

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Lenka Horáková

Enzymem aktivovatelné polymerní sondy pro fluorescenčně navigovanou chirurgii pevných nádorů

Enzyme-triggered polymer probes for fluorescence-guided
surgery of solid tumors

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Tomáš Etrych, Ph.D., DSc.

Školitel specialista: Ing. Michal Pechar, CSc.

PRAHA 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci vypracovala samostatně a použila výhradně uvedené citované prameny, literaturu a další odborné zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby má bakalářská práce byla používána ke studijním účelům. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne.....

Podpis:

Lenka Horáková

Poděkování

Mé poděkování patří hlavně Ing. Michalu Pecharovi, CSc. a RNDr. Tomáši Etrychovi, Ph.D., DSc. za trpělivost a laskavé přijetí na Ústav makromolekulární AV ČR. Dále děkuji Mgr. Tereze Krunclové za skvělou spolupráci a Oddělení biologických modelů ÚMCH AV ČR za uskutečnění *in vitro* studie. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a kamarádům, kteří mě během celého studia podporují.

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na syntézu vysokomolekulárních hydrofilních polymerních konjugátů s fluorofory pro vizualizaci pevných nádorů. Přáním do budoucna je jejich využití pro navigovanou endoskopickou chirurgii, kde by po i.v. podání mohly tyto polymerní sondy pomoci fluorescenčně označit hranice nádorové tkáně. Polymerní nosiče by měly zajistit prodlouženou cirkulaci sondy v těle a dopravu fluorescenční značky do požadovaného místa.

V rámci této práce byly syntetizovány a testovány polymerní sondy tvořené kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA), připravenými radikálovou kopolymerizací, a fluorescenční značkou cyanin7-amin (Cy7-NH₂). Značka byla navázána na nosič enzymově degradovatelnou peptidovou spojkou, konkrétněji Gly-Phe-Leu-Gly a Val-Cit-4-aminobenzylalkohol. U těchto polymerních konjugátů byla studována enzymová hydrolýza pomocí kathepsinu B. Následně byly připravené konjugáty podrobeny *in vitro* studii na hypofaryngální nádorové buněčné linii FaDu, ve které byla pomocí fluorescenční konfokální mikroskopie ověřena jejich internalizace do buněk a akumulace v buněčných kompartmentech.

Klíčová slova: nanomateriály, polymerní sondy, fluorescence, EPR efekt

Abstract

This work is focused on the synthesis of macromolecular hydrophilic polymer conjugates with fluorophores for visualization of solid tumors. These polymer probes were designed for their utilization within the image-guided endoscopic surgery, where the boundaries of the tumor tissue would be fluorescently marked after i.v. administration. Polymer carriers should provide prolonged circulation of the probe in the body and the transport of the fluorescent dye into the desired place.

Polymer probes based on *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymers prepared by radical copolymerization containing fluorescent dye cyanine7-NH₂ (Cy7-NH₂) were synthesized and evaluated. The dye was conjugated to the carrier via an enzymatically cleavable peptide linker, specifically Gly-Phe-Leu-Gly and Val-Cit-4-aminobenzylalcohol. The enzymatic hydrolysis of these polymer conjugates was studied using a model lysosomal enzyme cathepsin B. *In vitro* study was carried out using hypopharyngeal cancer cell line FaDu, in which the internalization of the probes into cells and accumulation in cell compartments was evaluated by the fluorescent confocal microscopy.

Key words: nanomaterials, polymer probes, fluorescence, EPR effect

[IN CZECH]

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
OBSAH.....	6
1. ÚVOD.....	8
1.1. NEOPLASTICKÁ ONEMOCNĚNÍ.....	8
1.2. CHARAKTERISTIKA NÁDOROVÉ TKÁNĚ.....	9
1.2.1. EPR EFEKT	9
1.3. POLYMERNÍ BIOMATERIÁLY PRO DOPRAVU LÉČIV A DIAGNOSTIK	11
1.3.1. VODOROZPUSTNÉ POLYMERNÍ KONJUGÁTY	11
1.3.1.1. STRUKTURNÍ ASPEKTY.....	12
1.3.1.2. DEGRADOVATELNÉ SPOJKY PRO VAZBU LÉČIV A DIAGNOSTIK.....	13
1.3.2. POLYMERNÍ NOSIČE S ENZYMOVĚ ŠTĚPITELNOU SPOJKOU	14
1.4. FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ.....	16
1.4.1. <i>IN VITRO</i> ZOBRAZOVÁNÍ.....	18
1.4.2. <i>IN VIVO</i> TESTOVÁNÍ.....	18
1.4.3. NAVIGOVANÁ CHIRURGIE.....	19
2. CÍLE PRÁCE.....	21
3. MATERIÁL.....	22
3.1. PŘÍSTROJE A MATERIÁL.....	22
3.2. CHEMIKÁLIE A ROZPOUŠTĚDLA.....	23
3.3. BUNĚČNÁ LINIE A KULTIVAČNÍ MEDIA.....	24
4. METODY.....	25
4.1. FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ METODY CHARAKTERIZACE	25
4.1.1. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	25
4.1.2. UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIE	25
4.1.3. TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRRAFIE	25
4.1.4. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	26
4.1.5. ROZMĚROVĚ VYLUČOVACÍ CHROMATOGRRAFIE	26
4.2. SYNTÉZA POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ	26
4.2.1. POLYMERNÍ PREKURZORY S REAKTIVNÍMI SKUPINAMI.....	27
4.2.2. POLYMERNÍ KONJUGÁT SE SPOJKOU GLY-PHE-LEU-GLY.....	28
4.2.3. SYNTÉZA AZIDOVÉHO DERIVÁTU DIPEPTIDU NA PEVNÉ FÁZI.....	29
4.2.4. SYNTÉZA AZIDOVÉHO DERIVÁTU DIPEPTIDU S 4-AMINO BENZYLAKOHOLEM	30
4.2.5. SYNTÉZA AKTIVOVANÉHO DERIVÁTU DIPEPTIDU.....	30
4.2.6. SYNTÉZA DERIVÁTU DIPEPTIDU S FLUORESCENČNÍ ZNAČKOU	31

4.2.7.	SYNTÉZA POLYMERNÍHO KONJUGÁTU SE SPOJKOU VAL-CIT-4-AMINOBENZYLALKOHOL.....	32
4.3.	ŠTĚPENÍ KATHEPSINEM B (Z HOVĚZÍ SLEZINY).....	33
4.3.1.	STANOVENÍ AKTIVITY KATHEPSINU B.....	33
4.3.2.	ŠTĚPENÍ POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ.....	33
4.4.	FLUORESCENČNÍ ZNAČKA.....	33
4.5.	<i>IN VITRO</i> STUDIE.....	34
5.	VÝSLEDKY.....	36
5.1.	PŘÍPRAVA POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ A JEJICH PREKURZORŮ.....	36
5.2.	ENZYMOVÉ ŠTĚPENÍ.....	37
5.3.	<i>IN VITRO</i> STUDIE.....	39
6.	DISKUZE.....	44
6.1.	SYNTÉZA A CHARAKTERIZACE POLYMERNÍCH SOND.....	44
6.2.	ŠTĚPENÍ KATHEPSINEM B.....	46
6.3.	VÝBĚR FLUORESCENČNÍ ZNAČKY.....	47
6.4.	<i>IN VITRO</i> STUDIE.....	48
7.	ZÁVĚR.....	50
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	51
	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	57

1. Úvod

1.1. Neoplastická onemocnění

Klinická onkologie je odvětví medicíny, které se rychle vyvíjí, i přesto však zůstávají nádorová onemocnění jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve světě. Jejich výskyt se stále zvyšuje také v důsledku prodlužování střední délky života. Jako nádorová onemocnění označujeme soubor chorob, pro které je typický abnormální růst buněk tělu vlastních. K nekontrolovanému dělení buněk dochází v důsledku selhání kontrolních mechanismů buňky, které vede ke vzniku mutací buněčné DNA. Vzhledem k heterogenitě buněk, které se mohou takto změnit, neexistuje jeden universální přístup k léčbě onkologických onemocnění. Jednou z velkých výzev je léčba rakoviny hlavy a krku, která je šestou nejčtenější rakovinou na světě s více než 550 000 případy za rok, z čehož zhruba 300 000 lidí nemoci podlehnou [1].

Nejobvyklejší a doposud nejúčinnější léčbou maligních nádorů hlavy a krku, rakoviny žaludku nebo tlustého střeva, je chirurgické vyjmutí nádoru. Nejvhodnější je odstranění nádoru v jeho rané fázi, kdy je nádor ještě malý a neprorůstá do okolní tkáně, protože tvorba metastáz je jedna z hlavních příčin úmrtí pacientů. Léčba maligních chorob je zásadně odlišná od léčebných postupů jiných chorob, protože v tomto případě se jedná o buňky „tělu vlastní“, které se transformovaly v nádorové buňky. Obecně lze konstatovat, že protinádorová léčba zahrnuje několik terapeutických postupů. Kromě chirurgického vyjmutí nádoru se často používá také chemoterapie, která využívá nízkomolekulární cytostatická léčiva. Hlavní nevýhodou cytostatik je jejich neselektivní působení pouze na nádorovou tkáň, a proto jsou projevy cytostatických účinků, bohužel, pozorovány i ve zdravé tkáni. V důsledku toho se na konci minulého století přišlo s novým konceptem makromolekulárních polymerních nanomateriálů, které minimalizují nežádoucí účinky léčby [2]. Vazba léčiva na polymerní nanomateriál umožňuje zlepšit biodistribuci léčiva v těle, a tím snížit jeho toxicitu vůči zdravé části organismu, a zároveň často vede k významnému navýšení protinádorové aktivity.

1.2. Charakteristika nádorové tkáně

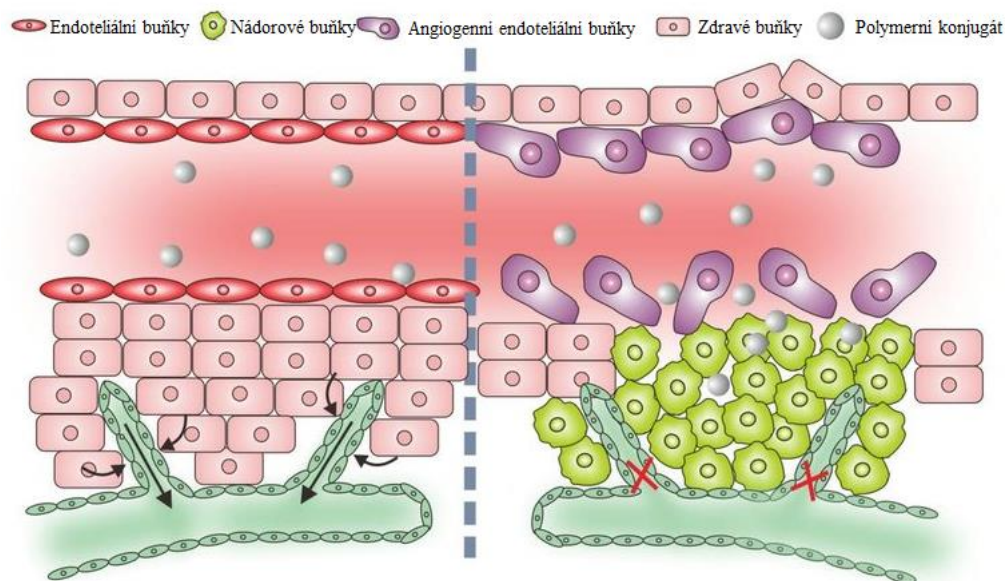
Jak již bylo uvedeno, nádorová onemocnění jsou způsobena abnormálním a nekontrolovaným růstem buněk. Společným rysem nádorových buněk mimo jiné je, že i v přítomnosti kyslíku vykazují zvýšený anaerobní metabolismus, který napomáhá buňce vyrovnat se s odčerpáváním zvýšeného množství energie a živin pro proliferaci a rychlý růst [3]. U většiny onkologických onemocnění se nádorové buňky neorganizovaně množí, hromadí a utvářejí nádor, který se neustále zvětšuje a ovlivňuje správnou funkci orgánů a tkání našeho těla. Nádory dělíme podle biologické povahy na benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Benigní nádory většinou nemají na svého hostitele závažnější negativní vliv a zpravidla je lze chirurgicky odstranit, jelikož jsou charakteristické svou ohraničeností (např. vazivovým pouzdem) a tím, že nemají tendenci prorůst do okolí. V horším případě se jedná o nádor maligní, kdy se nádorové buňky začínají šířit invazivně lymfatickými nebo krevními cestami do okolních tkání uvnitř těla a utváří v nich sekundární ložiska (metastázy) [4]. Nádorová tkáň vykazuje snížené pH extracelulárního prostředí (6,8 až 7,0) a zvýšené pH intracelulárního prostředí (7,3 až 7,6) v porovnání se zdravou tkání (7,4), což podporuje invazivitu buněk a právě vznik metastáz [5]. Tvorba metastáz je jedním z hlavních důvodů neúspěchu protinádorové léčby. Studie kožního melanomu z roku 1988 poskytla první důkaz, že intenzita angiogeneze v lidské neoplastické tkáni může pomoci předpovědět výskyt metastáz. Bylo zjištěno, že pacienti s metastázami vykazují výrazně vyšší angiogenezi než pacienti, kteří mají metastázy jen zřídka [6]. Obdobně Weidner *et al.* ve svých studiích invazivního nádoru prsu potvrdili korelaci mezi výskytem sekundárních ložisek a hustotou mikrocév (vlastnost angiogeneze) [7].

1.2.1. EPR efekt

Pevné nádory vykazují efekt zvýšené propustnosti a zádrže, tzv. EPR efekt (z angl. enhanced permeability and retention effect) (viz obr. 1.1, str. 10). První zmínka o EPR efektu ve světové literatuře pochází z roku 1986 (Yasuhiro Matsumura a Hiroshi Maeda) [2]. Cévní řečiště v nádoru je nepravidelné, málo organizované a neustále podléhá velmi rychlé neoangiogenezi (tj. formování nových krevních cév), aby byl zajištěn přísun živin a kyslíku pro rychlý růst nádoru [8]. Nádorové buňky sekretují specifické angiogenní faktory (např. vaskulární endoteliální růstový faktor), které

způsobují, že cévy v nádoru získávají anatomicky chybnou strukturu obsahující mezery mezi endotelovými buňkami, které jsou větší než v normálních cévách. Tím je zapříčiněno zvětšení průchodnosti krevních kapilár a s tím spojený vyšší průnik makromolekulárních látek z krevního řečiště skrz nádorový endotel [9].

V pevných nádorech se přednostně akumulují molekuly s vyšší molární hmotností (např. v této práci použitý kopolymer na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) má spodní hranici molární hmotnosti 20 000 g·mol⁻¹ [10]), významný efekt je pozorován u makromolekul o hydrodynamickém rozměru nad 8 nm [2]. V důsledku chybějící nebo nefunkční lymfatické drenáže jsou makromolekuly zadržovány v nádorovém meziprostoru po delší dobu (např. několik dní) [11]. Těchto vlastností se využívá pro cílenou dopravu a akumulaci makromolekulárních systémů, např. konjugátů polymerů s léčivý, nebo v mém případě konjugátů polymerů s diagnostickou fluorescenční značkou, v pevných nádorech.



Obr. 1.1: Znázornění EPR efektu a dějů s ním spojených. Na obrázku je znázorněna krevní kapilára, která přechází ze zdravé tkáně do nádorové tkáně. Ve zdravé tkáni endoteliální buňky tvoří bariéru, kterou nemohou makromolekuly procházet a nízkomolekulární látky jsou odstraňovány lymfatickým systémem. Naopak, v nádorové tkáni, z důvodu nekontrolovatelného růstu, dochází k chybnému řazení endoteliálních buněk s širokými mezerami, čímž je zvýšena propustnost pro makromolekulární polymerní konjugáty (např. s fluorescenčními značkami nebo léčivý) a v důsledku nedostatečné lymfatické drenáže jsou tyto makromolekuly zadržovány v nádoru. Převzato a upraveno dle [12].

1.3. Polymerní biomateriály pro dopravu léčiv a diagnostik

Již na přelomu 19. a 20. století Paul Ehrlich (1854–1915) formuloval první představu selektivní dopravy ideálního léčiva (tzv. magic bullet) do požadovaného místa v organismu [13]. Až roku 1975 představil Helmut Ringsdorf model nosičů léčiv využívající syntetických vysokomolekulárních polymerů, na které je kovalentně připojeno léčivo, a nazval je farmakologicky aktivními polymery [14]. Jeho smyslem měla být cílená doprava protirakovinného léčiva do nádoru. Tento model dále rozvíjel Jindřich Kopeček a rozdělil ho do čtyř částí: polymerní nosič, biodegradovatelná spojka, konjugované léčivo a směřující jednotka [15]. Kopeček využil hydrofilní HPMA kopolymer, na který bylo konjugováno kancerostatikum doxorubicin (Dox) pomocí oligopeptidové spojky Gly-Phe-Leu-Gly (GFLG) .

Makromolekulární nosiče léčiv a diagnostik lze rozdělit na základě struktury do dvou základních skupin: částicové systémy (nanočástice, liposomy, micely) a vodorozpustné polymerní nosiče. Podle jejich původu dělíme polymery na syntetické (polyethylglykol (PEG), polyHPMA) a přírodní (proteiny, polysacharidy). Přírodní polymerní nosiče jsou snadno dostupné, nicméně jejich využití je limitováno, protože i malou modifikací jejich struktury může být vyvolána jejich imunogenita. Proto jsou v poslední době intenzivně studovány syntetické vodorozpustné polymery jako vhodné dopravní systémy pro různé biologicky aktivní molekuly. Využití nano-nosičů léčiv je slibnou cestou k překonání systémové toxicity nízkomolekulárních látek. Obdobné systémy, vhodné pro dopravu protinádorových léčiv, lze využít analogicky také pro cílenou dopravu diagnostických značek pro zobrazování nádorů.

1.3.1. Vodorozpustné polymerní konjugáty

Vodorozpustné polymerní systémy jsou založeny na hydrofilních polymerech (např. polyHPMA, poly(2-ethyl-2-oxazolin, PEG). Tyto systémy mohou umožnit cílený transport nízkomolekulárních látek do nádorové tkáně a následně jejich řízené uvolnění. V našem případě umožňuje navázání fluorescenční značky na kopolymer využití polymerního konjugátu jako diagnostické sondy pro detekci maligních nádorů. Domníváme se, že tyto fluorescenční nanosondy budou využitelné pro fluorescenčně navigovanou endoskopickou chirurgii (viz kapitola 1.4.3).

1.3.1.1. Strukturní aspekty

Pro dopravu biologicky aktivní látky, léčiva, do místa určení je využíváno směřování, které může být pasivní nebo aktivní. Zatímco k pasivnímu směřování polymerních systémů s léčivem do pevných nádorů je využíváno jen vysoké molární hmotnosti, která úzce souvisí s EPR efektem (viz kapitola 1.2.1), tak aktivní směřování vyžaduje ještě navázání směřující jednotky (protilátky, lektinu, specifického oligopeptidu [16]). Směřující molekuly jsou schopné rozpoznat receptory v membránách nádorových buněk a následně se na ně navázat.

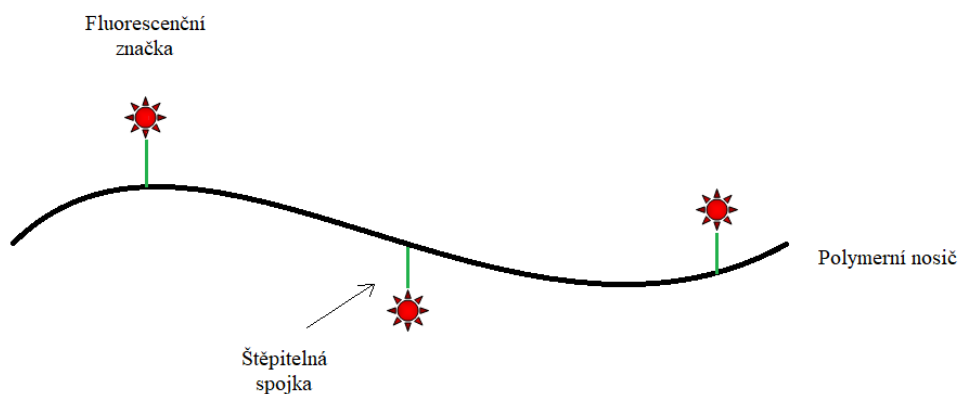
Polymerní nosič, který léčivo v organismu dopravuje do požadovaného místa, by měl být biokompatibilní, netoxický a neimunogenní. Je očekáváno, že po dopravení biologicky aktivní látky (diagnostické značky nebo léčiva) do místa účinku bude celý systém metabolizován a eliminován z organismu glomerulární filtrací v ledvinách [17, 18]. Ideální polymerní nosič by měl prodlužovat cirkulaci nízkomolekulární látky v krvi a měl by být biokompatibilní během transportu. Při dopravě biologicky aktivní látky by měl zamezit jejím nežádoucím vedlejším účinkům a uvolňovat ji ze spojky pomocí vnějšího stimulu (viz kapitola 1.3.1.2), a to jen v nádorové tkáni. Klíčovou roli při biodistribuci a následné akumulaci polymerních konjugátů v nádoru hrají molekulová hmotnost, struktura polymerních nosičů a polydisperzita. Se zvyšující se molekulovou hmotností polymerních konjugátů se prodlužuje doba cirkulace látky v krvi, roste pravděpodobnost její akumulace v nádoru a zpomaluje se její vylučování ledvinami [19].

Podle degradovatelnosti můžeme polymerní nosiče rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou degradovatelné polymerní nosiče, které se rozpadají na menší fragmenty, které jsou metabolizovány a následně vyloučeny močí. Takovými nosiči mohou být poly(α -aminokyseliny) jako např. poly(L-asparagová kyselina), poly(L-lysin) nebo poly(L-glutamová kyselina). Jelikož se jedná o nabité polymery, může u nich docházet k nežádoucím interakcím s některými tkáněmi, např. k jejich akumulaci ve specifických orgánech (játra, ledviny). Druhou skupinu tvoří ve fyziologickém prostředí nedegradovatelné polymerní nosiče s neštěpitelným hlavním řetězcem. Vylučování polymerního nosiče primárně závisí na jeho molekulové hmotnosti, která nesmí přesáhnout tzv. renální práh, aby mohlo dojít k jeho vyloučení močí [19]. V opačném případě může dojít k trvalé akumulaci polymeru v organismu, případně dochází k jeho pomalé eliminaci pomocí hepatobiliární soustavy (játra, žluč). Významné zástupce této skupiny představují polymerní nosiče na bázi PEG a dále

nosiče získané polymerizací monomerů vinylového typu, jako např. kopolymery na bázi HPMA. Samotný homopolymer polyHPMA však nenese vhodné funkční skupiny pro přímou vazbu léčiv, proto se do jeho struktury kopolymerizací zabudovávají např. aktivované methakrylované aminokyseliny nebo peptidy [16]. Kopolymerizace může být prováděna radikálovými roztokovými nebo srážecími polymerizacemi. PEG nosiče jsou dobře rozpustné jak v polárních, tak nepolárních rozpouštědlech. Jejich limitující faktory jsou, že PEG obsahuje pouze 2 koncové hydroxyskupiny, vhodné pro vazbu léčiva, a také má nízkou molekulovou hmotnost vzhledem k EPR efektu. Proto se PEG začal využívat v multiblokových polymerech [20], případně v micelárních nosičích. Na trhu nalezneme např. Doxil[®] (mimo US nazýván Caelyx[®]), který představuje liposom povrchově modifikovaný pomocí PEG obsahující antracyklin Dox.HCl určený pro i.v. podání [21].

1.3.1.2. Degradovatelné spojky pro vazbu léčiv a diagnostik

Spojka je nízkomolekulární struktura, která připojuje léčivo nebo fluorescenční značku k příslušnému nosiči (viz obr. 1.2, ~~str.~~). Spojky hrají zásadní roli v cílené protinádorové terapii a diagnostickém zobrazování, jelikož ovlivňují stabilitu konjugátu a uvolňování účinné látky z nosiče. Tyto spojky jsou buď stabilní nebo štěpitelné, a to buď hydrolyticky (v závislosti na pH), redukčně nebo enzymově.



Obr. 1.2: Schéma polymerního konjugátu s fluorescenční značkou (model).

Jednou z možností uvolňování je využít rozdílu hodnot pH mezi krevním řečištěm (pH ~7,4) a pH v endosomech nebo lysosomech (pH 4,5-6,5). Vazba by měla být hydrolyticky stabilní při fyziologickém pH, ale v mírně kyselém prostředí endosomů

uvnitř buněk by měla podléhat rychlé hydrolyze a dopravovaná látka by měla být uvolňována. Diagnostika a léčiva jsou vázána na polymerní nosič pH-senzitivní (acidolabilní) vazbou prostřednictvím např. hydrazonové [22] nebo *cis*-akonitylové vazby [23]. Navázané bioaktivní látky by neměly být uvolňovány během transportu, ale v důsledku poklesu pH v extracelulárním prostoru nádoru nebo v samotných nádorových buňkách by mělo docházet k jejich uvolnění.

Druhým typem aktivace léčiva je redukční degradace spojky mezi léčivem a nosičem rozštěpením disulfidové vazby S-S. Polymerní dopravní systémy obsahující disulfidové můstky podléhají v přítomnosti redukujících látek rychlému štěpení. Vysoký redoxní potenciál v buňkách je připisován hlavně glutathionu. Glutathion je tripeptid (Cys-Gly-Glu), který v cytoplasmě redukuje disulfidové můstky. V důsledku toho jsou redukčně štěpitelné polymerní nosiče poměrně stabilní v oxidačním extracelulárním prostředí, uvnitř buněk podléhají disulfidové linkery rychlé reductivní degradaci [24].

Třetím způsobem aktivace dopravované látky je enzymové štěpení [25]. Bylo zjištěno, že rakovinná onemocnění jsou spojena se zvýšenou expresí některých enzymů, např. legumainů a kathepsinů, čehož je využíváno pro kontrolované uvolňování léčiv do nádorového mikroprostředí. V literatuře je popsána celá řada enzymově štěpitelných spojek v polymerech nesoucích nízkomolekulární diagnostikum nebo léčivo, např. Val-Cit nebo Phe-Lys. Pro přípravu polymerních konjugátů na bázi HPMA byla nejčastěji využívána spojka Gly-Phe-Leu-Gly. Je vhodná hlavně díky své stabilitě v plasmě a rychlé hydrolyze v přítomnosti kathepsinu B. Tématice enzymově degradovatelných spojek bude věnována následující kapitola.

1.3.2. Polymerní nosiče s enzymově štěpitelnou spojkou

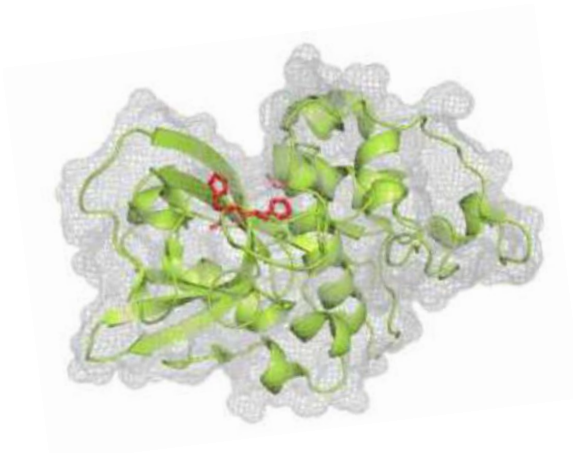
Některé lysosomální enzymy umožňují cílené štěpení chemických vazeb polymerních konjugátů. Příklady takovýchto enzymů jsou endogenní peptidasy, mezi které se řadí např. legumain, kathepsiny nebo matrix metaloproteinasy. Jelikož tyto enzymy vykazují značnou substrátovou specifitu, mohou být enzymově štěpitelné spojky štěpeny kontrolovatelně, a tak nedochází k předčasnému uvolňování dopravované látky.

Látka je uvolněna po průniku do buňky působením lysosomálních enzymů. Komplikací u tohoto typu uvolňování je, že v některých buňkách se tyto enzymy nemusí vyskytovat.

Jak bylo již výše zmíněno, Jindřich Kopeček se zasloužil o syntézu prvních syntetických polymerních konjugátů s navázaným protinádorovým léčivem přes biodegradovatelnou spojku, a to již koncem 70.let minulého století. O několik let později byl syntetizován polymerní konjugát tvořený kopolymerem HPMA nazvaný PK1, který jako první vstoupil do klinického testování [26]. Do tohoto konjugátu byla mezi chemoterapeutikum Dox a polymerní nosič vložena tetrapeptidová spojka Gly-Phe-Leu-Gly, která je štěpitelná intracelulárními lysosomálními proteasami, což umožňovalo uvolnění léčiva uvnitř nádorových buněk. Za nedlouho byl připraven polymerní konjugát PK2, který měl oproti PK1 přidanou směřující jednotku, 2-aminogalaktosu, zodpovědnou za směrování do hepatocelulárního karcinomu [27].

V případě legumainu (asparaginylová endopeptidasa) dochází většinou k velmi specifickému štěpení peptidových vazeb na C-konci, kde se nachází asparagová kyselina nebo asparagin. Příkladem polymerního konjugátu štěpitelného touto endopeptidasou je větvený polymerní konjugát 4-arm PEG-AANL-Dox, který je selektivně aktivován legumainem v nádorové tkáni. Chemoterapeutické léčivo Dox bylo navázáno na polymerní nosič pomocí štěpitelného tetrapeptidu Ala-Ala-Asn-Leu (AANL), který je jedním ze substrátů legumainu. Po i.v. podání byl konjugát dopraven do nádorové tkáně díky EPR efektu a byla specificky uvolněna molekula Leu-Dox [28].

Dalšími hojně využívanými enzymy pro uvolnění léčiv z polymerních nosičů jsou kathepsiny. Jedná se o proteolytické enzymy aktivní v kyselém prostředí lysosomů savců. Významným zástupcem je cysteinová proteasa kathepsin B. Bylo prokázáno, že kathepsin B je nejaktivnější právě při pH 5-6 [29]. Z tohoto důvodu by měl být polymerní konjugát s enzymově štěpitelnou spojkou stabilní v krevním řečišti a nemělo by tak docházet k předčasné enzymolýze spojky. Strukturu daného enzymu znázorňuje obr. 1.3, str. 16.



Obr. 1.3: Struktura lysosomální proteasy kathepsinu B (*Bos taurus*, slezina). Vytvořeno v programu PyMol 2.0 podle PDB souboru na odkaze <https://www.rcsb.org/>. Terciální struktura enzymu je značena zeleně, aktivní místo červeně a povrch enzymu šedivou mřížkou.

1.4. Fluorescenční zobrazování

Mechanické odstranění nádoru (operace) představuje v současnosti jednu z nejvyužívanějších metod léčby neoplastických onemocnění. Předpokladem úspěšné protinádorové terapie je vyjmutí nádoru přesně, kompletně a bez zbytečného poškození okolní zdravé tkáně. V ideálním případě by měly být splněny všechny zmíněné požadavky. Během operace nelze s přesností rozpoznat hranice nádorové tkáně pouhým okem, proto je velmi žádoucí nalézt spolehlivou metodu vizualizace hranic nádoru.

Zobrazovací metody jsou nedílnou součástí diagnostiky a prognózy rakoviny. V roce 2005 byla vydána studie pojednávající o využití úzkopásmového zobrazení (NBI, z angl. narrow-band imaging) v endoskopické diagnostice [30]. NBI je endoskopická, digitální zobrazovací metoda založená na principu zúžení optického spektra především na 2 vlnové délky (415 a 540 nm), které jsou dobře absorbovány červeným krevním barvivem. Kratší vlnová délka penetruje pouze do povrchových vrstev sliznice, zatímco delší vlnová délka proniká hlouběji a zobrazuje submukózní cévy. Tato technika funguje na principu optického kontrastu mezi více vaskularizovaným nádorem a normální tkání. NBI nádorové tkáně může být využívána jen pro značení některých typů nádorů, buď těch ve specifických místech, nebo těch nacházejících se v blízkosti povrchů sliznic [16].

Buňky obsahují molekuly, které po absorpci záření vhodné vlnové délky vyzařují fluorescenci (přesněji autofluorescenci). Fluorofory zodpovědné za tuto přirozenou tkáňovou fluorescenci označujeme jako endogenní. Mezi základní UV/VIS fluorofory patří kolagen, elastin, aromatické aminokyseliny (Tyr, Trp), porfyrin a koenzymy metabolických reakcí (FAD, NADH). Nicméně v blízké infračervené (NIR, z angl. near infrared) oblasti biologická tkáň nevykazuje téměř žádnou autofluorescenci (s výjimkou např. melaninu [31]), ani absorpci, což zlepšuje kontrast mezi nádorem a pozadím [32]. Ke zlepšení úrovně signálu může být využito NIR fluorescenčně kontrastních látek (exogenní fluorofory). Pro diagnostiku nádoru je důležité, aby rozdíl koncentrace fluoroforů v normální a nádorové tkáni, tedy defacto fluorescenční kontrast, byl co největší a mohla být snadno detekována hranice mezi nádorovou a normální tkání.

V současnosti je velká snaha vyvinout takovou vysokomolekulární fluorescenční polymerní sondu, která by po i.v. podání byla schopna přesně a neinvazivně sledovat okraje nádorové tkáně, čehož by bylo využíváno k diagnostickému zobrazení např. během operace. Ke sledování hranic nádoru je široce používaným detektorem citlivá, planární CCD (z angl. charged coupled device) kamera. A právě zvýšená akumulace vysokomolekulárních polymerních konjugátů s fluoroforem v nádorové tkáni je předpokladem k úspěšné fluorescenčně navigované endoskopické chirurgii [16]. NIR záření je elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 700 až 900 nm. V posledních letech začala při diagnostice být využívána právě tato oblast spektra namísto UV a viditelného záření (<700 nm). Důvodem je skutečnost, že zatímco UV/VIS paprsky pronikají do tkáně pouze v mikroměřítku, NIR záření může penetrovat biologickou tkání do hloubky několika milimetrů až centimetrů [33].

V posledních pár desetiletích vzrostl počet zobrazovacích metod fungujících na principu detekce fluorescence. Jedním z těchto přístupů je fluorescenční odrazové zobrazování (FRI, z angl. fluorescence reflectance imaging), které je využíváno k povrchovému snímání, avšak pro kvantifikaci buněčných procesů v hluboké tkáni je nevhodné. Z tohoto důvodu bylo epifluorescenční dvoudimenzionální (2D) FRI vystřídáno třídimenzionální (3D) fluorescenční molekulární tomografií (FMT) při diagnostice hluboké tkáně, jelikož planární FRI neumožňuje její detailní analýzu [34]. Fluorescenční zobrazování je široce využíváno v klinických studiích jako jsou zobrazování patogeneze, doprava léčiv a sledování enzymové aktivity.

1.4.1. *In vitro* zobrazování

Důležitým milníkem pro výzkum rakoviny bylo získání první lidské kontinuálně rostoucí buněčné linie HeLa roku 1951 [35]. Další immortalizované buněčné linie ji následovaly (Faji, FaDu). V současnosti jsou známy téměř 4000 lidských buněčných linií, jejichž původ je velmi rozmanitý, což umožňuje studium biologických procesů ve vybraných orgánech. Využitím těchto linií můžeme předpovědět chování např. potenciálních léčiv (např. cytotoxicitu) a získat cenné informace pro výzkum léčby rakoviny [36]. Nádorové buněčné linie jsou používány jako modelové systémy *in vitro* zejména pro preklinické studie v oblasti zdravotnictví, protože se snadno množí a kultivují.

Fyziologie buněk, lokalizace molekul nebo buněčné procesy (např. interakce proteinů) mohou být monitorovány pomocí fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční mikroskop je vysoce citlivý, a tak poskytuje lepší kontrast buněk vůči pozadí oproti běžnému světelnému mikroskopu. Využívá molekul (vnější fluorofory; např. barviva), které fluoreskují, když jsou stimulovány zářením o vhodné vlnové délce. Konfokální fluorescenční mikroskopie (CFM) je nejpoužívanější pro *in vitro* studie díky svému vysokému rozlišení a schopnosti potlačit signál z rovin nacházejících se mimo ohnisko (out-of-focus). Excitace je prováděna pomocí laseru o vlnové délce, která odpovídá excitační vlnové délce použitého fluoroforu.

K zobrazení jedné vrstvy pozorovaného objektu je vyžadováno použití skenování (LSCM, z angl. laser scanning confocal microscopy), a to buď skenování laserovým paprskem nebo skenování vzorkem. Při skenování paprskem preparát zůstává statický a excitovaný paprsek se po něm pohybuje, zatímco skenování vzorkem funguje naopak. LSCM našla své využití zejména v buněčné a molekulární biologii. Je vhodná např. k analýze vnitrobuněčné distribuce fluoroforů, a s tím souvisejícího sledování kolokalizace dvojice signálů v kompartmentech buňky [37]. Dále může poskytovat informace o uvolňování léčiv a jejich biodistribuci uvnitř buněk.

1.4.2. *In vivo* testování

Hlavní nevýhodu *in vitro* studií představuje skutečnost, že s pomocí buněčných linií nelze zcela detailně popsat procesy probíhající *in vivo*. Navzdory tomu jsou vhodné nosiče nízkomolekulárních látek pro *in vivo* studie vybírány právě na základě výsledků

zobrazování na buněčné úrovni. V případě zvířecích modelů využívaných pro testování by tyto modely měly být co nejvíce anatomicky a fyziologicky podobné svou biologickou aktivitou lidskému organismu. Athymické holé myši představují široce využívaný model pro preklinické testování léčiv ve výzkumu lidských nádorových onemocnění [38]. Hlavní roli ve výzkumu hraje absence brzlíku, což má za následek, že nemají žádné cirkulující T-buňky. Nedostatečně vyvinutý imunitní systém umožňuje transplantaci lidských nádorových buněk a tkání (xenograftů) na myši, aniž by docházelo k ničení těchto buněk T-lymfocyty.

In vivo imaging spočívá ve sledování buněčných procesů, systémové toxicity a strukturních změn ve tkáni. FMT je kvantitativní zobrazovací technika založená na NIR fluorescenci, kterou lze využít pro *in vivo* vizualizaci malých zvířat. Projekce na detektoru jsou získávány prosvícením zkoumaného zvířete. Správné provedení FMT zahrnuje několik podmínek: zkoumaná zvířata musí být oholena (bez srsti) a injekce používané zobrazovací látky musí být provedena tak, aby docházelo k optimální dopravě do místa určení a látka byla biokompatibilní. Využití NIR-značených sond při hloubkové FMT umožňuje detekci a kvantifikaci důležitých biologických procesů např. aktivity buněčných enzymů nebo vaskulárního úniku. Jedná se o zobrazovací modalitu, která je založena na přesné 3D-rekonstrukci distribuce injikovaných fluorescenčních sond a měření odpovídající intenzity fluorescence [39, 40]. Lasery excitují NIR fluorofory (např. fluorescenční značky) ve tkáni a jejich emitovaná fluorescence je sledována pomocí monochromatických detektorů (např. CCD kamerami). Tento postup dohromady s odpovídajícím matematickým výpočtem transportu fotonů ve tkáni (inverzní algoritmus) rekonstruuje 3D tomografické mapy distribuce NIR kontrastních látek ve vyšetřovaném zvířeti. FMT je často kombinována s rentgenovou (mikro)výpočetní tomografií (CT, μ CT). Právě tato kombinace umožňuje přiřadit získaný signál NIR fluorescence k části těla, a tak poskytuje projekci těla zvířete ve 3D [41].

1.4.3. Navigovaná chirurgie

Klinické testování léčiv na člověku může být prováděno pouze po zajištění odpovídající bezpečnosti na základě rozsáhlých *in vitro* a *in vivo* studií. Každé protirakovinné léčivo musí projít těmito preklinickými testy, než přechází do fáze klinického testování.

V kontextu předoperační diagnostiky solidních nádorů hrají důležitou roli lékařské vyšetřovací techniky, které podávají informace, jak o anatomické struktuře vnitřních orgánů lidského těla, jejich poškozeních a patologických ložiskách (CT, magnetická resonance (MRI, z angl. magnetic resonance imaging), tak o jeho fyziologických změnách (pozitronová emisní tomografie, jednofotonová emisní výpočetní tomografie) [42, 43]. V případě onkologických onemocnění můžeme pomocí výše zmíněných metod vizualizovat potřebnou oblast bez invazivního zásahu do lidského těla, anebo např. určit přítomnost nádorového ložiska. Naneštěstí tyto zobrazovací metody nemohou prozatím být použity během operace, a tak zůstává základním problémem pro chirurga správné rozlišení hranice nádoru.

Cílem navigované chirurgie je úplné odstranění nádorové tkáně pomocí vizualizace nádoru v reálném čase během operace, aniž by došlo ke zbytečnému odstranění zdravé tkáně v okolí nádoru. Fluorescenční zobrazovací systém obsahuje spektrálně rozlišený světelný zdroj (filtrovaný širokopásmový zdroj, světelná dioda nebo laserová dioda) excitující fluorofor a emitovaná fluorescence je sbírána pomocí CCD kamery. Signál specifický pro nádor by měl být výrazně odlišen od signálů okolní tkáně. Proto je využíváno fluorescenčního zobrazení v NIR části spektra, které by mělo napomoci přesně detekovat hranice nádoru. Jak už bylo nastíněno výše, tak v této oblasti spektra je pozorována relativně nízká autofluorescence a rozptyl světla. NIR fluorescenční navigovaná chirurgie skýtá mnoho výhod včetně nekontaktního zobrazování v reálném čase a absence ionizující záření.

2. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce byla syntéza a fyzikálně-chemická charakterizace kopolymerů na bázi HPMA nesoucích fluorescenční značku navázanou prostřednictvím enzymově štěpitelných spojek Gly-Phe-Leu-Gly a Val-Cit-4-amino-benzylalkohol, porovnání rychlosti uvolňování fluorescenční značky z těchto polymerních nosičů v přítomnosti kathepsinu B a *in vitro* studium internalizace těchto konjugátů do buněk a sledování intracelulární distribuce fluoroforu pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie.

3. Materiál

3.1. Pístroje a materiál

Camag UV cabinet	Camag, Švýcarsko
centrifuga stolní Hettich® EBA 20	Merck, Německo
detektor fluorescenční RF-10A _{XL}	Shimadzu, Japonsko
detektor indexu lomu (RID-10A)	Shimadzu, Japonsko
detektor indexu lomu Optilab rEX	Wyatt Technology Corp., USA
detektor diodového pole (SPD-M10A)	Shimadzu, Japonsko
Direct Heat CO ₂ inkubátor	ThermoFisher Scientific, USA
Heraeus Multifuge X1R	ThermoFisher Scientific, USA
hmotnostní spektrometr LCQ Fleet	ThermoFisher Scientific, USA
kapalinový chromatograf HPLC LC-20	Shimadzu, Japonsko
kolona Chromolith Performance RP-18e	Merck, Německo
kolona SEC TSK 3000 SWXL column	Tosoh Bioscience, Japonsko
kolona TSKgel Super AW3000	Tosoh Bioscience, Japonsko
konfokální mikroskop Nikon Eclipsa Ti-E	Abberior-Instruments STED, Německo
magnetická míchačka Poly 15 Variomag®	ThermoFisher Scientific, USA
spektrofotometr Jenway 7415	Cole-Parmer Ltd, UK
termoblok Haake P5	Haake Technik GmbH, Německo
třepačka Heidolph, Relax control	Heidolph, Německo
UV detektor	Shimadzu, Japonsko
vakuová odparka Hei-CHILL 350	Heidolph, Německo
viskozimetrický detektor Viscostar II	Wyatt Technology Corp., USA
víceúhlový detektor rozptylu světla DAWN Heleos	Wyatt Technology Corp., USA

3.2. Chemikálie a rozpouštědla

aceton (sušený, destilovaný)	Lach-Ner, Česká republika
1-aminopropan-2-ol (Amp)	TCI, Německo
<i>N</i> ^ω -benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid	Fluka, Německo
CH ₂ Cl ₂	Lach-Ner, Česká republika
cyanin7-NH ₂	Lumiprobe, GmbH, Německo
dichlormethan (DCM)	Sigma-Aldrich, USA
diethylether (sušený destilovaný)	Lach-Ner, Česká republika
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin (DIPEA)	Fluka, Německo
<i>N,N</i> -diisopropylkarbodiimid (DIC)	Fluka, Německo
<i>N,N</i> -dimethylacetamid (DMA)	Sigma-Aldrich, USA
<i>N,N</i> -dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich, USA
dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
<i>N</i> -Fmoc-L-Cit-OH	Iris Biotech GmbH, Německo
<i>N</i> -Fmoc-L-Val-OH	Iris Biotech GmbH, Německo
L-glutation (redukována forma)	Fluka, Německo
1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP)	Fluka, Německo
1-hydroxybenzotriazol (HOBt)	Sigma-Aldrich, USA
Hoechst33342	Thermofisher Scientific, Česká
kathepsin B (hovězí slezina)	Sigma-Aldrich, Česká republika
kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Fluka, Německo
kyselina methakrylová	Fluka, Německo
kyselina trifluoroctová (TFA)	Lach-Ner, Česká republika
LysoTracker Yellow-HCK-123	Thermofisher Scientific, Česká
KH ₂ PO ₄	Lach-Ner, Česká republika
methanol	Sigma-Aldrich, USA
MitoLite TM Dyes Blue FX490	Thermofisher Scientific, Česká
NaOH	Lach-ner, Česká republika
piperidin (25 % roztok v DMF)	Fluka, Německo

(benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinofosfonium	Iris Biotech GmbH, Německo
hexafluorofosfát (PyBOP)	
4-nitrofenylchloroformiát (PNPC), 96 %	Sigma-Aldrich, USA
uhličitan sodný (bezvodý G.R.)	Lach-Ner, Česká republika
thiazolidin-2-thion (TT)	Fluka, Německo

3.3. Buněčná linie a kultivační media

buněčná linie FaDu	ATCC, USA
kultivační medium MEM ^{a)}	Sigma-Aldrich, USA
kultivační medium EMEM ^{b)}	ÚMCH AV, ČR

^{a)}minimální esenciální medium (MEM, z angl. Minimum Essential Medium)

^{b)}Eagleovo minimální esenciální medium (EMEM) bylo získáno přidáním několika složek k mediu MEM: inaktivované fetální hovězí sérum, neesenciální aminokyseliny, antibiotika (penicilin, streptomycin) a glutamin.

4. Metody

4.1. Fyzikálně-chemické metody charakterizace

4.1.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Syntéza a čistota meziproductů a polymerních konjugátů byla monitorována vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Konkrétně byl použit systém HPLC Shimadzu (Japonsko) LC-10AD s kolonou $100 \times 4,6$ mm Chromolith Performance RP-18e (Merck, Německo) s reverzní fází. Bylo využito mobilní fáze s lineárním gradientem 0–100 % B (A: 94,9 % H₂O; 5 % acetonitril; 0,1 % TFA; B: 94,9 % acetonitril; 5 % H₂O; 0,1 % TFA). Průtoková rychlost: 5 ml·min⁻¹, lineární gradient 0-100 % B během 5 min. HPLC bylo vybaveno fluorescenčním detektorem (RF-10A_{XL}), detektorem indexu lomu (RID-10A) a detektorem diodového pole (SPD-M10A) (všechny Shimadzu, Japonsko).

4.1.2. UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometrie byla využita pro stanovení aktivity enzymu kathepsinu B. Spektra jednotlivých vzorků byla měřena na přístroji spektrofotometru Jenway 7415 (Cole-Parmer Ltd, UK) v kyvetách s optickou délkou, $l = 1$ cm nebo $l = 1$ mm. UV/VIS spektrofotometrie byla využita jak pro stanovení obsahu fluorescenční značky Cy7-NH₂ navázané na kopolymeru ($\epsilon_{750} = 199\,000$ dm³·mol⁻¹·cm⁻¹), tak pro stanovení obsahu koncových TT skupin ($\epsilon_{305} = 10\,300$ dm³·mol⁻¹·cm⁻¹) a DBCO skupin ($\epsilon_{292} = 13\,000$ dm³·mol⁻¹·cm⁻¹)

4.1.3. Tenkovrstvá chromatografie

Druhým způsobem kontroly čistoty meziproductů byla tenkovrstvá chromatografie (TLC). Byly použity destičky ALUGRAM Xtra SIL G/UV254 (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo) s fluorescentním indikátorem UV₂₅₄ (0,20 mm Silikagel 60). V některých případech byly jednotlivé meziproducty pozorovány pomocí UV záření (UV lampa; $\lambda = 254$ nm). Mobilní fází pro TLC byla směs DCM a methanolu v různých poměrech. K detekci volného 4-nitrofenolu byl použit vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného.

4.1.4. Hmotnostní spektrometrie

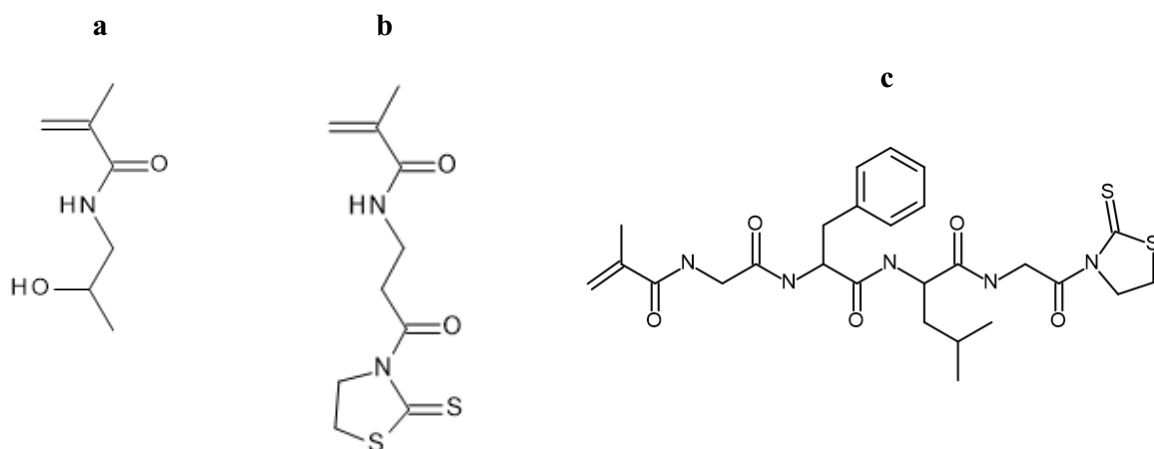
Molární hmotnosti nízkomolekulárních látek byly stanoveny pomocí hmotnostního spektrometru LCQ Fleet s elektrospray ionizací (ESI MS) (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA).

4.1.5. Rozměrově vylučovací chromatografie

Stanovení molárních hmotností a hodnot indexů polydispersity kopolymerů bylo provedeno pomocí rozměrově vylučovací chromatografie (SEC) a HPLC systému vybaveného UV/Vis detektorem (Shimadzu, Japonsko), detektorem indexu lomu Optilab, víceúhlovým detektorem rozptylu světla DAWN Heleos a viskozimetrickým detektorem Viscostar II (všechny Wyatt Technology Corp., USA) na SEC koloně TSK 3000 SWXL column (Tosoh Bioscience, Japonsko) (80 % methanol, 20 % 0.3 mol·dm⁻³ octanový pufr, pH 6.5) při průtoku 0,5 ml·min⁻¹.

4.2. Syntéza polymerních konjugátů

Syntéza polymerních systému je vedena od monomerů, přes polymerní prekurzory k polymerním konjugátům s fluorescenční značkou. Chemické struktury molekul byly vytvořeny v programu BIOVIA Draw. Všechny použité aminokyseliny měly v L-konfiguraci. Monomery HPMA, 3-(3-methakrylamidopropanoyl)thiazolidin-2-thion (Ma-β-Ala--TT) a 3-(*N*-methakryloyl-GFLG)thiazolidin-2-thion (Ma-GFLG-TT) byly připraveny, jak bylo popsáno dříve [44, 45]. Monomer a komonomery, které byly využity pro následující syntézu, jsou zobrazeny na obr. 4.1. Čistota monomerů byla kontrolována pomocí HPLC (kapitola 4.1.1) a TLC (kapitola 4.1.3).

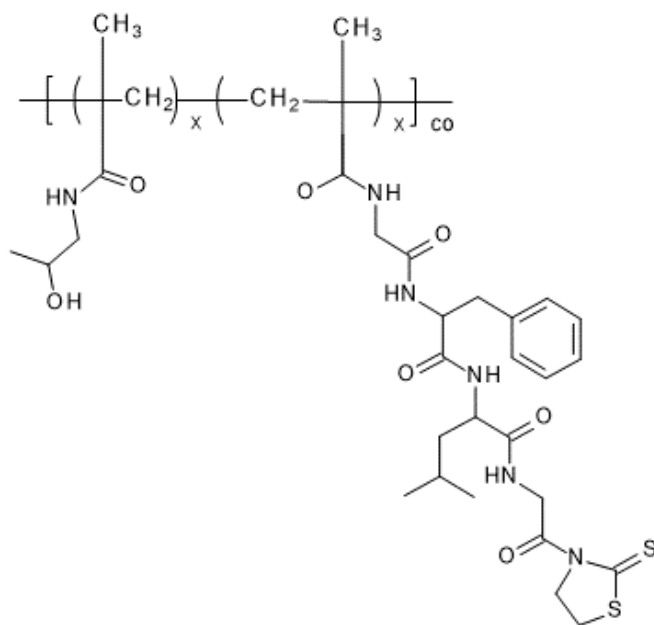


Obr. 4.1: Monomer: a - *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid; a methakrylované komonomery: b - 3-(3-methakrylamidopropanoyl)thiazolidin-2-thion; c - 3-(*N*-methakryloyl-GFLG)thiazolidin-2-thion

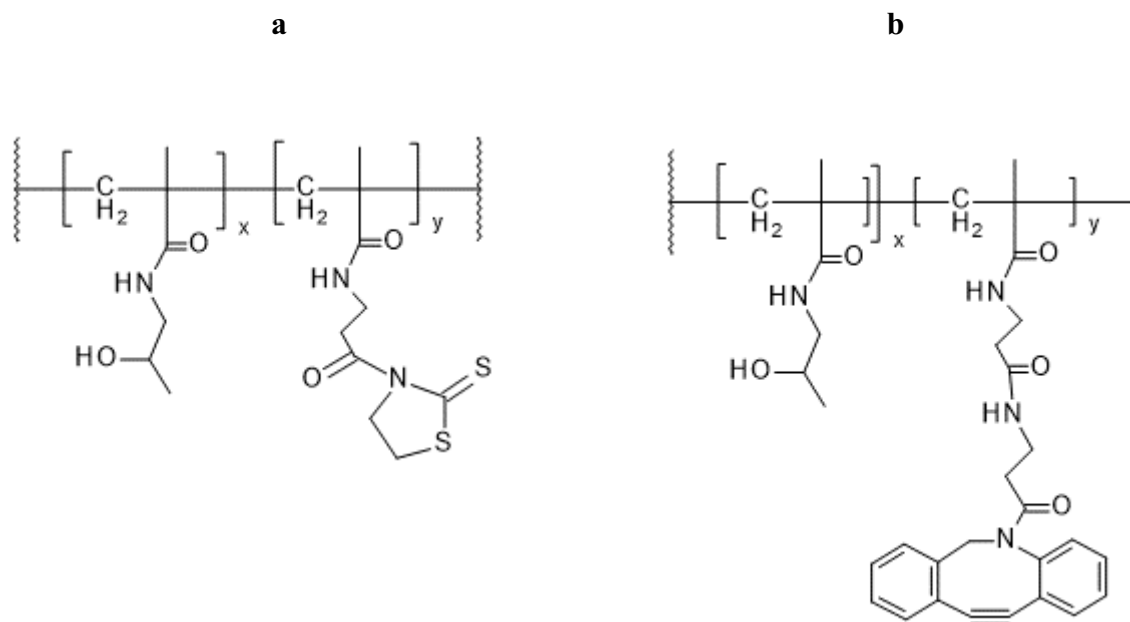
4.2.1. Polymerní prekurzory s reaktivními skupinami

Polymerní prekurzory, poly[HPMA-*co*-(Ma-GFLG-TT)] (P-GFLG-TT), viz obr. 4.2, a poly[HPMA-*co*-(Ma- β -Ala-TT)] (P-Ala-TT), viz obr. 4.3a, str. 28, byly připraveny podle dříve popsaného postupu řízenou radikálovou RAFT (z angl. reversible addition-fragmentation chain transfer polymerisation) polymerizací [44, 46]. Prekurzor P-GFLG-TT byl analyzován pomocí SEC: hmotnostně střední molární hmotnost (M_w) byla $35\,200\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $D = 1,14$. Výtěžek byl 75 %. Obsah TT koncových, 4,76 mol. % ($0,292\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), byl určen pomocí UV/Vis spektrofotometrie.

Polymerní prekurzor P-Ala-TT byl analyzován pomocí SEC: $M_w = 55\,700\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $D = 1,07$. Výtěžek reakce činil 78 %. Obsah TT skupin, 9,75 mol. % ($0,631\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), byl stanoven pomocí UV/Vis spektrofotometrie. Prekurzor nesoucí DBCO skupiny poly[HPMA-*co*-(Ma- β -Ala-DBCO)] (P-Ala-DBCO), viz obr. 4.3b, str. 28, byl připraven následnou modifikací reaktivních TT skupin na polymeru P-Ala-TT (20 mg, $0,4\text{ }\mu\text{mol}$) pomocí DBCO-NH₂ (3 mol. % odpovídající $0,194\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$; 1,1 mg, $4\text{ }\mu\text{mol}$) s DIPEA ($0,7\text{ }\mu\text{l}$) v 10% DMA ($190\text{ }\mu\text{l}$). Po 90 min reakce byl přidán Amp ($1\text{ }\mu\text{l}$) k odstranění zbývajících TT koncových skupin. Výsledný polymerní prekurzor byl separován precipitací ve směsi diethylether : aceton (1 : 1). Následně byl analyzován pomocí SEC: $M_w = 57\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ s $D = 1,1$. Výtěžek reakce byl 14,8 mg (72 %).



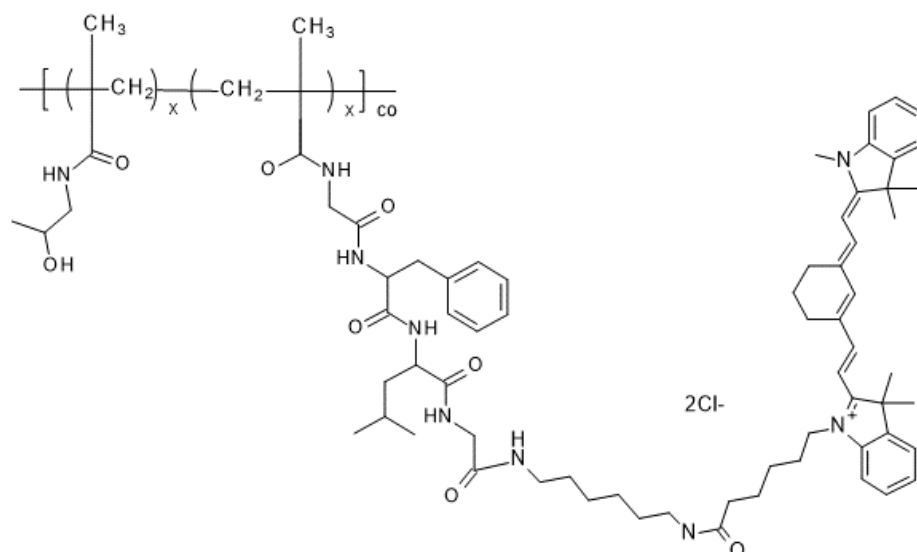
Obr. 4.2: Polymerní prekurzor poly[HPMA-*co*-(Ma-GFLG-TT)]



**Obr. 4.3: Polymerní prekurzory: a – poly[HPMA-*co*-(Ma- β -Ala-TT)];
b – poly[HPMA-*co*-(Ma- β -Ala-DBCO)]**

4.2.2. Polymerní konjugát se spojkou Gly-Phe-Leu-Gly

Konjugát poly[HPMA-*co*-(Ma-GFLG-Cy7)], (P-GFLG-Cy7), viz obr. 4.4, str. 29, byl připraven reakcí polymerního prekurzoru P-GFLG-TT a fluorescenční značky Cy7-NH₂ (1 mol. %). Cy7-NH₂ (0,88 mg, 0,001 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (70 μ l) a polymerní prekurzor (20 mg, 0,03 μ mol) v DMA (200 μ l). Roztoky byly smíchány a byl přidán DIPEA (1 μ l). Reakční směs byla míchána na třepačce a průběh reakce byl sledován pomocí HPLC. Poté byl přidán Amp (1 μ l) s cílem odstranit neodreagované TT skupiny. Následně byla reakční směs vysrážena pomocí směsi diethylether : aceton (1 : 1) a vzniklá sraženina byla izolována centrifugací a usušena za sníženého tlaku v exsikátoru. Sraženina byla rozpuštěna v destilované vodě (2,5 ml) a poté byla přečištěna přes kolonu PD10 a lyofilizována. U připraveného konjugátu P-GFLG-Cy7 (17 mg) nebylo možné pomocí SEC stanovit M_w ani D z důvodu interakce laseru s daným fluoroforem, jehož fluorescence výrazně ovlivní hodnotu intenzity rozptýleného světla naměřenou pomocí rozptylového detektoru.



Obr. 4.4: Polymerní konjugát poly[HPMA-co-(Ma-GFLG-Cy7)]

4.2.3. Syntéza azidového derivátu dipeptidu na pevné fázi

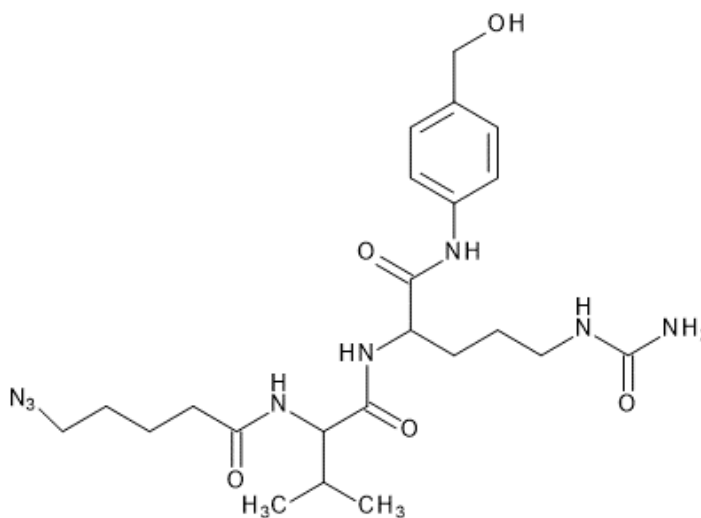
Derivát dipeptidu Val-Cit s N-koncovou azidovou skupinou byl připraven peptidovou syntézou na pevné fázi pomocí 9-fluorenylmethoxykarbonylové skupiny (Fmoc)/t-butyl strategie na 2-chlorotryl chloridové pryskyřici (CTR). *N*-Fmoc-Cit-OH (795 mg; 2 mmol) byl navázán na CTR (2 g) v prostředí DCM (20 ml) a v přítomnosti DIPEA (1,37 ml). Po 1,5 h míchání byla pryskyřice odsáta na fritě a promyta směsí DCM : methanol : DIPEA (17 : 2 : 1), DCM a methanolu.

Po deprotekcí 25 % roztokem piperidinu v DMF a důkladném promytí DMF byl v prostředí DCM navázán *N*-Fmoc-L-Val-OH (2,0 g; 6 mmol) v přítomnosti PyBOP (3,0 g; 6 mmol), HOBt (900 mg; 6 mmol) a DIPEA (2,1 ml; 12 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 1,5 h a promyta DMF.

Po opětovné deprotekcí 25 % roztokem piperidinu v DMF byla v prostředí DCM a v přítomnosti DIC (0,93 ml; 6 mmol) a DIPEA (2,1 ml; 12 mmol) navázána kyselina 5-azidopentanová (Az) (858 mg; 6 mmol). Po 1,5 h byla pryskyřice odsáta a promyta DMF, DCM a methanolu. Produkt Az-Val-Cit-OH byl pomocí roztoku HFIP (1,5 ml) a DCM (3,5 ml) odštěpen z pryskyřice, která byla následně odsáta na fritě. Získaný filtrát byl za sníženého tlaku odpařen, olejovitý zbytek byl vysrážen diethyletherem a vysušen v exsikátoru.

4.2.4. Syntéza azidového derivátu dipeptidu s 4-aminobenzyl-alkoholem

Na Az-Val-Cit-OH (156 mg, 0,4 mmol; viz obr. 4.5) byl v přítomnosti DIC (64 μ l, 1,05 ekv., 0,4 mmol) konjugován 4-aminobenzylalkohol (Aba) (51 mg, 1,05 ekv., 0,4 mmol). Reakce byla provedena ve směsi DMF : DCM v poměru 6 : 4 (3,5 ml). Po 16 h při teplotě 25 °C byl meziprodukt odpařen a olejovitý zbytek byl vysrážen diethyletherem. Byl získán téměř čistý produkt (160 mg, 0,32 mmol, 80 %).

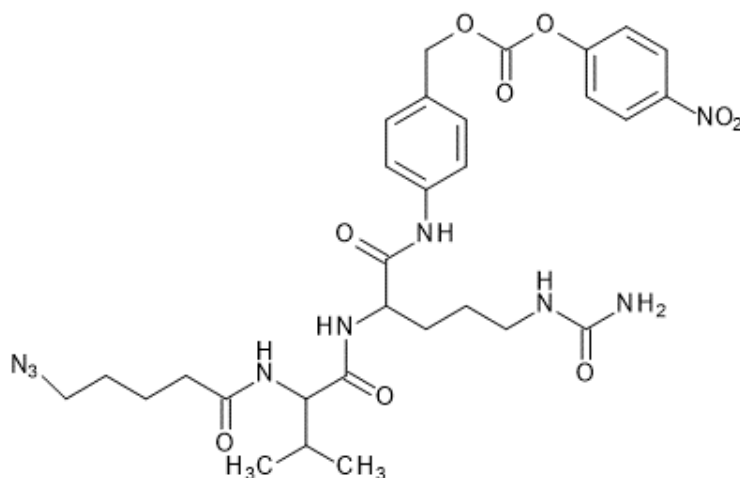


Obr. 4.5: Struktura Az-Val-Cit-Aba-OH

4.2.5. Syntéza aktivovaného derivátu dipeptidu

Postup přípravy byl převzat z již publikovaného postupu [47]. Az-Val-Cit-Aba-Npc (viz obr. 4.6, str. 31) byl syntetizován reakcí Az-Val-Cit-Aba-OH (50 mg, 0,1 mmol) a PNPC (60 mg, 0,3 mmol) ve směsi DCM (0,5 ml), DMA (0,15 ml) a pyridinu (0,15 ml). Průběh reakce byl sledován na HPLC. Po 4 h byla reakční směs částečně odpařena za sníženého tlaku a olejovitý zbytek byl chromatografován na preparativní HPLC koloně Chromolith C18 s lineárním gradientem voda-acetonitril (0-100 % během 15 min, 60 ml·min⁻¹). Frakce obsahující produkt ($t_r=8$ min) byl odpařena za sníženého tlaku k suchu. Výtěžek 48 mg bílé krystalické látky (0,07 mmol, 70 %). ESI MS (vypočteno 669,7, nalezeno $M+Na=692,2$). Analytické HPLC ukázalo jeden pík ($t_r=2.55$ min). ¹H NMR, 400 MHz (CD₃OD): δ 8.25 d, 2H (arom); 7.60 d, 2H (arom); 7.37 d, 4H (arom); 5.22 s, 2 H (CH₂O); 4.51 m, 1H (CH- α -Cit); 4.15 dd, 1H (CH- α -

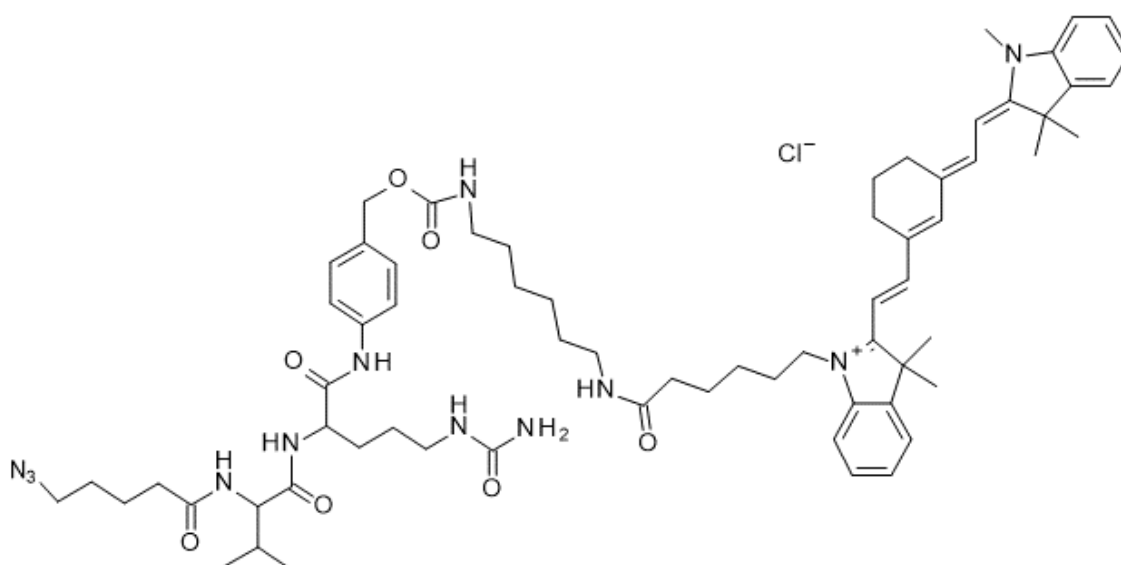
Val); 3.27 t, 2H (CH₂N₃); 3.25-3.05 m, 2H; 2.27 t, 2H; 2.05 m, 1H; 1.87 m, 1H; 1.75-1.47 m, 7H; 0.93 dd, 6H (CH₃).



Obr. 4.6: Schematická struktura Az-Val-Cit-Aba-Npc

4.2.6. Syntéza derivátu dipeptidu s fluorescenční značkou

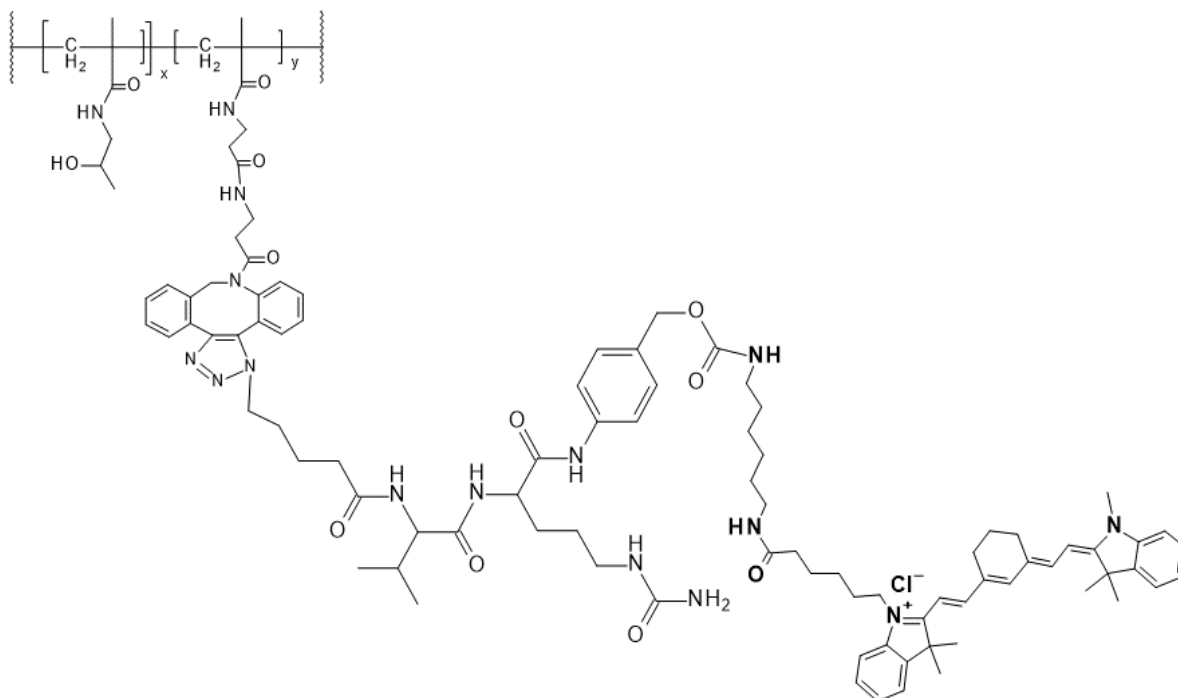
Nejdříve byl vzniklý Az-Val-Cit-Aba-Npc (2 mg, 3 μmol) rozpuštěn v methanolu (100 μl) a následně bylo přidáno fluorescenční barvivo Cy7-NH₂ (2,15 mg, 3 μmol) a 4 ekvivalenty DIPEA (2 μl). Pomocí HPLC byl sledován průběh reakce. MS ESI (vypočteno 1213,9, nalezeno M-CI=1177,7). Výtěžek Az-Val-Cit-Aba-Cy7 (viz obr. 4.7) činil 2,8 mg (2,3 μmol, 77 %). Získaný produkt byl přečištěn srážením ve směsi diethyletheru a vysušen v exsikátoru.



Obr. 4.7: Az-Val-Cit-Aba-Cy7

4.2.7. Syntéza polymerního konjugátu se spojkou Val-Cit-4-amino-benzylalkohol

Nejprve byl polymerní prekurzor P-Ala-DBCO (11,2 mg, 0,2 μmol) rozpuštěn v methanolu (50 μl) a následně k němu byl přidán Az-Val-Cit-Aba-Cy7 (1,5 mg, 1,2 μmol) spolu s dalším objemem methanolu (200 μl). Syntéza tohoto polymerního konjugátu poly[HPMA-*co*-(Ma- β -Ala-Val-Cit-Aba-Cy7)] (P-Val-Cit-Aba-Cy7), viz obr. 4.8, byla provedena nekatalyzovanou „click“ reakcí azidu na trojnou vazbu DBCO skupiny na prekurzoru. Methanol byl odstraněn na odparce a získaný polymer byl vysrážen ve směsi rozpouštědel acetonu a diethyletheru v poměru 1 : 1 a dále centrifugován. Ke sraženině přidán methanol (120 μl) a opět vysráženo, centrifugováno a přečištěno kolonou PD10. Poté byla provedena SEC (kapitola 4.1.5) s mobilní fází methanol : octan (pH=6,5) v poměru 4 : 1, pomocí které bylo kontrolováno vymytí nenavázané značky, a tedy čistota vzniklého produktu. U připraveného polymerního konjugátu (7 mg) nebylo možné pomocí SEC stanovit M_w ani D , protože dochází k interakci laserového paprsku s daným fluoroforem a emitovaná fluorescence značky způsobí výrazný nárůst intenzity, a tím ovlivňuje výsledné hodnoty.



Obr. 4.8: Polymerní konjugát poly[HPMA-*co*-(Ma- β -Ala-Val-Cit-Aba-Cy7)]

4.3. Štěpení kathepsinem B (z hovězí sleziny)

4.3.1. Stanovení aktivity kathepsinu B

Enzymová aktivita kathepsinu B byla stanovena před samostatným měřením dle článku [48]. Pro stanovení aktivity bylo využito modelového substrátu N^α -benzoyl-L-arginin-4-nitroanilidu (Bzl-Arg-Nap). Byl připraven fosfátový pufr (KH_2PO_4 $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $0,001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ EDTA), jehož pH bylo upraveno pomocí hydroxidu sodného ($1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) na požadovanou hodnotu 6,0. S využitím fosfátového pufru byly dále připraveny zásobní roztoky kathepsinu B (2 mg ve 1,27 ml pufru), glutathionu (30 mg v 2 ml pufru) a Bzl-Arg-Nap (13,59 mg ve 338 μl DMSO). Následně byli pufr (815 μl), roztok kathepsinu B (60 μl) a roztok glutathionu (100 μl) dohromady inkubovány ve skleněné kyvetě s optickou dráhou $l = 1 \text{ cm}$ ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min). Po uplynutí 5 min bylo přidáno 25 μl roztoku Bzl-Arg-Nap. Byla změřena absorbance hned po přidání a po 10 min od přidání Bzl-Arg-Nap při vlnové délce $\lambda = 410 \text{ nm}$. Byla zjištěna změna absorbance roztoku ($\Delta A_{410} = 0,259$) a srovnán s udávanými hodnotami ve článku. Ze získané hodnoty byla vypočtena koncentrace aktivních míst kathepsinu B ($1,57\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).

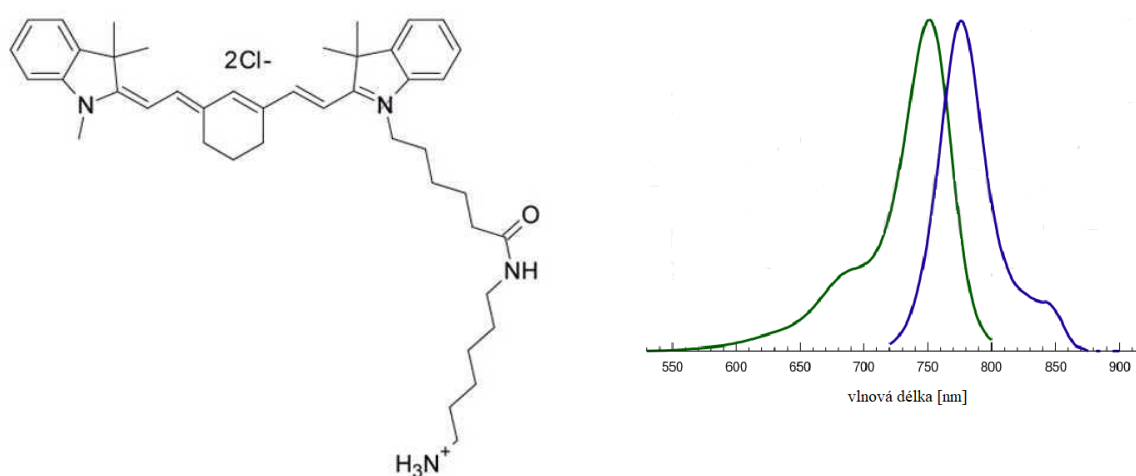
4.3.2. Štěpení polymerních konjugátů

Polymerní konjugáty byly rozpuštěny v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fosfátovém pufru (KH_2PO_4 $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; pH = 6,0 (upraveno pomocí hydroxidu sodného); $0,001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ EDTA), kde koncentrace polymeru byla $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a aktivita enzymu odpovídala $4\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Byl přidán roztok glutathionu ($15 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) a směs byla opět uchovávána v termostatu při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Uvolňování fluorescenční značky bylo sledováno pomocí HPLC s fluorescenční detektorem (excitace 750 nm, emise 773 nm) v čase 0, 1, 3, 5, 7, 12, 24 a 48 h od přidání enzymu. Vyhodnocování bylo provedeno z přírůstku nízkomolekulárního píku v případě polymerního konjugátu se spojkou Val-Cit-Aba a z ubývající plochy polymerního píku v případě spojky Gly-Phe-Leu-Gly.

4.4. Fluorescenční značka

Připravené polymerní konjugáty jsou složeny z hydrofilního polymerního nosiče na bázi HPMA, enzymově štěpitelné spojky a fluorescenční značky Cy7-NH₂ (viz obr. 4.9, str. 34). Jedná se o nízkomolekulární barvivo, které je kovalentně připojeno

k polymernímu nosiči. Emisní spektrum Cy7-NH₂ se pohybuje v blízké infračervené oblasti (NIR), která odpovídá rozmezí 700–900 nm. Struktura Cy7-NH₂ obsahuje volnou aminoskupinu, která může sloužit pro konjugaci s reaktivními molekulami. Její molekulová hmotnost je 719,87 g·mol⁻¹. Molární absorpční koeficient v methanolu je $\epsilon_{750} = 199000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Na obr. 4.9 jsou znázorněna absorpční a emisní spektra fluoroforu Cy7-NH₂ (s odpovídajícími maximy při 750 nm a 773 nm). Bohužel, fluorofor Cy7-NH₂ je ve vodě nerozpustný, takže nebylo možné stanovit extinkční koeficient Cy7-NH₂ ve vodném roztoku.



Obr. 4.9: Chemická struktura Cy7-NH₂ (vlevo); Emisní (modrá) a excitační (zelená) spektrum Cy7-NH₂ (vpravo). Převzato a upraveno dle [49].

4.5. *In vitro* studie

Práce s buněčnými kulturami byla provedena za sterilních podmínek v laminárním boxu. Pro *in vitro* studii byla využita epiteliální buněčná linie FaDu. Buněčná linie byla vybrána s návazností na předpokládané budoucí biomedicínské využití konjugátu (nádory hlavy a krku).

Jedná se o adherentní buňky, tedy buňky rostoucí přichycené na povrchu, proto byly z kultivační lahvičky uvolněny pomocí 1 ml 0,25 % trypsinu a vloženy do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) na 5 min. Po odloučení buněk od stěny lahvičky byl zbytkový trypsin inhibován růstovým médiem EMEM obsahujícím inhibitory trypsinu. Následovala centrifugace (400× g) po dobu 3 min. Supernatant byl odlit a peleta z nádorových buněk byla opět suspendována v čerstvém mediu (3 ml, 37 °C). Pomocí Bürkerovy

komůrky bylo napočítáno $5,27 \cdot 10^5$ buněk na 1 ml roztoku. Nejprve do každé čtvrtiny mikroskopické čtyřkomorové mističky bylo vloženo 90 000 buněk spolu s mediem (0,5 ml). V jedné komůrce byl polymer se spojkou Gly-Phe-Leu-Gly, ve druhé s Val-Cit-Aba, ve třetí s β -Ala a ve čtvrté byla kontrola (NT). Každé barvení bylo provedeno v duplikátech – dvě pro mitochondrie, dvě pro lysosomy. Buňky byly inkubovány 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Pro optimální viditelnost fluorescenční značky na buňkách byla použita koncentrace Cy7-NH₂ rovna 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

K vizualizaci distribuce a lokalizace polymeru v mitochondriích a lysosomech bylo využito několik fluorescenčních značek. K barvení lysosomů byl využit LysoTracker Yellow-HCK-123, k barvení mitochondrií MitoLite™Dyes Blue FX490, k barvení jader Hoechst 33342. Fluorofory spolu s použitými lasery a filtry jsou znázorněny v tab. 4.1. Pro fixaci barvení byl využit 4 % parachloraldehyd. Samotný polymer nese kovalentně navázaný Cy7-NH₂, který jsme díky jeho fluorescenci schopni pozorovat. Pomocí fluorescenční mikroskopie nelze rozlišit, zda je Cy7-NH₂ stále navázaný na polymeru nebo již volně v cytoplasmě.

Tab. 4.1: Fluorescenční značky s excitačními a emisními délkami, příslušným laserem a použité filtry

Barvivo	Excitační vlnové délka [nm]	Emisní vlnová délka [nm]	Laser [nm]	Filtr [nm]
Cyanin 7-NH ₂	750	773	775	800–900
LysoTracker Yellow-HCK-123	465	535	485	500–550
MitoLite™Dyes Blue FX490	350	490	405	422–467
Hoechst 33342	361	497	405	422–467

Konfokální mikroskop se skládal z optického mikroskopu Nikon Eclipse Ti-E s využitím nástrojů od firmy Abberior-Instruments STED při zvětšení 60 \times . Numerická apertura byla rovna 1,4. Rychlost snímání 1 pixelu byla zvolena buď 20 ms za 6 h, nebo 10 ms za 24 h, kde 1 pixel odpovídá 50 \times 50 nm.

5. Výsledky

5.1. Příprava polymerních konjugátů a jejich prekurzorů

V rámci této bakalářské práce byly syntetizovány fluorescenčně značené polymerní konjugáty, které by měly umožnit uvolnění fluoroforu v nádorovém prostředí. Základním bodem této práce byl předpoklad, že fluorescence vybraného fluoroforu se významně sníží po navázání na polymerní nosič, a po zpětném uvolnění dojde opět k významnému nárůstu fluorescence. Nejdříve byly úspěšně peptidovou syntézou na pevné fázi připraveny sekvence Gly-Phe-Leu-Gly a Az-Val-Cit-OH, které byly následně využity jako spojky mezi polymerním nosičem a fluorescenční značkou. Dále byly řízenou RAFT polymerizací připraveny kopolymery na bázi HPMA, konkrétně P-Ala-TT ($55\,700\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) a P-GFLG-TT ($35\,200\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Oba kopolymery měly molekulovou hmotnost umožňující jejich pasivní akumulaci v nádorové tkáni a zároveň jejich následnou eliminaci z organismu pomocí glomerulární filtrace.

Následující příprava polymerních konjugátů s fluorescenční značkou se lišila podle použitého prekurzoru. V případě prekurzoru s tetrapeptidem Gly-Phe-Leu-Gly bylo využito TT reaktivních skupin představující aktivované karboxylové skupiny. TT skupiny sloužily pro připojení fluorescenční značky, Cy7-NH₂, amidovou vazbou.

Syntéza polymerního konjugátu P-Val-Cit-Aba-Cy7 se sestávala ze dvou paralelně probíhajících příprav těchto meziproductů: Az-Val-Cit-Aba-Cy7 a polymerního prekurzoru P-Ala-DBCO, které byly nakonec propojeny nekatalyzovanou „click“ reakcí (bez přítomnosti mědi) azidu na trojnou vazbu DBCO skupin prekurzoru. Při přípravě Az-Val-Cit-Aba-Cy7 nejprve došlo k připojení Aba na karboxylový konec molekuly Az-Val-Cit-OH, po které následovala aktivace vzniklého produktu na Az-Val-Cit-Aba-Npc. Na aktivovaný komonomer Az-Val-Cit-Aba-Npc byl v posledním kroku připojen Cy7-NH₂. Při konjugaci fluoroforu dochází k uvolnění 4-nitrofenolu a navázání značky na hydroxyskupinu Aba pomocí uretanové vazby. Příprava prekurzoru P-Ala-DBCO spočívala v reakci P-Ala-TT s DBCO-NH₂. Zbývající TT skupiny byly odstraněny přidáním Amp.

Připravené polymerní konjugáty jsou charakterizovány v tab. 5.1, str. 37. Jako kontrolní vzorek pro přípravu nedegradovatelného polymerního konjugátu byl využit polymerní konjugát poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-Cy7)] (P-Ala-Cy7), který byl připraven v rámci oddělení, na kterém jsem vypracovala svou práci. Konjugát obsahuje enzymově

neštěpitelnou spojku β -Ala, u které bylo předpokládáno, že nedojde při biologickém využití k uvolnění fluoroforu, a tedy ani intenzita fluorescence se nebude zvyšovat. Polymerní konjugát P-Ala-Cy7 byl připraven konjugací Cy7-NH₂ na polymerní prekurzor poly[HPMA-co-(Ma- β -Ala-TT)] jehož obsah koncových TT skupin činil 11,2 mol. % (0,718 mmol·g⁻¹). Prekurzor byl analyzován pomocí SEC: $M_w = 36\,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $D = 1,05$.

Tab. 5.1: Molekulové charakteristiky polymerních prekurzorů a polymerních konjugátů s Cy7-NH₂

Kopolymer	$M_w^{a)}$ [g·mol ⁻¹]	$D^{a)}$	Cy7-NH ₂ ^{b)} [hm. %]	TT ^{c)} [mol. %]	DBCO ^{d)} [mol. %]
poly[HPMA-co-(Ma-GFLG-TT)]	35 200	1,08	-	4,76	-
poly[HPMA-co-(Ma- β -Ala-DBCO)]	57 000	1,10	-	-	3
poly[HPMA-co-(Ma- β -Ala-TT)]	36 500	1,05	-	11,2	-
poly[HPMA-co-(Ma-GFLG-Cy7)]	NA*	NA*	1	-	-
poly[HPMA-co-(Ma- β -Ala-Val-Cit-Aba-Cy7)]	NA*	NA*	1	-	-
poly[HPMA-co-(Ma- β -Ala-Cy7)]	NA*	NA*	2	-	-

*nelze změřit

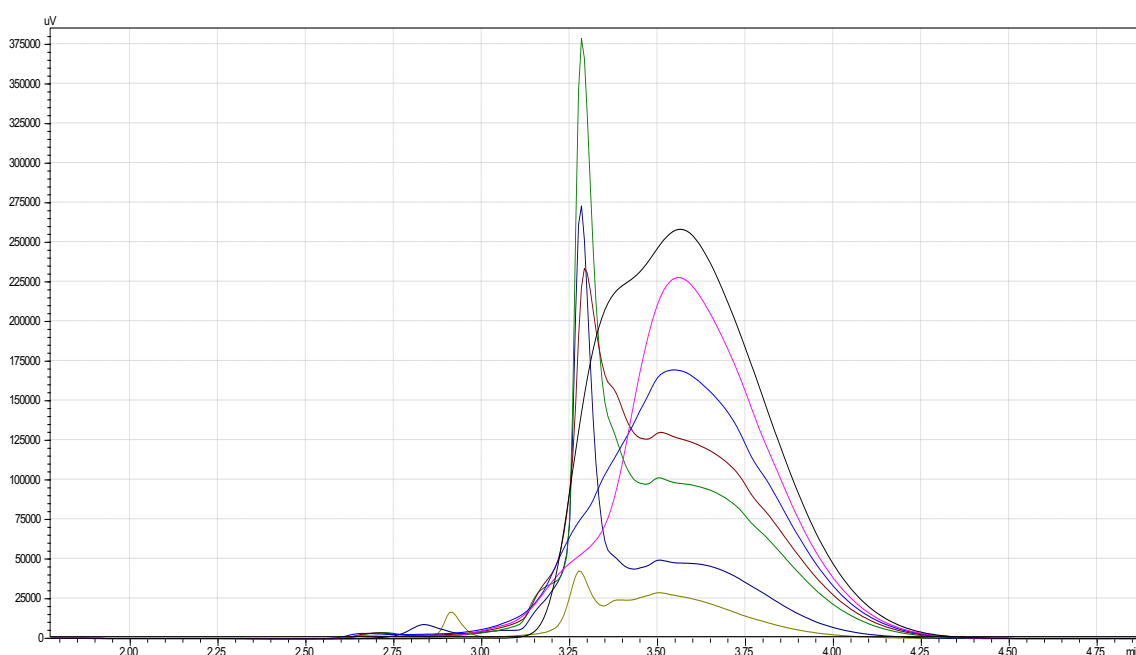
^{a)}Hmotnostně střední molární hmotnosti (M_w) a indexy polydisperzity (D) naměřené SEC pomocí rozptylového a refraktometrického detektoru; ^{b)}obsah Cy7-NH₂ naměřen UV/Vis spektrofotometrií v methanolu ($\epsilon_{750} = 199\,000\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), ^{c)}obsah TT-skupin naměřen pomocí UV/Vis spektrofotometrií v methanolu ($\epsilon_{305} = 10\,300\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); ^{d)}obsah DBCO-skupin naměřen pomocí UV/Vis spektrofotometrií v methanolu ($\epsilon_{292} = 13\,000\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

U připravených polymerních konjugátů nebylo možné pomocí SEC stanovit hmotnostně střední molekulovou hmotnost (v tab. 5.1 značeno NA), protože dochází k interakci laseru s daným fluoroforem a emitovaná fluorescence přispívá k intenzitě rozptýleného světla, a tím ovlivňuje výsledek. Jejich SEC záznam odpovídá SEC záznamu polymerních prekurzorů, nedošlo ani k posunu, ani k rozšíření příslušných píků.

5.2. Enzymové štěpení

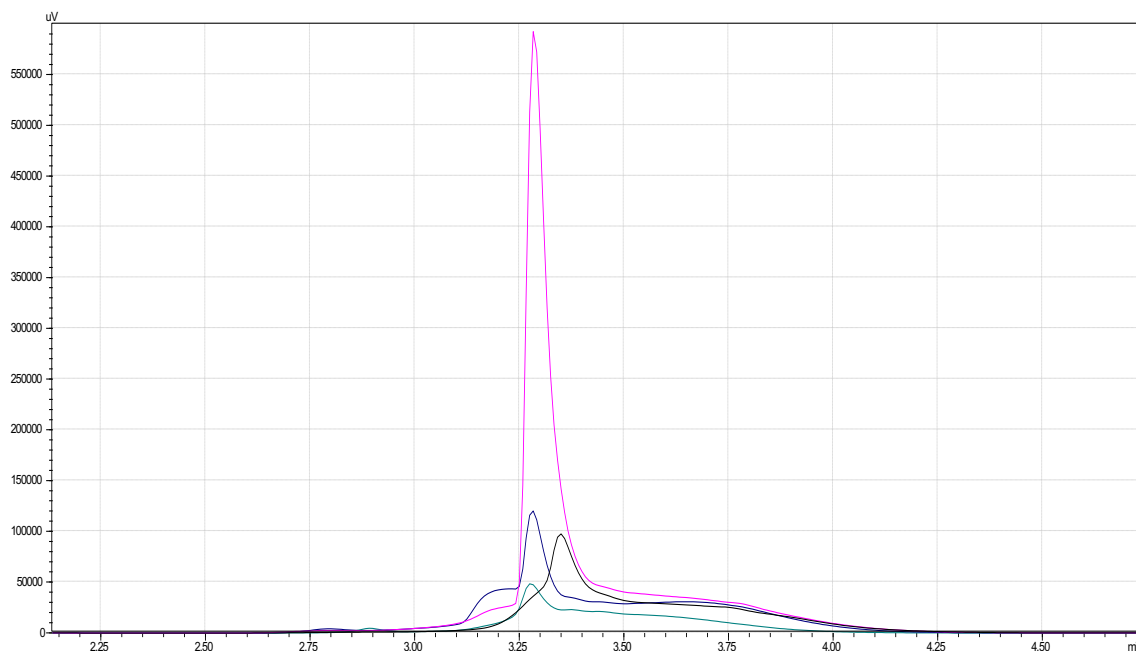
Fluorescenční značka Cy7-NH₂ byla z polymerního konjugátu štěpena pomocí enzymu kathepsinu B (*bos taurus*, slezina). Uvolňování značky bylo sledováno v závislosti na čase pomocí HPLC a je znázorněno na obr. 5.1, str. 38. Koncentrace aktivních míst kathepsinu B byla stanovena spektrofotometricky pomocí modelového substrátu Bzl-Arg-Nap (viz kapitola 4.3.1.). Pro enzymové reakce s polymerními substráty byla

použita výsledná koncentrace kathepsinu B $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. HPLC chromatogramy konjugátu se spojkou Gly-Phe-Leu-Gly v průběhu jeho inkubace s kathepsinem B v různých časech od počátku inkubace jsou uvedeny na obr. 5.1. Uvolňování fluorescenční značky z polymerního nosiče s Gly-Phe-Leu-Gly má za následek nárůst fluorescence volného fluoroforu a pokles fluorescence polymerně vázaného fluoroforu. Na počátku reakce byl veškerý Cy7-NH₂ navázaný na polymeru, viz černá křivka na obr. 5.1.



Obr. 5.1: HPLC chromatogramy reakční směsi polymerního konjugátu poly[HPMA-co-(Ma-GFLG-Cy7)] štěpené kathepsinem B ($4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), čas 0 hod (černá), 1 h (růžová), 3 h (světle modrá), 5 h (hnědá), 7 h (zelená), 12 h (tmavě modrá), 24 h (khaki). Kolona $100 \times 4,6 \text{ mm}$ Chromolith Performance RP-18e s reverzní fází, mobilní fáze s lineárním gradientem 0–100 % B (A: 94,9 % H₂O; 5 % acetonitril; 0,1 % TFA; B: 94,9 % acetonitril; 5 % H₂O; 0,1 % TFA), průtoková rychlost: $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Fluorescenční detektor, excitace 750 nm, emise 773 nm.

Na obr. 5.2 je znázorněn nárůst fluorescence při inkubaci polymerního konjugátu se štěpitelnou spojkou Val-Cit-Aba s kathepsinem B. Zde je jasně patrný prudký nárůst fluorescence po štěpení, což značí uvolnění fluoroforu.

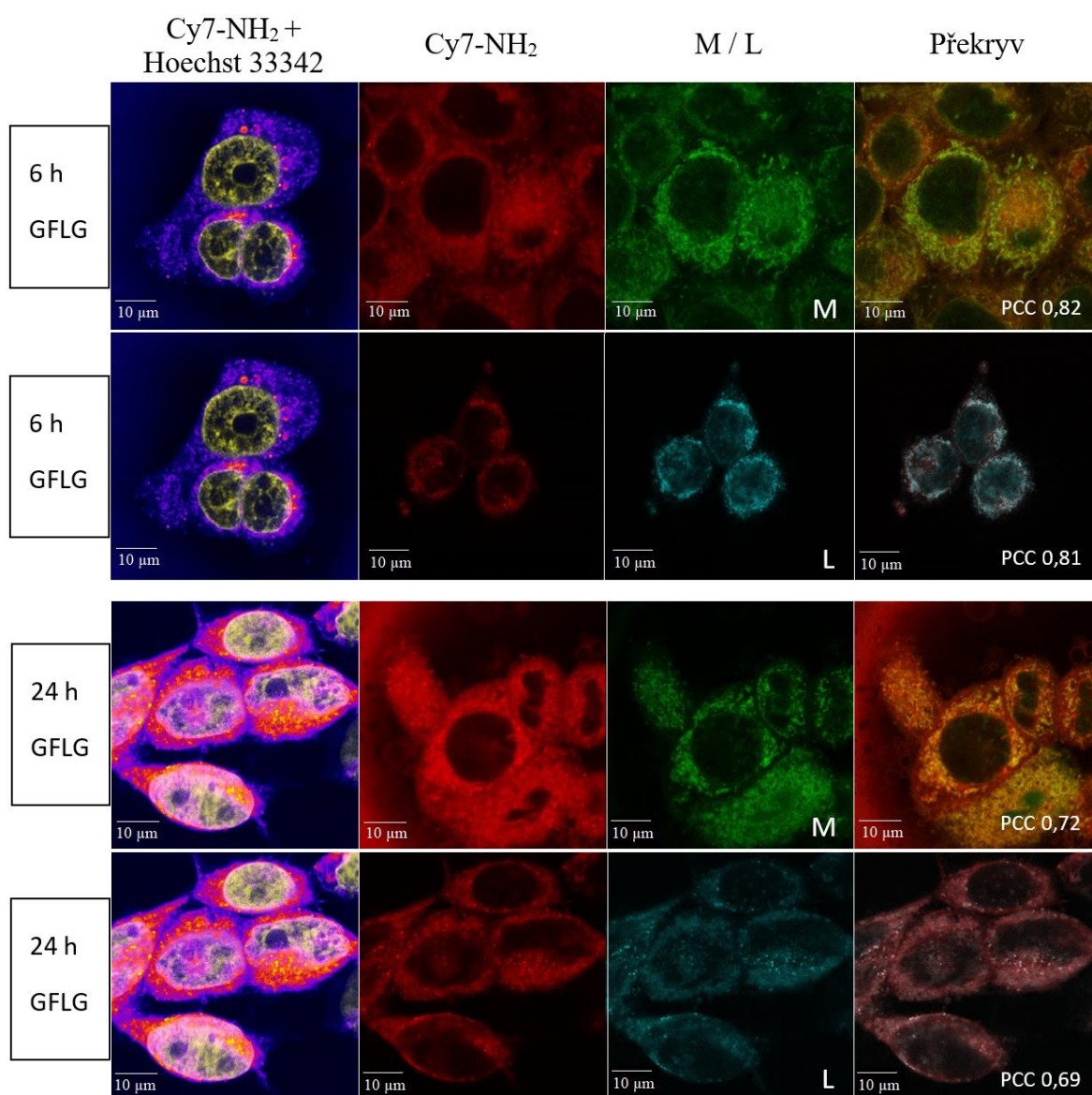


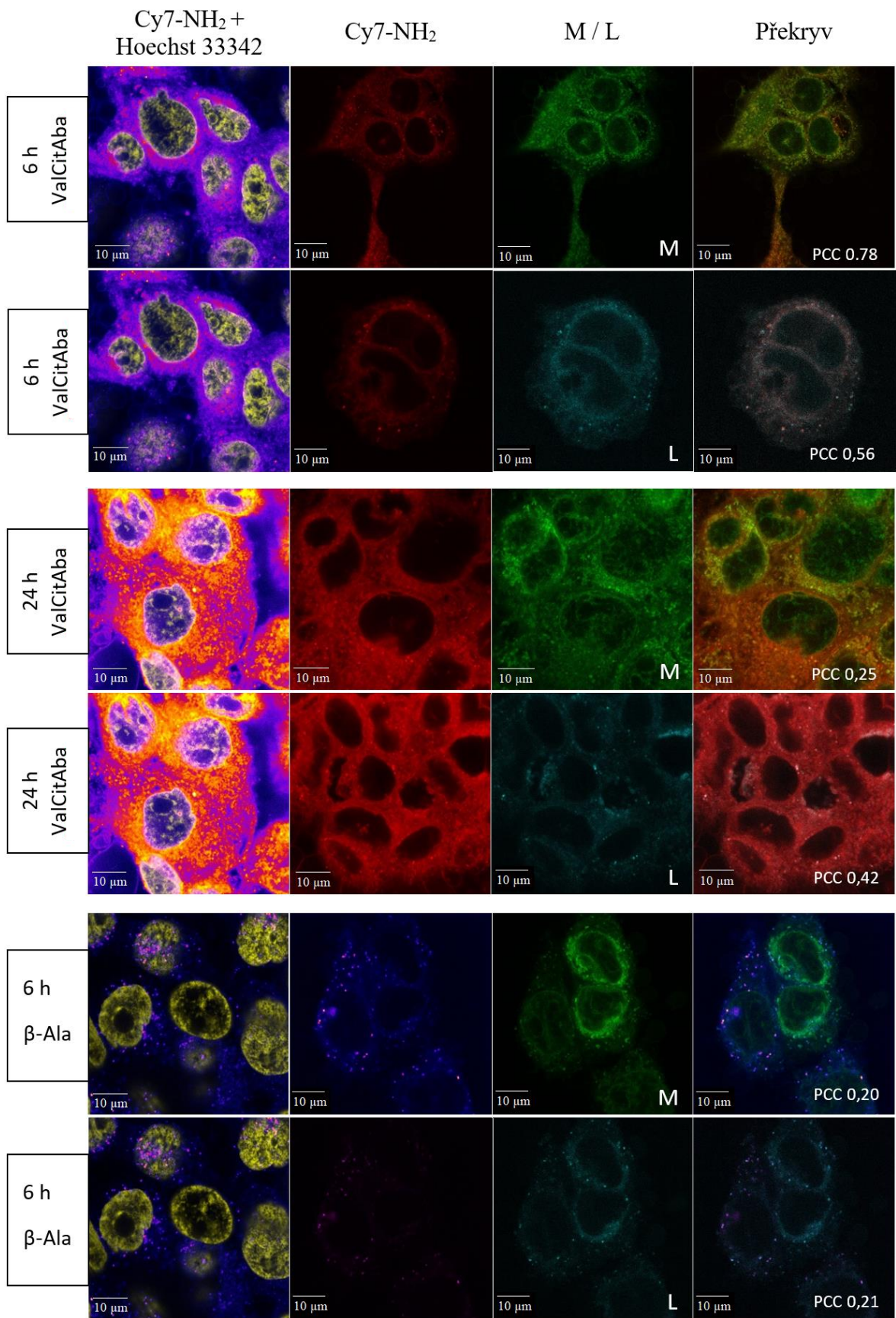
Obr. 5.2: HPLC chromatogramy reakční směsi polymerního konjugátu poly[HPMA-co-(Ma- β -Ala-Val-Cit-Aba-Cy7)] štěpené kathepsinem B ($4 \cdot 10^{-7}$ mol \cdot dm $^{-3}$), čas 0 h (černá), 1 h (růžová), 9 h (modrá), 48 h (zelená). Kolona 100 \times 4,6 mm Chromolith Performance RP-18e s reverzní fází, mobilní fáze s lineárním gradientem 0–100 % B (A: 94,9 % H $_2$ O; 5 % acetonitril; 0,1 % TFA; B: 94,9 % acetonitril; 5 % H $_2$ O; 0,1 % TFA), průtoková rychlost: 5 ml \cdot min $^{-1}$. Fluorescenční detektor, excitace 750 nm, emise 773 nm.

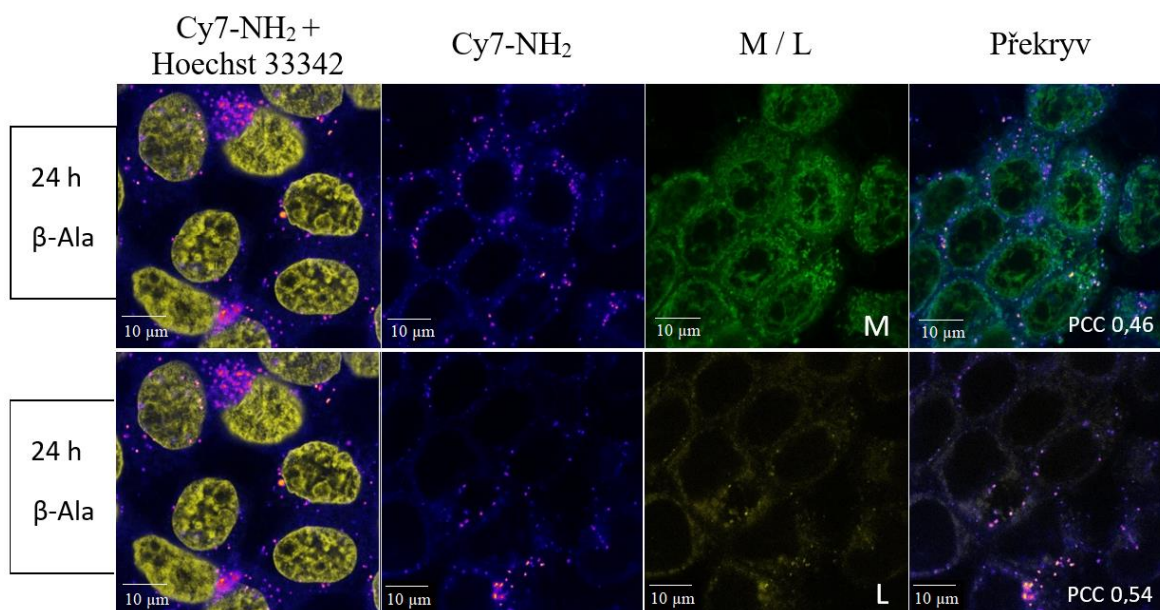
5.3. *In vitro* studie

Obr. 5.3, str. 40–42, znázorňuje snímky nádorových buněk (FaDu) inkubovaných s fluorescenčně značenými polymerními sondami. Pro biologické testování intracelulární biodistribuce polymerních nosičů byly použity tři polymerní konjugáty s různými spojkami: dvě spojky byly enzymově štěpitelné (Gly-Phe-Leu-Gly a Val-Cit-Aba) a jedna spojka sloužila jako enzymově neštěpitelná kontrola (β -Ala). Snímky byly pořízené pomocí laserové skenovací konfokální mikroskopie a zpracované softwarem ImageJ. Buněčné kompartmenty (jádro, mitochondrie, lysosomy) byly označeny fluorescenčními značkami (viz tab. 4.1, str. 35). Na pořízených snímcích, bohužel, nelze rozlišit polymerně vázaná značka a značka uvolněná z polymerního nosiče. Proto druhý sloupec obr. 5.3 odpovídá celkovému množství Cy7-NH $_2$.

Již po 6 h inkubace (37 °C) byla pozorována výrazně vyšší intenzita fluorescence Cy7-NH₂ v buňkách. U všech polymerních konjugátů došlo ke vstupu do nádorových buněk, kde je možné sledovat distribuci a lokalizaci Cy7-NH₂ v buněčných kompartmentech (mitochondrie, lysosomy). Nicméně fluorescenční intenzita byla významně vyšší u systémů se štěpitelnými spojkami. Fluorescenční intenzita pozorovaná po 24 h inkubace (37 °C) polymerních konjugátů s buňkami byla rovněž mnohem vyšší u polymerů se štěpitelnými spojkami Gly-Phe-Leu-Gly a Val-Cit-Aba, než u kontrolního konjugátu s neštěpitelnou spojkou β-Ala. U polymeru se spojkou β-Ala nepozorujeme po 24 h žádnou výraznou změnu, stále se fluorofory vyskytují v diskrétních váčcích.







$c(\text{Cy7-NH}_2) = 5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Obr. 5.3: Fluorescence zobrazená konfokálním mikroskopem. Internalizace fluorescenčně značených polymerních konjugátů s nádorových buňka (FaDu). GFLG: poly[HPMA-co-(Ma-GFLG-Cy7)]; ValCitAba: poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-Val-Cit-Aba-Cy7)]; β-Ala: poly[HPMA-co-(Ma-β-Ala-Cy7)]. Jádra jsou znázorněna žlutě, Cy7-NH₂ červeně, v případě spojky β-Ala modrou barvou (odstín Fire) z důvodu kontrastu. Jádra byla značena pomocí Hoechst33342, mitochondrie pomocí MitoLite™Dyes Blue FX490 (na snímcích označeno písmenem M), lysosomy pomocí LysoTracker Yellow-HCK-123 (na snímcích označeno písmenem L) a na polymer je kovalentně navázán Cy7-NH₂. Snímky byly zpracovány softwarem ImageJ a barvy na nich byly počítačově upraveny. V poslední sloupci je znázorněn překryv (kolokalizace) Cy7-NH₂ buď s MitoLite™Dyes Blue FX490, anebo s LysoTrackerem Yellow-HCK-123.

Pomocí Softwaru ImageJ byl stanoven tzv. Pearsonův korelační koeficient (PCC), jehož hodnoty jsou vyneseny v tab. 5.2, str. 43. Rozsah koeficientu je od hodnoty -1 do 1. Čím víc se PCC blíží 1 nebo -1, tím je dokonalejší korelace mezi lokalizací dvojice fluoroforů. Z hodnot PCC je patrné, že zatímco u polymerních konjugátů s enzymově štěpitelnou spojkou, P-GFLG-Cy7 a P-Val-Cit-Aba-Cy7, hodnota koeficientu po 24 h inkubace s buňkami poklesla oproti hodnotě po 6 h inkubace, tak u polymerního konjugátu s neštěpitelnou spojkou, P-Ala-Cy7, tomu bylo naopak.

Tab. 5.2: Pearsonův korelační koeficient Cy7-NH₂ s lysosomy a mitochondriemi po 6 a 24 hodinách inkubace pro různé spojky

Organela	Pearsonův korelační koeficient (PCC)					
	Gly-Phe-Leu-Gly		Val-Cit-Aba		β -Ala	
	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h
Lysosomy	0,81	0,69	0,56	0,42	0,21	0,54
Mitochondrie	0,82	0,72	0,78	0,25	0,20	0,46

6. Diskuze

Cílem předkládané bakalářské práce byla syntéza, fyzikálně-chemická charakterizace a předběžné biologické hodnocení makromolekulárních fluorescenčně značených polymerních sond určených pro vizualizaci pevných nádorů. Práce byla zaměřena na přípravu polymerních konjugátů na bázi kopolymerů HPMA a na enzymové uvolňování fluorescenční značky, Cy7-NH₂, v nádorových buňkách, a s tím související změnu intenzity fluorescence. Tato práce je založena na hypotéze, že intenzita fluorescence uvolněné značky je značně vyšší než v případě značky vázané na polymerní nosič, což bylo prokázáno v *in vitro* studii (viz obr. 5.3, str. 40–42), kde je rozdíl nejvíce patrný v případě spojky Val-Cit-Aba. Zároveň předpokládáme, že polymerní fluorescenční sonda se bude akumulovat v nádorových buňkách v důsledku EPR efektu, a tím bude dosaženo velkého kontrastu fluorescenčního signálu mezi nádorovou a zdravou tkání. Naším cílem tedy byla syntéza polymerního systému s aktivovatelnou intenzitou fluorescence, která by posléze umožnila chirurgovi odstranění nádorové hmoty na základě fluorescenčního signálu z nádorové tkáně.

6.1. Syntéza a charakterizace polymerních sond

Pozornost v této práci byla věnována především syntéze polymerních systémů s fluorescenční značkou, které se povedlo úspěšně připravit. Syntéza polymerních sond se sestávala z několika kroků, ve kterých postupně byly připravovány komonomery na bázi HPMA, polymerní prekurzory a nakonec polymerní konjugáty s fluorescenční značkou.

Obě polymerní sondy byly připravovány jinými strategiemi. Konjugát P-GFLG-Cy7 byl připraven kopolymerizací methakroylovaného tetrapeptidu. V rámci pracovního kolektivu byl syntetizován i methakroylovaný dipeptid s TT koncovými skupinami, Ma-Val-Cit-TT, ale pokusy o jeho vyčištění a izolaci nebyly úspěšné. Z tohoto důvodu byla zvolena jiná cesta přípravy, kde pomocí „click“ reakce byl Az-Val-Cit-Npc vázán na polymer, ale výsledný obsah reaktivních Npc na polymeru byl příliš nízký a nebylo možné následně konjugovat fluorofor. Proto bylo rozhodnuto vytvořit přímo azidový derivát s fluoroforem a následně cykloadiční „click“ reakcí připojit Az-Val-Cit-Npc-Cy7 na DBCO skupiny polymerního prekurzoru. V mém případě byl na koncový Npc připojen Aba. Ve srovnání s předcházející prací bylo zjištěno, že není-li přítomen Aba, reakce téměř neběží [50]. Je to dáno tím, že Aba dobře zapadá

do aktivního místa enzymu, tím dojde k uvolnění derivátu Aba-Cy7 a následně proběhne velmi rychlá 1,6-eliminace za vzniku Aba, CO₂ a Cy7-NH₂.

Aminokyselinové sekvence, které byly následně využity jako spojky pro navázání fluoroforu na polymerní prekurzor, byly připraveny metodou peptidové syntézy na pevné fázi (Merrifieldova metoda). Zatímco tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly byl po odštěpení z pryskyřice modifikován reaktivními TT skupinami, v případě Az-Val-Cit-OH došlo k připojení Aba na C-konec sekvence a následnou aktivací pomocí PNPC byl připraven Az-Val-Cit-Aba-Npc. Vzhledem k velkým ztrátám při čištění na silikagelu, bylo pro jeho čištění využito preparativní HPLC. Na derivát dipeptidu Az-Val-Cit-Aba-Npc byl uretanovou vazbou navázán fluorofor. Kopolymery HPMA s methakrylovanými aminokyselinami (β -Ala) nebo tetrapeptidem byly syntetizovány řízenou RAFT polymerizací.

Během syntézy polymerního konjugátu P-GFLG-Cy7 bylo zjištěno, že při aminolytickém navazování Cy7-NH₂ v methanolu na prekurzor s TT koncovými skupinami vzniká neznámý derivát fluorescenční značky, který má odlišné UV/Vis spektrum a jeho molekulová hmotnost určená hmotnostním spektrometrem se liší od molární hmotnosti výchozího Cy7-NH₂ o 2 g·mol⁻¹. Dále dochází k posunu absorpčního i emisního maxima k vyšším vlnovým délkám (780 nm) a analýza pomocí HPLC stanovila pro tento derivát téměř o půl minuty vyšší retenční čas. V DMF ke vzniku tohoto derivátu nedochází. Identita derivátu nebyla zjištěna, neboť další studium struktury této látky by přesahovalo rámec této bakalářské práce. Při přípravě makromolekulárního systému P-Val-Cit-Aba-Cy7 nejdříve došlo k modifikaci pomocí DBCO-NH₂ a v dalším kroku bylo využito cykloadiční „click“ reakce, při které vznikl triazolový kruh mezi azidy molekul Az-Val-Cit-Aba-Cy7 a koncovými DBCO skupinami polymerního prekurzoru P-Ala-DBCO.

Obsah fluorescenční značky Cy7-NH₂ na polymerních sondách (1 hm. % u enzymově štěpitelných konjugátů, 2 hm. % u enzymově neštěpitelné kontroly) byl dostačující pro fluorescenční zobrazování při biologickém testování, a měl by být dostačující i při budoucím využití v naváděné chirurgii. U připravených polymerních konjugátů s Cy7-NH₂ není možné stanovit hodnotu M_w přímo pomocí SEC s detektorem rozptylu světla, protože dochází k interakci laseru použitého pro rozptylový detektor s fluoroforem. K intenzitě rozptýleného světla by tak přispívala i intenzita fluorescence a naměřené hodnoty M_w by byly mnohonásobně vyšší než odpovídá realitě. Lze oprávněně předpokládat, že M_w připravených konjugátů se výrazně neliší od M_w

polymerních prekurzorů (viz tab. 5.1, str. 37), protože SEC chromatogramy konjugátů i prekurzorů jsou prakticky totožné. Vysoká molární hmotnost připravených polymerních konjugátů s fluorescenční značkou je vhodná pro jejich akumulaci a dopravu do pevného nádoru pomocí EPR efektu.

6.2. Štěpení kathepsinem B

V této práci byl jako modelový enzym ke sledování uvolňování Cy7-NH₂ z polymerních konjugátů použit kathepsin B. Jedná se o lysosomální a endosomální cysteinovou proteasu. Fluorescenční značka byla na polymerní nosič navázána prostřednictvím dvou spojek – Gly-Phe-Leu-Gly a Val-Cit-Aba, o nichž je známo, že vyhovují substrátové specifitě kathepsinu B. V případě spojky Val-Cit-Aba dochází k rozštěpení vazby mezi Aba a Cit, u spojky Gly-Phe-Leu-Gly dochází ke štěpení na C-konci sekvence. Jako negativní kontrola byl použit polymerní konjugát se spojkou β -Ala, která nepodléhá enzymové hydrolýze kathepsinem B.

Tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly, který vykazuje vysokou stabilitu v krevní plasmě, je v literatuře opakovaně popisován jako spojka nesoucí kancerostatikum Dox navázané na polymerní nosič na bázi HPMA, která umožňuje intracelulární uvolnění Dox působením lysosomálních proteas [44, 51]. Z těchto důvodů byla vybrána právě tato spojka pro *in vitro* studii v této práci. Spojka Val-Cit-Aba, jež byla použita např. v klinickém testování protilátkových konjugátů s monomethyl auristatinem E, podléhá ještě rychlejší enzymové degradaci kathepsinem B než Gly-Phe-Leu-Gly [52].

Pomocí fluorescenčního detektoru při HPLC analýze byla pozorována změna fluorescence pro polymerně vázaný a volný fluorofor. V případě polymerního konjugátu se spojkou Gly-Phe-Leu-Gly je možné pozorovat, jak samotný polymerní konjugát P-GFLG-Cy7, tak uvolněný fluorofor (viz obr. 5.1, str. 38). Po přidání enzymu, který způsobí uvolnění značky, se intenzita fluorescence uvolněného fluoroforu zvýší jen nepatrně oproti intenzitě fluorescence polymerně vázaného fluoroforu. Ze začátku množství uvolněného Cy7-NH₂ narůstá (zelená křivka), ale zhruba po 12 h je zaznamenán pokles plochy odpovídajícího píku, což přisuzujeme možné fázové separaci málo rozpustného uvolněného fluoroforu, případně jeho degradaci na produkty, které při této excitační vlnové délce fluorescenci nevykazují. Bohužel, použitá

koncentrace fluorescenční značky je příliš nízká pro sledování její absorpce pomocí UV/Vis detektoru.

K prudkému nárůstu intenzity fluorescence došlo po přidání enzymu k reakční směsi polymerního konjugátu P-Val-Cit-Aba-Cy7 (obr. 5.2, str. 39). Tento polymerní konjugát nevykazuje téměř žádnou fluorescenci. Je možné se domnívat, že zhášení fluorescence je způsobeno kombinací přítomnosti aromatické struktury ve spojení obsahující Aba a vzájemným přiblížením fluorescenčních molekul vázaných na polymer, což vede ke zhášení fluorescence fluoroforu na polymerním konjugátu. Jakmile je přidán enzym, dochází k uvolnění Cy7-NH₂ a tím i k výraznému zvýšení intenzity fluorescence. Pozorovaný fluorescenční signál na HPLC je proto téměř výhradně z uvolněného Cy7-NH₂. Po 1 h se zdá, že většina fluorescenční značky je z polymerního systému uvolněna (růžová křivka). Poté začne intenzita fluorescence odpovídající uvolněnému Cy7-NH₂ klesat (modrá křivka). Možnými důvody tohoto dění mohou být: degradace uvolněného Cy7-NH₂, nebo jeho fázová separace z roztoku v důsledku nízké rozpustnosti Cy7-NH₂ ve vodě.

Ze získaných výsledků intenzity fluorescence je patrné, že fluorescenční značka Cy7-NH₂ je výrazně rychleji uvolňována z polymerního nosiče obsahujícího spojení Val-Cit-Aba než z polymeru se spojkou Gly-Phe-Leu-Gly. V případě spojení Val-Cit-Aba dojde v řádu několika desítek minut k výraznému nárůstu intenzity fluorescence, což je požadovaný cíl pro fluorescenčně navigovanou chirurgii. Proto se lze domnívat, že rychleji štěpitelná spojka bude vhodnější fluorescenční sondou. Na závěr lze konstatovat, že intenzita fluorescence významně závisí na okolí fluoroforu, a proto i samotná struktura polymeru může způsobit zhášení fluorescence nesené fluoroforenční značky.

6.3. Výběr fluorescenční značky

Jedním z důvodů výběru značky Cy7-NH₂ byla její dostatečně vysoká vlnová délka excitace a emise, což je žádoucí, jelikož naše tělo pohlcuje v různých mírách elektromagnetické záření, např. viditelné záření je pohlcováno téměř absolutně. Záření o vysokých vlnových délkách v NIR oblasti spektra už tkání částečně prochází, protože nedochází k jeho úplnému zachycování a rozptylování. Dále lidské tělo v NIR oblasti nevykazuje téměř žádnou autofluorescenci, a proto je možné fluorescenci značky lépe pozorovat. Další výhodou této značky je volná aminoskupina, kterou lze využít

např. pro vazbu na polymer. Fluorofor Cy7-NH₂ relativně málo interaguje s buněčnými membránami, proto nedochází k jeho nespecifické sorpci na membránu, ani se výrazně nemění farmakokinetika polymerního nosiče pro navázání barviva. U některých fluorescenčních značek se totiž může stát, že ovlivní chování polymeru např. když se značka sorbuje na membrány buněk.

6.4. *In vitro* studie

Cílem práce bylo vyvinout takovou fluorescenční sondu, která by po i.v. podání dokázala vizualizovat hranice nádorové tkáně, a tak ji odlišit od okolní zdravé tkáně. Bylo by žádoucí mít výrazný rozdíl v intenzitě fluorescence mezi nádorem a zdravou tkání, aby byl získán dostatečný kontrast mezi těmito dvěma tkáněmi. Předpokladem pro *in vitro* studii bylo, že po přidání polymerního konjugátu k nádorovým buňkám nedojde k výraznému zvýšení intenzity fluorescence. Jakmile by mělo dojít k endocytóze konjugátů do buňky a štěpení enzymem v sekundárním lysosomu, tak je očekáváno uvolnění značky, a tím by mělo dojít k výraznějšímu zvýšení fluorescence některých organel buňky. Tento předpoklad byl posléze experimentem potvrzen (viz obr. 5.3, str. 40–42).

Intracelulární distribuce NIR značky byla pozorována pomocí LSCM. Ze získaných hodnot PCC v tab. 5.2, str. 43, můžeme konstatovat, že se Cy7-NH₂ nehromadí pouze v jednom buněčném kompartmentu, ale že se v různé míře dostává do různých organel, včetně mitochondrií a lysosomů. Právě tyto dvě organely byly vybrány pro detailní analýzu. Hodnoty koeficientu, bohužel, nepomohou určit, zda se fluorofor vyskytuje uvnitř kompartmentu nebo na jejím povrchu, ani zda je fluorescenční značka stále navázaná na polymer, anebo je již ve volné formě. Avšak je možné usuzovat, že v případě P-Val-Cit-Aba-Cy7 pozorovaná fluorescence pochází převážně z uvolněného fluoroforu, protože polymerně vázaný fluorofor má zanedbatelnou intenzitu fluorescence.

Použitý polymer je hydrofilní makromolekulární látka, proto nemůže samovolně difundovat skrz biologické membrány a proniká do buněk endocytózou. Po jeho internalizaci do buněk tak nejspíše dochází k jeho shlukování v blíže nespecifikovaných váčcích, což odpovídá i pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zda-li se jedná o sekundární lysosomy, endosomy nebo váčky zbylé po lysozomech a připravené k odstranění buněk, bude předmětem dalšího studia. Jakmile se Cy7-NH₂ uvolní

z polymeru v sekundárním lysosomu, bude mít pravděpodobně tendenci difundovat do cytoplasmy nebo se bude sorbovat na hydrofobní struktury, protože není rozpustný ve vodě.

PCC pro lysosomy je pro vzorky se spojkami Gly-Phe-Leu-Gly a Val-Cit-Aba po 24 h nižší oproti 6 h, což vypovídá o tom, že uvolněný Cy7-NH₂ se postupně začíná z lysosomů dostávat do jiných částí buňky. Kolokalizace u polymeru obsahujícího spojku Val-Cit-Aba klesá rychleji, což je v souladu s rychlejším štěpením, proto je po 6 h menší PCC v lysosomu než v případě spojky Gly-Phe-Leu-Gly. Zdá se, že uvolněný Cy7-NH₂ opouští lysosomy a je téměř v rámci celé buňky, a z tohoto důvodu je pozorována menší míra kolokalizace fluorescenčního signálu Cy7-NH₂ a signálu označujícího danou organelu. Polymer se spojkou β -Ala se vyskytuje v diskrétních váčcích a vyzařuje mnohem nižší intenzitu fluorescence pravděpodobně z důvodu neštěpitelnosti spojky. V tomto případě nebyla nalezena kolokalizace mitochondrie a neštěpitelného polymeru s Cy7-NH₂. Hodnota PCC je nižší, ale na rozdíl od štěpitelných spojek v čase roste, protože se pravděpodobně polymer postupně hromadí v těchto buněčných kompartmentech.

Je možné shrnout, že obě štěpitelné fluorescenční sondy obsahující enzymově degradovatelné sekvence prokázaly svou schopnost navýšení fluorescence po internalizaci do nádorových buněk. Vyšší nárůst fluorescenčního signálu byl pozorován pro spojku Val-Cit-Aba, nicméně i spojka Gly-Phe-Leu-Gly vykazala velmi slušný nárůst signálu po inkubaci s buňkami. Obě připravené polymerní sondy budou dále charakterizovány pokročilejšími biologickými metodami v navazujícím studiu.

7. Závěr

Cílem předkládané bakalářské práce byla syntéza, fyzikálně-chemická charakterizace a předběžné biologické testování hydrofilního makromolekulárního nosiče s fluorescenční značkou navrženého pro vizualizaci nádorové tkáně.

Kopolymery na bázi HPMA připravené řízenou RAFT polymerizací byly navrženy a úspěšně připraveny. Tyto systémy obsahovaly dvě různé enzymově degradovatelné spojky Gly-Phe-Leu-Gly a Val-Cit-Aba, na které byla konjugována fluorescenční značka Cy7-NH₂. U těchto konjugátů bylo porovnáno uvolňování fluoroforu hydrolýzou pomocí kathepsinu B, přičemž rychlejší štěpení bylo pozorováno u spojky Val-Cit-Aba. Bylo potvrzeno, že především i této spojky dochází poštěpení k výraznému nárůstu fluorescenčního signálu, což by mohlo být využitelné v rámci navigované chirurgie.

Získanými výsledky v rámci této práce byla ověřena hypotéza, že značka uvolněná z polymerního nosiče vykazuje výrazně vyšší intenzitu fluorescence než značka vázaná na nosič. Z provedené *in vitro* studie konfokální fluorescenční mikroskopie na nádorové buněčné linii FaDu je patrná internalizace polymerního konjugátu s fluorescenční značkou do buněk a akumulace fluoroforu v buněčných kompartmentech (mitochondrie a lysosomy). Výsledky této *in vitro* studie a další výsledky z fyzikálně-chemického testování naznačují, že zejména Val-Cit-Aba představuje slibnou enzymově štěpitelnou spojku použitelnou v polymerních sondách pro navigovanou endoskopickou chirurgii.

Seznam použitých zdrojů

- [1] Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D.: Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69–90 (2011).
- [2] Matsumura, Y.; Maeda, H.: A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research*, 46:8, 6387–6392 (1986).
- [3] Slaninová, V., Krejčí, A.: *Rakovinná buňka a změny jejího metabolismu: cesta k přežití i nástroj k destrukci*. Živa, 2013, s. 202–205.
- [4] Povýšil, C.; Šteiner, I. et al.: *Obecná patologie*. Praha, Galén, 2011, s. 133–144.
- [5] White, K. A.; Grillo-Hill, B. K.; Barber, D. L.: Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. *Journal of Cell Science*, 130, 663–669 (2017).
- [6] Srivastava, A.; Laidler, P.; Davies, R. P.; Horgan, K.; Hughes, L. E.: The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76–4.0 mm thick) skin melanoma (A quantitative histologic study). *American Journal of Pathology*, 133:2, 419–423 (1988).
- [7] Weidner, N.; Semple, J. P.; Welch, W. R.; Folkman, J.: Tumor angiogenesis and metastasis – Correlation in invasive breast carcinoma. *Massachusetts Medical Society*, 324:1 (1991).
- [8] Folkman, J.: Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American*. 150–154 (1996).
- [9] Roberts, W. G.; Palade, G. E.: Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Research*, 57:4, 765–772 (1997).
- [10] Seymour, L. W.; Duncan, R.; Strohm, J.; Kopeček, J.: Effect of molecular-weight (Mw) of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats. *J. Biomed. Mater. Res.* 21, 1341–1358 (1987).
- [11] Ulbrich, K.; Šubr, V.: Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 1023–1050 (2004).
- [12] Xie, X.; Zhang, Y.; Li, F.; Lv, T.; Li, Z.; Chen, H.; Jia, L.; Ga, Y.: Challenges and Opportunities from Basic Cancer Biology for Nanomedicine for Targeted Drug Delivery. *Current Cancer Drug Targets*. 18, 1–20 (2018).

- [13] Williams, K. J.: The introduction of “chemotherapy” using arsphenamine - The first magic bullet. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **102**:8, 343–348 (2009).
- [14] Ringsdorf H.: Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J. Polym. Sci., Symp.* **51**, 135–153 (1975).
- [15] Drobnik, J.; Kopecek, J.; Labsky, J.; Rejmanova, P.; Exner, J.; Saudek, V.; Kalal, J.: Enzymatic Cleavage of Side-Chains of Synthetic Water-Soluble Polymers. *Macromol. Chem. Phys.*, **177**:10, 2833–2848 (1976).
- [16] Pola, R.; Parnica, J.; Zuska, K.; Bohmova, E.; Filipova, M.; Pechar, M.; Pankrac, J.; Mucksova, J.; Kalina, J.; Trefil, P.; Sefc, L.; Vitvieka, D.; Pouekova, P.; Boueek, J.; Janouakova, O.; Etrych, T.: Oligopeptide-targeted polymer nanoprobes for fluorescence-guided endoscopic surgery. *Multifunctional Materials*, **2**:2, (2019).
- [17] Böhmová, E.; Pola, R.; Pechar, M.; Parnica, J.; Machová, D.; Janoušková, O.; Etrych, T.: Polymer Cancerostatics Containing Cell-Penetrating Peptides: Internalization E_cacy Depends on Peptide Type and Spacer Length. *Pharmaceutics*, **12**:1, 1–18 (2020).
- [18] Markovsky, E.; Baabur-Cohen, H.; Omer, L.; Tiram, G.; Ferber, S.; Ofek, O.; Polyak, D.; Scomparin, A.; Satchi-Fainaro, R.: Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. *Journal of Controlled Release*, **161**, 446–460 (2012).
- [19] Etrych, T.; Šubr, V.; Strohalm, J.; Šírová, M.; Říhová, B.; Ulbrich, K.: HEMA copolymer-doxorubicin conjugates: The effects of molecular weight and architecture on biodistribution and *in vivo* activity. *Journal of Controlled Release*, **164**, 346–354 (2012).
- [20] Pechar, M.; Ulbrich, K.; Šubr, V.; Seymour, L. W.; Schacht, E. H.: Poly(ethylene glycol) Multiblock Copolymer as a Carrier of Anti-Cancer Drug Doxorubicin. *Bioconjugate Chemistry*, **11**:2, 131–139 (2000).
- [21] U.S. Food & Drug Administration: Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs [online]. Dostupné z: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=050718>> [cit. 21.2.2021].
- [22] Etrych, T.; Jelínková, M.; Říhová, B.; Ulbrich, K.: New HEMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and

- preliminary *in vitro* and *in vivo* biological properties. *Journal of Controlled Release*, **73**:1, 89–102 (2001).
- [23] Kakinoki, A.; Kaneo, Y.; Ikeda, Y.; Tanaka, T.; Fujita, K.: Synthesis of Poly(vinyl alcohol)-Doxorubicin Conjugates Containing *cis*-Aconityl Acid-Cleavable Bond and Its Isomer Dependent Doxorubicin Release. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 103–110 (2008)
- [24] Song, N.; Liu, W.; Tu, Q.; Liu, R.; Zhang, Y.; & Wang, J.: Preparation and *in vitro* properties of redox-responsive polymeric nanoparticles for paclitaxel delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **87**:2, 454–463 (2011).
- [25] Pola, R.; Heinrich, A. K.; Mueller, T.; Kostka, L.; Mäder, K.; Pechar, M.; Etrych, T.: Passive Tumor Targeting of Polymer Therapeutics: *In Vivo* Imaging of Both the Polymer Carrier and the Enzymatically Cleavable Drug Model. *Macromolecular Bioscience*. **16**:(11), 1577–1582 (2016).
- [26] Vasey, P. A.; Kaye, S. B.; Morrison, R.; Twelves, C.; Wilson, P.; Duncan, R.; Thomson, A. H.; Murray, L. S.; Hilditch, T. E.; Murray, T.; Burtles, S.; Fraier, D.; Frigerio, E.; Cassidy, J.: 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*. **5**:1, 83–94 (1999).
- [27] Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Anderson, D.; Hesslewood, S.; Julyan, P. J.; Poyner, R.; Doran, J.; Young, A. M.; Burtles, S.; Kerr, D. J.: Hepatic Drug Targeting: Phase I Evaluation of Polymer-Bound Doxorubicin. *J. Clin. Oncol.*, **20**:6, 1668–1676 (2002).
- [28] Zhou, H.; Sun, H.; Lv, S.; Zhang, D.; Zhang, X.; Tang, Z.; Chen, X.: Legumain-cleavable 4-arm poly(ethylene glycol)-doxorubicin conjugate for tumor specific delivery and release, *Acta Biomaterialia*, **54**, 227–238 (2017).
- [29] Giusti, I.; D'Ascenzo, S.; Millimaggi, D.; Taraboletti, G.; Carta, G.; Franceschini, N.; Pavan, A.; Dolo, V.: Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia*. **10**:5, 481–488 (2008).
- [30] Gono, K.; Obi, T.; Yamaguchi, M.; Ohyama, N.; Machida, H.; Sano, Y.; Yoshida, S.; Hamamoto, Y.; Endo, T.: Appearance of enhanced tissue features in narrow-band endoscopic imaging. *Journal of Biomedical Optics*. **9**:3, 568–577 (2004).

- [31] Huang, Z.; Zeng, H.; Hamzavi, I.; Alajlan, A.; Tan, E.; McLean, D. I.; Lui, H.: Cutaneous melanin exhibiting fluorescence emission under near-infrared light excitation. *Journal of Biomedical Optics*, **11**:3, 034010 (2006).
- [32] Mansfield, J. R.; Gossage, K. W.; Hoyt, C. C.; Levenson, R. M.: Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging. *Journal of Biomedical Optics*, **10**:4, 041207 (2005).
- [33] Vahrmeijer, A. L.; Hutteman, M.; van der Vorst, J. R.; van de Velde, C.J.H.; Frangioni, J. V.: Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence, *Nat Rev Clin Oncol.* **10**:9, 507–518 (2013).
- [34] Yang, H.; Qian, W.; Yang, L.; Xie, H.; Jiang, H.: *In vivo* evaluation of a miniaturized fluorescence molecular tomography (Fmt) endoscope for breast cancer detection using targeted nanoprobe. *International Journal of Molecular Sciences.* **21**:24, 1–10 (2020).
- [35] Scherer, W.F.; Syverton, J.T.; Gey, G.O. Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97**, 695–710 (1953).
- [36] Pola, R.; Laga, R.; Ulbrich, K.; Siegllová, I.; Král, V.; Fábry, M.; Kabešová, M.; Kovář, M.; Pechar, M.: Polymer therapeutics with a coiled coil motif targeted against murine BCL1 leukemia. *Biomacromolecules.* **14**:3, 881–889 (2013).
- [37] Geri, S.; Krunclova, T.; Janouskova, O.; Panek, J.; Hruby, M.; Hernández-Valdés, D.; Probst, B.; Alberto, R. A.; Mamat, C.; Kubeil, M.; Stephan, H.: Light-Activated Carbon Monoxide Prodrugs Based on Bipyridyl Dicarboxyl Ruthenium(II) Complexes. *Chemistry - A European Journal*, **26**:48, 10992–11006 (2020).
- [38] Flanagan, S. P.: ‘Nude’, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetical Research*, **8**:3, 295–309 (1966).
- [39] Favicchio, R.; Psycharakis, S.; Schönig, K.; Bartsch, D.; Mamalaki, C.; Papamatheakis, J.; Ripoll, J.; Zacharakis, G.: Quantitative performance characterization of three-dimensional noncontact fluorescence molecular tomography. *Journal of Biomedical Optics.* **21**:2, 026009 (2016).
- [40] Kelly, K.; Alencar, H.; Funovics, M.; Mahmood, U.; Weissleder, R.: Detection of invasive colon cancer using a novel, targeted, library-derived fluorescent peptide. *Cancer Res.*, **64**, 6247–6251 (2004).

- [41] Ntziachristos, V.: Fluorescence molecular imaging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 1–33 (2006)
- [42] Chi, C.; Du, Y.; Ye, J.; Kou, D.; Qiu, J.; Wang, J.; Tian, J.; Chen, X.: Intraoperative Imaging-Guided Cancer Surgery: From Current Fluorescence Molecular Imaging Methods to Future Multi-Modality Imaging Technology. *Theranostics*, **4**, 1072–1084 (2014).
- [43] Wng, Ch.; Wang, Z.; Zhao, T.; Li, Y.; Huang, G.; Sumer, B. D.; Gao, J.: Optical molecular imaging for tumor detection and image-guided surgery. *Biomaterials*. **157**, 62–75 (2018).
- [44] Pola, R.; Laga, R.; Ulbrich, K.; Siegllová, I.; Král, V.; Fábry, M.; Kabešová, M.; Kovář, M.; Pechar, M.: Polymer Therapeutics with a Coiled Coil Motif Targeted against Murine BCL1 Leukemia. *Biomacromolecules*. **14**, 881–889 (2013).
- [45] Šubr, V.; Ulbrich, K.: Synthesis and properties of new N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide copolymers containing thiazolidine-2-thione reactive groups. *React Funct Polym.* **66**, 1525–1538 (2006).
- [46] Pola, R.; Král, V.; Filippov, S. K.; Kaberov, L.; Etrych, T.; Siegllová, I.; Sedláček, J.; Fábry, M.; Pechar, M.: Polymer Cancerostatics Targeted by Recombinant Antibody Fragments to GD2-Positive Tumor Cells. *Biomacromolecules*. **20**, 412–421 (2019).
- [47] Dubowchik, G. M.; Firestone, R. A.; Padilla, L.; Willner, D.; Hofstead, S. J.; Mosure, K.; Knipe, J. O.; Lasch, S. J.; Trail P. A.: Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers for Lysosomal Release of Doxorubicin from Internalizing Immunoconjugates: Model Studies of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity. *Bioconjugate Chemistry*. **13**:4, 855–869 (2002).
- [48] Pechar, M.; Strohalm, J.; Ulbrich, K.: Biodegradable drug carriers based on poly(ethylene glycol) block copolymers. *Macromolecular Chemistry and Physics* **198**:4, 1009–1020 (1997).
- [49] Lumiprobe: Cyanine 7 amine [online]. Dostupné z URL: <<https://www.lumiprobe.com/p/cy7-amine>> [cit. 20. 4. 2020]
- [50] Zelený, J. Příprava a charakterizace polymerních, enzymově štěpitelných, nosičů kancerostatik. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova: Praha, 2019.
- [51] Zhong, Y.; Shao, L.; Li, Y.: Cathepsin B-cleavable doxorubicin prodrugs for targeted cancer therapy. *International Journal of Oncology*. **42**, 373–383 (2013).

- [52] Li, H.; Yu, Ch.; Jiang, J.; Huang, Ch.; Yao, X.; Xu, Q.; Yu, Q.; Yu, F.; Lou, L.; Fang, J.: An anti-HER2 antibody conjugated with monomethyl auristatin E is highly effective in HER2-positive human gastric cancer. *Cancer biology&Therapy*. **17**, 346–354 (2016).

Seznam symbolů a zkratk

Aba	4-aminobenzylalkohol
Amp	1-aminopropan-2-ol
Az	zbytek kyseliny azidopentanové
Bzl-Arg-Nap	N ^α -benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid
CFM	konfokální fluorescenční mikroskopie
CT	výpočetní tomografie (z angl. computed tomography)
CTR	2-chlorotrityl chloridová pryskyřice
Cy7-NH ₂	cyanin 7-amin
DBCO-NH ₂	dibenzocyklooktyn-amin
DCM	dichlormethan
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylkarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamid
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
Dox	doxorubicin
DOT	difúzní optické tomografie
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EMEM	Eagleovo minimální esenciální medium (z angl. Eagle's Minimum Essential Medium)
EPR efekt	efekt zvýšené propustnosti a zádrže (z angl. enhanced permeation and retention)
<i>et al.</i>	a kolektiv (z lat. <i>et alii</i> – a další)
Fmoc	9-fluorenylmethoxykarbonylová skupina
FMT	fluorescenční molekulární tomografie (z angl. fluorescence molecular tomography)
FRI	fluorescenční odrazové zobrazování (z angl. fluorescence reflectance imaging)
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HOBt	1-hydroxybenzotriazol

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
LSCM	laserování skenovací konfokální mikroskopie (z angl. laser scanning confocal microscopy)
Ma	zbytek kyseliny methakrylové
MEM	minimální esenciální medium (MEM, z angl. Minimum Essential Medium)
MRI	magnetická resonance (z angl. magnetic resonance imaging)
NBI	úzkopásmového zobrazení (z angl. narrow-band imaging)
NIR	blízké infračervené (z angl. near infrared)
Npc	4-nitrofenylkarbonát
PCC	Pearsonův korelační koeficient (z angl. Pearson correlation coefficient)
PEG	polyethylenglykol, poly(ethylenoxid)
PNPC	4-nitrofenylchloroformiát
PyBOP	(benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinofosfonium hexafluorofosfát
RAFT	polymerizace s řízeným adičně-fragmentačním přenosem řetězce (z angl. reversible addition-fragmentation chain transfer)
SEC	rozměrově vylučovací chromatografie (z angl. size exclusion chromatography)
TFA	kyselina trifluoroctová
TT	thiazolidin-2-thion

Seznam použitých symbolů

ϵ	molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
A	absorbance
c	hmotnostní koncentrace [$\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
D	index polydisperzity
M	molární hmotnost [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
M_w	hmotnostně střední molární hmotnosti [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
t_r	retenční čas [min]

Seznam zkratk zvolených pro polymerní prekurzory a konjugáty

P-Ala-TT	poly[HPMA- <i>co</i> -(Ma- β -Ala-TT)]
P-Ala-DBCO	poly[HPMA- <i>co</i> -(Ma- β -Ala-DBCO)]
P-GFLG-TT	poly[HPMA- <i>co</i> -(Ma-GFLG-TT)]
P-Ala-Cy7	poly[HPMA- <i>co</i> -(Ma- β -Ala-Cy7)]
P-GFLG-Cy7	poly[HPMA- <i>co</i> -(Ma-GFLG-Cy7)]
P-Val-Cit-Aba-Cy7	poly[HPMA- <i>co</i> -(Ma- β -Ala-Val-Cit-Aba-Cy7)]

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

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka