

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

---

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Biochemie



Bc. Matyáš Bittner

HVĚZDICOVITÉ POLYMERNÍ NOSIČE LÉČIV PRO CÍLENOU  
DOPRAVU A pH-ŘÍZENÉ UVOLŇOVÁNÍ LÉČIVA

Star polymeric carriers of drugs for targeting and pH - dependent  
release of drugs

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Marie Stiborová DrSc.

Školitel – specialista: RNDr. Tomáš Etrych Ph.D.

Praha 2013

## Poděkování

Rád bych na tomto místě z celého srdce poděkoval všem, kteří mi pomohli s vypracováním této diplomové práce a všestranně mě podporovali po celou dobu studia, ať přímo, či nepřímo.

Jmenovitě bych chtěl poděkovat mé školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové za věcnou podporu při práci a vzor vědeckého bádání.

Velmi bych chtěl poděkovat mému školiteli - specialistovi RNDr. Tomáši Etrychovi Ph.D. za jeho příkladné vedení práce, odbornou i osobní podporu, trpělivost při praktickém a písemném zpracování diplomové práce. Mé velké díky také patří Mgr. Petru Chytilovi Ph.D. za významné poskytování rad v praktické části, ale i při sepisování práce. Mé velké díky také patří spolupracovníkům z oddělení Biolékařských polymerů na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i. vedené prof. Ing. Karlem Ulbrichem DrSc. za poskytnutí mnoha cenných rad při řešení každodenních problémů v laboratorní praxi a za vytvoření nadstandardně přátelského pracovního prostředí.

Dále bych chtěl poděkovat dr. Markovi Kovářovi za provedení testů *in vitro* a *in vivo*.

Na závěr bych chtěl vyjádřit svou vděčnost mé přítelkyni Anně Vošmikové a celé její rodině, která mi dokázala vytvořit trpělivé, tolerantní a láskyplné prostředí vhodné pro dokončení studia.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky prof. RNDr. Marie Stiborové DrSc. a odborného konzultanta RNDr. Tomáše Etrycha PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum: Praha, 5. května 2013

Podpis:

## Abstrakt:

Tato diplomová práce přináší nové poznatky o designu, syntéze, fyzikálně-chemické charakterizaci a biologické aktivitě nových hvězdicovitých konjugátů založených na HPMA zamýšlených k léčbě pevných nádorů.

V současnosti je popsáno mnoho různých vodorozpustných systémů určených k transportu léčiv založených na *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidových (HPMA) kopolymerech. V této práci popisujeme syntézu a fyzikálně-chemickou charakterizaci vysokomolekulárních hvězdicovitých konjugátů založených na HPMA polymerních nosičích s nízkou disperzitou připravených kontrolovaným “roubováním” HPMA kopolymerů na PAMAM dendrimerové jádro. S cílem udržet disperzitu nosiče léčiva pokud možno co nejnižší, bylo pro syntézu nových HPMA kopolymerů použita nová metoda polymerizace: Reversible Addition-Fragmentation Chain transfer (RAFT) polymerisation. Konečné reaktivní skupiny polymerních prekurzorů byly následně použity pro “roubování” na PAMAM jádro pomocí karbodiimidové kondenzace, případně 1,3-cykloadice azidu na trojnou vazbu vedoucí k syntéze hvězdicovitých vysokomolekulárních nosičů léčiv.

Popsaný postup syntézy umožňoval přípravu hvězdicovitých konjugátů o  $M_w$  mezi  $1 \cdot 10^5$  a  $3 \cdot 10^5$  g/mol a o nízké distribuci  $M_w$ . Modelové léčivo doxorubicin (Dox) bylo vázáno kovalentně přes hydrazonovou spojku senzitivní k pH k polymernímu nosiči, která prokazuje vysokou stabilitu v prostředí podobném krevnímu oběhu (pufr, pH 7,4) a naopak je snadno štěpena v prostředí simulující prostředí uvnitř endozomů a lysozomů nádorových buněk (pH 5 – 6). Disulfidová spojka mezi HPMA kopolymerem a PAMAM dendrimerovým jádrem umožňuje degradaci vysokomolekulární struktury v cytosomálních kompartmentech nádorových buněk na polymerní fragmenty schopné eliminace glomerulární filtrací z těla.

Vysokomolekulární nosiče, polymerní nosiče ( $3 \cdot 10^4$  g/mol) a volný Dox byly testovány *in vitro* a *in vivo* pro cytostatický efekt a protinádorový účinek. Nově syntetizovaný vysokomolekulární polymerní nosič prokázal nejvyšší efektivitu při léčbě EL4 T-buněčného lymfomu v myších.

## Klíčová slova:

HPMA, vysokomolekulární polymerní nosič, EPR efekt, protinádorová terapie, RAFT polymerizace,

Abstract:

This diploma thesis brings new data about design, synthesis, physico-chemical characterisation and biological efficacy of the novel star-like HPMA-based conjugates intended for treatment of solid tumors.

Recently, many different water-soluble drug delivery systems based on *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymers have been described. Here, we report synthesis and physico-chemical characterisation of high molecular weight star-like HPMA-based polymer carriers with low polydispersity prepared by controlled grafting of HPMA copolymers onto PAMAM dendrimer core. With the aim to keep the polydispersity of drug delivery system as low as possible, reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) polymerisation was used for HPMA-based polymer precursor preparation. The end groups of the polymer precursors was afterwards used for grafting using carbodidimide condensation reaction or copper free click chemistry on polyamidoamine (PAMAM) dendrimers resulting in a formation of star-like high-molecular-weight (HMW) drug carriers.

Described synthetic procedure provided preparation of star-like HMW drug carriers with  $M_w$  between  $1.10^5 - 3.10^5$  g/mol and narrow distribution of  $M_w$ . The model drug, doxorubicin (Dox), was attached to the hydrazide group containing polymer carriers by pH-sensitive hydrazone bond stable in conditions simulating blood circulation (buffer, pH 7.4) and releasing active drug in conditions modelling endosomes and lysosomes of tumor cells (pH 5 - 6). Disulfidic spacer between HPMA copolymer and PAMAM dendrimer core facilitate degradation of HMW structure in cytosomal compartment of tumor cells to polymer fragments eliminable by glomerular filtration from the body.

HMW drug carriers, linear polymer drug carriers ( $3.10^4$  g/mol) and free Dox were tested *in vitro* and *in vivo* for cytostatic effect and anti-tumor efficacy. The novel HMW star-like drug carrier demonstrated the highest effectivity in treatment of EL4 T-cell lymphoma in mice. „In Czech“

Keywords:

HPMA, high-molecular-weight drug carrier, EPR effect, anti-cancer therapy, RAFT polymerisation

# Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>4</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>2. PŘEHLED LITERATURY.....</b>	<b>8</b>
2.1 Léčba nízkomolekulárními cytostatiky.....	8
2.2 Vývoj farmakoterapie – prodloužení cirkulace léčiva v krevním oběhu .....	9
2.3 Polymerní nosiče .....	10
2.3.1 Transport polymerního nosiče do buňky.....	11
2.3.2 Efekt zvýšené propustnosti a zadržování (EPR efekt) .....	13
2.4 Struktura nosičů léčiv .....	15
2.4.1 Liposomy .....	15
2.4.2 Vodorozpustné polymerní nosiče .....	16
2.4.3 Vysokomolekulární polymerní nosiče pro pasivní směřování .....	17
2.4.4 Kontrolované uvolňování léčiv a degradace vysokomolekulárních nosičů.....	21
2.5 Příprava HPMA lineárních polymerů .....	22
<b>3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>26</b>
4.1 Syntetické postupy.....	26
4.1.1 Použité chemikálie.....	26
4.1.2 Příprava činidel pro přípravu a charakterizaci lineárních kopolymerů nesoucích koncovou azidovou skupinu .....	27
4.1.3 Použité monomery .....	28
4.1.4 Příprava reaktivních „semitelechelických“ kopolymerů na bázi HPMA.....	31
4.1.5 Příprava hvězdicovitých konjugátů .....	36
4.2 Použité metody .....	42
4.2.1 Acidobazická titrace.....	43
4.2.2 UV/Vis spektroskopie.....	43
4.2.3 Kapalinová chromatografie.....	46
4.2.4 Uvolňování Dox z konjugátů .....	46
4.2.5 Biologické testy .....	47
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>49</b>

<b>5.1</b>	<b>Syntéza a fyzikálně-chemická charakterizace polymerních prekurzorů .....</b>	<b>49</b>
5.1.1	Příprava lineárních kopolymerů s $\alpha$ -koncovou karboxylovou skupinou .....	50
5.1.2	Příprava lineárních kopolymerů s $\omega$ -koncovou karboxylovou skupinou .....	52
5.1.3	Příprava lineárních kopolymerů s koncovou azidovou skupinou .....	54
<b>5.2</b>	<b>Hvězdicovité konjugáty .....</b>	<b>56</b>
5.2.1	Příprava hvězdicovitých konjugátů typu A.....	57
5.2.2	Příprava hvězdicovitého konjugátu - Typ B a C.....	58
5.2.3	Odchránění hydrazidových skupin a vazba Dox na hvězdicovitý polymer .....	61
<b>5.3</b>	<b>Stanovení uvolňování léčiva a cytostatického efektu polymerních systémů.....</b>	<b>63</b>
5.3.1	Uvolňování léčiva <i>in vitro</i> .....	63
5.3.2	Cytostatický efekt polymerních konjugátů vůči nádorovým liniím.....	64
5.3.3	Protinádorová aktivita polymerních konjugátů .....	65
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>69</b>

## Seznam použitých zkratek

AIBN – 2,2-azobis(isobutyronitril), iniciátor využívaný v ATRP a RAFT polymerizacích

ATRP – „atom transfer radical polymerisation“ – řízená radikálová polymerace

Boc – *tert*-butoxykarbonylová chránící skupina

CDI – 1,1'-carboxydiimidazol - aktivátor karboxylové skupiny pro vznik esterových a amidových vazeb při esterifikačních reakcích

CTA – „chain transfer agent“ – univerzální označení pro přenašečové činidlo v RAFT polymerizacích

CTA-N<sub>3</sub> – [4-(3-azidopropylamino)-1-kyano-1-methyl-4-oxo-butyl]benzenkarbodithioát – přenosové činidlo pro přípravu polymerů s koncovou reaktivní N<sub>3</sub> skupinou

D<sub>2</sub>-(DBCO)<sub>n</sub> – PAMAM dendrimer G<sub>2</sub>, na jehož koncové NH<sub>2</sub> skupiny jsou zavedeny aza-dibenzocyklooktynové skupiny s nedegradovatelným linkerem

D<sub>2</sub>-(S-S-DBCO)<sub>n</sub> – PAMAM dendrimer G<sub>2</sub>, na jehož koncové NH<sub>2</sub> skupiny jsou zavedeny aza-dibenzocyklooktynové skupiny s redukčně degradovatelnou spojkou

DBCO – *N*-(aza-dibenzocyklooktyn), funkční skupina - na dusíku, který je součástí heterocyklu, je vázána lineární spojka o různé struktuře, na jejímž druhém konci je reaktivní skupina schopná vazby na jiné struktury (např. polymery) různými typy vazeb

DBCO-NHS-ester – *N*-(azadibenzocyklooktynyl)-6-oxohexanoát – nedegradovatelná spojka použitá pro 1,3-cykloadici azidu na trojnou vazbu

DBCO-S-S-NHS-ester – sukcinimidyl 3-[[[(aza-dibenzocyklooktynyl)4-oxobutanamido]ethyl]disulfanyl]propanoát - biodegradovatelná spojka použitá pro 1,3-cykloadici azidu na trojnou vazbu

DCC – dicyklohexylcarbodiimid - aktivátor karboxylové skupiny pro vznik esterových a amidových vazeb při esterifikačních reakcích

DIPC – di(isopropyl)carbodiimid - aktivátor karboxylové skupiny pro vznik esterových a amidových vazeb při esterifikačních reakcích

DIPEA – di(isopropyl)ethylamin

DIVEMA – poly(divinylether-*co*-maleinanhydrid)

DMF – dimethylformamid, rozpouštědlo

DMSO – dimethylsulfoxid, rozpouštědlo

Dox – Doxorubicin, kancerostatikum, využívané jako modelové léčivo

DTB – dithiobenzoátová skupina – reaktivní skupina, součástí CTA, v nově syntetizovaném polymeru je koncovou reaktivní skupinou

EDC – N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid - aktivátor karboxylové skupiny pro vznik esterových a amidových vazeb při esterifikačních reakcích

EEDQ – ethyl-2-ethoxy-1(2H)chinolinkarboxylát - aktivátor karboxylové skupiny pro vznik esterových a amidových vazeb při esterifikačních reakcích

EPR efekt – „Enhanced Permeability and Retention Effect“ – efekt zvýšené propustnosti a zadržování – studován na polymerních nosičích v nádorových tkáních

F – funkcionálnost polymeru, značí poměr polymerů s reaktivní skupinou, v případě „semitelechelických“ polymerů se její hodnota pohybuje v intervalu 0 – 1,0; kdy 0 znamená, že žádný polymer nemá danou funkční skupinu a 1,0 znamená, že každý lineární polymer má funkční skupinu.

HOBT – hydroxybenzotriazol, aktivátor karboxylové skupiny pro vznik esterových a amidových vazeb

HPMA – N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid, derivát MA

$I_n$  – index disperzity – popisuje distribuci hmotností, výpočet se provádí vydělením hodnoty  $M_w$  hodnotou  $M_n$

MA – methakrylamid, jeho deriváty jsou využívány k syntéze neimunogenních kopolymerů

MA-acap-X – derivát N'-6-methakryloylamino)-hexanoylové kyseliny, X značí různé substituenty karboxylové skupiny

MeOH – methanol, rozpouštědlo

$M_n$  – číselný střed molární hmotnosti

$M_w$  – hmotnostní střed molární hmotnosti

NCS – neokarcinostatin –peptidové antibiotikum

PAMAM dendrimer  $G_2$  – poly(amido)amin druhé generace – obecná struktura jádra pro syntézu hvězdicovitých konjugátů, v tomto případě obsahuje 16 koncových  $NH_2$  skupin

PEG – poly(ethylenglykol)

RAFT – „reverse addition-fragmentation chain transfer polymerization“ – nová metoda polymerizace například MA derivátů, využívá iniciátoru a přenašečového činidla

RES – retikuloendoteliální systém



SMA – poly(styren-*alt*-mono-*n*-butylmaleinát)

SMANCS – polymerní léčivo tvořené nosičem SMA, které mělo ve své struktuře kovalentně navázané léčivo NCS

TFA – trifluoroctová kyselina

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

THF – tetrahydrofuran, rozpouštědlo

TNBSA – 2,4,6-trinitrobenzensulfonová kyselina – používá se ke spektrálnímu stanovení obsahu NH<sub>2</sub> skupin

# 1. Úvod

Moderní životní styl s sebou na jednu stranu přináší prodloužení života díky rozvoji medicíny, prevenci onemocnění i zvyšování míry dostupnosti lékařské péče. Na druhou stranu je bohužel provázen i negativními jevy, mezi které patří především značný výskyt tzv. civilizačních chorob – choroby kardiovaskulárního systému (infarkt myokardu, arterioskleróza), obezita, rozmach diabetes mellitus (převážně druhého – tzv. seniorského typu) a v nemalé míře i nádorová onemocnění. Jako příklad tohoto neblahého trendu uveďme výrazný nárůst incidence rakoviny tlustého střeva (kód C18-ZN podle Klasifikace diagnóz onkologických onemocnění, ÚZIS ČR) v české populaci mezi lety 1977 až 2009, kdy došlo k více než dvojnásobnému zvýšení výskytu tohoto onemocnění (nárůst z 18 případů výskytu na 100 000 obyvatel v roce 1977 až na 46 případů výskytu na 100 000 obyvatel v roce 2009).<sup>1</sup>

Léčba chemoterapeutiky, velmi často vysoce účinná, je doprovázena často nežádoucími vedlejšími účinky, které vedou k poškození zdravých tkání a orgánů. Mnoho vědeckých týmů po celém světě v současné době hledá řešení, jak zvýšit účinnost dostupných chemoterapeutických látek a současně co nejvíce eliminovat vedlejší účinky těchto léčiv. Jednou z možností, jak dosáhnout výše zmíněného, je příprava systémů pro cílené směřování a řízené uvolňování léčiv. Tento vědecký obor v dnešní době zažívá velký rozvoj a hlavní cíle předkládané diplomové práce spadají právě do této problematiky.

## 2. Přehled literatury

V současnosti jsou neustále vyvíjena účinnější kancerostatická léčiva a terapeutické postupy mající za cíl dosáhnout pokud možno úplné nádorové regrese. Kromě toho je velmi intenzivně studována farmakokinetika s cílem dosáhnout co nejspecifičtějšího účinku. Ideálem současné medicíny je cílený transport léčiva do místa účinku. Cestou, jak toho dosáhnout, je použití polymerních nosičů léčiv.

V následujících kapitolách se budeme věnovat nejdříve historii nízkomolekulárních kancerostatik a klasické chemoterapie. Dále se zaměříme na podání stručného výčtu systémů, které byly studovány s cílem prodloužit dobu cirkulace nízkomolekulárních léčiv v krevním řečišti s důrazem na jednotlivé polymerní nosiče. Mimo jiné se zaměříme na oblast řízeného uvolňování léčiva, kde budou uvedeny nejzajímavější principy využívané v tomto oboru. V neposlední řadě bude část této kapitoly věnována také otázce degradace polymerních nosičových systémů a jejich eliminaci z organismu po splnění jejich úkolu, tedy dopravě aktivního léčiva do místa požadovaného účinku.

### 2.1 Léčba nízkomolekulárními cytostatiky

V současné době je nejčastěji používanou formou terapie kombinace několika terapeutických postupů najednou. Nejčastěji to bývá radioterapie, chemoterapie kancerostatiky a chirurgický zákrok. Kombinace je doporučována zvláště proto, že chirurgický zákrok zpravidla nedokáže zajistit úplné odstranění nádorové tkáně. Současně provedené ozáření, případně užití kancerostatik je však schopné tyto zbývající buňky zasáhnout.

Kancerostatika bývají nejčastěji látky na bázi antimetabolitů syntézy nové DNA (deriváty jednotlivých bází, dochází k inkorporaci do DNA), interkalátory do DNA (příkladem je v této práci používané léčivo doxorubicin), inhibitory enzymů podílejících se na replikaci DNA a RNA, regulační proteiny a látky navozující apoptózu buněk, případně hormony regulující buněčný růst a dělení u nádorů hormonálně sensitivních.<sup>2</sup>

Rozvoj chemoterapie a léčby cytostatiky zažil velký rozkvět kolem padesátých let dvacátého století. Na počátku lidé věřili, že tato léčiva jsou univerzální a použitelná na jakýkoliv typ nádorového onemocnění. Bohužel se velice brzy zjistilo, že i ona mají své limity. Nízkomolekulární léčiva jsou totiž volně distribuovaná krví do celého těla, kde mohou díky cytotoxickému účinku poškodit i zdravou tkáň díky svému nespecifickému účinku<sup>2</sup>. Samotnou biodistribuci léčiva v organismu ovlivňuje v mnoha případech struktura léčiva. Léčivo může být lipofilního charakteru a koncentrovat se v lipoidní tkáni, která ale není nádorem zasažena. V tomto případě může dojít k nechtěné akumulaci léčiva ve zdravé tkáni a mohou se projevit nechtěné vedlejší účinky, které mohou být následně i fatální. Mimo jiné bývají nízkomolekulární léčiva poměrně rychle biodegradována, lipofilní látky bývají hydrofilizovány a vyloučeny glomerulární filtrací z organismu, nebo také uloženy v játrech, ledvinách a kostech. Celý výše popsany děj navíc probíhá velmi rychle, počas vyloučení nízkomolekulárních chemoterapeutik z organismu odpovídá zpravidla několika minutám. Toto vše má za následek, že léčivo se v nádorové tkáni akumuluje jen nepatrně ve velmi nízkých koncentracích, navíc je velmi brzy z tkáně odstraněno. Moderní medicína řeší tento problém například častým opakováním podávání cytostatik nebo podáváním mixů kancerostatik se synergickým účinkem.

K nežádoucím účinkům v praxi užívaných chemoterapeutik patří jejich karcinogenita (např. léčivo tamoxifen), vysoké poškození rychle se množících tkání organismu (kostní dřev) a rovněž poškození ostatních zdravých tkání organismu, jako je vypadávání vlasů, poškození svalových buněk spojených se ztrátou svalové hmoty, poškození srdečního svalu (kardiomyopatie). V neposlední řadě bývá chemoterapie pacienty velmi špatně snášena a provázena nevolnostmi.

## **2.2 Vývoj farmakoterapie – prodloužení cirkulace léčiva v krevním oběhu**

S ohledem na výše uvedené nedostatky terapie nízkomolekulárními léčivy postupně docházelo od druhé poloviny 20. století ke změně přístupu v podávání léčiva pacientovi. Jako první byly do praxe zavedeny tři terapeutické postupy zajišťující prodloužení cirkulace léčiva v krevním oběhu – dlouhodobé podávání infuzního roztoku obsahujícího

léčivo při jedné návštěvě pacienta na oddělení, využití olejových suspenzí pro aplikaci *i.m.* a *s.c.* a využití nerozpustné polymerní matrice pro podání *p.o.* a *s.c.*. Poslední postup je již příkladem nové formy léčiv, tzv. protrahovaných systémů, které mají zajistit pozvolné uvolňování aktivního léčiva ze zásobního depa podaného pacientovi například ve formě pilulky.

Výhody využívání protrahovaných systémů v praxi byly prokázány v klinických studiích zkoumajících farmakokinetiku, rychlost eliminace kancerostatika, po podání léčiva v původní nízkomolekulární formě nebo protrahované formě<sup>3,4</sup>. Z obou studií je zřejmé, že nízkomolekulární cytostatika jsou odstraněna velmi rychle z krevního oběhu a následně z organismu. Proto začaly být podrobně studovány systémy s protrahovaným účinkem zaručujícím dlouhodobě vhodnou koncentrací<sup>5,6</sup>. Jako vhodný systém byly do praxe zavedeny polymerní matricové systémy, ze kterých je léčivo postupně vyplavováno do krevního řečiště.

Výše popsané postupy umožnily prodloužit cirkulaci aktivního léčiva v krevním oběhu, nicméně ideálem moderní medicíny je, aby léčivo bylo po celou dobu krevní cirkulace neúčinné a aktivovalo se až v místě účinku, a tím se minimalizoval kontakt léčiva se zdravou tkání. Tento bod je velmi důležitý u vysoce toxických protinádorových léčiv, které pokud nejsou dopraveny jen na místo svého působení, mohou působit intenzivně i na zdravou tkáň. V této souvislosti začaly být vyvíjeny systémy, které po celou dobu transportu přenášejí neaktivní léčivo, k jehož aktivaci dojde v místě účinku. Tyto v současnosti hojně studované systémy bývají zpravidla založeny na různých polymerních nosičích.

## 2.3 Polymerní nosiče

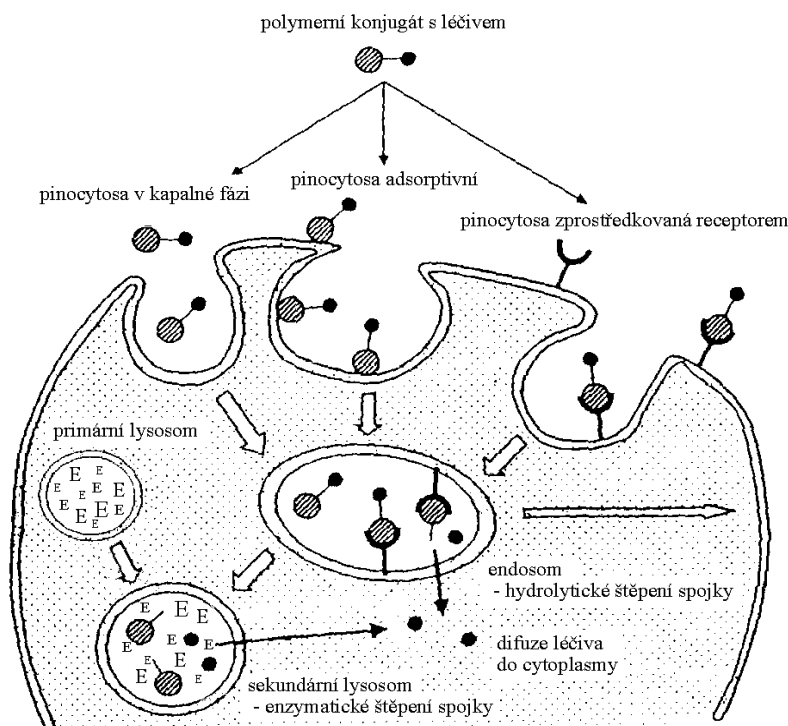
Jednou z možností jak významně prodloužit dobu cirkulace léčiva v organismu je jeho navázání na molekulu, která díky své struktuře cirkuluje významně delší dobu v organismu. Jako potenciální nosiče umožňující zmíněné prodloužení doby cirkulace jsou v současné době makromolekulární látky, jak přírodní tak i syntetické. V posledních dvou dekádách bylo studováno mnoho polymerů a kopolymerů, potenciální vysokomolekulární

nosiče pro nízkomolekulární léčiva. Z těchto studií lze vyvodit, jaké základní podmínky by měl ideální polymerní nosič splňovat<sup>46</sup>:

- biokompatibilitu a neimunogenost,
- netoxicitu a neantigenost (musí být dodržena i u potencionálních metabolitů),
- biodegradovatelnost, případně nesmí projevit výraznou akumulaci v těle,
- vodorozpustnost,
- schopnost vázat léčivo a případně směřující jednotku, musí umožňovat cílený transport,
- cenovou dostupnost a snadnou připravitelnost a umožňovat vazbu léčiva a jeho řízené uvolňování,
- nesmí vykazovat příliš širokou distribuci molárních hmotností.

### **2.3.1 Transport polymerního nosiče do buňky**

Zatímco nízkomolekulární léčivo se do živočišných buněk z mezibuněčného prostoru dostává prostou difuzí, případně aktivním transportem, u polymerních nosičů je makromolekula transportována do buněk (zdravých i nádorových) pomocí různých typů endocytosy (pinocytosy), což je významně pomalejší proces ve srovnání s difuzí. Pinocytosu je možné rozdělit na: pinocytosu v kapalně fázi, pinocytosu adsorptivní a pinocytosu zprostředkovanou receptorem (Obr. 4)<sup>46</sup>. Pinocytosa dává vzniknout vchlípeninám obsahujícím extracelulární kapalinu, která po úplném oddělení od cytoplazmatické membrány dává vzniknout endozomům, ze kterých se stávají lysozomy.



Obr. 4: Průnik polymerního léčiva do buňky a způsoby uvolňování léčiva (písmeny E jsou označeny lysosomální enzymy)<sup>26</sup>

Polymerní nosiče mohou být na základě své velikosti preferenčně akumulovány v některých orgánech a rovněž v pevných nádorech. Ve většině zdravých tkání nemohou polymerní nosiče, na rozdíl od nízkomolekulárních látek, volně pronikat přes stěny cévních kapilár. V případě nádorové tkáně, která rychleji proliferuje, pro což potřebuje vysoce účinné zásobování živinami, je situace odlišná. Nádorové buňky produkují angiogenní a vazodilatační faktory, čímž zvyšují průchodnost vaskulárního systému pro makromolekulární látky. Dynamický rozvoj nádorové tkáně zároveň neumožňuje správný vývoj lymfatického systému, který neodvádí akumulované makromolekulární látky z prostředí nádoru. Souběh obou zmíněných procesů způsobuje významně zvýšenou akumulaci makromolekul v nádorové tkáni. Tento efekt, „Efekt zvýšené propustnosti a zadržování“ („Enhanced permeability and retention effect“, EPR efekt) poprvé popsal H. Maeda.<sup>77</sup>

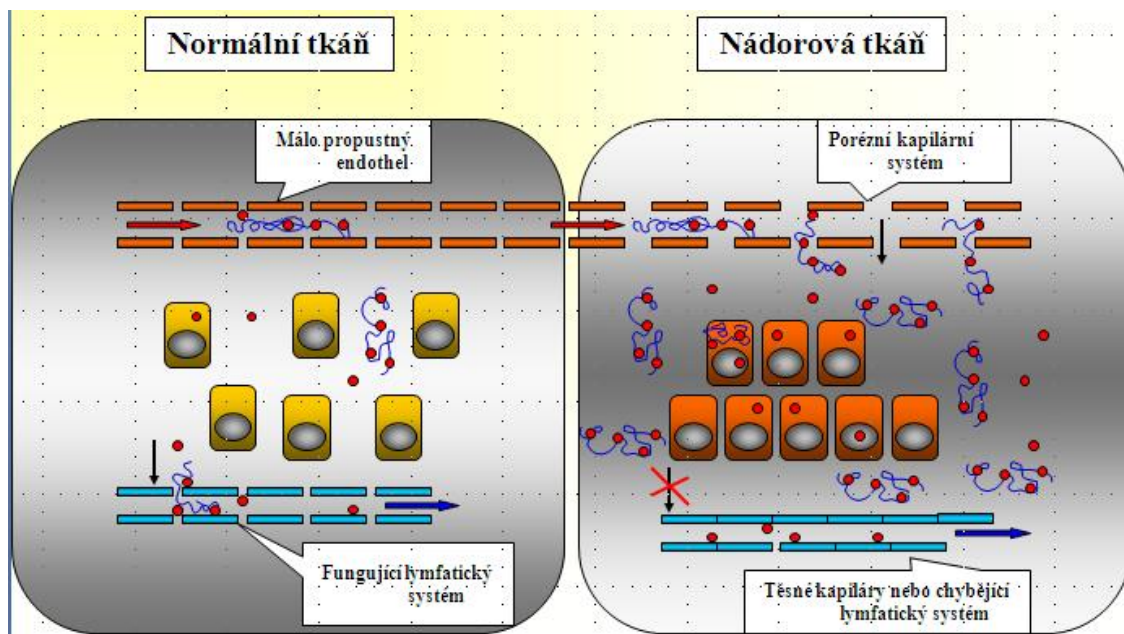
### 2.3.2 Efekt zvýšené propustnosti a zadržování (EPR efekt)

Pro účinný EPR efekt (princip EPR efektu znázorněn na Obr. 2) je nutné, aby bylo léčivo navázáno na dlouhocirkulující molekulu, například polymerní nosič, která významně navýší molekulovou hmotnost celého systému.<sup>14</sup>

EPR efekt byl objeven<sup>77</sup> při experimentech stanovujících závislosti rozdílu koncentrací makromolekul v krevním řečišti a v nádorové tkáni na molekulové hmotnosti. Při těchto pokusech byly studovány proteiny o  $M_w$  od 29 000 do 160 000 g/mol a také syntetický polymer SMANCS [ $M_w = 16\ 000$  g/mol, polymerní kopolymer poly(styren-*alt*-mono-*n*-butylmaleinát) (SMA) s navázaným léčivem neokarcinostatinem (NCS)]. Bylo prokázáno<sup>10,11</sup>, že makromolekuly se dokážou akumulovat v nádorové tkáni ve vyšším množství než ve zdravé tkáni. Jedná se o jedinečný jev vyskytující se u pevných nádorů ve spojitosti s jejich anatomickými a patofyziologickými rozdíly od zdravých tkání.

Výše uvedená domněnka principu EPR efektu (prodloužená zadrž léčiva v nádorové tkáni) byla prokázána<sup>13</sup> využitím radioznačených polymerů na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) k syntéze lineárních polymerů o různé hmotnosti (4 500 – 800 000 g/mol) s následným stanovením poměru množství polymerního nosiče v nádorové tkáni a v krevním řečišti. Bylo zjištěno, že se vzrůstající  $M_w$  vzrůstal i EPR efekt, nejvyšších hodnot dosahoval při  $M_w$  okolo 200 až 600 000 g/mol. Při překročení této hodnoty začal EPR efekt klesat. Předpokladem postupného poklesu je vliv hydrodynamického poloměru, kdy se nemůže do nádorové tkáně efektivně dostávat polymer, jehož hydrodynamický poloměr je větší než poloměr póru ve vlasečnicích nádorové tkáně, kdy výsledkem je pokles extravazace a nižší nádorová akumulace<sup>50</sup>.





Obr. 2: Porovnání normální tkáně a nádorové tkáně – EPR efekt

Jedním z omezení EPR efektu je vychytávání polymerů s hydrodynamickým poloměrem větším než 200 nm „opsoninovými“ proteiny a dalšími komponentami retikuloendoteliálního (RES) systému a jejich následného odstranění z krevního řečiště<sup>15</sup>. Jestli bude molekula polymeru schopná projít do nádorové tkáně i přes svůj větší hydrodynamický poloměr je také řízeno její strukturou. Lineární polymery dobře rozpustné v krevních tekutinách jsou po dobu transportu „sbaleny“ do klubka, které může být deformováno a jako takové může projít pórem vlásečnice. Naproti tomu rozvětvený systém, dendrimery a nízkorozpustné polymery mohou být „sbaleny“ do pevného rigidního klubka, které není schopné deformace potřebné pro průchod pórem<sup>16,17</sup>.

Závěrem lze tedy říci, že efektivita EPR efektu je významně ovlivněna vzrůstající  $M_w$ , architekturou a molekulovou konformací polymeru s optimem molekulových hmotností určenou pro HPMA kopolymery na 200 – 600 000 g/mol. Další otázkou je eliminace polymerního nosiče poté, co splní svou úlohu a dopraví léčivo do cílové části organismu. Renální práh pro efektivní vylučování z organismu HPMA kopolymerů v této práci používaných byl stanoven na 50 000 g/mol<sup>13</sup>. Pokud je molekulová hmotnost větší, je nutné do struktury polymerních nosičů zakomponovat biodegradovatelné spojky umožňující degradaci struktury na fragmenty s  $M_w$  pod limitem renální filtrace.

## 2.4 Struktura nosičů léčiv

Struktury nových nosičů kancerostatik jsou navrhovány na základě získaných poznatků o cílových tkáních. Studiu nosičů vhodných pro transport kancerostatik se v posledních letech věnuje velká pozornost, a to na mnoha pracovištích po celém světě<sup>18-20</sup>. Poprvé se tato myšlenka objevila již v sedmdesátých letech minulého století<sup>21,22</sup>, přičemž první experimentální výsledky se objevují v první polovině osmdesátých let<sup>23,24</sup>. V první polovině osmdesátých let byl také připraven první směrovaný polymerní systém<sup>25</sup>, kde bylo využito oligopeptidového bočního řetězce zakončeného galaktózou zvyšující pinocytózu polymeru do jaterních buněk. V současné době jsou patentovány různé polymerní nosiče a u některých z nich probíhají různé fáze klinického testování.

### 2.4.1 Liposomy

Liposomy zapadají do současného nárůstu zájmu o nanotechnologie, při kterém jsou studovány různé vysokomolekulární systémy, jejichž rozměry dosahují rozmezí 5 až několik set nanometrů. Jedná se o sférické nadmolekulární struktury, které vznikají nekovalentní interakcí mezi jednotlivými amfifilními strukturními podjednotkami za vzniku struktur podobných buněčným membránám<sup>84</sup>. Tyto struktury umožňují transport jak hydrofilních (ve formě roztoku enkapsulovaného uvnitř vytvořené dutiny), tak hydrofobních (uvnitř hydrofobní části slupky tvořené lipidovou dvojvrstvou) látek. Liposomální systémy mají nespornou výhodu v tom, že jsou snadno připravitelné.

Nevýhodou liposomálních systémů je jejich rychlá eliminace z organismu působením RES a bývají deponovány převážně v játrech (až 90 %), ledvinách a kostní dřeni. Tento problém je řešen povrchovou modifikací hydrofilními polymery, například poly(ethylenglykol) (PEG). Takto upravený liposomální systém prošel klinickými studiemi a v současné době je na trhu jako léčivo Doxil<sup>®</sup>/Caelyx<sup>®</sup> vhodné pro léčbu nádorů vaječníků<sup>46</sup>.

## 2.4.2 Vodorozpustné polymerní nosiče

### 2.4.2.1 Přírodní polymery

Prvními vodorozpustnými polymerními nosiči byly přírodní polymery založené převážně na polysacharidech a proteinech tvořící biologicky degradovatelné systémy. V případě sacharidů byly využity polymerní struktury dextranu a chitinu, v případě proteinů se jednalo o sérový albumin a různé glykoproteiny<sup>26-28</sup>. Výhodou těchto přírodních polymerů je jejich snadná degradace enzymovým štěpením na produkty vylučitelné z organismu nebo využitelné pro metabolismus organismu.

Mezi syntetické lineární biodegradovatelné polymerní nosiče řadíme zejména poly( $\alpha$ -aminokyseliny) vzniklé polymerací L-lysinu<sup>29</sup>, L-glutamové kyseliny<sup>30</sup> a L-asparagové kyseliny<sup>31</sup>.

### 2.4.2.2 Syntetické polymerní nosiče

Další významnou skupinou jsou syntetické vodorozpustné polymerní nosiče, jejichž struktura je v základě nedegradovatelná v biologickém prostředí. Tyto polymerní nosiče již musí být navrženy tak, aby nedocházelo k překročení renálního prahu a tím nechtěné akumulaci polymerů v organismu.

Mezi významné syntetické nedegradovatelné polymerní nosiče patří (PEG)<sup>32-35</sup>, který patří mezi nejvíce studované systémy. Jeho výhodou je rozpustnost v polárních i nepolárních rozpouštědlech a možnost přípravy polymerních řetězců o požadované molární hmotnosti, a to v široké škále při zachování nízké disperzity. V biologických systémech se nejčastěji používají PEG o  $M_w$  od 1 000 do 20 000 g/mol<sup>36</sup>. Jejich mírnou nevýhodou je možnost využít pouze koncové skupiny pro vazby biologicky aktivních molekul. Nejčastějším využitím PEG je povrchová modifikace proteinů, liposomů apod., která dokáže ochránit daný systém před degradačními mechanismy organismu, a tím vede k prodloužení jeho cirkulace v krevním řečišti<sup>37,38</sup>.

Mezi další významné systémy patří polymery vinylového typu (např. deriváty kyseliny akrylové a methakrylové)<sup>39</sup>. Tyto systémy jsou neimunogenní, biokompatibilní a vodorozpustné s množstvím funkčních skupin v bočních řetězcích vhodných pro vazbu léčiva. Do této skupiny spadají polymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu

(HPMA)<sup>40-43</sup>, poly(divinylether-*co*-maleinanhydrid (DIVEMA)<sup>44</sup>, nebo také poly(styren-*alt*-mono-*n*-butylmaleinát) (SMA)<sup>45</sup>. Posledně jmenovaný polymer reakcí anhydridu s  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinu, případně s N-koncem alaninu antibiotika neokarcinostatinu, poskytuje konjugát nazvaný SMANCS, který byl na trh uveden jako vůbec první polymerní nosič s protinádorovým léčivem<sup>46</sup>.

Z této skupiny syntetických polymerů jsou často využívány kopolymery na bázi HPMA. Vhodné funkční skupiny pro vazbu biologicky aktivních látek lze zavést do struktury tohoto polymerního nosiče pomocí kopolymerace s dalšími komonomery obsahujícími různé reaktivní skupiny. Takto mohou být do struktury kopolymeru na bázi HPMA vneseny například primární aminoskupiny, karboxylové skupiny, hydrazidy, primární hydroxylové skupiny a další využitelné funkční skupiny. Od druhé poloviny 80. let byly připravovány lineární konjugáty s cytostatikem doxorubicinem (Dox), kdy léčivo bylo k polymeru vázáno kovalentní amidovou vazbou přes enzymově degradovatelné oligopeptidové spojky<sup>48-49</sup>. Z testovaných spojek bylo dosaženo nejlepších výsledků při použití oligopeptidové spojky Gly-Phe-Leu-Gly, která se ukázala jako nejvhodnější substrát pro kathepsin B patřící mezi lysozomální peptidasy. Další používanou degradovatelnou spojkou je hydrazonová vazba, která je hydrolyzována v kyselém prostředí.

Vysokomolekulární systémy, například micely a „roubované“ polymery, vyvinuté v minulosti jako vhodné polymerní nosiče jsou popsány v následujících kapitolách.

### **2.4.3 Vysokomolekulární polymerní nosiče pro pasivní směřování**

V nedávno publikované studii<sup>50</sup>, věnované vlivu molární hmotnosti na akumulaci polymerního nosičového systému v pevných nádorech, bylo zjištěno, že při hodnotách molární hmotnosti systému od 200 000 do 600 000 g/mol docházelo k nejvyšší akumulaci ve vybraném pevném nádoru. Pokud by struktura takového polymerního konjugátu byla nedegradovatelná v organismu, docházelo by k jeho nechtěné dlouhodobé akumulaci, vzhledem k tomu, že jeho molekulová hmotnost významně přesahuje limit pro renální filtraci. Vhodnou alternativou se proto jeví v případě vysokomolekulárních polymerních nosičů příprava biodegradovatelných struktur tvořených základními polymerními jednotkami, jejichž molární hmotnost nepřesahuje 50 000 g/mol, avšak které jsou

pospojovány biodegradovatelnými spojkami. S výhodou lze využít i micelární nosičové systémy tvořené amfifilními kopolymery.

### 2.4.3.1 Micely

Polymerní micely vznikají samouspořádáním polymerních amfifilních struktur<sup>51-53</sup>. Amfifilní struktury polymerních nosičů bývají tvořeny „dibloky“, například PEG v bloku s poly( $\beta$ -benzoyl L-aspartátem) pro transport hydrofobního léčiva<sup>54</sup>. Léčivo může být vázáno kovalentní degradovatelnou vazbou k jednotlivým ramenům, ať už k hydrofilní části či hydrofobní, ve většině případů jsou ovšem léčiva vázána hydrofobními interakcemi v jádře micel<sup>56-58</sup>. Hydrofilní ramena jsou pro systém důležitá z důvodu rozpustnosti v tělních tekutinách, navíc bývají tvořena biokompatibilními látkami, které zabraňují vychytávání micel retikuloendoteliálním systémem (RES). Pokud se micela dostane do nádorové tkáně, přesněji řečeno do intersticiálního prostoru, dochází k endocytóze micel do buněk, kde může dojít k jejich rozpadu a uvolnění aktivního léčiva. Nevýhodami micelárních nosičů tvořených amfifilními blokovými kopolymery může být například nescifické uvolňování léčiva vázaného hydrofobními interakcemi v micelách. Případně při poklesu koncentrace micel v krevním řečišti pod určitou hladinu (kritická asociační koncentrace, CAC) může docházet k rozpadu micelárních struktur na jednotlivé molekuly – „unimery“, které se mohou pohybovat solvované ve vodném prostředí. „Unimery“ v krevním řečišti mohou mít určitou cytotoxicitu, případně mohou vyvolat hemolýzu díky své povrchové aktivitě („unimery“ s detergentními vlastnostmi mohou narušovat fosfolipidové buněčné membrány<sup>46</sup>). Další nevýhodou je neustálé ustavování rovnováhy mezi micelou a disociací micel na jednotlivé „unimery“ a celý systém je tak v termodynamicky nestabilním stavu<sup>78</sup>.

### 2.4.3.2 “Roubované” polymery

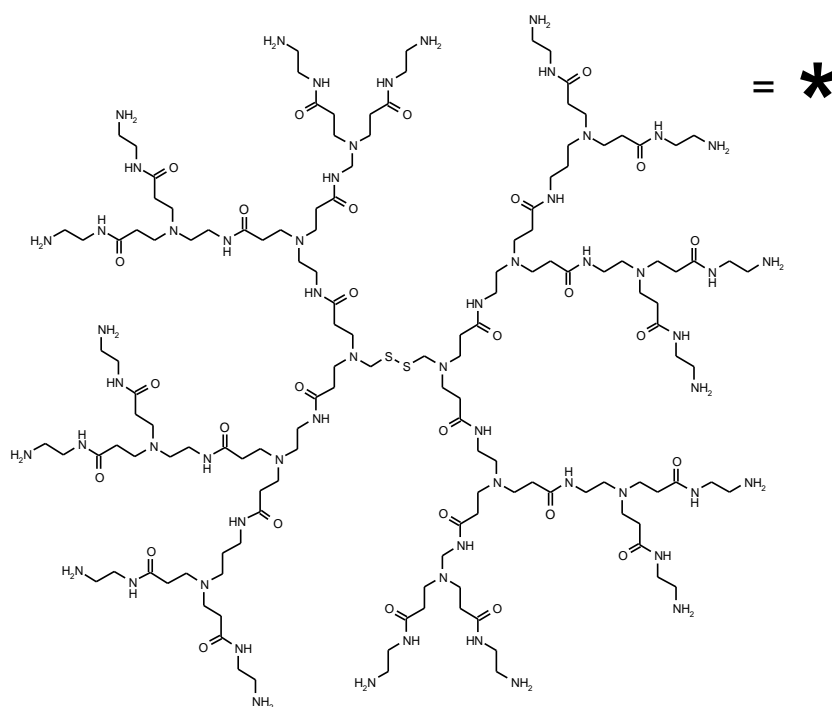
V případě „roubovaných“ polymerů je vysokomolekulární nosič léčiva založen na kovalentní vazbě lineárních kopolymerů na společné jádro. Společným jádrem mohou být jiné lineární kopolymery<sup>50,59</sup>, které nesou ve své struktuře reaktivní skupiny vhodné pro vazbu „semitelechelických“ kopolymerů (pro potřeby této diplomové práce se tímto

pojmem myslí kopolymer, jehož hlavní řetězec je zakončen jednou reaktivní skupinou), za vzniku vysokomolekulárního systému. Degradovatelnost takového systému může být zaručena biodegradovatelnými spojkami mezi jednotlivými komponentami systému, a to například redukčně štěpitelnými vazbami nebo enzymově degradovatelnými sekvencemi aminokyselin.

V roce 1999 byla publikována práce zabývající se syntézou „roubovaných“ vysokomolekulárních struktur polymerních nosičů založených na HPMA určených pro transport adriamycinu v krevním řečišti<sup>87</sup>. „Roubovaný“ vysokomolekulární polymerní nosič byl připraven kondenzací karboxylové skupiny lineárního kopolymeru s aminoskupinou na lineárním kopolymeru fungujícím jako jádro systému. Takto připravené systémy byly déle zadržovány v organismu díky zvýšení EPR efektu, ale měly několik významných nevýhod, například vysokou disperzitu, nízkou reprodukovatelnost a neobsahovaly biodegradovatelně štěpitelné spojky mezi jádrem a lineárním kopolymerem<sup>59</sup>.

### **2.4.3.3 Hvězdicovité polymerní nosiče**

Vysokomolekulární hvězdicovité polymerní nosiče byly v minulosti připraveny vazbou lineárních kopolymerů na hvězdicovité jádro. Oproti „roubovaným“ systémům mají významnou výhodu ve vyšší definovatelnosti, především významně nižší neuniformitě molekul vyjádřené nižší disperzitou systému. Jako jádro je v těchto systémech využíváno například dendrimeru na bázi poly(amido)aminů (PAMAM, obr. 5).



Obr. 5: Struktura poly(amido)aminového (PAMAM) dendrimeru použitého pro „roubování“ lineárních kopolymerů

V roce 2000 byla publikována studie zabývající se syntézou hvězdicovitých konjugátů využívajících dendrimerů na bázi PAMAM jako jader těchto konjugátů. K těmto PAMAM dendrimerům byly amidovou vazbou připojeny lineární HPMA kopolymery připravené radikálovou polymerací<sup>86</sup>.

V nedávné době byl rovněž také popsán hvězdicovitý polymerní nosič, a to nosič, ve kterém jsou lineární HPMA kopolymery navázány k středovému dendrimeru enzymově (sekvence Gly-Phe-Leu-Gly) nebo redukčně (disulfidová vazba) degradovatelnými spojkami<sup>50</sup>, které by měly zajistit rozpad vysokomolekulárního nosiče na vyloučitelné fragmenty. Využitím různých generací PAMAM dendrimerů, s různým počtem reaktivních koncových skupin, je možné v poměrně širokém rozmezí řídit počet polymerních „roubů“ navázaných na samotný dendrimer, což umožňuje připravit hvězdicovité polymerní nosiče v širokém rozmezí molekulových hmotností od 100 000 až do 1 000 000 g/mol<sup>50</sup>. Popsané polymerní nosiče s navázaným léčivem doxorubicinem, a to buď enzymově, nebo hydrolyticky degradovatelnou vazbou, prokázaly vysokou protinádorovou aktivitu.

#### 2.4.4 Kontrolované uvolňování léčiv a degradace vysokomolekulárních nosičů

Při návrhu biodegradovatelných spojek vhodných pro kontrolované uvolňování léčiv a pro zajištění degradovatelnosti vysokomolekulárních polymerních nosičů se vycházelo ze znalostí fyziologických pochodů v lidském organismu. Především bylo přihlédnuto k rozdílu pH v krevním řečišti (pH 7,4), v endozomech a v lysozomech nádorových buněk (pH 5 - 6)<sup>79</sup>, k přítomnosti specifických lyzozomálních enzymů v lysozomech<sup>80</sup> a k přítomnosti efektivní koncentrace glutathionu (1 - 5 mM) v buněčné cytoplasmě umožňující redukci disulfidických vazeb<sup>81</sup>. Cílem návrhu biodegradovatelných spojek, potažmo celého systému polymerního nosiče, je udržet léčivo po dobu cirkulace krevním řečištěm v neaktivní formě, aktivovat jej až při průchodu do buněčného prostoru a zajistit následný rozpad nosičového systému na fragmenty vyloučitelné z organismu glomerulární filtrací. Vzhledem k uvedeným vlastnostem se jako vhodné ukázaly vazby štěpitelné enzymově, redukčně a hydrolyticky.

Enzymové štěpení bylo nejčastěji využito pro uvolnění léčiva v lysozomech cílových buněk pomocí lyzozomálních enzymů. Tyto enzymy jsou vysoce specifické, a proto navržené spojky – jejich substráty – jsou štěpeny pouze v lysozomech cílových buněk<sup>79</sup> poté, co je nosičový systém cíleně dopraví do těchto buněk. Naopak v krevním řečišti nedochází ke štěpení těchto vazeb a s tím spojenému uvolňování léčiva. Studium různých kombinací oligopeptidových sekvencí byla zvolena za nejvíce vyhovující tetrapeptidová sekvence Gly-Phe-Leu-Gly<sup>61</sup>, která byla použita jak pro kovalentní vazbu léčiva, tak jako biodegradovatelná spojka při návrhu a přípravě vysokomolekulárních struktur<sup>50,59</sup>.

Degradovatelné spojky senzitivní k pH využívají rozdílů fyziologického pH (okolo 7,4) v krevním řečišti vzhledem k pH (pH = 5 - 6) v endozomech a lysozomech nádorových buněk<sup>26</sup>. Tyto spojky jsou navrženy tak, aby byly co nejstabilnější v prostředí fyziologického pH a naopak, aby docházelo k její rychlé degradaci (hydrolyze) v mírně kyselém prostředí. Při detailním studiu nádorových tkání bylo zjištěno, že již v mezibuněčném prostoru nádoru dochází k poklesu pH na hodnoty pH 6 - 6,5<sup>62</sup>. V tomto případě může dojít k uvolnění léčiva z nosiče ještě před endocytózou do buňky. V tomto případě není nezbytně nutné, aby bylo léčivo dopraveno až do jednotlivých nádorových



buněk, ale jeho aktivace probíhá již v mezibuněčném prostoru. V důsledku difúze je následně velmi rychle dopraveno do intracelulárního prostoru buňky. Mírnou nevýhodou těchto systémů je pomalé uvolňování léčiva již při transportu krevním řečištěm, který musí být minimalizován vhodným výběrem struktury spojky senzitivní k pH. Výhodou tohoto přístupu je naopak nezávislost na enzymovém vybavení buněk. Mezi testované hydrolyzovatelné vazby senzitivní k pH lze uvést například *cis*-akonitylovou spojku<sup>63</sup> a hydrazonovou vazbu<sup>64</sup>.

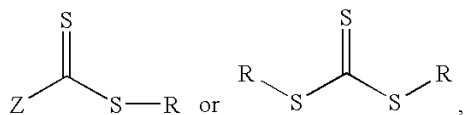
Redukčně degradovatelné spojky jsou v buněčném cytosolu degradovány působením glutathionu. Znovu je zde využito znalosti, že tato vazba může být štěpena pouze v intracelulárním prostoru<sup>65</sup>. Redukce disulfidické vazby byla ověřena na micelárních systémech tvořených PEG a poly(propylensulfidovým) blokem spojených dohromady disulfidickou vazbou<sup>66</sup>. Výhodou systémů obsahujících redukčně degradovatelné spojky je, že nedochází k předčasnému štěpení nosiče a uvolňování léčiva mimo vnitřní prostředí cílových buněk.

## 2.5 Příprava HPMA lineárních polymerů

Lineární polymerní nosiče na bázi HPMA byly a jsou připravovány především klasickou radikálovou polymerací, při které vznikají polymery s disperzitou molárních hmotností v rozmezí od 1,5 do 2,0. Teprve nedávno<sup>67</sup>, v roce 1998, byla poprvé popsána metoda řízené radikálové polymerace nazvaná „Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer“ (RAFT) polymerace<sup>68,69</sup>. Jde o metodu založenou na dříve vyvinutých chemických syntézách na principu radikálových reakcí nízkomolekulárních látek<sup>70</sup>. V roce 1995 stejné pracoviště<sup>68</sup> publikovalo polymerní syntézu založenou na RAFT polymerizaci, která vykazovala znaky živé polymerizace.

Chemismus RAFT polymerizace je postaven na zásadně odlišném principu ve srovnání s jinou v téže době popsanou řízenou radikálovou polymerací „atom transfer radical polymerization“ (ATRP) v tom, že se opírá o degenerativní přenos řetězce a nemá tak možnost využít přetrvávající radikálový účinek<sup>67</sup>. Technika RAFT polymerizace umožňuje polymerovat nebo kopolymerovat poměrně širokou šíří monomerů (např. vinylacetát, různé akryláty, methakryláty atd.).

RAFT polymerace začaly být od roku 1998 čím dál častěji používány pro syntézu polymerů vinylového typu. Obecná struktura přenašečového činidla („chain transfer agent“, CTA) je na Obr. 6.



Obr. 6: Obecná struktura CTA<sup>67</sup>

R-skupina je odstupující volná radikálová skupina, která musí být schopná reiniciovat polymeraci, a Z-skupina je zodpovědná za stabilizaci intermediátových radikálů vznikajících v průběhu polymerizace. Růst polymerů při ATRP polymeraci je umožněn prostřednictvím reversibilního štěpení kovalentní vazby mezi terminálním uhlíkem a koncovou skupinou polymeru, zatímco v případě RAFT je polymerace vedena degenerativním přenosem koncových skupin mezi propagačními radikály, případně „spícími“ skupinami, např. dithiokarbonylovou skupinou. RAFT polymerace umožňuje zavedení různých funkčních skupin na konce polymerních řetězců, tedy syntézu „semitelechelických“ a „telechelických“ kopolymerů („telechelickým“ kopolymerem se pro potřeby této práce myslí kopolymer, jehož obě koncové skupiny jsou zakončeny reaktivní skupinou).

Výběrem vhodného CTA lze zavést vhodné funkční skupiny buď na  $\alpha$ -konec nebo  $\omega$ -konec, případně na oba konce polymerního řetězce. Funkční skupiny obsažené v R-skupině CTA (viz Obr. 6) budou zabudovány i do  $\alpha$ -konce polymerního řetězce.

Stejně tak skupiny obsažené v Z-skupině (viz Obr. 6) budou zavedeny do  $\omega$ -konce. Protože se jedná o tzv. „pseudoživou“ radikálovou polymerizaci, při které nelze zamezit terminačním reakcím, funkcionality dithiokarbonylové koncové skupiny a tedy i Z-skupiny může klesat. I přes to nově vznikající polymer zpravidla dosahuje vysokých hodnot funkcionality na  $\omega$ -konci polymeru (většinou dosahuje hodnoty přesahující 90% v závislosti na reakčních podmínkách). Pro použití v biopolymerech však druhý způsob není žádoucí, lze totiž očekávat, že dithiokarbonylová skupina bude v těle degradovat, ať již hydrolyticky, nebo redukčně. Dithiokarbonylová skupina však může být odstraněna a volná thiolová skupina posléze využita pro zavedení vhodných skupin reakcí s bifunkčními činidly.

První HPMA homopolymer připravený RAFT polymerací za použití CTA s dithiobenzoátovou skupinou byl připraven v roce 2005<sup>82</sup>. Od té doby bylo RAFT polymerací připraveno několik homo- a kopolymerů, například za využití trithiokarbonátové skupiny jako CTA<sup>88</sup>. Následně byly RAFT polymerací připraveny blokové či statistické kopolymery HPMA. Pro přípravu blokových kopolymerů s bloky na bázi HPMA byly použity například deriváty akrylamidů (například *N*-[3-(dimethylamino)propyl]methakrylamid<sup>89</sup>), pro přípravu statistických kopolymerů byly použity například *N*-methakryolyloxysukcinimid<sup>90</sup>. Takto připravené kopolymery byly zamýšleny i jako nosiče biologicky aktivní látek, byl například připraven polymerní konjugát s kovalentně navázaným léčivem dexamethasonem s protizánětlivým a protinádorovým účinkem<sup>91</sup>, nebo micelární konjugát obsahující léčivo Dox vázané nekovalentně v jádře micel<sup>92</sup>.

### 3. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové bylo navázat na předchozí práce laboratoře, kde byla diplomová práce vypracována, a rozvinout přípravu a studium vlastností vysokomolekulárních vodorozpustných polymerních nosičů léčiv založených na kopolymerech HPMA. Tyto kopolymery umožňují díky svým vlastnostem cílený transport léčiva do požadovaného místa účinku a následnou aktivaci na polymerní nosič navázaného léčiva v místě požadovaného účinku. Předkládaná diplomová práce má za cíl navrhnout novou, zlepšenou strukturu polymerního nosiče, jenž umožňuje cílený transport léčiva při léčbě pevných nádorů. Předkládaná práce je řešena ve dvou na sebe navazujících krocích:

- 1) Příprava a fyzikálně chemická charakterizace lineárních polymerních prekurzorů lišících se koncovými skupinami vhodnými pro přípravu hvězdicovitých polymerních nosičů. Tyto lineární prekurzory umožňují díky své struktuře a přítomnosti funkčních skupin navázat vybrané léčivo přes spojku senzitivní k pH umožňující uvolnění léčiva na základě změn pH při přechodu z krevního řečiště (pH 7,4) do prostředí nádoru nebo dokonce endozomů a lysozomů nádorových buněk. Tento bod se skládá ze dvou postupných kroků:
  - Optimalizace kontrolované RAFT polymerizace s cílem dosáhnout lineárních polymerů o dostatečné molární hmotnosti, vysoké funkcionality koncových skupin a co nejnižší disperzity.
  - Příprava lineárních polymerních nosičů, jejichž polymerní řetězce jsou zakončeny reaktivními skupinami umožňujícími přípravu vysokomolekulárních struktur hvězdicovitěho typu.
- 2) Příprava a fyzikálně-chemická charakterizace hvězdicovitých polymerních konjugátů s nedegradovatelnou nebo biodegradovatelnou strukturou.
  - Syntéza nedegradovatelných hvězdicovitých konjugátů s navázaným léčivem přes hydrazonovou vazbu.
  - Syntéza biodegradovatelných hvězdicovitých konjugátů s využitím 1,3-cykloadice azidu na trojnou vazbu *N*-(aza-dibenzocyklooktynyl)ových (DBCO) skupin poly(amido)aminových (PAMAM) dendrimerů.
  - Studium fyzikálně chemických a biologických vlastností připravených hvězdicovitých polymerních konjugátů.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Syntetické postupy

#### 4.1.1 Použité chemikálie

Většina činidel a výchozích látek použitých v této práci byla od firem Fluka, Sigma či Aldrich. Činidla pro 1,3-cykloadici azidu na trojnou vazbu DBCO skupin PAMAM dendrimerů byla zakoupena u Click Chemistry Tools (USA). Doxorubicin hydrochlorid (Dox.HCl) byl zakoupen od Meiji Seika (Japonsko).

2,2-azobis(isobutyronitril) (AIBN) byl dvakrát rekrystalován z methanolu (b.t. 103°C). Methakryloylchlorid byl těsně před použitím predestilován s přidavkem několika mg inhibitoru oktylpyrokatechinu (bod varu (b.v.) 95-96°C). 1-aminopropan-2-ol byl destilován za sníženého tlaku (b.v. 67°C/ 2000 Pa). Všechna RAFT činidla byla před použitím přečištěna chromatografií na sloupci silikagelu. Dimethylformamid (DMF) byl těsně před použitím zbaven dimethylaminu za použití sníženého tlaku. Ostatní rozpouštědla byla sušena bezvodým síranem sodným a následně destilována.

Čistota monomerů a RAFT činidel byla stanovena pomocí HPLC, TLC a <sup>1</sup>H-NMR. Analýzy na HPLC byly provedeny na kolonách s reverzní fází (Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm; 5 μm) při průtoku 1 ml.min<sup>-1</sup>, s použitím gradientu od 0 do 100 % roztoku B v průběhu 17 min (roztok A: 5 % acetonitril, 94,9 % voda, 0,1 % TFA; roztok B: 94,9 % acetonitril; 5 % voda; 0,1 % TFA) s využitím UV/Vis detekce (detektor diodového pole (PDA) Shimadzu SPD-M10A). Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla provedena na destičkách Silica Gel 60 RP-18 F<sub>254s</sub> od firmy Merck. Vodíková spektra nukleární magnetické rezonance (<sup>1</sup>H-NMR) byla měřena na spektrometru Bruker 300 MHz.

## 4.1.2 Příprava činidel pro přípravu a charakterizaci lineárních kopolymerů nesoucích koncovou azidovou skupinu

### 4.1.2.1 Příprava [4-(3-azidopropylamino)-1-cyano-1-methyl-4-oxo-butyl] benzenkarbodithioátu (CTA-N<sub>3</sub>)

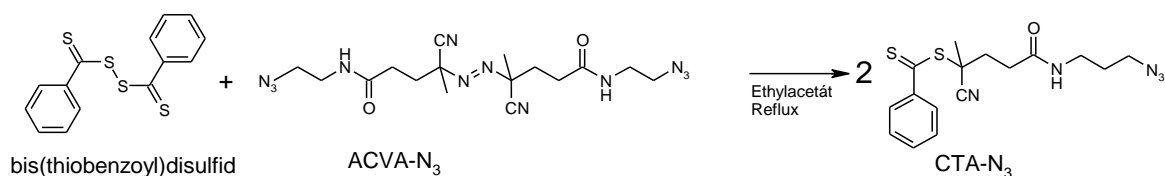


Schéma 1: Syntéza CTA-N<sub>3</sub>

RAFT činidlo CTA-N<sub>3</sub>, které umožňuje přípravu lineárního polymeru, jehož hlavní řetězec je zakončen na každém konci jinou reaktivní skupinou bylo připraveno reakcí bis(thiobenzoyl)disulfidu s 2,2'-azobis-isokyanovaleeroyl-2'-azido-propylamidem (ACVA-N<sub>3</sub>) podle Schématu 1 následujícím postupem:

0,4 g bis(thiobenzoyl)disulfidu (1,31 mmol) a 0,87 mg ACVA-N<sub>3</sub> (1,96 mmol) bylo rozpuštěno v 8 ml ethylacetátu, probubláno dusíkem a zahříváno pod refluxem. Průběh reakce byl sledován na HPLC. Po „odreagování“ bis(thiobenzoyl)disulfidu byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu a produkt byl izolován od nezreagovaného ACVA-N<sub>3</sub> pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze -ethylacetát, UV detekce při  $\lambda = 230$  nm). Eluát obsahující produkt byl jímán a odpařen do sucha. Výtěžek: 0.89 g (70%)

### 4.1.2.2 Příprava 2,2'-azobis-isokyanovaleeroyl-2'-azido-propylamidu (ACVA-N<sub>3</sub>)

2,2'-azobis-isokyanovaleeroyl-2'-azido-propylamid byl připraven Ing. Jiřím Strohalmem ve třech krocích: v prvním kroku byla provedena aktivace karboxylové skupiny 4,4'-azobis(4-kyanovaleerové kyseliny) chloridovými anionty z PCl<sub>5</sub> za vzniku ACVA-Cl. V druhém kroku byl připraven 3-amidopropylazid reakcí 3-aminopropylbromidu s NaN<sub>3</sub>. Ve třetím kroku byl aminolytickou reakcí 3-aminopropylazidu s ACVA-Cl připraven finální produkt ACVA-N<sub>3</sub>.

### 4.1.2.3 Příprava *N*-[(aza-dibenzocyclooktynyl)-6-oxohexanoyl]doxorubicinu (DBCO-Dox)

Syntéza DBCO-Dox byla provedena reakcí sukcinimidyl *N*-(aza-dibenzocyclooktynyl)-6-oxohexanoátu (DBCO-NHS-ester) s Dox v DMF podle Schématu 2 následujícím postupem:

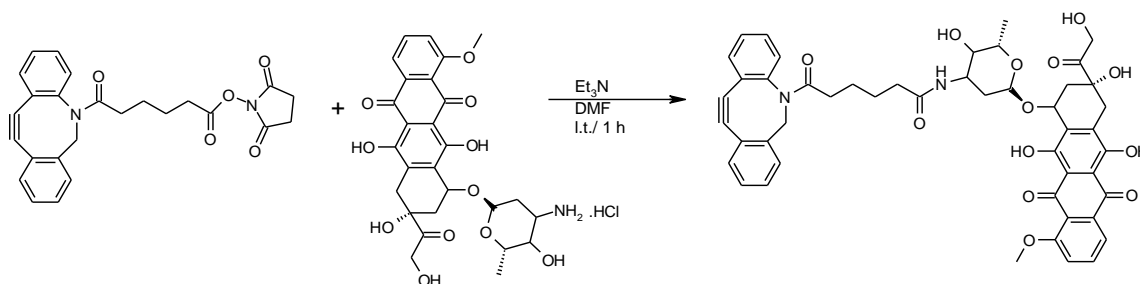


Schéma 2: Syntéza DBCO-Dox

20 mg (0,041 mmol) DBCO-NHS-esteru, 23,8 mg (0,041 mmol) Dox.HCl a 4,13 mg triethylaminu bylo rozpuštěno v 0,35 ml DMF. Reakční směs reagovala 1 h při laboratorní teplotě. Vzniklý DBCO-Dox byl vysrážen do nadbytku diethyletheru (20 ml) a izolován přečištěn od zbytků reaktantů pomocí gelové chromatografie (kolona Sephadex LH-20, mobilní fáze – methanol, UV detekce při  $\lambda = 480$  nm). Eluát obsahující produkt byl vakuově zahuštěn, vysrážen do nadbytku diethyletheru (20 ml), dekantován a vysušen do konstantní hmotnosti.

## 4.1.3 Použité monomery

### 4.1.3.1 Příprava *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA)

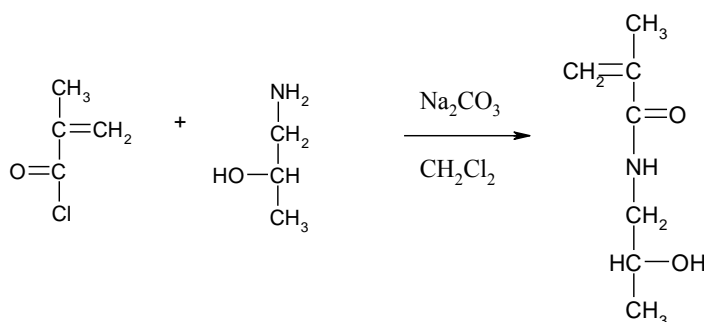


Schéma 3: Syntéza HPMA

*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA) byl připraven podle Schématu 3 acylací 1-aminopropan-2-olu methakryolylochlořidem v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. K roztoku 33 g (0,44 mol) 1-aminopropan-2-olu v 105 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bylo přidáno 46,6 g (0,44 mol) jemně rozetřeného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, suspenze byla ochlazená v lázni ethanol/suchý led na -5°C a za intenzivního míchání a chlazení bylo pomalu přidáno 46 g (0,44 mol) methakryolylochlořidu v 96 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Po skončení reakce byly anorganické soli odfiltrovány, znovu promyty 200 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Filtrát byl vysušen bezvodým síranem sodným (500 g), sušidlo bylo odstraněno filtrací na fritě S4 a filtrát byl zahuštěn na vakuové odparce na přibližně 100 ml. „Zakoncentrovaný“ roztok byl ponechán krystalizovat při -20°C. Po „odseparování“ matečného louhu byly krystaly rozpuštěny v acetonu a rekrystalovány za vzniku bílých krystalů. Výtěžek: 46 g (62 %), b.t.: 66-67 °C. Elementární analýza: vypočteno 58,80% C, 9,09% H, 9,79% N, nalezeno: 58,96% C, 9,39% H, 9,80% N. <sup>1</sup>H-NMR: 300 MHz ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 330 K): δ 1,02 d, 3H (CH<sub>3</sub>CH-OH-); δ 1,85 s, 3H (CH<sub>3</sub>-C=C); δ 3,08 m, 2H (N-CH<sub>2</sub>); δ 3,70- m, 1H (CH-OH); δ 4,51 br, 1H (NH); δ 5,28 a 5,63 d, 2H (CH<sub>2</sub>=C); δ 7,26 br, 1H (OH).

#### 4.1.3.2 Syntéza *N*-(tert-butoxykarbonyl)-*N'*-[6-(methakryolylamino)-hexanoyl]-hydrazidu (MA-acap-NHNH-Boc)

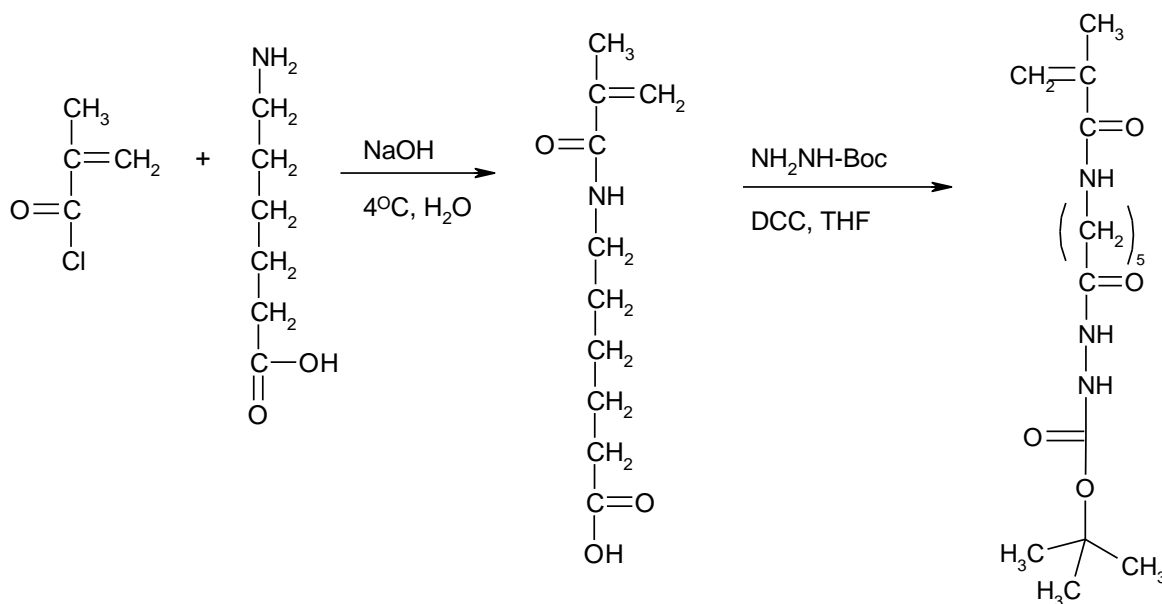


Schéma 4: Syntéza MA-acap-NHNH-Boc

Syntéza MA-acap-NHNH-Boc podle Schématu 4 byla provedena následovně: 21,4 g



(0,16 mol) 6-aminohexanové kyseliny a 6,5 g (0,16 mol) NaOH bylo za míchání a chlazení na 4°C rozpuštěno v 98 ml destilované vody. Z dělicích nádob bylo postupně přidáno 16,76 g methakryloylchloridu (0,16 mol, 15,70 ml) a roztok 6,50 g NaOH (0,16 mol) v 48 ml vody tak, aby pH zůstávalo v rozmezí 7,0 – 9,0. Reakční směs byla 15 min míchána při 4°C a 1 h při laboratorní teplotě. Poté byla směs okyselena pomocí roztoku HCl ve vodě (1 : 1) na pH = 2. Separace byla provedena vytřepáním produktu z okyselené vodné fáze do ethylacetátu (5x). Organická fáze s produktem byla zbavena vody přidávkem bezvodého síranu sodného a po filtraci vakuově zahuštěna. Produkt byl rekrystalizován ze směsi ethylacetát:diethylether 2:1. Výtěžek reakce: 22,3 g (65 %), b.t. 47 - 48 °C. Elementární analýza: vypočteno: 60,30% C, 8,54% H, 7,04% N, nalezeno: 59,93% C, 8,89% H, 7,28% N.

8 g MA-acap-OH (0,04 mol) a 9,9 g dicyklohexylcarbodiimidu (DCC, 0,048 mol) bylo rozpuštěno ve 140 ml THF. Po 30 min bylo do reakční směsi přidáno 20 ml vychlazeného roztoku připraveného rozpuštěním 5,3 g *tert.*-butyl karbazátu (0,04 mol) v THF a reakční směs se nechala 2 h reagovat při -18 °C a následně 14 h při 5 °C. Následně byla směs ohřáta na 25 °C. Vyloučená dicyklohexylmočovina (b.t. 226 °C) byla odstraněna filtrací na fritě S4. Reakční směs byla vakuově zahuštěna na viskózní olej, který byl následně ředěn 150 ml ethylacetátu. Nezareagovaný MA-acap-OH byl odstraněn „vytřepáním“ do 2% vodného roztoku NaHCO<sub>3</sub> (5x). Ethylacetátová fáze byla poté vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a sušidlo bylo odstraněno filtrací. Roztok v ethylacetátu byl zahuštěn na vakuové odparce na viskózní olej. Monomer byl izolován krystalizací ze směsi 100 ml ethylacetátu a 5 ml hexanu. Výtěžek: 5,56 g (44%), b.t.: 110 – 114 °C. Elementární analýza: vypočteno 57,49% C, 8,68% H, 13,41% N, nalezeno 58,34% C, 8,48% H, 13,32% N. <sup>1</sup>H-NMR: 300 MHz ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 330 K): δ 1,29 m, 2H (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N); δ 1,38 s, 9H ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C); δ 1,40 - 1,54 m, 4H (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-N); δ 1,95 m, 3H (CH<sub>3</sub>-C=C); δ 2,17 t, 2H (CO-CH<sub>2</sub>); δ 3,26 m, 2H (N-CH<sub>2</sub>); δ 3,91 br, 2H (NH<sub>2</sub>); δ 5,26 a 5,60 d, 2H (CH<sub>2</sub>=C); δ 6,10 br, 1H (NHNH<sub>2</sub>); δ 7,68 br, 1H (NH-CH<sub>2</sub>).

#### 4.1.4 Příprava reaktivních „semitelechelických“ kopolymerů na bázi HPMA

„Semitelechelické“ kopolymery HPMA s chráněnými hydrazidovými skupinami nesoucí různé koncové skupiny (poly(HPMA-*co*-MA-acap-NHNH-Boc)X, kde X=COOH, N<sub>3</sub>, DTB) byly připraveny řízenou radikálovou RAFT kopolymerizací HPMA s MA-acap-NHNH-Boc.

##### 4.1.4.1 Syntéza DTB-[poly(HPMA-*co*-MA-acap-NHNH-Boc)]-COOH

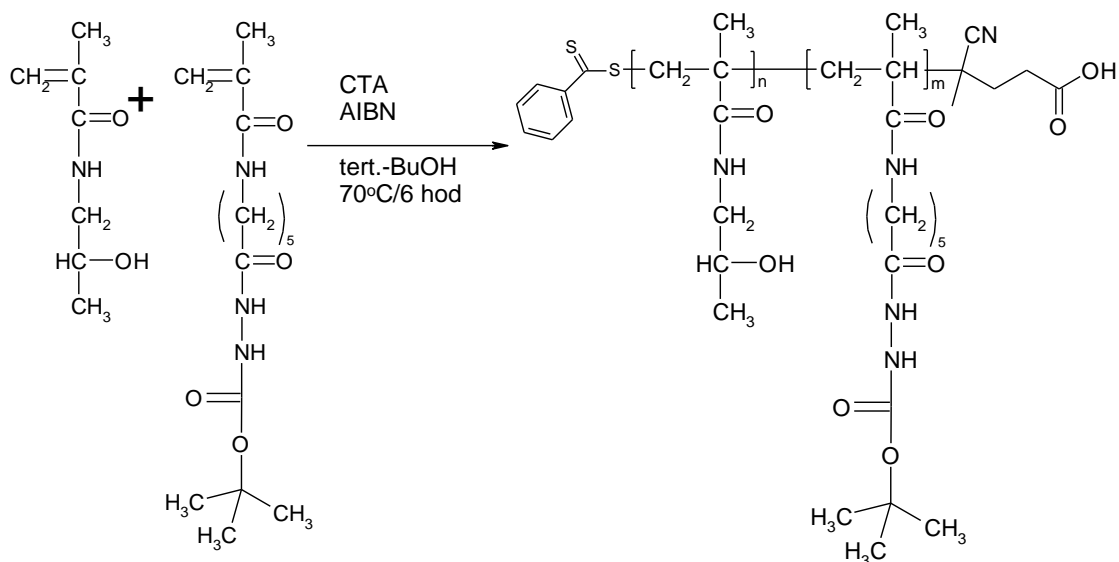


Schéma 5: Syntéza **P<sub>DTB/COOH1</sub> - 7**

Kopolymery nesoucí koncové DTB skupiny a zároveň COOH skupiny (polymery **P<sub>DTB/COOH1</sub> - P<sub>DTB/COOH7</sub>**) byly připraveny podle Schématu 5 RAFT polymerací s využitím 4-kyano-4-(thiobenzoylthio)pentanové kyseliny jako CTA činidla. Dále byl studován vliv poměru látkových množství monomerů (M), RAFT činidla (CTA) a iniciátoru (I) v reakční směsi – [M]:[CTA]:[I], teploty a polymerační doby na fyzikálně-chemické charakteristiky připravených polymerů (viz Tabulky 2., 3. a 4.). Jako příklad polymerace je uvedena příprava polymeru **P<sub>DTB/COOH5</sub>**:

386,66 mg HPMA (2,70 mmol) a 94,08 mg MA-acap-NHNH-Boc (0,3 mmol) bylo rozpuštěno v 1,86 ml *tert*-butanolu. 4,2 mg CTA, (0,015 mmol) bylo po rozpuštění v 0,84 ml *tert*-butanolu přidáno k reakční směsi. Následně byl do reakční směsi přidán roztok 1,24

mg AIBN [2,2-azobis(isobutyronitril), 7,5  $\mu\text{mol}$ ] v 0,4 ml *tert*-butanolu. Reakční směs byla převedena do polymerační ampule a probublána argonem po dobu 5 min. Zatavená ampule byla temperována při 70 °C po dobu 6 h. Kopolymer byl po ochlazení vysrážen do nadbytku ethylacetátu (100 ml) a „přesrážen“ z methanolu do ethylacetátu. Kopolymer byl filtrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti. Výtěžek polymerace byl 255 mg (53%).

#### 4.1.4.2 Syntéza DTB-[poly(HPMA-co-MA-acap-NHNH-Boc)]-N<sub>3</sub>

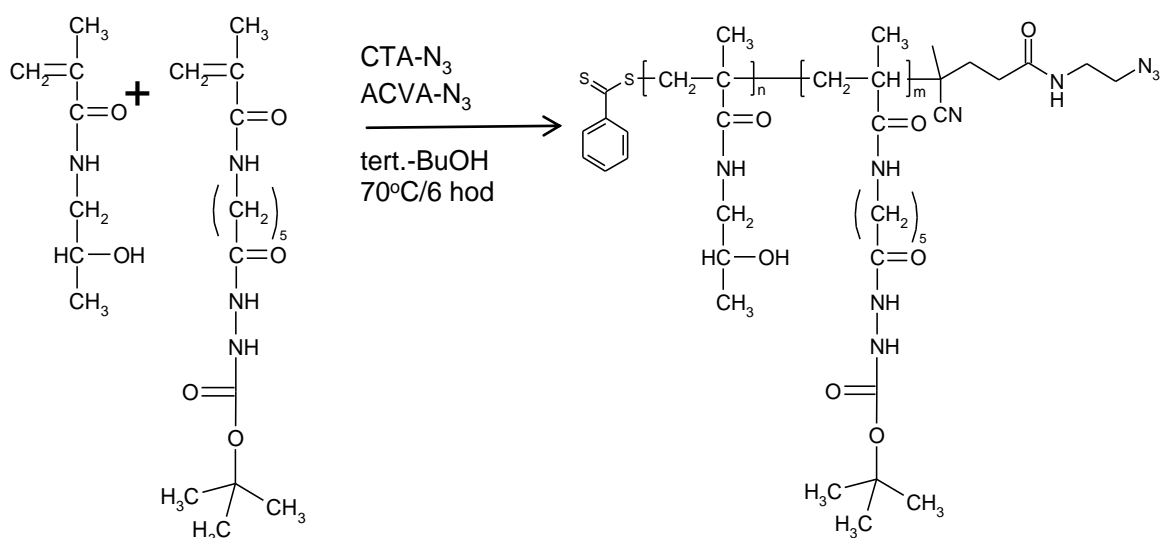


Schéma 6: Syntéza **P<sub>DTB/N31-3</sub>**

Kopolymery nesoucí zároveň koncové DTB skupiny a N<sub>3</sub> skupiny (polymery **P<sub>DTB/N31</sub>** - **P<sub>DTB/N33</sub>**) byly připraveny podle Schématu 6 RAFT polymerací při různých reakčních podmínkách (viz Tab. 5, kap.5.1.3.15.1.3) s využitím CTA-N<sub>3</sub> jako CTA činidla, jako iniciátor byl použit 2,2'-azobis-isokyanovaleroyl-2'-azido-propylamid (ACVA-N<sub>3</sub>). Jako příklad polymerace je uvedena příprava polymeru **P<sub>DTB/N32</sub>**:

193,33 mg HPMA (1,35  $\mu\text{mol}$ ) a 47,04 mg MA-acap-NHNH-Boc (0,15 mmol) bylo rozpuštěno v 0,93 ml *tert*-butanolu. 4,34 mg CTA-N<sub>3</sub> (0,012 mmol) bylo po rozpuštění v 0,42 ml *tert*-butanolu přidáno k reakční směsi. 2,67 mg ACVA-N<sub>3</sub> (6  $\mu\text{mol}$ ) bylo rozpuštěno v 0,2 ml DMSO a přidáno do reakční směsi. Reakční směs byla převedena do polymerační ampule a probublána argonem po dobu 5 min. Zatavená ampule byla temperována při 70 °C po dobu 6 h. Kopolymer byl po ochlazení vysrážen do nadbytku ethylacetátu (50 ml) a „přesrážen“ z methanolu do ethylacetátu. Kopolymer byl filtrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti. Výtěžek polymerace byl 163 mg (68%).

#### 4.1.4.3 Syntéza [poly(HPMA-co-MA-acap-NHNH-Boc)]-DTB

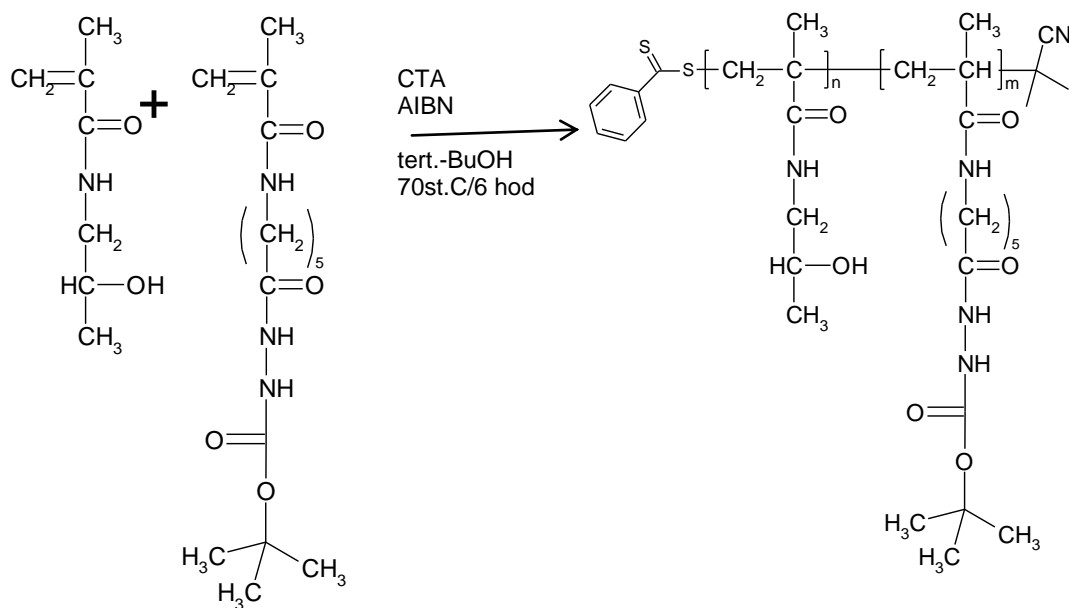


Schéma 7: Syntéza **P<sub>DTB1-3</sub>**

„Semitelechelické“ kopolymery nesoucí koncové DTB (polymery **P<sub>DTB1</sub>** - **P<sub>DTB3</sub>**) byly připraveny podle Schématu 7 RAFT polymerací při různých reakčních podmínkách (viz Tab. 3, kap. 5.1.2.1) s využitím 2-kyano-2-propylbenzodithioátu jako CTA činidla, jako iniciátor byl použit AIBN. Jako příklad polymerace je uvedena příprava polymeru **P<sub>DTB1</sub>**:

600 mg HPMA (4,19 mmol) a 146 mg MA-acap-NHNH-Boc (0,466 mmol) bylo rozpuštěno v 3,0 ml tert-butanolu. 6,86 mg CTA (2-kyano-2-propylbenzodithioátu, 0,031 mmol) bylo po rozpuštění v 2,60 ml tert-butanolu přidáno k reakční směsi. 2,55 mg AIBN (0,0155 mmol) bylo rozpuštěno v 0,5 ml DMSO a přidáno do reakční směsi. Reakční směs byla převedena do polymerační ampule a probublána argonem po dobu 5 min. Zatavená ampule byla temperována při 70 °C po dobu 6 h. Kopolymer byl po ochlazení vysrážen do nadbytku ethylacetátu (100 ml) a „přesrážen“ z methanolu do ethylacetátu. Kopolymer byl filtrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti. Výtěžek polymerace byl 463 mg (62%).

#### 4.1.4.4 Syntéza [poly(HPMA-co-MA-acap-NHNH-Boc)]-COOH

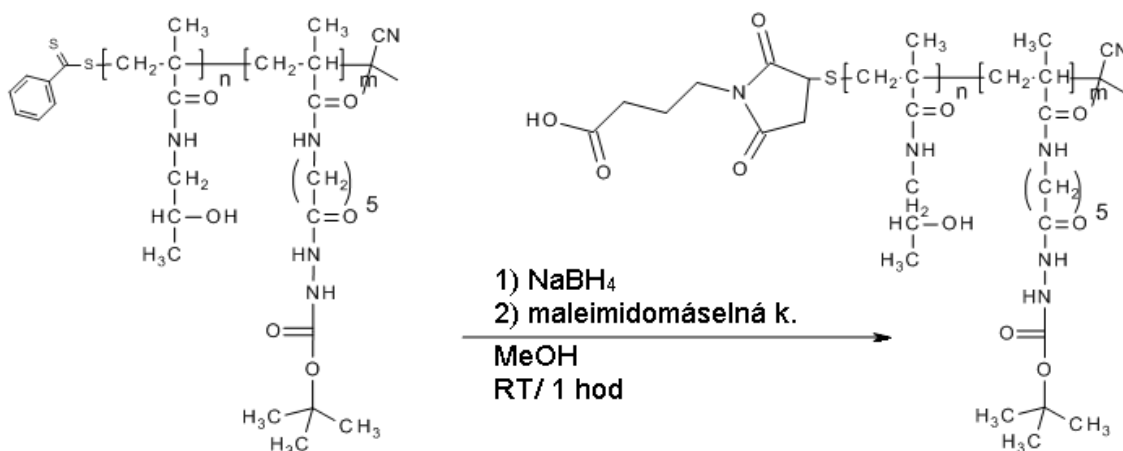


Schéma 8: Syntéza **P<sub>COOH1</sub> - 2**

Kopolymery s koncovými COOH skupinami (polymery **P<sub>COOH1</sub>** - **P<sub>COOH2</sub>**) byly připraveny dvoukrokovou syntézou podle Schématu 8. V prvním kroku byly redukcí koncových DTB skupin polymerů **P<sub>DTB1</sub>** - **P<sub>DTB3</sub>** připraveny polymery s thiolovými skupinami, na které byla následně adována maleimidomásečná kyselina.

Jako příklad syntézy je uvedena příprava **P<sub>COOH2</sub>**: 100 mg (4,59 μmol koncových DTB skupin) polymeru **P<sub>DTB2</sub>** bylo rozpuštěno v 1 ml methanolu, poté k němu bylo přisypáno 3,66 mg NaBH<sub>4</sub> (0,0966 mmol). Po 30 min míchání při laboratorní teplotě bylo do reakční směsi přidáno 17,70 mg kyseliny maleimidomásečné (0,0966 mmol) rozpuštěné v 75 μl methanolu. Po 30 min reakce při laboratorní teplotě byl kopolymer vysrážen do nadbytku ethylacetátu (30 ml) a „přesrážen“ z methanolu do diethyletheru. Polymer byl izolován dekantací a následně sušen. Usušený kopolymer byl rozpuštěn ve 4 ml vodného roztoku HCl o pH = 2 a separován pomocí gelové chromatografie (kolona Sephadex G25 ve vodě, UV detekce při λ = 230 nm) a následné lyofilizace. Výtěžek reakce: 89 mg (89 %)

#### 4.1.4.5 Syntéza [poly(HPMA-co-MA-acap-NHNH-Boc)]-N<sub>3</sub>

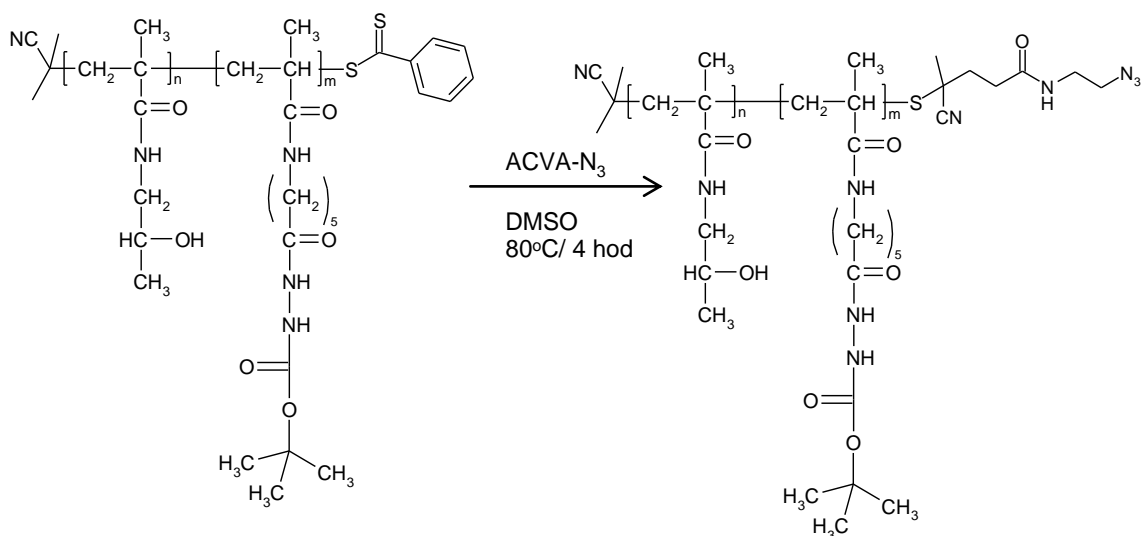


Schéma 9: Syntéza **P<sub>N31</sub>**

Kopolymery nesoucí koncové N<sub>3</sub> skupiny (polymery **P<sub>N31</sub>**) byly připraveny modifikací koncových DTB skupin polymerů **P<sub>DTB1-3</sub>** podle Schématu 9. Jako příklad modifikace je uvedena syntéza **P<sub>N31</sub>**:

100 mg polymeru **P<sub>DTB3</sub>** (6,02 μmol koncových DTB skupin) bylo rozpuštěno v 0,4 ml DMSO. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 mg ACVA-N<sub>3</sub> (0,045 mmol) a po rozpuštění byla směs převedena do ampule a 10 min probublávána argonem. Zatavená ampule byla temperována při 80°C po dobu 3 h. Modifikovaný kopolymer byl po ochlazení vysrážen do nadbytku (20 ml) ethylacetátu a „přesrážen“ z methanolu do diethyletheru. Sraženina byla centrifugována, sediment byl sušen. Výtěžek: 82 mg (82%).

## 4.1.5 Příprava hvězdicovitých konjugátů

### 4.1.5.1 Příprava hvězdicovitých konjugátů aktivací karboxylové skupiny (Typ A)

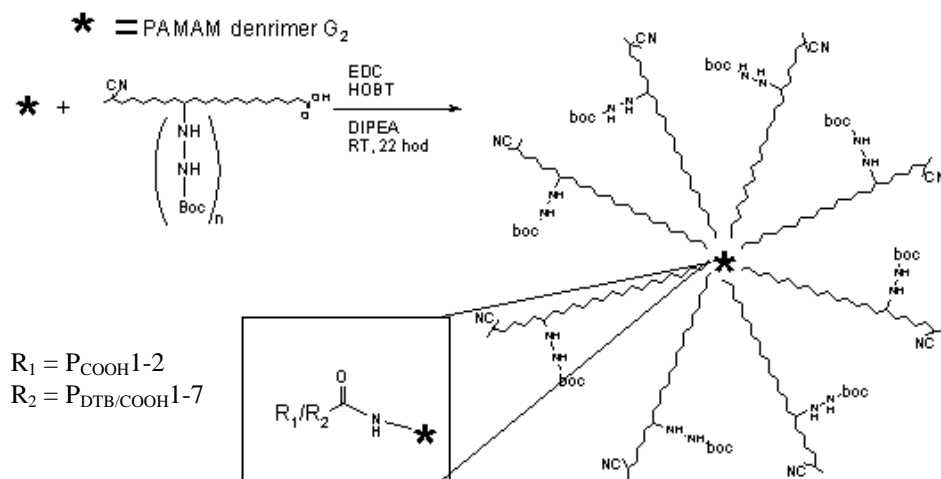


Schéma 10: Syntéza  $S_A(\text{Boc})_n$  1-4 s detailem vazby polymeru na jádro

Hvězdicovité konjugáty typu A byly připravené podle Schématu 10 „roubováním“ lineárních kopolymerů s koncovými COOH skupinami na amino skupiny poly(amido)aminového (PAMAM) dendrimeru druhé generace (16 NH<sub>2</sub> skupin, viz Obr. 5, kap. 2.4.3.3) pomocí aktivace karboxylové skupiny. Příklad syntézy vzorku  $S_A(\text{Boc})_n$  2 s využitím di(isopropyl)karbodiimidu (DIPC) jako kondenzačního činidla:

Methanolvý roztok obsahující 3,75 mg (1,12 μmol) PAMAM dendrimeru byl odpařen do sucha a odparek rozpuštěn v 0,25 ml DMF. 250 mg polymeru  $P_{\text{DTB/COOH}2}$  (8,33 μmol COOH skupin) a 1,32 mg hydroxybenzotriazolu (HOBT, 9,8 μmol) bylo rozpuštěno v 1 ml DMF a ponecháno 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo k reakční směsi obsahující polymer přidáno 0,3 ml DIPC (1,58 μmol). Po 10 min reakce byl do reakce přidán roztok obsahující 3,75 mg dendrimeru. Po dalších 5 min bylo k reakční směsi přidáno 4,5 μL di(isopropyl)ethylaminu (DIPEA, 0,0265 mmol). Reakční směs byla ponechána 22 h při laboratorní teplotě. Následně byl produkt vysrážen do ethylacetátu (50 ml) a „přesrážen“ z methanolu do diethyletheru. Produkt byl filtrován na fritě S4 a sušen do konstantní hmotnosti. Hvězdicovitý konjugát byl izolován od nezreagovaného „semitelechelického“ polymeru pomocí gelové chromatografie (kolona Sephacryl S300,

mobilní fáze – fosfátový pufr o pH = 7,4. Sole byly ze vzorku odstraněny lyofilizací frakce obsahující produkt do sucha s následným rozpuštěním v destilované vodě a oddělením gelovou permeační chromatografií, kolona PD-10, izolovaný produkt byl znovu lyofilizován do sucha a stanoven, UV detekce při  $\lambda = 230$  nm). Výtěžek 136 mg (55 %)

#### 4.1.5.2 Příprava hvězdicovitého konjugátu typu B s využitím 1,3-cykloadice azidu na trojnou vazbu DBCO skupin PAMAM dendrimerů

Hvězdicovité konjugáty typu B, konjugáty **S<sub>B</sub>(Boc)<sub>n</sub>1 - 4**, byly připraveny reakcí koncové azidové skupiny lineárního kopolymeru s N-(aza-dibenzocyklooktynovými) (DBCO) skupinami modifikovaného dendrimeru **D<sub>2</sub>-(DBCO)<sub>n</sub>**. Schéma zavedení DBCO skupin na koncové NH<sub>2</sub> skupiny PAMAM dendrimeru je uvedeno na Schématu 11:

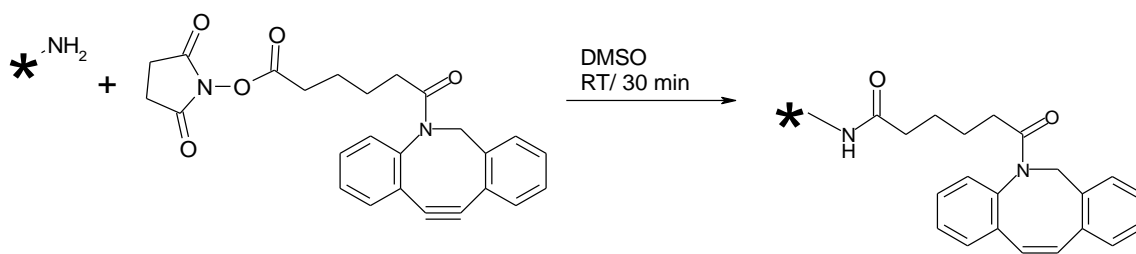


Schéma 11: Syntéza modifikovaného PAMAM dendrimeru – zavedení DBCO skupin na volné NH<sub>2</sub> skupiny PAMAM dendrimeru.

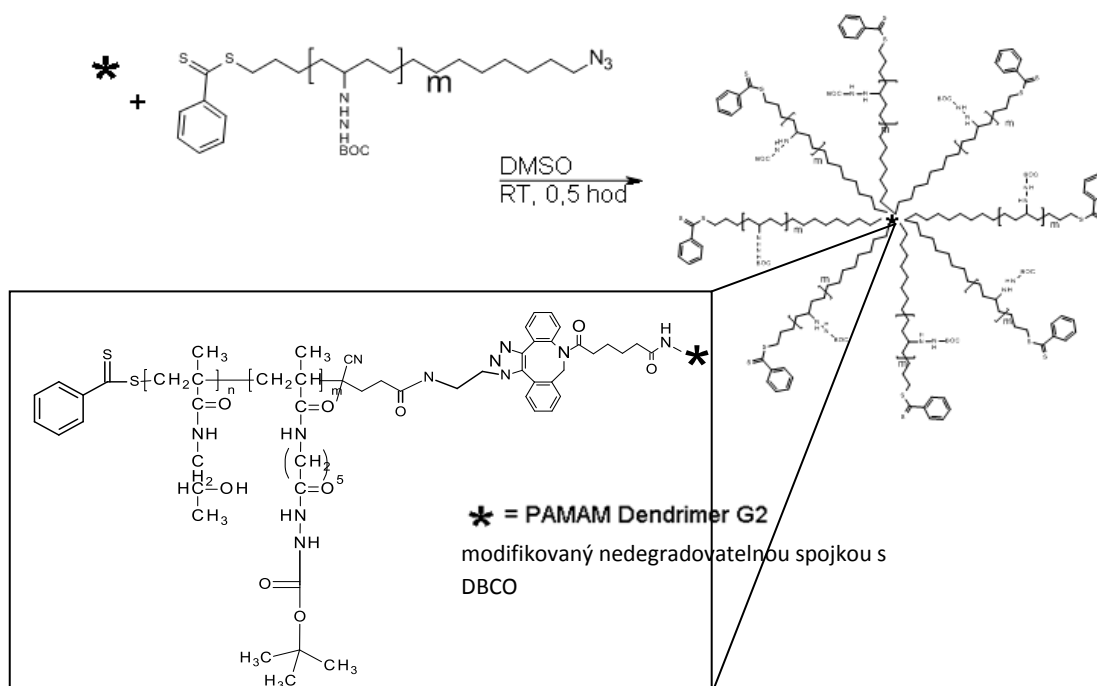


Schéma 12: Syntéza hvězdicovitého konjugátu typu B



Příklad syntézy  $S_B(\text{Boc})_n4$  dle Schématu 12: Methanolvý roztok obsahující 0,63 mg PAMAM dendrimera (0,189  $\mu\text{mol}$ ) byl odpařen do sucha na rotační odparce a odparek byl rozpuštěn v 80  $\mu\text{L}$  DMSO. 0,92 mg sukcinimidyl 6-(aza-dibenzocyklooktynyl)-6-oxohexanoátu (DBCO-NHS-esteru; 1,89  $\mu\text{mol}$ ) bylo rozpuštěno v 50  $\mu\text{L}$  DMSO a přidáno k roztoku PAMAM dendrimera. Reakční směs byla míchána 1 h při laboratorní teplotě a ihned použita do další reakce.

50 mg Polymeru  $P_{\text{DTB}/\text{N}_3}3$  (1,33  $\mu\text{mol}$  azidových skupin) bylo rozpuštěno v 0,3 ml DMSO. K roztoku bylo přidáno 0,13 ml 1,45 mM roztoku  $D_2-(\text{DBCO})_n$  v DMSO (0,189  $\mu\text{mol}$ ). Reakční směs byla míchána 1 h při laboratorní teplotě. Konjugát byl vysrážen do nadbytku (20 ml) ethylacetátu a „přesrážen“ z methanolu do diethyletheru a sušen do konstantní hmotnosti. Hvězdčovitý konjugát byl izolován od nezreagovaného „semitelehelického“ polymeru pomocí gelové chromatografie (kolona Sephacryl S300, mobilní fáze – fosfátový pufr o pH = 7,4. Sole byly ze vzorku odstraněny lyofilizací frakce obsahující produkt do sucha s následným rozpuštěním v destilované vodě a oddělením gelovou permeační chromatografií, kolona PD-10, izolovaný produkt byl znovu lyofilizován do sucha a stanoven, UV detekce při  $\lambda = 230 \text{ nm}$ ). Výtěžek: 29 mg (56 %).

#### 4.1.5.3 Příprava hvězdčovitého konjugátu typu C s využitím 1,3-cykloadice azidu na trojnou vazbu DBCO skupin PAMAM dendrimerů

Princip přípravy biodegradovatelného hvězdčovitého konjugátu typu C (konjugáty  $S_C(\text{Boc})_n1-4$ ) je obdobný jako v předchozím případě (viz kap. 4.1.5.2) s tím rozdílem, že byl využit DBCO derivát obsahující ve své struktuře redukčně degradovatelnou disulfidickou spojku. Zavedení reaktivních DBCO skupin na skupiny PAMAM dendrimera je uvedeno na Schéma 13:

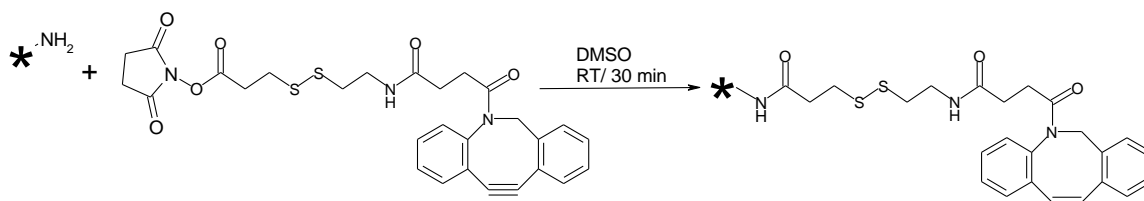


Schéma 13: Zavedení redukčně degradovatelné spojky na PAMAM dendrimer  $G_2$

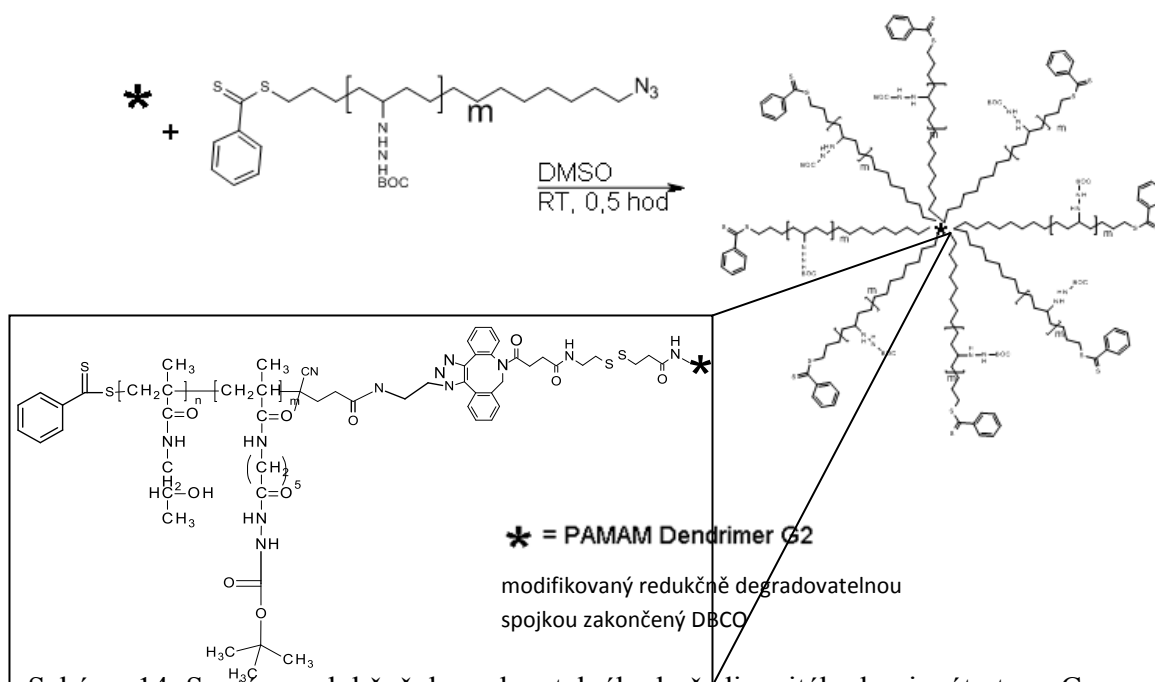


Schéma 14. Syntéza redukčně degradovatelného hvězdicovitého konjugátu typu C

Příklad syntézy  $S_C(\text{Boc})_n4$  podle Schématu 14: Methanolový roztok obsahující 0,63 mg PAMAM dendrimeru (0,189  $\mu\text{mol}$ ) byl odpařen do sucha na rotační odparce a odparek byl rozpuštěn v 80  $\mu\text{l}$  DMSO. 1,07 mg sukcinimidyl 3-[[[(aza-dibenzocyklooktynyl)4-oxobutanamido)ethyl]disulfanyl] propanoátu (DBCO-S-S-NHS-esteru 1,89  $\mu\text{mol}$ ) bylo rozpuštěno v 50  $\mu\text{l}$  DMSO a přidáno k roztoku PAMAM dendrimeru. Reakční směs byla míchána 1 h při laboratorní teplotě a dále použita v následujícím kroku.

50 mg polymeru  $P_{\text{DTB}/\text{N}_3}2$  (1,33  $\mu\text{mol}$  azidových skupin) bylo rozpuštěno v 0,3 ml DMSO. K roztoku bylo přidáno 0,13 ml 1,45 mM roztoku  $D_2(-\text{S-S-DBCO})_n$  v DMSO (0,189  $\mu\text{mol}$ ). Reakční směs byla míchána 1 h při laboratorní teplotě. Konjugát byl vysrážen do nadbytku (20 ml) ethylacetátu a „přesrážen“ z methanolu do diethyletheru, dekantován a sušen do konstantní hmotnosti. Hvězdicovitý konjugát byl separován od nezreagovaného „semitelehelického“ polymeru pomocí gelové chromatografie (kolona Sephacryl S300, mobilní fáze – fosfátový pufr o pH = 7,4). Sole byly ze vzorku odstraněny lyofilizací frakce obsahující produkt do sucha s následným rozpuštěním v destilované vodě a oddělením gelovou permeační chromatografií (kolona PD-10), izolovaný produkt byl znovu lyofilizován do sucha a stanoven, UV detekce při  $\lambda = 230 \text{ nm}$ ). Výtěžek: 36 mg (70 %)

#### 4.1.5.4 Odstranění reaktivních DTB skupin

Reaktivní DTB skupiny ve struktuře hvězdicovitých polymerů byly odstraněny reakcí s AIBN v DMSO podle Schématu 15.

36 mg  $S_c(\text{Boc})_n4$  (0,992  $\mu\text{mol}$  DTB skupin) bylo rozpuštěno v 0,2 ml DMSO. K tomuto roztoku bylo přidáno 7,2 mg AIBN (0,0438  $\mu\text{mol}$ ) a po rozpuštění byla směs převedena do ampule a 10 min probublávána argonem. Zatavená ampule byla temperována při 80°C po dobu 3 h. Konjugát byl po ochlazení vysrážen do nadbytku (20 ml) ethylacetátu a přesrážen z metanolu do diethyletheru. Sraženina byla dekantována a sušena do konstantní hmotnosti. Výtěžek: 33 mg (91%).

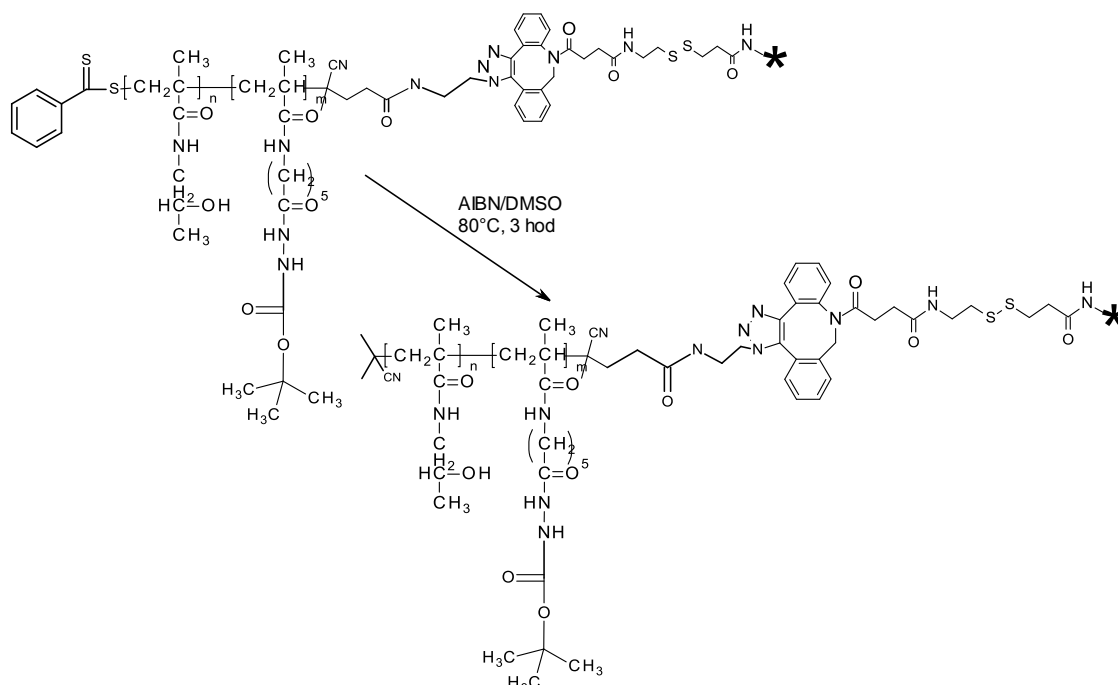


Schéma 15: Odstranění reaktivní DTB skupiny reakcí s AIBN, pro ilustraci je odstranění ukázáno na jednom řetězci

#### 4.1.5.5 Odchránění hydrazidových skupin polymerů

Odchránění BOC-chráněných hydrazidových skupin probíhalo ve směsi obsahující kyselinu trifluoroctovou, vodu a triisopropylsilan v poměru (95:2,5:2,5) podle Schématu 16.

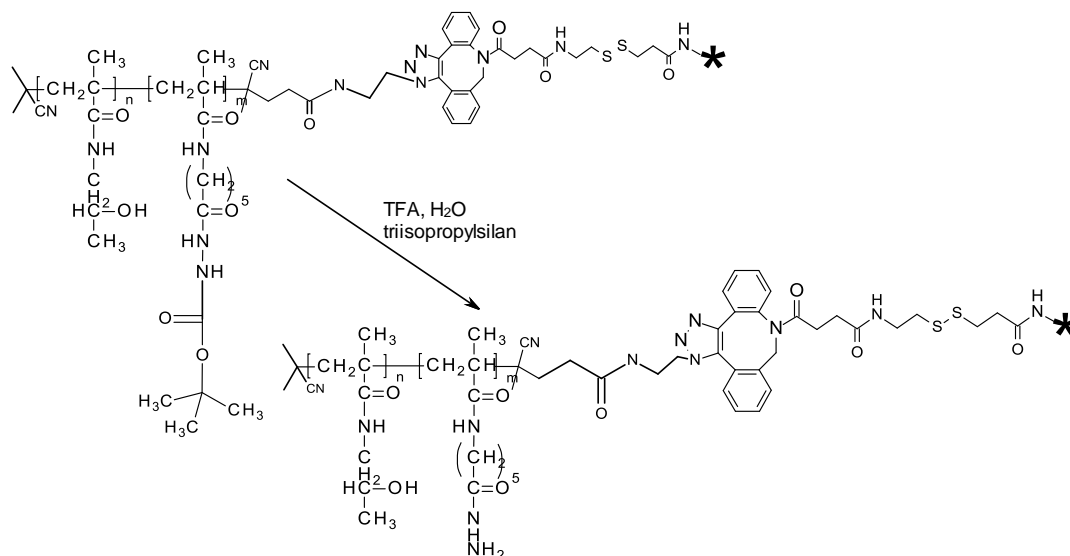


Schéma 16: Odchránění hydrazidové skupiny, pro ilustraci odchránění popsáno na jednom řetězci hvězdicovitého konjugátu

Příklad odchránění: 80 mg konjugátu **S<sub>A</sub>(Boc)<sub>n</sub>4** ( $5,80 \cdot 10^{-7}$  mol) bylo rozpuštěno v 1,3 ml směsi kyseliny trifluoroctové, vody a triisopropylsilanu (95:2,5:2,5). Po 5 min reakce bylo k roztoku přidáno 20 ml diethyletheru a vzniklá sraženina byla po dekantaci „přesrážena“ z methanolu do diethyletheru a následně sušena do konstantní hmotnosti. Výtěžek: 62 mg (78 %)

#### 4.1.5.6 Vazba Dox na polymerní nosič

Reakcí hvězdicovitých konjugátů obsahujících hydrazidové skupiny **S<sub>A</sub>(NHNH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>**, **S<sub>C</sub>(NHNH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>** a lineárního polymeru **P<sub>DTB</sub>(NHNH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>** s Dox prováděnou v methanolu za přítomnosti kyseliny octové byly připraveny polymerní nosiče s léčivem navázaným k nosiči hydrazonovou vazbou (Syntéza viz Schéma 17)

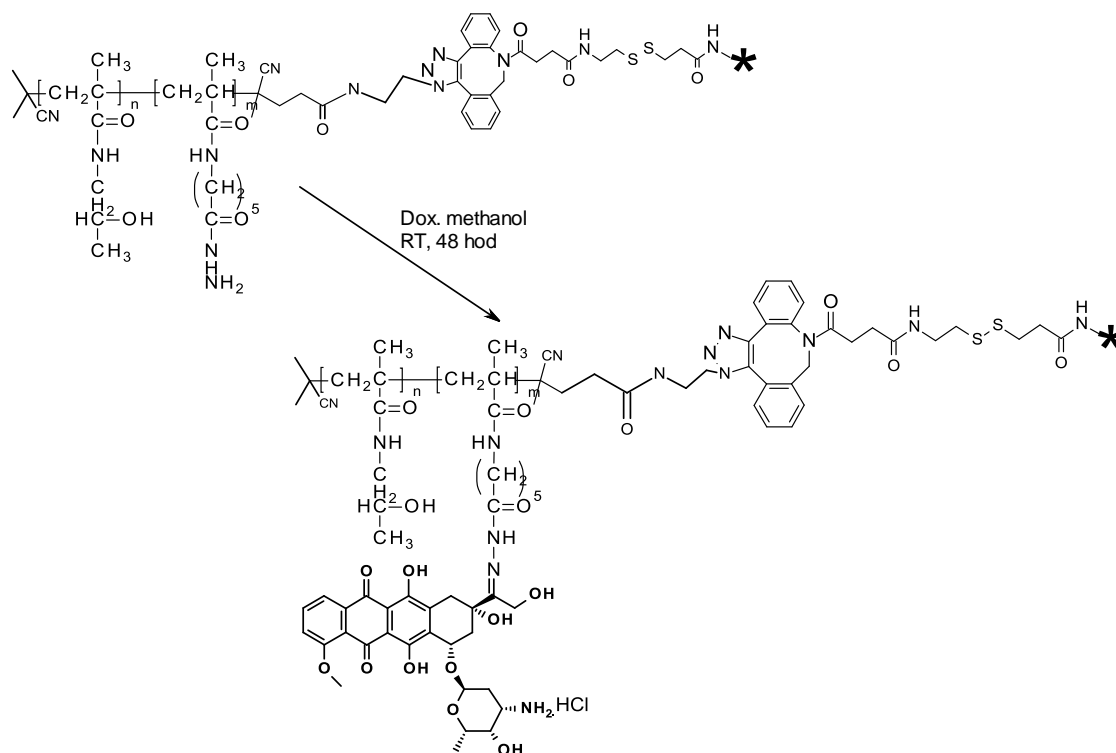


Schéma 17: Vazba Dox na hvězdicovitý polymerní nosič, vazba popsána na jednom rameni hvězdicovitého konjugátu

Příklad syntézy: 50 mg konjugátu  $S_C(\text{NHNH}_2)_n$  bylo rozpuštěno v 0,5 ml MeOH a k roztoku bylo přidáno 40  $\mu\text{l}$  kyseliny octové. Po 10 min bylo k reakční směsi přidáno 6 mg (0,011 mmol) Dox. Reakční směs byla v první fázi heterogenní, v průběhu reakce však došlo k vyčeření reakční směsi. Po 48 h míchání při laboratorní teplotě byl polymerní konjugát s léčivem zbaven nízkomolekulárních příměsí pomocí gelové chromatografie (kolona Sephadex LH-20 v methanolu). Výtěžek: 30 mg (60%).

## 4.2 Použité metody

Teploty tání monomerů byly stanoveny na bodotávku – Boetiově přístroji. Elementární analýzy byly provedeny na přístroji Perkin –Elmer 2400. Vzorby byly předtím sušeny za sníženého tlaku na olejové vývěvě minimálně 3 h. Lyofilizace byla prováděna na přístroji LYOVAC GT2.

### 4.2.1 Acidobazická titrace

Acidobazická titrace byla použita při stanovení koncových COOH skupin lineárních polymerů. K titraci byl použit autotitrátor ABU 901 (Radiometer Copenhagen). Titračním činidlem byl 0,01M roztok NaOH, jehož faktor byl stanoven na hydrogenftalát draselný. Voda používaná na rozpouštění vzorků byla před titrací zbavena CO<sub>2</sub> povařením po dobu 10 min. Titrační křivky byly vyhodnocovány v programu TimTalk 9. Ze získaných hodnot obsahu COOH skupin byla vypočtena molární hmotnost  $M_w$  pomocí Rovnice 1.:

$$M_w = c_g(poly)/c(konc)$$

Rovnice 1: Výpočet molární hmotnosti polymeru

Kde  $M_w$  je početně průměrná molární hmotnost polymeru stanovená z obsahu COOH skupin,  $c_g(poly)$  je koncentrace polymeru v g/L a  $c(konc)$  je molární koncentrace koncových COOH skupin.

### 4.2.2 UV/Vis spektroskopie

Měření UV/VIS spekter bylo prováděno na přístroji Helios Alfa (Thermo Spectronic), ke stanovení byly použity kyvety o optické délce 1 cm, pokud není v postupu uvedeno jinak.

#### 4.2.2.1 Stanovení obsahu koncových dithiobenzoátových skupin (DTB skupin)

Obsah koncových DTB skupin „semitechelických“ kopolymerů byl stanoven spektrálně z absorpce příslušející DTB při  $\lambda_{max} = 302$  nm v MeOH. Pro výpočet byl použit molární absorpční koeficient  $\epsilon = 12\ 100$  l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, stanovený na 2-kyano-2-propylbenzodithioát. Ze získaných hodnot obsahu DTB skupin byla vypočtena molární hmotnost  $M_w$  podle Rovnice 1.

#### 4.2.2.2 Stanovení DBCO skupin na dendrimeru

DBCO skupiny byly stanoveny spektrálně relativním srovnáním absorbance trinitrofenylaminových skupin, které vznikají nukleofilní aromatickou substitucí sulfonové skupiny 2,4,6-trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBSA) na koncové amino skupiny PAMAM dendrimeru. Principem je porovnání absorbance trinitrofenylaminových skupin vázaných na PAMAM dendrimer se zavedenými DBCO skupinami a trinitrofenylaminových skupin vázaných na volný PAMAM dendrimer. Nově vzniklý trinitrofenylamin absorbuje při  $\lambda_{\max} = 480$  nm.

34,5  $\mu\text{L}$   $3,0 \cdot 10^{-4}$  M roztoku obsahujícího PAMAM dendrimer  $G_2$  se zavedenými DBCO skupinami bylo přidáno k 390,5  $\mu\text{L}$  roztoku DMSO:borátový pufr 9:1. K této reakční směsi bylo přidáno 25  $\mu\text{L}$  0,03M vodného roztoku TNBSA (0,75  $\mu\text{mol}$ ). Jako standardu bylo použito 34,5  $\mu\text{L}$   $3,0 \cdot 10^{-4}$  M roztoku čistého PAMAM dendrimera  $G_2$ , 390,5  $\mu\text{L}$  roztoku DMSO:borátový pufr 9:1 a 25  $\mu\text{L}$  0,03M vodného roztoku TNBSA. Slepý vzorek byl připraven smícháním 34,5  $\mu\text{L}$  DMSO, 390,5  $\mu\text{L}$  roztoku DMSO:borátový pufr 9:1 a 25  $\mu\text{L}$  0,03M vodného roztoku TNBSA. Všechny tři směsi reagovaly 1,5 h při laboratorní teplotě. Absorbance byla měřena při  $\lambda_{\max} = 480$  nm a optické délce 1 mm dle Rovnice 2:

$$N_{(\text{DBCO})} = N_{(\text{NH}_2)} \times \left[ 1 - \frac{A[D_2(\text{DBCO})_n]}{A(D_2)} \right]$$

Rovnice 2: Výpočet počtu DBCO na PAMAM dendrimeru  $G_2$

kde  $N_{(\text{DBCO})}$  je počet DBCO navázaných na PAMAM dendrimer,  $N_{(\text{NH}_2)}$  značí celkový počet koncových  $\text{NH}_2$  na PAMAM dendrimeru,  $A[D_2(\text{DBCO})_n]$  značí absorbanci  $N$ -(2,4,6-trinitrofenylových) skupin vázaných na neobsazené  $\text{NH}_2$  skupiny PAMAM dendrimera s navázanými DBCO,  $A(D_2)$  je absorbance  $N$ -(2,4,6-trinitrofenylových) skupin vázaných na PAMAM dendrimer s volnými  $\text{NH}_2$  skupinami.

### 4.2.2.3 Stanovení koncových N<sub>3</sub> skupin „semitelechelických“ kopolymerů

Funkcionalita „semitelechelických“ kopolymerů s azidovými skupinami byla stanovena po reakci azidových skupin s DBCO-Dox v DMSO. Obsah Dox odpovídající obsahu azidových skupin byl následně stanoven spektrálně:

5 mg polymeru **P<sub>DTB/N3</sub>1** (0,182 μmol) bylo rozpuštěno ve 0,1 ml DMSO. K roztoku bylo přidáno 0,2 mg DBCO-Dox (0,218 μmol). Po 1 h reakce při laboratorní teplotě byl označený polymer vyčištěn od nízkomolekulárních příměsí pomocí gelové chromatografie (kolona Sephadex LH 20 v methanolu, UV detekce při  $\lambda_{\max} = 488$  nm), eluát koncentrován na vakuové odparce a vysrážen do nadbytku (20 ml) ethylacetátu. Obsah koncových N<sub>3</sub> skupin „semitelechelických“ kopolymerů byl stanoven spektrálně z absorpce příslušející Dox při  $\lambda_{\max} = 488$  nm v MeOH. Pro výpočet byl použit molární absorpční koeficient  $\epsilon = 10\,300 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  stanovený na DBCO-Dox. Ze získaných hodnot obsahu Dox byla vypočtena molární hmotnost a funkcionalita kopolymeru podle Rovnice 1.

### 4.2.2.4 Stanovení Dox v hvězdicovitých konjugátech

Obsah Dox vázaného v konjugátech hydrazonovou vazbou byl stanoven přímo spektrálně při  $\lambda_{\max} = 488$  nm ve vodě.

1 mg konjugátu **S<sub>A</sub>(Dox)<sub>n</sub>** (6,88 nmol) bylo rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Obsah Dox byl stanoven spektrálně z absorpce příslušející Dox při  $\lambda_{\max} = 488$  nm v H<sub>2</sub>O. Pro výpočet byl použit molární absorpční koeficient  $\epsilon = 9\,800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  stanovený pro monomer s Dox navázaným hydrazonovou vazbou<sup>9</sup>. Ze zjištěné hodnoty absorbance byl vypočítán hmotnostní podíl Dox v polymerním nosiči.



## 4.2.3 Kapalinová chromatografie

### 4.2.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Stanovení čistoty monomerů a RAFT činidel, sledování průběhu syntézy CTA-N<sub>3</sub> a rychlosti vazby DBCO-NHS esteru a DBCO-S-S-NHS esteru na PAMAM dendrimer G<sub>2</sub> bylo prováděno pomocí HPLC s využitím chromatografických kolon s reverzní fází (Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm; 5 μm) při rychlosti průtoku mobilní fáze 1 ml.min<sup>-1</sup> s použitím gradientu od 0 do 100 % roztoku B v průběhu 17 min (roztok A: 5 % acetonitril, 94,9 % voda, 0,1 % TFA; roztok B: 94,9 % acetonitril; 5 % voda; 0,1 % TFA) a UV/VIS detekcí (detektor diodového pole (PDA) Shimadzu SPD-M10A).

### 4.2.3.2 Gelová permeační chromatografie

Stanovení molárních hmotností lineárních kopolymerů a hvězdicovitých konjugátů bylo prováděno pomocí gelové permeační chromatografie s využitím detektorů refrakčního indexu (RI) Optilab-rEX, a rozptylu světla (LS; DAWN EOS, Wyatt Technology, USA) a UV/VIS. Pro lineární kopolymery byla použita kolona TSKgel G3000SW<sub>LX</sub> (300 x 7,8 mm, 5 μm) a pro hvězdicovité konjugáty byla použita kolona TSKgel G4000SW<sub>XL</sub> (300 x 7,8 mm, 8 μm). Jako mobilní fáze byl použit 0,3M roztok octanu sodného/methanol 1:4 obj. při průtoku 0,5 ml/min.

## 4.2.4 Uvolňování Dox z konjugátů

Konjugáty o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  M Dox byly inkubovány v acetátovém pufru (0,1 M CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH, 0,05 M NaCl) při pH 5,0 a 7,4. Vzorky byly inkubovány ve tmě při 37 °C a v předem daných časových intervalech byly odebírány části vzorků (0,1 ml). Dox.HCl byl převeden na bázi přidáním 0,4 ml uhličitanového pufru (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4 M NaCl, pH 9,8). Po promíchání bylo přidáno 0,8 ml CHCl<sub>3</sub> a po 10 min intenzivního „vytřepávání“ byl vzorek odstředěn (5 min, 5000 ot./min). Polovina chloroformové spodní vrstvy byla odebrána, rozpouštědlo odpařeno a volný Dox byl

rozpuštěn v acetonitrilu. HPLC byla provedena výše uvedeným způsobem. Kalibrace byla provedena aplikací přesných množství volného Dox.

## 4.2.5 Biologické testy

### 4.2.5.1 Testy *in vitro*

Nádorové buněčné linie byly inkubovány v živném médiu obsahujícím testované polymery a jejich cytotoxicita byla sledována pomocí změny inkorporace [<sup>3</sup>H]-thymidinu do testovaných buněk. V cytotoxickém prostředí dochází k zániku či poškození funkce testovaných buněk, což se projeví neschopností proliferovat, a tedy i zabudovávat [<sup>3</sup>H]-thymidin do buněčné struktury. Míra poklesu rychlosti inkorporace [<sup>3</sup>H]-thymidinu je tedy i mírou cytotoxicity preparátu pro testovaný typ buněk. Experimenty byly provedeny v 96 jamkových tkáňových mikrotitračních destičkách (Nunc) s použitím nádorových buněk myšího T-buněčného lymfomu EL4 ( $5 \times 10^4$  buněk/jamku) a lidského plicního karcinomu LL2 ( $10^4$  buněk/jamku). Buňky byly kultivovány tři dny při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub>. Třetí den byl přidán [<sup>3</sup>H]-thymidin (37 kBq na jamku) a buňky dále inkubovány ještě 6 h. Buňky s [<sup>3</sup>H]-thymidinem zabudovaným do DNA byly převedeny do pevného scintilátoru (Meltilex, Wallac, Finsko) a celkové množství zabudovaného radioaktivně značeného thymidinu bylo stanoveno pomocí přístroje pro měření β-záření (Microbeta Trilux). Výsledky byly vyhodnoceny jako aritmetické průměry měřených impulzů za min (cpm) z 3 individuálních jamek.

### 4.2.5.2 Experimenty protinádorové aktivity *in vivo*

Protinádorová aktivita hvězdčovitého konjugátu S<sub>A</sub>(Dox)<sub>n</sub> byla testována na myším T-buněčném lymfomu EL4. Samicím myši B/6 bylo injikováno subkutánně  $1 \cdot 10^5$  buněk nádorové linie v den 0. Vzorky byly aplikovány intravenózně osmý den po injikaci nádorové linie při dávkování 5 mg Dox(ekvivalent)/kg. Kontrolním zvířatům byly injikovány nádorové buňky a místo léčiva byl podáván pouze fyziologický roztok. V každé testované skupině bylo 8 myší. Velikost nádoru byla měřena každý druhý den tak, aby byl

zachycen jeho postupný růst. Byla sledována doba přežití pokusných zvířat, velikost nádoru a poměr dlouhodobě přežívajících jedinců. Jako kontrola byly dalším skupinám myší podány vzorky volného Dox a lineárního polymerního konjugátu **P<sub>DTB</sub>2**. Velikost nádoru byla vypočítána podle vzorce  $V=a \cdot b^2/2$ , kdy  $a$  značí delší průměr a  $b$  značí kratší průměr, který je kolmý na  $a$ .

## 5. Výsledky a diskuse

V této části diplomové práce jsou uvedeny a diskutovány výsledky studia vztahu mezi strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi vysokomolekulárních hvězdicovitých polymerních nosičů léčiv a jejich konjugátů s protinádorovým léčivem Dox umožňujících „pasivní“ směřování do pevných nádorů a v nich pH-řízené uvolnění léčiva.

První kapitola této části práce je věnována syntéze a fyzikálně-chemické charakterizaci „semitelechelických“ polymerních prekurzorů. Diskuze je zaměřena především na vliv reakčních podmínek řízené radikálové RAFT polymerace na molární hmotnost, disperzitu a funkcionalitu koncových reaktivních skupin „semitelechelických“ kopolymerů.

V následujících dvou kapitolách je diskutována syntéza a fyzikálně-chemické vlastnosti vysokomolekulárních hvězdicovitých polymerních prekurzorů a konjugátů s Dox. Pozornost je věnována zejména vlivu reakčních podmínek na molární hmotnost a výtěžek hvězdicovitých kopolymerů a přípravě jejich konjugátů s léčivem. Zaměřili jsme se rovněž na strukturu spojky mezi dendrimerním jádrem a polymerními rameny, přičemž záměrem bylo připravit biodegradovatelný konjugát, podléhající v biologickém prostředí degradaci na produkty vyloučitelné z organismu renální filtrací.

Poslední kapitola se věnuje výsledkům biologických testů a jejich diskuzi.

### 5.1 Syntéza a fyzikálně-chemická charakterizace polymerních prekurzorů

Doposud byly připravovány HPMA kopolymery převážně klasickou radikálovou polymerizací, která umožňuje přípravu HPMA kopolymerů v dostatečném výtěžku a v širokém rozmezí molárních hmotností. Nevýhodou této metody je poměrně široká distribuce molárních hmotností připravených kopolymerů. S cílem připravit HPMA kopolymery s úzkou distribucí molárních hmotností byla pro přípravu HPMA kopolymerů v této práci vybrána metoda řízené RAFT polymerizace. V dalších podkapitolách se budeme věnovat vlivu reakčních podmínek na výsledné fyzikálně-chemické vlastnosti připravených polymerů. Příprava HPMA kopolymerů byla zaměřena na polymery o

molární hmotnosti do 30 000 g/mol, které mohou být po aplikaci do lidského organismu a splnění svého úkolu, tj. dopravě účinné látky do místa terapeutického účinku, vyloučeny renální filtrací z organismu. Při studiu vlivu reakčních podmínek na výsledné vlastnosti HPMA kopolymerů jsme se zaměřili především na studium vlivu teploty polymerace a poměr koncentrací reakčních složek [M]:[CTA]:[I]. Všechny RAFT polymerace popsané v této práci byly provedeny v *tert.*-butanolu při koncentraci monomerů 0,8 M v návaznosti na předchozí výsledky<sup>64</sup>.

### **5.1.1 Příprava lineárních kopolymerů s $\alpha$ -koncovou karboxylovou skupinou**

Lineární polymery obsahující koncové karboxylové skupiny byly připraveny dvěma různými postupy. Prvním je přímá polymerace s využitím CTA nesoucí karboxylovou skupinu. Druhý postup byl založen na post-polymerační reakci kopolymerů nesoucích DTB skupiny. Polymery obsahující koncovou karboxylovou skupinu byly připraveny pro následnou kondenzační reakci s aminoskupinami PAMAM dendrimerů za vzniku amidové vazby.

#### **5.1.1.1 Optimalizace reakčních podmínek pro přípravu lineárních kopolymerů - vliv teploty a doby polymerace**

Průběh polymerizace RAFT mechanismem je podobně jako u klasické radikálové polymerizace vysoce závislý na teplotě polymerizační směsi. V prvním kroku jsme se právě z tohoto důvodu zaměřili na studium vlivu teploty při řízené radikálové RAFT polymeraci na fyzikálně-chemické vlastnosti připravených HPMA kopolymerů. Poměr komonomerů HPMA a MA-acap-NHNH-Boc byl zvolen tak, aby přibližně 10% monomerních jednotek obsahovalo hydrazidovou skupinu vhodnou pro vazbu modelového léčiva Dox. Ke každé teplotě polymerizační směsi byl zvolen polymerizační čas tak, abychom u každé polymerace dosáhli srovnatelného výtěžku a molární hmotnosti v rozmezí 20 000 až 30 000 g/mol. Fyzikálně-chemické charakteristiky připravených lineárních polymerů jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Charakteristiky připravených HPMA kopolymerů při různých teplotách polymerizační směsi

	[M]:[CTA] :[I]	T (°C)	Čas (h)	M <sub>w</sub> (g/mol)	M <sub>n</sub> (g/mol)	I <sub>n</sub> <sup>1</sup>	F <sub>(DTB)</sub> <sup>2</sup>	F <sub>(COOH)</sub> <sup>2</sup>	Výtěžek (%)
P <sub>DTB/COOH1</sub>	400:2:1	60	16	23900	21500	1,11	1,03	0,78	45
P <sub>DTB/COOH2</sub>	400:2:1	65	10	27600	25800	1,07	1,04	0,87	41
P <sub>DTB/COOH3</sub>	400:2:1	70	6	22600	21000	1,08	0,96	0,83	37
P <sub>DTB/COOH4</sub>	400:2:1	80	3	25100	23500	1,07	1,03	0,79	37

<sup>1</sup>disperzita kopolymeru vypočítaná M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>

<sup>2</sup>funkcionalita polymeru vypočítaná c(koncová skupina)/c(polymer)

Pro každou ze zvolených teplot RAFT polymerizace je možné správným výběrem doby polymerizace dosáhnout toho, že vznikající HPMA kopolymer má podobnou molární hmotnost (22 600 až 27 600 g/mol) s úzkou distribucí molárních hmotností (1,07 až 1,11). Rovněž funkcionalita koncových skupin (funkcionalita značí poměr polymerních řetězců zakončených danou koncovou reaktivní skupinou k celkovému počtu polymerních řetězců) se u všech připravených kopolymerů lišila velmi málo, a to pro obě koncové reaktivní skupiny, DTB i COOH. V případě DTB skupin byla funkcionalita u všech vzorků blízka 1, přičemž rozptyl naměřených hodnot je způsoben experimentální chybou stanovení. Funkcionalita koncových karboxylových skupin se pohybovala okolo 0,8, rozdíly mezi jednotlivými hodnotami nejsou vzhledem k přesnosti zvolené metody stanovení signifikantní. Nižší funkcionalita karboxylových skupin na α-konci kopolymerů je pravděpodobně způsobena reakčním mechanismem iniciačního systému tvořeného iniciátorem a CTA činidlem. Pro přípravu dalších kopolymerů byly vybrány teploty polymerizace 70 °C (6 h) a 60 °C (16 h).

### 5.1.1.2 Optimalizace reakčních podmínek pro přípravu lineárních kopolymerů - vliv poměru koncentrací reakčních složek

V dalším kroku byl studován vliv poměru molárních koncentrací monomerů, RAFT činidla a iniciátoru [M]:[CTA]:[I], a to zejména na výsledné molární hmotnosti kopolymerů. Na základě dříve publikovaných údajů<sup>64</sup> byly jako vhodné poměry [M]:[CTA]:[I] vybrány poměry 400:2:1, 600:2:1 a 800:2:1. Fyzikálně-chemické

charakteristiky polymerů připravených s využitím výše zmíněných poměrů jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Charakteristiky HPMA kopolymerů připravených při různých poměrech [M]:[CTA]:[I] v polymerizační směsi

	$[M]:[CTA]:[I]$	$T$ (°C)	Čas (h)	$M_w$ (g/mol)	$M_n$ (g/mol)	$I_n^1$	$F_{(DTB)}^2$	$F_{(COOH)}^2$	Výtěžek (%)
P <sub>DTB/COOH</sub> 5	400:2:1	60	16	23 900	21 500	1,11	1,03	0,78	45
P <sub>DTB/COOH</sub> 6	600:2:1	60	16	38 500	30 800	1,25	0,92	0,91	40
P <sub>DTB/COOH</sub> 7	800:2:1	60	16	53 000	45 600	1,16	0,91	0,78	37

<sup>1</sup>disperzita kopolymeru vypočítaná  $M_w/M_n$

<sup>2</sup>funkcionalita polymeru vypočítaná:  $c(\text{koncová skupina})/c(\text{polymer})$

Molární hmotnost HPMA kopolymerů roste se vzrůstající koncentrací monomerů v zásadě, její změnou lze tedy do značné míry řídit  $M_n$  připravených HPMA kopolymerů. Oproti tomu dle očekávání změna poměru [M]:[CTA] neměla významný vliv na disperzitu kopolymerů, funkcionalitu DTB skupin či COOH skupin.

Významnou nevýhodou využití 4-kyano-4-(fenyلكarbonothioylthio)pentanové kyseliny jako CTA byla poměrně nízká reprodukovatelnost fyzikálně-chemických vlastností připravených kopolymerů - výtěžku,  $M_w$  a funkcionality koncových skupin připravených HPMA kopolymerů. Tato nižší reprodukovatelnost byla nejspíše způsobena přítomností nečistot v uvedené kyselině vzniklých nízkou tepelnou stabilitou při laboratorní teplotě. Nárůst přítomnosti degradačních produktů byl prokázán pomocí analýz HPLC.

### 5.1.2 Příprava lineárních kopolymerů s $\omega$ -koncovou karboxylovou skupinou

Nevýhody přípravy polymerních prekurzorů s  $\alpha$ -koncovou COOH skupinou pomocí RAFT polymerizace využívající 4-kyano-4-(fenyلكarbonothioylthio)pentanové kyseliny jakožto CTA mne vedly k využití jiného syntetického postupu pro přípravu HPMA kopolymerů s koncovou karboxylovou skupinou. Nejprve byl připraven „semitelechelický“ kopolymer s DTB skupinou pomocí RAFT polymerizace s využitím 2-kyano-2-propylbenzodithioátu jakožto CTA. DTB skupiny na  $\omega$ -konci polymerního

řetězce byly odstraněny redukcí a na volné SH skupiny byly následnou adicí kyseliny maleimidomásečné zavedeny *in situ* COOH skupiny, následně využitelné pro navázání „semitelechelických“ kopolymerů amidovou vazbou na PAMAM dendrimer.

### 5.1.2.1 Příprava lineárních kopolymerů s koncovou dithiobenzoátovou skupinou

Z důvodu změny CTA činidla bylo nezbytné upravit polymerizační podmínky vedoucí k přípravě kopolymerů o molární hmotnosti v rozmezí 20 000 až 35 000 g/mol stejně jako v předchozích kapitolách. Charakterizace kopolymerů připravených za použití 2-kyano-2-propylbenzodithioátu jako CTA jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Charakteristika „semitelechelických“ kopolymerů s reaktivní DTB skupinou

	[M]:[CTA]:[I]	T (°C)	Čas (h)	$M_w$ (g/mol)	$M_n$ (g/mol)	$I_n^1$	$F_{(DTB)}^2$	Výtěžek (%)
P <sub>DTB1</sub>	400:2:1	70	6	27 500	25 800	1,07	0,98	53
P <sub>DTB2</sub>	300:2:1	70	6	25 000	20 700	1,21	0,94	54
P <sub>DTB3</sub>	250:2:1	70	6	19 600	16 100	1,18	0,97	61

<sup>1</sup>disperzita kopolymeru vypočítaná  $M_w/M_n$

<sup>2</sup>funkcionalita polymeru vypočítaná  $c(\text{koncová skupina})/c(\text{polymer})$

Použití jiného CTA činidla při přípravě kopolymeru **P<sub>DTB/COOH3</sub>** a **P<sub>DTB1</sub>** vedlo k rozdílným  $M_w$  (**P<sub>DTB/COOH3</sub>** = 22 600 g/mol, **P<sub>DTB1</sub>** = 27 500 g/mol) a výtěžkům (**P<sub>DTB/COOH3</sub>** 37%, **P<sub>DTB1</sub>** 53%) lineárních kopolymerů při zachování poměru [M]:[CTA]:[I]. Z tohoto důvodu bylo nutné při použití nového CTA opět optimalizovat reakční podmínky a provést studii vlivu poměru [M]:[CTA]:[I] na výsledné fyzikálně-chemické charakteristiky HPMa kopolymerů. Touto optimalizací bylo zjištěno, že pro přípravu lineárních kopolymerů **P<sub>DTB</sub>** o podobné  $M_w$  (jako v případě **P<sub>DTB/COOH3</sub>**) za použití 2-kyano-2-propylbenzodithioátu jako CTA je nutné upravit poměr na 300:2:1. Pro přípravu vysokomolekulárních hvězdicovitých polymerů použity polymery **P<sub>DTB2</sub>** a **P<sub>DTB3</sub>**. Významným rozdílem oproti syntéze popsané v předchozí kapitole je, že řízená radikálová RAFT polymerizace využívající 2-kyano-2-propylbenzodithioát jako CTA vede k vyšším výtěžkům polymerizací při zachování nízkých hodnot disperzity, vysoké funkcionality  $\omega$ -koncových DTB skupin a také výrazně vyšší reprodukovatelnosti nově syntetizovaných kopolymerů.



### 5.1.2.2 Příprava lineárních kopolymerů s $\omega$ -koncovou karboxylovou skupinou

DTB skupiny polymerů **P<sub>DTB2</sub>** a **P<sub>DTB3</sub>** byly redukovány dvacetinásobkem látkového množství NaBH<sub>4</sub> vzhledem k obsahu DTB skupin. Vysoký přebytek NaBH<sub>4</sub> byl zvolen z důvodu zajištění redukce všech koncových skupin. Reakční směs byla na závěr okyselena jednak z důvodu rozložení přebytečného NaBH<sub>4</sub>, jednak kvůli převedení COOH skupin z karboxylátů na kyseliny; v opačném případě by nemohlo dojít k vazbě polymeru na aminoskupiny PAMAM dendrimeru amidovou vazbou. Charakteristika polymerů je uvedena v Tab. 4:

Tab. 4: Charakteristiky polymerů připravených redukcí DTB a následnou adicí maleimidomáselné kyseliny.

	Prekurzor.	$M_w$ (g/mol)	$M_n$ (g/mol)	$I_n^1$	$F_{(COOH)}$
P <sub>COOH1</sub>	P <sub>DTB3</sub>	19 400	16 400	1,18	0,91
P <sub>COOH2</sub>	P <sub>DTB2</sub>	24 400	21 900	1,11	0,87

<sup>1</sup>disperzita kopolymeru vypočítaná  $M_w/M_n$

U obou polymerů **P<sub>COOH1</sub>** a **P<sub>COOH2</sub>** zůstala funkcionalita  $\omega$ -koncových skupin ( $F_{(COOH)}$ ) velmi vysoká, došlo jen k mírnému snížení funkcionality koncových skupin. Při porovnání  $M_n$  polymerů před a po zavedení COOH skupin je zřejmé, že během modifikace DTB skupin na karboxylové skupiny nedošlo k nežádoucí tvorbě dibloků spojených S-S můstkem, k čemuž přispělo redukční prostředí nadbytku borohydridu v reakční směsi.

Polymerní prekurzory nesoucí  $\omega$ -koncové karboxylové skupiny dosahovaly vhodných molárních hmotností, dostatečně nízkých hodnot disperzity a zároveň vysoké funkcionality koncových skupin tak, aby byly mohly být dále použity pro přípravu hvězdicovitých kopolymerů (viz kapitola 5.2.1).

### 5.1.3 Příprava lineárních kopolymerů s koncovou azidovou skupinou

Lineární polymery obsahující koncové azidové skupiny byly připraveny dvěma různými postupy obdobně jako při přípravě kopolymerů nesoucích koncové COOH

skupiny. A to jak post-polymerizační reakcí kopolymerů nesoucích DTB skupiny, tak přímou polymerizací s využitím CTA a iniciátoru nesoucích azidové skupiny. Polymery obsahující koncovou azidovou skupinu byly připraveny za účelem následné nekatalyzované 1,3-cykloadice azidu na trojnou vazbu DBCO skupin PAMAM dendrimerů za vzniku pětičlenného 1,2,3-triazolového heterocyklu.

### 5.1.3.1 Příprava kopolymerů s $\alpha$ -koncovou azidovou skupinou

V prvním případě byl lineární kopolymer obsahující koncovou  $N_3$  skupinu připraven přímo RAFT polymerizací. Kromě CTA obsahující azidové skupiny byl rovněž použit iniciátor s azidovými skupinami, aby bylo dosaženo  $F_{(N_3)}$  blízké 1. Výběr polymerizačních podmínek byl proveden na základě optimalizovaných polymerizačních podmínek v předchozích kapitolách. Charakterizace připravených kopolymerů je uvedena v Tab. 5.

Stanovení funkcionality  $N_3$  skupin bylo prováděno pomocí metody využívající adice modifikovaných fluorescenčních značek na azidové skupiny polymerů. Komerčně dostupná značka DBCO-Fluor 545 se ukázala jako nevyhovující, protože během stanovení docházelo k nespecifickým sorpcím značky na kopolymery, což znemožnilo odstranění nezreagované fluorescenční značky a zabránilo tak správnému stanovení obsahu azidových skupin. Správných výsledků bylo naopak dosaženo v případě použití fluorescenční značky DBCO-Dox (Schéma 2), kdy bylo možno odstranit nadbytek činidla.

Tab. 5: Charakterizace kopolymerů obsahujících  $\alpha$ -koncové azidové skupiny

	$[M]:[CTA]:[I]$	$T$ (°C)	$\check{C}as$ (h)	$M_w$ (g/mol)	$M_n$ (g/mol)	$I_n^1$	$F_{(N_3)}^2$	$F_{(DTB)}^2$	Výtěžek (%)
$P_{DTB/N_31}$	350:2:1	70	6	42 900	40 500	1,06	0,95	1,05	64
$P_{DTB/N_32}$	300:2:1	70	6	39 500	33 000	1,20	0,88	0,91	63
$P_{DTB/N_33}$	250:2:1	70	6	32 700	27 300	1,20	0,91	0,94	66

<sup>1</sup>disperzita kopolymeru vypočítaná  $M_w/M_n$

<sup>2</sup>funkcionalita polymeru vypočítaná  $c(\text{koncová skupina})/c(\text{polymer})$

Dosažené molární hmotnosti, disperzity, polymerační výtěžky i funkcionality koncových skupin uvedené v Tab. 5 ukazují, že tímto postupem lze poměrně reprodukovatelně připravit lineární kopolymery o definované molární hmotnosti s nízkou disperzitou a zároveň s funkcionalitami obou reaktivních konců „telechelického“

kopolymeru blízké 1. Významným rozdílem oproti předchozím polymerizacím využívajících jiná CTA činidla je, že pro dosažení přibližně stejné  $M_w$  je nutné měnit poměr  $[M]:[CTA]:[I]$ , viz např. srovnání kopolymerů  $P_{DTB/COOH6}$  a  $P_{DTB1}$  s  $P_{DTB/N31}$  a  $P_{DTB/N33}$ . Dosažené výsledky naprosto korespondují s výsledky popsány v literatuře<sup>64</sup>. Je možné konstatovat, že  $M_w$  lineárních kopolymerů závisí na poměru  $[M]:[CTA]$ , který je vždy specifický pro daný typ iniciačního komplexu<sup>83</sup>.

Polymerní prekurzory nesoucí  $\alpha$ -koncové azidové skupiny dosahovaly vhodných molárních hmotností, dostatečně nízkých disperzit a zároveň vysoké funkcionality azidových skupin a byly dále použity pro přípravu hvězdicovitých kopolymerů (viz kapitola 5.2.2).

### 5.1.3.2 Příprava kopolymerů s $\omega$ -koncovou azidovou skupinou

V případě přípravy kopolymerů obsahujících  $\omega$ -koncovou azidovou skupinu se vycházelo ze stejných polymerních prekurzorů jako v případě kopolymerů s  $\omega$ -koncovou COOH skupinou popsaných v kap. 5.1.2.2, tj. z lineárních „semitelechelických“ kopolymerů obsahujících DTB skupinu. Azidové skupiny byly zavedeny po jejich reakci s nadbytkem iniciátoru ACVA-N<sub>3</sub> za zvýšené teploty (80 °C)<sup>75</sup>.

Výtěžek přípravy lineárního kopolymeru  $P_{N31}$  reakcí  $P_{DTB3}$  s ACVA-N<sub>3</sub> činil přibližně 80 %, což při započítání výtěžku polymerace vzorku  $P_{DTB3}$  vede k celkovému kolem 49 %, který je tak nižší než v případě výtěžků  $P_{DTB/N31-3}$ . Polymer měl totožnou molekulovou hmotnost a disperzitu jako prekurzor  $P_{DTB3}$  ( $M_w$  19 400 g/mol,  $M_n$  16 400 g/mol,  $I_n$  1,18), ale takto připravený polymer vykazoval významně nižší funkcionalitu ( $F_{(N3)} = 0,69$ ) než v případě přímého zavedení azidů polymerizací. Tuto nižší funkcionalitu azidových skupin přičítáme nedostatečné reaktivitě ACVA-N<sub>3</sub> s DTB skupinami. Kvůli nižšímu výtěžku a především nízké funkcionalitě jsme se tímto syntetickým postupem dále nezabývali a připravené kopolymery nebyly dále využívány.

## 5.2 Hvězdicovité konjugáty

V rámci této diplomové práce byly připraveny celkem tři typy hvězdicovitých polymerních konjugátů, které se lišily v detailní struktuře. V prvním typu (A) byly

„semitelechelické“ HPMA polymerní prekurzory navázány na centrální molekulu PAMAM dendrimera G<sub>2</sub> přes amidovou vazbu. U druhého a třetího typu (B, C) byla pro „roubování“ HPMA kopolymerů na dendrimer použita nekatalyzovaná 1,3-cykloadice azidové skupiny na trojnou vazbu DBCO povrchové skupiny dendrimera. Třetí typ (C) hvězdicovitých konjugátů oproti druhému typu (B) obsahoval redukčně štěpitelnou disulfidovou spojku mezi dendrimera a HPMA kopolymerem.

### 5.2.1 Příprava hvězdicovitých konjugátů typu A

Hvězdicovité polymery typu A byly připraveny reakcí aminoskupin PAMAM dendrimera (druhé generace) s koncovou karboxylovou skupinou lineárního kopolymeru v přítomnosti kondenzačních činidel za vzniku amidové vazby. Volba reakčních podmínek vycházela z dříve publikovaných prací o hvězdicovitých HPMA kopolymerech<sup>50,59</sup>, kdy byly ovšem použity pouze polymerní prekurzory s širší disperzitou připravené klasickou radikálovou kopolymerizací. V rámci optimalizace přípravy hvězdicovitých kopolymerů bylo studováno použití pěti různých kondenzačních činidel: *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid (EDC), dicyklohexylkarbodiimid (DCC), di(isopropyl)karbodiimid (DIPC), ethyl-2-ethoxy-1(2H)chinolinkarboxylát (EEDQ) a 1,1'-carboxydiimidazol (CDI). Reakční směs vždy obsahovala hydroxybenzotriazol (HOBT) a di(isopropyl)ethylamin (DIPEA) s cílem zvýšit výtěžek kondenzační reakce. V průběhu reakce byly použity lineární polymery **P<sub>DTB/COOH2</sub>** (M<sub>n</sub> = 25 800) a **P<sub>COOH1</sub>** (M<sub>n</sub> = 16 400), kdy docházelo nejprve ke vzniku reaktivního derivátu karboxylové skupiny, který *in situ* reagoval s aminoskupinou PAMAM dendrimera. Přibližný počet ramen v nově syntetizovaném hvězdicovitém konjugátu byl vypočítán podle Rovnice 3:

$$\text{poč. ramen} = \frac{M_n(\text{Star})}{M_n(\text{lin. pol.})}$$

Rovnice 3: Vzorec pro výpočet pravděpodobného počtu ramen v hvězdicovitém konjugátu

Charakterizace připravených hvězdicovitých kopolymerů je uvedena v Tab. 6:

Tab. 6: Charakteristiky hvězdicovitých konjugátů připravených aktivací COOH skupiny

	<i>Kondenzační činidlo</i>	<i>Polymerní prekurzor</i>	$M_w$ (g/mol)	$M_n$ (g/mol)	$I_n^1$	<i>Výtěžek (%)</i>	<i>Poč.ramen<sup>2</sup></i>
$S_A(\text{Boc})_n1$	DIPC	$P_{\text{DTB}/\text{COOH}2}$	258 100	241 400	1,07	9	9,3
$S_A(\text{Boc})_n2$	EDC	$P_{\text{DTB}/\text{COOH}2}$	257 700	241 700	1,07	55	9,3
$S_A(\text{Boc})_n3$	DCC	$P_{\text{DTB}/\text{COOH}2}$	169 100	145 100	1,17	40	5,6
$S_A(\text{Boc})_n4$	EDC	$P_{\text{COOH}1}$	150 000	138 000	1,11	75	8,4

<sup>1</sup>disperzita hvězdicovitého konjugátu vypočítaná  $M_w/M_n$

<sup>2</sup>teoretický počet ramen hvězdicovitého konjugátu, vypočítán  $M_w(\text{hvězd.konj.})/M_w(\text{lineární pol.})$

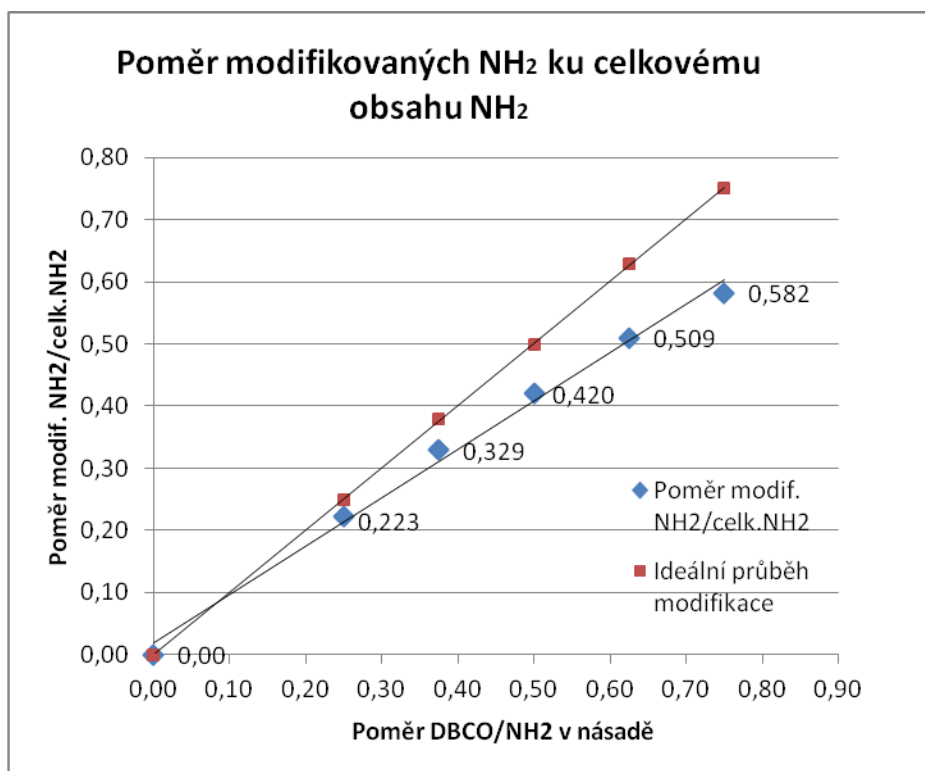
Využití kondenzačních činidel CDI (diimidazolové činidlo) a EEDQ (dihydrochinolinové činidlo) nevedlo k přípravě hvězdicovitých polymerů.

Hvězdicovité polymery o nejvyšší molární hmotnosti byly připraveny s DIPC a EDC jako kondenzačními činidly. V obou případech  $M_w$  dosáhla na více jak 250 000 g/mol. Zásadní rozdíl u těchto dvou činidel byl zjištěn u výtěžku kondenzační reakce, který byl více jak 6 krát vyšší u EDC. Využití DCC vedlo k přípravě hvězdicovitých polymerů, ale jejich molární hmotnost byla významně nižší než v případě EDC při použití stejných lineárních polymerů. Rovněž  $M_w$  použitého lineárního polymeru mělo významný vliv na výslednou  $M_w$  hvězdicovitých polymerů. Při snížení  $M_w$  lineárního polymeru o 1/3 došlo k obdobnému snížení  $M_w$  u připraveného hvězdicovitého polymeru (viz srovnání: pro syntézu  $S_A(\text{Boc})_n2$  použit  $P_{\text{DTB}/\text{COOH}2}$  o  $M_w = 27\,600$  g/mol, pro syntézu  $S_A(\text{Boc})_n4$  použit  $P_{\text{COOH}1}$  o  $M_w = 19\,400$  g/mol). S přihlédnutím k dosaženému výtěžku a molární hmotnosti připravených hvězdicovitých polymerů je možné konstatovat, že vhodnost kondenzačních činidel pro přípravu hvězdicovitých konjugátů typu A klesá v tomto pořadí EDC > DCC > DIPC >>> CDI, EEDQ. Hvězdicovitý konjugát  $S_A(\text{Boc})_n4$  byl díky dostatečné molární hmotnosti a počtu ramen vybrán pro přípravu hvězdicovitého konjugátu s léčivem pro biologické testy.

### 5.2.2 Příprava hvězdicovitého konjugátu - Typ B a C

Hvězdicovité polymery typu B a C byly připraveny 1,3 - cykloadicí koncových azidových skupin „semitelechelicých“ lineárních kopolymerů na trojnou vazbu DBCO

skupin PAMAM dendrimerů. DBCO skupiny bylo ovšem nejprve nutné na PAMAM dendrimery zavést, a to aminolytickou reakcí jejich aminoskupin s bifunkčními činidly obsahujícími DBCO skupinu a sukcinimidylový ester (DBCO-NHS-ester), přičemž jedno z nich obsahovalo redukčně štěpitelnou disulfidickou vazbu (DBCO-S-S-NHS-ester). Závislost počtu zavedených DBCO skupin na molárním poměru DBCO molekul k aminoskupinám je uvedena v Obr. 7:



Obr.7: Stanovení závislosti poměru zavedených DBCO na NH<sub>2</sub> na poměru DBCO/NH<sub>2</sub> v „násadě“

Z výsledků uvedených na Obr. 7 je patrné, že se zvyšujícím se poměrem DBCO molekul k aminoskupinám v reakční směsi bylo na dendrimer zavedeno více DBCO skupin. Od poměru 0,25 do 0,63 byla závislost modifikace aminoskupin DBCO skupinami takřka lineární, kdy došlo k zabudování okolo 88 % DBCO v násadě. Při poměru 0,75 však z důvodu stericých zábran došlo již k nižší modifikaci (78 %).

Důvodem pro použití 1,3 - cykloadice azidu na trojnou vazbu DBCO skupin PAMAM dendrimerů byla především její selektivita a rychlost, která probíhá za laboratorní teploty do vysokých konverzí. Navíc modifikace PAMAM dendrimeru derivátem DBCO umožňovala vnést do struktury PAMAM dendrimeru, potažmo posléze i

hvězdicovitého konjugátu, vhodnou degradovatelnou spojku (redukčně degradovatelnou disulfidovou vazbu). Výsledné charakteristiky takto připravených hvězdicovitých konjugátů typu B a C jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7: Charakteristiky hvězdicovitých konjugátů typu B a C připravených za různých reakčních podmínek,

	<i>Lin.pre kurzor</i>	$w_{směs}$ (%) <sup>1</sup>	<i>T</i> (°C)	<i>Rozpou štědlo</i>	$M_w$ (x10 <sup>3</sup> ) (g/mol)	$M_n$ (x10 <sup>3</sup> ) (g/mol)	$I_n^2$	<i>Výtěžek</i> (%)	<i>Poč. Ramen</i> <sup>3</sup>
S <sub>B</sub> (Boc) <sub>n</sub> 1	P <sub>DTB/N3</sub> 3	9	25	DMF	142	118	1,20	21	4,4
S <sub>B</sub> (Boc) <sub>n</sub> 2	P <sub>DTB/N3</sub> 1	9	37	DMF	248	195	1,27	28	5,8
S <sub>B</sub> (Boc) <sub>n</sub> 3	P <sub>DTB/N3</sub> 3	9	25	DMSO	193	153	1,26	34	5,9
S <sub>B</sub> (Boc) <sub>n</sub> 4	P <sub>DTB/N3</sub> 2	20	25	DMSO	492	354	1,39	56	11,3
S <sub>C</sub> (Boc) <sub>n</sub> 1	P <sub>DTB/N3</sub> 3	9	25	DMF	158	133	1,19	42	4,8
S <sub>C</sub> (Boc) <sub>n</sub> 2	P <sub>DTB/N3</sub> 1	9	37	DMF	302	220	1,41	56	7,0
S <sub>C</sub> (Boc) <sub>n</sub> 3	P <sub>DTB/N3</sub> 1	9	25	DMSO	356	260	1,37	58	8,3
S <sub>C</sub> (Boc) <sub>n</sub> 4	P <sub>DTB/N3</sub> 2	20	25	DMSO	448	322	1,40	70	10,3

<sup>1</sup>w<sub>směs</sub>(%) značí hm. procenta výchozích látek (lineární polymer + modifikovaný PAMAM dendrimer G<sub>2</sub>) v reakční směsi

<sup>2</sup>disperzita hvězdicovitého konjugátu vypočítaná  $M_w/M_n$

<sup>3</sup>teoretický počet ramen hvězdicovitého konjugátu, vypočítán  $M_w(\text{hvězd.konj.})/M_w(\text{lineární pol.})$

Výše uvedené hvězdicovité konjugáty byly připravovány reakcí lineárních kopolymerů a modifikovaných PAMAM G<sub>2</sub> v molárním poměru 10:1. Počet navázaných lineárních polymerů na modifikovaný PAMAM G<sub>2</sub> lze poměrně výhodně ovlivňovat změnou reakčních podmínek – teplotou, použitým rozpouštědlem a koncentrací roztoku. Úpravou těchto parametrů lze zvýšit počet navázaných ramen o přibližně 73 % (typ B) nebo až 80 % (typ C). Zvýšení reakční teploty na 37 °C nevedlo k významnému zvýšení výtěžku a počtu navázaných ramen. Změna rozpouštědla z DMF na DMSO nemá významný vliv na výtěžek, naopak nejvýznamnějším faktorem vedoucím ke zvýšení výtěžku a počtu navázaných ramen je zvýšení koncentrace reakční směsi z 9 % na 20 %.

$M_w$  hvězdicovitých konjugátů lze vhodně ovlivnit použitím lineárních kopolymerů o různých  $M_w$ . Podle stanovení počtu ramen se neprokázalo, že (v daném rozmezí  $M_w$  v této práci použitých lineárních kopolymerů) počet navázaných ramen je ovlivňován  $M_w$  lineárních kopolymerů. Oproti hvězdicovitému konjugátu typu A vedla 1,3-cykloadice azidu na trojnou vazbu DBCO skupin PAMAM dendrimerů k zavedení vyššího počtu

ramen. Může to být způsobeno tím, že vysoce reaktivní DBCO skupiny obou spojek (DBCO-NHS-ester a DBCO-S-S-NHS-ester) reagují selektivně s koncovými azidovými skupinami, což vede k vysokému výtěžku a vysokému počtu navázaných ramen. Počet ramen v nově syntetizovaném hvězdicovitém konjugátu byl vypočítán podle Rovnice 3 uvedené výše. Výtěžek přípravy vysokomolekulárního hvězdicovitého polymeru se zvyšoval u obou typů konjugátů se zvyšující se koncentrací reakční směsi. Teplota, koncentrace roztoku a použité rozpouštědlo nemá významný vliv na disperzitu nově syntetizovaných hvězdicovitých konjugátů. Získané konjugáty mají nízké hodnoty disperzity, ovšem vyšší, než u typu A. Vysvětlením může být určitá nehomogenita v počtu DBCO skupin zavedených na jednotlivé PAMAM dendrimery.

Při syntéze hvězdicovitých konjugátů za stejných reakčních podmínek (koncentrace, reakční teplota, rozpouštědlo) bylo dosaženo většího výtěžku v případě přípravy typu C. Předpokládáme, že to je způsobeno lepší přístupností DBCO skupin díky možné rotaci kolem disulfidické vazby.

### 5.2.3 Odchránění hydrazidových skupin a vazba Dox na hvězdicovitý polymer

Posledním krokem v přípravě hvězdicovitých polymerů vhodných pro navázání léčiva Dox je odchránění hydrazidových skupin, které se provádí pomocí kyseliny trifluoroctové. Odchránění probíhalo kvantitativně během 5 min inkubace. Charakterizace odchráněných hvězdicovitých konjugátů je uvedena v Tab. 8.

Tab. 8: Charakteristiky odchráněných konjugátů

	<i>Prekurzor</i>	$M_w$ (g/mol)	$M_n$ (g/mol)	$I_n^1$	<i>Obsah NHNH<sub>2</sub></i> (%)
$P_{DTB}(NHNH_2)_n$	$P_{DTB}2$	16 300	15 600	1,05	7,6
$S_A(NHNH_2)_n$	$S_A(Boc)_n4$	150 000	136 000	1,11	6,9
$S_C(NHNH_2)_n$	$S_C(Boc)_n4$	445 000	318 000	1,41	7,2

<sup>1</sup>disperzita hvězdicovitého konjugátu vypočítaná  $M_w/M_n$

Oba hvězdicovité polymery i lineární kopolymer obsahovaly okolo 7 % volných hydrazidových skupin, což bylo dostatečné množství pro následnou vazbu léčiva. Reakce



nevedla k výrazným změnám molekulové hmotnosti a disperzity hvězdicovitých konjugátů. V případě  $S_C(NHNH_2)_n$  bylo v reakční směsi nalezeno malé množství (cca 10 % celkového výtěžku) di-/tri- a případně tetramerů, jejich přítomnost a množství bylo potvrzeno vznikem vysokomolekulárního píku na GPC chromatogramu. Domníváme se, že vznikly reakcí ochráněných hydrazidových skupin jednoho hvězdicovitého konjugátu s volnými DBCO skupinami druhého hvězdicovitého konjugátu.

Vazba Dox na konjugáty, lineární i hvězdicovité, probíhá reakcí karbonylové skupiny Dox s hydrazidovými skupinami polymeru v přítomnosti kyseliny octové v metanolu.

Finální polymerní konjugát s léčivem byl zbaven nízkomolekulárních příměsí a volného Dox pomocí gelové chromatografie. Výsledný obsah léčiva se pohyboval v rozsahu od 6,6 hm% do 7,2 hm% (viz Tab. 9), což je dostatečný obsah léčiva pro navazující biologické experimenty. Výsledné polymery obsahovaly pod 0,2 % volného Dox, což je obsah volného léčiva, který nebude v dalších biologických experimentech významně ovlivňovat výsledky.

Tab. 9: Charakteristika polymerních konjugátů s Dox

	Prekurzor	$T$ (°C)	Čas (h)	$M_w$ (g/mol)	$M_n$ (g/mol)	$I_n^1$	Obsah Dox (hm%)
$P_{DTB}(Dox)_n$	$P_{DTB}(NHNH_2)_n$	25	48	17 400	16 300	1,07	7,2
$S_A(Dox)_n$	$S_A(NHNH_2)_n$	25	48	165 000	153 000	1,08	6,6
$S_C(Dox)_n$	$S_C(NHNH_2)_n$	25	48	491 000	351 000	1,40	7,1

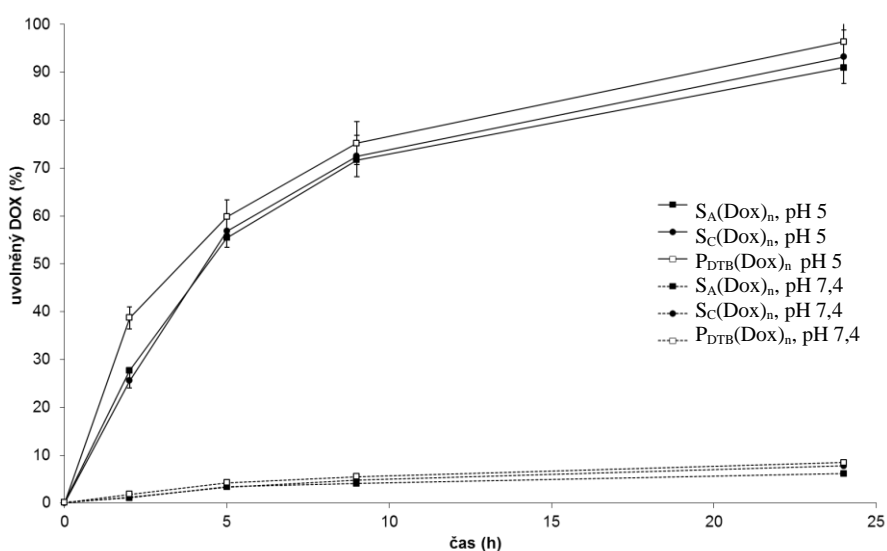
<sup>1</sup>disperzita hvězdicovitého konjugátu vypočítaná  $M_w/M_n$

Vazbou Dox na ochráněné hydrazidové skupiny nedošlo k výrazné změně disperzity systému. Mírný nárůst molekulové hmotnosti u všech polymerních konjugátů je způsoben navázáním molekul doxorubicinu. Ze stanoveného obsahu Dox je patrné, že detailní struktura polymerního nosiče neovlivňuje množství navázaného Dox na daný nosič.

## 5.3 Stanovení uvolňování léčiva a cytostatického efektu polymerních systémů

### 5.3.1 Uvolňování léčiva *in vitro*

Rychlost uvolňování Dox z konjugátů byla prováděna inkubací těchto systémů v pufrch o pH 7,4, model krevního řečiště, a pH 5,0, modelující pH prostředí v endozomech/lysozomech nádorových buněk, při teplotě 37 °C a následným stanovením obsahu uvolněného léčiva. Test *in vitro* byl proveden se všemi připravenými polymerními systémy, tedy s lineárním kopolymerem  $P_{DTB}(Dox)_n$ , nedegradovatelným hvězdicovitým konjugátem  $S_A(Dox)_n$  a redukčně degradovatelným  $S_C(Dox)_n$ .



Obr. 8: Závislost rychlosti uvolňování léčiva z polymerního nosiče při různém pH na čase

Všechny polymerní systémy uvolňují Dox v neutrálním pH jen velmi pozvolna (cca 7 % za 24 hod), zatímco ve slabě kyselém pH dochází k výraznému uvolňování léčiva (cca 90 % za 24 hod, viz Obr. 8). Rychlost uvolňování léčiva je ovlivněna použitou degradovatelnou spojkou mezi polymerním nosičem a léčivem, protože je ve všech použita stejná degradovatelná spojka, je rychlost uvolňování stejná ve všech případech a nijak nezávisí na  $M_w$  a stavu, zda je lineární polymer volný, či vázaný na PAMAM dendrimer.

### 5.3.2 Cytostatický efekt polymerních konjugátů vůči nádorovým liniím

Doxorubicin je cytostatikem běžně používaným v klinické praxi při léčbě mnoha druhů nádorových onemocnění. Tak jako u ostatních cytostatik je však jeho použití doprovázeno řadou nežádoucích účinků na lidský organismus, které by měly být potlačeny navázáním cytostatika na polymerní nosič. Zjištění rozdílů mezi účinky volné a polymerní formy léčiva je předmětem biologického testování. Jedním z nejdůležitějších testů potřebných k posouzení aktivity léčiva je zjištění cytotoxicity, kterou je možno pro určitý typ buněk testovat několika metodami. Jedna z nejcitlivějších metod využívá měření efektivity zabudování [<sup>3</sup>H]-thymidinu do buněk testované buněčné linie *in vitro*. Výsledky testů cytotoxicity, vyjádřené jako hodnota IC<sub>50</sub> (množství konjugátu, které z 50 % inhibuje proliferaci testovaných buněk), jsou uvedeny v Tab. 10. Experimenty byly provedeny za použití dvou nádorových linií.

Tab. 10. Hodnoty IC<sub>50</sub> pro polymerní konjugáty a volné léčivo stanovené na nádorových buňkách T-buněčného lymfomu EL4 a plicního karcinomu LL-2

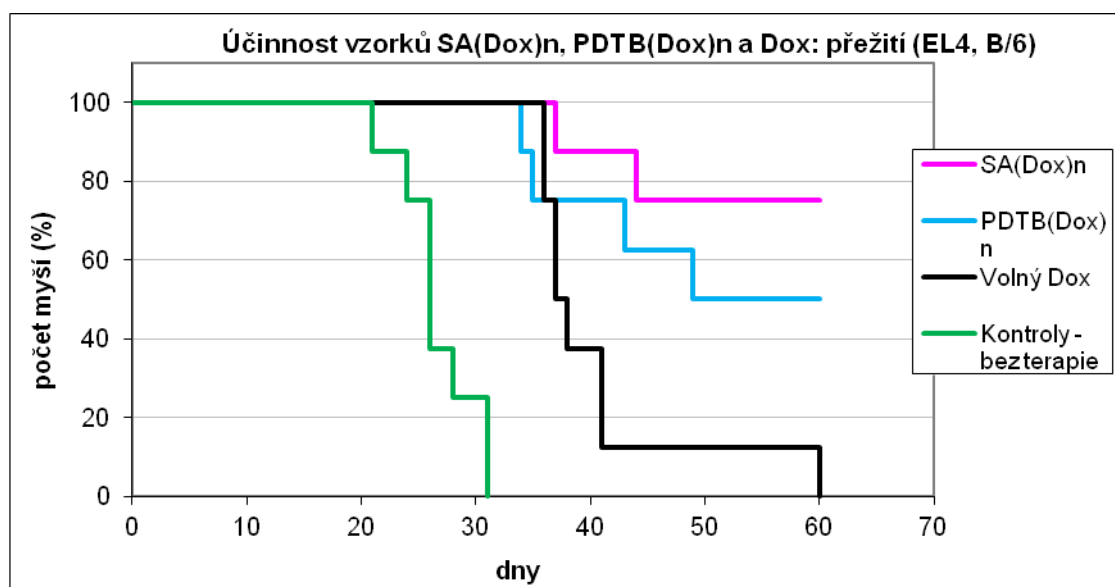
<i>Polymer</i>	IC <sub>50</sub>	
	<i>EL4 T-bun.lymfom (μg/ml)</i>	<i>LL2 plicní karcinom (μg/ml)</i>
P <sub>DTB</sub> (DOX) <sub>n</sub>	0,014	0,07
S <sub>A</sub> (DOX) <sub>n</sub>	0,025	0,22
S <sub>C</sub> (DOX) <sub>n</sub>	0,044	0,12
DoX	0,003	0,05

Volný Dox díky své velikosti proniká do buněk prostou difuzí. Tento proces je velmi rychlý a projevuje se značnou cytotoxicitou volného Dox (nízké IC<sub>50</sub>). Makromolekuly polymerních konjugátů s Dox mají významně větší rozměr a nemohou tedy do buněk pronikat difuzí, ale mnohem pomalejším procesem zvaným pinocytosa. Navíc musí nejprve dojít k uvolnění léčiva z polymeru. Výsledky provedených testů potvrdily vysokou cytotoxicitu Dox (velmi nízké hodnoty IC<sub>50</sub>). Avšak cytotoxicita konjugátů byla rovněž vysoká, blížila se téměř cytotoxicitě volného léčiva. Vysoká

cytotoxicita konjugátů s hydrazonově vázaným léčivem je nejspíše ovlivněna mechanismem uvolňování Dox, jelikož léčivo může být uvolněno z konjugátů jak v průběhu inkubace buněk (pomalu), tak po průniku do buňky (rychle). Při porovnání cytotoxicity u polymerních konjugátů je patrný mírný pokles se vzrůstem molární hmotnosti konjugátu. Vysvětlením této závislosti může být pomalejší průnik mnohem větších molekul přes plazmatickou membránu do buňky.

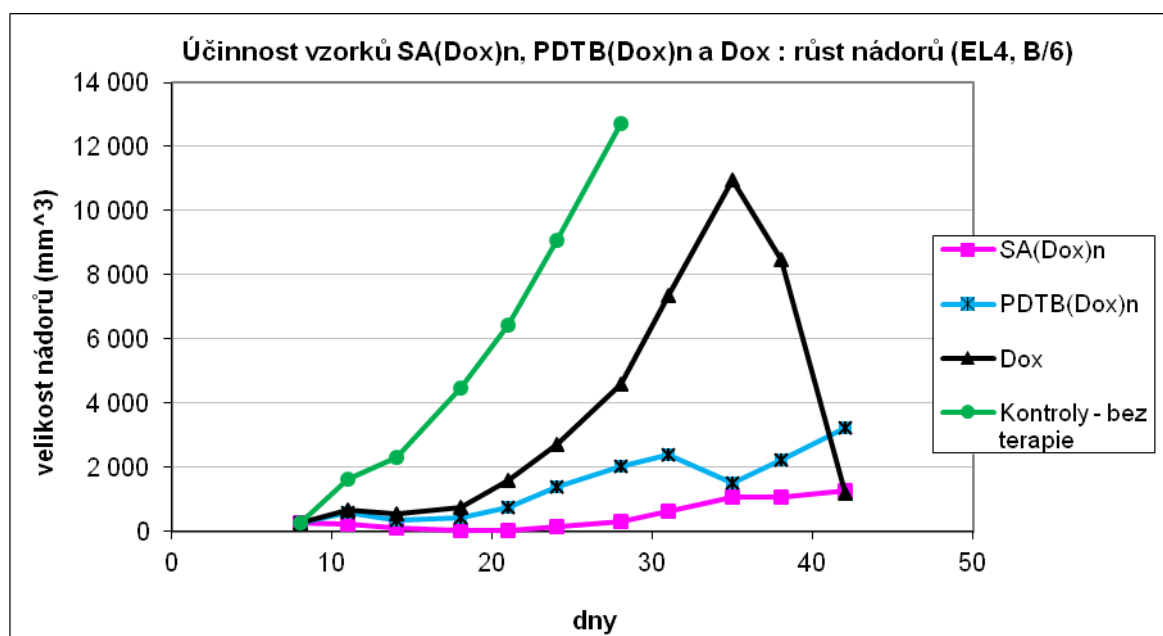
### 5.3.3 Protinádorová aktivita polymerních konjugátů

Protinádorová aktivita lineárního a hvězdicovitého polymerního konjugátu s Dox byla rovněž testována za použití laboratorních myších při léčbě T-buněčného lymfomu EL4. Tento typ nádoru je velmi agresivní a byl vybrán, protože jeho léčba volným Dox je téměř neúčinná a případná protinádorová aktivita polymerních konjugátů by měla být dobře patrná. Byl použit tzv. terapeutický model léčby, kdy je léčba zahájena až po znatelném vytvoření nádoru. Nízké dávkování 5 mg Dox (ekvivalent)/kg bylo zvoleno proto, aby byly patrné rozdíly v účinnosti oproti volnému léčivu i vůči použití různých polymerních struktur. Protinádorová aktivita jednotlivých polymerních nosičů je znázorněna na Obr. 9:



Obr. 9: Protinádorová aktivita  $S_A(\text{Dox})_n$ , lineárního polymeru  $P_{\text{DTB}}(\text{Dox})_n$  a volného léčiva při léčbě myšního EL4 T-buněčného lymfomu (5 mg Dox (ekvivalent)/kg).

Nejvyšší protinádorovou aktivitu při léčbě T-buněčného lymfomu vykázal vysokomolekulární hvězdicovitý konjugát  $S_A(\text{Dox})_n$ . Jednorázovým podáním terapeutické dávky 5 mg Dox (ekvivalent)/kg došlo k vyléčení a úplné regresi nádoru u 75 % myši. K rozvoji nádoru u nich nedošlo i po retransplatnaci – injikování nových nádorových buněk T-buněčného lymfomu EL4, avšak již bez nového podání léčiva. Protinádorová aktivita lineárního polymerního nosiče byla nižší než v případě vysokomolekulárního konjugátu (50 % úplně vyléčených při úplné regresi nádoru), což lze vysvětlit výraznějším uplatněním EPR efektu u vysokomolekulárního hvězdicovitého konjugátu. Volný Dox prodloužil přežití myši o přibližně dvojnásobnou dobu oproti kontrole bez léčby, avšak přesto všechny myši léčené volným léčivem uhynuly. Velikosti nádorů u experimentálních zvířat se významně lišily v závislosti na tom, jaká forma léčiva byla použita pro léčbu. Nejvýraznější nárůst novotvaru byl pozorován u kontrolního vzorku myši, kterým byl podán jen fyziologický roztok. Při podávání volného Dox byla rychlost nárůstu nádorů nižší než u neléčených kontrol, ale u všech zvířat nádory rostly. Prudký pokles velikosti nádorů je způsoben úhynem dvou myši s výrazně rozvinutým nádorem. Podání lineárního a hvězdicovitého polymerního konjugátu s Dox vázaným hydrazonovou vazbou vedlo k významnému snížení rychlosti růstu nádorů, které je více patrné při podání hvězdicovitého polymerního nosiče (viz Obr. 10)



Obr. 10: Průměrná velikost nádorů při použití  $S_A(\text{Dox})_n$ , lineárního polymeru  $P_{DTB}(\text{Dox})_n$  a volného léčiva při léčbě myšního EL4 T-buněčného lymfomu (5 mg Dox (ekvivalent)/kg).

## 6. Závěr

Hlavním cílem předkládané diplomové práce bylo navázat na současné poznatky o využití vodorozpustných polymerních nosičů léčiv při léčbě pevných nádorů. Práce byla zaměřena na přípravu nových polymerních nosičů – kopolymerů založených na *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu, které jsou pro organismus biokompatibilní, neimunogenní, vodorozpustné a umožňující pH-řízenou aktivaci léčiva v cílové nádorové tkáni. Struktura vysokomolekulárních polymerních nosičů byla v této práci navržena jako hvězdicovitá s cílem připravit polymerní nosič s úzkou distribucí molárních hmotností a zároveň s cílem dosáhnout co nejvyšší akumulace odvozených konjugátů s modelovým léčivem v pevných nádorech díky EPR efektu.

Bylo prokázáno, že pomocí RAFT polymerizace je možné připravit statistické kopolymery na bázi HPMA nesoucí chráněné hydrazidové skupiny vhodné po odchránění pro navázání molekul léčiv. Molekulová hmotnost těchto kopolymerů může být řízena změnou poměru složek v polymerní násadě, iniciátoru, CTA činidla a monomeru. Vhodným výběrem iniciátoru a CTA činidla je možné připravit „semitelechelické“ nebo „telechelické“ kopolymery, jejichž hlavní řetězec je zakončen jednou nebo dvěma reaktivními skupinami.

S využitím statistických kopolymerů na bázi HPMA byly úspěšně připraveny tři typy vysokomolekulárních hvězdicovitých polymerních konjugátů, které se lišily metodou vazby kopolymeru na centrální molekulu PAMAM dendrimeru a detailní strukturou. Hvězdicovitý konjugát s amidově vázanými polymerními „rouby“ byl připraven kondenzační reakcí z využitím karbodiimidové metody, přičemž nejvyšších výtěžků a zároveň nejvyššího počtu navázaných ramen bylo dosaženo použitím EDC jako kondenzačního činidla.

Počet navázaných ramen,  $M_w$  a výtěžek hvězdicovitých konjugátů připravených 1,3-cykloadicí koncové azidové skupiny polymerních „roubů“ na modifikovaný PAMAM dendrimer lze poměrně vhodně regulovat v širokém rozmezí koncentrací reakční směsi a  $M_w$  použitých polymerních „roubů“. Úspěšně byly připraveny lineární a hvězdicovité polymerní konjugáty s léčivem Dox navázaným hydrazonovou vazbou senzitivní k pH. Bylo potvrzeno, že detailní struktura polymerního nosiče (metoda vazby roubů na dendrimer,  $M_w$ ) významně neovlivňuje samotnou rychlost vazby léčiva hydrazonovou

vazbou senzitivní k pH na polymerní nosič, ani množství navázaného léčiva a dokonce ani rychlost uvolňování léčiva z nosiče, kdy v modelovém pufru při pH 7,4 došlo u všech nosičů shodně k uvolnění okolo 7 % za 24 hodin, zatímco v pufru o pH 5 došlo k uvolnění okolo 90 % léčiva za 24 hodin.

Výsledky testů cytotoxicity *in vitro* na nádorových buňkách prokázaly srovnatelnou cytotoxicitu, hodnotu  $IC_{50}$ , připravených lineárních a hvězdicovitých konjugátů vzhledem k cytotoxicitě volného léčiva. Protinádorová aktivita polymerních konjugátů testovaná *in vivo* za použití myšního T-buněčného lymfomu EL-4 potvrdila velmi vysokou terapeutickou účinnost polymerní konjugátů s Dox, které významným způsobem zpomalovaly růst nádoru, prodloužily dobu přežití a u některých laboratorních zvířat dopomohly k úplné nádorové regresi. Nejvyšší protinádorová účinnost byla jednoznačně prokázána u hvězdicovitého konjugátu o vyšší molekulové hmotnosti, což je s největší pravděpodobností způsobeno významnějším EPR efektem u polymerního konjugátu s vyšší  $M_w$ , u kterého dochází k prodloužení cirkulace celého systému v organismu a vyšší akumulaci polymerního nosiče v nádorové tkáni.

Předložená diplomová práce měla za cíl rozšířit a prohloubit poznatky vývoje polymerních nosičů určených pro léčbu pevných nádorů. Pozornost byla zaměřena na přípravu co nejlépe definovaných hvězdicovitých konjugátů, které byly použity pro přípravu konjugátů s Dox, vysoce účinných při terapii pevných nádorů. Tyto polymerní prekurzory však mohou sloužit i jako nosiče pro jiná léčiva, jejich kombinace, kombinaci léčiva s diagnostickou látkou, tzv. teranostika, čímž se otevírá velký potenciál využití popsaných polymerních nosičů při léčbě a diagnostice různých onemocnění.

## 7. Seznam literatury

- 1) <http://www.svod.cz/report.php?diag=C18&type=pdf>, citováno dne 24.6.2012
- 2) Hartl, J., Doležal, M., Miletín, M., Opletalová, V., Zimčík, P.: Farmaceutická chemie IV., nakladatelství Karolinum, Praha, Česká republika (2008)
- 3) Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A., Barenholz, Y.: *Cancer Res.*, 54, 987-992 (1994)
- 4) Rahman, A., Carmichael, D., Harris, M., Roh, J. K.: *Cancer Res.*, 46, 2295-2299 (1986)
- 5) Klener, P.; Klener jr., P.: Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii, Grada Publishing a.s., Praha, ČR, str. 73 a 158 (2010)
- 6) DelaFlor-Weiss, E., Uziely, B., Muggia, F. M.: *Ann. Oncol.*, 4, 723-733 (1993)
- 7) Rabišková, M.: *Remedia*, 17, 188-192 (2007)
- 8) Walsh, G., Spada, S.: Epogen/Procrit, v knize *Directory of approved biopharmaceutical products*, CRC press, Boca Raton, Florida, USA, str. 136-137 (2005)
- 9) Ho, R. J. Y., Gibaldi, M.: Hematopoetic growth factors and coagulation factors, v knize *Biotechnology and biopharmaceuticals: transforming proteins and genes into drugs*, Wiley-IEEE, Hoboken, New Jersey (USA), str. 139 - 158 (2003)
- 10) Matsumura, Y., Maeda, H.: *Cancer Res.*, 46, 6387-6392 (1986)
- 11) Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., *J. Controlled Release*, 65, 271-284 (2000)
- 12) Jain, R. K.: *Cancer Res.*, 47, 3039-3051 (1987)
- 13) Noguchi, Y., Wu, J., Duncan, R., Strohalm, J., Ulbrich, K., Akaike, T., Maeda, H.: *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 307-314 (1998)
- 14) Fox, M. E., Szoka, F. C., Fréchet, J. M. J.: *Acc. Chem. Res.*, 42, 1141-1151 (2009)
- 15) Owens, D. E. III., Peppas, N. A., *Int. J. Pharm.*, 307, 93-102 (2006)
- 16) Harding, S.: *Biophys.Chem*, 55, 69-93 (1995)
- 17) Uzgiris, E. E., Cline, H., Moasser, B., Grimmond, B., Amaratunga, M., Smith, J. F., Goddard, G.: *Biomacromolecules*, 5, 54-61 (2004)
- 18) Duncan. R.: *Adv. Drug Delivery Rev.*, 61, 1131-1148 (2009)
- 19) Breslow, D. S.: *Pure Appl. Chem.*, 49, 103-113 (1976)



- 20) Seymour, L. W.: J. Bioact. Comp. Polymers, 6, 178-216 (1991)
- 21) Ringsdorf, H.: J.Polym.Sci.Polym.Symp., 51, 135-153 (1975)
- 22) Drobník, J., Kopeček, J., Labský, J., Rejmanová, P., Exner, J., Saudek, V., Kálal, J.: Makromol. Chem., 177, 2833-2848 (1976)
- 23) Duncan, R., Kopeček, J.: Adv. Polym. Sci., 57, 51-101 (1983)
- 24) Lloyd, J. B., Duncan, R., Kopeček, J.: Pure Appl. Chem., 54, 1301-1304 (1984)
- 25) Duncan, R., Kopeček, J., Rejmanová, P. et al: Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj., 755, 518-521 (1983)
- 26) Kratz, F., Beyer, U., Schutte, M. T.: Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 16, 245-288 (1999)
- 27) Putnam, D., Kopeček, J.: Biopolymers, 122, 55-123 (1995)
- 28) Schacht, E. H., Vansteenkiste, S., Seymour, L. W.: Macromolecular Carriers for Drug Targeting, v knize The Practice of Medicinal Chemistry, (Kostelnik, R. J. ed.) Academic Press: New York, New York (USA), str. 718-736 (1996)
- 29) Morimoto, Y., Sugibayashi, K., Sugihara, S., Hsoya, K., Nozaki, S., Ogawa, S.: J.Pharmacobiodyn, 7, 688- 698 (1984)
- 30) Li, C.: Adv. Drug. Deliv. Rev., 54, 695-713 (2002)
- 31) Leopold, C. S., Friend, D.R.: J. Pharmacokine. Biopharm, 23, 397-406 (1995)
- 32) Martinez, A., Pendri, A., Greenwald, R.B.: Macromol. Chem. Phys., 198, 2489-2498 (1997)
- 33) Monfardini, C., Schiavon, O., Caliceti, P., Morpurgo, M., Harris, J.M., Veronese, F.M.: Bioconjug. Chem., 6, 62-69 (1995)
- 34) Herman, S., Hooftman, G., Schacht, E.: J. Bioact. Compat. Polym., 10, 145-187 (1995)
- 35) Zalipsky, S.: Bioconjug. Chem., 6, 150-165 (1995)
- 36) Zalipsky, S. Adv.Drug Deliv. Rev. 16, 157-182 (1995)
- 37) Davis, F. F.: Adv.Drug Deliv. Rev. 54, 457-458 (2002)
- 38) Veronese, F. M., Morpurgo, M.: Farmaco. 54, 497-516 (1999)
- 39) Šprincl, L., Vacík, J., Kopeček, J., Lím, D.: J. Biomed. Mater. Res., 5, 197-205 (1971)
- 40) Kopeček, J., Bažilová, H.: Eur. Polym. J., 9, 7-14 (1973)
- 41) Bohdanecký, M., Bažilová, H., Kopeček, J.: Eur. Polym. J. 10, 405-410 (1974)
- 42) Kopeček, J.: Makromol. Chem. 178, 2169-2183 (1977)

- 43) Kopeček, J., Rejmanová, P.: *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* 66, 15-32 (1979)
- 44) Putnam, D., Kopeček, J.: *Biopolymers* 122, 55-123 (1995)
- 45) Greish, K., Sawa, T., Fang, J., Akaike, T., Maeda, H.: *J. Control. Release*, 97, 219-230 (2004).
- 46) Chytil, P.: Polymerní nosiče léčiv na bázi HPMA kopolymerů usnadňující směřování do pevných nádorů a pH-řízenou aktivaci léčiva, Kandidátská disertační práce PřF UK Praha, katedra fyzikální a makromolekulární chemie, str. 17-21 (2007)
- 47) Etrych, T., Jelínková, M., Říhová, B., Ulbrich, K.: *J. Control. Release*, 73, 89-102 (2001)
- 48) Ulbrich, K., Šubr, V., Strohalm, J., Plocová, D., Jelínková, M., Říhová, B.: *J. Control. Release*, 64, 63-79 (2000)
- 49) Duncan, R., Hume, I. C., Kopečková, P., Ulbrich, K., Strohalm, J., Kopeček, J.: *J. Control. Release*, 10, 51-63 (1989)
- 50) Etrych, T., Kovář, L., Strohalm, J., Chytil, P., Říhová, B., Ulbrich, K.: *J. Control. Release*, 154, 241-248 (2011)
- 51) Torchilin, V. P.: *Pharm. Res.*, 24, 1-16 (2007)
- 52) Riess, G.: *Prog. Polym. Sci.*, 28, 1107-1170 (2003)
- 53) Aliabadi, H. M., Lavasanifar, A.: *Expert Opin. Drug Deliv.*, 3, 139-162 (2006)
- 54) Kwon, G. S., Naito, M., Kataoka, K., Yokoyama, M., Sakurai, Y., Okano, T.: *Colloid Surf. B*, 429-434 (1994)
- 55) Bader, H., Ringsdorf, H., Schmidt, B.: *Angew. Makromol. Chem.*, 123, 457-485 (1984)
- 56) Liggins, R. T., Burt, H. M.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 191-202 (2002)
- 57) Liu, J. B., Xiao, Y. H., Allen, C.: *J. Pharm. Sci.* 93, 132-143 (2004)
- 58) Nishiyama, N., Kataoka, K.: *Adv. Polym. Sci.* 193, 67-101 (2005)
- 59) Etrych, T., Strohalm, J., Chytil, P., Černoch, P., Starovoytova, L., Pechar, M., Ulbrich, K.: *Eur. J. Pharm. Sc.*, 42, 527-539 (2011)
- 60) De Duve, C., De Barsya, T., Poolea, B., Troueta, A., Tulkensa, P., Van Hoofa, F.: *Biochem. Pharmacol.*, 23, 2495-2515 (1974)
- 61) Šubr, V., Strohalm, J., Ulbrich, K., Duncan, R., Hume, I. C.: *J. Control. Release*, 18, 123-132 (1992)
- 62) Volk, T., Jahde, E., Fortmeyer, H. P., Glusenka, K. H., Rajewsky, M. F.: *Br. J. Cancer*, 68, 492-500 (1993)

- 63) Shen, W. C., Ryser, H. J. P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 102, 1048-1054 (1981)
- 64) Chytil, P., Etrych, T., Kříž, J., Šubr, V., Ulbrich, K.: *Eur. J. Pharm. Sci.*, 41, 472-482 (2010)
- 65) Tang, L.-Y., Wang, Y.-C., Li, Y., Du, J.-Z., Wang, J.: *Bioconjugate Chem.*, 20, 1095-1099 (2009)
- 66) Cerritelli, S., Velluto, D., Hubbel, J.A.: *Biomacromolecules*, 8, 1966-1972 (2007)
- 67) Barner-Kowollik, Ch.: *Handbook of RAFT Polymerization*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Federal Republic of Germany (2008)
- 68) Chiefari, J., Chong, Y. K., Ercole, E., Krstina, J., Jeffery, J., Le, T. P., Mayadunne, R. T. A., Meijs, G. F., Moad, C.L., Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S. H.: *Macromolecules* 31, 5559-5562 (1998)
- 69) Le, T. P., Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S. H., *Int. Pat.* 9801478, *Chem. Abstr.*, 128, 115390, 1998)
- 70) Delduc, P., Tailhan, C., Zard, S. Z.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 308-310 (1988)
- 71) Seymour, L. W., Miyamoto, Y., Maeda, H., Brereton, M., Strohal, J., Ulbrich, K., Duncan, R.: *Eur. J. Cancer*, 31A, 766-770 (1995)
- 72) Seymour, L. W., Duncan, R., Strohal, J., Kopeček, J.: *J. Biomed. Mater. Res.*, 21, 1341-1358 (1987)
- 73) Scales, C. W., Vasilieva, Y. A., Convertine, A. J., Lowe, A. B., McCormick, C. L.: *Biomacromolecules*, 6, 1846-1850 (2005)
- 74) <http://www.freepatentsonline.com/7179872.html>, citováno dne 12.6.2012
- 75) Perrier S., Takolpuckdee P, Mars, C. A., *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization: End Group Modification for Functionalized Polymers and Chain Transfer Agent Recovery*, *Macromolecules*, 38, 2033-2036 (2005)
- 76) Joullié, M. M., Lassen, K. M., *Evolution of amide bond formation*, *ARKIVOC* (viii), 189-250, (2010)
- 77) Maeda, H., Matsumura, Y., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6, 193-210 (1989)
- 78) Hrubý, M., *disertační práce, ÚMCH AV ČR a VŠCHT Praha*, 2005
- 79) Kratz, F., Beyer, U., Schutte, M. T. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 16, 245-288 (1999)
- 80) De Duve, C., De Barsya, T., Poolea, B., Troueta, A., Tulkensa, P., Van Hoofa, F. *Biochem. Pharmacol.*, 23, 2495-2515 (1974)

- 81) Pompella, A., Visvikis, A., Paolichi, A., De Tata, V., Casini A.F., *Biochem. Pharmacol.*, 66, 1499-1503 (2003)
- 82) Scales, S. W., Vasilieva, Y. A., Convertine, A. J., Lowe, A. B., McCormick, C. L., *Biomacromolecules*, 6, 1846-1850 (2005)
- 83) Faier, A., Charreyre, M. T., Pichot, Ch., *Polymer*, 45, 8661-8674 (2004)
- 84) Panyam, J. Labhasetwar, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 55, 329-347 (2003)
- 85) Dufés, Ch., Uchegbu, I. F., Schaetzlein, A. G., *Dendrimers in drug and gene delivery, Polymers in Drug Delivery*, Uchegbu, I. F., Schaetzlein, A. G., editors, CRC Press, Tailor and Francis, Chapter 13, 199-235 (2006)
- 86) Wang, D., Kopečková, P., Minko, T., Nanayakkara, V., Kopeček, J., *Biomacromolecules*, 1, 313-319 (2000)
- 87) Dvořák, M., Kopečková, P., Kopeček, J., *J. Controlled Release*, 60, 321-332 (1999)
- 88) Hong, C. Y, Pan, C. Y., *Macromolecules*, 39, 3517-3524 (2006)
- 89) Scales, C. W., Huang, F., Li, N., Vasilieva, Y. A., Ray, J., Convertine, A. J., McCormick, C. L., *Biomacromolecules*, 39, 6871-6881 (2006)
- 90) Yanjarappa, M. J., Gujraty, K. V., Joshi, A., Saraph, A., Kane, R. S., *Biomacromolecules*, 7, 1665-1670 (2006)
- 91) Liu, X., Quan, L.-D., Tian, J., Alnouti, Y., Fu, K., Thiele, G., Wang, D., *Pharm. Res.*, 25, 2910-2919 (2008)
- 92) Jia, Z., Wong, L., Davis, T. P., Bulmus, V., *Biomacromolecules*, 9, 3106-3113 (2008)

