

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Jan Zelený

Příprava a charakterizace
polymerních, enzymově štěpitelných, nosičů kancerostatik

The preparation and characterisation of polymeric, enzymatically
cleavable carriers for cancerostatic drugs

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Tomáš Etrych, DSc.

Školitel specialista: Ing. Michal Pechar, CSc.

Praha 2019

Prohlášení:

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

V Praze dne 22.5.2019

Podpis: _____

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svým školitelům, RNDr. Tomáši Etrychovi, DSc. a Ing. Michalu Pecharovi, CSc. a všem ostatním zaměstnancům oddělení Biolékařských polymerů Ústavu Makromolekulární Chemie AV ČR, v.v.i. za pomoc, podporu a trpělivost při práci na tomto projektu. Bez jejich odborného dohledu a rad by vytvoření této práce nebylo možné. Rovněž bych rád poděkoval své rodině a přátelům, bez nichž by nebylo možné celé moje studium. Děkuji.

Abstrakt

Současně s rozvojem protinádorových léčiv vyvstává stále častěji otázka, jak tato léčiva, která mnohdy sama o sobě vykazují karcinogenní účinky, s jistotou a efektivně dopravovat přímo do postižených tkání a předejít tak jejich destruktivním účinkům na zbytek organismu. Jednou z možností, jak dopravovat léčivo do nádorové tkáně, je využití některé ze specifických vlastností této tkáně, z nichž jednou je efekt zvýšené propustnosti a zádrže (tzv. EPR efekt). Tento jev, který bude v této práci dále diskutován, umožňuje makromolekulám, které jsou příliš objemné na to, aby pronikly z krevního řečiště do nepostižené tkáně, proniknout do tkáně nádorové a hromadit se v ní. Je-li tedy protinádorové léčivo připojeno k vhodné makromolekule, může díky tomuto efektu společně s ní vstoupit cíleně do nádorové tkáně. Je-li navíc toto léčivo připojeno k makromolekule prostřednictvím enzymově štěpitelné spojky, lze využít přítomnosti lysozomálních proteas (např. katepsinu B, který je v některých rakovinových buňkách zastoupen ve vyšší míře než v buňkách zdravých) k jeho odštěpení a aktivaci. Tato práce vedle samotných protinádorových léčiv popisuje jednotlivé zástupce polymerních systémů určených k směřování těchto léčiv, jejich strukturu a funkci. V části experimentální je dále popsána syntéza některých polymerních konjugátů (skládajících se z nosiče, spojky a léčiva) a jejich charakterizace. Výsledkem práce je sada polymerních konjugátů protinádorových léčiv doxorubicinu a pirarubicinu se třemi různými peptidovými spojkami a soubor dat, získaných měření rychlosti uvolňování protinádorových léčiv, stanovením jejich cytotoxicity a jejich charakterizací běžnými analytickými technikami.

Klíčová slova: nosiče léčiv, EPR efekt, kancerostatika, polymery, katepsin B

Abstract

As the development of cancerostatic drugs progresses it is becoming necessary to contemplate the question of how to deliver these drugs, which themselves tend to exhibit carcinogenic properties, effectively and accurately to the affected tissues and thus to circumvent their destructive effects upon the healthy parts of the organism. One approach to delivering drugs selectively to cancerous tissues is to make use of some of the specific properties which these tissues tend to possess, one of which being the so-called enhanced permeability and retention effect (EPR effect). This effect, which will be further discussed within this thesis, allows for macromolecules that are too massive to pass from the bloodstream into healthy tissue, to exit the blood vessels of cancerous tissue and to accumulate there. Therefore, a drug molecule can specifically enter cancerous tissue along with a suitable macromolecule, to which it is conveniently attached. If, moreover, the given drug is connected to the carrier molecule via an enzymatically cleavable spacer, it is possible to make use of lysosomal proteases (such as cathepsin B, which is overexpressed in some cancer cells) in order to attain its detachment from the carrier molecule and its subsequent activation. This bachelor thesis focuses on describing the structure and function of various polymeric drug delivery systems along with the cancerostatic drugs themselves. The experimental section of this thesis further details the synthesis of some of these polymeric conjugates (consisting of a carrier molecule, a spacer and a drug molecule) and their characterisation. The results obtained include a set of polymeric conjugates of doxorubicin and pirarubicin cancerostatics with three different peptide spacers and a body of data acquired by measuring drug release rates, determining the cytotoxicity of the conjugates and by characterising them by means of standard analytical procedures.

Keywords: drug delivery systems, EPR effect, cancerostatic drugs, polymers, cathepsin B

(In Czech)

OBSAH

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	8
1. ÚVOD	10
1.1 PROBLEMATIKA LÉČBY ZHOUBNÝCH NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ	10
1.2 SPECIFICKÉ VLASTNOSTI NÁDOROVÉ TKÁNĚ A EPR EFEKT	10
1.3 POLYMERNÍ NOSIČE LÉČIV	12
1.3.1 Struktura polymerního nosiče	12
1.3.1.1 Polymer	13
1.3.1.2 Spojka	13
1.3.1.3 Účinná látka	14
1.3.2 Polymerní nosiče s enzymově štěpitelnou spojkou	14
1.4 PROTINÁDOROVÁ LÉČIVA	17
1.4.1 Klasifikace protinádorových léčiv podle mechanismu působení	18
1.4.1.1 Inhibitory biosyntézy nukleových kyselin	18
1.4.1.2 Látky modifikující nukleové kyseliny (genotoxická cytostatika)	18
1.4.1.3 Látky bránící buněčnému dělení (antimitotika)	19
1.4.1.4 Látky s kombinovanými a dalšími účinky	19
1.4.2 Doxorubicin a pirarubicin	19
2. CÍLE PRÁCE	21
3. MATERIÁL	21
3.1 PŘÍSTROJE A MATERIAL	21
3.2 CHEMIKÁLIE A ROZPOUŠTĚDLA	22
3.3 BUNĚČNÉ LINIE A KULTIVAČNÍ MEDIA	23
4. METODY	24
4.1 METODY CHARAKTERIZACE PRODUKTŮ A KONTROLY SYNTETICKÝCH POSTUPŮ	24
4.1.1 HPLC	24
4.1.2 SEC	24
4.1.3 MS ESI	24
4.1.4 Spektrofotometrické stanovení TT skupin	25
4.2 SYNTÉZA POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ	25
4.2.1 Komonomer Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-TT	26
4.2.2 Polymerní prekurzor poly[HPMA-co-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-TT)]	27
4.2.3 Konjugáty poly[HPMA-co-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-DOX/PIR)]	28
4.2.4 Komonomer Ma-Val-Cit-TT	29
4.2.5 Polymerní prekurzor poly[HPMA-co-(Ma-Val-Cit-OH)]	30
4.2.6 Konjugáty poly[HPMA-co-(Ma-Val-Cit-DOX/PIR)]	31
4.2.7 Konjugáty poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-DOX/PIR)]	32

4.2.8 Konjugáty poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-,click“-Val-Cit-DOX/PIR)]	32
4.3 ŠTĚPENÍ KATEPSINEM B	33
4.3.1 Stanovení aktivity enzymu	33
4.3.2 Štěpení	34
4.4 STANOVENÍ CYTOTOXICITY POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ IN VITRO	34
4.5 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE A MĚŘENÍ POLOČASU ZHÁŠENÍ FLUORESCENCE	35
5. VÝSLEDKY	36
5.1 SYNTÉZA POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ S LÉČIVY A JEJICH PREKURZORŮ	36
5.2 ENZYMOVÉ ŠTĚPENÍ.....	36
5.3 STANOVENÍ CYTOTOXICITY POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ.....	38
5.4 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE A FLIM	40
6. DISKUSE	43
7. SOUHRN.....	47
POUŽITÁ LITERATURA.....	49

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AIBN	azobisisobutyronitril
AMP	1-aminopropan-2-ol
Az	zbytek kyseliny azidopentanové
Bzl-Arg-Nap	<i>N</i> ^α -benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid
CTA	přenosové činidlo (z angl. chain transfer agent)
DBCO	dibenzoazacyklooktynová skupina
DBCO-NH ₂	dibenzoazacyklooktyn-amin
DCM	dichlormethan
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylkarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DLD-1	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamid
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMEM	kultivační medium (z angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DOX	doxorubicin
DOX·HCl	doxorubicin hydrochlorid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EL4	buněčná linie myšího T-buněčného lymfomu
EPR efekt	efekt zvýšené propustnosti a zádrže (z angl. enhanced permeability and retention)
<i>et al.</i>	a kolektiv (z latinského <i>et alii</i> - a další)
FLIM	měření poločasu zhášení fluorescence (angl. fluorescence lifetime) imaging
Fmoc	9-fluorenylmethoxykarbonylová skupina
FTS	fetální telecí sérum
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HOBt	1-hydroxybenzotriazol

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
kys.	kyselina
Ma	zbytek kyseliny methakrylové
MeOH	methanol
MS ESI	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
PEG	poly(ethylen glykol)
PGA	poly(glutamová kyselina)
PIR	pirarubicin
PLA	poly(mléčná kyselina)
PyBOP	(benzotriazol-1-yl oxy)tripyrrolidino fosfonium hexafluorofosfát
RAFT	polymerace s řízeným adičně-fragmentačním přenosem řetězce (z angl. reversible addition-fragmentation chain transfer)
RPMI	kultivační médium (z angl. Roswell Park Memorial Institute)
SEC	rozměrově vylučovací chromatografie
t-BuOH	terc-butylalkohol (2-methylbutan-2-ol)
TFA	kyselina trifluoroctová
TT	thiazolidin-2-thion
V70	2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)
VPF	faktor vaskulární permeability (z angl. vascular permeability factor)

1. ÚVOD

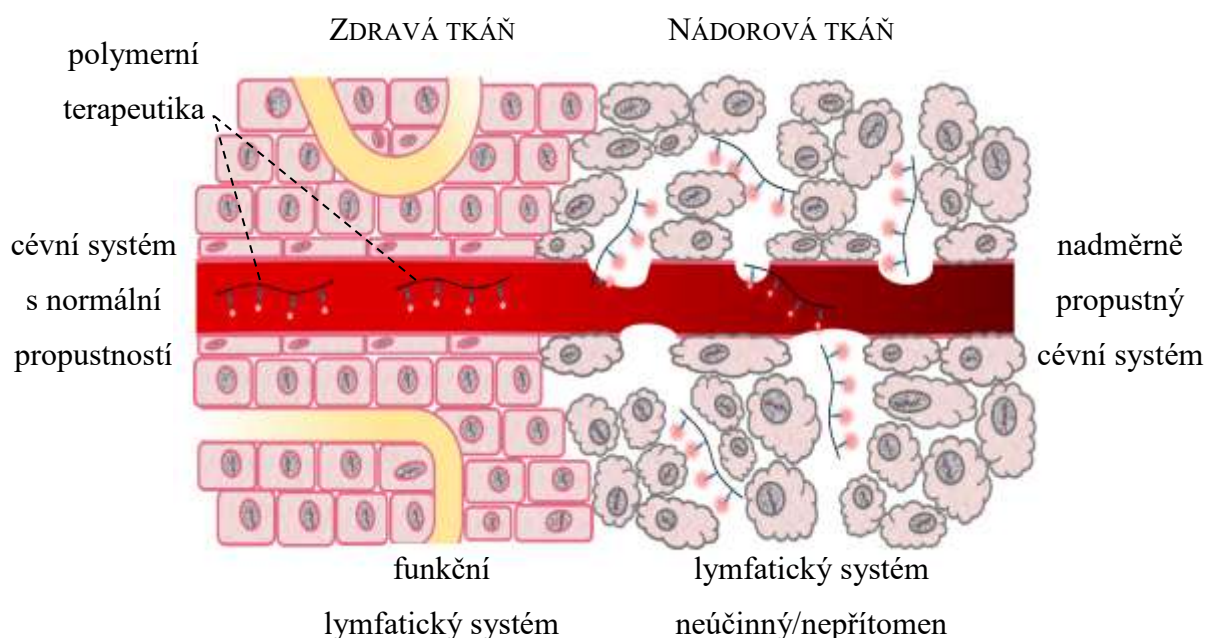
1.1 Problematika léčby zhoubných nádorových onemocnění

Zhoubná nádorová onemocnění patří vedle onemocnění kardiovaskulárních k hlavním příčinám úmrtí ve vyspělých zemích dnešní doby¹⁻³. Jejich léčba se vyznačuje mnohými úskalími, mezi něž patří mj. značná rozmanitost a vzájemná nepodobnost jednotlivých rakovinných onemocnění, nízká specifita a rychlé vylučování protinádorových léčiv a dále skutečnost, že mnohá tato léčiva sama o sobě vykazují toxické, či přímo karcinogenní účinky. Z tohoto důvodu se v posledních desetiletích staly předmětem vědeckého zájmu molekulární dopravní systémy, které by umožňovaly cílené dodávání protinádorových léčiv do postižených tkání, či buněk. Ve snaze vytvořit takovýto molekulární systém, byla v průběhu posledních desetiletí vyvinuta široká škála nosičů léčiv rozličných struktur a vlastností. Jako příklad lze uvést nosiče založené na polymerních nanočásticích, micelách, dendrimerech či liposomech, systémy založené na různých alotropech uhlíku, nebo systémy založené na vysokomolekulárních, vodorozpustných polymerních nosičích, které budou v této práci detailněji popsány².

1.2 Specifické vlastnosti nádorové tkáně a EPR efekt

V důsledku značných odlišností v růstu a vývoji nádorové tkáně ve srovnání se zdravou tkání disponují pevné nádory několika specifickými vlastnostmi, kterých lze v boji s nimi využít: Růst tumoru bývá provázen zvýšenou angiogenezí (pojmem angiogeneze se rozumí růst a větvení krevních kapilár)⁴. Tato hyperangiogeneze je stimulována faktorem vaskulárního endoteliálního růstu³ (angl. VEGF - „vascular endothelial growth factor“; dříve také VFP - „vascular permeability factor“)⁵ a umožňuje dostatečné zásobení rychle, z počátku exponenciálně⁶, rostoucího tumoru. Rychle rostoucí cévní systém však v porovnání se zdravou vaskulaturou vykazuje mnoho abnormalit, jakými jsou např. defektní endoteliální buňky s širokými fenestracemi, velká cévní lumina, či nepřítomnosti hladké svaloviny, v jejichž důsledku se stává více propustným³. Dalším systémem, vykazujícím značné defekty, je systém lymfatických cév, který je v nádorových tkáních buď zcela nepřítomen, nebo nefunguje dostatečně efektivně² a omezuje tak odstraňování látek z tumoru³. Společným důsledkem těchto anatomicky patofysiologických vlastností je

již zmiňovaný EPR efekt (EPR z angl. enhanced permeability and retention), popsáný v roce 1986 Y. Matsumurou a H. Maedou, který jej dále studoval a uvedl do kontextu s makromolekulárními nosiči léčiv³. Dle poznatků, publikovaných H. Maedou *et al.*, může vlivem zvýšené propustnosti nádorové vaskulatury dojít k extravazaci makromolekul převyšujících 40 kDa z nádorové vaskulatury a k jejich průniku do tkáně tumoru (permeability). Nefunkčnost lymfatického systému poté vede k zadržení těchto molekul v nádorové tkáni (retention)³. Tento jev lze ověřit intravenózním podáním Evansovy modři, vázané na plazmatický albumin, která se po vpravení do organismu akumuluje v nádorových tkáních a obarvuje je, zatímco ve zdravých tkáních k akumulaci (a tudíž ani k obarvení) nedochází. Mimo to lze u nádorů s průměrem větším než 3 cm pozorovat vyšší akumulaci barviva v periferiích, ve kterých převládá nádorový růst a angiogeneze, než ve středu nádoru, který bývá z části nekrotický a oproti periferiím hypovaskulární. Tato pozorování naznačují, že je EPR efekt (resp. akumulace makromolekulárních látek ve tkáni tumoru) závislý na cévním systému a jeho patologiích v nádorové tkáni konkrétního typu nádoru³.



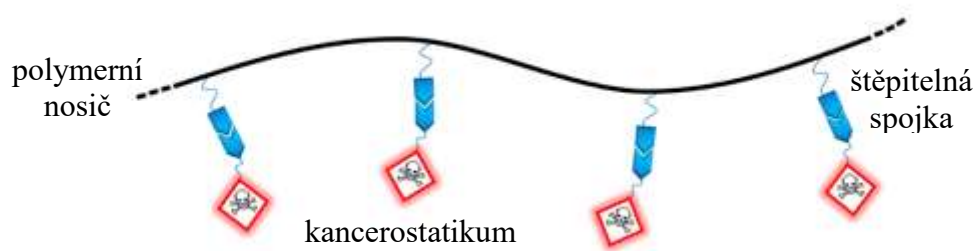
Obr. 1 Schématické znázornění EPR efektu. Zatímco objemnější molekuly do zdravé tkáně nepronikají a nízkomolekulární látky jsou odstraňovány lymfatickým systémem, do tkáně pevného nádoru pronikají i makromolekuly (např. polymerní terapeutika) a jsou v ní zadržovány.

1.3 Polymerní nosiče léčiv

Z výše popsaného vyplývá, že má-li být látka dopravena do nádorové tkáně s využitím EPR efektu, musí disponovat dostatečnou molekulovou hmotností (alespoň 40 kDa)³. Mnohá protinádorová léčiva jsou však sama o sobě látkami nízkomolekulárními a k jejich efektivní akumulaci v nádorové tkáni je tedy zapotřebí konjugovat je s vhodnými látkami vysokomolekulárními. V tomto bodě je nutno zmínit, že do nádorových tkání vlivem zvýšené permeability pronikají nejen makromolekuly, ale také látky nízkomolekulární. Ty se však, narozdíl od vysokomolekulárních látek, uvnitř tumoru nezadržují a vracejí se do krevního oběhu vlivem difuze⁷. Kromě selektivní akumulace léčiva v nádorové tkáni vlivem EPR efektu s sebou jeho konjugace s vhodným makromolekulárním nosičem přináší několik dalších výhod: Léčivo konjugované s vysokomolekulární látkou vykazuje lepší farmakokinetické vlastnosti (např. prodloužený biologický poločas - někdy až 200 krát delší oproti volnému léčivu³), vyšší rozpustnost a stabilitu⁸. Dále je možno konjugát léčiva s makromolekulou modifikovat dalšími ligandy, sloužícími např. k aktivnímu navádění konjugátu do cílové lokality⁸.

1.3.1 Struktura polymerního nosiče

V současnosti je známa široká škála látek, jak syntetického, tak i přírodního původu, které lze použít, jako polymerní prekurzory k přípravě nosičů léčiv. Základním kritériem využitelnosti těchto látek je biokompatibilita, tzn. daný polymer musí být biodegradovatelný a nesmí vykazovat toxické, či imunogenní účinky⁸. Základní polymerní konjugát sestává minimálně ze tří základních komponentů: vodorozpustný polymerní nosič (přírodní, či syntetický), biodegradovatelná spojka (angl. spacer), účinná látka⁸. V následujících odstavcích jsou tyto složky polymerního konjugátu detailněji popsány.



Obr. 2 Schéma polymerního konjugátu s protinádorovým léčivem (kancerostatikem).

1.3.1.1 Polymer

První zmínky o konjugaci léčiv s makromolekulárními nosiči přírodního či syntetického původu pochází z padesátých let minulého století. Mírně později, v sedmdesátých letech, byly popsány první pokusy o propojení léčiva s nosičem prostřednictvím peptidové spojky⁹. Od prvních experimentů bylo vyvinuto mnoho polymerních nosičů léčiv s různými strukturními a funkčními parametry, jež v principu umožňují přípravu vhodného konjugátu, odpovídajícího konkrétnímu využití a předpokládanému mechanismu působení². Mezi základní kritéria, která by polymerní nosič měl splňovat, patří již zmíněná vodorozpustnost, dále pak absence imunogenních, či toxických účinků, degradovatelnost, nebo vylučitelnost a v neposlední řadě dostatek vazebných míst, sloužících k připojení léčiva, či dalších funkčních jednotek². Zatímco například řetězec lineárního poly(ethylenglykolu) (PEG) disponuje pouze jedním, či dvěma vazebnými místy, mohou jich různé dendrimerní, hvězdicovité, nebo kopolymerní struktury obsahovat mnohem více². Co nejpřesněji definovaná molekulová hmotnost může být rovněž užitečnou vlastností, jelikož právě variací molekulové hmotnosti je možné ovládat distribuci polymerního konjugátu v organismu². V neposlední řadě je nutné, aby byla buňka schopna zvolený nosič prostřednictvím endocytózy internalizovat¹⁰. Jako příklad polymerních nosičů lze uvést výše jmenované poly(ethylenglykoly), polymerní deriváty kyseliny mléčné (PLA), poly(glutamovou kyselinu) (PGA), nebo v rámci experimentální části této práce použitý poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid) (HPMA), který je jedním z nejhojněji studovaných vodorozpustných nosičů léčiv².

1.3.1.2 Spojka

V kontextu nosičů léčiv se pojmem spojka (angl. spacer, linker) rozumí molekulární struktura, sloužící k připojení léčiva, či jiné látky ke zvolenému nosiči. Kromě připojení léčiva může tento útvar sloužit i k jeho kontrolovanému uvolňování. Za tímto účelem se využívá intracelulárně štěpitelných spojek, které jsou v prostředí vně buněk stabilní, ale které po proniknutí do intracelulárního prostoru určitým mechanismem degradují¹⁰. Podle mechanismu štěpení lze rozlišit následující typy spojek: pH senzitivní, redukovatelné, samoštěpící, enzymově štěpitelné¹⁰. Jelikož jsou předmětem zájmu této práce polymerní nosiče s enzymově štěpitelnou spojkou, bude zvláštní pozornost dále věnována právě jim - viz kapitola 1.3.2. Vedle výše popsaných vlastností musí spojka

rovněž být schopna degradovat tak, aby neovlivňovala molekulu léčiva, tj. v ideálním případě tak, aby uvolněná molekula léčiva neobsahovala zbytek spojky¹⁰.

1.3.1.3 Účinná látka

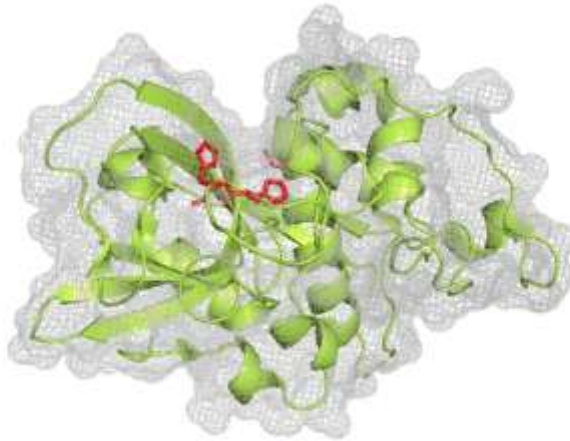
Účinná látka, někdy označována anglickým výrazem payload (náklad), může na polymerním nosiči být navázána buď v podobě neupravené, nebo v podobě neaktivního prekursoru (angl. prodrug)¹⁰, k jehož aktivaci dochází zvláštním mechanismem až po odštěpení z polymerního nosiče. V obou případech je nutnou podmínkou pro přípravu polymerního konjugátu možnost navázání účinné látky na spojku, a tudíž i na polymerní nosič, která je dána přítomností vhodných funkčních skupin na molekule účinné látky. Dodatečná modifikace původního léčiva těmito funkčními skupinami s sebou přináší riziko ztráty biologické aktivity, či jejího omezení¹¹. Po konjugaci účinné látky s makromolekulárním nosičem je dále zapotřebí aby tato účinná látka zůstala stabilní až do jejího uvolnění v cílové tkáni¹¹.

V souvislosti s účinností volného a na polymer vázaného léčiva je vhodné zmínit, že v odborné literatuře převládá názor, že polymerní konjugáty, které účinnou látku (kancerostatikum) neuvolňují, nevykazují přesvědčivou protinádorovou aktivitu *in vivo*². Prakticky se tedy předpokládá, že je odštěpení z nosiče nezbytné pro aktivaci většiny účinných látek, bez ohledu na to, zda byly navázány v „přirozené“, či neaktivní formě. Ověření právě tohoto předpokladu bylo jedním z cílů této práce (viz kapitola 2).

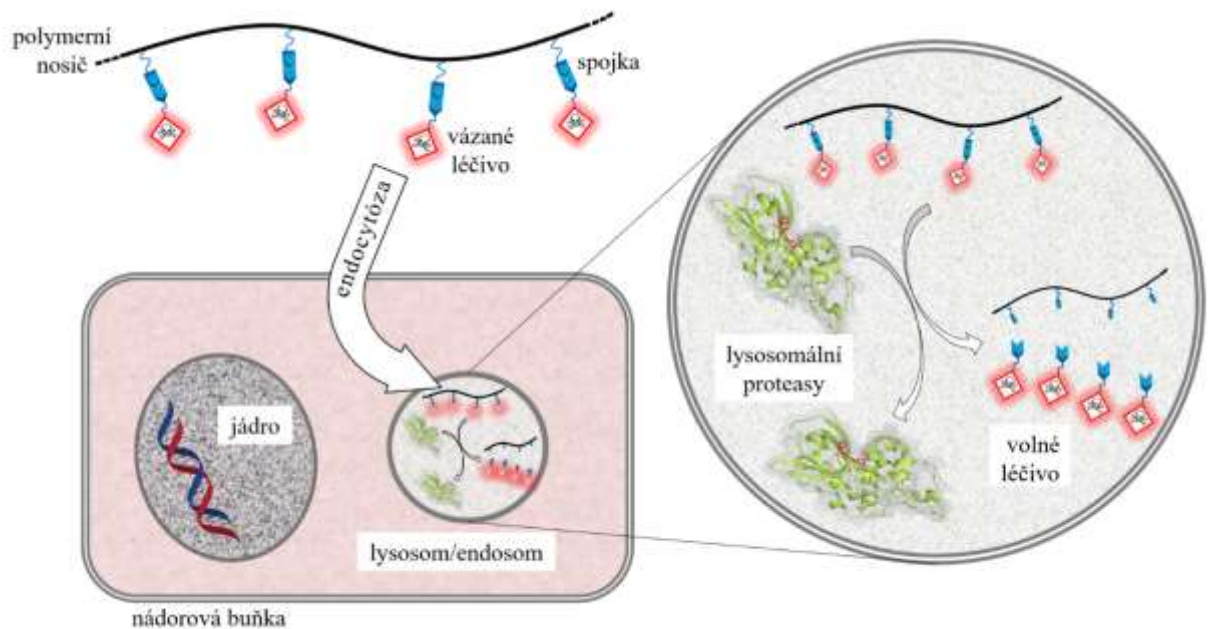
1.3.2 Polymerní nosiče s enzymově štěpitelnou spojkou

K cílenému štěpení různých chemických vazeb (např. peptidových, esterových, či glykosidických) lze využít aktivity některých enzymů^{2,10}. Substrátová specifita těchto enzymů, spolu s jejich nízkou aktivitou v krevním séru, je značnou výhodou, jelikož umožňuje využití těchto typů vazeb coby kontrolovatelně štěpitelných spojek mezi nosičem a léčivem¹⁰. Díky nízké aktivitě proteolytických enzymů v séru (způsobené přítomností inhibitorů a nepříznivým pH) vykazují zejména oligopeptidy vysokou stabilitu v krevním oběhu¹⁰. Avšak po jejich endocytóze mohou být tyto struktury degradovány působením lysosomálních, či endosomálních proteas^{2,10}, které navíc bývají (spolu s dalšími enzymy) v některých nádorových buňkách přítomny ve

zvýšené míře^{10,12–14}. V tomto směru je velmi významnou proteasou již zmiňovaný katepsin B⁹, který hraje zásadní roli při uvolňování protinádorových léčiv z polymerních nosičů s enzymově štěpitelnými spojkami, neboť jeho substrátová specifita je velmi blízká specifitě směsi všech lysosomálních proteas izolovaných z krysích jater, tzv. tritosomů¹⁵.

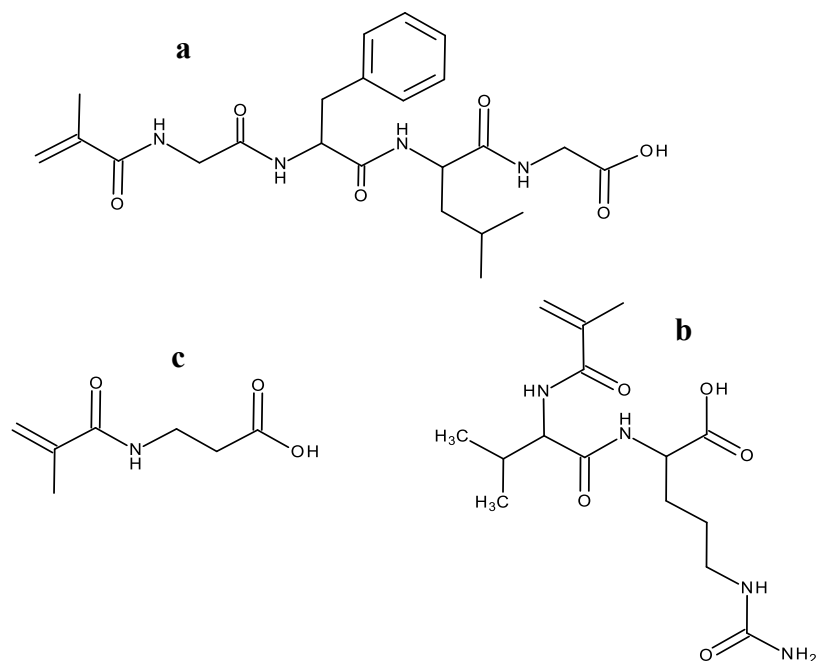


Obr. 3 Struktura katepsinu B (*Bos taurus*, slezina) vytvořená v programu PyMol 2.0 podle PDB souboru z webu <https://www.rcsb.org>¹⁶. Žlutě znázorněna je sekundární struktura enzymu, červeně jeho aktivní místo. Šedá mřížka naznačuje povrch proteinu.



Obr. 4 Mechanismus průniku polymerního terapeutika do nádorové buňky a uvolnění účinné látky působením lysosomálních proteas.

Ve snaze využít aktivity proteas k uvolňování léčiv z polymerních nosičů (konkrétně nosičů na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu - HPMA) bylo v sedmdesátých a osmdesátých letech minulého století syntetizováno a otestováno přes 300 různých oligopeptidů, z nichž se tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly (GFLG) ukázal jako nejslibnější spojka mezi polymerním nosičem a konkerostatikem doxorubicinem⁹. První polymerní konjugáty, obsahující spojku GFLG byly J.Kopečkem pojmenovány PK1 a PK2 (zkratka PK je tvořena počátečními písmeny měst Praha a Keele, kde byly tyto konjugáty syntetizovány a testovány). Konjugát PK1 byl tvořen kopolymerem HPMA a kyseliny methakrylové, na níž bylo prostřednictvím zmíněného tetrapeptidu GFLG navázáno protinádorové léčivo doxorubicin. Konjugát PK2 byl oproti PK1 doplněn ještě o směrující jednotku v podobě *N*-acetylgalaktosaminu, navázaného na polymerní nosič rovněž pomocí spojky GFLG. Od svého objevení do dnešní doby byl tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly rozsáhle studován a používán pro přípravu různých nosičů léčiv^{2,9,10}. Podobné popularitě se těší také dipeptid Val-Cit, vyznačující se vysokou stabilitou v krevním oběhu¹¹. Jakýmsi protipólem k těmto prokazatelně štěpitelným spojkám je spojka tvořená aminokyselinou β -alaninem (β -Ala), o jejíž degradaci katepsinem B ani jinými proteasami není nic známo a lze ji odůvodněně (na základě známé substrátové specifity katepsinu B) považovat za neštěpitelnou, což nakonec potvrzuje i tato práce. K ověření tvrzení, že je odštěpení léčiva z nosiče nutnou podmínkou jeho účinnosti, byly v rámci této práce připraveny a studovány mj. konjugáty protinádorových léčiv, využívající β -Ala jako spojku.



Obr. 5 Strukturní vzorce methakrylovaných spojek, popsanych v kapitole 1.3.2: **a** - Ma-Gly-Phe-Leu-Gly, **b** - Ma-Val-Cit, **c** - Ma-β-Ala. (Zkratka Ma značí zbytek kyseliny methakrylové, sloužící k zakotvení peptidové spojky do polymerního skeletu nosiče).

1.4 Protinádorová léčiva

Cílem protinádorové chemoterapie je vyvolání cytotoxických účinků, vedoucích k zastavení růstu a šíření nádoru a dlouhodobému vyléčení nádorového onemocnění⁶. Za tímto účelem byla vyvinuta řada cytostatických látek, s jejichž pomocí jsou nádorová onemocnění léčena. Zásah těchto léčiv je obvykle zaměřen proti metabolickým procesům nutným pro buněčnou replikaci. Jedním z problémů, spojených s využitím běžných chemoterapeutik, je jejich neschopnost rozlišit nádorové buňky od buněk normálních a tudíž jejich toxický účinek na všechny proliferující buňky^{6,10}. Z tohoto důvodu bývá protinádorová chemoterapie spojena s řadou nežádoucích účinků, jakými jsou např. zvracení, alopecie a stomatitida. U některých cytostatik dochází dále k poškození kostní dřeně, či myokardu (kardiotoxické účinky). Mezi způsoby, jak tyto nežádoucí účinky omezit, patří podávání antiemetik, růstových faktorů k zotavení funkce kostní dřeně, či podpora diurézy. Základní mechanismy působení cytostatických látek jsou uvedeny níže.

1.4.1 Klasifikace protinádorových léčiv podle mechanismu působení

Protinádorová léčiva lze podle mechanismu působení rozdělit do čtyř základních skupin. Jedná se o: 1) inhibitory biosyntézy nukleových kyselin a jejich prekurzorů; 2) látky modifikující již přítomné nukleové kyseliny; 3) látky poškozující mikrotubuly a bránící buněčnému dělení a 4) látky s kombinovanými a dalšími účinky⁶.

1.4.1.1 Inhibitory biosyntézy nukleových kyselin

Cytostatickými účinky disponují látky, které mají schopnost blokovat enzymy podílející se na biosyntéze nukleových kyselin, nebo jejich složek. Analogický účinek mají rovněž látky, které jsou svojí strukturou podobné některým stavebním kamenům nukleotidů a které však, jsou-li zabudovány do nukleové kyseliny, způsobují její nefunkčnost. Tyto látky, někdy nazývané antimetabolity, mohou současně působit jako inhibitory klíčových enzymů syntézy nukleových kyselin, jelikož jsou podobné jejich přirozeným substrátům. Mezi zástupce těchto látek patří např. palitrexat (inhibitor thymidylát-synthasy), 6-thioguanin (antimetabolit guaninu), nebo 5-fluorouracil (antimetabolit uracilu)⁶.

1.4.1.2 Látky modifikující nukleové kyseliny (genotoxická cytostatika)

Alternativou k využití antimetabolitů, či látek blokujících syntézu nukleových kyselin, je modifikace nukleových kyselin již existujících. Té lze docílit pomocí látek alkylačních, které se vážou na DNA a způsobují její denaturaci, pomocí inhibitorů topoisomeras, znemožňujících správné prostorové uspořádání DNA, nebo pomocí interkalačních látek⁶. Interkalace představuje vytvoření nekovalentní vazby mezi cytostatikem a DNA. Interkalující molekula proniká do nitra dvojité spirály DNA, kde se váže prostřednictvím vodíkových můstků¹⁷. Výsledkem je inhibice replikace i transkripce. Většina interkalačních látek má navíc schopnost inhibovat topoisomerasu II¹⁷. Mezi interkalační látky patří mj. anthracyklinová antibiotika (např. doxorubicin), která mají pro tuto práci speciální význam a která budou na následujících stranách dále popisována.

1.4.1.3 Látky bránící buněčnému dělení (antimitotika)

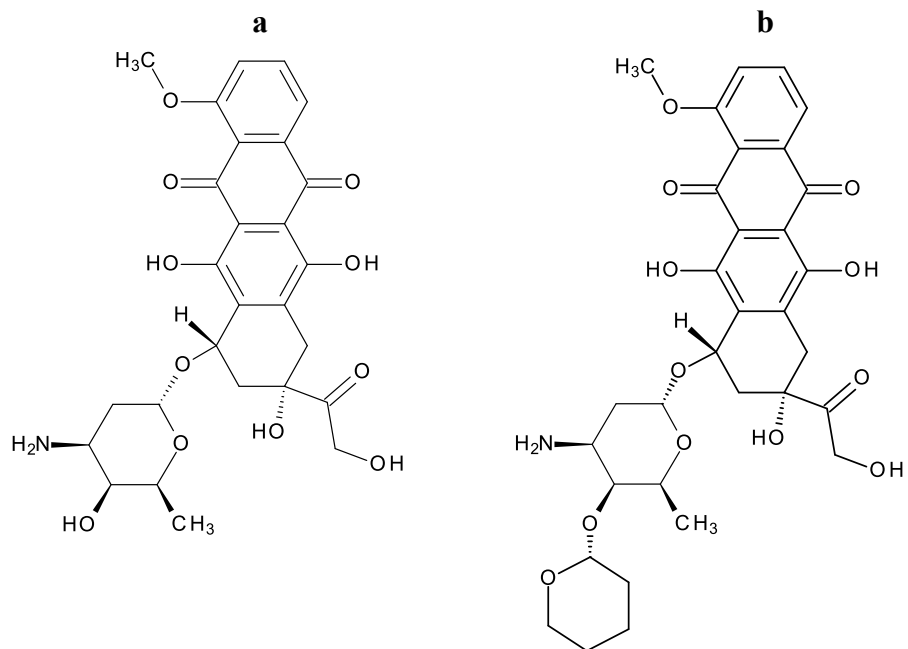
Mezi látky zabraňující buněčnému dělení, přesněji řečeno látky inhibující mitózu, patří buď látky, které inhibují vznik dělicího vřeténka (tzv. vinca-alkaloidy), nebo naopak látky blokuující jeho desintegraci (tzv. taxany)⁶.

1.4.1.4 Látky s kombinovanými a dalšími účinky

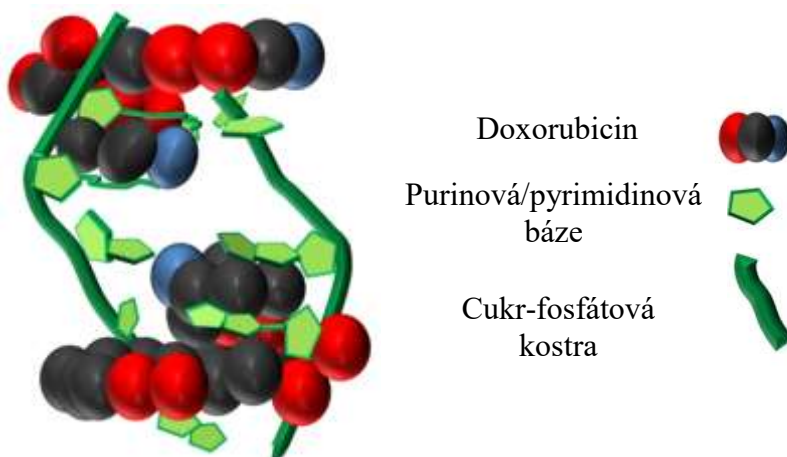
U některých cytostatik lze zaznamenat několik odlišných mechanismů působení. Příkladem může být kombinace alkylačního účinku s účinkem antimetabolickým, nebo interkalační efekt doprovázený inhibicí topoisomerasy⁶.

1.4.2 Doxorubicin a pirarubicin

V rámci této práce byly připravovány a studovány polymerní konjugáty dvou již zmíněných protinádorových léčiv - doxorubicinu (DOX) a pirarubicinu (PIR). Tato léčiva, patřící mezi anthracyklinová antibiotika¹⁷, lze dle výše uvedené klasifikace zařadit mezi genotoxická cytostatika, konkrétně mezi látky interkalační a látky inhibující topoisomerasu II. Doxorubicin, používaný k léčbě mnoha typů pevných nádorů a hematologických malignit¹⁷, je v souvislosti s polymerními terapeutickými systémy jedním z nejčastěji studovaných léčiv². Kromě toho mají obecně anthracyklinová antibiotika značný význam v kombinované chemoterapii širokého spektra rakovinných onemocnění¹⁷. Z těchto důvodů byly právě tyto látky ideálními modelovými kancerostatiky pro potřeby této práce. Díky využití dvou různých kancerostatik bylo možné sledovat nejen vlastnosti konjugátů s různými spojkami, ale také rozdíly v cytotoxicitě či rychlosti uvolňování v závislosti na použitém léčivu. Mechanismem působení jsou totiž doxorubicin a pirarubicin totožné. Důvodem je intracelulární přeměna PIR na DOX, ke které dochází již při poklesu pH ze 7,4 v krvi na přibližně 6,0 v cytoplazmě. Obě léčiva se však liší např. svojí hydrofobicitou, což má vliv především na rychlost internalizace léčiva přes buněčnou membránu.



Obr. 6 a - doxorubicin, **b**- pirarubicin.



Obr. 7 Znárodnění interkalace molekul doxorubicinu do dvoušroubovice DNA. Převzato a upraveno z¹⁸.

2. CÍLE PRÁCE

Jak již bylo naznačeno na předchozích stranách, byla cílem této práce příprava polymerních terapeutických systémů s protinádorovými léčivy, využívajících dvou různých, enzymově štěpitelných spojek (GFLG, Val-Cit), jejich fyzikálně-chemická a biologická charakterizace a vzájemné porovnání vlastností těchto konjugátů, jak v závislosti na použitém kancerostatiku (DOX, PIR), tak i na zvolené spojce. V neposlední řadě bylo cílem práce i ověření hypotézy pravíci, že léčivo vázané na polymer není terapeuticky aktivní a že tudíž jeho odštěpení z nosiče je nutnou podmínkou jeho účinnosti.

3. MATERIÁL

3.1 Přístroje a material

centrifuga Eppendorf 5430 R	Eppendorf, Německo
centrifuga stolní Corning, LSE	Thermo Fisher, USA
detektor indexu lomu Optilab rEX	Wyatt Technology, USA
detektor rozptylu světla Helleos II	Wyatt Technology, USA
detektor UV-VIS PDA	Shimadzu, Japonsko
detektor viskozimetrický Viscostar III	Wyatt Technology, USA
hmotnostní spektrometr LCQ Fleet	Thermo Fisher, USA
kapalinový chromatograf HPLC LC - 20	Shimadzu, Japonsko
kolona Chromolith Performance RP-18e	Merck, Německo
kolona TSKgel Super AW3000	Tosoh Bioscience, Japonsko
Plate-reader Synergy H1	Biotek, USA
Rastrovací konfokální mikroskop FV 1000	Olympus, Japonsko
spektrofotometr Helios α	Thermo Spectronic, UK
termoblok Grant QB T2	Grant Instruments Ltd., UK
termostat Haake D8	Haake Technik GmbH, Německo
vakuová odparka Laborota 4003	Heidolph, Německo
vakuová odparka Rotavapor-M	Büchi, Švýcarsko

3.2 Chemikálie a rozpouštědla

1-aminopropan-2-ol	TCI, Německo
2-chlorotryl chloridová pryskyřice	Iris Biotech GmbH, Německo
AIBN	Sigma-Aldrich, Česká republika
alamarBlue™ cell viability reagent	Thermo Fisher, USA
Bzl-Arg-Nap	Fluka, Německo
DCM	Sigma-Aldrich, Česká republika
DIC	Fluka, Německo
diethylether	Sigma-Aldrich, Česká republika
DMSO	Merck, Německo
doxorubicin hydrochlorid	Seiko, Japonsko
EDC	GenScript, USA
EDTA	Fluka, Německo
glutathion	Fluka, Německo
HFIP	Fluka, Německo
HOBt	Sigma-Aldrich, Česká republika
katepsin B z hovězí sleziny	Sigma-Aldrich, Česká republika
KH ₂ PO ₄	Lach:ner, Česká republika
kyselina methakrylová	Fluka, Německo
methanol	Sigma-Aldrich, Česká republika
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin	Fluka, Německo
<i>N,N</i> -dimethylacetamid	Sigma-Aldrich, Česká republika
<i>N,N</i> -dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Česká republika
NaOH	Lach:ner, Česká republika
<i>N</i> -Fmoc-glycin	Iris Biotech GmbH, Německo
<i>N</i> -Fmoc-L-citrulin	Iris Biotech GmbH, Německo
<i>N</i> -Fmoc-L-fenylalanin	Iris Biotech GmbH, Německo
<i>N</i> -Fmoc-L-leucin	Iris Biotech GmbH, Německo
<i>N</i> -Fmoc-L-valin	Iris Biotech GmbH, Německo
piperidin (25% roztok v DMF)	Fluka, Německo
pirarubicin hydrochlorid	Seiko, Japonsko
PyBOP	Iris Biotech GmbH, Německo

t-BuOH	Sigma-Aldrich, Česká republika
thiazolidin-2-thion	Fluka
V70	Sigma-Aldrich, Česká republika

3.3 Buněčné linie a kultivační media

Buněčná linie DLD-1	LGC Standards Sp. z o.o., Polsko
Buněčná linie EL4	LGC Standards Sp. z o.o., Polsko
Kultivační medium DMEM	Thermo Fischer, USA
Kultivační medium RPMI	Thermo Fischer, USA

4. METODY

4.1 Metody charakterizace produktů a kontroly syntetických postupů

4.1.1 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla používána v průběhu celé práce k monitorování jednotlivých syntetických kroků a k charakterizaci (mezi)produktů. Konkrétně byl používán systém HPLC Shimadzu LC-10 s kolonou Chromolith RP-18e s reverzní fází a dvojice mobilních fází A (94,9 % H₂O; 5 % acetonitril; 0,1 % TFA) a B (94,9 % acetonitril; 5 % H₂O; 0,1 % TFA) s lineárním gradientem od 100 % A do 100 % B po dobu 5 min a průtokem 5 ml·min⁻¹.

4.1.2 SEC

Hmotnostně vážené molekulové hmotnosti, M_w , a početně vážené molekulové hmotnosti, M_n , připravených polymerních konjugátů byly stanovovány pomocí rozměrově vylučovací chromatografie (SEC) na HPLC systému Shimadzu s kolonou TSKgel SuperAW3000, vybaveným detektorem UV/VIS, refraktometrickým detektorem, detektorem víceúhlového rozptylu světla a viskozimetrickým detektorem. Pro výpočty byla využita hodnota inkrementu indexu lomu, dn/dc , stanovená pro poly(HPMA). Získaná data byla zpracována pomocí softwaru ASTRA VII značky Wyatt Technology.

4.1.3 MS ESI

Produkty a meziprodukty jednotlivých reakcí byly charakterizovány pracovníky oddělení Biolékařských polymerů Ústavu Makromolekulární Chemie AV ČR, v.v.i. metodou hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem. Za tímto účelem byl použit hmotnostní spektrometr LCQ Fleet značky Thermo Fisher.

4.1.4 Spektrofotometrické stanovení TT skupin

Zastoupení reaktivních thiazolidin-2-thionových skupin na polymerních prekurzorech bylo prováděno spektrofotometricky na spektrofotometru Helios α , v kyvetách o optické délce, $l = 1$ mm, a při vlnové délce absorpčního maxima pro thiazolidin-2-thion, $\lambda_{\max} = 305$ nm. Pro výpočet byl použit absorpční koeficient TT skupin v methanolu $\varepsilon = 10300 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

4.2 Syntéza polymerních konjugátů

Proces syntézy polymerních konjugátů obecně sestával ze tří hlavních fází: syntéza methakrylovaného monomerního prekurzoru (neboli komonomeru), příprava prekurzoru polymerního kopolymerací komonomeru s HPMA a navázání léčiva (DOX/PIR) na polymerní prekurzor. Komonomery, obsahující spojky GFLG a Val-Cit byly připraveny peptidovou syntézou na pevné fázi (Merrifieldova metoda)^{19,20}. Tato metoda spočívá v kovalentním navázání C-koncové aminokyseliny, opatřené chránicí skupinou Fmoc, na povrch 2-chlorotryl chloridové pryskyřice a v postupném navazování dalších chráněných aminokyselin na N-konec rostoucího řetězce peptidu. Před navázáním další aminokyseliny je provedena deprotektace aminokyseliny předchozí a oplach přebytečných reaktantů a vedlejších produktů z nerozpustné pryskyřice¹⁹. Po navázání požadovaného počtu aminokyselin může být výsledný peptid dále modifikován a nakonec odštěpen z pryskyřice. V tomto případě byla na N-konec získaného peptidu navázána kyselina methakrylová, sloužící k zakotvení spojky do kostry polymerního nosiče. Na C-konec peptidu byla navázána thiazolidin-2-thionová skupina, uplatňující se při navazování protinádorových léčiv doxorubicinu, či pirarubicinu. V dalším kroku byla metodou řízené radikálové polymerace s reverzibilním adičně-fragmentačním přenosem řetězce (RAFT) provedena kopolymerace komonomeru s HPMA. Na výsledný polymerní prekurzor bylo následně navázáno po jednom ze studovaných léčiv (DOX/PIR). Na následujících stranách je popsána syntéza zvolených polymerních konjugátů, a to vždy v pořadí od komonomeru, přes polymerní prekurzor, až k výsledným dvěma konjugátům. Závěrem této kapitoly je vhodné zmínit, že všechny použité opticky aktivní aminokyseliny měly konfiguraci L.

4.2.1 Komonomer Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-TT

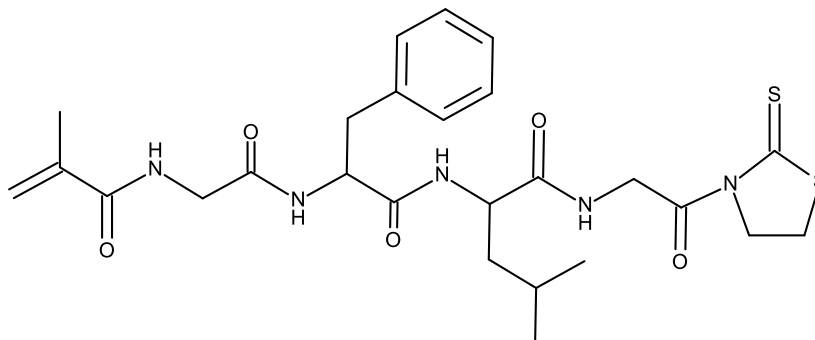
Na 2-chlorotrytyl chloridovou pryskyřici (0,5 g) byl za stálého míchání (probublávání N₂) v prostředí DCM (5 ml) a DIPEA (353 µl) navázán Fmoc-Gly-OH (149 mg). Uvedená navážka Fmoc-Gly-OH odpovídá požadované substituci 1 mmol·g⁻¹. Po navázání Fmoc-Gly-OH byla pryskyřice odsáta na fritě, promyta roztokem DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), čistým DCM a MeOH a vysušena v exsikátoru.

Po odstranění chránících skupin Fmoc z navázaného glycinu (25% roztokem piperidinu v DMF) a trojnásobným promytí čistým DMF, byl v roztoku DMF v přítomnosti PyBOP (780 mg), HOBt (230 mg) a DIPEA (514 µl) navázán Fmoc-L-Leu-OH (530 mg). Navážka Fmoc-L-Leu-OH odpovídá trojnásobnému molárnímu nadbytku oproti výchozí teoretické substituci. Ve stejném stechiometrickém nadbytku a stejným způsobem byly navázány i aminokyseliny Fmoc-L-Phe-OH a Fmoc-Gly-OH. Mezi jednotlivými kroky byla pryskyřice promývána DMF.

Na tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly, navázaný na pryskyřici, byla v prostředí DMF (5 ml) a v přítomnosti PyBOP (1300 mg), HOBt (383 mg) a DIPEA (856 µl) navázána kyselina methakrylová (220 µl). Narozdíl od trojnásobného nadbytku, ve kterém byly navazovány aminokyseliny (s výjimkou prvního glycinu), byl nadbytek kyseliny methakrylové oproti teoretické substituci pětinašobný.

Pryskyřice, nyní nesoucí methakrylovaný tetrapeptid Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-OH, byla po dobu 1,5 hod míchána s roztokem, tvořeným 30 % HFIP, 70 % DCM a malým množstvím (několik krystalků) inhibitoru polymerace [4-(5,5-dimethylhexyl)benzen-1,2-diol], čímž bylo docíleno odštěpení tetrapeptidu z pryskyřice. Dále byla pryskyřice odfiltrována na fritě a získaný roztok za sníženého tlaku zahuštěn do podoby hustého, olejovitého odparku. Odparek byl následně triturován sušeným, destilovaným diethyletherem a vzniklá bílá sraženina byla izolována filtrací na fritě a vysušena v exsikátoru.

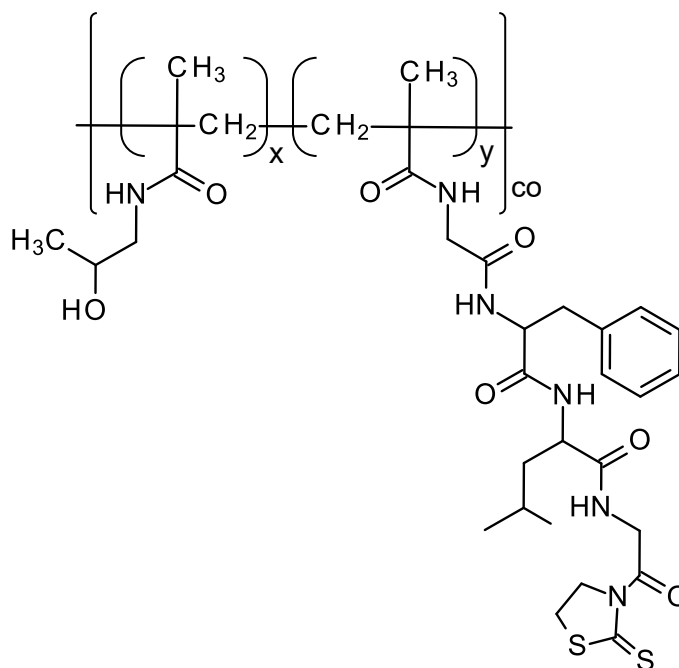
Na odštěpený tetrapeptid (125 mg) byl v roztoku DMF (2 ml) a v přítomnosti EDC (78 mg) a DMAP navázán thiazolidin-2-thion (36 mg), čímž byl získán komonomer Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-TT (46 mg; 0,078 mmol; 28 % teoretického výtěžku). Na HPLC (podmínky měření, viz kapitola 4.1.1) byl zaznamenán jeden pík ($t_r = 3,1$ min), pomocí MS ESI (podmínky měření, viz kapitola 4.1.3) byla stanovena molekulová hmotnost (M + Na) = 585 g·mol⁻¹.



Obr. 8 Komonomer Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-TT.

4.2.2 Polymerní prekurzor poly[HPMA-*co*-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-TT)]

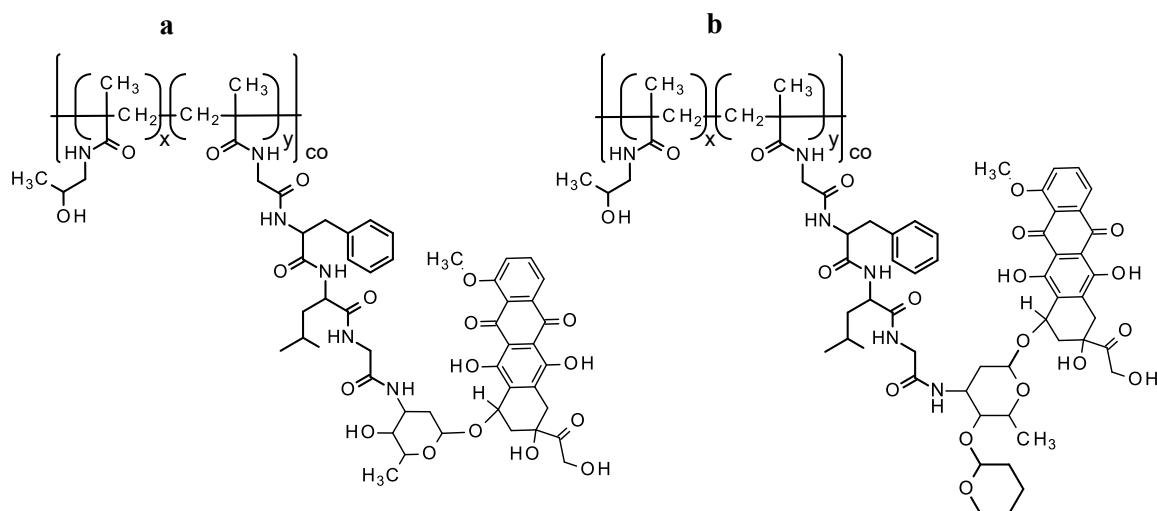
Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-TT byl kopolymerován řízenou radikálovou polymerací s HPMA dle následujícího postupu: monomer (43,6 mg) a V70 (0,4 mg) byly zvlášť rozpuštěny v DMA (celkový objem DMA: 431 μ l). Dále bylo CTA-AIBN (0,572 mg) a HPMA (100 mg) zvlášť rozpuštěno v 2-methylbutan-2-olu (celkový objem t-BuOH: 431 μ l). Získané roztoky byly smíchány ve skleněné ampuli (roztok V70 byl přidán jako poslední). Směs byla probublána argonem, čímž byl ze směsi i z ampule vypuzen vzduch. Poté byla ampule zatavena a na 23 hod. ponořena do vodní lázně o teplotě 40 °C. HPMA použité při kopolymeracích bylo připraveno podle literatury²¹. Polymer byl izolován srážením do směsi směsi aceton/diethylether a následnou centrifugací. Tento postup byl dvakrát opakován a získaná sraženina polymeru byla usušena za sníženého tlaku. Bylo získáno 46 mg polymerního prekurzoru (28 % teoretického výtěžku). Pomocí SEC (viz kapitola 4.1.2) bylo stanoveno $M_w = 57422$ a $D = 1,219$.



Obr. 9 Polymerní prekurzor poly[HPMA-*co*-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-TT)].

4.2.3 Konjugáty poly[HPMA-*co*-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-DOX/PIR)]

Na získaný polymerní prekurzor poly[HPMA-*co*-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-TT)] bylo dle následujícího postupu navázáno protinádorové léčivo doxorubicin (DOX): DOX·HCl (3,3 mg) byl rozpuštěn ve 100 μ l DMA. Dále byl ve 200 μ l DMA rozpuštěn kopolymer (30 mg). Roztoky byly smíchány a byly přidány 2 μ l DIPEA. Reakční směs byla míchána na stolní třepačce a průběh reakce byl monitorován pomocí HPLC. Po dokončení reakce bylo k reakční směsi přidáno malé množství 1-aminopropan-2-olu a roztok byl vysrážen směsí aceton/diethylether (1:1). Sraženina byla separována centrifugací, získaný pelet byl rozpuštěn v methanolu a byl znovu vysrážen směsí aceton/diethylether (1:1). Sraženina byla opět separována centrifugací. Získaný pelet byl krátce sušen argonem a následně dosušen v exsikátoru. Obdobným způsobem bylo provedeno navázání léčiva pirarubicinu (PIR).



Obr. 10 Polymerní konjugáty s GFLG spojkou: **a** - poly[HPMA-co-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-DOX)], **b** - poly[HPMA-co-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-PIR)].

4.2.4 Komonomer Ma-Val-Cit-TT

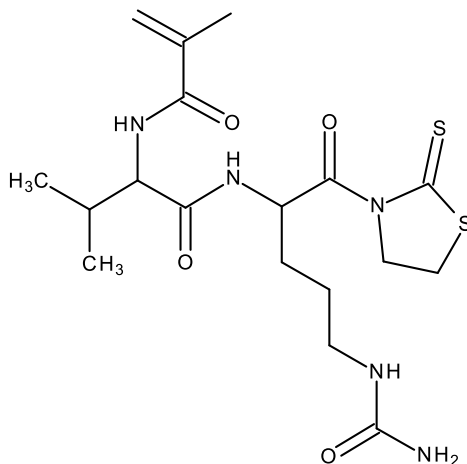
Na 2-chlorotrytil chloridovou pryskyřici (2 g) byl v prostředí DCM (20 ml) a v přítomnosti DIPEA (1,37 ml) navázán Fmoc-L-Cit-OH (795 mg). Reakční směs byla míchána po dobu 1,5 hod, načež byla pryskyřice odsáta na fritě a promyta směsí DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), dichlormethanem a methanolem.

Dále byla provedena deprotektce Fmoc-L-citulinu na pryskyřici 25% roztokem piperidinu v DMF. Po deprotektci a důkladném promytí DMF byl v prostředí DCM a v přítomnosti PyBOP (3,0 g), HOBt (900 mg) a DIPEA (2,1 ml) navázán Fmoc-L-Val-OH (2,0 g). Reakční směs byla míchána po dobu 1,5 h.

Po opětovné deprotektci 25% roztokem piperidinu v DMF byla v prostředí DCM a v přítomnosti DIC (1,548 ml) a DIPEA (3,425 ml) navázána kyselina methakrylová (1,756 ml). Reakční směs byla míchána po dobu 1,5 h. Pryskyřice byla následně odsáta a promyta DMF, DCM a MeOH.

Methakrylovaný dipeptid Ma-Val-Cit-OH byl pomocí roztoku HFIP (1,5 ml) a DCM (3,5 ml) s přidávkem inhibitoru polymerace [4-(5,5-dimethylhexyl)benzen-1,2-diol] odstěpen z pryskyřice, která byla následně odsáta na fritě. Získaný filtrát byl za sníženého tlaku odpařen a vysušen v exsikátoru. Na HPLC (podmínky měření, viz kapitola 4.1.1) byl zaznamenán jeden pík ($t_r = 1,7$ min), pomocí MS ESI (podmínky měření, viz kapitola 4.1.3) byla stanovena molekulová hmotnost ($M + Na$) = 365 g·mol⁻¹.

Na odštěpený methakrylovaný dipeptid Ma-Val-Cit-OH (68 mg) byl v prostředí DMF s přísávkem DMAP a v přítomnosti EDC (57 mg) navázán thiazolidin-2-thion (26 mg).

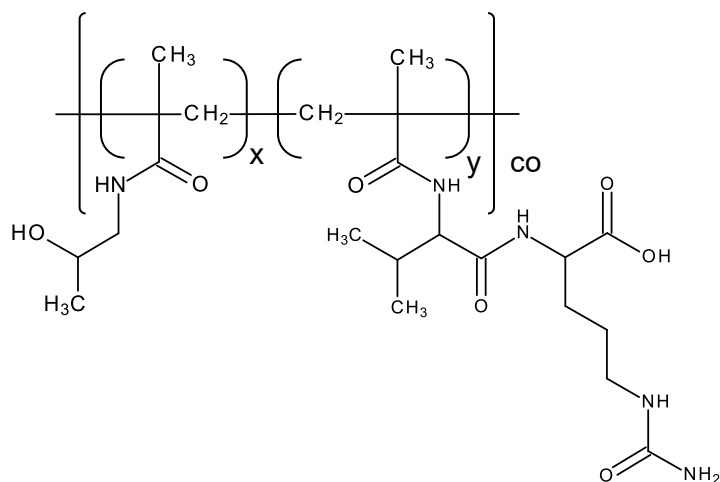


Obr. 11 Komonomer Ma-Val-Cit-TT.

Jelikož tato reakce opakovaně poskytla jen mizivý výtěžek (řádově jednotky mg), byl k přípravě polymerního konjugátu se spojkou Val-Cit použit prekurzor poly[HPMA-*co*-(Ma Val-Cit-OH)], jehož syntéza je popsána níže.

4.2.5 Polymerní prekurzor poly[HPMA-*co*-(Ma-Val-Cit-OH)]

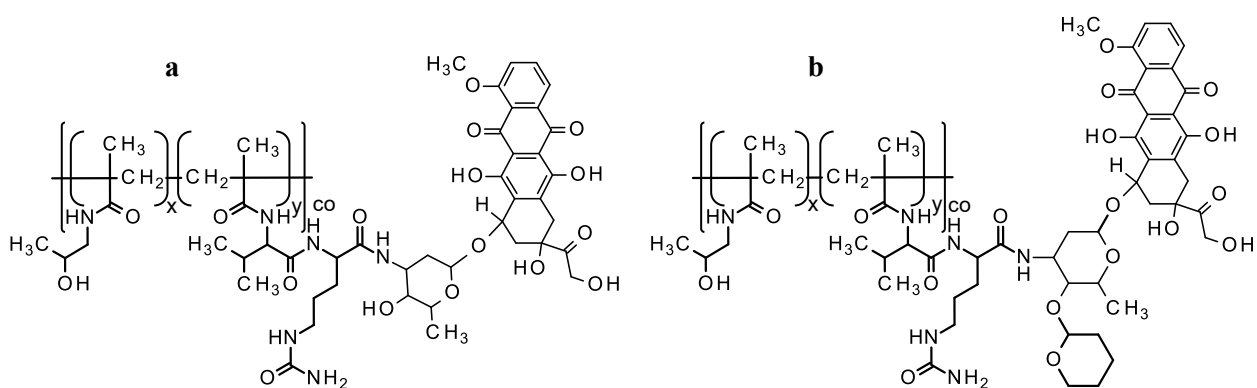
Polymerní prekurzor poly[HPMA-*co*-(Ma-Val-Cit-OH)] byl připraven kopolymerací HPMA (100 mg) s methakrylovaným dipeptidem (monomerem) Ma-Val-Cit-OH (15 mg) v prostředí *t*-BuOH a DMA s iniciátorem V70 a přenosovým činidlem AIBN v molárním poměru monomer:V70:AIBN = 600:2:1. Polymer byl opět izolován srážením do směsi směsi aceton/diethylether a následnou centrifugací. Získaná sraženina polymeru byla usušena za sníženého tlaku.



Obr. 12 Polymerní prekurzor Ma-Val-Cit-OH.

4.2.6 Konjugáty poly[HPMA-*co*-(Ma-Val-Cit-DOX/PIR)]

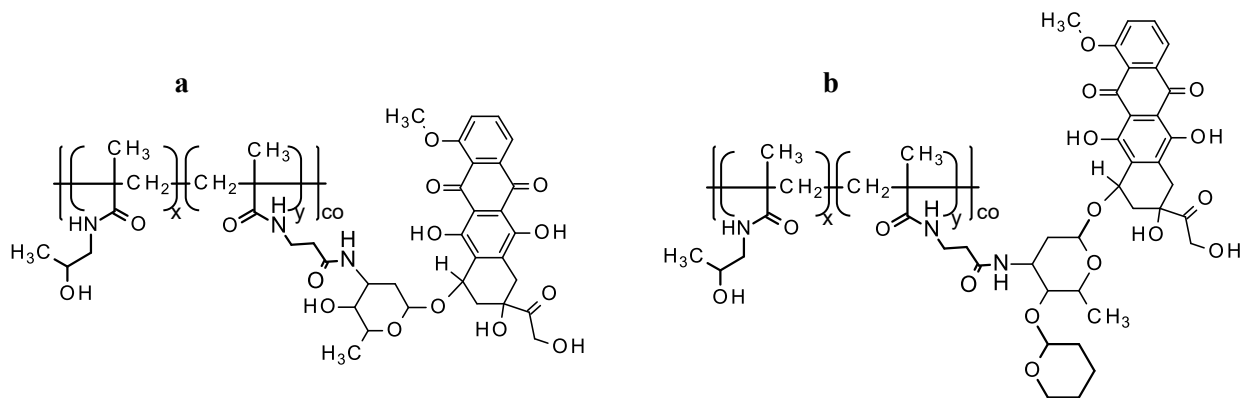
Na kopolymer poly[HPMA-*co*-(Ma-Val-Cit-OH)] byl dle následujícího postupu navázán doxorubicin: polymer (30 mg; 11 μmol COOH) byl společně s NHS (6,6 mg; 57 μmol) rozpuštěn v DMA a získaný roztok byl ochlazen na 4°C. K roztoku bylo dále přidáno DIC (8,8 μl ; 57 μmol) a po 30 min DOX·HCl (3,3 mg; 5,7 μmol) a DIPEA (9,8 μl ; 57 μmol). Obdobným způsobem byl na kopolymer poly[HPMA-*co*-(Ma-Val-Cit-OH)] navázán i pirarubicin.



Obr. 13 Polymerní konjugáty se spojkou Val-Cit: **a** - poly[HPMA-*co*-(Ma-Val-Cit-DOX)], **b** - poly[HPMA-*co*-(Ma-Val-Cit-PIR)].

4.2.7 Konjugáty poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-DOX/PIR)]

Na polymerní prekurzor poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-TT)] (20 mg; 12 μmol TT), předem připravený dle literatury²², byla navázána léčiva DOX a PIR dle stejného postupu, jako při navazování těchto léčiv na poly[HPMA-co-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-TT)], tj. v prostředí DMA a v přítomnosti DIPEA.



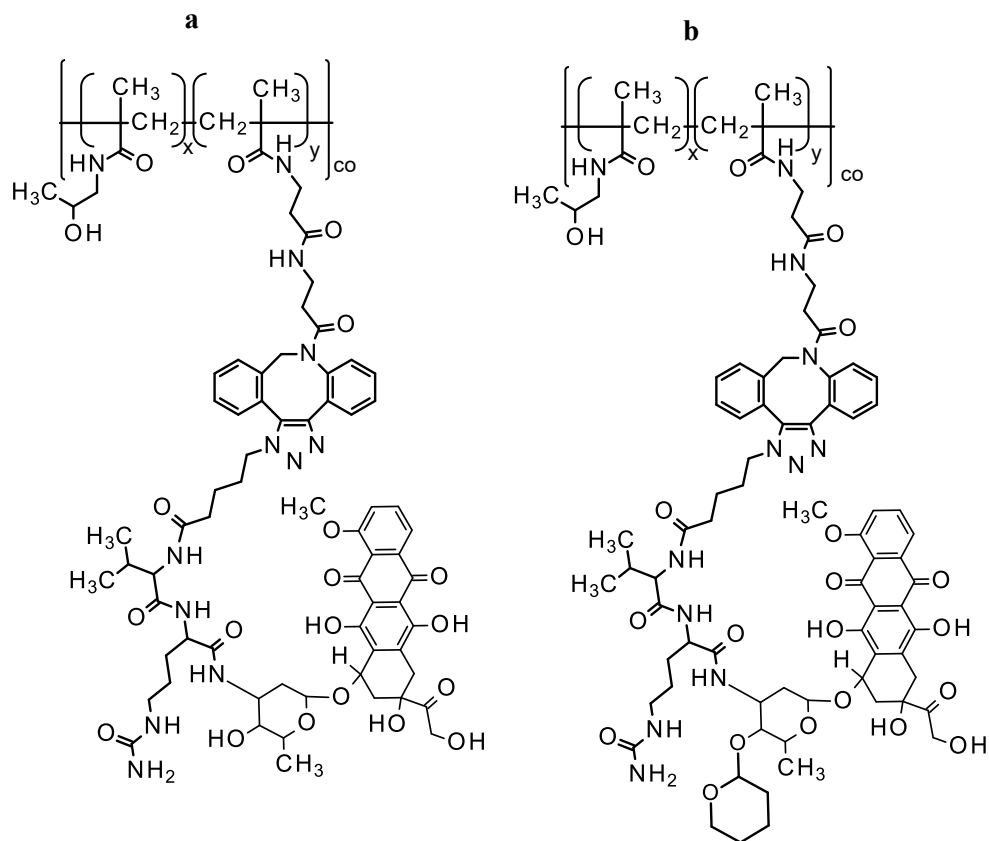
Obr. 14 Polymerní konjugáty s β-Ala spojkou: **a** - poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala -DOX)], **b** - poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala -PIR)].

4.2.8 Konjugáty poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-„click“-Val-Cit-DOX/PIR)]

Jako alternativa k přípravě konjugátů se spojkou Val-Cit prostřednictvím prekurzoru Ma-Val-Cit-OH, resp. Ma-Val-Cit-TT, byla dle následujícího postupu provedena příprava konjugátů se spojkou Val-Cit, založená na přípravě polymerního prekurzoru poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-DBCO)] a následném navázání léčiv v podobě prekurzorů Az-Val-Cit-DOX/PIR na polymer cestou tzv. „click“ reakce:

Na polymerní prekurzor poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-TT)] (50 mg.) byla v prostředí DMA navázána dibenzoazacyklooktynová skupina (5 mg DBCO-NH₂).

Léčivo DOX, popř. PIR, (20 mg) bylo navázáno na prekurzor Az-Val-Cit (14 mg) v přítomnosti NHS, DIC a DIPEA. Výsledný prekurzor Az-Val-Cit-DOX, resp. Az-Val-Cit-PIR, byl „click“ reakcí propojen s polymerním prekurzorem poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-DBCO)] v prostředí DMA. Získané konjugáty poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-„click“-Val-Cit-DOX/PIR)] byly přečištěny srážením do etheru a vysušeny v exsikátoru do konstantní hmotnosti.



Obr. 15 Polymerní konjugáty se spojkou Val-Cit, připravené „click“ reakcí: **a** - poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-„click“-Val-Cit-DOX)], **b** - poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-„click“-Val-Cit-PIR)].

4.3 Štěpení katepsinem B

4.3.1 Stanovení aktivity enzymu

Před enzymolýzou samotných polymerních konjugátů byla dle literatury²³ stanovena aktivita katepsinu B. Za tímto účelem byly připraveny následující zásobní roztoky: katepsin B ve fosfátovém pufru (KH_2PO_4 0,1M; 0,001M EDTA; pH = 6,0 - upraveno NaOH) ($1,6 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$), glutathion (30 mg) ve 2 ml téhož pufru a *N*^α-benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid (Bzl-Arg-Nap) (13,59 mg) ve 338 μl DMSO, coby modelový substrát. Následně bylo 60 μl roztoku katepsinu B, 815 μl pufru a 100 μl roztoku glutathionu společně inkubováno ve skleněné kyvetě o $l = 1 \text{ cm}$, při teplotě 37 °C po dobu 5 min, načež bylo přidáno 25 μl roztoku Bzl-Arg-Nap a byla změřena absorbance při $\lambda = 410 \text{ nm}$.

Reakční směs byla inkubována při 37 °C po dobu dalších 10 min, kdy byla znovu změřena absorbance při $\lambda = 410$ nm. Ze změny absorbance roztoku ($\Delta A_{410} = 0,226$) byla dle citace²³ vypočtena koncentrace aktivních míst enzymu.

4.3.2 Štěpení

Pro enzymové štěpení byly jednotlivé polymerní konjugáty rozpuštěny ve fosfátovém pufru o výše uvedeném složení ($1 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$) a zvlášť inkubovány při teplotě 37 °C s množstvím katepsinu B, odpovídajícím enzymové aktivitě $4\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a glutathionem ($15 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$) po dobu 0 hod, 24 hod, 48 hod a 72 hod. Po uplynutí jednotlivých dob inkubace bylo z reakční směsi vytřepáno volné léčivo (DOX/PIR) do chloroformu (800 μl). 500 μl chloroformové fáze bylo následně odpařeno do sucha, pevný zbytek byl rozpuštěn v methanolu (100 μl , v případě posledního měření, kdy bylo přítomno největší množství volného léčiva, 200 μl) a množství volného léčiva bylo kvantifikováno pomocí HPLC. Díky předem provedené kalibraci bylo následně možné z plochy pod píkem stanovit látkové množství odštěpeného doxorubicinu či pirarubicinu.

4.4 Stanovení cytotoxicity polymerních konjugátů *in vitro*

Cytotoxicitu, konkrétně koncentraci způsobující 50% inhibici životaschopnosti nádorových buněk (IC_{50}), jednotlivých polymerních konjugátů stanovili pracovníci z oddělení Biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR, v.v.i. na následujících dvou liniích nádorových buněk: buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu (DLD-1) a buněčná linie myšího T-buněčného lymfomu (EL4). Buňky DLD-1 byly kultivovány v kapalném mediu RPMI (Aditiva: 10 % FTS, $100 \text{ IU}\cdot\text{cm}^{-3}$, penicilin, $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ streptomycin), buňky EL4 v kapalném mediu DMEM s týmiž aditivy. Za účelem stanovení inhibiční koncentrace byly buňky obou linií zvlášť inkubovány s jednotlivými polymerními konjugáty o koncentracích $0,01 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $0,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ po dobu 72 hod při teplotě 37 °C. Životaschopnost buněk (angl. viability), potřebná k stanovení IC_{50} , byla stanovena spektrofotometricky pomocí činidla alamarBlue™ cell viability reagent s využitím přístroje Plate-reader H1. Hodnoty IC_{50} byly

odečteny z grafů závislosti naměřené životaschopnosti buněk na koncentraci polymerního konjugátu.

4.5 Fluorescenční mikroskopie a měření poločasu zhášení fluorescence (FLIM)

Aby bylo možné sledovat proces internalizace léčiv do nádorových buněk a případně i jejich intracelulární distribuci, byla se zkoumanými buňkami provedena řada mikroskopických pozorování za použití laserového rastrovacího fluorescenčního mikroskopu. Fluorescenční mikroskopie umožňuje mj. sledovat internalizaci a distribuci anthracyklinových léčiv (DOX, PIR) a jejich makromolekulárních konjugátů díky výrazné fluorescenci těchto látek v oblasti viditelného světla (např. pro doxorubicin i pirarubicin je $\lambda_{\text{excitační}} = 470 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisní}} = 595 \text{ nm}$)²⁴. Na fluorescenci zkoumaných látek je založena i metoda FLIM (angl. fluorescence lifetime imaging), při které je však namísto intenzity fluorescence sledován poločas jejího zhášení, definovaný jako průměrný čas, po který fluorofor setrvává v excitovaném stavu, dokud emisí fotonu nedojde k jeho návratu do stavu základního²⁵. Hodnoty tohoto poločasu vypovídají např. o chemickém okolí daného fluoroforu nebo o tom, zdali je přítomen ve volné či vázané formě. Fluorescenční mikroskopie a FLIM byly prováděny po 24 hod inkubace buněčných kultur s protinádorovými léčivy/konjugáty při 37 °C.

5. VÝSLEDKY

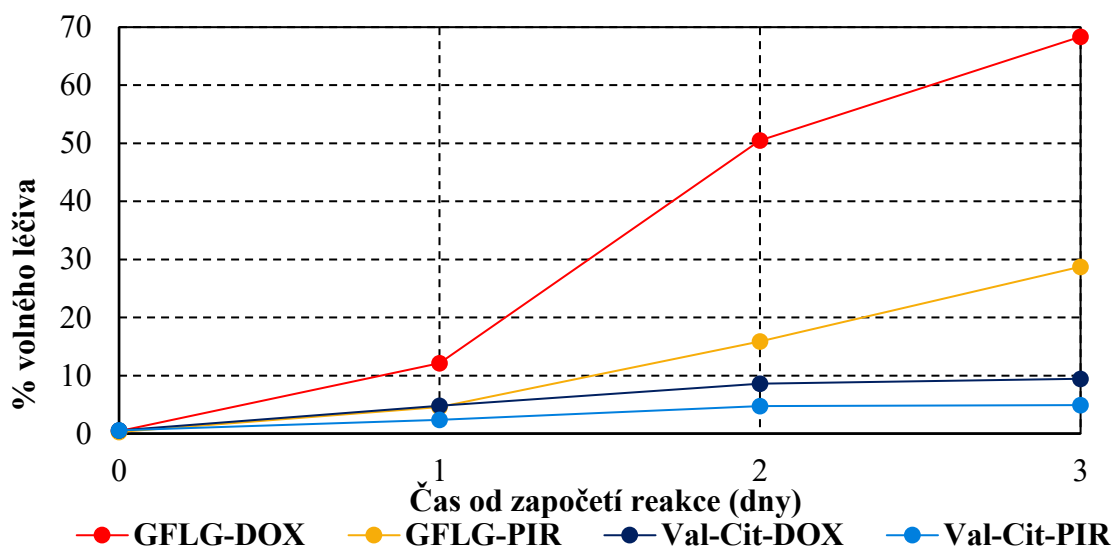
5.1 Syntéza polymerních konjugátů s léčivy a jejich prekurzorů

Za účelem vzájemného porovnání byly připraveny polymerní konjugáty protinádorových léčiv doxorubicinu a pirarubicinu na bázi statistických kopolymerů HPMA s methakrylovanými oligopeptidy či aminokyselinami, využívající tři různých spojek k propojení léčiva a polymerního nosiče (viz kapitoly 4.2.1 - 4.2.8). Spojka tvořená tetrapeptidem Gly-Phe-Leu-Gly a spojka tvořená dipeptidem Val-Cit byly navrženy jako enzymově štěpitelné, zatímco spojka tvořená aminokyselinou β -alaninem představovala enzymově neštěpitelnou kontrolu. Konjugáty s peptidovými spojkami byly vždy připravovány v pořadí od komonomeru na bázi *N*-methakrylované aminokyselinové sekvence, přes polymerní prekurzor k výslednému konjugátu, nesoucímu protinádorové léčivo. Aminokyselinové sekvence byly připravovány peptidovou syntézou na pevné fázi. Po odštěpení z pryskyřice byly modifikovány reaktivní skupinou TT nebo byly ponechány s volným karboxylem poslední aminokyseliny (Ma-Val-Cit-OH). Polymerní prekurzory byly syntetizovány kontrolovanou RAFT kopolymerací komonomerů s HPMA, přičemž bylo cílem získat polymerní prekurzory s nízkou disperzitou. Konjugáty se spojkou β -Ala byly syntetizovány s využitím předem připraveného polymerního prekurzoru poly[HPMA-co-(Ma- β -Ala-TT)]²². Průběh jednotlivých kroků syntetického postupu byl sledován pomocí HPLC a vzniklé produkty byly charakterizovány pomocí MS, GPC a HPLC. Výsledkem byla sada šesti konjugátů, které byly dále využity k porovnání rychlostí enzymového uvolňování léčiv a cytotoxicit *in vitro*. Kromě uvedených šesti konjugátů byly dále připraveny konjugáty poly[HPMA-co-(Ma- β -Ala-, „click“-Val-Cit-DOX)] a poly[HPMA-co-(Ma- β -Ala-, „click“-Val-Cit-PIR)], které však k dalšímu testování nebyly z kapacitních důvodů využity. Navázání DOX, nebo PIR, na polymer se neprojevovalo výraznou změnou disperzity.

5.2 Enzymové štěpení

Rychlost uvolňování léčiva z jednotlivých polymerních konjugátů byla stanovena s využitím modelového enzymu katepsinu B (*bos taurus*, slezina), který je v některých rakovinných buňkách přítomen ve zvýšené míře a jehož specifita je srovnatelná se

specifitou ostatních lysosomálních proteas, které mohou k uvolňování léčiva přispívat. Aktivita enzymu v zásobním roztoku ($1,37 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) byla předem stanovena spektrofotometricky s využitím modelového substrátu Bzl-Arg-NAp (viz kapitola 4.3.1). Do reakční směsi bylo vždy přidáváno takové množství zásobního roztoku, aby výsledná aktivita enzymu byla rovna $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Časový průběh enzymového štěpení je znázorněn grafem na obrázku 16. Přesná množství uvolněného léčiva, stanovená pomocí HPLC, jsou uvedena v tabulce 1, str. 44.



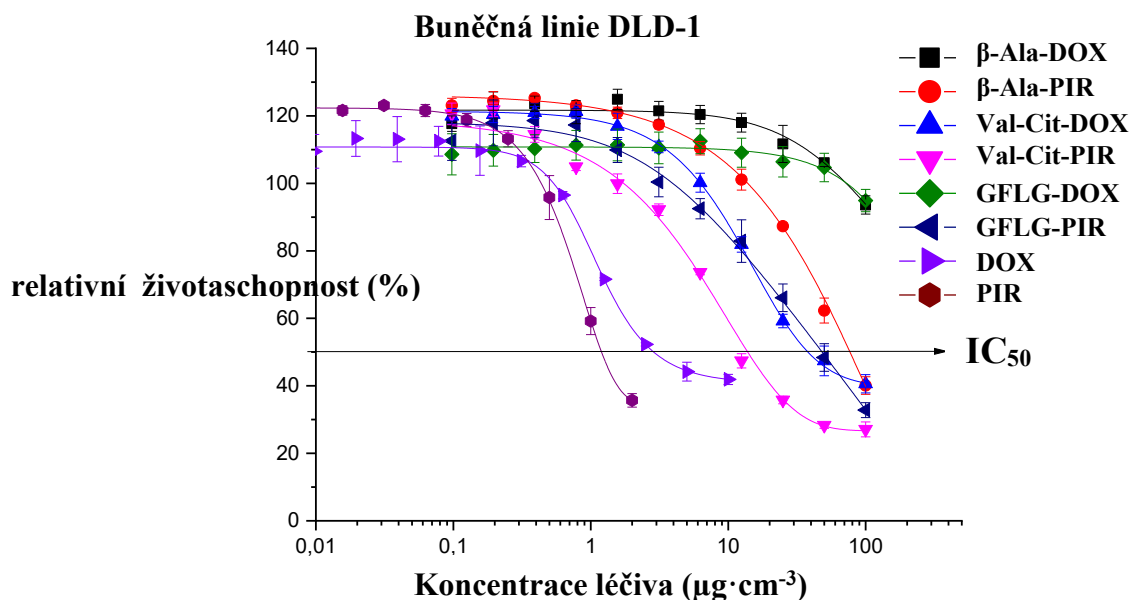
Obr. 16 Graf časové závislosti množství uvolněného léčiva (uvedeného v hmotnostních procentech celkového vázaného léčiva).

Tabulka 1 Podíl volného léčiva oproti vázanému (stanovený pomocí HPLC) v závislosti na čase.

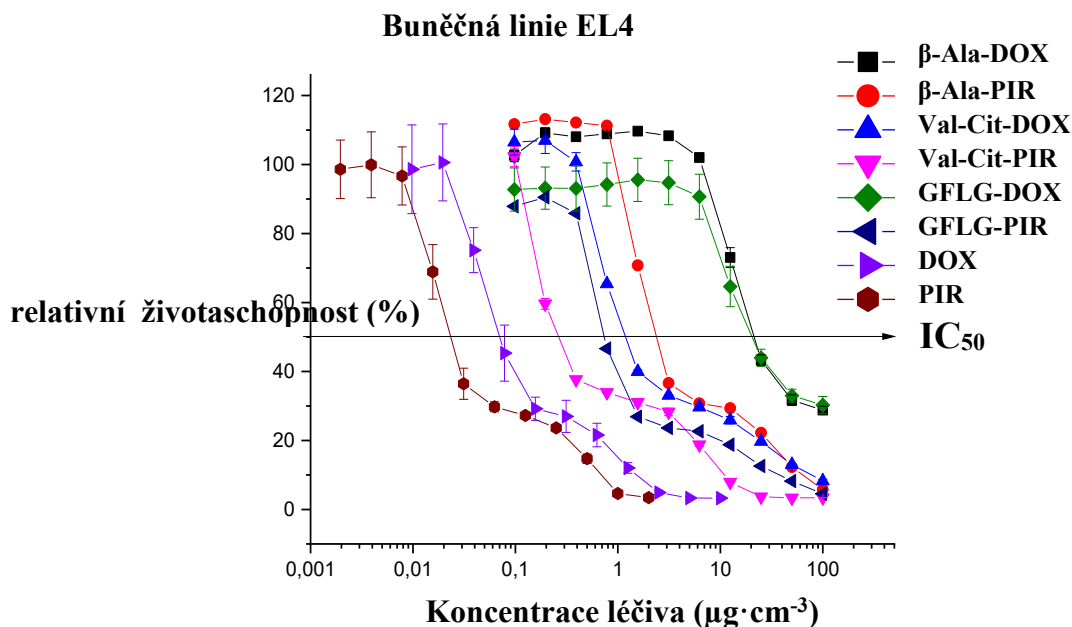
Konjugát	Hmotnostní procento uvolněného léčiva po		
	24 hod	48 hod	72 hod
GFLG-DOX	12	51	68
GFLG-PIR	4,6	16	29
Val-Cit-DOX	4,8	8,6	9,4
Val-Cit-PIR	2,4	4,7	4,9
β -Ala-DOX	0,0	0,0	0,0
β -Ala-PIR	0,0	0,0	0,0

5.3 Stanovení cytotoxicity polymerních konjugátů

Výsledky stanovení cytotoxicity konjugátů na nádorových buněčných liniích *in vitro* jsou uvedeny na obrázcích 17 a 18 a v tabulce 2 (str. 39). Z těchto výsledků je patrné, že cytotoxicita volných léčiv je vždy vyšší, než u léčiv vázaných na polymer. Při testování na obou buněčných liniích vykazoval nejvyšší cytotoxicitu konjugát se spojkou Val-Cit a léčivem PIR. Následovaly konjugáty Val-Cit-DOX a GFLG-PIR s navzájem podobnými hodnotami cytotoxicity. Konkrétní hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v tabulce 2 v pořadí od nejvyšší cytotoxicity k nejnižší.



Obr. 17 Graf závislosti relativní životaschopnosti buněk lidského kolorektálního adenokarcinomu na koncentraci protinádorového léčiva dodaného ve formě jednotlivých polymerních konjugátů. Inkubace: 72 hod, 37 °C.



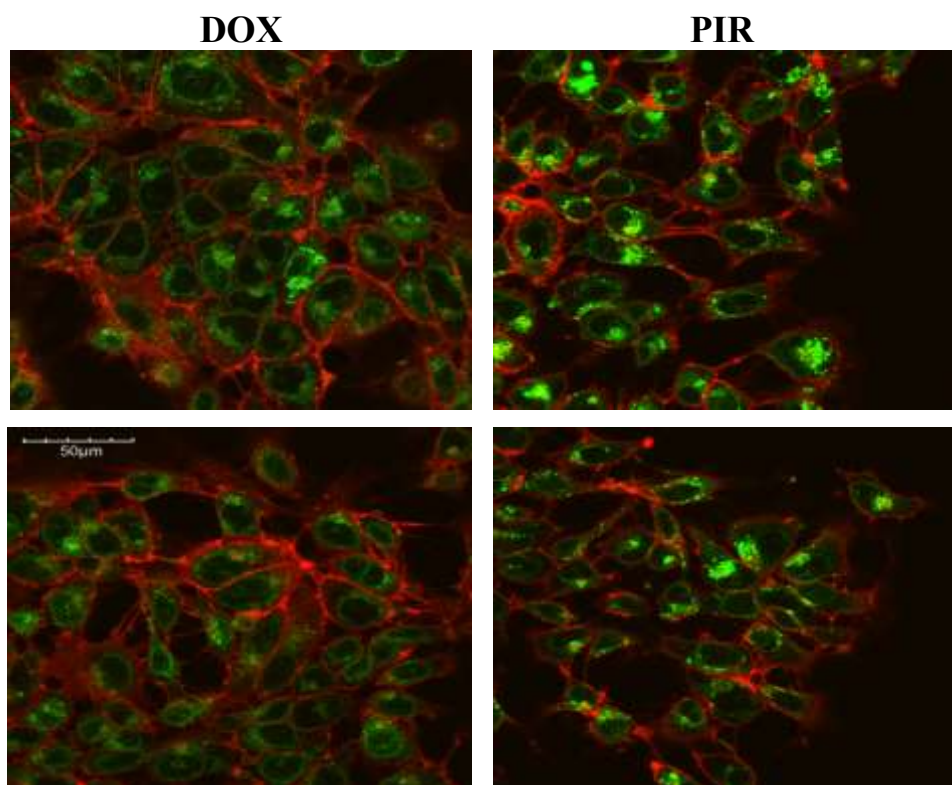
Obr. 18 Graf závislosti relativní životaschopnosti buněk myšího T-buněčného lymfomu na koncentraci protinádorového léčiva dodaného ve formě jednotlivých polymerních konjugátů. Inkubace: 72 hod, 37 ; °C.

Tabulka 2 Přehled inhibičních koncentrací, IC₅₀, volných léčiv a polymerních konjugátů pro buněčné linie DLD-1 a EL4.

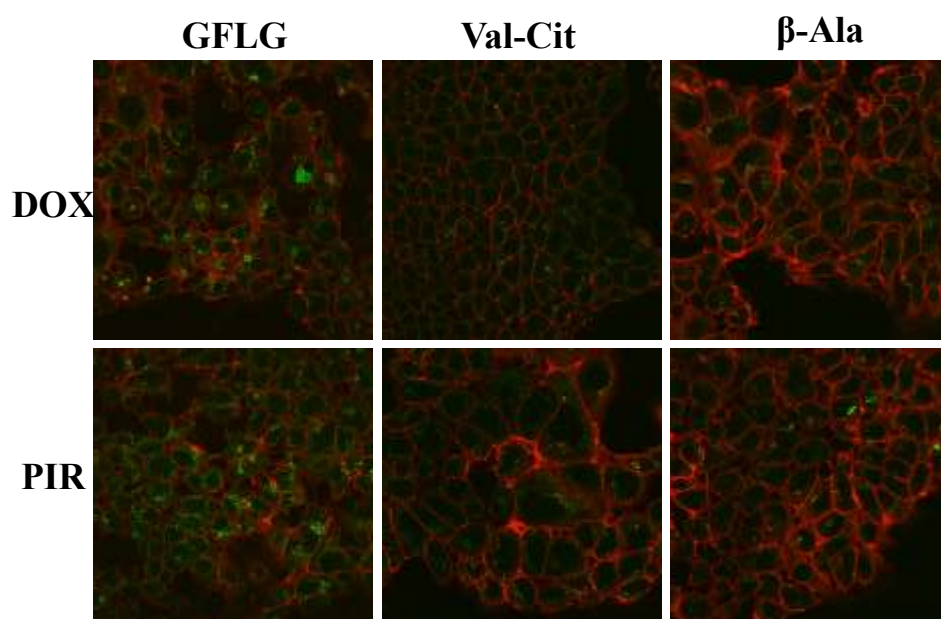
DLD-1		EL4	
Léčivo/konjugát	IC ₅₀ (μg·cm ⁻³)	Léčivo/konjugát	IC ₅₀ (μg·cm ⁻³)
PIR	1,2	PIR	0,023
DOX	2,8	DOX	0,069
Val-Cit-PIR	14	Val-Cit-PIR	0,27
Val-Cit-DOX	38	GFLG-PIR	0,74
GFLG-PIR	49	Val-Cit-DOX	1,2
β-Ala-PIR	77	β-Ala-PIR	2,4
β-Ala-DOX	-	GFLG-DOX	20
GFLG-DOX	-	β-Ala-DOX	21

5.4 Fluorescenční mikroskopie a FLIM

V rámci biologického testování polymerních konjugátů a volných protinádorových léčiv (viz kapitola 4.4) byla s buněčnou linií DLD-1 provedena řada mikroskopických pozorování s využitím laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu a série měření poločasu zhášení fluorescence (FLIM). Pořízené fotografie, vyobrazené níže (Obr. 19 - 21), poskytují náhled do intracelulární distribuce jednotlivých polymerních konjugátů, nebo léčiv a je díky nim možné, jak již bylo zmíněno, částečně usuzovat na přítomnost léčiv ve volné, či vázané podobě (dále, viz kapitola 6). Obě sady fotografií byly pořízeny po 24 hod inkubace buněčných kultur s protinádorovými léčivy/konjugáty při 37 °C - viz kapitola 4.5.

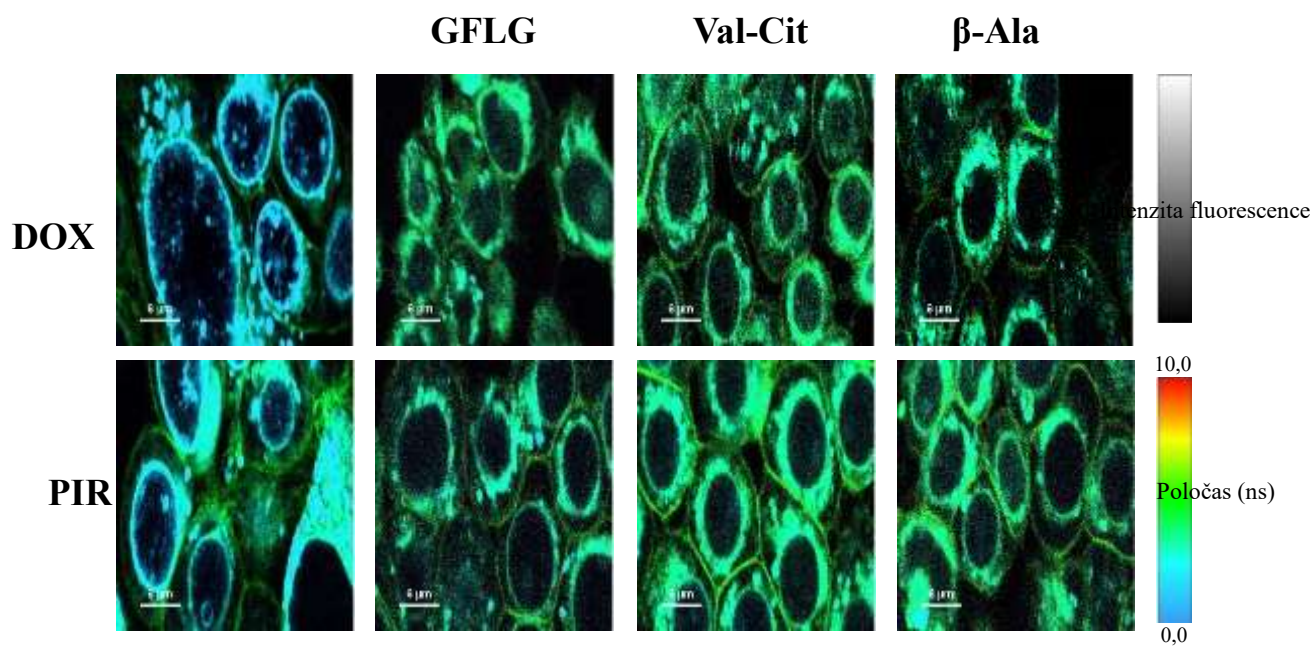


Obr. 19 Fluorescence volných nízkomolekulárných kancerostatik DOX (vlevo) a PIR (vpravo) v buňkách DLD-1 po 24 hod inkubace. Fluorescence léčiv je zobrazena zeleně, červeně jsou zobrazeny buněčné membrány a extracelulární matrix, vybarvené pomocí CellMask™ Deep Red. Barvy použité na snímcích jsou počítačově upravené.



Obr. 20 Fluorescence polymerních konjugátů s léčivy DOX a PIR v buňkách DLD-1 po 24 hod inkubace. Fluorescence léčiv je zobrazena zeleně, červeně jsou zobrazeny buněčné membrány a

extracelulární matrix, vybarvené pomocí CellMask™ Deep Red. Barvy použité na snímcích jsou počítačově upravené.



Obr. 21 Poločas zhášení fluorescence volných léčiv (sloupec vlevo) a jednotlivých konjugátů v prostředí buněk DLD-1 po 24 hod inkubace. Intenzita zbarvení odpovídá intenzitě fluorescence, zatímco barevné spektrum znázorňuje různé poločasy zhášení od nejdelších (červená) po nejkratší (světle modrá). Zde znázorněné poločasy se pohybují řádově v jednotkách nanosekund.

6. DISKUSE

S využitím postupů, popsaných na předchozích stranách této práce, byly úspěšně připraveny polymerní nosiče protinádorových léčiv na bázi kopolymerů HPMA s komonomery methakrylamidového typu, vybavené různými aminokyselinovými či peptidovými spojkami. Připravené kopolymery obsahovaly reaktivní TT skupiny které byly využity pro reakci s primárními aminoskupinami léčiv (DOX, PIR). Výjimkou byla syntéza polymerních konjugátů se spojkou Val-Cit, neboť polymerní prekurzor poly[HPMA-*co*-Ma-Val-Cit-TT] se nepodařilo s dostatečným výtěžkem připravit. Tento problém byl vyřešen přípravou polymerního prekurzoru poly[HPMA-*co*-Ma-Val-Cit-OH] a následným navázáním kancerotatických léčiv prostřednictvím karbodiimidu. Alternativu představovala syntéza polymerního prekurzoru tvořeného kopolymerem HPMA a methakrylovaného derivátu β -Ala-DBCO, na který bylo následně pomocí nekatalyzované cykloadice azid-alkyn, tzv. „click“ reakce navázáno léčivo se spojkou Az-Val-Cit. Konjugáty připravené touto cestou však nebyly použity k bližší charakterizaci.

Syntéza všech výše uvedených konjugátů probíhala v pořadí od komonomerů k polymerním prekurzorům a na závěr k požadovaným konjugátům s léčivem, přičemž di- a tetrapeptidové spojky byly syntetizovány metodou peptidové syntézy na pevné fázi dle Merrifielda. Kopolymery HPMA s methakrylovanými oligopeptidy či aminokyselinami, byly připravovány metodou řízené radikálové polymerace s reverzibilním adičně-fragmentačním přenosem řetězce (RAFT).

Z výsledků získaných při enzymovém štěpení jednotlivých konjugátů je patrné, že k nejrychlejšímu uvolnění léčiva z nosiče došlo v případě doxorubicinu, navázaného prostřednictvím spojky GFLG, kdy se po 48 hod inkubace uvolnilo přibližně 50 % z navázaného léčiva. Pirarubicin, navázaný prostřednictvím téže spojky, se uvolňoval o poznání pomaleji, s necelými 16 % uvolněného léčiva po 48 hod inkubace. Tento rozdíl v rychlosti uvolňování, lze zřejmě přisoudit větší sterické náročnosti pirarubicinu oproti doxorubicinu při tvorbě komplexu enzym-substrát (srov. strukturní vzorce na obr. 6, str. 20). Nečekaně nízkou rychlostí docházelo k uvolňování léčiv vázaných spojkou Val-Cit. V případě konjugátu poly[HPMA-*co*-Ma-Val-Cit-DOX] bylo po 48 hod inkubace uvolněno jen necelých 9 % z navázaného léčiva a v případě poly[HPMA-*co*-Ma-Val-Cit-

PIR] jen necelých 5 %. I zde je tedy patrné rychlejší uvolňování doxorubicinu oproti pirarubicinu. Překvapivá však je relativně nízká rychlost uvolňování obou těchto léčiv vázaných spojkou Val-Cit. Tato dipeptidová spojka je opakovaně popsána v literatuře zejména v souvislosti s konjugáty protilátek s léčivy. Zpravidla však bývá mezi dipeptidem a uvolňovaným léčivem za účelem zpřístupnění spojky pro enzym vložena spojka na bázi 4-aminobenzylalkoholu, která se po rozštěpení spaceru samočinně uvolní z léčiva tzv. 1,6-eliminací²⁶. Oba polymerní konjugáty obsahující spojku β -Ala neuvolnily při inkubaci s enzymem žádné léčivo, čímž byl potvrzen původní předpoklad neštěpitelnosti této spojky katepsinem B. Přestože by zdánlivě delší doba inkubace konjugátů s katepsinem B mohla poskytnout další cenné poznatky, byla inkubace po 3 dnech ukončena. Při delší inkubaci totiž katepsin B ztrácí svou aktivitu, čímž by další výsledky byly značně zkreslené. Prvotní pokus o stanovování volného léčiva *in situ*, tedy bez vytřepávání, nebyl úspěšný, jelikož uvolněná léčiva měla tendenci agregovat a vypadávat z reakční směsi, což vedlo ke značným zkreslením naměřených hodnot. Z tohoto důvodu byla zvolena metoda vytřepání volného léčiva a jeho následného stanovení pomocí HPLC. V souvislosti s enzymovým štěpením připravených konjugátů je nutno zmínit, že katepsin B, použitý, jako modelová lysosomální proteasa, není jediným enzymem, schopným štěpit dané peptidové spojky. K výsledné rychlosti uvolňování *in vivo* tedy může přispívat celá řada dalších, v daných nádorových buňkách přítomných, enzymů.

Neméně překvapivých výsledků bylo dosaženo při biologickém testování připravených konjugátů na buňkách DLD-1 a EL4. Přirozeně vykazovala v obou případech nejvyšší cytotoxicitu volná léčiva. Neočekávané však bylo zjištění, že konjugát pirarubicinu s enzymově neštěpitelnou spojkou β -Ala projevil v případě obou buněčných linií značně vyšší cytotoxicitu, než konjugát s GFLG-DOX, jehož hodnotu IC_{50} nebylo v případě buněk DLD-1 pro příliš nízkou cytotoxicitu ani možné určit. Dále pak byl cytotoxický účinek konjugátu β -Ala-DOX srovnatelně nízký s konjugátem GFLG-DOX, o kterém se předpokládalo, že bude vzhledem k nejvyšší rychlosti uvolňování vykazovat značně vyšší cytotoxicitu. Tyto výsledky naznačují, že nedošlo-li ke kontaminaci neštěpitelných konjugátů volným léčivem (což bylo na základě HPLC analýzy shledáno nepravděpodobným), mohla by přijít v úvahu možnost, že léčivo může projevit svůj účinek, aniž by bylo z polymerního nosiče odštěpeno. Pozorovaný nezanedbatelný cytotoxický účinek těchto neštěpitelných (a tudíž dle předpokladu, uvedeného v kapitole 2,

neúčinných) konjugátů naznačuje, že navázání léčiva na polymerní nosič nemusí nutně znamenat jeho inaktivaci a naopak. Tento poznatek je v souladu s některými nedávno publikovanými výsledky²⁷ ukazujícími, že u některých polymerních konjugátů DOX a PIR na bázi HPMA byla prokázána značná cytotoxicita, ačkoliv volné léčivo nebylo nalezeno v jádrech nádorových buněk, ale pouze byla zjištěna přítomnost polymerních konjugátů v membránových strukturách buněk. Mimo to je třeba poznamenat, že hodnoty IC_{50} , stanovené *in vitro*, nevypovídají o klinické využitelnosti testovaných konjugátů, jelikož jejich stanovení nebere v potaz farmakokinetické vlastnosti konjugátu, či zmiňovaný EPR efekt.

Jak je patrné z výše diskutovaných výsledků, jsou konjugáty pirarubicinu (a ostatně i volný pirarubicin) cytotoxičtější, než konjugáty doxorubicinu, a to i přesto, že je pirarubicin stéricky objemnější, což ztěžuje jeho uvolňování z nosiče. V cytoplazmě navíc dochází ke spontánní přeměně pirarubicinu na doxorubicin, což naznačuje, že je tento rozdíl v cytotoxicitě způsoben rozdílnou schopností překonávat fosfolipidovou membránu. Tuto skutečnost zachycují fotografie na obr. 19, str. 40, kde je dobře patrné vyšší množství pirarubicinu uvnitř buněk, oproti doxorubicinu. Předpokládalo se, že se tento rozdíl projeví i u polymerních konjugátů těchto léčiv, avšak při porovnání snímků na obr. 20, str. 41, nelze s jistotou říci, kterého konjugátu proniklo do buněk nejvíce. Tato problematika je dále komplikována skutečností, že je v případě DOX a PIR fluorescence volného léčiva řádově intenzivnější, než fluorescence léčiva vázaného, což omezuje možnost určovat kvantitu v buňce přítomného léčiva, či konjugátu podle intenzity fluorescence. Podobně je tomu i u toxicity volného a vázaného léčiva, což znamená, že i malá kontaminace konjugátu volným léčivem může velmi zkreslit jeho faktický cytotoxický účinek.

Ve snaze odlišit volné léčivo od vázaného, bylo provedeno měření poločasu zhášení fluorescence (FLIM). Jelikož je poločas zhášení fluoroforu do značné míry závislý jak na prostředí, ve kterém se fluorofor nachází²⁸ (např. pH, iontová síla, charakter sousedních molekul apod.), tak i na tom, zdali je přítomen ve volné, či vázané podobě, lze z naměřených hodnot poločasů usuzovat na aktuální stav a lokalizaci fluoroforu v době měření. Výsledky metody FLIM tedy neposkytují kvantitativní informaci, tj. nevypovídají o množství přítomných fluoroforů, ale informaci kvalitativní. Fotografie, pořízené při analýze FLIM (viz obr. 21, str. 41) ovšem prozrazují, že se poločasy zhášení fluorescence

volného a vázaného léčiva sice liší, avšak ne dostatečně na to, aby bylo možné od sebe tyto dvě formy léčiva odlišit. Na základě získaných dat tedy nelze určit, jakou měrou dochází uvnitř nádorových buněk k ovolňování léčiva a do jaké míry zůstává léčivo vázáno na polymer.

Výsledky jednotlivých stanovení, obdržené pro výše uvedené konjugáty, jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3 Přehled připravených konjugátů (zde uvedených ve zkrácené podobě spojka-léčivo) a příslušných stanovených hodnot: hmotnostně vážená průměrná molekulová hmotnost, M_w ; disperzita, D ; retenční čas, t_r , na HPLC; podíl enzymově uvolněného léčiva po 48 h inkubace s katepsinem B a inhibiční koncentrace, IC_{50} , pro buněčné linie DLD-1 a EL4.

SPOJKA-LÉČIVO	CHARAKTERISTIKA		BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ				
	m (mg)	%	M_w (g·mol ⁻¹)	D	hm.% volného léčiva po 48 hod	IC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	
						DLD-1	EL4
GFLG-DOX	13,9	42	57919	1,24	51	-	20
GFLG-PIR	20,0	62	57921	1,24	16	49	0,74
Val-Cit-DOX	11,2	34	46130	1,07	8,7	38	1,2
Val-Cit-PIR	12,3	37	46126	1,07	4,7	14	0,27
β -Ala-DOX	17,2	86	42910	1,14	-	-	21
β -Ala-PIR	18,1	91	42897	1,14	-	77	2,4

7. SOUHRN

Cílem této práce byla příprava, charakterizace a vzájemné porovnání níže uvedených polymerních konjugátů protinádorových léčiv doxorubicinu (DOX) a pirarubicinu (PIR) s peptidovými spojkami:

poly[HPMA-*co*-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-DOX)],

poly[HPMA-*co*-(Ma-Gly-Phe-Leu-Gly-PIR)],

poly[HPMA-*co*-(Ma-Val-Cit-DOX)],

poly[HPMA-*co*-(Ma-Val-Cit-PIR)],

poly[HPMA-*co*-(Ma- β -Ala-DOX)]

poly[HPMA-*co*-(Ma- β -Ala-PIR)].

Dále byly připraveny konjugáty poly[HPMA-*co*-(Ma- β -Ala-,click“-Val-Cit-DOX)] a poly[HPMA-*co*-(Ma- β -Ala-,click“-Val-Cit-PIR)], které však nebyly dále využity.

Za účelem porovnání rychlosti uvolňování léčiv z jednotlivých konjugátů bylo provedeno jejich štěpení katepsinem B, napodobující enzymové uvolňování protinádorových léčiv v rakovinných buňkách působením lysosomálních proteas.

Na závěr byl stanoveny a vzájemně porovnány cytotoxické účinky (konkrétně inhibičních koncentrace, IC₅₀) připravených konjugátů na buňkách lidského kolorektálního adenokarcinomu (DLD-1) a buňkách myšího T-buněčného lymfomu (EL4). Paralelně s biologickým testováním byla provedena řada mikroskopických pozorování s využitím laserového konfokálního rastrovacího mikroskopu a měření poločasu zhášení fluorescence (FLIM).

Vedle samotné přípravy a vzájemného porovnání polymerních konjugátů bylo cílem práce také ověření hypotézy, pravící, že je k účinnému působení léčiva konjugovaného s polymerním nosičem nutné jeho odštěpení z nosiče. Získané výsledky tuto hypotézu nepodporují. Na základě získaných údajů však není možné ani její úplné vyvrácení. Nicméně ze skutečnosti, že nejvyšší cytotoxicitu projevily konjugáty, které se enzymově štěpily spíše sporadicky, nebo jsou, jak je tomu u konjugátů se spojkou β -Ala,

považovány za neštěpitelné, lze při nejmenším vyvodit, že rychlost uvolňování léčiva není rozhodujícím faktorem jeho působení, což ostatně uvádí např. K.Ulbrich v citaci². Možná tedy odštěpení antracyklinového antibiotika (DOX, PIR) z polymerního nosiče není vždy nutnou podmínkou jeho protinádorové účinnosti. V současné době probíhají na spolupracujícím ústavu v Japonsku testy připravených konjugátů *in vivo*, které tuto problematiku snad pomohou více objasnit.

Tyto výsledky jsou samozřejmě jen velice hrubým náznakem toho, co by detailnějšími studii mohlo být prokázáno. Přesto však jsou zajímavou ukázkou toho, jak nepředvídatelná dokáže věda být.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Ritchie, H. & Roser, M. Causes of Death. *Our World in Data* (2018). at <<https://ourworldindata.org/causes-of-death>>
2. Ulbrich, K., Holá, K., Šubr, V., Bakandritsos, A., Tuček, J. & Zbořil, R. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chemical Reviews* (2016).
3. Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**, 136–151 (2010).
4. Angiogenesis Inhibitors. *National Cancer Institute* (2018). at <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/angiogenesis-inhibitors-fact-sheet>>
5. Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Peruzzi, C. A., Harvey, V. S. & Dvorak, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, (1983).
6. Hynie, S. *Speciální Farmakologie Díl VII/A - Protinádorová chemoterapeutika a imunomodulační látky*. (Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 2003).
7. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* **65**, 271–284 (2000).
8. Mohanty, A. K., Dilnawaz, F., Mohanta, G. P. & Sahoo, S. K. *Advances in Delivery Science and Technology - Targeted Drug Delivery: Concepts and Design*. (Controlled Release Society, 2015).
9. Kopeček, J. & Kopečková, P. HEMA copolymers: Origins, early developments, present, and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 122–149 (2010).
10. Böhme, D. & Beck-Sickinger, A. G. Drug delivery and release systems for targeted tumor therapy. *Journal of Peptide Science* 186–200 (2015).
11. McCombs, J. R. & Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *AAPS J* **17**, 339–351 (2015).
12. Tsuchikama, K. & An, Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein & Cell* **9**, 33–46 (2018).

13. Aggarwal, N. & Sloane, B. F. Cathepsin B: Multiple roles in cancer. *Proteomics Clinical Applications* 427–437 (2014).
14. Ruan, J., Zheng, H., Rong, X., Rong, X., Zhang, J., Fang, W., Zhao, P. & Luo, R. Over-expression of cathepsin B in hepatocellular carcinomas predicts poor prognosis of HCC patients. *Molecular Cancer* **15**, (2016).
15. Duncan, R., Cable, H. C., Lloyd, J. B., Rejmanová, P. & Kopeček, J. *Macromolecular chemistry* **184**,
16. Yamamoto, A., Tomoo, T., Matsugi, K., Hara, T., In, Y., Murata, M., Kitamura, K. & Ishida, T. Structural basis for development of cathepsin B-specific noncovalent-type inhibitor: crystal structure of cathepsin B-E64c complex. *Biochimica et Biophysica Acta* **1597**, 244–251 (2002).
17. Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J. & Votava, M. *Farmakologie*. (Grada Publishing a.s., 2018).
18. Dostalova, S., Vetter, M., Ruttkay-Nedecký, B., Kopel, P., Trnkova, L., Zitka, O., Adam, V. & Kizek, R. Studium vlivu neplatínových cytostatik na polymerázovou řetězovou reakci. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies 2014, Vol. 1, Pages 67-69* (2014).
19. McMurry, J. E. *Organic Chemistry*. (Brooks/Cole, CENGAGE Learning, 2012).
20. Vollmert, B. *Polymer Chemistry* (Springer-Verlag, 1973).
21. Ulbrich, K., Subr, V., Strohalm, J., Jelínková, M. & Ríhová, B. Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules. I. Synthesis and physico-chemical characterisation. *Journal of Controlled Release* 63–79 (2000).
22. Pola, R., Král, V., Filippov, S. K., Kaberov, L., Etrych, T., Siegllová, I., Sedláček, J., Fábry, M. & Pechar, M. Polymer Cancerostatics Targeted by Recombinant Antibody Fragments to GD2-Positive Tumor Cells. *Biomacromolecules* **20**, 412–421 (2019).
23. Pechar, M., Strohalm, J. & Ulbrich, K. Biodegradable drug carriers based on poly(ethylene glycol) block copolymers. *Macromolecular Chemistry and Physics* 1009–1020 (1997).
24. Shah, S., Chandra, A., Kaur, A., Sabnis, N., Lacko, A., Gryczynski, Z., Fudala, R. & Ignacy, G. Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **170**, 65–69 (2017).
25. Trautmann, S., Buschmann, V., Orthaus, S., Koberling, F., Ortmann, U. & Erdmann, R. Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM); Imaging technique based on differences in

the excited state decay rate. *PicoQuant* at
<<https://www.picoquant.com/applications/category/life-science/fluorescence-lifetime-imaging-flim>>

26. Dubowchik, G. M., Firestone, R. A., Padilla, L., Willner, D., Hofstead, S. J., Mosure, K., Knipe, J. O., Lasch, S. J. & Trail, P. A. Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers for Lysosomal Release of Doxorubicin from Internalizing Immunoconjugates: Model Studies of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity. *Bioconjugate Chemistry* **13**, 855–869 (2002).
27. Laga, R., Janoušková, O., Ulbrich, K., Pola, R., Blažková, J., Filippov, S. K., Etrych, T. & Pechar, M. Thermoresponsive Polymer Micelles as Potential Nanosized Cancerostatics. *Biomacromolecules* 2493–2505 (2015).
28. Munk, P. & Aminabhavi, T. M. *Introduction to Macromolecular Science* (John Wiley & Sons Inc., 2002)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka