

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
Katedra organické a jaderné chemie

Ústav jaderné fyziky AV ČR, v. v. i.
Oddělení radiofarmak

**„DRUG DELIVERY“ SYSTÉMY PRO NUKLEÁRNÍ
MEDICÍNU**

Doktorská disertační práce

Jan Kučka

Praha 2007

Motto:

Musíš se mnoho učit, abys poznal, že málo víš.

Michel de Montaigne

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto disertaci vypracoval samostatně pod odborným vedením Doc. RNDr. Ladislava Lešetického, CSc., a že řádně cituji všechna převzatá data a skutečnosti.

Mgr. Jan Kučka

V Praze dne:

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému školiteli, Doc. RNDr. Ladislavu Lešetickému, CSc., za odborné vedení této disertační práce. Dále bych chtěl poděkovat svým kolegům z Ústavu jaderné fyziky Akademie věd České republiky v Řeži u Prahy, kteří vytvořili podnětné a příjemné prostředí pro vypracování mé disertační práce, za pomoc bych chtěl jmenovitě poděkovat Ing. Ondřeji Lebedovi, Ph.D.

Velký dík patří Mgr. Martinu Hrubému, Ph.D., za nesmírně obětavou a trpělivou spolupráci. Nemalé díky patří i mé manželce Lence, nejen za trpělivost a pomoc s úpravou textu. Tato disertační práce byla vypracována za finanční podpory Grantové agentury Akademie věd České republiky (projekty číslo KJB4050408 resp. A400480616) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt 2B06165).

Souhrn

„Drug delivery“ systémy pro cílené směřování a řízené uvolňování léčiv jsou v současné době intenzivně studovány ve vývoji terapeutických, ale i diagnostických prostředků pro mnoho typů onemocnění. Tyto systémy mohou mít oproti základním léčivům výrazně vyšší účinnost a současně menší výskyt nežádoucích efektů, a to především díky vyšší specifické afinitě léčiva k cílové tkáni (např. nádoru) a prodloužené době setrvání léčiva v krevním řečišti. Tak může být dosaženo nejen snížení výskytu vedlejších účinků vlastního léčiva, ale např. i zlepšení jeho fyzikálně-chemických vlastností. Při použití vhodného terapeutického radionuklidu pro radioterapii nádorových onemocnění lze také významně snížit ekonomické náklady na léčbu, protože efektivní dávka radionuklidu je v řádu nanogramů oproti typickým desítkám až stovkám miligramů chemického léčiva a tedy i nosiče je třeba podstatně menší množství. Byly studovány vybrané typy nosičů založených na rozpustných polymerech a nanočásticích pro několik zvolených terapeutických a diagnostických radionuklidů. Radionuklidy byly voleny s ohledem na své fyzikální vlastnosti a samozřejmě také na svoji dostupnost.

V této práci jsou studovány tři typy polymerních nosičů léčiv, které mohou být považovány za perspektivní radiofarmaka, popř. mohou být dále modifikovány či využity jako modelové systémy pro další studie.

První z nich je termoresponsivní systém na bázi telecheického poly(*N*-isopropyl akrylamidu) s vázaným radionuklidem (^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y), který byl úspěšně připraven a označen za účelem lokálních radioterapeutických aplikací. Dále byly studovány systémy využívající stříbrné nanočástice jako nosiče astatu ^{211}At ($T_{1/2} = 7,21$ h) pro α -radioterapii a polymerní systém nesoucí radionuklidy ^{125}I a ^{111}In cílený hydroxybisfosfonátovými skupinami do kostní tkáně. Poslední jmenovaný systém byl připraven i ve variantě nesoucí chemoterapeutikum doxorubicin a s tímto polymerem byly provedeny srovnávací studie jeho cílení na modelu kostní tkáně (hydroxyapatit).

Klíčová slova: polymer, termoresponsivní, termosensitivní, nosič léčiv, radionuklid,

radionuklidová terapie, ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{111}In , ^{211}At

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAM – akrylamid

AcOH – kyselina octová

ADEPT – terapie proléčivem aktivovaným protilátkou směřovaným enzymem (antibody directed enzyme prodrug therapy)

AH – 6-aminohexanoyl (spojka)

AHHBP – (6-Amino-1-hydroxyhexan-1,1-diyl)bisfosfonová kyselina, monosodná sůl monohydrát

AIBN – 2,2'-azobis(isobutyronitril)

DCC – *N,N'*-dicyclohexylkarbodiimid

DDS – systém pro transport léčiva (drug delivery system)

DLS – dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)

DMSO – dimethylsulfoxid

DMSO-*d6* – perdeuterovaný dimethylsulfoxid (pro ¹H NMR)

DOTMP – kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetramethyl-enfosfonová

DOX – doxorubicin

DSC – diferenciální skenovací kalorimetrie (differential scanning calorimetry)

DTPA – kyselina diethylentriaminopentaoctová

DTPAA – dianhydrid kyseliny diethylentriaminopentaoctové

EDTMP – kyselina ethylendiaminotetra-methylenfosfonová

EPR (efekt) – efekt hromadění velkých molekul a nanočástic v nádorové tkáni (enhanced permeation and retention)

GFLG – tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly (spojka)

GPC – gelová permeační chromatografie

HA – hydroxyapatit

HBF – hydroxybisfosfonát

HEDP – kyselina hydroxyethylidifosfonová

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

LCST – dolní kritická rozpouštěcí teplota (lower critical solubility temperature)

MAb – monoklonální protilátka

$M_{r,w}$ – početně střední molekulová hmotnost

$\overline{M}_{r,n}$ – hmotnostně střední molekulová hmotnost

Ma-AH-OH – 6-methakryloylamidohexanová kyselina

Ma-AH-TT – 3-(6-methakryloylamidohexanoyl)thiazolidin-2-thion

Ma-GFLG-OH – *N*-methakryloyl glycyl-DL-fenylalanyl-L-leucylglycin

Ma-GFLG-TT – 3-(*N*-methakryloylglycyl-DL-fenylalanylleucylglycyl)thiazolidin-2-thion

PBS (pufr) – fosfátový pufr s chloridem sodným (phosphate buffered saline)

PET – pozitronová emisní tomografie

PEO – poly(ethylenoxid)

QELS – dynamický rozptyl světla

RES – retikulo-endoteliální systém

RIA – radioimunochemická analýza

SPECT – jednofotonová emisní počítačová tomografie

TT (skupina) – thiazolidin-2-thionová (skupina)

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Teoretická část.....	11
2.1. Látky využívané pro diagnostiku a terapii nádorových onemocnění.....	11
2.1.1. Chemická kancerostatika.....	12
2.1.2. Radiofarmaka využívané pro diagnostiku nádorových onemocnění	12
2.1.3. Radiofarmaka využívané pro terapii nádorových onemocnění	14
2.2. „Drug delivery“ systémy	16
2.3. Možnosti cílení „drug delivery“ systémů do nádorové tkáně	16
2.3.1. Cílení léčiv lokální aplikací do tkáně postižené onemocněním	16
2.3.1. Cílení účinku léčiva fyzikální aktivací zevnějšku organismu.....	17
2.3.3. Cílení léčiv založené na morfologické a fyziologické odlišnosti nádorové tkáně .	19
2.3.4. Cílení ligandem buněčně specifického receptoru.....	20
2.3.5. Cílení specifickými přenašeči živin a vitaminů kumulujících se ve zvýšené míře v nádoru.....	23
2.3.6. „Pretargeting“ a jiné studované techniky	23
2.4. „Drug delivery“ systémy (DDS) v nukleární medicíně	24
3. Cíle disertační práce	25
4. Experimentální část	26
4.1. Materiál	26
4.2. Metody	28
4.2.1. Termoresponsivní polymery pro lokální radioterapii.....	28
4.2.1.1. Příprava termoresponsivního polymeru	28
4.2.1.2. Studium fázové separace termoresponsivních polymerů	31
4.2.1.3. Isotopické značení termoresponsivního polymeru ¹²⁵ I.....	32
4.2.1.4. Isotopické značení termoresponsivního polymeru ⁹⁰ Y	32
4.2.2. Stříbrné nanočástice navržené pro lokální radioterapii a pasivní cílení.....	34
4.2.2.1. Příprava biokompatibilizovaných stříbrných nanočástic	34
4.2.2.2. Studium chování nanočástic stříbra ve vodných roztocích metodami rozptylu světla.....	34
4.2.2.3. Isotopické značení stříbrných nanočástic ²¹¹ At.....	34
4.2.3. Vodorozpustné polymery cílené hydroxybisfosfonátovými skupinami.....	36

4.2.3.1. Příprava vodorozpustných polymerů cílených hydroxybis-fosfonátovými skupinami	36
4.2.3.2. Značení hydroxybisfosfonátovými skupinami cílených polymerů jódem ^{125}I	41
4.2.3.3. Značení polymeru 16 indiem ^{111}In	41
4.2.3.4. Adsorpční studie na hydroxyapatitu (HA)	41
4.2.3.4.1. Vliv prostředí na adsorpci polymeru 17-4 na HA	42
4.2.3.4.2. Rychlost adsorpce polymerů 17 a 20 na HA	42
4.2.3.4.3. Sorpční kapacita HA pro polymery 17 a 20 na HA	42
5. Výsledky a diskuse.....	43
5.1 Termoresponsivní polymery pro lokální radioterapii.....	43
5.1.1. Studium fázové separace termoresponsivních polymerů	46
5.1.2. Značení termoresponsivních polymerů ^{125}I a ^{90}Y	50
5.2. Stříbrné nanočástice pro lokální radioterapii a pasivní směřování.....	53
5.2.1. Příprava biokompatibilizovaných stříbrných nanočástic	53
5.2.2. Studium chování stříbrných nanočástic ve vodných roztocích metodami rozptylu světla.....	54
5.2.3. Značení stříbrných nanočástic astatem ^{211}At	57
5.3. Vodorozpustné polymery cílené hydroxybisfosfonátovými skupinami.....	58
5.3.1. Příprava vodorozpustných polymerů cílených hydroxybisfosfonátovými skupinami	58
5.3.2. Značení polymerů cílených hydroxybisfosfonátovými skupinami radionuklidy ^{125}I a ^{111}In	60
5.3.3. Sorpční studie na hydroxyapatitu	60
5.4. Biologické vlastnosti studovaných systémů.....	65
5.4.1. Biodistribuce termoresponsivního polymerního systému	65
5.4.2. <i>In vivo</i> vlastnosti polymeru cíleného HBP skupinou	66
6. Závěr.....	68
7. Seznam použité literatury	70
8. Seznam publikací vytvořených v rámci dizertace.....	76
8.1. Publikace v recenzovaném zahraničním časopise, ve světovém jazyce	76
8.2. Publikace v ostatních časopisech	76

1. Úvod

V současné době jsou stále více studovány „drug delivery“ systémy využívající polymery jako perspektivní nosiče terapeutik pro léčbu mnoha typů onemocnění. Od těchto systémů se očekává především vyšší účinnost léčby při současném zmenšení vedlejších účinků vlastního léčiva, a to několika možnými způsoby. Jde o zvýšení afinity léčiva k cílové tkáni, o prodloužení cirkulace léčiva v krevním oběhu, potlačení vzniku rezistentních buněčných populací u aplikací pro nádorová onemocnění, dále i o zlepšení fyzikálně-chemických vlastností jako je např. rozpustnost vlastního léčiva aj.

Většina studovaných „drug delivery“ systémů je určena pro cílenou léčbu nádorů^{1,2}. Důvodem je častý výskyt těchto typů onemocnění při vysoké relativní mortalitě. Léčiva používaná v současné době mají nízkou afinitu k nádorové tkáni a jejich malé terapeutické rozpětí pak vede k výrazným nežádoucím vedlejším účinkům. Tyto nežádoucí vedlejší účinky nedovolují aplikaci dostatečně vysokých dávek léčiva nutných pro úspěšnou léčbu, často si dokonce vynutí úplné přerušování léčby (poruchy krve tvorby aj.) a působí kontraproduktivně (snížení imunity).

Nosiče léčiv by měly být kombinovány s terapeuticky vysoce účinnými látkami, aby organismus nebyl dále více zatěžován odbouráváním a vylučováním velkého množství nosiče. Z tohoto hlediska jsou ideální radionuklidy s krátkým poločasem rozpadu a emisí biologicky účinného částicového záření (α , β). V současné době se pro radioterapii užívá především radioisotopů jódu (^{131}I , méně často ^{132}I a ^{125}I) a dále např. ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{89}Sr aj.³. Užití těchto radionuklidů zatím spočívá do značné míry v paliativní terapii⁴.

Vhodné γ -zářiče (^{123}I , ^{111}In) nebo β^+ -zářiče (^{124}I , ^{19}F , ^{64}Cu) vázané na analogické systémy pak slouží ke sledování distribuce a metabolismu zobrazovacími metodami SPECT a PET.

Tato disertace se věnuje studiu vysokomolekulárních nosičů radionuklidů na bázi biokompatibilních polymerů s odlišnými způsoby cílení.

2. Teoretická část

2.1. Látky využívané pro diagnostiku a terapii nádorových onemocnění

V současnosti známe celou řadu metod a jejich kombinací použitelných pro diagnostiku a terapii nádorových onemocnění. Jejich úplný přehled by byl nad rámec této disertační práce, a proto budou uvedeny jen ty, které jsou v praxi často využívány a souvisejí s problematikou studovanou v této práci. Jde především o diagnostické metody nukleární medicíny [jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT) a pozitronová emisní tomografie (PET)], z terapeutických postupů budou především zmíněny ty, které využívají radionuklidy a chemická léčiva.

Metody SPECT a PET⁵ jsou založeny na detekci jednoho (SPECT) nebo dvou současně emitovaných (PET) fotonů záření gama vhodného radionuklidu aplikovaného do organismu a následném počítačovém zpracování získaných dat. Jejich vyhodnocením lze pak obdržet informaci o biodistribuci radiofarmaka v organismu a místu jeho významné retence, včetně časového vývoje. Metody mají značnou přenositelnost a variabilitu a jejich použití je časté i v jiných oblastech vnitřního lékařství, např. v kardiologii, neurologii aj.

Ačkoliv obě metody pracují na podobných principech, používají odlišné radionuklidy i technické prostředky detekce záření a zpracování dat. Metody SPECT využívají radionuklidy emitující gama záření o energii 100-200 keV (nejčastěji ^{99m}Tc)^{6,7} a detektory na bázi monokrystalu NaI(Tl). Technologie PET je složitější, využívá radionuklidů emitujících pozitrony a detekuje jejich anihilací vzniklé dva fotony gama o energii 511 keV (nejčastěji ¹⁸F)⁵. Pro detekci těchto fotonů pak slouží systém detektorů, který ve spolupráci s počítačem vyhodnotí jejich koincidence a určí místo anihilace původního pozitronu.

V terapii pak existuje celá řada principiálně odlišných způsobů léčby; nejčastěji jsou využívány jejich kombinace. Typickou kombinací je chirurgický výkon spojený s chemoterapií a radioterapií. Chemoterapie pak zahrnuje volbu vhodného léčiva, jeho aplikaci a velmi často aplikaci jeho antidotu a podpůrnou symptomatologickou léčbu nežádoucích vedlejších účinků. Radioterapie spočívá buď v lokálním či celkovém ozáření ionizujícím zářením (gama, rentgen, urychlené elektrony a jiné částice), nebo v přímé aplikaci radionuklidů do organismu. Moderní metodou externí radioterapie je tzv. „hadronová terapie“^{8,9}, její princip vyplývá z Braggovy křivky. Většina energie vysokoenergetických nabitých těžkých částic se totiž předává až těsně před jejich

dobržděním tj. např. v hluboko uloženém jinak inoperabilním nádoru. Tato technika je ovšem vázána na pracoviště vybavená dostatečně výkonným urychlovačem částic .

2.1.1. Chemická kancerostatika

Jde o početnou, chemicky heterogenní skupinu látek s odlišnými mechanismy účinku. V moderních lékopisech najdeme především antimetabolity [analoga kyseliny listové – např. methotrexát, analoga nukleových bází (např. 5-fluoruracil)], produkty metabolismu rostlin a plísní (alkaloidy - např. paklitaxel a antibiotika, např. doxorubicin), dále alkylojící cytostatika (deriváty *cis*-platiny, cyklofosfamid aj.), interkalátory, inhibitory topoisomerázy (elipticin, doxorubicin) a hormonálně aktivní léky (např. antiestrogeně působící lék, Tamoxifen^R)^{10;11}.

Mechanismy účinku těchto léčiv jsou často smíšené, např. léčivo se interkaluje v DNA a zároveň ji alkyluje a současně i inhibuje enzym DNA-gyrázu (topoizomerázu). Tyto efekty vedou k takovému poškození DNA nádorové buňky, že buňka není dále schopna replikace a zaniká. Příkladem takových léčiv jsou alkaloid elipticin¹² a antibiotikum doxorubicin^{10;11}.

Jsou-li ovšem taková léčiva aplikována systémově, obvykle působí výrazné nežádoucí účinky v celém organismu. Mezi nejčastěji pozorované hlavní nežádoucí účinky patří poruchy krvetvorby a s tím spojená imunodeficience. Tyto nežádoucí účinky včetně poškození dalších struktur organismu jsou však typické pro většinu chemoterapeutik.

2.1.2. Radiofarmaka využívané pro diagnostiku nádorových onemocnění

Radionuklidy jako volné prvky nebo ve formě svých solí, různých sloučenin a komplexů aplikované parenterálně či perorálně jsou ve spojení s vhodnou metodou (SPECT, PET) vhodné pro diagnostiku nejen onkologických onemocnění, ale i pro zjištění jiných poruch vnitřních orgánů, např. ledvin, srdce, plic a štítné žlázy.

Specifičnost radiofarmaka je zde dána především afinitou tkání k některým sloučeninám a prvkům. Příkladem může být záchyt isotopů jódu štítnou žlázou nebo kationu Tl⁺ [²⁰¹Tl] srdečním svalem. Při vyšetření ledvin a urogenitálního traktu se využívá sledování rychlosti a dalších parametrů distribuce a retence komplexů technecia (^{99m}Tc) či sloučenin jódu.

Diagnostika nádorových onemocnění využívá odlišností morfologie a biochemie nádorové tkáně, která spočívá například v hromadění makromolekulárních sloučenin (bílkovin, polymerů) nebo derivátů glukosy či nukleových bází v nádorové tkáni. Typickými představiteli těchto radiodiagnostik jsou značené makroagregáty albuminu^{13;14}, transferrin značený ⁶⁷Ga^{15;16} a zejména [¹⁸F]-2-deoxy-2-fluoro-D-glukosa (FDG)^{17;18}.

Při volbě vhodného diagnostického radionuklidu je třeba vzít v úvahu poločas rozpadu, energii emitovaných fotonů (optimum je 100-200 keV z důvodů maxima účinnosti detekce v krystalech NaI(Tl)) a další faktory. Nezanedbatelná je také minimalizace radiologické zátěže pacienta, jíž lze docílit volbou radionuklidu s vhodným poločasem rozpadu a minimální emisí částicového záření.

Radionuklidy běžně používané v diagnostice jsou uvedeny v **Tabulce 1** a **2**, včetně základních fyzikálně-chemických vlastností a příkladů použití¹⁹⁻⁴³.

Tabulka 1. SPECT radionuklidy¹⁹⁻⁴³.

N uklid	Chemická forma	Poločas rozpadu	Hlavní E _γ [keV]	Výroba *	Aplikace
⁵¹ Cr	Cr-HSA, Na ₂ CrO ₄	27,70 d	320	r	katabolismus proteinů aj.
⁵⁹ Fe	citrát železitý	44,50 d	1095, 1292	r	metabolismus Fe
⁶⁷ Ga	citrát galitý	3,26 d	93	c	scintigrafie nádorů a skeletu
^{87m} Sr	SrCl ₂	2,80 h	388	g (⁸⁷ Y)	scintigrafie kostní tkáně
^{99m} Tc	technecistan sodný, různé komplexy	6,01 h	141	g(⁹⁹ Mo)	scintigrafie, diagnostika značně univerzální podle použité chemické formy
¹¹¹ In	InCl ₃ , citrát inditý	2,80 d	247, 173	c	hematol. diagnostika
^{113m} In	In-EDTA	1,65 h	395	g(¹¹³ Sn)	diagnostika ledvin
¹²³ I	jodované organické látky	13,27 h	159	c	diagnostika myokardu, mozku, št. žlázy, ledvin a jiných podle použité chemické formy
¹³¹ I	jodované organické látky	8,02 d	364	r	diagnostika. myokardu, mozku, št. žlázy, ledvin a jiných podle použité chemické formy
¹⁶⁹ Yb	Yb-EDTA	32,02 d	63; 107; 198	r	diagnostika ledvin
²⁰¹ Tl	TlCl	72,91 h	167, X70-80	c	scintigrafie myokardu

* c = cyklotron, r = reaktor, g = radionuklidový generátor (mateřský radionuklid)

Tabulka 2. PET radionuklidy¹⁹⁻⁴³.

Nuklid	Příprava	Poločas rozpadu	$E_{\max}(\beta^+)$, MeV
¹¹ C	¹⁴ N(p, α)	20,39 min	0,96
¹⁸ F	¹⁸ O(p,n); ²⁰ Ne(d, α)	109,77 min	0,63
¹⁵ O	¹⁴ N(d,n) ¹⁵ O	122,24 s	1,72
³⁸ K	³⁸ Ar(p,n) ³⁸ K;	7,63 min	2,7
⁴⁵ Ti	⁴⁵ Sc(p,n) ⁴⁵ Ti	184,8 min	1,2
⁵⁵ Co *	⁵⁴ Fe(d,n) ⁵⁵ Co	17,53 h	1,51; 1,04
⁶⁰ Cu *	⁶⁰ Ni(p,n) ⁶⁰ Cu	23,70 min	3,9; 3,0
⁶¹ Cu *	⁶¹ Ni(p,n) ⁶¹ Cu	3,33 h	1,22; 1,15; ...
⁶² Cu	⁶² Zn/ ⁶² Cu generátor	9,74 min	2,9
⁶⁴ Cu	⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu; ⁶³ Cu(n, γ)	12,70 h	0,655
⁶⁸ Ga	⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga generátor	67,62 h	1,88; 0,77
⁸⁶ Y *	⁸⁶ Sr(p,n) ⁸⁶ Sr	14,74 h	2,33; 2,02; ...
^{94m} Tc *	⁹⁴ Mo(p,n) ^{94m} Tc	52,00 min	2,42
¹³⁴ La *	¹³⁴ Ce/ ¹³⁴ La gen.	6,45 min	2,67

* nejsou dosud zavedeny v klinické praxi

2.1.3. Radiofarmaka využívané pro terapii nádorových onemocnění

Jedna z metod terapie nádorových onemocnění spočívá v aplikaci ionizujícího záření na místa postižená nádorem. Zdroje záření mohou být externí, nebo interní. Příkladem externího zdroje záření je tzv. „Lexelův gama nůž“, který pracuje na principu fokusace mnoha svazků záření gama do nádorové tkáně. Příkladem interní aplikace zářičů mohou být zrna radioaktivního zlata (¹⁹⁸Au) implantovaná do nádoru (brachyradioterapie)⁴⁴⁻⁴⁶ nebo radiojód (¹³¹I) ve formě roztoku jodidu sodného, který se po aplikaci hromadí v některých nádorech štítné žlázy^{47;48}.

Pro interní radioterapii lze užít zářičů emitujících částice. Jejich cytotoxicita a dosah v tkáni je dána především hodnotou lineárního přenosu energie „linear energy transfer“; LET)^{49;50} emitovaného záření a polohou v buňce. Obecně platí, že α -zářiče mají zhruba o tři řády vyšší hodnotu LET než β -zářiče, avšak o dva řády kratší dolet, viz **Tabulka 3**.

Tabulka 3.

Záření:	β [$E_{\max}=2,8\text{MeV}$]	α [$E_z=6,8\text{MeV}$]
LET [keV/ μm]	0,2	100
Dosah v tkáni [mm]	4,1	<0,1

Biologické vlastnosti částicového záření

O vhodnosti použití radionuklidu dále rozhodují jeho další fyzikálně-chemické vlastnosti, zejména poločas rozpadu a možnost jeho přípravy v dostatečném množství a kvalitě. V současné době se v klinické praxi využívají pouze β -zářiče, ale předmětem studia jsou dlouhodobě i α -zářiče a také radionuklidy s emisí Augerových elektronů. Seznam nejčastěji používaných terapeutických radionuklidů viz **Tabulka 4**¹⁹⁻⁴³.

Je zřejmé, že i radionuklid musí být podán cíleně, tj. v chemické formě, jež má vysokou afinitu k nádorové tkáni, aby se minimalizovala radiační zátěž okolních struktur

Tabulka 4.

Nuklid	Chemická forma ^a	Poločas rozpadu	Max. E β (E α) /MeV	Hlavní E γ / MeV	Výroba ^b
³² P	fosforečnan	14,26 d	1,71	----	r ³² S(n,p)
⁶⁷ Cu	Cu-chelát-peptid	61,83 h	0,57	0,84	c
⁸⁹ Sr	SrCl ₂	50,53 d	1,46	--	r
⁹⁰ Y	Y-citrát, MAb	64,00 h	2,27	--	g(⁹⁰ Sr)
¹⁰⁵ Rh	Rh-chelát-peptid	35,36 h	0,57	0,32	r
^{117m} Sn	Sn-DTPA	13,60 d	0,13	0,158	r
¹³¹ I	I-thyroxin aj.	8,02 d	0,81	0,364	r
¹⁵³ Sm	Sm-EDTMP aj.	46,28 h	0,8	--	r
¹⁶⁶ Ho	Ho-DOTMP	26,83 h	1,6	0,81	r
¹⁸⁶ Re	Re-HEDP Re-peptid	3,71 d	1,07	0,137	r
¹⁸⁸ Re	Re-HEDP	17,00 h	2,11	0,155	g(¹⁸⁸ W)
²¹¹ At	At-protein aj.	7,21 h	(α) prům. 6,8		c
²¹³ Bi	Bi-DTPA-MAb	45,0 min	(α) prům. 7,8		g(²²⁵ Ac)

Důležitější používané nebo studované terapeutické radionuklidy¹⁹⁻⁴³.

a) DTPA = kyselina diethylentriaminopentaoctová, EDTMP = kyselina ethylendiaminotetramethylenfosfonová, DOTMP = kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetramethylenfosfonová, HEDP = kyselina hydroxyethylidifosfonová. MAb = monoklonální protilátka

b) c = cyklotron, r = reaktor, g = radionuklidový generátor.

2.2. „Drug delivery“ systémy

Drug delivery systémy jsou takové aplikační formy léčiv, které umožňují na základě svých fyzikálně-chemických vlastností změnit působení a biodistribuci vlastního léčiva tak, aby bylo dosaženo vhodnějších nebo zcela nových parametrů léčby. Jedním z hlavních důvodů příprav těchto systémů je i snaha o maximální koncentraci léčiva v cílové tkáni při současném snížení koncentrací léčiva ve ostatních částech organismu.

V této disertační práci uvedené systémy jsou uvažovány nejčastěji pro injekční podání ve formě pravých či koloidních roztoků, ačkoliv jsou známy a testovány i systémy založené na použití micel, liposomů či makroagregátů. Zvláštní důraz je kladen na protinádorovou terapii.

2.3. Možnosti cílení „drug delivery“ systémů do nádorové tkáně

Cílení terapeutických systémů do určité tkáně je možné několika způsoby. Jednou z možností je lokální aplikace léčiva do nádoru popř. do kaverny vzniklé po resekci nádoru. Jinou metodou je cílení účinku léčiva fyzikální aktivací, nejčastěji světelným zářením přivedeným světlovodnými vlákny, lokálním ohřevem tkáně, ultrazvukem, magnetickým polem nebo neutronovým tokem. Alternativu představuje využití odlišné morfologie a fyziologie nádorové tkáně, cílení ligandy buněčně specifických receptorů a využití látek, které nádory selektivně akumulují. Variantou této alternativy cílení může být „pretargeting“, tedy dvoufázové cílení ligand-receptorového charakteru s podstatně rychlejší kinetikou.

2.3.1. Cílení léčiv lokální aplikací do tkáně postižené onemocněním

Jde o nejjednodušší způsob cílení účinku léčiva, kdy je léčivo navázané na vhodný nosič aplikováno přímo na místo určení. Nosič zajistí setrvání léčiva na místě aplikace a jeho řízené uvolňování. Z hlediska léčby nádorových onemocnění jsou z tohoto pohledu studovány zejména gely⁵¹ a implantáty⁵² určené k chirurgickému zavedení po vyjmutí většiny nádorové tkáně, která je operabilní, dále pak intratumorální injekce⁵³ a případně intraperitoneálně aplikované systémy proti nádorům diseminovaným v dutině břišní⁵⁴.

Tento postup lze však použít jen u lokalizovaných nádorů. Naopak nevýhodou je, že často nelze zabránit významnějšímu úniku cytotoxického léčiva z nádoru do zdravé tkáně a že tento

způsob mnohdy nelze užít z důvodů anatomického umístění nádoru a obecně u metastáz. Navíc klade značné nároky na techniku provedení.

2.3.1. Cílení účinku léčiva fyzikální aktivací zvnějšku organismu

Aktivace účinku léčiva fyzikálně zvnějšku organismu je přístupem, který kombinuje parenterální aplikaci nosiče léčiva s dodatečným vnějším fyzikálním podnětem. Tím lze dosáhnout dvojího cílení – jednak zacílit vlastní nosič, například ligandem (viz dále), a jednak zacílit samotné aktivující pole, čímž se selektivity násobí.

Cílení ultrazvukovým svazkem je založeno na uvolnění hydrofóbně fyzikálně vázaného léčiva z polymerní micely vlivem ultrazvuku^{55;56}. Nevýhodou tohoto způsobu cílení je relativně slabý efekt zvýšení rychlosti uvolnění léčiva z micely⁵⁶ a nutnost použití výkonného ultrazvukového svazku, který už sám o sobě může mechanicky poškodit okolní tkáň.

Cílení vnějším magnetickým polem představuje v současné době intenzívně studovanou metodu^{3;57;58}. Ve většině studií se do krevního oběhu aplikuje léčivo na superparamagnetické částici (např. „ferrofluidu“) a k místu, kam je třeba zacílit účinek se zvnějšku přikládá silný elektromagnet⁵⁸. Aplikace je omezena na nádorová onemocnění lokalizovaná blízko povrchu těla, respektive na místa, kam lze magnet přiložit, stejně tak je omezena malou biodegradabilitou užívaných materiálů. Výhodou je naopak možnost vytvořit lokální hypertermii v nádoru vysokofrekvenčním vnějším magnetickým polem, a tím docílit případného zvýšení účinku.

Cílení termosensitivními systémy je založeno na změně chování polymerního nosiče při lokálním zvýšením teploty v nádorové tkáni vnějším zahřátím. Je-li v krevním oběhu přítomen nosič léčiva, který je při teplotě lidského těla v krevní plazmě rozpustný, ale za zvýšené teploty dochází k jeho vysrážení, lze této vlastnosti využít k zakoncentrování nosiče v takto přehřáté tkáni⁵⁹. Ze systémů, které jsou ve vodném prostředí rozpustné při laboratorní teplotě, ale mají dolní kritickou rozpouštěcí teplotu (LCST), nad kterou už jsou nerozpustné, se studují především „elastin-like“ peptidové systémy⁶⁰, polyethylenoxid-*block*-polypropylenoxid-*block*-polyethylenoxid⁶¹ a kopolymery poly(*N*-isopropylakrylamid)u^{62;63}, poly(*N*-isopropylmethakrylamid)u⁶⁴ a poly(*N,N*-diethylakrylamid)u⁵⁹. Termosensitivního chování lze využít jak v případě rozpustných systémů, tak i termosensitivních liposomů, gelů a micel⁵⁹. Nevýhodou termosensitivních systémů obecně je fakt, že praktickou limitou lokální hypertermie je teplota cca 42-43 °C, tedy jen o 5-6 °C vyšší, než teplota lidského těla. Vzhledem k tomu, že teplota separace fází termosensitivních polymerů je silně koncentračně závislá a navíc je u kopolymerů značně závislá na obsahu skupin s jinou polaritou, než má základní řetězec (separace fází je založena na hydrofóbní interakci, která

již nad určitou teplotou nemůže být kompenzována solvatací polárních skupin), nelze zaručit kompletní vysrážení v cílové tkáni⁶⁴.

Cílení neutronovým svazkem je založeno na jaderné reakci, kterou vzniká z biologicky relativně neškodného proudu zpomalených epitermálních neutronů v tkáni s dostatečnou koncentrací vhodného stabilního nuklidu sekundární ionizující záření, které má mnohem intenzivnější biologické účinky⁶⁵. Využívá se zde tedy opět duálního cílení, kde se nosič vhodného nuklidu zakoncentruje jiným mechanismem v nádorové tkáni a pak je pacient ozářen úzkým proudem epitermálních neutronů, který je rovněž kolimován na tuto nádorovou tkáň, čímž se násobí selektivity. Tento přístup reprezentuje borová neutronzáchyťová terapie (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT)⁶⁵, využívající tvorby vysoce cytotoxických částic α a jader ${}^7\text{Li}$ z ${}^{10}\text{B}$ epitermálními neutrony. Nevýhodou tohoto přístupu je především nutnost dosáhnout relativně vysokých koncentrací ${}^{10}\text{B}$ v cílové tkáni, aby se dosáhlo dostatečné efektivity a byly potlačeny konkurenční jaderné reakce neutronů s uhlíkem, vodíkem a sodíkem. Je tedy třeba podat injekčně i desítky gramů ${}^{10}\text{B}$ obohacené látky, což klade často nereálné požadavky na nosič léčiva, zejména je-li využito cílení ligandem⁶⁶⁻⁶⁹, které má mezní saturační hodnotu a je závislé na koncentraci receptoru na povrchu buněk cílové tkáně. Další nevýhodou je konkurenční aktivace ${}^{23}\text{Na}$ (přírodní monoisotopický) sodných solí v krvi a tkáních na radioaktivní ${}^{24}\text{Na}$ (β^- zářič, $T_{1/2} = 14,96$ h), která způsobuje, že pacient je zatížen ještě řadu hodin po ozáření indukovanou radioaktivitou.

Fotodynamická terapie je založena na aplikaci makrocyklů, především derivátů porfyrinu a ftalocyaninu, schopných aktivovat po ozáření viditelným světlem kyslík ve tkáních na singletový kyslík, který je velmi reaktivní a působí cytotoxicky (poškozuje zejména DNA)⁷⁰⁻⁷². Příslušná fotosenzibilizující látka, citlivá k viditelnému záření, je aplikována do krevního oběhu a po určité době, kdy dojde k uložení do nádorové tkáně, je světlovedným vláknem k nádoru přivedeno aktivující světelné záření. Vznikající singletový kyslík pak poškodí ozařovanou tkáň. Nevýhod této metody je několik. Především, což bylo nejkritičtější zejména u prvních generací fotosenzibilizátorů, se tyto látky ukládají i v kůži s poměrně dlouhým poločasem vylučování, takže pacient musel zůstat ve tmě nebo silném šeru po řadu dní, aby neriskoval popáleniny slunečním světlem. Další komplikací je zavedení světlovodu přímo k nádoru, což přináší podobné problémy jako lokální aplikace (viz výše). Další nevýhodou je, že nedostatečně prosvětlené okrajové části nádoru, které bývají proliferačně nejaktivnější, jsou nedostatečně inhibovány a mnohdy je tam proliferace buněk hormesním efektem dokonce stimulována. Konečně velmi závažným omezením této metody je, že nádorová tkáň je velmi často hypoxická.

Nedostatek volného kyslíku jako reaktantu pro vznik singletového kyslíku pak vede k jeho nedostatečné tvorbě.

2.3.3. Cílení léčiv založené na morfologické a fyziologické odlišnosti nádorové tkáně

Nově vzniklá nádorová tkáň má řadu morfologických specifíků, na kterých lze založit cílení nosičů léčiv. Především jde o mnohem větší prostupnost cévního systému nádorové tkáně pro velké molekuly (fenestrace), což spolu s nedostatečným nebo často i úplně chybějícím odtokem lymfy způsobuje hromadění velkých molekul v nádorové tkáni [tzv. „Enhanced Permeation and Retention“ (EPR) efekt]⁷³. Proto se makromolekuly o velké molekulové hmotnosti, micely, nanočástice a liposomy hromadí v nádorové tkáni často i s více než dvacetinásobnou selektivitou oproti normální tkáni⁷⁴. Vzhledem k charakteru interakce se tomuto cílení říká pasivní a hojně se využívá při návrhu struktur různých nosičových systémů pro protinádorová léčiva⁷⁴⁻⁷⁹. Dostatečně velké částice lze cílit i do tkání, které mají zúžený průsvit krevních kapilár (embolizace⁸⁰), zejména jsou-li aplikovány do arterie vyživující příslušný orgán, jako například částice TheraSphereTM. EPR efekt je dosti univerzální pro mnoho pevných nádorů, ale například pro radionuklidy s kratším poločasem rozpadu je jeho kinetika příliš pomalá (k akumulaci dochází v řádu hodin až dnů). Navíc EPR efekt cílí do intersticiálního prostoru tkáně, ale nikoliv dovnitř buněk. Proto je výhodné EPR efekt kombinovat s cílením ligandem, uvolňováním léčiva řízeným hodnotou pH apod. (viz výše).

Nádorová tkáň je z důvodů intenzivního metabolismu a relativního podzásobení kyslíkem poměrně kyselá (pH 5-6) oproti krevní plazmě (pH 7,4)⁸¹. Lze tedy využít systémů, které uvolní léčivo při snížení pH z neutrální do mírně kyselé oblasti. Toho lze docílit například štěpením acidolabilní hydrazonové nebo *cis*-akonitylové spojky mezi léčivem a polymerem, užitím liposomálních lékových forem, kdy se liposom v kyselém prostředí rozpadá, vazbou léčiva charakteru slabě hydrofóbní báze hydrofóbně do jádra polymerní micely a případně aplikací polymerní micely degradovatelné v kyselém prostředí^{81,82}.

2.3.4. Cílení ligandem buněčně specifického receptoru

Mnoho typů nádorových buněk hyperexprimuje na svém povrchu receptory pro ligandy a nebo antigeny normálně přítomné v organismu v malé míře, často mnohonásobně oproti normální tkáni, nebo dokonce receptory a antigeny v normální tkáni nepřítomné. Jestliže je příslušný komplementární ligand k takovému receptoru nebo protilátka proti takovému antigenu připojena k nosiči léčiva, pak může dojít ke specifické interakci takového nosiče léčiva s nádorovými buňkami a v důsledku toho k jeho akumulaci v nádorové tkáni. Je-li navíc receptor schopný po vazbě ligandu endocytózy, může takový ligand zprostředkovat i endocytózu celého systému. Cílení ligandem může být velmi specifické, ligand však musí být s nosičem spojen přes spojku („spacer“), která nebrání vazbě na receptor a receptor je v kompartmentu dostupném pro nosič. Hlavními nevýhodami a omezeními cílení ligandem jsou různé fáze vývoje nádorové buňky, ve kterých buňka nemusí exprimovat příslušný receptor, a navíc saturační kapacita a pomalá obnova dostupných receptorů v případě vyšších dávek směrovaného léčiva. Problémem může být i snížení koncentrace receptorů pro daný ligand v cílové tkáni vlivem zpětné vazby jako reakce buňky na nadbytek tohoto ligandu („downregulation“), u nádorových onemocnění v pozdějších stádiích i diferenciaci nádorové tkáně na imunologicky a biochemicky nehomogenní populace a následná selekce rezistentních populací vlivem cíleného léčiva. Podstatným faktorem může rovněž být fenotypová variabilita nádorových onemocnění, takže je obtížné najít ligand, který by byl alespoň částečně univerzální pro určitou skupinu nádorových onemocnění. Řada struktur, hyperexprimovaných v nádorové tkáni, užívaných ke studiu možnosti cílení (například folátový receptor, viz dále) je v určité, byť menší míře přítomna i v jiných tkáních, které pak mohou být cytostatikem také zasaženy.

Ke studiu cílení léčiv do jater a retikuloendotelového systému (RES) se využívá laktóza, galaktóza nebo galaktosamin (parenchymatické jaterní buňky), respektive trinitrofenylová skupina (neparenchymatické jaterní buňky)⁸³⁻⁸⁵. RES (játra, slezina, lymfatické uzliny, makrofágy) rovněž zachytává látky s obecně špatně biokompatibilní strukturou⁸⁶. Toho se dá využít i pro radiodiagnostiku RES. Mohlo by jít i o užitečný nástroj pro adjuvantní chemoterapii po operativním odstranění nádorové tkáně z hlediska tvorby metastáz přes lymfatický systém⁸⁷.

Tvorba protilátek představuje jednu z velmi efektivních specifických obran lidského těla proti cizorodým strukturám. Možnost použití protilátek proti nádorovým antigenům jako cílících skupin byla studována pro liposomy (tzv. imunoliposomy⁸⁸), micely (tzv. imunomicely^{78;89}) a další nosičové systémy^{84;90}. Z hlediska nevýhod a omezení cílení protilátkami je to jednak jejich vysoká cena, vysoká citlivost ke ztrátě vazebné aktivity vlivem chemických modifikací a tím i obtížná

reprodukovatelnost aktivity připravených preparátů, obtížné a finančně náročné čištění od ostatních bílkovin ze zdrojového biologického systému, obtížně dosažitelná bezinfekčnost zejména u preparátů vyrobených z krve, pomalá kinetika vychytávání, silné nespecifické interakce protilátek v jiných než cílových tkáních, nutnost použít protilátku téhož živočišného druhu kvůli imunogenicitě (případně monoklonální protilátku produkovanou hybridomovou technologií buňkami téhož živočišného druhu), ale i problémy s internalizací do buněk⁹¹. Vysoká molekulová hmotnost imunoglobulinů (cca 150 kDa u IgG) sice zvyšuje EPR efekt, ale snižuje dosažitelnou přepravní kapacitu pro léčivo. Proto se soustředí pozornost na Fab fragmenty protilátek o nižší molekulové hmotnosti⁹².

Myšlenka cílení lektiny, oligomerními rostlinnými bílkovinami schopnými selektivně vázat sacharidické struktury, je založena na odlišné glykosylaci membrán nádorových buněk a tím i vyšší afinitě mnoha lektinů k nádorové tkáni oproti normální tkáni⁹³⁻⁹⁵. Navíc řada lektinů je sama silně cytotoxických (např. viskotoxin, ricin) inhibicí proteosyntézy. Nevýhody cílení lektiny plynou především z toho, že jde o rostlinné, tělu cizí a tudíž imunogenní bílkoviny. Dále podjednotky funkční oligomerní struktury jsou vázány poměrně slabě nekovalentně, takže mají tendenci k reverzibilní deagregaci, nehledě na fakt, že konstanta stability vazby sacharidů na lektiny je poměrně nízká pro účely efektivního cílení.

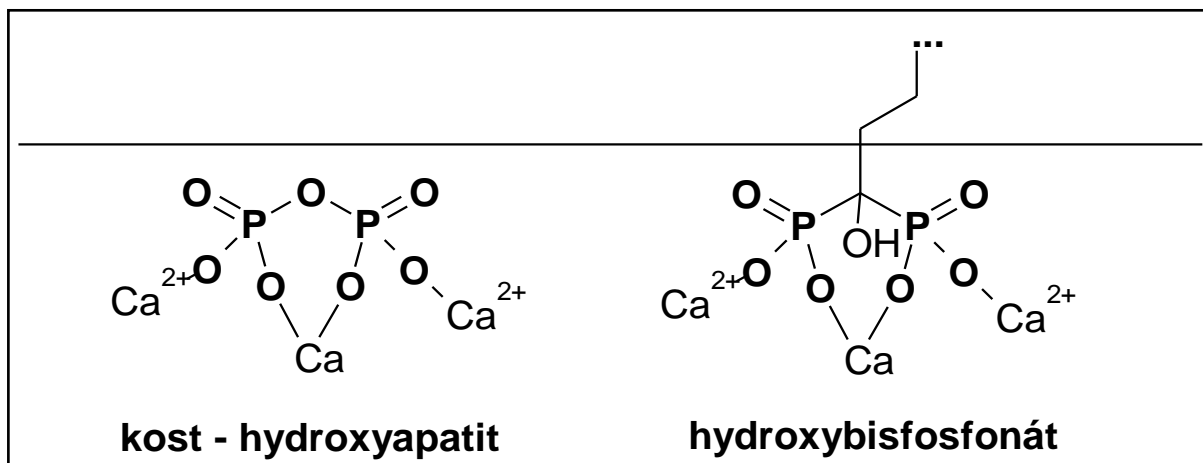
Proliferace tkání je podmíněna růstovými faktory a řada nádorů hyperexprimuje receptory pro tyto faktory, což představuje další možnou strategii pro cílení nosičů léčiv^{67;96}. Nevýhodou těchto ligandů jako směřujících jednotek je kromě poměrně malé transportní kapacity zejména silné zpětnovazebné potlačení exprese receptoru vlivem nadbytku ligandu v cílové tkáni⁹⁷.

Nově vytvořená nádorová vaskulatura obsahuje ve zvýšené míře integriny, které specificky vážou RGD (Arg-Gly-Asp) peptid a jeho analoga, na čemž je založen design polymerních nosičů pro cílení do nádorové vaskulatury⁹⁸⁻¹⁰⁰. Tkáň ozářená ionizujícím zářením má mnohem vyšší vazebnou kapacitu pro RGD indukci exprese příslušného integrinu, což představuje další možnost zvýšení selektivity RGD cílení kombinací s radioterapií (synergický efekt)^{101;102}. V poslední době se ve velké míře využívá pro vyhledávání potenciálních ligandů pro (nejen) nádorovou tkáň metoda „phage display“ kombinatoriálních knihoven¹⁰³.

Kostní tkáň je v podstatě přírodní orientovaný kompozit na bázi anorganického minerálu hydroxyapatitu. Tento minerál díky příhodné krystalové struktuře váže silně hydroxybisfosfonáty, které se chovají jako strukturní analoga difosfátu normálně přítomného ve struktuře hydroxyapatitu^{104;105}, viz **Obrázek 1**. Hydroxybisfosfonáty a jejich kovové komplexy se silně a velmi rychle po podání do organismu hromadí v kostech¹⁰⁶ a inhibují jejich odbourávání, čehož se využívá terapeuticky pro paliativní léčbu kostních metastáz¹⁰⁵, terapii osteoporózy a Pagetovy

choroby, i diagnosticky pro scintigrafii kostí, zejména pro radiodiagnostiku kostních metastáz. Byl proto navržen modelový bisfosfonátem cílený nosič léčiv (radionuklidů) pro kostní onemocnění¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Obrázek 1.



Struktura HA a jeho interakce s hydroxybisfosfonátem

Biokompatibilní polysacharid hyaluronan je rovněž využíván ke konstrukci slibných nosičových systémů pro léčiva cílených do nádorové tkáně, protože má afinitu k receptoru CD44, hyperexprimovanému v řadě nádorových tkání¹¹⁰. Nevýhodou hyaluronanu je nutnost jeho izolace z biologického materiálu, podobně jako u protilátek.

I řada enzymů vázaných na membrány je ve zvýšené míře exprimována v nádorové tkáni, což představuje další trend cílení do nádorové tkáně pomocí inhibitorů těchto enzymů jako cílících ligandů. Především jde o karboxypeptidázu II¹¹¹ a isoenzym *onco*-APázu (alkalická fosfatáza hyperexprimovaná v řadě mozkových nádorů, jejímiž inhibitory jsou deriváty 1,4-dihydronaftochinon difosfátu¹¹²).

2.3.5. Cílení specifickými přenašeči živin a vitaminů kumulujících se ve zvýšené míře v nádoru

Nádorová tkáň jako tkáň rychle se dělicích buněčných populací a rychle rostoucí, spotřebovává ve srovnání se zdravou tkání, jež neroste tak rychle, hodně organických i minerálních živin a vitaminů. Je tedy přirozené, že ve zvýšené míře akumuluje tyto živiny, případně jejich přenašeče, což lze využít pro cílení nosičů léčiv.

Železo je v organismu transportováno v podobě bílkoviny transferrinu. Bylo zjištěno, že transferrin je účinným nástrojem cílení různých nosičů léčiv do nádorové tkáně¹¹³, jeho hlavní nevýhodou však je nutnost jeho izolace z lidské plazmy.

Jedním z vitaminů je i kyselina listová (folát). Bylo zjištěno, že receptory zprostředkovávající příjem folátu jsou silně hyperexprimovány v mnoha typech nádorů. Folát je proto dodnes velmi studovaným cílícím ligandem¹¹⁴⁻¹¹⁶. Folát se stal i modelovou látkou řady studií na cílení obecně, například kolik molekul folátu stačí na cílení jednoho liposomu a jak ovlivní hustota cílících skupin na povrchu liposomu selektivitu¹¹⁷ anebo jak ovlivní způsob vazby folátu (který z jeho dvou karboxylů je využit pro vazbu) jeho cílící schopnost¹¹⁸. Folát se zprvu zdál ideální cílící skupinou, čím dál více autorů však poukazuje na jeho malou selektivitu k nádorové tkáni vzhledem k tomu, že jde o přirozený vitamin¹¹⁹. Antagonisté kyseliny listové (antifolika, např. Methotrexát nebo modernější Raltitrexát) jsou nicméně velmi užívanými a účinnými kancerostatiky, protože tento vitamin je nezbytný pro biosyntézu bází nukleových kyselin a tím i pro buněčné dělení.

2.3.6. „Pretargeting“ a jiné studované techniky

Když byla zjištěna pomalá kinetika vychytávání řady zejména bílkovinných ligandů jako jsou protilátky v nádorové tkáni, začaly se vyvíjet metody redukující tuto, zejména z hlediska např. imunoradioterapie velmi podstatnou nevýhodu, pomocí tzv. „pretargetingu“. „Pretargeting“ je založen na rozdělení cílení do dvou kroků. Nejprve se do cílové tkáně vnese pomalu, ale selektivně cílící skupinou sám o sobě neškodný receptor, na který existuje cílení s podstatně rychlejší kinetikou. Po určité době, nutné k akumulaci v cílové tkáni, se pak podá vlastní účinné léčivo cílené ligandem pro tento sekundárně vnesený receptor. Ze studovaných přístupů jde především o ADEPT („antibody directed enzyme prodrug therapy“¹²⁰), GDEPT („gene directed enzyme prodrug therapy“¹²⁰), PTAPT („peptide transporter-associated prodrug therapy“¹²⁰), LEAPT („lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy“¹²¹) a pretargeting pomocí specifické

interakce biotin-avidin nebo biotin-streptavidin⁸³. V případě GDEPT je do cílové tkáně nejprve vnesen gen pro enzym, který není obsažen v normální tkáni a který je schopen štěpit vazbu v nízkomolekulárním proléčivu („prodrug“, viz výše), která je neštěpitelná jakýmkoliv jiným enzymem v organismu. Proléčivo, samo o sobě neúčinné, se tedy aktivuje pouze v cílové tkáni. Zbytek je pak obdobný jako u „prodrug“ strategie. ADEPT, LEAPT a PTAPT využívají cílení ligandem (protilátkou – ADEPT, lektinem – LEAPT respektive peptidem – PTAPT), kterým je do cílové tkáně vnesen enzym pro prodrug strategii. Pretargeting pomocí velmi rychlé a specifické interakce biotin-avidin nebo biotin–streptavidin představuje vnesení bílkoviny avidinu respektive streptavidinu do cílové tkáně pomocí vhodného pomalu cílicího ligandu. Pak je aplikován konjugát biotinu s příslušným léčivem, který je vycytán v příslušné tkáni na avidinu respektive streptavidinu¹²⁰. Nevýhodou pretargetingu je značná komplikovanost těchto systémů, které způsobují jejich vysokou cenu, obtížnou reprodukovatelnost přípravy a těžko předvídatelný nespolehlivý účinek. Kromě toho využívají bílkoviny, což s sebou nese nevýhody jmenované u cílení protilátkami (viz výše).

2.4. „Drug delivery“ systémy (DDS) v nukleární medicíně

Přestože popsané možnosti cílení „drug delivery“ systémů lze rozšířit o oblast vývoje nových radiofarmak, nestudují se dosud dle dostupné literatury tyto systémy v očekávané míře. Využití radionuklidů jako aktivní složky DDS může odstranit mnohé limitující faktory DDS, ať již z hlediska nutnosti konstruovat nosič tak, aby uvolňoval léčivo přednostně v místě určení, tak z hlediska množství užitého nosiče. Je na místě podotknout, že vazba radionuklid-nosič musí být naopak velmi pevná, množství užitých nosičových systémů a finančně náročnějších cílicích skupin (protilátky a jejich fragmenty, peptidy) je však obecně velmi malé, typicky v řádu miligramů. Stávající DDS s chemickými léčivy typicky vyžadují dávkování v řádu stovek miligramů až desítek gramů, a tak se jejich použití v humánní medicíně stává obtížnějším.

Nevýhodou DDS nesoucích radionuklidy je skutečnost, že během transportu léčiva krevními cestami je radiačně zatěžována i zdravá tkáň, z čehož plyne požadavek na rychlou kinetiku akumulace takového systému v cílové tkáni.

3. Cíle disertační práce

Tato disertační práce je zaměřena na přípravu, charakterizaci a studium vlastností makromolekulárních nosičových systémů na bázi biokompatibilních polymerů pro radiofarmaka a chemoterapeutika navržených pro léčbu a diagnostiku nádorových onemocnění. Cílem je vývoj a poznání základních fyzikálně-chemických a radiochemických vlastností navržených systémů. K pochopení problematiky významně přispěla příprava a studium fyzikálně-chemických a posléze i biologických vlastností následujících systémů:

1. Termoresponsivní polymery navržené pro lokální terapii.
2. Systém určený pro lokální i systémovou radioterapii s pasivním cílením EPR efektem do tkáně pevných nádorů založený na stříbrném koloidu nesoucím ^{211}At .
3. Systém kombinující při systémové aplikaci pasivní cílení EPR efektem s aktivním cílením hydroxybisfosfonátovými skupinami do nádorové kostní tkáně.

4. Experimentální část

4.1. Materiál

Byly použity následující chemikálie a radiochemikálie, bez dodatečného čištění, není-li uvedeno jinak: (^{211}At) astat (ÚJF Řež), 6-aminohexanová kyselina (Fluka Chemie AG, Německo, ČR zastoupení Sigma-Aldrich s.r.o.), čistá; 1-aminopropan-2-ol (Fluka), čistý; 2,2'-azobis(isobutyronitril) (AIBN; Fluka), čistý, 3 x překrystalován z acetonu; benzen (Pliva Lachema a.s., Česká republika), p.a., vysušený sodíkem a předestilovaný; cyklohexan (Lachema), p.a., skladován nad sodíkem a před použitím předestilován; *N,N'*-dicyclohexylkarbodiimid (DCC; Fluka), čistý; cyklohexadien (Fluka), čistý; dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Fluka), p.a.; dihydrogenfosforečnan draselný (Fluka), p.a.; 4,5-dihydrothiazol-2-thiol (Fluka), čistý; dichlormethan (Lachema), p.a.; 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridin (Fluka), čistý; *N,N*-dimethylformamid (DMF; Fluka), čistý; dimethylsulfoxid (DMSO; Fluka), p.a.; dioxan (Lachema), p.a.; doxorubicin hydrochlorid (Fluka); ellipticin (Sigma-Aldrich), syntetický; *N*-ethylkarbazol (ECZ; Fluka), čistý; glycyl-L-fenylalanin (Fluka); hexahydrát dusičnanu vápenatého (Fluka), p.a.; hexan (Lachema), p.a.; hydrazinhydrát (Fluka), 50 %; hydrid sodný (Fluka), 60 % disperse v minerálním oleji; hydroxid draselný (Lachema), p.a.; hydroxid sodný (Lachema), p.a.; 2-hydroxy-2-methyl-1-fenyl-1-propanon (Aldrich), čistý; hydroxyapatit (HA; Fluka); chlorid sodný (Lachema), p.a.; chlorid (^{90}Y) yttritý (Lacoméd s.r.o., Česká republika); chloroform (Lachema), p.a.; isopropanol (Lachema), p.a.; jód (Lachema); chlorid fosforitý (Fluka); jodid (^{125}I a ^{131}I) sodný (Lacoméd); kyselina L-askorbová (Fluka), p.a.; kyselina fosforitá (Fluka), čistá; kyselina octová (Lachema), p.a.; L-leucylglycin (Fluka); methakryloylchlorid (Fluka), čistý, předestilovaný (b.v. 95 °C při atmosférickém tlaku); 4-methoxystyren (Fluka), čistý; methylester kyseliny sulfanyloctové (Fluka), čistý; octan sodný bezvodý (Fluka), p.a.; palladium na uhlí (5 %; Fluka), čisté; polyethylenoxid monomethyl ether (PEO monomethyl ether; $\overline{M}_{r,n}$ = 2000 a 5000; Fluka); silikagel 60 (Fluka), pro chromatografii; sodík (Lachema), čistý; stříbro koloidální (Fluka), Sudan III (Fluka), Standard; tetrahydrofuran (THF; Lachema), p.a., skladován nad sodíkem a před použitím předestilován; toluen (Lachema), p.a., skladován nad sodíkem a před použitím předestilován; L-tyrosinamid (Sigma-Aldrich), čistý.

Dialyzační střevo Spectra Por 3 (velikost pórů 3500 Da) bylo zakoupeno u Serva Electrophoresis GmbH (Německo), Sephadex LH 60 a Sephadex G 25 média pro gelovou

permeační chromatografii (GPC) a odsolovací kolonky PD-10 byly zakoupeny u Amersham Pharmacia Biotech AB (Švédsko).

4.2. Metody

4.2.1. Termoresponsivní polymery pro lokální radioterapii

4.2.1.1. Příprava termoresponsivního polymeru

Polymerace a charakterizace polymerů provedl na Ústavu makromolekulární chemie AVČR, v.v.i. Mgr. Martin Hrubý, PhD.

Příprava iniciátoru 3, 3' -azobis (4-kyano-4-methyl-1-oxobutan-1,4-diy)bis(thiazolin-2 thionu) (TT-ABIK; II)

4,4'-Azobis(4-kyanopentanová kyselina) (2,00 g, 7,14 mmol), thiazolidin-2-thion (1,87 g, 15,7 mmol) a 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridin (96 mg, 0,79 mmol) byly rozpuštěny v THF (20 ml). V dalších 5 ml THF byl rozpuštěn dicyklohexylkarbodiimid (DCC; 3,88 g 18,8 mmol). Oba roztoky byly ochlazeny na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a smíchány. Teplota $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla udržována 1 h, poté byla zvýšena na $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a na této výši udržována 24 h. Po skončení reakce bylo přidáno 0,1 ml kyseliny octové a 1 h mícháno za laboratorní teploty. Sraženina 1,3-dicyklohexylmočoviny byla odfiltrována a THF odpařen. Olejovitý zbytek byl rozpuštěn v malém množství dichlormetanu a ponechán krystalizovat ze směsi dichlormetan-diethylether. Výtěžek: 3,0 g (87%), b.t. 126–130 $^{\circ}\text{C}$. Elementární analýza: (teorie/změřeno): C 44,79/45,16 %, H 4,59/4,74 %, N 17,41/16,95 %, S 26,57/26,47 %. Molární absorpční koeficient $\epsilon_{305\text{ nm}} = 20,500\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (methanol). $^1\text{H NMR}$: $\sigma = 1,56$ (s, 6H), 2,75 (m, 4H), 2,95 (m, 4H), 3,19 (m, 4H), 4,04 (m, 4H) Reakční schéma viz **Obrázek 2**

*Příprava série poly(*N*-isopropylakrylamidů) s *L*-tyrosinovou koncovou skupinou (IV)*

N-Isopropylakrylamid (500 mg, 4,42 mmol) a TT-ABIK (II, navážka iniciátoru viz **Tabulka 5.**) byly rozpuštěny v THF a polymerizovány 12 h při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ pod dusíkem. Poté byl do reakční směsi přidán *L*-tyrosinamid (180 mg, 1,00 mmol), roztok byl dále míchán 3 h při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zfiltrován. Z filtrátu byl polymer vysrážen diethyletherem (Et_2O ; 40 ml), promyt diethyletherem, znovu rozpuštěn v THF (5 ml) a opět přesrážen diethyletherem (50 ml). Poté byl polymer (IV) zfiltrován a sušen ve vakuu. Další purifikace zahrnovala dialysu (72 h, proti destilované vodě), lyofilizaci a gelovou permaeční chromatografií (Sephadex G-25, mobilní fáze – destilovaná voda).

Nakonec byly frakce obsahující polymer lyofilizovány a byly stanoveny výtěžky (viz **Tabulka 5**). Obsah L-tyrosinamidu v polymerech **IV-1**, **IV-2**, **IV-3** byl stanoven spektrofotometricky ($\lambda=275$ nm) ve vodě, viz **Tabulka 5**.

Tabulka 5.

Polymer	IV-1	IV-3	IV-5
Iniciátor (molární %)	1,0	3,0	5,0
Iniciátor (mg)	21	64	107
Iniciátor (mmol)	0,044	0,133	0,221
Výtěžek (%)	52	37	46
M_n (kDa)	9,3	7,5	6,7
M_w (kDa)	20,9	18,3	17,2
Obsah funkční skupiny ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	9,0	26,6	41,5

Polymery s koncovým L-tyrosinamidem (**IV-1**, **IV-3**, **IV-5**)

Příprava série poly(N-isopropylakrylamidů s koncovou skupinou – DTPA (VI)

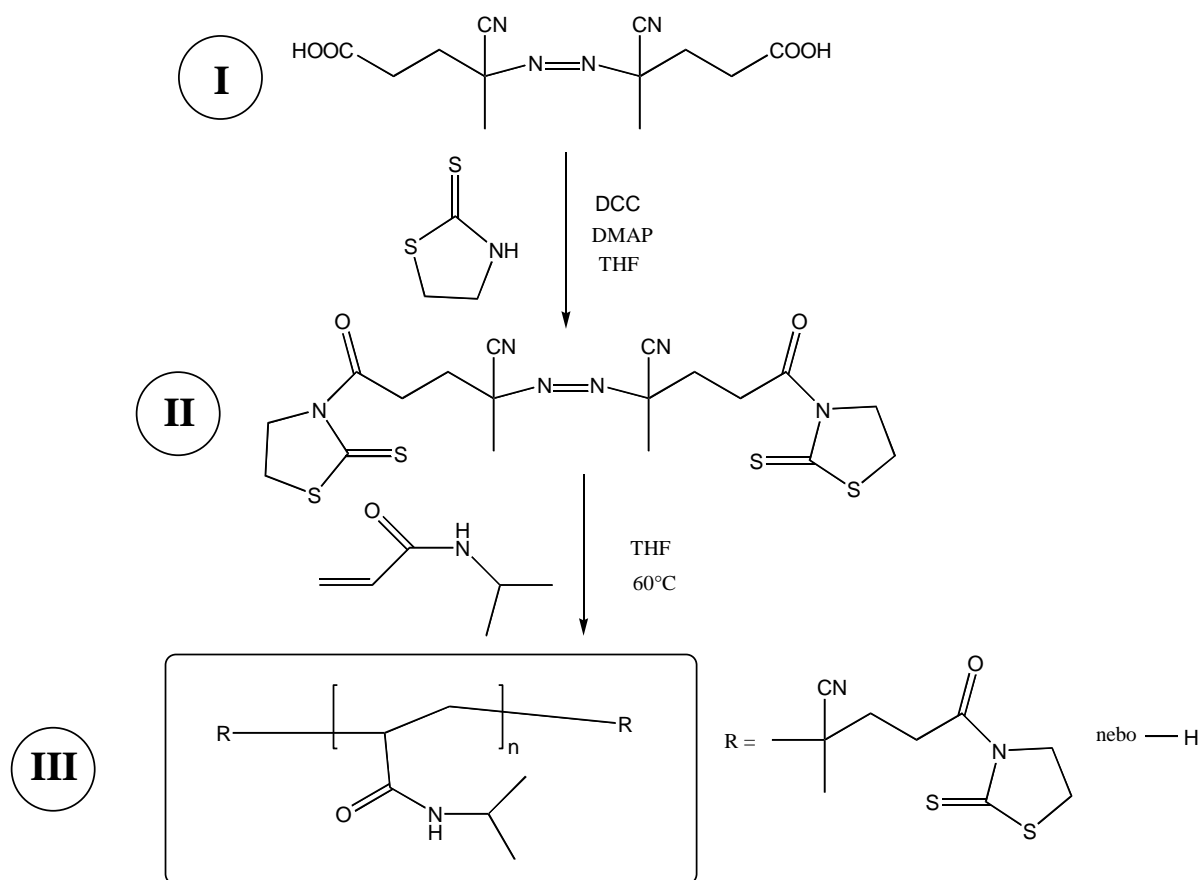
N-Isopropylakrylamid (1000 mg, 8,84 mmol) byl polymerován (viz syntéza **IV**) na roztok polymeru **III** (viz **Obrázek 2.**) K tomuto roztoku byl přidán ethylendiamin (590 μl , 8,84 mmol) a za stálého míchání byl roztok zahříván na 60 °C po 2 h. Polymer **V** byl sražen diethyletherem (80 ml) a odfiltrován. Následovalo rozpuštění v THF (10 ml), znovu vysrážení diethyletherem (100 ml), filtrace a sušení ve vakuu. Polymer byl dále čištěn gelovou permeační chromatografií (Sephadex G-25, mobilní fáze – destilovaná voda). Nakonec byly frakce obsahující polymer lyofilizovány (viz **Tabulka 6**).

Tabulka 6.

Polymer	V-1	V-3	V-5
Iniciátor (molární %)	1,0	3,0	5,0
Výtěžek (%)	74	76	85
M_n (kDa)	7,9	7,0	5,5
M_w (kDa)	18,6	18,5	14,3

Polymerační podmínky a charakteristiky polymerů **V-1**, **V-3** a **V-5**

Obrázek 2.



Syntéza reaktivního polymeru **III**.

Polymer **V** (300 mg) byl rozpuštěn v dimethylacetamidu (6 ml) a ethyldiisopropylaminu (500 μl , 2,92 mmol). K roztoku byl přidán 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridin (50 mg, 0,41 mmol), načež byl roztok za stálého míchání zahřát na 50 °C. Poté byl k roztoku přidán DTPAA (214 mg, 0,6 mmol) a roztok byl dále míchán po 3 h při teplotě 50 °C a dalších 12 h za laboratorní teploty. Poté byla reakce ukončena přidáním 30 ml vody. Polymer byl vysrážen rozpuštěním 15 g síranu amonného v reakční směsi a odfiltrován. Surový polymer byl rozpuštěn v destilované vodě (20 ml) a čištěn gelovou chromatografií za použití Sephadexu G-25 v koloně o objemu 120 ml a vodného roztoku octanu amonného (0,8 M) jako mobilní fáze. Frakce obsahující polymer byly smíchány, dialyzovány proti destilované vodě 72 h a nakonec lyofilizovány.

Výtěžky viz **Tabulka 7**.

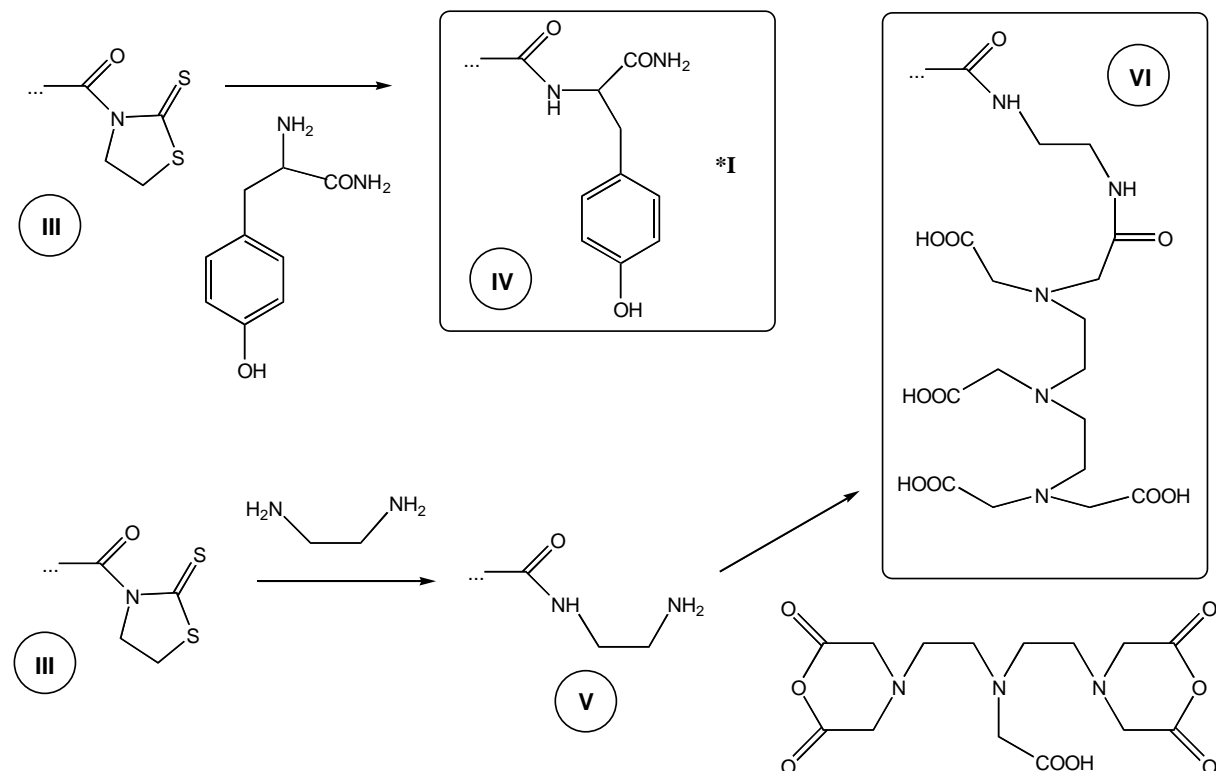
Obsah koncových DTPA skupin byl stanoven chelatometricky titrací octanem zinečnatým (0,25 mM) v pufru $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ (0,2 M, pH=9,25) za použití Eriochromové černi T jako indikátoru.

Tabulka 7.

Polymer	VI-1	VI-3	VI-5
Výtěžek (%)	84	84	79
M_n (kDa)	11,7	8,9	7,8
M_w (kDa)	19,9	18,4	17,9
Obsah funkční skupiny ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	6,9	9,3	11,5

Charakteristiky polymerů **VI-1**, **VI-3** a **VI-5**

Obrázek 3.



Příprava polymerů **IV**, **V**, **VI**.

4.2.1.2. Studium fázové separace termoresponsivních polymerů

Fázová separace termoresponsivních polymeru byla studována diferencíální skenovací kalorimetrií (differential scanning calorimetry; DSC). Měření byla provedena na kalorimetru Perkin-Elmer DSC Pyris 1 (Perkin-Elmer, USA) v isotonickém vodném roztoku NaCl ($0,15 \text{ mol.l}^{-1}$) jako modelu fyziologického prostředí.

4.2.1.3. Isotopické značení termoresponsivního polymeru ^{125}I

Termosensitivní polymer **IV** s koncovou L-tyrosinamidovou skupinou byl značen elektrofilní radiojodací isotopem ^{125}I chloraminovou metodou upravenou podle ¹²². Pro značení byl použit polymer s nejvyšším obsahem L-tyrosinamidové skupiny (**IV-5**). Postup byl následující:

Do mikrozkušavek Eppendorf bylo odpipetováno 200 μl destilované vody, 50 μl PBS pufru (phosphate buffered saline) o $\text{pH} = 7,4$, 20 μl vodného roztoku polymeru **IV-5** (20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 5 μl vodného roztoku chloraminu-T (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 5 μl vodného roztoku Na^{125}I (9 $\text{MBq}\cdot\text{ml}^{-1}$). Roztoky byly inkubovány požadovanou dobu (1; 1,5; 10; 30 a 60 minut) při 20 °C. Inkubace byla ukončena přidávkem 200 μl PBS 7,4 a 50 μl vodného roztoku kyseliny askorbové (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Polymerní frakce byla po značení oddělena z reakční směsi gelovou filtrací na odsolovacích kolonkách PD-10 za použití destilované vody jako elučního činidla. Radioaktivita jednotlivých frakcí (o objemu 1,4 ml) byla stanovena na scintilačním detektoru $\text{NaI}(\text{Tl})$, typ 74038 (RFT, Německo). Relativní chyba měření byla nižší než 5 %.

Vliv pH na výtěžek značení (^{125}I) polymeru **IV-5** byl testován za analogických podmínek za použití PBS pufru o $\text{pH} = 4,8$ po inkubační dobu 30 minut.

Vliv teploty na výtěžek radioznačení polymeru **IV-5** byl studován za podmínek PBS o $\text{pH} = 7,4$ a inkubace 30 minut při teplotách 20 °C, 37 °C a 50 °C.

Vliv koncentrace polymeru na výtěžek značení byl studován za analogických podmínek (PBS pufr o $\text{pH} = 7,4$ a inkubace 30 minut při teplotě 20 °C) s proměnnou koncentrací polymeru v roztoku: 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; 2,0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.2.1.4. Isotopické značení termoresponsivního polymeru ^{90}Y

Polymer **VI-5** nesoucí chelatující skupinu (DTPA) byl značen ionty ^{90}Y ve vodném roztoku octanu amonného (0,5 M) jako pufru.

Vodný roztok $^{90}\text{YCl}_3$ (12 $\text{MBq}\cdot\mu\text{l}^{-1}$; 10 μl) byl inkubován s roztokem polymeru **VI-5** (10 $\text{mg} / 200 \mu\text{l}$) ve vodném roztoku octanu amonného (0,5 M). Inkubace (10 minut) proběhla za laboratorní teploty (20 °C). Označená polymerní frakce byla z reakční směsi separována GPC za pomoci odsolovací kolonky PD-10 elucí roztokem octanu amonného (0,5 M). Relativní radioaktivita 1,4ml frakcí byla stanovena v ionizační komoře Bqmeter 4 (BQM; Česká republika) nebo pomocí přístroje Contamat FHT 111M (ESM Eberline Instruments Strahlen und Umwelttechnik GmbH; Německo).

Vazebná kapacita polymeru **VI-5** pro ^{90}Y byla stanovena řadou vzorků s klesající koncentrací polymeru **VI-5** v reakčním prostředí, dokud nebylo dosaženo přibližně 50% radiochemického výtěžku. Této hodnoty (přesně 57 %) bylo dosaženo inkubací vodného roztoku $^{90}\text{YCl}_3$ ($3,7 \text{ GBq}\cdot\text{ml}^{-1}$; 10 μl) s roztokem polymeru **VI-5** (5 μl ; 10 mg ml) ve vodném roztoku octanu amoného (0,5 M; 200 μl). Tomu odpovídá vazebná kapacita polymeru **VI-5** pro ^{90}Y cca $420 \text{ MBq}\cdot\text{mg}^{-1}$. Separace polymeru z reakčního roztoku a měření vzorků viz výše.

4.2.2. Stříbrné nanočástice navržené pro lokální radioterapii a pasivní cílení

4.2.2.1. Příprava biokompatibilizovaných stříbrných nanočástic

Komerčně dostupný stříbrný koloid (stříbrné nanočástice stabilizované přídavkem proteinu („silver proteinate“; 6,77 % Ag, 50 mg) byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody. Následoval přídavek sukcinimidylkarbonátu monomethoxypolyethylenoxidu ¹²³(„aktivovaný PEO“), (500 mg) a roztok byl za míchání a přídavku 1M roztoku NaOH udržován 60 minut na pH = 7,4. Poté byl roztok lyofilizován. Byly připraveny dva druhy nanočástic lišící se v molekulové hmotnosti použitého PEO (PEO-5000 a PEO-2000). Produkt byl lyofilizován a charakterizován elementární analýzou (obsah stříbra 0,62 % resp. 0,63 % je v dobré shodě s teoretickým obsahem 0,62%) a dynamickým rozptylem světla.

4.2.2.2. Studium chování nanočástic stříbra ve vodných roztocích metodami rozptylu světla

Zdánlivý hydrodynamický průměr D_H a šíře jeho distribuce $\Delta D_H / D_H$ stříbrného koloidu a biokompatibilizovaných nanočástic s volným PEO a též bez něj ve vodném roztoku (1,0 mg.ml⁻¹) byly určeny pomocí dynamického rozptylu světla (QELS) a přístroji Nano-ZS zetasizer (Malvern, UK).

QELS byl také použit na zjištění interakcí nanočástic modifikovaných PEO-5000 (0,5 mg.ml⁻¹) s hovězím sérovým albuminem (BSA, 10 mg.ml⁻¹) ve fyziologickém roztoku (0,15 mol.l⁻¹ NaCl), celková doba inkubace byla 7 h.

4.2.2.3. Isotopické značení stříbrných nanočástic ²¹¹At

Modifikované stříbrné nanočástice (12,5 mg) byly rozpuštěny v 450 μ l vody, k roztoku bylo přidáno 50 μ l PBS pufru (pH = 5,0 nebo 7,4 nebo 8,0) nebo 50 μ l vody. Pak byl přidán methanolický roztok ²¹¹At (5 μ l) o přibližné objemové aktivitě 1 MBq ml⁻¹. Po separaci gelovou permeační chromatografií (PD-10) byla měřena radioaktivita sebraných frakcí o objemu cca 1,4 ml a stanoveny radiochemické výtěžky.

Dále byl studován vliv redukčních a oxidačních činidel na afinitu astatu k stříbrným nanočásticím. K zásobnímu roztoku ²¹¹At (20 μ l) bylo přidáno 5 μ l roztoku KMnO₄, nebo NaBH₄ (10 mg.ml⁻¹) a vše bylo inkubováno 15 minut. Další postup byl shodný s výše uvedeným značením modifikovaných stříbrných nanočástic.

Stabilita označené vysokomolekulární frakce byla ověřována gelovou permeační chromatografií (PD-10) roztoku připraveného spojením vysokomolekulární frakce z výše uvedeného značení (1 ml) a 100 μ l PBS pufru (pH = 7,4) a 10 mg KCl (pro ověření kompetice chloridových iontů vs. ^{211}At). Inkubace probíhala 3,5 h a 7,0 h při teplotě 37 °C.

4.2.3. Vodorozpustné polymery cílené hydroxybisfosfonátovými skupinami

4.2.3.1. Příprava vodorozpustných polymerů cílených hydroxybisfosfonátovými skupinami

Příprava statistických kopolymerů N-[2-(hydroxypropyl)] methakrylamidu (HPMA)

Byly připraveny tři typy statistických HPMA kopolymerů pro studium sorpce na hydroxyapatit, pro přehlednost jsou značeny číslem polymeru podle struktury (viz **Obrázek 4 a 5**) a teoretického obsahu hydroxybisfosfonátových cílicích skupin v molárních procentech.

Statistické kopolymeru HPMA (**1**) s Ma-AH-TT (**5**) či Ma-GFLG-TT (**6**) byly připraveny radikálovou polymerizací v DMSO [iniciátor AIBN: 2 hm. % monomerů; koncentrace monomerů: 12,5 hm. %; molární poměr monomerů: HPMA : Ma-AH-TT (**5**; polymer **14**) respektive Ma-GFLG-TT (**6**; polymer **15**) 11,5 : 1; při 60 °C; 6 h]. Obsah TT skupin v polymerech **14** a **15** byl stanoven UV-VIS spektrofotometrií ($\epsilon = 10300 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ při $\lambda = 305 \text{ nm}$ v methanolu). Početně a hmotnostně střední molekulové hmotnosti ($\overline{M}_{r,w}$ a $\overline{M}_{r,n}$) byly stanoveny gelovou permeační chromatografií (GPC) po aminolyse reaktivních TT skupin 1-aminopropan-2-olem. Vlastní stanovení bylo provedeno na koloně Superose™ 6 za použití HPLC systému ÄKTA Explorer (Pharmacia) vybaveného RI, UV a víceúhlovým rozptylovým detektorem DAWN 8 (Wyatt Technology Corp., USA) a acetátového pufru jako mobilní fáze (0,3 mol.l⁻¹, pH 6,5). Charakterizace produktů viz **Tabulka 8**.

*Příprava HPMA kopolymeru obsahujícího hydroxybisfosfonátové skupiny a L-tyrosinamid (**16**, viz*

Obrázek 4)

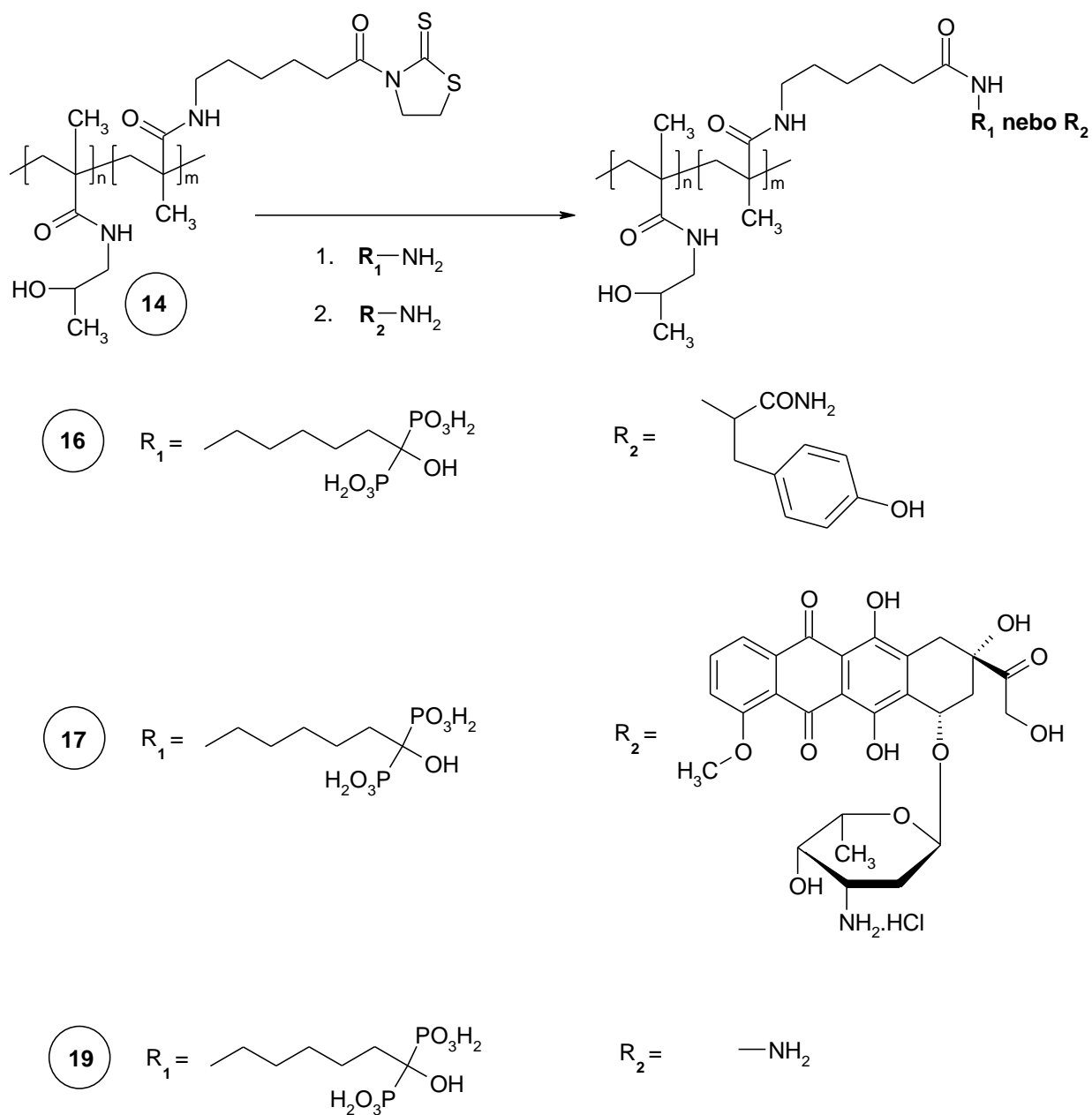
Konjugáty obsahující AHHBP (**4a**) a L-tyrosinamid byly připraveny reakcí polymerního prekursoru obsahujícího TT skupiny (**14**) s L-tyrosinamidem za laboratorní teploty ve fosfátovém pufru (0,05 mol.l⁻¹ NaH₂PO₄/Na₂PO₄; pH 8,1). Polymerní prekursor **14** (100 mg; 48 μmol TT skupin) byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru (1 ml) a pak byl přidán AHHBP (**4a**, 0 mg ~ 0 μmol ~ 0 molárních % pro polymer **16-0**; 2,7 mg ~ 14 μmol ~ 2 molární % pro polymer **16-2** respektive 5,4 mg ~ 28 μmol ~ 4 molárních % pro polymer **16-4**). pH reakční směsi bylo během reakce udržováno na hodnotě 8,1 přidávkou roztoku Na₂B₄O₇ (0,1 mol.l⁻¹). Po 30 minutách byl přidán L-tyrosinamid (2 mg, 11 μmol) a reakční směs byla míchána další 3 h. Zbylé TT skupiny pak byly

aminolyzovány přidavkem 1-aminopropan-2-olu (4 μ l, 53 μ mol). Po 10 minutách byl polymerní konjugát **16** izolován pomocí GPC na koloně naplněné Sephadexem G-25 (objem kolony 150 ml) za použití vody jako mobilní fáze, detekce konduktometricky. Polymerní frakce byla lyofilizována. Molekulové hmotnosti byly stanoveny pomocí HPLC (viz výše charakterizace TT prekursorů) a obsah AHHBP skupin byl vypočten z elementární analýzy obsahu fosforu. Obsah L-tyrosinamidu byl stanoven aminokyselinovou analýzou podle za použití HPLC systému LDC Analytical, USA [předkolonová OPA derivatizace; kolona Tessek SGX C₁₈, 250×4 mm, gradient vodný octan sodný (0,3 M) – methanol; fluorescenční detektor Fluoromonitor 4100]. Charakterizace produktů viz **Tabulka 8**.

*Příprava HPMA kopolymeru obsahujícího hydroxybisfosfonátové skupiny a DOX vázaný amidickou vazbou na postranní řetězec s 6-aminohexanovou kyselinou (**17**, viz **Obrázek 4**) respektive Gly-Phe-Leu-Gly tetrapeptidem (**18**, viz **Obrázek 5**)*

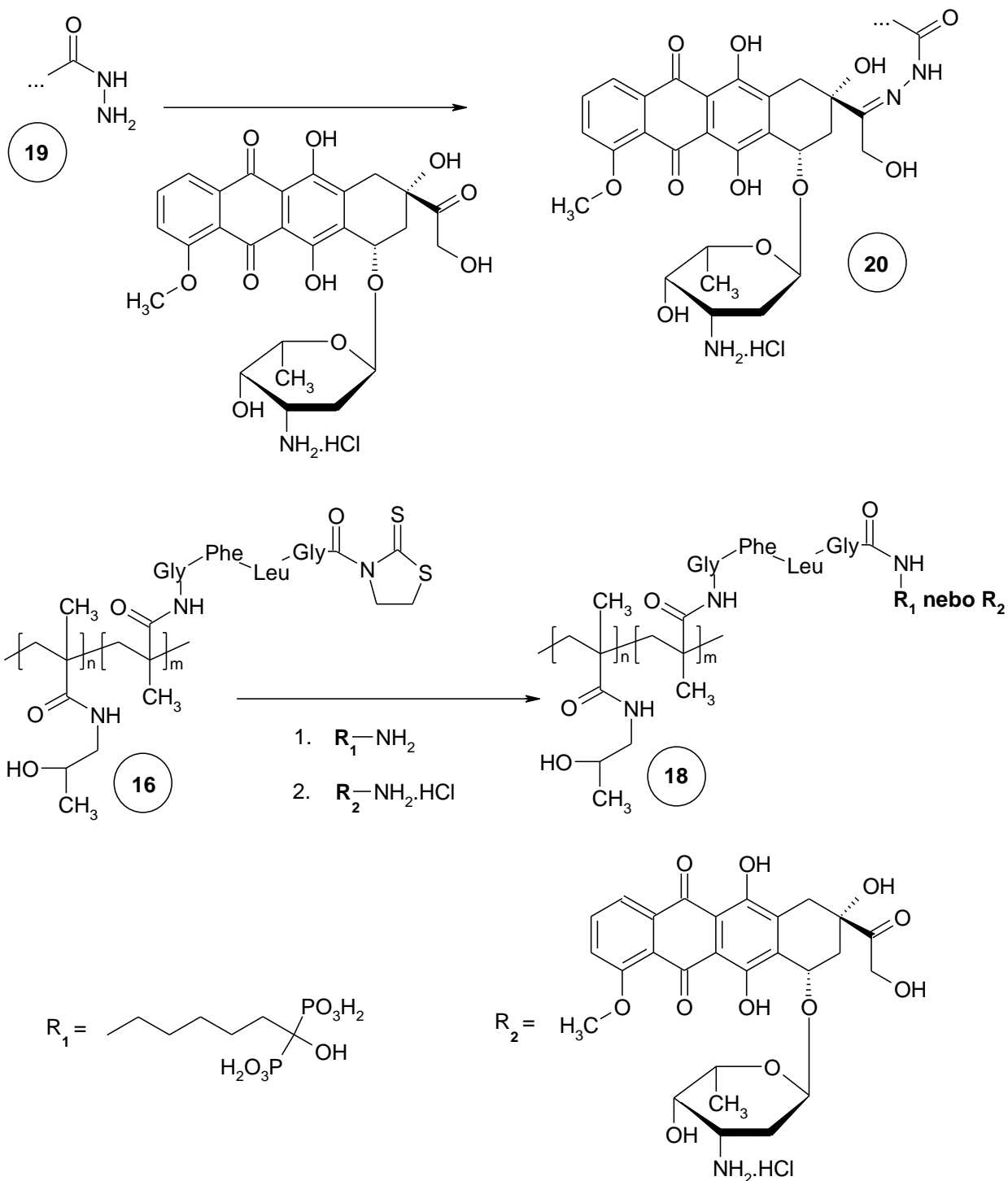
Konjugáty cílené hydroxybisfosfonátovými skupinami obsahující DOX vázaný amidicky byly připraveny reakcí příslušných polymerních prekursorů obsahující TT skupiny (polymery **14** respektive **15**) postupně s AHHBP (**4a**) a DOX.HCl. Reakce byla prováděna při laboratorní teplotě ve fosfátovém pufru ve tmě analogicky, jak je uvedeno výše u přípravy polymeru **16**, za použití ekvimolárního množství DOX.HCl místo L-tyrosinamidu. Polymerní konjugáty **17** respektive **18** byly vyčištěny pomocí GPC na koloně naplněné Sephadexem LH-20 (objem kolony 200 ml) za použití methanolu jako mobilní fáze. Polymerní frakce byla zahuštěna ve vakuu a přesrážena ve směsi aceton-diethylether (3:1 v/v).

Obrázek 4.



Příprava HPMA kopolymerů s hydroxybisfosfonátovými skupinami I.

Obrázek 5.



Příprava HPMA kopolymerů s hydroxybisfosfonátovými skupinami II.

Polymerní konjugáty **17** a **18** obsahující DOX byly charakterizovány elementární analýzou obsahu fosforu a HPLC, jak je uvedeno výše u konjugátu **16**. Obsah DOX byl stanoven UV-VIS spektrofotometrií ve vodě ($\epsilon = 11\,500\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ při $\lambda = 488\text{ nm}$). Charakterizace produktů viz **Tabulka 8**.

Ve všech konjugátech obsahujících doxorubicin byl stanoven obsah volného doxorubicinu po extrakci volného léčiva do chloroformu pomocí HPLC na koloně naplněné Superose™ 12 na chromatografu Äkta Explorer (Pharmacia) nebo na koloně Tessek SGX C18 (130×3 mm) na chromatografu Shimadzu (Japonsko) a použití gradientu methanol - voda 10-90 % methanolu, fluorescenční detektor s $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$.

Tabulka 8.

Polymer	Postranní řetězec	Obsah TT skupin (mol.%)	Obsah AHHBP (mol.%)	Obsah L-tyrosinamidu (mol.%)	Obsah hydrazidových skupin (mol.%)	Obsah DOX (hm.%)	$\overline{M}_{r,w}$	I_n
14	AH	6,85	-	-	-	-	24600	1,85
15	GFLG	7,3	-	-	-	-	34000	1,54
16-2	AH	-	2,53	1,42	-	-	32000	2,12
16-4	AH	-	4,02	1,48	-	-	35000	2,21
17-0	AH	-	0	-	-	3,74 ^a	25200	1,82
17-2	AH	-	1,37	-	-	4,12 ^a	27900	1,76
17-4	AH	-	3,42	-	-	3,68 ^a	28100	1,65
18-0	GFLG	-	0	-	-	5,10 ^a	38200	1,85
18-4	GFLG	-	1,60	-	-	5,25 ^a	43000	2,11
19-2	AH	-	1,75	-	4,3	-	34000	2,10
19-4	AH	-	3,32	-	2,9	-	30400	1,89
20-0	AH	-	0	-	-	8,51 ^h	29000	1,82
20-2	AH	-	1,75	-	-	5,53 ^h	32600	2,11
20-4	AH	-	3,32	-	-	4,23 ^h	34600	1,96

Charakteristiky statistických kopolymerů HPMA:

AH – 6-aminohexanoylová spojka; GFLG – spojka je tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly; ^a DOX vázaný amidicky; ^h DOX vázaný hydrazonovou vazbou; I_n - index polydispersity $I_n = \overline{M}_{r,w} / \overline{M}_{r,n}$.

4.2.3.2. Značení hydroxybisfosfonátovými skupinami cílených polymerů jódem ^{125}I

Polymer **16** (3 mg) byl v 1,5ml plastové mikrozkušavce Eppendorff rozpuštěn v PBS pufru (pH = 7,4; 200 μl) a v uvedeném pořadí byly postupně přidány: vodný roztok Na^{125}I (9 MBq. ml^{-1} ; 20 μl) a vodný roztok chloraminu-T (10 mg. ml^{-1} ; 50 μl). Vše bylo inkubováno 30 minut při 23 °C. Jodace byla zastavena přidáním vodného roztoku kyseliny L-askorbové (10 mg. ml^{-1} ; 80 μl). Vysokomolekulární frakce byla oddělena na odsolovací kolonce PD-10 za použití vodného roztoku NaCl (0,15 mol. l^{-1}) jako mobilní fáze, byly jímány 1,5ml frakce a jejich radioaktivita byla měřena na scintilačním počítači NaI(Tl), typ 74038 (RFT, Německo). Relativní chyba stanovení aktivity jednotlivých frakcí byla $\leq 5\%$. Celkový objem makromolekulární frakce byl pro sorpční experimenty upraven na 3,0 ml (tj. koncentrace polymeru 1 mg. ml^{-1}).

4.2.3.3. Značení polymeru 16 indiem ^{111}In

Polymer **16** (3 mg) byl v 1,5ml plastové mikrozkušavce Eppendorff rozpuštěn ve vodném roztoku octanu amonného (0,5 mol. l^{-1} , 300 μl), pak byl přidán vodný roztok $^{111}\text{InCl}_3$ (9 MBq. ml^{-1} ; 20 μl) a směs byla inkubována 30 minut při 23 °C. Vysokomolekulární frakce byla oddělena na odsolovací kolonce PD-10 za použití vodného octanu amonného (0,5 M) jako mobilní fáze, byly jímány 1,5 ml frakce a jejich radioaktivita byla měřena jak je popsáno výše pro značení polymeru **16** jódem ^{125}I .

4.2.3.4. Adsorpční studie na hydroxyapatitu (HA)

Vyhodnocení adsorpce na hydroxyapatit bylo ve všech případech provedeno tak, že vzorek suspenze HA v roztoku polymeru byl po příslušné době inkubace odcentrifugován a obsah polymeru v supernatantu byl proměřen spektrofotometricky (DOX; $\lambda = 488\text{ nm}$, v kyvetě o optické dráze 1 cm na přístroji Unicam Helios), respektive byla změřena jeho radioaktivita (^{125}I a ^{111}In , viz výše). Z podílu zbytkové versus původní absorbance (radioaktivity) byla vypočtena frakce nasorbovaná na hydroxyapatit.

4.2.3.4.1. Vliv prostředí na adsorpci polymeru 17-4 na HA

K roztoku polymeru **17-4** v destilované vodě ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 1 ml) byl přidán příslušný pufr (PBS pufr pH 5,0 respektive pH 7,4; 1 ml) a roztok dusičnanu vápenatého ($4,8\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 0, 0,5, 1 respektive 10 molárních ekvivalentů hydroxybis-fosfonátových skupin navázaných na polymeru **17**). Pak byl přidán HA (50 mg) a suspenze byla třepána 30 minut. Pak byla směs odcentrifugována a byla změřena absorbance supernatantu při $\lambda = 488 \text{ nm}$.

4.2.3.4.2. Rychlost adsorpce polymerů 17 a 20 na HA

Roztok polymeru ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 15 ml) v příslušném PBS pufru (pH 5,0 respektive 7,4) byl třepán s HA (750 mg). V časových intervalech (1, 2, 5, 10, 30, 60, 120 a 300 minut) byly odebírány vzorky (1 ml) suspenze, které byly ihned odcentrifugovány a byla změřena absorbance supernatantu při $\lambda = 488 \text{ nm}$.

4.2.3.4.3. Sorpční kapacita HA pro polymery 17 a 20 na HA

K naváženým množstvím HA (0 – 200 mg, 8 vzorků o rostoucí hmotnosti v této škále) byl přidán roztok polymeru ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 2,5 ml) v příslušném PBS pufru (pH 5,0 respektive 7,4). Vzorky byly třepány 30 minut a pak odcentrifugovány. Byla změřena absorbance supernatantu při $\lambda = 488 \text{ nm}$.

5. Výsledky a diskuse

5.1 Termoresponsivní polymery pro lokální radioterapii

Tento termosensitivní „drug delivery“ systém založený na poly(*N*-isopropylakrylamidu) s isotopicky značitelnou koncovou skupinou byl navržen pro lokální radioterapii. Je rozpustný v isotonickém roztoku chloridu sodného za laboratorní teploty a při teplotě lidského těla dochází ke kompletní fázové separaci, tj. prakticky veškerá radioaktivita zůstane ve vysráženém polymeru, viz **Obrázek 6**.

Obrázek 6.



Příklad fázové separace termoresponsivního polymeru. V obou zkumavkách je roztok poly(*N*-isopropylakrylamidu) ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) ve vodném roztoku chloridu sodném ($0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), levá lázeň má teplotu místnosti ($23 \text{ }^\circ\text{C}$), pravá lázeň má teplotu lidského těla ($37 \text{ }^\circ\text{C}$).

Polymery s isotopicky značitelnou koncovou skupinou byly připraveny radikálovou polymerací *N*-isopropylakrylamidu za použití reaktivního iniciátoru nesoucího karboxylovou skupinu. Tyto karboxylové skupiny byly následně transformovány vybranými aminy.

Iniciátor 2-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxo-(1,3-thiazolan-3-yl)butyl]-1-diazenyl-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxo-(1,3-thiazolan-3-yl)pentannitril (**II**) byl připraven acylací thiazolin-2-thionu komerčně dostupným radikálovým iniciátorem 4-[2-(3-karboxy-1-kyano-1-methylpropyl)-

1-diazenyl]-4-kyanopentanovou kyselinou za použití dicyklohexylkarbodiimidu jako kondenzačního činidla. Reakce byla provedena v tetrahydrofuranu s katalytickým množstvím 4-(*N,N*-dimethylamino-pyridinu) v analogii podle ¹²⁴. Thiazolidin-2-thion amid jsou reaktivní sloučenina sloužící k velmi selektivní acylaci aminů. Proti hydrolyse a alkohololyse je poměrně odolný¹²⁴.

Produkt **II** je směs *Z* a *E* stereoisomerů, které mohou být rozděleny pomocí HPLC za použití reversní fáze, ale vzhledem k jejich stejným iniciačním vlastnostem nebyla separace provedena.

Polymerizace samotná byla nejprve testována v suchém dimethylsulfoxidu, dimethylsulfoxid však příliš ztěžoval separaci a čištění. Z těchto důvodů byl zvolen tetrahydrofuran (THF) jako polymerizační prostředí s výhodou snadné separace poly(*N*-isopropylakrylamid)u jeho sražením přídavkem diethyletheru. THF je navíc dostatečně inertní vůči thiazolin-2-thionovým amidům. Velmi vysoké molekulové hmotnosti polymeru jsou nežádoucí z hlediska pomalé eliminace z organismu.

Získaný polymer měl dostatečnou molekulární váhu pro cíle zamýšlené v této práci. Všechny námi zkoušené termoresponsivní polymery byly polymerizovány v THF.

K omezení nežádoucí aminolysy reaktivních thiazolin-2-thionovým amidů v průběhu separace a čištění nebyl meziproduct izolován, ale bezprostředně aminolysován přídavkem zvoleného aminu.

Poly(*N*-isopropylakrylamid) s koncovou skupinou *L*-tyrosinamidem (**IV**) byl připraven *in situ* aminolysou prekursoru **II** *L*-tyrosinamidem. Polymer byl vysrážen diethyletherem a přečištěn dialysou proti destilované vodě. Dialýsa rovněž odstraní nadbytečný *L*-tyrosinamid a oligomery vzhledem k jejich malé molekulové hmotnosti. Dalšími experimenty [značení ¹²⁵I, gelovou permeační chromatografií (GPC) s UV detekcí] však byl zjištěn stále vysoký obsah volného *L*-tyrosinamidu. Jeho obsah je značně nežádoucí z hlediska značení ¹²⁵I, protože volný *L*-tyrosinamid se rovněž snadno značí, a tak snižuje relativní výtěžky značení vysokomolekulární frakce.

Z tohoto důvodu byla nutná další purifikace GPC za použití běžné odsolovací kolony PD-10 (Sephadex G-25) ve vodném prostředí. Roztok čistého poly(*N*-isopropylakrylamidu) byl lyofilizován za vzniku kyprého a snadno rozpustného produktu bílé barvy.

Jako značně nepříjemná vlastnost se ukázala pěnovost koncentrovaných roztoků při vlastním značení radionuklidu, protože exploze bublin snadno vede k radioaktivní kontaminaci okolí radioisotopy a klade tak vysoké nároky na manuální zručnost a preciznost přípravy.

Molekulové hmotnosti polymerů **IV** jsou v **Tabulce 5**.

M_w jsou kolem 18 kDa s indexem polydispersity $I = M_w/M_n \approx 2,4$. Molekulová hmotnost polymerů **IV** dle očekávání klesá s rostoucím obsahem iniciátoru v polymerizačním roztoku. Srovnání polymerů **IV-1**, **IV-3**, **IV-5** je uvedeno v **Tabulce 5**. Teoretická kapacita pro značení polymeru **IV-5** radioisotopy jodu je cca 50 GBq.mg⁻¹ a 6,7 GBq.mg⁻¹ pro ¹³¹I, resp. ¹²⁵I.

Polymer **VI** s koncovou skupinou diethylentriaminpentaoctovou kyselinou (DTPA) byl připraven dvoukrokovou syntézou zahrnující aminolysu prekursoru **III** ethylendiaminem a následnou acylaci produktu reakcí s dianhydridem kyseliny diethylentriaminpentaoctové (DTPAA). Obě činidla, jak ethylendiamin, tak DTPAA, jsou bifunkční a byla použita ve výrazném stechiometrickém nadbytku pro potlačení reakcí vedoucích k propojení polymerních řetězců. Aminolysa polymerního amidu (**III**) byla provedena analogicky k polymeru **IV** s *L*-tyrosinamidem. Acylace polymeru **V** byla nejprve zkoušena ve vodném pufru uhličitanu sodného a DTPAA, nicméně výtěžky reakce nebyly uspokojivé. Nejlepšího výsledku (nejvyššího obsahu DTPA) bylo dosaženo reakcí v dimethylacetamidu za použití terciální báze ethyldiisopropylaminu. Přebytek volné DTPA byl odstraněn dvakrát opakovaným vysolením polymeru z roztoku a GPC za použití kolony PD-10 (Sephadex G-25). Mobilní fáze užitá pro GPC obsahovala NaCl (9 g.l⁻¹, fyziologický roztok) pro potlačení iontových interakcí polymeru se Sephadexem G-25 vedoucích k rozmývání píku obsahujícího vysokomolekulární frakci. Z **Tabulek 6** a **7** je patrné, že nedošlo k zvětšení molekulové hmotnosti polymeru spojením řetězců vlivem bifunkčních činidel.

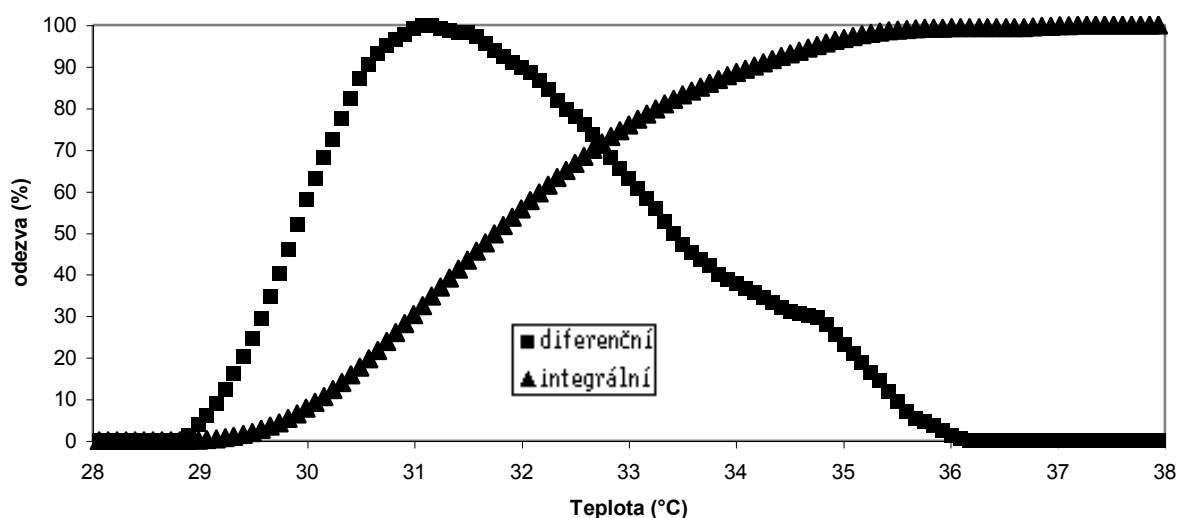
5.1.1. Studium fázové separace termoresponsivních polymerů

Chování fázové separace termoresponsivních (ko)polymerů se studuje převážně UV-VIS spektrofotometricky a pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Obě metody mají určité výhody a samozřejmě i nevýhody. UV-VIS spektrofotometrická metoda je založená na měření intenzity zákalu. Metoda je omezena na nízké koncentrace polymeru a pozvolný růst (pokles) teploty, protože zákal vznikající v zahříváném roztoku není lineární odpovědí na probíhající děje. Množství a velikost částic sráženého polymeru jsou totiž rovněž proměnné v průběhu precipitace polymeru. Také je poměrně obtížné přesně zjistit okamžitou teplotu uvnitř měřicí kvety. Tento problém byl nakonec vyřešen termorezistorem v ochranném epoxidovém pouzdře vlastní konstrukce umístěvaném do měřicí kvety.

Srážení polymeru z roztoku lze charakterizovat takto: nejprve, se vzrůstající teplotou po kolapsu polymerního klubka (přechod coil-to-globule) se objevuje zákal, který dále (teplota překročila LCST) houstne a objevuje se sraženina s patrnými částicemi, které se dále shlukují (vše v řádu minut)^{125;126}. Shluky částic koagulují v poloprůhledné klky (v řádu hodin), až nakonec utvoří gel (a dle koncentrace i často kopírující tvar mikrozkuhavky).

Proto tato měření UV-VIS spektrofotometrickou metodou měla převážně orientační charakter a pro další studium byla zvolena metoda DSC. Tato metoda je založená na měření tepla absorbovaného endotermní fázovou separací a je mnohem přesnější v odhadu separace frakcí polymeru různé molekulární hmotnosti, viz **Obrázek 7**.

Obrázek 7.



DSC křivka (diferenciální a integrovaná) polymeru IV-5 (5mg.ml⁻¹) v roztoku NaCl (0,15 mol.l⁻¹).

Měření probíhala v isotonickém vodném roztoku NaCl (0,15 mol.l⁻¹) jako modelu fyziologického prostředí. Důležitá data fázové separace polymerů **IV-1**, **IV-3**, **IV-5** a **VI-1**, **VI-3**, **VI-5** získaná DSC metodou jsou uvedena v **Tabulce 8**. Tyto data zahrnují začátek fázové separace (nejdůležitější parametr), maximum a konec separace. Experimentálně bylo ověřeno, že nižší rychlost ohřevu vzorku (0,5 – 1,0 a 2,0 °C.min⁻¹) neměla na důležité teplotní body měřených polymerů žádný vliv. Z tohoto důvodu byla zvolena jako optimální rychlost ohřevu vzorku 5,0 °C.min⁻¹, kdy odezva přístroje a přesnost měření byla stále ve vyhovujícím poměru.

Tabulka 8

Polymer	Start (°C)	Maximum (°C)	Konec (°C)
IV-1	29,6	31,5	37,5
IV-3	29,3	31,2	35,7
IV-5	28,9	31,1	33,2
VI-1	28,2	31,5	35,2
VI-3	29,3	29,7	34,9
VI-5	29,7	31,2	33,0

Průběh fázové separace polymerů v roztoku NaCl (0,15 mol.l⁻¹).
Koncentrace polymeru byla 5 mg.ml⁻¹, stanoveno DSC.

Ve shodě s teoretickým předpokladem bylo pozorováno, že se vzrůstajícím obsahem *L*-tyrosinamidu (polymery **IV-1**, **IV-3**, **IV-5** viz **Tabulka 8**) teplota fázové separace klesá a u polymerů s rostoucím obsahem DTPA (polymery **VI-1**, **VI-3**, **VI-5** viz **Tabulka 8**) teplota fázové separace stoupá. Teoretický předpoklad vychází ze změny celkové polaritity polymeru inkorporací *L*-tyrosinamidu, který je méně polární než hlavní polymerní řetězec poly(*N*-isopropylakrylamid)u a opačně pro DTPA (která je polárnější než hlavní polymerní řetězec). To je v dobrém souhlasu s hydrofobní povahou jevu fázové separace a také v souhlasu s dříve získanými daty jiných termoresponsivních polymerů jako nosičů chemoterapeutik¹²⁷.

Tato data také demonstrují, jak malý obsah (viz **Tabulka 8**) terminální skupiny významně ovlivní teplotu fázové separace, a ukazují nutnost použití telecheických polymerů místo statistických kopolymerů s podstatně širší distribucí obsahu značitelé skupiny.

Vliv iontové síly na průběh fázové separace má charakter vysolovacího efektu^{127;128}. Se vzrůstající iontovou silou roztoku klesá teplota fázové separace (viz **Tabulka 9**). Nebyla pozorována závislost vysolovacího efektu na terminální skupině polymeru, jev je způsoben částečně hydrofobní povahou hlavního polymerního řetězce. Vysolovací efekt je prakticky využitelný při čištění polymerů. Na druhé straně, je třeba brát jej v úvahu při práci s těmito polymery, neboť při vyšších koncentracích polymeru a především pufrů může teplota fázové

separace klesnout pod laboratorní teplotu a značně ztížit další postup nežádoucí precipitací polymeru.

Tabulka 9

Polymer	koncová skupina	prostředí	Start (°C)	Maximum (°C)	Konec (°C)
IV-5	<i>L</i> -tyrosinamid	destilovaná voda	31,4	33,3	38,0
IV-5	<i>L</i> -tyrosinamid	aq. NaCl (0,15 M)	28,9	31,1	33,2
VI-5	DTPA	destilovaná voda	32,0	34,3	37,1
VI-5	DTPA	aq. NaCl (0,15 M)	29,0	31,2	33,0

Vliv iontové síly na chování fázové separace

Byla pozorována určitá hystereze fázové separace, která se, ačkoliv je precipitace reversibilní, projevuje zpožděním rozpouštění polymeru při dosažení určité teploty. Jak je ukázáno na příkladu polymeru **IV-5**, (viz **Tabulka 10**), sraženina polymeru se začíná zpětně rozpouštět teprve při teplotě, kdy zprvu polymer začínal precipitovat. Zjištění má význam například pro lokální aplikaci polymeru do periferních tkání (kloubů), kde může nastat i lokální podchlazení oblasti.

Tabulka 10

Koncentrace polymeru (mg.ml ⁻¹)	Start (°C)	Maximum (°C)	Konec (°C)
(Ohřev)	5	30,3	32,2
	10	29,3	32,7
	20	27,8	31,2
(Chlazení)	5	30,4	29,4
	10	31,0	28,6
	20	30,7	29,2

Teplotní hystereze fázové separace polymeru IV-5 ve vodném roztoku NaCl (0,15 M)

Velmi cenný je poznatek, že všechny testované polymery s nejvyšším obsahem značitelne skupiny (IV-5 a VI-5) zcela kompletně precipitují pod normální teplotou lidského těla.

5.1.2. Značení termoresponsivních polymerů ^{125}I a ^{90}Y

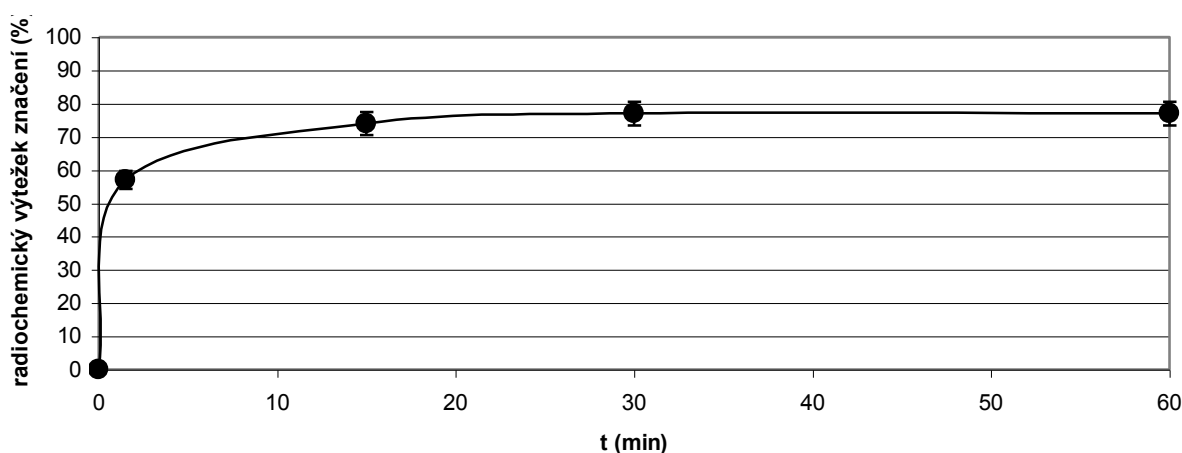
Termoresponsivní polymery (**IV-1**, **IV-3** a **IV-5**) a na bázi poly(*N*-isopropylakrylamidu) s koncovou skupinou *L*-tyrosinamidu byly značeny elektrofilní jodací ^{125}I jakožto modelovým radioisotopem za použití Na^{125}I a chloraminu-T. Pro experimenty uvedené dále byl zvolen polymer **IV-5** z důvodu nejvyššího obsahu značitelné koncové skupiny. Radiojodace byla ukončena přidávkem roztoku redukčního činidla (kyselina *L*-askorbová). Polymerní frakce byla oddělena od nezreagovaného nízkomolekulárního radiojodu gelovou permeační chromatografií za použití odsolovací kolony PD-10 (Sephadex G-25). Tyto kolony mají náplň 8,3 ml gelu. Separace jsou plně reprodukovatelné.

Experimenty byly zaměřeny na vliv několika parametrů na výtěžek značení (je uveden v % celkové radioaktivity vnesené do reakčního roztoku ve formě Na^{125}I). Po značení byla polymerní frakce separována od nízkomolekulární podílů reakční směsi gelovou permeační chromatografií za použití odsolovacích kolonek PD-10.

Byly studovány vybrané faktory ovlivňující radiochemický výtěžek a chování polymerů (doba inkubace, vliv pH, teploty a koncentrace polymeru). Výtěžek značení je uváděn v % celkové radioaktivity vnesené do reakce v podobě Na^{125}I .

Značení elektrofilní aromatickou jodací probíhalo velmi rychle i za laboratorní teploty a po 30 minutách dosáhlo maxima cca 77 % viz **Obrázek 8**.

Obrázek 8.



Výtěžek radiojodace polymeru **IV-5** - závislost na reakčním čase

K dosažení dostatečně vysokého výtěžku je nezbytná vysoká čistota značeného polymeru, zejména absence volného *L*-tyrosinamidu, který kvůli vyšší reaktivitě oproti *L*-tyrosinamidu vázanému na polymer významně snižuje výtěžek značení.

Bylo zjištěno, že snížení pH fosfátového pufru z 7,4 (pH krevní plasmy) na pH = 4,8, při němž se obvykle u elektrofilní substituce dosahuje vyšších výtěžků, v tomto případě snižuje výtěžek z 77% na 51%. Proto byl fosfátový pufr o pH = 7,4 (který je vhodný i pro parenterální aplikaci) použit i v ostatních experimentech.

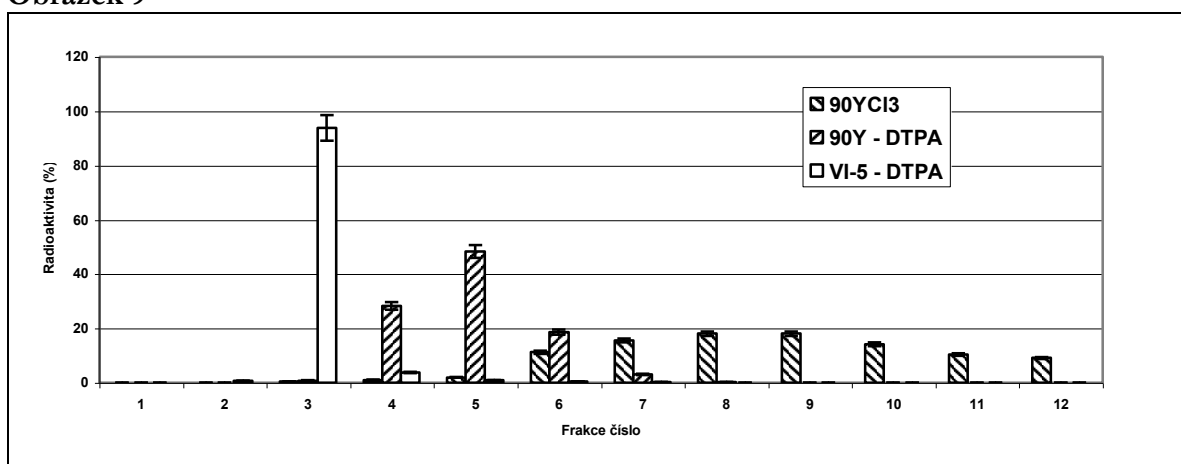
Zajímavý poznatek přinesl experiment týkající se vlivu teploty na výtěžek značení. S rostoucí teplotou výtěžek klesal (20°C - 77%, 37°C - 72%, 50°C - 64%), což je opačný trend oproti většině chemických reakcí včetně radiojodace nízkomolekulárních látek. Pravděpodobným vysvětlením je snížení reaktivity polymerního *L*-tyrosinamidu v koagulovaných částicích polymeru, do kterých radiojodační činidlo (¹²⁵I₂) obtížněji difunduje.

S souladu s očekáváním výtěžky značení mírně rostly se stoupající koncentrací polymeru (0,5 mg.ml⁻¹ - 71%; 2,0 mg.ml⁻¹ - 79%; 10,0 mg.ml⁻¹ - 86%)

Značení polymeru **VI-5** chloridem [⁹⁰Y] ytritým

Značení polymeru obsahujícího DTPA polymeru probíhalo téměř kvantitativně (> 99%) v prostředí pufru octanu amoného (0,5 mol.l⁻¹). Separace značeného polymeru od volného ⁹⁰YCl₃ a ⁹⁰Y-DTPA komplexu pomocí GPC na kolonkách PD-10 byla dostatečně účinná, jak je patrné z **Obrázku 9**.

Obrázek 9



Radioaktivita jednotlivých frakcí separovaných pomocí GPC. Z obrázku je patrné charakteristické rozdělení nízkomolekulárních (⁹⁰YCl₃) a vysokomolekulárních látek (⁹⁰Y-DTPA) na kolonkách PD-10. (Součet procentického zastoupení každé chemické formy je 100%)

Vazebná kapacita polymeru **VI-5** byla určena experimentálně řadou pokusů se snižujícím se množstvím polymeru a koncentrovaným roztokem $^{90}\text{YCl}_3$. Dosažitelná kapacita je cca $420 \text{ MBq}\cdot\text{mg}^{-1}$ polymeru a pro lokální radioterapii plně postačuje. Kvantitativní výtěžek značení rovněž umožňuje použít tento polymerní systém bez nutnosti separace polymerní frakce pomocí GPC na PD-10.

Pro uvažované použití polymeru **VI-5** pro radioterapii bylo nutné ověřit stabilitu vazby ^{90}Y na polymeru v prostředí kompetujících iontů (Ca^{2+} , Mg^{2+} a fosfáty). Jejich koncentrace byla zvolena tak, aby přibližně odpovídala fyziologickému prostředí resp. prostředí krevní plasmy ($\text{Ca}^{2+} 1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; $\text{Mg}^{2+} 10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; fosfát $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Inkubace v prostředí kompetujících iontů trvala 24 hodin při teplotě 37°C . Více než 97 % ^{90}Y bylo nalezeno v HMW frakci, tj. lze předpokládat i vysokou stabilitu vazby ^{90}Y -DTPA-polymer v *in vivo* prostředí, jak je popsáno pro jiné systémy, kde je DTPA použita jako chelatační činidlo^{129;130}.

5.2. Stříbrné nanočástice pro lokální radioterapii a pasivní směřování

5.2.1. Příprava biokompatibilizovaných stříbrných nanočástic

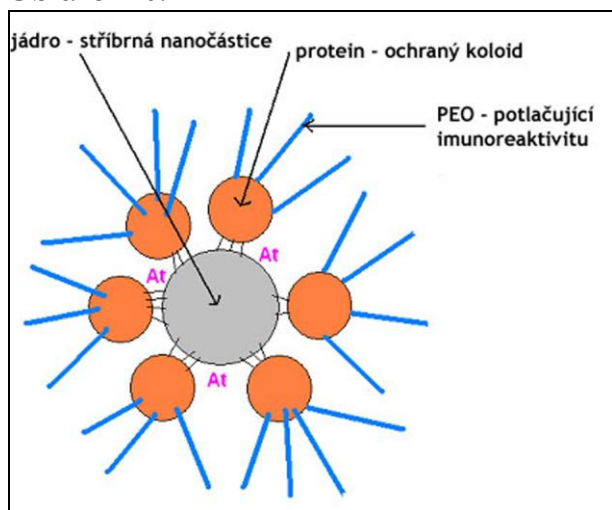
Jako model EPR efektem cíleného DDS byly připraveny stříbrné nanočástice. Byly zvoleny z důvodů dobré fyzikální stability koloidní formy stříbra a především proto, že stříbro vykazuje vysokou afinitu k astatu. Stříbro jako kov rovněž nemůže být atakováno drastickými radiačními podmínkami panujícími v astat [^{211}At] obsahujících roztocích, na rozdíl od jiných uvažovaných nošičů, tj. protilátek a jejich fragmentů. Astat [^{211}At] je α -zářič s poločasem rozpadu $T_{1/2} = 7,21$ h a pro tyto vlastnosti je vhodným radionuklidem pro terapii malých nádorů a mikrometastáz, aniž by příliš poškozoval okolní struktury díky malému dosahu α -záření v tkáních.

Aby se předešlo interakci stříbrných nanočástic, které jsou stabilizované proteinem zvířecího původu, s imunitním systémem, byl jejich povrch modifikován polyethylenoxidem (PEO).

Modifikované stříbrné nanočástice byly připraveny ve dvou verzích. Obě měly povrch pokrytý polyethylenoxidem lišící se pouze molekulární vahou použitého PEO. Byly použity PEO o molekulové hmotnosti 2000 a 5000 (PEO-2000, resp. PEO-5000).

Na **Obrázku 10** je model biokompatibilizované stříbrné nanočástice.

Obrázek 10.



Nanočástice stříbra (koloid) jsou stabilizované proteinem, ten jako cizorodá bílkovina působí silně imunogenně; proto byl jeho povrch modifikován PEO. V důsledku této modifikace dojde k zneviditelnění nanočástic pro imunitní systém – „biokompatibilizace“

5.2.2. Studium chování stříbrných nanočástic ve vodných roztocích metodami rozptylu světla

Zdánlivé hydrodynamické poloměry D_H a D_H -distribuce $\Delta D_H / D_H$ stříbrného koloidu polyethylenoxidem (PEO) modifikovaných nanočástic s volným PEO a bez něj ve vodném roztoku ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) jsou uvedeny v **Tabulce 11**. Modifikace povrchu stříbrných nanočástic PEO mírně zvyšuje poloměr těchto částic především o tloušťku vlastní vrstvy PEO. Agregace modifikovaných nanočástic byla pozorována v případě, že byl odstraněn nadbytečný PEO pomocí dialýzy a následně lyofilizován. Proto byl ponechán přebytek volného PEO jako ochranný faktor. Velikost poloměru modifikovaných stříbrných nanočástic se již nachází v oblasti, kde se EPR efekt zřetelně projevuje.

Tabulka 11.

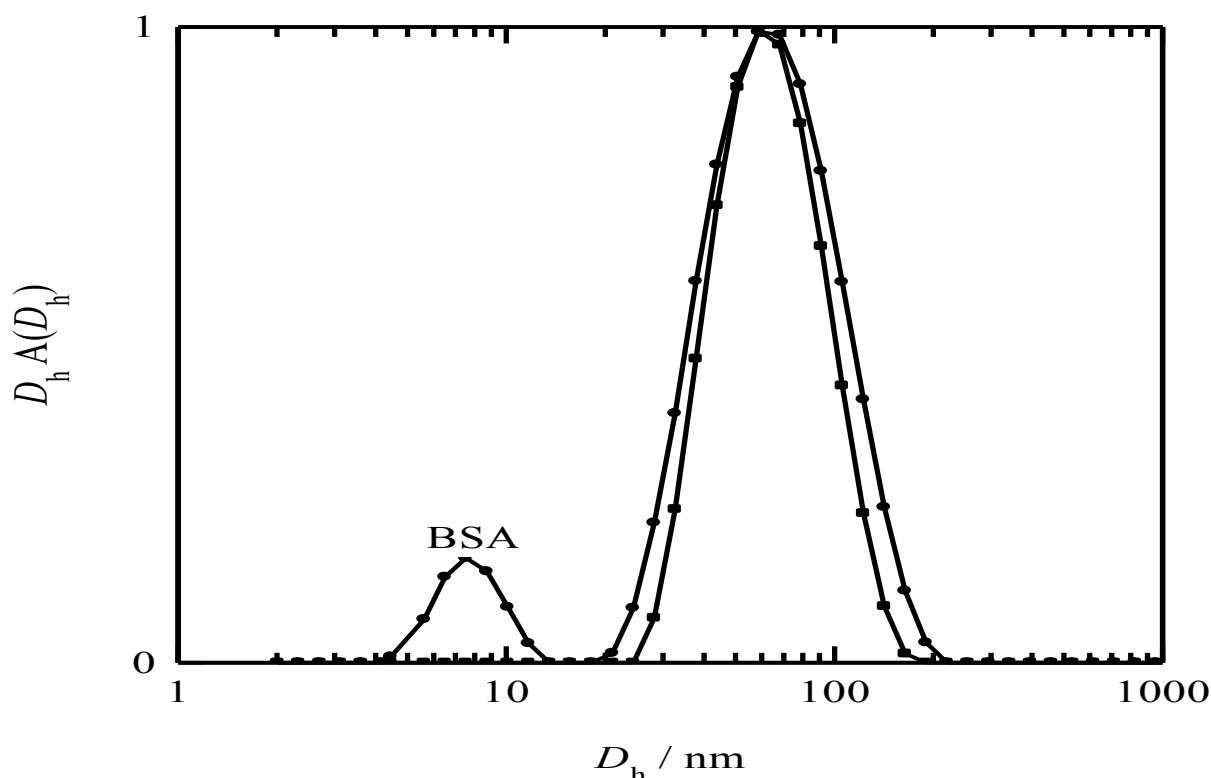
Vzorek	D_H (nm)	$\Delta D_H / D_H$
Výchozí nanočástice	18,3	0,42
Ag-PEO-2000	19,5	0,41
Ag-PEO-5000	24,2	0,33
Ag-PEO-2000 (dialysovaný)	28,2	0,39
Ag-PEO-2000 (dialysovaný)	34,7	0,36

Zdánlivé hydrodynamické poloměry D_H a D_H a šířka distribuce $\Delta D_H / D_H$ stříbrných nanočástic a jejich modifikovaných verzí s volným PEO a bez něj. K modifikaci nanočástic byl použit PEO o molekulární váze 2000 a 5000 (PEO-2000, resp. PEO-5000).

K ověření částečné kompatibility s fyziologickým prostředím bylo zvoleno studium interakce stříbrných nanočástic modifikovaných PEO-5000 s hovězím sérovým albuminem ve fyziologickém roztoku (vodný roztok NaCl, $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Distribuce zdánlivých hydrodynamických poloměrů před a po 7 hodinách inkubace je na **Obrázku 11**. D_H -distribuce modifikovaných částic se v přítomnosti BSA prakticky nemění, nedochází tedy k významné agregaci částic.

Obrázek 11.

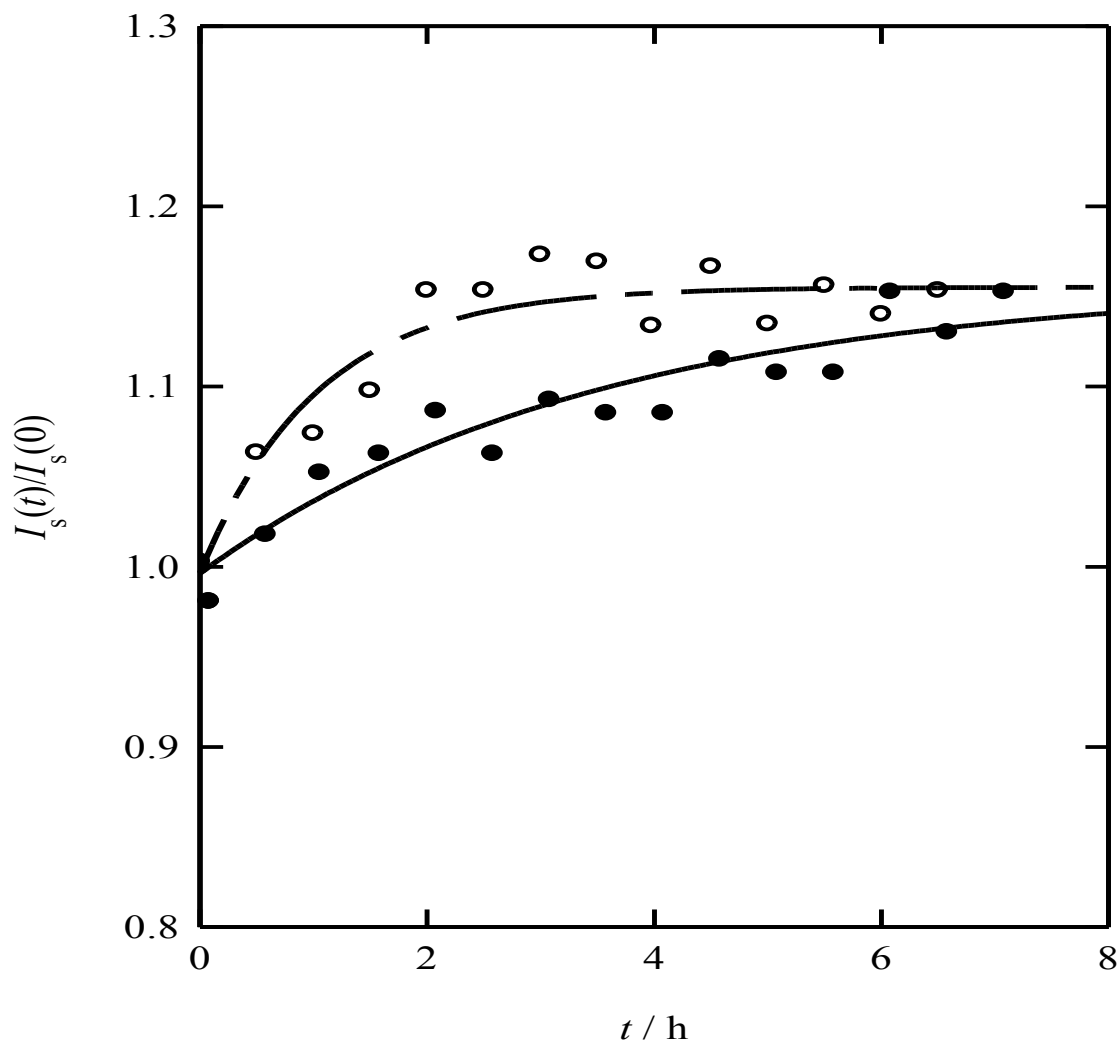


D_h -distribuce modifikovaných stříbrných nanočástic v 0,15 mol.l⁻¹ NaCl (čtverce) a v BSA roztoku (kroužky)

Zdánlivý hydrodynamický poloměr D_H modifikovaných nanočástic je mírně ovlivněn koncentrací BSA, poloměr D_H klesá z 81 ± 3 nm při koncentraci BSA $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ na 74 ± 3 nm při koncentraci BSA $0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Vliv BSA na výchozí i modifikované stříbrné nanočástice (PEO-2000 resp. PEO-5000) byl studován pomocí rozptylu světla, viz **Obrázek 12**. Relativní intenzita rozptylu světla $I_s(t)/I_s(0)$ se zvětšovala exponenciálně a dosáhla ve všech případech nejvyšších hodnot za cca 1,16 h. Zvětšení rozptylu svědčí o nárůstu molekulárních hmotností částic, tento nárůst je dán spíše sorbcí BSA na povrchu částic než jejich aglomerací. Povrch výchozích nemodifikovaných nanočástic resp. povrchově modifikované verze byl nasycen za 1h, resp. za 3,5 h.

Obrázek 12.



Časová závislost relativní změny světelného rozptylu $I_s(t)/I_s(0)$ modifikovaných (plné kroužky) a nemodifikovaných (prázdné kroužky) stříbrných nanočástic v roztoku BSA

Modifikování povrchu biokompatibilním polymerem tedy významně zpomaluje interakci stříbrných nanočástic s albuminem a podobný efekt lze očekávat i u ostatních proteinů vyskytujících se v krvi.

5.2.3. Značení stříbrných nanočástic astatem ^{211}At

Značení modifikovaných stříbrných nanočástic ^{211}At poskytuje obvykle vysoké výtěžky vlivem značné afinity astatu ke stříbru. Výtěžky značení v destilované vodě byly mírně vyšší než v PBS pufru (99,1%, resp. 98,6%), patrně vlivem kompetice chloridových iontů, hodnota pH neměla na výtěžek prakticky vliv. Rychlost značení je vysoká, značení je prakticky kompletní za 15 minut. Separace modifikovaných stříbrných nanočástic proběhla pomocí GPC na kolonkách PD-10 za použití vody jako elučního prostředku.

Významně ovlivňujícím faktorem jsou oxidačně - redukční podmínky v reakčním roztoku viz **Tabulka 12**

Tabulka 12

Činidlo	Výtěžek (%)
KMnO_4	53,7
NaBH_4	99,7
Na_2SO_3	94,2

Vliv oxidačních (redukčních) činidel na výtěžky značení stříbrných nanočástic Ag-PEO-5000 v prostředí PBS pufru o pH = 7,4

Zajímavým jevem, který jsem pozorovali, bylo občasné a nečekané snížení výtěžků značení (až na 53%), pokud nebyla přidána redukční činidla. Tento jev významně snižoval reprodukovatelnost výsledků a jeho příčiny jsou patrně ve procesu přípravy zásobního roztoku ^{211}At . Podobně, jako byly pozorovány značné výkyvy ve výtěžcích značení s radionuklidy jodu od různých výrobců (a dokonce i různých šarží téhož výrobce), lze i v tomto případě uvažovat o vlivu různých chemických forem astatu.

V zásobním roztoku ^{211}At o objemové aktivitě $1 \text{ MBq}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ se dávkový příkon pohybuje okolo $1 \text{ Gy}\cdot\text{s}^{-1}$, probíhá v něm tedy radiolýsa, jejíž produkty značně ovlivňují oxidační stavy a chemické formy astatu. Tyto formy mohou pochopitelně pozbývat afinity ke stříbru, která je patrně vlastností astatidového aniontu. Tento výklad je v souladu s pozorovanými vlivy oxidačních a redukčních činidel uvedenými v **Tabulce 12**.

Vliv na reprodukovatelnost měl v našich experimentech pravděpodobně obsah vody ve výchozím methanolovém roztoku ^{211}At , který se získává vymytím vymrazené teflonové kapiláry, v níž kondenzuje ^{211}At při suché destilaci z ozářeného terče.

Pokud byl v destilační aparatuře malý objem vodní páry (vzdušná vlhkost !), ta spolu s ^{211}At kondenzovala v kapiláře (množství v jednotkách μl – již patrně pouhým okem) a s ním byla

vymyta do malého množství methanolu (řádově 100-200 μ l). Bezvodý methanol funguje jako tzv. „scavenger“ volných radikálů, ale tato funkce patrně v přítomnosti malé příměsi vody nezabrání efektivně oxidaci astatu produkty radiolysy.

K zajištění dobré reprodukovatelnosti jsme proto přidávali do zásobního roztoku ^{211}At stopové množství NaBH_4 .

Modifikace povrchu nanočástic vedla při pokusech *in vitro* k značnému omezení interakcí s proteiny. Testy na tkáňových kulturách prokázaly nižší toxicitu, než vykazuje AgNO_3 , a předběžný test na laboratorních myších neprokázal žádnou toxicitu při podání uvažovaných terapeutických dávek.

5.3. Vodorozpustné polymery cílené hydroxybisfosfonátovými skupinami

Kostní tkáň se na rozdíl od jiných tkání lidského těla vyznačuje specifickými odlišnostmi, plynoucími z její primárně mechanické funkce. Hlavním specifikem je vysoký obsah minerálu hydroxyapatitu (HA), který zlepšuje její mechanické vlastnosti. Podobnost hydroxybisfosfonátů (HBF) s difosfátem v HA je patrná z **Obrázku 1**. Strukturální podobnost je také důvodem preferenčního vychytávání HBF v oblastech kosti s vysokou remodelační aktivitou. Zejména v osteolysou postižených místech může koncentrace HBF po jejich podání dosáhnout až desetinásobku koncentrace HBF v ostatních částech kosti.

Proto byl připraven polymerní nosičový systém umožňující cílený transport radiodiagnostik, radioterapeutik a protinádorových léčiv do kostní tkáně.

5.3.1. Příprava vodorozpustných polymerů cílených hydroxybisfosfonátovými skupinami

Všechny polymery byly připraveny z prekursoru nesoucího reaktivní *N*-acylthiazolidin-2-thionové skupiny (TT) vyznačující se rychlou aminolysou s relativní odolností vůči hydrolyse¹²⁴. Selektivita TT skupin ve vodném prostředí k aminolyse je mnohem vyšší než selektivita např. 4-nitrofenyl esterové (ONp) skupiny, která se obvykle používá pro konjugaci HPMA kopolymerů s aminy¹²⁴. Navíc TT skupiny neinteragují s radikálovou polymerací tak jako ONp a umožňují tedy lepší řízení polymerizační reakce.

L-tyrosinamid, cílicí 6-amino-1-hydroxyhexan-1,1-diyl)bisfosfonová kyselina (AHHBP), hydrazin a amidicky vázaný DOX byly pak navázány na polymer aminolysou polymerních prekurzorů **I** resp. **VI** příslušným aminem.

DOX byl navázán na polymer **VI** obsahující hydrazid kondenzací a separace polymerů z reakční směsi (pomocí GPC) musela být provedena ve fyziologickém roztoku pro potlačení iontových interakcí zhoršujících výsledky separace.

Charakteristiky všech polymerů a polymerních konjugátů jsou shrnuty v **Tabulce13** . Molekulová hmotnost všech polymerů mírně vzrůstá připojením AHHBP, *L*-tyrosinamidu, hydrazinu a DOX, ale ukazuje, že nedochází k nežádoucímu zesíťování či roubování.

Tabulka 13

Polymer	Postraní řetězec	AHHBP (molár. %)	DOX (wt.%)	M_w	<i>I</i>
I	AH	-	-	24600	1.85
II-2	AH	2.53	-	32000	2.12
II-4	AH	4.02	-	35000	2.21
III-0	AH	0	3.74	25200	1.82
III-2	AH	1.37	4.12	27900	1.76
III-4	AH	3.42	3.68	28100	1.65
IV-2	AH	1.75	-	34000	2.10
IV-4	AH	3.32	-	30400	1.89
V-0	AH	0	8.51	29000	1.82
V-2	AH	1.75	5.53	32600	2.11
V-4	AH	3.32	4.23	34600	1.96
VI	GFLG	-	-	34000	1.54
VII-0	GFLG	0	5.10	38200	1.85
VII-4	GFLG	1.60	5.25	43000	2.11

Charakterizace polymerů pro studium cílení do kostní tkáně.

Ve všech případech molekulová hmotnost polymerů na bázi HPMA zůstává pod renálním prahem. Díky tomu mohou být tyto polymery eliminovány glomerulární filtrací, aniž by docházelo k jejich kumulaci v organismu.

V případě AHHBP, *L*-tyrosinamidu a hydrazinu dosáhla konverze TT skupin 70 % až 100 % v závislosti na kombinaci použitých připojovaných aminů. V případě připojení DOX na polymer je konverze poměrně nízká, jen mezi 40 – 60 %. Nebyla nalezena závislost na typu reakce, spíše jde o důsledek velikosti molekul DOX (stérické zábrany a jiné interakce).

5.3.2. Značení polymerů cílených hydroxybisfosfonátovými skupinami radionuklidy ^{125}I a ^{111}In

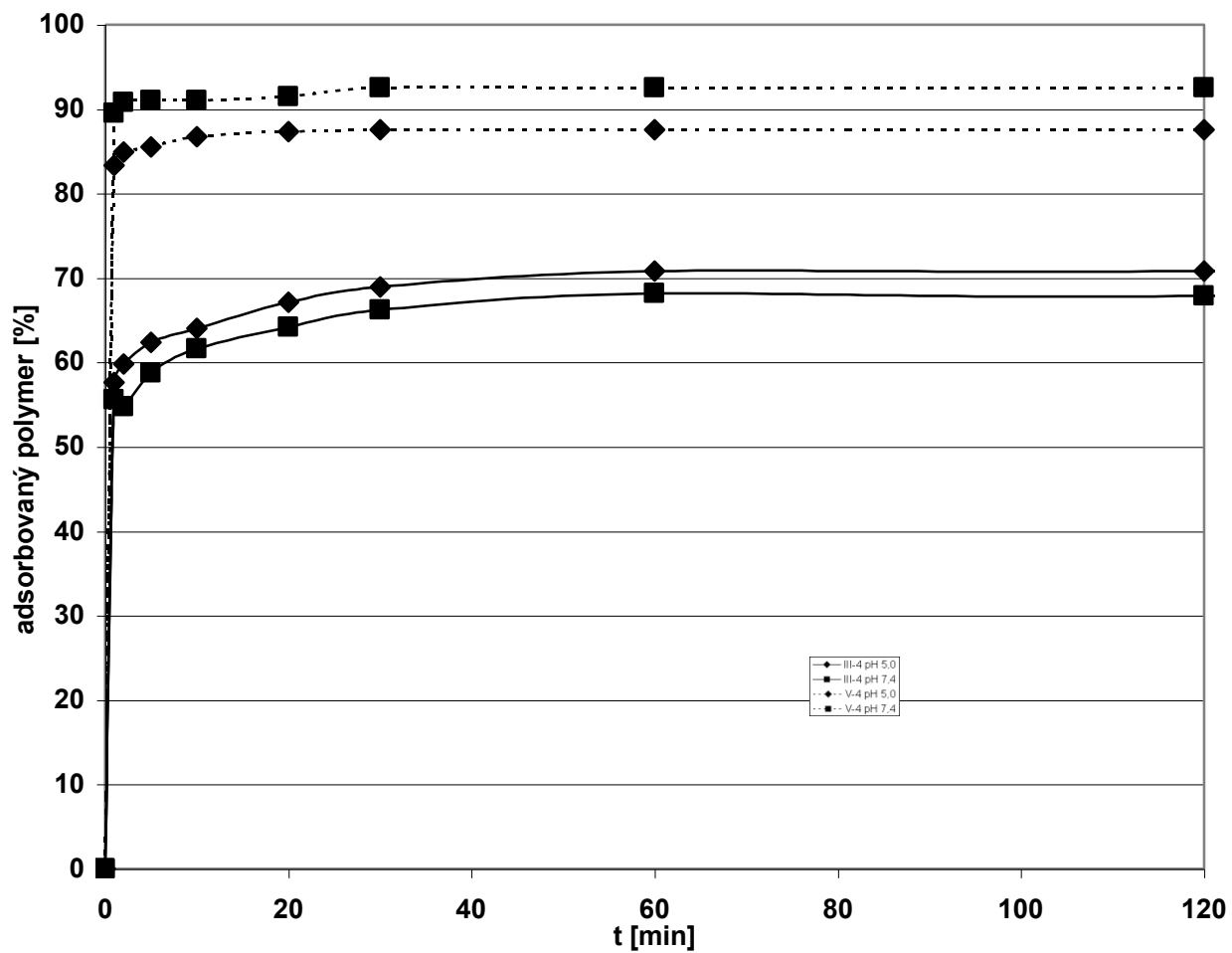
Vazba radionuklidu na systém navržený pro diagnosu a radioterapii kostních metastáz je DDS založena na elektrofilní radiojodaci aromatického kruhu *L*-tyrosinamidu radionuklidem ^{131}I (zářič β a γ – použitelný pro terapii i scintigrafickou diagnostiku) respektive chelataci ^{111}In (γ – zářič, výhodný pro scintigrafickou diagnostiku) iontů polymerem **II**. Pro experimenty byl použit jako modelový radioisotop jodu nuklid ^{125}I , který je vhodnější k laboratorní práci [nižší dávkový příkon, delší poločas ($T_{1/2} = 59,40$ d)]. Polymer **II** byl značen Na^{125}I a $^{111}\text{InCl}_3$ s radiochemickými výtěžky 67 % pro ^{125}I a více než 99 % pro ^{111}In .

Stabilita obou značených polymerů ve fyziologickém roztoku ($0,15 \text{ mol.l}^{-1}$ NaCl) byla dostatečná, více než 99 % radioaktivity zůstalo vázáno v polymeru.

5.3.3. Sorpční studie na hydroxyapatitu

Jako model kostní tkáně byl zvolen fosforečnan vápenatý, který je ve formě hydroxyapatitu (HA) dominantní komponentou kostní tkáně. Polymery **II**, **III**, **V**, **VII** nesoucí hydroxybisfosfonát (HBF) jsou rychle adsorbovány na povrchu HA. Rychlost adsorbce je velmi vysoká a téměř nezávislá na pH ve fyziologických mezích (5,0 - 7,4). Většina polymeru je adsorbována již v první minutě (viz **Obrázky 13, 14a** a **14b**).

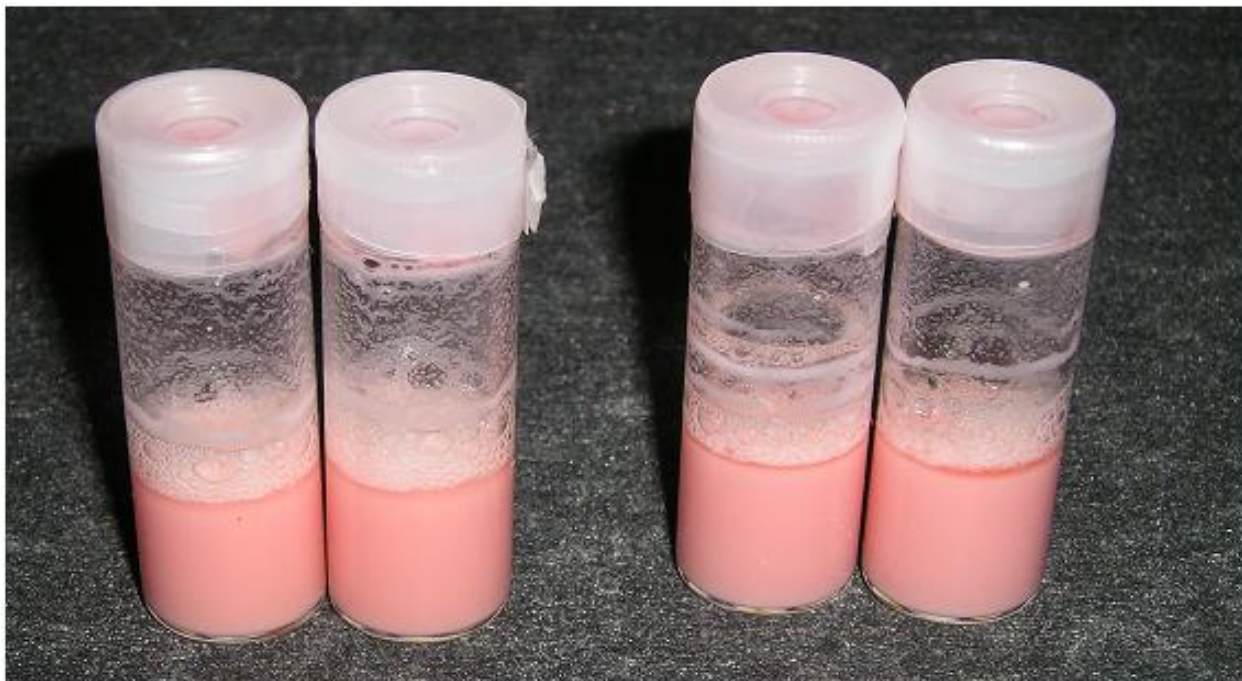
Obrázek 13.



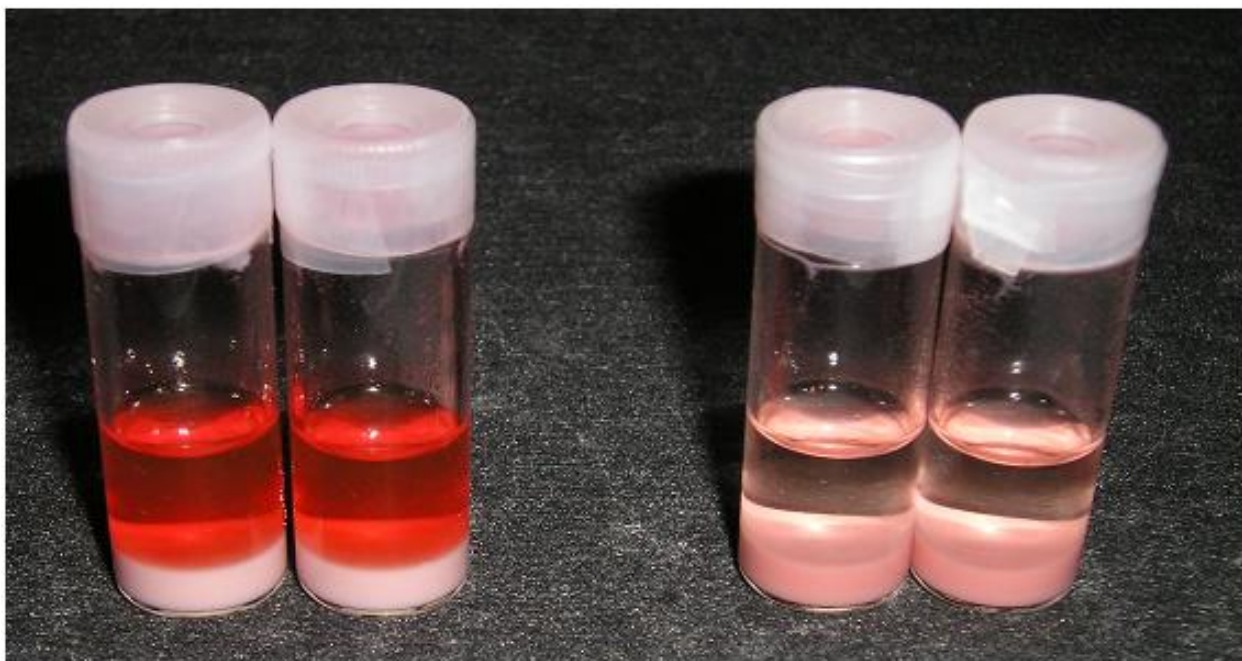
Rychlost adsorbce polymerů **III-4** a **V-5** na HA při pH = 5,0 a pH = 7,4. Experimentální podmínky : 15 ml roztoku polymeru (0,5 mg.ml⁻¹) v příslušném pufru a 400 mg HA.

Obrázek 14

A) Suspense hydroxyapatitu v roztoku necíleného (lahvičky vlevo) a cíleného (lahvičky vpravo) polymeru nesoucích DOX. Obsah doxorubicinu dodává polymeru charakteristickou červenooranžovou barvu.

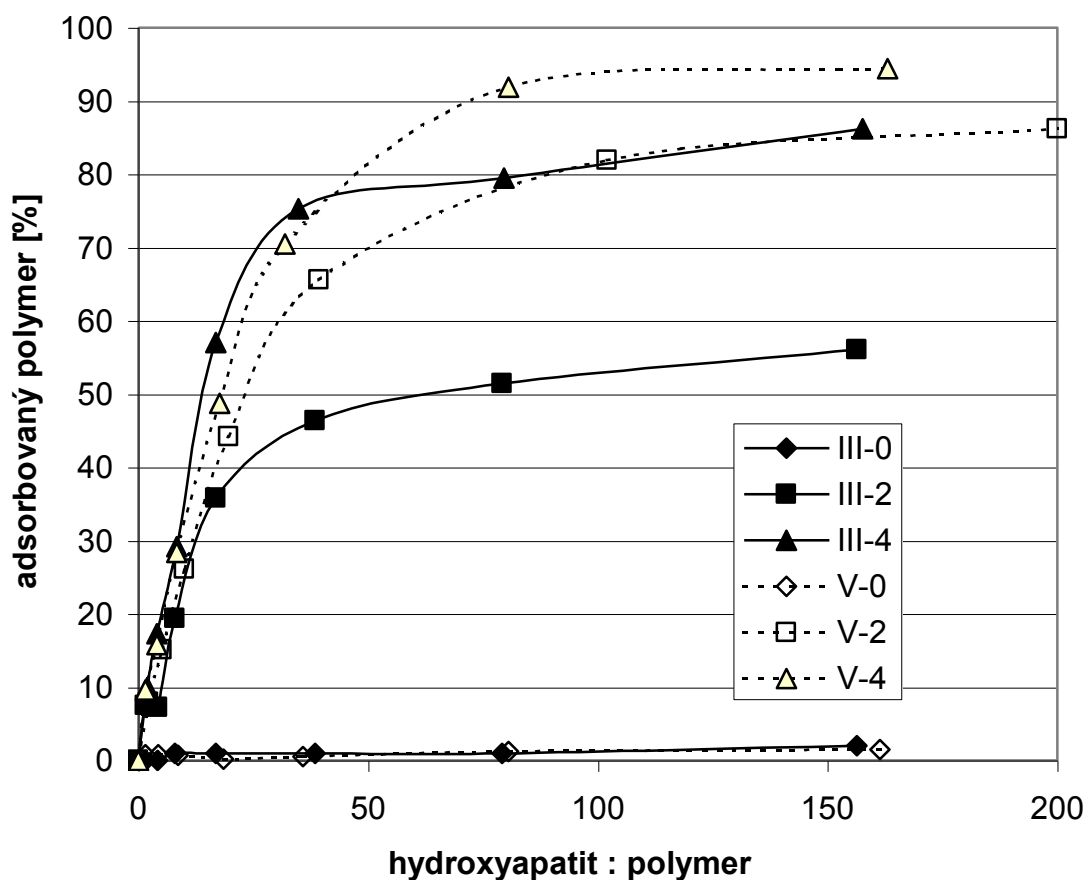


B) Tytéž vzorky bezprostředně po sedimentaci, u cíleného polymeru je zcela zřetelné, že supernatant pozbyl své charakteristické barvy a polymer byl téměř kompletně adsorbován na HA



Množství polymeru adsorbovaného na HA je silně závislé na obsahu HBF skupin. Polymery bez cílicí skupiny se na HA prakticky neabsorbují. S rostoucím obsahem HBF výrazně roste afinita polymerů k HA. Pro polymery **V-0**, **V-2** a **V-4** byly nalezeny tyto hodnoty adsorbce: 1 %, 86 % a 94 %. Na **Obrázku 15** je vynesena závislost adsorbce HBF cílených polymerů na HA v poměru hmotnosti polymer/HA.

Obrázek 15



Adsorbční isothermy polymerů **III-0**, **III-2**, **III-4**, **V-0**, **V-2** a **V-4** na hydroxyapatitu
 Experimentální podmínky: Roztok polymeru (0,5 mg.ml⁻¹, 2,5 ml) v PBS pufru (pH 7.4) byl přidán k HA, doba inkubace 60 minut.

Neúplnost adsorbce BHF polymerů na HA lze vysvětlit chemickou a molekulární polydisperzitou, která způsobuje, že některé DOX nesoucí polymerní řetězce mají málo nebo vůbec žádnou cílicí skupinu. Pro efektivní cílení je potřebný větší počet HBF skupin, protože polymerní řetězec v roztoku představuje statistické klubko, na jehož povrchu musí být přístupná alespoň jedna HBF skupina potřebná pro interakci s povrchem HA. Tento efekt byl popsán také

u albuminu cíleného do kostní tkáně¹³¹. Pro jeho efektivní cílení bylo zapotřebí nejméně pět aminobisfosfonátových skupin.

Tento efekt byl také ověřen sorbčními experimenty s polymerem **II-4** značeným ¹¹¹In ([¹¹¹In **II-4**]) na HA. Byla zjištěna silná a rychlá adsorbce samotného ¹¹¹InCl₃ na HA, zatímco [¹¹¹In **II-4**] se na HA sorboval s podstatně menší afinitou (85 %). Tedy pokud nízkomolekulární trivalentní iont (In³⁺), HBF komplex a HBF samotný mají stejnou afinitu ke kostní tkáni, respektive HA, pak musí existovat polymerní řetězce s tak malým obsahem HBF skupin, že již nepostačují pro další interakci resp. adsorbci na HA (viz **Tabulka 14**).

Tabulka 14

Polymer	Isotop	Adsorbovaný polymer [%]
II-0	¹²⁵ I	3
II-2	¹²⁵ I	57
II-4	¹²⁵ I	77
II-2	¹¹¹ In	92
II-4	¹¹¹ In	85
InCl ₃	¹¹¹ In	93

Studovali jsme rovněž vliv Ca²⁺ iontů přítomných v krevním řečišti a též silně chelatovaných HBF, zda neinterferují se sorbcí polymerů na HA. Nebyl nalezen patrný vliv koncentrace Ca²⁺ iontů na sorbci ani za podmínek, kdy se molární poměr Ca²⁺/polymer AHHPB v inkubačních roztocích pohyboval v intervalu 0; 0,5; 1 až 10. Toto zjištění je v souladu s adsorbčním mechanismem, který zahrnuje chelataci vápníku HBF přímo ve struktuře krystalu HA, analogicky k prostorové chelataci vápníku difosfátem (viz Teoretická část).

Adsorbce polymerních HBF na HA není čistě elektrostatickou interakcí, protože polymerní HBF nesou záporný náboj a jejich zeta-potenciál na HA v použitých pufrch byl – 9.2 mV při pH 5,0 a –33.2 mV při pH 7,4

Polymer **V** obsahující hydrazid a DOX je mnohem rychleji a kompletněji adsorbován na povrchu HA než polymery s amidicky vázaným DOX nebo nesoucím L-tyrosinamid (**II**, **III** a **VII**). Předpokládáme že tento efekt je způsoben protonizovatelnou aminoskupinou vázaného DOX přítomného v polymeru **V** (ale nikoliv v polymerech **II**, **III** and **VII**), která snižuje celkový záporný náboj polymeru způsobený nesenými HBF skupinami. To omezuje elektrostatické odpuzivé síly mezi polymerem **V** a povrchem HA. Rovněž jsou tak omežovány odpuzivé elektrostatické síly mezi molekulami již adsorbovaného polymeru a je tak možné dosáhnout vyšší plošné hustoty adsorbovaných molekul polymeru **V**.

Sorbce polymeru **II** značeného ^{125}I na HA byla nižší než sorbce polymeru **II** značeného ^{111}In (viz **Tabulka 14**). Tento efekt může být způsoben částečnou nestabilitou komplexu HBF s trojmocným kationtem v prostředí obsahujícím kompetující ionty a vysokou afinitou volného In^{3+} k HA, která byla ověřena sorbcí In^{3+} na HA (> 99% vázáno).

Radioisotopy jodu mohou být v tomto směru podstatně výhodnější, protože vazba polymer - tyrosinamid a vazba jodu na tyrosinamid je mnohem stabilnější a navíc zůstávají neobsazené HBF skupiny potřebné pro interakci s HA. Výběr dostupných radioisotopů (^{123}I , ^{124}I a ^{131}I) jodu pokrývá celé spektrum zobrazovacích diagnostických metod (SPECT i PET), a konečně pro samotnou radioterapii lze použít ^{131}I .

5.4. Biologické vlastnosti studovaných systémů

Studie biologických vlastností hydroxybisfosfonátového systému byly provedeny na pracovišti na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, vedeném prof. RNDr. Blankou Říhovou, DrSc., experimenty prováděli Mgr. David Větvička, RNDr. Ondřej Hovorka, PhD. a RNDr. Marek Šťastný, PhD.

Studie biologických vlastností termoresponsivního systému byla provedena v laboratoři biologického testování Ústavu jaderného výzkumu Řež a.s., pod vedením Ing. Alfreda Riedela, CSc.. Experimenty provedla Ing. Ludmila Jandová a Ing. Alfred Riedel, CSc..

5.4.1. Biodistribuce termoresponsivního polymerního systému

Byly stanoveny biodistribuce termoresponsivního polymeru (**VI-5**) na šestičlenných skupinách myši (**Balb/c**) v intervalech 1 h, 8 h, 24 h, 3 dny a 7 dní. Označený polymer (^{131}I) byl v roztoku dimethylsulfoxidu (50 μl roztoku obsahujícího 1 mg polymeru **VI-5**, měrná aktivita 4,44 $\text{MBq}\cdot\text{ml}^{-1}$ roztoku) aplikován injekčně do svaloviny zadní nohy. Po stanovené době byly myši usmrceny a vybrané orgány spolu s injikovanou svalovinou byly odebrány. Radioaktivita těchto tkání byla změřena na gama spektrometru MC1256 s velkoobjemovou měřicí studnou. Získaná data po korekci na poločas rozpadu ^{131}I jsou v **Tabulce 15**. V souladu s očekáváním byla prokázána značná retence polymeru v místě aplikace po dobu odpovídající jednomu poločasu rozpadu radioisotopu ^{131}I . Nízká radioaktivita ve štítné žláze svědčí pro vysokou stabilitu vazby radiojód – polymer.

Na druhé straně, příliš dlouhá retence v místě aplikace nemusí vždy vyhovovat poločasu nuklidu i charakteru aplikace, v příštích experimentech bude proto rozšířeno spektrum polymerů o biologicky odbouratelné termoresponsivní systémy.

Tabulka 15.

Orgán	1 h	8 h	24 h	3 d	7 d
Krev celkem	1,483	0,380	0,112	0,050	0,018
Štítná žláza	0,244	0,317	0,085	0,018	0,009
Ledviny	0,168	0,245	0,301	0,312	0,268
Plíce	0,045	0,013	0,027	0,002	0,004
Srdce	0,015	0,005	0,004	0,014	0,003
Slezina	0,020	0,005	0,004	0,005	0,003
Varlata	0,022	0,012	0,006	0,001	0,002
Žaludek - stěna	0,226	0,050	0,035	0,005	0,006
Žaludek - obsah	0,323	0,032	0,062	0,011	0,009
Játra	0,367	0,103	0,086	0,012	0,055
Slinivka	0,079	0,030	0,018	0,096	0,011
Tenké střevo	0,302	0,200	0,202	0,020	0,042
Tlusté střevo - stěna	0,053	0,062	0,050	0,067	0,025
Tlusté střevo - obsah	0,033	0,138	0,152	0,037	0,009
Svalovina levé zadní nohy	93,8	86,3	79,9	77,9	79,6

Průměrná radioaktivita (% z aplikované dávky) odebraných orgánů ve stanoveném čase. Vysoká retence radioaktivity v místě aplikace je zřejmým důkazem retence polymeru v tkáni.

5.4.2. *In vivo* vlastnosti polymeru cíleného HBP skupinou

Byla testována *in vivo* účinnost cílení polymerů cílených hydroxybisfosfonátovými (HBP) skupinami (RNDr. Tomáš Mrkvan, PhD. ze skupiny prof. Říhové, nepublikované výsledky). Byla stanovena biodistribuce polymeru **17- 4** (HBP-cílený konjugát s DOX) u zdravých myši C3H/He a myši C3H/He s B-buněčným lymfomem 38C13, který metastazuje do páteře, ačkoliv nejde o typický osteolytický nádor.

Výsledky (viz **Tabulka 16**) ukazují, že polymerní léčivo cirkuluje v krevním oběhu poměrně dlouho, po 18 hod je ještě značné množství v krvi a silně prokrvených orgánech. V kostech zdravých myši se hromadí 2,5-krát více léčiva než v silně prokrvené svalovině (srdce), takže lze říci, že byl pozorován směřující účinek do kostí, byť slabší než u nízkomolekulárních hydroxybisfosfonátů. Při porovnání biodistribucí ve zdravé myši a myši s nádorem lze pozorovat některé odlišnosti. Především u myši s nádorem se výrazně méně léčiva hromadí ve zdravých kostech (zde femur, průměrně 2,6-krát), pravděpodobně v důsledku demineralizace.

Tabulka 16.

Orgán	Procent injikované dávky		DOX ve tkáni (mg.kg-1)	
	Zdravá myš	Myš s nádorem	Zdravá myš	Myš s nádorem
femur 1	0,21	0,069	9,5	3,6
femur 2	0,20	0,075	9,4	4,2
játra	3,7	6,8	10,0	13
krev	30	22	58	42
slezina	1,0	0,48	32	4,6
srdce	0,093	0,057	3,8	2,0
nádor	-	0,63	-	3,1

Průměrné biodistribuce polymeru **17- 4** ve zdravých myších kmene C3H/He a myších C3H/He s nádorem podle obsahu aglykonu DOX po hydrolýze; zvířata usmrcena 18 hod po aplikaci konjugátu.

Dosti velké množství léčiva bylo nalezeno ve slezině a játrech, což může být způsobeno jednak jejich silnou prokrveností a jednak tvorbou komplexů HBP skupin s vápníkem, které jsou u nízkomolekulárních hydroxybisfosfonátů známé tím, že se významně zachytávají kromě kostí i ve slezině a játrech (viz výše). Akumulace ve slezině je ovšem výrazně menší u myši s nádorem (průměrně 7-krát) než u zdravých myši, což může být způsobeno přednostním zachytem polymerního léčiva v nádoru. Významná je akumulace v nádoru, k čemuž pravděpodobně dosti přispívá EPR efekt. Zde je třeba vzít v úvahu, že použitý modelový nádor (38C13) není primárně osteolytický kostní nádor, ale byl vybrán proto, že šlo o jediný dostupný model nádoru významně metastazujícího do kostí (zde páteře). Primární nádor byl pod kůží na zádech. Byla vybrána zvířata v dosti pokročilém stadiu onemocnění, aby už byly vyvinuty metastázy na páteři, takže procenta akumulace v nádoru v **Tabulce 16** uvedené v procentech injikované dávky mohou být do určité míry zavádějící, protože byla analyzována pouze vyoperovatelná část nádorové tkáně. Dále, vysoká koncentrace v krvi svědčí o tom, že příští experiment by měl mít delší prodlevu mezi aplikací léčiva a stanovením biodistribuce.

6. Závěr

Předkládaná disertační práce splnila všechny vytčené cíle (viz kapitola 3). Při jejím vypracování bylo dosaženo následujících nejdůležitějších poznatků:

1. Byl připraven, charakterizován, označen a *in vivo* otestován termoresponsivní systém nesoucí ^{131}I a ^{90}Y . Byla pozorována dobrá biokompatibilita polymeru a jeho dlouhodobé setrvání v místě aplikace současně s rychlým vyloučením uvolněného polymeru z organismu. Dalším zjištěným faktem byla vysoká stabilita lyofilizovaného produktu, po dobu 1 měsíce nedošlo k žádné pozorovatelné změně fyzikálně-chemických vlastností. Ačkoliv šlo o první systém, lze uvažovat o jeho praktickém použití např. pro radiosynovektomie. Dlouhodobé setrvání v místě aplikace by mohlo být v některých případech nežádoucí, a proto byly zahájeny práce na biodegradovatelném polymeru. Již byly provedeny předběžné pokusy s modelovými polymery.
2. Podařilo se stabilně vázat s kvantitativním výtěžkem ^{211}At na potenciálně přímo použitelný nosič, který není tolik náchylný k silné radiolyse vyvolané α -zářením ^{211}At . Navíc se podařilo částečně ožrejmít chování ^{211}At vůči redukčně oxidačním procesům a stabilizovat jej v chemické formě astatidu vhodné pro značení zvoleného systému.
3. Byly připraveny a charakterizovány modelové rozpustné systémy navržené pro cílení makromolekul do kostní tkáně a založené na statistických kopolymerech *N*-[2-(hydroxypropyl)]methakrylamidu s monomerem obsahujícím hydroxybisfosfonátové skupiny. Byla prokázána rychlá a účinná adsorpce cílených polymerů na *in vitro* model kostní tkáně hydroxyapatit (většina polymeru je nasorbována během 1 minuty inkubace; v řadě případů bylo nasorbováno za tuto dobu přes

80 % polymeru). Množství polymeru adsorbovaného na hydroxyapatit je silně závislé především na obsahu hydroxybisfosfonátových skupin v polymeru. Byly připraveny systémy obsahující modelová léčiva vázaná na polymer stabilní amidickou, hydrolyticky štěpitelnou hydrazonovou vazbou. Na polymer bylo navázáno chemické kancerostatikum (doxorubicin), radiodiagnostikum (^{111}In) a model radioterapeutika (^{125}I).

7. Seznam použité literatury

1. Allen, C.; Eisenberg, A.; Maysinger, D. *STP Pharma Sci.* **1999**, *9*, 139-151.
2. Gutman, R. L.; Peacock, G.; Lu, D. R. *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 31-41.
3. Hafeli, U. O.; Sweeney, S. M.; Beresford, B. A.; Sim, E. H.; Macklis, R. M. *J. Biomed. Mater. Res.* **1994**, *28*, 901-908.
4. Kucuk, N. O.; Ibis, E.; Aras, G.; Baltaci, S.; Ozalp, G.; Beduk, Y.; Canakci, N.; Soylu, A. *Ann. Nucl. Med.* **2000**, *14*, 239-245.
5. Alfke, H.; Nocken, F.; Heverhagen, J. T.; Klose, K. J. *Rofo-Fortschr. Gebiet Rontgenstrahlen Bildgeb. Verfahr.* **2001**, *173*, 391-398.
6. Alexandrakis, M. G.; Kyriakou, D. S.; Passam, F.; Koukouraki, S.; Karkavitsas, N. *Ann. Hematol.* **2001**, *80*, 349-353.
7. Souza, J. F.; Dantas, B. M.; Braga, F. J. H. N.; Bertelli, L.; Netto, T. G. *Radiat. Prot. Dosim.* **2000**, *89*, 305-307.
8. Amaldi, U.; Kraft, G. *Rep. Prog. Phy.* **2005**, *68*, 1861-1882.
9. Orecchia, R.; Krenqli, M.; Jereczek-Fossa, B. A.; Franzetti, S.; Gerard, J. P. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2004**, *51*, 81-90.
10. Wenke, M. e. al. *Farmakologie*; Avicenum, Praha: 1990.
11. Holý, A. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*; Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta: Olomouc, 2004.
12. Allard, B.; Jouini, M.; Alunnibistocchi, G.; Orvietani, P. L.; Ricci, A.; Lescot, E.; Schwaller, M. A. *J. Chem. Res., Synop.* **1995**, 218-&.
13. Kissler, S.; Siebzehnuebl, E.; Kohl, J.; Mueller, A.; Hamscho, N.; Gaetje, R.; Ahr, A.; Rody, A.; Kaufmann, M. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2004**, *83*, 369-374.
14. Watanabe, N.; Shirakami, Y.; Tomiyoshi, K.; Oriuchi, N.; Hirano, T.; Yukihiro, M.; Inoue, T.; Endo, K. *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23*, 595-598.
15. Draisma, A.; Maffioli, L.; Gasparini, M.; Savelli, G.; Pauwels, E.; Bombardieri, E. *Tumori* **1998**, *84*, 434-441.
16. Groeneveld, A. B. J.; Raijmakers, P. G. H. M. *Crit. Care Med.* **1998**, *26*, 685-691.
17. Ohta, M.; Tokuda, Y.; Suzuki, Y.; Kubota, M.; Makuuchi, H.; Tajima, T.; Nasu, S.; Suzuki, Y.; Yasuda, S.; Shohtsu, A. *Nucl. Med. Commun.* **2001**, *22*, 875-879.
18. Wang, W. P.; Larson, S. M.; Fazzari, M.; Tickoo, S. K.; Kolbert, K.; Sgouros, G.; Yeung, H.; Macapinlac, H.; Rosai, J.; Robbins, R. J. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85*, 1107-1113.

19. Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. *Curr. Pharm. Design* **2007**, *13*, 3-16.
20. Lawrentschuk, N.; Davis, I. D.; Bolton, D. M.; Scott, A. M. *Int. J. Urol.* **2007**, *14*, 89-95.
21. Krausz, Y.; Israel, O. *Semin. Nucl. Med.* **2006**, *36*, 267-274.
22. Damerla, V.; Packianathan, S.; Boerner, P. S.; Jani, A. B.; Vijayakumar, S.; Vijayakumar, V. *Am. J. Clin. Oncol.-Cancer Clin. Trials* **2005**, *28*, 513-520.
23. Qaim, S. M. *Radiat. Phys. Chem.* **2004**, *71*, 917-926.
24. Fisher, D. R. *Radiat. Prot. Dosim.* **2003**, *105*, 581-586.
25. Goh, A. S. W.; Ng, D. C. E. *Ann. Acad. Med. Singap.* **2003**, *32*, 507-517.
26. Love, C.; Din, A. S.; Tomas, M. B.; Kalapparambath, T. P.; Palestro, C. *Radiographics* **2003**, *23*, 341-358.
27. Acampa, W.; Petretta, M.; Cuocolo, A. *Quart. J. Nucl. Med.* **2002**, *46*, 323-330.
28. Zuckier, L. S. *Quart. J. Nucl. Med.* **2002**, *46*, 160-168.
29. Rubello, D.; Rufini, V.; Casara, D.; Calcagni, M. L.; Gajate, A. M. S.; Shapiro, B. *Panminerva Medica* **2002**, *44*, 185-196.
30. Gopalan, D.; Bomanji, J. B.; Costa, D. C.; Ell, P. J. *Clin. Radiol.* **2002**, *57*, 565-574.
31. Thomas, S. R. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2002**, *17*, 71-82.
32. Bombardieri, E.; Aliberti, G.; De Graaf, C.; Pauwels, E.; Crippa, F. *Semin. Surg. Oncol.* **2001**, *20*, 134-146.
33. Mahfouz, R. M.; Al Wassil, A. I.; Al Farhan, K. A.; Mukhalalati, M. H. *ACH-Models Chem.* **1999**, *136*, 31-40.
34. Seregny, E.; Chiti, A.; Bombardieri, E. *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, *25*, 639-658.
35. Medley, C. M. T.; Vivian, G. C. *Br. J. Radiol.* **1997**, *70*, S133-S144.
36. Mirzadeh, S.; Knapp, F. F. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **1996**, *203*, 471-488.
37. Volkert, W. A.; Jurisson, S. *Technetium Rhenium* **1996**, *176*, 123-148.
38. Hjelstuen, O. K. *Analyst* **1995**, *120*, 863-866.
39. Puncher, M. R. B.; Blower, P. J. *Eur. J. Nucl. Med.* **1994**, *21*, 1347-1365.
40. Knapp, F. F.; Mirzadeh, S. *Eur. J. Nucl. Med.* **1994**, *21*, 1151-1165.
41. Gordon, I. *Br. J. Radiol.* **1993**, *66*, 971-985.
42. Podoloff, D. A.; Kim, E. E.; Haynie, T. P. *Radiology* **1992**, *183*, 305-317.

43. Noyek, A. M.; Witterick, I. J.; Kirsh, J. C. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **1991**, *117*, 372-378.
44. Kwong, D. L. W.; Wei, W. I.; Cheng, A. C. K.; Choy, D. T. K.; Lo, A. T. C.; Wu, P. M.; Sham, J. S. T. *Cancer* **2001**, *91*, 1105-1113.
45. Choy, D.; Sham, J. S. T.; Wei, W. I.; Ho, C. M.; Wu, P. M. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1993**, *25*, 505-512.
46. Horiuchi, J.; Takeda, M.; Shibuya, H.; Matsumoto, S.; Hoshina, M.; Suzuki, S. *Radiother. Oncol.* **1991**, *21*, 29-38.
47. Lin, J. D.; Chao, T. C.; Hsueh, C. *Clin. Endocrinol.* **2007**, *66*, 224-228.
48. Ain, K. B. *Best Pract. Res. Clin. Endoc. Metab.* **2000**, *14*, 615-629.
49. Allen, B. J. *Phys. Med. Biol.* **2006**, *51*, R327-R341.
50. Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R. *Phys. Med. Biol.* **1996**, *41*, 1915-1931.
51. Št'astný, M.; Plocová, D.; Etrych, T.; Kovar, M.; Ulbrich, K.; Říhová, B. *J. Controlled Release* **2002**, *81*, 101-111.
52. Fung, L. K.; Saltzman, W. M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *26*, 209-230.
53. Goldberg, E. P.; Hadba, A. R.; Almond, B. A.; Marotta, J. S. *J. Pharm. Pharmacol.* **2002**, *54*, 159-180.
54. Bredow, J.; Kretschmar, M.; Wunderlich, G.; Dorr, W.; Pohl, T.; Franke, W. G.; Kotzerke, J. *Nuklearmedizin* **2004**, *2*.
55. Hussein, G. A.; Myrup, G. D.; Pitt, W. G.; Christensen, D. A.; Rapoport, N. A. *J. Controlled Release* **2000**, *69*, 43-52.
56. Hussein, G. A.; Rapoport, N. Y.; Christensen, D. A.; Pruitt, J. D.; Pitt, W. G. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2002**, *24*, 253-264.
57. Hafeli, U. O. *Int. J. Pharm.* **2004**, *277*, 19-24.
58. Jain, K. K. *Drug Delivery in Cancer: Technologies and Commercial Opportunities*; Decision Resources, Inc., Waltham, U.S.A.: 2000.
59. Gil, E. S.; Hudson, S. A. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 1173-1222.
60. Wright, E. R.; Conticello, V. P. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 1057-1073.
61. Wei, G.; Xu, H.; Ding, P. T.; Li, S. M.; Zheng, J. M. *J. Controlled Release* **2002**, *83*, 65-74.
62. Shah, S. S.; Wertheim, J.; Wang, C. T.; Pitt, C. G. *J. Controlled Release* **1997**, *45*, 95-101.
63. Uludag, H.; Norrie, B.; Kousinioris, N.; Gao, T. J. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *73*, 510-521.
64. Chytrý, V.; Ulbrich, K. *J. Bioactiv. Compaq. Polym.* **2001**, *16*, 427-440.

65. Mehta, S. C.; Lu, D. R. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 344-351.
66. Kullberg, E. B.; Carlsson, J.; Edwards, K.; Capala, J.; Sjoberg, S.; Gedda, L. *Int. J. Oncol.* **2003**, *23*, 461-467.
67. Kullberg, E. B.; Nestor, M.; Gedda, L. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 229-236.
68. Peacock, G.; Sidwell, R.; Pan, G. L.; Oie, S.; Lu, D. R. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 13-19.
69. Wei, Q. C.; Kullberg, E. B.; Gedda, L. *Int. J. Oncol.* **2003**, *23*, 1159-1165.
70. Hirth, A.; Michelsen, U.; Wohrle, D. *Chem. Unserer Zeit* **1999**, *33*, 84-94.
71. Fu, J.; Li, X.; Ng, D. K. P.; Wu, C. *Langmuir* **2002**, *18*, 3843-3847.
72. Le Garrec, D.; Taillefer, J.; van Lier, J. E.; Lenaerts, V.; Leroux, J. C. *J. Drug Targeting* **2002**, *10*, 429-437.
73. Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 113-131.
74. Nishiyama, N.; Okazaki, S.; Cabral, H.; Miyamoto, M.; Kato, Y.; Sugiyama, Y.; Nishio, K.; Matsumura, Y.; Kataoka, K. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 8977-8983.
75. Fonseca, C.; Simoes, S.; Gaspar, R. E. *J. Controlled Release* **2002**, *83*, 273-286.
76. Hoste, K.; De Winne, K.; Schacht, E. *Int. J. Pharm.* **2004**, *277*, 119-131.
77. Kopeček, J.; Kopečková, P.; Minko, T.; Lu, Z. R.; Peterson, C. M. *J. Controlled Release* **2001**, *74*, 147-158.
78. Torchilin, V. P. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2549-2559.
79. Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Kataoka, K. *J. Drug Targeting* **1999**, *7*, 171-186.
80. Kato, T.; Sato, K.; Sasaki, R.; Kakinuma, H.; Moriyama, M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1996**, *37*, 289-296.
81. Ulbrich, K.; Šubr, V. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1023-1050.
82. Gillies, E. R.; Frechet, J. M. J. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1295-1307.
83. Chen, L.; Schechter, B.; Arnon, R.; Wilchek, M. *Drug Dev. Res.* **2000**, *50*, 258-271.
84. Seymour, L. W.; Ulbrich, K.; Wedge, S. R.; Hume, I. C.; Strohal, J.; Duncan, R. *Br. J. Cancer* **1991**, *63*, 859-866.
85. Zern, M. A.; Kresina, T. F. *Hepatology* **1997**, *25*, 484-491.
86. Gaur, U.; Sahoo, S. K.; De, T. K.; Ghosh, P. C.; Maitra, A.; Ghosh, P. K. *Int. J. Pharm.* **2000**, *202*, 1-10.
87. Averbach, A. M.; Jacquet, P.; Sugarbaker, P. H. *GI Cancer* **1996**, *1*, 239-246.

88. Mastrobattista, E.; Koning, G. A.; Storm, G. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *40*, 103-127.
89. Torchilin, V. P.; Lukyanov, A. N.; Gao, Z. G.; Papahadjopoulos-Sternberg, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 6039-6044.
90. Říhová, B. *Drugs Future* **2003**, *28*, 1189-1210.
91. Carrion, C.; de Madariaga, M. A.; Domingo, J. C. *Life Sci.* **2004**, *75*, 313-328.
92. Říhová, B.; Jelínková, M.; Strohalm, J.; Šubr, V.; Plocová, D.; Hovorka, O.; Novák, M.; Plundrová, D.; Germano, Y.; Ulbrich, K. *J. Controlled Release* **2000**, *64*, 241-261.
93. Gabius, S.; Kayser, K.; Bovin, N. V.; Yamazaki, N.; Kojima, S.; Kaltner, H.; Gabius, H. J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1996**, *42*, 250-261.
94. Minko, T. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 491-509.
95. Wroblewski, S.; Kopečková, P.; Říhová, B.; Kopeček, J. *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, *199*, 2601-2608.
96. Kullberg, E. B.; Bergstrand, N.; Carlsson, J.; Edwards, K.; Johnsson, M.; Sjöberg, S.; Gedda, L. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 737-743.
97. Broxterman, H. J.; Lankelma, J.; Hoekman, K. *Drug Resist. Update* **2003**, *6*, 111-127.
98. Park, J. H.; Kwon, S. G.; Nam, J. O.; Park, R. W.; Chung, H.; Seo, S. B.; Kim, I. S.; Kwon, I. C.; Jeong, S. Y. *J. Controlled Release* **2004**, *95*, 579-588.
99. Zitzmann, S.; Ehemann, V.; Schwab, M. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5139-5143.
100. Nasongkla, N.; Shuai, X.; Ai, H.; Weinberg, B. D.; Pink, J.; Boothman, D. A.; Gao, J. M. *Angew. Chem.-Int. Ed.* **2004**, *43*, 6323-6327.
101. Hallahan, D.; Geng, L.; Qu, S. M.; Scarfone, C.; Giorgio, T.; Donnelly, E.; Gao, X.; Clanton, J. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 63-74.
102. Hallahan, D. E.; Qu, S. M.; Geng, L.; Cmelak, A.; Chakravarthy, A.; Martin, W.; Scarfone, C.; Giorgio, T. *Am. J. Clin. Oncol.-Cancer Clin. Trials* **2001**, *24*, 473-480.
103. Shadidi, M.; Sioud, M. *Faseb J.* **2002**, *16*.
104. Fleisch, H. *Expert Opin. Ther. Patents* **2001**, *11*, 1371-1381.
105. Fleisch, H. *Breast Cancer Res.* **2002**, *4*, 30-34.
106. Shigematsu, M.; Shiomi, S.; Iwao, H.; Ochi, H. *Ann. Nucl. Med.* **2002**, *16*, 55-59.
107. Hirabayashi, H.; Takahashi, T.; Fujisaki, J.; Masunaga, T.; Sato, S.; Hiroi, J.; Tokunaga, Y.; Kimura, S.; Hata, T. *J. Controlled Release* **2001**, *70*, 183-191.
108. Hirabayashi, H.; Fujisaki, J. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 1319-1330.
109. Wang, D.; Miller, S.; Sima, M.; Kopeckova, P.; Kopeček, J. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 853-859.

110. Luo, Y.; Ziebell, M. R.; Prestwich, G. D. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 208-218.
111. Barinka, C.; Šácha, P.; Sklenář, J.; Man, P.; Bezouška, K.; Slusher, B. S.; Konvalinka, J. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1627-1635.
112. Zalutsky, M. R.; Vaidyanathan, G. *Curr. Pharm. Design* **2000**, *6*, 1433-1455.
113. Zijlstra, J. M.; Hoekstra, O. S.; Raijmakers, P. G. H. M.; Comans, E. F. I.; van der Hoeven, J. J. M.; Teule, G. J. J.; Jonkhoff, A. R.; von Tinteren, H.; Lammertsma, A. A.; Huijgens, P. C. *Br. J. Haematol.* **2003**, *123*, 454-462.
114. Leamon, C. P.; Low, P. S. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 44-51.
115. Leamon, C. P.; Reddy, J. A. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1127-1141.
116. Leamon, C. P.; Cooper, S. R.; Hardee, G. E. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 738-747.
117. Saul, J. M.; Annapragada, A.; Natarajan, J. V.; Bellamkonda, R. V. *J. Controlled Release* **2003**, *92*, 49-67.
118. Reddy, J. A.; Low, P. S. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **1998**, *15*, 587-627.
119. Gabizon, A.; Horowitz, A. T.; Goren, D.; Tzemach, D.; Shmeeda, H.; Zalipsky, S. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 6551-6559.
120. Han, H. K.; Amidon, G. L. *AAPS Pharmsci* **2000**, *2*.
121. Robinson, M. A.; Charlton, S. T.; Garnier, P.; Wang, X. T.; Davis, S. S.; Perkins, A. C.; Frier, M.; Duncan, R.; Savage, T. J.; Wyatt, D. A.; Watson, S. A.; Davis, B. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 14527-14532.
122. Koyama, Y.; Ishikawa, M.; Ueda, A.; Suginaka, A. *Polymer J.* **1993**, *25*, 355-361.
123. Kučka, J.; Hrubý, M.; Koňák, C.; Kozempel, J.; Lebeda, O. *Appl. Radiat. Isot.* **2006**, *64*, 201-206.
124. Šubr, V.; Ulbrich, K. *React. Funct. Polymers* **2006**, *66*, 1525-1538.
125. Yessine, M. A.; Leroux, J. C. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 999-1021.
126. Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X.; Cui, J. Z.; Zhang, J. T. *Int. J. Pharm.* **2002**, *235*, 43-50.
127. Gil, E. S.; Hudson, S. A. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 1173-1222.
128. Dautzenberg, H.; Gao, Y. B.; Hahn, M. *Langmuir* **2000**, *16*, 9070-9081.
129. Achour, B.; Costa, J.; Delgado, R.; Garrigues, E.; Geraldès, C. F. G. C.; Korber, N.; Nepveu, F.; Prata, M. I. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2729-2740.
130. Koop, B.; Reske, S. N.; Neumaier, B. *Radiochim. Acta* **2007**, *95*, 39-42.
131. Uludag, H.; Kousinioris, N.; Gao, T. J.; Kantoci, D. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 258-267.

8. Seznam publikací vytvořených v rámci dizertace

8.1. Publikace v recenzovaném zahraničním časopise, ve světovém jazyce

- [1] Hrubý M., Kučka J., Lebeda O., Macková H., Babič M., Koňák Č., Studenovský M., Sikora A., Kozempel J., Ulbrich K.: New bioerodable thermoresponsive polymers for possible radiotherapeutic applications. *J. Controlled Release*, *in press*. IF = 3.696
- [2] Hrubý M., Šubr V., Kučka J., Kozempel J., Lebeda O., Sikora A.: *Thermoresponsive polymers as promising new materials for local radiotherapy*. *Appl. Radiat. Isot.* **2005**, 63 (4), pp. 423–431. IF = 0.757
- [3] Kučka J., Hrubý M., Koňák Č., Kozempel J., Lebeda O.: *Astatination of nanoparticles containing silver as possible carriers of ²¹¹At*, *Appl. Radiat. Isot.* **2006**, 64 (2), pp. 201–206, 2006. IF = 0.757
- [4] Hrubý, M., Etrych, T., Kučka, J., Forsterová, M., Ulbrich, K.: Hydroxybisphosphonate containing polymeric drug delivery systems designed for targeting into bone tissue. *J. Appl. Polym Sci.* **2006**, 101, 3192–3201. IF = 1.072

8.2. Publikace v ostatních časopisech

- [1] Hrubý, M., Kučka, J., Kozempel, J., Lebeda, O.: Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy* **2006**, 100, 10-16. IF = 0.445