu a trpělivost.

Dále bych rád poděkoval všem kolegům z ÚMCH AV ČR za příjemné pracovní prostředí, ochotu pomoci, a především za možnost zpracovávat svou diplomovou práci právě na tomto pracovišti.

Obsah

1 Úvod 10

1.1 Systémy pro dopravu léčiv 10

1.2 Pasivní cílení do pevných nádorů a EPR efekt 11

1.3 Vstup polymerních konjugátů do nádorových buněk a uvolnění léčiva z kopolymeru . 13

1.3.1 Polymerní konjugáty s léčivem vázaným enzymaticky štěpitelnou spojkou 13

1.3.2 Polymerní konjugáty s léčivem vázaným hydrolyticky štěpitelnou spojkou 14

1.4 Vylučování polymerních nosičů z organizmu 14

1.5 Polymerní nosiče léčiv 15

1.5.1 Kopolymery *N*-(2-hydroxypropyl)methalakrylamidu 15

1.5.2 Kopolymery *N*-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)methakrylamidu 17

1.6 Kyselina betulinová a její deriváty 17

1.6.1 Mechanismus cytotoxického účinku BA 18

1.6.2 Kombinace s jinými cytostatiky 21

1.6.3 Deriváty kyseliny betulinové 21

2 Cíle práce 23

3 Experimentální část 24

3.1 Použité chemikálie 24

3.2 Syntetické postupy 26

3.2.1 Syntéza derivátů 26

3.2.3 Syntéza přenosového činidla (CTA) 26

3.2.4 Syntéza polymerních prekurzorů 26

3.2.5 Navazování derivátů kyseliny betulinové na kopolymery 30

3.3 Použité přístroje 34

3.4 Charakterizace a analytické metody 35

3.4.1 Spektroskopické metody 35

3.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) 36

3.4.4 Stanovení hydrodynamického průměru pomocí DLS 38

3.4.5 Biologické testování 38

4 Výsledky 40

4.1 Syntéza polymerních prekurzorů 40

4.2 Analýza derivátu dBA1 40

4.2.1 FT-IR a Ramanova spektroskopie 41

4.2.2 Předkolonová derivatizace dBA1 42

4.3 Syntéza polymerních konjugátů s dBA1 a dBA2 42

4.3.1 Hydrolytická stabilita polymerních konjugátů P1-dBAa1 až P4-dBA1 43

4.3.2 Hydrolytická stabilita polymerních konjugátů P5 s dBA1 a dBA2 44

5 Diskuze 47

6 Závěr 51

7 Zdroje: 52

Seznam zkratek

AIBN	2,2-azobis(isobutyronitril)
BA	betulinová kyselina
BIP	Bcl-2 interagující protein
CTA	přenosové činidlo
CytoC	cytochrom C
DABCO	1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DBTP	dibutylthiofosfát
DDS	drug delivery system
DHPMA	*N*-(1,3-dihydroxypropyl)methakrylamid
DLS	dynamický rozptyl světla
DMA	*N,N*-dimethylacetamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EndoG	endonukleata G
EPR efekt	efekt zvýšené permeability a retence
FMOC-Cl	chlorid 9-fluorenylmethoxykarbonylu
GPC	gelová permeační chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPMA	*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid
IL-1	interleukin 1
MeOH	methanol
Ma-Ah-NHNH-Boc	*N*-(*terc*-butoxykarbonyl)-*N′*-(6-methakrylamidohexanoyl)hydrazin
Ma-βAla-NHNH-Boc	*N*-(*terc*-butoxykarbonyl)-*N′*-(6-methakrylamidopropanoyl)hydrazin
Ma-Pr-NH-Boc	*terc*-butyl (3-methacrylamidopropyl)carbamate (MA-Pr-NH-Boc)
MMP	mitochondriální membránový potenciál
NF-kβ	nukleárny faktor kappa β
PDAM	poly(*N,N*-dimetylakrylamid)
PEG	polyethylenglykol
RAFT	reverzibilní adičně-fragmentační polymerizace s přenosem na řetězec
ROS	reaktivní formy kyslíku

Sod2	superoxiddismutasa 2
STAT3	signalizačný transdukčný a transkripční aktivátor 3
t-BuOH	terc-butylalkohol
TNBSA	kyselina 2,4,6-trinitrobenzen-1-sulfonová
TNF	tumor nekrotizující faktor
TPP	trifenylfosfonium
TTc	trithiokarbonátová skupina
V-70	2-[(2-kyano-4-methoxy-4-methylpentan-2- yl)diazenyl]-4-methoxy-2,4-dimethylpentanenitril
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VPF	faktor vaskulární permeability
VASP	vazodilatátorem stimulovaný fosfoprotein

1 Úvod

Mnoho protinádorových léčiv má nežádoucí vedlejší účinky, které souvisí s jejich nespecifickou biologickou aktivitou. Patří sem zejména cytotoxický efekt na rychle se množící zdravé buňky, kardiotoxicita, nefrotoxicita a hepatotoxicita [1]. Při systémovém podání je léčivo distribuováno do celého těla, ale pouze zlomek podané dávky dosáhne cíleného místa účinku. Léčba onkologických onemocnění proto může být předčasně ukončena z důvodu nadměrné systémové toxicity. Proto se v posledních desetiletích hledají nové možnosti, jak zvýšit akumulaci v cílovém místě působení. Systémy pro dopravu léčiv (drug delivery systems, DDS) si kladou za cíl prodloužit dobu oběhu léčiv v těle, příznivě ovlivnit jejich biodistribuci a kinetiku uvolňování, či zvýšit jejich rozpustnost [2, 3].

1.1 Systémy pro dopravu léčiv

DDS by měly zajistit zvýšenou akumulaci léčiva v požadovaném místě v organismu, aniž by došlo k jeho degradaci nebo biotransformaci během transportu [7]. Během podání a distribuce DDS je dopravované léčivo ve valné většině případů v neaktivní formě a aktivuje se na biologicky aktivní molekulu až v cílovém místě účinku uvolněním z nosiče [4, 5, 6]. Ideálním řešením, navrženým již před více jak 100 lety P. Ehrlichem, je zkonstruovat lék jako „kouzelnou střelu“, kdy lék působí výhradně na nádorové buňky [7, 8].

Dosud byla navržena řada různých DDS jako jsou koloidní nosiče (mikro, nanočástice, liposomy, micely), systémy na bázi konjugátů protilátka-léčivo, nanogely nebo vodorozpustné polymerní systémy [1]. A právě poslední jsou předmětem předkládané práce. Aby mohl být polymer použit jako nosič, musí být biokompatibilní, neimunogenní, netoxický a rozpustný v tělních tekutinách. Léčivo je na polymerní nosič kovalentně navázáno tak, aby se uvolnilo v cílovém místě působení na základě specifického podnětu (například na základě změny pH). Polymerní nosič je zároveň navržen tak, aby byl po uvolnění léčiva vyloučen z organizmu renální filtrací [3].

Polymerní nosiče léčiv lze klasifikovat dle původu na přírodní a syntetické. Syntetické nosiče lze rozdělit na biologicky odbouratelné a biologicky nerozložitelné. Výhoda přírodních polymerů je jejich biokompatibita, schopnost biodegradace a možnost získávání z přírodních zdrojů. Naopak nevýhodou je možné riziko imunogenicity [9, 10]. U syntetických polymerů je

velkou výhodou možnost kontrolovat jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, například molární hmotnost a hydrodynamický rozměr. Jsou také stabilnější a mají širší škálu použití, lze z nich připravit nanosystémy o různých strukturách. Jejich nevýhodou může být náročnost syntézy a omezení molární hmotnosti, jak bude popsáno níže [4, 5].

Polymery rozpustné ve vodě se používají v oblasti vývoje DDS kvůli hydrofilní povaze polymerního řetězce, jehož hydratace zvyšuje energetickou bariéru adsorpce proteinů a jiných biomolekul během transportu v krevním oběhu, čímž se pro organizmus stávají „neviditelnými“ [4, 5]. Vazba na vodorozpustný polymer může solubilizovat léčiva nerozpustná ve vodě, výrazně zlepšit jejich farmakokinetiku a eliminovat jejich vedlejší účinky [3]. Polymerní léčiva vykazují prodlouženou dobu setrvání v krvi a zvýšenou akumulaci v pevných nádorech prostřednictvím efektu zvýšené permeability a retence, tzv. EPR efektu (viz kapitola 1.2.). Následuje řízené uvolnění léčiva v nádorovém mikroprostředí, případně po průniku do nádorových buněk [2, 3, 11].

Chemická struktura polymeru, molární hmotnost a disperzita značně ovlivňují celkovou terapeutickou aktivitu [4, 13]. Vysoká molární hmotnost brání rychlé eliminaci polymerních nosičů renální filtrací, a umožňuje tak jejich prodlouženou cirkulaci a zvýšený záchyt v pevných nádorech [5, 14]. Aby se však zabránilo nežádoucímu hromadění polymerních nosičů v těle, musí být zajištěno vyloučení nosičů z organizmu po slnění jejich role. Vyloučení polymerních nosičů glomerulární filtrací je řízena především velikostí polymerních klubek, respektive jejich molární hmotností [4, 15].

1.2 Pasivní cílení do pevných nádorů a EPR efekt

Jak již bylo zmíněno, jedním z úskalí účinné léčby rakoviny je neschopnost selektivního působení léčiva vůči nádorovým buňkám. Kromě aktivního cílení, například za použití protilátek, je možné použít i pasivní cílení, které je založené na odlišných vlastnostech vaskulárního systému pevných nádorů a které popisuje EPR efekt (obr. 1) [2]. Když pevný nádor dosáhne velikosti 1 až 2 mm, potřebuje vytvořit nové cévy, které jej budou zásobovat živinami a kyslíkem. Nicméně tyto nové cévy mají nepravidelnou a neúplnou stavbu [2, 12, 14].

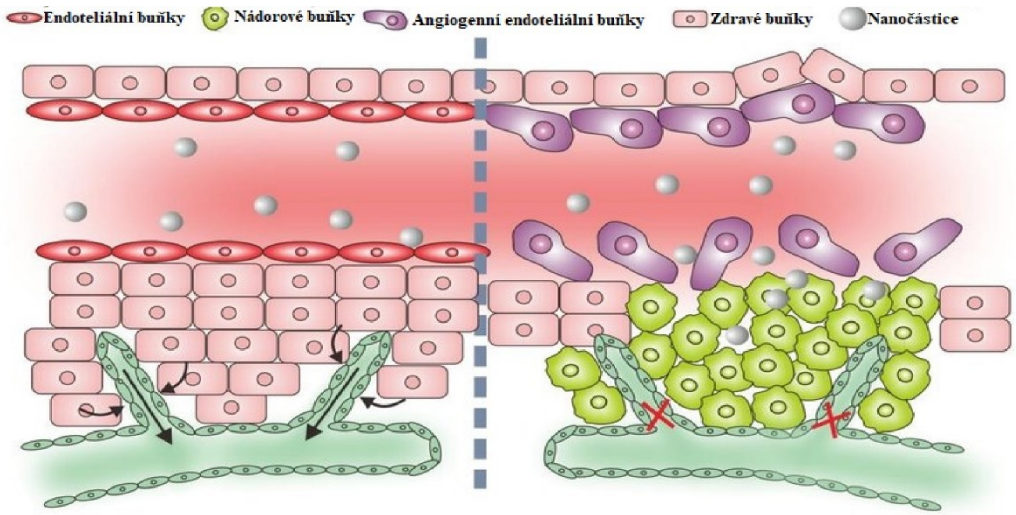
Jedinečné vlastnosti a faktory vaskulární patofyziologie pevných nádorů jsou:

a) Aktivní angiogeneze a vysoká vaskulární hustota.

b) Rozsáhlá produkce vaskulárních mediátorů, které usnadňují extravazaci (bradykinin, oxid dusnatý, VPF/VEGF, prostaglandiny, kolagenasa, proxydusitan).

c) Vadná vaskulární architektura jako nedostatek buněk vrstvy hladkého svalstva, nedostatek receptorů pro angiotenzin II, velká mezera ve spojení endoteliálních buněk, anomální konformace vaskulatury nádoru.

d) Zhoršená lymfatická clearance makromolekul a lipidů z intersticiální tkáně. [12, 14]



Obr. 1 EPR efekt: vlevo je znázorněn zdravý cévní systém s fungujícím lymfatickým systémem, vpravo je znázorněn pevný nádor, kde jsou angiogenní endoteliální buňky tvořící nepravidelnou výstelku cévy, a nefunkční lymfatický systém, díky čemu se v pevném nádoru zadržují nanosystémy. Převzato a upraveno z [2].

Navzdory zvýšenému intersticiálnímu tlaku v nádorové tkáni bylo experimentálně dokázáno, že se velké molekuly hromadí v nádorové tkáni. Póry mezi endotelovými buňkami v permeabilizované nádorové vaskularitě mají velikost přibližně 200 až 800 nm, což umožňuje průnik a akumulaci nanočástic v nádorovém mikroprostředí. Nejčastěji používaná DDS jsou obyčejně navržena tak, aby měla průměr 10 až 100 nm [2, 14].

I když se použitím DDS při léčbě pevných nádorů zvyšuje bezpečnost, ne vždy dochází ke zlepšení účinnosti v porovnání s podáváním samotného nízkomolekulárního léčiva. Zvýšená vaskulární hustota pevných nádorů, oproti zdravým tkáním, nastává v raných fázích a je klíčovým faktorem růstu nádorů. Růstem nádorů dochází ke zvýšené koagulaci krve, což vede k okluzi a ucpávání nádorových cév. Kyslík a živiny nejsou dostatečně dopravovány a nádorová

tkáň se stává silně hypoxickou, část nádorové tkáně začne odumírat a stává se avaskulární, což vede ke zhoršení EPR efektu [2, 14].

Kvůli těmto omezením jsou studovány nové možnosti aplikace polymerních nosičů léčiv využívající EPR efekt, které spočívají v současném podání molekul generující oxid dusnatý (nitroglycerin, hydroxymočovina, L-arginin) a DDS, což vede k zesílení EPR efektu a zvýšení akumulace DDS v pevném nádoru [16].

1.3 Vstup polymerních konjugátů do nádorových buněk a uvolnění léčiva z kopolymeru

Polymerní konjugáty nemohou procházet přes cytoplazmatickou membránu prostou difuzí, ale vstupují do buněk pomocí endocytárních cest [4, 5]. V poslední době se výzkum navíc zaměřuje na identifikaci různých cest vstupu do buňky s cílem dopravit léčivo do kompartmentů odlišných od lysozomů/endozomů. Tento způsob by mohl vést k vývoji účinnějších DDS vzhledem k tomu, že aktivita mnoha léčiv závisí právě na subcelulárním zacílení, například do mitochondrií nebo jádra buňky. Pro vstup do jádra jsou účinné přístupy zprostředkované pomocí receptorů steroidních hormonů, které procházejí z cytoplazmy do jádra [17]. Mitochondriální cílení je zprostředkované delokalizovanými hydrofobními kationty, mezi něž patří například trifenylfosfonium (TPP) [18]. V případě, že polymerní konjugát není cílen vůči konkrétní buněčné organele nebo jiné části, dochází k uvolnění léčiva z polymerního nosiče v lysozomu, a to většinou buď pomocí působení lysozomálních enzymů, nebo kyselou hydrolýzou.

1.3.1 Polymerní konjugáty s léčivem vázaným enzymaticky štěpitelnou spojkou

Jako spojku vázající léčivo k polymernímu nosiči lze použít oligopeptidové spojky, které jsou stabilní v krevním séru a plazmě, a zároveň jsou vhodnými substráty pro lysozomální enzymy, např. katepsiny [5, 19]. Na základě podrobných studií byla vybrána sekvence aminokyselin GlyPheLeuGly jež byla testována i v klinických studiích s DDS nesoucí cytostatika doxorubicin, paklitaxel, či karboplatina [20]. Použity byly i jiné enzymaticky štěpitelné spojky, GlyGlyGly-aminomalonát či GlyAcapGly jež byly také klinicky testovány, [23].

1.3.2 Polymerní konjugáty s léčivem vázaným hydrolyticky štěpitelnou spojkou

Další z možností je využití pH-senzitivní spojky pro navázání léčiva. Tento přístup využívá rozdílných hodnot pH mezi krevní plazmou (pH 7,4) a pH lysozomů (pH ≈ 5-6) resp. nádorového mikroprostředí, které je mírně kyselé (pH ≈ 6,5). K uvolnění léčiva dochází převážně v mírně kyselém prostředí v endosomech a lysozomech nádorových buněk. K uvolnění léčiva ovšem může dojít i v mírně kyselém nádorovém mikroprostředí (pH obvykle kolem 6,5) [21, 22] V minulosti byly studovány především hydrazonová vazba, případně Shiffova báze. Výhodou hydrazonové vazby je její poměrně velká stabilita během transportu v krvi (pH 7,4). Hydrazonová vazba vzniká reakcí hydrazidové skupiny na polymeru s keto nebo aldehydovou skupinou na molekule léčiva. Tímto způsobem jsou syntetizovány například polymery na bázi HPMA s doxorubicinem, nebo pirarubicinem [4]. Pokud léčivo nemá přirozeně keto, nebo aldehydovou skupinu, může být modifikováno, a tato skupina může být do jeho struktury zavedena. To se týká i kyseliny betulinové, která přirozeně nemá keto skupinu a musí se tedy vhodně derivatizovat, čemuž se věnovala i práce Lomkové et al., na kterou táto práce navazuje [24].

Kromě hydrazonové vazby lze použít i vazbu přes Shiffovu bázi, která je podobně jako hydrazonová vazba, poměrně stabilní při pH krve a hydrolyzuje se při nižším pH (5-6). Syntetizuje se kondenzací keto, nebo aldehydové skupiny s amino skupinou. Takto byly například připraveny polymerní konjugáty polyethylenglykolu (PEG) s doxorubicinem nebo glycidyl metakrylát s lineárním PEG [25].

1.4 Vylučování polymerních nosičů z organizmu

Po dosažení místa účinku a uvolnění léčiva by v ideálním případě mělo dojít k vyloučení polymerního nosiče z organizmu. V případě cílení na pevné nádory, u kterých chybí lymfatický systém, cirkuluje polymerní nosič v krevním řečišti a je vyloučen renálním systémem. Pro polymerní nosiče na bázi HPMA kopolymerů se limit renální filtrace pohybuje okolo 50 000 g/mol, což odpovídá hydrodynamickému průměr přibližně 10 nm [26, 27].

Přesahuje-li polymerní systém tuto hranici je vyloučen stolicí. Tento způsob vylučování ovšem může trvat i několik měsíců, a z hlediska možného hromadění nosiče v organizmu, nebo s ohledem na vedlejší účinky, není pro léčbu vhodný. Navíc polymery, které se nevylučují z organizmu by neobstály při procesu schválení pro klinickou praxi [26]. Přesto jsou popsány

polymerní nosiče přesahující limit renální filtrace. Vyloučitelnost těchto vysokomolekulárních systémů, je zajištěna například přítomností degradovatelných spojek v hlavním řetězci těchto polymerů. Jedná se především o hvězdicové, di-blokové anebo micelární systémy [28]. Výhodou těchto biodegradovatelných vyskomolekulárních polymerních nosičůje vysoký záchyt v pevných nádorech díky EPR efektu.

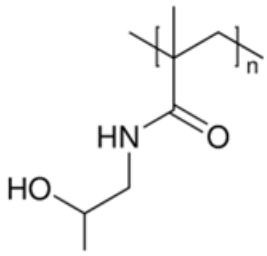
1.5 Polymerní nosiče léčiv

Jedním z prvních polymerů, který byl použit jako nosič léků, byl PEG. Jedná se o syntetický a zároveň hydrofilní polymer, jehož výhody spočívají ve zvýšení stability a rozpustnosti léčiva, prodloužení poločasu rozpadu, zlepšení biodistribuce a snížení imunogenicity. Vzhledem ke značnému rozšíření PEG včetně oligomerních forem, byl popsány různé imunitní reakce. Produkce protilátek proti PEG je již dnes běžně uznávaná vědeckou komunitou. Přesto se stále běžně používají zejména pro ochranu proteinů, liposomů apod. Proto se hledají alternativy k PEG, které by nebyly imunogenní [29].

Dalším příkladem hydrofilních polymerních nosičů jsou polyoxazoliny, které jsou oproti PEG méně imunogenní, stabilnější při různém pH, a také chemicky variabilnější [30]. V neposlední řadě jsou využívány polymerní prekurzory na bázi vodorozpustných methakrylamidů, mezi než patří *N*-(2-hydroxypropyl)methalakrylamid a *N*-(1,3-dihydroxypropyl)methakrylamid, kterým se táto práce věnuje [26].

1.5.1 Kopolymery *N*-(2-hydroxypropyl)methalakrylamidu

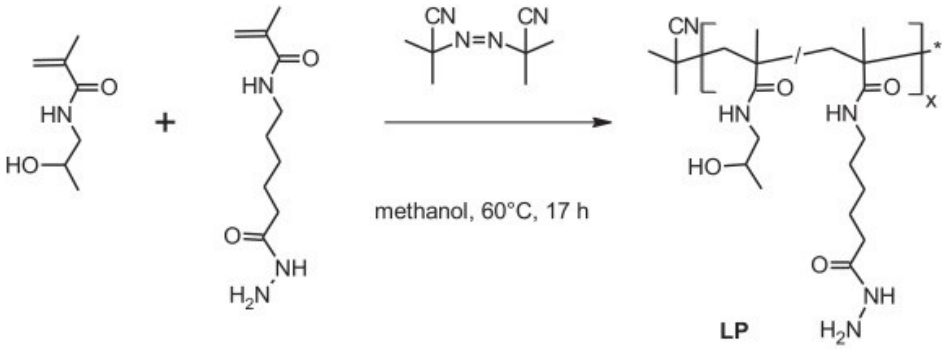
N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA, obr. 2) byl poprvé syntetizován v Praze v 70. letech za účelem vývoje biokompatibilních hydrofilních polymerů jako náhražka krevní plasmy. Struktura tohoto monomeru byla vybrána zejména pro hydrofilitu a biokompatibilitu získaných polymerů, ale také díky snadnosti připravit monomer o vysoké čistotě, protože ve srovnání s mnoha ostatními studovanými akrylamidy a methakrylamidy ochotně krystalizuje. *N*-substituce methakrylamidu na alfa uhlíku byla zvolena pro hydrolytickou stabilitu postranních řetězců [31].



Obr. 2 Polymer N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu

Další výhodou HPMA je možnost přípravy kopolymerů s vhodnými funkčními skupinami pro připojení léčiv, nebo jiných biologicky aktivních látek. Vazba léčiva na HPMA kopolymer může solubilizovat ve vodě nerozpustná léčiva, jako je právě betulinová kyselina, a tím zlepšit jejich farmakokinetiku [31].

Kopolymery lze připravovat volnou radikálovou polymerací (obr. 3), nicméně takto připravené kopolymery mají širokou distribucí molárních hmotností s disperzitou (*Đ*) obvykle nad 1,5, což může bránit případnému klinickému schválení připraveného DDS. S rozvojem moderních polymeračních technik, jako je polymerizace s reverzibilním adičně-fragmentačním přenosem řetězce (RAFT) (kap. 3.2, obr. 9), lze připravit lépe definované polymery s úzkou distribucí molárních hmotností (*Đ* kolem 1,1) [32].



Obr. 3 Schéma syntézy kopolymeru HPMA s monomerem nesoucím hydrazidovou skupinu volnou radikálovou polymerací.

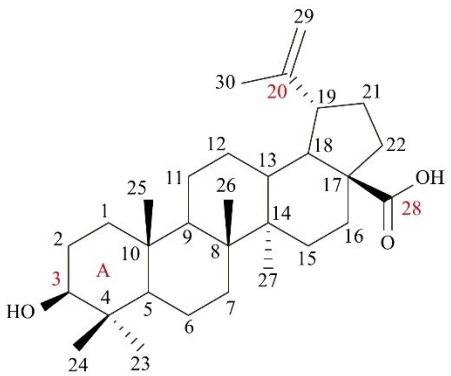
1.5.2 Kopolymery *N*-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)methakrylamidu

N-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)methakrylamid (DHPMA) se od HPMA liší dvěma primárními hydroxylovými skupinami namísto jedné sekundární. Polymerní konjugáty s léčivy na bázi DHPMA vykazují vyšší rozpustnost ve vodě, než analogické kopolymery na bázi HPMA. Díky tomu může být navýšen obsah hydrofobních léčiv při zachování zlepšení farmakokinetiky, prodloužené doby oběhu, či akumulace léčiva v pevném nádoru vlivem EPR efektu. Vyšší hydrofilita DHPMA, a tím i větší potenciál solubilizovat hydrofobní léčiva byla prokázána jak porovnáním Markových-Houwinkových parametrů pro DHPMA a HPMA, tak i porovnáním termoresponzivního chování polymerních konjugátů s hydrofobním léčivem, pirarubicinem [33, 34, 35].

V odborné literatuře jsou popsány polymerní konjugáty na bázi DHPMA s pirarubicinem vázaným acidolabilní hydrazonovou vazbou, či analogické enzymaticky štěpitelné diblokové kopolymery s doxorubicinem [34].

1.6 Kyselina betulinová a její deriváty

Kyselina betulinová (3β-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oová kyselina, BA, obr. 4) je pentacyklický triterpenoid, který se přirozeně vyskytuje v rostlinách a obvykle se izoluje z březové kůry. V rostlině je přítomná v glykosylované i aglykonové formě [36,37].



Obr. 4 Struktura kyseliny betulinové.

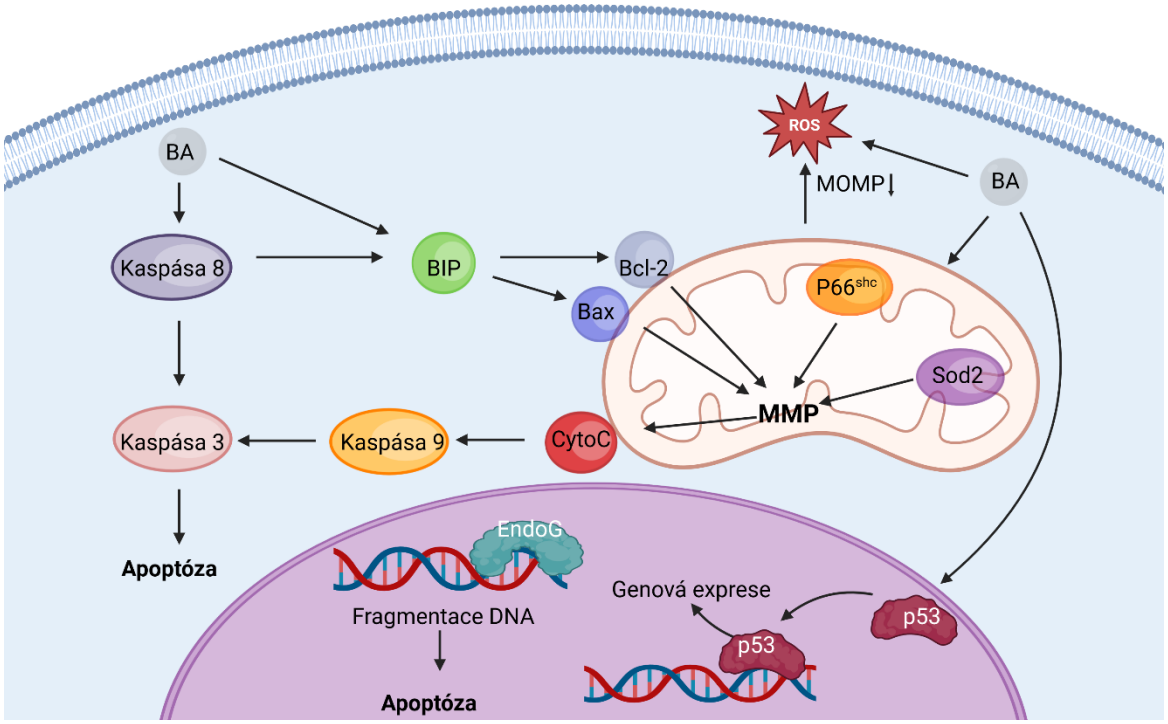
BA a její deriváty mají významnou biologickou aktivitu. Jsou popsány protinádorové, protizánětlivé, anti-HIV, antimalarické a antibakteriální účinky [38]. Protinádorová účinnost BA a jejích derivátů je studována zejména při léčbě melanomu, rakoviny prostaty, prsu, kolorektálního karcinomu a u rakoviny plic. BA má při potenciální chemoterapeutické léčbě výhodu, protože cytotoxický účinek na různé lidské nádorové buňky, je výrazně vyšší ve srovnání se cytotoxicitou na normálních (zdravých) buňkách [39]. BA už postoupila do klinického testování, jako cytostatikum [37].

1.6.1 Mechanismus cytotoxického účinku BA

Kyselina betulinová má hned několik mechanizmů cytotoxické aktivity a jedná se především o indukci mitochondriálního oxidačního stresu, regulaci buněčného cyklu a inhibici angiogeneze [38, 40].

Aktivace mitochondriálních drah

V důsledku buněčného dýchání jsou mitochondrie významným zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňce, jejichž akumulace úzce souvisí s buněčnou proliferací a apoptózou. Nadměrná produkce ROS může vést k oxidačnímu stresu, který způsobuje poškození DNA, proteinů nebo lipidů a vede k apoptopické nebo nekrotické buněčné smrti [41]. BA indukuje tvorbu ROS a snižuje vnější mitochondriální membránový potenciál (MMP). Přechodový pór mitochondriální membrány hraje důležitou roli při přenosu signálu apoptózy. Depolarizace mitochondriální membrány může nakonec aktivovat apoptotickou signální dráhu (viz. obr. 5) [40, 42, 43].



Obr.5 Schematický popis aktivace mitochondriální dráhy buněčné smrti pomocí BA:

Přítomnost BA vede ke snížení vnějšího membránového potenciálu (MMP), zvýšené produkci ROS a také zvyšuje hladinu proapoptických proteinů (Bax, kaspása 3, 8 a 9). Zkratky: Bcl-2 interagující protein (BIP), cytochrom C (CytoC), superoxiddismutasa 2 (Sod2), endonukleasa G (EndoG). Převzato a upraveno z [40].

Inhibice signálních drah STAT3

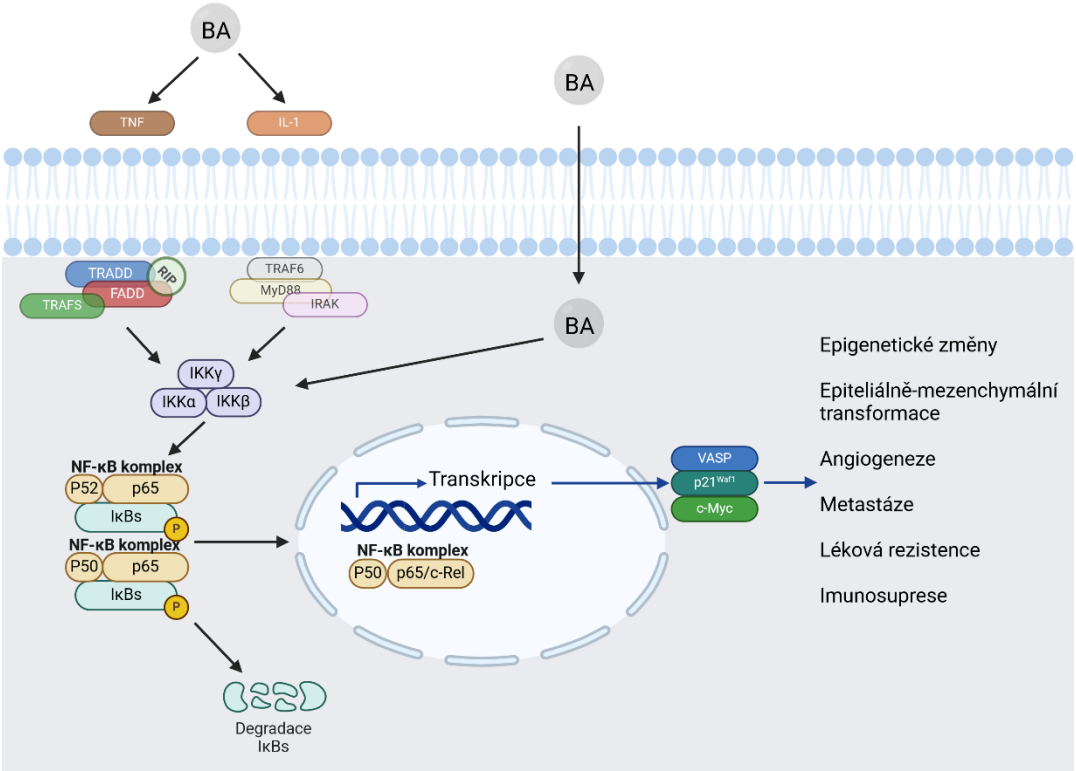
STAT3 je onkogen, který je běžně aktivován u různých druhů rakoviny a podílí se na diferenciaci, proliferaci, apoptóze, metastázách a angiogenezi. Jeho aktivace se podílí na řadě onemocnění jako je rakovina prsu, rakovina hlavy a krku, mnohočetný myelom, giberelinová leukémie, akutní myeloidní leukémie a jiné [44].

BA selektivně inhibuje dráhu STAT3, čímž omezuje proliferaci nádorových buněk. Mechanismus BA spočívá v blokaci vazebné aktivity STAT3/DNA [48, 49]. BA potlačuje vazbu STAT3 a hypoxií indukovatelného faktoru-1α na promotor VEGF za hypoxických podmínek a inhibuje tak angiogenezi karcinomu [45].

Inhibice signálních drah nukleárního faktoru κB (NF-κB)

Tato signální dráha je běžná u zánětu a rakoviny a hraje důležitou roli v regulaci buněčné proliferace a apoptózy [46]. Aktivace NF-κB bývá spuštěna lipopolysacharidem nebo některými zánětlivými cytokiny, jako je tumor nekrotizující faktor α (TNF-α) a interleukin-1 (IL-1) [47]. K aktivaci NF-κB dochází v nádorovém mikroprostředí většiny pevných a hematologických nádorů, což může způsobovat epigenetické změny, epiteliálně mezenchymální transformaci, angiogenezi, metastáze, lékovou rezistenci a imunosupresi [47].

BA může vést k apoptóze nádorových buněk snížením stability kinasy IKK-α [53]. BA může také snížit transkripční aktivaci NF-κB inhibicí expresi proteinu p65, čímž se sníží exprese vazodilatátorem simulovaný fosfoprotein (VASP). a podpoří apoptózu nádorových buněk (obr. 6) [49].



Obr. č. 6 Detailní popis inhibice signálních drah NF-κB pomocí BA: BA může přímo působit na komplex IKK, ovlivňovat aktivitu a fosforylaci proteinu IkB, čímž omezuje jadernou translokaci NF-kB/p65 a inhibuje jeho vazbu na DNA. Převzato a upraveno z [40].

Regulace růstu nádorových buněk pomocí transkripčních faktorů Sp

Sp patří do rodiny transkripčních faktorů a regulují nejen fyziologické procesy, jako je buněčný růst proliferace a diferenciace, ale také regulují patogenezi mnoha lidských onemocnění, včetně rakoviny a zánětu [50].

Inhibice Sp sníží expresi onkogenů, což vede k inhibici růstu nádorových buněk a zvýšení počtu buněk ve fázi G2/M. Aby došlo k zastavení buněčného cyklu, dochází k podpoře exprese kaspas a následné indukci apoptózy nádorových buněk [51].

1.6.2 Kombinace s jinými cytostatiky

Cytotoxický účinek BA může být významně podpořen kombinací s dalšími protinádorovými modalitami. Pozitivní výsledky byly prokázány zejména při kombinaci BA a mithramycinu A, která vedla k synergické inhibici růstu pankreatického karcinomu a potlačení angiogeneze [52]. Kombinace BA s cisplatinou vykázala schopnost indukovat apoptózu kolorektálních nádorových buněk [53]. Synergický efekt byl pozorován rovněž při kombinaci BA s ionizujícím zářením, zejména v modelu melanomu, kde BA potencovala antiproliferační účinek radioterapie a napomáhala indukci apoptózy [51]. Tyto výsledky ukazují, že BA nemusí působit jen sama o sobě jako protinádorová látka, ale může taky pomoct zlepšit účinek chemoterapie nebo ozařování v kombinaci s již zavedenými léčebnými postupy.

1.6.3 Deriváty kyseliny betulinové

Pro zlepšení rozpustnosti a terapeutické účinnosti BA bylo připraveno a testováno několik stovek derivátů BA. Místa pro modifikování BA jsou nejčastěji v pozicích C-1, C-2, C-3, C-4, C-20, C-28, a také na kruzích A, D a E. Z dostupných dat bylo vyvozeno několik závěrů:

a) Přítomnost halogenového substituentu v poloze C-2 zvyšuje cytotoxicitu
b) Modifikace v místě C-3 může být kritická pro cytotoxický účinek
c) Karboxylová skupina (v poloze C-28) je nezbytná pro cytotoxický účinek Nicméně amidový konjugát v této poloze zlepšil rozpustnost BA beze změny cytotoxicity
d) Přítomnost dvojné vazby mezi uhlíky C-20 a C-29 nevede k zvýšení cytotoxicity
e) Zvětšení kruhu A nemělo významný vliv na cytotoxickou aktivitu

V kapitole 1.3 bylo zmíněno, že zavedením molekuly TPP vede ke zvýšení akumulace v mitochondriích, které jsou zároveň i cílem působení cytotoxické aktivity BA. Z těchto důvodů

byly testovány deriváty BA s TPP. Zavedení jedné nebo dvou molekul TPP na C-2, C-30 nebo C-28 obvykle vedla ke zlepšení rozpustnosti a cytotoxicity BA [52]. Vzhledem k výše zmíněným závěrům je patrné, že v tomto případě modifikace karboxylové skupiny nesnížila cytotoxicitu, podobně jako přítomnost amidu v této poloze [53].

2 Cíle práce

1. Připravit polymerní nosičové systémy na bázi HPMA a DHPMA pro dopravu derivátů kyseliny betulinové do nádorových buněk.
2. Charakterizovat fyzikálně-chemické vlastnosti připravených konjugátů.
3. Stanovit biologickou aktivitu vybraných systémů *in vitro*.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

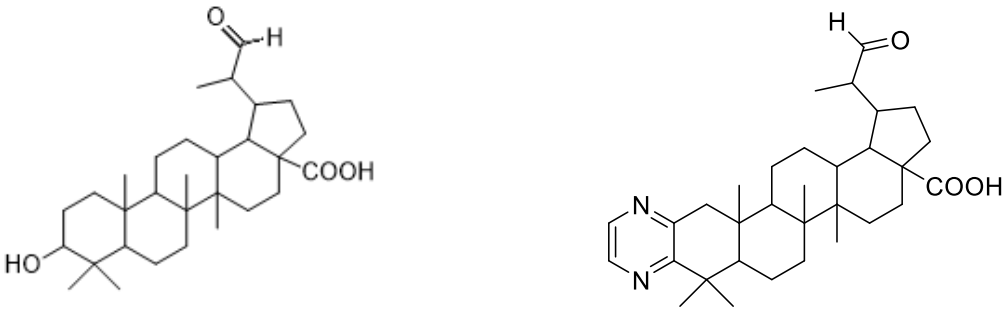
Chemikálie	Čistota	Výrobce
aceton	99,98 % sušený, destilovaný	Lach-Ner
acetonitril	99,95 % pro HPLC	VWR Chemicals
aminopropanol	>98 %	Sigma-Aldrich
2,2- azobis(isobutyro)nitril (AIBN)	rekrystalovaný	Wako Chemicals
2,2-azobis(4-methoxy-2,4-dimethyl)valeronitril (V-70)	≥ 98 %	Wako Chemicals
chlorid sodný	99,99%	Lach-Ner
1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO)	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
dibutylcíndilaurát (DBTL)	≥ 95 %	Sigma-Aldrich
dichlormethan	99,95%	Lach-Ner
diethylether	99,8 % sušený, destilovaný	Lach-Ner
dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	99,90%	VWR Chemicals
N,N-dimethylacetamid (DMA)	99,5 % extra suchý	Acros Organics
dimethylsulfoxid	99,9 % bezvodý	Sigma-Aldrich
fenylisokyanát	≥ 99 %	Fluka
fluorenylmethyloxykarbonylchlorid (Fmoc-Cl)	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
hydrogenfosforečnan disodný dihydrát	100%	VWR Chemicals
kyselina octová	99,98%	Lach-Ner
kyselina trifloroctová (TFA)	≥ 99 %	Iris Biotech
methanol (MeOH)	bezvodý	Macron Fine Chemicals
poly(N,N-dimetylakrylamid) (PDAM)	≥ 99 %	Sigma-Aldrich

terc-buthanol (*t*-BuOH)	99,5 % pro analýzy	Acros Organics
terc-butyl (3-methacrylamidopropyl)carbamate (MA-Pr-NH-Boc)	99%	Polysciences
tetraboritan sodný	99,5%	Fluka Biochemika
tetramethylsilane	99%	Sigma-Aldrich
2,4,6-trinitrobenzensulfonová kyselina (TNBSA)	≥ 98 %	Sigma-Aldrich

3.2 Syntetické postupy

3.2.1 Syntéza derivátů

Deriváty kyseliny betulinové dBA1 (30-oxodihydrobetulínová kyselina) a dBA2 (30-oxo-3-(pyrazin-4-yl)dihydrobetulínová kyselina) byly syntetizovány ve skupině prof. Milana Urbana na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci (obr. 7).



Obr. 7 Struktura derivátů betulinové kyseliny dBA1 (vlevo) a dBA2 (vpravo).

3.2.2 Syntéza monomerů

Monomery *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA) [55], *N*-(*terc*-butoxykarbonyl)-*N′*-(6-methakrylamidopropanoyl)hydrazin (Ma-βAla-NHNH Boc) [56] *N*-(*terc*-butoxykarbonyl)-*N′*-(6-methakrylamidohexanoyl)hydrazin (Ma-Ah-NHNH-Boc) [54] a *N*-(1,3-dihydroxypropyl)methakrylamid (DHPMA) [55] byly syntetizovány na oddělení Biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR podle již publikovaných postupů.

3.2.3 Syntéza přenosového činidla (CTA)

Přenosové činidlo S-2-kyano-2-propyl-S′-ethyltrithiokarbonát (TTC-AIBN) bylo syntetizováno na oddělení Biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR podle již publikovaného postupu [57].

3.2.4 Syntéza polymerních prekurzorů

Pro přípravu polymerních konjugátů s deriváty kyseliny betulinové bylo použito několik polymerních prekurzorů na bázi HPMA a DHPMA, které se lišily typem postranní reaktivní

skupiny (–$NHNH_2$ nebo –NH_2) a spojkou mezi hydrazidovými skupinami a polymerním řetězcem. V dalším textu jsou tyto polymerní prekurzory označeny jako P1–P5:

P1 a P2 představují polymery na bázi HPMA nebo DHPMA s navázanými hydrazidovými skupinami spojku tvořenou β-alaninem, P3 a P4 jsou rovněž polymery na bázi HPMA resp. DHPMA obsahují ale spojku na bázi 6-aminohexanové kyseliny zakončenou hydrazidovou skupinou a konečně P5 zakončený primární aminoskupinou místo hydrazidové. Všechny polymery byly připraveny v rámci spolupráce na ÚMCH AV ČR a v následujících odstavcích je popsán jejich postup přípravy.

3.2.4.1 Syntéza polymerního prekurzoru na bázi HPMA s hydrazidovými skupinami

Monomery HPMA (500 mg; 3,50 mmol) a Ma-βAla-NHNH-Boc (80 mg; 0,3 mmol) pro P1, resp. Ma-Ah-NHNH-Boc (95 mg; 0,31 mmol) pro P3, byly rozpuštěny v 5 ml směsi tBuOH a DMA (90:10 v:v) s přídavkem azo-iniciátoru V-70 (2,32 mg; 7,6 µmol) a přenosového činidla TTC-AIBN (3,40 mg; 15,2 µmol). Molární poměr monomer:CTA:V-70 pro polymerní prekurzor byl 250:1:0,5. Molární poměr DHPMA k Ma-βAla-NHNH-Boc, resp. Ma-Ah-NHNH-Boc byl 11,5:1 pro P1, resp. pro P3. Směs byla probublána argonem po dobu 10 minut, následně byla ampule uzavřena a směs byla ponechána k polymeraci po dobu 24 hodin při teplotě 40 °C.

Po polymeraci byla reakční směs vysrážena do směsi acetonu a diethyletheru (2:1, v:v), po centrifugaci byl supernatant odstraněn a sraženina byla vyčištěna rozpuštěním ve 400 µl MeOH a následným vysrážením do směsi aceton a diethylether (2:1, v:v). Po centrifugaci a odstranění supernatantu byla sraženina předsušena argonem a dosušena v exikátoru za sníženého tlaku. Bylo získáno 346 mg produktu ve formě nažloutlého prášku odpovídajícího výtěžku 69,2 % pro P1, resp. 423 mg (76,0 %) pro P3.

Po syntéze bylo potřeba odstranit koncové TTC skupiny, což bylo provedeno reakcí 345 mg resp. 422 mg polymeru se 70 mg AIBN v 2,5 ml DMA při 80 °C (3 h). Směs byla po reakci vysrážena a čištěna, obdobně, jak je uvedeno v předchozím odstavci. Bylo získáno 235 mg produktu ve formě bílého prášku odpovídajícího výtěžku 67,9 % pro P1, resp. 305 mg (72,3 %) pro P3.

Následně byly odstraněny Boc skupiny chránicí hydrazidy, což bylo provedeno rozpuštěním 234 mg resp. 305 mg polymeru v 6 ml destilované vody a ponecháním v olejovém

termostatu při 100 °C po dobu jedné hodiny. Produkt byl izolován lyofilizací. Bylo získáno 168 mg produktu ve formě bílého lyofilizátu odpovídajícího výtěžku 71,8 % pro P1 (obr. 9), resp. 258 mg (84,7 %) pro P3.

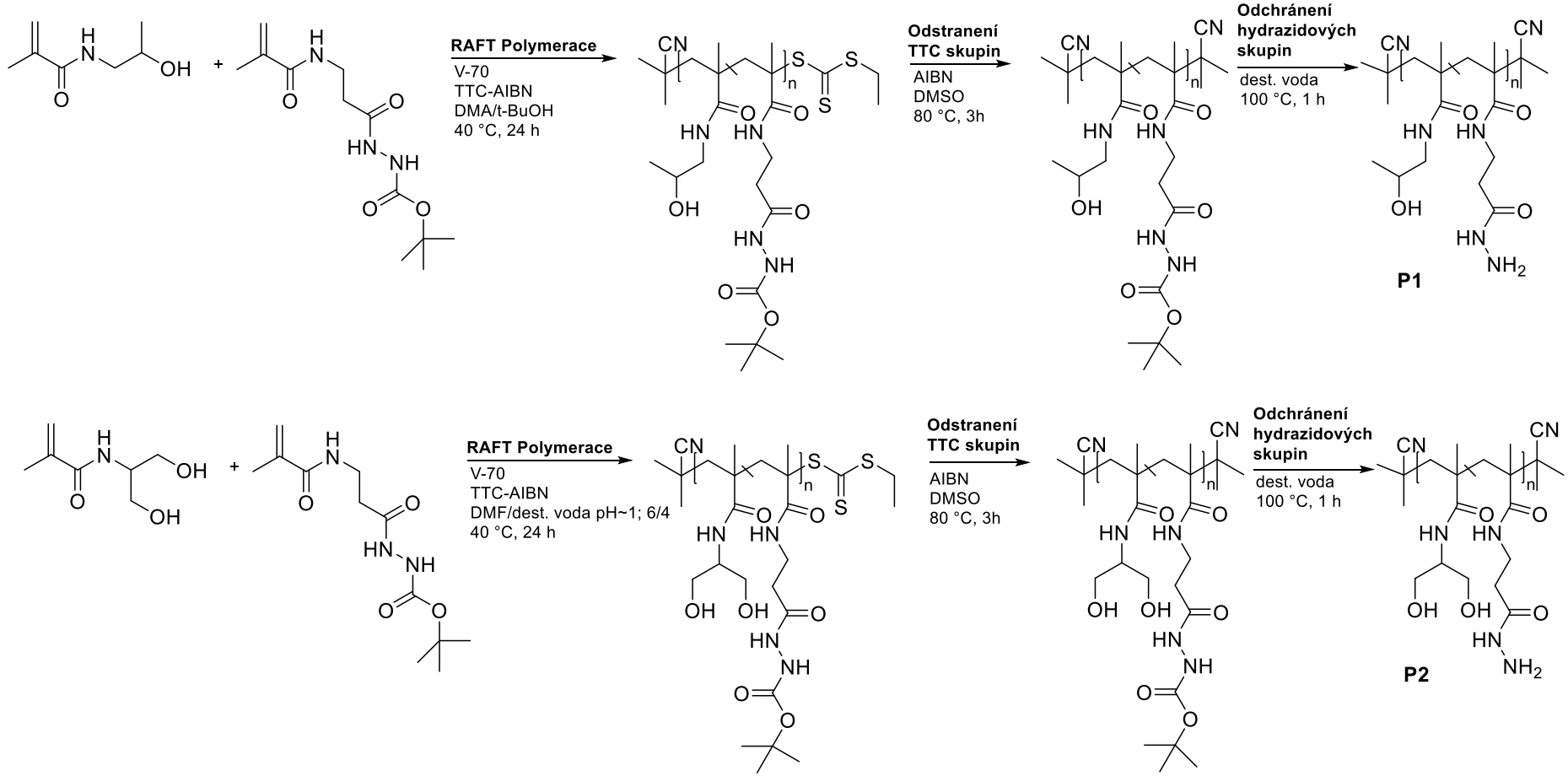
3.2.4.2 Syntéza polymerního prekurzoru na bázi DHPMA s hydrazidovými skupinami

Monomery DHPMA (500 mg; 3,50 mmol) a Ma-βAla-NHNH-Boc (80 mg; 0,3 mmol) pro P2, resp. Ma-Ah-NHNH-Boc (85,7 mg; 0,3 mmol) pro P4, byly rozpuštěny v 5 ml směsi tBuOH a DMA (90:10 v:v) s přídavkem azo-iniciátoru V-70 (2,32 mg; 7,6 µmol) a přenosového činidla TTC-AIBN (3,40 mg; 15,2 µmol). Molární poměr monomer:CTA:V-70 pro polymerní prekurzor byl 250:1:0,5. Molární poměr DHPMA k Ma-βAla-NHNH-Boc, resp. Ma-Ah-NHNH-Boc byl 11,5:1 pro P2, resp. pro P4. Směs byla probublána argonem po dobu 10 minut, následně byla ampule uzavřena a směs byla ponechána k polymeraci po dobu 24 hodin při teplotě 40 °C.

Po polymeraci byla reakční směs vysrážena do směsi acetonu a diethyletheru (2:1, v:v), po centrifugaci byl supernatant odstraněn a sraženina byla vyčištěna rozpuštěním ve 400 µl MeOH a následným vysrážením do směsi aceton a diethylether (2:1, v:v). Po centrifugaci a odstranění supernatantu byla sraženina předsušena argonem a dosušena v exikátoru za sníženého tlaku. Bylo získáno 346 mg produktu ve formě nažloutlého prášku odpovídajícího výtěžku 69,2 % pro P2, resp. 562 mg (94,0 %) pro P4.

Odstranění koncových TTC skupin, bylo provedeno reakcí 345 mg resp. 563 mg polymeru se 70 mg AIBN v 2,5 ml DMSO při 80 °C (3 h). Směs byla po reakci vysrážena a čištěna, obdobně, jak je uvedeno v předchozím odstavci. Bylo získáno 235 mg produktu ve formě bílého prášku odpovídajícího výtěžku 67,9 % pro P2, resp. 382 mg (68,0 %) pro P4.

Následně byly odstraněny Boc skupiny chránicí hydrazidy, což bylo provedeno rozpuštěním 234 mg resp. 380 mg polymeru v 6 ml destilované vody a ponecháním v olejovém termostatu při 100 °C po dobu jedné hodiny. Produkt byl izolován lyofilizací. Bylo získáno 168 mg produktu ve formě bílého lyofilizátu odpovídajícího výtěžku 71,8 % pro P2 (obr. 8), resp. 286 mg (75,3 %) pro P4.



Obr. 8 Schéma syntézy polymerních prekurzorů P1 a P2

3.2.4.3 Syntéza polymerního prekurzoru na bázi HPMA s amino skupinami

Monomery HPMA (466 mg; 3,26 mmol) a Ma-Pr-NH-Boc (59 mg; 0,25 mmol) byly rozpuštěny v 5 ml směsi tBuOH a DMA (85:15, v:v) s přídavkem azo-iniciátoru V-70 (1,80 mg; 5,8 µmol) a přenosového činidla TTC-AIBN (2,4 mg; 11,7 µmol). Molární poměr monomer:CTA:V-70 pro polymerní prekurzor byl 300:1:0,5. Molární poměr HPMA k Ma-Pr-NH-Boc byl 93:7. Směs byla probublána argonem po dobu 10 minut, následně byla ampule uzavřena a směs byla ponechána k polymeraci po dobu 20 hodin při teplotě 40 °C. Po polymeraci byla reakční směs vysrážena do směsi acetonu a diethyletheru (2:1, v:v), po centrifugaci byl supernatant odstraněn a sraženina byla vyčištěna rozpuštěním ve 400 µl MeOH a následným vysrážením do směsi aceton a diethylether (2:1, v:v). Po centrifugaci a odstranění supernatantu byla sraženina předsušena argonem a dosušena v exikátoru za sníženého tlaku. Bylo získáno 370 mg produktu ve formě nažloutlého prášku odpovídajícího výtěžku 70 %.

Odstranění koncových TTC skupiny, což bylo provedeno reakcí 368 mg polymeru se 70 mg AIBN v 2,5 µl DMA při 80 °C (3 h). Směs byla po reakci vysrážena a čištěna, obdobně, jak je uvedeno v předchozím odstavci. Bylo získáno 275 mg produktu ve formě bílého prášku odpovídajícího výtěžku 74,6 %.

Následně byly odstraněny Boc skupiny chránící aminoskupiny, což bylo provedeno rozpuštěním 273 mg polymeru v xx ml destilované vody při 150 °C po dobu 2 hodin. Produkt byl izolován lyofilizací. Bylo získáno 198 mg produktu ve formě bílého lyofilizátu odpovídajícího výtěžku 72,4 %.

3.2.5 Navazování derivátů kyseliny betulinové na kopolymery

Konjugáty P1-dBA1 (obr. 9), P2-dBA1 (obr. 9), P3a-dBA1, P3b-dBA1, P4a-dBA1 a P4b-dBA1 byly připraveny reakcí příslušného polymerního prekurzoru (P1–P4) s derivátem betulinové kyseliny dBA1. Reakce probíhala za vzniku pH-citlivé hydrazonové vazby mezi hydrazidovými skupinami polymeru a aldehydovou skupinou derivátu dBA1. Přehled použitých polymerních prekurzorů, obsahu reaktivních skupin a podmínek syntézy je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled použitých polymerních prekurzorů, procentuální obsah, a podmínky syntézy pro navazování derivátů kyseliny betulinové

Název	Polymer	Obsah hydrazidů [mol%]	Obsah dBA1 v reakční směsi [µmol]	Navážka dBA1 [mg]	wt% dBA1 v reakční směsi	Reakční podmínky*
P1-dBA1	HPMA-*co*-MA-βAla-$NHNH_2$	4,18	10,6	5	10	48 hod
P2-dBA1	DHPMA-*co*-MA-βAla-$NHNH_2$	4,71	10,6	5	10	48 hod.
P3a-dBA1	HPMA-*co*-MA-Ah-$NHNH_2$	11,9	10,6	5	10	96 hod
P3b-dBA1			5,3	2,5	5	
P4a-dBA1	DHPMA-*co*-MA-Ah-$NHNH_2$	10,9	10,6	5	10	96 hod.
P4b-dBA1			5,3	2,5	5	

* Všechny experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě

Polymerní prekurzory na bázi HPMA (P1, P3a a P3b) (50 mg) a derivát dBA1 byly rozpuštěny v MeOH (500 µl) a DMSO (10 µl). Po smíchání roztoků bylo přidáno 20 µl kyseliny octové. Po navazování byla reakční směs vysrážena do ethylacetátu, sraženina byla odstředěna a po odstranění supernatantu znovu rozpuštěna ve 400 µl MeOH. Směs byla znovu vysrážena do ethylacetátu, odstředěna, předsušena argonem a dosušena v exikátoru za sníženého tlaku.

Polymerní prekurzory na bázi DHPMA (P2, P4a a P4b) (50 mg), a derivát dBA1 byly rozpuštěny v DMSO (410 µl), a MeOH (100 µl). Po smíchání roztoků k nim bylo přidáno 20 µl kyseliny octové.

Po navazování byla reakční směs vysrážena do ethylacetátu, sraženina byla odstředěna a po odstranění supernatantu znovu rozpuštěna ve 400 µl DMSO. Poté byla směs znovu vysrážena do ethylacetátu, odstředěna a po odstranění supernatantu znovu protřepávána

v ethylacetátu, znovu odstředěna, předsušena argonem a dosušena v exikátoru za sníženého tlaku.

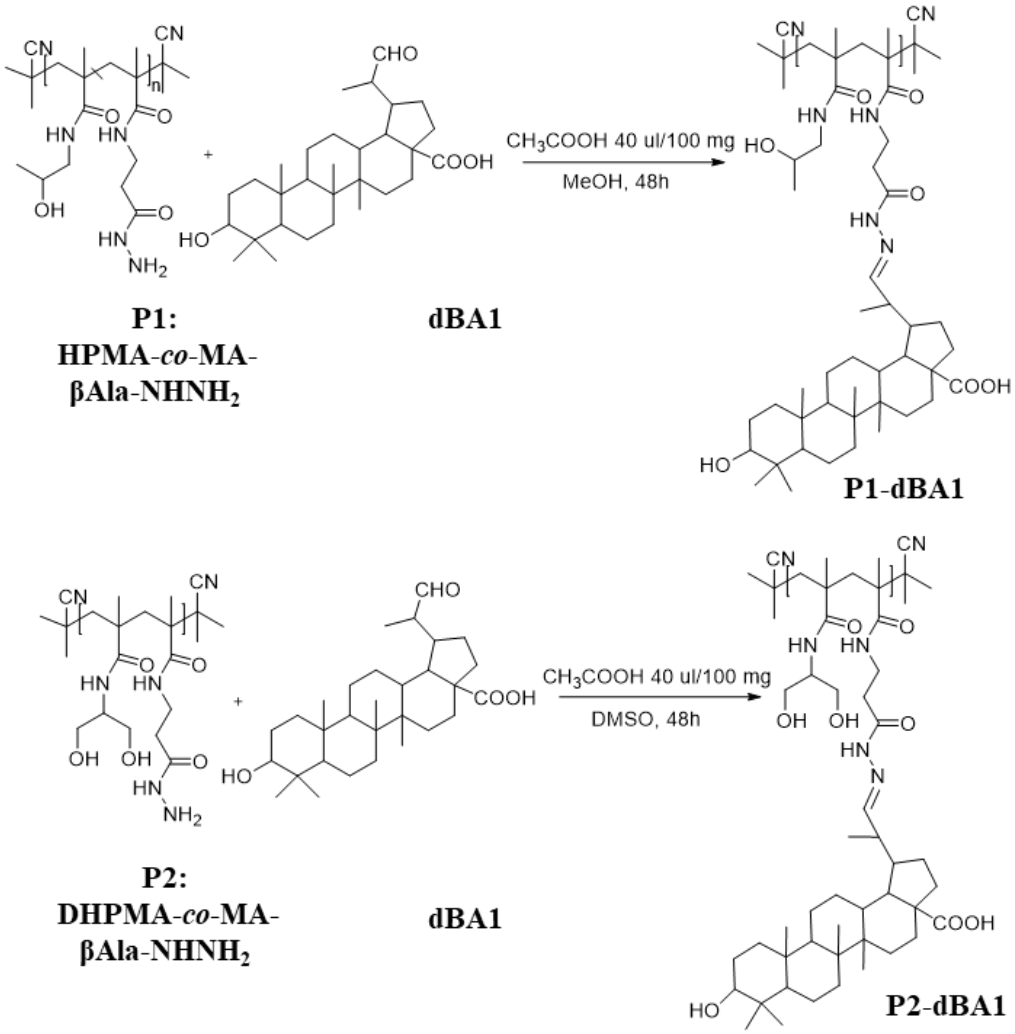
Konjugáty P5a-dBA1 a P5b-dBA2 byly připraveny reakcí amino skupiny polymerního prekurzoru P5 s aldehydovou skupinou derivátů dBA1 resp. dBA2. Přehled podmínek reakce je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Polymerní prekurzor s amino skupinami, procentuální obsah amino skupin na polymeru, a podmínky syntézy pro navazování derivátů kyseliny betulinové

Název	**Polymer**	**Derivát**	**Obsah aminoskupin [mol%]**	**Obsah dBA v reakční směsi [µmol]**	**Navážka dBA [mg]**	**wt% derivátu v reakční směsi**	**Reakční podmínky**
P5a-dBA1	HPMA-*co*-MA-Pr-NH_2	dBA1	4,7	8,5	4	8	72 hod lab.t.
P5b-dBA2		dBA2		13,7	7,5	15	72 hod 37 °C

Tento polymerní prekurzor (50 mg), derivát dBA1 a derivát dBA2 byly rozpuštěny v MeOH (300 µl) a DMSO (210 µl) resp. v MeOH (300 µl) a DMSO (200 µl). Po smíchání roztoků k nim bylo přidáno 20 µl kyseliny octové.

Po navazování byla reakční směs vysrážena do ethylacetátu, sraženina byla odstředěna a po odstranění supernatantu znovu rozpuštěna ve 400 µl DMSO. Směs byla znovu vysrážena do ethylacetátu, odstředěna a po odstranění supernatantu znovu protřepávána v ethylacetátu, znovu odstředěna, předsušena argonem a dosušena v exikátoru za sníženého tlaku.



Obr. 9 Schéma syntézy polymerních konjugátů P1-dBA1 a P2-dBA1

3.3 Použité přístroje

Centrifuga

Centrifuga 5430R od firmy Eppendorf (Německo) s rotorem F-35-6-30

(maximum otáček 7 830 ≅ 7 700 g).

Čtečka mikrotitračních destiček

Čtečka destiček Infinite M200Pro od firmy Tecan (Švýcarsko).

FT-IR spektroskop

Spektrometr Nicolet Nexus vybavený diamantovým krystalem s MMCT detektorem, měření bylo prováděno metodou ATR na GoldenGateTM (Wisconsin, USA).

Lyofilizátor

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

Nano-Zetasizer

Malvern Panalytical. Sběr dat a jejich vyhodnocení probíhalo v softwaru ZetaSizer Software 7.11. (Velká Británie)

Ramanův spektroskop

Spektrometr Renishaw inVia Quantor, vybavený detektorem Centurus CCT, s mřížkou 2400 linek/mm pro 532 nm diodové excitační lasery. (Velká Británie)

Rotační vakuová odparka

Systém G3 Heidolph s chladící jednotkou Heil-CHILL 350. (Německo)

Rozměrově vylučovací chromatograf

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

Rozměrově vylučovací chromatograf 2: od firmy Shimadzu (Japonsko) vybavený pumpou LC-40D, odplyňovačem DGU-403, kolonou TSK3000 SW od firmy Tosoh Bioscience (Japonsko), fotodiodovým detektorem SPD-M40 a dvěma detektory (rozptylový detektor Dawn 8 a koncentrační detektor Optilab) od firmy WYATT Technology (USA). Systém byl řízen jednotkou CBM-40. Záznam dat byl realizován softwary LabSolutions 5.97 a ASTRA 7.3.

UV-VIS spektrofotometr

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

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf

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

3.4 Charakterizace a analytické metody

3.4.1 Spektroskopické metody

3.4.1.1 UV-VIS spektroskopie pro stanovení obsahu hydrazidových skupin

Obsah hydrazidových a amino skupin byl stanoven spektrofotometricky. Vzorek kopolymeru byl rozpuštěn v borátovém pufru (c = 2 mg/ml, pH = 9,3). 100 µl tohoto roztoku bylo smícháno s 875 µl borátového pufru a k němu bylo přidáno 25 µl TNBSA. Referenční roztok byl připraven smícháním 975 µl borátového pufru a 25 µl TNBSA.

Po promíchání byly roztoky inkubovány 1 hod při laboratorní teplotě a pak byla změřena absorbance při vlnové délce 500 nm. Pro výpočet obsahu hydrazidů byl použit vzorec (3.1), kde byl použit molární absorpční koeficient ε_{500} = 17 200 l/mol·cm.

$$n_{hydrazidů} \frac{100}{\frac{\frac{\varepsilon \times c \times l}{A} - M_H}{M_{HPMA}} + 1} \quad (3.1)$$

ε molární absorpční koeficient [$l/mol \cdot cm$]

c koncentrace polymeru [*mg/ml*]

l optická dráha kyvety [*cm*]

A absorbance roztoku polymeru

M_H molární hmotnost monomeru s hydrazidy [*g/mol*]

M_{HPMA} molární hmotnost monomeru HPMA [*g/mol*]

3.4.1.2 Ramanova a FT-IR spektroskopie

Experiment Ramanovy spektroskopie byl proveden s mřížkou 2400 linek/mm pro 532 nm. Každý vzorek byl měřen na několika místech pro posouzení homogenity vzorku. FTIR spektra byla zaznamenána se spektrálním rozlišením 4 cm^{-1}, pro každé spektrum bylo vytvořeno 256 skenů. Pro tuto metodu byly připraveny 5 % roztoky konjugátů P1 a P2, derivátu dBA1 a kyseliny betulinové. Samotné měření a analýzu provedla kolegyně RNDr. Ivana Šeděnková, Ph.D.

3.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC byla použita pro kvantifikaci obou derivátů kyseliny betulinové (dBA1 a dBA2), pro stanovení jejich obsahu na polymerních konjugátech a pro hodnocení hydrolytické stability. Derivát dBA1 vyžadoval předkolonovou derivatizaci, zatímco dBA2 bylo možné analyzovat přímo pomocí UV detekce. Všechny analýzy byly prováděny na systému Agilent 1260 Infinity s použitím kolony Chromolith HighResolution RP-18e (100 mm × 4,6 mm). Mobilní fáze A sestávala z 95 % vody a 0,1 % kyseliny trifluoroctové (TFA), mobilní fáze B z 95 % acetonitrilu a 0,1 % TFA. Gradientový elučný program probíhal od 0 % do 100 % B během 5 minut, s průtokem 5 ml/min. Detekce byla prováděna buď pomocí UV detektoru nebo pomocí fluorescenčního detektoru v závislosti na typu derivátu.

Stanovení derivátu dBA1

Byly provedeny tři způsoby předkolonové derivatizace pro HPLC:

Fmoc-Cl derivatizace: Roztok dBA1 (1 mg/ml) byl smíchán s Fmoc-Cl (5,7 mg/ml v acetonitrilu) a inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Pro stabilizaci produktu bylo přidáno 20 µl 2-aminopropanolu a 40 µl mobilní fáze B. Detekce probíhala při 260 nm.

Fenylisokyanátová derivatizace: Reakční směs obsahovala dBA1, fenylisokyanát, DABCO a DBTL v acetonitrilu. Vzorky byly ponechány 10 minut při laboratorní teplotě. Detekce probíhala při 254 nm.

PDAM derivatizace (pro fluorescenční detekci): Nejlépe vyhovující metoda spočívala v derivatizaci pomocí pyrenyldiazomethanu (PDAM). Roztok dBA1 a PDAM (0,1 mg/ml, resp. 1 mg/ml v ethylacetátu) byly smíchány v poměru 1:1 a inkubovány při 50 °C po dobu 2 hodin. Detekce derivátu probíhala při λ_ex = 340 nm a λ_em = 395 nm. Tato metoda byla následně použita pro všechny analýzy polymerních konjugátů s dBA1.

Stanovení derivátu dBA2

Na rozdíl od dBA1 nebylo nutné derivát dBA2 derivatizovat před analýzou. Vzorky byly rozpuštěny v mobilní fázi B (1 mg/ml) a přímo aplikovány na kolonu. Detekce probíhala pomocí UV detektoru při 275 nm.

Kvantifikace obou derivátů (dBA1 i dBA2) probíhala pomocí kalibračních křivek sestavených z pěti standardních koncentrací v rozsahu 1–50 µg/ml. Všechny vzorky byly měřeny ve trojnásobné replikaci. Při stanovení v polymerních systémech byly použity polymerní prekurzory jako negativní kontrola.

3.4.2.1 Stanovení obsahu derivátů BA na polymerních konjugátech

Množství navázaného derivátu kyseliny betulinové bylo stanoveno po jeho uvolnění z polymerního nosiče. K tomu byly polymerní konjugáty (2 mg/ml) inkubovány ve vodném roztoku HCl (pH 1) po dobu 1 hodiny při 37 °C. V důsledku hydrolýzy vznikl volný derivát BA, který byl extrahován do dichlormethanu (600 µl) třepáním po dobu 20 minut. Po odpaření organické fáze byl zbytek upraven podle typu derivátu:

dBA1: zbytek byl derivatizován pomocí PDAM a analyzován metodou HPLC s fluorescenční detekcí (λ_ex = 340 nm, λ_em = 395 nm).

dBA2: zbytek byl rozpuštěn v mobilní fázi B a přímo analyzován pomocí HPLC s UV detekcí při 275 nm.

3.4.2.2 Stanovení hydrolytické stability konjugátů

Stabilita polymerních konjugátů byla hodnocena v prostředí simulujícím extracelulární (pH 7,4) a endozomální (pH 5,0) podmínky. Roztoky konjugátů (2 mg/ml) byly připraveny ve fosfátovém, resp. citrátovém pufru a inkubovány při 37 °C.

Vzorky byly odebírány v časových bodech 0, 1, 3, 5, 7, 10, 16 a 24 hodin. Z každého vzorku byl derivát BA extrahován do dichlormethanu (600 µl), fáze oddělena a odpařena. Deriváty byly pak analyzovány stejně, jako v přecházející kapitole.

3.4.2.3 Stanovení molární hmotnosti pomocí GPC

Hmotnostně průměrná molární hmotnost (M_w), početně průměrná molární hmotnost (M_n) a disperzita ($Đ$) připravených polymerních systémů byly zjišťovány pomocí rozměrově vylučovací chromatografie (GPC). Měření byla prováděna na zařízení Shimadzu, detekce zahrnovala refraktometr (RI), viskozimetr a rozptyl světla. Měření polymerních prekurzorů na bázi DHPMA byla provedena na koloně Superose-6-Increase 10/300 GL v mobilní fázi (0,05M fosfát, 0,15M NaCl, pH 7,4) s průtokem 0,5 ml/min a časem měření 100 min. Měření polymerních konjugátů na bázi HPMA byla provedena na koloně TSK 3000 SW v mobilní fázi (methanol: 0,3M octan sodný, 80:20, v:v, pH 6,5) s průtokem 0,5 ml/min a časem měření 45 min.

3.4.4 Stanovení hydrodynamického průměru pomocí DLS

Velikost polymerních agregátů byla měřena metodou dynamického rozptylu světla (DLS) na přístroji Malvern Zetasizer Nano. Vzorky byly rozpuštěny v 0,026 M roztoku NaCl a měřeny při 37 °C.

Na základě difuzního koeficientu byl vypočten hydrodynamický průměr (Rh) jednotlivých vzorků. Měření poskytlo informace o velikosti a homogenitě polymerních systémů, což je důležité pro posouzení jejich stability a biodistribuce.

3.4.5 Biologické testování

Cytotoxická aktivita byla testována na linii lidského karcinomu DLD-1. Buňky byly kultivovány v médiu RPMI-1640 (Sigma), které obsahuje 2 mM L-glutamin, 4500 mg/l glukosy, 10 mM HEPES, 1 mM pyruvát sodný, antibiotika penicilin a streptomycin a 10 % FBS. Buňky byly inkubovány při 37 °C a ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO_2. Před zahájením

testu byla ověřena životaschopnost buněk pomocí trypanové modři, přičemž viabilita vždy přesahovala 95 %.

Pro test cytotoxicity byly buňky nasazeny do 96-ti jamkových destiček (10 000 buněk/jamka) a kultivovány po dobu 24 hod před přidáním jak polymerních konjugátů P3a-dBA1, P5a-dBA1 a P5b-dBA2, tak i derivátů dBA1 a dBA2 samotných. Nejvyšší koncentrace jak samotných derivátů kyseliny betulinové, tak i jejich polymerních konjugátů (P3a-dBA1 P5a-dBA1) byla 760 µM, přičemž byla použita dvojková ředící řada. Nejvyšší koncentrace léčiva dBA2 konjugátu P5b-dBA2 byla 200 µM. Celkově bylo použito osm různých koncentrací pro jak pro samotné deriváty BA, tak i jejich polymerní konjugáty. Poté byly buňky inkubovány po dobu 72 hod a byla měřena jejich viabilita pomocí MTT eseje. Měření bylo provedeno v triplikátech.

4 Výsledky

4.1 Syntéza polymerních prekurzorů

V této práci byly syntetizovány kopolymery na bázi HPMA a DHPMA se spojkou na bázi β-alaninu (βAla) nebo kyseliny aminohexanové (Ah) zakončenou hydrazidem resp. amino skupinou, které byly později použity ke konjugaci s deriváty kyseliny betulinové. Všechny polymerní prekurzory byly syntetizovány pomocí RAFT-polymerace popsané v kapitole 3.2.

Molární hmotnosti spolu s hodnotami disperzity všech prekurzorů byly stanoveny pomocí rozměrově vylučovací chromatografie. Obsah hydrazidových skupin, na které se bylo později vázáno léčivo, byly stanoveny spektrofotometricky a velikost polymerních částic byla analyzována pomocí dynamického rozptylu světla Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 3 Fyzikálně-chemická charakterizace polymerních prekurzorů

Název	Polymer	M_w [g/mol]	Đ	$D_{h\ prekurzoru}$ [nm]	Obsah hydrazidů [mol%]	Obsah amino skupin [mol%]
P1	Poly(HPMA-*co*-MA-βAla-$NHNH_2$)	34 000	1,17	7,4	4,2	—
P2	Poly(DHPMA-*co*-MA-βAla-$NHNH_2$)	40 000	1,27	7,9	4,7	—
P3	HPMA-*co*-MA-Ah-$NHNH_2$	34 800	1,19	5,8	11,9	—
P4	DHPMA-*co*-MA-Ah-$NHNH_2$	34 500	1,12	4,9	10,9	—
P5	Poly(HPMA-*co*-MA-Pr-NH_2)	27 700	1,10	8,7	—	4,7

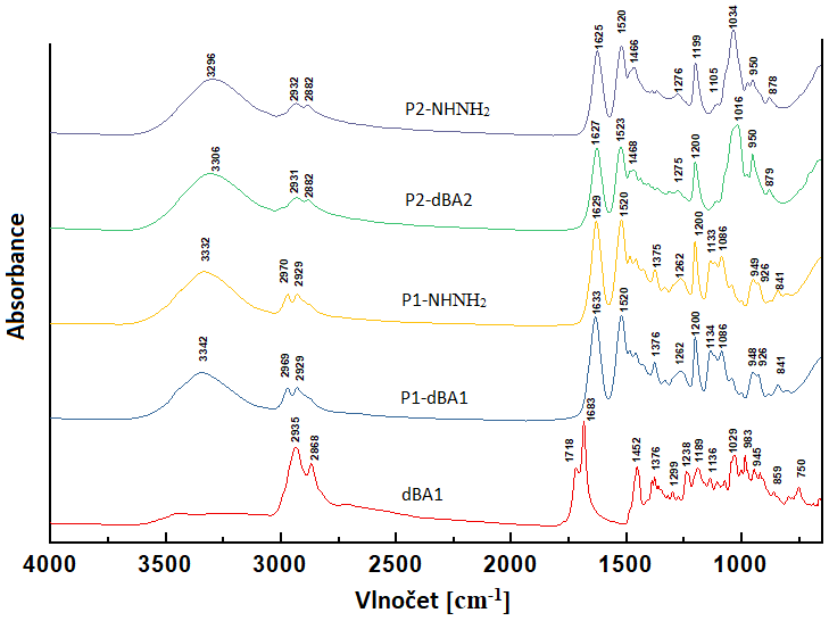
4.2 Analýza derivátu dBA1

Aby mohl být stanoven skutečný obsah léčiva dBA1 navázaného na kopolymer, musela být nalezena vhodná analytická metoda schopná toto léčivo detekovat. Samotný derivát dBA1

nemá absorbanci v UV-VIS spektru, ani nevykazuje fluorescenci. Pro analýzu byly tedy vybrány FT-IR a Ramanova spektrometrie, a následně předkolonová derivatizace a detekce pomocí HPLC.

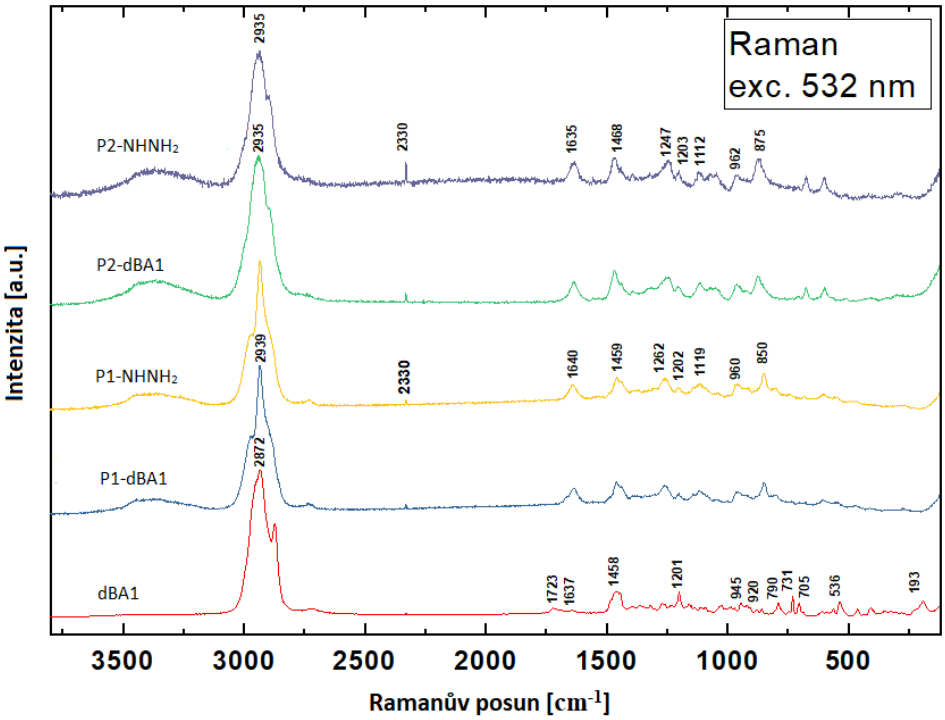
4.2.1 FT-IR a Ramanova spektroskopie

Pro FT-IR a Ramanovu spektroskopii byly vybrány konjugáty P1-dBA1 a P2-dBA1, jejich polymerní prekurzory a samotný derivát dBA1. Z grafu pro FT-IR (graf 1) je patrné, že ve spektru mezi prekurzorem a konjugátem není žádný rozdíl. Na spektrech konjugátů není patrný charakteristický pík jako u derivátu dBA1 v oblasti kolen 1683 cm^{-1}, což je pík odpovídající volné karboxylové skupiny. Pík v oblasti 1718 cm^{-1} odpovídá aldehydové skupině. Píky v kolem 1630 cm^{-1} odpovídají volným hydrazidům.



Graf 1 Záznam FT-IR spekter polymerních konjugátů P1-dBA1 a P2-dBA1 s léčivem dBA1, jejich polymerní prekurzory a samotné léčivo dBA1

Při záznamu z Ramanovy spektroskopie (graf 2) jsou valenční vibraceskupin primárních aminů v polymerech prezentovány ve spektrálním intervalu 3550 až 3250 cm^{-1} a deformační vibrace 1650 až1580 cm^{-1}. V žádné z těchto oblastí nebyly pozorovány změny po funkcionalizaci. Protože poloha prvního pásma (3550 až 3250 cm^{-1}), se překrývá s oblastí valenčních vibrací -OH skupi. A poloha druhého pásma (1650 až 1580)cm^{-1} se překrývá s polohou pásma amidu I. Konverze $-NH_2$ skupin pod detekčním limitem (asi 5 %) nelze vyloučit.



Graf 2 Záznam z Ramanovy spektroskopie polymerních konjugátů P1-dBA1 a P2-dBA1 s léčivem dBA1, jejich polymerní prekurzory a samotného léčiva dBA1

4.2.2 Předkolonová derivatizace dBA1

Jelikož z Ramanovy a FT-IR spektrometrie nebylo léčivo dBA1 na konjugátech viditelné byla zvolena další strategie, a to předkolonová derivatizace a následná detekce pomocí HPLC. Byly vyzkoušeny dvě molekuly cílící na volnou hydroxylovou skupinu (na pozici C-3) a to Fmoc-Cl a fenylisiokyanát. U těchto derivatizací ovšem nebyla pozorována žádná konverze. Je možné, že sekundární alkohol v molekule dBA1 je pro tyto reakce příliš stabilní.

Následně byla derivatizace cílena na karboxylovou skupinu (na pozici C-28) pomocí PDAM, která byla úspěšná. Poté byla vytvořena kalibrační křivka z roztoků derivatizovaného dBA1 o známých koncentracích, díky které mohl být spočítán celkový obsah dBA1 na konjugátech, a také proveden test hydrolytické stability.

4.3 Syntéza polymerních konjugátů s dBA1 a dBA2

Molární hmotnost a disperzita byly stanoveny pomocí rozměrově vylučovací chromatografie. Stanovení obsahu léčiva na polymerech bylo provedeno úplnou hydrolýzou derivátu dBA1 či

dBA2. Stanovení obsahu derivátu dBA1 bylo provedeno pomocí předkolonové derivatizace s PDAM pomocí HPLC. Stanovení obsahu derivátu dBA2 bylo rovněž měřeno pomocí HPLC, bez nutnosti derivatizace. Velikost polymerních částic byla analyzována pomocí dynamického rozptylu světla. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.4.

Tab. 4 Fyzikálně-chemická charakteristika polymerních konjugátů

Název	wt derivátu v reakci [%]	wt derivátu na konjugátu [%]	M_w konjugátu [g/mol]	Đ konjugátu	D_h konjugátu [nm]
P1-dBA1	10	5,5	37 000	1,33	8,2
P2-dBA1	10	3,8	47 000	1,10	9,3
P3a-dBA1	10	4,2	46 200	1,17	9,2
P3b-dBA1	5	2,3	45 000	1,18	9,0
P4a-dBA1	10	3,9	38 900	1,11	8,4
P4b-dBA1	5	2,4	41 000	1,11	6,7
P5a-dBA1	10	2,4	30 000	1,07	5,5
P5b-dBA2	15	1,0	27 000	1,06	5,2

Po navázání léčiva došlo u všech konjugátů k nárůstu střední molární hmotnosti i hydrodynamického poloměru oproti výchozím polymerům. Jak je ale z těchto výsledků patrné, konjugáty se mezi sebou celkem zásadně lišily obsahem léčiva. To bylo způsobeno neochotou léčiva vázat se na polymer, a to i za použití vyššího hmotnostního zlomku léčiva v reakci.

4.3.1 Hydrolytická stabilita polymerních konjugátů P1-dBAa1 až P4-dBA1

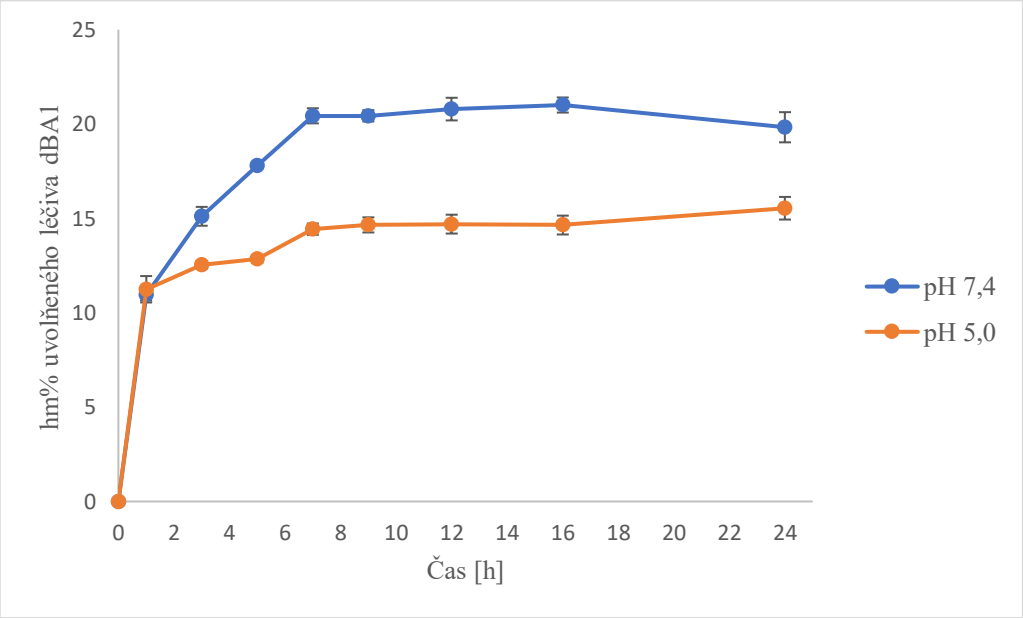
Léčivo Deriváty dBA1 a dBA2 se na hydrazidové skupiny polymerních prekurzorů vázaly aldehydovou skupinou za vzniku hydrazonové vazby. Ta je obvykle hydrolyzována v mírně kyselém prostředí za vzniku volného léčiva a polymerního prekurzoru. Nižší pH simuluje mikroprostředí pevného nádoru a také pH v lysozomech.

Konjugáty byly rozpuštěny v pufrech o pH 7,4 (PBS) a pH 5,0 (citrátový pufr); přičemž byla sledována rychlost hydrolýzy dBA1 a dBA2 v časech 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 16 a 24 hod. Přestože obvykle v podobných systémech dochází k rychlejší hydrolýze při nižším pH, v tomto případě nedošlo k žádné hydrolýze. Vazba aldehydu na hydrazidové skupiny za vzniku hydrazonové vazby je v našem případě velmi stabilní.

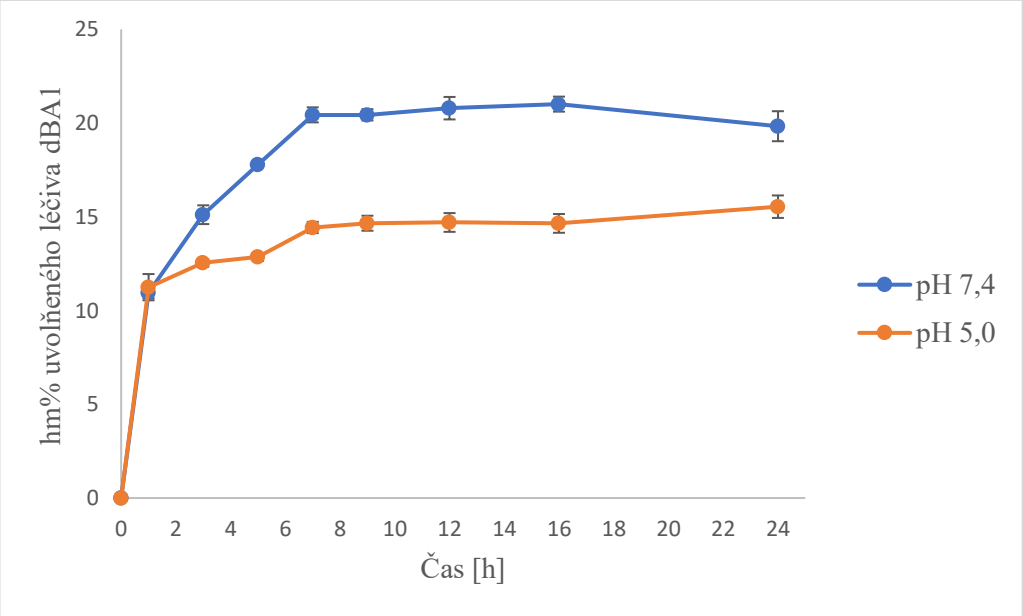
4.3.2 Hydrolytická stabilita polymerních konjugátů P5 s dBA1 a dBA2

Na rozdíl od výše uvedených polymerních systémů, u konjugátů P5 s dBA1 a dBA2 již docházelo k hydrolýze léčiva, a to jak při pH 5,0, tak i při pH 7,4. Z grafu 3 je patrné, že hydrolýza léčiva z konjugátu P5a-dBA1 není na pH velmi závislá, což není vhodné pro potenciálním použití. Systém navržen tak, aby docházelo k hydrolýze až uvnitř buněk v lysozomech (pH ~5) nebo v mikroprostředí pevného nádoru, které je charakteristické nižším pH okolo 6,5-6,8.

Hydrolytickou stabilitu konjugátu P5b-dBA2 s léčivem dBA2 nebylo možné stanovit, kvůli příliš nízkému obsahu navázaného léčiva. Uvolněné množství léčiva bylo pod detekčním limitem. Derivát dBA2 byl na konjugát P5b-dBA2 navázán na polymer prostřednictvím Schiffovy báze, obdobně jako dBA1 na P5a-dBA1. Při biologickém testování se na základě této podobnosti předpokládala obdobná hydrolytická stabilita.



Graf 3 Hydrolytická stabilita konjugátu P5a-dBA1 s léčivem dBA1

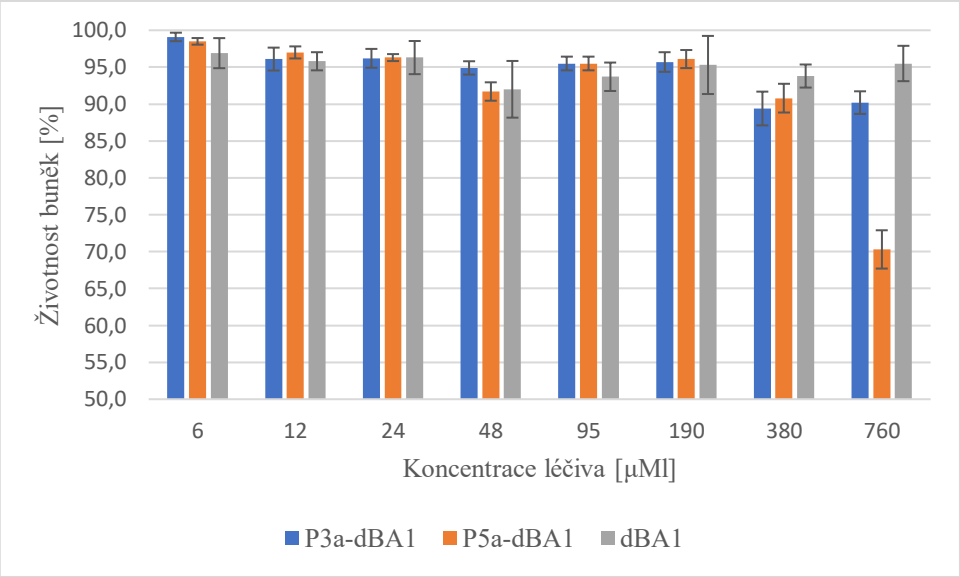


Graf 3 Hydrolytická stabilita konjugátu P5a-dBA1 s léčivem dBA1

4.4 Cytotoxická aktivita polymerních konjugátů na buňkách rakoviny lidského kolorekta DLD-1

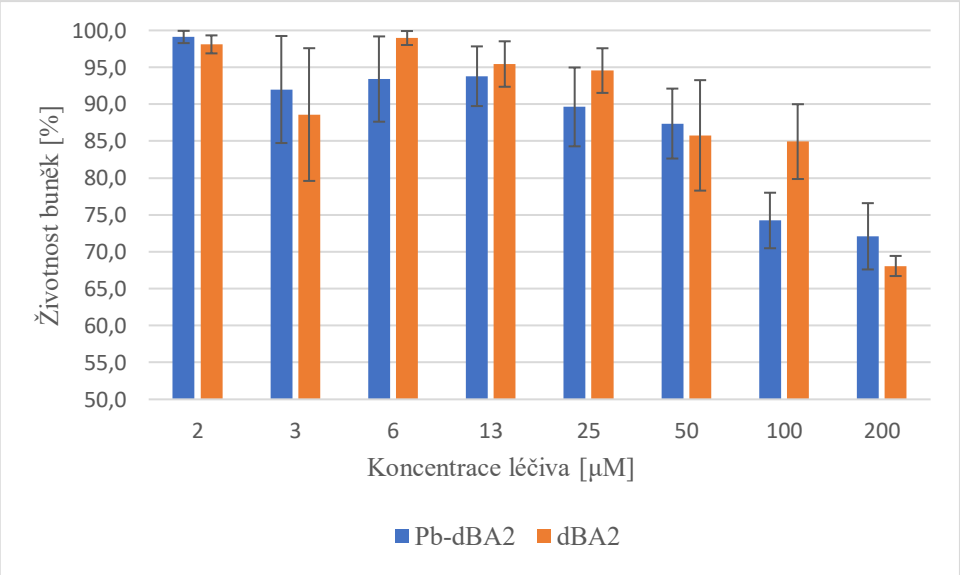
Jako biologický systém byly zvoleny buňky rakoviny lidského kolorekta DLD-1. Pro testování byly vybrány polymerní konjugáty P3a-dBA1, P5a-dBA1 (graf 4) a konjugát P5b-dBA2 (graf 5). Polymerní konjugáty P1-dBA1, P2-dBA1 a P4-dBA1 byly vyloučeny z dalšího testování, protože derivát dBA1 se z těchto polymerních konjugátů neuvolňuje. Konjugát P3a-dBA1 byl testován pro porovnání možné cytotoxické aktivity s konjugátem P5a-dBA1, u kterého již k hydrolýze léčiva dochází.

Inkubace buněk DLD-1 s polymerními konjugáty a samotným léčivem trvala 72 hod, při 37 °C. Maximální koncentrace léčiva jak samotného dBA1, tak dBA1 navázaného na polymerní konjugát P3a-dBA1 a P5a-dBA1 v inkubační směsi byla 760 µM.



Graf 4 Životnost buněk DLD-1 po inkubaci s léčivem dBA1 a polymerními konjugáty P3a-dBA1 a P5a-dBA1

Maximální koncentrace léčiva jak samotného dBA2, tak dBA2 navázaného na polymerní konjugát P5b v inkubační směsi byla 200 µM. Tato nižší koncentrace dBA2 byla zvolena z důvodu jeho nízkého obsahu na polymerním konjugátu.



Graf 5 Životnost buněk DLD-1 po inkubaci s léčivem dBA2 a polymerním konjugátem P5b-dBA2

5 Diskuze

Táto práce se věnovala přípravě a *in vitro* testování polymerních systémů na bázi methakrylamidů pro dopravu derivátů kyseliny betulinové. Vyvinuté polymerní systémy jsou určeny pro cílenou léčbu rakoviny.

Nejprve byly připraveny vodorozpustné hydrofilní kopolymery na bázi HPMA a DHPMA obsahující hydrazidové a amino skupiny vázané prostřednictvím beta-alaninové (βAla) a aminohexanové (Ah) spojky. Záměrem výběru DHPMA byl jeho hydrofilnější charakter ve srovnání s HPMA, což potenciálně umožňuje dosáhnout vyššího obsahu hydrofobního léčiva při zachování rozpustnosti ve vodném prostředí [35]. Ze stejného důvodu byla zvolena i βAla spojka, jelikož je o tři uhlíky kratší, a tedy i hydrofilnější, než aminohexanová spojka. Tato práce navazovala na výzkum Lomkové a spol. [24], kdy se konjugáty s deriváty kyseliny betulinové, spojené přes aminohexanovou spojku s polymerem, uvolňovaly příliš rychle.

Pro syntézu polymerních prekurzorů v této práci byla využita technika řízené radikálové polymerace s vratným adičně-fragmentačním přenosem řetězce (RAFT polymerace) jež poskytuje polymery s nižší disperzitou ve srovnání s polymery připravenými volnou radikálovou polymerací. Všechny polymerní prekurzory měly poměrně nízkou hodnotu disperzity, která svědčí o kontrolované polymerizaci těchto polymerů. Vzorky obsahující hydrazidové skupiny měly molární hmotnost okolo 35 – 40 000 g-mol, tab.3. Polymerní prekurzor s amino skupinami měl molární hmotnost nižší. Všechny polymerní prekurzory měly nicméně vzodné fyzikálne-chemické charakteristiky pro další vazbu léčiv.

Po přípravě a charakterizaci polymerních prekurzorů byly připraveny polymerní konjugáty s deriváty kyseliny betulinové dBA1 a dBA2. Při navazování derivátů kyseliny betulinové byl optimalizován jak hmotnostní obsah léčiva, tak teplota a čas reakce (tab. 1 a 2). U konjugátů připravených přes hydrazonovou vazbu byl obsah navázaného léčiva vyšší než u Schiffovy báze a rozdíly mezi jednotlivými deriváty byly jen malé. U konjugátů připravených přes Schiffovu bázi byla účinnost navázání léčiv nižší, pravděpodobně kvůli sterickému bránění a uspořádání reaktivních skupin. Nejvíce se to projevilo u derivátu dBA2, kde se navázalo pouze 1 hm %, přestože v reakční směsi bylo 15 hm %, teplota při navazování byla 40 °C a reakční doba byla 72 h. Celkově se při syntéze systémů s hydrazonovou vazbou dosahovalo

vyšších výtěžků než v případě systémů se Schiffovou bází. Budoucí práce by se tedy mohly zaměřit i na hledání optimálních podmínek syntézy konjugátů s těmito deriváty za dosažení vyšších konverzí. Molární hmotnost polymerních konjugátů (P1-dBA1 až P4-dBA1) se mírně lišila, jejich hydrodynamický průměr však byl srovnatelný a o několik nanometrů větší než průměr jejich polymerních prekurzorů, čímž bylo prokázáno, že polymerní konjugáty po navázání hydrofobních derivátů dBA zůstávají zcela vodorozpustné. Velikost částic konjugátů P5a-dBA1 a P5b-dBA2 byla nižší než prekurzoru, což mohlo být způsobeno hydrofobním kolapsem. Jejich velikost a molární hmotnost byly srovnatelné, což poskytuje lepší základ pro jejich porovnání v dalším výzkumu.

Předtím, než mohly být zjištěny obsahy léčiva dBA1 na polymerních konjugátech, musela být nalezena metoda, pomocí které by bylo možné detekovat samotnou molekulu dBA1, vzhledem k tomu, že nevykazuje UV-VIS absorbanci ani fluorescenci.

Nejprve bylo vyzkoušeno, zda lze přítomnost dBA1 detekovat pomocí FT-IR či Ramanovy spektroskopie s konjugáty P1-dBA1 a P2-dBA1, jejich polymerními prekurzory a samotným derivátem dBA1. Na spektrálním záznamu FT-IR (graf 1) je vidět, že konjugáty postrádají charakteristický pík, charakteristický pro derivát dBA1, který odpovídá volné karboxylové skupině. V záznamu Ramanova spektra (graf 2) také nebyly pozorovány změny po navázání dBA1 na polymer. Avšak kvůli překryvu valenčních vibrací hydroxylových a aminových skupin by změnu bylo vidět až nad detekčním limitem 5 % (více podrobností viz kap. 4 Výsledky).

Dále byla vyzkoušena předkolonová derivatizace pomocí HPLC. Nejdříve byla cílena na hydroxylovou skupinu (C-3) s molekulami Fmoc-Cl a fenylisiokyanátem, avšak tyto derivatizace dopadly neúspěšně pravděpodobně proto, že sekundární alkoholová skupina ve struktuře dBA1 není dostatečně reaktivní. Následně byla vyzkoušena derivatizace karboxylovoé skupiny na pozici C-28 s pomocí PDAM, která dopadla úspěšně. S cílem dosáhnout co nejvyšší konverze reakce probíhala 2 h při 50 °C (v reakční směsi byl minimálně 20ti násobný molární nadbytek PDAM).

Po nalezení analytické metody pro stanovení celkového obsahu dBA1 na konjugátech se přistoupilo k provedení experimentu hydrolytické stability polymerních konjugátů s dBA1 (P1-dBA1 až P4-dBA1). Experiment byl prováděn ve fosfátovém pufru o pH 7,4, odpovídající pH krevní plazmy a citrátovém pufru o pH 5,0, který simuluje pH lysozomu nádorových buněk.

Sledované časy byly 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 16, 24 hodin. Jak již bylo zmíněno ve Výsledcích, k žádnému uvolnění léčiva z polymeru nedocházelo. Hydrazonová vazba vzniklá reakcí hydrazidové skupiny na polymeru s aldehydovou skupinou dBA1 je pravděpodobně příliš stabilní. Z důvodu neuvolnění léčiva byl syntetizován konjugát dBA1 a polymerního prekurzoru, obsahujícího volné amino skupiny (P5), kdy spojením s aldehydovou skupinou derivátu dBA1 vznikla Schiffova báze, která také může podléhat hydrolýze při nižším pH, zatímco při neutrálním pH je stabilní. Z výsledků je patrné, že i když tento polymerní konjugát podléhal hydrolýze, tak tato hydrolýza nebyla na pH výrazně závislá (graf 3).

Obsah derivátu dBA2 na konjugátu byl stanoven pomocí UV-VIS spektroskopie na HPLC koloně bez nutnosti předchozí derivatizace, jelikož samotný derivát vykazuje absorpční maximum při vlnové délce kolem 275 nm. Jak již bylo zmíněno, obsah derivátu na konjugátu byl pouhé 1 hm%. Kvůli tak nízkému obsahu dBA2 nebylo možné stanovit hydrolytickou stabilitu. Uvolněné množství by bylo pod schopností detekce UV-Vis detektoru. Budoucí práce by tedy kromě zvýšení obsahu léčiva dBA2 měly také ověřit rychlost uvolňování léčiva ze schiffovy báze při nižším pH. Při testování *in vitro* bylo počítáno s možností uvolnění léčiva dBA2 z polymeru, vzhledem ke stejnému způsobu navázání na polymer, jako v případě dBA1.

Po přípravě a charakterizaci polymerních konjugátů s deriváty dBA1 a dBA2 bylo provedeno testování *in vitro* na nádorových buňkách lidského kolorekta DLD-1. Tato buněčná linie byla vybrána díky dříve potvrzené citlivosti na kyselinu betulinovou, Jedná se o jednu z nejčastějších forem rakoviny. Linie DLD-1 byla také použita v práci Lomková 2016. Jelikož se z konjugátů P1-dBA1 až P4-dBA1 léčivo vůbec neuvolňovalo byly použity pouze konjugáty P5a-dBA1, P5b-dBA2 a pro porovnání i P3a. Od původního cíle použití polymerního prekurzoru DHPMA a βAla spojky se tedy upustilo.

Při testování samotného derivátu dBA1 i obou jeho polymerních konjugátů (P3-dBA1 a P5a-dBA1) nebyla pozorována žádná významná cytotoxická aktivita. Toto zjištění bylo překvapivé vzhledem k významné cytotoxické aktivitě samotné kyseliny betulinové a skutečnosti, že strukturně se od ní derivát dBA1 liší jenom nepatrně, a to aldehydovou skupinou na uhlíku 20 místo dvojné vazby (C20-C29). V případě volného léčiva jde o zcela zásadní změnu na cytotoxickou aktivitu na buněčné linii DLD-1. Toto zjištění koreluje se studií, dle které tato dvojná vazba není vhodná pro modifikaci, protože je součástí farmakoforu. V případě derivátu dBA2 již byla cytotoxická aktivita pozorována, a to jak u volného léčiva, tak u

polymerního konjugátu P5b-dBA2. Derivát dBA2 má, rovněž jako dBA1, aldehydovou skupinu na uhlíku C20, ale také se liší modifikací na kruhu A. Další práce by se mohly zaměřit na strukturu, ve které by byla ponechána dvojná vazba, jako v kyselině betulinové, ale zároveň by byl modifikován kruh A.

6 Závěr

V této práci byly připraveny a charakterizovány nové polymerní systémy na bázi HPMA a DHPMA určené pro cílenou dopravu derivátů kyseliny betulinové. Byly syntetizovány prekurzory obsahující hydrazidové nebo aminoskupiny, na které byly navázány deriváty dBA1 a dBA2 přes hydrazonovou vazbu, resp. prostřednictvím Schiffovy báze.

Hydrolytická stabilita konjugátů byla ověřena při fyziologickém (7,4) a mírně kyselém pH (5,0). Bylo zjištěno, že u konjugátů s hydrazonovou vazbou nedocházelo k uvolnění léčiva ani za mírně kyselých podmínek. Konjugáty se Schiffovou bází vykazovaly rychlost uvolňování nezávislou na pH.

Biologické testování *in vitro* na buněčné linii DLD-1 ukázalo rozdílné chování jednotlivých derivátů. Derivát dBA2 vykazoval signifikantní cytotoxickou aktivitu, zatímco derivát dBA1 aktivitu nevykazoval. Tyto výsledky potvrzují, že chemická struktura derivátu zásadně ovlivňuje biologickou účinnost i v případě pevné vazby na polymerní nosič.

Výsledky této práce ukazují potenciál polymerních systémů na bázi HPMA a DHPMA pro cílenou dopravu derivátů kyseliny betulinové, avšak zdůrazňují nutnost pečlivé volby derivátu a typu spojky s polymerním prekurzorem. Pro další výzkum se doporučuje zaměřit na deriváty zachovávající farmakofor kyseliny betulinové, a optimalizovat syntézu tak, aby bylo dosaženo vyšší konverze a kontrolovaného uvolňování.

7 Zdroje

[1] XIE, Xiaoyan; ZHANG, Yifan; LI, Feng; LV, Ting; LI, Zhen; CHEN, Hao; JIA, Lin; GAO, Yong. Challenges and opportunities from basic cancer biology for nanomedicine for targeted drug delivery. *Current Cancer Drug Targets*. 2018, 18(1), 1–20.

[2] KOPEČEK, Jindřich. Smart polymeric biomaterials: DDSs for the 21st century. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003, 20(1), 1–16.

[3] CHYTIL, Petr; ETRYCH, Tomáš; MRKVIČKOVÁ, Lucie; ŠÍROVÁ, Milada; ŘÍHOVÁ, Blanka; ULBRICH, Karel. HPMA copolymer-based nanomedicines: preclinical data overview. *Journal of Personalized Medicine*. 2021, 11(2), 115.

[4] ULBRICH, Karel; ŠUBR, Vladimír. Polymeric drug conjugates with controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004, 56(7), 1023–1050.

[5] RINGSDORF, Helmut. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposium*. 1975, 51, 135–153.

[6] KOPEČEK, Jindřich; ULBRICH, Karel; MRKVIČKOVÁ, Lucie; ŠÍROVÁ, Milada; ŘÍHOVÁ, Blanka; CHYTIL, Petr. HPMA copolymers: origins, early developments, present, and future. *Journal of Controlled Release*. 2000, 65(1–2), 135–148.

[7] SEYMOUR, Lester W.; DUNCAN, Ruth. Polymeric carriers: neoteric design for delivery of anticancer drugs. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1992, 26(7), 835–852.

[8] EHRLICH, Paul. Collected studies on immunity. New York: John Wiley & Sons, 1908.

[9] LOMKOVÁ, Kateřina; ŠIRC, Jan; ETRYCH, Tomáš. Nanoparticle drug delivery systems based on natural polymers. *Journal of Functional Biomaterials*. 2021, 12(3), 41.

[10] GOH, Chee Hwee; HENG, Paul Wan Sia; CHAN, Lai Wah. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*. 2012, 88(1), 1–12.

[11] SEYMOUR, Lester W.; THOMAS, N.; FERRARI, M.; DUNCAN, Ruth. Influence of molecular weight on passive tumor accumulation. *European Journal of Cancer*. 1995, 31A(5), 766–770.

[12] MATSUMURA, Yasuhiro; MAEDA, Hiroshi. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation. *Cancer Research*. 1986, 46(12), 6387–6392.

[13] DUNCAN, Ruth. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews Cancer*. 2002, 2(5), 347–360.

[14] MAEDA, Hiroshi. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect. *Cancer Science*. 2010, 101(5), 1179–1185.

[15] GREENWALD, Robert B. PEGylated protein drugs: products, properties, and pharmacokinetics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003, 2(3), 205–217.

[16] MAEDA, Hiroshi; FANG, Jun; INUTSUKA, Tetsuya; FUKUDA, Hiroshi. Vascular permeability enhancement in solid tumor: improving efficacy of macromolecular therapeutics. *Cancer Science*. 2013, 104(7), 779–785.

[17] TORCHILIN, Vladimir P. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers: design principles and applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009, 71(3), 431–444.

[18] ZIELONKA, Józef; JOSEPH, Josh; SIKORSKA, Magdalena; HARDY, Mark; KOWALSKI, Jan. Mitochondria-targeted drug delivery using lipophilic cations. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. 2017, 1858(8), 2107–2123.

[19] ETRYCH, Tomáš; CHYTIL, Petr; ŠUBR, Vladimír; MRKVIČKOVÁ, Lucie; ŠÍROVÁ, Milada; ŘÍHOVÁ, Blanka; ULBRICH, Karel. Biodegradable N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers with doxorubicin attached via pH-sensitive bond. *Journal of Controlled Release*. 2014, 180, 61–70.

[20] DUNCAN, Ruth; VICENT, María J.; GRECO, Francesca; NICHOLSON, Richard I.; KRATZ, Felix. Polymer–drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2005, 12(Suppl 1), S189–S199.

[21] CHYTIL, Petr; KOZIOLOVÁ, Eva; ETRYCH, Tomáš; ULBRICH, Karel. HPMA copolymer-drug conjugates with controlled tumor-specific drug release. *Macromolecular Bioscience*. 2018, 18(1).

[22] HOVORKA, Ondřej; ETRYCH, Tomáš; ŠUBR, Vladimír; STROHALM, Jan; ULBRICH, Karel; ŘÍHOVÁ, Blanka. HPMA-based macromolecular therapeutics: internalization, intracellular pathway and cell death depend on the character of covalent bond between the drug and the peptidic spacer and also on spacer composition. *Journal of Drug Targeting*. 2006, 14(6), 391–403.

[23] MAEDA, Hiroshi; KHATAMI, Mohammad; FANG, Jun; INUTSUKA, Tetsuya; HAMAGUCHI, Takanori. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on the EPR effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013, 71(3), 409–419.

[24] LOMKOVÁ, Kateřina; ETRYCH, Tomáš; CHYTIL, Petr; TOMEČEK, Daniel; JANOUŠEK, Jiří; STĚTINA, Radek; RŮŽIČKA, Aleš. Biodegradable HPMA copolymer conjugates of betulinic acid for passive tumor targeting. *Biomacromolecules*. 2016, 17(11), 3350–3363.

[25] ZHANG, Yifan; YANG, Chen; WANG, Wei; LIU, Jing; LIU, Qian; HUANG, Fang; CHU, Lin; GAO, Hao; LI, Cheng; KONG, Dong; LIU, Qian; LIU, Jing. Co-delivery of doxorubicin and curcumin by pH-sensitive prodrug nanoparticle for combination therapy of cancer. *Scientific Reports*. 2016, 6, 21225.

[26] ULBRICH, Karel; ŠUBR, Vladimír; DUNCAN, Ruth; STROHALM, Jan; RYŠKA, Miroslav; ŠŤASTNÝ, Miroslav; KOPP, Josef. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, 62(2), 150–166.

[27] DUNCAN, Ruth. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003, 2(5), 347–360.

[28] NICOLAS, Julien; MAKHLOUF, Mohamed; GUILLERMO, Couvreur; DUVAL, Christophe. Design of degradable polymer carriers for renal clearance. *Chemical Society Reviews*. 2013, 42(3), 1147–1235.

[29] TURÁNEK, Jaroslav; KOSZTYU, Petr; TURÁNEK KNÖTIGOVÁ, Pavlína; BARTHELDYOVÁ, Eliška; HUBATKA, František; ODEHNALOVÁ, Nikola;

MIKULÍK, Robert; VAŠKOVICOVÁ, Naděžda; ČELECHOVSKÁ, Hana; KRATOCHVÍLOVÁ, Irena; FEKETE, Ladislav; TAVARES, Marina R.; CHYTIL, Petr; RAŠKA, Milan; ETRYCH, Tomáš. Long circulating liposomal platform utilizing hydrophilic polymer-based surface modification: preparation, characterisation, and biological evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2024, 661, 124465.

[30] SEDLÁČEK, Ondřej; HOOGENBOOM, Richard. Poly(2-oxazoline)s: a polymer class with numerous potential applications. *Macromolecular Rapid Communications*. 2020, 41(17), 2000115.

[31] KOPEČEK, Jindřich. HPMA copolymers: origins, early developments, present, and future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, 62(2), 122–149.

[32] CHYTIL, Petr; ETRYCH, Tomáš; ŠÍROVÁ, Martina; MRKVIČKOVÁ, Lucie; KLENER, Pavel; ULBRICH, Karel; KOPEČEK, Jindřich. Controlled polymer architecture for HPMA conjugates. *Macromolecular Bioscience*. 2017, 17(4), 1600257.

[33] CHEN, Qian; CHYTIL, Petr; ETRYCH, Tomáš; MRKVIČKOVÁ, Lucie; ŠÍROVÁ, Martina; ULBRICH, Karel; LU, Wei. Highly hydrophilic methacrylamide-based copolymers as precursors for polymeric nanomedicines containing anthracyclines. *Acta Biomaterialia*. 2019, 92, 196–207.

[34] CHYTIL, Petr; ETRYCH, Tomáš; KONÁK, Čestmír; MRKVIČKOVÁ, Lucie; ŠÍROVÁ, Martina; ULBRICH, Karel; KOPEČEK, Jindřich. N-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)methacrylamide-based polymer conjugates of pirarubicin and doxorubicin for cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, 41(3–4), 473–482.

[35] PYTLÍKOVÁ, Sára; CHYTIL, Petr; ETRYCH, Tomáš; MRKVIČKOVÁ, Lucie; ŠÍROVÁ, Martina; PAVLOV, Alexander; STEININGER, Radek; ULBRICH, Karel; KOPEČEK, Jindřich. Highly hydrophilic methacrylamide-based copolymers as precursors for polymeric nanomedicines containing anthracyclines. *European Polymer Journal*. 2024, 205, 112756.

[36] ALAKURTTI, Sami; MAZZEI, Matteo; PIETRZIK, Claus; BERNI, Andrea; GUSTAFSSON, Jan-Åke; YLI-KAUHALUOMA, Jari; WENNERBERG, Krister. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulinic acid and its derivatives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006, 29(1), 1–13.

[37] YOGEESWARI, Perumal; SRIRAM, Dharmarajan. Betulinic acid and its derivatives: a review of their biological properties. *Current Medicinal Chemistry*. 2005, 12(6), 657–666.

[38] FULDA, Simone; FRIESEN, Claudia; LOS, Marek; BOHNSACK, Christian; SCHMIDT, Holger; DEBATIN, Klaus-Michael. Betulinic acid: a new cytotoxic agent against neuroectodermal tumors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, 9(6), 1057–1067.

[39] ZUCO, Valentina; SUPINO, Rosanna; RAGAZZI, Elena; RICCI, Francesca; GALLI, Claudio; CASERINI, Carla. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumour cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letters*. 2002, 175(1), 17–25.

[40] JIANG, Yifan; LU, Hao; ZHANG, Jing; WANG, Hui; WANG, Yujie. Betulinic acid in the treatment of tumour diseases: application and research progress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021, 138, 111496.

[41] HOLZE, Cathleen; MICHAUDEL, Chloé; MACKOWIAK, Claire; HAAS, Darya A.; BENDA, Christian; HUBEL, Philipp; PENNEMANN, Friederike L.; SCHNEPF, Daniel; WETTMARSHAUSEN, Jennifer; BRAUN, Marianne; LEUNG, Daisy W.; AMARASINGHE, Gaya K.; PEROCCHI, Fabiana; STAEHELI, Peter; RYFFEL, Bernhard; PICHLMAIR, Andreas. Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. *Nature Immunology*. 2018, 19(2), 130–140.

[42] ZENG, Anqi; QI, Qian; WANG, Ning; GAO, Zhi; GUO, Qian; YOU, Yanan; ZHANG, Hui; CHEN, Dong. Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human colorectal cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2019, 27(14), 2805–2811.

[43] YANG, Jie; ZHANG, Qian; ZHANG, Yan; ZHOU, Hong; ZHU, Xia. p53-p66Shc/miR-21-Sod2 signaling and the effect of betulinic acid in hepatocellular carcinoma. *Toxicology Letters*. 2015, 234(3), 139–147.

[44] TANIGUCHI, Keisuke; TSUGANE, Momomi; ASAI, Akira. A brief update on STAT3 signaling: current challenges and future directions in cancer treatment. *Journal of Cell Signaling*. 2021, 2(3), 181–194.

[45] SHIN, Jimin; LEE, Hyo-Jeong; JUNG, Deok-Beom; JUNG, Ji Hoon; LEE, Hyo-Jung; LEE, Eun-Ok; LEE, Seok Geun; SHIM, Beom Sang; CHOI, Seung Hoon; KO,

Seong Gyu; AHN, Kwang Seok; JEONG, Soo-Jin; KIM, Sung-Hoon. Suppression of STAT3 and HIF-1α mediates anti-angiogenic activity of betulinic acid in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. *PLoS ONE*. 2011, 6(6), e21492.

[46] DIDONATO, Joseph A.; MERCURIO, Frank; KARIN, Michael. NF-κB and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews*. 2012, 246(1), 379–400.

[47] TANIGUCHI, Koji; KARIN, Michael. NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology*. 2018, 18(5), 309–324.

[48] SHANKAR, Eswar; ZHANG, Ailin; FRANCO, Daniel; GUPTA, Sanjay; LI, Shuxian; GOU, Xiaojing; SINGH, Kamaleshwar P.; SARKAR, Fazlul H.; KUMAR, Arun P. Betulinic acid-mediated apoptosis in human prostate cancer cells involves p53 and NF-κB (IKKα/p65) pathways. *Molecules*. 2017, 22(2), 264.

[49] CHEN, Xi; YUAN, Xian-Ning; ZHANG, Zhi; GONG, Pei-Jie; YIN, Wei-Na; JIANG, Qian; XU, Jun; XU, Xiao-Li; GAO, Yu; CHEN, Wei-Li; DAI, Li; WANG, Jian; MA, Jie; WANG, Jing; CHENG, Xian-Sheng. Betulinic acid inhibits cell proliferation and migration in gastric cancer by targeting the NF-κB/VASP pathway. *European Journal of Pharmacology*. 2020, 889, 173493.

[50] MERTENS-TALCOTT, Susanne U.; TALCOTT, Stephen T.; PARADES, Ana. Betulinic acid decreases expression of specificity protein transcription factors Sp1, Sp3 and Sp4 in human breast cancer cells via disruption of microRNA-27a:ZBTB10. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012, 11(11), 1335–1345.

[51] CABINDA, Rute; CHINTHARLAPALLI, Sudhakar. Betulinic acid decreases expression of Sp1, Sp3 and Sp4 and induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *BMC Cancer*. 2011, 11, 371.

[52] GAO, Yong; JIA, Zhiliang; KONG, Xiangyu; LI, Qiang; CHANG, David Z.; WEI, Daoyan; LE, Xiangdong; HUANG, Suyun; WANG, Liwei; XIE, Keping. Combining betulinic acid and mithramycin A effectively suppresses pancreatic cancer by inhibiting proliferation, invasion, and angiogenesis. *Cancer Research*. 2011, 71(15), 5182–5193.

[53] WANG, Yan; ZHANG, Ting; WU, Bo; LI, Dong; ZHAO, Min. Betulinic acid enhances chemosensitivity of colorectal cancer to cisplatin by promoting apoptosis and inhibiting Bcl-2 expression. *Molecular Medicine Reports*. 2016, 13(6), 4694–4700.

[54] ULBRICH, Karel; ETRYCH, Tomáš; CHYTIL, Petr; JELÍNKOVÁ, Markéta; ŘÍHOVÁ, Blanka. Antibody-targeted polymer-doxorubicin conjugates with pH-controlled activation. *Journal of Drug Targeting*. 2004, 12(8), 477–489.

[55] ULBRICH, Karel; ŠUBR, Vladimír; STROHALM, Jiří; RYŠKA, Miroslav; ŠŤASTNÝ, Miroslav; KOPP, Jan. Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules I. Synthesis and physico-chemical characterisation. *Journal of Controlled Release*. 2000, 64, 63–67.

[56] KOTALÍK, Kevin. Polymerní sondy pro fotodynamickou terapii pevných nádorů. [Bakalárska práca]. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, 2022.

[57] ISHITAKE, Koji; SATOH, Kotaro; KAMIGAITO, Masami; OKAMOTO, Yoshio. Stereogradient polymers formed by controlled/living radical polymerization of bulky methacrylate monomers. *Angewandte Chemie*. 2009, 121(11), 2025–2028.