

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Makromolekulární chemie

Studijní obor: Makromolekulární chemie



Bc. Kevin Kotalík

Makromolekulární systémy pro fotodynamickou terapii nádorů a inhibici klíčových proteinů zodpovědných za vícečetnou lékovou rezistenci

Macromolecular systems for photodynamic therapy of tumors and inhibition of key proteins responsible for multidrug resistance

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Konzultant: Ing. Vladimír Šubr, CSc.

Praha 2024

Prohlášení:

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

V Praze dne 15. 5. 2024

Podpis.....

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Tomáši Etrychovi, Ph.D., DSc. za konzultace k práci a její vedení, dále pak konzultantovi Ing. Vladimíru Šubrovi, CSc. za mnohé rady k mým chemickým problémům i za korektury práce. Poděkování patří i RNDr. Markétě Frejkové za pomoc jak v laboratoři, tak při četných konzultacích týkající se IAP inhibitorů, děkuji i za poskytnutí vzorku **P9**. Děkuji i všem ostatním kolegům z Oddělení biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR za poskytnutí přátelského pracovního prostředí. Dále bych rád poděkoval kolegyním z Oddělení analytické chemie a Oddělení strukturní analýzy ÚMCH AV ČR za provedení servisních měření. Děkuji také doc. RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. a Mgr. Alici Šimonové z Katedry analytické chemie PřF UK za provedení experimentů za použití kapilární elektroforézy. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během studia.

Abstrakt

Výzkum v oblasti cílené dopravy léčiv zaznamenal v posledních desetiletích velký rozvoj. Jedním z významných oborů, kde se tento princip studuje, je protinádorová terapie. Řada systémů pro cílenou dopravu léčiv (DDS) je založena na makromolekulárních nosičích, které jsou schopné akumulace v nádorové tkáni na základě efektu zvýšené propustnosti a zádrže (EPR efektu). Mezi tyto makromolekulární nosiče se řadí zejména polymerní nanočástice, polymerosomy, dendrimery, polymerní micely či vodorozpustné polymerní konjugáty. Zajímavým materiálem využitelným pro DDS je poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid] (PHPMA), který je vysoce hydrofilní, biokompatibilní a neinteraguje s krevními proteiny. PHPMA kopolymery umožňují inkorporaci funkčních skupin pro kovalentní vazbu léčiv pomocí stabilních či na stimul (např. pH či enzymatickou aktivitu) senzitivních vazeb. Mezi moderní přístupy k protinádorové terapii patří např. fotodynamická terapie (PDT), využívající fotosenzibilizátorů, které po ozáření generují cytotoxické reaktivní kyslíkové radikály (ROS). Dalším trendem v léčbě onkologických onemocnění je použití inhibitorů antiapoptotických proteinů (IAP), které zvyšují účinnost protinádorových terapií v kombinaci s klasickými cytostatiky. Při léčbě pokročilých či vysoce rezistentních nádorů je často potřeba pro úspěšnou léčbu kombinovat více takovýchto terapeutických přístupů. Předmětem této diplomové práce je návrh, syntéza a fyzikálně-chemická charakterizace nových DDS použitelných v protinádorové terapii. Úspěšně byly syntetizovány a charakterizovány vodorozpustné polymerní konjugáty nesoucí proléčiva využitelná v PDT, kyselinu 5-aminolevulovou (5-ALA) či její hexylester (HAL), připojená k PHPMA nosiči pomocí pH senzitivní hydrazonové vazby. První generace těchto konjugátů byla založena na polymerních nosičích s velikostí pod limitem renální filtrace, druhá generace na vysokomolekulárních polymerech obsahujících biodegradovatelné vazby. Dále byly úspěšně připraveny PHPMA systémy nesoucí IAP inhibitor LCL-161 připojený pomocí hydrazonové vazby či pomocí enzymaticky štěpitelné spojky Val-Cit-pAB. Úspěšně byl rovněž syntetizován biodegradovatelný roubovaný kopolymer PCL-*g*-PHPMA, který se ve vodném prostředí samouspořádává do micelárních struktur, které byly využity pro enkapsulaci IAP inhibitoru AZD-5582. Všechny připravené systémy budou dále biologicky testovány pro prokázání jejich účinnosti, a tedy potvrzení jejich potenciálu jako DDS v rámci protinádorové léčby.

Klíčová slova: polymer, RAFT polymerizace, léčivo, fotodynamická terapie, vícečetná léková rezistence

Abstract

The research in the field of drug delivery systems has been extensively studied in the past decades. One of the fields where this principle is applied, is anticancer therapy. Many drug delivery systems (DDS) are based on macromolecular carriers, which are able to accumulate in the tumor tissue due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect. Those macromolecular carriers are mostly based on polymer nanoparticles, polymerosomes, dendrimers, polymer micelles or water-soluble polymer conjugates. An interesting polymer material applicable in DDS is poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] (PHPMA), which is highly hydrophilic, biocompatible and non-fouling to plasma proteins. PHPMA copolymers enable incorporation of functional groups for covalent drug attachment via stable or stimuli (e.g. pH or enzymatic activity) sensitive bonds. Modern approaches to anticancer therapy are e.g. photodynamic therapy (PDT), which uses photosensitisers, compounds able to generate cytotoxic reactive oxygen species (ROS) upon irradiation. Another trend is the usage of inhibitors of antiapoptotic proteins (IAP), which are able to increase the therapeutic effect in combination with classical cytostatics. In the treatment of advanced or highly resistant tumors, combination of such therapies is key to successful treatment. The topic of the diploma thesis presented is the design, synthesis and physico-chemical characterization of new DDS applicable in anticancer therapy. Water-soluble polymer conjugates bearing prodrugs for PDT, 5-aminolevulinic acid (5-ALA) or its hexyl ester (HAL) connected to a PHPMA carrier via pH sensitive hydrazone bond, were successfully synthesized. The first generation of those conjugates was based on polymer carriers of a size below the renal filtration limit, while the second generation was based on high molar mass polymers containing biodegradable bonds. Moreover, a successful synthesis of PHPMA systems bearing IAP inhibitor LCL-161 linked via hydrazone bond or enzymatically cleavable linker Val-Cit-pAB was successfully completed. Finally, the synthesis of biodegradable graft copolymer PCL-*g*-PHPMA, which self-assembles into micellar structure in aqueous solutions, was successfully performed. The micelles were used to encapsulate IAP inhibitor AZD-5582. All prepared systems will be biologically tested to prove their efficacy, and thus confirm their potential as DDS in anticancer therapy.

Keywords: polymer, RAFT polymerization, drug, photodynamic therapy, multidrug resistance

[IN CZECH]

Obsah

1	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
1.1	Cílená doprava léčiv	11
1.2	Polymerní systémy pro cílenou dopravu léčiv	13
1.2.1	Vodorozpusitelné polymerní konjugáty	15
1.2.2	Polymerní micely.....	18
1.3	Vazba aktivních látek na polymerní nosič.....	20
1.4	Moderní přístupy k protinádorové terapii.....	23
2	CÍLE PRÁCE	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	Použité chemikálie	26
3.2	Syntetické postupy	29
3.2.1	Syntéza monomerů	29
3.2.2	Syntéza přenosového činidla	31
3.2.3	Syntéza derivátu léčiva.....	32
3.2.4	Syntéza polymerních prekurzorů.....	34
3.2.5	Kovalentní vazba léčiv	37
3.2.6	Enkapsulace hydrofobního léčiva.....	38
3.3	Metody.....	38
3.3.1	Rozměrově vylučovací chromatografie (SEC).....	38
3.3.2	Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	39
3.3.3	Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI MS).....	39
3.3.4	Dynamický rozptyl světla (DLS).....	39
3.3.5	UV-VIS spektrofotometrie	39
3.3.6	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	40
3.3.7	Stanovení obsahu funkčních skupin a aktivních látek.....	40
3.3.8	Stanovení CMC	42
3.3.9	Studium kinetiky uvolňování léčiv z polymerních nosičů	42
3.3.10	Elementární analýza	43
3.3.11	Frakcionace tokem v asymetrickém poli (FFF).....	43
3.3.12	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS).....	44
3.3.13	Stanovení elektroforetické mobility	45
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	46
4.1	Polymerní systémy pro dopravu prekurzorů biosyntézy protoporphyrinu IX pro fotodynamickou terapii.....	46
4.2	Polymerní systémy pro dopravu sloučenin inhibujících antiapoptotické proteiny IAP	56
4.2.1	Polymerní systémy nesoucí léčivo LCL-161.....	57
4.2.2	Polymerní systémy nesoucí léčivo AZD-5582.....	70

5	ZÁVĚR.....	80
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	82

Seznam použitých zkratk

5-ALA	kyselina 5-aminolevulová
ADC	konjugát protilátka-léčivo (z angl. <i>antibody-drug conjugate</i>)
AIBN	2,2'-azobis(2-methylpropionitril)
APDC	konjugát protilátka-polymer-léčivo (z angl. <i>antibody-polymer-drug conjugate</i>)
APMA-Boc	<i>N</i> -(3-(<i>tert</i> -butoxykarbonyl)-aminopropyl)methakrylamid
β -Ala	β -alanin
BCN	bicyklo[6.1.0]non-4-ynové skupiny
BCN-PEG2-NH ₂	<i>N</i> -[(1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-bicyklo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxykarbonyl]-1,8-diamino-3,6-dioxaoktan
Bis-dodecyl-TTc	butan-1,4-diylbis(4-kyano-4-[(dodecylsulfanylthiokarbonyl)sulfanyl]pentanoát
Bis-MPA	bis(hydroxymethyl)propionová kyselina
Bzl-Arg-Nap	<i>N</i> ^{α} -benzoyl- <i>L</i> -arginin-4-nitroanilid hydrochlorid
C ⁴ D	kapacitně vázaná bezkontaktní vodivostní detekce (z angl. <i>capacitively-coupled contactless conductivity detector</i>)
CMC	kritická micelární koncentrace (z angl. <i>critical micellar concentration</i>)
CTA	přenosové činidlo (z angl. <i>chain transfer agent</i>)
DCM	dichloromethan
DDS	systém pro cílenou dopravu léčiv (z angl. <i>drug delivery system</i>)
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DLS	dynamický rozptyl světla (z angl. <i>dynamic light scattering</i>)
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamid
DMAP	4-(dimethyl)aminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethyl sulfoxid
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid hydrochlorid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EPR efekt	efekt zvýšené propustnosti a zádrže (z angl. <i>enhanced permeability and retention effect</i>)
Ethyl-TTc-IBN	<i>S</i> -2-kyano-2-propyl <i>S'</i> -ethyl trithiokarbonát
Ethyl-TTc-N ₃	<i>N</i> -(3-azidopropyl)-4-kyano-4-ethylsulfanylkarbothioylsulfanyl pentanamid
ϵ -CL	ϵ -kaprolakton
ESI MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (z angl. <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>)
FFF	frakcionace tokem v asymetrickém poli (z angl. <i>field flow fractionation</i>)

GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (<i>z angl. gas chromatography-mass spectrometry</i>)
HAL	<i>n</i> -hexyl-5-aminolevulinát
HEMA	hydroxyethylmethakrylát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>z angl. high performance liquid chromatography</i>)
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
IAP	<i>z angl. inhibitor of apoptosis protein</i>
INI-N ₃	<i>N</i> -(3-azidopropyl)-4-[3-(3-azidopropylkarbamoyl)-1-kyano-1-methylpropylazo]-4-kyano-4-methylbutyramid
LDA	diisopropylamid lithný
Ma-Acap-NHNH-Boc	<i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxykarbonyl)- <i>N'</i> -(6-methakrylamidohexanoyl)hydrazin
Ma-Acap-TT	3-(6-methakrylamidohexanoyl)thiazolidin-2-thion
Ma-βAla-NHNH-Boc	<i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxykarbonyl)- <i>N'</i> -(3-methakrylamidopropanoyl)hydrazin
MALS	víceúhlový rozptyl světla (<i>z angl. multi angle light scattering</i>)
Ma-NHNH-Boc	<i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxykarbonyl)- <i>N'</i> -(methakryloyl)hydrazin
N ₃ -VCP-PNP	6-azidohexanoyl-valyl-citrullyl-(4-aminobenzyl)-(4-nitrophenyl)-karbonát
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAMAM	poly(amidoamin)
PCL	poly(ε-kaprolakton)
PDA	<i>z angl. photodiode array</i>
PEO	poly(ethylenoxid)
PGA	poly(glykolid)
PHPMA	poly[<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid]
PLA	poly(laktid)
PMMA	poly(methylmethakrylát)
PNIPAM	poly(<i>N</i> -isopropylakrylamid)
POx	poly(oxazoliny)
PPIX	protoporfyrin IX
PPO	poly(propylenoxid)
PPz	poly(fosfazeny)
prg	propargylové skupiny
PS	fotosenzibilizátor (<i>z angl. photosensitizer</i>)
PVP	poly(<i>N</i> -vinylpyrrolidon)
RAFT	<i>z angl. reversible addition-fragmentation chain transfer</i>
RVO	rotační vakuová odparka

SAXS	malouhlový rozptyl rentgenového záření (<i>z angl. small angle X-ray scattering</i>)
SEC	rozměrově vylučovací chromatografie (<i>z angl. size exclusion chromatography</i>)
SMAC	<i>z angl. second mitochondria-derived activator of caspase</i>
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TT	thiazolidin-2-thionové skupiny
V-70	2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril)

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Vzhledem ke skutečnosti, že nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve světě, je neustále vyvíjen tlak na zlepšování současných léčebných postupů a zavádění nových účinnějších léčiv. Již několik desetiletí je intenzivně studován koncept cílené dopravy léčiv (*angl. drug delivery*), zejména chemoterapeutik či jiných biologicky aktivních látek. Tento koncept je založen na požadavku selektivní akumulace léčiva v nádorové tkáni oproti tkáni zdravé, který má za důsledek zlepšení terapeutické účinnosti a snížení vedlejších účinků. Systémy pro cílenou dopravu léčiv (DDS, z *angl. drug delivery systems*) jsou často založeny na makromolekulárním nosiči, který zajišťuje prodloužení cirkulace v krevním řečišti a na základě efektu zvýšené propustnosti a zádrže (viz kapitola 1.1) umožňuje akumulaci léčiva v nádorové tkáni. Tyto systémy mohou být založeny na vodorozpustných polymerech, dendrimerech, polymerních micelách či nanočásticích, lipozomech, polymerozomech či jiných strukturách¹.

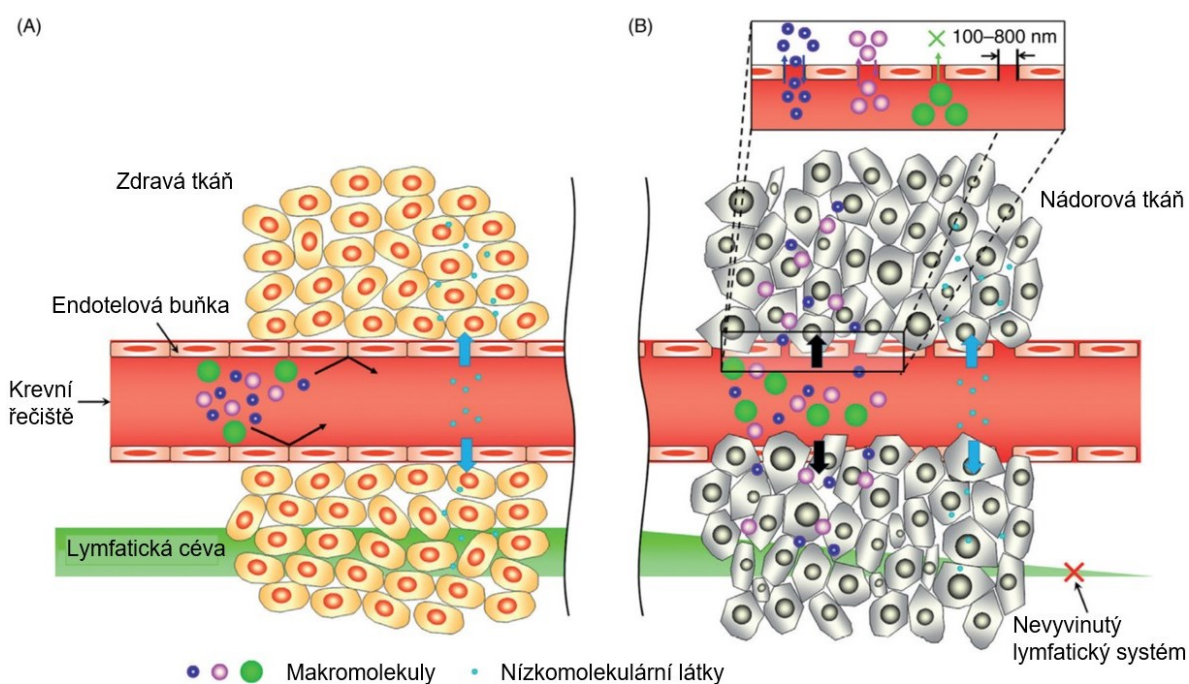
V posledních letech je trendem kombinovat více než jeden terapeutický přístup pro experimentální léčbu nádorových buněk s cílem navýšit samotnou terapeutickou účinnost a zajistit účinnou terapii i přes heterogenní povahu nádoru, která způsobuje často rezistenci na monoterapie. Mezi moderní kombinované terapeutické přístupy patří např. fotodynamická terapie (PDT) či použití tzv. IAP inhibitorů pro potenciaci konvenčních cytostatik.

Tato diplomová práce přispívá k tomuto trendu návrhem, syntézou a fyzikálně-chemickou charakterizací vodorozpustných či micelárních makromolekulárních systémů pro cílenou dopravu prekurzorů protoporfyrinu IX (PPIX) pro využití ve fotodynamické terapii či pro dopravu IAP inhibitorů do nádorové tkáně.

1.1 Cílená doprava léčiv

Jak již bylo výše zmíněno, cílené dopravy léčiv lze dosáhnout pomocí makromolekulárních nosičů. Koncept spočívá ve vazbě léčiva na makromolekulární strukturu, která zaručí dostatečně dlouhou cirkulaci v krevním oběhu, během které je léčivo inaktivní a z nosiče se nijak neuvolňuje. Díky své makromolekulární struktuře je takové léčivo přednostně akumulováno v pevných nádorech, kde je schopen nosič vstoupit do buněk pomocí endocytózy. Léčivo je poté uvolněno z nosiče (např. díky využití stimul-senzitivních vazeb) přímo v nádorových buňkách a samotný nosič je posléze z těla vyloučen, nejčastěji glomerulární filtrací. Dojde tak k preferenční akumulaci léčiva v nádoru, a tedy ke zefektivnění jeho účinnosti a snížení vedlejších účinků na zdravé části organismu. V mnohých případech také polymerní nosiče pomáhají s rozpustností léčiv, která musí být sama o sobě podána s pomocí lékových forem, např. olejových kapek¹. Pro dosažení zmíněných požadavků musí polymerní nosič využitelný pro DDS splňovat několik podmínek. Musí být biokompatibilní (netoxický, neimunogenní) a vylučitelný z organismu po řízeném uvolnění léčiva.

DDS mohou být v nádorové tkáni akumulovány především dvěma způsoby. Pasivně směřované systémy jsou v nádorové tkáni zachycovány na základě efektu zvýšené propustnosti a zadržky (EPR efekt, z *angl. enhanced permeability and retention effect*), který byl popsán v roce 1986 Hiroshi Maedou². Tento jev spočívá v prostupu makromolekul do nádorové tkáně na základě jejich velikosti. Nádorová vaskulatura je kvůli rychlému růstu nádorové tkáně nedokonale vyvinutá, není těsná jako zdravá tkáň a umožňuje vstup makromolekul do nádorového mezibuněčného prostoru. Nedokonale vyvinutý lymfatický systém, který nedokáže odvádět jak DDS, tak uvolněné léčivo, dále přispívá ke zvýšení akumulace makromolekulárních systémů v pevných nádorech. Zdravá tkáň se těmito charakteristikami nevyznačuje, a tak makromolekulární nosiče léčiv neprostupují do zdravých částí organismu, čímž jsou zdravé buňky daleko méně vystaveny vedlejším účinkům dopravovaných léčiv. Princip EPR efektu je schematicky znázorněn na obrázku č. 1. Velikost EPR efektu a míra akumulace v nádorové tkáni závisí na hydrodynamickém rozměru DDS a může být zásadně ovlivněna podáním vazodilatačních látek, např. NO donorů či bradykininu³.



Obrázek č. 1 – Schematické znázornění EPR efektu. (A) zdravá tkáň, (B) nádorová tkáň. Převzato a upraveno z⁴.

Aktivně směřované systémy pro cílenou dopravu léčiv jsou do nádoru směřovány nejen díky EPR efektu, ve své struktuře obsahují navíc směřující ligand, který je specifický pro receptor či jinou strukturu, která se přednostně nebo nadměrně vyskytuje v nádorové tkáni⁵. Aktivního směřování lze dosáhnout pomocí ligandů různé chemické povahy⁶. Například pro směřování k jaterním nádorům je často využíváno ligandů na bázi galaktosy, naopak mannosy a její deriváty směřují do imunitních buněk^{7,8}. Ligandy na bázi proteinů, či ještě častěji na bázi krátkých peptidových sekvencí jsou využívány pro směřování do mnoha různých typů tkání,

nejznámější je sekvence Arg-Gly-Asp (RGD), jež je specificky rozpoznávána integrinem $\alpha_v\beta_3$ ⁹. Nelze však opomenout ani struktury na bázi hormonů (též peptidové povahy) či vitaminů (např. folát)¹⁰. V poslední době je též velmi populární směřování pomocí specifických protilátek, kterého se využívá u konjugátů protilátka-léčivo (ADC, z *angl. antibody-drug conjugate*), popř. protilátka-polymer-léčivo (APDC, z *angl. antibody-polymer-drug conjugate*), kde je navíc léčivo konjugováno k polymernímu nosiči. Tyto makromolekulární konstrukty jsou slibné zejména na poli personalizované terapie¹¹. Jejich hlavní výhodou je vysoká účinnost, nevýhodou naopak zaměření na velmi úzký výběr nádorových onemocnění a jejich syntéza není jednoduše škálovatelná.

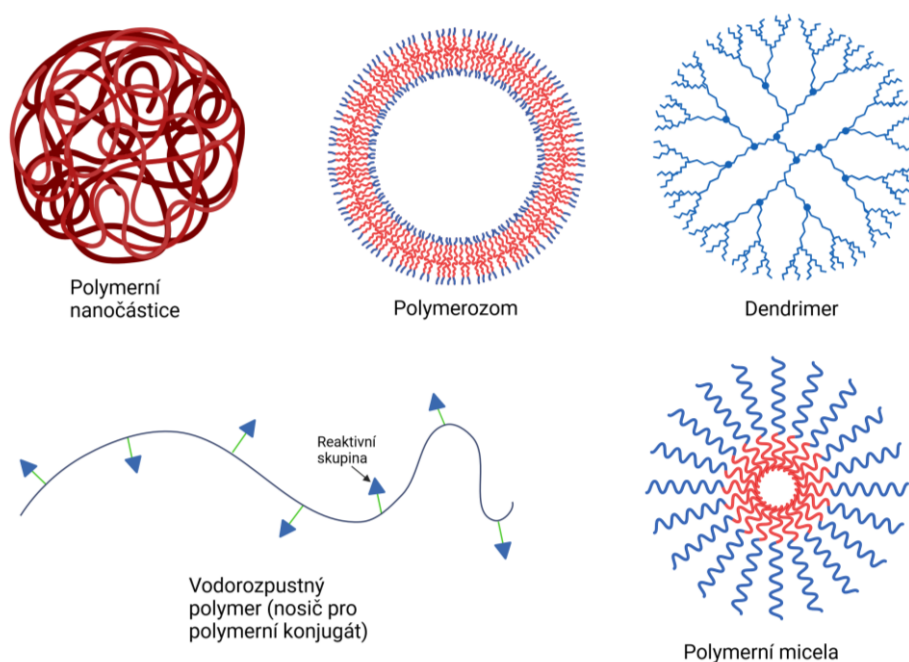
1.2 Polymerní systémy pro cílenou dopravu léčiv

Polymerní materiály jsou s oblibou využívány jako nosiče pro cílenou dopravu léčiv. Z hlediska materiálové povahy lze proto DDS dělit na základě několika kritérií. Z hlediska původu materiálu mohou být rozlišeny DDS na bázi přírodních či syntetických polymerů. Použití přírodních polymerů, zejména polysacharidů (např. chitosan, dextran) či proteinů (nejčastěji albumin), je výhodné z hlediska biodegradability či biokompatibility, je však limitováno z hlediska strukturní variability, navíc tyto systémy mohou být po modifikaci léčivem imunogenní^{12,13}. Naopak na poli syntetických polymerů je velkou výhodou variabilita použitelných struktur za předpokladu zachování biokompatibility a dalších podmínek (viz kapitola 1.1).

Druhým hlediskem dělení polymerních nosičů léčiv je jejich degradovatelnost. Pro cílenou dopravu léčiv mohou být použity polymery jak biodegradovatelné, tak polymery nedegradovatelné. Pojem biodegradabilita je definován jako degradace hlavního polymerního řetězce v živých organismech či v podmínkách živé organismy simulující. Jedná se převážně o hydrolytické či enzymově katalyzované reakce. Mezi biodegradovatelné polymery se řadí např. hydrolyticky labilní polyestery poly(ϵ -kaprolakton) – PCL, poly(laktid) – PLA, poly(glykolid) – PGA a polykarbonáty či poly(fosfazeny) – PPz, typickým zástupcem enzymově degradovatelných polymerů jsou poly(aminokyseliny) (např. poly(L-lysin) či poly(L-glutamová kyselina))¹⁴. Nedegradovatelné polymery se vyznačují neštěpitelným hlavním řetězcem, obsahujícím nejčastěji pouze C-C vazby. Mezi tyto nosiče se tedy řadí všechny polymery vznikající z vinylových monomerů (např. poly(*N*-vinylpyrolidon) - PVP, poly(methylmethakrylát) – PMMA, poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid] – PHPMA, a další). Nedegradovatelné jsou však i jiné polymery používané v medicíně, např. poly(ethylenoxid) – PEO či poly(oxazoliny) – POx. Pro zajištění vylučitelnosti těchto nedegradovatelných polymerů je nutné, aby se jejich hydrodynamický průměr pohyboval pod limitem renální filtrace, který má pro tyto polymery hodnotu okolo 10 nm. Při překročení tohoto limitu jsou tyto polymery stále vylučitelné hepatobiliární cestou, nicméně cirkulují v těle podstatně déle¹⁵.

Neméně důležitým parametrem polymerních materiálů je jejich hydrofilie. Hydrofilní polymery jsou využívány často jako materiál pro vodorozpustné polymerní konjugáty (viz kapitola 1.2.1.) či jako hydrofilní část amfifilních systémů (pro tvorbu nadmolekulárních struktur, zejména micel, polymerozomů). Hydrofobní polymery jsou používány pro tvorbu polymerních nanočástic nebo jako hydrofobní část již zmíněných amfifilních systémů.

Ze všech těchto materiálů lze připravit velkou variabilitu struktur, ať už lineárních, větvených či síťovaných. Tyto struktury jsou vhodné pro přípravu různých typů architektur polymerních nosičů, z nichž nejznámější jsou: polymerní nanočástice, polymerozomy (či jejich analoga lipozomy na bázi lipidů), polymerní micely, dendrimery či vodorozpustné polymerní konjugáty (viz obrázek č. 2).



Obrázek č. 2 – Architektury polymerních nosičů pro cílenou dopravu léčiv. Vytvořeno s pomocí Biorender.com.

Polymerní nanočástice jsou hydrofobní nadmolekulární útvary s výhodou rozměru pod 200 nm. Při větším rozměru dochází k jejich vychytávání retikuloendoteliálním systémem, což vede k nežádoucí změně farmakokinetiky a indukce imunitní reakce. K tomuto záchytu však může dojít i přesto, že nanočástice má rozměr pod 200 nm. Nicméně, lze tomu však zabránit pomocí povrchové modifikace hydrofilním polymerem (nejčastěji PEO), který zajistí zvýšenou biokompatibilitu těchto nanočástic. Naopak pro syntézu samotných nanočástic se používají hydrofobní polymery, např. PCL, PLA či přírodní chitosan¹⁶.

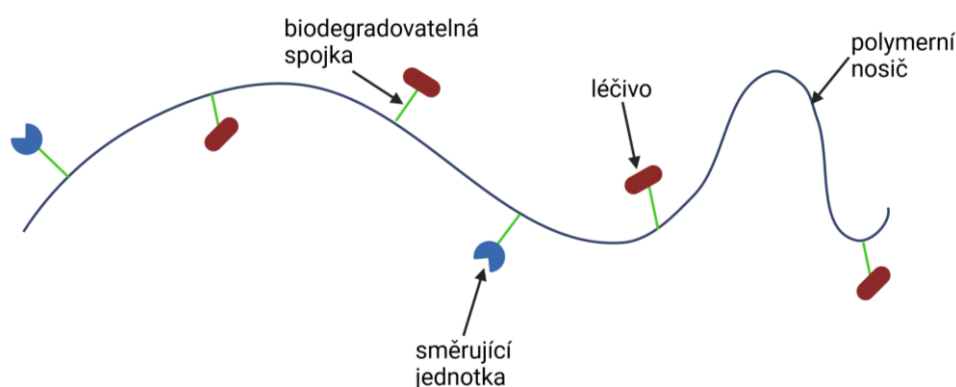
Polymerozomy jsou polymerní analoga lipozomů. Jedná se o duté vezikuly tvořené amfifilními kopolymery (na bázi stejných materiálů jako polymerní micely), jejichž hydrofobní vrstva je obalená hydrofilním jádrem a obalem. Výhodou je možnost enkapsulace jak hydrofobních, tak hydrofilních léčiv¹⁷.

Dendrimery jsou vysoce větvené polymery sestávající z jádra, ze kterého vyrůstají jednotlivé větve. Výhodou těchto systémů je jejich dobře definovaná molární hmotnost umožněná postupnou syntézou (na rozdíl od polymerizací připravených vysoce větvených polymerů, jejichž distribuce molárních hmotností je často velmi široká). Dendrimery lze použít jako takové pro vazbu léčiva nebo pro syntézu vysokomolekulárních hvězdicových polymerních systémů složených z dendrimerního jádra a ramen z lineárních polymerů. Nejvýznamnějšími zástupci dendrimerů z hlediska materiálů jsou nedegradovatelný poly(amidoamin) – PAMAM či víceramenný PEO, naopak biodegradabilitu vykazuje dendrimer na bázi 2,2-bis(hydroxymethyl)propionové kyseliny (bis-MPA) či polylysinový dendrimer¹⁸.

Vodorozpustným polymerním konjugátům a polymerním micelám jsou věnovány následující podkapitoly.

1.2.1 Vodorozpustné polymerní konjugáty

Systémy pro cílenou dopravu léčiv na bázi hydrofilních polymerů se začaly studovat v sedmdesátých letech minulého století. První model pro takovéto sloučeniny navrhl Helmut Ringsdorf. Systém se stabilním či biodegradovatelným polymerním řetězcem obsahoval solubilizující netoxickou část, dále farmakologicky aktivní část nesoucí léčivo a část nazvanou jako transportní systém, která zajišťovala cílenou dopravu do místa účinku¹⁹. Tento model následně zjednodušil Jindřich Kopeček, který navrhl vodorozpustné polymerní konjugáty tak, jak jsou známy dnes. Polymerní konjugát je tvořený vodorozpustným polymerním řetězcem (v Kopečkově případě PHPMA), na který je přes biodegradovatelnou spojku navázáno léčivo. Polymerní konjugát může také obsahovat směřující jednotku navázanou na polymer v případě aktivně cíleného systému²⁰. Oproti Ringsdorfovu modelu tak odpadá solubilizující část systému, která je zajištěna hydrofilní povahou samotného polymerního řetězce. Kopečkův model je znázorněn na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3 – Kopečkův model vodorozpustného polymerního konjugátu. Vytvořeno s pomocí Biorender.com.

Nejdéle zkoumaným vodorozpustným polymerem je PEO, který je syntetizován aniontovou polymerizací ethylen oxidu (oxiranu). Hlavní výhodou PEO je jeho komerční dostupnost

v širokém rozsahu molárních hmotností, s velmi nízkou disperzitou a se širokou škálou dobře definovaných koncových skupin. Nevýhodou je však možnost modifikace pouze koncových skupin, na jednu molekulu PEO tak lze navázat maximálně dvě molekuly léčiva¹. Kopolymerace ethylen oxidu s funkcionalizovanými monomery často bývá synteticky obtížná. V poslední době se také kvůli nadužívání PEO nejen na poli DDS začínají objevovat u určité části populace tzv. „anti-PEO“ protilátky. Tento polymer tak již není zcela neimunogenní²¹. V současné době se PEO proto používá spíše pro přípravu povrchově modifikovaných lipozomů, nanočástic nebo proteinů než jako nosič pro vodorozpustné polymerní konjugáty. Dnes jsou proto na trhu schválené systémy obsahující povrchové modifikace tímto polymerem, naopak vodorozpustné konjugáty na bázi PEO se již skoro nestudují.

Dobrou alternativou k polymerním konjugátům na bázi PEO jsou systémy s polymerním řetězcem tvořeným POx. Tyto polymery lze připravit kationtovou polymerizací oxazolinů za otevření kruhu. Tato polymerizace poskytuje polymery o široké škále molárních hmotností a s nízkou disperzitou. Volbou postranního řetězce monomeru je pak volena hydrofilie systému – poly(methyloxazolin) je vodorozpustný, poly(ethyloxazolin) a poly(isopropyloxazolin) vykazují termoresponzivní charakter a poly(butyloxazolin) či poly(fenyloxazolin) jsou již hydrofobní, a tedy ve vodě nerozpustné. Výhodou poly(oxazolinů) oproti PEO je možnost statistické kopolymerizace s funkcionalizovanými komonomery, což umožňuje vazbu léčiva i podél řetězce²².

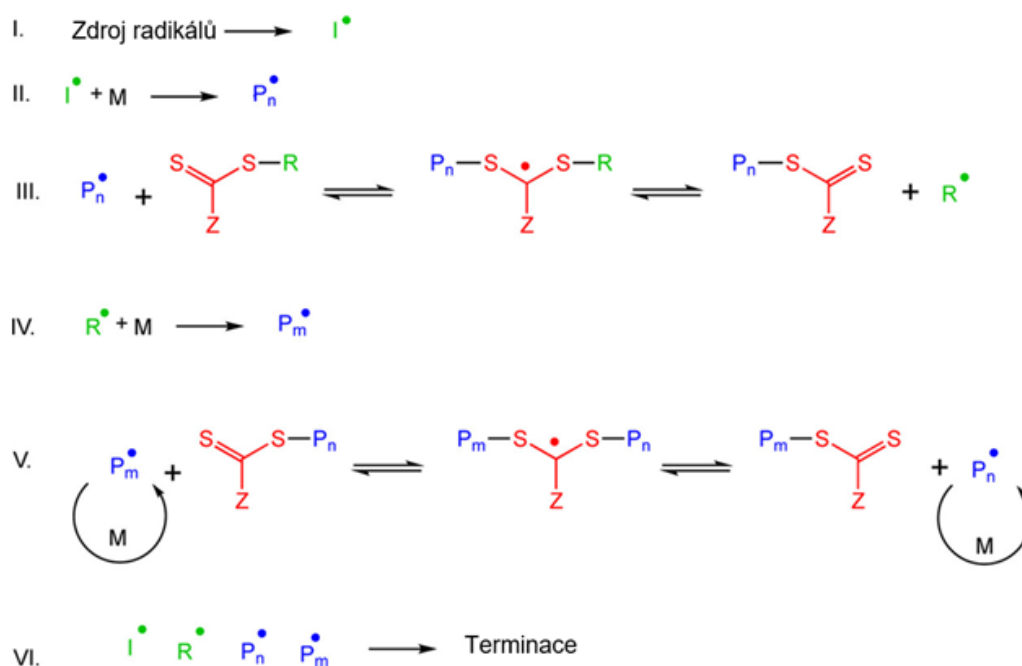
Dnes již málo používaným vodorozpustným polymerem na poli polymerních nosičů léčiv je PVP. Lze ho připravit radikálovou polymerizací, často ve vodných rozpouštědlech. Byly připraveny i kopolymery, nejčastěji s vinyl acetátem. Nejprve byl používán pro náhražky krevní plasmy, dnes je používán ve více odvětvích, mimo jiné v potravinářském průmyslu²³.

Zajímavými vodorozpustnými polymery jsou PPz obsahující ve svém hlavním řetězci vazbu P=N. Tyto polymery jsou biodegradovatelné s možností řízení rychlosti degradace pomocí povahy postranních řetězců. Degradční produkty jsou pak netoxické. PPz lze připravit polymerizací cyklického hexachlorotrifosfazenu a následnou modifikací postranních skupin²⁴.

Velmi významným vodorozpustným polymerem využívaným v cílené dopravě léčiv je PHPMA. Tento vodorozpustný polymer methakrylamidového typu je vysoce biokompatibilní, a tedy netoxický a neimunogenní, neváže se na proteiny krevní plasmy a navíc je snadno a definovaně syntetizován včetně kopolymerů s funkčními skupinami. Do klinických zkoušek v minulosti vstoupil polymerní konjugát na bázi PHPMA nesoucí protinádorové léčivo doxorubicin^{25–27}. Od té doby bylo připraveno mnoho DDS na bázi PHPMA nesoucích protinádorová léčiva (např. doxorubicin²⁸, cytarabin²⁹, docetaxel³⁰), popř. navíc další aktivní složky např. pro zabránění vícečetné lékové rezistenci (např. derivát ritonaviru³¹) či tzv. fotosenzibilizátory, léčiva používaná ve fotodynamické terapii nádorů (viz dále) (např. chlorin e_6 ³², pyropheoforbid a^{33} či kyselinu 5-aminolevulovou (5-ALA)³⁴). Vzhledem k tomu, že tento

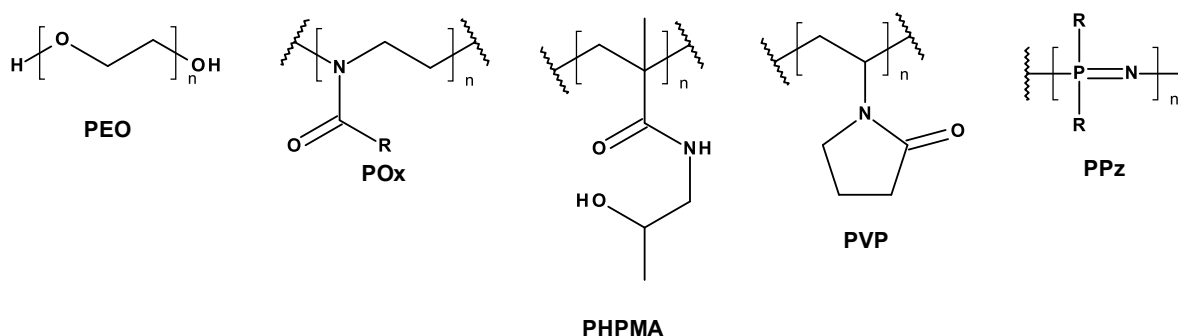
polymer není biodegradovatelný a limit renální filtrace se pro PHPMA polymerní konjugáty pohybuje okolo hodnoty $50\,000\text{ g mol}^{-1}$ (což odpovídá D_h cca 10 nm), mají lineární PHPMA (ko)polymery pro účely DDS molární hmotnost zpravidla nižší¹⁵. Byly však připraveny i vysokomolekulární vodorozpustné PHPMA kopolymery, které obsahují jednu či více degradovatelných vazeb. Jednalo se o nejčastěji o blokové^{35,36}, roubované³⁷ či hvězdicové³⁸ kopolymery.

Polymery na bázi HPMA lze syntetizovat radikálovými polymerizacemi, a to buď volnou radikálovou polymerizací (roztokovou či srážecí), která však poskytuje polymery s vysokou disperzitou, či kontrolovanými technikami, které tuto nevýhodu eliminují. Velmi výhodnou pro syntézu PHPMA je RAFT polymerizace (z angl. *reversible addition-fragmentation chain transfer*), jejíž provedení se od volné radikálové polymerizace liší pouze použitím přenosového činidla (CTA, z angl. *chain transfer agent*), které snižuje počet propagujících řetězců a zároveň tak potlačuje terminaci, což vede k polymerům s nízkou disperzitou (typicky $\bar{D} < 1,2$). Mechanismus RAFT polymerizace je znázorněn na obrázku č. 4. Navíc existuje mnoho funkcionalizovaných CTA umožňujících syntézu (semi)telechelických polymerů pro přípravu pokročilých polymerních architektur^{39,40}.



Obrázek č. 4 – Mechanismus RAFT polymerizace. M = monomer, P_n, P_m = polymerní řetězce. I. Iniclace, II. Propagace, III. „RAFT pre-equilibrium“, IV. Reiniclace, V. Hlavní RAFT rovnováha, VI. Terminace. Převzato a upraveno z⁴⁰.

Struktury polymerů vhodných pro tvorbu vodorozpustných polymerních konjugátů jsou zobrazeny na obrázku č. 5.



Obrázek č. 5 – Struktury vodorozpuštěných polymerů. Vytvořeno v programu BIOVIA draw.

1.2.2 Polymerní micely

Polymerní micely jsou nadmolekulární útvary vytvořené samouspořádáním amfifilních polymerů. Jejich velikost je značně menší než u polymerních nanočástic, v řádech desítek nm. Hydrofobní část polymeru (např. PCL, PLA, poly(propylenoxid) – PPO) tvoří jádro, do kterého lze enkapsulovat hydrofobní léčiva a které je obklopené obalem z hydrofilní části polymeru (např. PEO, POx, PHPMA). Takovou strukturu lze nalézt v tzv. selektivních rozpouštědlech, která rozpouští pouze jednu část amfifilu (nejčastěji vodné roztoky, které rozpouští pouze hydrofilní část polymeru), a to při dostatečné koncentraci, jejíž hodnota je vyšší než hodnota tzv. kritické micelární koncentrace (CMC, z *angl. critical micellar concentration*). Pod CMC jsou v roztoku přítomny pouze jednotlivé polymerní řetězce, tzv. unimery, naopak nad CMC jsou přítomny jak micely, tak unimery (v některých případech je koncentrace unimerů mizivá)^{1,41}.

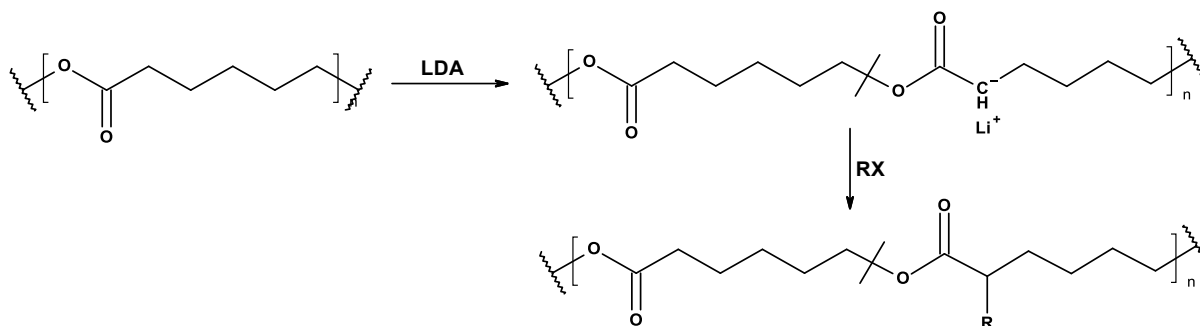
Samouspořádání amfifilních kopolymerů do micel lze dosáhnout několika způsoby. Nejčastěji se využívá dialýzy, nanoprecipitace, metody založené na odpařování rozpouštědla, působení ultrazvuku či hydratace polymerního filmu. V některých případech stačí pro samouspořádání amfifilních kopolymerů pouhá hydratace polymerní sraženiny či lyofilizátu⁴².

Tvar a velikost polymerních micel závisí na mnoha faktorech: prvním z nich je struktura amfifilního polymeru. Nejčastěji se jedná o diblokové kopolymery sestávající z hydrofilního a hydrofobního bloku, popř. o triblokové polymery typu A-B-A, kde A je hydrofilní blok a B blok hydrofobní. Jako příklady micel tvořených z blokových kopolymerů lze uvést systémy PLA-PEO, PCL-PEO či PEO-PPO-PEO, známé též pod názvem Pluronic^{®41}. Méně běžné jsou i systémy tvořené statistickými kopolymery, ve kterých je hydrofobní složka rozprostřena podél polymerního řetězce. Jako příklad lze uvést PHPMA kopolymer nesoucí deriváty cholesterolu⁴³. Zajímavý příklad představují roubované kopolymery, které lze dále dělit na dvě skupiny. U první skupiny je hlavní řetězec hydrofobní povahy, naopak rouby navěšené na tento řetězec jsou hydrofilní. V druhém případě je hlavní řetězec hydrofilní a rouby mají hydrofobní charakter. Dalším faktorem ovlivňujícím tvar a velikost polymerních micel jsou poměry

hydrofilních a hydrofobních částí (např. počet roubů) v amfifilním polymeru, s čímž také souvisí molární hmotnost těchto částí^{44,45}.

Jak již bylo výše zmíněno, k rozpadu polymerních micel na unimery dochází při jejich zředění na koncentraci nižší než CMC (u polymerů často velmi nízká hodnota). Mnohé systémy jsou však syntetizovány tak, aby byl jejich rozpad řízený určitým podnětem. Prvním způsobem, jakým lze řízeného rozpadu micely dosáhnout, je použití biodegradovatelných polymerů. Často se jedná o biodegradovatelnou hydrofobní část amfifilního systému (např. rouby či bloky na bázi PCL, PLA či jiných polyesterů), která zajistí rozpad jádra micely za uvolnění hydrofilního obalu ve formě jednotlivých řetězců a nízkomolekulárních látek vzniklých biodegradací jádra⁴⁶. Druhý způsob je založen na použití stimul-senzitivních vazeb, citlivých např. na změny pH či přítomnost enzymů, které spojují hydrofilní a hydrofobní část. V případě styku se stimulem (např. v nádorové tkáni) pak dojde k rozpadu na hydrofobní a hydrofilní část (opět nejčastěji bloky) ve formě jednotlivých řetězců, které mohou být vyloučeny (za předpokladu, že jejich velikost nepřevyšuje limit renální filtrace)^{47,48}.

Zajímavými systémy, které jsou často schopné samouspořádání do micel ve vodných roztocích jsou roubované kopolymery na bázi PCL. Jak vyplývá z výše uvedeného, hydrofobní PCL se v těchto systémech může vyskytovat buď jako hlavní řetězec nebo v druhém případě jako rouby napojené na hydrofilní hlavní řetězec. Pro více studované systémy s hlavním řetězcem PCL je nutná přítomnost funkčních skupin podél řetězce PCL⁴⁹. Toho lze dosáhnout více způsoby. Prvním je aniontová modifikace PCL pomocí LDA (diisopropylamid lithný) za tvorby polyaniontu, který následně reaguje s halogenderivátem obsahujícím příslušnou funkční skupinu (viz obrázek č. 6). Tato modifikace je synteticky rychlá a snadná, s možností zavést široké spektrum funkčních skupin, nicméně skýtá i mnoho nevýhod. Nevýhodou je zejména nežádoucí štěpení esterových vazeb v řetězci PCL, což vede k nárůstu disperzity. S touto nežádoucí reakcí je spojen i maximální stupeň substituce PCL (cca 20 %): pro dosažení vyšší substituce by bylo nutné použít příliš velké množství LDA, což by vedlo k ještě většímu nárůstu disperzity kvůli příliš velkému množství štěpů v polyesterovém řetězci^{49,50}.



Obrázek č. 6 – Aniontová modifikace PCL. Vytvořeno v programu BIOVIA draw.

Druhým způsobem je kopolymerace ϵ -kaprolaktonu (ϵ -CL) s funkcionalizovanými komonomery. Tento způsob je synteticky náročnější (vícekroková syntéza monomerů

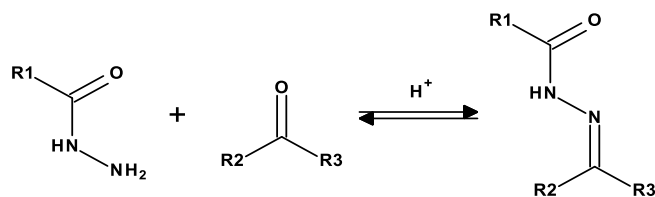
vyžadující purifikační kroky snižující výtěžky), umožňuje zavedení pouze vybraných funkčních skupin a vyžaduje nastavení polymerizačních podmínek pro každý kopolymer zvlášť. V některých případech může navíc být dosaženo pouze nízkých polymerizačních stupňů. Oproti předchozí metodě však poskytuje vysoce definované polymery s nízkou disperzitou a možností vyššího stupně substituce. Funkcionalizované monomery jsou často syntetizovány Bayer-Villigerovou oxidací příslušných substituovaných cyklohexanonů. V případě -OH či -COOH substituovaných kaprolaktonů je třeba tyto skupiny chránit a chránicí skupiny následně odstranit postpolymerizační reakcí. Byly připraveny i halogenované monomery, monomery obsahující dvojně či trojně vazby, etherové vazby a mnohé další^{49,51}. Takto vzniklý PCL s funkčními skupinami je následně buď reagován s hydrofilním semitelehelickým polymerem (tzv. „grafting to“ přístup), popř. je použit pro iniciaci polymerizace hydrofilních roubov (tzv. „grafting from“ přístup). Vzniklé roubované kopolymery jsou výhodné z několika důvodů: nabízejí rozpad díky biodegradovatelnému řetězci PCL, hodnotu jejich CMC lze nastavit počtem roubov, jejich molární hmotností a molární hmotností PCL, navíc mezi rouby a hlavní řetězec lze zavést stimul-senzitivní vazby^{52,53}. Jako příklad lze uvést systémy PCL-g-PEO⁵⁴, termoresponzivní PCL-g-PNIPAM⁵⁵, kationtový PCL-g-poly(lysin)⁵⁶ či PCL-g-PPMA⁴⁵. Posledně zmíněné roubované kopolymery PCL-g-PPMA, syntetizované pomocí „click chemie“ z propargyl-substituovaného PCL a semitelehelického PPMA (koncové azidové skupiny), jsou schopné samouspořádání do micel, bez přítomnosti unimerů, o velikosti okolo 20 nm pouhou hydratací sraženiny/lyofilizátu, vykazují velmi nízkou hodnotu CMC (jednotky $\mu\text{g ml}^{-1}$) a umožňují duální zachycení léčiv (enkapsulace na základě nekovalentní interakce + kovalentní stimul-senzitivní vazba).

Druhou skupinou roubovaných kopolymerů na bázi PCL jsou systémy s rouby tvořenými řetězci PCL. U těchto systémů se velmi často využívá tzv. „grafting through“ přístupu, který spočívá v syntéze makromonomeru, který je následně kopolymerován s klasickým monomerem za tvorby roubovaného kopolymeru. Makromonomery lze syntetizovat modifikací koncových skupin PCL (např. modifikace -OH skupiny methakryloyl chloridem) nebo polymerizací ϵ -CL iniciovanou -OH skupinou monomeru. Tímto způsobem byly připraveny makromonomery z hydroxyethylmethakrylátu (HEMA-PCL)⁵⁷ či HEMA-PCL⁵⁸.

1.3 Vazba aktivních látek na polymerní nosič

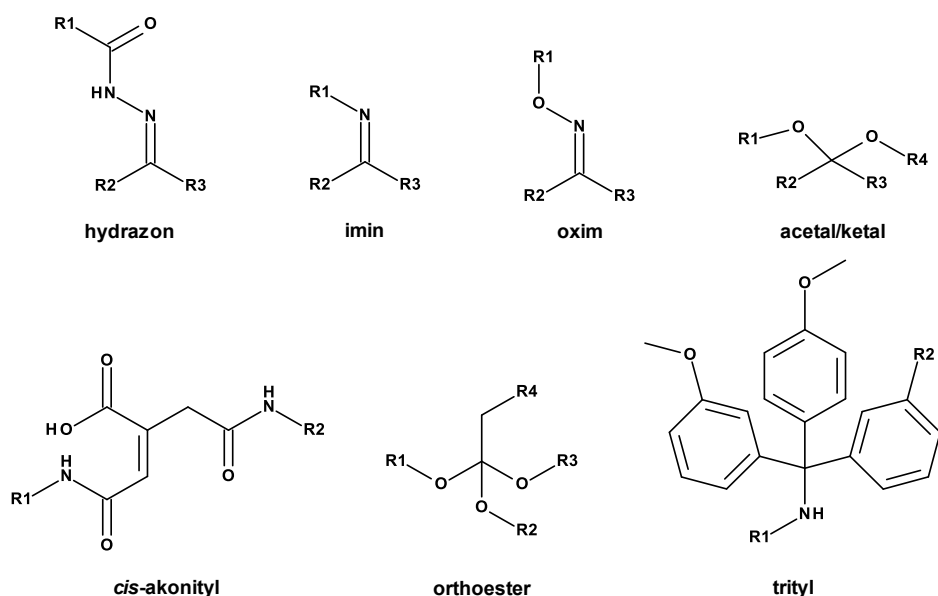
Způsob vazby léčiv či jiných bioaktivních látek k polymernímu nosiči zásadně ovlivňuje výsledné vlastnosti systému. Ideálním se jeví připojení pomocí kovalentní vazby, která může být neštěpitelná v případě vazby fluorescenčních značek či směřujících ligandů, neboť tyto struktury není nutné ve většině případů z nosičového systému uvolnit. V tomto případě se velmi často se využívá amidových vazeb či selektivní „click chemie“ založené na reakci trojných vazeb s azidy^{59,60}.

V případě léčiv je naopak jejich uvolnění základním kamenem úspěšné terapie, a proto se aplikují degradovatelné, na stimul senzitivní vazby. Mezi ně patří vazby citlivé na pH, které je v případě nádorové tkáně podstatně nižší (hodnoty pH okolo 6,5 extracelulárně a 5,0 intracelulárně v lyzozomech nádorových buněk) než fyziologická hodnota pH (7,4). Zástupcem pH senzitivních vazeb je vazba hydrazonová, vznikající reakcí acyl hydrazidu a aldehydu či ketonu v bezvodém kyselém prostředí. Tato vazba je v ideálním případě stabilní při pH = 7,4; naopak při nižších hodnotách pH dochází k její hydrolyze zpět na hydrazid a karbonyl⁶¹. Mechanismus vzniku a hydrolyzy je uveden na obrázku č. 7.



Obrázek č. 7 – Vznik a hydrolyza hydrazonové vazby. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

Obdobou hydrazonové skupiny je imin, který vzniká reakcí aminu s karbonylem za analogických podmínek. Iminy (někdy též Schiffovy báze) jsou však často méně stabilní než hydrazony, a to i při vyšších hodnotách pH⁶². Naopak stabilnější vazba, než je vazba hydrazonová, vzniká reakcí hydroxylaminu s karbonylem za vzniku oximu⁶³. Mezi další pH senzitivní vazby patří acetal či ketal⁶⁴, vznikající reakcí alkoholu s karbonylovou skupinou nebo pomocí transacetalizace, dále *cis*-akonityly⁶⁵, orthoestery⁶⁶ či trityly⁶⁷. Struktury příslušných pH senzitivních vazeb jsou znázorněny na obr. č. 8. Všechny tyto vazby jsou degradovatelné hydrolyticky a obecně lze říci, že jejich stabilita záleží na elektronovém okolí vazby.



Obrázek č. 8 – Struktury pH senzitivních spojek. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

Dalším důležitým stimulem využitelným pro uvolnění léčiv z nosičů je aktivita vybraných enzymů. Enzymaticky degradovatelné spojky mezi polymerem a léčivem jsou založené na oligopeptidových sekvencích, které jsou vybrány jako vhodné substráty pro konkrétní enzym. Častá je sekvence Gly-Phe-Leu-Gly, která je vhodným substrátem pro katepsin B přítomný v lysozomech nádorových buněk. V poslední dekádě byla popsána sekvence Val-Cit-pAB, která vykazuje vzhledem ke katepsinu B vyšší substrátovou specifitu a je štěpena rychleji. U této sekvence katepsin B štěpí amidovou vazbu za citrulinem, *p*-aminobenzylalkoholová spojka napomáhá vazbě do aktivního místa a je odstraněna následnou 1,4-eliminací. V případě nepřítomnosti pAB spojky je však štěpení samotné Val-Cit sekvence velmi pomalé^{68,69}. Rovněž matrix metalloproteinasy, které štěpí např. sekvenci Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly^{35,70}, jsou využívány pro kontrolovanou aktivaci léčiv.

Reduktivně štěpitelné vazby jsou dalším zástupcem na stimul senzitivních spojek degradovatelných v redukčním prostředí uvnitř buněk. Nejčastěji se jedná o disulfidové, -S-S-, vazby⁷¹, popř. lze využít štěpitelnosti azosloučenin azoreduktasou přítomnou v tlustém střevě či játrech^{72,73}.

Stimul-senzitivní vazby mohou být dále citlivé na elektromagnetické záření (nejčastěji UV/VIS/NIR, např. *o*-nitrobenzyl estery)⁷⁴ či reaktivní formy kyslíku (např. aryl boronáty, alkyl diselenidy či thioketaly)⁷⁵.

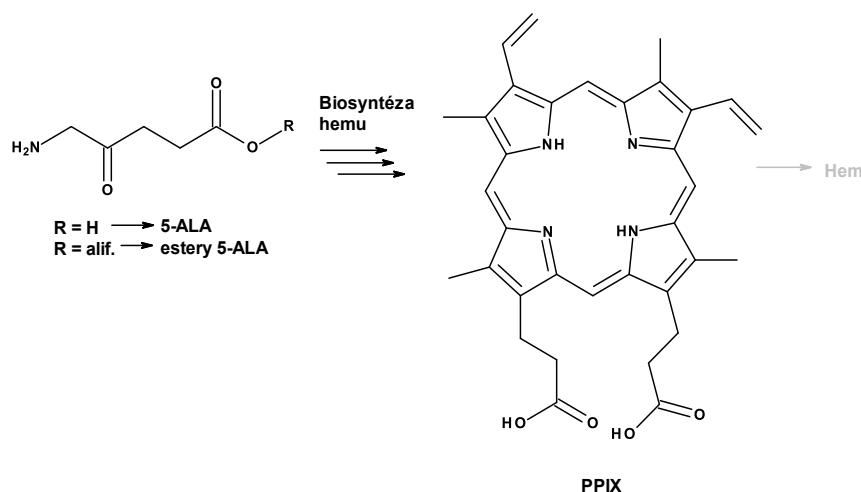
V případě hydrofobních léčiv lze alternativně k aplikaci kovalentní vazby využít enkapsulace těchto molekul do polymerních micel, polymerosomů či nanočástic. Tuto techniku však nelze využít pro vodorozpustné polymerní konjugáty, neboť je založena na hydrofobní nekovalentní interakci. Hydrofobní léčivo je v tomto případě zachyceno v jádře micely a k jeho uvolnění by mělo docházet v ideálním případě po rozpadu nosiče. Tyto interakce však často nejsou dostatečně silné a v čase dochází k samovolnému uvolňování léčiva i bez rozpadu micely během cirkulace v organismu. Míru stability celého systému micela-léčivo je možné v některých případech podpořit zavedením aromatických skupin, které pomocí π - π stackingových interakcí podporují nekovalentní interakci léčiv s aromatickými skupinami⁷⁶. Enkapsulace hydrofobních léčiv do polymerních micel se provádí obdobnými technikami jako samotná tvorba micel. Nejčastěji se tedy používá dialýza či metoda odpařování rozpouštědla. Výhodou dialýzy je jistota odstranění jak neenkapsulovaného léčiva, tak veškerého organického rozpouštědla. Další metodou je lyofilizace s *tert*-butanolem, po které následuje disoluce ve vodném roztoku a filtrace volného léčiva^{41,77}.

Třetím typem interakce mezi polymerním nosičem a aktivní složkou je elektrostatická interakce, které se využívá nejčastěji při cílené dopravě genů pro genovou terapii. Jedná se o nábojovou interakci mezi nukleovou kyselinou (polyaniontem) a kladně nabitým polymerem (polykationtem)⁷⁸.

1.4 Moderní přístupy k protinádorové terapii

I v dnešní době dochází k neustálému vývoji nových přístupů k léčbě nádorových onemocnění. Ačkoli se jedná o již známou techniku, zůstává fotodynamická terapie (PDT) stále v hledáčku vědeckých skupin při vývoji nových pokročilých systémů pro protinádorovou terapii. PDT je založena na použití světla v kombinaci s tzv. fotosenzibilizátorem (PS). Po podání této světlocitlivé látky a její distribuci v těle dojde k osvětlení poškozené tkáně zářením o vhodné vlnové délce. Molekula PS tak přejde do singletového excitovaného stavu, ze kterého může přecházet pomocí mezisystémového přechodu do excitovaného tripletového stavu. V tomto stavu je molekula PS schopna reagovat s molekulou kyslíku (v základním tripletovém stavu) za tvorby singletového kyslíku a molekuly PS v základním stavu. Kromě toho mohou probíhat i fotochemické procesy generující jiné reaktivní formy kyslíku (ROS). Tyto reaktivní částice následně způsobují buněčnou smrt, nejčastěji apoptózu. Kromě toho jsou většinou molekuly PS schopny fluorescence, čehož se využívá pro diagnostické účely^{79,80}.

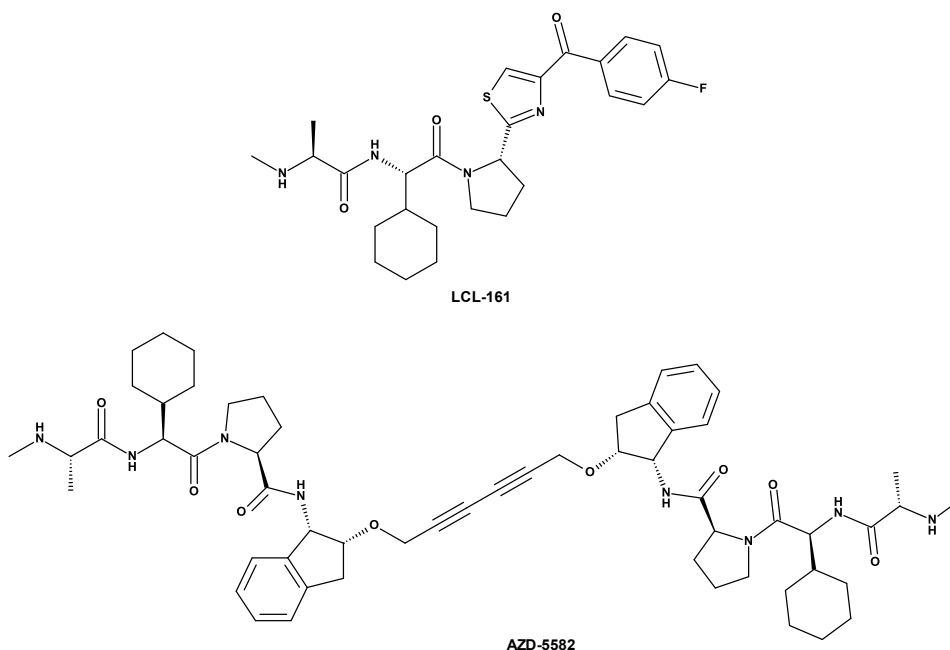
Mezi nejběžnější fotosenzibilizátory patří porfyriny či jim příbuzné struktury⁸¹. Jedním z nich je endogenní protoporfyrin IX (PPIX), který je často podáván ve formě prolečiv, kyseliny 5-aminolevulové (5-ALA) či jejích esterů. 5-ALA je endogenní metabolit, ze kterého je biosyntetizován hem, přičemž posledním meziproduktem je právě PPIX, který je navíc v nádorové tkáni při podání nadbytku 5-ALA akumulován⁸² (viz obrázek č. 9). 5-ALA má však řadu nevýhod z hlediska farmakokinetiky, jako např. omezený vstup do buněk kvůli nabitému charakteru, distribuci po celém těle způsobující fotosenzitivitu kůže po terapii či rychlou eliminaci. Estery 5-ALA některé tyto vlastnosti částečně zlepšují^{83,84}, stále se však jedná o malé molekuly, které nejsou nijak cílené do nádorové tkáně.



Obrázek č. 9 – Princip využití 5-ALA/esterů 5-ALA jako prolečiv v PDT. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

Dalším moderním trendem v léčbě rakoviny je použití tzv. IAP (*z angl. inhibition of apoptosis protein*) inhibitorů. Tyto sloučeniny terapeuticky cílí na proteiny známé pod zkratkou IAP, které

se zapojují do velmi důležité signální dráhy, ve které je jejich úkolem inhibovat caspasy a bránit tak apoptóze (rakovinné) buňky. Tyto IAP proteiny se více vyskytují v nádorové tkáni, zatímco exprese proteinu SMAC (z *angl. second mitochondria-derived activator of caspase*), který proteiny IAP přirozeně inhibuje, je naopak v řadě nádorů významně понížena^{85,86}. Za inhibici je v SMAC proteinu zodpovědná zejména sekvence Ala-Val-Pro-Ile, proto byla vyvinuta syntetická analoga tohoto peptidu, známá jako IAP inhibitory (někdy též SMAC mimetika). Mezi tato léčiva patří např. sloučenina LCL-161, která inhibuje aktivní doménu IAP a zároveň má schopnost tyto proteiny proteolyticky degradovat⁸⁷, je proto využívána také jako ligand v tzv. PROTAC konstruktech⁸⁸. Další sloučenina nese kód AZD-5582 a na rozdíl od předchozí se jedná o dimer, který je schopen vazby ke dvěma aktivním doménám na IAP proteinu⁸⁹⁻⁹¹. Vybrané IAP inhibitory jsou dnes již v pokročilých stádiích klinických studií, kde se vyskytují jako sloučeniny potencující aktivitu konvenčních cytostatik (např. gemcitabin, paklitaxel)⁹² v případě jejich nedostatečné účinnosti např. z důvodu lékové rezistence. Struktury některých IAP inhibitorů jsou zobrazeny na obrázku č. 10.



Obrázek č. 10 – Struktury vybraných IAP inhibitorů. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

2 CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá syntézou a fyzikálně-chemickou charakterizací nových DDS využitelných v protinádorové terapii. V práci byly studovány polymerní DDS pro dva různé terapeutické přístupy, s možností jejich potenciální kombinace v případě léčby rezistentních forem nádorových onemocnění, kde jedna samostatná terapie nebude dostatečná. Prvním zvoleným přístupem práce je PDT, a to konkrétně strategie podání proléčiva, 5-ALA či jejích esterů, které jsou prekurzorem endogenního PPIX. Druhý přístup cílí na inhibici antiapoptotických proteinů IAP. Vazbou těchto léčiv k polymernímu nosiči by mělo dojít k významnému zlepšení jejich farmakokinetiky, a tedy ke zvýšené terapeutické účinnosti vyvinutých DDS.

Mezi dílčí cíle této práce patří zejména:

- Syntéza monomerů, přenosových činidel či derivátů léčiv
- Syntéza polymerních nosičů
- Postpolymerizační reakce a konjugace polymerních nosičů s léčivem
- Fyzikálně-chemická charakterizace všech syntetizovaných produktů
- Studium kinetiky uvolňování léčiv z připravených DDS

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Chemikálie	Čistota	Výrobce
Aceton	sušený, destilovaný	Lach-ner, ČR
Acetonitril	99,95 %	VWR international, USA
Acetylaceton	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
DL-2-Aminopropan-1-ol	≥ 98 %	TCI Chemicals, Japonsko
AZD-5582	98,21 %	MedChemExpress, USA
6-Azidohexanoyl-valyl-citrullyl-(4-aminobenzyl)-(4-nitrophenyl)-karbonát (N ₃ -VCP-PNP)	N.D.*	Iris Biotech, Německo
3-Azidopropan-1-amin	≥ 98 %	Click Chemistry Tools, USA
2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) (AIBN)	rekrytalizovaný	FUJIFILM Wako Chemicals Europe, Německo
2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (V-70)	95,0 %	FUJIFILM Wako Chemicals Europe, Německo
β-alanin (βAla)	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
N ^α -Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid hydrochlorid (Bzl-Arg-Nap)	≥ 98 %	Sigma Aldrich, USA
N-[(1R,8S,9S)-Bicyklo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxykarbonyl]-1,8-diamino-3,6-dioxaoktan (BCN-PEG2-NH ₂)	≥ 95,0 %	Sigma Aldrich, USA
Bromid lithný	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
Bromid měďný	98 %	Sigma Aldrich, USA
Diethylether	sušený, destilovaný	Lach-ner, ČR
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	99,9 %	VWR international, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný	≥ 98 %	Sigma Aldrich, USA
Dichlormethan (DCM)	99,94 %	Lach-ner, ČR
Diisopropylamid lithný (LDA)	2,0 mol dm ⁻³ v THF/ heptanu/ethyl benzenu	Sigma Aldrich, USA
N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA)	99,5 %	Sigma Aldrich, USA

Chemikálie	Čistota	Výrobce
<i>N,N</i> -Dimethylacetamid (DMA)	bezvodý, 99,5 %	Acros Organics, USA
<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC)	rekrytalizovaný	Sigma Aldrich, USA
4-(Dimethyl)aminopyridin (DMAP)	99 %	Sigma Aldrich, USA
<i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF)	sušený, destilovaný	VWR international, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	bezvodý, ≥ 99,9 %	VWR international, USA
Dimethylsulfoxid deuterovaný (DMSO- <i>d6</i>)	99,8 %	Eurisotop, Francie
1,4-dioxan	99,8 %	Sigma Aldrich, USA
Ethanol absolutní	≥ 99,8 %	VWR international, USA
Ethyl acetát	sušený, destilovaný	Lach-ner, ČR
<i>N</i> -ethyl maleimid	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
Formaldehyd	37% roztok ve vodě	Sigma Aldrich, USA
Glutathion	≥ 98 %	Sigma Aldrich, USA
<i>n</i> -heptan	99,15 %	Lach-ner, ČR
Hexamethylfosforamid	99 %	Sigma Aldrich, USA
<i>n</i> -hexan	99,98 %	Lach-ner, ČR
<i>n</i> -hexyl-5-aminolevulinát hydrochlorid (HAL)	N.D.*	Biosynth - Carbosynth, Švýcarsko
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát	100 %	VWR international, USA
Hydrogenuhlíčan sodný bezvodý	100 %	VWR international, USA
Hydroxid sodný	100 %	VWR international, USA
8-chinolinol	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
Chlorid amonný	100 %	VWR international, USA
Chlorid sodný	≥ 99 %	VWR international, USA
Chloroform deuterovaný (CDCl ₃)	99,8 %	Eurisotop, Francie
Katepsin B	≥10 U/mg proteinu	Sigma Aldrich, USA
Kyselina 5-aminolevulová hydrochlorid (5-ALA)	≥ 97,0 %	Sigma Aldrich, USA

Chemikálie	Čistota	Výrobce
Kyselina citronová monohydrát	100 %	Lach-ner, ČR
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) disodná sůl	98 %	Apollo Scientific, UK
Kyselina chlorovodíková	35 %	Lach-ner, ČR
Kyselina mravenčí	98 %	Penta, ČR
Kyselina octová	99 %	Lach-ner, ČR
Kyselina trifluorooctová (TFA)	peptidová kvalita	Iris Biotech, Německo
LCL-161	99,72 %	TargetMol, USA
Methanol	≥ 99,9 %	Sigma Aldrich, USA
Methakryloyl anhydrid	≥ 94 %	Sigma Aldrich, USA
Methakryloyl chlorid	destilovaný	Sigma Aldrich, USA
PCL 45 kDa	N.D.*	Sigma Aldrich, USA
Poly(DL-asparagová kyselina) sodná sůl 15-50 kDa	N.D.*	Sigma Aldrich, USA
Poly(L-lysin) hydrobromid 15-30 kDa	N.D.*	Sigma Aldrich, USA
Propargyl bromid	80% v toluenu	Sigma Aldrich, USA
Pyren	98 %	Sigma Aldrich, USA
Síran hořečnatý bezvodý	98,6 %	Lach-ner, ČR
Sířičitan sodný bezvodý	≥ 98 %	Sigma Aldrich, USA
Sulfo-Cyanin3-DBCO	95 %	Lumiprobe, Německo
<i>Terc</i> -butanol	99,7 %	Honeywell, Německo
<i>N</i> -(3-(<i>Terc</i> -butoxykarbonyl)-aminopropyl)methakrylamid (APMA-Boc)	N.D.*	Polysciences, USA
<i>Terc</i> -butyl karbazát	98 %	Sigma Aldrich, USA
<i>Terc</i> -oktylpyrokatechin	rekrytalizovaný	ÚMCH AV ČR
Tetrahydroboritan sodný	99,99 %	Sigma Aldrich, USA
Tetrahydrofuran (THF)	sušený, destilovaný	Lach-ner, ČR

Chemikálie	Čistota	Výrobce
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	99,9 %	Sigma Aldrich, USA

*N.D. = nestanoveno

Aceton a ethyl acetát byly sušeny na molekulových sítích a destilovány. Diethyl ether a THF byly sušeny na sodíku a destilovány. DMF byl sušen hydridem vápenatým a vakuově destilován. Methakryloyl chlorid byl před použitím destilován za normálního tlaku. AIBN byl rekrystalizován z methanolu za horka. EDC byl rekrystalizován ze směsi DCM + diethyl ether. *Terc*-oktyl pyrokatechin byl rekrystalizován z horkého hexanu.

Následující chemikálie byly syntetizovány na oddělení biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR podle dříve publikovaných postupů:

- *N*-(3-Azidopropyl)-4-[3-(3-azidopropylkarbamoyl)-1-kyano-1-methylpropylazo]-4-kyano-4-methylbutyramid (INI-N₃)³⁹
- Butan-1,4-diylbis(4-kyano-4-[(dodecylsulfanylthiokarbonyl)sulfanyl]pentanoát (bis-dodecyl-TTc)³⁶
- 4-Kyano-4-(ethylthiokarbonothioylthio)pentanová kyselina⁹³
- *S*-2-Kyano-2-propyl *S'*-ethyl trithiokarbonát (ethyl-TTc-IBN)⁹⁴
- 3-(6-Methakrylamidohexanoyl)thiazolidin-2-thion (Ma-Acap-TT) (modifikovaný postup vycházející z⁹⁵)
- *N*-(*terc*-butoxykarbonyl)-*N'*-(6-methakrylamidohexanoyl)hydrazin (Ma-Acap-NHNH-Boc)^{28,96}

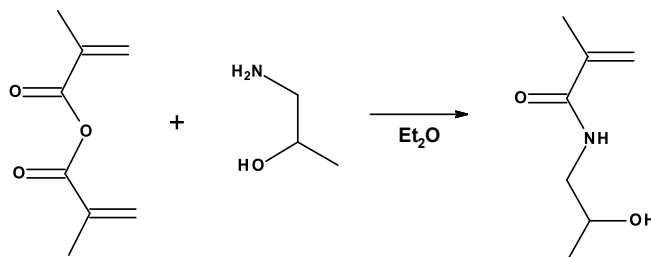
3.2 Syntetické postupy

3.2.1 Syntéza monomerů

N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA)

Monomer HPMA byl syntetizován reakcí methakryloyl anhydridu s DL-2-aminopropan-1-olem podle modifikovaného postupu převzatého z⁹⁷. Schéma reakce je zobrazeno na obrázku č. 11. DL-2-Aminopropan-1-ol (68,2 g; 71,0 ml; 0,91 mol; 1 ekv.) byl rozpuštěn v 600 ml diethyl etheru, methakryloyl anhydrid (140 g; 0,91 mol; 1 ekv.) byl rozpuštěn ve stejném množství diethyl etheru, bylo přidáno 0,4 g inhibitoru polymerizace *terc*-oktyl pyrokatechinu a roztok byl přikapán do roztoku DL-2-aminopropan-1-olu obsahujícího 0,4 g *terc*-oktyl pyrokatechinu během 2,5 hodin. Reakce byla chlazená tak, aby její teplota nepřesáhla 25 °C. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty další 1 hodinu, poté byla ochlazená na -20 °C, čímž došlo k separaci krystalického produktu. Surový produkt byl izolován filtrací přes fritu (S4), krystaly byly promyty diethyl etherem a sušeny pod vakuem. Získaný monomer byl rekrystalizován z acetonu (101 g v 220 ml acetonu) při -20 °C. Výtěžek (bílá krystalická látka) 74 g (72,3 %).

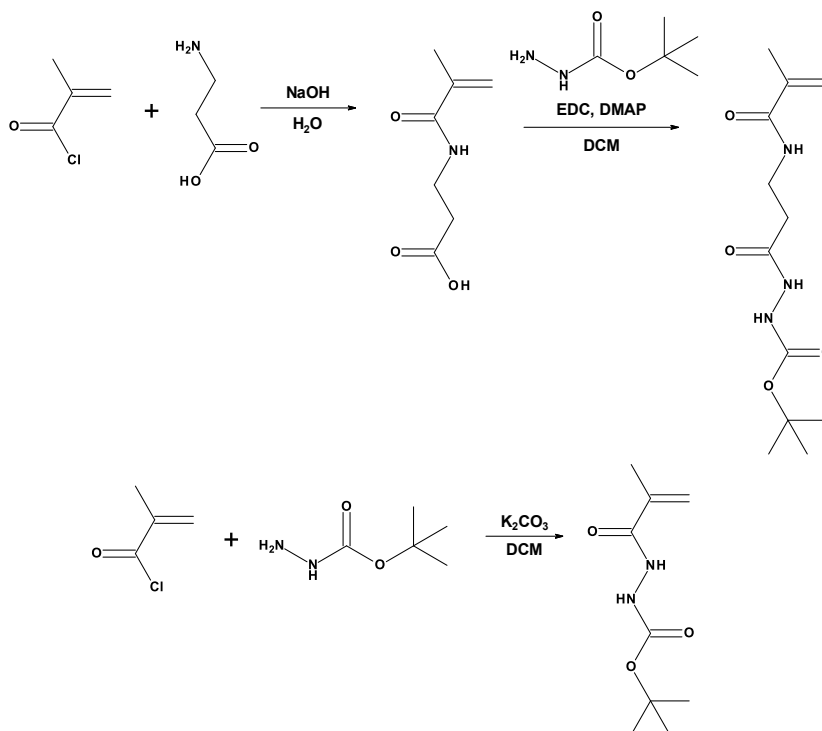
^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): 7,82-7,75 (br t, 1H, -NH-); 5,65 (br t, 1H, -C=CH₂); 5,31 (t, 1H, -C=CH₂); 4,67 (d, 1H, -OH); 3,73-3,65 (m, 1H, -CH-OH); 3,06-3,03 (m, 2H, -NH-CH₂); 1,85 (m, 3H, -CH₃-C=CH₂); 1,00 (d, 3H, -CH-CH₃). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*6): 167,7 (-C=O); 140,0 (-C=CH₂); 118,9 (-C=CH₂); 65,1 (-CH-OH); 46,8 (-NH-CH₂-CH-); 21,1 (CH₂-CH-CH₃); 18,7 (CH₃-C=CH₂). Elementární analýza (vypočteno hm. %/nalezeno hm. %): C 58,72/58,62; H 9,15/9,11; N 9,78/9,82. Bod tání 70 °C.



Obrázek č. 11 – Schéma syntézy monomeru HPMA. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

Monomery obsahující chráněné hydrazidové skupiny

N-(*tert*-butoxykarbonyl)-*N'*-(3-methakrylamidopropanoyl)hydrazin (Ma-βAla-NHNH-Boc) byl syntetizován dvoustupňovou syntézou, kde v prvním kroku methakryloyl chlorid reagoval s β-alaninem (Schotten-Baumannova reakce), takto připravená 3-methakryloylamidopropanová kyselina dále reagovala s *tert*-butyl karbazátem v přítomnosti činidel EDC a DMAP za vzniku požadovaného produktu. *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*N'*-(methakryloyl)hydrazin (Ma-NHNH-Boc) byl připraven jedнокrokovou reakcí methakryloyl chloridu s *tert*-butyl karbazátem. Schémata syntéz jsou uvedeny na obrázku č. 12, podrobné postupy a výsledky charakterizace jsou pak uvedeny v mé bakalářské práci⁹⁸.

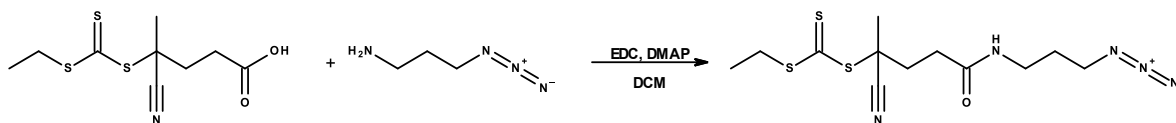


Obrázek č. 12 – Schéma syntézy monomerů *Ma-βAla-NHNH-Boc* a *Ma-NHNH-Boc*. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

3.2.2 Syntéza přenosového činidla

Přenosové činidlo *N*-(3-azidopropyl)-4-kyano-4-ethylsulfanylnkarbothioylsulfanyl pentanamid (ethyl-TTc-N₃) bylo syntetizováno reakcí 4-kyano-4-(ethylthiokarbonothioylthio)pentanové kyseliny s 3-azidopropan-1-aminem podle dříve publikovaného postupu⁹⁹ (schéma viz obrázek č. 13). Výchozí kyselina (512 mg; 1,94 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v 33 ml DCM, následně bylo přidáno činidlo EDC (447 mg; 2,14 mmol; 1,2 ekv.) a roztok byl míchán 20 minut při laboratorní teplotě. Poté byl přidán 3-azidopropan-1-amin (210 μl; 214 mg; 2,33 mmol; 1,1 ekv.) a DMAP (4,1 mg; 0,0389 mmol; 0,02 ekv.). Reakce byla míchána další 2 hodiny a poté byla naředěna DCM (125 ml). Následovala extrakce deionizovanou vodou (2 × 50 ml), organická fáze byla sušena 1 hodinu bezvodým síranem hořečnatým, zfiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce (RVO). Finální produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, *n*-hexan + ethyl acetát, gradient 4:1-1:1), frakce obsahující čistý produkt byly odpařeny (RVO). Výtěžek produktu (oranžová viskózní kapalina) 468 mg (69,7 %). ¹H NMR (400 MHz; CDCl₃): 6,00-5,94 (br t, 1H, -NH-); 3,41-3,30 (m, 6H, -CH₂-S-, -NH-CH₂-, -CH₂-N₃); 2,57-2,29 (m, 4H, -CH₂-CH₂-C=O-); 1,90 (s, 3H, -S-C(-CN)-CH₃); 1,84-1,76 (p, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-N₃); 1,38-1,33 (t, 3H, CH₃-CH₂-S-). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 217,3 (-C=S); 170,7 (-C=O); 119,4 (-C≡N); 49,5 (-CH₂-N₃); 46,9 (-S-C(-CN)-CH₃); 37,5 (-NH-CH₂-); 34,6 (-CH₂-CH₂-C=O); 32,0 (-CH₂-CH₂-C=O); 31,5 (CH₃-CH₂-S-); 28,9 (-S-C(-CN)-CH₃); 25,2 (-CH₂-CH₂-CH₂-N₃); 12,9 (CH₃-CH₂-S-).

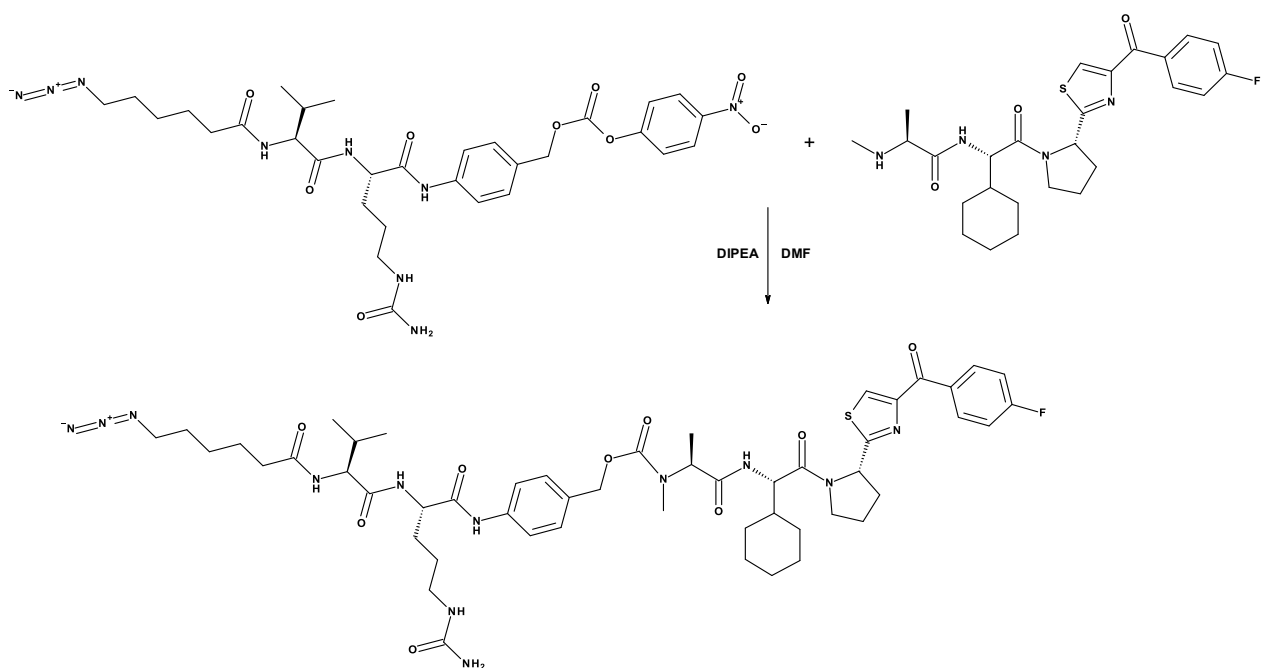
ESI MS 368,02 [M+Na]⁺; 712,72 [2M+Na]⁺. HPLC (metoda 1, viz odstavec 3.3.6): $t_R = 3,61$ min, čistota 94,1 %.



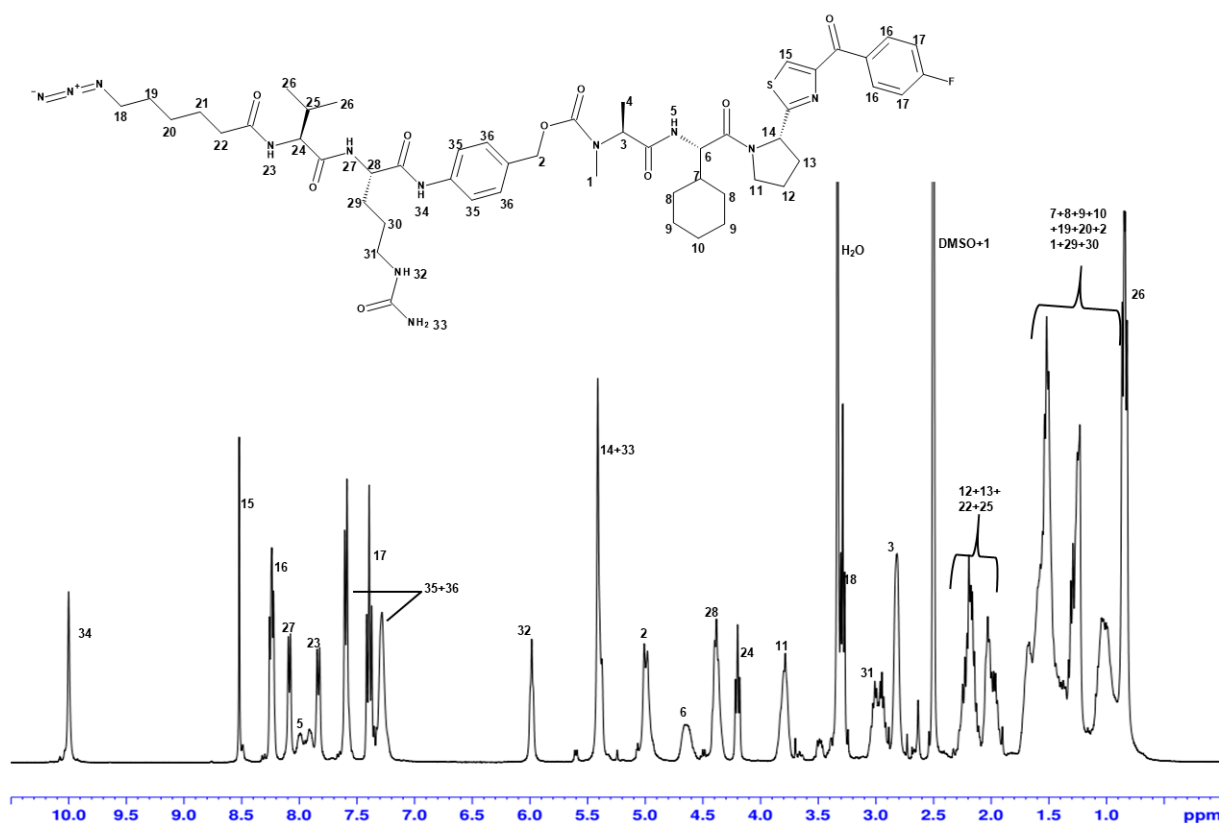
Obrázek č. 13 – Schéma syntézy přenosového činidla obsahujícího azidovou skupinu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

3.2.3 Syntéza derivátu léčiva

Derivát léčiva LCL-161 obsahující spojku Val-Cit-pAB a azidovou skupinu (N₃-VCP-LCL) byl syntetizován reakcí léčiva LCL-161 se spojku N₃-VCP-PNP dle schématu na obrázku č. 14. LCL-161 (24,6 mg; 0,0491 mmol; 1 ekv.) byl rozpuštěn v 1 ml DMF, byla přidána spojka N₃-VCP-PNP (33,6 mg; 0,0491 mmol; 1 ekv.) v 1 ml DMF a následně DIPEA (52 μl; 38,6 mg; 0,300 mmol; 6 ekv.). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 96 hodin (monitorováno pomocí HPLC). Následně byla reakční směs vysrážena do diethyl etheru (40 ml), sraženina byla centrifugována a usušena pod vakuem. Sraženina obsahovala malé množství nezreagované spojky, které bylo odstraněno pomocí flash chromatografie (silikagel, DCM + methanol, gradient 100:0-90:10 během 10 minut, 20 ml min⁻¹, UV detekce, λ = 230 nm). Frakce obsahující čistý produkt byly následně odpařeny (RVO) do sucha a dosušeny pod vakuem (bezbarvý film). Výtěžek 20,0 mg (40,0 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10,05-9,94 (br s, 1H); 8,55-8,47 (s, 1H); 8,29-8,17 (m, 2H); 8,15-8,04 (d, 1H); 8,04-7,87 (m, 1H); 7,87-7,78 (d, 1H); 7,66-7,53 (m, 2H); 7,44-7,34 (t, 2H); 7,34-7,18 (m, 2H); 6,04-5,93 (br t, 1H); 5,47-5,34 (m, 3H); 5,04-4,90 (m, 2H); 4,74-4,54 (m, 1H); 4,47-4,28 (m, 1H, překryv s blíže neurčenou nečistotou); 4,25-4,14 (t, 1H); 3,89-3,72 (m, 2H); 3,41-3,23 (m, 3H, překryv s rozpouštědlem); 3,08-2,88 (m, 2H); 2,88-2,74 (m, 1H, překryv s blíže neurčenou nečistotou); 2,50 (s, 3H, překryv s rozpouštědlem); 2,34-2,09 (m, 4H); 2,09-1,89 (m, 3H); 1,76-1,34 (m, 9H, překryv s blíže neurčenou nečistotou); 1,34-1,18 (m, 4H, překryv s blíže neurčenou nečistotou); 1,18-0,91 (m, 4H, překryv s blíže neurčenou nečistotou); 0,91-0,65 (m, 6H). Přiřazení signálů je uvedeno na obrázku č. 15. ESI MS 1067,31 [M+Na]⁺. HPLC (metoda 1, viz odstavec 3.3.6): $t_R = 3,92$ min, čistota 95,9 %.



Obrázek č. 14 – Schéma syntézy derivátu léčiva N_3 -VCP-LCL. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.



Obrázek č. 15 – Interpretace NMR spektra derivátu N_3 -VCP-LCL.

3.2.4 Syntéza polymerních prekurzorů

Polymerní prekurzory na bázi HPMA byly syntetizovány RAFT polymerizací. HPMA bylo rozpuštěno v *tert*-butanolu, komonomer, přenosové činidlo a iniciátor byly rozpuštěny v DMA. Poměr rozpouštědel *tert*-butanol:DMA byl 85:15. Koncentrace monomerů v polymerizační směsi byla 0,7 mol dm⁻³ pro **P1-P7** a 0,9 mol dm⁻³ pro **P8** (viz tabulka č. 1). Příslušné objemy roztoků byly smíchány, polymerizační směs byla převedena do ampule, probublána argonem, uzavřena a umístěna do vodní lázně. Konkrétní podmínky syntézy jednotlivých polymerních prekurzorů (**P1-P8**) jsou uvedeny v tabulce č. 1. Po uplynutí doby polymerizace byly polymery vysráženy do dvacetinásobku objemu směsi aceton + diethyl ether (2:1), filtrovány na fritě (S4) a sušeny pod vakuem. Další purifikace byla provedena přesrážením z methanolu (10% roztok v/v) do stejné směsi rozpouštědel, následovala opět filtrace a sušení pod vakuem. Výtěžky jednotlivých polymerizací se lišily v závislosti na reakčních podmínkách a jsou uvedeny ve výsledkové části.

Tabulka č. 1 – Podmínky RAFT polymerizace pro syntézu polymerů na bázi HPMA.

	Komonomer	CTA	INI	M:K:CTA:INI* (mol. % HPMA)	t [h]	T [°C]
P1 (1,8 g)	Ma-Acap-NHNH-Boc	ethyl-TTc-IBN	V-70	450:150:2:1 (75 %)	20	40
P2 (2,0 g)	Ma-βAla-NHNH-Boc	ethyl-TTc-IBN	V-70	450:150:2:1 (75 %)	20	40
P3 (1,8 g)	Ma-NHNH-Boc	ethyl-TTc-IBN	V-70	540:180:2:1 (75 %)	72	30
P4 (3,3 g)	Ma-βAla-NHNH-Boc	bis-dodecyl-TTc	V-70	450:150:1:1 (75 %)	72	30
P5 (1,2 g)	Ma-Acap-NHNH-Boc	ethyl-TTc-IBN	V-70	552:48:2:1 (92 %)	20	40
P6 (0,3 g)	APMA-Boc	ethyl-TTc-IBN	V-70	552:48:2:1 (92 %)	20	40
P7 (1,1 g)	Ma-Acap-TT	ethyl-TTc-IBN	V-70	712,5:37,5:2:1 (95 %)	16	40
P8 (1,2 g)	Ma-Acap-NHNH-Boc	ethyl-TTc-N ₃	INI-N ₃	184:16:2,0925:1 (92 %)	16	70

*Molární poměr HPMA:komonomer:přenosové činidlo:iniciátor. U polymerních prekurzorů **P1-P8** je v závorce uvedena navážka monomerů v násadě.

U polymerních prekurzorů připravených RAFT kopolymerizací byly koncové trithiokarbonátové skupiny odstraněny reakcí s azoiniciátorem AIBN¹⁰⁰. Příslušný polymer (1 ekv. w/w) byl rozpuštěn v DMA (10% roztok v/v), byl přidán AIBN (0,2 ekv. w/w), reakční směs byla převedena do ampule a probublána argonem (10 minut). Reakce probíhala ve vodní lázni při teplotě 80 °C po dobu 3,5 hodiny. Polymerní prekurzor byl izolován srážením do

ethylacetátu (dvacetinásobek objemu), filtrací a sušením pod vakuem. Následovala purifikace opět přesrážením do ethylacetátu z 10% methanolového roztoku, dále filtrace a sušení. Výtěžky těchto reakcí se pohybovaly okolo 75-85 %. Polymery s takto modifikovanou koncovou skupinou jsou dále označovány **PX-IBN**, **X** = 1-8.

U semitelechelického polymeru **P8-IBN** byly zbytkové trithiokarbonátové skupiny dále redukovány tetrahydroboritanem sodným, vzniklé -SH skupiny byly zreagovány s *N*-ethyl maleimidem. Polymer **P8-IBN** (400 mg; 1 ekv. *w/w*) byl rozpuštěn v methanolu (4 ml), postupně během 5 minut byl přidán NaBH₄ (2,0 mg; 0,005 ekv. *w/w*), reakční směs byla míchána 5 minut za laboratorní teploty, poté byl přidán *N*-ethyl maleimid (8,0 mg; 0,02 ekv. *w/w*) a reakční směs byla míchána dalších 10 minut. Následně byla přidána kyselina octová (10 µl) pro neutralizaci a methanol (9 ml) pro naředění. Výsledný polymer byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (Sephadex LH-20, methanol, UV detekce, $\lambda = 220$ nm), izolována byla vysokomolekulární frakce. Methanol byl odpařen (RVO), frakce byla rozpuštěna v deionizované vodě a lyofilizována. Výtěžek 395 mg (98,8 %). Výsledný polymerní prekurzor je dále označován **P8-RED**.

U polymerů **PX-IBN**, kde **X** = 1,2,3,5,6, obsahujících chráněné reaktivní skupiny (hydrazidové či aminové) byla chránicí Boc skupina odstraněna následujícím způsobem. Polymer **PX-IBN** byl rozpuštěn v deionizované vodě (10% roztok *v/v*), roztok byl probublán argonem a umístěn v ampuli do olejové lázně na 100 °C (**P1-IBN-P3-IBN**; **P5-IBN**) či 150 °C (**P6-IBN**) na 1 hodinu. Poté byl roztok odchráněného polymeru zfiltrován, zmražen a lyofilizován. Výtěžky těchto reakcí se pohybovaly okolo 70-80 %. Polymery s takto odchráněnými hydrazidovými či aminovými skupinami jsou dále označovány **PX-ODBOC**, **X** = 1,2,3,5,6.

Odstranění chránicích Boc skupin u polymeru **P4-IBN** obsahujícího esterové vazby bylo provedeno pomocí TFA. Polymer **P4-IBN** (200 mg) byl rozpuštěn v TFA (2 ml; 10% roztok *v/v*), ihned po rozpuštění byl srážen do diethyl etheru (40 ml), filtrován a usušen pod vakuem. Sraženina byla rozpuštěna v deionizované vodě (5 ml), byl přidán fosfátový pufr (hydrogenfosforečnan sodný; dihydrogenfosforečnan sodný; chlorid sodný; $c = 0,1$ mol dm⁻³; pH = 7,4) (PBS; 4 ml) pro neutralizaci a následně byl roztok odsolen pomocí sloupcové chromatografie (Sephadex G-25, deionizovaná voda, UV detekce, $\lambda = 220$ nm). Polymerní frakce byla lyofilizována. Výtěžek 79 %. Výsledný polymer je dále označován **P4-ODBOC**.

Polymer **P7-IBN** obsahující aminolyticky reaktivní thiazolidin-2-thionové (TT) skupiny byl postpolymerizačně modifikován za účelem zavedení bicyklo[6.1.0]non-4-ynových (BCN) skupin. Polymer **P7-IBN** (196,5 mg; 0,0526 mmol TT skupin; 1 ekv. TT skupin) byl rozpuštěn v DMA (1,54 ml), byl přidán BCN-PEG2-NH₂ (17,06 mg; 0,0526 mmol; 1 ekv.) rozpuštěný v DMA (0,46 ml). Reakční směs byla míchána 1,5 hodiny při laboratorní teplotě, následně byl přidán DIPEA (20 µl; 14,8 mg; 0,115 mmol; 2,19 ekv.), po dalších 5 minutách byl přidán nadbytek DL-2-aminopropan-1-olu (140 µl; 134,5 mg; 1,791 mmol; 34 ekv.) pro odstranění

zbytkových TT skupin. Reakce probíhala dalších 25 minut, následovalo srážení do 40 ml směsi ethyl acetát + DCM 8:2 (pro izolaci a odstranění zbytkového nezreagovaného BCN-PEG2-NH₂), filtrace přes fritu (S4) a sušení pod vakuem. Následovalo přesrážení z methanolu (194 mg v 1,94 ml) do stejné směsi rozpouštědel, filtrace a sušení pod vakuem. Výtěžek 159 mg (80,9 %). Výsledný polymer obsahující BCN skupiny je dále označován **P7-BCN**.

Polymerní prekurzor **P9** byl připraven modifikací (LDA, propargyl bromid) komerčního PCL podle dříve publikovaného postupu¹⁰¹. Do aparatury s trojhrdlou baňkou a mechanickým míchadlem byl pod atmosférou argonu do baňky přidán PCL (2,51 g; 0,022 mol Cl monomerních jednotek), který byl následně rozpuštěn v sušeném THF (150 ml). Roztok byl ochlazen na -50 °C, poté byl pod argonem během 5 minut přidán roztok LDA (5,51 ml; 0,5 ekv. na monomerní jednotku). Teplota byla udržována mezi -55 a -50 °C dalších 25 minut a následně byl do reakce během 5 minut přidán propargyl bromid (1,16 ml; 0,5 ekv. na monomerní jednotku). Reakční směs byla míchána dalších 25 minut na -40 °C až -30 °C. Reakce byla zastavena přidáním nasyceného vodného roztoku chloridu amonného (38 ml) a pH bylo upraveno na neutrální hodnotu pomocí HCl ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$). Polymer byl extrahován DCM (3 × 80 ml), organická fáze byla promyta deionizovanou vodou (3 × 100 ml) a sušena síranem hořečnatým. Po zahuštění na RVO byl polymer vysrážen do ledového methanolu (500 ml), filtrován přes fritu (S4) a usušen pod vakuem. Přečištění bylo provedeno přesrážením z DCM opět do ledového methanolu. Výtěžek 1,4 g (55 %). *Tento polymerní prekurzor připravila RNDr. Markéta Frejková, které tímto děkuji.*

Roubovaný kopolymer PCL-g-PHPMA byl syntetizován pomocí „click chemie“, reakcí PCL obsahujícího propargylové skupiny (**P9**) a semitelechelického HPMA kopolymeru s azidovými skupinami (**P8-RED**). Polymer **P8-RED** (161,0 mg; 0,0116 mmol; 1,0 ekv.) byl rozpuštěn v destilovaném DMF (3,5 ml), následně byl přidán PCL (**P9**; 18,5 mg; 6,8 mol. % propargylových skupin (prg), 0,0107 mmol prg; 0,92 ekv. prg) a směs byla probublávána argonem po dobu 20 min. Poté byl přidán bromid měďný (16,1 mg; 0,112 mmol; 9,68 ekv.) a reakce byla za laboratorní teploty míchána a probublávána argonem 2 hodiny. Následně byl přidán další PCL (**P9**; 4,5 mg; 0,00261 mmol prg; 0,23 ekv. prg.) a bromid měďný (1,0 mg; 0,00697 mmol; 0,60 ekv.). Reakce byla monitorována pomocí SEC (systém 3, viz odstavec 3.3.1). Po dalších 2 hodinách byl přidán nadbytek 8-chinolinolu (850 mg) pro komplexaci iontů mědi, směs byla naředěna methanolem (7 ml) a čištěna od mědi pomocí sloupcové chromatografie (Sephadex LH-20, methanol, UV detekce, $\lambda = 230 \text{ nm}$). Vysokomolekulární frakce byla zahuštěna, vysrážena do diethyl etheru (45 ml), centrifugována a usušena pod vakuem. Sraženina byla rozpouštěna v deionizované vodě (5 ml) a následně byl přidán vodný roztok chloridu sodného (8,9 mg ml⁻¹, 4 ml). Roztok byl přefiltrován (0,45 μm PVDF filtr) a čištěn pomocí preparativní chromatografie (Sephacryl S-300, chlorid sodný, $c = 8,9 \text{ mg ml}^{-1}$, UV detekce, $\lambda = 230 \text{ nm}$) pro odstranění nezreagovaného výchozího polymeru **P8-RED**. Frakce obsahující čistý roubovaný kopolymer byla poté odsolena pomocí sloupcové chromatografie

(Sephadex G-25, voda, UV detekce, $\lambda = 230$ nm). Vysokomolekulární frakce byla zmrazena a lyofilizována. Finální výtěžek byl 91,4 mg (49,7 %). Vzniklý roubovaný kopolymer je dále označován jako **G1**.

Schéματα jednotlivých reakcí jsou pro přehlednost uvedena ve výsledkové části u konkrétních polymerních prekurzorů.

3.2.5 Kovalentní vazba léčiv

Polymerní konjugáty nesoucí proléčivo 5-ALA či HAL navázané pomocí hydrazonové vazby byly syntetizovány reakcí hydrazidových skupin podél řetězce polymerních prekurzorů **P1-ODBOC** až **P4-ODBOC** s ketoskupinou příslušného proléčiva. Polymer **PX-ODBOC** (**X** = 1-4) (1 ekv. NHNH_2 skupin) byl rozpuštěn v bezvodém methanolu (7% roztok v/v), bylo přidáno proléčivo (1 ekv.) a kyselina octová (40 μl na 100 mg polymeru). Reakční směs byla třepána při 25 °C po dobu 24 hodin. Následně došlo k naředění methanolem na 2% roztok (v/v) a přečištění produktu od nenavázaného proléčiva a k. octové pomocí sloupcové chromatografie (Sephadex LH-20, methanol, UV detekce, $\lambda = 220$ nm). Polymerní frakce byla odpařena na RVO, rozpuštěna v methanolu (10% roztok v/v) a vysrážena do ethyl acetátu. Sraženina byla zfiltrována a usušena pod vakuem. Výtěžky se pohybovaly zpravidla mezi 60 a 75 %, reakce byly prováděny v množství 25-300 mg polymeru. Vzniklé polymerní konjugáty jsou dále označovány **PX-5-ALA** či **PX-HAL**, **X** = 1-4.

Polymerní konjugáty s navázaným léčivem LCL-161 přes pH sensitivní vazbu byly syntetizovány reakcí ketoskupiny tohoto proléčiva s hydrazidovými či aminovými skupinami polymerních prekurzorů **P5-ODBOC**, resp. **P6-ODBOC**. Nejprve byla provedena optimalizace reakcí: polymer **PX-ODBOC** (**X** = 5,6) (9 mg; 1 ekv. w/w) byl rozpuštěn v bezvodém methanolu/DMA/k. octové/TFA (7% roztok, v/v), bylo přidáno LCL-161 (1 mg; 0,11 ekv. w/w) a k. octová/TFA (12 μl). Reakce byla monitorována pomocí rozměrově vylučovací chromatografie (SEC; systém 3, viz odstavec 3.3.1). Po nalezení optimálních podmínek byla reakce opakována ve stejných poměrech. Po 72 hodinách při 60 °C byl konjugát nesoucí LCL-161 připojené pomocí hydrazonové vazby, **P5-LCL**, přečištěn analogickým způsobem ke vzorkům **PX-5-ALA** či **PX-HAL**. Výtěžek 73,2 %. Vzhledem k prakticky nulové reaktivitě ketoskupiny léčiva s aminoskupinami polymerního prekurzoru **P6-ODBOC** nebyl konjugát nesoucí LCL-161 navázané pomocí iminové vazby připraven.

Polymerní konjugát nesoucí derivát léčiva VCP-LCL s enzymaticky štěpitelnou spojkou byl připraven pomocí „click chemie“ reakcí tohoto derivátu s polymerním prekurzorem **P7-BCN**. Polymerní prekurzor **P7-BCN** (75,9 mg; 1 ekv. w/w) byl rozpuštěn v DMSO (400 μl), byl přidán derivát léčiva N_3 -VCP-LCL (20 mg; 0,263 ekv. w/w) v DMSO (600 μl) a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin. Následně byl výsledný produkt vysrážen do ethyl acetátu (20 ml), sraženina byla centrifugována a usušena pod vakuem. Výtěžek 90 mg (93,8 %). Výsledný polymerní konjugát je dále označován **P7-LCL**.

3.2.6 Enkapsulace hydrofobního léčiva

Enkapsulace léčiva AZD-5582 do micel tvořených roubovaným kopolymerem PCL-g-PHPMA byla prováděna metodou lyofilizace⁴⁵. Léčivo AZD-5582 bylo rozpuštěno v dioxanu ($c = 4 \text{ mg ml}^{-1}$; 1 ekv.), byl přidán *tert*-butanol (333 μl na 1 mg léčiva) a roztok byl míchán za chlazení v ledové lázni. Následně byl během 20 minut přikapán roubovaný kopolymer **G1** rozpuštěný v deionizované vodě ($c = 2,86 \text{ mg ml}^{-1}$; 5/10/20 ekv.). Roztok byl za chlazení ledovou lázní míchán dalších 40 minut, poté byl zmrazen a lyofilizován. Lyofilizát byl rozpuštěn v PBS ($c_{\text{G1}} = 5 \text{ mg ml}^{-1}$) a přefiltrován přes 0,45 μm PVDF filtr pro odstranění neenkapsulovaného léčiva. Efektivita enkapsulace byla stanovena pomocí HPLC (metoda 1, viz odstavec 3.3.6). Vzorky s enkapsulovaným léčivem jsou dále označovány **AZD-X**, kde **X** je hmotnostní obsah léčiva v násadě, počítaný vzhledem k polymeru **G1** (5/10/20). Enkapsulace byly prováděny v množstvích 5–15 mg roubovaného kopolymeru.

Paralelně byl proveden „slepý pokus“, kde byla k léčivu místo roubovaného kopolymeru přikapána pouze deionizovaná voda. Po lyofilizaci a filtraci bylo pomocí HPLC stanoveno, kolik léčiva se tímto procesem rozpustí.

3.3 Metody

3.3.1 Rozměrově vylučovací chromatografie (SEC)

Pro stanovení průměrů molárních hmotností a disperzity ($D = M_w/M_n$) připravených polymerů či pro monitorování průběhu a optimalizace vazebných reakcí polymerních prekurzorů s léčivy byla využita rozměrově vylučovací chromatografie (SEC). Měření bylo prováděno na třech systémech operujících v různých mobilních fázích a disponujících různými kolonami. Každý systém sestával z HPLC chromatografu (Shimadzu, Japonsko) opatřeným gradientovou pumpou LC-20 AD, odplyňovačem DGU 20A5R, řídicí jednotkou CBM-20A, autosamplerem SIL-20AC, kolonovým termostatem CTO-20AC a detektorem UV-VIS PDA (*photo diode array*) SPD-M20A. Dále byly zapojeny víceúhlový detektor rozptylu světla (MALS) Dawn Helios II, refraktometrický detektor Optilab rEX, v případě systému 2 také viskozimetrický detektor Viscostar III (vše Wyatt, USA).

Systém 1: mobilní fáze bromid lithný ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$) v DMF, kolony GRAM Lux 10 Å, 1000 Å a 1000 Å zapojené v sérii (PSS, Německo), průtok mobilní fáze 1 ml min⁻¹, hodnota inkrementu indexu lomu $dn/dc = 0,100 \text{ ml g}^{-1}$, stanovená pro PHPMA a hodnota $dn/dc = 0,050 \text{ ml g}^{-1}$, stanovená pro PCL.

Systém 2: mobilní fáze fosfátový pufr (hydrogenfosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan sodný, $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) + chlorid sodný ($c = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$) o pH = 7,4, kolona Superose 6 Increase 10/300 GL (Cytiva, USA), průtok mobilní fáze 0,5 ml min⁻¹, hodnota $dn/dc = 0,170 \text{ ml g}^{-1}$, stanovená pro PHPMA a hodnota $dn/dc = 0,152 \text{ ml g}^{-1}$, stanovená pro micely tvořené PCL-g-PHPMA.

Systém 3: mobilní fáze octan sodný ($c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,5$) + methanol (1:4 v/v), kolony TSKGel3000SW_{XL} a TSKGel4000SW_{XL} (Tosoh Bioscience, Německo), průtok mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, hodnota $dn/dc = 0,167 \text{ ml g}^{-1}$, stanovená pro PHPMA a hodnota $dn/dc = 0,159 \text{ ml g}^{-1}$, stanovená pro roubované kopolymery PCL-g-PHPMA.

Vzorky byly připraveny o koncentraci $3\text{-}5 \text{ mg ml}^{-1}$ v mobilní fázi (pokud není uvedeno jinak) a byly filtrovány přes $0,2 \text{ }\mu\text{m}$, resp. $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ filtry. Nástřik byl $50 \text{ }\mu\text{l}$. Pro vyhodnocení byl použit software Astra 8.1.0.

3.3.2 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR) byla využita k ověření sktruktury nízkomolekulárních látek a dále také ke stanovení vybraných funkčních skupin či aktivních látek (viz odstavec 3.3.7) ve vzorcích polymerů. NMR spektra byla měřena na spektrometru Bruker Avance Neo 400. Parametry měření byly následující: frekvence spektrometru $400,13 \text{ MHz}$ (^1H) a $100,61 \text{ MHz}$ (^{13}C); šířka 90° pulzu $16,5 \text{ }\mu\text{s}$; relaxace 10 s ; akviziční čas $3,28 \text{ s}$ (^1H), $1,22 \text{ s}$ (^{13}C). Vzorky byly připraveny v deuterovaných rozpouštědlech o koncentraci zpravidla 9 mg ml^{-1} . Pro vyhodnocení spekter byl použit software TopSpin 4.1.3.

3.3.3 Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI MS)

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru LCQ Fleet (Thermo Scientific, USA) opatřeném elektrosprejovou ionizací a hmotnostním analyzátozem obsahujícím iontovou past. Vzorky byly připraveny o koncentraci menší než $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$.

3.3.4 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Pro stanovení hydrodynamických poloměrů (resp. průměrů) byl použit dynamický rozptyl světla (DLS). Měření byla prováděna na přístroji Nano ZetaSizer ZEN3600 vybaveném He-Ne laserem o vlnové délce $\lambda = 632,8 \text{ nm}$. Měření byla prováděna při rozptylovém úhlu 173° , z-průměrné hydrodynamické poloměry, R_h , byly vypočteny na základě Stokesovy-Einsteinovy rovnice z hodnot z-průměrných difuzních koeficientů, D :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (1)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota a η je viskozitní koeficient rozpouštědla. Vzorky o koncentraci 5 mg ml^{-1} v PBS (pokud není uvedeno jinak) byly filtrovány přes $0,22/0,45 \text{ PVDF}$ filtr do plastových kyvet. Pro vyhodnocení byl použit ZetaSizer Software.

3.3.5 UV-VIS spektrofotometrie

UV-VIS spektrofotometrie byla použita pro stanovení některých funkčních skupin (viz odstavec 3.3.7) či pro studování kinetiky uvolňování léčiva z polymerního konjugátu (viz odstavec 3.3.9). Spektra byla měřena na přístroji Specord 205 (Analytik Jena AG, Německo). Vzorky

byly umístěny v křemenných kyvetách, jako referenční vzorek bylo vždy použito čisté rozpouštědlo.

3.3.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla použita pro monitorování některých reakcí, stanovení čistoty některých produktů či pro stanovení obsahu aktivních látek. Měření byla prováděna na chromatografu (Shimadzu, Japonsko) opatřeném gradientovou pumpou LC-20 AD, odplyňovačem DGU 20A5R, řídicí jednotkou CBM-20A, autosamplerem SIL-20AC, kolonovým termostatem CTO-20AC, kolonou Chromolith® High Resolution RP-18e (100 × 4,6 mm; Sigma Aldrich, USA), detektory UV-VIS PDA SPD-M20A, fluorescenčním detektorem RF-20A, refraktometrickým detektorem RID-10A a frakčním kolektorem FRC-10A.

Byly použity dvě metody: metoda 1: mobilní fáze A: 95% deionizovaná voda, 5% acetonitril, 0,1% TFA, mobilní fáze B: 95% acetonitril, 5% deionizovaná voda, 0,1 % TFA, průtok mobilní fáze 4 ml min⁻¹, gradient 0 % B – 100 % B během 6 minut, detekce pomocí PDA detektoru. Metoda 2: mobilní fáze A: 94% deionizovaná voda, 5% methanol, 1% k. octová, mobilní fáze B: 49,5% methanol, 49,5% deionizovaná voda, 1% k. octová (stanovení 5-ALA) nebo 99% methanol, 1% k. octová (stanovení HAL), průtok mobilní fáze 1 ml min⁻¹, gradient 0 % B – 100 % B během 10 minut, detekce pomocí fluorescence (excitace: $\lambda = 370$ nm, emise: $\lambda = 460$ nm).

3.3.7 Stanovení obsahu funkčních skupin a aktivních látek

Stanovení thiazolidin-2-thionových (TT) skupin bylo provedeno spektrofotometricky. Polymer **P7-IBN** byl rozpuštěn v methanolu, vzorky byly převedeny do křemenných kyvet a byla měřena absorbance při 305 nm. Výsledný obsah TT skupin byl vypočten podle vzorce:

$$\text{obsah TT skupin (mol. \%)} = \frac{100}{\frac{\varepsilon \cdot c \cdot l}{A} - M_{\text{Ma-Acap-TT}} + \frac{M_{\text{HPMA}}}{1}} \cdot 100 \quad (2)$$

kde ε je molární absorpční koeficient ($\lambda = 305$ nm; $\varepsilon_{305} = 10520 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$)⁹⁵, c je koncentrace vzorku ($c = 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$), l je délka optické dráhy ($l = 1 \text{ cm}$), A je absorbance, $M_{\text{Ma-Acap-TT}}$ je molární hmotnost komonomerní jednotky s TT skupinami ($M_{\text{Ma-Acap-TT}} = 300,44 \text{ g mol}^{-1}$) a M_{HPMA} je molární hmotnost HPMa monomerní jednotky ($M_{\text{HPMA}} = 143,19 \text{ g mol}^{-1}$). Stanovení bylo provedeno v triplicátu.

Stanovení koncových azidových skupin bylo provedeno nepřímo po reakci s nadbytkem (oproti azidovým skupinám) fluorescenční značky sulfo-Cyanin3-DBCO. Semitelehelický polymerní prekurzor **P8-RED** (6 mg; 1 ekv. w/w) byl rozpuštěn v methanolu (100 μl), byla přidána značka sulfo-Cyanin3-DBCO (0,6 mg; 0,1 ekv. w/w) v methanolu (40 μl) a reakční směs byla míchána po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Poté byla směs naředěna methanolem (500 μl) a PBS

(500 μ l) a vyčištěna od nezreagované fluorescenční značky pomocí sloupcové chromatografie (Sephadex LH-20, methanol). Vysokomolekulární frakce byla odpařena, rozpuštěna ve směsi methanol + PBS (1:1, 1000 μ l) a znovu stejným způsobem přečištěna. Odparek byl rozpuštěn v deionizované vodě, zmrazen a lyofilizován. Přesná navážka lyofilizátu (prováděno v triplicátu) byla rozpuštěna v deionizované vodě, převedena do křemenných kyvet a množství fluorescenční značky bylo stanoveno pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Výsledná funkcionalita, F , semitelechelického polymeru byla vypočtena za použití následujícího vzorce:

$$F = \frac{M_n}{\frac{\varepsilon \cdot c \cdot l}{A}} \quad (3)$$

kde M_n je početně vážený průměr molární hmotnosti polymeru (před reakcí se sulfo-Cyanin3-DBCO) stanovený pomocí SEC, ε je molární absorpční koeficient ($\lambda = 548$ nm, $\varepsilon_{548} = 162000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$), c je koncentrace vzorku ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$), l délka optické dráhy ($l = 1 \text{ cm}$) a A je změřená absorbance při vlnové délce 548 nm.

Pro stanovení následujících funkčních skupin byla použita NMR spektroskopie (viz odstavec 3.3.2): NHNH_2 skupiny v polymerních prekurzorech **P1-ODBOC** až **P5-ODBOC**, NH_2 skupiny v polymerním prekurzoru **P6-ODBOC** (pro toto stanovení byl použit signál chráněné NH -Boc skupiny v prekurzoru **P6-IBN**), BCN skupiny ve vzorku **P7-BCN**, propargylové skupiny ve vzorku **P9**. NMR spektroskopie byla použita též pro stanovení obsahu PCL ve vzorku roubovaného kopolymeru **G1**.

Stanovení obsahu 5-ALA a HAL v polymerních konjugátech obsahujících tato proléčiva bylo provedeno po totální hydrolyze hydrazonové vazby (25 °C, 1 h, 0,1% TFA, pH 1,1). Ke stanovení bylo použito HPLC s prekolonovou derivatizací pomocí acetylacetonu a formaldehydu. Do vialky bylo přidáno 20 μ l vzorku po hydrolyze ($c = 1\text{--}2 \text{ mg ml}^{-1}$), 800 μ l derivatizačního činidla obsahujícího acetylaceton (3 ml acetylacetonu, 2 ml absolutního ethanolu, 15 ml deionizované vody) a 100 μ l 10% formaldehydu. Vialka byla inkubována 10 minut při 100 °C. Po ochlazení byl vzniklý fluorescenční derivát kvantifikován pomocí HPLC (metoda 2, viz odstavec 3.3.6), retenční časy, t_R , derivátu 5-ALA = 9,7 min, t_R derivátu HAL = 9,1 min.

Obsah léčiva LCL-161 v polymerním konjugátu **P5-LCL** byl stanoven po totální hydrolyze hydrazonové vazby (37 °C, 24 h, 0,1% TFA, pH 1,1) pomocí HPLC (metoda 1, viz odstavec 3.3.6).

Obsah derivátu léčiva LCL-VCP v polymerním konjugátu **P7-LCL** byl stanoven pomocí NMR spektroskopie (viz odstavec 3.3.2).

3.3.8 Stanovení CMC

Kritická micelární koncentrace (CMC) micel tvořených roubovaným kopolymerem PCL-*g*-PHPMA byla stanovena fluorimetricky s použitím fluorescenční značky pyrenu. Nejprve byla připravena koncentrační řada polymerního prekurzoru **G1** v PBS ($c = 0,75 \text{ mg ml}^{-1} - 3,81 \cdot 10^{-6} \text{ mg ml}^{-1}$), poté byly přidány ke každému vzorku 3 μl roztoku pyrenu ($c = 0,4 \text{ mmol l}^{-1}$ v absolutním ethanolu). Vzorky byly třepány přes noc ve tmě při 25 °C. Následně byla měřena intenzita fluorescence na přístroji Plate-reader Biotek H1 (Agilent, USA), parametry měření byly následující: excitace: $\lambda = 280 \text{ nm} - \lambda = 360 \text{ nm}$ (krok 1 nm); emise: $\lambda = 390 \text{ nm}$. Měření bylo prováděno při 25 °C. Poměr intenzit fluorescence při $\lambda_{ex} = 335 \text{ nm}$ a $\lambda_{ex} = 338 \text{ nm}$ (I_{338}/I_{335}) byl vyneseno do grafu oproti logaritmu koncentrace vzorku. CMC byla získána z průsečíku lineárních závislostí.

3.3.9 Studium kinetiky uvolňování léčiv z polymerních nosičů

Kinetika hydrolyzy pH senzitivní hydrazonové vazby přítomné v polymerních konjugátech **PX-5-ALA** a **PX-HAL** ($X = 1-3$) byla studována ve fosfáto-citrátových pufrch (hydrogenfosforečnan sodný, k. citronová, chlorid sodný, pH = 7,4/6,5/5,0, $I = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$). Vzorky byly rozpuštěny v příslušném pufru ($c = 5 \text{ mg ml}^{-1}$) a inkubovány při 37 °C. V jednotlivých časových bodech byly odebrány alikvoty inkubovaných roztoků (40 μl), byl přidán roztok Tris-HCl (5 mg ml^{-1} , 4 μl , vnitřní standard) a obsah 5-ALA či HAL byl stanoven pomocí kapilární elektroforézy s kapacitně vázanou bezkontaktní vodivostní detekcí (C^4D). Byl použit systém 7100 CE (Agilent, USA) s nemodifikovanou křemennou kapilárou (vnitřní průměr 20 μm , vnější průměr 375 μm , celková délka 50,0 cm, efektivní délka 35,0 cm; Polymicro Technologies, USA), termostatovanou na 25 °C. Byl použit C^4D detektor (Admet, ČR), sestávající z dvou tubulárních elektrod (délka 4 mm, vnitřní průměr 400 μm), pracujících při frekvenci 1,84 MHz a amplitudě 44 V. Před každým měřením byla kapilára promyta 3 minuty NaOH ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$), 2 minuty vodou a 4 minuty základním elektrolytem. Vzorky byly nastříkány při tlaku 5 kPa po dobu 20 sekund. Analýza probíhala při separačním napětí 25 kV (proud přibližně 10 μA), v průběhu separace byl na vstupní konec kapiláry aplikován tlak 10 kPa, pro urychlení analýzy a stabilizaci základní linie. Jako základní elektrolyt byla použita k. mravenčí ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$). Hodnoty migračních časů, t_{mig} , byly pro 5-ALA $t_{\text{mig}} = 3,4 \text{ min}$, pro HAL $t_{\text{mig}} = 4,3 \text{ min}$. Hodnota 100 % uvolněného proléčiva byla stanovena po inkubaci vzorků v roztoku 50 mM HCl při 37 °C (HAL) či 90 °C (5-ALA) po dobu 24 hodin. Experiment byl proveden v triplicátu. *Měření prováděli doc. RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D. a Mgr. Alice Šimonová z Katedry analytické chemie PŘF UK, kterým tímto děkuji.*

Rychlost uvolňování léčiva LCL-161 z polymerního konjugátu **P5-LCL** byla studována s pomocí spektrofotometrie. Polymerní konjugát o koncentraci 8 mg ml^{-1} byl rozpuštěn ve fosfáto-citrátovém pufru (složení viz předchozí odstavec) a inkubován při 37 °C. V předem stanovených časových bodech byla měřena absorpční spektra. Kinetika hydrolyzy hydrazonové vazby byla sledována z úbytku absorbance při $\lambda = 290 \text{ nm}$. Hodnota 100 % uvolněného léčiva

byla stanovena při největším úbytku absorbance při pH 1,1 (vzorek rozpuštěn v 0,1 % TFA). Experiment byl proveden v triplikátu.

Kinetika enzymového štěpení spojky Val-Cit-pAB v polymerním konjugátu **P7-LCL** za uvolnění samotného léčiva LCL-161 byla studována za použití katepsinu B. Jako pufr byl v tomto experimentu použit fosfátový pufr (dihydrogenfosforečnan draselný, $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, disodná sůl EDTA, $c = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$; pH = 6,0). Nejprve byla stanovena aktivita katepsinu B za použití substrátu Bzl-Arg-Nap: do 1cm křemenné kyvety byl pipetován pufr (815 μl), byl přidán katepsin B (60 μl ; $c = 1,6 \text{ mg ml}^{-1}$ ve fosfátovém pufru) a glutathion (100 μl ; $c = 15 \text{ mg ml}^{-1}$ ve fosfátovém pufru). Kyveta byla inkubována 5 minut při 37 °C, poté byl přidán substrát Bzl-Arg-Nap v DMSO (25 μl ; $c = 40,2 \text{ mg ml}^{-1}$) a ihned byla měřena absorbance při $\lambda = 410 \text{ nm}$ při 37 °C po dobu 10 minut. Jako referenční vzorek byl použit samotný pufr. Aktivita katepsinu B (počet aktivních míst) byl vypočten z rozdílu absorbance v čase 10 a 0 minut ($\Delta A = 0,5627$), přičemž bylo experimentálně zjištěno, že hodnota $\Delta A = 0,33$ odpovídá koncentraci aktivních míst, $[E] = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ¹⁰². Hodnota $\Delta A = 0,5627$ tedy odpovídá koncentraci aktivních míst $[E] = 3,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Následně bylo provedeno samotné štěpení: polymerní konjugát **P7-LCL** byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru o pH = 6,0 ($c = 2 \text{ mg ml}^{-1}$), byl přidán katepsin B (výsledná koncentrace katepsinu B v roztoku = 0,0563 mg ml^{-1} , toto množství odpovídá koncentraci aktivních míst $[E] = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tj. hodnotě převzaté z literatury⁶⁹ a použité pro štěpení) a glutathion (výsledná koncentrace glutathionu v roztoku = 1,5 mg ml^{-1}). Vzorky byly inkubovány při 37 °C, v předem určených časových bodech byly 2 × naředěny methanolem, centrifugovány a supernatant byl analyzován pomocí HPLC (metoda 1; viz odstavec 3.3.6) pro stanovení uvolněného LCL-161. Stanovení bylo provedeno v triplikátu.

Stabilita micelárních systémů PCL-g-PHPMA s enkapsulovaným léčivem AZD-5582 byla sledována při pH 7,4 (jako pufr byl použit PBS) pomocí filtrace. Roztok vzorku byl inkubován při 37 °C a v předem určených časových bodech byl přefiltrován přes 0,45 PVDF filtr pro odstranění uvolněného hydrofobního léčiva. Obsah neuvolněného léčiva ve filtrovaném roztoku byl následně stanoven pomocí HPLC (metoda 1; odstavec 3.3.6).

3.3.10 Elementární analýza

Stanovení C, H, N bylo prováděno na přístroji CHNS/O FlashSmart™ Elemental Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA). Přibližně 1,5 mg vzorku bylo naváženo do cínové kapsle pomocí analytických vah Sartorius SE 2-OCE. Kapsle byla utěsněna a vložena do autosampleru analyzátoru. Pro C, H, N stanovení byly následně použity standardní pracovní postupy. *Měření prováděla Zuzana Kálalová z Oddělení analytické chemie ÚMCH AV ČR, které tímto děkuje.*

3.3.11 Frakcionace tokem v asymetrickém poli (FFF)

Frakcionace tokem v asymetrickém poli (FFF) byla použita pro stanovení molárních hmotností a disperzity roubovaného kopolymeru **G1**. Měření byla prováděna na systému sestávajícím z kapalinového chromatografu (Agilent, USA), modulu Eclipse 3+ (Wyatt, USA) opatřeným

kanálem s regenerovanou celulosovou membránou (cutoff 10 kDa) a detektorů MALS Dawn Helios 8+ a refraktometrického detektoru Optilab rEX (obojí Wyatt, USA). Jako mobilní fáze byl použit 0,02% vodný roztok azidu sodného, průtok mobilní fáze detektorem byl 1 ml min⁻¹. Doba fokusace byla 5 minut za příčného toku 3,5 ml min⁻¹. Průtok injektorem byl nastaven na 0,2 ml min⁻¹ a ve všech případech bylo nastříknuto 100 µl vzorku. Po kroku fokusace se příčný tok lineárně snižoval z 2,5 ml min⁻¹ na 0,1 ml min⁻¹ během 35 minut a poté se udržoval konstantní na 0,1 ml min⁻¹ po dobu dalších 15 minut, po kterých následovalo 15 minut bez příčného toku. Délka analýzy byla 75 minut. Vzorky o koncentraci 5 mg ml⁻¹ (rozpuštěné v mobilní fázi) byly filtrovány přes 0,45 µm PVDF filtr. Pro vyhodnocení byl použit software Astra 8.1.0, pro micely tvořené PCL-g-PHPMA byla použita stejně jako v případě SEC analýzy hodnota dn/dc = 0,152 ml g⁻¹. *Měření prováděly Zuzana Mašínová a RNDr. Olga Kočková, Ph.D. z Oddělení analytické chemie ÚMCH AV ČR, kterým tímto děkuji.*

3.3.12 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

Měření SAXS bylo prováděno pomocí pinhole kamery MolMet (Rigaku, Japonsko), vylepšené pomocí SAXSLAB (Xenocs, Francie). Kamera byla připevněna k mikrofokusemu generátoru rentgenových paprsků MicroMax 003 (Rigaku, Japonsko), pracujícím při 0,6 mA a 50 kV. Dále byl součástí systému detektor Pilatus 300K (vakuová verze). Vzdálenost mezi vzorkem a detektorem byla kalibrována (behenát stříbrný) a nastavena pro pokrytí rozsahu rozptylového vektoru $q = 0,005-0,5 \text{ \AA}^{-1}$. Rozptylový vektor, q , je definován dle rovnice

$$q = \frac{4\pi}{\lambda \cdot \sin \theta} \quad (4)$$

kde λ je vlnová délka (CuK α čára = 1,54 Å) a 2θ je rozptylový úhel. Čas vystavení zdroji byl 720 minut při každém měření. Vzorek byl rozpuštěn v PBS, koncentrace 5 mg ml⁻¹. Signál samotného rozpouštědla a prázdné kapiláry byl odečten. Pro získání jednodimenzionálních SAXS křivek byla provedena azimutální integrace dvoudimenzionálních obrazů. Data byla následně zpracována s použitím softwarů SasView 5.0.5 a Sasfit 0.94.11. Gyrační poloměr, R_g , byl získán pomocí Guinierovy analýzy dle rovnice

$$I(q) = I(0) \cdot e^{-\left(\frac{R_g^2 q^2}{3}\right)} \quad (5).$$

Distribuční funkce $P(r)$ (párová distribuční funkce, *angl. pair-distance distribution function*) byla vypočtena inverzní Fourierovou transformací částicového faktoru (*angl. form factor*), $P(q)$, za použití rovnice

$$P(r) = 4\pi \int_0^\infty P(q) \frac{\sin qr}{qr} dq \quad (6)$$

kde r je vzdálenost. *Měření a interpretaci dat prováděly Eva Miškovská a Mgr. Magdalena Konefal, Ph.D. z Oddělení strukturní analýzy ÚMCH AV ČR. Oběma tímto děkuji.*

3.3.13 Stanovení elektroforetické mobility

Stanovení elektroforetické mobility bylo prováděno na přístroji 7100 CE (Agilent, USA). Měření probíhalo v nemodifikované křemenné kapiláře (vnitřní průměr 50 μm , vnější průměr 375 μm , celková délka 50,0 cm, efektivní délka 41,5 cm; Polymicro Technologies, USA). Před každým měřením byla kapilára promývána 2 minuty základním elektrolytem. Vzorek byl dávkován tlakem 5 kPa po dobu 5 sekund. Separáční napětí bylo 20 kV (proud přibližně 72 μA). Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr, $\text{pH} = 7,4$; $I = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$. Byla použita UV spektrometrická detekce při vlnové délce 200 nm. Kapilára byla termostatována na 25 $^{\circ}\text{C}$. Vzorek byl rozpuštěn v základním elektrolytu a naředěn na koncentraci 0,5-5 mg ml^{-1} podle odezvy detektoru a tvaru píku tak, aby koncentrace byla co nejnižší, ale zároveň umožňovala spolehlivé vyhodnocení. Ke všem vzorkům byl přidán DMSO o koncentraci 0,1 mg ml^{-1} jako marker elektroosmotického toku. Stanovení bylo provedeno v triplicátu. Efektivní elektroforetická mobilita, μ_{ef} , byla vypočtena dle vzorce (7)

$$\mu_{\text{ef}} = \left(\frac{1}{t_{\text{mig}}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right) \cdot \frac{l_{\text{t}} \cdot l_{\text{d}}}{U} \quad (7)$$

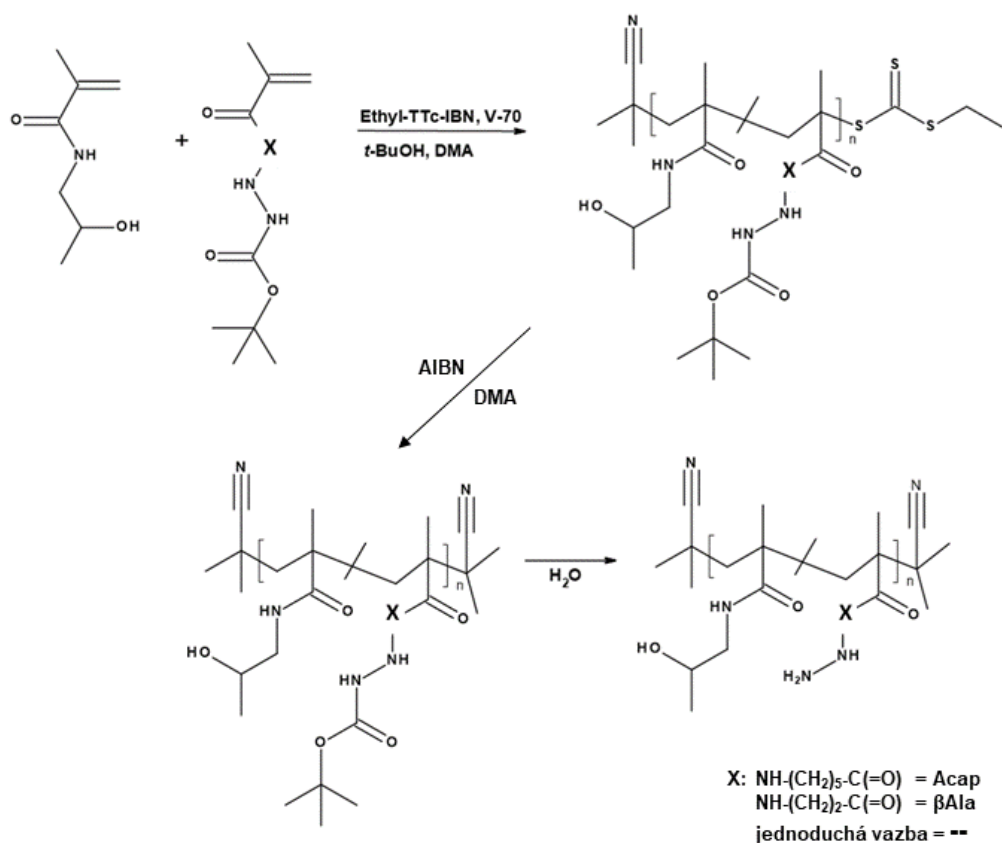
kde t_{M} je migrační čas analytu, t_{eof} je migrační čas markeru elektroosmotického toku, l_{T} je celková délka kapiláry, l_{D} je efektivní délka kapiláry a U je použité separáční napětí. *Měření prováděli doc. RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D. a Mgr. Alice Šimonová z Katedry analytické chemie PřF UK, kterým tímto děkuji.*

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Polymerní systémy pro dopravu prekurzorů biosyntézy protoporphyrinu IX pro fotodynamickou terapii

Prvním ze studovaných přístupů této práce k protinádorové terapii je fotodynamická terapie (PDT), ve které je jednou z používaných aktivních molekul, tzv. fotosenzibilizátorů, endogenní protoporphyrin IX (PPIX). Ten je však často podáván ve formě proléčiva (biosyntetického prekurzoru), kyseliny 5-aminolevulové (5-ALA) či jejích esterů. Tyto molekuly jsou však hydrofilní a nabité, a mají tak špatné farmakokinetické vlastnosti (např. špatný vstup do buněk, distribuce po celém těle, rychlá eliminace, navíc nejsou preferenčně akumulovány v nádorové tkáni). Jedním z možných řešení je proto vazba takovýchto molekul na polymerní nosič, který prodlouží jejich biologický poločas a přispěje k selektivní akumulaci v nádorové tkáni. Tato část práce navazuje na mou bakalářskou práci⁹⁸, některé výsledky jsou proto pro úplnost zopakovány.

Jako nosič byly použity hydrofilní kopolymery na bázi HPMA obsahující komonomerní jednotky s reaktivními hydrazidovými skupinami. Tyto polymerní prekurzory byly připravené pomocí RAFT polymerizace a následných postpolymerizačních reakcí (viz obrázek č. 16), a to odstranění koncových trithiokarbonátových skupin a následné odchránění hydrazidových skupin. Za účelem studia na vliv rychlosti uvolňování proléčiv byly použity komonomery se třemi spojkami mezi polymerním řetězcem a hydrazidovými skupinami: Acap (6C), β Ala (3C) a žádná spojka (--).



Obrázek č. 16 – Schéma syntézy polymerních prekurzorů pro využití v PDT. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

Molární hmotnost polymerních prekurzorů byla nastavena tak, aby byla co nejvyšší, ale zároveň se pohybovala pod limitem renální filtrace, tedy na hodnotu okolo 45000 g mol^{-1} . Výsledky fyzikálně-chemické charakterizace jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 – Fyzikálně-chemická charakterizace polymerních prekurzorů pro využití v PDT.

Polymer	Spojka	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\mathcal{D}	$D_{h,i}$ [nm]	Obsah NHH ₂ skupin [mol. %]
P1-ODBOC	Acap	39000	44000	1,13	9,0	22,0
P2-ODBOC	βAla	39000	46000	1,16	8,6	24,4
P3-ODBOC	--	41000	46000	1,11	9,9	14,0

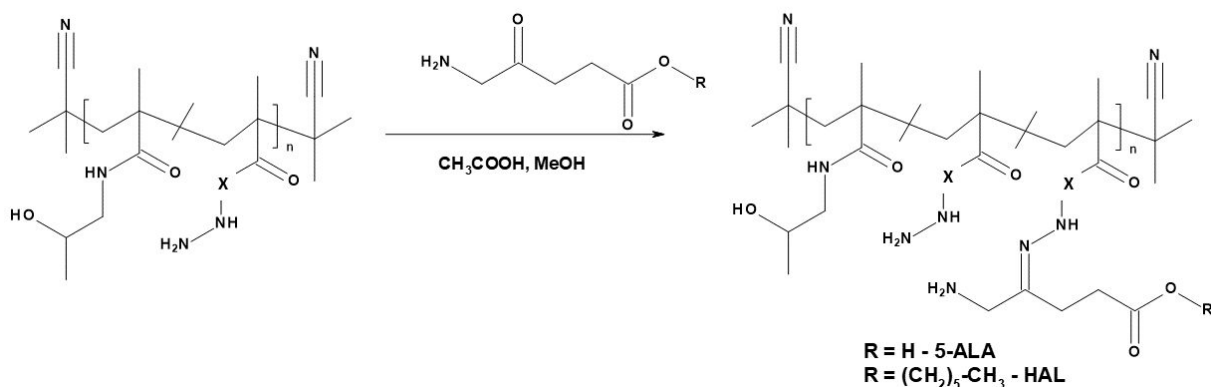
Průměry molárních hmotností a disperzita byly stanoveny pomocí SEC (systém 1, mobilní fáze DMF + LiBr), hodnota intenzitně váženého hydrodynamického průměru ($D_{h,i}$) byla stanovena pomocí DLS v PBS, obsah NHH₂ skupin byl stanoven pomocí NMR.

Z výsledků v tabulce č. 2 je patrné, že byly připraveny kopolymery o požadovaných molárních hmotnostech a s nízkou disperzitou (\mathcal{D}). Jejich hydrodynamický průměr (D_h) byl menší než 10 nm, a jsou tedy vylučitelné renální filtrací. Průměry molárních hmotností (M_n , M_w) byly stanoveny jak po polymerizaci, tak po odstranění trithiokarbonátových skupin (výsledky nejsou uvedeny) a po odstranění chránících Boc skupin. Během postpolymerizačních reakcí se však

tyto parametry signifikantně neměnily. Pouze odstraněním chránicích Boc skupin došlo k mírnému zvýšení disperzity, pravděpodobně způsobenému nekovalentními interakcemi hydrazidových skupin.

Obsah hydrazidových skupin podél řetězce se u tří polymerních prekurzorů významně lišil, monomer Ma-NHNH-Boc má zřejmě oproti ostatním komonomerům horší kopolymerizační parametry, proto byl u vzorku **P3-ODBOC** podstatně nižší obsah NHNH₂ skupin. To mohlo být způsobeno např. sterickou zábranou objemné chránicí Boc skupiny, která byla příliš blízko rostoucímu polymernímu řetězci. Navíc pro dosažení obdobných výtěžků bylo nutné syntetizovat polymer **P3** za odlišných polymerizačních podmínek (delší čas, nižší teplota). Výtěžky všech polymerizací se tak pohybovaly okolo hodnoty 60 %, celkové výtěžky finálních polymerních prekurzorů po postpolymerizačních reakcích pak dosahovaly hodnot okolo 35 %.

Hydrazidové skupiny byly následně využity pro kovalentní vazbu proléčiv, 5-ALA a jejího hexyl esteru (HAL), obsahujících ketoskupinu v jejich struktuře. Po reakci těchto skupin došlo k vytvoření pH senzitivní hydrazonové vazby (viz obrázek č. 17), hydrolyzovatelné v kyselém prostředí. Vazba obou proléčiv byla prováděna v bezvodém kyselém prostředí při laboratorní teplotě. Charakterizace výsledných polymerních konjugátů je uvedena v tabulce č. 3.



Obrázek č. 17 – Schéma konjugace 5-ALA/HAL k polymernímu prekurzoru za tvorby pH senzitivní hydrazonové vazby. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

Tabulka č. 3 – Fyzikálně-chemická charakterizace polymerních konjugátů nesoucích 5-ALA/HAL.

Polymer	Spojka	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	$D_{h,i}$ [nm]	Obsah proléčiva [hm. %]
P1-5-ALA	Acap	49000	60000	1,20	13,0	17,5
P2-5-ALA	βAla	N.D.*	N.D.*	N.D.*	10,2	18,9
P3-5-ALA	--	51000	57000	1,13	8,9	10,2
P1-HAL	Acap	52000	62000	1,19	10,8	10,5
P2-HAL	βAla	50000	61000	1,22	10,6	11,9
P3-HAL	--	54000	74000	1,37	8,5	5,8

Průměry molárních hmotností a disperzita byly stanoveny pomocí SEC (systém 1, mobilní fáze DMF + LiBr), hodnota intenzitně váženého hydrodynamického průměru ($D_{h,i}$) byla stanovena pomocí DLS v PBS, obsah proléčiva byl stanoven pomocí HPLC po uvolnění proléčiva. * N.D. = nestanoveno (vzorek nerozpustný v mobilní fázi).

Molární hmotnosti těchto polymerních konjugátů byly stanoveny v organické mobilní fázi, přestože se jedná o vysoce hydrofilní materiály (hydrofilní polymer + hydrofilní proléčivo). Důvodem byla interakce se stacionární fází kolony v systémech, které obsahovaly vodu v mobilní fázi, tyto systémy tedy nebylo možné použít. Na druhé straně, při příliš velkém obsahu proléčiva se vyskytovaly problémy s rozpustností vzorků v organické mobilní fázi (DMF + LiBr), proto u konjugátu **P2-5-ALA** nebylo možné molární hmotnosti stanovit. Z porovnání s molárními hmotnostmi polymerních prekurzorů (viz tabulky č. 2 a 3) je zřejmé, že po vazbě proléčiva molární hmotnost vzrostla, v případě vzorku **P3-HAL** došlo zřejmě navíc v malé míře k vedlejším reakcím, což vedlo k výraznému zvýšení M_w , a tedy zvýšení disperzity. Oproti tomu hodnoty D_h se neměnily příliš signifikantně. V některých případech se D_h lehce zvětšil, v jiných případech došlo k lehkému zmenšení, pouze však v rámci chyby měření. U konjugátu **P2-5-ALA** se hodnota D_h nezměnila více, než u ostatních konjugátů, proto lze předpokládat, že jeho molární hmotnost se nezvýšila více než v ostatních případech. Velký rozdíl mezi konjugáty nesoucí 5-ALA a HAL byl však v účinnosti vazby, která je podstatně nižší pro HAL. To mohlo být způsobeno např. sterickou zábranou objemného hexylového zbytku.

Vzhledem k tomu, že všechny připravené konjugáty nesou proléčiva s ionizovatelnými skupinami (amino skupina v případě obou proléčiv a karboxylová skupina v případě 5-ALA), byla studována jejich elektroforetická mobilita v pufru o pH 7,4, mimikující prostředí krevního řečiště. Účelem těchto měření bylo potvrdit či vyvrátit, zda se konjugáty chovají spíše jako polyelektrolyty, či zda se jejich elektroforetická mobilita blíží více PHPMA homopolymeru. Pokud by konjugáty měly příliš velký kladný náboj, mohly by být toxické během dopravy či být vychytávány pomocí retikuloendoteliálního systému, naopak konjugáty s velkým záporným

nábojem mohou být zachytávány v ledvinách. Analyzovány byly všechny polymerní prekurzory a konjugáty, PHPMA homopolymer, samotná proléčiva, dále poly(L-lysin) jako polykationt a poly(L-asparagová kyselina) jako polyaniont a marker elektroosmotického toku (DMSO). Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4 – Hodnoty elektroforetické mobility.

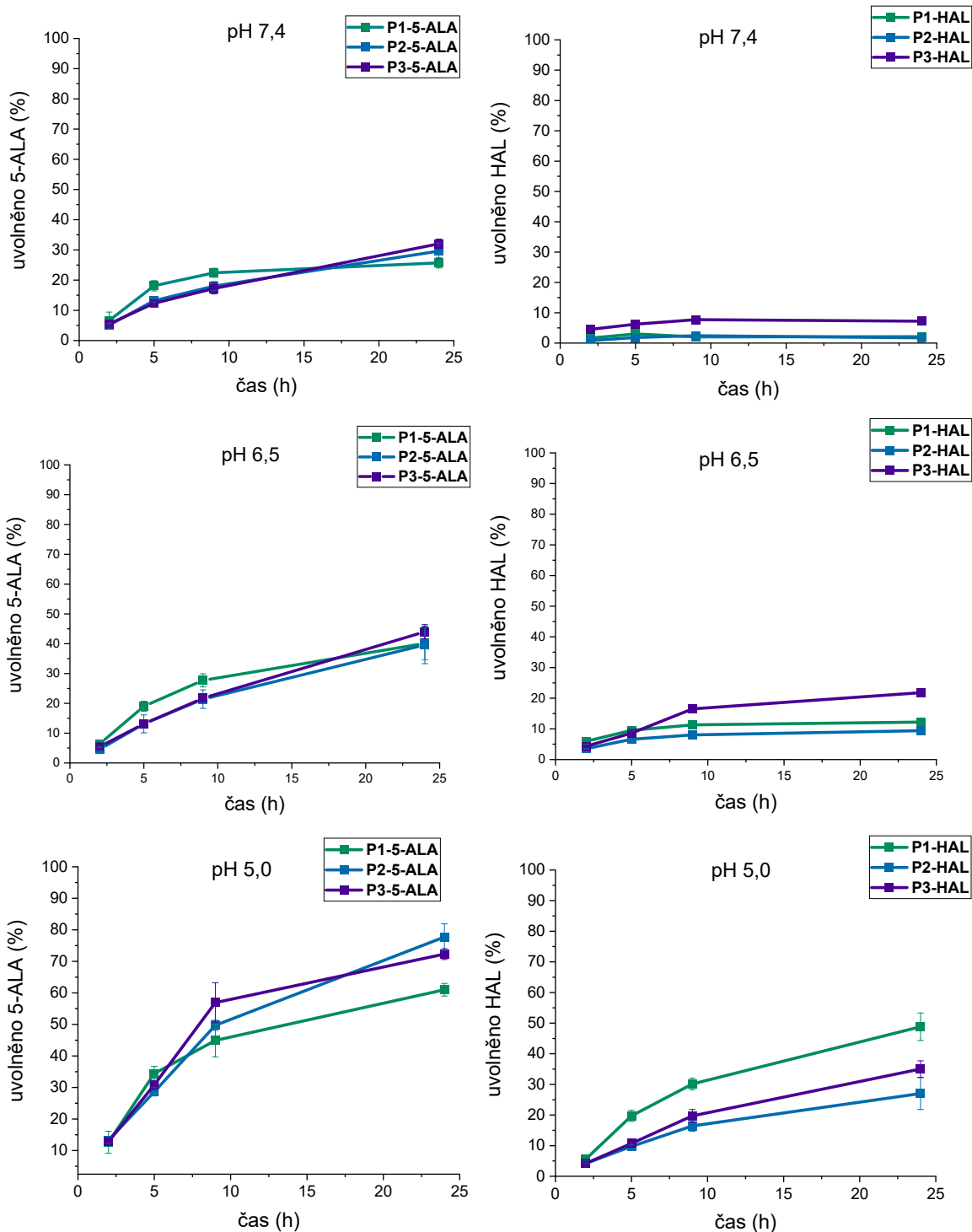
Vzorek	μ_{ef} [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
P1-5-ALA	-1,47
P2-5-ALA	-2,58
P3-5-ALA	-0,47
P1-HAL	3,23
P2-HAL	3,28
P3-HAL	1,69
P1-ODBOC	0,39
P2-ODBOC	0,43
P3-ODBOC	0,55
homopolymer PHPMA	0,60
5-ALA	-5,28
HAL	14,81
DMSO	0
Poly(Lys)	10,8
Poly(Asp)	-39,8

Efektivní elektroforetická mobilita byla stanovena pomocí kapilární elektroforézy (základní elektrolyt fosfátový pufr, pH = 7,4), hodnoty byly vypočteny z migračních časů dle rovnice (7).

Polymerní konjugáty nesoucí 5-ALA vykazovaly lehce zápornou mobilitu, zvyšující se se zvyšujícím se obsahem 5-ALA. U polymerů nesoucích HAL tomu bylo přesně naopak, kladná mobilita se zvyšovala se zvyšujícím se obsahem HAL. Polymerní prekurzory nesoucí hydrazidové skupiny vykazovaly podobné mobility jako homopolymer PHPMA, a to menší než 1. Je však nutné říci, že hodnoty jsou vztahovány k DMSO, jakožto markeru, jehož mobilita je předpokládána jako nulová. Mezi různými markery (jako markery se používají neutrální látky) jsou však také rozdíly v hodnotách mobility, jak bylo popsáno¹⁰³, např. thiomčovina vykazuje oproti DMSO hodnotu $-0,90 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Hodnoty mobilit tak nejsou absolutní, lze je však mezi sebou porovnávat a vztahovat k vybranému standardu. Mobility obou proléčiv byly značně vyšší než u všech polymerů, dále absolutní hodnota pro 5-ALA byla přibližně třetinová oproti HAL, což odpovídá vypočtenému zastoupení jednotlivých iontových forem obou sloučenin při pH 7,4. Analogicky, absolutní hodnoty mobilit konjugátů nesoucích 5-ALA byly nižší než hodnoty pro polymery nesoucí HAL, přestože tyto polymery nesly méně proléčiva.

Konečně, mobility polyelektrolytů o řádově stejných molárních hmotnostech (pro zajištění podobného roztokového chování z hlediska viskozity a difuze) byly o mnoho vyšší (v absolutní hodnotě). Lze tedy říci, že roztokové chování připravených polymerních konjugátů se nepadobá polyelektrolytům, a je tedy možné předpokládat, že během dopravy v těle by tyto systémy neměly vykazovat toxicitu ani zádrž v ledvinách.

Dále byla studována kinetika uvolňování obou proléčiv z polymerních nosičů při různých hodnotách pH. Pufr o pH 7,4 mimikoval krevní řečiště, pH 6,5 bylo použito pro simulaci extracelulárního nádorového prostředí a pH 5,0 bylo použito jako simulace prostředí lysozomu nádorových buněk. Účelem bylo zjistit, jaký vliv má spojka mezi polymerním řetězcem a hydrazonovou vazbou na rychlost hydrolýzy této pH senzitivní vazby, a také, zda se obě proléčiva uvolňují s podobným rychlostním profilem. Výsledky tohoto studia jsou zobrazeny v grafech na obrázku č. 18.



Obrázek č. 18 – Grafy závislosti uvolněného proléčiva na čase v pufrech o příslušných hodnotách pH.

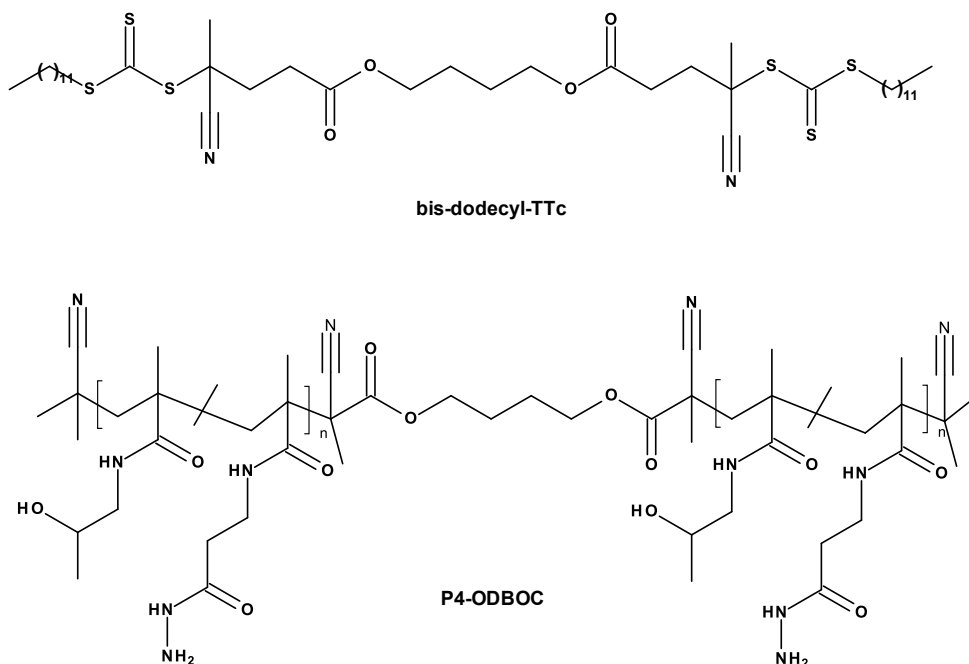
Kinetika uvolňování 5-ALA byla dle předpokladu závislá na pH, nejméně docházelo k hydrolyze při pH 7,4, přesto se však za těchto podmínek uvolnilo okolo 30 % navázaného proléčiva za 24 hodin, systém tak při cirkulaci v krevním řečišti není zcela stabilní, nicméně rychlost uvolňování je stále v rozumném měřítku a umožňuje cílenou dopravu do nádorové tkáně. Se snižujícím se pH se rychlost uvolňování zvyšovala, při pH 5,0 se za 24 hodin uvolnilo

60-80 % navázané 5-ALA, v mikroprostředí nádoru se tedy léčivo uvolní podstatně rychleji. Z grafů je zřejmé, že vliv spojky mezi polymerním řetězcem a hydrazonovou vazbou byl velmi malý, znatelný pouze při pH 5,0. Při další optimalizaci systému bude tedy spojka důležitá spíše z hlediska kopolymerizačních parametrů než z hlediska vlivu na rychlost uvolňování.

Zásadní vliv na rychlost hydrolýzy hydrazonové vazby měla struktura proléčiva. HAL byl z polymerního nosiče uvolňován podstatně pomaleji, při pH 7,4 bylo za 24 hodin uvolněno maximálně 7 % navázaného HAL, v případě konjugátu **P3-HAL** (bez spojky), u ostatních dvou konjugátů bylo uvolněno pouze okolo 1 %. Tyto konjugáty jsou tak při dopravě do nádoru mnohem stabilnější než v případě konjugátů nesoucích 5-ALA. Rychlost uvolňování HAL opět vzrůstala s klesajícím pH, ovšem při pH 5,0 bylo za 24 hodin uvolněno mezi 25 a 45 % navázaného HAL. V tomto případě byl vliv spojky patrnější, nejrychlejší hydrolýzu v nejnižším použitém pH vykazoval konjugát **P1-HAL** (spojka Acap), nejpomalejší naopak **P2-HAL** (spojka β Ala). Vliv spojky však stále nebyl zásadní, rychlostní profily jsou u všech konjugátů nesoucích HAL podobné. Pomalejší uvolňování HAL oproti 5-ALA je způsobeno zřejmě větší hydrofobií, popř. i sterickou náročností hexylového zbytku, svou roli může hrát i kladný náboj tohoto proléčiva, který může do jisté míry zvyšovat lokální pH v rámci polymerního klubka konjugátu.

Doposud popsané polymerní konjugáty 5-ALA a HAL byly založeny na vodorozpustných kopolymerech s molární hmotností pod limitem renální filtrace. V dalším textu bude popsána syntéza a charakterizace druhé generace polymerních konjugátů vycházejících z biodegradovatelných polymerních prekurzorů s molární hmotností nad limitem renální filtrace. Druhá generace s vyšší molární hmotností byla navržena s cílem navýšit akumulaci v nádorové tkáni posílením EPR efektu. Pro tuto generaci byla vybrána již pouze jedna spojka, β Ala, pro obě proléčiva. Tato spojka byla vybrána z několika důvodů: při RAFT polymerizaci se komonomer s touto spojkou nejlépe zabudovává (lepší kopolymerizační parametry), uvolňování 5-ALA i HAL je v případě této spojky vhodné pro další experimenty a tato spojka umožnila navázání vyššího množství proléčiva.

Jako nosiče byly zvoleny vysokomolekulární lineární kopolymery obsahující ve středu biodegradovatelnou spojkou (dále označovány jako diblokové, oba bloky jsou v tomto případě shodné) s hydrolyzovatelnými esterovými vazbami. Tyto polymery lze připravit za použití bifunkčního CTA (zde bis-dodecyl-TTc) při RAFT polymerizaci. Struktura tohoto CTA a vzniklého polymeru je zobrazena na obrázku č. 19.



Obrázek č. 19 – Struktura bifunkčního CTA a z něj vzniklého diblokového polymerního prekurzoru. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

Polymerní prekurzor **P4** byl připraven RAFT polymerizací monomerů HPMA a Ma-βAla-NHNH-Boc s následným odstraněním trithiokarbonátových skupin a odstraněním chránících Boc skupin. V tomto případě bylo díky použití delšího času a nižší teploty polymerizace dosaženo vyššího výtěžku polymeru **P4** (75 %). Syntéza byla analogická k polymerům **P1-P3**, pouze s použitím rozdílného CTA a různým způsobem odstranění Boc skupin. V tomto případě nebylo možné použít dříve popsáný způsob spočívající v povaření ve vodě, neboť by došlo k hydrolýze esterových vazeb. Boc skupiny tak byly odstraněny pomocí TFA a následnou neutralizací. Symetričnost obou ramen byla ověřena totální hydrolýzou esterových vazeb (vodný roztok NaOH, 25 °C, 24 hodin) a následnou SEC analýzou (označení **P4-HYDROL**). Molární hmotnost polymerního prekurzoru **P4** byla nastavena na přibližně dvojnásobnou hodnotu oproti polymerům **P1** až **P3**. Vazba proléčiv 5-ALA a HAL probíhala analogicky k lineárním polymerům (**P1** až **P3**). Výsledky fyzikálně-chemické charakterizace jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5 – Fyzikálně-chemická charakterizace diblokových polymerů.

Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	$D_{h,i}$ [nm]	Obsah NHH ₂ skupin [mol. %]
P4-ODBOC	78000	96000	1,22	17,5	24,5
P4-HYDROL	39000	44000	1,14	-	-
Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	$D_{h,i}$ [nm]	Obsah proléčiva [hm. %]
P4-5-ALA	N.D.*	N.D.*	N.D.*	18,3	21,0
P4-HAL	105000	133000	1,28	15,7	15,6

Průměry molárních hmotností a disperzita byly stanoveny pomocí SEC (systém 1, mobilní fáze DMF + LiBr), u vzorku **P4-HYDROL** byl použit systém 2 (mobilní fáze PBS), hodnota intenzitně váženého hydrodynamického průměru ($D_{h,i}$) byla stanovena pomocí DLS v PBS, obsah NHH₂ skupin byl stanoven pomocí NMR, obsah proléčiva byl stanoven pomocí HPLC po uvolnění proléčiva. * N.D. = nestanoveno (vzorek nerozpustný v mobilní fázi).

Pomocí SEC bylo zjištěno, že molární hmotnost diblokového polymerního konjugátu odpovídala nastaveným parametrům kopolymerizace, disperzita byla mírně vyšší, což je možné vysvětlit přítomností malého množství monoaktivovaného CTA. Molární hmotnost polymeru po hydrolyze byla poloviční, což potvrzuje symetričnost jednotlivých bloků. Hodnoty D_h pak byly vyšší než u lineárních polymerních prekurzorů **P1-P3**, tento systém tedy bude schopen déle cirkulovat v těle. Obsah hydrazidových skupin byl podobný jako v případě **P2-ODBOC**. Hydrolytická stabilita tohoto systému (hydrolyza esterových vazeb při pH 7,4) nebyla studována, byla však studována a publikována stabilita analogického systému, homopolymeru PHPMA syntetizovaného s použitím stejného CTA. Poločas rozpadu na jednotlivá ramena byl 8 dní³⁶.

Po vazbě proléčiva 5-ALA opět nebylo možné stanovit průměry molárních hmotností pomocí SEC, analogicky k polymeru **P2-5-ALA**, v rámci další optimalizace bude nutné najít vhodnou kombinaci rozpouštědla a SEC kolony, která by umožňovala toto stanovení u všech systémů obsahujících 5-ALA či HAL. V případě polymerního konjugátu **P4-HAL** došlo k nárůstu molární hmotnosti analogicky k polymeru **P2-HAL**. Rozdíl hodnot D_h obou diblokových polymerních konjugátů oproti polymernímu prekurzoru opět nebyl signifikantní.

U diblokových polymerních konjugátů bylo pro obě proléčiva dosaženo vyššího obsahu těchto látek, než tomu bylo v případě lineárních polymerních konjugátů (**P2-5-ALA** a **P2-HAL**). Lze předpokládat, že to bylo způsobeno vyšší reaktivitou hydrazidových skupin po ochránění pomocí TFA. Je pravděpodobné, že i přes neutralizaci hydrazidových skupin pomocí pufru PBS zůstalo určité procento těchto skupin ve formě trifluoracetátu, prostředí vazebné reakce tedy mohlo být kyselější, což zřejmě způsobilo navázání většího množství proléčiva.

U těchto konjugátů byla také studována elektroforetická mobilita, výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 6. Z výsledků je patrné, že oproti lineárním polymerům měly tyto diblokové polymery nižší hodnoty mobilit, a to jak v případě polymerního prekurzoru, tak v případě polymerních konjugátů s oběma proléčivými. V případě polymerního prekurzoru **P4-ODBOC** je snížení mobility oproti **P1-P3-ODBOC** způsobeno přítomností zbytkové TFA (hydrazidové skupiny ve formě trifluoracetátu, popř. sorpce zbylé TFA), v případě polymerního konjugátu **P4-5-ALA** navíc hraje roli i vyšší obsah záporně nabitého proléčiva. V případě konjugátu **P4-HAL**, který stále obsahuje část hydrazidových skupin volných, a tedy opět ve formě trifluoracetátu, byla výsledkem efektu kladného HAL a záporného trifluoracetátu nulová mobilita. Tyto tři polymery by stejně jako předchozí lineární polymery neměly vykazovat chování podobné polykationtům ani polyaniontům, a předpokládá se tedy, že nebudou po podání do těla toxické ani se zadržovat v ledvinách.

Tabulka č. 6 – Hodnoty elektroforetické mobility diblokových polymerů.

Vzorek	μ_{ef} [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
P4-ODBOC	-1,09
P4-5-ALA	-5,57
P4-HAL	0

Efektivní elektroforetická mobilita byla stanovena pomocí kapilární elektroforézy (základní elektrolyt fosfátový pufr; pH = 7,4), hodnoty byly vypočteny z migračních časů dle rovnice (7).

Kinetika uvolňování proléčiv z diblokových polymerních konjugátů nebyla studována, lze předpokládat, že tato kinetika je shodná s kinetikou pro lineární konjugáty. Při této úvaze bylo vycházeno z literatury^{36,38}, která dokládá, že molární hmotnost polymeru signifikantně neovlivní rychlost uvolňování léčiv z polymerních konjugátů vázaných pomocí hydrazonové vazby.

4.2 Polymerní systémy pro dopravu sloučenin inhibujících antiapoptotické proteiny IAP

Vzhledem k tomu, že lidská nádorová tkáň je velmi heterogenní, stále častěji se objevují případy, ve kterých léčba cílená pouze na jeden terapeutický cíl selhává. Využívají se proto s výhodou kombinace dvou nebo více terapeutických přístupů. Tato část je proto věnována novým polymerním systémům cílícím na antiapoptotické proteiny (IAP) tím, že dopravují jejich inhibitory. IAP inhibitory jsou nízkomolekulární látky, které nejsou přednostně akumulovány v nádoru, obsahují amidové vazby, které mohou být během jejich cirkulace v krevním oběhu degradovány. Navíc mohou tyto látky vykazovat vedlejší účinky kvůli distribuci i do zdravých tkání. Jejich farmakokinetiku lze opět zlepšit použitím polymerních nosičů. V rámci této práce byly vybrány dva IAP inhibitory: prvním z nich je LCL-161 (struktura viz obrázek č. 10, strana 24), obsahující vhodné skupiny pro konjugaci

s vodorozpustným polymerním nosičem. Druhý použitý IAP inhibitor nese označení AZD-5582. Ze struktury na obrázku č. 10 (strana 24) je patrné, že se jedná o dimer obsahující velmi málo funkčních skupin pro kovalentní modifikaci, navíc nerozpustný ve vodě, jeví se proto jako vhodný pro enkapsulaci do polymerních micel.

4.2.1 Polymerní systémy nesoucí léčivo LCL-161

Pro kovalentní vazbu léčiva LCL-161 na polymerní nosič byla vybrána jeho ketoskupina, kterou lze reagovat s polymerním nosičem obsahujícím hydrazidové skupiny za tvorby pH senzitivní hydrazonové vazby, analogicky k vazbě proléčiv 5-ALA a HAL. Nejprve byl tedy syntetizován vodorozpustný polymerní prekurzor na bázi HPMA nesoucí hydrazidové skupiny podél řetězce, polymerní prekurzor nese označení **P5**. Syntéza probíhala analogicky k polymernímu prekurzoru **P1** (tedy RAFT polymerizace, odstranění trithiokarbonátových skupin a odstranění chránicích Boc skupin), pouze s nižším obsahem komonomeru. V tomto případě byl výtěžek RAFT polymerizace opět okolo 60 %.

Molární hmotnost polymerního prekurzoru byla nastavena podmínkami kopolymerizace na hodnotu okolo 30000 g mol⁻¹, tedy opět pod limitem renální filtrace. Výsledky uvedené v tabulce č. 8 (strana 59) ukazují, že bylo dosaženo hodnot pouze mírně vyšších, než se předpokládalo, polymerní prekurzor **P5** je však stále vylučitelný, což potvrzuje i zjištěná hodnota D_h .

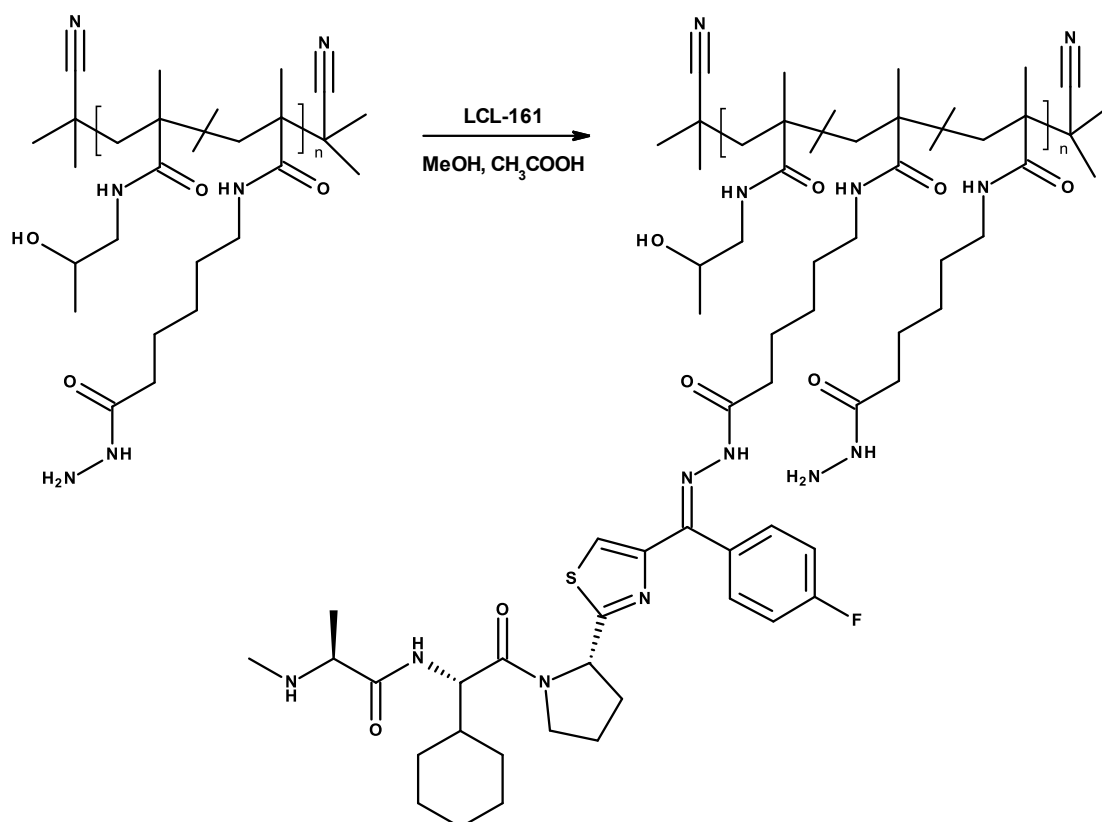
Vzhledem k tomu, že ketoskupina léčiva je z obou stran v konjugaci s aromatickými systémy, předpokládalo se, že se změní její reaktivita, a proto byly podmínky vazby nejprve optimalizovány. Bylo optimalizováno složení rozpouštědel a teplota. Průběh reakcí byl monitorován pomocí SEC (systém 3, viz odstavec 3.3.1) s UV detektorem ($\lambda = 270$ nm, charakteristická pro absorpci léčiva, nikoliv však polymeru), konkrétně byl sledován poměr ploch píků polymeru a léčiva, A_{pol}/A_{LCL} , při této vlnové délce. Vzhledem k tomu, že prvními experimenty bylo zjištěno, že tento poměr s časem vzrůstá, byl nastaven reakční čas na 72 hodin. Výsledky optimalizace jsou uvedeny v tabulce č. 7. Počáteční hodnota ($t = 0$ hodin) A_{pol}/A_{LCL} se pohybovala mezi 0,003 a 0,01. Dále byl sledován rozklad léčiva během reakcí pomocí HPLC, reakce, u kterých rozklad probíhal, jsou v tabulce označeny **červeně**.

Tabulka č. 7 – Optimalizace reakčních podmínek vazby léčiva LCL-161 pomocí hydrazonové vazby.

Reakce	Rozpouštědlo	Teplota	$A_{\text{pol}}/A_{\text{LCL}}$
1	Methanol + k. octová	25 °C	0,389
2	Methanol + k. octová	60 °C	3,45
3	DMA + k. octová	25 °C	0,00877
4	DMA + k. octová	60 °C	0,980
5	K. octová	25 °C	2,83
6	K. octová	60 °C	2,23
7	Methanol + TFA	25 °C	0,441
8	Methanol + TFA	60 °C	0,215
9	DMA + TFA	25 °C	1,03
10	DMA + TFA	60 °C	1,04
11	TFA	25 °C	0,402
12	TFA	60 °C	0,263

V případě použití methanolu/DMA + kyseliny bylo použito 12 μl kyseliny na 10 mg výchozích látek. U reakcí označených **červeně** probíhal rozklad léčiva.

Na základě tohoto experimentu byly vybrány podmínky reakce 2, u které byl poměr $A_{\text{pol}}/A_{\text{LCL}}$ nejvyšší, jako vhodné pro další postup a reakce byla zopakována včetně izolace produktu. Schéma reakce je uvedeno na obrázku č. 20, výsledky fyzikálně-chemické charakterizace polymerního prekurzoru **P5-ODBOC** a polymerního konjugátu **P5-LCL** jsou pak uvedeny v tabulce č. 8.



Obrázek č. 20 – Schéma syntézy polymerního konjugátu **P5-LCL**, nesoucího léčivo LCL-161, vázané pomocí pH senzitivní hydrazonové vazby. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

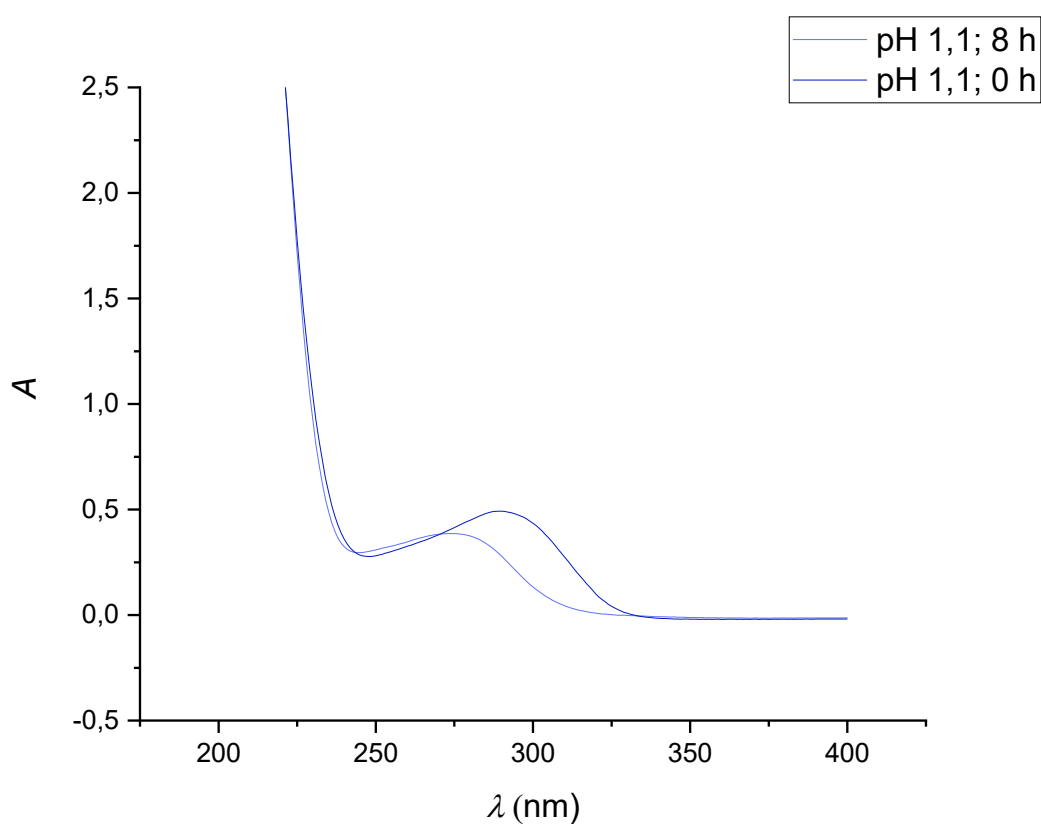
Tabulka č. 8 – Fyzikálně-chemická charakterizace polymerního konjugátu **P5-LCL** a příslušného polymerního prekurzoru.

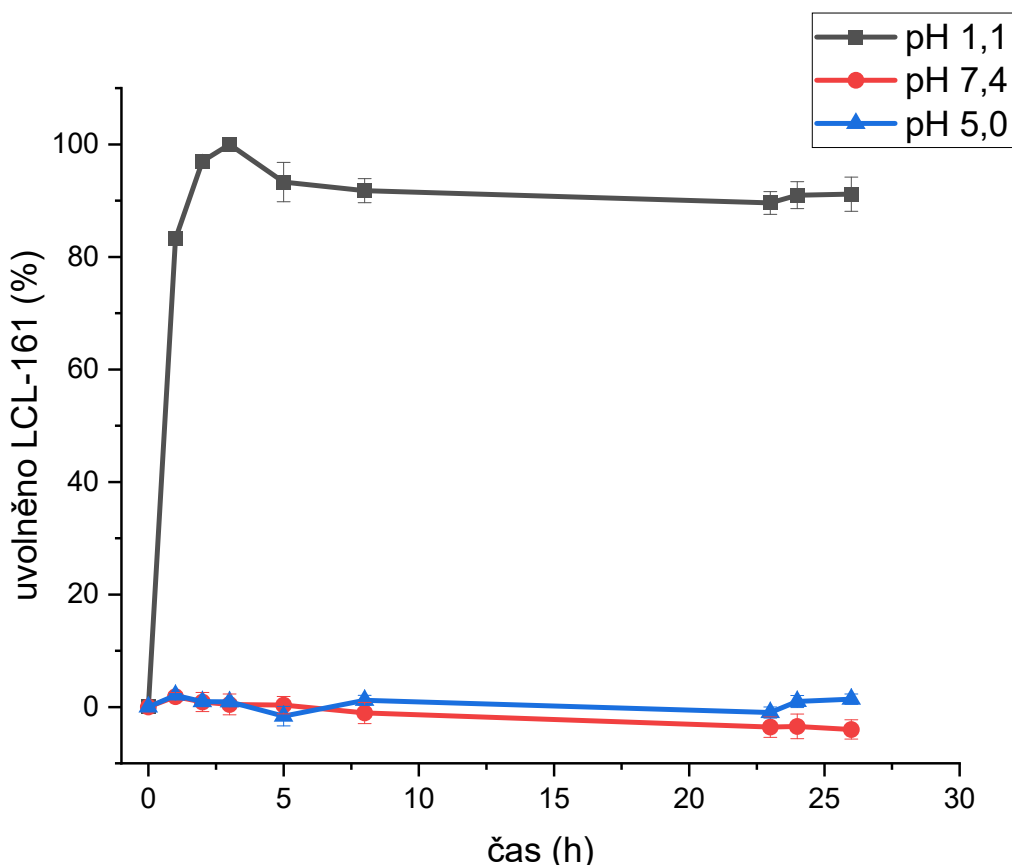
Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	$D_{h,w}$ [nm]	Obsah NHHH ₂ skupin [mol. %]
P5-ODBOC	33000	37000	1,12	8,6	7,9
Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	$D_{h,w}$ [nm]	Obsah LCL-161 [hm. %]
P5-LCL	34000	40000	1,17	8,6	7,5

Průměry molárních hmotností, disperzita a hodnota hmotnostně váženého hydrodynamického průměru, $D_{h,w}$, byly stanoveny pomocí SEC (systém 2, mobilní fáze PBS), obsah NHHH₂ skupin byl stanoven pomocí NMR, obsah LCL-161 byl stanoven pomocí HPLC po jeho uvolnění.

Vazbou léčiva došlo pouze k mírnému vzrůstu molární hmotnosti, hodnota D_h , kterou bylo možno zjistit přímo pomocí SEC díky viskozimetrické detekci, se nezměnila, stále se tedy jednalo o vodorozpustný systém s roztokovým chováním blízkým PHPMA, polymerní konjugát tedy dokázal úspěšně zlepšit rozpustnost léčiva. Díky použití vysoké teploty bylo navázáno poměrně vysoké množství léčiva (68,2 % z léčiva v zásadě).

Vazbou léčiva na polymerní prekurzor došlo ke vzniku hydrazonové vazby, která však v tomto případě byla konjugována ke dvěma aromatickým systémům. Došlo tak k posunu v absorpčním UV spektru polymerního konjugátu ($\lambda_{\max,2} = 290$ nm) oproti spektru volného LCL-161 ($\lambda_{\max,2} = 270$ nm). Tohoto posunu bylo využito ke studiu uvolňování LCL-161 z konjugátu **P5-LCL**. Na obrázku č. 21 je zobrazeno UV absorpční spektrum konjugátu **P5-LCL** před a po uvolnění léčiva (nahore), dále pak výsledky experimentu zkoumajícího uvolňování LCL-161 z tohoto konjugátu v pufrch o různých hodnotách pH (dole). Pro stanovení 100 % uvolněného léčiva byl proveden tento experiment i v pH 1,1, kde se předpokládá, že dojde ke kompletnímu uvolnění.



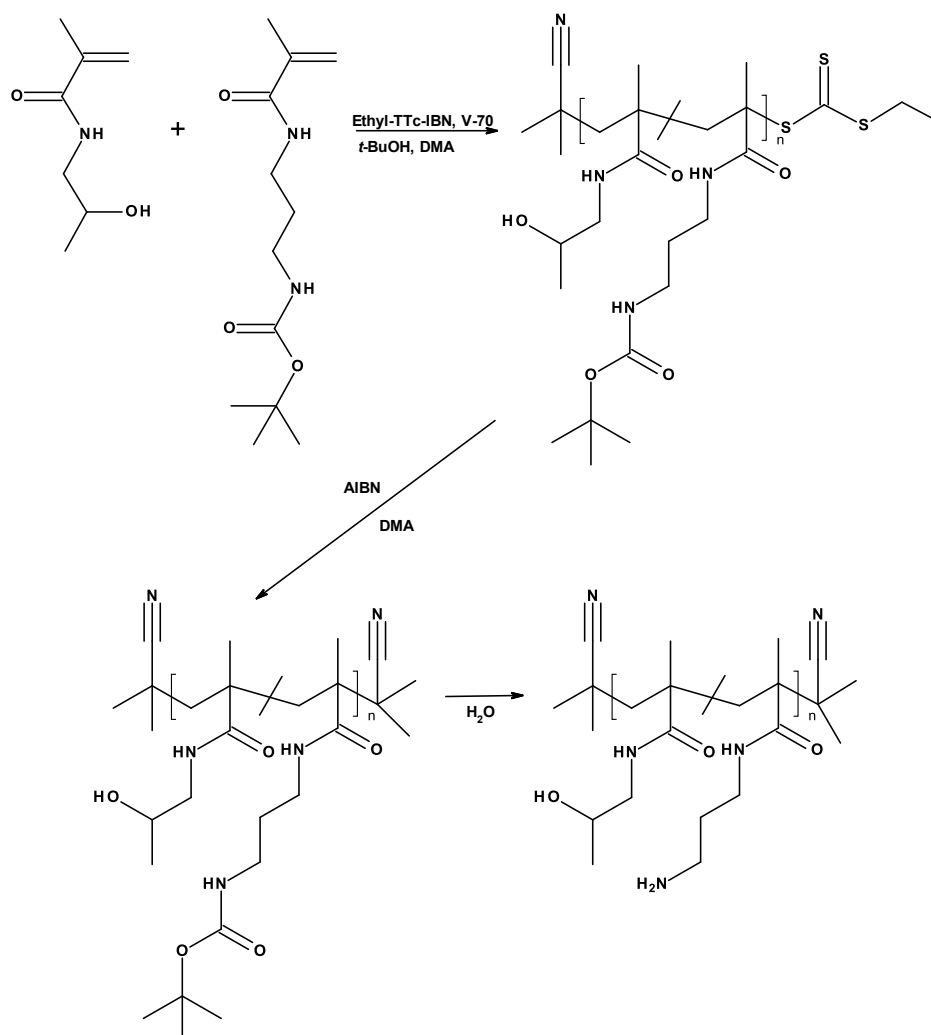


Obrázek č. 21 – Rozdíl v absorpčních spektrech polymerního konjugátu **P5-LCL** před a po uvolnění léčiva (nahore) a graf závislosti množství uvolněného LCL-161 na čase v pufrch o různých hodnotách pH (dole).

Předpokládalo se, že kinetika hydrolýzy hydrazonové vazby v konjugátu **P5-LCL** za uvolnění LCL-161 bude pomalejší než např. u konjugátů nesoucích 5-ALA, a to vzhledem ke konjugaci této vazby. Výsledky však ukázaly, že hydrazonová vazba je stabilní nejen v pH 7,4, ale i v prostředí o pH 5,0, kde dochází k uvolnění okolo 2 % LCL-161 za 24 hodin. Hydrazonová vazba je poměrně nestabilní při pH 1,1, její pH senzitivita je tedy výrazně posunuta k nižším hodnotám pH. Tento posun k nižším hodnotám pH je přímo závislý na již zmíněné konjugaci se dvěma aromatickými skupinami.

Vzhledem k tomu, že hydrazonová vazba v polymerním konjugátu **P5-LCL** je kvůli její konjugaci velmi stabilní i při pH 5,0, jako další postup byla zvolena příprava polymerního konjugátu nesoucího LCL-161 vázané pomocí iminové vazby, která je známá menší stabilitou oproti vazbě hydrazonové⁶². Nejdříve byl tedy připraven polymerní prekurzor nesoucí reaktivní aminové skupiny pomocí RAFT polymerizace monomerů HPMA a APMA-Boc (molární hmotnost nastavena opět na 30000 g mol⁻¹), následovalo odstranění trithiokarbonátových skupin a ochránění aminových skupin. Oproti polymernímu prekurzoru **P5** byl rozdíl v použití vyšší teploty (150 °C oproti 100 °C) při odstranění chránících Boc skupin. Výtěžek RAFT

polymerizace se pohyboval opět okolo 60 %, stejně jako u polymerů **P1** až **P3** a **P5**. Schéma syntézy polymeru **P6** je uvedeno na obrázku č. 22, výsledky fyzikálně-chemické charakterizace pak v tabulce č. 9.



Obrázek č. 22 – Schéma syntézy polymerního prekurzoru **P6**, obsahujícího reaktivní aminové skupiny. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

Tabulka č. 9 – Fyzikálně-chemická charakterizace polymerního prekurzoru **P6-ODBOC**.

Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	$D_{h,w}$ [nm]	Obsah NH ₂ skupin [mol. %]
P6-ODBOC	29000	33000	1,13	8,6	7,8

Průměry molárních hmotností, disperzita a hodnota hmotnostně váženého hydrodynamického průměru, $D_{h,w}$ byly stanoveny pomocí SEC (systém 2, mobilní fáze PBS), obsah NH₂ skupin byl stanoven pomocí NMR.

Polymerní prekurzor **P6-ODBOC** vykazoval obdobné charakteristiky jako prekurzor **P5-ODBOC**. Molární hmotnost odpovídala polymerizační násadě, stejně tak hodnota D_h a

obsah reaktivních aminoskupin. Změna komonomeru na APMA-Boc tedy nezpůsobila zásadní změny ve výsledném polymerním prekurzoru.

Aminové skupiny polymerního prekurzoru **P6-ODBOC** byly reagovány s ketoskupinou léčiva LCL-161, analogicky k syntéze **P5-LCL**. Nejprve byly opět optimalizovány reakční podmínky za použití SEC. Opět byl monitorován poměr $A_{\text{pol}}/A_{\text{LCL}}$ v čase, $t = 0-48$ h. Reakční podmínky a hodnoty $A_{\text{pol}}/A_{\text{LCL}}$ po 48 hodinách reakce jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10 – Optimalizace reakčních podmínek vazby léčiva LCL-161 pomocí iminové vazby.

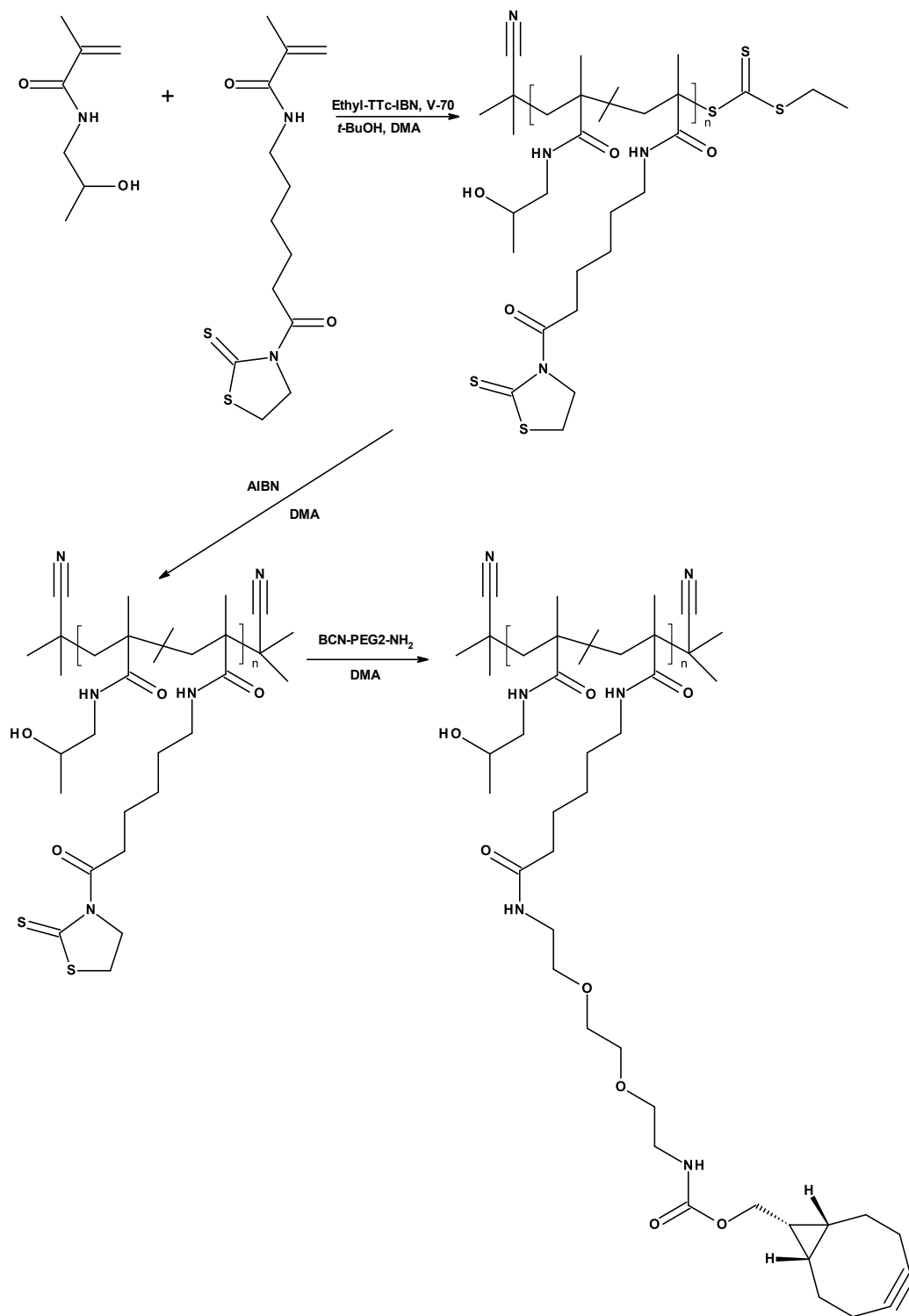
Reakce	Rozpouštědlo	Teplota	$A_{\text{pol}}/A_{\text{LCL}}$
1	Methanol + k. octová	25 °C	0,00907
2	Methanol + k. octová	45 °C	0,0105
3	DMA + k. octová	25 °C	0,00644

Bylo použito 12 μl k. octové na 10 mg výchozích látek.

Z výsledků v tabulce č. 10 je patrné, že se hodnota poměru $A_{\text{pol}}/A_{\text{LCL}}$ v čase neměnila, vazba LCL-161 na polymer **P6-ODBOC** tedy vůbec neprobíhala, a to ani za zvýšené teploty, proto bylo od dalších pokusů o vytvoření polymerního konjugátu nesoucího LCL-161 vázané přes iminovou vazbu upuštěno.

Jako další vhodná funkční skupina ve struktuře LCL-161 se pro konjugaci k polymernímu nosiči jevila sekundární aminoskupina. V tomto případě byl však záměr vytvořit enzymaticky štěpitelný polymerní konjugát obsahující spojku Val-Cit-pAB. Nejprve byl syntetizován derivát LCL-161 obsahující tuto spojku a azidovou skupinu (N_3 -VCP-LCL). Reakce sekundární aminoskupiny s nitrofenylovou skupinou spojky N_3 -VCP-PNP byla velmi pomalá, navíc bylo nutné provést chromatografickou separaci pro odstranění zbytků této spojky, což vedlo ke snížení výtěžku. Schéma přípravy derivátu je uvedeno v odstavci 3.2.3 (strana 33).

Dále byl připraven polymerní prekurzor na bázi HPMa nesoucí BCN skupiny, využitelné v „click“ reakci s azidovými skupinami derivátu N_3 -VCP-LCL. Byla opět použita RAFT polymerizace monomeru HPMa a komonomeru Ma-Acap-TT, obsahujícího aminoreaktivní TT skupiny. Výtěžek RAFT polymerizace byl pouze 33 %, pravděpodobně kvůli horší reaktivitě komonomeru Ma-Acap-TT. Následovalo odstranění trithiokarbonátových skupin a poté aminolytická reakce (byl použit BCN-PEG2-NH₂) pro zavedení BCN skupin. Schéma syntézy je uvedeno na obrázku č. 23, fyzikálně-chemická charakterizace polymerního prekurzoru **P7** je pak uvedena v tabulce č. 11 (strana 65).



Obrázek č. 23 – Schéma syntézy polymerního prekurzoru **P7-BCN**, nesoucího „click“ reaktivní BCN skupiny. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw.

I přes nízký výtěžek RAFT polymerizace odpovídala molární hmotnost polymerního prekurzoru **P7-IBN** polymerizační násadě, která byla nastavena na hodnotu okolo 30000 g mol^{-1} . Obsah TT skupin byl mírně nižší než v násadě, což bylo v souladu s očekáváním. Po vazbě BCN-PEG2-NH₂ však došlo ke zvýšení průměrů molárních hmotností a disperzity.

To bylo zřejmě způsobeno přítomností nečistoty v této chemikálii (čistota pouze 95,0 %). Tato nečistota zřejmě způsobila síťování části řetězců. Během optimalizace této reakce (data neuvedena) bylo zjištěno, že množství zesíťovaných řetězců narůstá s časem reakce, ten byl tedy nastaven na co nejnižší (1,5 h). Přestože polymerní prekurzor **P7-BCN** obsahoval 4,5 mol. % hydrofobních BCN skupin, byl stále rozpustný ve vodě.

Následovala vazba derivátu N₃-VCP-LCL, která byla provedena pomocí „click“ reakce BCN skupin polymerního prekurzoru **P7-BCN** a azidových skupin derivátu N₃-VCP-LCL. Struktura výsledného polymerního konjugátu, **P7-LCL**, je zobrazena na obrázku č. 24, výsledky fyzikálně-chemické charakterizace jsou uvedeny v tabulkách č. 11 a 12.

Tabulka č. 11 – Fyzikálně chemická charakterizace polymerního konjugátu **P7-LCL** a jeho polymerního prekurzoru **P7** v organickém rozpouštědle.

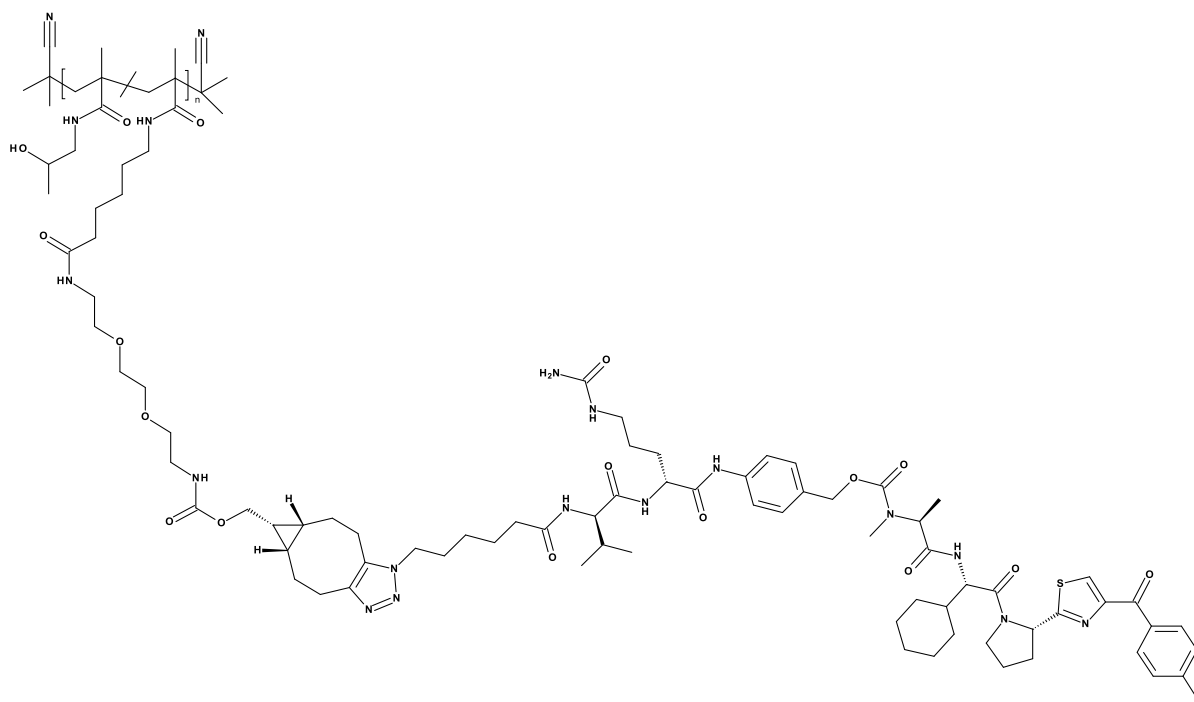
Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	Obsah funkčních skupin [mol. %]
P7-IBN	30000	33000	1,10	4,0 (TT skupiny)
P7-BCN	36000	47000	1,30	4,5 (BCN skupiny)
Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	Obsah LCL-161 [hm. %/mol. %]
P7-LCL	49000	76000	1,54	7,9/3,1

Průměry molárních hmotností a disperzita byly stanoveny pomocí SEC (systém 1, mobilní fáze DMF + LiBr), obsah TT skupin byl stanoven spektrofotometricky, obsah BCN skupin a obsah léčiva LCL-161 byl stanoven pomocí NMR.

Tabulka č. 12 – Fyzikálně chemická charakterizace polymerního konjugátu **P7-LCL** a příslušného polymerního prekurzoru ve vodném rozpouštědle.

Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	$D_{h,i}$ [nm]
P7-BCN	48000	58000	1,22	10,7
Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	$D_{h,i}$ [nm]
P7-LCL	271000	279000	1,03	17,7

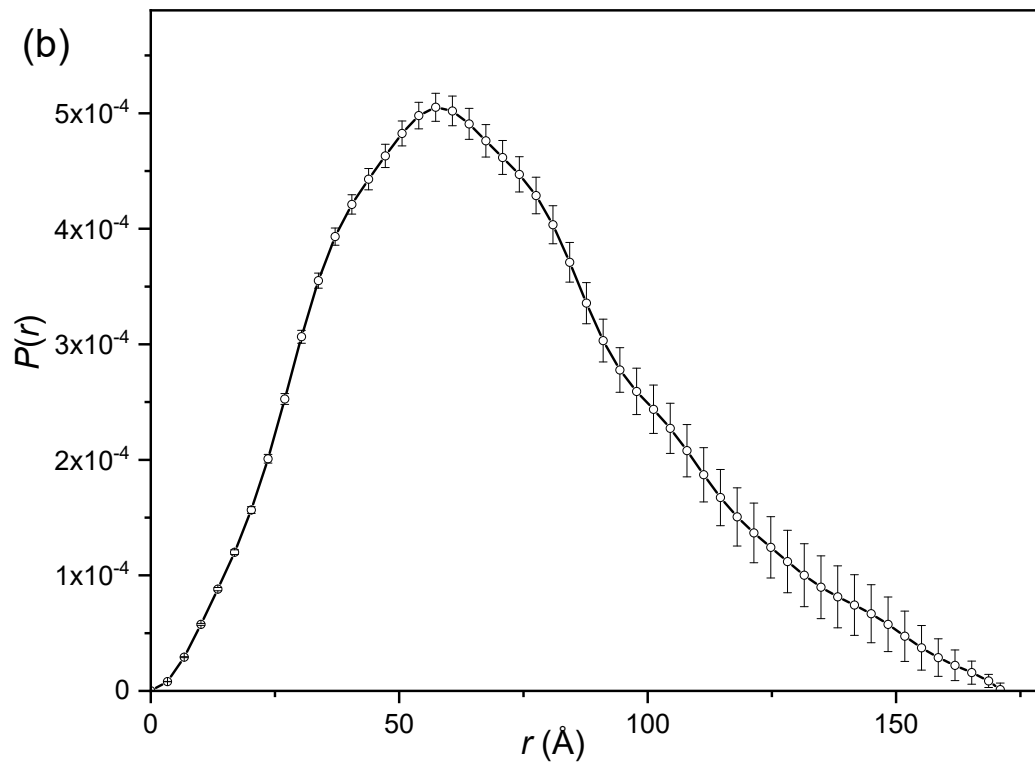
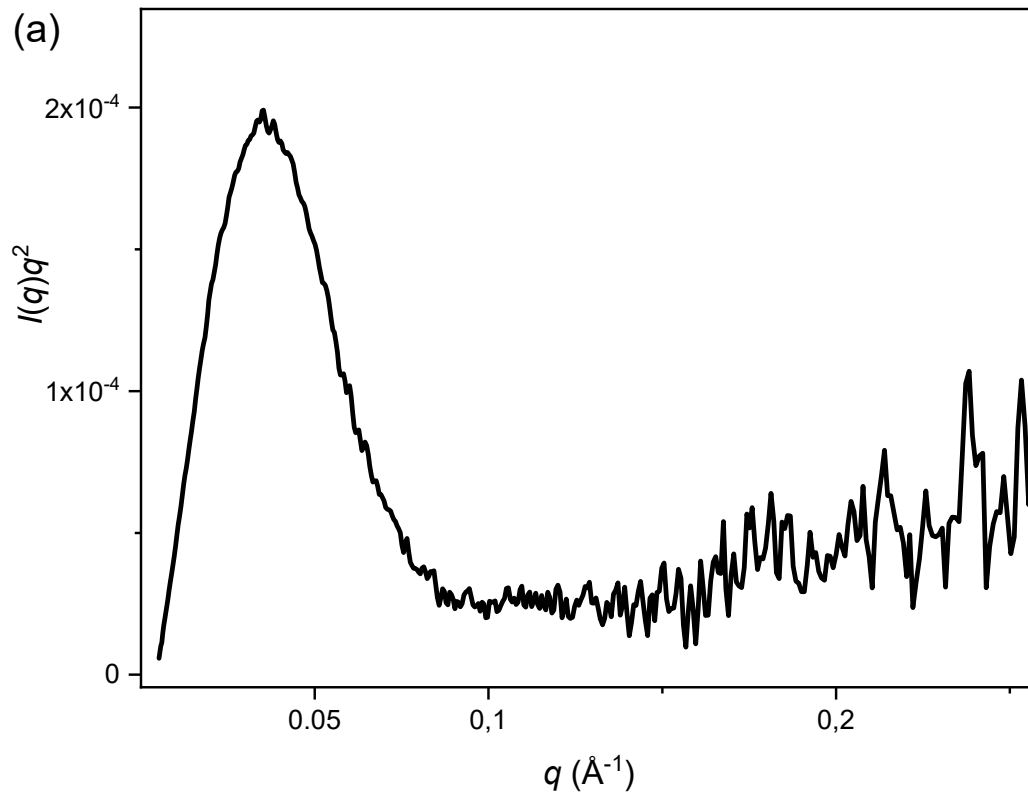
Průměry molárních hmotností a disperzita byly stanoveny pomocí SEC (systém 2, mobilní fáze PBS), hodnota intenzitně váženého hydrodynamického průměru ($D_{h,i}$) byla stanovena pomocí DLS v PBS.

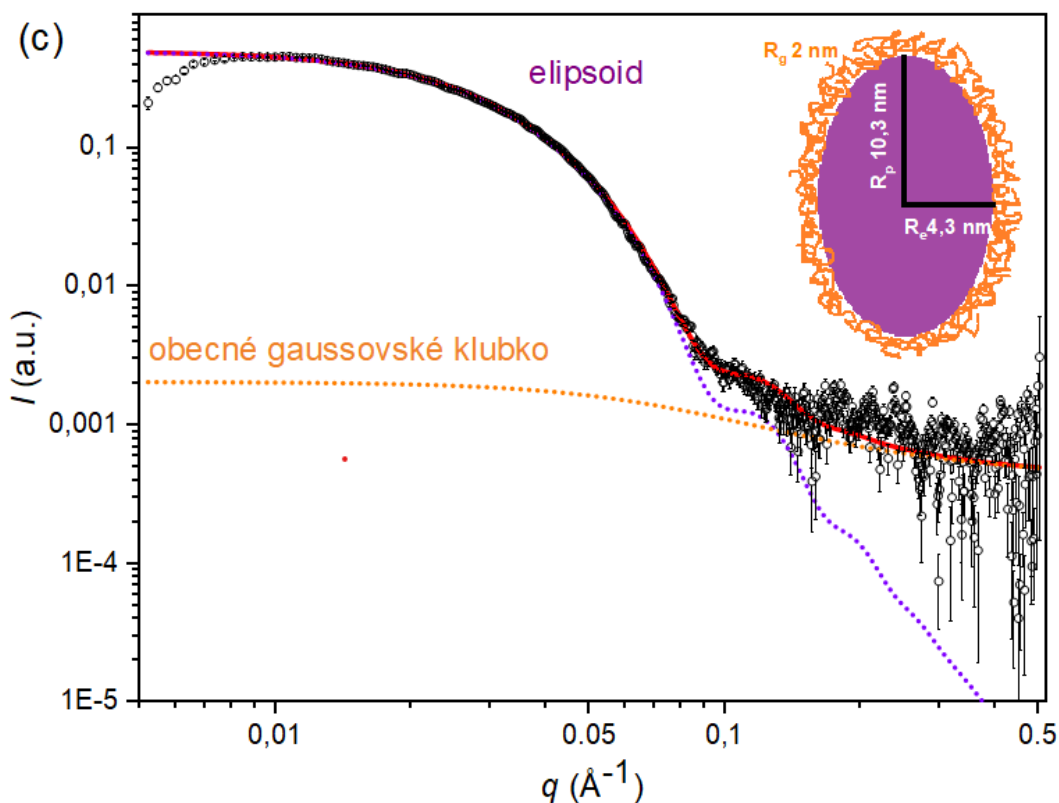


Obrázek č. 24 – Struktura polymerního konjugátu **P7-LCL**, nesoucího léčivo **LCL-161** vázané přes enzymaticky štěpitelnou **Val-Cit-pAB** spojku. Vytvořeno v programu **BIOVIA Draw**.

Během vazby léčiva pomocí „click“ reakce docházelo k dalšímu rozšiřování disperzity a s tím spojenému zvyšování molárních hmotností, zřejmě opět způsobené nečistotou v polymerním prekurzoru **P7-BCN** pocházející z **BCN-PEG2-NH₂**. Zajímavé však bylo chování ve vodné fázi, kde systém vytváří nadmolekulární strukturu, pravděpodobně micelární. To může být způsobeno vysokým obsahem derivátu léčiva **VCP-LCL**, který je hydrofobnější než samotné léčivo, a hydrofobních **BCN** skupin. Z hodnoty disperzity tohoto systému je patrné, že struktura je velmi vysoce definovaná. Poměrem hodnot M_n ve vodné a organické fázi lze pak získat agregační číslo, N_{agg} , v tomto případě rovné 5,65. Nadmolekulární útvar je tedy tvořen v průměru 5-6 polymerními řetězci. Vzhledem k těmto zajímavým výsledkům byl polymerní konjugát podroben další analýze za účelem bližší charakterizace, např. potvrzení micelární struktury a určení tvaru.

Pro bližší charakterizaci byla zvolena analýza pomocí SAXS (prováděno v PBS). Tato metoda se jevila jako vhodná s ohledem na velikost zjištěnou pomocí DLS. Výsledky měření jsou uvedeny na obrázku č. 25.



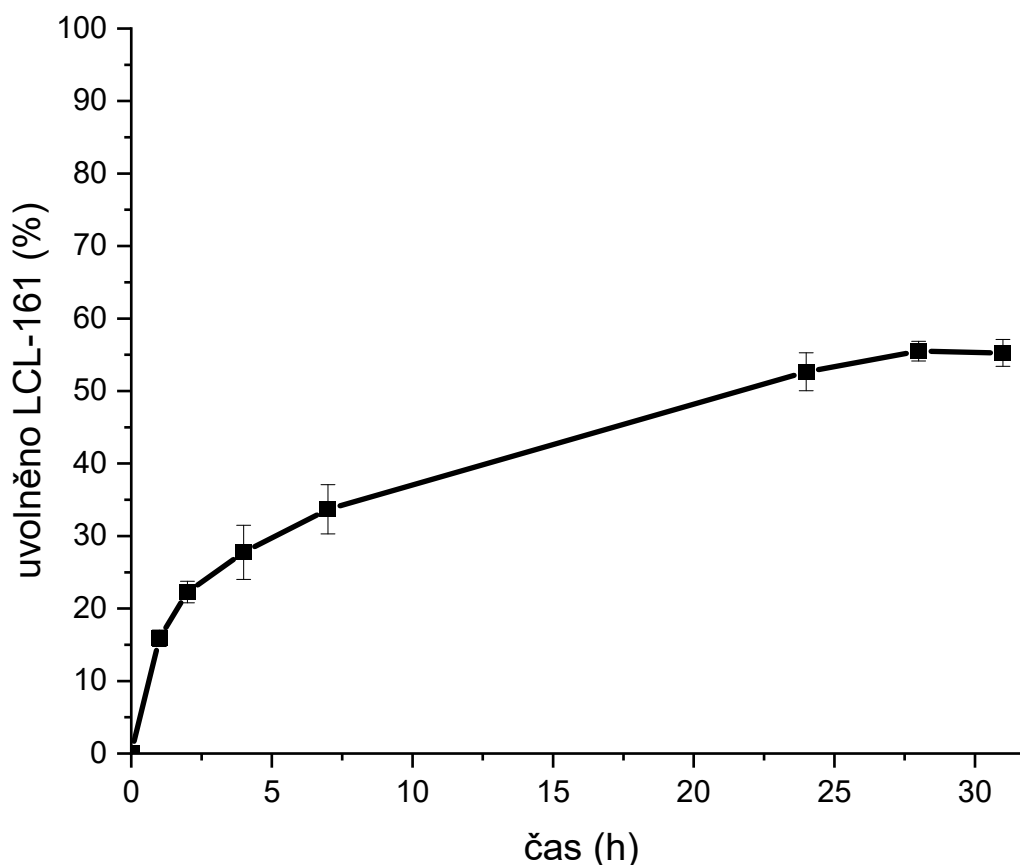


Obrázek č. 25 – Výsledky SAXS analýzy polymerního konjugátu **P7-LCL**. a) Kratkého graf, b) $P(r)$ funkce, c) rozptylová křivka s analýzou pomocí modelu elipsoidu (fialově) a gaussovského klubka (oranžově).

Nejprve byla provedena analýza dat v Guinierově oblasti, ze které byl získán gyrační poloměr, R_g , celé částice dle rovnice (5) (viz odstavec 3.3.12), $R_g = 5,68 \pm 0,16 \text{ nm}$. Z poměru hodnot R_g a R_h (hydrodynamický poloměr) lze získat tzv. „shape factor“, ρ , vypovídající o tvaru částice. V tomto případě byla hodnota $\rho = 5,7/8,9 = 0,64$, indikující sférický tvar částic (pro koule se hodnota ρ pohybuje okolo 0,77). Dále byl sestrojen tzv. Kratkého graf (*angl. Kratky plot*). Z tvaru křivky na obrázku č. 25 (a) lze soudit, že polymerní konjugát **P7-LCL** v daném rozpouštědle tvořil kompaktní strukturu (charakteristické přítomností maxima), naopak křivka se nepadobá vodorozpuštěnému polymeru zaujímajícímu konformaci náhodného klubka⁴³. Absence ostrého minima naznačuje, že povrch struktury není ostře ohraničen. Další informace o struktuře částic byly získány z analýzy tzv. $P(r)$ funkce (párová distribuční funkce, *angl. pair distance distribution function*). Asymetričnost křivky na obr. 25 (b) naznačuje, že se však nejedná o sférickou částici, nýbrž o protažený útvar. Při vyšších hodnotách r lze pozorovat „hrboly“, které naznačují, že se jedná o protáhlé elipsoidy nalepené k sobě (dimery či oligomery). Pomocí této funkce bylo dále možné získat veličinu D_{\max} (maximální velikost částic), která byla rovna 17,1 nm, což je v souladu s výsledky získanými pomocí DLS. Stejně tak je možné získat z maxima této křivky opět hodnotu R_g , pomocí této analýzy byla získána hodnota $R_g = 5,47 \text{ nm}$, což je v souladu s Guinierovou analýzou. Po získání informací z analýz nezávislých na aplikovaném modelu bylo přistoupeno k analýze rozptylové křivky pomocí

modelů. Pro analýzu bylo nutné použít dva modely, jejichž součet odpovídá získané křivce. Jednalo se o model elipsoidu a model obecného gaussovského klubka (analýza pomocí „core-shell“ micelárního modelu neposkytla uspokojivé výsledky), jak je patrné z obrázku č. 25 (c). Na tomto obrázku je též zobrazen celkový model částice, tedy elipsoid (tvořený patrně hydrofobními komonomerními jednotkami) obklopený gaussovskými klubky (patrně sestávající z hydrofilních HPMA monomerních jednotek). Parametry tohoto útvaru jsou následující: R_p (poloměr vertikální osy elipsoidu) = 10,3 nm; R_e (poloměr horizontální osy elipsoidu; v modelu nastavena polydisperzita 0,1) = 4,3 nm; R_g (gyrační poloměr gaussovských klubek) = 2 nm. Hodnota R_p je skoro dvojnásobná než hodnota R_g získaná z předchozích analýz, což indikuje tvorbu dimerů částic nalepených na sebe, tedy ve shodě s $P(r)$ funkcí. Analýza se od křivky odchyluje pouze v oblasti, kde se hodnota q blíží nule, což může být způsobeno disperzitou částic, či odpuzováním částic (což je však velmi nepravděpodobné). Dále bylo možné určit hodnotu vyloučeného objemu, ν , z Floryho teorie roztokového chování, která byla rovna 0,65, tedy velmi blízko teoretické hodnotě pro polymery v dobrém rozpouštědle. Lze tedy říci, že vodné prostředí (PBS) je pro vznikající částice dobrým rozpouštědlem. Výsledky analýzy pomocí modelů jsou v souladu s výsledky získanými analýzou Kratkého diagramu a $P(r)$ funkce, ovšem neshodují se zcela s hodnotou ρ . To může být způsobeno tvorbou dimerů těchto částic, při zdvojnásobení hodnoty R_g získané pomocí Guinierovy analýzy by hodnota ρ byla rovna 1,28, což je charakteristické pro protáhlé tvary (např. tyčinky). V literatuře⁴³ je popsána SAXS a DLS analýza nadmolekulárních systémů založených na PHPMA nesoucích cholesterol, pro které byly získány výsledky indikující velmi podobný tvar částic.

Polymerní konjugát **P7-LCL** byl dále testován z hlediska štěpitelnosti pomocí enzymu katepsinu B, přítomného v lysozomech nádorových buněk. Výsledkem štěpení je uvolnění volného LCL-161. Výsledky tohoto experimentu jsou zobrazeny v grafu na obrázku č. 26.



Obrázek č. 26 – Graf závislosti uvolněného LCL-161 z polymerního konjugátu P7-LCL na čase v přítomnosti katepsinu B.

Z grafu na obrázku č. 26 je patrné, že vlivem katepsinu B docházelo k nárůstu uvolněného léčiva v čase. Spojka Val-Cit-pAB tedy byla pro katepsin B stericky přístupná i přesto, že byla přítomna v jádře nadmolekulární struktury tvořené polymerním konjugátem **P7-LCL**. Ze shody retenčních časů při HPLC analýze lze potvrdit, že se uvolňovalo samotné léčivo LCL-161, štěpení tedy probíhalo podle předpokládaného mechanismu (štěpení amidové vazby za citrulinem následované 1,4-eliminací). Vzhledem k tomu, že se po 24 hodinách neodštěpilo veškeré léčivo, nebylo možné pomocí DLS stanovit hodnoty D_h polymeru nesoucího pouze spojku Val-Cit, nikoliv však LCL-161. Lze však předpokládat, že tyto hodnoty budou podobné polymernímu prekurzoru **P7-BCN**. Jeho hodnoty molárních hmotností a D_h se pohybují těsně nad limitem renální filtrace, což je opět způsobeno částečným síťováním. V rámci další optimalizace těchto systémů bude navržena taková syntetická strategie, která se vyhne použití činidel vedoucím k takovýmto vedlejším reakcím.

4.2.2 Polymerní systémy nesoucí léčivo AZD-5582

Druhé použité léčivo schopné inhibovat proteiny IAP bylo AZD-5582, které ve své struktuře obsahuje modifikovatelnou pouze vnitřní trojnou vazbu či sekundární aminoskupinu (která se již v případě léčiva LCL-161 ukázala jako velmi málo reaktivní), navíc obě skupiny jsou přítomné dvakrát, což komplikuje syntézu monoderivátu tohoto léčiva. Nejjednodušším

způsobem bylo proto enkapsulovat tuto hydrofobní molekulu do polymerních micel. Byly zvoleny micely tvořené roubovanými kopolymery PCL-g-PPHMA, které byly již dříve vyvinuty a publikovány⁴⁵. Tyto systémy jsou biodegradovatelné, schopné samouspořádání do micel pouhou hydratací polymeru v pevném stavu (např. lyofilizát) a jsou charakteristické nízkou hodnotou CMC, tedy vysokou micelární stabilitou. Roubovaný kopolymer PCL-g-PPHMA byl syntetizován pomocí „grafting to“ přístupu, a to konkrétně „click“ reakcí PCL obsahujícího propargylové skupiny podél řetězce a semitelechelického PPHMA s azidovými skupinami.

Nejprve byly připraveny jednotlivé lineární polymerní prekurzory. Semitelechelický PPHMA byl připraven RAFT kopolymerizací monomerů HPMa a Ma-Acap-NHNH-Boc za použití funkcionalizovaného CTA s azidovou skupinou, následovalo odstranění trithiokarbonátových skupin a následná redukce zbylých nezreagovaných trithiokarbonátových skupin pomocí borohydridu sodného a reakce s *N*-ethyl maleimidem. Tato modifikace minimalizovala možnost vedlejších reakcí při syntéze roubovaného kopolymery. Tento polymerní prekurzor, označený **P8-RED**, nesl chráněné hydrazidové skupiny podél řetězce. Tyto skupiny byly zařazeny, neboť v budoucích studiích mohou být po odchránění využity pro kovalentní vazbu dalšího léčiva, např. cytostatika doxorubicinu, čehož lze využít v kombinační terapii. Fyzikálně-chemická charakterizace tohoto polymerního prekurzoru je uvedena v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13 – Fyzikálně-chemická charakterizace polymerního prekurzoru **P8-RED**.

Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\mathcal{D}	F	Obsah NHNH-Boc skupin [mol. %]
P8-RED	13900	14300	1,02	0,77	6,6

Průměry molárních hmotností a disperzita byly stanoveny pomocí SEC (systém 3, mobilní fáze methanol + octan sodný, kolona TSKGel3000SW_{XL}), funkcionalita, F , (azidové skupiny) byla stanovena nepřímou reakcí s fluorescenční značkou sulfo-Cyanin3-DBCO, obsah NHNH-Boc skupin byl stanoven pomocí NMR.

Molární hmotnost polymerního prekurzoru **P8** odpovídala násadě RAFT polymerizace (hodnota okolo 15000 g mol⁻¹), výtěžek polymerizace byl 70 %. Funkcionalita koncových azidových skupin byla mírně nižší (plná funkcionalita koncových skupin odpovídá hodnotě 1,0), což bylo způsobeno částečnou redukcí azidových skupin na aminové během modifikace zbylých trithiokarbonátových skupin pomocí borohydridu sodného. Obsah NHNH-Boc skupin odpovídal násadě polymerizace (8 mol. % komonomeru v násadě).

PCL nesoucí propargylové (prg) skupiny (**P9**) byl připraven aniontovou modifikací komerčního PCL homopolymeru pomocí LDA a propargyl bromidu (schéma reakce viz obrázek č. 27). Jak již bylo zmíněno v literární části, LDA je schopen štěpit esterové vazby, což vedlo ke snížení molární hmotnosti. Polymerní prekurzor **P9** měl i poměrně vysokou disperzitu, viz tabulka č. 14, ve které jsou uvedeny výsledky fyzikálně-chemické charakterizace.

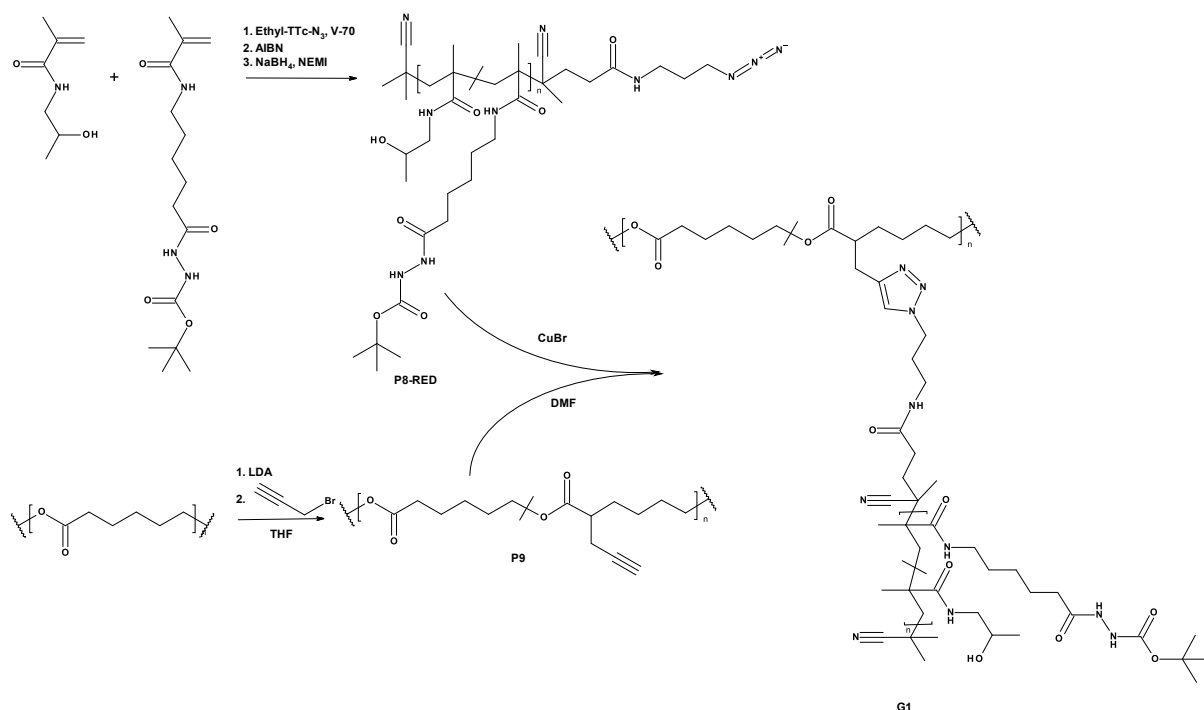
Tabulka č. 14 – Fyzikálně-chemická charakterizace polymerního prekurzoru **P9** a výchozího PCL.

Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	Obsah prg skupin [mol. %]
PCL 45 kDa	40000-50000*	48000-90000*	-	-
P9	20000	36000	1,74	6,8

Průměry molárních hmotností a disperzita byly stanoveny pomocí SEC (systém 1, mobilní fáze DMF + LiBr), obsah prg skupin byl stanoven pomocí NMR. *Údaje od výrobce.

Obsah prg skupin byl v souladu s předpokladem (násada reakce). Výhodou této syntézy je její nízká náročnost, vysoký výtěžek, nevýhodou je však nízká definovanost vzniklého polymerního materiálu.

Roubovaný polymerní prekurzor, PCL-g-PHPMA, označený **G1** (schéma na obrázku č. 27) byl připraven následnou „click“ reakcí polymerních prekurzorů **P8-RED** a **P9**. Samotná reakce probíhala rychle, nevýhodou byla však složitá chromatografická separace (oddělení mědi, oddělení nezreagovaného prekurzoru **P8-RED** kvůli nízké funkcionalitě a odsolení), která byla časově náročná a zároveň snižovala výtěžek reakce. Výsledný polymerní prekurzor **G1** byl fyzikálně-chemicky charakterizován, a to jak na úrovni polymerních řetězců (unimerů), tak na úrovni nadmolekulárních útvarů (micel), které se tvoří samouspořádáním těchto amfifilních systémů ve vodných roztocích. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 15, 16 a 17.



Obrázek č. 27 – Schéma syntézy polymerního prekurzoru PCL-g-PHPMA, označeného **G1**.

Tabulka č. 15 – Fyzikálně-chemická charakterizace roubovaného kopolymery **G1** v organické mobilní fázi (unimery).

Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	Obsah PCL [mol. %]
G1	116000	168000	1,45	22,4

Průměry molárních hmotností a disperzita byly stanoveny pomocí SEC (systém 3, mobilní fáze methanol + octan sodný, kolona TSKGel4000SW_{XL}), obsah PCL byl stanoven pomocí NMR.

Polymerní prekurzor **G1** byl rozpustný v organických rozpouštědlech, proto pomocí SEC v mobilní fázi obsahující methanol byla stanovena molární hmotnost unimerů. Výsledky ukazují na přítomnost pouze jedné populace, nicméně se širokou distribucí molárních hmotností. Pomocí NMR byl stanoven obsah PCL, z jehož hodnoty byl vypočten počet PHPMA kopolymerních řetězců na 1 řetězec PCL, který byl roven 6,8. Tomu odpovídá i hodnota M_n polymerního prekurzoru **G1**. Výtěžek roubování byl 71 %. Všechny tyto hodnoty jsou porovnatelné s dříve připravenými systémy⁴⁵.

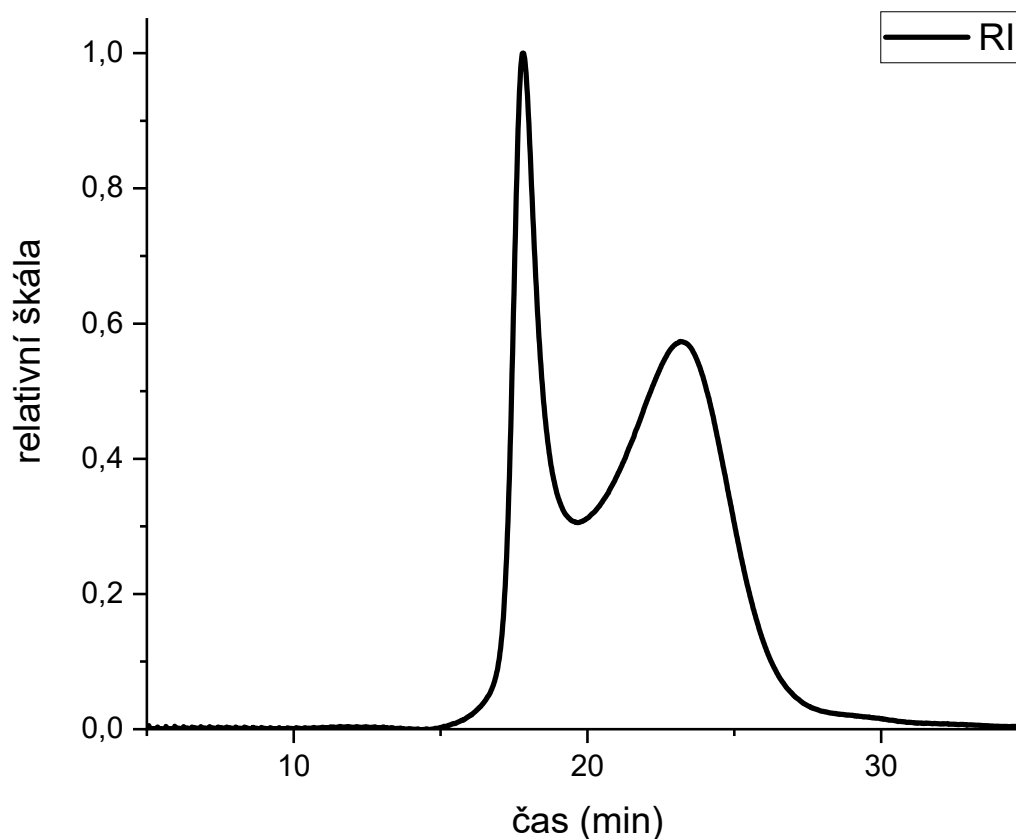
Tabulka č. 16 – Fyzikálně-chemická charakterizace roubovaného kopolymery **G1** ve vodné mobilní fázi (micely) pomocí SEC.

Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	N_{agg}	$D_{g,w}$ [nm]	$D_{h,w}$ [nm]
G1-1 (73 %)	1471000	1584000	1,08	12,7	36,2	28,1
G1-2 (27 %)	6490000	15990000	2,46	55,9	75,2	55,9

Průměry molárních hmotností, disperzita, hodnoty $D_{g,w}$ a $D_{h,w}$ byly stanoveny pomocí SEC (systém 2, mobilní fáze PBS).

Ve vodné mobilní fázi došlo k samouspořádání polymerního prekurzoru **G1** do micel. Průměry molárních hmotností, hodnota hmotnostně váženého gyračního ($D_{g,w}$) a hydrodynamického průměru ($D_{h,w}$) byly stanoveny pomocí SEC (mobilní fáze PBS). Z RI chromatogramu na obrázku č. 28 je zřejmé, že polymerní prekurzor **G1** se samouspořádává do dvou populací micel (označeny jako **G1-1** a **G1-2**). Nebyl detekován žádný unimer, což svědčí o úplném samouspořádání do nadmolekulárních struktur. Konkrétní hodnoty (včetně hodnot agregačních čísel, vypočtených z poměrů hodnot M_n pro micelu a unimer) jsou pak uvedeny v tabulce č. 16. V obou případech (**G1-1** i **G1-2**) byla hodnota $D_{g,w}$ větší než hodnota $D_{h,w}$, tedy hodnota „shape faktoru“, ρ , byla větší než jedna (1,29 a 1,35). Tyto výsledky naznačují, že by se mohlo jednat o protáhlé struktury, jejichž jádro je tvořeno agregovanými řetězci PCL, naopak do vodné fáze jsou exponované hydrofilní řetězce PHPMA.

Vzhledem k tomu, že molární hmotnost populace **G1-2** se již blíží vylučovacímu limitu kolony, byla provedena další charakterizace tohoto systému pomocí frakcionace tokem v asymetrickém poli (FFF), která umožňuje separaci částic o výrazně vyšších velikostech.



Obrázek č. 28 – RI chromatogram SEC separace polymerního prekurzoru **G1**. Jsou přítomny dvě populace micel, označené **G1-1** a **G1-2**.

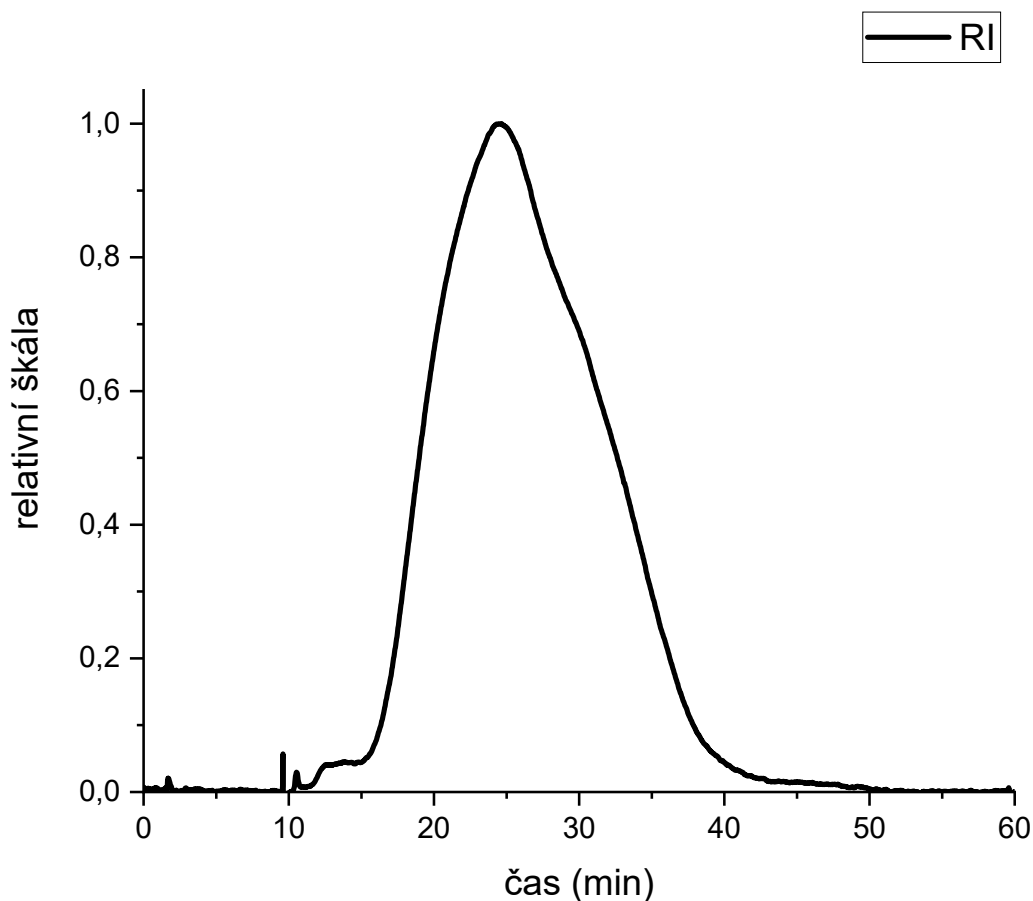
Tabulka č. 17 – Fyzikálně-chemická charakterizace roubovaného kopolymeru **G1** ve vodné mobilní fázi (micely) pomocí FFF a DLS.

Polymer	M_n [g mol ⁻¹]	M_w [g mol ⁻¹]	\bar{D}	N_{agg}	$D_{g,w}$ [nm]	$D_{h,i}$ [nm]
G1	1646000	3090000	1,88	14,2	41,6	91,0

Průměry molárních hmotností, disperzita a hodnota $D_{g,w}$ byly stanoveny pomocí FFF (mobilní fáze 0,02% azid sodný ve vodě), hodnota $D_{h,i}$ byla stanovena pomocí DLS v PBS.

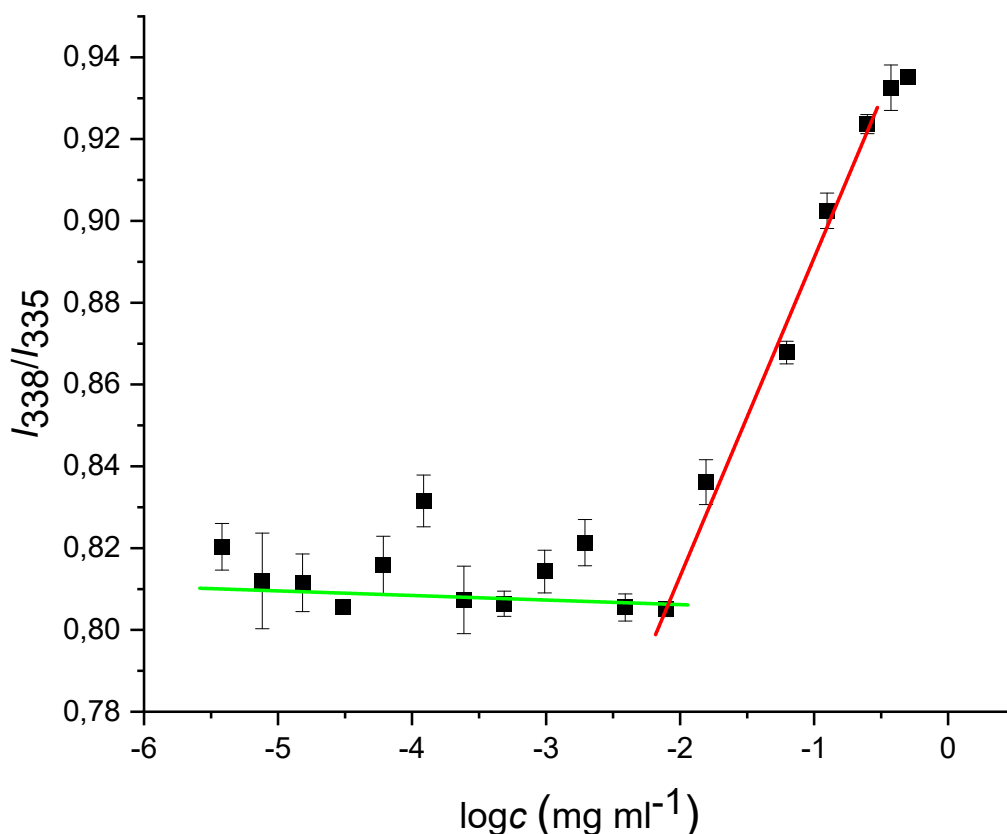
Pomocí FFF bylo možné stanovit stejné parametry jako pomocí SEC s výjimkou hodnoty $D_{h,w}$, která nemohla být stanovena vzhledem k nepřítomnosti viskozimetrického detektoru. Z RI fraktogramu na obrázku č. 29 je patrné, že vzorek obsahoval dvě populace (asymetrický pík), které však nebyly plně rozděleny. Hodnoty průměrů molárních hmotností (viz tabulka č. 17) se pohybovaly mezi hodnotami pro populace **G1-1** a **G1-2**, zjištěnými pomocí SEC, výsledky obou metod jsou v přibližné shodě. Dále bylo přítomno cca 0,5 % frakce o velmi vysoké molární hmotnosti, mohlo se však jednat o artefakt měření způsobený interakcí vzorku s celulosovou membránou. Hodnota $D_{h,i}$, stanovená pomocí DLS, byla značně vyšší než hodnota $D_{h,w}$ vypočtená pomocí SEC. To mohlo být způsobeno tím, že při měření DLS nebyl vzorek rozdělený a nařaděn jako při měření SEC či FFF. Navíc, distribuce hodnot D_h změřená

pomocí DLS byla velmi široká, což opět naznačuje přítomnost dvou populací micel, které však v tomto případě nebyly rozděleny. Hodnoty průměrů molárních hmotností se řádově shodovaly s již publikovanými výsledky analogického systému⁴⁵.



Obrázek č. 29 – RI fraktogram FFF separace polymerního prekurzoru **GI**.

Dále byla stanovena kritická micelární koncentrace (CMC) tohoto polymerního prekurzoru pomocí fluorimetrie za použití pyrenu. Vyhodnocení bylo provedeno z excitačních spekter, konkrétně z poměru intenzit fluorescence při $\lambda = 335$ nm a $\lambda = 338$ nm. Výsledný graf je zobrazen na obrázku č. 30. Hodnota CMC byla rovna **7,12 $\mu\text{g ml}^{-1}$** , což odpovídá hodnotám zjištěným dříve⁴⁵. Nízká hodnota CMC znamená, že by tento systém měl být dostatečně stabilní během transportu v těle a nemělo by docházet k jeho rozpadu na unimery.



Obrázek č. 30 – Graf závislosti poměru intenzit fluorescence I_{335}/I_{338} na logaritmu koncentrace polymerního prekurzoru **G1**. Hodnota CMC byla odečtena z průsečíku obou přímek.

Hydrolytická stabilita polyesterového řetězce PCL nebyla studována, neboť byla již dříve publikována⁴⁵. Hlavní řetězec roubovaného kopolymeru byl hydrolyticky velmi stabilní, k hydrolyze esterových vazeb docházelo však účinkem intracelulárních enzymů.

Do micel tvořených polymerním prekurzorem **G1** bylo enkapsulováno léčivo AZD-5582. Bylo využito metody lyofilizace s *tert*-butanolem, která je velmi jednoduchá a umožňuje odstranění neenkapsulovaného léčiva pomocí filtrace. Byly připraveny celkem tři systémy, které v zásadě obsahovaly 5/10/20 hm. % AZD-5582 (vzorky označeny **AZD-5/10/20**). Paralelně byl proveden slepý pokus, kde byla místo polymerních micel přidána pouze deionizovaná voda a po filtraci bylo stanoveno, kolik léčiva AZD-5582 bylo tímto procesem rozpuštěno. Překvapivě došlo k rozpuštění 17,8 % léčiva a výsledky účinnosti enkapsulace (viz tabulka č. 18) a stability (viz dále) jsou zatíženy do jisté míry právě touto neočekávanou rozpustností AZD-5582 ve vodném prostředí. Proto byl odečtením hodnoty rozpuštěného léčiva vypočten aproximovaný obsah léčiva, který by mohl více odpovídat realitě.

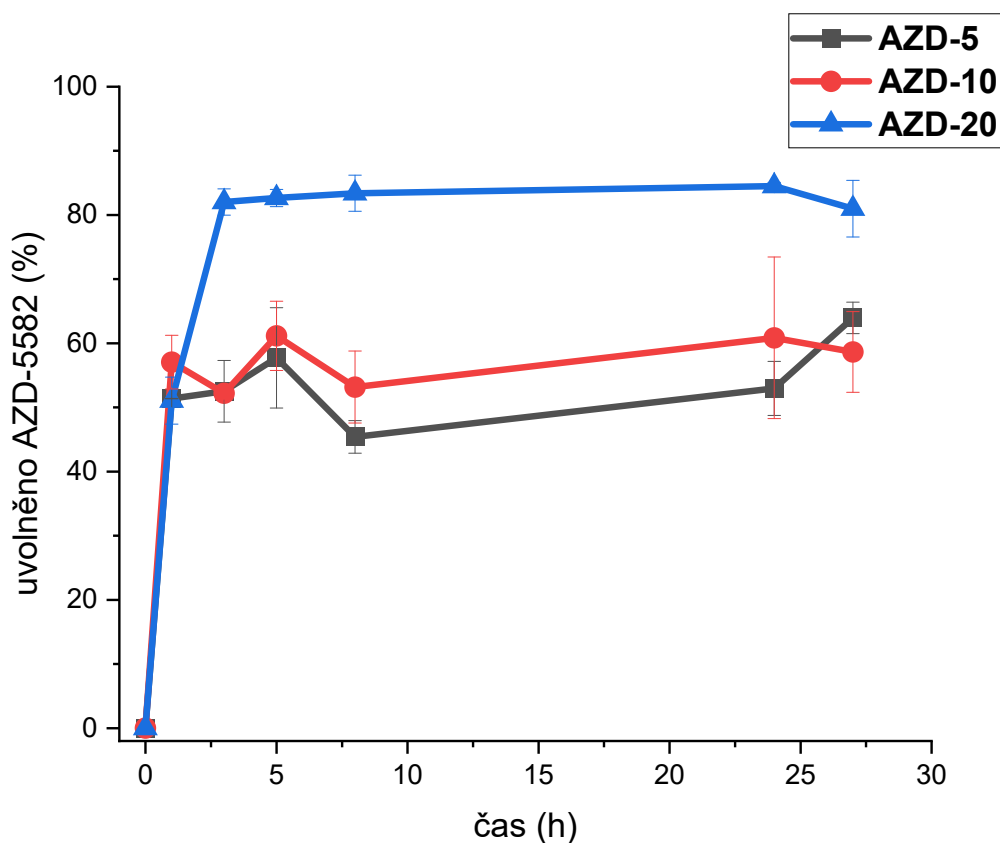
Tabulka č. 18 – Účinnost enkapsulace léčiva AZD-5582 do polymerních micel tvořených polymerním prekurzorem **G1**.

Polymer	Obsah léčiva v násadě [hm. %]	Účinnost enkapsulace [%]	Obsah léčiva* [hm. %]	Aproximovaný obsah léčiva** [hm. %]
AZD-5	5	61	3,1	2,5
AZD-10	10	73	7,3	6,0
AZD-20	20	77	15,4	12,7

Účinnost enkapsulace byla stanovena pomocí HPLC po odfiltrování neenkapsulovaného léčiva. *Obsah léčiva stanovený ve vzorku po enkapsulaci. **Obsah léčiva, kde je odečten přibližný podíl rozpuštěného léčiva, které není enkapsulováno, ale ve vzorku se nachází.

Z výsledků je patrné, že s vyšším obsahem AZD-5582 v násadě se účinnost enkapsulace zvyšovala, nicméně zvyšovalo se i množství rozpuštěného léčiva, které nebylo možné odfiltrovat. Pomocí aproximace po odečtení množství rozpuštěného léčiva se však stále účinnost enkapsulace s vyšším obsahem léčiva zvyšuje.

Stabilita těchto systémů v pufru PBS (pH = 7,4) při 37 °C byla studována pomocí filtrace, při které je v daných časových bodech uvolněné nerozpustné léčivo odfiltrováno. Nicméně, tato metoda je rovněž zatížena chybou způsobenou částečnou rozpustností AZD-5582 ve vodných pufrch. Cílem tohoto stanovení bylo zjistit, zda se léčivo z micel bude uvolňovat již během transportu v těle. Výsledky stabilitní studie jsou zobrazeny na obrázku č. 31. Dále bylo provedeno měření DLS v čase 0 hodin a 24 hodin pro získání dalších informací o těchto systémech. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 19.



Obrázek č. 31 – Graf závislosti uvolněného AZD-5582 z polymerních micel AZD-5/10/20 na čase (pufr PBS pH = 7,4; filtrační metoda).

Tabulka č. 19 – Hodnoty hydrodynamických průměrů polymerních micel s enkapsulovaným léčivem AZD-5582 v čase.

Polymer	Čas [h]	$D_{h,i}$ [nm]
G1	0	91,0
	24	117,1
AZD-5	0	110,2
	24	110,2
AZD-10	0	93,1
	24	76,1
AZD-20	0	140,8
	24	48,9

Hodnoty $D_{h,i}$ byly měřeny pomocí DLS v PBS.

Všechny tři systémy vykazovaly tzv. „burst effect“, při kterém se část enkapsulovaného léčiva uvolnila velice rychle. V případě AZD-5 a AZD-10 došlo k uvolnění přibližně poloviny léčiva během první hodiny, po zbytek času se již léčivo neuvolňovalo. Předpoklad je, že zbylé léčivo se uvolní v nádorových buňkách po rozpadu micely na unimery nebo po degradaci

polyesterového řetězce PCL pomocí intracelulárních enzymů. V případě systému **AZD-20** byla během velmi krátkého času uvolněna většina enkapsulovaného léčiva, což bylo pozorováno i přítomností nerozpustných částic v inkubovaném roztoku (u systémů **AZD-5** a **AZD-10** nebylo toto pozorováno). Po odečtení hodnoty 17,8 %, která odpovídá rozpuštěnému léčivu, lze aproximovat, že množství uvolněného léčiva se o tuto hodnotu sníží. Výsledky DLS analýz ukazují, že hydrodynamický průměr se po inkorporaci léčiva významně nezměnil, pouze v případě **AZD-20** došlo ke zvýšení hodnoty $D_{h,i}$ oproti prekurzoru **G1** a naopak k jejímu snížení v čase 24 hodin, což mohlo být způsobeno přeuspořádáním jednotlivých řetězců a změnou poměru populací větších a menších micel. U všech vzorků však byla distribuce hodnot D_h velmi široká, a tak je pravděpodobné, že v systému byly opět přítomny dvě populace nadmolekulárních útvarů.

Tyto výsledky naznačují, že v případě **AZD-5** a **AZD-10** mohla být pouze část léčiva enkapsulována do hydrofobního jádra (protože hodnoty D_h se po enkapsulaci signifikantně nezměnily), tato část léčiva se při inkubaci v pufru neuvolňovala, zatímco zbylá část pouze interagovala s rozhraním hydrofobní a hydrofilní domény micely, což bylo zřejmě způsobeno nedostatečnou hydrofobií léčiva AZD-5582. V případě systému **AZD-20** došlo zřejmě k enkapsulaci většího množství léčiva na rozhraní hydrofobní a hydrofilní domény micel (zvýšení D_h), které bylo následně rychle uvolněno po začátku experimentu. Navíc je nutno vzít v úvahu, že část léčiva mohla být molekulárně rozpuštěná v pufru.

Závěrem lze tedy konstatovat, že přestože polymerní micely tvořené roubovaným kopolymerem **G1** poskytují řadu výhod, jako je samouspořádání pouhou hydratací polymerního lyofilizátu bez přítomnosti unimerů či nízká hodnota CMC, léčivo AZD-5582 není kvůli své částečné vodné rozpustnosti příliš vhodné pro enkapsulaci tak, jak se prvotně jevílo z jeho struktury. I přesto, že tyto systémy nesplňují požadavky pro ideální DDS, stále mohou být použity jako léková forma pro toto léčivo, která umožňuje jeho podání *in vivo*.

Polymerní prekurzor **G1** tvořící micely byl připraven z prekurzoru **P9**, který vykazoval vysokou disperzitu, a tak i finální roubovaný kopolymer byl disperzní na úrovni unimerů, na úrovni micel tvořil dvě populace nadmolekulárních útvarů. V rámci další optimalizace tohoto systému se provádí syntéza PCL nesoucího prg skupiny pomocí kopolymerizace ϵ -Cl s komonomerem obsahujícím prg skupinu. Takto bude možné připravit PCL, a tedy i roubovaný kopolymer s nízkou disperzitou, což by mohlo vést k samouspořádání pouze do jedné populace micel. V současné době je optimalizována kopolymerizace ϵ -Cl s připravenou směsí monomerů 3- a 7-(prop-2-ynyl)oxepan-2-onu, výsledky však již nejsou součástí této diplomové práce.

5 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zabývala syntézou a fyzikálně-chemickou charakterizací nových DDS pro použití v protinádorové terapii, které jsou založené na vodorozpustných polymerních konjugátech a polymerních micelách. Byly připraveny systémy zaměřující se na dva různé terapeutické přístupy.

V rámci prvního přístupu se jednalo o polymerní systémy pro PDT s navázanými prolečivými, 5-ALA či jejím hexyl esterem HAL. V práci byly úspěšně syntetizovány vysoce definované vodorozpustné PHPMA kopolymery nesoucí hydrazidové skupiny s molární hmotností pod limitem renální filtrace. Tyto kopolymery byly posléze úspěšně konjugovány s prolečivými za tvorby pH senzitivní hydrazonové vazby, přičemž nebyl prokázán vliv spojky mezi polymerním řetězcem a hydrazonovou vazbou na rychlost uvolňování prolečiva. Na základě výsledků fyzikálně-chemické charakterizace je možné predikovat, že systémy by neměly být toxické po podání a neměly by mít tendenci pro nespecifickou zadrž v ledvinách. Tyto systémy se tak zdají slibnými pro budoucí biologické hodnocení.

Úspěšně byla připravena druhá generace polymerních materiálů pro PDT založená na biodegradovatelných polymerních nosičích s vyšší molární hmotností, které by měly vykazovat zlepšené farmakokinetické vlastnosti, a to díky prodloužené cirkulaci a zvýšené akumulaci v nádorové tkáni na bázi EPR efektu, a tedy i zvýšený PDT efekt.

Druhým přístupem byla cílená doprava IAP inhibitorů do nádorové tkáně. Úspěšně byl syntetizován vodorozpustný PHPMA systém nesoucí léčivo LCL-161, připojené opět pomocí hydrazonové vazby. Tento polymerní konjugát vykazoval příliš pomalé uvolňování LCL-161 v biologicky relevantních hodnotách pH, které není dostatečné pro biologický efekt. Z tohoto důvodu byl navržen a úspěšně připraven polymerní konjugát nesoucí toto léčivo připojené pomocí spojky Val-Cit-pAB štěpitelné enzymaticky (např. katepsinem B). Bylo prokázáno, že tento polymerní konjugát se ve vodném prostředí samouspořádává do vysoce definovaných nadmolekulárních struktur ve tvaru elipsoidů obklopených gaussovskými klubky tvořenými HPMA monomerními jednotkami.

Úspěšně byl rovněž připraven systém s IAP inhibitorem AZD-5582, který byl enkapsulován do polymerních micel tvořených biodegradovatelnými roubovanými kopolymery PCL-g-PHPMA. Takto připravené polymerní micely s enkapsulovaným léčivem bohužel neprokázaly dostatečnou stabilitu, a uvolňovaly léčivo velmi rychle. Je možné tvrdit, že tyto systémy by mohly sloužit jako možná léková forma, nicméně ne jako dopravní systém pro dlouhodobou cirkulaci.

Lze konstatovat, že v rámci této diplomové práce byly splněny všechny cíle. Připravené polymerní systémy byly důkladně charakterizovány pomocí moderních analytických metod.

Očekává se, že v budoucích biologických studiích tyto systémy prokáží vyšší protinádorovou účinnost oproti samotným nízkomolekulárním aktivním látkám.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Ulbrich, K.; Holá, K.; Šubr, V.; Bakandritsos, A.; Tuček, J.; Zbořil, R. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (9), 5338–5431.
- (2) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
- (3) Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H. The EPR Effect: Unique Features of Tumor Blood Vessels for Drug Delivery, Factors Involved, and Limitations and Augmentation of the Effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (3), 136–151.
- (4) Alasvand, N.; Urbanska, A. M.; Rahmati, M.; Saeidifar, M.; Gungor-Ozkerim, P. S.; Sefat, F.; Rajadas, J.; Mozafari, M. Chapter 13 - Therapeutic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drugs. V *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*; Grumezescu, A. M., Ed.; Elsevier, **2017**; 245–259.
- (5) Dutta, B.; Barick, K. C.; Hassan, P. A. Recent Advances in Active Targeting of Nanomaterials for Anticancer Drug Delivery. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2021**, *296*, 102509.
- (6) Salahpour Anarjan, F. Active Targeting Drug Delivery Nanocarriers: Ligands. *Nano-Struct. Nano-Objects* **2019**, *19*, 100370. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100370>.
- (7) Irache, J. M.; Salman, H. H.; Gamazo, C.; Espuelas, S. Mannose-Targeted Systems for the Delivery of Therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5* (6), 703–724.
- (8) Yan, G.; Wang, J.; Hu, L.; Wang, X.; Yang, G.; Fu, S.; Cheng, X.; Zhang, P.; Tang, R. Stepwise Targeted Drug Delivery to Liver Cancer Cells for Enhanced Therapeutic Efficacy by Galactose-Grafted, Ultra-pH-Sensitive Micelles. *Acta Biomater.* **2017**, *51*, 363–373.
- (9) Kunjachan, S.; Pola, R.; Gremse, F.; Theek, B.; Ehling, J.; Moeckel, D.; Hermanns-Sachweh, B.; Pechar, M.; Ulbrich, K.; Hennink, W. E.; Storm, G.; Lederle, W.; Kiessling, F.; Lammers, T. Passive versus Active Tumor Targeting Using RGD- and NGR-Modified Polymeric Nanomedicines. *Nano Lett.* **2014**, *14* (2), 972–981.
- (10) Zwicke, G. L.; Ali Mansoori, G.; Jeffery, C. J. Utilizing the Folate Receptor for Active Targeting of Cancer Nanotherapeutics. *Nano Rev.* **2012**, *3* (1), 18496.
- (11) Randárová, E.; Kudláčová, J.; Etrych, T. HPMa Copolymer-Antibody Constructs in Neoplastic Treatment: An Overview of Therapeutics, Targeted Diagnostics, and Drug-Free Systems. *J. Control. Release* **2020**, *325*, 304–322.
- (12) Barclay, T. G.; Day, C. M.; Petrovsky, N.; Garg, S. Review of Polysaccharide Particle-Based Functional Drug Delivery. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *221*, 94–112.
- (13) Hong, S.; Choi, D. W.; Kim, H. N.; Park, C. G.; Lee, W.; Park, H. H. Protein-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (7), 604.
- (14) Piskin, E. Biodegradable Polymers as Biomaterials. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1995**, *6* (9), 775–795.
- (15) Seymour, L. W.; Duncan, R.; Strohalm, J.; Kopeček, J. Effect of Molecular Weight (M_w) of *N*-(2-hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymers on Body Distribution and Rate of Excretion after Subcutaneous, Intraperitoneal, and Intravenous Administration to Rats. *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, *21* (11), 1341–1358.
- (16) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 24–36.
- (17) Lee, J. S.; Feijen, J. Polymersomes for Drug Delivery: Design, Formation and Characterization. *J. Control. Release* **2012**, *161* (2), 473–483.

- (18) Gillies, E.; Frechet, J. Dendrimers and Dendritic Polymers in Drug Delivery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10* (1), 35–43.
- (19) Ringsdorf, H. Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers: PHARMACOLOGICALLY ACTIVE POLYMERS. *J. polym. sci., C Polym. symp.* **1975**, *51* (1), 135–153.
- (20) Kopeček, J.; Rejmanová, P.; Duncan, R.; Lloyd, J. B. Controlled Release of Drug Model from *N*-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamide Copolymers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1985**, *446* (1), 93–103.
- (21) Kozma, G. T.; Shimizu, T.; Ishida, T.; Szebeni, J. Anti-PEG Antibodies: Properties, Formation, Testing and Role in Adverse Immune Reactions to PEGylated Nano-Biopharmaceuticals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *154–155*, 163–175.
- (22) Sedlacek, O.; Monnery, B. D.; Filippov, S. K.; Hoogenboom, R.; Hruby, M. Poly(2-Oxazoline)s - Are They More Advantageous for Biomedical Applications Than Other Polymers? *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (19), 1648–1662.
- (23) Kurakula, M. Pharmaceutical Assessment of Polyvinylpyrrolidone (PVP): As Excipient from Conventional to Controlled Delivery Systems with a Spotlight on COVID-19 Inhibition. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *60*, 102046.
- (24) Lakshmi, S.; Katti, D. S.; Laurencin, C. T. Biodegradable Polyphosphazenes for Drug Delivery Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55* (4), 467–482.
- (25) Vasey, P. A.; Kaye, S. B.; Morrison, R.; Twelves, C.; Wilson, P.; Duncan, R.; Thomson, A. H.; Murray, L. S.; Hilditch, T. E.; Murray, T.; Burtles, S.; Fraier, D.; Frigerio, E.; Cassidy, J. Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of PK1 [*N*-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymer Doxorubicin]: First Member of a New Class of Chemotherapeutic Agents-Drug-Polymer Conjugates. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5* (1), 83–94.
- (26) Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Anderson, D.; Hesslewood, S.; Julyan, P. J.; Poyner, R.; Doran, J.; Young, A. M.; Burtles, S.; Kerr, D. J. Hepatic Drug Targeting: Phase I Evaluation of Polymer-Bound Doxorubicin. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20* (6), 1668–1676.
- (27) Chytil, P.; Kostka, L.; Etrych, T. HPMa Copolymer-Based Nanomedicines in Controlled Drug Delivery. *J. Pers. Med.* **2021**, *11* (2), 115.
- (28) Etrych, T.; Chytil, P.; Jelínková, M.; Říhová, B.; Ulbrich, K. Synthesis of HPMa Copolymers Containing Doxorubicin Bound via a Hydrazone Linkage. Effect of Spacer on Drug Release and *in Vitro* Cytotoxicity. *Macromol. Biosci.* **2002**, *2* (1), 43–52.
- (29) Pola, R.; Pokorná, E.; Vočková, P.; Böhmová, E.; Pechar, M.; Karolová, J.; Pankrác, J.; Šefc, L.; Helman, K.; Trněný, M.; Etrych, T.; Klener, P. Cytarabine Nanotherapeutics with Increased Stability and Enhanced Lymphoma Uptake for Tailored Highly Effective Therapy of Mantle Cell Lymphoma. *Acta Biomater.* **2021**, *119*, 349–359.
- (30) Etrych, T.; Šírová, M.; Starovoytova, L.; Říhová, B.; Ulbrich, K. HPMa Copolymer Conjugates of Paclitaxel and Docetaxel with pH-Controlled Drug Release. *Mol. Pharmaceutics* **2010**, *7* (4), 1015–1026.
- (31) Kostka, L.; Sivák, L.; Šubr, V.; Kovářová, J.; Šírová, M.; Říhová, B.; Sedlacek, R.; Etrych, T.; Kovář, M. Simultaneous Delivery of Doxorubicin and Protease Inhibitor Derivative to Solid Tumors via Star-Shaped Polymer Nanomedicines Overcomes P-gp- and STAT3-Mediated Chemoresistance. *Biomacromolecules* **2022**, *23* (6), 2522–2535.
- (32) Říhová, B.; Krinick, N. L.; Kopeček, J. Targetable Photoactivatable Drugs. 3. *In Vitro* Efficacy of Polymer Bound Chlorin *e6* toward Human Hepatocarcinoma Cell Line (PLC/PRF/S) Targeted with Galactosamine and to Mouse Splenocytes Targeted with Anti-Thy 1.2 Antibodies. *J. Control. Release* **1993**, *25* (1-2), 71–87.

- (33) Tavares, M. R.; Islam, R.; Šubr, V.; Hackbarth, S.; Gao, S.; Lobaz, V.; Fang, J.; Etrych, T. Polymer Theranostics with Multiple Stimuli-Based Activation of Photodynamic Therapy and Tumor Imaging. *Theranostics* **2023**, *13* (14), 4952–4973.
- (34) Islam, R.; Kotalík, K.; Šubr, V.; Gao, S.; Zhou, J.-R.; Yokomizo, K.; Etrych, T.; Fang, J. HPMA Copolymer Conjugated 5-Aminolevulinic Acid Exhibits Superior Efficacy for Photodynamic Therapy with Tumor-Responsive and Targeting Properties. *Nanomedicine: NBM* **2023**, *48*, 102636.
- (35) Šubr, V.; Pola, R.; Gao, S.; Islam, R.; Hirata, T.; Miyake, D.; Koshino, K.; Zhou, J.-R.; Yokomizo, K.; Fang, J.; Etrych, T. Tumor Stimulus-Responsive Biodegradable Diblock Copolymer Conjugates as Efficient Anti-Cancer Nanomedicines. *J. Pers. Med.* **2022**, *12* (5), 698.
- (36) Hrochová, M.; Kotrchová, L.; Frejková, M.; Konefał, R.; Gao, S.; Fang, J.; Kostka, L.; Etrych, T. Adaptable Polymerization Platform for Therapeutics with Tunable Biodegradability. *Acta Biomater.* **2023**, *171*, 417–427.
- (37) Etrych, T.; Chytil, P.; Mrkvan, T.; Šírová, M.; Řihová, B.; Ulbrich, K. Conjugates of Doxorubicin with Graft HPMA Copolymers for Passive Tumor Targeting. *J. Control. Release* **2008**, *132* (3), 184–192.
- (38) Kostka, L.; Kotrchová, L.; Šubr, V.; Libánská, A.; Ferreira, C. A.; Malátová, I.; Lee, H. J.; Barnhart, T. E.; Engle, J. W.; Cai, W.; Šírová, M.; Etrych, T. HPMA-Based Star Polymer Biomaterials with Tuneable Structure and Biodegradability Tailored for Advanced Drug Delivery to Solid Tumours. *Biomaterials* **2020**, *235*, 119728.
- (39) Šubr, V.; Kostka, L.; Strohalm, J.; Etrych, T.; Ulbrich, K. Synthesis of Well-Defined Semitelechelic Poly[*N*-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide] Polymers with Functional Group at the α -End of the Polymer Chain by RAFT Polymerization. *Macromolecules* **2013**, *46* (6), 2100–2108.
- (40) Perrier, S. *50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization—A User Guide*. *Macromolecules* **2017**, *50* (19), 7433–7447.
- (41) Jones, M.-C.; Leroux, J.-C. Polymeric Micelles – a New Generation of Colloidal Drug Carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1999**, *48* (2), 101–111.
- (42) Bu, X.; Ji, N.; Dai, L.; Dong, X.; Chen, M.; Xiong, L.; Sun, Q. Self-Assembled Micelles Based on Amphiphilic Biopolymers for Delivery of Functional Ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *114*, 386–398.
- (43) Filippov, S. K.; Chytil, P.; Konarev, P. V.; Dyakonova, M.; Papadakis, Christine M.; Zhigunov, A.; Pleštil, J.; Stepanek, P.; Etrych, T.; Ulbrich, K.; Svergun, D. I. Macromolecular HPMA-Based Nanoparticles with Cholesterol for Solid-Tumor Targeting: Detailed Study of the Inner Structure of a Highly Efficient Drug Delivery System. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (8), 2594–2604.
- (44) Bagheri, M.; Bresseleers, J.; Varela-Moreira, A.; Sandre, O.; Meeuwissen, S. A.; Schiffelers, R. M.; Metselaar, J. M.; Van Nostrum, C. F.; Van Hest, J. C. M.; Hennink, W. E. Effect of Formulation and Processing Parameters on the Size of mPEG-*b*-p(HPMA-Bz) Polymeric Micelles. *Langmuir* **2018**, *34* (50), 15495–15506.
- (45) Bláhová, M.; Randárová, E.; Konefał, R.; Nottelet, B.; Etrych, T. Graft Copolymers with Tunable Amphiphilicity Tailored for Efficient Dual Drug Delivery via Encapsulation and pH-Sensitive Drug Conjugation. *Polym. Chem.* **2020**, *11* (27), 4438–4453.
- (46) Trousil, J.; Syrová, Z.; Dal, N.-J. K.; Rak, D.; Konefał, R.; Pavlova, E.; Matějková, J.; Cmarko, D.; Kubíčková, P.; Pavliš, O.; Urbánek, T.; Sedlák, M.; Fenaroli, F.; Raška, I.; Štěpánek, P.; Hrubý, M. Rifampicin Nanof ormulation Enhances Treatment of Tuberculosis in Zebrafish. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (4), 1798–1815.

- (47) Xu, J.; Qin, B.; Luan, S.; Qi, P.; Wang, Y.; Wang, K.; Song, S. Acid-Labile Poly(Ethylene Glycol) Shell of Hydrazone-Containing Biodegradable Polymeric Micelles Facilitating Anticancer Drug Delivery. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2018**, *33* (2), 119–133.
- (48) Petrova, S. L.; Jäger, E.; Jäger, A.; Höcherl, A.; Konefał, R.; Zhigunov, A.; Pavlova, E.; Janoušková, O.; Hrubý, M. Development of an Acid-Labile Ketal Linked Amphiphilic Block Copolymer Nanoparticles for pH-Triggered Release of Paclitaxel. *Polymers* **2021**, *13* (9), 1465.
- (49) Coudane, J.; Nottelet, B.; Mouton, J.; Garric, X.; Van Den Berghe, H. Poly(ϵ -Caprolactone)-Based Graft Copolymers: Synthesis Methods and Applications in the Biomedical Field: A Review. *Molecules* **2022**, *27* (21), 7339.
- (50) Ponsart, S.; Coudane, J.; Vert, M. A Novel Route To Poly(ϵ -Caprolactone)-Based Copolymers via Anionic Derivatization. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (2), 275–281.
- (51) Lou, X.; Detrembleur, C.; Jérôme, R. Novel Aliphatic Polyesters Based on Functional Cyclic (Di)Esters. *Macromol. Rapid Commun.* **2003**, *24* (2), 161–172.
- (52) He, Y.; Zhang, Y.; Xiao, Y.; Lang, M. Dual-Response Nanocarrier Based on Graft Copolymers with Hydrazone Bond Linkages for Improved Drug Delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *80*, 145–154.
- (53) Zhang, K.; Wang, Y.; Zhu, W.; Li, X.; Shen, Z. Synthesis, Characterization, and Micellization of PCL-g-PEG Copolymers by Combination of ROP and Click Chemistry via Graft onto Method. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2012**, *50*, 2045–2052.
- (54) Riva, R.; Schmeits, S.; Jérôme, C.; Jérôme, R.; Lecomte, P. Combination of Ring-Opening Polymerization and “Click Chemistry”: Toward Functionalization and Grafting of Poly(ϵ -Caprolactone). *Macromolecules* **2007**, *40* (4), 796–803.
- (55) Li, M.; Shan, G.; Bao, Y.; Pan, P. Poly(ϵ -Caprolactone)-Graft-Poly(*N*-Isopropylacrylamide) Amphiphilic Copolymers Prepared by a Combination of Ring-Opening Polymerization and Atom Transfer Radical Polymerization: Synthesis, Self-Assembly, and Thermoresponsive Property. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131* (22), 41115.
- (56) Nottelet, B.; El Ghzaoui, A.; Coudane, J.; Vert, M. Novel Amphiphilic Poly(ϵ -Caprolactone)-g-Poly(L-Lysine) Degradable Copolymers. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (8), 2594–2601.
- (57) Sponchioni, M.; Ferrari, R.; Morosi, L.; Moscatelli, D. Influence of the Polymer Structure over Self-Assembly and Thermo-Responsive Properties: The Case of PEG-*b*-PCL Grafted Copolymers via a Combination of RAFT and ROP. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2016**, *54* (18), 2919–2931.
- (58) Rani, S.; Gupta, U. Synthesis, Morphology, and Rheological Evaluation of HPMA (*N*-2-Hydroxypropyl Methacrylamide)-PCL (Polycaprolactone) Conjugates. *ACS Omega* **2021**, *6* (44), 29788–29803.
- (59) Pola, R.; Braunová, A.; Laga, R.; Pechar, M.; Ulbrich, K. Click Chemistry as a Powerful and Chemoselective Tool for the Attachment of Targeting Ligands to Polymer Drug Carriers. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (4), 1340–1350.
- (60) Böhmová, E.; Pola, R.; Pechar, M.; Parnica, J.; Machová, D.; Janoušková, O.; Etrych, T. Polymer Cancerostatics Containing Cell-Penetrating Peptides: Internalization Efficacy Depends on Peptide Type and Spacer Length. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (1), 59.
- (61) Sonawane, S. J.; Kalhapure, R. S.; Govender, T. Hydrazone Linkages in pH Responsive Drug Delivery Systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *99*, 45–65.
- (62) Zou, Y.; Zhou, Y.; Jin, Y.; He, C.; Deng, Y.; Han, S.; Zhou, C.; Li, X.; Zhou, Y.; Liu, Y. Synergistically Enhanced Antimetastasis Effects by Honokiol-Loaded pH-Sensitive Polymer–Doxorubicin Conjugate Micelles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (22), 18585–18600.

- (63) Kölmel, D. K.; Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376.
- (64) Gillies, E. R.; Goodwin, A. P.; Fréchet, J. M. J. Acetals as pH-Sensitive Linkages for Drug Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15* (6), 1254–1263.
- (65) Ulbrich, K.; Etrych, T.; Chytil, P.; Jelínková, M.; Říhová, B. HEMA Copolymers with pH-Controlled Release of Doxorubicin. *J. Control. Release* **2003**, *87* (1–3), 33–47.
- (66) Masson, C.; Garinot, M.; Mignet, N.; Wetzer, B.; Mailhe, P.; Scherman, D.; Bessodes, M. pH-Sensitive PEG Lipids Containing Orthoester Linkers: New Potential Tools for Nonviral Gene Delivery. *J. Control. Release* **2004**, *99* (3), 423–434.
- (67) Timmers, M.; Weterings, J.; Van Geijn, M.; Bell, R.; Lenting, P. E.; Rijcken, C. J. F.; Vermonden, T.; Hennink, W. E.; Liskamp, R. M. J. A New Class of Tunable Acid-Sensitive Linkers for Native Drug Release Based on the Trityl Protecting Group. *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33* (9), 1707–1715.
- (68) Dubowchik, G. M.; Firestone, R. A.; Padilla, L.; Willner, D.; Hofstead, S. J.; Mosure, K.; Knipe, J. O.; Lasch, S. J.; Trail, P. A. Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers for Lysosomal Release of Doxorubicin from Internalizing Immunoconjugates: Model Studies of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific *in Vitro* Anticancer Activity. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13* (4), 855–869.
- (69) Pechar, M.; Pola, R.; Studenovský, M.; Bláhová, M.; Grosmanová, E.; Dydowiczová, A.; Filipová, M.; Islam, R.; Gao, S.; Fang, J.; Etrych, T. Polymer Nanomedicines with Enzymatically Triggered Activation: A Comparative Study of *in Vitro* and *in Vivo* Anti-Cancer Efficacy Related to the Spacer Structure. *Nanomedicine: NBM* **2022**, *46*, 102597.
- (70) Chau, Y.; Tan, F. E.; Langer, R. Synthesis and Characterization of Dextran–Peptide–Methotrexate Conjugates for Tumor Targeting via Mediation by Matrix Metalloproteinase II and Matrix Metalloproteinase IX. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15* (4), 931–941.
- (71) Rades, N.; Achazi, K.; Qiu, M.; Deng, C.; Haag, R.; Zhong, Z.; Licha, K. Reductively Cleavable Polymer-Drug Conjugates Based on Dendritic Polyglycerol Sulfate and Monomethyl Auristatin E as Anticancer Drugs. *J. Control. Release* **2019**, *300*, 13–21.
- (72) Gao, S.-Q.; Lu, Z.-R.; Petri, B.; Kopečková, P.; Kopeček, J. Colon-Specific 9-Aminocamptothecin-HPMA Copolymer Conjugates Containing a 1,6-Elimination Spacer. *J. Control. Release* **2006**, *110* (2), 323–331.
- (73) Medina, S. H.; Chevliakov, M. V.; Tiruchinapally, G.; Durmaz, Y. Y.; Kuruvilla, S. P.; ElSayed, M. E. H. Enzyme-Activated Nanoconjugates for Tunable Release of Doxorubicin in Hepatic Cancer Cells. *Biomaterials* **2013**, *34* (19), 4655–4666.
- (74) Weinstain, R.; Slanina, T.; Kand, D.; Klán, P. Visible-to-NIR-Light Activated Release: From Small Molecules to Nanomaterials. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (24), 13135–13272.
- (75) Saravanakumar, G.; Kim, J.; Kim, W. J. Reactive-Oxygen-Species-Responsive Drug Delivery Systems: Promises and Challenges. *Adv. Sci.* **2017**, *4* (1), 1600124.
- (76) Shi, Y.; van Steenbergen, M. J.; Teunissen, E. A.; Novo, L.; Gradmann, S.; Baldus, M.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. II–II Stacking Increases the Stability and Loading Capacity of Thermosensitive Polymeric Micelles for Chemotherapeutic Drugs. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (6), 1826–1837.
- (77) Fournier, E.; Dufresne, M.-H.; Smith, D. C.; Ranger, M.; Leroux, J.-C. A Novel One-Step Drug-Loading Procedure for Water-Soluble Amphiphilic Nanocarriers. *Pharm Res* **2004**, *21* (6), 962–968.
- (78) Wong, S. Y.; Pelet, J. M.; Putnam, D. Polymer Systems for Gene Delivery—Past, Present, and Future. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32* (8–9), 799–837.
- (79) Josefsen, L. B.; Boyle, R. W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Metal-Based Drugs* **2008**, *2008*, 1–23.

- (80) Nompumelelo Simelane, N. W.; Kruger, C. A.; Abrahamse, H. Photodynamic Diagnosis and Photodynamic Therapy of Colorectal Cancer *in Vitro* and *in Vivo*. *RSC Adv.* **2020**, *10* (68), 41560–41576.
- (81) Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X.-H.; Childs, C. J.; Sibata, C. H. Photosensitizers in Clinical PDT. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, *1* (1), 27–42.
- (82) Wachowska, M.; Muchowicz, A.; Firczuk, M.; Gabrysiak, M.; Winiarska, M.; Wańczyk, M.; Bojarczuk, K.; Golab, J. Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules* **2011**, *16* (5), 4140–4164.
- (83) Casas, A.; Fukuda, H.; Di Venosa, G.; Batlle, A. Photosensitization and Mechanism of Cytotoxicity Induced by the Use of ALA Derivatives in Photodynamic Therapy. *Br. J. Cancer* **2001**, *85* (2), 279–284.
- (84) De Rosa, F. S.; Lopez, R. F. V.; Thomazine, J. A.; Tedesco, A. C.; Lange, N.; Bentley, M. V. L. B. *In Vitro* Metabolism of 5-ALA Esters Derivatives in Hairless Mice Skin Homogenate and *in Vivo* PpIX Accumulation Studies. *Pharm. Res.* **2004**, *21* (12), 2247–2252.
- (85) Rathore, R.; McCallum, J. E.; Varghese, E.; Florea, A.-M.; Büsselberg, D. Overcoming Chemotherapy Drug Resistance by Targeting Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs). *Apoptosis* **2017**, *22* (7), 898–919.
- (86) Cetraro, P.; Plaza-Diaz, J.; MacKenzie, A.; Abadía-Molina, F. A Review of the Current Impact of Inhibitors of Apoptosis Proteins and Their Repression in Cancer. *Cancers* **2022**, *14* (7), 1671.
- (87) West, A. C.; Martin, B. P.; Andrews, D. A.; Hogg, S. J.; Banerjee, A.; Grigoriadis, G.; Johnstone, R. W.; Shortt, J. The SMAC Mimetic, LCL-161, Reduces Survival in Aggressive MYC-Driven Lymphoma While Promoting Susceptibility to Endotoxic Shock. *Oncogenesis* **2016**, *5* (4), 1–6.
- (88) Wang, C.; Zhang, Y.; Shi, L.; Yang, S.; Chang, J.; Zhong, Y.; Li, Q.; Xing, D. Recent Advances in IAP-Based PROTACs (SNIPERs) as Potential Therapeutic Agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2022**, *37* (1), 1437–1453.
- (89) Hennessy, E. J.; Adam, A.; Aquila, B. M.; Castriotta, L. M.; Cook, D.; Hattersley, M.; Hird, A. W.; Huntington, C.; Kamhi, V. M.; Laing, N. M.; Li, D.; MacIntyre, T.; Omer, C. A.; Oza, V.; Patterson, T.; Repik, G.; Rooney, M. T.; Saeh, J. C.; Sha, L.; Vasbinder, M. M.; Wang, H.; Whitston, D. Discovery of a Novel Class of Dimeric Smac Mimetics as Potent IAP Antagonists Resulting in a Clinical Candidate for the Treatment of Cancer (AZD5582). *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (24), 9897–9919.
- (90) Moon, J.-H.; Shin, J.-S.; Hong, S.-W.; Jung, S.-A.; Hwang, I.-Y.; Kim, J. H.; Choi, E. K.; Ha, S.-H.; Kim, J.-S.; Kim, K.-M.; Hong, D.-W.; Kim, D.; Kim, Y. S.; Kim, J. E.; Kim, K.-P.; Hong, Y. S.; Choi, E. K.; Lee, J. S.; Hattersley, M.; Jin, D.-H.; Kim, T. W. A Novel Small-Molecule IAP Antagonist, AZD5582, Draws Mcl-1 Down-Regulation for Induction of Apoptosis through Targeting of cIAP1 and XIAP in Human Pancreatic Cancer. *Oncotarget* **2015**, *6* (29), 26895–26908.
- (91) Zhu, H.; Li, Y.; Liu, Y.; Han, B. Bivalent SMAC Mimetics for Treating Cancer by Antagonizing Inhibitor of Apoptosis Proteins. *ChemMedChem* **2019**, *14* (23), 1951–1962.
- (92) Finlay, D.; Teriete, P.; Vamos, M.; Cosford, N. D. P.; Vuori, K. Inducing Death in Tumor Cells: Roles of the Inhibitor of Apoptosis Proteins. *F1000Res* **2017**, *6*, 587.
- (93) Convertine, A. J.; Benoit, D. S. W.; Duvall, C. L.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. Development of a Novel Endosomolytic Diblock Copolymer for siRNA Delivery. *J. Control. Release* **2009**, *133* (3), 221–229.

- (94) Ishitake, K.; Satoh, K.; Kamigaito, M.; Okamoto, Y. Stereogradient Polymers Formed by Controlled/Living Radical Polymerization of Bulky Methacrylate Monomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (11), 1991–1994.
- (95) Šubr, V.; Ulbrich, K. Synthesis and Properties of New *N*-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymers Containing Thiazolidine-2-Thione Reactive Groups. *React. Funct. Polym.* **2006**, *66* (12), 1525–1538.
- (96) Kovář, M.; Šubr, V.; Běhalová, K.; Studenovský, M.; Starenko, D.; Kovářová, J.; Procházková, P.; Etrych, T.; Kostka, L. Chemosensitization of Tumors via Simultaneous Delivery of STAT3 Inhibitor and Doxorubicin through HPMA Copolymer-Based Nanotherapeutics with pH-Sensitive Activation. *Nanomedicine: NBM* **2024**, *56*, 102730.
- (97) Fairbanks, B. D.; Thissen, H.; Maurdev, G.; Pasic, P.; White, J. F.; Meagher, L. Inhibition of Protein and Cell Attachment on Materials Generated from *N*-(2-Hydroxypropyl) Acrylamide. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (9), 3259–3266.
- (98) Kotalík, K. Polymerní sondy pro fotodynamickou terapii pevných nádorů. Bakalářská práce. *Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie*, **2022**, 1–60.
- (99) Šubr, V.; Ormsby, T.; Šácha, P.; Konvalinka, J.; Etrych, T.; Kostka, L. The Role of the Biotin Linker in Polymer Antibody Mimetics, IBodies, in Biochemical Assays. *Polym. Chem.* **2021**, *12* (41), 6009–6021.
- (100) 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* **2005**, *38* (6), 2033–2036.
- (101) Leroy, A.; Al Samad, A.; Garric, X.; Hunger, S.; Noël, D.; Coudane, J.; Nottelet, B. Biodegradable Networks for Soft Tissue Engineering by Thiol–Yne Photo Cross-Linking of Multifunctional Polyesters. *RSC Adv.* **2014**, *4* (60), 32017–32023.
- (102) Pechar, M.; Strohalm, J.; Ulbrich, K.; Schacht, E. Biodegradable Drug Carriers Based on Poly(Ethylene Glycol) Block Copolymers. *Macromol. Chem. Phys.* **1997**, *198* (4), 1009–1020.
- (103) Martínková, E.; Křížek, T.; Kubíčková, A.; Coufal, P. Mobilization of Electroosmotic Flow Markers in Capillary Zone Electrophoresis. *Electrophoresis* **2021**, *42* (7–8), 932–938.