

**Ústav makromolekulární chemie
Akademie věd České Republiky**

**Katedra fyzikální a makromolekulární chemie
Přírodovědecká fakulta
Karlova univerzita**

**Polymerní nosiče léčiv na bázi HPMA kopolymerů
usnadňující směřování do pevných nádorů
a pH-řízenou aktivaci léčiva**

Disertační práce

Mgr. Petr Chytil

Praha 2007

Školitel: prof. Ing. Karel Ulbrich, DrSc.

Motto:

Musíme začít s chybou a proměnit ji v to, co je pravdivé. To znamená, že musíme odhalit zdroj chyby, jinak by nám slyšení pravdy nepomohlo. Nemůžeme se k ní totiž dostat, když něco stojí na jejím místě. Abychom někoho přesvědčili o tom, co je pravdivé, nestačí, že to vyslovíme, ale musíme nalézt cestu od chyby k pravdě. A tak se znovu a znovu musíme nořit do vod pochybností.

L. Wittgenstein

Poděkování

Rád bych z celého srdce poděkoval všem, kteří mne podporovali během celého doktorského studia.

Především bych chtěl poděkovat mému školiteli prof. Karlu Ulbrichovi za vedení, podporu, trpělivost a příklad vědeckého myšlení a zápalu pro vědecké bádání.

Velké díky bych rád vyjádřil i dr. Tomáši Etrychovi za teoretickou a praktickou pomoc, i za jeho přátelství. Rovněž děkuji všem svým spolupracovníkům za poskytnutí mnoha rad při řešení problémů při každodenní laboratorní praxi i za vytvoření nadstandartně přátelského pracovního prostředí. Jsou jimi dr. Alena Braunová, dr. Martin Hrubý, dr. Vladimír Chytrý, ing. Libor Kostka, Albert Koválik, ing. Hana Krakovičová, ing. Richard Laga, Ivana Mutinová, dr. Michal Pechar, prom. chem. Dana Plocová, ing. Robert Pola, dr. Martin Studenovský, ing. Jiří Strohalm a dr. Vladimír Šubr.

Vřelé díky náleží i prof. Blance Říhové a členům její pracovní skupiny (Mikrobiologický ústav, AV ČR), zejména dr. Tomáši Mrkvanovi a dr. Miladě Šírové, za provedení biologického testování, cenné rady a plodné diskuze.

Dále bych chtěl poděkovat pí. Daně Kaňkové za změření všech NMR spekter a pracovníkům Oddělení analytické chemie za provedení GC a mnoha elementárních analýz.

Hlubokou vděčnost cítím i vůči mé manželce Renatě za vytvoření láskyplného zázemí a velkou trpělivost a toleranci. V neposlední řadě chci vyjádřit poděkování i mým rodičům za výchovu a podporu během mého předchozího studia a dále mé milé a obětavé tchýni.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně pod odborným vedením prof. Ing. Karla Ulbricha, DrSc., a že řádně cituji všechna převzatá data a skutečnosti.

V Praze dne 22. 6. 2007


Mgr. Petr Chytil

Obsah

1.	ÚVOD	5
2.	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	Systémy pro léčbu nádorových onemocnění	6
2.1.1	Chemoterapie nízkomolekulárními léčivy	6
2.1.2	Idea „kouzelné střely“	7
2.1.3	Přehled systémů používaných jako nosiče léčiv	8
2.1.3.1	Nanočástice a liposomy	8
2.1.3.2	Vodorozpustné polymerní nosiče	9
2.1.3.3	Micelární systémy	9
2.1.3.4	Dendrimery	9
2.1.3.5	Genová terapie	10
2.2	Vodorozpustné polymerní nosiče léčiv	11
2.2.1	Model polymerního nosiče léčiv	11
2.2.2	Vlastnosti polymerních nosičů léčiv	12
2.2.3	Principy dopravy a kontrolovaného uvolňování léčiv	13
2.2.4	Přírodní polymerní nosiče	15
2.2.5	Syntetické biodegradovatelné polymerní nosiče	15
2.2.6	Syntetické nedegradovatelné polymerní nosiče	16
2.2.6.1	PEG nosiče	16
2.2.6.2	Nosiče vinylového typu	17
2.2.6.3	Kopolymery na bázi HPMA	18
2.3	Micelární nosiče léčiv	20
2.3.1	Počátky vývoje micelárních nosičů léčiv	20
2.3.2	Vlastnosti micelárních nosičů léčiv	21
2.3.3	Micelární nosiče léčiv s fyzikálně vázaným léčivem	22
2.3.4	Micelární nosiče léčiv s kovalentně vázaným léčivem	23
2.3.5	Micelární nosiče vzniklé asociací polyiontů	23
2.4	Způsoby uvolňování kovalentně vázaných léčiv	24
2.4.1	Enzymaticky degradovatelné spojky	24
2.4.2	pH-senzitivní hydrolyticky degradovatelné spojky	25
2.4.2.1	<i>cis</i> -Akonitylová spojka	25
2.4.2.2	Hydrazonová vazba	27
2.4.2.3	Jiné hydrolyticky labilní spojky	29
2.4.2.4	Hydrolyticky degradovatelné spojky v micelárních systémech	30
2.5	Směrování polymerních léčiv	32
2.5.1	Směrování k receptorům exprimovaným na povrchu buněk	33
2.5.1.1	Protilátky	33
2.5.1.2	Peptidy	34

2.5.2	Pasivní směřování - EPR efekt	35
2.5.2.1	Konjugáty s protilátkami	36
2.5.2.2	Biodegradovatelné větvené kopolymery	36
2.5.2.3	Biodegradovatelné multiblokové polymery.....	37
2.5.2.4	Hybridní systémy tvořené vodorozpustnými polymery a dendrimery	38
2.5.2.5	Micelární systémy.....	40
3.	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	41
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
4.1	Syntetické postupy	42
4.1.1	Použité chemikálie.....	42
4.1.2	Příprava monomerů.....	42
4.1.2.1	Příprava <i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA).....	42
4.1.2.2	Příprava 6-(methakryloylamino) hexanové kyseliny (MA- ϵ Ahx-OH).....	43
4.1.2.3	Příprava 4-nitrofenyl 6-(methakryloylamino) hexanoátu (MA- ϵ Ahx-ONp)	43
4.1.2.4	Příprava <i>N</i> ¹ -(<i>terc</i> -butoxykarbonyl)- <i>N</i> ² -(6-(methakrylamido)hexanoyl)hydrazinu (MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc).....	44
4.1.2.5	Příprava (6-(methakryloylamino) hexanoyl)hydrazinu (MA- ϵ Ahx-NHNH ₂)	45
4.1.2.6	Příprava cholesteryl 6-(methakryloylamino) hexanoátu (MA- ϵ Ahx-cholesteryl).....	46
4.1.2.7	Ostatní monomery.....	47
4.1.3	Příprava kopolymerů na bázi HPMA obsahujících hydrazidové skupiny	48
4.1.3.1	Syntéza kopolymerů na bázi HPMA využívající monomer MA- ϵ Ahx-ONp.....	48
4.1.3.2	Syntéza kopolymerů na bázi HPMA využívající monomer MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc	49
4.1.3.3	Syntéza kopolymerů na bázi HPMA využívající monomer MA- ϵ Ahx-NHNH ₂	50
4.1.4	Příprava terpolymerů na bázi HPMA obsahujících hydrazidové skupiny a další záporně či kladně nabitě skupiny	50
4.1.4.1	Příprava terpolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH ₂ - <i>co</i> -MA-GFLG-OH)	50
4.1.4.2	Příprava terpolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH ₂ - <i>co</i> -MA-GG-OH)	51
4.1.4.3	Příprava terpolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH ₂ - <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-OH)	51
4.1.4.4	Příprava terpolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH ₂ - <i>co</i> -DMAEMA)	52
4.1.4.5	Příprava terpolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH ₂ - <i>co</i> -TMAEMA).....	52
4.1.5	Příprava terpolymerů na bázi HPMA obsahujících hydrazidové skupiny a hydrofobní substituenty.....	53
4.1.5.1	Příprava terpolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH ₂ - <i>co</i> -DDM)	53

4.1.5.2	Příprava terpolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH ₂ - <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH-oleoyl)	54
4.1.5.3	Příprava terpolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH ₂ - <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-cholesteryl)	55
4.1.6	Příprava roubovaných kopolymerů na bázi HPMA obsahujících hydrazidové skupiny	56
4.1.6.1	Příprava thiazolidin-2-thionu 4,4'-azobis(kyanovalerové kyseliny)	56
4.1.6.2	Příprava semitelechelického kopolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-OSu	57
4.1.6.3	Příprava semitelechelického kopolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-TT	58
4.1.6.4	Příprava kopolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA-GFLG-NHNH ₂)	58
4.1.6.5	Příprava terpolymeru poly(HPMA- <i>co</i> -MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc- <i>co</i> -MA-GFLG-NH-CH ₂ CH ₂ -NH ₂)	59
4.1.6.6	Příprava roubovaného kopolymeru - reakce OSu a -NHNH ₂ skupin	60
4.1.6.7	Příprava roubovaného kopolymeru - reakce TT a -NH ₂ skupin	61
4.1.7	Vazba DOX na polymerní prekurzory	62
4.2	Použití fyzikálně-chemické metody	63
4.2.1	UV-VIS spektroskopie	63
4.2.1.1	Stanovení obsahu 4-nitrofenoxy skupin	64
4.2.1.2	Stanovení obsahu thiazolin-2-thionových skupin	64
4.2.1.3	Stanovení obsahu hydrazidových skupin	64
4.2.1.4	Stanovení obsahu primárních aminoskupin	65
4.2.1.5	Stanovení obsahu DOX	65
4.2.2	Stanovení obsahu karboxylových skupin	65
4.2.3	Kapalinová chromatografie	65
4.2.3.1	Tenkovrstvá kapalinová chromatografie	65
4.2.3.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	65
4.2.3.3	Rozměrově vylučovací chromatografie	66
4.2.3.4	Stanovení molárních hmotností	66
4.2.4	Quasi-elastický rozptyl světla	67
4.2.5	Nukleární magnetická rezonance	67
4.2.5.1	Stanovení obsahu oleoylových skupin	67
4.2.5.2	Stanovení obsahu cholesterylových skupin	68
4.2.6	Plynová chromatografie	68
4.2.7	Měření rychlosti uvolňování DOX z polymerních konjugátů a stanovení obsahu zbytkového, nenávaného DOX v polymerních konjugátech	68
4.2.7.1	Metoda využívající kombinaci extrakce a HPLC	68
4.2.7.2	Metoda SEC	69
4.2.8	Stanovení kopolymerizačních parametrů	69
4.2.9	Stanovení kritické asociační koncentrace	70
4.3	Biochemické a biologické metody	70
4.3.1	Štěpení GFLG sekvence roubovaných kopolymerů kathepsinem B	70
4.3.2	Inhibice proliferace	71
4.3.3	<i>In vivo</i> experimenty protinádorové aktivity	72

5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	73
5.1	Příprava a studium vlastností konjugátů polymer – DOX	74
5.1.1	Optimalizace přípravy polymerních prekurzorů.....	75
5.1.2	Příprava polymerních prekurzorů a konjugátů s DOX	80
5.1.3	Uvolňování léčiva v <i>in vitro</i> podmínkách.....	81
5.1.4	Cytostatická aktivita	82
5.1.5	<i>In vivo</i> protinádorová aktivita.....	83
5.2	Příprava a studium vlastností konjugátů polymer – DOX obsahujících nabitě funkční skupiny.....	85
5.2.1	Příprava polymerních prekurzorů a konjugátů s DOX	85
5.2.2	Chování polymerních prekurzorů a konjugátů ve vodném prostředí	87
5.2.3	Uvolňování léčiva v <i>in vitro</i> podmínkách.....	88
5.2.4	Cytostatická aktivita	90
5.2.5	<i>In vivo</i> protinádorová aktivita.....	90
5.3	Příprava a studium vlastností polymer – DOX konjugátů obsahujících hydrofobní substituenty	94
5.3.1	Příprava polymerních prekurzorů a konjugátů s DOX	94
5.3.2	Chování polymerních prekurzorů a konjugátů ve vodném prostředí	96
5.3.3	Uvolňování léčiva v <i>in vitro</i> podmínkách.....	101
5.3.4	Cytostatická aktivita	102
5.3.5	<i>In vivo</i> protinádorová aktivita.....	103
5.4	Příprava a studium vlastností roubovaných konjugátů polymer – DOX.....	105
5.4.1	Roubované kopolymery využívající semitelechelické kopolymery nesoucí sukcinimidyllové skupiny	105
5.4.1.1	Příprava roubovaných kopolymerů.....	105
5.4.1.2	<i>In vitro</i> degradace roubovaného kopolymeru kathepsinem B	108
5.4.2	Roubované kopolymery využívající semitelechelické kopolymery nesoucí thiazolidin-2-thionové skupiny	109
5.4.2.1	Optimalizace přípravy roubovaných kopolymerů	109
5.4.2.2	Příprava polymerního prekurzoru a konjugátu s DOX.....	113
5.4.2.3	Cytostatická aktivita	115
5.4.2.4	<i>In vivo</i> protinádorová aktivita	115
6.	ZÁVĚR.....	118
7.	SEZNAM LITERATURY	121
	Seznam použitých zkratk a symbolů	131

1. Úvod

Vědecko – technická revoluce přinesla v mnohých ohledech zlepšení kvality života. Odvrácenou tvář rozvoje společnosti je mimo jiné i zvýšení výskytu tzv. civilizačních chorob. Kardiovaskulární choroby spolu s nádorovými onemocněními jsou hlavními příčinami úmrtí obyvatelstva.

Léčba nádorových onemocnění chemoterapeutiky, nízkomolekulárními látkami s kancerostatickými účinky, vede v řadě případů k vyléčení pacientů. Chemoterapie má ovšem i své stinné stránky. Většina kancerostatik se vyznačuje různými vedlejšími účinky, které mohou vést k poškození zdravých tkání či orgánů. U většiny z nich nelze ovlivnit biodistribuce v organismu, ani zajistit lokalizované působení léčiva v nádoru. Proti některým nádorovým onemocněním dokonce dosud nebyla objevena vhodná a dostatečně účinná léčiva.

Vývoj nových léčiv a lékových forem, které by umožnily překonat nedostatky současné léčby, proto patří mezi jednu z nejvíce studovaných oblastí výzkumu. Polymerní léčiva, umožňující cílený transport do nádorové tkáně a řízené uvolňování léčiv ve farmakologicky účinné formě, projevila v mnoha případech výraznou protinádorovou aktivitu. Od prvních systémů navržených na konci 70. let 20. století dospěl výzkum až k několika klinickým aplikacím v současnosti, přičemž řada dalších polymerních léčiv připravovaných na bázi rozpustných polymerních nosičů již postoupila do závěrečných fází klinického testování.

Cílem této disertační práce je přispět k vývoji polymerních nosičů léčiv, jejichž kombinace s kancerostatiky povede k cíleně působícím lékovým formám umožňujícím vysoce účinnou léčbu nádorových onemocnění. Práce je konkrétně věnována přípravě nových polymerních kancerostatik s pH-řízenou aktivací léčiva, určených pro pasivní transport do pevných nádorů. Polymerní léčiva jsou tvořena konjugáty kopolymerů na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu a kancerostatika doxorubicinu navázaného k polymernímu nosiči pH-senzitivní hydrazonovou vazbou, která umožňuje uvolnit léčivo v nádorových buňkách v důsledku poklesu pH.

2. Teoretická část

Vývoj systémů pro dopravu léčiv a jejich kontrolované uvolňování (*drug delivery and controlled release*) v živém organismu prožívá již řadu let nebývalý rozkvět. Existuje celá řada přístupů k řešení problematiky i řada aplikací, pro které jsou systémy určeny. Získané vědecké poznatky z oblastí biologie a medicíny umožňují v současné době připravovat systémy „šité na míru“ (*tailoring*), určené pro léčbu konkrétního onemocnění. Tato kapitola by měla být přehledem současného stavu dosaženého při výzkumu a vývoji léčiv a lékových forem určených pro léčbu nádorových onemocnění. Nejprve budou stručně popsány principy klasické chemoterapie a bude poukázáno na důvody vedoucí ke změně paradigmatu v léčbě nádorových onemocnění¹, k revoluční změně ve struktuře používaných léčiv. Pak budou nastíněny hlavní směry, kterými se výzkum nových forem léčiv ubírá. Značný prostor bude věnován vývoji lékových forem využívajících vodorozpustných polymerních nosičů léčiv a micelárních nosičů, případně nosičů od nich odvozených. Pozornost bude zaměřena také na způsoby uvolňování léčiv z nosičových systémů a způsoby cílení léčiv do nádorových buněk. Důraz bude kladen především na systémy využívající pH-senzitivní hydrolyticky degradovatelné spojky mezi léčivem a nosičem a na systémy pro „pasivní“ směřování.

2.1 Systémy pro léčbu nádorových onemocnění

2.1.1 Chemoterapie nízkomolekulárními léčivy

Současná léčba nádorových onemocnění se skládá z kombinace chirurgických, chemoterapeutických a radiačních metod. Chirurgicky mohou být odstraněny pouze nádory, které jsou lokalizovány. Obvykle však nelze odstranit všechny nádorové buňky, proto po operativním zákroku zpravidla terapie pokračuje podáváním chemoterapeutik (kancerostatik) nebo ozařováním. Obě metody mají řadu nedostatků a nežádoucích vedlejších účinků. Věnujme se nadále již jen chemoterapii.

Principem chemoterapie je ovlivnění růstu a metabolismu nádorových buněk chemickými sloučeninami, cytostatiky. Nízkomolekulární chemoterapeutika zažila svůj rozkvět v 50. a 60. letech 20. století. Tehdy se věřilo, že budou schopna vyléčit vše. Záhy se ukázaly limity tohoto způsobu léčby. Jmenujme některé z nich: Běžně užívaná chemoterapeutika jsou obecně nízkomolekulární látky, krví volně distribuované do celého

organismu, kde mohou v důsledku svých cytotoxických účinků poškodit zdravé tkáně. Cytostatika jsou buněčné jedy, které působí, vzhledem k nepatrným odlišnostem mezi normálními a nádorovými buňkami, toxicky nejen na buňky nádorové, ale i na buňky zdravých tkání. Nízkomolekulární léčivo je velmi rychle odstraněno z organismu glomerulární filtrací v ledvinách (jedná se řádově o minuty až desítky minut). Nechráněné volné léčivo může také ještě před vyloučením z organismu projít biotransformací nebo se ukládat v některých tkáních (například játra, ledviny). V důsledku všech těchto vlivů se jen malá část léčiva akumuluje v nádorové tkáni. Pokles koncentrace účinné látky v léčeném místě proto vyžaduje časté opakování podání cytostatik, nebo použití vyšších koncentrací, což ovšem vede i ke zvýšení vedlejších toxických účinků. K dalším častým nevýhodám klasické chemoterapie patří i nízká rozpustnost hydrofobních léčiv ve fyziologickém prostředí.

2.1.2 Idea „kouzelné střely“

V roce 1906 P. Ehrlich formuloval požadavky kladené na ideální léčivo, které pojmenoval „kouzelnou střelou“ (*magic bullet*), zacílenou přímo do nemocné tkáně². Léčivo by mělo být při podání neaktivní, cíleně by se mělo ukládat v místě požadovaného účinku a pouze tam by mělo docházet k uvolňování léčiva v aktivní formě po dobu potřebnou k dosažení maximální efektivity. V předchozí kapitole jsme poukázali na to, že běžně používaná nízkomolekulární cytostatika zdaleka nedosahují těchto požadavků. Možným řešením je však použití vysokomolekulárních systémů jako nosičů léčiv. Jejich výhodou je výrazné prodloužení doby cirkulace na nich navázaného léčiva v krevním řečišti a naopak pomalé vylučování léčiva z organismu způsobené sníženou rychlostí glomerulární filtrace vysokomolekulárních látek ledvinami. Mezi další výhody takových nosičových systémů patří i snížení přímé toxicity samotného léčiva (nekovalentně či kovalentně vázaného k nosiči), zlepšení jeho rozpustnosti, možnost snížení množství podávaného léčiva, ochránění léčiva před biotransformací či degradací a případně i zajištění dopravy specificky do poškozených částí organismu. Výzkumem takovýchto léčiv, nazývaných souhrnně systémy pro dopravu léčiv (*drug delivery*) nebo systémy pro kontrolované uvolňování (*controlled release*), se zabývá řada vědeckých pracovišť, a to nejen na poli výzkumu léčby nádorových onemocnění.

2.1.3 Přehled systémů používaných jako nosiče léčiv

2.1.3.1 Nanočástice a liposomy

V posledních letech vzrůstá zájem o různé nanotechnologie. Protože rozměry vysokomolekulárních systémů pro dopravu léčiv se pohybují v rozmezí pěti až několika set nanometrů, mohou být poznatky nově vyvíjených nanotechnologií využitelné i pro vývoj těchto systémů. Mezi nejvíce studované nanosystémy použitelné jako nosiče léčiv patří nanočástice a liposomy. Nanočástice jsou polymerní koloidní částice se submikronovými rozměry, na něž je léčivo vázáno převážně fyzikálními interakcemi³. Polymerní matrice bývá často tvořena biodegradovatelnými polymery, např. kopolymery poly(D,L-laktid-co-glykolid). Liposomy jsou sférické nadmolekulární struktury vzniklé uspořádáním amfifilních strukturních jednotek nerozpustných polárních lipidů (např. fosfolipidů) do struktur podobných strukturám buněčných membrán⁴. Léčivo je ve většině případů vázáno v dutině liposomu ve formě vodného roztoku, pokud je hydrofilní a ve vodě rozpustné, nebo ve slupce tvořené lipidovou dvojvrstvou, pokud je hydrofobní⁵. Velkou výhodou nanočásticových a liposomálních systémů je poměrně jednoduchá příprava, jednotlivé komponenty jsou také často komerčně dostupné. Z tohoto důvodu se jimi zabývá řada výzkumných pracovišť. Na druhou stranu nanočástice i liposomy jsou velmi rychle pohlcovány buňkami retikuloendoteliálního systému (RES) a poměrně výrazně deponovány v játrech (80 – 90 %), ledvinách (5 - 8 %) a kostní dřeni (1 – 2 %)⁵. V další generaci těchto systémů je zásadní problém vychytávání částic buňkami RES minimalizován povrchovou modifikací hydrofilními polymery, zejména poly(oxyethylen)em, známým i pod názvem poly(ethylenglykol) (PEG)^{6,7}. V nedávné době bylo na trh (po úspěšném projití všemi fázemi klinických zkoušek) uvedeno první liposomální léčivo Doxil[®]/Caelyx[®] – liposom povrchově modifikovaný PEG a obsahující cytostatikum doxorubicin (DOX). Toto liposomální léčivo je určeno pro léčbu nádorů vaječníku (<http://www.doxil.com>).

Při použití obou výše uvedených systémů jako nosičů cytostatik je možné předpokládat, že zvýšení protinádorového účinku bude dosaženo nejen prodloužením cirkulace a snížením toxicity lékové formy, ale především jejich přednostním ukládáním v pevných nádorech v důsledku tzv. EPR efektu (viz kapitoly 2.2.3 a 2.5.2).

2.1.3.2 Vodorozpustné polymerní nosiče

Jiný přístup k získání „kouzelné střely“ představuje příprava polymerních konjugátů léčiv, ve kterých je léčivo vázáno kovalentně k vodorozpustnému polymernímu nosiči^{8,9}. Tyto systémy by měly umožnit, kromě pasivního směřování do pevných nádorů, i aktivní směřování k předem vybraným tkáním či typům buněk. Podrobně se vodorozpustným nosičům léčiv budeme detailněji věnovat v kapitole 2.2.

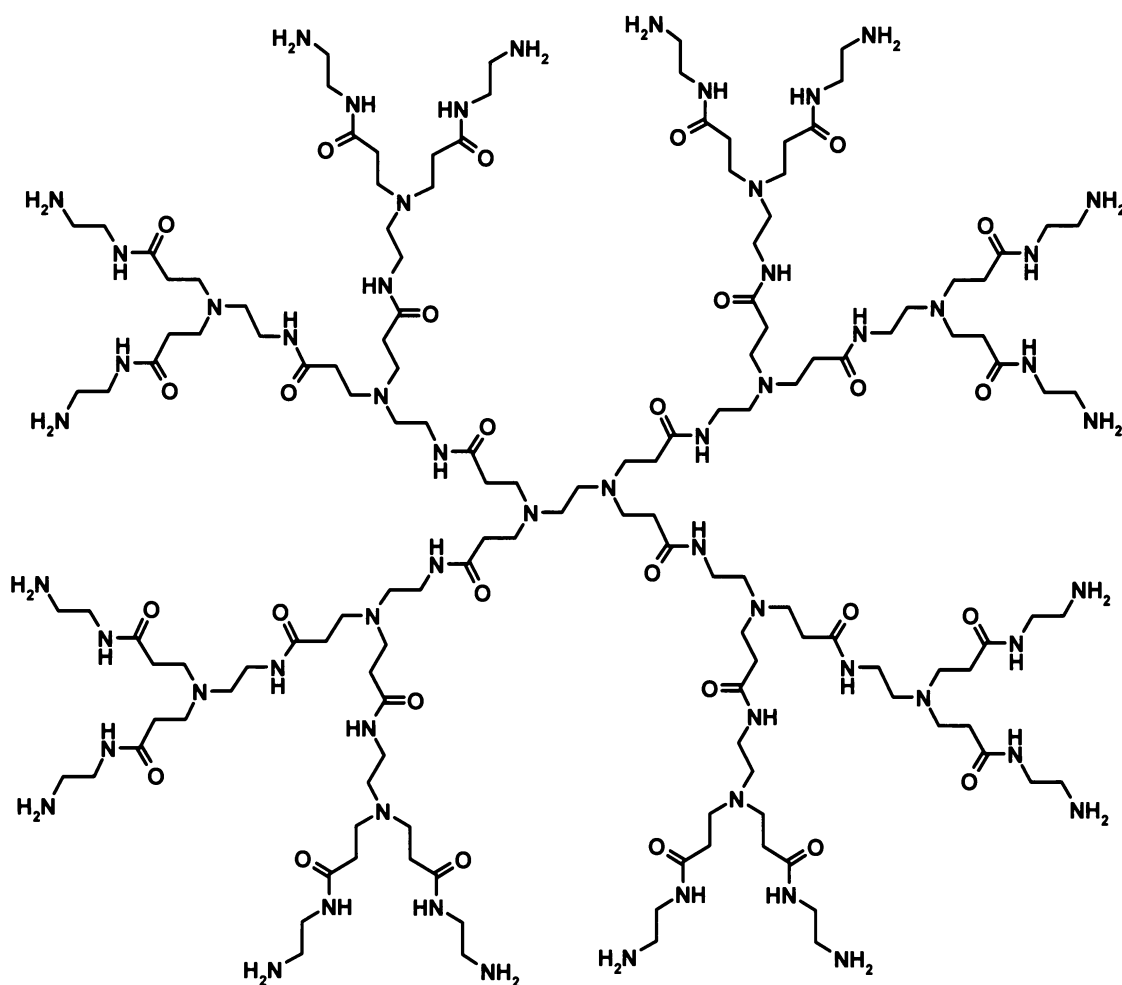
2.1.3.3 Micelární systémy

Na pomezí mezi nanočásticovými systémy a rozpustnými polymerními nosiči je i významná oblast micelárních nosičových systémů^{10,11}. Polymerní micely jsou sférické nadmolekulární struktury utvořené uspořádáním amfifilních blokových nebo roubovaných kopolymerů¹² do micelárních struktur tvořených hydrofobním polymerním jádrem obklopeným vysoce hydrofilní polymerní vrchní vrstvou. Léčivo je buď nekovalentně vázáno v hydrofobním jádru micely, nebo kovalentně navázáno k polymernímu řetězci. V druhém případě může být připojeno jak v hydrofobní části micely, tak i v hydrofilní části. Micelárními systémy se budeme podrobněji zabývat v kapitole 2.3.

2.1.3.4 Dendrimery

Zvláštním typem rozpustných polymerních systémů jsou dendrimery^{13,14}. Jde o vysoce větvené vysokomolekulární systémy s přísně definovanou architekturou a úzkou distribucí molekulárních hmotností. Dendrimery jsou trojrozměrné makromolekuly, jejichž struktura připomíná strom (název je proto odvozen z řeckého *dendron* – strom). Stromovitá struktura je založena na úplném propojení jednoduchých trojfunkčních monomerních jednotek. Jádro („kořen“) dendrimerů je tvořeno vícefunkční molekulou. K ní jsou připojeny „stromy“ – dendrony, které jsou tvořeny rozvětvenou strukturou monomerních jednotek. Konce větví, které mohou nést různé funkční skupiny, pak tvoří vrchní slupku dendrimeru. Dendrimery jsou téměř monodisperzní s dobře definovanou velikostí a molární hmotností. Velikost dendrimerů a počet funkčních skupin na povrchu lze řídit počtem navázaných větvících jednotek, počtem generací (generace 0 označuje jádro). Mezi nejznámější zástupce, které jsou zároveň komerčně dostupné, patří polyamidoaminové (PAMAM) (schéma struktury je znázorněno na Obrázku 2-1) a polypropyleniminové (PPI) dendrimery.

Léčivo může být vázáno nekovalentními interakcemi jako jsou hydrofobní nebo iontové interakce, či vodíkové můstky¹⁵. Léčivo se může vyskytovat v různých částech dendrimera, a to v závislosti na chemické struktuře léčiva i částí dendrimera. Obsahují-li koncové strukturální jednotky dendrimera vhodné funkční skupiny, je jich možno využít ke kovalentnímu navázání jak léčiva, tak i směřující jednotky pro aktivní cílení do nemocné tkáně¹³.



Obrázek 2-1 Struktura PAMAM dendrimera generace 2

2.1.3.5 Genová terapie

Zcela jiný přístup k léčbě některých nádorových onemocnění představuje genová terapie. Cílem zde není smrt buňky v důsledku toxicity léčiva, ale vnesení genů do buněčné DNA. Úkol je proto složitější, nestačí léčivo – v tomto případě obvykle plasmidová DNA – dopravit do buňky, ale je nutné je ochránit před degradací lysosomálními enzymy a dopravit až do jádra buněk. Vnesené geny mohou působit různým způsobem, uveďme tři hlavní přístupy: 1. Zvýšení imunogenicity nádorových buněk. Ty se tak stanou „viditelné“ pro imunitní systém organismu, který je pak může sám odstranit.

2. Vnesení „sebevražedného“ genu. Gen vede k produkci enzymu, který katalyzuje biosyntézu cytotoxické látky vedoucí ke zničení nádorové buňky. 3. Náhrada poškozeného genu. V důsledku vnesení nádorově-supresivního genu bude v buňce probíhat apoptóza (programovaná smrt buňky), která ve zmutovaných nádorových buňkách zpravidla neprobíhá¹⁶.

Příkladem systému založeného na syntetických polymerech a potenciálně vhodného pro transport genu a genovou terapii jsou tzv. polyplexy, polyelektrolytové komplexy polykationtů s DNA (záporný náboj DNA je dán fosfátovými skupinami), nebo lipoplexy, liposomální nosiče DNA¹⁷. Ačkoliv byla navržena již řada struktur polyplexů i lipoplexů, praktickému využití obou systémů pro genovou terapii stojí zatím v cestě mnoho překážek.

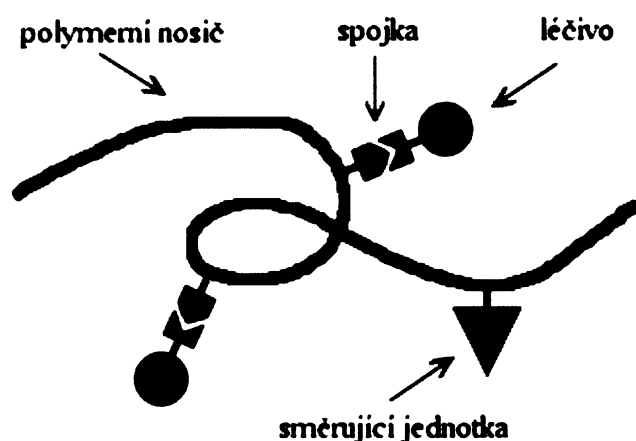
2.2 Vodorozpustné polymerní nosiče léčiv

2.2.1 Model polymerního nosiče léčiv

Rozpustné polymerní nosiče léčiv patří k nejvýznamnějším novým systémům umožňujícím dopravu a uvolňování léčiv. S myšlenkou využití vodorozpustných polymerů jako nosičů léčiv přišel první H. Ringsdorf v roce 1975¹⁸. Navržený farmakologicky aktivní polymer se skládal z hlavního polymerního řetězce modifikovaného různými funkčními skupinami. Úkolem vysoce hydrofilních skupin vnesených do řetězce bylo hydrofilizovat celý polymerní nosič, a tím zvýšit jeho rozpustnost ve vodném prostředí. Zavedené reaktivní skupiny měly sloužit k vazbě molekul nízkomolekulárního léčiva, nebo obecně biologicky aktivní látky. Mezi léčivo a polymer byla umístěna spojka (*spacer*), která mohla být biodegradovatelná a měla být odpovědná za řízené uvolňování léčiva z nosiče. Část označená jako směřující struktura by pak měla zajistit dopravu celého nosiče i s léčivem do místa určení.

Ringsdorfův návrh krátce na to rozvinul J. Kopeček¹⁹. Na jeho pracovišti v Ústavu makromolekulární chemie ČSAV měli tehdy bohaté zkušenosti se syntézou hydrofilních polymerů. Zatímco H. Ringsdorf měl problém získat dostatečně vodorozpustný polymerní nosič (polymerní řetězec proto musel obsahovat hydrofilní část), J. Kopeček použil samotný hydrofilní polymer jako nosič. Jeho základní model se tedy skládal ze čtyř hlavních komponent: polymerního nosiče, léčiva navázaného k nosiči kovalentní vazbou, biodegradovatelné spojky a směřující jednotky (Obrázek 2-2). Kopeček se spolupracovníky navrhli použít jako biodegradovatelnou spojku mezi nosičem a léčivem

oligopeptidy připravené „na míru“ jako substráty lysosomálních enzymů. Změnou struktury oligopeptidu (kvality substrátu) pak bylo možné řídit rychlost uvolňování léčiva z nosiče. Jako polymerní nosič byly použity kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu (HPMA) a pro kinetické studie byl použit 4-nitroanilin jako model léčiva.



Obrázek 2-2 Model polymerního léčiva podle J. Kopečka

V současnosti, v době specializovaných konferencí a vědeckých časopisů, zaměřených pouze na oblast polymerních léčiv, kdy u řady polymerních léčiv probíhají klinické testy nebo první z nich jsou dokonce již v prodeji, jsou jen těžko představitelné počáteční problémy s přijetím ideje použití polymerních léčiv v humánní medicíně. Bylo třeba překonat několik předsudků. Panovala obava z použití syntetických polymerů pro intravenózní aplikace. Nepříjemná se dále zdála možnost specifické enzymolýzy spojky s odůvodněním nepřístupnosti substrátu pro enzym v důsledku stínění polymerem. Skupina J. Kopečka věnovala proto mnoho úsilí na obhájení oprávněnosti použití polymerních nosičů¹⁹⁻²¹ při přípravě léčiv a lékových forem.

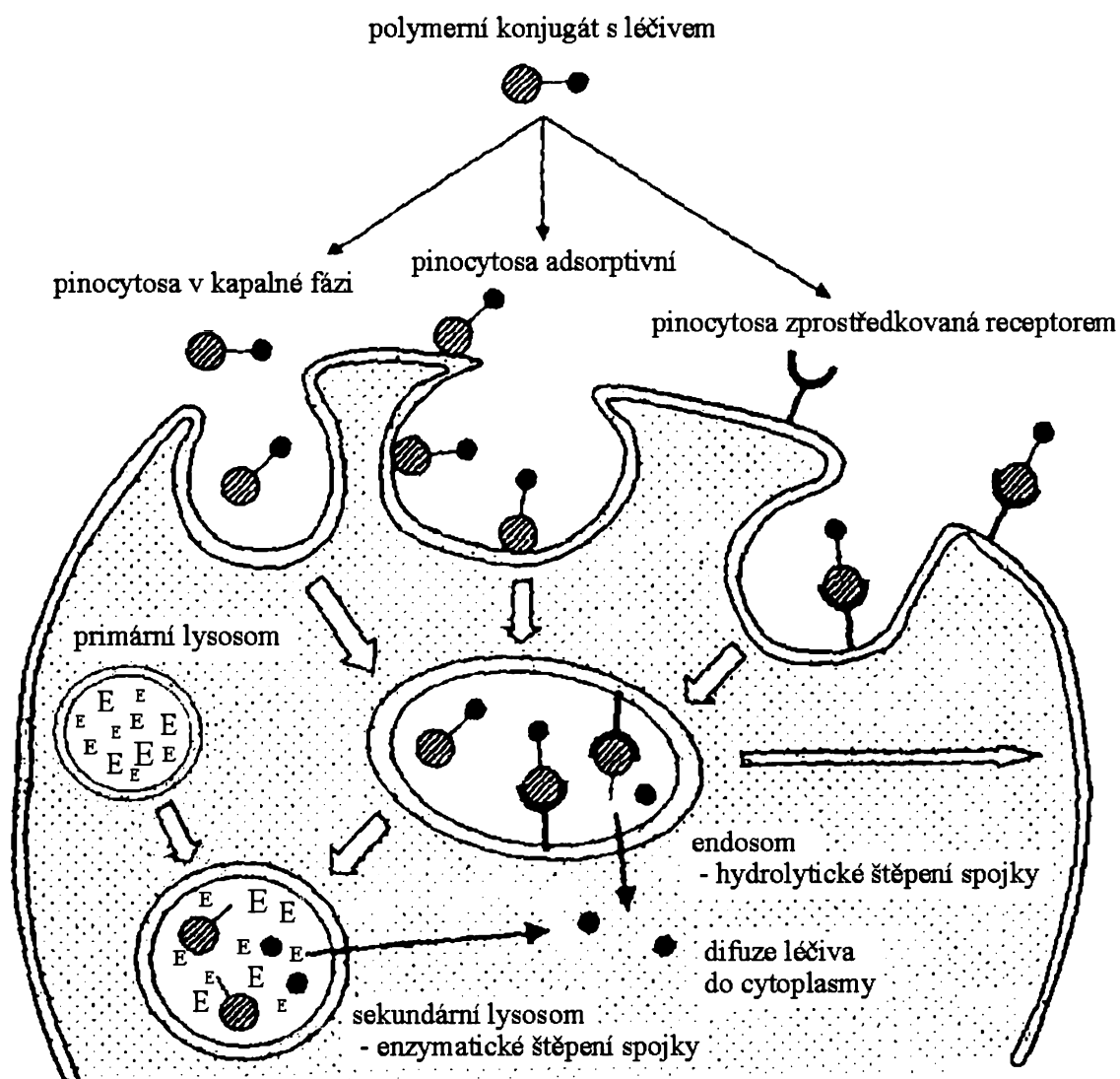
2.2.2 Vlastnosti polymerních nosičů léčiv

Polymerní nosiče léčiv musí splňovat řadu podmínek, aby mohly být použity v humánní medicíně^{5, 21, 22}. V ideálním případě musí být polymerní nosič:

- netoxický a neantigenní (požadavek se týká i jeho potenciálních metabolitů)
- biodegradovatelný, nebo nesmí projevit výraznou akumulaci v těle (molární hmotnost musí být pod limitem renální filtrace)
- vodorozpustný
- biokompatibilní a neimunogenní
- schopný vázat léčivo a směrující jednotku
- cenově dostupný a relativně snadno připravitelný
- a dále nesmí vykazovat příliš širokou distribuci molárních hmotností.

2.2.3 Principy dopravy a kontrolovaného uvolňování léčiv

Zatímco nízkomolekulární látky pronikají do živočišných buněk rychle difuzí buněčnou membránou, k pronikání vysokomolekulárních látek dochází pomalejším procesem – endocytosou, která se v případě rozpustných látek nazývá pinocytosa (Obrázek 2–3). Mechanismus průniku membránou může být různý, je známa pinocytosa v kapalně fázi, adsorptivní pinocytosa a pinocytosa zprostředkovaná receptorem. U všech procesů dochází nejdříve k vchlípení části plasmatické membrány s následným vytvořením endosomu uvnitř buňky.



Obrázek 2-3 Schéma znázorňující průnik polymerního léčiva do buňky a způsoby uvolňování léčiva (písmeny E jsou označeny lysosomální enzymy)²³

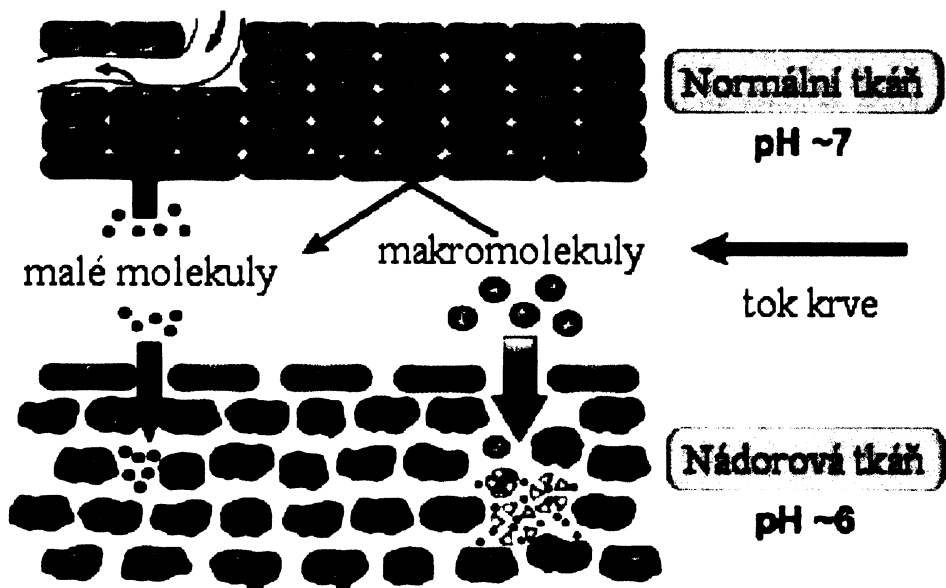
Pokud je léčivo k polymernímu nosiči připojeno vhodnou pH-senzitivní hydrolyzovatelnou vazbou, může být uvolňováno kyselé katalyzovanou hydrolýzou v důsledku poklesu pH již v endosomu (viz kapitola 2.4.2). Spojením endosomu

s primárním lysosomem, který obsahuje lysosomální enzymy schopné degradovat většinu biologických makromolekul, vznikne sekundární lysosom; v něm se bude léčivo uvolňovat za předpokladu, že spojka byla připravena jako substrát pro některý z lysosomálních enzymů (viz kapitola 2.4.1)^{23,24}.

Aby bylo dosaženo co největšího terapeutického účinku, jsou při přípravě polymerních nosičů kancerostatik využívány obecně známé rozdíly mezi nádorovými a zdravými buňkami. Nádorové buňky mají často nižší pH uvnitř buňky i v jejich okolí, v extracelulárním prostoru. Dále např. exprimují na svém povrchu specifické receptory (lišící se navíc v různých fázích vývoje buněk), mají propustnější buněčnou membránu a vyšší rychlost pinocytosy. Předpokládá se, že v jejím důsledku mohou polymerní léčiva do nádorové buňky pronikat rychleji než do buňky zdravé.

Specifické receptory vyskytující se v membránách nádorových buněk mohou být využity pro směrování léčiv k povrchům těchto buněk. Polymerní léčiva v tom případě musí nést vhodné směřující jednotky, které tyto receptory rozpoznají. Po interakci těchto jednotek s receptorem proniká konjugát do buňky jedním z mechanismů pinocytosy²⁴. V tomto případě mluvíme o buněčně specifickém směrování. Podrobněji bude tato problematika pojednána v kapitole 2.5.1.

Jiným způsobem směrování je tzv. pasivní směrování, které je zaměřeno na celý orgán, v případě pevného nádoru pak na celý nádor. Obecně makromolekuly nemohou, narušiv od nízkomolekulárních látek, pronikat snadno přes stěny cévních kapilár zdravé tkáně. Nádorové buňky ovšem rychle proliferují, a proto je jejich metabolismus uzpůsoben pro zvýšený přísun živin. Pevné nádory produkují angiogenní a kapiláry rozšiřující faktory, které působí na zvětšení průchodnosti vaskulárního systému nádoru, a tím umožňují zvýšený průnik makromolekul z krevního řečiště (viz Obrázek 2-4). Navíc je nádorový lymfatický systém jen málo rozvinutý, případně chybějící. Proto nejsou makromolekuly z nádorové tkáně odváděny, ale zůstávají v ní zachyceny. Tento efekt byl poprvé popsán H. Maedou a nazván „Efekt zvýšené propustnosti a zadržování“ („*Enhanced permeability and retention effect*“), EPR efekt)²⁵. Polymerní léčiva o vyšší molární hmotnosti jsou díky tomuto efektu přednostně zachycována v tkáni pevných nádorů. Dále bude této problematice věnována kapitola 2.5.2.



Obrázek 2-4 Schéma znázorňující rozdíly mezi zdravou a nádorovou tkání²⁶

2.2.4 Přírodní polymerní nosiče

Jako vodorozpustné nosiče léčiv byly nejdříve studovány přírodní polymerní nosiče typu polysacharidů (dextrany, chitin) a proteinů (sérový albumin, transferin, glykoproteiny)^{23,24,27}. Jejich předností je snadná dostupnost, biokompatibilita a biodegradovatelnost. Na druhou stranu však bývají často imunogenní, zvláště po modifikaci cizorodými látkami, např. cytostatiky. Další nevýhodou je časté výrazné snížení rozpustnosti těchto nosičů po konjugaci s léčivem a často i rozdíly v kvalitě jednotlivých šarží produktů dodávaných jednotlivými výrobci.

Mezi glykoproteiny patří i protilátky, které se používají jako směřující jednotky. V tom případě pak slouží zároveň jako nosiče léčiva i jako směřující jednotky. Příkladem dovedení výzkumu až ke komerčním aplikacím je konjugát monoklonální protilátky antiCD33 s cytostatikem calicheamicinem, nazvaným Mylotarg[®] (Gemtuzumab ozogamicin)²⁸. Konjugát je určen pro léčbu leukémie (<http://www.pharmacist.com/pdf/mylotarg.pdf>).

2.2.5 Syntetické biodegradovatelné polymerní nosiče

Synteticky lze připravit celou řadu polymerních nosičů s požadovanou strukturou, nesoucích vhodné funkční skupiny pro připojení léčiva či směřující jednotky. Tyto polymery můžeme rozdělit podle biodegradovatelnosti. U biodegradovatelných nosičů

odpadá problém s jejich odstraněním z organismu poté, co splnily svůj úkol. Jsou totiž degradovány na menší fragmenty, které organismus buď dále metabolizuje, nebo vyloučí močí obdobně jako nízkomolekulární látky. Patří mezi ně zejména poly(α -aminokyseliny): poly(L-lysin), poly(L-asparagová kyselina), poly(L-glutamová kyselina) a jejich deriváty^{27,29,30}. Lze je připravit aniontovou polymerizací otevíráním kruhů *N*-karboxyanhydridů. V poslední fázi klinických zkoušek je v současnosti konjugát poly(L-glutamové kyseliny) s cytostatikem paclitaxel XyotaxTM (<http://www.cticseattle.com>). Paclitaxel je zde navázaný esterovou vazbou k polymernímu nosiči degradovatelnému lysosomálními proteázami³¹.

Na tomto místě je nutné zmínit obecnou nevýhodu nabitých polymerů, u nichž může docházet k nežádoucím interakcím v organismu a jejich akumulaci v některých orgánech (např. játra, ledviny). Tím je *de facto* omezeno jejich použití. V několika málo případech to však může být výhodou. Pokud je nádorovým onemocněním zasažena tkáň, ve které dochází k akumulaci polymerního nosiče, lze takový nosič využít pro směrování do této tkáně. XyotaxTM je proto např. testován pro léčbu nádorů jater a vaječníků.

2.2.6 Syntetické nedegradovatelné polymerní nosiče

Hlavní řetězce většiny používaných synteticky připravených polymerních nosičů nejsou biodegradovatelné. Aby bylo zajištěno vyloučení polymerních nosičů močí a zamezeno akumulaci v organismu, nesmí jejich molární hmotnost přesáhnout tzv. „renální (ledvinový) práh“ (např. pro nosiče vinylového typu se uvádí přibližně 50 000 g.mol⁻¹). V opačném případě by polymerní nosiče mohly být odstraňovány jen velmi pomalým procesem přes játra a žluč.

2.2.6.1 PEG nosiče

Značná pozornost je v současné době věnována vývoji polymerních nosičů, jejichž součástí jsou PEG řetězce. Splňují požadavky kladené na nosiče léčiv, navíc jsou dobře rozpustné v polárních i nepolárních rozpouštědlech⁵. Výhodou PEG je možnost přípravy polymerů o definované molární hmotnosti a navíc s nízkým indexem molekulární neuniformity, neboť jsou připravovány živou aniontovou polymerizací. PEG je komerčně dostupný ve velkém rozmezí molárních hmotností. Pro biologické aplikace je nejčastěji používán v rozmezí \overline{M}_w od 1 000 do 20 000 g.mol⁻¹³². Nevýhodou PEG řetězců je

omezený počet funkčních skupin, vhodných pro vazbu léčiva. Lze totiž použít pouze konce lineárních řetězců.

Konjugáty s biologicky aktivními látkami mohou být připravovány ze semitelechelického α -methyl- ω -hydroxypoly(oxyethylenu) s jednou koncovou hydroxylovou skupinou. Tyto monofunkční PEG jsou vhodné zejména pro povrchovou modifikaci proteinů^{33,34}. K výhodám této modifikace patří ochrana proteinu před biodegradací, prodloužení jeho cirkulace v krevním řečišti, omezení renální filtrace a úprava biodistribuce³⁵. Prvním (v roce 1994) proteinem chráněným PEG, který byl uvedený do klinické praxe, se stala asparaginasa (Oncaspar) (<http://www.enzon.com>). Enzym modifikovaný řetězcí PEG o \overline{M}_w 5 000 g.mol⁻¹ byl použit pro léčbu akutní lymfoblastické leukémie³⁶. V klinických testech, případně již na trhu, jsou i další podobné konjugáty³⁷.

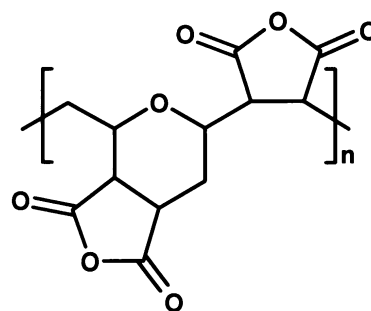
První generace PEG nosičů cytostatik vycházela také z monofunkčního PEG, koncová hydroxylová skupina byla po aktivaci použita pro konjugaci s léčivem^{38,39}. Nevýhodou těchto konjugátů je nízký obsah léčiva. Obsah léčiva je však možné zvýšit, pokud se použije bifunkčního PEG s obecnou strukturou HO-(CH₂CH₂O)_n-H. Byla navržena řada konjugátů obsahujících léčivo na obou koncích PEG řetězce⁴⁰. Konjugát PEG-L-alanin-camptothecin (PROTHECANTM) byl zařazen do klinických zkoušek.

Zvýšení obsahu léčiva a zároveň zvýšení \overline{M}_w polymerního nosiče umožnila příprava poly(PEG-*alt*-L-lysinu) tvořeného alternujícími jednotkami PEG a L-lysinu, jehož obě aminoskupiny byly součástí hlavního řetězce. Na volné karboxylové skupiny lysinů pak byl amidovou vazbou navázán DOX⁴¹. Zajímavými systémy jsou i nosiče na bázi biodegradovatelných blokových polymerů PEG, kterým se budeme blíže věnovat v kapitole 2.5.2.3.

2.2.6.2 Nosiče vinylového typu

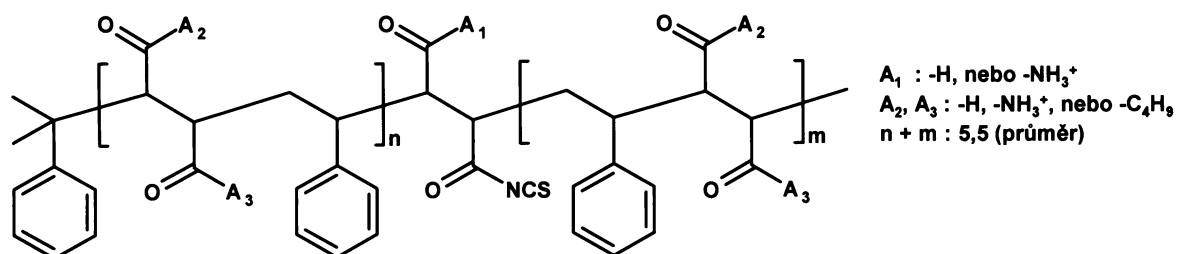
Velkou skupinu syntetických nosičů s nedegradovatelnými hlavními řetězci tvoří různé vodorozpuštěné polymery vinylového typu – např. různé deriváty kyseliny akrylové a methakrylové. Připravují se radikálovými rozpouštěcími či srážecími polymerizacemi. Relativně velký výběr monomerů a komonomerů pro radikálovou kopolymerizaci umožňuje přípravu polymerních nosičů obsahujících různé funkční skupiny, vhodné pro vazbu léčiva nebo směřující jednotky²⁷.

Mezi nejstarší studované kopolymery patří kromě kopolymerů na bázi HPMA i poly(divinylether-*co*-maleinanhydrid) (DIVEMA) (Obrázek 2-5). Již samotný polymer projevovat mimo jiné protinádorové účinky^{5,24}. Anhydridové skupiny umožňují vazbu léčiva k nosiči. Byl popsán např. konjugát s methotrexátem⁴².



Obrázek 2-5 Schéma struktury DIVEMA

Významným nosičem je poly(styren-*alt*-mono-*n*-butylmaleinát), připravený z kopolymeru poly(styren-*alt*-maleinanhydrid) (SMA) (Obrázek 2-6)⁴³. Anhydridová skupina byla využita pro reakci s ϵ -aminoskupinou lysinu nebo N-koncovou aminoskupinou alaninu antibiotika neocarzinostatinu. Konjugát, nazvaný SMANCS, tedy obsahuje dva polymerní řetězce navázané na jednu molekulu peptidu. SMANCS byl prvním komerčně dostupným protinádorovým léčivem (Zinostatin stimalamer[®]) využívajícím vodorozpustný syntetický polymerní nosič. V Japonsku je od roku 1993 používán pro léčbu primárních jaterních nádorů. Účinnost konjugátu byla zvýšena aplikováním v kombinaci s lipidovým kontrastním médiem lipiodol. Došlo k prodloužení doby cirkulace v krvi, umožnění vizualizace nádoru a jistému zvýšení akumulace v nádoru^{37,44}.



Obrázek 2-6 Schéma struktury SMA⁴⁴

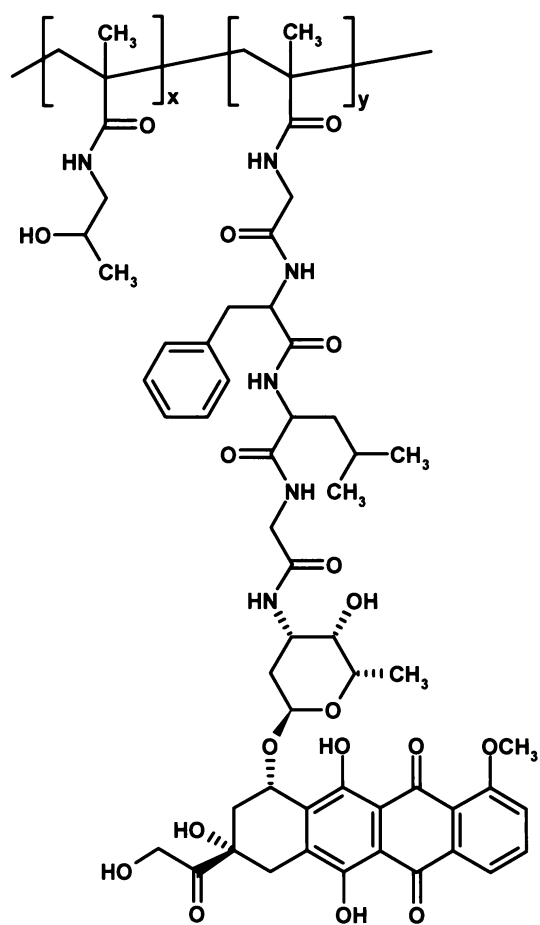
Mezi další studované biologicky nedegradovatelné syntetické vodorozpustné polymerní nosiče patřily např. poly(1-vinyl-2-pyrrolidon)⁴⁵, poly(1-vinyl-2-pyrrolidon-*co*-maleinanhydrid)^{46,47} nebo poly[(*N*-akryloyl)morfolin]⁴⁸. Avšak patrně nejvýznamnější jsou kopolymery na bázi HPMA, kterým se budeme věnovat v následující kapitole.

2.2.6.3 Kopolymery na bázi HPMA

Kopolymery na bázi HPMA byly již zmíněny při popisu modelu polymerního nosiče (kapitola 2.2.1), věnujme se jim nyní detailněji. Samotný homopolymer poly(HPMA) je

biokompatibilní neimunogenní vodorozpustný polymer. Homopolymer však nenesl vhodné funkční skupiny pro přímou vazbu léčiv, proto se do jeho struktury zabudovávají reaktivní skupiny kopolymerizací HPMA s vhodnými komonomery. Nejvýznamnější polymerní prekurzory s reaktivními skupinami byly připraveny kopolymerizací HPMA s aktivními estery methakrylovaných oligopeptidů a aminokyselin. Kopolymerizace byly prováděny srážecími nebo roztokovými radikálovými polymerizacemi s použitím iniciátoru 2,2-azobis(isobutyronitril)u (ABIN)^{19-21,49}.

První konjugáty připravené na pracovišti J. Kopečka obsahovaly pouze modelové léčivo 4-nitroanilin. Od druhé poloviny 80. let však již byly syntetizovány konjugáty s cytostatiky DOX a daunomycinem. V těchto konjugátech bylo léčivo připojeno k polymeru amidovou vazbou prostřednictvím enzymaticky degradovatelné oligopeptidové spojky⁵⁰⁻⁵². Nejúčinnější v *in vivo* experimentech se ukázaly konjugáty obsahující tetrapeptidové spojky GFLG⁵³. Konjugát s DOX nazvaný PK1 (název byl vytvořen z prvních písmen domovských měst výzkumných týmů spolupracujících na jeho vývoji – Praha, Keele) byl vybrán do klinických studií (schéma struktury je znázorněno na Obrázku 2-7). Konjugát PK1 prošel druhou fází klinického testování ve Velké Británii^{37,54}.



Obrázek 2-7 Schéma struktury PK1

V následujících letech byly studovány podobné konjugáty jako PK1, které nesly jiná léčiva. R. Duncan uvádí příklady 17 různých nízkomolekulárních protinádorových léčiv a dále pěti dalších léčiv určených pro léčbu jiných onemocnění⁵⁵. Kromě PK1 byly do klinického testování zařazeny i konjugáty obsahující paclitaxel⁵⁶, camptothecin⁵⁷, či derivát platiny⁵⁸. Paclitaxel byl navázán esterovou vazbou ke spojce GFLG. Camptothecin byl navázán také esterovou vazbou přes spojku tvořenou pouze glycinem.

Jako ligand pro vazbu platiny ve formě komplexu byl použit derivát malonové kyseliny, připojené k biodegradovatelné spojce GFLG.

Všechny dosud popsané konjugáty neobsahovaly aktivní směřující jednotky, byla však připravena i řada směřovaných konjugátů. Zatím jediným zástupcem specificky směřovaných konjugátů v klinických testech byl konjugát PK2^{59,60}. Jednalo se o polymer se strukturou podobnou PK1, který obsahoval navíc monosacharid galaktosamin, navázaný přes stejnou tetrapeptidovou spojku. PK2 byl určen pro léčbu jaterních nádorů, asialoglykoproteinové receptory hepatocytů totiž projevují afinitu vůči galaktose. Klinicky byl dále testován (nejednalo se však o řádné klinické studie jako v předchozích případech, do této předběžné studie bylo zařazeno pouze několik pacientek v terminálním stadiu onemocnění karcinomem prsu) konjugát s protilátkou - lidským imunoglobulinem⁶¹⁻⁶³. Ačkoliv se konjugát ukázal velmi účinným, jeho výroba ve větším množství je náročná jak synteticky, tak i finančně.

2.3 Micelární nosiče léčiv

2.3.1 Počátky vývoje micelárních nosičů léčiv

Počátky studia polymerních micel spadají do šedesátých let 20. století. První použití polymerních micel jakožto nosičů léčiv však bylo uveřejněno až v roce 1984 H. Ringsdorfem a jeho kolegy^{64,65}. Sulfidový derivát cyklofosfamidu byl navázán na lysinové zbytky blokového kopolymeru PEG-*block*-poly(L-lysin). Použité léčivo bylo hydrofilní, proto bylo nutné hydrofobizovat jádro micely. Z toho důvodu byla na přibližně 50 % ϵ -aminoskupin lysinových zbytků navázána kyselina palmitová. Studie byla sice ukončena ve stádiu *in vitro* testování, ale ukázala na novou cestu ve vývoji polymerních nosičů léčiv.

V roce 1989 A. Kabanov s kolegy popsal nárůst *in vivo* aktivity neuroseptického léčiva haloperidol nekovalentně vázaného v polymerních micelách, které tvořil Pluronic[®] P-85 (Pluronic[®] je blokový kopolymer PEG-*block*-poly(oxypropylen)-*block*-PEG)⁶⁶. Byly připraveny jak nesměřované micely, tak micely směřované protilátkami. Pluronic[®] s inkorporovaným DOX je v současné době ve druhé fázi klinického testování⁶⁷.

Ve stejné době jako A. Kabanov připravili M. Yokoyama a K. Kataoka s kolegy blokový kopolymer PEG-*block*-poly(L-asparagová kyselina)^{68,69}. Cytostatikum DOX bylo amidově navázáno na γ -karboxylové skupiny hydrofobního bloku poly(L-asparagové

kyseliny). Micelární konjugát vykazoval vysokou protinádorovou aktivitu vůči leukemickým nádorům. V současné době je micelární systém (pod označením NK911), obsahující kovalentně vázané DOX (pro vazbu DOX bylo využito přibližně 50 % -COOH skupin) a zároveň fyzikálně vázané DOX, zařazen do druhé fáze klinického testování^{70,71}. Zdá se však, že farmakologicky účinnou látkou je pouze inkorporovaný DOX, nikoliv amidově vázaný DOX, jehož funkce je především hydrofobizovat jádro micely a zároveň hydrofobními interakcemi poutat volné léčivo.

2.3.2 Vlastnosti micelárních nosičů léčiv

Velkou výhodou micelárních nosičů léčiv je biokompatibilní hydrofilní povrch, chrání micelu před vychytáváním v RES. Micely proto mohou cirkulovat po dlouhou dobu v krevním řečišti. Této vlastnosti lze využít v případě protražovaného systému, kdy je cílem pozvolné dlouhodobé uvolňování léčiva během cirkulace⁷². Další předností micelárních nosičů je možnost použít léčiva obtížně rozpustná ve vodném prostředí (například paclitaxel^{73,74} či ellipticin⁷⁵). Taková léčiva jsou vázána hydrofobními interakcemi v jádře, hydrofilní obal pak zajišťuje vodorozpustnost celého micelárního útvaru a zároveň i ochranu před biotransformací v organismu. Podobně jako v případě vodorozpustných polymerních nosičů i zde se uplatňuje pasivní směřování do pevných nádorů díky významnému EPR efektu⁷⁶.

Nevýhody micelárních nosičů léčiv vyplývají z jejich dynamického charakteru. Při koncentraci nižší než je tzv. kritická asociační koncentrace (CAC) tvoří amfifilní látky nadmolekulární útvary - micely, ale jejich molekuly - unimery - se pohybují samostatně solvatované ve vodném prostředí. I nad CAC se však polymer tvořící micelu nachází v rovnováze s unimerem. Nevýhoda výskytu unimerů je dvojitá: Mohou být cytotoxické nebo mohou způsobovat hemolýzu. Jsou totiž povrchově aktivní, mohou jako detergenty narušovat fosfolipidové membrány buněk. Dále je nechráněná hydrofobní část unimeru přístupná pro zachycení v RES. Micely jsou proto v důsledku neustále se ustavující rovnováhy mezi unimerem a micelou v organismu v principiálně termodynamicky nestabilním stavu⁷⁷. Na druhé straně však dynamika systému napomáhá uvolňování léčiva a může přispět, po uvolnění hydrofobního léčiva z jádra, k finálnímu rozpadu micely a následnému vyloučení polymeru z organismu.

2.3.3 Micelární nosiče léčiv s fyzikálně vázaným léčivem

Nejjednodušší, a proto i nejrozšířenější, způsob zachycení léčiva na micelární nosič je inkorporace hydrofobního léčiva do hydrofobního jádra polymerní micely. Léčivo tak není vázáno kovalentně, ale pouze hydrofobními interakcemi. Příkladem mohou být již dříve zmíněné micely obsahující Pluronic®^{66,67}. Většinou se jedná o diblokové (A-B) nebo triblokové (A-B-A) kopolymery (A označuje hydrofilní polymer, B hydrofobní). Vedle snadné přípravy je jejich výhodou i možnost použít léčiva, která nemají vhodné funkční skupiny pro kovalentní vazbu k polymeru. Nevýhodou těchto systémů je obtížná kontrola uvolňování léčiva. Uvolňování léčiva je zde difuzí řízený děj, proto dochází k uvolňování po celou dobu cirkulace micel v krvi a nikoliv pouze v místě požadovaného terapeutického účinku.

Hydrofilní bloky by měly splňovat stejná kritéria, jaká jsou kladena na vodorozpustné polymerní nosiče (viz kapitola 2.2.2). Většinou bývají tvořeny PEG řetězci⁷⁸. Výhody i nevýhody PEG byly již diskutovány v kapitole 2.2.6.1. Vyzdvihneme zde pouze jejich nízký index molekulární neuniformity ($\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1,05 - 1,2$), který dovoluje připravit micely s poměrně úzkou distribucí molárních hmotností, a tedy i velikostí částic. Hydrodynamický poloměr micely je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících jak dobu cirkulace, tak i schopnost micely pronikat membránami a ukládat se v pevných nádorech. Jako hydrofilní bloky byly, kromě PEG, také použity polymery vinylového typu. Jednalo se např. o homopolymery poly(HPMA) nebo poly(1-vinyl-2-pyrrolidon)^{79,80}. Hydrofobní blok poly(ϵ -kaprolakton)u, který obsahoval koncové -SH skupiny, byl využit jako přenosové činidlo pro radikálovou polymerizaci HPMA nebo 1-vinyl-2-pyrrolidonu⁸⁰. Nevýhodou polymerů připravených volnou radikálovou polymerizací s přenosem je širší distribuce molárních hmotností ($\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1,5 - 2$) ve srovnání s PEG. Využití pseudoživých radikálových polymerizací by však mohlo vést k odstranění této nevýhody^{81,82}.

Hydrofobní blok by měl být složen z netoxických polymerů, které je možné připravit s úzkou distribucí molárních hmotností. Nabízí se řada možných struktur. Velkou nevýhodou používaných polystyrenových⁸³, polymethylmethakrylátových⁸⁴, či poly(oxypropylen)ových⁶⁶ řetězců je absence jejich biodegradace. Proto se při přípravě hydrofobních bloků diblokových polymerů dává přednost řetězcům obsahujícím amidové nebo esterové vazby, které jsou enzymaticky, resp. hydrolyticky štěpitelné. Z polyesterů se

jedná např. o poly(L-laktid)^{85,86} nebo poly(ϵ -kaprolakton)^{79,80}. Z polyamidů je to pak poly(β -benzyl-L-aspartát)^{72,83}.

2.3.4 Micelární nosiče léčiv s kovalentně vázaným léčivem

Výhodou micelárních nosičů obsahujících léčivo, které je kovalentně navázáno, je možnost ovlivnit rychlost jeho uvolňování podle výběru vazby a spojky mezi léčivem a polymerním řetězcem. Naopak nevýhodou je větší náročnost syntézy těchto systémů.

V kapitole 2.3.1 jsme již popsali první dva navržené micelární systémy, obsahující kovalentně navázané léčivo. V obou systémech léčivo nebylo vázané biodegradovatelnou vazbou^{64,65,68,69}. Micelární nosič PEG-*block*-poly(L-asparagová kyselina) byl dále použit pro vazbu léčiva cisplatinu⁸⁷. Autoři nepozorovali žádné uvolňování léčiva z micel. Konjugát byl přesto cytotoxický vůči nádorovým liniím (myši B16 melanom), byť přibližně šestkrát méně než volná cisplatina. Vysvětlení cytostatické aktivity konjugátů obecně není snadné, je však možné, že terapeutický účinek léčiva není podmíněn jeho uvolněním z nosiče, jak bylo nedávno pozorováno u konjugátu PK1⁸⁸.

Většina prací je ovšem zaměřena na systémy, umožňující kontrolované uvolňování léčiva. V oblasti výzkumu vodorozpustných polymerních nosičů byly nejčastěji studovány systémy obsahující enzymově degradovatelné spojky mezi léčivem a nosičem. Oproti tomu v případě micelárních nosičů byla pozornost věnována jinému způsobu uvolňování léčiva. Jádra micel jsou totiž velmi málo dostupná pro aktivní místa enzymů⁸⁹. Největší pozornost byla proto věnována pH-senzitivním hydrolyticky degradovatelným spojkám mezi léčivem a micelárním nosičem. Těmito systémy se budeme podrobně věnovat v kapitole 2.4.2.4.

2.3.5 Micelární nosiče vzniklé asociací polyiontů

Výše popsané micelární systémy asociovaly díky hydrofobním interakcím mezi hydrofobními částmi unimerů. Micely ovšem vznikají i v důsledku iontových interakcí mezi unimery, které obsahují části tvořené polyaniony, a unimery, které obsahují části tvořené polykationy. Příkladem je směs PEG-*block*-poly(L-asparagová kyselina) a PEG-*block*-poly(L-lysin)⁹⁰. Jádro micely tvořené polyelektrolytovým komplexem je chráněno slupkou PEG řetězců. Micely také vznikají interakcí nabitých blokových kopolymerů s nabitými peptidy nebo nukleovými kyselinami. PEG-*block*-poly(L-asparagová kyselina) byl např. použit pro přípravu micel s modelovým proteinem lysozymem⁹¹. Pro komplexaci

s DNA byly využity blokové kopolymery PEG s poly(L-lysin)⁹², poly(dimethylaminoethylmethakrylát)⁹³, či poly(ethylenimin)⁹⁴, nebo kopolymer poly(HPMA)-*block*-poly[2-(trimethylammonio)ethylmethakrylát chlorid]⁹⁵.

2.4 Způsoby uvolňování kovalentně vázaných léčiv

Smyslem navazování léčiva na polymerní nosič je především dopravit léčivo na požadované místo v organizmu a tam zajistit jeho řízené uvolňování ve farmakologicky účinné formě. V případě protinádorových polymerních léčiv je potřeba, aby léčivo zůstalo neaktivní během transportu v krevním řečišti a aby se uvolnilo z nosiče ve své aktivní, cytotoxické formě teprve po průniku do nádorové buňky. Ve většině studovaných konjugátů bývá léčivo navázáno k polymernímu nosiči přes speciální spojku, která tento nárok splňuje. K nejpoužívanějším vazbám patří enzymaticky hydrolyzovatelné vazby a pH-senzitivní hydrolyticky štěpitelné vazby. Podrobně se budeme věnovat pouze druhému způsobu vazby.

2.4.1 Enzymaticky degradovatelné spojky

K nejstudovanějším systémům patří tzv. lysosomotropní systémy, k uvolnění léčiva využívají lysosomální enzymy, které se vyskytují v organizmu v lysosomech buněk. Vzhledem k vysoké specifitě enzymových reakcí je u takových systémů zajištěno, že během transportu v krevním řečišti nedochází k uvolňování léčiva. Dojde k němu až po průniku do buňky v důsledku působení specifického enzymu. To je důležité především při přípravě konjugátů s vysoce toxickými cytostatiky, jejichž uvolňování by bylo, například v krevním řečišti, doprovázeno vedlejšími toxickými účinky. Lysosomálními enzymy jsou štěpitelné peptidové, glykosidické a fosfátové vazby⁹⁶, v oblasti výzkumu polymerních nosičů léčiv však byly v naprosté většině studovány pouze peptidové vazby. Jako potenciální biodegradovatelné spojky byly testovány různé α -aminokyseliny a oligopeptidové sekvence. Po detailním studiu polymerních substrátů obsahujících tyto spojky byla vybrána tetrapeptidová sekvence GFLG⁵³. Klinicky testované polymerní nosiče na bázi kopolymerů HPMA, případně další lysosomotropní konjugáty, obsahovaly stejnou spojku.

Lysosomotropní systémy mají ovšem i některé nevýhody. Především je pro uvolnění léčiva nutná přítomnost lysosomálních enzymů, které se v některých typech buněk nemusí

vůbec vyskytovat. V neposlední řadě je nevýhodou i poměrně složitá a nákladná syntéza oligopeptidových sekvencí.

2.4.2 pH-senzitivní hydrolyticky degradovatelné spojky

Důležitou oblastí studia jsou i systémy používající spojky, které obsahují hydrolyticky degradovatelné vazby. Princip tohoto způsobu uvolňování léčiva z polymerních konjugátů využívá rozdílů mezi pH v prostředí krevního řečiště (pH 7,4) a pH v endosomech a lysosomech buňky (pH 5 - 6)²³. Vazba mezi léčivem a nosičem má být proto stabilní v pH neutrálním prostředí, tzn. během transportu krevním řečištěm by nemělo docházet k uvolňování léčiva. Naproti tomu má být vazba hydrolyzovatelná ve slabě kyselém prostředí, tzn. v endosomech či lysosomech nádorových buněk, kde by mělo docházet k relativně rychlému uvolňování léčiva v jeho původní aktivní formě. K poklesu pH však může docházet již v okolí nádorových buněk, v extracelulárním prostoru nádorové tkáně^{97,98}. V tom případě postačí, aby byl konjugát dopraven pouze do blízkosti nádorových buněk. V důsledku poklesu pH zde dojde k uvolnění léčiva, které vzápětí pronikne do buňky velmi rychlým difuzním procesem.

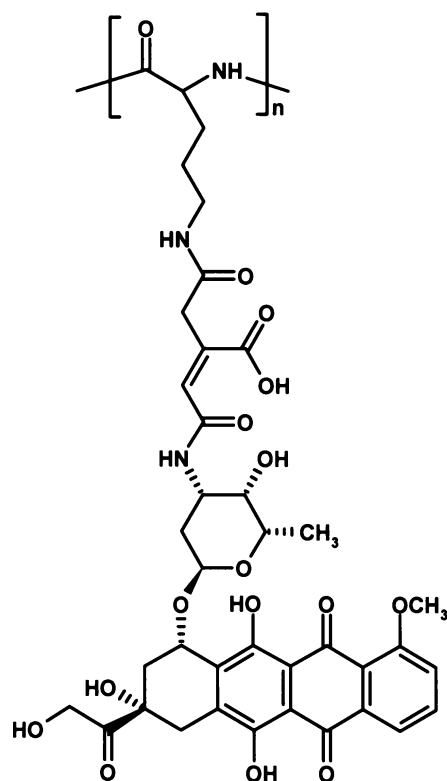
Ve srovnání s enzymolyticky degradovatelnými spojkami přináší použití hydrolyticky degradovatelných spojek jisté výhody i nevýhody. Velkou výhodou je nezávislost na přítomnosti enzymů pro uvolňování léčiva a ve většině případů i relativně snadnější a levnější příprava. Nevýhodou je naopak částečné uvolňování léčiva v krvi v průběhu transportu léčiva k cílové tkáni, k hydrolýze totiž může docházet i při pH krve. Na druhou stranu je třeba podotknout, že konjugáty cirkulují v krvi řádově desítky minut až jednotky hodin. Za tuto dobu by se v krevním řečišti nemělo uvolňovat výrazné množství léčiva. To znamená, že pro výběr struktur vhodných pro pH-závislé uvolňování léčiv je možné vybrat i takové struktury, které částečně a pomalu hydrolyzují při pH krve, rychlost jejich hydrolýzy v mírně kyselém prostředí (prostředí endosomů) by však měla být řádově vyšší. Hydrolytická nestabilita systému také klade větší nároky na skladování připravených preparátů.

2.4.2.1 *cis*-Akonitylová spojka

Mezi jedno z prvních rozsáhleji studovaných pH-senzitivně hydrolyzovatelných spojení léčiva a nosiče patří použití *cis*-akonitylové spojky. V roce 1981 W.C. Shen a H.J.P. Ryser připravili konjugát poly(D-lysinu) s daunomycinem (Schéma struktury je

znázorněno na Obrázku 2-8)⁹⁹. Syntéza probíhala ve dvou krocích, v prvním byla aminoskupina daunomycinu acylována *cis*-akonitylanhydridem, ve druhém volný γ -karboxyl *cis*-akonitylové spojky reagoval s ϵ -aminoskupinou poly(D-lysinu) v přítomnosti vodorozpustného karbodiimidu. Bylo zjištěno, že při 37 °C v pufru o pH 5,0 se polovina navázaného léčiva uvolnila z nosiče za 6 h, zatímco v pufru o pH 7,0 nebylo pozorováno významné uvolňování ani po 4 dnech inkubace. Výsledky *in vitro* testů ukázaly na významnou inhibici růstu leukemických buněk v porovnání s konjugátem, ve kterém bylo léčivo navázáno přes stabilní spojku.

V dalších letech byly studovány různé konjugáty daunomycinu či DOX, ve kterých bylo léčivo navázáno pomocí *cis*-akonitylové spojky k různým polymerním nosičům. Většinou byly použity přírodní polymery, zejména monoklonální protilátky²³. Jiným příkladem polymeru použitého pro konjugaci s léčivem prostřednictvím *cis*-akonitylové spojky je např. alginát (lineární kopolymer β -D-mannuronové a α -L-guluronové kyseliny)¹⁰⁰. Ze synteticky připravených nosičů byly kromě poly(D-lysinu)^{99, 101} syntetizovány kopolymery HPMA^{102, 103}, výsledky biologických testů však neukázaly výraznou protinádorovou aktivitu ve srovnání s volným DOX. *cis*-Akonitylová spojka byla také využita pro vazbu DOX k micelárním nosičům (viz kapitola 2.4.2.4)¹⁰⁴.



Obrázek 2-8 Schéma struktury konjugátu poly(D-lysinu) s daunomycinem obsahující *cis*-akonitylovou spojku

Příprava konjugátů s *cis*-akonitylovou spojkou není snadná. Nežádoucí je zejména vznik dvou různých produktů, reakce navazování k polymernímu řetězci se totiž mohou účastnit obě volné --COOH skupiny. Zdá se, že jeden z produktů není hydrolyzovatelný, bohužel zatím nebyla provedena detailní studie, která by tento problém objasnila. V posledních letech byly konjugáty s *cis*-akonitylovou spojkou syntetizovány a testovány jen ojediněle. Pozornost se soustřeďuje na jiné, slibnější pH-senzitivní hydrolyticky labilní spojení, jako je například hydrazonová vazba.

2.4.2.2 Hydrazonová vazba

V posledních dvou desetiletích byla pro navazování vhodných léčiv (obsahujících keto nebo aldehydovou skupinu) na polymerní nosiče využívána také hydrazonová vazba. Léčiva (především DOX nebo daunomycin) byla většinou připojena přes krátkou spojku k monoklonálním protilátkám, případně k transferrinu či lidskému sérovému albuminu¹⁰⁵⁻¹⁰⁹. První takové konjugáty se datují do roku 1990. U některých konjugátů byla zjištěna vyšší protinádorová aktivita vůči pevným nádorům než u volného léčiva. V nedávné době dokonce skončila I. fáze klinických zkoušek prvního takového konjugátu²⁶. Jednalo se o konjugát albuminu s DOX, při jehož syntéze byl použit (6-maleimidohexanoyl)hydrazonový derivát DOX¹¹⁰.

Zatím bylo popsáno jen několik konjugátů, ve kterých bylo léčivo připojeno hydrazonovou vazbou i k jiným nosičům. Takové systémy byly poprvé navrženy ve dvou pracích v roce 1979. V jedné studii byl model léčiva představovaný sloučeninou nesoucí karbonylovou skupinu (cyklohexanon a 4-bromobenzaldehyd) navázán na polyhydrazin [polyakryloylhydrazin, poly((6-(methakryloylamino)-hexanoyl)hydrazin) a poly((4-(methakryloyloxy)-benzoyl)hydrazin)]¹¹¹. Ve druhé studii byly již připraveny konjugáty s léčivem, se sulfátem streptomycinu. Polymerizovatelný hydrazonový derivát léčiva byl použit pro kopolymerizaci s methakrylamidem nebo s 2-(methylsulfinyl)ethylmethakrylátem¹¹². V dalším roce byly jako potencionální nosiče studovány karboxymethyl-dextran a polyglutamát¹¹³. Hydrazinolýzou aktivovaných karboxylových skupin byly do bočních řetězců polymerů zavedeny hydrazidové skupiny, které byly následně použity pro konjugaci s daunomycinem. Oba konjugáty vykazaly zvýšenou protinádorovou aktivitu *in vivo* vzhledem k volnému léčivu (myší Yac lymfom).

Ačkoliv výsledky biologických testů hydrazonových konjugátů působily slibně, po mnoho dalších let nebyla hydrazonová vazba dále používána pro vazbu léčiv k polymerním nosičům. Pokud opomineme konjugáty s protilátkami nebo jinými proteiny, další hydrazonové konjugáty byly připraveny až počátkem 90. let 20. století.

Polymerní nosič poly(PEG-*alt*-L-lysylylhydrazid) byl použit pro vazbu DOX⁴¹. Molární hmotnost (\overline{M}_w) polymerního prekurzoru činila 47 000 a index molekulární neuniformity 1,5. Vzhledem k tomu, že byl pro přípravu polymerního nosiče využit PEG o $\overline{M}_w = 2\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, výsledný polymerní nosič obsahoval značné množství hydrazidových skupin (12,6 mol.%). Na konjugát bylo proto možné navázat poměrně velké

množství DOX (13,5 hm.%). Bohužel nebyly publikovány žádné biologické studie připraveného konjugátu. Jako nosič streptomycinu byly použity poly(*N*-(hydroxyethyl)-*L*-glutamin) a dextran¹¹⁴. Na polymerní nosiče aktivované 4-nitrofenylchloroformátem byl nejprve navázán *N*¹-(*tert*-butoxykarbonyl)-*N*²-glycyl hydrazin. Poté byly ochráněny hydrazidové skupiny trifluoroctovou kyselinou a navázán streptomycin. Konjugát léčiva s dextranem obsahoval 11,2 hm.% léčiva a konjugát s poly(*N*-(hydroxyethyl)-*L*-glutamin)em 15,0 hm.%. V druhém případě byla provedena i studie rychlosti uvolňování léčiva *in vitro*. Inkubováním při 37 °C při pH 5,2 došlo k uvolnění 50 % léčiva za 8 h, při pH 7,4 se však léčivo uvolňovalo jen o něco málo pomaleji (30 % za 8 h). Bohužel opět nebyly publikovány žádné biologické studie připravených konjugátů.

Hydrazonová vazba byla dále použita v různých konjugátech obsahujících PEG řetězce. Konjugáty s DOX byly připraveny ve dvou krocích¹¹⁵. Nejprve byl připraven hydrazonový derivát DOX, který obsahoval maleimidylovou skupinu. Tato reaktivní skupina byla dále využita pro vazbu k monofunkčním či bifunkčním PEG řetězcům zakončeným SH- skupinou (\overline{M}_w PEG řetězců činilo 20 000 g.mol⁻¹). V pH 5,0 se poloviční množství vázaného DOX uvolnilo za 2 h, 6 h, resp. 30 h v závislosti na struktuře použité spojky. U všech konjugátů se při pH 7,4 uvolnilo méně než 10 % léčiva za 48 h. Stejně bifunkční PEG řetězce byly použity i pro vazbu paclitaxelu¹¹⁶ a daunorubicinu¹¹⁷. Výsledky *in vitro* testů uvolňování léčiva ukázaly na podobné rychlosti uvolňování jako v případě předchozích PEG konjugátů. U všech tří typů konjugátů byly provedeny *in vitro* testy cytotoxicity, ve kterých konjugáty prokázaly cystostatickou aktivitu. Při interpretaci těchto výsledků je však nutná opatrnost. V průběhu testování totiž může dojít k hydrolyze hydrazonové vazby, účinek vysoce cytotoxického uvolněného léčiva pak výrazně zkreslí výsledek testu.

Velkou nevýhodou všech tří typů konjugátů, popsaných v předchozím odstavci, byl velmi nízký obsah léčiva. Většina hmotnosti konjugátu byla totiž tvořena vysokomolekulárním PEG řetězcem, léčivo bylo možné navázat pouze na konce lineárního polymeru. S cílem překonat tato omezení byly připraveny multiblokové PEG nosiče^{118, 119}. Krátké PEG řetězce ($\overline{M}_w = 2\,000$ g.mol⁻¹) byly propojeny biodegradovatelnými oligopeptidovými spojkami, které byly tvořeny sekvencemi EK(E)¹¹⁸ nebo DPK(DP)¹¹⁹. Volné karboxylové skupiny byly převedeny na hydrazidové skupiny a dále využity pro vazbu léčiva. Obsah navázaného léčiva byl již poměrně vysoký, činil 14, resp. 11 hm.%. V *in vitro* podmínkách se v obou případech při 37 °C v pufru o pH 5,0 uvolnilo přibližně

70 % DOX a při pH 7,4 přibližně 20 % léčiva. Oba konjugáty prokázaly protinádorovou aktivitu vůči myším T-buněčnému lymfomu EL4, jehož léčba volným DOX je jen velmi málo účinná. Dalším multiblokovým kopolymerům se budeme věnovat v kapitole 2.5.2.3.

Hydrazonově vázaný DOX byl použit i v detailní studii provedené na polymerních nosičích na bázi HPMA. Jako spojky mezi léčivem a nosičem sloužily hydrazidovou skupinou zakončené různé sekvence α -aminokyselin nebo hydrazidy jiných aminokyselin^{120,121}. Při 37 °C v prostředí o pH 5,0 docházelo k poměrně rychlému uvolňování DOX v závislosti na struktuře spojky (60 – 80 % za 24 h), kdežto v prostředí o pH = 7,4 se uvolňovalo jen minimální množství léčiva (pod 10 % za 24 h). Protinádorová aktivita testovaná na myším T-buněčném lymfomu EL4 byla výrazně vyšší než aktivita volného léčiva i než aktivita PK1¹⁰³. Další výrazné zvýšení terapeutického účinku bylo pozorováno při použití vysokomolekulárního větveného konjugátu¹²⁰ (viz kapitola 2.5.2.2). Předkládaná disertační práce navazuje především na tyto poznatky a rozvíjí je.

Hydrazonová vazba byla také využívána v jiných systémech, než jsou vodorozpustné polymerní nosiče. Byly připraveny např. micelární^{104,122,123} nebo dendrimerní^{124,125} konjugáty s DOX. Těmto konjugátům se budeme věnovat v kapitolách 2.4.2.4, resp. 2.5.2.3.

2.4.2.3 Jiné hydrolyticky labilní spojky

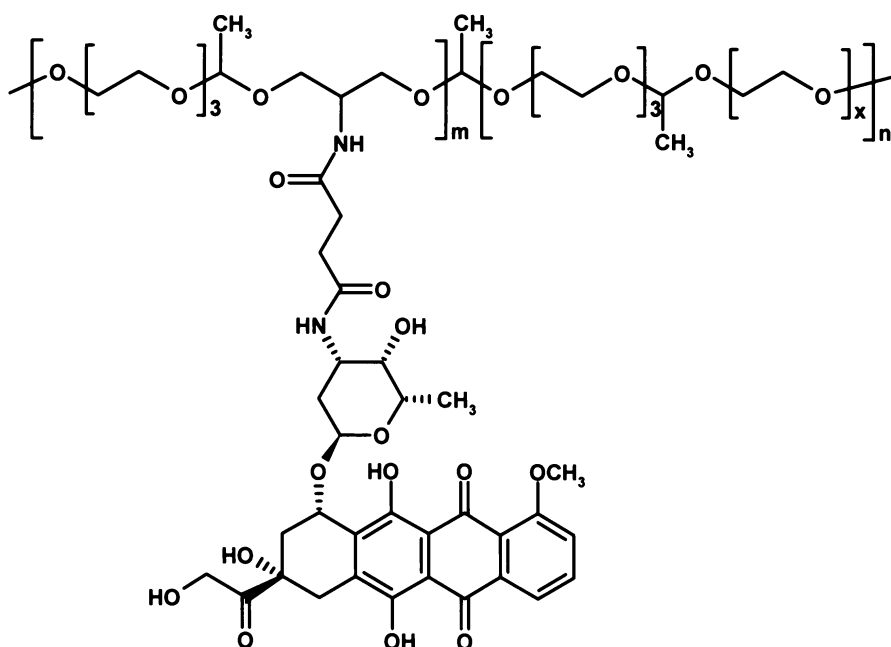
Jiná pH-senzitivní hydrolyticky degradovatelná spojení, než jsou *cis*-akonitylová spojka a hydrazonová vazba, byla využita jen sporadicky. Byly popsány konjugáty protilátek s difluoronukleotidy navázanými pomocí spojky tvořené substituovanou tritylovou skupinou^{126,127}. Vazba byla relativně stabilní při 37 °C při pH 7,4 s poločasy hydrolyzy minimálně 133 h. Při pH 5,4 docházelo k výrazně rychlejšímu uvolňování léčiva, poločasy hydrolyzy se pohybovaly mezi 2,5 – 26,5 h v závislosti na substituci tritylu.

Dále byla použita fosfamidová vazba pro vazbu protivirálního léčiva 5-jodo-2'-deoxyuridinu 5'-monofosfátu k poly(L-lysin)u¹²⁸. Konjugát byl směřován do jaterních buněk pomocí navázaných laktosových jednotek.

Jiným příkladem je spojka obsahující *N*-(benzylthiokarbamoyl)aspartyl, pomocí níž byl daunorubicin navázán k poly[2-akrylamido-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol]u¹²⁹.

Při 37 °C byl konjugát stabilní v pufru o pH 7,4, ve slabě kyselém prostředí docházelo k pomalému uvolňování léčiva (poločas hydrolýzy: 150 h při pH 5,0 a 44 h při pH 4,0).

V nedávné době byl připraven konjugát DOX s polyacetalovým nosičem¹³⁰, jehož schematická struktura je znázorněna na Obrázku 2-9. Aplikovaný přístup se však liší od všech předchozích případů. Byl použit pH-senzitivní hydrolyticky degradovatelný polymerní nosič, nikoliv hydrolyzovatelná spojka. Hmotnost polyacetalové páteře nosiče ubývala rychleji při pH 5,5 o 40 % za 1 den a pomaleji při pH 7,4 o 10 % za 3 dny inkubace při 37 °C¹³¹. Ačkoliv degradace nevedla k uvolnění DOX, vzniklý nízkomolekulární derivát působil cytotoxicky vůči vybraným nádorovým liniím. Konjugát cirkuloval déle v krevním řečišti a více se akumuloval v nádorové tkáni ve srovnání s PK1.



Obrázek 2-9 Schéma struktury polyacetalového konjugátu s DOX

2.4.2.4 Hydrolyticky degradovatelné spojky v micelárních systémech

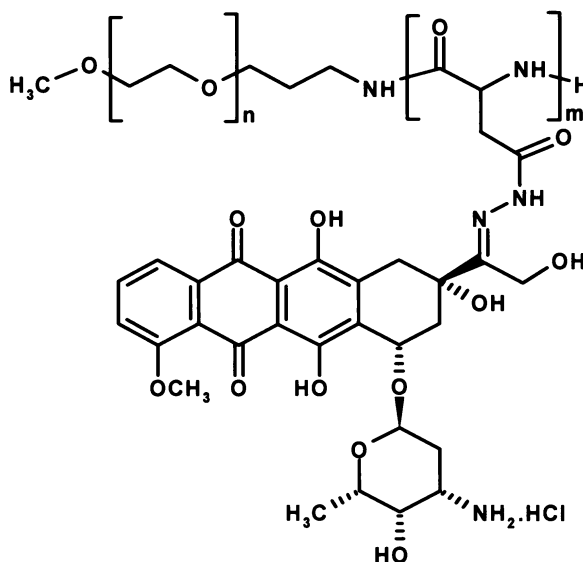
Hydrolyticky degradovatelné spojky v micelárních systémech představují problematiku poněkud odlišnou od systémů využívajících vodorozpustné polymerní nosiče. Proto jsou pojednány v samostatné kapitole.

Micelární nosič PEG-*co*-poly(L-asparagová kyselina), popsany v kapitole 2.3.1, byl také použit pro navázání methotrexátu^{132, 133}. Na nosič byly nejprve zavedeny hydroxylové skupiny (po reakci ethanolaminu s L-asparagylbenzoátem) a následně využity pro vazbu léčiva esterovou vazbou. V *in vitro* testech rychlosti uvolňování docházelo k velmi pozvolné hydrolýze esterové vazby. Při pH 7,4 se uvolnilo pouze 15 % léčiva za 10 dní, při

pH 5,0 hydrolyza probíhala ještě dvakrát pomaleji. Výsledky biologických testů dosud nebyly prezentovány.

Na micelární nosič PEG-*block*-poly(D,L-laktid-*co*-glykolid) byl pomocí karbamátové vazby navázán DOX¹³⁴. Tato vazba však nebyla biodegradovatelná, k uvolnění léčiva mělo dojít po degradaci hydrofobního bloku. Rychlost uvolňování měřená *in vitro* byla velmi nízká, v pH neutrálním prostředí při 37 °C bylo detekováno pouze 50 % uvolněného DOX po dvou týdnech inkubace. Další nevýhodou tohoto systému byl i nízký obsah vázaného léčiva (2,2 hm.%). DOX byl totiž navázán pouze na volném konci bloku poly(D,L-laktid-*co*-glykolid). Autoři proto změnili způsob vazby léčiva. Nově využili hydrazonové vazby a *cis*-akonitylové spojky¹⁰⁴. V případě hydrazonově vázaného DOX k PEG-*block*-poly(L-laktid)u při pH 7,4 nedocházelo k signifikantnímu uvolňování léčiva a při pH 5,0 došlo k uvolnění 40 % za 1 den. V případě DOX vázaného pomocí *cis*-akonitylové spojky byl profil uvolňování obdobný. Při pH 5,0 sice došlo k uvolnění 50 % DOX za 1 den, avšak ne jako původního nederivovaného léčiva. Nevýhodou obou testovaných systémů byl opět nízký počet skupin, na které bylo možné léčivo navázat.

Hydrazonová vazba byla také použita pro navázání DOX k micelárním nosičům PEG-*co*-poly(L-asparagová kyselina)^{122, 135} (schéma struktury je znázorněno na Obrázku 2-10) a PEG-*block*-poly(allylglycidyl-ether)^{123, 136}. Micelární nosič PEG-*block*-poly(L-asparagová kyselina), na který byly zavedeny hydrazidové skupiny, již umožňoval navázat vyšší obsah léčiva než umožňovaly předchozí systémy. Konjugát obsahoval 42,5 hm.% DOX. Při pH 7,4 nedocházelo k významnému uvolňování DOX a při pH 5,0 došlo k uvolnění 25 % léčiva za 24 hodin. Připravený konjugát vykazoval zvýšenou protinádorovou aktivitu oproti volnému léčivu, při léčbě myšího adenokarcinomu C26 cirkuloval déle v krvi (s poločasem přibližně 5 h) a výrazně se akumuloval v nádorové tkáni.



Obrázek 2-10 Schéma struktury micelárního nosiče PEG-*block*-poly(L-aspartoylhydrazid) s kovalentně vázaným DOX

Reakcí dvojných vazeb PEG-*block*-poly(allylglycidylether)u s methyl sulfanylacetátem a následnou hydrazinolýzou methylesteru byly do hydrofobního bloku zavedeny hydrazidové skupiny, které byly dále využity pro vazbu DOX hydrazonovou vazbou¹²³. Konjugát obsahoval sice pouze 3 hm.% DOX, ale principiálně bylo možné navázat léčiva mnohem více. Při 37 °C se v pufru o pH 7,4 uvolnilo 16 % léčiva za 24 h a v pufru o pH 5,0 43 % léčiva za 24 h. Výsledky biologických testů zatím nebyly prezentovány.

Závěrem této kapitoly se zaměříme na profil uvolňování léčiva z micel. Nejprve zpravidla dojde k uvolnění určitého množství léčiva, pak se však uvolňování výrazně zpomalí a s časem se prakticky nemění (např. v posledním popsaném konjugátu se uvolnilo při pH 5,0 za 1 den 43 % léčiva a za 16 dní 48 %). Hydrofobní léčivo je patrně i po hydrolýze a rozrušení kovalentní vazby nadále poutáno k hydrofobnímu jádru hydrofobními interakcemi a z micely neuniká ven do polárního prostředí. Tato hypotéza byla potvrzena následujícím pokusem: K inkubovaným vzorkům byl přidán nadbytek dimethylsulfoxidu, který způsobil rozpad micel na jejich unimery. Teprve poté bylo stanoveno množství uvolněného léčiva. Za těchto podmínek bylo pozorováno výrazně rychlejší uvolňování léčiva při pH 5,0 i 7,4 (75 %, resp. 10 % uvolněného DOX za 1 den)¹²³. Při pH 5,0 se uvolnilo téměř veškeré navázané léčivo. Uspořádání experimentu neumožňuje uvolnit 100 % DOX. Zatímco v tomto *in vitro* pokusu může probíhat vratná reakce – tvorba hydrazonové vazby, v reálném *in vivo* systému bude uvolněné léčivo kontinuálně odstraňováno z dosahu polymeru, čímž se zamezí jeho zpětnému navazování.

2.5 Směrování polymerních léčiv

Existují různé přístupy, které se snaží vyřešit problém směrování léčiva přímo do místa požadovaného terapeutického účinku, v našem případě do nádorové tkáně. Jako nejjednodušší možnost se nabízí aplikace léčiva přímo do nádoru (intratumorální podání)¹³⁷. Tato možnost však má mnohá omezení. Nutným předpokladem je přístupný a lokalizovaný nádor, metodu nelze použít u metastazujících nádorů. Touto léčbou ovšem nemohou být zasaženy všechny nádorové buňky a navíc může být poškozena i okolní zdravá tkáň následkem difuze léčiva ven z nádoru.

Jiný přístup využívá aktivace proléčiva působením vnějších fyzikálních sil v definovaném místě organismu. Neaktivní léčivo (proléčivo, *prodrug*) je distribuováno krví do celého organismu. Účinným se stane pouze v místě lokálního působení vnějšího

podnětu. Příkladem je fotodynamická terapie^{9,138,139}. Na konjugát s léčivem (mesochlorin e₆, či jiné deriváty porfyrinového typu) je působeno UV zářením, které aktivuje léčivo zajišťující produkci singletového kyslíku toxického pro cílovou buňku. Jiným příkladem stimulem aktivovaného směřování může být kombinace termosensitivních systémů a lokálního ohřátí nádorové tkáně. Použité termosensitivní polymerní nosiče (např. peptidy podobné elastinu¹⁴⁰, nebo kopolymery na bázi *N*-isopropylakrylamidu¹⁴¹) jsou rozpustné při tělesné teplotě. V místě zvýšené teploty však nastává fázová separace, což vede k tzv. depo efektu, v daném místě dochází k akumulaci konjugátu uvolňujícího léčivo. Tyto metody jsou obecně limitovány dosahem a specifitou působení vnějšího podnětu.

Patrně nejčastějším způsobem směřování polymerních léčiv je však cílení buněčně specifickými ligandy a tzv. pasivní směřování využívající EPR efektu. Oběma přístupy se budeme zabývat v samostatných kapitolách.

2.5.1 Směřování k receptorům exprimovaným na povrchu buněk

Většina buněk v organismu exprimuje na svém povrchu struktury specifické pro daný typ buněk, které jsou schopny interagovat s vybranými biologicky aktivními molekulami, chovají se jako jejich receptory. Pokud bude polymerní léčivo obsahovat směřující jednotky, které jsou schopné rozpoznat tyto receptory v membránách nádorových buněk a navázat se na ně, potom může být takové léčivo přednostně dopraveno do místa požadovaného terapeutického účinku, tedy do nádoru a především k nádorovým buňkám. V minulosti byly studovány jako směřující struktury zejména biologicky aktivní proteiny, sacharidy, lektiny a protilátky. Oblast výzkumu směřujících jednotek se však v poslední době dynamicky rozvíjí a jsou navrhovány různé nové struktury. Věnujme se dále jen zřejmě nejdůležitějším z nich, protilátkám a peptidům.

2.5.1.1 Protilátky

Protilátky (AtB), neboli imunoglobuliny patří mezi globulární glykoproteiny, které se skládají z řetězců spojených do tvaru písmene Y^{142,143}. Dělí se na několik tříd, v lidské krvi je nejvíce zastoupen typ IgG. V rámci téhož typu se AtB liší variabilními doménami, které tvoří vazebná místa pro antigeny (receptory v buněčných membránách). AtB jsou v organismu produkovány B lymfocyty. Každý typ B lymfocytu produkuje imunoglobuliny jiné třídy, specifity a afinity k antigenu. Produkce protilátek určité

specifity se dosahuje imunizací pokusných zvířat, čímž se získají tzv. polyklonální AtB. Obsahují však směs imunoglobulinů o různé specifitě, a proto hrozí nebezpečí jejich interakce s receptory i na zdravých buňkách. Před necelými třiceti lety byl objeven způsob přípravy tzv. monoklonálních AtB¹⁴⁴, které již mají jednotnou specifitu. Jejich nevýhodou jsou vysoké náklady na přípravu a nestabilita (koagulace) při výraznější změně pH, iontové síly a teploty. Přesto však monoklonální i polyklonální protilátky představují velmi univerzální formu směřující jednotky¹⁴⁵, neboť je možné připravit AtB specifické pro různé nádory.

Protilátky mohou sloužit nejen jako směřující jednotka, ale i jako samotný polymerní nosič¹⁴⁶. K nevýhodám těchto systémů patří nízký počet molekul léčiva, které je možné navázat na molekulu AtB, snížení vazebné aktivity AtB k receptorům a někdy i zhoršení rozpustnosti konjugátu AtB s hydrofobním léčivem. Pro praktickou aplikaci může přinést jistý problém i jejich potenciální imunogenicita.

Byla popsána řada konjugátů AtB-polymerní nosič-léčivo, ve kterých jako polymerní nosič figurují vodorozpustné polymery^{8, 24, 27, 103, 146}, polymerní micely¹⁴⁷, či liposomy⁴.

Jako směřující jednotky se využívají i fragmenty AtB, např. Fab a F(ab)₂^{148, 149}, nebo jejich kombinace. Tyto fragmenty stále obsahují aktivní vazebné místo pro antigen. Výhodou jejich použití při syntéze směřovaných systémů je zejména jejich mnohem menší velikost ve srovnání s celou AtB a často definovanější struktura směřovaného konjugátu. Velké molekuly AtB mohou totiž obtížně pronikat do nádorů, které mají nedostatečně vyvinutý cévní systém¹⁵⁰. Spojením dvou Fab fragmentů, pocházejících z různých protilátek, je možné připravit tzv. *diabody*. Získaná směřující jednotka je specifická pro dva různé receptory téže buňky, čímž se zvyšuje její afinita. Směrování konjugátu pomocí *diabody* pak může být účinnější než směrování původními Fab fragmenty¹⁵¹.

2.5.1.2 Peptidy

V souvislosti s výběrem vhodných směřujících struktur s výraznou specifitou a afinitou k cílovým receptorům je v současnosti stále větší pozornost věnována peptidům a zvláště oligopeptidům jako alternativě k protilátkám. Jsou mnohem menší než fragmenty protilátek, mají přesně definovanou strukturu a navíc nejsou vychytávány v RES, jsou chemicky stabilní a relativně snadno derivatizovatelné¹⁵². Využití peptidů jako směřujících struktur může být různé. Podobně jako v případě monoklonálních AtB, lze získat peptidové sekvence, které se vyznačují specifickou afinitou k některým receptorům vyskytujícím se

na površích vybraných nádorových buněk. K výběru vhodných sekvencí je využívána především tzv. *phage-display* metoda¹⁵³.

Některé peptidy mohou být použity, kromě směřování k buněčným receptorům specifických nádorových linií, i ke směřování do nádorové vaskulatury, k endoteliálním buňkám cév vyživujících nádor¹⁵². V pevných nádorech totiž probíhá angiogeneze, poměrně rychlá tvorba nových cév. Endoteliální buňky, které jsou součástí tohoto procesu, exprimují specifické integriny obsahující receptory citlivé vůči určitým peptidovým motivům, působícím jako jejich inhibitory (např. sekvence RGD). Inhibice dělení endoteliálních buněk přispívá k zamezení tvorby nových cév a vyživování nádoru. Tyto oligopeptidové sekvence mohou být, díky specifičnosti své interakce, použity pro směřování cytostatik do endothelia nádoru. Jejich antiangiogenní účinek v kombinaci s cytotoxickým účinkem léčiva tak může vést k eliminaci nádoru.

Zatím bylo publikováno jen málo prací věnovaných polymerním nosičům, které by byly takto směřovány¹⁵⁴⁻¹⁵⁸. V budoucnosti však lze očekávat velký nárůst zájmu, i přes vyšší cenu a náročnější syntézu takovýchto konjugátů.

2.5.2 Pasivní směřování - EPR efekt

Princip pasivního směřování makromolekul do pevných nádorů založený na EPR efektu již byl vysvětlen na konci kapitoly 2.2.3. Zde bude pozornost blíže zaměřena na připravené systémy, které tohoto efektu využívají. Poprvé byl EPR efekt popsán u konjugátu SMANCS⁴³, a poté i u dalších polymerních nosičů léčiv^{44, 159}. Podrobná studie byla provedena i pro kopolymery HPMA. V jejich případě byl sledován vliv molární hmotnosti kopolymerů (\overline{M}_w od 22 000 do 778 000 g.mol⁻¹) na biodistribuci a zejména na akumulaci v pevných nádorech¹⁶⁰. Již kopolymery s nejmenší molární hmotností se výrazně akumulovaly v nádorech, s rostoucí hmotností pak rostla i míra akumulace.

Použití vysokomolekulárních konjugátů tvořených biologicky nedegradovatelnými polymerními řetězci brání omezení, které je dané limitem renální filtrace (viz úvod kapitoly 2.2.6). Zopakujme, že takové konjugáty nemohou být dostatečně rychle vyloučeny z organismu močí přes ledviny a při jejich použití jako nosičů léčiv by mohlo dojít k jejich nežádoucí akumulaci. Aby mohly být vysokomolekulární konjugáty pro tyto účely použity, musí obsahovat biodegradovatelné spojky propojující polymerní řetězce o molárních

hmotnostech nižších, než je limit renální filtrace. Degradční produkty, tvořené krátkými polymerními fragmenty, pak mohou být po splnění funkce nosiče léčiv vyloučeny z těla.

Zatím bylo publikováno jen velmi malé množství prací, které by byly věnovány jiným systémům, než jsou micelární nosiče nebo konjugáty s AtB. Do značné míry se však jednalo o modelové systémy, u kterých se teprve v budoucnu ukáže, zda jejich vývoj je slepou uličkou, či naopak slibnou cestou.

2.5.2.1 Konjugáty s protilátkami

Protilátky mají vysokou molární hmotnost, např. pro typ IgG je \overline{M}_w přibližně 150 000 g.mol⁻¹. Proto se u AtB směřovaných konjugátů významně uplatňuje, kromě specifického směřování (viz kapitola 2.5.1.1.), i EPR efekt. Vliv jednotlivých způsobů směřování na zvýšení protinádorové aktivity těchto konjugátů lze jen těžko odlišit, zejména u polyklonálních protilátek. Velkou nevýhodou konjugátů s AtB je nízký obsah léčiva vzhledem k celkové hmotě konjugátu. Často také dochází k tvorbě větvených struktur, pro které jsou charakteristické velmi vysoké molární hmotnosti a široká distribuce molárních hmotností.

2.5.2.2 Biodegradovatelné větvené kopolymery

Poprvé syntetizované vysokomolekulární větvené polymer - DOX konjugáty obsahovaly řetězce PK1, které byly spojeny spojkou degradovatelnou lysosomálními enzymy. Větvené konjugáty (o \overline{M}_w od 160 000 do 1 200 000 g.mol⁻¹) byly připraveny kopolymerizací s přidavkem větvičího činidla *N*²,*N*⁵-bis(*N*-methakryloylglycylphenylalanylleucyl) ornithinu¹⁶¹. Takovéto konjugáty se vyznačovaly velmi širokou distribucí molárních hmotností. *In vitro* provedený test degradace konjugátů inkubovaných v přítomnosti tritosomů ukázal na jejich poměrně rychlou degradaci na krátké polymerní fragmenty. Všechny konjugáty byly rozštěpeny během 30 h. Slibně se jeví i výsledky *in vivo* pokusů. Větvené konjugáty cirkulovaly déle v krvi a více se akumulovaly v nádoru (lidský karcinom vaječníku OVCAR-3)¹⁶², nežli jejich lineární analoga.

Jiný typ polymer - DOX konjugátu na bázi HPMA obsahoval také spojku tvořenou dvěma GFLG sekvencemi, avšak léčivo bylo navázáno pH-senzitivní hydrazonovou vazbou¹²⁰. Větvený konjugát byl připraven následovně: Nejprve byl získán větvený kopolymer reakcí ethylendiaminu s částí reaktivních 4-nitrofenoxy skupin polymerního

prekurzoru. Poté byly hydrazinolýzou zbylých reaktivních skupin zavedeny do struktury polymeru hydrazidové skupiny, na které bylo dále navázáno léčivo. Konjugát o $\overline{M}_w = 115\,000\text{ g.mol}^{-1}$ byl v *in vitro* prostředí degradován kathepsinem B na fragmenty o $\overline{M}_w = 43\,000\text{ g.mol}^{-1}$ během 5 dní. Dále bylo prokázáno, že vysokomolekulární konjugát byl mnohem účinnější *in vivo* než odpovídající nevětvený konjugát (myší T-buněčný lymfom EL4).

Nevýhodou obou příkladů větvených konjugátů je poměrně široká distribuce molárních hmotností ($\overline{M}_w/\overline{M}_n = 3 - 7$) a špatná reprodukovatelnost přípravy konjugátů o stejné molární hmotnosti.

2.5.2.3 Biodegradovatelné multiblokové polymery

Přístup využívající propojení polymerních řetězců biodegradovatelnými spojkami byl použit i pro PEG polymerní nosiče. Hlavní řetězec multiblokových PEG polymerů byl tvořen nedegradovatelnými krátkými lineárními PEG řetězci (např. o $\overline{M}_w = 2\,000\text{ g.mol}^{-1}$). Konce řetězců byly spojeny biodegradovatelnými spojkami, na které bylo dále připojeno léčivo, případně směřující jednotka.

První připravené multiblokové polymery obsahovaly enzymově degradovatelné spojky mezi PEG řetězci, modelové léčivo 4-nitroanilin bylo rovněž navázáno přes enzymaticky degradovatelnou oligopeptidovou spojku¹⁶³. Rychlost degradace kathepsinem B byla v širokém rozsahu řízena výběrem aminokyselin, ze kterých se spojka skládala. V dalších pracích bylo modelové léčivo nahrazeno DOX, konjugát prokázal vyšší protinádorovou aktivitu než volné léčivo (myší kolorektální karcinom C26)¹⁶⁴. Protilátkami směřované konjugáty tohoto polymeru byly také účinné *in vivo* (myší T-buněčný lymfom EL4)¹⁶⁵. Nedávno byly připraveny konjugáty obsahující DOX vázaný k polymeru hydrolyticky štěpitelnou vazbou¹¹⁸. Rovněž byly připraveny blokové kopolymery PEG obsahující v hlavním řetězci hydrolyticky degradovatelné esterové vazby¹⁶⁶, nebo obsahující enzymově i hydrolyticky degradovatelnou pentapeptidovou spojku¹¹⁹. Molární hmotnosti (\overline{M}_w) připravených multiblokových polymerů dosahovaly přibližně $40\,000\text{ g.mol}^{-1}$.

Nedávno byla publikována práce popisující složitější, roubovaný systém¹⁶⁷. Páteř roubovaných kopolymerů byla tvořena multiblokovým kopolymerem na bázi poly(PEG-*-alt-ester-karbonát*)u¹⁶⁸. Tento kopolymer je biodegradovatelný, ve fyziologickém

prostředí došlo během 24 h k úplné hydrolyze kopolymeru na PEG a oligomerní produkty. Boční řetězce roubovaných kopolymerů byly složeny z PEG řetězců, na jejichž konec byl amidovou vazbou navázán DOX přes GFLG spojku. Podařilo se připravit vysokomolekulární konjugáty ($\overline{M}_w = 100\ 000$ a $190\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), ty však byly obtížně rozpustné a obsahovaly jen malé množství vázaného DOX (přibližně 4 hm.%). Patrně z těchto důvodů žádný z konjugátů neprokázal protinádorovou aktivitu (melanom B16F10 a leukemie L1210).

2.5.2.4 Hybridní systémy tvořené vodorozpustnými polymery a dendrimery

Jiný přístup řešící přípravu vysokomolekulárních konjugátů využívá kombinace lineárních polymerních nosičů s dendrimery. Navrženy byly hvězdicovité konjugáty, asymetricky substituované dendrimery a dendronizované lineární polymerní nosiče.

Ve hvězdicovitých systémech dendrimer sloužil jako střed hvězdy, na který byla připojena ramena tvořená lineárními polymery. PANAM dendrimer (G4) byl např. využit pro vazbu semitelechelického kopolymeru na bázi HPMA, který již obsahoval amidově vázaný DOX přes GFLG sekvenci¹⁶⁹. Připravený hvězdicovitý konjugát o $\overline{M}_w = 150\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ s poměrně úzkou distribucí molárních hmotností ($\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2,3$) byl tvořen přibližně 11 polymerními rameny. V prvotní studii, kterou publikace byla, konjugát prozatím neobsahoval biodegradovatelné spojky, v dalších případných studiích by však již neměly být opomenuty. *In vitro* testy uvolňování DOX v přítomnosti kathepsinu B ukázaly na velmi pozvolné uvolňování léčiva oproti referenční PK1. Poměrně kompaktní struktura hvězdicovitého konjugátu zřejmě brání přístupu enzymu k léčivu. Provedené testy cytotoxicity ukázaly nízkou inhibici růstu nádorových buněk. Bohužel zatím nebyly provedeny testy protinádorové aktivity konjugátu v *in vivo* podmínkách. I přes uvedené nevýhody je tento konjugát zajímavým a slibným systémem využívajícím EPR efekt.

Jiným příkladem hvězdicovitého konjugátů je tříramenná hvězdice¹²⁴, jejíž střed byl tvořen trojfunkční molekulou, ramena byla složena z PEG řetězců. Na vnější konec každého PEG byl připojen polyesterový dendron (G2). Každý dendron nesl čtyři hydrazidové skupiny, které byly využity pro vazbu DOX hydrazonovou vazbou. Konverze hydrazidových skupin proběhla z 50 %, zbývající funkční skupiny byly zřejmě stéricky bráněné. Molární hmotnost konjugátu získaná pomocí MALDI-TOF MS činila $27\ 200\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a distribuce molárních hmotností byla velmi úzká. Předběžné biologické

in vivo testy ukázaly prodlouženou dobu cirkulace konjugátu v krvi¹²⁵. Lze proto očekávat, že se jej dostane do nádorové tkáně více, než v případě klasických dendrimerních nosičů. Nevýhodou připraveného konjugátu byla opět absence biodegradovatelných částí hvězdice. Také molární hmotnost hvězdice nebyla příliš vysoká pro výraznější uplatnění EPR efektu.

Asymetricky substituované dendrimery (autory nazvané „*bow-tie*“ – motýlek, vázanka) byly složeny z polyesterových dendrimerů (G1 – G3), na jejichž jeden dendron byly navázány PEG řetězce ($\overline{M}_w = 5\,000 - 20\,000 \text{ g.mol}^{-1}$)¹⁷⁰. \overline{M}_w připravených hybridních systémů se pohybovala mezi 20 000 a 123 000 g.mol^{-1} v závislosti na použité generaci dendrimeru a délce řetězce PEG. Ve všech případech se jednalo o systémy s úzkou distribucí molárních hmotností (přibližně $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1,1$). V předběžných *in vivo* testech bylo zjištěno, že všechny konjugáty déle cirkulovaly v krvi a výrazně se ukládaly v pevném nádoru (melanom B16F10). Prozatím se jednalo o modelový systém, konjugát s vhodným léčivem dosud nebyl připraven. Jejich velkou nevýhodou však zřejmě bude nízký obsah navázaného léčiva. Připravené systémy totiž obsahovaly jen malý počet skupin vhodných pro vazbu léčiva.

Posledním studovaným systémem byly dendronizované lineární polymery. Jednalo se o analogii roubovaných kopolymerů. Na nosný řetězec byly „naroubovány“ dendrony. Páteř polymerního nosiče byla tvořena nedegradovatelným poly(4-hydroxystyrenem)¹⁷¹ nebo biodegradovatelným γ -substituovaným polykaprolaktonem¹⁷². V prvním případě byly připraveny dva vysokomolekulární dendronizované lineární polymery s velmi úzkou distribucí molárních hmotností. Polymer připravený z původního polymeru o $\overline{M}_w = 4\,800 \text{ g.mol}^{-1}$ a při růstu dendrimerní větve do generace G3 dosáhl $\overline{M}_w = 95\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ bez rozšíření distribuce molárních hmotností ($\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1,08$). Polymer připravený z původního polymeru o $\overline{M}_w = 10\,400 \text{ g.mol}^{-1}$ a při růstu dendronu do generace G3 dosáhl $\overline{M}_w = 112\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ a $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1,02$. V druhém případě byl připraven dendronizovaný polymer o $\overline{M}_w = 80\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ a $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1,2$ (původní polymer měl $\overline{M}_w = 12\,300 \text{ g.mol}^{-1}$, $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1,04$; růst dendronu proběhl do G4). Tento polymer byl stabilní v kyselém prostředí (pH 5,0; 37 °C). Oproti tomu s rostoucí bazicitou prostředí rostla i rychlost degradace. Zatímco při neutrálním pH byl poločas rozpadu 16 dní, při pH 9 činil 2,5 dne. V obou případech byla v předběžných *in vivo* testech zjištěna prodloužená doba cirkulace v krvi¹⁷³.

Stejně jako u výše popsaných asymetricky substituovaných dendrimerů i v případě dendronizovaných lineárních polymerů se jednalo o modelový systém, polymerní nosiče nenesly žádné léčivo. Navázání léčiva totiž může výrazně změnit farmakokinetiku celého systému, konjugát s léčivem se např. může více akumulovat v některých orgánech. Proto lze jen těžko odhadovat, zda budou tyto konjugáty působit protinádorově. Nespornou výhodou dendronizovaných lineárních kopolymerů oproti asymetricky substituovaným dendrimerům je dostatečný počet funkčních skupin, na které je možné navázat léčivo, případně směřující jednotku.

2.5.2.5 Micelární systémy

Jiným přístupem jak využít EPR efektu ke směřování léčiv do pevných nádorů je použití nadmolekulárních systémů, polymerních micel. V případě micel, kdy se jedná o dynamický systém složený z relativně malých unimerů, není principiálně nutné uvažovat o biodegradabilitě celého polymeru, protože k vyloučení polymeru (nosiče) z organismu může dojít po uvolnění léčiva a rozpadu micely na unimery. Kritické micelární koncentrace polymerních micel jsou však často nízké a rozpad micely na unimery je tedy pomalý. Proto je vhodné použít biodegradovatelné micely, nebo přesněji, použít k přípravě micel blokový kopolymer, jehož alespoň jeden blok je degradovatelný. Proto bývají pro studie micelárních systémů připravovány blokové kopolymery, jejichž hydrofobní část je tvořena biodegradovatelnými polymery (viz kapitola 2.3.3). Jiné přístupy bývají navrhovány jen zřídka. Příkladem nového přístupu může být nedávno publikovaný micelární systém nesoucí hydrazonovou vazbou vázaný DOX. Tento systém vychází z představy, že v endosomech nádorových buněk dochází v důsledku kyselě katalyzované hydrolýzy k uvolnění hydrazonově vázaného hydrofobního DOX, a tím i k výrazné hydrofilizaci původně hydrofobního bloku, což vede k rozpouštění polymeru a rozpadu micel¹²³.

3. Cíle disertační práce

Hlavním cílem této disertační práce je příprava a studium vlastností vodorozpustných polymerních nosičů léčiv na bázi kopolymerů HPMA umožňujících pH-řízenou aktivaci léčiva. Značná pozornost je soustředěna na vývoj polymerních nosičů pro „pasivní“ směrování cytostatik do pevných nádorů. Práce ovšem nemá být pouze teoretickou studií, její nedílnou součástí je i spolupráce s Mikrobiologickým ústavem AV ČR při biologickém testování připravených léčiv a využití těchto výsledků při návrhu a optimalizaci struktur nové generace léčiv vhodných k použití v humánní medicíně.

Předpokladem k dosažení cíle je vyřešení čtyř okruhů otázek:

1. Příprava a studium vlastností polymerních nosičů léčiv nesoucích hydrazidové skupiny
 - a) syntéza polymerních prekurzorů nesoucích hydrazidové skupiny a její optimalizace
 - b) syntéza polymer - DOX konjugátů a studium jejich vlastností v závislosti na struktuře použitého polymerního prekurzoru.
2. Příprava a studium vlastností polymerních nosičů léčiv obsahujících záporně, nebo kladně nabitě skupiny
 - a) syntéza polymerních prekurzorů nesoucích hydrazidové skupiny a nabitě funkční skupiny
 - b) syntéza polymer - DOX konjugátů a studium jejich vlastností v závislosti na jejich struktuře
3. Příprava a studium vlastností polymerních nosičů léčiv obsahujících hydrofobní substituenty
 - a) syntéza polymerních prekurzorů nesoucích hydrazidové skupiny a hydrofobní substituenty
 - b) syntéza polymer - DOX konjugátů, studium jejich uspořádání do nadmolekulárních struktur a studium jejich vlastností v závislosti na jejich struktuře
4. Příprava a studium vlastností biodegradovatelných roubovaných polymerních nosičů léčiv
 - a) syntéza vysokomolekulárních polymerních prekurzorů, obsahujících enzymolyticky degradovatelné spojky, a její optimalizace
 - b) syntéza biodegradovatelných vysokomolekulárních polymer - DOX konjugátů a studium jejich vlastností

4. Experimentální část

4.1 Syntetické postupy

4.1.1 Použité chemikálie

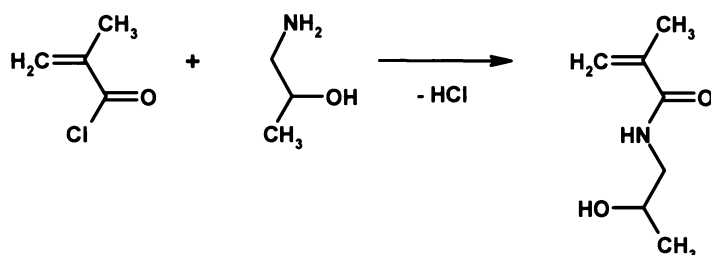
Všechna činidla a výchozí látky použité v této práci byly od firem Sigma, Fluka nebo Aldrich. 2,2-azobis(isobutyronitril) byl dvakrát rekrystalován z methanolu (bod tání (b.t.) 103 °C). Doxorubicin hydrochlorid byl zakoupen od firmy Meiji Seika. 2,4,6-Trinitrobenzen-1-sulfonová kyselina (TNBSA) byla zakoupena od firmy Serva. Methakryloylchlorid byl těsně před použitím predestilován s přidavkem inhibitoru oktylpyrokatechinu (bod varu (b.v.) 95 - 96 °C). Dodecylmethakrylát (DDM) byl zakoupen od firmy Merck, těsně před použitím byl predestilován za sníženého tlaku na olejové lázni s přidavkem inhibitoru difenylpikrylhydrazylu (b.v. 160 °C). 1-amino-2-propanol byl destilován za sníženého tlaku (b.v. 67 °C/ 2000 Pa). Dimethylformamid (DMF) byl sušen P₂O₅ a destilován za sníženého tlaku (b.v. 61 °C/ 2000 Pa). Dimethylsulfoxid (DMSO) byl sušen nad molekulovými síty Merck 4A a destilován za sníženého tlaku (b.v. 76 °C/ 2000 Pa). Ostatní rozpouštědla byla sušena bezvodým síranem sodným a následně destilována.

4.1.2 Příprava monomerů

Čistota monomerů byla kontrolována pomocí TLC (kapitola 4.2.3.1), HPLC (kapitola 4.2.3.2) a ¹H-NMR (kapitola 4.2.5).

4.1.2.1 Příprava *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA)

N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid byl připraven acylací 1-aminopropan-2-olu methakryloylchloridem v dichlormethanu (DCM) (schéma syntézy viz Obrázek 4-1)⁵⁰.

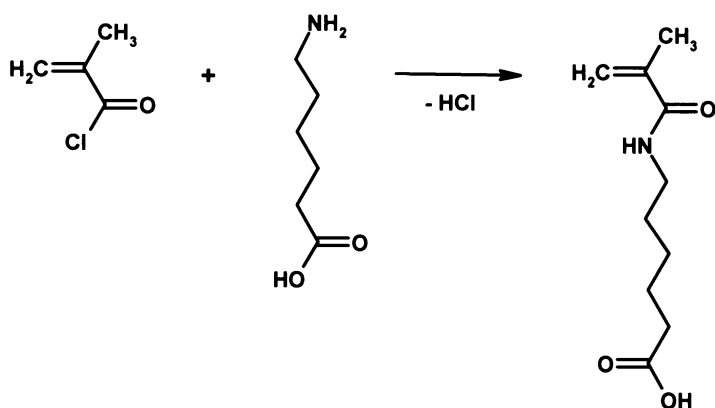


Obrázek 4-1 Schéma syntézy *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu

Vznikající HCl byl odstraňován z reakční směsi pomocí Na₂CO₃. B.t. 70 °C. Elementární analýza: vypočteno 58,72 % C, 9,15 % H, 9,78 % N; nalezeno 58,98 % C, 9,18 % H, 9,82 % N.

4.1.2.2 Příprava 6-(methakryloylamino) hexanové kyseliny (MA-εAhx-OH)

3,29 g (0,025 mol) 6-aminohexanové kyseliny a 1,00 g (0,025 mol) NaOH bylo za míchání a chlazení na 4°C rozpuštěno v 15 ml destilované vody. Z dělicích nádob bylo postupně přidáno 2,62 g methakryloylchloridu (0,025 mol, 2,5 ml) a roztok 1,00 g NaOH (0,025 mol) v 7,4 ml vody tak, aby pH zůstávalo v rozmezí 7 – 9. Po přidání všech reaktantů byla reakční směs 15 minut míchána při 4 °C a 1 h při laboratorní teplotě. Poté byla směs okyselena pomocí HCl (1 : 1) na pH = 2. Produkt byl vytřepán do ethylacetátu (5x). Organická fáze byla zbavena vody přidávkem bezvodého síranu sodného a po filtraci vakuově zahuštěna. Produkt byl krystalizován i rekrystalizován ze směsi ethylacetát : diethylether 2 : 1. Výtěžek reakce: 2,61 g (52 %). B.t. 44 – 45 °C. Elementární analýza: vypočteno 60,28 % C, 8,60 % H, 7,03 % N; nalezeno 60,06 % C, 8,10 % H, 6,79 % N. TLC: aceton, R_f = 0,75. Schéma syntézy je znázorněno na Obrázku 4-2.

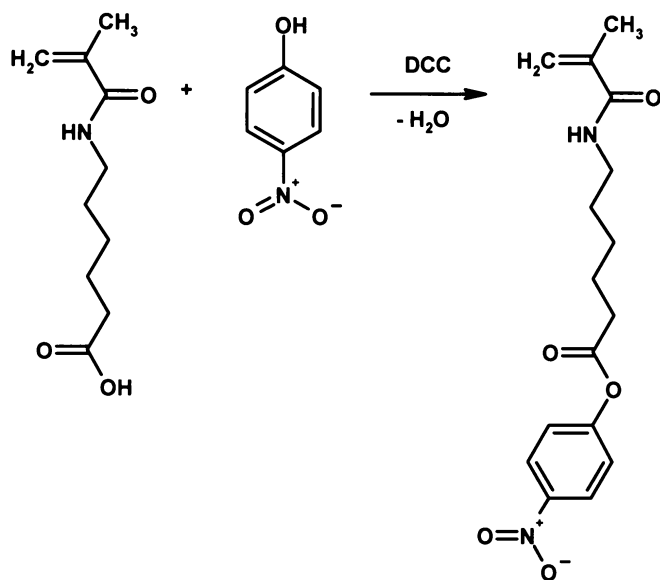


Obrázek 4-2 Schéma syntézy 6-(methakryloylamino)-hexanové kyseliny

4.1.2.3 Příprava 4-nitrofenyl 6-(methakryloylamino) hexanoátu (MA-εAhx-ONp)

2,40 g 6-(methakryloylamino)-hexanové kyseliny (0,012 mol) a 1,68 g 4-nitrofenolu (0,012 mol) bylo rozpuštěno v 22 ml čerstvě předestilovaného DMF. Po ochlazení na -10 °C byl za míchání postupně do reakční směsi přidán roztok 2,74 g (0,013 mol) konjugačního činidla *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) v 5,0 ml DMF a reakční směs byla míchána 1 h při -10 °C a 20 h při 4 °C. Vyloučená dicyklohexylmočovina (DCU) (b.t. 226 °C) byla odfiltrována na fritě S4. Reakční směs byla vakuově za sníženého tlaku zahuštěna na viskózní olej, po jehož ochlazení byl získán

krystalický produkt. Produkt byl čištěn krystalizací ze směsi chloroform : hexan 2 : 1 a rekrystalizací ze stejné směsi. Výtěžek reakce: 2,39 g (62 %). B.t. 75 - 76 °C. Elementární analýza: vypočteno 60,00 % C, 6,29 % H, 8,75 % N; nalezeno 60,19 % C, 6,44 % H, 8,74 % N. TLC: ethylacetát, $R_f = 0,75$. Schéma syntézy je znázorněno na Obrázku 4–3.

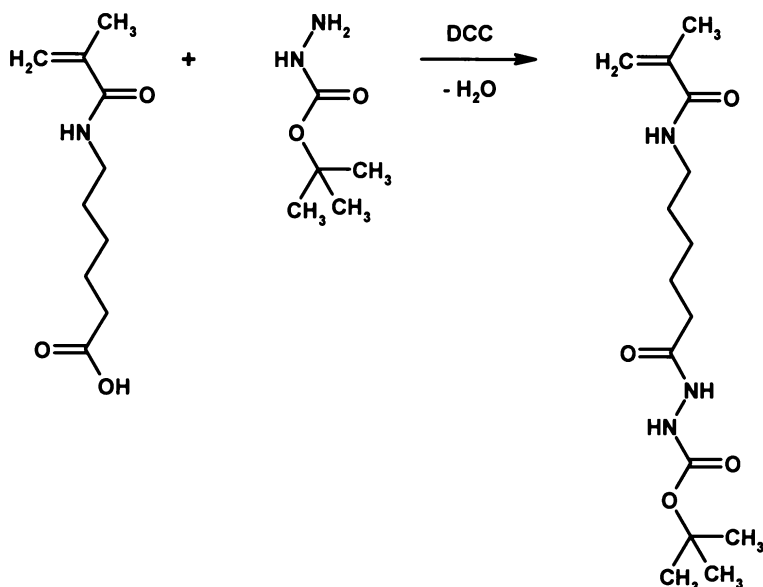


Obrázek 4-3 Schéma syntézy 4-nitrofenyl 6-(methakryloylamino) hexanoátu

4.1.2.4 Příprava N^1 -(*tert*-butoxykarbonyl)- N^2 -(6-(methakrylamido)hexanoyl) hydrazinu (MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)

8,37 g 6-(methakryloylamino) hexanové kyseliny (0,042 mol) a 5,55 g *tert*-butylkarbazátu (Boc-hydrazinu) (0,042 mol) bylo rozpuštěno v 85 ml čerstvě předestilovaného tetrahydrofuranu (THF) (Boc je zkratka pro *tert*-butoxykarbonylovou skupinu). Za míchání a chlazení na -18 °C byl postupně do reakční směsi přikapáván roztok 9,53 g DCC (0,046 mol) v 10 ml THF a reakční směs byla míchána při této teplotě 1 h a poté 20 h při 4 °C. Vyloučená DCU byla odfiltrována na fritě S4 a filtrát odpařen na vakuové odparce. Odpařený filtrát byl rozpuštěn v 120 ml ethylacetátu a zbylá volná kyselina byla odstraněna vytřepáváním do 2 % NaHCO₃. Ethylacetátová fáze byla poté vysušena bezvodým Na₂SO₄ a sušidlo bylo odstraněno filtrací. Produkt byl čištěn krystalizací ze směsi ethylacetát – hexan a rekrystalizací ze stejné směsi. Výtěžek: 6,06 g (46 %). B.t. 110 - 114 °C. Elementární analýza: vypočteno 57,70 % C, 8,33 % H, 13,46 % N; nalezeno 58,66 % C, 8,84 % H, 13,16 % N. TLC: ethylacetát : methanol 9 : 1; $R_f = 0,8$. ¹H-NMR 300 MHz ((CD₃)₂SO, 330 K): δ 1,29 m, 2H (CH₂(CH₂)₂-N); δ 1,38 s, 9H ((CH₃)₃-C); δ 1,40 - 1,54 m, 4H (CH₂CH₂CH₂CH₂-N); δ 1,95 m, 3H (CH₃-C=C); δ 2,17 t, 2H

(CO-CH₂); δ 3,26 m, 2H (N-CH₂); δ 3,91 br, 2H (NH₂); δ 5,26 a 5,60 d, 2H (CH₂=C); δ 6,10 br, 1H (NHNH₂); δ 7,68 br, 1H (NH-CH₂). Schéma syntézy je znázorněno na Obrázku 4-4.



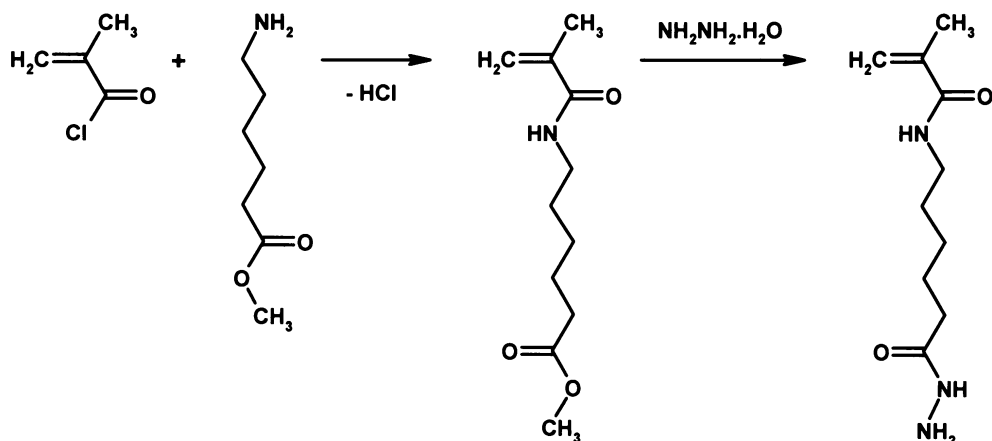
Obrázek 4-4 Schéma syntézy *N*¹-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*²-(6-(methakrylamido)hexanoyl)hydrazinu

4.1.2.5 Příprava (6-(methakryloylamino) hexanoyl)hydrazinu (MA-εAhx-NHNH₂)

5 g methyl 6-aminohexanoát hydrochloridu (0,028 mol) a 9,5 ml diisopropylethylaminu (0,055 mol) a přibližně 20 mg oktylpyrokatechinu bylo při laboratorní teplotě rozpuštěno v 35 ml DCM a ochlazeno na 0 °C. K míchanému chlazenému roztoku bylo postupně přikapáváno 2,82 g methakryloylchloridu (0,027 mol, 2,6 ml) v 5 ml DCM. Po nadávkování celého objemu byla směs ještě 0,5 h míchána při 0 °C a 2 h při laboratorní teplotě. Nezareagovaný diisopropylethylamin a vodorozpustné produkty byly odstraněny vytřepáváním z ethylacetátu do 2 % NaHCO₃. DCM fáze byla poté vysušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a rozpouštědlo odpařeno.

Olejovitá kapalina obsahující meziprodukt methyl 6-(methakryloylamino) hexanoát byla rozpuštěna v 16 ml methanolu, do intenzivně míchaného roztoku byly při laboratorní teplotě přidány 4 ml hydrazin hydrátu (0,082 mol). Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po 4 h byla reakční směs odpařena na vakuové odparce za vakua vodní vývěvy, olejovitá kapalina byla naředěna methanolem a reakční směs znovu odpařena. Tento postup byl několikrát opakován, dokud se po odpaření neobjevil krystalický produkt. Produkt byl čistěn krystalizací a rekrystalizací z ethylacetátu. Výtěžek: 3,84 g (65 %). B.t. 80 - 81 °C. Elementární analýza: vypočteno 56,32 % C, 8,98 % H, 19,70 % N; nalezeno

56,27 % C, 8,88 % H, 19,75 % N. TLC: ethylacetát : methanol 5 : 1; $R_f = 0,2$. $^1\text{H-NMR}$ 300 MHz (CDCl_3 , 297 K): δ 1,35 m, 2H ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{-N}$); δ 1,50 - 1,69 m, 4H ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-N}$); δ 1,95 m, 3H (CH_3); δ 2,17 t, 2H (CO-CH_2); δ 3,26 m, 2H (N-CH_2); δ 3,91 br, 2H (NH_2); δ 5,30 a 5,67 d, 2H ($\text{CH}_2=\text{C}$); δ 6,10 br, 1H, (NHNH_2); δ 7,45 br, 1H (NH-CH_2). Schéma syntézy je znázorněno na Obrázku 4–5.



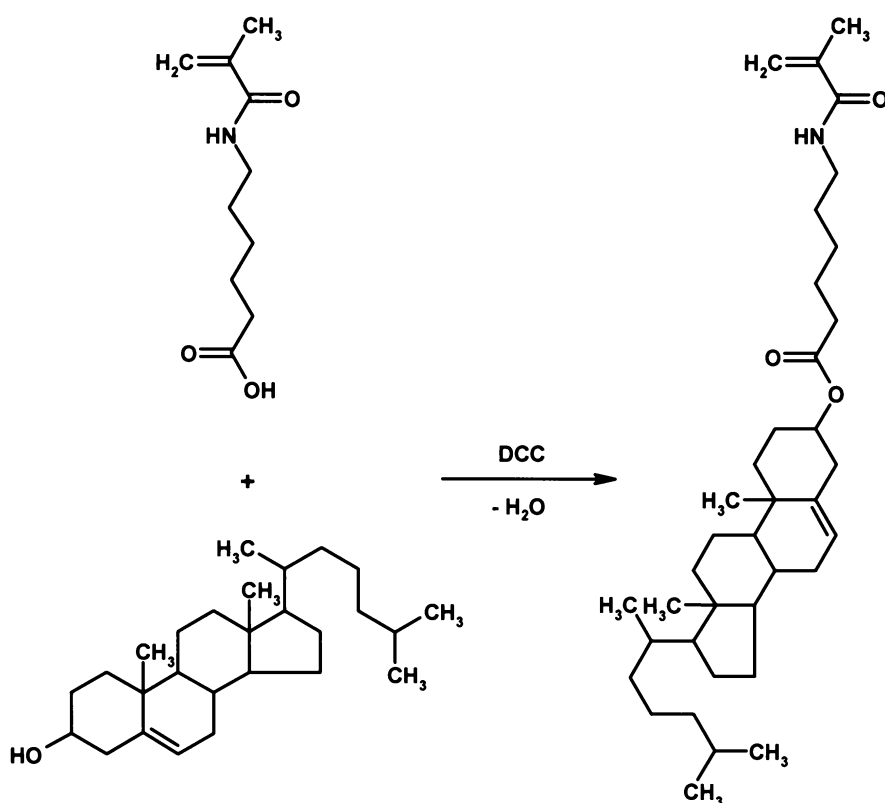
Obrázek 4-5 Schéma syntézy (6-(methakryloylamino) hexanoyl)hydrazinu

4.1.2.6 Příprava cholesteryl 6-(methakryloylamino) hexanoátu (MA- ϵ Ahx-cholesteryl)

17-(1,5-Dimethyl-hexyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahydro-1H-cyklopenta[a]phenanthren-3-yl 6-(methakryloylamino) hexanoát (MA- ϵ Ahx-cholesteryl) byl připraven reakcí 6-(methakryloylamino) hexanové kyseliny (MA- ϵ Ahx-OH) s cholesterolem v přítomnosti DCC v THF. (Schéma syntézy viz Obrázek 4-6).

250 mg MA- ϵ Ahx-OH (1,26 mmol) a 456 mg cholesterolu (1,26 mmol) bylo rozpuštěno v 3,75 ml čerstvě předestilovaného THF. 1,2 molární nadbytek DCC (311 mg, 1,51 mmol) byl rozpuštěn v 0,75 ml THF, do roztoku bylo přidáno několik krystalků *N,N'*-dimethylaminopyridinu. Oba roztoky byly ochlazeny na $-18\text{ }^\circ\text{C}$. Po 1 h po ochlazení byly roztoky slity a reakční směs byla ponechána 1 h při $-18\text{ }^\circ\text{C}$ a 16 h při $4\text{ }^\circ\text{C}$. Nezreagovaný DCC byl odstraněn reakcí s 50 μl koncentrované kyseliny octové za míchání při laboratorní teplotě. Za 0,5 h byla vyloučená DCU odstraněna filtrací, THF byl odpařen a produkt rozpuštěn v ethylacetátu. Zbytky vyloučené DCU byly opět odstraněny filtrací. Nezreagovaná MA- ϵ Ahx-OH byla odstraněna vytřepáváním do 2 % NaHCO_3 . Organická fáze byla vysušena bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrována a rozpouštědlo odpařeno. MA- ϵ Ahx-cholesteryl byl separován krystalizací z acetonu a přečištěn rekrystalizací.

Výtěžek: 329 mg (46 %). B.t. 93 - 95 °C. Elementární analýza: vypočteno 78,25 % C, 10,83 % H, 2,47 % N, nalezeno 78,73 % C, 10,85 % H, 2,34 % N, TLC: ethylacetát : hexan 1 : 1, R_f = 0,8. ¹H-NMR 300 MHz (CDCl₃, 297 K): δ 3,30 m, 1H (CH₂-NH); δ 4,58 m, 1H (CO-O-CH₂-(CH₂)₂); δ 5,29 a 5,65 d (2H (CH₂=C)); δ 5,81 br, 1H (NH); vybrané píky z cholesterylové části molekuly: δ 5,35 t, 1H (C=CH-CH₂); δ 0,66 s, 3H (C(18)H₃).



Obrázek 4-6 Schéma syntézy cholesteryl 6-(methakryloylamino) hexanoátu

4.1.2.7 Ostatní monomery

Ostatní monomery byly připraveny dříve popsánymi způsoby. Schotten-Baumannovou acylací dipeptidu glycyglycinu methakryloylchloridem byl získán *N*-methakryloylglycyglycin (MA-GG-OH)¹⁹.

Acylací dipeptidu glycyfenylalaninu methakryloylchloridem, jeho převedením na ONp ester a následnou reakcí s leucylglycinem byl připraven *N*-methakryloylglycy-D,L-fenylalanylleucylglycin (MA-GFLG-OH). Reakcí MA-GFLG-OH s 4-nitrofenolem byl pomocí DCC připraven 4-nitrofenyl ester (ONp) *N*-methakryloylglycy-D,L-fenylalanylleucylglycinu (MA-GFLG-ONp)⁵¹.

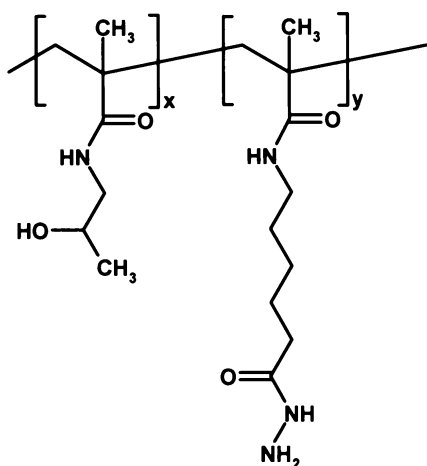
Reakcí MA-GFLG-OH s 4,5-dihydrothiazol-2-thiolem byl pomocí DCC připraven thiazolidin-2-thion (TT) *N*-methakryloylglucyl-D,L-fenylalanylleucylglycinu (MA-GFLG-TT)¹⁷⁴.

N-(2-(dimethylamino)ethyl)methakrylamid hydrochlorid (DMAEMA) byl připraven acylací 2-(dimethylamino)ethylaminu methakryloylchloridem¹⁷⁵.

2-(trimethylammonio)ethylmethakrylamid chlorid (TMAEMA) byl připraven dvoustupňovou syntézou. Nejprve byl acylací methakryloylchloridem v přebytku 2-(dimethylamino)ethylaminu syntetizován *N*-(2-(dimethylamino)ethyl)methakrylamid, který byl posléze kvarternizován methylchloridem na TMAEMA¹⁷⁵.

4.1.3 Příprava kopolymerů na bázi HPMA obsahujících hydrazidové skupiny

Statistické kopolymery na bázi HPMA, které obsahovaly hydrazidové skupiny, poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂) byly připraveny třemi různými způsoby. Schéma struktury tohoto kopolymeru je znázorněna na Obrázku 4-7.



Obrázek 4-7 Schéma struktury kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂)

Připravené kopolymery byly charakterizovány molární hmotností (kapitola 4.2.3.4), obsahem hydrazidových skupin (kapitola 4.2.1.3) a případně obsahem dalších funkčních skupin nacházejících se ve struktuře připravených kopolymerů.

4.1.3.1 Syntéza kopolymerů na bázi HPMA využívající monomer MA- ϵ Ahx-ONp

Kopolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-ONp) byl připraven radikálovou srážecí kopolymerizací HPMA a MA- ϵ Ahx-ONp v acetonu⁴⁹. Kopolymer poly(HPMA-*co*-

-MA- ϵ Ahx-NHNH₂), **P(ONp)**, byl připraven hydrazinolýzou polymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-ONp) hydrazin hydrátem v methanolu.

Příklad kopolymerizace: 849 mg (5,93 mmol) HPMA, 100 mg (0,31 mmol) MA- ϵ Ahx-ONp (12,4 hm.% monomerů) a 46 mg (0,28 mmol) (0,6 hm.%) ABIN bylo rozpuštěno v 8,4 ml acetonu. Ampule s polymerizační směsí byla 10 min probublávána dusíkem, zatavena a umístěna na 22 h do termostatu vyhřívaného na 50 °C. Vzniklý polymer byl izolován filtrací, rozpuštěn v methanolu a přesrážen do dvacetinásobného množství acetonu. Po odfiltrování a promytí acetonem a diethyletherem byl polymer usušen do konstantní hmotnosti. Obsah ONp skupin byl stanoven spektroskopicky (kap. 4.2.1.1).

250 mg poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-ONp) (0,05 mmol ONp) bylo rozpuštěno v 2,5 ml methanolu a za intenzivního míchání bylo přidáno 25 μ l NH₂NH₂.H₂O (0,5 mmol). Po 1 h byla reakční směs naředěna 25 ml destilované vody a dialyzována proti destilované vodě 2 dny. Roztok polymeru byl poté lyofilizován.

4.1.3.2 Syntéza kopolymerů na bázi HPMA využívající monomer MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc

Kopolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc) byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA a MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc v methanolu při 60 °C. Poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂), **P(Boc)**, byl získán odstraněním chránící skupiny Boc koncentrovanou kyselinou trifluorooctovou (TFA).

Příklad kopolymerizace: 22,8 g (0,159 mol) HPMA, 3,8 g (12,2 mmol) MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc (14 hm.% monomerů) a 1,9 g (11,6 mmol) ABIN (1 hm.%) bylo rozpuštěno v 170 ml methanolu. Ampule s roztokem polymerizační směsi byla 10 min probublávána dusíkem, poté zatavena a na 23 h umístěna do termostatu vyhřívaného na 60 °C. Reakční směs byla vysrážena do 2,2 l směsi aceton : diethylether 2 : 1. Vyloučený polymer byl odfiltrován na fritě S4, rozpuštěn ve 150 ml methanolu a vysrážen do 2 l stejné srážecí směsi. Poté byl polymer sušen do konstantní hmotnosti.

15 g poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc) bylo rozpuštěno ve 150 ml TFA. Po 15 minutách byla směs opakovaně odpařována s methanolem (v pětinašobném přebytku) na vakuové odparce za vakua vodní vývěvy, dokud se nevyloučil pevný podíl polymeru. Produkt byl rozpuštěn ve 100 ml vody a pH tohoto roztoku bylo upraveno na pH = 7 – 8 pomocí 1 M NaOH. Nízkomolekulární příměsi byly z roztoku polymeru

odstraněny pomocí dialýzy proti vodě (2 dny) a polymer byl z roztoku izolován následnou lyofilizací.

4.1.3.3 Syntéza kopolymerů na bázi HPMA využívající monomer MA- ϵ Ahx-NHNH₂

Kopolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂), **P(OMe)**, byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA s MA- ϵ Ahx-NHNH₂ v methanolu při 60 °C.

Příklad kopolymerizace: 468 mg (3,27 mmol) HPMA, 52 mg (0,24 mmol) MA- ϵ Ahx-NHNH₂ (14 hm.% monomerů) a 37 mg (0,22 mmol) ABIN (1 hm.%) bylo rozpuštěno v 4 ml methanolu. Ampule s roztokem polymerizační směsi byla 10 min probublávána dusíkem, poté zatavena a na 17 h umístěna do termostatu vyhřívaného na 60 °C. Reakční směs byla vysrážena do 80 ml ethylacetátu. Vyloučený polymer byl odfiltrován na fritě S4, rozpuštěn ve 4 ml methanolu a vysrážen do 80 ml ethylacetátu. Finální polymer byl sušen do konstantní hmotnosti.

4.1.4 Příprava terpolymerů na bázi HPMA obsahujících hydrazidové skupiny a další záporně či kladně nabitě skupiny

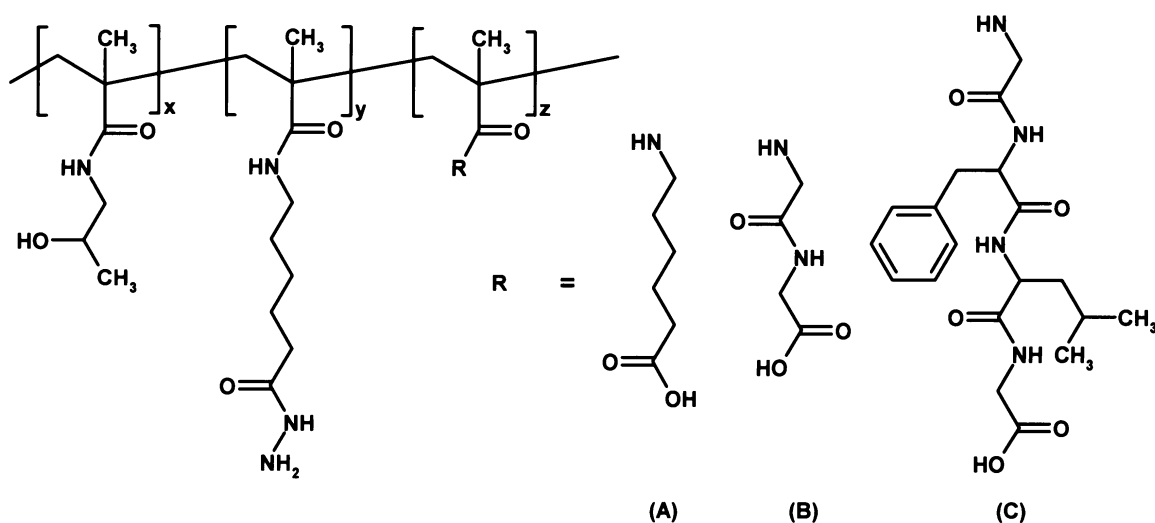
Připravené terpolymery byly charakterizovány molární hmotností (kapitola 4.2.3.4), velikostí částic (R_H) a jejich distribucí (kapitola 4.2.4), obsahem hydrazidových skupin (kapitola 4.2.1.3) a obsahem záporně či kladně nabitých skupin.

4.1.4.1 Příprava terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA-GFLG-OH)

Terpolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA-GFLG-OH), **P-GFLG-OH**, byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA s MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc a MA-GFLG-OH v methanolu při 60 °C a následným ochráněním hydrazidových skupin. Schéma struktury terpolymeru je znázorněno na Obrázku 4-8.

Příklad kopolymerizace: 233 mg (1,63 mmol) HPMA, 46 mg (0,15 mmol) MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc, 21 mg (0,05 mmol) MA-GFLG-OH (14 hm.% monomerů) a 22 mg (0,13 mmol) ABIN (1 hm.%) bylo rozpuštěno v 2,3 ml methanolu. Ampule s roztokem polymerizační směsi byla 10 min probublávána dusíkem, poté zatavena a na 23 h umístěna do termostatu vyhřívaného na 60 °C. Reakční směs byla vysrážena do 50 ml acetonu a sraženina byla izolována centrifugací. Vzniklý polymer byl přesrážen z methanolu do diethyletheru, odfiltrován na fritě S4 a byl sušen do konstantní hmotnosti. Chránící skupina Boc byla odstraněna koncentrovanou TFA podle postupu popsáném

v kapitole 4.1.3.2. Terpolymer byl charakterizován stanovením obsahu -COOH skupin titrací karboxylů (kapitola 4.2.2).



Obrázek 4-8 Schéma struktury terpolymerů poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA- ϵ Ahx-OH) (A), poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA-GG-OH) (B) a poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA-GFLG-OH) (C)

4.1.4.2 Příprava terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA-GG-OH)

Terpolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA-GG-OH), **P-GG-OH**, byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA s MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc a MA-GG-OH v methanolu při 60°C a následným odchráněním hydrazidových skupin. Schéma struktury terpolymeru je znázorněno na Obrázku 4-8.

Postup kopolymerizace, izolace terpolymeru i odchránění hydrazidových skupin byl shodný s postupem uvedeným v kapitole 4.1.4.1. Terpolymer byl charakterizován stanovením obsahu -COOH skupin titrací karboxylů (kapitola 4.2.2).

4.1.4.3 Příprava terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA- ϵ Ahx-OH)

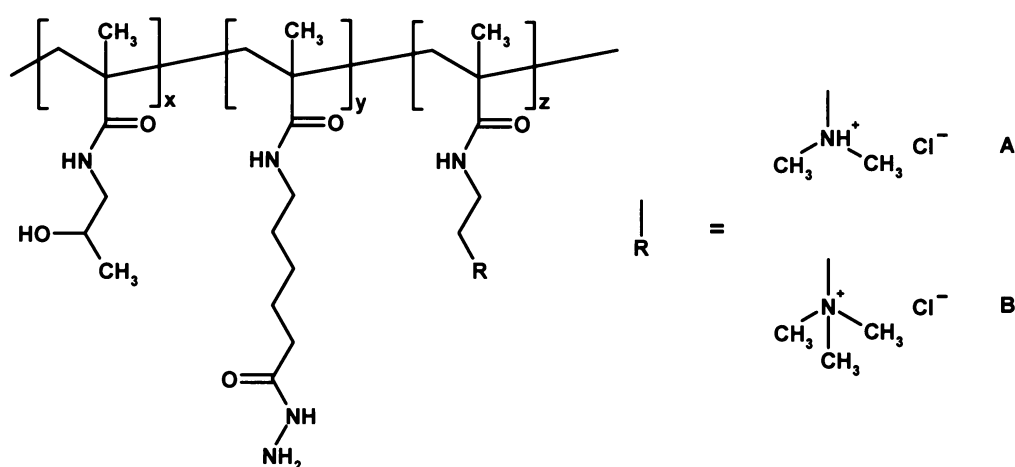
Terpolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA- ϵ Ahx-OH), **P- ϵ Ahx-OH**, byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA s MA- ϵ Ahx-NHNH₂ a MA- ϵ Ahx-OH v methanolu při 60 °C. Schéma struktury terpolymeru je znázorněna na Obrázku 4-8.

Příklad kopolymerizace: 822 mg (5,74 mmol) HPMA, 112 mg (0,53 mmol) MA- ϵ Ahx-NHNH₂, 66 mg (0,33 mmol) MA- ϵ Ahx-OH (14 hm.% monomerů) a 71 mg (0,43 mmol) ABIN (1 hm.%) bylo rozpuštěno v 7,7 ml methanolu. Reakční směs byla vysrážena do 140 ml ethylacetátu. Vyloučený polymer byl odfiltrován na fritě S4,

rozpuštěn v 8 ml methanolu a vysrážen do 160 ml ethylacetátu. Finální produkt byl sušen do konstantní hmotnosti. Terpolymer byl charakterizován stanovením obsahu -COOH skupin titrací karboxylů (kapitola 4.2.2).

4.1.4.4 Příprava terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-DMAEMA)

Terpolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-DMAEMA), **P-DMAE**, byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA a MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc a DMAEMA v methanolu při 60 °C následovanou odchráněním hydrazidových skupin. Schéma struktury terpolymeru je znázorněno na Obrázku 4-9.



Obrázek 4-9 Schéma struktury terpolymerů poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-DMAEMA) (A) a poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-TMAEMA) (B)

Příklad kopolymerizace: 391,3 mg (2,73 mmol) HPMA, 78,4 mg (0,25 mmol) MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc, 30,3 mg (0,16 mmol) DMAEMA (14 hm.% monomerů) a 35,7 mg (0,22 mmol) ABIN (1 hm.%) bylo rozpuštěno v 3,8 ml methanolu. Ampule s roztokem polymerizační směsi byla 10 min probublávána dusíkem, poté zatavena a na 23 h umístěna do termostatu vyhřívaného na 60 °C. Postup separace a odchránění hydrazidových skupin byl shodný s postupem uvedeným v kapitole 4.1.4.1. Obsah *N*-(2-(dimethylamino)ethyl) (DMAE) skupin byl zjištěn elementární analýzou polymeru pomocí stanovení obsahu chloru.

4.1.4.5 Příprava terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-TMAEMA)

Terpolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-TMAEMA), **P-TMAE**, byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA a MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc

a TMAEMA v methanolu při 60 °C následovanou odchráněním hydrazidových skupin. Schéma struktury terpolymeru je znázorněno na Obrázku 4-9.

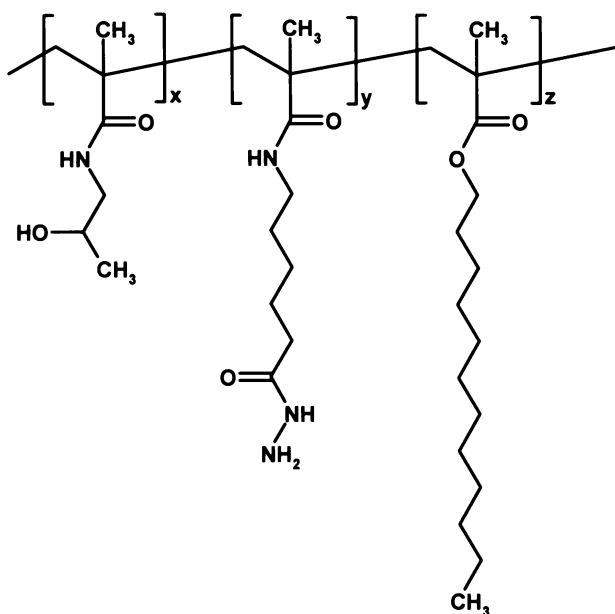
Postup kopolymerizace, izolace terpolymeru i odchránění hydrazidových skupin byl shodný s postupem uvedeným v kapitole 4.1.4.4. Obsah 2-(trimethylammonio)ethyl (TMAE) skupin byl zjištěn elementární analýzou polymeru pomocí stanovení obsahu chloru.

4.1.5 Příprava terpolymerů na bázi HPMA obsahujících hydrazidové skupiny a hydrofobní substituenty

Připravené terpolymery byly charakterizovány molární hmotností (kapitola 4.2.3.4), velikostí částic (R_H) a jejich distribucí (kapitola 4.2.4), obsahem hydrofobního substituentu (kapitoly 4.2.5 a 4.2.6) a obsahem hydrazidů (kapitola 4.2.1.3).

4.1.5.1 Příprava terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-DDM)

Terpolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-DDM), **P-dodecyl**, byl připraven ve dvou krocích. Prvním krokem byla roztoková radikálová kopolymerizace HPMA s MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc a DDM v methanolu při 60 °C. V druhém kroku byly odstraněny chránící skupiny pomocí TFA. Schéma struktury terpolymeru je znázorněno na Obrázku 4-10.

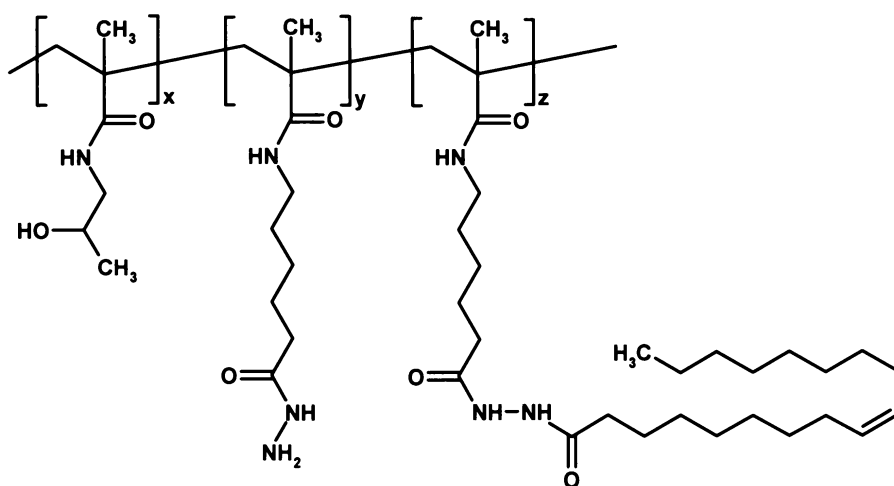


Obrázek 4-10 Schéma struktury terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-DDM)

Příklad přípravy **P-dodecyl-1**: 818 mg (5,71 mmol) HPMA, 158 mg (0,506 mmol) MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc, 24 mg (0,095 mmol) čerstvě predestilovaného DDM (14 hm.% monomerů) a 71,4 mg (0,435 mmol) ABIN (1 hm.%) bylo rozpuštěno v 7,7 ml methanolu. Ampule s roztokem polymerizační směsi byla 10 min probublávána dusíkem, poté zatavena a na 20 h umístěna do termostatu na 60 °C. Reakční směs byla vysrážena do 175 ml směsi aceton : diethylether 3 : 1 a sraženina odcentrifugována. Vzniklý polymer byl přesrážen z methanolu do stejné směsi, zfiltrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti. 288 mg polymeru s chráněnými hydrazidovými skupinami bylo rozpuštěno v 3 ml směsi TFA : triisopropylsilan : voda 95 : 2,5 : 2,5. Po 15 minutách byla směs opakovaně odpařována s methanolem (v pětinasobném přebytku) na vakuové odparce za vakua vodní vývěvy, dokud se nevyloučil pevný podíl polymeru. Produkt byl rozpuštěn v 10 ml vody a pH tohoto roztoku bylo upraveno na pH = 7 – 8 pomocí 1 M NaOH. Nízkomolekulární příměsi byly z roztoku polymeru odstraněny pomocí dialýzy proti vodě (2 dny) a polymer byl z roztoku izolován lyofilizací.

4.1.5.2 Příprava terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-oleoyl)

Terpolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-oleoyl), **P-oleoyl**, byl připraven polymer-analogickou reakcí hydrazidových skupin poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂) se sukcinimidyl oleátem. Schéma struktury terpolymeru je znázorněno na Obrázku 4-11.

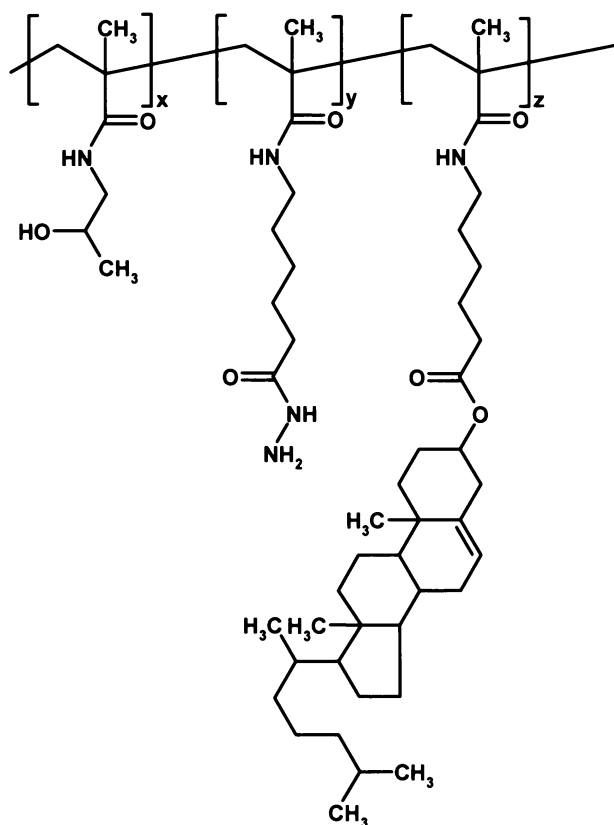


Obrázek 4-11 Schéma struktury terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-oleoyl)

Příklad přípravy **P-oleoyl-2**: 209 mg poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂) (0,100 mmol -NHNH₂) bylo rozpuštěno v 1 ml methanolu. 10 mg sukcinimidyl oleátu (0,027 mmol) bylo rozpuštěno v 0,2 ml methanolu a přidáno do míchaného roztoku polymeru. Reakce probíhala 5 h při laboratorní teplotě, a pak 16 h při 4 °C. Reakční směs byla poté vysrážena do ethylacetátu a vysrážený polymer oddělen centrifugací. Dále byl polymer rozpuštěn v methanolu, vysrážen do ethylacetátu, přefiltrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti.

4.1.5.3 Příprava terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA- ϵ Ahx-cholesteryl)

Terpolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA- ϵ Ahx-cholesteryl), **P-cholesteryl**, byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA, MA- ϵ Ahx-NHNH₂ a MA- ϵ Ahx-cholesteryl v methanolu při 60 °C. Schéma struktury kopolymeru je znázorněno na Obrázku 4-12.



Obrázek 4-12 Schéma struktury terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA- ϵ Ahx-cholesteryl)

Příklad přípravy **P-cholesteryl-2**: 601,3 mg (4,20 mmol) HPMA, 69,3 mg (0,327 mmol) MA- ϵ Ahx-NHNH₂ a 79,46 mg (0,140 mmol) MA- ϵ Ahx-cholesteryl

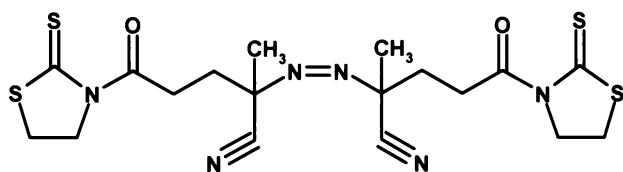
(14 hm.% monomerů) a 53,6 mg (0,326 mmol) ABIN (1 hm.%) bylo rozpuštěno v 5,76 ml methanolu. Ampule s roztokem polymerizační směsi byla 15 min probublávána dusíkem, poté zatavena a na 20 h umístěna do termostatu na 60 °C. Malá část nerozpustného podílu se rozpustila po ohřátí směsi na 60 °C. Reakční směs byla vysrážena do 150 ml ethylacetátu a vysrážený polymer oddělen centrifugací. Dále byl polymer přesrážen z methanolu do ethylacetátu, odfiltrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti.

4.1.6 Příprava roubovaných kopolymerů na bázi HPMA obsahujících hydrazidové skupiny

Roubované kopolymery byly charakterizovány molární hmotností (kapitola 4.2.3.4) a obsahem hydrazidových skupin (kapitola 4.2.1.3).

4.1.6.1 Příprava thiazolidin-2-thionu 4,4'-azobis(kyanovalerové kyseliny)

Thiazolidin-2-thion 4,4'-azobis(kyanovalerové kyseliny) (ABIK-2TT) (Obrázek 4-13) byl připraven reakcí 4,5-dihydrothiazol-2-thiolu s 4,4'-azobis(kyanovalerovou kyselinou) (ABIK) v přítomnosti DCC v THF¹⁷⁶.

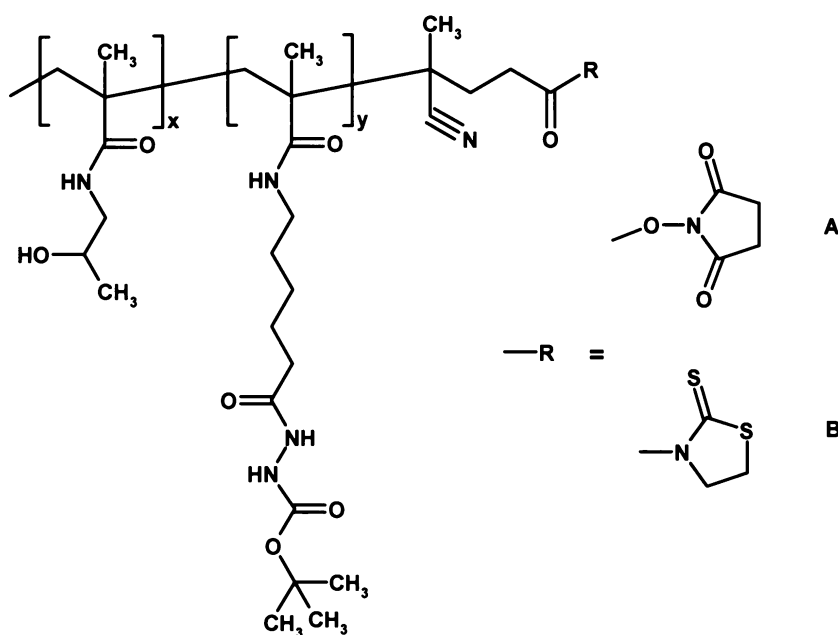


Obrázek 4-13 Struktura thiazolidin-2-thionu 4,4'-azobis(kyanovalerové kyseliny)

5 g ABIK (0,018 mol) a 8,83 g DCC (0,021 mol) bylo rozpuštěno v 30 ml čerstvě předestilovaného THF a ochlazeno na -18 °C. 4,47 g 4,5-dihydrothiazol-2-thiolu (0,019 mol) bylo rozpuštěno v 10 ml THF, ochlazeno na -18 °C a přidáno k roztoku ABIK a DCC. Reakční směs byla ponechána při -18 °C 2 h a poté 20 h při 4 °C. Do reakční směsi byly přidány 0,2 ml kyseliny octové, aby zreagovala zbývající DCC. Po 1 h byla vyloučená DCU odstraněna filtrací na fritě S4 a filtrát byl odpařen na vakuové odparce do sucha. Produkt byl rozpuštěn v DCM a nerozpuštěné zbytky (další podíl DCU) odstraněny filtrací. Produkt byl čištěn dvakrát krystalizací z DCM. Výtěžek: 3,7 g (43 %). B.t. 128 – 130 °C. Elementární analýza: vypočteno 44,50 % C, 4,95 % H, 17,3 % N, 26,50 % S; nalezeno 45,10 % C, 4,96 % H, 16,89 % N, 26,05 % S. TLC: ethylacetát : aceton 3 : 1, R_f = 0,8.

4.1.6.2 Příprava semitelechelického kopolymery poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-OSu

Kopolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-OSu, **SP-OSu**, byl připraven dvoukrokovou syntézou. Nejdříve byl roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA a MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc v ethanolu při 50 °C v přítomnosti iniciátoru AIBN připraven kopolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-COOH. Karboxylové skupiny kopolymeru byly následně aktivovány na reaktivní sukcinimidový ester (OSu) pomocí DCC. Schéma struktury kopolymeru je znázorněno na Obrázku 4-14.



Obrázek 4-14 Schéma struktury semitelechelických kopolymerů poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-OSu (A) a poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-TT (B)

3,33 g (23,2 mmol) HPMA, 674 mg (2,16 mmol) MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc (12 hm.% monomerů) a 600 mg (2,14 mmol) AIBN (1,8 hm.%) bylo rozpuštěno v 35 ml ethanolu. Roztok byl přelit do ampule a 10 min probubláván dusíkem. Ampule byla zatavena a umístěna do vyhřívaného termostatu na 50 °C. Po 21 h polymerizace byla reakční směs vysrážena do 700 ml acetonu a vysrážený polymer oddělen centrifugací. Polymer byl přesrážen z methanolu do acetonu, odfiltrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti. Polymer byl charakterizován stanovením obsahu -COOH skupin titrací karboxylů (kapitola 4.2.2) a stanovením obsahu hydrazidových skupin (kapitola 4.2.1.3) po odstranění Boc skupin dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.3.2.

400 mg polymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-COOH (0,027 mmol -COOH) bylo rozpuštěno v 1,75 ml DMF. 27,5 mg DCC (0,133 mmol) a 15,4 mg *N*-hydroxysukcinimidu (0,133 mmol) bylo rozpuštěno v 0,2 ml DMF a přidáno

k míchanému a chlazenému (4 °C) roztoku polymeru. Reakční směs byla míchána 1,5 h při 4 °C a 2 h při laboratorní teplotě. Polymer byl izolován srážením reakční směsi do 30 ml acetonu a filtrací na fritě S4. Po usušení do konstantní hmotnosti byl vzorek skladován pod argonem při -18 °C.

4.1.6.3 Příprava semitelechelického kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-TT

Kopolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-TT, **SP-TT**, byl připraven roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA a MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc v DMSO při 60 °C v přítomnosti iniciátoru ABIK-2TT. Schéma struktury kopolymeru je znázorněno na Obrázku 4-14.

367,5 mg (2,57 mmol) HPMA, 70 mg (0,224 mmol) MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc (14 hm.% monomerů) a 140 mg (0,290 mmol) ABIK-2TT (4 hm.%) bylo naváženo přímo do polymerizační ampule, do které bylo přilito 2,7 ml DMSO. Po 10 min probublávání dusíkem byla ampule zatavena a umístěna do termostatu vyhřívaného na 60 °C. K rozpuštění všech reaktantů došlo do 15 min po ohřátí polymerizační směsi na 60 °C. Po 6 h polymerizace při 60 °C byla reakční směs vysrážena do 80 ml směsi aceton : diethylether 2 : 1 a vysrážený polymer byl oddělen centrifugací. Polymer byl přesrážen z methanolu do stejné srážecí směsi, odfiltrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti. Polymer byl charakterizován spektroskopickým stanovením obsahu TT skupin (kapitola 4.2.1.2).

4.1.6.4 Příprava kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA-GFLG-NHNH₂)

Kopolymer poly(HPMA-*co*-MA-GFLG-NHNH₂), **P'-GFLG-NHNH₂**, byl připraven hydrazinolýzou kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA-GFLG-ONp) hydrazin hydrátem v methanolu. Kopolymer poly(HPMA-*co*-MA-GFLG-ONp) byl připraven radikálovou srážecí kopolymerizací HPMA s MA-GFLG-ONp v acetonu¹⁹.

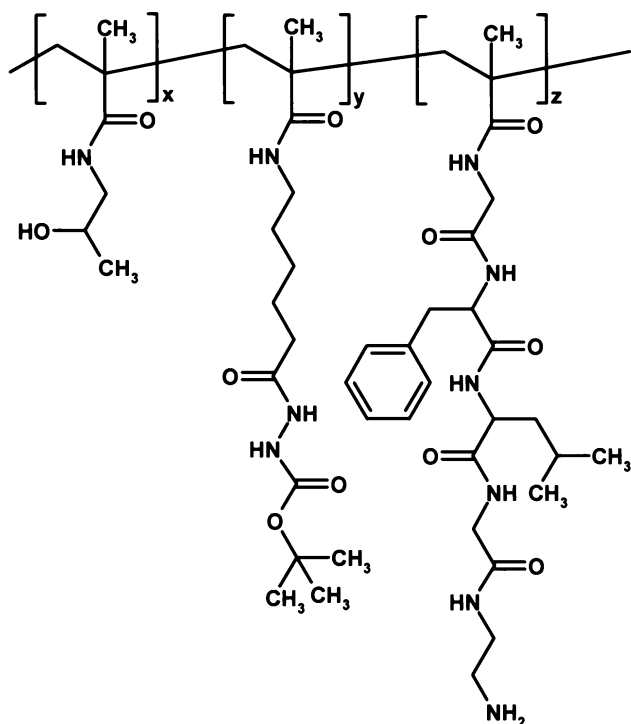
1,43 g (10,0 mmol) HPMA, 580 mg (1,0 mmol) MA-GFLG-ONp (12,4 hm.% monomerů) a 96 mg (0,6 mmol) ABIN (0,6 hm.%) bylo rozpuštěno v 17,5 ml acetonu. Ampule s polymerizační směsí byla 10 min probublávána dusíkem, zatavena a umístěna na 22 h do termostatu vyhřívaného na 50 °C. Vysrážený polymer byl izolován filtrací na fritě S4, rozpuštěn v methanolu a přesrážen do dvacetinásobného množství acetonu. Po odfiltrování a promytí acetonem a diethyletherem byl polymer usušen do konstantní

hmotnosti. Polymer byl charakterizován spektroskopickým stanovením obsahu ONp skupin (kapitola 4.2.1.1).

400 mg poly(HPMA-*co*-MA-GFLG-ONp) (0,19 mmol ONp) bylo rozpuštěno ve 4 ml methanolu a za intenzivního míchání bylo přidáno 100 μ l $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1,94 mmol). Po 2 h byla reakční směs naředěna 40 ml destilované vody a dialyzována proti destilované vodě 2 dny. Roztok polymeru byl poté lyofilizován.

4.1.6.5 Příprava terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc-*co*-MA-GFLG-NH-CH₂CH₂-NH₂)

Terpolymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc-*co*-MA-GFLG-NH-CH₂CH₂-NH₂), *P'*-GFLG~NH₂, byl připraven dvukrokovou syntézou. V prvním kroku byl roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA, MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc a MA-GFLG-TT v DMSO při 60 °C připraven polymer poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc-*co*-MA-GFLG-TT). Terpolymer nesoucí primární aminoskupiny byl připraven následnou reakcí TT skupin s nadbytkem ethylendiaminu. Schéma struktury terpolymeru je znázorněno na Obrázku 4-15.



Obrázek 4-15 Schéma struktury terpolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc-*co*-MA-GFLG-NH-CH₂CH₂-NH₂)

465 mg (3,25 mmol) HPMA, 44,5 mg (0,14 mmol) MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc, 100 mg (0,18 mmol) MA-GFLG-TT (12,5 hm.% monomerů) a 98,3 mg (0,60 mmol) ABIN

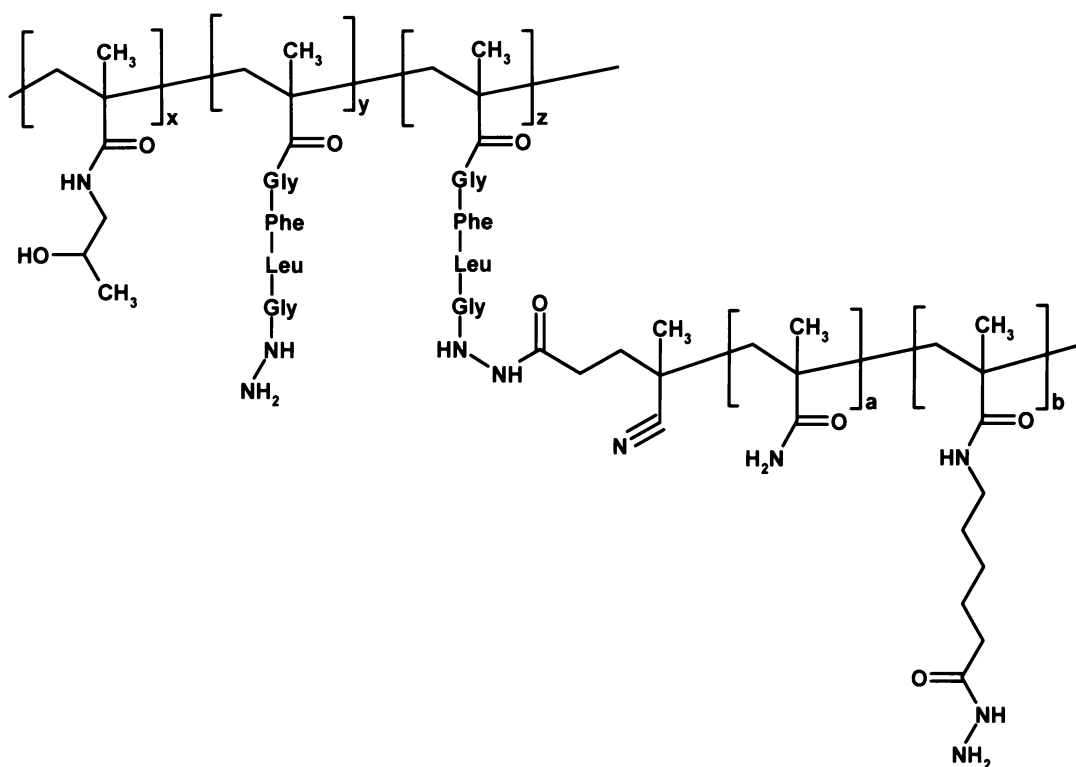
(2 hm.%) bylo rozpuštěno v 3,8 ml DMSO. Ampule s roztokem polymerizační směsi byla 10 min probublávána dusíkem, poté zatavena a na 6 h umístěna do termostatu vyhřívaného na 60 °C. Reakční směs byla vysrážena do 80 ml směsi aceton : diethylether 3 : 1 a vysrážený polymer byl oddělen centrifugací. Polymer byl přesrážen z methanolu do stejné směsi, odfiltrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti. Polymer byl charakterizován stanovením obsahu TT skupin (kapitola 4.2.1.2).

410 mg polymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc-*co*-MA-GFLG-TT) (0,10 mmol TT) bylo rozpuštěno v 6 ml methanolu. Do intenzivně míchaného nažloutlého roztoku bylo přidáno 70 μ l ethylendiaminu (1,05 mmol). Po 30 min byl z bezbarvého roztoku polymer izolován vysrážením do 120 ml směsi aceton : diethylether 3 : 1, přesrážen z methanolu do stejné směsi a zfiltrován. Polymer byl poté sušen do konstantní hmotnosti. Polymer byl charakterizován stanovením obsahu aminoskupin (kapitola 4.2.1.4).

4.1.6.6 Příprava roubovaného kopolymeru - reakce OSu a -NHNH₂ skupin

Roubovaný kopolymer poly(HPMA-*co*-MA-GFLG-NHNH₂)-*graft*-poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂) byl připraven reakcí reaktivních OSu skupin semitelechelického kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-OSu s hydrazidovými skupinami kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA-GFLG-NHNH₂) a následným odstraněním chránících Boc skupin. Schéma struktury roubovaného kopolymeru je znázorněno na Obrázku 4-16.

206 mg poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-OSu bylo rozpuštěno ve 1,2 ml DMSO a přidáno k míchanému roztoku 102 mg poly(HPMA-*co*-MA-GFLG-NHNH₂) (39 μ mol NHNH₂) ve 0,6 ml DMSO. Po 24 h reakce při laboratorní teplotě byla reakční směs vysrážena do 25 ml diethyletheru a vyloučený roubovaný polymer byl odfiltrován na fritě S4. Polymer byl přesrážen z methanolu do diethyletheru, znovu odfiltrován a sušen do konstantní hmotnosti. Roubovaný kopolymer byl frakcionován pomocí SEC na koloně Sephacryl S-300 s destilovanou vodou jako eluentem a získané frakce roubovaného polymeru byly izolovány z vodného roztoku lyofilizací. Odstranění Boc skupin bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.5.1.

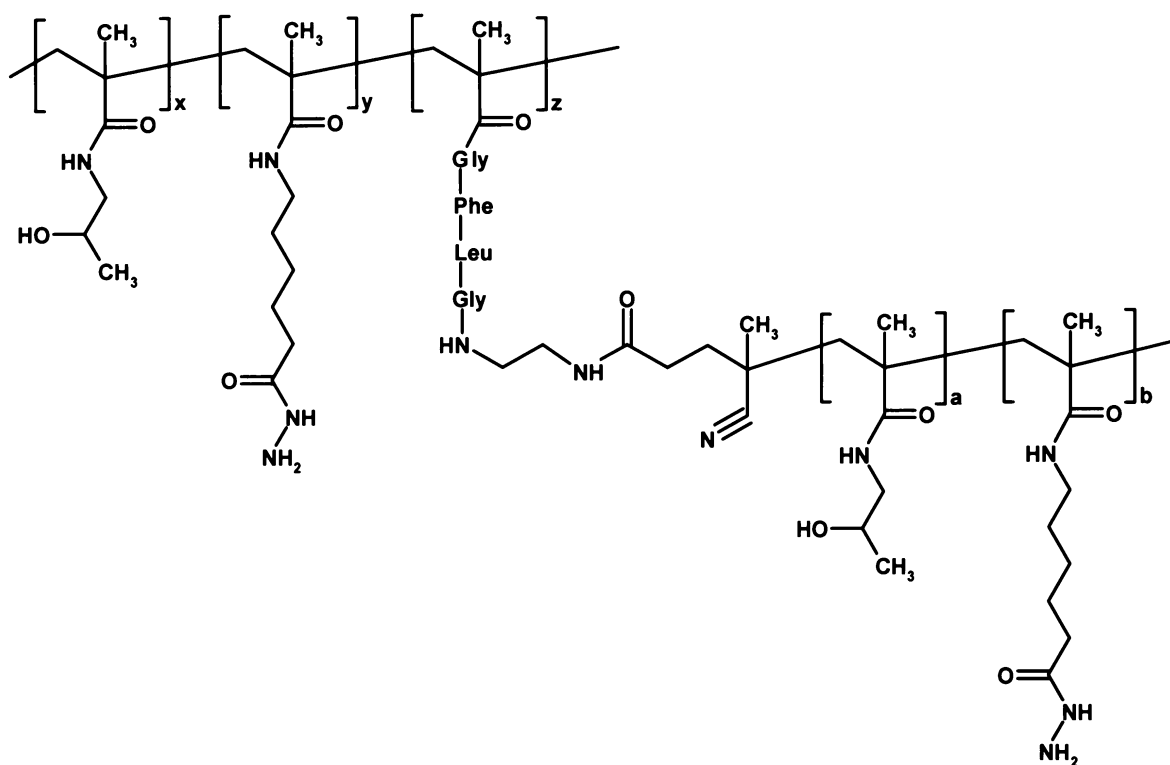


Obrázek 4-16 Schéma struktury roubovaného kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA-GFLG-NHNH₂)-*graft*-poly(HPMA-*co*-MA-εAhx-NHNH₂)

4.1.6.7 Příprava roubovaného kopolymeru - reakce TT a -NH₂ skupin

Roubovaný kopolymer poly(HPMA-*co*-MA-εAhx-NHNH₂-*co*-MA-GFLG-NH-CH₂CH₂-NH)-*graft*-poly(HPMA-*co*-MA-εAhx-NHNH₂) byl připraven reakcí reaktivních TT skupin semitelechelického kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA-εAhx-NHNH-Boc)-TT s aminoskupinami kopolymeru poly(HPMA-*co*-MA-εAhx-NHNH-Boc-*co*-MA-GFLG-NH-CH₂CH₂-NH₂) a následným odstraněním Boc skupin. Schéma struktury roubovaného kopolymeru je znázorněno na Obrázku 4-17.

Příklad přípravy ve vodném pufru (**RP(TT)-9**): 127 mg poly(HPMA-*co*-MA-εAhx-NHNH-Boc)-TT (13 μmol TT) bylo rozpuštěno v 0,75 ml fosfátového pufru (0,066 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8,0) a přidáno k míchanému roztoku 56 mg poly(HPMA-*co*-MA-εAhx-NHNH-Boc-*co*-MA-GFLG-NH-CH₂CH₂-NH₂) (13 μmol -NH₂) v 2 ml 0,75 ml fosfátového pufru. Po 16 h reakce při laboratorní teplotě byl kopolymer izolován pomocí SEC na koloně G-25 s destilovanou vodou jako eluentem a následnou lyofilizací. Odstranění Boc skupin bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.5.1.



Obrázek 4-17 Schéma struktury roubovaného kopolymery poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂-*co*-MA-GFLG-NH-CH₂CH₂-NH)-*graft*-poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂)

Příklad přípravy v DMSO (**RP(TT)-15**): 179 mg poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc)-TT (19 μ mol TT) bylo rozpuštěno ve 3 ml DMSO a přidáno k míchanému roztoku 124,4 mg poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc-*co*-MA-GFLG-NH-CH₂CH₂-NH₂) (28 μ mol -NH₂) v 2 ml DMSO. Po 2,5 h reakce při laboratorní teplotě byla reakční směs vysrážena do 250 ml směsi ethylacetát : diethylether 3 : 1, polymer byl přesrážen z methanolu do stejné směsi a odfiltrován. Polymer byl sušen do konstantní hmotnosti za vakua olejové vývěvy. Odstranění Boc skupin bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.5.1.

4.1.7 Vazba DOX na polymerní prekurzory

Reakcí polymerních prekurzorů obsahujících hydrazidové skupiny s DOX byly připraveny polymerní konjugáty s DOX kovalentně navázaným hydrazonovou vazbou. Reakce byly prováděny při laboratorní teplotě v methanolu v přítomnosti kyseliny octové.

Příklad přípravy: Roztok 150 mg kopolymery poly(HPMA-*co*-MA- ϵ Ahx-NHNH₂) (61 μ mol -NHNH₂) v 1 ml methanolu byl za míchání přidán k 13 mg DOX.HCl (22 μ mol). Do heterogenní reakční směsi bylo přidáno 30 μ l koncentrované kyseliny octové (0,52 mmol). V průběhu reakce docházelo k postupnému rozpouštění DOX.HCl.

Po 2 dnech reakce prováděné v temnu při laboratorní teplotě byl homogenní roztok přečištěn gelovou filtrací (2x) na koloně naplněné Sephadexem LH-20 s methanolem jako eluentem. Polymerní frakce byla vakuově zahuštěna na objem 1 – 3 ml a polymer vysrážen do ethylacetátu. Produkt byl vakuově sušen do konstantní hmotnosti.

Polymerní konjugáty s DOX byly charakterizovány molární hmotností (kapitola 4.2.3.4), obsahem celkového DOX (kapitola 4.2.1.5) a obsahem volného, nenavázaného DOX (kapitola 4.2.7). V některých případech byly konjugáty také charakterizovány velikostí částic (R_H) a jejich distribucí (kapitola 4.2.4).

4.2 Použité fyzikálně-chemické metody

Teploty tání byly měřeny na Boetiově přístroji. Elementární analýzy byly provedeny na přístroji Perkin-Elmer 2400. (Vzorky byly před analýzou vakuově sušeny 2 – 3 h za vakua olejové vývěvy.) Lyofilizace vodných roztoků byly prováděny na přístroji LYOVAC GT2. Dialýzy byly prováděny na dialyzačních membránách Spectra/Por MWCO 3500 (Serva).

4.2.1 UV-VIS spektroskopie

UV-VIS spektra byla měřena na přístroji Heλios α (Thermo Spectronic). Pokud není uvedeno jinak, byly používány kyvety s optickou délkou 1 cm.

Molární procenta aktivního komonomeru byla vypočítávána podle následujícího vzorce, odvozeného z Lambert – Beerova zákona:

$$\text{mol.\%}M_2 = 100 / (1 + \frac{\epsilon \cdot d \cdot g/A - M_2}{M_1})$$

mol.% M_2 - molární procenta aktivního komonomeru

M_1 - molární hmotnost HPMA ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

M_2 - molární hmotnost aktivního komonomeru ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

ϵ - molární absorpční koeficient ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

d - optická délka kyvety (cm)

g - koncentrace polymeru ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

A - absorbance

4.2.1.1 Stanovení obsahu 4-nitrofenoxy skupin

Obsah ONp skupin v polymerních prekurzorech byl stanoven spektrálně při $\lambda = 274$ nm v DMSO. Měření byla prováděna v kyvetách s optickou délkou 1 mm. Při stanovení byl použit molární absorpční koeficient $\varepsilon = 9\,500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

4.2.1.2 Stanovení obsahu thiazolin-2-thionových skupin

Obsah TT skupin v polymerních prekurzorech byl stanoven spektrálně při $\lambda = 305$ nm v methanolu. Při stanovení byl použit molární absorpční koeficient $\varepsilon = 10\,300 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

4.2.1.3 Stanovení obsahu hydrazidových skupin

Obsah hydrazidových skupin byl stanoven spektrálně po jejich derivatizaci pomocí TNBSA¹⁷⁷. Principem stanovení je nukleofilní aromatická substituce sulfonové skupiny TNBSA hydrazidovou skupinou, vzniklý substituovaný trinitrofenylhydrazin výrazně absorbuje v červené oblasti viditelného světla.

Vzorky kopolymerů a terpolymerů obsahující hydrazidové skupiny nebo jiné skupiny, než jsou hydrofobní substituenty, byly rozpuštěny v borátovém pufru (0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$; pH = 9,3) tak, aby byla výsledná koncentrace polymeru $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. 25 μl roztoku bylo přidáno do kyvety, která obsahovala 950 μl pufru a 25 μl 0,03 M roztoku TNBSA ve vodě. Referenční kyveta obsahovala 975 μl pufru a 25 μl 0,03 M roztoku TNBSA ve vodě. Po 45 min inkubace byly zjištěny absorbance při $\lambda = 500$ nm. Molární absorpční koeficient byl získán pomocí reakce známého množství MA- ε Ahx-NHNH₂ s TNBSA ($\varepsilon = 17\,200 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Vzorky terpolymerů obsahujících hydrazidové skupiny a hydrofobní substituenty byly rozpuštěny v DMSO tak, aby byla výsledná koncentrace polymeru $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. 25 μl tohoto roztoku bylo přidáno do kyvety, která obsahovala 950 μl směsi DMSO : borátový pufr 9 : 1 a 25 μl 0,03 M roztoku TNBSA ve vodě. Referenční kyveta obsahovala 975 μl směsi a 25 μl 0,03 M roztoku TNBSA ve vodě. Po 45 min inkubace byly zjištěny absorbance při $\lambda = 520$ nm. Molární absorpční koeficient byl získán pomocí reakce známého množství MA- ε Ahx-NHNH₂ s TNBSA ($\varepsilon = 21\,130 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Kopolymery obsahující TT skupiny a zároveň chráněné hydrazidové skupiny byly před stanovením obsahu hydrazidových skupin nejprve aminolyzovány dle postupu

uvedeného v kapitole 4.2.3.4, poté byly odstraněny Boc skupiny dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.3.2.

4.2.1.4 Stanovení obsahu primárních aminoskupin

Obsah aminoskupin byl stanoven spektrálně po jejich derivatizaci pomocí TNBSA podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.1.3. Molární absorpční koeficient byl získán pomocí reakce známého množství lysinu s TNBSA v borátovém pufru (0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; pH = 9,3), při $\lambda = 420$ nm byla zjištěna hodnota $\varepsilon = 11\,550 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.1.5 Stanovení obsahu DOX

Obsah DOX vázaného v konjugátech hydrazonovou vazbou byl stanoven spektrálně při $\lambda = 488$ nm ve vodě. Pro výpočet byl použit molární absorpční koeficient $\varepsilon = 9\,800 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, který byl stanoven pro modelový monomer MA- ε Ahx-NHN=DOX¹⁷⁸.

4.2.2 Stanovení obsahu karboxylových skupin

Obsah karboxylových skupin v kopolymerech byl stanoven acidobazickou titrací 0,05 M NaOH s použitím titrátoru TIM 900 (Radiometer Copenhagen). Titrace byla prováděna v destilované vodě zbavené CO_2 vyvařením. Titr NaOH byla stanoven titrací na hydrogenftalan draselný.

4.2.3 Kapalinová chromatografie

4.2.3.1 Tenkovrstvá kapalinová chromatografie

Pro ověření čistoty připravených monomerů a sledování průběhu reakcí byla použita tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC). Byly použity destičky Silicagel 60 F₂₅₄ od firmy Merck.

4.2.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Čistota připravených monomerů byla ověřena pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) na systému Shimadzu VP [kolona s reverzní fází 125 x 4 mm SGX C₁₈ (Tessek), průtok 0,5 ml.min⁻¹ a gradient eluentů A a B od 40 do 100 % roztoku B v průběhu 35 min (roztok A: 10 % methanol, 89,9 % voda, 0,1 % TFA; roztok B: 89,9 %

methanol, 10 % voda, 0,1 % TFA)]. HPLC bylo vybaveno průtokovým UV/VIS spektrofotometrem nebo UV/VIS detektorem s fotodiodovým polem.

4.2.3.3 Rozměrově vylučovací chromatografie

Polymerní konjugáty s DOX byly čištěny od nízkomolekulárních podílů rozměrově vylučovací chromatografií (SEC) na preparativní koloně (300 x 15 mm) naplněné Sephadexem LH-20 a s methanolem jako mobilní fází. Frakce obsahující kopolymer byla jímána, roztok byl zahuštěn na vakuové odparce a vysrážen do ethylacetátu. Roubovaný kopolymer byl frakcionován na preparativní koloně (500 x 40 mm) naplněné Sephakrylem S-300 s vodou jako mobilní fází (UV/VIS detekce při 230 nm). Frakce roubovaných kopolymerů byly poté lyofilizovány.

4.2.3.4 Stanovení molárních hmotností

Stanovení molárních hmotností bylo prováděno pomocí HPLC systému (ÄKTA™ explorer 10S, nebo Shimadzu VP) s detektorem rozptylu světla (DAWN DSP-F, nebo DAWN 8, obojí od Wyatt Technology) a diferenciálním refraktometrem (Shimadzu RID-10A nebo Optilab®-rEX od Wyatt Technology). Pro stanovení molárních hmotností kopolymerů neobsahujících hydrofobní substituenty byla použita SEC kolona Superose™6 (300 x 10 mm). Jako mobilní fáze byl použit 0,3 M octanový pufr (pH = 6,5; 0,5 g.l⁻¹ NaN₃) při průtoku 0,5 ml.min⁻¹. Pro stanovení molárních hmotností terpolymerů obsahujících hydrofobní substituenty byla použita kolona TSKGel G 3000 (300 x 7,8 mm). Jako mobilní fáze byla použita směs tvořená methanolem a 0,3 M octanovým pufrem (pH = 6,5; 0,5 g.l⁻¹ NaN₃) v poměru 80 : 20 obj.% při průtoku 0,5 ml.min⁻¹. Hodnoty inkrementu indexu lomu polymerů se pohybovaly v rozmezí 0,167 – 0,175 ml.g⁻¹. V případě použití diferenciálního refraktometru Optilab®-rEX bylo možné měřit inkrement indexu lomu přímo v průběhu stanovení.

Kopolymery obsahující reaktivní skupiny ONp a TT byly před stanovením molárních hmotností aminolyzovány 1-amino-2-propanolem. Příklad aminolýzy: 20 mg poly(HPMA-*-co*-MA-εAhx-ONp) bylo rozpuštěno v 0,2 ml methanolu. Za laboratorní teploty a míchání bylo přidáno 10 µl 1-amino-2-propanolu. Po 15 min míchání byl aminolyzovaný kopolymer vysrážen do 5 ml acetonu a centrifugován. Pevný podíl byl poté promyt diethyletherem, polymer byl odfiltrován na fritě S4 a usušen do konstantní hmotnosti.

4.2.4 Quasi-elastický rozptyl světla

Hydrodynamické poloměry (R_H) a jejich distribuce ve fyziologickém roztoku (koncentrace $c = 0,02 \text{ g.ml}^{-1}$ pro vodorozpustné polymery nebo $c = 0,01 \text{ g.ml}^{-1}$ pro konjugáty s hydrofobními substituenty a roubované konjugáty) byly určovány pomocí Nano-ZS Zetasizer (model ZEN 3600, Malvern, UK). Intenzita rozptýleného světla byla detekována při úhlu $\theta = 173^\circ$. Vlnová délka použitého laseru byla 632,8 nm. Pro vyhodnocení dat dynamického rozptylu světla byl použit DTS(Nano) program.

Zdánlivá molární hmotnost (M_{app}) konjugátů byla vypočtena podle Rovnice 1. Hustota (ρ) polymerních klubek, asociátů nebo micel byla vypočtena podle Rovnice 2. Agregační číslo (n_a) bylo vypočteno podle Rovnice 3.

Rovnice 1

$$M_{app} = \frac{(I_{vz} - I_v)_\theta \sin \theta}{0,662 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 c \cdot I_t(90^\circ)} \quad ; \quad \begin{array}{l} dn/dc - \text{inkrement indexu lomu, } 0,174 \text{ ml.g}^{-1} \\ I_t - \text{intenzita rozptýleného světla toluenu, } 104,8 \text{ kcps} \\ I_v - \text{intenzita rozptýleného světla vody, } 24,4 \text{ kcps} \\ I_{vz} - \text{intenzita rozptýleného světla měřeného vzorku} \end{array}$$

Rovnice 2

$$\rho = \frac{M_{app}}{\frac{4}{3} \pi (R_H)^3 N_A} \quad ; \quad N_A - \text{Avogadrova konstanta}$$

Rovnice 3

$$n_a = \frac{M_{app}}{M_w}$$

4.2.5 Nukleární magnetická rezonance

Vodíková spektra nukleární magnetická rezonance ($^1\text{H-NMR}$) byla naměřena na spektrometru Bruker pracujícím s frekvencí 300 MHz.

4.2.5.1 Stanovení obsahu oleoylových skupin

Obsah oleoylových skupin v terpolymerech byl získán porovnáním integrálních intenzit v CH_3OD : δ 5,35 t, 2H ($\text{CH}=\text{CH}$), δ 3,88 br, 1H (CH-OH).

4.2.5.2 Stanovení obsahu cholesterýlových skupin

Obsah cholesterýlových skupin v terpolymerech byl získán porovnáním integrálních intenzit v $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$: δ 5,32 t, 1H (C=CH), δ 4,70 br, 1H (CH-OH).

4.2.6 Plynová chromatografie

Obsah dodecýlových skupin v terpolymerech byl stanoven pomocí plynové chromatografie analýzou obsahu 1-dodekanolu, uvolněného bazickou hydrolyzou terpolymerů. 5 mg terpolymeru bylo rozpuštěno v 0,4 ml 6 M NaOH, roztok byl inkubován 13 h při teplotě 110 °C. 1-dodekanol byl následně extrahován do 2 ml ethylacetátu a analyzován pomocí plynové chromatografie s plameno-ionizačním detektorem (AutoSystem PerkinElmer, kolona PE – Carbowax 20M (0,25 mm x 20 m, tloušťka filmu 0,25 μm), nosný plyn dusík, teplota detektoru 240 °C, teplota injektoru 200 °C, teplotní program: počáteční teplota 100 °C, izotermálně 2 min, pak růst rychlostí 8 °C.min⁻¹ na 200 °C za 5,5 min). Výpočet koncentrace vzorku byl proveden metodou externího standardu.

4.2.7 Měření rychlosti uvolňování DOX z polymerních konjugátů a stanovení obsahu zbytkového, nenavázaného DOX v polymerních konjugátech

4.2.7.1 Metoda využívající kombinaci extrakce a HPLC

Množství DOX uvolněného z polymerních konjugátů po jejich inkubaci ve vodných roztocích pufrů nebo volného, nenavázaného DOX v polymerních konjugátech bylo stanoveno metodou využívající kombinaci extrakce a HPLC. Uvolněný DOX byl nejdříve extrahován z vodného prostředí do chloroformu a extrakty pak analyzovány pomocí HPLC.

Měření rychlosti uvolňování DOX z polymerních konjugátů: Konjugáty s DOX byly inkubovány ve fosfátových pufrách (0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0,15 M NaCl) o pH 5,0 a 7,4 ve tmě při 37 °C. Koncentrace polymeru byla 10 g.l⁻¹. V časových intervalech 0, 2, 5, 9 a 24 h bylo z inkubačního roztoku odebráno vždy 0,1 ml vzorku. Ke vzorku bylo přidáno nejprve 0,3 ml uhličitanového pufru (0,1 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, 4 M NaCl, pH = 9,8) a následně 0,8 ml chloroformu. Po 15 min extrakce a odstředění byla odebrána část spodní chloroformové vrstvy o známém objemu a rozpouštědlo bylo odpařeno.

Odparek obsahující DOX byl rozpuštěn v definovaném množství methanolu a analyzován pomocí HPLC (systém Shimadzu VP) vybaveném kolonou s reverzní fází (125 x 4 mm SGX C₁₈ (Tessek)) při průtoku 0,5 ml.min⁻¹ a s použitím gradientu od 40 do 100 % roztoku B v průběhu 35 min (roztok A: 10 % methanol, 89,9 % voda, 0,1 % TFA; roztok B: 89,9 % methanol; 10 % voda; 0,1 % TFA). Pro detekci byl použit fluorescenční detektor (Shimadzu RF-10AXL) ($\lambda_{exc} = 480$ nm, $\lambda_{em} = 560$ nm). Kalibrace byla provedena pomocí nástríku přesného množství volného DOX rozpuštěného v methanolu. Množství volného DOX v konjugátech nebo množství uvolněného DOX při experimentech bylo určeno v procentech z poměru nalezeného množství volného DOX a obsahu celkového DOX v konjugátech stanoveného spektroskopicky (kapitola 4.2.1.5). Množství léčiva ve vzorku odebraného v čase 0 h ve všech případech odpovídalo množství volného DOX v konjugátu, stanoveného jiným nezávislým měřením.

4.2.7.2 Metoda SEC

Množství volného, nenavázaného, DOX nebo DOX uvolněného v inkubačním roztoku bylo stanoveno pomocí HPLC systému (ÄKTATM explorer 10S, nebo Shimadzu VP) s využitím průtokového UV/VIS spektrofotometru (UV/VIS detekce při 488 nm). Z inkubačního roztoku (viz kapitola 4.2.7.1) bylo v předem určených časových intervalech (0, 2, 5, 9 a 24 h) odebíráno 50 μ l vzorku a analyzováno pomocí SEC. Měření bylo provedeno na koloně TSKGel G3000 (300 x 7,8 mm) s izokratickým průtokem 0,5 ml.min⁻¹ s využitím mobilní fáze složené ze směsi methanol : octanový pufr o pH 6,5 (80 : 20 obj.%). Obsah volného DOX v konjugátech nebo množství uvolněného DOX bylo uvedeno v procentech a bylo určeno jako poměr ploch píků náležících volnému a vázanému DOX.

4.2.8 Stanovení kopolymerizačních parametrů

Kopolymerizační parametry kopolymerizace HPMA s MA- ϵ Ahx-NHNH₂, nebo MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc byly vypočteny pomocí Fineman – Rossovy metody¹⁷⁹ nebo Kelen – Tüdősovy metody¹⁸⁰. Složení kopolymeru bylo zjištěno pomocí spektrálního stanovení obsahu hydrazidových skupin po jejich derivatizaci pomocí TNBSA v borátovém pufru (viz kapitola 4.2.1.3). Reakční podmínky kopolymerizací byly stejné jako v případě syntézy **P(OMe)** a **P(Boc)** (viz kapitoly 4.1.3.2 a 4.1.3.3). Kopolymerizační násady obsahovaly 2, 6, 10, 14 a 18 mol.% MA- ϵ Ahx-NHNH₂, resp. MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc.

Kopolymerizace byly vedeny do nízké konverze a byly ukončeny po 1 h reakce (konverze ~ 5 - 10 %), reakční směsi byly vysráženy do ethylacetátu a vysrážené kopolymery byly odděleny centrifugací. Kopolymery byly přesráženy z methanolu do stejného srážedla, odfiltrvány na fritě S4 a sušeny do konstantní hmotnosti. Před stanovením obsahu hydrazidových skupin byly případně odstraněny chránicí Boc skupiny.

4.2.9 Stanovení kritické asociační koncentrace

Kritická asociační koncentrace byla stanovena v 0,15 M vodném roztoku NaCl metodou založenou na zvýšení intenzity fluorescence pyrenu při přechodu z vodného prostředí do hydrofobního jádra micely při konstantní celkové koncentraci pyrenu¹⁸⁵. Byla připravena řada roztoků polymerního prekurzoru o objemu 2 ml a koncentraci (10 – 0,0001 g.l⁻¹) ve vodě. Ke každému roztoku byly přidány 2 ml nasyceného roztoku pyrenu v 0,3 M vodném roztoku NaCl. Po 16 h inkubace při laboratorní teplotě ve tmě byla měřena intenzita fluorescence pyrenu ($\lambda_{exc} = 339$ nm, $\lambda_{em} = 367$ nm) (Hitachi Perkin-Elmer MPF-2A spektrometr). Data byla vyhodnocena ze závislosti intenzity fluorescence na logaritmu koncentrace¹⁸⁵.

4.3 Biochemické a biologické metody

Biologické testování připravených polymerních konjugátů nebylo možno provést na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR. Stanovení inhibice proliferace nádorových buněk (kapitola 4.3.2) a *in vivo* testy protinádorové aktivity (kapitola 4.3.3) byly proto provedeny spolupracovníky ze skupiny prof. RNDr. Blanky Říhové, DrSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR.

4.3.1 Štěpení GFLG sekvence roubovaných kopolymerů kathepsinem B

Roubovaný kopolymer, ve kterém jsou rouby navázány k hlavnímu polymernímu řetězci biodegradovatelnou tetrapeptidovou spojkou o struktuře GFLG, byl štěpen v *in vitro* podmínkách v 0,5 μ M roztoku thiolové proteinázy kathepsinu B při 37 °C. Aktivita enzymu byla stanovena pomocí *N* $_{\alpha}$ -benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid.HCl jako substrátu. Do kyvety o světelné délce 1 cm bylo nadávkováno 60 μ l roztoku enzymu (1,6 g.l⁻¹) ve fosfátovém pufru (NaH₂PO₄/NaOH, 1 mM EDTA; pH 6,0), 815 μ l fosfátového pufru a 100 μ l roztoku glutathionu (15,4 g.l⁻¹) rozpuštěného ve stejném pufru. Po 10 min inkubace při 37 °C bylo přidáno 25 μ l zásobního roztoku *N* $_{\alpha}$ -benzoyl-L-arginin-

-4-nitroanilid.HCl ($40,8 \text{ g.l}^{-1}$) v DMSO a byl změřen rozdíl absorbancí $\Delta A/10 \text{ min}$ při 410 nm ($\epsilon = 8440 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Titrací aktivních míst enzymu ^{14}C -jodoctovou kyselinou bylo zjištěno, že hodnota $\Delta A/10 \text{ min} = 0,33$ odpovídá koncentraci aktivních míst kathepsinu B $0,2 \text{ }\mu\text{M}^{181}$. Výpočet koncentrace enzymu v inkubačním roztoku byl proveden pomocí tohoto údaje a skutečně naměřené změny absorbance substrátu v kalibračních roztocích enzymu o několika různých koncentracích.

Vlastní měření průběhu štěpení roubovaného polymeru bylo prováděno následovně. Polymer byl rozpuštěn v $0,1 \text{ M}$ fosfátovém pufru ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$; 5 mM glutathion; 1 mM EDTA; $\text{pH} = 6,0$) tak, aby jeho konečná koncentrace v pufru byla 15 g.l^{-1} . Po přidavku vypočteného množství zásobního roztoku enzymu (konečná koncentrace enzymu byla $0,5 \text{ }\mu\text{M}$) byla reakční směs inkubována v termostatu ve tmě při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. V předem určených časových intervalech byly ze směsi odebírány vzorky, které byly na SEC koloně s náplní Sephadexu G-25 (eluent destilovaná voda) zbaveny nízkomolekulárních příměsí a solí. Vodný roztok obsahující degradační polymerní produkty byl lyofilizován. Molární hmotnosti polymerních degradačních štěpů byly stanoveny pomocí SEC s využitím detektoru rozptylu světla (kapitola 4.2.3.4).

4.3.2 Inhibice proliferace

Normální nebo nádorové buněčné linie byly inkubovány v živném médiu obsahujícím testované polymery. Cytostatická aktivita polymerů byla sledována pomocí změny inkorporace ^3H thymidinu do testovaných buněk. V cytotoxickém prostředí dochází k zániku či poškození funkce testovaných buněk, což se projeví neschopností proliferovat, a tedy i zabudovávat ^3H thymidin do buněčné struktury. Míra poklesu rychlosti inkorporace ^3H thymidinu je tedy i mírou toxicity preparátu pro testovaný typ buněk. Experimenty byly provedeny v 96 jamkových tkáňových mikrotitračních destičkách (Nunc) s použitím různých nádorových linií: myší T-buněčný lymfom EL4 ($5 \cdot 10^4$ buněk), 38C13 myší B-buněčný lymfom ($2 \cdot 10^3$ buněk), SW 620 lidský kolorektální karcinom ($1 \cdot 10^4$ buněk); Raji lidský B-buněčný lymfom ($1 \cdot 10^4$ buněk); Jurkat lidská T-buněčná leukemie ($1 \cdot 10^4$ buněk). Do jamek byly přidány zásobní roztoky polymerů tak, aby se konečná koncentrace polymeru v roztoku pohybovala v rozmezí odpovídajícímu $0,0002 - 40,0 \text{ mg.l}^{-1}$ DOX. V kontrolních jamkách byly buňky kultivovány bez přidání testovaného vzorku. Buňky byly kultivovány 72 h (EL4 buňky 48 h) při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v 5% CO_2 . Pak byl přidán ^3H thymidin ($18,5 \text{ kBq}$, resp. $0,5 \text{ }\mu\text{Ci}$ na jamku) a buňky byly dále

inkubovány ještě 6 h (4 h v případě EL4 buněk, 5 h v případě 38C13 buněk). Intenzita β -záření zabudovaného radioaktivně značeného thymidinu byla detekována pomocí scintilátoru 1450 Microbeta Trilux (Wallac, Finsko). Výsledky byly vyhodnoceny jako aritmetické průměry změřených impulsů za min (cpm) ze tří individuálních jamek a vyjádřeny jako hodnoty IC₅₀, tj. koncentrace DOX nebo ekvivalentu DOX, která inhibuje růst 50 % buněk. V případě kontrolního testování cytotoxicity polymerních prekurzorů (nosiče) bylo použito množství polymeru odpovídající množství příslušného konjugátu.

4.3.3 *In vivo* experimenty protinádorové aktivity

Pro *in vivo* experimenty byl použit myší T-buněčný lymfom EL4. Samcům myší C57BL/6 bylo subkutánně injikováno $1 \cdot 10^5$ buněk nádorové linie v den 0. Vzorky byly aplikovány intravenózně do ocasní žíly až po zřetelném vytvoření nádoru (terapeutický režim podávání léčiva). Zvířata byla denně sledována, aby byl zachycen proces růstu nádoru. Objem nádoru byl vypočítáván podle vzorce $V = a \cdot b^2 / 2$, kde „a“ značí delší průměr a „b“ kratší, na něj kolmý průměr. Dále byla sledována doba přežívání myší a jejich tělesná hmotnost.

Konjugát **K(Boc)** byl testován v jednom pokusu při dávkování 25 mg DOX(ekvivalent)/kg v jedné dávce (podané 10. den), 75 mg DOX(ekvivalent)/kg ve třech dávkách po 25 mg (10., 15. a 20. den), a 75 mg DOX(ekvivalent)/kg v jedné dávce (10. den). Každá skupina myší se skládala z 8 jedinců. Konjugáty obsahující nabitě funkční skupiny a **K(Boc)** byly testovány při dvou různých dávkováních. Při vyšším dávkování bylo aplikováno 50 mg DOX(ekvivalent)/kg ve dvou dávkách po 25 mg (11. a 16. den), každá skupina myší se skládala z 8 jedinců. Při nižším dávkování bylo ve dvou nezávislých pokusech aplikováno 15 mg DOX(ekvivalent)/kg v jedné dávce (8. den, resp. 9. den), každá skupina myší se skládala z 8 jedinců s výjimkou **K-DMAE**, který byl testován pouze na 4 jedincích. Samotného léčiva bylo aplikováno 10 mg DOX.HCl/kg ve dvou dávkách po 5 mg (8. a 15. den). Konjugáty obsahující hydrofobní substituenty byly aplikovány při dvou různých dávkováních, a to 10 mg DOX (ekvivalent)/kg v jedné dávce (8. den), nebo ve dvou dávkách, vždy po 5 mg ekvivalentu DOX (8. a 12. den). Každá skupina myší se skládala z 8 jedinců. Konjugát **K(Boc)** byl dávkován pouze v jedné dávce 15 mg DOX (ekvivalent)/kg (8. den). Roubovaný konjugát a **K(Boc)** byly aplikovány při dávkování 15 mg DOX (ekvivalent)/kg (9. den).

5. Výsledky a diskuze

V této části disertační práce jsou uvedeny a diskutovány výsledky studia vztahu mezi strukturou a fyzikálně-chemickými a biologickými vlastnostmi konjugátů polymerních nosičů léčiv s doxorubicinem umožňujících pH-řízené uvolnění, a tedy i aktivaci léčiva.

Kapitola 5.1 je věnována zejména optimalizaci přípravy nových polymerních prekurzorů nesoucích hydrazidové skupiny, připravených dvěma různými způsoby. Diskuze je zaměřena i na fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti konjugátů polymer – DOX připravených z těchto polymerních prekurzorů.

Obsahem dvou následujících kapitol jsou výsledky studia vlivu struktury konjugátů, nesoucích v polymerním řetězci kovalentně vázané záporně či kladně nabitě funkční skupiny (kapitola 5.2) nebo hydrofobní substituenty (kapitola 5.3), na jejich fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti.

Kromě základní charakterizace připravených konjugátů a jejich polymerních prekurzorů (molární hmotnosti, obsahy funkčních skupin, obsah léčiva) je pozornost věnována i jejich chování ve vodném prostředí, zejména tomu, zda dochází ke tvorbě nadmolekulárních útvarů v důsledku nekovalentních interakcí. Důležité informace poskytují i výsledky testů rychlosti uvolňování léčiva v *in vitro* podmínkách. Stejně jako v případě zjišťování inhibice proliferace nádorových buněk se ovšem jedná pouze o modelové testy. Důležitějším ukazatelem „účinnosti“ konjugátu je proto zjištění protinádorové aktivity konjugátů, prováděné na laboratorních zvířatech.

Poslední kapitola (5.4) je zaměřena na přípravu a fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti vysokomolekulárních roubovaných kopolymerů, obsahujících biodegradovatelné spojky. Největší prostor je věnován optimalizaci přípravy roubovaných kopolymerů. Pozornost je také zaměřena na ověření degradace konjugátu v *in vitro* podmínkách. Nejdůležitějším testem ovšem zůstává zjištění protinádorové aktivity v *in vivo* podmínkách.

5.1 Příprava a studium vlastností konjugátů polymer – DOX

Pro přípravu „klasických“ konjugátů, ve kterých byl DOX vázán k polymeru amidovou vazbou, byly používány polymerní prekurzory nesoucí reaktivní ONp estery. Kopolymerizační reakce HPMA s *N*-methakryloylovanými aminokyselinami nebo oligopeptidy byly v minulosti detailně studovány⁴⁹. Získané poznatky umožňovaly syntézu kopolymerů s požadovanou molární hmotností a obsahem reaktivních skupin. Proto byly tyto kopolymery jako první využity i pro přípravu polymer - DOX konjugátů nesoucí léčivo vázané k polymeru hydrazonovou vazbou¹⁸². Do polymerní struktury byly nejprve zavedeny hydrazidové skupiny hydrazinolýzou ONp esterů a vzniklé hydrazidové skupiny byly následně využity pro vazbu léčiva. Použití polymerních prekurzorů obsahujících reaktivní ONp skupiny k přípravě polymerních hydrazidů je spojeno s několika nevýhodami, k nimž patří omezená možnost regulace molárních hmotností polymeru při přípravě radikálovou polymerizací, způsobená účastí ONp skupin na přenosových reakcích, a malá hydrolytická stabilita těchto skupin. Složení vznikajících kopolymerů bylo obtížně definovatelné, a proto jsme hledali jiné způsoby přípravy dobře definovaných polymerních prekurzorů nesoucích hydrazidové skupiny.

Nový postup přípravy polymerních prekurzorů spočíval v použití monomerů, které již přímo obsahovaly hydrazidové skupiny. Kopolymerizací těchto monomerů s HPMA by tedy již měly vznikat kopolymery s definovanou strukturou. Dva navržené postupy syntézy polymerních prekurzorů se lišily především ve struktuře použitého monomeru. V prvním případě byly hydrazidové skupiny chráněny skupinou Boc, v druhém případě byl využit monomer obsahující volné hydrazidové skupiny.

V předchozích studiích byl sledován vliv struktury spojky, tvořené aminokyselinami či oligopeptidy, na fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti konjugátů polymer – DOX nesoucích léčivo navázané hydrazonovou vazbou^{182, 183}. Jako nejvhodnější spojka byla vybrána 6-aminohexanová kyselina, a to díky poměrně vysoké stabilitě hydrazonové vazby na této spojce při pH fyziologického prostředí a zároveň díky nejvyšší rychlosti uvolňování léčiva při endosomálním pH (5,0). Proto byly pro další studie používány zpravidla konjugáty obsahující právě tuto spojku.

5.1.1 Optimalizace přípravy polymerních prekurzorů

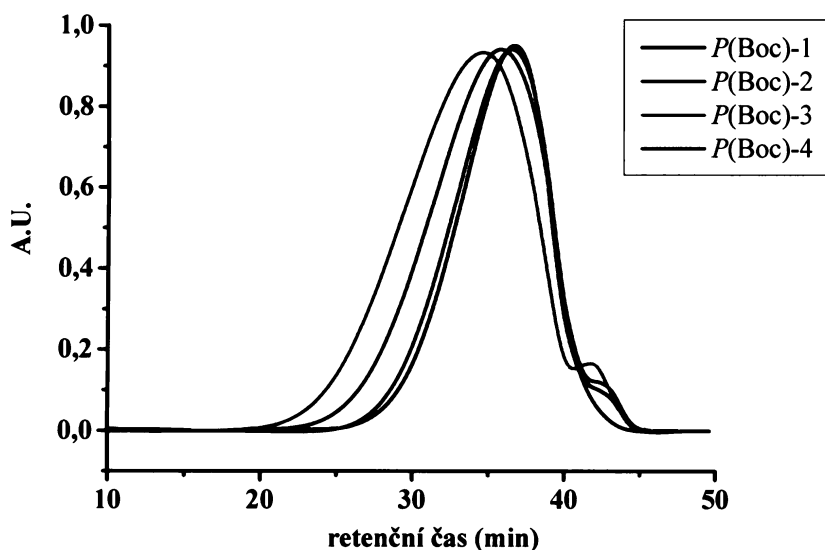
Polymerní prekurzory označené jako **P(Boc)** byly připraveny roztokovými radikálovými kopolymerizacemi HPMA s monomerem obsahujícím chráněné hydrazidové skupiny (MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc). Polymerní prekurzory označené jako **P(OMe)** byly připraveny roztokovými radikálovými kopolymerizacemi HPMA s monomerem obsahujícím hydrazidové skupiny bez chránících skupin (MA- ϵ Ahx-NHNH₂).

V prvním kroku optimalizace přípravy polymerních prekurzorů byly provedeny kopolymerizace v různých rozpouštědlech. Výběr rozpouštědel byl především omezen rozpustností monomerů. Molární hmotnosti připravených polymerních prekurzorů v methanolu, ethanolu, DMSO a DMF jsou uvedeny v Tabulce 5-1.

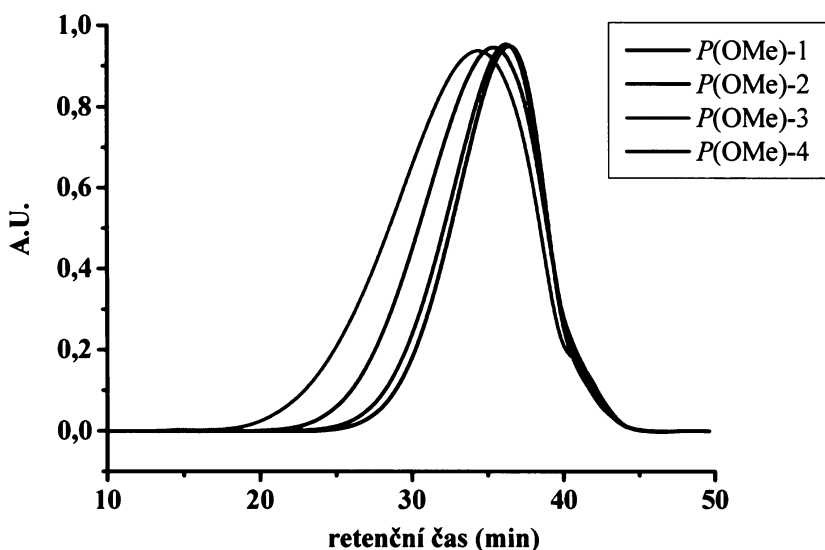
Tabulka 5-1 Charakteristiky molárních hmotností polymerních prekurzorů připravených kopolymerizací v různých rozpouštědlech (reakční podmínky kopolymerizací: 14 hm.% monomerů, 1 hm.% ABIN, 60 °C, 20 h)

Polymerní prekurzor	rozpouštědlo	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
P(Boc)-1	methanol	18 500	1,8
P(Boc)-2	ethanol	27 600	2,4
P(Boc)-3	DMSO	39 400	2,1
P(Boc)-4	DMF	19 800	2,0
P(OMe)-1	methanol	18 000	2,2
P(OMe)-2	ethanol	28 800	2,4
P(OMe)-3	DMSO	46 300	2,5
P(OMe)-4	DMF	20 300	2,1

Molární hmotnost připravených kopolymerů závisela na použitém rozpouštědle. Kopolymerizace připravené v DMSO dosáhly nejvyšších \overline{M}_w . Oproti tomu molární hmotnosti kopolymerů připravených v methanolu byly přibližně o polovinu nižší. Ke snížení došlo důsledkem většího přenosu rozpouštědlem při radikálové kopolymerizaci prováděné v methanolu. Podobného výsledku bylo dosaženo i v případě polymerizací *N*-substituovaných methakrylamidů, autoři zjistili, že přenosová konstanta methanolu byla přibližně desetinásobná oproti přenosové konstantě DMSO¹⁸⁴. V ethanolu zřejmě také docházelo k přenosům, avšak ne v takové míře, jako při kopolymerizaci v methanolu. Molární hmotnosti kopolymerů připravených v DMF byly srovnatelné s molárními hmotnostmi kopolymerů připravených v methanolu, výrazný přenos byl pravděpodobně způsoben aminosloučeninami vznikajícími rozkladem DMF při zvýšené teplotě.



Obrázek 5-1 Vliv rozpouštědla na distribuci molárních hmotností (záznam RI detektoru) polymerních prekurzorů **P(Boc)** při kopolymerizační reakci.



Obrázek 5-2 Vliv rozpouštědla na distribuci molárních hmotností (záznam RI detektoru) polymerních prekurzorů **P(OMe)** při kopolymerizační reakci.

S rostoucí molární hmotností polymerních prekurzorů vzrůstal i index molekulární neuniformity, což je patrné i ze záznamů distribuce molárních hmotností (viz Obrázky 5-1 a 5-2). Přítomnost chránicí skupiny neměla vliv na molární hmotnost prekurzorů, hydrazidové skupiny tedy zřejmě nezpůsobují přenos aktivních center kopolymerizace. Výtěžky kopolymerizací se pohybovaly v rozmezí 65 – 75 %.

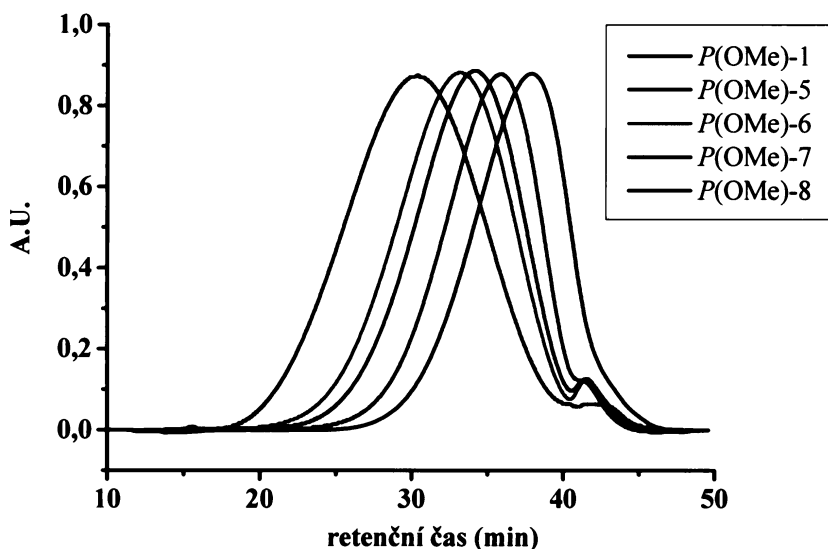
Na základě předběžných studií byl jako nejvhodnější rozpouštědlo pro polymerizaci vybrán methanol, pro výjimečné případy pak ještě DMF. Při polymerizacích v těchto rozpouštědlech se dosažené \overline{M}_w kopolymerů pohybovaly okolo 20 000 g.mol⁻¹. Takové kopolymery splňují podmínku vyloučitelnosti z organismu renální filtrací. Použití methanolu mělo oproti DMF několik výhod: methanol má nižší bod varu rozpouštědla, nedochází k jeho degradaci při průběhu kopolymerizace, izolace kopolymeru srážením je jednodušší a z ekonomického hlediska je jeho použití výrazně levnější.

V dalším kroku optimalizace přípravy polymerních prekurzorů byl studován vliv koncentrace iniciátoru, koncentrace monomerů a teploty na vlastnosti kopolymeru připravovaného v methanolu. Molární hmotnosti připravených kopolymerů **P(OMe)** jsou uvedeny v Tabulce 5-2.

Tabulka 5-2 Charakteristiky molárních hmotností polymerních prekurzorů **P(OMe)** připravených kopolymerizací v methanolu (reakční doba 17 h)

Polymerní prekurzor	obsah iniciátoru v násadě (hm.%)	obsah monomerů v násadě (hm.%)	kopolymerizační teplota (°C)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
P(OMe)-1	1,0	14	60	18 000	2,2
P(OMe)-5	0,8	14	50	38 300	1,9
P(OMe)-6	0,5	14	50	49 300	1,8
P(OMe)-7	0,5	14	60	25 500	1,8
P(OMe)-8	0,5	20	50	88 800	2,1

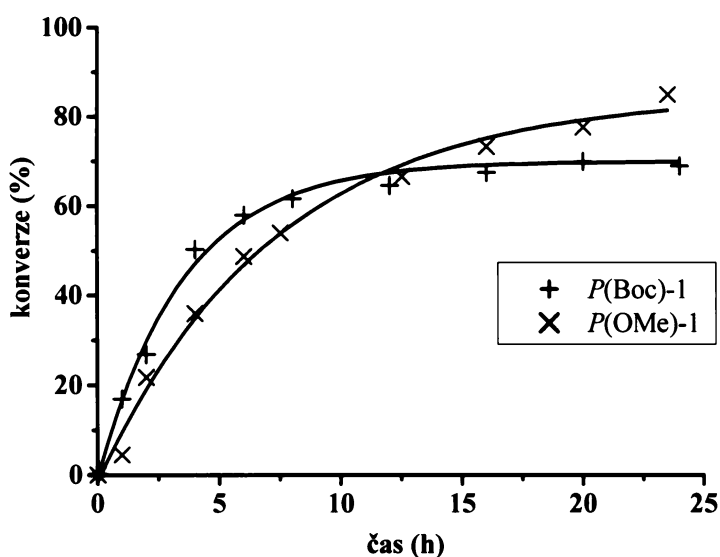
Snížení koncentrace iniciátoru vedlo v souladu s teorií ke zvýšení \overline{M}_w kopolymerů, jak je patrné ze srovnání molárních hmotností **P(OMe)-1** (18 000 g.mol⁻¹) a **P(OMe)-7** (25 500 g.mol⁻¹) kopolymerizovaných při 60 °C nebo ze srovnání **P(OMe)-5** (38 300 g.mol⁻¹) a **P(OMe)-6** (49 300 g.mol⁻¹) kopolymerizovaných při 50 °C. Snížení kopolymerizační teploty ze 60 °C na 50 °C vedlo k ještě výraznějšímu vzrůstu molárních hmotností, jak je patrné ze srovnání **P(OMe)-7** (25 500 g.mol⁻¹) a **P(OMe)-6** (49 300 g.mol⁻¹). Rovněž zvýšení koncentrace monomerů v kopolymerizační násadě vedlo ke zvýšení \overline{M}_w kopolymerů, jak je zřejmé ze srovnání molárních hmotností **P(OMe)-6** (49 300 g.mol⁻¹) a **P(OMe)-8** (88 800 g.mol⁻¹). Zvýšení molárních hmotností kopolymerů v důsledku snížení koncentrace iniciátoru, snížení kopolymerizační teploty nebo zvýšení koncentrace monomerů je v souladu s teoretickými vztahy, kterými se řídí průběh roztokových radikálových polymerizací. S rostoucí molární hmotností polymerních prekurzorů se výrazně neměnil index molekulární neuniformity, což je patrné i ze záznamu distribuce molárních hmotností (viz Obrázek 5-3).



Obrázek 5-3 Vliv reakčních podmínek na distribuci molárních hmotností (záznam RI detektoru) polymerních prekurzorů **P(OMe)** při kopolymerizaci v methanolu.

Pokud jsou molární hmotnosti polymerních prekurzorů s nedegradovatelnými hlavními řetězci pod limitem renální filtrace, může dojít k vyloučení polymerních nosičů z organismu. **P(OMe)-1** a **P(OMe)-7** tuto podmínku splňovaly, a proto byly reakční podmínky použité k jejich syntéze i nadále používány k syntéze HPMA kopolymerů.

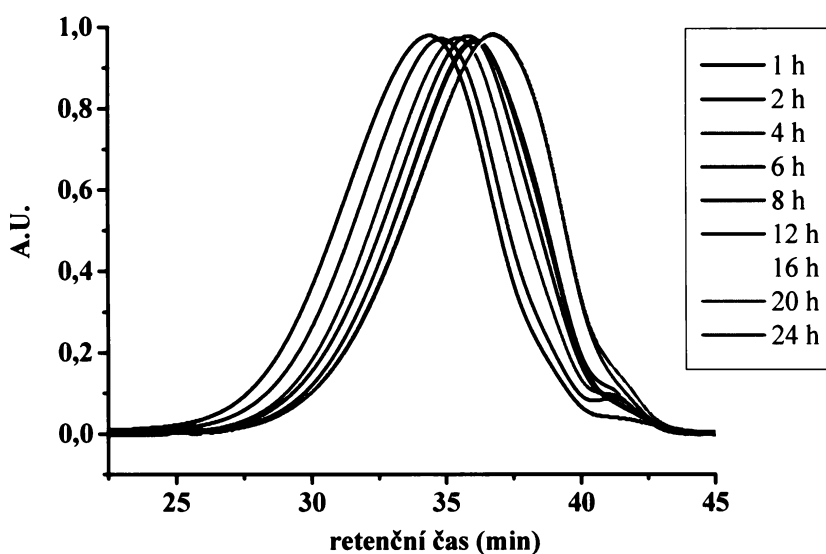
V následujícím kroku byla sledována časová závislost molárních hmotností kopolymerů a konverze reakce. Kopolymerizace byly provedeny při optimalizovaných reakčních podmínkách přípravy **P(OMe)-1** a **P(Boc)-1**.



Obrázek 5-4 Závislost konverze na době polymerizace

V případě **P(Boc)-1** bylo poměrně rychle (6 h) dosaženo konverze 60 % (viz Obrázek 5-4). \overline{M}_w přitom klesla z 27 400 g.mol⁻¹ (měřeno po 2 h reakce) na 23 200 g.mol⁻¹. V dalším průběhu reakce výtěžek kopolymerizace vzrůstal jen minimálně na konečných 70 % (20 h). \overline{M}_w přitom klesla na konečných 19 000 g.mol⁻¹ po 16 h kopolymerizace a dále se již neměnila. (Časová závislost distribuce molekulových hmotností je znázorněna na Obrázku 5-5.) $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ se v průběhu kopolymerizace měnil jen nepatrně, z hodnoty 1,5 (měřeno po 2 h) až na konečných 1,8.

V případě **P(OMe)-1** rostl výtěžek kopolymerizace pomaleji, přičemž limitní hodnoty nebylo dosaženo ani po 24 h kopolymerizace. Časová závislost distribuce molárních hmotností **P(OMe)-1** byla téměř identická s distribucí molárních hmotností **P(Boc)-1**. \overline{M}_w klesla z 27 800 g.mol⁻¹ po 2 h reakce na 18 200 g.mol⁻¹ po 16 h reakce. $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ se také měnil jen nepatrně, z hodnoty 1,6 na 1,9.



Obrázek 5-5 Vliv doby kopolymerizace na distribuci molárních hmotností (záznam RI detektoru) polymerního prekurzoru **P(Boc)-1**.

Pro kopolymerizace HPMA s MA- ϵ Ahx-NH₂ nebo MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc bylo provedeno stanovení kopolymerizačních parametrů. Pro jejich výpočet byly použity dvě základní metody, Fineman – Rossova a Kelen – Tüdősova. Vypočítané hodnoty kopolymerizačních parametrů, uvedených v Tabulce 5-3, byly podle očekávání blízké hodnotě 1. Výsledky získané různými metodami se téměř shodovaly.

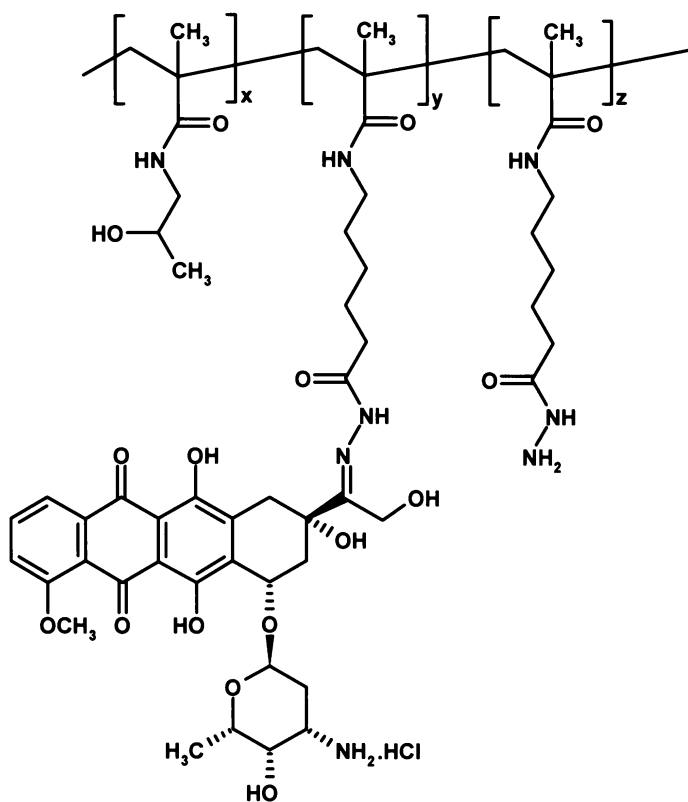
Tabulka 5-3 Kopolymerizační parametry

Použitý komonomer	Metoda výpočtu	r_a^*	r_b
MA- ϵ Ahx-NHNH-Boc	Fineman – Ross	1,63	1,41
	Kelen – Tüdös	1,60	1,15
MA- ϵ Ahx-NHNH ₂	Fineman – Ross	1,26	0,91
	Kelen – Tüdös	1,26	0,93

^{*)} index „a“ označuje HPMA

5.1.2 Příprava polymerních prekurzorů a konjugátů s DOX

Reakční podmínky kopolymerizace **P(Boc)-1** a **P(OMe)-1** byly použity pro přípravu většího množství polymerních prekurzorů **P(Boc)** a **P(OMe)**, které byly v další kroku využity pro syntézu polymer–DOX konjugátů **K(Boc)** a **K(OMe)**. Charakteristiky konjugátů a jim odpovídajících polymerních prekurzorů jsou uvedeny v Tabulce 5-4. Polymerní prekurzor označený jako **P(ONp)** byl připraven srážecí radikálovou kopolymerizací HPMA a MA- ϵ Ahx-ONp, následovanou hydrazinolýzou ONp skupin¹⁸³. Schéma struktury konjugátů **K(Boc)** a **K(OMe)** je znázorněna na Obrázku 5-6.



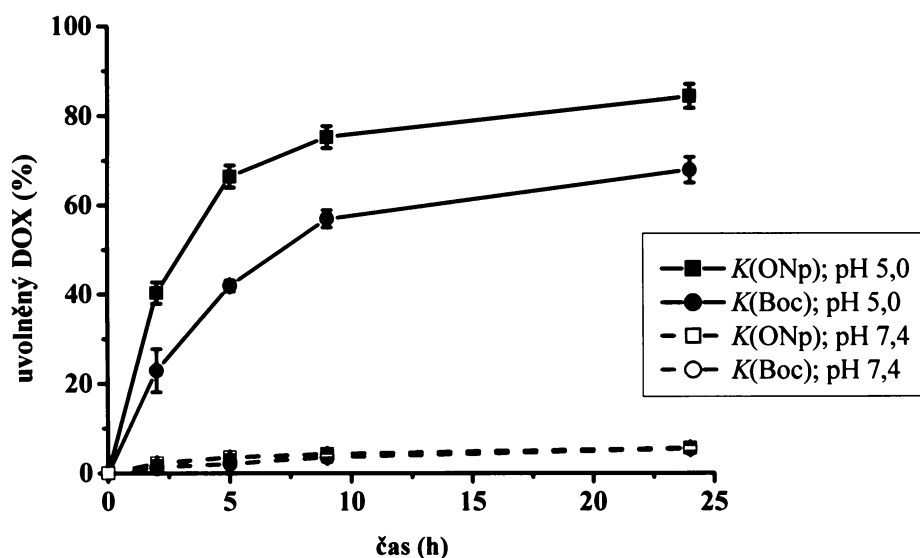
Obrázek 5-6 Schéma struktury **K(Boc)** nebo **K(OMe)**.

Tabulka 5-4 Charakteristiky polymerních prekurzorů a polymer – DOX konjugátů

Polymer	Obsah hydrazidů (mol.%)	Obsah DOX (hm.%)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
P(ONp)	2,3	-	28 900	1,9
P(Boc)	5,3	-	24 200	1,7
P(OMe)	5,7	-	17 800	1,7
K(ONp)	-	5,5	30 700	1,5
K(Boc)	-	10,0	25 000	1,8
K(OMe)	-	10,1	20 800	1,8

5.1.3 Uvolňování léčiva v *in vitro* podmínkách

Uvolnění volné farmakologicky účinné formy léčiva z nosiče je ve většině případů předpokladem pro účinnou protinádorovou aktivitu doxorubicinových konjugátů. Pro polymerní konjugáty, které využívají k aktivaci léčiva hydrolyticky degradovatelné vazby mezi léčivem a spojkou, je důležité, aby hydrolýza vazby neprobíhala, nebo probíhala velmi pomalu během cirkulace krevním řečištěm (neutrální pH), ale aby probíhala relativně rychle v mírně kyselém prostředí (pH 5 – 6) endosomů či lysosomů cílových buněk (viz kapitola 2.4.2). Při studii rychlosti uvolňování léčiv v *in vitro* podmínkách byly obě prostředí připodobněny zjednodušenými modely: inkubace byla provedena ve fosfátových pufrch o pH 5,0 a pH 7,4 při teplotě lidského těla (37 °C).



Obrázek 5-7 Uvolňování DOX z konjugátů ve fosfátových pufrch při 37 °C. Srovnání K(ONp) a K(Boc).

V pufru o pH 5,0 docházelo u všech testovaných konjugátů k výraznému uvolňování DOX, zatímco v pufru o pH 7,4 byla rychlost uvolňování velmi malá. Předpoklad použití konjugátů, formulovaný v předchozím odstavci, byl tedy splněn. Vzhledem k poměrně rychlé akumulaci polymer – DOX konjugátů v nádoru lze předpokládat, že léčivo bude z konjugátu uvolňováno především v endosomech či lysosomech nádorových buněk.

Rychlost uvolňování DOX při pH 7,4 z **K(ONp)** i z **K(Boc)** byla srovnatelná (5 % za 24 h). Oproti tomu byla rychlost uvolňování DOX při pH 5,0 z **K(ONp)** (85 % za 24 h) značně vyšší než rychlost uvolňování z **K(Boc)** (68 % za 24 h) (viz Obrázek 5-7). Mezi nevýhody přípravy polymerních prekurzorů obsahujících ONp skupiny, zmíněné na začátku kapitoly 5.1, patří i malá hydrolytická stabilita ONp skupin. Vzrůst rychlosti by tedy mohl být způsoben přítomností karboxylových skupin v **K(ONp)** vzniklých částečnou hydrolyzou ONp skupin. Oprávněnost této hypotézy bude diskutována v kapitole 5.2.3. Rychlosti uvolňování DOX při pH 5,0 z obou konjugátů budou porovnány s rychlostmi uvolňování léčiva z konjugátů obsahujících definovaná množství karboxylových skupin v polymerní struktuře.

5.1.4 Cytostatická aktivita

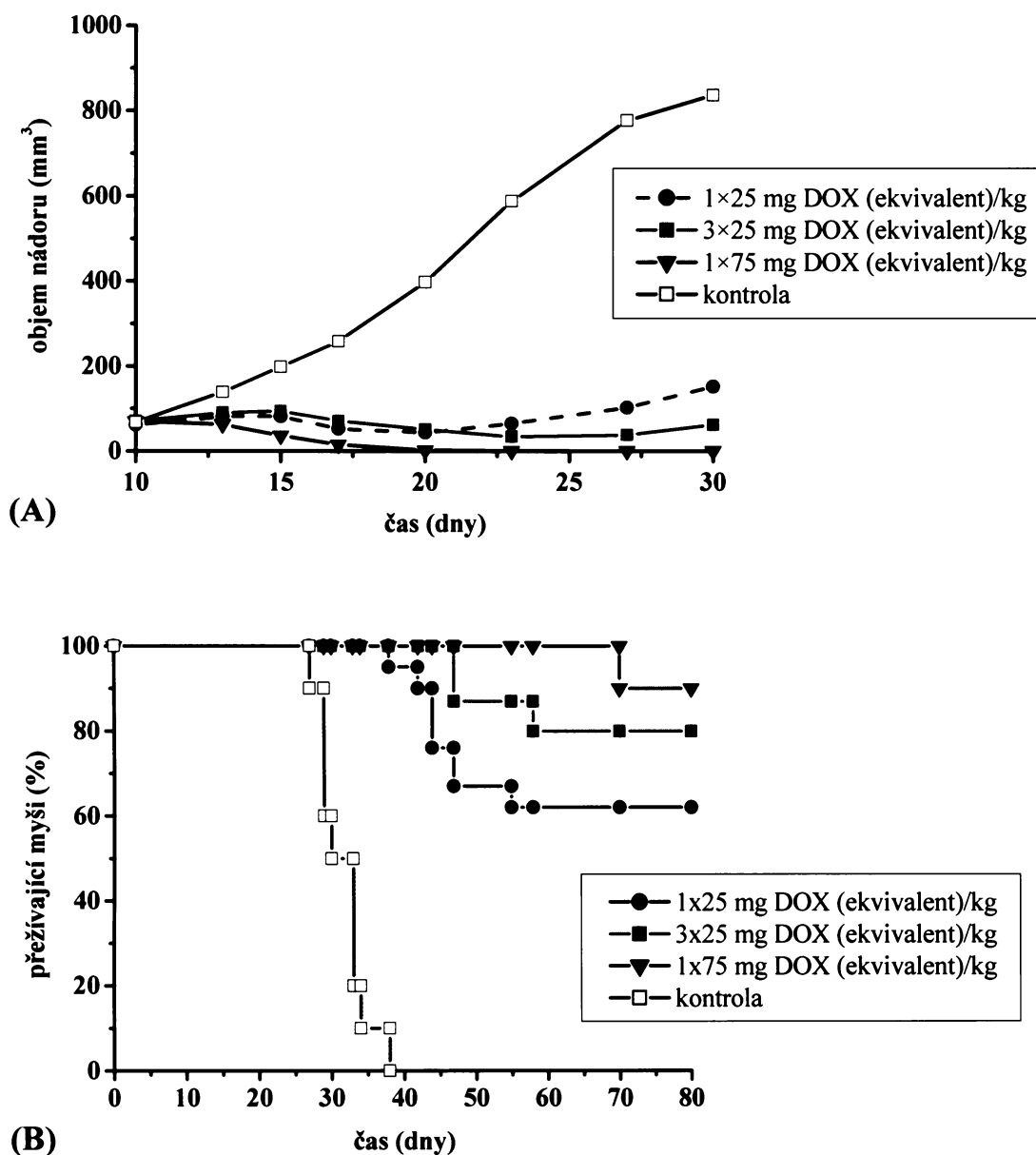
Konjugáty prokázaly velmi vysokou cytostatickou aktivitu, téměř srovnatelnou s volným DOX (viz Tabulka 5-5). Cytostatická aktivita konjugátů významně závisela na použitém typu nádorových buněk. Konjugáty byly vysoce toxické pro buněčné linie, které jsou citlivé pro léčbu volným DOX (38C13 B-buněčný lymfom, SW 620 lidský kolorektální karcinom, Raji lidský B-buněčný lymfom). Pro tyto linie byla IC₅₀ (koncentrace DOX nebo ekvivalentu DOX, která inhibuje růst 50 % buněk) nižší než 0,05 µg DOX/ml a žádný významný rozdíl mezi konjugáty nebyl pozorován. I testy s méně citlivými liniemi (EL4 T-buněčný lymfom, Jurkat lidská T-buněčná leukemie) neukázaly podstatné rozdíly v cytostatické aktivitě konjugátů. Celkově vzato cytostatická aktivita konjugátů byla pro tyto linie přibližně o jeden řád nižší než aktivita volného léčiva.

Tabulka 5-5 Cytostatická aktivita konjugátů vyjádřená jako IC₅₀ v µg DOX/ml

	EL4	38C13	SW620	Raji	Jurkat
K(ONp)	0,340	-	-	-	-
K(Boc)	0,169	0,004	0,048	0,001	1,440
K(OMe)	0,139	0,006	0,040	0,007	1,035
DOX	0,012	0,003	0,004	0,001	0,125

5.1.5 *In vivo* protinádorová aktivita

Protinádorová aktivita polymer – DOX konjugátů byla testována na laboratorních myších inbredního kmene C57BL/6 s inokulovanými buňkami modelového nádoru, myšního T-buněčného lymfomu EL4. Tento nádor je velmi agresivní a jeho léčba volným DOX je téměř neúčinná.



Obrázek 5-8 Protinádorová aktivita *K(Boc)* v závislosti na dávkování v terapeutickém režimu: růst EL4 T-buněčného lymfomu (A); přežití myší (B)

Testování *in vivo* aktivity je možné provádět v tzv. protektivním nebo terapeutickém módu. Při protektivním způsobu podání léčiva se léčivo začíná podávat následující den

po inokulaci nádorových buněk pokusným zvířatům, tedy ještě před zřetelným vytvořením nádoru. Blíže reálné situaci je ovšem terapeutický režim podání léčiva, při kterém je léčivo podáváno až při zjištění prvních známek růstu nádoru. Ve všech *in vivo* testech uvedených v disertační práci byl proto používán výhradně terapeutický režim podávání.

Konjugát **K(Boc)** byl velmi účinný v léčbě EL4 T-buněčného lymfomu (viz Obrázek 5-8). Nejnižší dávkou 1×25 mg DOX (ekvivalent)/kg bylo zcela vyléčeno 62 % myší. Trojnásobným opakováním této dávky (3×25 mg DOX (ekvivalent)/kg, opakování dávky vždy po 5 dnech) byla zvýšena protinádorová aktivita, léčbou bylo vyléčeno 80 % myší. Použití vysoké dávky 1×75 mg DOX (ekvivalent)/kg vedlo k vyléčení téměř 100 % myší (pouze 1 myš uhynula, avšak až po velmi dlouhé době od zahájení léčby). U všech dlouhodobě přežívajících myší došlo ke kompletní regresi nádoru.

Konjugát **K(OMe)** projevilo, podle očekávání, velmi podobnou protinádorovou aktivitu jako **K(Boc)**. Data proto nejsou znázorněna.

5.2 Příprava a studium vlastností konjugátů polymer – DOX obsahujících nabitě funkční skupiny

Záporně, či kladně nabitě funkční skupiny, zavedené do polymerní struktury, by mohly výrazně ovlivnit „osud“ konjugátu v organismu. V důsledku elektrostatických repulzí by mohly vzrůst rozměry polymerních klubek, vedoucích ke zvýšení EPR efektu, a tím i ke zvýšení protinádorové aktivity konjugátů. Nabitě skupiny by také mohly ovlivnit rychlost uvolňování léčiva, nebo zrychlit průnik konjugátů do nádorových buněk díky interakcím skupin s membránami^{186,187}. Tetrapeptidová sekvence GFLG by navíc mohla zvýšit penetraci konjugátů do buněk v důsledku zatím neobjasněného mechanismu⁸⁸.

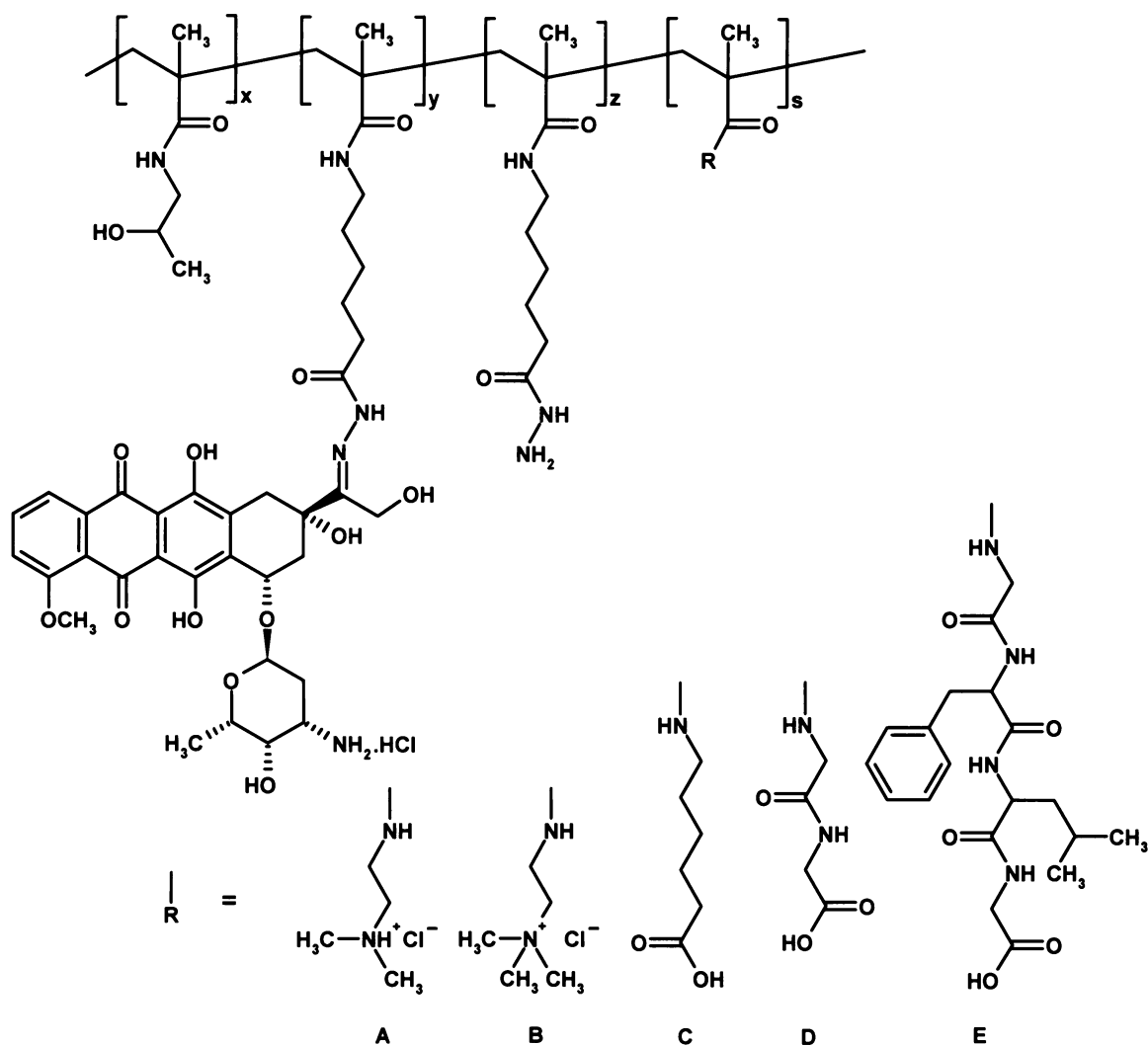
5.2.1 Příprava polymerních prekurzorů a konjugátů s DOX

Polymerní prekurzory byly připraveny roztokovou radikálovou kopolymerizací HPMA s monomerem obsahujícím chráněnou hydrazidovou skupinu (MA-εAhx-NHNH-Boc) a monomerem nesoucím nabitou funkční skupinu. Všechny monomery obsahovaly methakrylamidovou skupinu. Záporný náboj byl do struktury polymeru zaveden použitím různých methakrylovaných aminokyselinových sekvencí (MA-εAhx-OH, MA-GG-OH a MA-GFLG-OH). Kladný náboj byl zaveden do struktury kopolymeru použitím komonomeru obsahujícího hydrochlorid terciární dimethylamino skupiny nebo kvartérní trimethylammoniové báze (DMAEMA, resp. TMAEMA).

Tabulka 5-6 Charakteristiky polymerních prekurzorů nesoucích kladně nebo záporně nabitě skupiny

Polymerní prekurzor	Nabitá skupina	Obsah hydrazidů (mol.%)		Obsah nabitých skupin (mol.%)		\bar{M}_w (g.mol ⁻¹)	\bar{M}_w/\bar{M}_n
		v násadě	v ter-polymeru	v násadě	v ter-polymeru		
<i>P</i> (Boc)	-	8,0	5,3	-	-	24 200	1,7
<i>P</i> -GG-OH	GG-OH	8,0	5,4	3,5	3,3	20 100	1,6
<i>P</i> -GFLG-OH-1	GFLG-OH	8,0	5,4	1,5	1,2	22 500	1,6
<i>P</i> -GFLG-OH-2	GFLG-OH	8,0	5,3	2,5	2,4	20 300	1,6
<i>P</i> -GFLG-OH-3	GFLG-OH	8,0	5,1	4,0	3,3	25 900	1,5
<i>P</i> -GFLG-OH-4	GFLG-OH	8,0	4,1	5,5	5,2	21 200	1,7
<i>P</i> -εAhx-OH	εAhx-OH	8,0	5,3	5,0	4,3	19 300	1,9
<i>P</i> -DMAE	DMAE	8,0	5,4	5,0	6,1	20 500	1,8
<i>P</i> -TMAE	TMAE	8,0	5,7	5,0	7,2	21 900	2,0

Charakteristiky připravených polymerních prekurzorů jsou uvedeny v Tabulce 5-6. Přídavek nabitého komonomeru do polymerizační směsi významně neovlivnil molární hmotnost či index molekulární neuniformity. Složení terpolymerů přibližně odpovídalo složení kopolymerizačních směsí, což ukazuje na podobné kopolymerizační parametry. Výtěžky terpolymerizací se pohybovaly v rozmezí 65 – 75 %.



Obrázek 5-9 Schéma struktur konjugátů nesoucích nabitě funkční skupiny: **K-DMAE** (A), **K-TMAE** (B), **K-εAhx-OH** (C), **K-GG-OH** (D), **K-GFLG-OH** (E).

Všechny polymerní prekurzory byly použity pro vazbu DOX hydrazonovou vazbou. Charakteristiky polymer-DOX konjugátů jsou uvedeny v Tabulce 5-7. Přítomnost nabitých skupin neměla vliv na reakci hydrazidových skupin s DOX. Schéma struktur konjugátů jsou znázorněna na Obrázku 5-9.

Tabulka 5-7 Charakteristiky konjugátů s DOX nesoucích nabitě skupiny

Konjugát s DOX	Polymerní prekurzor	Obsah DOX (hm.%)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
<i>K</i> (Boc)	<i>P</i> (Boc)	10,0	25 000	1,8
<i>K</i> -GG-OH	<i>P</i> -GG-OH	7,6	22 000	1,7
<i>K</i> -GFLG-OH-1	<i>P</i> -GFLG-OH-1	7,2	24 600	1,7
<i>K</i> -GFLG-OH-2	<i>P</i> -GFLG-OH-2	6,9	26 100	1,8
<i>K</i> -GFLG-OH-3	<i>P</i> -GFLG-OH-3	5,9	26 300	1,9
<i>K</i> -GFLG-OH-4	<i>P</i> -GFLG-OH-4	5,9	21 600	1,8
<i>K</i> -εAhx-OH	<i>P</i> -εAhx-OH	7,3	25 800	2,2
<i>K</i> -DMAE	<i>P</i> -DMAE	8,2	21 900	2,1
<i>K</i> -TMAE	<i>P</i> -TMAE	8,7	23 700	2,2

5.2.2 Chování polymerních prekurzorů a konjugátů ve vodném prostředí

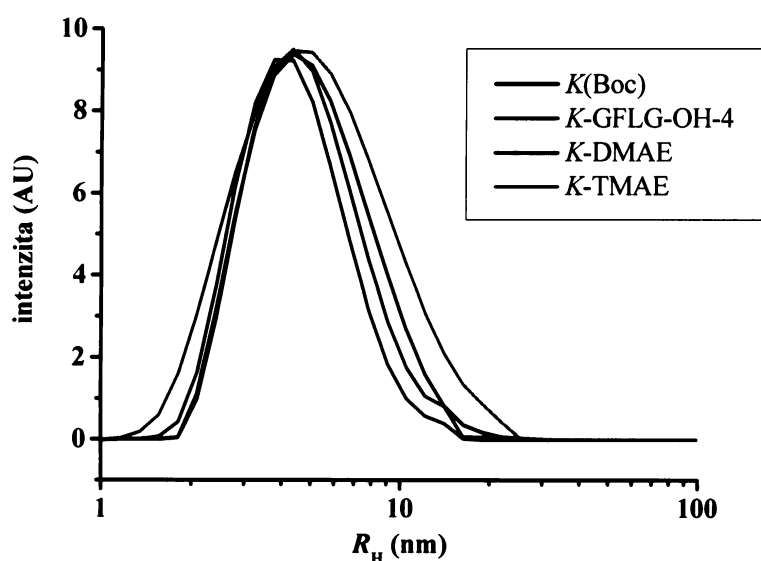
Akumulace makromolekul v pevných nádorech způsobená EPR efektem závisí na jejich molárních hmotnostech (hydrodynamických rozměrech) (viz kapitoly 2.2.3 a 2.5.2). Alternativou k vysokomolekulárním konjugátům, které jsou biodegradovatelné, nebo obsahují biodegradovatelné spojky mezi polymerními řetězci, mohou být systémy, kde by nárůstu hydrodynamických rozměrů polymerních nosičů bylo dosaženo buď botnáním polymerních klubek v důsledku elektrostatických repulzí, nebo díky „self-assembly“ krátkých polymerů do polymerních micel. Konjugáty popisované v této části práce, které obsahují nabitě skupiny podél polymerního řetězce, byly vhodnými kandidáty pro zvýšení rozměrů klubek právě díky elektrostatickým repulzím.

Tabulka 5-8 Hydrodynamické poloměry polymerních prekurzorů a konjugátů s DOX

Polymerní prekurzor	R_H (nm)	Konjugát s DOX	R_H (nm)
<i>P</i> (Boc)	3,8	<i>K</i> (Boc)	4,3
<i>P</i> -GG-OH	4,1	<i>K</i> -GG-OH	4,3
<i>P</i> -GFLG-OH-1	4,3	<i>K</i> -GFLG-OH-1	4,7
<i>P</i> -GFLG-OH-2	3,9	<i>K</i> -GFLG-OH-2	4,6
<i>P</i> -GFLG-OH-3	4,8	<i>K</i> -GFLG-OH-3	4,5
<i>P</i> -GFLG-OH-4	4,0	<i>K</i> -GFLG-OH-4	4,7
<i>P</i> -DMAE	3,9	<i>K</i> -DMAE	4,3
<i>P</i> -TMAE	4,0	<i>K</i> -TMAE	4,6

Hydrodynamické poloměry polymerních prekurzorů i konjugátů s DOX byly zjišťovány pomocí quasi-elastického rozptylu světla (QELS). Měření byla prováděna ve fyziologickém roztoku, ve kterém se zpravidla vodorozpustná léčiva intravenózně podávají. Průměrné hodnoty hydrodynamických poloměrů (R_H) jsou uvedeny

v Tabulce 5-8, distribuce R_H vybraných konjugátů jsou znázorněny na Obrázku 5-10. R_H - distribuce polymerních prekurzorů byly téměř shodné s R_H - distribucí konjugátů.



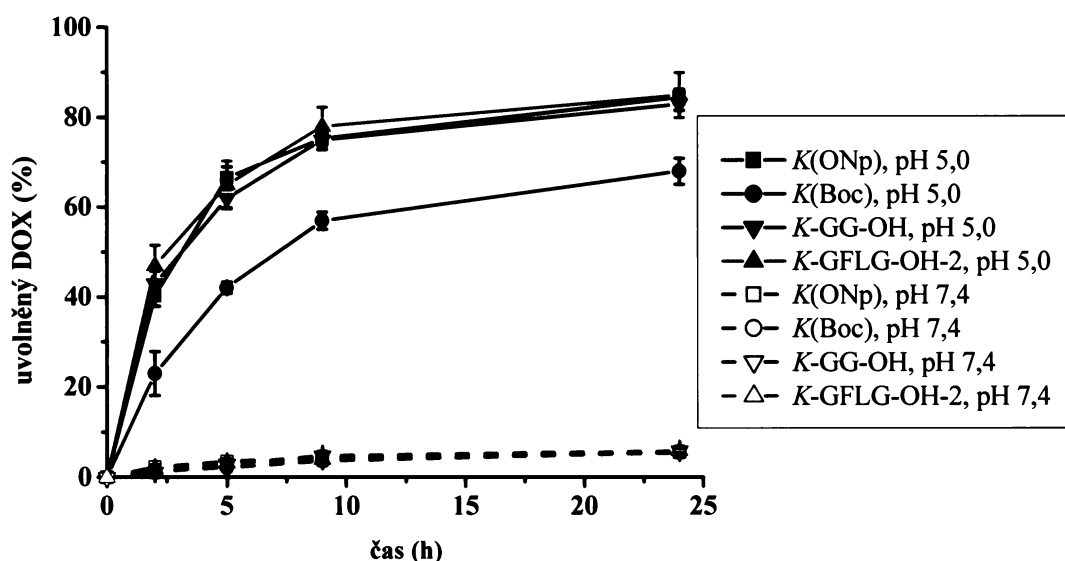
Obrázek 5-10 R_H - distribuce konjugátů s DOX obsahujících nabitě skupiny

Hydrodynamické poloměry všech polymerních prekurzorů i konjugátů byly srovnatelné s R_H polymerního prekurzoru **P(Boc)**, resp. konjugátu **K(Boc)** neobsahujícího nabitě skupiny ($R_H \approx 4 - 4,5$ nm). Distribuce R_H všech měřených polymerů byla relativně úzká. K očekávanému nárůstu R_H nedošlo u žádného z polymerních prekurzorů a konjugátů. Obsah nabitých skupin (méně než ≈ 8 mol.%) byl pravděpodobně příliš nízký, než aby způsobil změnu R_H polymerních klubek a jejich distribuci v důsledku elektrostatických repulzí. Je tedy možné předpokládat, že žádný z konjugátů nesoucích nabitě funkční skupiny neprojeví zvýšenou protinádorovou aktivitu při léčbě pevných nádorů v důsledku EPR efektu.

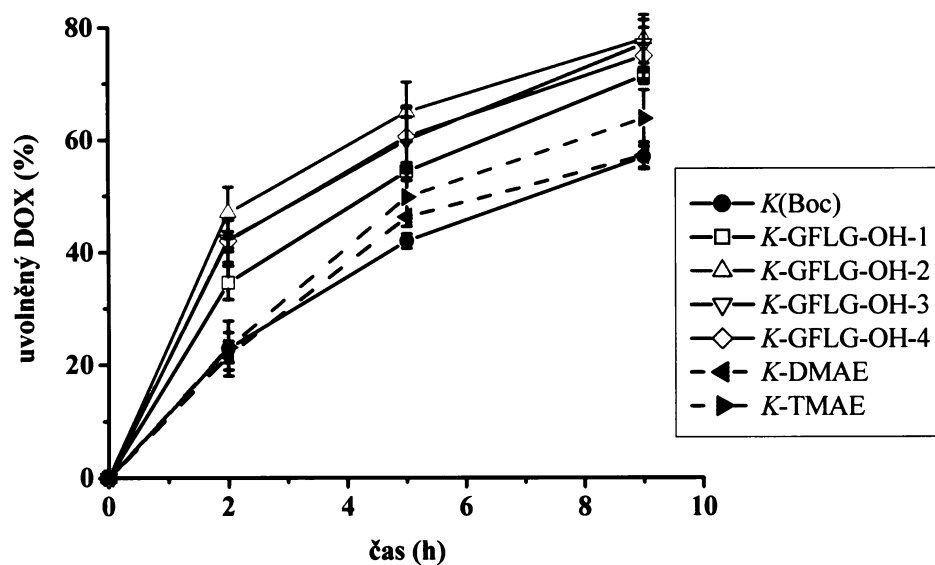
5.2.3 Uvolňování léčiva v *in vitro* podmínkách

V kapitole 5.1.3 jsme uvedli, že rychlost uvolňování DOX při pH 5,0 z konjugátu **K(ONp)** byla vyšší než rychlost uvolňování z konjugátu **K(Boc)**. Vyjádřili jsme hypotézu, že vzrůst rychlosti byl způsoben přítomností karboxylových skupin v **K(ONp)** vzniklých hydrolyzou ONp skupin. Aby byla správnost hypotézy ověřena, byly připraveny konjugáty obsahující definované množství karboxylových skupin v polymerní struktuře. Rychlost uvolňování DOX ze dvou konjugátů **K-GG-OH** a **K-GFLG-OH-2** obsahujících karboxylové skupiny byla podobná rychlosti uvolňování DOX z **K(ONp)** (viz Obrázek

5-11). Přítomnost karboxylových skupin v polymerní struktuře tedy zřejmě snižuje pH v okolí polymerních řetězců a vede ke zvýšení rychlosti kyselě katalyzované hydrolyzy a uvolňování DOX v pufru o pH 5,0. To znamená, že rychlost uvolňování DOX by mohla být ovlivněna zavedením definovaného množství karboxylových skupin do polymerní struktury kopolymerizací. Bylo ovšem pozorováno, že i malé množství -COOH skupin (1 – 2,5 mol.%) **K-GFLG-OH-1** a **K-GFLG-OH-2** vedlo ke zvýšení rychlosti uvolňování DOX při pH 5,0 (viz Obrázek 5-12). Další zvýšení obsahu -COOH skupin **K-GFLG-OH-3** a **K-GFLG-OH-4** již nevedlo k dalšímu nárůstu rychlosti uvolňování.



Obrázek 5-11 Uvolňování DOX z konjugátů ve fosfátových pufrách při 37 °C. Vliv přítomnosti -COOH skupin.



Obrázek 5-12 Uvolňování DOX z konjugátů ve fosfátovém pufru o pH 5,0 při 37 °C. Vliv přítomnosti a obsahu nabitých skupin.

Přítomnost kladně nabitých skupin v kopolymerech (**K-DMAE** a **K-TMAE**) významně neovlivnila rychlost uvolňování DOX při pH 5,0, která tak byla srovnatelná s rychlostí uvolňování DOX z konjugátu neobsahujícího nabitě skupiny - **K(Boc)** (viz Obrázek 5-12). Mírné zvýšení rychlosti uvolňování léčiva z **K-TMAE** by nemělo být bráno v potaz, naměřené hodnoty se pohybovaly v rámci experimentální chyby měření.

Všechny konjugáty byly relativně stabilní v pufru o pH 7,4. Rychlosti uvolňování DOX byly v těchto podmínkách přibližně stejné. Změna struktury konjugátů nevedla k žádnému významnému zvýšení rychlosti uvolňování, volné léčivo by proto mělo být v průběhu transportu krevním řečištěm uvolňováno z konjugátů jen minimálně.

5.2.4 Cytostatická aktivita

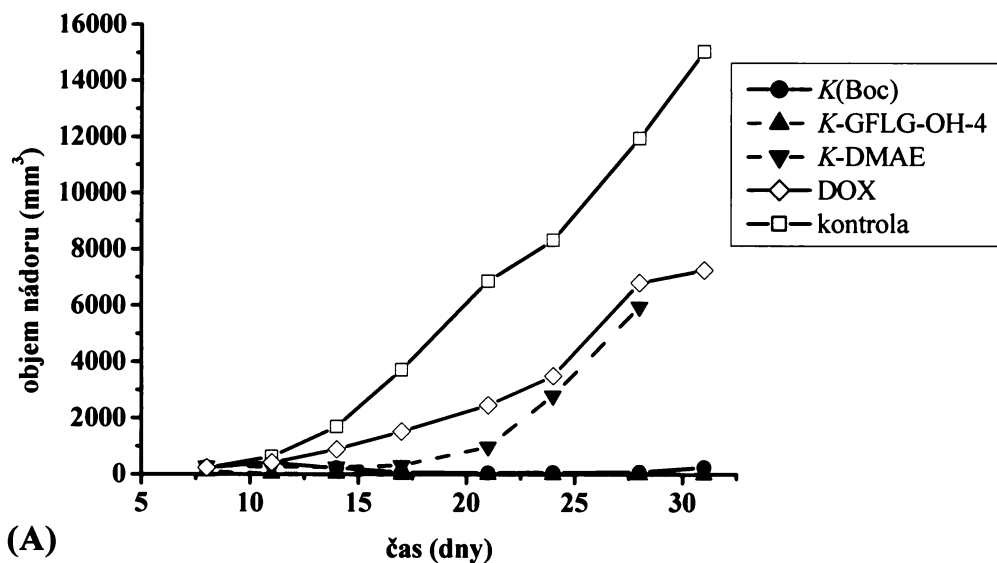
Všechny testované konjugáty prokázaly velmi vysokou cytostatickou aktivitu, srovnatelnou s volným DOX (viz Tabulka 5-9), která opět významně závisela na použitém typu nádorových buněk. Ani testy provedené s méně citlivými liniemi (EL4 T-buněčný lymfom, Jurkat lidská T-buněčná leukemie) neukázaly podstatné rozdíly v cytostatické aktivitě konjugátů. Velmi malé rozdíly v naměřených cytostatických aktivitách připravených konjugátů bohužel nedovolují podrobně diskutovat závislosti mezi aktivitou a strukturou konjugátů.

Tabulka 5-9 Cytostatická aktivita konjugátů vyjádřená jako IC₅₀ v µg DOX/ml

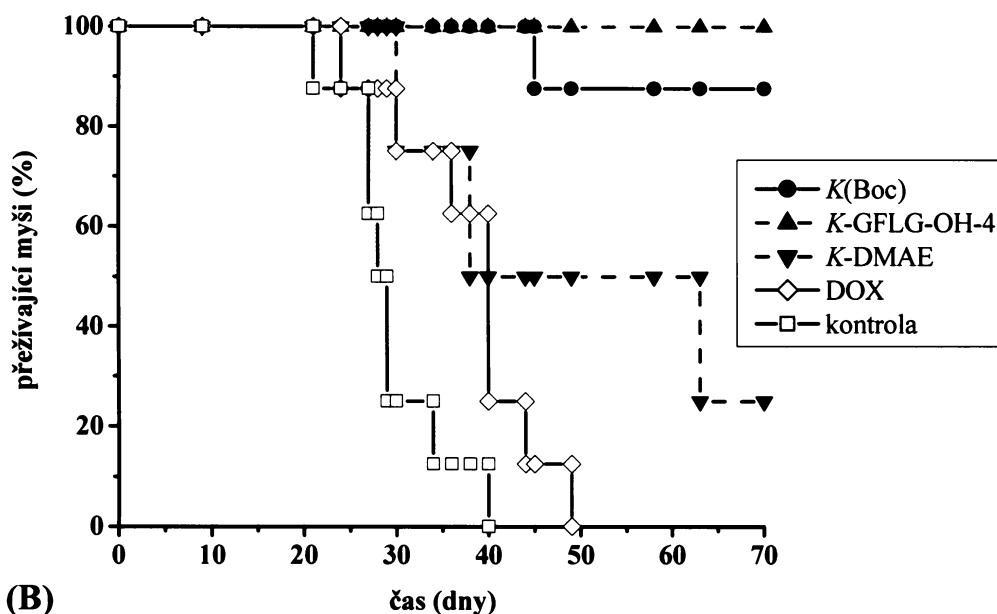
	EL4	38C13	SW620	Raji	Jurkat
<i>K(Boc)</i>	0,275	0,011	0,035	0,006	0,595
<i>K-GFLG-OH-1</i>	0,709	0,010	0,016	0,002	0,916
<i>K-GFLG-OH-2</i>	0,301	0,010	0,028	0,003	1,016
<i>K-GFLG-OH-4</i>	0,509	0,008	0,037	0,002	1,301
<i>K-εAhx-OH</i>	0,247	0,009	0,083	0,013	0,800
<i>K-DMAE</i>	0,080	0,005	0,016	0,004	1,025
<i>K-TMAE</i>	0,632	0,013	-	-	-
DOX	0,030	0,002	0,010	0,003	0,056

5.2.5 *In vivo* protinádorová aktivita

Konjugáty **K(Boc)**, **K-GFLG-OH-4** a **K-DMAE** byly při podání 2×25 mg DOX(ekvivalent)/kg myším kmene C57BL/6 nesoucím inokulovaný nádor myšího T-buněčného lymfomu EL4 vysoce účinné, léčba vedla ke kompletní regresi nádoru, nebyl nalezen rozdíl v účinnosti (data nejsou znázorněna).



(A)

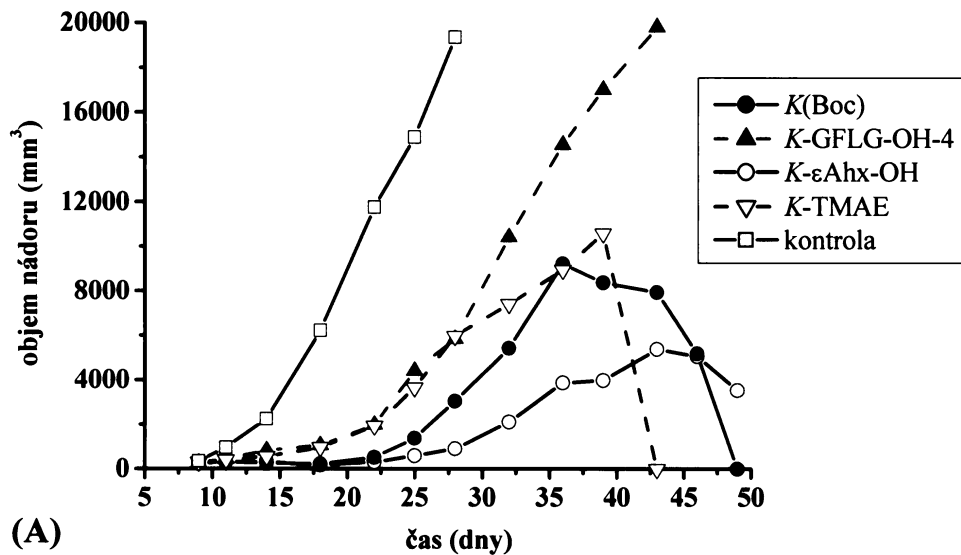


(B)

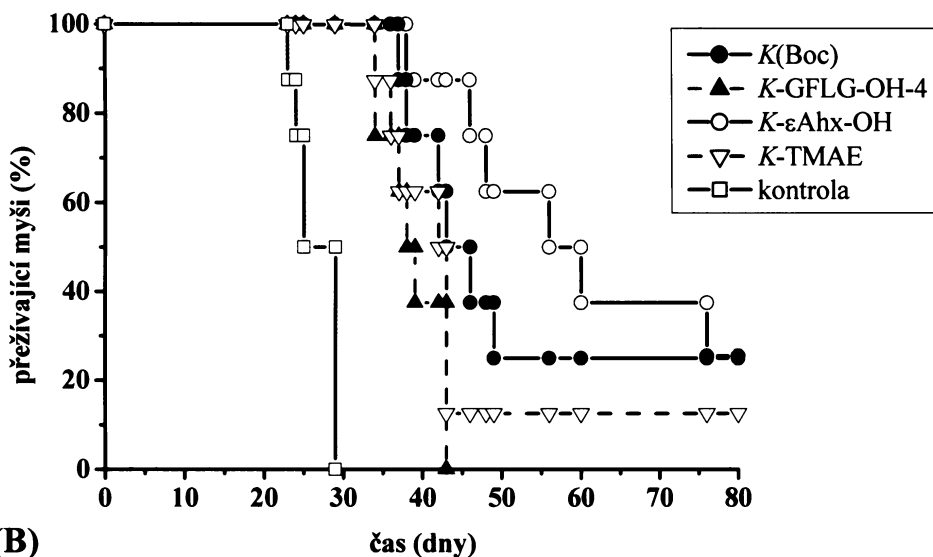
Obrázek 5-13 Protinádorová aktivita **K-GFLG-OH-4**, **K-DMAE**, **K(Boc)** a **DOX.HCl** (terapeutický režim, 1×15 mg DOX (ekvivalent)/kg pro konjugáty a 2×5 mg DOX/kg pro DOX): růst EL4 T-buněčného lymfomu (A); přežití myši (B)

Při nižším dávkování (1×15 mg DOX(ekvivalent)/kg) **K(Boc)** a **K-GFLG-OH-4** byl růst nádoru kompletně inhibován, nádor zmizel a nebyl hmatatelný již po 17. dnu po inokulaci nádorových buněk (viz Obrázek 5-13). Oproti nim inhibice růstu nádoru konjugátem **K-DMAE** byla při stejném dávkování mnohem menší, avšak stále větší než inhibice růstu volným DOX. Přežití myši ukázalo jisté rozdíly v aktivitách konjugátů. Nejúčinněji působil **K-GFLG-OH-4** (100 % dlouhodobě přežívajících myši). Vysokou

účinnost prokázal i **K(Boc)** (88 % dlouhodobě přežívajících myší). Aktivita konjugátu **K-DMAE** nesoucího kladný náboj byla sice nejnižší (25 % dlouhodobě přežívajících myší), avšak byla stále mnohem vyšší než aktivita volného DOX. Při léčbě volným DOX došlo pouze k prodloužení doby života o ~ 30 %, přičemž nepřežilo žádné laboratorní zvíře.



(A)



(B)

Obrázek 5-14 Protinádorová aktivita **K-GFLG-OH-4**, **K-εAhx-OH**, **K-TMAE** a **K(Boc)** (terapeutický režim, 1×15 mg DOX (ekvivalent)/kg): růst EL4 T-buněčného lymfomu (A); přežití myší (B)

Pro rozlišení vlivu GFLG sekvence a -COOH skupin byly porovnány aktivity konjugátů **K-GFLG-OH-4** a **K-εAhx-OH** nesoucí oligopeptid nebo kyselinu 6-aminohexanovou. Test byl proveden při stejném suboptimálním dávkování 1×15 mg DOX(ekvivalent)/kg. Zároveň byla sledována i aktivita **K-TMAE** nesoucího kvartérní ammoniovou skupinu. **K-GFLG-OH-4**, **K-εAhx-OH** i **K-TMAE** ovšem neprojevily výrazně lepší protinádorovou aktivitu oproti **K(Boc)** (25 % dlouhodobě přežívajících myší) (viz Obrázek 5-14).

Ze srovnání *in vivo* testů protinádorové aktivity (EL4 T-buněčný lymfom, terapeutický režim, 1×15 mg DOX (ekvivalent)/kg) je zřejmé, že zavedení kladně či záporně nabitých funkčních skupin do polymerní struktury nevedlo k výraznému zvýšení protinádorové aktivity v terapeutickém režimu podávání léčiva.

5.3 Příprava a studium vlastností polymer – DOX konjugátů obsahujících hydrofobní substituenty

Obdobně jako nabitě funkční skupiny, zavedené do polymerní struktury, by i hydrofobní substituenty mohly výrazně ovlivnit „osud“ konjugátu v organismu. V důsledku hydrofobních interakcí by mohly konjugáty vytvářet ve vodném prostředí micelární struktury. Zvětšení rozměrů a molární hmotnosti micel by pak mohly vést ke zvýšení EPR efektu, a tím i ke zvýšení protinádorové aktivity konjugátů. Hydrofobní substituenty by mohly rovněž ovlivnit rychlost uvolňování léčiva nebo ovlivnit průnik konjugátu do nádorových buněk díky hydrofobním interakcím s membránami.

5.3.1 Příprava polymerních prekurzorů a konjugátů s DOX

V závislosti na hydrofobicitě a detailní struktuře byly vybrány tři různé hydrofobní substituenty. Nejkratší a nejméně hydrofobní uhlíkatý řetězec (12 C atomů) představoval alifatický dodecylový substituent. Jako příklad alifatického metabolizovatelného substituentu byl použit derivát kyseliny olejové (*cis*-9-oktadekanové) (18 C atomů). Nejvíce hydrofobní substituent byl odvozen od cholesterolu (27 C atomů), který má na rozdíl od předchozích lineárních substituentů cyklickou strukturu.

Polymerní prekurzory byly připraveny dvěma různými způsoby. Hydrofobní substituenty byly do polymerní struktury zavedeny buď polymer-analogickou reakcí, nebo terpolymerizací. V prvním případě byla část hydrazidových skupiny polymerního prekurzoru *P*(Boc), resp. *P*(Boc)-5 použita pro reakci s hydrofobní sloučeninou nesoucí reaktivní skupiny (sukcinimidyl oleát). Reakce proběhla kvantitativně. Polymerní prekurzory připravené tímto způsobem jsou charakterizovány v Tabulce 5-10.

Tabulka 5-10 Charakteristiky polymerních prekurzorů nesoucích hydrofobní substituenty, které byly připraveny polymer-analogickou reakcí

Polymerní prekurzor	Obsah hydrazidů (mol.%)	Obsah hydrofobního substituentu (mol.%)		\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
		teoreticky	v terpolymeru		
<i>P</i> (Boc)	5,3	-	-	24 200	1,7
<i>P</i> -oleoyl-1	4,3	1,0	1,0	20 800	1,9
<i>P</i> -oleoyl-2	3,4	2,0	1,9	19 200	1,9
<i>P</i> (Boc)-5*	7,6	-	-	24 400	1,9
<i>P</i> -oleoyl-3	2,5	5,0	4,8	20 500	1,9

**P*(Boc)-5 byl připraven podobně jako *P*(Boc), ale s větším obsahem monomeru s hydrazidovými skupinami v násadě (11 mol.%)

Druhá metoda přípravy prekurzorů byla založena na terpolymerizaci HPMA s monomerem nesoucím hydrazidové skupiny a komerčně dostupným dodecyl methakrylátem nebo námi syntetizovaným cholesterylovým esterem 6-(methakryloylamino)hexanové kyseliny. Výtěžky terpolymerizací se pohybovaly v rozmezí 65 – 75 %. Obsah monomerních jednotek v terpolymerech přibližně odpovídal zastoupení monomerů v polymerizační násadě. Polymerní prekurzory připravené tímto způsobem jsou charakterizovány v Tabulce 5-11.

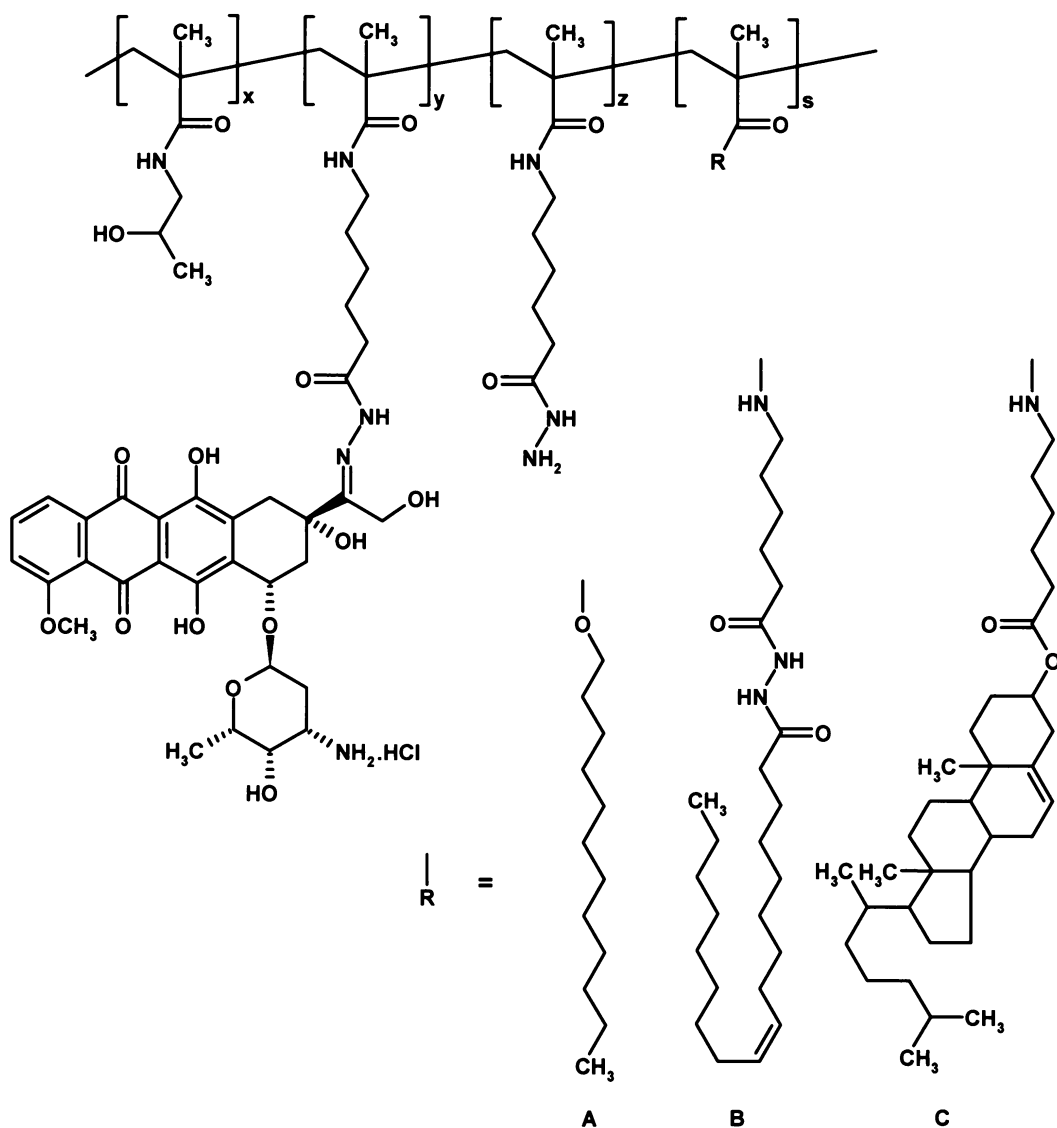
Tabulka 5-11 Charakteristiky polymerních prekurzorů nesoucích hydrofobní substituenty připravených terpolymerizací

Polymerní prekurzor	Obsah hydrazidů (mol.%)		Obsah hydrofobního substituentu (mol.%)		\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
	v násadě	v terpolymeru	v násadě	v terpolymeru		
<i>P</i> -dodecyl-1	7,0	5,1	1,5	1,6	22 900	2,1
<i>P</i> -dodecyl-2	7,0	4,3	5,0	4,7	29 500	2,4
<i>P</i> -cholesteryl-1	7,0	5,5	1,5	1,4	16 300	2,2
<i>P</i> -cholesteryl-2	7,0	4,6	3,0	2,8	17 300	2,0
<i>P</i> -cholesteryl-3	7,0	4,4	5,0	5,0	20 500	2,3

Polymerní prekurzory byly využity pro navázání DOX hydrazonovou vazbou. Charakterizace polymer-DOX konjugátů je uvedena v Tabulce 5-12, jejich struktura je znázorněna na Obrázku 5-15. Reakce nebyla ovlivněna přítomností hydrofobních substituentů ve struktuře polymerních prekurzorů.

Tabulka 5-12 Charakteristiky konjugátů s DOX nesoucích hydrofobní substituenty

Konjugát s DOX	Polymerní prekurzor	Obsah DOX (hm.%)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
<i>K</i> (Boc)	<i>P</i> (Boc)	10,0	25 000	1,8
<i>K</i> -dodecyl-1	<i>P</i> -dodecyl-1	7,7	27 200	1,9
<i>K</i> -dodecyl-2	<i>P</i> -dodecyl-2	8,7	32 500	2,0
<i>K</i> -oleoyl-1	<i>P</i> -oleoyl-1	7,8	29 900	2,0
<i>K</i> -oleoyl-2	<i>P</i> -oleoyl-2	7,8	32 400	2,1
<i>K</i> -oleoyl-3	<i>P</i> -oleoyl-3	6,1	29 000	1,9
<i>K</i> -cholesteryl-2	<i>P</i> -cholesteryl-1	8,6	23 700	2,0
<i>K</i> -cholesteryl-2	<i>P</i> -cholesteryl-2	8,7	24 500	2,2



Obrázek 5-15 Schéma struktur konjugátů nesoucích hydrofobní substituenty: *K*-dodecyl (A), *K*-oleoyl (B), *K*-cholesteryl (C).

5.3.2 Chování polymerních prekurzorů a konjugátů ve vodném prostředí

Chování polymerních prekurzorů a konjugátů bylo studováno ve fyziologickém roztoku, který má obdobnou iontovou sílu jako tělní tekutiny. Z tohoto důvodu byl tento roztok použit jako vhodné modelové prostředí. Terpolymery (kromě *P*-cholesteryl-3) se kompletně rozpouštěly během 15 – 20 min pouze za použití míchání a ultrazvuku. Často používaný složitý způsob přípravy micel, založený na krokové dialýze ze selektivního rozpouštědla do vody^{82, 122} proto nebyl nutný.

Vlastnosti polymerních prekurzorů v roztoku byly měřeny pomocí QELS. Použitý přístroj (Zetasizer) vyhodnocoval rozptýlené světlo z jednoho zadního úhlu (173°),

což postačovalo pro určení hydrodynamických rozměrů. Molární hmotnosti konjugátů vypočítané z intenzity rozptýleného světla při tomto úhlu jsou ovšem pouze zdánlivými molárními hmotnostmi (M_{app}). Navíc hodnoty M_{app} nebyly extrapolovány na nulovou koncentraci (použitá koncentrace byla 20 g.l^{-1} pro **K(Boc)** nebo 10 g.l^{-1} pro konjugáty s hydrofobními substituenty). Proto M_{app} a stejně tak i hustota ρ a agregační číslo n_a vypočtené pomocí M_{app} by proto měly být chápány jen jako orientační hodnoty. Skutečné molární hmotnosti by měly být vyšší, jak je zřejmé ze srovnání hodnot M_{app} a \overline{M}_w v případě konjugátu **K(Boc)**. Toto pozorování potvrzuje popsané stanovení druhého viriálního koeficientu A_2 , který byl určen pro obdobný lineární vodorozpustný polymer – DOX konjugát se shodným obsahem DOX. Tento koeficient byl kladný ($A_2 = 5 \cdot 10^{-4}$)¹⁷⁸, což znamená, že s klesající koncentrací kopolymeru stoupá jeho zdánlivá molární hmotnost. Proto skutečné molární hmotnosti konjugátů by měly být vyšší než M_{app} .

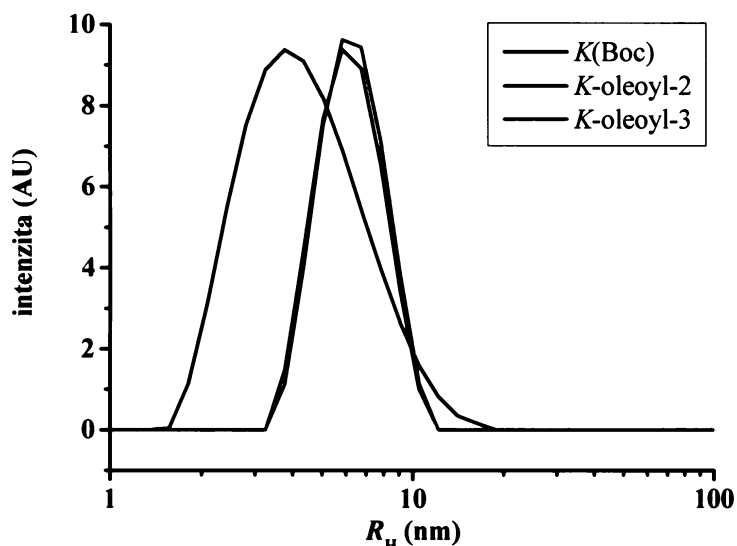
Zavedení hydrofobních substituentů do polymerní struktury vedlo ve většině případů k výrazné změně chování ve vodném prostředí. Polymerní prekurzory a konjugáty tvořily ve vodném prostředí polymerní asociáty nebo micely. Charakteristiky jejich chování jsou uvedeny v Tabulce 5-13. Výjimky tvořily **P-oleoyl-1** a **K-oleoyl-1**, které obsahovaly příliš nízký obsah oleoylových skupin umožňující tvorbu micel či asociátů. Rozdíl mezi M_{app} a \overline{M}_w u konjugátu **K-oleoyl-1** je možné vysvětlit stejným způsobem jako rozdíl molekulových hmotností konjugátu **K(Boc)**. Naopak **P-cholesteryl-3** obsahoval příliš mnoho silně hydrofobních cholesterylových skupin znemožňujících přímé rozpuštění kopolymeru ve fyziologickém roztoku.

Tabulka 5-13 Charakteristiky chování polymerních prekurzorů či konjugátů s DOX ve fyziologickém roztoku

Polymerní prekurzor	R_H (nm)	Konjugát s DOX	R_H (nm)	M_{app} (g.mol^{-1})	ρ (g.cm^{-3})	n_a
<i>P</i> (Boc)	3,8	<i>K</i> (Boc)	4,3	11 000	0,05	~1
<i>P</i> -dodecyl-1	6,7	<i>K</i> -dodecyl-1	6,1	22 000	0,04	~1
<i>P</i> -dodecyl-2	5,6	<i>K</i> -dodecyl-2	6,5	37 000	0,05	1,1
<i>P</i> -oleoyl-1	4,0	<i>K</i> -oleoyl-1	4,0	14 000	0,09	~1
<i>P</i> -oleoyl-2	6,8	<i>K</i> -oleoyl-2	6,4	110 000	0,17	3,4
<i>P</i> -oleoyl-3	6,6	<i>K</i> -oleoyl-3	6,4	170 000	0,26	5,9
<i>P</i> -cholesteryl-1	8,8	<i>K</i> -cholesteryl-1	9,6	41 000	0,02	1,7
<i>P</i> -cholesteryl-2	17,9	<i>K</i> -cholesteryl-2	18,4	460 000	0,03	19

n_a – agregační číslo, udávající poměr M_{app}/\overline{M}_w konjugátu

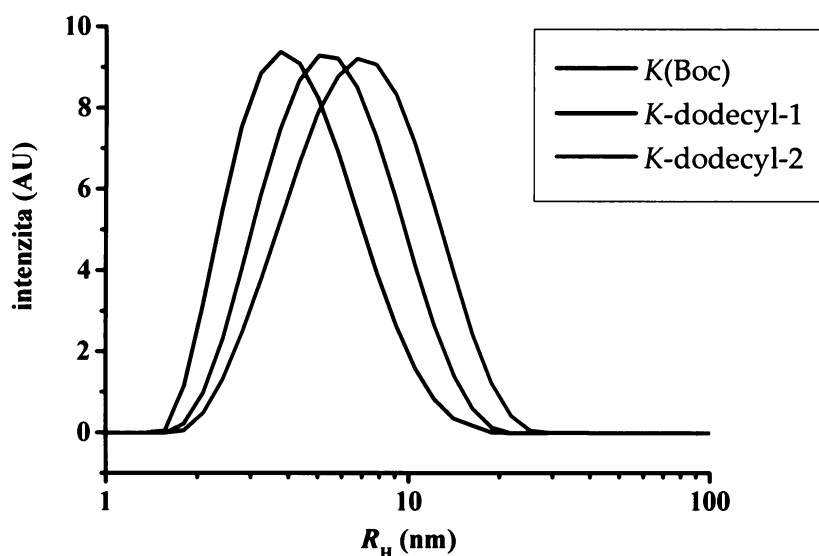
Polymerní prekurzory či konjugáty, které obsahovaly více než 1 mol.% oleoylové skupiny, tvořily ve fyziologickém roztoku micely s úzkou distribucí velikostí a $R_H \sim 6,5$ nm. Došlo k nárůstu M_{app} ($\sim 1 - 2 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹) a ρ ($\sim 0,2$ g.cm⁻³) přibližně o jeden řád. O vzniku micel svědčí také vzrůst agregačního čísla. Distribuce R_H micel vytvořených z polymerních konjugátů obsahujících oleoylové skupiny jsou znázorněny na Obrázku 5-16.



Obrázek 5-16 R_H - distribuce konjugátů obsahujících oleoylové skupiny

Zajímavé zjištění vyplynulo ze srovnání chování kopolymerů obsahujících oleoylové skupiny ve vodě a v 0,15 M vodném roztoku NaCl. Zatímco polymerní prekurzory tvořily stabilní micely v obou prostředích, v případě konjugátů s léčivem byla ve vodě rovnováha unimer – micela posunuta směrem k unimeru a micely byly jen málo stabilní. Tento jev byl zřejmě způsoben protonací aminoskupin DOX, který působil proti tvorbě micel.

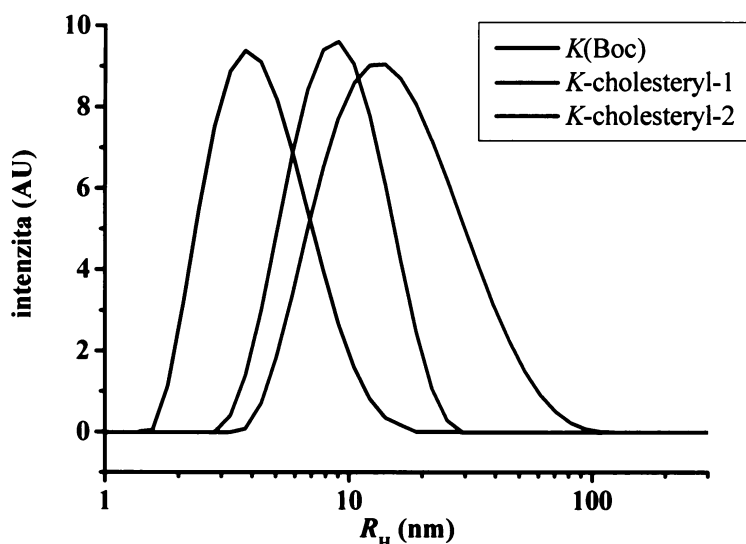
U všech polymerních prekurzorů nebo konjugátů obsahujících dodecylovou skupinu vzrostl hydrodynamický poloměr ($R_H \sim 6 - 6,5$ nm) obdobně jako v případě konjugátů obsahujících více než 1 mol.% oleoylové skupiny. Jejich M_{app} ovšem vzrostlo jen velmi málo, a to i v případě použití nejvyššího obsahu hydrofobní skupiny. Také nedošlo ke zvýšení hustoty a agregačního čísla nebo ke zúžení distribuce R_H (viz Obrázek 5-17), tedy k charakteristikám, které zpravidla dokládají tvorbu micel. Lze se tedy domnívat, že nanejvýš došlo k tvorbě malých stabilních asociátů, nikoliv však ke tvorbě micel.



Obrázek 5-17 R_H - distribuce konjugátů obsahujících dodecylové skupiny ve vodném prostředí

Polymery nesoucí vysoce hydrofobní substituent cholesteryl tvořily nadmolekulární útvary s nejvyššími R_H . (Distribuce R_H micel jsou znázorněny na Obrázku 5-18.) Jejich R_H byly přibližně třikrát větší než R_H micel obsahujících oleoyl. M_{app} a n_a konjugátu ***K-cholesteryl-2*** také velmi významně vzrostly. Oproti micelám obsahujících oleoyl ovšem nedošlo k nárůstu hustoty a rovněž distribuce R_H nebyly úzké (viz Obrázek 5-18). Struktura těchto nadmolekulárních útvarů se spíše podobá náhodným asociátům, tvořeným ohebnými polymerními řetězci spojenými hydrofobními bodovými kontakty cholesterolu¹⁸⁸. Díky planární struktuře cholesterolu pak lze předpokládat, že bodové kontakty připomínají „sendvičovou“ strukturu. Vytvořené částice zřejmě připomínají fyzikálně síťované mikrogely. Stanovení přesné nadmolekulární struktury těchto konjugátů bude věnována navazující práce.

Konjugát ***K-cholesteryl-2*** měl největší hydrodynamické rozměry ze všech připravených konjugátů obsahujících hydrofobní skupiny. Částice o průměru téměř 40 nm splňují předpoklad pro účinnou extravasaci do nádorové tkáně. Lze proto předpokládat, že by mohl prokázat větší protinádorovou aktivitu než ostatní konjugáty, a to v důsledku možnosti většího uplatnění EPR efektu.



Obrázek 5-18 R_H - distribuce konjugátů obsahujících cholesterýlové skupiny

Kritické asociační koncentrace (CAC) připravených konjugátů byly zjišťovány pomocí metody využívající zvýšení intenzity fluorescence pyrenu při přechodu z vodného prostředí do hydrofobního jádra micely při konstantní celkové koncentraci pyrenu. Tyto kritické koncentrace byly stanoveny pouze pro polymerní prekurzory s nejvyšším obsahem hydrofobního substituentu. CAC micel vytvořených z konjugátu **K-oleoyl-3** byla $0,176 \pm 0,009 \text{ g.l}^{-1}$ a z konjugátu **K-cholesteryl-2** $0,044 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$. CAC konjugátů odpovídajících měřeným prekurzorům nebyly stanoveny, neboť fluorescenční spektrum DOX se překrývá se spektrem pyrenu. CAC blokových kopolymerů ve vodném prostředí se zpravidla pohybuje v hodnotách 0,001 až 0,010⁷⁸. Vzhledem k těmto hodnotám byly námi připravené micely nebo asociáty o něco méně stabilní než micely tvořené blokovými kopolymerem.

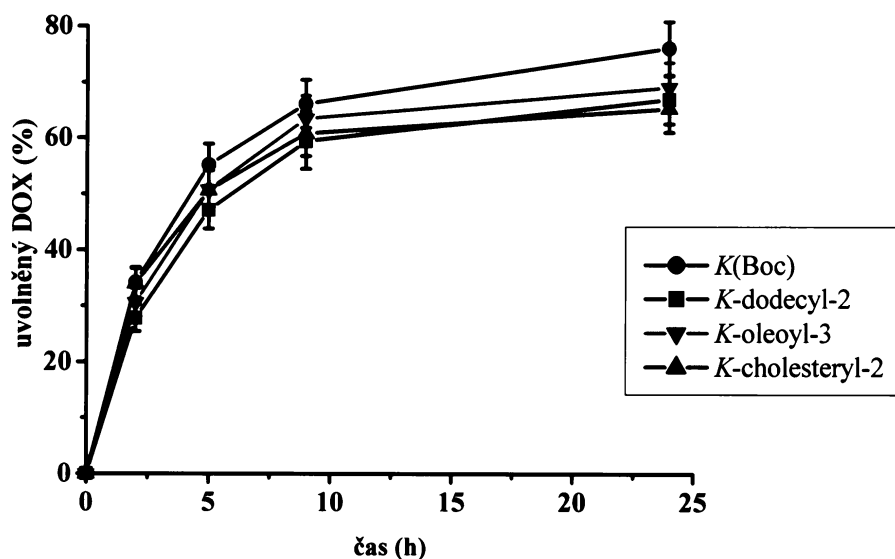
Obecně mohou amfifilní unimery, uvolněné z micelárních nosičů v průběhu transportu krevním řečištěm, působit jako detergenty, a tím narušovat buněčné membrány, což může vést ke smrti buněk (toxické účinky na zdravou tkáň). Proto byly provedeny předběžné *in vitro* testy toxicit těchto látek na buněčných kulturách, výsledky budou diskutovány v kapitole 5.3.4.

5.3.3 Uvolňování léčiva v *in vitro* podmínkách

Ve většině micelárních nosičů bývá léčivo navázáno k polymerním řetězcům tvořícím hydrofobní jádro micel. Oproti tomu bylo v našem případě léčivo navázáno k hydrofilní části micelárního nosiče, terpolymeru na bázi HPMA. Z tohoto důvodu by měl být DOX, vázaný v hydrofilním obalu micel, snadněji uvolňován, aniž by musel překonávat sterické zábrany nebo hydrofobní interakce.

Rychlost uvolňování DOX při pH 5,0 z **K-oleoyl-3**, stanovená stejnou metodou jako v případě konjugátů diskutovaných v předchozích kapitolách, byla významně nižší než rychlost uvolňování z **K(Boc)** (přibližně o 20 % za 24 h). Zdánlivé snížení obsahu volného DOX v inkubační směsi mohlo být způsobeno vazbou volného hydrofobního léčiva na hydrofobní složky micely poměrně silnou vazbou, kterou se při stanovení extrakční metodou nepodařilo rozrušit, a tak se i volné léčivo mohlo chovat jako polymerně vázané a zůstat ve vodné vrstvě. To nás vedlo k vypracování nové metody stanovení obsahu volného DOX v inkubační směsi. Inkubované vzorky byly analyzovány přímo pomocí SEC. Použitá mobilní fáze složená z 80 obj.% z methanolu by měla rozrušit případné hydrofobní interakce mezi uvolněným léčivem a micelárním konjugátem. V důsledku toho by touto metodou mělo být stanoveno veškeré množství DOX uvolněného hydrolýzou hydrazonové vazby. Výsledky této metody stanovení rychlosti uvolňování nás vedly k závěru, že u původní metody využívající extrakce nebylo veškeré uvolněné léčivo extrahováno do organické vrstvy a výsledky byly zatíženy značnou chybou. U všech micelárních konjugátů byla proto pro stanovení rychlosti uvolňování DOX z nosiče použita metoda SEC.

Rychlost uvolňování DOX z vybraných konjugátů je znázorněna na Obrázku 5-19. Nejrychleji byl DOX uvolňován z **K(Boc)** (76 % za 24 h). Z ostatních konjugátů bylo léčivo uvolňováno jen o něco málo pomaleji (67 % za 24 h z **K-dodecyl-2**, 69 % z **K-oleoyl-3** a 65 % z **K-cholesteryl-2**). Přítomnost hydrofobních skupin v polymerní struktuře tedy významně neovlivnila rychlost hydrolýzy hydrazonové vazby při pH 5,0.



Obrázek 5-19 Uvolňování DOX z konjugátů ve fosfátovém pufru o pH 5,0 při 37 °C. Vliv přítomnosti hydrofobních substituentů.

Rychlost uvolňování DOX z micel inkubovaných při pH 7,4 se stejně jako v případě konjugátů nesoucích nabitě skupiny významně nelišila v závislosti na struktuře kopolymeru (~ 5 % za 24 h) (viz kapitola 5.2.3). Případné rozdíly se pohybovaly v rámci chyby měření.

5.3.4 Cytostatická aktivita

Oba testované konjugáty prokázaly velmi vysokou cytostatickou aktivitu (viz Tabulka 5-14). Testy provedené s méně citlivými liniemi (EL4 T-buněčný lymfom, Jurkat lidská T-buněčná leukemie) neukázaly podstatné rozdíly v cytostatické aktivitě konjugátů, podobně jako v případě konjugátů nesoucích nabitě funkční skupiny.

Tabulka 5-14 Cytostatická aktivita konjugátů s DOX a jejich polymerních prekurzorů vyjádřená jako IC₅₀ v µg DOX/ml

	EL4	38C13	SW620	Raji	Jurkat
<i>P</i> -oleoyl(3)	> 400	141	> 400	-	> 400
<i>P</i> -cholesteryl(2)	> 400	255	> 400	-	> 400
<i>K</i> -oleoyl(3)	0,151	0,007	0,040	0,010	0,124
<i>K</i> -cholesteryl(2)	0,159	0,005	0,040	0,013	0,120
DOX	0,010	0,001	0,003	0,001	0,119

Narozdíl od polymerních konjugátů žádný z testovaných polymerních prekurzorů neprojevil cytostatickou aktivitu vůči nádorovým liniím. Lze proto očekávat, že konjugáty

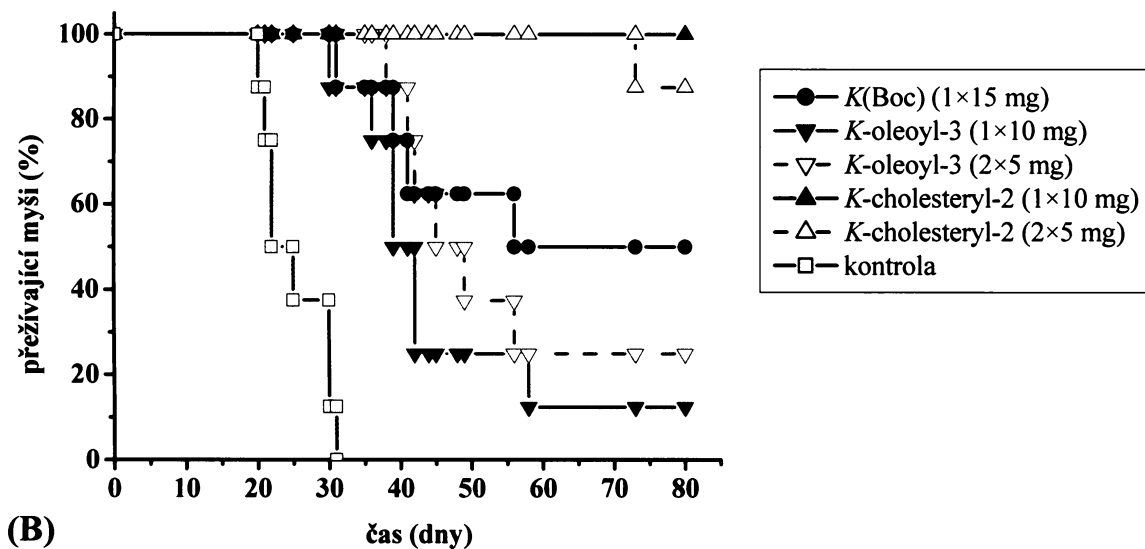
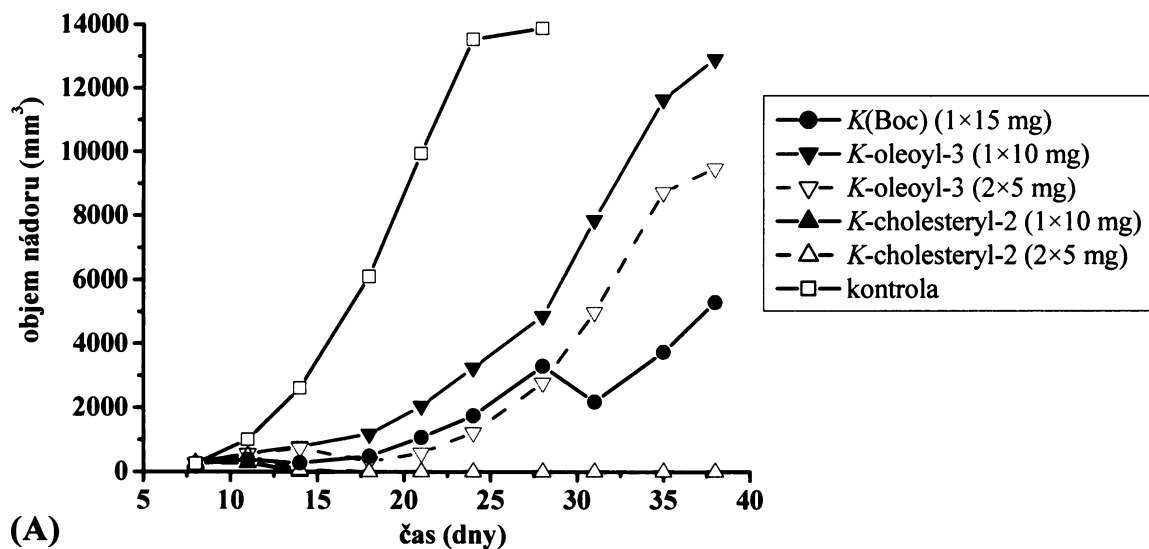
po uvolnění léčiva nebudou působit toxicky ani vůči jiným buňkám, například během transportu krevním řečištěm nebo v průběhu odstraňování z organismu.

5.3.5 *In vivo* protinádorová aktivita

Při podání micelárního konjugátu **K-oleoyl-3** v dávkách 2×25 i 1×15 mg DOX(ekvivalent)/kg podaného myším kmene C57BL/6 se krátce po podání projeví příznaky akutní toxicity polymerního léčiva (např. zježené chlupy několik hodin po injekci). V důsledku akutní toxicity léčiva uhynulo 50 % myši v případě vyšší dávky a 14 % v případě nižší dávky. U přeživších laboratorních zvířat však léčba EL4 T-buněčného lymfomu vedla v naprosté většině ke kompletní regresi nádoru (data nejsou znázorněna), úspěšnost léčby byla srovnatelná s úspěšností léčby konjugátem **K(Boc)** při stejně vysoké dávce, která však u při podání konjugátu **K(Boc)** byla bezpečná. To ukazuje na skutečnost, že micelární konjugáty jsou toxičtější a jejich použití zřejmě vyžaduje jiné dávkování než u vodorozpustných neasociovaných konjugátů.

Protinádorová aktivita konjugátu **K-oleoyl-3** ovšem ani při dávkách 1×10 a 2×5 mg DOX(ekvivalent)/kg nebyla vyšší než aktivita konjugátu **K(Boc)**, podaného při suboptimální dávce 1×15 mg DOX(ekvivalent)/kg, kterým bylo vyléčeno 50 % myši (viz Obrázek 5-20). Znaky akutní toxicity micelárního konjugátu však již nebyly při snížené dávce pozorovány. Nižší úspěšnost léčby konjugátem **K-oleoyl-3**, oproti léčbě **K(Boc)**, je tedy možné zdůvodnit nižší podanou dávkou ekvivalentu DOX, konečné závěry však bude možné učinit až po provedení podrobnější *in vivo* studie.

Podání jiného micelárního kancerostatika **K-cholesteryl-2** však vedlo k výraznému zvýšení protinádorové aktivity. V případě obou schémat podání léčiva došlo k zamezení růstu nádoru a k téměř 100 % vyléčení myši (pouze v případě podání 2×5 mg DOX(ekvivalent)/kg 1 myš uhynula, avšak až po velmi dlouhé době od začátku léčby). Příčinou zvýšené účinnosti konjugátu **K-cholesteryl-2** byl zřejmě zvýrazněný EPR efekt, neboť micely, vytvořené z konjugátu **K-cholesteryl-2** měly větší hydrodynamické rozměry a molární hmotnost, nežli micely připravené z ostatních konjugátů. Ve srovnání s **K(Boc)**, podaném při dávce 1×75 mg DOX(ekvivalent)/kg (viz Obrázek 5-8) se podařilo velmi výrazně snížit účinnou dávkou polymerního léčiva při zachování stejné úspěšnosti léčby.



Obrázek 5-20 Protinádorová aktivita *K-oleoyl-3*, *K-cholesteryl-2* a *K(Boc)* (terapeutický režim): růst EL4 T-buněčného lymfomu (A); přežití myši (B)

5.4 Příprava a studium vlastností roubovaných konjugátů polymer – DOX

V případě konjugátů, obsahujících nabitě funkční skupiny, nebo hydrofobní substituenty v polymerní struktuře, bylo cílem práce připravit vysokomolekulární struktury se zvýrazněnou interakcí s buněčnou membránou a nebo s výrazným EPR efektem. Mělo toho mělo být dosaženo uspořádáním polymerních řetězců do supramolekulární struktury o vhodné velikosti. Jinou možností, jak dosáhnout výrazného EPR efektu bylo využití vysokomolekulárních vodorozpustných polymerních léčiv, jejichž vysokomolekulární struktura je dosažena výhradně propojením polymerních řetězců kovalentními vazbami. Kopolymery na bázi HPMA však lidský organismus nedokáže degradovat, a proto jsou jejich molární hmotnosti shora omezeny limitem renální filtrace. Vysokomolekulární konjugáty na bázi HPMA, které mají být vyloučitelné z organismu proto musí obsahovat biodegradovatelné spojky. Příkladem takového konjugátu byl i větvený konjugát, ve kterém byl DOX navázán hydrazonovou vazbou a který obsahoval enzymaticky degradovatelnou spojku mezi polymerními řetězci tvořenou tetrapeptidem GFLG¹²⁰. Konjugát byl velmi účinný při léčbě EL4 T-buněčného lymfomu. Jeho nevýhodou však byla především špatná reprodukovatelnost přípravy větveného polymerního prekurzoru a široká distribuce molárních hmotností. Analogií k větveným konjugátům, avšak překonávajícím jejich nedostatky, by mohly být roubované konjugáty. I u nich lze očekávat zvýšení protinádorové aktivity v důsledku většího uplatnění EPR efektu.

5.4.1 Roubované kopolymery využívající semitelechelické kopolymery nesoucí sukcinimidylové skupiny

5.4.1.1 Příprava roubovaných kopolymerů

V prvních pokusech přípravy enzymaticky degradovatelných roubovaných kopolymerů byl použit semitelechelický kopolymer, který obsahoval -COOH skupinu na konci polymerního řetězce. Reakce s hydrazidovými skupinami statistického kopolymeru *P*'-GFLG-NHNH₂ i při velkém nadbytku konjugačního činidla DCC nevedla k tvorbě roubovaných kopolymerů. Stejně dopadly i pokusy se semitelechelickým kopolymerem, který obsahoval ONp estery na konci polymerního řetězce (data nejsou prezentována).

Reakce mezi polymerními řetězci probíhají zpravidla pomaleji než v případě reakcí mezi polymerem a nízkomolekulární látkou. To je především způsobeno stérickými

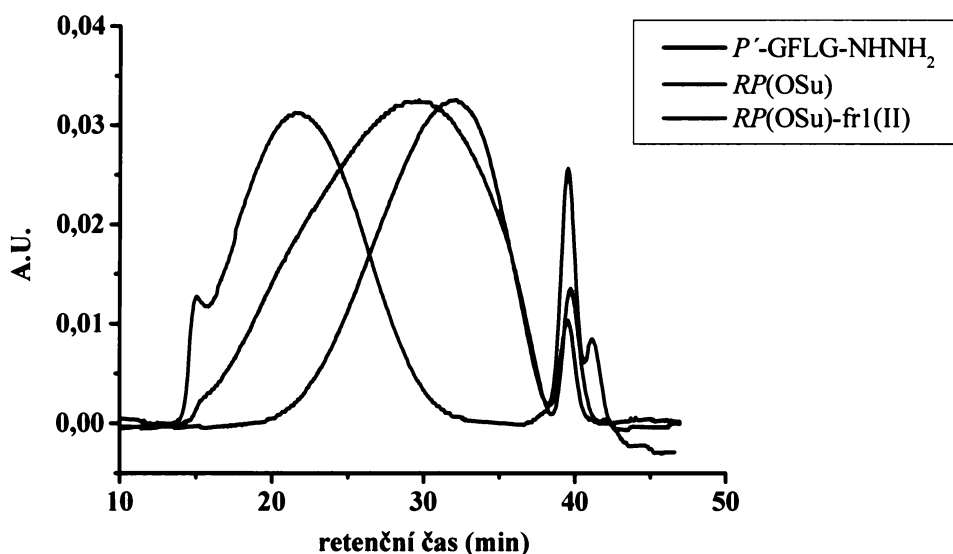
zábranami vzájemnému přístupu reakčních center. Proto byly pro aktivaci koncové karboxylové skupiny semitelehelického kopolymeru vybrány poměrně velmi reaktivní OSu skupiny. Jejich značná reaktivita je zároveň i jejich nevýhodou, OSu skupiny jsou velmi citlivé na stopy vlhkosti a snadno hydrolyzují. Ztráta aktivace části koncových skupin by vedla k významné kontaminaci roubovaného kopolymeru obtížně odstranitelným nízkomolekulárním kopolymerem, která by se projevila na značném rozšíření distribuce molárních hmotností. Aktivace -COOH skupin byla proto provedena s co nejmenším časovým odstupem od vlastní syntézy roubovaného kopolymeru.

Základní charakterizace připravených polymerních prekurzorů je uvedena v Tabulce 5-15. Připravený semitelehelický kopolymer **SP-OSu** měl poměrně vysokou molární hmotnost, blízkou limitu renální filtrace. Jednalo se však o orientační pokus přípravy roubované struktury, pro další studium by bylo nutné nalézt vhodnější reakční podmínky kopolymerizace. Funkčnost kopolymeru F byla vyjádřena jako podíl \overline{M}_n , získané SEC s detekcí rozptylu světla a změny indexu lomu, a $M_{n,COOH}$, získané ze stanovení koncových funkčních skupin acidobazickou titrací. V ideálním případě by měly mít semitelehelické kopolymery funkčnost $F = 1$. Radikálová kopolymerizace může být ovšem zakončena i rekombinací radikálů, která vede ke vzniku telechelických kopolymerů. $F > 1$ proto ukazuje na vznik semitelehelických kopolymerů s příměsí kopolymerů telechelických (bifunkčních).

Tabulka 5-15 Charakteristiky polymerních prekurzorů použitých pro přípravu roubovaného kopolymeru

Polymerní prekurzor	Obsah hydrazidů (mol.%)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	$M_{n,COOH}$ (g.mol ⁻¹)	F
<i>SP-OSu</i>	5,7	45 700	2,2	14 500	1,4
<i>P'-GFLG-NHNH₂</i>	5,1	20 100	1,9	-	-

Reakce **SP-OSu** a **P'-GFLG-NHNH₂** (2 : 1 hmotnostně) v DMSO vedla ke vzniku vysokomolekulárního kopolymeru **RP(OSu)** o \overline{M}_w 146 000 g.mol⁻¹ s poměrně širokou distribucí molárních hmotností (viz Obrázek 5-21). Při srovnání chromatogramu **RP(OSu)** s chromatogramem prekurzoru **P'-GFLG-NHNH₂** bylo patrné, že roubovaný kopolymer obsahoval i značný podíl nízkomolekulárních kopolymerů. Příčinou mohla být již zmiňovaná hydrolytická nestabilita OSu skupin nebo nedostatečná aktivace karboxylových skupin.



Obrázek 5-21 SEC chromatogramy (záznam RI detektoru) roubovaného kopolymeru $RP(OSu)$ (nefrakcionovaný kopolymer a vysokomolekulární frakce) a polymerního prekurzoru.

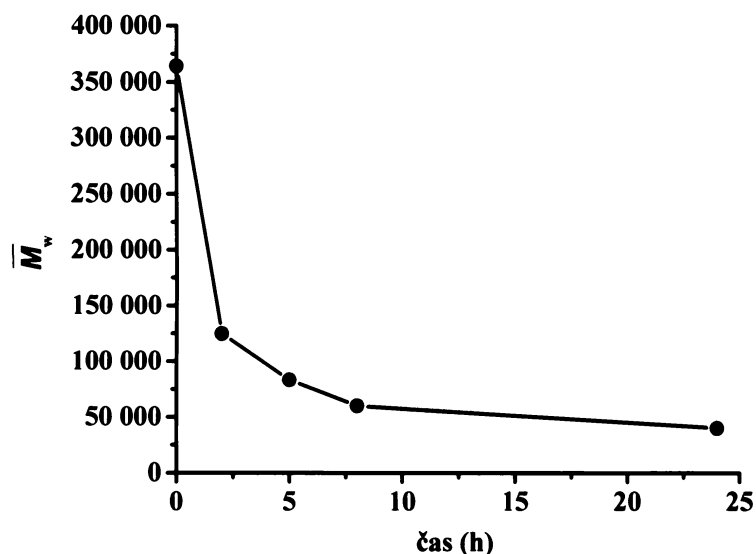
Kopolymery s nízkou molární hmotností byly odstraněny frakcionací na preparativní SEC na koloně s náplní Sephacryl S-300. Frakcionací bylo zároveň dosaženo zúžení distribuce molárních hmotností vysokomolekulární frakce. \overline{M}_w frakcí jsou uvedeny v Tabulce 5-16, SEC chromatogram vysokomolekulární frakce ($RP(OSu)$ -fr1(II)) je znázorněn na Obrázku 5-18. Velkou nevýhodou frakcionace ovšem bylo snížení výtěžku, $RP(OSu)$ -fr1(II) tvořil pouze 30 % původní hmotnosti $RP(OSu)$.

Tabulka 5-16 Molární hmotnost roubovaných kopolymerů

Roubovaný kopolymer	Frakcionace	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)
$RP(OSu)$	nefrakcionovaný	146 000
$RP(OSu)$ -fr1(I)	1. frakce	214 000
$RP(OSu)$ -fr2(I)	2. frakce	74 500
$RP(OSu)$ -fr1(II)	1. frakce po opakování frakcionace	365 000

5.4.1.2 *In vitro* degradace roubovaného kopolymeru kathepsinem B

V kapitole 2.5.2 bylo zdůrazněno, že vysokomolekulární polymerní konjugáty musí obsahovat biodegradovatelné spojky, umožňující degradaci konjugátu na nízkomolekulární polymerní fragmenty. V našem případě byla použita enzymaticky degradovatelná oligopeptidová spojka GFLG, která je pro tuto vlastnost často využívána v oblasti polymerních léčiv (viz kapitola 2.4.1).



Obrázek 5-22 Časový průběh degradace **RP(OSu)-fr1(II)** kathepsinem B

V *in vitro* podmínkách byla sledována rychlost degradace **RP(OSu)-fr1(II)** kathepsinem B jako zástupcem lysosomálních enzymů. Vliv doby inkubace na \overline{M}_w roubovaného kopolymeru je znázorněn na Obrázku 5-22. Roubovaný kopolymer byl poměrně rychle enzymaticky degradován na produkty s molární hmotností nižší, než je limit renální filtrace. V prostředí lysosomů nádorových buněk by proto mělo dojít k degradaci roubovaného kopolymeru na fragmenty vyloučitelné z organismu. Skutečná rychlost degradace v *in vivo* podmínkách však bude odlišná, buněčné linie se totiž mohou lišit jak v množství, tak ve složení lysosomálních enzymů. Navíc byla měřená rychlost degradace ovlivněna i postupným úbytkem aktivity enzymu.

5.4.2 Roubované kopolymery využívající semitelechelické kopolymery nesoucí thiazolidin-2-thionové skupiny

5.4.2.1 Optimalizace přípravy roubovaných kopolymerů

V předchozí kapitole byly uvedeny nevýhody OSu skupin a jejich vlivu na přípravu roubovaných kopolymerů. Proto jsme vyvinuly nový postup syntézy roubovaných kopolymerů využívající dostatečně reaktivní, avšak hydrolyticky mnohem stabilnější thiazolidin-2-thionové skupiny (TT)¹⁷⁴. Tato skupina reaguje s hydrazidovými skupinami na polymerním řetězci velmi pomalu (data nejsou uvedena). TT skupiny však ochotně reagují s primárními aminoskupinami, proto bylo nejprve nutné zavést -NH₂ skupiny do polymerního řetězce.

Zatímco semitelechelické kopolymery nesoucí koncové OSu skupiny byly připraveny aktivací -COOH skupin, TT skupiny byly zavedeny již do struktury iniciátoru radikálové kopolymerizace. Připravené semitelechelické kopolymery by proto měly obsahovat pouze tyto koncové skupiny. Funkčnost kopolymeru F byla vyjádřena jako podíl \overline{M}_n , získané SEC s detekcí rozptylu světla a změny indexu lomu, a $M_{n,TT}$, získané ze spektroskopického stanovení koncových funkčních skupin. Funkčnost polymeru F byla stejně jako v případě **SP-OSu** vyšší než 1, což ukazuje na rekombinační zakončení růstu polymerního řetězce při radikálové kopolymerizaci. **SP-TT** proto obsahoval i příměs telechelických kopolymerů. Charakterizace použitých kopolymerů je uvedena v Tabulce 5-17.

Tabulka 5-17 Charakteristiky polymerních prekurzorů použitých pro přípravu roubovaných kopolymerů

Polymerní prekurzor	Obsah hydrazidů (mol.%)	Obsah aminoskupin (mol.%)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	$M_{n,TT}$ (g.mol ⁻¹)	F
SP-TT	5,2	-	31 000	2,2	9 800	1,4
P'-GFLG~NH ₂	-	3,7	19 130	1,9	-	-

Reakce **SP-TT** a **P'-GFLG~NH₂** byla nejprve prováděna ve vodném prostředí za podmínek použitých u jiných dříve popsaných reakcí TT s -NH₂ skupinami¹⁷⁴. Při laboratorní teplotě se reakční doba pohybovala v řádu hodin až desítek hodin. Největší hodnota molární hmotnosti byla dosažena po 16 h, proto byla tato reakční doba zachována i pro další reakce ve vodném prostředí. Vliv reakční doby na molární hmotnost roubovaných kopolymerů je zaznamenán v Tabulce 5-18.

Tabulka 5-18 Vliv reakční doby na molární hmotnost roubovaných kopolymerů při reakci polymerních prekurzorů *SP*-*TT* a *P'*-*GFLG*~*NH*₂ prováděné ve vodném prostředí

Roubovaný kopolymer	Reakční doba (h)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)
<i>RP</i> (<i>TT</i>)-1	2	65 100
<i>RP</i> (<i>TT</i>)-2	4	68 200
<i>RP</i> (<i>TT</i>)-3	16	85 000

Další optimalizace reakčních podmínek spočívala v porovnání vlivu poměru *TT* a -*NH*₂ skupin v reakční směsi na molární hmotnost výsledných roubovaných kopolymerů. Výsledky studie jsou uvedeny v Tabulce 5-19. Poměr funkčních skupin však zřejmě neměl na růst molární hmotnosti významný vliv. Po navázání určitého počtu řetězců semitelechelického kopolymeru již patrně zbývající aminoskupiny *P'*-*GFLG*~*NH*₂ nebyly pro další reakci přístupné. Naopak, vliv koncentrace kopolymerů se jevil jako hlavní faktor ovlivňující \overline{M}_w , proto byl tento vliv studován v dalším pokusu.

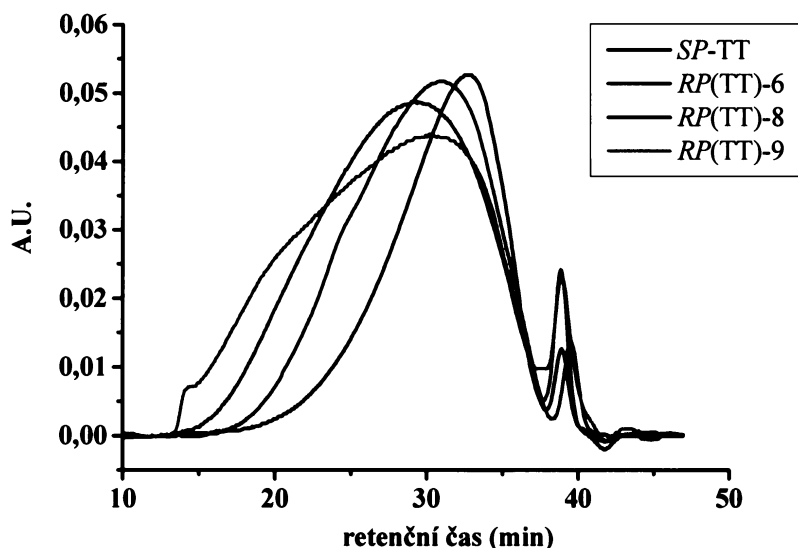
Tabulka 5-19 Vliv poměru funkčních skupin na molární hmotnost roubovaných kopolymerů při reakci ve vodném prostředí

Roubovaný kopolymer	Poměr skupin - <i>NH</i> ₂ : <i>TT</i>	Koncentrace kopolymerů (g.l ⁻¹)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)
<i>RP</i> (<i>TT</i>)-4	4 : 1	16	39 400
<i>RP</i> (<i>TT</i>)-5	2 : 1	21	42 300
<i>RP</i> (<i>TT</i>)-6	1 : 1	16	39 500
<i>RP</i> (<i>TT</i>)-7	1 : 2	27	48 600

V Tabulce 5-20 jsou uvedeny molární hmotnosti roubovaných kopolymerů připravených v roztocích lišících se použitou celkovou koncentrací kopolymerů v reakční směsi. Nárůst koncentrace reaktantů měl za následek zvýšení \overline{M}_w . S nárůstem koncentrace se však také rozšiřovala distribuce molárních hmotností, jak je patrné z Obrázku 5-23. Navíc roubované kopolymery obsahovaly vždy i část nezreagovaných nízkomolekulárních kopolymerů.

Tabulka 5-20 Vliv koncentrace kopolymerů na molární hmotnost roubovaných kopolymerů při reakci ve vodném prostředí

Roubovaný kopolymer	Koncentrace kopolymerů (g.l ⁻¹)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)
<i>RP</i> (<i>TT</i>)-6	21	39 500
<i>RP</i> (<i>TT</i>)-8	63	82 100
<i>RP</i> (<i>TT</i>)-9	122	111 000

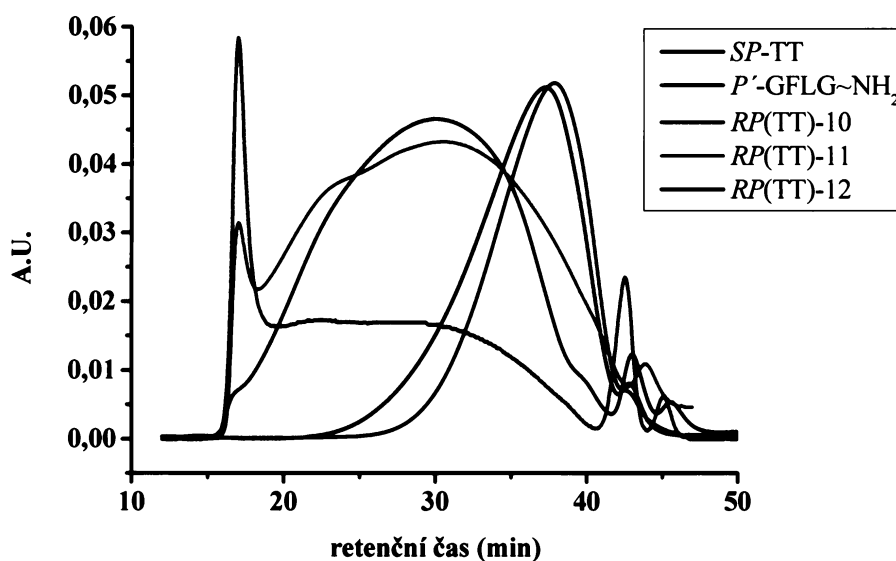


Obrázek 5-23 Vliv koncentrace kopolymerů na distribuci molárních hmotností (záznam RI detektoru) roubovaných kopolymerů při reakci ve vodném prostředí

Reakce probíhající ve vodném prostředí zřejmě nebyla optimální pro tvorbu roubovaných kopolymerů. Pro další studium přípravy roubovaných kopolymerů byl tedy vybrán DMSO. Reakce v organickém rozpouštědle probíhala výrazně rychleji než ve vodném prostředí. Po 2,5 h reakce došlo k tvorbě kopolymerů o vysoké \overline{M}_w při všech použitých koncentracích reaktantů (viz Tabulka 5-21 a Obrázek 5-24). **RP(TT)-10** měl nejužší distribuci molárních hmotností a přitom dostatečně vysokou \overline{M}_w , proto byly pro další optimalizační studie vybrány reakční podmínky přípravy tohoto kopolymeru.

Tabulka 5-21 Vliv koncentrace kopolymerů na molární hmotnost roubovaných kopolymerů při reakci v DMSO

Roubovaný kopolymer	Koncentrace kopolymerů (g.l ⁻¹)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)
RP(TT)-10	43	203 000
RP(TT)-11	86	308 000
RP(TT)-12	120	405 000

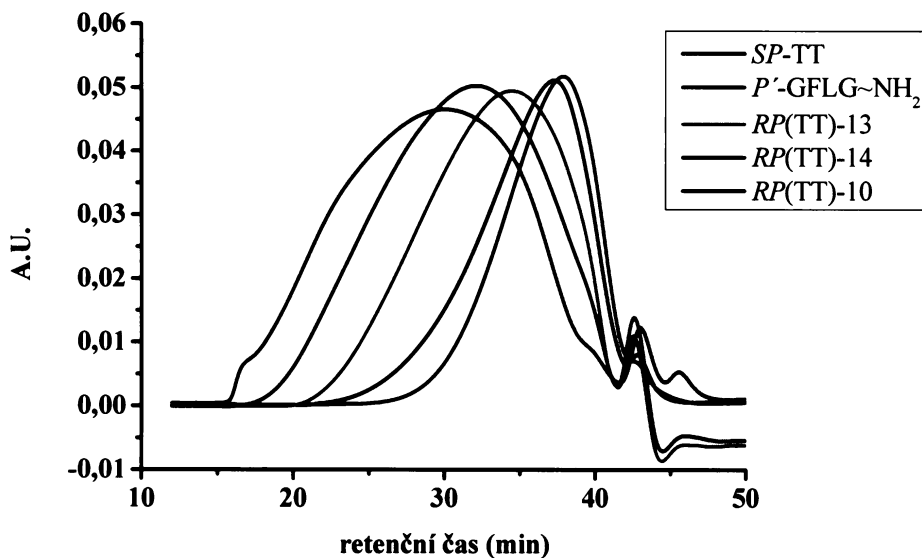


Obrázek 5-24 Vliv koncentrace kopolymerů na distribuci molárních hmotností (záznam RI detektoru) roubovaných kopolymerů při reakci v DMSO

Na rozdíl od přípravy roubovaných polymerů ve vodném prostředí závisela velikost molární hmotnosti při reakci v DMSO na množství TT skupin v reakci. S klesajícím poměrem reagujících skupin, resp. se vzrůstajícím množstvím *SP-TT* docházelo k růstu \overline{M}_w (viz Tabulka 5-22 a Obrázek 5-25). Molární hmotnost *RP(TT)-14* byla dostatečně vysoká a zároveň distribuce molárních hmotností nebyla tolik široká jako u jiných kopolymerů připravených v DMSO. Proto byly stejné reakční podmínky použity pro přípravu většího množství roubovaného polymer – DOX konjugátu, určeného pro biologické testování.

Tabulka 5-22 Vliv poměru funkčních skupin na molární hmotnost roubovaných kopolymerů při reakci v DMSO

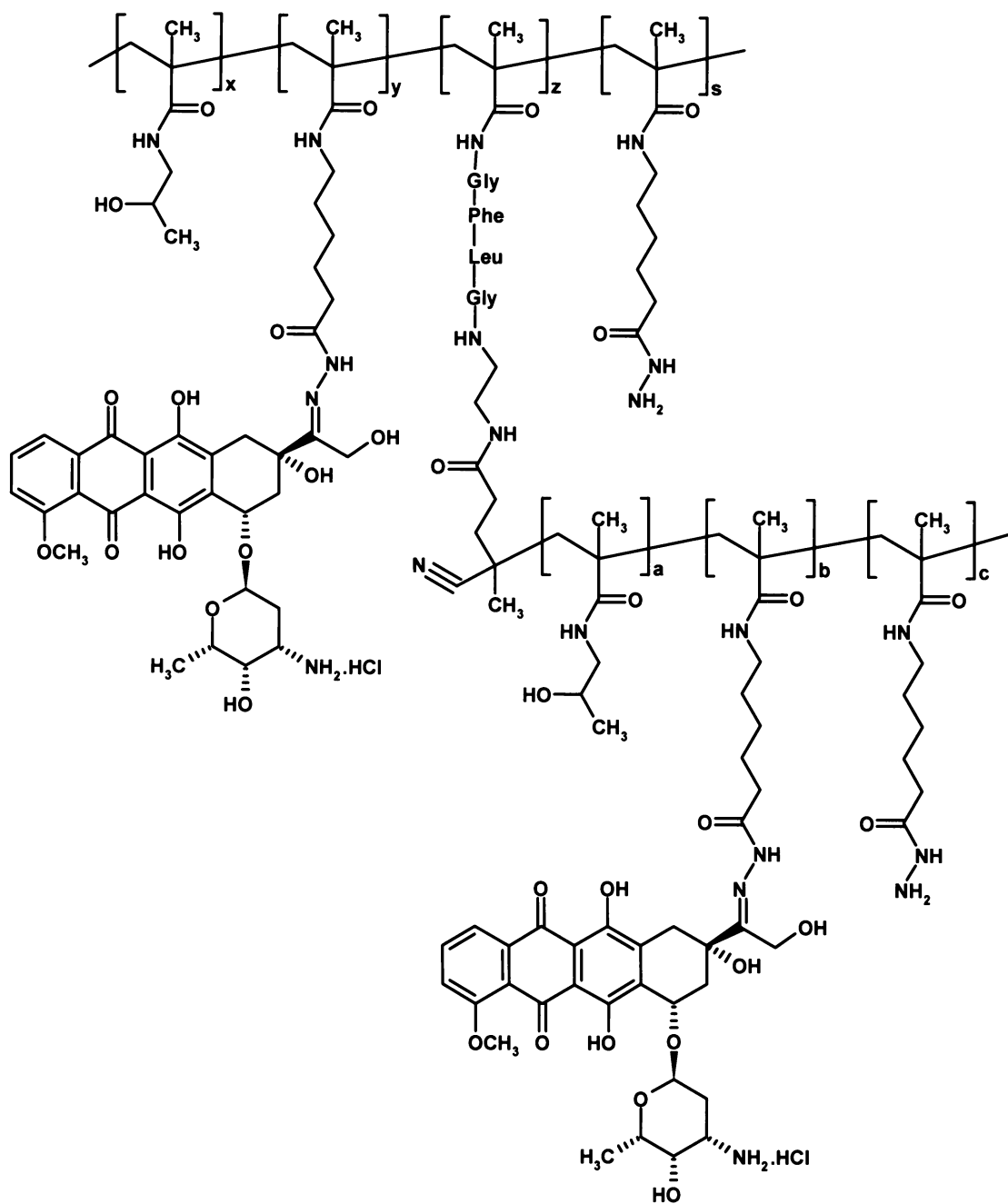
Roubovaný kopolymer	Poměr skupin -NH ₂ : TT	Koncentrace kopolymerů (g.l ⁻¹)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)
<i>RP(TT)-13</i>	4 : 1	43	75 900
<i>RP(TT)-14</i>	2 : 1	43	120 000
<i>RP(TT)-10</i>	1 : 1	43	203 000



Obrázek 5-25 Vliv poměru funkčních skupin na distribuci molárních hmotností (záznam RI detektoru) roubovaných kopolymerů při reakci v DMSO

5.4.2.2 Příprava polymerního prekurzoru a konjugátu s DOX

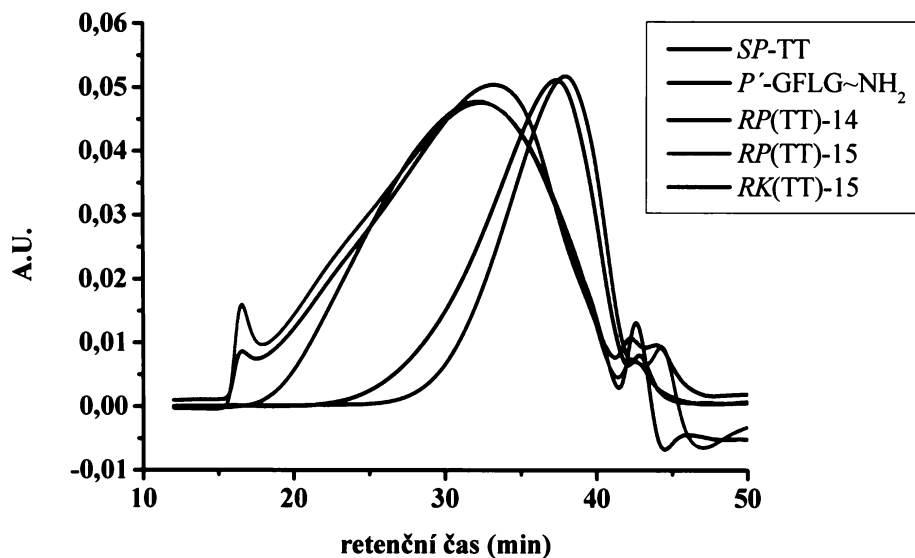
Při přípravě roubovaného kopolymeru **RP(TT)-15** byly použity desetinásobné navážky reaktantů i objem rozpouštědla. Ačkoliv ostatní reakční podmínky zůstaly zachovány, \overline{M}_w **RP(TT)-15** byla výrazně vyšší než v případě **RP(TT)-14** (viz Tabulka 5-23). Ze srovnání SEC chromatogramů (viz Obrázek 5-27) obou kopolymerů je patrné, že jejich průběhy jsou téměř totožné, **RP(TT)-15** však navíc obsahoval i nezanedbatelný podíl kopolymerů o velmi vysoké molární hmotnosti. Tento podíl byl zřejmě vytvořen ihned po přidavku **P'-GFLG~NH₂** do reakční směsi, ačkoliv byla reakce intenzivně míchána. Při míchání v menším objemu reakční směsi se oproti tomu vysokomolekulární podíl nestačil vytvořit. Při dalším studiu přípravy roubovaných kopolymerů bude zapotřebí tento vliv omezit. Prioritní ovšem bylo zodpovězení otázky, zda budou roubované kopolymery účinnější při léčbě nádorových onemocnění nežli nízkomolekulární lineární kopolymery, případně polymery tvořící micely. Proto byl nejdříve připraven konjugát nesoucí DOX navázaný hydrazonovou vazbou (**RP(TT)-15**) a následně byly testovány jeho biologické účinky. Struktura konjugátu je znázorněna na Obrázku 5-26. Vzhledem k větším hydrodynamickým rozměrům a molární hmotnosti by konjugát mohl projevit zvýšenou protinádorovou aktivitu díky EPR efektu.



Obrázek 5-26 Schéma struktury roubovaného konjugátu **RK(TT)-15**.

Tabulka 5-23 Charakteristiky roubovaných kopolymerů při reakci prováděné v DMSO – finální prekurzor a konjugát s DOX

Roubovaný kopolymer	Obsah hydrazidů (mol.%)	Obsah DOX (hm.%)	\bar{M}_w (g.mol ⁻¹)	R_H (nm)	M_{app} (g.mol ⁻¹)
RP(TT)-15	4,5	-	222 000	-	-
RK(TT)-15	-	7,9	234 000	21,1	120 000



Obrázek 5-27 Distribuce molárních hmotností (záznam RI detektoru) při reakci prováděné v DMSO při přípravě většího množství roubovaných kopolymerů

Rychlost uvolňování DOX z roubovaného konjugátu se příliš nelišila od rychlosti uvolňování DOX z nízkomolekulárních konjugátů. Vysoká molární hmotnost konjugátu podle očekávání rychlost uvolňování příliš neovlivnila.

5.4.2.3 Cytostatická aktivita

Cytostatická aktivita roubovaného konjugátu s DOX byla studována stejným způsobem, jaký byl popsán v kapitole 5.2.4. a vyjádřena jako IC_{50} . Konjugát **RK(TT)-15** projevil vysokou cytostatickou aktivitu (viz Tabulka 5-24). Testy provedené s méně citlivými liniemi (EL4 T-buněčný lymfom, Jurkat lidská T-buněčná leukemie) neukázaly významné odlišnosti v cytostatické aktivitě oproti jiným konjugátům (viz Tabulka 5-5, 5-9 a 5-14).

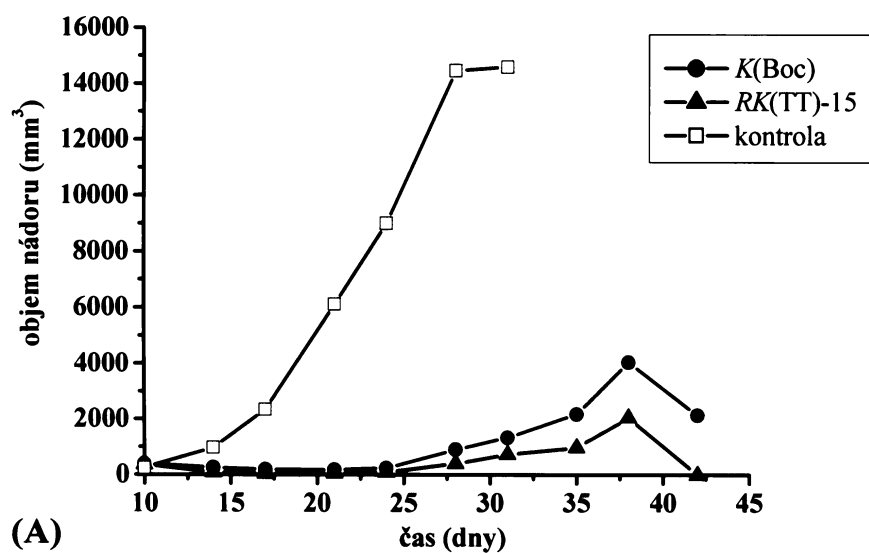
Tabulka 5-24 Cytostatická aktivita roubovaného konjugátu vyjádřená jako IC_{50} v $\mu\text{g DOX/ml}$

	EL4	38C13	SW620	Raji	Jurkat
RK(TT)-15	0,222	0,005	0,040	0,006	0,461
DOX	0,010	0,001	0,003	0,001	0,119

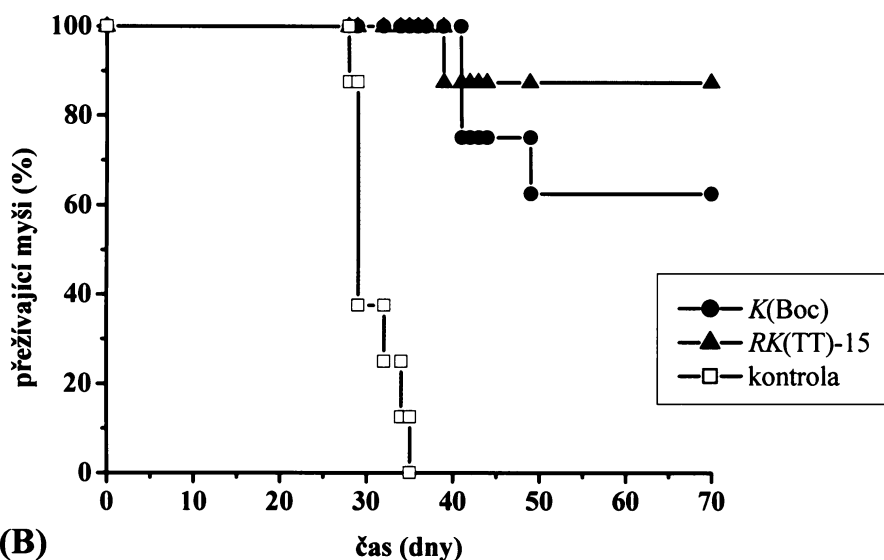
5.4.2.4 *In vivo* protinádorová aktivita

Zatímco při testování micelárních konjugátů (**K-oleoyl-3**) byly při vyšších dávkách pozorovány příznaky akutní toxicity polymerního léčiva, v případě podání **RK(TT)-15** při dávce $1 \times 15 \text{ mg DOX(ekvivalent)/kg}$ se žádné podobné účinky neprojevíly. Léčba

roubovaným kopolymerem vedla k zastavení růstu nádoru u naprosté většiny pokusných zvířat. Kompletně bylo vyléčeno 88 % myši, tj. pouze jedna myš uhynula (Obrázek 5-24). Léčba konjugátem *K(Boc)*, podaném při stejné dávce, vedla také k zastavení růstu nádoru, avšak již ne tak výraznému, jako v případě podání roubovaného polymeru. Dlouhodobě přežívajících myši bylo pouze 63 %.



(A)



(B)

Obrázek 5-28 Protinádorová aktivita *RK(TT)-15* a *K(Boc)* (terapeutický režim, 1×15 mg DOX (ekvivalent)/kg): růst EL4 T-buněčného lymfomu (A); přežití myši (B)

Porovnání protinádorového účinku obou konjugátů vede k závěru, že vysokomolekulární roubovaný konjugát vykazuje, tak jak bylo předpokládáno, signifikantně vyšší protinádorovou aktivitu nežli nízkomolekulární lineární konjugát,

u kterého se EPR efekt může uplatnit mnohem méně. Nárůst v aktivitě při léčbě vysokomolekulárním roubovaným konjugátem tedy můžeme vysvětlit výraznějším uplatněním EPR efektu. Obdobně jako v případě **K-cholesteryl-2** se podařilo velmi výrazně snížit účinnou dávku konjugátu při zachování vysoké úspěšnosti léčby.

6. Závěr

Hlavním tématem předkládané disertační práce byl vývoj nových polymerních nosičů léčiv a na jejich bázi připravených polymerních cytostatik pro účinnou léčbu nádorových onemocnění. Práce byla zaměřena na přípravu a studium vodorozpustných polymerních léčiv na bázi kopolymerů *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA), umožňujících směřování do pevných nádorů a pH-řízenou aktivaci léčiva - cytostatika doxorubicinu (DOX) - v nádorové tkáni.

Pozornost byla věnována přípravě nových postupů syntézy polymerních prekurzorů pro snadnou a reprodukovatelnou vazbu léčiva, především doxorubicinu. Ve dvou nových postupech příprav polymerních prekurzorů byly pro kopolymerizační reakci s HPMA použity monomery obsahující volné nebo Boc skupinou chráněné hydrazidové skupiny. Připravené kopolymery měly definovanou lineární strukturu a změnami reakčních podmínek kopolymerizační reakce bylo možné řídit jejich molární hmotnosti v širokém rozmezí hodnot. Konjugáty polymer – DOX, připravené z lineárních polymerních prekurzorů, projevíly vysokou cytostatickou aktivitu, blízkou aktivitě volného léčiva. *In vivo* protinádorová aktivita konjugátů vůči modelovému nádoru EL4 T-buněčnému lymfomu testovaná na myších modelech byla výrazně vyšší nežli aktivita komerčně používaného volného léčiva. Při vhodné dávce a režimu podání polymerního léčiva bylo vyléčeno až 100 % myší.

Dalším cílem této práce bylo prostudovat možnosti zvýšení protinádorové aktivity konjugátů polymer – DOX pomocí ovlivnění rychlosti uvolňování léčiva, změnou hydrodynamických rozměrů konjugátů ve vodném prostředí, nebo umožněním jejich interakce s buněčnými membránami nádorových buněk. Proto byla připravena řada konjugátů nesoucích v polymerním řetězci kovalentně vázané záporně nabitě (aminokyseliny či oligopeptidy zakončené –COOH skupinou) nebo kladně nabitě (hydrochlorid terciární dimethylamino skupiny či kvartérní trimethylammoniové báze) funkční skupiny nebo hydrofobní substituenty (dodecyl, derivát kyseliny olejové nebo cholesterolu).

Zavedení záporně nabitě skupiny do struktury polymeru vedlo ke zvýšení rychlosti uvolňování léčiva v pufru o pH 5, modelujícím pH prostředí endosomů nádorových buněk. Stejně jako v případě konjugátů obsahujících kladně nabitě skupiny se však u těchto konjugátů neprojevílo zavedení náboje do řetězce významným zvýšením protinádorové

aktivity konjugátu při léčbě EL4 T-buněčného lymfomu. Zatímco v případě konjugátů, které nesly nabitě funkční skupiny, nedošlo ke změnám hydrodynamických rozměrů, v případě konjugátů s hydrofobními substituenty tyto rozměry výrazně vzrostly, a to v závislosti na struktuře a množství použitého substituentu. Zvětšení hydrodynamických rozměrů provázené zvýšením molární hmotnosti konjugátů vede k většímu uplatnění tzv. EPR efektu (efektu zvýšené propustnosti a zadržování), a s tím k očekávanému zvýšení protinádorové aktivity při léčbě pevných nádorů. Konjugáty obsahující funkční derivát olejové kyseliny tvořily ve vodném prostředí polymerní micely s úzkou distribucí velikosti částic. Vybraný micelární konjugát ovšem při *in vivo* testování působil při vyšších dávkách toxicky a při nižších dávkách nebyl při léčbě EL4 T-buněčného lymfomu terapeuticky účinnější nežli lineární vodorozpustný konjugát. V případě konjugátů obsahujících cholesterylový substituent došlo ve vodném prostředí k ještě výraznějšímu zvětšení rozměrů a zvýšení molární hmotnosti vznikajících nadmolekulárních struktur. Jejich fyzikálně-chemická charakterizace však neshvědčila o uspořádání polymerních řetězců do micelárních útvarů, nýbrž o vytvoření náhodných asociátů tvořených ohebnými polymerními řetězci spojenými hydrofobními bodovými kontakty. Testovaný konjugát obsahující cholesteryl prokázal zvýšenou protinádorovou aktivitu (až 100 % dlouhodobě přežívajících myší) při léčbě EL4 T-buněčného lymfomu vzhledem k lineárnímu vodorozpustnému konjugátu, a to dokonce i při významně nižších dávkách léčiva.

Práce řešila i syntézu relativně složitěho systému, biodegradovatelného vysokomolekulárního roubovaného konjugátu doxorubicinu. Jeho polymerní prekurzory byly tvořeny roubovanými kopolymery na bázi HPMa, které byly připraveny reakcí semitelechelických kopolymerů s reaktivními koncovými skupinami se statistickými multivalentními kopolymery. Aby se tyto vysokomolekulární roubované konjugáty efektivně ukládaly v pevných nádorech a současně byly vyloučitelné z organismu, byly mezi jednotlivé polymerní řetězce, jejichž molekulová hmotnost leží pod renálním prahem, zavedeny enzymaticky degradovatelné spojky, tvořené oligopeptidem GFLG. Optimalizace reakčních podmínek a výběr vhodných funkčních skupin pro reakci semitelechelického kopolymeru s multivalentním kopolymerem vedly k přípravě konjugátu, který prokázal výraznou protinádorovou aktivitu (90 % dlouhodobě přežívajících myší) při léčbě EL4 T-buněčného lymfomu. Stejně jako v případě konjugátu nesoucího cholesterol byla vyšší protinádorová aktivita zřejmě způsobena významným

uplatněním EPR efektu, vyvolaného nárůstem molární hmotnosti a rozměrů konjugátu. Inkubace roubovaného kopolymeru v pufru obsahujícím lysosomální enzym kathepsin B prokázala degradaci vysokomolekulární roubované struktury až na lineární řetězce o původní molární hmotnosti, vyloučitelné z organismu.

Předložená disertační práce tedy obohacuje naše teoretické znalosti polymerních nosičů léčiv. Má ovšem zároveň i velmi nadějný praktický výstup. Navržené typy polymerních kancerostatik jsou totiž součástí vývoje polymerních léčiv, jejichž rozsáhlé předklinické testování bylo zahájeno ve spolupráci s farmaceutickou firmou Zentiva a.s. Lze tedy oprávněně předpokládat, že výsledky obsažené v předložené práci nezůstanou nepovšimnuty a v případě pozitivních výsledků zmíněného testování budou zařazeny do dalších klinických zkoušek.

7. Seznam literatury

1. Kühn, T. S. *The Structure of Scientific Revolutions*; Chicago UP: Chicago, **1970**.
2. Ehrlich, P. *Studies in Immunity*; Wiley ed.; Plenum Press: New York, **1906**.
3. Panyam, J.; Labhasetwar, V. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*(3), 329-347.
4. Allen, T. M.; Moase, E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *21* 117-133.
5. Monfardini, C.; Veronese, F. M. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9* 418-450.
6. Gabizon, A.; Martin, F. *Drugs* **1997**, *54* 15-21.
7. Torchilin, V. P.; Trubetskoy, V. S.; Whiteman, K. R.; Caliceti, P.; Ferruti, P.; Veronese, F. M. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*(9), 1049-1053.
8. Hoste, K.; De Winne, K.; Schacht, E. *Int. J. Pharm.* **2004**, *277*(1-2), 119-131.
9. Kopeček, J.; Kopečková, P.; Minko, T.; Lu, Z. R.; Peterson, C. M. *J. Control. Release* **2001**, *74*(1-3), 147-158.
10. Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47*(1), 113-131.
11. Kwon, G. S.; Kataoka, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16*(2-3), 295-309.
12. Tuzar, Z.; Kratochvíl, P. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1976**, *6* 201-232.
13. Dufés, Ch.; Uchegbu, I. F.; Schätzlein, A. G. Dendrimers in Drug and Gene Delivery, in *Polymers in Drug Delivery*, Uchegbu, I. F.; Schätzlein, A. G., editors; CRC Press, Taylor&Francis: **2006**; Chapter 13, pp. 199-235.
14. Tomalia, D. A.; Fréchet, J. M. J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*(16), 2719-2728.
15. Zeng, F. W.; Zimmerman, S. C. *Chem. Rev.* **1997**, *97*(5), 1681-1712.
16. Reschel, T., disertační práce, ÚMCH AV ČR a KFMCH PřF UK, **2002**.
17. *Nonviral Vectors for Gene Therapy*; Academic Press: **1999**.
18. Ringsdorf, H. *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **1975**, *51* 135-153.
19. Drobník J.; Kopeček, J.; Labský, J.; Rejmanová, P.; Exner, J.; Saudek, V.; Kálal, J. *Makromol. Chem.* **1976**, *177* 2833-2848.
20. Kopeček, J.; Rejmanová, P.; Chytrý, V. *Makromol. Chem.* **1981**, *182* 799-809.
21. Ouchi, T.; Ohya, Y. *Prog. Polym. Sci.* **1995**, *20*(2), 211-257.
22. Duncan, R.; Kopeček, J. *Adv. Polym. Sci.* **1984**, *57* 51-101.
23. Kratz, F.; Beyer, U.; Schutte, M. T. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1999**, *16*(3), 245-288.
24. Putnam, D.; Kopeček, J. *Biopolymers* **1995**, *122* 55-123.

25. Maeda, H.; Matsumura, Y. *Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* **1989**, 6(3), 193-210.
26. Haag, R.; Kratz, F. *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **2006**, 45(8), 1198-1215.
27. Schacht, E. H.; Vansteenkiste, S.; Seymour, L. W. Macromolecular Carriers for Drug Targeting, in *The Practice of Medicinal Chemistry*, Kostelnik, R. J., editor; Academic Press: New York, **1996**; Chapter 33, pp. 718-736.
28. Damle, N. K.; Frost, P. *Curr.Opin.Pharmacol.* **2003**, 3(4), 386-390.
29. Rysen, H.; Shen, W. C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1978**, 75 3867-3870.
30. Zunino, F.; Giulliani, F.; Savi, G.; Dasdia, T. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **1982**, 30, 465-469.
31. Shaffer, S.; Baker-Lee, C.; Kennedy, J.; Lai, M.; Vries, P.; Buhler, K.; Singer, J. *Cancer Chemother.Pharmacol.* **2006**.
32. Zalipsky, S. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **1995**, 16(2-3), 157-182.
33. Davis, F. F. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2002**, 54(4), 457-458.
34. Veronese, F. M.; Morpurgo, M. *Farmaco* **1999**, 54(8), 497-516.
35. Harris, J. M. *Poly(ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and biomedical applications.*; Plenum Press: New York, **1992**.
36. Graham, M. L. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2003**, 55(10), 1293-1302.
37. Vicent, M. J.; Duncan, R. *Trends Biotechnol.* **2006**, 24(1), 39-47.
38. Zalipsky, S.; Gilon, C.; Zilkha, A. *Eur.Polym.J.* **1983**, 19 1177-1186.
39. Ouchi, T.; Yuyama, H.; Vogl, O. *Makromol.Chem., Rapid Commun.* **1985**, 6, 815-823.
40. Greenwald, R. B. *J.Control.Release* **2001**, 74(1-3), 159-171.
41. Nathan, A.; Zalipsky, S.; Kohn, J. *J.Bioact.Compat.Polym.* **1994**, 9(3), 239-251.
42. Przybylski, M.; Fung, W. P.; Ringsdorf, H. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **1978**, 19 6.
43. Maeda, H. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **1991**, 6(2), 181-202.
44. Maeda, H.; Greish, K.; Fang, J. *Adv.Polym.Sci.* **2006**, 193 103-121.
45. Caliceti, P.; Schiavon, O.; Morpurgo, M.; Veronese, F. M.; Sartore, L.; Ranucci, E.; Ferruti, P. *J.Bioact.Compat.Polym.* **1995**, 10(2), 103-120.
46. Pato, J.; Azori, M.; Ulbrich, K.; Kopeček, J. *Makromolekul.Chem.* **1984**, 185(2), 231-237.
47. Pato, J.; Ulbrich, K.; Šubr, V.; Baker, P.; Mezo, G.; Hudecz, F. *J.Bioact.Compat.Polym.* **1999**, 14(2), 99-121.

48. Ranucci, E.; Spagnoli, G.; Sartore, L.; Ferruti, P.; Caliceti, P.; Schiavon, O.; Veronese, F. M. *Macromol.Chem.Phys.* **1994**, *195*(10), 3469-3479.
49. Strohaln, J.; Kopeček, J. *Angew.Makromol.Chem.* **1978**, *70* 109-118.
50. Ulbrich, K.; Šubr, V.; Strohaln, J.; Plocová, D.; Jelínková, M.; Říhová, B. *J.Control.Release* **2000**, *64*(1-3), 63-79.
51. Říhová, B.; Bilej, M.; Větvička, V.; Ulbrich, K.; Strohaln, J.; Kopeček, J.; Duncan, R. *Biomaterials* **1989**, *10*(5), 335-342.
52. Duncan, R.; Hume, I. C.; Kopečková, P.; Ulbrich, K.; Strohaln, J.; Kopeček, J. *J.Control.Release* **1989**, *10*(1), 51-63.
53. Šubr, V.; Strohaln, J.; Ulbrich, K.; Duncan, R.; Hume, I. C. *J.Control.Release* **1992**, *18*(2), 123-132.
54. Vasey, P. A.; Kaye, S. B.; Morrison, R.; Twelves, C.; Wilson, P.; Duncan, R.; Thomson, A. H.; Murray, L. S.; Hilditch, T. E.; Murray, T.; Burtles, S.; Fraier, D.; Frigerio, E.; Cassidy, J. *Clin.Cancer Res.* **1999**, *5*(1), 83-94.
55. Duncan, R. *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Conjugate, in *Polymeric Drug Delivery Systems*, Kwon, G. S., editor; Taylor&Francis: **2005**; Chapter 1, pp. 1-92.
56. Terwogt, J. M. M.; Huinink, W. W. T.; Schellens, J. H. M.; Schot, M.; Mandjes, I. A. M.; Zurlo, M. G.; Rocchetti, M.; Rosing, H.; Koopman, F. J.; Beijnen, J. H. *Anti-Cancer Drugs* **2001**, *12*(4), 315-323.
57. Schoemaker, N. E.; van Kesteren, C.; Rosing, H.; Jansen, S.; Swart, M.; Lieverst, J.; Fraier, D.; Breda, M.; Pellizzoni, C.; Spinelli, R.; Porro, M. G.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M.; Huinink, W. W. T. *Br.J.Cancer* **2002**, *87*(6), 608-614.
58. Bouma, M.; Nuijen, B.; Stewart, D. R.; Shannon, K. F.; St John, J. V.; Rice, J. R.; Harms, R.; Jansen, B. A. J.; van Zutphen, S.; Reedijk, J.; Bult, A.; Beijnen, J. H. *PDA J.Pharm.Sci.Technol.* **2003**, *57*(3), 198-207.
59. Julyan, P. J.; Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Daryani, S.; Boivin, C. M.; Doran, J.; David, M.; Anderson, D.; Christodoulou, C.; Young, A. M.; Hesslewood, S.; Kerr, D. J. *J.Control.Release* **1999**, *57*(3), 281-290.
60. Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Anderson, D.; Hesslewood, S.; Julyan, P. J.; Poyner, R.; Doran, J.; Young, A. M.; Burtles, S.; Kerr, D. J. *J.Clin.Oncol.* **2002**, *20*(6), 1668-1676.

61. Říhová, B.; Strohalm, J.; Kubáčková, K.; Jelínková, M.; Hovorka, O.; Kovář, M.; Plocová, D.; Šírová, M.; Šťastný, M.; Rozprimová, L.; Ulbrich, K. *J.Control.Release* **2002**, 78(1-3), 97-114.
62. Říhová, B.; Strohalm, J.; Prausová, J.; Kubáčková, K.; Jelínková, M.; Rozprimová, L.; Šírová, M.; Plocová, D.; Etrych, T.; Šubr, V.; Mrkvan, T.; Kovář, M.; Ulbrich, K. *J.Control.Release* **2003**, 91(1-2), 1-16.
63. Říhová, B.; Strohalm, J.; Kovář, M.; Mrkvan, T.; Šubr, V.; Hovorka, O.; Šírová, M.; Rozprimová, L.; Kubáčková, K.; Ulbrich, K. *Scand.J.Immunol.* **2005**, 62 100-105.
64. Bader, H.; Ringsdorf, H.; Schmidt, B. *Angew.Makromol.Chem.* **1984**, 123(AUG), 457-485.
65. Pratten, M. K.; Lloyd, J. B.; Horpel, G.; Ringsdorf, H. *Makromolekul.Chem.* **1985**, 186(4), 725-733.
66. Kabanov, A. V.; Chekhonin, V. P.; Alakhov, V. Y.; Batrakova, E. V.; Lebedev, A. S.; Meliknubarov, N. S.; Arzhakov, S. A.; Levashov, A. V.; Morozov, G. V.; Severin, E. S.; Kabanov, V. A. *FEBS Lett.* **1989**, 258(2), 343-345.
67. Kabanov, A. V.; Zilkha, A. Pluronic® Block Copolymers for Drug and Gene Delivery, in *Polymeric Drug Delivery Systems*, Kwon, G. S., editor; Taylor&Francis: **2005**; Chapter 14, pp. 577-613.
68. Yokoyama, M.; Miyauchi, M.; Yamada, N.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K.; Inoue, S. *Cancer Res.* **1990**, 50(6), 1693-1700.
69. Yokoyama, M.; Miyauchi, M.; Yamada, N.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K.; Inoue, S. *J.Control.Release* **1990**, 11(1-3), 269-278.
70. Bae, Y.; Kataoka, K. Polymer Assemblies - Intelligent Block Copolymer Micelles for the Programmed Delivery of Drug and Genes, in *Polymeric Drug Delivery Systems*, Kwon, G. S., editor; Taylor&Francis: **2005**; Chapter 12, pp. 491-532.
71. Nakanishi, T.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Suzuki, M.; Matsumura, Y.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. *J.Control.Release* **2001**, 74(1-3), 295-302.
72. Kataoka, K.; Matsumoto, T.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Kwon, G. S. *J.Control.Release* **2000**, 64(1-3), 143-153.
73. Lee, S. C.; Kim, C.; Kwon, I. C.; Chung, H.; Jeong, S. Y. *J.Control.Release* **2003**, 89(3), 437-446.

74. Liggins, R. T.; Burt, H. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*(2), 191-202.
75. Liu, J. B.; Xiao, Y. H.; Allen, C. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*(1), 132-143.
76. Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Adv. Polym. Sci.* **2005**, *193* 67-101.
77. Hrubý, M. disertační práce, ÚMCH AV ČR a VŠCHT Praha, **2005**.
78. Yokoyama, M. Polymeric Micelles for the Targeting of Hydrophobic Drugs, in *Polymeric Drug Delivery Systems*, Kwon, G. S., editor; Taylor&Francis: **2005**; Chapter 13, pp. 533-575.
79. Lele, B. S.; Leroux, J. C. *Polymer* **2002**, *43*(21), 5595-5606.
80. Lele, B. S.; Leroux, J. C. *Macromolecules* **2002**, *35*(17), 6714-6723.
81. Ganachaud, F.; Monteiro, M. J.; Gilbert, R. G.; Dourges, M. A.; Thang, S. H.; Rizzardo, E. *Macromolecules* **2000**, *33*(18), 6738-6745.
82. Koňák, C.; Ganchev, B.; Teodorescu, M.; Matyjaszewski, K.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *Polymer* **2002**, *43*(13), 3735-3741.
83. Cammas-Marion, S.; Okano, T.; Kataoka, K. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **1999**, *16*(1-4), 207-215.
84. Inoue, T.; Chen, G. H.; Nakamae, K.; Hoffman, A. S. *J. Control. Release* **1998**, *51*(2-3), 221-229.
85. Kohori, F.; Yokoyama, M.; Sakai, K.; Okano, T. *J. Control. Release* **2002**, *78*(1-3), 155-163.
86. Kohori, F.; Sakai, K.; Aoyagi, T.; Yokoyama, M.; Sakurai, Y.; Okano, T. *J. Control. Release* **1998**, *55*(1), 87-98.
87. Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Suwa, S.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **1996**, *39*(2-3), 351-356.
88. Hovorka, O.; Etrych, T.; Šubr, V.; Strohalm, J.; Ulbrich, K.; Říhová, B. *J. Drug Target.* **2006**, *14*(6), 391-403.
89. Ulbrich, K.; Koňák, C.; Tuzar, Z.; Kopeček, J. *Makromolekul. Chem.* **1987**, *188*(6), 1261-1272.
90. Harada, A.; Kataoka, K. *Science* **1999**, *283*(5398), 65-67.
91. Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1998**, *31*(2), 288-294.
92. Kataoka, K.; Togawa, H.; Harada, A.; Yasugi, K.; Matsumoto, T.; Katayose, S. *Macromolecules* **1996**, *29*(26), 8556-8557.
93. Kataoka, K.; Harada, A.; Wakebayashi, D.; Nagasaki, Y. *Macromolecules* **1999**, *32*(20), 6892-6894.

94. Akiyama, Y.; Harada, A.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Macromolecules* **2000**, 33(16), 5841-5845.
95. Koňák, C.; Mrkvičková, L.; Nazarova, O.; Ulbrich, K.; Seymour, L. W. *Supramolecular Science* **1998**, 5(1-2), 67-74.
96. De Duve, C.; De Barsya, T.; Poolea, B.; Troueta, A.; Tulkensa, P.; Van Hoofa, F. *Biochem.Pharmacol.* **1974**, 23(18), 2495-2515.
97. Gerweck, L. E.; Seetharaman, K. *Cancer Res.* **1996**, 56(6), 1194-1198.
98. Volk, T.; Jahde, E.; Fortmeyer, H. P.; Glusenkamp, K. H.; Rajewsky, M. F. *Br.J.Cancer* **1993**, 68(3), 492-500.
99. Shen, W. C.; Ryser, H. J. P. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **1981**, 102(3), 1048-1054.
100. Alshamkhani, A.; Duncan, R. *Int.J.Pharm.* **1995**, 122(1-2), 107-119.
101. Hudecz, F.; Clegg, J. A.; Kajtar, J.; Embleton, M. J.; Szekerke, M.; Baldwin, R. W. *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3(1), 49-57.
102. Choi, W. M.; Kopečková, P.; Minko, T.; Kopeček, J. *J.Bioact.Compat.Polym.* **1999**, 14(6), 447-456.
103. Ulbrich, K.; Šubr, V. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2004**, 56(7), 1023-1050.
104. Yoo, H. S.; Lee, E. A.; Park, T. G. *J.Control.Release* **2002**, 82(1), 17-27.
105. Greenfield, R. S.; Kaneko, T.; Daues, A.; Edson, M. A.; Fitzgerald, K. A.; Olech, L. J.; Grattan, J. A.; Spitalny, G. L.; Braslawsky, G. R. *Cancer Res.* **1990**, 50(20), 6600-6607.
106. Braslawsky, G. R.; Edson, M. A.; Pearce, W.; Kaneko, T.; Greenfield, R. S. *Cancer Res.* **1990**, 50(20), 6608-6614.
107. Mueller, B. M.; Wrasidlo, W. A.; Reisfeld, R. A. *Bioconjugate Chem.* **1990**, 1(5), 325-330.
108. Kaneko, T.; Willner, D.; Monkovic, I.; Knipe, J. O.; Braslawsky, G. R.; Greenfield, R. S.; Vyas, D. M. *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2(3), 133-141.
109. Willner, D.; Trail, P. A.; Hofstead, S. J.; King, H. D.; Lasch, S. J.; Braslawsky, G. R.; Greenfield, R. S.; Kaneko, T.; Firestone, R. A. *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4(6), 521-527.
110. Kratz, F.; Warnecke, A.; Scheuermann, K.; Stockmar, C.; Schwab, J.; Lazar, P.; Druckes, P.; Esser, N.; Drevs, J.; Rognan, D.; Bissantz, C.; Hinderling, C.; Folkers, G.; Fichtner, I.; Unger, C. *J.Med.Chem.* **2002**, 45(25), 5523-5533.

111. Ferruti, P.; Tanzi, M. C.; Vaccaroni, F. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1979**, *17*, 277-279.
112. Hofmann, V.; Ringsdorf, H.; Seganova, A.; Wagner, W. H. *Makromolekul. Chem.* **1979**, *180*(3), 837-841.
113. Hurwitz, E.; Wilchek, M.; Pitha, J. *J. Appl. Biochem.* **1980**, *2*, 25-35.
114. Coessens, V.; Schacht, E.; Domurado, D. *J. Control. Release* **1996**, *38*(2-3), 141-150.
115. Rodrigues, P. C. A.; Beyer, U.; Schumacher, P.; Roth, T.; Fiebig, H. H.; Unger, C.; Messori, L.; Orioli, P.; Paper, D. H.; Mulhaupt, R.; Kratz, F. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*(11), 2517-2524.
116. Rodrigues, P. C. A.; Scheuermann, K.; Stockmar, C.; Maier, G.; Fiebig, H. H.; Unger, C.; Mulhaupt, R.; Kratz, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*(3), 355-360.
117. Rodrigues, P. C. A.; Roth, T.; Fiebig, H. H.; Unger, C.; Mulhaupt, R.; Kratz, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*(12), 4110-4117.
118. Pechar, M.; Braunová, A.; Ulbrich, K.; Jelínková, M.; Říhová, B. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2005**, *20*(4), 319-341.
119. Pechar, M.; Braunová, A.; Ulbrich, K. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2005**, *70*(3), 327-338.
120. Etrych, T.; Jelínková, M.; Říhová, B.; Ulbrich, K. *J. Control. Release* **2001**, *73*(1), 89-102.
121. Říhová, B.; Etrych, T.; Pechar, M.; Jelínková, M.; Šťastný, M.; Hovorka, O.; Kovář, M.; Ulbrich, K. *J. Control. Release* **2001**, *74*(1-3), 225-232.
122. Bae, Y.; Nishiyama, N.; Fukushima, S.; Koyama, H.; Yasuhiro, M.; Kataoka, K. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*(1), 122-130.
123. Hrubý, M.; Koňák, C.; Ulbrich, K. *J. Control. Release* **2005**, *103*(1), 137-148.
124. Ihre, H. R.; De Jesus, O. L. P.; Szoka, F. C.; Fréchet, J. M. J. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*(3), 443-452.
125. De Jesus, O. L. P.; Ihre, H. R.; Gagne, L.; Fréchet, J. M. J.; Szoka, F. C. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*(3), 453-461.
126. Patel, V. F.; Hardin, J. N.; Starling, J. J.; Mastro, J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*(5), 507-512.
127. Patel, V. F.; Hardin, J. N.; Mastro, J. M.; Law, K. L.; Zimmermann, J. L.; Ehlhardt, W. J.; Woodland, J. M.; Starling, J. J. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*(4), 497-510.

128. Biessen, E. A. L.; Beuting, D. M.; Vietsch, H.; Bijsterbosch, M. K.; Vanberkel, T. J. C. *J.Hepatol.* **1994**, *21*(5), 806-815.
129. Daussin, F.; Boschetti, E.; Delmotte, F.; Monsigny, M. *Eur.J.Biochem.* **1988**, *176*(3), 625-628.
130. Tomlinson, R.; Heller, J.; Brocchini, S.; Duncan, R. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*(6), 1096-1106.
131. Tomlinson, R.; Klee, M.; Garrett, S.; Heller, J.; Duncan, R.; Brocchini, S. *Macromolecules* **2002**, *35*(2), 473-480.
132. Li, Y.; Kwon, G. S. *Colloid Surf.B-Biointerfaces* **1999**, *16*(1-4), 217-226.
133. Li, Y.; Kwon, G. S. *Pharm.Res.* **2000**, *17*(5), 607-611.
134. Yoo, H. S.; Park, T. G. *J.Control.Release* **2001**, *70*(1-2), 63-70.
135. Bae, Y.; Fukushima, S.; Harada, A.; Kataoka, K. *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **2003**, *42*(38), 4640-4643.
136. Hrubý, M.; Koňák, C.; Ulbrich, K. *J.Appl.Polym.Sci.* **2005**, *95*(2), 201-211.
137. Goldberg, E. P.; Hadba, A. R.; Almond, B. A.; Marotta, J. S. *J.Pharm.Pharmacol.* **2002**, *54*(2), 159-180.
138. Shiah, J. G.; Sun, Y.; Kopečková, P.; Peterson, C. M.; Straight, R. C.; Kopeček, J. *J.Control.Release* **2001**, *74*(1-3), 249-253.
139. van Nostrum, C. F. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2004**, *56*(1), 9-16.
140. Chilkoti, A.; Dreher, M. R.; Meyer, D. E.; Raucher, D. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2002**, *54*(5), 613-630.
141. Chytrý, V.; Ulbrich, K. *J.Bioact.Compat.Polym.* **2001**, *16*(6), 427-440.
142. Bier, O. G.; da Silva, W. D.; Goetze, D.; Mota, I. *Základy imunologie*; Avicenum: Praha, **1984**.
143. Saltzman, W. M. *Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* **1993**, *10*(2) 111-142.
144. Kohler, G.; Milstein, C. *Nature* **1975**, *256* 495-506.
145. Panchagnula, R.; Dey, C. S. *J.Clin.Pharm.Ther.* **1997**, *22*(1), 7-19.
146. Garnet, M. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2001**, *53*(2), 171-216.
147. Torchilin, V. P. *Cell.Mol.Life Sci.* **2004**, *61*(19-20), 2549-2559.
148. Lu, Z. R.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *Nat.Biotechnol.* **1999**, *17*(11), 1101-1104.
149. Lu, Z.-R.; Shiah, J.-G.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *J.Control.Release* **2001**, *74*, 263-268.
150. Dvořák, H. F.; Nagy, J. A.; Dvořák, A. M. *Cancer Cells-A Monthly Review* **1991**, *3*(3), 77-85.

151. Nielsen, U. B.; Adams, G. P.; Weiner, L. M.; Marks, J. D. *Cancer Res.* **2000**, *60*(22), 6434-6440.
152. Aina, O. H.; Sroka, T. C.; Chen, M. L.; Lam, K. S. *Biopolymers* **2002**, *66*(3), 184-199.
153. Parmley, S. F.; Smith, G. P. *Gene* **1988**, *73*(2), 305-318.
154. Satchi-Fainaro, R.; Puder, M.; Davies, J. W.; Tran, H. T.; Sampson, D. A.; Greene, A. K.; Corfas, G.; Folkman, J. *Nat. Med.* **2004**, *10*(3), 255-261.
155. Mitra, A.; Mulholland, J.; Nan, A.; McNeill, E.; Ghandehari, H.; Line, B. R. *J.Control.Release* **2005**, *102*(1), 191-201.
156. Mitra, A.; Coleman, T.; Borgman, M.; Nan, A.; Ghandehari, H.; Line, B. R. *J.Control.Release* **2006**, *114*(2), 175-183.
157. Pechar, M.; Ulbrich, K.; Etrych, T.; Fabra, A.; Stevenson, M.; Seymour, L. *J.Control.Release* **2005**, *101*(1-3), 376-379.
158. Lammers, T.; Kuhnlein, R.; Kissel, M.; Šubr, V.; Etrych, T.; Pola, R.; Pechar, M.; Ulbrich, K.; Storm, G.; Huber, P.; Peschke, P. *J.Control.Release* **2005**, *110*(1), 103-118.
159. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. *J.Control.Release* **2000**, *65*(1-2), 271-284.
160. Seymour, L. W.; Miyamoto, Y.; Maeda, H.; Brereton, M.; Strohmalm, J.; Ulbrich, K.; Duncan, R. *Eur.J.Cancer* **1995**, *31A*(5), 766-770.
161. Dvořák, M.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *J.Control.Release* **1999**, *60*(2-3), 321-332.
162. Shiah, J. G.; Dvořák, M.; Kopečková, P.; Sun, Y.; Peterson, C. M.; Kopeček, J. *Eur.J.Cancer* **2001**, *37*(1), 131-139.
163. Pechar, M.; Strohmalm, J.; Ulbrich, K.; Schacht, E. *Macromol.Chem.Phys.* **1997**, *198*(4), 1009-1020.
164. Pechar, M.; Ulbrich, K.; Šubr, V.; Seymour, L. W.; Schacht, E. H. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*(2), 131-139.
165. Pechar, M.; Ulbrich, K.; Jelínková, M.; Říhová, B. *Macromol.Biosci.* **2003**, *3*(7), 364-372.
166. Braunová, A.; Pechar, M.; Ulbrich, K. *Collect.Czech.Chem.Commun.* **2004**, *69*(8), 1643-1656.
167. Andersson, L.; Davies, J.; Duncan, R.; Ferruti, P.; Ford, J.; Kneller, S.; Mendichi, R.; Pasut, G.; Schiavon, O.; Summerford, C.; Tirk, A.; Veronese, F. M.; Vincenzi, V.; Wu, G. F. *Biomacromolecules* **2005**, *6*(2), 914-926.

168. Vincenzi, V.; Ferruti, P.; Ford, J.; Duncan, R. *Macromol.Biosci.* **2001**, *1*(4), 164-169.
169. Wang, D.; Kopečková, P.; Minko, T.; Nanayakkara, V.; Kopeček, J. *Biomacromolecules* **2000**, *1*(3), 313-319.
170. Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. *J.Am.Chem.Soc.* **2002**, *124*(47), 14137-14146.
171. Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **2001**, *34*(19), 6542-6544.
172. Lee, C. C.; Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J. *J.Polym.Sci., Part A: Polym.Chem.* **2004**, *42*(14), 3563-3578.
173. Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. *Drug Discov.Today* **2005**, *10*(1), 35-43.
174. Šubr, V.; Ulbrich, K. *Reactive & Functional Polymers* **2006**, *66*(12), 1525-1538.
175. Reschel, T.; Koňák, C.; Oupicky, D.; Seymour, L. W.; Ulbrich, K. *J.Control.Release* **2002**, *81*(1-2), 201-217.
176. Šubr, V.; Koňák, C.; Laga, R.; Ulbrich, K. *Biomacromolecules* **2006**, *7*(1), 122-130.
177. Snyder, S. L.; Sobocinski, P. *Z. Anal.Biochem.* **1975**, *64*(1), 284-288.
178. Etrych, T.; Mrkvan, T.; Chytil, P.; Koňák, C.; Říhová, B.; Ulbrich, K. *Biomaterials* **2007**, *submitted for publication*.
179. Fineman, M.; Ross, S. D. *J.Polym.Sci.* **1950**, *5*(2), 259-265.
180. Kelen, T.; Tudos, F. *J.Macromol.Sci.Chem.* **1975**, *A 9*(1), 1-27.
181. Pohl, J.; Baudyš, M.; Tomášek, V.; Kostka, V. *FEBS Lett.* **1982**, *142*(1), 23-26.
182. Etrych, T., disertační práce, ÚMCH AV ČR a KFMCH PřF UK, **2002**.
183. Chytil, P., diplomová práce, ÚMCH AV ČR a KFMCH PřF UK, **2002**.
184. Ulbrich, K.; Kopeček, J. *Eur.Polym.J.* **1976**, *12*(3), 183-187.
185. Lee, E.S.; Shin, H.J.; Na, K.; Bae, Y.H. *J.Control.Release* **2003**, *90*(3), 363-374.
186. McCormick, L. A.; Seymour, L. C. W.; Duncan, R.; Kopeček, J. *J.Bioact.Comp.Polym* **1986**, 4-19.
187. Duncan, R.; Cable, H. C.; Rejmanová, P.; Kopeček, J.; Lloyd, J. B. *Biochim.Biophys.Acta* **1984**, *799*(1), 1-8.
188. Burchard, W. *Trends Polym.Sci* **1993**, *1*(7), 192-198.

Seznam použitých zkratek a symbolů

ABIK	4,4'-azobis(kyanovalerová kyselina)
ABIK-2TT	thiazolidin-2-thion 4,4'-azobis(kyanovalerové kyseliny)
ABIN	2,2-azobis(isobutyronitril)
AtB	protilátky, imunoglobuliny
b.t.	bod tání
b.v.	bod varu
Boc	<i>tert</i> -butoxykarbonylová skupina
CAC	kritická asociační koncentrace
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DCU	<i>N,N'</i> -dicyklohexylmočovina
DDM	dodecylmethakrylát
DIVEMA	poly(divinylether- <i>co</i> -maleinanhydrid)
DMAE	<i>N</i> -(2-(dimethylamino)ethyl)
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EPR efekt	efekt zvýšené propustnosti a zadržování (<i>Enhanced permeability and retention effect</i>)
F	funkčnost semitelechelického kopolymeru
Fab, F(ab) ₂	fragmenty protilátek
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
IC ₅₀	koncentrace DOX nebo ekvivalentu DOX, která inhibuje růst buněk z 50 %
MA	methakryloylamino skupina
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací MALDI a v kombinaci s analyzátozem doby letu iontů
M_{app}	zdánlivá molekulová hmotnost
\overline{M}_n	početně průměrná molární hmotnost
$M_{n,COOH}$, $M_{n,TT}$	početně průměrná molární hmotnost, získaná ze stanovení koncových funkčních skupin

\overline{M}_w	hmotnostně průměrná molární hmotnost
$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	index molekulární neuniformity
NMR	nukleární magnetická rezonance
ONp	4-nitrofenoxy skupina
OSu	sukcinimidylxy skupina
PEG	poly(oxyethylen), poly(ethylenglykol)
PK1	konjugát poly(<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid- <i>co</i> - <i>N</i> -methakryloylglycyl-D,L-fenylalanylleucylglycin)u s DOX
QELS	quasi-elastický rozptyl světla
RES	retikuloendoteliální systém
Rf	retenční faktor, TLC metoda
R_H	hydrodynamický poloměr
RI detektor	diferenciální refraktometr
SEC	rozměrově vylučovací chromatografie
SMA	poly(styren- <i>alt</i> -maleinanhydrid)
SMANCS	konjugát poly(styren- <i>alt</i> -maleinanhydrid)u s neocarcinostatinem
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMAE	2-(trimethylammonio)ethyl
TNBSA	2,4,6-trinitrobenzen-1-sulfonová kyselina
TT	thiazolidin-2-thionová skupina