

Posudek oponenta na disertační práci pana Mgr. Petra Chytila „Polymerní nosiče léčiv na bázi HPMA kopolymerů usnadňující směrování do pevných nádorů a pH-řízenou aktivaci léčiva“

Předkládaná disertační práce Mgr. Petra Chytila spadá svým zaměřením do důležité oblasti současného speciálního polymerního výzkumu – do oblasti studia polymerních systémů pro dopravu a řízené uvolňování léčiv v živém organismu. Práce se konkrétně zabývá vývojem a přípravou nových polymerních kancerostatik (určených pro transport do pevných nádorů) tvořených konjugáty kopolymerů na bázi N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) a kancerostatika doxorubicinu (DOX) navázaného k nosiči pH-senzitivní hydrazonovou vazbou.

Z práce je nesporné, že se autor (v souladu s cíly sumarizovanými v Kap. 3) věnoval komplexnímu experimentálnímu tématu zahrnujícímu: (i) syntézu a optimalizaci syntézy polymerních prekusorů včetně prekusorů nesoucích kladně nebo záporně nabitě funkční skupiny a hydrofobní substituenty s ohledem na reprodukovatelnost procesu a kontrolovatelnou molární hmotnost a definovanou strukturu produktu, (ii) přípravu a optimalizaci přípravy vysokomolekulárních prekusorů s biodegradovatelnými oligopeptidovými spojkami, (iii) přípravu konjugátů typu polymerní nosič-DOX s použitím vybraných polymerních prekusorů jednotlivých výše uvedených typů a (iv) studium „funkčních“ vlastností připravených konjugátů (in vitro studovaná rychlost uvolňování léčiva a cytostatická aktivita a in vivo studovaná protinádorová aktivita) a zejména pak vztahů mezi těmito funkčními vlastnostmi a parametry konjugátu (složení, molární hmotnost, chování v roztoku). Z práce je evidentní, že tento nelehký úkol zvládl autor úspěšně, a to (i) jak v oblasti pokročilé víceúrovňové polymerní syntézy zahrnující často nejprve syntézu monomerů, jejich radikálovou kopolymerizaci a finální modifikaci kopolymerů v řadě případů cestou polymer-analogických reakcí a dále pak přípravu roubovaných kopolymerů využívající semitelechelické kopolymery, opět v rámci práce připravované, (ii) tak v oblasti komplexního studia funkční aktivity připravených konjugátů. V řadě optimalizací syntetických kroků se pan Chytil věnoval studiu vlivu širšího spektra reakčních parametrů (teplota, rozpouštědlo, poměr reagujících skupin, reakční čas) na výsledek syntézy a shromáždil tak experimentální data i obecnější závěry cenné pro přípravu polymerních nosičů tohoto typu. Studium funkční aktivity připravených konjugátů ukázalo možnosti cíleného ovlivňování rychlosti uvolňování léčiva z konjugátu a dále pak prokázalo, že v rámci studované skupiny systémů dochází k jednoznačnému nárůstu protinádorové aktivity konjugátů s jejich narůstající molární hmotností. Toto zjištění autor přičítá výraznějšímu uplatnění tzv. EPR efektu s rostoucí molární hmotností konjugátu.

Disertační práce je sepsána přehlednou, srozumitelnou a čtivou formou s minimem písařských překlepů. Jako zjevný klad považuji zařazení krátkých úvodních odstavců ke každé kapitole části „Výsledky a diskuse“, sumarizujících důvody, které vedly autora k návrhu v kapitole diskutovaných experimentů. Výsledky jsou prezentovány ve většině případů v přehledné a jednoznačné formě, jejich interpretace je srozumitelná, prezentované závěry jsou vždy důsledně podpořeny experimentem.

Připomínky formální:

- V Kap. 2.4.2.4 (druhý odstavec str. 30 a str. 31) došlo zřejmě k záměně hodnot pH. Hydrolyza by měla probíhat rychleji při pH = 5,0 než při pH = 7,4.
- Kap. 4.1.2.4 (str. 44): Ve výpisu ^1H NMR spektra látky N^1 -(*tert*-butoxykarbonyl)- N^2 -(6-(methakrylamido)hexanoyl) hydrazin je přiřazováno celkem 28 H, molekula studované látky však obsahuje pouze 27 atomů H (jedná se zřejmě o překlep ve výpisu). V této souvislosti prosím autora o odpověď na otázku jakým způsobem byly přiřazovány signály ^1H NMR spekter monomerů.
- Kap. 5.1.1 (str. 76, Obr. 5-1, 5-2, a diskuse v textu): Obrázky zachycují SEC (GPC) chromatogramy analyzovaných kopolymerů (odezva detektoru vs. retenční čas), nikoliv přímo „distribuce molárních hmotností“ jak je uvedeno v textu práce. Transformace SEC chromatogramu na zobrazení distribuční funkce (logaritmická váhová distribuční funkce) by vyžadovala transformaci osy retenčního času na osu molárních hmotností.
- Kap. 5.4.2.4 (str. 115 a 116): Obr.5-28 prezentovaný v této kapitole je v textu mylně označen jako Obr. 5-24.

Připomínky věcné a otázky do diskuse:

- Při kopolymerizaci HPMA s N^1 -(*tert*-butoxykarbonyl)- N^2 -(6-(methakrylamido)hexanoyl) hydrazinem (MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc) a s jeho nechráněným analogem (MA- ϵ Ahx-NHNH₂) byl studován časový průběh konverze komonomerů a molární hmotnosti vznikajícího kopolymeru, přičemž byl konstatován pokles molární hmotnosti (v hodnotách M_w zhruba o jednu třetinu při přechodu od reakčního času 2 hod k reakčnímu času 20 hod) (Kap. 5.1.1). Jaké navrhuje autor vysvětlení pro toto zjištění?
- Závěry Kap. 5.2.3 ukazují, že zavedení malého množství karboxylových skupin do struktury kopolymerního nosiče pozitivně ovlivňuje rychlost uvolňování DOX-léčiva z nosiče, zřejmě v důsledku lokálního snížení pH v okolí polymerních řetězců. S dalším nárůstem obsahu karboxylových skupin se však již tento pozitivní efekt neprohlubuje. Má pro toto zjištění autor nějaké vysvětlení?
- Pro některé ze studovaných systémů byl metodou QELS studován hydrodynamický poloměr kopolymerních nosičů a konjugátů. V některých případech je pak prezentována distribuce hodnot R_H v jiných případech pak zřejmě střední hodnota, která však není blíže specifikována.

- Studované kopolymerní nosiče a z nich následně připravené konjugáty s DOX-léčivem vykazují molekulárně hmotnostní neuniformitu s indexem $M_w/M_n \sim 2$. V této souvislosti se nabízí otázka, zda je v rámci daného vzorku komonomerní složení kopolymeru a obsah navázaného léčiva nezávislé na délce kopolymerního řetězce.
- Z obr. 5-8 A (str. 83) je patrný řádově nižší objem nádoru u kontrolní (neléčené) skupiny myši studované v rámci kapitoly 5.1.5 (objem nádoru cca 900 mm³ po 30 dnech) v porovnání s kontrolními skupinami myši studovanými v následujících kapitolách (např. Kap. 5.2.5, Obr. 5-13 A, str. 91, objem nádoru cca 15000 mm³ po 30 dnech). Má autor pro tento rozdíl nějaké vysvětlení.

Výše uvedené připomínky v žádném případě nesnižují kvalitu předkládané práce. Autor jednoznačně prokázal schopnost tvůrčím způsobem řešit komplexní výzkumný úkol. Doporučuji proto přijmout předloženou práci jako práci disertační.

V Praze dne 5. 9. 2007

RNDr. Jan Sedláček Dr.