

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie



DISERTAČNÍ PRÁCE

**Substituované poly(ethylenglykoly) jako
nosiče léčiv**

Hradec Králové

2009

Mgr. Martin Pravda

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Datum

Podpis

Poděkování:

Za všestrannou pomoc, cenné rady, připomínky a za ochotu při vedení během postgraduálního studia děkuji PharmDr. Lence Kubicové, CSc, Prof. Ing. Milošovi Sedlákovi, DrSc a Doc. PharmDr. Alexandrovi Hrabálkovi, Csc.

1. Obsah

1. OBSAH	1
2. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
3. ÚVOD	5
4. CÍLE PRÁCE	8
5. TEORETICKÁ ČÁST	10
5.1 POLY(EHTYLENGLYKOL)	10
5.2 KONJUGÁTY POLY(ETHYLENGLYKOLU) A BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK	11
5.2.1 <i>Konjugáty s biomakromolekulami</i>	12
5.2.2 <i>Konjugáty s léčivý charakteru nízkomolekulárních organických látek</i>	15
5.3 BLOKOVÉ KOPOLYMERY POLY(ETHYLENGLYKOLU) A POLY(AMINOKYSELIN).....	18
5.3.1 <i>Konjugáty blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin) s biologicky aktivními látkami</i>	20
5.3.2 <i>Studium vlivu chirálních polymerů na kinetiku krystalizace racemických směsí aminokyselin</i>	21
5.4 ANTIMYKOTIKA.....	22
5.4.1 <i>Azolové deriváty</i>	24
5.4.2 <i>Fluoropyrimidiny</i>	26
5.4.3 <i>Echinokandiny</i>	27
5.4.4 <i>Allylaminy</i>	27
5.4.5 <i>Polyenová antibiotika</i>	27
6. METODICKÁ ČÁST	39
6.1 PŘÍPRAVA POLYMERNÍCH NOSIČŮ NA BÁZI MODIFIKOVANÝCH POLY(ETHYLENGLYKOLŮ) PRO DISTRIBUCI AMFOTERICINU B.....	39
6.1.1 <i>Příprava modifikovaných poly(ethylenglykolů)</i>	39
6.1.2 <i>Příprava blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin)</i>	41
6.2 PŘÍPRAVA KONJUGÁTŮ AMB S POLYMERNÍMI NOSIČI.....	43
6.3 STUDIE STABILITY KONJUGÁTŮ AMB IN VITRO	43
6.3.1 <i>Stabilita konjugátu ve fosfátových pufrch</i>	43
6.3.2 <i>Stabilita konjugátu v plazmě a v lidském séru</i>	44
6.3.3 <i>Studium akutní toxicity připravených konjugátů</i>	44
6.4 STUDIUM Vlivu CHIRÁLNÍCH POLYMERŮ NA KINETIKU KRYSTALIZACE RACEMICKÝCH SMĚSÍ AMINOKYSELIN	44
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
7.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	46

7.2	PŘÍPRAVA MODIFIKOVANÝCH POLY(ETHYLENGLYKOLŮ)	47
7.2.1	<i>Příprava α-methoxy-ω-(4-formylfenyloxy)poly(ethylenglykolu) ($M_w = 5\ 000$)</i>	47
7.2.2	<i>Obecný postup acylace poly(ethylenglykolů) 4-formylbenzovoze kyselinou</i>	48
7.3	PŘÍPRAVA BLOKOVÝCH KOPOLYMERŮ POLY(ETHYLENGLYKOL)-BLOK-POLY(L- AMINOKYSELIN) 51	
7.3.1	<i>Příprava N-karboxyanhydridu γ-benzylesteru L-glutamové kyseliny</i>	51
7.3.2	<i>Příprava α-methoxy(polyethylenglykol)-blok-poly(L-α-glutamové) kyseliny</i>	52
7.3.3	<i>Příprava N-karboxyanhydridu α-(N_ε-benzyloxykarbonyl)-L-lysinu</i>	53
7.3.4	<i>Příprava poly(L-α-lysin)-blok-poly(ethylenglykol)-blok-poly(L-α-lysinu)</i>	54
7.3.5	<i>Příprava poly(N_ε-(4-formylfenylkarboxamino)-L-α-lysinu)-blok-poly(ethylenglykol)-blok-poly(N_ε-(4-formylfenylkarboxamino)-L-α-lysinu)</i>	55
7.4	PŘÍPRAVA KONJUGÁTŮ AMB S POLYMERNÍMI NOSIČI.....	56
7.4.1	<i>Příprava konjugátů I, IIa, IIIa</i>	58
7.4.2	<i>Příprava konjugátů IIb-d, IIIb-d</i>	59
7.4.3	<i>Příprava konjugátů IV</i>	60
7.4.4	<i>Příprava 4-karboxybenzylideniminoamfotericinu B (V)</i>	61
7.5	STABILITA KONJUGÁTU VE FOSFÁTOVÝCH PUFRECH	62
7.6	STABILITA KONJUGÁTU V PLAZMĚ A V LIDSKÉM SÉRU.....	62
7.7	STUDIUM VLIVU CHIRÁLNÍCH POLYMERŮ NA KINETIKU KRYSTALIZACE RACEMICKÝCH SMĚSÍ AMINOKYSELIN	63
8.	VÝSLEDKY A DISKUZE	64
8.1	PŘÍPRAVA MODIFIKOVANÝCH POLY(ETHYLENGLYKOLŮ)	64
8.2	PŘÍPRAVA BLOKOVÝCH KOPOLYMERŮ POLY(ETHYLENGLYKOLU) A POLY(AMINOKYSELIN).....	66
8.3	PŘÍPRAVA KONJUGÁTŮ AMB S POLYMERNÍMI NOSIČI	68
8.4	STABILITA KONJUGÁTU VE FOSFÁTOVÝCH PUFRECH	69
8.5	STABILITA KONJUGÁTŮ V LIDSKÉ PLAZMĚ A V LIDSKÉM SÉRU.....	72
8.6	STUDIUM AKUTNÍ TOXICITY PŘIPRAVENÝCH KONJUGÁTŮ	75
8.7	STUDIUM VLIVU CHIRÁLNÍCH POLYMERŮ NA KINETIKU KRYSTALIZACE RACEMICKÝCH SMĚSÍ AMINOKYSELIN	76
9.	ZÁVĚR.....	82
10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	86
11.	PUBLIKOVANÉ VĚDECKÉ PRÁCE	92
12.	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ ODBORNÝCH A VĚDECKÝCH PRACÍ	113
13.	SOUHRN.....	116
14.	SUMMARY.....	117

2. Seznam použitých zkratek

5-FC	5-fluorocytosin
5-FdUMP	5-fluoro-2'-deoxyuridin-5'-monofosfát
5-FU	5-fluorouracil
5-FUMP	5-fluorouridin-5'-monofosfát
5-FUTP	5-fluorouridin-5'-trifosfát
ABC	ATP-binding cassette transporters
ABCD	Amphocil [®] ; koloidní disperze amfotericinu B
ABL C	Abelcet [®] ; Lipidový komplex amfotericinu B
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome; Syndrom získaného selhání imunity
AmB	Amfotericin B
AMBD	Amfotericin B deoxycholát
ATP	Adenosintrifosfát
Boc	Letální dávka
Boc	<i>t</i> -Butoxykarbonyl
CD	Cirkulární dichroismus
DIC	Diisopropylkarbodiimid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dTMP	2'-deoxythymidin-5'-monofosfát
dUMP	2'-deoxyuridin-5'-monofosfát
EPR efekt	Enhanced permeability and retention efekt
FDA	Food and Drug Administration; Úřad pro léčiva a potraviny
GPC	Gelová permeační chromatografie
HDL	High density lipoprotein; lipoproteiny s vysokou hustotou
HIV	Human Immunodeficiency Virus; virus lidské imunitní nedostatečnosti
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysukcinimid
HPLC	High performance liquid chromatography; Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IČ	Infračervená spektrofotometrie
IL-1	Interleukin 1
LAMB	AmBisome [®] ; liposomální amfotericin B
LDL	Low density lipoprotein; lipoproteiny s nízkou hustotou
LNYS	Liposomální nystatin
MDR	Multiple drug resistance; mnohonásobná léková rezistence
MFAME	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -D-fruktosylamfotericin B methylester
MFS	Proton motive force dependent-major facilitators
mPEG	α -Methoxypoly(ethylenglykol)

NCA	<i>N</i> -Karboxyanhydrid
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NYS	Nystatin
PDR	Pleiotropic drug resistance; mnohonásobná léková rezistence
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEG- <i>b</i> -p(AA)	Blokové kopolymery poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin)
PEG- <i>b</i> -p(L-Asp)	Blokový kopolymer poly(ethylenglykolu) a poly(L-asparagové kyseliny)
PEG- <i>b</i> -p(L-Glu)	Blokový kopolymer poly(ethylenglykolu) a poly(L-glutamové kyseliny)
PEG- <i>b</i> -p(L-Lys)	Blokový kopolymer poly(ethylenglykolu) a poly(L-lysinu)
PGE2	Prostaglandin E2
PIC	Polyion complex
PrPSC	Patologická izoforma prionového celulárního proteinu
RES	Retikuloendotelový systém
RI	Refractive index; index lomu
RNA	Ribonukleová kyselina
THF	Tetrahydrofuran
TNF	Tumor nekrotizující faktor
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TS	Thymidilátsyntáza
TSE	Transmisivní spongiformní encefalopatie
UK	Univerzita Karlova v Praze
UMP	Uridinmonofosfát
UV/VIS	Spektrofotometrie ultrafialové a viditelné oblasti

3. Úvod

Příprava konjugátů s polymery je jednou z cest jak ovlivnit biodistribuci, farmakokinetiku a toxicitu biologicky aktivních látek. Mezi výhody, které přináší vazba na polymerní nosič, patří zvýšení odolnosti vázaných látek proti chemickým vlivům prostředí, ochrana před působením proteolytických enzymů, prodloužení biologického poločasu, snížení imunogenicity a schopnosti interakce s protilátkami imunitního systému. Tyto vlastnosti předurčují využití těchto konjugátů pro přípravu systémů s cílenou distribucí léčiv (tzv. *drug delivery systémy*). Problematika, zabývající se volbou vhodných polymerů, jejich modifikacemi a metodikou přípravy jejich konjugátů s léčivy a biologicky aktivními látkami bývá souhrnně označována jako *biokonjugace*¹.

Polymery využívané pro biokonjugaci musí splňovat řadu podmínek. Nesmí být toxické, nesmí vyvolávat interakce s imunitním systémem a musí být schopné eliminace z organismu. Pokud je léčivo vázáno k polymeru kovalentní vazbou, mělo by se jednat o biodegradabilní vazby, schopné uvolnit léčivo v aktivní formě². V současné době je pro biokonjugaci využívána celá řada přírodních i syntetických polymerů. Velmi výraznou roli hrají biopolymery na bázi polysacharidů (např. dextran, arabinogalaktan, inulin, chitosan, karboxymethyldextran, hyaluronová kyselina), dále polymery odvozené od syntetických polyaminokyselin (poly(L-lysin), poly(L-aspartová kyselina), poly(α,β -N-(2-hydroxyethyl)-D,L-aspartamid), poly(N-(2-hydroxyethyl)-L-glutamin) atd.) a řada dalších syntetických polymerů (např. poly(vinylalkohol), polyakryláty, poly(N-vinylpyrrolidin), poly(hydroxypropylakrylát). Využívány jsou také blokové kopolymery jako DIVEMA (blokový kopolymer poly(divinyletheru) a poly(maleinové kyseliny), či SMA (blokový kopolymer poly(maleinové kyseliny) a poly(styrenu))^{1,3}.

Jedním z nejčastěji používaných polymerů pro biokonjugaci je poly(ethylenglykol) (PEG). Je tomu tak pro jeho snadnou dostupnost, nízkou toxicitu, vysokou biokompatibilitu, rozpustnost ve vodě a většině organických rozpouštědel. Kovalentně vázaný PEG solubilizuje obtížně rozpustné molekuly, přenáší je přes buněčné membrány (mechanismem endocytózy) a pozitivně ovlivňuje jejich farmakokinetiku³⁻⁷.

Konjugace biologicky aktivní látky s poly(ethylenglykolem) je proces nazývaný PEGylace^{4,8}. Bylo popsáno mnoho systémů léčivo-poly(ethylenglykol) včetně modifikace již používaných forem nosičů léčiv, jako jsou např. liposomy, nanočástice apod. Vzhledem k tomu, že poly(ethylenglykol) nevyvolává interakci se složkami imunitního systému, jeho

vazba na proteiny či oligonukleotidy snižuje imunogenní potenciál těchto látek. Toho se využívá k tzv. *maskování* biologicky aktivních substancí⁴⁻⁹.

Naše pracovní skupina se zaměřila na konjugaci poly(ethylenglykolu) s látkami, které vykazují antimykotickou aktivitu. Farmakoterapie systémových mykóz představuje závažný, dosud nevyřešený problém. Současná paleta použitelných léčiv je poměrně chudá (některé z azolových derivátů, amfotericin B, kaspofungin a některé další látky s menším významem jako flucytosin nebo terbinafin)¹⁰. Žádné z těchto léčiv však nesplňuje představy o ideálním antimykotiku. Mezi hlavní problémy patří nedostatečně široké spektrum antimykotické aktivity a relativně vysoká toxicita projevující se mnoha závažnými vedlejšími účinky. K významným směrům tohoto výzkumu patří, kromě hledání nových strukturních typů antimykotik, i snaha o snížení toxicity a zlepšení farmakokinetického profilu již známých a používaných léčiv^{10,11}.

Významnou skupinu léčiv, používaných v terapii těžkých mykóz, představují polyenová antimykotika a z nich zejména amfotericin B, dosud neúčinnější antimykotikum s nejširším spektrem účinku a nejmenším výskytem rezistencí. Vzhledem k minimální rozpustnosti amfotericinu B ve vodě a jeho značné akutní i chronické toxicitě (závažná je zejména nefrotoxicita) jsou využívány různé strategie ke zlepšení jeho vlastností, jako např. inkorporace do lipidových forem^{12,13}. Teprve v poslední době se objevují pokusy o vyřešení tohoto problému vazbou na hydrofilní polymer. Předběžná studie ukázala, že ve vodě rozpustný konjugát amfotericinu B s methoxy(polyethylenglykolem) vykazoval při snížené toxicitě srovnatelnou účinnost¹⁴. Podobných výsledků bylo dosaženo u biodegradabilních konjugátů amfotericinu B s kopolymery poly(ethylenglykolu) a poly(α -L-aminokyselin)¹⁵ a také u konjugátů amfotericinu B s polysacharidy¹⁶.

Příprava sofistikovaných systémů pro cílenou distribuci léčiv není jediným využitím poly(ethylenglykolu) v biomedicínských aplikacích. Různé typy kopolymerů poly(ethylenglykolu) nalézají uplatnění například v tkáňovém inženýrství. Jejich schopnost vytvářet hydrogely je využívána při přípravě scaffoldů (podpůrné struktury umožňující růst buněk nově tvořené tkáně) a bioadhesiv¹⁷. Blokované kopolymery poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin) mohou za vhodných podmínek zaujímat ve své polyamidové části složitější sekundární struktury např. šroubovici typu α -helix¹⁸. Tato vlastnost jim uděluje schopnost interagovat s dalšími chirálními sloučeninami. Takovéto kopolymery, schopné

vytvářet organizované chirální útvary, je možné využít při přípravě chirálních stacionárních fází pro HPLC nebo jako aditiv pro dělení racemických směsí krystalizací¹⁹.

4. Cíle práce

Tato disertační práce byla zaměřena na přípravu polymerních nosičů pro systémy s cílenou distribucí léčiv. Pozornost byla věnována přípravě drug delivery systému pro polyenová antibiotika, zejména amfotericin B. Konjugace léčiva s hydrofilním polymerem měla vést ke zlepšení jeho rozpustnosti ve vodě a příznivě ovlivnit jeho toxikologický profil. Úkolem bylo připravit kovalentní pH–sensitivní konjugáty amfotericinu B a sledovat jejich stabilitu v modelových prostředích tlumivých roztoků, plazmy a krevního séra (*in vitro*). Dále měla být provedena toxikologická studie připravených derivátů *in vivo*. Pozornost měla být zaměřena zejména na stanovení akutní toxicity připravených konjugátů.

Prvním úkolem byla příprava kovalentních konjugátů poly(ethylenglykolu) s amfotericinem B, které by ve své struktuře obsahovaly aromatické acidolabilní spojky polymer–léčivo, které by umožňovaly uvolnění léčiva v prostředí se sníženým pH. K zavedení takovýchto spojek bylo využito modifikace terminálních hydroxylových skupin poly(ethylenglykolu).

K tomuto účelu byly zvoleny tři přístupy:

- 1) tvorba nebiodegradabilní etherové vazby s 4-hydroxybenzaldehydem
- 2) acylace koncových hydroxylových skupin polyethylenglykolu 4–formylbenzoovou kyselinou
- 3) acylace koncových aminoskupin α -methoxy- ω -aminopoly(ethylenglykolu) a α,ω -diaminopoly(ethylenglykolu) 4–formylbenzoovou kyselinou

Cílem bylo vypracovat metodiku pro přípravu takto modifikovaných poly(ethylenglykolů) o molekulové hmotnosti 5 000, 6 000, 10 000 a 20 000. Takto připravené polymerní nosiče sloužily k přípravě kovalentních konjugátů s amfotericinem B, ve kterých byla molekula léčiva připojena prostřednictvím iminové vazby.

Dalším cílem této disertační práce byla příprava blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin). Záměrem bylo připravit blokové kopolymery poly(ethylenglykol)-*blok*-poly-(L-lysin) a poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L-glutamová) kyseliny.

Blokový kopolymer poly(ethylenglykol)-*blok*-poly-(L-lysin) měl sloužit jako základ pro přípravu kovalentního konjugátu s amfotericinem B. Úkolem byla syntéza

pH-sensitiveho systému pro cílenou distribuci amfotericinu B a sledování jeho stability v modelových prostředích *in vitro*. Dále měla být provedena toxikologická studie připravených derivátů *in vivo*. Pozornost měla být zaměřena zejména na stanovení akutní toxicity připravených konjugátů.

Dalším cílem této práce bylo studium fyzikálně-chemických vlastností blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin). Cílem bylo studovat sekundární strukturu těchto blokových kopolymerů a sledovat vliv jejich přítomnosti na proces krystalizace racemických směsí aminokyselin. Opticky aktivní polymery lze využít jako aditiva, která jsou schopna ovlivnit rychlost krystalizace jednotlivých enantiomerů během krystalizace racemických směsí. Výsledkem je pak směs krystalů s převažujícím zastoupením jednoho z enantiomerů. Provedené pokusy měly za cíl ověřit možnost využití chirálního blokového kopolymeru α -methoxypoly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L-glutamové) kyseliny k tomuto účelu. Jako modelová racemická směs byl zvolen D,L-threonin. Úkolem krystalizačních pokusů bylo sledovat zastoupení jednotlivých enantiomerů ve vznikajících krystalech a krystalizačním roztoku. Dále byly studovány změny v morfologii vznikajících krystalů a kinetika krystalizace. Studium rozdílů v biologické aktivitě jednotlivých enantiomerů chirálních biologicky aktivních látek^{20,21} a vliv polymorfismu krystalických forem léčiv na jejich rozpustnost a biodostupnost jsou významnými směry ve farmacii^{22,23} a studium těchto jevů je důležitou součástí vývoje nových účinných látek a lékových forem.

5. Teoretická část

5.1 Poly(ethylenglykol)

Poly(ethylenglykol) (PEG) patří mezi nejvíce využívané polymery v oblasti přípravy systému pro cílenou distribuci léčiv. Splňuje všechny základní podmínky pro biokonjugaci s biologicky aktivními látkami – je netoxický, nevyvolává imunitní odpověď, je snadno vylučován z organismu, základní řetězec poly(ethylenglykolu) je jen velmi málo reaktivní. Toxicitu vykazují pouze poly(ethylenglykoly) s nízkou molekulovou hmotností ($M < 400$). Takovéto řetězce poly(ethylenglykolu) mohou být *in vivo* degradovány alkoholdehydrogenázou na toxické metabolity. S rostoucí molekulovou hmotností polymeru toxicita klesá¹⁻⁹. Organizací FDA byly poly(ethylenglykoly) schváleny pro širokou škálu biomedicínských aplikací. Jedná se o látky velmi dobře rozpustné ve vodě a v mnoha organických rozpouštědlech s výjimkou diethyletheru, diisopropyletheru, hexanu a ethylenglykolu. Díky jejich šroubovicovité struktuře dobře krystalizují z některých organických rozpouštědel (ethanol, propan-2-ol)⁴. Vodné roztoky mohou být snadno sterilizovány (filtrace, tepelná sterilizace). Koncové hydroxylové skupiny řetězce mohou být modifikovány tak, aby byly schopny kovalentní vazby s dalšími ligandy^{4,24}.

Kromě poly(ethylenglykolu) se dvěma terminálními hydroxylovými skupinami (tzv. PEG) se pro přípravu biokonjugátů využívá i jeho monomethoxy derivát (tzv. mPEG). Oba typy jsou syntetizovány polymerací ethylenoxidu za použití nukleofilní katalýzy buď s hydroxidovým, nebo methoxidovým aniontem⁴. α -Methoxypoly(ethylenglykol) našel uplatnění např. při přípravě konjugátů s látkami bílkovinného charakteru, kde methylová skupina řetězce polymeru brání nežádoucímu síťování („cross link“) řetězců proteinů²⁴. Kromě těchto dvou typů polymerů se v poslední době využívá i tzv. rozvětvených poly(ethylenglykolů), jejichž výhoda spočívá ve větším počtu reaktivních koncových hydroxylových skupin⁹.

Nejběžnější komerčně dostupné poly(ethylenglykoly) mají molekulovou hmotnost od 500 – 100 000. V literatuře se můžeme setkat i s označením poly(ethylenoxid), poly(oxyethylen) nebo poly(oxiran). Poly(ethylenglykoly) o molekulové hmotnosti 200 až 600 jsou viskózní kapaliny. Polymery o molekulové hmotnosti do 1000 jsou charakterizovány jako vosky, od vyšších molekulových hmotností je můžeme považovat za krystalické látky. Poly(ethylenoxydy) o velmi vysokých molekulových hmotnostech (1×10^6

a více) nacházejí uplatnění ve farmaceutické technologii, kde slouží k přípravě hydrogelů a hydrofilních matrix pro tablety s prodlouženým uvolňováním²⁵.

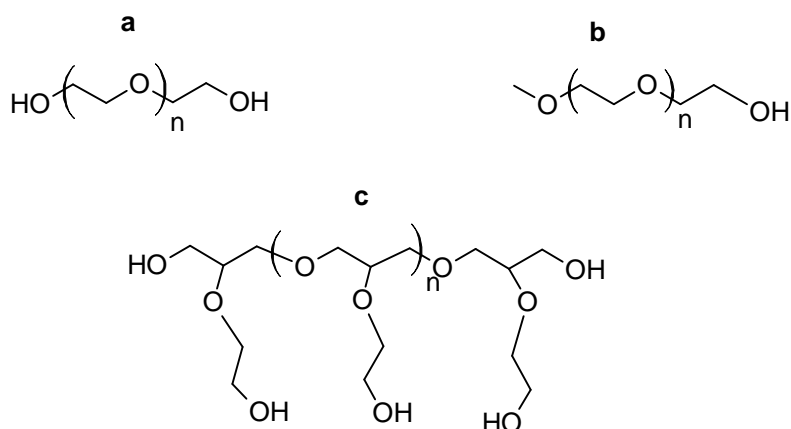


Schéma 1: a) poly(ethylenglykol); b) α -methoxypoly(ethylenglykol); c) rozvětvený řetězec poly(ethylenglykolu)

Farmakokinetika poly(ethylenglykolu) po intravenózním podání silně závisí na jeho molekulové hmotnosti. Poly(ethylenglykoly) s molekulovou hmotností menší než 20 000 snadno podléhají glomerulární filtraci a jsou rychle eliminovány ledvinami. S rostoucí molekulovou hmotností rychlost jejich vylučování do moči klesá a nejvíce se tento efekt projeví při překročení molekulové hmotnosti 30 000^{7,26}. Takové poly(ethylenglykoly) jen obtížně podstupují glomerulární filtraci, jejich plazmatické poločasy se prodlužují, a kromě ledvin jsou vylučovány i stolicí. Navíc může být jejich molekulová hmotnost redukována enzymy (např. komplex P450, alkoholdehydrogenáza, aldehyddehydrogenáza). Rychlost těchto procesů je ovšem velmi nízká a tento mechanismus hraje při eliminaci poly(ethylenglykolů) z organismu podružnou roli^{9,26}.

5.2 Konjugáty poly(ethylenglykolu) a biologicky aktivních látek

Jak již bylo zmíněno, konjugáty léčiv s poly(ethylenglykolem) mají řadu výhodných vlastností. Z fyzikálně-chemického hlediska se jedná o zvýšení rozpustnosti léčiva ve vodě, což umožňuje dosažení vyšších koncentrací léčiva ve vodných roztocích, aniž by docházelo k tvorbě agregátů či precipitací⁹. Prodloužení plazmatických poločasů léčiva je způsobeno zejména poklesem rychlosti eliminace léčiva ledvinami, ale také snížením míry jeho odstraňování prostřednictvím retikuloendotelového systému (RES)^{7-9,26,27}.

Další výhodou konjugace s poly(ethylenglykoly) je možnost využití cílené distribuce léčiva v organismu tzv. targetingu. V případě poly(ethylenglykolů) je využíváno „enhanced permeability and retention“ (EPR) efektu^{7-9,26}. Tento jev vzniká na základě zvýšené propustnosti kapilár přítomných např. v zánětlivé tkáni, nebo v solidních tumorech. Tyto podmínky, v kombinaci s omezenou drenáží lymfatickými cestami, vedou ke kumulaci léčiva v postižené tkáni. V případě EPR efektu mluvíme o tzv. pasivním targetingu. Při tvorbě systému s cílenou distribucí léčiva lze využít i tzv. aktivní targetingu. Příkladem je konjugát protinádorového léčiva karboplatiny s poly(ethylenglykolem) a kyselinou listovou²⁸. Kyselina listová, jako důležitý kofaktor biosyntézy nukleových bází, je kumulována v biosynteticky aktivních tkáních, což vede k hromadění celého komplexu v místě účinku (např. tumor). Podobně lze využít např. i monoklonálních protilátek majících afinitu k nádorovým buňkám²⁹. Další možností je využití acidolabilních vazeb mezi polymerem a molekulou léčiva. Takové vazby jsou v krevní plazmě za fyziologických podmínek stabilní a podléhají degradaci až v místech se sníženým pH, kde dojde k uvolnění léčiva³⁰.

5.2.1 Konjugáty s biomakromolekulami

V poslední letech roste význam látek typu nízkomolekulárních frakcionovaných proteinů popř. oligonukleotidů ve farmakoterapii⁹. Většina těchto biologicky aktivních látek je z důvodu své relativně nízké molekulové hmotnosti z organismu rychle vylučována glomerulární filtrací a *in vivo* podléhají degradaci působením enzymů různých typů.

Studie sledující vlastnosti vodných roztoků PEG ukázaly, že každá ethylenglykolová jednotka polymeru může být hydratována dvěma až třemi molekulami vody⁴. Tato vlastnost má za následek, že efektivní objem molekuly polymeru, který je rozhodující pro glomerulární filtraci, je výrazně vyšší, než je tomu u molekul proteinů. Za hraniční molekulovou hmotnost, při jejímž překročení již proteiny nepodléhají glomerulární filtraci, je považováno $M_w = 70\ 000$, což je přibližně molekulová hmotnost sérového albuminu²⁶. V případě poly(ethylenglykolů) pozorujeme výrazný pokles rychlosti glomerulární filtrace již u polymerů o molekulové hmotnosti zhruba $30\ 000$ ³¹. Většina proteinů, které jsou využívány pro terapeutické účely, má molekulovou hmotnost nižší než sérový albumin, a jsou proto snadno a rychle vylučovány ledvinami. Tento problém lze vyřešit právě konjugací s poly(ethylenglykoly). Tou dojde ke zvýšení molekulové hmotnosti a zvětšení objemu konjugátu do té míry, že dojde k výraznému zpomalení jeho

eliminace prostřednictvím glomerulární filtrace, a tím prodloužení plazmatického poločasu⁷⁻⁹. Tohoto efektu lze dosáhnout konjugací s větším množstvím polymerních řetězců o menší molekulové hmotnosti (1 000 – 2 000), nebo připojením jednoho či dvou řetězců poly(ethylenglykolu) o vyšších molekulových hmotnostech (30 000).

Další výhodou přípravy konjugátů poly(ethylenglykolu) s biomakromolekulami je omezení interakcí se složkami imunitního systému. Konjugace s polymerem zabraňuje opsonizaci a omezuje tak vychytávání biomakromolekul prostřednictvím RES. Tohoto jevu je využíváno k maskování liposomů (tzv. *stealth*-liposomy), tvorbě nanočástic a polymerních micel (např. blokové kopolymery s α -L-aminokyselinami)^{7-9,26,27,31,32}.

Proces přípravy kovalentních konjugátů biologicky aktivních látek s polymery můžeme rozdělit do dvou fází. První krok zahrnuje modifikaci polymerního nosiče zavedením reaktivních funkčních skupin. V případě poly(ethylenglykolu) se jedná o modifikaci koncových hydroxylových skupiny. Ty mohou být aktivovány přímo (příprava aktivovaných karbonátů), nebo jsou nejprve převedeny na jiné funkční skupiny (karboxyl, primární amin, aldehyd apod.). Další možností zavedení reaktivních center do molekuly polymeru je využití spojek polymer–léčivo. Jejich přítomnost nejenže umožňuje samotné připojení léčiva, ale zároveň může výrazně ovlivňovat stabilitu vazby léčiva na polymer a rychlost rozpadu konjugátu³³. Příprava polymerního nosiče může zahrnovat i několik syntetických kroků. Výsledkem je aktivovaný polymer nesoucí reaktivní funkční skupiny.

Dalším krokem přípravy polymerního drug delivery systému můžeme označit jako navázání („coupling“) léčiva (ligandu) na polymerní nosič. Povaha biologicky aktivních komponent konjugátů (bílkoviny, oligonukleotidy apod.) vyžaduje, aby reakční podmínky za nichž dochází k vazbě ligandu na polymerní nosič, byly natolik šetrné, aby během této chemické reakce nedocházelo ke změnám ve struktuře léčiva (biologicky aktivní látky), které by znemožnily jeho účinek (např. denaturace bílkovin). Na rozdíl od přípravy samotného polymerního nosiče je, v případě vazby léčiva, výhodné, aby se jednalo o jednostupňovou syntézu, po jejímž ukončení je možno vzniklý konjugát snadno izolovat.

V roce 1977 poprvé použili pojem PEGylace Abuchowski *et al.*³⁴ pro kovalentní vazbu α -methoxy(polyethylenglykolu) s bovinním sérovým albuminem. K vazbě na molekuly methoxypoly(ethylenglykolu) byly využity zejména primární alifatické aminoskupiny přítomné v postranních řetězcích aminokyselin albuminu. U konjugátu byl pozorován delší plazmatický poločas a snížená schopnost interagovat se složkami imunitního systému^{7,34}.

Primární aminoskupiny, přítomné ve struktuře biologicky aktivních látek, patří mezi nejvyužívanější funkční skupiny pro připojení poly(ethylenglykolového) řetězce. Jedním z možných přístupů je alkylace těchto skupin^{7,8,35}. Tato metoda vede ke vzniku vysoce stabilních sekundárních aminů. K tomuto účelu byly používány poly(ethylenglykoly), jejichž koncové hydroxyly byly aktivovány přeměnou na tosylát či tresylát. Nevýhodou této metody je nízká selektivita elektrofilu (aktivovaného poly(ethylenglykolu))^{26,36,37}. Tento jev je nežádoucí zejména při pegylaci proteinů, kdy je výsledným produktem alkylace těžko charakterizovatelná směs izomerů. Z historického hlediska je tento typ konjugátů řazen do tzv. „první generace“^{8,36,37}. Do této kategorie řadíme i konjugáty při jejichž přípravě je využito aktivace poly(ethylenglykolu) trichlorotriazinem. Takto aktivovaný polymer je schopen podstupovat substituční reakce s řadou nukleofilů (např. s aminy, hydroxyly a thioly přítomných ve struktuře aminokyselin). Vyšší selektivitu vůči aminoskupinám vykazuje 2,4-bis(polyethylenglykol)-6-chlorotriazin (PEG₂-chlorotriazine). Pro svou toxicitu již nejsou poly(ethylenglykoly) modifikované takovýmto způsobem používány⁸.

Ke konjugátům první generace řadíme i takové, které využívají pro vazbu na ligand amidickou či karbamátovou vazbu. V případě přípravy konjugátů typu karbamátu je poly(ethylenglykol) nutné nejprve převést na asymetrický diester kyseliny uhličité. Ten obsahuje dobře odstupující skupinu (např. HOSu, HOBt, p-nitrofenol, 2,3,5-trichlorfenol, imidazol apod.), která je během couplingu nahrazena primární aminoskupinou za vzniku karbamátu^{7,8,26,36,37}.

Pro přípravu konjugátů, využívajících amidickou vazbu pro spojení molekuly polymeru a ligandu, je nutné nejprve zavést do struktury poly(ethylenglykolu) karboxylovou funkci. Toho lze docílit buď oxidací koncových hydroxylů, přípravou etheru s ω -halogen karboxylovou kyselinou, nebo acylací cyklickým anhydridem dikarboxylové kyseliny. Volný karboxyl je poté aktivován, například esterifikací s HOSu³⁶.

Typickým představitelem tzv. „druhé generace“ pegylovaných biologicky aktivních látek jsou konjugáty s poly(ethylenglykol)propionaldehydem³⁵. Tato metoda využívá proces reduktivní aminace, kdy nejprve dochází ke vzniku iminové vazby mezi primární aminoskupinou ligandu a aldehydem polymeru. Tato vazba je následně redukována za vzniku sekundárního aminu. Výhodou tohoto postupu je vyšší selektivita reakce zejména vůči terminálním aminoskupinám peptidových řetězců. Tím dochází ke vzniku menšího počtu izomerů při přípravě pegylovaných proteinů^{8,35,37}. Nicméně i tato metoda vede ke

vzniku permanentně pegylovaných molekul ligandu, které se jen obtížně uvolňují z vazby na polymer.

Výše zmíněné metody jsou široce využívány pro přípravu konjugátů poly(ethylenglykolu) s látkami vysokomolekulárního charakteru (nejčastěji peptidy, proteiny oligonukleotidy apod.) a mají za cíl modifikovat strukturu těchto látek tak, aby nebyly zasaženy jejich specifické struktury, které jsou nositeli jejich biologické aktivity.

Výhody, které pegylace přináší, byly důvodem pro přípravu konjugátů PEGu a řady dalších léčiv ze skupiny hormonů, (erythropoetin, somatotropin⁹ (Somavert[®]), apod), enzymů (L-asparaginasa⁷ (Oncaspar[®]), streptokinasa, superoxiddismutasa⁹) a cytokinů (PEG-fligrastrim⁷ Neulasta[®], interferon (Peg-intron[®])⁹.

5.2.2 Konjugáty s léčivy charakteru nízkomolekulárních organických látek

Základním předpokladem pro vytvoření účinného systému s cílenou distribucí léčiva je znalost farmakodynamiky a farmakokinetiky aktivní komponenty včetně pochopení vztahu struktura – účinek. Na základě těchto informací je možné zvolit jak vhodný polymerní nosič, s ohledem na jeho chemické a fyzikální vlastnosti (rozpuštěnost ve vodě, přítomnost funkčních skupin, molekulová hmotnost), tak charakter chemické vazby spojující ligand s molekulou polymeru. Druh této chemické vazby určuje stabilitu konjugátu nejen během jeho přípravy, izolace, popř. formulace léčivého přípravku, ale zejména během interakce s organismem. Charakter této vazby determinuje rychlost uvolnění léčiva z konjugátu, čímž ovlivňuje rychlost nástupu a délku trvání jeho účinku. Uvolnění léčiva z konjugátu se může projevit i negativně např. výskytem vedlejších nežádoucích účinků, které byly předtím potlačeny biokonjugací (např. alergická reakce). Vlastnosti vazby mohou ovlivnit i místo (přítomnost specifických enzymů) nebo podmínky rozpadu konjugátu (snížené pH) a umožňují tak cílenou distribuci léčiva (targeting)¹⁻⁹.

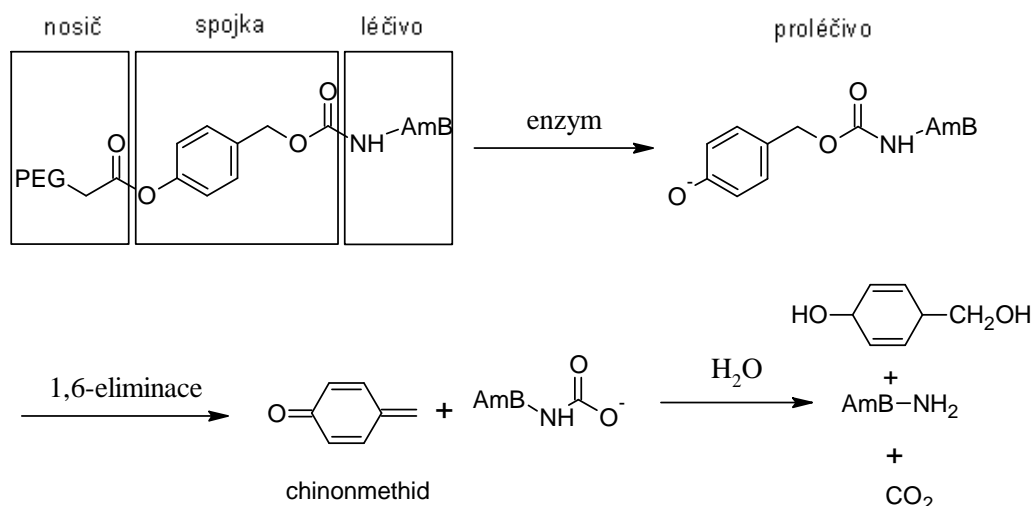
V literatuře nalezneme řadu příkladů konjugátů poly(ethylenglykolu) s nízkomolekulárními léčivy, například ze skupiny nesteroidních antiflogistik: PEG–indometacin^{38,39}, PEG–ibuprofen³⁹, PEG–ketoprofen⁴⁰. Dalším příkladem je konjugát poly(ethylenglykolu) s opiátovým analgetikem oxykodonem⁴¹ nebo antivirotikem aciklovirem⁴².

Příprava biokonjugátu s nízkomolekulárními léčivy našla nejširší uplatnění zejména v oblasti protinádorových léčiv (kamptothecin, cis-platina, adriamycin,

doxorubicin, daunorubicin, paklitaxel, podophyllotoxin)^{3,7-9}. Nejčastěji jsou tyto konjugáty využívány jako makromolekulární prolečivo, skládající se z polymerního nosiče a nízkomolekulárního ligandu – léčiva. K dosažení farmakodynamického efektu je často nutné, aby došlo k uvolnění léčiva z vazby na polymer. Tento děj by měl probíhat postupně, ideálně za specifických podmínek, které panují v místě účinku. K tomuto účelu byla v poslední době vyvinuta řada konjugátů, které obsahují různé typy biodegradabilních kovalentních vazeb, schopných podstupovat enzymatické nebo hydrolytické štěpení (vazba esterová, amidová, karbonáty, karbamáty)^{3,7-9,36}. Jednou z možností, jak umožnit degradaci vazby polymer – léčivo, je využití acidolabilních spojek, které snadno hydrolyzují v kyselém prostředí (např. lyzozom), ale jsou stálé při pH blízkém 7 (plazma pH \approx 7,4). Při přípravě pH-senzitivních derivátů doxorubicinu a daunorubicinu bylo jako acidolabilní spojky využito *cis*-akonitylamidu popř. struktur obsahujících hydrazonovou vazbu^{43,44}. Podobně bylo využito i spojek obsahujících acetalovou nebo iminovou vazbu³⁰.

Kromě využití jednoduchých amidických či esterových vazeb, byly vyvinuty i sofistikované systémy, které umožňují řízené uvolnění léčiva z kovalentní vazby v konjugátu. Tyto systémy často využívají různých typů spojek („linkerů a spacerů“), které využívají kaskádu reakcí vedoucích k přerušení vazby léčiva na polymer. Mezi takovéto systémy patří například konjugáty využívající k uvolnění léčiva princip benzylové eliminace nebo laktonizace^{7,15}.

Greenwald *et al.*^{7,15} využili těchto principů k přípravě drug delivery systémů pro řadu nízkomolekulárních léčiv, včetně amfotericinu B. V případě systémů, využívajících k uvolnění léčiva mechanismus benzylové eliminace, je k připojení ligandu k polymernímu nosiči využito karamátové vazby, na jejíž tvorbě se podílí primární aminoskupina léčiva. Jako linker je využita molekula *p*-hydroxybenzylalkoholu. Prvním, rychlost určujícím krokem rozpadu konjugátu, je enzymatická reakce, kdy působením krevních hydroláz dochází ke štěpení vazby mezi spojkou a PEGem. Primárně vzniklé prolečivo (spojka–AmB) následně podléhá 1,6-benzylové eliminaci za vzniku chinonmethidu a AmB–karbamátu. Chinonmethid se potom rychle hydratuje a AmB–karbamát se rozpadá na oxid uhličitý a volný AmB^{7,15,45} (Schéma 2).



Rovněž metoda uvolnění léčiva, využívající „trimethyl lock laktonizaci“, našla při přípravě konjugátů poly(ethylenglykolu) s nízkomolekulárními léčivy široké uplatnění⁷. Tento postup byl využit např. při přípravě drug delivery systémů pro cytostatika daunorubicin a cytarabin. Tato léčiva obsahují ve své struktuře primární aminoskupiny, které jsou schopny tvořit amidové vazby s karboxylovou skupinou spojky („spaceru“). Po uvolnění proléčiva (tvořeného spacerem a léčivem) z konjugátu dochází k cyklizační reakci, jejímž výsledkem je rozpad amidické vazby a uvolnění léčiva (Schéma 3).

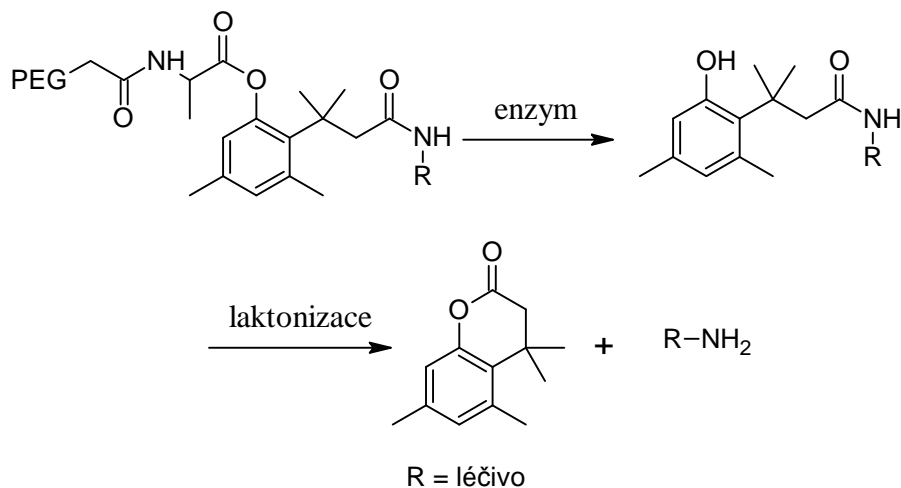


Schéma 3.

V roce 2001 publikovali Sedlák *et al.* konjugát amfotericinu B, ve kterém je 50 mol% AmB vázáno kovalentně karbamátovou vazbou na methoxypoly(ethylenglykol) (mPEG) a zbylých 50 mol% je vázáno nekovalentně¹⁴. Konjugát vykazoval *in vitro* podobné spektrum antimykotické účinnosti jako liposomální a deoxycholátové formy

AmB, ale až desetkrát výhodnější poměr antifungální aktivity a akutní toxicity (LD₅₀) na myši, ve srovnání s klasickou klinicky používanou deoxycholátovou formou AmB.

5.3 Blokové kopolymery poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin)

Blokové kopolymery poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin) hrají výraznou úlohu v oblasti vývoje materiálů pro biomedicínské aplikace. Jejich amfifilní vlastnosti jsou široce využívány při přípravě micel pro systémy s cílenou distribucí léčiv⁴⁶⁻⁴⁸. Další velice významnou oblastí jejich využití je tkáňové inženýrství, kde je využíváno jejich schopnosti tvořit hydrogely⁴⁹. Takovéto materiály jsou využívány k tvorbě scaffoldů – umělých struktur nahrazujících extracelulární matrix podporující růst buněk a tvorbu nové tkáně. Řetězce polyaminokyselin, které jsou součástí těchto blokových kopolymerů, jsou schopny zaujímat i složitější prostorové uspořádání. Za vhodných podmínek jsou tyto řetězce schopny přecházet z konformace náhodného klubka do organizovanějších struktur typu α -helix či β -skládaného listu. Tím dávají vzniknout dalšímu prvku chiralit v systému, čehož lze využít například pro dělení racemických směsí.

Základní přístup k přípravě řetězců polyaminokyselin využívá postup „ring opening“ polymerace *N*-karboxyanhydridů α -aminokyselin (NCA)⁵⁰⁻⁵². Jedná se o sloučeniny, u nichž je zároveň docíleno ochránění primární α -aminoskupiny a aktivace karboxylu⁵¹. V obou případech jsou nově vznikající vazby vysoce reaktivní a celkově se tedy jedná o poměrně nestálé sloučeniny. Nejčastěji jsou připravovány reakcí aminokyselin s fosgenem (nebo látkami sloužícími jako jeho prekurzory – difosgen, trifosgen) v polárních aprotických rozpouštědlech (ethylacetát, THF, DMF, dioxan) za vyloučení vzdušné vlhkosti⁵⁰⁻⁵². V případě, že se ve struktuře aminokyseliny nacházejí, kromě karboxylu a α -aminoskupiny, i další funkční skupiny (např. lysin, threonin, serin či asparagová a glutamová kyselina) je nutno tyto skupiny chránit. K tomuto účelu se využívá běžných chránících skupin používaných při syntéze peptidů (Boc, benzyloxykarbonyl, benzyl apod.)⁵⁰⁻⁵⁵.

Polymerace *N*-karboxyanhydridů může být iniciována nukleofily, popř. bázemi. Nejčastěji jsou využívány primární aminy a alkokidy⁵². Způsob iniciace polymerace je závislý na poměru mezi nukleofilitou a bazicitou iniciátoru. Primární aminy, u nichž převládá nukleofilní charakter, jsou k tomuto účelu využívány nejčastěji.

V literatuře jsou rozlišovány dva základní mechanismy průběhu polymerace *N*-karboxyanhydridů. Prvním z nich je „aminový“ nebo též „karbamátový“ mechanismus⁵². Uplatňuje se zejména v případě, že nukleofilní charakter iniciátoru výrazně převyšuje jeho bazicitu. Tento mechanismus předpokládá nukleofilní atak v pozici „5“ *N*-karboxyanhydridového kruhu. Dochází k otevření pětičlenného kruhu anhydridu. Po dekarboxylaci vznikajícího karbamátu dochází k uvolnění α -aminoskupiny původní aminokyseliny, která se může podílet na propagaci polymerace (Schéma 4)⁵².

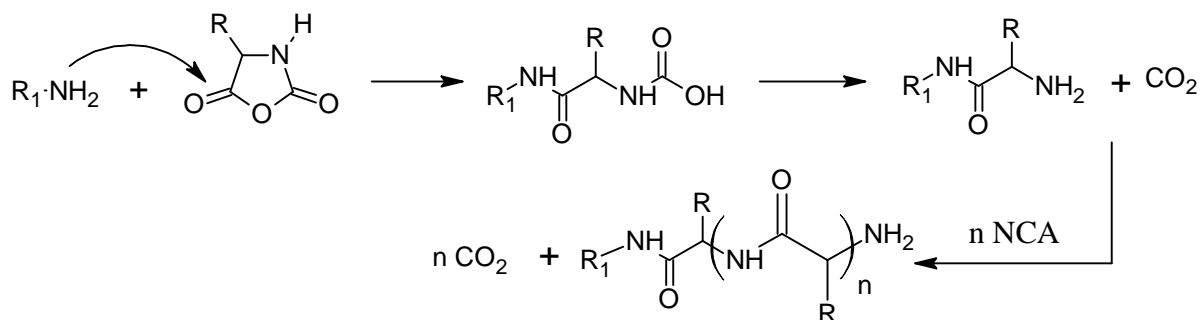
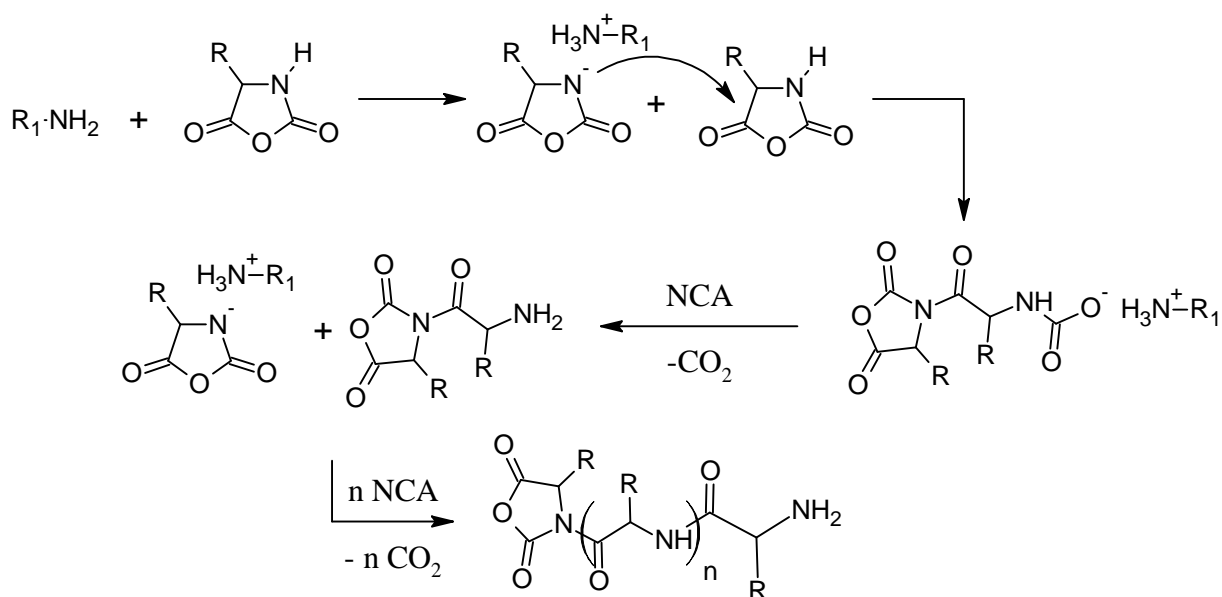


Schéma 4.

Druhý mechanismus, který bývá v literatuře zmiňován, zahrnuje vznik aktivovaného monomeru během iniciace (Schéma 5.)⁵². Tento mechanismus připadá v úvahu při použití silně bazických iniciátorů (alkoxidy, terciární aminy). Ty jsou schopné deprotonovat sekundární dusík v cyklu *N*-karboxyanhydridu, čímž dochází ke vzniku nukleofilní částice, která je schopna atakovat další molekulu NCA. V případě tohoto mechanismu může probíhat propagace polymerace oběma možnými mechanismy. To vede ke vzniku směsí polyamidů se širokou distribucí molekulových hmotností.



V případě přípravy blokových kopolymerů polyaminokyselin a poly(ethylenglykolu) je jako iniciátoru běžně používáno PEGu, jehož koncové hydroxylové skupiny jsou nahrazeny primárními aminoskupinami. Ty slouží jako iniciátor polymerace. V literatuře nalezneme mnoho příkladů syntéz blokových polymerů PEGu s různými typy polyaminokyselin (PEG-polylysin, PEG-polyglutamát, PEG-polyaspartát atd.)^{53,54,56-60}. Polymerace je nejčastěji prováděna v polárních aprotických rozpouštědlech (DMF, acetonitril, dioxan) za mírných podmínek (40 - 60 °C) s vyloučením vzdušné vlhkosti.

5.3.1 Konjugáty blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin) s biologicky aktivními látkami

Blokové kopolymery poly(ethylenglykolu) s poly(aminokyselinami), PEG-*b*-p(AA), jsou často používané nosiče léčiv v systémech s cílenou distribucí^{46,61}. Jejich výhodou je nízká toxicita a biodegradabilita. Ta část kopolymeru, která je tvořena polyamidovým řetězcem, podléhá v organismu enzymatickému štěpení, jehož produktem jsou aminokyseliny⁴⁶. Díky svým amfifilním vlastnostem jsou PEG-*b*-p(AA) schopny tvořit polymerní micely, čehož se široce využívá při formulaci nejrůznějších typů transportních systémů hydrofódních nebo vysoce toxických léčiv⁴⁷. Takovéto polymerní micely napodobují svojí funkcí a strukturou organismu vlastní transportní systémy. Hydrofilní obal, tvořený řetězcem poly(ethylenglykolu), zabraňuje interakcím se strukturami imunitního systému, čímž prodlužuje plazmatické poločasy těchto částic. Malá velikost

těchto micelárních útvarů (≈ 100 nm) snižuje možnost vychytávání retikuloendotelovým systémem a zároveň usnadňuje prostup micel z kapilárního řečiště do tkání, kde může docházet k jejich kumulaci (EPR efekt). Amfifilní charakter micel rovněž napomáhá interakcím s plazmatickými membránami buněk organismu, což hraje roli při prostupu molekul léčiv do nitra buněk, popř. subcelulárních struktur^{48,62}.

Hydrofóbní jádro, tvořené řetězci polyaminokyselin, funguje jako nosič molekul hydrofóbních léčiv. V případě, že se v postranních řetězcích aminokyselin nacházejí vhodné funkční skupiny (aminoskupina, hydroxylová skupina, karboxyl), lze jich využít k tvorbě kovalentních biodegradabilních vazeb s molekulou léčiva. Další možností modifikace těchto skupin je jejich hydrofobizace (např. příprava amidů či esterů mastných kyselin). Takováto změna vede ke zvýšení lipofility jádra micely, což ovlivňuje jak stabilitu micelárního útvaru, tak množství léčiva, jež je micela schopna nést^{56,57,63-65}. Pro tvorbu micel, schopných enkapsulovat molekuly hydrofóbních léčiv, byly rovněž použity PEG-*b*-p(L-Asp) a PEG-*b*-p(L-Glu), jejichž karboxylové skupiny v postranním řetězci byly modifikovány benzylesterem⁵³. Jako léčiva byly v tomto případě použity indometacin³⁸ a doxorubicin. Konjugáty doxorubicinu vykazovaly podobnou aktivitu jako samotné léčivo⁵⁴.

Přítomnost funkčních skupin v postranních řetězcích polyaminokyselin umožňuje připojení léčiva prostřednictvím biodegradabilních kovalentních vazeb. Této vlastnosti bylo využito například při přípravě konjugátu PEG-*b*-p(L-Asp) s adriamycinem^{58,66}. V takovém případě můžeme konjugát považovat za proléčivo, které uvolňuje aktivní látku až po hydrolytickém rozštěpení vazby léčivo – polymer.

Dalším možným využitím PEG-*b*-p(L-AA) je tvorba micel na základě tzv. "polyion komplexu" (PIC)⁵⁹. Jako příklad lze uvést komplexy negativně nabitého kopolymeru PEG-*b*-p(L-Asp) a kladně nabitého PEG-*b*-p(L-Lys). Těchto vlastností lze využít i k interakci PEG-*b*-p(L-AA) s molekulou léčiva, jako v případě komplexu PEG-*b*-p(L-Lys) s oligonukleotidy⁶⁰.

5.3.2 Studium vlivu chirálních polymerů na kinetiku krystalizace racemických směsí aminokyselin

V posledních dvaceti letech neustále roste podíl léčiv, které jako účinné látky využívají čisté enantiomery^{20,67}. Příprava aktivních substancí ve formě čistých enantiomerů a sledování rozdílů v jejich interakcích s organismem se stala běžnou součástí

preklinických studií nově zaváděných léčiv. Proto má hledání nových efektivních metod, umožňujících přípravu biologicky aktivních látek ve formě čistých enantiomerů, popř. metod schopných dělit racemické směsi těchto látek, velký význam pro rozvoj bioorganické a farmaceutické chemie.

Opticky aktivní polymery, přírodní i syntetické, jsou nepřetržitě v centru pozornosti a nacházejí široké uplatnění jako katalyzátory stereoselektivních syntéz, či jako materiál pro přípravu stacionárních fází chirálních kolon pro HPLC^{19,58-61}. Opticky aktivních polymerů lze rovněž využít jako aditiv, která jsou schopna ovlivnit rychlost krystalizace jednotlivých enantiomerů během krystalizace konglomerátů a racemických směsí^{68,69}. Mastai *et al.*⁷⁰ prokázali vliv přítomnosti blokového kopolymeru poly(ethylenglykolu) a poly(ethyleniminu), který nesl opticky aktivní ligandy, na rychlost krystalizace jednotlivých forem tetrahydrátu vlnanu vápenatého. Tato studie prokázala, že přítomnost vhodného chirálního polymeru může zpomalit rychlost vzniku jedné z forem opticky čistých krystalů vlnanu. Efekt přítomnosti opticky aktivního polymeru na rychlost krystalizace jednotlivých forem krystalů je vysvětlován na základě interakce mezi chirální strukturou polymeru a povrchy krystalů. Předpokládá se, že dochází k adsorpci polymeru na povrch krystalu, což vede k ovlivnění rychlosti jeho růstu. Je známo, že opticky aktivní polymery se vyznačují vysokou účinností při dělení racemických směsí, což je pravděpodobně způsobeno jejich schopností tvořit složité, ale pravidelně uspořádané chirální struktury. Nedávno Cölfen *et. al.*⁷¹ popsali syntézu a sekundární strukturu série hydrofilních blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) s krátkými řetězci poly(aminokyselin). Bylo prokázáno, že sekundární strukturu peptidových segmentů těchto kopolymerů je možné ovlivnit teplotou a hodnotou pH. Tyto parametry ovlivňují poměr zastoupení řetězců, které se nacházejí v nepravidleném uspořádání náhodného klubka a těmi, které zaujímají α -helikální konformaci. V současné době je pozornost věnována možnosti využití takovýchto polymerů jako aditiv umožňujících dělení racemátů a racemických směsí krystalizací.

5.4 Antimykotika

V průběhu posledních několika desetiletí významně vzrostla incidence a prevalence těžkých systémových mykotických onemocnění. Závažné život ohrožující mykotické infekce se týkají zejména pacientů oslabených, s nefunkčními nebo narušenými obrannými mechanismy (např. vlivem leukémie, AIDS, podávání cytostatik, imunosupresiv,

širokospektrých antibiotik a antibakteriálních chemoterapeutik). Další rizika přináší paradoxně sám pokrok medicíny. Rozvoj transplantační chirurgie, používání dlouhodobých a trvalých protéz, infuzních kanyl, katetrizace apod. způsobuje poškození přirozených tělesných bariér a umožňuje mikroorganismům průnik do krevního řečiště. Tyto faktory značně rozšiřují počet pacientů vnímavých k vážným mykotickým infekcím.⁷²⁻⁷⁶

Nejčastějšími původci systémových mykóz ze skupiny kvasinek jsou zástupci rodu *Candida*. Infekce způsobené kvasinkou *Candida albicans* jsou nejčastější nozokomiální infekcí a čtvrtou nejčastější infekcí krevního oběhu pacientů na jednotkách intenzivní péče⁷⁷⁻⁸⁰. V posledních letech se rozšířily i non-albicans druhy, jako *C.tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*^{72,81,82}. Nejčastějšími rizikovými faktory, pro rozvinutí onemocnění, jsou léčba širokospektrými antibiotiky, imunosupresivními léky, dále popáleniny, imunodeficience pacienta, katetrizace aj. Klinické příznaky jsou velmi různorodé a nespecifické. Může se vyskytovat kandidúrie, kandidémie, sepse, aj.⁷⁷ Úmrtnost pacientů na kandidózy je 20 – 40 %⁸¹.

Dalším závažným infekčním onemocněním způsobeným kvasinkami je kryptokokóza. Jde o závažné systémové onemocnění, které je způsobené kvasinkou *Cryptococcus neoformans*. Jejím zdrojem je nejčastěji holubí trus. Onemocnění má často asymptomatický průběh, vyskytuje se hlavně u imunoalterovaných pacientů. Nejčastěji se setkáme s kryptokokovou meningitidou, méně často s kožní a plicní formou⁸³.

Z dalších zástupců kvasinek, způsobujících závažné systémové mykotické infekce, lze uvést druhy *Trichosporon asachii*, *Saccharomyces cerevisiae*, a dále příslušníky rodů *Rhodotorula* a *Blastoschizomyces*⁷⁴.

Dalšími závažnými onemocněními způsobenými patogenními houbami jsou aspergilózy. Jedná se o onemocnění způsobená vláknitými houbami rodu *Aspergillus*, zejména druhy *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*⁸⁴. Nejčastěji se jedná o nozokomiální infekce vyskytující se u imunoalterovaných pacientů. Výrazně ohrožují život pacientů po transplantacích, po podávání imunosupresivních léků, po polytraumatech aj. Rizikovým faktorem je zvýšená kontaminace vzduchu spórami, které se do těla dostávají inhalací, nebo kontaktem v místě traumatu. Aspergily vyvolávají zejména onemocnění plic (pulmonální aspergilózu), vzácně aspergilom a někdy i endokarditidu⁸⁵. Úmrtnost pacientů na aspergilózy je 50 – 90 %⁵⁸.

Zygomykózy (mukormykózy) jsou akutní, život ohrožující mykotické infekce, které postihují především imunoalterované pacienty. Původci mukormykóz jsou běžně se

vyskytující vláknité houby třídy Zygomycetes, řádu Mucorales, nejčastější rody *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor* a *Rhizomucor*. Nejčastější formy jsou rhino-orbito-cerebrální (nekrotizující ložiska v obličejových dutinách a na patře, šířící se do mozku), plicní, gastrointestinální, kožní a diseminovaná. Mukormykózy mají velmi špatnou prognózu. I přes intenzivní péči umírá téměř 100 % pacientů, v závislosti na formě mukormykózy a na pacientově primární chorobě⁸⁶⁻⁸⁸.

Farmakoterapie systémových mykóz představuje dosud nevyřešený problém. K dispozici jsou pouze některé azolové preparáty (itrakonazol, flukonazol, vorikonazol, posakonazol, pramikonazol, ravukonazol⁶³, isavukonazole⁸⁹), polyenová antibiotika (amfotericin B a v poslední době i liposomální forma nystatinu), flucytosin a kaspofungin, zástupce nové skupiny echinokandinových antimykotik⁸⁹⁻⁹⁵. Žádné z těchto léčiv ale nesplňuje představy o ideálním antimykotiku, a proto trvá snaha hledat nové strukturní typy antimykotik, nebo snížit toxicitu a zlepšit farmakokinetiku již známých léčiv.

5.4.1 Azolové deriváty

Azolové deriváty jsou jednou z nejvýznamnějších skupin antifungálních léčiv. Zahrnují antimykotika imidazolového typu (mikonazol, klotrimazol), která našla uplatnění při léčbě topických mykóz. Jediným zástupcem antimykotik imidazolového typu, který byl používán i při terapii systémových mykóz, je ketokonazol. Ani ten se však již v této indikaci nepoužívá, protože byl překonán novou generací antimykotik⁷⁷ – triazolovými deriváty. Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny léčiv jsou itrakonazol, flukonazol, vorikonazol, posakonazol, pramikonazol, ravukonazol, isavukonazol⁸⁹. Jedná se o látky se širokým spektrem antifungální aktivity vhodné pro systémové podání. Aplikovat je lze jak, perorálně tak intravenózně.

Mechanismus účinků azolových antimykotik je založen na inhibici biosyntézy ergosterolu, který je významnou součástí buněčných membrán hub. Podobně jako cholesterol v membránách savčích buněk je ergosterol důležitý pro udržení integrity membrán, podílí se na zachování jejich fluidního charakteru a v neposlední řadě se podílí na regulaci jejich růstu a proliferaci. Inhibice probíhá vazbou molekuly léčiva na cytochrom P450 dependentní 14 α -demethylázu⁷⁴. Tento enzym se účastní demethylace lanosterolu na další prekurzor ergosterolu – zymosterol. Azolová antimykotika se prostřednictvím svého triazolového jádra vážou na železnaté kationty obsažené v hemu cytochromu P450. Azolová antimykotika se vyznačují skříženou afinitou vůči savcím

cytochrom dependentním enzymům. I když je jejich aktivita vůči savčím enzymům několikanásobně nižší, má tento jev za následek toxicitu těchto léčiv a podílí se také na vzniku lékových interakcí⁹⁶.

Na vzniku resistance vůči azolovovým antimykotikům se podílí několi mechanismů. Ty zahrnují modifikace lanosterol demethylázy, popř. dalších enzymů podílejících se na biosyntéze ergosterolu. Nositelem informace o struktuře lanosterol demethylázy je gen označovaný jako *ERG11*, jehož mutace může vyvolat změny ve struktuře enzymu, které vedou ke snížení afinity azolů k němu. Stejně tak zvýšená exprese genu *ERG11* a tím vyšší produkce lanosterol demethylázy v buňce může snižovat účinek azolových antimykotik⁹⁷⁻⁹⁹. Dále se na vzniku resistance proti azolovým derivátům podílejí mechanismy, které vedou ke vzniku tzv. „multiple drug resistance“ (MDR)^{100,101}. Tyto mechanismy jsou založeny na přítomnosti membránových přenašečů schopných snižovat koncentraci léčiva v buňce. Nacházíme je v řadě typů prokaryotických¹⁰² a eukaryotických buněk včetně buněk savčích¹⁰³. V případě kvasinek jsou označovány jako "pleiotropic drug resistance" (PDR)⁹⁷. Jedná se o přenašeče patřící do dvou skupin – „ATP-binding cassette transporters“ (ABC) a „proton motive force dependent-major facilitators" (MFS). ABC proteiny jsou rozsáhlá skupina přenašečů, podílejících se na aktivním transportu řady strukturně odlišných látek (proteiny, peptidy, amino kyseliny, cukry, ionty, antibiotika) přes membránu buněk. Energie pro tento děj je získávána hydrolýzou ATP^{97,104}. MFS proteiny využívají pro eliminaci xenobiotik z buňky proton-antiportu a vyskytují se v řadě prokaryotických a eukaryotických buněk^{105,106}. Zvýšená aktivita těchto transportních systémů vede ke snížení koncentrace antimykotika v buňce a poklesu jeho účinnosti.^{97,107}

Flukonazol a itraconazol jsou aktivní vůči *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* a *C. glabrata*. Resistentní vůči fluconazolu je *C. krusei*⁷⁸. Profylaktické dlouhodobé podávání flukonazolu a itraconazolu, např. u HIV pozitivních pacientů, může vést ke vzniku resistance u *C. albicans*^{108,109}. Většina kmenů resistentních na flukonazol vykazuje skříženou resistenci na itraconazol¹⁰⁸. Na rozdíl od itraconazolu nevykazuje flukonazol aktivitu vůči rodu *Aspergillus*⁷⁴. Flukonazol se dobře vstřebává po perorálním podání. Samotný itraconazol se po p.o. podání vstřebává jen v malém množství. Lepších výsledků je dosaženo, podává-li se ve formě perorální suspenze^{77,110}. Průnik přes hematoencefalickou bariéru je vyšší u flukonazolu, itraconazol proniká jen velmi málo. Flukonazol je primárně eliminován především ledvinami, na rozdíl od itraconazolu, který je metabolizován v játrech a v moči jsou přítomna pouhá 2 % nemetabolizovaného

itakonazolu¹¹¹. Z lékových interakcí jsou významné ty, které souvisí se skříženou afinitou azolů vůči savcím CYP enzymům. Pokud je itakonazol podáván ve formě tobolek ovlivňuje jeho absorpci pH. Pro rychle rozpouštění této lékové formy je nutné udržovat žaludeční pH 1-4. Současné podávání antacid, H₂-antihistaminik či blokátorů protonové pumpy může výrazně snížit absorpci itakonazolu. Tomu lze předejít využitím jiných lékových forem, např. perorální suspenze. Absorbce flukonazolu po perorálním podání není závislá na pH^{111,112}.

Vorikonazol je nový triazolový derivát. Má široké spektrum aktivity, je účinný proti kvasinkám rodu *Candida*, včetně *Candida krusei*. Ve srovnání s itakonazolem vykazuje vyšší aktivitu vůči druhům rodu *Aspergillus*¹¹² a dalším plísním, např. rodu *Fusarium*. Vorikonazol se výborně vstřebává po perorálním podání a dobře prostupuje hematoencefalickou bariérou. Je metabolizován játry, v moči je přítomno pouze 1 % nemetabolizovaného léčiva. Podobně jako u flukonazolu není absorpce po perorálním podání závislá na pH¹¹².

Mezi další nadějně triazolové deriváty, které se momentálně nacházejí v různých stupních klinického zkoušení, patří posakonazol, albakonazol a ravikonazol^{77,89}.

5.4.2 Fluoropyrimidiny

Jediným zástupcem této skupiny, který je využíván pro léčbu systémových mykotických onemocnění je 5-fluorocytosin (5-FC). Pro dosažení fungistatického účinku je nutná jeho transformace na 5-fluorouracil (5-FU). Pro tento proces je nezbytná přítomnost enzymu cytosindeaminázy v buňce patogenu^{97,113,114}. Druhy nedisponující tímto enzymem jsou vůči 5-fluorocytosinu resistantní. 5-FU je přeměněn enzymem UMP-pyrofosfatázou na 5-fluorouridin-5'-monofosfát (5-FUMP). Následná fosforylace dává vzniknout 5-fluorouridin-5'-trifosfátu (5-FUTP), který je zabudován do struktury RNA a jeho přítomnost blokuje biosyntézu bílkovin citlivých kmenů. Druhý směr transformace 5-FU vede ve dvou krocích k tvorbě 5-fluoro-2'-deoxyuridin-5'-monofosfátu (5-FdUMP). Ten nahrazuje přirozený substrát (2'-deoxyuridin-5'-monofosfát – dUMP) enzymu thymidylátsyntázy (TS) a tvoří s enzymem a kyselinou tetrahydrolistovou nefunkční komplex. Tím znemožňuje přenos methylové skupiny na dUMP a v důsledku toho se netvoří 2'-deoxythymidin-5'-monofosfát (dTMP), který je po fosforylaci základním stavebním kamenem DNA^{113,114}.

5-FC se především využívá v kombinaci s amfotericinem B při terapii infekcí

způsobených kryptokoky a kandidami. Kombinace s amfotericinem B vede ke snazšímu průniku 5-FC do buněk. To vede k omezení resistance a zároveň rozšíření spektra na původně necitlivé nebo málo citlivé patogeny.¹¹⁵

5.4.3 Echinokandiny

Echinokandiny jsou sekundární metabolity hub obsahující hexapeptidové jádro s postranními lipofilními řetězci. Jedná se o inhibitory syntézy beta-(1-3)-D-glukanu, který je nezbytnou součástí buněčné stěny hub. Echinokandiny se vyznačují fungicidním účinkem a širokým spektrem aktivity. Jedná se o velice nadějnou skupinu léčiv, která může v budoucnosti nahradit amfotericin B při terapii závažných systémových mykóz. Nevýhodou těchto léčiv je potřeba i.v. aplikace¹¹⁶.

Nejdůležitějším zástupcem echinokandinů je kaspofungin. Jedná se o semisyntetický derivát vhodný pro léčbu invazivních kandidóz a aspergilóz^{112,115}. Je možné ho používat v kombinaci s vorikonazolem, itrakonazolem a amfotericinem B. Vyznačuje se malým počtem nežádoucím účinků. Vzhledem k tomu, že nemá vysokou afinitu k enzymům cytochromu P-450, je u něj i nízký výskyt lékových interakcí¹¹⁵. Dalším komerčně dostupným zástupcem této skupiny je micafungin. Jeho spektrum zahrnuje zástupce rodů *Candida*, *Aspergillus* a některé dimorfní houby. Dalším zástupcem této skupiny antimykotik je např. anidulafungin⁸⁹. Jedná se rovněž semisyntetický derivát, který se v současnosti nachází ve fázi klinického zkoušení¹¹⁷.

5.4.4 Allylaminy

Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou terbinafin a naftifin. Allylaminy, podobně jako azolové deriváty, blokují biosyntézu ergosterolu. Na rozdíl od azolů ale inhibují enzym skvalenepoxidázu, nezbytný pro oxidaci skvalenu, a skvalen-2,3-epoxid, který je následně působením skvalencyklázy přeměněn na lanosterol⁹⁷. Epoxidace skvalenu je rovněž důležitým krokem při biosyntéze cholesterolu v savčích buňkách. Jak terbinafin, tak naftifin však vykazují jen nízkou aktivitu vůči skvalenepoxidáze přítomné v savčích buňkách.⁹⁶

5.4.5 Polyenová antibiotika

Polyenové makrolidy způsobily ve své době převrat v léčbě mykóz. Až do roku 1950 neexistovala žádná bezpečná a kauzální terapie systémových a invazivních mykóz.

Teprve objev nystatinu a amfotericinu v 50. letech^{74,75} ukázal nové možnosti léčby mykotických infekcí.

Polyenová antibiotika jsou přírodní látky produkované půdními aktinomycetami, zejména rodu *Streptomyces*. Jedná se o velmi rozsáhlou skupinu látek. Dosud bylo objeveno víc než 200 polyenových antibiotik, ale do praktického použití v antifungální terapii se dostaly jen amfotericin B, nystatin, kandacidin a pimaricin⁷⁹.

Polyenová antimykotika jsou jednou ze dvou podskupin makrolidových antibiotik. Jedná se o amfifilní molekuly obsahující rigidní lipofilní část a flexibilní hydrofilní část. Na rozdíl od antibakteriálních makrolidů, kam patří například erythromycin, jsou polyenové makrolidy tvořené podstatně větším laktonovým kruhem (o 26 až 40 atomech). Rigidní, planární část laktonového kruhu, nazývaná chromofor, je lipofilní a obsahuje několik konjugovaných dvojných vazeb (3–7). Podle jejich počtu se polyenová antimykotika dělí na trieny, tetraeny, pentaeny, hexaeny, heptaeny¹¹⁸:

tetraeny: amfotericin A¹¹⁹, antimykoin A, endomycin A, chromin, nystatin, rimocidin, tetrin A, tetrin B, natamycin

pentaeny: eurocidin, filipin, fungichromin, kapacidin

hexaeny: dermostatin, flavacid, kryptocidin

heptaeny: hachimycin, hamycin, kandacidin, kandidin, kandimycin, perimycin, amfotericin B

Přítomnost chromoforu má za následek typické absorpční spektrum v ultrafialové oblasti, které obsahuje tři charakteristická absorpční maxima, a také některé fyzikální a chemické vlastnosti, např. fotolabilitu a špatnou rozpustnost ve vodě^{120,121}. Druhá část laktonového kruhu je substituována polárními skupinami (hydroxyskupina, karboxylová skupina, epoxidová skupina). Na makrocyclický laktonový kruh je obvykle navázána jedna nebo více sacharidových jednotek, připojených glykosidickou vazbou k uhlíku sousedícímu s chromoforem. Ve většině případů se jedná o mykosamin (3-amino-3,6-dideoxy-D-mannosa), pouze výjimečně o jeho izomer perosamin (4-amino-4,6-dideoxy-D-mannosa) nebo neutrální monosacharid 2,6-dideoxy-L-ribohexopyranosu. Důležitou funkční skupinou polyenových antibiotik je karboxylová skupina, obvykle navázaná na čtvrtý atom uhlíku od chromoforu. Tato karboxylová skupina i aminoskupina aminosacharidu jsou ionizovatelné a mohou se účastnit řady intra- nebo intermolekulárních interakcí⁷³. Epoxidový můstek, pokud jej molekula obsahuje, se nachází v blízkosti karboxylové skupiny. Některá polyenová antibiotika (např. kandacidin) obsahují ještě

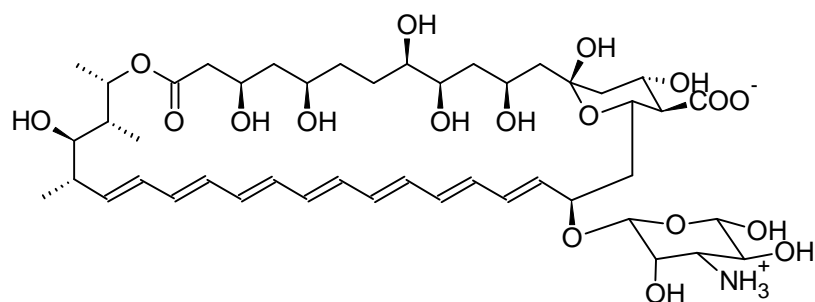
aromatickou část, situovanou na opačné straně laktonového kruhu než karboxylová skupina^{118,122}. Biosyntéza polyenových antibiotik je podrobně popsána v řadě publikací. Základním procesem, probíhajícím během jejich biosyntézy, je kondenzace acetátu, propionátu a mastných kyselin polyketidovou cestou^{73,122}.

Hlavním mechanismem antifungální aktivity i většiny toxických účinků polyenových antibiotik je interakce se steroly biologických membrán, která má za následek změny v jejich permeabilitě a následně smrt buňky. Použitelnost polyenových antibiotik v antifungální terapii souvisí s jejich rozdílnou afinitou k ergosterolu, který se nachází v membránách hub, a cholesterolu, přítomnému v membránách živočišných buněk. Polyeny s menším makrolidovým kruhem (např. filipin) se vážou mnohem ochotněji k cholesterolu než k ergosterolu, zatímco u polyenů s velkým makrolidovým kruhem (např. amfotericin B) je mnohem vyšší afinita k ergosterolu než k cholesterolu¹²³. Pouze takové látky mohou být terapeuticky využitelné. Polyenová antibiotika sice mají široké spektrum antifungálního účinku a malý výskyt rezistentních patogenů¹²⁴, ale jsou značně toxická, s mnoha vážnými vedlejšími účinky, zejména při nitrožilním podání. Další problémy při terapeutickém použití těchto látek vyplývají z jejich nevýhodných fyzikálně-chemických a chemických vlastností, jako je velmi nízká rozpustnost ve vodě a malá stabilita, zejména fotolabilita¹²⁵.

5.4.5.1 AMFOTERICIN B

Struktura a mechanismus účinku

Amfotericin B (AmB), produkovaný půdní aktinomycetou *Streptomyces nodosus*, byl donedávna jediným zástupcem polyenových antibiotik, použitelným v terapii systémových mykóz. Jedná se o heptaen s 38-členným laktonovým kruhem, na který je navázán aminosacharid mykosamin^{73,118,126}. Amfotericin B je sloučenina velmi špatně rozpustná ve vodě, kde tvoří micely, popř. další typy agregátů¹²⁵. Dimery vznikají hydrofobními interakcemi polyenových oblastí v sousedních monomerech. Ve vodných roztocích se mohou vytvářet až oktamery^{127,128}.



Amfotericin B

Fungicidní efekt polyenových antibiotik je založen zejména na tvorbě transmembránových kanálů, kterými mohou prostupovat ionty (především Na^+ a K^+). Tím dochází k dramatickému snížení intracelulárního pH, které má za následek řadu dalších změn (precipitace subcelulárních struktur aj.) a nakonec buněčnou smrt^{73,89,106,112,128}. Mechanismus poškození buněčných membrán polyenovými antibiotiky byl podrobně studován na erythrocytech^{124,128,129}. Dalším mechanismem účinku amfotericinu B je peroxidace membránových struktur volnými radikály s následnou alterací jejich stability a fluidity, jak rovněž vyplynulo ze studií na membránách erythrocytů^{130,131}.

Studiem interakcí amfotericinu B s membránami v přítomnosti či nepřítomnosti sterolů se podrobně zabývala řada autorů¹³²⁻¹⁴⁰. Milhaud a spolupracovníci zjistili, že v nepřítomnosti sterolů zůstávají agregáty amfotericinu B na povrchu fosfolipidové dvojvrstvy, zatímco teprve u membrán s obsahem ergosterolu dochází k proniknutí antibiotika dovnitř membrány a vytvoření kanálu. V případě AmB se předpokládá, že vzniklý kanál je tvořen celkem osmi molekulami léčiva¹³³. Jejich chromoforová část je orientována tak, aby mohla interagovat se steroly přítomnými v membráně, hydrofilní polyolový řetězec je orientován do středu kanálu. Hydrofilní hlava molekuly (tvořená hemiketalovým kruhem a cukernou složkou) je rovněž orientována do hydrofilního prostředí vně membrány. Naopak lipofilní část molekuly, obsahující methylové skupiny na uhlících 34, 36 a 37, je orientována do lipofilního středu membrány. Tento model odpovídá interakci molekul léčiva s jednovrstvou membránou^{132,134}. V případě skutečných biologických membrán ovšem musíme uvažovat o interakci s dvouvrstvou fosfolipidovou membránou. V tomto případě se předpokládá, že dojde ke zdvojení této struktury, čímž dojde ke vzniku dostatečně dlouhého kanálu, který prostupuje celou šířkou membrány¹³². U jiných polyenových antibiotik počet molekul, zapojených do tvorby kanálu, kolísá od 3-17.

Ze studia aktivit různých derivátů polyenových antibiotik vyplynulo, že jejich účinnost a toxicitu ovlivňuje charakter přítomného polyenového řetězce a dále modifikace karboxylové skupiny, přítomné na hemiketalovém kruhu, a aminoskupiny cukerné složky^{122,141,142}.

Z porovnání aktivit nystatinu, AmB a AmA₁ (analog AmB s polyenovým řetězcem totožným s nystatinem) vyplynulo, že přítomnost sedmi konjugovaných dvojných vazeb zvyšuje aktivitu *in vitro*. Příčinou je pravděpodobně vyšší afinita heptaenů vůči sterolům⁷³.

Esterifikace karboxylové skupiny hemikatalového kruhu vedla k výraznému poklesu hemolytické aktivity derivátů polyenových antibiotik, ale jen k poměrně malému poklesu aktivity antifungální¹⁴³. Naproti tomu acetylace aminoskupiny měla jen malý vliv na toxické účinky polyenových antibiotik, zatímco výrazně snížila aktivitu vůči houbám¹⁴². Tento jev je vysvětlován tvorbou vodíkových můstků mezi aminoskupinou cukerné složky polyenového antibiotika a 3-β-OH skupinou sterolů. Na vzniku této interakce se významně podílí přítomnost ionizovatelné volné karboxylové skupiny v molekule antibiotika, která prostřednictvím elektrostatických interakcí s aminoskupinou fixuje cukernou složku ve specifické poloze, což usnadňuje tvorbu vodíkového můstku s 3-β-OH skupinou sterolu. Naproti tomu esterifikace karboxylu zvyšuje pohyblivost cukerné složky a znesnadňuje tak interakci mezi sterolem a aminoskupinou. Síla vazby mezi molekulou antibiotika a sterolu je tak mnohem více určována vznikem hydrofobních interakcí mezi molekulou antibiotika a sterolem. Vzhledem ke struktuře postranních řetězců cholesterolu a ergosterolu vznikají silnější hydrofobní interakce s molekulou ergosterolu^{135,143-145}.

Terapeutické využití amfotericinu B je založené na skutečnosti, že amfotericin B má vyšší afinitu k ergosterolu, který je hlavním zástupcem sterolů v buněčných membránách hub, než k cholesterolu, přítomnému v buněčných membránách savčích buněk. Pomocí molekulového modelování bylo zjištěno, že interakce mezi amfotericinem B a ergosterolem jsou specifitější a vzniklý kanál je širší, než při interakci AmB s cholesterolem¹³⁴. Ještě vyšší afinitu má však AmB k 7-dehydrocholesterolu¹³⁵. Amfotericin B vykazuje také silnou afinitu k plazmatickým LDL-lipoproteinům¹³⁹. K bližšímu objasnění interakcí AmB s membránami byly syntetizovány kovalentní konjugáty AmB s fosfolipidy¹⁴² a steroly.¹³⁶ Modelové konjugáty amfotericinu B s ergosterolem permeabilizovaly membrány daleko silněji než analogické konjugáty s cholesterolem^{136,146}.

Farmakokinetika a vedlejší účinky

Samotný amfotericin B má natolik nevýhodné vlastnosti, že se nehodí pro systémovou terapii. Je prakticky nerozpustný ve vodě a nevstřebává se z trávicího traktu. Obvykle používanou formou je deoxycholát (AMBD)¹⁴⁷, podávaný intravenózně pomalou infuzí. Velká část podaného AmB se deponuje ve tkáních, především v tukové tkáni, ze které se pomalu uvolňuje do krve. Pro kandidové infekce je většinou dostačující dávka 0,5 – 0,75 mg/kg/den. Pro infekce vláknitými houbami jsou nutné vyšší dávky 1 – 1,5 mg/kg/den. Amfotericin B se pomalu vylučuje ledvinami a žlučí.¹⁴⁸

Amfotericin B je poměrně toxické léčivo vykazující akutní i chronickou toxicitu¹⁴⁹. Akutní toxicita (během infuze nebo do 60-180 minut po zahájení léčby) zahrnuje projevy jako je horečka, třesavka, rigor, nauzea a zvracení, bolesti hlavy, svalstva a kloubů, koliky, průjem. Mnohé z těchto nežádoucích účinků souvisejí s expresí několika genů kódujících syntézu cytokinů a chemokinů (PGE2, TNF a IL-1)^{147,150}. Riziko těchto reakcí je možné snížit zpomalením infuze nebo premedikací¹⁵¹. Nejzávažnější chronickou toxicitou je nefrotoxicita (glomerulární i tubulární poškození) až selhání ledvin^{150,152}. Vážné komplikace po podání AmB, zejména nefrotoxicita a riziko poškození jater nebo CNS, limitují denní dávku na 1,5 mg/kg¹⁵³. Rizikovými faktory nefrotoxicity jsou velikost denní dávky, trvání léčby, chronické renální onemocnění a současné užívání jiných nefrotoxických léků. Nefrotoxicita může být vratná nebo nevratná. Je-li celková dávka menší než 2 g, nastává jen minimální poškození ledvin. Celková dávka 2-4 g způsobuje reverzibilní poškození u 50% pacientů, nad 5 g nastanou ireverzibilní změny u 80%. Vlivem poškození ledvin může sekundárně dojít k narušení minerálního metabolismu. Vznik nefrotoxicity je ovlivněn redistribucí molekul léčiva mezi HDL a LDL cholesterolem v krevní plazmě. Zejména vyšší hladina komplexu AmB-LDL cholesterol se jeví jako rizikový faktor, který zvyšuje pravděpodobnost poškození ledvin¹⁵⁴. Vzácnější jsou poruchy jater¹⁵³, poškození pankreatu¹⁵⁵, kostní dřeně nebo hemolytická normocytární normochromní anémie. Její příčinou je inhibice tvorby erytropoetinu v důsledku poškození ledvin. Riziko poškození ledvin se dá snížit hydratací, suplementací minerálů, ale i pomalou či kontinuální infuzí namísto obvyklého podání stejné dávky během 2–6h¹⁵¹.

Antifungální aktivita

Amfotericin B má široké spektrum antifungálního účinku (viz tab. 1), které zahrnuje prakticky všechny patogenní mikromycety, jako dimorfní houby, aspergily, kvasinky včetně kryptokoků, zygomycety aj.¹⁵⁶. Rezistence na amfotericin B může být

primární nebo sekundární. Mezi druhy, primárně rezistentní vůči AmB, patří například kvasinky *Trichosporon beigelii*, některé dermatofyty a vláknité houby, například rod *Fusarium* a jiné¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Sekundární rezistence na amfotericin B se naštěstí vyskytují poměrně zřídka^{159,160}. Může jít o kombinaci různých mechanismů. U rezistentních kmenů byly prokázány kvantitativní i kvalitativní změny v zastoupení membránových sterolů (pokles koncentrace ergosterolu, maskování či změna orientace molekul již existujícího ergosterolu, nahrazení biosyntézy ergosterolu biosyntézou jiných sterolů, ke kterým má amfotericin B mnohem menší afinitu než k ergosterolu)^{157,158}. Byla také prokázána alterace složení buněčné stěny, kdy peptidoglykany mutantního kmene *A. flavus* inhibovaly vstup AmB přes buněčnou stěnu¹⁶⁰. Agarwal a kol. podrobně popsali genovou expresi u *C. albicans* a *S. cerevisiae* po aplikaci amfotericinu B a dalších látek¹⁶¹. Rezistence k amfotericinu B bývá také spojena s tvorbou biofilmů, například na zavedených katetech¹⁶².

Tabulka 1: Antifungální spektrum polyenových antibiotik amfotericinu B a nystatinu in vitro (převzato z lit.⁷⁴)

Třída a rod	MIC ₉₀ (mg/l)					
	AMBD ^a	NYS ^b	ABCD ^c	ABLCL ^d	LAMB ^e	LNYS ^f
Klinicky důležité kvasinky						
<i>Candida albicans</i>	0.25-1	0.25-4	1	0.25-1	0.125-1	0.125-2
<i>Candida dubliniensis</i>	1		0.25	0.03-0.25	0.25	0.5
<i>Candida glabrata</i>	1-1.25	1-2.5	1-10	0.062-1.25	2-10	1.25-2
<i>Candida guilliermondii</i>	1-2	4	1	0.5-4	2	2
<i>Candida krusei</i>	2	4	2	>16	>16	4
<i>Candida lusitanae</i>	0.5	2	0.5	0.125-0.5	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	0.62-1	0.31-4	0.62-1	0.62-1	0.25-2	0.62-2
<i>Candida tropicalis</i>	0.62-1	1.25-4	1.25-1	0.62-4	1.25-1	1.25-2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.25	0.5	0.5	0.062-0.5	0.5	0.5
<i>Trichosporon spp.</i>	0.5-1	0.03-2	1	0.25-0.5	1	1
Klinicky důležité vláknité houby						
<i>Absidia spp.</i>	0.25	0.25-1	1	0.125	0.125-1	0.125
<i>Aspergillus flavus</i>	2	4	16	16	16	4
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	2	1	2	0.5-2	4
<i>Aspergillus niger</i>	1	4	1	1	0.5-1	4
<i>Aspergillus terreus</i>	1-4			1	2->16	
<i>Fusarium spp.</i>	0.5->16			>16	4->16	
<i>Mucor spp.</i>	0.5-2					
<i>Rhizomucor spp.</i>	0.5-2					
<i>Rhizopus spp.</i>	0.5-2			1-2	1-2	

^aAMBD: Amfotericin B deoxycholát

^bNYS: Nystatin

^cABCD: koloidní disperze amfotericinu B

^dABLCL: Lipidový komplex amfotericinu B

^eLAMB: Liposomální amfotericin B

^fLNYS: Liposomální nystatin

Jiné biologické účinky amfotericinu B

Kromě antifungální aktivity vykazuje amfotericin B i jiné účinky. V kombinaci s tetracyklinem se používá při léčbě chlorelózy, pseudofungální infekce způsobené řasou *Chlorella vulgaris*^{163,164}. Je účinný i u některých protozoálních infekcí, např. viscerální leishmaniázy (kala-azar, těžké onemocnění vyvolané prvoky rodu *Leishmania*). V této indikaci je však kvůli své toxicitě využíván jako léčivo 2. linie. Nedávno byla vyvinuta nanosuspenze AmB, umožňující perorální podání amfotericinu B. Silná adheze ke gastrointestinální sliznici umožňuje vstřebání amfotericinu B^{165,166}. Tento výsledek se jeví jako velmi zajímavý, protože naznačuje, že v budoucnu by mohla být nalezena perorální forma amfotericinu B i pro antifungální terapii.

Již v 70. letech bylo zjištěno, že AmB a jeho deriváty (např. methylester) inhibují proliferaci virů s lipidovým obalem (např. herpesviry, viry způsobující vesikulární stomatitidy)¹⁶⁷. Po vypuknutí epidemie HIV/AIDS bylo potvrzeno, že AmB a jeho deriváty mohou inhibovat replikaci HIV virů *in vitro*. Polyenová antibiotika inhibují replikaci viru HIV v takových koncentracích, které ještě neovlivňují životaschopnost buněk, a proto by mohla přispět k novým možnostem terapie AIDS¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

Bylo zjištěno, že podání AmB může prodloužit inkubační dobu prionových onemocnění tím, že zpomaluje replikaci prionů. Prionové nákazy se vyznačují hromaděním abnormálních zbytků isoform prionových proteinů PrPSc v mozku. Na rozdíl od normálního proteinu je tato isoforma rezistentní k proteinkináze K a je nerozpustná. Prionové nákazy mají za následek fatální neurodegenerativní poruchy, např. spongiformní encefalopatie (transmissible spongiform encephalopathies, TSE). Experimenty *in vitro* ukázaly, že AmB v nízkých koncentracích zlepšuje rozpustnost a snižuje proteázovou rezistenci PrPSc. I pozdní podání AmB může výrazně prodloužit přežití TSE-infikovaných zvířat. Toxicita AmB sice brání jeho používání v této indikaci, ale mohly by být využity některé méně toxické deriváty AmB¹⁷⁰⁻¹⁷².

V souvislosti s nálezem vysoké afinity amfotericinu B k 7-dehydrocholesterolu byla nedávno navržena možnost využití polyenových antibiotik v terapii hepatocelulárního karcinomu po předchozím podávání diety bohaté na cholesterol, která by měla zablokovat biosyntézu cholesterolu ve zdravých buňkách. Protože rakovinné buňky postrádají regulaci biosyntézy cholesterolu, mohou se v jejich membránách hromadit, po podání vhodných inhibitorů biosyntézy cholesterolu, jeho prekurzory (7-dehydrocholesterol). Následně podaná polyenová antibiotika by měla rakovinné buňky selektivně likvidovat¹³⁵.

Semisyntetické modifikace AmB

V minulosti byla hledána řada cest ke snížení toxicity, zlepšení chemicko-fyzikálních a farmakokinetických vlastností AmB při zachování jeho biologické aktivity. Jedním z možných řešení je příprava semisyntetických derivátů.

Studiem mechanismu interakcí mezi AmB s membránami, obsahujícími různé typy sterolů, byl prokázán zásadní vliv typu asociace molekul polyenu v mediu na afinitu vůči jednotlivým typům membrán. Pokud se molekuly léčiva vyskytovaly ve formě rozpustných agregátů, byly schopny interagovat s membránami, které obsahovaly cholesterol, a stejně tak s membránami obsahujícími ergosterol. Naopak monomerní forma léčiva vykazovala vysokou afinitu vůči membránám obsahujícím ergosterol, a jen velmi nízkou afinitu vůči membránám s obsahem cholesterolu^{173,174}. Na základě těchto poznatků byl vytvořen závěr, že chemická modifikace struktury AmB, vedoucí k potlačení tvorby agregátů molekul léčiva, povede ke zvýšení selektivní toxicity vůči buňkám, v jejichž membráně je přítomem ergosterol. V kombinaci s dalšími poznatky o vztazích struktura-účinek AmB byl syntetizován derivát methylester *N*-Methyl-*N*-D-fruktosylamfotericinu B (MFAME). Esterifikace exocyklické karboxylové funkční skupiny AmB, spolu se substitucí aninoskupiny přítomné ve struktuře mykosaminu vedla k potlačení tvorby agregátů a zároveň k výraznému zvýšení rozpustnosti ve vodě. Aktivita nově připraveného derivátu byla srovnatelná s původním léčivem, došlo ovšem k výraznému nárůstu selektivity účinku a tím i poklesu toxicity¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Lipidové a další transportní formy AmB

Během posledních desetiletí byla připravena řada transportních forem AmB, které mají za úkol zlepšit jeho farmakokinetický a toxikologický profil. Jednou z cest je příprava lipidových komplexů AmB s fosfolipidy, popř. jinými povrchově aktivními látkami¹⁷⁸.

Příkladem takové lékové formy je liposomální forma AmB. Liposomy jsou mikročástice – vesikuly tvořené fosfolipidovou membránou. Molekuly léčiva jsou kumulovány uvnitř této membrány. Vzhledem k vyšší afinitě AmB k ergosterolu je léčivo schopno přestupu ze struktury liposomu do buněčné membrány a zároveň je značně omezena možnost interakce s cholesterolem přítomným v buňkách savčích buněk. Na uvolnění léčiva z fosfolipidové dvojvrstvy se podílí i extracelulární fosfolipáza produkovaná buňkami hub. Tyto mechanismy se tak podílí na pasivním targetingu léčiva a snížení jeho toxicity. Příkladem takové formy je AmBisome[®]. Klasické liposomy jsou tvořeny fosfolipidovou dvojvrstvou, ale v případě formulace AmBisome[®] je použito

vesikulů, jejichž membrána je pouze jednovrstevná¹⁷⁹. Tato vrstva je tvořena směsí fosfatidylcholinu, cholesterolu a distearoyl fosfatidylglycerolu. Liposomální formy amfotericinu B nacházejí uplatnění při léčbě invazivních mykotických onemocnění a umožňují i využívání nových aplikačních cest léčiva, jakou je např. inhalace¹⁸⁰.

Dalším typem lipidových forem AmB jsou jeho koloidní disperze. Zástupcem této skupiny je Amphocil® (ABCD). Jedná se o disperzi AmB a cholesteryl sulfátu, které jsou společně schopny tvořit micely ve tvaru disku. Při podávání stejných dávek je ABCD proti AmB-deoxycholátu zhruba 2-5krát méně efektivní, současně však 5-8krát méně toxický. Vyšší terapeutický index ABCD tak umožní podat vyšší dávky, a proto je léčba účinnější. Po i.v. aplikaci se micely ABCD prakticky neváží na plazmatické bílkoviny ani na membrány krevních buněk. Částice Amphocilu® jsou rychle vychytávány buňkami RES a dochází k jejich kumulaci v játrech, slezině, kostní dřeni a kapilárách plic. Předpokládá se, že v RES dochází postupně k uvolnění AmB z vazby na cholesteryl fosfát. Následně dochází k uvolnění zpět do krevního řečiště a redistribuci léčiva^{181,182}. K uvolnění léčiva dochází postupně, čímž je vytvořena stálá hladina koncentrace v plazmě. Nižší plazmatické koncentrace volného AmB přispívají k potlačení nefrotoxicity léčiva^{183,184}.

Abelcet® (ABLC) je dalším zástupcem lipidových forem AmB. Jedná se o komplex AmB s dimyristoylfosfatidylcholinem a dimyristoylfosfatidylglycerolem¹⁷⁹. Podobně jako předešlé transportní formy vykazuje výrazně vyšší afinitu k ergosterolu fungálních membrán než k cholesterolu, který je složkou savčích buněčných membrán. Obdobně jako v případě ABCD jsou lipidové částice rychle zachytávány buňkami RES. Vysoká afinita k ergosterolu, rychlý odsun z plazmy a nižší maximální koncentrace v krvi jsou podstatou nižší nefrotoxicity. Ve stejných dávkách je 2-4krát méně účinný než konvenční AmB, nižší nefrotoxicita však umožňuje podání vyšších dávek ABLC. Výskytem akutních projevů toxicity se od konvenčního amfotericinu B příliš neliší^{178,179,181}.

Alternativním přístupem k přípravě transportních forem AmB je příprava lipidových mikroemulzí. Často je využíváno lipidových emulzí sloužících k parenterální výživě (Intralipid®, Lipofungin®). Příkladem takové lékové formy je FImax® tvořený kombinací Intralipidu® a AmB. Obdobně jako v případě lipidových forem vede využití této lékové formy k rozšíření terapeutického indexu AmB^{185,186,187}.

Další možností jak změnit fyzikálně-chemické vlastnosti AmB je změna typu agregace jeho molekul. Toho lze docílit např. zahříváním roztoku AmB po dobu 20 minut na 70 °C a následným ochlazením na laboratorní teplotu. Tento proces vede ke změně

v poměrech mezi koncentracemi monomerní a agregované formy léčiva. Pokles toxicity je pravděpodobně způsoben nižší schopností upraveného AmB indukovat produkci cytokinů a chemokinů. Tato finančně nenáročná úprava neovlivňuje antifungální aktivitu léčiva, významně však snižuje jeho toxicitu vůči savčím buňkám¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

Využití syntetických polymerů a jejich blokových kopolymerů umožňuje přípravu micelárních útvarů, sloužících k cílené distribuci AmB. K přípravě micel, vhodných pro transport AmB, bylo využito blokového kopolymeru poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L-aspartát). Postranní řetězce aminokyselin byly hydrofobizovány, tak aby tato část kopolymeru byla schopna tvořit hydrofóbní jádro micely, které je schopno nést molekuly hydrofobního léčiva^{64,191,192}. Dalším příkladem využití syntetických blokových kopolymerů je příprava micel tvořených poly(ethylenglykol)-*blok*-(ϵ -kaprolakton-*co*-trimethylkarbonátu).¹⁹³

Kromě lipidových a micelárních forem AmB, ve kterých jsou molekuly léčiva vázány na základě nekovalentních interakcí, byly připraveny i konjugáty s polymerními hydrofilními nosiči, ve kterých je molekula léčiva vázána kovalentní vazbou. Příkladem může být konjugát AmB s arabinogalaktanem. Polysacharid byl nejprve parciálně oxidován. Molekuly léčiva byly poté připojeny prostřednictvím iminových vazeb, vznikajících mezi aldehydickými skupinami polysacharidu a aminoskupinou přítomnou v mykosaminu AmB. Připravený konjugát vykazoval dobrou rozpustnost ve vodě, sníženou hemolytickou aktivitu a toxicitu při zachování aktivity proti původcům leishmaniózy. Rovněž antifungální aktivita *in vitro* byla zachována^{16,194,195}.

Ve spolupráci Farmaceutické fakulty UK a Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice jsou intenzivně studovány polymerní konjugáty amfotericinu B, které by mohly mít podobně jako lipidové formy pozměněnou farmakokinetiku a sníženou toxicitu. Jako první byl syntetizován konjugát amfotericinu B s α -methoxypoly(ethylenglykolem) (Schéma 6.). V něm je AmB částečně (z 50 %) navázán prostřednictvím kovalentní karbamátové vazby a zbytek je vázán pomocí nekovalentních interakcí.

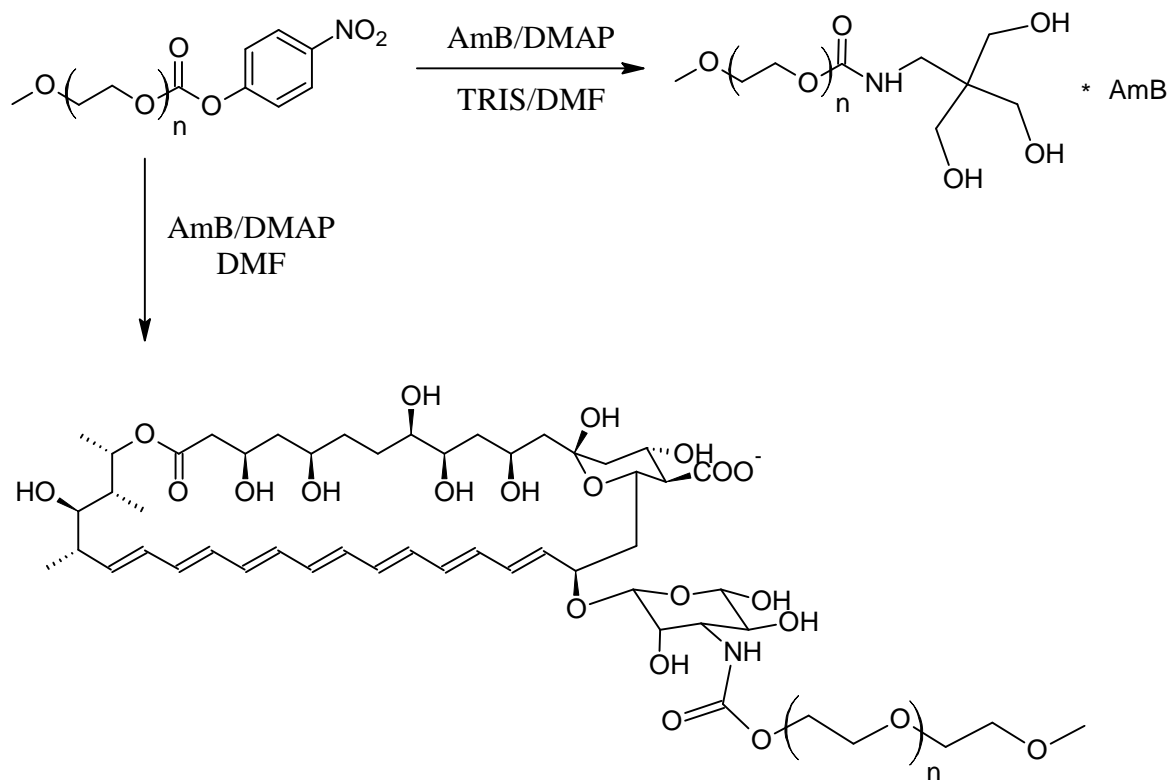


Schéma 6.

Tento konjugát je dobře rozpustný ve vodě, srovnatelně toxický jako AmB-deoxycholát používaný v terapii, ale *in vitro* je několikanásobně účinnější proti většině testovaných kmenů hub¹⁴. Podobných výsledků bylo později dosaženo v zahraničí u konjugátů amfotericinu B s poly(ethylenglykoly), obsahujících v molekule spojovací články mezi léčivem a polymerem¹⁵.

6. Metodická část

6.1 Příprava polymerních nosičů na bázi modifikovaných poly(ethylenglykolů) pro distribuci Amfotericinu B

Na rozdíl od vysokomolekulárních léčiv (např. enzymy) vede permanentní konjugace nízkomolekulárních léčiv s poly(ethylenglykolem) často k výraznému snížení, nebo dokonce ke ztrátě biologické aktivity⁷. Přítomnost objemného polymerního řetězce může bránit interakci molekuly léčiva se specifickými buněčnými strukturami (např. receptory) a tím znemožňuje jeho farmakodynamické působení.

V rámci této práce byla pozornost zaměřena na přípravu konjugátu AmB s modifikovanými poly(ethylenglykoly), v jejichž struktuře se nachází aldehydová funkční skupina. Její přítomnost umožňuje vznik acidolabilní iminové vazby mezi molekulou polymerního nosiče a aminoskupinou mykosaminu – cukerné složky AmB. Systém byl navrhován tak, aby k rozštěpení této vazby a uvolnění účinné látky docházelo specificky v místě snížené hodnoty pH, jaká se vyskytuje například v místě zánětu způsobeného napadením mikroorganismy^{196,197}.

Zásadní nevýhodou při přípravě konjugátů lineárních poly(ethylenglykolů) s nízkomolekulárními ligandy je nízká kapacita nosiče (pouze dvě reaktivní funkční skupiny). Tomuto problému lze předejít přípravou rozvětvených poly(ethylenglykolů), nebo přípravou blokových polymerů PEGu s polymerem, které ve své struktuře nesou větší množství funkčních skupin přístupných derivatizaci. Jedním z možných přístupů je příprava blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) s poly(aminokyselinami). Vhodnou volbou výchozí aminokyseliny lze do struktury polymeru zavést větší množství reaktivních skupin, které se mohou podílet na tvorbě vazby s molekulou léčiva. Za tímto účelem byl připraven blokový kopolymer poly(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -lysin).

6.1.1 Příprava modifikovaných poly(ethylenglykolů)

Příprava polymerních nosičů na bázi poly(ethylenglykolu) byl první úkol, který byl během přípravy nových konjugátů AmB řešen. Cílem bylo zavést do molekuly polymeru aldehydickou funkční skupinu schopnou vytvořit iminovou vazbu s primárními aminoskupinami léčiva. V minulosti bylo v literatuře popsáno několik technik vedoucích

k poly(ethylenglykolům), jejichž koncové hydroxylové skupiny byly modifikovány obdobným způsobem. Jedním z možných způsobů je řízená oxidace těchto hydroxylů pomocí mírných oxidačních činidel (např. MnO_2)¹⁹⁸. Při pegylaci proteinů bylo v minulosti s úspěchem využito 3-poly(ethylenglykolyloxy)propionaldehydu, který byl připravován reakcí diethyl acetalu 3-chloropropionaldehydu s alkokidem poly(ethylenglykolu)³⁵.

Pro vypracování metodiky přípravy polymerních nosičů byl vybrán α -methoxypoly(ethylenglykol) o $M_w = 5\,000$. Jeho koncová hydroxylová skupina byla obměněna připojením aromatické spojky nesoucí aldehydickou skupinu. Byly připraveny tři různé typy nosičů lišících se charakterem chemické vazby (ether, amid, ester), kterou byla aromatická spojka připojena k molekule polymeru.

První typ nosiče využíval jako aromatickou spojku *p*-hydroxybenzaldehyd. Ten byl s poly(ethylenglykolem) spojen stabilní etherovou vazbou. α -Methoxy- ω -(4-formylfenyloxy)-poly(ethylenglykol) byl připraven nukleofilní substitucí methansulfonové skupiny v α -methoxy- ω -methansulfonylpoly(ethylenglykolu)¹⁹⁹. Jako nukleofil byl použit 4-(1,3-dioxolan-2-yl)fenol²⁰⁰. Odchránění aldehydické skupiny bylo provedeno kyselou hydrolýzou acetalu (Schéma 7.)

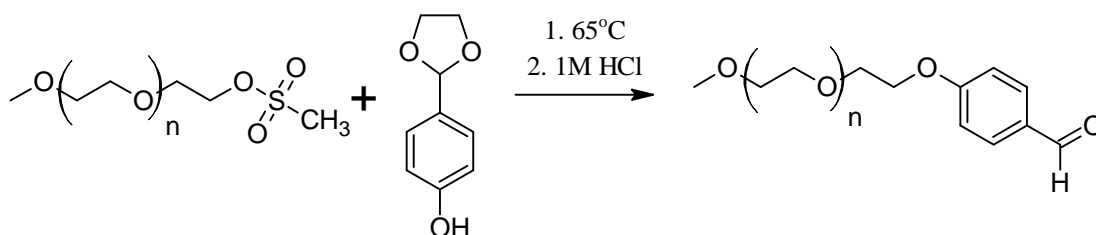


Schéma 7.

Další dva typy nosičů využívaly jako aromatickou spojku 4-formylbenzoovou kyselinu. Ta byla s molekulou polymerního nosiče spojena buď prostřednictvím esterové nebo amidické vazby. V obou případech bylo k aktivaci karboxylu 4-formylbenzoové kyseliny využito diisopropylkarbodiimidu²⁰¹. V případě nosiče využívajícího spojení pomocí amidické vazby musely být nejprve koncové hydroxylové skupiny poly(ethylenglykolu) převedeny na primární aminoskupiny. K tomuto účelu bylo využito Gabrielovy syntézy primárních aminů²⁰².

Tyto postupy byly využity k přípravě série polymerních nosičů na bázi modifikovaného poly(ethylenglykolu) o molekulových hmotnostech $M_w = 6\,000$ až $20\,000$. Souhrn takto připravených nosičů je uveden v tabulce 2 na straně 49.

6.1.2 Příprava blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin)

Byly připraveny dva typy blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin). Prvním z nich byl dvoublokový kopolymer α -methoxypoly(ethyleneglykol)-*block*-poly(L- α -glutamové) kyseliny, který byl využit ve studii věnující se vlivu chirálních polymerů na kinetiku krystalizace racemických směsí aminokyselin. Dále byla pozornost zaměřena na přípravu blokového kopolymeru poly(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -lysinu). Takovýto nosič obsahuje ve své struktuře reaktivní aminoskupiny a je tak schopen poutat větší množství molekul léčiva, než je tomu v případě polymerních nosičů odvozených od lineárního poly(ethylenglykolu).

Základní postup pro přípravu řetězců polyaminokyselin využívá postup „ring opening“ polymerace *N*-karboxyanhydridů α -aminokyselin (NCA)⁵⁰⁻⁵². V případě přípravy blokových kopolymerů polyaminokyselin a poly(ethylenglykolu) jsou jako iniciátory používány poly(ethylenglykoly), jejichž koncové hydroxylové skupiny jsou nahrazeny primárními aminoskupinami. V literatuře nalezneme mnoho příkladů syntéz blokových polymerů PEGu s různými typy polyaminokyselin (PEG-polylysin, PEG-polyglutamát, PEG-polyaspartát atd.)^{53,54,56-60}. Polymerace je nejčastěji prováděna v polárních aprotických rozpouštědlech (DMF, acetoniril, dioxan) za mírných podmínek (40 - 60 °C) s vyloučením vzdušné vlhkosti. Této metody bylo využito k přípravě blokových polymerů poly(ethylenglykolu) s poly(L- α -lysinem) a poly(L- α -glutamovou) kyselinou. K přípravě výchozích *N*-karboxyanhydridů bylo využito reakce příslušných aminokyselin s trifosgenem za použití tetrahydrofuranu jako rozpouštědla. Primární aminoskupina v poloze 6 L-lysinu byla ochráněna benzyloxykarbonylovou skupinou. Karboxylová skupina v poloze 5 L-glutamové kyseliny byla ochráněna benzyl esterem.

Jako iniciátor polymerace byl použit α,ω -diaminopoly(ethylene glykol) ($M_w = 10\,000$) a α -methoxy- ω -aminopoly(ethyleneglykol) ($M_w = 5\,000$). Využití α -methoxy- ω -aminopoly(ethyleneglykolu) jako iniciátoru polymerace vede ke vzniku dvoublokového polymeru. Využití α,ω -diaminopoly(ethyleneglykolu) vede ke vzniku trojblokového polymeru. K ochránění funkčních skupin v postranních řetězcích polyamidových řetězců je možné využít kyselou hydrolyzy⁵⁵ nebo katalytické hydrogenace²⁰³. Připravené blokové kopolymery byly charakterizovány pomocí IČ spektrofotometrie, ¹H NMR spektroskopie, gelové permeační chromatografie a elementární analýzy. V případě blokového kopolymeru

poly(L-glutamové) kyseliny byl sledován vliv pH roztoku na konformaci polyamidového řetězce pomocí cirkulárního dichroismu (CD).

Posledním krokem přípravy blokového kopolymeru, který měl sloužit jako polymerní nosič pro přípravu konjugátu s AmB, byla modifikace primárních aminoskupin poly(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -lysinu) acylací 4-formylbenzoovou kyselinou. Stejně jako v případě přípravy modifikovaných poly(ethylenglykolů) jsme k aktivaci karboxylu aromatické kyseliny využili diisopropylkarbodiimid. Vzhledem k vysoké reaktivitě takto aktivovaného karboxylu lze předpokládat, že acylační reakce neprobíhá regioselektivně a že jí podléhají jak ϵ -aminoskupiny lysinu, tak *N*-terminální aminoskupiny polyamidového řetězce (Schéma 8.). Takto připravený nosič byl charakterizován pomocí IČ spektrofotometrie, ^1H NMR spektroskopie, gelové permeační chromatografie a elementární analýzy.

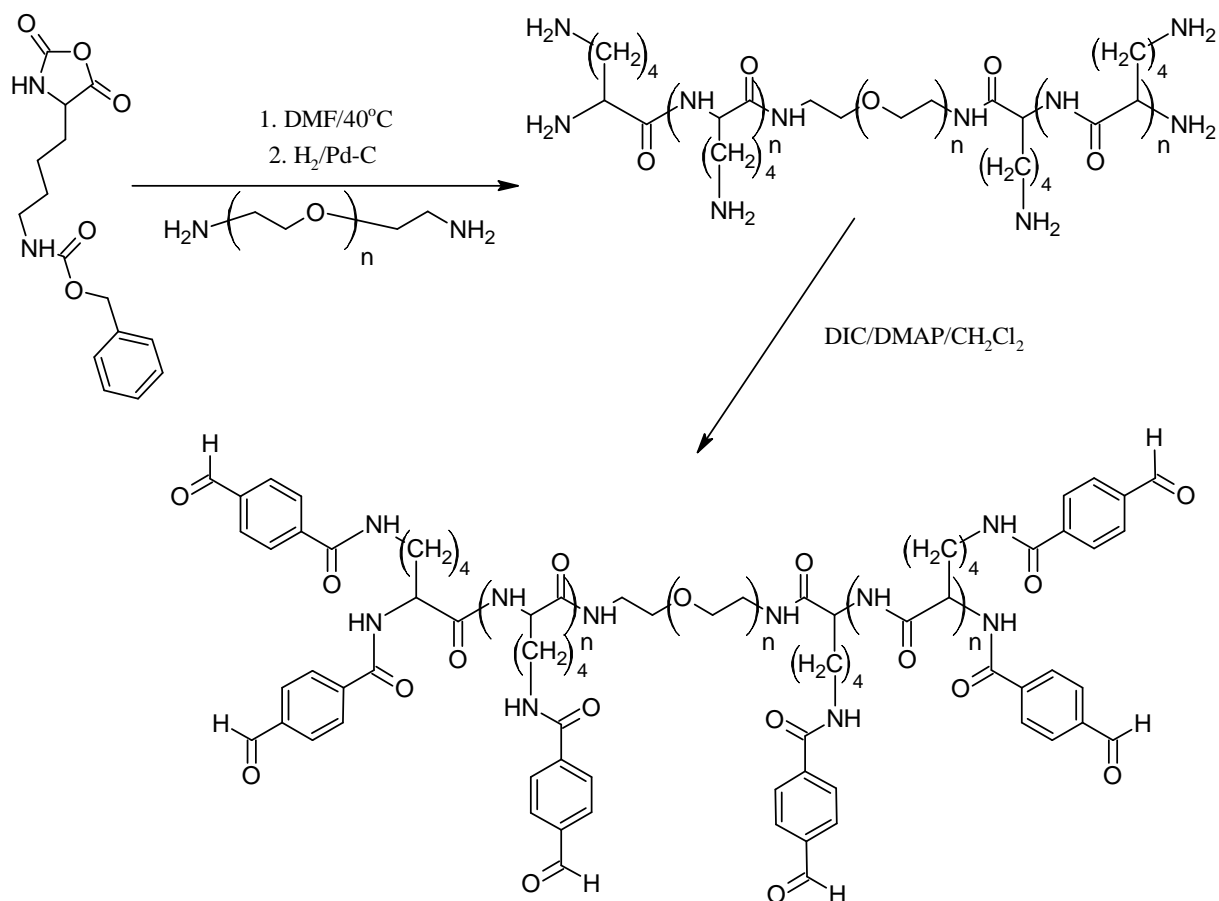


Schéma 8.

6.2 Příprava konjugátů AmB s polymerními nosiči

Při přípravě konjugátů AmB s připravenými polymerními nosiči bylo využito schopnosti primární aminoskupiny mykosaminu, cukerné složky AmB, tvořit iminové vazby s aldehydovými skupinami modifikovaného poly(ethylenglykolu). Obdobný způsob byl popsán při přípravě konjugátů AmB s arabinogalaktanem¹⁶, kdy autoři využili reduktivní aminace. Tento postup rovněž zahrnuje vznik labilní iminové vazby, která je ovšem následně redukována na stabilní sekundární amin. Jako prostředí pro reakci mezi primární aminoskupinou a aldehydem byl v tomto případě využit borátový pufr o pH 11. Reakce probíhala 48 hodin při r.t.¹⁶

V našem případě byla kondenzační reakce aminoskupiny AmB s aldehydickými skupinami nosiče prováděna v přítomnosti trimethylorthofomiátu a molekulového síta. Reakce probíhala v suchém dimethylformamidu při vyloučení vzdušné vlhkosti. Ukončení reakce bylo monitorováno pomocí GPC. Produkty byly čištěny opakovanou precipitací. Vzniklé konjugáty byly charakterizovány pomocí IČ spektrofotometrie, elementární analýzy a gelové permeační chromatografie (GPC).

6.3 Studie stability konjugátů AmB in vitro

6.3.1 Stabilita konjugátu ve fosfátových puffrech

Uvedené experimenty byly prováděny ve spolupráci s Katedrou organické chemie Fakulty chemicko technologické Univerzity Pardubice. U připravených konjugátů byla sledována stabilita iminové vazby mezi molekulou nosiče a AmB. K tomuto účelu byly vybrány 0,07M fosfátové puffry²⁰⁴ o hodnotě pH 7,4 a 5,5²⁰⁵. Stabilitní studie byly prováděny při 37 °C. Tyto podmínky měly za úkol simulovat jednak prostředí krevní plazmy (pH ≈7,4) a dále prostředí se sníženým pH (pufr pH = 5,5), které se vyskytuje např. v místě zánětu.^{196,197} Stabilita konjugátů byla sledována UV/VIS spektrofotometrií. Sledováním závislosti změn v UV/VIS spektru konjugátu na čase byla stanovena rychlost hydrolýzy iminové vazby¹⁸⁸. Jako kontrola byly za stejných podmínek testovány i samotné nosiče bez navázaného AmB. Během tohoto slepého pokusu nedocházelo v jejich UV/VIS spektru k žádným změnám. Rovněž samotný AmB byl podroben stejnému experimentu a za daných podmínek byl stabilní po dobu několika hodin.

6.3.2 Stabilita konjugátu v plazmě a v lidském séru

Studie stability konjugátů v lidské krevní plazmě a lidském krevním séru byla provedena ve spolupráci s Katedrou analytické chemie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice. Stabilita konjugátů byla sledována vždy po dobu 24 hodin. Postupně byly odebírány vzorky v čase 0, dále každých 60 min až do času 10 hodin. Poslední vzorek byl odebrán v čase 24 hodin. Vzorky byly stabilizovány přidavkem 4% ZnSO₄·7 H₂O. Po jejich odstředění byl odebraný supernatant analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro separaci byla využita kolona LiChroCART[®] 125 x 4 mm. Stacionární fáze byla tvořena náplní LiChrospher[®] 100 RP-18e 5 μm (Merck). Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem s přidavkem 20 mM chelatonu II. Výsledky kinetických měření v krevní plazmě a v krevním séru byly v rámci experimentálních chyb navzájem srovnatelné. Stanovení koncentrací konjugátu v krevní plazmě však bylo zatíženo větší chybou a horší reprodukovatelností.

6.3.3 Studium akutní toxicity připravených konjugátů

U konjugátu AmB odvozených od α -methoxy- ω -(4-formylfenylkarbonyloxy)-poly(ethyleneglykolu) (M_w = 5 000) (**1**), α,ω -bis(4-formylfenylkarbonyloxy)-poly(ethyleneglykolu) (M_w = 10 000) (**2c**) a poly(4-formylfenylkarboxamino)-L- α -lysinu)-blok-poly(ethyleneglykol)-blok-poly(4-formylfenylkarboxamino)-L- α -lysinu) (**4**) byla testována akutní toxicita na myších. Jako kontroly bylo využito AmB. Pro každý derivát byla pokusná zvířata rozdělena do 6 skupin. Studované konjugáty byly podávány intravenózně. Mortalita a projevy toxicity byly sledovány po dobu 14 dní. Hodnoty LD₅₀ a interval spolehlivosti byl stanoven nelineární regresí s využitím GraphPad Prism (version 4; GraphPad software, Inc., San Diego CA, USA). Studie byla provedena ve spolupráci s Katedrou farmakologie a toxikologie FaFUK Hradec Králové.

6.4 Studium vlivu chirálních polymerů na kinetiku krystalizace racemických směsí aminokyselin

Dalším cílem této disertační práce bylo zkoumat sekundární strukturu blokového kopolymeru poly(ethyleneglykolu) a poly(L- α -glutamové) kyseliny a sledovat vliv jeho přítomnosti na proces krystalizace racemických směsí. Během experimentů byl sledován vliv pH prostředí na změny v sekundární struktuře řetězce poly(glutamové) kyseliny. K tomuto účelu bylo využito spektroskopie cirkulárního dichroismu.

Poznatky získané z těchto experimentů byly využity při sledování vlivu přítomnosti studovaného polymeru na krystalizaci racemické směsi. Předpokladem bylo, že výrazněji se bude vliv polymeru projevovat, bude-li zaujímat α -helikální strukturu, než za podmínek, ve kterých se bude nacházet převážně v konformaci náhodného klubka. Tato teorie vychází ze znalosti interakcí mnoha biopolymerů (proteiny, DNA, RNA) s povrchy krystalů chirálních látek^{206,207}.

Jako modelová racemická směs byl vybrán D,L-threonin. Byl sledován vliv přítomnosti připraveného polymeru na kinetiku krystalizace, morfologii vzniklých krystalů a enantiomerní výtěžek procesu. Jako kontroly bylo využito jak roztoků bez aditiv, tak roztoků obsahující nemoifikovaný α -methoxy(polyethylenglykol). Ve snaze eliminovat vliv povrchového náboje povrchu molekul a vyloučit vliv krystalizace v izoelektrickém bodu byly experimenty prováděny při různých pH. Krystalizační experimenty byly prováděny při dvou hodnotách pH (pH = 3,75 a 7,8). Další faktor, který ovlivňuje rychlost krystalizace a mechanismus formování krystalů, je míra přesycenosti roztoku. Proto byly všechny experimenty prováděny pouze s mírně přesycenými roztoky (index nasycení roztoku SI = 0,5 až 2). Rovněž byl proveden experiment, kdy nasycený roztok sledované racemické směsi obsahoval čistou L-glutamovou kyselinu jako aditivum. Vliv pH a přítomnosti kopolymeru na rychlost krystalizace D,L-threoninu byl sledován měřením vodivosti roztoku. Pokles ve vodivosti roztoku indikoval pokles koncentrace threoninu v roztoku. Vliv podmínek krystalizace byl sledován pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a rentgenové difrakce. Vliv na enantiomerní výtěžek procesu byl posuzován na základě měření optické otáčivosti matečného roztoku a vznikajících krystalů.

7. Experimentální část

7.1 Přístrojové vybavení

Potvrzení struktury připravených derivátů bylo provedeno na základě instrumentálních analýz. ^1H NMR spektra byla měřena v deuterovaném chloroformu CDCl_3 na přístrojích Bruker AMX 360 (Univerzita Pardubice), Bruker 500 Avance apparatus (Univerzita Bar Ilan) a Varian Mercury-Vx BB 300 (FaF UK). Infračervená spektra byla získána na přístroji NICOLET IMPACT 400. ESI-MS měření byla provedena na přístroji Esquire 3000 analyzátor s iontovou pastí (Bruker Daltonics).

Analýzy využívající chromatografické metody byly provedeny na Katedře analytické chemie Chemicko-technologické fakulty Univerzity Pardubice. Gelová permeační chromatografie byla prováděna s využitím sloupců HEMA-BIO (hydrofilně modifikované sloupce HEMA-Gel, velikosti částic 10 μm , porozita 40/100/300/1000) s využitím RI a UV/VIS detektoru. Jako mobilní fáze bylo využito redestilované H_2O (pH = 7,1). Sloupce byly kalibrovány standardy poly(ethylenglykolu) o různých molekulových hmotnostech (PSS, Polymer Standard Service GmbH).

Pro stanovení stabilit konjugátů v lidské krevní plazmě a lidském krevním séru byly odebrané vzorky analyzovány pomocí HPLC. Pro separaci byla využita kolona LiChroCART[®] 125 x 4 mm. Stacionární fáze byla tvořena náplní LiChrospher[®] 100 RP-18e 5 μm (Merck). Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem s přidavkem 20 mM chelatonu II.

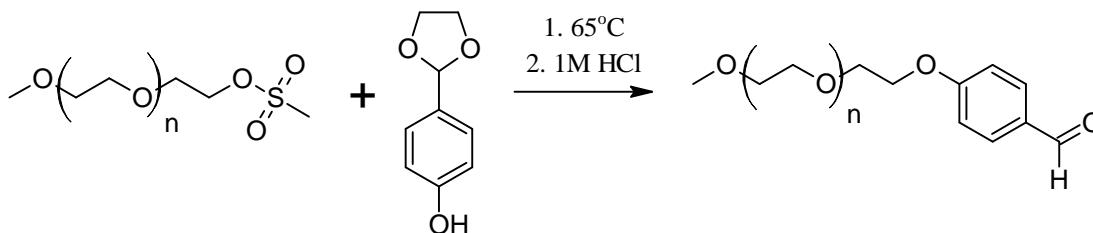
Studie věnovaná vlivu chirálních polymerů na kinetiku krystalizace racemických směsí aminokyselin byla provedena během stáže autora na Katedře chemie Fakulty přírodních věd Univerzity Bar-Ilan, Ramat Gan, Izrael. K měření specifické optické otáčivosti byl využit digitální polarimetr JASCO (Model P-1010) s kyvetou z křemenného skla. Měření cirkulárního dichroismu bylo prováděno spektrometrem J-715 (Model 6025), který byl vybaven kyvetou z křemenného skla (0,1 ml). Vodivost krystalizačních roztoků byla sledována přístrojem CDM230 Radiometer Analytical SAS. Pro studium morfologie vznikajících krystalů byl využit skanovací elektronový mikroskop JEOL 840. Difrakce rentgenového záření byla měřena pomocí přístroje Bruker AXS D8 ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$).

7.2 Příprava modifikovaných poly(ethylenglykolů)

7.2.1 Příprava α -methoxy- ω -(4-formylfenoxy)poly(ethylenglykolu)

($M_w = 5\ 000$)

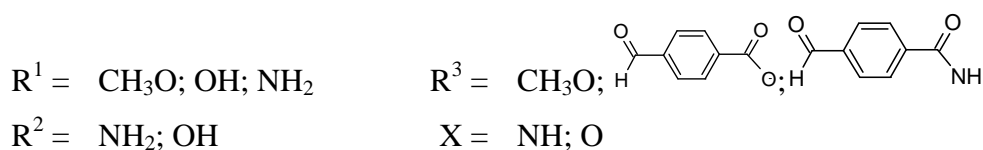
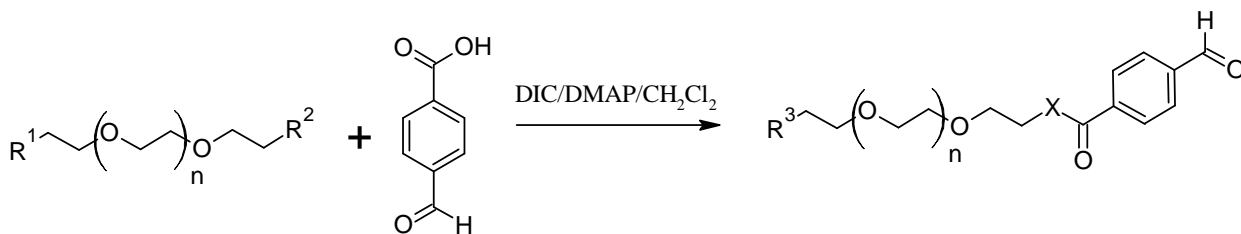
Schéma reakce:



Směs α -methoxy- ω -methansulfonylpoly(ethylenglykolu)¹⁹⁹ (5 g; 1 mmol), 4-(1,3-dioxolan-2-yl)fenolu²⁰⁰ (2,5 g; 15 mmol) a uhličitanu draselného (2 g; 15 mmol) byla zahřívána na 65 °C po dobu 48 hodin v inertní atmosféře s vyloučením vzdušné vlhkosti. Poté byla reakční směs ochlazená, rozpuštěna ve 200 ml dichlormethanu a filtrována. Rozpouštědlo bylo z filtrátu odstraněno destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn ve 150 ml 1M HCl. Roztok byl 4 hodiny zahříván pod zpětným chladičem. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl roztok nasycen NaCl. Vodná fáze byla extrahována 5 × 60 ml dichlormethanu. Spojené extrakty dosucha odpařeny na vakuové rotační odparce. Produkt byl získán krystalizací z propan-2-olu. Bylo získáno 3,4 g produktu, což odpovídá 64 % teoretického výtěžku. Produkt byl charakterizován pomocí ¹H NMR a IČ (viz. Tabulka 3. na straně 46.)

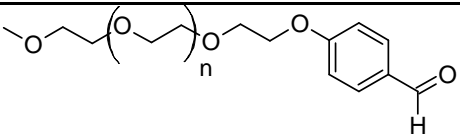
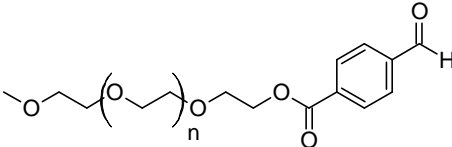
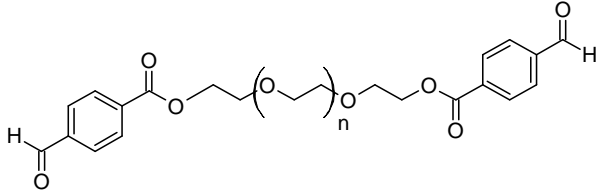
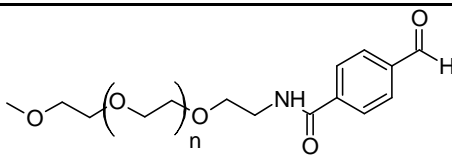
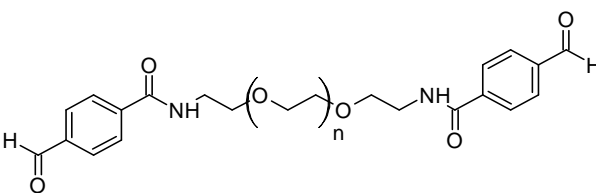
7.2.2 Obecný postup acylace poly(ethylenglykolů) 4-formylbenzovou kyselinou

Schéma reakce



Jako výchozí polymery pro acylační reakci byly použity: α -methoxypoly(ethylenglykol) ($M_w = 5\,000$), poly(ethylenglykol) ($M_w = 6\,000, 10\,000, 20\,000$), α -methoxy- ω -aminopoly(ethylenglykol) ($M_w = 5\,000$), α, ω -diaminopoly(ethylenglykol) ($M_w = 6\,000, 10\,000, 20\,000$). Poly(ethylenglykoly) obsahující terminální aminové skupiny byly připraveny s využitím postupu Gabrielovy syntézy primárních aminů²⁰². Výchozí poly(ethylenglykol) byl rozpuštěn, 4-formylbenzoová kyselina a 4-dimethylaminopyridin byly rozpuštěny v suchém dichlormethanu a vzniklý roztok byl ochlazen na 0 °C. Během 10 minut byl do reakční směsi přikapán vychlazený roztok diisopropylkarbodiimidu v dichlormethanu. Reakční směs byla míchána ještě 4 h při 0 °C a následně byla pozvolna vytemperována na laboratorní teplotu. Po 24 h byla odfiltrována diisopropylmočovina. Produkt byl izolován precipitací s diethyletherem a čištěn krystalizací z propan-2-olu. Dále byl produkt zbaven zbytků rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Přehled takto připravených nosičů a data, získaná během jejich charakterizace instrumentálními analytickými metodami, obsahují tabulky 2 a 3 na straně 49 a 50.

Tabuka 2.: Souhrn připravených modifikovaných poly(ethylenglykolů)

Označení	M _w	Vzorec
1	5000	
2a	5 000	
2b	6 000	
2c	10 000	
2d	20 000	
3a	5 000	
3b	6 000	
3c	10 000	
3d	20 000	

Tabuka 3.: ¹H NMR a IČ spektra připravených nosičů

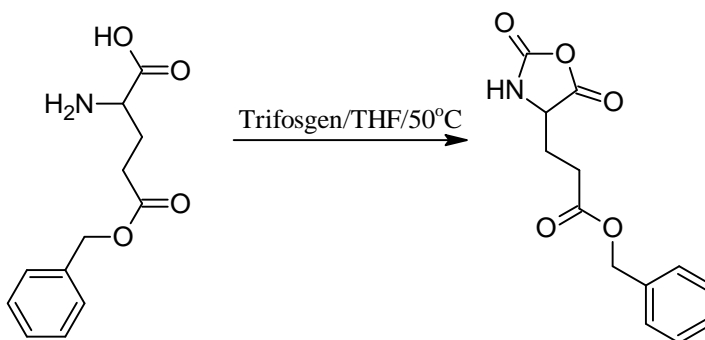
Označení	M _w	Vzorec
1	5000	¹ H NMR (CDCl ₃ , ppm) δ: 3,36 (s; 3H, CH ₃ -O); 3,52-4,27 (m; 460H, (CH ₂ -CH ₂ -O) ₁₁₅); 7,17 (d; <i>J</i> 7,7 Hz, 2H-arom); 7,97 (d; <i>J</i> 7,7 Hz, 2 H-arom); 9,94 (s; 1H, CH=O). IČ (KBr) m: 3439, 2945, 2887, 2741, 1701, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm ⁻¹ .
2a	5 000	¹ H NMR (CDCl ₃ , ppm) δ: 3,36 (s; 3H, CH ₃ -O); 3,52 – 4,27 (m; 448H, (CH ₂ -CH ₂ -O) ₁₁₂); 4,50 (m; 2H, CH ₂ -O-CO); 7,96 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 2H-arom); 8,22 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 2H-arom); 10,11 (s; 1H, CH=O). IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1730, 1701, 1693, 1572, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm ⁻¹ .

2b	6 000	¹ H NMR (CDCl ₃ , ppm) δ: 3,52 – 4,27 (m; 540H; (CH ₂ -CH ₂ -O) ₁₃₅); 4,50 (m; 4H, CH ₂ -O-CO); 7,96 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 8,22 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 10,11 (s; 2H, CH=O). IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1730, 1701, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm ⁻¹ .
2c	10 000	¹ H NMR (CDCl ₃ , ppm) δ: 3,52 – 4,27 (m; 900H; (CH ₂ -CH ₂ -O) ₂₂₅); 4,50 (m; 4H, CH ₂ -O-CO); 7,96 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 8,22 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 10,11 (s; 2H, CH=O). IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1730, 1701, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm ⁻¹ .
2d	20 000	¹ H NMR (CDCl ₃ , ppm) δ: 3,52 – 4,27 (m; 1820H; (CH ₂ -CH ₂ -O) _n); 4,50 (m; 4H, CH ₂ -O-CO); 7,96 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 8,22 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 10,11 (s; 2H, CH=O). IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1730, 1701, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm ⁻¹ .
3a	5 000	¹ H NMR (CDCl ₃ , ppm) δ: 3,36 (s; 3H, CH ₃ -O); 3,52 – 4,27 (m; 448H, (CH ₂ -CH ₂ -O) ₁₁₂); 4,51 (m; 2H, CH ₂ -NH-CO); 6,48 (m; H, NH-CO); 7,96 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 2H-arom); 8,22 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 2H-arom); 10,11 (s; 1H, CH=O). IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1654, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm ⁻¹ .
3b	6 000	¹ H NMR (CDCl ₃ , ppm) δ: 3,52 – 4,27 (m; 540H, (CH ₂ -CH ₂ -O) ₁₃₅); 4,50 (m; 4H, CH ₂ -O-CO); 6,48 (m; H, NH-CO); 7,96 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 8,22 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 10,11 (s; 2H, CH=O). IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1654, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm ⁻¹ .
3c	10 000	¹ H NMR (CDCl ₃ , ppm) δ: 3,52 – 4,27 (m; 908 H, (CH ₂ -CH ₂ -O) ₂₂₇); 4,50 (m; 4H, CH ₂ -O-CO); 6,48 (m; H, NH-CO); 7,96 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 8,22 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 10,11 (s; 2H, CH=O). IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1654, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm ⁻¹ .
3d	20 000	¹ H NMR (CDCl ₃ , ppm) δ: 3,52 – 4,27 (m; 1820H, (CH ₂ -CH ₂ -O) ₄₅₅); 4,50 (m; 4H, CH ₂ -O-CO); 6,48 (m; H, NH-CO); 7,96 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 8,22 (d; <i>J</i> 7,8 Hz, 4H-arom); 10,11 (s; 2H, CH=O). IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1654, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm ⁻¹ .

7.3 Příprava blokových kopolymerů poly(ethylenglykol)-blok-poly(L- α -aminokyseliny)

7.3.1 Příprava N-karboxyanhydridu γ -benzylesteru L-glutamové kyseliny

Schéma reakce:



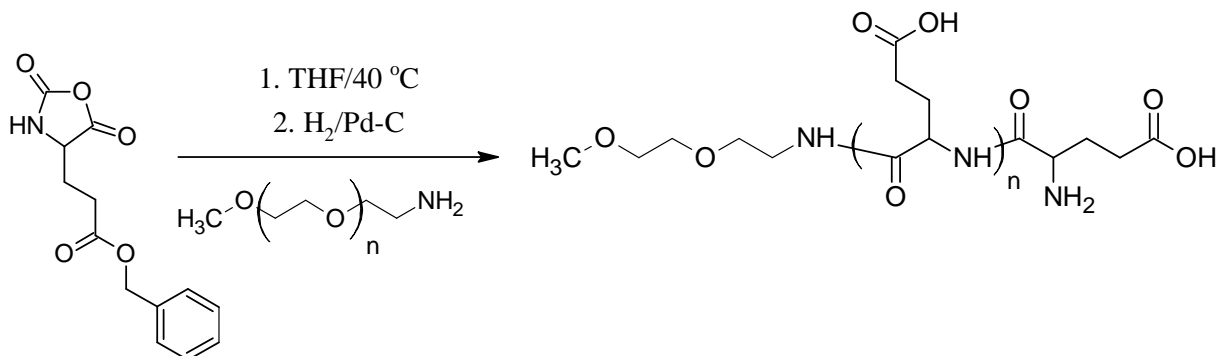
Byla připravena suspenze 1 g (4,2 mmol) γ -benzylesteru L-glutamové kyseliny v 10 ml tetrahydrofuranu. K suspenzi byl přidán roztok trifosgenu (0,623 g; 2,1 mmol) v 10 ml tetrahydrofuranu. Reakční směs byla zahřívána po dobu 1 hodiny na 50 °C. Reakce byla provedena v inertní atmosféře s vyloučením vzdušné vlhkosti. Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Produkt byl krystalizován ze směsi THF/n-hexan. Získané krystaly byly rozpuštěny v 15 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 100 ml 0,5% roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Organická fáze byla poté sušena 48 hodin nad bezvodým K_2CO_3 . Poté bylo sušidlo odfiltrováno a rozpouštědlo bylo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Vzniklý N-karboxyanhydrid byl získán krystalizací ze směsi tetrahydrofuran/n-hexan. Produkt byl zbaven zbytků organických rozpouštědel sušením ve vakuu. Bylo získáno 0,9 g produktu což odpovídá 82 % teoretického výtěžku.

IČ (KBr): 3336, 2950, 1881, 1786, 1721, 1548, 1450, 1344, 1251, 1190, 1114, 934, 755, 733 cm^{-1} .

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2,13 – 2,27 (m; 2H; CH_2); 2,57 (m; 2H; CH_2); 4,37 (m; 1H; CH-N); 5,14 (s; 2H; -O- CH_2 -Ph); 7,63 (m, 5H-arom)

7.3.2 Příprava α -methoxy(polyethylenglykol)-blok-poly(L- α -glutamové) kyseliny

Shéma reakce:



K roztoku α -methoxy- ω -amino-poly(ethylenglykolu) (0,5 g; 0,1 mmol; $M_w = 5000$ g/mol) v 10 ml tetrahydrofuranu byl přidán roztok *N*-karboxyanhydridu γ -benzylesteru L-glutamové kyseliny (0,395 g; 1,5 mmol) v 5 ml tetrahydrofuranu. Reakční směs byla zahřívána 3 dny na 40 °C s vyloučením vzdušné vlhkosti. Poté bylo rozpouštědlo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml tetrahydrofuranu a meziprodukt byl získán precipitací n-hexanem. Výtěžek činil 0,627 g.

IČ (KBr): 3293, 3063, 3034, 2884, 1731, 1650, 1548, 1452, 1358, 1164, 1112, 962, 842, 794, 697, 610 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3Cl) δ : 2,05 – 2,18 (m; 2H; CH_2); 2,50 (m; 2H; CH_2); 3,36 (s; 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 3,55 – 4,27 (m; 452 H, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_{113}$); 4,67 (m; 1H; CH-N); 5,13 (s; 20H; $-\text{O-CH}_2\text{-Ph}$); 7,28 (m, 100 H-arom).

Blokový kopolymer byl rozpuštěn v 60 ml směsi methanol-voda (1:1). K vzniklému roztoku bylo přidáno 0,2 g katalyzátoru Pd/C (10%). Směs byla nasycena vodíkem a míchána po dobu 12 hodin. Poté byl katalyzátor odstraněn filtrací. Vodný roztok polymeru byl dialyzován proti destilované H_2O . Voda byla posléze odstraněna lyofilizací.

IČ (KBr): 2888, 1655, 1467, 1343, 1280, 1242, 1110, 962, 842 cm^{-1}

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3Cl) δ : 2,05 – 2,20 (m; 2H; CH_2); 2,54 (m; 2H; CH_2); 3,30 (s; 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 3,50 – 4,30 (m; 452 H, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_{113}$); 4,70 (m; 1H; CH-N)

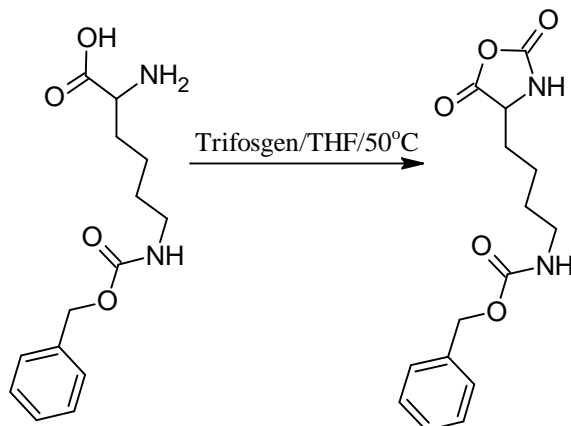
GPC: $M_w = 7\ 500$

$M_w/M_n = 1,3$

$[\alpha]_D^{20} = -20.51^\circ$ (4.7 mg polymeru v 5 ml 1% roztoku NaHCO_3)

7.3.3 Příprava *N*-karboxyanhydridu α -(*N*_ε-benzyloxykarbonyl)-*L*-lysinu

Schéma reakce



Byla připravena suspenze α -(*N*_ε-benzyloxykarbonyl)-*L*-lysinu 1g (3,6 mmol) v 30 ml tetrahydrofuranu. K suspenzi bylo přidáno 0,5 g (1,8 mmol) trifosgenu. Reakční směs byla zahřívána 1 hodinu na 50 °C. Reakci byla provedena v inertní atmosféře s vyloučením vzdušné vlhkosti. Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Olejovitý odparek byl rozpuštěn v 50 ml ethylacetátu. Organická fáze byla ve třech krocích promyta 150 ml vychlazeného 0,1M roztoku NaHCO_3 . Organická fáze byla poté sušena 48 hodin nad bezvodým K_2CO_3 . Poté bylo sušidlo odfiltrováno a rozpouštědlo bylo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Vzniklý *N*-karboxyanhydrid α -(*N*_ε-benzyloxykarbonyl)-*L*-lysinu byl získán krystalizací ze směsi tetrahydrofuran/*n*-hexan. Produkt byl zbaven zbytků organických rozpouštědel sušením ve vakuu. Bylo získáno 0,88 g produktu což odpovídá 80 % teoretického výtěžku.

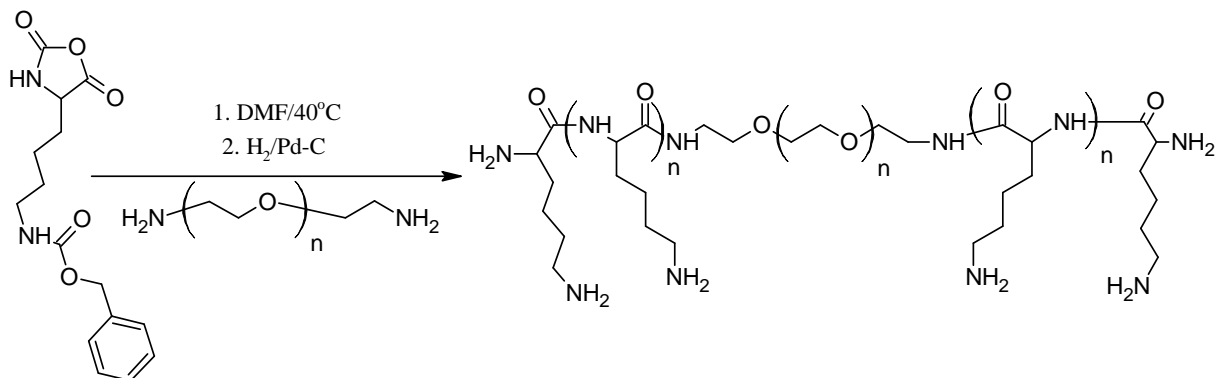
IČ (KBr) v: 3346, 3062, 1830, 1790, 1691, 1656, 1609, 1582, 1530, 1423, 1366, 1350, 1338, 1294, 1165, 1029 730, 539 cm^{-1} .

Teplota tání: 97-100°C

Teplota tání uvedená v literatuře: 99.2-101.8°C¹⁹¹

7.3.4 Příprava poly(L- α -lysin)-blok-poly(ethylenglykol)-blok-poly(L- α -lysinu)

Schéma reakce



Roztok α,ω -diaminopoly(ethylenglykolu) (10 g; 0,1 mmol; $M_w = 10\ 000$) v 10 ml dimethylforamidu byl smísen s roztokem N -karboxyanhydridu α -(N_ϵ -benzyloxykarbonyl)- L -lysinu (0,46 g; 1,5 mmol) v 10 ml dimethylformamidu. Vzniklá reakční směs byla zahřívána 3 dny na 40°C s vyloučením vzdušné vlhkosti. Reakce byla ukončena precipitací diethyletherem. Vzniklý kopolymer byl přečištěn krystalizací z propan-2-olu. Blokovaný kopolymer byl rozpuštěn v 60 ml směsi methanol-voda (1:1). K vzniklému roztoku bylo přidáno 0,2 g katalyzátoru Pd/C (10%). Směs byla nasycena vodíkem a mísená po dobu 12 hodin. Poté byl katalyzátor odstraněn filtrací. Vodný roztok polymeru byl dialyzován proti destilované H_2O . Voda byla odstraněna destilací za sníženého tlaku. Blokovaný kopolymer byl získán precipitací ze směsi dichlormethan-diethylether. Získáno bylo 0,8 g poly(L- α -lysin)-*b*-poly(ethylene glykol)-*b*-poly(L- α -lysinu). Produkt byl charakterizován NMR, IČ, GPC a elementární analýzou.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1,38$ (m; 30 H; $(CH_2)_3$), 2,74 (br s; 4H, ϵ - CH_2 , (α -helix)), 3,01 (br s; 6H, α - CH_2 , (random coil)), 3,69 (m, 227H, $(CH_2)_2O$),

IČ (KBr) ν : 3339, 3114, 2942, 2866, 2337, 1657, 1630, 1537, 1455, 1258, 1139, 923, 748, 963, 531 cm^{-1} ;

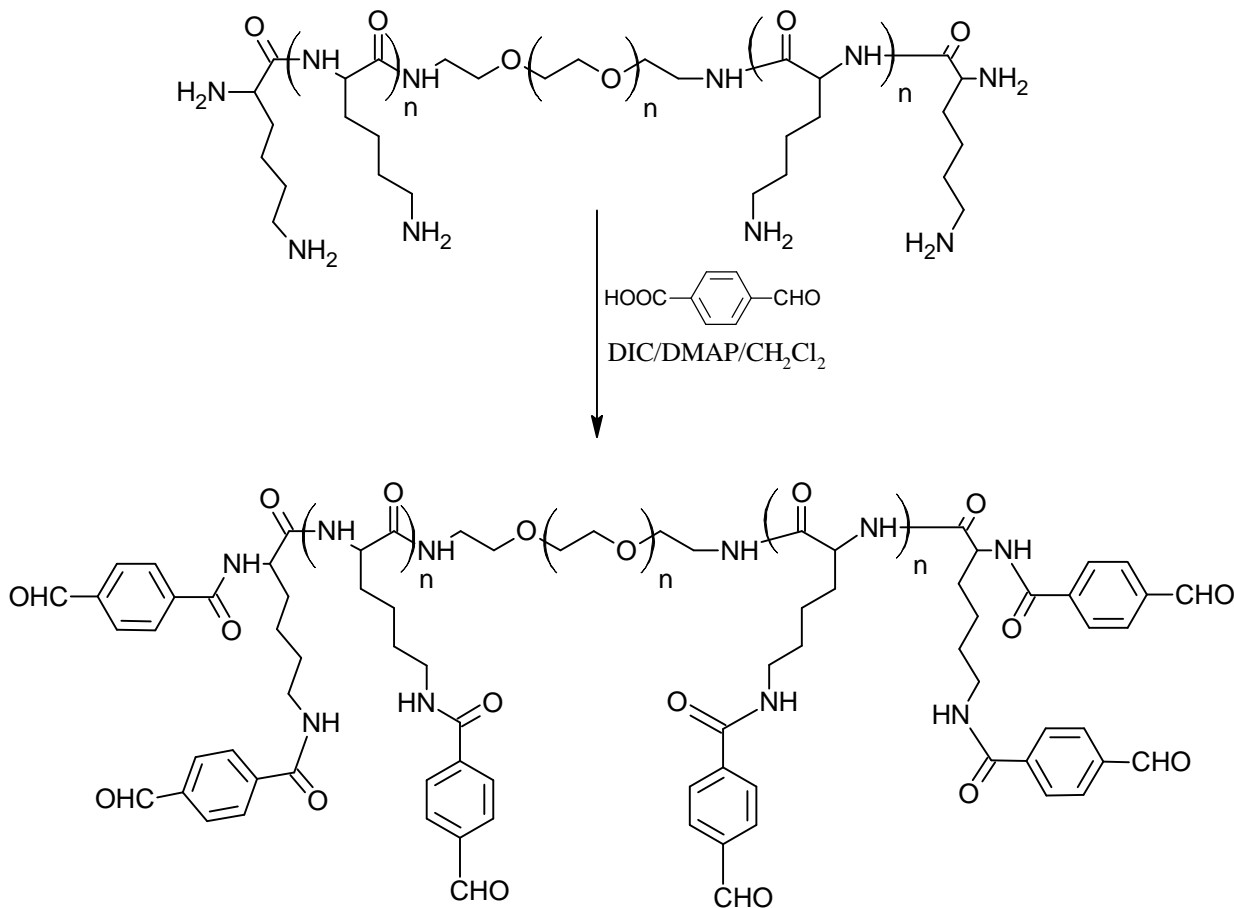
Elementární analýza: $C_{1176}H_{1948}N_{34}O_{466}$ – Teorie: C, 54.58 %; H, 9.13 %; N, 2.71 %;

Nalezeno: C, 54.81 %; H, 9.32 %; N, 2.98 %;

GPC: $M_w = 13\ 200$

$M_w/M_n = 1.16$.

7.3.5 Příprava poly(*N*_ε-(4-formylfenylkarboxamino)-L- α -lysinu)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(*N*_ε-(4-formylfenylkarboxamino)-L- α -lysinu)



Poly(L- α -lysin)-*b*-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L- α -lysin) (0,8 g; 0,06 mmol), 4-formylbenzoová kyselina (0,42 g; 2,8 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (0,1 g; 0,8 mmol) byly rozpuštěny v 70 ml suchého dichlormethanu a vzniklý roztok byl ochlazen na 0 °C. Během 10 minut byl do reakční směsi přikapán vychlazený roztok 0,44 ml (2,8 mmol) diisopropylkarbodiimidu v 10 ml dichlormethanu. Reakční směs byla míchána ještě 4 h při 0 °C a následně byla pozvolna vytemperována na laboratorní teplotu. Po 24 h byla odfiltrována diisopropylmočovina. Produkt byl izolován precipitací diethyletherem a čištěn opakovanou krystalizací z propan-2-olu. Dále byl produkt zbaven zbytků rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Bylo připraveno 0,85 g produktu což odpovídalo 90 % teoretického výtěžku.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,40 (m; 30H; (CH₂)₃), 2,76 (br s; 2H, ϵ -CH₂, (α -helix)), 3,09 (br s; 8H, ϵ -CH₂, (random coil)), 3,70 (m, 114H, (CH₂)₂O), 5,39 (br s, 5H, CH), 6,92

(d, $J = 7,7$ Hz, 14H, arom.), 7,83 (d; $J = 7,7$ Hz, 14H, arom.), 10,11 (m, 6H, CHO), 10,20 (br s, 5H, CONH);

I% C (KBr) m: 3341, 3116, 2942, 2866, 2337, 1701, 1683, 1657, 1630, 1537, 1455, 1258, 1139, 923, 748, 696, 963, 531 cm^{-1} ;

Elementární analýza: $\text{C}_{612}\text{H}_{1096}\text{N}_{22}\text{O}_{274}$ – Teorie: C, 55.92 %; H, 8.35 %; N, 2.35 %;

Nalezeno: C, 55.81 %; H, 8.13 %; N, 2.56 %;

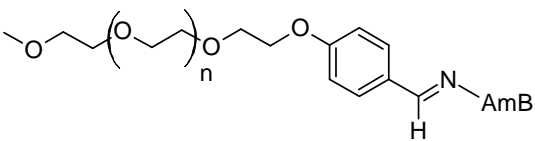
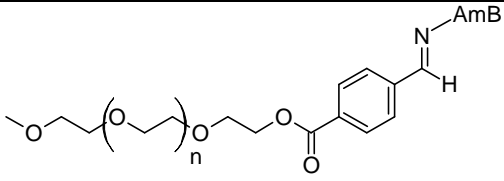
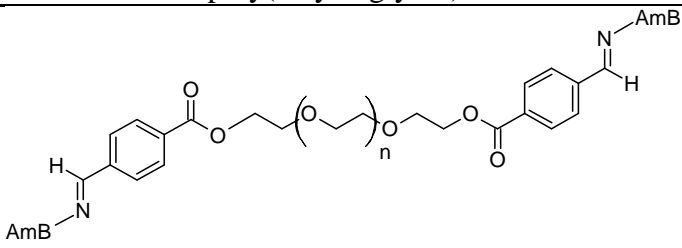
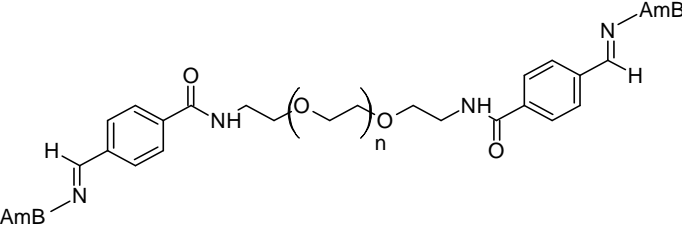
GPC: $M_w = 15\,500$

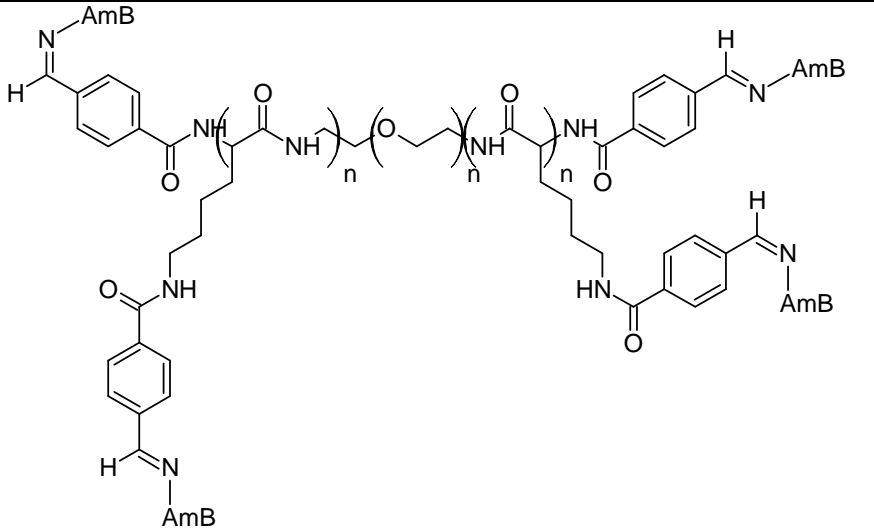
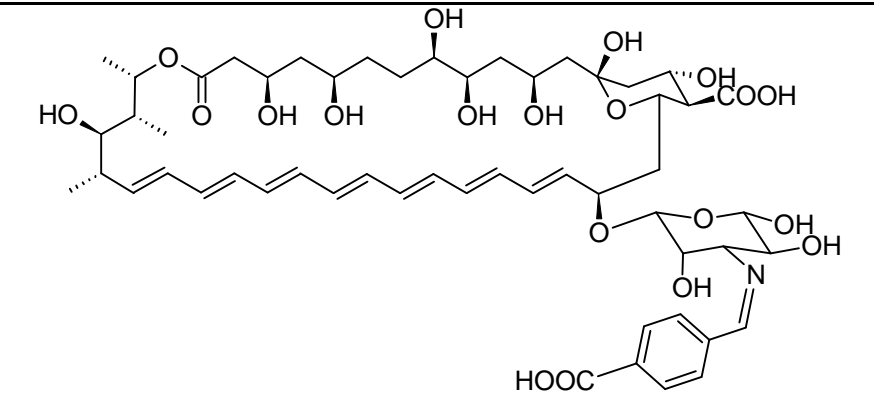
$M_w/M_n = 1.18$

7.4 Příprava konjugátů AmB s polymerními nosiči

Tabulka 4 obsahuje souhrn připravených konjugátů modifikovaných poly(ethylenglykolů) s AmB včetně jejich názvů. V rámci těchto experimentů bylo připraveno i proléčivo 4-karboxybenzylideniminoamfotericin B, které vzniká během rozpadu některých typů konjugátů. Vzhledem ke komplikovanému názvoslovnému pojmenování připravených sloučenin je v tomto textu budeme nadále označovat číselným kódem, který jim je přiřazeno v této tabulce. Přesné názvoslovné označení připravených konjugátů je uvedeno vždy pod danou strukturou v téže tabulce.

Tabulka 4.: Souhrn připravených konjugátů AmB

Ozn.	M _w	Vzorec
I	6000	 <p>α-Methoxy-ω-(4-AMB-iminomethylfenyloxy)-poly(ethylenglykol)</p>
IIa	6 000	 <p>α-Methoxy-ω-(4-AMB-iminomethylfenylkarbonyloxy)-poly(ethylenglykol)</p>
IIb	8 000	 <p>α,ω-Bis(4-AMB-iminomethylfenylkarbonyloxy)-poly(ethylenglykol)</p>
IIc	12 000	
IId	22 000	
IIIa	6 000	
IIIb	8 000	 <p>α,ω-Bis(4-AMB-iminomethylfenylkarboxamino)-poly(ethylenglykol)</p>
IIIc	12 000	
IIId	22 000	

<p>IV</p>	<p>26 700</p>	 <p>Poly(ethylenglykol)-[<i>b</i>-poly((L-lysin)₅)₂-(AmB)₁₂</p>
<p>V</p>	<p>1057</p>	 <p>4-karboxybenzylideniminoamfotericin B</p>

7.4.1 Příprava konjugátů I, IIa, IIIa

α -Methoxy- ω -(4-formylfenyloxy)poly(ethylenglykol) (0,1 mmol; $M_w = 5\ 000$), α -methoxy- ω -(4-formylfenylkarbonyloxy)-poly(ethyleneglykol) (0,1 mmol; $M_w = 5\ 000$) nebo α -methoxy- ω -(4-formylfenylkarboxamino)-poly(ethylenglykol) (0,1 mmol; $M_w = 5\ 000$) byl rozpuštěn v 5 ml trimethylorthoformiátu. K vzniklému roztoku bylo přidáno ekvivalentní množství (0,1 mmol) amfotericinu B ve formě roztoku v dimethylformamidu s přidavkem 0.2 g aktivovaného molekulového síta 4Å. Reakční směs byla míchána 14 dnů při laboratorní teplotě v argonové atmosféře s vyloučením světelného záření. Ukončení reakce bylo monitorováno pomocí GPC. Závěrem byla reakční směs zfiltrována a z filtrátu byl při 25 °C vakuově oddestilován trimethylorthoformiát. Destilační zbytek byl smísen s

250 ml suchého diethyletheru a vyloučený produkt byl odfiltrován. Připravené konjugáty byly rozpuštěny v dichlormethanu a přesráženy diethyletherem.

I – Získáno 450 mg produktu (74 % teoretického výtěžku)

UV/VIS (DMF) λ_{\max} : 253, 346, 363, 383, 407 nm.

IČ (KBr) ν : 3428, 2945, 2885, 2741, 2695, 1719, 1637, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843 cm^{-1} .

IIa – Získáno 980 mg produktu (83% teoretického výtěžku).

UV/VIS (DMF) λ_{\max} : 253, 346, 363, 383, 407 nm.

IČ (KBr) ν : 3439, 2945, 2887, 2741, 1735, 1719, 1693, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

IIIa – Bylo získáno 320 mg produktu (54% teoretického výtěžku).

UV/VIS (DMF) λ_{\max} : 253, 346, 363, 383, 407 nm.

IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1719, 1654, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1}

7.4.2 Příprava konjugátů IIb-d, IIIb-d

α,ω -Bis(4-formylphenylkarboxamino)poly(ethylenglykol) (0,1 mmol; $M_w = 6\ 000$, 10 000, 20 000) nebo α,ω -bis(4-formylfenylkarbonyloxy)poly(ethylenglykol) (0,1 mmol; $M_w = 6\ 000$, 10 000, 20 000) byl rozpuštěn v 15 ml trimethylorthoformiátu, k vzniklému roztoku bylo přidáno ekvivalentní množství (0,2 mmol) AmB ve formě roztoku v dimethylformamidu s přidavkem 0,2 g aktivovaného molekulového síta 4Å. Reakční směs byla míchána 14 dnů při laboratorní teplotě v argonové atmosféře s vyloučením světelného záření. Ukončení reakce bylo monitorováno pomocí GPC. Závěrem byla reakční směs zfiltrována a z filtrátu byl při 25 °C vakuově oddestilován trimethylorthoformiát. Destilační zbytek byl smísen s 250 ml suchého diethyletheru a vyloučený produkt byl odfiltrován. Připravené konjugáty byly rozpuštěny v dichlormethanu a přesráženy diethyletherem.

IIb – Získáno 630 mg produktu(80% teoretického výtěžku)

UV/VIS (DMF) λ_{\max} : 253, 291, 346, 363, 383, 407 nm.

IČ (KBr) ν : 3439, 2945, 2887, 2741, 1730, 1720, 1691, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

IIc – Získáno 890 mg produktu(75% teoretického výtěžku)

UV/VIS (DMF) λ_{\max} : 253, 346, 363, 383, 407 nm.

IČ (KBr) v: 3439, 2945, 2887, 2741, 1734, 1718, 1689, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

IIId – Získáno 1,8 g produktu (80% teoretického výtěžku)

UV/VIS (DMF) λ_{max} : 253, 346, 363, 383, 407 nm.

IČ (KBr) v: 3439, 2945, 2887, 2741, 1734, 1718, 1689, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

IIIb – Bylo získáno 430 mg produktu (54% teoretického výtěžku).

UV/VIS (DMF) λ_{max} : 253, 346, 363, 383, 407 nm.

IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1719, 1653, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1}

IIIc – Bylo získáno 840 mg produktu (70% teoretického výtěžku).

UV/VIS (DMF) λ_{max} : 253, 346, 363, 383, 407 nm.

IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1720, 1655, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1}

IIId – Bylo získáno 1,7 g produktu (75% teoretického výtěžku).

UV/VIS (DMF) λ_{max} : 253, 346, 363, 383, 407 nm.

IČ (KBr) v: 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1720, 1656, 1637, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1}

7.4.3 Příprava konjugátů IV

Poly(N_{ϵ} -(4-formylfenylkarboxamino)-L- α -lysinu)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(N_{ϵ} -(4-formylfenylkarboxamino)-L- α -lysin) (780 mg 0,05 mmol) byl rozpuštěn v 15 ml trimethylorthoformiátu, k vzniklému roztoku bylo přidáno (0,6 mmol) AmB ve formě roztoku v dimethylformamidu s přidavkem 0,2 g aktivovaného molekulového síta 4Å. Reakční směs byla míchána 14 dnů při laboratorní teplotě v argonové atmosféře s vyloučením světelného záření. Ukončení reakce bylo monitorováno pomocí GPC. Závěrem byla reakční směs zfiltrována a z filtrátu byl při 25 °C vakuově oddestilován trimethylorthoformiát. Destilační zbytek byl nalit do 250 ml suchého diethyletheru a vyloučený produkt byl odfiltrován. Připravené konjugáty byly rozpuštěny dichlormethanu a přesráženy diethyletherem. Bylo získáno 1,1 g produktu což odpovídá 86% teoretického výtěžku.

IČ (KBr) v: 3341, 3116, 2945, 2886, 2741, 2337, 1852, 1814, 1719, 1693, 1637, 1630, 1537, 1467, 1256, 1201, 1139, 923, 748, 696, 963, 531 cm^{-1} ;

UV/VIS λ_{\max} : 253, 346, 367, 386, 409 nm;

Elementární analýza: $C_{1176}H_{1948}N_{34}O_{466}$ – Teorie(%): C, 58.82; H, 8.13; N, 1.98;

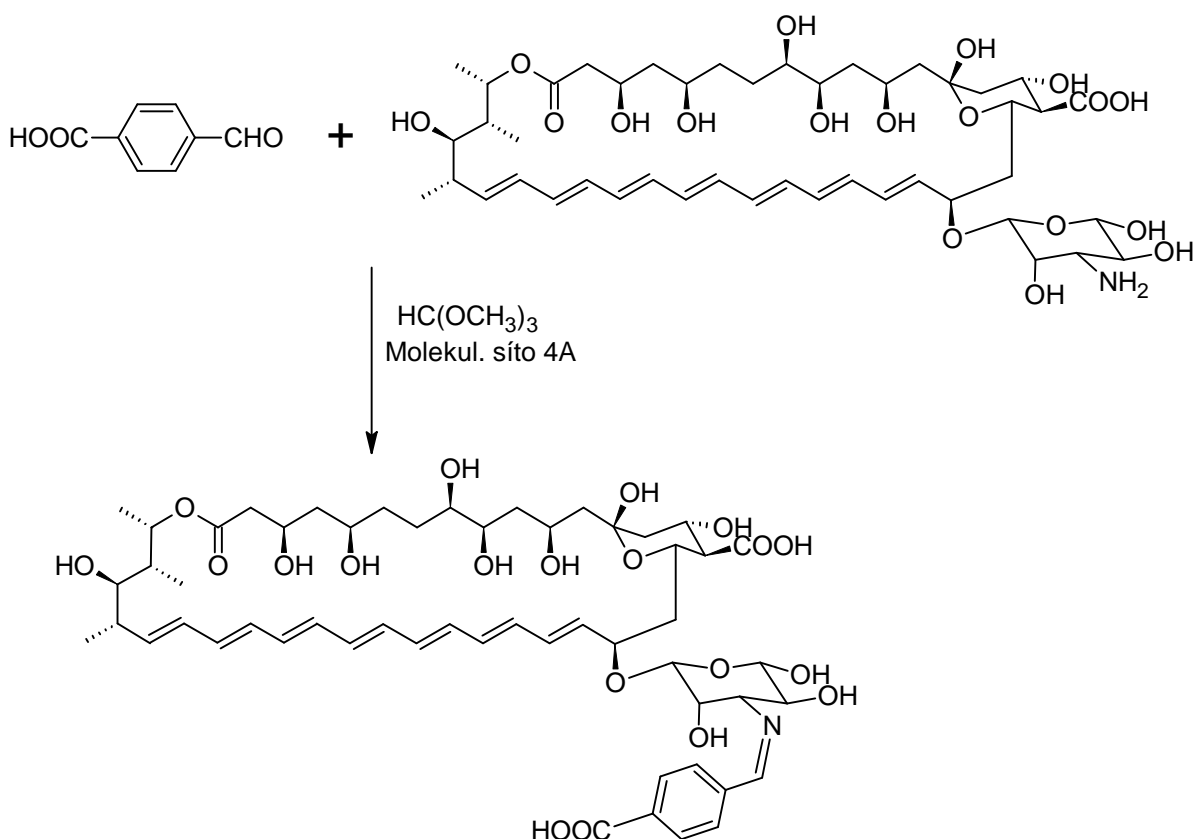
Nalezeno: C, 58.99; H, 8.36; N, 2.20;

GPC: $M_w = 26\,700$

$M_w/M_n = 1.11$.

7.4.4 Příprava 4-karboxybenzylideniminoamfotericinu B (V)

Schéma reakce:



Byl připraven roztok amfotericinu B (0,1mmol, 930 mg) a 4-formylbenzoové kyseliny (0,1 mmol, 150mg) ve směsi suchého DMSO (2 ml) a trimethylorthoformiátu (3 ml). K tomuto roztoku bylo přidáno molekulové síto 4Å (0,2 g). Po 48 hodinách byla reakční směs zlitrována přes fritu S4. Ze vzniklého filtrátu byl destilací za sníženého tlaku odstraněn trimethylorthoformiát. Odparek byl precipitován nadbytkem suchého diethyletheru. Vzniklá sraženina byla odfiltrována a sušena ve vakuu. Bylo získáno 84 mg 4-karboxybenzylideniminoamfotericinu B což odpovídá 84% teoretického výtěžku.

IČ (KBr) v: 3439, 3097, 2838, 2679, 2560, 2345, 1719, 1638, 1610, 1575, 1560, 1505, 1430, 1393, 1293, 1125, 934, 885, 790, 762, 686, 532, 461 cm⁻¹.

ESI-MS (M = 1056.2): [M+H]⁺ m/z 1057.2.

7.5 Stabilita konjugátu ve fosfátových pufrách

Uvedené experimenty byly prováděny ve spolupráci s Katedrou organické chemie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

U derivátů **I**, **IIa**, **IIc**, **II d** a **IIIa** byla sledována stabilita imino vazby vůči kyselé katalyzované hydrolyze. Stejná studie byla provedena i v případě připraveného pro léčiva 4-karboxybenzylideniminoamfotericinu B. Měření bylo prováděno na přístroji HP UV/VIS 8453 Diode Array v uzavíratelné kyvetě z křemenného skla o vnitřním průměru 1 cm. Do měřicí cely byly přidány 2 ml příslušného fosfátového pufru (0,07 M pH = 7,4 nebo 5,5). Roztok byl vytemperován na 37 °C. Poté bylo přidáno 10 – 20 μl metanolického roztoku sledované látky tak, aby výsledná koncentrace substrátu dosahovala zhruba 5×10^{-5} M. Na základě změn v UV/VIS spektru byla vypočítána rychlostní konstanta reakce (k_{obs} (s⁻¹)). K výpočtu této konstanty bylo využito rovnice 1.

$$k_{\text{obs}t} = \ln \Delta A + \text{konst.}$$

$$\Delta A = (A_{\infty} - A_t) \text{ nebo } (A_t - A_{\infty}).$$

Rovnice 1.

7.6 Stabilita konjugátu v plazmě a v lidském séru

Studie stability konjugátů v lidské krevní plazmě a lidském krevním séru byla provedena ve spolupráci s Katedrou analytické chemie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

Stabilita konjugátu (**I**, **IIa**, **IIc**, **II d** a **IIIa**) v lidské krevní plazmě a v lidském krevním séru byla sledována po dobu 24 hodin (jak sérum, tak plazma pocházely od zdravých dárců). Do mikrozkušavky bylo napipetováno 500 μl vzorku (plazmy, séra), 500 μl konjugátu, výsledná koncentrace konjugátu byla 1×10^{-1} M. Směs byla inkubována při 37 °C. Postupně byly odebírány vzorky v čase 0 hod (okamžitě), 1, 2 hod až 10 hod a po 24 hod. Vzorky byly stabilizovány 100 μl 4% ZnSO₄·7H₂O. Směs byla 1 min třepána a poté centrifugována po dobu 3 min při 14000 ot/min. Supernatant (20 μl) byl dávkován na HPLC kolonu. Pro separaci byla použita kolona LiChroCART® 125 x 4 mm s náplní LiChrospher® 100 RP-18e 5 μm (MERCK, Darmstadt). Jako mobilní fáze byl použit 20mM roztok chelatonu II v acetonitrilu.

7.7 Studium vlivu chirálních polymerů na kinetiku krystalizace racemických směsí aminokyselin

Studie, věnovaná vlivu chirálních polymerů na kinetiku krystalizace racemických směsí aminokyselin, byla provedena během stáže autora na Katedře chemie Fakulty přírodních věd, Univerzity Bar-Ilan, Ramat Gan, Izrael.

Všechny krystalizační experimenty byly prováděny s přesycenými roztoky D,L-threoninu. Pokusy byly prováděny při dvou rozdílných hodnotách pH (pH = 3,75 a pH = 7,8). pH roztoků bylo udržováno fosforečnanovými puframi. Byla připravena suspenze D,L-threoninu (900mg) v příslušném pufru (3ml), která byla zahřívána na 70 °C do rozpuštění krystalů. Roztok byl ochlazen na 25 °C a ponechán krystalizovat po dobu 150 min. Vzniklé krystaly byly izolovány a vysušeny za sníženého tlaku při 25 °C. Optická otáčivost byla stanovena jednak pro zbylý matečný roztok, a jednak pro roztok připravený z vyloučených krystalů (5mg/ 6 ml destilované vody).

Krystalizační experimenty byly provedeny s přidavkem chirálního kopolymeru α -methoxy(polyethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -glutamové) kyseliny (c = 1mg/ml). Dále byly provedeny kontrolní pokusy bez přidavku aditiv a s přidavkem nemodifikovaného α -methoxy(polyethylenglykolu) (c = 1 mg/ml).

8. Výsledky a diskuze

Tato disertační práce byla zaměřena na přípravu polymerních nosičů pro systémy s cílenou distribucí léčiv. Pozornost byla věnována přípravě systému s řízeným uvolňováním léčiva pro polyenová antibiotika, zejména amfotericin B. Úkolem bylo připravit kovalentní pH–sensitivní konjugáty amfotericinu B a sledovat jejich stabilitu v modelových prostředích tlumivých roztoků, plazmy a krevního séra (*in vitro*). Dále byla provedena toxikologická studie připravených derivátů *in vivo*. Systém byl navrhován tak, aby k uvolnění léčiva docházelo specificky v místě snížené hodnoty pH, jaká se vyskytuje například v místě zánětu vyvolaného napadením tkáně mikroorganismy^{196,197,208}.

Dalším úkolem byla syntéza blokového kopolymeru α -methoxy(polyethylenglykol) *blok*-poly(γ -benzyl-L- α -glutamové) kyseliny. U připraveného blokového kopolymeru byly studovány konformační změny probíhající v polyamidové části řetězce. Následně byl studován vliv přítomnosti tohoto chirálního polymeru na průběh krystalizace racemické směsi D,L-threoninu.

8.1 Příprava modifikovaných poly(ethylenglykolů)

Pro vypracování metodiky přípravy hydrofilních polymerních nosičů byl vybrán α -methoxypoly(ethylenglykol) o M_w 5 000. Jeho koncová hydroxylová skupina byla obměněna připojením aromatické spojky nesoucí aldehydickou skupinu. Byly připraveny tři různé typy nosičů lišící se charakterem chemické vazby (ether, amid, ester), kterou byla aromatická spojka připojena k molekule polymeru.

První typ nosiče využíval jako aromatickou spojku *p*-hydroxybenzaldehyd. Ten byl s polyethylenglykolem spojen stabilní etherovou vazbou. α -Methoxy- ω -(4-formylfenyloxy)-poly(ethylenglykol) byl připraven nukleofilní substitucí methansulfonové skupiny v α -methoxy- ω -methansulfonylpoly(ethylenglykolu)¹⁹⁹. Jako nukleofil byl použit 4-(1,3-dioxolan-2-yl)fenol²⁰⁰. Reakce byla prováděna zahříváním směsi reaktantů s využitím uhličitanu draselného jako bazického katalyzátoru. Odchránění aldehydické skupiny bylo provedeno kyselou hydrolýzou acetalu.

Struktura připraveného nosiče byla potvrzena pomocí ¹H NMR spektroskopie. Dublety 7,17 ppm a 7,97 ppm odpovídají aromatické substituci. Integrací signálu vůči signálům vodíků poly(ethylenglykolového) řetězce, bylo zjištěno, že více než 90 % koncových hydroxylových skupin bylo převedeno na požadovaný éther. Přítomnost volné

aldehydicke skupiny je potvrzena přítomností singletu s chemickým posunem 9,94 ppm. Tento fakt potvrzuje i přítomnost absorpčního pásu s maximem 1701 cm^{-1} , který nacházíme v infračerveném spektru připraveného derivátu.

Další dva typy nosičů využívaly jako aromatickou spojku 4-formylbenzoovou kyselinu. Ta byla s molekulou polymerního nosiče spojena buď prostřednictvím esterové²⁰¹, nebo amidické vazby. V obou případech bylo k aktivaci karboxylu 4-formylbenzoové kyseliny využito diisopropylkarbodiimidu (DIC) (Schéma 9.). DIC je reaktivní činidlo snadno podléhající hydrolyze, a proto bylo nutné tuto reakci provádět v inertní argonové atmosféře s vyloučením vzdušné vlhkosti. Během aktivace karboxylu 4-formylbenzoové kyseliny dochází ke vzniku *O*-acylisourey, která může podléhat přesmyku za vzniku nereaktivní *N*-acylisourey²⁰⁹. Abychom zabránili této nežádoucí vedlejší reakci, je nutné provádět tuto reakci za snížené teploty ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Acylační reakce poté probíhala v přítomnosti 4-dimethylaminopyridinu, který je běžně používaným katalyzátorem acylačních reakcí.

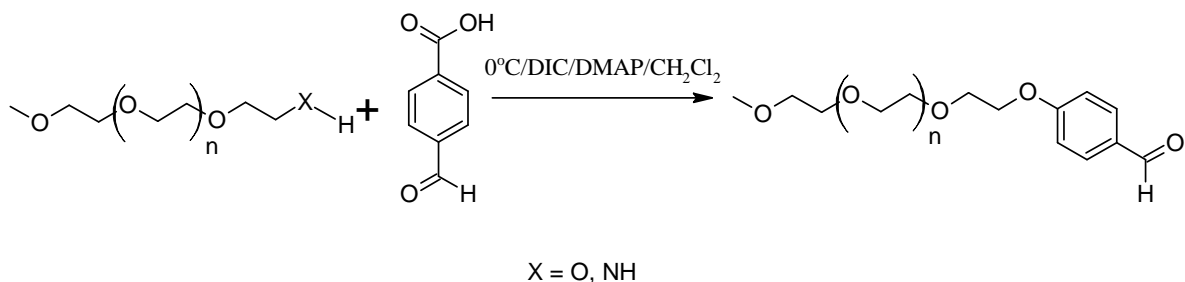


Schéma 9.

Připravené nosiče byly charakterizovány pomocí infračervené spektroskopie a ^1H NMR. V případě nosičů esterového typu nalézáme v IČ spektru absorpční pás 1735 cm^{-1} charakteristický pro karbonylu esteru. V případě nosičů amidového typu nalézáme absorpční pás v oblasti 1650 cm^{-1} , který náleží karbonylu amidu. Přítomnost aromatických vodíků s posuny 7,9 a 8,2 ppm v ^1H NMR potvrzuje přítomnost aromatické substituce. Přítomnost aldehydicke skupiny je potvrzena přítomností singletu s chemickým posunem 9,94 ppm. Na základě intenzity signálů ve spektru byl určen stupeň konverze koncových hydroxylových skupin poly(ethylenglykolu), který byl vyšší než 90 %.

V případě nosiče využívajícího spojení pomocí amidické vazby musely být nejprve koncové hydroxylové skupiny poly(ethylenglykolu) převedeny na primární aminoskupiny. K tomuto účelu bylo využito Gabrielovy syntézy primárních aminů²⁰².

Takto vypracovaná metodika byla využita při přípravě série polymerních nosičů na bázi modifikovaného poly(ethylenglykolu) o molekulových hmotnostech $M_w = 6\ 000$ až $20\ 000$. Souhrn takto připravených nosičů je uveden v tabulce 2 na straně na 49.

8.2 Příprava blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin)

Pro účely této disertační práce byly připraveny dva typy blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a poly(aminokyselin). Prvním z nich byl dvoublokový kopolymer α -methoxypoly(ethyleneglykol)-*blok*-poly(L- α -glutamové) kyseliny, který byl využit ve studii věnující se vlivu chirálních polymerů na kinetiku krystalizace racemických směsí aminokyselin.

Dále byla pozornost zaměřena na přípravu blokového kopolymeru poly(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -lysinu). Takovýto nosič obsahuje ve své struktuře reaktivní aminoskupiny a je tak schopen poutat větší množství molekul léčiva, než je tomu v případě polymerních nosičů odvozených od lineárního poly(ethylenglykolu).

Základní přístup k přípravě řetězců polyaminomínokyselin využívá postup „ring opening“ polymerace *N*-karboxyanhydridů α -aminokyselin (NCA)⁵². Této metody bylo využito k přípravě blokových polymerů poly(ethylenglykolu) s poly-(L- α -lysinem) a poly(L- α -glutamovou) kyselinou. K přípravě výchozích *N*-karboxyanhydridů bylo využito reakce příslušných aminokyselin s trifosgenem v tetrahydrofuranu^{50-52,55,60}. Primární aminoskupina v poloze 6 L-lysinu byla ochráněna benzyloxykarbonylovou skupinou. Karboxylová skupina v poloze 5 L-glutamové kyseliny byla ochráněna benzylesterem. Struktura takto připravených monomerů byla potvrzena infračervenou spektrofotometrií a stanovením bodu tání. V případě *N*-karboxyanhydridu (*N*_ε-benzyloxykarbonyl)-(L- α -lysinu) nalézáme ve spektru absorpční pásy 1830 a 1790 cm^{-1} , které jsou typické pro karbonyly pětičlenného kruhu *N*-karboxyanhydridu. Připravený *N*-karboxyanhydrid byl charakterizován i bodem tání (viz Experimentální část). V případě *N*-karboxyanhydridu γ -benzylesteru L-glutamové kyseliny náleží těmto karbonylům absorpční pásy 1881 cm^{-1} ; 1786 cm^{-1} . V tomto případě byla struktura připravené sloučeniny potvrzena i ¹H NMR spektroskopii (viz Experimentální část).

Byl připraven blokový kopolymer poly(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -lysin). Jako iniciátor polymerce byl využit α,ω -diamino(polyethyleglykol). Reakce byla prováděna v DMF při $40\text{ }^\circ\text{C}$. Připravený blokový kopolymer poly(*N*_ε-

benzyloxykarbonyl)-(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(N_ϵ -benzyloxykarbonyl)-(L- α -lysin) byl charakterizován pomocí infračervené spektroskopie. K ochránění primárních aminoskupin v postranních řetězcích poly(L- α -lysinu) bylo využito hydrogenolýzy využívající jako katalyzátor Pd/C (10%)²⁰³. Výsledný poly(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(-L- α -lysin) byl charakterizován pomocí infračervené spektroskopie, ¹H NMR a GPC. Na základě analýz bylo zjištěno, že na každý řetězec poly(ethylenglykolu) připadá deset monomerních jednotek L-lysinu. Molekulová hmotnost polymeru byla stanovena pomocí GPC na $M_w = 13\,200$.

Pro vodíky ϵ -CH₂ skupiny nalézáme v ¹H NMR dva druhy signálů - první, s chemickým posunem 2,74 ppm, a druhý s posunem 3,01 ppm. Signál s posunem 2,74 ppm odpovídá ϵ -CH₂ nacházejícím se v polyamidovém řetězci, který zaujímá terciární strukturu α -helix. Naopak signál s posunem 3,01 ppm odpovídá situaci, kdy polyamidový řetězec zaujímá náhodné uspořádání. Na základě porovnání intenzit těchto signálů docházíme k závěru, že 40 % řetězců poly(L- α -lysinu) se nalézá v uspořádání strukturu α -helix, zatímco zbylých 60 % řetězců nevytváří žádnou konkrétní terciární strukturu a je uspořádáno náhodně (tzv. „random coil“)¹⁸.

Takto připravený blokový kopolymer poly(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -lysin) byl využit jako základ pro přípravu polymerního nosiče pro amfotericin B. Finálním krokem přípravy tohoto nosiče byla acylace primárních aminoskupin polyamidového řetězce 4-formylbenzoovou kyselinu. K tomuto účelu byla opět využita aktivace karboxylu aromatické kyseliny diisopropylkarbodiimidem. Takto připravený nosič byl charakterizován pomocí IČ spektrofotometrie, ¹H NMR spektroskopie elementární a GPC. Pomocí gelové permeační chromatografie byla stanovena střední molekulová hmotnost nosiče ($M_w = 15\,500$). Přítomnost aromatické substituce je potvrzena přítomností signálů s chemickým posunem 6,92 ppm a 7,83 ppm v ¹H NMR spektru. Přítomnost volné aromatické aldehydické skupiny je potvrzena přítomností signálu 10,11 ppm v ¹H NMR a existencí absorpčního pásu 1701 cm⁻¹ v IČ spektru polymeru. Na základě porovnání intenzit signálů v ¹H NMR bylo zjištěno, že došlo k acylaci všech primárních aminoskupin ve struktuře polymeru, včetně koncové α -aminoskupinu polyamidu.

Dalším typem blokového kopolymeru, který byl připraven v rámci této disertační práce, byl α -methoxy(polyethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -glutamové) kyseliny. Jedná se o dvoublokový kopolymer, k jehož přípravě bylo opět využito „ring opening“ polymerace

N-karboxyanhydridu γ -benzylesteru L-glutamové kyseliny. Jako iniciátor polymerace byl využit α -methoxy- ω -amino(polyethylenglykol). Reakce byla prováděna v DMF při 40 °C. Připravený blokový kopolymer α -methoxy- ω -amino(polyethylenglykol)-*blok*-poly(γ -benzyl-L- α -glutamové) kyseliny byl charakterizován pomocí infračervené spektroskopie a ^1H NMR spektroskopie a elementární analýzy. V infračerveném spektru se nacházejí absorpční pásy typické pro amidickou (1548 cm^{-1} (amid II, N-H, C-N); 1650 cm^{-1} (amid, C=O)) a esterovou vazbu 1731 cm^{-1} (benzylester, C=O). K ochránění primárních karboxylových skupin v poloze 5 postranních řetězců poly(L-glutamové) kyseliny bylo využito hydrogenolýzy využívající jako katalyzátor Pd/C (10%). Vzniklý kopolymer α -methoxy(polyethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -glutamové) kyseliny byl charakterizován pomocí IČ spektroskopie, ^1H NMR spektroskopie, elementární analýzou a GPC. V infračerveném spektru došlo k vymizení absorpčního pásu v oblasti 1731 cm^{-1} , který původně náležel dvojné vazbě karbonylu benzylesteru. Rovněž v ^1H NMR spektru došlo k vymizení aromatických signálů s posunem 7,28 ppm a signálu 5,13 ppm, který původně náležel methylenové skupině benzylesteru. Na základě gelové permeační chromatografie byla molekulová hmotnost polymeru stanovena na 7 500. Z toho vyplývá, že polyamidová část blokového kopolymeru se skládala průměrně ze 20 jednotek glutamové kyseliny.

8.3 Příprava konjugátů AmB s polymerními nosiči

Při přípravě konjugátů AmB s připravenými polymerními nosiči bylo využito schopnosti primární aminoskupiny mykosaminu, cukerné složky AmB, tvořit iminové vazby s aldehydickými skupinami modifikovaného poly(ethylenglykolu). Kondenzační reakce byla prováděna v přítomnosti dehydratačních činidel - trimethylorthoformiátu a molekulárního síta. Reakce probíhala v suchém dimethylformamidu při vyloučení vzdušné vlhkosti. Vzniklé konjugáty byly charakterizovány pomocí ^1H NMR spektroskopie, IČ a UV/VIS spektrofotometrie, elementární analýzou a gelovou permeační chromatografií (GPC). Dále byl připraven i 4-karboxybenzylideniminoamfotericin B. Tato sloučenina představuje proléčivo, jehož vznik lze očekávat během uvolnění AmB z nosičů esterového typu. Tento derivát AmB byl připraven reakcí AmB a 4-formylbenzoové kyseliny v suchém DMSO za přítomnosti trimethylorthoformiátu a molekulárního síta. Produkt byl charakterizován pomocí ESI hmotnostní spektroskopie a IČ spektrofotometrie.

Vznik iminové vazby mezi aminoskupinou léčiva a aldehydickými funkčními skupinami nosiče se projevuje vznikem absorpčního pásu v oblasti 1640 cm^{-1} v IČ spektru

připravených konjugátů. V IČ spektrech rovněž nacházíme absorpční pás s maximem 1719 cm^{-1} odpovídající vibraci karbonylové skupiny laktonového kruhu AmB. Přítomnost ligandu v konjugátu byla potvrzena pomocí UV/VIS spektrofotometrie, kdy příslušná spektra vykazovala absorpční maxima typická pro systém sedmi konjugovaných dvojných vazeb AmB ($\lambda_{\text{max}} = 253, 346, 363, 383, 407 \text{ nm}$). Absorpční maximum 253 nm odpovídá aromatickému kruhu 4-formylbenzoové kyseliny. Spektra byla získána měřením v DMF. Toto rozpouštědlo umožnilo připravit kalibrační řadu AmB, podle které mohla být vypočítána koncentrace AmB v měřených vzorcích konjugátů. Na základě těchto výpočtů bylo ověřeno, že v případě konjugátů **I**, **IIa** a **IIIa** odpovídalo množství nosiče a AmB ve vzorku poměru 1:1. V případě bifunkčních (**IIb-d**, **IIIb-d**) nosičů molární poměr nosič/léčivo stanoven na 1:2. V případě nosiče **IV** tento poměr činil 1:12. V případě tohoto konjugátu byla stanovena molekulová hmotnost pomocí GPC na $M_w = 26\,700$. Tento derivát byl rovněž charakterizován IČ spektrofotometrií. Ve spektru opět nacházíme vibraci typickou pro karbonyl laktonu AmB (1719 cm^{-1}), iminovou vazbu konjugátu (1638 cm^{-1}), dále vibrace charakteristické pro dvojně vazby karbonylu amidů (1650 cm^{-1}). Složení tohoto konjugátu **IV** bylo potvrzeno i elementární analýzou.

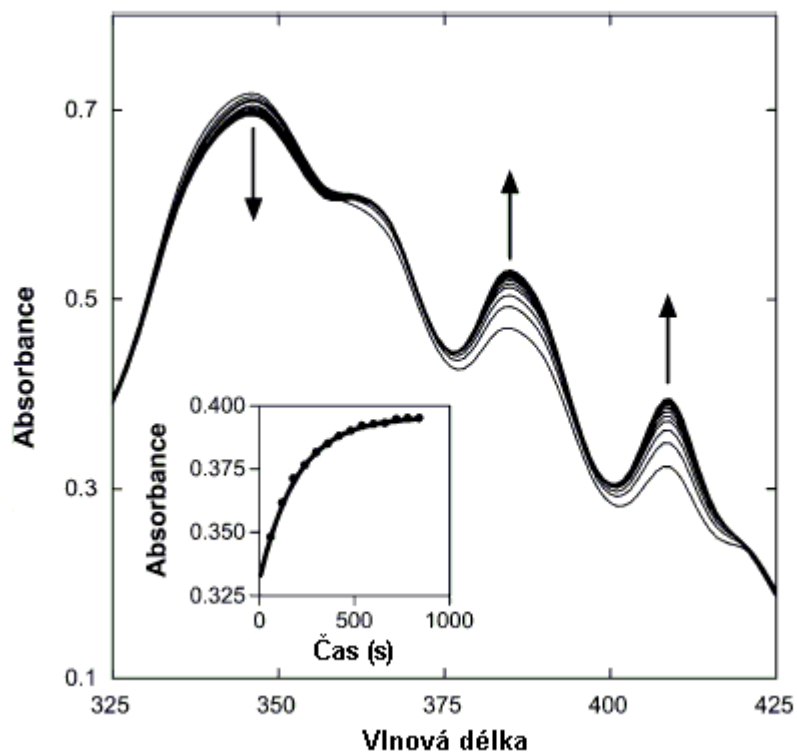
8.4 Stabilita konjugátu ve fosfátových pufrch

Během těchto experimentů byla sledována stabilita připravených konjugátů a rychlost kyselě katalyzované hydrolýzy iminové vazby mezi molekulou nosiče a AmB. K tomuto účelu byly vybrány 0,07M fosfátové pufrы o hodnotě pH 7,4 a 5,5^{204,205}. Stabilitní studie byly prováděny při 37 °C. Tyto podmínky měly za úkol simulovat jednak prostředí krevní plazmy (pH $\approx 7,4$)²¹⁰, a jednak prostředí se sníženým pH (pufr pH = 5,5)⁴⁴. Stabilita konjugátů byla ověřována UV/VIS spektrofotometrií. Sledováním závislosti změn v UV/VIS spektru konjugátu na čase byla stanovena rychlost hydrolýzy iminové vazby. Jako kontrola byly za stejných podmínek testovány i samotné nosiče bez navázaného AmB. Během tohoto slepého pokusu nedocházelo v jejich UV/VIS spektru k žádným změnám. Rovněž samotný AmB byl podroben stejnému experimentu a za daných podmínek byl stabilní po dobu několika hodin.

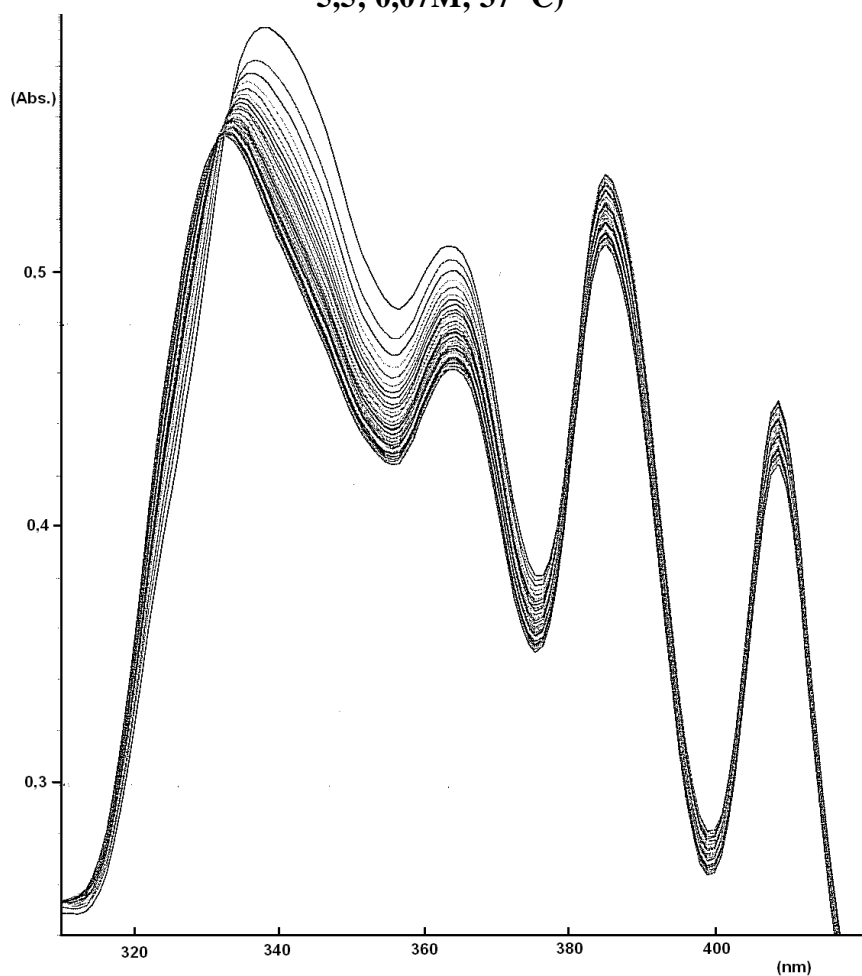
Samotné konjugáty byly poměrně stabilní v prostředí fosforečnanového pufru o pH = 7,4 (37 °C). Hydrolýza iminové vazby mezi molekulou AmB a nosičem se sice projevila, její rychlost však byla nízká. Za dobu 24 hodin se z konjugátu za daných podmínek uvolnilo méně než 5 % (mol/mol) léčiva. K hydrolýze iminové vazby docházelo

v prostředí fosforečnanového pufru pH = 5,5 (37 °C). Postupné uvolnění molekuly AmB z vazby na polymerní nosič se projevilo poklesem intenzity absorpčního maxima při vlnové délce 346 nm a zvýšením absorbance v oblasti absorpčních maxim 367, 386 a 409 nm. Nárůst absorbance v maximum 409 nm odpovídá vzniku volného AmB¹⁸⁸. Rychlost těchto změn odpovídá rychlosti hydrolýzy vazby nosič-léčivo (Graf 1 a 2.).

Graf 1.: Časová závislost změn v UV/VIS spektru konjugátu IIa (fosfátový pufr pH 5,5; 0,07M; 37 °C)



Graf 2.: Časová závislost změn v UV/VIS spektru konjugátu IV (fosfátový pufr pH 5,5; 0,07M; 37 °C)



V tabulce 5. nalezneme údaje o rychlosti tohoto hydrolytického děje, jak byly stanoveny pro vybrané deriváty a připravené pro léčivo 4-karboxybenzylideniminoamfotericin B.

Tabulka 5.: Stabilita imino vazby vůči kyselé katalyzované hydrolýze

Konjugát	$t_{1/2}$ (pH = 5,5)
Ia	(45 ± 1) min
IIa	(2,1 ± 0,1) min
IIc	(2,2 ± 0,1) min
IId	(2,4 ± 0,1) min
IIIa	(1,8 ± 0,2) min
IV	(2,0 ± 0,1) min
V	(2.15 ± 0.01) min

Z uvedených údajů vyplývá, že na rychlost kyselě katalyzované hydrolyzy iminové vazby má vliv typ substituce benzenového jádra aromatické spojky léčivo-nosič. V případě konjugátu **I** je touto spojkou 4-hydroxybenzaldehyd, který je s molekulou poly(ethylglykolu) spojen etherovou vazbou. Jedná se tedy o modifikaci benzenového jádra substituentem I. řádu, který se chová jako donor elektronů. Naproti tomu, je-li jako aromatické spojky využito 4-formylbenzoové kyseliny, je benzenový kruh substituován elektron-akceptorovou skupinou (karbonyl esteru či amidu). Tento fakt způsobuje výrazné rozdíly v rychlosti kyselě katalyzované hydrolyzy iminové vazby konjugátů **IIa**, **IIc**, **IId** a **IIIa** v porovnání s konjugátem **I**.

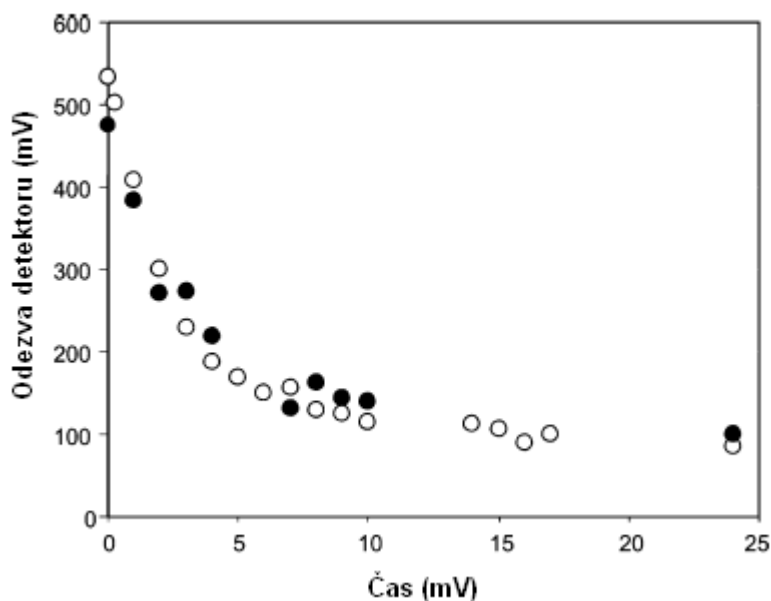
Z porovnání rychlostí rozpadu iminové vazby v případě nosičů **IIa**, **IIc** a **IId** vyplývá, že rostoucí molekulová hmotnost polymerního nosiče ($M_w = 5\ 000$ až $20\ 000$) nemá vliv na rychlost hydrolyzy této chemické vazby.

8.5 Stabilita konjugátů v lidské plazmě a v lidském séru

Stabilita připravených konjugátů v lidské krevní plazmě a séru byla sledována pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie. Konjugáty **I** a **IIIa** (konjugáty amidového a éterového typu) byly stabilní jak v lidské krevní plazmě, tak séru. Tyto výsledky odpovídaly výsledkům stabilitních studií provedených ve fosfátovém pufru o pH 7,4. Z těchto informací vyplývá, že z konjugátů **I** a **IIIa** by se léčivo uvolnilo pouze v místech se sníženým pH a to kyselě katalyzovanou hydrolyzou iminové vazby.

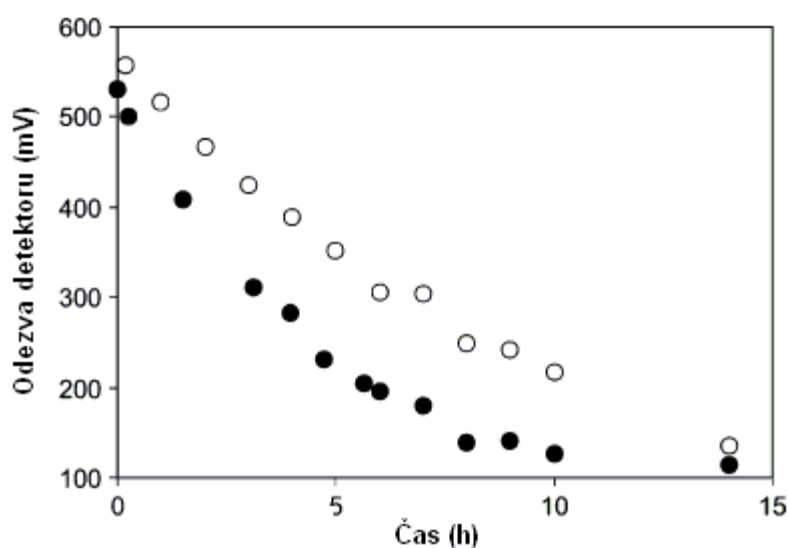
Jiná situace nastává v případě konjugátů, kde je aromatická spojka (4-formylbenzoová kyselina) spojena s molekulou polymeru esterovou vazbou (konjugáty **IIa**, **IIb**, **IIc** a **IId**). Graf 3 znázorňuje porovnání výsledků sledování stability konjugátu **IIa** v lidské plazmě a lidském krevním séru. K pozorování kinetických závislostí byl zvolen postup, kdy je v jednotlivých vzorcích stanovován obsah výchozího konjugátu. Jedná se o výhodnější přístup, než sledování nárůstu koncentrace volného AmB. Ten může podléhat interakcím s lipoproteiny¹⁵⁴ přítomnými v krevní plazmě či séru, což by vedlo ke zkreslení výsledků pozorování. Z dat uvedených v grafech 3 a 4 dále vyplývá, že výsledky měření rychlosti hydrolyzy konjugátu **IIa** v lidské krevní plazmě a séru jsou srovnatelné a vzniklé rozdíly jsou v mezích experimentální chyby. V případě experimentu, využívajícího jako médium krevní plazmu, však byla získaná data zatížena větší experimentální chybou a horší reprodukovatelností.

Graf 3: Časová závislost koncentrace konjugátu IIa v lidské krevní plazmě (●) (pH 7,4; 37°C) a v lidském krevním séru (○)(pH 7,4; 37°C).



Data uvedená v grafu 4 umožnila vypočítat poločas hydrolyzy konjugátu **IIa**, který byl stanoven na $t_{1/2} = (2.1 \pm 0.2)$ h. Tyto výsledky jsou podobné s výsledky, které stanovil Grennwald et al.⁷ při měření rychlosti hydrolyzy esterové vazby poly(ethyleglykolu) ($M_w = 5\ 000$) v krysím krevním séru ($t_{1/2} = 1-3$ h). Dále byla provedena stabilitní studie konjugátů **IIc** a **II d** v lidském krevním séru (Graf 4). Ze získaných dat byl proveden výpočet rychlosti hydrolyzy esterových vazeb jednotlivých konjugátů (Tabulka 6).

Graf 4: Časová závislost koncentrace konjugátu IIc (●) a II d v lidském krevním séru (○)(pH 7,4; 37°C).



Tabulka 6.: Stabilita esterové vazby konjugátů v lidské krevní plazmě a v lidském krevním séru

Konjugát	M_w PEG	$t_{1/2}$
IIa	5 000	(2.1 ± 0.2) h
IIc	10 000	(3 ± 0.3) h
II d	20 000	(5 ± 0.2) h

Z hodnot uvedených v tabulce 6 vyplývá, že v případě enzymatické hydrolyzy esterové vazby ovlivňuje rychlost tohoto děje molekulová hmotnost použitého nosiče. Rychlost hydrolyzy vazby klesá s molekulovou hmotností polymerního nosiče.

Lze tedy předpokládat, že v případě nosičů esterového typu (**IIa-d**) dochází během uvolnění léčiva z konjugátu nejprve k enzymatické hydrolyze esterové vazby za vzniku proléčiva 4-karboxybenzylideniminoamfotericinu B (**V**). Tento derivát amfotericinu B byl syntetizován a byla sledována jeho stabilita ve fosfátových pufrách o pH 7,4 a 5,5. Obdobně jako konjugáty (I-IVa) byla i v tomto případě přítomná iminovazba stabilní při pH 7,4, ale podléhala rychlé kyselé katalyzované hydrolyze při pH 5,5 ($t_{1/2} = (2.15 \pm 0.01)$ min). Z těchto poznatků lze usuzovat, že vzniklé proléčivo bude po uvolnění z vazby na polymer stabilní v prostředí lidské krevní plazmy a k hydrolyze iminovazby a uvolnění AmB dojde až v místě se sníženým pH. Předpokládaný způsob uvolnění léčiva z konjugátů esterového typu (**IIa-d**) je znázorěn ve schématu 10.

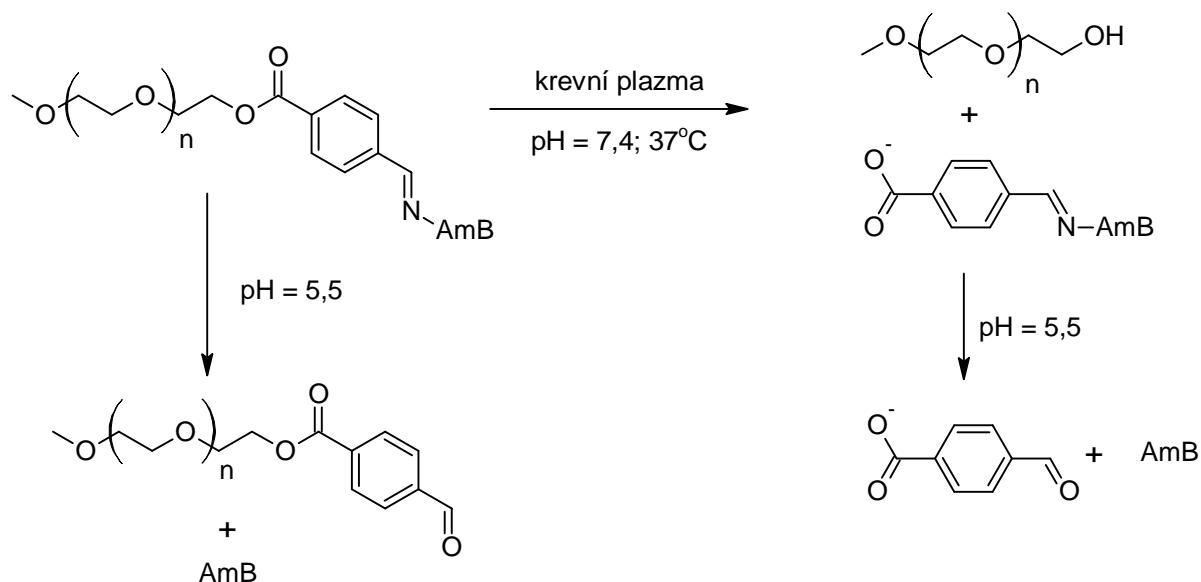


Schéma 10.

V případě starších typů konjugátů, které obsahovaly stabilní karbamátové vazby¹⁴, (v kombinaci s nekovalentně vázaným podílem léčiva) či konjugátů využívajících 1,6-benzylové eliminaci¹⁵ dochází k uvolnění AmB již v krevním řečišti. U konjugátů, připravených v rámci této disertační práce, by mělo docházet k uvolnění léčiva až v prostředí se sníženým pH, které se vyskytuje například v místě zánětu způsobeného napadením mikroorganismy^{196,197,208}. Připravené konjugáty můžeme tedy popsat jako pH-senzitní systém s řízeným uvolňováním léčiva.

Rychlost a způsob uvolnění léčiva z námi připravených konjugátů lze ovlivnit několika způsoby. Rychlost kyselé katalyzované hydrolýzy iminovazby, spojující nosič a léčivo, je ovlivněna typem vazby aromatické spojky na polymer (eher, amid, ester). V případě konjugátů typu amidu či esteru dochází v prostředí se sníženým pH k rychlé hydrolýze iminové vazby ($t_{1/2} \approx 2$ min). Naopak v případě nosiče éterového typu (**I**) je tento děj výrazně pomalejší ($t_{1/2} \approx 45$ min). Na základě studia chování připravených konjugátů v lidské krevní plazmě a séru lze předpokládat, že v případě konjugátů esterového typu může docházet k uvolnění léčiva ve dvou krocích – uvolněním proléčiva 4-karboxybenzylideniminoamfotericinu B (**V**) enzymatickou hydrolýzou esterové vazby a následnou kyselé katalyzovanou hydrolýzou iminovazby. Rychlost uvolnění proléčiva z konjugátu (resp. rychlost enzymatické hydrolýzy esterové vazby) je závislá na molekulové hmotnosti polymerního nosiče.

8.6 Studium akutní toxicity připravených konjugátů

U konjugátu AmB odvozených od α -methoxy- ω -(4-formylfenylkarboxyloxy)-poly(ethyleneglykolu) ($M_w = 5\ 000$) (**I**), α,ω -bis(4-formylfenylkarboxyloxy)-poly(ethylenglykolu) ($M_w = 10\ 000$) (**IIc**) a poly(*N*-6-(4-formylphenyl-carboxamino)-L- α -lysinu)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(*N*-6-(4-formylfenylkarboxamino)-L- α -lysinu) (**IV**) byla testována akutní toxicita na myších. Jako kontroly bylo využito AmB. Pro každý derivát byla pokusná zvířata rozdělena do 6 skupin. Studované konjugáty byly podávány intravenózně. Mortalita a projevy toxicity byly sledovány po dobu 14 dní. Hodnoty LD_{50} a interval spolehlivosti byl stanoven nelineární regresí s využitím GraphPad Prism (version 4; GraphPad software, Inc., San Diego CA, USA). Získaná data jsou uvedena v tabulce 7. Hodnoty uvedené v tabulce 6 odpovídají množství AmB přítomného v konjugátu.

Tabulka 7.:Hodnoty LD₅₀ vybraných konjugátů

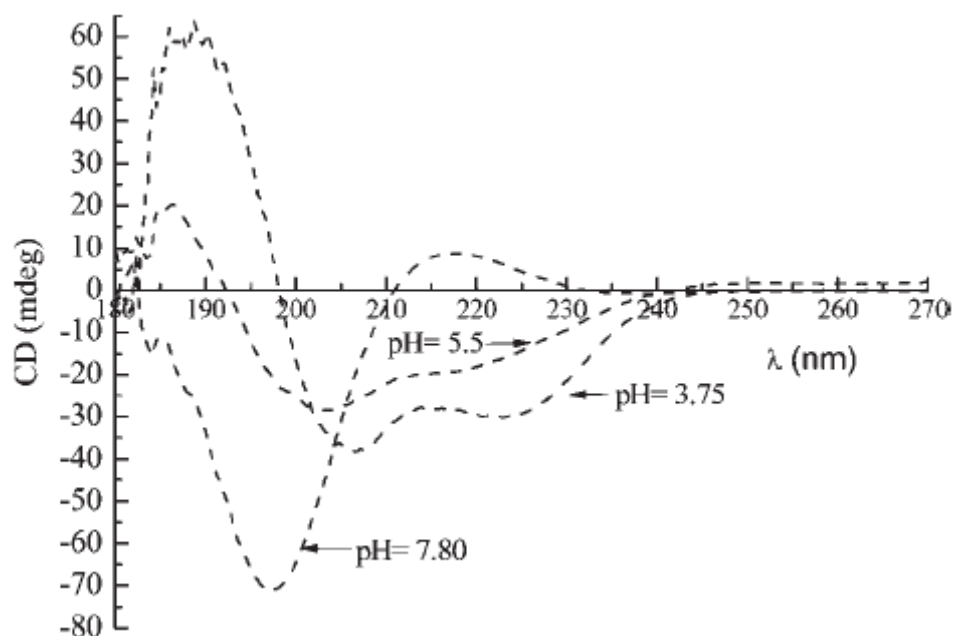
Konjugát	Kontrola (AmB)	IIa	IIc	IV
LD ₅₀ myš (mg/kg)	3,7	40,5	20,7	45,1
95% interval spolehlivosti	3,2–4,2	38,1–43,1	15,4–32,3	42,1–48,1

Z uvedených hodnot vyplývá, že konjugací s připravenými polymerními nosiči dochází až k pětinasobnému snížení akutní toxicity AmB. Výše popsané systémy pro cílenou distribuci AmB minimalizují hladinu volného AmB v plazmě a ovlivňují redistribuci léčiva mezi HDL a LDL cholesterolem. Nízká koncentrace volného léčiva bezprostředně po intravenózním podání konjugátu může omezovat projevy akutní toxicity¹⁵¹ léčiva a změny v redistribuci AmB mezi HDL a LDL cholesterol mohou snížit riziko poškození lednin, které je závažným projevem chronické toxicity tohoto antimykotika¹⁵⁴. Tuto hypotézu je však nutné potvrdit dalšími testy, např. provedením experimentů, které by sledovaly projevy subchronické a chronické toxicity konjugátů.

8.7 Studium vlivu chirálních polymerů na kinetiku krystalizace racemických směsí aminokyselin

Dalším cílem této práce bylo studium fyzikálně-chemických vlastností blokových kopolymerů poly(ehtylenglykolu) a poly(aminokyselin). Byla provedena studie sledující vliv konformace řetězců blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a poly(L- α -glutamové) kyseliny na jejich schopnost ovlivňovat proces krystalizace racemických směsí aminokyselin. Během syntetických prací byl připraven blokový kopolymer α -methoxy(polyethylenglykol)-*blok*-poly(L-glutamové) kyseliny. V koncentračním rozmezí 0,1 – 0,5 mg/ml vykazoval tento kopolymer dobrou rozpustnost ve vodě. Dále byly sledovány změny v sekundární struktuře řetězců připraveného polymeru ve vodném prostředí. K tomuto účelu bylo využito sledování cirkulárního dichroismu. Graf 5 znázorňuje změny v CD spektru připraveného kopolymeru při různých hodnotách pH.

Graf 5.: CD spektra blokového kopolymeru poly(ethylenglykolu) a poly(L-glutamové) kyseliny



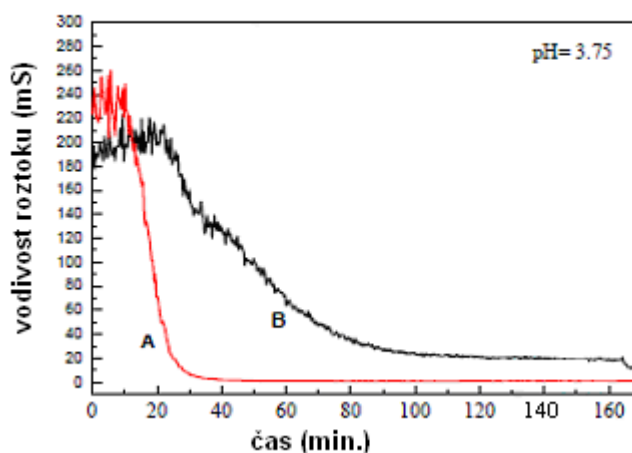
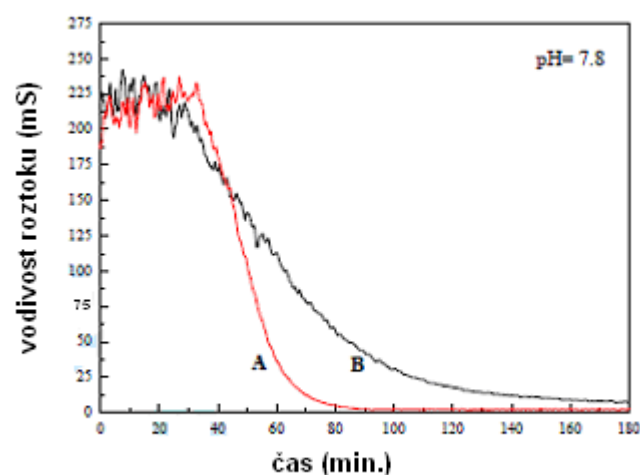
Syntetické polyaminokyseliny jsou schopné zaujímat tři základní typy sekundárních struktur – α -helix, β -skládaný list a konformaci náhodného klubka. Jak je možné pozorovat z CD spekter v grafu 5 při nízkých hodnotách pH (3,75) vykazoval polymer spektrum typické pro α -helikální uspořádání řetězce. Z hodnot v minimech 209 a 222 nm bylo vypočítáno, že při daném pH se 90-95 % řetězců nachází v konformaci α -helix. Se zvyšujícím se pH klesal počet řetězců kopolymeru, zaujímající tuto sekundární strukturu. Při pH 7,8 se nacházely všechny molekuly polymeru v konformaci náhodného klubka. Tyto výsledky jsou v souladu s poznatky, které byly získány při studiu chování poly(L-glutamové) ve vodě²¹¹.

Dále byl sledován vliv přítomnosti připraveného chirálního blokového kopolymeru na krystalizaci racemické směsi D,L-threoinu. D,L-threonin patří mezi skupinu látek, které z vodných roztoků krystalizují ve formě racemické směsi (konglomerátu). V takovéto směsi nacházíme dva typy krystalů, které jsou vždy tvořeny pouze jedním typem enantiomeru (D či L). Přítomnost chirálního polymeru v roztoku během krystalizace vyvolávala změny v kinetice tohoto děje, změny v morfologii vznikajících krystalů a ovlivňovala enantiomerní výtěžek procesu. Jako kontroly bylo využito jak vodných roztoků bez aditiv, tak roztoků obsahující nemodifikovaný α -methoxy(polyethylenglykol). Ve snaze eliminovat vliv povrchového náboje povrchu molekul a vyloučit vliv krystalizace v izoelektrickém bodu byly krystalizační experimenty

prováděny při dvou hodnotách pH (pH = 3,75 a 7,8). Další faktor, který ovlivňuje rychlost krystalizace a mechanismus formování krystalů, je míra přesycenosti roztoku. Proto byly všechny experimenty prováděny pouze s mírně přesycenými roztoky (index nasycenosti roztoku SI = 0,5 až 2). Rovněž byl proveden experiment kdy nasycený roztok sledované racemické směsi obsahoval čistou L-glutamovou kyselinu jako aditivum.

V první fázi byl sledován vliv sekundární struktury chirálního blokového kopolymeru na rychlost krystalizace racemické směsi D,L-threoninu. K tomuto účelu bylo využito měření vodivosti přesyceného roztoku D,L-threoninu během krystalizace. Výsledky měření rychlosti krystalizace při různých hodnotách pH matečného roztoku jsou znázorněny v grafu 6.

Graf 6: Časová závislost vodivosti roztoku D,L-threoninu během krystalizace. (A – červená křivka: bez přidavku kopolymeru; B – černá křivka: v přítomnosti chirálního kopolymeru)



Na základě získaných dat byl stanoven parametr „poločas krystalizace“ $t_{(0,5)}$ (čas za který poklesne vodivost krystalizačního roztoku na polovinu). Experiment byl proveden při dvou hodnotách pH (3,75 a 7,8). Výsledky shrnuje tabulka 8.

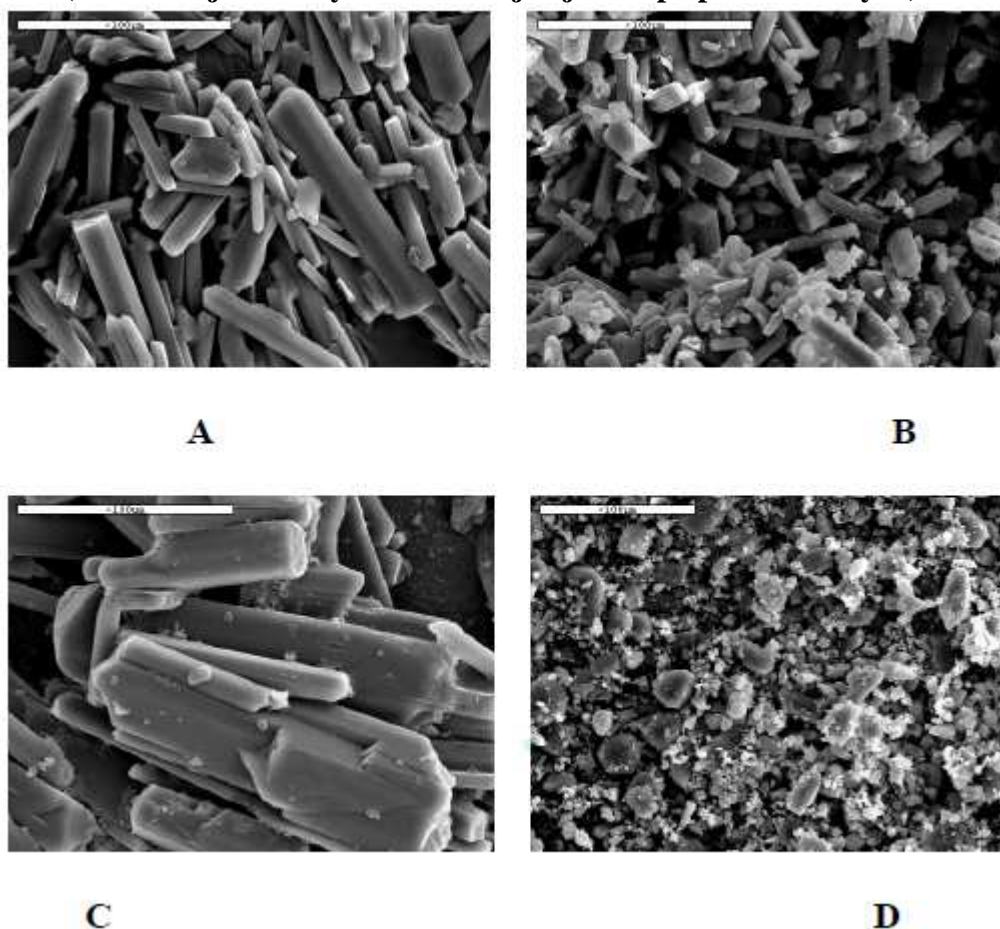
Tabulka 8.: Hodnoty poločasů krystalizace za různých podmínek

Ozn.	pH	přítomnost polymeru	$t_{(0,5)}$ (min)
A	7,8	–	50
B	7,8	+	70
C	3,75	–	20
D	3,75	+	60

Na rychlost krystalizace měla vliv hodnota pH krystalizačního roztoku. Při nižších hodnotách pH probíhala krystalizace výrazně rychleji (pokusy C a D v tabulce.) Přítomnost chirálního polymeru vedla vždy ke snížení rychlosti krystalizace. Efekt polymeru se výrazněji projevil v případě pokusu provedeném při pH 3,75. Zde došlo až k trojnásobnému prodloužení poločasu krystalizace. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že přítomnost chirálního polymeru mnohem intenzivněji ovlivňuje rychlost krystalizace v případě, kdy řetězce polymeru zaujímají α -heklíkální sekundární strukturu (pH = 3,75).

Dále byl sledován vliv přítomnosti chirálního kopolymeru na morfologii vznikajících krystalů, K tomuto účelu bylo využito skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Krystaly získané krystalizací bez přítomnosti chirálního polymeru při pH = 7,8 měly rozměry v průměru $20 \times 100 \mu\text{m}$. Sížením pH na hodnotu 3,75 byly získány krystaly o větších rozměrech ($40 \times 200 \mu\text{m}$). Přítomnost chirálního polymeru vždy vedla k poklesu velikosti vznikajících krystalů. Zejména při pH 3,75 byl tento pokles velmi výrazný. Vzniklé krystaly měly průměrnou velikost jen $10 \mu\text{m}$. Rovněž jejich tvar se změnil z podélně protáhlého na kulovitý (viz obrázek 1).

Obrázek 1: Vliv podmínek krystalizace na morfologii vznikajících krystalů (Označení jednotlivých vorků stejné jako v případě tabulky 8.)



Změny ve velikosti a tvaru krystalů ukazují na existenci silné interakce mezi povrchem vznikajících krystalů a polymerem nacházejícím se v konformaci α -helix.

Dalším parametrem, který byl během experimentů sledován, byl vliv na enantiomerní výtěžek procesu (e.e.). Tento parametr je definován jako absolutní rozdíl mezi zastoupením jednotlivých enantiomerů ve směsi²¹². V praxi se nejčastěji vyjadřuje jako procentuální enantiomerický výtěžek (rovnice 2.)

$$\text{e.e. (\%)} = ([\alpha_{\text{obs}}]/[\alpha_{\text{max}}])/100$$

α_{obs} = specifická otáčivost směsi

α_{max} = specifická otáčivost čistého enatiomeru

Rovnice 2.

Zjištěná data jsou znázorněna v tabulce 9. Z výsledku vyplývá, že k výraznému ovlivnění výsledného e.e. dochází zejména při pH 3,75, kdy se většina řetězců chirálního kopolymeru nachází v konformaci α -helix. Vliv polymeru na výsledek krystalizace se zvětšoval s jeho rostoucí koncentrací. Naopak přítomnost achirálního

α -methoxypoly(ethylenglykolu) nezpůsobila žádný výrazný posun ve výsledném enantiomerickém výtěžku. Ani přítomnost L-glutamové kyseliny nezvyšuje podíl jedné formy enantiomeru ve vzniklých krystalech²¹³. Všechny výsledky byly v souladu s pravidlem reciprocit. Dle tohoto pravidla R aditivum vytváří přednostně komplex s R enantiomery přítomnými v roztoku a tím zpomaluje růst jejich krystalů.

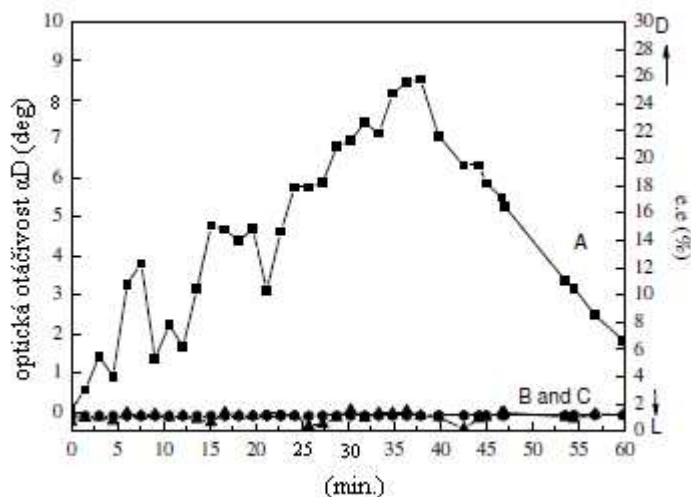
Tabulka 9

pH	Polymerní aditivum	Výtěžek krystalů (%)	e.e.
3,75	1 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	6,8	19,1 (L)
3,75	1 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	10,2	35,8 (L)
3,75	0,5 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	10,2	29,2 (L)
3,75	0,1 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	5,4	11,9 (L)
3,75	0,1 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	9,1	20,9 (L)
7,8	1 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	7,7	4,4 (L)
7,8	1 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	10,9	3,1 (L)
7,8	0,5 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	3,5	2,8 (L)
7,8	0,5 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	9	3,7 (L)
7,8	0,1 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	5,3	3,1 (L)
7,8	0,1 mg/ml PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -L-Glu ₂₀	8,7	1,1 (L)
Kontrola			
3,75	1 mg/ml PEG ₁₁₃	8,1	2,2 (D)
7,8	1 mg/ml PEG ₁₁₃	6,1	3,1 (L)

K potvrzení vlivu chirálního polymeru na rychlost krystalizace jednotlivých typů enantiomerů z roztoku D,L-threoninu byl proveden pokus, který sledoval časovou závislost změny optické otáčivosti krystalizačního roztoku. Experiment provedený při pH 3,75 prokázal, že polymer, který se za daných podmínek nachází v konformaci α -helix, zpomaluje krystalizaci D-threoninu. To způsobuje převahu molekul D-threoninu v krystalizačním roztoku. Ta se projeví nárůstem optické otáčivosti roztoku až k hodnotě $\alpha = + 8,32^\circ$. To odpovídá enantiomernímu výtěžku 26%. Po dosažení maxima křivky v čase $t = 37$ min, dochází k pomalé krystalizaci převažujícího D enantiomeru, což je dokumentováno poklesem optické otáčivosti krystalizačního roztoku (graf 7). Z grafu je rovněž zřejmé, že během pokusů, které byly provedeny bez přítomnosti polymeru, či

v přítomnosti samotného pol(ethylenglykolu), nedocházelo ke změnám v optické otáčivosti krystalizačního roztoku.

Graf 7.: Časová závislost změn optické otáčivosti krystalizačního roztoku D,L-threoninu



9. Závěr

Předkládaná práce byla zaměřena na přípravu systémů pro cílenou distribuci polyenových antimykotik. Pozornost byla zaměřena na přípravu kovalentních pH-sensitivních konjugátů modifikovaných poly(ethylenglykolů) s amfotericinem B. Během syntetických prací byla vypracována metodika přípravy modifikovaných poly(ethylenglykolů), které ve své struktuře obsahovaly aromatické acidolabilní spojky polymer–léčivo, které umožňují uvolnění léčiva v prostředí se sníženým pH. K zavedení těchto spojek bylo využito modifikace terminálních skupin poly(ethylenglykolu).

K tomuto účelu byly zvoleny tři přístupy:

- 1) tvorba nebiodegradabilní éterové vazby s 4-hydroxybenzaldehydem
- 2) acylace koncových hydroxylových skupin polyethylenglykolu 4-formylbenzoovou kyselinou
- 3) acylace koncových aminoskupin α -methoxy- ω -aminopoly(ethylenglykolu) a α,ω -diaminopoly(ethylenglykolu) 4-formylbenzoovou kyselinou

Pro vypracování metodiky přípravy jednotlivých typů nosičů byl jako výchozí polymer využíván α -methoxy(polyethylenglykol). Všechny aromatické spojky obsahovaly aldehydicke skupiny, které umožňovaly vznik iminové vazby mezi molekulou polymerního nosiče a léčiva. Získané zkušenosti byly využity pro přípravu série nosičů o molekulových hmotnostech 6 000, 10 000 a 20 000. Jednotlivé typy připravených

polymerních nosičů se lišily způsobem vazby aromatické spojky. V prvním případě byl 4-hydroxybenzaldehyd spojen s molekulou polymeru stabilní étherovou vazbou. Další dva typy nosičů využívaly k tomuto účelu biodegradabilní vazby – amidickou či esterovou. Modifikované poly(ethylglykoly) byly charakterizovány pomocí analytických instrumentálních metod – NMR spektroskopie, IČ spektrofotometrie.

Získané polymerní nosiče byly využity k přípravě kovalentních konjugátů s amfotericinem B. K vazbě na polymer byla využita primární aminoskupina mykosaminu, cukerné sloužky AmB, která je schopna vytvářet iminové vazby s aromatickými aldehydickými skupinami polymerních nosičů. Konjugáty byly charakterizovány IČ spektrofotometrií a gelovou permeační chromatografií.

Klíčovou část studie tvořilo studium stability připravených konjugátů za různých fyziologických podmínek. Jako modelová prostředí byly zvoleny fosfátové pufrы o pH 7,4 a 5,5²⁰⁴. Tlumivý roztok o pH 5,5 měl simulovat prostředí o sníženém pH, které se vyskytuje např. v místě zánětu^{196,197}. Dále byla studována stabilita konjugátů v krevní plazmě a krevním séru.

Samotné konjugáty byly stabilní v prostředí fosforečnanového pufru o pH = 7,4 (37 °C). Konjugáty byly navrhovány tak, aby k uvolnění léčiva docházelo v místech se sníženým pH. Tyto podmínky byly simulovány použitím fosforečnanového pufru pH = 5,5 (37 °C). Za těchto podmínek docházelo k hydrolyze iminovazby konjugátu. Provedené experimenty prokázaly vliv struktury připravených polymerních nosičů na rychlost uvolnění léčiva z kovalentní vazby na polymer. Ze získaných údajů vyplývá, že na rychlost kysele katalyzované hydrolyzy iminovazby má vliv typ substituce benzenového jádra aromatické spojky léčivo-nosič. V případě konjugátu **I** je touto spojkou 4-hydroxybenzaldehyd, který je s molekulou poly(ethylglykolu) spojen étherovou vazbou. Jedná se tedy o modifikaci benzenového jádra substituentem I. řádu, který se chová jako donor elektronů. Naproti tomu, je-li jako aromatické spojky využito 4-formylbezoové kyseliny, je benzenový kruh substituován elektron-akceptorovou skupinou (karbonyl esteru či amidu). Tento fakt způsobuje výrazné rozdíly v rychlosti kysele katalyzované hydrolyzy iminovazby konjugátů **IIa**, **IIc**, **IIId** a **IIIa** ($t_{1/2} \approx 2$ min) v porovnání s konjugátem **I** ($t_{1/2} = 45$ min).

Dále byla sledována stabilita připravených konjugátů v lidské krevní plazmě a séru. Konjugáty **I** a **IIIa**, ve kterých byla aromatická spojka vázána na polymer pomocí étherové resp. amidické vazby, byly stabilní jak v lidské krevní plazmě, tak séru. Tyto výsledky

odpovídaly výsledkům stabilitních studií provedených ve fosfátovém pufru o pH 7,4. Z těchto informací vyplývá, že z konjugátů **I** a **IIIa** se léčivo uvolňuje pouze v místech se sníženým pH a to kysele katalyzovanou hydrolyzou iminovazby. Jiná situace nastává v případě konjugátů, kde je aromatická spojka (4-formylbenzoová kyselina) spojena s molekulou polymeru esterovou vazbou (konjugáty **IIa**, **IIb**, **IIc** a **IId**). Studie prokázala, že v případě nosičů **IIa-d** dochází nejprve k enzymatické hydrolyze esterové vazby za vzniku proléčiva 4-karboxybenzylideniminoamfotericinu **B** (**V**). Rychlost tohoto děje klesá s rostoucí molekulovou hmotností použitého poly(ethylenglykolu). Z další získaných poznatků lze předpokládat, že vzniklé proléčivo **V** bude po uvolnění z vazby na polymer stabilní v prostředí lidské krevní plazmy a k hydrolyze iminovazby a uvolnění AmB dojde až v místě se sníženým pH. Ze studie, sledující akutní toxicitu připravených konjugátů *in vivo*, vyplývá, že vazba na polymerní nosič vedla ke snížení toxicity amfotericinu **B**²¹⁴.

Dalším cílem této práce byla příprava blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a polyaminokyselin. K přípravě těchto kopolymerů bylo využito postup „ring opening“ polymerace *N*-karboxyanhydridů α -aminokyselin (NCA). Byly připraveny dva typy polymeru – dvoublokový kopolymer α -methoxypoly(ethyleneglykol)-*block*-poly(L- α -glutamové) kyseliny a trojblokový kopolymer poly(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -lysin).

Trojblokový kopolymer poly(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -lysin) byl dále využit pro přípravu pH-senzitivního konjugátu amfotericinu **B**. Primární aminoskupiny polyamidové části kopolymeru byly nejprve modifikovány acylací 4-formylbenzoovou kyselinou. Ta sloužila jako aromatická spojka, která byla schopna tvořit acidolabilní iminovou vazbu s primární aminoskupinou mykosaminu amfotericinu **B**. Testy stability prokázaly, že připravený konjugát je stabilní ve fosfátovém pufru (pH = 7,4) a lidském krevním séru. K uvolnění amfotericinu **B** z vazby na polymer dochází kysele katalyzovanou hydrolyzou iminové vazby. Tento jev byl prokázán experimentem sledujícím stabilitu konjugátu ve fosfátovém pufru o pH 5,5. Ze studie, sledující akutní toxicitu připraveného konjugátů *in vivo*, vyplývá, že vazba na polymerní nosič vedla až k šestinásobnému snížení LD₅₀ v porovnání s amfotericinem **B**²¹⁵.

Dále byla provedena studie zabývající se fyzikálně-chemickými vlastnostmi blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a polyaminokyselin. K účelům této studie byl připraven dvoublokový kopolymer α -methoxypoly(ethyleneglykol)-*block*-poly(L- α -glutamové) kyseliny. Během experimentů byly sledovány změny v sekundární struktuře

tohoto kopolymeru v závislosti na pH roztoku. Sledováním změn ve spektrech cirkulárního dichroismu bylo prokázáno, že v závislosti na klesajícím pH roztoku roste podíl řetězců kopolymeru, jejichž polyamidová část zaujímá konformaci α -helix. Dále byl sledován vliv přítomnosti tohoto kopolymeru na kinetiku krystalizace racemické směsi D,L-threoninu. Studie měla prokázat možnost využití připraveného chirálního polymeru jako aditiva umožňujícího dělení směsí enantiomerů krystalizací. Provedené krystalizační pokusy prokázaly, že za podmínek, kdy je v roztoku zastoupen převážně α -helikální konformer (pH 3,75), dochází ke vzniku rozdílu mezi rychlostí krystalizace jednotlivých enantiomerů modelové racemické směsi. To vede ke vzniku směsi krystalů, v nichž jsou jednotlivé enantiomery zastoupeny v různé míře. Během experimentů byly rovněž sledovány změny v morfologii vznikajících krystalů threoninu. Přítomnost kopolymeru α -methoxypoly(ethyleneglykol)-*block*-poly(L- α -glutamové) kyseliny měla vliv na velikost i tvar vznikajících krystalů modelové racemické směsi D,L-threoninu.

Studium rozdílů v biologické aktivitě jednotlivých enantiomerů chirálních biologicky aktivních látek^{20,21} a vliv polymorfismu krystalických forem léčiv na jejich rozpustnost a biodostupnost jsou významnými směry ve farmacii^{22,23}. Získaná data přispívají k poznání procesů probíhajících během krystalizace racemických směsí opticky aktivních sloučenin a naznačují možnost využití chirálních polymerů jako aditiv umožňujících dělení směsí enantiomerů krystalizací.

10. Seznam použité literatury

1. Veronese, F. M.; Morpurgo, M., *Farmaco* 54, 497, 1999.
2. Duncan, R.; Gac-Breton, S.; Keane, R., *et al.*, *J Control Release* 74, 135, 2001.
3. Khandare, J.; Minko, T., *Prog Polym Sci* 31, 359, 2006.
4. Sedlák, M., *Collect Czech Chem Commun* 70, 269 2005.
5. Bhadra, D.; Bhadra, S.; Jain, P., *et al.*, *Pharmazie* 57, 5, 2002.
6. Bonora, G. M.; Drioli, S., *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2, 189, 2008.
7. Greenwald, R. B.; Choe, Y. H.; McGuire, J., *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev* 55, 217, 2003.
8. Veronese, F. M.; Pasut, G., *Drug Discov Today* 10, 1451, 2005.
9. Parveen, S.; Sahoo, S. K., *Clin Pharmacokinet* 45, 965, 2006.
10. Sundriyal, S.; Sharma, R. K.; Jain, R., *Curr Med Chem* 13, 1321, 2006.
11. Ting, P. C.; Walker, S. S., *Curr Top Med Chem* 8, 592, 2008.
12. Barrett, J. P.; Vardulaki, K. A.; Conlon, C., *et al.*, *Clin Ther* 25, 1295, 2003.
13. Dupont, B., *J Antimicrob Chemother* 49 Suppl 1, 31, 2002.
14. Sedlák, M.; Buchta, V.; Kubicová, L., *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett* 11, 2833, 2001.
15. Conover, C. D.; Zhao, H.; Longley, C. B., *et al.*, *Bioconjug Chem* 14, 661, 2003.
16. Ehrenfreund-Kleinman, T.; Azzam, T.; Falk, R., *et al.*, *Biomaterials* 23, 1327, 2002.
17. Yu, L.; Ding, J., *Chem Soc Rev* 37, 1473, 2008.
18. Harada, A.; Cammas, S.; Kataoka, K., *Macromolecules* 29, 6183, 1996.
19. Yamamoto, C.; Okamoto, Y., *Bull Chem Soc Jpn* 77, 227, 2004.
20. Hutt, A. J.; Tan, S. C., *Drugs* 52 Suppl 5, 1, 1996.
21. Hutt, A. J.; O'Grady, J., *J Antimicrob Chemother* 37, 7, 1996.
22. Wouters, J.; Ooms, F., *Curr Pharm Des* 7, 529, 2001.
23. Mallick, S.; Pattnaik, S.; Swain, K., *et al.*, *Drug Dev Ind Pharm* 33, 865, 2007.
24. Zalipsky, S., *Adv Drug Deliv Rev* 16, 157, 1995.
25. Dhawan, S.; Dhawan, S. K.; Varma, M., *et al.*, *Pharm Tech* 29, 72, 2005.
26. Caliceti, P.; Veronese, F. M., *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1261, 2003.
27. Owens, D. E., 3rd; Peppas, N. A., *Int J Pharm* 307, 93, 2006.
28. Kim, S. L.; Jeong, H. J.; Kim, E. M., *et al.*, *J Korean Med Sci* 22, 405, 2007.
29. Springer, C. J.; Niculescu-Duvaz, I. I., *Adv Drug Deliv Rev* 26, 151, 1997.
30. Ulbrich, K.; Šubr, V., *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1023, 2004.
31. Dhawan, S.; Dhawan, S. K.; Varma, M., *et al.*, *Pharm Tech* 29, 82, 2005.
32. van Vlerken, L. E.; Vyas, T. K.; Amiji, M. M., *Pharm Res* 24, 1405, 2007.
33. Soyez, H.; Schacht, E.; Vanderkerken, S., *Adv Drug Deliv Rev* 21, 81, 1996.
34. Abuchowski, A.; McCoy, J. R.; Palczuk, N. C., *et al.*, *J Biol Chem* 252, 3582, 1977.
35. Harris, J. M.; Sedaghat-Herati, M. R., US5252714, 1993
36. Harris, J. M.; Chess, R. B., *Nat Rev Drug Discov* 2, 214, 2003.
37. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., *Adv Drug Deliv Rev* 54, 459, 2002.
38. Bonina, F. P.; Montenegro, L.; De Caprariis, P., *et al.*, *J Control Release* 34, 223, 1995.
39. Sartore, L.; Peroni, I.; Ferruti, P., *et al.*, *J Biomater Sci Polym Ed* 8, 741, 1997.
40. Choi, H. K.; Chun, M. K.; Lee, S. H., *et al.*, *Int J Pharm* 341, 50, 2007.
41. Telyatnikov, V. V.; Guo, Z.; Shafer, J., EP1782834, 2007

42. Zacchigna, M.; Di Luca, G.; Maurich, V., *Farmaco* 57, 207, 2002.
43. Řihova, B.; Etrych, T.; Pechar, M., *et al.*, *J Control Release* 74, 225, 2001.
44. Ulbrich, K.; Etrych, T.; Chytil, P., *et al.*, *J Control Release* 87, 33, 2003.
45. Sedlák, M.; Kubicová, L.; Ventura, K., *et al.*, CZ298676B6, 2007
46. Adams, M. L.; Lavasanifar, A.; Kwon, G. S., *J Pharm Sci* 92, 1343, 2003.
47. Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G. S., *Adv Drug Deliv Rev* 54, 169, 2002.
48. Van Domeselaar, G. H.; Kwon, G. S.; Andrew, L. C., *et al.*, *Colloids Surf B Biointerfaces* 30, 323, 2003.
49. Lee, H. J.; Lee, J.-S.; Chansakul, T., *et al.*, *Biomaterials* 27, 5268, 2006.
50. Daly, W. H.; Poché, D., *Tetrahedron Lett* 29, 5859, 1988.
51. Wilder, R.; Mobashery, S., *J Org Chem* 57, 2755, 1992.
52. Timothy J. Deming, *J Polym Sci A Polym Chem* 38, 3011, 2000.
53. La, S. B.; Okano, T.; Kataoka, K., *J Pharm Sci* 85, 85, 1996.
54. Kataoka, K.; Matsumoto, T.; Yokoyama, M., *et al.*, *J Control Release* 64, 143, 2000.
55. Beyermann, J.; Kukula, H., *Macromolecules* 33, 5906, 2000.
56. Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G. S., *J Control Release* 77, 155, 2001.
57. Kwon, G. S.; Naito, M.; Kataoka, K., *et al.*, *Colloids Surf B Biointerfaces* 2, 429, 1994.
58. Masayuki, Y.; Mizue, M.; Noriko, Y., *et al.*, *J Control Release* 11, 269, 1990.
59. Harada, A.; Togawa, H.; Kataoka, K., *Eur J Pharm Sci* 13, 35, 2001.
60. Harada, A.; Kataoka, K., *Science* 283, 65, 1999.
61. Pechar, M.; Ulbrich, K.; Šubr, V., *et al.*, *Bioconjug Chem* 11, 131, 2000.
62. Yuan, F.; Leunig, M.; Huang, S. K., *et al.*, *Cancer Res* 54, 3352, 1994.
63. Yuan, F.; Dellian, M.; Fukumura, D., *et al.*, *Cancer Res* 55, 3752, 1995.
64. Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G. S., *J Control Release* 79, 165, 2002.
65. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T., *et al.*, *J Control Release* 65, 271, 2000.
66. Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y., *et al.*, *J Control Release* 32, 269, 1994.
67. Waldeck, B., *Pharmacol Toxicol* 93, 203, 2003.
68. Zbaida, D.; Lahav, M.; Drauz, K., *et al.*, *Tetrahedron* 56, 6645, 2000.
69. Zbaida, D.; Weissbuch, I.; Shavit-Gati, E., *et al.*, *Reactive Polym* 6, 241, 1987.
70. Mastai, Y.; Sedlák, M.; Cölfen, H., *et al.*, *Chem Eur J* 8, 2429, 2002.
71. Kašparová, P.; Antonietti, M.; Cölfen, H., *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 250, 153, 2004.
72. Haddad, N. E.; Powderly, W. G., *AIDS Read* 11, 365, 2001.
73. Zotchev, S. B., *Curr Med Chem* 10, 211, 2003.
74. Carrillo-Muñoz, A. J.; Quindós, G.; Lopez-Ribot, J. L., *Cur Med Chem - Anti-Infective Agents* 3, 297, 2004.
75. Buchta, V.; Jílek, P.; Horáček, J., *et al.*, *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*; Karolinum: Praha, 1998.
76. Castón-Osorio, J. J.; Rivero, A.; Torre-Cisneros, J., *Int J Antimicrob Agents* 32, S103, 2008.
77. Wong-Beringer, A.; Kriengkauykiat, J., *Pharmacotherapy* 23, 1441, 2003.
78. Edmond, M. B.; Wallace, S. E.; McClish, D. K., *et al.*, *Clin Infect Dis* 29, 239, 1999.
79. Blot, S.; Vandewoude, K., *Drugs* 64, 2159, 2004.
80. Perlroth, J.; Choi, B.; Spellberg, B., *Med Mycol* 45, 321, 2007.
81. Glasmacher, A.; Prentice, A. G., *J Antimicrob Chemother* 56 Suppl 1, i23, 2005.

82. Picazo, J. J.; González-Romo, F.; Candel, F. J., *Int J Antimicrob Agents* 32, S83, 2008.
83. M. Richardson, C. L.-F., *Clinical Microbiology and Infection* 14, 5, 2008.
84. de Pauw, B. E.; Picazo, J. J., *Int J Antimicrob Agents* 32, S167, 2008.
85. Cuenca-Estrella, M.; Bernal-Martinez, L.; Buitrago, M. J., *et al.*, *Int J Antimicrob Agents* 32, S143, 2008.
86. Prabhu, R. M.; Patel, R., *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 1, 31, 2004.
87. Eucker, J.; Sezer, O.; Graf, B., *et al.*, *Mycoses* 44, 253, 2001.
88. Kerr, O. A.; Bong, C.; Wallis, C., *et al.*, *Br J Dermatol* 150, 1212, 2004.
89. Pasqualotto, A. C.; Denning, D. W., *J Antimicrob Chemother* 61 Suppl 1, i19, 2008.
90. Arthur, R. R.; Drew, R. H.; Perfect, J. R., *Expert Opin Investig Drugs* 13, 903, 2004.
91. Baddley, J. W.; Pappas, P. G., *Drugs* 65, 1461, 2005.
92. Boucher, H. W.; Groll, A. H.; Chiou, C. C., *et al.*, *Drugs* 64, 1997, 2004.
93. McCormack, P. L.; Perry, C. M., *Drugs* 65, 2049, 2005.
94. Vazquez, J. A., *Future Microbiol* 2, 115, 2007.
95. Rogers, T. R.; Frost, S., *Br J Haematol* 144, 629, 2009.
96. St. Georgiev, V., *Current Drug Targets* 1, 261, 2000.
97. Bard, M.; Lees, N. D.; Barbuch, R. J., *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 147, 794, 1987.
98. Ishida, N.; Aoyama, Y.; Hatanaka, R., *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 155, 317, 1988.
99. Prasad, R.; Gaur, N. A.; Gaur, M., *et al.*, *Infect Disord Drug Targets* 6, 69, 2006.
100. Monk, B. C.; Goffeau, A., *Science* 321, 367, 2008.
101. Gottesman, M. M.; Pastan, I., *J Biol Chem* 263, 12163, 1988.
102. Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A., *et al.*, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 361, 1999.
103. Higgins, C. F., *Annu Rev Cell Biol* 8, 67, 1992.
104. Marger, M. D.; Saier, M. H., Jr., *Trends Biochem Sci* 18, 13, 1993.
105. Paulsen, I. T.; Brown, M. H.; Skurray, R. A., *Microbiol Rev* 60, 575, 1996.
106. Prasad, R.; Kapoor, K.; Kwang, W. J. In *International Review of Cytology*; Academic Press, 2004.
107. Kontoyiannis, D. P.; Lewis, R. E., *Lancet* 359, 1135, 2002.
108. White, T. C.; Holleman, S.; Dy, F., *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1704, 2002.
109. Pfaller, M. A.; Messer, S. A.; Hollis, R. J., *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1032, 2002.
110. Terrell, C. L., *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* 74, 78, 1999.
111. Wiebe, V.; Karriker, M., *Clin Tech Small Anim Pract* 20, 250, 2005.
112. Como, J. A.; Dismukes, W. E., *N Engl J Med* 330, 263, 1994.
113. Diasio, R. B.; Bennett, J. E.; Myers, C. E., *Biochem Pharmacol* 27, 703, 1978.
114. Haber, J.; Čermák, J., *Klin mikrobiol inf lék* 9, 294, 2003.
115. Bachmann, S. P.; Ramage, G.; VandeWalle, K., *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3657, 2003.
116. Ernst, E. J.; Roling, E. E.; Petzold, C. R., *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3846, 2002.
117. Luque, J. C.; Clemons, K. V.; Stevens, D. A., *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1452, 2003.

118. Abu-Salah, K. M., *Br J Biomed Sci* 53, 122, 1996.
119. Sowinski, P.; Pawlak, J. K.; Borowski, E., *et al.*, *J Antibiot (Tokyo)* 38, 175, 1985.
120. Gutteridge, J. M.; Thomas, A. H.; Cuthbert, A., *J Appl Biochem* 5, 53, 1983.
121. Thoma, K.; Kubler, N., *Pharmazie* 52, 294, 1997.
122. Cybulska, B.; Mazerski, J.; Borowski, E., *et al.*, *Tag-Ber Akad Landwirtsch Wiss DDR* 222, 299, 1984.
123. Gruszecki, W. I.; Gagos, M.; Herec, M., *J Photochem Photobiol B* 69, 49, 2003.
124. Ellis, D., *J Antimicrob Chemother* 49 Suppl 1, 7, 2002.
125. Torrado, J.; Ballesteros, M. P.; Torrado-Santiago, S.; *J Pharm Sci* 97, 2405, 2008.
126. Thoma K., New results in the photoinstability of antimycotics. In: *Drugs: Photochemistry and Photostability*. Albiny A., Fasani E. (Eds.), RSC, Cambridge, . 1998, 116-133.
127. Milhaud, J.; Ponsinet, V.; Takashi, M., *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1558, 95, 2002.
128. Knopik-Skrocka, A.; Bielawski, J., *Cell Mol Biol Lett* 7, 31, 2002.
129. Siegel, E. B., *Antimicrob Agents Chemother* 11, 675, 1977.
130. Rao, M. R.; Olinde, K. D.; Markov, A. K., *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 95, 217, 1997.
131. Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E., *Biochim Biophys Acta* 1567, 63, 2002.
132. Bolard, J.; Legrand, P.; Heitz, F., *et al.*, *Biochemistry* 30, 5707, 1991.
133. Fisher, P. B.; Bryson, V.; Schaffner, C. P., *J Cell Physiol* 100, 335, 1979.
134. Charbonneau, C.; Fournier, I.; Dufresne, S., *et al.*, *Biophys Chem* 91, 125, 2001.
135. Matsumori, N.; Eiraku, N.; Matsuoka, S., *et al.*, *Chem Biol* 11, 673, 2004.
136. Paquet, M. J.; Fournier, I.; Barwicz, J., *et al.*, *Chem Phys Lipids* 119, 1, 2002.
137. Volpon, L.; Lancelin, J. M., *Eur J Biochem* 269, 4533, 2002.
138. Ridente, Y.; Aubard, J.; Bolard, J., *FEBS Lett* 446, 283, 1999.
139. Barwicz, J.; Christian, S.; Gruda, I., *Antimicrob Agents Chemother* 36, 2310, 1992.
140. Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Murata, M., *Org Biomol Chem* 1, 3882, 2003.
141. Cheron, M.; Cybulska, B.; Mazerski, J., *et al.*, *Biochem Pharmacol* 37, 827, 1988.
142. Taylor, A. W.; Costello, B. J.; Hunter, P. A., *et al.*, *J Antibiot (Tokyo)* 46, 486, 1993.
143. Mazerski, J.; Bolard, J.; Borowski, E., *Biochim Biophys Acta* 1236, 170, 1995.
144. Khutorsky, V., *Biophys J* 71, 2984, 1996.
145. Baginski, M.; Gariboldi, P.; Borowski, E., *Biophys Chem* 49, 241, 1994.
146. Girois, S. B.; Chapuis, F.; Decullier, E., *et al.*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24, 119, 2005.
147. Cleary, J. D.; Rogers, P. D.; Chapman, S. W., *Pharmacotherapy* 23, 572, 2003.
148. Petrikkos, G.; Skiada, A., *Int J Antimicrob Agents* 30, 108, 2007.
149. Kleinberg, M., *Int J Antimicrob Agents* 27, 12, 2006.
150. Harbarth, S.; Pestotnik, S. L.; Lloyd, J. F., *et al.*, *Am J Med* 111, 528, 2001.
151. Imhof, A.; Walter, R. B.; Schaffner, A., *Clin Infect Dis* 36, 943, 2003.
152. Wali, R. K.; Henrich, W. L., *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11, 155, 2002.
153. Inselmann, G.; Inselmann, U.; Heidemann, H. T., *Eur J Intern Med* 13, 288, 2002.
154. Wasan, K. M.; Wong, J. C.; Corr, T., *et al.*, *Cancer Chemother Pharmacol* 57, 120, 2006.
155. Stuecklin-Utsch, A.; Hasan, C.; Bode, U., *et al.*, *Mycoses* 45, 170, 2002.
156. Nivoix, Y.; Zamfir, A.; Lutun, P., *et al.*, *J Infect* 52, 67, 2006.
157. Canuto, M. M.; Rodero, F. G., *Lacert Infect Dis* 2, 550, 2002.
158. Mukherjee, M.; Chakravarty, A. K.; Sengupta, S., *Curr Mikrobiol* 27, 1, 1993.

159. Broughton, M. C.; Bard, M.; Lees, N. D., *Mycoses* 34, 75, 1991.
160. Seo, K.; Akiyoshi, H.; Ohnishi, Y., *Microbiol Immunol* 43, 1017, 1999.
161. Agarwal, A. K.; Rogers, P. D.; Baerson, S. R., *et al.*, *J Biol Chem* 278, 34998, 2003.
162. Tobudic, S.; Lassnigg, A.; Kratzer, C., *et al.*, *Mycoses* 2009.
163. Malewicz, B., *Oceanology*, 19, 1975.
164. Pfaller, M. A.; Diekema, D. J., *J Clin Microbiol* 43, 1495, 2005.
165. Kayser, O.; Olbrich, C.; Yardley, V., *et al.*, *Int J Pharm* 254, 73, 2003.
166. Wasan, E. K.; Bartlett, K.; Gershkovich, P., *et al.*, *Int J Antimicrob Agents* 372, 76, 2009.
167. Magierowska-Jung, M.; Cefai, D.; Marrakchi, H., *et al.*, *Res Virol* 147, 313, 1996.
168. Konopka, K.; Guo, L. S.; Duzgunes, N., *Antiviral Res* 42, 197, 1999.
169. Malewicz, B.; Momsen, M.; Jenkin, H. M., *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 25, 772, 1984.
170. Grigoriev, V. B.; Adjou, K. T.; Sales, N., *et al.*, *J Mol Neurosci* 18, 271, 2002.
171. Adjou, K. T.; Demaimay, R.; Lasmezas, C., *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2810, 1995.
172. Xi, Y. G.; Ingrosso, L.; Ladogana, A., *et al.*, *Nature* 356, 598, 1992.
173. Legrand, P.; Romero, E. A.; Cohen, B. E., *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 36, 2518, 1992.
174. Yamashita, K.; Janout, V.; Bernard, E., *et al.*, *J Am Chem Soc* 117, 6249, 1995.
175. Cybulska, B.; Kupczyk, K.; Szlinder-Richert, J., *et al.*, *Acta Biochim Pol* 49, 67, 2002.
176. Szlinder-Richert, J.; Cybulska, B.; Grzybowska, J., *et al.*, *Farmaco* 59, 289, 2004.
177. Szlinder-Richert, J.; Mazerski, J.; Cybulska, B., *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1528, 15, 2001.
178. Hossain, M. A.; Ghannoum, M. A., *Expert Opin Investig Drugs* 10, 1501, 2001.
179. Maesaki, S., *Curr Pharm Des* 8, 433, 2002.
180. Muñoz, P.; Guinea, J.; Narbona, M. T., *et al.*, *Int J Antimicrob Agents* 32, S125, 2008.
181. Arikan, S.; Rex, J. H., *Expert Opin Emerg Drugs* 7, 3, 2002.
182. Bowden, R.; Chandrasekar, P.; White, M. H., *et al.*, *Clin Infect Dis* 35, 359, 2002.
183. Slain, D.; Miller, K.; Khakoo, R., *et al.*, *Clin Ther* 24, 1636, 2002.
184. Guo, L. S., *Adv Drug Deliv Rev* 47, 149, 2001.
185. Egito, E. S.; Araujo, I. B.; Damasceno, B. P., *et al.*, *J Pharm Sci* 91, 2354, 2002.
186. Esposito, E.; Bortolotti, F.; Menegatti, E., *et al.*, *Int J Pharm* 260, 249, 2003.
187. Brime, B.; Molero, G.; Frutos, P., *et al.*, *Eur J Pharm Sci* 22, 451, 2004.
188. Gaboriau, F.; Cheron, M.; Leroy, L., *et al.*, *Biophys Chem* 66, 1, 1997.
189. Dannaoui, E.; Afeltra, J.; Meis, J. F., *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2708, 2002.
190. Rogers, P. D.; Barker, K. S.; Herring, V., *et al.*, *J Antimicrob Chemother* 51, 405, 2003.
191. Adams, M. L.; Andes, D. R.; Kwon, G. S., *Biomacromolecules* 4, 750, 2003.
192. Adams, M. L.; Kwon, G. S., *J Control Release* 87, 23, 2003.
193. Vandermeulen, G.; Rouxhet, L.; Arien, A., *et al.*, *Int J Pharm* 309, 234, 2006.
194. Nishi, K. K.; Antony, M.; Mohanan, P. V., *et al.*, *Pharm Res* 24, 971, 2007.
195. Ehrenfreund-Kleinman, T.; Golenser, J.; Domb, A. J., *Biomaterials* 25, 3049, 2004.
196. Reeh, P. W.; Steen, K. H., *Prog Brain Res* 113, 143, 1996.
197. Dubin, A.; Estensoro, E., *Front Biosci* 13, 1340, 2008.

198. Garfield, P. R., US4002531, 1977.
199. Sieber, F.; Wentworth, P.; Janda, K. D., *Molecules* 5, 1018, 2000.
200. Gopinath, R.; Haque, S. J.; Patel, B. K., *J Org Chem* 67, 5842, 2002.
201. Wang-Ge, S.; Yun-Yun, Y.; Yan-Guang, W., *Synthesis* 530, 2005.
202. Wang, L.; Wang, S.; Bei, J., *Polym Adv Technol* 15, 617, 2004.
203. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protectiv groups in organic synthesis*; John Wiley & Sons, Inc., 1999.
204. In *Český lékopis 2002*; Grada Publishing a.s.: Praha, Chap. Tlumivé roztoky.
205. Diwu, Z.; Chen, C. S.; Zhang, C., *et al.*, *Chem Biol* 6, 411, 1999.
206. Yeh, Y.; Feeney, R. E., *Chem Rev* 96, 601, 1996.
207. Aoki, T.; Kobayashi, Y.; Kaneko, T., *et al.*, *Macromolecules* 32, 79, 1999.
208. Mellman, I.; Fuchs, R.; Helenius, A., *Annu Rev Biochem* 55, 663, 1986.
209. Mathias, L. J., *Synthesis*, 561, 1979.
210. Katzung, B., *Basic & Clinical Pharmacology*; Appleton & Lange,; Norwalk, CN, 2001.
211. Holzwarth, G.; Doty, P., *J Am Chem Soc* 87, 218, 1965.
212. Moss, G. P., *Pure Appl. Chem.* 68, 2193, 1996.
213. Addadi, L.; Berkovitch-Yellin, Z.; Domb, N., *et al.*, *Nature* 296, 21, 1982.
214. Sedlák, M.; Pravda, M.; Štaud, F., *et al.*, *Bioorg Med Chem* 15, 4069, 2007.
215. Sedlák, M.; Pravda, M.; Kubicová, L., *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett* 17, 2554, 2007.

11. Publikované vědecké práce



Available online at www.sciencedirect.com



Bioorganic &
Medicinal
Chemistry

Bioorganic & Medicinal Chemistry 15 (2007) 4069–4076

Synthesis of pH-sensitive amphotericin B–poly(ethylene glycol) conjugates and study of their controlled release in vitro

Miloš Sedlák,^{a,*} Martin Pravda,^b Frantisek Staud,^c Lenka Kubicová,^c
Katerina Týčová^d and Karel Ventura^d

^aDepartment of Organic Chemistry, University of Pardubice, Čs. legii 565, 532 10 Pardubice, Czech Republic

^bDepartment of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^cDepartment of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^dDepartment of Analytical Chemistry, University of Pardubice, Čs. legii 565, 532 10 Pardubice, Czech Republic

Received 17 October 2006; revised 26 March 2007; accepted 30 March 2007

Available online 3 April 2007

Dedicated to Professor Jaromir Kaválek on the occasion of his 70th birthday.

Abstract—New intravenous conjugates of amphotericin B (AMB) with poly(ethylene glycols) (PEG) ($M = 5000, 10,000, 20,000$) have been synthesized and characterised. The intermediate PEGs possess a 1,4-disubstituted benzene ring with aldehyde group at the end of the chain. The benzene ring is connected with PEG at its 4-position (with respect to the aldehyde group) by various functional groups (ether, amide, ester). Reaction of terminal aldehyde group of the substituted PEGs with AMB gave conjugates containing a pH-sensitive imine linkage, which can be presumed to exhibit antimycotic effect at sites with lowered pH value. All types of the conjugates are relatively stable in phosphate buffer at physiological conditions of pH 7.4 (37 °C), less than 5 mol% AMB being split off from them within 24 h. For a model medium of afflicted tissue was used a phosphate buffer (pH 5.5, 37 °C), in which controlled release of AMB from the conjugates takes place. The imine linkage is split to give free AMB with half-lives of 2–45 min. The rate of acid catalysed hydrolysis depends upon substitution of the benzene ring; however, it does not depend on molecular weights of the PEGs used. The conjugates with ester linkage undergo enzymatic splitting in human blood plasma and/or blood serum at pH 7.4 (37 °C) with half-lives of 2–5 h depending on molecular weights of the PEGs used ($M = 5000, 10,000, 20,000$). At first, the splitting of ester linkage produces the relatively stable pro-drug, that is, 4-carboxybenzylideneamphotericin B, which is decomposed to AMB and 4-formylbenzoic acid in a goal-directed manner only at pH 7 ($t_{1/2} = 2$ min, pH 5.5, 37 °C). A goal-directed release of AMB is only achieved by acid catalysed hydrolysis of imine linkage, either from the polymeric conjugate or from the pro-drug released thereof. The LD₅₀ values determined in vivo (mouse) are 20.7 mg/kg and 40.5 mg/kg for the conjugates with ester linkage ($M = 10,000$ and 5000, respectively), which means that they are ca. 6–11 times less toxic than free AMB.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The AIDS epidemic, cancer chemotherapy, pervasive use of antibiotics and immunosuppressive drugs used for organ transplantation have all contributed to the emergence of fungal pathogens¹ like *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, etc. Polyene macrocyclic antibiotics, particularly amphotericin B (AMB), have been found to be effective and extensively used drugs in treatment of both pre-systemic and

systemic fungal infections.² Amphotericin B was isolated by Trejo and Bennett³ half a century ago from the *Streptomyces nodosus* found along the Orinoco River in Tebladora (Venezuela). However, clinical applications of AMB are limited by its poor solubility in water and by possible serious organ toxicity, particularly nephrotoxicity, which appears to be dose dependent.⁴ With the aim of increasing the therapeutic index of AMB, a number of formulations and conjugates have been adopted, which enable solubilization of AMB in aqueous media and also ensure continuous dosage usually accompanied by lowered toxicity.⁵ The clinically applied formulations are non-covalent complexes of the type of amphotericin B lipid complex (ABLC⁶), which are colloidal systems composed of biodegradable phospholipid matrices (e.g.,

Keywords: Amphotericin B; Poly(ethylene glycol); Drug polymer conjugates; Acid-sensitivity; Controlled release in vitro.

* Corresponding author. Tel.: +420 466 037 015; fax: +420 466 037 068; e-mail: milos.sedlak@upce.cz

0968-0896/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bmc.2007.03.083

dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)⁶ or modified poly(ethylene glycols) [e.g., distearoyl-*N*-[(monomethoxy)poly(ethylene glycol)succinyl]-phosphatidylethanolamin (DSPE-PEG)]⁶ with amphotericin B. Such lipid formulations of amphotericin B often significantly increase antifungal activity *in vitro* as compared with common amphotericin B.⁷ Our previous paper⁸ suggested a synthesis of a conjugate for intravenous application in which 50 mol% AMB is bound by covalent carbamate bond to methoxy poly(ethylene glycol) (mPEG) and the remaining 50 mol% is bound non-covalently in this conjugate. This non-covalent bond is most probably realised by π - π interaction and hydrogen bonds between the covalently bound AMB and the monomeric AMB in similar way⁹ as it is in the aggregated forms of AMB. Our conjugate exhibits very good water solubility and an antimycotic spectrum similar to that of the liposomal and deoxycholate formulations.⁸ At present, we are finishing pharmacokinetic studies *in vivo* of this conjugate on animal models. Our study⁸ was continued by the team of R.B. Greenwald,¹⁰ who prepared conjugates of AMB with poly(ethylene glycol) (PEG) in which AMB is bound by means of labile carbamate bond that is decomposed in blood plasma by elimination mechanism to give free AMB ($t_{1/2} = 1.5$ –3 h, blood plasma, rat). This labile bond between PEG and AMB is constructed in such a way that the first slowest step of release consists in enzymatic reaction in which blood hydrolases split the ester linkage. In the second step, the pro-drug thus formed undergoes a fast base-catalysed 1,6-benzyl elimination¹¹ giving quinonemethide and carbamic acid of AMB. The quinonemethide is then immediately hydrated, and the carbamic acid of AMB is rapidly decomposed to carbon dioxide and free AMB.^{10,11} This system of release of active substance appears to be suitable for goal-directed distribution of cytostatics containing primary amino group, namely in the delivery systems that in their polymeric carrier contain a bound monoclonal antibody possessing affinity to specific glycoprotein surface of tumour-transformed cells.¹² However, this principle cannot be applied generally to all groups of drugs. For example, in the case of PEG-AMB conjugates this system of 1,6-benzyl elimination results in relatively fast splitting off of free AMB directly into the blood circulation, which rapidly increases its concentration in kidneys, and this is undesirable due to its nephrotoxicity. The AMB released in blood undergoes subsequent distribution¹³ between the present lipoproteins (high-density-lipoprotein (HDL) and low-density-lipoprotein (LDL)). Previously, it has been found out¹⁴ that the increased level of complexes of AMB with LDL causes nephrotoxic effects of AMB.

The aim of the present paper is synthesis and characterisation of a new type of AMB-PEG conjugates in which AMB is bound in such a way as to prevent splitting off of free AMB in blood circulation during intravenous applications: AMB should be released in a goal-directed manner only at the site of activity of fungal pathogens. One of the methods of achieving such goal-directed antimycotic action in such cases is based on the fact that a number of pathogens, inclusive of fungal agents, induce such biochemical processes in the afflicted tissue¹⁵ that

lead to local lowering of pH value as much as to pH ≈ 5 . This piece of knowledge has been utilised recently in constructing very efficient pH-sensitive lipid formulations (liposomes) of nystatin.¹⁶ An analogous principle was also used for pH-sensitive spacers between the drug and carrier that enable release of an active drug from the carrier in a tumour tissue, either slightly acidic extracellular fluids or, after endocytosis, in endosomes or lysosomes of cancer cell.^{17–19} For the pH-sensitive bond between amino group of mycosamine AMB and PEG, we have selected imino group, which should be sufficiently stable at pH values that are usual in blood and tissues (pH 7.4–7.6), for example, in blood plasma or blood serum. On the other hand, the bond should be very easy to hydrolyse at lowered pH value. The chosen carriers are poly(ethylene glycols) (mPEG $M = 5000$ and PEG $M = 10,000, 20,000$), which can be chemically substituted very easily^{20,21} and are non-toxic, non-immunogenic, non-antigenic, that is, resistant to recognition by the immunity system of organism.²² Figure 1 presents the structures of our selected conjugates: α -methoxy- ω -(4-AMB-iminomethylphenoxy)poly(ethylene glycol) (**1**), in which the poly(ethylene glycol) chain is bound to the benzene ring by means of ether linkage. This linkage should not be split by usual components of blood plasma. The 4-position of the benzene ring of the conjugate carries the pH-sensitive imino group connecting the conjugate with AMB. The second suggested conjugate, that is, α -methoxy- ω -(4-AMB-iminomethylphenylcarboxamino)-poly(ethylene glycol) (**2**), contains linkages that are not split in blood plasma, namely amide group directed to the poly(ethylene glycol) chain and pH-sensitive imino group directed to AMB. The third type of our suggested conjugates includes α -methoxy- ω -(4-AMB-iminomethylphenylcar-

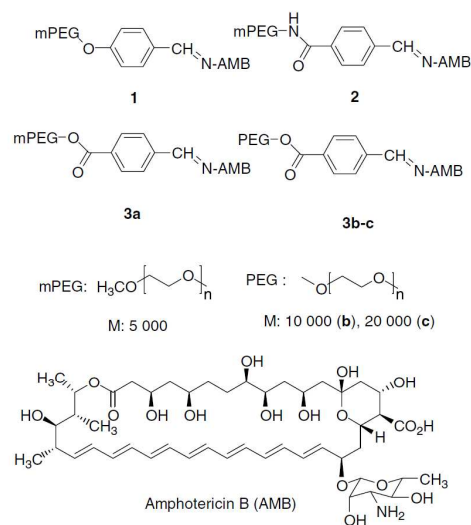


Figure 1. Structures of PEG amphotericin B conjugates **1**, **2**, **3a**–**c**.

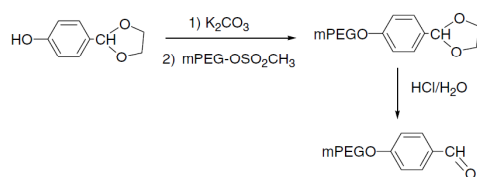
bonyloxy)poly(ethylene glycol) (**3a**) and α,ω -bis(4-AMB-iminomethylphenylcarbonyloxy)poly(ethylene glycols) (**3b–c**), which in contrast to the previous derivatives have ester linkage between PEG chain and 4-iminomethylbenzoic acid that can be split by blood hydrolases. Apart from synthesis and characterisation of the suggested conjugates, it was also the aim of this paper to study the behaviour of the conjugates in blood plasma and/or blood serum and in phosphate buffers (pH 7.4; 5.5). The paper also includes determination of toxicity of the synthesized conjugates on mouse model *in vivo* in order to enable evaluation of anticipated advantages of the above-mentioned conjugates.

2. Results and discussion

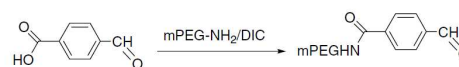
2.1. Synthesis of substituted poly(ethylene glycols) and conjugates

First, we synthesized substituted poly(ethylene glycols) having a terminal benzene ring with aldehyde group. The benzene ring is bound to the poly(ethylene glycol) chain at 4-position with respect to the aldehyde group by means of various bridges (ether, amide, ester) (Fig. 1). α -Methoxy- ω -(4-formylphenoxy)poly(ethylene glycol) ($M = 5000$) was prepared by nucleophilic substitution of methanesulfonic group in α -methoxy- ω -methanesulfonyl poly(ethylene glycol)²³ with anion of 4-(1,3-dioxolan-2-yl)phenol.²⁴ The reaction was carried out in melt (65 °C) using a 15-fold excess of 4-(1,3-dioxolan-2-yl)phenol in the presence of potassium carbonate as basic catalyst (Scheme 1). Deblockade of aldehyde functional group was carried out by hydrolysis in 1 M hydrochloric acid. After extraction with dichloromethane, the crude product containing ca 5% free 4-hydroxybenzaldehyde was twice recrystallized from propan-2-ol; yield 68 % pure product.

α -Methoxy- ω -(4-formylphenylcarboxamino)poly(ethylene glycol) ($M = 5000$) was prepared by reaction of α -amino- ω -methoxypoly(ethylene glycol) with 4-formylbenzoic acid, which was pre-activated with diisopropylcarbodiimide (DIC); yield of reaction 86% (Scheme 2). α -Methoxy- ω -(4-formylphenoxy)poly(ethylene glycol) ($M = 5000$) and α,ω -bis(4-formylphenylcarbonyloxy)poly(ethylene glycol)²⁵ ($M = 10,000$) or α,ω -bis(4-formylphenylcarbonyloxy)poly(ethylene glycol)²⁵ ($M = 20,000$) were prepared similarly in accordance with the literature.²⁵ The synthesized starting substituted PEGs were characterised by means of ¹H NMR. Comparison



Scheme 1. Synthesis of α -methoxy- ω -(4-formylphenoxy)poly(ethylene glycol).



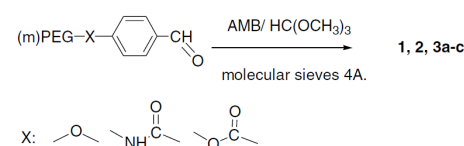
Scheme 2. Synthesis of α -methoxy- ω -(4-formylphenylcarboxamino)poly(ethylene glycol).

of integral intensities of hydrogen atoms of poly(ethylene glycol) chain and hydrogen atoms of aromatic system and/or of CH=O or CONH groups showed that the terminal functional group(s) (OSO₂CH₃, NH₂ or OH) of poly(ethylene glycol) chain were transformed practically quantitatively. Infrared spectroscopy revealed typical bands of the functional groups at 3225, 1693 cm⁻¹ (CONH), 1701 cm⁻¹ (CHO) and 1735 cm⁻¹ for the ester functional group. The syntheses of conjugates **1**, **2**, **3a–c** made use of the reaction²⁵ of the aldehyde functional group present in the benzene ring of substituted PEG with the primary amino group of amphotericin B in the presence of activated molecular sieves 4A and trimethyl orthoformate giving imino linkage (Schiff's base) (Scheme 3).

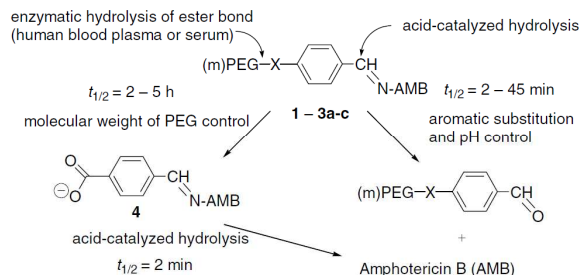
The yields of conjugates varied in the interval of 74–92%. The conjugates were characterised by means of infrared spectroscopy; the spectra exhibited the following bands: 1735 cm⁻¹ (ester), 1719 cm⁻¹ (lactone), 1638 cm⁻¹ (imine). Using HPLC and GPC, we estimated the purity of conjugates; the content of free AMB was <1 mol%. Moreover, UV/vis spectroscopy showed that the AMB content in conjugates **1**, **2**, **3a** corresponds to the molar ratio of 1:1 (AMB/PEG) and in conjugates **3b–c** to 2:1 (AMB/PEG). The UV/vis spectra of all the conjugates measured in water exhibit identical typical maxima corresponding to the polyene system of AMB (346, 367, 386, 409 nm). In an independent way, we also synthesized 4-carboxybenzylideneamphotericin B (**4**), that is, the pro-drug formed by splitting of ester linkage of conjugates **3** by hydrolases of blood plasma and/or blood serum (Scheme 4). 4-Carboxybenzylideneamphotericin B (**4**) was prepared by reaction of AMB with 4-formylbenzoic acid in dimethylsulfoxide at similar conditions to those used for conjugates **1–3**; composition of the product was verified by means of ESI-MS, showing the molecular peak [M+H]⁺ *m/z* 1057.2. IR spectrum showed typical bands of lactone at 1719 cm⁻¹ and imine at 1638 cm⁻¹.

2.2. Study of hydrolytic behaviour of conjugates in phosphate buffers, human blood plasma and human blood serum

A key part of the research consisted in investigation of behaviour of synthesized conjugates in various media



Scheme 3. Synthesis of PEG amphotericin B conjugates **1**, **2**, **3a–c**.



Scheme 4. Survey of controlled release of AMB from conjugates.

imitating conditions that control the stability of solutions of the conjugates and their behaviour in organism. First, we studied stability of all the conjugates **1–3a–c** in phosphate buffers and then in the medium of human blood plasma and/or human blood serum. On the basis of monitoring of time changes in UV/vis spectra, we found out that in solutions of phosphate buffer at the value of pH 7.4, (7×10^{-2} M, 37 °C) all types of conjugates are relatively stable, very slow hydrolysis being only observed in the case of imino linkage: less than 5 mol% AMB is split off from the conjugates during 24 h. All the conjugates were constructed in such a way as to release AMB in goal-directed manner only at spots with pathologically lowered pH value. The model medium imitating the afflicted tissue (characterised by the lowered pH value) was a phosphate buffer solution²⁶ (pH 5.5; 7×10^{-2} M). During the hydrolysis of conjugate **3a**, we observed absorbance decrease at 346 nm (corresponding to concentration drop of conjugate) and absorbance increase at 367, 386 and 409 nm. The absorption band at 409 nm is specific⁹ for monomeric AMB, and its time increase corresponds to the rate of its formation (Fig. 2).

Similar spectral record was also obtained during monitoring of hydrolysis of the other conjugates **1–3b–c**. Conjugates **2**, **3a–c** in phosphate buffer medium (pH 5.5; 7×10^{-2} M) undergo a relatively fast splitting of imino linkage giving free AMB, the half-lives of individual conjugates being as follows: **2**: $t_{1/2} = (1.8 \pm 0.2)$ min; **3a**: $t_{1/2} = (2.1 \pm 0.1)$ min. We also found out that the acid-catalysed hydrolyses of conjugates **3b**: $t_{1/2} = (2.4 \pm 0.2)$ min and **3c**: $t_{1/2} = (2.2 \pm 0.4)$ min proceed at comparable rates, which means that the molecular weight of poly(ethylene glycol) carrier has virtually no effect on these rates. Conjugate **1** with different substitution in benzene ring exhibits a rate decrease of acid-catalysed hydrolysis of imino linkage ($t_{1/2} = (45 \pm 1)$ min). The rate difference of hydrolyses of conjugate **1** as compared with conjugates **2**, **3a–c** corresponds to the effect of substituent at 4-position of benzene ring upon the acid-catalysed hydrolysis of imines.²⁷ Conjugates **1** and **2** are hydrolysed at measurable rates only in the imine moiety, the difference between rates of their acid-catalysed hydrolyses being approximately one order of magnitude. Conjugates **3a–c**, in contrast to conjugates **1** and **2**, contain two types of

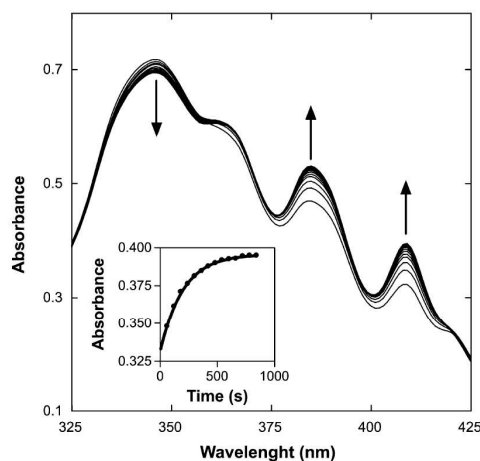


Figure 2. Time changes of spectrum of conjugate **3a** in phosphate buffer (pH 5.5; 7×10^{-2} M, 37 °C). The inset represents the absorbance–time dependence during hydrolysis of imino linkage in **3a** at 409 nm ($t_{1/2} = (124 \pm 8)$ s).

hydrolysable linkages, namely ester and imine linkage (Fig. 1). If the same conditions (pH 5.5, 7×10^{-2} M) were adopted when monitoring the stability of ester of methoxy-*o*-(4-formylphenoxy)poly(ethylene glycol), it was found that the hydrolysis of ester linkage proceeds immeasurably slowly in this case, which confirmed the fact that in the phosphate buffer medium the splitting of conjugates exclusively concerns their imino linkage and gives AMB.

Furthermore, using HPLC, we monitored the stability and/or decomposition of all the conjugates in media of human blood plasma or human blood serum. Results of the kinetic measurements indicate that conjugates **1** and **2** are relatively stable in both blood serum and blood plasma (pH 7.4), like in phosphate buffer (pH 7.4). Conjugates **3a–c** in blood serum and/or blood plasma undergo enzymatic hydrolysis of their ester linkage by action of blood hydrolases, which is indicated by the decrease in concentration of the starting conjugate.

The kinetic dependence shown in Figure 3 indicates that the results of kinetic measurements of hydrolysis of conjugate **3a** in blood plasma and in blood serum were mutually comparable within experimental error. However, the determination of concentration of the conjugates in blood plasma was loaded with larger error and worse reproducibility (Fig. 3). From the standpoint of analysis, it appeared more appropriate to monitor the concentration decrease of starting conjugates than to follow the AMB increases, since AMB interacts with the present lipoproteins,²⁸ which results in concentration changes of free AMB that are not connected with the kinetic course of decrease in the starting conjugates.

The kinetic dependence shown in Figure 3 also allows calculation of half-life (2.1 ± 0.1 h) of enzymatic hydrolysis of conjugate **3a** in human blood serum. The half-life found by us is comparable with literature data,^{10,12} reporting splitting of ester linkages in poly(ethylene glycol) ($M = 5000$) in rat blood serum with the half-life values of 1–3 h. However, in our case the splitting in blood plasma or serum produces the relatively stable pro-drug **4**, that is, AMB with bound 4-formylbenzoic acid, which can subsequently release AMB only at the conditions of lowered pH value, that is, at the spot of damaged tissue. Our kinetic measurements confirmed (phosphate buffer, pH 5.5, 7×10^{-2} M, 37 °C) that the half-life of acid-catalysed hydrolysis of pro-drug **4** ($t_{1/2} = (2.15 \pm 0.01)$ min) is comparable with the half-lives of acid-catalysed hydrolyses of conjugates **3a–c** (Scheme 4). Moreover, we found out that the half-lives of enzymatic hydrolyses of ester linkage by blood hydrolases in plasma and/or serum depend on molecular weights of individual conjugates: **3a**: $t_{1/2} = (2.1 \pm 0.2)$ h; **3b**: $t_{1/2} = (3.0 \pm 0.3)$ h; **3c**: $t_{1/2} = (5 \pm 0.2)$ h; (PEG: $M = 5000, 10,000, 20,000$) (Figs. 3 and 4).

From these results it is obvious that molecular weight of carrier controls the rate of enzymatic release of pro-drug

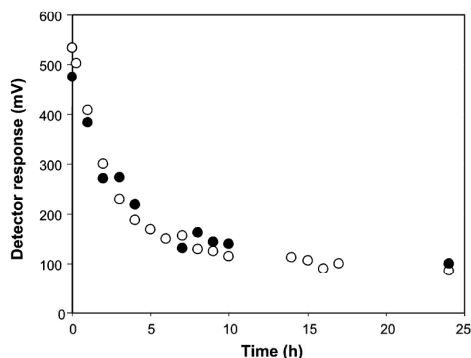


Figure 3. Concentration–time dependence of conjugate **3a** in human blood plasma (●) (pH 7.4) and in human blood serum (○) (pH 7.4) at 37 °C. The conjugate decrease represents the enzymatic hydrolysis of ester linkage by blood hydrolases ($t_{1/2} = 2$ h).

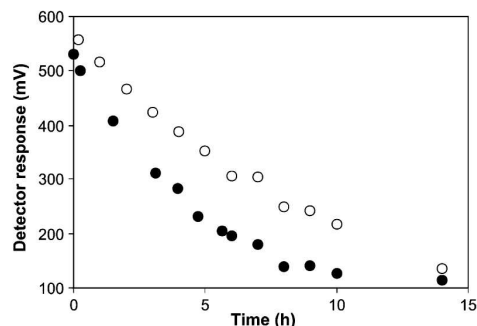


Figure 4. Concentration–time dependence of conjugate **3b** (●) ($t_{1/2} = (3.0 \pm 0.3)$ h) and **3c** (○) ($t_{1/2} = (5.0 \pm 0.3)$ h) in human blood serum (pH 7.4) at 37 °C.

4 (Scheme 4). Application of PEGs with higher molecular weight results in retardation of release of pro-drug **4** and can be favourable from the point of view of prolongation of the drug effect, not only for the reason of generally known¹² slower excretion of PEGs with higher molecular weight by kidneys.

2.3. Study of toxicity of conjugates **3a** and **3b**

Acute toxicity was tested for AMB as a control and for two conjugates (**3a** and **3b**).

Mice (NMRI, weight 25–30 g) were purchased from Biotest Ltd. Konarovice, Czech Republic. For each compound tested, the mice were divided into 6 groups of 10 males, and the compound was administered intravenously via the tail vein at doses carefully determined after a series of preliminary trials. Most deaths occurred 5 min to 24 h after iv administration of the tested compound. When compared to control, PEGylation increased LD_{50} 11 times in the case of **3a** conjugate and about five times in the case of **3b** conjugate (see Table 1).

Both the toxicities of conjugates determined *in vivo* and the results of hydrolytic studies *in vitro* agree with the presumption that our suggested system of two-stage independent release of AMB minimizes the level of free AMB and its complexes with LDH in blood circulation and thereby reduces the risk of toxic damage to the patient.¹⁴ In conclusion, it can be stated that the conjugates prepared by us represent promising candidates for new intravenous forms of AMB suitable for further tests on animal model.

Table 1. Effect of amphotericin PEGylation on acute iv toxicity in mice

Compound	Control (AMB)	3a	3b
LD_{50} mouse iv (mg/kg)	3.7	40.5	20.7
95% confidence intervals (mg/kg)	3.2–4.2	38.1–43.1	15.4–32.3

3. Experimental

3.1. Materials

Unless otherwise stated, all the poly(ethylene glycols), amphotericin B, other chemicals and solvents were obtained from Fluka or Aldrich and used without further purification.

3.2. Analytical methods

3.2.1. The ^1H NMR spectra were measured in deuteriochloroform (CDCl_3), on a Bruker AMX 360 apparatus and a Bruker 500 Avance apparatus.

3.2.2. Positive-ion electron-spray ionisation (ESI) mass spectra were measured on an Esquire 3000 ion trap analyzer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) in the m/z range of 50–1500.

3.2.3. The IR spectra were measured using Nicolet Impact 400 spectrometer. The samples (0.2 mg) were measured in KBr pellets (200 mg).

3.2.4. Gel permeation chromatography measurements of the prepared conjugates **1–3** were performed with HEMA–BIO columns (hydrophilic modified HEMA–Gel, particle size 10 μm , porosity 40/100/300/1000) at room temperature using RI detector and UV/vis detector. Redistilled water (pH 7.1) was used as the eluent. The columns were calibrated with a series of standard PEGs with varying molecular weights (PSS, Polymer Standard Service GmbH, Mainz, Germany).

3.2.5. Study of acid-catalysed hydrolysis of imine linkage in compounds **1–3a–c**, **4** in phosphate buffers. The kinetic measurements were performed on an HP UV/vis 8453 Diode Array apparatus in 1 cm closable quartz cell kept at a temperature of 37 $^\circ\text{C}$. The cell was charged with 2 ml phosphate buffer (pH 7.4, 7×10^{-2} M or pH 5.5, 7×10^{-2} M), and after reaching the above-mentioned temperature, 10–20 μl methanolic solutions of conjugates **1–3a–c** or pro-drug **4** were injected to make the final concentration of substrate ca 5×10^{-5} M. The measured time dependences of absorbance (A) were used to calculate the pseudo-first-order observed rate constants (k_{obs} (s^{-1})) using the equation: $k_{\text{obs}}t = \ln \Delta A + \text{const.}$, where $\Delta A = (A_\infty - A_t)$ or $(A_t - A_\infty)$.

3.2.6. Study of enzymatic hydrolysis of ester linkage of conjugates **3a–b** in human blood plasma and human blood serum by means of HPLC. A micro-test-tube was charged with 500 μl plasma or serum sample (obtained from healthy donors of plasma at transfusion station) and 500 μl aqueous solution of conjugates **3a–c** to make the final conjugate concentration of 1×10^{-1} M. The samples were incubated at 37 $^\circ\text{C}$. After the incubation, they were gradually (at definite time intervals: 0 (immediately), 1, 2 to 10 h and after 24 h) stabilized with 100 μl of 4% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The mixture was shaken for 1 min and then centrifuged at 14000 rpm for 3 min. The supernatant (20 μl) was then introduced on a LiChro-CART[®] 125 \times 4 mm column packed with LiChrospher[®]

100 RP-18e 5 μm (Merck) and eluted with mobile phase of acetonitrile with 20 mM chelaton II. The measured time dependences of the analyser responses (mV) were used to calculate the pseudo-first-order observed rate constants (k_{obs} (h^{-1})) similarly as in above cases.

3.3. Synthesis of α -methoxy- ω -(4-formylphenoxy)poly(ethylene glycol)

A melt of 5 g (1 mmol) α -methoxy- ω -methanesulfonyl-poly(ethylene glycol),²³ 2.5 g (15 mmol) 4-(1,3-dioxolan-2-yl)phenol²⁵ and 2 g (15 mmol) potassium carbonate was stirred and heated under argon atmosphere at 65 $^\circ\text{C}$ for 48 h. After cooling, the reaction mixture was dissolved in 200 ml dichloromethane, filtered with Celite and evaporated on a water bath. The dry evaporation residue was dissolved in 150 ml of 1 M hydrochloric acid and refluxed for 4 h. After cooling, the solution was saturated with sodium chloride and extracted with 5×60 ml dichloromethane. The combined extracts were dried and evaporated, and the residue was twice recrystallized from propan-2-ol. Yield 3.4 g product (68%). ^1H NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 3.36 (s; 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 3.52–4.27 (m; 460H, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_{115}$); 7.17 (d; J 7.7 Hz, 2H-arom); 7.97 (d; J 7.7 Hz, 2H-arom); 9.94 (s; 1H, CH=O). IR (KBr) ν : 3439, 2945, 2887, 2741, 1701, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

3.4. Synthesis of α -methoxy- ω -(4-formylphenylcarbox-amino)poly(ethylene glycol)

α -Amino- ω -methoxypoly(ethylene glycol) (5 g; 1 mmol),²¹ 0.6 g (4 mmol) 4-formylbenzoic acid and 0.05 g (0.4 mmol) 4-dimethylaminopyridine were dissolved in 50 ml dry dichloromethane, and the obtained solution was cooled to 0 $^\circ\text{C}$. The reaction mixture was treated with cold solution of 0.5 g (4 mmol) diisopropylcarbodiimide in 10 ml dichloromethane added drop by drop during 10 min. Then the reaction mixture was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ for another 4 h, whereupon it was slowly warmed to room temperature. After 24 h, diisopropylurea was filtered off and the filtrate was evaporated; the residue was recrystallized from propan-2-ol. Yield 4.3 g product (86%). ^1H NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 3.36 (s; 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 3.52–4.27 (m; 460H, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_{115}$); 4.51 (m; 2H, $\text{CH}_2\text{-NH-CO}$); 6.48 (m; H, NH-CO); 7.96 (d; J 7.8 Hz, 2H-arom); 8.22 (d; J 7.8 Hz, 2H-arom); 10.11 (s; 1H, CH=O). IR (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

3.5. General procedure of synthesis of conjugates **1**, **2**, **3a–c**

α -Methoxy- ω -(4-formylphenoxy)poly(ethylene glycol) (0.1 mmol; $M = 5000$), α -methoxy- ω -(4-formylphenylcarboxamino)poly(ethylene glycol) (0.1 mmol; $M = 5000$), α -methoxy- ω -(4-formylphenylcarbonyloxy)poly(ethylene glycol)²⁵ (0.1 mmol; $M = 5000$), α,ω -bis(4-formylphenylcarbonyloxy)poly(ethylene glycol)²⁵ (0.1 mmol; $M = 10,000$), or α,ω -bis(4-formylphenylcarbonyloxy)poly(ethylene glycol)²⁵ (0.1 mmol; $M = 20,000$) was dissolved in 5–10 ml trimethyl orthoformate, and the solution

formed was treated with an equivalent amount (0.1 or 0.2 mmol) of saturated solution of amphotericin B in dimethylformamide with addition of 0.2 g activated molecular sieves 4A. The reaction mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature for several days with exclusion of light. The end of reaction was established for the individual cases by means of GPC. Finally, the reaction mixture was filtered, and the filtrate was evaporated in vacuum to remove trimethyl orthoformate. The distillation residue was poured in 250 ml dry diethyl ether, and the precipitated product was collected by filtration. The conjugates prepared were dissolved in dichloromethane and reprecipitated with diethyl ether.

3.5.1. α -Methoxy- ω -(4-AMB-iminomethylphenyloxy)poly(ethylene glycol) (1). Yield 450 mg (74%). IR (KBr) ν : 3428, 2945, 2885, 2741, 2695, 1719, 1637, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843 cm^{-1} .

3.5.2. α -Methoxy- ω -(4-AMB-iminomethylphenylcarboxamino)poly(ethylene glycol) (2). Yield 500 mg (54%). IR (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1719, 1693, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

3.5.3. α -Methoxy- ω -(4-AMB-iminomethylphenylcarbonyloxy)poly(ethylene glycol) (3a). Yield 510 mg (86%). IR (KBr) ν : 3439, 2945, 2887, 2741, 1735, 1719, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

3.5.4. α,ω -Bis(4-AMB-iminomethylphenylcarbonyloxy)poly(ethylene glycol) (3b). Yield 980 mg (83%). IR (KBr) ν : 3439, 2945, 2887, 2741, 1735, 1719, 1693, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

3.5.5. α,ω -Bis(4-AMB-iminomethylphenylcarbonyloxy)poly(ethylene glycol) (3c). Yield 2 g (92%). IR (KBr) ν : 3439, 2945, 2887, 2741, 1735, 1719, 1693, 1638, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

3.6. Synthesis of 4-carboxybenzylideniminoamphotericin B (4)

Amphotericin B (93 mg; 0.1 mmol) and 15 mg (0.1 mmol) 4-formylbenzoic acid were dissolved in 2 ml dry dimethylsulfoxide and 3 ml trimethyl orthoformate with addition of 0.1 g activated molecular sieves 4A. After 48 h (25 °C), the reaction mixture was filtered, and the filtrate was distilled in vacuum at the temperature of 30 °C to remove the trimethyl orthoformate. After addition of 400 ml dry diethyl ether, the obtained solid was collected by filtration, washed and dried in vacuum desiccator. Yield 90 mg (84%). IR (KBr) ν : 3439, 3097, 2838, 2679, 2560, 2345, 1719, 1638, 1610, 1575, 1560, 1505, 1430, 1393, 1293, 1125, 934, 885, 790, 762, 686, 532, 461 cm^{-1} ; ESI-MS ($M = 1056.2$): $[M+H]^+$ m/z 1057.2.

3.7. Acute toxicity

Acute toxicity was tested for amphotericin B (Bristol-Myers Squibb) as a control and for two PEGylated

derivatives (**3a**, **3b**). For each compound tested, the mice were divided into 6 groups of 10 males, and the compound was administered intravenously via the tail vein at doses carefully determined after a series of preliminary trials. Toxic signs and mortality were monitored for 14 days after administration. LD₅₀ values and the corresponding confidence limits were determined by non-linear regression using GraphPad Prism (version 4; GraphPad software, Inc., San Diego CA, USA).

4. Conclusion

In contrast to the previous idea of covalent-noncovalent conjugates and conjugates based on 1,6-benzyl elimination, which release free AMB in blood circulation, we have suggested such conjugates that selectively release AMB only at the site of expected operation of fungal pathogen, that is, tissue with lowered pH value. The goal-directed release can only take place by acid-catalyzed hydrolysis of imino linkage, either in the polymeric conjugate or in the liberated pro-drug **4**, which is split off enzymatically from the carrier by action of blood hydrolases. The molecular weight of carrier controls the rate of enzymatic liberation of pro-drug **4**. From the LD₅₀ values determined *in vivo* on mouse model for conjugates **3b** and **3a** it follows that they are ca 6–11 times less toxic than free AMB. The above-described system of release of AMB from conjugates **3** minimizes the level of free AMB and hence also that of its complexes with LDH in blood circulation, which results in lowered toxicity of the conjugates as compared with free AMB. Our suggested conjugates **3** of amphotericin B with poly(ethylene glycols) represent a new system of two-stage independent release of AMB from polymeric carrier. However, its appropriateness for practical applications will need further studies on animal models and their critical evaluation.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from the MSM 002 162 7501 and the Science Foundation of the Czech Republic, Grant No. 203/06/0583.

References and notes

1. Diamond, R. D. *Rev. Infect. Dis.* **1991**, *13*, 480.
2. Cereghetti, D. M.; Carreira, E. M. *Synthesis* **2006**, 914.
3. Trejo, W.; Bennett, R. *J. Bacteriol.* **1962**, *85*, 436.
4. Heidemann, H. T.; Gerkens, J. F.; Jackson, E. K.; Branch, R. A. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1983**, *324*, 148.
5. Janoff, A. S.; Boni, L. T.; Poesch, M. C.; Minchey, S. R.; Cullis, P. R.; Madden, T. D.; Tarashi, T. F.; Gruner, S. M.; Shyamsunder, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 61227.
6. Janoff, A. S.; Perkins, W. R.; Saleton, S. L.; Swenson, C. E. *J. Liposome Res.* **1993**, *3*, 451.
7. Moribe, K.; Mararuyama, K.; Iwatsuru, M. *Int. J. Pharm.* **2000**, *201*, 37.

8. Sedlák, M.; Buchta, V.; Kubicová, L.; Šimůnek, P.; Holčápek, M.; Kašparová, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2833.
9. Gaboriau, F.; Chéron, M.; Leroy, L.; Bolard, J. *Biophys. Chem.* **1997**, *66*, 1.
10. Conover, C. D.; Zhao, H.; Clifford, B.; Longley, C. B.; Shum, K. L.; Greenwald, R. B. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 661.
11. Wakselman, M. *Nouv. J. Chim.* **1983**, *7*, 439.
12. Greenwald, R. B.; Choe, Y. H.; McGurie, J.; Conover, C. D. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 217.
13. Sivak, O.; Lau, B.; Patankar, N.; Wasan, K. M. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 2336.
14. (a) Clements, J. S.; Peacock, J. E. *Am. J. Med.* **1990**, *88*, 22; (b) Wasan, K. M.; Wong, J. C.; Corr, T.; Pritchard, S. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *57*, 120.
15. Mellman, I.; Fuchs, R.; Helenius, A. *Ann. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 773.
16. Nasti, T. H.; Khan, M. A.; Owais, M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 349.
17. Ulbrich, K.; Šubr, V. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1023.
18. Ulbrich, K.; Etrych, T.; Chytil, P.; Pechar, M.; Jelinková, M.; Říhová, B. *Int. J. Pharm.* **2004**, *277*, 63.
19. Rodrigues, P. C. A.; Roth, T.; Fiebig, H. H.; Unger, C.; Mülhaupt, R.; Kratz, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4110.
20. Sedlák, M.; Antonietti, M.; Cölfen, H. *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, *199*, 247.
21. Sedlák, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2005**, *70*, 269.
22. Harris, J. M. In *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Application*; Harris, J. M., Ed.; Plenum Press: New York, 1992; pp 1–13.
23. Sieber, F.; Ventworth, P.; Janda, K. D. *Molecules* **2000**, *5*, 1018.
24. Gopinath, R.; Haque, S. J.; Patel, B. K. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5842.
25. Shou, W. G.; Yang, Y. Y.; Wang, Y. G. *Synthesis* **2005**, 530.
26. Diwu, Z.; Chen, C. S.; Stass, S. A.; Mixon, A. G. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 411.
27. Cordes, E. H.; Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2843.
28. Bekersky, I.; Fielding, R. M.; Dressler, D. E.; Lee, J. W.; Buell, D. N.; Walsh, T. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 834.



Synthesis and characterisation of a new pH-sensitive amphotericin B—poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) conjugate

Miloš Sedlák,^{a,*} Martin Pravda,^b Lenka Kubicová,^b
Petra Mikulčíková^c and Karel Ventura^c

^aDepartment of Organic Chemistry, University of Pardubice, Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, Czech Republic

^bDepartment of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^cDepartment of Analytical Chemistry, University of Pardubice, Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, Czech Republic

Received 9 January 2007; revised 1 February 2007; accepted 3 February 2007

Available online 7 February 2007

Dedicated to Professor Vojeslav Štěrba on the occasion of his 85th birthday

Abstract—This paper reports on the synthesis, characterisation, and efficiency of a new intravenous conjugate of amphotericin B (AMB). Twelve molecules of AMB were attached to block copolymer poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) via pH-sensitive imine linkages. In vitro drug release studies demonstrated the conjugate ($M_w = 26,700$) to be relatively stable in human plasma and in phosphate buffer (pH 7.4, 37 °C). Controlled release of AMB was observed in acidic phosphate buffer (pH 5.5, 37 °C) with the half-life of 2 min. The LD₅₀ value determined in vivo (mouse) is 45 mg/kg.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The polyene macrocyclic antifungal antibiotic amphotericin B (AMB) belongs among life-saving drugs^{1,2} in treatment of systemic fungal diseases due to failure of patient's immunity caused by severe illnesses.¹ Amphotericin B was isolated by Trejo and Bennett³ half a century ago along the Orinoco River in Tembladora (Venezuela) from the *Streptomyces nodosus*. However, clinical application of AMB is limited by its poor solubility and also potential serious organ toxicities, particularly nephrotoxicity, which mainly appear to be dose-dependent.⁴ A number of conjugates have been used in order to increase the therapeutic index of AMB: they enable solubilisation in aqueous media and also continuous dosage, which usually lowers the toxicity, too.⁵ The conjugates clinically applied so far are non-covalent bio-degradable phospholipid complexes of the type amphotericin B lipid complex (ABLC).⁶

Such lipid formulations of amphotericin B often significantly increase the antifungal activity in vitro as compared with the amphotericin B itself.⁷ In our previous paper, we described the preparation of conjugate of

AMB with poly(ethylene glycol) (PEG), where AMB is bound partly by covalent bond and partly by non-covalent interactions.⁸ In another type of conjugate, AMB was attached to PEG by means of labile carbamate link,⁹ which decomposes in blood plasma by 1,6-benzyl elimination mechanism¹⁰ to give free AMB ($t_{1/2} = 1.5–3$ h, blood rat plasma). However, this principle is not generally suitable and applicable to any arbitrary group of medical drugs. For instance, in the case of PEG-AMB conjugates this system of 1,6-benzyl elimination leads to a relatively fast release of free AMB directly into blood circulation, which rapidly increases its concentration in kidneys, and this is undesirable especially because of its nephrotoxicity. The AMB set free in the blood undergoes subsequent distribution¹¹ among the present lipoproteins [high-density-lipoprotein (HDL) and low-density-lipoprotein (LDL)], and it is presumed¹² that the increased level of the complexes of AMB with LDL results in the nephrotoxic effect of AMB. Another disadvantage of the above-described AMB conjugates lies in low capacity of the poly(ethylene glycol) chain,^{13,14} the relatively large carrier molecule carrying only two AMB molecules. This present paper deals with synthesis and characterisation of a new type of conjugate of AMB with block copolymer poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) (PEG-*b*-PLL), which is considered

Keywords: Drug delivery; Amphotericin B; pH-sensitive conjugate.

* Corresponding author. Tel.: +420 466 037 015; fax: +420 466 037 068; e-mail: milos.sedlak@upce.cz

0960-894X/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bmcl.2007.02.009

to be fully biocompatible, non-toxic and has been often used for drug or gene delivery systems¹⁵ or for biomimetic applications.¹⁶ However, in comparison with the poly(ethylene glycol) itself¹⁴, it enables attachment of a larger number of AMB molecules, whereby it approaches the supramolecular arrangement similar to the attachment of four amphotericin B molecules to one molecule of calix[4]arene.¹⁷ The bond type between the carrier PEG-*b*-PLL and AMB was chosen in such a way as to prevent release of free AMB in blood circulation during intravenous application: the targeted release of AMB only takes place at the location of fungal pathogens. One of the methods that enable targeted antimycotic action is based on the fact that a number of pathogens—inter alia fungal agents—start such biochemical processes in the attacked tissue¹⁸ that lead to local decrease of pH value down to pH \approx 5. This finding has been recently used in construction of highly effective pH-sensitive lipid formulations (liposomes) of nystatin¹⁹ and the covalent conjugate poly(ethylene glycol)-AMB.¹³ We have chosen imine group as pH-sensitive link between amino group of mycosamine AMB and polymeric carrier. This link should be sufficiently stable at the pH values usual in blood and tissues (pH 7.4–7.6), e.g., in blood plasma and/or blood serum. On the other hand, it should be very easily hydrolysable at lower pH value (Fig. 1).

First, we used well-known NCA method¹⁵; ring-opening polymerization of α -(*N*^c-benzyloxycarbonyl)-L-lysine^{15,20} initiated by α,ω -diaminopoly(ethylene glycol)¹⁴ ($M_w = 10,000$) and followed by hydrogenolytic deblocking of benzyloxycarbonyl group to obtain the block polymer poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) (PEG-*b*-PLL) ($M_w = 13,200$).²¹ This block copolymer was characterised by means of GPC²², ¹H NMR²², IR spectroscopy²² and elemental analysis.²² The results of GPC, elemental analysis and integral intensities of ¹H NMR signals of individual hydrogen atoms indicate²¹ that at either end of the poly(ethylene glycol) chain there are (statistically) five L-lysine units. A comparison of integral intensities of hydrogen signals of ϵ -CH₂ group in ¹H NMR spectrum²¹ at 2.74 ppm and at 3.01 ppm indi-

cated that approximately 40% of poly(L-lysine) chain is present in the α -helix arrangement (deuteriochloroform solution), while the remaining approximately 60% is in the form of random coil.²³ In the second step, we prepared poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*N*-(4-formylphenylcarboxamino)-L-lysine)²⁴ (PEG-*b*-PFLL) by reaction of PEG-*b*-PLL with 4-formylbenzoic acid,^{19,25} which was activated with diisopropylcarbodiimide (DIC). The IR spectrum of PEG-*b*-PFLL contains the typical band of aldehyde group (1701 cm⁻¹), and the results of ¹H NMR measurements indicate^{23,24} that all the terminal amino groups of PEG-*b*-PLL have been quantitatively substituted with formylbenzoic acid, which means that at either end of the chain there are six aldehyde functional groups attached to aromatic ring. Moreover we have found from ¹H NMR²⁴ that due to this substitution the proportion of the chain in α -helix arrangement decreased to 20% in accordance with Ref. 23. The synthesis of the conjugate of PEG-*b*-PFLL with AMB involves reaction of terminal aldehyde functional groups in the PEG-*b*-PFLL chain with the primary amine group of amphotericin B in the presence of activated molecular sieves 4 Å and trimethyl orthoformate to form the imine bond²⁵ (Schiff's base) (Scheme 1).

The final conjugate, poly(ethylene glycol)-[*b*-poly(L-lysine)₅]₂-(AMB)₁₂ (PEG-*b*-PFLL-AMB), was characterised²⁶ by means of infrared spectroscopy: the IR spectra exhibit band at 1638 cm⁻¹ which is typical for CH=N bond. The ¹H NMR spectrum was unclear, and the individual signals could not be assigned. The GPC method was used for determination of M_w , and the HPLC technique for determination of purity of the conjugate (the content of free AMB was always less than 1 mol %). Furthermore, by means of UV/Vis spectroscopy (typical maxima corresponding to polyene system of AMB²⁶) it was proved that the content of AMB in the conjugate corresponds to the molar ratio of 1:12 (PEG-*b*-PLL/AMB). The prepared conjugate is very well soluble in water and forms finely opalescent solutions. The next part of our work deals with investigation of behaviour of the conjugate prepared in various

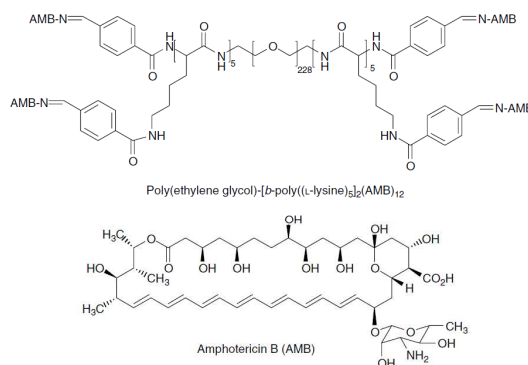
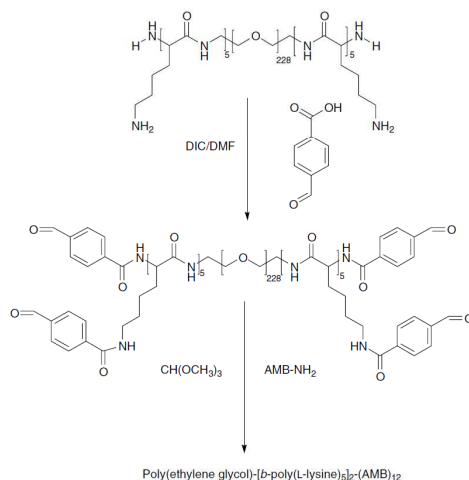


Figure 1. Structure of poly(ethylene glycol)-[*b*-poly(L-lysine)₅]₂-(AMB)₁₂.



Scheme 1. Synthesis of poly(ethylene glycol)-[b-poly(L-lysine)]₂-(AMB)₁₂ (AMB)₁₂.

media. First, we studied the stability of the conjugate in phosphate buffers and then in human blood plasma. The time changes of the conjugate concentration in human blood plasma during 24 h at 37 °C were negligible and their values were comparable with error of estimation.²⁷ From the time changes in the UV/Vis spectra we have found that in solutions of phosphate buffer with pH 7.4, (7×10^{-2} M, 37 °C) the conjugate is relatively stable, being hydrolysed only very slowly at the imine bond, so that less than 5 mol % AMB is released from the conjugate during 24 h. The conjugate has been designed in order to achieve targeted release of AMB only in the places with pathologically lowered pH value. The solution of phosphate buffer²⁸ (pH 5.5; 7×10^{-2} M) was adopted as a model of medium imitating affected tissue with lowered pH value. The acid-catalysed²⁹ hydrolysis of the conjugate was accompanied by decrease of absorbance at 346 nm and an increase of absorbance at 386 and 409 nm (Fig. 2).

The absorption band at 409 nm is specific³⁰ for monomeric AMB, and its increase with time corresponds to

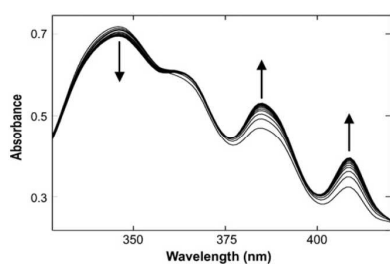


Figure 2. Time changes of UV/Vis spectrum of conjugate in phosphate buffer (pH 5.5; 7×10^{-2} M).

Table 1. Acute toxicity of conjugate: poly(ethylene glycol)-[b-poly(L-lysine)]₂-(AMB)₁₂ (PEG-b-PFLL-AMB)

Compound	Control (AMB)	Conjugate
LD ₅₀ mouse iv (mg/kg)	3.7	45.1
95% confidence intervals (mg/kg)	3.2–4.2	42.1–48.1

the rate of free AMB release. From the absorbance–time dependence at 409 nm we calculated²⁸ the pseudo-first-order rate constant for AMB release from conjugate which is $k_{\text{obs}} = (5.6 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, i.e., $t_{1/2} = 2$ min. Acute toxicity was tested³¹ on mice with the conjugate PEG-b-PFLL-AMB in comparison with AMB itself. Most deaths occurred 5 min to 24 h after iv administration of the tested compounds. When compared to control, PEG-b-PFLL-AMB increased LD₅₀ 12 times for conjugate itself or five times related to content of AMB in polymer (see Table 1).

Both the toxicity of the conjugate found in vivo and the results of hydrolysis study in vitro are in accordance with the presumption that our suggested system of pH-sensitive release of AMB minimizes the level of free AMB and of its complexes with LDH in blood circulation and thereby lowers the risk of toxic injury to patient¹². In contrast to the earlier^{8,9,13} intravenous conjugates of AMB with poly(ethylene glycol)s releasing free AMB in blood circulation, we have suggested and prepared new conjugate allowing selective release of AMB only through acid-catalysed hydrolysis of imine bond, i.e., only at the places of anticipated activities of fungal pathogen. Our new conjugate contains 12 molecules of amphotericin B attached to one molecule of biocompatible carrier, namely poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lysine). In conclusion it can be stated that the conjugate prepared by us represents another promising candidate for new intravenous forms of AMB, suitable for further tests on animal model.

Acknowledgment

The authors acknowledge the financial support from the MSM 002 162 7501 and from the Czech Science Foundation, Grant No. 203/06/0583.

References and notes

- (a) Holz, R. W.. In *Antibiotics*; Hahn, F. E., Ed.; Springer: Berlin, 1979; Vol. 5, p 313; (b) Diamond, R. D. *Rev. Infect. Dis.* **1991**, *13*, 480; (c) Ruijgrok, E. J.; Meis, J. F. G. *M. Expert Opin. Emerg. Drugs* **2002**, *7*, 33.
- Cereghetti, D. M.; Carreira, E. M. *Synthesis* **2006**, 914.
- Trejo, W.; Bennett, R. *J. Bacteriol.* **1962**, *85*, 436.
- Heidenmann, H. T.; Gerkens, J. F.; Jackson, E. K.; Branch, R. A. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1983**, *324*, 148.
- (a) Janoff, A. S.; Boni, L. T.; Poescu, M. C.; Minchey, S. R.; Cullis, P. R.; Madden, T. D.; Tarashi, T. F.; Gruner, S. M.; Shyamsunder, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 61227; (b) Ehrenfreund-Kleinman, T.; Golenser, J.; Domb, A. J. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3049.

6. Janoff, A. S.; Perkins, W. R.; Saleton, S. L.; Swenson, C. E. *J. Liposome Res.* **1993**, *3*, 451.
7. Moribe, K.; Maruyama, K.; Iwatsuru, M. *Int. J. Pharm.* **2000**, *201*, 37.
8. Sedláčková, M.; Buchta, V.; Kubíčková, L.; Šimůnek, P.; Holčápek, M.; Kašparová, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2833.
9. (a) Conover, C. D.; Zhao, H.; Clifford, B.; Longley, C. B.; Shum, K. L.; Greenwald, R. B. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 661; (b) Greenwald, R. B.; Choe, Y. H.; McGurie, J.; Conover, C. D. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 217.
10. Wakselman, M. *Nouv. J. Chim.* **1983**, *7*, 439.
11. Sivak, O.; Lau, B.; Patankar, N.; Wasan, K. M. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 2336.
12. Wasan, K. M.; Wong, J. C.; Corr, T.; Pritchard, S. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *57*, 120.
13. Sedláčková, M.; Staud, F.; Pravda, M.; Kubíčková, L.; Týčová, K.; Ventura, K.; *Bioorg. Med. Chem.* submitted for publication.
14. (a) Harris, J. M. In *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Application*; Harris, J. M., Ed.; Plenum Press: New York, 1992; pp 1–13; (b) Sedláčková, M.; Antonietti, M.; Cölfen, H. *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, *199*, 247; (c) Sedláčková, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2005**, *70*, 269.
15. (a) Thünemann, A. F.; Beyermann, J.; Kukula, H. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5906; (b) Harada, A.; Togawa, H.; Kataoka, K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 35; (c) Thünemann, A. F.; Kubowitz, S.; Burger, C.; Watson, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 352; (d) Harada, A.; Kataoka, K.; Furusho, M.; Tanaka, F.; Wada, H.; Ikenaka, K. *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 471; (e) Katakura, H.; Harada, A.; Auguste, D. T.; Armes, S. P.; Brzezinska, K. R.; Deming, T. J.; Kohn, J.; Prud'homme, R. K. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2599; (f) Thünemann, A. F.; Schuett, D.; Sachse, R.; Schlaad, H.; Möhwald, H. *Langmuir* **2006**, *22*, 2323.
16. (a) Cölfen, H. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22*, 219; (b) Cölfen, H.; Mann, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 2350; (c) Kasparova, P.; Antonietti, M.; Cölfen, H. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2004**, *250*, 153.
17. Paquet, V.; Zumbuehl, A.; Carreira, E. M. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1460.
18. (a) Mellman, I.; Fuchs, R.; Helenius, A. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 773; (b) Ulbrich, K.; Šubr, V. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1023.
19. Nasti, T. H.; Khan, M. A.; Owais, M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 349.
20. Dimitrov, I.; Schlaad, H. *Chem. Commun.* **2003**, 2944.
21. Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) (PEG-*b*-PLL) ($M_w = 13\,200$): yield 98%; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.38$ (m; 30H; $(\text{CH}_2)_3$), 2.74 (br s; 4H, $\nu\text{-CH}_2$, (α -helix)), 3.01 (br s; 6H, $\nu\text{-CH}_2$, (random coil)), 3.69 (m, 114H, $(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 5.38 (br s, 5H, CH); IR (KBr) ν : 3339, 3114, 2942, 2866, 2337, 1852, 1814, 1783, 1657, 1630, 1537, 1455, 1258, 1139, 923, 748, 696, 663, 531 cm^{-1} ; for $\text{C}_{516}\text{H}_{1036}\text{N}_{22}\text{O}_{238}$ (%): C, 54.58; H, 9.13; N, 2.71; found: C, 54.81; H, 9.32; N, 2.98; $M_w/M_n = 1.16$.
22. Gel permeation chromatography (GPC) was used for estimation M_w of polymers. The measurements were performed with HEMA-BIO columns (hydrophilic modified HEMA-Gel, particle size 10 μm porosity 40/100/300/1000) at room temperature using RI detector and UV/Vis detector. Redistilled water (pH 7.1) was used as the eluent. The columns were calibrated with a series of standard PEGs with varying molecular weights (PSS, Polymer Standard Service GmbH, Mainz, Germany); the $^1\text{H NMR}$ spectra were measured in deuteriochloroform (CDCl_3), on a Bruker AMX 360 apparatus and a Bruker 500 Avance apparatus, respectively. The IR spectra were measured using Nicolet Impact 400 spectrometer. The samples (0.2 mg) were measured in KBr pellets (200 mg).
23. Harada, A.; Cammas, S.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1996**, *29*, 6183.
24. Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*N*-(4-formylphenyl-carboxamino)-L-lysine) (PEG-*b*-PFLL) ($M_w = 15,500$): yield 92%; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.40$ (m; 30H; $(\text{CH}_2)_3$), 2.76 (br s; 2H, $\nu\text{-CH}_2$, (α -helix)), 3.09 (br s; 8H, $\nu\text{-CH}_2$, (random coil)), 3.70 (m, 114H, $(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 5.39 (br s, 5H, CH), 6.92 (d, $J = 7.7$ Hz, 14H, arom.), 7.83 (d; $J = 7.7$ Hz, 14H, arom.), 10.11 (m, 6H, CHO), 10.20 (br s, 5H, CONH); IR (KBr) ν : 3341, 3116, 2942, 2866, 2337, 1852, 1814, 1701, 1783, 1657, 1630, 1537, 1455, 1258, 1139, 923, 748, 696, 663, 531 cm^{-1} ; for $\text{C}_{612}\text{H}_{1096}\text{N}_{22}\text{O}_{274}$ (%): C, 55.92; H, 8.35; N, 2.35; found: C, 55.81; H, 8.13; N, 2.56; $M_w/M_n = 1.18$.
25. Shou, W. G.; Yang, Y. Y.; Wang, Y. G. *Synthesis* **2005**, 530.
26. Poly(ethylene glycol)-[*b*-poly(L-lysine) $_5$]-(*AMB*) $_{12}$ (PEG-*b*-PFLL-AMB) ($M_w = 26\,700$), yield: 86%; IR (KBr) ν : 3341, 3116, 2945, 2886, 2741, 2337, 1852, 1814, 1719, 1693, 1637, 1630, 1537, 1467, 1256, 1201, 1139, 923, 748, 696, 963, 531 cm^{-1} ; UV-vis (λ_{max} : 346, 367, 386, 409 nm); for $\text{C}_{1176}\text{H}_{1948}\text{N}_{34}\text{O}_{466}$ (%) calculated: C, 58.82; H, 8.13; N, 1.98; found: C, 58.99; H, 8.36; N, 2.20; $M_w/M_n = 1.11$.
27. A micro-test-tube was charged (from a pipette) with 500 μl sample of plasma or serum (from healthy donors of plasma at transfusion station) and 500 μl aqueous solution of conjugate PEG-*b*-PFLL-AMB to obtain the final concentration of the conjugate equal to 1×10^{-1} M. The samples were incubated at 37 °C. After the incubation, at definite intervals: 0 (immediately), 1, 2–10 h and after 24 h they were stabilised with 100 μl of 4% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The mixture was shaken for 1 min and then centrifuged for 3 min at 14000 rpm. The supernatant (20 μl) was introduced to a column LiChroCART[®] 125 \times 4 mm packed with LiChrospher[®] 100 RP-18e 5 μm (MERCK); mobile phase: acetonitrile, 2×10^{-2} M chelator II.
28. The kinetic measurements were performed on an HP VU/VIS 8453 Diode Array apparatus using 1 cm closable quartz cells in thermostat block at 37 °C. The cell was charged with 2 ml phosphate buffer (pH 7.4, 7×10^{-2} M or pH 5.5, 7×10^{-2} M), and after attaining the mentioned temperature, 15 μl methanolic solution of conjugate PEG-*b*-PFLL-AMB was injected into the cell to obtain the final concentration of substrate equal to approximately 5×10^{-5} M. The measured absorbance-time (*A*-*t*) dependences were used to calculate the observed rate constants of pseudo-first order (k_{obs} (s^{-1})) from the equation: $k_{\text{obs}}t = \ln \Delta A + \text{const.}$, where $\Delta A = (A_{\infty} - A_t)$ or $(A_t - A_{\infty})$.
29. (a) Cordes, E. H.; Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2843; (b) Hoffmann, J.; Štěrba, V. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1972**, *38*, 2043; (c) Hoffmann, J.; Štěrba, V. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1973**, *38*, 3146.
30. Gaboriau, F.; Chéron, M.; Leroy, L.; Bolard, J. *Biophys. Chem.* **1997**, *66*, 1.
31. Acute toxicity was tested for amphotericin B (Bristol-Myers Squibb) as a control and for PEG-*b*-PFLL-AMB. For both the compounds tested, the mice were divided into six groups of 10 males, and the compound was administered intravenously via the tail vein at doses carefully determined after a series of preliminary trials. Toxic signs and mortality were monitored for 14 days after administration. LD₅₀ values and the corresponding confidence limits were determined by non-linear regression using GraphPad Prism (version 4; GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA).

Correlation Between Structures of Chiral Polymers and Their Efficiency for Chiral Resolution by Crystallization

TALI MENAHEM, MARTIN PRAVDA, AND YITZHAK MASTAI*

Department of Chemistry, Institute of Nanotechnology, Bar-Ilan University, Ramat-Gan, Israel

ABSTRACT In this work, we describe the correlation between chiral polymer structures, particularly α -helical and random coil conformations, and their efficiency as chiral resolving agents in crystallization processes. A set of chiral block copolymers based on polyethylene oxide with chiral glutamic acid oligopeptide segments (PEG₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀) were synthesized and employed as additives in the crystallization of *rac*-threonine. CD spectroscopy demonstrates that structures of chiral polymers could be switched between a helical and a disordered random coil by pH. The effect of these polymers at different conformations on the crystallization kinetics, crystal morphology, and chiral resolution of *rac*-threonine is reported. Our study demonstrates that only chiral polymers with α -helical conformations of the chiral segment are effective as additives for chiral resolution throughout crystallization. Overall, our results provide useful guidelines for the selection and design of chiral polymer additives that will act efficiently for chiral resolution by crystallization. *Chirality* 21:862–870, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: chiral resolution; chiral polymers; crystallization; chiral auxiliaries; poly amino acids; molecular recognition

INTRODUCTION

Chiral polymers, both naturally occurring and synthetic, have received much attention recently, and extensive studies on their syntheses, conformation, and functions have been conducted.^{1,2} Optically active polymers were successfully utilized for many applications, such as chiral catalysts,³ chiral hosts,⁴ and as a chiral stationary phase in HPLC.⁵ Today the most powerful and practical method to resolve and analyze enantiomers is actually to use polymers as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography.⁶

Chiral polymers have been used to resolve many classes of racemates, including drugs and their precursors.⁷ In many cases, chiral polymers are employed for the chiral kinetic resolution of conglomerates and racemates in crystallization processes. For example, Zbaida et al.^{8,9} used chiral polymers as “tailor-made additives” for the kinetic resolution of conglomerates by crystallization. In recent years, the research in our group has focused on the synthesis of chiral polymers for chiral discrimination, particularly in crystallization processes. We also examined the utility of these polymers for enantioselective crystallization on their chiral surfaces.^{10,11} With reference to chiral polymers, we demonstrated in an early article¹² the potential application of chiral double hydrophilic block copolymers to control chirality throughout crystallization. We showed that appropriate chiral polymers could slow down both the formation of the thermodynamically most stable racemic crystals and the formation of one of the pure enantiomeric crystals. Therefore, chiral discrimination by crystallization is obtained also when racemic crystals are formed. In a

previous article¹⁰ we described the preparation and use of chiral polymers based on *R* or *S* poly *N*-acryl amino acids for the resolution of racemic solutions by crystallization. We found that these polymeric additives showed strong capabilities for enhancing enantioselective resolution during the crystallization of amino acids. Moreover, we investigated the chiral discrimination of the polymers in the form of microspheres. Those spherical microparticles were also active in similar chiral discrimination during the amino acid crystallization occurring on microparticle surfaces. Recently, we presented a new approach to chiral resolution based on enantioselective crystallization on chiral polymeric microspheres. We have developed a new synthetic method for the preparation of porous and hollow chiral polymeric microspheres. The chiral discrimination ability of these chiral microspheres has been studied for *rac*-valine crystallization as a model system for chiral racemic crystallization. X-ray diffraction and DSC proved that enantiopure crystals crystallized onto the chiral polymeric microspheres. Although the enantiomeric excess of these chiral polymeric microspheres is not yet very high, we demonstrated the basic principles of chiral discrimination by enantioselective crystallization on chiral microspheres.

Generally, the efficiency of chiral polymers that act as a chiral auxiliary in crystallization processes is rationalized

*Correspondence to: Dr. Y. Mastai, Department of Chemistry, Bar-Ilan University, Ramat-Gan, 52900 Israel. E-mail: mastai@mail.biu.ac.il
Received for publication 3 October 2008; Accepted 13 February 2009
DOI: 10.1002/chir.20724
Published online 19 May 2009 in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com).

in terms of molecular recognition between the optical active fragments of the polymers and the crystal surfaces. Usually, stereoselective adsorption of the polymers at the surfaces of the crystals is assumed. In general, optically active polymers having high chiral recognition ability, e.g., chiral stationary polymer phases for chiral HPLC, possess regular higher-order structures that seem to be the most important factor in their efficient chiral recognition.

The goal of this article is to explore the correlation between the secondary structure of chiral polymers, namely, helical structure/random coil, and their chiral recognition abilities in crystallization processes. Our assumption is that a chiral polymer with a helical structure will express high chiral discrimination in crystallization processes due to superior chiral interactions with crystal surfaces during crystallization, in comparison with chiral polymers having a random coil structure. This hypothesis is based on the knowledge that in numerous biological macromolecules such as proteins, DNA, and RNA expose high-molecular recognition with crystal surfaces due to their helical structure. Fish antifreeze protein is one wonderful example of the correlation between the protein structure and its interaction with ice crystal surfaces.¹³ These antifreeze proteins consist of four repeated ice-binding motifs, and due to the helical structure of the protein they "fit" the ice crystal unit cell, resulting in antifreeze activity. Another example of the importance of the polymer structure for this interaction is the work of Aoki et al.,¹⁴ who show that a substituted polyacetylene polymer having a chiral helical conformation exhibited excellent enantioselectivity with solid membranes of *rac*-tryptophan. The synthesis, properties, and application of chiral helical polymers in chiral resolution has attracted much attention in recent years. For these reasons it is important to study the effects of the parameters of polymer structures on polymer chiral efficiency, particularly in chiral resolution by crystallization. In view of the above, the aim of this work is to explore the effects of chiral polymer structures, i.e., helical structure/random coil, on the chiral resolution efficiency in crystallization. For this reason, we had to find a model system of a chiral polymer whose transition from helical structure to random coil can be controlled, and which is known to be effective in chiral resolution by crystallization. Based on our previous study, we chose to use double hydrophilic block copolymers of amino acids as a polymeric model system. Copolymers are a new class of polymers that can be tuned for a wide range of applications, covering different aspects such as the stabilization of colloids,¹⁵ crystal growth modification,¹⁶ induced micelle formation,^{17,18} and polyelectrolyte complexes to novel drug carrier systems.¹⁹ Recently, Colfen and coworkers²⁰ described the synthesis and the secondary structures of a series of double hydrophilic block copolymers based on polyethyleneglycol and short chiral amino acid blocks. It was shown that the secondary structures of the peptide segments in these double hydrophilic block copolymers could be switched between a helical motif and a disordered random coil by temperature or pH. As regards the chiral crystallization system, we chose to use the crystallization of *rac*-threonine because Lahav and coworkers²¹

reported on the chiral resolution of this system using a chiral polymer based on a glutamic acid motif.

In the present article, the synthesis and characterization of chiral block copolymers with a chiral glutamic acid oligopeptide segment and the application of these chiral polymers in the crystallization of *rac*-threonine are described. From these experiments, we wanted to learn about the importance of the specific structure of chiral motifs for the chiral recognition of crystal surfaces and chiral resolution.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals

Analytical grade threonine was purchased from Aldrich-Sigma. The purity of the threonine was checked by a polarimeter and used without further purification. α -Methoxy- ω -amino-poly-(ethylene glycol) monomer of $M_w = 5000$ g/mol used for polymerization was purchased from Aldrich-Sigma. For the crystallization experiments and other chemical process standard analytical grade solvents and chemicals were used.

Preparation of Chiral Block Copolymers

The synthesis of the chiral block copolymers of amino acids was carried out by methods previously reported.²²⁻²⁴ The most frequently used route toward copolymers with polypeptide block segments is by the ring-opening polymerization of protected amino acid-*N*-carboxyanhydrides (NCA), initiated by an amino functional polymer.

Synthesis of NCA of (+)-(*S*)-Glutamic acid γ -Benzyl ester

A solution of triphosgene (0.623 g; 0.0021 mol) in 10 ml of THF was added to a suspension of (+)-(*S*)-glutamic acid γ -benzyl ester (1 g; 0.0042 mol) in 10 ml of THF. The mixture was stirred for 1 h at 50°C under argon atmosphere. After 1 h the suspension became a transparent solution. The solvent was evaporated under reduced pressure and the product was crystallized from THF/*n*-hexane. The crystalline product was dissolved in 15 ml of cold ethyl acetate and washed with a cold solution of sodium bicarbonate in water (0.5%, 100 ml). The layer of ethyl acetate was isolated and the solvent was evaporated under reduced pressure. The product was recrystallized three times from a mixture of THF/*n*-hexane and dried at RT in vacuum. Yield: 0.9 g; 82%. IR: 1881 cm^{-1} ; 1786 cm^{-1} (C=O of cyclic anhydride). ¹H NMR: $\delta = 7.63$ (aromatic). $\delta = 5.14$ (methylene group of benzyl group). $\delta = 4.37$ (t, proton on the carbon No. 2 of glutamic acid), $\delta = 2.57$ (protons on carbon No. 4 of glutamic acid), $\delta = 2.27$, $\delta = 2.13$ (protons of carbon No. 3 of glutamic acid – next to the chiral centrum).

Synthesis of Copolymer Poly(ethylene oxide)-(block)-Poly((+)-(*S*)-glutamic acid γ -Benzyl ester)

A solution of the NCA of (+)-(*S*)-glutamic acid γ -benzyl ester (0.395 g; 0.0015 mol) in 5 ml THF was added to a solution of α -methoxy- ω -amino-poly(ethylene glycol) (0.5 g; 0.0001 mol; $M_w = 5000$ g/mol) in 10 ml THF. The mixture was stirred during 3 days at 40°C under argon atmosphere.

Chirality DOI 10.1002/chir

The solvent was then evaporated under reduced pressure and the product was dissolved in 2 ml of THF and precipitated in petroleum ether (or *n*-hexane). Yield: 0.627 g Elemental analysis: N (4.5%), C (61%), H (7.2%). IR: 1548 cm^{-1} (amide II, N–H, C–N); 1650 cm^{-1} (amide, C=O); 1731 cm^{-1} (benzylester, C=O). ^1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 3.55 (PEG); 7.28 (H-aromatic), etc.

Deprotection of the γ -Carboxylic Group of Glutamic Acid—Catalytic Hydrogenation

For catalytic hydrogenation, palladium on charcoal (10% Pd/C) was used as a catalyst. A total of 0.5 g of a polymer was dissolved in 60 ml of THF/methanol 1:1 and 0.21 g of a catalyst was added. The mixture was charged with hydrogen and stirred for 18 h at room temperature. The catalyst was removed by filtration, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The product was dissolved in water, dialyzed (against pure water/2 days), and freeze-dried. IR: 1548 cm^{-1} (amide II, N–H, C–N); 1650 cm^{-1} (amide, C=O). ^1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 4.37 (t, proton of the carbon No. 2 of glutamic acid), δ = 2.57 (protons of the carbon No. 4 of glutamic acid), δ = 2.27, δ = 2.13 (protons of the carbon No. 3 of glutamic acid – next to the chiral centrum).

Specific optical rotation: $[\alpha]_D^{20} = -20.51$ (4.7 mg of a polymer in 5 ml of a 1% solution of sodium bicarbonate in water). Specific optical rotation of glutamic acid $[\alpha]_D^{20} = -5.11$ (9 mg in 5 mL of a 1% solution of sodium bicarbonate in water).

Crystallization Experiments

All crystallization experiments were conducted from supersaturated solutions of *rac*-threonine. The crystallization experiments of *rac*-threonine were performed at two pH values: pH = 3.75 and pH = 7.80. The crystallization of *rac*-threonine from pure water solutions was performed as follows: 900 mg of *rac*-threonine was suspended in 3 ml of deionized water. The solution was heated to 70°C and stirred until complete dissolution occurred. The solutions were then left to cool spontaneously to room temperature, and after complete crystallization occurred the crystals were filtered and kept under vacuum for future examinations (e.g., optical rotation, X-ray diffraction, and electron microscopy). Crystallization experiments for crystallization in the presence of chiral polymers were carried out by the addition of 1 mg/ml of the polymers to the crystallization solutions. Specific light rotation (enantiomeric excess, e.e.) during crystallization and at different intervals of crystallization was measured both in the crystals and in solutions with a JASCO digital polarimeter (Model P-1010 λ = 589 nm \pm 0.05° accuracy) using a cylindrical quartz cell (6 ml) at room temperature. The enantiomeric excess of the crystals was measured by dissolving 5 mg of the crystals in water (6 ml).

Experimental Techniques

Gel permeation chromatography (GPC) measurements were carried out using SP-Thermo Separation Products, consisting of a UV detector (UV 100 model at 254 nm) with an IR detector. Five milligrams of the dried polymer

Chirality DOI 10.1002/chir

was dissolved in 1 ml of chloroform, after which 20 μl of the chloroform polymer solution was injected into the G.P.C column. Samples were eluted with an acetate buffer, pH 7, $T = 25^\circ\text{C}$, through a 4 \times HEMA-BIO column (10 4 Å pore size) at a flow of 1 ml/min. The molecular weights were determined relative to standards of PEO (Sigma Aldrich) using a Winer-286 computer program. A Bruker AXS D8 advance diffractometer (using $\text{CuK}\alpha$ $\lambda = 1.5418$ Å radiation) operating at 40 kv/40 mA was used with a graphite reflected beam monochromator and variable divergence slits for powder X-ray diffraction analysis. Peak fitting and lattice parameter refinement were computed using the Topas and Metric programs (Bruker Analytical X-ray system). Scanning electron microscope (SEM) images were acquired on a JEOL 840 instrument at an acceleration voltage of 20 kV. Specific optical rotation was measured with a JASCO digital polarimeter (Model P-1010 $\lambda = 586$ nm \pm 0.05° accuracy) using a cylindrical quartz cell (6 ml) at room temperature by dissolving the crystals. Circular dichroism measurements were carried out with a Jasco J-715 spectrometer (Model 6025) using a cylindrical quartz cell (0.1 ml) at room temperature. Time-resolved conductivity measurements were performed using a conductivity meter (Model CDM230 Radiometer Analytical SAS).

RESULTS AND DISCUSSION

Polymer Characterization

In this study, we prepared and employed a chiral polymer based on a PEO block ($M_w = 5000$ g/mol) and a block of (+)-(*S*)-glutamic acid. The synthesis of the chiral block copolymers was carried out by previously reported methods. The reaction sequence for the preparation of the chiral block polymer is shown in Figure 1. In general, the chiral block copolymers were synthesized via the ring-opening polymerization of a (+)-(*S*)-glutamic acid *N*-carboxyanhydride monomer with α -methoxy- ω -amino-poly(ethylene glycol) as a macroinitiator. The block copolymers were optically active, and ^1H NMR, IR spectra, and elemental analysis confirmed their structure. Based on the ^1H NMR spectrum of the block copolymer and G.P.C. analysis, the number of amino acid units in the block is calculated to be 20 on average (PEO $_{113}$ -*b*-(+)-(*S*)-Glu $_{20}$).

The PEO $_{113}$ -*b*-(+)-(*S*)-Glu $_{20}$ copolymers show a high polydispersity index (PDI) of ca. 1.30 that is rather narrow PDI for block copolymers particularly for copolymers with polypeptide block. It should be mentioned that with the recently introduced organo-nickel-based initiating system, bipy-Ni(COD), and other transition metal complexes,²⁵ the NCA polymerization of block copolymers is much better controlled and produces well-defined polypeptides with a PDI < 1.2. Here we should mention that the PDI of the starting monomer, namely, the methoxy- ω -amino-poly(ethylene glycol) is rather narrow (PDI = 1.1).

The block polymers were highly water-soluble in concentrations ranging from 0.1 to 0.5 mg/ml. The secondary structures of the chiral block copolymers in aqueous solutions were analyzed by circular dichroism (CD) spectroscopy.

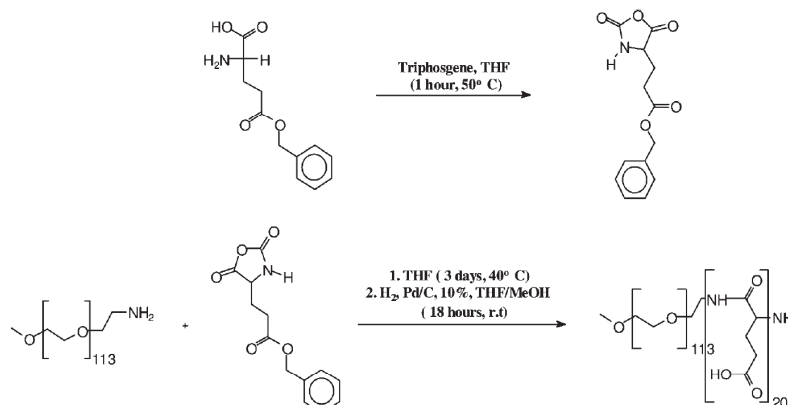


Fig. 1. Schematic graph for the chemical route for the synthesis of chiral polymers.

In Figure 2, the CD spectra of PEO₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀ at different pH and at room temperature are shown. In principle, synthetic peptides can adopt three main types of secondary structures, α -helix, β -sheet, and random coil, which depend on the measurement conditions, mainly pH or temperature. As can be seen in Figure 2, at low pH 3.75 values, the amino acid block shows a CD spectrum typical for a α -helix 90%–95%, calculated with two minima at $\lambda = 209$ and 222 nm. At pH 7.8, the secondary structure of the peptide block was a random coil (100%). At pH values between 3.75 and 7.8, mixtures of both structures were found with increasing contents of α -helix with decreasing pH. Overall, these results agree well with the behavior of synthetic poly (+)-(S)-glutamic acid structures in water.²⁶

Chiral Crystallization

The presence of the chiral block copolymers as additives in the crystallization of *rac*-threonine show various

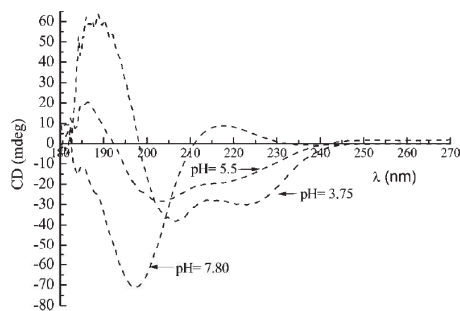


Fig. 2. Circular dichroism (CD) measurements of PEO₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀ at different pH at 25°C.

effects on the crystallization kinetics, crystal morphology, and chiral discrimination, which will be discussed separately. We will differentiate between the description of the results and the different pH values.

Generally, when a chiral molecule crystallizes from solutions it can form either (a) racemic crystals, which contain equal numbers of left- and right-handed molecules in the same crystal, (b) conglomerates of separate left- or right-handed crystals of the pure enantiomers, such as Pasteur's tartrate salt, or (c) a racemic solid solution in which the two enantiomers coexist in a disordered manner in the crystal lattice in any portion or in a specified concentration range. Racemic crystals, however, tend to greatly outnumber conglomerates in nature. For instance, Jacques et al.²⁷ reported that statistically between 5% and 10% of all racemates form conglomerate crystals. In this work, we chose to investigate the crystallization of *rac*-threonine as a model system for the chiral crystallization of a conglomerate system.

It is well known that kinetics of crystallization, crystal morphology, crystal growth mechanisms, and to some extent chiral resolutions are affected by supersaturation solution levels and pH solution values. Therefore, we work under low supersaturation conditions with a typical supersaturation index of $\sigma = 0.5$ –2. Moreover, they were also examined for both pH values for pure crystallization from water and for crystallization with chiral polymer additives. Polymers and other macromolecules can affect the nucleation, growth, and morphology of inorganic and organic crystals.²⁸ Therefore, we used polyethylene oxide, PEO, 5000 g/mol, as a control for the crystallization experiments. In addition, to eliminate parameters regarding chiral amino acids such as molecular surface electrical charge and isoelectric point (pI), we carried out the crystallization of *rac*-threonine at different pH and also performed crystallization experiments with pure glutamic acid as a chiral additive.

Chirality DOI 10.1002/chir

Finally, all the crystallization experiments were carried out for both enantiomers of the chiral polymers, PEO₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀ and PEO₁₁₃-*b*-(-)(R)-Glu₂₀. However, as the results for both enantiomers are identical, for convenience and clarity, we report our results only on the S enantiomer of the polymer, i.e., PEO₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀.

Effect on Crystallization Kinetics

In the first step, we studied the effect of the polymer structure, the random coil, or the α -helix on the chiral segment of the polymers, on the crystallization kinetics. To investigate the influence of our chiral copolymers on the crystallization kinetics, we monitored the specific conductivity of the supersaturated solutions during crystallization.²⁹ It should be noted that solution conductivity is proportional to the dissolved threonine concentration. The according drop in solution conductivity is related to the formation of threonine crystals.

A series of crystallization experiments on the conglomerate system of *rac*-threonine were performed at two pH values, pH = 3.75 and pH = 7.8, first from pure solutions and then from a solution containing the chiral block copolymers (1 mg/ml). The results of the kinetic measurements of crystallization experiments at different pH values are shown in Figure 3. In all cases, as the crystallization proceeds, the conductivity of the solution decreases proportionally to the concentration of solute remaining in the solution phase. As can be observed in Figure 3, the overall crystallization kinetics, e.g., nucleation and crystal growth, is more rapid at pH = 3.75 compared with the crystallization at pH = 7.8, as is expressed by the slope of the solutions' conductivity. To quantify and to compare the crystallization kinetics at different pH values, we will define the general parameter, called half time of crystallization, $t_{0.5}$, to determine the time at which half the crystallization occurs. Based on $t_{0.5}$ we can qualitatively discuss and compare the crystallization kinetics under different crystallization conditions. The $t_{0.5}$ for bulk crystallization at pH = 7.8 is ca. 50 min, whereas for pH = 3.75 $t_{0.5}$ 20 min. The addition of the chiral polymers to the crystallization solutions is reflected in both pH values by the decrease in the crystallization rate. However, the effect of the polymer on the crystallization kinetics is most pronounced at pH = 3.75 with $t_{0.5}$ 60 min, which is about 3 time slower in comparison to the bulk case of crystallization at the same pH with a pure water solution. The effect of the polymers on the crystallization kinetics at pH = 7.8 is less significant ($t_{0.5}$ = 70 min). From the above results we can conclude that at pH = 3.75, a chiral polymer with a α -helix configuration has a stronger effect on the crystallization kinetics, probably due to the enhanced molecular interactions at the crystal surfaces.

Effects on Crystal Morphology

The morphology of *rac*-threonine crystals crystallized at different pH and in the presence of chiral polymers is shown in Figure 4. Pure *rac*-threonine at pH = 7.8 crystallized as elongated-shaped crystal with average dimensions of 100 μm \times 20 μm . Crystals grown at pH = 3.75 maintain the elongated shape, but show a moderate change in the

Chirality DOI 10.1002/chir

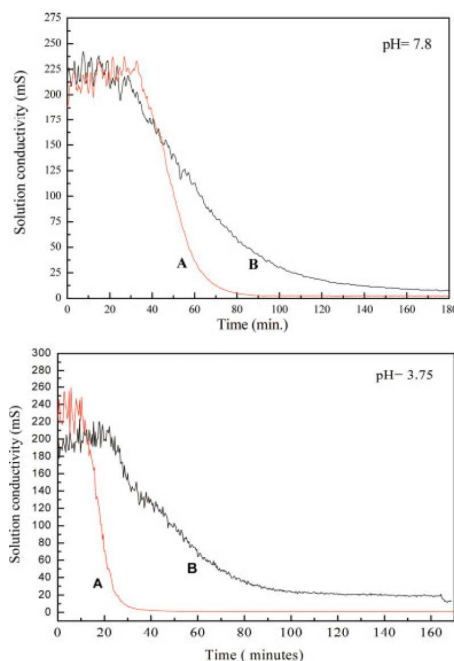


Fig. 3. Time-dependent conductivities of *rac*-threonine crystallization at pH = 7.8 and pH = 3.75 for pure water (A-red) and (B-black) for a solution with 1 mg/ml PEO₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

crystal aspect ratio, namely, an increase in the average crystal dimensions to average size of 200 μm \times 40 μm . The presence of chiral block copolymers influenced the morphology of *rac*-threonine crystals, as shown in Figure 4. All the crystallization in the presence of chiral block copolymers resulted in a decrease in the average crystal size, particularly at pH = 3.75. At this pH, the chiral block copolymers lead to a significant decrease in crystal size to about an average crystal size of 10 μm . Moreover, the morphology of *rac*-threonine crystals transforms to a spherical shape. These modifications in crystal size morphology indicate the strong interaction of the chiral polymers with crystal surfaces at this pH due to its α -helix configuration. Finally, it should be mentioned that we did not observe any change in the X-ray diffraction pattern for crystals crystallized with chiral polymers, as can be seen in Figure 5. The X-ray diffraction of the pure *rac*-threonine match the one reported in the literature as an orthorhombic space group (P mm^2) with unit cell parameters (in \AA) $a = 7.750$, $b = 13.640$, $c = 5.160$.³⁰ In comparison with pure *rac*-threonine crystals, the X-ray-diffraction of crystals grown in chiral polymer solutions shows only modifications in the peak's diffraction intensity, i.e., an increase in the (020)

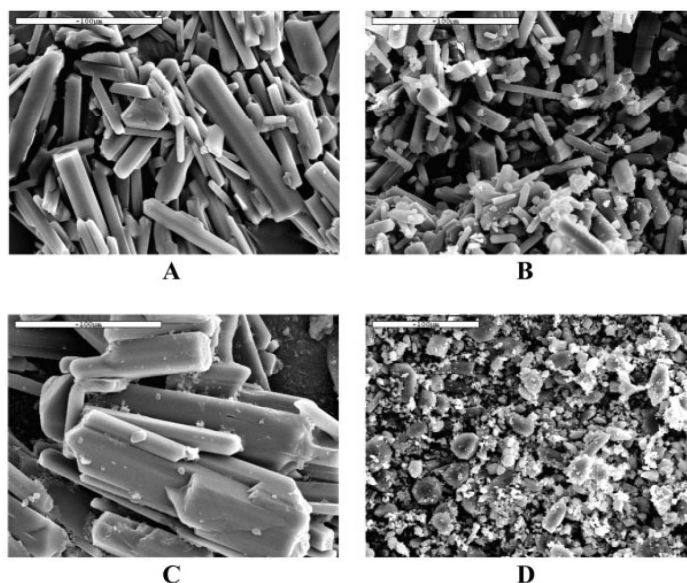


Fig. 4. Scanning electron microscope images of *rac*-threonine crystal crystallized at several crystallization conditions (in all cases the scale bar is 100 μm) (A) crystallization at pH = 7.8, (B) crystallization from solution with 1 mg/mL PEO113-b-(+)-(S)-Glu20 at pH = 7.8, (C) crystallization at pH = 3.75, (D) Crystallization from solution with 1 mg/mL PEO113-b-(+)-(S)-Glu20 at pH = 3.75.

crystal's plane and a decrease in the peak's diffraction intensity of planes (011), (101), (202). In principle this observed difference in the X-ray diffraction intensity may possibly give indication regarding the interactions of the chiral polymers with certain crystal faces. However, as our measurements are based on X-ray powders diffraction we

cannot directly correlated between intensity of the X-ray diffraction and exposure of certain crystal planes.

Chiral Discrimination

In Table 1 some results are reported on the resolution by the crystallization of *rac*-threonine in the presence of chiral block copolymers under various polymer concentrations at different intervals of crystallization processes. The experiments were performed at room temperature and the enantiomeric excess (e.e.) during crystallization was measured both in the crystals and in the crystallization solutions.

The control experiments using only PEO₁₁₃ as the polymer additive at pH 3.75 and 7.8 confirm our assumption and show, as expected, negligible e.e. (the values of the e.e. are insignificant and within the error range of the instrumentation). For instance, the crystallization of *rac*-threonine at pH = 3.75 in the presence of 1 mg/ml of PEO₁₁₃ verifies the low enantiomeric excess of 2.2%, as shown in Table 1. Crystallization with pure glutamic acid shows a high e.e. (data not shown) and these results are in agreement with previously reported values of e.e. by Lahav and coworkers.³¹

As regards the influence of chiral polymers, it is shown that only at a crystallization pH of 3.75, were chiral polymers with a α -helix structure found to act as resolving agents for the kinetic chiral crystallization of *rac*-threonine.

Chirality DOI 10.1002/chir

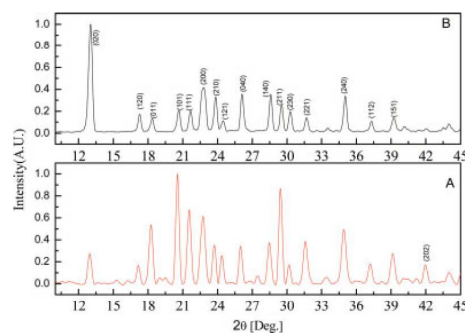


Fig. 5. X-ray diffraction spectrum of *rac*-threonine (A) at pH = 3.75, (B) Crystallization from solution with 1 mg/mL PEO113-b-(+)-(S)-Glu20 at pH = 3.75. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

TABLE 1. Resolution experiments at room temperature of *rac*-threonine with chiral polymers

pH	Chiral polymers (mg/ml)	Crystal yield (%)	e.e.
Exp. conditions			
3.75	1 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	6.8	19.1 (R)
3.75	1 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	10.2	35.8 (R)
3.75	0.5 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	10.2	29.2 (R)
3.75	0.1 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	5.4	11.9 (R)
3.75	0.1 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	9.1	20.9 (R)
7.80	1 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	7.7	4.4 (R)
7.80	1 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	10.9	3.1 (R)
7.80	0.5 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	3.5	2.8 (R)
7.80	0.5 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	9	3.7 (R)
7.80	0.1 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	5.3	3.1 (R)
7.80	0.1 mg/ml PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -(+)-(S)-Glu ₂₀	8.7	1.1 (R)
Control exp.			
3.75	1 mg/ml PEO ₁₁₃	8.1	2.2 (S)
7.80	1 mg/ml PEO ₁₁₃	6.1	3.1 (R)

For example, the presence of 1 mg/ml of PEG₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀ at pH = 3.75 verifies the chiral discrimination of about 19.1% (of the R enantiomers) at the early crystallization stages. An inspection of the results of chiral resolution by crystallization shows a linear correlation between the polymer concentrations in solution and the resolving power of the polymer. At higher polymer concentrations, a high e.e. is achieved. For instance, at a polymer concentration of 0.1 mg/ml, a maximum e.e. of 20.9% is achieved, whereas at similar conditions with a polymer concentration of 1 mg/ml, an e.e. of 35.8% is observed. It should be mentioned that these results that obey the "rule of reversal"³¹ hold in our study. This well-known rule is dedicated to the relationship between the chirality of the solute and the additive. Generally, the "rule of reversal" claims that R additive is absorbed selectively on the R enantiomorph growing crystal and as a result delays the growth of the R crystal. Consequently, the enantiomorph of the opposite chirality precipitates in excess and vice versa for the S additive.

For chiral polymers with a random coil structure (crystallization at pH = 7.8), the results did not show any chiral resolution under all the polymer concentrations. To confirm the kinetic chiral resolution of the polymers during crystallization, we conducted the time-dependent polarimetry of the crystallization solutions throughout the crystallization runs. One of those experiments is shown in Figure 6, where it is clearly shown that the presence of the α -helix polymer at pH = 3.75 gives rise to significant optical rotation in the solution phase with maximum values of $\alpha = 8.32^\circ$, which correspond to an e.e. in the solution phase of approximately 26% of the R enantiomer.

The shape of Figure 6 is typical for kinetic chiral resolution by crystallization: the e.e. reaches a maximum value at $t = 37$, and minutes afterward the c.e. values decrease slowly with time as the inhibited enantiomer starts to crystallize slowly. Figure 6 also demonstrates that with the presence of PEO₁₁₃ or crystallization in the presence of PEG₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀ at pH = 7.8, no chiral discrimination occurs.

Chirality DOI 10.1002/chir

Our results demonstrate the dominant role played by chiral polymer structures on its efficiency to act as a chiral resolving agent in the crystallization process. As expected based on the literature mentioned earlier, only the α -helix conformations of the chiral polymers turned out to be efficient in chiral crystallization. The results obtained from the kinetics and morphology studies do not allow us to provide a detailed mechanism for the correlation between chiral polymer structures and their efficiency for chiral resolution by crystallization. However, we assume that the interactions of the chiral polymers with crystal surfaces are key parameters for chiral resolution via crystallization. Based on this hypothesis, we can conclude that chiral polymers with a α -helix structure have strongly (or additional) molecular and chiral interactions with the crystal surfaces of *rac*-threonine. Furthermore, our results are similar to other findings on the effect of polymer struc-

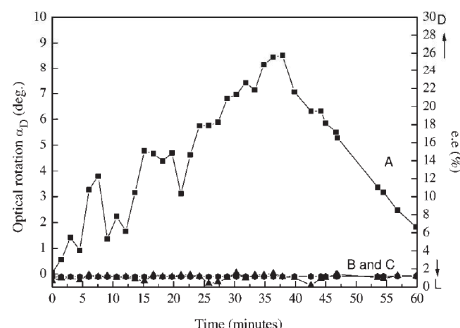


Fig. 6. Time-dependent polarimetry of the crystallization solutions: (A) Crystallization of *rac*-threonine from solution with 1 mg/mL polymer PEO₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀ at pH = 3.75. (B) Crystallization *rac*-threonine from solution with 1 mg/mL polymer of PEO₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀ at pH = 7.8. (C) Crystallization of *rac*-threonine from solution with 1 mg/mL polymer of PEO₁₁₃ pH = 3.75.

tures on crystallization. The interactions of block copolymers with crystal surfaces are a fundamental issue for understanding the effects of polymers in crystallization process. We have to point out that in other study for example Colfen et al. showed that copolymers based on PEO and short acidic polypeptides with a random conformation of the peptide blocks are more advantageous in the mineralization of biominerals of CaCO_3 and BaSO_4 .²⁰ Also the crystallization of CdS in the presence of PEG block copolymers with linear or branched dendritic poly(ethyleneimine) blocks³² show that the flexible branched polymers has highest binding group density and the optimum polymer architecture, compared to a flexible linear block and an organized, but stiff, dendritic block.

CONCLUSIONS

In this work we describe the correlation between chiral polymer structures and their efficiency for chiral resolution by crystallization. The main polymer structural parameters on which we focus our investigation are the α -helical and random coil conformations of the chiral polymers and their influence on chiral recognition at crystal surfaces. For this purpose, we synthesized double hydrophilic chiral polymers based on PEG and glutamic acid oligopeptide segments. The secondary structures of the peptide segments were characterized by CD-spectroscopy, which show that structures of the chiral polymers could be switched between an α -helical and a disordered random coil by pH. These polymers were employed in the crystallization of *rac*-threonine as a model system of chiral crystallization. The effects of the chiral polymers on the crystallization kinetics, crystal morphology, and chiral resolution were studied. The α -helical conformer of the chiral polymer turned out to be more efficient for chiral resolution by crystallization. We assume that chiral polymers with a α -helical conformation exhibit stronger chiral recognition and interactions with crystal surfaces of threonine. Overall, our research can provide useful guidelines for the selection of chiral polymer additives that will act efficiently for chiral resolution by crystallization. Although experiments on chirality go back to the middle of the last century, the knowledge in this field is still rather limited. We believe that the presented results may provide further insight into chiral discrimination in crystallization process. The possibility of creating chiral polymers with a variety of sizes, architectures, and chemical functionalities opens new experimental opportunities for probing the pattern recognition between polymers and crystal surfaces at the molecular level.

ACKNOWLEDGMENTS

T. Menahem would like to acknowledge the Bar-Ilan President's Ph.D. Scholarship Foundation.

LITERATURE CITED

1. Okamoto Y. Chiral polymers. *Progr Polym Sci* 2000;25:159–162.
2. Yamamoto C, Okamoto Y. Optically active polymers for chiral separation. *Bull Chem Soc Japan* 2004;77:227–257.

3. Itsuno S, Ito K, Hirao A, Nakahama S. Asymmetric-synthesis using chirally modified borohydrides. 2. Enantioselective reduction of ketones with polymeric (*S*)-proline-borane reagent. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1984;12:2887–2893.
4. Kakuchi T, Takaoka T, Yokota K. Polymeric chiral crown ethers. 5. Synthesis of polymers by cyclo-polymerization of divinyl ethers containing moieties deriving from *l*-tartaric acid, and the chiral recognition toward amino-acids. *Makromol Chem: Macromol Chem Phys* 1989;190:2449–2455.
5. Gubitz G. Separation of drug enantiomers by HPLC using chiral stationary phases—a selective review. *Chromatographia* 1990;30(9–10): 555–564.
6. Kelly EJ, Haddleton DM, Crout DHG, Ross P, Dutton J. A novel stationary phase for chiral chromatography: poly-*l*-leucine supported on porous graphitic carbon and its application to the separation of the enantiomers of chiral epoxides. *Chem Commun* 1999:1233–1234.
7. Khan M, Viswanathan B, Rao DS, Reddy R. Chiral separation of Frovatriptan isomers by HPLC using amylose based chiral stationary phase. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci* 2007;846(1–2):119–123.
8. Zbaida D, Lahav M, Drauz K, Knaup G, Kottenhahn M. A cyclic continuous process for converting conglomerates into optically pure enantiomers by crystallization and dissolution with the assistance of 'tailor-made' polymers. *Tetrahedron* 2000;56:6645–6649.
9. Zbaida D, Weissbuch I, Shavitgati E, Addadi L, Leiserowitz L, Lahav M. Design of chiral polymers for the kinetic resolution of racemic conglomerates. *Reactive Polym* 1987;6(2–3):241–253.
10. Menahem T, Mastai Y. Chiral soluble polymers and microspheres for enantioselective crystallization. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2006; 44:3009–3017.
11. Medina DD, Goldshtein J, Margel S, Mastai Y. Enantioselective crystallization on chiral polymeric microspheres. *Adv Funct Mater* 2007; 17:944–950.
12. Mastai Y, Sedlak M, Colfen H, Antonietti M. The separation of racemic crystals into enantiomers by chiral block copolymers. *Chem Eur J* 2002;8:2430–2437.
13. Yeh Y, Feeney RE. Antifreeze proteins: structures and mechanisms of function. *Chem Rev* 1996;96:601–617.
14. Aoki T, Kobayashi Y, Kaneko T, Oikawa E, Yamamura Y, Fujita Y, Teraguchi M, Nomura R, Masuda T. Synthesis and properties of polymers from disubstituted acetylenes with chiral pinanyl groups. *Macromolecules* 1999;32:79–85.
15. Yu SH, Colfen H, Mastai Y. Formation and optical properties of gold nanoparticles synthesized in the presence of double-hydrophilic block copolymers. *J Nanosci Nanotechnol* 2004;4:291–298.
16. Qi LM, Colfen H, Antonietti M. Control of barite morphology by double-hydrophilic block copolymers. *Chem Mater* 2000;12:2392–2403.
17. Bo Q, Zhao Y. Double-hydrophilic block copolymer for encapsulation and two-way pH change-induced release of metalloporphyrins. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2006;44:1734–1744.
18. Ge ZS, Xie D, Chen DY, Jiang XZ, Zhang YF, Liu HW, Liu SY. Stimuli-responsive double hydrophilic block copolymer micelles with switchable catalytic activity. *Macromolecules* 2007;40:3538–3546.
19. Mountrichas G, Pispas S. Novel double hydrophilic block copolymers based on poly(*p*-hydroxystyrene) derivatives and poly(ethylene oxide). *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2007;45:5790–5799.
20. Kasparova P, Antonietti M, Colfen H. Double hydrophilic block copolymers with switchable secondary structure as additives for crystallization control. *Colloids Surfaces A: Physicochem Engin Aspects* 2004;250(1–3):153–162.
21. Addadi L, Weinstein S, Gati E, Weissbuch I, Lahav M. Resolution of conglomerates with the assistance of tailor-made impurities—generality and mechanistic aspects of the rule of reversal—a new method for assignment of absolute-configuration. *J Am Chem Soc* 1982;104:4610–4617.
22. Hruska Z, Riess G, Goddard P. Synthesis and purification of a poly(ethylene oxide) poly(γ -benzyl-L-glutamate) diblock copolymer bearing tyrosine units at the block junction. *Polymer* 1993;34:1333–1335.
23. Yokoyama M, Inoue S, Kataoka K, Yui N, Sakurai Y. Preparation of adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block

Chirality DOI 10.1002/chir

- copolymer—a new type of polymeric anticancer agent. *Makromol Chem Rapid Commun* 1987;8:431–435.
24. Daly WH, Poche D. The preparation of *N*-carboxyanhydrides of α -amino-acids using bis(trichloromethyl)carbonate. *Tetrahedron Lett* 1988;29:5859–5862.
 25. Deming TJ. Facile synthesis of block copolypeptides of defined architecture. *Nature* 1997;390:386–389.
 26. Holzwart G, Doty P. Ultraviolet circular dichroism of polypeptides. *J Am Chem Soc* 1965;87:218–228.
 27. Jacques J, Collet A, Wilen SH. *Enantiomers, racemates and resolutions*. New York: Wiley; 1981.
 28. Yu SH, Colfen H. Bio-inspired crystal morphogenesis by hydrophilic polymers. *J Mater Chem* 2004;14:2124–2147.
 29. Buhse T, Kondepudi DK, Hoskins B. Kinetics of chiral resolution in stirred crystallization of *D/L*-glutamic acid. *Chirality* 1999;11:343–348.
 30. Cherin P. DL Threonine crystals, International Centre for Diffraction Data Powder Diffraction File, JCPDS PDF card 01-001-0992 (Year 1959). New York: Polytechnic Institute of Brooklyn. 1959.
 31. Addadi L, Berkovitchyellin Z, Domb N, Gati E, Lahav M, Leiserowitz L. Resolution of conglomerates by stereoselective habit modifications. *Nature* 1982;296:21–26.
 32. Qi LM, Colfen H, Antonietti M. Synthesis and characterization of CdS nanoparticles stabilized by double-hydrophilic block copolymers. *Nano Lett* 2001;1:61–65.

12. Seznam publikovaných prací odborných a vědeckých prací

Publikace vztahující se k tématu disertační práce

Originální články:

1. Sedlák, M.; Pravda, M.; Štaud, F., *et al.*: Synthesis of pH-sensitive amphotericin B–poly(ethylene glycol) conjugates and study of their controlled release in vitro *Bioorg Med Chem* 15, 4069, 2007. (IF₂₀₀₇ 2,624)
2. Sedlák, M.; Pravda, M.; Kubicová, L., *et al.*: Synthesis and characterisation of a new pH-sensitive amphotericin B–poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) conjugate *Bioorg Med Chem Lett* 17, 2554, 2007. (IF₂₀₀₇ 2,538)
3. Menahem, T.; Pravda, M.; Mastai, M.: Correlation between structures of chiral polymers and their efficiency for chiral resolution by crystallization *Chirality* 21, 862, 2009. (IF₂₀₀₈ 2,441)

Příspěvky na konferencích

1. Pravda, M.; Sedlák, M.; Kubicová, L.: Konjugáty amfotericinu B s polymerními nosiči na bázi poly(ethyleneglykol)-*b*-poly(L-lysinu); 41. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 4. - 6.12.2006 *Chem Listy* 100, 1033, 2006. (IF₂₀₀₆ 0,431)
2. Pravda, M.; Kubicová, L.; Sedlák, M.: Syntéza a charakterizace nového konjugátu methoxypoly(ethylenglykolu) s nystatinem. In *Nové směry ve výzkumu léčiv. Sborník 34. konference Syntéza a analýza léčiv. 12. - 14. 9. 2005, Brno. s. 111., 2005.*
3. Pravda, M.; Kubicová, L.; Sedlák, M.: Syntéza a charakterizace nových konjugátů poly(ethylenglykolu) s deriváty salicylanilidu. *ChemZi* 1, 234, 2005.
4. Kubicová, L.; Pravda, M.; Sedlák, M. *et al.*: Amphotericin B, its lipid formulations and conjugates with polymers. *Cent Eur J Publ Health* 53-55, 2004.

Patenty

1. Sedlák, M.; Kubicová, L.; Pravda, M. *et al.*: Nosiče léčiv na bázi modifikovaných poly(ethylenglykolů) a jejich pH sensitivní konjugáty, CZ298676B6, 2007.

Ostatní publikace

1. Pravda, M.; Kubicová, L.; Veselý, O. *et al.*: Systemic antifungal agents - current status and future trends. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 31/32, 67, 2004.
2. Pravda, M.; Kubicová, M.; Silva, L.; Buchta, V.: Antifungální aktivita salicylanilidů a thiosalicylanilidů. 38. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 28.-30.2003, *Chem Listy* 97, 1122-1123, 2003. (IF₂₀₀₃ 0.345)
3. Pravda M, Hrnčiarová D., Kráľová K., Kubicová L.: 3-Methylthiosalicylanilidy – inhibitory Hillovy reakce. 38. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 28.-30.2003, *Chem Listy* 97, 1122, 2003. (IF₂₀₀₃ 0.345)
4. Kubicová L., Šustr M., Pravda M., Waissner K.: Biological activity of 2-hydroxythiobenzanilides and related compounds. *Cent Eur J Pub. Health*, 56-58, 2004.
5. Šustr M., Hrnčiarová D., Látalová M., Pravda M., Kubicová L.: Biological activity of *N*-substituted thiobenzamides and related compounds. *Folia Pharm Univ Carol* 29, 39-54, 2003.
6. Pravda M., Šustr M., Kolář P., Kubicová L., Kráľová L.: Thioanthranililides as analogues of thiosalicylanilides - influence on autotrophic organisms. Konferencja Ecopole'03 Jamrozowa Polana 16 - 18. Października 2003. Sborník s. 121.
7. Pravda M., Šustr M., Hrnčiarová D., Kubicová L., Kráľová K.: Effects of 3-methylthiosalicylanilides on chlorophyll content in freshwater alga *Chlorella vulgaris*. Konferencja ECOpole'03 Jamrozowa Polana 16 - 18. Października 2003. Sborník s. 120.
8. Kubicová, L.; Pravda, M.; Šustr, M. *et al.*: Antimykobakteriální aktivita thiosalicylanilidů 39. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 26. - 28.11.2006, *Chem. Listy* 98, 1023, 2004.
9. Kubicová, L.; Pravda, M.; Chobot V. *et. al.*: Syntéza a fotoxikologický screening salicylanilidů 39. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 26. - 28.11.2006, *Chem. Listy* 98, 1023, 2004. (IF₂₀₀₃ 0.345)
10. Pravda, M.; Kubicová, L.; Skála, P.: Syntéza salicylanilidů v mikrovlnném reaktoru. 39. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 26. - 28.11.2006, *Chem. Listy* 98, 1028, 2004. (IF₂₀₀₃ 0.345)

11. Pravda, M.; Kubicová, L.; Skála, P.: Syntéza 3-aryl-1,2,3-bezotriazin-4(3H)-thionů.
39. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii,
Nymburk, 26. - 28.11.2006, *Chem. Listy* 98, 1028, 2004. (IF₂₀₀₃ 0.345)

Granty

1. Pravda M.: FRVŠ 2005 661/G6: Polymerní nosiče antimykotik na bázi modifikovaných polyethylenglykolů
2. Pravda M.: FRVŠ 2006 1744/G6: Tvorba modelových úloh pro předmět Vybrané metody laboratorní techniky

13. Souhrn

Předkládaná práce byla zaměřena na přípravu systémů pro cílenou distribuci polyenových antimykotik. Cílem byla příprava kovalentních pH-senzitivních konjugátů modifikovaných poly(ethylenglykolů) s amfotericinem B (AmB). Byla vypracována metodika přípravy modifikovaných poly(ethylenglykolů), které ve své struktuře obsahovaly aromatické acidolabilní spojky polymer–léčivo, které umožňují uvolnění léčiva v prostředí se sníženým pH. K zavedení těchto spojek bylo využito modifikace terminálních skupin poly(ethylenglykolu). K tomuto účelu byly zvoleny tři přístupy:

- 1) tvorba nebiodegradabilní éterové vazby s 4-hydroxybenzaldehydem
- 2) acylace koncových hydroxylových skupin polyethylenglykolu 4-formylbenzoovou kyselinou
- 3) acylace koncových aminoskupin α -methoxy- ω -aminopoly(ethylenglykolu) a α,ω -diaminopoly(ethylenglykolu) 4-formylbenzoovou kyselinou

K vazbě léčiva na polymer byla využita primární aminoskupina mykosaminu, cukerné sloužky AmB, která je schopna vytvářet iminové vazby s aromatickými aldehydickými skupinami. Klíčovou část studie tvořilo studium stability připravených konjugátů za různých fyziologických podmínek. Jako modelová prostředí byly zvoleny fosfátové pufrы o pH 7,4 a 5,5. Studována byla i stabilita konjugátů v krevní plazmě a krevním séru. Dalším dílčím cílem této práce byla příprava blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a polyaminokyselin. Trojblokový kopolymer poly(L- α -lysin)-*blok*-poly(ethylenglykol)-*blok*-poly(L- α -lysin) byl využit pro přípravu pH-senzitivního konjugátu s AmB. Primární aminoskupiny polyamidové části kopolymeru byly nejprve modifikovány acylací 4-formylbenzoovou kyselinou, která sloužila jako aromatická spojka umožňující vazbu AmB. U připraveného konjugátu byla rovněž provedena studie stability za různých fyziologických podmínek. U připravených konjugátů byly provedeny studie zaměřené na projevy akutní toxicity *in vivo*.

Posledním úkolem řešeným v rámci této práce bylo provedení studie zabývající se fyzikálně-chemickými vlastnostmi blokových kopolymerů poly(ethylenglykolu) a polyaminokyselin. K účelům této studie byl připraven dvoublokový kopolymer α -methoxypoly(ethyleneglykol)-*block*-poly(L- α -glutamové) kyseliny. Během experimentů byly sledovány změny v sekundární struktuře tohoto kopolymeru v závislosti na pH roztoku. Studie měla prokázat možnost využití připraveného chirálního polymeru jako aditiva umožňujícího dělení směsí enantiomerů krystalizací.

14. Summary

The aim of this dissertation thesis was preparation of drug delivery systems for polyene antimycotics, especially amphotericin B (AmB). Series of pH-sensitive conjugates of AmB with substituted poly(ethylene glycols) (PEG) have been synthesized and characterized for this purpose. The intermediate PEGs possess a 1,4-disubstituted benzene ring with aldehyde group at the end of the chain. The benzene ring is connected with PEG at its 4-position (with respect to the aldehyde group) by various functional groups (ether, amide, ester). Reaction of terminal aldehyde group of the substituted PEGs with AmB gave conjugates containing a pH-sensitive imine linkage, which can be presumed to exhibit antimycotic effect at sites with lowered pH value. The stability of prepared conjugates under the different physiological conditions was studied. Phosphate buffers (pH = 7.4 or 5.5) were used as model media. Stability of conjugates in human blood plasma and human blood serum was examined. The imine linkage is split to give free AmB with half-lives of 2–45 min. The rate of acid catalysed hydrolysis depends upon substitution of the benzene ring; however, it does not depend on molecular weights of the PEGs used. The conjugates with ester linkage undergo enzymatic splitting in human blood plasma and/or blood serum at pH 7.4 (37 °C) with half-lives of 2–5 h depending on molecular weights of the PEGs used ($M = 5000, 10,000, 20,000$). At first, the splitting of ester linkage produces the relatively stable pro-drug, that is, 4-carboxybenzylideneamphotericin B, which is decomposed to AmB and 4-formylbenzoic acid in a goal-directed manner only at pH 7 ($t_{1/2} = 2$ min, pH 5.5, 37 °C). The LD_{50} values of prepared conjugates were determined in vivo (mouse).

Another goal of this thesis was preparation of poly(ethylene glycol)-*b*-poly(amino acid) block copolymers. Twelve molecules of AmB were attached to block copolymer poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) via pH-sensitive imine linkages. In vitro drug release studies demonstrated the conjugate ($M_w = 26,700$) to be relatively stable in human plasma and in phosphate buffer (pH 7.4, 37 °C). Controlled release of AmB was observed in acidic phosphate buffer (pH 5.5, 37 °C) with the half-life of 2 min. The LD_{50} values of prepared conjugate was determined.

Last part of the thesis was dedicated to study of physical-chemical properties of poly(ethylene glycol)-*b*-poly(amino acid) block copolymers. A set of chiral block copolymers based on PEG with chiral glutamic acid oligopeptide segments (PEG₁₁₃-*b*-(+)-(S)-Glu₂₀) were synthesized and employed as additives in the crystallization of rac-

threonine. CD spectroscopy demonstrates that structures of chiral polymers could be switched between a helical and a disordered random coil by pH. The effect of these polymers at different conformations on the crystallization kinetics, crystal morphology and chiral resolution of rac-threonine is reported. Our study demonstrates that only chiral polymers with α -helical conformations of the chiral segment are effective as additives for chiral resolution throughout crystallization. Overall, our results provide useful guidelines for the selection and design of chiral polymer additives that will act efficiently for chiral resolution by crystallization.