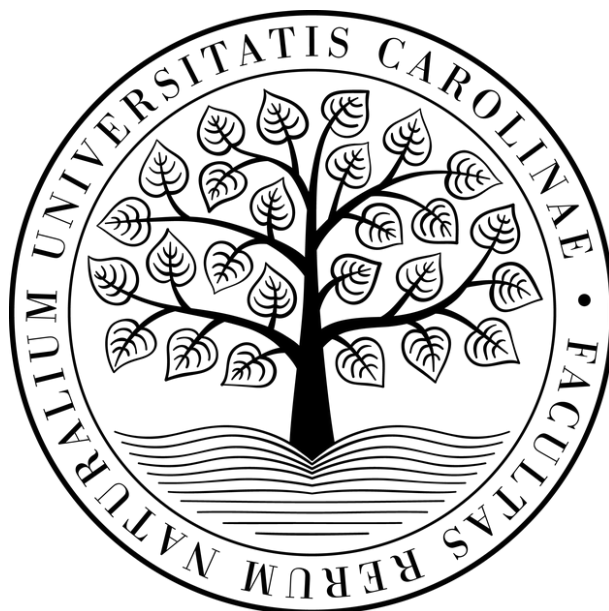


**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Dominik Horák

**Polymerní sondy pro navigovanou endoskopickou chirurgii pevných nádorů**

Polymer probes for image-guided endoscopic surgery of solid tumors

**Bakalářská práce**

Školitel: RNDr. Tomáš Etrych, DSc.

Školitel specialista: Ing. Eliška Grosmanová

Praha, 2021

**Prohlášení:**

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

V Praze, 13.6.2021

.....

## **Poděkování:**

Chtěl bych poděkovat svému školiteli RNDr. Tomáši Etrychovi, DSc. a školitelce specialistece Ing. Elišce Grosmanové za jejich odborné vedení mé práce a výzkumu, za veškerou ochotu a čas, a za nespočet dovedností, které jsem při tvorbě této práce získal. Moc si toho vážím, protože vím, že jsem byl od začátku v nejlepších rukou.

Dále bych rád poděkoval i všem ostatním z oddělení Biolékařských polymerů Ústavu makromolekulárních věd Akademie Věd ČR za každý den, který jsem zde mohl strávit. Získal jsem skvělé kolegy – odborníky z mnoha oborů, kteří mi vždy se vším ochotně pomohli a každou nejasnost vysvětlili. Jejich odhodlání a vášně pro vědu mi pomohly najít si svou vlastní cestu k vědě, o které jsem předtím tolik pochyboval. Navíc se tito kolegové stali mými přáteli, a to bez ohledu na rozdíl mezi mými a jejich znalostmi, úspěchy a zkušenostmi. Proto si velmi vážím, že jsem se mohl stát členem tohoto skvělého kolektivu.

V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat za finanční i jinou podporu svých rodičů, protože bez nich bych se nemohl naplno věnovat tomuto výzkumu.

## **Abstrakt:**

Tato práce se věnuje vývoji látek pro fluorescenčně navigovanou endoskopickou chirurgii, a to jak nízkomolekulárních, tak především vysokomolekulárních, s důrazem na vlastnosti nádorové tkáně i samotné látky. V průběhu let se postupně upustilo od nízkomolekulárních látek jako je indokyaninová zeleň především z důvodů velmi nízké lokalizace a krátké doby oběhu. Vyřešit tyto nevýhody si kladly za cíl polymerní sondy mj. na bázi pHPMA, jelikož nádorová tkáň vykazuje efekt zvýšené propustnosti a zadržování, který je specifický právě pro makromolekulární látky. Vazba fluoroforu na polymer ale způsobuje zhášení, proto byly navrženy nástupnické systémy, které fluorofor odštěpují – například díky kyselému prostředí nádorové tkáně či nad expresi některých peptidas. Právě polymernímu systému, na kterém je fluorofor vázán pH-senzitivní spojkou, se věnuje experimentální část této práce.

## **Klíčová slova:**

polymerní sondy, fluorescence, pH-senzitivní, nanomateriály, řízené uvolňování, zhášení, Cyanine7

## **Abstract:**

This work focuses on development of both low- and high-molecular substances usable in fluorescent navigated endoscopic surgery with an emphasis on the characteristics of both tumor tissue and the substance itself. The usage of low-molecular substances, such as indocyanine green, has been abandoned over the past years, mostly due to poor localization and short circulation time. New polymer probes such as those based on pHPMA, were introduced to resolve these flaws. They benefit from the enhanced permeability and retention effect of the tumor tissue which is specific for macromolecules. The attachment of fluorophores to polymer carriers induces quenching, therefore novel systems are being designed to be able to release the fluorophore for example due to acidic environment of a tumor tissue or the overexpression of some peptidases. The experimental part of this work is dedicated to such polymer system with a pH-sensitive spacer-bound fluorophore.

## **Keywords:**

polymer probes, fluorescence, pH-sensitive, nanomaterials, controlled release, quenching, Cyanine7

[IN CZECH]

# OBSAH

OBSAH.....	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	8
Seznam použitých zkratk.....	8
Seznam použitých symbolů.....	10
1. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	11
1.1 Úvod.....	11
1.2 Cíle navigované chirurgie.....	11
1.3 Princip opticky navigované chirurgie.....	12
1.4 První generace fluorescenčních sond.....	15
1.5 Druhá generace .....	16
1.5.1 Polymerní nosič .....	16
1.5.2 Změna biologických vlastností sond.....	17
1.5.3 Fluorescence polymerní sondy .....	18
1.6 Třetí generace .....	19
1.6.1 Využití vlastností nádorové tkáně.....	20
1.6.2 Biodegradovatelné spojky.....	21
1.6.3 Aktivní směřování.....	23
1.7 Současný vývoj a využití fluorescenčních látek.....	25
1.7.1 Indokyaninová zeleň (ICG) .....	25
1.7.2 Panitumumab-IRDye800 .....	26
1.7.3 Polypeptid AVB-620 .....	26
1.7.4 Polymerní sonda využívající fluorofor IR783 .....	26
2. CÍLE PRÁCE .....	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
3.1 Použité chemikálie.....	29
3.2 Použité přístroje .....	31
3.3 Použité metody .....	32
3.3.1 Syntézy.....	32
3.3.2 Charakterizace produktů .....	38
3.4 Testování <i>in vitro</i> .....	41
4. VÝSLEDKY .....	42
4.1 Syntéza a charakterizace polymerních prekurzorů .....	42

4.2	Syntéza aktivovaných oxokyselin a derivátů fluoroforů s těmito oxokyselinami .....	43
4.3	Charakterizace fluoroforu Cyanine7 a jeho derivátů .....	44
4.3.1	Stanovení molárních absorpčních koeficientů .....	44
4.3.2	Stanovení kalibrační závislosti fluorescence derivátů spojek.....	44
4.3.3	Stanovení kvantových výtěžků derivátů v methanolu .....	45
4.4	Syntéza a charakterizace konjugátů .....	45
4.4.1	Syntéza polymerních konjugátů.....	45
4.4.2	Stanovení molární hmotnosti .....	46
4.4.3	Stanovení obsahu fluoroforu.....	47
4.4.4	Stanovení kvantového výtěžku konjugátů v methanolu .....	47
4.5	Uvolňování fluoroforu .....	47
4.5.1	Stanovení rychlosti štěpení v závislosti na pH .....	47
4.5.2	Stanovení kvantových výtěžků konjugátů ve vodě.....	48
4.5.3	Konfokální mikroskopie .....	51
5.	DISKUZE.....	53
5.1	Syntéza polymerního prekurzoru.....	53
5.2	Aktivované oxokyseliny a jejich deriváty .....	53
5.3	Konjugáty.....	55
5.4	Konfokální mikroskopie .....	57
6.	ZÁVĚR.....	58
	POUŽITÁ LITERATURA .....	59

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

## Seznam použitých zkratek

<b>zkratka</b>	<b>význam</b>
AIBN	2,2'-azobis(2-methylpropionitril)
Boc	<i>terc</i> -butyloxykarbonyl
COP	5-cyklohexyl-5-oxopentanová kyselina
CTA	přenosové činidlo z angl. chain transfer agent
Cy7	Cyanine7-amin
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamid
DNA	2'-deoxyribonukleová kyselina z angl. 2'-deoxyribonucleic acid
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EMEM	Eaglovo minimální esenciální médium
EPR efekt	efekt zvýšené propustnosti a zadržování z angl. enhanced permeability and retention effect
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv z angl. Food and Drug Administration
hm%	hmotnostní procento ( $m(a)/m \cdot 100$ )
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie z angl. high-performance liquid chromatography
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
ICG	indokyaninová zeleň z angl. indocyanine green
Ma-Ahx-NHNH <sub>2</sub>	6-methakrylamidohexanohydrazid
Ma-GG-ONp	<i>N</i> -methakryloylglycylglycyl- <i>p</i> -nitrofenylester
MALS	víceúhlový rozptyl světla z angl. multi-angle light scattering
Ma-β-Ala-TT	3-(3-methakryl-amidopropanoyl)thiazolidin-2-thion
mol%	molární procento ( $n(a)/n \cdot 100$ )
obj%	objemové procento ( $V(a)/V \cdot 100$ )
OPB	4-(2-oxopropyl)benzenkarboxylová kyselina
PYR	4-oxo-4-(2-pyridyl)butanová kyselina



<b>zkratka</b>	<b>význam</b>
RAFT polymerizace	polymerizace s reverzním adičně-fragmentačním řetězovým přenosem z angl. reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization
RI	index lomu z angl. refractive index
RNA	ribonukleová kyselina z angl. ribonucleic acid
SEC	rozměrově-vylučovací chromatografie z angl. size-exclusion chromatography
SFL	spektrofluorimetrie
SPF	spektrofotometrie
t-BuOH	2-methylpropan-2-ol
TIPS	triisopropylsilan
TLC	tenkovrstvá chromatografie z angl. thin-layer chromatography
V-70	2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril)

## Seznam použitých symbolů

symbol	jednotka	název
$\varepsilon$	$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	molární absorpční koeficient
$\eta$	-	molární zlomek
$\lambda$	nm	vlnová délka
$\Phi$	-	kvantový výtěžek
A	-	absorbance
D	-	disperzita
F	$\text{V} \cdot \text{min}$	plocha pod křivkou fluorescence
M	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	molární hmotnost
$\bar{M}_n$	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	početně-průměrná molární hmotnost
$\bar{M}_w$	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	hmotnostně-průměrná molární hmotnost
c	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	molární koncentrace
$c_m$	$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	hmotnostní koncentrace
d	cm	optická dráha kyvety, resp. tloušťka vrstvy
m	kg	hmotnost
n	mol	látkové množství
V	$\text{dm}^{-3}$	objem

# 1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Úvod

Historie využití syntetických biomedicínálních polymerů sahá do konce padesátých let 20. století, kdy bylo zavedeno používání nitroočních čoček vyrobených z poly(methylmethakrylátu). Od té doby se škála uplatnění polymerů v medicíně rozrostla natolik, že je obtížné tuto skupinu charakterizovat. Je možné je definovat jako materiály navržené za účelem zlepšení léčby pacienta – ať už po stránce terapeutické, tak i diagnostické. Pro popisné účely je vhodné rozdělit biomedicínální polymery do dvou skupin v závislosti na jejich účelu v organismu.

První skupinou jsou polymery určené pro pasivní (podpůrnou) funkci. U nich je důležitá jejich inertnost v organismu. Mohou to být třeba umělé klouby z polyethylenu [1], nitrooční čočky z poly(methylmethakrylátu) či silikonu [2] nebo umělé cévy z poly(ethylentereftalátu) [3]. Dále také chirurgické nitě na bázi polyesteru (polylaktát, polyglykolát, polykaprolakton), který jsou postupně hydrolyticky degradovány [4].

Druhou skupinou jsou polymery určené pro aktivní (terapeutickou) funkci, tedy převážně nosiče léčiv a diagnostika. Pro ty je naopak důležitá biodegradovatelnost nebo vyloučitelnost. Příkladem jsou polymerní nosiče, jejichž páteř tvoří například poly(ethylenoxid), poly(propylenoxid) nebo různé polyakryláty [5]. Jedním z možných nosičů využitelných pro terapeutické nebo diagnostické účely je i poly(*N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamid) (pHPMA) a jeho kopolymery, kterými se tato práce dále zabývá.

## 1.2 Cíle navigované chirurgie

Onkochirurgie je jedním ze základních léčebných postupů pro většinu nádorových onemocnění. Při resekci tkáně je zcela zásadní odstranit co nejvíce, nejlépe všechnu, nádorovou tkáň, aby nedošlo k opětovnému růstu nádorové masy. Při chirurgickém zákroku je však často velmi obtížné určit okraje nádorové tkáně. Roli zde hraje značná heterogenita této tkáně, také špatná rozlišitelnost od tkáně zdravé, obtížná přístupnost a neohrazenost, tedy pronikání výběžků nádoru do zdravé tkáně. Proto jsou resektáty podrobovány patologickým vyšetřením. Pokud se na okraji resektátu nachází nádorová tkáň, je takový vzorek označen jako vzorek s pozitivním okrajem. Například u rakoviny prsu je identifikováno až 23 % resektátů s pozitivním okrajem [6]. U takových pacientek

je pak pravděpodobné, že dojde k znovuobjevení nádoru, čímž je snížena šance na uzdravení.

Hlavním cílem opticky navigované onkochirurgie je zvýraznit hranici nádoru tak, aby byl odstraněn v celém rozsahu a zároveň nedošlo ke zbytečnému odstranění zdravé tkáně. V současnosti se často využívají endoskopické přístupy, kdy je do těla zavedena sonda s kamerou, která umožňuje provádět minimálně invazivní operace.

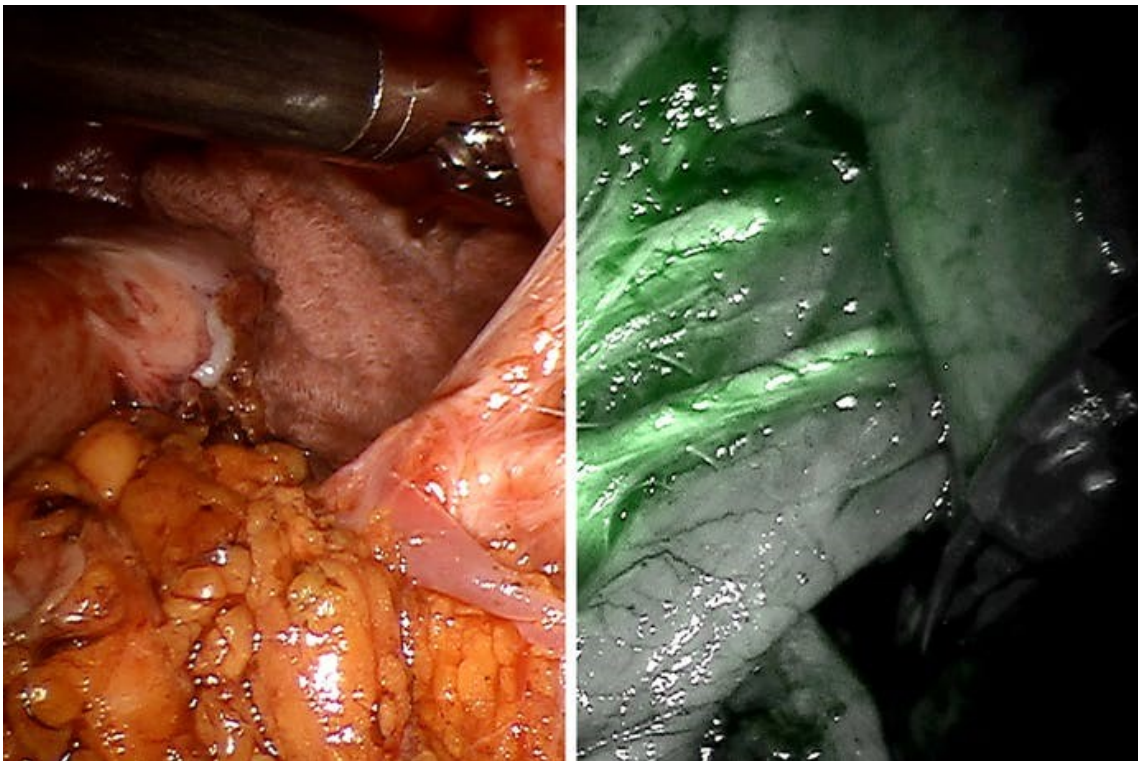
### 1.3 Princip opticky navigované chirurgie

Při opticky navigované chirurgii asistuje chirurgovi záření emitované z postižené tkáně. Toho je dosaženo přítomností dodaného luminoforu nebo fluoroforu, který emituje po ozáření světlem elektromagnetické záření o delší vlnové délce. Z fyzikálního hlediska se jedná o proces fluorescence, tedy vybuzení elektronů do excitovaného stavu a následný přechod elektronů do základního stavu, který je doprovázen vyzařením fotonů o nižší energii a tedy vyšší vlnové délce. Využití viditelného světla v rámci navigované chirurgie je značně omezené, a to především díky autofluorescenci tkáně v této oblasti elektromagnetického vlnění a rovněž díky významné absorpci a rozptylu jak přicházejícího, tak vyzařeného světla živou tkání. V tkáních se nachází fluorescenční biomolekuly jako hemoglobin, bilirubin [7], kreatinin [8], nebo cytochrom P450 [9], které mají ve viditelném spektru, 400–700 nm, svá absorpční maxima a tedy viditelné světlo pohlcují a vyzařují na základě fluorescence světlo o vyšších vlnových délkách [10]. Tím dochází k již zmíněné autofluorescenci tkáně, díky které vzniká signálový šum znemožňující detekci fluorescence pocházející z použitého experimentálního fluoroforu o podobných emisních a excitačních charakteristikách pro navigovanou chirurgii [11]. Zmíněné problémy lze minimalizovat použitím záření ve vzdálené červené (vlnová délka 700–750  $\mu\text{m}$ ) nebo blízké infračervené (vlnová délka 750–2500 nm) oblasti elektromagnetického záření, kde většina tkáňových molekul nemá významnou absorpci záření.

V ideálním případě navigované chirurgie by mělo dojít k absorpci světla ve vzdálené červené nebo blízké infračervené oblasti právě jen dodaným fluoroforem, čímž dojde k jeho excitaci a následné emisi světla o konkrétní emisní vlnové délce, která leží s výhodou v blízké infračervené oblasti spektra [10]. Pro získání maximální odezvy fluorescence je důležité použít pro ozáření tkáně světla o vlnové délce excitačního maxima dodaného fluoroforu, což vede k nejvyšším výtěžkům fluorescence dodaného

fluoroforu. Emitované světlo je poté zachyceno kamerou, která je vybavena absorpčním filtrem, který odfiltruje nevhodné vlnové délky vyzářeného světla. Data z kamery jsou následně promítána na obrazovku. Chirurg provádějící zákrok může sledovat na obrazovce vizualizovaný nádor, spolu s ním může mít na monitoru i referenční obraz z běžné kamery.

Příkladem takových systémů, které již byly uvedeny do praxe, jsou laserové SPY a Fluobeam, případně PDE, FLARE a da Vinci Firefly, znázorněny na obr. 1.1, využívající LED technologii.



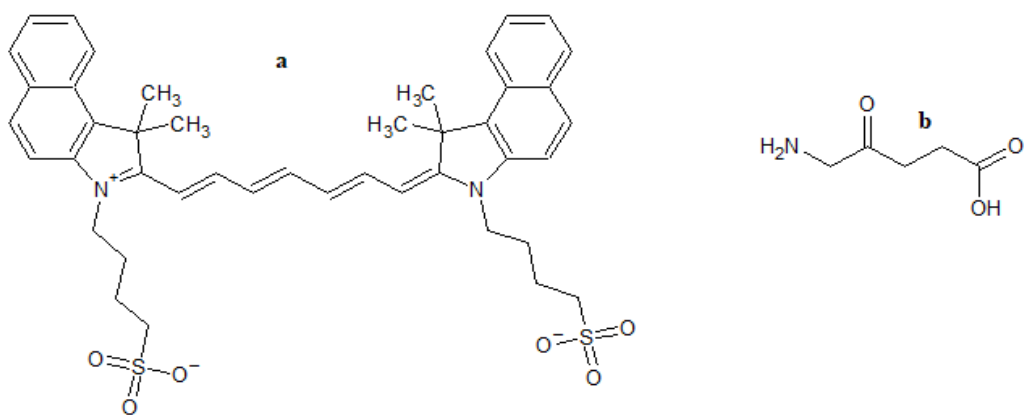
Obr. 1.1 *Systém da Vinci Firefly*. Vlevo je snímek pořízený kamerou endoskopu bez filtrace vlnových délek, vpravo je snímek pořízený stejnou kamerou, avšak při filtrování konkrétní vlnové délky, po aplikaci fluorescenčního barviva do tkáně. [12]

V posledních letech jsou pro fluorescenčně navigovanou chirurgii nádorů studovány a využívány jako kontrastní látky především dva typy sond [13]. První z nich jsou tzv. „vždy aktivní“ systémy, které vykazují fluorescenci nezávisle na své lokalizaci v těle. Zde se uplatňují především nízkomolekulární látky, např. indokyaninová zeleň (ICG) nebo 5-aminolevulová kyselina (obr. 1.2a a 1.2b na str. 15), která je prekurzorem fluorescenčních porfyrinů. Tyto látky jsou podávány intravenózně přímo do krevního oběhu. Významnou nevýhodou nízkomolekulárních látek je jejich nízká molekulová hmotnost, díky níž jsou tyto látky filtrovány ledvinami do moči, a tudíž setrvávají

poměrně krátkou dobou v krevní cirkulaci. To je pro dostatečnou akumulaci v nádoru velmi limitující a není často dosahováno dostatečného signálu v nádorové tkáni. Dalším nedostatkem těchto látek je nízká selektivita pro nádorové buňky. Tato skutečnost se negativně odráží na šumu (background noise), čímž je značně sníženo rozlišení nádorové tkáně od zdravé. Zvýšení samotného signálu a kontrastu vzhledem k zdravým tkáním je možné dosáhnout navázáním fluoroforů na polymerní biokompatibilní nosič, popřípadě v kombinaci s aktivním směřováním [14].

Naproti tomu systémy z druhé skupiny využívají aktivaci signálu v místě nádorové masy. Ve valné většině mají vysokomolekulární strukturu založenou na polymerních biokompatibilních materiálech obsahujících ve své struktuře fluorofor, jehož fluorescence je částečně až zcela potlačena po vazbě na zmíněný nosič. To je způsobeno změnou fyzikálních vlastností fluoroforu po navázání na polymerní nosič. Při zhášení fluorescence se může významně uplatnit i vliv spojky mezi polymerním řetězcem a fluoroforem. Opětovné „rozsvícení“ fluoroforu, tedy odstranění zhášení fluorescence, je většinou zajištěno řízeným odštěpením fluoroforu, přičemž spouštěčem štěpení může být změna pH, výskyt reduktivního prostředí či prezenze specifického enzymu. V tomto případě řeší navázání fluoroforu na polymerní nosič jak problém s krátkou cirkulací, tak i s nízkou selektivitou pro nádorovou tkáň.

Makromolekulární látky vykazují v rámci cirkulace v biologickém organismu zvýšené akumulaci v nádorové tkáni, a to díky EPR (angl. enhanced permeability and retention) efektu (více se tomuto efektu věnuje kapitola 1.5.2). S výhodou mohou ve své struktuře obsahovat i molekuly pro aktivní cílení k receptorům na nádorových buňkách, nebo buňkách nádorového endotelu. Samotná aktivace fluorescenčního signálu je uskutečněna díky nádorově-specifickému štěpení převážně v těchto buňkách nebo nádorovém mikroprostředí, takže dochází k významné redukci šumu, tedy ke zvýšení rozlišení nádorové tkáně od zdravé.



Obr. 1.2 (a) *Indokyaninová zeleň* obsahuje několikanásobně konjugované dvojně vazby a dvě naftalenová jádra. Dále také obsahuje dvě sulfoskupiny zvyšující její rozpustnost. (b) *Kyselina 5-aminolevulová* po aldolové kondenzaci a transaminaci přechází na porfobilinogen, jehož čtyři molekuly dávají vzniku prekurzoru protoporphyrinu IX, z něhož vznikají barviva hem nebo chlorofyl.

#### 1.4 První generace fluorescenčních sond

První generace studovaných sond s fluorescenčními vlastnostmi byla založena pouze na pasivní akumulaci nízkomolekulárních látek s emisí v oblasti blízké infračervené oblasti elektromagnetického záření. Příkladem takové látky je již zmíněná ICG, která se aplikovala intravenózně například k detekci nádorů trávicí soustavy [15]. Krevním oběhem se ICG poměrně rychle, v řádu desítek sekund, dostane k nádorové tkáni u myších modelů. Po aplikaci je zkoumaná tkáň vystavena elektromagnetickému záření s vlnovou délkou 768 nm, což je excitační vlnová délka odpovídající fluoroforu ICG. Dochází k relativnímu navýšení fluorescenčního signálu, ale pouze díky větší fenestraci a hustotě cév v nádoru [15, 16]. Nicméně vzhledem ke krátkému poločasu cirkulace v těle, který činí necelých 80 minut, je zcela nezbytné aplikovat látku těsně před operací, navíc musí být operace velmi rychlá, což je v praxi velmi obtížné [17].

Z výsledků studie Kimury a kol. [15], která se zabývala výše zmíněnými nádory trávicí soustavy, je jasně patrné nízké rozlišení nádorové tkáně při využití samotné ICG. Podání fluoroforu nevedlo ke zviditelnění ani jednoho ze sedmi zkoumaných nezhoubných adenomů a pouze devíti z dvaceti tří (39 %) zhoubných adenokarcinomů v raném stádiu bylo pozitivně identifikováno na základě fluorescence ICG [15]. Tyto relativně špatné výsledky mají několik příčin. Zřejmě největší slabinou použití ICG a potažmo všech látek této skupiny je neschopnost významně cílit do nádorové tkáně. Aplikovaná látka cirkuluje v krevním řečišti jen krátkou dobu a má tedy jen limitovanou

dobu na průnik do nádorové tkáně difuzí z krevního řečiště. Krátká doba cirkulace je zapříčiněna snadným vylučováním těchto látek ledvinami do moči.

V souhrnu můžeme uzavřít, že fluorescenční nízkomolekulární sondy nejsou příliš vhodnou alternativou pro navigovanou nádorovou chirurgii. Nedovolují přesnou diagnostiku v relativně dlouhém časovém úseku, který je při chirurgických zákrocích nezbytný.

## 1.5 Druhá generace

Nedostatky první generace, jako je krátká doba cirkulace a nízká selektivita pro nádorovou tkáň, resp. samotné nádorové buňky, se snaží překonat druhá generace fluorescenčních diagnostik. Namísto nízkomolekulárních látek je možné zvolit složitější strukturu, kdy je fluorofor pevně vázán na nosič tvořený biokompatibilním polymerem.

### 1.5.1 Polymerní nosič

Vzhledem k zamýšlenému využití v medicíně je třeba zvolit takový polymer, aby splňoval hned několik základních podmínek. Mezi ně se řadí to, že je polymer netoxický, neimunogenní, apyrogenní a vodorozpustný. Polymerní nosič by měl být dobře definovaný, tedy s nízkou distribucí molární hmotnosti charakterizovanou disperzitou,  $\mathfrak{D}$ . Ta je definována podle rovnice 1,

$$\mathfrak{D} = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} \quad [-] \quad (1)$$

kde  $\bar{M}_w$  představuje hmotnostně-průměrnou molární hmotnost a  $\bar{M}_n$  je početně-průměrná molární hmotnost.

Čím více se hodnota blíží k  $\mathfrak{D} = 1$ , tím je polymer uniformnější, hodnota rovna jedné odpovídá souboru identických molekul, taková charakteristika náleží např. přírodním proteinům. Velmi dobře vodorozpustné, netoxické i neimunogenní, zároveň s nízkou disperzitou a poměrně snadnou přípravou jsou (ko)polymery na bázi HPMA, ať už připravené pomocí volné radikálové, či novější kontrolované tzv. RAFT (angl. reversible addition-fragmentation chain-transfer) polymerizace [18]. Ta funguje také na principu volných radikálů, ale umožňuje díky přenosovému činidlu precizně kontrolovat délku řetězce, tedy dosáhnout velmi nízké hodnoty  $\mathfrak{D}$ , která se v případě radikálového polymeru pohybuje okolo hodnot 1,5 a větších, zatímco u RAFT polymerace dosahuje hodnot pod 1,2 [18]. Pro účel navázání aminoderivátu fluoroforu je možné využít například HPMA kopolymery s reaktivními estery nebo imidy

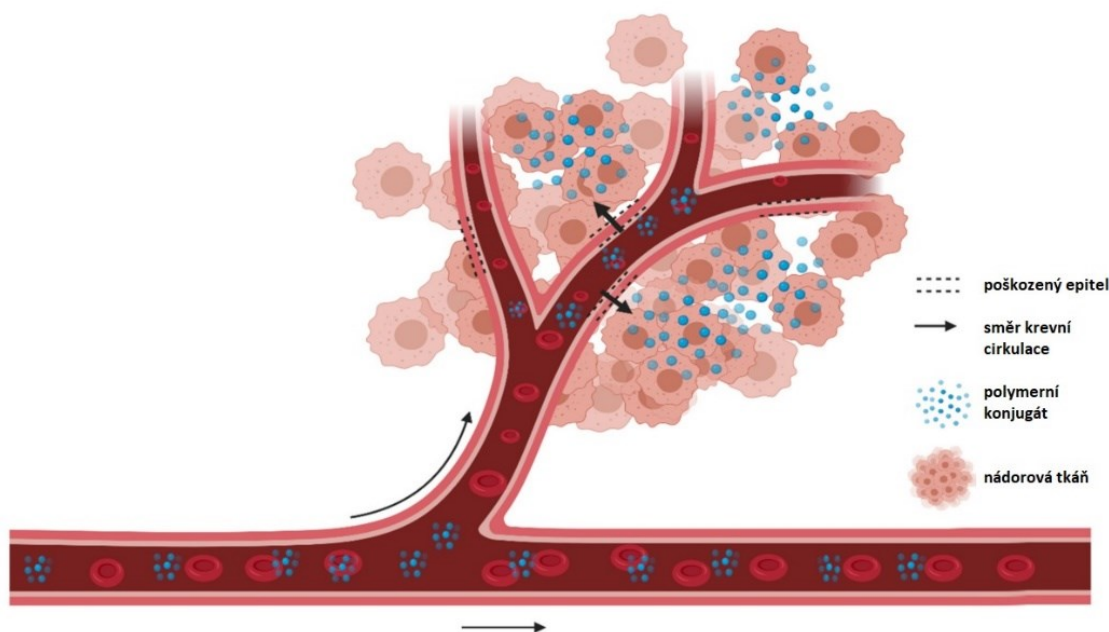


karboxylových kyselin jako jsou *p*-nitrofenylester (ONp) nebo thiazolidin-2-thion (TT). V případě, že je na polymerní řetězec vázán azid fluoroforu, jako je tomu např. u ICG, využívá se přístupu tzv. „click“ chemie, tedy reakce azidu s dibenzylcyklooktynem za vzniku triazolového kruhu. Tato reakce probíhá rychle a bez nutnosti katalýzy a je téměř nezávislá na struktuře slučovaných molekul. Tohoto přístupu bylo využito například při syntéze HPMA polymeru obsahující fluorofor Cyanine7 a směřující oligopeptid s názvem GE-11 (YHWYGYTPQNVI) [14].

### 1.5.2 Změna biologických vlastností sond

Užití polymeru s vysokou molární hmotností namísto nízkomolekulární látky způsobí značné prodloužení poločasu cirkulace v těle, například u ICG z 80 minut [17], až na nižší stovky hodin [19], a to v závislosti na molekulové hmotnosti, potažmo hydrodynamickém poloměru výsledného konjugátu s fluoroforem. Ledviny jsou běžně schopné vyloučit látky až do velikosti 9-10 nm, rozhodující vliv má ale také tvar a náboj molekuly [20]. Malé póry glomerulární membrány jsou průchozí pro neutrální molekuly o průměru cca 9 nm. [21]. Například HPMA kopolymer o molekulové hmotnosti  $65 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  (o hydrodynamickém poloměru asi 7 nm [20]) se v krvi po 24 hodinách vyskytuje v necelé čtvrtině podané dávky, zatímco polymer o molekulové hmotnosti  $23 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  (o hydrodynamickém poloměru necelé 4 nm [20]) se za stejnou dobu v krvi nachází pouze v necelých 6 % původní dávky [19]. Rozdílná velikost polymerního nosiče tedy násobně ovlivňuje dobu cirkulace v krvi.

Další výhodou použití polymeru jakožto nosiče fluoroforu je tzv. efekt zvýšené propustnosti a zadržování (EPR efekt) (obr. 1.3 na str. 18), který se uplatňuje u mnoha typů pevných nádorů [22]. Makromolekuly o průměru asi 4 nm a větší jsou mnohem více zadržovány v nádorové tkáni než ve tkáni zdravé. Hlavním faktorem podporující průnik makromolekul do nádorové tkáně je nedovyvinutí jejího cévního a lymfatického systému, čímž je značně zvýšena propustnost jinak pro makromolekuly málo propustného endotelu, a naopak je snížena schopnost lymfatického systému odstraňovat cizorodé látky z tkání. Díky své velikosti nemohou po penetraci makromolekuly na rozdíl od nízkomolekulárních látek difundovat zpět do krevního řečiště, nejsou ani odváděny nevyvinutým lymfatickým systémem, a tak mohou být zadržovány i desítky hodin v nádorové tkáni.



Obr. 1.3 Znárodnění EPR efektu. Na obrázku je znázorněna zdravá céva (dole), která neumožňuje makromolekulám prostupovat z krevního řečiště do tkáň. Naopak céva procházející nádorovou tkání (nahore) je pro makromolekuly průchozí, čímž dochází k již zmíněnému EPR efektu. Převzato a upraveno z [23].

### 1.5.3 Fluorescence polymerní sondy

Fluorescence polymeru je zajištěna navázáním nízkomolekulární látky přímo na funkční skupinu kopolymeru, často je mezi polymer a fluorofor začleněna vhodná spojka. Při souběhu EPR efektu a prodloužené doby cirkulace v krvi bychom u polymerních sond v porovnání s volným fluoroforem očekávali pozorování výrazně intenzivnějšího fluorescenčního signálu v nádoru. Jenže s narůstajícím obsahem fluoroforu byla naopak pozorována klesající intenzita fluorescence [13]. Zde se kromě pasivní akumulace na základě EPR efektu uplatnil i jev známý jako zhášení fluorescence, kdy navázaný fluorofor vykazuje výrazně nižší fluorescenci než samotný nenavázaný fluorofor.

Zhášení může nastat jednak interakcí fluorofor-fluorofor (samozhášení) nebo fluorofor-zhášeč (angl. quencher) [24]. První zmíněná interakce nastává, pokud se v dostatečné blízkosti od excitovaného fluoroforu nachází další molekula fluoroforu, Druhým případem je přítomnost tzv. zhášeče tedy látky, která sama o sobě nemusí vykazovat fluorescenci, ale různými mechanismy zapříčiňuje snížení kvantového výtěžku fluorescence. Zhášení může být buď statické nebo dynamické. V prvním případě vzniká komplex fluorofor-zhášeč již v základním stavu, takže dochází přímo ke změně samotného fluoroforu a vzniká komplex s jiným fluorescenčním spektrem. V druhém

případě nedochází ke změně fyzikálních vlastností fluoroforu, ale dochází k přenosu energie z fluoroforu bez vyzáření elektromagnetického vlnění.

V případě intersystémové konverze dochází k přenosu energie z excitovaného fluoroforu na zhasič [25], čímž dojde k návratu fluoroforu do základního stavu bez vyzáření elektromagnetického vlnění (např. Försterův rezonanční přenos energie). Jedná-li se o přenos elektronů indukovaný světlem, pak dochází k přenosu elektronu, čímž vznikne nefluoreskující kation fluoroforu v případě, že elektron ztrácí, nebo anion fluoroforu, pakliže elektron přijímá. Mohou také vznikat komplexy, a to buď mezi fluoroforem v excitovaném stavu a dalším fluoroforem v základním stavu, vzniklý komplex se pak nazývá excimer. Nebo dojde ke vzniku komplexu excitovaného fluoroforu se zhasičem, takový komplex se nazývá exciplex. Takové komplexy mohou emitovat nezářivě, nebo při jiných vlnových délkách. V případě světlem indukovaného přenosu protonu je v excitovaném stavu přenesen proton [26], světlo tak indukuje změnu acidobazických vlastností molekuly.

Souhrnně lze o druhé generaci říci, že oproti první generaci, tedy volným nízkomolekulárním fluoroforům, byla výrazně vylepšena jak doba oběhu v krvi pro fluorofor navázaný na polymer, tak i selektivita pro nádorovou tkáň, ale zároveň bylo pozorováno zhasení fluoroforů vlivem jejich zvýšené lokální koncentrace na polymerním nosiči. Proto se nabízí vývoj třetí generace, která by obsahovala odštěpitelný fluorofor, jehož uvolňování by bylo nádorově specifické.

## 1.6 Třetí generace

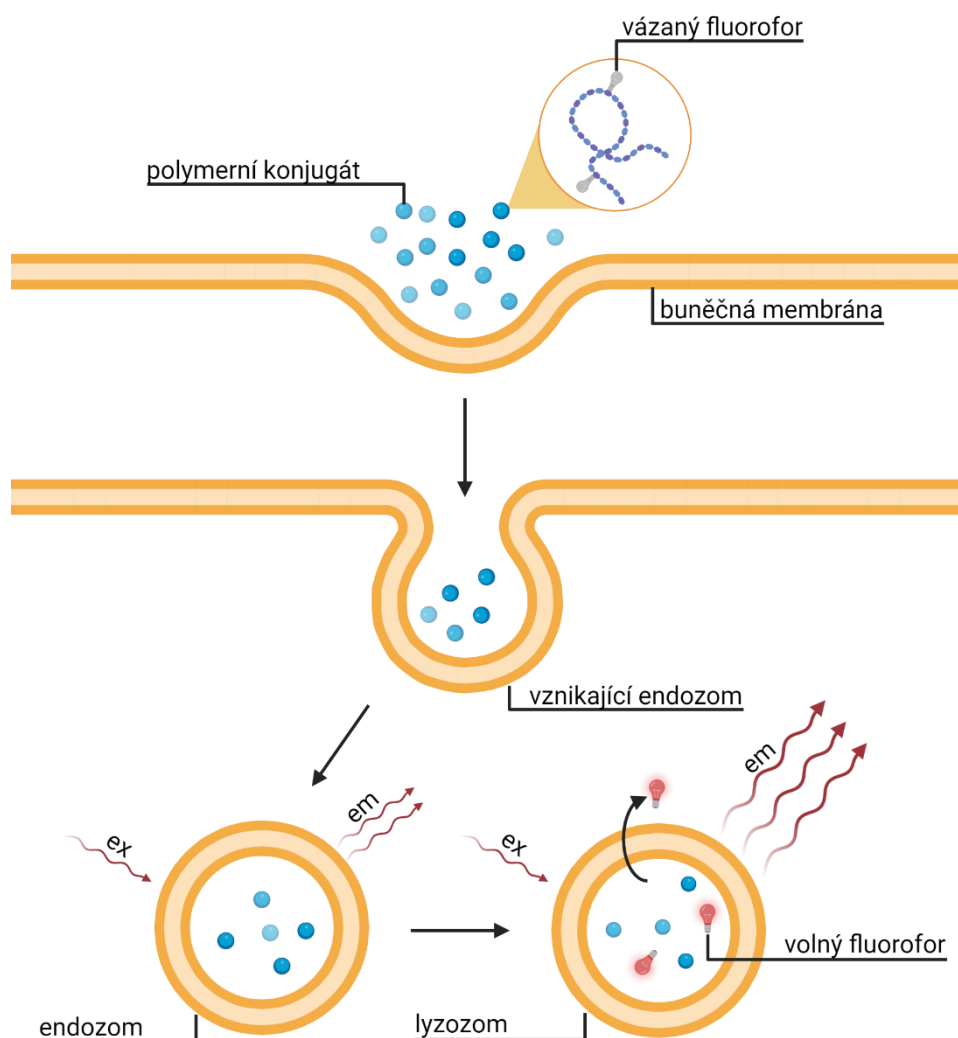
Hlavním cílem při studiu této generace polymerních sond bylo zvýšení kontrastu fluorescenčního signálu asociovaného s nádorovou tkání, a to tím, že dojde k zpětné aktivaci fluorescence po uvolnění fluoroforů z polymerních sond. Vzhledem k tomu, že zhasení fluorescence na polymerních sondách je vyvolané zvýšenou lokální koncentrací fluoroforů na nosiči, se jako nejjednodušší řešení jeví odštěpení fluoroforu v nádorové tkáni. Při návrhu spojek využitelných pro zpětné odštěpení fluoroforu je důležité znát prostředí nádorové tkáně. Například v myších kolorektálních nádorech vedla aplikace lineárního HPMA kopolymeru o velikosti asi  $30 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  (tedy hydrodynamickém poloměru přes 4 nm [20]) s fluoroforem vázaným přes pH-senzitivní spojku k velmi významnému nárůstu fluorescence nádorové tkáně, přetrvávající i několik dní [27].

### 1.6.1 Využití vlastností nádorové tkáně

Charakteristickou vlastností nádorových buněk je významné zvýšení hodnoty intracelulárního pH, která běžně nabývá hodnot okolo 7,0; zatímco v nádorových buňkách hodnot mezi 7,1 a 7,7 [28, 29]. Tato odchylka od běžné hodnoty je udržována expresí některých transportérů a enzymů. Dále k ní přispívá glykolýza, která je vyvolána lokální hypoxií.

Díky transportu protonů z nádorových buněk, vzniklých především při glykolýze, klesá v okolní tkáni hodnota pH. Na rozdíl od zdravé tkáně, která má hodnoty extracelulárního pH v rozmezí 7,3 až 7,4; nabývá ta nádorová hodnot 6,2 až 6,9 [28]. Kromě již zmíněného transportu protonů extracelulární pH značně ovlivňují karboxyanhydrasy, které katalyzují vznik bikarbonátového aniontu. Tato reakce probíhá vně buňky, kde se druhý produkt, vodíkový kation, adsorbuje na povrch buňky [30].

Dalším místem, kde se v buňce nachází kyselé pH, jsou endosomy a lysosomy [31]. V nich je kyselé pH udržováno pomocí vakuolární  $H^+$ -ATPasy, která je vlastně obrácenou ATP-synthasou. Za spotřeby ATP totiž pumpuje protony proti jejich koncentračnímu gradientu. Tím ale na membráně lysosomu vzniká napětí. Na tuto změnu reagují napětím řízené kanály, například  $H^+/Cl^-$  antiportér, kdy chloridové anionty snižují napětí vzniklé vodíkovými kationty. V primárním lysosomu můžou hodnoty pH dosahovat až 5,0. Ten poté splývá s endosomem, čímž vzniká sekundární, aktivní lysosom, kde dochází k enzymatické hydrolýze nejen proteinů, ale většiny látek importovaných endocytosou. Tento děj je v případě polymerního konjugátu schematicky znázorněn na obr. 1.4 na str. 21.



Obr. 1.4 Vliv lysosomu na polymerní konjugát. Endosom vzniká vchlípením buněčné membrány pomocí klathrinů. V kyselém prostředí lysosomu, který vzniká splynutím endosomu s vákem obsahujícím mj. trávicí enzymy, dochází k rapidnímu štěpení hydrazonové vazby. Díky tomu se od sebe molekuly fluoroforu dostatečně vzdálí, takže dojde k výraznému zvýšení fluorescence. Vytvoření pomocí biorender.com

### 1.6.2 Biodegradovatelné spojky

Spojky, které využívají charakteristických vlastností nádorové tkáně, mohou být hydrolyticky, enzymaticky nebo reduktivně štěpitelné. Ty mohou ve spojení s EPR efektem cíleně využít kyselého prostředí buněčné tkáně, resp. nadprodukcí vybraných enzymů či zvýšenou přítomnost glutathionu v nádorových buňkách.

#### *Hydrolyticky štěpitelné spojky*

Možností, jak využít jedné z těchto vlastností nádorové tkáně, je navázat na polymerní nosič derivát fluoroforu obsahující spojku, která se štěpí rozdílnou rychlostí v závislosti

na pH. Jako spojku, která se štěpí v kyselém pH lze využít oxokyselinu, přes jejíž karbonylovou skupinu je navázán fluorofor na hydrazid pomocí hydrazonové vazby. Ta je v neutrálním pH poměrně stabilní, ale v kyselém prostředí podléhá hydrolyze. Několik takových systémů již bylo v minulosti připraveno, jen místo fluoroforu byla použita jiná molekula, například léčivo. Například lineární nebo hvězdicové polymerní systémy obsahující doxorubicin vázaný hydrazonovou vazbou určené pro léčbu nádorů, kde se léčivo uvolňuje v kyselém pH [19, 32], nebo hydrogely s léčivem, jehož uvolňování je řízené pomocí teploty nebo pH [33].

### ***Enzymaticky štěpitelné spojky***

Další mechanismus pro uvolnění dopravované látky z nosiče je využití nadměrné exprese některého enzymu, která je specifická pro studovaný typ nádorové tkáně. Například je možné využít lysosomální enzymy, matrix-metaloproteinasy, aldehyddehydrogenasy nebo karbonáthydrolasu [34]. V tomto případě je fluorofor navázán na vhodnou oligopeptidovou spojku, která by měla být substrátem pro vybraný enzym nebo skupinu enzymů.

Je možné využít lysosomálních enzymů, čehož se využívá, pokud je vybraný oligopeptid v buňce enzymaticky štěpen v lysosomech např. enzymy z rodiny katepsinů. Nejprve tedy proběhne endocytóza polymerního nosiče, kdy dojde k vytvoření vchlípeniny v plazmatické membráně. Toto se děje kruhovou polymerací aktinu těsně pod membránou, kdy dochází ke zvětšování vchlípeniny, až je nakonec “přiškrcena” a uvolní se tak endosom [35]. Ten může následně splynout s lysosomy, ve kterých je vysoká koncentrace právě zmíněných katepsinů, a peptidová spojka se začne štěpit. Mezi často používané spojky patří synteticky připravené oligopeptidy, např. tetrapeptid glycylleucylfenylalanyl-glycin (GLFG), který je štěpen především katepsinem B [36], dále alanylleucylalanyl-leucin (ALAL) nebo valylcitrulyl-4-aminobenzylalkohol [37].

### ***Reduktivně štěpitelné spojky***

Další možností je využít redoxních vlastností kompartmentů organismu. Koncentrace redukovaného glutathionu a jeho oxidované formy, glutathion disulfidu, jsou udržovány jak uvnitř, tak vně buňky na prakticky konstantní úrovni. V extracelulárním prostoru je koncentrace redukované formy 2–20  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , zatímco v cytosolu nabývá hodnot 0,5–10  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  [38]. Díky tomu je v buňce silně redukční prostředí.

Toho lze využít zavedením spojky, například obsahující disulfidovou vazbu, mezi polymerní nosič a fluorofor. Disulfidová vazba vzniká oxidací dvou thiolových skupin, přičemž reakce je vratná. Příkladem thiolu využitelného pro připojení léčiva je cysteamin, 3-thiopropionová kyselina nebo cystein [38]. Nízká koncentrace redukovaného glutathionu v krvi způsobuje, že disulfidová vazba je stabilní během cirkulace v krvi a polymerní sonda s fluoroforem navázaným přes disulfid se tak dostane až k nádorové tkáni. Po endocytóze je však disulfidová vazba v redukčním prostředí buňky rychle štěpena a fluorofor je tak uvolněn, čímž by mělo dojít ke zvýšení jeho fluorescence. Příkladem využití reduktivního štěpení je HPMA kopolymer, do něhož je inkorporován komonomer, na kterém je navázaná modifikovaná fluorescenční značka Cyanine. Na něj je disulfidickou vazbou vázán kamptothecin, který se v redukujícím prostředí odštěpí a tím dojde ke zvýšení intenzity fluorescence [39].

### 1.6.3 Aktivní směřování

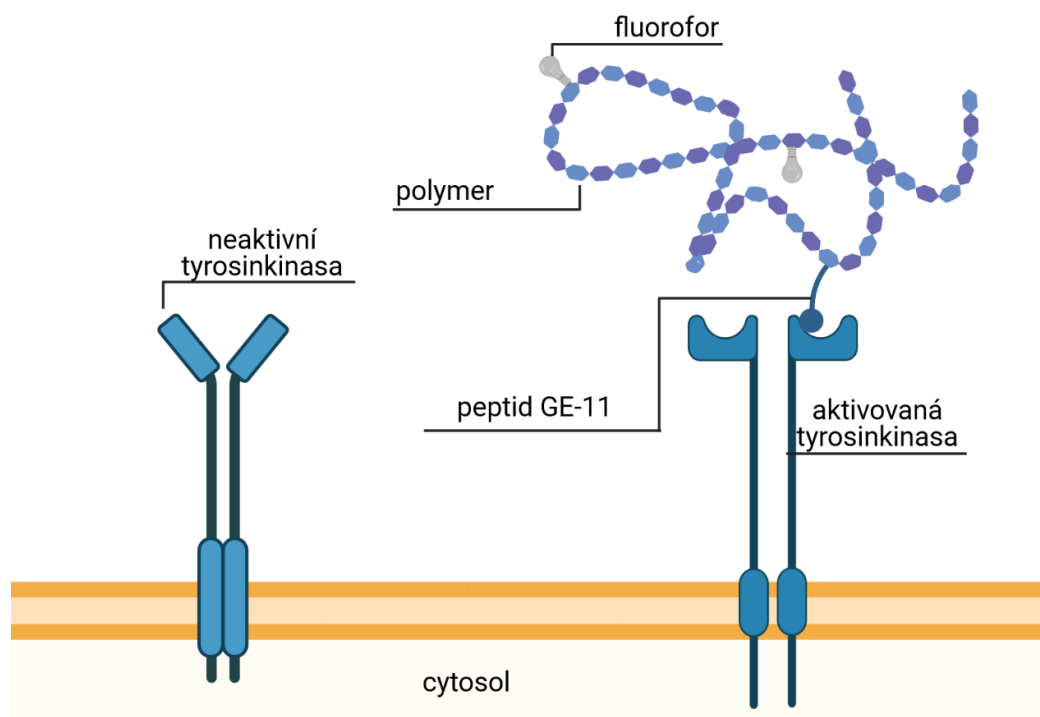
Dalším vylepšením nosičů oproti druhé generaci je aktivní směřování, kdy kromě pasivní akumulace vyvolané pouze EPR efektem dochází i k cílení na specifické receptory nádorových buněk nebo nádorové neovaskulatury. Výhodou polymerních nosičů je, že na ně lze navázat i více směřujících skupin, čímž může dojít k mnohem silnější interakci polymeru s buněčnými receptory. Jako směřující struktury se uplatňují např. protilátky, jejich fragmenty, cukry, polysacharidy, vitaminy, aptamery nebo peptidy [40].

#### *Cílení peptidy*

Jednou z možností pro cílení je navázání peptidové sekvence. Využitelných peptidů je obrovská škála, mj. přirozené ligandy receptorů, peptidy odvozené od struktury receptorů *in silico*, v neposlední řadě i pseudopeptidy – ty ve své struktuře obsahují neproteinogenní aminokyselinu, či dokonce úplně jinou strukturu. Směřující sekvence je pak rozpoznána příslušným receptorem a dojde ke specifické vazbě vedoucí k receptorem zprostředkované endocytóze [41].

Aktivní směřování je vhodné zejména v synergii s EPR efektem, kdy dojde k dalšímu zvýšení lokalizace polymeru, především z krátkodobého hlediska. Například polymerní nosiče o velikosti asi 10 nm obsahující RGD (arginylglycylaspartát), případně NGR (asparagylglycylarginin) se sice oproti neznačenému nosiči kumulovaly v nádorové tkáni více, ale z dlouhodobého hlediska (vyšší jednotky hodin) byl obsah směřovaných polymerů nižší než těch nesměrovaných, způsobený zejména zhoršenou biodistribucí

směřovaných konjugátů [42]. Hlavní výhodou využití RGD sekvence je specifická vazba na integriny (mj. integrin  $\alpha_v\beta_3$ ), které jsou nadměrně exprimovány vaskulaturou nádorové tkáně [43]. Dalším možným peptidem pro aktivní směřování je nonapeptid EDPGFFNVE, který se váže na specifické receptory T- a B-lymfocytů [44], nebo výše již zmíněný peptid GE-11 (YHWYGYTPQNVI) cílicí na receptor pro epidermální růstový faktor (viz obr 1.5) [14].



Obr. 1.5 Cílení polymerního konjugátu peptidem GE-11, který cílí na epidermální růstový faktor nádorové tkáně. Místem účinku tohoto motivu jsou receptory pro epidermální růstový faktor z rodiny tyrosinkinasy. Jedná se o internalizující receptor, to znamená, že navázaný polymer se dostane do lysosomu, kde dojde k hydrolyze fluoroforu. Vytvořeno pomocí biorender.com

### **Cílení aptamery**

Další možností aktivního směřování je využití aptamerů, tedy jednořetězcových či dvouřetězcových RNA nebo DNA. Příkladem může být aptamer A10 RNA skládající se z 57 párů bází, kde jsou všechny pyrimidinové nukleotidy v poloze 2' substituovány fluorem, stejně tak je i deoxythimidinová čepička substituovaná v poloze 3' fluorem. [45]. Její substituce zajišťuje této RNA odolnost proti krevním nukleasám. Tento aptamer se specificky váže na extracelulární doménu prostatického specifického membránového antigenu, jejíž exprese je u rakoviny této tkáně významně zvýšena [40]. Dalším příkladem je aptamer AS1411 DNA, který se specificky váže na nukleolin. Ten je ve vysoké míře zastoupen jak u glioblastomů, tak i na buňkách nádorového endotelu vzniklých



angiogenezi rakovinné tkáně [40]. Možnými nevýhodami aptamerů jsou možná ztráta afinity důsledkem konformačních změn, vysoká cena a náchylnost k degradaci nukleasami [40].

### ***Cílení sacharidy***

Obdobně i sacharidy umožňují aktivně směřovat do nádorové tkáně, jak bylo ukázáno pro polymerní nosič v práci Tavares a kol. z roku 2020 [46]. V této práci byly jako směřující struktury použity  $\beta$ -galaktosidy, které se specificky váží na galektiny. Některé galektiny jsou nadměrně exprimovány nádorovými buňkami, jejichž aktivace navázáním ligandu ovlivňuje metastazování, angiogenezi i buněčnou adhezi, a kromě využití k aktivnímu směřování je lze využít i při samotné léčbě rakoviny. Výhodou cílení je rozdílná afinita polymeru v závislosti na prostorovém uspořádání sacharidů. Galektin-1 měl výrazně vyšší afinitu k individuálně vázaným *N*-acetyllaktosaminům, zatímco galektin-3 vykazoval vyšší afinitu ke dvěma nebo třem molekulám téhož sacharidu vázaného na společnou spojku. Vliv na afinitu má i počet cukerných jednotek sacharidu.

## **1.7 Současný vývoj a využití fluorescenčních látek**

Opticky navigovaná onkochirurgie zaznamenala v posledním desetiletí zvýšený zájem medicíně i výzkumné sféry. V současné době je několik látek, ať už nízkomo- nebo vysokomolekulárních, v různých stádiích klinických testů. V této kapitole byly vybrány různé přístupy k této problematice.

### **1.7.1 Indokyaninová zeleň (ICG)**

Použití ICG v medicíně se datuje od konce padesátých let 20. století, kdy bylo její použití povoleno americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Původně sloužila jako nástroj pro diagnostiku jaterního krevního řečiště. Později se začala využívat při biopsii sentinelních lymfatických uzlin, jelikož právě v nich dochází k potenciálnímu zachytávání blízkých nádorových buněk. Zároveň zde dochází ke kumulaci ICG, čehož využívá právě biopsie. Výsledky německé studie z roku 2010 ukazují 97% diagnostickou specifitu a 94% selektivitu detekce těchto uzlin při použití ICG [47]. V současnosti má podporu i využití ICG v navigované chirurgii [48].

### 1.7.2 Panitumumab-IRDye800

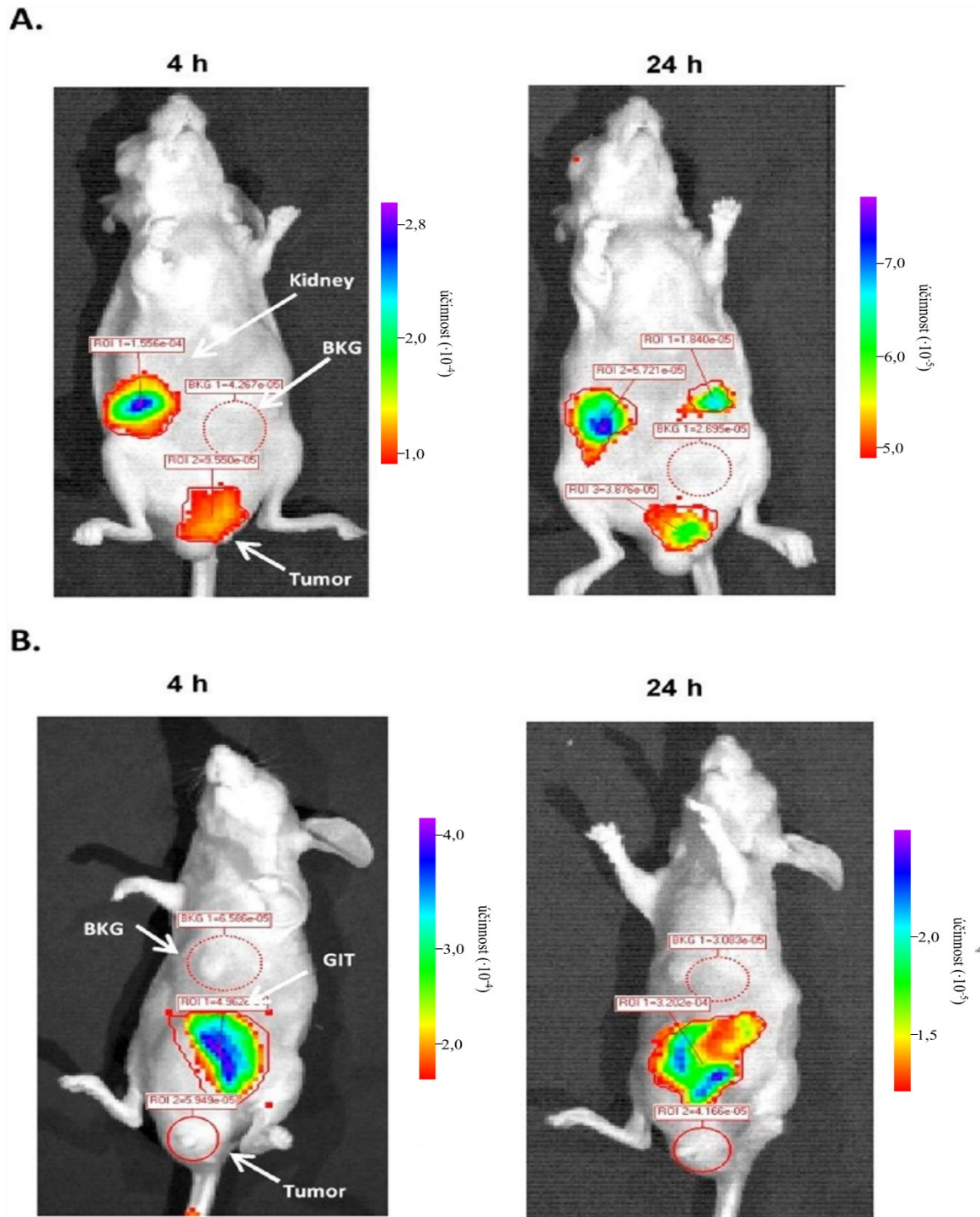
Tato látka je konjugát lidské protilátky epidermálního růstového faktoru a fluoroforu IR800 od firmy LI-COR Inc. Cílí na receptory epidermálního růstového faktoru, ke kterému si zachovává velkou afinitu, čehož je docíleno velmi nízkým molárním poměrem protilátky a fluoroforu [49]. Látka je v současnosti v šesti probíhajících amerických klinických studiích zaměřených na použití této látky v opticky navigované onkochirurgii.

### 1.7.3 Polypeptid AVB-620

Tento polypeptid se skládá ze dvou homooligopeptidů, poly-D-argininu, jehož N-konec je modifikován a obsahuje Cyanine5, a poly-D-glutamátu, který je na N-konci derivatizován fluoroforem Cyanine7 [50]. Oba tyto peptidy jsou propojeny sekvencí aminokyselin, která je vhodným substrátem pro matrix-metaloproteinasy nebo serinovou peptidasu elastasu. Bez přítomnosti těchto peptidas se oba fluorofory sondy vzájemně zhášejí. Kladně nabitě aminoskupiny argininů se elektrostaticky přitahují se záporně nabitými karboxylovými skupinami glutamátů, a proto se fluorofory nachází blízko u sebe. Po enzymatickém rozštěpení této sondy dojde ke vzdálení dvou vzniklých peptidů a k výraznému nárůstu fluorescence.

### 1.7.4 Polymerní sonda využívající fluorofor IR783

Polymerní sonda na bázi HPMA využívající fluorofor IR783 vykazala velmi dobré výsledky při detekci kolorektálního karcinomu [51]. Jedná se o aktivovatelný systém, kdy dojde k výraznému zvýšení fluorescence díky enzymatickému rozštěpení peptidové spojky pomocí katepsinu B. Chemická struktura této sondy je radikálový kopolymer HPMA s monomerem obsahujícím peptid GGFLGK, na který je posléze navázán fluorofor amidovou vazbou. Zastoupení fluoroforu se pohybuje mezi 2,5 a 20 mol%. Nejlepší *in vitro* výsledky, tedy největší zvýšení intenzity fluorescence po enzymatickém štěpení, vykazala sonda obsahující 7,5 molárních procent fluoroforu – intenzita se zvýšila více než pětkrát. Další pokusy proto probíhaly už pouze s polymerní sondou s tímto obsahem fluoroforu. Následné *in vivo* a *ex vivo* testy prokázaly funkčnost této sondy i v myších (viz obr. 1.6 na str. 27).



Obr. 1.6 *In vivo* snímky myši nesoucí implantovaný kolorektální nádor. Z obrázku je jasně patrná kumulace v nádorech, a to i po 48 hodinách od podání diagnostika. Dávka A činila  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a dávka B  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Oblast GIT představuje gastrointestinální trakt, Kidney představuje ledviny, BKG představuje pozadí a oblast Tumor představuje nádor [51].

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je návrh, syntéza a fyzikálně-chemická charakterizace polymerních konjugátů s fluoroforem Cyanine7. Tyto polymerní konjugáty by mohly nalézt své uplatnění při navigované endoskopické chirurgii, jelikož by mělo dojít k selektivní fluorescenci nádorové tkáně.

Jednotlivými dílčími cíli bylo:

- připravit polymerní prekurzor s vhodnou molární hmotností a její úzkou distribucí,
- připravit deriváty vybraných oxokyselin s fluoroforem Cyanine 7,
- připravit polymerní konjugáty s vybranými fluorescenčními deriváty oxokyselin,
- charakterizovat spektroskopické, hydrolytické a případně i biologické vlastnosti připravených konjugátů,
- připravit alespoň jeden konjugát, jehož hydrolytická stabilita bude záviset na pH v rozmezí 5,0–7,4,
- připravit alespoň jeden konjugát, jehož fluorescence se po hydrolyze významně zvýší
- charakterizovat alespoň jeden konjugát pomocí *in vitro* konfokální mikroskopie.

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité chemikálie

chemikálie	čistota	výrobce, původ
2,2'-azobis(2-methylpropionitril)	98 %	FUJIFILM Wako Chemclas Europe, DE
2-kyano-5-oxo-5-(2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)pentan-2-yl ethyl karbontrithionát	>95 %	BP – ÚMCH AV ČR, ČR
4-(dimethylamino)pyridin	99 %	Sigma-Aldrich, US
4-kyano-4-thiobenzoylsulfanylpentanová kyselina	>95 %	BP – ÚMCH AV ČR, ČR
6-methakrylamidohexanohydrazid-boc	99,5 %	BP – ÚMCH AV ČR, ČR
aceton	sušený	Lach-ner, ČR
acetonitril	99,9 %	VWR International, US
Cyanine7-amin	95 %	Lumiprobe, DE
diethylether	99,5 %	VWR International, US
dihydrogenfosforečnan sodný	99,9 %	VWR International, US
dichlormethan	99,9 %	Lach-ner, ČR
dodekahydrát tetraboritanu sodného	99,5 %	Sigma-Aldrich, US
ethyl-acetát	sušený	Lach-ner, ČR
hydrogenfosforečnan sodný	99,9 %	VWR International, US
hydroxid sodný	99,4 %	Lach-ner, ČR
k. 4-(2-oxopropyl)benzenkarboxylová	97 %	Rieke Metals, US
k. 4-oxo-4-(2-pyridyl)butanová	97 %	Rieke Metals, US
k. 5-cyklohexyl-5-oxopentanová	97 %	Rieke Metals, US
k. octová	99,9 %	Lach-ner, ČR
k. trifluoroctová	P. G.	Iris Biotech, DE

<b>chemikálie</b>	<b>čistota</b>	<b>výrobce, původ</b>
k. trinitrobenzensulfonová	N/A	Sigma-Aldrich, US
methanol	sušený	Avantor, NL
<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid	99,8 %	BP – ÚMCH AV ČR, ČR
<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid	99 %	Sigma-Aldrich, US
<i>N,N'</i> -diisopropylethylaminem	99 %	Iris Biotech, DE
<i>N,N'</i> -dimethylacetamid	99,8 %	Sigma-Aldrich, US
<i>N,N'</i> -dimethylformamid	P. G.	Iris Biotech, DE
octan sodný	>98,5 %	Lach-ner, ČR
<i>tert</i> -butanol	99,5 %	ACROS Organics, US
tetrahydrofuran	99,9 %	ACROS Organics, US
thiazolidin-2-thion	98 %	Sigma-Aldrich, US
triisopropylsilan	98 %	Sigma-Aldrich, US
V-70	95 %	FUJIFILM Wako Chemiclas Europe, DE

P. G. = peptide grade; BP – ÚMCH AV ČR = příprava v oddělení Biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR ; N/A = není dostupné

<b>pufř</b>	<b>koncentrace</b> <b>[mol·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>solí</b>	<b>pH</b>
fosfátový 1	0,3	hydrogenfosforečnan a dihydrogenfosforečnan sodný	7,4
fosfátový 2	0,3	hydrogenfosforečnan a dihydrogenfosforečnan sodný	6,5
fosfátový 3	0,3	hydrogenfosforečnan a dihydrogenfosforečnan sodný	5,0
borátový	0,5	tetraboritan draselný dekahydrát	9,4

## 3.2 Použité přístroje

### *HPLC*

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf, HPLC (Shimadzu, JP), opatřený řídicí jednotkou CBM-20A, odplyňovačem DGU-20A<sub>5</sub>, pumpou LC-20AD, autosamplérem SIL-20AC, fluorescenčním detektorem RF-20A, fotodiodovým detektorem SPD-M20A, úložištěm kolony CTO-20AC obsahujícím kolonu Chromolith® HighResolution RP-18 Endcapped (Sigma-Aldrich, US). Software: LCsolution 1.25.

### *SEC*

Rozměrově-vylučovací chromatografie (SEC, z angl. size-exclusion chromatography) někdy také označovaná jako gelová permeační chromatografie (GPC) byla prováděna na chromatografu Shimadzu opatřeném pumpou LC-10AD, autosamplérem SIL-HT, fotodiodovým UV-Vis detektorem SPD-10AV, úložištěm kolony CTO-10AC obsahujícím kolonu TSKgel SuperSW3000, víceúhlovým detektorem rozptylu světla (MALS) DAWN 8 (Wyatt, US) a detektorem indexu lomu (RI) Optilab rEX (Wyatt, US). Software: ASTRA 5.3 a LCsolution 1.25.

### *Spektrofotometr*

Spektrofotometr (Jenway 7415, UK), opatřený xenonovou lampou (198-1000 nm).

### *Vakuová odparka*

Vakuová odparka (Heidolph, DE), opatřená řídicí jednotkou Hei-VAP Precision G3 a chladicí jednotkou RotaChill Large.

### *Centrifuga*

Centrifuga 5430 R (Eppendorf, DE), opatřená rotorem F-35-6-30 s maximem 7830 otáček za minutu ( $\sim 7\,700 \cdot g$ ).

### *Termostat*

Termostat Haake Fisons L (Thermo Haake, DE), s řídicí jednotkou Haake Fisons D8, byl použit při syntéze polymerního prekurzoru k udržení stabilní teploty.

### *Fluorimetr*

Fluorimetr FP-6200 (Jasco, JP), opatřený xenonovou lampou (200-1000 nm), termostatem ETC-272T, fotodiodou pro detekci excitačního záření a fotonásobičem pro detekci emisního záření. Software: Spectra Manager 1.54.

### 3.3 Použité metody

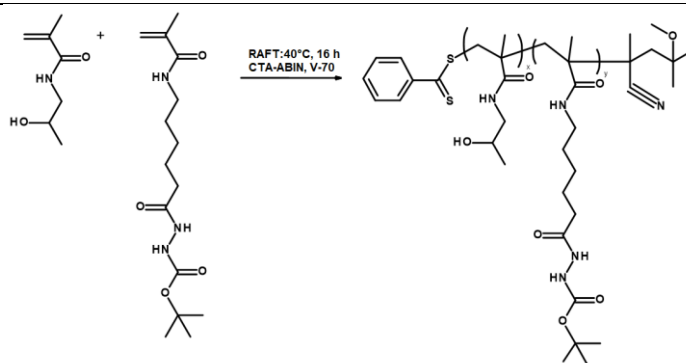
#### 3.3.1 Syntézy

##### *Syntéza kopolyméru poly(HPMA-co-Ma-Ahx-NHNH-Boc)*

Polymer byl připraven RAFT polymerací komonomerů HPMA a Ma-Ahx-NHNH-Boc v molárním poměru 9 : 1 (viz obr 3.1 na str. 32). Reakční směs (viz tabulka 3.1) byla připravena rozpuštěním navážky HPMA v *terc*-butanolu, ke kterému byl přidán roztok DMA obsahující Ma-Ahx-NHNH-Boc. Poté bylo do reakční směsi přidáno přenosové činidlo (CTA) a iniciátor V-70, rovněž rozpuštěné v DMA. Koncentrace monomerů v reakční směsi byla  $0,7 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a objemový poměr rozpouštědel *t*BuOH : DMA byl 9 : 1. Ampule s reakční směsí byla probublána argonem, zatavena a ponechána ve vodní lázni o teplotě  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu šestnácti hodin. Reakce byla ukončena vysrážením polymeru do směsi bezvodých aceton-diethylether (obj. 1 : 1). Sraženina byla oddělena od supernatantu centrifugací po dobu tří minut při zrychlení  $7\,700\text{-g}$ . Následně byla sušena proudem argonu a poté dosušena v exsikátoru za sníženého tlaku do konstantní hmotnosti.

Tab. 3.1 Navážky a objemy reakční směsi pro polymeraci.

látko	molární poměr	navážka	objem rozpouštědla
HPMA	450	1,50 g	14 ml <i>t</i> BuOH
Ma-Ahx-NHNH-Boc	50	365 mg	1,2 ml DMA
CTA	2	10,3 mg	964 $\mu\text{l}$ <i>t</i> BuOH
V-70	1	7,17 mg	436 $\mu\text{l}$ <i>t</i> BuOH



Obr. 3.1 Reakční schéma RAFT polymerace. Produkt obsahuje koncovou dithiobenzoátovou skupinu, která byla v dalším kroku odstraněna.



Odstranění přítomných dithiobenzoátových skupin po polymerizaci bylo docíleno reakcí (viz tabulka 3.2) polymeru s přebytkem iniciátoru 2,2'-azobis(2-methylpropionitrilu) (AIBN) v DMA při 80 °C po dobu dvou hodin v zatavené ampuli s inertní atmosférou argonu. Následně byl polymer izolován již výše popsaným způsobem srážení. Odstranění chránicích skupin z reaktivních hydrazidových skupin bylo provedeno mícháním polymeru rozpuštěného ve směsi kyseliny trifluoroctové, triisopropylsilanu (TIPS) a destilované vody (viz tabulka 2.2) po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě. Produkt byl izolován dvojnásobným vysrážením roztoků do ethyl-acetátu (první sraženina byla rozpuštěna v methanolu) a následnou centrifugací. Konečný produkt byl poté vysušen v exsikátoru za sníženého tlaku do konstantní hmotnosti.

Tab. 3.2 Navážky a objemy pro odstranění dithiobenzoátových, resp. *tert*-butyloxykarbonylových skupin.

<b>Odstranění dithiobenzoátových skupin</b>		
navážka AIBN		objem DMA
259,1 mg		8,64 ml
<b>Odstranění <i>tert</i>-butyloxykarbonylových skupin</b>		
objem CF <sub>3</sub> COOH	objem TIPS	objem vody
95 obj%	2,5 obj%	2,5 obj%
10 ml	263 μl	263 μl

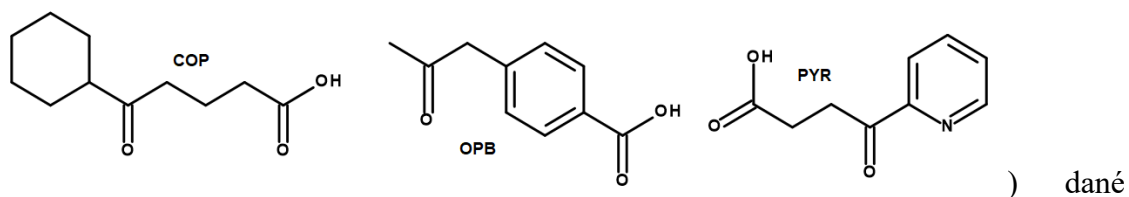
### ***Syntéza kopolymeru poly(HPMA-co-Ma-β-Ala-TT)***

Polymer byl připraven RAFT polymerací komonomerů HPMA a Ma-β-Ala-TT v molárním poměru 92 : 8. Reakční směs byla připravena rozpuštěním navážky HPMA (3 g) v *tert*-butanolu, ke kterému byl přidán roztok DMA obsahující 471 mg Ma-β-Ala-TT. Poté bylo do reakční směsi přidáno přenosové činidlo 4-kyano-4-thiobenzoylsulfanylpentanová kyselina (25,2 mg) a iniciátor AIBN (9,35 mg) rovněž rozpuštěné v DMA. Koncentrace monomerů v reakční směsi byla 0,9 mol·dm<sup>-3</sup> a objemový poměr rozpouštědel tBuOH : DMA byl 9 : 1. Ampule s reakční směsí byla probublána argonem, zatavena a ponechána ve vodní lázni o teplotě 70 °C po dobu šestnácti hodin. Reakce byla ukončena vysrážením polymeru bezvodého acetonu.

Sraženina byla oddělena od supernatantu centrifugací po dobu tří minut při zrychlení 7 700·g. Následně byla sušena proudem argonu a poté dosušena v exsikatoru za sníženého tlaku do konstantní hmotnosti. Odstranění dithiobenzoátových skupin proběhlo úplně stejně, jako u výše zmíněného polymeru.

### Syntéza aktivovaných oxokyselin a jejich derivátů

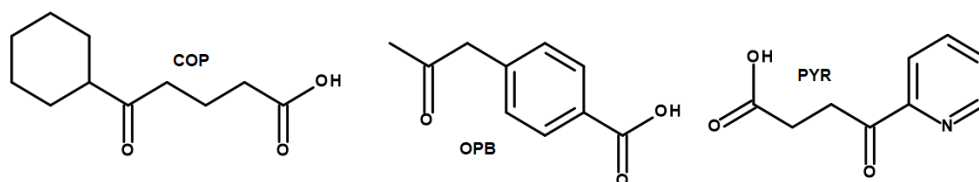
Kyseliny 5-cyklohexyl-5-oxopentanová (COP), 4-(2-oxopropyl)benzenkarboxylová (OPB) a 4-oxo-4-(2-pyridyl)butanová (PYR) byly aktivovány reakcí s thiazolidin-2-thionem, tuto reakci znázorňuje schéma na obr. 3.2 na str. 35. Navážky (viz tabulka 3.3



oxokyseliny a *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) byly rozpuštěny v bezvodém tetrahydrofuranu. Navážky thiazolidin-2-thionu (TT) a 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP) byly také rozpuštěny v tetrahydrofuranu. Tyto roztoky byly ochlazeny na -18 °C a po dvaceti minutách smíchány. Za stálého míchání byla udržována tato teplota po dobu jedné hodiny, dalších dvacet hodin teplota 4 °C. Následně byla reakční směs dvojnásobnou filtrací zbavena *N,N'*-dicyklohexylmočoviny, filtrát byl odpařen za sníženého tlaku a rozpuštěn v ethyl-acetátu. Produkt byl vyčištěn dvojnásobnou krystalizací ve směsi ethyl-acetát : dichlormethan (obj. 1 : 1).

Tab. 3.3 Navážky a objemy látek pro aktivaci uvedených kyselin.

látka	COP	OPB	PYR	molární ekvivalent
oxokyselina	60 mg	100 mg	100 mg	1,00 ekv.
DCC	79,1 mg	132 mg	139 mg	1,20 ekv.
THF	0,78 ml	1,4 ml	1,4 ml	2,45 dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup>
thiazolidin-2-thion	39,7 mg	70 mg	69 mg	1,05 ekv.
DMAP	2 mg	2 mg	2 mg	katalytické množství
THF	0,30 ml	0,53 ml	0,53 ml	1,12 dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup>

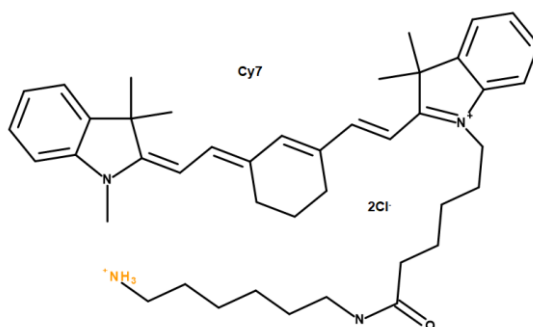


Obr. 3.2 *Struktura oxokyselin a reakční schéma jejich aktivace.* Aktivační reakcí vzniká aktivovaná kyselina a *N,N'*-dicyklohexylmočovina ve formě sraženiny.

Takto aktivované kyseliny byly poté derivatizovány amino-derivátem fluorescenční molekuly Cyanine7 (Cy7, obr. 3.2). Navážky (viz tabulka 3.4) dané kyseliny a Cy7 byly rozpuštěny v příslušných objemech rozpouštědla (dimethylformamid-methanol, 3 : 1 V/V) a poté smíchány. K roztoku byl přidán příslušný objem 2,6M roztoku hydroxidu sodného. Za stálého míchání probíhala reakce při pokojové teplotě po dobu tří hodin, následně byla ukončena odpařením rozpouštědla. Průběh reakce byl sledován pomocí HPLC metodou CH5M.

Tab. 3.4 *Navážky a objemy látek pro syntézu derivátů aktivovaných kyselin.*

látko	COP-TT	OPB-TT	PYR-TT	Molární ekv.
akt. oxokyselina	1,39 mg	1,30 mg	1,30 mg	1,00 ekv.
objem rozp.	1,193 ml	1,193 ml	1,193 ml	256,5 dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup>
Cy7	3,35 mg	3,35 mg	3,35 mg	1,00 ekv.
objem rozp.	1,193 ml	1,193 ml	1,193 ml	256,5 dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup>
NaOH (pevný)	0,20 mg	0,20 mg	0,20 mg	1,10 ekv.
2,6M rozt. NaOH	1,97 μl	1,97 μl	1,97 μl	0,42 dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup>

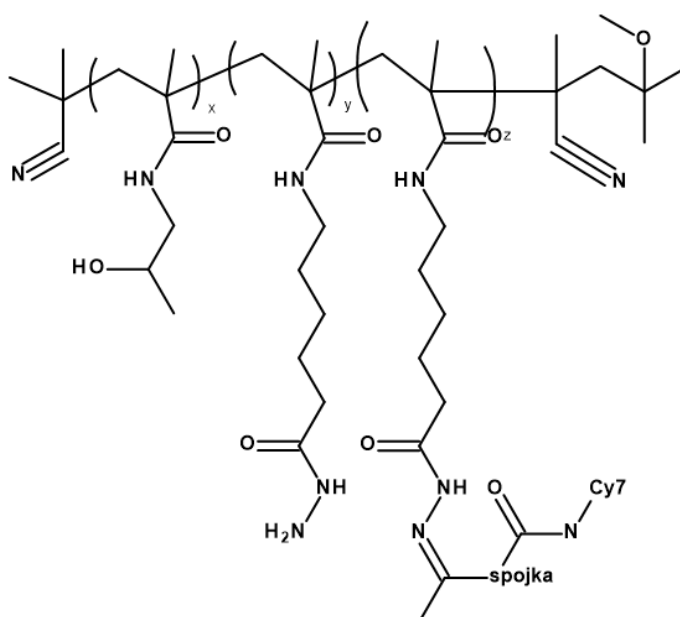


Obr. 3.3 *Struktura molekuly Cy7 se znázorněnou vazebnou aminoskupinou.* Struktura obsahuje obdobně jako indokyaninová zeleň několik konjugovaných dvojných vazeb a dvě benzenová jádra.

### Syntéza polymerních konjugátů

Konjugáty **pol-COP-Cy7**, **pol-OPB-Cy7** a **pol-PYR-Cy7** byly připraveny smícháním methanolvého roztoku příslušného derivátu (viz tabulka 3.5 na str. 37) s 10% roztokem polymeru obsahující volné hydrazidové skupiny v roztoku v takovém poměru, aby měl výsledný produkt teoreticky požadovanou hodnotu substituce samotným fluoroforem (nikoli celou molekulou derivované kyseliny), tedy 2 hm%. Reakce byla katalyzována koncentrovanou kyselinou octovou (40  $\mu$ l na 1 ml rozpouštědla) a za stálého míchání probíhala při pokojové teplotě 20 hodin. Poté byly produkty (viz obr. 3.3) reakce purifikovány sloupcovou gelovou chromatografií pomocí gelu Sephadex LH-20, jako mobilní fáze byl použit methanol. Frakce produktu byly zahuštěny odpařením methanolu za sníženého tlaku a vysráženy do ethyl-acetátu, centrifugovány a zbaveny zbytkového rozpouštědla v exsíkátoru za sníženého tlaku do konstantní hmotnosti.

Reakcí nederivovaného fluoroforu Cy7 s polymerním prekurzorem obsahující reaktivní TT skupiny v jejich 10 % roztoku v hmotnostním poměru 2 : 98 byl připraven kontrolní konjugát **pol- $\beta$ -Ala-Cy7** s neštěpitelně vázaným fluoroforem. Tato reakce byla katalyzována alkalicky *N,N*-diisopropylethylaminem za stálého míchání při pokojové teplotě po dobu 20 h. Následně byl produkt purifikován sloupcovou gelovou chromatografií pomocí gelu Sephadex LH-20, jako mobilní fáze byl opět použit methanol. Následné zpracování bylo stejné jako u výše uvedených konjugátů, jen byl jako srážedlo použit aceton.



Obr. 3.4 Struktura polymerního konjugátu s naznačeným způsobem připojení fluoroforu.

Tab. 3.5 Navážky a objemy látek pro syntézu polymerních konjugátů.

<b>látka</b>	<b>pol-COP-Cy7</b>	<b>pol-OPB-Cy7</b>	<b>pol-PYR-Cy7</b>
substituce Cy7 (hm%)	2	2	2
derivát kyseliny	2 mg	2 mg	2 mg
MeOH	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
polymer	79,2 mg	80,2 mg	80,1 mg
MeOH	792 $\mu$ l	802 $\mu$ l	801 $\mu$ l
CH <sub>3</sub> COOH	47,7 $\mu$ l	48,1 $\mu$ l	48,0 $\mu$ l

### 3.3.2 Charakterizace produktů

#### *Chromatografické metody*

##### *HPLC*

HPLC s chromatografem Shimadzu LC-20AD vybaveným kolonou Chromolith RP-18e s reverzní fází byla využita ke stanovení čistoty látek, sledování průběhu reakcí a ke stanovení množství fluoroforu (vázaného i volného). Mobilní fáze byla gradientová, složená z fáze A (95 % voda, 5 % acetonitril, V/V) a B (95 % acetonitril, 5 % voda, V/V) s lineárním gradientem od 100 % A do 100 % B. Délka separace byla 5 minut (průtok 5,0 ml·min<sup>-1</sup>) (dále jen CH5M) nebo 15 minut (průtok 2,5 ml·min<sup>-1</sup>) (dále jen CH15M) v závislosti na požadované přesnosti rozdělení.

##### *SEC*

SEC s chromatografem Shimadzu LC-10AD vybaveným kolonou TSKgel SuperSW3000 byla využita ke stanovení hmotnostně- i početně-průměrné molekulové hmotnosti polymerního prekurzoru a konjugátů. Mobilní fáze byla izokratická, složená z methanolu (80 %, V/V) a octanového pufru: octan sodný, k. octová, pH 6,5 (20 %, V/V). Délka separace byla 45 minut (průtok 0,3 ml·min<sup>-1</sup>).

##### *TLC*

Tenkovrstvá kapalinová chromatografie byla prováděna pomocí silikagelové destičky (5 x 7,5 cm) ALUGRAM Xtra SIL G/UV s fluorescenčním indikátorem UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel, DE).

#### *Spektroskopické (SPF) metody*

##### *Stanovení molekulové hmotnosti pomocí koncentrace dithiobenzoátových skupin*

Absorbance vzorků byly měřeny v křemenné kyvetě o průměru 1,00 cm, vzorky byly rozpuštěné v methanolu o koncentraci 1,0 g·dm<sup>-3</sup>. Spektrofotometrické měření probíhalo při  $\lambda = 302$  nm, molární absorpční koeficient dithiobenzoátových skupin při dané vlnové délce je 12 100 dm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> [52]. Molekulová hmotnost byla stanovena pomocí rovnice 2,

$$M_{n,DTB} = \frac{\varepsilon \times d}{A} \times \frac{m}{V} \quad [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}] \quad (2)$$

kde  $M_{n,DTB}$  představuje molekulovou hmotnost ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $\varepsilon$  molární absorpční koeficient látky při dané vlnové délce ( $\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ),  $d$  představuje rozměr kyvety v centimetrech,  $m$  představuje navážku (mg) a  $V$  představuje objem methanolu ( $\mu\text{l}$ ), ve kterém byla navážka rozpuštěna.

#### *Stanovení hydrazidových skupin*

Absorbance vzorků byly měřeny v křemenné kyvetě o optické dráze 1,00 cm, vzorky byly rozpuštěné v borátovém pufru o pH 7,4 o koncentraci  $200 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Poté bylo do kyvety pipetováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku vzorku, ke kterému bylo následně přidáno 875  $\mu\text{l}$  borátového pufru a 25  $\mu\text{l}$  trinitrobenzensulfonové kyseliny o koncentraci  $30 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , která působila jako vybarvovací činidlo [53]. Referenční kyveta obsahovala 975  $\mu\text{l}$  borátového pufru a 25  $\mu\text{l}$  trinitrobenzensulfonové kyseliny. Roztok v kyvetách reagoval hodinu a poté byl spektrofotometricky změřen při  $\lambda = 500 \text{ nm}$ . Molární absorpční koeficient takto modifikovaných hydrazinových skupin je  $17\,200 \text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [53]. K vypočtení molárního zlomku hydrazidových skupin byla použita rovnice 3,

$$\eta = A \times \frac{M_{HPMA}}{A(M_{HPMA} - M_{Co}) + \varepsilon \times c_m \times d} \quad [-] \quad (3)$$

kde  $\eta$  představuje molární zlomek,  $A$  absorbanci,  $M_{HPMA}$  molekulovou hmotnost HPMA monomeru ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $M_{Co}$  molekulovou hmotnost komonomeru (Ma-Ahx-NHNH<sub>2</sub>) ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $\varepsilon$  molární absorpční koeficient látky při dané vlnové délce ( $\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ),  $c_m$  představuje hmotnostní koncentraci ( $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a  $d$  představuje rozměr kyvety (cm).

#### *Stanovení thiazolidin-2-thionových skupin*

Absorbance vzorků byly měřeny v křemenné kyvetě o optické dráze 1,00 cm, vzorky byly rozpuštěny v methanolu o koncentraci  $1,00 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Referenční kyveta obsahovala pouze methanol. Roztoky byly ihned spektrofotometricky změřeny při  $\lambda = 305 \text{ nm}$ . Molární absorpční koeficient thiazolidin-2-thionu je  $10\,300 \text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [54]. K vypočtení molárního zlomku thiazolidin-2-thionových skupin byla použita rovnice 3.

#### *Stanovení molárních absorpčních koeficientů*

Vzorky byly měřeny rozpuštěné v methanolu ve dvou koncentračních řadách v křemenné kyvetě o rozměru 1,00 cm. Nejprve proběhlo orientační měření širší pětkové koncentrační řady (koncentrace  $26\text{--}50 \text{ pmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Po následném vyhodnocení dat proběhlo přesné měření v lineární oblasti závislosti absorbance na koncentraci dvou dvojkových ředících

řad o počátečních koncentracích 5,0 a 3,0  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Měření probíhalo v absorpčním maximu měřených látek, minimálně v duplikátech, v případě výrazné směrodatné odchylky i ve více opakováních.

#### *Spektrofluorometrie (SFL)*

Fluorescence vzorků byla měřena pomocí fluorimetru při koncentraci polymerního konjugátu 100  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  ve fosfátovém pufru o pH 7,4. Měření probíhalo v křemenných kyvetách, při teplotě 37 °C. Ačkoliv je excitační maximum konjugátů při  $\lambda = 750$  nm, vzorky byly měřeny při  $\lambda = 730$  nm a šířce clony 5 nm z důvodu zabránění interference excitačního záření se zářením emitovaným. Emisní spektrum bylo měřeno při vlnových délkách 740–900 nm po 1 nm o šířce clony 5 nm. Hydrolyza vzorku byla provedena přidáním čtvrtiny objemu kyvety koncentrované kyseliny octové, zředění bylo promítnuto do výsledků vynásobením intenzit 1,25x.

#### *Kvantový výtěžek*

Kvantový výtěžek derivátů fluoroforu Cy7 a následně i jejich polymerních konjugátů byly stanoveny pomocí metod HPLC a spektrofotometrie. Spektrofotometricky byly stanoveny absorbance při  $\lambda = 750$  nm methanolových roztoků derivátů o koncentraci 1,00  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , resp. polymerních konjugátů o koncentraci 100  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Roztoky o stejné koncentraci byly fluorescenčně analyzovány metodou HPLC (CH15M) při excitační, resp. emisní vlnové délce 750, resp. 773 nm. Kvantový výtěžek byl stanoven pomocí rovnice 4:

$$\Phi = \Phi_R \frac{F}{F_R} \frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A}} \frac{n^2}{n_R^2} \quad [-] \quad (4)$$

kde  $\Phi$  představuje získaný kvantový výtěžek, F představuje plochu pod křivkou ( $\text{V}\cdot\text{min}$ ), A představuje naměřenou absorbanci (-) a n představuje index lomu rozpouštědla (-). Dolní index R značí, že daná veličina se týká referentu, v tomto případě Cy7. Výrobce stanovil kvantový výtěžek Cy7 jako 0,3 [55]. V některých případech bylo nutné absorbance lineárně extrapolovat, jelikož se citlivost detekce absorbance a fluorescence řádově liší.



### 3.4 Testování *in vitro*

*In vitro* testování probíhalo ve spolupráci s oddělením Biologických modelů, ÚMCH AV ČR, s využitím konfokálního mikroskopu Laboratoře konfokální a fluorescenční mikroskopie, BIOCEV. Pro testování byly využity buňky z linie FaDu (American Type Culture Collection, US). Tyto buňky epitelu pocházejí z hltanu muže, 56 let, postiženého skvamocelulární rakovinou. Pro konfokální mikroskopii byly buňky pěstovány v živném Eaglově minimálním esenciálním médiu (EMEM) doplněném o 10% fetální hovězí sérum (Sigma-Aldrich, US) ve zvlhčovaném inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Buňky byly poté odlepeny roztokem trypsinu (0,05 %) a nasazeny na speciální misky v počtu 20 000 buněk na jamku, a to 24 hodin před zahájením experimentu. Buňky byly inkubovány s polymerním konjugátem o koncentraci **fluoroforu** Cy7 5 mg·dm<sup>-3</sup> po dobu 6 a 24 hodin. Poté byly fluorescenčními značkami barveny jejich organely. K barvení jader byla použita fluorescenční značka Hoechst 33342 (Thermo scientific, ČR, 5 mg·dm<sup>-3</sup>, 10 minut). Pro barvení lysosomů byla využita značka LysoTracker™ Yellow (Thermo scientific, ČR, 75 nM, 30 minut). Po barvení byly buňky třikrát promyty Dullbecovým fosfátovým pufrům (s Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> kationty) a zafixovány 4 % paraformaldehydem (Sigma-Aldrich, US). Jako kontrola byly použity buňky inkubované s neštěpitelně vázaným fluoroforem, konjugátem **pol-β-Ala-Cy7**.

Konfokální mikroskopie probíhala na přístroji firmy Abberior Instruments (DE) vybaveným excitačními lasery,  $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ , 485 nm, 561 nm a 640 nm. Pro excitaci v blízkém infračerveném spektru, tedy fluoroforu Cy7, sloužil tzv. STED (z angl. stimulated emission depletion) laser o  $\lambda_{\text{ex}} = 775 \text{ nm}$ . Pro mikroskopii byl použit imerzní objektiv Nikon CFI Plan Apo Lambda 60x Oil (Nikon, JP) s numerickou aperturou 1,40; clona o průměru 1,34 Airy Units (tedy  $1,22 \cdot \lambda$  / numerická apertura) a detektor Abberior QUAD scanner. Záznam a zpracování dat probíhalo v programu Inspector 16.1. Velikost snímku byla vždy 60·60 μm při rozlišení 1200·1200 pixelů. Jeho pořizovací doba byla 270 s, čas strávený získáním jednoho pixelu (tzv. dwell time) byl 20 μs.

## 4. VÝSLEDKY

Cílem experimentální části bylo navrhnout a připravit polymerní sondu, která by v kyselém prostředí simulujícím nádorovou tkáň uvolňovala fluorofor Cy7, čímž by mělo dojít k výraznému lokálnímu nárůstu intenzity fluorescence. Takováto sonda by byla využitelná pro navigovanou endoskopickou chirurgii pevných nádorů. Aktivace fluorescence v nádorové tkáni by v tomto případě měla vést k nárůstu kontrastu mezi nádorovou a zdravou tkání, která by posléze při operativním zákroku umožnila přesné odstranění nádorové tkáně.

### 4.1 Syntéza a charakterizace polymerních prekurzorů

Polymerní prekurzor byl připraven pomocí kontrolované radikálové polymerace monomerů HPMa a Ma-Ahx-NHNH-Boc při poměru 9:1. Molekulová hmotnost byla řízena poměrem monomery:CTA:iniciátor, který byl 500:2:1. RAFT polymerací se podařilo připravit 1,3 g (výtěžek 69 %) polymerního prekurzoru, který byl následně zbaven dithiobenzoátových skupin, stejně tak chránících *tert*-butoxykarbonylových skupin. Odstranění chránících skupin nemělo vliv na změnu dispersity a molekulové hmotnosti. Po odstranění chránících skupin bylo získáno 1,1 g produktu (výtěžek 58 %). Hmotnostně-, resp. početně-průměrná molární hmotnost, byla stanovena pomocí SEC metody s RI a MALS detektory.  $\bar{M}_w$ , resp.  $\bar{M}_n$  byla 26,0; resp. 24,5 kg·mol<sup>-1</sup>, disperzita  $D = 1,06$ . Molární obsah komonomeru Ma-Ahx-NHNH<sub>2</sub> byl spektrofotometricky stanoven na 5,3 mol%. Všechny charakteristiky polymerního prekurzoru odpovídaly předpokládaným hodnotám a polymerní prekurzor byl využit v dalším kroku pro vazbu fluorescenčních značek.

Polymerní prekurzor vzniklý kontrolovanou radikálovou polymerací monomerů HPMa a Ma-β-Ala-TT při jejich vzájemném molárním poměru 92 : 8 byl po odstranění dithiobenzoátových skupin charakterizován pomocí SEC metody s RI a MALS detektory. Jeho  $\bar{M}_w$  byla rovna 37 kg·mol<sup>-1</sup>, disperzita 1,11. Molární obsah komonomeru Ma-β-Ala-TT byl stanoven spektrofotometricky na 8,8 mol%. Všechny charakteristiky tohoto prekurzoru taktéž odpovídaly předpokládaným hodnotám.

## 4.2 Syntéza aktivovaných oxokyselin a derivátů fluoroforů s těmito oxokyselinami

Fluorescenční značky byly před samotným navázáním na polymerní prekurzor modifikovány. S cílem umožnit jejich navázání hydrazonovou vazbou bylo nutné do jejich struktury zavést reaktivní karbonylovou skupinu. Z literatury byly vybrány tři oxokyseliny vhodné pro takovouto modifikaci, jmenovitě COP, OBP, PYR. Vycházeli jsme z předpokladu, že lišící se okolí karbonylové skupiny by mělo zapříčinit rozdílnou rychlost hydrolyzy hydrazinové vazby, tedy štěpení z polymerního prekurzoru, což bude předmětem dalších analýz této práce. V prvním kroku byly tyto oxokyseliny aktivovány reakcí s thiazolidin-2-thionem v tetrahydrofuranu za přítomnosti DCC a katalyzátoru DMAP. Čistota výsledných produktů **COP-TT**, **OPB-TT** a **PYR-TT** byla charakterizována pomocí HPLC (CH5M) (viz kapitola 3.3.2) a pomocí TLC s mobilní fází ethyl-acetátem. Výsledky shrnuje tabulka 4.1.

Tab. 4.1 *Přehled procentuálních výtěžků a charakterizace produktů aktivace oxokyselin.*

	<b>COP-TT</b>	<b>OPB-TT</b>	<b>PYR-TT</b>
výtěžek	42,1 %	6,5 %	33,5 %
molární hmotnost [g·mol <sup>-1</sup> ]	299,5	279,4	280,4
charakterizace	TLC, HPLC	TLC, HPLC	TLC, HPLC
čistota	>98 %	>98 %	>98 %

V dalším kroku byly aktivované oxokyseliny reagovány s aminoskupinou fluoroforu Cy7-NH<sub>2</sub>. Poměr aktivované kyseliny a fluorescenční značky byl v reakční směsi ekvimolární. Reakce probíhala ve směsi dimethylfuranu a methanolu za katalýzy hydroxidem sodným. Čistota derivátů byla ověřena pomocí HPLC (CH5M) a pomocí TLC s mobilní fází ethyl-acetátem. Analýza pomocí HPLC (CH5M) ukázala úplnou čistotu derivátu **COP-Cy7**. U derivátů **OPB-Cy7** a **PYR-Cy7** byl přítomen i malý pík nezreagovaného fluoroforu odpovídající asi 9 %. Vzhledem k tomu, že nezreagovaný Cy7 neobsahuje karbonylovou skupinu, kterou by mohl reagovat s hydrazidy v následujícím reakčním kroku, nebylo potřeba odstranit jej z produktu. Došlo k tomu totiž spontánně při dalším kroku syntézy. Výsledky shrnuje tabulka 4.2 na str. 44.

Tab. 4.2 Přehled množství a procentuálních výtěžků produktů derivace oxokyselin fluoroforem Cy7.

	<b>COP-Cy7</b>	<b>OPB-Cy7</b>	<b>PYR-Cy7</b>
výtěžek	94,4 %	96,8 %	99,5 %
molární hmotnost [g·mol <sup>-1</sup> ]	891,1	880,1	881,0
charakterizace	TLC, HPLC, spektrofotometrie, fluorimetrie	TLC, HPLC, spektrofotometrie, fluorimetrie	TLC, HPLC, spektrofotometrie, fluorimetrie
molární absorpční koeficient [dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ]	91·10 <sup>3</sup>	83·10 <sup>3</sup>	60·10 <sup>3</sup>
kvantový výtěžek	0,34	0,35	0,17
čistota	100 %	91 %	91 %

### 4.3 Charakterizace fluoroforu Cyanine7 a jeho derivátů

#### 4.3.1 Stanovení molárních absorpčních koeficientů

Volný i derivatizovaný Cy7 byl spektrofotometricky charakterizován (viz kapitola 3.3.2) při  $\lambda = 750$  nm, což odpovídá jeho absorpčním maximu v methanolu. Účelem bylo ověřit, zda se molární absorpční koeficient změní derivatizací fluoroforu oxokyselinou, popř. stanovit novou hodnotu molárního absorpčního koeficientu pro pozdější charakterizace polymerních konjugátů. Molární absorpční koeficient ( $\epsilon$ ) samotného Cy7 byl při dané vlnové délce méně než poloviční než deklarovaný výrobcem, přesněji  $93 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , oproti deklarovaným  $199 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (výrobce neudává rozpouštědlo, ve kterém bylo měření provedeno). Molární absorpční koeficienty derivátů **COP-Cy7**, **OPB-Cy7** a **PYR-Cy7** byly stanoveny na  $91 \cdot 10^3$ ,  $83 \cdot 10^3$  a  $60 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Oblast lineární závislosti, tedy takovou oblast, kde lze tento koeficient pro přesný výpočet použít, je v případě **COP-Cy7** v rozmezí 0,15 až 1,5  $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , pro **OPB-Cy7** v rozmezí 0,15 až 1,25  $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a pro **PYR-Cy7** v rozmezí 0,15 až 5,0  $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

#### 4.3.2 Stanovení kalibrační závislosti fluorescence derivátů spojek

Dále byla u všech derivátů stanovena fluorescence, a to HPLC metodou CH15M s využitím fluorescenčního detektoru RF-20A. Získané hodnoty fluorescence byly

použity pro i následnou charakterizaci fluorescence polymerních konjugátů. Získané plochy pod křivkami při známých koncentracích byly použity pro stanovení kalibrační závislosti. Konstanty této lineární závislosti (směrnice) pro **COP-Cy7**, **OPB-Cy7** a **PYR-Cy7** byly stanoveny jako  $38,2 \cdot 10^6$ ,  $38,5 \cdot 10^6$  a  $16,3 \cdot 10^6$   $\text{dm}^3 \cdot \text{V} \cdot \text{min} \cdot \text{mol}^{-1}$  při excitační, resp. emisní vlnové délce 750 a 773 nm v methanolu.

#### 4.3.3 Stanovení kvantových výtěžků derivátů v methanolu

Kvantové výtěžky pro deriváty **COP-Cy7**, **OPB-Cy7** a **PYR-Cy7** byly stanoveny spektrofotometricky a metodou HPLC (CH15M) v methanolu pomocí rovnice 4 jako 0,34 (112 %), 0,35 (115 %) a 0,17 (58 %). V závorce je uveden relativní kvantový výtěžek vztažený ke kvantovému výtěžku Cy7, který výrobce udává jako 0,3 [55].

### 4.4 Syntéza a charakterizace konjugátů

#### 4.4.1 Syntéza polymerních konjugátů

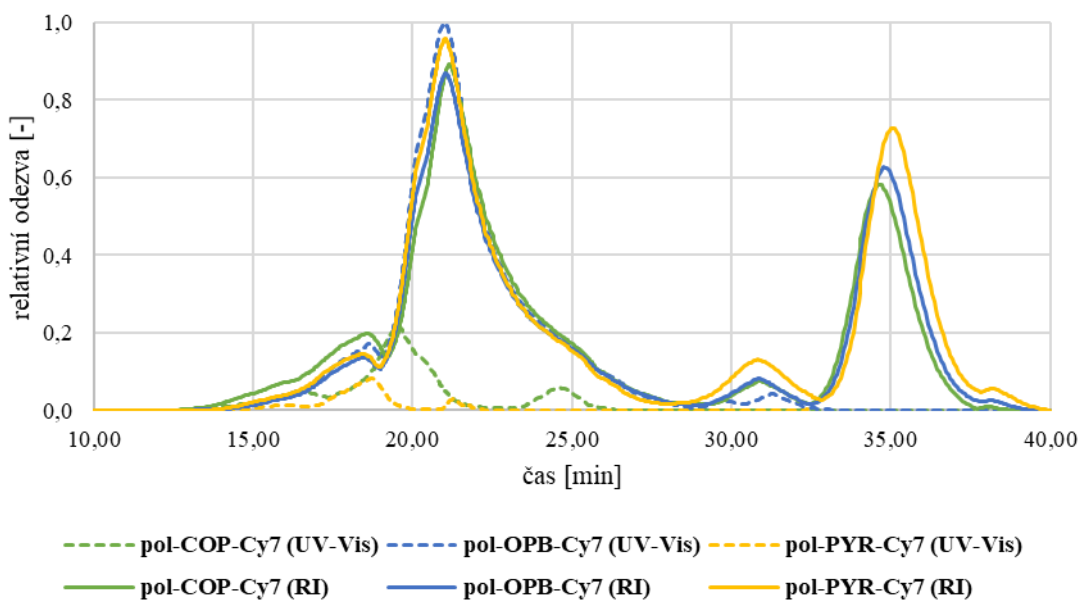
Konjugáty polymeru s fluoroforem byly připraveny reakcí derivátů oxokyselin s polymerním prekurzorem za katalýzy kyseliny octové. Průběh reakce v čase byl sledován analýzou reakční směsi pomocí HPLC (CH5M). Bylo pozorováno, že po určitém čase, se složení reakční směsi již nemění, i když nedošlo k plnému navázání derivátu fluoroforu. Reakce byla ukončena zředěním methanolem (na 2% roztok, m/V) a následnou separací pomocí sloupcové chromatografie na koloně s náplní LH20 v methanolu, kdy došlo k rozdělení polymerní a nezreagované nízkomolekulární frakce. Polymerní frakce byla jímána, zahuštěna pomocí vakuové odparky a srážena do ethyl-acetátu (v případě kontrolního konjugátu do acetonu). Kontrolní konjugát obsahujícího neštěpitelně vázanou fluorescenční značku byl připraven reakcí amino skupiny fluoroforu Cy7 s TT skupinami polymeru v methanolu. Průběh reakce byl sledován taktéž metodou HPLC (CH5M) a separace polymerního konjugátu byla provedena obdobným způsobem jak je uvedeno výše. Čistota produktů byla potvrzena analýzou HPLC (CH5M a CH15M), kdy se za typicky neostrým vrcholem polymeru nacházel pouze nízký vrchol nenavázaného fluoroforu. Vyčištěné produkty měly světle tyrkysovou barvu svědčící o úspěšném navázání fluoroforu. Výsledky jednotlivých reakcí včetně následující charakterizace v **methanolu** shrnuje tabulka 4.3.

Tab. 4.3 Charakterizace polymerních konjugátů v *methanolu*.

	pol-COP-Cy7	pol-OPB-Cy7	pol-PYR-Cy7	pol-β-Ala-Cy7
výtěžek	62,0 %	51,2 %	59,3 %	90,8 %
charakterizace	HPLC, SEC, SPF, SFL	HPLC, SEC, SPF, SFL	HPLC, SEC, SPF, SFL	HPLC, SEC, SPF, SFL
obsah Cy7	0,3 hm%	1,8 hm%	0,3 hm%	1,9 hm%
kvantový výtěžek	0,06	0,09	0,07	0,12
relativní kvantový výtěžek	18 %	26 %	37 %	40 %

#### 4.4.2 Stanovení molární hmotnosti

Produkty **pol-COP-Cy7**, **pol-OPB-Cy7**, **pol-PYR-Cy7** a **pol-β-Ala-Cy7** byly charakterizovány pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie s využitím kolony TSKgel SuperSW3000 a detektorů RI a UV-Vis (vlnová délka 220 nm nebo 750 nm). Při vlnové délce 750 nm bylo zejména sledováno, zda se v retenčním čase příslušícím nízkomolekulárním látkám (okolo 35. minuty, obr. 4.1) nachází volný derivát fluoroforu. Podle analýzy byl obsah volného derivátu fluoroforu nižší než detekční limit (0,2 %).



Obr. 4.1 Chromatogramy polymerních konjugátů.

#### 4.4.3 Stanovení obsahu fluoroforu

Všechny čtyři polymerní konjugáty, tedy **pol-COP-Cy7**, **pol-OPB-Cy7**, **pol-PYR-Cy7** a **pol-β-Ala-Cy7** byly spektrofotometricky charakterizovány při  $\lambda = 750$  nm, tedy při jejich absorpčním maximu. Cílem měření bylo stanovení obsahu fluoroforu v konjugátech. Měření probíhalo ve čtyřech koncentracích připravených dvojkovou ředící řadou tak, aby všechny koncentrace ležely v lineární oblasti, pro tyto konjugáty tedy okolo  $100 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Z naměřených hodnot absorbance byl pomocí rovnice 5, vypočítán hmotnostní obsah fluoroforu Cy7 v konjugátech,

$$w_m = \frac{A \times \varepsilon \times d \times M_{\text{Cy7}}}{c_m} \quad [-] \quad (5)$$

kde  $w_m$  představuje hmotnostní zlomek (-),  $A$  představuje absorbanci (-),  $\varepsilon$  představuje molární absorpční koeficient ( $\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ),  $d$  představuje průměr kyvety (cm),  $M_{\text{Cy7}}$  představuje molekulovou hmotnost Cy7 ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) a  $c_m$  představuje hmotnostní koncentraci polymerního konjugátu v kyvetě ( $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Vypočtené hodnoty jsou pro konjugáty **pol-COP-Cy7**, **pol-OPB-Cy7**, **pol-PYR-Cy7** a **pol-β-Ala-Cy7** uvedeny v tabulce 4.3 na str. 46.

#### 4.4.4 Stanovení kvantového výtěžku konjugátů v methanolu

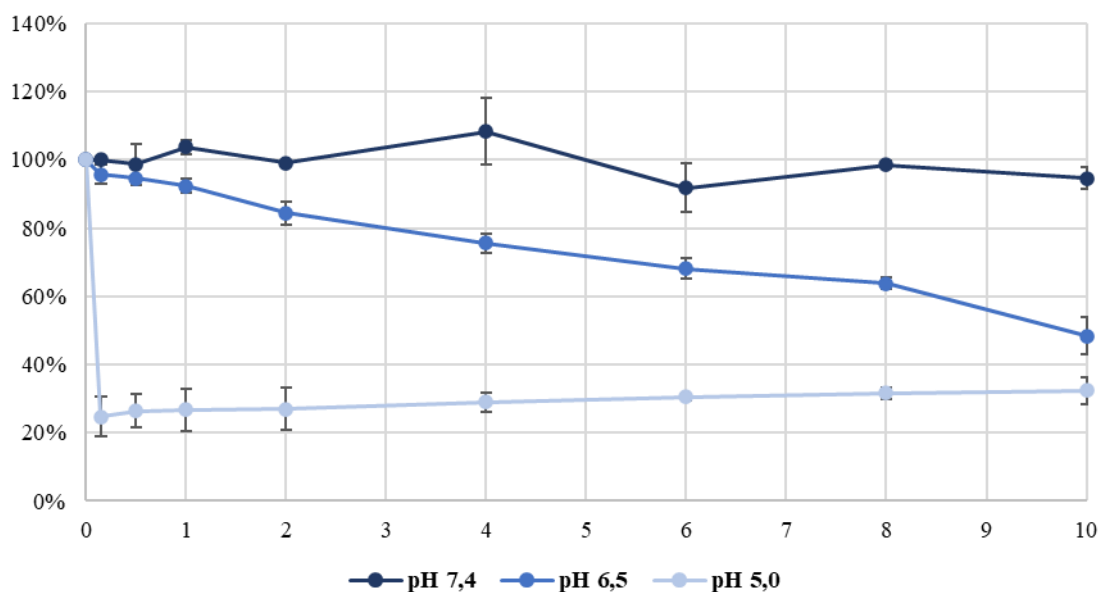
Kvantové výtěžky pro konjugáty **pol-COP-Cy7**, **pol-PB-Cy7**, **pol-PYR-Cy7** a **pol-β-Ala-Cy7** byly stanoveny spektrofotometricky a metodou HPLC (CH15M) v **methanolu** pomocí rovnice 4 jako 0,06 (18 %), 0,09 (26 %), 0,07 (37 %) a 0,12 (40 %). V závorce je uveden relativní kvantový výtěžek vztažený ke kvantovému výtěžku daného derivátu spojky.

### 4.5 Uvolňování fluoroforu

#### 4.5.1 Stanovení rychlosti štěpení v závislosti na pH

Uvolňování fluoroforu z polymerních konjugátů **pol-COP-Cy7**, **pol-OPB-Cy7** a **pol-PYR-Cy7** bylo stanoveno pomocí HPLC (CH15M). Uvolňování fluoroforu bylo studováno ve fosfátových pufrech o hodnotách pH 7,4, 6,5 a v případě konjugátu **pol-OPB-Cy7** i 5,0. První zmíněná hodnota pH měla za cíl simulovat fyziologické pH, zatímco druhá kyselá pH nádorové tkáně. Hodnota pH 5,0 pak simulovala prostředí lysosomu. Tato metoda zjednodušeně demonstruje hydrolytickou stabilitu konjugátů

v krevním oběhu a nádorové tkáni. Měření všech konjugátů proběhla v duplikátech při totožné koncentraci fluoroforu Cy7, a to  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Tuto závislost pro polymerní konjugát **pol-OPB-Cy7** ilustruje obrázek 4.2.



Obr. 4.2 Závislost plochy absorbance polymerního konjugátu **pol-OPB-Cy7** při 750 nm v roztoku o pH 7,4, 6,5 a 5,0 na čase. V kyselém pH podléhá konjugát rapidní hydrolyze, kdy dojde ke snížení obsahu fluoroforu v konjugátu v pH 6,5 na polovinu původního obsahu asi za 9 hodin. V pH 5,0 dojde k hydrolyze téměř okamžitě. Naopak ve fyziologickém pH je konjugát velmi stabilní.

U konjugátů **pol-COP-Cy7** a **pol-PYR-Cy7** docházelo v pH 7,4 k velmi podobné závislosti, tedy k žádnému významnému úbytku vázaného fluoroforu nedocházelo. V pH 6,5 docházelo u **pol-PYR-Cy7** k téměř stejně rychlému štěpení, po 10 hodin se odštěpilo také přibližně 50 % vázaného fluoroforu. U **pol-COP-Cy7** docházelo k rychlejšímu štěpení, polovina vázaného konjugátu se odštěpila asi za 3 hodiny.

#### 4.5.2 Stanovení kvantových výtěžků konjugátů ve vodě

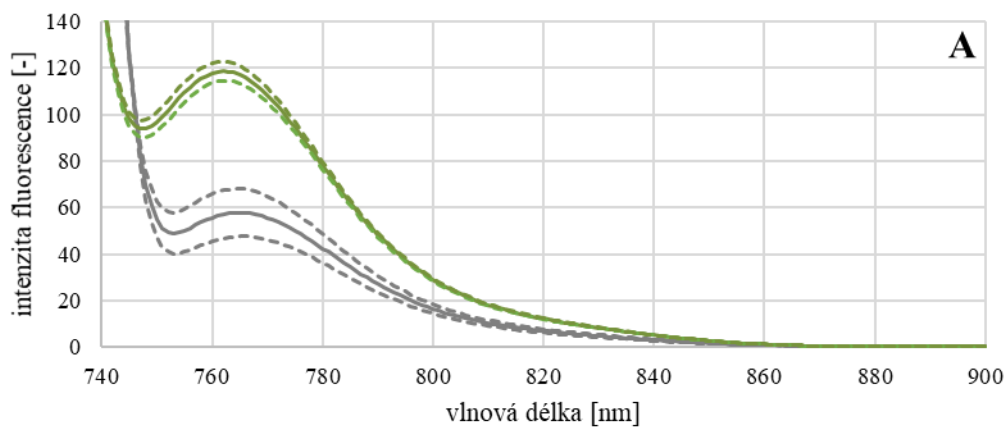
Veškeré předchozí stanovení kvantových výtěžků polymerních konjugátů probíhalo v **methanolu**. Tím bylo umožněno charakterizovat ve vodě velmi málo rozpustnou fluorescenční značku a její deriváty, a tedy zajištěna podmínka stejného rozpouštědla, která je ke vzájemnému porovnání naměřených hodnot nezbytná. V dalším kroku bylo nutné stanovit hodnoty pro polymerní systémy ve vodných pufrách, a to vzhledem k potenciálnímu využití v navigované chirurgii.

Fluorimetrické měření intenzity fluorescence roztoků konjugátů před a po hydrolyze koncentrovanou kyselinou octovou poskytlo informaci o změně kvantových výtěžků

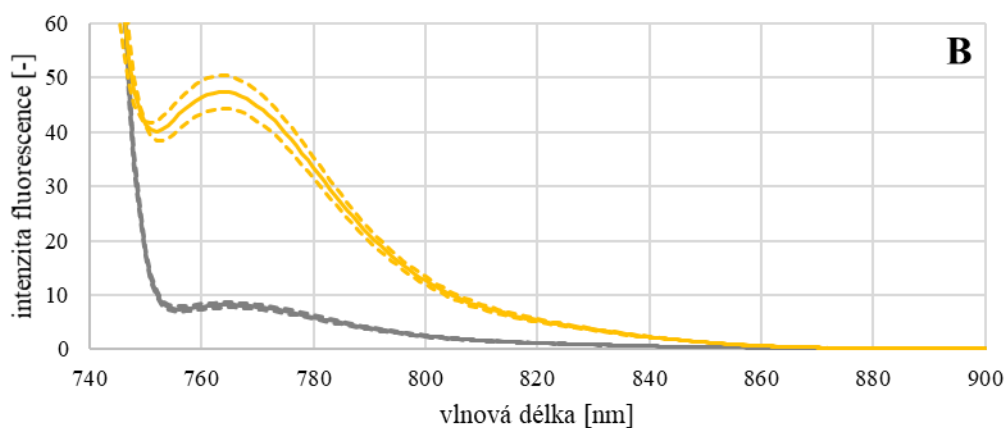


polymerních konjugátů **pol-COP-Cy7**, **pol-OPB-Cy7** a **pol-PYR-Cy7** v důsledku totálního odštěpení fluoroforu. Cílem bylo ověřit hypotézu, že při konjugaci fluoroforu s polymerním prekurzorem dojde ke zhášení fluorescence, po uvolnění fluoroforu v důsledku kyselého prostředí by však mělo dojít k opětovnému nárůstu intenzity fluorescence (viz obr. 4.3A, B a C na str. 50).

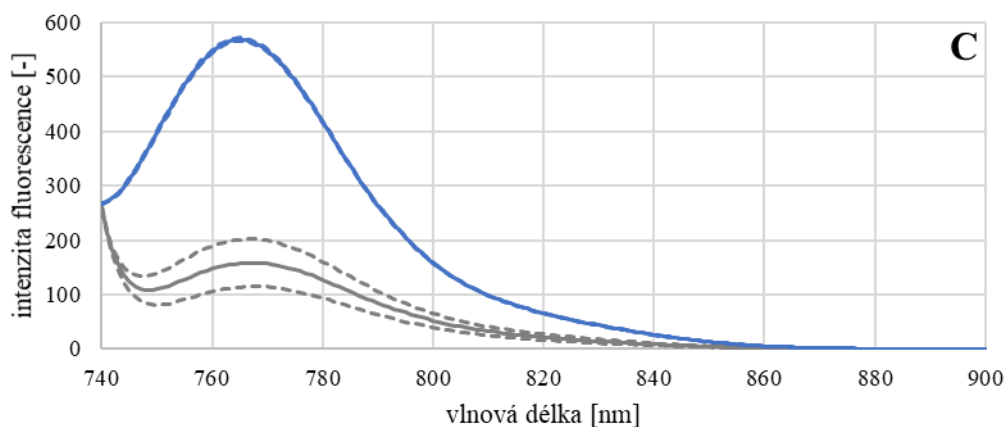
Kvantový výtěžek polymerního konjugátu **pol-COP-Cy7** po uvolnění činil asi 190 % původního kvantového výtěžku polymerního konjugátu před uvolněním značky, konjugátu **pol-OPB-Cy7** asi 330 % původního a konjugátu **pol-PYR-Cy7** asi 530 %. Kvantový výtěžek neštěpitelného konjugátu **pol-β-Ala-Cy7** se téměř nezměnil.



— před hydrolyzou    — po hydrolyze



— před hydrolyzou    — po hydrolyze



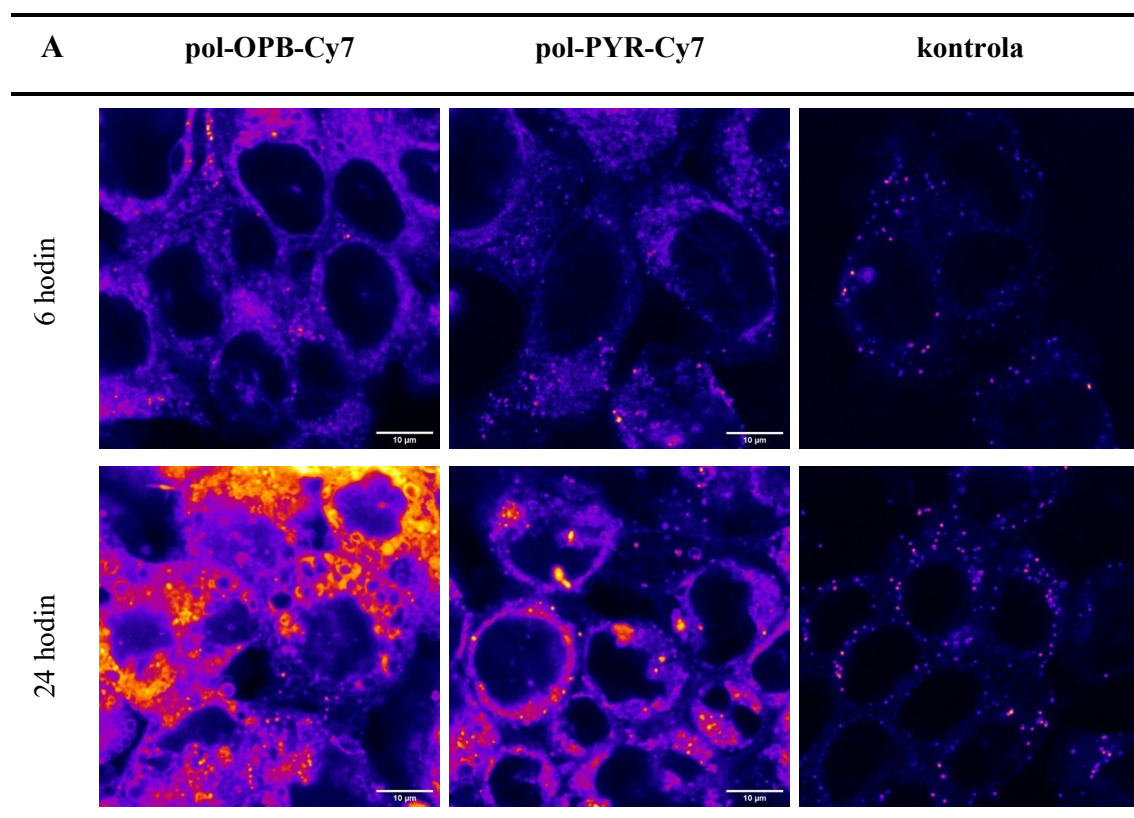
— před hydrolyzou    — po hydrolyze

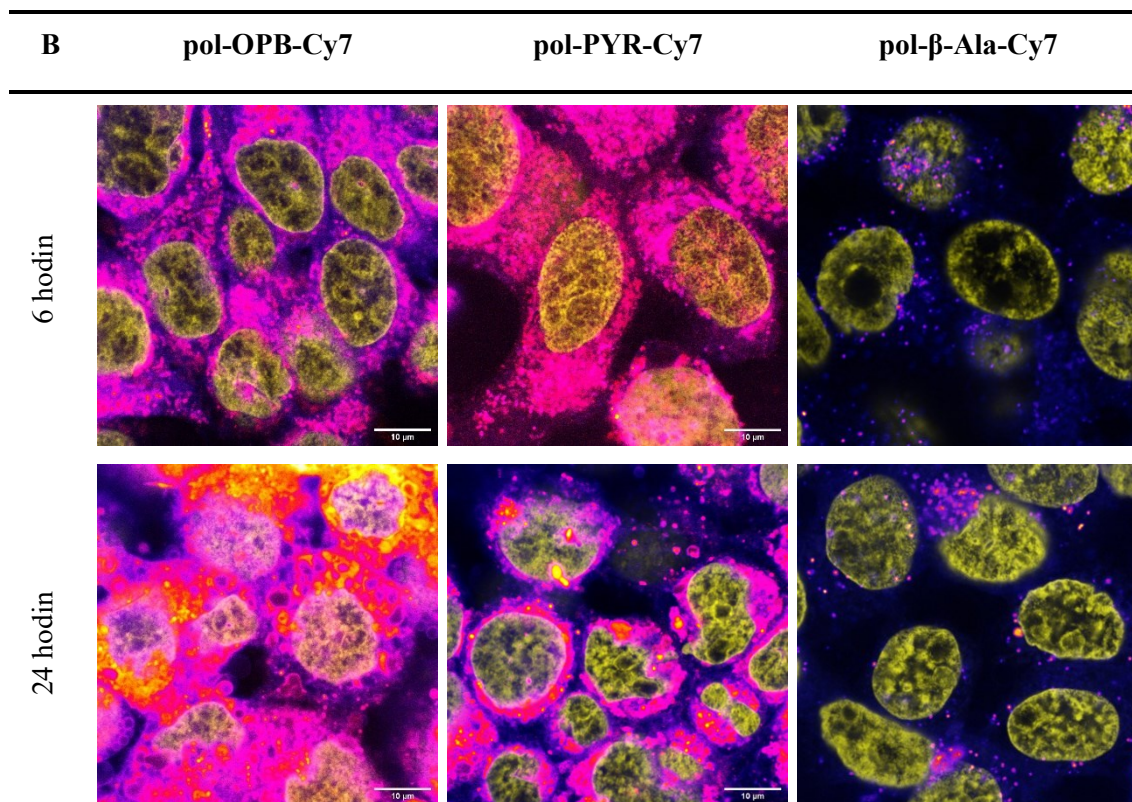
Obr. 4.3 Intenzity fluorescence roztoku před a po hydrolyze polymerního konjugátu *pol-COP-Cy7* (A), *pol-PYR-Cy7* (B) nebo *pol-OPB-Cy7* (C) při excitační vlnové délce 730 nm. Oblast vlnové délky okolo 900 nm slouží jako referenční, jelikož se zde intenzita nemění, a navíc je přibližně rovna nule. Analýza probíhala metodou fluorimetrie při koncentraci  $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  ve fosfátovém pufru o pH 7,4.

### 4.5.3 Konfokální mikroskopie

Testování *in vitro* spočívající v inkubaci polymerních systémů s buňkami a stanovení fluorescence v buňkách probíhalo pomocí konfokální mikroskopie. Byla sledována intenzita fluorescence po 6 a 24 hodinách od podání polymerních konjugátů. Vzhledem k časové náročnosti experimentu a předchozím výsledkům byly zvoleny pouze dva konjugáty, a to **pol-OPB-Cy7** a **pol-PYR-Cy7**, a to na základě fyzikálně-chemické charakterizace, především z hlediska změny kvantových výtěžků těchto dvou konjugátů při okyselení jejich roztoků, tedy po uvolnění fluoroforu. V případě konjugátu **pol-OPB-Cy7** byla tato změna rovna 330 %, v případě konjugátu **pol-PYR-Cy7** dokonce 530 %.

Jako reference byl použit konjugát **pol- $\beta$ -Ala-Cy7**, který obsahoval neštěpitelně vázaný fluorofor Cy7. Cílem testování bylo zjistit, zda polymerní systémy mohou vstoupit do buněk a zda se v čase bude měnit intenzita fluorescence ve vztahu k uvolňování fluoroforu. Pro lepší představu o (ko)lokalizaci volného či konjugovaného fluoroforu Cy7 bylo využito překryvného zobrazení fluorescence zdroje spolu s označenými jádry a lysosomy. Nutno zmínit, že překryv nemusí nutně znamenat, že se fluorofor v dané organele nachází. Výsledné snímky shrnuje obrázek 4.5 (A) na této straně (bez kolokalizace) a (B) str. 52(s kolokalizací).





Obr. 4.4 Výsledky konfokální mikroskopie FaDu buněk inkubovaných s polymerními konjugáty po dobu 6 resp. 24 h. Překryvné zobrazení snímků zachycujících jádra barvená Hoechst 33342 (žlutě), lysosomy barvené LysoTracker Yellow (červeně) a fluorofor Cy7 (fialově). Koncentrace obou polymerních konjugátů (**pol-OPB-Cy7**, **pol-PYR-Cy7**) byla  $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  fluoroforu Cy7. Konjugát **pol-β-Ala-Cy7** sloužil jako kontrola, jelikož obsahoval neštěpitelně vázaný fluorofor Cy7.

## 5. DISKUZE

Cílem experimentální části bylo syntetizovat polymerní sondu s fluoroforem navázaným na polymerní systém přes pH-senzitivní spojku a prokázat, zda by takováto sonda mohla být využita pro zvýšení kontrastu fluorescenčního signálu v rámci navigované chirurgie nádorů. Cílem bylo ověřit hypotézu založenou na pozorovaném efektu, kdy by mělo vazbou na polymerní systém dojít ke zhášení fluorescence, která by se opět měla zintenzivnit po uvolnění fluoroforu z polymerního systému.

### 5.1 Syntéza polymerního prekurzoru

Polymerní prekurzor byl připraven pomocí RAFT techniky a výsledný polymer měl fyzikálně-chemické vlastnosti v souladu s literaturou [14, 20, 56]. Disperzita a molekulová hmotnost prekurzoru po odstranění chránících skupin byla  $D = 1,06$  a  $\bar{M}_w = 24,5 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Hodnota disperzity odpovídá vysoce definovanému systému s velmi malým rozptylem molekulových hmotností. Aplikace kontrolované polymerizační techniky jednoznačně umožnila přípravu vhodného prekurzoru pro navazující syntetické kroky. Čím více se disperzita blíží hodnotě jedna, tím uniformnější je směs polymerních řetězců, což je výhodou při potenciálním schvalovacím procesu lékovými agenturami (např. FDA), jelikož bude polymer uniformní i z biologického hlediska – například při biodistribuci a vylučování z organismu. Molární obsah reaktivních hydrazidových skupin byl 5,3 % oproti teoretickým 10 % v polymerní niasadě. Nižší obsah zabudovaných monomerních jednotek s hydrazidovými skupinami je možné vysvětlit díky kopolymerizačním parametrům použitých komonomerů, které byly publikovány pro podobně prováděné polymerizace [57]. Nicméně obsah hydrazidových skupin byl pro další experimenty dostatečný, jelikož substituce fluoroforu byla navrhována pod 1 mol%.

### 5.2 Aktivované oxokyseliny a jejich deriváty

Vybrané oxokyseliny slouží jako spojka mezi polymerním nosičem a fluoroforem, umožňují jej navázat pH-senzitivní hydrazonovou vazbou. Pro derivatizaci těchto oxokyselin fluoroforem byla nejprve zapotřebí jejich aktivace. Ta proběhla reakcí daných oxokyselin s thiazolidin-2-thionem v souladu s literaturou [27]. Surový produkt byl dále čištěn krystalizací. Nižší výtěžky derivátů (viz tabulka 4.1 na str. 43) byly zapříčiněny

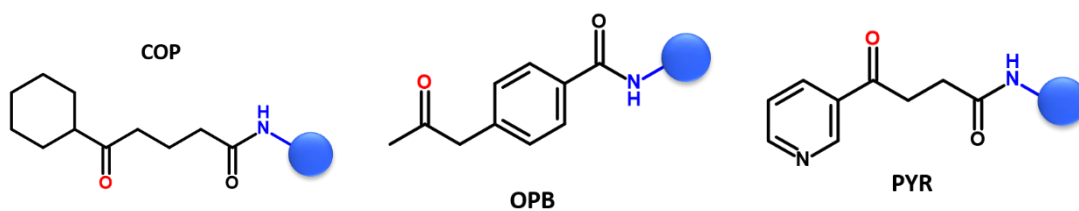
především důrazem na co nejvyšší čistotu produktů. Pokud by ve výsledném vzorku byly přítomny nezreagované oxokyseliny, mohlo by docházet k jejich přednostní reakci s polymerem obsahujícím volné hydrazidové skupiny v navazujícím syntetickém kroku. Tím by došlo k nežádoucí nižší substituci fluoroforu na polymeru.

Takto připravené aktivované oxokyseliny byly navázány amidovou vazbou na fluorofor. Alkalicky katalyzovaná reakce probíhala ve směsi rozpouštědel dimethylformamidu a methanolu. Výtěžky reakcí se pohybovaly mezi 94 a 99 %. Výtěžky blízké se 100% je možné přisoudit vysoké účinnosti aktivace oxokyselin pomocí thiazolidin-2-thionu, který ochotně reaguje s aminy za vzniku již zmíněné amidové vazby [58]. Čistota produktů byla ověřena metodou HPLC (CH5M). V případě derivátů **COP-Cy7** se v produktu nevyskytovala žádná nečistota, naproti tomu u derivátů **OPB-Cy7** a **PYR-Cy7** se vyskytovalo 9 % původního, nezreagovaného, fluoroforu. Vzhledem k tomu, že se tento volný fluorofor nemůže navázat na reaktivní skupiny polymerního prekurzoru, nebyl z reakční směsi odstraněn před další reakcí.

Z naměřených molárních absorpčních koeficientů takto derivovaných oxokyselin vyplývá, že derivatizací došlo k mírnému snížení schopnosti fluoroforu absorbovat elektromagnetické záření, v případě **PYR-Cy7** je toto snížení výrazné (přes 30 %). Vliv na absorpci může mít změna elektronové hustoty způsobená navázáním jednotlivých spojek k fluoroforu. Jejich struktury jsou znázorněny na obr. 5.1 na str. 55. Vzhledem k tomu, že spojka OPB má karboxylovou skupinu v konjugaci s benzenovým jádrem, ale spojka COP nikoliv, a přesto je hodnota jejich molárních absorpčních koeficientů podobná, nelze přičítat tuto změnu aromatickému okolí vazby fluoroforu na spojku. To dokládá i fakt, že karboxyl spojky PYR je od pyridinového kruhu izolován, ale přesto u ní dochází k největšímu poklesu schopnosti absorbovat.

Kvantový výtěžek fluorescence byl nejvyšší pro derivát **OPB-Cy7** (0,35), naopak nejnižší pro **PYR-Cy7** (0,17). Je důležité zmínit, že v případě OPB a COP derivátů došlo k navýšení výtěžku fluorescence vůči samotnému fluoroforu. Vzhledem k tomu, že kvantový výtěžek určuje poměr mezi absorbovanými a emitovanými fotony, je tato charakteristika důležitá vzhledem k zamýšlenému budoucímu užití derivátů. Hodnoty kvantových výtěžků všech derivátů jsou pro aplikaci dostačující, a to i v případě derivátu **PYR-Cy7**, kdy je zpět emitováno 17 % absorbovaných fotonů. Ani zde nelze snadno vyvodit, proč dochází u derivátů **OPB-Cy7** a **COP-Cy7** ke zvýšení, zatímco u **PYR-Cy7** naopak ke snížení kvantového výtěžku. Vliv opět nemůže mít pouhá přítomnost

aromatické struktury v derivátech, pravděpodobně hraje roli i vzdálenost aromatického jádra a rovněž i přítomnost heteroatomu v případě spojky PYR, jelikož aromatické spojky OPB a PYR vykazují po derivatizaci opačný trend.



Obr. 5.1 *Strukturní vzorce derivátů oxokyseliny*. Modrá barva představuje fluorofor Cy7 vázaný amidovou vazbou, zatímco červeně značený karbonyl znázorňuje, kde budou jednotlivé deriváty vázány přes hydrazon v polymerních konjugátech.

### 5.3 Konjugáty

Polymerní konjugáty s deriváty **pol-COP-Cy7**, **pol-OPB-Cy7** a **pol-PYR-Cy7** se podařilo připravit kyselé katalyzovanou reakcí polymerního prekurzoru obsahujícího reaktivní hydrazidové skupiny s konkrétním derivátem fluoroforu. Hmotnostní výtěžek reakcí se pohyboval mezi 50 a 60 %. Polymerní konjugáty byly okamžitě po ukončení reakce vyčištěny od volného derivátu Cy7 pomocí sloupcové chromatografie. Čistota finálních konjugátů byla následně ověřena metodou SEC a bylo potvrzeno, že v žádném z konjugátů se nevyskytovalo detekovatelné množství volného derivátu. Vzhledem k tomu, že vlnová délka laseru MALS detektoru koliduje s absorpčním spektrem fluorescenční značky Cy7, nemohla být určena přesná číselná hodnota  $\bar{M}_w$  a  $D$ . Porovnáním RI chromatogramů polymerních prekurzorů s RI chromatogramy konjugátů ale bylo zjištěno, že v průběhu navazování derivátů fluorescenčních značek na polymerní prekurzor nedošlo k významnému rozšíření disperzity molekulových hmotností a ani molekulová hmotnost nebyla významně zvýšena.

Substituce fluoroforem v konjugátech byla stanovena spektrofotometricky, v případě konjugátů **pol-COP-Cy7** a **pol-PYR-Cy7** byla nižší, a to 0,3 hm%, tedy 15 % z násady. Naproti tomu u konjugátu **pol-OPB-Cy7** činila substituce 90 % z násady, tedy 1,8 hm% navázaného fluoroforu. Rozdíl těchto hodnot zřejmě spočívá v charakteru vazeb v okolí vznikající hydrazonové vazby a sterické dostupnosti karbonylu příslušného derivátu fluoroforu.

Kvantové výtěžky fluorescence polymerních konjugátů stanovené v methanolu (tab. 4.3 na str. 46) byly významně nižší (až šestinásobně) než samotných derivátů

fluoroforu. Toto snížení kvantového výtěžku fluorescence přisuzujeme konjugaci fluoroforů s polymerním prekurzorem. Na polymerním prekurzoru se jednotlivé molekuly fluoroforu dostávají do takové blízkosti, že dochází k významnému zhášení fluorescence. Stanovením relativních kvantových výtěžků konjugátů ve fosfátovém pufru před (pH 7,4) a po okyselení (pH ~5) byla ověřena hypotéza, že kyselou hydrolyzou hydrazonové vazby došlo k opětovnému uvolnění fluoroforů vedoucí k oddálení jednotlivých molekul Cy7, a tudíž ke zvýšení kvantových výtěžků, a tedy i intenzity fluorescence.

Další krok byl zaměřen na stanovení závislosti rychlosti hydrolytického štěpení hydrazonové vazby mezi polymerem a derivátem fluoroforu na pH. Všechny tři konjugáty byly ve fyziologickém pH (7,4) poměrně stabilní, docházelo k hydrolyze do 20 % za 24 h. V mírně kyselém pH 6,5 (odpovídajícímu pH v mezibuněčném prostředí nádoru) docházelo k postupnému štěpení pH-senzitivní hydrazonové vazby, polovina fluoroforu byla uvolněna u **pol-PYR-Cy7** a **pol-OPB-Cy7** po 10 hodinách, v případě konjugátu **pol-COP-Cy7** již po 3 hodinách. Nejpomaleji ze všech tří konjugátů se štěpil konjugát **pol-PYR-Cy7**, což je v souladu s literaturou publikovanou pro jiné systémy s nízkomolekulárními léčivy [59]. V pH 5,0 (modelující prostředí lysosomu) došlo v případě konjugátu **pol-OPB-Cy7** k rapidní hydrolyze, kdy bylo uvolněno více jak 65 % fluoroforu během 5 minut. Můžeme konstatovat, že na rychlost uvolňování mělo významný vliv chemické okolí hydrazonové vazby. Obecně je známo, že největší vliv na stabilitu hydrazonové vazby má její konjugace do aromatické struktury nebo její sterická dostupnost [60]. V případě spojek COP, OPB a PYR lze předpokládat, že rozdílnou rychlost uvolňování způsobuje přítomnost aromatické struktury u spojek OPB a PYR, z pohledu sterické dostupnosti není mezi spojkami velký rozdíl. Výsledky měření hydrolytické stability všech tří konjugátů těmito předpoklady odpovídají. Nejrychleji se štěpil konjugát **pol-COP-Cy7**, jehož spojka neobsahuje žádnou aromatickou strukturu. Naopak konjugáty **pol-OPB-Cy7** a **pol-PYR-Cy7** ve svých strukturách obsahují aromatické struktury a hydrolyzují výrazně pomaleji než prvně zmíněný konjugát. Jak již bylo zmíněno, vůbec nejpomaleji se štěpí konjugát **pol-PYR-Cy7**, u něhož je hydrazonová vazba přímo konjugována s pyridinovým kruhem.



## 5.4 Konfokální mikroskopie

V posledním kroku byly ověřeny předběžné biologické vlastnosti v *in vitro* uspořádání, konkrétně šlo o stanovení intenzity fluorescenčního signálu nádorových buněk po inkubaci s polymerními konjugáty pomocí konfokální mikroskopie. Cílem bylo ověřit hypotézu, že při odštěpení fluoroforu z polymeru dojde k nárůstu fluorescenčního signálu buňky. Pro testování byla vybrána buněčná linie FaDu (buňky skvamocelulárního epitelálního nádoru hltnu). Tato buněčná linie byla zvolena proto, že polymerní sondy jsou zamýšleny primárně pro endoskopickou chirurgii pevných nádorů hlavy a krku.

Inkubace polymerních konjugátů s buňkami po dobu 24 hodin prokázala, že dochází k výraznému nárůstu intenzity fluorescence v rámci buněk (viz obr. 4.4 na str. 52), což přisuzujeme štěpení hydrazonové vazby v kyselém prostředí endosomů a lysosomů. Po uvolnění fluoroforu dochází k zvýšení jeho kvantového výtěžku fluorescence, a tedy je pozorováno významné navýšení fluorescence, které nebylo pozorováno pro kontrolní polymerní systém **pol- $\beta$ -Ala-Cy7** s fluoroforem vázaným neštěpitelnou amidovou vazbou (viz obr 4.4 na str. 52). Podobné výsledky byly pozorovány u polymerních konjugátů s fluoroforem IR783 navázaným enzymaticky štěpitelnou peptidovou spojkou [51].

Kombinací výsledků získaných fyzikálně-chemickou charakterizací konjugátů, zejména uvolňováním fluoroforu v čase a změny kvantového výtěžku po hydrolyze, a výsledků získaných metodou konfokální mikroskopie se polymerní konjugát **pol-OPB-Cy7** ukázal jako nejslibnější kandidát pro budoucí *in vivo* testování. Vzhledem k tomu, že je ale *in vitro* testování velmi zjednodušeným modelem (uzavřený systém, absence krevního oběhu a lymfatické drenáže), bylo by velmi předčasné na jeho základě vyloučit konjugáty **pol-PYR-Cy7** a **pol-COP-Cy7** pro eventuální *in vivo* testování např. na myším modelu. Teprve živý systém může ukázat vhodnost připravených polymerních sond pro použití v praxi.

## 6. ZÁVĚR

Závěrem je možné shrnout, že se podařilo připravit biokompatibilní polymerní prekurzor, poly(HPMA-co-MA-Ahx-NHNH<sub>2</sub>), o vhodném obsahu reaktivních hydrazidových skupin, úzké disperzitě a molární hmotnosti splňující vyloučení ledvinami po splnění zobrazovací funkce v organismu. Dále se podařilo připravit tři deriváty oxokyselin COP, OPB a PYR s molekulou fluoroforu Cyanine7. Ty byly následně navázány na polymerní prekurzor, za vzniku tří polymerních konjugátů **pol-OPB-Cy7**, **pol-COP-Cy7** a **pol-PYR-Cy7** s fluoroforem vázaným přes pH-senzitivní hydrazonovou vazbu.

Můžeme konstatovat, že fyzikálně-chemické vlastnosti připravených polymerních konjugátů byly vzhledem k zamýšlenému použití vyhovující ve všech sledovaných charakteristikách. Polymerní konjugáty obsahovaly dostatečné množství fluoroforu Cyanine7 a byla zjištěna pH senzitivní závislost uvolňování fluoroforu. V mírně kyselém pH 6,5 modelujícím prostředí nádorové tkáně vykazovaly výrazně rychlejší štěpení než v pH 7,4, které odpovídá prostředí krevního řečiště. Důležitým faktem je, že po navázání fluoroforu na polymer došlo k významnému snížení kvantového výtěžku fluorescence u všech tří konjugátů, přičemž při jejich odštěpení v kyselém prostředí došlo k jeho opětovnému zvýšení, a tedy znatelnému nárůstu intenzity fluorescence.

Dva vybrané polymerní konjugáty, **pol-OPB-Cy7** a **pol-PYR-Cy7**, byly podrobeny *in vitro* testování pomocí konfokální mikroskopie na buněčné linii FaDu. Prokázali jsme, že inkubací polymerních konjugátů s nádorovými buňkami dochází k časově závislému významnému navýšení fluorescence pozorovatelné v nádorových buňkách. Lze shrnout, že připravené polymerní systémy vykazují vhodné vlastnosti pro navazující *in vivo* biologické experimenty, které by měly prokázat schopnost připravených systémů fluorescenčně označit nádorovou tkáň pro opticky navigovanou chirurgii. Poskytnou-li i *in vivo* experimenty uspokojivé výsledky, pak budou tyto látky vhodnými kandidáty pro navazující preklinické hodnocení pro chirurgické uplatnění.

V rámci práce byly splněny všechny vytyčené dílčí cíle zaměřené na syntézu polymerního prekurzoru, syntézu derivátů oxokyselin s fluoroforem, syntézu konjugátů, detailní fyzikálně-chemickou a předběžnou biologickou charakterizaci. Jednoznačným výstupem práce jsou funkční polymerní konjugáty, pH-stimulem aktivovatelné polymerní fluorescenční sondy, které by mohly najít uplatnění jako nástroj pro navigovanou chirurgii pevných nádorů. Výsledky práce jsou součástí připravované patentové přihlášky „*Fluorescenčně značený polymer jako nástroj pro vizualizaci nádorů*”.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KYOMOTO, Masayuki, Toru MORO a Kazuhiko ISHIHARA. Phospholipid Polymer Grafted Highly Cross-Linked UHMWPE. In: *UHMWPE Biomaterials Handbook: Ultra High Molecular Weight Polyethylene in Total Joint Replacement and Medical Devices: Third Edition* [online]. 2016, s. 352–368. ISBN 9780323354011. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-35401-1.00020-X
- [2] ÖZYOL, Pelin, Erhan ÖZYOL a Fatih KAREL. Biocompatibility of intraocular lenses. *Turk Oftalmoloji Dergisi* [online]. 2017, **47**(4), 221–225. ISSN 13000659. Dostupné z: doi:10.4274/tjo.10437
- [3] WANG, Dongfang, Yiyang XU, Qian LI a Lih Sheng TURNG. Artificial small-diameter blood vessels: Materials, fabrication, surface modification, mechanical properties, and bioactive functionalities. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2020, **8**, 801–1822. ISSN 20507518. Dostupné z: doi:10.1039/c9tb01849b
- [4] LIU, Shuqiang, Juanjuan YU, Huimin LI, Kaiwen WANG, Gaihong WU, Bowen WANG, Mingfang LIU, Yao ZHANG, Peng WANG, Jie ZHANG, Jie WU, Yifan JING, Fu LI a Man ZHANG. Controllable drug release behavior of polylactic acid (PLA) surgical suture coating with ciprofloxacin (CPFX)-polycaprolactone (PCL)/polyglycolide (PGA). *Polymers* [online]. 2020, **12**(20), 288. ISSN 20734360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12020288
- [5] LIECHTY, William B., David R. KRYSCIO, Brandon V. SLAUGHTER a Nicholas A. PEPPAS. Polymers for drug delivery systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* [online]. 2010, **1**, 149–173. ISSN 19475438. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847
- [6] MORIMOTO, Tadaoki, Kuniyasu OKAZAKI, Kansei KOMAKI, Mitsunori SASA, Toshiaki MORI, Hideo TSUZUKI, Yoshitaka KAMAMURA, Hitoshi MIKI a Yasumasa MONDEN. Cancerous residue in breast-conserving surgery. *Journal of surgical oncology*. 1993, **52**(2), 71–76. ISSN 0022-4790.
- [7] LEE, Kwang Sun a Lawrence M. GARTNER. Spectrophotometric characteristics of bilirubin. *Pediatric Research* [online]. 1976, **10**(9), 782–8. ISSN 15300447. Dostupné z: doi:10.1203/00006450-197609000-00004
- [8] KRISHNEGOWDA, Avinash, Nagaraja PADMARAJAIAH, Shivakumar ANANTHARAMAN a Krishna HONNUR. Spectrophotometric assay of

- creatinine in human serum sample. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2017, **10**(2), 2018–2024. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2013.07.030
- [9] RITTLE, Jonathan a Michael T. GREEN. Cytochrome P450 compound I: Capture, characterization, and C-H bond activation kinetics. *Science* [online]. 2010, **330**(6006), 933–937. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1193478
- [10] GIOUX, Sylvain, Hak Soo CHOI a John V. FRANGIONI. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: Fundamentals of clinical translation. *Molecular Imaging* [online]. 2010, **9**(5), 237–255. ISSN 15353508. Dostupné z: doi:10.2310/7290.2010.00034
- [11] JOHNSON, Robert N., Arthur D. FU, H. Richard MCDONALD, J. Michael JUMPER, Everett AI, Emmett T. CUNNINGHAM a Brandon J. LUJAN. Fluorescein Angiography: Basic Principles and Interpretation. In: *Retina Fifth Edition* [online]. 2012, s. 27–42. ISBN 9781455707379. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-0737-9.00001-1
- [12] *Da Vinci Vision* [online]. [vid. 2020-12-28]. Dostupné z: <https://www.intuitive.com/en-us/products-and-services/da-vinci/vision>
- [13] BLAU, Rachel, Yana EPSHTEIN, Evgeni PISAREVSKY, Galia TIRAM, Sahar Israeli DANGOOR, Eilam YEINI, Adva KRIVITSKY, Anat ELDAR-BOOCK, Dikla BEN-SHUSHAN, Hadas GIBORI, Anna SCOMPARIN, Ori GREEN, Yael BEN-NUN, Emmanuelle MERQUIOL, Hila DORON, Galia BLUM, Neta EREZ, Rachel GROSSMAN, Zvi RAM, Doron SHABAT a Ronit SATCHI-FAINARO. Image-guided surgery using near-infrared Turn-ON fluorescent nanoprobe for precise detection of tumor margins. *Theranostics* [online]. 2018, **8**(13), 3437–3460. ISSN 18387640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.23853
- [14] POLA, Robert, Eliška BÖHMOVÁ, Marcela FILIPOVÁ, Michal PECHAR, Jan PANKRÁC, David VĚTVIČKA, Tomáš OLEJÁR, Martina KABEŠOVÁ, Pavla POUČKOVÁ, Luděk ŠEFC, Michal ZÁBRODSKÝ, Olga JANOUŠKOVÁ, Jan BOUČEK a Tomáš ETRYCH. Targeted polymer-based probes for fluorescence guided visualization and potential surgery of EGFR-positive head-and-neck tumors. *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(1), 31. ISSN 19994923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12010031
- [15] KIMURA, Tetsuo, Naoki MUGURUMA, Susumu ITO, Seisuke OKAMURA, Yoshitaka IMOTO, Hiroshi MIYAMOTO, Masako KAJI a Eiji KUDO. Infrared

- fluorescence endoscopy for the diagnosis of superficial gastric tumors. *Gastrointestinal Endoscopy* [online]. 2007, **66**(1), 37–43. ISSN 00165107. Dostupné z: doi:10.1016/j.gie.2007.01.009
- [16] GRUNSTEIN, Jeremy, W. Gregory ROBERTS, Odile MATHIEU-COSTELLO, Douglas HANAHAN a Randall S. JOHNSON. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Research*. 1999, **59**(7), 1592–1298. ISSN 00085472.
- [17] CHEN, Yu, Dongxin CHEN, Wenhao HU, Guanyang LIN a Shiyong HUANG. Pharmacokinetic study of indocyanine Green after intravenous administration by UPLC-MS/MS. *International journal of clinical and experimental medicine* [online]. 2015, **8**(9), 15482—15489. ISSN 1940-5901. Dostupné z: <https://europepmc.org/articles/PMC4658927>
- [18] CHIEFARI, John, Y. K. CHONG, Frances ERCOLE, Julia KRSTINA, Justine JEFFERY, Tam P.T. LE, Roshan T.A. MAYADUNNE, Gordon F. MEIJS, Catherine L. MOAD, Graeme MOAD, Ezio RIZZARDO a San H. THANG. Living free-radical polymerization by reversible addition - Fragmentation chain transfer: The RAFT process. *Macromolecules* [online]. 1998, **31**(16), 5559–5562. ISSN 00249297. Dostupné z: doi:10.1021/ma9804951
- [19] LAMMERS, Twan, Rainer KÜHNLEIN, Maria KISSEL, Vladimir SUBR, Tomas ETRYCH, Robert POLA, Michal PECHAR, Karel ULBRICH, Gert STORM, Peter HUBER a Peter PESCHKE. Effect of physicochemical modification on the biodistribution and tumor accumulation of HPMA copolymers. *Journal of Controlled Release* [online]. 2005, **110**(1), 103–118. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.010
- [20] ETRYCH, Tomáš, Vladimír ŠUBR, Jiří STROHALM, Milada ŠÍROVÁ, Blanka ŘÍHOVÁ a Karel ULBRICH. HPMA copolymer-doxorubicin conjugates: The effects of molecular weight and architecture on biodistribution and in vivo activity. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **164**(3), 346–354. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.029
- [21] TENCER, Jan, Inga Maria FRICK, Björn W. ÖQUIST, Per ALM a Bengt RIPPE. Size-selectivity of the glomerular barrier to high molecular weight proteins: Upper size limitations of shunt pathways. *Kidney International* [online]. 1998, **53**(3), 709–715. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00797.x

- [22] MAEDA, Hiroshi, Jun WU, Tomohiro SAWA, Yasuhiro MATSUMURA a Katsuyoshi HORI. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000, **65**(1–2), 271–84. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(99)00248-5
- [23] YANG, Shicheng, Mia WALLACH, Apurva KRISHNA, Raushan KURMASHEVA a Srinivas SRIDHAR. Recent Developments in Nanomedicine for Pediatric Cancer. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2021, **10**(7), 1437. Dostupné z: doi:10.3390/jcm10071437
- [24] FERBER, Shiran, Hemda BAABUR-COHEN, Rachel BLAU, Yana EPSHTEIN, Einat KISIN-FINFER, Orit REDY, Doron SHABAT a Ronit SATCHI-FAINARO. Polymeric nanotheranostics for real-time non-invasive optical imaging of breast cancer progression and drug release. *Cancer Letters* [online]. 2014, **352**(1), 81–89. ISSN 18727980. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2014.02.022
- [25] LAKOWICZ, Joseph R. Quenching of Fluorescence. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [online]. 3. 2006, s. 257–301. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-46312-4\_8
- [26] REHM, Dieter a Albert WELLER. Kinetics of Fluorescence Quenching by Electron and H-Atom Transfer. *Israel Journal of Chemistry* [online]. 1970, **8**(2), 259–271. ISSN 18695868. Dostupné z: doi:10.1002/ijch.197000029
- [27] CHYTIL, Petr, Stefan HOFFMANN, Lucie SCHINDLER, Libor KOSTKA, Karel ULBRICH, Henrike CAYSA, Thomas MUELLER, Karsten MÄDER a Tomáš ETRYCH. Dual fluorescent HPMA copolymers for passive tumor targeting with pH-sensitive drug release II: Impact of release rate on biodistribution. *Journal of Controlled Release* [online]. 2013, **172**(2), 504–512. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2013.05.008
- [28] RESHKIN, Stephan Joel, Maria Raffaella GRECO a Rosa Angela CARDONE. Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2014, **369**, 1638. ISSN 09628436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2013.0100
- [29] GERWECK, Leo E. a Kala SEETHARAMAN. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Research*. 1996, **56**(6), 1194–1198. ISSN 00085472.

- [30] STOCK, Christian a Albrecht SCHWAB. Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* [online]. 2009, **458**(5), 981–992. ISSN 00316768. Dostupné z: doi:10.1007/s00424-009-0677-8
- [31] MINDELL, Joseph A. Lysosomal acidification mechanisms. *Annual Review of Physiology* [online]. 2012, **74**, 69–86. ISSN 00664278. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142317
- [32] ETRYCH, Tomáš, Lubomír KOVÁŘ, Jiří STROHALM, Petr CHYTIL, Blanka ŘÍHOVÁ a Karel ULBRICH. Biodegradable star HPMA polymer-drug conjugates: Biodegradability, distribution and anti-tumor efficacy. *Journal of Controlled Release* [online]. 2011, **154**(3), 241–248. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.015
- [33] QIU, Yong a Kinam PARK. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **53**(3), 321–339. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2012.09.024
- [34] BAIG, Mohammad Hassan, Mohd ADIL, Rosina KHAN, Surendar DHADI, Khurshid AHMAD, Gulam RABBANI, Tufail BASHIR, Mohammad Azhar IMRAN, Fohad Mabood HUSAIN, Eun Ju LEE, Mohammad Amjad KAMAL a Inho CHOI. Enzyme targeting strategies for prevention and treatment of cancer: Implications for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2019, **56**, 1–11. ISSN 10963650. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2017.12.003
- [35] BLOOMFIELD, Gareth a Robert R. KAY. Uses and abuses of macropinocytosis. *Journal of Cell Science* [online]. 2016, **129**, 2697–2705. ISSN 14779137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.176149
- [36] DHEER, Divya, Julien NICOLAS a Ravi SHANKAR. Cathepsin-sensitive nanoscale drug delivery systems for cancer therapy and other diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2019, **151–152**, 130–151. ISSN 18728294. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2019.01.010
- [37] DUBOWCHIK, Gene M., Raymond A. FIRESTONE, Linda PADILLA, David WILLNER, Sandra J. HOFSTEAD, Kathleen MOSURE, Jay O. KNIPE, Shirley J. LASCH a Pamela A. TRAIL. 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* [online]. 2002, **13**(4), 855–869. ISSN 10431802.

Dostupné z: doi:10.1021/bc025536j

- [38] MENG, Fenghua, Wim E HENNINK a Zhiyuan ZHONG. Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications. *Biomaterials* [online]. 2009, **30**(12), 2180–2198. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.026>
- [39] ZHAO, Xiaodan, Hengxin LEI, Yilong CHENG, Youshen WU, Mingming ZHANG, Gang HE, Dandan PEI, Zhen DONG, Ang LI a Yanfeng ZHANG. A polymeric prodrug for non-invasive, real-time reporting drug release based on “turn-on” fluorescent probes. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2020, **154**. ISSN 13815148. Dostupné z: doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104649
- [40] ZHONG, Yinan, Fenghua MENG, Chao DENG a Zhiyuan ZHONG. Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromolecules* [online]. 2014, **15**(6), 1955–1969. ISSN 15264602. Dostupné z: doi:10.1021/bm5003009
- [41] ARAP, Wadih, Renata PASQUALINI a Erkki RUOSLAHTI. Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. *Science* [online]. 1998, **279**(5349), 377–380. Dostupné z: doi:10.1126/science.279.5349.377
- [42] KUNJACHAN, Sijumon, Robert POLA, Felix GREMSE, Benjamin THEEK, Josef EHLING, Diana MOECKEL, Benita HERMANN-SACHWEH, Michal PECHAR, Karel ULBRICH, Wim E. HENNINK, Gert STORM, Wiltrud LEDERLE, Fabian KIESSLING a Twan LAMMERS. Passive versus active tumor targeting using RGD- and NGR-modified polymeric nanomedicines. *Nano Letters* [online]. 2014, **14**(2), 972–981. ISSN 15306984. Dostupné z: doi:10.1021/nl404391r
- [43] DANHIER, Fabienne, Aude Le BRETON a Véronique PRÉAT. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2012, **9**(11), 2961–2973. ISSN 15438384. Dostupné z: doi:10.1021/mp3002733
- [44] KOPEČEK, Jindřich, Pavla KOPEČKOVÁ, Tamara MINKO a Zheng Rong LU. HEMA copolymer-anticancer drug conjugates: Design, activity, and mechanism of action. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2000, **50**(1), 61–81. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/S0939-6411(00)00075-8



- [45] ZHANG, Huiming. *Thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticle-A10 RNA aptamer-doxorubicin conjugate*. 2008.
- [46] TAVARES, Marina Rodrigues, Markéta BLÁHOVÁ, Lieselotte SEDLÁKOVÁ, Lothar ELLING, Helena PELANTOVÁ, Rafał KONEFAŁ, Tomáš ETRYCH, Vladimír KŘEN, Pavla BOJAROVÁ a Petr CHYTIL. High-Affinity N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymers with Tailored N-Acetyllactosamine Presentation Discriminate between Galectins. *Biomacromolecules* [online]. 2020, **21**(2), 641–652. ISSN 15264602. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.9b01370
- [47] HIRCHE, Christoph, Dawid MURAWA, Zarah MOHR, Soeren KNEIF a Michael HÜNERBEIN. ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. 2010, **121**(2), 373–378. ISSN 01676806. Dostupné z: doi:10.1007/s10549-010-0760-z
- [48] VETTORETTO, Nereo, Emanuela FOGLIA, Lucrezia FERRARIO, Chiara GERARDI, Beatrice MOLteni, Umberto NOCCO, Emanuele LETTIERI, S. MOLFINO, Gian BAIOCCHI, Ugo ELMORE, R. ROSATI, G. CURRÒ, E. CASSINOTTI, L. BONI, Roberto CIROCCHI, Alessandra MARANO, Wanda Luisa PETZ, Alberto AREZZO, Alberto BONINO, F. DAVINI, Alberto BIONDI, Gabriele ANANIA, Ferdinando AGRESTA a Gianfranco SILECCHIA. Could fluorescence-guided surgery be an efficient and sustainable option? A SICE (Italian Society of Endoscopic Surgery) health technology assessment summary. *Surgical Endoscopy* [online]. 2020, **34**(7), 3270–3284. ISSN 14322218. Dostupné z: doi:10.1007/s00464-020-07542-3
- [49] BHATTACHARYYA, Sibaprasad, Nimit L. PATEL, Ling WEI, Lisa A. RIFFLE, Joseph D. KALEN, G. Craig HILL, Paula M. JACOBS, Kurt R. ZINN a Eben ROSENTHAL. Synthesis and biological evaluation of panitumumab-IRDye800 conjugate as a fluorescence imaging probe for EGFR-expressing cancers. *MedChemComm* [online]. 2014, **5**(9), 1337–1346. ISSN 20402511. Dostupné z: doi:10.1039/c4md00116h
- [50] LIU, Hong Wen, Lanlan CHEN, Chengyan XU, Zhe LI, Haiyang ZHANG, Xiao Bing ZHANG a Weihong TAN. Recent progresses in small-molecule enzymatic fluorescent probes for cancer imaging. *Chemical Society Reviews* [online]. 2018, **47**(18), 7140–7180. ISSN 14604744. Dostupné z: doi:10.1039/c7cs00862g
- [51] KOPANSKY-GROISMAN, Eva, Inga KOGAN-ZVIAGIN, Osnat SELLA-

- TAVOR, Mor ORON-HERMAN a Ayelet DAVID. Near-Infrared Fluorescent Activated Polymeric Probe for Imaging Intraluminal Colorectal Cancer Tumors. *Biomacromolecules* [online]. 2019, **20**(9), 3547–3556. ISSN 15264602. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.9b00806
- [52] LAGA, Richard, Olga JANOUŠKOVÁ, Karel ULBRICH, Robert POLA, Jana BLAŽKOVÁ, Sergey K. FILIPPOV, Tomáš ETRYCH a Michal PECHAR. Thermoresponsive Polymer Micelles as Potential Nanosized Cancerostatics. *Biomacromolecules* [online]. 2015, **16**(8), 2493–2505. ISSN 15264602. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.5b00764
- [53] KOSTKOVÁ, H., L. SCHINDLER, L. KOTRCHOVÁ, M. KOVÁŘ, M. ŠÍROVÁ, L. KOSTKA a T. ETRYCH. Star Polymer-Drug Conjugates with pH-Controlled Drug Release and Carrier Degradation. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2017, **2017**, 1–10. ISSN 16874129. Dostupné z: doi:10.1155/2017/8675435
- [54] BÖHMOVÁ, Eliška, Robert POLA, Michal PECHAR, Jozef PARNICA, Daniela MACHOVÁ, Olga JANOUŠKOVÁ a Tomáš ETRYCH. Polymer Cancerostatics Containing Cell-Penetrating Peptides: Internalization Efficacy Depends on Peptide Type and Spacer Length. *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(1). ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12010059
- [55] *Cyanine7-amine* [online]. [vid. 2021-04-29]. Dostupné z: <https://www.lumiprobe.com/p/cy7-amine>
- [56] RANDÁROVÁ, Eva, Hideaki NAKAMURA, Rayhanul ISLAM, Martin STUDENOVSKÝ, Haratake MAMORU, Jun FANG, Petr CHYTIL a Tomáš ETRYCH. Highly effective anti-tumor nanomedicines based on HPMa copolymer conjugates with pirarubicin prepared by controlled RAFT polymerization. *Acta Biomaterialia* [online]. 2020, **106**, 256–266. ISSN 18787568. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2020.02.011
- [57] BRODU, Nicolas, Imed BEN TALOUBA, Isabelle LAHOUD, Laurent BALLAND a Nordine MOUHAB. Thermokinetic parameter estimation of RAFT solution polymerization of dodecyl methacrylate by reaction calorimetry. *Chemical Papers* [online]. 2021, **75**(4), 1607–1617. ISSN 1336-9075. Dostupné z: doi:10.1007/s11696-020-01412-x
- [58] NAGAO, Yoshimitsu, Tadayo MIYASAKA, Kaoru SENO, Eiichi FUJITA,

- Daisuke SHIBATA a Etsushiro DOI. Peptide-bond formation, chemoselective acylation of amino acids, and crosslinking reaction between amino acids utilizing a functional five-membered heterocycle, 1, 3-thiazolidine-2-thione. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* [online]. 1984, (0), 2439–2446. Dostupné z: doi:10.1039/P19840002439
- [59] HOFFMANN, Stefan. *Polymers for passive tumor targeting: a contribution to enlighten the effect of polymer nature and architecture on the biodistribution*. B.m., 2014. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [60] SEDLÁČEK, Ondřej, Martin HRUBÝ, Martin STUDENOVSKÝ, David VĚTVIČKA, Jan SVOBODA, Dana KAŇKOVÁ, Jan KOVÁŘ a Karel ULBRICH. Polymer conjugates of acridine-type anticancer drugs with pH-controlled activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **20**(13), 4056–4063. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.007>
- [61] HOFFMANN, Stefan, Lucie VYSTRČILOVÁ, Karel ULBRICH, Tomáš ETRYCH, Henrike CAYSA, Thomas MUELLER a Karsten MÄDER. Dual fluorescent HPMA copolymers for passive tumor targeting with pH-sensitive drug release: Synthesis and characterization of distribution and tumor accumulation in mice by noninvasive multispectral optical imaging. *Biomacromolecules* [online]. 2012, **13**(3), 652–663. ISSN 15257797. Dostupné z: doi:10.1021/bm2015027