

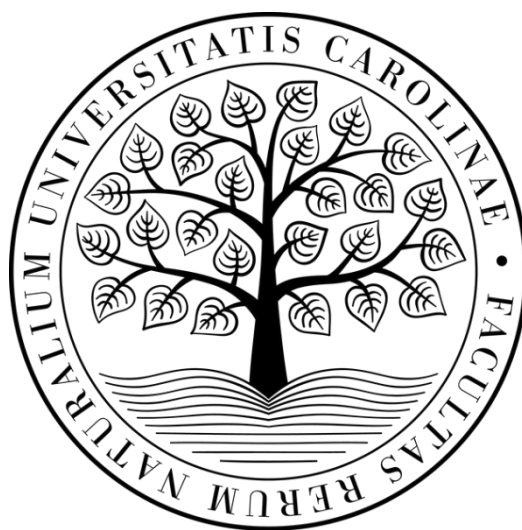
UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Michaela Hrochová

**Biodegradabilní polymerní nosiče léčiv se strukturou navrženou pro zvýšenou
prostupnost nádorovou tkání**

Biodegradable polymer carriers with structure tailored for increased tumor tissue
permeability

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Konzultant: Ing. Lenka Kotrčová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, dne 18.6.2021

Podpis

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Tomášovi Etrychovi, Ph.D., DSc. za umožnění navázání spolupráce s Ústavem makromolekulární chemie AV ČR a odborné vedení. Dále patří velké poděkování Ing. Lence Kotrchové, Ph.D. za trpělivost, ochotu a především čas, který mi věnovala nejen při práci v laboratoři. Mé poděkování patří také Ing. Liborovi Kostkovi, Ph.D. a celému oddělení Biolékařských polymerů na ÚMCH AV ČR za přátelské prostředí a cenné rady. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat celé své rodině za podporu při studiu.

Abstrakt

Nádorová onemocnění jsou po celém světě jednou z nejčastějších příčin úmrtí. V České republice je právě pětina úmrtí zapříčiněna onkologickým onemocněním. Velkým problémem jsou při léčbě onkologických onemocnění nežádoucí účinky chemoterapie, které činí pacientům léčbu ještě těžší. V případě předkládané bakalářské práce je výzkum soustředěn na syntézu polymerních nosičů, které by mohly sloužit jako dopravní cytotstatik do nádorové tkáně. Při použití nosičů cytotstatik by bylo působení na zdravé tkáně a tím způsobené nežádoucí účinky výrazně sníženy. Práce je zaměřená na syntézu a fyzikálně chemickou charakterizaci nových diblokových polymerních nosičů cytotstatik, konkrétně cytotstatika docetaxelu. V předkládané práci je vedle úspěšné syntézy nových vodorozpustných polymerních prekurzorů a konjugátů na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu studována hydrolytická stabilita syntetizovaných diblokových systémů v 0,3M fosfátovém pufru o pH 7,4 simulujícím prostředí krevního řečiště. Úspěšně bylo ověřeno, že syntetizované polymerní systémy jsou hydrolyticky labilní, a tudíž snadno vylučitelné z organismu. V práci je dále prokázán vliv typu oxokyseliny použitých pro modifikaci cytotstatika na rychlost uvolňování neseného cytotstatika z polymerního nosiče. Na závěr práce byla studována *in vitro* cytotoxicita připravených polymerních konjugátů, která prokazuje sníženou cytotoxicitu léčiva navázaného na polymerní nosič.

Klíčová slova: protinádorová terapie, nanomateriál, biodegradace, polymerní nosič, léčivo

Abstract

Cancer diseases are the most common cause of death over the world. One fifth of death is caused by cancer in the Czech Republic. The big problem in the treatment of cancer diseases are side effects of chemotherapy, which make treatment more difficult for patients. The present bachelor thesis is focused on synthesis and characterization of novel polymer carriers. Polymer carriers can target the cytostatic drug to the tumor tissue and minimize side-effect of chemotherapies. This bachelor thesis is focused on synthesis and physical chemistry characterization of new diblock polymer carriers, specifically carries of docetaxel. Successful synthesis of novel water-soluble polymer precursors and conjugates based on *N*-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide is described and discussed in this thesis. The hydrolytic stability of the synthesized diblock systems was studied in 0,3M phosphate buffer at pH 7,4 simulating the bloodstream environment. It has been successfully verified that the synthesized polymer systems are hydrolytically degradable after fulfilling its role of drug carrier and therefore can be finally excreted from the organism. The effect of the type of oxoacid used for modification of the cytostatic on the release rate of the carried cytostatic from the polymeric carriers was thoroughly evaluated and proved. Finally, the *in vitro* cytotoxicity of the prepared polymer conjugates was studied to demonstrate the reduced cytotoxicity of the drug bound to the polymeric carrier.

Key words: anti-cancer, nanomaterial, biodegradation, polymer carrier, drug

(in Czech)

Obsah

1	LITERÁRNÍ PŘEHLED	5
1.1	Úvod.....	5
1.2	Způsoby léčby nádorových onemocnění.....	5
1.3	Polymerní nosiče léčiv	8
1.4	Vodorozpustné polymerní konjugáty	11
2	CÍLE PRÁCE	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1	Chemikálie	19
3.2	Syntézy.....	20
3.3	Přístroje	27
3.4	Metody	29
3.5	Hydrolytická stabilita	32
3.6	Studie <i>in vitro</i>	32
4	VÝSLEDKY	34
4.1	Syntéza a charakterizace derivátů docetaxelu.....	34
4.2	Syntéza a fyzikálně-chemická charakterizace polymerních systémů ...	35
4.3	Hydrolytická stabilita	37
4.4	Studie <i>in vitro</i>	43
5	DISKUZE	44
5.1	Syntéza a charakterizace derivátů docetaxelu.....	44
5.2	Syntéza a charakterizace polymerních systémů	45
5.3	Hydrolytická stabilita diblokových systémů	49
5.4	Rychlost uvolňování léčiva	51
5.5	Studie <i>in vitro</i>	52
6	ZÁVĚR.....	54
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56

Seznam zkratek

AIBN	2,2-azobis(isobutyronitril)
CTA	2-kyano-5-oxo-5-(2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)pentan-2-yl-ethylkarbontrithionát
CTA-1	benzen-1,3-diylbis(2(((dodecylthio)karbonothioyl)thio)-2-methylpropanoát
CTA-2	benzen-1,3-diylbis(4-kyano-4-[(dodecylsulfanylthiokarbonyl)sulfanyl]pentanoát
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamid
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
DOX	doxorubicin
DTX	docetaxel
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid hydrochlorid
GFLG	tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly
GPC	gelová permeační chromatografie
hm%	hmotnostní procenta
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
MA-Acap-NHNH-Boc	1-(terc-butoxykarbonyl)-2-(6methakrylamidohexanoyl)hydrazin
MeOH	methanol
MeOHe	kyselina 5-methyl-4-oxo-hexanová
mol%	molární procenta
MS	hmotnostní spektrometrie
PEG	poly(ethylenglykol)
pHPMA	HPMA kopolymer
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové

PPO	poly(propylenoxid)
PYR	kyselina 4-oxo-4-(2-pyridyl)butanová
TFA	kyselina trifluoroctová
TNBS	kyselina 2,4,6-trinitrobenzen-1-sulfonová
TTc	trithiokarbonát
V-70	iniciátor 2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril)

Seznam symbolů

ε	$[l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$	molární absorpční koeficient
η	$[m^{-1} \cdot kg \cdot s^{-1}]$	dynamická viskozita kapaliny
A	-	absorbance
D	$[m^2 \cdot s^{-1}]$	difúzní koeficient
\mathcal{D}	-	disperzita
F	-	funkcionalita
M	$[mol \cdot l^{-1}]$	molární koncentrace
M_{HPMA}	$[g \cdot mol^{-1}]$	molární hmotnost HPMA
M_n	$[g \cdot mol^{-1}]$	početně průměrná molární hmotnost
M_t	$[g \cdot mol^{-1}]$	teoretická molární hmotnost
R_h	$[m]$	hydrodynamický poloměr
T	$[K]$	teplota prostředí
c_m	$[mg \cdot ml^{-1}]$	hmotnostní koncentrace
c_n	$[mol \cdot dm^{-3}]$	molární koncentrace
d	$[cm]$	šířka kyvety
k	$[J \cdot K^{-1}]$	Boltzmanova konstanta

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Úvod

Nádorová onemocnění stále trápí velkou část celosvětové populace [1]. Odhaduje se, že v roce 2018 trpělo rakovinovým onemocněním na celém světě 18 milionů lidí; 9,5 milionů mužů a 8,5 milionů žen. Podle dat Světové zdravotnické organizace (WHO z angl. World Health Organization) jsou nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtí. V roce 2018 způsobila celosvětově 9,6 milionů úmrtí. Vzhledem k množství typů nádorových onemocnění, která se liší mezi sebou v příčinách vzniku, typu napadené tkáně a průběhu onemocnění se mnoho vědeckých týmů po celém světě snaží vyvíjet nové a efektivnější přístupy léčby těchto onemocnění s minimem vedlejších účinků.

Jedním ze způsobů, jak dosáhnout minimalizace vedlejších účinků chemoterapie a zároveň snížit potřebné množství podávaného cytostatika je využití polymerních nosičů léčiv. Bylo prokázáno, že využitím vodorozpustných netoxických polymerních nosičů lze dosáhnout zvýšené akumulace cytostatika v nádorové tkáni bez výraznější akumulace léčiva ve zdravých orgánech organismu. Nicméně mnoho studovaných systémů, které vykazují velmi dobré výsledky v protinádorové léčbě, jsou velmi náročné na syntézu. Náročná syntéza tak komplikuje jejich přípravu ve větších množstvích. Právě proto se tato práce zabývá návrhem, syntézou a charakterizací nových polymerních systémů, které budou snadno připravitelné ve velkém množství, zajistí zvýšenou akumulaci neseného cytostatika docetaxelu v pevném nádoru a zároveň budou po splnění funkce nosiče jednoduše vylučitelné z organismu glomerulární filtrací.

1.2 Způsoby léčby nádorových onemocnění

V současné době již existuje několik způsobů léčby, které dokážou postup rakovinových onemocnění významně zpomalit, nebo v nejlepším případě rakovinu úplně vyléčit. Mezi tyto způsoby se řadí hlavně chirurgická léčba, chemoterapie, radioterapie a biologická léčba. Ve většině případů se využívá kombinace zmíněných léčebných postupů. V případě pevných nádorů, pokud je to možné, nejprve dochází k chirurgickému odstranění co největší části nádoru. I přes odstranění velké části nádorové tkáně musí pacient dále podstoupit další léčebné kroky k odstranění případných zbylých ložisek

nádorové tkáně. V některých případech ovšem není možné tento postup aplikovat a primární léčbou bývá biologická léčba, radioterapie nebo chemoterapie.

Ve své práci se zaměřuji konkrétně na cytostatika, jejich dopravu do místa určení a jejich samotný účinek, proto bude pozornost v dalších kapitolách věnována právě chemoterapii.

1.2.1 Chemoterapie a cytostatika

Chemoterapie je léčba nádorových onemocnění založená na využití léků ze skupiny cytostatik. Cytostatika jsou obecně definována jako látky, které různými mechanismy zastavují růst a množení nádorových buněk [2]. Tento účinek je bohužel často nescifický a při podání cytostatika může dojít i k zasažení některých (zvláště rychle se množících) zdravých buněk organismu. Mezi nejvíce poškozené buňky našeho těla patří např. buňky červených krvinek, bílých krvinek, buňky ve sliznicích trávicího ústrojí nebo vlasových váčcích. Se zasažením těchto buněk při podání cytostatika jsou spojené nepříjemné komplikace jako vypadávání vlasů, řas, poškození sliznic trávicího ústrojí, nevolnost nebo únava. Během chemoterapie může docházet k poklesu bílých a červených krvinek, to má pak za následek snížení obranyschopnosti. K nejzávažnějším vedlejším účinkům chemoterapie patří febrilní neutropenie či katetrová seps, která může pacienta dokonce ohrozit na životě.

Rozdělení cytostatik a jejich působení

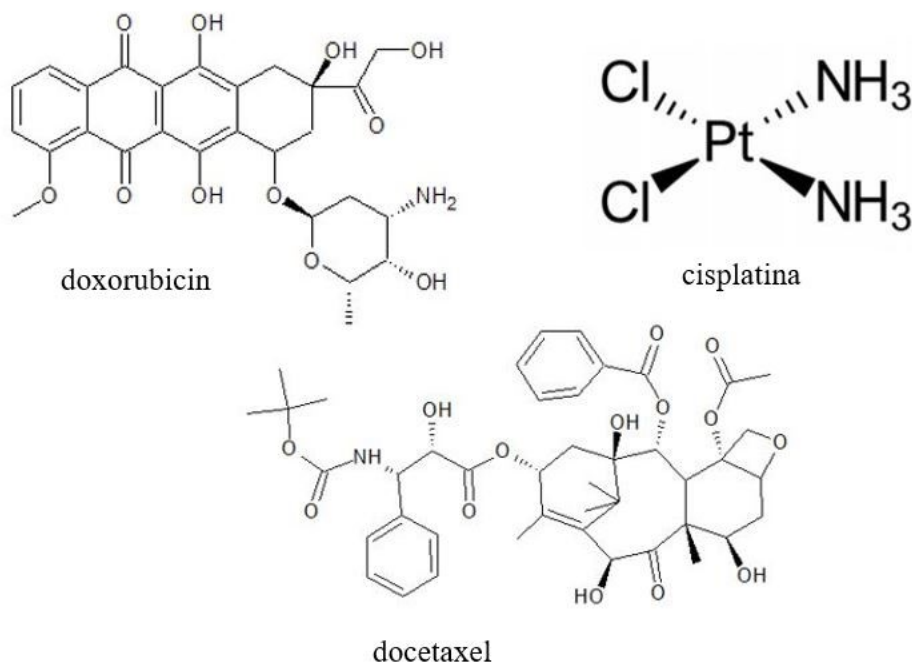
Mezi mechanismy účinku cytostatik se řadí např. inhibice syntézy nukleových kyselin, poškození struktury nukleových kyselin, alterace mikrotubulárního proteinu, inhibice proteosyntézy nebo kombinace výše zmíněných mechanismů. Podle mechanismu účinku jsou cytostatika rozdělena do několika skupin [3]:

- **Alkylační látky**, skupina léčiv, které se kovalentně vážou na DNA a inhibují tak její funkci a další dělení buněk. Do této skupiny řadíme hlavně deriváty yperitu a dále platinová cytostatika, která mají podobný mechanismus účinku. Cisplatina (viz obrázek 1, str. 8) je jedním z nejúčinnějších známých léčiv, která vykazuje klinickou aktivitu u mnoha druhů pevných nádorů. Její cytotoxický účinek spočívá v reakci s DNA za vzniku DNA aduktů (např. nitridové). Následně dochází díky těmto

aduktům k aktivaci několika signálních drah jako je ATR, p53, p73 či MAPK. Všechny tyto spontánní reakce následně vyvrcholí v apoptózu buňky. Aby však mohlo dojít k interakci cisplatiny s DNA, je zapotřebí několika aktivačních kroků, které vedou k nahrazení cis-chlor ligandů cisplatiny za molekuly vody [4].

- **Antimetabolity** jsou cytostatika, která inhibují tvorbu bází DNA. Může také docházet k začlenění antimetabolitů v pozměněné, aktivované formě („pseudonukleotid“) do řetězců nukleových kyselin, z kterých následně vzniká poškozená, nefunkční DNA [5]. Zástupci této skupiny jsou např. metotrexát, pemetrexed, 5-fluorouracil [6], cytarabin či gemcitabin.
- Skupina **inhibitorů mitózy** zahrnuje alkaloidy a taxany původně rostlinného původu, mezi které se řadí léčivo docetaxel (DTX, viz obrázek 1, str. 8), které zaujímá důležitou roli této práci. Uvedené skupiny léčiv vytváří vazbu s tubulinem, a tím způsobují rozrušení buněčných mikrotubulů, které mají velký podíl na správném průběhu mitózy. Toto rozrušení zapříčiní inhibici buněčného dělení a s tím spojenou buněčnou smrt. Dalšími příklady těchto inhibitorů jsou léčiva paclitaxel či vincristin. Mezi nevýhody této skupiny léčiv patří jejich vysoký hydrofobní charakter, z tohoto důvodu musí být samotné léčivo podáváno v olejové formulaci na bázi emulgátorů. Bylo ovšem prokázáno, že rozpouštědla vyvolávají u značné části pacientů nežádoucí reakce, proto je nová strategie pro podávání těchto látek žádoucí [7].
- **Interkalační cytostatika** jsou zodpovědné za tzv. interkalaci neboli vsunutí mezi báze, vytvoření nekovalentní vazby cytostatika na DNA a tím znemožnění nové syntézy DNA nebo RNA. Tyto cytostatika způsobují také blokaci topoisomerasy II a poškozují buněčnou membránu. Tuto inhibici způsobují antracyklinové glykosidy, mezi které řadíme např. doxorubicin (DOX, viz obrázek 1, str. 8) či mitomycin [8]. Vznikem kyslíkových radikálů (peroxidů a superoxidů) je zapříčiněna kardiotoxicita antracyklinů. Ošetřovanému se tak za život musí podat jen určité množství tohoto cytostatika. Pro doxorubicin je tato dávka určena na 450–550 mg/m² plochy povrchu těla (a to včetně použití příbuzných léků jako je např. daunorubicin) [9].

- **Kortikosteroidy** jsou přírodní hormony a léky podobné hormonům. Tyto látky jsou účinné jak při léčbě rakoviny, tak i dalších onemocnění. V případě léčby rakoviny jsou používány jako chemoterapeutika a také při prevenci proti nevolnosti a zvracení vyvolaných chemoterapií. Známým kortikosteroidem je např. dexamethason.
- **Ostatní** chemoterapeutická léčiva nezapadají svým účinkem do žádné větší skupiny. K nim se řadí např. mitotam či romidepsin [10].



Obrázek 1: Struktury vybraných cytostatik

1.3 Polymerní nosiče léčiv

V současné době jsou polymerní nosiče léčiv stále častěji studovány v souvislosti s vývojem nových terapeutických systémů pro léčbu mnoha onemocnění. Právě tyto polymerní nosiče by měly pomoci v dopravení léčiva k cílové tkáni, řídit aktivaci nesené látky či prodlužovat dobu cirkulace biologicky aktivní látky v krevním řečišti. Tímto způsobem lze omezit např. nežádoucí účinky neseného léčiva, potlačit rezistenci cílové tkáně k léčivu nebo zajistit či alespoň zvýšit rozpustnost léčiva ve vodě. Polymerní nosiče léčiv lze rozdělit na dvě skupiny makromolekul dle jejich původu, a to na přírodní a syntetické.

Mezi **přírodní makromolekuly** se řadí například proteiny, glykoproteiny nebo polysacharidy. Použití těchto přírodních nosičů má řadu výhod, ale obnáší i řadu nevýhod. Mezi pozitivní vlastnosti patří například biodegradabilita a dobrá snášenlivost

molekul v organismu. Často jsou přírodní makromolekuly získávány z obnovitelných zdrojů, na druhé straně mohou tyto přírodní molekuly po určité chemické modifikaci ztratit svoji biodegradovatelnost, jejich fyzikálně-chemické chování je poměrně nestálé a v neposlední řadě se mohou stát, po vazbě s další komponentou dopravního systému, imunogenními [11, 12].

1.3.1 Syntetické polymery, jejich rozdělení a vlastnosti

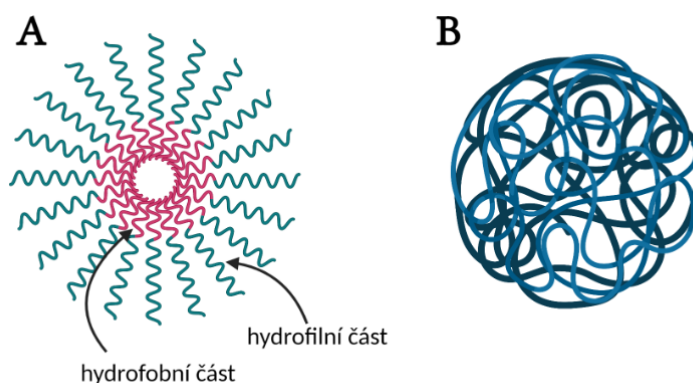
Nejrozšířenější polymerní materiály pro syntézu polymerních nosičů léčiv, jsou materiály syntetické. Tyto materiály mohou být hydrofilní, hydrofobní nebo amfifilní, tedy obsahovat část hydrofilní i hydrofobní. Všechny polymerní materiály použité pro syntézu polymerních nosičů musí splňovat několik kritérií, a to: musí být netoxické, biokompatibilní, neimunogenní a po splnění úkolu snadno vylučitelné z organismu. Důležitý je také rozměr syntetických polymerů s navázaným léčivem. Obecně platí, že čím větší je hydrodynamická velikost polymerního systému, tím déle cirkuluje konjugát v krevním řečišti a tím pomaleji se polymerní léčivo vylučuje z těla ven [13]. V případě polymerních materiálů s velikostí nad 200 nm již dochází ke zvýšenému záchytu polymerních systémů také v některých zdravých tkáních. Aby byly polymerní nosiče snadno vyloučeny pomocí glomerulární filtrace, musí molekuly projít póry glomerulární membrány o průměru 8–10 nm. Proto se u polymerního nosiče musí brát ohled nejen na molární hmotnost, ale především na jeho hydrodynamický rozměr, který musí být pod hodnotou renálního prahu zmíněného výše. Tato hodnota pro polymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu je přibližně 50 kg·mol⁻¹ [14, 15].

Syntetické polymerní nosiče léčiv můžeme rozdělit do tří základních skupin podle jejich hydrofilicity:

- Vodorozpustné polymerní konjugáty
- Amfifilní polymerní micely
- Hydrofobní polymerní nanočástice s hydrofilním povrchem

Vzhledem k zaměření této práce, ve které se využívají právě vodorozpustné polymerní nosiče, bude této skupině věnována samostatná kapitola. Zbylé dva typy polymerních nosičů jsou popsány v následujících odstavcích.

Polymerní micely jsou samo-uspořádávající se částice nejčastěji o velikosti mezi 10–50 nm, které jsou tvořeny amfifilními blokovými nebo větvenými polymery [16]. Ve vodném roztoku vzniká z takovýchto materiálů polymerní micela tvořená hydrofilním obalem a hydrofobním jádrem (viz obrázek 2, vytvořeno v BioRender.com). Výhoda polymerních micel je jednak možnost transportu hydrofobních bioaktivních molekul bez nutnosti kovalentní vazby mezi polymerním nosičem a léčivem a jednak snadné vyloučení z organismu v podobě tzv. polymerních unimerů vzniklých při rozpadu nadmolekulární struktury micely. Díky hydrofilnímu obalu micely tvořené vodorozpuštěným polymerem, je během cirkulace v krevním řečišti minimalizováno vyvolání imunitní odpovědi, interakce s retikuloendoteliálním systémem a je významně snížena nespecifická akumulace léčiva ve zdravých tkáních. Polymerní micely se tak dají považovat za univerzální doručovací systémy, které usnadňují rozpustnost léčiv a umožňují specifickou dopravu hydrofobních molekul, které jsou jinak ve vodě nerozpustné. Nevýhodou micelárních systémů s fyzikálně vázanými léčivy je často jejich nedostatečná stabilita, a tím způsobené uvolňování léčiva již v průběhu cirkulace v těle.



Obrázek 2: Schématické znázornění polymerní micely (A) a polymerní nanočástice (B)

V dnešní době jsou popsány polymerní micely pro dopravu léčiv složené z hydrofilních polymerů na bázi polyethylenglykolu (PEG), kopolymerů *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidových (pHPMA) či poly(oxazolinů) a hydrofobních polymerů jako je například poly(propylenoxid) (PPO), poly(ϵ -kaprolakton) či poly(ethylakrylát). Jako velmi účinný se ukázal nosič na bázi kopolymeru pHPMA s PPO, který nese navázaný doxorubicin, a kromě dopravy léčiv dokáže i inhibovat p-glykoproteinovou pumpu, a tedy obejít vícečetnou lékovou rezistenci. Dále jsou zajímavými příklady micelární nosiče na bázi PEG s poly(D,L-laktidem) a paclitaxelem

nebo PEG s poly(glutamátem) a navázanou cisplatinou, které se dostaly i do klinického testování [17, 18].

Hydrofobní polymerní nanočástice s hydrofilním obalem jsou částice o velikosti 10–200 nm často tvořené v organismu nerozpustnými materiály, například kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) [19]. Takovéto částice mohou být snadno v organismu vychytány retikuloendoteliálním systémem, a proto je zapotřebí tyto částice povrchově modifikovat hydrofilními polymerními řetězci. K modifikaci se hojně využívá např. PEG. Léčivo je do polymerních nanočástic nejčastěji enkapsulováno, a uvolňuje se po rozpadu nanočásticového systému. Další využití nanočásticových systémů pak nalezneme například v radioterapii či diagnostice [20]. Polymerní nanočástice, které se uplatňují právě jako nosiče léčiv a jsou používány klinicky či podstupují klinické testování, jsou například částice tvořené kopolymerem PLGA a PEG obsahující hydrofobní léčivo (taxoly, doxorubicin či rapamycin) [21].

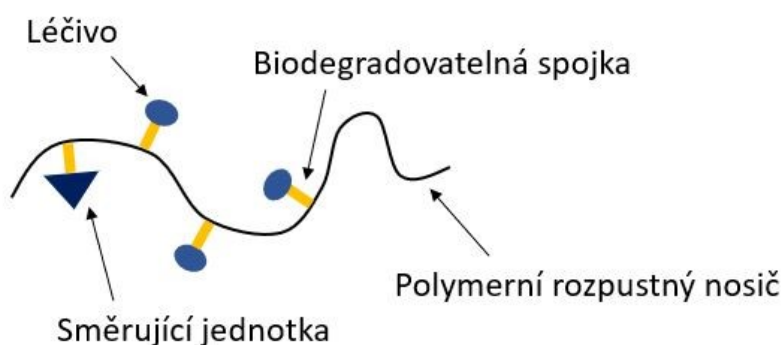
1.4 Vodorozpustné polymerní konjugáty

Vodorozpustné polymery jsou v kombinaci s cytotoxickými chemoterapeutiky velkým příslibem pro zdokonalení nádorové léčby. Obecně jsou takovéto systémy více specifické, vysoce účinné, a hlavně mají významně redukované vedlejší účinky pro pacienty v porovnání se samotným cytostatikem [22]. Jedná se o velkou skupinu polymerů, a to převážně lineárních. Polymerní řetězce mohou obsahovat různé funkční skupiny, které umožňují navázání aktivní látky. Další z předních výhod těchto polymerů je, že po navázání biologicky aktivní molekuly (např. chemoterapeutika) je toxická funkce této molekuly odstíněna nosičem a stává se tak méně toxickou nebo až netoxickou. S výhodou také dochází ke zvýšení vodorozpustnosti cytostatik jinak špatně rozpustných ve vodných roztocích. Typická představa vodorozpustného konjugátu tak jak ji známe dnes byla vyvíjena po několik desítek let [23, 24].

Již před více než sto lety, v roce 1906, formuloval německý lékař, biochemik a farmakolog Paul Ehrlich představu o tzv. kouzelné střele („magic bullet“) [25]. Tato střela měla představovat léčivo v takové formě, že by ho bylo možné nasměrovat přímo k postižené tkáni. Problémem této představy bylo hledání správného posla, který by léčivo dopravil do požadovaného místa. Prvními kandidáty byly bílkoviny vznikající v důsledku specifické obrany proti antigenům, tzv. protilátky [25].

V roce 1975 formuloval polymerní chemik Helmuth Ringsdorf myšlenku, že jako tzv. poslové, by mohly sloužit také syntetické polymery [26]. Na základě této myšlenky, sestavil Ringsdorf model, ve kterém navrhoval strukturu biokompatibilního polymerního řetězce, na kterém bylo navázané léčivo kovalentní vazbou přes spojku štěpitelnou v cílové tkáni. Jako další bylo nutné k polymernímu řetězci navázat tzv. solubilizační skupiny, které zaručovaly rozpustnost konjugátu ve vodě a směřující jednotky. Tyto jednotky měly za úkol dopravit strukturu do místa účinku [26].

Podle této navržené koncepce byly na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR (ÚMCH) v laboratoři biolékařských polymerů koncem 70. let syntetizovány a představeny nové polymerní nosiče léčiv Jindřichem Kopečkem a jeho spolupracovníky [27]. Struktura těchto nových polymerů vycházela z koncepce chemika Ringsdorfa, nicméně jeho obecné představy o funkci jednotlivých komponent byly řešeny konkrétně (viz obrázek 3). Konstrukce polymerního konjugátu byla tvořena z lineárního, hydrofilního kopolymeru na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA). Díky dobré vodorozpustnosti tohoto polymerního prekurzoru odpadla potřeba solubilizačních jednotek. Na řetězec bylo pomocí biodegradovatelné spojky navázáno léčivo a také tzv. směřující jednotka.



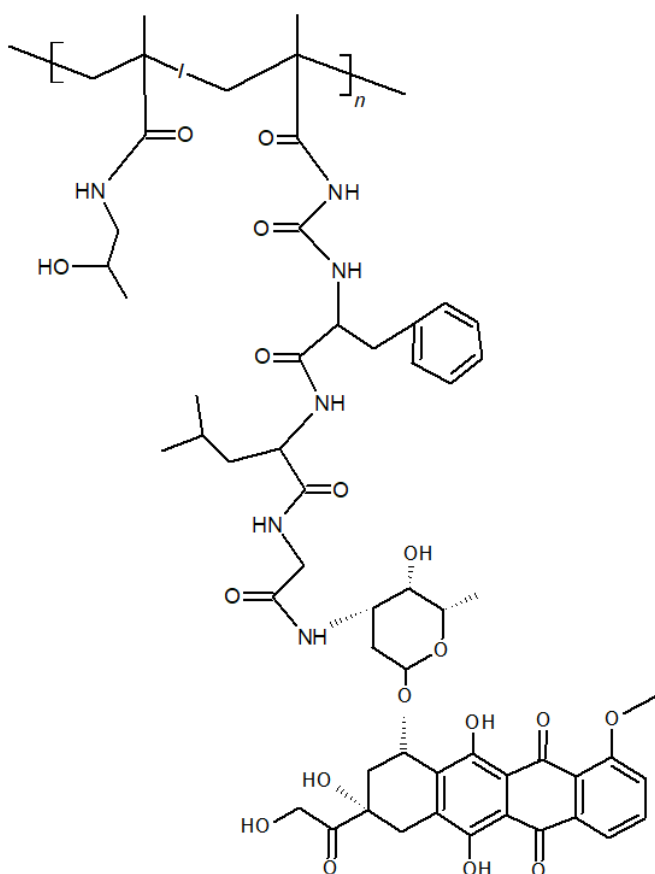
Obrázek 3: Schéma rozpuštěného polymerního nosiče s navázaným léčivem a směřující jednotkou

1.4.1 Polymerní konjugáty na bázi HPMA pro nádorovou léčbu

V posledních letech jsou vodorozpustní „dopravci“ na bázi **HPMA** intenzivně studovány, a to díky jejich biokompatibilitě a ostatním velmi příznivým biologickým vlastnostem [28]. Velkou výhodou HPMA kopolymerů je snadná kopolymerizace s methakrylamidy obsahující různé funkční skupiny, na které se mohou vázat nejrůznější biologicky aktivní molekuly jako jsou např. nízkomolekulární protinádorová léčiva, proteiny

a imunomodulanty. Biologické účinky se u většiny protinádorových léčiv navázaných na HPMA kopolymery minimalizují a začnou se projevovat až po opětovném uvolnění z polymerního nosiče ve své původní – aktivní formě. Můžeme říci, že léčivo navázané na pHPMA vykazuje ve srovnání se samotným nízkomolekulárním léčivem v těle významně nižší vedlejší účinky na zdravé tkáně [29]. Toto téma bude více probráno v další kapitole.

Jako první byly studovány konjugáty pHPMA s navázanými nízkomolekulárními léčivy, a to například s doxorubicinem připojeným pomocí oligopeptidové sekvence štěpitelné vybranými enzymy. V roce 1994 se konjugát s kovalentně navázaným doxorubicinem pomocí oligopeptidové spojky (Gly-Phe-Leu-Gly) označený jako PK1 (viz obrázek 4) dostal jako první polymerní léčivo do první a druhé fáze klinického testování [30, 31].



Obrázek 4: Struktura konjugátu s kovalentně navázaným doxorubicinem pomocí oligopeptidové spojky

Během dalších let byly syntetizovány polymerní konjugáty na bázi HPMA obsahující různá chemoterapeutika a směřující jednotky. Například konjugát podobný PK1 označený PK2, který obsahoval taktéž léčivo DOX navázané pomocí enzymaticky

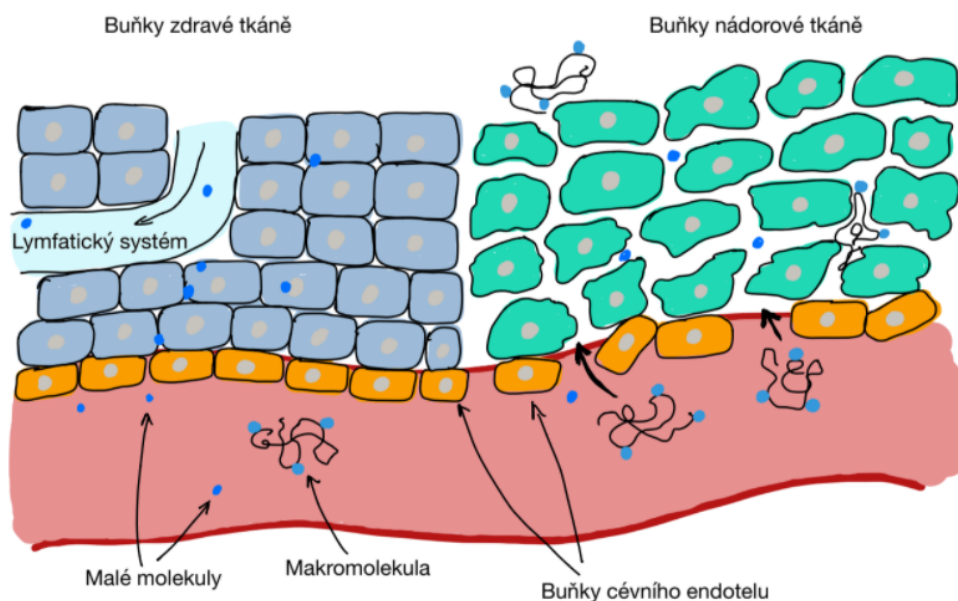
štěpitelné vazby, ale navíc směřující jednotku ve formě monosacharidu galactosaminu, byl také testován v klinických testech na lidských pacientech. Tento konjugát se dostal také do druhé fáze klinického testování. Do první fáze klinického testování se dostaly např. konjugáty pHPMA s captothecinem [32], paclitaxelem [33] či cisplatinou [34]. Mezi další studované konjugáty, které byly testovány v klinických studiích se řadí i konjugáty na bázi pHPMA s DTX [35].

1.4.2 Aktivní a pasivní směřování léčiva

Důležitou otázkou celého procesu léčby je samotné doručení léčiva do cíleného místa, tedy do postižené tkáně pevným nádorem. Jsou hned dva příklady, jak směřování může probíhat.

V případě **aktivního směřování** je vyžadováno, aby cílová buňka obsahovala specifický receptor, na který se bude vázat směřující jednotka nosiče s léčivem [36]. Výhodou takto připravených systémů je zvýšení selektivity podávaného léčiva. Jde o velmi účinný proces, který může být ale technicky poměrně složitý. Všechny nádorové buňky ale neobsahují daný receptor anebo své receptory vůbec nevystavují. Může tak dojít k tomu, že bude zasažena jen část nádorových buněk, či v horším případě nádorové buňky léčbu přežijí. Dále pak stejné receptory mohou obsahovat i zdravé buňky, i když v menším množství, tato shoda se pak stává zásadní nevýhodou, která způsobuje zvýšenou toxicitu směřovaných systémů na zdravé části organismu. V současné době se využívá směřujících jednotek, jako jsou například proteiny, peptidy, sacharidy a polysacharidy či různé „malé molekuly“ jako např. vitaminy [37].

Druhou možností je tzv. **pasivní směřování** neboli využití efektu zvýšené propustnosti a zadržky (EPR efekt – z anglického Enhanced Permeability and Retention effect). Tento efekt byl popsán v roce 1986 profesorem H. Maedou [38]. Na základě tohoto efektu (viz obrázek 5) dochází k akumulaci polymerních konjugátů s vysokou molekulovou hmotností a velikostí v nádorové tkáni. Akumulaci v pevných nádorech podporují hlavně rozdíly mezi zdravou a nádorovou tkání.



Obrázek 5: EPR efekt

V případě zdravé tkáně jsou buňky endotelu cévních kapilár uspořádané, bez velkých mezibuněčných prostor a v rámci zdravých tkání je dobře vybudován lymfatický systém odvádějící odpadní látky z těchto tkání. Na rozdíl od zdravých buněk, se nádorové buňky dělí mnohem rychleji než zdravé, tím pádem dochází k poškození cévního endotelu a vzniku velkých mezibuněčných prostor. Proto je v místech pevných nádorů zvýšená propustnost pro vysokomolekulární látky, které se do zdravé tkáně kvůli své velikosti nedostávají ve velké míře. Díky popsanému procesu, může vysokomolekulární konjugát proniknout přímo do nádorové tkáně ve velké míře. Další výhodou pro směřování polymerních léčiv je, že nádorová tkáň nemá dostatečně vyvinutý lymfatický systém nebo jí úplně chybí, proto zde dochází k vysoké zadržce akumulovaných látek. Tato specifika tak umožňují akumulaci biokompatibilní makromolekuly v nádorové tkáni. Molekuly nebo částice na bázi HPMA, které mají molekulovou hmotnost větší než $40 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ vykazují výrazně vyšší dobu cirkulace v krevním oběhu, prostupují nádorem

selektivním způsobem a navíc se udržují v nádorové tkáni po relativně dlouhou dobu (až několik dní) [39].

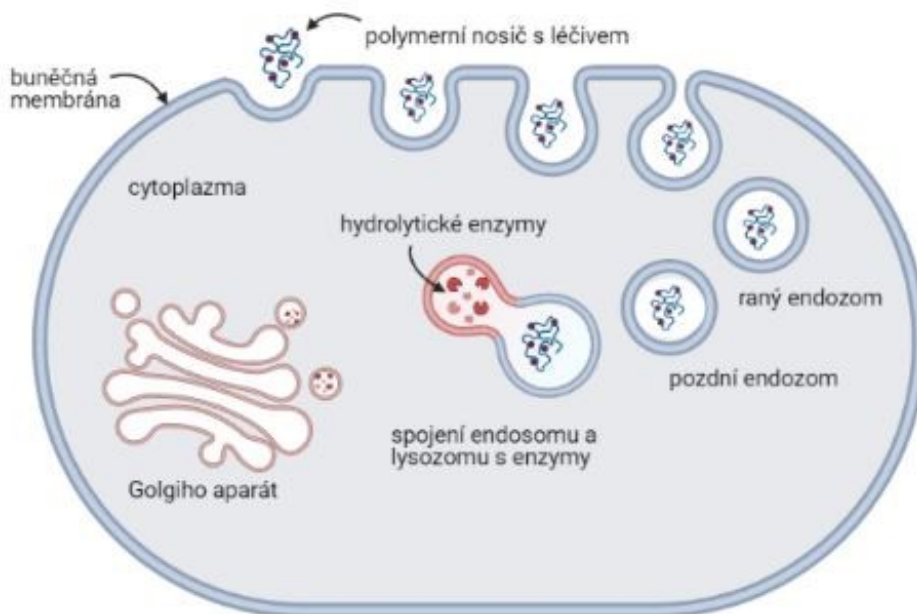
1.4.3 Uvolňování léčiva v místě účinku

Samotné léčivo je k vodorozpustnému polymernímu nosiči připojeno kovalentní vazbou a je v této formě téměř neaktivní. K aktivaci nízkomolekulárního léčiva dochází až po uvolnění z polymerního nosiče. Ideálně k tomuto uvolnění dochází v cílové tkáni, tedy v nádoru, nebo přímo v jednotlivých nádorových buňkách. Aby vytvořený konjugát uvolnil léčivo na správném místě, je potřeba využít biologicky štěpitelnou spojku, k jejíž štěpení dochází až v prostředí nádorové tkáně. Správný výběr takové spojky mezi léčivem a nosičem je rozhodující pro správném uvolnění léčiva v místě účinku. Nejpoužívanějšími spojkami jsou spojky, které tvoří s léčivem pH-senzitivní vazbu, která je štěpena hydrolyticky nebo vazbu štěpitelnou působením enzymů vyskytujících se ve zvýšené míře v daných tkáních.

Nejvíce používanou a studovanou pH-senzitivní vazbou mezi spojkou a léčivem je vazba **hydrazonová**. Nespornou výhodou je její stabilita při neutrálním, tedy i při fyziologickém pH 7,4, a naopak rychlé hydrolytické štěpení při nižším pH. Tato pH-senzitivní závislost je přesně šitá pro dopravu nosiče s léčivem do nádorové tkáně. Během cirkulace krevním řečištěm je tato vazba stabilní a léčivo zůstává v neaktivní formě nebo se uvolňuje pouze v malém množství. Po vniknutí do nádorové tkáně, kde je prostředí mírně kyselé (pH nádoru okolo 6,5 a v lysozomech dokonce 4–5) se však začne vazba hydrolyticky štěpit a dochází tak k uvolnění velkého množství léčiva, které se tak stává aktivním a vysoce cytotoxickým. Bylo studováno několik polymerních konjugátů, které se lišily v detailní struktuře. Mezi polymerním řetězcem a hydrazonovou vazbou obsahovaly tyto konjugáty různé oligopeptidové nebo aminokyselinové spojky. Všechny konjugáty vykazovaly uvolnění léčiva (DOX) od 65 % do 85 % po 24h inkubaci v pufru o pH 5,0 modelující nádorové prostředí a od 5 % do 10 % po 24h inkubaci v pufru o pH 7,4 modelující krevní řečiště [28]. Mezi další využívané pH senzitivní spojky patří cis-aconityl nebo tritylové spojky [40].

Enzymaticky štěpitelné spojky mají také velký význam. Je opět nezbytné, aby systém nosiče s léčivem byl po dobu transportu do cílové tkáně stabilní, a aby podléhal degradaci v cílové buňce a odštěpil tak léčivo, které by na místě mohlo začít účinkovat.

Důležitou roli tohoto procesu hraje tzv. endocytóza, díky které se nosič s léčivem absorbuje do buňky v podobě vezikuly, která se následně spojí s lysosomální buňkou (viz obrázek 6, vytvořeno v BioRender,com).



Obrázek 6: Znárodnění průběhu endocytózy

Tyto lysosomální buňky obsahují velké množství různých hydrolytických enzymů, např. skupiny esteráz, glykosidáz, lipáz či proteáz, které jsou schopné degradovat přítomné makromolekuly a vazby mezi léčivem a polymerním nosičem.

Pro enzymaticky štěpitelné spojky se nejvíce používají oligopeptidové sekvence. První takové sekvence byly zkoumány v osmdesátých letech na polymerním konjugátu na bázi pHPMA a jako modelové léčivo sloužil 4-nitroanilin [41]. Jako nejvhodnější spojka byl vybrán tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly (GFLG), který vykazoval nejvyšší stabilitu v krvi a zároveň byl rychle degradován v přítomnosti lysosomálních enzymů (konkrétně kathepsinu B nebo směsi lysosomálních enzymů zvaných tritosomy). Právě spojka GFLG byla jedna z nejlepších kandidátů pro syntézu konjugátů s reálným kancerostatikem určeným pro *in vivo* léčbu různých nádorů. Úspěšně tak byly syntetizovány konjugáty na bázi pHPMA např. s daunomycinem, puromycinem či doxorubicinem, které obsahovaly zmíněný tetrapeptid [28].

2 CÍLE PRÁCE

1. Návrh a syntéza nových biodegradovatelných diblokových systémů na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu
 - a. Syntéza diblokových homopolymerů za využití strukturně odlišných přenosových činidel
 - b. Syntéza diblokových kopolymerů za využití strukturně odlišných přenosových činidel
 - c. Syntéza kontrolního lineárního polymerního kopolymeru
2. Fyzikálně-chemická charakterizace nových polymerních systémů
 - a. Ověření řízeného průběhu polymerizace
 - b. Stanovení molárních hmotností polymerních systémů a jejich hydrodynamických průměrů ve vodném prostředí
 - c. Stanovení hydrolytické stability syntetizovaných diblokových systémů
3. Modifikace léčiva docetaxel pro možnost navázání na polymerní nosič pH-senzitivní vazbou
 - a. Syntéza a optimalizace dvou různých derivátů léčiva docetaxel
4. Syntéza polymerních konjugátů
 - a. Syntéza a charakterizace lineárních a diblokových polymerních konjugátů za využití dvou rozdílných derivátů docetaxelu
 - b. Studium rychlosti uvolňování léčiva z polymerního konjugátu v závislosti na hodnotě pH
5. Stanovení cytotoxicity
 - a. Stanovení cytotoxicity syntetizovaných derivátů a konjugátů léčiva docetaxel

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Chemikálie	čistota	výrobce, původ
4-(dimethylamino)pyridin	95,0%	Sigma Aldrich, US
1,3-benzendiol	pro syntézu	Sigma Aldrich, DE
aceton	98,0%	Lach-ner, ČR
acetonitril	pro HPLC	VWR, US
AIBN	rekrytalizo vaný	FUJIFILM Wako Chemicals Europe, DE
2-kyano-5-oxo-5-(2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)pentan-2-yl-ethylkarbontrithionát (CTA)	> 99 % (HPLC)	ÚMCH AV, ČR
diethylether	Sušený, destilovaný	Lach-ner, ČR
dimethylsulfoxid	99,9%	Sigma Aldrich, DE
docetaxel	97,0%	AURISCO, CN (CHN)
EDC·HCl	> 98,0%	Sigma Aldrich, DE
ethylacetát	99,9%	Lach-ner, ČR
hydrogenuhličitan sodný	> 99,0%	Lach-ner, ČR
chloroform	99,9%	Lach-ner, ČR
k. 5-methyl-4-oxo-hexanová	97%	RIEKE Metals, US
k. 2-(dodecylthiokarbonothioylthio)-2-methylpropionová	98,0%	Sigma Aldrich, DE
k. 4-oxo-4-(2-pyridyl)butanová	97,0%	RIEKE Metals, US
k. 4-kyano-4-[dodecylsulfanylthiokarbonyl]sulfanyl]pentanová	98,0%	Sigma Aldrich, DE
k. octová	99,9%	Lach-ner, ČR
k. trifluoroctová	99,0%	Iris biotech, FR
methanol	> 99,8%	VWR Chemicals, FR
<i>terc</i> -butanol	> 99,0%	Honeywell, DE
TNBS	1M roztok v H ₂ O	Sigma Aldrich, DE
V-70	95,0%	FUJIFILM Wako Chemicals Europe, DE
<i>N,N'</i> -dimethylacetamid	bezvodý, 99,8%	Sigma Aldrich, DE
dichlormethan	99,90%	Lach-ner, ČR
chlorid sodný	p.a.	Lach-ner, ČR
hydrogenfosforečnan sodný	> 98,0%	VWR Chemicals, BE
dihydrogenfosforečnan sodný	> 99,0%	VWR Chemicals, BE

3.2 Syntézy

3.2.1 Syntéza derivátů léčiva

Reakcí oxokyselin 5-methyl-4-oxo-hexanové (MeOHe) a 4-oxo-4-(2-pyridyl)butanové (PYR) s docetaxelem byly připraveny dva odlišné deriváty léčiva. Navážky (viz tabulka 1) docetaxelu, EDC·HCl a příslušné oxokyseliny byly rozpuštěny v dichlormethanu. K vzniklému roztoku bylo přidáno katalytické množství DMAP. Směs byla míchána za laboratorní teploty (25 °C) bez přístupu světla po dobu 18 h. Následně byl výsledný produkt extrahován vodou, 2% hydrogenuhličitanem sodným (m/V), 2x vodou. Takto byla reakční směs zbavena EDC·HCl a nezreagované oxokyseliny. Po provedení extrakce byla organická fáze sušena síranem hořečnatým, následně byla sůl odfiltrována a filtrát byl poté zahuštěn na rotační vakuové odparce. Získaný produkt byl rozpuštěn v acetonitrilu a purifikován pomocí FLASH chromatografie (Silicagel, gradient voda : acetonitril 0–100 %).

Tabulka 1: Navážky chemikálií pro syntézu derivátů PYR-DTX a MeOHe-DTX

	PYR-DTX	MeOHe-DTX
DTX [mg]	400	400
DCM [ml]	4	4
oxokyselina [mg]	184	150
EDC·HCl [mg]	395	395
DCM [ml]	5,76	5,45
DMAP	kat.	kat.
molární poměr v násadě [DTX] : [oxokyselina] : [EDC·HCl] = 1 : 1,4 : 2,8		

3.2.2 Syntéza monomerů

Monomery HPMA a 1-(*tert*-butoxykarbonyl)-2-(6-methakrylamidohexanoyl)hydrazine (MA-Acap-NHNH-Boc) byly syntetizovány na oddělení Biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR podle již publikovaných postupů [42, 43].

3.2.3 Syntéza přenosových činidel

Přenosová činidla, použitá pro syntézu lineárních a diblokových polymerů, 2-kyano-5-oxo-5-(2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)pentan-2-yl-ethylkarbontrithionát (CTA), benzen-1,3-diylbis(2(((dodecylthio)karbonothioyl)thio)-2-methylpropanoát

(CTA-1) a benzen-1,3-diylbis(4-kyano-4-[(dodecylsulfanylthiokarbonyl)sulfanyl]-pentanoát (CTA-2) byl syntetizován na oddělení Biologických polymerů ÚMCH AV ČR. CTA bylo syntetizováno podle již publikovaného postupu [44]. CTA-1 a CTA-2 byly syntetizovány následovně.

Syntéza CTA-1: Kyselina 2-(dodecylthiokarbonothioylthio)-2-methylpropionová (1,2 g, 3,29 mmol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC); 1,27 g, 6,60 mmol), 1,3-benzendiol (137,3 mg, 1,25 mmol) a katalytické množství 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP) bylo rozpuštěno ve 20 ml dichlormethanu. Roztok byl následně míchán přes noc při 25 °C. Následně byla reakční směs opakovaně extrahována vodou a roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Organická fáze obsahující produkt byla sušena síranem hořečnatým a zfiltrována. Výsledný produkt byl zahuštěn na rotační vakuové odparce a čištěn pomocí kolonové chromatografie (Silikagel, hexan : ethylacetát 40 : 1). Jímaná frakce byla odpařena do sucha a výsledný produkt byl skladován při -20 °C pod inertní atmosférou.

Syntéza CTA-2 probíhala obdobným způsobem jako CTA-1 s použitím 4-kyano-4-[(dodecylsulfanylthiokarbonyl)sulfanyl]pentanové kyseliny. Při čištění pomocí kapalinové chromatografie byla jako mobilní fáze použita směs hexan : ethylacetát v poměru 60 : 1.

3.2.4 Syntéza polymerních prekurzorů

Mechanismem RAFT (z angl. reversible-addition-fragmentation chain-transfer) polymerizace byly připraveny homopolymery a kopolymery na bázi HPMA. V závislosti na použitém přenosovém činidle byly připraveny lineární a dva odlišné typy diblokových polymerů.

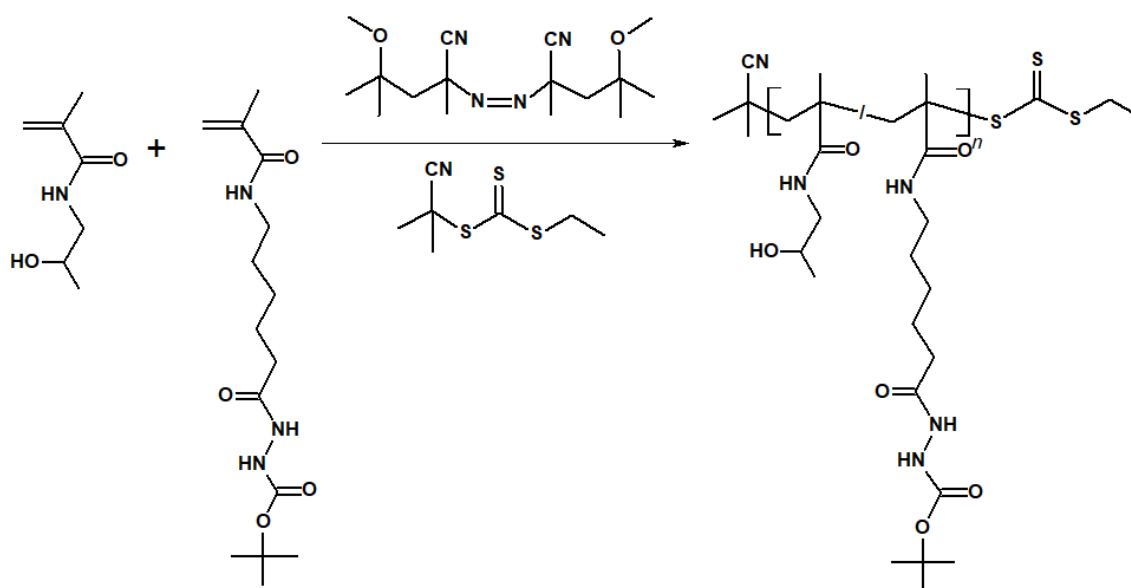
Lineární polymerní prekurzor

Základním polymerem použitým pro tuto práci byl lineární kopolymer na bázi HPMA a komonomeru obsahující hydrazidové skupiny. Navážky a molární poměry výchozích látek potřebných pro syntézu lineárního prekurzoru shrnuje tabulka 2 (str. 22). Monomery HPMA a MA-Acap-NHNH-Boc byly rozpuštěny v *tert*-butanolu tak, aby jejich koncentrace v reakční směsi byla 0,7 mol·dm⁻³. Přenosové činidlo (CTA) bylo rozpuštěno v *N,N*-dimethylacetamidu (DMA) a taktéž i iniciátor V-70. Všechny roztoky

byly následně kvantitativně převedeny do polymerizační ampule. Reakční směs byla probublána argonem, ampule uzavřena a uložena do vodní lázně (30 °C, 72 h). Reakce byla ukončena ochlazením reakční směsi a nízkomolekulární látky byly odstraněny srážením reakční směsi do směsi bezvodých rozpouštědel aceton : diethylether v poměru 1 : 1. Vzniklý produkt byl přefiltrován, sušen a opětovně srážen z methanolu (MeOH). Finální produkt byl sušen v exsikátoru za sníženého tlaku do konstantní hmotnosti. Reakce syntézy lineárního polymeru je znázorněna na obrázku 7.

Tabulka 2: Navážky, molární poměry a objemy příslušných chemikálií použitých při syntéze lineárního polymeru

lineární polymerní prekurzor LN1			
	navážka [mg]	molární poměr	objem rozpouštědla
HPMA	1000	358,8	8, 06 ml <i>t</i> -BuOH
MaAcap-NHNH-Boc	190	31,2	
CTA	3,98	1	1, 42 ml DMA
V-70	3,00	0,5	



Obrázek 7: Reakce syntézy lineárního kopolymeru

Diblokový polymerní systém

Diblokový polymer byl syntetizován jednak ve formě homopolymeru HPMA, který byl použit pro modelovou studii hydrolytické stability diblokového systému, jednak ve formě kopolymeru HPMA, který sloužil k syntéze polymerního konjugátu. Diblokové

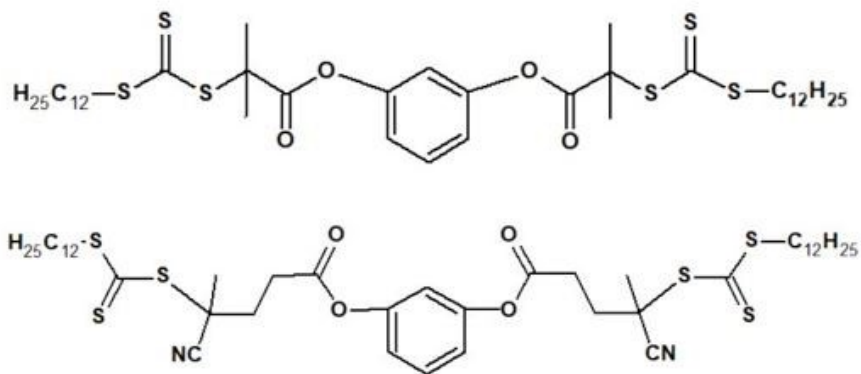
homopolymery i kopolymery byly syntetizovány analogicky jako v případě lineárního prekurzoru LN1.

Navážky a příslušné objemy rozpouštědel použité při syntéze diblokových homopolymerů jsou zobrazeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Navážky a objemy chemikálií použitých při syntéze diblokových homopolymerů

diblokový homopolymer DB-H1			diblokový homopolymer DB-H2		
	navážka [mg]	objem rozpouštědla		navážka [mg]	objem rozpouštědla
HPMA	500	4,49 ml <i>t</i> -BuOH	HPMA	500	4,49 ml <i>ss</i> -BuOH
CTA-1	3,51	0,499 ml DMA	CTA-2	3,85	0,499 ml DMA
V-70	1,35		V-70	1,35	
molární poměr v násadě [HPMA] : [CTA] : [V-70] = 800 : 1 : 1					

V případě homopolymerních dibloků byly tímto způsobem připraveny dva odlišné systémy. Strukturálních rozdílů bylo dosaženo použitím rozdílných přenosových činidel (viz obrázek 8).



Obrázek 8: Struktury přenosových činidel CTA-1 (nahore) a CTA-2 (dole) použitých při syntéze dvou typů diblokových homopolymerů

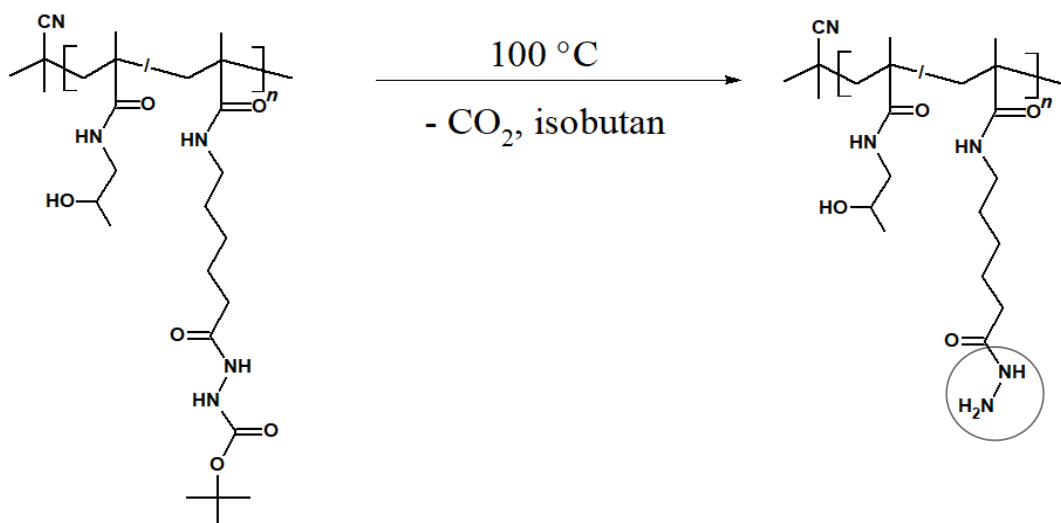
Jednotlivé navážky příslušných reaktantů pro syntézu diblokového kopolymeru jsou rozepsány v tabulce 4. Kopolymerní systém byl syntetizován pouze z přenosového činidla CTA-1 z důvodu větší stability, která bude diskutována v kapitole 5.3 (str. 49).

Tabulka 4: Navážky, molární poměr a objemy chemikálií použitých při syntéze diblokového kopolymeru

diblokový kopolymer DB-K1			
	navážka [mg]	molární poměr	objem rozpouštědla
HPMA	1000	736	9, 77 ml t-BuOH
MaAcap-NHNH-Boc	190	64	
CTA-1	7,42	1	1, 08 ml DMA
V-70	2,93	1	

Odstranění chránících a přenosových skupin

Vzhledem k možné hydrolyze trithiokarbonátových skupin (TTc), bylo nutné koncové skupiny odstranit před další reakcí polymerního prekurzoru. Odstranění trithiokarbonátových skupin bylo provedeno reakcí polymeru s nadbytkem AIBN v DMA. K 600 mg lineárního polymeru bylo přidáno 20 hm% AIBN, a následně bylo vše rozpuštěno v 6 ml DMA (10% roztok). Roztok byl převeden do reakční ampule, probublán argonem 10 minut a temperován při 80 °C po dobu tří hodin. Následně byl polymer srážen do směsi bezvodého ethylacetátu, filtrován a sušen. Pro odstranění zbytků AIBN a rozpouštědel byl polymer rozpuštěn v methanolu, srážen opět do ethylacetátu, filtrován a sušen pod vakuem do konstantní hmotnosti. Stejným postupem byly odstraněny i trithiokarbonátové skupiny u diblokového polymeru. Reaktivní hydrazidové skupiny byly v případě lineárního polymeru ochráněny termickou hydrolyzou Boc skupin v olejové lázni. Ke 100 mg polymeru byly přidány 2 ml destilované vody, po rozpuštění byl roztok převeden do reakční ampule a temperován při 100 °C v olejové



Obrázek 9: Schéma reakce představující ochránění hydrazidových skupin lineárního kopolymeru

lázni 40 minut. Po ochlazení byl roztok kvantitativně převeden do krystalizační misky, zmrazen a lyofilizován. Reakci znázorňuje obrázek 9 (str. 25).

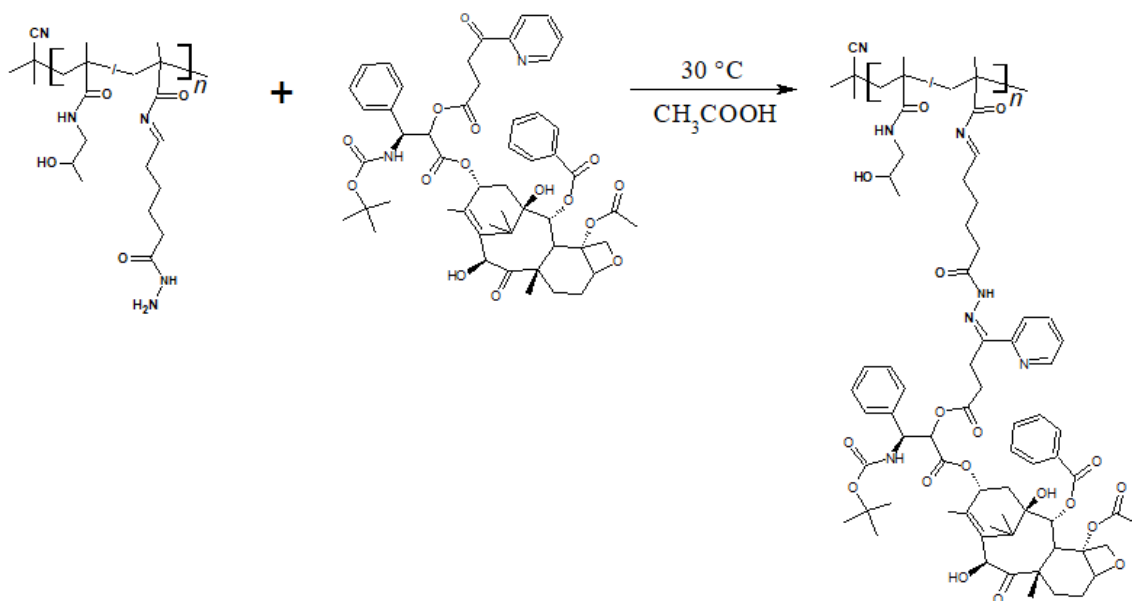
Odstranění chránících skupin na reaktivních hydrazidových skupinách diblokového kopolymeru bylo docíleno reakcí s kyselinou trifluoroctovou (TFA). Z navážky polymeru byl připraven 10% (m/V) roztok polymeru v TFA. Po 5 minutách reakce byl polymer srážen do diethyletheru, následně byl polymer ještě 3x promyt diethyletherem a filtrován. Suchý produkt byl opětovně rozpuštěn v methanolu a srážen do diethyletheru, filtrován a sušen pod vakuem do konstantní hmotnosti. Na závěr byly zbytky TFA odstraněny použitím chromatografie (PD10, QH₂O), finální roztok převeden do krystalizační misky, zmrazen a lyofilizován.

3.2.5 Syntéza lineárních polymerních konjugátů

Pomocí pH-senzitivní hydrazonové vazby byl na lineární polymerní prekurzor navázán derivát docetaxelu. Navážka polymeru (viz tabulka 5) byla rozpuštěna v methanolu a smíchána s roztokem derivátu léčiva. Reakce byla katalyzována přidavkem kyseliny octové a míchána bez přítomnosti světla při teplotě 30 °C po dobu 18 h. Nenavázaný derivát docetaxelu byl odstraněn pomocí kolonové chromatografie (LH20, Sephadex, MeOH). Takto připravený polymerní konjugát byl zkoncentrován, srážen do ethylacetátu, zfiltrován a sušen za sníženého tlaku do konstantní hmotnosti. Reakce syntézy konjugátu LN1-PYR-DTX je znázorněna na obrázku 10 (str. 27).

Tabulka 5: Navážky chemikálií použitých při syntéze konjugátu LN-PYR-DTX a LN-MeOHe-DTX

	LN1-PYR-DTX	LN1-MeOHe-DTX
derivát [mg]	10,9	10,2
MeOH [μ l]	100	100
lineární polymer [mg]	84,1	85,1
MeOH [μ l]	700	700
k. octová [μ l]	100	100



Obrázek 10: Znárodnění reakce derivátu léčiva PYR-DTX s lineárním kopolymerem za vzniku lineárního konjugátu s hydrázonově vázaným docetaxelem

3.2.6 Syntéza diblokových polymerních konjugátů

Diblokový konjugát DB-K1 byl syntetizován následovně: navážka polymeru byla rozpuštěna v methanolu a stejně tak navážky derivátů PYR-DTX, případně MeOHe-DTX. Oba roztoky byly smíchány, po přidavku kyseliny octové jako katalyzátoru reakce byla směs míchána bez přítomnosti světla při teplotě 30 °C po dobu 18 h. Nezareagovaný derivát léčiva byl odstraněn pomocí kolonové chromatografie (LH20, Sephadex, MeOH). Takto vyčištěný polymerní konjugát byl zakoncentrován na rotační vakuové odparce, srážen nejprve do ethylacetátu, následně do diethyletheru, filtrován a sušen za sníženého tlaku do konstantní hmotnosti. Použité navážky a objemy jednotlivých výchozích látek znázorňuje tabulka 6.

Tabulka 6: Navážky a objemy chemikálií použitých při syntéze konjugátu DB-K1-PYR-DTX a DB-K1-MeOHe-DTX

	DB-K1-PYR-DTX	DB-K1-MeOHe-DTX
derivát [mg]	6,16	7,37
MeOH [μ l]	100	100
diblokový polymer [mg]	70,12	90,12
MeOH [μ l]	600	800
k. octová [μ l]	84	108

3.3 Pístroje

Ke sledování jednotlivých reakcí a charakterizaci syntetizovaných produktů v práci byly použity následující pístroje.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. high performance liquid chromatography) firmy Shimadzu (JP) s pumpou LC-20AD, odplyňovačem DGU-20A₅, kolonou Chromolith® HighResolution RP-18 Endcapped od firmy Sigma-Aldrich (US) uloženou v CTO-20AC a detektory (fotodiodový SPD-M20A, fluorescenční RF-20A). Systém je řízen jednotkou CMB-20A. Záznam dat je realizován softwarem LCsolution 1.25.

Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (GPC, z angl. gel permeation chromatography) od firmy Shimadzu (JP) vybaven pumpou LC-20AD, odplyňovačem DGU-20A_{5R}, kolonami Superose-6-Increase 10/300 GL a Superose 12 10/300 GL od firmy Cytiva (US), fotodiodovým detektorem SPD-M20A a třemi detektory (refraktometrický Optilab, viskozimetrický ViscoStar III a 18-úhlový rozptyl světla DAWN HELIOS II) od firmy WYATT Technology (US). Systém je řízen jednotkou CBM-20A. Záznam dat je realizován softwary LabSolutions 5.97 a ASTRA 7.3.

Spektrofotometr

Spektrofotometr Jenway 7415 od firmy Jasco (DE) s xenonovou lampou (198–1000 nm).

Chromatografický systém FLASH

Chromatografický systém PrepChrom C-700 od firmy BÜCHI (SUI) s kolonou Chromolith RP-C18 25/100 od firmy Merck (DE).

Rotační vakuová odparka

Systém G3 heidolph s chladicí jednotkou heil-CHILL 350.

Centrifuga

Centrifuge 5430R od firmy Eppendorf (DE) s rotorem F-35-6-30 (maximum otáček $7\,830 \cong 7\,700g$).

Lyofilizátor

Lyofilizátor L4-110 PRO s řídicí jednotkou LyoControl od firmy GREGOR Instruments (CZ).

Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr LCQ Feet od firmy Thermo SCIENTIFIC (US), ionizace elektrosprejem. Záznam dat realizován softwarem Excalibur.

Nano-Zetasizer

Přístroj sloužící k určení velikosti polymerních systémů v roztoku od firmy Malvern Panalytica (UK).

3.4 Metody

Všechny syntetizované produkty byly standardně charakterizovány pomocí níže popsaných metod.

3.4.1 Metody UV-VIS spektrofotometrie

Metoda UV-VIS spektrofotometrie byla použita ke stanovení skupin TTc, hydrazidových skupin a stanovení molárních absorpčních koeficientů. Absorbance jednotlivých vzorků byly měřeny na spektrofotometru ve skleněných kyvetách o šířce buď 1 cm nebo 1 mm. Pro výpočet koncentrací jednotlivých funkčních skupin a molárních absorpčních koeficientů byl použit Lambert-Beerův zákon.

Stanovení obsahu koncových trithiokarbonátových skupin

Obsah koncových trithiokarbonátových skupin byl stanoven ze změřené absorbance. Polymerní prekurzor byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) tak, aby koncentrace odpovídala $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Absorbance TTc skupin byla měřena při vlnové délce 307 nm. Výsledný obsah TTc skupin byl použit jako funkcionalita polymerního řetězce, tedy podíl molární hmotnosti z GPC a molární hmotnosti určené z hodnoty absorbance viz rovnice (1). Pro výpočet byl použit molární absorpční koeficient $\epsilon_{307} = 10\,500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

$$F = \frac{M_n(\text{GPC})}{\frac{\epsilon \cdot c \cdot d}{A}} \quad (1)$$

F	funkcionalita
M_n	početně průměrná molární hmotnost změřená pomocí dRI [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]
ϵ	molární absorpční koeficient [$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]
c_m	koncentrace polymer [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]
d	šířka kyvety [cm]
A	absorbance roztoku polymeru

Stanovení hydrazidových skupin

Obsah komonomeru obsahující hydrazidové skupiny byl stanoven pomocí 2,4,6-trinitrobenzen-1-sulfonové kyseliny (TNBS). Hydrazidy substituovaný trinitrobenzen absorbuje v červené oblasti při 500 nm. Vzorek byl připraven rozpuštěním

polymeru v borátovém pufru (0,1 M Na₂B₄O₇·10H₂O; pH 9,3) na koncentraci 2 mg·ml⁻¹. Roztok použitý pro spektrální měření byl připraven smícháním 100 µl připraveného vzorku polymeru, 875 µl borátového pufru a 25 µl 0,03 M TNBS. Referenční vzorek byl připraven smícháním 975 µl borátového pufru s 25 µl 0,03 M TNBS. Po 60 minutách byla změřena absorbance při 500 nm a vypočteny molární procenta zastoupení hydrazidových skupin kopolymeru viz rovnice (2). Pro výpočet byl použit molární absorpční koeficient $\varepsilon_{500} = 17\,200 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

$$\text{mol\% kopolymeru} = \frac{100}{\frac{\varepsilon \cdot c \cdot d}{A} - M_n \frac{1}{M_{HPMA}} + 1} \quad (2)$$

M_n	molární hmotnost kopolymerní jednotky [$g\cdot mol^{-1}$]
M_{HPMA}	molární hmotnost HPMA [$g\cdot mol^{-1}$]
ε	molární absorpční koeficient [$l\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$]
c_m	koncentrace polymer [$mg\cdot ml^{-1}$]
d	šířka kyvety [cm]
A	absorbance roztoku polymeru

Stanovení molárního absorpčního koeficientu použitých přenosových činidel

Přesné navážky CTA-1 a CTA-2 byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci $5\cdot 10^{-4}$ M. Následně byly roztoky měřeny na spektrofotometru v 1 mm skleněných kyvetách při vlnové délce 312 nm. Ze získaných absorbancí byl vypočten molární absorpční koeficient pomocí Lambert-Beerova zákona viz rovnice (3).

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot d} \quad (3)$$

ε	molární absorpční koeficient [$l\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$]
A	absorbance roztoku polymeru
d	šířka kyvety [cm]
c_n	koncentrace roztoku [$mol\cdot dm^{-3}$]

3.4.2 Chromatografické metody

GPC

Pro stanovení molekulové hmotnosti připravených polymerních prekurzorů a konjugátů byla použita gelová permeační chromatografie. Vzorky byly měřeny při průtoku mobilní fáze (0,05 M fosfátový pufr + 0,05 M NaCl, pH 7,4) 0,5 ml·min⁻¹. Délka jednotlivých měření byla 100 min. Pro výpočet molárních hmotností připravených polymerů byl použit index inkrementu lomu (dn/dc) 0,167.

HPLC

Pomocí HPLC byla stanovena čistota připravených nízkomolekulárních látek. Stejná metoda byla také použita pro stanovení celkového obsahu a vyhodnocení rychlosti uvolňování navázaného léčiva z polymerního nosiče. Pro měření byla použita metoda s mobilní fází složené z pufru A (95 % voda, 5 % acetonitril, 0,1 % TFA) a B (95 % acetonitril, 5 % voda, 0,1 % TFA) s lineárním gradientem 0–100 % B, průtokem 2,5 ml·min⁻¹ a délkou měření 12 minut.

DLS

Hydrodynamický poloměr (R_h) polymerních prekurzorů a konjugátů byl stanoven za využití dynamického rozptylu světla. Vzorky byly měřeny v 0,15 M NaCl (5 mg·ml⁻¹) při teplotě 37 °C. Všechny vzorky byly filtrovány přes 0,2 μm PVDF filtr. Poloměry ekvivalentních tuhých koulí, které mají stejný difúzní koeficient s měřeným vzorkem, byly vypočteny z naměřených difúzních koeficientů pomocí Einstein-Stokesovy rovnice viz (4).

$$R_h = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (4)$$

R_h	hydrodynamický poloměr [m]
k	Boltzmanova konstanta [$J \cdot K^{-1}$]
T	teplota prostředí [K]
η	dynamická viskozita kapaliny [$m^{-1} \cdot kg \cdot s^{-1}$]
D	difúzní koeficient [$m^2 \cdot s^{-1}$]

3.5 Hydrolytická stabilita

3.5.1 Hydrolytická stabilita diblokových prekurzorů

Hydrolytická stabilita připravených diblokových homopolymerů a diblokového kopolymeru byla prováděna ve fosfátovém pufru o pH 7,4 při 37 °C o koncentraci roztoku 3 mg·ml⁻¹. Rychlost hydrolytické degradace byla sledována pomocí přístroje GPC a vyhodnocena z výsledných molárních hmotností rozštěpeného polymeru.

3.5.2 Rychlost uvolňování navázaného léčiva

Rychlost uvolňování derivátu léčiva z lineárního polymerního nosiče byla sledována pomocí HPLC. Uvolňování připravených polymerních konjugátů LN1-PYR-DTX a LN1-MeOHe-DTX bylo prováděno ve 0,3M fosfátových pufrech o třech různých pH, demonstrující krevní řečiště a prostředí s lysozimy uvnitř nádoru, tedy pH 7,4 a pH 5,0. Pro každé pH byla připravena řada vzorků o hmotnosti 1 mg, které byly rozpuštěny v 500 µl fosfátového pufru o příslušném pH a inkubovány při 37 °C po dobu v rozmezí 0,5 h až 48 h.

Po přesně daném časovém intervalu bylo uvolněné léčivo extrahováno do 1 ml chloroformu, přesný objem organické fáze byl odebrán, odpařen do sucha, rozpuštěn v 1 ml DMSO a analyzován na HPLC. Pomocí kalibrační křivky bylo následně spočteno množství uvolněného derivátu léčiva.

3.6 Studie *in vitro*

Testování *in vitro* probíhalo ve spolupráci s oddělením Biologických modelů na ÚMCH AV ČR. Pro docetaxel byly použity buněčné linie DLD-1, kolorektálního karcinomu (LGC, Standarts Sp., Polsko). Testované buňky byly pěstovány v RPMI médiu (Gibco, US) obohaceném o 10% fetální bovinní sérum (FBS; Sigma-Aldrich) a 1% penicilin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, US) ve zvlhčovaném inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Buňky byly následně sklizeny pomocí 0,05% roztoku trypsinu a nasazeny do 96jamkových destiček v koncentraci 5000 buněk/jamku. Po 24 hodinách kultivace byly buňky inkubovány s příslušnými roztoky 72 hodin. Roztoky byly připraveny dvojkovou ředící řadou ze zásobních roztoků viz tabulka 7 (str. 33). Po třech dnech bylo do každé jamky přidáno 10 µl barviva Presto Blue (Thermo Fisher Scientific, US) a po

čtyřech hodinách od přidání barviva byly kultivační destičky měřeny pomocí spektrofotometru Hybrid Reader Synergy H1 (BioTek, US) při excitační, resp. emisní vlnové délce 550, resp. 590 nm. Pro vyhodnocení sloužil program Gen 5 2.03.

Tabulka 7: Vzorky použité pro měření *in vitro* cytotoxicity, použítá rozpouštědla a koncentrace zásobního roztoku, z kterého byla následně připravena dvojková ředící řada

vzorek	DTX	PYR-DTX	MeOHe-DTX	LN1-PYR-DTX	LN1-MeOHe-DTX
rozpouštědlo	DMSO: PBS 1:1	DMSO: PBS 1:1	DMSO: PBS 1:1	PBS	PBS
koncentrace roztoku	5 mg·ml ⁻¹	5 mg·ml ⁻¹	5 mg·ml ⁻¹	20 mg·ml ⁻¹	20 mg·ml ⁻¹

Ve spolupráci s oddělením na Mikrobiologickém ústavu AV ČR probíhalo též měření cytotoxicity docetaxelu, derivátu docetaxelu a taktéž jeho konjugátu. V tomto případě byly použity buněčné linie EL4 (buněčný T-lymfom) a CT26 (myší karcinom tlustého střeva). Všechny buněčné linie byly zakoupeny od společnosti ATCC a byly udržovány podle doporučení dodavatele. Buňky byly kultivovány v 96jamkových kultivačních destičkách s různými koncentracemi vzorků konjugátů a volného DTX po dobu tří dnů. Na začátku kultivace byla koncentrace buněk 5000 buněk/jamku. Proliferace byla poté vyhodnocena standardním testem inkorporace [3H]-thymidinu, která využívá radioaktivního značení.

4 VÝSLEDKY

Cílem této práce byla nejen syntéza nových biodegradabilních polymerních systémů, ale také optimalizace vazby docetaxelu na polymerní nosič, studium chování polymerního systému a také navázaného docetaxelu v prostředí simulující prostředí organismu. V následujících podkapitolách budou popsány výsledky získané během vypracování této bakalářské práce.

4.1 Syntéza a charakterizace derivátů docetaxelu

Během práce byly úspěšně připraveny dva rozdílné deriváty docetaxelu. Léčivo docetaxel neobsahuje vhodnou ketoskupinu pro navázání na polymerní prekurzor, proto bylo nutné léčivo modifikovat. K modifikaci byly použity dvě oxokyseliny, které zastávaly roli spojek mezi léčivem a polymerním řetězcem. Karboxylová skupina oxokyseliny sloužila pro navázání docetaxelu pomocí esterové vazby. Připravený derivát byl poté navázán pomocí ketoskupiny na polymerní řetězec pomocí vazby hydrazonové. Konkrétně byly připraveny deriváty s kyselinou 5-methyl-4-oxo-hexanovou (MeOHe-DTX) a kyselinou 4-oxo-4-(2-pyridyl)butanovou (PYR-DTX). Vybrané oxokyseliny měly odlišnou strukturu, která by měla mít zásadní vliv na rychlost uvolňování derivátu z polymerního řetězce.

Deriváty docetaxelu byly připraveny esterifikací příslušné kyseliny. Do reakce byly nasazeny reaktanty v molárním poměru DTX : oxokyselina : EDC = 1 : 1,4 : 2,8, reakce byla katalyzována přidavkem DMAP a probíhala 18 h při pokojové teplotě. Pomocí HPLC bylo stanoveno, že reakce proběhla z 77 % pro derivát PYR-DTX a z 62 % pro MeOHe-DTX. Další prodloužení reakční doby již nemělo vliv na nárůst produktu. Výsledné deriváty byly dále čištěny pomocí FLASH chromatografie, díky které bylo dosaženo vysoké čistoty derivátů.

MeOHe-DTX byl připraven s výtěžkem 34 %. Struktura derivátu byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) (ESI): m/z : 956,42 $[M + Na]^+$, která odpovídá teoretické molární hmotnosti ($M_t = 934,06 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Čistota připraveného derivátu byla také ověřena pomocí HPLC (jeden pík, retenční čas 6,75 min, čistota > 99%).

PYR-DTX byl připraven s výtěžkem 40 %. Struktura derivátu byla potvrzena MS (ESI): m/z : 969,17 $[M + Na]^+$, která odpovídá teoretické molární hmotnosti

($M_t = 969,03 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Čistota připraveného derivátu byla také ověřena pomocí HPLC (jeden pík, retenční čas 6,50 min, čistota > 99%).

4.2 Syntéza a fyzikálně-chemická charakterizace polymerních systémů

4.2.1 Přenosová činidla pro řízenou radikálovou polymerizaci

Přenosová činidla CTA-1 a CTA-2 (viz Obrázek 8, str. 23), která umožňují *in situ* syntézu diblokových systémů, byla nově syntetizována na Oddělení biolékařských polymerů ÚMCH. Obě přenosová činidla umožňují průběh polymerizace tak, že pomocí jedné molekuly přenosového činidla vzniknou dva spojené polymerní řetězce. Lze tak syntetizovat polymerní řetězec s dvojnásobnou molární hmotností než v případě lineárního polymeru. Tento nárůst molární hmotnosti polymeru umožňuje delší cirkulaci v organismu. Přenosová činidla byla navržena tak, aby vzniklý diblokový polymer, byl po degradaci vyloučen pomocí glomerulární filtrace. Konkrétně připravená činidla obsahují esterové vazby, díky kterým se diblokový systém v pH 7,4 rozpadá na dva štěpy s poloviční molární hmotností.

CTA-1 bylo syntetizováno s výtěžkem 75,7 % a CTA-2 72,1 %. Čistota produktu obou přenosových činidel byla ověřena pomocí HPLC (> 99%) a ^1H NMR v CDCl_3 . Molární hmotnosti obou CTA byly stanoveny pomocí hmotnostní spektrometrie a molární absorpční koeficient přenosových činidel byl stanoven pomocí UV-VIS spektrometrie v DMSO. Všechny popsané hodnoty pro CTA-1 a CTA-2 shrnuje tabulka 8.

Tabulka 8: Molární hmotnosti a molární absorpční koeficienty syntetizovaných přenosových činidel CTA-1 a CTA-2

	m/z	$M_r [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$\epsilon_{308} [\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]$
CTA-1	803	803,34	21 406,30
CTA-2	881	881,41	22 063,30

4.2.2 Diblokové homopolymery

Za účelem studia hydrolytické stability diblokových systémů byly syntetizovány dva diblokové homopolymery DB-H1 a DB-H2. V případě dibloků DB-H1 bylo použito přenosové činidlo CTA-1, v případě DB-H2 bylo použito CTA-2. Molární poměr použitých přenosových činidel : HPMA : iniciátoru V-70 byl 1 : 800 : 1. Reakce

probíhala 72 h při 30 °C. Následně byly odstraněny TTc skupiny reakcí s AIBN a finální produkty charakterizovány. Charakterizaci připravených homopolymerů shrnuje tabulka 9. V případě DB-H2 došlo při reakci ke ztrátě části produktu a výtěžek je tak nižší, než se předpokládalo.

Tabulka 9: Charakterizace diblokových homopolymerů

homopolymer	Výtěžek [%]	M_t [g·mol ⁻¹]	M_n [g·mol ⁻¹]	Đ	F (TTc)	R_h [nm]
DB-H1	53	114 500	70 700	1,16	2	10,1
DB-H2	32	114 500	102 000	1,21	1,4	10,9

M_t – teoretická M_n při 100% konverzi

4.2.3 Lineární a diblokový kopolymer

Všechny polymerní systémy popsané v této práci byly syntetizovány pomocí kontrolované RAFT kopolymerizace. V práci byly syntetizovány dva typy polymerních prekurzorů, lineární a diblokový, jejichž syntéza se lišila použitým přenosovým činidlem. V případě lineárního prekurzoru LN1 bylo do reakce použito přenosové činidlo CTA, molární poměr CTA : iniciátoru : monomerním jednotkám byl na začátku reakce 1 : 0,5 : 390. Reakce probíhala při 30 °C po dobu 72 h. Po polymerizaci byl lineární prekurzor čištěn srážením, dále byly odstraněny TTc skupiny a ochráněny hydrazidové skupiny, na které se v dalším kroku vázal připravený derivát docetaxelu hydrazonovou vazbou. Pro diblokový prekurzor bylo použito přenosové činidlo CTA-1. Toto přenosové činidlo vykazovalo při studiu hydrolytického štěpení vyšší stabilitu. Do reakce bylo nasazeno CTA-1, monomerní jednotky a iniciátor V-70 v molárním poměru 1: 800 : 1, reakce probíhala při 30 °C po dobu 72 hodin. Molární hmotnosti po odstranění TTc skupin i po ochránění hydrazidových skupin byly shodné.

Molární hmotnost syntetizovaných kopolymerů LN1 a DB-K1 byla po ochránění hydrazidových skupin stanovena pomocí GPC spolu s hodnotou disperzity. Obsah hydrazidových skupin, na které se v dalším kroku vázal modifikovaný DTX, byl stanoven pomocí UV-VIS spektrometrie a je spolu s funkcionalitou koncových trithiokarbonátových skupin polymerního řetězce uveden v tabulce 10 (str. 38).

Tabulka 10: Charakterizace lineárního a diblokového polymerního prekurzoru

prekurzor	Výtěžek [%]	M_n [g·mol ⁻¹]	Đ	F (TTC)	NHNH ₂ [mol%]	R_h [nm]
LN1	74	41 000	1,1	0,9	6,1	4,1
DB-K1	83	80 800	1,2	2,0	4,6	5,7

4.2.4 Polymerní konjugáty

Připravené polymerní prekurzory LN1 a DB-K1 byly použity pro syntézu polymerních konjugátů s deriváty docetaxelu. V této práci byly syntetizovány celkem čtyři rozdílné polymerní konjugáty. Dva lineární LN1-PYR-DTX, LN1-MeOHe-DTX a dva diblokové DB-K1-PYR-DTX a DB-K1-MeOHe-DTX. V případě lineárních konjugátů bylo do násad nasazeno 13 hm% derivátu PYR-DTX a 12 hm% derivátu MeOHe-DTX. Pro diblokové konjugáty byl zvolen nižší obsah léčiva v násadě, a to 8 hm% derivátů. Reakce probíhaly po dobu 18 h při 30 °C, po vysrážení byly výsledné produkty čištěny pomocí kolonové chromatografie (LH20, MeOH). Polymerní konjugáty obsahovaly pod 1 % volného DTX. Výsledky fyzikálně-chemické charakterizace jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Charakterizace čtyř připravených polymerních konjugátů

konjugát	výtěžek [%]	M_n [g·mol ⁻¹]	Đ	obsah léčiva [hm%]	R_h [nm]
LN1-PYR-DTX	79	65 200	1,2	12	7,4
LN1-MeOHe-DTX	77	49 800	1,1	8	5,3
DB-K1-PYR-DTX	57	98 400	1,3	3	8,8
DB-K1-MeOHe-DTX	60	78 100	1,3	3	5,2

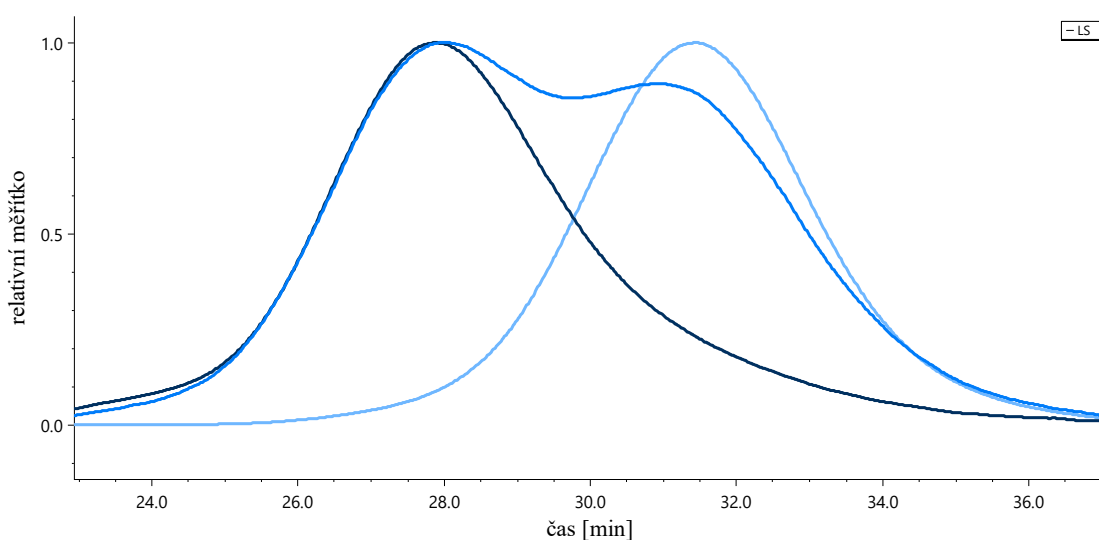
4.3 Hydrolytická stabilita

Hydrolytická stabilita diblokových systémů byla sledována na homopolymerních řetězcích a následně jednom diblokovém kopolymeru před a po ochránění hydrazidových skupin. Takto mohl být zjištěn vliv jak komonomerní jednotky, tak volných hydrazidů na hydrolytickou stabilitu dibloků. Na konec byla sledována i hydrolytická stabilita diblokového konjugátu DB-K1-PYR-DTX.

4.3.1 Rychlost degradace diblokových homopolymerů, kopolymeru a konjugátu

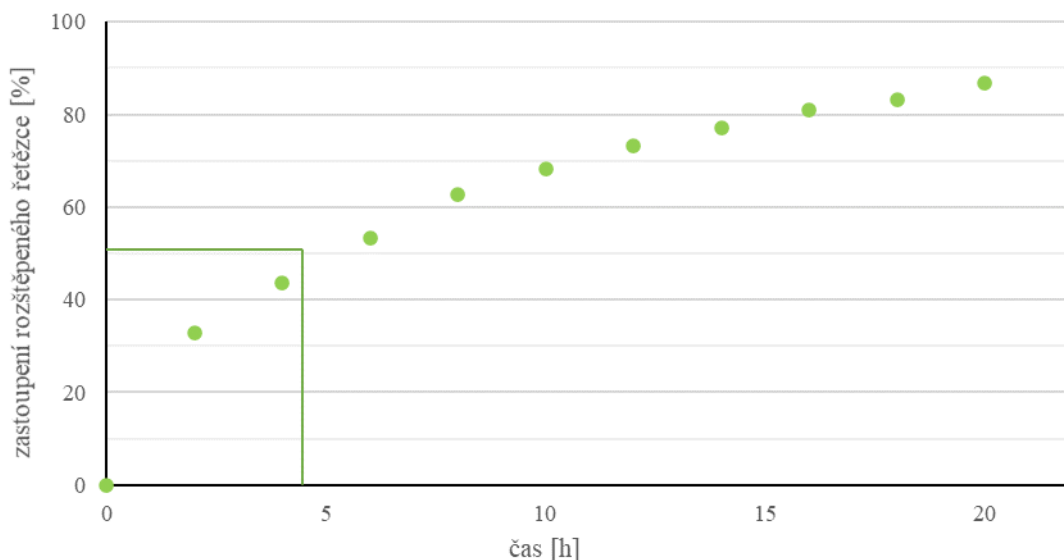
Hydrolytická stabilita připravených diblokových systémů byla provedena v 0,3M fosfátovém pufru o pH 7,4 při teplotě 37 °C (modelující prostředí krevního řečiště). V časových intervalech po 2 h byl vzorek analyzován na GPC a ze získaných hodnot molekulových hmotností byly sestaveny příslušné grafy.

Průběh sledování hydrolytické stability znázorňuje obrázek 11, kde je patrný posun píku v čase, a tedy snížení molární hmotnosti které vyplývá z průběhu gelové permeační chromatografie.



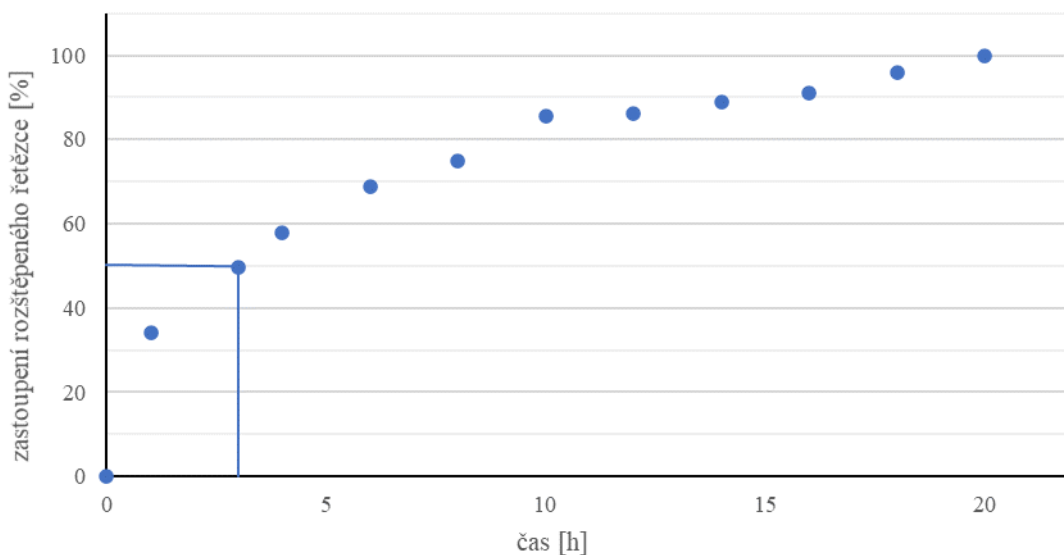
Obrázek 11: Znázornění průběhu hydrolytického štěpení diblokového systému v čase. Tmavě modrá křivka znázorňuje diblok před štěpením, tedy v čase 0 hodin. Světle modrá představuje již rozštěpený řetězec s poloviční molární hmotností po proběhnutém štěpení

Homopolymerní diblok DB-H1 syntetizovaný pomocí CTA-1 vykazuje nízkou hydrolytickou stabilitu za daných podmínek. Poločas rozpadu tohoto dibloku, tzn. čas, kdy se v roztoku polymeru nachází 50 % rozštěpených řetězců, byl stanoven na 5 hodin. Rychlost degradace DB-H1 je znázorněna na obrázku 12 (str. 40).



Obrázek 12: Graf nárůstu procentuálního zastoupení degradovaného dibloku DB-H1 v čase se znázorněným poločasem rozpadu

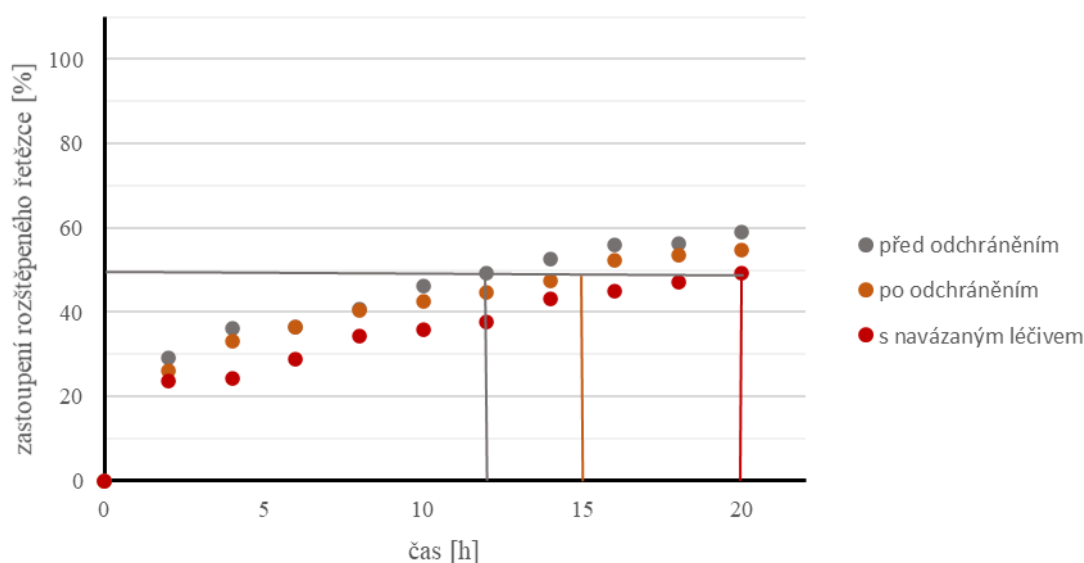
V případě druhého homopolymeru DB-H2, který byl syntetizovaný pomocí CTA-2 podléhá esterová vazba ještě rychlejší hydrolyze než u DB-H1. Poločas rozpadu tohoto systému v pufru o pH 7,4 při 37 °C byl stanoven na 2,5 hodiny (viz obrázek 13).



Obrázek 13: Graf nárůstu procentuálního zastoupení degradovaného dibloku DB-H2 v čase se znázorněným poločasem rozpadu

Pro ověření případného vlivu komonomerních jednotek na stabilitu esterové vazby spojující jednotlivé bloky byla provedena hydrolytická stabilita kopolymeru DB-K1 před a po odchránění hydrazidových skupin. V případě DB-K1 před odchráněním

byl poločas rozpadu 12 hodin, pro diblokový systém DB-K1 po odchránění, tedy s volnými hydrazidovými skupinami, bylo dosaženo poločasu rozpadu po 15 hodinách. Dále byla také zkoumána hydrolytická stabilita dibloku s navázaným docetaxelem a byl tak přiblížen vliv navázaného léčiva na stabilitu celého systému. Pro DB-K1-PYR-DTX byl poločas rozpadu 20 hodin. Srovnání rychlosti hydrolytického štěpení DB-K1 před a po odchránění a dibloků s navázaným docetaxelem je znázorněno na obrázku 14. Před a také po měření byla provedena kontrola hodnoty pH měřeného roztoku.



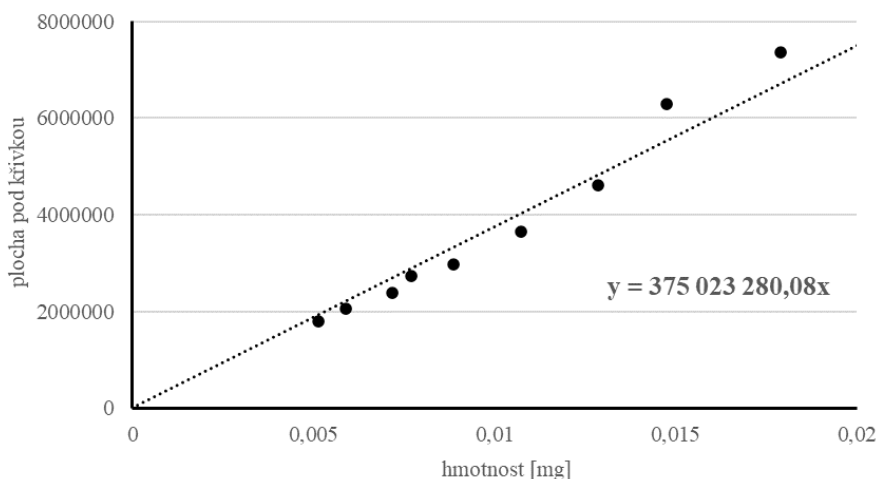
Obrázek 14: Graf nárůstu procentuálního zastoupení degradovaného dibloku DB-K1 před, po odchránění hydrazidových skupin a s navázaným léčivem v čase, se znázorněným poločasem rozpadu systému

4.3.2 Rychlost uvolňování derivátu léčiva z lineárních konjugátů

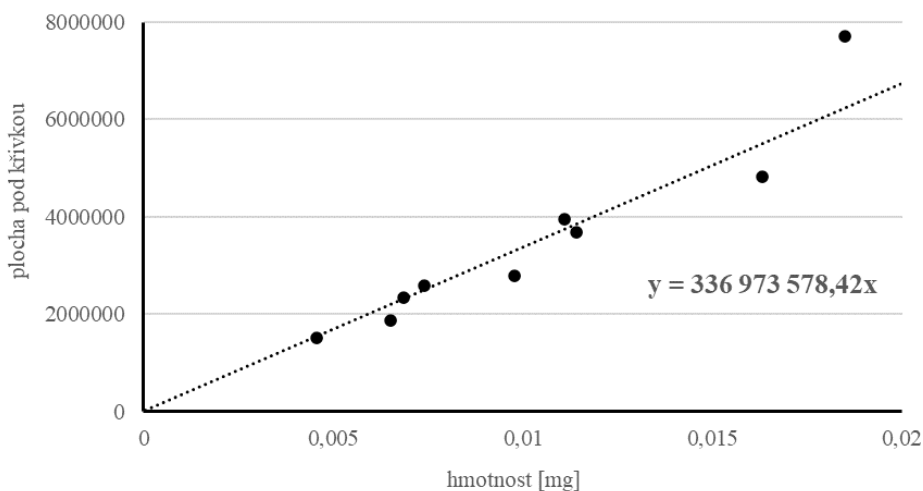
Rychlost uvolňování derivátu léčiva z polymeru byla vyhodnocována pomocí HPLC. Aby bylo možné kvantifikovat naměřená data, byla nejprve stanovená kalibrace pro studované deriváty s PYR a MeOHe. Stanovené kalibrace jsou zobrazeny na obrázku 15 a obrázku 16 (str. 41). Následně byly pomocí HPLC zjištěny plochy pod křivkou, které odpovídaly danému derivátu a následným dosazením do kalibrační rovnice bylo určeno uvolněné množství příslušného derivátu.

Z připravených lineárních konjugátů LN1-MeOHe-DTX a LN1-PYR-DTX byla demonstrována rychlost uvolnění derivátů MeOHe-DTX nebo PYR-DTX v modelovém prostředí krevního řečiště a prostředí lysozomů uvnitř nádorové buňky (0,3M fosfátový

pufr o pH 7,4 a pH 5,0). Pro každý konjugát byly připraveny uvolňovací řady ve všech demonstrujících pH a v rozmezí od 0,5 h do 48 h byly vzorky inkubovány při teplotě 37 °C. Po daném čase byl do roztoku přidán přesně definovaný objem chloroformu a uvolněný derivát následně vytřepán do organické fáze, tato fáze byla odpařena, vzorek rozpuštěn v MeOH a analyzován pomocí HPLC.

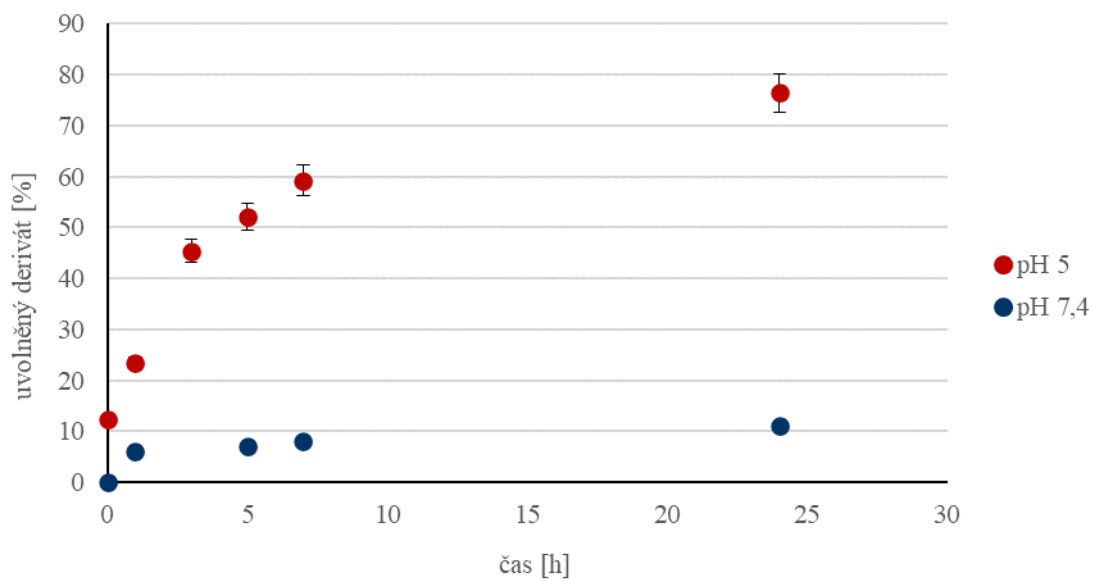


Obrázek 15: Kalibrační křivka pro derivát PYR DTX

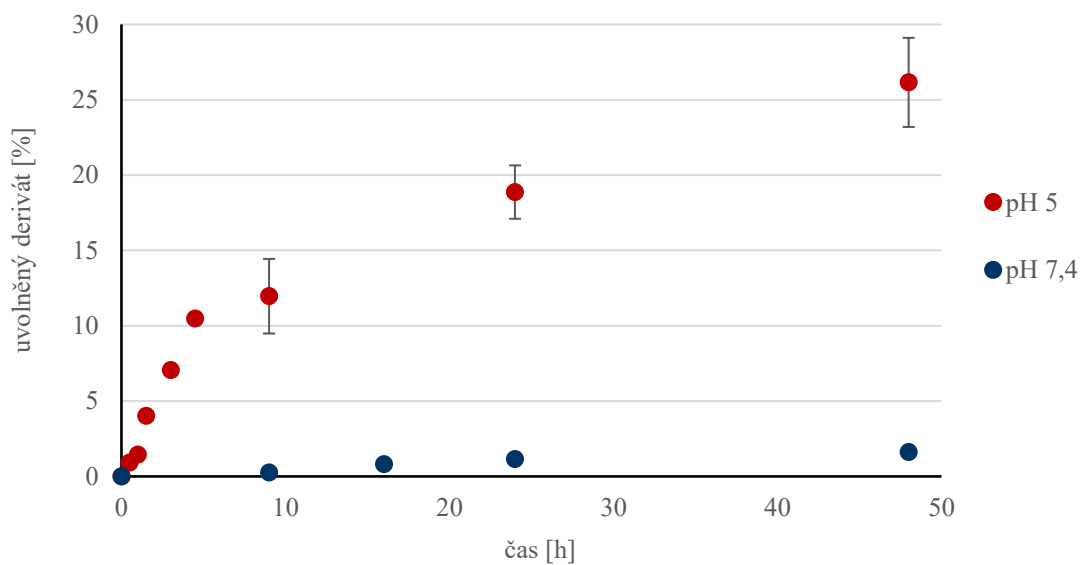


Obrázek 16: Kalibrační křivka pro derivát MeOHe DTX

Ze získaných dat byly následně sestaveny grafy porovnávající rychlosti uvolnění derivátu MeOHe-DTX a PYR-DTX z lineárního polymeru (viz obrázek 17 a 18, str. 42). Je tak možné konstatovat, že v případě pH 5,0 se derivát uvolňuje výrazně rychleji než v pH 7,4. Při porovnání grafů navzájem je také patrné, že rychlosti uvolnění závisí na použitém typu oxokyseliny při modifikaci DTX.



Obrázek 17: Graf porovnání rychlosti uvolňování derivátu MeOHe-DTX z lineárního polymeru v pH 5 a 7,4



Obrázek 18: Graf porovnání rychlosti uvolňování derivátu PYR-DTX z lineárního polymeru v pH 5 a 7,4

4.4 Studie *in vitro*

Studium cytotoxicity bylo prováděno na kultuře buněk DLD-1. Při provádění experimentu bohužel došlo k technickým problémům s používaným médiem. Výrobce byla dodaná špatná šarže, ve které docházelo jen k minimální proliferaci buněk a nemohlo tak být dosaženo správných výsledků. Byla tak navázána spolupráce s laboratoří na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, kde mohla být provedena studie *in vitro* na buňkách CT26 (buněčná linie myšího karcinomu tlustého střeva) a EL4 (buňky T-buněčného lymfomu). Inhibice proliferace nádorových buněk je vyjádřena jako IC50, tedy koncentrace použitého vzorku (DTX nebo jeho ekvivalentu v derivátu nebo polymerním konjugátu), která inhibovala proliferaci buněk o 50 %. Výsledné hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a jsou spolu se směrodatnou odchylkou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Hodnoty IC50 změřené na dvou buněčných koloniích pro samotný docetaxel, jeho derivát s MeOHe a polymerní konjugát

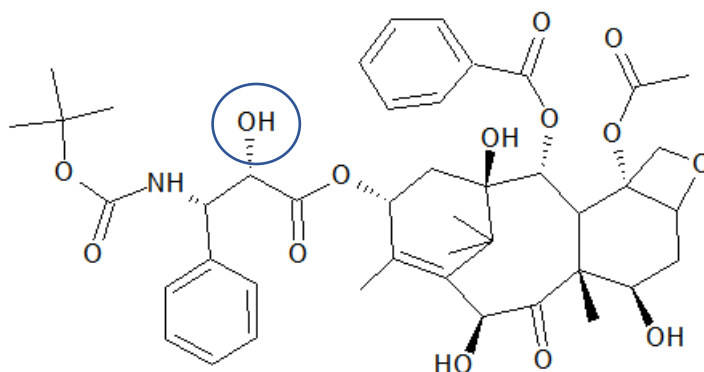
použité buňky	přidaný vzorek	IC50 [nM]
CT26	DTX	27 ± 8,5
	MeOHe-DTX	53 ± 3,5
	LN1-MeOHe-DTX	78 ± 12
EL4	DTX	2,3 ± 0,01
	MeOHe-DTX	7,7 ± 0,24
	LN1-MeOHe-DTX	17 ± 0,76

5 DISKUZE

V následujících podkapitolách budou diskutovány výsledky získané během vypracování této práce. Všechny diskutované výsledky jsou zmíněny v předchozí kapitole.

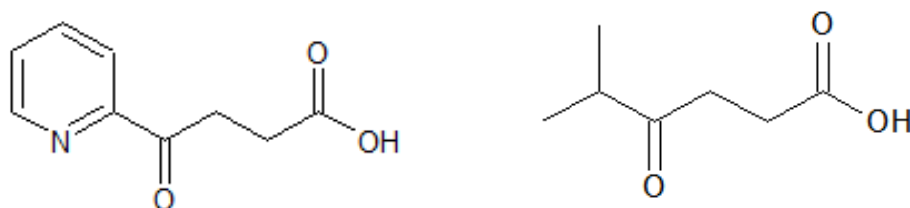
5.1 Syntéza a charakterizace derivátů docetaxelu

Léčivo docetaxel ve své struktuře neobsahuje žádnou ketoskupinu, která by mohla být použita k navázání léčiva hydrazonovou vazbou na polymerní prekurzor. Z tohoto důvodu muselo být léčivo derivatizováno pomocí vybraných oxokyselin. Modifikací hydroxylové skupiny znázorněné na obrázku 19 byly připraveny deriváty DTX vhodné pro navázání pomocí pH-senzitivní hydrazinové vazby na polymer.



Obrázek 19: Struktura docetaxelu se znázorněnou hydroxylovou vazbou využitou při navázání na oxokyseliny a vytvoření derivátu

Pro tuto práci byly vybrány dvě oxokyseliny s rozdílnou strukturou (viz obrázek 20). Karboxylová skupina oxokyselin byla použita pro navázání léčiva esterovou vazbou. Zavedená ketoskupina byla následně použita k navázání derivátů DTX na polymerní prekurzory hydrazonovou vazbou. Zásadním rozdílem v oxokyselinách PYR a MeOHe je, že oxokyselina PYR obsahuje v alfa poloze ke ketoskupině aromatický, pyridinový, kruh, kdežto spojka MeOHe jen alifatický isopropyl. Aromatické okolí



Obrázek 20: Struktura oxokyseliny PYR (vlevo) a MeOHe (vpravo) použitých pro derivatizaci docetaxelu

hydrazonové vazby by mělo dle literatury stabilizovat vzniklou hydrazonovou vazbu mezi derivátem léčiva a polymerem [45]. Naopak MeOHe je alifatickou oxokyselinou, která by neměla hydrazonovou vazbu stabilizovat. Tento rozdíl by měl mít hlavní vliv na rychlost uvolňování derivátu z polymerního prekurzoru a bude více přiblížen v kapitole 5.4 (str. 51).

Reakce oxokyselin s DTX byla sledována pomocí HPLC. Po 18 h bylo v případě derivátu PYR-DTX odreagováno 77 %, reakce derivátu MeOHe-DTX odreagovala z 62 %. Vedle požadovaného produktu ovšem dochází i k mírné modifikaci ostatních hydroxylových skupin na molekule docetaxelu. Kvůli této nechtěné modifikaci bylo nutné výsledný derivát vyčistit pomocí FLASH kolonové chromatografie. Výsledkem byl čistý produkt PYR-DTX, který byl získán v množství 211 mg (34 %) a MeOHe-DTX, který byl získán v množství 170 mg (40 %). Čistota a struktura finálního produktu byla potvrzena pomocí HPLC a MS. Nízký výtěžek reakce byl nejspíše zapříčiněn vysokými ztrátami produktu v procesu čištění.

V porovnání s výsledky publikovanými v práci T. Etrycha a spol. [7], kde byly syntetizovány obdobné deriváty docetaxelu s jinými oxokyselinami, bylo v předkládané práci dosaženo větší čistoty ovšem s nižšími výtěžky.

5.2 Syntéza a charakterizace polymerních systémů

Řízená radikálová RAFT polymerizace byla aplikována pro přípravu všech polymerních prekurzorů popisovaných v této práci. Strukturálních odlišností bylo dosaženo použitím rozdílných přenosových činidel. Pro syntézu lineárního kopolymeru bylo pro reakci použito přenosové činidlo CTA. V případě diblokových homopolymerů a kopolymeru byly použity dvě bifunkční přenosová činidla CTA-1 a CTA-2, jejichž vliv na přípravu diblokových polymerních systémů byl dále studován.

5.2.1 Polymerní prekurzory

Cílem práce bylo připravit biodegradovatelné polymerní systémy, které po splnění své úlohy spočívající v dopravě docetaxelu, budou degradovatelné na polymerní štěpy a vylučitelné glomerulární filtrací.

V případě lineárního prekurzoru bylo cílem připravit polymerní prekurzor s molární hmotností pod $50\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a hydrodynamickým průměrem polymerního klubka v rozmezí 8–10 nm. Při dosažení této velikosti je dle publikovaných výsledků potvrzeno, že polymerní prekurzor splňující tyto limity je snadno vylučitelný pomocí glomerulární filtrace ven z organismu a nedochází tak k dlouhodobému ukládání tohoto nosiče v těle [14].

Při syntéze lineárního prekurzoru se podařilo připravit prekurzor, který má molární hmotnost před odstraněním TtC skupin $42\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Po reakci s nadbytkem AIBN byly tyto skupiny odstraněny, a nedošlo ke změně molární hmotnosti polymerního prekurzoru ($41\,800\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Po termickém odchránění hydrazidových skupin opět nedošlo ke změně molární hmotnosti lineárního prekurzoru ($41\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Polymerní prekurzor i po odstranění TtC a Boc skupin měl nízkou disperzitu (1,1) a hydrodynamický poloměr polymerního klubka byl 4,1 nm, tedy pod limitem renální filtrace. Teoretická molární hmotnost spočtená z molárních hmotností příslušných monomerních jednotek a použitého molárního poměru monomerů : přenosovému činidlu při 100% konverzi je $44\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Díky souladu teoretické a stanovené molární hmotnosti a nízké disperzitě lze konstatovat, že jde opravdu o řízenou polymerizaci.

Dalším krokem byla příprava diblokových systémů, které by měly mít dvojnásobnou molární hmotnost oproti kontrolnímu lineárnímu prekurzoru.

Při syntéze diblokových systémů se úspěšně podařilo syntetizovat dva homopolymerní dibloky DB-H1 a DB-H2 s využitím přenosových činidel CTA-1 a CTA-2. Tyto systémy dále sloužily ke studiu hydrolytické stability (viz podkapitola 5.3, str. 49). Molární hmotnosti připravených homopolymerů jsou uvedeny v tabulce 13 a odpovídají vypočtené teoretické molární hmotnosti.

Tabulka 13: Přehled molárních hmotností a disperzit dibloků a jejich rozštěpených jednotek

systém	M_t [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	M_n [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	\bar{D}	$M_{n/2}$ [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	$\bar{D}_{1/2}$
DB-H1	114 500	100 000	1,0	40 000	1,1
DB-H2	114 500	120 000	1,1	61 000	1,2
DB-K1	100 800	95 200	1,3	50 000	1,1

M_t – teoretická M_n při 100% konverzi

Dále byl úspěšně syntetizován diblokový kopolymer, který sloužil primárně pro navázání docetaxelu, ale také ke studiu hydrolytické stability. V případě tohoto kopolymeru bylo nutné odstranit TTc skupiny a následně odchránit hydrazidové skupiny, které v dalším kroku slouží pro navázání léčiva. Odstranění TTc skupin nemělo vliv na molární hmotnost diblokového kopolymeru. Chránící Boc skupina musela být v případě diblokových systémů odstraněna pomocí kyseliny trifluoroctové. Termicky katalyzovaná hydrolýza chránící skupiny (100 °C, 40 minut) způsobila rozštěpení esterové vazby, a tak rozpadnutí diblokového systému. Provedením reakce s TFA (TFA, 5 minut) k nežádoucímu štěpení esterové vazby nedocházelo. Výtěžek této reakce dosahoval 85 % a molární hmotnost diblokového prekurzoru mírně narostla na hodnotu 95 200 g·mol⁻¹. Tato molární hmotnost odpovídala teoreticky stanovené molární hmotnosti. Molární hmotnosti diblokových systémů a spočtené teoretické molární hmotnosti jsou shrnuty v tabulce 13 (str. 47).

Po provedení totální hydrolýzy dibloku vznikaly dva téměř monodisperzní polymerní řetězce s poloviční molární hmotností (viz tabulka 13, str. 47). To dokazuje, že jde opravdu o řízenou polymerizaci diblokového systému jak s přenosovým činidlem CTA-1, tak i s CTA-2. Z charakterizace diblokových homopolymerů syntetizovaných s využitím nových přenosových činidel CTA-1 a CTA-2 je patrné, že jsou tato činidla vhodná pro polymerizaci HPMA. Syntetizované kopolymery mohou tak díky svým výsledkům sloužit k navázání derivátu léčiva a vytvoření finálního konjugátu.

5.2.2 Polymerní konjugáty

Připravené kopolymery byly použity jako nosiče léčiva DTX, respektive jeho derivátu. Z léčiva se navázáním na polymerní nosič stala neaktivní forma, která tak při dopravování k nádoru působí jen minimálně na buňky zdravé tkáně, na rozdíl od samotného volného – aktivního léčiva. Pro navázání léčiva na polymerní nosič byly využity odchráněné hydrazidové skupiny kopolymeru, které mohly reagovat s keto skupinou oxokyselinou derivátu léčiva a vytvořit tak hydrazonovou vazbu, která je labilní v prostředí s pH 5,0.

Lineární polymerní konjugáty

Ze syntetizovaného lineárního prekurzoru LN1 byly připraveny dva konjugáty LN1-PYR-DTX a LN1-MeOHe-DTX, které se lišily použitou oxokyselinou, která sloužila jako spojka mezi léčivem a polymerním řetězcem. Lineární prekurzor LN1

obsahoval 6,1 mol% hydrazidových skupin, na které mohl být navázán derivát léčiva. V případě derivátu PYR-DTX bylo nasazeno do reakce 13 hm% tohoto derivátu. Pro konjugát s oxokyselinou MeOHe bylo v násadě 12 hm% derivátu MeOHe-DTX. Syntézy polymerních konjugátů byly sledovány pomocí HPLC. Po odreagování většiny derivátu léčiva, byl finální produkt čištěn od nezreagovaného nízkomolekulárního léčiva pomocí kolonové chromatografie (LH20, MeOH) a následně byl stanoven obsah léčiva navázaného na lineárním prekurzoru. V případě LN1-PYR-DTX polymerní konjugát obsahoval 12 hm% (2 mol%) derivátu léčiva a navázalo se tak 92 % derivátu z násady. Polymerní konjugát LN1-MeOHe-DTX obsahoval pouze 7 hm% (1,2 mol%) derivátu léčiva což odpovídá 58 % derivátu z násady. Z výsledků je patrné, že efektivita vazby s derivátem PYR-DTX je vyšší, než při reakci s MeOHe-DTX.

Cílem této práce bylo připravit vodorozpustné polymerní konjugáty, které by neztratily svou vodorozpustnost ani po navázání hydrofobního léčiva. Z tohoto důvodu bylo při syntéze lineárního prekurzoru do reakce nasazeno jen 8 mol% hydrazidových skupin. Toto množství hydrazidových skupin je zárukou zachování vodorozpustnosti polymerních konjugátů. Lineární prekurzor LN1 obsahoval po polymerizaci 6,1 mol% hydrazidových skupin, a tedy v případě lineárního konjugátu LN1-PYR-DTX byla derivátem léčiva obsazena jedna třetina (2 mol%) volných hydrazidových skupin. V případě konjugátu LN1-MeOHe-DTX byla derivátem obsazena pouze šestina volných hydrazidových skupin. Nízké množství navázaného derivátu mohlo být způsobeno přítomností vody v rozpouštědle, díky které během vazby derivátu zároveň docházelo k jeho štěpení.

Vzhledem k dostatečnému množství volných hydrazidových skupin na polymerním řetězci, by mělo být možné v budoucnosti navázání i většího množství MeOHe-DTX.

Diblokové polymerní konjugáty

Připravený diblokový prekurzor DB-K1 primárně sloužil k navázání dvou derivátů léčiva hydrazonovou vazbou. Vzhledem k nižšímu množství hydrazidových skupin, 4,6 mol%, bylo do reakce nasazeno jen 8 hm% derivátu PYR-DTX a taktéž 8 hm% derivátu MeOHe-DTX. Po reakci polymerního prekurzoru s deriváty DTX byly vytvořeny dva diblokové konjugáty DB-K1-PYR-DTX a DB-K1-MeOHe-DTX, které se lišily použitou oxokyselinou mezi léčivem a polymerním řetězcem.

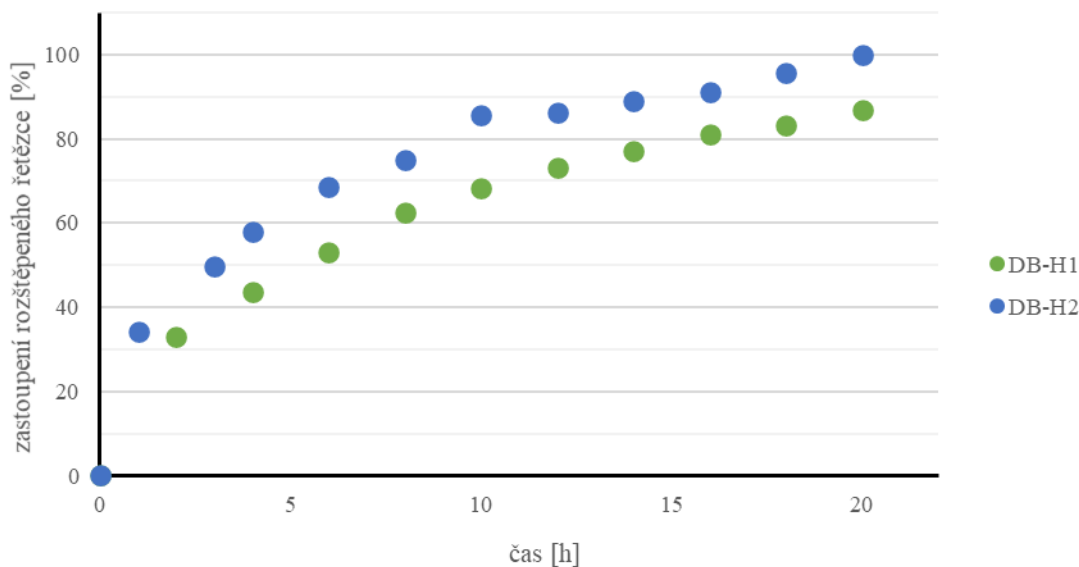
Obsah navázaného derivátu léčiva byl stanoven pomocí HPLC. V případě obou konjugátů, DB-K1-PYR-DTX a DB-K1-MeOHe-DTX, byly navázány 3 hm% (0,5 mol%) derivátu léčiva, což představuje 37,5 % derivátu z násady. Nezareagované deriváty léčiva byly odstraněny za využití kolonové chromatografie (LH20, MeOH).

Nízký obsah navázaného derivátu léčiva byl nejspíše způsoben vysokým podílem TFA v polymerním prekurzoru, která byla použita k ochránění hydrazidových skupin polymerního prekurzoru a následně nedostatečně odstraněna. Teorie podílu TFA byla ověřena rozpuštěním polymerního prekurzoru s volnými hydrazidovými skupinami v pufru o pH 7,4 a následným změřením hodnoty pH roztoku, které pokleslo na hodnotu 7,1. Lze tak předpokládat, že během syntézy polymerního konjugátu a následného čištění mohlo docházet ke štěpení hydrazonové vazby což vedlo k nízkému množství navázaného derivátu DTX. Vzhledem k přítomnosti malého množství vody jak v ledové kyselině octové, tak v polymeru, je tato možnost štěpení v okyselené reakční směsi vysoce pravděpodobná. Nežádoucí vliv kyseliny trifluoroctové na obsah navázaného derivátu byl již nad rámec této práce a nebyl dále řešen samostatně.

5.3 Hydrolytická stabilita diblokových systémů

Diblokové systémy díky své velikosti kolují déle krevním řečištěm, je ovšem nutné, aby také po vyložení svého nákladu docetaxelu byly vyloučeny pomocí glomerulární filtrace z organismu. Vyloučení je dosaženo díky rozštěpení esterových vazeb použitých přenosových činidel, z kterých se rozrůstají dva řetězce. Právě tyto estery, labilní v pH 7,4 simulující krevní řečiště, se v tomto prostředí štěpí a z diblokového systému se tak stávají dva lineární řetězce s předurčením pro snadné vyloučení z organismu.

V této práci byla zkoumána hydrolytická stabilita dvou diblokových homopolymerů a následně diblokového kopolymeru, u kterého bylo z důvodu vyšší stability využito CTA-1. U připravených homopolymerů byl studován hlavně vliv okolí zmíněné esterové vazby dvou rozdílných přenosových činidel CTA-1 a CTA-2 (viz obrázek 21, str. 50), z toho důvodu byly také syntetizovány právě homopolymery.



Obrázek 21: Porovnání rychlosti hydrolytického štěpení homopolymerů DB-H1 a DB-H2

Poločas rozpadu homopolymeru DB-H1 (viz obrázek 12, str. 39) je dle získaných dat 5 h, oproti homopolymeru DB-H2 (viz obrázek 13, str. 39), jehož poločas rozpadu činí 2,5 h je tak o polovinu pomalejší, a tedy také stabilnější. Vysvětlením větší stability homopolymeru DB-H1 by mohlo být okolí esterové vazby. Konkrétně methylové skupiny v blízkosti esterové vazby na CTA-1 by mohly vlivem svého kladného indukčního efektu podpořit hydrolytickou stabilitu esterové vazby.

Pro ověření případného vlivu komonomerních jednotek na hydrolytickou stabilitu esterového dibloku byl připraven kopolymer DB-K1 pomocí CTA-1 a také konjugát s navázaným docetaxelem DB-K1-PYR-DTX. Rozdíl poločasu rozpadu kopolymeru s chráněnými a odchráněnými hydrazidovými skupinami je nejspíše zapříčiněn špatným čištěním po odchránění hydrazidových skupin. Před i po měření hydrolytické stability byly měřeny hodnoty pH roztoku polymerního nosiče. Před měřením byla hodnota pH 7,4, jak by tomu skutečně mělo být. Naopak po 24 hodinách měření hydrolytické stability došlo ke snížení hodnoty pH na 7,2–7,1. Tento pokles pH byl nejspíš zapříčiněn právě zbytkem TFA použité při odchránění hydrazidových skupin a následným špatným čištěním. Možností poklesu pH během hydrolytické stability mohla být i kontaminace pufru a přítomnost bakterií. Snížená hodnota pH mohla způsobit zpomalení procesu hydrolýzy studovaných kopolymerů.

Polymerní konjugát s navázaným léčivem má poločas rozpadu nejvyšší. V tomto případě bylo také měřeno pH roztoku a opět docházelo po 24 hodinách k jeho mírnému poklesu. Vyšší hydrolytická stabilita konjugátu by také mohla být způsobena přítomností hydrofobního léčiva.

Vzhledem k tomu, že měření probíhalo za statických podmínek, bez míchání roztoku i bez průběžného odstraňování degradovaného produktu, jak by k tomu nejspíše docházelo v organismu. Hydrolyza diblokového systému bude v živém organismu nejspíše probíhat rychleji.

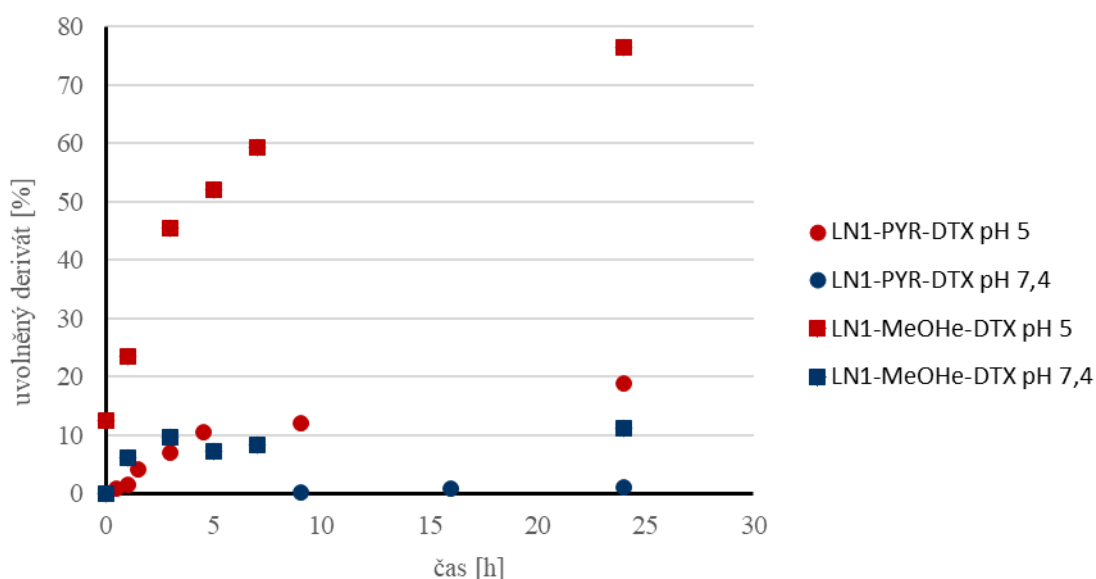
5.4 Rychlost uvolňování léčiva

V případě lineárních konjugátů byla sledována rychlost uvolňování derivátu docetaxelu z polymeru pomocí HPLC. Pro uvolňování byly použity roztoky 0,3 M fosfátového pufru o rozdílných pH, simulujících jednotlivá prostředí, kde se bude polymerní konjugát nacházet při dopravování léčiva. Konkrétně prostředí krevního řečiště (pH 7,4) a místo přímo v nádorové buňce (pH 5,0). Hydrazonová vazba spojující derivát s polymerem je labilní v pH 5,0, jak znázorňuje i obrázek 22 (str. 52), v obou případech, je rychlost uvolnění derivátu (MeOHe-DTX či PYR-DTX) viditelně vyšší při pH 5,0 než při pH 7,4. Takového chování je pak předpokládáno v modelovém příkladu, kdy se derivát uvolní až v pH 5,0 v nádorové buňce, a tak minimálně zasáhne zdravou tkáň organismu.

V případě uvolňování v pH 7,4, je rychlost uvolnění derivátu výrazně nižší. Po 24 hodinách dochází k uvolnění maximálně kolem 10 %. Je ovšem předpokládáno, že po této době bude polymer vyloučen z těla díky jeho velikosti viz. podkapitola 5.2.1 (str. 45) a na zdravé tkáni bude působit jen minimální množství modifikovaného cytostatika.

Při porovnání lineárních konjugátů mezi sebou je patrné, že rozdílné struktury použitých oxokyselin MeOHe a PYR při derivatizaci docetaxelu mají určitý vliv na uvolňování derivátu z polymeru. V případě modifikace oxokyselinou PYR, probíhá uvolnění pomaleji. Oxokyselina PYR obsahuje ve své struktuře aromatický kruh, který tak stabilizuje hydrazonovou vazbu výrazně víc než oxokyselina MeOHe, která je alifatická. Pro srovnání slouží obrázek 22 (str. 52), na kterém je patrné, že po 24 hodinách v pH 5,0 se v případě konjugátu s docetaxelem navázaným přes PYR uvolnilo necelých

20 %. U druhého konjugátu s DTX navázaným přes alifatickou MeOHe je po 24 hodinách v pH 5,0 uvolněno už téměř 80 % derivátu.



Obrázek 22: Porovnání rychlosti uvolňování derivátu léčiva z jednotlivých konjugátů v pH 5 a 7,4

5.5 Studie *in vitro*

Ve spolupráci s laboratoří Mikrobiologického ústavu AV ČR, bylo provedeno měření cytotoxicity pro docetaxel, derivát docetaxelu s MeOHe a také pro lineární konjugát s derivátem MeOHe-DTX. Experiment byl prováděn na dvou typech buněčných linií (EL4 a CT26). Bylo zjištěno, že nejvyšší toxicitu z testovaných látek má volný docetaxel. V případě derivátu léčiva MeOHe-DTX byla zjištěna cytotoxicita mírně nižší na obou typech nádorových buněk než u volného docetaxelu. Toto dvou až třináásobné snížení toxicity přisuzujeme použité derivatizaci léčiva, která byla nutná pro jeho vazbu na polymerní systém. Nicméně můžeme konstatovat, že i po derivatizaci je MeOHe-DTX vysoce aktivním protinádorovým léčivem. Můžeme tedy předpokládat, že při uvolnění derivátu léčiva z polymerního řetězce v nádorových buňkách, bude derivát léčiva účinný velmi podobně, jako volný docetaxel. Nejnižší cytotoxická aktivita na obou typech buněk byla stanovena pro samotný polymerní konjugát. Pokles cytotoxicity pro nádorové buňky přisuzujeme různému mechanismu vstupu léčiv do nádorových buněk. Při procesu vniknutí jednotlivých látek do buňky přes membránu se uplatňuje v případě docetaxelu jako nízkomolekulárního léčiva volná difúze, tedy průnik po koncentračním spádu, který je dán vyšší koncentrací docetaxelu vně buňky a nižší koncentrací uvnitř. Pro konjugát

ovšem nastává odlišná situace. Zvýšená velikost zabraňuje konjugátu procházet přes membránu jednoduchou difúzí a uplatňuje se zde tzv. endocytóza, která je významně pomalejším procesem než samotná difúze. Polymerní konjugát musí být nejprve endocytován, kde buď již v endosomu nebo v sekundárním lysozomu dochází k uvolnění léčiva, které může prokázat protinádorový efekt. Nicméně můžeme konstatovat, že polymerní konjugát má i přes mírně zvýšenou hodnotu IC50 proti samotnému původnímu léčivu dostatečnou cytotoxickou aktivitu pro navazující detailní testování.

Pro detailnější studii chování těchto protinádorových nosičů v organismu bude klíčová studie *in vivo*, která proběhne v rámci další spolupráce.

6 ZÁVĚR

V práci byly úspěšně syntetizovány řízenou raftovou polymerací dva nové diblokové polymerní systémy, vhodné pro dopravu cytostatik do nádorové tkáně. Bylo prokázáno, že nové systémy mají větší hydrodynamický poloměr, tudíž by mohly být akumulovány do vyšší míry v nádorové tkáni. Zároveň obsahují degradovatelné sekvence, které umožňují jejich degradaci po splnění úkolu spočívajícího v dopravě cytostatika na degradační produkty vylučitelné jednoduše glomerulární filtrací z organismu. Tato vlastnost by měla umožnit vysokou nádorovou akumulaci a snížit nežádoucí dlouhodobou akumulaci ve zdravých částech organismu. Také byla stanovena hydrolytická stabilita připravených systémů v prostředí modelující krevní řečiště. Vzhledem k vysoké labilitě systémů syntetizovaných pomocí CTA-2, které dosahovaly poločasu rozpadu již po 2,5 hodinách, byl jako vhodnější systém pro biologické aplikace vybrán diblokový systém syntetizovaný pomocí CTA-1.

Dále bylo úspěšně modifikováno léčivo docetaxel pomocí dvou oxokyselin, konkrétně oxokyseliny MeOHe a PYR, a takto modifikované léčivo bylo v dalším kroku úspěšně navázáno na připravené polymerní prekurzory.

V práci byly úspěšně syntetizovány polymerní konjugáty obou derivátů léčiva pomocí kontrolního lineárního polymerního prekurzoru LN1 a následně za využití diblokového prekurzoru DB-K1. Připravené konjugáty LN1-MeOHe-DTX a LN1-PYR-DTX byly následně použity na studium rychlosti uvolňování léčiva. Bylo prokázáno, že PYR stabilizuje hydrazonovou vazbu a díky tomu zpomaluje rychlost uvolňování léčiva v obou studovaných pH. Polymerní konjugát LN1-MeOHe-DTX vykazoval výrazně rychlejší uvolňování polymerního derivátu. V pH 5,0 bylo dosaženo 60 % uvolněného léčiva již po 7 hodinách, v neutrálním pH vykazoval konjugát LN1-MeOHe-DTX vyšší stabilitu a nebylo detekováno více než 10 % uvolněného derivátu během 24 hodin.

Rovněž byla provedena studie *in vitro*, ve které byla prokázána mírně vyšší cytotoxicita docetaxelu v porovnání s polymerním konjugátem. Bylo zároveň ověřeno, že derivát léčiva má hodnotu IC₅₀ velmi blízko volnému docetaxelu a dá se tak předpokládat, že po uvolnění z polymerního řetězce bude derivát docetaxelu téměř stejně účinný jako samotný docetaxel.

V předkládané práci tak byly splněny všechny dílčí cíle této práce. Úspěšně byly připraveny degradovatelné vysokomolekulární vodorozpustné polymerní konjugáty s deriváty protinádorového léčiva docetaxelu. Tyto polymerní systémy jsou navrženy pro zvýšenou akumulaci v nádorové tkáni následovanou uvolněním aktivního léčiva. Po splnění této nosičové úlohy je navržený polymerní systém připravený pro navazující degradaci na polymerní degradační produkty vylučitelné z organismu. Detailní studie protinádorové účinnosti bude provedena v brzké budoucnosti. Předpokládá se, že tento polymerní systém vykáže významně vylepšený terapeutický efekt v porovnání s volným léčivem nebo předchozími generacemi polymerních systémů pro dopravu léčiv.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Worldwide cancer data* [online]. 2018 [vid. 2021-06-05]. Dostupné z: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>
- [2] *cytostatikum* [online]. [vid. 2020-10-31]. Dostupné z: <http://www.olecich.cz/slovník/cytostatikum>
- [3] SLÍVA, Jiří a Martin VOTAVA. *Farmakologie*. Praha: Triton, 2010. ISBN 978-80-7387-424-7.
- [4] SIDDIK, Zahid H. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* [online]. 2003, **22**(47 REV. ISS. 6), 7265–7279. ISSN 09509232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1206933
- [5] KLENER, Pavel a Pavel KLENER JR. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010. ISBN 978-80-247-2808-7.
- [6] LONGLEY, Daniel B., D. Paul HARKIN a Patrick G. JOHNSTON. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2003, **3**(5), 330–338. ISSN 1474175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc1074
- [7] ETRYCH, Tomáš, Jiří STROHALM, Milada ŠÍROVÁ, Barbora TOMALOVÁ, Jan ROSSMANN, Blanka ŘÍHOVÁ, Karel ULBRICH a Marek KOVÁŘ. High-molecular weight star conjugates containing docetaxel with high anti-tumor activity and low systemic toxicity in vivo. *Polymer Chemistry* [online]. 2015, **6**(1), 160–170. ISSN 17599962. Dostupné z: doi:10.1039/c4py01120a
- [8] MEREDITH, Ann Marie a Crispin R. DASS. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2016, **68**(6), 729–741. ISSN 20427158. Dostupné z: doi:10.1111/jphp.12539
- [9] *doxorubicin TEVA* [online]. [vid. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0139063>
- [10] THE AMERICAN CANCER SOCIETY MEDICAL AND EDITORIAL

- CONTENT TEAM. *How Chemotherapy Drugs Work* [online]. 2019 [vid. 2020-10-28]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8418.00.pdf>
- [11] HRUBÝ, Martin, Jan KUČKA, Ján KOZEMPEL a Ondřej LEBEDA. Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*. 2006, 10–16.
- [12] DE GROOT, Anne S. a David W. SCOTT. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in Immunology* [online]. 2007, **28**(11), 482–490. ISSN 14714906. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2007.07.011
- [13] SHIAH, Jane Guo, M. DVOŘÁK, Pavla KOPEČKOVÁ, Yongen SUN, C. Matthew PETERSON a Jindřich KOPEČEK. Biodistribution and antitumour efficacy of long-circulating N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-doxorubicin conjugates in nude mice. *European Journal of Cancer* [online]. 2001, **37**(1), 131–139. ISSN 09598049. Dostupné z: doi:10.1016/S0959-8049(00)00374-9
- [14] ETRYCH, Tomáš, Vladimír ŠUBR, Jiří STROHALM, Milada ŠÍROVÁ, Blanka ŘÍHOVÁ a Karel ULBRICH. HPMa copolymer-doxorubicin conjugates: The effects of molecular weight and architecture on biodistribution and in vivo activity. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **164**(3), 346–354. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.029
- [15] YANG, Jiyuan a Jindřich KOPEČEK. Design of smart HPMa copolymer-based nanomedicines. *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, **240**, 9–23. ISSN 18734995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.10.003
- [16] HWANG, Duhyeong, Jacob D. RAMSEY a Alexander V. KABANOV. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2020. ISSN 18728294. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2020.09.009
- [17] BRAUNOVÁ, Alena, Libor KOSTKA, Ladislav SIVÁK, Lucie CUCHALOVÁ, Zuzana HVĚZDOVÁ, Richard LAGA, Sergey FILIPPOV, Peter ČERNOCH, Michal PECHAR, Olga JANOUŠKOVÁ, Milada ŠÍROVÁ a Tomáš ETRYCH.

- Tumor-targeted micelle-forming block copolymers for overcoming of multidrug resistance. *Journal of Controlled Release* [online]. 2017, **245**, 41–51. ISSN 18734995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.11.020
- [18] HOUDAIHED, Loujin, James C. EVANS a Christine ALLEN. Overcoming the Road Blocks: Advancement of Block Copolymer Micelles for Cancer Therapy in the Clinic. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2017, **14**(8), 2503–2517. ISSN 15438392. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00188
- [19] RAFIEI, Pedram a Azita HADDADI. Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: Pharmacokinetics and biodistribution profile. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2017, **12**, 935–947. ISSN 11782013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S121881
- [20] ULBRICH, Karel, Kateřina HOLÁ, Vladimír ŠUBR, Aristides BAKANDRITSOS, Jiří TUČEK a Radek ZBOŘIL. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chemical Reviews* [online]. 2016, **116**(9), 5338–5431. ISSN 15206890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00589
- [21] DUNCAN, Ruth a Rogerio GASPAR. Nanomedicine(s) under the microscope. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2011, **8**(6), 2101–2141. ISSN 15438384. Dostupné z: doi:10.1021/mp200394t
- [22] GRECO, Francesca a Maria J. VICENT. Polymer-drug conjugates: Current status and future trends. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2008, **13**(7), 2744–2756. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/2882
- [23] LARSON, Nate a Hamidreza GHANDEHARI. Polymeric conjugates for drug delivery. *Chemistry of Materials* [online]. 2012, **24**(5), 840–853. ISSN 08974756. Dostupné z: doi:10.1021/cm2031569
- [24] PARK, Jae Hyung, Seulki LEE, Jong Ho KIM, Kyeongsoon PARK, Kwangmeyung KIM a Ick Chan KWON. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Progress in Polymer Science (Oxford)* [online]. 2008, **33**(1), 113–137. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.09.003

- [25] ŘÍHOVÁ, Blanka. Polymerní cytostatika. *Vesmír* [online]. 2003, 498–500. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2003/cislo-9/polymerni-cytostatika.html>
- [26] RINGSDORF, Helmut. Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers. *J Polym Sci Polym Symp* [online]. 1975, **153**(51), 135–153. ISSN 0360-8905. Dostupné z: doi:10.1002/polc.5070510111
- [27] PECHAR, Michal a Karel ULBRICH. Polymerní terapeutika u nás a ve světě. *Chemické listy*. 2009, 3–10.
- [28] CHYTIL, Petr, Eva KOZIOLOVÁ, Tomáš ETRYCH a Karel ULBRICH. HPMa Copolymer–Drug Conjugates with Controlled Tumor-Specific Drug Release. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2018, **18**(1), 1–15. ISSN 16165195. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201700209
- [29] ŘÍHOVÁ, Blanka, Jiří STROHALM, Ondřej HOVORKA, Vladimír ŠUBR, Tomáš ETRYCH, Petr CHYTIL, Robert POLA, Dana PLOCOVÁ, Jan BOUČEK a Karel ULBRICH. Doxorubicin release is not a prerequisite for the in vitro cytotoxicity of HPMa-based pharmaceuticals: In vitro effect of extra drug-free GlyPheLeuGly sequences. *Journal of Controlled Release* [online]. 2008, **127**(2), 110–120. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2008.01.003
- [30] MARKOVSKY, Ela, Hemda BAABUR-COHEN, Anat ELDAR-BOOCK, Liora OMER, Galia TIRAM, Shiran FERBER, Paula OFEK, Dina POLYAK, Anna SCOMPARIN a Ronit SATCHI-FAINARO. Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **161**(2), 446–460. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2011.12.021
- [31] VASEY, Paul A., Stan B. KAYE, Rosemary MORRISON, Chris TWELVES, Peter WILSON, Ruth DUNCAN, Alison H. THOMSON, Lilian S. MURRAY, Tom E. HILDITCH, Tom MURRAY, Sally BURTLES, D. FRAIER, E. FRIGERIO a Jim CASSIDY. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2- hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: First member of a new class of chemotherapeutic agents - Drug-polymer conjugates. *Clinical*

Cancer Research. 1999, **5**(1), 83–94. ISSN 10780432.

- [32] BISSETT, D., J. CASSIDY, J. S. DE BONO, F. MUIRHEAD, H. MAIN, L. ROBSON, D. FRAIER, M. L. MAGNÈ, C. PELLIZZONI, M. G. PORRO, R. SPINELLI, W. SPEED a C. TWELVES. Phase I and pharmacokinetic (PK) study of MAG-CPT (PNU 166148): A polymeric derivative of camptothecin (CPT). *British Journal of Cancer* [online]. 2004, **91**(1), 50–55. ISSN 00070920. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bjc.6601922
- [33] MEERUM TERWOGT, Jetske M., Wim W. TEN BOKKEL HUININK, Jan H.M. SCHELLENS, Margaret SCHOT, Ingrid A.M. MANDJES, Maria G. ZURLO, Marurizio ROCCHETTI, Hilde ROSING, Franciska J. KOOPMAN a Jos H. BELJNEN. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel. *Anti-Cancer Drugs* [online]. 2001, **12**(4), 315–323. ISSN 09594973. Dostupné z: doi:10.1097/00001813-200104000-00003
- [34] RADEMAKER-LAKHAI, Jeany M., Catherine TERRET, Stephen B. HOWELL, Christiane M. BAUD, Richard F. DE BOER, Dick PLUIM, Jos H. BEIJNEN, Jan H.M. SCHELLENS a Jean Pierre DROZ. A phase I and pharmacological study of the platinum polymer AP5280 given as an intravenous infusion once every 3 weeks in patients with solid tumors. *Clinical Cancer Research* [online]. 2004, **10**(10), 3386–3395. ISSN 10780432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0315
- [35] ETRYCH, Tomáš, Milada ŠÍROVÁ, L. STAROVOYTOVA, Blanka ŘÍHOVÁ a Karel ULBRICH. HPMa copolymer conjugates of paclitaxel and docetaxel with pH-controlled drug release. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2010, **7**(4), 1015–1026. ISSN 15438384. Dostupné z: doi:10.1021/mp100119f
- [36] ŘÍHOVÁ, Blanka. Směrování cytostatik. *Vesmír* [online]. 2012, 224–225. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2012/cislo-4/smerovani-cytostatik.html>
- [37] ZHONG, Yinan, Fenghua MENG, Chao DENG a Zhiyuan ZHONG. Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromolecules* [online]. 2014, **15**(6), 1955–1969. ISSN 15264602. Dostupné

z: doi:10.1021/bm5003009

- [38] MATSUMURA, Yasuhiro a Hiroshi MAEDA. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research*. 1986, **46**(8), 6387–6392. ISSN 15387445.
- [39] FANG, Jun, Hideaki NAKAMURA a Hiroshi MAEDA. 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* [online]. 2011, **63**(3), 136–151. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2010.04.009
- [40] ULBRICH, Karel a Vladimír ŠUBR. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2004, **56**(7), 1023–1050. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2003.10.040
- [41] REJMANOVÁ, P., J. KOPEČEK, R. DUNCAN a J. B. LLOYD. Stability in rat plasma and serum of lysosomally degradable oligopeptide sequences in N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers. *Biomaterials* [online]. 1985, **6**(1), 45–48. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/0142-9612(85)90037-7
- [42] ULBRICH, K., V. ŠUBR, J. STROHALM, D. PLOCOVÁ, M. JELÍNKOVÁ a B. ŘÍHOVÁ. Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules. I. Synthesis and physico-chemical characterisation. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000, **64**(1–3), 63–79. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(99)00141-8
- [43] ULBRICH, K., T. ETRYCH, P. CHYTIL, M. JELÍNKOVÁ a B. ŘÍHOVÁ. HEMA copolymers with pH-controlled release of doxorubicin: In vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity. *Journal of Controlled Release* [online]. 2003, **87**(1–3), 33–47. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(02)00348-6
- [44] ISHITAKE, Kenji, Kotaro SATOH, Masami KAMIGAITO a Yoshio OKAMOTO. Stereogradient polymers formed by controlled/living radical polymerization of bulky methacrylate monomers. *Angewandte Chemie - International Edition* [online]. 2009, **48**(11), 1991–1994. ISSN 14337851.

Dostupné z: doi:10.1002/anie.200805168

- [45] QUAN, Lingdong, Yijia ZHANG, Bart J. CRIELAARD, Anand DUSAD, Subodh M. LELE, Rijcken CRISTIANNE J. F., Josbert M. METSELAAR, Hana KOSTKOVA, Toma's ETRYCH, Karel ULBRICH, Fabian KIESSLING, Ted R. MIKULS, Wim E. HENNINK, Gert STORM, Twan LAMMERS a Dong WANG. Nanomedicines for In fl ammatory Arthritis: Head-to-Head Comparison of Glucocorticoid-Containing. *ACS Nano*. 2013, **8**(1), 458–466.