



**Akademie věd
České republiky**

Teze dizertace

pro získání vědeckého titulu „Doktor věd“ ve skupině věd Chemie

**Hydrofilní polymery jako nosiče biologicky aktivních
látek v medicíně**

**Hydrophilic polymers as carriers of biologically active
molecules in medicine**

Komise pro obhajobu doktorských dizertací v oboru
Makromolekulární chemie

Jméno předkládajícího: **RNDr. Tomáš Etrych, Ph.D.**

Pracoviště předkládajícího: Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.
Oddělení biolékařských polymerů
Heyrovského nám. 2
162 06 Praha 6

V Praze dne 17.1.2017

ABSTRAKT

V předkládané dizertační práci jsou shrnuty výsledky systematického studia polymerních materiálů využitelných jako nosiče biologicky aktivních látek s potenciální aplikací v humánní medicíně. V úvodu je stručně popsán současný stav poznání v oboru cílené dopravy léčiv a jejich kontrolovaného uvolňování v místě požadovaného účinku. V následujících kapitolách je diskutován způsob řešení základních problémů výzkumu a vývoje cíleně působících polymerních „proléčiv“. Kromě výběru hydrofilního biokompatibilního polymeru tvořícího základní skelet polymerního léčiva jde především o řešení kovalentního připojení biologicky aktivní molekuly k polymernímu řetězci, návrh a přípravu struktur umožňujících cílenou dopravu aktivní látky v organismu, ověření možnosti kombinované terapie, vývoj metod umožňujících sledování osudu léčiva v organismu a následně problematika eliminace polymeru z organismu po dosažení terapeutického efektu.

V druhé části dizertace je studována otázka základní struktury polymerního nosiče. Jak je ukázáno v řadě publikací zahrnutých do dizertace, nevhodnější polymerní skelet tvoří kopolymery *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu. Biologicky aktivní látka (léčivo) by měla být v nosičovém systému k polymeru vázána kovalentní vazbou, stálou v průběhu dopravy krevním řečištěm do místa požadovaného terapeutického efektu a degradovatelnou v místě požadovaného působení. K aktivaci neaktivní látky (léčiva) vázané na polymer by mělo dojít tedy jen v požadovaném místě. Tento úkol byl vyřešen vazbou léčiva na polymer pomocí spojek stálých v krevním řečišti a degradovatelných v cílové tkáni či buňce zde přítomným enzymem (např. lysozomální enzymy) nebo v důsledku sníženého pH (v nádorech, v buněčných endozomech a lysozomech).

Třetí a čtvrtá část dizertace shrnuje práce věnované cílené dopravě biologicky aktivních molekul do místa požadovaného účinku. Většina prací je zaměřena na cílenou dopravu cytostatik do nádorové tkáně nebo přímo do nádorových buněk. Cíleného účinku cytostatik v nádorové tkáni bylo dosaženo kombinací specifického uvolňování léčiva z nosiče (aktivace léčiva) přednostně v nádorové tkáni a vhodné struktury polymerního nosiče umožňující efektivní zachycení polymeru v nádoru (pasivní směřování). Většina navržených a syntetizovaných polymerních systémů využívala vlastnosti mnohých pevných vaskularizovaných nádorů akumulovat makromolekuly s vhodným hydrodynamickým rozměrem (EPR efekt). Na základě porovnání fyzikálně-chemických a biologických vlastností polymerních systémů s lineární mono i diblokovou strukturou, systémů tvořených větvenými, roubovanými a hvězdicovitými polymery a micelárními systémů byly navrženy a syntetizovány polymerní konjugáty vyznačující se značnou specificitou účinku a vysokou protinádorovou aktivitou nejen *in vitro*, ale především *in vivo* při léčbě modelových nádorů u myší. Cílená doprava cytostatik do jednotlivých nádorových buněk byla vyřešena zavedením směřujících struktur (protilátky, specifické oligopeptidy) do molekuly polymerního nosiče. Tyto struktury se specificky vážou na receptory v membránách cílových buněk (aktivní směřování), a zajišťují tak průnik celého polymerního léčiva do těchto buněk různými formami pinocytózy. Protinádorová účinnost aktivně směřovaných polymerních léčiv značně závisela na způsobu přípravy směřovaného nosiče. Při dodržení zásad získaných při studiu těchto systémů je možné připravit specificky působící léčiva s vysokou protinádorovou aktivitou.

Otázka eliminace polymeru z organismu po splnění funkce nosiče byla vyřešena zavedením biodegradovatelných spojek (enzymaticky, hydrolyticky nebo reduktivně štěpitelných) mezi jednotlivé polymerní segmenty tvořící vysokomolekulární strukturu polymerního konjugátu. Vysokomolekulární nosič zajišťující účinnou akumulaci v nádorech se posléze rozpadá na polymerní fragmenty vyloučitelné z organismu glomerulární filtrací.

V páté části dizertace jsou diskutovány možnosti využití studovaných polymerních nosičů pro kombinovanou terapii s cílem získání synergického účinku dvou léčiv vázaných na jeden polymerní nosič. Poslední část dizertace shrnuje výsledky studia metod sledování osudu polymerního léčiva i jeho součástí v organismu (biodistribuce) pomocí neinvazivního fluorescenčního zobrazování duálně značených polymerních systémů.

ABSTRACT

In this dissertation, results of our systematic study of polymer materials useful as carriers of biologically active molecules with potential application in human medicine are described and the most important findings are emphasized. In the first chapter, an overview of the drug delivery and controlled release research area is provided. In the following chapters our approach to the solution of essential problems of targeted drug delivery research is presented and our findings in the area of experimental research and development of polymer-based drug delivery systems are summarized. Beside the selection of a proper hydrophilic biocompatible polymer serving as a basic skeleton of a polymer prodrug the major focus was aimed at the issue of design and preparation of structures enabling targeted delivery of drugs in organism, covalent attachment of biologically active compounds to the polymer backbone, verification of efficiency of combined therapy using various polymer prodrugs and visualization of polymer and prodrug pharmacokinetics and facile elimination of the polymer from organism after the therapeutic effect is reached.

As demonstrated in the second chapter, the most suitable polymer carrier is formed by copolymers of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide. Indeed, biologically active molecules should be attached to the carrier via covalent bond stable during the prodrug delivery in the bloodstream to its target, and degradable (drug released) within the tissue/cells where the therapeutic effect of the drug is required. We have solved this issue by introduction of spacers stable in the bloodstream and degradable by enzymolysis (e.g. lysosomal enzymes), or due to the decreased pH (in tumours, in cell endosomes and lysosomes).

The third and fourth part of the dissertation summarize results of the study of targeted delivery of selected biologically active molecules into the site of their desired action, mostly into the tumour tissue or directly into the tumour cells. We have achieved an enhanced therapeutic effect in tumor tissue by combination of site-specific activation, i.e. drug release from the carrier within the tumor tissue, and selection of tailored architecture of the polymer carrier enabling its effective accumulation in solid tumors (so called passive targeting) based on the EPR effect. Various polymer structures, ranging from linear polymers with mono or diblock structure, through branched and grafted polymer, to star-like and micellar polymers, were designed, synthesized and tested for their physico-chemical and biological properties. Selected polymer prodrug conjugates showed not only specific biological action *in vitro*, but most importantly, a significant *in vivo* therapeutic efficacy of the treatment of model tumours in mice was achieved.

Active targeting of cytotoxic drugs to individual tumour cells was achieved by introducing specific targeting moieties (antibody, specific oligopeptides) into the polymer structure. The targeting moieties are able to bind to specific receptors expressed on membranes of the tumour cells and they are also capable of mediating penetration of the polymer prodrug into the tumour cells by different forms of pinocytosis. Selected actively targeted polymer prodrugs with preserved binding efficacy to the cell receptors were found to be highly effective in the treatment of model tumours in mice.

The issues of the polymer carrier elimination from the organism after fulfilling the role of the carrier were solved by introduction of biodegradable spacers (enzymatically, hydrolytically and reductively degradable) between the polymer segments forming high-molecular weight structure of the polymer conjugate. This high-molecular weight carrier ensuring the increased accumulation of the whole conjugate in solid tumours due to EPR effect was afterward degraded to polymer fragments eliminable from the organism by glomerular filtration.

The potential of studied polymer prodrugs for combined therapy using synergistic action of two drugs attached to single polymer backbone is described and discussed in the fifth part of the dissertation. The results of non-invasive fluorescence imaging of dual labelled polymer systems proving suitability of this strategy for diagnosis are described in the last part of the dissertation.

In conclusion, it was proved that the polymer drug conjugates based on copolymers of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide have a considerable potential in the targeted cancer therapy.

OBSAH

1	Úvod.....	9
1.1	Systémy pro cílenou dopravu léčiv.....	9
1.1.1	<i>Polymerní micely</i>	10
1.1.2	<i>Lipozomy a nanočástice</i>	10
1.1.3	<i>Vodorozpustné polymerní nosiče</i>	11
1.2	Cíle předkládané práce.....	11
2.	Polymerní „proléčiva“	13
2.1	Polymerní systémy s pH řízenou aktivací uvolňování léčiv .14	
2.1.1	<i>Polymerní proléčiva s hydrazonovou vazbou</i>	14
2.1.2	<i>Polymerní proléčiva s cis-akonitovou spojkou</i>	17
2.1.3	<i>Polymerní proléčiva s dalšími léčivy</i>	17
2.2	Příprava polymerních proléčiv kontrolovanou radikálovou polymerizací	19
2.3	Polymerní léčiva a aktivace imunitní odpovědi	20
2.4	Závěr kapitoly	20
3.	Vysokomolekulární polymerní systémy umožňující zvýšenou akumulaci v pevných nádorech	20
3.1	Větvené a roubované polymerní systémy	21
3.2	Hvězdicovité polymerní systémy	24
3.3	Hvězdicovité polymerní konjugáty s dalšími léčivy	30
3.4	Hvězdicovité polymery připravené s využitím RAFT polymerizace.....	31
3.5	Micelární systémy s cholesterylovými substituenty	32
3.6	Závěr kapitoly	35
4.	Aktivně směřované „prodrug“ polymerní systémy.....	35

4.1	Protilátkou směrované hvězdicovité polymerní systémy	36
4.2	Polymerní systémy směrované redukovánými protilátkami	39
4.3	Polymerní systémy směrované oligopeptidy	39
4.4	Závěr kapitoly	40
5.	Polymerní systémy pro kombinovanou terapii	41
5.1	Polymery s kombinací doxorubicinu a dexamethazonu	41
5.2	Polymery s kombinací doxorubicinu a mitomicinu C	42
5.3	Polymery s kombinací duálně vázaného doxorubicinu	43
5.4	Závěr kapitoly	45
6.	Studium biodistribuce polymerních nosičů a léčiv	45
6.1	Chemická analýza tkání	45
6.2	Neinvazivní fluorescenční metoda	46
6.3	Závěr kapitoly	48
7.	Závěr	48
8.	Reference zahrnuté do dizertace	50
9.	Reference nezahrnuté do dizertace:	52
10.	Scientometrická data pro T. Etrycha	53

1 Úvod

Humánní medicína využívá při léčbě pacientů velké množství léčiv, jejichž základem většinou byly a stále jsou nízkomolekulární látky. Zajistit jejich specifické působení pouze v cílové tkáni, orgánu, nebo dokonce v jednotlivých buňkách je velmi žádoucí, zvláště u toxických látek, jako jsou kancerostatika. Bohužel dosažení tohoto cíle je velmi problematické. Po aplikaci běžného léčiva probíhá často mnoho vedlejších, nežádoucích interakcí s organizmem. Během cirkulace v organizmu může nízkomolekulární léčivo podléhat biotransformaci, může se deponovat v některých tkáních nebo je velmi rychle vyloučeno renální filtrací. Navíc je léčivo distribuováno do celého biologického systému, a jeho akumulace je tedy v místě požadovaného terapeutického účinku velmi malá. Má-li být dosaženo požadovaného terapeutického efektu, musí být dávka běžně aplikované formy nízkomolekulárního léčiva poměrně vysoká a navíc musí být léčivo podáváno opakovaně, čímž se zvyšuje riziko nežádoucích vedlejších účinků. V případě protinádorových nízkomolekulárních léčiv je problém udržení vhodné terapeutické koncentrace léčiva komplikován (kromě výše uvedeného) jejich extrémně vysokou toxicitou. Dávka protinádorového léčiva tak může při účinné léčbě způsobit vážné, v některých případech až fatální vedlejší toxické účinky, a to především u tkání a orgánů s rychle se množícími buňkami. Jednou z možností, jak překonat nevýhody klasických léčiv, je vývoj „proléčiv“, založených na systémech se „zvětšenou“ velikostí (hydrodynamickým rozměrem) a s léčivem zabudovaným do struktury systému kovalentní vazbou či fyzikální interakcí. Tato proléčiva dokážou významně prodloužit dobu cirkulace dopravovaného léčiva v krevním řečišti, a tím zajistit jeho vhodnou koncentraci po dostatečnou dobu. Pokud je systém schopen uvolňovat léčivo po dobu potřebnou k dosažení maximálního léčebného efektu a v požadované koncentraci, mluvíme o systémech s kontrolovaným uvolňováním léčiva („controlled release“). V průběhu posledních tří dekad se věnovala studiu orgánově nebo buněčně specifické dopravy nízkomolekulárních léčiv řada vědeckých týmů po celém světě a jejich úsilí směřuje k takové formulaci léčiv, která by snížila rychlost jejich vylučování z organizmu, snížila přímou toxicitu, zlepšila rozpustnost a zajistila dopravu přímo do poškozených částí organizmu.

1.1 Systémy pro cílenou dopravu léčiv

V současné době jsou vyvíjeny a studovány vlastnosti řady systémů umožňujících cílenou dopravu léčiv a jejich řízené uvolňování. Společným znakem těchto systémů je velikost od několika až po stovky nanometrů a také to, že kromě nosiče obsahují jednu nebo více terapeuticky účinných látek (nanoléčiva, nanomedicines). Mezi nejdůležitější nosiče léčiv patří micelární systémy, nanočástice, lipozomy a vodorozpustné polymerní nosiče.

1.1.1 Polymerní micely

Široce studovaným systémem pro dopravu především lipofilních léčiv jsou polymerní micely, které jsou připravovány z amfifilních molekul převážně diblokových kopolymerů. Polymerní micely jsou tvořeny uspořádanými hydrofobními částmi amfifilních molekul (jádro) obklopenými hydrofilními částmi molekul (obal). Při dopravě hydrofobního léčiva na místo terapeutického účinku je léčivo zachyceno buď v lipofilním jádře micely hydrofobní interakcí, nebo je navázáno kovalentně do jádra nebo obalu micely. Nespornou výhodou micelárních systémů je jejich zvýšená akumulace v pevných nádorech a rozpad po snížení jejich koncentrace pod kritickou micelární koncentraci, což umožňuje odstranění součástí polymerních micel z organismu po dopravení léčiva do místa terapeutického účinku. Žádný z těchto systémů však doposud nebyl schválen pro klinické použití.

1.1.2 Lipozomy a nanočástice

Lipozomy jsou systémy vznikající z relativně malých amfifilních strukturních jednotek jejich samsopřádaním. Nerozpuštěné polární lipidy (např. fosfolipidy) se v nadbytku vody shlukují do vysoce organizovaných agregátů (membrán), které mohou za určitých podmínek vytvářet sférické útvary - lipozomy. Léčiva mohou být zachycena buď v hydrofilní dutině, nebo v lipidové dvojvrstvě, v závislosti na jejich hydrofilicitě, respektive hydrofobicitě. Po aplikaci do lidského nebo zvířecího organismu jsou lipozomové nosiče schopné výrazně změnit farmakokinetiku léčiva. Na trhu i v klinické praxi se objevují první nanoléčiva připravená na této bázi (Doxil, Myocet, DepoCyt atd.).

Dalším systémem použitelným pro dopravu a řízené uvolňování nízkomolekulárních léčiv jsou částice s fyzikálně vázaným léčivem. Syntetické částice i částice připravené z přírodních materiálů (např. albumin, chitosan) se dělí podle velikosti na mikročástice (průměr 1 - 50 μm) a nanočástice (průměr 10 - 200 nm). Pro cílenou dopravu léčiv mohou být využity jen nanočástice, mikročástice jsou příliš velké a neprojdou krevními kapilárami, případně dochází k jejich masivnímu vychytávání v některých orgánech. Naproti tomu nanočástice o velikosti desítek až stovek nm mohou alespoň částečně procházet krevními kapilárami a nedochází k jejich masivnímu vychytávání buňkami eetikuloendoteliálního systému (RES) a játry, jako je tomu u mikročástic.

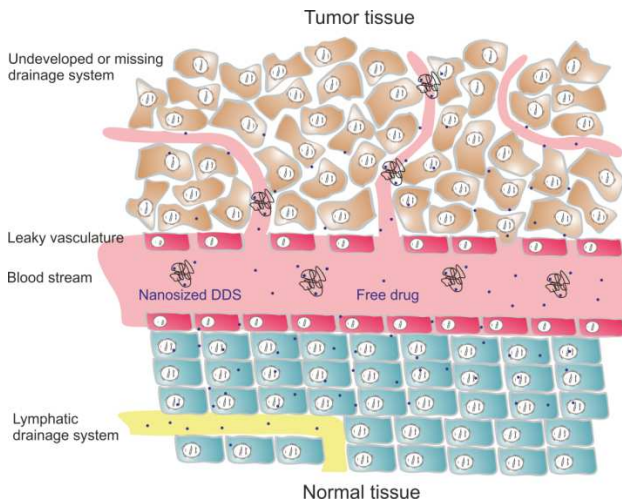
Nanočástice a lipozomy, pokud nejsou povrchově modifikovány, se však často hromadí v játrech, ledvinách a kostní dřeni. Povrchovou modifikací nanočástic a lipozomů pomocí hydrofilních polymerů je možné významně prodloužit dobu jejich cirkulace. Nanoléčiva na bázi biodegradovatelných nanočástic se stále více uplatňují v klinické praxi (např. Abraxane).

1.1.3 Vodorozpustné polymerní nosiče

Mezi velmi nadějně, vysoce variabilní a v poslední době intenzivně studované systémy, které umožňují řízené uvolňování léčiva a prodlužují dobu jeho cirkulace v krevním řečišti, čímž zvyšují jeho terapeutickou účinnost, jsou konjugáty vodorozpustného polymerního nosiče s léčivem. U polymerních proléčiv lze dosáhnout značné variability vlastností nosiče pouhou změnou v jeho struktuře a architektuře. Nízkomolekulární léčivo je možné připojit k polymernímu nosiči kovalentní vazbou, a to pomocí reakce skupin nacházejících se v bočních řetězcích polymeru s některou z funkčních skupin léčiva - tyto skupiny mohou být použity i pro další modifikace molekuly konjugátu funkčními molekulami s celou řadou důležitých funkcí. Takový polymerní konjugát může být použit jako cíleně směřované vysokomolekulární proléčivo, které v ideálním případě uvolní účinné nízkomolekulární léčivo v místě požadovaného terapeutického účinku. V klinické praxi jsou zatím zavedeny jen polymerní konjugáty polyethylenglykolu s biologicky aktivními proteiny (Oncaspar, Somavert, Pegasys, Neulasta). Širší praktické využití tohoto systému je očekáváno v nejbližších letech.

1.2 Cíle předkládané práce

Předkládaná práce se zabývá studiem nových systémů pro dopravu léčiv využívajících vodorozpustných nebo micelárních polymerních nosičů a tyto systémy rovněž porovnává. Byla studována především závislost fyzikálně-chemických a biologických vlastností na struktuře použitého polymerního systému. Hlavní důraz byl kladen na přípravu vysokomolekulárních polymerních systémů, které jsou akumulovány preferenčně ve vaskularizovaných pevných nádorech pomocí efektu zvýšeného průniku a zachytu (enhanced permeability and retention effect, EPR), viz Obr. 1. Pevné nádory produkují v důsledku nedostatečného zásobování výživnými látkami angiogenní a cévní kapiláry rozšiřující faktory, které způsobují zvětšení průchodnosti vaskulárního systému nádoru a zvýšené zachycování makromolekul z krevního řečiště ve tkáni nádoru. Na druhou stranu nedostatečně vybavený lymfatický systém rychle rostoucího nádoru nedovoluje odvádět akumulované makromolekuly z nádorové tkáně. Zmíněný efekt je důležitý nejen pro růst nádoru, ale i pro vytvoření nového nádoru a jeho zásobování živinami. EPR efekt však může být využit při cílené nádorové terapii vysokomolekulárními systémy, jak je uvedeno níže.



Obrázek 1. Schematické znázornění EPR efektu

Hlavní důvod pro volbu vodorozpustných nebo micelárních polymerních systémů pro naše studium spočíval v široké strukturální variabilitě polymerních řetězců (široké spektrum monomerů), v možnosti syntézy polymerů s předem definovanou molární hmotností obsahujících vhodné reaktivní skupiny a ve snadné aplikovatelnosti těchto systémů. Pro svou práci jsme se rozhodli využít makromolekulární dopravní systémy na bázi syntetických polymerů především kvůli významným výhodám, které mají tyto systémy obecně v porovnání s původními nízkomolekulárními léčivy. Především jde o vylepšenou farmakokinetiku, prodlouženou dobu cirkulace léčiva v organismu a akumulaci v cílové části organismu, které bylo dosaženo zvýšením molární hmotnosti polymerního proléčiva vzhledem k původnímu léčivu. Po napojení léčiva na polymerní systém dále dochází k významnému snížení toxicity a dalších vedlejších účinků neseného léčiva, ke zvýšení vodorozpustnosti. Navázaná léčiva jsou chráněna polymerním řetězcem před nechtěnou biotransformací.

Cílem práce bylo systematické studium polymerních materiálů využitelných jako nosiče biologicky aktivních látek s možnou aplikací v humánní medicíně. V práci jsme se zaměřili na řešení základních problémů výzkumu a vývoje cíleně působících polymerních proléčiv, a to od výběru hydrofilního biokompatibilního polymeru tvořícího základní skelet polymerního léčiva přes řešení kovalentního připojení biologicky aktivní molekuly k polymernímu řetězci, přípravu struktur umožňujících cílenou dopravu aktivní látky v organismu a kombinovanou terapii až po řešení otázky vizualizace osudu léčiva a polymerního

nosičového systému v organismu. Při návrhu struktur zmíněných polymerních léčiv jsme využívali odlišností nádorových buněk v porovnání s normálními zdravými buňkami, a to zejména těchto: nádorové buňky mají nižší pH uvnitř buňky, vyšší rychlost endocytózy, produkují speciální hormony a enzymy a exprimují s nádorem asociované antigeny. „Na míru“ provedenými úpravami polymerních léčiv jsem dosáhl zvýšeného protinádorového účinku a snížení vedlejších účinků cytostatik.

2. Polymerní „proléčiva“

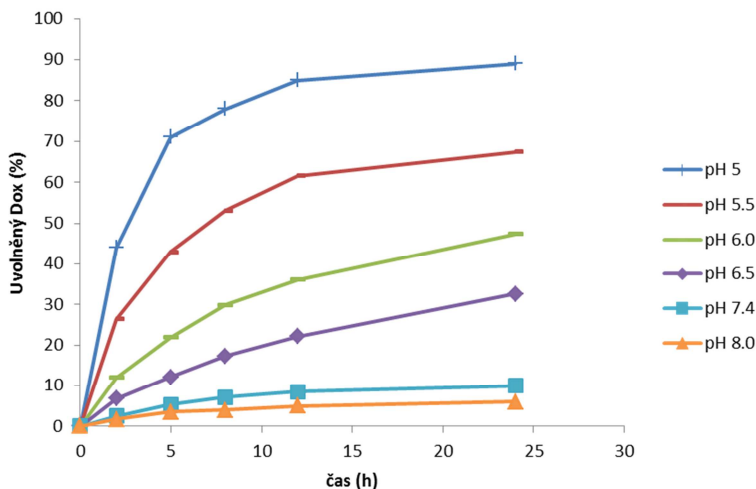
V rámci studia polymerních systémů pro dopravu léčiv jsem se se svým týmem plně soustředil na syntézu a studium vlastností hydrofilních polymerních konjugátů na bázi kopolymerů *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) s kovalentně navázaným léčivem. Kopolymery HPMA (pHPMA) jsou intenzivně studovány jako vhodné polymerní materiály pro využití v medicíně. Jsou to netoxické, vodorozpustné, neimunogenní polymery, jejichž struktura může být snadno modifikována kopolymerizací HPMA s metakrylovými monomery obsahujícími vybrané reaktivní skupiny. Polymerní řetězec takového nosiče je dostatečně variabilní a poskytuje širokou škálu vlastností, je multivalentní, což dovoluje připojit k nosiči kromě léčiva i další funkční molekuly umožňující dále modifikovat vlastnosti polymerního konjugátu, a dále díky dostatečné hydrofilitě je zárukou potřebné biokompatibility. Takový konjugát umožňuje podání léčiv bez nežádoucích vedlejších účinků a jejich aktivaci přímo v cílové části organismu. Léčivo může být navázáno k nosiči kovalentní vazbou, která reaguje na změnu prostředí (změnu neutrálního prostředí v redukční prostředí nebo změnu pH), nebo je součástí vhodného substrátu pro vybrané enzymy. V návaznosti na změnu prostředí nebo enzymatické štěpení dochází k uvolnění léčiva v jeho biologicky aktivní formě. Při enzymatickém štěpení jsou za hydrolytický rozklad přírodních makromolekul či substrátů vstupujících endozomy do buněk zodpovědné lysozomální enzymy. Znalost substrátové specifity právě lysozomálních enzymů může být využita při návrhu struktur enzymaticky štěpitelných spojek využívajících lysozomálních enzymů při řízeném uvolňování nízkomolekulárních léčiv z polymerních nosičů, kdy jako spojka mezi léčivem a polymerním nosičem je vybrán například vhodný oligopeptid štěpitelný lysozomálními proteázami. Starší práce kolegů prokázaly, že ve vnitřním prostoru lysozomů je kyselé prostředí o pH v rozmezí 4,5 až 5,5, a to v závislosti na druhu buněk a na okolních podmínkách. Nižší pH v lysozomech (ve srovnání s krevním řečištěm - pH 7,4) je tedy možno využít jako další spouštěcí mechanismus uvolňování léčiv z makromolekulárních nosičů.

2.1 Polymerní systémy s pH řízenou aktivací uvolňování léčiv

V naší práci jsme se zaměřili na detailní studium systémů s pH-řízenou aktivací léčiva. Na rozdíl od výše zmíněných polymerních konjugátů s oligopeptidovými spojkami připravenými jako substráty pro lysozomální enzymy jsou námi navržené systémy aktivovatelné (hydrolyticky degradovatelné) nejenom po vstupu do nádorových buněk, ale již po penetraci do nádorové tkáně, kde dochází k mírnému poklesu pH ze 7,4 (prostředí krve) na pH ~ 6,5. Další masivní uvolnění léčiva by mělo následovat po vstupu do nádorových buněk, kde pH v endozomech a lysozomech klesá na hodnoty mezi 5 a 6. K aktivaci tedy dochází na několika místech, jak v extracelulárním, tak v intracelulárním prostředí nádoru. Ke studiu jsme vyselektovali dvě spojky: spojku obsahující hydrazonovou vazbu a spojku tvořenou zbytkem cis-akonitové kyseliny.

2.1.1 Polymerní proléčiva s hydrazonovou vazbou

S cílem navázat vybrané nízkomolekulární antracyklinové protinádorové antibiotikum doxorubicin (Dox), které ve své struktuře obsahuje keto skupinu a zároveň amino skupinu, jsme připravili kopolymer na bázi HPMA. První polymerní systémy jsme syntetizovali klasickou radikálovou polymerizací a připravili jsme pHPMA s reaktivními p-nitrofenyloxy skupinami (Onp). Tyto Onp skupiny byly v dalším kroku hydrazinolyzovány hydrazin hydrátem a vzniklý pHPMA obsahující hydrazidové skupiny byl vyčištěn dialýzou, popřípadě sloupcovou chromatografií. Tento polymerní prekurzor obsahující okolo 5 mol % hydrazidů byl v následujícím kroku využit pro navázání Dox v nevodném prostředí methanolového roztoku za přídavku kyseliny octové. Během 24 h bylo navázáno okolo 97 váhových % použitého Dox. Polymerní konjugát byl zbaven nezreagovaného léčiva pomocí gelové chromatografie^{[1] [N1]}. U připraveného polymerního konjugátu byla stanovena rychlost uvolňování Dox z polymeru v závislosti na pH pufru, iontové síle a koncentraci polymerního konjugátu. Zjistili jsme, že ani iontová síla, ani koncentrace nemá vliv na rychlost uvolnění Dox z polymerního konjugátu. Zásadní vliv na rychlost uvolňování léčiva mělo pH roztoku, ve kterém byl polymerní konjugát inkubován. Zatímco při pH 8 a 7,4 docházelo k uvolnění jen cca 4 až 10 % navázaného léčiva za 24 h, s pH klesajícím pod 7 docházelo k významné akceleraci rychlosti uvolňování, viz Obr. 2. Z obrázku je patrné, že při pH 5 – 6 (prostředí lysozomů) dochází k velmi rychlému uvolnění léčiva v původní aktivní formě. Rovněž při pH 6,5 (pH extracelulárního prostředí v nádoru) je rychlost uvolnění významně vyšší než při pH 7,4 (fosfátový pufr o pH 7,4 byl použit jako model prostředí krevního řečiště).

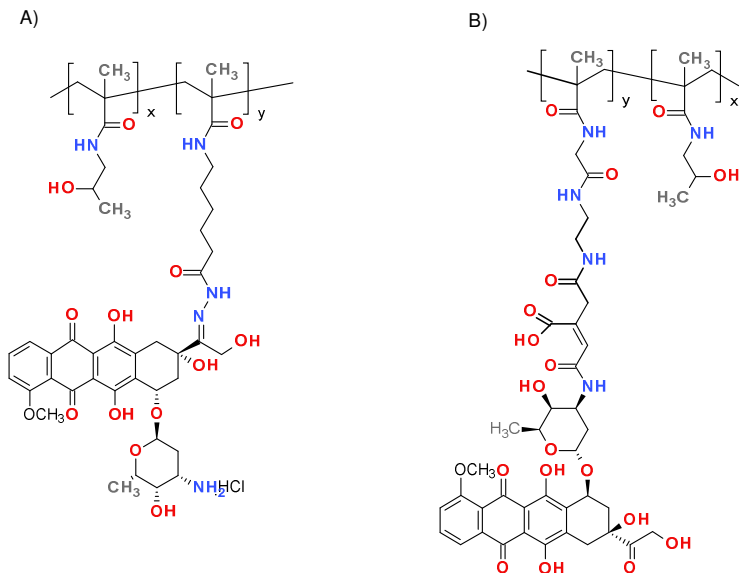


Obrázek 2. Rychlost uvolňování léčiva Dox navázaného k polymernímu konjugátu pH-senzitivní hydrazonovou vazbou. Závislost na pH roztoku.

Posléze jsme detailně studovali vliv chemického okolí hydrazonové vazby na rychlost uvolňování Dox. Byly připraveny polymerní prekurzory s různými aminokyselinovými nebo oligopeptidickými sekvencemi mezi polymerním řetězcem a hydrazidovou skupinou. Ze všech polymerních prekurzorů byly připraveny polymerní konjugáty s Dox a byla detailně studována rychlost uvolňování. Zjistili jsme, že změnou struktury spojky mezi polymerním řetězcem a hydrazonovou skupinou je možné částečně ovlivnit stabilitu hydrazonové vazby. Jako nejvýhodnější byla vybrána spojka obsahující 6-aminohexanovou kyselinu, u jejíhož polymerního konjugátu byl zjištěn největší rozdíl stability při pH 7,4 (uvolněno do 8 % léčiva za 24 h) a pH 5 (uvolněno více než 90 % léčiva za 24 h). Při dalších syntézách byla používána již jen tato aminokyselinová spojka (Obr. 3A).

Důležitým aspektem při studiu polymerních systémů je jejich toxicita při inkubaci s buňkami. Bylo zjištěno, že samotný polymerní nosič obsahující hydrazidové skupiny není toxický ani pro nádorové buňky, ani pro myší splenocyty. Obdobný výsledek byl zjištěn po *in vivo* aplikaci do laboratorních zvířat. Polymerní prekurzor s hydrazidovými skupinami nevykazoval ani při vysoké dávce žádné toxické účinky, které by se projevíly úbytkem váhy zvířat nebo změnami v jejich chování. *In vivo* protinádorová aktivita byla posléze testována na myších s inokulovaným nádorem agresivního myšního T-buněčného

lymfomu EL-4. Experimenty potvrdily, že polymerní konjugáty s hydrazonově vázaným Dox umožňují významné zvýšení aplikovatelné dávky léčiva, aniž by došlo k projevům toxicity navázaného léčiva. Při terapeutickém podání polymerního konjugátu bylo dosaženo významně většího protinádorového účinku v porovnání jak s účinkem volného léčiva, tak s účinkem polymerního léčiva vyvinutého dříve (oligopeptidová spojka s aktivací léčiva lysozomálními enzymy)^{[2] [N2]}. Úspěšně byly připraveny polymerní konjugáty obsahující od 3 do 25 váhových % Dox vázaného hydrazonovou vazbou. Při studiu fyzikálně-chemických vlastností těchto polymerních konjugátů bylo zjištěno, že při obsahu léčiva nad 13 váhových % dochází ke změně druhého viriálního koeficientu ve vodném prostředí z kladné hodnoty na zápornou. Při obsahu léčiva nad 13 váhových % se tedy začal měnit charakter polymeru z hydrofilního na hydrofobní, což by mohlo potenciálně vyvolat nechtěnou agregaci polymerních řetězců. Z tohoto důvodu byl obsah léčiva v polymerních konjugátech pro další vývoj a testování nastaven na 9 – 13 váhových %. Na základě získaných výsledků bylo možné konstatovat, že polymerní systémy s léčivem vázaným pH-senzitivní hydrazonovou vazbou jsou velmi slibnými kandidáty pro další vývoj účinných polymerních proslých s protinádorovým účinkem.



Obrázek 3. Schematické struktury polymerních konjugátů s hydrazonově vázaným léčivem (A) a léčivem vázaným přes cis-akonitovou spojku (B).

V oblasti syntézy byl další výzkum zaměřen na zlepšení syntetických postupů při přípravě konjugátů. V prvním kroku byl syntetizován monomer 6-methacrylamidohexanohydrazid obsahující hydrazidovou skupinu, jeho radikálovou kopolymerizací s HPMA byl připraven polymerní prekurzor nesoucí volnou hydrazidovou skupinu^[3]. Zmíněnou polymerizací byly úspěšně syntetizovány polymerní prekurzory s obsahem hydrazidových skupin 2 až 15 mol%. Zjištěné kopolymerizační parametry ($r_a=1.26$ a $r_b=0.91$, Fineman – Ross; $r_a=1.26$ a $r_b=0.93$, Kelen – Tüdös) potvrdily, že se oba monomery zabudovávají do řetězce téměř statisticky, což je výhodné při syntézách prekurzoru ve velkých šaržích o desítkách gramů.

2.1.2 Polymerní proléčiva s *cis*-akonitovou spojkou

Kromě léčiva vázaného na polymer pomocí hydrazoné vazby jsme se zaměřili také na studium pH-senzitivní spojky odvozené od *cis*-akonitové kyseliny uvolňující léčivo při poklesu pH^[4]. Byl připraven derivát léčiva (Dox acylovaný *cis*-akonitovou kyselinou), který byl následně navázán na polymerní prekurzor obsahující amino skupiny s využitím karbodiimidové metody (Obr. 3B). Obdobně jako v případě konjugátů s hydrazonovou vazbou byly připraveny polymery s obsahem léčiva od 3 do 10 váhových %. Vlastnosti obou polymerních systémů, s hydrazonovou vazbou a s *cis*-akonitovou spojkou, byly následně porovnány v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. Polymerní konjugát s *cis*-akonitovou spojkou vykázal v *in vitro* podmínkách menší rozdíl v rychlosti uvolňování léčiva než obdobný polymerní konjugát s hydrazonovou vazbou. V rámci *in vitro* a *in vivo* biologických experimentů jsme dále zjistili, že polymerní konjugát s *cis*-akonitovou spojkou nedosahuje takové protinádorové účinnosti, jaká byla zjištěna u polymerního konjugátu s hydrazonově vázaným léčivem. V souhrnu je možné konstatovat, že polymerní konjugát s *cis*-akonitovou spojkou uvolňoval léčivo pH-řízeným mechanismem, ale jeho biologické vlastnosti nebyly srovnatelné s vlastnostmi polymerních konjugátů s hydrazonovou vazbou. Proto náš další výzkum tímto směrem nepokračoval.

2.1.3 Polymerní proléčiva s dalšími léčivy

V návaznosti na velmi slibné biologické výsledky získané při *in vivo* experimentech s polymerním konjugátem obsahujícím Dox navázaný přes pH-senzitivní hydrazonovou vazbu jsme navrhli, připravili, charakterizovali a otestovali několik polymerních konjugátů s dalšími vybranými léčivy, převážně kancerostatiky. Některá z těchto léčiv neobsahovala keto skupiny potřebné pro připojení k polymeru hydrazonovou vazbou. Proto byly keto skupiny zavedeny do molekuly léčiva acylací příslušnou keto kyselinou. Paclitaxel (PTX) a docetaxel (DTX) byly acylovány kyselinou levulovou na -OH skupině v poloze 2 molekuly léčiva^{[5][N3]}. Takto derivatizovaná léčiva byla následně navázána na

polymerní prekurzor nesoucí hydrazidové skupiny. Hydrolyza vzniklé hydrazonové vazby byla pH závislá, rychlost uvolňování PTX nebo DTX byla významně vyšší při pH 5 (modelující intracelulární prostředí nádorových buněk) než při pH 7,4 (prostředí krevního řečiště). Při *in vivo* experimentech bylo zjištěno, že po navázání na polymerní nosič došlo k významnému zvýšení rozpustnosti obou hydrofobních léčiv a tolerovatelná dávka léčiva výrazně vzrostla (v porovnání se samotným léčivem). Rovněž terapeutická účinnost polymerních konjugátů byla signifikantně vyšší než u původních nízkomolekulárních léčiv.

Obdobně byl připraven polymerní konjugát s léčivem dexamethason (Dex). V tomto případě byly zvoleny dvě syntetické strategie^{[6] [N4]}. Léčivo bylo navázáno přímo přes keto skupinu, která se v molekule léčiva nachází v blízkém sousedství dvojné vazby stabilizující vznikající hydrazonovou vazbu. Souběžně byl připraven derivát Dex acylací -OH skupiny kyselinou levulovou, obdobně jako v případě vazby DTX. Rychlost uvolňování léčiva a jeho derivátu se významně lišila v závislosti na struktuře vzniklé spojky. Polymerní konjugát s přímo hydrazonově vázaným léčivem uvolňoval léčivo velmi pomalu, 2 % za 24 h při pH 5. Polymerní konjugát připravený z derivátu Dex vykazoval obdobnou rychlost uvolňování a pH-senzitivní charakter hydrolyzy jako polymerní konjugáty Dox nebo DTX. Dex byl při pH 7,4 uvolňován poměrně pomalu (25 % za 24 h), ovšem rychlost uvolňování se významně zvýšila po snížení pH na hodnotu okolo 5 (70 % za 8 h). Biologická aktivita konjugátů byla testována *in vivo* na dvou rozdílných systémech, při léčbě hormon-dependentních inokulovaných nádorů B buněčného lymfomu 38C13^[6] a při léčbě indukované reumatoidní artritidy u krys^[N4]. Zjistili jsme, že polymerní konjugát připravený z derivátu Dex a uvolňující léčivo pH-senzitivní hydrolyzou je terapeuticky aktivní při synergické léčbě lymfomu 38C13, kdežto polymerní konjugát s přímo vázaným Dex a pomalým uvolňováním léčiva je naopak účinný při dlouhodobé léčbě indukované reumatoidní artritidy. Výsledky studia ukázaly, že volbou vhodné struktury spojky v polymerních proléčivech je možné dosáhnout vysoké terapeutické účinnosti při léčbě různých onemocnění, u kterých se liší žádoucí koncentrace a doba působení léčiva.

Dalším léčivem použitým při studiu vlastností polymerních konjugátů využívajících pHPMA nosičů bylo antracyklinové antibiotikum pirarubicin (THP). Toto léčivo má oproti Dox významnou výhodu v mnohem vyšší rychlosti internalizace do nádorových buněk. Léčivo THP bylo navázáno obdobným způsobem jako Dox přímo reakcí keto skupiny s hydrazidovými skupinami polymerního prekurzoru^[7]. Zjistili jsme, že rychlost uvolňování je srovnatelná s rychlostí u polymerních systémů s Dox, a to při všech studovaných pH. Polymerní konjugát s THP vykázal oproti samotnému léčivu výrazně lepší biologické vlastnosti při *in vitro* experimentech prováděných na různých

nádorových liniích a především při *in vivo* studiích protinádorové aktivity u myši nesoucích inokulované i karcinogenem vyvolané myší nádory. Předpokládáme, že zlepšená biologická účinnost je důsledkem kombinace zvýšené rozpustnosti léčiva po navázání na hydrofilní polymerní nosič, zvýšené akumulace léčiva v nádorech a selektivního uvolnění léčiva v nádorové tkáni a nádorových buňkách žádoucí rychlostí. Výsledky *in vivo* testů ukázaly, že konjugát pHMA s THP je proléčivem vhodným pro léčbu nádorových onemocnění, a to potažmo i u lidských pacientů. Ve spolupráci s japonskými pracovišti bylo provedeno ověřování léčby nádorových onemocnění v rámci „soucitého využití“ u několika desítek lidských pacientů v terminálním stádiu nemoci^[8]. Bylo zjištěno, že přes 90 % těchto pacientů, kteří již nereagovali na klasickou léčbu, nepozorovalo žádné vedlejší účinky při podání polymerního proléčiva (vypadávání vlasů, nevolnost...) a u 40 % pacientů byla zaznamenána jednoznačná pozitivní odezva na léčbu. U několika pacientů došlo k tak významnému ústupu onemocnění, že byli propuštěni z nemocnice a vrátili se i ke své práci. Tyto výsledky jednoznačně prokazují vysoký potenciál testovaných polymerních proléčiv.

2.2 Příprava polymerních proléčiv kontrolovanou radikálovou polymerizací

Klasická radikálová polymerizace umožňuje připravit semitelechelické polymery (polymerní prekurzory s funkční skupinou na jednom konci polymerního řetězce) a polymery v širokém rozmezí molárních hmotností. Syntézu je možné jednoduše zvýšit do větších šarží, disperzita polymerů však zůstává díky mechanismu klasické radikálové polymerizace vyšší, v rozmezí 1,5 až 2. Zvýšená disperzita je částečně limitujícím faktorem pro širší využití těchto systémů v medicíně. S cílem připravit obdobné polymerní prekurzory s úzkou distribucí molárních hmotností jsme studovali možnosti jejich syntézy s využitím kontrolované radikálové tzv. RAFT polymerizace^[9], z anglického reverzibilní addition chain transfer polymerization. Byly studovány reakční podmínky RAFT polymerizace a především kopolymerizace HPMa s cílem připravit obdobné polymerní systémy jako v případě klasické radikálové polymerizace, ovšem s disperzitou okolo 1,1 až 1,2. Při volbě vhodného rozpouštědla, iniciátoru a přenosového činidla bylo možné takové polymerní prekurzory připravit. Polymerní prekurzory s úzkou distribucí byly následně využity pro přípravu polymerních konjugátů s Dox. Porovnání fyzikálně-chemických a biologických vlastností konjugátů připravených klasickou radikálovou polymerizací a RAFT polymerizací ukázalo, že nové RAFT polymery jsou vhodnější pro přípravu polymerních konjugátů s definovanou strukturou a že díky nízké disperzitě jsou tyto systémy vhodnější pro *in vivo* aplikace, kde umožňují dosažení zvýšené akumulace léčiva v nádoru a tím i vyšší terapeutické účinnosti^[N5].

2.3 Polymerní léčiva a aktivace imunitní odpovědi

Biologická testování pHPMA konjugátů s kancerostatiky ukázala, že jejich podání, na rozdíl od volného léčiva, je bezpečné, bez zřejmých vedlejších účinků a že nepoškozuje imunitní systém laboratorních zvířat. Zatímco u volného léčiva dochází k omezení funkce imunitního systému a samotná obranná funkce organismu je tedy oslabena, polymerní formy stejných léčiv mají vedlejší účinky významně redukovány a imunitní systém může synergicky s léčbou polymerními konjugáty omezit růst nádorů ^[10]. Navíc bylo zjištěno, že díky účinné léčbě polymerními konjugáty se nádorové buňky rozpadají a imunitní systém se aktivuje součástími rozpadajících se nádorových buněk. Dochází k „nádorové imunizaci“, která se projevuje tím, že vyléčená laboratorní zvířata jsou vůči další dávce stejných nádorových buněk imunní a po inokulaci smrtelné dávky těchto buněk nedochází k rozvinutí nádorového onemocnění. Tento efekt je naprosto zásadní pro praktickou léčbu, protože významně zvyšuje potenciál využití polymerních proléčiv při léčbě vysoce agresivních neoplastických onemocnění.

2.4 Závěr kapitoly

Bylo potvrzeno, že vodorozpustné polymerní nosiče na bázi HPMA jsou vhodnými nosičovými systémy pro dopravu a řízené uvolňování léčiv. Polymerní konjugáty s pH-řízeným uvolňováním léčiva prokázaly velmi dobré výsledky při léčbě modelových nádorů *in vivo*. Úspěšně byly připraveny polymerní konjugáty celé řady léčiv, a to jak protinádorových, tak protizánětlivých. Bylo prokázáno, že správným výběrem struktury nosiče a spojky mezi léčivem a nosičem je možné připravit polymerní proléčiva vhodná pro léčbu různých onemocnění. Úspěšně byla zavedena nová metoda přípravy polymerních prekurzorů, a to řízená radikálová polymerizace.

3. Vysokomolekulární polymerní systémy umožňující zvýšenou akumulaci v pevných nádorech

Terapeutickou aktivitu polymerních proléčiv určených k léčbě nádorových onemocnění lze zvýšit několika způsoby. Jednou z metod je "pasivní" cílení konjugátu do solidních nádorů díky EPR efektu popsánému výše. Zvýšení molární hmotnosti polymerních nosičů v tomto případě zabraňuje rychlému odstranění navázaného léčiva z organismu renální filtrací, dochází tedy k prodloužení cirkulace v krvi a k významnému navýšení koncentrace akumulovaného polymerního systému s léčivem ve tkáni pevného nádoru. Míra akumulace polymerního nosiče v pevných nádorech závisí především na jeho molární hmotnosti, potažmo na hydrodynamickém rozměru použitého dopravního systému.

V naší práci využíváme vlastností syntetických polymerů methakrylamidového typu, které jsou biologicky stálé a nepodléhají degradaci. Tyto vodorozpustné polymery mohou být z organismu odstraňovány poměrně rychle glomerulární (renální) filtrací, ovšem jen přibližně do molární hmotnosti cca 50 000 g/mol, což je běžně uznávaný limit pro tento typ polymerů. V případě použití polymerních systémů o vyšší molární hmotnosti je nutné zavést do polymerní struktury degradovatelné sekvence, které umožní rozpad polymerního systému na vyloučitelné fragmenty tak, aby nedocházelo k dlouhodobému ukládání polymerních nosičů v těle po splnění jejich funkce nosiče. Ideálně by polymerní nosiče léčiv měly být odstraněny z těla po kompletním uvolnění a aktivaci léčiva v místě požadovaného účinku (např. v nádoru). V případě polymerních micelárních systémů je situace podobná, opět je nutný rozpad micelárního systému na menší části, ovšem k rozpadu v tomto případě může docházet na základě fyzikálního procesu. Micelární systémy vhodné jako nosiče léčiv jsou supramolekulární struktury tvořené samouspořádáním amfifilních kopolymerů, unimerů, s molární hmotností pod limitem renální filtrace. V tomto případě dochází k rozpadu micely na vyloučitelné části až po poklesu koncentrace micel pod kritickou micelární koncentraci (CMC).

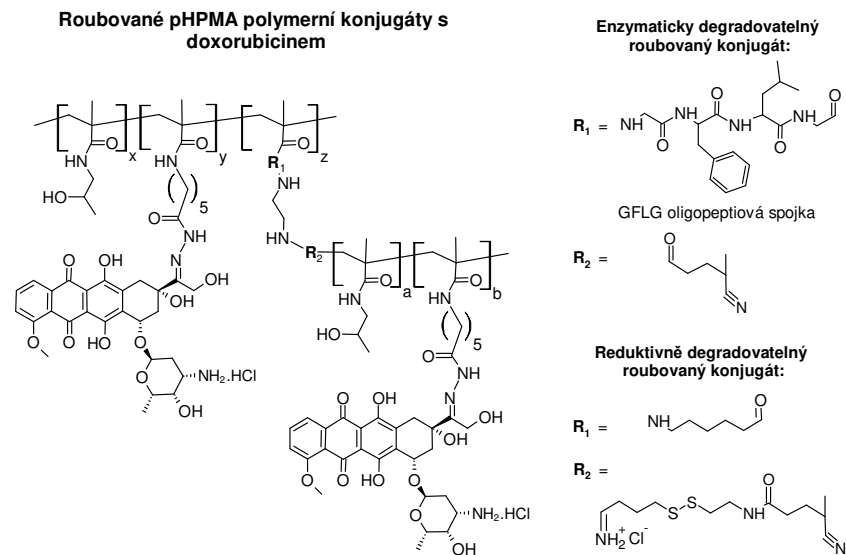
Tato kapitola pojednává o výsledcích studia vlivu molární hmotnosti, respektive velikosti vodorozpustných polymerních nosičů a micelárních nosičů léčiv na bázi pHPMA, na jejich akumulaci v pevných nádorech. Zároveň uvádí i výsledky studia možnosti odstranění těchto vysokomolekulárních (VM) nosičů z organismu po splnění funkce nosiče. Eliminace VM konjugátu z organismu je založena na zavedení biodegradovatelných, na změnu prostředí reagujících spojek mezi jednotlivými polymerními řetězci vytvářejícími VM strukturu. Biodegradovatelné spojky umožňují degradaci VM polymerních struktur v nádorové tkáni nebo až přímo v nádorových buňkách, a to s využitím enzymatického, redukčního nebo hydrolytického štěpení.

3.1 Větvené a roubované polymerní systémy

První VM polymerní systém byl připraven částečným post-polymerizačním větvením pHPMA obsahujícího komonomerní jednotky s oligopeptidem GFLG zakončeným Onp skupinou. Tento kopolymer byl větven reakcí s ethylendiaminem tak, aby vznikal nesíťovaný vodorozpustný polymerní nosič se zvýšenou molární hmotností, ale pod bodem gelace. Zbývající reaktivní Onp skupiny byly hydrazinolyzovány hydrazin hydrátem s cílem zavést do struktury takto větveného VM polymeru hydrazidové skupiny vhodné pro vazbu léčiv hydrazonovou vazbou^[1]. Úspěšně byly připraveny polymerní nosiče s molární hmotností v rozmezí 100 000 – 350 000 g/mol, vykazovaly ale velkou disperzitu ($\mathbb{D} = 3-7$) a poměrně špatnou reprodukovatelnost syntézy. U těchto VM polymerních nosičů byla rovněž studována degradabilita působením

lysozomálního enzymu katepsinu B, pro který je GFLG oligopeptid dobrým substrátem (jedná se o zjednodušený model prostředí lysozomů nádorových buněk). Inkubací v pufru obsahujícím fyziologickou koncentraci tohoto enzymu bylo zjištěno, že se větvené polymerní nosiče rozpadají na degradační produkty s molární hmotností podobnou molární hmotnosti polymeru použitého k větvení, tedy polymeru s molární hmotností pod limitem renální filtrace. Na připravené VM polymerní nosiče bylo pH-senzitivní hydrazonovou vazbou navázáno léčivo Dox. Polymerní konjugáty vykazaly zvýšenou terapeutickou aktivitu in vivo na myších s inokulovaným T-buněčným lymfomem EL-4, prodlouženou dobu cirkulace a zvýšenou akumulací v nádoru v porovnání s volným léčivem nebo lineárním polymerním konjugátem s Dox s molární hmotností pod limitem renální filtrace. Bohužel výše zmíněná vysoká disperzita a nereprodukovatelnost přípravy těchto větvených polymerů bránila v jejich dalším studiu při vývoji nosičů léčiv. S cílem snížit disperzitu a zlepšit reprodukovatelnost přípravy VM konjugátů jsme se proto v dalším studiu zaměřili na roubované polymerní systémy.

Pokročilejší roubované polymerní nosiče byly připraveny roubováním semitelechelických pHPMA na lineární multivalentní pHPMA, přičemž mezi polymerní roubu a polymerní řetězec byly umístěny enzymaticky (GFLG oligopeptid) nebo reduktivně (disulfidová vazba) degradovatelné spojky (viz Obr. 4.) [11][N6].



Obrázek 4. Schematické znázornění struktury roubovaných polymerních systémů.

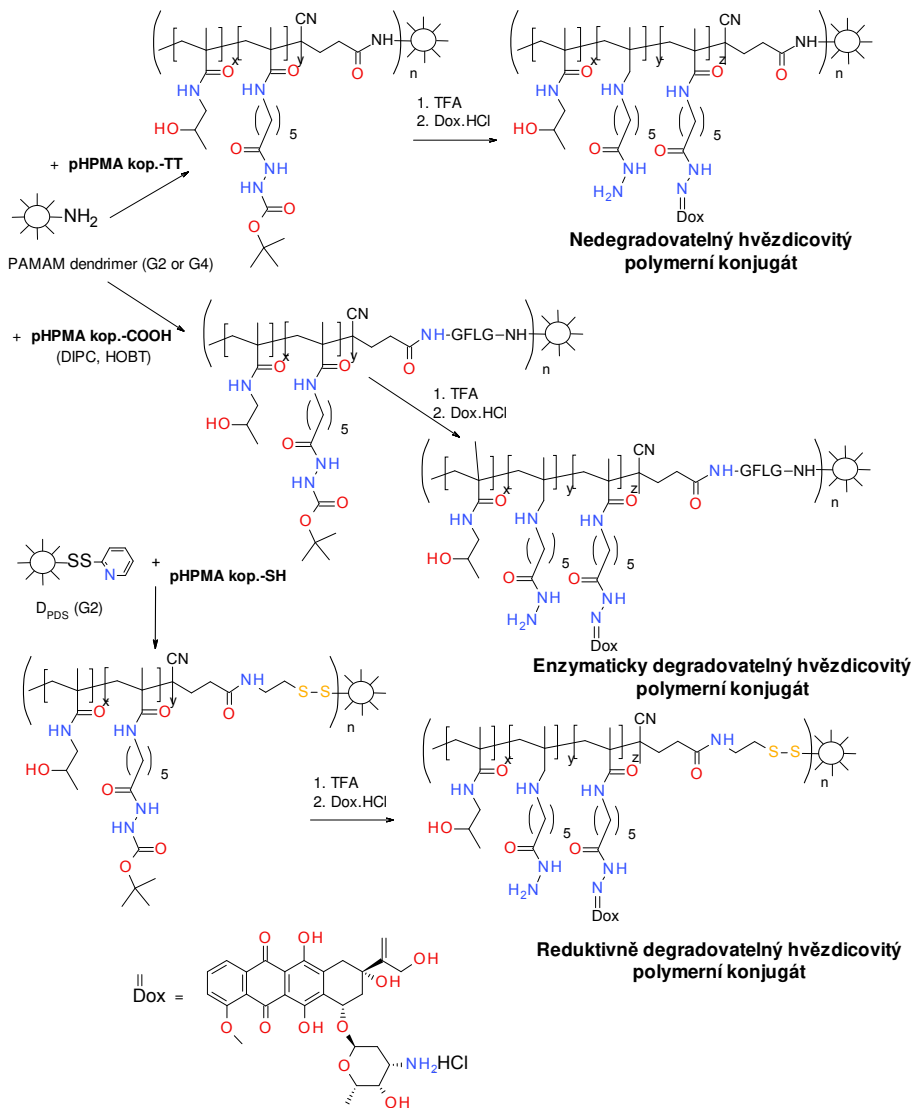
Semitelechelické pHPMA připravené klasickou radikálovou polymerizací s hlavním řetězcem zakončeným *N*-hydroxysukcinimidovou (NHS) nebo thiazolidin-2-thionovou (TT) skupinou byly roubovány na statistické pHPMA nesoucí v bočních řetězcích GFLG oligopeptid ukončený hydrazidovou skupinou nebo primární aminoskupinou. Alternativně byl semitelechelický pHPMA s koncovou pyridyldisulfidovou skupinou roubován na kopolymer nesoucí v bočních řetězcích thiolové skupiny zavedené do kopolymeru modifikací aminové skupiny polymeru reakcí s 2-iminothiolanem. Molární hmotnost připravených roubovaných kopolymerů byla převážně v rozmezí 90 000 – 120 000 g/mol, což při molární hmotnosti použitých lineárních polymerů (25 000 – 30 000 g/mol) znamená, že na jeden hlavní řetězec byly v průměru navázány 3-4 polymerní rouby. Obdobně jako v případě větvených VM polymerů se však významně zvýšila disperzita z hodnoty 1,9 zjištěné pro použité lineární prekurzory na hodnotu $\bar{D} = 2,4 - 3$. Disperzita roubovaných systémů byla sice nižší než disperzita větvených systémů, ale stále poměrně vysoká a nedošlo k očekávanému zvýšení reprodukovatelnosti syntézy vzhledem k přípravě systémů větvených. Roubované polymery byly použity jako VM nosiče nízkomolekulárních biologicky aktivních látek, a to především léčiva Dox vázaného přes pH-senzitivní hydrazonovou spojku. Zjistili jsme, že zvýšení molární hmotnosti a roubovaná struktura neměly vliv na rychlost uvolňování léčiva při různých pH. Roubovaný polymerní systém byl poměrně stabilní při inkubaci v pufrech o pH 7,4 (uvolněno cca 8 % Dox za 24 h), k masivnímu uvolnění léčiva došlo v modelových pufrech o pH 6 a 5 (35 %, respektive 85 % za 12 h) modelujících prostředí lysozomů a endozomů nádorových buněk. Roubovaný konjugát prokázal významně prodlouženou dobu cirkulace v krevním řečišti a byl rovněž zjištěn významný nárůst akumulace polymeru i léčiva v pevných nádorech. Akumulace VM konjugátu byla více než pětinasobná ve srovnání s akumulací lineárních konjugátů a více než 25násobná vzhledem k akumulaci volného léčiva. Prodloužené setrvání v krevním oběhu a zvýšená akumulace v nádoru vedly rovněž k významnému nárůstu protinádorové aktivity *in vivo* zjištěné u myši s inokulovanými nádory T-buněčného lymfomu EL-4 a B-buněčného lymfomu 38C13. Roubované polymerní konjugáty prokázaly při dávkování okolo 15 mg/kg Dox ekv. vynikající protinádorovou aktivitu, většina pokusných zvířat přežila po podání roubovaných systémů po celou dobu sledování, zatímco při léčbě lineárními konjugáty dlouhodobě přežívalo 60 % zvířat a při léčbě volným léčivem (dávka 5 mg/kg) bylo jen 20 % dlouhodobě přežívajících. Degradace roubovaných polymerních systémů byla studována v přítomnosti lysozomálního enzymu katepsinu B, dále v reduktivním prostředí 3 mM glutathionu, popřípadě v prostředí obsahujícím jejich kombinaci. Nejrychleji probíhala degradace roubovaného polymeru se spojkami obsahujícími jak GFLG oligopeptid, tak disulfidovou vazbu, kde se uplatnily oba degrační mechanismy zároveň (enzymolýza, redukce). Redukce disulfidického můstku probíhala obecně

rychleji než enzymatická hydrolýza GFLG oligopeptidu, což je možné vysvětlit sterickým bráněním objemné molekule enzymu s molární hmotností okolo 30 000 g/mol v přístupu ke GFLG sekvenci v rámci struktury roubovaného pHPMA. V modelových podmínkách však byly všechny roubované polymery degradovány na degradační produkty s molární hmotností pod limitem renální filtrace během 2 až 15 h. S cílem detailně prokázat degradovatelnost systémů s disulfidickými spojkami byla studována jejich stabilita v různých prostředích a také při inkubaci s nádorovými buňkami. Zjistili jsme, že polymerní konstrukty obsahující zmíněné biodegradovatelné spojky (roubované, diblokové, multiblokové) jsou stabilní v prostředí modelujícím prostředí krve. Naopak při inkubaci s nádorovými buňkami byla zjištěna časově závislá degradace všech studovaných struktur^[12]. Výsledky získané při studiu roubovaných polymerních konjugátů jsou sice velmi slibné, stále však převažují negativa těchto systémů: příliš vysoká disperzita, jen omezené možnosti řízení molární hmotnosti a nepříliš vysoká reprodukovatelnost jednotlivých šarží. Molární hmotnosti roubovaných polymerů jsou 2-5krát vyšší ve srovnání s lineárními konjugáty, další navýšení by však bylo problematické. Z tohoto důvodu jsme ve vývoji těchto systémů dále nepokračovali.

3.2 Hvězdicovité polymerní systémy

Další studium jsme zaměřili na nový typ polymerních struktur, a to na hvězdicovité polymerní nosiče. Při volbě struktur těchto nových VM polymerních nosičů jsme vycházeli ze zkušeností získaných při přípravě roubovaných polymerů. Namísto polymerního řetězce jako centrální molekuly systému jsme použili menší molekuly o definované struktuře s vyšším počtem reaktivních skupin. Ukázalo se, že pro přípravu hvězdicovitých nosičů jsou nejvhodnější dendritické struktury, mezi nimi především dendrimery na bázi polyamidoaminů, tzv. PAMAM dendrimery. VM hvězdicovité polymery byly připraveny kontrolovaným roubováním semitelechelických polymerních prekurzorů na reaktivní skupiny PAMAM dendrimerů. Stejně jako v případě roubovaných polymerů byla biodegradace VM hvězdicovitých polymerů zajištěna vložením biodegradovatelné spojky mezi centrální PAMAM molekulu a polymerní rouby. Byly připraveny polymerní prekurzory obsahující reduktivně štěpitelné disulfidické můstky a enzymaticky degradovatelné sekvence GFLG^[13] [N7,N8]. Při syntéze těchto polymerů byly použity semitelechelické polymerní pHPMA připravené radikálovou polymerizací iniciovanou funkcionalizovaným iniciátorem 3,3'-[azobis(4-cyano-4-methyl-1-oxobutan-4,1-diyl)]bis(thiazolidin-2-thionem) (ABIC-TT). Využití tohoto funkcionalizovaného iniciátoru radikálové polymerizace nám umožnilo kontrolovaně připravovat polymerní prekurzory obsahující jednu koncovou reaktivní skupinu a chráněné funkční skupiny, hydrazidové skupiny chráněné terc.-butoxykarbonylovou skupinou nebo přímo léčivo Dox navázané přes oligopeptidovou spojku GFLG. Molární hmotnost

polymerních prekurzorů (nejčastěji v rozmezí 20 000 – 40 000 g/mol) bylo možné řídit složením polymerizační směsi. Hvězdčité polymery byly posléze připraveny přímým roubováním polymerních prekurzorů na PAMAM dendrimery. Molární hmotnost hvězdčitých polymerů byla řízena velikostí (generací) PAMAM dendrimera, molární hmotností použitých roubov a počtem polymerních roubov připadajících na jednu centrální molekulu dendrimera. Při syntéze byly nejčastěji používány PAMAM dendrimery 2. – 4. generace s 16 - 64 koncovými amino skupinami, polymerní rouby o $M_w = 28\,000$ g/mol a poměr polymeru k dendrimera byl měněn od 6:1 do 40:1. Úspěšně byly připraveny hvězdčité polymery s M_w od 90 000 do 1 000 000 g/mol. Příprava hvězdčitých polymerů využívala reakci aktivovaných karboxylů (thiazolidin-2-thionový reaktivní amid) s primárními aminy PAMAM dendrimera. Hvězdčité polymerní prekurzory s polymery připojenými k dendrimera redukčně degradovatelnými disulfidovými vazbami byly připraveny z PAMAM dendrimera modifikovaného pyridyldisulfidovými skupinami, roubováním semitelechelickými polymery s koncovými thiolovými skupinami. Enzymaticky degradovatelný hvězdčitý polymer byl připraven z polymerního roubov, na jehož reaktivní konec byl navázán oligopeptid GFLG, jehož koncový karboxyl byl použit pro acylaci primárních amino skupin PAMAM dendrimera pomocí karbodiimidové metody. Všechny tři syntetické metody vedly k přípravě VM hvězdčitých polymerních konjugátů^[13] (Obr. 5). Na rozdíl od roubovaných polymerů popsaných výše nedocházelo u hvězdčitých polymerů k rozšiřování distribuce molárních hmotností a disperzita připravených polymerů byla v rozmezí 1,6 až 2,1. Pro studium využitelnosti těchto VM polymerů jako nosičů léčiv bylo vybráno modelové léčivo Dox s dvěma funkčními skupinami vhodnými pro připojení k polymeru kovalentní vazbou: primární aminoskupinou a karbonylovou skupinou. Karbonylová skupina umožnila navázat léčivo na polymerní nosič pH-senzitivní hydrazonovou vazbou, aminoskupina byla využita pro amidickou vazbu přes oligopeptidovou spojku GFLG štěpitelnou lysozomálními enzymy^[13] [N7, N8]. Léčivo připojené k polymernímu řetězci přes GFLG sekvenci bylo do polymerní struktury inkorporováno přímou kopolymerizací methakrylamidového monomeru obsahujícího léčivo s HPMA. Dox vázaný přes spojku obsahující hydrazonovou vazbu byl navázán na polymer až v posledním kroku syntézy po ochránění hydrazidových skupin polymerního prekurzoru trifluoroctovou kyselinou. Oba typy vazeb zajišťují stabilitu polymeru po dobu transportu v krevním řečišti, každá ale představuje jiný mechanismus a jiné místo řízeného uvolnění léčiva z nosiče. Amidická vazba je štěpitelná enzymaticky a umožní uvolnění léčiva z nosiče pouze působením enzymů přítomných v lysozomech cílových nádorových buněk. Hydrazonová vazba je štěpitelná hydrolyticky, a to jak v mírně kyselém prostředí nádoru (pH 6 - 6.5), tak po průniku konjugátu do buněk v endozomech, případně i lysozomech.

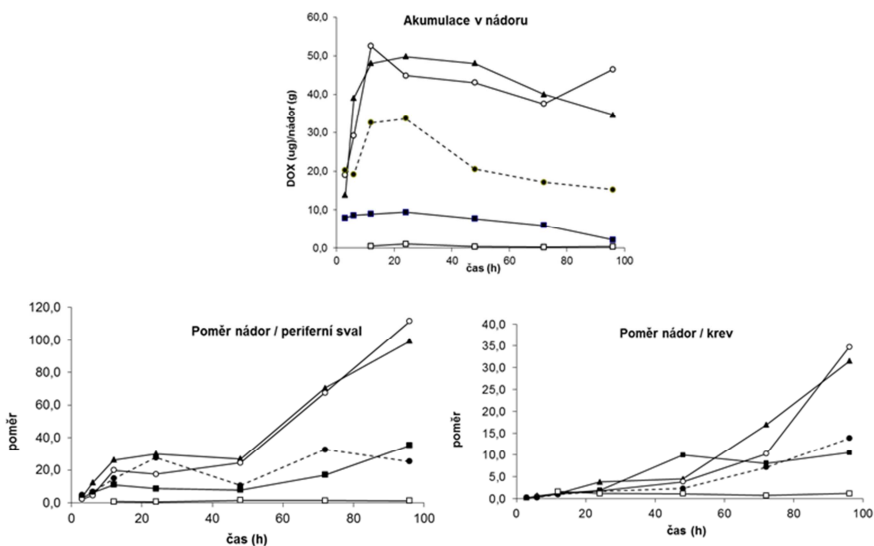


Obrázek 5. Schematické znázornění přípravy hvězdicovitých polymerních systémů.

Rychlost uvolňování Dox z hvězdicovitých konjugátů byla ověřena v pufrech modelujících prostředí krevního řečiště, prostředí v nádoru i uvnitř nádorových buněk. Bylo zjištěno, že rychlost uvolňování hydrazonově vázaného léčiva byla stejná jako u původního lineárního polymerního nosiče. Rychlost uvolňování Dox rostla s klesajícím pH prostředí. Léčivo navázané na hvězdicovitý polymer přes GFLG sekvenci se uvolňovalo v přítomnosti modelového lysozomálního enzymu katepsinu B pomaleji než v případě lineárních polymerů s menší molární hmotností. Tento rozdíl byl vysvětlen tak, že v případě pH-senzitivního systému se jedná o prostou hydrolyzu a aktivní molekulou je malá molekula vody, která může jednoduše procházet strukturou i VM polymerů. U systémů s mechanismem na bázi enzymatického štěpení je aktivní molekulou rozměrná molekula enzymu katepsinu B (M_w přibližně 30 000 g/mol), která ze sterických důvodů štěpí substráty ve VM polymerech s rozvětvenou strukturou pomaleji. Studium biodegradace výše popsaných hvězdicovitých VM polymerních konjugátů se zabudovanými reduktivně štěpitelnými disulfidovými a enzymaticky štěpitelnými vazbami ukázalo, že oba biodegradovatelné polymerní systémy jsou stabilní v prostředí modelujícím krevní řečiště. Při inkubaci v pufrech s cytoplazmatickou koncentrací glutathionu (3 mM) nebo s lysozomálním enzymem katepsinem B docházelo k jednoznačné degradaci těchto polymerních systémů. V obou případech se hvězdicovité polymery rozpadaly až na polymerní degradační produkty s molární hmotností pod limitem renální filtrace zjištěným pro daný typ pHPMA (okolo 50 000 g/mol). Bylo dokázáno, že reduktivní degradace je rychlejší než degradace enzymatická, a rozdíl byl vysvětlen sterickými důvody.

V návaznosti na výsledky fyzikálně-chemické charakterizace jsme přistoupili k hodnocení biologických vlastností studovaných hvězdicovitých polymerních konjugátů. Bylo prokázáno, že nově připravené hvězdicovité polymery vykazují významně prodlouženou cirkulaci v krevním řečišti a zvýšenou akumulaci v pevných nádorech. Pomocí chemické analýzy nádorů a neinvazivní techniky fluorescenčního zobrazování jsme zjistili, že VM polymery jsou v nádorové tkáni akumulovány cca 50krát více než volné léčivo a cca 5 – 10krát více než lineární polymer s molární hmotností pod limitem renální filtrace. Zároveň nebyla nalezena žádná významná akumulace v ostatních zdravých částech organismu, koncentrace léčiva nalezeného v nádoru ve srovnání s jeho koncentrací v krvi (tzv. poměr nádor/krev) nebo v periferním svalu (tzv. poměr nádor/periferní sval) výrazně narůstaly s časem po podání. V případě volného léčiva jsou oba poměry přibližně rovné jedné, což svědčí o neselektivní distribuci v těle a absenci jakéhokoliv směřování do nádorové tkáně. U hvězdicovitých polymerů jsme našli hodnoty až 35 pro poměr nádor/krev a až 100 pro poměr nádor/periferní sval (Obr. 6). Zásadní vliv na chování polymerních konjugátů v organismu měla jejich molární hmotnost, přičemž s narůstající molární hmotností rostla i akumulace v nádorové tkáni. Při porovnání akumulace

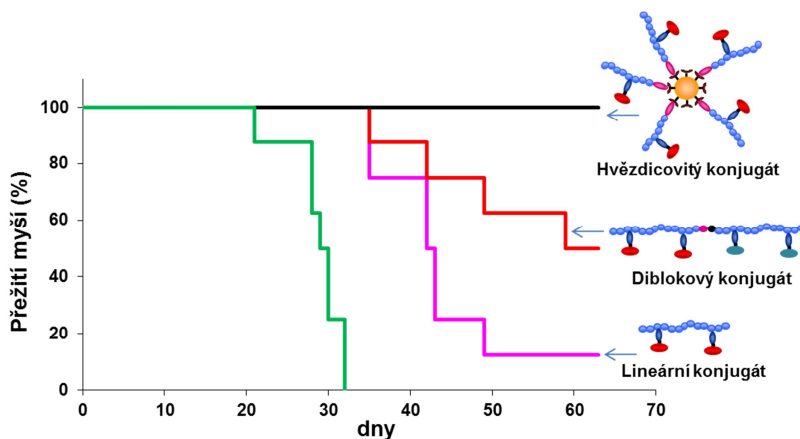
hvězdčovitých polymerních konjugátů s M_w v rozmezí 200 000 až 1 000 000 g/mol bylo zjištěno, že akumulace v nádorové tkáni narůstala se vzrůstající M_w až k polymeru s molární hmotností 600 000 g/mol. U polymerních konjugátů s vyšší M_w byla akumulace naopak snížena, což připisujeme snížené schopnosti extravazace těchto rozměrných polymerních konjugátů s hydrodynamickým průměrem okolo 80 nm [13, 14]. Na základě dosažených výsledků je možné konstatovat, že molární hmotnost, potažmo velikost, hraje klíčovou roli ve farmakokinetice hvězdčovitých polymerních systémů. Nejlepší výsledky z hlediska účinné akumulace v nádorové tkáni je možné získat při použití polymerů s M_w v rozmezí 200 000 – 600 000 g/mol, což odpovídá hydrodynamickému průměru 25 – 60 nm. Zmíněné výsledky byly jednoznačně potvrzeny také neinvazivní technikou fluorescenčního zobrazování [14].



Obrázek 6. Akumulace v nádoru, poměr akumulace v nádoru ku krvi a k perifernímu svalu u volného Dox, lineárního konjugátu s Dox a hvězdčovitých konjugátů s Dox o molární hmotnosti 200, 600 a 1000 kg/mol v myších s EL-4 T-buněčným lymfomem, i.v.; (□ —) Dox·HCl, (■ —) lineární konjugát s Dox, (▲ —) hvězdčovitý konjugát s Dox o molární hmotnosti 200 kg/mol, (○ —) hvězdčovitý konjugát s Dox o molární hmotnosti 600 kg/mol, (● - - -) hvězdčovitý konjugát s Dox o molární hmotnosti 1000 kg/mol.

Rovněž byl studován vliv stability hydrazonové vazby na dobu cirkulace fluorescenčního modelu léčiva a jeho akumulaci v nádorové tkáni. Jak doba cirkulace, tak nádorová akumulace vzrůstaly se stabilitou hydrazonové vazby mezi polymerním nosičem a modelem léčiva.

In vivo biologická účinnost hvězdicovitých konjugátů Dox byla studována na myších nesoucích několik typů myších nádorů. Jak u pevných nádorů (EL-4 T-buněčný lymfom a C3H B-buněčný lymfom), tak u myší BCL1 leukémie byl zjištěn významný nárůst účinnosti protinádorové terapie při použití VM léčiva vzhledem k účinnosti léčby volným léčivem nebo polymerními konjugáty s nižší molární hmotností, viz Obr. 7. Využití VM hvězdicovitých polymerních konjugátů umožnilo efektivní léčbu agresivních nádorových modelů v myších i s poměrně nízkými dávkami léčiv.



Obrázek 7. Protinádorová aktivita hvězdicovitého, diblokového a lineárního konjugátu s Dox vázaným hydrazonovou vazbou u myší s inokulovaným T-buněčným lymfomem EL-4. Léčba 8 den po inokulaci nádorů polymerními konjugáty při dávce 15 mg Dox ekv./kg. Kontrolní zvířata – zelená linka, léčba hvězdicovitým konjugátem – černá linka, léčba diblokovým konjugátem – červená linka, léčba lineárním konjugátem – fialová linka.

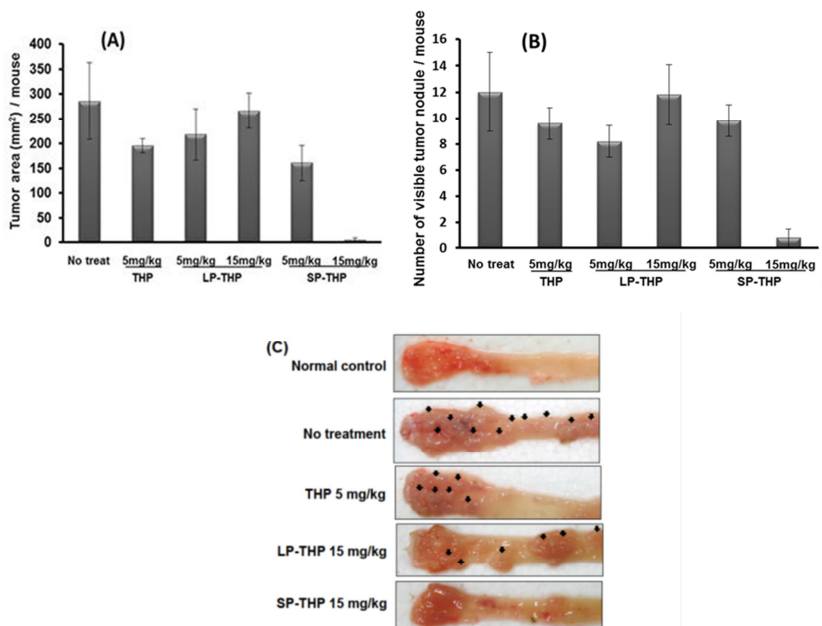
Kromě výše zmíněného byly hvězdicovité konjugáty, nesoucí kromě léčiva i fluorescenční značku, použity pro léčbu vysoce rezistentního nádoru 1411HP (karcinom zárodečných buněk), u kterého léčba volným léčivem nebo polymerním konjugátem s nižší molární hmotností nevedla k žádnému pozorovatelnému účinku. Fluorescenční zobrazování jednoznačně prokázalo významnou akumulaci hvězdicovitých polymerů v nádoru, která byla značně

vyšší než akumulace volného léčiva a polymerního konjugátu s molární hmotností pod limitem renální filtrace^[15]. Po podání dvou dávek se ovšem i léčba hvězdicovitým polymerním konjugátem jevila poměrně neúčinná. V rámci dalšího studia však bylo zjištěno, že po podání další dávky a překročení šestinásobku běžné dávky volného léčiva dochází k významnému terapeutickému účinku hvězdicovitého konjugátu nesoucího Dox vázaný pH-senzitivní hydrazonovou vazbou – u laboratorních zvířat došlo až ke kompletnímu vymizení nádorů. Při důkladném studiu nádorového mikroprostředí bylo zjištěno, že původní nádory nebyly hypoxické, což vedlo k poměrně nízké aktivitě polymerních konjugátů využívajících pokles pH jako spouštěcí mechanismus účinku nesených léčiv. Hypoxie, která je obecnou vlastností rychle rostoucích pevných nádorů, vyvolává právě snížení pH již v extracelulárním prostoru. V průběhu experimentu na 1411HP nádoru bylo zjištěno, že pokud je použit hvězdicovitý polymerní konjugát v dostatečné dávce, dojde spontánně v důsledku léčby k významnému nárůstu hypoxie nádoru, která dále akceleruje uvolnění léčiva z polymerního nosiče. Popsaný hvězdicovitý polymerní konjugát tedy svým účinkem změnil nádorové mikroprostředí tak, že významně potencovalo jeho vlastní účinnost. Výsledkem byla regrese nádoru, který je velmi rezistentní k chemoterapii. Zde je možné shrnout, že potenciál VM hvězdicovitých nosičů léčiv je v rámci léčby neoplastických onemocnění opravdu velmi vysoký.

3.3 Hvězdicovité polymerní konjugáty s dalšími léčivy

Velmi povzbudivé výsledky studia terapeutické účinnosti hvězdicovitých polymerních konjugátů Dox nás vedly k přípravě obdobných polymerních konjugátů i s jinými protinádorovými léčivy. Byly připraveny polymerní systémy s THP^[16], DTX a PTX^[17]. THP byl navázán k polymernímu nosiči obdobně jako Dox reakcí keto skupiny s hydrazidovými skupinami polymerního prekurzoru. DTX a PTX byly před navázáním na polymerní nosič derivatizovány na hydroxylové skupině v pozici 2 pomocí různých oxo kyselin a až poté navázány na polymerní nosič hydrazonovou vazbou. Detailně byl studován vliv struktury použité oxokyselinové spojky na stabilitu vzniklé hydrazonové vazby. Bylo zjištěno, že nevhodnější spojka je tvořena hydrazonem levulové kyseliny, která vykazovala dobrou stabilitu hydrazonové vazby v prostředí modelujícím krevní řečiště a naopak rychle uvolňovala léčivo po poklesu pH na hodnoty běžné v rámci pevných nádorů. U zmíněných polymerních konjugátů byl zjištěn významný nárůst protinádorové aktivity v porovnání s volným léčivem a jinými polymerními konjugáty s nižší molární hmotností. Vynikající výsledky při testování terapeutické účinnosti byly získány především v případě hvězdicovitého polymerního konjugátu s THP, a to jak u inokulovaných nádorů, tak u nádorů spontánně vyvolaných kancerogenem, viz Obr.8.

V obou případech jsme dokázali myši s nádory dokonce vyléčit (na rozdíl od volného léčiva a dříve studovaných proléčiv – lineárních, roubovaných a větvených), laboratorní zvířata přežila více než 60 dnů po ukončení experimentu bez viditelné známky znovuobjevení nádorů



Obrázek 8. Léčba chemicky indukovaného (karcinogen: azoxymetan) kolorektálního karcinomu u myši volným léčivem THP, lineárním konjugátem a hvězdicovitým konjugátem, dávka 5 nebo 15 mg THP ekv./kg. Celková plocha nádorových bulek po 4 týdnech od aplikace léčiv (A), počet nádorových bulek po 4 týdnech od aplikace léčiv (B) a vyoperované střevo s označením nádorových bulek šipkami (C). Adaptováno z [16].

3.4 Hvězdicovité polymery připravené s využitím RAFT polymerizace

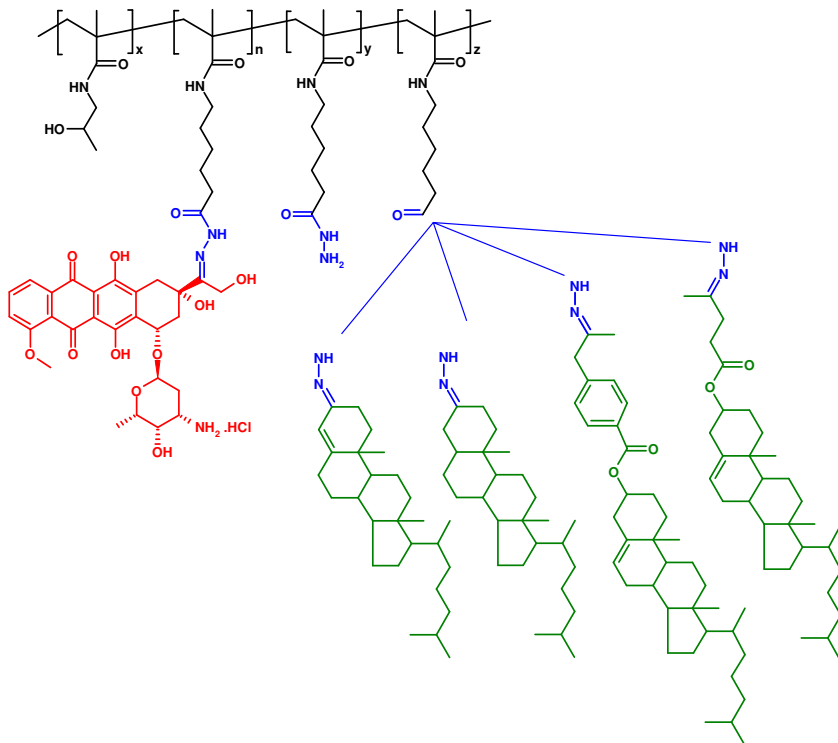
Hvězdicovité polymerní konjugáty popsané výše byly připravovány roubováním PAMAM dendrimerů semitelechelickými polymerními prekurzory připravenými klasickou radikálovou polymerizací. Tyto polymerní systémy

umožňují přípravu hvězdicovitých polymerů s mírně rozšířenou distribucí molárních hmotností. S cílem snížit disperzitu hvězdicovitých polymerů byly pro jejich syntézu vyvinuty a použity polymerní prekurzory připravené kontrolovanou RAFT polymerizací. Takové heterotelechelické prekurzory připravené RAFT polymerizací s iniciací funkcionalizovaným iniciátorem a přenosovým činidlem na bázi dithiobenzoátů byly použity pro přípravu hvězdicovitého polymeru o nízké disperzitě v rozmezí 1,2 – 1,3^[18] nesoucího kromě funkčních skupin rozmístěných podél řetězce i koncové reaktivní dithiobenzoátové skupiny převeditelné na jiné reaktivní funkční skupiny. Na tyto hvězdicovité prekurzory o nízké disperzitě bylo navázáno léčivo Dox přes spojku obsahující pH-senzitivní hydrazonovou vazbu. Bylo prokázáno, že rychlost uvolňování Dox byla shodná s rychlostmi pozorovanými při hydrolyzách hvězdicovitých konjugátů připravených z polymerů klasickou radikálovou polymerizací. Koncové dithiobenzoátové skupiny byly posléze využity pro navázání fluorescenční značky TAMRA 545 nm. Kromě toho mohou být tyto koncové reaktivní skupiny využity i pro vazbu molekul umožňujících aktivní směřování hvězdicovitých polymerních léčiv. Při zkoumání biologické účinnosti nebyl prozatím nalezen významnější vliv nižší disperzity hvězdicovitých konjugátů připravených z RAFT polymerních prekurzorů na jejich účinnost, nicméně definovanost takových systémů je přesnější.

3.5 Micelární systémy s cholesterylovými substituenty

Zvýšení hydrodynamického rozměru, a tedy i akumulace polymerních nosičů v pevných nádorech v důsledku EPR efektu je možné docílit nejenom vyšší molární hmotností použitých polymerních nosičů, ale také využitím samoasociačního mechanismu amfifilních polymerů (tvorby micelárních struktur) ve vodných roztocích. S cílem porovnat chování VM vodorozpustných polymerů a polymerních micel na bázi pHPMA byly studovány polymerní micely pHPMA obsahující vysoce hydrofobní molekuly cholesterolu. Po navázání cholesterolu na pHPMA docházelo v závislosti na obsahu cholesterolu k tvorbě micelárních struktur. Při vyšším obsahu cholesterolu byly vzniklé polymery ve vodě naprosto nerozpustné a micelární struktury nebylo možno vytvořit. Micely o velikosti R_h od 12 do 37 nm vznikaly při obsahu monomerních jednotek zakončených molekulami cholesterolu mezi 1,5 až 5 molárními procenty^[19] (Obr. 9). S pomocí rozptylových metod bylo prokázáno, že vytvořené micely mají podobu „perlového náhrdelníku“ - několik hydrofobních jader bylo spojeno do struktury, která byla obalena hydrofilními řetězci pHPMA. Pro tento typ micel byla v modelovém prostředí krevního řečiště stanovena kritická micelární koncentrace 44 $\mu\text{g/ml}$, která je dostatečně nízká, aby zajistila stabilitu cholesterolových micel v krevním řečišti po dobu transportu do nádorové tkáně a naopak umožnila

rozpad micel na jednotlivé polymerní řetězce po splnění funkce nosiče léčiva do nádorové tkáně.



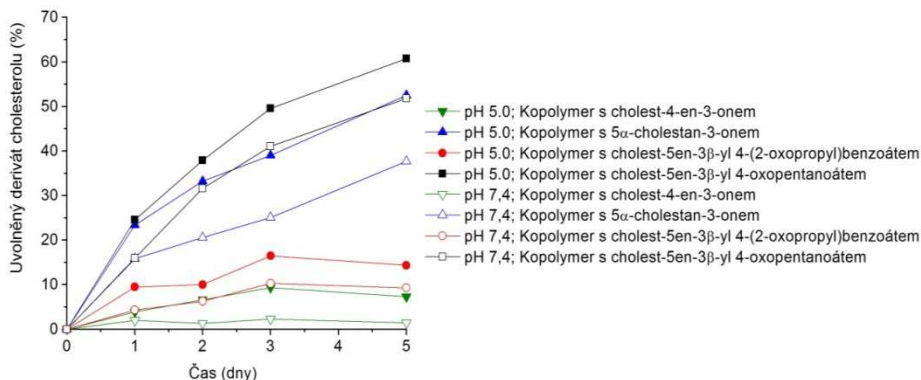
Obrázek 9. Schematická struktura polymerního konjugátu obsahujícího hydrofobní substituenty cholest-4-en-3-one, 5 α -cholestan-3-one, cholest-5en-3 β -yl 4-(2-oxopropyl)benzoát (Opb-Chol) a cholest-5en-3 β -yl 4-oxopentanoát (Lev-Chol), které tvoří ve vodných roztocích micelární struktury.

Micelární nosiče je možné využít pro dopravu léčiv vázaných buď fyzikálně (nekovalentně, v hydrofobní části micel), nebo kovalentně v části hydrofilní. V našem případě jsme se rozhodli pro druhou variantu. Byly připraveny polymerní micely obsahující léčivo Dox navázané v bočních řetězcích pHPMA. Na základě vynikajících výsledků s vodorozpustnými konjugáty popsanými výše bylo na cholesterolové polymerní micely navázáno léčivo přes

pH-senzitivní hydrazonovou vazbu. Během studia těchto systémů jsme zjistili, že rychlost uvolňování Dox nebyla ovlivněna tvorbou micelárních struktur a byla srovnatelná s rychlostmi zjištěnými u rozpustných polymerních systémů, a to jak s molární hmotností pod limitem renální filtrace, tak nad tímto limitem. Během biologických experimentů bylo zjištěno, že připravené micelární konjugáty mají výrazně prodlouženou dobu cirkulace v krevním řečišti a významně se akumulují v nádorové tkáni. Vzhledem k obdobným hydrodynamickým rozměrům micelárních konjugátů a hvězdicovitých konjugátů popsaných v minulém oddíle byla doba cirkulace v krevním řečišti i akumulace v pevných nádorech srovnatelná pro oba tyto systémy. Rovněž terapeutická aktivita připravených polymerních micel byla obdobná aktivitě zjištěné u hvězdicovitých polymerních konjugátů, tedy významně lepší než terapeutická aktivita volného léčiva nebo polymerních konjugátů s nižší molární hmotností. Oba typy VM polymerních konjugátů byly schopné značně prodloužit přežití léčených laboratorních zvířat a v mnoha případech docházelo k jejich úplnému vyléčení. Zvířata přežívala více než 60 dní po ukončení pokusu, aniž by se u nich objevila známka obnoveného nádorového onemocnění. Výsledky biologického testování prokázaly jednoznačně vysoký potenciál těchto micelárních systémů.

Popsané micelární systémy vykazovaly poměrně nízkou hodnotu CMC, k jejich rozpadu na unimery, které jsou již vyloučitelné z organismu renální filtrace, tedy může docházet až za poměrně dlouhou dobu po jejich nástřiku do organismu. Micely se v tomto případě rozpadají až po naředění na velmi nízkou koncentraci. Abychom mohli řídit rozpad micel a tím i rychlost vyloučení polymeru z organismu, zavedli jsme do struktury těchto amfifilních polymerů biodegradovatelné spojky umožňující degradaci systému po splnění jeho úlohy nosiče léčiva. Ve výše popsaném micelárním konjugátu byl cholesterol navázán k polymernímu řetězci přes esterovou vazbu, která byla velmi stabilní i ve fyziologickém prostředí, a docházelo tedy k uvolňování cholesterolu v řádu jednotek procent až za několik dní. Při přípravě hydrolyticky degradovatelných micelárních konjugátů jsme buď využili dostupné deriváty cholesterolu obsahující keto skupiny (cholest-4-en-3-on, 5- α -cholestanon), nebo jsme cholesterol derivovali vybranými oxokyselinami (Obr. 9). Všechny deriváty cholesterolu obsahující keto skupiny byly posléze navázány na polymerní prekurzory nesoucí hydrazidové skupiny a byla ověřena schopnost těchto konjugátů tvořit supramolekulární micelární struktury. Derivatizace cholesterolu neměla vliv na tvorbu micel a všechny deriváty byly použity pro přípravu odpovídajících micelárních konjugátů. Vzniklé micelární polymerní konjugáty se významně lišily stabilitou micel v pufru modelujícím fyziologické prostředí, jak je uvedeno na Obr. 10 ^[N9]. Změnou struktury polymerního konjugátu s cholesterolem bylo možné do jisté míry řídit stabilitu připravených micel ve vodných roztocích, přičemž nejméně stabilním byl systém s cholesterolem

modifikovaným kyselinou levulovou a nejstabilnějším byl systém s cholest-4-en-3-onem.



Obrázek 10. Rychlost uvolňování cholesterolu nebo jeho derivátů z polymerních micel.

3.6 Závěr kapitoly

V této kapitole byly popsány příprava a výsledky fyzikálně-chemického a biologického testování VM polymerních systémů na bázi pHPMA kopolymerů. Jednoznačně bylo potvrzeno, že kopolymery na bázi HPMA jsou vhodnými prekurzory pro přípravu VM polymerních systémů pro dopravu a řízené uvolňování léčiv. Bylo prokázáno, že hvězdicovité polymery a micely-tvořící polymery s cholesterolem nebo jeho deriváty mají vysoký potenciál jako systémy pro dopravu léčiv s prodlouženou dobou cirkulace a vysokou akumulací léčiva v pevných nádorech, která je významně vyšší než u volného léčiva a jiných polymerních systémů. Použití hvězdicovitých a micelárních polymerních konjugátů s pH-řízeným uvolňováním léčiva vykazuje velmi dobré výsledky při léčbě modelových nádorů *in vivo*. Úspěšně byly připraveny polymerní konjugáty celé řady léčiv, a to především protinádorových.

4. Aktivně směřované „prodrug“ polymerní systémy

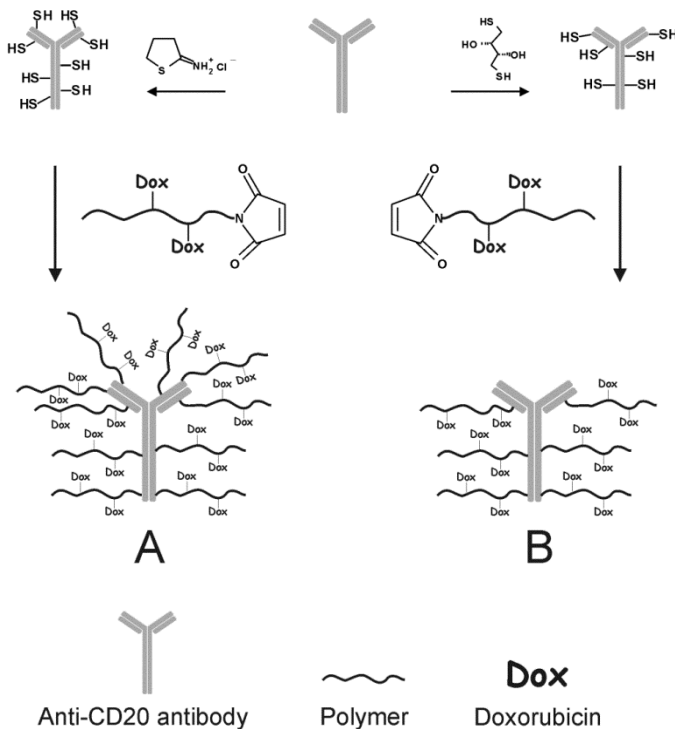
Při léčbě většiny onemocnění, zejména pak nádorových, je nutné dopravit aktivní léčivo do místa požadovaného terapeutického účinku, jímž může být celý orgán, nebo jen určitý typ buněk. Transport léčiva můžeme tedy rozdělit na orgánově specifický a buněčně specifický. Při buněčně specifickém transportu musí léčivo z krevního řečiště projít přes endoteliální membránu a při styku s buňkou (exprimující receptory pro danou buňku specifické) do ní může endocytózou vstoupit a začít terapeuticky působit. Při orgánově specifickém

transportu léčiv je cílem celý orgán a všechny buňky v něm. Předchozí kapitoly byly věnovány pHPMA polymerním proléčivům připraveným pro maximální akumulaci v pevných nádorech díky EPR efektu. Polymerní proléčiva však mohou být aktivně směřována do nádorové tkáně pomocí směřujících skupin, které jsou součástí proléčiva a jsou schopné rozpoznávat specifické receptory na membránách určitého typu buněk nádoru, obecně cílového orgánu/tkáně.

Jako vhodné směřující skupiny mohou být vybrány různé molekuly, jako například protilátky a jejich fragmenty, oligopeptidy odvozené od vazebných sekvencí různých proteinů v lidském těle, oligosacharidy, lektiny apod. V naší práci jsme se zaměřili především na molekuly protilátek, které mají obvykle vysokou specifitu při vazbě na membránové antigeny, a jejich použití při směřování polymerních proléčiv k cílovým buňkám by tedy mělo vést k velmi účinným specificky působícím systémům. V 80. a 90. letech minulého století byla na našem oddělení vyvinuta metoda přípravy polymerních konstruktů směřovaných molekulami protilátek IgG typu. V této metodě byla pro přípravu polymerních konjugátů směřovaných protilátkou využita reakce multivalentního polymerního prekurzoru, obsahujícího reaktivní Onp skupiny, s lyzinovými ϵ -amino skupinami molekuly protilátky. Úspěšně byly touto metodou připraveny směřované polymerní konjugáty s několika typy polyklonálních i monoklonálních protilátek. Velkou nevýhodou této syntézy byla tvorba větvených struktur o vysoké molární hmotnosti, značná disperzita a obtížná reprodukovatelnost polymerních systémů. Nevýhody tohoto systému jsme postupně překonali změnou strategie syntézy polymerního prekurzoru.

4.1 Protilátkou směřované hvězdicovité polymerní systémy

Při přípravě protilátkami směřovaných proléčiv s úzkou distribucí molárních hmotností jsme použili podobnou syntetickou metodu jako v případě hvězdicovitých konjugátů s dendrimery, proto i je lze nazvat hvězdicovité (viz schematické struktury na Obr. 11). Zde jsme ovšem semitelehelické kopolymery obsahující koncové reaktivní funkční skupiny (reaktivní estery nebo amidy) nechali reagovat s aminoskupinami protilátky^[N10]. Velkou výhodou nového syntetického přístupu oproti použití multivalentních polymerních prekurzorů byla příprava protilátkou směřovaných polymerních konjugátů s léčivem Dox s výrazně užší distribucí molárních hmotností, nedocházelo totiž k větvicím reakcím a příprava vzorků byla reprodukovatelná.



Obrázek 11. Schematické znázornění protilátkou směrovaných polymerních konjugátů připravených z protilátky modifikované 2-iminothiolanem (A) nebo z redukovaných protilátek (B). Ke konjugaci byla použita reakce adice SH skupiny na dvojnou vazbu maleimidové skupiny polymeru.

Protilátkou směrované hvězdicovité polymerní konjugáty byly nejdříve připraveny jako enzymaticky štěpitelné systémy, tedy jako konjugáty nesoucí léčivo navázané přes enzymaticky degradovatelné oligopeptidové spojky. Tyto polymerní konjugáty směrované anti-CD71/A, anti-CD71/B nebo anti-Thy-1.2 protilátkami vykázaly významně vyšší cytostatický i terapeutický účinek ve srovnání jak s nesměrovanými polymerními konjugáty, tak s konjugáty směrovanými shodnými protilátkami, ale připravenými starší metodou pomocí multivalentních polymerních prekurzorů^[N10]. V dalším výzkumu jsme se zaměřili především na hvězdicovité konjugáty s analogickou strukturou, avšak obsahující

léčiva navázaná přes pH-senzitivní hydrazonovou vazbu. Pro srovnání biologické aktivity byly připraveny tři různé, protilátkou (lidský imunoglobulin IgG) směřované polymerní konjugáty lišící se v metodě přípravy. Při jejich syntéze byl použit jak multivalentní polymerní prekurzor, tak semitelechelický prekurzor. Na straně protilátky byly při konjugaci využity buď lyzinové amino skupiny, nebo cukerné jednotky v Fc řetězci ^[20]. První dva typy polymerních konjugátů byly připraveny z protilátek modifikovaných 2-iminothiolanem, který na lyzinové amino skupiny zavedl thiolové skupiny schopné další reakce s polymerními prekurzory, multivalentními nebo semitelechelickými, nesoucími pyridyldisulfidové reaktivní skupiny. Jako v případě metody využívající reaktivních esterů, i zde vedla syntetická cesta se semitelechelickými polymerními prekurzory k lépe definovanému polymernímu systému s významně nižší disperzitou, než tomu bylo u konjugátu připraveného z multivalentního polymerního prekurzoru. Obecnou nevýhodou využití aminoskupin protilátek pro vazbu polymeru je nebezpečí ztráty vazebné aktivity protilátky na antigen. Koncové aminoskupiny peptidových řetězců Fab fragmentů tvořících vazebné místo protilátky jsou totiž reaktivnější než ostatní ϵ -aminoskupiny lysinových jednotek. Tento problém jsme vyřešili díky nové metodě vazby polymeru k protilátce využívající cukerných jednotek na jejím Fc řetězci. V prvním kroku byly tyto cukerné jednotky nacházející se mimo vazebné místo oxidovány jodistanem sodným a vzniklé aldehydové skupiny byly poté využity k reakci s polymerními prekurzory nesoucími hydrazidové skupiny. Vzniklé hydrazonové skupiny byly následně redukovány kyanoborohydridem, což vedlo ke stabilizaci vazby. Prokázali jsme, že způsob vazby polymeru k protilátce významně ovlivňuje vazebnou aktivitu směřovaných polymerních konjugátů. Nejvyšší vazebná aktivita byla zjištěna u systému připraveného z oxidovaných protilátek, nejnižší u polymerního konjugátu využívajícího aminoskupiny protilátky a multivalentní prekurzor. Významnou nevýhodou směřovaného konjugátu připraveného reakcí oxidovaných protilátek byla bohužel nízká substituce protilátek polymerními řetězci - pohybovala se jen okolo 5-6 polymerních řetězců vázaných na jednu molekulu protilátky.

Další výzkum byl zaměřen na syntézu a studium vlastností protilátkou směřovaných hvězdicovitých polymerních konjugátů obsahujících léčivo navázané přes hydrazonovou vazbu. Zdokonalili jsme syntézu a do struktury polymerních prekurzorů jsme včlenili maleinimidové (MI) skupiny selektivně reagující s thiolovými skupinami zavedenými do molekuly protilátek pomocí reakce s 2-iminothiolanem ^[21]. Výsledný směřovaný polymerní konjugát vykazoval poměrně dobré výsledky při léčbě syngenních myších nádorů. Bohužel i v tomto případě docházelo k významnému snížení vazebné aktivity, a to kvůli částečné modifikaci vazebného místa protilátek po reakci s 2-iminothiolanem a

následném naroubování polymerního řetězce. Z tohoto důvodu jsme se v dalším kroku zaměřili na jinou syntetickou cestu vycházející z redukovanych protilátek.

4.2 Polymerní systémy směrované redukovаныmi protilátkami

Mírnou redukcí disulfidických můstků v molekule protilátky pomocí dithiothreitolu bylo do molekuly protilátky zavedeno 10 – 14 thiolových skupin, které byly posléze použity pro reakci s maleinimidylovými skupinami polymerních prekurzorů. Po redukcí disulfidických můstků nedochází k porušení struktury protilátky, ta je i nadále udržována elektrostatickými interakcemi a vodíkovými můstky. Takto redukované protilátky byly následně použity pro přípravu směrovaných hvězdicovitých polymerních konjugátů, a to reakcí se semitelechelickými polymerními prekurzory nesoucími koncovou MI skupinu a léčivo navázané v bočních řetězcích polymeru přes pH-senzitivní hydrazonovou vazbu ^[22] ^[N11]. Prokázali jsme, že metoda využívající redukované protilátky vede k přípravě hvězdicovitých polymerních konjugátů, které mají poměrně úzkou distribuci molárních hmotností, dostatečné množství navázaných polymerních řetězců i léčiva a zachovanou vazebnou aktivitu k antigenu. Byly připraveny směrované polymerní konjugáty s anti-CD20 monoklonálními protilátkami a byla prokázána vysoká vazebná aktivita k buňkám exprimujícím CD20 receptor, u kterých popsane konjugáty vykázaly vysokou míru cytotoxicity, významně vyšší než jiné polymerní konjugáty ^[22]. S cílem studovat potenciální synergismus jak chemoterapeutického, tak biologického účinku anti-CD20 monoklonální protilátky rituximabu byly připraveny směrované polymerní konjugáty této protilátky, a to s využitím její redukcí před vazbou polymerního prekurzoru. V následných biologických experimentech bylo zjištěno, že si protilátka po redukcí a konjugaci zachovala svou vazebnou aktivitu a směrovaný polymerní konjugát vykazoval poměrně vysokou cytotoxickou aktivitu proti CD20 pozitivním buňkám ^[N11]. Bohužel při *in vivo* experimentech bylo prokázáno, že nedochází k synergismu biologického a chemoterapeutického účinku, což si vysvětlujeme tím, že po modifikaci polymerem se sníží vlastní schopnost protilátky spouštět pro-apoptotický mechanismus smrti nádorové buňky s CD20 receptorem. Modifikace thiolových skupin po redukcí protilátky vedla nejspíše ke sterickému bránění Fc řetězce protilátky, který je zodpovědný za zmíněný biologický mechanismus účinku rituximabu. Nicméně je možné konstatovat, že polymerní konjugát směrovaný rituximabem byl účinnější při léčbě vysoce rezistentních lidských lymfomů než samotný rituximab nebo volné léčivo.

4.3 Polymerní systémy směrované oligopeptidy

Kromě protilátkami směrovaných polymerních konjugátů jsme také studovali polymerní systémy směrované oligopeptidem GE7

(NPVVG YIGERPQYRDL), v literatuře popsaným jako směřující sekvence k receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), který je exprimován ve značné míře na epiteliálních nádorech, jako jsou nádory hlavy a krku, prsou, plic, střeva, prostaty, ledvin, vaječníku a močového měchýře. Úspěšně byly připraveny polymerní konjugáty s oligopeptidem GE7 a kontrolními oligopeptidy se zaměněným pořadím aminokyselin, tzv. scrambled peptides^[23]. Polymerní konjugát obsahující léčivo Dox navázané pomocí hydrazonové vazby a směřovaný oligopeptidem GE7 vykázal vysokou vazebnou aktivitu proti nádorovým buňkám exprimujícím EGFR, významně vyšší než nesměrovaný polymerní konjugát nebo polymerní konjugáty směřované „scrambled“ oligopeptidy. Rovněž cytotoxický účinek byl u aktivně směřovaného polymerního konjugátu s GE7 oligopeptidem vyšší než u ostatních polymerních konjugátů. Pokud ovšem porovnáme vazebnou aktivitu polymerních konjugátů směřovaných GE7 oligopeptidem s vazebnou aktivitou polymerních konjugátů směřovaných anti-EGFR monoklonální protilátkou, je třeba konstatovat, že systém směřovaný monoklonální protilátkou má o více než jeden řád vyšší vazebnou aktivitu k antigenu, což je způsobeno významně nižší vazebnou aktivitou krátkého oligopeptidu, než má celá molekula monoklonální protilátky.

4.4 Závěr kapitoly

Tato kapitola shrnuje výsledky získané při studiu syntézy, fyzikálně-chemických a biologických vlastností aktivně směřovaných polymerních systémů na bázi pHPMA. Byly studovány a vypracovány metody syntézy těchto polymerních systémů s cílem minimalizovat ztrátu vazebné aktivity směřující struktury k antigenu a zvýšit protinádorovou aktivitu směřovaných polymerních konjugátů. Bylo jednoznačně potvrzeno, že směřování pomocí monoklonálních protilátek zvyšuje cytotoxicitu konjugátů proti nádorovým liniím *in vitro* a zvyšuje protinádorovou aktivitu *in vivo* v porovnání s volným léčivem a nesměrovanými lineárními polymerními konjugáty. Při léčbě pevných nádorů bylo zjištěno, že směřované polymerní systémy vykazují obdobnou protinádorovou aktivitu jako hvězdčovitě polymerní konjugáty popsané v minulé kapitole: pasivní akumulace na bázi EPR efektu u směřovaných i nesměrovaných VM systémů převážila a efekt aktivního směřování nebyl signifikantní. Velmi povzbudivé výsledky byly naopak získány při léčbě BCL1 leukemie, kde aktivní směřování k cirkulujícím buňkám významně zvýšilo protinádorový efekt v porovnání s účinností léčby všemi ostatními polymerními systémy nebo volným léčivem. Protilátkami směřované polymerní konjugáty se jeví jako vynikající systém pro léčbu nesolidních neoplastických nádorů.

5. Polymerní systémy pro kombinovanou terapii

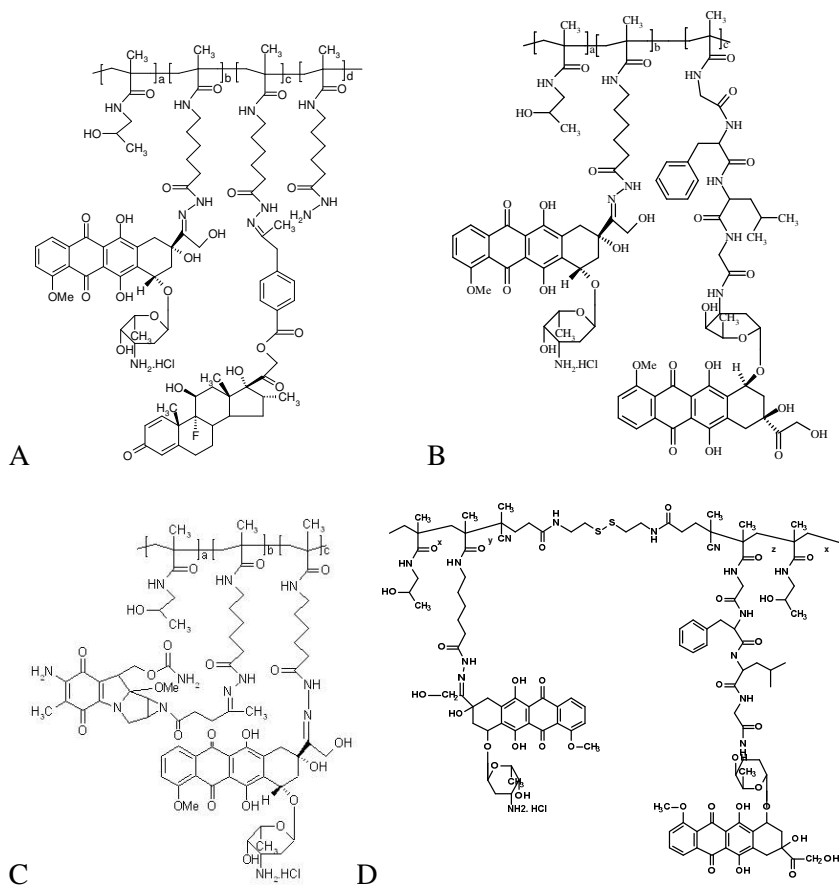
V klasické chemoterapeutické léčbě se využívají většinou směsi (tzv. „koktejly“) nízkomolekulárních léčiv, která synergicky působí při léčbě neoplastických onemocnění. Obdobně je možné využít i polymerní nosiče: buď je směs biologicky aktivních látek navázána na jeden polymerní nosič, nebo jsou kombinovány nosiče s jedním daným léčivem. Během studia polymerních systémů na bázi PHPMA jsme se zaměřili také na tuto oblast a zkoumali jsme detailně vhodnost použití polymerních nosičů pro kombinovanou terapii nádorových onemocnění.

5.1 Polymery s kombinací doxorubicinu a dexamethazonu

V první fázi jsme se věnovali studiu možnosti použití polymerních konjugátů pro léčbu hormon-dependentních nádorů, např. B-buněčných lymfomů, u kterých je známá synergie protinádorových a protizánětlivých léčiv. Pro naši studii byl vybrán Dox jako modelové kancerostatikum a Dex jako modelové protizánětlivé léčivo. Dex byl před vazbou na polymerní prekurzor derivatizován pomocí kyseliny levulové nebo 4-(2-oxopropyl)benzoové, jak již bylo popsáno v kapitole 2.1.3, s cílem zavést do struktury Dex reaktivní keto skupinu. Posléze byly připraveny polymerní konjugáty obsahující buď jedno z léčiv, nebo obě léčiva navázaná na jeden polymerní řetězec^[6], v obou případech byla použita pH-senzitivní hydrazonová vazba. Detailně byla studována stabilita připravených polymerních konjugátů v modelových pufrech imitujících prostředí krevního řečiště, extracelulární prostředí nádoru a intracelulární prostředí buněk. Zjistili jsme, že rychlost uvolňování Dex je silně závislá na pH roztoku a případném obsahu karboxyesteráz. Se snižujícím se pH se významně zvyšovala rychlost uvolňování léčiva a ta se ještě zvýšila v přítomnosti esteráz vyskytujících se mezi lysozomálními enzymy^[31]. Pro další studium byl vybrán Dex acylovaný kyselinou 4-(2-oxopropyl)benzoovou, u kterého byly stanoveny nejvýhodnější profily uvolňování při modelových podmínkách. Při studiu protinádorové aktivity *in vivo* prováděném na myších inokulovaných B-buněčným a T-buněčným lymfomem bylo zjištěno, že v případě T-buněčného lymfomu, který není hormon dependentním nádorem, přispívá k léčbě jen Dox a žádného synergického účinku nebylo dosaženo. Ovšem při léčbě B-buněčného lymfomu 38C13 byla zjištěna významně vyšší terapeutická aktivita polymerního konjugátu obsahujícího obě léčiva ve správném poměru^[24]. Léčba polymerním konjugátem obsahujícím Dox a derivatizovaný Dex dosahovala významně lepší terapeutické účinnosti ve srovnání s léčbou volnými léčivy, jejich kombinací nebo polymerními konjugáty obsahujícími jen jedno léčivo.

5.2 Polymery s kombinací doxorubicinu a mitomicinu C

Obdobně jsme se věnovali studiu terapie pomocí polymerních konjugátů kombinujících účinek dvou protinádorových léčiv Dox a derivátu mitomicinu C (Mit C). Mit C byl v prvním kroku derivatizován na své amino skupině na aziridinovém kruhu pomocí kyseliny levulové a do struktury Mit C byla zavedena keto skupina vhodná pro tvorbu hydrazonové vazby. Následně byly připraveny polymerní konjugáty obsahující buď jedno z léčiv, nebo obě léčiva vázaná na jednom polymerním řetězci. Jako nosiče léčiv byly v tomto případě použity lineární polymery o molární hmotnosti okolo 30 000 g/mol a biodegradovatelný diblokový kopolymer obsahující jako spojku mezi oběma bloky reduktivně štěpitelný disulfid^[25]. Prokázali jsme, že rychlost uvolňování obou léčiv z nosiče splňovala základní předpoklady pro kontrolované uvolňování léčiv v nádorové tkáni. Obě léčiva byla uvolňována velmi pomalu ve fosfátovém pufru o pH 7,4 při 37°C, což odpovídá pH krve. Uvolnění méně než 15 % léčiva během 24 h svědčilo o použitelnosti polymerních konjugátů pro transport krevním řečištěm. Při použití pufru o pH 5 imitujícím prostředí nádorových buněk bylo uvolněno během 4 h již více než 60 % obou léčiv. Zjistili jsme, že při *in vitro* podmínkách vykazují polymerní konjugáty s Dox a Mit C významný synergický efekt při léčbě EL-4 T-buněčného lymfomu. Synergický efekt byl posléze prokázán i v *in vivo* podmínkách při léčbě tohoto lymfomu. Nejvýznamnější nárůst terapeutické aktivity byl pozorován u diblokového polymerního konjugátu, kde došlo k synergickému působení obou léčiv v kombinaci s významným navýšením akumulace léčiv nádorové tkáni v důsledku zvýšené molární hmotnosti a EPR efektu^[33]. Obdobně jako v předchozím případě je možné konstatovat, že polymerní nosiče umožňují kombinovanou terapii a je možné dosáhnout významného navýšení protinádorové aktivity, a to v porovnání jak s volným léčivem, tak i s polymerními konjugáty nesoucími jen jedno z léčiv.



Obrazek 12. Schematické struktury polymerních systémů použitých pro kombinovanou terapii: polymerní konjugát obsahující kombinaci léčiv Dox a Dex (A), polymerní konjugát s léčivem Dox navázaným přes hydrazonovou vazbu a zároveň přes enzymaticky degradovatelný oligopeptid (B), polymerní konjugát obsahující kombinaci léčiv Dox a Mit C (C), diblokový polymerní konjugát s léčivem Dox navázaným přes hydrazonovou spojku v jedné části a přes enzymaticky degradovatelný oligopeptid v druhé části.

5.3 Polymery s kombinací duálně vázaného doxorubicinu

V další fázi jsme se zaměřili na studium polymerních konjugátů obsahujících jen jeden typ léčiva, Dox, vázaný dvěma různými způsoby na polymerní prekurzor a působící zánik nádorových buněk dvěma různými

mechanizmy. Při detailním biologickém hodnocení polymerních konjugátů s hydrazonově vázaným léčivem Dox a stejným léčivem vázaným přes oligopeptidovou spojku jsme zjistili, že oba polymerní konjugáty mají do značné míry odlišný mechanismus účinku. V případě hydrazonového konjugátu byl prokázán klasický účinek Dox po uvolnění z polymerního nosiče, tedy interkalace do DNA a spuštění apoptotické dráhy smrti nádorové buňky. Naopak u polymerního konjugátu s Dox navázaným přes oligopeptid GFLG byl prokázán dvojitý účinek založený především na interakci polymerního konjugátu s buněčnými membránami vedoucí k nekrotické smrti buněk, která byla kombinována s interkalací uvolněného Dox do DNA a tedy pro-apoptotickou dráhou smrti buněk. Při porovnání terapeutického účinku obou polymerních systémů vykazuje hydrazonový konjugát vždy vyšší efektivitu *in vivo*. Rozdíly v mechanismu účinku obou polymerních systémů nás vedly k přípravě polymerních konjugátů o různé struktuře kombinujících Dox navázaný přes hydrazonovou vazbu a přes biodegradovatelný oligopeptid ^[26]. Byly připraveny statistické kopolymery obsahující náhodně rozmístěné léčivo vázané oběma způsoby (viz Obr. 12) a lineární polymery obsahující léčivo navázané jen jedním typem vazby. Dále jsme z lineárních konjugátů připravili větvené polymerní konjugáty reakcí ketoskupiny Dox (amidicky vázaného na polymer přes oligopeptid) se zbývajících hydrazidovými skupinami na polymerním konjugátu obsahujícím hydrazonově vázané léčivo. Nakonec byl připraven polymerní diblok z lineárních konjugátů, přičemž každý blok obsahoval jinak vázaný Dox. Zjistili jsme, že způsob přípravy kombinovaných konjugátů nijak neovlivnil rychlost uvolňování Dox vázaného hydrazonovou vazbou. V případě Dox navázaného amidicky přes biodegradovatelný oligopeptid byla rychlost uvolňování léčiva snížena u větvených a diblokových konjugátů s vyšší molární hmotností, a to nejspíše ze sterických důvodů. Výsledky testování terapeutické účinnosti *in vivo* prokázaly významný nárůst protinádorové aktivity u prostých směsí lineárních konjugátů, diblokového a větveného konjugátu ^[26, 27] ^[N12]. V případě lineárního konjugátu s náhodně rozmístěným léčivem vázaným oběma způsoby byla terapeutická aktivita srovnatelná s obdobným konjugátem nesoucím jen hydrazonově vázané léčivo. V tomto případě konjugátu s náhodným rozložením léčiva došlo k porušení jednotné struktury polymerního proléčiva s Dox vázaným amidicky přes oligopeptid, což vedlo k nedostatečné interakci s buněčnou membránou nádorových buněk, a nebyla tedy spuštěna jejich nekrotická smrt. Všechny ostatní směsné konjugáty prokázaly významné synergické působení na nádorové buňky EL-4 T buněčného lymfomu. Nejvyšší protinádorový účinek byl pozorován u diblokového konjugátu, kde došlo kromě významného synergického působení Dox vázaného dvěma způsoby také k několikanásobnému navýšení akumulace léčiva v pevném nádoru v důsledku zvýšené molární hmotnosti diblokového konjugátu ^[26, 27]. V souhrnu je možné konstatovat, že polymerní konjugáty obsahující léčivo Dox vázané jak přes hydrazonovou vazbu, tak přes

biodegradovatelný oligopeptid jsou velmi slibnými kandidáty pro úspěšnou protinádorovou terapii.

5.4 Závěr kapitoly

V předposlední kapitole dizertace jsou uvedeny výsledky studia přípravy a fyzikálně-chemických a biologických vlastností polymerních systémů umožňujících kombinovanou terapii nádorových onemocnění. Byla studována a optimalizována syntéza tří polymerních systémů s cílem připravit polymerní konjugáty se synergickým mechanismem účinku na vybrané nádorové modely. Potvrdili jsme, že polymerní nosiče na bázi pHPMA jsou vhodnými kandidáty pro kombinovanou terapii a umožňují navázání dvou různých léčiv, případně jednoho léčiva dvěma různými způsoby. Prokázali jsme, že jak kombinace Dox a Dex, tak kombinace Dox a Mit C jsou po vazbě pH-senzitivní hydrazonovou vazbou na polymerní nosič vhodnými kandidáty pro léčbu hormon-dependentních B-buněčných lymfomů nebo T-buněčných lymfomů. Rovněž jsme prokázali významný synergický účinek polymerních konjugátů obsahujících léčivo Dox navázané dvěma různými způsoby lišícími se finálním účinkem léčiva na nádorové buňky. V souhrnu je možné konstatovat, že polymerní konjugáty na bázi pHPMA představují účinný systém pro kombinovanou léčbu solidních neoplastických nádorů.

6. Studium biodistribuce polymerních nosičů a léčiv

Mezi základní výhody polymerních proléčiv patří (kromě omezení vedlejších účinků léčiv a jejich nechtěné biotransformace) především příznivější biodistribuce a farmakokinetika dopravovaného léčiva. Z tohoto důvodu jsme se biodistribucí polymerních nosičů a dopravovaných léčiv věnovali velmi podrobně. V průběhu studia jsme využili především dvě základní metody, a to chemickou analýzu vzorků tkání a neinvazivní metodu fluorescenčního zobrazování.

6.1 Chemická analýza tkání

V první metodě, jejíž výsledky již byly částečně diskutovány v předchozích kapitolách práce, se jednalo o stanovení obsahu derivátu léčiva Dox v biologických vzorcích po hydrolýze v 1M HCl prováděné po dobu 1 h při 50 °C. Zmíněný derivát, aglykon Dox, byl posléze vytřepán do organického rozpouštědla a jeho obsah byl stanoven pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Tato metoda nám umožnila stanovení hladiny léčiva v krvi a v různých orgánech během poměrně dlouhého časového úseku. Výhodou této metody je, že polymerní konjugáty s Dox není nutné předem nijak modifikovat. Nevýhodou je potom omezený výběr léčiv, která lze stanovit dostatečnou citlivostí, tj. pomocí

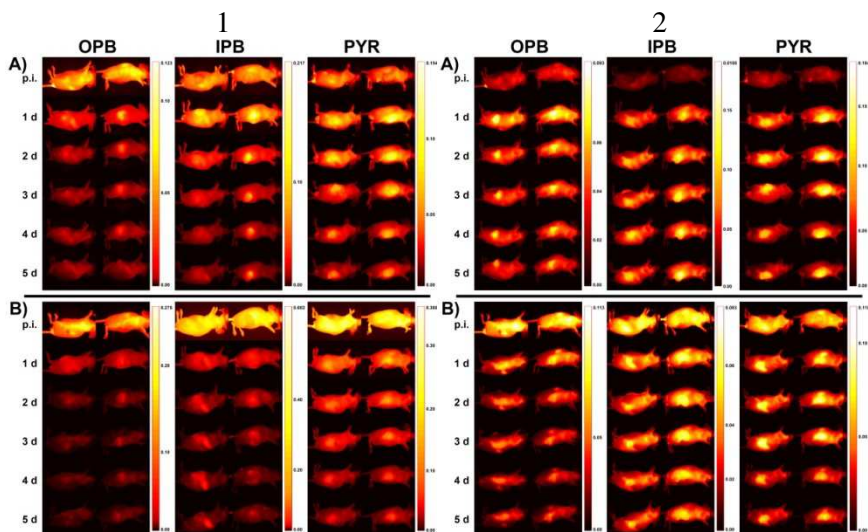
fluorescence. Např. konjugáty s DTX a PTX se nám takto analyzovat nepodařilo. Při svém studiu jsme se kromě stanovení farmakokinetiky jednotlivých typů polymerních nosičů Dox snažili sledovat také osud léčiva z hlediska jeho vylučování z organismu. Byly připraveny pHPMA polymerní konjugáty lišící se strukturou polymerního řetězce (lineární a hvězdovitá struktura, různé molární hmotnosti s hodnotami pod a nad limitem renální filtrace prezentovaným v literatuře, různé disperzity). V *in vivo* podmínkách byla u těchto polymerních konjugátů s Dox sledována především akumulace léčiva v nádoru, vylučování léčiva a polymerů v moči, doba cirkulace léčiva v krevním řečišti a detailní charakteristika vyloučených polymerů v moči pokusných zvířat ^[28].

Zjistili jsme, že akumulace léčiva v pevných nádorech vzrůstá se zvyšující se molární hmotností použitého polymerního nosiče, případně s rostoucím hydrodynamickým rozměrem klubka v roztoku, přičemž detailní struktura polymerního nosiče nehrála v míře akumulace významnou roli. Obdobný výsledek byl pozorován u doby cirkulace léčiva v krvi, mírně delší dobu cirkulovaly systémy hvězdovité v porovnání se systémy lineárními. Větší rozdíl byl ovšem pozorován při vylučování ledvinami. U všech polymerních systémů byly v jednotlivých časových intervalech v moči nalezeny polymery s poměrně úzkou distribucí molárních hmotností s disperzitou okolo 1,1, přičemž molární hmotnost vylučovaných polymerů vzrůstala s narůstajícím časem od podání léčiva do organismu. Zatímco u hvězdovitých polymerů byly v moči nalezeny polymery pouze do molární hmotnosti cca 50 000 g/mol odpovídající publikovaným výsledkům v literatuře, u lineárních polymerních systémů jsme v delších časových intervalech našli i polymery o molární hmotnosti okolo 70 000 g/mol. Je důležité zmínit, že se zvyšující se M_w významně klesalo množství polymeru vyloučeného močí za jednotku času ^[28]. Výsledek těchto experimentů nás vedl k hypotéze, že zatímco hvězdovité, relativně rigidní struktury polymerů mohou být vylučovány glomerulární filtrací v ledvinách jen na základě hydrodynamického rozměru, který přibližně odpovídá 50 000 g/mol pro pHPMA kopolymery, lineární polymery mohou být vylučovány jak na základě hydrodynamického rozměru svého klubka, tak také daleko pomalejším procesem, kdy lineární polymery o vyšší molární hmotnosti s větším hydrodynamickým rozměrem projdou glomerulární filtrací tzv. „worm-like“ pohybem, který není dostupný pro rigidnější hvězdovité struktury. Zmíněné výsledky jsme dále využili při návrhu struktury našich polymerních systémů.

6.2 Neinvazivní fluorescenční metoda

Kromě omezeného výběru léčiv je další nevýhodou předchozí metody i nemožnost sledování osudu polymerního nosiče v těle. Neinvazivní metody sledování biodistribuce polymerních systémů v živém organismu jsou velmi vhodným nástrojem pro pochopení vztahu mezi strukturou a chováním daného

polymerního systému v organismu. Z tohoto důvodu jsme společně s kolegy z Martin Luther University Halle-Wittenberg vyvinuli metodu neinvazivního fluorescenčního zobrazování založenou na dvojitě značených polymerních nosičích. Jedna fluorescenční značka byla navázána přímo na polymerní nosič vazbou, která není degradovatelná v živém organismu, druhá značka byla navázána přes biodegradovatelnou spojku, např. hydrazonovou vazbu. První značka sloužila ke sledování osudu polymerního nosiče a druhá simulovala léčivo, které by se mělo uvolnit v závislosti na změně prostředí. Obě fluorescenční značky byly vybrány tak, aby rozdíl v jejich absorpčních a emisních spektrech byl alespoň 100 nm. Vzhledem k autofluorescenci živých tkání a k záchytu fluorescence o nižších vlnových délkách byly použity fluorescenční značky Dyomics-676 a Dyomics-782, které mají emisi ve vzdálené červené nebo blízké infračervené oblasti spektra. V rámci této neinvazivní metody zobrazování bylo tedy možné jednoznačně odlišit signál fluorescenčního modelu léčiva od signálu značeného polymerního nosiče^[29].



Obrázek 13. Biodistribuce modelu polymerního léčiva (1) a polymerního nosiče (2) po aplikaci hvězdicovitého (A) a lineárního polymeru (B) se třemi různými spojkami obsahujícími hydrazonovou vazbu – OPB – spojka obsahující 4-(2-oxopropyl)benzoovou kyselinu, IPB – spojka obsahující 4-isopropyl-4-oxobutanovou kyselinu a PYR – spojka obsahující 4-oxo-4-(2-pyridyl)butanovou kyselinu.

Tato metoda nám umožnila sledovat a porovnat nejen biodistribuci jednotlivých typů polymerních nosičů, viz Obr. 13, ale také akumulaci modelu léčiva v nádorech, a to v závislosti na stabilitě hydrazonové vazby mezi polymerním nosičem a fluorescenční značkou simulující léčivo^[29, 30]. Výsledky těchto experimentů nám pomohly navrhnout struktury jednotlivých polymerních systémů z hlediska co nejvhodnější biodistribuce a schopnosti dopravit léčivo do cílového místa účinku - pevného nádoru.

Metoda dvojité značených polymerních nosičů léčiv byla posléze využita také pro prokázání funkčnosti dalších polymerních systémů založených na kontrolovaném uvolňování léčiva na základě redukce v cytoplazmatickém prostředí buněk, redukce pomocí glutathionu a thioredoxinu II nebo na základě enzymatického uvolnění lysozomálními enzymy v sekundárních lysozomech nádorových buněk^[30, 31]. Byly připraveny polymerní konjugáty označené jednou fluorescenční značkou přes nedegradovatelnou vazbu. Na polymer byla potom připojena druhá fluorescenční sonda, a to přes disulfidický můstek^[30] nebo přes oligopeptid GFLG^[31]. V obou případech bylo při *in vivo* experimentu prokázáno, že dochází k preferenční akumulaci nejen polymerního nosiče, ale i dopravovaného modelu léčiva. Na základě porovnání distribuce fluorescence bylo rovněž v obou případech prokázáno, že dochází ke specifickému štěpení obou zmíněných spojek a modelové léčivo je uvolněno v prostředí nádoru.

6.3 Závěr kapitoly

V poslední kapitole jsme popsali možnosti sledování biodistribuce polymerních nosičů i dopravovaných biologicky aktivních látek. Připravili jsme duálně fluorescenčně značené polymerních nosiče, díky nimž bylo možné sledovat neinvazivním způsobem pomocí fluorescenčního zobrazování nejen osud polymerního nosiče, ale i distribuci modelu léčiva a jeho uvolnění z nosiče v cílové tkáni. Sledování distribuce polymerních systémů je nepostradatelným nástrojem pro pochopení vlivu struktury polymerních nosičů léčiv na jejich biologickou funkci v organismu a je velmi důležité pro zpětnou vazbu při návrhu struktur nových a účinnějších polymerních „drug delivery“ systémů.

7. Závěr

V předložené dizertační práci jsou shrnuty výsledky systematického výzkumu zaměřeného na oblast polymerních systémů pro dopravu a řízené uvolňování biologicky aktivních látek v živém organismu („controlled drug release and delivery“) a využití těchto systémů při vývoji cíleně působících léčiv. Hlavní výsledky tohoto studia jsou shrnuty níže:

- Bylo potvrzeno, že vodorozpustné polymerní nosiče na bázi HEMA kopolymerů s pH-řízeným uvolňováním léčiva jsou vhodnými systémy pro dopravu a řízené uvolňování léčiv. Polymerní proléčiva připravená s využitím těchto nosičů vykazují velmi dobré výsledky při léčbě modelových nádorů *in vivo* u zvířecích modelů i u prvních lidských pacientů. Byla vypracována nová metoda syntézy polymerních prekurzorů umožňující přípravu velmi dobře definovaných polymerních léčiv.
- Potvrdili jsme, že HEMA kopolymery jsou vhodnými prekurzory pro přípravu vysokomolekulárních hvězdicovitých a micely-tvořících polymerních systémů, které vykazují vysoký potenciál pro dopravu a řízené uvolňování léčiv s prodlouženou dobou cirkulace a vysokou akumulací léčiva v pevných nádorech; oba tyto parametry jsou výrazně vyšší než u volného léčiva i lineárních polymerních konjugátů.
- Prokázali jsme, že směřování pomocí monoklonálních protilátek zvyšuje cytotoxicitu proti nádorovým liniím *in vitro* a protinádorovou aktivitu *in vivo* v porovnání s volným léčivem a nesměrovanými lineárními polymerními konjugáty. Velmi povzbudivé výsledky zjištěné při léčbě myši leukemie nás vedou k závěru, že protilátkami směřované polymerní konjugáty představují vynikající systém pro léčbu nesolidních neoplastických nádorů.
- Potvrdili jsme, že polymerní nosiče na bázi HEMA kopolymerů jsou vhodné pro přípravu systémů s kombinovanou terapií: umožňují navázání dvou různých léčiv, případně jednoho léčiva dvěma různými způsoby, s významným synergickým cytotoxickým účinkem navázaných léčiv na nádorové buňky.
- Studovali jsme biodistribuci polymerních konjugátů, abychom lépe poznali vliv struktury polymerních nosičů léčiv na jejich biologickou funkci v organismu. Vyvinuli jsme metodu spočívající v neinvazivním fluorescenčním zobrazování duálně značených polymerních konjugátů, která umožňuje sledovat nejen osud polymerního nosiče, ale i distribuci modelu léčiva a jeho uvolnění z nosiče v organismu.

Věříme, že výsledky prezentovaného systematického studia budou použity nejen vědeckou komunitou při dalším vědeckém studiu, ale i při preklinickém a klinickém vývoji cíleně působících léčiv v onkologické léčbě a jiných oborech medicíny.

8. Reference zahrnuté do dizertace

- [1] T. Etrych, M. Jelinkova, B. Rihova, K. Ulbrich, *J Control Release* **2001**, *73*, 89.
- [2] T. Etrych, P. Chytil, M. Jelinkova, B. Rihova, K. Ulbrich, *Macromol Biosci* **2002**, *2*, 43.
- [3] T. Etrych, T. Mrkvan, P. Chytil, C. Konak, B. Rihova, K. Ulbrich, *J Appl Polym Sci* **2008**, *109*, 3050.
- [4] K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelinkova, B. Rihova, *J Control Release* **2003**, *87*, 33.
- [5] T. Etrych, M. Sirova, L. Starovoytova, B. Rihova, K. Ulbrich, *Mol Pharmaceut* **2010**, *7*, 1015.
- [6] H. Krakovicova, T. Etrych, K. Ulbrich, *Eur J Pharm Sci* **2009**, *37*, 405.
- [7] H. Nakamura, T. Etrych, P. Chytil, M. Ohkubo, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda, *J Control Release* **2014**, *174*, 81.
- [8] H. Dozono, S. Yanazume, H. Nakamura, T. Etrych, P. Chytil, K. Ulbrich, J. Fang, T. Arimura, T. Douchi, H. Kobayashi, M. Ikoma, H. Maeda, *Target Oncol* **2016**, *11*, 101.
- [9] P. Chytil, T. Etrych, J. Kriz, V. Subr, K. Ulbrich, *Eur J Pharm Sci* **2010**, *41*, 473.
- [10] T. Mrkvan, M. Sirova, T. Etrych, P. Chytil, J. Strohalm, D. Plocova, K. Ulbrich, B. Rihova, *J Control Release* **2005**, *110*, 119.
- [11] T. Etrych, P. Chytil, T. Mrkvan, M. Sirova, B. Rihova, K. Ulbrich, *J Control Release* **2008**, *132*, 184.
- [12] T. Etrych, L. Kovar, V. Subr, A. Braunova, M. Pechar, P. Chytil, B. Rihova, K. Ulbrich, *J Bioact Compat Pol* **2010**, *25*, 5.
- [13] T. Etrych, L. Kovar, J. Strohalm, P. Chytil, B. Rihova, K. Ulbrich, *J Control Release* **2011**, *154*, 241.
- [14] P. Chytil, S. Hoffmann, L. Schindler, L. Kostka, K. Ulbrich, H. Caysa, T. Mueller, K. Mader, T. Etrych, *J Control Release* **2013**, *172*, 504.
- [15] A. K. Heinrich, H. Lucas, L. Schindler, P. Chytil, T. Etrych, K. Mader, T. Mueller, *Mol Cancer Ther* **2016**, *15*, 998.
- [16] H. Nakamura, E. Koziolova, T. Etrych, P. Chytil, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda, *Eur J Pharm Biopharm* **2015**, *90*, 90.
- [17] T. Etrych, J. Strohalm, M. Sirova, B. Tomalova, P. Rossmann, B. Rihova, K. Ulbrich, M. Kovar, *Polym Chem-Uk* **2015**, *6*, 160.
- [18] P. Chytil, E. Koziolova, O. Janouskova, L. Kostka, K. Ulbrich, T. Etrych, *Macromol Biosci* **2015**, *15*, 839.
- [19] P. Chytil, T. Etrych, K. Ulbrich, *J Control Release* **2008**, *132*, E62.

- [20] K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Pechar, M. Jelinkova, B. Rihova, *Int J Pharm* **2004**, 277, 63.
- [21] T. Etrych, T. Mrkvan, B. Rihova, K. Ulbrich, *J Control Release* **2007**, 122, 31.
- [22] T. Etrych, J. Strohalm, L. Kovar, M. Kabesova, B. Rihova, K. Ulbrich, *J Control Release* **2009**, 140, 18.
- [23] M. Studenovsky, R. Pola, M. Pechar, T. Etrych, K. Ulbrich, L. Kovar, M. Kabesova, B. Rihova, *Macromol Biosci* **2012**, 12, 1714.
- [24] H. Kostkova, T. Etrych, B. Rihova, K. Ulbrich, *J Bioact Compat Pol* **2011**, 26, 270.
- [25] H. Kostkova, T. Etrych, B. Rihova, L. Kostka, L. Starovoytova, M. Kovar, K. Ulbrich, *Macromol Biosci* **2013**, 13, 1648.
- [26] B. Rihova, T. Etrych, M. Sirova, L. Kovar, O. Hovorka, M. Kovar, A. Benda, K. Ulbrich, *Mol Pharmaceut* **2010**, 7, 1027.
- [27] T. Etrych, V. Subr, R. Laga, B. Rihova, K. Ulbrich, *Eur J Pharm Sci* **2014**, 58, 1.
- [28] T. Etrych, V. Subr, J. Strohalm, M. Sirova, B. Rihova, K. Ulbrich, *J Control Release* **2012**, 164, 346.
- [29] S. Hoffmann, L. Vystreilova, K. Ulbrich, T. Etrych, H. Caysa, T. Mueller, K. Mader, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 652.
- [30] M. Studenovsky, A. K. Heinrich, H. Lucas, T. Mueller, K. Mader, T. Etrych, *J Bioact Compat Pol* **2016**, 31, 348.
- [31] A.-K. H. R. Pola, T. Mueller, L. Kostka, K. Mader, M. Pechar, T. Etrych, *Macromol Biosci* **2016**.

Prohlášení o autorství prezentovaných vědeckých výsledků:

Ve většině prezentovaných výsledků je příspěvek autora dizertace zásadní, přispěl zásadním dílem k designu polymerních konstruktů, jejich syntéze a fyzikálně-chemické charakterizaci, a to tím, že prováděl samotné experimenty nebo vedl studenty magisterského a doktorského studia. Z prací zahrnutých do dizertační práce je u 12 prací autorem prvním a u 11 prací autorem korespondenčním. Vzhledem k vysokému podílu mezioborového výzkumu je nutné zdůraznit, že autor dizertace se vždy podílel na části chemické a fyzikálně-chemické, biologická část prací byla prováděna kolegy z jiných pracovišť po důkladné diskuzi s autorem dizertace.

9. Reference nezahrnuté do dizertace:

- [N1] K. Ulbrich, T. Etrych, B. Říhová, M. Jelínková, M. Kovář, pH senzitivní polymerní konjugáty antracyklinového kancerostatika pro cílenou terapii (pH-Sensitive Polymeric Conjugates of an Anthracycline Cancerostatic Drug for Targeted Therapy), Patent CZ 293 787 B6 (2004), EP1463529B (2009-Europa), EA007353B (2009-EuroAsia), US 7,919,076 B2 (2011-US)
- [N2] M. Šírová, T. Mrkvan, T. Etrych, P. Rossmann, P. Chytil, K. Ulbrich, B. Říhová, Polymer prodrugs based on HPMA conjugates with pH-controlled activation of doxorubicin: II. In vivo efficacy, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 200.
- [N3] T. Etrych, K. Ulbrich, M. Šírová, B. Říhová, Polymerní konjugáty paclitaxelu a docetaxelu s pH řízeným uvolňováním kancerostatika, Patent CZ 303072 B6 (2009)
- [N4] L. Quan, Y. Zhang, B. Crieleard, A. Dusad, S. Lele, C. Rijcken, B. Metselaar, H. Kostková, T. Etrych, K. Ulbrich, W. Hennink, G. Storm, T. Lammers, D. Wang, Nanomedicine for inflammatory arthritis: Head-to-head comparison of glucocorticoid-containing polymers, micelles and liposomes, *ACS Nano* **2014**, *8*, 458.
- [N5] P. Chytil, M. Šírová, E. Koziolová, K. Ulbrich, B. Říhová, T. Etrych, The comparison of in vivo properties of water-soluble HPMA-based polymer conjugates with doxorubicin prepared by controlled RAFT or free radical polymerization, *Physiol. Res.* **2015**, *64* (Suppl. 1), 41.
- [N6] T. Etrych, P. Chytil, K. Ulbrich, T. Mrkvan, B. Říhová, Polymerní léčivo a způsob jeho výroby (Grafted Macromolecular conjugates of doxorubicin with anticancer activity and method of their preparation), Patent CZ 298 945 B6 (2008)
- [N7] T. Etrych, J. Strohal, P. Chytil, P. Černoch, L. Starovoytova, M. Pechar, K. Ulbrich, Biodegradable star HPMA polymer conjugates of doxorubicin for passive tumor targeting, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, *42*, 527.
- [N8] T. Etrych, P. Chytil, J. Strohal, K. Ulbrich, B. Říhová, Dendritické vysokomolekulární polymerní nosiče léčiv a jejich konjugáty s léčivy pro léčbu zejména pevných nádorů, Patent CZ 302830 B6 (2011)
- [N9] P. Chytil, T. Etrych, K. Ulbrich, Hydrolytically Degradable Polymer Micelles for Anticancer Drug Delivery to Solid, *Macromolecular chemistry and physics* **2012**, *213*, 858.
- [N10] M. Jelínková, J. Strohal, T. Etrych, K. Ulbrich, B. Říhová, Starlike vs. Classic Macromolecular Prodrugs: Two Different Antibody Targeted HPMA Copolymers of Doxorubicin Studied in Vitro and in Vivo as Potential Anticancer Drugs, *Pharm. Res.* **2003**, *20* 1558.

- [N11] O. Lidický, O. Janoušková, J. Strohalm, M. Alam, P. Klener, T. Etrych*, Anti-Lymphoma Efficacy Comparison of Anti-CD20 Monoclonal Antibody-Targeted and Non-Targeted Star-Shaped Polymer-Prodrug Conjugates, *Molecules* **2015**, *20*, 19849.
- [N12] T. Etrych, K. Ulbrich, O. Hovorka, B. Říhová, Polymerní přípravek se synergickým účinkem při léčbě nádorových onemocnění, Patent CZ 301 288 B6 (2009),

10. Scientometrická data pro T. Etrycha

Ke dni 17.1.2017

Počet publikací: 108

Počet citací: 2859

Počet citací bez autocitací: 2322

Průměrná citovanost publikací: 26,5

H-index: 32

ResearcherID: G-3420-2014