

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Studijní program: Doktorský

Studijní obor: Lékařská biofyzika



**MUDr. Jana Mattová**

**Chelatující polymery pro léčbu Wilsonovy nemoci**  
**Chelating polymers for the therapy of Wilson's disease**

**Disertační práce**

**Školitel: doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc.**

Ústav biofyziky a informatiky

1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze

**Praha 2016**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 5. 12. 2016

MUDr. Jana Mattová

## **Identifikační záznam**

MATTOVÁ, Jana. *Chelatující polymery pro léčbu Wilsonovy nemoci. [Chelating polymers for the therapy of Wilson's disease]*. Praha, 2016. 149 stran, 6 příloh. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biofyziky a informatiky. Školitel doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc.

## **Poděkování**

Děkuji doc. RNDr. Pavle Poučkové, CSc. za odborné vedení, technickou pomoc a podporu při psaní této práce a v průběhu celého doktorského studia. Dále bych ráda poděkovala celému Oddělení experimentální radiobiologie Ústavu biofyziky a informatiky za cenné připomínky a rady, dále pak pánovi Mgr. Martinovi Hrubému, Ph.D., DSc. a RNDr. Janovi Kučkovi, Ph.D. z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR za pomoc při realizaci experimentů. Vřelé poděkování patří také mé rodině a mému příteli za trpělivost a toleranci, kterou mi poskytuje.

# OBSAH

<b>SOUHRN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>1 ÚVOD</b> .....	5
1.1 Důležitost mědi v organismu .....	5
1.2 Metabolizmus, transport a biochemie mědi .....	7
1.2.1 Absorpce z potravy .....	7
1.2.2 Játra – orgán regulující množství a biodistribuci mědi.....	9
1.2.3 Vylučování mědi.....	11
1.3 Wilsonova choroba.....	13
1.3.1 Mutace genu ATP7B .....	13
1.3.2 Patofyziologie Wilsonovy choroby .....	15
1.3.3 Formy a klinické projevy .....	17
1.3.4 Diagnostika .....	22
1.3.5 Terapie .....	24
1.3.6 Problémy současné léčby.....	28
<b>2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	30
2.1 Základní cíle experimentů.....	30
2.2 Hypotézy .....	33
<b>3 MATERIÁL A METODIKA</b> .....	34
3.1 Polymerní nosiče s navázanými ligandy .....	34
3.2 Cu <sup>2+</sup> -adsorpční a Cu <sup>2+</sup> -desorpční studie s poly(GMA-co-EDMA).....	38
3.2.1 Cu <sup>2+</sup> -adsorpční studie .....	38
3.2.2 Cu <sup>2+</sup> -desorpční studie .....	38
3.3 Selektivita adsorpce – Cu <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup> kompetitivní studie s poly(GMA-co-EDMA) .....	40
3.4 Biodistribuční <i>in vivo</i> studie s poly(GMA-co-EDMA).....	41
3.4.1 Biodistribuční studie s radionuklidem <sup>125</sup> I.....	41
3.4.2 Biodistribuční studie s radionuklidem <sup>64</sup> Cu.....	42
3.5 Biodistribuční <i>in vivo</i> studie s chitosanem a celulózou .....	44
3.5.1 Biodistribuční studie s radionuklidem <sup>64</sup> Cu.....	44
3.6 Dlouhodobá <i>in vivo</i> studie s poly(GMA-co-EDMA) za účelem snížení obsahu mědi .....	46
3.6.1 Sledování celkového stavu laboratorních potkanů .....	46

3.6.2	Stanovení obsahu volné mědi v krvi laboratorních potkanů.....	47
3.6.3	Stanovení obsahu volné mědi ve vybraných orgánech laboratorních potkanů.....	47
3.7	Statistická analýza.....	48
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>49</b>
4.1	Cu <sup>2+</sup> -adsorpční a Cu <sup>2+</sup> -desorpční studie s poly(GMA- <i>co</i> -EDMA).....	49
4.2	Selektivita adsorpce – Cu <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup> kompetitivní studie s poly(GMA- <i>co</i> -EDMA) .....	53
4.3	Biodistribuční <i>in vivo</i> studie s poly(GMA- <i>co</i> -EDMA).....	55
4.3.1	Biodistribuční studie s radionuklidem <sup>125</sup> I.....	55
4.3.2	Biodistribuční studie s radionuklidem <sup>64</sup> Cu.....	58
4.4	Biodistribuční <i>in vivo</i> studie s chitosanem a celulózou .....	61
4.4.1	Biodistribuční studie s radionuklidem <sup>64</sup> Cu.....	61
4.5	Dlouhodobá <i>in vivo</i> studie s poly(GMA- <i>co</i> -EDMA) za účelem snížení obsahu mědi .....	69
4.5.1	Sledování celkového stavu laboratorních potkanů .....	69
4.5.2	Stanovení obsahu volné mědi v krvi laboratorních potkanů.....	72
4.5.3	Stanovení obsahu volné mědi ve vybraných orgánech laboratorních potkanů.....	75
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>83</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>84</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>86</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>98</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>99</b>
	<b>SEZNAM GRAFŮ</b> .....	<b>100</b>
	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	<b>101</b>
	<b>PŘÍLOHY A – PUBLIKACE</b> .....	<b>102</b>
	Příloha Ia: Novel photodynamic therapy of prostate carcinoma using hydroxy- aluminum phthalocyanine entrapped in liposomes .....	102
	Příloha IIa: Chelating polymeric particles intended for the therapy of Wilson's disease .....	109
	Příloha IIIa: Chelating polymeric beads as potential therapeutics for Wilson's disease .....	116
	Příloha IVa: Multistage-targeted pH-responsive polymer conjugate of Auger electron emitter: Optimized design and <i>in vivo</i> activity .....	124

<b>PŘÍLOHY B – PATENTOVÉ PŘIHLÁŠKY .....</b>	<b>135</b>
Příloha Ib: Národní patentová přihláška. Název vynálezu: Polymer na bázi polysacharidu a jeho použití k prevenci a léčbě Wilsonovy choroby .....	135
Příloha IIb: Mezinárodní patentová přihláška. Název vynálezu: Polysaccharide-based polymer and its use for the prevention and treatment of the Wilson's disease. ....	143

## SOUHRN

Wilsonova choroba je vrozené onemocnění metabolismu mědi, při kterém dochází k jejímu ukládání v organizmu, zejména v játrech, mozku a ledvinách. Současná léčba je založena na použití tradičních nízkomolekulárních chelátorů mědi a vysokých dávek solí zinku, které bohužel způsobují mnoho závažných nežádoucích účinků kvůli systémovému působení.

Cílem této disertační práce je snaha o zlepšení léčby Wilsonovy nemoci pomocí polymerních nosičů. Velikost polymerních částic v řádech desítek mikrometrů by měla zajistit nevstřebatelnost léku po perorálním podání. Jako polymerní matrice byly pro tuto práci použity jak syntetické mikročástice poly(glycidyl methakrylátu-co-ethylén dimethakrylátu), tak přírodní mikrokryalická celulóza a zesíťovaný chitosan. Jako specifické chelátory mědi byly zvoleny *N,N*-di(2-pyridylmetyl)amin, triethyltetraamin a 8-hydroxychinolin, které dokážou s vysokou účinností komplexovat měďnaté kationty. Principem navrhované léčby je, že polymerní nosič s navázaným chelátorem adsorbuje měď v zažívacím traktu organismu přímo z potravy a díky nevstřebatelnosti se celý komplex vyloučí ven z těla spolu se stolicí. Tím se prakticky eliminují systémové nežádoucí účinky.

Jako první byla testována schopnost adsorpce mědi za podmínek simulujících prostředí žaludku a střeva a dále pak i stabilita polymerního komplexu v takovém prostředí. Dále se zjišťovala nevstřebatelnost a biodistribuce polymerů s navázanými chelátory po perorálním podání za podmínek *in vivo* u laboratorních zvířat pomocí radioaktivních značek  $^{125}\text{I}$  a  $^{64}\text{Cu}$ . U syntetických polymerních mikročástic byl navíc proveden i dlouhodobý experiment, jehož cílem bylo ověřit terapeutický efekt a schopnost dostatečně snížit obsah mědi v organizmu po perorálním podávání.

Ukázali jsme, že všechny použité typy polymerních nosičů jsou téměř stoprocentně nevstřebatelné ze zažívacího traktu po perorálním podání u laboratorních zvířat. Testy za simulovaných podmínek rovněž potvrdili vysoce účinnou komplexaci mědi a dostatečnou stabilitu polymerních komplexů. Nejdůležitějším výsledkem pak bylo zjištění, že syntetické polymerní mikročástice dokázaly u laboratorních zvířat se statistickou významností snížit obsah mědi, což je nutný požadavek terapie.



**Klíčová slova:** polymerní mikročástice, chelátory kationtů mědi, Wilsonova choroba, nevstřebatelnost polymerních komplexů, perorální aplikace, terapeutický účinek, laboratorní zvířata, radionuklidy  $^{125}\text{I}$  a  $^{64}\text{Cu}$ .

## ABSTRACT

Wilson's disease is a hereditary disorder of copper metabolism, which causes copper accumulation in organism, especially in the liver, kidneys and brain. Current treatment is based on the use of low-molecular weight copper chelators and high doses of zinc salts. Unfortunately, they can induce some severe side effects due to systemic action.

The aim of this thesis is to improve the treatment of Wilson's disease by using of polymeric drug delivery systems. The size of polymer particles in tens of microns should provide non-resorbability of the drug after oral administration. Synthetic microparticles of poly(glycidyl methacrylate-*co*-ethylene dimethacrylate), natural microcrystalline cellulose and cross-linked chitosan were used as polymer matrices. *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine, triethylenetetraamine and 8-hydroxyquinoline were selected as specific copper chelators, which can complex copper cations with high efficiency. The principle of the proposed treatment is that the polymeric carrier-bound chelator complex copper directly from the food in digestive tract of the organism. Because of non-resorbability, the entire complex should be eliminated from the body together with stools. This virtually eliminates systemic side effects.

The ability of adsorption of copper and the stability of polymer complex under conditions simulating stomach and intestine environment were tested first. Further, non-resorbability and biodistribution of polymers with bound chelators were investigated *in vivo* in laboratory animals after oral administration of radiolabelled polymers with radionuclides  $^{125}\text{I}$  and  $^{64}\text{Cu}$ . The long-term experiment with synthetic polymer microparticles was also performed. The aim was to verify therapeutic effects and sufficient reduction of copper content in the body after oral administration.

We have shown that all types of polymeric carriers are almost entirely non-resorbable from the gastrointestinal tract after oral administration in laboratory animals. The studies under simulated conditions also confirmed highly efficient complexation of copper and sufficient stability of polymer complexes. The most important result was the finding that synthetic polymer microparticles were able to reduce copper content in laboratory animals significantly, which is a necessary requirement of therapy.

**Key words:** polymer microparticles, copper chelators, Wilson's disease, non-resorbability of polymer complexes, oral administration, therapeutic effect, laboratory animals, radionuclides  $^{125}\text{I}$  and  $^{64}\text{Cu}$ .

# 1 ÚVOD

## 1.1 Důležitost mědi v organismu

Měď je pro člověka esenciální prvek, který plní mnoho významných funkcí. V přírodě se vyskytuje v elementární formě nebo ve formě měďnatého ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a měďného ( $\text{Cu}^+$ ) kationtu jako součást sloučenin. V biologických systémech je měď přítomná většinou ve formě  $\text{Cu}^{2+}$  kationtu a funguje jako kofaktor mnoha enzymů, ze kterých nejdůležitější jsou následující:

- a) ferroxidázy (včetně ceruloplazminu), které hrají roli v metabolismu železa;
- b) lyzyl oxidáza podílející se na zesíťování kolagenu a elastinu v pojivových tkáních;
- c) dopamin  $\beta$ -hydroxyláza katalyzující přeměnu dopaminu na noradrenalin;
- d) Cu/Zn superoxid-dismutáza fungující jako scavenger volných radikálů;
- e) monoaminoxidáza potřebná pro syntézu serotoninu;
- f) tyrozináza podílející se na tvorbě melaninu (Shike M., 2009);

Je tedy vidět, že měď je zásadní pro správný průběh erytropoézy, hojivých procesů, vylučování volných radikálů, syntézy neurotransmiterů či pigmentace.

Doporučená denní dávka mědi je různá v závislosti na stavu organismu. Obecně lze říct, že se pohybuje od 0,5 mg/den u dětí po 1,3 mg/den u kojících žen. Denní doporučená dávka u zdravého dospělého člověka tak vychází na přibližně 0,9 mg/den (Weber T. et Solioz M., 2014). Měď se v příslušných potravinách nachází v takovém množství, které je dostatečné k zabránění deficiencie a zároveň nezpůsobující toxicitu. Obsah mědi v běžné denní stravě se obvykle pohybuje mezi 1 – 5 mg, což je víc, než organismus potřebuje. (Gaetke L. M. et al., 2014). Co se týče konkrétních potravin, velké množství mědi se nachází v hovězích játrech a ústřicích, dále pak v luštěninách, houbách, čokoládě, ořechách a v semenech. Naopak tuky, oleje, cukr, tuňák a hlávkový salát patří mezi potraviny obsahující minimální množství tohoto stopového prvku (Pennington J. A. T. et al., 1995; Lindow C. W. et al., 1929).

Nedostatek mědi je u člověka poměrně vzácný. Většinou se pozoruje u lidí, u kterých je všeobecně nedostatečný příjem širší stravy nebo se u nich vyskytuje těžká malnutrice z důvodu různých chorob. Manifestace deficiencie mědi zahrnuje anemii,

leukopenii, kostní abnormality (Shike M., 2009), srdeční problémy, ztrátu vlasové pigmentace a neurologické poruchy (Danks D. M., 1988). Toxicita z nadměrného množství mědi se ve srovnání s jejím nedostatkem vykytuje častěji. Můžeme se setkat jednak s akutní toxicitou (typicky otrava z požití), která rychle postupuje do jaterního a ledvinového selhání a s chronickou toxicitou vyskytující se především u Wilsonovy nemoci. Wilsonova nemoc je vrozené onemocnění, u kterého dochází během života k hromadění mědi především v játrech, mozku a ledvinách. S místem poškození pak souvisí i projevy této nemoci, ke kterým patří jaterní cirhóza, rozličné neurologické poruchy a eventuálně i selhávání ledvin (Mason K. E., 1979).

Bilance mědi v těle člověka musí být udržována ve fyziologické normě, jinak dochází k výše zmíněným poruchám, které tvoří skutečně široké spektrum a mohou být život ohrožující. Disertační práce je zaměřena na nový přístup k léčbě Wilsonovy choroby, která představuje komplikované onemocnění postihující několik funkčních systémů organismu. Jelikož je hlavní příčinou nadměrné hromadění mědi v orgánech, ideálním přístupem se zdá být právě zabránění absorpce tohoto prvku z přijímané potravy.

## 1.2 Metabolismus, transport a biochemie mědi

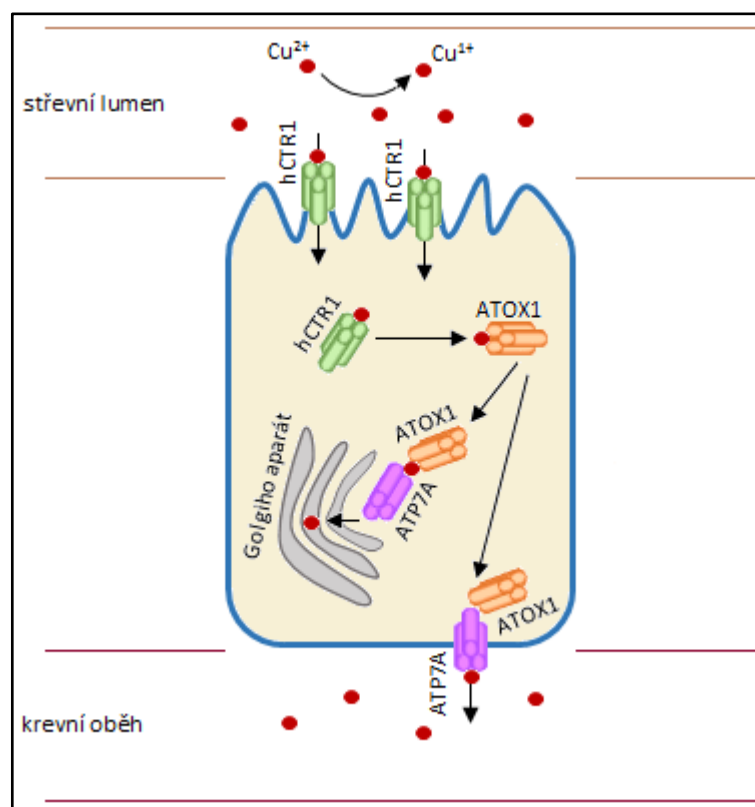
V následujících kapitolách se podíváme podrobněji na komplexnost metabolismu mědi v těle, což nám pomůže lépe se zorientovat v patofyziologii Wilsonovy nemoci. Co se stane s mědí po absorpci z potravy až po vyloučení z těla ven, si vyžaduje mnoho dílčích kroků, na kterých se podílí různé buňky a buněčné složky.

### 1.2.1 Absorpce z potravy

Jak již bylo zmíněno, měď se přirozeně vyskytuje ve třech formách – jako elementární prvek, měďnatý ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a měďný ( $\text{Cu}^+$ ) kationt. V potravě ho nalezneme typicky ve formě kationtů různých sloučenin. Při přechodu zažívacím traktem je měď absorbována zčásti již v žaludku, ale především pak v duodenu. Z celkového přijatého množství se do těla dostane něco mezi 0,6 – 1,6 mg/den (Linder M. C. et Hazegh-Azam M., 1996). Aby mohla být měď absorbována enterocyty střeva z lumenu, je zapotřebí redukovat  $\text{Cu}^{2+}$  kationt na  $\text{Cu}^+$  kationt. Je to proto, že **hlavní membránový transportér** pro měď **hCTR1** (human high-affinity copper transporter 1) na apikální straně membrány enterocytů má vysokou afinitu právě k  $\text{Cu}^+$  kationtu. Redukci provádí enzym metaloreduktáza (Kim B. E. et al., 2008). Některé studie tvrdí, že kromě hCTR1 transportéru je měď přenášena do enterocytů také prostřednictvím transportéru DMT1 (divalent metal transporter 1), což je primární přenašeč  $\text{Fe}^{2+}$  kationtů (Prohaska J. R., 2008). Tím, že jde o přenašeče dvojmocných kationtů, si pravděpodobně nevyžaduje redukci mědi jako v případě hCTR1.

Jakmile dojde k internalizaci hCTR1 přenašeče spolu s mědí buňkou střeva (eventuálně i DMT1), roli dalšího směřování přebírá intracelulární protein **chaperon ATOX1** (antioxidant protein 1). Obecně je chaperon takový protein, který pomáhá jiným bílkovinám nalézt správnou prostorovou konformaci pro dané situace (tzv. *sbalování*). ATOX1 je pak specifický chaperon s velkou afinitou k mědi a jeho hlavní funkcí je předat tento kov pomocí protein-proteinových interakcí dalším bílkovinám v buňce. Nejdůležitější takovou bílkovinou je **ATP7A**, **ATPáza typu P specifická pro měď**, která přesouvá měď dvěma různými směry – buď do Golgiho aparátu, kde se

měď využije na biosyntézu různých měď-dependentních enzymů a jiných proteinů anebo směrem ven z buňky na bazolaterální straně do krevního oběhu (Prohaska J. R., 2008; van den Berghe P. V. E. et Klomp L. W. J., 2009). Názornost transportu mědi přes enterocyt střeva ukazuje **Obrázek 1**.



**Obrázek 1:** Transport mědi přes enterocyt střeva. Nejdříve se v střevním lumenu měď redukuje a pak je pomocí přenašeče hCTR1 na apikální straně přenesena dovnitř do buňky, kde funkcí přebírá chaperon ATOX1. Ten nasměřuje měď spolu s ATPázou ATP7A buď do Golgiho aparátu k dalšímu zpracování, nebo ven z buňky do krevního oběhu.

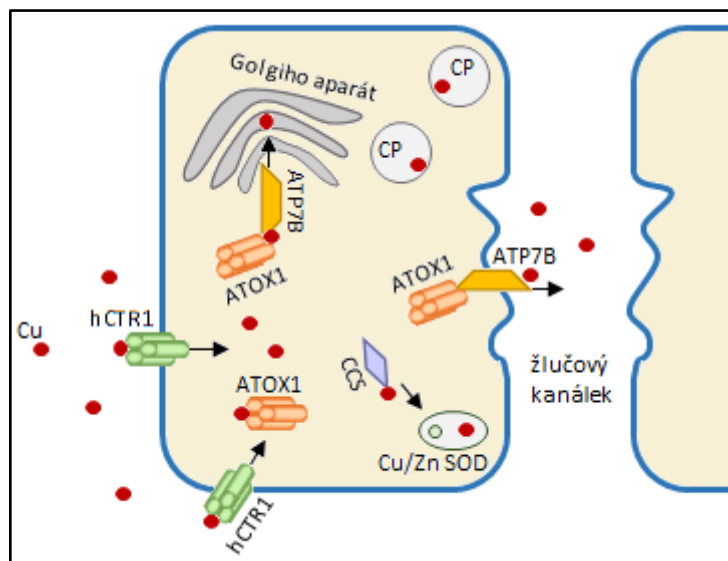
Jakmile se měď ocitne v krvi, dostane se portálním oběhem do jater, která hrají zásadní roli v regulaci množství mědi v organismu. Játra rozhodují o tom, kolik mědi se dostane dále do těla k ostatním orgánům a kolik se enterohepatálním oběhem vyloučí.

### 1.2.2 Játra – orgán regulující množství a biodistribuci mědi

Co se týče hepatocytů, nijak zásadně se v transportu mědi neliší od enterocytů. Pro internalizaci je také potřebný přenašeč hCTR1, který se ale na rozdíl od enterocytů nachází na bazolaterální straně membrány. I protein-proteinové interakce uvnitř buňky zprostředkovává chaperon ATOX1. Je nutné si připomenout, že jaterní buňky plní mnoho syntetických funkcí, při kterých vznikají různé enzymy či krevní bílkoviny. A právě pro mnoho z nich je zapotřebí měď (tzv. kuproproteiny). Uvedeme si dva nejdůležitější příklady – **ceruloplazmin** a **Cu/Zn superoxiddizmutázu**. Ceruloplazmin je glykoprotein obsahující 6 – 7 atomů mědi a plní funkci oxidace  $Fe^{2+}$  kationtu na  $Fe^{3+}$ . Tato oxidace je velmi důležitá, protože pouze trojmocné železo je schopné spojit se s hlavním intracelulárním zásobním proteinem pro železo – s apoferitinem (Harris E. D., 1998). Druhým důležitým proteinem, který obsahuje měď, je Cu/Zn superoxiddizmutáza (Cu/Zn SOD). Cu/Zn SOD je enzym, který chrání buňku před oxidačním stresem (Valko M. et al., 2007). Uvnitř hepatocytů se měď k tomuto enzymu připojuje pomocí **CCS** (copper chaperon for SOD), dalšího **specifického chaperonu** pro měď (Furukawa Y. et al., 2004).

Podobně jako v případě enterocytů, i v hepatocytech plní vylučovací část **specifická ATPáza typu P pro měď** umístěná na bazolaterální straně membrány. Tato ATPáza, nazývaná **ATP7B**, se proteinovou stavbou trochu liší od ATP7A a je exprimována především v jaterních buňkách, dále pak v mozku, v ledvinách a placentě, zatímco v jiných tkáních se nachází právě ATP7A. Prakticky je funkce obou ATPáz stejná – kromě vylučování mědi z buňky také transportují měď do Golgiho aparátu, kde se pak slučuje se syntetizovanými proteiny (Lutsenko S. et al., 2007). ATP7B je v jaterních buňkách umístěná na membráně tak, že se měď vylučuje do žlučových kanálků. Názorný transport mědi jaterní buňkou ukazuje **Obrázek 2**.





**Obrázek 2:** Transport mědi přes jaterní buňku. Část vstřebané mědi se využije na syntézu ceruloplazminu (CP), Cu/Zn superoxididizmutázu (Cu/Zn SOD) a další různé proteiny. Množství, které se v buňce nevyužije, je vyloučeno pomocí ATP7B ATPázy do žlučového kanálku.

Játra zároveň rozhodují o množství mědi, která se tělem spotřebuje. Regulace příjmu a vylučování různých látek buňkou je obvykle vykonávána prostřednictvím množství receptorů na buněčné membráně, které se mění v závislosti na nadbytku či nedostatku dané látky. Co se týče absorpce mědi, zdá se, že množství exprimovaného transportéru hCTR1 pro import do buňky není výrazně závislé na obsahu samotné mědi (Prohaska J. R., 2008). **Nejdůležitějším regulačním proteinem je ATPáza ATP7B**, která výrazně reaguje na množství mědi v jaterních buňkách. Pokud dochází k jejímu nadbytku, funkce ATPázy je zesílená a je pozorován mnohem větší eflux mědi do žlučových kanálků (La Fontaine S. et Mercer J. F., 2007). Ohledně ATPázy ATP7A ve střevě a dalších orgánech existují kontroverze, jestli její exprese je na mědi závislá (Lutsenko S. et al., 2007). Některé studie ukazují, že určitou funkci v regulaci má i intracelulární chaperon ATOX1, protože delece odpovídajícího genu má za následek zhoršený transport mědi k ostatním proteinům uvnitř buňky a je zpomalen i export z buňky (Hamza I. et al., 2001). Další studie dokonce naznačují, že v homeostazi mědi se uplatňují i jiné orgány, například mozek. Existuje docela silný důkaz z experimentů u myši, že nadměrná exprese amyloidového prekurzorového proteinu APP vede ke snížení obsahu mědi v mozku (Prohaska J. R., 2006). Nicméně, zcela přesné

pochopení regulace homeostázy mědi stále zůstává nedořešeným tématem. S jistotou můžeme říct to, že o jejím využitelném množství v těle rozhodují především játra a funkce ATPázy ATP7B.

### 1.2.3 Vylučování mědi

Měď uvolněná z jater je primárně navázána na albumin (60 – 90 % z celkového cirkulujícího množství v krvi). Zčásti může být navázána i na jiných bílkovinách, například na albuminu či histidinu. Tyto proteiny pak měď doručují všem dalším orgánům, kde se spotřebuje (Harris E., 1993). Interakce tohoto prvku s intracelulárními složkami všech typů buněk zabezpečují tři základní chaperony. Dva již byly zmíněny, ATOX1 a CCS. Třetím je pak měďný chaperon, který doručuje tento kov do mitochondrií pro aktivaci cytochrom-c-oxidázy, což je enzym účastnící se buněčného dýchání (Boal A. K. et Rosenzweig A. C., 2009). Měď, která se buňkami nevyužije, je pak vyloučená výše zmíněnými specifickými ATPázami.

Co se stane s nadbytečnou mědí? Existují dva možné způsoby vyloučení z těla. Nejdůležitější cestu představuje **biliární exkrece** z jaterních buněk (kolem 2,5 mg/den). Poměrně velké množství se vyloučí také do pankreatické šťávy (kolem 2 mg/den). Malou část exkretované mědi nalezneme i v žaludeční šťávě a slinách (Lewis K. O., 1973). Podstatný rozdíl ve vyloučené mědi, která pochází z biliární exkrece a ostatních částí trávicího traktu, spočívá v tom, že **ve žluči se měď imobilizuje** navázáním na různé žlučové komponenty (např. žlučové soli). To má velký význam, protože se zabrání zpětné reabsorpci ve střevě, zatímco neimobilizovaná měď z jiných sekretů se zpětně při průchodu střevem resorbuje. Denně se tak pomocí žluče vyloučí z těla defekací maximálně kolem 2,5 mg mědi (Lewis K. O., 1973; van den Berghe P. V. E. et Klomp L. W. J., 2009). Je nutné podotknout, že množství neimobilizované mědi, které se ve střevě zpětně resorbuje z trávicích sekretů, je také značné, a proto u zdravého organismu nedochází k jejímu strádání. Z tohoto důvodu játra představují nejdůležitější orgán regulující množství vylučování mědi.

Druhý způsob vylučování mědi umožňují **ledviny**. V moči nalezneme tzv. volnou měď, která v krvi cirkuluje nenavázaná na ceruloplazmin (resp. na jiné

bílkoviny). Referenční limity pro množství vyloučené mědi v moči se u jednotlivých laboratoří liší, ale mnoho z nich se shoduje na horní hranici kolem 40 µg/den (Ala A. et al., 2007). Je tedy vidět, že u zdravých jedinců se močí vyloučí poměrně malé množství. Naopak, vysoká exkrece se pozoruje u lidí s vysokým obsahem cirkulující mědi a u pacientů s těžší poruchou jater (P. Ferenci, 2004).

### 1.3 Wilsonova choroba

Wilsonova choroba je vrozené onemocnění autosomálně recesivního typu, charakterizované nadměrnou akumulací mědi v organizmu (Scheinberg I. H. et Sternlieb I., 1984). Celosvětová prevalence je 1:30 000 až 1:100 000 v závislosti na regionu, přičemž frekvence nosičů je mnohem vyšší, asi jeden člověk z devadesáti (Behari M. et Pardasani V., 2010; Shah A. B. et al., 1997). Hlavní příčinou nadměrné akumulace mědi jsou různé mutace specifické měď transportující ATPázy ATP7B (Pfeiffer R. F., 2007; Huster D., 2010). Do jaké míry a s jakými symptomy se nemoc projeví, závisí hodně na dané mutaci. Je známých více než 500 různých mutací, které jsou spojené s Wilsonovou chorobou (Kenney S. M. et Cox D. W., 2007). Korelace mezi genotypem a fenotypem není ale vždy jednoznačná kvůli vysokému výskytu heterozygotních jedinců. To pak hodně stěžuje včasnou diagnostiku a léčbu této choroby (Huster D. et al., 2012).

#### 1.3.1 Mutace genu ATP7B

ATP7B gen ležící na 13. chromozomu je tvořen z 21 exonů a kóduje stejnojmenný protein složený z 1465 aminokyselin. Tímto proteinovým produktem je výše zmíněná ATPáza ATP7B o molekulové hmotnosti 156 kDa (Petrukhin K. et al., 1994). Jak již bylo řečeno, tato ATPáza bývá exprimována hlavně v játrech, ale také v mozku či ledvinách a plní dvě základní funkce – vylučování mědi z buňky a intracelulární přenos tohoto kovu směrem ke Golgiho aparátu. Většina mutací způsobujících Wilsonovu chorobu je typu missense (záměna správné aminokyseliny v řetězci za jinou v dané pozici), což má za následek více či méně zhoršenou funkci ATPázy (Ferenci P., 2006). Jelikož existují stovky mutací a mnoho z nich představují ojedinělé případy, je zmíněno pouze několik nejčastějších. Také je nutné podotknout, že mutace jsou silně vázané na příslušnou geografickou a etnickou oblast. Zcela jiné typy mutací se objevují u Evropanů ve srovnání s Asiaty apod. (Ferenci P. et Roberts E. A., 2012).

V Evropě se nejčastěji vyskytuje tzv. **H1069Q mutace** s alelovou frekvencí 35 – 50 % (Caca K. et al., 2001). Mutace je způsobena záměnou aminokyseliny histidin na pozici 1069 za aminokyselinu glutamin a leží v té části ATPázy, kde se na protein váže molekula ATP, což má za následek narušenou fosforylaci a inaktivaci ATPázy (Tanzi et al., 1993). Dochází tak k velmi omezenému transportu mědi směrem ven z buňky a ke snížené tvorbě proteinů obsahujících měď (kuproproteinů). Tato mutace nebyla nikdy zaznamenána v Indii a Asii (Behari M. et Pardasani V., 2007).

V asijské populaci se můžeme nejčastěji setkat s **mutací** označenou **R778L**, která je podobně jako předchozí způsobena záměnou aminokyseliny arginin za leucin v řetězci na pozici 778 (Thomas G. R. et al., 1995) a prakticky stejným způsobem dochází k narušení syntézy kuproproteinů a omezené exkreci mědi (Zhu M. et al., 2015). Alela s touto mutací bývá nalezena až u 57 % pacientů s Wilsonovou chorobu mladších než 18 let především v Číně a Koreji (Wu Z. Y. et al., 2001).

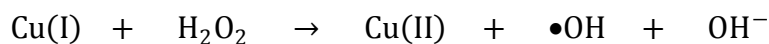
Další zajímavou mutací ATP7B genu je **mutace G943S** (záměna glycinu za serin v pozici 943), která v konečném důsledku narušuje pouze transport mědi, zatímco syntéza kuproproteinů je umožněna. To pak vysvětluje, proč u některých pacientů s příznaky Wilsonovy choroby není např. snížená koncentrace krevního ceruloplazminu (Forbes J. R. et Cox D. W., 1999).

Všechny výše uvedené mutace jsou typu missense (záměna správné aminokyseliny v řetězci za nesprávnou v dané pozici), které zhoršují, až znemožňují funkci ATP7B ATPázy. U Wilsonovy choroby lze nalézt i jiné mutace, například inzerci (zařazení aminokyselin navíc), delecí (ztráta aminokyseliny) či sestřihovou mutaci (narušení sestřihu mRNA). Jsou ale vzácné a vyskytují se v určité etnické oblasti nebo pouze v konkrétních rodinách (Behari M. et Pardasani V., 2007). Jelikož záměna či ztráta aminokyseliny v dané pozici řetězce nemusí výrazně změnit smysl kódování, je i projev funkce ATPázy různý – od nepatrného narušení až po těžkou nemožnost transportu mědi. Z toho důvodu je i patofyziologie nemoci velmi individuální a choroba se vyskytuje v několika formách.

### 1.3.2 Patofyziologie Wilsonovy choroby

Narušení homeostázy kovových iontů v těle může vést k tomu, že se navážou na jiná vazebná místa proteinů než ta, která jsou k tomu určena a dojde tak k ovlivnění proteinové funkce či různých signálních a enzymatických cest (Nelson N., 1999). Přítomnost redoxních kovů je dále úzce spojená s **tvorbou volných radikálů**, a proto je nutné udržet redoxní stav v buňkách v přísném rozmezí fyziologických hodnot (Rahman K., 2007). Jelikož při redoxních reakcích dochází k cyklické výměně elektronů mezi kovy a substráty, je udržování redoxní homeostázy v buňce neoddelitelné od homeostázy a přítomného množství daných kovových iontů (Lindeque J. Z. et al., 2010). Nekontrolovatelná redoxní aktivita pak může vést k nadměrnému **oxidačnímu stresu** buněk. Následkem nadbytku volných radikálů je to, že způsobují modifikaci DNA bázi, peroxidaci buněčných lipidů i poškození proteinů. Takové výrazné narušení buněčných struktur pak nevyhnutelně směřuje k smrti samotných buněk (Gutteridge J. M. C., 1995; Valko M. et al., 2006).

Hlavním patofyziologickým mechanismem Wilsonovy choroby je právě výše zmíněný oxidační stres způsobený nadbytečným obsahem mědi v buňkách. Podíváme se podrobněji na to, jaké volné radikály vznikají při redoxních reakcích, kterých se účastní měď. Prvním způsobem vzniku volných radikálů uvnitř buněk je **Fentonova reakce** (Prousek J., 2007; Liochev S. I. et Fridovich I., 2002). Měďnatý kationt může být redukován na měďný kationt například prostřednictvím superoxidového aniontu, kyseliny askorbové či glutationu (Jomova K. et Valko M., 2011). Měďný kationt je pak schopný dále reagovat s peroxidem vodíku (Fentonova reakce), přičemž vzniká **extrémně reaktivní hydroxylový radikál**:



Vysoká reaktivita hydroxylového radikálu spočívá v tom, že může reagovat prakticky s jakýmkoliv biologickými molekulami ve svém okolí a to velmi rychle (například odtržením vodíku, což hraje roli při lipoperoxidaci). Zlomy DNA jsou v největší míře také způsobené prostřednictvím Fentonové reakce (Moriwaki H. et al., 2008).

Druhým způsobem oxidačního stresu u Wilsonovy choroby je samotný vysoký obsah mědi v buňkách, který významně **snižuje hladinu glutationu** (Speisky H. et al., 2009). Glutation je velmi důležitým buněčným antioxidantem, který odstraňuje volné kyslíkové radikály. Glutation může měď přímo chelatovat a udržet ji v redukovaném stavu, což brání kovu účastnit se redoxního cyklu (Mattie M. D. et Freedman J. H., 2004). Vysoká hladina mědi zároveň vyčerpává funkci glutationu a snižuje jeho dostupný pool, čímž se buňka posouvá směrem k oxidujícímu prostředí. To má pak za následek zvýšenou produkci volných kyslíkových radikálů (Linder M. C. et Hazegh-Azam M., 1996).

Kromě dvou zmíněných mechanismů vzniku oxidačního stresu může vysoký obsah mědi buňky poškodit i dalšími způsoby. Některé in vitro studie například ukázaly, že měď může přímo **oxidovat LDL a HDL lipoproteiny**. To by pak znamenalo, že nadměrné množství mědi se může podílet na aterosklerotických a protrombotických procesech (Harris E. D., 1992; Witting P. K. et al., 1995; Hillstrom R. J. et al., 2003). Dále je měď schopná aktivovat některé signální cesty a enzymové kaskády, které regulují expresi genů a případně i diferenciaci a proliferaci buněk. Při vysoké hladině tohoto kovu tak může dojít ke zvýšení aktivity těchto procesů (Mattie M. D. et al., 2008).

Poškození buněk jako následek toxicity mědi samozřejmě znamená i celkovou dysfunkci jednotlivých orgánů. U Wilsonovy nemoci bývají postiženy orgány, ve kterých je ATP7B ATPáza hodně exprimována, tedy v játrech, mozku a ledvinách. Jak již bylo zmíněno, exprese postiženého genu je variabilní, a proto se u pacientů nemoc v jednotlivých orgánech projevuje různě. Na základě toho lze rozlišit dvě základní formy nemoci, hepatální a neurologicko-psychiatrickou, které jsou podrobně rozebrány v následující kapitole. Kromě toho lze najít známky oxidačního poškození i v jiných tkáních, které v menší míře exprimují ATP7B gen. Poměrně často se lze setkat s narušenou funkcí ledvin, poškozením myokardu a poruchou kalciového metabolismu (Ferenci P. et al., 2012). Dále je známo, že zvýšené markery oxidačního stresu lze pozorovat u některých typů nádorových onemocnění (Roberts R. A. et al., 2010). Taky bylo ukázáno, že vysoké hladiny mědi přímo ovlivňují **vývoj nádorového onemocnění** (Gupte A. et Mumper R. J., 2009). A skutečně je u Wilsonovy choroby pozorován zvýšený výskyt zejména hepatobiliárních malignit (Pfeiffenberger J. et al., 2015).

### 1.3.3 Formy a klinické projevy

Příznaky Wilsonovy choroby se u pacientů objevují nejčastěji **mezi 5 – 35 věkem** (Ferenci P. et al., 2012; Ferenci P. et Roberts E. A., 2012). Nejmladšímu pacientovi, u kterého byla zaznamenána cirhóza jako následek této choroby, byly tři roky (Wilson D. C. et al., 2000). Naopak nejstarší pacient byl diagnostikován v době, kdy mu bylo víc než 70 let (Ala A. et al., 2005; Czlonkowska A. et al., 2008). U Wilsonovy choroby lze pozorovat i klinické **rozdíly mezi jednotlivými pohlavími**. U žen častěji nalezneme hepatální formu nemoci a u mužů neurologicko-psychiatrické symptomy. To naznačuje, že pravděpodobně existuje určitá závislost mezi pohlavím a toxicitou mědi k jednotlivým tkáním. Může to být způsobeno pohlavními hormony, metabolismem železa (který úzce souvisí s metabolismem mědi) anebo tím, že mužský mozek je víc náchylný k akumulaci mědi (Litwin T. et al., 2012).

Tato kapitola je podrobněji zaměřena na klinické symptomy dvou nejčastějších forem - hepatální a neurologicko-psychiatrické. U některých pacientů lze pozorovat příznaky obou forem, u jiných zase dominují například pouze symptomy jaterního selhání nebo neurologického poškození. Jak již bylo zmíněno, mohou se vyskytnout i příznaky postižených ledvin či srdečního selhání, proto je v závěru kapitoly uvedeno i několik atypických manifestací této choroby.

#### *Hepatální forma*

Pokud dominují hepatální symptomy, nástup příznaků se obvykle objevuje velmi brzy a to mezi 10. – 13. rokem (Walshe J. M., 1989). Nejčastěji pacienti přicházejí se **žloutenkou, hepatomegalií a abdominální bolestí** (Saito T., 1987). 6 – 12 % pacientů bohužel postihne **akutní jaterní selhání** a musí nutně podstoupit transplantaci jater. Ačkoliv je ve většině případů akutního selhání přítomna již cirhóza, nemoc se nenápadně objeví a velmi rychle progreduje (Walshe J. M. et Dixon A. K., 1986; Eisenbach C. et al., 2007). Akutní selhání jater jako následek Wilsonovy nemoci se vyskytuje častěji u žen a to v poměru 4:1 (Walshe J. M., 1987). Kombinace těžké



žloutenky a relativně nízká aktivita aminotransferáz u mladých lidí by měla vždy upozornit na možnost této choroby (Eisenbach C. et al., 2007).

Asi nejvíce pacientů má v anamnéze známky **chronického poškození jater** a přítomnost **cirhózy**, které vůbec nemusí být odlišitelné od jiných nemocí způsobujících chronickou hepatitidu. Může se jednat o jakýkoliv symptom – žloutenku, hepatomegalii, portální hypertenzi, ascites, krvácení z varixů, jaterní encefalopatii, nevolnost, abdominální bolesti, pokles albuminu, zvýšení aminotransferáz, splenomegalii a podobně (Ferenci P. et al., 2012; Shah D., 2014). Chronické jaterní poškození může předcházet nástupu neurologických příznaků i o několik let (Kitzberger R. et al., 2005).

Dalším a jediným projevem Wilsonovy choroby může být **hemolytická anémie**, i když to obvykle znamená již těžké poškození jater. Vzniká jako následek uvolnění velkého množství mědi z nekrotizujících a rozpadajících se hepatocytů. Takový obsah mědi zablokuje různé enzymy, čímž se potencuje rozvoj hemolýzy. Zhoršení prognózy pak může vyvolat následné akutní selhání ledvin (Ferenci P. et al., 2012).

Poměrně vzácnou, ale velmi závažnou komplikací Wilsonovy nemoci mohou být malignity, zejména **hepatocelulární karcinom** (Walshe J. M. et al., 2003).

### *Neurologicko-psychiatrická forma*

Neurologické symptomy Wilsonovy nemoci se obvykle objevují ve druhé a třetí dekádě života (Machado A. et al., 2006). Samozřejmě, není výjimkou nástup příznaků již u malých dětí nebo u seniorů. Obecně lze neurologické abnormality rozdělit do čtyř skupin: (1) **akineticko-rigidní syndrom** podobný Parkinsonové nemoci; (2) **pseudoskleróza** s dominujícím tremorem; (3) **ataxie** a (4) **dystonický syndrom** (Dalvi A., 2014). Akineticko-rigidní syndrom bývá prezentován jako forma parkinsonismu. Mezi typické příznaky patří bradykineze (zpomalený průběh pohybů), rigidita, těžkosti s chůzí a různé typy tremoru (Lorincz M. T., 2010). Nejčastější neurologickou variantou je pseudoskleróza s dominující dysartrií, ataxií (dyskoordinace pohybů) a tremorem napodobujícím „třepotání křídel“ (Machado A. et al., 2006). Dysartrie je zároveň nejběžnějším obecním projevem neurologického poškození u pacientů s Wilsonovou

nemocí. Vyskytuje se až u 90 % nemocných (Aggarwal A. et Bhatt M., 2013). Typicky se mezi mluvenými slovy vyskytují mezery a může být omezena i hlasitost. Ataxie je zaznamenána jako proměnlivý znak choroby. Může se vyskytovat s jinými příznaky i samostatně (Oder W. et al., 1993). Poslední varianta, dystonie (přetrvávající svalové stahy), může být přítomná fokálně, segmentálně i generalizovaně. Dystonie určitých svalů bývá pozorována jak unilaterálně, tak bilaterálně (Dalvi A., 2014).

Kromě výše uvedených příznaků asi 10 % případů Wilsonovy choroby má v anamnéze **choreu**, což jsou náhodné a nepředvídatelné mimovolní pohyby a **atetózu**, hyperkinetické abnormální mimovolní pohyby (Oder W. et al., 1991). Tato forma neurologického poškození má časnější nástup již v mladém věku (Walshe J. M. et Yealland M., 1992).

V následující kapitole je pak ukázáno, že existuje korelace jednotlivých variant neurologické formy nemoci s konkrétními nálezy při zobrazení magnetickou rezonancí. Dále je nutno podotknout, že k poškození mozku může dojít i následkem pokročilé jaterní formy s hepatální encefalopatií, což často vede k chybnému diagnostikování (Ferenci P. et al., 2012).

Psychiatrické poruchy nalezneme asi u jedné třetiny nemocných (Dalvi A., 2014). Podle jedné studie dokonce 20 % všech wilsonických pacientů navštívilo psychiatra ještě před stanovením samotné diagnózy (Zimbrea P. C. et Schilsky M. L., 2014). Dalo by se říct, že většina postižených s neurologickou formou bude mít i určitý stupeň psychiatrických příznaků a existuje i jejich tendence k progresi paralelně s progresí neurologických poruch (Lorincz M. T., 2010). U dětí se můžeme setkat se **zhoršením školních výsledků, změnou osobnosti, impulsivitou, labilní náladou** či **nevhodným chováním**. Tyto příznaky bývají pravidelně špatně diagnostikovány jako pubertální behaviorální poruchy (Svetel M. et al., 2009). U poměrně velkého počtu pacientů je dále pozorován výskyt **deprese, zhoršení kognitivních funkcí a podrážděnost** (Denning T. R. et Berrios G. E., 1990). Psychotické rysy jsou méně obvyklé, ale zvláště u starších pacientů lze zaznamenat **paranoii** a **schizofrenii** (Denning T. R., 1991; Ferenci P. et al., 2012). Psychiatrické symptomy nemusí výhradně následovat až po rozvoji neurologické poruchy. Klidně mohou předcházet i rozvoj této nebo hepatální formy. To pak často způsobuje pozdní diagnostiku nemoci, protože nemocní jsou považováni za psychiatrické pacienty. Dokonce existují i případy, kde při

podezření na Wilsonovu chorobu byly naprosto negativní nálezy z biopsie jater, což je jeden z nejdůležitějších diagnostických kritérií (Ferenci P. et al., 2012; Ferenci P. et al., 2005).

### *Další a atypické projevy nemoci*

Velmi častým příznakem spojeným hlavně s neurologickou formou nemoci je **Kayser-Fleischerův prstenec** zapříčiněný deposity mědi v Descemetově membráně rohovky, což je blanka na její zadní straně (Ferenci P. et al., 2012; Walshe J. M., 2014). Nahromadění mědi v této membráně se projeví opticky jako do hněda zbarvený prstenec, který je viditelný zejména na okrajích duhovky (**Obrázek 3**).



**Obrázek 3:** Kayser-Fleischerův prstenec. Typické zbarvení prstence je hnědé, ale odstín se liší v závislosti na samotné barvě duhovky. Walshe J. M., 2014.

Kayser-Fleischerův prstenec lze nalézt až u 95 % pacientů s neurologickou formou nemoci, zatímco u pacientů s hepatální formou se vyskytuje v 50 – 60 % případů. Přítomnost prstence obvykle znamená pokročilejší stádium nemoci, i když někdy to může být jediný viditelný znak (Kitzberger R. et al., 2005; Steindl P. et al., 1997). Další častou oční změnou u neurologických pacientů bývá i **slunečnicová katarakta** v důsledku ukládání mědi zejména v předním pouzdře čočky (Ala A. et al., 2007).

Jelikož je měďná ATPáza ATP7B exprimována taky v ledvinách, může dojít k jejich poškození při uvolnění velkého množství mědi do oběhu (Dasty M. et al.,

2010). Funkce ledvin je velmi rozmanitá, proto i projevy narušené tkáně jsou různé. U wilsonických pacientů lze pozorovat **nefrolitiázu**, **urolitiázu** či **nefrokalcinózu** (Azizi E. et al., 1989; Nakada S. Y. et al., 1994), dále pak **ztráty důležitých látek** jako například aminokyseliny, cukry, fosfáty a vápník (Wang H. H. et al., 2015).

Mezi další, méně časté projevy patří kardiomyopatie, myopatie, chondrokaclinóza a osteoartritida, hypoparathyroidismus, pankreatitida, neplodnost a opakované potraty (Ferenci P. et al., 2012).

**Tabulka 1** znázorňuje celkový přehled nejčastějších projevů a příznaků Wilsonovy choroby.

<b><i>Jaterní forma</i></b>	žloutenka hepatomegalie abdominální bolesti akutní jaterní selhání chronické jaterní selhání cirhóza portální hypertenze	ascites krvácení z varixů jaterní encefalopatie splenomegalie hemolytická anemie hepatocelulární karcinom
<b><i>Neurologické příznaky</i></b>	třes bradykineze rigidita dysartrie	ataxie dystonie chorea atetóza
<b><i>Psychiatrické příznaky</i></b>	změny osobnosti impulsivita labilní nálada nevhodné chování deprese	podráždění porucha kognitivních funkcí paranoia schizofrenie
<b><i>Další projevy</i></b>	Kayser-Fleischerův prstenec slunečnicová katarakta nefrolitiáza urolitiáza nefrokalcinóza ztráty látek ledvinami kardiomyopatie	myopatie chondrokalcinóza osteoartritida pankreatitida hypoparathyroidismus neplodnost, opakované potraty

**Tabulka 1:** Nejčastější projevy a příznaky Wilsonovy choroby.

### 1.3.4 Diagnostika

Správně stanovit diagnózu Wilsonovy choroby je složitější u jaterní formy. Je to způsobeno tím, že klinický obraz a biochemické parametry často napodobují jiné nemoci jater. Jedná se například o autoimunitní hepatitidy, těžkou malnutrici, jaterní selhání jakékoliv příčiny nebo celiakii (Cauza E. et al., 1997). Diagnostiku dále ztěžuje absence Kayser-Fleischerova prstence, který může chybět až u 50 % nemocných s jaterní formou.

Současný nález **Kayser-Fleischerova prstence** a **nízké hladiny sérového ceruloplazminu** je obvykle dostatečný pro stanovení diagnózy (Ferenci P. et al., 2012). Sérový ceruloplazmin je obvykle snížený o 50 % normy (0,2 – 0,6 g/l), i když se uvádí, že až u 45 % pacientů s jaterní formou může být jeho hladina fyziologická (Steindl P. et al., 1997). Rozpad hepatocytů může být dále příčinou velkého uvolnění kovů z jaterních zásob, a proto můžeme pozorovat **zvýšenou hladinu volné sérové mědi** (obvykle nad 200 µg/l). Týká se to zejména pacientů, kteří zatím neměli žádnou léčbu. Je totiž známo, že při léčbě se hladina volné mědi v séru znormalizuje, takže její hladina současně slouží i k monitorování účinnosti terapie (Ferenci P. et al., 2012). Množství volné mědi v cirkulaci odráží také její vylučování močí. U neléčených nemocných je typickým nálezem **vysoká močová exkrece mědi** (nad 100 µg/24 hod). Nevýhodou tohoto testu je, že vyšší množství mědi v moči můžeme nalézt i u jakékoliv jiné jaterní choroby, kde dochází k masivnější nekróze hepatocytů (Ferenci P. et al., 2007).

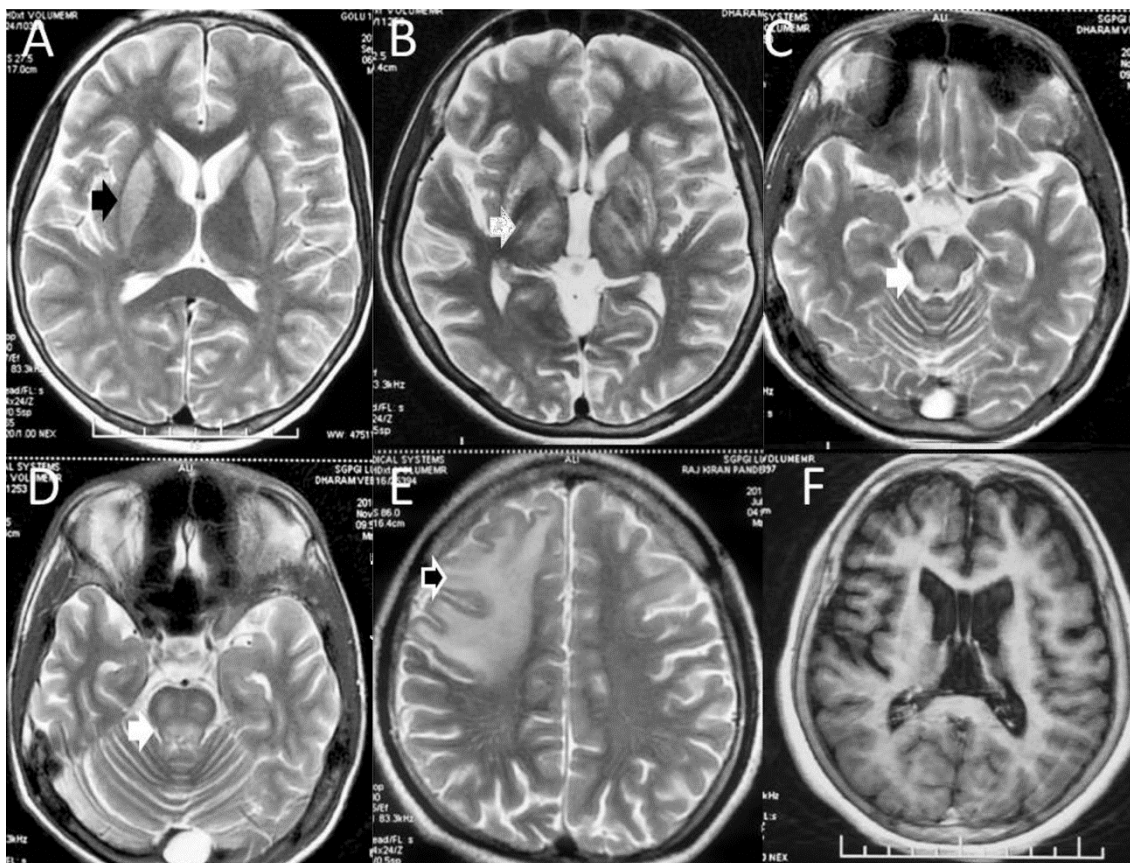
Pokud se správná diagnostika nemoci stále nedaří určit pomoci klinických symptomů a výše uvedených parametrů, přistupuje se k jaterní biopsii kvůli stanovení **zvýšené parenchymální koncentrace mědi**. Do úvahy se bere tzv. suchá váha mědi v bioptickém vzorku. Nález je pozitivní až u 82 % nemocných, což zaručuje dobrou senzitivitu testu. Normální množství mědi v játrech je do 50 µg/g suché hmotnosti, přičemž u Wilsonovy nemoci je víc než pětinasobné, tedy nad 250 µg/g suché hmotnosti (Ferenci P., 2004). Co se týče **jaterní histologie**, výsledek není vždy jednoznačný, jelikož může naznačovat i známky jiné nemoci. Nejčasnější histologické abnormality zahrnují střední steatózu, nahromadění glykogenu v jádrech hepatocytů a fokální nekrózu. S progresí nemoci se objevují známky fibrózy a cirhózy (Ludwig J. et al., 1994; Strohmeyer F. W. et Ishak K. G., 1980).

Kromě invazivního zásahu do jater kvůli odběru bioptického vzorku mohou být do jisté míry nápomocné některé zobrazovací techniky (zejména ultrazvuk, MRI a CT). Zdá se, že velmi důležitým nálezem u Wilsonovy choroby je přítomnost perihepatické tukové vrstvy a poměr velikostí jaterních laloků (Akpınar E. et Akhan O., 2007).

Velmi důležitá je rychlá diagnostika v případě akutního selhání jater, protože mortalita je hodně vysoká. Pro akutní selhání jater jsou typické elevace nebo poklesy jednotlivých jaterních enzymů, resp. žlučových barviv. U Wilsonovy choroby nalezneme velmi specifické poměry dvou parametrů: poměr hladiny alkalické fosfatázy k celkovému bilirubinu je menší než 4 a poměr hladiny aspartátaminotransferázy (AST) k alaninaminotransferáze (ALT) je větší než 2,2. Kombinace těchto dvou poměrů zaručuje správnou diagnostiku nemoci téměř stoprocentně (Ferenci P., 2004).

Mezi další pomocné testy patří **mutační analýza** a **rodinný screening**. Určení mutace je ale poměrně složité kvůli jejich vysoké variabilitě. Kromě toho je většina pacientů složenými heterozygoty (nesou dvě různé mutace). Nápomocná může být konkrétní regionální distribuce daných mutací. Rodinný screening se pak zaměřuje na rodiny, u kterých se choroba vyskytuje, aby se diagnóza vyloučila nebo potvrdila u sourozenců a aby se zachytil výskyt nosičů mutací mezi příbuznými (Ferenci P. et al., 2012).

Diagnostika nemoci je mnohem jednodušší u neurologicko-psychiatrické formy, jelikož až u 95 % pacientů nalezneme přítomnost Kayser-Fleischerova prstence. Pokud je současně snížený sérový ceruloplazmin, diagnóza je prakticky jasná. Kromě klinického obrazu se u wilsonických pacientů vyskytují typické nálezy při **zobrazení magnetickou rezonancí**, eventuálně i při CT vyšetření. Nejčastěji lze nalézt hyperintenzitu na T2-váženém obraze v oblasti bazálních ganglií (van Wassenaeer-van Hall H. N. et al., 1996). Až v 72 % případů je postižen putamen. U více než poloviny nemocných lze dále pozorovat cerebrální atrofii, kaudální a talamické léze či léze mozkového kmene (Ranjan A. et al., 2015). Jelikož jednotlivé oblasti mozku mají konkrétní funkce, lze najít jistou korelaci mezi MRI nálezy a klinickými příznaky. Například kaudální léze jsou významně spojovány s dysartrií a dystonií. Poškození putamenu má vztah navíc i k bradykinezi. Ataxie a tremor odrážejí fokální talamické léze (Sinha S. et al., 2006). **Obrázek 4** znázorňuje některé typické MRI nálezy u Wilsonovy choroby.



**Obrázek 4:** MRI nálezy u pacientů s Wilsonovou chorobou majících neurologické symptomy. (A) T2 hyperintenzita bazálních ganglií. (B) T2 hyperintenzita talamu a corpus striatum. (C) T2 hyperintenzita středního mozku. (D) Pontinní T2 hyperintenzita. (E) T2 hyperintenzita frontoparietální subkortikální bílé hmoty a kortikální T2 hyperintenzita. (F) Kortikální atrofie v T1-váženém obraze. Ranjan A. et al., 2015.

### 1.3.5 Terapie

Léčba Wilsonovy nemoci zahrnuje dva aspekty: odstranění depositů mědi z těla a terapii vzniklých symptomů (Huster D., 2010). Jakmile je diagnóza stanovena, pacienti se musí léčit doživotně, protože nemoc by nakonec vždy progredovala k cirhóze či jaternímu selhání s následnou smrtí. Základem celé léčby je docílit snížení obsahu mědi v orgánech, k čemu slouží především chelátory mědi. K dalším léčivům patří zinek, antioxidanty a velmi důležité je taky dodržovat přísnou dietu. V případě

hepatálního selhání či pokročilé cirhózy je ve většině případů jedinou možností záchranu života transplantace jater.

### *Chelátory mědi*

„Zlatým standardem“ terapie je **D-penicilamin**, což je vlastně derivát cysteinu obsahující sulfhydrylovou skupinu, která komplexuje měď (Walshe J. M. et Yealland M., 1993; Ala A. et al., 2007). V léčbě se používá D-enantiomer, protože L-penicilamin je mnohem víc toxický v interakci s pyridoxinem. Komplexací mědi na D-penicilamin se sníží její pool určený k navázání na proteiny. Kromě toho tento chelátor indukuje metalothionein, na cystein bohatý protein, který funguje jako endogenní chelátor kovů (Dalvi A. et Padmanaban M., 2014). Více než 80 % D-penicilaminu se vyloučí ledvinami, čímž se urychlí močová exkrece mědi (Ala A. et al., 2007). Obvyklá dávka léku je 1 – 1,5 g denně u dospělých a 20 mg/kg denně u dětí (Ferenci P. et al., 2012; Ferenci P., 2004). Podává se perorálně a jeho absorpce ze zažívacího traktu je rychlá (Perrett D., 1981). Zlepšení jaterních funkcí a klinických příznaků lze pozorovat již během prvních 2 – 6 měsíců od začátku léčby. U neurologické formy je zlepšení symptomů mnohem pomalejší a mohou být viditelné až po třech letech (Czlonkowska A. et al., 1996; Brewer G. J. et al., 1987). Hlavním problémem D-penicilaminu je bohužel jeho poměrně vysoká toxicita, o které je zmíněno v další kapitole.

Alternativu k D-penicilaminu představuje **trientin (triethyltetraamin)**, který má odlišnou chemickou strukturu. Je to polyamin, který komplexuje měď pomocí čtyř atomů dusíku. Funguje ale stejně jako D-penicilamin, a to urychlením močové exkrece mědi (Ala A. et al., 2007; Dalvi A. et Padmanaban M., 2014). Počínající perorální terapie začíná obvykle na množství 0,9 – 2,7 g/den rozděleného do 2 – 3 dílčích dávek (Ala A. et al., 2007; Ferenci P. et al., 2012). Na rozdíl od D-penicilaminu je trientin po požití absorbován docela v malém množství z celkové dávky, ale nezdá se, že by byl účinek léku horší. Trientin se doporučuje především těm pacientům, kteří špatně snášejí D-penicilamin (Walshe J. M., 1982). Některé studie ho dokonce volí jako lék první volby kvůli menší toxicitě (Saito H. et al., 1991; Schilsky M. L., 2001).



Posledním terapeutikem této skupiny je **amonium tetrathiomolybdát**, kterého funkce má jiný mechanismus na rozdíl od předchozích dvou léčiv. Po požití je schopný komplexovat měď již v trávicím traktu přímo z potravy, čímž se zabrání absorpci kovu. Dále pak v krevním oběhu vytváří komplex spolu s mědí a albuminem, což snižuje její příjem buňkami (Brewer G. J. et al., 1994; Ferenci P., 2004). Celý komplex se metabolizuje prostřednictvím jater s následnou exkrecí do žluče (Brewer G. J., 2005). Klinické zkušenosti s tímto lékem jsou zatím limitované, i když se zdá, že by mohl být prospěšný jako iniciační léčba u neurologicky symptomatických pacientů (Brewer G. J. et al., 1994; Brewer G. J. et al., 1996).

### *Terapie zinkem*

Mechanismus účinku zinku na snížení obsahu mědi je docela jednoduchý. Oba kovy totiž **soupeří o stejný nosičový receptor na enterocytech** střeva, takže podání většího množství zinku zabrání absorpci mědi pomocí transportéru DMT1. Kromě toho zinek navíc v enterocytech **indukuje metalothionein**, což je, jak již bylo zmíněno, endogenní chelátor kovů. Metalothionein má větší afinitu k mědi než k zinku a jakmile se na něj měď naváže, nemůže pak vstoupit do portálního oběhu (Brewer G. J., 2001; Yuzbasiyan-Gurkan V. et al., 1992). Zinek se podává perorálně ve formě soli (např. sulfát či acetát) v množství 75 – 250 mg denně rozděleného do třech dílčích dávek. Užívat by se měl několik minut před jídlem, aby se stihl navázat na střevní receptory dříve, než se objeví měď z potravy (Ferenci P. et al., 2012). Současně je zinek doporučován jako udržovací terapie. Jakmile se pacienti zlepší léčbou chelátory, přejdou na zinek a sledují se, jestli jsou asymptomatictí. U pacientů s mírnější formou nemoci někdy dokonce stačí samostatná terapie zinkem bez chelátorů (Czlonkowska A et al., 1996; Ferenci P., 2004). Ve srovnání s chelátory je terapeutický účinek zinku slabší a dostatečná efektivita je pozorována spíše u neurologické formy nemoci. U jaterní formy je naopak nutná opatrnost, protože občas je po podání zinku zaznamenán případ zhoršení jaterních funkcí (Weiss K. H. et al., 2011; Walshe J. M. et Munro N. A., 1995). Ze všech zmíněných léků má zinek nejmenší toxicitu vzhledem k tomu, že jde o prvek běžně přijímaný z potravy, a proto se obvykle volí i jako lék pro těhotné ženy

trpící Wilsonovou chorobou (Brewer G. J., 2001). Samozřejmě dávkování zinku je řádově vyšší, než je denní příjem zinku u zdravých jedinců.

### *Doplňující a symptomatologická terapie*

Jelikož hlavní příčinou poškození orgánů u Wilsonovy nemoci je oxidační stres, vhodným doplňkem terapie mohou být **antioxidanty**, a to zejména vitamin E. Je totiž známo, že hladiny tohoto vitamínu jsou u wilsonických pacientů v séru a jaterní tkáni snižené. Na druhé straně neexistuje dostatek studií, které by dokazovali zlepšení symptomatologie po užívání antioxidantů (Ferenci P. et al., 2012; Ala A. et al., 2007). Dále je pro pacienty velmi důležitá vhodná **dieta**. Je nutno se vyvarovat potravinám obsahujících bohaté množství mědi (například čokoláda, houby a oříšky). Samozřejmě je nepožívat alkohol, jelikož játra jsou hlavním zasaženým orgánem. Některé neoficiální studie uvádějí, že jistou výhodou může být také vegetariánská strava (Dalvi A. et Padmanaban M., 2014).

Léčba musí být dále zaměřena i na **koexistující nemoci a symptomy**. Je zapotřebí včas řešit portální hypertenzi, jaterní encefalopatii, ztráty důležitých látek ledvinami, bolesti, selhání ledvin a podobně. Zvláště u neurologické formy je nutno zvážit například užívání benzodiazepinů u dystonického syndromu či levodopy a dopaminových agonistů u parkinsonických symptomů (Ala A. et al., 2007).

### *Transplantace jater*

Transplantace jater je primární volbou léčby u pacientů s akutním jaterním selháním a dekompenzovanou cirhózou (Khanna A. et al., 1999). Podle jedné studie o velikosti skupiny 55 pacientů s ortotopicky transplantovanými játry byl medián přežití 2,5 roků po transplantaci. Nejdelší přežití v této skupině bylo až 20 let. Přežívání bylo také delší u pacientů s chronicky pokročilou nemocí než u pacientů s akutním fulminantním selháním (Schilsky M. L. et al., 1994). Zůstává však otázkou, jestli by transplantace jater mohla pomoci i pacientům s neurologickými příznaky, ale bez jaterní

insuficience (Ferenci P., 2004). Kromě jaterního selhání se operace taky doporučuje pacientům, kteří neodpovídají na žádnou medikamentózní léčbu, aby se zabránili progresi nemoci (Ala A. et al., 2007). Transplantace s sebou bohužel nese velké riziko. Již samotná operace je pro pacienty náročná a není zaručeno, že se štěp úspěšně přihojí.

### 1.3.6 Problémy současné léčby

Bohužel, jako i u mnohých léčiv, i u chelátorů lze nalézt spoustu nežádoucích účinků. Ačkoliv je D-penicilamin stále považován za lék volby, právě tento chelátor s sebou nese nejvíc nežádoucích účinků, přičemž některé z nich mohou být i závažné. Těžké nežádoucí účinky postihují až 30 % pacientů, což je velmi vysoké procento (Walshe J. M., 1973). **Toxicita D-penicilaminu** je dvojaká: přímá toxicita závislá na dávce a imunologicky indukované poškození. Přímá toxicita vyvolává především **deficienci pyridoxinu a narušení formace kolagenu a elastinu** (Ferenci P., 2004). Mezi imunologicky navozené nežádoucí účinky patří **útlum kostní dřeně**, který může být velmi závažný s celkovou aplasií. Dále může dojít k pozdním imunologickým reakcím vyvolávajících nefrotoxicitu, systémový lupus, různé kožní léze, myastenii gravis, optickou neuritidu a serózní retinitidu (Becuwe C. et al., 2005; Ferenci P. et al., 2012; Ferenci P., 2004). Vážným problémem je také náhlé **zhoršení neurologického stavu** u neurologické formy nemoci. Uvádí se až u 20 – 50 % případů, zvláště těch léčených vyššími dávkami. Nejzávažnější na tom je to, že u některých pacientů je toto poškození ireverzibilní (Brewer G. J. et al., 1987). Léčba D-penicilaminem může dále vést k rozvoji hepatální siderózy a sideroblastické anémii z důvodu redukované hladiny ceruloplazminu a volné sérové mědi (Shiono Y. et al., 2001). Vzhledem ke všem těmto důsledkům zůstává otázkou, jestli by měl být D-penicilamin skutečně lékem volby.

**Trientin** sice vykazuje méně vedlejších účinků, ale stejně je u 25 % pacientů zaznamenáno **neurologické zhoršení**. Kromě toho se objevují také reakce podobné lupusu či sideroblastické anémie. Trientin navíc **chelatuje i železo** a celý komplex je pak toxický, proto by se mělo vyvarovat současnému podávání léku se železem. Mezi další nevýhody trientinu patří jeho vysoká cena a menší efektivita ve srovnání s D-penicilaminem (Ferenci P. et al., 2012; Dalvi A. et Padmanaban M., 2014). **Amonium**

**tetrathiomolybdát** je naopak velmi silným chelátorem mědi, což může opět vyvolat **neurologické zhoršení** (Brewer G. J. et al., 2003). Agresivní snížení mědi má i antiangiogenní efekt (Pan Q. et al., 2002). Mezi další potenciální negativní účinky tohoto léků patří útlum kostní dřeně a hepatotoxicita (Karunajeewa H. et al., 1998; Medici V. et al., 2006).

Pravidelné užívání **většího množství zinku** má také určité dopady na pacienty. Běžným problémem je **dráždění žaludku**, což je zřejmě následek lékové formy (jako zinečnatá sůl). Zinek dále působí **imunosupresivně**, omezuje chemotaxi leukocytů a zvyšuje hladinu sérové lipázy a amylázy. Neurologické zhoršení ve srovnání s chelátory je méně časté (Ferenci P. et al., 2012).

Co se týče jaterní transplantace, bylo již zmíněno, že samotná operace je rizikovým zákrokem. Po operaci není zaručeno přijetí štěpu a pacienti musí být na imunosupresivní léčbě. Transplantace také nezaručuje dlouholeté přežívání nemocného. Jinými problémy léčby Wilsonovy nemoci je pak zvládání všech sekundárních symptomů a nemocí. To představuje vykonávání dalších zákroků a podávání různých léků navíc, čímž se pacienti nadměrně zatěžují.

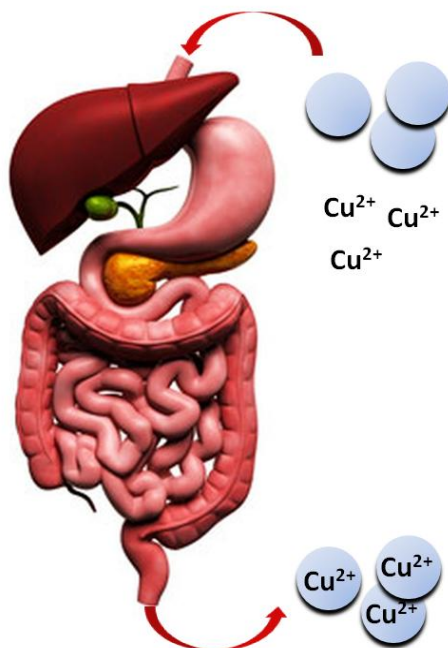
## 2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

### 2.1 Základní cíle experimentů

Tato práce je zaměřena na zcela novou možnost léčby Wilsonovy choroby pomocí perorálně podávaných **polymerních mikročástic**. Chemicky lze připravit různé typy polymerů, které mají přesně požadované vlastnosti (například nerozpustnost ve vodě, specifickou velikost, porositu apod.). Na polymerní bázi je založena například i léčba hypercholesterolemie pomocí známého léku cholestyraminu. Cholestyramin je pryskyřice založená na kationizované styren-divinylbenzenové matrici, která selektivně adsorbuje anionty žlučových kyselin ve střevě, a tím zabrání jejich recyklaci, čímž se zvýší metabolická degradace cholesterolu v játrech k doplnění jejich zásob (Ullah I. et Wiley G. J., 2000; Goto T. et Meno T., 2000; Amer M. S. et Gray J. C., 1990). Kromě medicínského uplatnění je již poměrně dlouhou dobu známé také použití různých polymerních částic pro selektivní sorpci mědi za přítomnosti jiných kovů, které byly vyvinuty zejména pro čištění odpadových vod a hydrometalurgický průmysl (Chouyyok W. et al., 2010; Warshawsky A. et al., 1982; Horak D. et al., 2001).

Cílem této studie je otestovat **polymerní mikročástice na bázi poly(glycidyl methakrylátu-co-ethylen dimethakrylátu), poly(GMA-co-EDMA)**, s vhodnými měďnými chelátory pro léčbu Wilsonovy choroby. Pokud je známo, polymerní nosič jako léčivo této choroby dosud nebyl publikován. Poly(GMA-co-EDMA) je syntetický nerozpustný kopolymer složený ze dvou monomerních jednotek, glycidyl methakrylátu (GMA) a ethylén dimethakrylátu (EDMA). Mnoho podobných polymerů se již dlouhou dobu používá například v kapalinové chromatografii pro separaci molekul (Moore J. C., 1964). Výhodou tohoto polymeru je jeho **velká porozita** s póry o molekulární velikosti. To výrazně zvětšuje efektivní plochu polymeru na stovky čtverečních metrů na gram sorbentu, na kterou lze navázat ve velkém množství další sloučeniny, například i měďné chelátory (Mattiasson B. et al., 2009). Současně přítomné makropóry tak urychlují kinetiku sorpce. Díky specifické velikosti a nerozpustnosti polymerních částic je pak celý systém **nevstřebatelný ze zažívacího traktu** po perorálním užití, a proto by měl být biokompatibilní a plně vylučitelný stolicí. Nevstřebatelnost je v tomto případě velmi

žádoucí, protože většina systémových nežádoucích účinků léků je způsobena tím, že je lék nízkomolekulární a vstřebává se do těla a krevního oběhu. **Obrázek 5** znázorňuje jednoduchý princip navrhované léčby, kde by se polymerní mikročástice s navázanou mědí kompletně vyloučily ve stolici.



**Obrázek 5:** Předpokládané vyloučení polymerních mikročástic spolu s navázanou mědí ze zažívacího traktu po perorálním podání.

Abychom dokázali pozitivou měď z trávicího traktu wilsonických pacientů adsorbovat na mikročástice poly(GMA-co-EDMA), ty musí obsahovat navázaný specifický chelátor. Pro studie byly vybrány **tři vysoce specifické ligandy**: *N,N*-di(2-pyridylmetyl)amin (dipikolyamin, DPA), triethyltetraamin (TTA) a 8-hydroxychinolin (8-HQ). Ligand DPA byl poprvé testován pro interakci s mědí již v roce 1964 a je o něm známo, že tvoří velmi stabilní komplexy s bivalentními kationty, zvláště s kationtem měďnatým (O'Neil E. J. et Smith B. D., 2006). Zatím ho ale nikdo nezkoušel použít na Wilsonovou nemoc. Druhým vybraným chelátorem je 8-HQ, který má rovněž vysokou selektivitu pro měď. Ve srovnání s D-penicilaminem je dokonce efektivnější při nižším pH, což je pro komplexaci v prostředí žaludku důležité (Riha M. et al., 2013). TTA se sice pro léčbu Wilsonovy choroby používá, ale nikoliv na

polymerním nosiči. Byl vybrán i proto, že ve srovnání s D-penicilaminem je méně toxický a oxidačně stabilnější při skladování.

Hlavním testovaným polymerním nosičem této práce je poly(GMA-*co*-EDMA), ale některé experimenty byly navíc zopakovány i s přirozenými biopolymery, **chitosanem** a **celulózou**. Jedná se o naprosto přírodní látky, které jsou pro člověka **přirozeně nestravitelné** kvůli absenci specifických trávicích enzymů a střevních bakterií (McConnell E. L. et al., 2008; Robert C. et Bernalier-Donadille A., 2003). Díky nestravitelnosti těchto biopolymerních nosičů nedochází k jejich rozkladu při průchodu zažívacím traktem, takže by měla zůstat zachována i stabilita vazby navázaného chelátoru.

## 2.2 Hypotézy

Předpokladem celého testovaného systému je jeho možné využití v léčbě Wilsonovy choroby. Polymerní nosič by měl zabezpečit nevstřebatelnost léku, jeho průchod zažívacím traktem bez narušení stability po perorálním podání a následné vyloučení pomocí stolice i s navázanou mědí. Jelikož jsou vybrané chelátory vysoce specifické pro měď, otázkou je spíše stabilita celého komplexu v širším rozmezí pH daného prostředí. Například v žaludku je kyselé prostředí, kterého pH kolísá od 1,8 po 4. Naopak v tenkém střevě je pH prakticky neutrální, což je nutné pro správnou funkci pankreatických enzymů. Podaný lék by měl být proto schopný zachovat si stabilitu při průchodu celým zažívacím traktem, jinak by mohlo dojít k uvolnění polymerních fragmentů nebo chelátorů, které by se vstřebaly do těla. Nevstřebatelnost je pro tuto práci zásadní, abychom se vyhnuli i případným systémovým nežádoucím účinkům.

Dalším předpokladem je schopnost testovaného léku snížit obsah mědi v těle, zvláště v těch orgánech, které jsou u wilsonických pacientů postižené. Výhodou je, že měď by se měla adsorbovat již přímo v trávicím traktu z potravy.

Formulace jednotlivých vědeckých předpokladů jsou následující:

**Hypotéza 1: Vazba polymerního nosiče s navázaným ligandem a komplexovanou mědí je stabilní v širším rozsahu pH za simulovaných podmínek a při průchodu zažívacím traktem za *in vivo* podmínek u laboratorních zvířat.**

**Hypotéza 2: Polymerní nosič s navázaným ligandem a komplexovanou mědí je nevstřebatelný z trávicího traktu po perorálním podání za *in vivo* podmínek u laboratorních zvířat.**

**Hypotéza 3: Polymerní nosič s navázaným ligandem dokáže významně redukovat obsah mědi v těle za *in vivo* podmínek u laboratorních zvířat.**

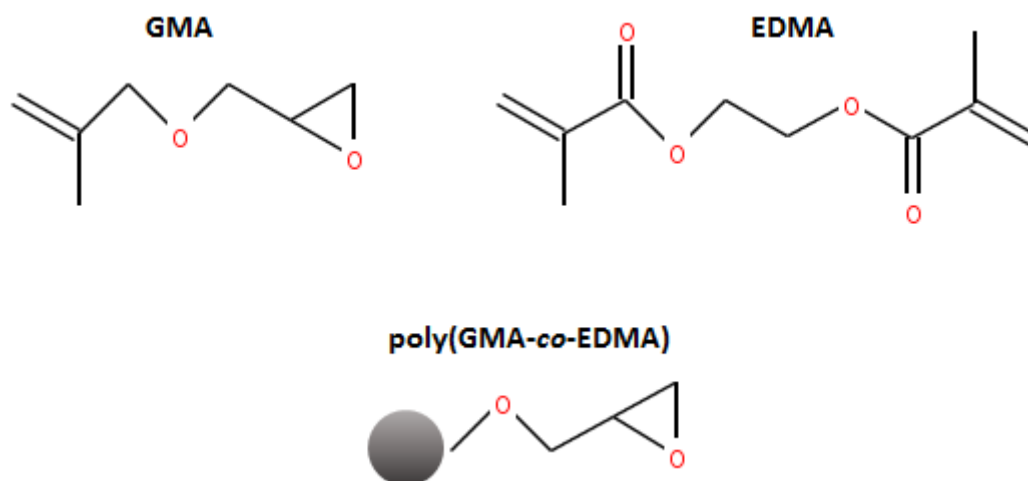


### 3 MATERIÁL A METODIKA

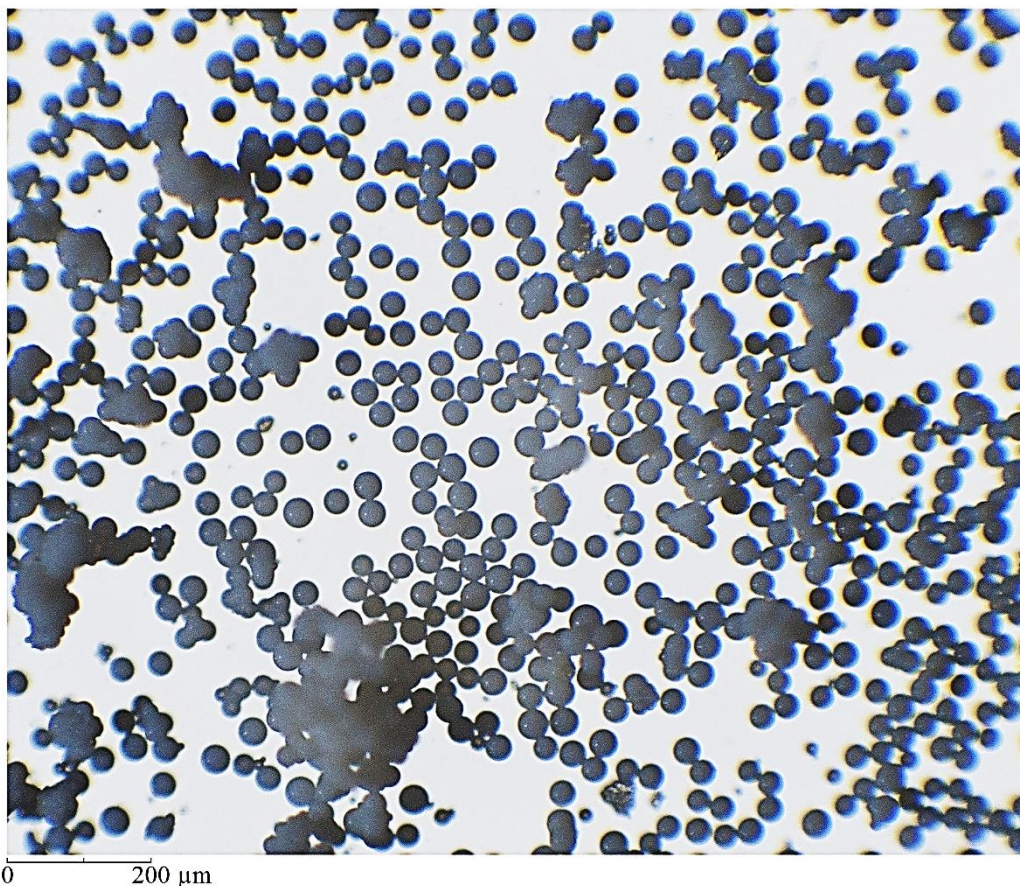
#### 3.1 Polymerní nosiče s navázanými ligandy

Všechny polymery (poly(GMA-*co*-EDMA), chitosan, celulóza) s navázanými chelátory (DPA, TTA, 8-HQ) byly syntetizovány a radioaktivně značeny na Oddělení nadmolekulárních polymerních systémů Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i. (ÚMCH).

Poly(GMA-*co*-EDMA) byl syntetizován tak, že jeho monomerní jednotky byly v procentuálním poměru 60:40 a velikost částic ve tvaru kuliček se pohybovala mezi 20 – 40  $\mu\text{m}$ . Mikročástice jsou tedy poměrně velké, což jim brání v absorpci ze zažívacího traktu, jelikož svou velikostí převyšují samotné buňky. Na **Obrázku 6** a **7** je znázorněna chemická struktura polymeru a jeho snímek, který byl vyfotografován (fotoaparát Nikon D90) na mikroskopu (Breukhoven BMS microscope systems – BMS 037 Pro).

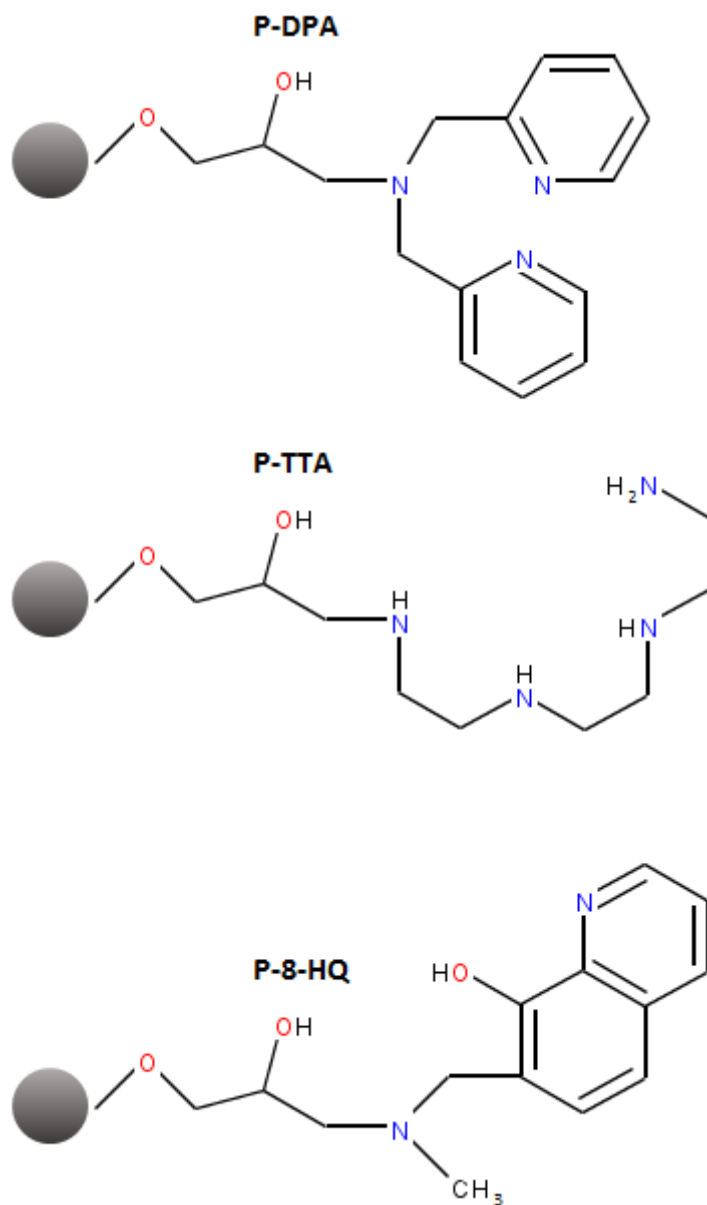


**Obrázek 6:** Chemická struktura jednotlivých monomerů GMA, EDMA a polymeru poly(GMA-*co*-EDMA). Důležitá je zejména epoxidová skupina, která vytváří kovalentní vazbu s ligandy DPA, TTA a 8-HQ (viz dále).



**Obrázek 7:** Mikroskopický snímek polymerních mikročástic poly(GMA-co-EDMA). Jejich sférický tvar je jasně viditelný. Místy tvoří mikročástice i větší shluky.

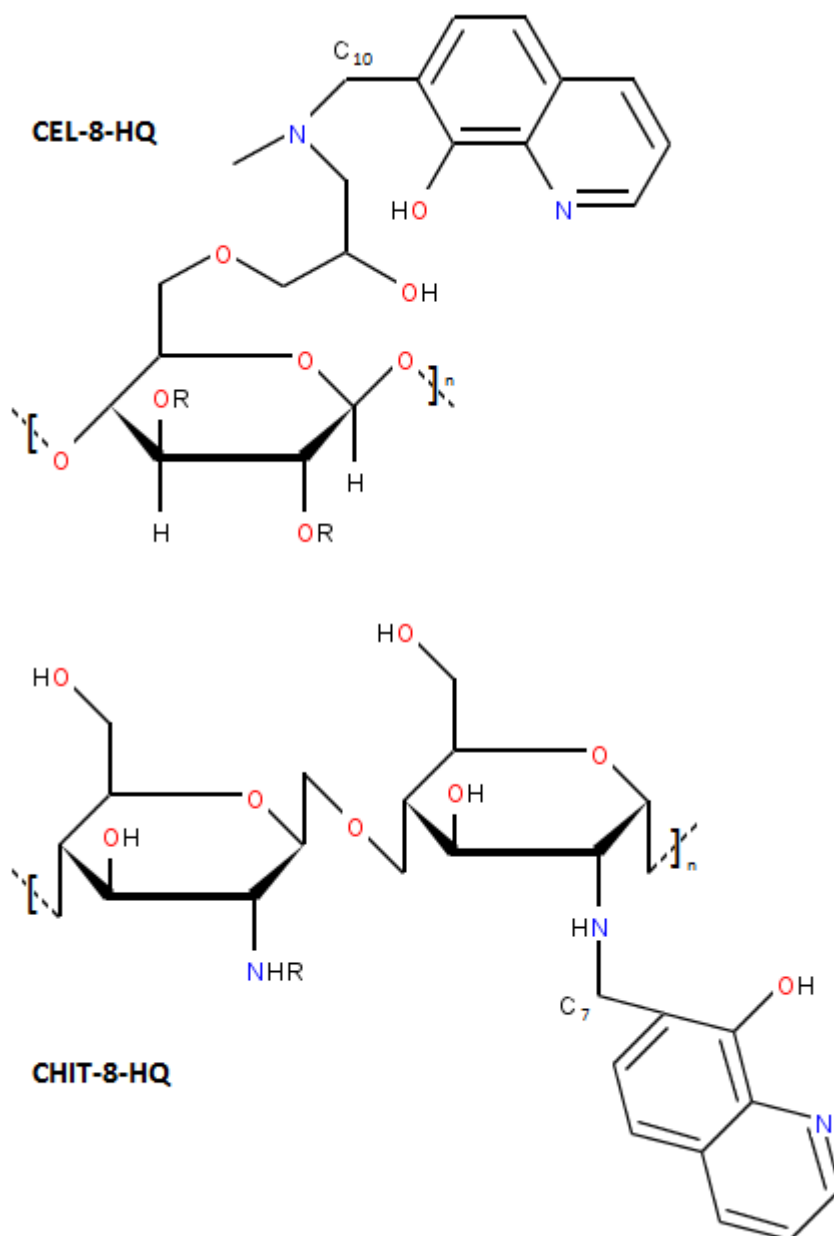
Na pořízeném snímku je vidět, že při procesu suspenzní polymerizace vznikají částice mikroskopického rozměru. Porozita mikročástic poskytuje velkou plochu pro navázání většího množství ligandů, čímž se zvyšuje účinnost komplexace mědi. Jak již bylo zmíněno, tato plocha činí díky porozitě až stovky čtverečních metrů na gram takových mikročástic. To může být výhodou, protože pak by u pacientů postačila nižší dávka polymeru, ale s vysokým obsahem komplexujících látek. Epoxidová skupina vzniklého polymeru je rozhodující pro následnou vazbu ligandů DPA, TTA a 8-HQ. Všechny tři chelátory pro měď vytvářejí s touto skupinou kovalentní vazbu pomocí atomu dusíku, 8-HQ i pomocí kyslíku (**Obrázek 8**). Kovalentní vazba by pak měla zaručit stabilitu celého polymerního komplexu při běžných podmínkách, které panují v zažívacím traktu a nemělo by docházet k uvolňování chelátorů.



**Obrázek 8:** Struktura jednotlivých polymerních komplexů poly(GMA-*co*-EDMA) s navázanými ligandy DPA, TTA a 8-HQ (P-DPA, P-TTA a P-8-HQ).

Druhým testovaným polymerním nosičem byla mikrokrystalická celulóza, která byla modifikována metylaminem za vzniku *N*-metylamino celulózy. Táto modifikace má význam v tom, že zavádí sekundární aminoskupiny na molekuly celulózy, které pak umožňují reakci s 8-hydroxychinolinem podobně jako v případě poly(GMA-*co*-EDMA). Posledním zkoušeným polymerním nosičem byl chitosan modifikovaný glutaraldehydem za vzniku zesítěvaného chitosanu. Cílem této modifikace je poznamenat, že zesítěvaný chitosan nepodléhá v trávicím traktu degradaci pankreatickými enzymy a

střevními bakteriemi (McConnell E. L. et al., 2008). Aminokupiny zesíťovaného chitosanu pak opět slouží k vytvoření kovalentní vazby s 8-hydroxychinolinem. Velikost mikročásteček biopolymerů je v průměru kolem 50  $\mu\text{m}$  u celulózy a 60  $\mu\text{m}$  u chitosanu. Na **Obrázku 9** je znázorněna zjednodušená struktura celulózy a chitosanu s navázaným 8-HQ (CEL-8-HQ a CHIT-8-HQ).



**Obrázek 9:** Struktura biopolymerních mikročásteček celulózy a chitosanu s navázaným 8-hydroxychinolinem (CEL-8-HQ a CHIT-8-HQ).

### **3.2 Cu<sup>2+</sup>-adsorpční a Cu<sup>2+</sup>-desorpční studie s poly(GMA-co-EDMA)**

Jelikož je pH zažívacího traktu různé v jeho jednotlivých úsecích, hlavní úlohou tohoto experimentu bylo ověřit, jestli jsou polymerní mikročástice s navázanými chelátory schopny v simulovaném prostředí žaludku komplexovat dostatečné množství mědi a jestli nedochází k jejímu uvolňování v simulovaném prostředí tenkého střeva.

#### **3.2.1 Cu<sup>2+</sup>-adsorpční studie**

Pro simulování žaludečního prostředí byly připraveny dva vodní roztoky o objemu 100 ml s různou hodnotou pH. Jeden roztok s obsahem 0,01 mol/l kyseliny chlorovodíkové s pH = 2 odpovídajícímu prázdnému žaludku a druhý roztok s obsahem 1 mol/l octanového pufru s pH = 4 odpovídajícímu žaludku s obsahem potravy. Do každého roztoku bylo přidáno 5 mg mědi ve formě síranu měďnatého. Oba roztoky byly následně za pokojové teploty (23 °C) smíchány a protřepány (120 ot/min) s 500 mg jednotlivých polymerních částic (P-DPA, P-TTA nebo P-8-HQ). Z každé vzniklé suspenze byl odebrán vzorek o velikosti 10 ml v časových intervalech 0, 2, 5, 10, 20 a 60 min od smíchání všech komponentů, profiltrován a obsah volných měďnatých iontů byl stanoven pomocí atomové absorpční spektrometrie, AAS (Perkin Elmer 3110 AAS Spectrometer). Adsorpční kapacita jednotlivých polymerních částic byla určena jako funkce zbytku volných měďnatých iontů vzhledem k počátečnímu obsahu mědi v čase  $t = 0$  min. Pro statistickou analýzu bylo použito 5 vzorků pro každý časový interval a každý typ polymerních mikročástic.

#### **3.2.2 Cu<sup>2+</sup>-desorpční studie**

Pro simulaci prostředí tenkého střeva byl použit roztok aminokyselin o objemu 200 ml s obsahem 93 mg L-histidinu, 133 mg L-cysteinu a 6,67 g glycinu. Jedná se hlavně o aminokyseliny, které mají určitou afinitu k mědi a v případě narušení stability

polymerního komplexu by mohly kompetitivně měď z roztoku vyvázat. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 6,8 pomocí 1 mol/l kyseliny chlorovodíkové, respektive 1 mol/l hydroxidu sodného. Do roztoku bylo dále přidáno 500 mg polymerních částic (P-DPA, P-TTA nebo P-8-HQ) s obsahem 5 mg již adsorbované mědi. Vzniklá suspenze byla protřepána (120 ot/min) při pokojové teplotě (23 °C) a následně byly v časových intervalech 10, 30, 90, 135, 300 a 1440 min postupně odebírány vzorky o objemu 10 ml, profiltrovány a obsah volných měďnatých iontů byl stanoven pomocí AAS. Obsah této volné mědi posloužil jako míra stability komplexu v daném simulovaném prostředí tenkého střeva. Pro statistickou analýzu bylo použito 5 vzorků pro každý časový interval a každý typ polymerních mikročástic.

### 3.3 Selektivita adsorpce – Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> kompetitivní studie s poly(GMA-co-EDMA)

Zinek má velmi podobné koordinační vlastnosti jako měď, a proto by mohlo dojít k tomu, že polymerní mikročástice z potravy vyváží kromě mědi také zinek, což by bylo nežádoucí, zejména při kombinované terapii s podáváním zinku, kde by obě léčiva takto mohla vzájemně interferovat. Vzhledem k této možnosti byly v experimentu použity dva roztoky o hodnotě pH = 2 a pH = 4, stejné jako v adsorpční studii. Do každého roztoku byl přidán síran měďnatý o koncentraci 3,15 mmol/l, síran zinečnatý o koncentraci 315 mmol/l a 50 mg jednotlivých polymerních částic (P-DPA, P-TTA nebo P-8-HQ). Molární koncentrace zinku byla tedy stonásobně větší, což zhruba odpovídá nadměrnému dennímu množství zinku, který užívají wilsoničtí pacienti v tabletách. Polymerní suspenze spolu se zinkem a mědí byla protřepávána (120 ot/min) po dobu 2 hod za pokojové teploty (23 °C). Následně byla stanovena koncentrace volné mědi a volného zinku v roztoku a koncentrace komplexované mědi a zinku na polymerních částicích (umytých a vysušených po mineralizaci) pomocí AAS (Perkin Elmer 3110 AAS Spectrometer). Koncentrace volných kationtů v roztoku byla určena v milimolech na litr roztoku a koncentrace komplexovaných kationtů v milimolech na gram polymerních částic. Selektivita adsorpce pro měď za přítomnosti zinku byla vypočtena následovně:

$$\text{selektivita adsorpce} = \left( \frac{C_{\text{komplexované mědi}}}{C_{\text{mědi v roztoku}}} \times \frac{C_{\text{zinku v roztoku}}}{C_{\text{komplexovaného zinku}}} \right)$$

Pro statistickou analýzu bylo použito 5 vzorků pro každý typ polymerních mikročástic.

### 3.4 Biodistribuční *in vivo* studie s poly(GMA-co-EDMA)

Polymerní mikročástice by měli být nevstřebatelné ze zažívacího traktu po perorálním podání. Úkolem studie bylo zjistit, jaká je biodistribuce poly(GMA-co-EDMA) s navázaným 8-hydroxychinolinem (P-8-HQ) po perorálním podání u laboratorních zvířat. 8-Hydroxychinolin byl vybrán na základě výsledků z předchozích experimentů. Biodistribuce P-8-HQ byla stanovena pomocí radioaktivního značení radionuklidů  $^{125}\text{I}$  a  $^{64}\text{Cu}$ .

Všechny zvířecí experimenty popsány níže a u dalších studií jsou v souladu s odpovídající legislativou, a to se Zákonem 246/1992 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání a s Vyhláškou č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat, které jsou plně kompatibilní se směrnicí Evropské unie.

#### 3.4.1 Biodistribuční studie s radionuklidem $^{125}\text{I}$

Polymerní mikročástice P-8-HQ byly označeny radionuklidem  $^{125}\text{I}$  ( $T_{1/2} = 59,4$  dnů, dodavatel Lacomed Ltd., Řež, Česká republika) chloraminovou metodou (elektrofilní substituce na 8-hydroxychinolinu) na ÚMCH. Výběr radionuklidu byl zvolen na základě dobré dostupnosti, nenáročného radiochemického značení, dlouhého poločasu, menší radiační zátěže a relativně nízké ceny, zvláště při větším potřebném množství.

Jako laboratorní zvířata byly pro tento pokus použity zdravé potkany kmene Wistar (samice, 11 týdnů staré, dodavatel AnLab, Ltd., Praha, Česká republika), které byly náhodně rozděleny do tří experimentálních skupin ( $n = 6$ ). Každému zvířeti bylo aplikováno 450  $\mu\text{l}$  značené polymerní vodné suspenze (aktivita 10 MBq a 5 mg polymeru) pomocí gastrické sondy. Všechna zvířata po perorální aplikaci měla volný přístup k vodě a potravě *ad libitum* do doby, kdy byly jednotlivé skupiny usmrceny předávkováním intramuskulárního anestetika (roztokem ketaminu v dávce 50 mg/ml a xylazinu v dávce 23,3 mg/ml) v časových intervalech 2,5 hod (první skupina), 8 hod (druhá skupina) a 24 hod (třetí skupina) od aplikace polymerní suspenze. Časové intervaly byly určeny podle předpokladu, že jeden den je dostatečný k průchodu



polymerních mikročastic zažívacím traktem. Každému potkanovi byly při pitvě v daných časových intervalech odebrány vnitřní orgány, jmenovitě žaludek, tenké střevo, tlusté střevo, slepé střevo, játra, ledviny, slezina, srdce, plíce a štítná žláza. Ve všech orgánech byla stanovena radioaktivita v becquerelech ihned po excizi pomocí ionizační komory (Bqmetr 4, Empos Ltd., Praha). Míra množství polymerních mikročastic v jednotlivých orgánech byla vypočtena jako procento radioaktivity z počáteční podané dávky. Aktivita byla také změřena v krvi a zbytku těla po vyjmutí všech výše zmíněných orgánů. Jelikož námi sledovaný nejdelší časový interval byl 24 hod od aplikace, nebylo nutné výsledky korigovat vzhledem k dlouhému poločasu  $^{125}\text{I}$  (chyba je menší než 1 %).

### 3.4.2 Biodistribuční studie s radionuklidem $^{64}\text{Cu}$

Kromě kvantitativního stanovení distribuovaných polymerních mikročastic P-8-HQ v jednotlivých orgánech, bylo pro srovnání provedeno i zobrazení pomocí PET/CT vyšetření s izotopem  $^{64}\text{Cu}$  ( $T_{1/2} = 12,7$  hod, dodavatel Helmholtz Centre HZDR, Dresden, Německo). Tento radionuklid byl vybrán hlavně proto, že se jedná přímo o měď a lze tak přímo sledovat ovlivnění jejího metabolismu.

Pro tento experiment byly použity outbrední myši kmene NMRI (samice, 4 týdny staré, dodavatel Charles River, Wilmington, MA, USA). Proč byly pro tento pokus zvoleny laboratorní myši a ne potkani, je zdůvodněno tím, že vzhledem k omezenému prostoru v zvířecím PET/CT stroji je lepší manipulace s menším zvířetem. Také bylo užitečné zjistit srovnání průchodu polymerních mikročastic zažívacím traktem těchto dvou podobných zvířecích druhů. Pro celý experiment byly použity 4 NMRI myši, které před počátkem pokusu neměly přístup k potravě po dobu 12 hod. Následně bylo dvěma myším aplikováno gastrickou sondou 300  $\mu\text{l}$  roztoku  $^{64}\text{CuCl}_2$  (aktivita 15 MBq) v 0,15 mol/l octanového pufru. Tyto dvě myši posloužily jako kontrolní bez P-8-OH mikročastic. Dalším dvěma myším bylo stejnou cestou podané stejné množství i aktivita radioaktivního roztoku spolu s 5 mg P-8-OH. Následně byla zvířata uvedena dle potřeby do inhalační anestezie pomocí 2 % isofluranu a podstoupila PET/CT vyšetření v časových intervalech 15 min, 2,5, 5, 8, 24,

48 a 72 hod od podání látek. Všechny myši měly přístup k potravě za 4 hod od aplikace a po skončení experimentu byly usmrceny předávkováním inhalační anestezie.

Samotné zobrazování probíhalo na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty UP v Olomouci na malém zvířecím přístroji Albira PET/SPECT/CT (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, USA). Každé PET vyšetření v axiální projekci trvalo 15 min a následovalo axiálním CT skenováním (600 projekcí).

### 3.5 Biodistribuční *in vivo* studie s chitosanem a celulózou

Biodistribuční *in vivo* pokus s biopolymery byl proveden prakticky stejným způsobem jako u poly(GMA-*co*-EDMA), a to kvantitativním stanovením aktivity v jednotlivých orgánech laboratorních zvířat pomocí ionizační komory a PET/CT vyšetřením. Na obě studie byl tentokrát jako radioaktivní značka použit jenom radionuklid  $^{64}\text{Cu}$  ( $T_{1/2} = 12,7$  hod, dodavatel Ústav jaderné fyziky AV ČR, v. v. i., Řež, Česká republika).

#### 3.5.1 Biodistribuční studie s radionuklidem $^{64}\text{Cu}$

Pro první krok experimentu byly jako laboratorní zvířata zvoleny zdravé potkany Wistar (samice, 11 týdnů staré, dodavatel AnLab, Ltd., Praha, Česká republika), které byly náhodně rozděleny do 6 experimentálních skupin ( $n = 6$ ). Dvěma skupinám bylo pomocí gastrické sondy aplikováno 250  $\mu\text{l}$  samotného  $^{64}\text{CuCl}_2$  (aktivita 12,5 MBq) a posloužily jako kontrola. Dalším dvěma skupinám bylo gastrickou sondou aplikováno 500  $\mu\text{l}$  CEL-8-HQ suspenze spolu s  $^{64}\text{CuCl}_2$  (aktivita 12,5 MBq a 10 mg polymeru) a posledním dvěma skupinám 500  $\mu\text{l}$  CHIT-8-HQ suspenze spolu s  $^{64}\text{CuCl}_2$  (aktivita 12,5 MBq a 10 mg polymeru). Všechna zvířata po perorální aplikaci měla volný přístup k vodě a potravě *ad libitum* do doby, kdy byly jednotlivé skupiny usmrceny předávkováním intramuskulárního anestetika (roztokem ketaminu v dávce 50 mg/ml a xylazinu v dávce 23,3 mg/ml) v časových intervalech 8 hod a 24 hod od aplikace. Kratší časový interval než 8 hod tentokrát zvolen nebyl, jelikož na základě výsledků s poly(GMA-*co*-EDMA) bylo zjištěno, že polymer postupuje zažívacím traktem pomalu. Každému potkanovi byly při pitvě v daných časových intervalech odebrány vnitřní orgány, jmenovitě žaludek, tenké střevo, tlusté střevo, slepé střevo, játra, ledviny, slezina, srdce, plíce a krev. Ve všech orgánech byla stanovena radioaktivita v becquerelech ihned po excizi pomocí ionizační komory (Bqmetr 4, Empos Ltd., Praha). Aktivita byla také změřena ve zbytku těla po vyjmutí všech výše zmíněných orgánů. Míra množství biopolymerů v jednotlivých orgánech byla vypočtena

jako procento radioaktivity z počáteční podané dávky. Jelikož je poločas rozpadu mědi krátký, bylo nutné získané aktivity korigovat vzhledem k poločasu a to podle vztahu:

$$A = A_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

kde  $A_0$  je počáteční aktivita,  $A$  aktivita v čase  $t$  a  $\lambda$  rozpadová konstanta.

Druhým krokem biodistribučních studií s celulórou a chitosanem bylo PET/CT vyšetření. I když je použití myši na zvířecím přístroji snadnější kvůli manipulaci a nižší použité radioaktivní dávky, na základě výsledků PET vyšetření s P-8-HQ se jeví jako optimálnější použití stejného zvířecího druhu kvůli určitým rozdílům, které jsou dále v sekci výsledků zmíněny. Pro zobrazovací metodu bylo proto použito celkově 6 zdravých potkanů kmene Wistar (samice, 11 týdnů staré, dodavatel AnLab, Ltd., Praha, Česká republika). Prvním dvěma zvířatům bylo pomocí gastrické sondy aplikováno 250  $\mu$ l roztoku  $^{64}\text{CuCl}_2$  (aktivita 28 MBq) spolu s 250  $\mu$ l fyziologického roztoku. Dalším dvěma zvířatům bylo stejným způsobem aplikováno 500  $\mu$ l směsi CEL-8-HQ suspenze (10 mg) a roztoku  $^{64}\text{CuCl}_2$  (aktivita 20 MBq) a posledním dvěma zvířatům 500  $\mu$ l směsi CHIT-8-HQ suspenze (10 mg) a roztoku  $^{64}\text{CuCl}_2$  (aktivita 20 MBq). Následně bylo u zvířat provedeno PET/CT vyšetření v inhalační anestézii s 2 % isofluranem v časových intervalech 2 hod, 8 hod a 24 hod od aplikace. Během celého pokusu měla zvířata volný přístup k vodě a potravě *ad libitum* a na konci pokusu byla usmrcena předávkováním inhalační anestezie.

Samotné zobrazování probíhalo v Centru pokročilého preklinického zobrazování 1. LF UK v Praze na malém zvířecím přístroji Albira PET/SPECT/CT (Bruker Biospin, Ettlingen, Německo). Každé PET vyšetření v axiální projekci trvalo 1 hod a následovalo axiálním CT skenováním (250 projekcí).

### **3.6 Dlouhodobá *in vivo* studie s poly(GMA-*co*-EDMA) za účelem snížení obsahu mědi**

Dokázat snížit obsah mědi v orgánech laboratorních zvířat bylo nejdůležitějším experimentem celé disertační práce. Pro tuto studii byly vybrány zdravé potkany kmene Wistar (samice, 12 týdnů staré, dodavatel AnLab, Ltd., Praha, Česká republika), které byly po dobu 6 týdnů na speciální dietě. Podstatou této diety bylo krmení zvířat *ad libitum* klasickým krmivem určeným pro laboratorní potkany (pelety PS R/M-H, 15 mm, dodavatel AnLab, Ltd., Praha, Česká republika, producent SSNIFF GmbH, Soest, Německo), do kterého byly během výrobního procesu zakomponovány polymerní mikročástice poly(GMA-*co*-EDMA) s navázanými ligandy DPA, TTA nebo 8-HQ. Pro každý ligand na polymeru byly použity dvě různé dávky v krmivech, a to následující: 333,3 mg/kg a 1000 mg/kg P-DPA, 333,3 mg/kg a 1000 mg/kg P-TTA a 333,3 mg/kg a 1000 mg/kg P-8-HQ. Pro každou dávku byla zvolena jedna skupina náhodně rozdělených zvířat ( $n = 6$ ), dohromady tedy 6 experimentálních skupin. Jako kontrolní skupina ( $n = 6$ ) posloužila zvířata, která byla krmena stejným typem krmiva, ale bez přidaných polymerních mikročástic. Kromě přesně daného množství testovaných látek, bylo upraveno v krmivu i množství mědi na obsah 5 mg/kg, což odpovídá horní hranici denního příjmu mědi z potravy u člověka.

#### **3.6.1 Sledování celkového stavu laboratorních potkanů**

Od začátku podávání krmiva s přidanými polymerními mikročásticemi byla zvířata po dobu 6 týdnů pravidelně kontrolována kvůli možnému zhoršení zdravotního stavu. Ačkoliv je podle předpokladu polymerní komplex nevstřebatelný a biokompatibilní, bylo nutné vzít v úvahu jeho možnou nesnášenlivost, zvláště u dlouhodobé konzumace krmiva. Z toho důvodu se každý druhý den sledoval celkový zdravotní stav potkanů – jejich vzhled, pohybová aktivita, množství a konzistence stolice, chuť k jídlu, možné zvracení a změny v chování. Dvakrát týdně byla všechna zvířata zvážena kvůli možnému úbytku hmotnosti. Dále se denně vážila hmotnost zkonsumovaného krmiva za účelem zjištění, jestli zvířata pravidelně přijímala stejnou

dávku polymerních mikročástic. Abychom dostali přesnější hmotnost požitého krmiva, potkany byly umístěny v chovných akváriích po třech jedincích.

### **3.6.2 Stanovení obsahu volné mědi v krvi laboratorních potkanů**

Nejjednodušší variantou sledování změny obsahu mědi během pokusu, bylo určení její koncentrace v krvi laboratorních zvířat v pravidelných intervalech. Proto se na konci každého týdne trvání pokusu odebral 1 ml krve z retro-orbitálního plexu všech zvířat. Během odebírání byla zvířata v inhalační anestezii s použitím 1,5 % isofluranu. Krev byla odebírána do zkumavek s heparinem (20  $\mu$ l), aby nedošlo k jejímu srážení. Vzorky byly do analýzy udržovány zamražené při teplotě  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Obsah mědi byl určen jako hmotnostní koncentrace v mg/l sérové volné mědi (nenavázané na krevní bílkoviny) pomocí AAS na ÚMCH.

### **3.6.3 Stanovení obsahu volné mědi ve vybraných orgánech laboratorních potkanů**

Na konci experimentu (po 6 týdnech) byla všechna zvířata usmrcena předávkováním intramuskulárního anestetika (roztokem ketaminu v dávce 50 mg/ml a xylazinu v dávce 23,3 mg/ml) a byl jim odebrán mozek, játra a ledviny. Tyto orgány byly pro excizi zvolené proto, že jde o orgány, které bývají nejvíce postiženy u wilsonických pacientů. Dále bylo z dolní duté žíly odebráno 1,5 ml krve do zkumavek s heparinem (30  $\mu$ l). Všechny vzorky byly do analýzy udržovány zamražené při teplotě  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Obsah mědi v orgánech byl určen jako hmotnostní množství na hmotnost orgánu v mg/kg pomocí AAS po mineralizaci vzorků na Státním veterinárním institutu v Praze (Oddělení chemie).

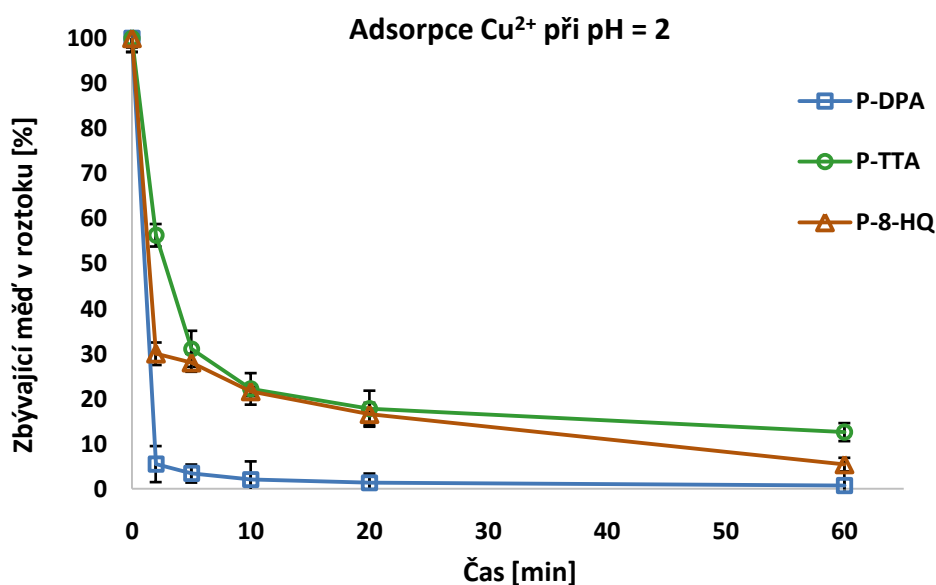
### 3.7 Statistická analýza

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí počítačového programu OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, MA, USA) a Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, WA, USA). Na určení účinku faktorů (polymerních mikročástic s ligandy) byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA), která umožňuje vícenásobné porovnávání středních hodnot. Jako základní parametr bylo počítáno testovací kritérium  $F$ , pomocí kterého se stanovilo, jestli se průměry jednotlivých skupin, resp. vzorků od sebe lišily více než jenom na základě náhodného kolísání. Statistická signifikance byla interpretována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 $\text{Cu}^{2+}$ -adsorpční a $\text{Cu}^{2+}$ -desorpční studie s poly(GMA-co-EDMA)

Cílem adsorpční a desorpční studie za simulovaných podmínek bylo zjistit, jak se chovají jednotlivé sorbenty při různém pH, které se liší v daných oddílech zažívacího traktu. V případě žaludku hodnota pH kolísá v závislosti na tom, jestli je žaludek prázdný (pH = 2) nebo je naplněný potravou (pH = 4). Aby byly polymerní mikročástice účinné, je důležitá přímá adsorpce měďnatých iontů přímo z potravy již v žaludku. Zároveň musí být stabilita celého komplexu vysoká, aby se měď po komplexaci znovu neuvolnila. Proto byla provedena adsorpční studie s vodním roztokem (pH = 2 a pH = 4), který na počátku obsahoval definované množství mědi 5 mg. Po přidání jednotlivých typů polymerů se sledovala jednak rychlost komplexace, dále pak celkové množství adsorbované mědi v určitých časových intervalech a stabilita komplexu. Na **Grafu 1** je znázorněn průběh adsorpce mědi při pH = 2.

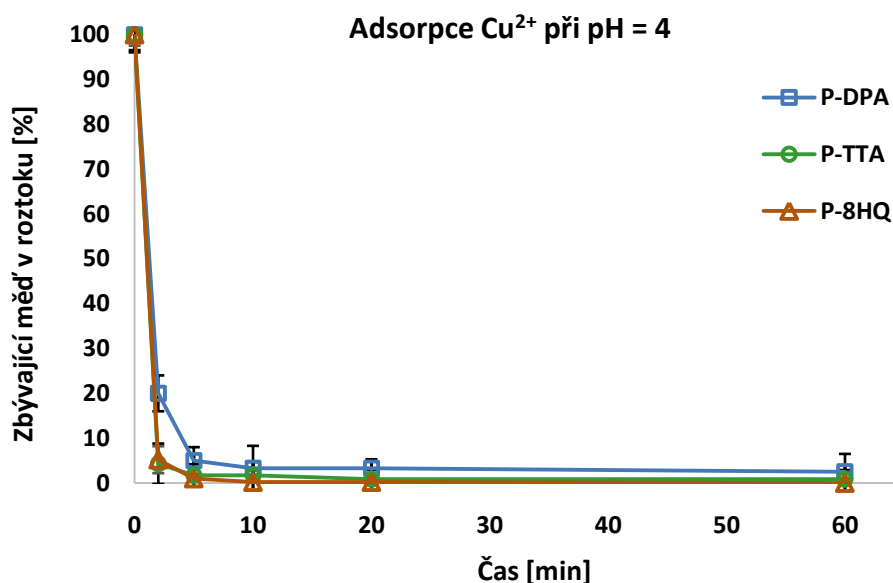


**Graf 1:** Průběh adsorpce  $\text{Cu}^{2+}$  iontů z vodního roztoku v určitých časových intervalech pro polymerní mikročástice P-DPA, P-TTA a P-8-HQ při pH = 2.



Množství zbylé nevykomplexované mědi v roztoku je vyjádřeno jako procento z počátečního množství 5 mg. V grafu je na první pohled viditelné, že při pH = 2 nejrychleji a nejvíce dokázaly adsorbovat měď mikročástice poly(GMA-co-EDMA) s navázaným *N,N*-di(2-pyridylmetyl)aminem (P-DPA). Již po 2 minutách od přidání polymeru do roztoku byla vykomplexována téměř veškerá měď a v průměru zbylo pouze 5,5 % původní volné mědi. Po 60 minutách zbylo v roztoku dokonce 0,7 % zbylé mědi, což je skutečně velmi malé procento a nasvědčuje to velmi dobré adsorpci. Komplexace mědi pomocí polymerních mikročastic s trietylntetraminem (P-TTA) a 8-hydroxychinolinem (P-8-HQ) nebyla sice tak rychlá jako v případě P-DPA, ale po 60 minutách zbylo v roztoku také nízké procento původní volné mědi (v průměru 5,4 % pro P-8-HQ a 12,6 % pro P-TTA), což je pro účinnost komplexace dostačující.

Na **Grafu 2** je pak znázorněn průběh adsorpce měďnatých iontů při pH = 4, což je hodnota odpovídající naplněnému žaludku.

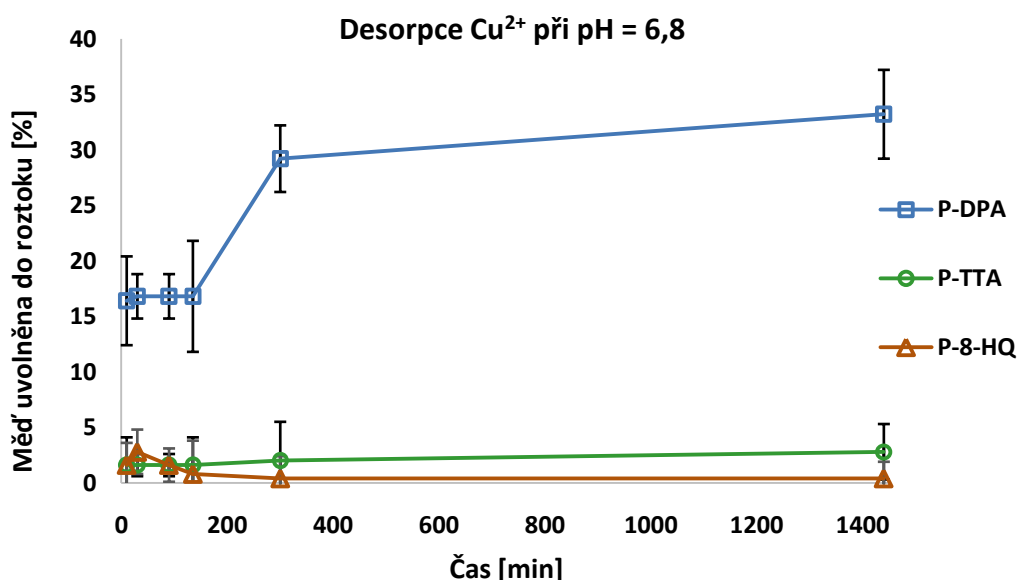


**Graf 2:** Průběh adsorpce Cu<sup>2+</sup> iontů z vodního roztoku v určitých časových intervalech pro polymerní mikročástice P-DPA, P-TTA a P-8-HQ při pH = 4.

V případě pH = 4 byla účinnost všech tří polymerních mikročastic vyšší. To je velmi pozitivní výsledek, jelikož měď se bude v žaludku s největší pravděpodobností vyskytovat spolu s potravou při této hodnotě pH. Nejlepším sorbentem byl v tomto

případě P-8-HQ, kde po 60 minutách nezbyla v roztoku prakticky žádná měřitelná volná měď. Lze tedy říct, že pro komplexaci 5 mg měďnatých iontů je 500 mg P-8-HQ plně postačujících. Přitom jde o množství mědi odpovídající horní hranici jejího denního příjmu z potravy u lidí. P-DPA a P-TTA měly při pH = 4 také velmi vysokou účinnost. Po 60 minutách zbylo v roztoku v průměru pouze 0,9 % pro P-TTA a 2,5 % pro P-DPA.

Mechanicky zpracovaná potrava přechází dále do tenkého střeva, kde se pH vlivem pankreatické tekutiny značně zvyšuje na téměř neutrální hodnotu. Takové prostředí by mohlo narušit stabilitu komplexu a způsobit zpětné uvolnění (desorpci) mědi. Tím by se efektivita výrazně snížila, protože uvolněné mědi by nic nebránilo k jejímu vstřebání do těla. Jako simulace střevního prostředí byl použitý roztok aminokyselin histidinu, glycinu a cysteinu o pH = 6,8. Tyto aminokyseliny byly zvoleny schválně, protože mají určitou afinitu k měďnatým iontům a stabilitu komplexu by mohla kromě pH narušit i přítomnost aminokyselin. U sledování časového průběhu desorpce byly zvoleny delší časové intervaly (nejdelší 1440 min) ve srovnání s adsorpcí, protože průchod potravy střevem je mnohem delší než její průchod žaludkem. Na **Grafu 3** je znázorněn průběh desorpce pro jednotlivé typy polymerních mikročásteček.



**Graf 3:** Průběh desorpce Cu<sup>2+</sup> iontů z roztoku aminokyselin v určitých časových intervalech pro polymerní mikročástečky P-DPA, P-TTA a P-8-HQ při pH = 6,8.

Množství mědi zpětně uvolněné do roztoku je v grafu vyjádřeno jako procento z původního množství 5 mg navázaného na 500 mg sorbentu. Z grafu vyplývá, že již samotné zvýšení pH vyvolalo poměrně velkou desorpci mědi u polymerních mikročástic P-DPA. Po 10 minutách se uvolnilo z P-DPA v průměru 16,4 % navázané mědi, přičemž se procento nadále zvyšovalo a po 1440 minutách narostlo na 33,2 %, což je třetina celkového adsorbovaného množství. Naopak, komplex polymerních mikročástic P-8-HQ byl vysoce stabilní. Za celý sledovaný čas došlo k uvolnění v průměru pouze 0,4 % navázaných měďnatých iontů, což je z praktického hlediska zanedbatelné procento. Vazba mědi na P-TTA byla v simulovaném středním prostředí také vysoce stabilní a po 1440 minutách bylo v průměru uvolněno 2,8 % navázané mědi. Když zároveň srovnáme křivky desorpce, je u P-8-HQ a P-TTA nárůst uvolněné mědi v čase velmi mírný ve srovnání s P-DPA.

U všech měření adsorpčních a desorpčních studií nebyla směrodatná odchylka větší než 5 % dané hodnoty. Pokud se podíváme na tyto úvodní experimenty z výsledného hlediska, zdá se, že nejúčinnějším polymerním chelátorem v simulovaných podmínkách byl P-8-HQ.

## 4.2 Selektivita adsorpce – $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ kompetitivní studie s poly(GMA-co-EDMA)

S ohledem na koordinační vlastnosti jsou měďnaté ionty velice podobné s ionty zinečnatými. Za běžných podmínek je specifická jednotlivých ligandů k mědi vysoká, ale je nutné si uvědomit, že při léčbě Wilsonovy choroby pacienti užívají vysoké dávky zinku. Jen pro připomenutí, běžně ordinována dávka může být i 1200 mg, což je ve srovnání s 8 – 15 mg zinku běžně přítomnými v potravě extrémně vysoké množství. Ačkoliv je specifická ligandů pro měď vysoká, při takové nadměrné přítomnosti zinku by se mohlo stát, že se selektivita obrátí ve prospěch zinku. Proto byla provedena kompetitivní studie pro srovnání selektivity adsorpce těchto dvou velice podobných iontů. Pro experiment byl použitý vodní roztok o  $\text{pH} = 2$  a  $\text{pH} = 4$  (stejný jako v případě adsorpční studie). Kromě měďnatých iontů byly v roztoku přítomné navíc i zinečnaté ionty a to v stonásobně vyšší koncentraci. Po 2 hodinách protřepávání vzorku spolu s jednotlivými polymerními mikročásticemi byly pro oba ionty určeny koncentrace jednak pro volné ionty v roztoku, a jednak pro ty adsorbované. **Tabulka 2** pak uvádí výslednou selektivitu (vypočtenou podle vzorce z kapitoly 3.3) pro jednotlivé polymerní mikročástice.

<i>Polymerní mikročástice</i>	<i>Selektivita k <math>\text{Cu}^{2+}</math> ve srovnání se <math>\text{Zn}^{2+}</math></i>	
	<i>pH 2</i>	<i>pH 4</i>
P-DPA	1321	940
P-TTA	59	424
P-8-HQ	904	798

**Tabulka 2:** Selektivita adsorpce pro měďnaté ionty za přítomnosti zinečnatých iontů.

Všechny typy sorbentů vykazovaly řádově vyšší selektivitu k měďnatým iontům a to i při stonásobně vyšší koncentraci iontů zinečnatých. Vysoký stupeň selektivity lze pozorovat zejména u P-DPA a P-8-HQ. Je také vidět lepší selektivitu při  $\text{pH} = 2$ . U P-TTA je naopak mnohem vyšší selektivita při vyšším  $\text{pH}$ , ale ve srovnání s ostatními

dvěma sorbenty až o polovinu nižší. V tomto experimentu P-TTA tak vyšel jako nejhorší selektivní chelátor mědi. U všech měření byla směrodatná odchylka stejně jako u adsorpce a desorpce menší než 5 % dané hodnoty.

### 4.3 Biodistribuční *in vivo* studie s poly(GMA-co-EDMA)

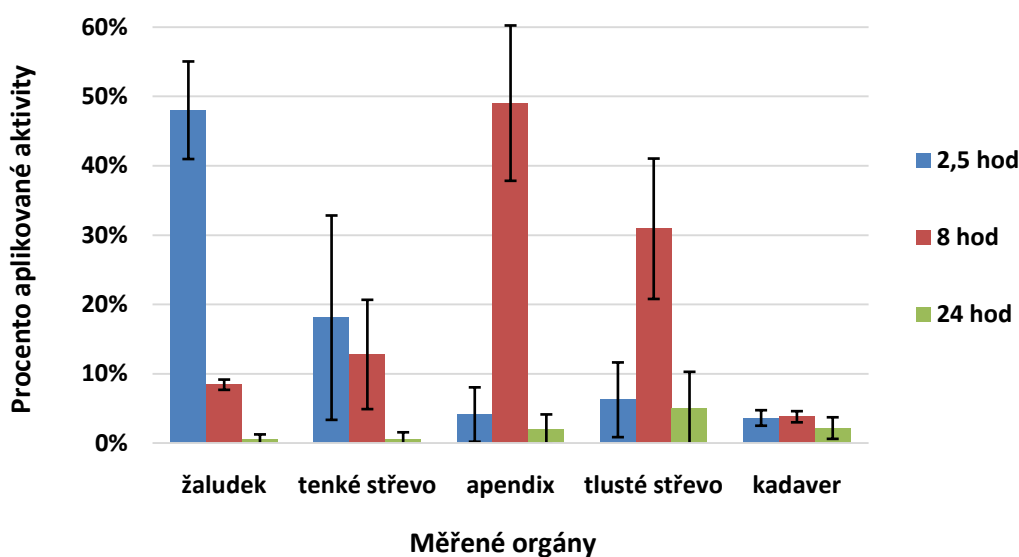
#### 4.3.1 Biodistribuční studie s radionuklidem $^{125}\text{I}$

Chování polymerních mikročástic se může samozřejmě výrazně lišit za podmínek *in vivo*, kde na testovanou látku působí velké množství faktorů a to nelze nasimulovat. Tento experiment navazuje na adsorpční a desorpční studie s cílem ověřit stabilitu a nevstřebatelnost celého polymerního komplexu při jeho průchodu zažívacím traktem po perorálním podání. Na pokus byly použity potkaní samice kmene Wistar, kterým bylo perorálně gastrickou sondou podáno 450  $\mu\text{l}$  vodní suspenze polymerních mikročástic P-8-HQ (množství 5 mg). P-8-HQ byl zvolen podle výsledků předchozích experimentů, ze kterých vyplynulo, že je nejvhodnější pro komplexaci měďnatých kationtů. Polymerní mikročástice byly označeny pomocí radionuklidu  $^{125}\text{I}$ . Tento radionuklid byl zvolen na základě dobré dostupnosti, nenáročného radiochemického značení, dlouhého poločasu, menší radiační zátěže, relativně nízké ceny a toho, že stabilně značí přímo chelatuující jednotku. Laboratorní zvířata byla rozdělena do tří skupin ( $n = 6$ ) a v časových intervalech 2,5 hod, 8 hod a 24 hod od perorálního podání byly jednotlivé skupiny usmrceny, zvířatům se při pitvě odebraly vnitřní orgány a krev, ve kterých se změřila přítomnost radioaktivity pomocí ionizační komory.

Vzhledem k poločasu rozpadu  $^{125}\text{I}$  ( $T_{1/2} = 59,4$  dnů) nebylo nutné výsledky korigovat na rozpad, jelikož námi sledované časové intervaly byly krátké a výsledná experimentální chyba s ohledem na poločas byla pod 1 %. Proto se s takovým radionuklidem zároveň dobře pracovalo, protože jsme nemuseli „pospíchat“ s aplikací, abychom neztráceli radioaktivitu.

Z hlediska nevstřebatelnosti byly nejdůležitějšími orgány játra, ledviny a krev. Pokud by došlo k nějakému vstřebání, ve velké míře by se to projevilo právě v těchto částech těla zvířat. Pokud tedy ke vstřebání nedochází, musela se většina aktivity změřit v trubici trávicího traktu. Na následujícím **Grafu 4** je znázorněna biodistribuce značeného P-8-HQ ve vybraných orgánech v jednotlivých časových intervalech.

### Biodistribuce značeného P-8-HQ



**Graf 4:** Biodistribuce radioaktivně značeného P-8-HQ ve vybraných orgánech v časových intervalech 2,5 hod, 8 hod a 24 hod od perorální aplikace.

Radioaktivita změřena v orgánech je vyjádřena jako procento počáteční aplikované aktivity (10 MBq). Graf 4 v podstatě vyjadřuje pasáž polymerních částic zažívacím traktem. Po 2,5 hodinách od podání polymerních mikročástic byla většina aktivity změřena v žaludku potkanů a to 48,00 % ( $SO = 7,04$  %) počáteční dávky. Mimo to byla větší aktivita nalezena také v tenkém střevě (18,07 %,  $SO = 14,74$  %), apendixu (4,09 %,  $SO = 3,92$  %) a tlustém střevě (6,22 %,  $SO = 5,39$  %). Apendix bylo nutné změřit samostatně, jelikož se u těchto zvířat také podílí na trávení a to významnou mírou. Dohromady bylo tedy nalezeno kolem 76 % aplikované aktivity v žaludku a střevě. Určité procento bylo dále změřeno ve zbytku těla po vyjmutí všech orgánů (3,60 %,  $SO = 1,12$  %). Nález aktivity ve zbytku těla lze vysvětlit pravděpodobnou kontaminací během provádění pitvy. V krvi, plicích, ledvinách, srdci a slezině nebyla naměřena aktivita ani u jednoho potkana, což skutečně nasvědčuje faktu, že se polymerní částice ze zažívacího traktu nemohly do krevního oběhu vstřebat v měřitelném množství. U dvou potkanů byly stopy aktivity nalezeny v játrech (0,44 % a 0,06 %). Jedná se ale o desetiny až setiny procenta z podané aktivity, což je z praktického hlediska zanedbatelné. Pravděpodobně se jednalo o nečistotu vzorku, u

kterého se velmi malé množství volného chelátoru s jódem vstřebalo přes stěnu střeva. Právě játra jsou nejdůležitějším měřeným orgánem, protože pokud by došlo ke vstřebání sorbentu, byl by transportován portálním oběhem právě do jater. Dalším vyšetřovaným orgánem byla štítná žláza, která zároveň posloužila i jako kontrola stability vazby s radionuklidem. Pokud by se jód z polymeru uvolnil (v zažívacím traktu nebo i uvnitř těla), většina obsahu by byla vychytána buňkami štítné žlázy. U všech potkanů této skupiny nebyly ale zjištěny žádné měřitelné stopy aktivity ve štítné žláze, což znovu svědčí o nevstřebatelnosti polymerních mikročástic a stabilitě vazby.

Po 8 hodinách od aplikace byla znovu většina aktivity změřena v zažívacím traktu, ale tentokrát hlavně v distální části trubice a to 12,76 % ( $SO = 7,89$  %) v tenkém střevě, 49,03 % ( $SO = 11,21$  %) v apendixu a 30,90 % ( $SO = 10,13$  %) v tlustém střevě. Je velmi dobře patrné, jak se celý obsah posouvá distálním směrem k vyloučení z těla. V žaludku bylo po 8 hodinách nalezeno pouze 8,40 % ( $SO = 0,74$  %) počáteční aktivity. Ve zbytku těla bylo u této skupiny změřeno přibližně stejné množství aktivity jako u předešlé skupiny. V ostatních vnitřních orgánech, krvi a štítné žláze znovu nebyla zaznamenána žádná měřitelná aktivita, což je opět velmi pozitivní výsledek naznačující nevstřebatelnost polymerních mikročástic. Za zmínku možná stojí játra potkanů. U této skupiny byla aktivita patrná u všech zvířat, ale znovu se jednalo o desetiny procenta (v průměru za celou skupinu 0,19 % původní aktivity,  $SO = 0,03$  %), což je zanedbatelné.

Za 24 hodin od aplikace se předpokládalo, že prakticky veškerý obsah podaný gastrickou sondou by měl již být vyloučený ven z těla. A skutečně bylo v žaludku, apendixu, tenkém a tlustém střevě nalezeno dohromady pouze 8 % z počáteční aktivity. U této skupiny nebyly nalezeny žádné stopy další aktivity v ostatních orgánech včetně jater, ani v krvi. To znamená, že téměř všechny značené polymerní mikročástice již byly z těla v této době vyloučené. Pouze u jednoho potkana této skupiny byla překvapivě zjištěna aktivita v plících (téměř 3 %). Šlo ale o jediný nález aktivity v plících v celém experimentu, což lze snadno vysvětlit tím, že během aplikace gastrickou sondou pravděpodobně došlo k aspiraci části obsahu sondy.

Celkové zjištění z tohoto experimentu je velmi slibné, jelikož naznačuje nevstřebatelnost polymerních mikročástic P-8-HQ po perorálním podání. Ostatní dva sorbenty P-DPA a P-TTA by se pravděpodobně měly chovat stejně nebo podobně,

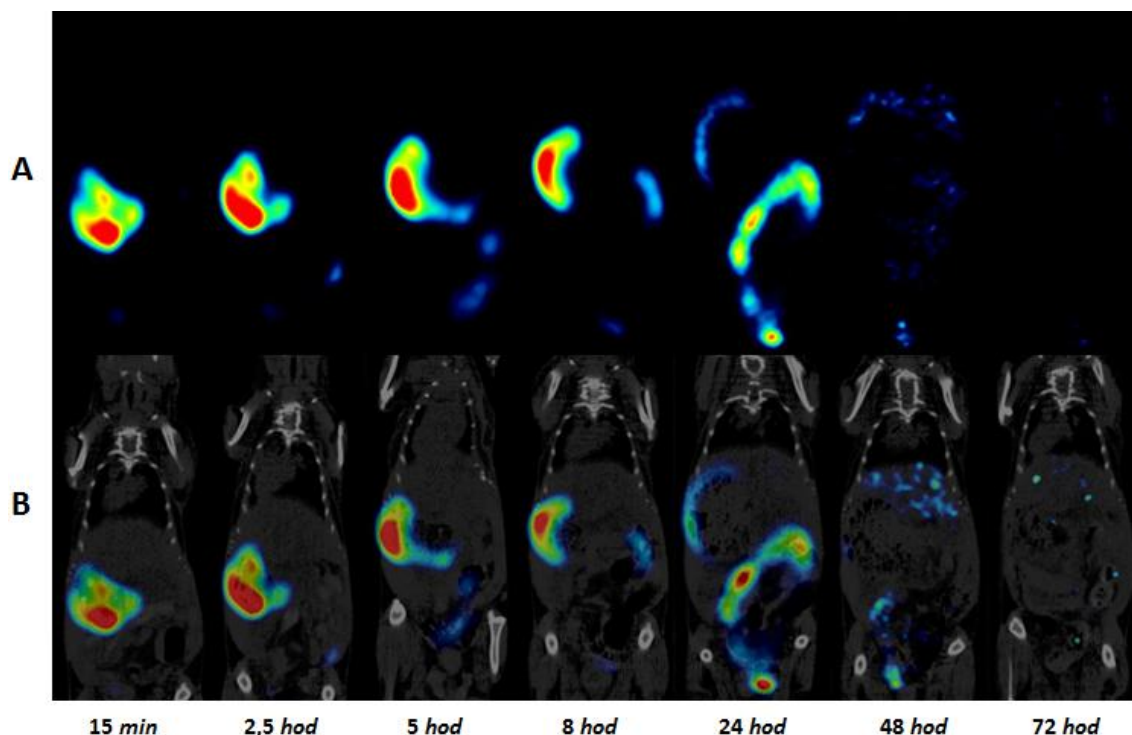


jelikož o nevstřebatelnosti rozhoduje velikost mikročastic a ne samotný typ použitého chelátoru.

#### 4.3.2 Biodistribuční studie s radionuklidem $^{64}\text{Cu}$

PET/CT vyšetření bylo provedeno za účelem získání druhého pohledu na biodistribuci polymerních mikročastic *in vivo*. Výhodou zobrazovací metody je především to, že není nutné ve stanoveném časovém intervalu laboratorní zvířata usmrtit a stačí použít jejich menší množství. Na druhé straně je o něco horší kvantifikace aktivity v orgánech, což do jisté míry závisí na správném vymezení pozorovaného objemu a na použitém softwaru. Jako polymerní mikročastice byly znovu zvoleny P-8-HQ, ale tentokrát současně podané s radionuklidem  $^{64}\text{Cu}$ . Tento radionuklid byl zvolen hlavně proto, že je možné přímo sledovat, jestli sorbent ovlivňuje příjem mědi jako prvku z trávicího traktu. Jelikož 8-hydroxychinolin vykazuje vysokou specifitu pro měď s velmi dobrou adsorpcí, samotná radioaktivní měď není faktorem, který by mohl ovlivnit způsob biodistribuce ve srovnání s radionuklidem  $^{125}\text{I}$  z předchozího experimentu a tudíž by měly být získané výsledky srovnatelné.

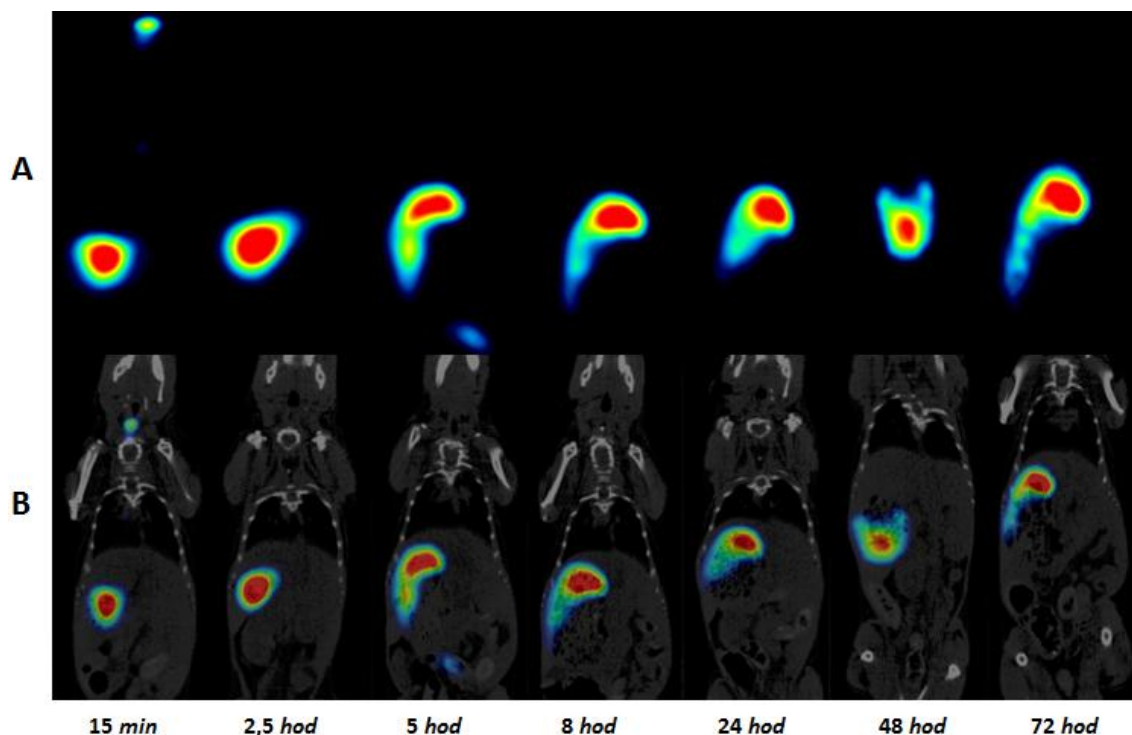
Pro tento pokus byly zvoleny samice myšího kmene NMRI. Vzhledem k omezenému prostoru v zvířecím PET/CT stroji je lepší manipulace s menším zvířetem a také šlo o první zobrazovací experiment a spíše doplňkový k předchozímu pokusu, proto bylo optimálnější zvolit jednodušší a levnější variantu. Před samotným zobrazováním byl dvěma myším aplikován gastrickou sondou pouze roztok radioaktivní mědi  $^{64}\text{CuCl}_2$ . Tato zvířata zároveň posloužila jako kontrolní (na rozdíl od předchozí studie se měď nevychyťává přednostně štítnou žlázou). Ostatním dvěma myším byl stejným způsobem aplikován kromě roztoku  $^{64}\text{CuCl}_2$  také sorbent P-8-HQ (5 mg). Následně byla zvířata podrobena PET/CT vyšetření v časových intervalech 15 min, 2,5, 5, 8, 24, 48 a 72 hod od podání látek. Na **Obrázku 10** jsou znázorněny získané snímky myši, které byl aplikován pouze roztok radioaktivní mědi.



**Obrázek 10:** Biodistribuce  $^{64}\text{CuCl}_2$  u NMRI myši v daných časových intervalech. **A** Snímky z PET vyšetření. **B** Fúzní snímky PET/CT vyšetření zobrazeny pomocí PMOD softwaru.

Na snímcích je vidět, že prvních 8 hodin od aplikace se většina roztoku nacházela v žaludku myši, což se potvrdilo i přibližnou kvantifikací. Po 5 a 8 hodinách se malá část začala posouvat směrem do tenkého střeva a po 24 hodinách si můžeme všimnout největší stopy aktivity v tlustém střevě a ve stolici. Po třech dnech byl prakticky veškerý obsah vyloučen. Jelikož šlo o pouhý roztok mědi, část obsahu se vstřebala do těla a aktivita byla taky patrná v játrech, krvi či v ledvinách a dalších orgánech. Jednalo se ale o nízké procento aktivity, které bylo ze snímků odfiltrováno. Je nutné podotknout, že vzhledem ke krátkému poločasu mědi byly signály v delších časových bodech zesíleny.

**Obrázek 11** pak znázorňuje snímky získané od myši, které byl kromě roztoku radioaktivní mědi aplikován také P-8-HQ.



**Obrázek 11:** Biodistribuce  $^{64}\text{CuCl}_2$  s P-8-HQ u NMRI myši v daných časových intervalech. **A** Snímky z PET vyšetření. **B** Fúzní snímky PET/CT vyšetření zobrazeny pomocí PMOD softwaru.

U myši s aplikovaným P-8-HQ byla aktivita nalezena prakticky pouze v žaludku a to ve všech časových intervalech. Vzhledem k poločasu rozpadu se množství v průběhu času téměř nezměnilo. To znamená, že polymerní mikročástice rychle adsorbovaly měď, a sice se do těla nevstřebaly, ale zůstaly uvězněné v žaludku a jen velmi pomalu se vylučovaly ve stolici. Pravděpodobně došlo k ulpění mikročástic na žaludeční stěnu, což u předchozí studie s potkany nebylo vůbec pozorováno. P-8-HQ patrně vykazuje větší adhezivitu k myši žaludeční stěně než k potkaní. Na druhé straně by mohlo být zadržování polymeru v žaludku i pozitivním nálezem, protože takto vytvořené depo, které se pomalu vylučuje, by mohlo znamenat méně časté užívání léku. V takovém případě by ale musely mikročástice obsahovat dostatek chelátoru, který by byl schopen komplexovat i větší množství mědi, které pacient přijme z potravy v průběhu několika dnů.

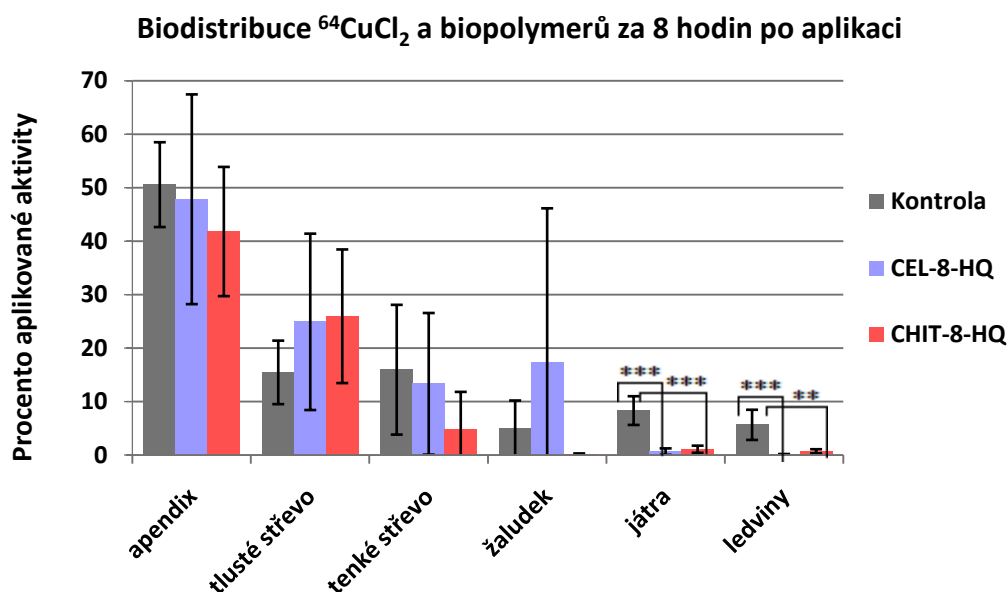
#### 4.4 Biodistribuční *in vivo* studie s chitosanem a celulórou

Měď vstřebaná do těla z tenkého střeva je transportována do jater, kde se většina inkorporuje do ceruloplazminu. Nevyužitá část putuje do žluče a dále do střeva, kde se podle potřeby znovu resorbuje nebo vyloučí. Menší část tohoto kovu se z těla vylučuje také ledvinami. V tomto experimentu se sledovalo, jak se chová radionuklid  $^{64}\text{Cu}$  v těle laboratorních potkanů po perorálním podání. Je nutné podotknout, že potkany na rozdíl od lidí dokážou z části celulózu v trávicím traktu zpracovat díky přítomnosti celulolytických bakterií (Macy J. M. et al., 1982). Rozdílnost v bakteriální střevní flóře může taky způsobit částečné strávení i u chitosanu. Proto lze u těchto biopolymerů očekávat částečné vstřebání *in vivo* u potkanů.

##### 4.4.1 Biodistribuční studie s radionuklidem $^{64}\text{Cu}$

Na pokus byly použity potkaní samice kmene Wistar, které byly rozděleny do 6 skupin ( $n = 6$ ). Kontrolním skupinám byl gastrickou sondou aplikován pouze roztok  $^{64}\text{CuCl}_2$ . Dalším skupinám byl stejnou cestou aplikován kromě roztoku radiomědi také biopolymer CEL-8-HQ (10 mg) nebo CHIT-8-HQ (10 mg). Následně byly jednotlivé skupiny usmrceny po 8 a 24 hodinách od aplikace a podobně jako u pokusu s poly(GMA-*co*-EDMA) byly zvířatům odebrány vnitřní orgány včetně krve, ve kterých se stanovila radioaktivita pomocí ionizační komory. Interval 2,5 hod byl v tomto pokusu vynechán z toho důvodu, že u experimentu s poly(GMA-*co*-EDMA) se v tomto čase od aplikace většina obsahu podané látky vyskytovala v žaludku. Existoval tedy dobrý předpoklad, že se biopolymery budou ve střevě vyskytovat za více než 2,5 hod. Tento experiment zároveň posloužil i k tomu, abychom srovnali efektivitu nevstřebatelnosti s poly(GMA-*co*-EDMA).

Následující **Graf 5** znázorňuje biodistribuci  $^{64}\text{CuCl}_2$  u obou biopolymeru včetně kontroly po 8 hodinách od perorálního podání.

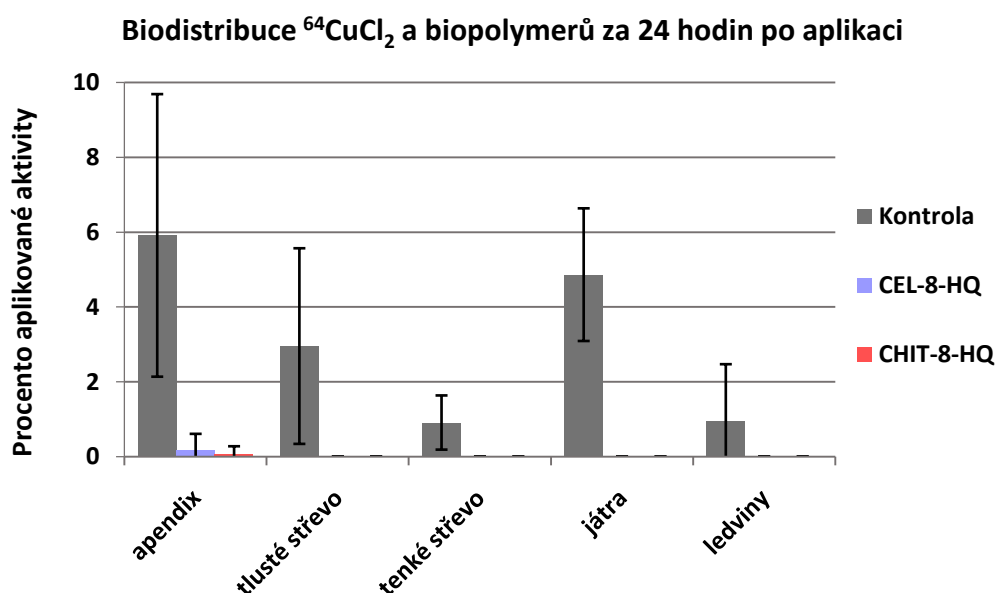


**Graf 5:** Biodistribuce  $^{64}\text{CuCl}_2$  samotného a s biopolymery ve vybraných orgánech v časovém intervalu 8 hod od perorální aplikace. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

Výsledná aktivita v orgánech byla vypočtena jako procento počáteční aplikované dávky a vzhledem ke krátkému poločasu  $^{64}\text{Cu}$  ( $T_{1/2} = 12,7$  hod) také korigována podle vztahu z kapitoly 3.5.1. V grafu je zřetelné, že téměř veškerá měď se po 8 hodinách nacházela v apendixu, konkrétně 50,55 % ( $SO = 7,93$  %) původní aktivity u kontroly, 47,82 % ( $SO = 19,60$  %) u skupiny, která kromě  $^{64}\text{Cu}$  dostala i CEL-8-HQ a 41,79 % ( $SO = 12,08$  %) u skupiny s  $^{64}\text{Cu}$  a CHIT-8-HQ. Další větší množství bylo nalezeno v tlustém i tenkém střevě, méně pak v žaludku. Dohromady se v celé trávicí trubici vyskytovalo u všech skupin více než 70 % počáteční podané aktivity. Nejdůležitějším objevem byla aktivita v játrech a ledvinách, která se velmi výrazně lišila mezi experimentálními skupinami a kontrolou. U kontroly se vyskytovalo 8,32 % ( $SO = 2,68$  %) původní aktivity  $^{64}\text{Cu}$ , u skupiny CEL-8-HQ 0,65 % ( $SO = 0,60$  %) a u CHIT-8-HQ 1,10 % ( $SO = 0,66$  %). Na základě těchto získaných výsledků dostáváme pro statistické parametry následující hodnoty:  $F = 46,68$ ,  $p = 0,000046$  pro CEL-8-HQ a  $F = 40,96$ ,  $p = 0,000078$  pro CHIT-8-HQ ve srovnání s kontrolou. Jinými slovy lze říct, že u experimentálních skupin se v játrech vyskytovalo maximálně jedno procento aktivity  $^{64}\text{Cu}$ , zvláště u skupiny CEL-8-HQ. Dále pak byly velké rozdíly nalezeny také v ledvinách. Zatímco co u kontroly bylo v průměru změřeno 5,66 % ( $SO = 2,82$  %)

aktivity, u CEL-8-HQ to bylo pouze 0,11 % ( $SO = 0,09$  %) a u CHIT-8-HQ 0,71 % ( $SO = 0,38$  %). Tomu odpovídá hodnota  $F = 23,19$  a  $p = 0,00071$  pro CEL-8-HQ a  $F = 18,1$  a  $p = 0,0017$  pro CHIT-8-HQ. Zajímavý nález aktivity byl také v krvi zvířat. Zatímco u kontroly byla změřena aktivita u každého potkana (v průměru za skupinu 1,76 % ( $SO = 0,94$  %)), u skupiny CEL-8-HQ byly stopy  $^{64}\text{Cu}$  nalezeny pouze u dvou potkanů a u skupiny CHIT-8-HQ u jednoho potkana. Aktivity v jiných orgánech (srdce, plíce či slezina) byly nepatrné, šlo o desetiny až setiny procenta celkové aktivity, ale i tak byly nalezeny významné rozdíly mezi kontrolou a biopolymery. O něco lépe dokázal zabránit vstřebání mědi biopolymer CEL-8-HQ.

Na dalším **Grafu 6** je vidět biodistribuci  $^{64}\text{CuCl}_2$  za 24 hodin od aplikace.



**Graf 6:** Biodistribuce  $^{64}\text{CuCl}_2$  samotného a s biopolymery ve vybraných orgánech v časovém intervalu 24 hod od perorální aplikace.

Po 24 hodinách byla aktivita změřena prakticky pouze u kontrolní skupiny. Větší stopy se nacházely stále v zažívacím traktu, menší stopy pak v játrech a ledvinách. Dohromady se v celém těle zvířat kontroly vyskytovalo v průměru kolem 16 % původní aktivity  $^{64}\text{Cu}$  i po jednom dni. Krev, srdce a slezina byly jedinými místy, u kterých aktivita nebyla už měřitelná. U experimentálních skupin se našla zanedbatelná stopa

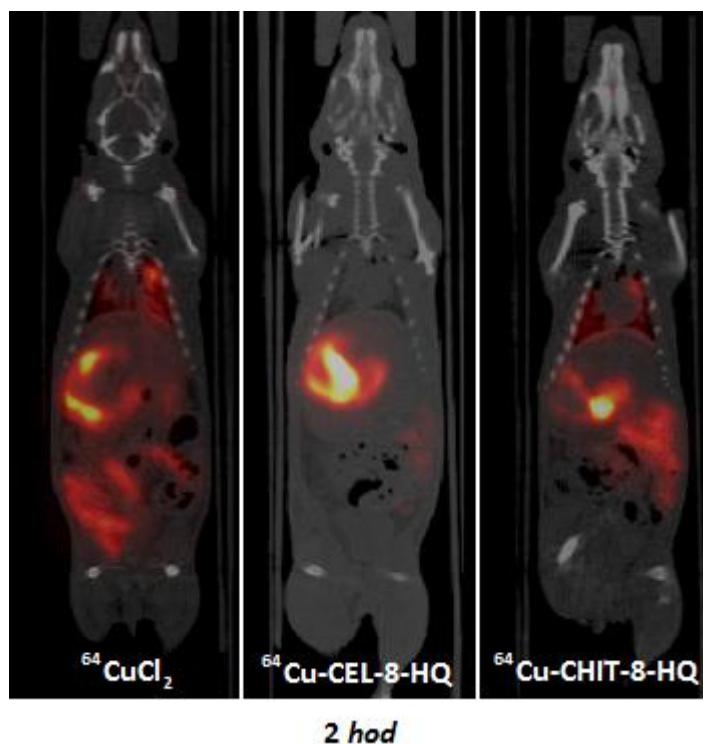
aktivity pouze v apendixu jediného potkana a to jak u skupiny CEL-8-HQ, tak u skupiny CHIT-8-HQ.

Z celkového hlediska rozdílné aktivity v játrech, ledvinách a krvi jednoznačně odpovídají tomu, že biopolymery dokázaly komplexovat měď v zažívacím traktu a pouze nepatrné množství tohoto kovu bylo vstřebáno do těla. Významné rozdíly ve prospěch biopolymerů byly viditelné i u jiných vnitřních orgánů. Lze tedy usoudit, že biopolymery jsou stejně dobře nevstřebatelné jako poly(GMA-*co*-EDMA) a stejně dobře dokážou komplexovat měď v zažívacím traktu.

Druhou částí tohoto experimentu bylo srovnání biodistribuce pomocí vyšetření PET/CT. Výsledky ze zobrazování poly(GMA-*co*-EDMA) ukázaly rozdíly v časové biodistribuci mezi potkanem a myší, konkrétně delší zadržování polymerních mikročástic v žaludku u myši. Ačkoliv tyto rozdíly nebyly důležité pro hodnocení nevstřebatelnosti sorbentu, byly pro tento experiment raději zvoleny laboratorní potkany Wistar, aby byla fyziologie biopolymerů stejná s předchozím experimentem. Problém představovala hlavně velikost zvířat. Jednak s nimi byla horší manipulace v samotném PET/CT přístroji, jednak bylo nutné použít vyšší dávku radiomědi vzhledem k mnohem většímu objemu těla. Také snímací interval trval zhruba jednu hodinu u každého potkana, což nás vzhledem ke krátkému poločasu  $^{64}\text{Cu}$  omezovalo při výběru většího počtu časových bodů biodistribuce. Jelikož předchozí experimenty ukázaly, jak rychle postupují polymery zažívacím traktem, byly zvoleny sledovací časy 2, 8 a 24 hod od aplikace. Delší časový bod se nezdál nezbytně nutný, jelikož většina obsahu biopolymerů byla z těla prakticky již po jednom dni vyloučena.

Na PET/CT vyšetření byly tedy použity samice Wistar potkanů ( $n = 6$ ). Dvěma zvířatům byl gastrickou sondou aplikován pouze roztok  $^{64}\text{CuCl}_2$ . Dalším potkanům byl stejným způsobem kromě roztoku radiomědi aplikován také biopolymer CEL-8-HQ (10 mg) nebo CHIT-8-HQ (10 mg). Následně byla zvířata podrobena PET/CT vyšetření za 2, 8 a 24 hod od aplikace.

Následující **Obrázek 12** znázorňuje biodistribuci roztoku radiomědi samotného a s biopolymery v časovém bodu 2 hod od aplikace.

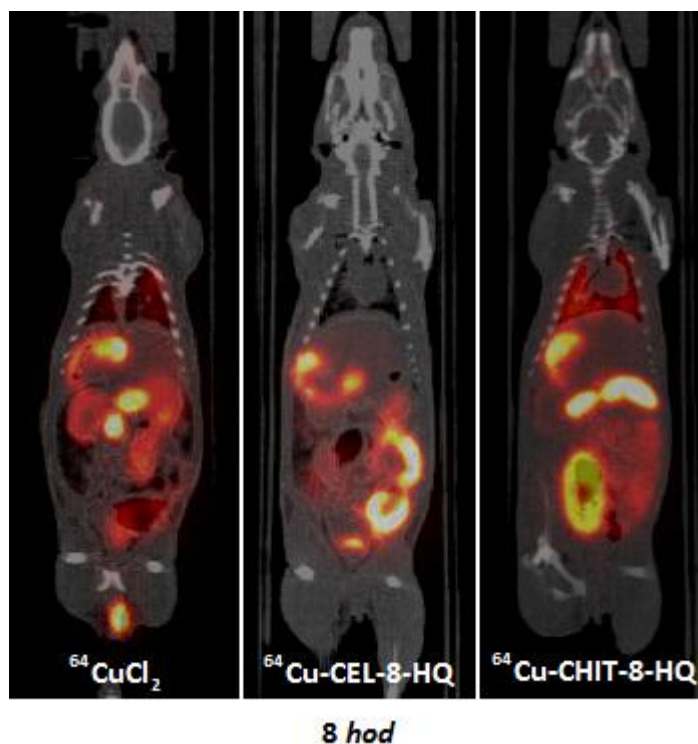


**Obrázek 12:** Biodistribuce  $^{64}\text{CuCl}_2$  samotného a spolu s biopolymery v časovém bodu 2 hodiny od perorální aplikace. Fúzní snímky PET/CT vyšetření zobrazeny pomocí PMOD softwaru.

Za dvě hodiny od aplikace se podle předpokladu většina radiomědi vyskytovala v zažívacím traktu všech zvířat. Nejrychleji trávicí trubici postupoval roztok  $^{64}\text{CuCl}_2$  u kontroly, protože přibližně třetina množství se vyskytovala v tomto čase již ve střevě. Malé procento bylo dokonce vstřebáno a shromážděno i do jater. Naopak, u potkana, který přijal kromě roztoku radiomědi také biopolymer CEL-8-HQ, byla téměř veškerá aktivita zaznamenána v žaludku, z čeho vyplývá, že se mikročástice posouvaly distálním směrem mnohem pomaleji. U potkana s podaným CHIT-8-HQ můžeme vidět posun biopolymeru o něco rychlejší. Dále si můžeme všimnout u kontroly a u potkana s CHIT-8-HQ, že část aktivity se objevila také v plicích. S největší pravděpodobností došlo k aspiraci obsahu gastrické sondy během aplikace. Pokud by šlo o vstřebanou měď, aktivita by byla v daný moment pozorovatelná i v jiných částech těla, například v srdci, ledvinách či slezině a nebyla by takto nahromaděna pouze v plicích.

Následující **Obrázek 13** znázorňuje biodistribuci radiomědi samotné a s biopolymery v dalším časovém bodu a to 8 hodin od aplikace.

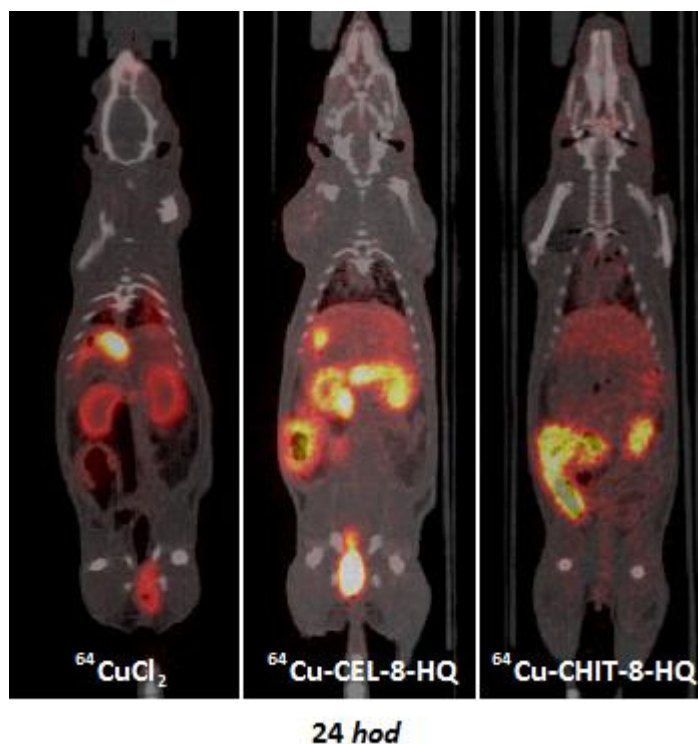




**Obrázek 13:** Biodistribuce  $^{64}\text{CuCl}_2$  samotného a spolu s biopolymery v časovém bodu 8 hodin od perorální aplikace. Fúzní snímky PET/CT vyšetření zobrazeny pomocí PMOD softwaru.

U kontrolního potkana byla největší aktivita po 8 hodinách od aplikace stále patrná v zažívacím traktu, menší část již byla vyloučena. Jelikož zvíře přijalo pouze roztok radiomědi, kterému nic nebránilo ve vstřebání, zhruba 15 % mědi bylo nalezeno v ledvinách a játrech. Především nález v ledvinách potvrzuje poznatek, že měď se vylučuje také močí a ne jenom prostřednictvím žluče. Teprve za 8 hodin od aplikace je u obou biopolymerů vidět jejich posun distálním směrem. Největší část radiomědi byla pozorována ve střevech zvířat a velmi malé stopy také v játrech, ale ve srovnání s kontrolou šlo o zanedbatelné množství. Stále si můžeme všimnout výskyt aktivit v plicích kontroly a potkana s CHIT-8-HQ z pravděpodobné aspirace.

Poslední pozorovaný časový bod 24 hodin od aplikace je znázorněn na **Obrázku 14**.



**Obrázek 14:** Biodistribuce  $^{64}\text{CuCl}_2$  samotného a spolu s biopolymery v časovém bodu 24 hodin od perorální aplikace. Fúzní snímky PET/CT vyšetření zobrazeny pomocí PMOD softwaru.

Před samotným hodnocením snímků je nutné podotknout, že vzhledem ke krátkému poločasu použitého radionuklidu mědi, zachycené signály představovaly pouze 25 % aplikované aktivity. Proto byly snímky upraveny a signál zesílen tak, aby byl výsledek srovnatelný s předchozími měřeními. U kontrolního potkana byla většina zbylé radiomědi nalezena v ledvinách, játrech a ve střevě. Naopak u potkanů s podanými biopolymery si můžeme všimnout, že stopy aktivit se vyskytovaly stále ve střevě. Dále je u těchto zvířat patrný nález radiomědi v játrech. Zvláště tady byl signál výrazně zesílen, což mylně prezentuje vyšší zaznamenanou aktivitu. Ve skutečnosti se ale jednalo o pouhé desetiny procenta. Také si můžeme všimnout, že aktivita radiomědi z plic po aspiraci za 24 hodin již vymizela. Někde je taky vidět miniaturní stopy na končetinách zvířat, na hlavě či v okolí úst. To lze vysvětlit spíše kontaminací povrchu těla, protože je známo, že laboratorní potkany požírají své exkrementy a v těch se radioměď samozřejmě vyskytovala.

PET/CT vyšetření prakticky potvrdilo to, co se naměřilo na ionizační komoře. PET bylo možná o něco citlivější, proto byl patrný výskyt aktivity v některých orgánech

pozorovaný i za 24 hodin ve srovnání s ionizační komorou, která už signály v té době nezachytila. Na druhé straně šlo o malé a zanedbatelné procenta z aplikované aktivity, takže obecně lze říct, že oba biopolymery celulóza i chitosan jsou po perorálním podání jednoznačně nevstřebatelné a dokážou s vysokou účinností pomocí navázaného ligandu 8-hydroxychinolinu komplexovat měď přímo v zažívacím traktu laboratorních potkanů. Jsou srovnatelně efektivní s polymerními mikročásticemi poly(GMA-*co*-EDMA) a kromě toho jde o přirozeně se vyskytující biopolymery.

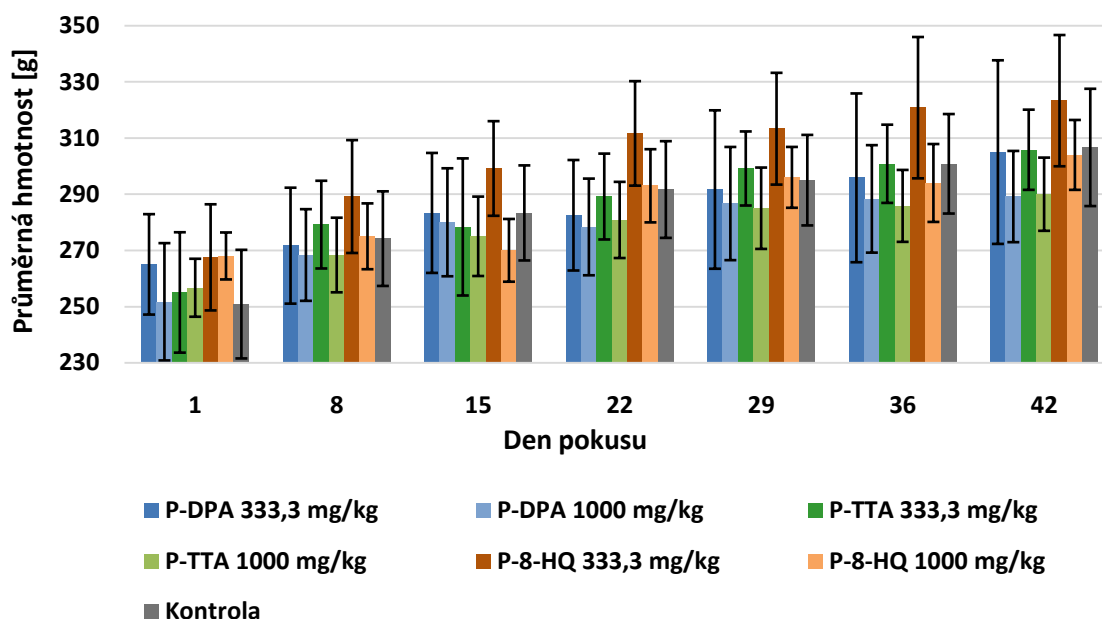
## 4.5 Dlouhodobá *in vivo* studie s poly(GMA-co-EDMA) za účelem snížení obsahu mědi

U této studie byly laboratorní potkany Wistar krmeny po dobu 6 týdnů speciálním krmivem, do kterého byl zakomponován známý obsah mědi a jednotlivých polymerních mikročástic P-DPA, P-TTA nebo P-8-HQ. Zvířata byla rozdělena do 6 experimentálních a jedné kontrolní skupiny ( $n = 6$ ). Každý typ polymerních mikročástic byl v krmivu přítomen ve dvou různých dávkách, 333,3 mg/kg nebo 1000 mg/kg. Kontrolní skupina dostávala pouze obyčejné krmivo bez polymerních mikročástic, ale se stejným obsahem mědi. Zvířata měla po celou dobu přístup k jídlu *ad libitum*. Předmětem zájmu tohoto experimentu bylo několik sledovaných parametrů. Jaké množství krmiva zvířata přijímala a jestli byl příjem pravidelný, jak se měnila jejich hmotnost, jaká byla koncentrace mědi v jejich krvi při pravidelných odběrech, jestli nebyly pozorovány známky toxicity mikročástic apod. Nejdůležitější otázkou pak bylo to, jestli polymerní mikročástice dokázaly s nějakou statistickou významností snížit i měď v samotných orgánech. Z pohledu Wilsonovy choroby jsou u pacientů postiženými orgány především játra, mozek a ledviny, a právě proto se tento experiment zaměřil na tyto orgány.

### 4.5.1 Sledování celkového stavu laboratorních potkanů

Během doby šesti týdnů se všechna zvířata dvakrát týdně vážila kvůli možnému úbytku hmotnosti. Právě ztráta na váze představuje jeden z nejdůležitějších patologických příznaků nějakého orgánového poškození nebo chronické toxicity podávané látky. Také se mohlo stát, že přítomnost mikročástic by způsobila nepříjemnou chuť krmiva a zvířata by ho přestala konzumovat, čímž by znovu ubírala na váze. Potkany byly 12 týdnů staré samice, u kterých se z hlediska fyziologie očekával pravidelný nárůst hmotnosti podle předepsaných křivek či tabulek. **Graf 7** ukazuje vývoj hmotnosti jednotlivých skupin během šesti týdnů podávání speciálního krmiva.

### Vývoj hmotnosti při dlouhodobém podávání polymerních mikročástic



**Graf 7:** Vývoj hmotnosti laboratorních potkanů při dlouhodobém podávání polymerních mikročástic P-DPA, P-TTA a P-8-HQ.

Při pravidelném vážení hmotnosti se zjistilo, že ani v jednom měření se experimentální skupiny významně nelišily od kontrolní skupiny. Počáteční hmotnost zvířat byla v rozmezí 230 – 285 g a na konci experimentu došlo k jejímu nárůstu na hodnoty mezi 280 a 360 g. Z toho lze usoudit, že byl pozorován normální nárůst hmotnosti u všech zvířat. Na druhé straně se objevily menší statistické významnosti u některých měření mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Šlo v podstatě o zjištění, že se některé skupiny ocitly na dolní hranici a některé zas na horní hranici fyziologického rozmezí hmotnosti. Ve srovnání s kontrolou tak rozdíly nalezeny sice nebyly, ale mezi těmito hraničními skupinami pak ano. Například u skupiny P-DPA s dávkou 1000 mg/kg a P-TTA s dávkou 1000 mg/kg se od třetího týdne podávání krmiva naměřila vždy nejnižší průměrná hmotnost. Naopak, skupina P-8-HQ s dávkou 333,3 mg/kg vykazovala již od prvního týdne nejvyšší hmotnost. Proto byly mezi těmito skupinami někdy nalezeny menší statistické rozdíly. Podstatné ale je, že všechna zvířata pravidelně na váze přibírala. Z toho lze usoudit, že polymerní mikročástice neměly statisticky významný vliv na hmotnost ve srovnání s kontrolou, která tyto mikročástice

nepožívala. Konzumace těchto polymerů tak pravděpodobně významně neovlivňovala orgány trávicí trubice.

Případná nechuť k jídlu byla dále ověřována pravidelným vážením požitého krmiva. To nám zároveň poskytlo údaje i o tom, jestli zvířata přijímala během experimentu pravidelnou dávku polymerních mikročástic. V **Tabulce 3** jsou uvedeny průměrné hmotnosti požitého krmiva za jeden den za celou skupinu v průběhu experimentu.

<i>Skupina</i>	<i>Průměrná váha zkonsumovaných pelet za den (g)</i>
P-DPA 333,3 mg/kg	21,1 ± 3,4
P-DPA 1000 mg/kg	21,7 ± 3,7
P-TTA 333,3 mg/kg	21,9 ± 3,3
P-TTA 1000 mg/kg	20,6 ± 3,0
P-8-HQ 333,3 mg/kg	24,0 ± 3,4
P-8-HQ 1000 mg/kg	20,7 ± 3,0
Kontrola	24,0 ± 3,1

**Tabulka 3:** Průměrná váha zkonsumovaných pelet za den v gramech za celou skupinu.

Přechod na nové krmivo na začátku experimentu u zvířat pravděpodobně vyvolal větší chuť k peletám, protože všechny skupiny první den zkonsumovaly v průměru více než 30 g krmiva, což je víc než za normálních podmínek. Hned následující dny však začala konzumace klesat a ustálila se. Během celého experimentu se množství požitého krmiva pohybovalo přibližně v rozmezí 16 – 26 g. Velmi zajímavý byl mírný pokles konzumace jídla právě v těch dnech, kdy zvířatům byla pravidelně (na konci každého týdne) odebírána krev z retro-orbitálního plexu na stanovení koncentrace krevní mědi. Pravděpodobně byla zvířata mírně traumatizována odběrem a vykazovala tak menší chuť k jídlu. Jinak se množství požitě potravy v průběhu šesti týdnů mezi skupinami významně nelišilo. Můžeme tedy tvrdit, že nebyly skupiny, které by dostávaly o něco vyšší nebo nižší dávku polymerních mikročástic. Zároveň lze usoudit, že zvířata nijak nepoznala přítomnost polymerních

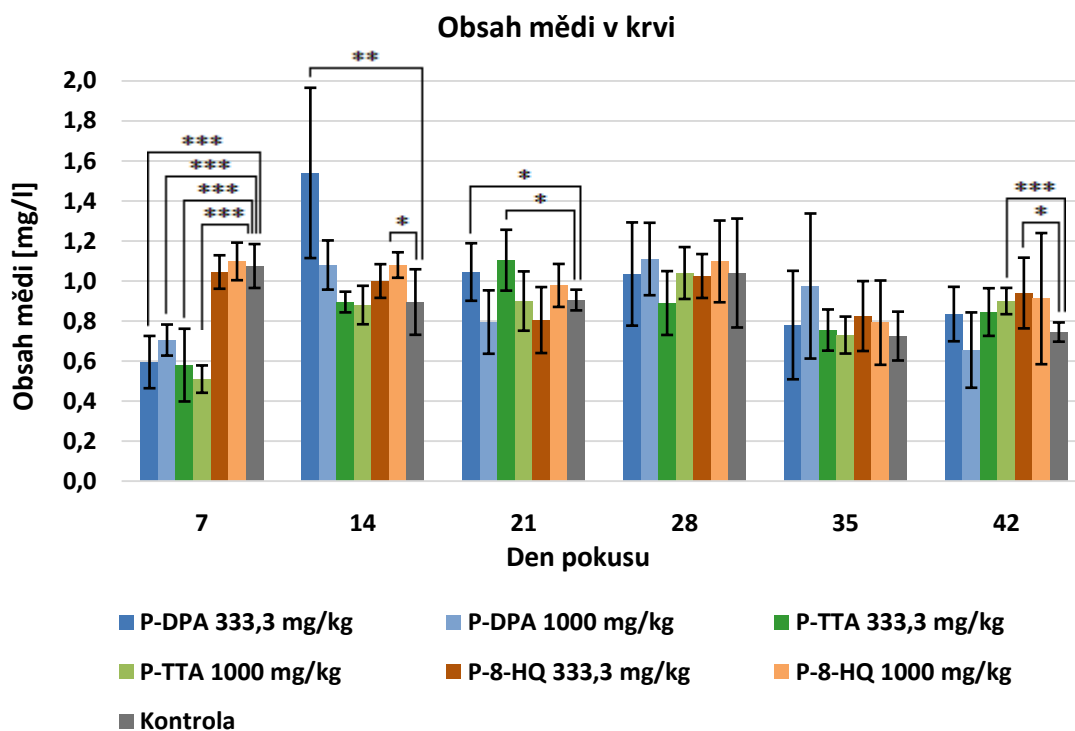
mikročástic zakomponovaných v potravě. Pravidelný příjem také nasvědčuje tomu, že polymery nemohly být pro zvířata významně toxické.

Dále se kromě hmotnosti sledoval i celkový stav zvířat. Důležité bylo množství a vzhled stolice, jelikož testované látky procházely trávicí trubicí. Ani u jedné skupiny nebyl zaznamenán průjem či přítomnost krve ve stolici, z čeho lze usoudit, že polymerní částice střevní stěnu pravděpodobně nedráždily. Zvířata byla během celého experimentu aktivní a vitální, nebyly zaznamenány ani změny v chování, což také nasvědčuje tomu, že jim požívání polymerů zásadně nevadilo. Jak již bylo zmíněno, mírná traumatizace byla pozorována pouze ty dny, kdy jim byla odebírána krev. Během odběrů byli potkani v inhalační anestezii, což mělo jistě vliv na jejich stav po probuzení.

#### **4.5.2 Stanovení obsahu volné mědi v krvi laboratorních potkanů**

Terapeutický účinek sorbentů by se měl projevit i ve změně obsahu krevní mědi. Předpokládalo se, že při dlouhodobém podávání krmiva s polymery se účinek objeví hlavně na počátku experimentu, kdy si tělo začne uvědomovat nedostatek mědi a jaterní zásoby se ještě nestihnou mobilizovat. Proto se všem zvířatům pravidelně odebírala krev z retro-orbitálního plexu na konci každého pokusného týdne. Vždy se odebral 1 ml krve do zkumavek s heparinem a obsah mědi se stanovil jako koncentrace volné mědi v krvi (nenavázané na bílkoviny). Ačkoliv je hlavním krevním ukazatelem měďného metabolismu ceruloplazmin, metodicky bylo mnohem jednodušší stanovit volnou měď, protože pokud organismus celkově trpí na nedostatek mědi, deficiencie se projeví jak na snížené hladině ceruloplazminu, tak na snížené volné mědi. To, že jsme se zaměřili na deficienci mědi, bylo kvůli tomu, že použitá laboratorní zvířata byla zdravá, takže je logické, že se po komplexaci mědi v zažívacím traktu začne v těle rozvíjet její nedostatek. Nicméně, i kdybychom pokus provedli se zvířecím modelem, stále by se jednalo o snižování obsahu mědi. To se prakticky týká ne jenom v případě krevní analýzy, ale také při stanovování množství mědi v orgánech. Vždy se jedná o srovnávání experimentální léčené a kontrolní neléčené skupiny.

Na následujícím **Grafu 8** je znázorněn graf vyjadřující časový průběh změn koncentrace krevní volné mědi v mg/l.



**Graf 8:** Obsah volné mědi v krvi laboratorních potkanů v pravidelných časových bodech během podávání jednotlivých polymerních mikročásteček ve dvou různých dávkách. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

Výsledky krevní mědi poskytly velmi zajímavé zjištění. Když se podíváme na graf, po prvním týdnu podávání sorbentů došlo k výraznému snížení obsahu mědi u čtyř experimentálních skupin ve srovnání s kontrolou. U kontroly bylo naměřeno v průměru 1,08 mg/l ( $SO = 0,11$  mg/l), kdežto u některých skupin byla koncentrace téměř dvojnásobně nižší. Jednalo se o skupiny, které dostávaly P-DPA jak v dávce 333,3 mg/kg ( $c = 0,60$  mg/l,  $SO = 0,13$  mg/l), tak v dávce 1000 mg/kg ( $c = 0,71$  mg/l,  $SO = 0,08$  mg/l). Podobné snížení pak bylo pozorováno u skupin s oběma dávkami P-TTA ( $c = 0,58$  mg/l,  $SO = 0,18$  mg/l pro P-TTA 333,3 mg/kg a  $c = 0,51$  mg/l,  $SO = 0,07$  mg/l pro P-TTA 1000 mg/kg).  $F$  a  $p$  statistické hodnoty byly pro zmíněné skupiny následovné:  $F = 47,51$  a  $p = 0,000042$  u skupiny s P-DPA 333,3 mg/kg,  $F = 45,48$  a  $p = 0,000051$  u skupiny s P-DPA 1000 mg/kg,  $F = 32,65$  a  $p = 0,00019$  u skupiny s P-TTA 333,3 mg/kg,  $F = 114,62$  a  $p = 0,00000085$  u skupiny s P-TTA 1000 mg/kg. U skupin, které dostávaly P-8-HQ, byla koncentrace krevní mědi po 1. týdnu srovnatelná s kontrolou. Zajímavé ale byly následující týdny trvání pokusu, protože při dalších

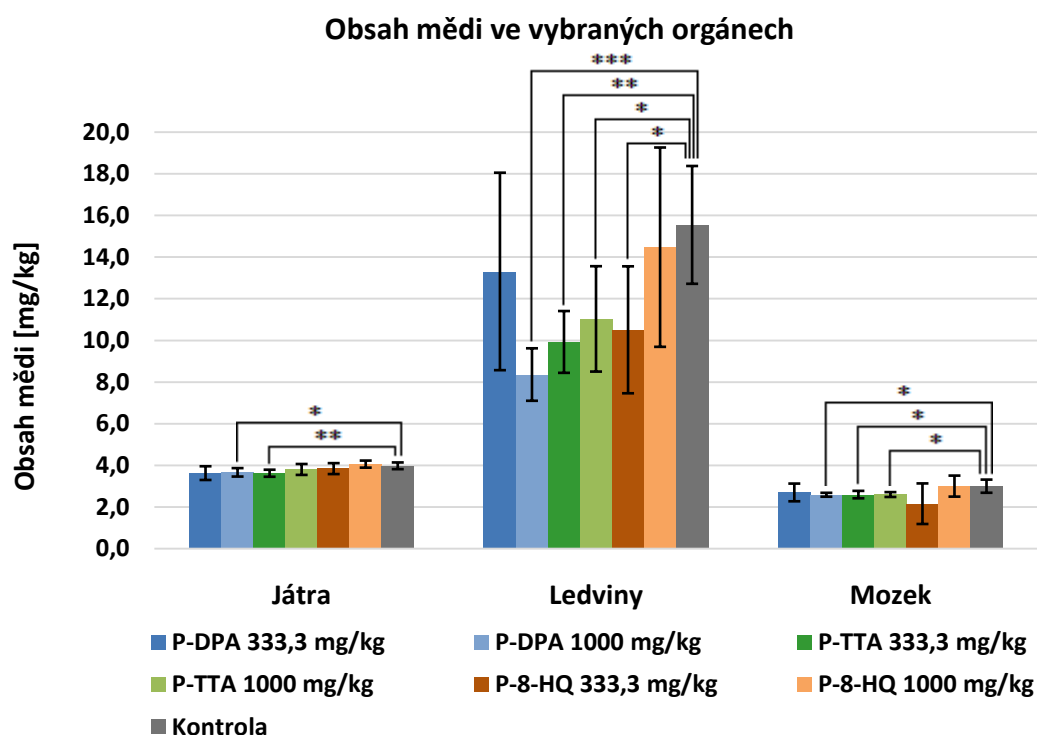


odběrech se zjistilo, že obsah krevní mědi byl u některých experimentálních skupin dokonce statisticky významně vyšší než u kontroly. V podstatě u všech pokusných skupin byla pozorována tendence k vyšší hladině. Například při odběru v 14. den experimentu bylo zjištěno výraznější zvýšení hladiny na koncentraci 1,54 mg/l ( $SO = 0,43$  mg/l) u skupiny P-DPA 333,3 mg/kg ( $F = 12,02$  a  $p = 0,0061$ ) a 1,08 mg/l ( $SO = 0,06$  mg/l) u skupiny P-8-HQ 1000 mg/kg ( $F = 5,59$  a  $p = 0,042$ ). U kontroly byla při tomto odběru zjištěna koncentrace 0,89 mg/l ( $SO = 0,16$  mg/l). Další zvýšení hladiny bylo pozorováno za dalších sedm dní v 21. den pokusu opět u skupiny P-DPA 333,3 mg/kg ( $c = 1,05$  mg/l,  $SO = 0,14$  mg/l,  $F = 7,23$  a  $p = 0,048$ ) a u skupiny P-TTA 333,3 mg/kg ( $c = 1,10$  mg/l,  $SO = 0,15$  mg/l,  $F = 9,18$  a  $p = 0,013$ ) ve srovnání s kontrolou ( $c = 0,91$  mg/l,  $SO = 0,05$  mg/l). U následujících dvou odběrů (28. a 35. den) nebyly naměřeny výraznější výkyvy hladiny krevní mědi ani u jedné skupiny ve srovnání s kontrolou. Změny byly pozorovány až u posledního odběru v 42. den pokusu, kde se znovu jednalo o zvýšení koncentrace ve srovnání s kontrolou ( $c = 0,75$  mg/l,  $SO = 0,05$  mg/l). Jednalo se o skupiny P-TTA 1000 mg/kg ( $c = 0,90$  mg/l,  $SO = 0,07$  mg/l,  $F = 21,74$  a  $p = 0,00089$ ) a P-8-HQ 333,3 mg/kg ( $c = 0,94$  mg/l,  $SO = 0,18$  mg/l,  $F = 6,81$  a  $p = 0,026$ ).

Proč došlo nejdříve k výraznému snížení a pak ke zvýšení koncentrace krevní mědi u experimentálních skupin? Lze to vysvětlit tím, že když se v organismu na počátku projeví deficeience nějaké živiny, její pokles se prvně projeví zejména v krvi, která má za úkol tuto živinu dopravit k orgánům. Pokud organismus tuto živinu nadále nepřijímá, mobilizují se zásoby v těle, aby mohla být k dispozici pro nejdůležitější orgány. Mobilizaci zásob se tak může krevní hladina normalizovat, případně i zvýšit, ale na úkor tělesných zásob. Pravděpodobně proto byly pozorovány podobné výkyvy krevní mědi u laboratorních potkanů v tomto pokusu. Postupně se nedostatek krevní mědi vyvolaný polymerními mikročásticemi normalizoval, případně zvýšil uvolněním tělesných zásob. Abychom potvrdili tuto domněnku, bylo nutné stanovit i samotný obsah mědi v orgánech.

### 4.5.3 Stanovení obsahu volné mědi ve vybraných orgánech laboratorních potkanů

Jelikož jsou játra hlavním zásobním orgánem mědi, obsah mědi v jaterním parenchymu byl nejdůležitějším předmětem zájmu na konci pokusu s dlouhodobým podáváním polymerních mikročástic v krmivu. Kromě jater je poškození tímto prvkem u Wilsonovy choroby patrné ve větší míře také v mozku a ledvinách. Proto byly tyto tři orgány odebrány všem zvířatům po 6 týdnech trvání pokusu. Existoval předpoklad, že polymerní mikročástice adsorbují měď již v trávicím traktu a budou vyloučeny spolu se stolicí, což u zvířat mělo vyvolat deficienci tohoto kovu. Na **Grafu 9** je znázorněn obsah volné mědi ve vybraných orgánech v miligramech na kilogram hmotnosti těchto orgánů.



**Graf 9:** Obsah mědi v játrech, ledvinách a mozku laboratorních potkanů po 6 týdnech podávání polymerních mikročástic. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

Analýza obsahu mědi v orgánech ukázala, že její nejvýraznější snížení se projevilo v ledvinách laboratorních zvířat, nejvíce u skupiny P-DPA s dávkou 1000 mg/kg, kde hmotnostní obsah byl 8,35 mg/kg ( $SO = 1,26$  mg/kg) ve srovnání s kontrolou, u které bylo zjištěno téměř dvojnásobně větší množství 15,53 mg/kg ( $SO = 2,83$  mg/kg). Statistické hodnoty pro tuto skupinu byly  $F = 26,94$  a  $p = 0,00041$ . Další významné snížení bylo nalezeno u skupin P-TTA 333,3 mg/kg (obsah mědi 9,91 mg/kg,  $SO = 1,48$  mg/kg,  $F = 15,49$  a  $p = 0,0028$ ), P-TTA 1000 mg/kg (obsah mědi 11,02 mg/kg,  $SO = 2,53$  mg/kg,  $F = 7,08$  a  $p = 0,024$ ) a P-8-HQ 333,3 mg/kg (obsah mědi 10,5 mg/kg,  $SO = 3,05$  mg/kg,  $F = 7,34$  a  $p = 0,022$ ). U jater bylo významné snížení pozorováno pouze u dvou skupin a to u P-DPA 1000 mg/kg s obsahem 3,65 mg/kg ( $SO = 0,20$  mg/kg) a u P-TTA 333,3 mg/kg s obsahem 3,61 mg/kg ( $SO = 0,17$  mg/kg). Zvířata kontrolní skupiny měli obsah mědi v játrech v průměru 3,97 mg/kg ( $SO = 0,16$  mg/kg). Na první pohled se zdá, že rozdíl velký nebyl, ale jedná se o poměrně nízké koncentrace, čímž dostáváme ve srovnání s kontrolou rozdíl téměř 10 % ( $F = 7,33$  a  $p = 0,022$  pro skupinu P-DPA 1000 mg/kg,  $F = 11,72$  a  $p = 0,0065$  pro skupinu P-TTA 333,3 mg/kg). V mozkové tkáni bylo taky zjištěno určité snížení obsahu mědi. Kým u kontroly obsah v průměru představoval 2,99 mg/kg ( $SO = 0,32$  mg/kg), u skupiny P-DPA 1000 mg/kg bylo změřeno 2,58 mg/kg ( $SO = 0,09$  mg/kg), u skupiny P-TTA 333,3 mg/kg 2,59 mg/kg ( $SO = 0,18$  mg/kg) a u skupiny P-TTA 1000 mg/kg 2,15 mg/kg ( $SO = 0,97$  mg/kg). Ve srovnání s kontrolou jde o snížení mědi opět o více než 10 % ( $F = 7,82$  a  $p = 0,019$  pro skupinu P-DPA 1000 mg/kg,  $F = 6,18$  a  $p = 0,032$  pro skupinu P-TTA 333,3 mg/kg a  $F = 7,14$  a  $p = 0,023$  pro skupinu P-TTA 1000 mg/kg).

Analýza obsahu mědi v játrech, ledvinách a mozku tak ukázala, že především polymerní mikročástice P-DPA a P-TTA dokázaly významně snížit obsah mědi ve všech třech orgánech a P-8-HQ v ledvinách zvířat.

## 5 DISKUZE

Cílem disertační práce bylo otestovat polymerní mikročástice poly(GMA-co-EDMA), zesíťovaný chitosan a mikrokrystalickou celulózu, jestli jsou vhodnými nosiči chelátorů pro měďnaté kationty. Jako chelátory byly použity *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amin (DPA), triethyltetraamin (TTA) a 8-hydroxychinolin (8-HQ), které vysoce účinně komplexují tento kov. Takové polymerní komplexy by mohly sloužit jako nové terapeutikum pro léčbu Wilsonovy choroby. Na rozdíl od současné léčby je takový komplex příliš velký na to, aby se vstřebal do těla ze zažívacího traktu po perorálním podání. Tímto způsobem se lze vyhnout systémovým nežádoucím účinkům, které u většiny různých léků vznikají právě kvůli vstřebání do oběhu a působení na mnohé orgány, které nejsou cílové. Předpokladem navrhovaného léku tedy je, že po perorálním podání léčivo adsorbuje měď již v trávicím traktu přímo z potravy a vše se vyloučí ven z těla ve stolici.

Abychom zjistili, jestli takový systém může skutečně fungovat, bylo nutné otestovat několik aspektů. Především se musela potvrdit stabilita celého polymerního komplexu při určitých hodnotách pH, které panují v trávicím traktu organismu. Dalším krokem bylo zjišťování, jestli jsou polymerní mikročástice skutečně nevstřebatelné po perorálním podání. S polymerem poly(GMA-co-EDMA) byl navíc proveden i terapeutický experiment, kterého cílem byla snaha o snížení obsahu mědi v organismu laboratorních zvířat. Co lze na základě jednotlivých výsledků očekávat, jaká zjištění jsou přínosná a jaká problémová, je rozebráno v následujícím textu.

### *Schopnost adsorpce mědi a stabilita polymerního komplexu*

Nejdříve byla provedena adsorbční a desorpční studie s poly(GMA-co-EDMA) s navázanými chelátory DPA, TTA a 8-HQ. Studie probíhala za simulovaných podmínek s roztoky napodobujícími prostředí trávicího traktu. První překážkou léku by totiž mohlo být různé pH, které je hodně kyselé v žaludku a téměř neutrální ve střevě. Simulované prostředí prázdného žaludku s pH = 2 ukázalo, že polymerní komplexy dokázaly s vysokou účinností adsorbovat téměř veškerou měď z roztoku. To platilo pro

všechny testované typy. Ještě lepší výsledek byl dosažen při  $\text{pH} = 4$ , což odpovídá žaludku naplněnému potravou. Takové zjištění bylo pro nás pozitivní, protože předpokladem je, že polymerní komplexy budou adsorbovat měď přirozeně tehdy, když se žaludek naplní potravou a ne když je prázdný. S tím se pak naskytuje i možnost dávkování léku, který by se mohl užívat například třikrát denně s jídlem.

Následně by polymerní komplex s adsorbovanou mědí putoval dále do střeva, kde se  $\text{pH}$  zvyšuje téměř na neutrální hodnotu. Na základě toho byla provedena desorpční studie s roztokem aminokyselin o  $\text{pH} = 6,8$ , u které se zjišťovala stabilita celého systému a jestli nedochází k zpětnému uvolnění mědi. Přítomnost aminokyselin měla svůj účel, protože některé vykazují větší afinitu k mědi a představují tak kompetitivní prostředí. Nejlepší výsledek byl tentokrát zjištěn u polymerních mikročásteček P-TTA a P-8-HQ. Ty dokázaly udržet téměř veškerou adsorbovanou měď i po 24 hodinách. U mikročásteček P-DPA ale bohužel došlo k uvolnění třetiny adsorbované mědi, což je poměrně velké množství.

Adsorpční a desorpční studie s biopolymery celulórou a chitosanem nebyly opakovány ze dvou důvodů. Prvním byl ten, že oba jsou pro člověka přirozeně nestravitelné a chelatace mědi v závislosti na  $\text{pH}$  zcela závisí pouze na ligandu, nikoliv na polymeru, na kterém je tento ligand navázaný. Druhým důvodem bylo to, že jejich chemická modifikace umožnila zavést do molekuly aminoskupiny, které vytvořily kovalentní vazbu s chelátorem 8-HQ podobně jako v případě poly(GMA-co-EDMA). A tak se předpokládalo, že se budou chovat velmi podobně jako P-8-HQ.

Kromě adsorpce a desorpce byla navíc u poly(GMA-co-EDMA) provedena i kompetitivní studie se zinkem, protože jde o kov, který se v případě komplexace chová velmi podobně jako měď. Jde tedy spíše o vlastnost samotných chelátorů, které jsou na polymerní mikročástečce navázané. Pacienti s Wilsonovou chorobou užívají vysoké dávky zinku, který pak ve střevě soutěží o receptory spolu s mědí a díky své vysoké koncentraci ji vytěsňuje. Právě z tohoto důvodu byla studie provedena se stonásobně vyšší koncentrací zinku oproti mědi. Ukázalo se, že P-DPA a P-8-HQ vykazují vysokou selektivitu pro měďnaté kationty ve srovnání s kationty zinečnatými. I P-TTA komplexoval s preferencí měď, ale ve srovnání s P-DPA a P-8-HQ přibližně patnáctkrát méně při  $\text{pH} = 2$  a dvakrát méně při  $\text{pH} = 4$ . Nicméně, lze tvrdit, že pokud by pacienti

byli léčení P-DPA a P-8-HQ spolu se zinkem, nemělo by to vstřebávání zinku ve střevě ovlivnit.

### *Nevstřebatelnost polymerních mikročástic*

Nevstřebatelnost polymerních mikročástic byla testována dvěma způsoby za pomoci radionuklidů  $^{125}\text{I}$  a  $^{64}\text{Cu}$ . Jednak se provedlo kvantitativní stanovení radioaktivity přímo v jednotlivých orgánech laboratorních zvířat a jednak pomocí zobrazování PET/CT. Hlavním principem navrhované léčby je právě nevstřebatelnost léku po perorálním podání, a tudíž získané výsledky byly jedny z nejdůležitějších.

Na základě předchozích zjištění byl pro studii vybrán 8-hydroxychinolin jako nejvhodnější chelátor pro měď. V případě poly(GMA-co-EDMA) s navázaným 8-hydroxychinolinem (P-8-HQ) a značeným pomocí radionuklidu  $^{125}\text{I}$  se zjistilo, že polymer po perorální aplikaci postupoval zažívacím traktem laboratorních potkanů prakticky jako normální potrava. Po 2,5 hodinách byly mikročástice nalezeny zejména v žaludku, po 8 hodinách ve střevě a za 24 hodin byla většina z nich vyloučena. Kromě zažívacího traktu nebyla radioaktivita změřena v žádném vnitřním orgánu či v krvi, což nasvědčuje nevstřebatelnosti polymeru. Jako kontrola v tomto případě posloužil samotný radionuklid jódu, protože pokud by se nějakým způsobem dokázaly vstřebat fragmenty polymeru anebo uvolněný chelátor, jód by se přednostně vylučoval ve štítné žláze zvířat, a to pozorováno nebylo. Nevstřebatelnost potvrdilo i PET/CT vyšetření s radionuklidem  $^{64}\text{Cu}$  u laboratorních myší. Při tomto vyšetření byl nalezen jeden zajímavý rozdíl mezi myší a potkanem. Zatímco u potkana se polymerní mikročástice z těla vyloučily prakticky za jeden den, u myši se poměrně velká část zadržovala v žaludku i po třech dnech od aplikace. Pravděpodobně mikročástice vykazovaly u myši větší afinitu k sliznici žaludeční stěny. Na jedné straně by podobné chování u člověka mohlo být pozitivní v tom ohledu, že takto vytvořené depo polymerních mikročástic v žaludku by stačilo komplexovat měď i v průběhu několika dnů, a tak by se lék nemusel užívat každý den, ale například obden. Na druhé straně by mohl vzniknout problém při příliš dlouhodobé adhezi a nahromadění mikročástic v žaludku, ačkoliv je tento polymerní nosič biokompatibilní. V takovém případě by mohlo dojít k dráždění

žaludeční stěny, což by se u pacientů projevilo trávicím diskomfortem či bolestí. Samozřejmě, bylo by nutné provést podobnou studii u samotných pacientů, což je plánem dalších experimentů.

Co se týče biopolymerů celulózy a chitosanu s navázaným 8-hydroxychinolinem (CEL-8-HQ a CHIT-8-HQ), studie byla provedena s radionuklidem  $^{64}\text{Cu}$  v obou případech, a to jak u kvantitativního stanovení radioaktivity v jednotlivých orgánech, tak u PET/CT vyšetření. Na celou studii byly tentokrát použity pouze laboratorní potkany. U těchto zvířat je na rozdíl od lidí známo, že zvláště celulóza se může díky přítomnosti specifické střevní mikroflóry zčásti strávit. Proto se ještě před samotným experimentem očekávalo, že určité procento aktivity bude změřeno i ve vnitřních orgánech, což by znamenalo vstřebání strávených biopolymerů. Skutečně se v případě analýzy jednotlivých orgánů ukázalo, že aktivita byla přítomna v krvi, játrech, ledvinách či srdci. Zvláště aktivita v játrech a krvi nasvědčuje vstřebání. Je nutné podotknout, že šlo o velmi nízké procenta z aplikované dávky. V těle zvířat bylo mimo trávicí trakt méně než 5 % aktivity v době 8 hodin od aplikace, což ve srovnání s kontrolou představovalo 4 – 5 krát menší množství. Jelikož se u člověka tyto biopolymery netráví, pravděpodobně by nedošlo k žádnému vstřebání, eventuálně pouze k nepatrnému. Navíc za 24 hodin nebyla u potkanů pozorována žádná radioaktivita uvnitř mimotrávicích orgánů. PET/CT vyšetření taky ukázalo částečné vstřebání (více u CHIT-8-HQ), i když opět šlo o nízká procenta z aplikované dávky.

Biodistribuční studie potvrdili nevstřebatelnost polymerních nosičů, což byl důležitý cíl. Pokud by navrhovaný lék fungoval a postoupil ke klinickému testování na pacientech, bylo by nutné ověřit několik dalších věcí. Jednak zmíněnou možnost zvýšené adheze mikročástic k žaludeční nebo střevní stěně, což by vyvolávalo iritaci. Dále by bylo nutné přesně stanovit adsorpci mědi v zažívacím traktu a podle toho nalézt optimální dávkování. Wilsoničtí pacienti trpí vysokým obsahem mědi v těle a příliš účinná a rychlá komplexace by mohla paradoxně způsobit náhlý pokles a deficienci. To by představovalo problém, protože organizmus měď potřebuje pro různé funkce. Sice by se zlepšila prognóza Wilsonovy nemoci, ale mohly by se objevit symptomy z nedostatku mědi. Dále by bylo zapotřebí otestovat možnou interferenci s některými pro tělo důležitými živinami. Lék by se pravděpodobně užíval s jídlem, které obsahuje

nejrůznější látky. Mohlo by dojít například k ovlivnění postupu mikročastic zažívacím traktem (k příliš rychlému nebo příliš pomalému). Anebo naopak, mikročastice by mohly ovlivnit proces trávení složek potravy.

### *Terapeutický účinek polymerních mikročastic*

Cílem dlouhodobého podávání polymerních mikročastic P-DPA, P-TTA a P-8-HQ zakomponovaných v krmivu byla snaha o snížení obsahu mědi v těle. Jelikož šlo o zdravé laboratorní potkany kmene Wistar, měla se rozvinout deficienze tohoto prvku. Analýza obsahu mědi se soustředila především na játra, mozek a ledviny, které jsou nejvíc postižené u wilsonických pacientů. Játra zároveň představují regulační a zásobní orgán pro metabolismus mědi, takže jakékoliv změny se projeví právě v jaterní tkáni. Ledviny také hrají určitou roli ve vylučování mědi prostřednictvím moče. Mozek je zas orgánem, kde se nadbytek či nedostatek mědi výrazně projevuje někdy až závažnou symptomatologií.

Po uplynutí doby šesti týdnů, během kterých se zvířatům podávaly polymerní mikročastice, výsledky obsahu mědi v orgánech ukázaly, že skutečně došlo ke snížení jejího množství. Deficienze se nejvíce rozvinula v ledvinách zvířat, dále pak v játrech a částečně v mozku. Jednalo se zejména o experimentální skupiny zvířat, které dostávaly P-DPA v dávce 1000 mg/kg a P-TTA v dávce 333,3 mg/kg. Menší efekt byl pozorován i u skupin P-TTA s dávkou 1000 mg/kg a P-8-HQ s dávkou 333,3 mg/kg. Zajímavé je, že na základě adsorpčních a desorpčních studií byl nejlepší komplexační účinek nalezen u polymerních mikročastic P-8-HQ, zatímco u terapeutického pokusu *in vivo* mnohem lepší výsledky ve smyslu deficienze mědi vykazovaly P-DPA a P-TTA. Nicméně, můžeme tvrdit, že všechny typy polymerních mikročastic s navázanými chelátory vykazují schopnost snížit množství mědi v organizmu laboratorních zvířat.

Kromě stanovení obsahu mědi v orgánech se u dlouhodobého podávání polymerních mikročastic pravidelně sledoval celkový stav zvířat a pravidelně se taky odebírala krev na stanovení koncentrace krevní volné mědi. Hmotnost zvířat, množství požitá potravy, aktivita a vitalita zvířat, stolice, chování apod. nevykazovaly žádné známky toho, jestli polymerní mikročastice působily na laboratorní potkany negativně.



Zvířata na rozdíl od lidí dokážou velmi dobře vycítit přítomnost „nevhodné“ složky v potravě, takže pokud by jim mikročástice vadily, projevilo by se to poklesem jejich hmotnosti a menším množstvím zkonsumované potravy. Také případná toxicita by se mohla projevit poklesem hmotnosti a celkovým strádáním, což pozorováno nebylo. Koncentrace krevní mědi v průběhu experimentu docela kolísala. Zvláště na počátku experimentu došlo k výraznému snížení koncentrace u skupin P-DPA a P-TTA ve srovnání s kontrolou, což by odpovídalo komplexaci mědi v zažívacím traktu. V následujících týdnech se naopak stav obrátil a u některých experimentálních skupin bylo zjištěno dokonce až zvýšení koncentrace oproti kontrole. Lze to vysvětlit tím, že jakmile se v těle začínala rozvíjet deficience mědi, mohly se uvolnit její větší zásoby do krve, aby se měď dopravila k cílovým orgánům.

## 6 ZÁVĚR

Wilsonova nemoc je komplexní nemoc, při které je postižená celá řada orgánů. Nejlepším terapeutickým řešením se jeví taková možnost, aby se měď do těla vůbec nevstřebala, respektive aby se vstřebávala pouze v minimálním, k životu potřebném množství. Námi navrhované léčivo představuje polymerní nosič o velikosti řádově desítky mikrometrů, na který je navázán vysoce specifický chelátor mědi. Díky velikosti a nestravitelnosti takových polymerních mikročástic je celý systém nevstřebatelný skrze zažívací trakt po perorálním podání. Účinná komplexace mědi v žaludku a ve střevě umožní to, aby se polymerní komplex spolu s mědí vyloučil ven z těla spolu se stolicí. Princip nevstřebatelnosti léku zároveň umožňuje eliminovat případné systémové nežádoucí účinky, které u různých léčiv obvykle vznikají právě kvůli vstřebání do krevního oběhu.

V této práci jsme ukázali, že námi navrhované polymerní mikročástice na báze poly(GMA-*co*-EDMA), zesíťovaného chitosanu a mikrokrytalické celulózy jsou velmi dobrými nosiči chelátorů mědi, které se po perorálním podání ze zažívacího traktu do těla laboratorních zvířat nevstřebávají. Komplexace měďnatých kationtů pomocí použitých chelátorů *N,N*-di(2-pyridylmetyl)aminu, triethyltetraaminu a 8-hydroxychinolinu byla v daných experimentech vysoce účinná, a to i v případě přítomnosti kompetitivních látek, jakými jsou například zinek či některé aminokyseliny. U terapeutického pokusu s poly(GMA-*co*-EDMA) jsme ukázali, že zvláště polymerní mikročástice P-DPA a P-TTA dokázaly významně snížit obsah mědi ve vybraných orgánech laboratorních potkanů. Tím se prakticky naskýtá možnost jejich léčivého účinku u pacientů s Wilsonovou nemocí. Dále se díky biokompatibilitě poly(GMA-*co*-EDMA) a přirozenému původu zesíťovaného chitosanu či mikrokrytalické celulózy nepředpokládá výraznější negativní působení, čímž by se organizmus nezatěžoval různými toxickými složkami, které často bývají součástí mnoha různých medikamentů.

Na závěr tedy můžeme vyslovit tvrzení, že námi navrhované polymerní léčivo má velmi dobrý potenciál stát se novým lékem pro léčbu Wilsonovy choroby a mohlo by tak postoupit dále ke klinickému testování.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie
ALT	alaninaminotransferáza
APP	amyloidový prekurzorový protein
AST	aspartátaminotransferáza
ATOX1	antioxidant protein (chaperon) 1
ATP7A	ATPáza typu P specifická pro měď, podtyp 7A
ATP7B	ATPáza typu P specifická pro měď, podtyp 7B
CCS	copper chaperon for SOD
CP	ceruloplazmin
CT	počítačová tomografie
Cu/Zn SOD	Cu/Zn superoxiddizmutáza
DMT1	divalent metal transporter 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPA	<i>N,N</i> -di(2-pyridylmetyl)amin
EDMA	ethylén dimethakrylát
G943S	missense genová mutace u Wilsonovy choroby (záměna glycinu za serin v pozici 943)
GMA	glycidyl methakrylát
H1069Q	missense genová mutace u Wilsonovy choroby (záměna histidinu za glutamin v pozici 1069)
hCTR1	human high-affinity copper transporter 1
HDL	high-density lipoprotein
8-HQ	8-hydroxychinolin
LDL	low-density lipoprotein
MRI	magnetic resonance imaging
NMRI	kmen laboratorních myší získaný z Naval Medical Research Institute
PET	pozitronová emisní tomografie
poly(GMA- <i>co</i> -EDMA)	poly(glycidyl methakrylát- <i>co</i> -ethylén dimethakrylát)

R778L	missense genová mutace u Wilsonovy choroby (záměna argininu za leucin v pozici 778)
SPECT	jednofotonová emisní tomografie
TTA	triethylentetraamin

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Aggarwal A, Bhatt M. Update on Wilson disease. *International Review of Neurobiology*, **2013**, vol. 110, p. 313 – 348.
- (2) Akpınar E, Akhan O. Liver imaging findings of Wilson's disease. *European Journal of Radiology*, **2007**, vol. 61, issue 1, p. 25 – 32.
- (3) Ala A, Borjigin J, Rochwarger A, Schilsky M. Wilson disease in septuagenarian siblings: raising the bar for diagnosis. *Hepatology*, **2005**, vol. 41, issue 3, p. 668 – 670.
- (4) Ala A, Walker AP, Keyoumars A, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *The Lancet*, **2007**, vol. 369, issue 9559, p. 397 – 408.
- (5) Amer MS, Gray JC. Cholestyramine compositions and method for preparation thereof. US 4.895.723, **1990**.
- (6) Azizi E, Eshel G, Aladjem M. Hypercalciuria and nephrolithiasis as a presenting sign in Wilson disease. *European Journal of Pediatrics*, **1989**, vol. 148, issue 6, p. 548 – 549.
- (7) Becuwe C, Dalle S, Ronger-Salve S, Skowron F, Balme B, Kanitakis J, Thomas L. Elastosis perforans serpiginosa associated with pseudo-pseudoxanthoma elasticum during treatment of Wilson's disease with penicillamine. *Dermatology*, **2005**, vol. 210, issue 1, p. 60 – 63.
- (8) Behari M, Pardasani V. Genetics of Wilson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, **2010**, vol. 16, issue 10, p. 639 – 644.
- (9) Boal AK, Rosenzweig AC. Structural biology of copper trafficking. *Chemical Reviews*, **2009**, vol. 109, issue 10, p. 4760 – 4779.
- (10) Brewer GJ. Neurologically presenting Wilson's disease: epidemiology, pathophysiology and treatment. *CNS Drugs*, **2005**, vol. 19, issue 3, p. 185 – 192.
- (11) Brewer GJ. Zinc acetate for the treatment of Wilson's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **2001**, vol. 2, issue 9, p. 1473 – 1477.
- (12) Brewer GJ, Dick RD, Johnson V, Wang Y, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kluin K, Fink JK, Aisen A. Treatment of Wilson's disease with ammonium tetrathiomolybdate: I. Initial therapy in 17 neurologically affected patients. *Archives of Neurology*, **1994**, vol. 51, issue 6, p. 545 – 554.

- (13) Brewer GJ, Hedera P, Kluin KJ, Carlson M, Askari F, Dick RB, Sitterly J, Fink JK. Treatment of Wilson's disease with ammonium tetrathiomolybdate: III. Initial therapy in a total of 55 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy. *Archives of Neurology*, **2003**, vol. 60, issue 3, p. 379 – 385.
- (14) Brewer GJ, Johnson V, Dick RD, Kluin KJ, Fink JK, Brunberg JA. Treatment of Wilson's disease with ammonium tetrathiomolybdate: II. Initial therapy in 33 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy. *Archives of Neurology*, **1996**, vol. 53, issue 10, p. 1017 – 1025.
- (15) Brewer GJ, Terry CA, Aisen AM, Hill GM. Worsening of neurologic syndrome in patients with Wilson's disease with initial penicillamine therapy. *Archives of Neurology*, **1987**, vol. 44, issue 5, p. 490 – 493.
- (16) Caca K, Ferenci P, Kuhn HJ, Polli C, Willgerodt H, Kunath B, Hermann W, Mossner J, Berr F. High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis. *Journal of Hepatology*, **2001**, vol. 35, issue 5, p. 575 – 581.
- (17) Cauza E, Maier-Dobersberger T, Polli C, Kaserer K, Kramer L, Ferenci P. Screening for Wilson's disease in patients with liver diseases by serum ceruloplasmin. *Journal of Hepatology*, **1997**, vol. 27, issue 2, p. 358 – 362.
- (18) Czlonkowska A, Gajda J, Rodo M. Effects of long-term treatment in Wilson's disease with D-penicillamine and zinc sulphate. *Journal of Neurology*, **1996**, vol. 243, issue 3, p. 269 – 273.
- (19) Czlonkowska A, Rodo M, Gromadzka G. Late onset Wilson's disease: therapeutic implications. *Movement Disorders*, **2008**, vol. 23, issue 6, p. 897 – 899.
- (20) Dalvi A. Wilson's disease: Neurological and psychiatric manifestations. *Disease-A-Month*, **2014**, vol. 60, issue 9, p. 460 – 464.
- (21) Dalvi A, Padmanaban M. Wilson's disease: Etiology, diagnosis, and treatment. *Disease-A-Month*, **2014**, vol. 60, issue 9, p. 450 – 459.
- (22) Danks DM. Copper deficiency in humans. *Annual Review of Nutrition*, **1988**, vol. 8, p. 235 – 257.

- (23) Dastych M, Prochazkova D, Pokorny A, Zdrzil L. Copper and zinc in the serum, urine, and hair of patients with Wilson's disease treated with penicillamine and zinc. *Biological Trace Element Research*, **2010**, vol. 133, issue 3, p. 265 – 269.
- (24) Dening TR. The neuropsychiatry of Wilson's disease: a review. *The International Journal of Psychiatry in Medicine*, **1991**, vol. 21, issue 2, p. 135 – 148.
- (25) Dening TR, Berrios GE. Wilson's disease: a longitudinal study of psychiatric symptoms. *Biological Psychiatry*, **1990**, vol. 28, issue 3, p. 255 – 265.
- (26) Eisenbach C, Sieg O, Stremmel W, Encke J, Merle U. Diagnostic criteria for acute liver failure due to Wilson disease. *World Journal of Gastroenterology*, **2007**, vol. 13, issue 11, p. 1711 – 1716.
- (27) Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Human Genetics*, **2006**, vol. 120, issue 2, p. 151 – 159.
- (28) Ferenci P. Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **2004**, vol. 19, issue 2, p. 157 – 165.
- (29) Ferenci P, Czlonkowska A, Merle U, Szalay F, Gromadzka G, Yurdaydin C, Vogel W, Bruha R, Schmidt HT, Stremmel W. Late-onset Wilson's disease. *Gastroenterology*, **2007**, vol. 132, issue 4, p. 1294 – 1298.
- (30) Ferenci P, Czlonkowska A, Stremmel W, Houwen R, Rosenberg W, Schilsky M, Jansen P, Moradpour D, Gitlin J. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of Hepatology*, **2012**, vol. 56, issue 3, p. 671 – 685.
- (31) Ferenci P, Roberts EA. Defining Wilson disease phenotypes: From the patient to the bench and back again. *Gastroenterology*, **2012**, vol. 142, issue 4, p. 692 – 696.
- (32) Ferenci P, Steindl-Munda P, Vogel W, Jessner W, Gschwantler M, Stauber R, Datz C, Hackl F, Wrba F, Bauer P, Lorenz O. Diagnostic value of quantitative hepatic copper concentration in patients with Wilson's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **2005**, vol. 3, issue 8, p. 811 – 818.
- (33) Forbes JR, Cox DW. Functional characterization of missense mutations in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant? *The American Journal of Human Genetics*, **1998**, vol. 63, issue 6, p. 1663 – 1674.

- (34) Furukawa Y, Torres AS, O'Halloran TV. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *The EMBO Journal*, **2004**, vol. 23, issue 14, p. 2872 – 2881.
- (35) Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology*, **2014**, vol. 88, issue 11, p. 1929 – 1938.
- (36) Goto T, Meno T. Tablets containing anion-exchange resin. US 6.022.533, **2000**.
- (37) Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*, **2009**, vol. 35, issue 1, p. 32 – 46.
- (38) Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, **1995**, vol. 41, issue 12B, p. 1819 – 1828S.
- (39) Hamza I, Faisst A, Prohaska J, Chen J, Gruss P, Gitlin JD. The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2001**, vol. 98, issue 12, p. 6848 – 6852.
- (40) Harris ED. Copper as a cofactor and regulator of copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of Nutrition*, **1992**, vol. 122, issue 3, p. 636 – 640S.
- (41) Harris ED. Copper transport and metabolism: An update. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, **1998**, vol. 11, issue 2 – 3, p. 163 – 176.
- (42) Harris E. The transport of copper. In *Essential and toxic trace elements in human health and disease: an update*. New York: Wiley-Liss, **1993**, p. 163 – 179.
- (43) Hillstrom RJ, Yacopin-Ammons AK, Lynch SM. Vitamin C inhibits lipid oxidation in human HDL. *Journal of Nutrition*, **2003**, vol. 133, issue 10, p. 3047 – 3051.
- (44) Horak D, Benes MJ, Gumargalieva K, Zaikov G. A novel highly copper(II)-selective chelating ion exchanger based on poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) beads modified with aspartic acid derivative. *Journal of Applied Polymer Science*, **2001**, vol. 80, issue 7, p. 913 – 916.
- (45) Huster D. Wilson disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **2010**, vol. 24, issue 5, p. 531 – 539.
- (46) Huster D, Kuhne A, Bhattacharjee A, Raines L, Jantsch V, Noe J, Schirrmeister W, Sommerer I, Sabri O, Berr F, Mossner J, Steiger B, Caca K, Lutsenko S. Diverse



- functional properties of Wilson disease ATP7B variants. *Gastroenterology*, **2012**, vol. 142, issue 4, p. 947 – 956.
- (47) Chouyyok W, Shin Y, Davidson J, Samuels WD, Lafemina NH, Rutledge RD, Fryxell GE, Sangvanich T, Yantasee W. Selective removal of copper(II) from natural waters by nanoporous sorbents functionalized with chelating diamines. *Environmental Science & Technology*, **2010**, vol. 44, issue 16, p. 6390 – 6395.
- (48) Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, **2011**, vol. 283, issue 2 – 3, p. 65 – 87.
- (49) Karunajeewa H, Wall A, Metz J, Grigg A. Cytopenias secondary to copper depletion complicating ammonium tetrathiomolybdate therapy for Wilson's disease. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, **1998**, vol. 28, issue 2, p. 215 – 216.
- (50) Kenney SM, Cox DW. Sequence variation database for Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Human Mutation*, **2007**, vol. 28, issue 12, p. 1171 – 1177.
- (51) Khanna A, Jain A, Eghtesad B, Rakela J. Liver transplantation for metabolic liver diseases. *Surgical Clinics of North America*, **1999**, vol. 79, issue 1, p. 153 – 162.
- (52) Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology*, **2008**, vol. 4, issue 3, p. 176 – 185.
- (53) Kitzberger R, Madl C, Ferenci P. Wilson disease. *Metabolic Brain Disease*, **2005**, vol. 20, issue 4, p. 295 – 302.
- (54) La Fontaine S, Mercer JF. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2007**, vol. 463, issue 2, p. 149 – 167.
- (55) Lewis KO. Nature and excretion of biliary copper in man. *Clinical Science*, **1973**, vol. 45, issue 1, p. 133 – 133.
- (56) Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1996**, vol. 63, issue 5, p. 797 – 811.
- (57) Lindeque JZ, Levanets O, Louw R, van der Westhuizen FH. The involvement of metallothioneins in mitochondrial function and disease. *Current Protein and Peptide Science*, **2010**, vol. 11, issue 4, p. 292 – 309.
- (58) Lindow CW, Elvehjem CA, Peterson WH. The copper content of plant and animal foods. *Journal of Biological Chemistry*, **1929**, vol. 82, p. 465 – 471.

- (59) Liochev SI, Fridovich I. The Habber-Weiss cycle – 70 years later: an alternative view. *Redox Report*, **2002**, vol. 7, issue 1, p. 55 – 57.
- (60) Litwin T, Gromadzka G, Czlonkowska A. Gender differences in Wilson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, **2012**, vol. 312, issue 1 – 2, p. 31 – 35.
- (61) Lorincz MT. Neurologic Wilson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2010**, vol. 1184, p. 173 – 187.
- (62) Ludwig J, Moyer TP, Rakela J. The liver biopsy diagnosis of Wilson's disease. Methods in pathology. *American Journal of Clinical Pathology*, **1994**, vol. 102, issue 4, p. 443 – 446.
- (63) Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dimitriev OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiological Reviews*, **2007**, vol. 87, issue 3, p. 1011 – 1046.
- (64) Lutsenko S, LeShane ES, Shinde U. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2007**, vol. 463, issue 2, p. 134 – 148.
- (65) Macy JM, Farrand JR, Montgomery L. Cellulolytic and non-cellulolytic bacteria in rat gastrointestinal tracts. *Applied and Environmental Microbiology*, **1982**, vol. 44, issue 6, p. 1428 – 1434.
- (66) Machado A, Chien HF, Deguti MM, Cancado E, Azevedo RS, Scaff M, Barbosa ER. Neurological manifestations in Wilson's disease: Report of 119 cases. *Movement Disorders*, **2006**, vol. 21, issue 12, p. 2192 – 2196.
- (67) Mason KE. Conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. *Journal of Nutrition*, **1979**, vol. 109, issue 11, p. 1979 – 2066.
- (68) Mattiasson B, Kumar A, Galeaev IY. *Macroporous Polymers: Production Properties and Biotechnological/Biomedical Applications*. **2009**. Oxford, UK: CRC Press, Taylor and Francis Inc. 525 p. ISBN 978-1-4200-8461-0.
- (69) Mattie MD, Freedman JH. Copper-inducible transcription: regulation by metal- and oxidative stress-responsive pathways. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, **2004**, vol. 286, issue 2, p. C293 – C301.
- (70) Mattie MD, McElwee MK, Freedman JH. Mechanism of copper-activated transcription: activation of AP-1, and the JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Journal of Molecular Biology*, **2008**, vol. 383, issue 5, p. 1008 – 1018.

- (71) McConnell EL, Murdan S, Basit AW. An investigation into the digestion of chitosan (noncrosslinked and crosslinked) by human colonic bacteria. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2008**, vol. 97, issue 9, p. 3820 – 3829.
- (72) Medici V, Trevisan CP, Bigotto MA, D'Inca R, Martines D, Dal Pont E, Sturniolo GC. Adverse reaction after tetrathiomolybdate treatment for Wilson's disease: A case report. *Movement Disorders*, **2006**, vol. 21, issue 11, p. 2030 – 2032.
- (73) Moore JC. Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers. *Journal of Polymer Sciences*, **1964**, part A-2, p. 835 – 843.
- (74) Moriwaki H, Osborne MR, Phillips DH. Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction. *Toxicology in Vitro*, **2008**, vol. 22, issue 1, p. 36 – 44.
- (75) Nelson N. Metal ion transporters and homeostasis. *The EMBO Journal*, **1999**, vol. 18, issue 16, p. 4361 – 4371.
- (76) Nakada SY, Brown MR, Rabinowitz R. Wilson's disease presenting as symptomatic urolithiasis: a case report and review of the literature. *The Journal of Urology*, **1994**, vol. 152, issue 3, p. 978 – 979.
- (77) Oder W, Grimm G, Kollegger H, Ferenci P, Schneider B, Deecke L. Neurological and neuropsychiatric spectrum of Wilson's disease: a prospective study of 45 cases. *Journal of Neurology*, **1991**, vol. 238, issue 5, p. 281 – 287.
- (78) Oder W, Prayer L, Grimm G, Spatt J, Ferenci P, Kollegger H, Schneider B, Gangl A, Deecke L. Wilson's disease: Evidence of subgroups derived from clinical findings and brain lesions. *Neurology*, **1993**, vol. 43, issue 1, p. 120 – 124.
- (79) O'Neil EJ, Smith BD. Anion recognition using dimetallic coordination complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, **2006**, vol. 250, issue 23 – 24, p. 3068 – 3080.
- (80) Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, De Carvalho M, Mesri EA, Robins DM, Dick RD, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Research*, **2002**, vol. 62, issue 17, p. 4854 – 4859.
- (81) Pennington JAT, Schoen SA, Salmon GD, Young B, Johnson RD, Marts RW. Composition of core foods in the U.S. food supply, 1982 – 1991: III. Copper,

- manganese, selenium, and iodine. *Journal of Food Composition and Analysis*, **1995**, vol. 8, issue 2, p. 171 – 217.
- (82) Perret D. The metabolism and pharmacology of D-penicillamine in man. *Journal of Rheumatology*, **1981**, vol. 8, suppl. 7, p. 41 – 50.
- (83) Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, Ross BM, Kaplan JH, Gilliam TC. Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Human Molecular Genetics*, **1994**, vol. 3, issue 9, p. 1647 – 1656.
- (84) Pfeiffenberger J, Mogler C, Gotthardt DN, Schulze-Bergkamen H, Litwin T, Reuner U, Hefter H, Huster D, Schemmer P, Czlonkowska A, Schirmacher P, Stremmel W, Cassiman D, Weiss KH. Hepatobiliary malignancies in Wilson disease. *Liver International*, **2015**, vol. 35, issue 5, p. 1615 – 1622.
- (85) Pfeiffer RF. Wilson's disease. *Seminars in Neurology*, **2007**, vol. 27, issue 2, p. 123 – 132.
- (86) Prohaska JR. Copper. In *Presented knowledge in nutrition*. Washington, DC: International Life Sciences Institute, **2006**, p. 458 – 470.
- (87) Prohaska JR. Role of copper transporters in copper homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **2008**, vol. 88, issue 3, p. 826S – 829S.
- (88) Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry*, **2007**, vol. 79, issue 12, p. 2325 – 2338.
- (89) Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Journal of Clinical Interventions in Aging*, **2007**, vol. 2, issue 2, p. 219 – 236.
- (90) Ranjan A, Kalita J, Kumar S, Bhoi SK, Misra UK. A study of MRI changes in Wilson disease and its correlation with clinical features and outcome. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, **2015**, vol. 138, p. 31 – 36.
- (91) Riha M, Karlickova J, Filipicky T, Macakova K, Hrdina R, Mladenka P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2013**, vol. 123, p. 80 – 87.
- (92) Robert C, Bernalier-Donadille A. The cellulolytic microflora of the human colon: evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. *FEMS Microbiology Ecology*, **2003**, vol. 46, issue 1, p. 81 – 89.

- (93) Roberts RA, Smith RA, Safe S, Szabo C, Tjalkens RB, Robertson FM. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*, **2010**, vol. 276, issue 2, p. 85 – 94.
- (94) Saito T. Presenting symptoms and natural history of Wilson disease. *European Journal of Pediatrics*, **1987**, vol. 146, issue 3, p. 261 – 265.
- (95) Saito T, Watanabe K, Sahara M, Mochizuki R, Edo K, Ohyama Y. Triethylene-tetramine (trien) therapy for Wilson's disease. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **1991**, vol. 164, issue 1, p. 29 – 35.
- (96) Shah D. Wilson's disease: Hepatic manifestations. *Disease-A-Month*, **2014**, vol. 60, issue 9, p. 465 – 474.
- (97) Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, Parano E, Pavone L, Evgrafov O, Ivanova Smolenskaya IA, Anneren G, Westermark K, Urrutia FH, Penschaszadeh GK, Sternlieb I, Schienberg IH, Gilliam TC, Petrukhin K. Identification and analysis of mutations in Wilson disease gene (ATP7B): Population, frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analysis. *American Journal of Human Genetics*, **1997**, vol. 61, issue 2, p. 317 – 328.
- (98) Shike M. Copper in parenteral nutrition. *Gastroenterology*, **2009**, vol. 137, issue 5, p. 13 – 17.
- (99) Shiono Y, Wakusawa S, Hayashi H, Takikawa T, Yano M, Okada T, Mabuchi H, Kono S, Miyajima H. Iron accumulation in the liver of male patients with Wilson's disease. *American Journal of Gastroenterology*, **2001**, vol. 96, issue 11, p. 3147 – 3151.
- (100) Scheinberg IH, Sternlieb I. Wilson disease. In *Major problems in internal medicine*. Philadelphia: Saunders, **1984**, p. 171.
- (101) Schilsky ML. Treatment of Wilson's disease: what are the relative roles of penicillamine, trientine, and zinc supplementation? *Current Gastroenterology Reports*, **2001**, vol. 3, issue 1, p. 54 – 59.
- (102) Schilsky ML, Scheinberg IH, Sternlieb I. Liver transplantation for Wilson's disease: indications and outcome. *Hepatology*, **1994**, vol. 19, issue 3, p. 583 – 587.
- (103) Sinha S, Taly AB, Ravishankar S, Prashanth LK, Venugopal KS, Arunodaya GR, Vasudev MK, Swamy HS. Wilson's disease: cranial MRI observations and clinical correlation. *Neuroradiology*, **2006**, vol. 48, issue 9, p. 613 – 621.

- (104) Speisky H, Gomez M, Burgos-Bravo F, Lopez-Alarcon C, Jullian C, Olea-Azar C, Aliaga ME. Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes; redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, vol. 17, issue 5, p. 1803 – 1810.
- (105) Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, Grimm G, Pabinger I, Madl C, MaierDobersberger T, Herneth A, Dragosics B, Meryn S, Knoflach P, Granditsch G, Gangl A. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: A diagnostic challenge. *Gastroenterology*, **1997**, vol. 113, issue 1, p. 212 – 218.
- (106) Strohmeyer FW, Ishak KG. Histology of the liver in Wilson's disease: a study of 34 cases. *American Journal of Clinical Pathology*, **1980**, vol. 73, issue 1, p. 12 – 24.
- (107) Svetel M, Potrebic A, Pekmezovic T, Tomic A, Kresojevic N, Jesic R, Dragasevic N, Kostic VS. Neuropsychiatric aspects of treated Wilson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, **2009**, vol. 15, issue 10, p. 772 – 775.
- (108) Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM, Devoto M, Peppercorn J, Bush AI, Sternlieb I, Pirastu M, Gusella JF, Evgrafov O, Penchaszadeh GK, Honig B, Edelman IS, Soares MB, Scheinberg IH, Gilliam TC. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genetics*, **1993**, vol. 5, issue 4, p. 344 – 350.
- (109) Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genetics*, **1995**, vol. 9, issue 2, p. 210 – 217.
- (110) Ullah I, Wiley GJ. Cholesterol-lowering tablets. US 6.066.336, **2000**.
- (111) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2007**, vol. 39, issue 1, p. 44 – 84.
- (112) Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **2006**, vol.160, issue 1, p. 1 – 40.
- (113) van den Berghe PVE, Klomp LWJ. New developments in the regulation of intestinal copper absorption. *Nutrition Reviews*, **2009**, vol. 67, issue 11, p. 658 – 672.

- (114) van Wassenauer-van Hall HN, van den Heuvel AG, Algra A, Hoogenraad TU, Mali WP. Wilson disease: Findings at MR imaging and CT of the brain with clinical correlation. *Radiology*, **1996**, vol. 198, issue 2, p. 531 – 536.
- (115) Walshe JM. Copper chelation in patients with Wilson's disease. A comparison of penicillamine and triethylene tetramine dihydrochloride. *The Quarterly Journal of Medicine*, **1973**, vol. 42, p. 441 – 452.
- (116) Walshe JM. The Kayser-Fleischer ring. *British Journal of Hospital Medicine*, **2014**, vol. 75, issue 3, p. C38 – C39.
- (117) Walshe JM. The liver in Wilson's disease. In *Diseases of the Liver*. 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lippincott, **1987**, p. 1037 – 1050.
- (118) Walshe JM. Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride. *The Lancet*, **1982**, vol. 1, issue 8273, p. 643 – 647.
- (119) Walshe JM. Wilson's disease presenting with features of hepatic dysfunction: a clinical analysis of eighty-seven patients. *The Quarterly Journal of Medicine*, **1989**, vol. 70, issue 263, p. 253 – 263.
- (120) Walshe JM, Dixon AK. Dangers of non-compliance in Wilson's disease. *The Lancet*, **1986**, vol. 1, issue 8485, p. 845 – 847.
- (121) Walshe JM, Munro NA. Zinc-induced deterioration in Wilson's disease aborted by treatment with penicillamine, dimercaprol, and a novel zero copper diet. *Archives of Neurology*, **1995**, vol. 52, issue 1, p. 10 – 11.
- (122) Walshe JM, Waldenstrom E, Sams V, Nordlinder H, Westermark K. Abdominal malignancies in patients with Wilson's disease. *The Quarterly Journal of Medicine*, **2003**, vol. 96, issue 9, p. 657 – 662.
- (123) Walshe JM, Yealland M. Chelation treatment of neurological Wilson's disease. *The Quarterly Journal of Medicine*, **1993**, vol. 86, issue 3, p. 197 – 204.
- (124) Walshe JM, Yealland M. Wilson's disease: the problem of delayed diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **1992**, vol. 55, issue 8, p. 692 – 696.
- (125) Wang HH, Zhou ZH, Hu JY, Han YZ, Wang X, Cheng N, Wu YF, Yang RM. Renal impairment in different phenotypes of Wilson disease. *Neurological Sciences*, **2015**, vol. 36, issue 11, p. 2111 – 2115.

- (126) Warshawsky A, Kalir R, Patchornik A. Metal complexing polymers. US 4.317.887, **1982**.
- (127) Weber T, Solioz M. Evaluation of chocolate as a source of dietary copper. *European Food Research and Technology*, **2014**, vol. 238, issue 6, p. 1063 – 1066.
- (128) Weiss KH, Gotthardt DN, Klemm D, Merle U, Ferenci-Foerster D, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Zinc monotherapy is not as effective as chelating agents in treatment of Wilson disease. *Gastroenterology*, **2011**, vol. 140, issue 4, p. 1189e1 – 1198e1.
- (129) Wilson DC, Phillips MJ, Cox DW, Roberts EA. Severe hepatic Wilson's disease in preschool-aged children. *Journal of Pediatrics*, **2000**, vol. 137, issue 5, p. 719 – 722.
- (130) Witting PK, Bowry VW, Stocker R. Inverse deuterium kinetic isotope effect for peroxidation in human low-density lipoprotein (LDL): a simple test for tocopherol-mediated peroxidation of LDL lipids. *FEBS Letters*, **1995**, vol. 375, issue 1 – 2, p. 45 – 49.
- (131) Wu ZY, Wang N, Lin MT, Fang L, Murong SX, Yu L. Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in Chinese patients with Wilson disease. *Archives of Neurology*, **2001**, vol. 58, issue 6, p. 971 – 976.
- (132) Yuzbasiyan-Gurkan V, Grider A, Nostrant T, Cousins RJ, Brewer GJ. Treatment of Wilson's disease with zinc. X. Intestinal methalothionein induction. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **1992**, vol. 120, issue 3, p. 380 – 386.
- (133) Zhu M, Dong Y, Wang N, Zhi-Ying W. Defective roles of ATP7B missense mutations in cellular copper tolerance and copper excretion. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **2015**, vol. 67, p. 31 – 36.
- (134) Zimbrea PC, Schilsky ML. Psychiatric aspects of Wilson disease: a review. *General Hospital Psychiatry*, **2014**, vol. 36, issue 1, p. 53 – 62.



## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Nejčastější projevy a příznaky Wilsonovy choroby.....	21
Tabulka 2: Selektivita adsorpce pro měďnaté ionty za přítomnosti zinečnatých iontů.....	53
Tabulka 3: Průměrná váha zkonzumovaných pelet za den v gramech za celou skupinu.....	71

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Transport mědi přes enterocyt střeva.....	8
Obrázek 2: Transport mědi přes jaterní buňku.....	10
Obrázek 3: Kayser-Fleischerův prstenec.....	20
Obrázek 4: MRI nálezy u pacientů s Wilsonovou chorobou majících neurologické symptomy.....	24
Obrázek 5: Předpokládané vyloučení polymerních mikročastic spolu s navázanou mědí ze zažívacího traktu po perorálním podání.....	31
Obrázek 6: Chemická struktura jednotlivých monomerů GMA, EDMA a polymeru poly(GMA-co-EDMA).....	34
Obrázek 7: Mikroskopický snímek polymerních mikročastic poly(GMA-co-EDMA).....	35
Obrázek 8: Struktura jednotlivých polymerních komplexů poly(GMA-co-EDMA) s navázanými ligandy DPA, TTA a 8-HQ (P-DPA, P-TTA a P-8-HQ).....	36
Obrázek 9: Struktura biopolymerních mikročastic celulózy a chitosanu s navázaným 8-hydroxychinolinem (CEL-8-HQ a CHIT-8-HQ).....	37
Obrázek 10: Biodistribuce $^{64}\text{CuCl}_2$ u NMRI myši v daných časových intervalech.....	59
Obrázek 11: Biodistribuce $^{64}\text{CuCl}_2$ s P-8-HQ u NMRI myši v daných časových intervalech.....	60
Obrázek 12: Biodistribuce $^{64}\text{CuCl}_2$ samotného a spolu s biopolymery v časovém bodu 2 hodiny od perorální aplikace.....	65
Obrázek 13: Biodistribuce $^{64}\text{CuCl}_2$ samotného a spolu s biopolymery v časovém bodu 8 hodin od perorální aplikace.....	66
Obrázek 14: Biodistribuce $^{64}\text{CuCl}_2$ samotného a spolu s biopolymery v časovém bodu 24 hodin od perorální aplikace.....	67

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Průběh adsorpce $\text{Cu}^{2+}$ iontů z vodního roztoku v určitých časových intervalech pro polymerní mikročástice P-DPA, P-TTA a P-8-HQ při $\text{pH} = 2$ .....	49
Graf 2: Průběh adsorpce $\text{Cu}^{2+}$ iontů z vodního roztoku v určitých časových intervalech pro polymerní mikročástice P-DPA, P-TTA a P-8-HQ při $\text{pH} = 4$ .....	50
Graf 3: Průběh desorpce $\text{Cu}^{2+}$ iontů z roztoku aminokyselin v určitých časových intervalech pro polymerní mikročástice P-DPA, P-TTA a P-8-HQ při $\text{pH} = 6,8$ .....	51
Graf 4: Biodistribuce radioaktivně značeného P-8-HQ ve vybraných orgánech v časových intervalech 2,5 hod, 8 hod a 24 hod od perorální aplikace.....	56
Graf 5: Biodistribuce $^{64}\text{CuCl}_2$ samotného a s biopolymery ve vybraných orgánech v časovém intervalu 8 hod od perorální aplikace.....	62
Graf 6: Biodistribuce $^{64}\text{CuCl}_2$ samotného a s biopolymery ve vybraných orgánech v časovém intervalu 24 hod od perorální aplikace.....	63
Graf 7: Vývoj hmotnosti laboratorních potkanů při dlouhodobém podávání polymerních mikročástic P-DPA, P-TTA a P-8-HQ.....	70
Graf 8: Obsah volné mědi v krvi laboratorních potkanů v pravidelných časových bodech během podávání jednotlivých polymerních mikročástic ve dvou různých dávkách.....	73
Graf 9: Obsah mědi v játrech, ledvinách a mozku laboratorních potkanů po 6 týdnech podávání polymerních mikročástic.....	75

## SEZNAM PUBLIKACÍ

1. Novel topical photodynamictherapy of prostate carcinoma using hydroxy-aluminum phthalocyanine entrapped in liposomes. Sutoris Karel, Rakusan Jan, Karaskova Marie, Mattova Jana, Benes Jiri, Nekvasil Milos, Jezek Petr, Zadinova Marie, Pouckova Pavla, Vetvicka David. *Anticancer Research*, 2013, vol. 33, issue 4, p. 1563 – 1568. IF 1,895.
2. Chelating polymeric particles intended for the therapy of Wilson's disease. Skodova Michaela, Kucka Jan, Vetric Miroslav, Skopal Jan, Walterova Zuzana, Sedlacek Ondrej, Stepanek Petr, Mattova Jana, Pouckova Pavla, Urbanek Petr, Hruby Martin. *Reactive & Functional Polymers*, 2013, vol. 73, issue 11, p. 1426 – 1431. IF 2,725.
3. Chelating polymeric beads as potential therapeutics for Wilson's disease. Mattova Jana, Pouckova Pavla, Kucka Jan, Skodova Michaela, Vetric Miroslav, Stepanek Petr, Urbanek Petr, Petrik Milos, Novy Zbynek, Hruby Martin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, vol. 62, p. 1 – 7. IF 3,773.
4. Multistage-targeted pH-responsive polymer conjugate of Auger electron emitter: Optimized design and in vivo activity. Sedlacek Ondrej, Kucka Jan, Mattova Jana, Parizek Martin, Studenovsky Martin, Zadinova Marie, Pouckova Pavla, Hruby Martin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, vol. 63, p. 216 – 225. IF 3,773.

## **PŘÍLOHY A – PUBLIKACE**

### **Příloha Ia: Novel photodynamic therapy of prostate carcinoma using hydroxy-aluminum phthalocyanine entrapped in liposomes**

Novel topical photodynamictherapy of prostate carcinoma using hydroxy-aluminum phthalocyanine entrapped in liposomes. Sutoris Karel, Rakusan Jan, Karaskova Marie, Mattova Jana, Benes Jiri, Nekvasil Milos, Jezek Petr, Zadinova Marie, Pouckova Pavla, Vetvicka David. *Anticancer Research*, 2013, vol. 33, issue 4, p. 1563 – 1568. IF 1,895.

# Novel Topical Photodynamic Therapy of Prostate Carcinoma Using Hydroxy-aluminum Phthalocyanine Entrapped in Liposomes

KAROL SUTORIS<sup>1,2</sup>, JAN RAKUSAN<sup>3</sup>, MARIE KARASKOVA<sup>3</sup>, JANA MATTOVA<sup>4</sup>, JIRI BENES<sup>4</sup>, MILOS NEKVASIL<sup>5</sup>, PETR JEZEK<sup>5</sup>, MARIE ZADINOVA<sup>4</sup>, PAVLA POUCKOVA<sup>4</sup> and DAVID VETVICKA<sup>4,6</sup>

<sup>1</sup>Charles University in Prague, Third Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic;

<sup>2</sup>Thomayer Hospital, Clinic of Surgery, Prague, Czech Republic;

<sup>3</sup>Centre for Organic Chemistry, Ltd., Rybitvi, Czech Republic;

<sup>4</sup>Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Institute of Biophysics and Informatics, Prague, Czech Republic;

<sup>5</sup>Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Physiology, Prague, Czech Republic;

<sup>6</sup>CancerTech, s.r.o., Prague, Czech Republic

**Abstract.** *Background:* Clinically-approved anticancer photodynamic therapy (PDT) is now extensively studied for various cancer diagnoses. We focused on the treatment efficacy of topical administration of hydroxy-aluminum phthalocyanine (AIOH-PC) entrapped in liposomes against *in vivo* models of prostate carcinomas. *Materials and Methods:* LNCaP and PC3 cells were subcutaneously injected into the right flank of athymic nude mice. Mice with grown tumours were used for *in vivo* efficacy studies. Firstly, we applied different doses of AIOH-PC to less aggressive LNCaP tumours to determine the effective dose. In later studies, we focused on more aggressive prostate tumours (PC3) using doses of liposomal-AIOH-PC gel formulation. Topical application of photosensitizers was followed by PDT irradiation (600-700 nm, 635 nm peak). Tumour growth was measured three times-a-week. *Results:* Comparison of PDT of aggressive PC3 and less aggressive LNCaP prostate carcinomas showed that both tumour types are sensitive and treatable by liposomal formulation of AIOH-PC. For LNCaP tumours the efficient dose (100% experimental animals cured,  $n=8/8$ ) was 4.5 mg/ml of AIOH-PC in the gel. Whereas, in the case of PC3 carcinomas, a dose of 4 mg/ml significantly postponed tumour growth, but no animals were cured ( $n=0/8$ ); a sufficient curative dose (100% mice cured,

$n=8/8$ ) was 6 mg/ml of AIOH-PC in the gel. *Conclusion:* Liposomal AIOH-PC gel has potential for effective PDT of prostate carcinomas.

The fact that despite progress in cancer research leading to the design of new generations of targeted drugs, only a relatively low number of new clinically approved drugs is available; this places an emphasis on other under-utilized therapeutic approaches. Photodynamic therapy (PDT) has been a clinically-accepted approach for cancer treatment for a long time, but is still clinically rather under-appreciated (1). It consists of three key components: a light source, photosensitizer and tissue oxygen (Figure 1). When the photosensitizer is exposed to light of specific wavelength, it shifts oxygen into an excited state. As it returns into the former unexcited state, the released energy is utilized for production of singlet oxygen, which in turn directly mediates a cytotoxic effect (2). The mechanism of tumour destruction lies mainly in apoptotic or necrotic cell death pathways; an additional described mode of action is direct damage of tumour blood vasculature (1, 3). Moreover, it has been reported that PDT can induce a host immune reaction against the tumour cells (4, 5).

A member of the family of classical photosensitizers, porfimer sodium, received Food and Drugs Administration (FDA) approval as early as 1993 under the name Photofrin II (Axcan Pharma, Montreal, Canada) (6). Systemically administered Photofrin II as a treatment for non-dermatological malignancies has poor specificity for neoplastic tissues, moreover, it also requires a long interval between administration and consequent irradiation (48-72 h) (7). Additionally, skin photosensitivity after systemic administration is the major drawback of Photofrin II application (6). Other intravenously-

*Correspondence to:* Karol Sutoris, MD, Clinic of Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and Thomayer Hospital, Videnska 800, Prague 4 – Krc, 14059, Czech Republic. Tel: +420 734864238, Fax: +420 261082620, e-mail: sutoris@gmail.com

*Key Words:* Photodynamic therapy, phthalocyanine, liposomal photosensitizer.

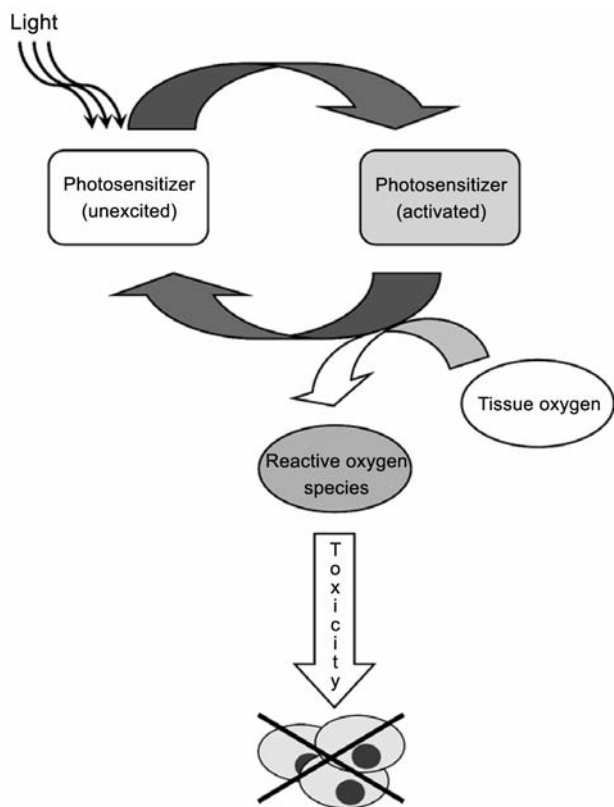


Figure 1. The irradiated photosensitizer assumes its activated form. Returning to the unexcited form is accompanied by energy release, which can be transferred to tissue oxygen. This leads to generation of reactive oxygen species (ROS), such as free radicals and singlet oxygen, which then cause toxicity. Adapted from Dolmans et al. (2).

administered photosensitizers also face this problem (8, 9). With topical administration, this obstacle can be overcome; the clinically-approved photosensitizer methylester of  $\delta$ -aminolevulinic acid (Metvix; Galderma & PhotoCure ASA, Inc., Oslo, Norway) serves as a successful example (10).

New photosensitizers aim to shorten the interval between administration and PDT even more. This would bring better comfort to patients and hopefully enable PDT to be used more in clinical practice (7). Another approach within the family of new-generation photosensitizers is utilization of longer wavelengths for their activation. Due to better tissue penetration for light with longer wavelengths, this enables for deeper tumour treatment opportunities (11). Different phthalocyanines are being studied as candidates from this new generation of photosensitizers (12-14). In accordance with the demand for long wavelength utilization, they do absorb in the red spectrum ( $\sim 670$  nm) (15), and additionally, they have a high extinction coefficient (over 100,000/M/cm) together with a high coefficient of singlet oxygen production (16). Over time, metal-conjugated and metal-free

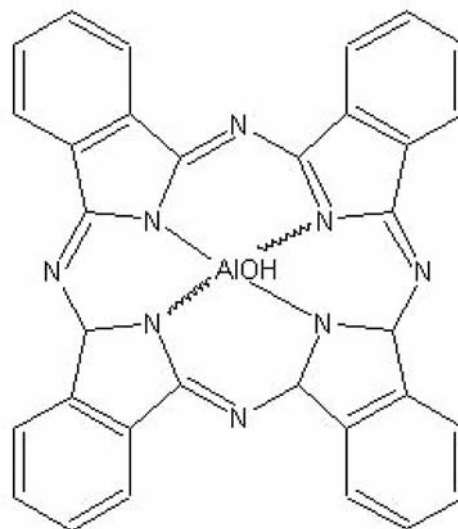


Figure 2. Chemical structure of tested photosensitizer: hydroxy-aluminum phthalocyanine.

phthalocyanines have been studied and the metal-conjugated ones showed better sensitizing properties (16). Among these phthalocyanines, due to its strong photodynamic activity (7) and simple synthesis, hydroxy-aluminum phthalocyanine (AIOH-PC) has emerged as a potential candidate for utilization in PDT (Figure 2).

We recently showed that a liposomal formulation of AIOH-PC is suitable for efficient treatment of mammary carcinoma (17). In this study, we tested the potential of PDT with AIOH-PC as a photosensitizer against prostate carcinomas.

## Materials and Methods

**Preparation of gel containing phthalocyanine liposomes.** The detailed preparation of AIOH-PC-containing liposomes is a patented procedure (18). Briefly, sterile lecithin solution of concentration 1-40 mg/ml underwent microfluidization, using a semi-industrial microfluidizer (M-110L; Microfluidics Inc., Newton, MA, USA), to produce particles smaller than 1  $\mu$ m. Lyophilized AIOH-PC powder was added to the suspension, and this mixture underwent further microfluidization in a smaller chamber leading to the formation of liposomes of size under 500 nm. Such preparation leads to the production of organic solvent-free liposomes. Final liposomes containing AIOH-PC were then mixed with a translucent gel (Gel 2, clear pharmaceutical magistral gel based on 4% carboxymethylcellulose; Pharmgest, Ltd., Pribram, Czech Republic) at a 1:1 ratio by volume (ml/ml).

**Experimental cell line.** Human prostate carcinoma cell lines LNCaP and PC3 were purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK; distributed by Sigma-Aldrich, Ltd., Prague, Czech Republic). Before application, cells had been cultivated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2% penicillin/streptomycin, 1.25% L-glutamine, and 1% sodium pyruvate.

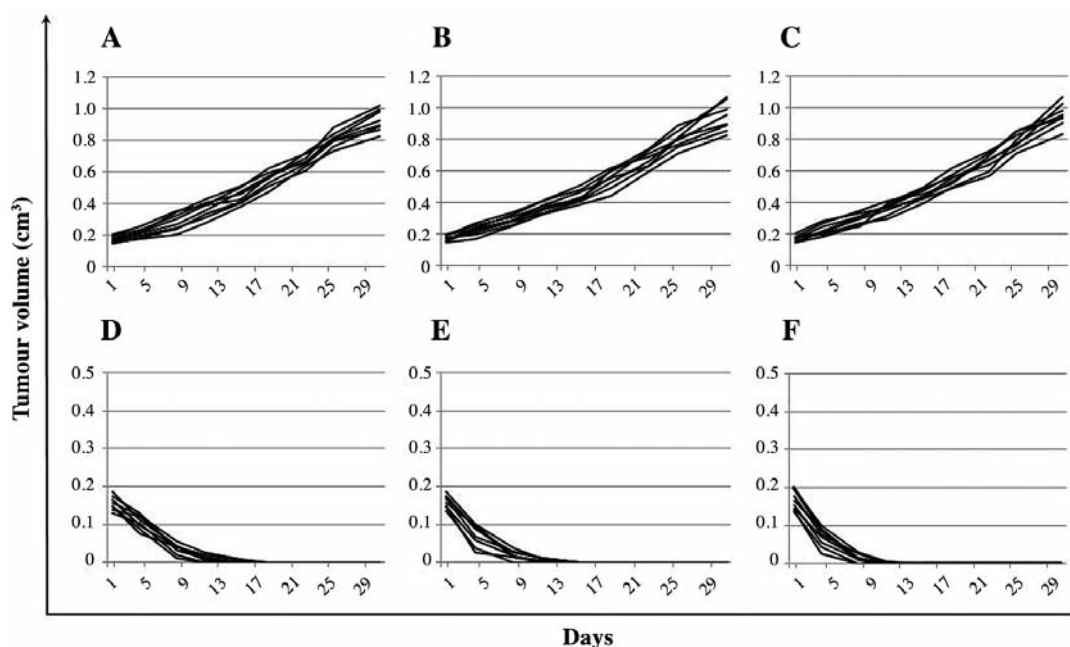


Figure 3. Antitumour efficacy of liposomal (AIOH-PC) gel against LNCaP xenografts: A: Untreated control group; B: control group treated with liposomal AIOH-PC gel without subsequent irradiation; C: irradiated control group without treatment with photosensitizer; D: group treated with 4.5 mg/ml liposomal AIOH-PC gel followed by irradiation; E: group treated with 9 mg/ml liposomal AIOH-PC gel followed by irradiation; F: group treated with 18 mg/ml liposomal AIOH-PC gel followed by irradiation. Number of experimental animals in each group was 8 ( $n=8$ ). These results are representative of three independent experiments,  $p<0.05$ .

*In vivo* efficacy of liposomal phthalocyanine in gel on LNCaP tumours. All animal experiments depicted here after were performed in accordance with the Act on Experimental Work with Animals (Public Notice of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic No. 246/1992, No. 311/1997, No. 207/2004; Decree of the Ministry of the Environment of the Czech Republic No. 117/1987; and Act of the Czech National Assembly No. 149/2004) of the Czech Republic, which is fully-compatible with the corresponding European Union directives.

Harvested LNCaP cells were administered subcutaneously,  $1 \times 10^6$  cells as a mixture with BD Matrigel™ (I.T.A.-Intertact, Ltd., Prague, Czech Republic) into the abdominal right flank of athymic *nu/nu* mice (obtained from AnLab, Ltd. and Charles River Laboratories International, Inc., Prague, Czech Republic). When the tumours had reached a size of about 6 mm in diameter, mice were divided randomly into groups ( $n=8$ ). Control groups were as follows: a) group without any compound and without irradiation; b) group with irradiation, but without any compound; and c) group with AIOH-PC gel (highest dose), but without irradiation. The experimental groups were treated with irradiation gels at three different concentrations of AIOH-PC (4.5, 9, and 18 mg/ml of AIOH-PC). For treated groups, each gel was applied topically to the tumour (0.2 ml per tumour). Irradiation took place 10 min [according to (7)] after application of gel using a xenon lamp (ONL 051; Preciosa Crytur, Trutnov, Czech Republic) at 0.97 W, with a total energy of  $100 \text{ J/cm}^2$  from a distance of 1 cm behind the transmission filter. In all experimental cases, the duration of irradiation was precisely 8 min. Tumour growth was recorder twice-a-week and recorded data were statistically analysed using one-tailed *t*-test.

*In vivo* efficacy of liposomal phthalocyanine in gel on PC3 tumours. Growing PC3 tumours in athymic mice were assessed as described for LNCaP line above. Similarly, mice were randomly divided into groups ( $n=8$ ) and gel application was followed by irradiation 10 min after application (irradiation time was precisely 8 min). We tested two different treatment schemes consisting of 4.5, 9, and 18 mg/ml (data not shown) and 2, 4 and 6 mg/ml AIOH-PC concentrations. Control groups were as follows: a) group without any compound and without irradiation; b) group with irradiation, but without any compound; and c) group with AIOH-PC gel (highest dose), but without irradiation. All recorded data were statistically analysed using one-tailed *t*-test.

## Results

*In vivo* efficacy of liposomal phthalocyanine in gel on LNCaP tumours. Neither irradiation itself nor applied photosensitizer, had any significant effect on tumour growth (Figure 3A-C).

Three different AIOH-PC gel preparations were tested in order to determine the efficient concentration of photosensitizer for the treatment of a less aggressive prostate carcinoma model with low metastatic potential (LNCaP tumours). Treatment with gels containing liposomal AIOH-PC at concentrations of 4.5, 9 and 18 mg/ml led to shrinkage of tumours immediately after the irradiation (Figure 3D-F). Within a 15-day period, tumours decreased to an impalpable size, and as all treated



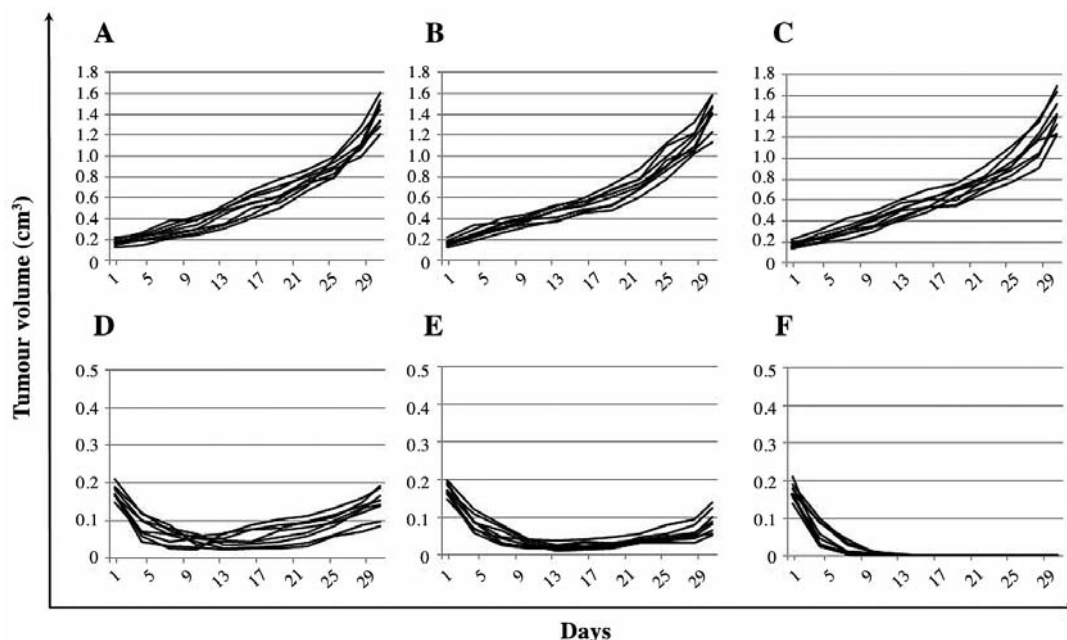


Figure 4. Antitumour efficiency of liposomal (AIOH-PC) gel against PC3 xenografts: A: Untreated control group; B: control group treated with liposomal AIOH-PC gel without subsequent irradiation; C: irradiated control group without treatment with photosensitizer; D: group treated with 2 mg/ml liposomal AIOH-PC gel followed by irradiation; E: group treated with 4 mg/ml liposomal AIOH-PC gel followed by irradiation; F: group treated with 6 mg/ml liposomal AIOH-PC gel followed by irradiation. Number of experimental animals in each group was 8 ( $n=8$ ). These results are representative of three independent experiments,  $p<0.05$ .

experimental mice remained in this state up to the defined end dates, we considered those mice as cured.

The lowest tested dose of 4.5 mg/ml only slightly reduced the tumour volume when compared with the higher doses, in the first days after treatment (Figure 3D). However, the curative effect was delayed and this was statistically insignificant, while final destruction of the tumour mass occurred within the same time, as that with the other doses (9 and 18 mg/ml).

*In vivo* efficacy of liposomal phthalocyanine in gel on PC3 tumours. More aggressive PC3 tumours were treated with the same gels as previously described for LNCaP tumours (*i.e.* 4.5, 9 and 18 mg/ml). Doses of 9 and 18 mg/ml were sufficient for complete tumour eradication, whereas 4.5 mg/ml gel postponed tumour growth significantly [size of treated tumours was over 20 times smaller than controls at the endpoint of the experiment (data not shown)]. However, the growth was only delayed.

We wanted to determine the curative dose, so we tested three different gels with narrower concentration intervals (2, 4 and 6 mg/ml). The possible effect of the photosensitizer itself (without irradiation) and irradiation-alone on the growth of the PC3 tumours was also assessed. As shown in Figure 4A-C, single usage of either irradiation or AIOH-PC liposomes had no effect on PC3 tumour growth.

In accordance with previous tests (data not shown), neither 2 nor 4 mg/ml gels were efficient for total eradication of the tumour mass (Figure 4D and E). However, both doses showed significant prolongation of tumour growth, with postponed growth outburst. Furthermore, we saw a total obliteration of tumour mass after treatment with 6 mg/ml AIOH-PC gel (Figure 4F).

## Discussion

PDT has a potential utilization for many new cancer indications (19, 20). Modern fiber-optic systems together with improved endoscopy techniques can deliver light to almost any part of the body, therefore PDT is no longer limited to the field of superficial tumours (21). Additionally, new-generation photosensitizers have been developed to utilize long wavelength light activation (*e.g.* porphyrins ~630 nm; phthalocyanines ~670 nm; texafirins ~734 nm; bacteriochlorins ~740 nm). Easier tissue penetration of light with longer wavelengths compared to light with shorter wavelengths opens the door for usage of topically-administered PDT not restricted to superficial tumours, as the biological response can be documented at two-to three-times greater depths.

Moreover, the topical administration of photosensitizer brings site benefits compared to systemic administration,

such as reducing systemic toxicity, by-passing first-pass elimination/metabolism in the liver, and also minimizing the induction of photosensitivity. A potential obstacle for the use of topical PDT may be the long interval between photosensitizer application and consequent irradiation, such as that for approved Metvix (4-6 h), which is inconvenient for patients (22). Our group described a liposomal system for phthalocyanine that overcomes this obstacle. We reported the unsurpassed drug-to-light time interval of 10 min sufficient for complete eradication of tumour in various models (7). Thus patients would not be forced to spend hours in hospitals waiting for irradiation of the treated area, which would be better for patients and less costly for both them and the health system.

The described “proof-of-principle” study shows the efficient treatment of two different prostate carcinomas using topically-administered liposomal AIOH-PC. It highlights the need for extensive further study of photosensitizer–microenvironment interactions. We plan to introduce fluorescently-labelled tumour cells (23-25) to be able to follow even few residual tumour cells. Recent data suggest that expression of fluorescent proteins enhances the efficiency of PDT (26). One can hypothesize, that due to utilization of far-red light activation of AIOH-PC, the treatment will not be affected by expression of green fluorescent protein.

## Conclusion

We have shown that liposomal AIOH-PC prepared by a patented microfluidization procedure is potentially suitable for PDT of prostate carcinomas. As previously reported for other tumour models, only a very short interval between gel application and irradiation (10 min) is required for the efficient treatment after topical administration of liposomal AIOH-PC. AIOH-PC showed promising efficacy against both aggressive PC3 tumours with high metastatic potential (100% cure at a dose of 6 mg/ml) and for less aggressive LNCaP tumours with low metastatic potential (100% cure at a dose of 4.5 mg/ml).

## Acknowledgements

This research was supported partly by the Czech Ministry of Industry and Commerce, grant No. 2A-1TP1/026, the Czech Ministry of Education, grant No. OE 09026 and the Czech Technological Agency, grant No. TA 01010781.

## References

- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC and Golab J: Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J Clin* 61(4): 250-281, 2011.
- Dolmans DE, Fukumura D and Jain RK: Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 380-387, 2003.
- Yoo JO and Ha KS: New insights into the mechanisms for photodynamic therapy – induced cancer cell death. *Int Rev Cell Mol Biol* 295: 139-174, 2012.
- Mroz P, Hashmi JT, Huang YY, Lange N and Hamblin MR: Stimulation of antitumor immunity by photodynamic therapy. *Expert Rev Clin Immunol* 7: 75-91, 2011.
- Kammerer R, Buchner A, Palluch P, Pongratz T, Oboukhovskij K, Beyer W, Johansson A, Stepp H, Baumgartner R and Zimmermann W: Induction of immune mediators in glioma and prostate cancer cells by non-lethal photodynamic therapy. *PLoS One* 6: e21834, 2011.
- Moriwaki SI, Misawa J, Yoshinari Y, Yamada I, Takigawa M and Tokura Y: Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin). *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17: 241-243, 2001.
- Nekvasil M, Zadinova M, Tahotna L, Zackova M, Pouckova P and Jezek P: Optimum modality for photodynamic therapy of tumors: Gels containing liposomes with hydrophobic photosensitizers. *Drug Dev Res* 5: 235-252, 2007.
- Bilgin MD, Elçin AE and Elçin YM: Topical use of liposomal copper palmitate formulation blocks porphyrin-induced photosensitivity in rats. *J Photochem Photobiol* 80: 107-114, 2005.
- Zeitouni NC, Oseroff AR and Shieh S: Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancers. Current review and update. *Mol Immunol* 39: 1133-1136, 2003.
- Togsverd-Bo K, Lerche CM, Poulsen T, Wulf HC and Haedersdal M: Photodynamic therapy with topical methyl- and hexylaminolevulinate for prophylaxis and treatment of UV-induced SCC in hairless mice. *Exp Dermatol* 19: e166-172, 2010.
- Baron ED, Malbasa CL, Santo-Domingo D, Fu P, Miller JD, Hanneman KK, Hsia AH, Oleinick NL, Colussi VC and Cooper KD: Silicon phthalocyanine (Pc 4) photodynamic therapy is a safe modality for cutaneous neoplasms: Results of a phase 1 clinical trial. *Lasers Surg Med* 42(10): 728-735, 2010.
- Kyriazi M, Alexandratou E, Yova D, Rallis M and Trebst T: Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: Pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 24: 87-94, 2008.
- Kaestner L, Cesson M, Kassab K, Christensen T, Edminson PD, Cook MJ, Chambrier I and Jori G: Zinc octa-n-alkyl phthalocyanines in photodynamic therapy: Photophysical properties, accumulation and apoptosis in cell cultures, studies in erythrocytes and topical application to Balb/c mice skin. *Photochem Photobiol Sci* 2: 660-667, 2003.
- Kalka K, Ahmad N, Criswell T, Boothman D and Mukhtar H: Up-regulation of clusterin during phthalocyanine 4 photodynamic therapy-mediated apoptosis of tumor cells and ablation of mouse skin tumors. *Cancer Res* 60: 5984-5987, 2000.
- Hopper C: Photodynamic therapy: A clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol* 1: 212-219, 2000.
- Castano AP, Deminova TN and Hamblin MR: Mechanisms in photodynamic therapy: Part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiag Photodyn Ther* 4: 279-293, 2004.

- 17 Sutoris K, Vetvicka D, Horak L, Benes J, Nekvasil M, Jezek P, Zadinova M and Pouckova P: Evaluation of topical photodynamic therapy of mammary carcinoma with an experimental gel containing liposomal hydroxyl-aluminum phthalocyanine. *Anticancer Res* 32(9): 3769-3774, 2012.
- 18 Czech Patent No. 298978, Liposomal phthalocyanine gel preparation for photodynamic therapy of tumors and its procedure of preparation. Czech Office of Industrial Ownership, Prague, 2008.
- 19 Allison RR, Sibata C, Downie GH and Cuenca RE: Photodynamic therapy of the intact breast. *Photodiag Photodyn Ther* 3: 139-146, 2006.
- 20 Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH and Sibata CH: The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol* 2: 53-71, 2006.
- 21 Roche JVE, Whitehurst C, Watt P, Moore JV and Krasner N: Photodynamic therapy (PDT) of gastrointestinal tumours: A new light delivery system. *Laser Med Sci* 13: 137-142, 1998.
- 22 Annemans L, Caekelbergh K, Roelandts R, Boonen H, Leys C, Nikkels AF, van Den Haute V, van Quickenborne L, Verhaeghe E and Leroy B: Real-life practice study of the clinical outcome and cost-effectiveness of photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in the management of actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol* 18: 539-546, 2008.
- 23 Tran Cao HS, Kaushal S, Snyder CS, Ongkeko WM, Hoffman RM and Bouvet M: Real-time imaging of tumor progression in a fluorescent orthotopic mouse model of thyroid cancer. *Anticancer Res* 30: 4415-4422, 2010.
- 24 Vetvicka D, Hovorka O, Kovar L and Rihova B: Establishment of imageable model of T-cell lymphoma growing in syngenic mice. *Anticancer Res* 29: 4513-4517, 2009.
- 25 Kimura H, Lee C, Hayashi K, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M and Hoffman RM: UV light killing efficacy of fluorescent protein-expressing cancer cells in vitro and *in vivo*. *J Cell Biochem* 110: 1439-1446, 2010.
- 26 Momiyama M, Suetsugu A, Kimura H, Kishimoto H, Aki R, Yamada A, Sakurada H, Chishima T, Bouvet M, Bulgakova NN, Endo I and Hoffman RM: Fluorescent proteins enhance UVC PDT of cancer cells. *Anticancer Res* 32: 4327-4330, 2012.

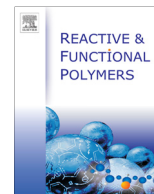
*Received January 17, 2013*

*Revised February 26, 2013*

*Accepted February 26, 2013*

**Příloha IIa: Chelating polymeric particles intended for the therapy of  
Wilson's disease**

Chelating polymeric particles intended for the therapy of Wilson's disease. Skodova Michaela, Kucka Jan, Vetric Miroslav, Skopal Jan, Walterova Zuzana, Sedlacek Ondrej, Stepanek Petr, Mattova Jana, Pouckova Pavla, Urbanek Petr, Hruby Martin. *Reactive & Functional Polymers*, 2013, vol. 73, issue 11, p. 1426 – 1431. IF 2,725.



## Chelating polymeric particles intended for the therapy of Wilson's disease



Michaela Škodová<sup>a</sup>, Jan Kučka<sup>a,b</sup>, Miroslav Vetrík<sup>a</sup>, Jan Skopal<sup>a</sup>, Zuzana Walterová<sup>a</sup>, Ondřej Sedláček<sup>a</sup>, Petr Štěpánek<sup>a</sup>, Jana Mattová<sup>c</sup>, Pavla Poučková<sup>c</sup>, Petr Urbánek<sup>c</sup>, Martin Hrubý<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Macromolecular Chemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. Heyrovského nám. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic

<sup>b</sup> Nuclear Physics Institute, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. Řež 130, 250 68 Řež, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Salmovská 1, 120 00 Prague 2, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 February 2013

Received in revised form 12 July 2013

Accepted 15 July 2013

Available online 24 July 2013

#### Keywords:

Wilson's disease  
Polymer beads  
Copper metabolism  
Selective sorbent  
Amines

### ABSTRACT

Wilson's disease is a genetic disorder that leads to a high accumulation of copper in multiple organs with subsequent toxic effects. In this paper, a gentle therapy to eliminate harmful copper concentrations in patients with Wilson's disease is proposed using an oral administration of insoluble polymeric sorbents containing selective chelating groups for copper(II). The sorbents contained triethylenetetramine, *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine, 8-hydroxyquinoline or 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid chelating groups bound to a methacrylate-based macroporous support. Nearly quantitative copper(II) uptake within minutes was achieved in buffers modeling the pH range present in the gastric environment (pH 2.0 and 4.0). The sorbents demonstrated chelating selectivity for copper(II) against zinc(II) with ratios of up to 1321. The sorbents demonstrated sufficient stability of the copper complexes against rechelation using studies in a model environment for the small intestine (the presence of chelating amino acids, pH 6.8).

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Wilson's disease is a genetically conditioned disorder of copper metabolism, leading to toxic damage of mainly the liver and brain [1,2]. The cause of the disease is a malfunction of ATPase 7B [3], with more than 400 mutations of the respective gene that have been described to date [4]. The average prevalence in the general population is 1:30,000 [1]. The malfunction of ATPase 7B significantly decreases the secretion of copper into the bile, the main pathway for the elimination of copper, leading to an accumulation of copper, mainly in the liver and the central nervous system. Increased concentrations of copper within tissues can lead to a number of symptoms, resulting in toxic oxidative stresses that can damage the liver, brain and parenchymal organs [1,2,4,5]. Untreated Wilson's disease is lethal, with the most serious complications arising from liver cirrhosis, portal hypertension and massive bleeding in the alimentary tract [1,6].

Current first line therapy is based on a decrease in the amounts of copper by an administration of low-molecular-weight copper(II) chelators (penicillamine, triethylenetetramine or tetrathiomolybdate) [1,4], leading to a decreased absorption of copper from food with a subsequent increase in biological elimination. As an adjunct therapy, high doses of zinc(II) salts are administered as these

ions competitively block copper uptake from the gastrointestinal tract [1].

Suitable forms of zinc are not always available worldwide. Current therapies also suffer from serious side effects, such as myelosuppression, lupus and penicillamine-associated myasthenia [5,7] as a consequence of the re-formation of a complex of essential elements after the gastrointestinal absorption of the chelating agent. Zinc therapy is typically accompanied with strong gastrointestinal adverse effects, with typical doses of zinc of up to 1200 mg/day [8], which is approximately one hundred-fold more than the daily intake of zinc (ca 8–15 mg) [9,10].

The average uptake of copper from food ranges from 0.6 to 1.6 mg per day. At the beginning of the therapy for Wilson's disease, a diet with low quantities of copper is often recommended (i.e., avoiding food with high copper content, such as liver, nuts or mushrooms) [1]. Considering the omnipresence of copper in food, a copper-less diet can be near impossible to fully obtain [11]. A significant amount of copper is eliminated through the alimentary tract followed by a subsequent re-uptake, representing higher amounts than the quantities obtained from food (ca 4.4–5.3 mg of copper is secreted daily, with 7% from saliva, 20% from gastric juices, 50% from bile, 18% from pancreatic juices and 5% from duodenal secretion) [11].

The oral administration of cholestyramine is used for the treatment of hypercholesterolemia (high blood levels of cholesterol). Cholestyramine is a strongly basic anion exchange resin based on

\* Corresponding author. Tel.: +420 296809230.

E-mail address: [mhruby@centrum.cz](mailto:mhruby@centrum.cz) (M. Hrubý).

a styrene–divinylbenzene matrix [12–16] that selectively adsorbs anionic bile acids to form an insoluble polymeric carrier in the intestine. An impaired recycling process of the bile acids can result in an increased metabolization of cholesterol to bile acids.

Various polymeric matrices for the selective sorption of copper ions in the presence of other heavy metal ions have been developed for wastewater treatment and hydrometallurgical industrial applications [17–25].

To the best of our knowledge, peroral administration of chelating polymers that are selective for copper ions has not been reported for Wilson's disease therapy. The aim of this study was to screen suitable sorbents [containing *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine (DPA), triethylenetetramine (TTA), 8-hydroxyquinoline (8HQ) or 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid (8HQ5S) chelating groups] for the rapid absorbance of copper in the gastric milieu without releasing these ions under rechelating challenge as experienced in the intestinal environment. The copper-chelating moieties to be attached to polymer beads were selected from known copper-chelating agents used in qualitative analytical chemistry. Effective sorbents should be able to adsorb copper released from food prior to uptake by the gastrointestinal tract and also exhibit an ability to scavenge copper secreted into the gastrointestinal tract, with an eventual elimination into the feces.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Poly(glycidyl methacrylate-*co*-ethylene dimethacrylate) (**1**, 60:40, particle size 20–40  $\mu\text{m}$ ) particles were synthesized by suspension copolymerization using a procedure described in the literature [26]. (CHN: 58.59% C, 7.32% H, 0.00% N.) All other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic) and were used as received.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Synthesis of the sorbents (see Scheme 1)

**2.2.1.1. Sorbent with DPA chelating groups (polymer 2).** Polymer **1** (16 mmol epoxide groups, 4.00 g) was reacted with *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine (24 mmol, 4.31 mL) in propan-2-ol (10 mL) at 75 °C for 16 h. Product **2** was subsequently washed in methanol and dried. Elemental analysis: 59.77% C, 6.87% H, 4.81% N (3.45 mmol/g N; 1.15 mmol/g of ligand). Capacity for  $\text{Cu}^{2+}$  (in excess 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  in 1 mol  $\text{L}^{-1}$  acetate buffer, pH 4.75) was 0.666 mmol/g.

**2.2.1.2. Sorbent with TTA chelating groups (polymer 3).** Polymer **1** (16 mmol epoxide moieties, 4.00 g) was reacted with triethylenetetramine (48 mmol, 4.69 mL) in methanol (16 mL) at room temperature for 6 days. Product **3** was washed with methanol and dried with air. Elemental analysis CHN: 54.49% C, 7.96% H, 4.49% N (3.20 mmol/g N; 0.80 mmol/g of ligand). Capacity for  $\text{Cu}^{2+}$  (in 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  excess of  $\text{CuSO}_4$  in 1 mol  $\text{L}^{-1}$  acetate buffer, pH 4.75) was 0.544 mmol/g.

**2.2.1.3. Sorbents with 8HQ groups (5) and 8HQ5S groups (6).** Sorbents **5** (containing 8HQ moieties) and **6** (containing 8HQ5S moieties) were synthesized via secondary amine intermediate **4** according to the literature [27]. Briefly, Polymer **1** (20 mmol epoxide moieties, 5.00 g) was immersed in 41% aqueous methylamine (20 mL) and held for 72 h at ambient temperature. The polymer was washed with water and methanol and dried with air. The yield was 5.05 g of polymer **4**. CHN elemental analysis: 52.80% C, 7.35% H, 3.51% N (2.51 mmol/g secondary amine).

Polymer **4** (2.00 g, 5.02 mmol secondary amino groups) was reacted with 8-hydroxyquinoline Q (1.90 g, 13 mmol, synthesis of polymer **5**) or 8HQ5S (2.93 g, 13 mmol, synthesis of polymer **6**) in the presence of formaldehyde (40% aqueous solution, 6.00 mL, 65 mmol) and anhydrous sodium sulfate (13.4 g, 94.3 mmol) in methanol (30 mL) at room temperature for 7 days. The polymer was successively washed with methanol, 1 mol  $\text{L}^{-1}$  aqueous hydrochloric acid, water, 0.5 mol  $\text{L}^{-1}$  ammonium acetate and water and dried with air. The yields were 2.23 g of polymer **5** and 1.85 g of polymer **6**. CHN elemental analysis: polymer **5**: 57.70% C, 7.35% H, 4.02% N; polymer **6**: 52.39% C, 7.67% H, 3.38% N, 1.15% S (0.359 mmol/g S or ligand).

The capacity for  $\text{Cu}^{2+}$  (in 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  excess of  $\text{CuSO}_4$  in 1 mol  $\text{L}^{-1}$  acetate buffer, pH 4.75) was measured to be 0.480 mmol/g (polymer **5**) and 0.287 mmol/g (polymer **6**).

#### 2.2.2. Ultra-trace copper concentration absorption test

The suspension of each sorbent (20 mg; in acetate buffer (1 mL, 1 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 4.0)) was mixed with aqueous radioactively labeled [ $^{64}\text{Cu}$ ]- $\text{CuCl}_2$  (8  $\mu\text{L}$ , activity  $A_0 = 525$  kBq, corresponding to  $5.75 \cdot 10^{-14}$  mol of copper) and shaken for 1 h at room temperature. The activity of the samples was measured using a Bqmetr 4 ionization chamber (Empos Ltd., Prague, Czech Republic). Each suspension was then centrifuged with one-half of the supernatant volume (504  $\mu\text{L}$ ) removed and measured for radioactivity ( $A$ ). The percentage of residual copper  $w_{\text{CuR}}$  in the solution was calculated according to the following equation:

$$w_{\text{CuR}} = 2A/A_0 * 100\% \quad (1)$$

The experimental error was less than 5% of the measured value for all samples (number of repetitions,  $n = 5$ ).

#### 2.2.3. The copper(II) adsorption study

Two buffers (pH 2.0–0.01 mol  $\text{L}^{-1}$  hydrochloric acid or pH 4.0–1 mol  $\text{L}^{-1}$  acetate buffer, 100 mL each) containing 5 mg copper as  $\text{CuSO}_4$  were combined and shaken (120 rotations per min, rpm) at room temperature (23 °C) with 500 mg of each sorbent sample. The samples (aa 10 mL) were collected at specific time points (0, 2, 5, 10, 20 and 60 min), filtered and the copper content determined in the filtrate by atomic absorption spectrometry (AAS). The experimental error was less than 5% of the measured value for all samples ( $n = 5$ ).

#### 2.2.4. The copper(II) desorption study (copper-chelating challenge)

Solutions with copper-chelating amino acids (93 mg of *L*-histidine, 133 mg of *L*-cysteine and 6.67 g of glycine, 200 mL, pH 6.8) were mixed with 500 mg of the test sorbents containing 5 mg of the adsorbed copper (from acetate buffer), and the suspension was shaken (120 rotations per minute) at room temperature (23 °C). Samples (aa 10 mL) were collected at selected time points (10, 30, 90, 135, 300 and 1440 min), filtered and the copper content determined in the filtrate by AAS. The experimental error was less than 5% of the measured value for all samples ( $n = 5$ ).

#### 2.2.5. Selectivity of sorption – competition with $\text{Zn}^{2+}$

Each sorbent (50 mg) was suspended in the buffers (pH 2 or 4, see above, 10 mL) containing copper sulfate (3.15 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) and zinc sulfate (315 mmol  $\text{L}^{-1}$ ). After 2 h of shaking (120 rotations per minute) at room temperature (23 °C), the concentrations of copper and zinc in solution and in the water-washed and dried sorbent after mineralization were determined by AAS with the selectivity for copper in presence of zinc calculated using the following equation,

$$\text{Selectivity} = [\text{Cu}(\text{sorbent})/\text{Cu}(\text{solution})] * [\text{Zn}(\text{solution})/\text{Zn}(\text{sorbent})] \quad (2)$$

where  $Cu(\text{sorbent})$  is the concentration of copper in the sorbent ( $\text{mmol/g}$ ),  $Cu(\text{solution})$  is the concentration of copper in solution ( $\text{mmol L}^{-1}$ ),  $Zn(\text{sorbent})$  is the concentration of zinc in the sorbent ( $\text{mmol/g}$ ) and  $Zn(\text{solution})$  is the concentration of zinc in solution ( $\text{mmol L}^{-1}$ ). The experimental error was less than 5% of the measured value for all samples ( $n = 5$ ).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Polymer synthesis and characterization

The synthesis of sorbents using polymer **1** with relevant moieties was performed as described in Scheme 1. Epoxide groups of polymer **1** were reacted with the amines [*N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine, triethylenetetramine or methylamine]. Both the polymer support and the amines contain carbon and hydrogen, making the calculation of the conversion using the carbon and hydrogen contents highly inaccurate, in addition to the possible experimental errors. As the starting polymer **1** does not contain nitrogen and the products contain covalently bound amines, the progress of reaction can be easily and accurately followed by an analysis of the nitrogen content; the reaction was continued until the nitrogen content no longer increased.

The reaction with DPA was performed in propan-2-ol at 75 °C. The reaction was completed after 16 h (2.25% N after 2 h; 3.41% N after 4 h, 4.20% N after 6 h; 4.65% N after 8 h; 4.78% N after 10 h; 4.81% N after 16 h). The final content of 4.81% N corresponds to 3.45 mmol/g N and 1.15 mmol/g of ligand.

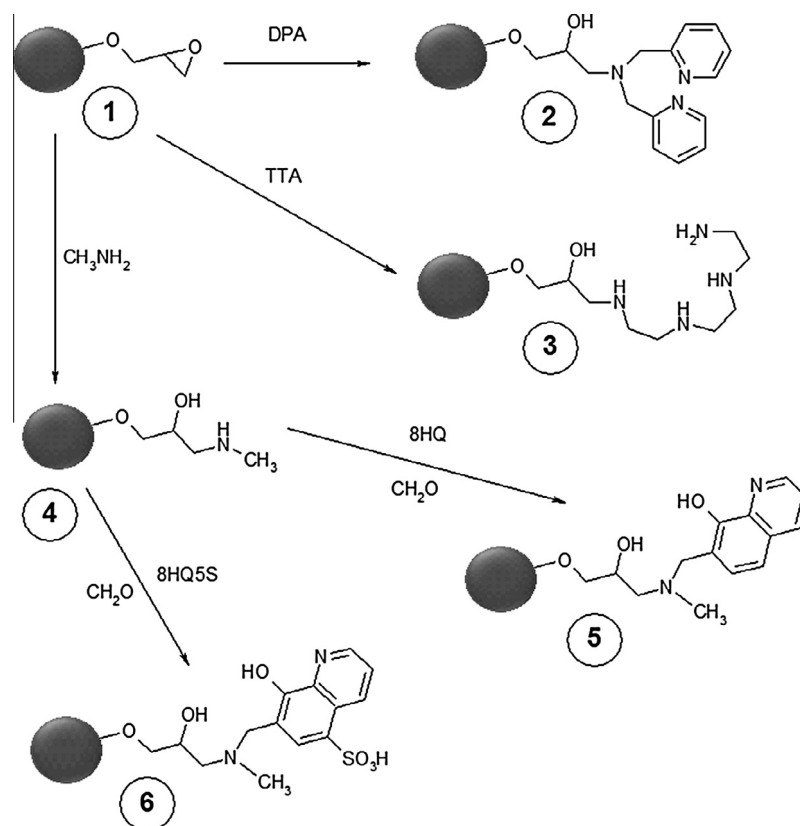
The reaction with TTA was performed in methanol at room temperature. The reaction was completed after 6 days (3.10% N after 2 days; 4.41% N after 4 days; 4.49% N after 6 days). The final

content of 4.49% N corresponds to 3.20 mmol/g N or 0.80 mmol/g of ligand.

The reaction with aqueous methylamine was performed at room temperature. The reaction was completed after 72 h (1.89% N after 0.5 h; 2.47% N after 1 h; 2.75% N after 2 h; 3.11% N after 5 h; 3.22% N after 24 h; 3.51% N after 72 h). The final content of 3.51% N corresponds to 2.51 mmol/g N of secondary amine.

The progress of the reaction of the amines with the epoxides was followed by infrared spectroscopy (see Fig. 1). For all samples, the epoxide absorption band at  $908\text{ cm}^{-1}$  in the products after complete conversion of epoxides on polymer **1** was not observed. The amide  $C=O$  band was not observed in the products, suggesting that the side reactions were either hydrolysis or basically catalyzed alcoholysis with the solvent, but not aminolysis of the ester to the amide (and thus the nitrogen content shows the real content of the active ligands). Only the absorption band of the  $C=O$  bond of ester of the methacrylate matrix at  $1718\text{ cm}^{-1}$  was observed in the infrared spectra (see Fig. 4).

The Mannich condensation reactions with formaldehyde and 8-HQ or 8HQ5S were followed as an estimate of the copper adsorption capacity, as the analysis of C, H and N is unreliable with both starting polymer **4** and products containing similar amounts of these elements as well as the contributions from the possible experimental errors. For the synthesis of polymer **6**, the progress of the reaction can be followed using a sulfur analysis, which correlates well with the copper adsorption capacity. The reaction was found to be completed after 7 days, as reported previously [27] (e.g., the  $Cu^{2+}$  adsorption capacity in the course of the synthesis of polymer **5** was 0.24 mmol/g after 4 h, 0.33 mmol/g after 24 h, 0.43 mmol/g after 96 h, 0.48 mmol/g after 168 h and 0.48 mmol/g after 336 h).



**Scheme 1.** Synthesis of the sorbents from poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate (**1**); DPA = *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine, TTA = triethylenetetramine, 8HQ = 8-hydroxyquinoline, 8HQ5S = 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid.

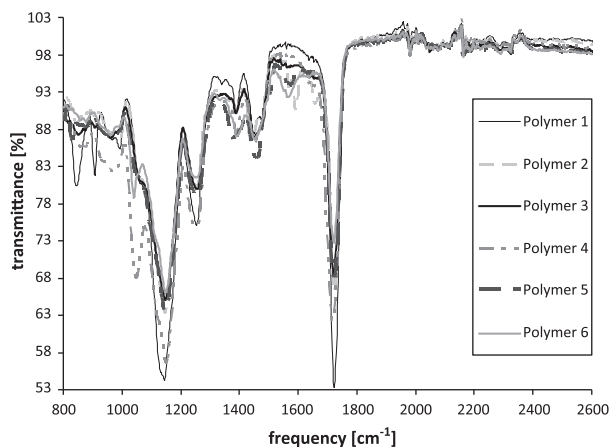


Fig. 1. IR spectra of polymers 1–6.

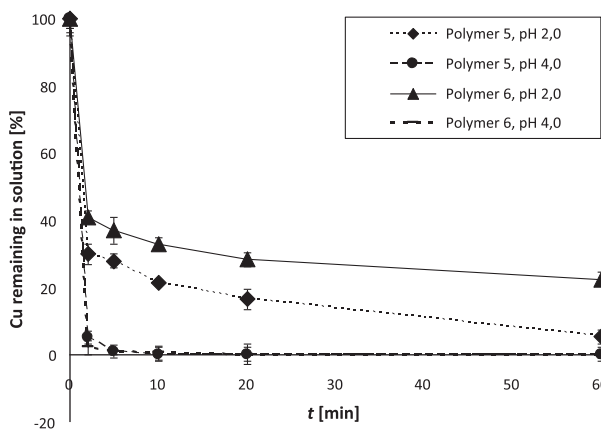


Fig. 3. Adsorption of  $\text{Cu}^{2+}$  on polymers 5 and 6 at pH 2.0 and 4.0; initial concentration of copper 5 mg/100 mL buffer, 500 mg sorbent (bead size 20–40  $\mu\text{m}$ ), shaking 120 rpm, 23 °C.

### 3.2. Metal adsorption experiments

The capacity for  $\text{Cu}^{2+}$  adsorption was comparable for all sorbents. With the capacities of sorbents for  $\text{Cu}^{2+}$  adsorption at values that were slightly lower than the ligand contents calculated from the elemental analysis, the ligand accessibility for copper adsorption was assumed to be good, even at high ligand contents. All adsorption experiments were performed with sorbents using maximal ligand contents for each particular sorbent (to optimize for practical use). With the high degree of copper release in the stomach, the modeling of the copper entrapment in the gastric environment was performed in aqueous solutions buffered to pH 2.0 (gastric content fasting) and pH 4.0 (gastric content with food). In these experiments, 500 mg of sorbent was used according to a presumed dose for human of 500 mg with the amount of copper corresponding to the total amount of copper in nutrients and the amount of copper eliminated in the alimentary tract. The investigated sorption capacity of environment was found sufficient to prevent change in pH during the sorption (tested,  $\Delta\text{pH}$  is less than 0.1). For the sorption capacity of the sorbents, the results as a function of the copper residues are expressed in proportion to the original concentration in the solution, as shown in Figs. 2 and 3. For the sorbent with *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine (polymer 2), copper ions in solution at pH 2.0 and pH 4.0 were almost quantitatively

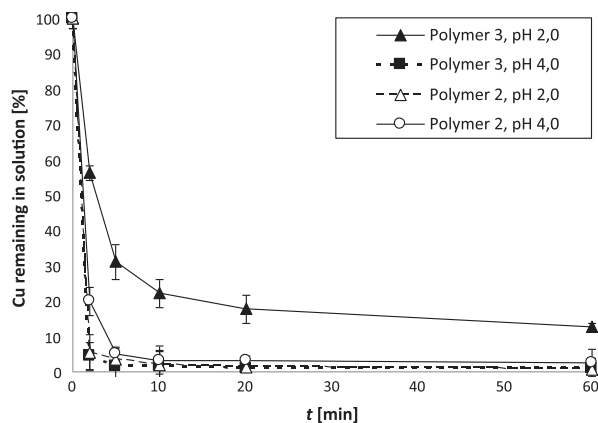


Fig. 2. Adsorption of  $\text{Cu}^{2+}$  on polymers 2 and 3 at pH 2.0 and 4.0; initial concentration of copper 5 mg/100 mL buffer, 500 mg sorbent (bead size 20–40  $\mu\text{m}$ ), shaking 120 rpm, 23 °C.

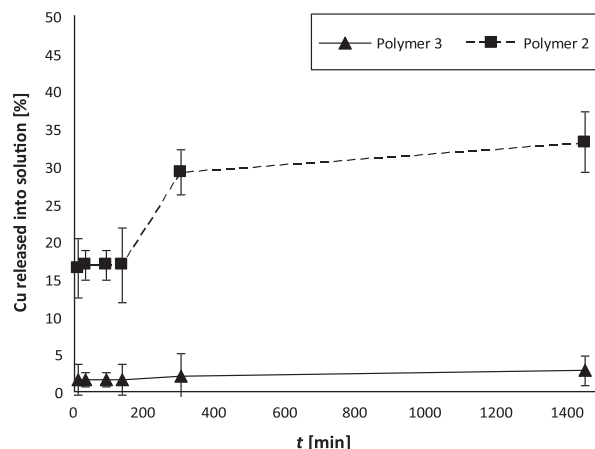


Fig. 4. Desorption of copper(II) from sorbents using an amino acids challenge solution; initial concentration of copper 5 mg/500 mg sorbent (bead size 20–40  $\mu\text{m}$ ), shaking 120 rpm, 23 °C.

entrapped within several minutes (after 60 min, only 0.7% of the copper ions at pH 2.0 and 2.5% at pH 4.0 remained in solution).

For the sorbent with triethylenetetramine (polymer 3), the entrapment of copper from solution was also rapid (within the time scale of minutes) at both pH 2.0 and 4.0. At pH 4.0, the sorption was almost quantitative (after 60 min, only 0.9% of the copper ions remained in solution).

Sorbents with 8-hydroxyquinoline and 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid (polymer 5 and 6) entrapped copper rapidly (within the time scale of minutes) at both pH 2.0 and 4.0. At pH 4.0, the sorption was quantitative with the sorption at pH 2.0 satisfactory [5.4% of the copper ions (polymer 5) or 22.6% (polymer 6) remained in solution after 60 min].

Adsorption rate depends generally on the complexation rate and transport phenomena, especially diffusion rate to and accessibility of the chelating groups. Macroporous hydrophilic nature of the matrix the beads are formed from ensures both rapid diffusion rate and good accessibility of the complexing groups and the ligands we have chosen are known to show practically immediate reaction with copper(II) ions in solution (qualitative analytical proofs), which is in accordance with the very fast copper uptake kinetics observed in this study. In fact, the observed uptake rate is fully sufficient for the intended use so the bead size (which



may influence the uptake rate) was chosen according to manufacturing/handling feasibility.

The sorbents were able to absorb copper, even in ultra-trace concentrations. For these experiments, *carrier-free* radioactive copper-64 was used, where the chemical concentration of copper is within picomolar range. After the sorption experiments, the solutions contained less than 2% of the original radioactivity added to solution (i.e. less than 10.5 kBq) for all sorbents, suggesting a high degree of sorption effectiveness even in picomolar concentrations of copper.

The small intestine environment represents a considerable competitive chelating challenge (due to protease activity, there are high concentrations of free amino acids), which may lead to significant leakage of the absorbed copper from the sorbent. The intestinal environment was simulated by a solution of amino acids, with two of the most strongly copper chelating amino acids added at concentrations corresponding to their average daily uptake as determined from the average weight of ingested aliment with beverages totaling a volume of 1.5 L (1000 mg of L-cysteine and 700 mg of L-histidine per 1.5 L). The remaining amino acids were simulated with glycine at concentrations corresponding to amounts that are consistent with an average daily ingestion (50 g per 1.5 L). The amino acid concentrations were adjusted to 93 mg of L-histidine, 133 mg of L-cysteine and 6.67 g of glycine in 200 mL. The pH value was set at 6.8, representing an average pH of the intestinal conditions. For a 200 mL aliquot of this solution, 500 mg of sorbent containing 5 mg of copper (previously adsorbed from acetate buffer) was added, and the suspension was shaken for 24 h at room temperature. The copper in solution was expressed proportionally with the amount that was released by a complete desorption, as shown in Fig. 4.

The desorption experiments in a model of the small intestine environment demonstrated that only small quantities of copper were released in this chelating environment. The released amounts of copper(II) were determined to be 33% for polymer 2, 2.8% for polymer 3, 0.4% for polymer 5 and 10.8% for polymer 6.

Zinc ions are similar to copper ions with coordinating properties. This attribute is used in the current treatment of Wilson's disease by high doses of dissolved zinc salts competing with copper uptake from the gastrointestinal tract. For ordinary foods, the content of zinc can be significantly higher than that of copper (daily uptake of zinc in food averages 8–15 mg [9]). A key characteristic of a sorbent useful in the treatment of Wilson's disease is a sufficient selectivity for the sorption of copper ions in the presence of an excess of zinc salts. The sorbent selectivities of copper ion adsorption were tested in the presence of zinc ions (Cu:Zn molar ratio 1:100) in an environment imitating stomach conditions (pH 2.0 and 4.0). This zinc concentration (in the given model experiment) corresponds with a daily uptake of 1700 mg of zinc, which exceeds the ordinarily used doses for the therapy of Wilson's disease (1200 mg of zinc per day maximally).

**Table 1**

Sorption selectivities for copper ions in the presence of zinc ions; sorbent weight 50 mg, buffers with pH 2 or 4, respectively (10 mL) containing initial concentrations of copper sulfate 3.15 mmol L<sup>-1</sup> and of zinc sulfate 315 mmol L<sup>-1</sup>, shaking for 2 h (120 rotations per minute) at room temperature (23 °C).

Sorbent	pH	Selectivity for Cu <sup>2+</sup> compared to Zn <sup>2+</sup>
Polymer 2	2.0	1321
	4.0	940
Polymer 3	2.0	59
	4.0	424
Polymer 5	2.0	904
	4.0	798
Polymer 6	2.0	90
	4.0	93

The experimental results are shown in Table 1, suggesting that the sorbents possess a high degree of selectivity for copper ion sorption in the presence of zinc ions at both pH 2.0 and 4.0. The sorbent with the DPA groups (polymer 2) and the sorbent with the 8HQ groups (polymer 5) were the most selective among the tested sorbents.

Biocompatibility is an important issue for sorbents intended to be used in living organisms. For peroral treatment of Wilson's disease, materials with low to negligible interaction with intestinal mucosa, no local irritation and no uptake from gastrointestinal tract are eligible. This excludes materials with excellent copper-chelating ability such as poly(ethylene imine) [28], which is cytotoxic. However (meth)acrylic and styrene-based macroporous beads with size above several micrometers are completely nontoxic, because they cannot be resorbed from gastrointestinal tract due to size and insolubility. In the same time they retain metal adsorption ability, because the metal-chelating moieties are mostly inside the beads, being inaccessible for the mucosa cells, but accessible for small metal ions. As an example of this type of materials, macroporous beads with quaternary ammonium groups (Cholestyramine<sup>®</sup>) are approved and clinically used bile acid scavengers for peroral therapy of hypercholesterolemia [12–16].

#### 4. Conclusions

Four sorbents with different Cu<sup>2+</sup>-chelating moieties (*N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine, triethylenetetramine, 8-hydroxyquinoline and 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid) were prepared and characterized, with the results suggesting that under model conditions, these sorbents may be useful as therapeutics for the treatment of Wilson's disease. The sorbents effectively and quickly entrapped copper in an environment modeling the gastric conditions without significantly releasing copper in an environment modeling the intestinal conditions. Effective even at ultra-trace concentrations, the sorption was not disturbed by zinc salts, even at amounts of significant excess that correspond with therapeutic doses of zinc salts. These results suggest that the polymers have the potential as novel therapeutics for Wilson's disease, as these sorbents are also expected to be completely non-toxic (macroporous polymer beads are insoluble and thus cannot be taken up from the gastrointestinal tract) with an expected elimination from the body in the feces.

#### Acknowledgements

The authors would like to express our appreciation for the financial support of the Grant Agency of the Czech Republic (Grant # P304/12/0950 and 13-08336S). The authors would also like to thank the Charles University in Prague for the support of these PhD studies.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.010>.

#### References

- [1] A. Ala, A.P. Walker, K. Ashkan, J.S. Dooley, M.L. Schilsky, *Lancet* 369 (2007) 397–408.
- [2] R.F. Butterworth, *Neurotoxicity Res.* 18 (2010) 100–105.
- [3] R. Bruha, Z. Marecek, L. Pospisilova, S. Nevsimalova, L. Vitek, P. Martasek, J. Nevoral, J. Petrtyl, P. Urbaneck, A. Jiraskova, P. Ferenci, *Liver Int.* 31 (2010) 83–91.
- [4] U. Merle, M. Schaefer, P. Ferenci, W. Stremmel, *Gut* 56 (2007) 115–120.

- [5] D. Huster, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24 (2010) 531–539.
- [6] A. Uno, H. Ishida, K. Konno, Y. Ohnami, H. Naganuma, M. Niizawa, Y. Hamashima, O. Masamune, *Abdominal Imaging* 22 (1997) 72–78.
- [7] S.K. Das, K. Ray, *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2 (2006) 482–493.
- [8] G.J. Brewer, V. Yuzbasiyan-Gurkan, V. Johnson, R.D. Dick, Y. Wang, *Am. J. Med. Sci.* 305 (1993) 199–202.
- [9] Dietary Reference Intakes (DRIs): Estimated Average Requirements, Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001. <<http://www.nap.edu>>
- [10] N. Shimizu, J. Fujiwara, S. Ohnishi, M. Sato, H. Kodama, T. Kohsaka, A. Inui, T. Fujisawa, H. Tamai, S. Ida, S. Itoh, M. Ito, N. Horiike, M. Harada, M. Yoshino, T. Aoki, *Transl. Res.* 156 (2010) 350–357.
- [11] P.V.E. van den Berghe, *Nutr. Rev.* 67 (2009) 658–672.
- [12] I. Ullah, G.J. Wiley, *Cholesterol-lowering tablets*, 2000, US 6.066.336.
- [13] T. Goto, T. Meno, *Tablets containing anion exchange resin*, 2000, US 6.022.533.
- [14] M.S. Amer, J.C. Gray, *Cholestyramine compositions and method for preparation thereof*, 1990, US 4.895.723.
- [15] T.G. Wood, C.J. Xenides, *Edible, baked compositions containing cholestyramine*, US, 1991, 5.015.477.
- [16] J.R. Andre, J.A. Colliopoulos, *Anion exchange resin compositions containing almond paste for taste improvement*, 1996, US 5.500.190.
- [17] L. Lehtinen, M. Lahtinen, M. Jyrala, M. Vuokko, *Method for the removal of copper from a zinc sulphate solution*, 2010, US 7.682.581.
- [18] K.R. Zinn, *Process for separating a radionuclide from solution*, 1995, US 5.409.677.
- [19] W. Chouyyok, Y. Shin, J. Davidson, W.D. Samuels, N.H. LaFemina, R.D. Rutledge, G.E. Fryxell, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 6390–6395.
- [20] M. Richter, O. Schumacher, *Process for preparing chelating ion exchanger resins and the use thereof for the extraction of metals*, 1994, U.S. 5.290.453.
- [21] A. Warshawsky, R. Kalir, A. Patchornik, *Metal complexing polymers*, 1982, US 4.317.887.
- [22] H.B. Scher, *Microencapsulated chelating agents and their use in removing metal ions from aqueous solutions*, 1985, US 4.500.494.
- [23] J.O. Porath, *Ion adsorbent for metals having a coordination number greater than two*, 1983, US 4.423.158.
- [24] D. Horak, M.J. Benes, K. Gumargalieva, G. Zaikov, *J. Appl. Polym. Sci.* 80 (2001) 913–916.
- [25] P.M. an Berkel, W.L. Driessen, G.J.A.A. Kodhass, J. Reedijk, D.C. Sherington, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 2 (1995) 147–148.
- [26] F. Svec, J. Hradil, J. Coupek, J. Kalal, *Angew. Makromol. Chem.* 48 (1975) 135–143.
- [27] M. Hruby, M. Skodova, H. Mackova, J. Skopal, M. Tomes, M. Kropacek, J. Zimova, J. Kucka, *React. Funct. Polym.* 71 (2011) 1155–1159.
- [28] S. Zhang, J.E.I. Wright, N. Ozber, H. Uludag, *Macromol. Biosci.* 7 (2007) 656–670.

**Příloha IIIa: Chelating polymeric beads as potential therapeutics for Wilson's disease**

Chelating polymeric beads as potential therapeutics for Wilson's disease. Mattova Jana, Pouckova Pavla, Kucka Jan, Skodova Michaela, Vetric Miroslav, Stepanek Petr, Urbanek Petr, Petrik Milos, Novy Zbynek, Hraby Martin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, vol. 62, p. 1 – 7. IF 3,773.



## Chelating polymeric beads as potential therapeutics for Wilson's disease



Jana Mattová<sup>a</sup>, Pavla Poučková<sup>a</sup>, Jan Kučka<sup>b</sup>, Michaela Škodová<sup>b</sup>, Miroslav Vetrík<sup>b</sup>, Petr Štěpánek<sup>b</sup>,  
Petr Urbánek<sup>a</sup>, Miloš Petřík<sup>c</sup>, Zbyněk Nový<sup>c</sup>, Martin Hrubý<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Salmovska 1, 120 00 Prague 2, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i., Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Hnevotinska 5, 77900 Olomouc, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 December 2013

Received in revised form 1 May 2014

Accepted 3 May 2014

Available online 9 May 2014

#### Keywords:

Wilson's disease

Polymer beads

Chelators

Copper chelation

### ABSTRACT

Wilson's disease is a genetic disorder caused by a malfunction of ATPase 7B that leads to high accumulation of copper in the organism and consequent toxic effects. We propose a gentle therapy to eliminate the excessive copper content with oral administration of insoluble non-resorbable polymer sorbents containing selective chelating groups for copper(II). Polymeric beads with the chelating agents triethylenetetramine, *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine, and 8-hydroxyquinoline (8HQB) were investigated. In a preliminary copper uptake experiment, we found that 8HQB significantly reduced copper uptake (using copper-64 as a radiotracer) after oral administration in Wistar rats. Furthermore, we measured organ radioactivity in rats to demonstrate that 8HQB radiolabelled with iodine-125 is not absorbed from the gastrointestinal tract after oral administration. Non-resorbability and the blockade of copper uptake were also confirmed with small animal imaging (PET/CT) in mice. In a long-term experiment with Wistar rats fed a diet containing the polymers, we have found that there were no signs of polymer toxicity and the addition of polymers to the diet led to a significant reduction in the copper contents in the kidneys, brains, and livers of the rats. We have shown that polymers containing specific ligands could potentially be novel therapeutics for Wilson's disease.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Wilson's disease is a genetic disorder of copper metabolism resulting in hepatic cirrhosis and basal ganglia degeneration (Ala et al., 2007; Butterworth, 2010). Inheritance is autosomal recessive, and the disease is caused by the malfunction of ATPase 7B (Bruha et al., 2010); more than 400 mutations of this gene have been described to date (Merle et al., 2007). Worldwide prevalence of this disease is 1:30,000 (Ala et al., 2007). The impaired function of the ATPase causes an inability to excrete copper into the bile, which is the main pathway for copper elimination in humans. This leads to high copper accumulation in the organism, especially in the liver and central nervous system. High concentrations of copper lead to numerous symptoms due to toxic oxidative-stress-related damage to the liver tissue, brain, and other parenchymal organs (Ala et al., 2007; Butterworth, 2010; Merle et al., 2007). The three typical clinical presentations are liver disease, neurological disease, and psychiatric disease (Ala et al., 2007; Bruha et al., 2010; Huster, 2010). Liver disease is the most common presentation, and in the later

course of untreated Wilson's disease, it may be fatal in all presentations. Patients with liver disease typically develop all possible complications, including liver cirrhosis, portal hypertension, hepatic encephalopathy, and massive bleeding from esophageal varices (Ala et al., 2007; Uno et al., 1997).

The currently recommended first-line therapy is based on lowering copper concentrations in organs through the administration of copper-chelating agents (penicillamine, triethylenetetraamine, or tetrathiomolybdate) (Ala et al., 2007; Roberts and Schilsky, 2003), which leads to decreased uptake and increased elimination of copper into the urine. In addition, high doses of zinc salts are administered as a maintenance therapy because zinc blocks copper uptake from the gastrointestinal tract (Ala et al., 2007; Huster, 2010).

Unfortunately, suitable zinc formulations are not available in all countries. The use of these drugs is limited by multiple and occasionally severe side effects, e.g., myelosuppression, lupus, and myasthenia for penicillamine (Huster, 2010; Das and Ray, 2006), which originate from the general recomplexation of essential elements within the body after uptake from the gastrointestinal tract. Significant gastrointestinal disorders have been reported for zinc therapy (in fact, the doses applied cause mild zinc poisoning)

\* Corresponding author. Tel.: +420 296809230.

E-mail address: [mhruby@centrum.cz](mailto:mhruby@centrum.cz) (M. Hrubý).

(Huster, 2010; Shimizu et al., 2010). The typical dietary intake of copper is 0.6–1.6 mg per day, and thus, a low-copper diet is recommended as an adjuvant measure at the beginning of therapy. However, copper is omnipresent in almost all consumables, making a copper-free diet nearly impossible (van den Berghe and Klomp, 2009). Thus, the diet typically consists of avoiding only the foods with the highest copper content (e.g., liver, mushrooms, and nuts) (Ala et al., 2007).

We propose the use of macroporous polymeric microbeads containing groups that selectively chelate copper as a dietary supplement for the treatment of Wilson's disease. The macroporous nature of the microbeads assures full accessibility of the chelating groups to the copper(II) ions. The polymer would pass along with the gastrointestinal tract contents and scavenge all copper released from food during digestion. Moreover, it should also adsorb copper that is secreted into gastrointestinal tract, i.e., ca. 5.3 mg copper per day, of which 7% is secreted into saliva, 20% into gastric fluid, 50% into bile, 18% into pancreatic fluid, and 5% by duodenal secretion (Linder et al., 1998), further shifting the copper balance toward elimination. Because polymer microbeads are generally not resorbable and are insoluble (Mattiasson et al., 2009), they are completely nontoxic and are fully eliminated along with the feces. In our previous paper (Skodova et al., 2013), we described the chemistry and *in vitro* copper scavenging ability of the synthesized macroporous microbeads in detail. In this study, we evaluate the biological effectiveness of this new therapeutic approach *in vivo*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Synthesis of the polymers

Macroporous poly(glycidyl methacrylate-*co*-ethylene dimethacrylate)-based beads (particle size 20–40  $\mu\text{m}$ ) containing the ligands *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine (DPAB), triethylenetetraamine (TTAB), and 8-hydroxyquinoline (8HQB) were synthesized according to the procedure described in our previous paper (Skodova et al., 2013). The ligand contents of the particular polymers were 1.15 mmol/g of *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine in DPAB and 0.48 mmol/g of 8-hydroxyquinoline in 8HQB.

### 2.2. Experiment A – Preliminary copper uptake experiment using $^{64}\text{Cu}$ in rats after the administration of polymeric microbeads

All animal experiments described hereinafter were performed in accordance with the corresponding legislation in the Act on Experimental Work with Animals (Decreets No. 311/97; 117/87 and Act No. 246/96 of the Czech Republic), which is fully compatible with the corresponding European Union directives.

To measure copper uptake from the gastrointestinal tract, we used healthy female Wistar rats (average weight 220 g, 11 weeks old, obtained from AnLab, Ltd., Prague, Czech Republic) that received a stock solution of radioactive copper with or without polymer and tracked the fate of copper inside the body.

A stock solution of radioactive copper was prepared using 200  $\mu\text{l}$  of  $^{64}\text{CuCl}_2$  (containing 170.6 MBq  $^{64}\text{Cu}$ , ca. 100 MBq  $^{64}\text{Cu}$ /mg Cu, Nuclear Physics Institute of the ASCR, v.v.i.) in 0.05 M HCl and 2.300  $\mu\text{l}$  of physiological solution.

The animals were randomly divided into three groups (two experimental groups and a control group,  $n = 2$ ) and subsequently received a solution of  $^{64}\text{CuCl}_2$  with a polymer suspension through a gastric probe in the following doses: 250  $\mu\text{l}$  of  $^{64}\text{CuCl}_2$  stock solution (standard sample – 250  $\mu\text{l}$ , activity  $A = 17.06$  MBq) with no polymer (*control group*); 250  $\mu\text{l}$  of  $^{64}\text{CuCl}_2$  stock solution with 250  $\mu\text{l}$  of DPAB suspension (50 mg of polymer with *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine

in 200  $\mu\text{l}$  of physiological solution) (*DPAB group*); or 250  $\mu\text{l}$  of  $^{64}\text{CuCl}_2$  stock solution with 250  $\mu\text{l}$  of 8HQB suspension (50 mg of polymer with 8-hydroxyquinoline in 200  $\mu\text{l}$  of physiological solution) (*8HQB group*). After administration, the animals had free access to food and water. The rats were sacrificed 24 h later, and the radioactivity in the excised gastrointestinal tract, liver, kidneys, lungs, heart, spleen, and carcass and in excrements was determined using an ionization chamber (Bqmetr 4, Empos Ltd., Prague). All radioactivity data presented in this manuscript are decay-corrected (half-life of  $^{64}\text{Cu}$   $T_{1/2} = 12.7$  h).

### 2.3. Experiment B – Determination of polymer uptake via the gastrointestinal tract

The polymeric microbeads should be not absorbable from the digestive tract according to our hypothesis. We chose the polymer 8HQB radiolabeled with  $^{125}\text{I}$  to track its resorbability after oral administration in healthy Wistar rats because this polymer was the most efficient in inhibiting copper uptake and also because the 8-hydroxyquinoline moiety can be radiolabeled in high yield using a standard electrophilic radioiodination protocol.

The polymer 8HQB was radiolabeled with  $^{125}\text{I}$  using the standard chloramine method according to Hruby et al. (2005) adapted for insoluble beads. Briefly, the polymer 8HQB (100 mg) was suspended in phosphate buffered saline (PBS, 1 ml); then, a solution of  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (Lacomed Ltd., Rez, Czech Republic, 185 MBq in 10  $\mu\text{l}$ ) and a freshly prepared solution of chloramine T (50  $\mu\text{L}$ , 10 mg/ml) were added. After 60 min, the beads were washed via centrifugation and redispersion, twice with 1 ml of ascorbic acid solution (20 mg/ml in PBS), once with ascorbic acid solution (20 mg/ml in PBS) containing 2 mg of NaI (non-radioactive) with an overnight incubation and then twice with 1 ml of water. The net radiolabeling yield was 95% (174 MBq  $^{125}\text{I}$  in 8 ml of aqueous suspension containing 100 mg of polymer). The pellet obtained after centrifugation was diluted with water to a total volume of 8 ml (stock suspension).

Healthy female Wistar rats (average weight 220 g, 11 weeks old, AnLab, Ltd., Prague, Czech Republic) were randomly divided into three groups ( $n = 6$ ), and 0.45 ml of stock suspension of radiolabeled polymer 8HQB was administered to each animal. The animals then had free access to food and water until they were sacrificed at 2.5 h (group 1), 8 h (group 2), or 24 h (group 3) after polymer administration. The selected time intervals were sufficient to observe the passage of polymer through the digestive tract. Immediately after sacrifice, the internal organs, including the digestive tract, were excised, and radioactivity was determined using an ionization chamber (Bqmetr 4, Empos Ltd., Prague).

### 2.4. Animal imaging

Imaging techniques are useful in determining the localization of various processes. Therefore, we used PET/CT animal imaging with radionuclide  $^{64}\text{Cu}$  to confirm the non-resorbability of the polymer (and also to compare it with Experiment B).

Carrier-free  $^{64}\text{Cu}$ -chloride was obtained from the Helmholtz Centre (HZDR, Dresden, Germany). The 8HQB (5 mg per mouse) was labeled with ca. 15 MBq of  $^{64}\text{CuCl}_2$ -chloride using 0.15 M acetate buffer (300  $\mu\text{l}$ ) at room temperature. The second studied tracer contained only  $^{64}\text{CuCl}_2$  (ca. 15 MBq) diluted with 0.15 M acetate buffer (300  $\mu\text{l}$ ).

The positron emission tomography (PET) and computed tomography (CT) images were acquired with an Albira PET/SPECT/CT small animal imaging system (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, USA) (Sanchez et al., 2013). Female outbred NMRI mice (average weight 19 g, 4 weeks old, Charles River, Wilmington, MA, USA) were chosen for this experiment to compare the passage of

the polymer through the gastrointestinal tract with rats. We used four mice (two for tracking  $^{64}\text{Cu}$ -8HQB and two for tracking  $^{64}\text{CuCl}_2$ ). The animals were fasted 12 h prior to  $^{64}\text{Cu}$ -chloride or  $^{64}\text{Cu}$ -8HQB administration. A radiolabeled tracer was administered perorally at a dose of ca. 15 MBq per mouse using a gastric probe. Mice were allowed access to food 4 h after the tracer administration. Mice were subsequently anaesthetized using isoflurane (FORANE, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) (2% flow rate) and were kept under anesthesia during the imaging. The PET/CT images were acquired at time intervals starting at 15 min and followed by 2.5, 5, 8, 24, 48, and 72 h after p.o. administration of the radioactive tracer. A 15-min PET scan (axial FOV 148 mm) was performed, followed by a CT scan (axial FOV 65 mm, 45 kVp, 400  $\mu\text{A}$ , at 600 projections).

The PET/CT scans were reconstructed with the Albira software (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, USA) using maximum likelihood expectation maximization (MLEM) and filtered backprojection (FBP) algorithms (Sanchez et al., 2013, 2012). After reconstruction, the acquired data were viewed and analyzed with PMOD software (PMOD Technologies Ltd., Zurich, Switzerland). The 3D images were obtained using VolView software (Kitware, Clifton Park, NY, USA).

### 2.5. Experiment C – Long-term experiment with rats fed diets containing polymer microbeads

Our main goal was to determine whether the polymers containing ligands are capable of reducing the copper content in the target organs of rats during long-term therapy.

Healthy female Wistar rats (average weight 260 g, 12 weeks old, AnLab, Ltd., Prague, Czech Republic) were randomly divided into seven groups, six experimental and one control ( $n = 6$ ). The animals were fed (*ad libitum*) diets containing polymeric microbeads for six weeks. To more accurately measure the quantity of ingested chow, the rats from each group were placed in two individual cages ( $n = 3$ ). The chows were obtained from AnLab, Ltd., Prague, Czech Republic (producer – SSSNIFF GmbH, Soest, Germany). The composition of the chow was regular granulated food for rats (Rat/mouse maintenance, PS R/M-H, 15 mm) with the ligand-containing polymers added to the mixture in a defined quantity during the manufacturing process. The amount of ligand-containing polymers in the diet for each group was as follows: 333.3 mg/kg of polymer with *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine (DPAB 333.3 mg/kg group), 1000 mg/kg of polymer with *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine (DPAB 1000 mg/kg group), 333.3 mg/kg of polymer with triethylenetetramine (TTAB 333.3 mg/kg group), 1000 mg/kg of polymer with triethylenetetramine (TTAB 1000 mg/kg group), 333.3 mg/kg of polymer with 8-hydroxyquinoline (8HQB 333.3 mg/kg group), and 1000 mg/kg of polymer with 8-hydroxyquinoline (8HQB 1000 mg/kg group). The control group received only a regular diet without added polymer.

In addition to the defined quantity of polymer, the amount of copper in the diets was also known, i.e., 5 mg/kg.

The weight of devoured chow was measured every day of the experiment, and the weights of the rats were measured twice a week to characterize the weight development and appetite of the rats. At the end of every week, retro-orbital blood collection under inhalation anesthesia (1.5% isoflurane) was performed on each animal to determine the copper concentration (1 ml of heparin-anticoagulated blood). The rats were sacrificed after 6 weeks of eating the polymer-containing or control diets. The brains, livers, and kidneys were excised from their bodies, and blood was collected from the *vena cava inferior* (1.5 ml of heparin-anticoagulated blood). The excised organs and blood samples were kept at  $-25\text{ }^\circ\text{C}$  until analysis. The copper content in the organs and blood samples was determined using atomic absorption spectroscopy (AAS) after

mineralization at the State Veterinary Institute, Prague, Department of Chemistry.

### 2.6. Statistical analysis of data

The statistical evaluation of the data was performed with the OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, MA, USA) computer program. A calculation of analysis of variance (ANOVA) was performed at a significance level  $\alpha = 0.05$ .

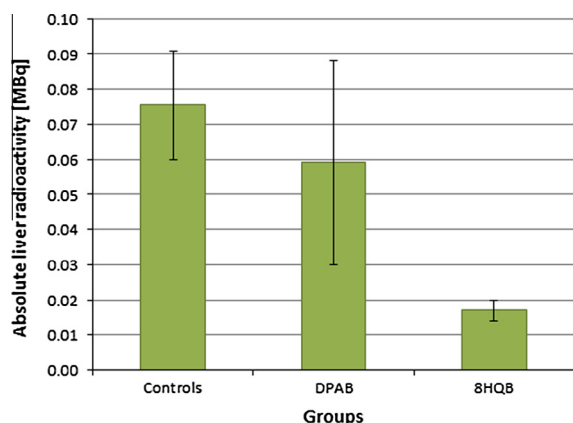
## 3. Results and discussion

Only a small portion of the daily copper intake is absorbed from the digestive tract in humans (25–60%). The absorbed copper is overwhelmingly transported into the liver, where most of it is used for the production of ceruloplasmin. Excess copper is eliminated from the liver through biliary secretion. A small portion is excreted into urine. Because the liver is the principal storage organ for copper (and is also the most damaged by Wilson's disease), the concentration of copper in the liver is the marker for the amount of absorbed copper.

The first experiment (Experiment A) was performed to obtain a preliminary understanding of how the chelating beads can decrease the uptake of dietary copper using a  $^{64}\text{CuCl}_2$  radiotracer. In this experiment, the control group received only the stock solution of  $^{64}\text{CuCl}_2$  without polymer to follow the route of copper in the body. The experimental groups received polymer with specific ligands (DPAB or 8HQB) in addition to the stock solution.

Most of the radioactivity (stated as percentage of initial administered radioactivity) was measured in the excrements of each group, including the control ( $63.9 \pm 7.1\%$  of standard for the control group,  $51.3 \pm 9.2\%$  for the DPAB group, and  $59.7 \pm 6.3\%$  for the 8HQB group), which is consistent with the fact that only a small portion of copper is absorbed from the gastrointestinal tract. Significant radioactivity indicating copper content was also detected in the organs of the gastrointestinal tract (stomach, intestine, and colon),  $5.28 \pm 0.83\%$  of the radioactivity on average for the control group,  $8.8 \pm 1.3\%$  for the DPAB group, and  $8.1 \pm 1.8\%$  for the 8HQB group. The most likely reason for this result is that the content of the gastric probe was not fully eliminated from the body.

The other investigated organs were the lungs, heart, and spleen, where no measurable radioactivity was detected in all groups, including the control group. Extremely low radioactivity was found in the kidneys ( $0.71 \pm 0.47\%$  of the applied dose on average for the control group,  $0.2365 \pm 0.0015\%$  for the DPAB group, and  $0.184 \pm 0.061\%$  for the 8HQB group), suggesting extremely low excretion of copper in the urine. Carcasses were also studied, and the following radioactivities were detected:  $5.15 \pm 0.82\%$  of standard on average for the control group,  $5.92 \pm 0.43\%$  for the DPAB group, and  $2.93 \pm 0.32\%$  for the 8-HQB group. The radioactivity in the carcasses can be explained by the self-absorption of radiation, contamination during the excision of the organs, or by the measurement geometry of radiation. There were no significant differences between the control and experimental groups in the radioactivities of the organs mentioned above or of the carcasses. In contrast, quite remarkable findings appeared in the radioactivities of the liver, the main copper-storage organ, with  $1.77 \pm 0.37\%$  of the applied dose for the control group,  $1.40 \pm 0.69\%$  for the DPAB group, and  $0.416 \pm 0.075\%$  for the 8HQB group. Therefore, a reduction in copper uptake was obtained, especially in the 8HQB group (polymer with 8-hydroxyquinoline, 4.5-times reduction of copper content, see Fig. 1). This preliminary experiment clearly demonstrates that the polymer containing 8-hydroxyquinoline (8HQB) is promising for reducing the uptake of copper after oral administration. Thus, it was necessary to perform further detailed



**Fig. 1.** Radioactivity in the livers of rats measured 24 h after the administration of a mixture of  $^{64}\text{CuCl}_2$  and the polymers DPAB and 8HQB in preliminary Experiment A ( $n = 2$ ).

experiments to perform a biological evaluation of the polymer on larger groups of animals to ensure statistical validity.

First, it was necessary to verify that the polymer cannot be absorbed from the gastrointestinal tract. Because the polymer with 8-hydroxyquinoline (8HQB) significantly reduced the copper content of the liver in both rats in the preliminary experiment with  $^{64}\text{CuCl}_2$ , the same polymer was chosen for the next experiment (Experiment B). The aim was to determine whether the polymer is non-absorbable after oral administration. If absorption does not occur, the resulting radioactivity should be found only in the gastrointestinal organs through which the polymer passed (particularly the stomach, intestine, and colon). We chose  $^{125}\text{I}$  as the radiotracer because 8-hydroxyquinoline may be directly radiolabeled in high yield at position 5 of the quinoline system. Because the half-life of  $^{125}\text{I}$  is 59.4 days and our final observation time was 24 h after  $^{125}\text{I}$ -8HQB administration, the resulting radioactivity did not need to be corrected for decay (error less than 1%). Radioactivity was measured as a percentage of the initial radioactivities for each dosage. For sacrificed group 1 (8HQB 2.5 h after administration), the majority of the polymer was found at the beginning of gastrointestinal tract, as expected. The majority of radioactivity ( $48.0 \pm 7.0\%$  of the applied dose) was measured in the stomach (Fig. 2). It is necessary to consider the individual rate of digestion

of each rat; thus, some of the content was also found in the small intestine ( $18 \pm 14\%$ ) and colon ( $6.2 \pm 5.4\%$ ).

For group 2 (8HQB 8 h after administration), most of the content was found in the distal parts of the gastrointestinal tract;  $12.8 \pm 7.9\%$  was found in the small intestine,  $49 \pm 11\%$  was found in the caecum, and  $31 \pm 10\%$  was found in the colon (see Fig. 2), suggesting that the polymer content was moving toward the rectum, theoretically resulting in consequent elimination from the body. Only traces of radioactivity were found in the liver of groups 1 and 2 (less than 0.2%), demonstrating the stability of the polymer against uptake.

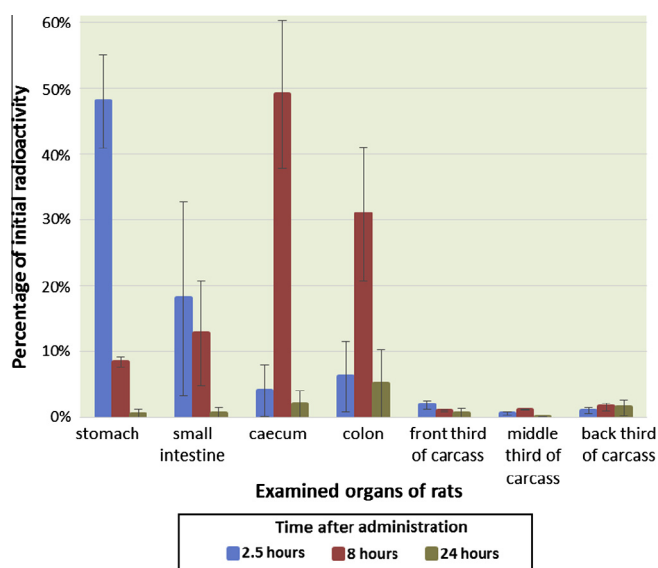
Only low radioactivity was found in the bodies of the rats in group 3 (8HQB 24 h after administration; Fig. 2). Most of the radioactivity was measured in the colon (at an average of  $5.0 \pm 5.2\%$ ). Only  $0.45 \pm 0.78\%$  and  $0.57 \pm 0.96\%$  was measured in the stomach and small intestine, respectively. Almost the entire content was eliminated from the bodies of the rats. Radioactivity in the liver of this group was not observed.

In all animals, the radioactivity was also measured in the thyroid gland, spleen, heart, kidneys, and lungs. No radioactivity was detected in these organs. Thus, polymer was not absorbed; instead, it was eliminated with the feces. Only extremely low radioactivity (2.98% of the initial radioactivity) was detected in the lungs of one rat in group 3 (8HQB 24 h after administration). This animal likely aspirated part of the radiolabeled polymer administered using a gastric probe. The polymer was not significantly absorbed from the gastrointestinal tract, as it is stable at model pH conditions. The total balance of radioactivity (measured/applied) was always more than 70%, which is a good result for the low-energy gamma emitter  $^{125}\text{I}$  displaying inherent self-absorption in tissues. This experiment clearly demonstrates that the polymer passed through the gastrointestinal tract and was not absorbed. This result is clinically important because dietary copper should be not absorbed after chelation.

The key experiment in this study was to determine whether the polymer is able to decrease copper accessibility from food with no side effects. Therefore, we conducted a long-term experiment measuring the blood copper content of rats fed a diet containing the polymers (Experiment C). In addition, after the experiment, the rats were sacrificed, and the copper content in their internal organs was determined.

Polymer added to the chow could affect the taste of the chow and thus the appetite of the rats and the amount of food ingested. Therefore, we weighed the quantity of ingested food each day of the experiment. The average consumption of food for Wistar rats is 15–30 g. All seven groups ingested a similar amount of chow on average. There was only a small difference between the controls and several groups (approximately 2–4 g/day more in the controls). However, the difference is not statistically significant; therefore, we can assume that all groups ate normally and the same amount of food per day. The time course of the amount of ingested chow is shown in Table 1. The weight of the ingested chow was larger on the first day of experiment (30–35 g on average) due to the transition to a different type of diet. Furthermore, there was a small decrease in food intake on days 7, 14, 21, 28, and 35. On those days, retro-orbital blood collections were performed, which could decrease food intake due to fatigue after anesthesia. Importantly, the food intake was normal throughout the entire experiment; thus, the animals also regularly ingested the polymer mixed into the food. The feces were also normal and regular, indicating good digestion.

Further, we monitored the body weight of the rats after the administration of diets with added polymer because a decrease in body weight is one of the signs of eventual general toxicity. The average weights of each group during the experiment are shown in Fig. 3. Because the Wistar rats were young, it was natural

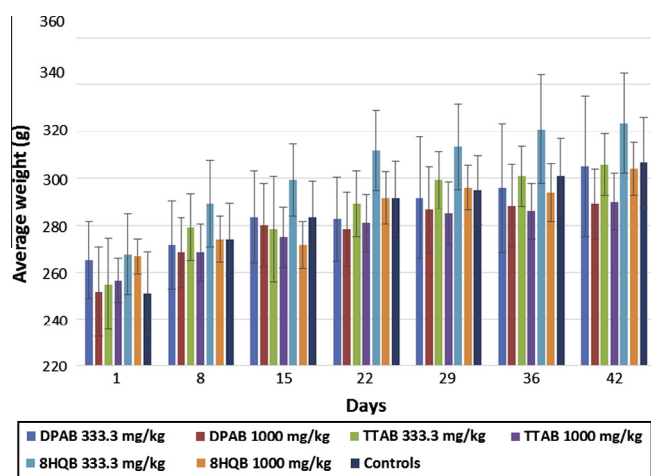


**Fig. 2.** Biodistribution of  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled 8HQB 2.5 h, 8 h and 24 h, respectively, after administration in Experiment B ( $n = 6$ ).

**Table 1**

Diet intake in the course of Experiment C ( $n = 6$ ). No statistically significant differences were found on level  $\alpha = 0.05$ .

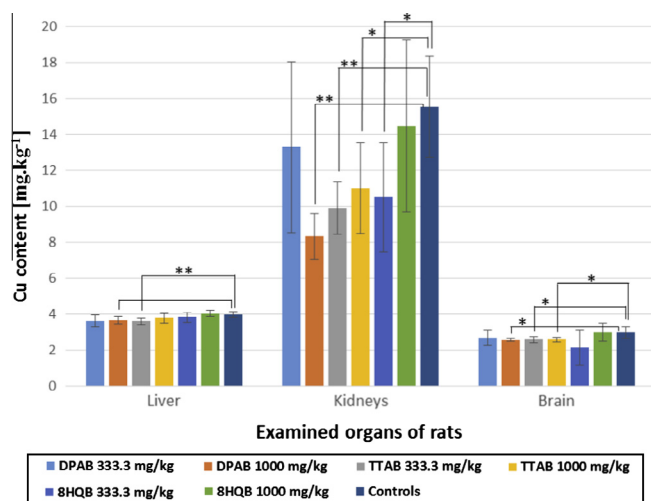
Group	Average weight of ingested diet per day (g) Value $\pm$ standard deviation
DPAB 333.3 mg/kg	21.1 $\pm$ 3.4
DPAB 1000 mg/kg	21.7 $\pm$ 3.7
TTAB 333.3 mg/kg	21.9 $\pm$ 3.3
TTAB 1000 mg/kg	20.6 $\pm$ 3.0
8HQB 333.3 mg/kg	24.0 $\pm$ 3.4
8HQB 1000 mg/kg	20.7 $\pm$ 3.0
Controls	24.0 $\pm$ 3.1



**Fig. 3.** Weight development of Wistar rats over the course of Experiment C ( $n = 6$ ).

that the weights increased during the 6 weeks of the experiment. The weight development was normal and similar in all groups. Thus, the added polymer did not affect the weight of the rats and is most likely not toxic.

A quantitative amount of copper was found in the liver, brain, and kidneys at the end of the experiment (after 6 weeks). The copper concentrations in the organs are shown in Fig. 4. Significant dif-

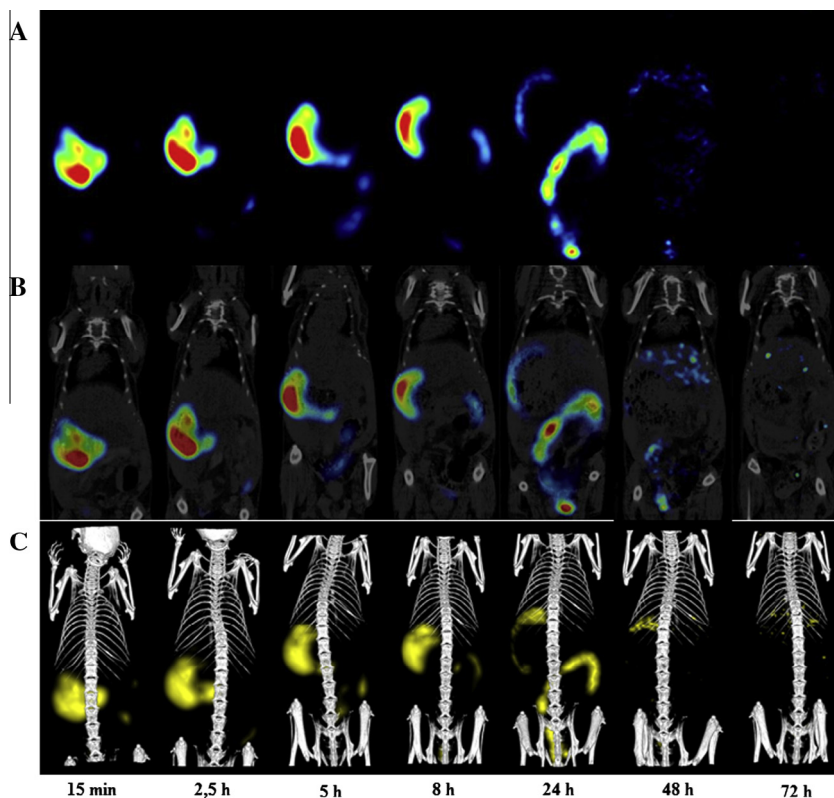


**Fig. 4.** Copper content in selected internal organs of rats after eating a diet containing chelating polymers in Experiment C (at the end of the experiment,  $n = 6$ ); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

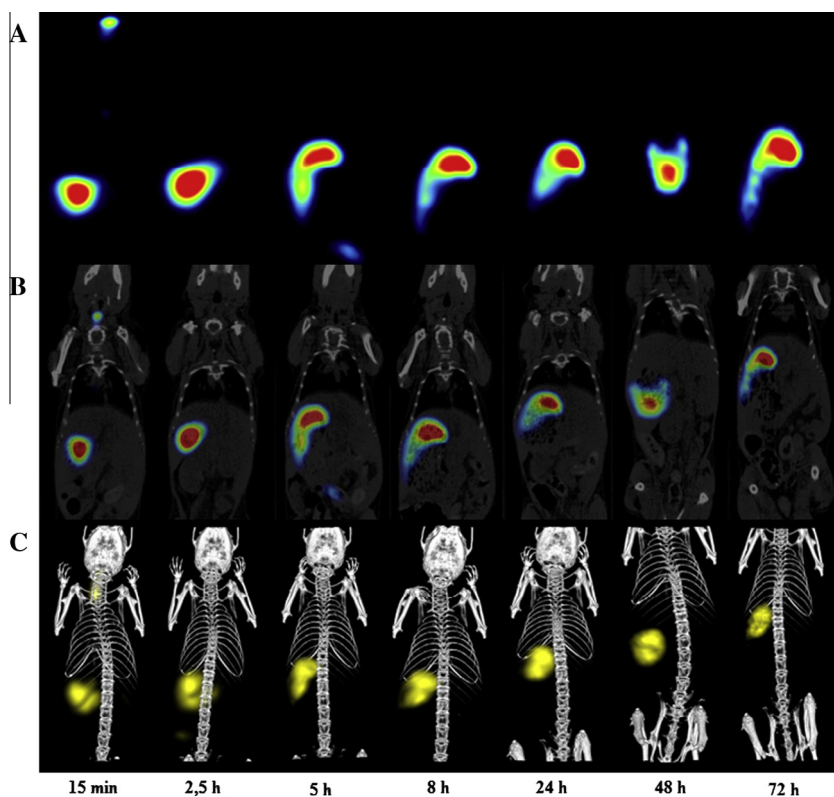
ferences in copper content were observed in the kidneys of the experimental animals. The polymer with *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine at a dose of 1000 mg/kg (group DPAB 1000 mg/kg) had the greatest reduction in copper content in kidneys, with an average copper concentration of  $8.3 \pm 1.3$  mg/kg vs.  $15.5 \pm 2.8$  mg/kg in the controls (statistically significant according to ANOVA at a confidence level  $\alpha = 0.05$ ,  $F = 26.94$ ,  $p = 0.00041$ ). A statistically significant decrease in the copper content in kidneys (according to ANOVA at a confidence level  $\alpha = 0.05$ ) was also observed in group TTAB 333.3 mg/kg ( $9.9 \pm 1.5$  mg/kg,  $F = 15.49$ ,  $p = 0.0028$ ), group TTAB 1000 mg/kg ( $11.0 \pm 2.5$  mg/kg,  $F = 7.08$ ,  $p = 0.024$ ), and group 8HQB 333.3 mg/kg ( $10.5 \pm 3.0$  mg/kg,  $F = 7.34$ ,  $p = 0.022$ ). Thus, all polymers with specific ligands at certain doses are able to significantly reduce copper content in the kidneys. Because the *in vitro* adsorption studies indicate sufficient copper adsorption for our chosen ligands, we also expected a decrease in liver and brain concentrations. Compared to the controls ( $2.99 \pm 0.32$  mg/kg), we found a statistically significant (according to ANOVA at a confidence level  $\alpha = 0.05$ ) decrease in the brain copper concentrations in group DPAB 1000 mg/kg ( $2.577 \pm 0.094$  mg/kg,  $F = 7.82$ ,  $P = 0.019$ ), group TTAB 333.3 mg/kg ( $2.59 \pm 0.18$  mg/kg,  $F = 6.18$ ,  $p = 0.032$ ), and group TTAB 1000 mg/kg ( $2.59 \pm 0.12$  mg/kg,  $F = 7.14$ ,  $p = 0.023$ ). The decrease in brain copper concentration was not statistically significant in the other groups due to the standard deviation in the contents in the animals within the groups. Promising findings were also observed for copper concentrations in the liver. A statistically significant (according to ANOVA at a confidence level  $\alpha = 0.05$ ) decrease was found in group DPAB 1000 mg/kg ( $3.65 \pm 0.20$  mg/kg,  $F = 7.33$ ,  $p = 0.022$ ) and group TTAB 333.3 mg/kg ( $3.61 \pm 0.17$  mg/kg,  $F = 11.72$ ,  $p = 0.0065$ ) compared to the controls ( $3.97 \pm 0.16$  mg/kg). From a clinical perspective, a significant reduction in copper content in the selected organs is the most important finding because this is the main purpose of our proposed therapy. In further experiments, we will perform a longer-term evaluation, where the original copper content in the liver at the beginning of the experiment would play a smaller role and polymer-induced copper deficiency may fully develop. This trend is also supported by the fact that the content of copper in the blood varied only slightly and not in a statistically significant manner (data not shown); thus, the livers of all experimental animals were still able to maintain copper homeostasis in the blood.

Next, we investigated the interspecies differences in the biological behavior of the polymer. We performed a microPET/CT imaging experiment on mice. Because of the weight of the average mouse, which is approximately one tenth of the weight of the rat, a higher activity for imaging and a longer time interval of 72 h (half-life of  $^{64}\text{Cu}$  is 12.7 h) were required compared to *ex vivo* biodistribution measurements. Therefore, we used no-carrier-added cyclotron-produced  $^{64}\text{CuCl}_2$ . Preliminary animal imaging experiments were performed in four NMRI mice. Two animals received  $^{64}\text{CuCl}_2$ , and the second group of two mice received  $^{64}\text{Cu}$ -8HQB. The animals were scanned at selected time intervals to compare the biodistribution of the studied radiolabeled tracers. Fig. 5 presents the biodistribution of  $^{64}\text{CuCl}_2$  in a mouse up to 72 h after p.o. administration. At the early time intervals (up to 8 h),  $^{64}\text{CuCl}_2$  predominantly remained in the stomach. In contrast, later scans (from 24 h) revealed a clear shift of the tracer into the intestines. Nearly the entire administered dose was excreted at the 72 h time interval. Similar to  $^{64}\text{Cu}$ -chloride, Fig. 6 presents an example of the biodistribution of  $^{64}\text{Cu}$ -8HQB in a mouse up to 72 h after p.o. administration. The  $^{64}\text{Cu}$ -8HQB primarily remained in stomach for all selected imaging time intervals and was slowly excreted via the gastrointestinal tract. The only exception was observed at the 15 min time interval, displaying a radioactive signal in the esophagus caused by minor 'contamination' during p.o. administration.





**Fig. 5.** Biodistribution of  $^{64}\text{CuCl}_2$  in a mouse at selected time intervals. PET (A) and fused PET/CT (B) images (coronal slices) of a mouse scanned 15 min and 2.5, 5, 8, 24, 48, and 72 h after p.o. administration of  $^{64}\text{Cu}$ -chloride displayed using PMOD software. (C) Fused PET/CT 3D images of the same mouse displayed using VolView software.



**Fig. 6.** An example of the biodistribution of  $^{64}\text{Cu}$ -8HQB in a mouse at selected time intervals. PET (A) and fused PET/CT (B) images (coronal slices) of a mouse scanned 15 min and 2.5, 5, 8, 24, 48, and 72 h after p.o. administration displayed using PMOD software. (C) Fused PET/CT 3D images of the same mouse displayed using VolView software.

**Table 2**

Comparison of radioactivity detected in the region of interest (stomach) in selected time intervals in percent of injected dose per gram (%ID/g) calculated by PMOD software, SD = standard deviation; \* – statistically significant difference between  $^{64}\text{CuCl}_2$  and  $^{64}\text{Cu-8HQB}$  on level  $\alpha = 0.05$ .

$^{64}\text{CuCl}_2$	Time interval	15 min	2.5 h	5 h	8 h	24 h	48 h	72 h
	Average %ID/g	15.0	14.4	16.4	17.8	0.4	0.4	0.01*
SD	4.2	4.6	4.9	5.8	0.05	0.07	0.001	
$^{64}\text{Cu-8HQB}$	Time interval	15 min	2.5 h	5 h	8 h	24 h	48 h	72 h
	Average %ID/g	17.1	27.8*	18.3	22.1	17.7*	17.4*	15.2*
SD	5.9	7.3	4.8	5.7	4.3	4.8	3.7	

The data presented in Table 2 clearly demonstrate the significant differences in the biodistribution of the studied radiolabeled tracers. Moreover, we have proven that  $^{64}\text{Cu-8HQB}$  is not absorbed and remains in the gastrointestinal tract, as shown in Fig. 6.

The mouse imaging experiment also demonstrates that there are interspecies differences between rats and mice. In rats, the polymer is not absorbed in the stomach and passes through the gastrointestinal tract, whereas in mice, the radioactivity of  $^{64}\text{Cu}$  on the polymer remains in the stomach; this may be due to the higher adhesivity of the polymer to murine stomach mucosa compared to rat stomach mucosa. However, the fact that the radioactivity of carrier-free  $^{64}\text{Cu}$  was imaged may be a factor because this means that only traces of copper are present in the system, and thus, uptake by microflora in the gastrointestinal tract may play a role compared with the first experiment (Experiment A) which utilized a copper-containing carrier with a specific activity of ca. 100 MBq/mg Cu. Despite these findings, the polymer blocked copper uptake even in the latter imaging experiment for mice.

#### 4. Conclusions

This study investigated polymeric microbeads with three different chelating moieties, *N,N*-di(2-pyridylmethyl)amine (DPAB), triethylenetetramine (TTAB), and 8-hydroxyquinoline (8HQB). We have shown that 8HQB was effective in blocking copper uptake from the gastrointestinal tract in a preliminary copper uptake experiment; this result was confirmed using PET/CT imaging with radiolabeled  $^{64}\text{Cu-8HQB}$ . Because the macroporous polymeric beads are insoluble, it was expected that they would not be absorbed from the digestive tract. Therefore, we followed the absorption of radiolabeled  $^{125}\text{I-8HQB}$  after oral administration. We have shown that there was no measurable radioactivity in the internal organs except those of the digestive tract, through which the polymer passed. This result demonstrates that the polymer is non-resorbable (this is also clear in the PET/CT images). In a long-term experiment feeding rats diets containing the polymers DPAB, TTAB, or 8HQB, the polymers did not affect the amount of food ingested or the weight of the rats, and thus, they are likely non-toxic, as expected because the polymer cannot be absorbed from the digestive tract. The measurement of copper concentrations in the selected organs indicated that at certain doses, all three polymers are capable of significantly reducing the copper content in the kidneys and DPAB and TTAB are capable of significantly reducing the copper content in the liver and brain of rats. Thus, these polymers with specific ligands are promising for a novel therapy for Wilson's disease. The macroporous polymer appears to be non-resorbable and non-toxic and is fully eliminated with the chelated copper from the body in the feces after oral administration.

#### Acknowledgements

Financial support from the Grant Agency of the Czech Republic (Grant # P304/12/0950 and 13-08336S), the Ministry of Industry and Trade of the Czech republic (Grant # MPO-TIP FR-TI4/625), and the Biomedreg (Grant # CZ.1.05/2.1.00/01.0030) is gratefully acknowledged. The authors also acknowledge Dr. Martin Walther (Thieme et al., 2012) from the Helmholtz Centre (HZDR, Dresden, Germany) for the kind gift of carrier-free cyclotron produced  $^{64}\text{CuCl}_2$ .

#### References

- Ala, A., Walker, A.P., Ashkan, K., Dooley, J.S., Schilsky, M.L., 2007. Wilson's disease. *Lancet* 369, 397–408.
- Bruha, R., Marecek, Z., Pospisilova, L., Nevsimalova, S., Vitek, L., Martasek, P., Nevoril, J., Petryl, J., Urbanek, P., Jiraskova, A., Ferenci, P., 2010. Long-term follow-up of Wilson disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver Int.* 31, 83–91.
- Butterworth, R.F., 2010. Metal toxicity, liver disease and neurodegeneration. *Neurotox. Res.* 18, 100–105.
- Das, S.K., Ray, K., 2006. Wilson's disease: an update. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 482–493.
- Hruby, M., Subr, V., Kucka, J., Kozempel, J., Lebeda, O., Sikora, A., 2005. Thermoresponsive polymers as promising new materials for local radiotherapy. *Appl. Radiat. Isot.* 63, 423–431.
- Huster, D., 2010. Wilson disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24, 531–539.
- Linder, M.C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., Lomeli, N., 1998. Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 965–971.
- Mattiasson, B., Kumar, A., Galeev, I.Y., 2009. *Macroporous Polymers: Production Properties and Biotechnological/Biomedical Applications*, first ed. CRC Press, Taylor and Francis Inc., Oxford.
- Merle, U., Schaefer, M., Ferenci, P., Stremmel, W., 2007. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut* 56, 115–120.
- Roberts, E.A., Schilsky, M.L., 2003. A practice guideline on Wilson disease. *Hepatology* 37, 1475–1492.
- Sanchez, F., Moliner, L., Correcher, C., Gonzalez, A., Orero, A., Carles, M., Soriano, A., Rodriguez-Alvarez, M.J., Medina, L.A., Mora, F., Benlloch, J.M., 2012. Small animal PET scanner based on monolithic LYSO crystals: performance evaluation. *Med. Phys.* 39, 643–653.
- Sanchez, F., Orero, A., Soriano, A., Correcher, C., Conde, P., González, A., Hernández, L., Moliner, L., Rodríguez-Alvarez, M.J., Vidal, L.F., Benlloch, J.M., Chapman, S.E., Leevy, W.M., 2013. ALBIRA: a small animal PET/SPECT/CT imaging system. *Med. Phys.* 40, # 051906.
- Shimizu, N., Fujiwara, J., Ohnishi, S., Sato, M., Kodama, H., Kohsaka, T., Inui, A., Fujisawa, T., Tamai, H., Ida, S., Itoh, S., Ito, M., Horiike, N., Harada, M., Yoshino, M., Aoki, T., 2010. Effects of long-term zinc treatment in Japanese patients with Wilson disease: efficacy, stability, and copper metabolism. *Transl. Res.* 156, 350–357.
- Skodova, M., Kucka, J., Vetric, M., Skopal, J., Walterova, Z., Sedlacek, O., Stepanek, P., Mattova, J., Pouckova, P., Urbanek, P., Hruby, M., 2013. Chelating polymeric particles intended for the therapy of Wilson's disease. *React. Funct. Polym.* 73, 1426–1431.
- Thieme, S., Walther, M., Pietzsch, H.J., Henniger, J., Preusche, S., Mading, P., Steinbach, J., 2012. Module-assisted preparation of  $^{64}\text{Cu}$  with high specific activity. *Appl. Radiat. Isot.* 70, 602–608.
- Uno, A., Ishida, H., Konno, K., Ohnami, Y., Naganuma, H., Niizawa, M., Hamashima, Y., Masamune, O., 1997. Portal hypertension in children and young adults: sonographic and color Doppler findings. *Abdom. Imaging* 22, 72–78.
- van den Bergh, P.V.E., Klomp, L.W.J., 2009. New developments in the regulation of intestinal copper absorption. *Nutr. Rev.* 67, 658–672.

**Příloha IVa: Multistage-targeted pH-responsive polymer conjugate of Auger electron emitter: Optimized design and in vivo activity**

Multistage-targeted pH-responsive polymer conjugate of Auger electron emitter: Optimized design and in vivo activity. Sedlacek Ondrej, Kucka Jan, Mattova Jana, Parizek Martin, Studenovsky Martin, Zadinova Marie, Pouckova Pavla, Hruby Martin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, vol. 63, p. 216 – 225. IF 3,773.



# Multistage-targeted pH-responsive polymer conjugate of Auger electron emitter: Optimized design and *in vivo* activity



Ondrej Sedlacek<sup>a</sup>, Jan Kucka<sup>a</sup>, Jana Mattova<sup>b</sup>, Martin Parizek<sup>c</sup>, Martin Studenovský<sup>a</sup>, Marie Zadinova<sup>b</sup>, Pavla Pouckova<sup>b</sup>, Martin Hruby<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i., Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Salmovska 1, 120 00 Prague 2, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Physiology AS CR, v.v.i., Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 5 June 2014

Received in revised form 17 July 2014

Accepted 31 July 2014

Available online 7 August 2014

### Keywords:

Ellipticine  
Drug delivery  
Radiotherapy  
Auger electrons  
Intercalator  
Iodine-125

## ABSTRACT

Auger electrons-emitting radioisotopes (such as iodine-125) are a potentially effective cancer treatment. They are extremely biologically effective, but only within a short range (nanometers). Their use as an effective cancer therapy requires that they will be transported within close proximity of DNA by an intercalator, where they induce double-strand breaks leading to cell death. This type of therapy may be even more beneficial when associated with drug delivery systems. In this report, we describe an optimized triple-targeted polymer delivery system for the intercalator ellipticine, which contains radioisotope iodine-125 with high specific radioactivity (63.2 GBq/mg). This compound is linked to an *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer via an optimized acid-sensitive hydrazone linker. The system is stable at pH 7.4 (representing the pH of blood plasma), and the radioiodine-containing biologically active intercalator is released upon a decrease in pH (44% of the intercalator is released after 24 h of incubation in pH 5.0 buffer, which mimics the pH in late endosomes). The active compound is a potent intercalator, as shown with direct titration with a DNA solution, and readily penetrates into cell nuclei, as observed by confocal microscopy. Its polymer conjugate is internalized into endosomes and releases the radioactive intercalator, which accumulates in the cell nuclei. *In vivo* experiments on mice with 4T1 murine breast cancer resulted in a statistically significant increase in the survival of mice treated with the polymer radioconjugate. The free radiolabeled intercalator was also shown to be effective, but it was less potent than the polymer conjugate.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Internal radiotherapy is one of most effective means of cancer treatment enabling a theranostic approach (simultaneous therapy and diagnostics of the tumor); however, its effectiveness is dependent on the selective delivery of the radionuclide to the target tissue (Bernhardt et al., 2001; O'donoghue and Wheldon, 1996; Ting et al., 2010; Wheldon et al., 1991). In most cases, therapy with  $\beta^-$

emitters is used (Wheldon et al., 1991; Balan et al., 1994). However, this therapy suffers from many drawbacks due to the relatively long range of  $\beta^-$  radiation in living tissues (typically several millimeters depending on the energy) particularly the radiation burden of the healthy tissues (Foerster et al., 1986; Huang et al., 2012). Radioactive decay of many radionuclides (e.g.,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$  or  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) is accompanied by the emission of several Auger electrons (AEs), which have relatively low energy and are emitted during the electron shell reorganization after nuclear decay (Weiss et al., 1988). The AEs are a form of potent ionizing radiation within their very short range in living tissue (typically a few nanometers, i.e., tens of chemical bonds) (Kassis, 2003; Volkert et al., 1991). However, to be effective as radiotherapeutics, they must be localized within the cell nucleus, preferentially within close proximity to or into (e.g., as [ $^{125}\text{I}$ ]-iododeoxyuridine) deoxyribonucleic acid (DNA) (which is the main biological target for ionizing radiation) (Feinendegen, 1975). Here they can induce double-strand breaks leading to cell apoptosis, rather than mutations that are caused by other types of

**Abbreviations:** AEs, Auger electrons; ANOVA, analysis of variance; bp, base pair; EPR (effect), Enhanced Permeation and Retention effect – EPR (effect); GPC, gel permeation chromatography; HPMA, *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide; MALS, multiangle light scattering; MS, mass spectrometry; PBS, phosphate buffered saline; poly(HPMA-co-MAAcap-hydrazide), poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-co-1-*N*-(6-hydrazino-6-oxohexyl)-2-methylacrylamide]; RAFT, reversible addition–fragmentation chain-transfer; SEC, size exclusion chromatography; UV–VIS, ultraviolet–visible range (spectrometry).

\* Corresponding author. Tel.: +420 296 809 230; fax: +420 296 809 410.

E-mail address: [mhruby@centrum.cz](mailto:mhruby@centrum.cz) (M. Hruby).

DNA damage (Kassis et al., 1999a; Häfliger et al., 2005). AEs emitter-bearing intercalators, such were [ $^{125}\text{I}$ ]-iodinated daunorubicin (Ickenstein et al., 2006) or acridine derivatives (Gardette et al., 2014, 2011), are especially advantageous in such cases because they transport the radionuclide directly to the DNA. Such isotopically labeled intercalators may be more effective when combined with a drug delivery system (Fig. 1), which would ensure selective, targeted delivery of the radionuclide into tumor tissue (*first targeting* by, e.g., passive tumor accumulation due to the Enhanced Permeation and Retention (EPR) effect) (Sedláček et al., 2011; Etrych et al., 2001; Ulbrich and Šubr, 2010; Maeda et al., 2000). In solid tumor tissue, the AE emitter-bearing intercalator can be released from its carrier in a controlled fashion, for example, by including an acid-labile hydrazone linker between the carrier and the radio-labeled intercalator that will break upon the decrease in pH in a hypoxic tumor microenvironment (*second targeting* by pH-activation). According to our preliminary studies, the pH-dependent drug release rate may be precisely adjusted so that the conjugate is stable during transport in the bloodstream at pH 7.4, and subsequently, the intercalator is released in late endosomes after internalization into tumor cells (where pH may drop to 5.0) (Sedláček et al., 2012, 2013). The conjugate should be also relatively stable in tumor interstitial space (where pH is around 6.5) to prevent washing out redistribution of the active released radioiodinated intercalator within organism. After being released, the intercalator transports the radionuclide into the cell nuclei due to its affinity for DNA and ability to passively cross phospholipid bilayers (*third targeting*). This decreases the radiation burden of healthy tissues during transport into the target tumor tissue and allows the biodistribution to be followed by real time  $\gamma$ -imaging from the primary  $\gamma$ -rays of the decay (which are far less biologically effective than AEs). The first system for the delivery of the AEs emitter-containing intercalators employing triple targeting approach was recently developed in our group (Sedláček et al., 2011). However, this system, consisting of polymer-bound [ $^{125}\text{I}$ ]-iodinated ellipticine, had limited biological efficacy because of the low specific

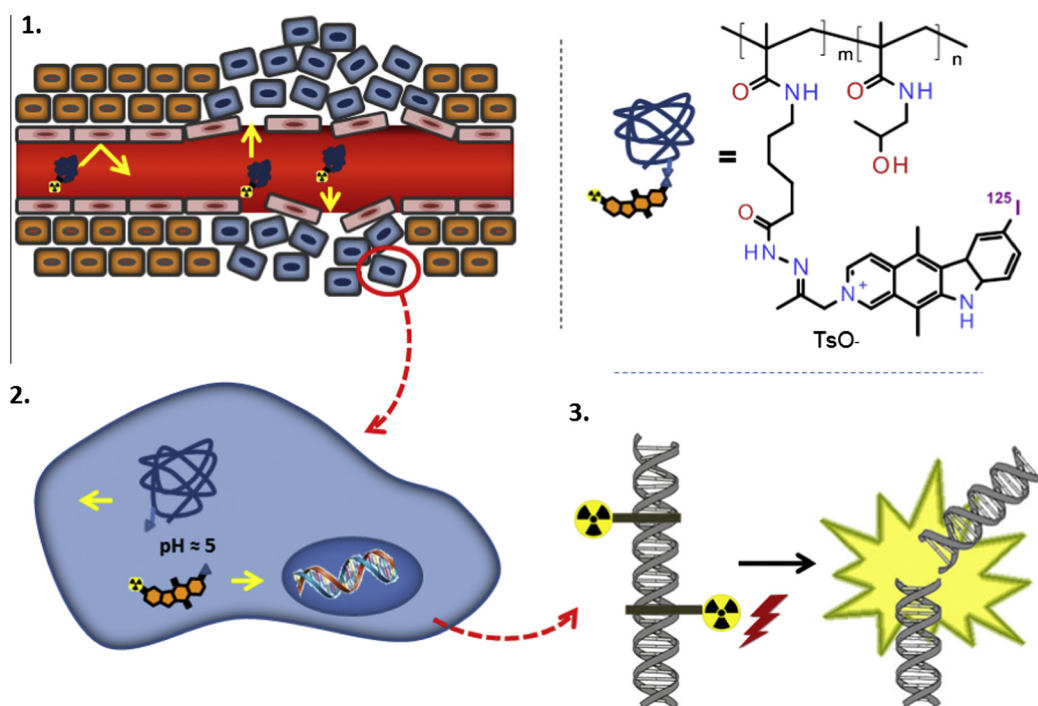
activity of the radiotherapeutic (8.2 MBq/mg). Further, Gedda et al. published a system containing [ $^{125}\text{I}$ ]-iodinated daunorubicin enclosed in a liposome (Fondell et al., 2010). However, in these non-covalent systems, the release of the bioactive component cannot be managed as well as in covalent conjugates (the second targeting step is disputable). Therefore, we optimized our first preliminary system and evaluated the biological efficacy of the upgraded system in an *in vivo* animal cancer model.

This report describes a conceptually new finely tuned anticancer delivery system for the Auger electron emitter  $^{125}\text{I}$  (half-life  $T_{1/2} = 59.4$  days, electron capture decay mode) for the first time with a precisely tailored triple-targeting approach. It consists of a derivative of the potent DNA intercalator ellipticine (which was chosen on the basis of its strong intercalating ability, facile straightforward functionalization chemistry to hydrazone-conjugable radioiodinated derivative and relative chemical stability) that contains  $^{125}\text{I}$ , a radioisotope with high specific radioactivity (63.2 GBq/mg). This is linked, via an optimized hydrazone linker, to the *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) copolymer (see Fig. 2), which has a narrow molecular weight distribution [synthesized by reversible addition-fragmentation chain-transfer (RAFT) copolymerization]. The copolymer of HPMA was chosen because of its known biocompatibility and favorable biodistribution of the HPMA copolymers in general (Lammers et al., 2005; Shiah et al., 2001). The preliminary *in vivo* therapeutical evaluation was performed using an animal cancer model. This system should be efficient while reducing whole-body radiation burden.

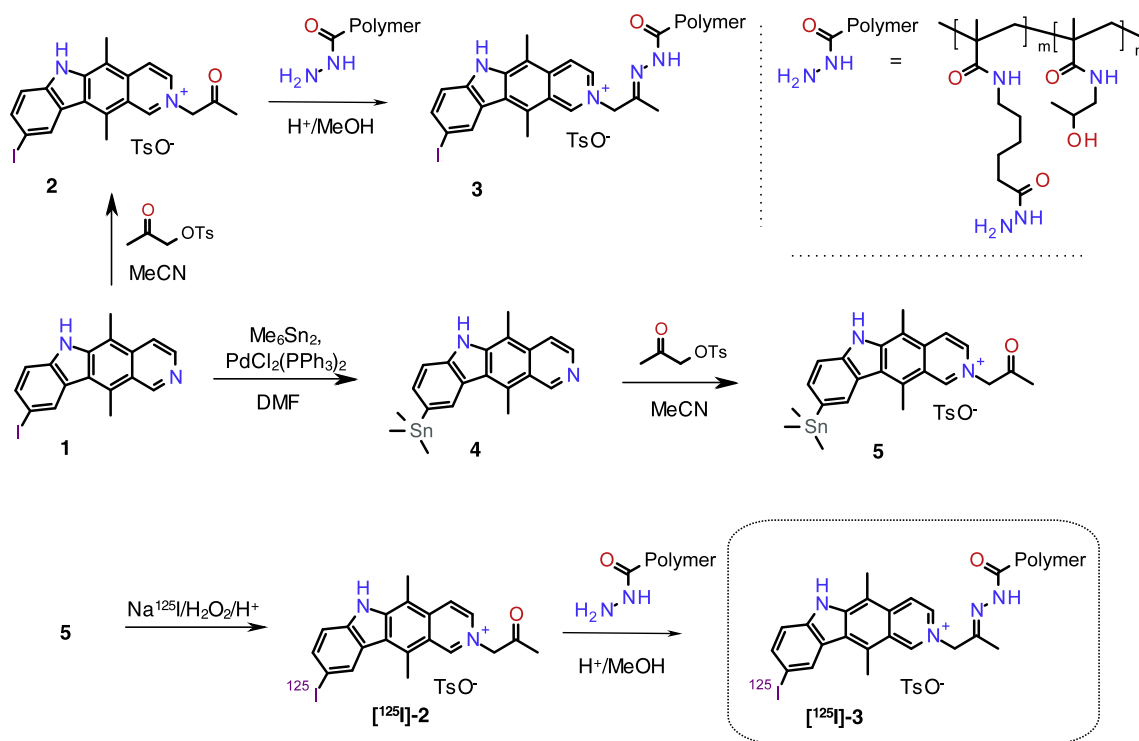
## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials and general procedures

The poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-co-1-*N*-(6-hydrazino-6-oxohexyl)-2-methylacrylamide] (poly(HPMA-co-MAAcap-hydrazide)), weight-average molecular weight  $M_w = 25.4$  kDa, polydispersity  $I = M_w/M_n = 1.21$ , where  $M_n$  is



**Fig. 1.** Mechanism of the triple-targeting approach: (1) The polymer-bound radioactive intercalator is accumulated in the tumor tissue by EPR effect. (2) The radioactive intercalator is released from the polymer due to the hydrolysis of the pH-responsive hydrazone linker in the acidic environment of the endosome. (3) After intercalation into the DNA, the radioactive decay of the Auger electron emitter causes severe damage of DNA, leading to cell apoptosis.



**Fig. 2.** Synthesis of the polymer conjugates. Polymer: poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-co-1-N-(6-hydrazino-6-oxohexyl)-2-methylacrylamide] (poly(HPMA-co-MAAcap-hydrazide)); (1) – 9-iodoellipticine; (2) – 2-oxopropyl 9-iodoellipticinium tosylate; (3) – polymer conjugate of 2-oxopropyl 9-iodoellipticinium tosylate; (4) – 9-(trimethylstannyl)ellipticine; (5) – 2-oxopropyl-9-(trimethylstannyl)ellipticinium tosylate.

number-average molecular weight, 7.5 mol% of hydrazide monomer unit) was synthesized by reversible addition and fragmentation (RAFT) copolymerization of *N*-(2-hydroxypropyl)methylacrylamide with *N*-Boc-protected *N*-(6-hydrazino-6-oxohexyl)-2-methylacrylamide using azobis(isobutyronitrile) as an initiator and 2-cyano-2-propyl benzodithioate as chain transfer agent, followed by deprotection according to Chytil et al. (2010). 9-Iodoellipticine (1) was synthesized according to Devraj et al. (1996) in 66% yield. Tosylacetol was synthesized from propargylalcohol according to Dickschat et al. (2005) in 51% overall yield. No-carrier-added Na<sup>125</sup>I solution was purchased from Lacomel Ltd. (Czech Republic). All other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich Ltd. (Prague, Czech Republic) and were used without further purification. Analyses were performed on a HPLC chromatograph (Dionex Ultimate 3000, Dionex, USA) using a reverse-phase column (Chromolith Performance RP-18e 100 × 4.6 mm, Merck, Germany) and UV detection. FlowStar LB 513 Radio Flow Detector (Berthold Technologies, Germany) was used for the in-line radioactivity measurements. Mixture of water and acetonitrile was used as the eluent with a gradient of 5–100 vol.% of acetonitrile with 0.1% of trifluoroacetic acid in 5 min at a flow rate of 5 mL/min, unless stated otherwise. NMR spectra were measured with a Bruker Advance MSL 300 MHz NMR spectrometer (Bruker Daltonik, Germany). The molecular weights of the polymers were determined by size exclusion chromatography (SEC) using HPLC Ultimate 3000 system (Dionex, USA) equipped with a GPC column (TSKgel G3000SWxl 300 × 7.8 mm, 5 μm), UV/VIS, refractive index (RI) Optilab<sup>®</sup>-rEX and multiangle light scattering (MALS) DAWN EOS (Wyatt Technology Co., USA) detectors using a methanol and sodium acetate buffer (0.3 M, pH 6.5) mixture (80:20 vol.%, flow rate of 0.5 mL/min). UV/VIS spectra were measured on an Evolution 220 Spectrometer (Thermo Scientific, USA). Fluorescence spectra were measured on Jasco spectrofluorometer (Jasco, USA). The content of the ellipticine derivative in the conjugate, as well as the release profile of the

conjugates were determined as reported previously (by UV–VIS spectrophotometry or GPC, respectively) (Etrych et al., 2001). For the drug release measurement, the phosphate buffer saline (150 mM, pH 7.4), respectively the acetate buffer (150 mM, pH 5.0), were used. Radioactivity of the products was measured using a ionization chamber Bqmetr 4 (Empos Ltd., Czech Republic).

## 2.2. Synthesis of 2-oxopropyl 9-iodoellipticinium tosylate (2)

Tosylacetol (90 mg, 0.4 mmol) was added to the solution of 9-iodoellipticine (1, 30 mg, 80 μmol) in dry acetonitrile (0.5 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then, it was evaporated *in vacuo* and the orange solid was triturated three times with ethyl acetate. The crude product was purified by the preparative TLC (silica, MeOH–CHCl<sub>3</sub> 3:7 with 1% AcOH) to give 2 (42 mg, 88% yield) as an orange solid.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 12.41 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.54 (d, *J* = 7.23 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 7.31 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.40 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.39 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.05 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 7.98 Hz, 2H), 5.82 (s, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.28 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 200.2, 148.2, 145.7, 144.4, 141.8, 137.4, 136.7, 136.5, 134.4, 134.1, 132.8, 132.3, 132.1, 127.9, 125.4, 124.8, 124.6, 119.9, 114.0, 110.9, 67.1, 27.0, 20.7, 15.0, 12.0; MS (ESI+) *m/z* 429.3(calcd): 429.2 [M]<sup>+</sup>; Anal. calcd for C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: 54.01% C, 4.20% H, 4.67% N; found: 54.04% C, 4.27% H, 4.59% N.

## 2.3. Synthesis of polymer conjugate 3

The solution of poly(HPMA-co-MAAcap-hydrazide) (*M<sub>w</sub>* = 25.4 kDa, *I* = *M<sub>w</sub>*/*M<sub>n</sub>* = 1.21; 50 mg), iodoellipticinium derivative (10 mg) and glacial acetic acid (50 μL) in methanol (500 μL) was stirred at room temperature for 3 days. The polymer was then isolated by gel filtration on Sephadex LH-20 column (80 mL bed

volume) using methanol as eluent, concentration of polymer-containing fractions under reduced pressure, precipitation into diethyl ether (10 mL), filtration and drying. Yield 46 mg of conjugate **3**.  $M_w = 26.8$  kDa,  $M_w/M_n = 1.24$ ; content of iodoellipticinium **2** in the conjugate 6.2% wt.

#### 2.4. Synthesis of 9-(trimethylstannyl)ellipticine (**4**)

9-iodoellipticine (**1**, 30 mg, 80  $\mu$ mol), hexamethylditin (50  $\mu$ L, 0.24 mmol) and dichlorobis(triphenylphosphine)palladium(II) (9.2 mg, 13.2  $\mu$ mol) were dissolved in 4 mL of dimethylformamide and the reaction mixture was stirred 2 h at 80 °C under argon atmosphere. The solvent was then evaporated under vacuum and the solid was extracted with diethyl ether. The dark cloudy solution was filtered, concentrated under vacuum, diluted with hexane and concentrated again to crystallization. The same procedure was repeated once again to obtain pale yellow crystals of pure product **4** (10 mg, 61% yield).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, *DMSO-d6*)  $\delta$  ppm 11.35 (s, 1H), 9.67 (s, 1H) 8.43–8.39 (m, 3H), 7.61–7.52 (m, 2H), 3.26 (s, 3H), 2.76 (s, 3H), 0.33 (t, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, *DMSO-d6*)  $\delta$  ppm 149.3, 142.6, 140.2, 139.9, 133.7, 132.1, 130.4, 129.8, 127.7, 123.3, 122.8, 121.7, 115.5, 110.4, 107.6, 14.1, 11.6, –9.2; MS (ESI+)  $m/z$  409.1 (calcd): 410.0 [M+H] $^+$ ; Anal. calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{Sn}$ : 58.72% C, 5.42% H, 6.85% N; found: 58.54% C, 5.46% H, 6.79% N.

#### 2.5. 2-Oxopropyl-9-(trimethylstannyl)ellipticinium tosylate (**5**)

Compound **4** (12 mg, 29  $\mu$ mol) was quaternized with tosylacetol (33 mg, 0.15 mmol) in dry acetonitrile (0.5 mL) at room temperature overnight. After precipitation in ethyl acetate and filtration the product was isolated on Sephadex LH-20 column (100 mL bed volume) using methanol as an eluent to produce after solvent evaporation product **5** (14 mg, 73% yield) as yellow solid.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, *DMSO-d6*)  $\delta$  ppm 12.43 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.55–8.52 (m, 2H), 8.31 (d,  $J = 7.17$  Hz, 1H), 7.78–7.69 (m, 2H), 7.46 (d,  $J = 8.04$  Hz, 2H), 7.10 (d,  $J = 7.91$  Hz, 2H), 5.81 (s, 2H), 3.30 (s, 3H), 2.89 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 0.38 (t, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, *DMSO-d6*)  $\delta$  ppm 200.2, 147.6, 145.7, 144.3, 142.9, 137.4, 135.6, 133.4, 132.8, 132.6, 131.9, 131.4, 128.6, 127.9, 125.9, 125.3, 122.6, 119.9, 111.5, 110.4, 67.0, 26.9, 20.6, 13.8, 11.9, –9.0; MS (ESI+)  $m/z$  466.2 (calcd): 466.3 [M+H] $^+$ ; Anal. calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4\text{SSn}$ : 56.53% C, 5.38% H, 4.40% N; found: 56.41% C, 5.39% H, 4.36% N.

#### 2.6. Synthesis of [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** and [ $^{125}\text{I}$ ]-**3**

To the mixture of stannylated precursor **5** (0.5 mg in 40  $\mu$ L of acetonitrile) were added 12  $\mu$ L of glacial acetic acid, 8  $\mu$ L of hydrogen peroxide (30% aqueous solution) and 18  $\mu$ L of  $\text{Na}^{125}\text{I}$  stock solution (334 MBq). The reaction tube was sealed and vortexed for 20 min. Then, the reaction mixture was separated using the Chromolith Performance RP-18e HPLC column. The separation was carried out with the gradient of acetonitrile in water (5–100% acetonitrile in 20 min) with 0.1% of trifluoroacetic acid at a flow rate of 2 mL/min, using 120  $\mu$ L injection loop and radiodetection. The radioactive peak ( $R_t = 8.5$  min) was collected and evaporated *in vacuo*. The yield was 289 MBq of [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** (87% radiochemical yield, specific radioactivity 63.2 GBq/mg). The purity and the specific radioactivity of [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** was assayed by the same HPLC system as above, using gradient of acetonitrile in water (5–100% in 5 min) with 0.1% of trifluoroacetic acid at a flow rate of 5 mL/min, using 20  $\mu$ L injection loop, radiodetection and UV–VIS detection, as well. The specific radioactivity of [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** was calculated from the ratio of its UV–VIS and radiodetection peak areas.

For this purpose, the UV–VIS detector calibration was carried out using **2** as a standard.

Conjugation to the polymer was done in the same way as for the non-radiolabeled polymer, but using higher excess of polymer (10 mg) to *N*-2-oxopropyl-9-iodoellipticinium [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** (160 MBq). Yield 10 mg of the conjugate [ $^{125}\text{I}$ ]-**3** containing 145 MBq of [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** (91% radiochemical yield).

#### 2.7. *In vitro* intercalation

The solution of **2** in PBS buffer (20  $\mu$ M, 3 mL) with 1 mM EDTA–2Na in spectrophotometric cuvette was titrated with aliquots of calf thymus DNA in phosphate buffered saline (PBS, 4.3 mM) (Volkert et al., 1991). After each addition of DNA, the fluorescence emission spectra were recorded (Fig. 3), using the excitation wavelength of 350 nm. The titration continued until the spectra changes of were minimal. From the function of fluorescence emission intensity at 534 nm (spectra maximum) on the amount of added DNA, the binding affinity was determined. The drug binding fraction  $\alpha$  at each titration point was calculated from the equation:

$$\alpha = C_b/C = (1 - C_f)/C = (I - I_f)/(I_b - I_f)$$

where  $C_b$  and  $C_f$  is the concentration of fully bound and free drug **2**, respectively,  $C$  is the total concentration of **2**,  $I$  is the fluorescence emission intensity at each point of titration,  $I_f$  and  $I_b$  are the fluorescence intensities of free and fully bound drug **2**, respectively. Then the amount of drug bound per unit of DNA  $r$  at each point of titration can be determined as  $r = \alpha \cdot C/C_{\text{DNA}}$ , where  $C_{\text{DNA}}$  is the total concentration of DNA in the sample. The intrinsic binding constant  $K_i$  was then calculated using the equation  $r/C_f = K_i(n - r)$ , where  $n$  represents the number of DNA base pairs occupied by the bound drug (Volkert et al., 1991). The experiments were performed in triplicates.

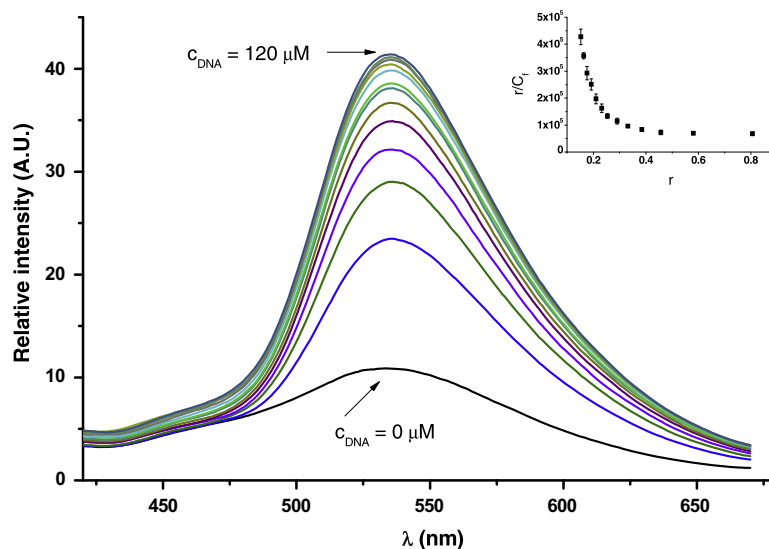
#### 2.8. *In vitro* cell internalization

Internalization of the ellipticine derivatives and their conjugates into cells was assayed with murine mammary carcinoma cell line 4T1 (ATCC, USA) cell line. The cells were seeded on sterile microscopic glass inserted into 24-well polystyrene plates (TPP, Switzerland; well diameter 1.5 cm). The seeding density was 30,000 cells/well, i.e. 17,000 cells/cm<sup>2</sup>. The cells were cultivated for 48 h in 1.5 mL RPMI media (Sigma, U.S.A.) supplemented with fetal bovine serum (Sebak GmbH, Germany) and gentamicine (LEK, Slovenia) (Maeda et al., 2000).

After that nonradioactive 2-oxopropyl-9-iodoellipticinium (**2**) and its conjugate **3** (as 1 wt.% stock solutions in dimethyl sulfoxide), respectively, were added to reach the final concentration 0.1 mg/mL (free ellipticinium or equivalent bound to polymer). Cell nuclei were stained with nuclear dye Hoechst # 33342 (Sigma, U.S.A.) for live cells. The dye was added 5 min before observation of the particular specimen at the given time interval. Internalization was followed in time intervals 2.5 h, 5 h and 24 h, the cells were observed on a confocal microscope Leica SPE (Leica, Germany).

#### 2.9. *In vivo* experiments

All animal experiments described hereinafter in this manuscript have been performed in accordance with The Law of Animal Protection against Cruelty (Act No. 359/2012) of the Czech Republic, which is fully compatible with the corresponding European Union directives, and was approved by the Ethical Committee as requested by the above stated legislative. The pre-cultivated 4T1 tumor cells were applied subcutaneously ( $10^7$  cells per animal) as a mixture with BD Matrigel™ (I.T.A.-Interact, Ltd., Prague, Czech



**Fig. 3.** Enhancement of the emission fluorescence intensity of **2** with increasing concentration (10  $\mu\text{M}$  increments) of calf thymus DNA from  $C_{\text{DNA}} = 0 \mu\text{M}$  (bp) to  $C_{\text{DNA}} = 120 \mu\text{M}$  (bp). Inset graph: Scatchard plot of the fluorescence titration at 534 nm. Excitation wavelength was 350 nm.

Republic) into the back of female Balb/C mice (The Jackson Laboratory, Maine, USA, 6 weeks old). When the tumors reached the size of about 6 mm in diameter (after 7 days), the mice with uniformly grown tumors ( $n = 25$ ) were randomly divided into three groups. Each animal in group received single dose of therapeutic in phosphate buffered saline (PBS) i.v. into the tail vein as follows:

Group 1 ( $n = 9$ ): [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** (2 MBq, in 70  $\mu\text{L}$  of PBS).

Group 2 ( $n = 8$ ): [ $^{125}\text{I}$ ]-**3** (2 MBq, in 40  $\mu\text{L}$  in PBS).

Controls ( $n = 8$ ) untreated control group.

After application, survival of mice was observed. Moreover, mice were shaved in the area of the tumor and tumor growth was recorded twice a week. Tumor volumes were measured by a caliper and calculated by the following equation:

$$V = \frac{a \times b \times b \times \pi}{6}$$

where  $V$  was the tumor volume,  $a$  was the length and  $b$  was the width of the surface area. The statistical evaluation of data was performed with an OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, MA, U.S.) computer program. Calculation of analysis of variance (ANOVA) was performed at significance level  $\alpha = 0.05$  and  $\alpha = 0.10$ , respectively.

### 3. Results and discussion

An ellipticine analogue with the stable isotope of  $^{127}\text{I}$  was synthesized (Fig. 2) to determine the main physico-chemical characteristics of the iodinated ellipticine derivative, such as the *in vitro* drug intercalation, internalization, and the release rate of the ellipticine derivative from the conjugate, all of which are largely independent of the isotope of the iodine used. 9-Iodoellipticine (**1**) was prepared through the acetomercuration of ellipticine followed by the iodination of the mercurio-intermediate (Devraj et al., 1996). Because the 9-iodoellipticine moiety does not contain an oxo group, which is necessary for the formation of hydrazone bond, it was quaternized with 2-oxopropyl-*p*-toluenesulfonate to form the *N*-(2-oxopropyl)-9-iodoellipticinium *p*-toluenesulfonate (**2**). This compound was used as the non-radioactive analogue of the radioactive drug described below. For the quaternization, 2-oxopropyl-*p*-toluenesulfonate was used instead of the more accessible

bromoacetone because the bromide anion, unlike the tosylate, would be partly oxidized to bromine by hydrogen peroxide during the radioiodination (see below) and would therefore interfere in the destannylation process to produce bromoderivative, which is hard to separate from the iododerivative (Moerlein and Coenen, 1985).

The efficacy of the AE emitters is highly dependent on their proximity to the DNA (O'donoghue and Wheldon, 1996; Kassiss et al., 1999b). Thus, the high DNA binding ability of the iodinated intercalator is essential for efficacy of the whole system. The intercalation constant was determined by direct titration of the iodoellipticinium **2** with a solution of calf thymus DNA followed by measurement of the fluorescence emission spectra (excitation wavelength of 350 nm) (Fox, 1997). Upon each addition of DNA, the intensity of the fluorescence emission increased (Fig. 3). The drug-DNA intercalation constant was determined using a Scatchard plot, based on the dependence of the fluorescence intensity at maxima (534 nm) on the amount of added DNA at each point of titration (Sorace and Sheid, 1978; Kohn et al., 1975). Similarly as described previously for ellipticine and quaternary ellipticinium derivatives (Sedláček et al., 2013), the 9-iodoellipticine exhibits two different binding modes depending on the drug/DNA ratio. The calculated binding constant was  $K_i = 4.3 \pm 0.32 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (bp) with an average binding density of one molecule of iodoellipticinium **2** to 4.05 base pairs (bp) of DNA. These values are slightly lower than those measured for the similar ellipticinium compound lacking iodine (Sedláček et al., 2013). This may be attributed to the steric and hydrophobic effects of the iodine atom. However, the intercalation constant is high enough that **2** may be considered as an effective intercalator (for comparison, the DNA affinities of ethidium bromide and acridine orange are  $K_i = 1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (bp) (Gaugain et al., 1978) and  $K_i = 3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (bp) (Lyles and Cameron, 2002), respectively).

The non-radioactive iodoellipticinium **2** was linked to the hydrazide group containing the HPMA copolymer ( $M_w = 25.4 \text{ kDa}$ ,  $I = M_w/M_n = 1.21$ ) to form the polymer conjugate **3**. The molecular weight and polydispersity ( $M_w = 26.8 \text{ kDa}$ ,  $M_w/M_n = 1.24$ ) being only slightly higher compared to starting HPMA copolymer indicates the absence of cross-linking during the conjugation reaction. The content of iodoellipticinium **2** in the conjugate was 6.2% wt., and the yield of conjugation with respect to the ellipticinium derivative was 76%. Furthermore, the rate of drug **2** release from the



HPMA copolymer at 37 °C was determined by HPLC. The results indicated that hydrolysis of the low molecular weight drug–polymer hydrazone linker was highly pH sensitive (Fig. 4). At pH 7.4 (mimicking the pH of the blood plasma), the linker was stable and almost no drug was released from the polymer (0.11% in 24 h). However, at pH 5.0 [mimicking the pH in late endosomes, where the polymer conjugates typically get into after internalization (Etrych et al., 2001)] rapid release of drug **2** was observed [47% of the drug **2** was released within 24 h, which is fully consistent with typical tumor accumulation curves for HPMA conjugates giving maximum after ca 24 h and plateau/slow elimination for several following days (Etrych et al., 2001)]. Importantly, the release at pH 6.5 (model of tumor interstitial space) is also relatively slow, less than 6 % within 24 h, assuring that unwanted redistribution of the released radioiodinated intercalator within the body would be minimal. These values are consistent with our previous results (Sedláček et al., 2013), in which the structure of ketone linkers was optimized with respect to the hydrolysis rate of the hydrazone conjugates.

The release of drug **2** from polymer **3** in the pH 5.0 buffer is approximately twice as fast as of the release in our first system (Sedláček et al., 2011), and the conjugate in the present study remained intact at pH 7.4. This represents a significant improvement of the system with respect to the second targeting step (pH-responsive drug release).

Internalization of ellipticine derivatives can be directly observed without additional staining due to their inherent fluorescence properties (Bawa et al., 2012). The use of fluorescence of the nonradioactive drug instead of radioactivity of the radiolabeled compound allows not only to follow internalization of the ellipticine derivative as whole, but also intracellular localization in real time. However, Hoechst # 33342 nuclear stain was applied to visualize the co-localization in the cell nuclei. Hoechst # 33342 dye and the ellipticinium derivative **2** both possess DNA intercalating ability, which is a crucial requirement for the therapeutic effect of the studied system. For both the free (**2**) and polymer-bound drug (**3**), the co-localization in the cell nuclei can be visualized after 24 h (Fig. 5A and B), indicating effective intercalation *in vitro* as well as effective release of the intercalator from the polymer conjugate in the cells. Staining of the cell nuclei with 2-oxopropyl-9-iodoellipticinium occurs more slowly for the polymer conjugate **3** than for the free drug **2**; this may be explained by the fact that free drug must be released from the conjugate before it acts as an intercalator, a process that takes time. For HPMA copolymers the diffusion itself in cells is much faster than the *in vitro* release rate observed

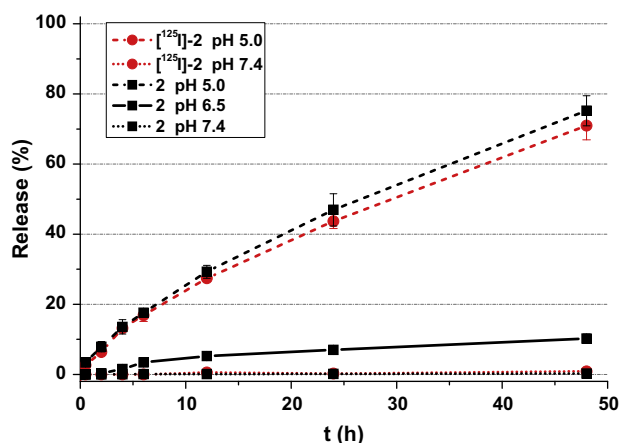
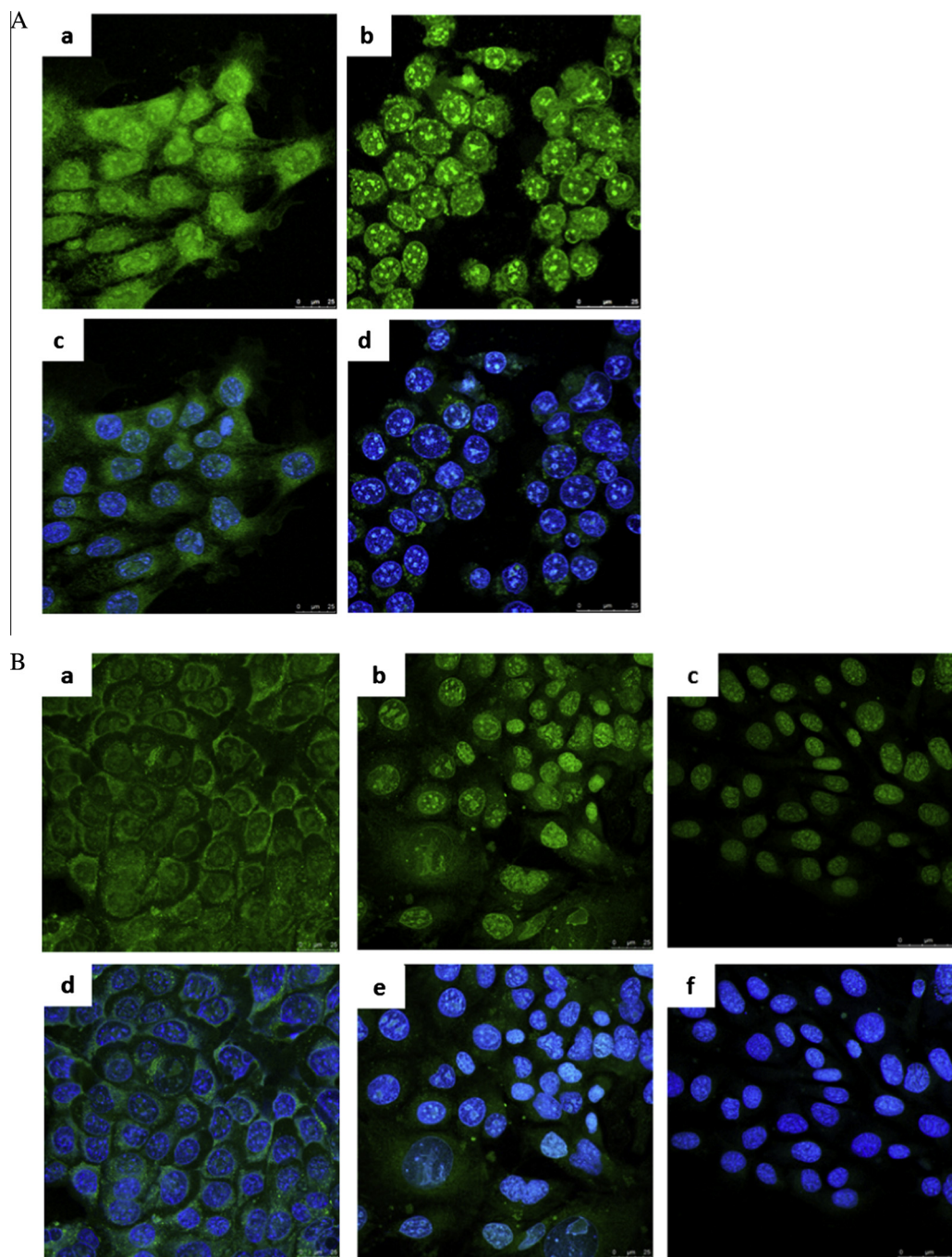


Fig. 4. The release profiles of derivatives **2** (solid line) and [<sup>125</sup>I]-**2** (dashed line) from their conjugates **3**, [<sup>125</sup>I]-**3**, in buffered media at 37 °C.

for the system described in this manuscript so this is unlikely to be a significantly diffusion-controlled effect. Furthermore, this observation indicates the anticipated release of drug **2** from the polymer carrier after cell internalization. It is interesting to note that the extranuclear space in the cell (i.e., cytoplasm and organelles such as endosomes) was stained more in the case of the free drug than for the conjugate, especially after 24 h. One would expect the opposite because the ellipticine derivative is most likely released from the conjugate in the acidic environment of late endosomes, which are expected to remain fluorescent in the meantime. It is likely that an excess of the free drug exists outside of the cell, thus oversaturating the binding sites within the cells, including the cell nuclei. In addition, cytoplasmic binding sites with lower affinity, such as RNA or proteins, may bind the ellipticinium derivative **2** (Wilson et al., 1993). In contrast, only the intracellularly released drug from the polymer conjugate is available in the cells and is present in a lower quantity; this quantity is most likely not sufficient to saturate the cell nucleus that contains DNA to which the intercalator has a high binding affinity. As we have shown on *in vitro* release, the ellipticine derivative remains bound to the polymer in a neutral environment in the cultivation media (Fig. 4).

After observing satisfactory *in vitro* results using the non-radioactive system, the same system was developed using the Auger emitting radioisotope <sup>125</sup>I in place of the naturally occurring non-radioactive isotope <sup>127</sup>I (Fig. 2). Because the high specific radioactivity of the radiolabeled intercalator is desirable, it is necessary to synthesize a radioisotope without an added carrier; thus, the radioiodination step needs to occur quickly and have a high yield, and the radioactive product needs to be easily separated from the reaction mixture. The direct radioiodination of ellipticine used previously had a low yield (and thus required a large excess of carrier-added iodine) (Sedláček et al., 2011); therefore, the iododestannylation approach was chosen. This reaction fulfils all of the necessary criteria (Krause et al., 1997). First, the trimethylstannyl group was introduced to the ellipticine base by reaction of 9-iodoellipticine (**1**) with hexamethylditin in the presence of the palladium complex catalyst. This yielded 9-(trimethylstannyl)ellipticine (**4**), which was subsequently quaternized with 2-oxopropyl-*p*-toluenesulfonate to produce the precursor that is suitable for radiolabeling (**5**). The precursor was radioiodinated with <sup>125</sup>I<sub>2</sub>, formed *in situ* from Na<sup>125</sup>I, hydrogen peroxide and acetic acid. The reaction was completed at room temperature within 20 min. The product [<sup>125</sup>I]-**2** was separated using an HPLC system (RP-C18 Chromolith column). The HPLC-retention time of the isolated product [<sup>125</sup>I]-**2** (monitored by an in-line flow radiodetector) was the same as that of the non-radioactive analogue **2** (monitored by an UV detector) (Fig. 6A). By comparing the peak area of [<sup>125</sup>I]-**2** measured using the radio- and UV-detectors, the specific radioactivity was determined to be 63.2 GBq/mg (37.8 TBq/mmol), which is in four orders of magnitude higher than in our previous system (Sedláček et al., 2011). After successful radioiodination, the drug [<sup>125</sup>I]-**2** was attached to the hydrazide-containing HPMA copolymer analogous to the non-radioactive copolymer, yielding conjugate [<sup>125</sup>I]-**3**. The SEC chromatogram of this compound (Fig. 6B; monitored by FlowStar radiodetector) was nearly identical with that of the unlabeled hydrazide-containing HPMA copolymer (monitored by RI detector) which indicates the absence of the polymer cross-linking by radioactivity. Subsequently, the release of the drug [<sup>125</sup>I]-**2** from the polymer conjugate [<sup>125</sup>I]-**3** was measured. As expected, the release profile of the radiolabeled drug from its conjugate (negligible release in pH 7.4 buffer, 44% release within 24 h in pH 5.0 buffer) did not substantially differ from the release profile of its non-radioactive analogue **2**. Therefore, the high specific radioactivity did not have any effect on the stability of the hydrazone bond.

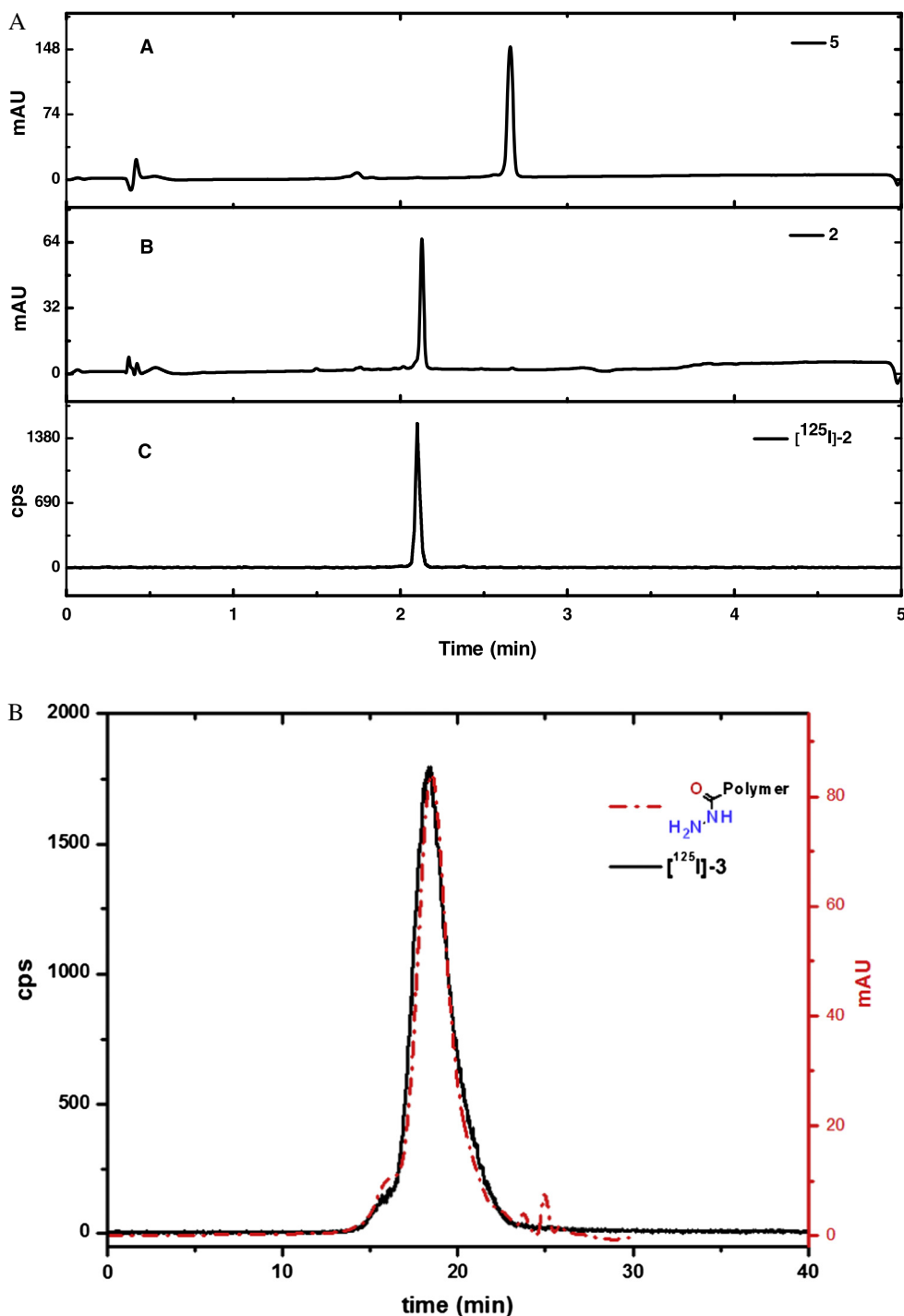
In the *in vivo* experiment with Balb/C mice inoculated with 4T1 mammary carcinoma, it was a priority to monitor the survival of



**Fig. 5.** (A) Internalization of free 2-oxopropyl-9-iodoellipticinium **2**: 2-Oxopropyl-9-iodoellipticinium channel: a, after 2.5 h; b, after 24 h. Merged 2-oxopropyl-9-iodoellipticinium + Hoechst # 33342 channels: c, after 2.5 h; d, after 24 h. Field =  $150 \times 150 \mu\text{m}$ . (B) Internalization of polymer conjugate **3**: 2-Oxopropyl-9-iodoellipticinium channel: a, after 2.5 h; b, after 5 h; c, after 24 h. Merged 2-oxopropyl-9-iodoellipticinium + Hoechst # 33342 channels: d, after 2.5 h; e, after 5 h; f, after 24 h. Field =  $150 \times 150 \mu\text{m}$ .

the mice treated with radioactive drugs [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** and [ $^{125}\text{I}$ ]-**3**, respectively (Fig. 7). The dose of the radiolabeled intercalator and its conjugate (2 MBq per animal) was chosen on the basis of previously published studies on low-molecular-weight Auger electron emitter-radiolabeled intercalators (Fondell et al., 2010; Gardette et al., 2011; Ickenstein et al., 2006). The treated groups had longer survival times compared to the untreated Controls ( $27.1 \pm 6.1$  days); the average survival time in Group 1, treated with the low molecular weight drug [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** (2 MBq per mice), was  $36.0 \pm 9.9$  days after drug administration, and in Group 2, treated with [ $^{125}\text{I}$ ]-**3** (2 MBq per mice), the survival time was

$45.5 \pm 11.5$  days. There was a statistically significant difference ( $\alpha = 0.05$ ) between Group 2 and Controls ( $P = 0.0022$ ). The difference between Group 1 and Controls was statistically significant ( $P = 0.057$ ) at the level  $\alpha = 0.10$  but not at the level  $\alpha = 0.05$ . Survival was noticeably longer in Group 2 (radioellipticinium derivative on polymer [ $^{125}\text{I}$ ]-**3**) in comparison with Group 1 (free radioellipticinium [ $^{125}\text{I}$ ]-**2**), although the difference was not statistically significant due to variance in the values within each group. Therefore, the therapy with the intercalator-targeted Auger electron emitter [ $^{125}\text{I}$ ] is effective compared to controls, and the therapeutic effect is even more pronounced when the ellipticinium is

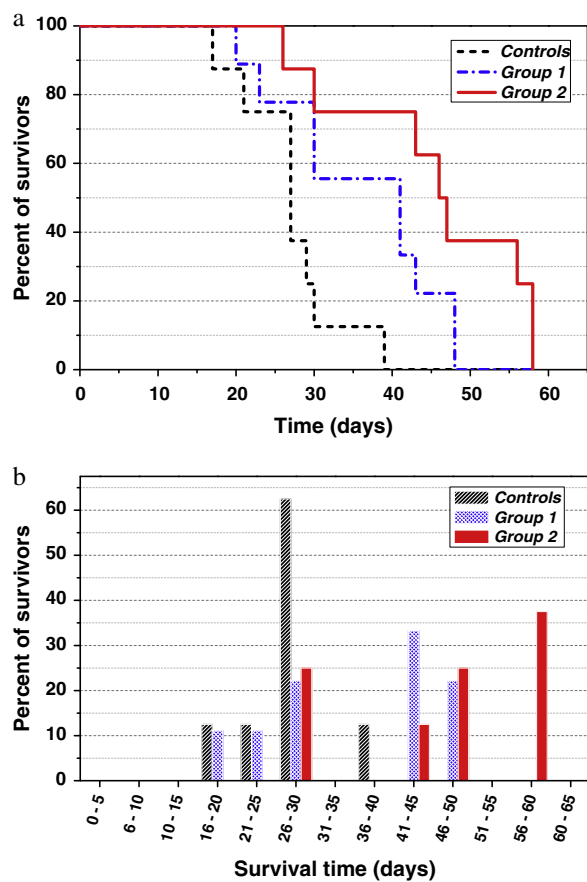


**Fig. 6.** (A) RP-18 HPLC chromatograms of the synthesized compounds: A. Chromatogram of the stannylated precursor **5**, detected by UV spectroscopy. B. Chromatogram of **2**, detected by UV spectroscopy. C. Chromatogram of [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** measured by FlowStar radiodetector; conditions: gradient 5–100% of acetonitrile in 0.1% aqueous TFA in 5 min, flow rate of 5 mL/min; (B) SEC chromatograms of the hydrazide-containing HPMA copolymer (dash-dotted line, RI detection) and [ $^{125}\text{I}$ ]-**3** (solid line, FlowStar radiodetector).

bound to a polymer, as in the polymer conjugate [ $^{125}\text{I}$ ]-**3**. This is most plausibly due to additional two targeting steps in our triple targeted polymer conjugate [ $^{125}\text{I}$ ]-**3** (EPR effect, pH-triggered release) compared to free radiolabeled intercalator [ $^{125}\text{I}$ ]-**2** as explained in the Introduction section.

The localization of the tumor in the subcutaneous tissue of the back may affect the survival time of mice because mice were eventually paralyzed due to tumor penetration into the spine. Paralysis resulted in immobility and the inability to eat, which could generally reduce average survival; however, this effect would be

comparable in all groups. Tumor growth and volume were also observed in this experiment. There was little difference in tumor volume and growth between all groups, especially in the first 10 days after treatment. This difference was not statistically significant, and the tumor sizes were similar at the time of death:  $5.9 \pm 1.9 \text{ cm}^3$  in *Group 1*,  $5.9 \pm 1.3 \text{ cm}^3$  in *Group 2* and  $5.8 \pm 1.4 \text{ cm}^3$  in *Controls* group. In one animal from *Group 2*, the tumor disappeared and was impalpable on day six after treatment, but the tumor appeared again on day 10. Accordingly, it is likely that the extended survival of the treated groups is more a result



**Fig. 7.** Survival of mice with 4T1 mammary carcinoma; Group 1: [ $^{125}\text{I}$ ]-2-oxopropyl-9-iodoellipticinium [ $^{125}\text{I}$ ]-2, 2 MBq/mice; Group 2: [ $^{125}\text{I}$ ]-2-oxopropyl-9-iodoellipticinium linked to the HPMA copolymer [ $^{125}\text{I}$ ]-3, 2 MBq/mice; Controls: untreated controls: (a) overall survival chart; (b) histogram.

the suppression of the metastatic process rather than the inhibition of growth of the primary tumor, which was not statistically significant. The similar behavior was before described for the acridine-bound  $^{125}\text{I}$  low molecular weight drugs (Gardette et al., 2014). Therefore, not only the Enhanced Permeation and Retention (EPR) effect but also the extended circulation time and the resulting higher effective dose when using a polymer conjugate are most likely important in this case. As described before (Etrych et al., 2001; Ulbrich and Šubr, 2010; Lammers et al., 2005; Shiah et al., 2001), extended blood circulation times of poly(HPMA) conjugates compared to free drugs are given by polymer molecular weight and are only very slightly influenced by chemical nature of the hydrazone-bound drug unless there is some specific targeting moiety such as peptide (and there is no such moiety in the case of the system described in this paper).

Further detailed experiments on biodistribution, toxicity data, employing alternate dosages and specific radioactivities to optimize the treatment are needed as well as confirmation that the treatment decreases the development of metastases as primary mode of action. These experiments are currently underway.

#### 4. Conclusions

We developed and characterized a fine-tuned system for the selective delivery of Auger electron emitter  $^{125}\text{I}$  with a precisely tailored triple-targeting approach. It is composed of the derivative of the potent DNA intercalator ellipticine, which contains  $^{125}\text{I}$  with high specific radioactivity, linked to the HPMA copolymer, with a

narrow molecular weight distribution (synthesized by RAFT copolymerization), using an optimized hydrazone linker. The *in vivo* evaluation of the therapeutical effect was performed using an animal cancer model and resulted in prolonged survival of cancer-bearing mice after administration of the radioconjugate. Thus, the concept of the triple-targeting approach of the Auger electron emitter is worth pursuing. Further detailed biological experiments are currently underway.

#### Acknowledgements

Financial support provided by the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (Grant # MPO TIP FR-TI4/625), the Academy of Sciences of the Czech Republic (Grant # M200501201) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Grant # MSMT KONTAKT II LH14079) is gratefully acknowledged.

The authors declare no competing financial interest.

#### References

- Balan, K.K., Raouf, A.H., Critchley, M., 1994. Outcome of 249 patients attending a nuclear medicine department with well differentiated thyroid cancer; a 23 year review. *Br. J. Radiol.* 67, 283–291.
- Bawa, R., Fung, S.Y., Shiozaki, A., Yang, H., Zheng, G., Keshavjee, S., Liu, M., 2012. Self-assembling peptide-based nanoparticles enhance cellular delivery of the hydrophobic anticancer drug ellipticine through caveolae-dependent endocytosis. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 8, 647–654.
- Bernhardt, P., Forsell-Aronsson, E., Jacobsson, L., Skarnemark, G., 2001. Low-energy electron emitters for targeted radiotherapy of small tumours. *Acta Oncol.* 40, 602–608.
- Chytil, P., Etrych, T., Kříž, J., Šubr, V., Ulbrich, K., 2010. *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide-based polymer conjugates with pH-controlled activation of doxorubicin for cell-specific or passive tumour targeting. Synthesis by RAFT polymerisation and physicochemical characterisation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 41, 473–482.
- Devraj, R., Barrett, J.F., Fernandez, J.A., Katzenellenbogen, J.A., Cushman, M., 1996. Design, synthesis, and biological evaluation of ellipticine–estradiol conjugates. *J. Med. Chem.* 39, 3367–3374.
- Dickschat, J.S., Reichenbach, H., Wagner-Döbler, I., Schulz, S., 2005. Novel pyrazines from the Myxobacterium *Chondromyces crocatus* and marine bacteria. *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 4141–4153.
- Etrych, T., Jelfinková, M., Řihová, B., Ulbrich, K., 2001. New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary *in vitro* and *in vivo* biological properties. *J. Control. Release* 73, 89–102.
- Feinendegen, L.E., 1975. Biological damage from the Auger effect, possible benefits. *Radiat. Environ. Biophys.* 12, 85–99.
- Foerster, M.H., Bornfeld, N., Schulz, U., Wessing, A., Meyer-Schwickerath, G., 1986. Complications of local beta radiation of uveal melanomas. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 224, 336–340.
- Fondell, A., Edwards, K., Ickenstein, L.M., Sjöberg, S., Carlsson, J., Gedda, L., 2010. Nuclisome: a novel concept for radionuclide therapy using targeting liposomes. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 114–123.
- Fox, K.R., 1997. *Drug–DNA Interaction Protocols*, vol. 90. Springer, Berlin.
- Gardette, M., Papon, J., Bonnet, M., Desbois, N., Labarre, P., Wu, T.D., Miot-Noirault, E., Madelmont, J.C., Guerquin-Kern, J.L., Chezal, J.M., 2011. Evaluation of new iodinated acridine derivatives for targeted radionuclide therapy of melanoma using  $^{125}\text{I}$ , an Auger electron emitter. *Invest. New Drugs* 29, 1253–1263.
- Gardette, M., Viillard, C., Paillas, S., Guerquin-Kern, J.L., Papon, J., Moins, N., Labarre, P., Desbois, N., Wong-Wah-Chung, P., Palle, S., 2014. Evaluation of two  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled acridine derivatives for Auger-electron radionuclide therapy of melanoma. *Invest. New Drugs*, 1–11.
- Gauguin, B., Barbet, J., Capelle, N., Roques, B.P., Le Pecq, J.B., Le Bret, M., 1978. DNA bifunctional intercalators. 2. Fluorescence properties and DNA binding interaction of an ethidium homodimer and an acridine ethidium heterodimer. Appendix: numerical solution of McGhee and von Hippel equations for competing ligands. *Biochemistry* 17, 5078–5088.
- Häfliger, P., Agorastos, N., Spingler, B., Georgiev, O., Viola, G., Alberto, R., 2005. Induction of DNA-double-strand breaks by Auger electrons from  $^{99m}\text{Tc}$  complexes with DNA-binding ligands. *ChemBioChem* 6, 414–421.
- Huang, C.Y., Pourgholami, M.H., Allen, B.J., 2012. Optimizing radioimmunoconjugate delivery in the treatment of solid tumor. *Cancer Treat. Rev.* 38, 854–860.
- Ickenstein, L.M., Edwards, K., Sjöberg, S., Carlsson, J., Gedda, L., 2006. A novel  $^{125}\text{I}$ -labeled daunorubicin derivative for radionuclide-based cancer therapy. *Nucl. Med. Biol.* 33, 773–783.
- Kassis, A.I., 2003. Cancer therapy with Auger electrons: are we almost there? *J. Nucl. Med.* 44, 1479–1481.

- Kassis, A.I., Harapanhalli, R.S., Adelstein, S.J., 1999a. Comparison of strand breaks in plasmid DNA after positional changes of Auger electron-emitting iodine-125. *Radiat. Res.* 151, 167–176.
- Kassis, A.I., Harapanhalli, R.S., Adelstein, S.J., 1999b. Strand breaks in plasmid DNA after positional changes of Auger electron-emitting iodine-125: direct compared to indirect effects. *Radiat. Res.* 152, 530–538.
- Kohn, K.W., Waring, M.J., Glaubiger, D., Friedman, C.A., 1975. Intercalative binding of ellipticine to DNA. *Cancer Res.* 35, 71–76.
- Krause, M., Stark, H., Schunack, W., 1997. Iododestannylation: an improved synthesis of [<sup>125</sup>I] iodoproxyfan, a specific radioligand of the histamine H3 receptor. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 39, 601–606.
- Lammers, T., Kuhnlein, R., Kissel, M., Subr, V., Etrych, T., Pola, R., Pechar, M., Ulbrich, K., Storm, G., Huber, P., Peschke, P., 2005. Effect of physicochemical modification on the biodistribution and tumor accumulation of HPMA copolymers. *J. Control. Release* 110, 103–118.
- Lyles, M.B., Cameron, I.L., 2002. Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA. *Biophys. Chem.* 96, 53–76.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release* 65, 271–284.
- Moeriein, S.M., Coenen, H.H., 1985. Regiospecific no-carrier-added radiobromination and radioiodination of aryltrimethyl group IVb organometallics. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1941–1947.
- O'donoghue, J.A., Wheldon, T.E., 1996. Targeted radiotherapy using Auger electron emitters. *Phys. Med. Biol.* 41, 1973–1992.
- Sedláček, O., Hruby, M., Studenovsky, M., Kucka, J., Větvička, D., Kovar, L., Rihova, B., Ulbrich, K., 2011. Ellipticine-aimed polymer-conjugated Auger electron emitter: multistage organelle targeting approach. *Bioconjug. Chem.* 22, 1194–1201.
- Sedláček, O., Hruby, M., Studenovsky, M., Větvička, D., Svoboda, J., Kaňková, D., Kovář, J., Ulbrich, K., 2012. Polymer conjugates of acridine-type anticancer drugs with pH-controlled activation. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 4056–4063.
- Sedláček, O., Studenovsky, M., Větvička, D., Ulbrich, K., Hruby, M., 2013. Fine tuning of the pH-dependent drug release rate from polyHPMA-ellipticinium conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 5669–5672.
- Shiah, J.-G., Dvorak, M., Kopeckova, P., Sun, Y., Peterson, C.M., Kopecek, J., 2001. Biodistribution and antitumour efficacy of long-circulating *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer ± doxorubicin conjugates in nude mice. *Eur. J. Cancer* 37, 131–139.
- Sorace, R.A., Sheid, B., 1978. Characterization of ellipticine binding to native calf thymus DNA. *Chem. Biol. Interact.* 23, 379–386.
- Ting, G., Chang, C.-H., Wang, H.-E., Lee, T.-W., 2010. Nanotargeted radionuclides for cancer nuclear imaging and internal radiotherapy. *BioMed Res. Int.*, 1–17. Article ID 953537.
- Ulbrich, K., Šubr, V., 2010. Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 150–166.
- Volkert, W.A., Goeckeler, W.F., Ehrhardt, G.J., Ketring, A.R., 1991. Therapeutic radionuclides: production and decay property considerations. *J. Nucl. Med.* 32, 174–185.
- Weiss, A., Mayer, R., Jibaly, M., Lei, C., Mehl, D., Lynn, K.G., 1988. Auger-electron emission resulting from the annihilation of core electrons with low-energy positrons. *Phys. Rev. Lett.* 61, 2245–2248.
- Wheldon, T.E., O'Donoghue, J.A., Barrette, A., Michalowski, A.S., 1991. The curability of tumours of differing size by targeted radiotherapy using <sup>131</sup>I or <sup>90</sup>Y. *Radiother. Oncol.* 21, 91–99.
- Wilson, W.D., Ratmeyer, L., Zhao, M., Strekowski, L., Boykin, D., 1993. The search for structure-specific nucleic acid-interactive drugs: effects of compound structure on RNA versus DNA interaction strength. *Biochemistry* 32, 4098–4104.

## **PŘÍLOHY B – PATENTOVÉ PŘIHLÁŠKY**

**Příloha Ib: Národní patentová přihláška. Název vynálezu: Polymer na bázi polysacharidu a jeho použití k prevenci a léčbě Wilsonovy choroby.**

# ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

Antonína Čermáka 2a 160 68 Praha 6  
Telefon: 220 383 111 Fax: 224 324 718  
E-mail: [posta@upv.cz](mailto:posta@upv.cz)

[WWW.UPV.CZ](http://WWW.UPV.CZ)

## PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU se žádostí o udělení patentu

(Vyplni Úřad)

Pořadové číslo:

Spisová značka přihlášky:

Potvrzení o přijetí  
vydáno dne:

MPT

Vyřizuje

Kód

### 1. DRUH PŘIHLÁŠKY

Přihláška NÁRODNÍ (označte křížkem)  nebo ZAHRANIČNÍ

Přihláška PCT – národní fáze,  
číslo přihlášky PCT

Dat. mez. podání

Žádost o přeměnu z EP na přihlášku  
národní, číslo přihlášky EP

Dat. EP podání

Přihláška VYLOUČENÁ z původně podané PV, číslo přihlášky PV

### 2. NÁZEV VYNÁLEZU

Polymer na bázi polysacharidu a jeho použití k prevenci a léčbě Wilsonovy choroby

### 3. POČET PŘIHLAŠOVATELŮ

2

**4. PŘIHLAŠOVATEL(-É)** (Pokud není možné uvést úplné údaje o kterémkoliv z vyplňovaných subjektů z důvodu nedostatku místa zde, použijte prosím k tomuto účelu doplňkový list formuláře.)

Příjmení: Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.  
(Firma)

Jméno:

Ulice a číslo: Heyrovského nám. 1888/2

Město: Praha 6

Země (případně stát USA): Česká republika

PŘIHLAŠOVATEL je i PŮVODCE (označte křížkem): ANO

PŘIHLAŠOVATEL je (označte křížkem): Právnícká osoba

Titul před jm.:

Datum nar.<sup>1</sup>:

Telefon:

PSČ (jen pro ČR): 162 06

E-mail:

Titul za jm.:

IČ<sup>1</sup>: 61389013

Fax:

Příjmení: Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta  
(Firma)

Jméno:

Ulice a číslo: Kateřinská 1660/32

Město: Praha 2

Země (případně stát USA): Česká republika

PŘIHLAŠOVATEL je i PŮVODCE (označte křížkem): ANO

PŘIHLAŠOVATEL je (označte křížkem): Právnícká osoba

Titul před jm.:

Datum nar.<sup>1</sup>:

Telefon:

PSČ (jen pro ČR): 121 08

E-mail:

Titul za jm.:

IČ<sup>1</sup>: 00216208

Fax:

Příjmení:  
(Firma)

Jméno:

Ulice a číslo:

Město:

Země (případně stát USA):

PŘIHLAŠOVATEL je i PŮVODCE (označte křížkem): ANO

PŘIHLAŠOVATEL je (označte křížkem): Právnícká osoba

Titul před jm.:

Datum nar.<sup>1</sup>:

Telefon:

PSČ (jen pro ČR):

E-mail:

Titul za jm.:

IČ<sup>1</sup>:

Fax:

**5. POČET PŮVODCŮ**

8

**6. PŮVODCE(-I)** (V případě, že je původce současně i přihlašovatelem, není nutné požadované údaje u tohoto původce vyplňovat. Pokud není možné uvést úplné údaje o kterémkoliv z vyplňovaných subjektů z důvodu nedostatku místa zde, použijte prosím k tomuto účelu doplňkový list formuláře.)

Příjmení: Hrubý

Jméno: Martin

Ulice a číslo: Šárecká 11

Město: Praha 6

PŮVODCE si nepřeje být zveřejněn (označte křížkem):

Titul před jm.: Mgr.

Datum nar.<sup>1</sup>:

Země (případně stát USA): Česká republika

PSČ (jen pro ČR): 160 00

Titul za jm.: Ph.D.



Příjmení: Vetrík  
Jméno: Miroslav  
Ulice a číslo: Dolný Majer 655/36  
Město: Košeca  
PŮVODCE si nepřeje být zveřejněn (označte křížkem):

Titul před jm.: Mgr.                      Titul za jm.: Ph.D.  
Datum nar.¹:  
Země (případně stát USA): Slovenská republika  
PSČ (jen pro ČR): 018 64

Příjmení: Kučka  
Jméno: Jan  
Ulice a číslo: Platanová 96  
Město: Holubice-Kozinec  
PŮVODCE si nepřeje být zveřejněn (označte křížkem):

Titul před jm.: RNDr.                    Titul za jm.: Ph.D.  
Datum nar.¹:  
Země (případně stát USA): Česká republika  
PSČ (jen pro ČR): 252 65

Příjmení: Macková  
Jméno: Hana  
Ulice a číslo: Na Žižkově 810/33  
Město: Liberec 6  
PŮVODCE si nepřeje být zveřejněn (označte křížkem):

Titul před jm.: Ing.                      Titul za jm.: Ph.D.  
Datum nar.¹:  
Země (případně stát USA): Česká republika  
PSČ (jen pro ČR): 460 06

## 7. ZÁSTUPCE PŘIHLAŠOVATELE

Název kanceláře: INVENTIA s.r.o.

Příjmení: Hartvichová  
Jméno: Kateřina  
Ulice a číslo: Na Bělidle 3  
Město: Praha 5  
Země: Česká republika  
Číslo prezidiální plné moci:

Titul před jm.: RNDr.                    Titul za jm.:  
Datum nar.¹:                                IČ¹: 60470615  
Telefon: 222247483  
PSČ: 150 00                                Fax:  
E-mail: office@inventia.cz  
Číslo jednací zástupce:

Prezidiální plná moc je podávána současně s touto přihláškou (označte křížkem):

## 8. ADRESA PRO DORUČOVÁNÍ (Kontaktní adresa pro styk s Úřadem – VYPLŇUJE SE jen v případě, že jde o ADRESU ODLIŠNOU od adresy přihlašovatele nebo zástupce.)

Název kanceláře/firmy:

Příjmení:  
Jméno:  
Ulice a číslo:  
Město:  
PSČ:

Titul před jm.:                            Titul za jm.:  
Telefon:  
Fax:  
E-mail:

## 9. PRÁVO PŘEDNOSTI PODLE MEZINÁRODNÍ SMLOUVY

Číslo přihlášky

Datum podání přihlášky

Země / Úřad

Číslo přihlášky

Datum podání přihlášky

Země / Úřad

Číslo přihlášky

Datum podání přihlášky

Země / Úřad

## 10. POČET PATENTOVÝCH NÁROKŮ

9

## 11. PODNIKOVÝ VYNÁLEZ

Jedná se o PODNIKOVÝ VYNÁLEZ (označte křížkem): ANO  NE

## 12. NABÍDKA LICENCE

NABÍDKA LICENCE (označte křížkem): ANO NE

## 13. SEZNAM PŘÍLOH (Vybrané možnosti označte křížkem.)

- |   |                                     |       |   |
|---|-------------------------------------|-------|---|
| 3 x popis vynálezu                      | <input checked="" type="checkbox"/> |       |   |
| 3 x patentové nároky                    | <input checked="" type="checkbox"/> |       |   |
| 3 x anotace                             | <input checked="" type="checkbox"/> |       |   |
| 3 x obrázek k anotaci                   |                                     |       |   |
| 3 x výkresy                             | <input checked="" type="checkbox"/> |       |   |
|   |                                     |       |   |
| - Plná moc                              |                                     |       |   |
| - Doklad o nabytí práva na patent       |                                     | počet |   |
| - Prioritní doklad                      |                                     | počet |   |
| - Potvrzení o deponování mikroorganismů |                                     | počet |   |
| - Doplnující listy tiskopisu přihlášky  | <input checked="" type="checkbox"/> | počet | 2 |
| - Další doklady                         |                                     | počet |   |

## 13A. ŽÁDOST O ÚPLNÝ PRŮZKUM (Není již nutné podávat samostatnou žádost o provedení úplného průzkumu.)

ŽÁDÁM O PROVEDENÍ ÚPLNÉHO PRŮZKUMU u této přihlášky vynálezu podle zákona č. 527/1990 Sb., o vynálezech a zlepšovacích návrzích, ve znění pozdějších předpisů.

(označte křížkem): ANO  NE

### 13B. SOUHLASÍM S PŘEDÁNÍM VÝSLEDKŮ REŠERŠE pro účely Pravidla 141 EPC přímo EPÚ

(označte křížkem): ANO  NE

Vysvětlivky (poznámka):

**13B** O úplný průzkum lze požádat buď při podání přihlášky (označením příslušného políčka ve formuláři křížkem) nebo formou samostatné žádosti kdykoli během následujících 36 měsíců.

V případě, že budete z této přihlášky nárokovat právo přednosti v následně evropské patentové přihlášce a máte zájem, aby požadavek podle Pravidla 141 EPC, tj. předložení výsledku rešerše Evropskému patentovému úřadu (EPÚ) provedl přímo náš Úřad, pak příslušné políčko označte křížkem. Jinak musíte požadavku z Pravidla 141 EPC vyhovět sami.

### 14. INFORMACE O VÝŠI SPRÁVNÍHO POPLATKU

Správní poplatek za podání přihlášky vynálezu přihlašovatelem je stanoven na 1 200 Kč.

Správní poplatek za podání přihlášky vynálezu přihlašovatelem, který je současně i původcem, je stanoven na 600 Kč.

Správní poplatek za žádost o provedení úplného průzkumu je stanoven na 3 000 Kč.

Správní poplatek za 11. a každý další patentový nárok je stanoven na 500 Kč.

**\*\*Způsob platby** (Vyberte jednu z uvedených možností a označte křížkem.):

- Složenkou
- Převodem z účtu \*
- Hotově v pokladně Úřadu
- Kolkem

Pozn.: Správní poplatek je splatný při podání přihlášky. Kolky lze platit pouze pro platby do 5 000 Kč (včetně).

\*) Číslo účtu správních poplatků ÚPV: 3711-21526001/0710

\*\*) Ostatní informace jsou uvedeny v nápovědě.

Místo pro nalepení kolku

### 15. POZNÁMKA

**Potvrzuji pravdivost a úplnost shora uvedených údajů a žádám o udělení patentu.**

Vyberte jednu z uvedených možností a označte křížkem:

- Přihlašovatel(-é) (V případě více přihlašovatelů musí být uvedeny podpisy všech těchto přihlašovatelů.)
- Zástupce

30.10.2015

-----  
Datum

Katrina Hubrich

-----  
Podpis

(u právnické osoby případně i razítko)

## 4. PŘIHLAŠOVATEL(-É)

Příjmení: (Firma) Titul před jm.: Titul za jm.:  
 Jméno: Datum nar.¹: IČ¹:  
 Ulice a číslo: Telefon:  
 Město: PSČ (jen pro ČR): Fax:  
 Země (případně stát USA): E-mail:  
 PŘIHLAŠOVATEL je i PŮVODCE (označte křížkem): ANO NE  
 PŘIHLAŠOVATEL je (označte křížkem): Právnícká osoba Fyzická osoba

Příjmení: (Firma) Titul před jm.: Titul za jm.:  
 Jméno: Datum nar.¹: IČ¹:  
 Ulice a číslo: Telefon:  
 Město: PSČ (jen pro ČR): Fax:  
 Země (případně stát USA): E-mail:  
 PŘIHLAŠOVATEL je i PŮVODCE (označte křížkem): ANO NE  
 PŘIHLAŠOVATEL je (označte křížkem): Právnícká osoba Fyzická osoba

## 6. PŮVODCE(-I)

Příjmení: Štěpánek Titul před jm.: RNDr. Titul za jm.: DrSc.  
 Jméno: Petr Datum nar.¹:  
 Ulice a číslo: Cetýňská 7 Země (případně stát USA): Česká republika  
 Město: Praha 5 PSČ (jen pro ČR): 150 00  
 PŮVODCE si nepřeje být zveřejněn (označte křížkem):

Příjmení: Mattová Titul před jm.: MuDr. Titul za jm.:  
 Jméno: Jana Datum nar.¹:  
 Ulice a číslo: Vyšný Žipov 173 Země (případně stát USA): Slovenská republika  
 Město: Vranov nad Topľou PSČ (jen pro ČR): 094 33  
 PŮVODCE si nepřeje být zveřejněn (označte křížkem):

## 9. PRÁVO PŘEDNOSTI PODLE MEZINÁRODNÍ SMLOUVY

Číslo přihlášky  
 Datum podání přihlášky  
 Země / Úřad  
 Číslo přihlášky  
 Datum podání přihlášky  
 Země / Úřad

## 4. PŘIHLAŠOVATEL(-É)

Příjmení: (Firma) Titul před jm.: Titul za jm.:  
 Jméno: Datum nar.<sup>1</sup>: IČ<sup>1</sup>:  
 Ulice a číslo: Telefon:  
 Město: PSČ (jen pro ČR): Fax:  
 Země (případně stát USA): E-mail:  
 PŘIHLAŠOVATEL je i PŮVODCE (označte křížkem): ANO NE  
 PŘIHLAŠOVATEL je (označte křížkem): Právnícká osoba Fyzická osoba

Příjmení: (Firma) Titul před jm.: Titul za jm.:  
 Jméno: Datum nar.<sup>1</sup>: IČ<sup>1</sup>:  
 Ulice a číslo: Telefon:  
 Město: PSČ (jen pro ČR): Fax:  
 Země (případně stát USA): E-mail:  
 PŘIHLAŠOVATEL je i PŮVODCE (označte křížkem): ANO NE  
 PŘIHLAŠOVATEL je (označte křížkem): Právnícká osoba Fyzická osoba

## 6. PŮVODCE(-I)

Příjmení: Poučková Titul před jm.: doc. RNDr. Titul za jm.: CSc.  
 Jméno: Pavla Datum nar.<sup>1</sup>:  
 Ulice a číslo: Americká 632 Země (případně stát USA): Česká republika  
 Město: Dobříchovice PSČ (jen pro ČR): 252 29  
 PŮVODCE si nepřeje být zveřejněn (označte křížkem):

Příjmení: Urbánek Titul před jm.: prof. MUDr. Titul za jm.: CSc.  
 Jméno: Petr Datum nar.<sup>1</sup>:  
 Ulice a číslo: Raichlova 8 Země (případně stát USA): Česká republika  
 Město: Praha 5 PSČ (jen pro ČR): 150 00  
 PŮVODCE si nepřeje být zveřejněn (označte křížkem):

## 9. PRÁVO PŘEDNOSTI PODLE MEZINÁRODNÍ SMLOUVY

Číslo přihlášky  
 Datum podání přihlášky  
 Země / Úřad  
 Číslo přihlášky  
 Datum podání přihlášky  
 Země / Úřad

**Příloha IIb: Mezinárodní patentová přihláška. Název vynálezu:  
Polysaccharide-based polymer and its use for the prevention and treatment  
of the Wilson's disease.**

**PCT REQUEST**

Print Out (Original in Electronic Form)

<b>0</b>	<b>For receiving Office use only</b>	
<b>0-1</b>	International Application No.	
<b>0-2</b>	International Filing Date	
<b>0-3</b>	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
<b>0-4</b>	<b>Form PCT/RO/101 PCT Request</b>	
0-4-1	Prepared Using	<b>ePCT-Filing Version 3.3.011 MT/FOP 20151028/0.20.5.24</b>
<b>0-5</b>	<b>Petition</b> The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
<b>0-6</b>	<b>Receiving Office (specified by the applicant)</b>	<b>Industrial Property Office (Czech Republic) (RO/CZ)</b>
<b>0-7</b>	<b>Applicant's or agent's file reference</b>	<b>P1447PC00</b>
<b>I</b>	<b>Title of Invention</b>	<b>POLYSACCHARIDE-BASED POLYMER AND ITS USE FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF THE WILSON'S DISEASE</b>
<b>II</b>	<b>Applicant</b>	
II-1	This person is	<b>Applicant only</b>
II-2	Applicant for	<b>All designated States</b>
II-4	Name	<b>USTAV MAKROMOLEKULARNI CHEMIE AV CR, V.V.I.</b>
II-5	Address	<b>Heyrovskeho namesti 2 16206 Praha 6 - Brevnov Czech Republic</b>
II-6	State of nationality	<b>CZ</b>
II-7	State of residence	<b>CZ</b>
II-10	e-mail	<b>hartvichova@inventia.cz</b>
II-10(a)	E-mail authorization The receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority are authorized to use this e-mail address, if the Office or Authority so wishes, to send notifications issued in respect of this international application:	<b>exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent)</b>

**PCT REQUEST**

Print Out (Original in Electronic Form)

<b>III-1</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-1-1	This person is	<b>Applicant only</b>
III-1-2	Applicant for	<b>All designated States</b>
III-1-4	Name	<b>UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, 1. LEKARSKA FAKULTA</b>
III-1-5	Address	<b>Katerinska 1660/32 12108 Praha 2 Czech Republic</b>
III-1-6	State of nationality	<b>CZ</b>
III-1-7	State of residence	<b>CZ</b>
III-1-10	e-mail	<b>hartvichova@inventia.cz</b>
III-1-10(a)	E-mail authorization The receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority are authorized to use this e-mail address, if the Office or Authority so wishes, to send notifications issued in respect of this international application:	<b>exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent)</b>
<b>III-2</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-2-1	This person is	<b>Inventor only</b>
III-2-3	Inventor for	<b>All designated States</b>
III-2-4	Name (LAST, First)	<b>HRUBY, Martin</b>
III-2-5	Address	<b>Sarecka 11 16000 Praha 6 Czech Republic</b>
<b>III-3</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-3-1	This person is	<b>Inventor only</b>
III-3-3	Inventor for	<b>All designated States</b>
III-3-4	Name (LAST, First)	<b>VETRIK, Miroslav</b>
III-3-5	Address	<b>Dolny Majer 655/36 01864 Koseca Slovakia</b>
<b>III-4</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-4-1	This person is	<b>Inventor only</b>
III-4-3	Inventor for	<b>All designated States</b>
III-4-4	Name (LAST, First)	<b>KUCKA, Jan</b>
III-4-5	Address	<b>Platanova 96 25265 Holubice-Kozinec Czech Republic</b>



**PCT REQUEST**

Print Out (Original in Electronic Form)

<b>III-5</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-5-1	This person is	<b>Inventor only</b>
III-5-3	Inventor for	<b>All designated States</b>
III-5-4	Name (LAST, First)	<b>MACKOVA, Hana</b>
III-5-5	Address	<b>Na Zizkove 810/33 46006 Liberec 6 Czech Republic</b>
<b>III-6</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-6-1	This person is	<b>Inventor only</b>
III-6-3	Inventor for	<b>All designated States</b>
III-6-4	Name (LAST, First)	<b>STEPANEK, Petr</b>
III-6-5	Address	<b>Cetynska 7 15000 Praha 5 Czech Republic</b>
<b>III-7</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-7-1	This person is	<b>Inventor only</b>
III-7-3	Inventor for	<b>All designated States</b>
III-7-4	Name (LAST, First)	<b>MATTOVÁ, Jana</b>
III-7-5	Address	<b>Vysny Zipov 173 09433 Vranov nad Toplou Slovakia</b>
<b>III-8</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-8-1	This person is	<b>Inventor only</b>
III-8-3	Inventor for	<b>All designated States</b>
III-8-4	Name (LAST, First)	<b>POUCKOVA, Pavla</b>
III-8-5	Address	<b>Americcka 632 25229 Dobrichovice Czech Republic</b>
<b>III-9</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-9-1	This person is	<b>Inventor only</b>
III-9-3	Inventor for	<b>All designated States</b>
III-9-4	Name (LAST, First)	<b>URBANEK, Petr</b>
III-9-5	Address	<b>Raichlova 8 15000 Praha 5 Czech Republic</b>

## PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

<b>IV-1</b>	<b>Agent or common representative; or address for correspondence</b> The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	<b>Agent</b>
IV-1-1	Name (LAST, First)	<b>HARTVICOVA, Katerina</b>
IV-1-2	Address	<b>INVENTIA s.r.o. Na Belidle 3 15000 Praha 5 Czech Republic</b>
IV-1-3	Telephone No.	<b>+420 222 247 483</b>
IV-1-4	Facsimile No.	<b>+420 224 218 645</b>
IV-1-5	e-mail	<b>hartvichova@inventia.cz</b>
IV-1-5(a) )	E-mail authorization The receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority are authorized to use this e-mail address, if the Office or Authority so wishes, to send notifications issued in respect of this international application:	<b>exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent)</b>
<b>V</b>	<b>DESIGNATIONS</b>	
<b>V-1</b>	<b>The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.</b>	
<b>VI-1</b>	<b>Priority claim of earlier national application</b>	
VI-1-1	Filing date	<b>02 November 2015 (02.11.2015)</b>
VI-1-2	Number	<b>PV 2015-770</b>
VI-1-3	Country or Member of WTO	<b>CZ</b>
<b>VI-2</b>	<b>Priority document request</b> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	<b>VI-1</b>
<b>VI-3</b>	<b>Incorporation by reference :</b> where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.	

**PCT REQUEST**

Print Out (Original in Electronic Form)

<b>VII-1</b>	<b>International Searching Authority Chosen</b>	<b>European Patent Office (EPO) (ISA/EP)</b>	
<b>VIII</b>	<b>Declarations</b>	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
<b>IX</b>	<b>Check list</b>	Number of sheets	Electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	<b>6</b>	✓
IX-2	Description	<b>11</b>	✓
IX-3	Claims	<b>3</b>	✓
IX-4	Abstract	<b>1</b>	✓
IX-5	Drawings	<b>15</b>	✓
IX-7	TOTAL	<b>36</b>	
	<b>Accompanying Items</b>	Paper document(s) attached	Electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	-	✓
<b>IX-20</b>	<b>Figure of the drawings which should accompany the abstract</b>	<b>0</b>	
<b>IX-21</b>	<b>Language of filing of the international application</b>	<b>English</b>	
<b>X-1</b>	<b>Signature of applicant, agent or common representative</b>	<b>/Katerina Hartvichova/</b>	
<b>X-1-1</b>	Name (LAST, First)	<b>HARTVICOVA, Katerina</b>	
<b>X-1-3</b>	Capacity (if such capacity is not obvious from reading the request)	<b>Agent</b>	

**PCT REQUEST**

Print Out (Original in Electronic Form)

**FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY**

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

**FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY**

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--