

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Kateřina Běhalová

**Biokompatibilní polymerní nanomateriály s nesteroidními léčivý
v protizánětlivé terapii**

Biocompatible polymer nanomaterials with non-steroid drugs tailored
for anti-inflammation therapy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Tomáš Etrych, DSc.
Konzultantka: Mgr. Marcela Filipová, PhD.

Praha 2021

Prohlášení:

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

V Praze,

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Tomáši Etrychovi, DSc. za možnost zpracovat svou bakalářskou práci na oddělení Biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR, v. v. i. a za vedení této práce. Můj největší dík patří RNDr. Markétě Bláhové za vedení, rady, vstřícný přístup, velkou ochotu a dohled nad celým projektem. Také jí tímto děkuji za změření NMR spekter. Dále děkuji své konzultantce Mgr. Marcele Filipové, PhD. za dohled nad biologickým experimentem a náměty na zlepšení práce. Děkuji RNDr. Petru Chytilovi, PhD. za konzultace k práci. Celému oddělení děkuji za příjemné a přátelské pracovní prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat Biofyzikálnímu ústavu AV ČR, v. v. i. v Brně za změření cytotoxicity sloučenin syntetizovaných v rámci této práce.

V neposlední řadě velmi děkuji své rodině a přátelům za podporu a trpělivost během celého studia.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce byla syntéza, fyzikálně-chemická a předběžná biologická charakterizace vodorozpustného biokompatibilního polymerního systému pro cílenou dopravu acetylsalicylové kyseliny do zánětem postižené tkáně. Tyto systémy by v budoucnosti mohly být využity pro terapeutické využití v rámci léčby chronických zánětlivých onemocnění. V rámci projektu bylo připraveno několik vhodných derivátů acetylsalicylové kyseliny a polymerní nosič na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidového kopolymeru. V posledním kroku bylo provedeno připojení derivátu acetylsalicylové kyseliny na kopolymer za vzniku pH senzitivní hydrazonové vazby umožňující řízené uvolnění navázaného léčiva v cílové oblasti. Součástí práce je SEC, NMR a HPLC charakterizace syntetizovaných látek, ověření jejich stability v roztocích o různém pH a výsledky uvolňování nízkomolekulárních derivátů z polymerního nosiče, a to jak při fyziologickém pH, tak mírně kyselém pH, modelující prostředí zánětu. Dále bylo v rámci této práce pomocí laktátdehydrogenasové eseje prokázáno, že syntetizované deriváty acetylsalicylové kyseliny nevykazují akutní toxicitu na úrovni nekrotického působení. Rovněž byla potvrzena jejich inhibiční aktivita vůči cyklooxygenase 1. Polymerní konjugát acetylsalicylové kyseliny či jejího derivátu by mohl poskytnout výhody oproti podání nízkomolekulárního léčiva, a to především zvýšenou rozpustnost léčiva, stabilitu během transportu v krvi, snížení vedlejších účinků a cílené působení v místě zánětu. Mezi další benefity acetylsalicylové kyseliny patří zejména schopnost indukce syntézy resolvinů (protizánětlivých mediátorů). Tato vlastnost acetylsalicylové kyseliny by mohla být předmětem dalšího výzkumu v rámci pokračujícího studia připravených polymerních nanoterapeutik.

Klíčová slova:

Protizánětlivá terapie, nanomateriál, nesteroidní léčivo, polymer, cílená doprava.

Abstract

The main aim of this bachelor thesis was synthesis and physico-chemical and preliminary biological characterization of water-soluble biocompatible polymeric system for targeted delivery of acetylsalicylic acid to inflamed tissue. Such polymer conjugates should be employed in the future for the therapeutic use within the treatment of chronic inflammatory diseases. The project included the preparation of a series of suitable acetylsalicylic acid derivatives and the synthesis of a polymeric carrier based on *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer. Finally, the acetylsalicylic acid derivative was attached to the polymer forming a polymeric conjugate with pH-sensitive bond between the drug derivative and polymer chain, thus allowing controlled release of the drug in the target site. The work includes SEC, NMR and HPLC characterization of all synthesized compounds, verification of their stability in solutions with different pH and results of the release of drug derivatives from the polymeric carrier at physiological pH, or mildly acidic pH modeling inflamed environment. Moreover, the cytotoxicity bioassay of acetylsalicylic acid derivatives using LDH assay did not prove any cytotoxicity at the level of necrotic activity. Also, their cyclooxygenase 1 inhibitory activity was observed and discussed. The polymeric conjugate of acetylsalicylic acid or its derivative could provide advantages over the administration of its parent drug such as increased drug solubility, stability during transport in the blood and reduction of side effects. Other benefits of acetylsalicylic acid include in particular the ability to induce the synthesis of resolvins (anti-inflammatory mediators). This feature of acetylsalicylic acid could be the subject of further research on the developed polymer nanotherapeutics.

Keywords:

Anti-inflammatory therapy, nanomaterial, non-steroid drug, polymer, controlled delivery.

[IN CZECH]

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	9
1. ÚVOD	13
2. POLYMERNÍ NOSIČE LÉČIV	14
2.1 POLYMERNÍ NOSIČE V MEDICÍNĚ	14
2.1.1 <i>Struktura a molární hmotnost nosičů</i>	15
2.1.2 <i>HPMA kopolymery</i>	16
2.1.3 <i>Řízená radikálová polymerizace</i>	17
2.2 PRINCIPY SMĚROVÁNÍ POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ	17
2.2.1 <i>Pasivní směrování</i>	17
2.2.2 <i>Aktivní směrování</i>	18
2.3 POLYMERNÍ SYSTÉMY S PH SENZITIVNÍ AKTIVACÍ LÉČIVA	18
2.3.1 <i>Změna pH v závislosti na lokalizaci v organismu</i>	19
2.3.2 <i>pH senzitivní spojky</i>	19
3. CHRONICKÁ ZÁNĚTLIVÁ ONEMOCNĚNÍ	20
3.1 AKUTNÍ A CHRONICKÝ ZÁNĚT	20
3.2 DRÁHA NUKLEÁRNÍHO FAKTORU K β	21
3.3 REVMATOIDNÍ ARTRITIDA	22
3.3.1 <i>Biochemie revmatoidní artritidy</i>	22
4. CYKLOOXYGENASY A NESTEROIDNÍ ANTOFLOGISTIKA	22
4.1 NESTEROIDNÍ ANTOFLOGISTIKA A FUNKCE CYKLOOXYGENAS	22
4.2 VÝZNAMNÁ NESTEROIDNÍ ANTOFLOGISTIKA	23
4.2.1 <i>Indukce syntézy resolvinů</i>	24
4.3 STRUKTURA CYKLOOXYGENAS	24
4.4 METABOLISMUS ARACHIDONOVÉ KYSELINY	25
4.5 PROSTAGLANDINY A JEJICH FYZIOLOGICKÁ ROLE SOUVISEJÍCÍ S NEŽÁDOUCÍMI ÚČINKY NESTEROIDNÍCH ANTOFLOGISTIK	26
5. CÍLE PRÁCE	27
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
6.1 MATERIÁL	28
6.1.1 <i>Chemikálie</i>	28
6.1.2 <i>Přístrojové vybavení</i>	30
6.2 METODY	31
6.2.1 <i>Metody charakterizace vzorků</i>	31
6.2.1.1 <i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie</i>	31

6.2.1.2	Nukleární magnetická rezonance	31
6.2.1.3	Chromatografie na tenké vrstvě	31
6.2.1.4	Dělení nízkomolekulárních látek pomocí FLASH chromatografického systému	32
6.2.1.5	Rozměrově vylučovací chromatografie	32
6.2.1.6	Stanovení hydrazidových skupin polymerního nosiče s využitím UV-Vis spektrometrie	32
6.2.1.7	Čištění polymerních konjugátů	33
6.2.2	<i>Syntéza</i>	33
6.2.2.1	Příprava polymerního nosiče	33
6.2.2.2	Příprava hydrazidu acetylsalicylové kyseliny	34
6.2.2.3	Příprava hydrazidu acetylsalicylové kyseliny reakcí s <i>terc</i> -butyl karbazátem	35
6.2.2.4	Příprava (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoátu	36
6.2.2.5	Příprava (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátu	37
6.2.2.6	Příprava [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátu	37
6.2.2.7	Syntéza polymerních konjugátů	38
	Příprava polymerního konjugátu s (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoátem	39
	Příprava polymerního konjugátu s (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátem	39
	Příprava polymerního konjugátu s [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátem	40
6.2.3	<i>Stanovení stability derivátů acetylsalicylové kyseliny v prostředí o pH 7,4 a 5</i>	41
6.2.4	<i>Uvolňování derivátů acetylsalicylové kyseliny z polymerního nosiče</i>	42
6.2.4.1	Uvolňování (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátu z polymerního nosiče	42
6.2.4.2	Uvolňování [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátu z polymerního nosiče	42
6.2.5	<i>Biologické testování</i>	42
6.2.5.1	Stanovení inhibiční aktivity derivátů acetylsalicylové kyseliny cyklooxygenázy 1	42
6.2.5.2	Testování cytotoxicity derivátů acetylsalicylové kyseliny pomocí laktátdehydrogenasové eseje	43
6.2.5.3	Statistické vyhodnocení	43
7.	VÝSLEDKY	45
7.1	SYNTÉZA A CHARAKTERIZACE POLYMERNÍHO NOSIČE	45
7.2	SYNTÉZA A CHARAKTERIZACE DERIVÁTŮ ACETYLSALICYLOVÉ KYSELINY	45
7.2.1	<i>Syntéza a charakterizace hydrazidu acetylsalicylové kyseliny</i>	45
7.2.2	<i>Syntéza a charakterizace hydrazidu acetylsalicylové kyseliny reakcí ASA s <i>terc</i>-butyl karbazátem</i>	45
7.2.3	<i>Syntéza a charakterizace (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoátu</i>	46
7.2.4	<i>Syntéza a charakterizace oxoderivátu (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátu</i>	46
7.2.5	<i>Syntéza a charakterizace [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátu</i>	46
7.3	SYNTÉZA A CHARAKTERIZACE POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ	46
7.4	STANOVENÍ STABILITY DERIVÁTŮ ACETYLSALICYLOVÉ KYSELINY V PROSTŘEDÍ O PH 7,4 A PH 5,0	47
7.5	UVOLŇOVÁNÍ DERIVÁTŮ ACETYLSALICYLOVÉ KYSELINY Z POLYMERNÍHO NOSIČE	47
7.5.1	<i>Uvolňování nízkomolekulárního derivátu acetylsalicylové kyseliny z polymerního konjugátu s (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátem</i>	47

7.5.2	<i>Uvolňování nízkomolekulárního derivátu acetylsalicylové kyseliny z polymerního konjugátu s 4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátem</i>	48
7.6	BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ	49
7.6.1	<i>Biologické testování aktivity derivátů acetylsalicylové kyseliny při inhibici cyklooxygenasy 1</i>	49
7.6.2	<i>Testování toxicity derivátů acetylsalicylové kyseliny pomocí laktátdehydrogenasového testu</i>	51
8.	DISKUZE	52
8.1	SYNTÉZA DERIVÁTŮ ACETYLSALICYLOVÉ KYSELINY	52
8.1	POLYMERNÍ NOSIČ A POLYMERNÍ KONJUGÁTY	53
8.1.1	<i>Syntéza polymerního nosiče</i>	53
8.1.2	<i>Syntéza polymerních konjugátů</i>	54
8.2	STABILITA HYDRAZONOVÉ VAZBY A OXODERIVÁTŮ ACETYLSALICYLOVÉ KYSELINY	55
8.2.1	<i>Stabilita oxoderivátů acetylsalicylové kyseliny</i>	55
8.2.2	<i>Stabilita hydrazonové vazby</i>	56
8.3	BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ	58
9.	ZÁVĚR	60
	POUŽITÁ LITERATURA	62

Seznam použitých zkratk a symbolů

zkratka	význam
% v/v	Objemová procenta
A	Absorbance
AIBN	2,2'-asobis(2-methylpropionitril)
ANOVA	Jednorozměrná analýza rozptylu (z angl. analysis of variance)
ASA	Kyselina acetylsalicylová
c	Molární koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
CID	Chronická zánětlivá onemocnění (z angl. Chronic Inflammatory Diseases)
cm	Hmotnostní koncentrace [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
COX vazebné místo	Vazebné místo pro cyklooxygenasovou aktivitu
COX-1	Cyklooxygenasa 1
COX-2	Cyklooxygenasa 2
CTA	S-2-kyano-2-propyl S'-ethyl trithiokarbonát
d	Optická dráha kyvety [cm]
Đ	Disperzita
DAMP	Dammage Associated Molecular Pattern
DCM	Dichlormethan
ddH ₂ O	Deonizovaná, destilovaná voda
DIC	Isopropylkarbodiimid
DMA	<i>N,N'</i> -dimethylacetamid
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMARDs	Chorobu modifikující léky (z angl. Disease Modifying AntiRheumatic Drugs)
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (z angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> 6	Deuterované DMSO
EDC·HCl	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid hydrochlorid
ekv.	Ekvivalent

zkratka	význam
ELVIS	Extravasation through Leaky Vasculature and Subsequent Inflammatory cell-mediated Sequestation
EPR	Efekt zvýšeného průchodu a zadržování (z angl. Enhanced Permeability and Retention)
FAB	(4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoát
FBS	Fetální bovinní sérum
GCs	Glukokortikoidy (z angl. Glucocortikoids)
GIT	Gastrointestinální trakt
hm. %	Hmotnostní procenta
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography)
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
LDH	Laktátdehydrogenasa
LPS	Lipopolysacharid
M	Molární hmotnost [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
m	Hmotnost [g]
m	Multiplet (ve výpisu NMR)
Ma-Ahx-NHNH-Boc	<i>N</i> ¹ -(<i>terc</i> -butoxykarbonyl)- <i>N</i> ² -(6-(methakrylamido)hexanoyl) hydrazin
MeOH	Methanol
mol. %	Molární procenta
MRI	Magnetická rezonance (z angl. Magnetic Resonance Imaging)
M_w	Hmotnostně průměrná molární hmotnost
M_n	Početně průměrná molární hmotnost
ND	Nestanoveno (z angl. Not Determined)
NF- κ B	Nukleární faktor κ B (z angl. Nuclear Factor κ B)
NK buňky	Žírné buňky (z angl. Natural Killer cells)
NMR	Nukleární magnetická rezonance (z angl. Nuclear Magnetic Resonance)
NSAIDs	Nesteroidní antiflogistika (z angl. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)

zkratka	význam
OAB	(3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoát
OFAB	[4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoát
PAMP	Patogen Associated Molecular Pattern
PEG	Polyethylenglykol
P-FAB	Polymerní konjugát s (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátem
PGD ₂	Prostaglandin G ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostacyklin
pHPMA	Polymerní nosiče na bázi <i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamidu
P-OAB	Polymerní konjugát s (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoátem
P-OFAB	Polymerní konjugát s [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátem
POX vazebné místo	Vazebné místo pro peroxidasovou aktivitu
PTFE	Polyethylenteraftalát
RAFT	Řízená radikálová polymerizace (z angl. Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer)
RPM	Otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
s	singlet
SA	Kyselina salicylová
SEC	Rozměrově vylučovací chromatografie (z angl. size exclusion chromatography)
SEM	Střední chyba průměru (z angl. standard error of the mean)
t	triplet
TFA	Kyselina trifluoroctová
THF	Tetrahydrofuran
TLR	Toll-like receptor
TNBSA	Kyselina trinitrobenzensulfonová
TNF α	Faktor nádorové nekrózy α (z angl. Tumor Necrosis Factor α)

zkratka	význam
TXA ₂	Thromboxan A ₂
V-70	2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril)
ϵ	Molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
λ	Vlnová délka [nm]
δ	Chemický posun [ppm]

1. ÚVOD

Chronické záněty a nádorová onemocnění dnes postihují velkou část populace. Celosvětově až 3 z 5 postižených na některé z těchto onemocnění umírá, jedná se tak o obecně nejvýznamnější příčinu úmrtí. Počet pacientů trpících chronickými zánětlivými onemocněními neustále roste a existuje předpoklad, že i v následujících třiceti letech neustále poroste (studie ve Spojených státech [1]).

Mezi nejčastěji se vyskytující onemocnění patří revmatoidní artritida a další kloubní onemocnění, osteoartritida, kardiovaskulární poruchy, poruchy trávicího traktu – zejména Crohnova nemoc či plicní onemocnění jako chronická obstrukční plicní nemoc. Na mnohé existuje medikace schopná potlačit příznaky a usnadnit pacientovi život, neřeší však obvykle příčinu. I poměrně jednoduchá a dlouho známá a využívaná léčiva z kategorie nesteroidních antiflogistik, jako například kyselina acetylsalicylová (ASA – z angl. acetylsalicylic acid), mají potenciál ve vysokých dávkách (ASA konkrétně 2-3 g/24 hodin [2]) působit protizánětlivě. Vysoké dávky takovýchto léčiv však velmi často provází nepříjemné a život ztěžující až ohrožující vedlejší účinky. Je proto snaha o nalezení způsobu, jak takováto léčiva dopravit na místo jejich účinku (tedy do zánětem postižené tkáně) a maximálně při tom vedlejší účinky eliminovat. Slibné řešení tohoto problému přináší výzkum biokompatibilních polymerních nosičů.

2. POLYMERNÍ NOSIČE LÉČIV

2.1 Polymerní nosiče v medicíně

Éra, kdy se využití syntetických polymerů v medicíně soustřeďovalo především na oblast biomateriálů pro tkáňové náhrady nebo při povrchových aplikacích, jako například kloubní a orgánové implantáty či ochranné vrstvy s povrchovou modifikací, je již několik desetiletí pasé. Výzkum ve vodě rozpustných polymerních systémů pro cílenou dopravu léčiv začal již na přelomu šedesátých a sedmdesátých let minulého století a prošel již značným rozvojem pro své slibné vyhlídky aplikovatelnosti na poli medicíny [3]. Jak bylo zmíněno již v úvodu této práce, využití klasických nízkomolekulárních léčiv často naráží na problémy s vedlejšími účinky těchto léčiv. Nabízí se proto podání léčiva v jeho neaktivní formě, tedy ve formě „proléčiva“. Pro transport léčiva v této formě je potřeba nalézt vhodný nosič, který způsobí, že léčivo zůstává v průběhu transportu neaktivní, dopraví léčivo do postiženého místa, kde je léčivo uvolněno a stává se opět biologicky aktivní. Elegantním řešením je vazba léčiva na syntetický biokompatibilní polymerní nosič o definované molární hmotnosti. Právě molární hmotnost vybraného polymerního nosiče a také jeho struktura jsou jedny z rozhodujících prvků v regulaci doby cirkulace polymerního konjugátu s navázaným léčivem (dále jen konjugátu) v organismu. Více se této problematice věnuje kapitola 2.1.1.

Kromě výše zmíněných výhod plynoucích z aplikace syntetického nosiče má toto použití i další benefity. Jedním z nejvýznamnějších je možnost pasivního či aktivního směřování konjugátu do cílového místa. Pasivní směřování do pevných nádorů je popsáno tzv. EPR efektem (Enhanced Permeability and Retention effect), efektem zvýšeného průchodu a zadržování. Tento fenomén je zodpovědný za hromadění polymerního konjugátu v nádorové tkáni, v tkáni zánětlivé je obdobný jev popsán jako efekt ELVIS (Extravasation through Leaky Vasculature and Subsequent Inflammatory cell-mediated Sequestration), více se o těchto efektech zmiňuje v kapitola 2.2.1

Polymerní nosiče nejsou studovány jen jako transportéry léčiv, ale mohou sloužit i jako transportní jednotky pro fluorescenční značky, chelátory radionuklidů nebo kovů pro MRI (Magnetic Resonance Imaging). Polymerní nosiče s fluorescenční značkou jsou například studovány jako sondy pro navigovanou endoskopickou chirurgii pevných nádorů. První model ideálního polymerního konjugátu s léčivem byl prezentován H. Ringsdorfem v roce 1975 [4] a sestával z polymerní páteře jakožto nosiče léčiv, biodegradovatelné spojky, kterou bylo léčivo navázáno a prvku zodpovědného za směřování, konjugát však všechny zmíněné prvky obsahovat nemusí [5].

Vazbou léčiva na polymer lze modulovat fyzikální i chemické vlastnosti léčiva, což mnohdy přináší výhody využitelné při potenciálním medicínském využití. Například ve vodě nerozpustná léčiva se po vazbě na vodorozpustný polymer stávají rozpustnými a je možné je významně jednodušeji dávkovat do organismu. Použití polymerního konjugátu léčiva může

významně změnit farmakokinetiku léčiva, snížit tak jeho akumulaci ve zdravých tkáních, a tedy zabránit nežádoucímu vstřebávání léčiva v jiném než cílovém terapeutickém místě a eliminovat tak nežádoucí účinky. Napojení léčiva na polymerní nosič často stabilizuje léčivo před rychlou degradací, např. působením enzymů [6].

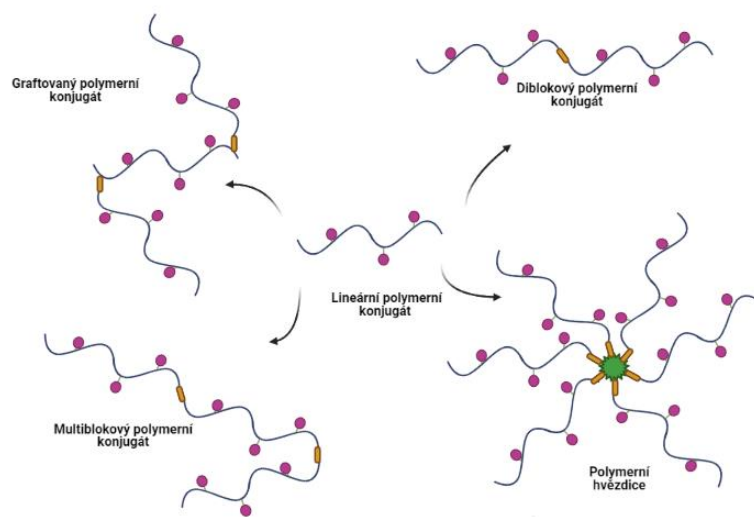
Mezi nadějně polymery studované jako potenciální nosiče léčiv patří polymery odvozené od *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA), jež jsou použity pro účely této práce a je jim věnována kapitola 2.1.2. V klinické praxi je jako polymerní nosič již běžně používán polyethylenglykol (PEG). Používá se především pro dopravu biologicky aktivních látek (enzymů, cytokinů a dalších) a stejně jako polymerní nosiče na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (pHPMA) se vyznačuje EPR efektem. Na rozdíl od pHPMA však má tu nevýhodu, že obsahuje pouze jednu nebo dvě funkční skupiny pro navázání aktivních látek a v poslední době existuje podezření na jeho imunogenicitu doprovázenou tvorbou protilátek proti PEG [5].

2.1.1 Struktura a molární hmotnost nosičů

Struktura a molární hmotnost vodorozpustného polymerního nosiče mají významný vliv na biologické chování výsledného konjugátu a jeho biodistribuci. Se zvyšující se molekulovou hmotností polymeru se prodlužuje jeho doba cirkulace v krevním řečišti a snižuje se rychlost jeho eliminace renální filtrací. V souladu s prodlouženou cirkulací v organismu dochází také k zvyšování pravděpodobnosti záchytu polymeru v cílové tkáni.

Polymerní nosič se ideálně volí tak, aby všechny jeho komponenty měly molární hmotnost pod prahem renální filtrace a byly tedy bezpečně vylučitelné ledvinami bez nežádoucí akumulace v těle. Zároveň je ale nevhodné volit polymerní nosič o příliš nízké molekulové hmotnosti, který by byl eliminován z organismu příliš rychle, a nebyl by tak plně využit potenciál polymerního léčiva. Volbou vhodné molární hmotnosti nosiče je tedy možné prodloužit dobu cirkulace léčiva v krevním oběhu a zvýšit jeho biologickou dostupnost.

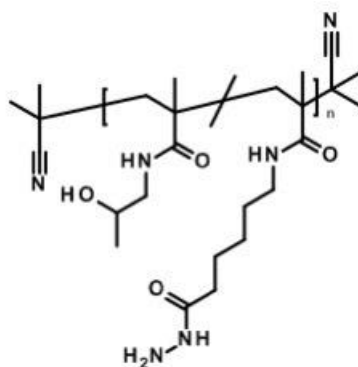
Výhodné je také použití degradovatelných systémů s molekulovou hmotností nad prahem renální filtrace, které zajišťují prodlouženou dobu cirkulace a po vykonání své transportní funkce jsou v těle enzymaticky či hydrolyticky štěpeny na menší fragmenty vylučitelné z organismu. V nedávné době byly popsány syntézy složitých vysokomolekulárních nebo nadmolekulárních struktur sestávajících z lineárních polymerů o molárních hmotnostech pod renálním limitem spojených buď biodegradovatelnými spojkami, nebo samoskladem amfifilních kopolymerů [7]. Mezi tyto systémy na bázi polymerů patří zejména struktury zobrazené na *Obr. 1*, str. 16, diblokové a multiblokové systémy [8], polymerní hvězdičky či micely [9, 10].



Obr. 1: Struktura polymerních nosičů.

2.1.2 HPMA kopolymerý

Kopolymerý na bázi HPMA byly vyvinuty v Československu v 70. letech 20. století a pro své unikátní vlastnosti jako je vynikající vodorozpustnost, biokompatibilita či neimunogenicitá, byly vybrány jako potenciálně vhodné nosiče léčiv [11]. HPMA kopolymerý se ukázaly být netoxické, apyrogenní, nevyvolávaly tvorbu protilátek v myších a nebyl prokázán žádný účinek na aktivaci komplementu u prasat [3].



Obr. 2: Struktura pHPMA s hydrazidovými skupinami.

Byla připravena řada HPMA kopolymerů, které umožňují navázání různého množství a typů funkčních skupin a spojek podél polymerního řetězce, připravených na míru podle struktury biologicky aktivních látek a způsobu uvolnění v léčené tkáni. V naší skupině se nejvíce používají HPMA kopolymerý s hydrazidovými a thiazolin-2-thionovými funkčními skupinami (Obr. 2, str. 16) [10,11].

Konjugáty pHPMA s léčivem lze rozčlenit do několika kategorií na základě různých kritérií. Podle charakteru polymerní páteře se nabízí rozdělení na konjugáty tvořené nedegradovatelným lineárním polymerem s degradovatelnou spojkou pouze mezi léčivem a polymerem a na

konjugáty s biodegradovatelnou polymerní páteří. Roli degradovatelné spojky mezi dvěma nebo více lineárními polymerními řetězci může plnit např. oligopeptid GFLGKGLFG. Takto spojené polymerní řetězce se mohou vyznačovat různou architekturou, a tvořit tak struktury jako dibloky, multibloky, hvězdice či micely, zmíněné již v kapitole 2.1.1 [3, 14]. Další dělení je možné na základě štěpitelnosti spojek, které bývají nejčastěji enzymaticky štěpitelné (např. aminokyselinová sekvence GFLG či pH senzitivní (např. hydrazonová vazba).

2.1.3 Řízená radikálová polymerizace

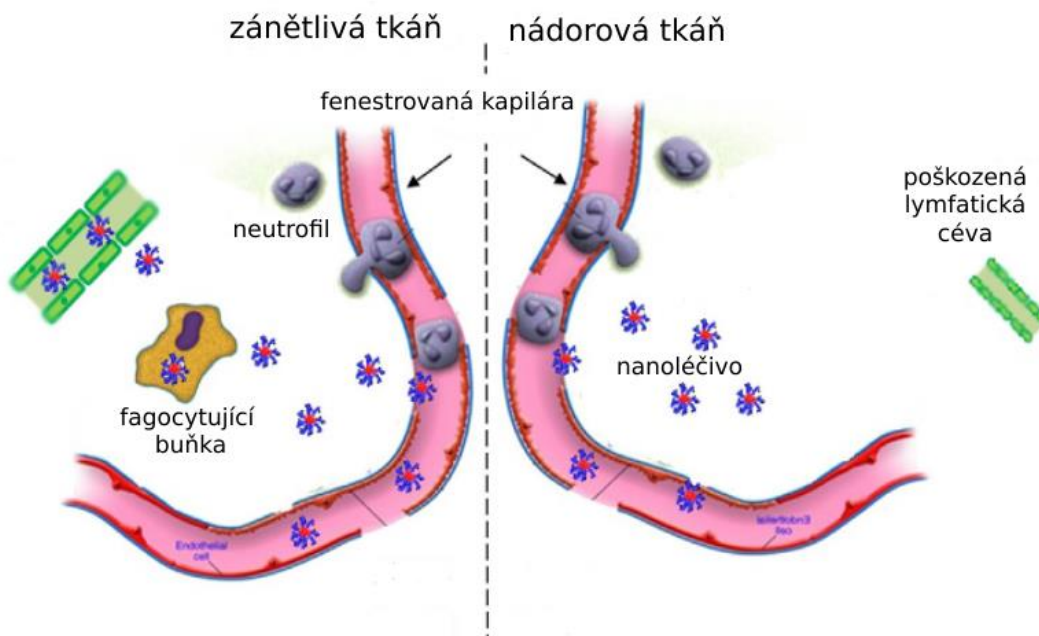
Polymerní biomateriál, který by měl být potenciálně využitelný v medicíně, by měl splnit několik základních podmínek, mezi něž patří také úzká distribuce jeho molárních hmotností, tzv. disperzita. Při syntéze biokompatibilního polymerního nosiče je důležité, aby se hodnoty jeho disperzity co možná nejvíce blížily hodnotě 1, tak, jako je tomu u těla vlastních biopolymerů, např. proteinů. Zmíněného požadavku lze dosáhnout mechanismem kontrolované RAFT polymerizace (z angl. Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer). Pro správný průběh této polymerizace jsou nezbytná přenosová činidla (CTA – chain transfer agent) na bázi dithiobenzoátů nebo trithiokarbonátů [15, 16].

2.2 Principy směřování polymerních konjugátů

2.2.1 Pasivní směřování

Při aplikaci léčiva vázaného na polymerním nosiči dochází v případě pevných nádorů a zánětlivých ložisek k pasivní akumulaci a zadržování tohoto nosiče v takto postižené tkáni. V případě pevných nádorů je tato akumulace způsobena EPR efektem. Podstatou tohoto efektu jsou fyziologické a anatomické rozdíly nádorové a zdravé tkáně. Nádorová, rychle rostoucí tkáň se vyznačuje nedokonale vytvořeným, fenestrovaným cévním endotelem, který umožňuje průchod větších molekul z krve do nádorové tkáně. Tyto vlastnosti nádorové tkáně jsou výhodné pro její rychlejší růst a zvýšený přístup živin do nádoru, zároveň ovšem umožňují průnik makromolekulárních látek a jejich následnou akumulaci v nádoru. V důsledku EPR efektu tedy dochází k pasivnímu hromadění polymerního konjugátu v nádorové tkáni, kde se může léčivo následně uvolnit. Nádorová tkáň má navíc poškozené lymfatické cévy, které brání v odstranění zadrženého léčiva [17].

Jako analogie EPR efektu v zánětlivé tkáni byl popsán efekt ELVIS. Efekt v první fázi připomíná efekt EPR, dojde ke zvýšenému průniku léčiva v důsledku poškozených endoteliálních buněk synoviální vaskulatury. Následně je makromolekulární proléčivo vychytáváno a zadržováno aktivovanými synoviocyty a transportováno do lysozomálních kompartmentů, kde může dojít k uvolnění léčiva z konjugátu a tím k jeho aktivaci [18]. Zmíněné efekty porovnává *Obr. 3*, str.18.



Obr. 3: Schéma EPR/ELVIS efektu. V případě ELVIS efektu (vlevo) dochází ke zvýšenému průniku léčiva v důsledku poškozených endoteliálních buněk a následnému zadržování v buňkách imunitního systému, tzv. sekvestraci. Efekt EPR (vpravo) je charakteristický vstupem léčiva do nádorové tkáně kapilárou s poškozenými endoteliálními buňkami, kde je následně léčivo zadržováno a poškozená lymfatická kapilára brání jeho vyloučení [19].

2.2.2 Aktivní směřování

Kromě pasivního směřování lze polymer s léčivem směřovat i navázáním specifických ligandů, tedy aktivně směřovat. K aktivnímu směřování může docházet na různých úrovních závislejících na požadavku zasažené tkáně, buňky nebo orgány. Může se tedy jednat o směřování na úrovni orgánu, buňky, ale i o subcelulární směřování. Je nutné podotknout, že i polymerní konjugát schopný aktivního směřování podléhá současně EPR či ELVIS efektu, přičemž jeho zadrž v nádorové či zánětlivé tkáni je posléze dána součtem obou typů akumulace, tedy aktivní i pasivní. Jako směřující jednotky se používají především monoklonální protilátky, specifické peptidy, oligosacharidy, lektiny a další molekuly, jako například kyselina listová [20].

2.3 Polymerní systémy s pH senzitivní aktivací léčiva

Dopravovaná léčiva na polymerních nosičích musí být ve valné většině případů aktivována uvolněním z nosiče. V literatuře jsou popsány různé mechanismy štěpení vazby mezi léčivem a jeho polymerním nosičem závislející na charakteru vnějšího stimulu, který by měl být spouštěčem samotného uvolnění léčiva v cílové tkáni. Tento stimul může představovat například změna pH, redoxního potenciálu nebo přítomnost specifických enzymů. Tato práce se zabývá pouze systémy využívajícími pH senzitivní spojky, které budou dále diskutovány.

2.3.1 Změna pH v závislosti na lokalizaci v organismu

Princip fungování pH senzitivních systémů je založen na rozdílech pH jak v rámci jednotlivých tkání v těle, tak v různých částech buněk. Změny pH lze následně využít pro řízené uvolňování léčiva.

Polymerní léčivo je většinou podáváno intravenózně, přičemž pH krevní plazmy se pohybuje v rozmezí 7,35-7,45. Zánětlivá či nádorová tkáň se hodnotami pH liší od tkáně zdravé, nádorová tkáň má obvykle kyselejší charakter než tkáň zdravá (pH 6,5-7,2) v důsledku hypoxického prostředí, kdy je v průběhu anaerobní glykolýzy produkován pyruvát a kyselina mléčná. Rovněž tkáň postižená zánětem má pH v rozsahu 5,4-7,4. Ke změně prostředí dochází i po vstupu konjugátu do buňky. Polymer vstupuje do buňky mechanismem endocytózy [21] a ocitá se tak v prostředí organel o nižším pH. Nejprve vzniká endosom vchlípením buněčné membrány dovnitř buňky (pH časného endosomu je 5,5-6,5, pozdního 5,0-6,0), který obsahuje polymerní léčivo. Po splynutí endosomu s primárním lysozomem dochází ke vzniku sekundárního lysozomu, kde pH klesá až na hodnoty 4,5-5,0. Takováto změna pH může být s výhodou využita k urychlení uvolňování léčiva z jeho polymerního nosiče [22].

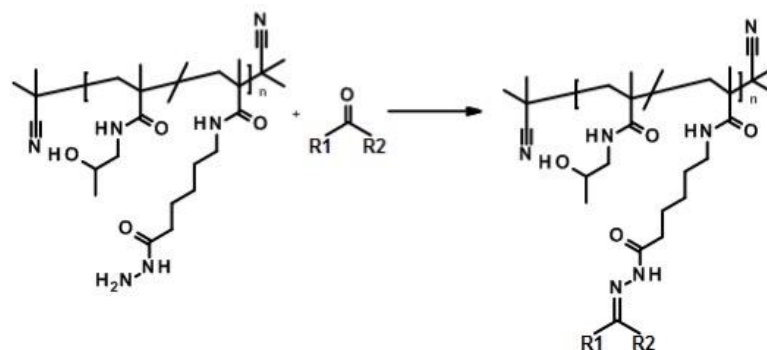
2.3.2 pH senzitivní spojky

Bylo popsáno mnoho spojek podléhajících hydrolyze v důsledku změny pH. Jednotlivé spojky se liší zejména rychlostí jejich hydrolyzy. Tohoto faktu lze využít při výběru spojky na míru přímo pro její aplikaci.

Spojky využívající cis-akonitylovou kyselinu se vyznačují rychlým štěpením v kyselém pH (v pH 4 během tří hodin uvolněno až 50 % léčiva) a jsou relativně stabilní v pH hodnotách odpovídající fyziologickému pH (50 % léčiva uvolněno až po 96 hodinách) [23].

Acetaly a zejména ketal se vyznačují hydrolytickou degradací silně závislou na pH, přičemž při poklesu pH o každý stupeň dojde k desetinásobnému zvýšení rychlosti hydrolyzy. Ketal jsou tak schopné velmi rychlé hydrolyzy v kyselém prostředí o pH 4, a jsou tak potenciálně vhodnými spojkami pro transport léčiva do buněk melanomu, ve kterých je takové pH potvrzeno [24]. Naproti tomu oximy jsou charakteristické vysokou chemickou stabilitou a jsou proto vhodné spíše pro aplikace požadující postupné dávkování [25].

Hydrazony vznikají kondenzací hydrazidu a ketonu nebo aldehydu a vyznačují se hydrolyticky labilní C=N vazbou (schéma reakce na *Obr. 4*, str. 20). Byly syntetizovány konjugáty pHPMA s doxorubicinem vázaným hydrazonovou vazbou podléhající rychlé degradaci v pH 5 (za 5 hodin uvolněno téměř 70 % léčiva) a zároveň vykazující stabilitu při fyziologickém pH (za 24 hodin uvolněno méně než 25 % léčiva) [26]. V případě, že léčivo nemá vhodnou keto nebo aldehydovou skupinu, využívá se často derivatizace s využitím ketokyselin. Tento postup umožní zavést na léčivo vhodnou keto skupinu, která následně slouží jako spojka mezi léčivem a polymerem.



Obr. 4: Schéma vzniku hydrazonové vazby na pHEMA.

3. CHRONICKÁ ZÁNĚTLIVÁ ONEMOCNĚNÍ

3.1 Akutní a chronický zánět

Zánět je obranná reakce organismu na přítomnost cizorodé látky (vir, bakterie, houba, parazit, nádorová buňka a jiné). Zahrnuje fyziologické změny v postižené tkáni a umožňuje snadnější vstup imunitních buněk do cílového místa. Cizorodá částice je rozpoznána pomocí Toll-like receptorů (TLR, z angl. Toll-like receptors), které dokážou rozeznat i jemné rozdíly mezi antigeny, a umožňují tak imunitnímu systému rozlišit vlastní buňky od cizorodých. Toll-like receptory rovněž aktivují imunocyty. Obecně se látky rozpoznávané pomocí TLR označují jako PAMP (Patogen Associated Molecular Pattern) a patří mezi ně zejména lipopolysacharid gram-negativních bakterií či teichoová kyselina gram-pozitivních bakterií. Látky označované jako DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) jsou rovněž zodpovědné za aktivaci imunitního systému, avšak na rozdíl od PAMP se uvolňují z poškozených buněk. Další obrannou úlohu hrají regulační cytokiny, mezi nejvýznamnější patří interleukin 1 β (IL-1 β), faktor nádorové nekrózy α (TNF α , z angl. Tumor Necrosis Factor α) a interleukin 6 (IL-6). Cytokiny se podílejí na rozvoji zánětu, některé vyvolávají horečku, která taktéž působí jako obranný mechanismus, jelikož podporuje fagocytózu a jiné obranné děje [27].

Na rozvoji zánětu se v neposlední řadě podílejí také prostaglandiny, leukotrieny či tromboxany, lipidové sloučeniny odvozené od kyseliny arachidonové. Mezi typické projevy zánětu pak patří zvýšená teplota tkáně, bolest, zarudnutí, otok a ztráta nebo zhoršení funkce tkáně.

Pokud dojde k selhání obranného mechanismu, může se akutní zánět vyvinout v chronický. Na rozdíl od akutního zánětu, chronický zánět je reakcí na dlouhodobé vystavení organismu zánětlivému podnětu a může trvat až týdny, v některých případech i celý život. Klíčovými buňkami zodpovědnými za rozvoj chronického zánětu jsou makrofágy, vzniklé přeměnou z monocytů, a lymfocyty. Monocyty a lymfocyty jsou neustále transportovány do místa zánětu v důsledku přetrvávajícího zánětlivého stimulu. Současně v rámci zánětlivé odpovědi na tento stimul dochází k soustavnému poškozování postižené tkáně a dochází ke

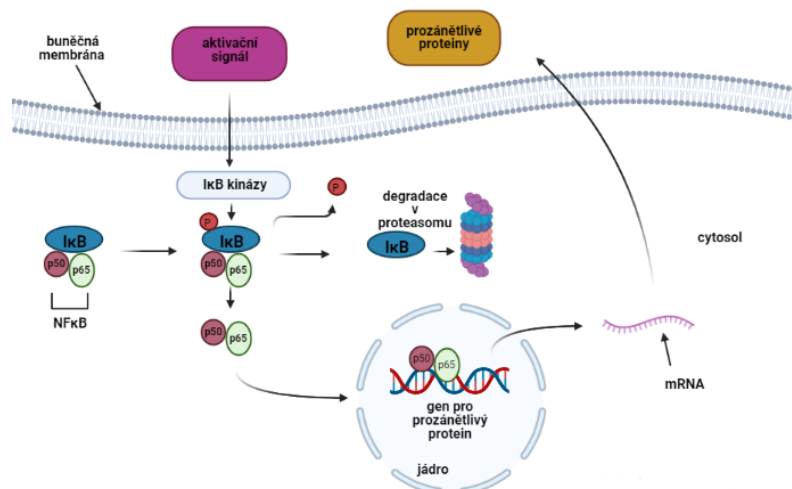
změnám v procesu uzdravování tkáně, jako je proliferace fibroblastů a malých krevních cév [28].

Nejrozšířenější chronická zánětlivá onemocnění (CID, z anglického Chronic Inflammatory Diseases) představují dnes především revmatoidní artritida, osteoartritida, roztroušená skleróza, Crohnova nemoc a další. V pozdějším stadiu mohou vést až k rozvoji nádorového onemocnění [29].

3.2 Dráha nukleárního faktoru κ B

Dráha nukleárního faktoru NF- κ B (z angl. Nuclear Factor κ B) je jednou z hlavních regulačních drah zapojujících se během rozvoje chronického zánětu (dráhu zobrazuje *Obr. 5*, str. 21). Zvyšuje expresi genů pro některé prozánětlivé mediátory, zejména cytokiny, některé enzymy a adhezivní molekuly (neutrofilů, eozinofilů, T-lymfocytů). Mezi enzymy regulované NF- κ B patří například inducibilní NO syntasa, zodpovědná za vyšší produkci oxidu dusnatého v postižené tkáni (epiteliální buňky v plicích při astmatu, epitheliální buňky střeva u pacientů trpících ulcerózní kolitidou či v synoviálních buňkách v kloubech postižených chronickým zánětem) [30]. Dalším významným inducibilním enzymem, jehož exprese je regulována NF- κ B je cyklooxygenasa 2 [31], více o tomto enzymu v kapitole 4.

NF- κ B je heterodimer skládající se ze dvou podjednotek, proteinu p65 a p50. Pokud není aktivována žádným stimulem, je přítomna v cytoplasmě a vázána na protein I κ B, který zabraňuje jejímu vstupu do jádra. Jakmile se objeví aktivační signál, I κ B je fosforylován specifickými kinasami a je degradován v proteasomu. Následně NF- κ B vstupuje do jádra a váže se na specifické promotorové sekvence a ovlivňuje transkripci mRNA, což vede ke zvýšené syntéze prozánětlivých proteinů [32, 33].



Obr. 5: Schéma ovlivnění genové exprese pomocí NF- κ B.

3.3 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida patří mezi autoimunitní chronická zánětlivá onemocnění. Postihuje kloubní synovii (vnitřní výstelku kloubního pouzdra) a projevuje se synoviální hypertrofií, poškozením kloubní chrupavky a dekalifikací kostí. Při zánětu se leukocyty hromadí v synovii, která je zodpovědná za produkci synoviální tekutiny. Synoviální tekutina snižuje tření ploch kloubů při pohybu a vyživuje kloubní chrupavku. Revmatoidní artritida se vyskytuje se častěji u žen, a přestože se může rozvinout v jakémkoli věku, nejčastěji postihuje pacienty ve věku 40-60 let. Výrazně zhoršuje postiženému kvalitu života a v současnosti na ni neexistuje léčba [18].

Pro zmírnění příznaků a potlačení bolesti se používají tři základní kategorie léčiv. Jsou to nesteroidní antiflogistika (NSAIDs, z angl. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs), glukokortikoidy (GCs, z angl. Glucocorticoids) a chorobu modifikující léky (DMARDs, z angl. Disease Modifying AntiRheumatic Drugs) [18].

3.3.1 Biochemie revmatoidní artritidy

V rámci reakce imunitního systému na rozvoj revmatoidní artritidy dochází k zapojení jak vrozených, tak adaptivních imunitních mechanismů. Na obranné reakci se podílí řada efektorových buněk vrozeného imunitního systému, jako žírné buňky, NK (z angl. Natural Killer) buňky a zejména makrofágy. Všechny tyto buňky se vyznačují schopností fagocytózy a vyskytují se v synoviální membráně. Makrofágy jsou nejvýznamnější buňky podílející se na rozvoji synovitidy (zánět kloubní výstelky), především v důsledku uvolňování cytokinů, reaktivních kyslíkových a dusíkatých intermediátů či prostanoidů [34]. Cytokiny mají významný vliv na průběh nemoci a jejich zastoupení se v různých stádiích onemocnění mění. Tyto cytokiny zahrnují především TNF- α , interleukin-6 a interleukiny rodiny 1, způsobující aktivaci leukocytů, endoteliálních buněk, chondocytů a osteoklastů, a interleukiny 12,15,18 a 23 [35]. Neutrofilů jsou přítomné v synoviální tekutině a na rozvoj revmatoidní artritidy mají vliv zejména uvolňováním prostaglandinů, proteáz a reaktivních kyslíkových intermediátů [36]. Mechanismy adaptivní imunity se uplatňují spíše v raných stádiích onemocnění a zahrnují předkládání autoprotilátek. Role T-buněk dosud není uspokojivě objasněna [37].

4. CYKLOOXYGENASY A NESTEROIDNÍ ANTOFLOGISTIKA

4.1 Nesteroidní antiflogistika a funkce cyklooxygenas

Jako nesteroidní antiflogistika se označuje skupina léčiv používaných za účelem tlumení zánětlivých pochodů, zmírnění bolesti a snížení horečky. Obecný mechanismus účinku spočívá

v inhibici enzymů cyklooxygenas. Tyto enzymy se v buňce nachází ve vnitřní straně membrány endoplazmatického retikula a v jaderné membráně a zajišťují přeměnu kyseliny arachidonové na její metabolity, mezi které patří zejména prostaglandiny, tromboxany a leukotrieny, látky odpovědné za rozvoj zánětu. Existují dvě izoformy tohoto enzymu, cyklooxygenasa 1 (COX-1) a 2 (COX-2) [18].

Cyklooxygenasa 1 je důležitá pro tkáňovou homeostázu, přispívá ke správné činnosti orgánů a ovlivňuje mnoho fyziologických procesů, včetně ochrany gastrointestinálního traktu (GIT). Její inhibice je tedy spojena s četnými nežádoucími účinky, jako je eroze žaludeční sliznice a inhibice agregace krevních destiček, což má za následek krvácení, ulcerace či perforace stěny GIT. Nesteroidní antiflogistika mohou dále působit poškození ledvin a způsobit renální insuficienci (průtok krve ledvinami zajišťují prostaglandiny, jejichž syntézu inhibují), při dlouhodobějším užívání také analgetickou nefropatií [38].

Cyklooxygenasa 2 je zejména odpovědná za produkci prostaglandinů, které působí horečku, dráždí nociceptory a podporují zánětlivý proces. Většina nesteroidních antiflogistik působí jako nespecifické inhibitory cyklooxygenas, tzn. inhibují jak COX-1, tak COX-2. V důsledku nežádoucích účinků spojených s inhibicí COX-1 ale byly vyvinuty i specifické inhibitory COX-2 označované jako coxiby [38].

Cyklooxygenasa 1 je konstitutivní enzym a je běžně produkován téměř všemi buňkami těla. Naproti tomu COX-2 je inducibilní enzym a jeho exprese probíhá na základě zánětlivých a fyziologických podnětů v buňkách jako synoviocyty, makrofágy a endoteliální buňky. Takovými podněty mohou být např. prozánětlivé cytokiny IL-1 β nebo TNF α , lipopolysacharidy, mitogeny, onkogeny či růstové faktory. Cyklooxygenasa 2 je ale také exprimována i mimo zánět buňkami těla při stresu, např. v ledvinách jako odpověď na vyčerpání sodíku nebo stavy hyperfiltrace, a v postsynaptických excitačních neuronech v mozku jako stimulátor. Podílí se na regulaci renin angiotensinového systému a může docházet i k jeho hormonální indukci, při ovulaci, porodu či na konci těhotenství [39].

4.2 Významná nesteroidní antiflogistika

Kyselina acetylsalicylová, komerčně známá jako aspirin, se používá pro úlevu od bolesti a horečky, ve vyšších dávkách působí jako protizánětlivé léčivo. Oproti ostatním léčivům z kategorie nesteroidních antiflogistik vyniká ASA schopností ireverzibilně inhibovat COX-1 i COX-2 interakcí se serinovým zbykem (jeho acetylací) v aktivním místě cyklooxygenas (konkrétně Ser 529 a Ser 516). Kromě acetylace působí v aktivním místě cyklooxygenas také interakcí své COOH skupiny s dalšími aminokyselinovými zbytky v aktivním místě enzymu. Ireverzibilní inhibicí cyklooxygenas je schopna potlačit projevy zánětu, pro samotný protizánětlivý efekt je nutné poměrně vysoké dávkování (až 3 g/den [2]). Při průchodu GIT může být metabolizována na kyselinu salicylovou. Kyselina salicylová má výraznější nežádoucí účinky než její acetylovaný derivát [40].

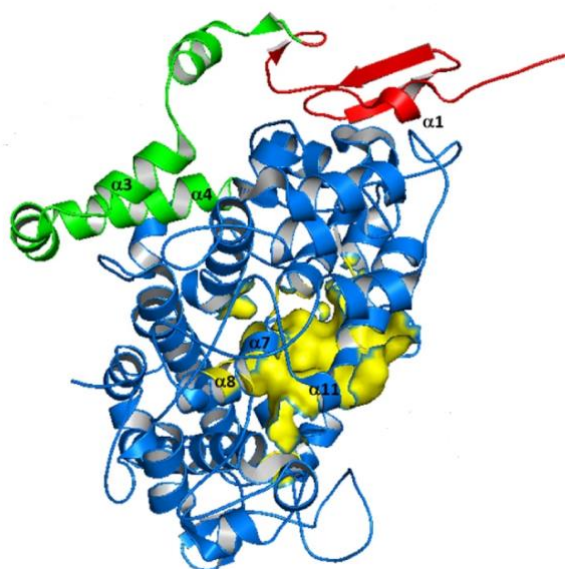
Další léčiva z této kategorie používaná v protizánětlivé terapii, která mají zároveň účinky analgetické a antipyretické jsou např. indometacin a méně toxický diklofenak, sulidinak nebo tolmentin. Velmi populárním léčivem je rovněž ibuprofen. Ibuprofen má slabší protizánětlivé účinky, je ale vhodnou náhradou kyseliny acetylsalicylové u dětí, protože nehrozí riziko Reyova syndromu. Lze využít i deriváty ibuprofenu, jako je flurbiprofen, ketoprofen nebo naproxen [41].

4.2.1 Indukce syntézy resolvinů

Acetylací COX-2 je ASA schopna indukovat biosyntézu protizánětlivých mediátorů, tzv. resolvinů. Pojem resolvinů zahrnuje aktivní metabolity omega-3 polynenasycených mastných kyselin, přirozeně se nacházejících v rybím tuku. Resolvinů hrají důležitou roli v rezoluci akutní fáze zánětu (např. akutní poškození ledvin, plic či zranění). Zánět u řady onemocnění přispívá k progresi rakoviny a resolvinů tedy mohou mít přínos i v národové terapii. Indukce biosyntézy resolvinů tak představuje potenciální zajímavé biomedicínské aplikace s minimem nežádoucích účinků [42, 43].

4.3 Struktura cyklooxygenas

Cyklooxygenasy 1 a 2 (prostagladin H syntasy 1 a 2) jsou homodimery složené z 576 aminokyselin a 587 aminokyselin (struktura viz *Obr. 6*, str. 25). Dimerizace je podstatná pro strukturní integritu a katalytickou aktivitu. Každý monomer obsahuje tři strukturní domény: N koncovou doménu rozpoznávající epidermální růstový faktor, C koncovou membránu vázající doménu a katalytickou doménu. Membránu vázající doména obsahuje 4 α helixy, hydrofobní a aromatické zbytky aminokyselin těchto helixů zajišťují interakci s lipidovou dvojrůstvou. Tři z těchto helixů leží ve stejné rovině, čtvrtý se označuje jako helix D a prostupuje do katalytické domény. Katalytická doména představuje místo vazby substrátu a působení NSAIDs, obsahuje vazebné místo pro cyklooxygenasovou aktivitu (COX vazebné místo), která zajišťuje přeměnu arachidonové kyseliny na prostaglandin G₂ (PGG₂) a peroxidasovou aktivitu (POX vazebné místo), kde dochází k redukci PGG₂ na prostaglandin H₂ (PGH₂). Vstup do vazebného místa cyklooxygenas zajišťuje dlouhý hydrofobní kanál s počátkem v membránu vázající doméně (tvoří první polovinu kanálu, umožňuje průchod arachidonové kyseliny a O₂ přímo z apolárního kompartmentu z lipidové dvojrůstvy), který se na pomezí membránu vázající domény a katalytické domény zužuje. Toto zúžení je zajištěno pomocí tří aminokyselinových zbytků Arg120, Tyr355 a Glu524. Aktivní vazebná místa COX-1 a COX-2 jsou velmi podobná, liší se ale přítomností postranní dutiny nad zúžením hydrofobního kanálu u COX-2, a díky ní je povrch enzymu přístupný rozpouštědlu větší. Ke zvětšení tohoto povrchu také přispívá jiné postavení helixu D, který má u COX-2 posunutě umístění Arg120 [39].

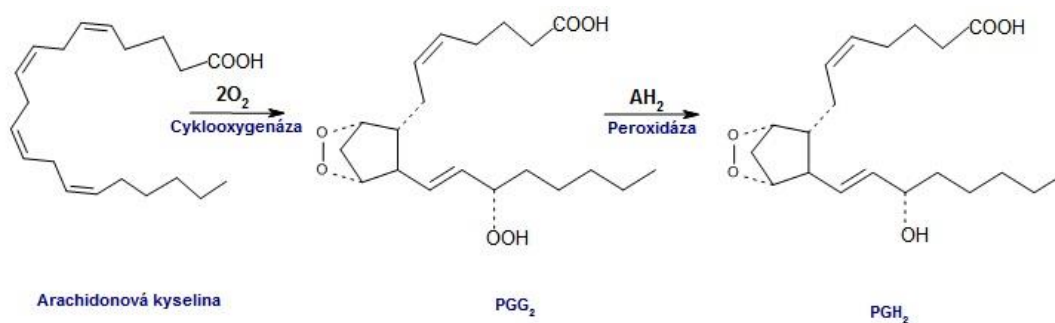


Obr. 6: Struktura lidské COX-1. Na obrázku jsou barevně odlišeny jednotlivé domény enzymu, červená barva náleží doméně rozpoznávající epidermální růstový faktor, zelená membránu vazající doméně a modrá katalytické doméně. Upraveno a převzato z [44].

4.4 Metabolismus arachidonové kyseliny

Arachidonová kyselina vstupuje do COX vazebného místa hydrofobním kanálem. Karboxylová skupina substrátu se váže iontovými páry na guanidin Arg120 a vodíkovými můstky na Tyr355, prochází kanálem otočkou ve tvaru písmene L kolem Tyr385 a kontakt se substrátem zajišťují aminokyselinové zbytky pomocí Van der Waalsových interakcí. Arachidonová kyselina se váže svým omega koncem v zúženém kanálu a je obklopena šesti aminokyselinovými zbytky [45].

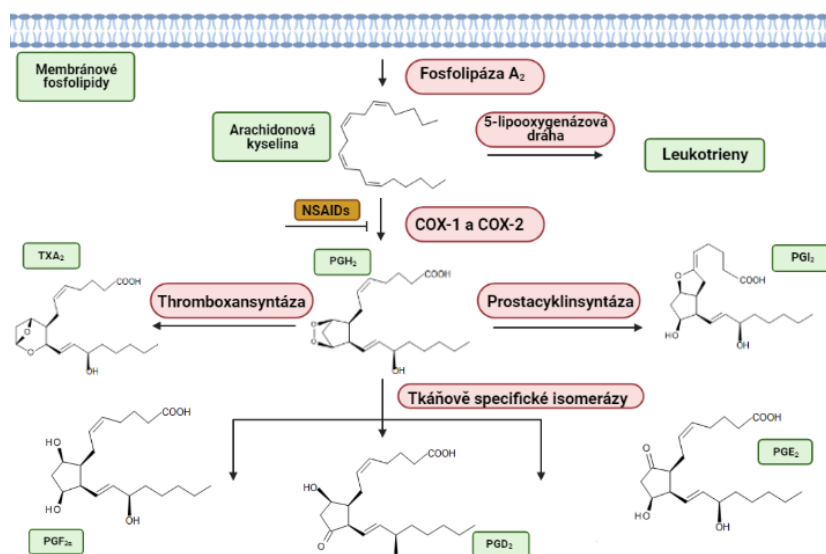
V katalytické doméně COX-1 i 2 dochází k transformaci arachidonové kyseliny na prostaglandiny (schéma viz Obr. 7, str. 26). Nejprve probíhá přeměna arachidonové kyseliny na PGG₂ v COX vazebném místě a poté jeho redukce na PGH₂ v peroxidasovém vazebném místě. Mechanismus je obdobný jiným hem peroxidasám. Hydroperoxid reaguje s hemovým železem a je docíleno dvouelektronové oxidace za vzniku oxyferryllhem kation radikálu. Ten formuje radikál z Tyr385, který iniciuje cyklooxygenasovou reakci za vzniku arachidonového radikálu. Tento radikál poskytuje reakci s kyslíkem 11-hydroperoxyl radikál, cyklizuje se a za přidavku dalšího kyslíku na uhlík 15 následovaného redukcí vzniká PGG₂ a regeneruje se tyrosylový radikál. PGG₂ přechází difúzí z cyklooxygenasového vazebného místa do peroxidasového vazebného místa a zde se redukuje na PGH₂ (prostaglandin H₂). Z PGH₂ se následně formují i ostatní prostaglandiny, popř. další metabolity. Peroxidasová reakce může běžet i nezávisle na COX reakci (při inhibici například), ale cyklooxygenasová je na POX reakci závislá [39].



Obr. 7: Schéma cyklooxygenasové a následné peroxidasové reakce.

4.5 Prostaglandiny a jejich fyziologická role související s nežádoucími účinky nesteroidních antiflogistik

Prostaglandiny (jejich biosyntéza je znázorněna na Obr. 8, str. 26) jsou produkovány téměř všemi buňkami těla ve všech tkáních a mají široké spektrum biologických funkcí. Mezi nejvýznamnější efekty prostaglandinů na organismus patří cytoprotektivní vlastnosti GIT a regulace renální funkce v ledvinách. Inhibicí syntézy prostaglandinů je pak vyvoláno mnoho nežádoucích účinků. V důsledku snížené syntézy PGI₂ (prostacyklin), PGD₂ (prostaglandin D₂) a PGE₂ (prostaglandin E₂) je snížena regulace míry glomerulární filtrace a dochází k renálním poruchám a hypertenzi. Pro nedostatečné cytoprotektivní vlastnosti vzniká podráždění, ulcerace až perforace stěny GIT. Inhibicí cyklooxygenáz v trombocytech je snížena produkce TXA₂ (thromboxan A₂) která má za následek prodloužení času krvácení a inhibici shlukování krevních destiček. Snížená hladina PGE₂ vyvolává posun od cyklooxygenasové dráhy směrem k 5-lipoxygenasové dráze, vzniklé leukotrieny působí jako bronchokonstriktory a mohou vyvolat astmatické záchvaty [46].



Obr. 8: Konverze arachidonové kyseliny na prostaglandiny, thromboxany a leukotrieny.

5. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo syntetizovat derivát ASA a jeho konjugát s polymerním nosičem pro využití v protizánětlivé terapii a tento derivát i polymerní konjugát charakterizovat s využitím HPLC, SEC a NMR.

Dílčím cílem práce bylo podrobit syntetizovaný derivát ASA biologickým testům pro vyloučení jeho cytotoxicity (na úrovni nekrotické buněčné smrti) a ověření jeho aktivity při inhibici COX-1 a stanovením hodnoty jeho IC_{50} .

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Materiál

6.1.1 Chemikálie

Chemikálie	čistota	výrobce
4-(4-hydroxyfenyl)-2-butanon	99 %	Sigma-Aldrich, USA
4-(dimethylamino)pyridin (DMAP)	99 %	Sigma-Aldrich, USA
4-hydroxy-2-butanon	95 %	Sigma-Aldrich, USA
4-hydroxybenzaldehyd	98 %	Sigma-Aldrich, USA
<i>N</i> ¹ -(<i>tert</i> -butoxykarbonyl)- <i>N</i> ² -(6-(methakrylamido)hexanoyl)hydrazin (Ma-Ahx-NHNH-Boc)	99,5 %	ÚMCH AV ČR, ČR [47]
Aceton	>99,0 %	Lach-ner, ČR
Acetonitril	99,9 %	VWR International, USA
Anhydrid kyseliny octové	>96,0 %	VWR International, USA
Diethylether	99,5 %	VWR International, USA
Dichlormethan (DCM)	99,9 %	Lach-ner, ČR
Dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát	99,9 %	VWR International, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	99,9 %	Sigma-Aldrich, USA
Ethylacetát	>99,5 %	Lach-ner, ČR
<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N</i> ^c -ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC·HCl)	>98,0 %	VWR International, USA
Chloroform	99,93 %	Lach-ner, ČR
Hydrogenfosforečnan sodný, dihydrát	100 %	VWR International, USA
Isopropylkarbodiimid (DIC)	98,0 %	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina acetylsalicylová (ASA)	99,0 %	Sigma-Aldrich, USA

Chemikálie	čistota	výrobce
Kyselina octová	99,9 %	Lach-ner, ČR
Kyselina salicylová (SA)	99,0 %	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina trifluoroctová (TFA)	Peptidová kvalita	Iris Biotech, DE
Kyselina trinitrobenzensulfonová (TNBSA)	N/A	Sigma-Aldrich, USA
Methanol (MeOH)	>99,9%	VWR International, USA
MgSO ₄ bezvodý	>98 %	Lach-ner, ČR
<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA)	99,8 %	ÚMCH AV ČR, ČR, [48]
<i>N,N'</i> -dimethylacetamid (DMA)	99,8 %	Sigma-Aldrich, USA
Octan sodný	>98,5 %	Lach-ner, ČR
Pyridin	99,8 %	Sigma-Aldrich, USA
<i>Terc</i> -butanol	99,5 %	ACROS Organics, USA
<i>Terc</i> -butyl karbazát	>98 %	Alfa Aesar, USA
Tetrahydrofuran (THF)	99,9 %	ACROS Organics, USA
Toluen	99,24 %	Lach-ner, ČR
S-2-kyano-2-propyl S'-ethyl trithiokarbonát (CTA)	>95%	ÚMCH AV ČR, ČR
2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (V-70)	95 %	FUJIFILM Wako Chemicals Europe, DE
2,2'-azobis(2-methylpropionitril) (AIBN)	98 %	FUJIFILM Wako Chemicals Europe, DE

V rámci výzkumné skupiny Biolékařských polymerů ÚMCH AV ČR byly syntetizovány tři z použitých chemikálií, Ma-Ahx-NHNH-Boc [47], HPMA [48] a CTA [49] podle postupů uvedených v příslušných citacích. AIBN byl před použitím dvakrát rekrystalizován z methanolu. DCM byl sušen hydridem vápenatým a destilován přes molekulová síta. Diethylether byl sušen sodíkem a následně destilován, ethylacetát a aceton byly sušeny molekulovými síty a destilovány.

Pro účely biologického testování aktivity sloučenin při inhibici COX-1 byl využit komerčně dostupný kit ab204698 od firmy Abcam, USA.

Biologické testování cytotoxicity jednotlivých sloučenin bylo provedeno na buňkách RAW 246.7 (myší peritoneální makrofágy, dodávané firmou LGC Standards Sp. z o.o., Polsko). Jako médium pro kultivaci bylo použito Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (DMEM, z angl. Dulbecco's modified Eagle's medium, #31053-028; Gibco, Irsko). Příprava: Medium DMEM + 10 % FBS. Do 500 ml media DMEM bylo přidáno 50 ml tepelně inaktivovaného FBS (fetální bovinní sérum, Biosera, Francie), 5 ml penicilin/streptomycin (Invitrogen, USA), 5 ml 200 mM L-glutaminu (L-glutamin, C₅H₁₀N₂O₃, Sigma-Aldrich, Německo) a 5 ml 100 mM pyruvátu sodného (C₃H₃NaO₃, Gibco, Irsko). Uchováváno bylo při 4 °C. K detekci laktádehydogenasy (LDH) byla použita komerčně dostupná LDH esej (cytotoxicity detection kitPLUS, Roche applied science, Německo). Pro experiment bylo použito LPS médium (lipopolysacharid z *Escherichia coli*, serotyp 026:B6, Sigma-Aldrich, Německo).

6.1.2 Přístrojové vybavení

Automatické pipety Research plus (1-1000 µl), Eppendorf, DE

Analytické váhy ALJ 220-50NM, KERN, DE

Centrifuga 5430 R, eppendorf, DE

Čtečka mikrotitračních destiček Synergy H1 Plate Reader, Bio Tek, USA

FLASH chromatografický systém PrepChrom C-700, BÜNCHI SWITZERLAND

HPLC (z. angl. high performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie) LC-20AD, Shimadzu, Japonsko, vybavené autosamplrem SIL-20AC HT, fotodiodovým detektorem SPD-M20A, úložištěm kolony CTO-20AC a fluorescenčním detektorem RF-20A XS

Lyofilizátor GREGOR instruments, ČR

Magnetická míchačka Heidolph, DE

NMR (z angl. nuclear magnetic resonance – nukleární magnetická rezonance) Bruker Avance Neo 400 spectrometer, DE

Olejová lázeň HAAKE S, FISIONS, UK

Průtokový detektor D-14163, KNAUER, DE

SEC (z angl. size exclusion chromatography – rozměrově vylučovací chromatografie) LC-10AD, Shimadzu, Japonsko, vybavené autosamplrem SIL-HT, fotodiodovým detektorem SPD-10AV, úložištěm kolony CTO-10AC, víceúhlovým detektorem rozptylu světla DAWN 8 a detektorem indexu lomu Optilab rEX, oba Wyatt, USA

Termotřepačka ThermoMixer C, Eppendorf, USA

UV lampa UVP UVLG-58, Analytic Jena, DE

UV-VIS spektrometr Specord 205 ST, Analytic Jena, DE

Vakuová odparka Heidolph, DE

Vakuová vývěva Heidolph, DE

Vodní lázeň QBT2, Grant Instruments, UK

6.2 Metody

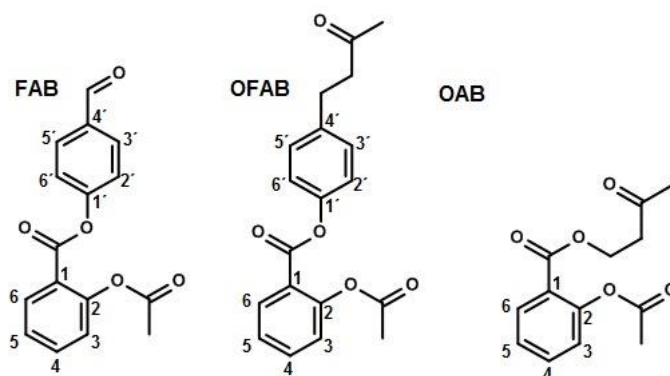
6.2.1 Metody charakterizace vzorků

6.2.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pro analýzu průběhu reakcí nízkomolekulárních látek, kontrolu čistoty produktů a monitorování průběhu vazby nízkomolekulárních derivátů na polymerní nosič byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Separace probíhala 7 min na koloně s reverzní fází Chromolith Performance RP-18e (100 × 4.6 mm, Merck Millipore), průtok mobilní fáze byl 4 ml·min⁻¹ (složení mobilní fáze A: acetonitril : voda 95 : 5 s 0,1% TFA, mobilní fáze B: voda:acetonitril 95:5 s 0,1% TFA). Pro monitorování polymerních konjugátů byly použity tytéž mobilní fáze bez TFA. K měření a vyhodnocení získaných dat byl použit software LCsolution 1.25.

6.2.1.2 Nukleární magnetická rezonance

Měření spekter pomocí nukleární magnetické rezonance umožnilo ověřit strukturu syntetizovaných derivátů a polymerních konjugátů a stanovení obsahu aktivních látek vázaných na polymerním nosiči. K měření byl použit přístroj Bruker Avance Neo 400 pracující při frekvenci 400,13 MHz (¹H) a 100.61 MHz (¹³C). Vzorky o koncentraci 10 mg·ml⁻¹ v deuterovaných rozpouštědlech byly měřeny v 5 mm NMR kyvetách. Šířka 90 ° pulzu byla 16,5 μs, relaxace 10 s, akviziční čas 3,28 s (¹H), 1,22 s (¹³C), 32-64 skenů (¹H), 300-400 skenů (¹³C). Pro vyhodnocení spekter byl použit software Topspin (4.0.9). Pro účely výpisu NMR spekter bylo zavedeno jednoduché číslování aromatických jader derivátů, viz *Obr. 9*, str. 31.



Obr. 9: Znárodnění číslování aromatických jader (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoátu (OAB), 4-formylfenyl 2-acetoxybenzoátu (FAB) a [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátu (OFAB) v NMR výpisech.

6.2.1.3 Chromatografie na tenké vrstvě

Pro samostatnou analýzu průběhu reakce či jako doplňková metoda k HPLC byla použita chromatografie na tenké vrstvě na stacionární fázi TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (MERCK, DE). Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform: methanol v různých poměrech, detekce byla provedena pomocí UV lampy (λ=254 nm).

6.2.1.4 Dělení nízkomolekulárních látek pomocí FLASH chromatografického systému

FLASH chromatografický systém byl využit k odstranění nečistot a stop vedlejších produktů či nezreagovaných výchozích látek z reakční směsi. Separace byla provedena na přístroji PrepChrom C-700 vybaveným kolonou Chromolith Performance RP-18e (100 × 25 mm, Merck Millipore), složení mobilních fází A: destilovaná voda, B: acetonitril), průtok 60 ml·min⁻¹, délka metody byla 15 min.

Vzorek byl při každém dělení aplikován na kolonu po rozpuštění v methanolu, nebo acetonitrilu (vzorek byl nanášen v rozmezí koncentrací 30-50 mg·ml⁻¹, na koloně bylo v jednom nástřiku děleno 60-100 mg derivátu) a po přefiltrování přes 0,45 μm polytetrafluorethylenový filtr (PTFE). Byly jímány jednotlivé frakce a frakce s obsahem produktu (ověřeno pomocí HPLC) byly odděleny a odpařeny do sucha.

6.2.1.5 Rozměrově vylučovací chromatografie

Pro stanovení molární hmotnosti (hmotnostně průměrné – M_w i početně průměrné – M_n) syntetizovaného kopolymeru a jeho disperzity (D) byla použita rozměrově vylučovací chromatografie. Měření bylo provedeno na přístroji HPLC (Shimadzu LC-10AD) vybaveném kolonou TSKgel SuperSW3000 (300 × 4.6 mm), složení mobilní fáze methanol : octanový pufr (octan sodný, kyselina octová, pH 6,5) 4 : 1 (v/v), průtok 0,5 ml·min⁻¹, délka metody byla 40 minut. Pro měření a vyhodnocení byly použity softwary ASTRA 5.3 a LCsolution 1.25.

Roztoky vzorků o koncentraci 5 mg·ml⁻¹ v mobilní fázi byly aplikovány na kolonu (nástřik o objemu 50-100 μl) pomocí autosampleru SIL-HT po přefiltrování přes 0,2 μm PTFE filtr.

6.2.1.6 Stanovení hydrazidových skupin polymerního nosiče s využitím UV-Vis spektrometrie

Obsah hydrazidových skupin byl stanoven pomocí TNBSA eseje [9] a UV-Vis spektrometrie při $\lambda=500$ nm. K roztoku vzorku o koncentraci 0,5 mg·ml⁻¹ (100 μl) byl pipetován borátový pufr o pH 9,3 (875 μl) a 3% roztok TNBSA (připravený z 1 mmol·dm⁻³ roztoku) v destilované vodě (30 μl). Směs byla ponechána 60 minut inkubovat a poté byla změřena odezva na UV-Vis spektrometru při $\lambda=500$ nm v 1 cm kyvetě. Měření a příprava vzorku byly provedeny v triplicátu.

Výpočet koncentrace hydrazidových skupin v roztoku byl proveden pomocí následujícího vztahu:

$$\eta(\%) = \frac{100}{1 + \frac{\varepsilon \cdot c_M \cdot d}{A} - M_{Ma-Ahx-NHNH_2} / M_{HPMA}}$$

kde c_M je hmotnostní koncentrace (0,2 g·dm⁻³), A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient (17 200 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹) a d je optická dráha kyvety (1 cm), $M_{Ma-Ahx-NHNH_2}$ je

molární hmotnost monomerní jednotky Ma-Ahx-NHNH₂ (213,3 g·mol⁻¹) a M_{HPMA} je molární hmotnost HPMA (143,2 g·mol⁻¹).

6.2.1.7 Čištění polymerních konjugátů

Pro čištění konjugátů od nenávaného nízkomolekulárního léčiva a dalších nečistot byla provedena separace na koloně se sephadexovou náplní LH 20. Skleněná kolona o dvacetinásobném objemu oproti objemu vzorku byla naplněna do 7/8 náplní Sephadex LH 20 v MeOH. Kolona byla promyta MeOH dvojnásobkem svého objemu a byla napojena na průtokový detektor KNAUER D-14163 (odezva měřena při $\lambda=230$ nm). Vzorek byl nanesen na promytou kolonu a po zapuštění převrstven MeOH. Průběh dělení byl monitorován připojeným detektorem a při zvýšení intenzity signálu byla jímána frakce a její složení ověřeno HPLC. Roztok přečištěného produktu byl odpařením zahuštěn na přibližně 10% roztok, vysrážen do dvacetinásobku objemu ethylacetátu a odstředěn na centrifuze (7100 × g). Supernatant byl oddělen a vzorek sušen v eksikátoru (2 hodiny na membránové pumpě, 16 hodin na olejové pumpě). Takto získané vzorky byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

6.2.2 Syntéza

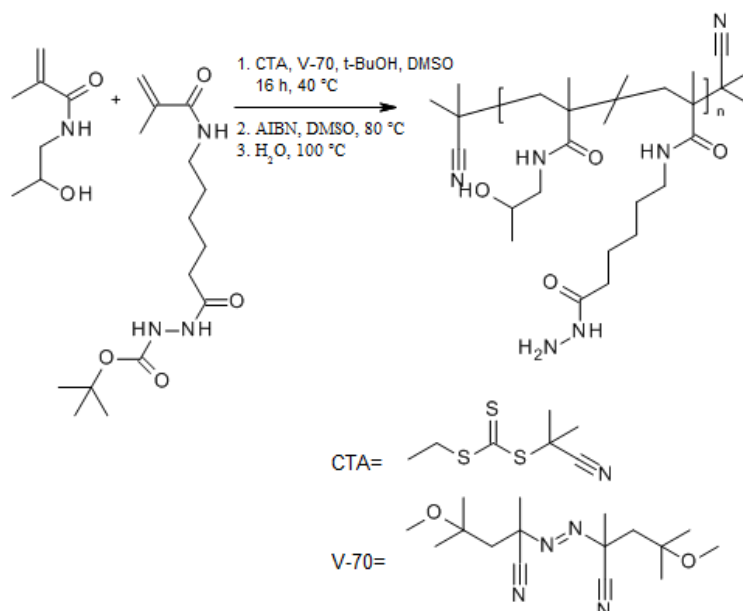
6.2.2.1 Příprava polymerního nosiče

Monomer HPMA (1,00 g, $7,0 \cdot 10^{-3}$ mol) byl rozpuštěn v *terc*-butanolu (9,76 ml) ve skleněné šroubovací ampuli. Druhý monomer Ma-Ahx-NHNH-Boc (190,0 mg, $6,1 \cdot 10^{-4}$ mol) byl rozpuštěn v DMA (200 μ l) a kvantitativně přenesen (za spotřeby 100 μ l DMA na výplach) k roztoku HPMA. Molární poměr monomery (HPMA + Ma-Ahx-NHNH-Boc) : CTA (TTC-AIBN) : iniciátor (V-70) odpovídal 400 : 2 : 1. Byl připraven zásobní roztok CTA (TTC-AIBN, 8,42 mg v 100 μ l DMA) a iniciátoru V-70 (6,65 mg v 500 μ l DMA). Ze zásobního roztoku V-70 bylo k roztoku monomerů pipetováno 440 μ l, ze zásobního roztoku CTA 93 μ l a dalších 251 μ l DMA bylo přidáno ke směsi (celkový objem DMA v ampuli 10% v/v). Vzniklý roztok byl po dobu 10 minut probublán argonem a utěsněná ampule byla vložena do vodní lázně o teplotě 40 °C na 16 hodin. Po ochlazení ampule pod tekoucí vodou byl roztok po kapkách vysrážen do směsi aceton : diethylether 3 : 1 (300 ml) za stálého míchání. Sraženina byla odsáta na S4 fritě a promyta směsí aceton : diethylether 3 : 1 (50 ml) a čistým diethyletherem (50 ml). Vzorek byl sušen v eksikátoru na membránové vývěvě a po 2 hodinách byl rozpuštěn v MeOH (6 ml) a přesrážen opět do směsi acetonu a diethyletheru 3 : 1 (150 ml).

Pro odstranění trithiokarbonátových (TTC) skupin byl ze získaného polymeru (693,0 mg, $4,6 \cdot 10^{-3}$ mol) nejprve připraven jeho 10% roztok v DMA (6,9 ml) a k tomuto roztoku bylo za stálého míchání přidáno 20 hm. % AIBN (138 mg, $8,4 \cdot 10^{-4}$ mol). Směs byla v utěsněné ampuli ponořena na dobu 3 hodiny do olejové lázně o teplotě 80 °C, poté vysrážena do dvacetinásobného objemu ethylacetátu (140 ml), odsáta na fritě S4, promyta ethylacetátem (50 ml) a vysušena na fritě v eksikátoru. Po 2 hodinách byl polymer rozpuštěn v MeOH (6 ml),

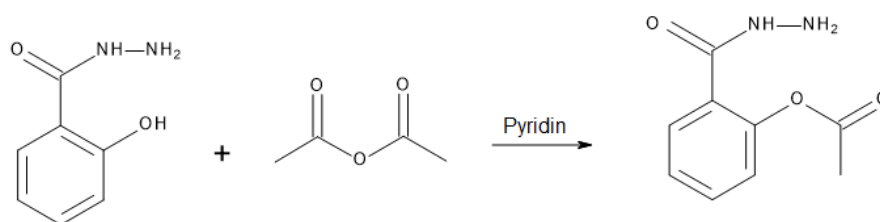
přesrážen za stálého míchání do ethylacetátu (300 ml) a vysušen. Bylo získáno 712 mg polymeru (59,8 % výtežek).

Pro odstranění Boc skupin byl polymer (400,0 mg, $2,7 \cdot 10^{-3}$ mol) rozpuštěn v destilované vodě (40,0 ml) a umístěn v utěsněné šroubovací ampuli na 30 minut do olejové lázně o teplotě 100 °C. Následně byl vzorek lyofilizován a uchován v lednici při teplotě 4 °C (382 mg). Schéma reakce zachycuje Obr. 10, str. 34.



Obr. 10: Schéma přípravy kopolymeru poly(HPMA-co-Ma-Ahx-NHNH-Boc).

6.2.2.2 Příprava hydrazidu acetylsalicylové kyseliny

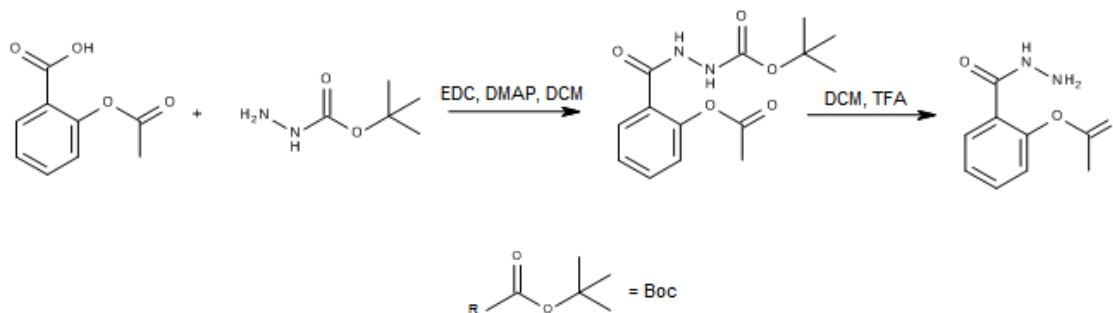


Obr. 11: Schéma reakce přípravy hydrazidu acetylsalicylové kyseliny.

Hydrazid kyseliny salicylové (100,0 mg, $6,6 \cdot 10^{-4}$ mol) byl rozpuštěn v DCM (3,0 ml) za stálého míchání v baňce se septem a k tomuto roztoku byl přidán anhydrid kyseliny octové (74,6 μ l, $7,9 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,2 ekv.) a pyridin (58,2 μ l, $7,2 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,1 ekv.). V čase 60 minut od zahájení reakce byl přidán pyridin znovu (58,2 μ l, $7,2 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,1 ekv.), v čase 120 minut znovu pyridin (58,2 μ l, $7,2 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,1 ekv.) a anhydrid kyseliny octové (74,6 μ l, $7,9 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,2 ekv.). Reakce byla monitorována pomocí HPLC a TLC (mobilní fáze chloroform : methanol 10 : 1). V čase 180 minut byl přidán tetrahydrofuran (1 ml) a směs byla ponechána reagovat přes noc. Následující den byl přidán pyridin (232,8 μ l, $2,6 \cdot 10^{-3}$ mol, 4 ekv.) a anhydrid kyseliny octové (149,2 μ l, $1,3 \cdot 10^{-3}$ mol, 2 ekv.), roztok byl v čase 24 hodin odpařen do sucha, znovu

odpařen po přidavku toluenu (2 ml) k odstranění zbytků anhydridu a uchován v mrazáku při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Schéma reakce viz *Obr. 11*, str. 34.

6.2.2.3 Příprava hydrazidu acetylsalicylové kyseliny reakcí s *tert*-butyl karbazátem



Obr. 12: Schéma reakce přípravy hydrazidu acetylsalicylové kyseliny.

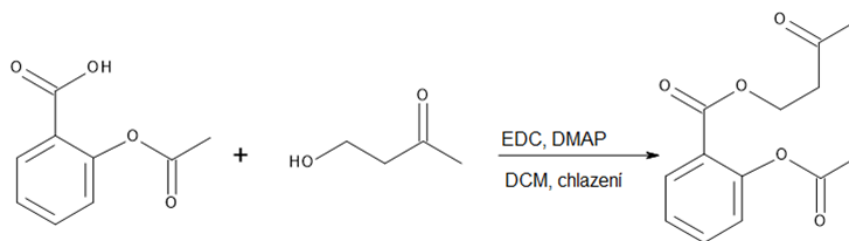
Reakce A: Acetylsalicylová kyselina (100,0 mg, $5,6 \cdot 10^{-4}$ mol), EDC·HCl (117,0 mg, $6,1 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,1 ekv.) a *tert*-butyl karbazát (80,7 mg, $6,1 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,1 ekv.) byly za stálého míchání v uzavřené baňce rozpuštěny v sušeném DCM (4,0 ml). Po 30 minutách od zahájení reakce byl přidán DMAP (3,4 mg, $2,8 \cdot 10^{-5}$ mol, 5 mol. %). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze chloroform : methanol 40 : 1) a HPLC, v čase 90 minut byla reakce ukončena.

Reakce B: Acetylsalicylová kyselina (100,0 mg, $5,6 \cdot 10^{-4}$ mol) a EDC·HCl (117,0 mg, $6,1 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,1 ekv.) byly za stálého míchání v argonové atmosféře a za chlazení v ledové lázni rozpuštěny v sušeném DCM (2,0 ml). Po 90 minutách byl přidán *tert*-butyl karbazát (80,7 mg, $6,1 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,1 ekv.) a DMAP (3,4 mg, $2,8 \cdot 10^{-5}$ mol, 5 mol. %). Reakce byla monitorována pomocí HPLC a TLC a byla ukončena v čase 120 minut. Vzorek byl naředěn DCM (50 ml) a byl promyt 3×50 ml destilované vody. Fáze DCM byla sušena bezvodým síranem hořečnatým po dobu 60 minut. Sušidlo bylo odfiltrováno přes skládaný filtr a filtrát odpařen do sucha, vzorek byl uchován při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazáku. Následující den byl vzorek přečištěn chromatografií na koloně naplněné silikagelem 60 (30 g), jako mobilní fáze byla použita směs chloroform : methanol 40 : 1. Frakce byly jímány do zkumavek, přítomnost produktu byla detekována pomocí TLC. Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny do sucha a odparek uchován v mrazáku při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bylo získáno 130,0 mg požadované látky ve formě bílého prášku (79,6 %). Schéma reakce viz *Obr. 12*, str. 35.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.17$ (m, 1 H, -NHNH-), 7.86 (m, 1 H, Ar-6), 7.53 (m, 1 H, Ar-4), 7.34 (m, 1 H, Ar-5), 7.16 (m, 1 H, Ar-3), 6.88 (m, 1 H, -NHNH-), 2.42 (s, 3 H, -OC(O)CH₃), 1.50 (s, 9 H, -C(O)OC(CH₃)₃) ppm. Retenční čas na HPLC chromatogramu byl 2,74 min.

Boc-chráněný hydrazid ASA (15,0 mg, $5,1 \cdot 10^{-5}$ mol) byl rozpuštěn v DCM (500,0 μl) a za stálého míchání a chlazení v ledové lázni byla přikapána trifluoroctová kyselina (367,4 μl , $4,8 \cdot 10^{-3}$ mol, 30 ekv.). Reakce byla monitorována HPLC. Vzorek byl odpařen do sucha.

6.2.2.4 Příprava (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoátu



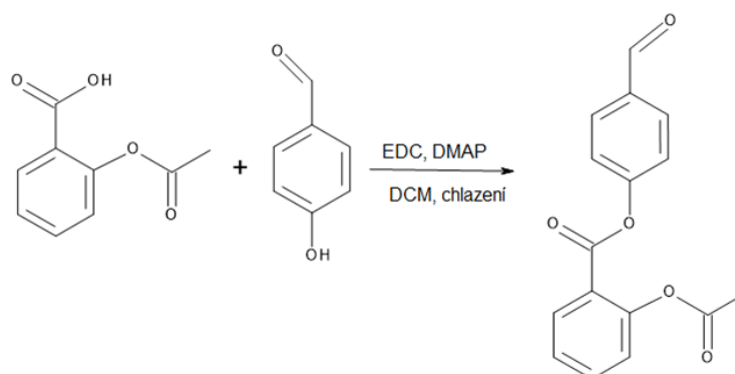
Obr. 13: Schéma reakce přípravy (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoátu.

Navážka ASA (300,0 mg, $1,7 \cdot 10^{-3}$ mol) a DIC (231,0 mg, $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,1 ekv.) byla převedena do baňky se septem a rozpuštěna v sušeném DCM (3,0 ml) za stálého míchání v argonové atmosféře. Baňka byla chlazena ledovou lázní. Po 30 minutách byl přidán 4-hydroxy-2-butanon (175,8 mg, $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 ekv.) rozpuštěný v sušeném DCM (2,0 ml) a DMAP (3,0 mg, $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol, 1,5 mol. %). Reakce byla ukončena v čase 180 minut. Průběh reakce byl sledován pomocí HPLC. Reakční směs byla odpařena do sucha, odparek byl rozpuštěn ve směsi MeOH (2 ml) a acetonitrilu (4 ml) a směs byla přečištěna pomocí FLASH chromatografie. Bylo získáno 131,0 mg (31,4 %) (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoátu (OAB).

Reakce byla provedena analogicky i za použití karbodiimidu EDC·HCl (reakce nasazena z ASA (100,0 mg, $5,6 \cdot 10^{-4}$ mol), EDC·HCl (117,0 mg, $6,1 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,1 ekv.), 4-hydroxy-2-butanonu (58,6 mg, $6,7 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,2 ekv.) a DMAP (1,0 mg, $8,3 \cdot 10^{-6}$, 1,5 mol. %). Po ukončení reakce byla reakční směs naředěna DCM (50 ml) a promyta 3×35 ml destilované vody. Fáze DCM byla sušena bezvodým síranem hořečnatým 60 minut. Sušidlo bylo odfiltrováno přes skládaný filtr a filtrát odpařen do sucha a uchován přes noc v mrazáku při teplotě -18 °C. Následující den byl odparek rozpuštěn v acetonitrilu (3,0 ml) a byl přečištěn pomocí FLASH chromatografie. Výtěžek činil 58,0 mg (13,9 %). Schéma reakce viz Obr. 13, str. 36.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.88 (m, 1 H, Ar-6), 7.68 (m, 1 H, Ar-4), 7.40 (m, 1 H, Ar-5), 7.23 (m, 1 H, Ar-3), 4.39 (t, 2 H, -O-CH₂CH₂-), 2.90 (t, 2 H, -OCH₂CH₂-), 2.27 (s, 3 H, -OC(O)CH₃), 2.15 (s, 3 H, -CH₂C(O)CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 205.97 (-CH₂C(O)CH₃), 168.98 (-OC(O)CH₃), 163.91 (Ar-C(O)OCH₂-), 149.94 (Ar-2), 134.20–124.05 (4 × C, Ar-3 – Ar-6), 123.02 (Ar-1), 60.17 (-O-CH₂CH₂-), 41.34 (-O-CH₂CH₂-), 29.93 (-CH₂C(O)CH₃), 20.67 (-OC(O)CH₃) ppm. Retenční čas na HPLC chromatogramu byl 2,86 min.

6.2.2.5 Příprava (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátu



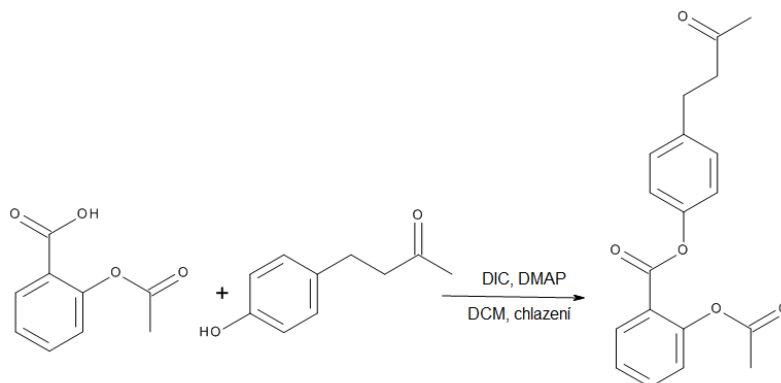
Obr. 14: Schéma reakce přípravy (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátu.

Acetylsalicylová kyselina (150,0 mg, $8,3 \cdot 10^{-4}$ mol) a DIC (115,5 mg, $9,2 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,1 ekv.) byly rozpuštěny v sušeném DCM (3,0 ml) v baňce se septem za stálého míchání v argonové atmosféře. Baňka byla ponořena do ledové lázně. Po 30 minutách byl přidán 4-hydroxybenzaldehyd (122,1 mg, $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 ekv.) rozpuštěný v sušeném DCM (2,0 ml). Reakce byla v čase sledována pomocí HPLC. V čase 120 minut byl přidán DMAP (1,5 mg, $1,3 \cdot 10^{-5}$ mol, 1,5 mol. %). Reakce byla ukončena v čase 210 minut. Reakční směs byla odpařena do sucha, odparek byl rozpuštěn v MeOH (1 ml) a acetonitrilu (2 ml) a takto vzniklý roztok byl přečištěn pomocí FLASH chromatografie. Bylo získáno 108 mg (45,6 %) (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátu (FAB). Schéma reakce viz Obr. 14, str. 36.

Při použití EDC·HCl s postupem analogickým jako v kapitole 6.2.2.4 bylo získáno 84,0 mg produktu (35,5 %).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.04 (s, 1 H, -CHO), 8.19 (m, 1 H, Ar-6), 8.03 (m, 2 H, Ar-3', Ar-5'), 7.81 (m, 1 H, Ar-4), 7.55-7.47 (m, 3 H, Ar-5, Ar-2', Ar-6'), 7.35 (m, 1 H, Ar-3), 2.26 (s, 3 H, -OC(O)CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 191.99 (CHO), 169.41 (-OC(O)CH₃), 162.03 (Ar-C(O)O-Ar), 154.64 (Ar-1'), 150.67 (Ar-2), 135.33–121.84 (10 × C, Ar-1, Ar-3 – Ar-6, Ar-2' – Ar-6'), 20.73 (-OC(O)CH₃) ppm. Retenční čas na HPLC chromatogramu byl 3,40 min.

6.2.2.6 Příprava [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátu



Obr. 15: Schéma reakce přípravy [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátu.

Acetylsalicylová kyselina (300,0 mg, $1,7 \cdot 10^{-3}$ mol) a DIC (231,0 mg, $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,1 ekv.) byly rozpuštěny v sušeném DCM (3,0 ml) v baňce se septem za stálého míchání v atmosféře argonu, baňka byla ponořena do ledové lázně. Po 30 minutách byl kvantitativně přidán 4-(4-hydroxyfenyl)-2-butanon (328,2 mg, $6,7 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,2 ekv.) rozpuštěný v sušeném DCM (2,0 ml). V čase 50 minut byl přidán DMAP (3,0 mg, $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol, 1,5 mol. %). Průběh reakce byl monitorován pomocí HPLC. V čase 90 minut byla reakce ukončena a vzorek byl po odpaření uchován přes noc v mrazáku při teplotě -18 °C. Další den byl ke vzorku přidán acetonitril (4,0 ml) a MeOH (2,0 ml) pro úplné rozpuštění. Reakční směs byla přečištěna s využitím FLASH chromatografie. Bylo získáno 226 mg (41,6 %) [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátu (OFAB). Schéma reakce viz *Obr. 15*, str. 37.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ = 8.14 (m, 1 H, Ar-6), 7.77 (m, 1 H, Ar-4), 7.49 (m, 1 H, Ar-5), 7.34-7.27 (m, 3 H, Ar-3, Ar-3', Ar-5'), 7.11 (m, 2 H, Ar-2', Ar-6'), 2.80 (m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), 2.24 (s, 3 H, $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.10 (s, 3 H, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*6): δ = 207.52 ($-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 169.31 ($-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 162.87 (Ar- $\text{C}(\text{O})\text{O}$ -Ar), 150.27–148.27 (Ar-2, Ar-1'), 139.40–121.47 ($10 \times \text{C}$, Ar-1, Ar-3 – Ar-6, Ar-2' – Ar-6'), 44.08 (Ar- CH_2CH_2-), 29.63–28.05 ($2 \times \text{C}$, Ar- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 20.47 ($-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$) ppm. Retenční čas na HPLC chromatogramu byl 3,54 min.

6.2.2.7 Syntéza polymerních konjugátů

Obecný postup pro přípravu polymerních konjugátů: Kopolymer poly(HPMA-*co*-Ma-Ahx-NH-NH₂) byl rozpuštěn v sušeném DMSO a vzniklý roztok byl smísen s roztokem derivátu ASA obsahujícím keto skupinu v DMSO a s kyselinou octovou. Směs byla ponechána na třepačce při laboratorní teplotě a reakce byla monitorována pomocí HPLC. Po 18 hodinách byla reakční směs naředěna MeOH a přečištěna na koloně s náplní LH 20. Po zahuštění na zhruba 10% roztok byl polymerní konjugát izolován vysrážením do dvaceti násobku objemu sušeného ethylacetátu, sraženina odstředěna na centrifuze (7800 RPM, 4 minuty) a sušena na membránové vývěvě (2 hodiny) a poté na olejové vývěvě (16 hodin). Polymerní konjugát byl charakterizován pomocí SEC a NMR.

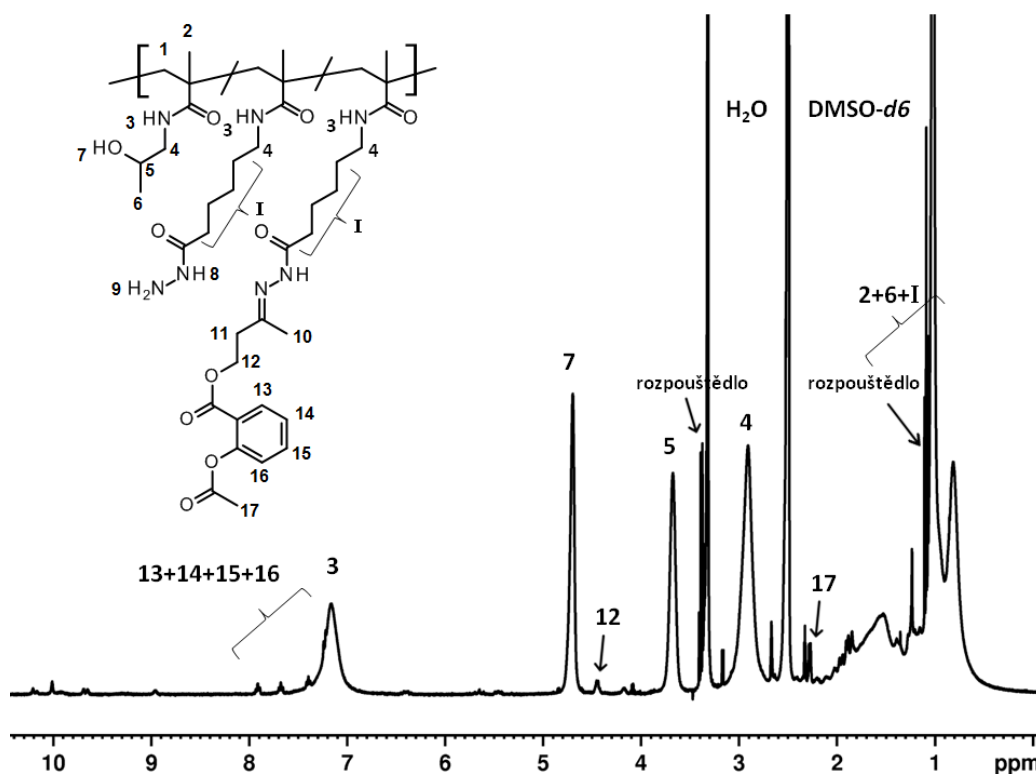
Navážka nízkomolekulárních derivátů v závislosti za požadovaném molárním obsahu byla určena podle vztahu:

$$m(\text{derivátu}) = \frac{m(\text{polymeru}) \cdot \text{mol. \%}(\text{derivátu}) \cdot 0,01 \cdot M(\text{derivátu})}{0,92 \cdot M_{\text{HPMA}} + 0,08 \cdot M_{\text{Ma-Ahx-NHNH}_2}}$$

kde $m(\text{derivátu})$ je navážka derivátu (g), $m(\text{polymeru})$ je hmotnost polymeru (g), $M(\text{derivátu})$ je molární hmotnost derivátu ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$), $M_{\text{Ma-Ahx-NHNH}_2}$ je molární hmotnost monomerní jednotky Ma-Ahx-NHNH₂ ($213,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) a M_{HPMA} je molární hmotnost monomerní jednotky HPMA ($143,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Příprava polymerního konjugátu s (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoátem

Pro přípravu polymerního konjugátu s OAB (konjugát P-OAB) s 4,5 mol. % aktivní látky v násadě byl použit kopolymer poly(HPMA-*co*-Ma-Ahx-NH-NH₂) (250,0 mg) v sušeném DMSO (2,0 ml), (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoát (18,8 mg, 4,5 mol. % vzhledem k průměrné monomerní jednotce kopolymeru) v DMSO (688,0 μ l) a kyselina octová (14,5 μ l, $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol). Bylo získáno 202,0 mg konjugátu (75,1 %). Spektrum získané NMR charakterizací zobrazuje *Obr. 16*, str. 39.

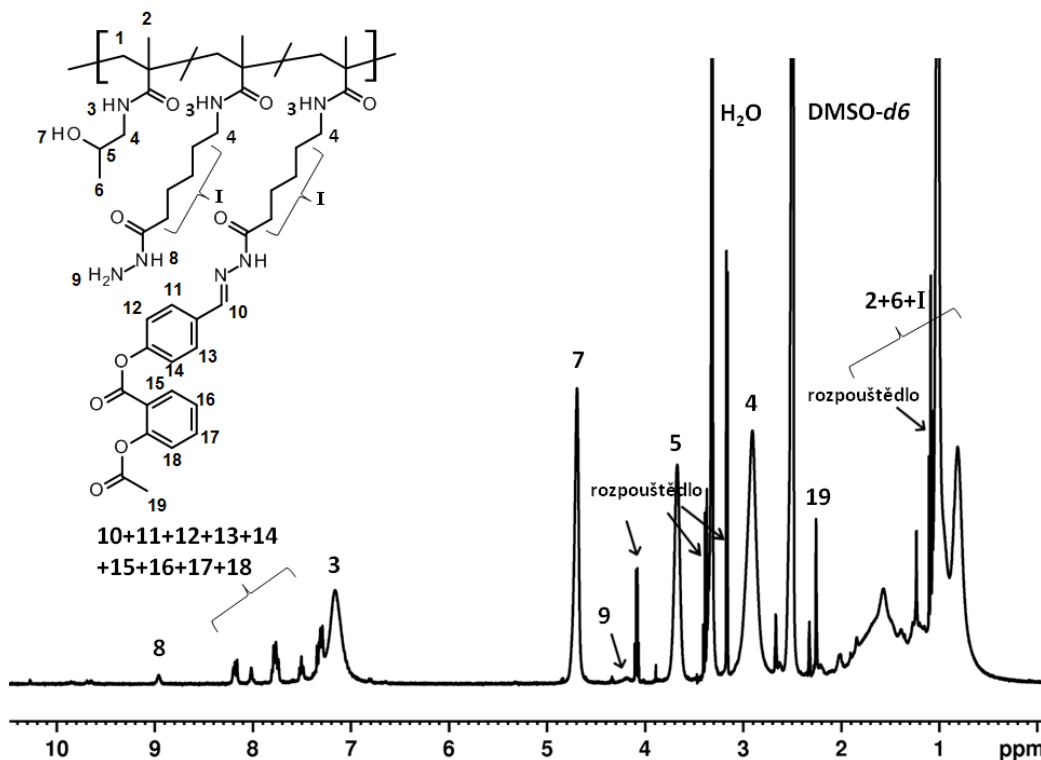


Obr. 16 ¹H NMR spektrum konjugátu P-OAB, měřeno při parametrech uvedených v kapitole 6.2.1.2. Měřeno v DMSO-*d*₆.

Příprava polymerního konjugátu s (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátem

Pro přípravu polymerního konjugátu s FAB (konjugát P-FAB) s 8 mol. % aktivní látky v násadě byl použit kopolymer poly(HPMA-*co*-Ma-Ahx-NH-NH₂) (50,0 mg) v sušeném DMSO (300 μ l), (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoát (7,6 mg, 8 mol. % vzhledem k průměrné monomerní jednotce kopolymeru) v DMSO (276,0 μ l) a kyselina octová (14,5 μ l, $2,3 \cdot 10^{-4}$ mol). Bylo získáno 33,0 mg konjugátu (57,3 %).

Pro přípravu polymerního konjugátu P-FAB s 4,5 mol. % aktivní látky v násadě byl použit kopolymer poly(HPMA-*co*-Ma-Ahx-NH-NH₂) (250,0 mg) v sušeném DMSO (2,0 ml), FAB (21,3 mg, 4,5 mol. % vzhledem k průměrné monomerní jednotce kopolymeru) v DMSO (713,0 μ l) a kyselina octová (68,3 μ l, $1,1 \cdot 10^{-3}$ mol). Bylo získáno 245,0 mg konjugátu (90,3 %). Spektrum získané NMR charakterizací zobrazuje *Obr. 17*, str. 40.

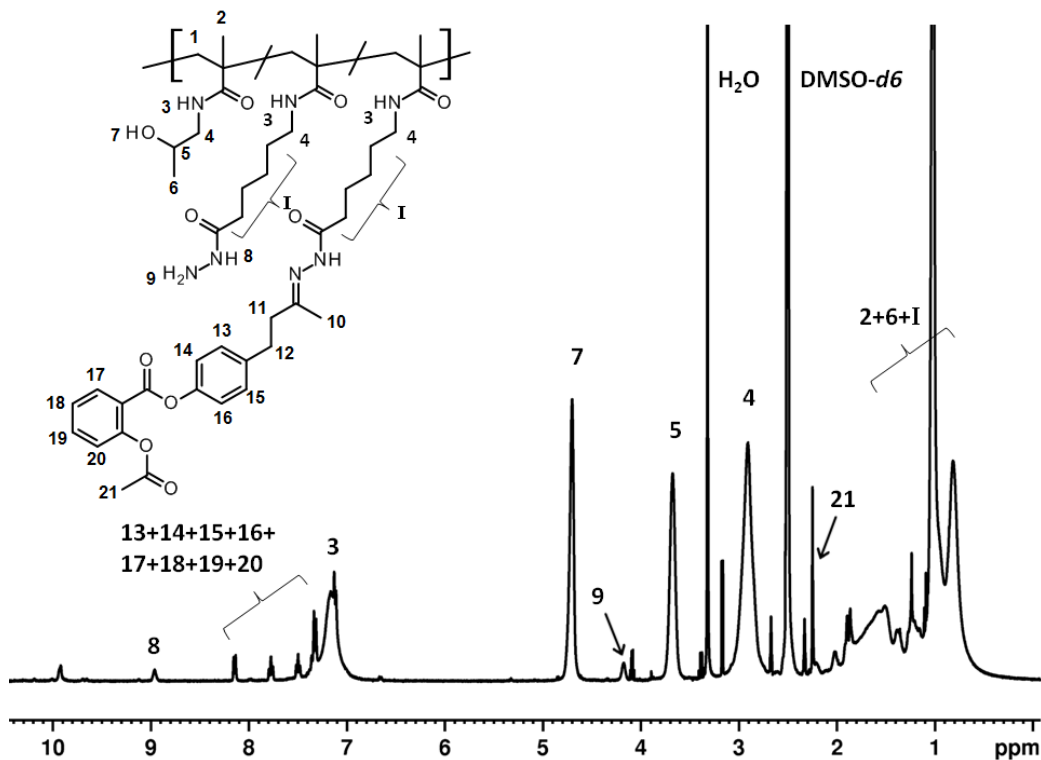


Obr. 17: NMR spektrum konjugátu P-FAB, měřeno při parametrech uvedených v kapitole 6.2.1.2 v DMSO- d_6 .

Příprava polymerního konjugátu s [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátem

Pro přípravu polymerního konjugátu s OFAB (P-OFAB) (8,0 mol. % aktivní látky v násadě) byl použit kopolymer poly(HPMA-*co*-Ma-Ahx-NH-NH₂) (50,0 mg) v sušeném DMSO (300 μ l), OFAB (4,9 mg, 4,5 mol. % vzhledem k průměrné monomerní jednotce kopolymeru) v DMSO (713,0 μ l) a kyselina octová (68,3 μ l, $1,1 \cdot 10^{-3}$ mol). Bylo získáno 43,5 mg konjugátu (74,1 %).

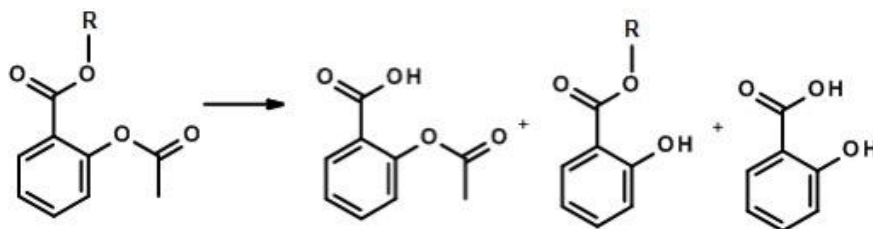
Pro přípravu polymerního konjugátu P-OFAB (4,5 mol. % aktivní látky v násadě) byl použit kopolymer poly(HPMA-*co*-Ma-Ahx-NH-NH₂) (250,0 mg) v sušeném DMSO (2,0 ml), [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátem (24,5 mg, 4,5 mol. % vzhledem k průměrné monomerní jednotce kopolymeru) v DMSO (745,0 μ l) a kyselina octová (13,1 μ l, $1,2 \cdot 10^{-3}$ mol). Bylo získáno 235,0 mg konjugátu (85,6 %). Spektrum získané NMR charakterizací zobrazuje Obr. 18, str. 41.



Obr. 18: NMR spektrum konjugátu P-OFAB, měřeno při parametrech uvedení v kapitole 6.2.1.2. v DMSO-d₆.

6.2.3 Stanovení stability derivátů acetylsalicylové kyseliny v prostředí o pH 7,4 a 5

Ze syntetizovaných derivátů byly připraveny roztoky v DMSO o koncentraci 100 mg·ml⁻¹. Zásobní roztoky byly pipetovány do jednotlivých mikrozkušavek obsahující fosfátové pufrы o pH 7,4 a pH 5 tak, aby výsledná koncentrace derivátů byla 1 mg ml⁻¹ (obsah DMSO 1 % v/v). Vzniklé suspenze derivátů v pufrách byly ponechány inkubovat v termotřepačce při teplotě 37 °C a 400 RPM. Obsah mikrozkušavek byl v čase 0, 1, 3, 5, 20 a 24 hodin naředěn methanolem na 0,125 mg·ml⁻¹, centrifugován, a supernatanty analyzovány pomocí HPLC. Schéma možného rozkladu zachycuje Obr. 19, str. 41.



Obr. 19: Schéma možného rozkladu oxoderivátů ASA. Rozkladem vznikají tři hlavní produkty, zprava SA, oxoderivát bez acetylové skupiny (deacetylovaný produkt) a ASA.

6.2.4 Uvolňování derivátů acetylsalicylové kyseliny z polymerního nosiče

Obečný postup při experimentu uvolňování polymerních konjugátů: Byl připraven zásobní roztok ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) polymerního konjugátu ve fosfátovém pufru (pH 7,4, $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Tento roztok byl rozpipetován po 200 μl do 15 plastových mikrozkušavek, které byly umístěny do termotřepačky ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 400 RPM). Vzorek byl v triplicátech v časech 0, 1, 5, 18 a 24 hodin 10 minut extrahován DCM, část DCM fáze byla odebrána a odpařena do sucha. Po rozpuštění v MeOH byl extrakt analyzován pomocí HPLC (nástřík 20 μl). Analogicky bylo provedeno uvolňování ve fosfátovém pufru o pH 5 ($0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Pro účely stanovení obsahu uvolněného léčiva byla na HPLC naměřena kalibrace a sestrojena kalibrační přímka závislosti plochy píku na hmotnosti ASA derivátu. Jako 100 % uvolněného derivátu pro sestrojení křivky uvolňování bylo vzato množství navázaného derivátu určené metodou NMR.

6.2.4.1 Uvolňování (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátu z polymerního nosiče

Podle postupu uvedeného na začátku kapitoly 6.2.4 byl zahájen experiment uvolňování polymerního konjugátu P-FAB. Před extrakcí bylo do každé z mikrozkušavek pipetováno DCM (500 μl), z toho množství bylo po extrakci odebráno 400 μl . Po odpaření bylo přidáno MeOH (50 μl). Analýza byla provedena v časech 0, 1, 3, 5 a 24 hodin pro pH 5 a 0, 1, 5, 18 a 24 hodin pro pH 7,4.

6.2.4.2 Uvolňování [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátu z polymerního nosiče

Podle postupu uvedeného na začátku kapitoly 6.2.4 byl zahájen experiment uvolňování polymerního konjugátu P-OFAB. Před extrakcí bylo do každé z mikrozkušavek pipetováno DCM (500 μl), z toho množství bylo po extrakci odebráno 300 μl . Po odpaření bylo přidáno MeOH (100 μl). Analýza byla provedena v časech 0, 1, 5 a 24 hodin pro pH 5 a 0, 1, 5, 18 a 24 hodin pro pH 7,4.

6.2.5 Biologické testování

6.2.5.1 Stanovení inhibiční aktivity derivátů acetylsalicylové kyseliny cyklooxygenázy 1

Ředící řadou byly připraveny roztoky tří syntetizovaných derivátů ASA (OAB, FAB, OFAB) a tří komerčně dostupných sloučenin (ASA, SA a hydrazidu SA) o koncentracích 400, 300, 200, 100 a 50 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v DMSO. Příslušné roztoky byly následně vždy ředěny s PBS tak, aby vznikly roztoky o koncentracích 20, 15, 10, 5 a 2,5 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Bylo pipetováno 10 μl z každého roztoku v duplikátu na mikrotitrační destičku s tmavým dnem. Byla připravena kontrola inhibitoru (smísením 2 μl SC560 COX-1 inhibitoru a 8 μl COX pufru z reakční směsi), kontrola rozpouštědla (směs DMSO a PBS v poměru 1 : 19), jako kontrola enzymu byla použita připravená COX-1 reakční směs (5320 μl pufru, 70 μl próby, 110 μl kofaktoru ($200\times$ zředěného) a 70 μl COX-1 enzymu). Z každého roztoku kontroly bylo pipetováno 10 μl

na mikrotitrační destičku v duplikátu. Následně bylo do každé jamky pipetováno 80 μl připravené COX-1 reakční směsi a 10 μl substrátu (směsi arachidonové kyseliny, hydroxidu sodného a filtrované ddH₂O v poměru 1 : 1 : 22). Destička byla ponechána 10 minut inkubovat v termobloku při 37 °C a měřena fluorescence na čtečce mikrotitračních destiček (při vlnové délce 535 nm pro excitaci a 587 nm pro emisi po dobu 15 minut) v kinetickém módu (měření po jedné minutě). Inhibiční koncentrace, 50 % (IC₅₀, hodnota koncentrace látky, potřebná pro inhibici 50 % enzymu) byla stanovena pomocí nelineární regrese s využitím programu GraphPad Prism 5.03 (GraphPadSoftware, CA, USA). Experiment byl proveden celkem třikrát.

6.2.5.2 Testování cytotoxicity derivátů acetylsalicylové kyseliny pomocí laktátdehydrogenasové eseje

Buňky myší linie peritoneálních makrofágů RAW 264.7 byly aplikovány na 24 jamkovou kultivační destičku v počtu 2×10^5 buněk na jamku, kde byly ponechány růst do druhého dne. Ředící řadou byly připraveny roztoky dvou komerčně dostupných sloučenin (ASA a SA) a tři syntetizovaných oxoderivátů ASA (OAB, FAB a OFAB), které byly pipetovány tak, aby výsledná koncentrace v jamkách destičky byla 1,5, 1 a 0,5 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Buňky byly s příslušnými látkami preinkubovány 60 minut. Následně byl do každé jamky pipetován aktivátor buněk lipopolysacharid (LPS), jehož výsledná koncentrace v jamce byla 25 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. Buňky byly ponechány inkubovat 24 hodin. Do dvou kontrolních jamek byl 30 minut před ukončením experimentu přidán lyzační roztok. Médium s buňkami bylo převedeno do plastových mikrozkuvek a centrifugováno při (1000 RCF, 10 minut). Produkce LDH byla změřena s využitím LDH detekčního kitu.

20 minut před ukončením experimentu bylo sterilně přidáno 20 μl lyzačního pufru z Cytotoxicity detection KitPLUS (Roche applied science, Německo). Buňky byly dále inkubovány při 37 °C až do ukončení experimentu. Na 96 jamkovou mikrotitrační destičku bylo pipetováno 100 μl vzorku (odsáté medium z experimentů). Reakční činidlo bylo připraveno smícháním reagentů A a B v poměru 1 : 45. Lyofilizovaný reagent A byl nejprve rozpuštěn v 1 ml destilované vody. Do každé jamky bylo přidáno 100 μl reakčního činidla, deska byla zakryta a inkubována 10 minut při pokojové teplotě. Na spektrofotometru Sunrise (Tecan, Švýcarsko) byla změřena absorbance při 490 nm. Experiment byl proveden ve spolupráci s BFÚ AV ČR, Brno. Celkem byl proveden pětikrát.

6.2.5.3 Statistické vyhodnocení

Získaná data byla statisticky zpracována a uvedena jako aritmetický průměr \pm SEM (standard error of the mean – střední chyba průměru) hodnot získaných z celkem pěti měření. Pro účely statistické analýzy byla provedena jednorozměrná analýza rozptylu (ANOVA – analysis of variance) s Dunnettovým post-hoc testem s využitím programu GraphPad Prism 5.03

(GraphPadSoftware, CA, USA). Statistická významnost byla vyhodnocena s ohledem na p-hodnoty (hodnoty $P < 0,001$ vyhodnoceny jako vysoce signifikantní(***)).

7. VÝSLEDKY

7.1 Syntéza a charakterizace polymerního nosiče

Metodou RAFT polymerizace (viz kapitola 2.1.3) byl úspěšně syntetizován kopolymer poly(HPMA-*co*-Ma-Ahx-NHNHBoc). Po odstranění Boc skupin byla provedena charakterizace SEC a byl stanoven obsah hydrazidových skupin UV-VIS spektrometrií a NMR. Získané výsledky shrnuje *Tab. 1*, str. 45. Bylo získáno 712 mg kopolymeru s výtěžkem reakce 59,8 %.

Tab. 1: Výsledky získané charakterizací polymerního prekurzoru rozměrově vylučovací chromatografií a UV-VIS spektrometrií.

Početně průměrná molární hmotnost M_n [g·mol ⁻¹]	Hmotnostně průměrná molární hmotnost M_w [g·mol ⁻¹]	Disperzita \bar{D} (M_w/M_n)	Obsah hydrazidových skupin [mol. %] UV-VIS	Obsah hydrazidových skupin [mol. %] NMR
20 000	21 000	1,05	6,8	7,5

7.2 Syntéza a charakterizace derivátů acetylsalicylové kyseliny

7.2.1 Syntéza a charakterizace hydrazidu acetylsalicylové kyseliny

Reakcí hydrazidu SA s anhydridem kyseliny octové proveden pokus o syntézu hydrazidu ASA. Syntéza proběhla neúspěšně, následná charakterizace HPLC poukázovala na přítomnost směsi produktů s velmi podobnými retenčními časy.

7.2.2 Syntéza a charakterizace hydrazidu acetylsalicylové kyseliny reakcí ASA s *terc*-butyl karbazátem

Reakcí ASA s *terc*-butyl karbazátem pomocí Steglichovy esterifikace (reakcí A) byl proveden pokus o syntézu Boc-chráněného hydrazidu ASA. HPLC charakterizací této reakční směsi bylo detekováno velké množství vedlejších produktů, a reakce tak neproběhla úspěšně. Reakcí B (provedena za mírnějších podmínek) byl úspěšně připraven a charakterizován Boc-chráněný hydrazid ASA s výtěžkem 130,0 mg (79,6 %). Syntéza této látky dosud nebyla publikována (k datu 20.5.2021). Charakterizace pomocí HPLC, NMR a TLC po odstranění Boc skupiny reakcí s TFA však prokázala, že reakcí místo požadovaného produktu vznikl hydrazid SA. Kromě odstranění Boc skupiny došlo tedy i k deacetylaci.

7.2.3 Syntéza a charakterizace (3-oxobutyl) 2-acetoxybenzoátu

Reakcí ASA s 4-hydroxy-2-butanonem byl mechanismem Steglichovy esterifikace úspěšně syntetizován oxoderivát OAB. Pro účely této syntézy byly k aktivaci karboxylové skupiny ASA použity dva různé karbodiimidy. S využitím karbodiimidu EDC·HCl bylo dosaženo výtěžku reakce 13,9 %, za použití karbodiimidu DIC 31,4 %. Nově syntetizovaný derivát má molární hmotnost $250,25 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, jeho retenční čas na HPLC chromatogramu (při zvolených parametrech, viz 6.2.1.1) byl 2,86 min. Jeho struktura byla potvrzena pomocí NMR. Syntéza této látky dosud nebyla publikována (k datu 20.5.2021).

7.2.4 Syntéza a charakterizace oxoderivátu (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátu

Mechanismem Steglichovy esterifikace byl úspěšně syntetizován derivát FAB, a to kondenzací ASA s 4-hydroxybenzaldehydem. S karbodiimidem EDC·HCl proběhla reakce s výtěžkem 35,5 %, s použitím DIC dosáhl výtěžek 45,6 %. Derivát byl již dříve syntetizován [50], NMR spektra odpovídají publikaci. Molární hmotnost derivátu je $284,26 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, jeho retenční čas při HPLC chromatografii (při parametrech popsaných v kapitole 6.2.1.1) je 3,40 min.

7.2.5 Syntéza a charakterizace [4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátu

Analogicky jako ostatní oxoderiváty byl i derivát OFAB připraven reakcí ASA s 4-(4-hydroxyfenyl)-2-butanonem za využití Steglichovy esterifikace. Tato syntéza byla provedena pouze za využití karbodiimidu DIC s výtěžkem reakce 41,6 %. Molární hmotnost nově syntetizované sloučeniny je $326,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, retenční čas při HPLC chromatografii (parametry uvedeny v kapitole 6.2.1.1) byl 3,54 min. Struktura byla potvrzena pomocí NMR. Syntéza této látky dosud nebyla publikována (k datu 20.5.2021).

7.3 Syntéza a charakterizace polymerních konjugátů

Všechny tři deriváty ASA, které byly v předchozím kroku syntetizovány, se následně podařilo úspěšně navázat na kopolymer poly(HPMA-*co*-Ma-Ahx-NH-NH₂) za vzniku hydrazonové vazby mezi hydrazidovou skupinou polymerního nosiče a oxoskupinou derivátu ASA. Po přečištění všech konjugátů od nenavázaného derivátu a dalších nízkomolekulárních látek či nečistot gelovou filtrací byla provedena charakterizace SEC a byla změřena NMR spektra. Naměřené hodnoty shrnuje *Tab. 2*, str. 47.

Tab. 2: SEC a NMR charakterizace polymerních konjugátů s deriváty ASA.

Označení konjugátu	Množství derivátu v násadě [mol. %]	M_n [g·mol ⁻¹]	M_w [g·mol ⁻¹]	\bar{D} (M_w/M_n)	Obsah navázaného léčiva [mol. %]
konjugát P-OAB	4,5	19 900	23 200	1,2	1,5
konjugát P-FAB	4,5	20100	22800	1,1	4,1
	8,0	21200	24300	1,1	7,4
konjugát P-OFAB	4,5	21900	24500	1,1	4,4
	8,0	22900	25800	1,1	7,2

7.4 Stanovení stability derivátů acetylsalicylové kyseliny v prostředí o pH 7,4 a pH 5,0

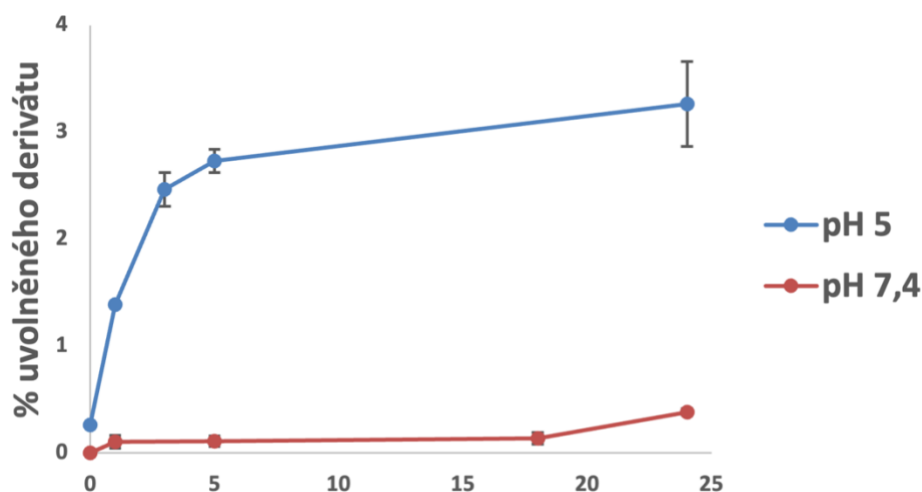
Byla studována stabilita syntetizovaných derivátů ASA v prostředích o pH 7,4 a pH 5,0. Jako téměř stabilní se jevil OFAB. V pH 7,4 bylo za 5 hodin rozloženo pouze 5 % derivátu na deacetylovaný produkt a minoritní množství ASA, za 24 hodin 7 % derivátu. V pH 5 v čase 24 hodin bylo rozloženo pouze 1 % derivátu. Horší stabilitu vykazoval FAB, v případě tohoto derivátu bylo v pH 7,4 rozloženo za 5 hodin 37 % derivátu na 4-hydroxybenzaldehyd, ASA a SA, za 24 hodin bylo rozloženo 48 % derivátu. V pH 5 se tento derivát jevil poměrně stabilní, za 24 hodin se rozložilo pouze 10 % derivátu. Deacetylovaný produkt nebyl téměř pozorován. Nedostatečnou stabilitou se vyznačoval OAB. V pH 7,4 byl již v čase 5 hodin kompletně rozložen na ASA a SA. V pH 5 bylo za 24 hodin rozloženo 63 % derivátu, přičemž deacetylovaný produkt téměř nebyl pozorován ani v jednom z vybraných pH prostředí.

7.5 Uvolňování derivátů acetylsalicylové kyseliny z polymerního nosiče

7.5.1 Uvolňování nízkomolekulárního derivátu acetylsalicylové kyseliny z polymerního konjugátu s (4-formylfenyl) 2-acetoxybenzoátem

HPLC analýzou byla získána data o časovém průběhu uvolňování FAB z polymerního nosiče (7,4 mol. % derivátu na polymeru) v prostředí o pH 7,4 (simulace podmínek krevní plasmy) a pH 5,0 (simulace pH lysozomu) při teplotě 37 °C. Za pomoci sestavené kalibrační přímky nízkomolekulárního derivátu (kalibrační závislost byla měřena v rozsahu koncentrací

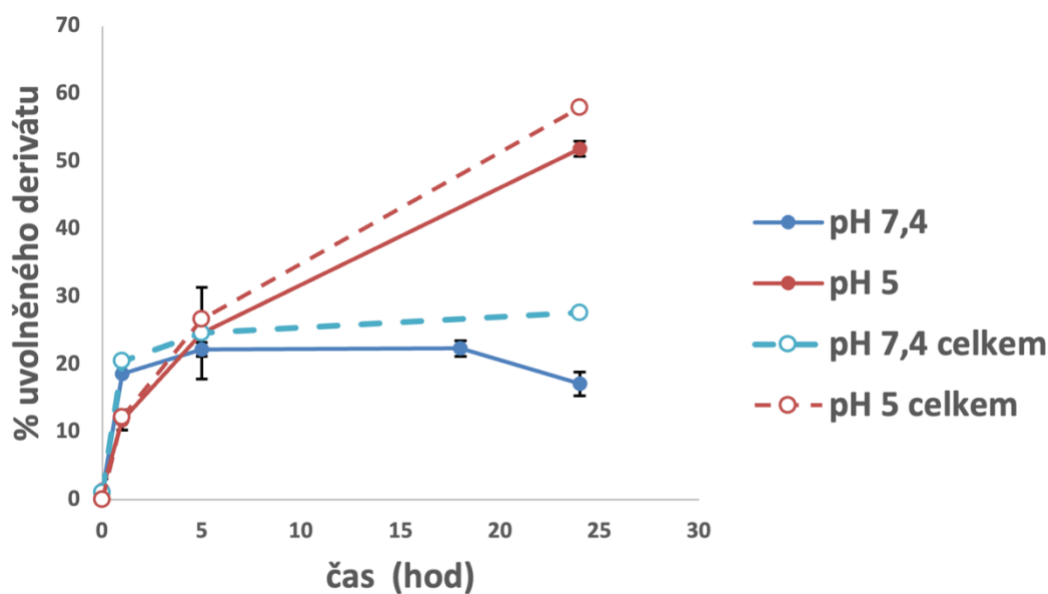
$1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ mg·ml⁻¹ a vynesena jako závislost plochy píku změřené na HPLC na hmotnosti derivátu v nástřiku uvedené v µg, výsledná rovnice přímky: $y = 336\,935x + 19\,055$, korelační koeficient $R = 0,9995$) a stanovení celkového obsahu derivátu (pomocí NMR) navázaného na polymerním nosiči byla získána závislost % uvolněného derivátu z celkového navázaného množství na čase. Získanou závislost zobrazuje *Graf 1*, str. 48. Za 24 hodin došlo v pH 5,0 k uvolnění 3,3 % a v pH 7,4 0,4 % FAB. Jako vedlejší produkt rozkladu byla pozorována ASA a SA, jejich množství však byla tak nízká, že je nebylo možné kvantifikovat.



Graf 1: Časový průběh uvolňování FAB z polymerního nosiče.

7.5.2 Uvolňování nízkomolekulárního derivátu acetylsalicylové kyseliny z polymerního konjugátu s 4-(3-oxobutyl)fenyl] 2-acetoxybenzoátem

S použitím sestavené kalibrační přímky pro OFAB (kalibrační závislost byla proměřena v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ mg·ml⁻¹, data byla vynesena jako závislost plochy píku naměřené na HPLC na hmotnosti derivátu v nástřiku uvedené v µg, rovnice přímky: $y = 533\,121x + 34281$, korelační koeficient $R = 0,9993$) a stanovení celkového množství derivátu (pomocí NMR) navázaného na polymerním nosiči byla kvantifikována HPLC data naměřená v průběhu experimentu uvolňování a vynesena jako závislost % uvolněného derivátu z celkového navázaného množství (4,4 mol. % derivátu na polymeru) na čase. Závislost zobrazuje *Graf 2*, str. 49. Za 24 hodin se v pH 5,0 uvolnilo 51,9 % OFAB, v pH 7,4 bylo maxima uvolněného derivátu (17,1 %) dosaženo v čase 18 hodin. Mimo uvolněného derivátu byl na HPLC chromatogramu pozorován také deacetylovaný produkt a ASA, v nekvantifikovatelném množství také SA. Procentuální zastoupení těchto vedlejších rozkladných produktů určené z poměru ploch píků na HPLC chromatogramu bylo následující: v pH 5,0 bylo v čase 5 hodin pozorováno 7 % deacetylovaného produktu, v čase 24 hodin 10 %. V pH 7,4 byl rozklad výraznější, v čase 5 hodin bylo detekováno 8 % deacetylovaného produktu, v čase 24 hodin již 19 %.



Graf 2: Časový průběh uvolňování OFAB z polymerního nosiče. Datové řady pH 7,4 celkem a pH 5 celkem značí součet ploch uvolněného derivátu a uvolněných vedlejších produktů.

7.6 Biologické testování

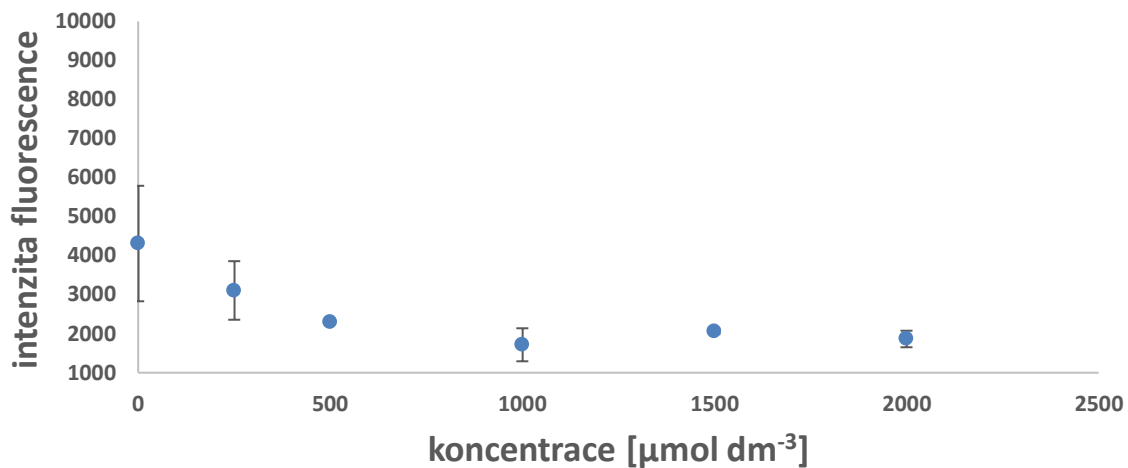
7.6.1 Biologické testování aktivity derivátů acetylsalicylové kyseliny při inhibici cyklooxygenasy 1

Enzymatická aktivita syntetizovaných oxoderivátů a komerčně dostupných látek ASA, SA a hydrazidu SA byla změřena pomocí komerčně dostupného kitu. Po aplikaci vzorků o různých koncentracích na mikrotitrační destičku obsahující enzym COX-1 a jeho substrát, arachidonovou kyselinu, byla fluorimetricky sledována konverze arachidonové kyseliny na PGG₂. Získané hodnoty byly graficky zpracovány a s využitím programu GraphPad Prism byla stanovena IC₅₀, hodnota udávající koncentraci účinné látky působící poloviční inhibici aktivity COX-1, pro ASA, SA a OAB. Získané výsledky shrnuje Tab. 3, str. 49. Pro SA, FAB a OFAB nebylo z naměřených dat možné určit hodnoty IC₅₀. U všech syntetizovaných oxoderivátů však byl patrný trend poklesu intenzity fluorescence s rostoucí koncentrací vzorku, závislosti zobrazují Grafy 3, 4 a 5, str. 50.

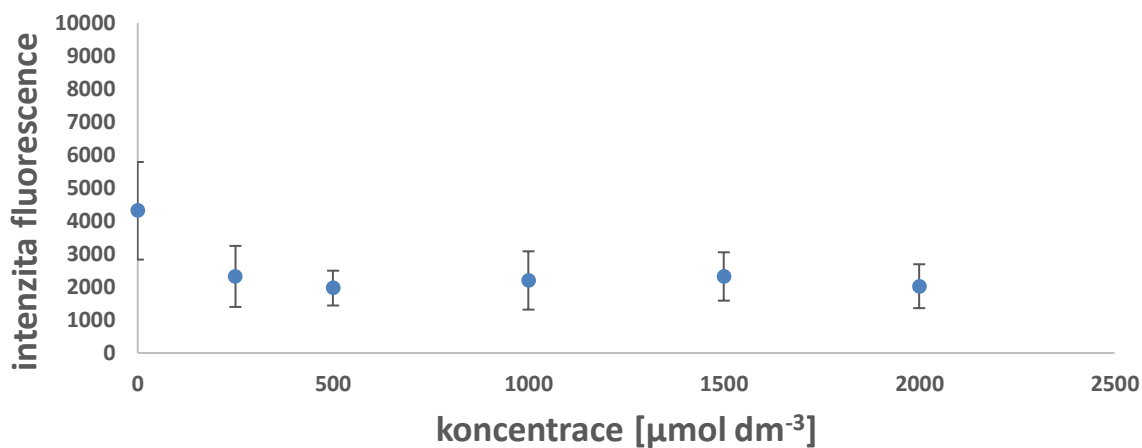
Tab. 3: Hodnoty IC₅₀ pro jednotlivě testované aktivní látky.

Testovaná molekula	IC ₅₀ [μg·ml ⁻¹]
ASA	48±4
SA	ND
hydrazid SA	80±5
OAB	694±4
FAB	ND
OFAB	ND

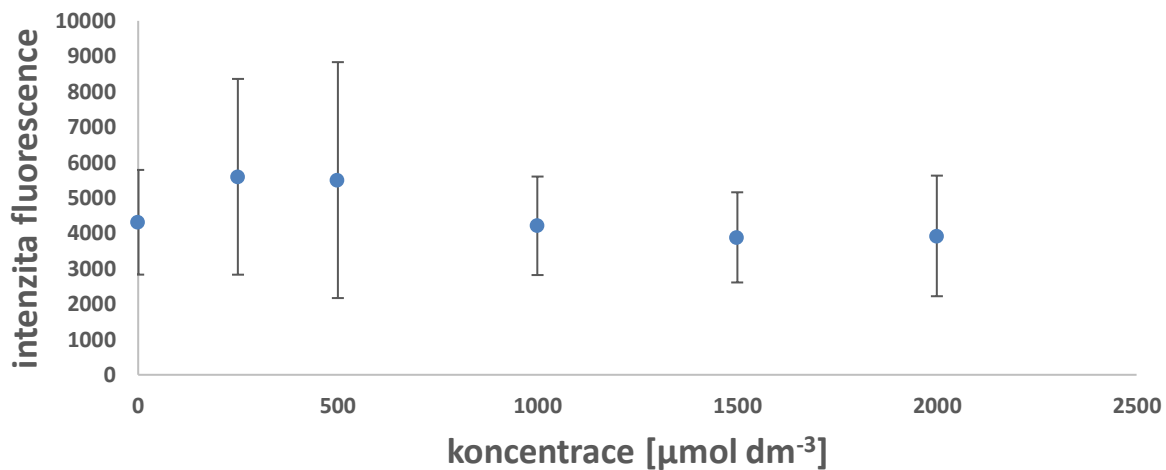
Vysvětlivky: ND, nestanoveno (z angl. Not Determined)



Graf 3: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci OAB. Měření bylo provedeno v kinetickém módu při 535/587 nm.



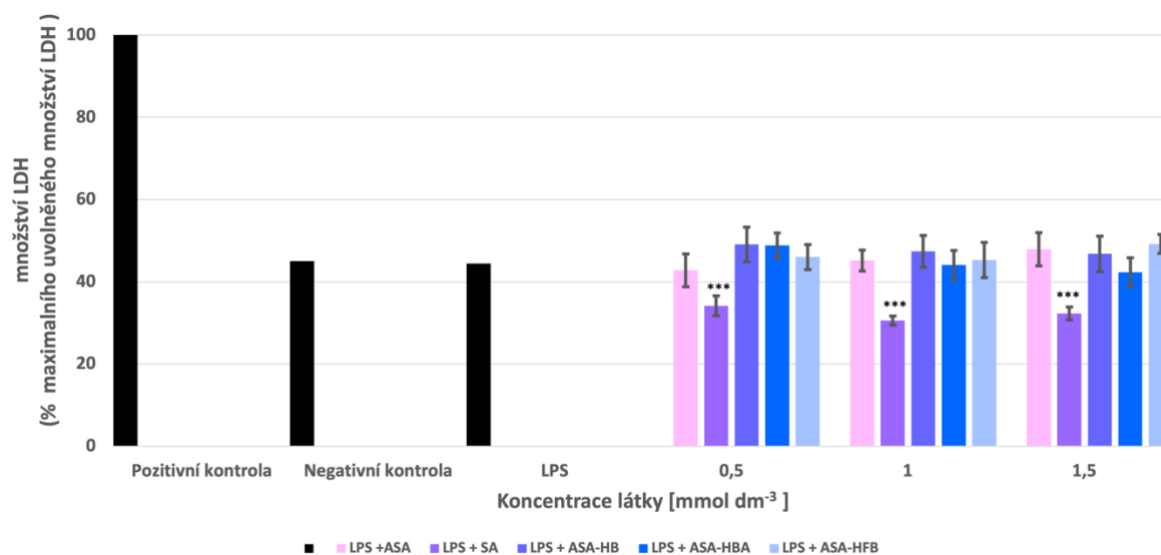
Graf 4: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci FAB. Měření bylo provedeno v kinetickém módu při 535/587 nm.



Graf 5: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci OFAB. Měření bylo provedeno v kinetickém módu při 535/587 nm

7.6.2 Testování toxicity derivátů acetylsalicylové kyseliny pomocí laktátdehydrogenasového testu

Inkubací RAW 264.7 buněk s roztoky ASA, SA a tří syntetizovaných oxoderivátů po aktivaci LPS byla s využitím LDH detekčního kitu stanovena toxicita těchto sloučenin. Získaná data byla vyhodnocena jako množství uvolněné LDH v % po vztažení na jamku s pozitivní kontrolou (maximální uvolněná LDH), viz *Graf 6*, str. 51.



*Graf 6: Stanovení nekrotického působení ASA a SA a tří syntetizovaných derivátů OAB, FAB a OFAB vyjádřené jako množství uvolněné LDH vztažené na hodnotu pozitivní kontroly stanovené pomocí LDH testu. Uvedená data byla vynesena jako průměr hodnot naměřených v pěti experimentech \pm SEM. Statistická signifikance byla vyhodnocena metodou jednorozměrné analýzy rozptylu (ANOVA s Dunnettovým post-hoc testem; *** $P < 0,001$ ve srovnání s negativní kontrolou).*

Z grafu je patrné, že u žádné ze sloučenin nedošlo k výraznému nárůstu produkce LDH a tudíž žádná ze sloučenin nevykazuje významnou toxicitu ve smyslu indukce nekrotického typu buněčné smrti. U všech syntetizovaných derivátů a rovněž u ASA v koncentracích 1 a 1,5 mmol·dm⁻³ lze pozorovat mírný nárůst produkce LDH oproti negativní kontrole. Maximální nárůst produkce LDH se však pohyboval v rozmezí 0,2-4,2 %, což je v rámci chyby od průměru. Statistická signifikace vyhodnocená metodou ANOVA s Dunnettovým post-hoc testem ve srovnání s negativní kontrolou prokázala, že v porovnání s těmito kontrolami odchylky produkce LDH nejsou statisticky signifikantní. Pouze data pro SA ve všech zmíněných koncentracích byla vysoce signifikantní, v tomto případě ale ve smyslu snížení produkce LDH oproti negativní kontrole.

8. DISKUZE

8.1 Syntéza derivátů acetylsalicylové kyseliny

Za účelem syntézy vhodných derivátů ASA nesoucích funkční skupiny pro následné připojení na polymerní nosič přes pH-senzitivní vazbu bylo provedeno celkem šest reakcí. Nejprve byla provedena acetylace hydrazidu SA (schéma reakce zobrazuje *Obr. 11*, str. 33). Zavedení hydrazidu na molekulu ASA by umožnilo připojit tento derivát na HPMA kopolymer s oxoskupinami podél řetězce. Při této reakci ovšem vznikala směs produktů s blízkými retenčními časy na HPLC chromatogramu a produkt, pokud byl přítomen, by bylo téměř nemožné oddělit od vedlejších produktů reakce. Pravděpodobně vznikla směs produktů s acetylovanou hydrazidovou i hydroxy skupinou. Z těchto důvodů byla zvolena jako alternativa reakce přípravy hydrazidu ASA její reakcí s *tert*-butyl karbazátem (*Obr. 12*, str. 34). Tato reakce byla provedena dvakrát v různých reakčních podmínkách. Nejprve byla směs ponechána reagovat za pokojové teploty, bez chlazení a za přístupu vzduchu (reakce A). Následnou charakterizací této reakční směsi bylo detekováno velké množství vedlejších produktů. Při reakci docházelo k deacetylaci ASA, tedy vzniku salicylové kyseliny, která se dále účastnila vedlejších reakcí. Podmínky reakce bylo tedy potřeba optimalizovat, aby nedocházelo k rozkladným reakcím, a tedy ke vzniku směsi produktů. Analýzou reakční směsi po provedení reakce v podmínkách argonové atmosféry za chlazení ledovou lázní (reakce B) byla potvrzena přítomnost požadovaného produktu, hydrazidu ASA s navázanou Boc-chráničící skupinou. Po odstranění této chráničící skupiny reakcí s TFA však došlo i k deacetylaci produktu a vznikl hydrazid SA. Podmínky pro odstranění Boc-chráničící skupiny by zřejmě vyžadovaly další optimalizaci, nicméně vzhledem k nejasnému výsledku a náročnosti další optimalizace bylo od přípravy hydrazidu ASA upuštěno.

V návaznosti na negativní výsledky výše popsaných reakcí jsme se rozhodli změnit strategii přípravy polymerních konjugátů. Byly provedeny tři reakce s cílem syntetizovat oxoderivát ASA obsahující keto skupinu, který by bylo možné připojit na HPMA kopolymer s hydrazidovými skupinami. Podařilo se úspěšně syntetizovat tři deriváty, OAB, FAB, OFAB, připravené z ASA a 3-hydroxybutanonu, 4-hydroxybenzaldehydu a 4-(4-hydroxyfenyl)-2-butanonu s cílem připravit deriváty lišící se strukturou v okolí oxoskupiny (jejich struktura by mohla příznivě ovlivnit rychlost uvolňování derivátu z polymerního konjugátu) a také s cílem připravit deriváty lišící se stabilitou esterové vazby mezi ASA a oxospojku. FAB byl již publikován ([50]), v případě OAB a OFAB jde o nově syntetizované deriváty, které ještě nebyly publikovány (k datu 20.5.2021). Syntéza těchto látek byla provedena mechanismem Steglichovy esterifikace s využitím karbodiimidu k aktivaci karboxylové skupiny ASA. Reakce byly nejprve provedeny s využitím karbodiimidu EDC·HCl, opakovaně ale docházelo k nízkým výtěžkům reakce (zhruba 15 % v případě OAB

a zhruba 35 % v případě FAB). Byl proto sledován vliv volby karbodiimidu na výtěžek reakce a zmíněné reakce byly provedeny i s karbodiimidem DIC. Řešení obdobné problematiky bylo nalezeno v literatuře [51], kde byl sledován vliv typu karbodiimidu na průběh reakce ASA. Karbodiimid EDC obsahuje ve své struktuře amin a mohl by tak zapříčinit odstoupení acetylové skupiny (bazickou hydrolyzou esteru) za vzniku vyššího množství vedlejšího deacetylovaného produktu, a snížit tak výtěžek reakce. Byl však používán ve formě hydrochloridu, ve které je aminová skupina chráněná HCl. Výhodou použití EDC ve formě soli je možnost následné extrakce zbytků EDC·HCl a močovinnového produktu (vedlejší produkt reakce) do vodné fáze. Nižší výtěžky však mohl zapříčinit právě tento způsob odstranění vedlejšího močovinnového produktu (extrakce), během kterého dochází ke ztrátám produktu. Reakcí s DIC bylo dosahováno vyšších výtěžků (v případě OAB došlo ke zvýšení výtěžku až o zhruba 17 % a v případě FAB zhruba o 10 %), proto pro syntézu OFAB byl již použit pouze DIC. Rovněž byly provedeny reakce s karbodiimidem DCC, při zmíněném postupu se ale neukázal být vhodný. Vedlejší produkt reakce, dicyklohexylmočovina, se srážela v reakční směsi nadále i po rozpuštění v MeOH), a působila tak potíže při čištění reakční směsi FLASH chromatografickým systémem. V případě DIC takový problém nebyl pozorován, jelikož diisopropylmočovina je v MeOH rozpustná, a je možné ji oddělit na koloně. Dicyklohexylmočovina by musela být pravděpodobně oddělena krystalizací. Vliv na výtěžky reakcí mohl mít rovněž DMAP. Studie [51] ukázala, že DMAP může ve vyšších koncentracích zapříčinit ovlivnění reakce za vzniku vyššího množství deacetylovaného produktu. Nicméně bez přítomnosti DMAP docházelo pouze ke vzniku aktivovaného meziproductu, a přítomnost DMAP se tak ukázala být klíčová pro správný průběh reakce. Rovněž byla provedena optimalizace přidaného množství DMAP, při přidavku 1,5 mol. % probíhaly reakce s vyššími výtěžky, než při přidavku 1 mol. %, ale již při přidavku 4 mol. % docházelo k rozkladu produktu na deacetylovaný derivát. Ke snížení výtěžků mohlo dojít také vlivem ztrát při čištění reakčních směsí FLASH chromatografií.

8.1 Polymerní nosič a polymerní konjugáty

8.1.1 Syntéza polymerního nosiče

Kopolymer poly(HPMA-*co*-Ma-Ahx-NHNHBoc) byl úspěšně syntetizován mechanismem RAFT polymerizace a následně charakterizován. Polymerizace probíhala 16 hodin při 40 °C, jde tedy o nízkoteplotní polymerizaci, pro kterou byl použit nízkoteplotní iniciátor V-70 a trithiokarbonátové přenosové činidlo. Charakterizace pomocí SEC potvrdila polymer s úzkou distribucí molárních hmotností s disperzitou blízkou jedné. Nižší výtěžek reakce (kolem 60 %) byl pravděpodobně způsoben příliš krátkou reakční dobou polymerizace. Vyšších výtěžků (až do 85 %) je možné dosáhnout RAFT polymerizací s použitím iniciátoru V-70 probíhající po dobu 72 hodin při teplotě 30 °C [9]. Obsah hydrazidových skupin byl stanoven

dvěma metodami, pomocí NMR spektroskopie (7,5 mol. %) a s využitím TNBSA metody (6,8 mol. %). Obě metody vykazují určitou míru chybovosti, avšak NMR spektroskopie by měla poskytnout přesnější údaje. Obsah hydrazidových skupin na polymerním nosiči byl dostatečný pro další syntetické kroky a vazbu derivátů ASA.

8.1.2 Syntéza polymerních konjugátů

Vázání nízkomolekulárních derivátů na polymerní nosič za vzniku hydrazonové vazby se obvykle provádí v prostředí MeOH s přidavkem kyseliny octové, nicméně v tomto rozpouštědle byla pozorována vyšší míra rozkladu derivátů ASA na deacetylované produkty, proto byly tyto reakce provedeny v prostředí bezvodého DMSO. Průběh reakcí byl sledován pomocí HPLC, ve většině případů byla pozorována více než 90% účinnost vázání derivátů na polymerní nosič. Navázání derivátů vedlo dle očekávání k odpovídajícímu zvýšení molární hmotnosti konjugátů uvedených v *Tab 2*, str. 47 a zároveň nedocházelo k výraznému rozšíření jejich distribuce. Je možné konstatovat, že se podařilo navázat 4,1-7,4 mol. % derivátu v závislosti na množství derivátu v zásadě v případě konjugátů P-FAB a P-OFAB (*Tab 2*, str. 47). U konjugátu P-OAB došlo opakovaně k navázání nízkého množství derivátu. Při navýšení množství derivátu v zásadě (ekvivalent k 8 mol. % hydrazidových skupin) se podařilo navázat pouze 3,6 mol. % derivátu. Nicméně došlo k rozšíření disperzity polymerního nosiče ($D 1,7$), zřejmě v důsledku nekovalentních interakcí polymerních řetězců. Přestože se navázalo pouze 3,6 mol. % derivátu, nebyly v NMR spektru pozorovány žádné volné hydrazidové skupiny. Tyto skupiny tedy mohly být kromě ASA derivátu obsazeny samotným 4-hydroxy-2-butanonem vznikajícím *in situ* při reakci. Vzhledem k nízké stabilitě OAB (kapitola 8.2.2), mohlo již během vázání derivátu na polymer dojít k jeho hydrolytickému rozkladu. Přestože reakce probíhala v bezvodém DMSO, malé množství vody obsahuje jak ledová kyselina octová, tak i polymer (okolo 2 hm. %) a k uvolnění molekuly vody dochází také při vzniku hydrazonové vazby. Přítomnost malého množství vody tak mohla podpořit hydrolyzu esteru a mohlo dojít k navázání samotného 4-hydroxy-2-butanonu. Vzhledem k tomu, že OAB ani 4-hydroxy-2-butanon nemají ve své struktuře více funkčních skupin, díky kterým by se mohly navázat na polymerní nosič, nemohlo při nárůstu disperzity polymerního konjugátu jít o klasické síťování. Předpokládáme, že diskutované rozšíření disperzity je způsobené nekovalentními interakcemi, např. vodíkovými vazbami, které mohou vznikat mezi OH skupinami 4-hydroxy-2-butanonu navázaného na polymer navzájem či mezi těmito OH skupinami a zbylými volnými hydrazidovými skupinami.

Jako metoda stanovení celkového navázaného množství derivátů na polymerní nosič byla zvolena NMR spektroskopie. Metoda využívající HPLC stanovení obsahu derivátů po jejich celkové hydrolyze z polymerních konjugátů pomocí přidavku TFA a následné extrakce DCM nebylo možné použít, protože vykazovala značné nepřesnosti. Důvodem nepřesného stanovení mohla být nízká účinnost extrakce, nedostatečné uvolnění derivátu či stabilita

jednotlivých hydrazonových vazeb, přičemž například u P-FAB bylo prokázáno, že přidavkem TFA není možné ani po 48 hodinách uvolnit veškeré množství navázaného derivátu, a tedy přesně určit celkové navázané množství. Při této 48hodinové hydrolyze navíc docházelo k vyšší míře rozkladu derivátu (na ASA, SA a deacetylovaný produkt), což vedlo ke ztížení podmínek stanovení.

8.2 Stabilita hydrazonové vazby a oxoderivátů acetylsalicylové kyseliny

8.2.1 Stabilita oxoderivátů acetylsalicylové kyseliny

Syntetizované oxoderiváty ASA byly zvoleny tak, aby se ideálně lišily stabilitou své esterové vazby. Pro biologické aplikace výhodnější než doprava derivátu ASA, by byla možnost dopravy ASA samotné, tedy příprava derivátu ASA, který by posléze *in vivo* uvolnil samotnou aktivní látku. Zavedením oxospojky na molekulu ASA totiž dochází k zablokování COOH skupiny, která je (mimo acetylu) také důležitá pro funkci na cyklooxygenasách (viz kapitola 4.2). Před zahájením experimentu uvolňování byla nejprve ověřena stabilita samotných oxoderivátů ASA (zejména jejich esterových vazeb) v prostředích o různých pH a uvažován vliv jejich stability na případné výsledky experimentů jejich uvolňování z polymerního nosiče. Esterové vazby derivátů vykazovaly vyšší stabilitu v pH 5,0, než v pH 7,4, což je v souladu s obecně známou hydrolytickou stabilitou esterových vazeb. Nejlabilnější esterovou vazbu obsahuje OAB, který se rychle a ochotně rozkládal na ASA a SA, kdy během 5 hodin došlo v pH 7,4 k úplnému rozkladu. Zmíněná výrazná labilita esteru OAB může souviset s jeho rozpustností ve vodě (vyznačuje se ve vodě nejlepší rozpustností ze všech tří zmíněných derivátů). Derivát OAB je tedy zřejmě příliš labilní pro zmíněnou aplikaci, neboť by docházelo k velmi rychlé degradaci při jeho transportu již v krevním řečišti. Naopak nejstabilnější se prokázala být esterová vazba OFAB, který měl tendence se rozkládat spíše na deacetylovaný produkt (7 % za 24 hodin v pH 7,4), zatímco ester zůstal téměř stabilní v obou pH. U FAB byl rozklad na ASA a SA pozorován, nebyl ale tak markantní jako u OAB. Během 24 hodin v pH 7,4 došlo k rozložení zhruba 48 % derivátu. Vzhledem ke stabilitě derivátu se tedy OFAB jeví jako nejlepší volba.

Experiment ověření stability oxoderivátů zahrnuje analýzu celé reakční směsi, a lze tak touto metodou stanovit všechny rozkladné vedlejší produkty, včetně ASA a SA. Problém může nastat v případě experimentu uvolňování, na který je tato metoda neaplikovatelná a analyzují se pouze látky, které přejdou při extrakci do DCM fáze. Jelikož se deriváty OAB a FAB rozkládají převážně na ASA a SA, není možné tento rozklad při zvolené metodě uvolňování spolehlivě pozorovat (byl orientačně stanoven extrakční koeficient oxoderivátů ASA a samotné ASA a SA a zatímco syntetizované deriváty přechází do DCM téměř ze 100 %, ASA a SA do organické fáze téměř vůbec nepřechází, a nelze je tak na HPLC v celém rozsahu jejich množství pozorovat). Za předpokladu, že po navázání derivátu na polymerní nosič a následném uvolnění

nebude jejich stabilita výrazně změněna ani ovlivněna přítomností polymeru, byly provedeny experimenty uvolňování FAB a OFAB z polymerního nosiče. Jedná se však o orientační výsledky a v případě uvolňování FAB z polymerního nosiče mohlo dojít ke zkreslení křivky uvolňování (více v kapitole 8.2.2)

8.2.2 Stabilita hydrazonové vazby

Syntetizované deriváty ASA bylo možné díky zavedené oxoskupině připojit na polymerní nosič a podařilo se tak připravit polymerní konjugáty nesoucí aktivní molekulu ASA ve formě jejich esterových derivátů. Rozdílná struktura oxospojek, 4-hydroxy-2-butanonu, 4-hydroxybenzaldehydu a 4-(4-hydroxyfenyl)-2-butanonu, umožnila po připojení na polymerní nosič získat hydrazonově vázané deriváty ASA s rozdílnou rychlostí degradace v čase a stabilitou v prostředí o různých pH.

V průběhu stanovení stability samotných oxoderivátů (viz předchozí kapitola) bylo zjištěno, že jako velmi stabilní se jevil OFAB, výsledky získané v průběhu experimentu uvolňování tohoto derivátu z polymerního nosiče by tedy neměly být zatíženy téměř žádnou chybou. Nižší stabilitu vykazoval FAB, jehož stabilita v prostředí o pH 7,4 (rozklad 48 % derivátu za 24 hodin) by mohla zapříčinit ovlivnění průběhu křivky uvolňování z polymerního nosiče. Z důvodu extrémní nestability OAB nebyl s konjugátem P-OAB experiment uvolňování proveden. Výsledky uvolňování tohoto derivátu z polymerního nosiče by nebyly konzistentní a byly by zatíženy velkou chybou. Navíc, vzhledem k velmi rychlé hydrolyze derivátu v pH 7,4, ke které zřejmě dochází i při samotném vázání derivátu na polymerní nosič (viz kapitola 8.1.2), se OAB nejvíce jeví jako dobrý kandidát pro přípravu polymerních léčiv s cílem pasivní akumulace v zánětu.

Oxoderivát ASA FAB, obsahující ve své struktuře 4-hydroxybenzaldehyd, tedy aromatický aldehyd, se vyznačuje nejpomalejším uvolňováním z polymeru ze všech syntetizovaných derivátů. Vykazuje vysokou stabilitu nejen v prostředí o pH 7,4 (za 24 hodin se uvolnilo méně než 1 % z celkového navázaného množství), ale i v prostředí o pH 5,0 (za 5 hodin uvolněno méně než 3 %), závislost zobrazuje *Graf 1*, str. 48. Z důvodu nízké stability samotného derivátu FAB a jeho rozkladu převážně na ASA a SA, které není téměř možné extrahovat do DCM fáze, však mohlo dojít k ovlivnění průběhu této křivky ve smyslu jejího falešného snížení v časech 5, 18 a 24 hodin. V případě P-FAB by mohl poměrně labilní ester v kombinaci s relativně stabilním hydrazonem být využit přímo k dopravě samotné ASA do zánětlivého ložiska a vytvořit tak polymerní dlouhocirkulující depo léčiva. Toto depo by umožnilo průběžné uvolňování a dlouhodobější metabolizování aktivní látky na rozdíl od podání samotného nízkomolekulárního léčiva, které je obecně rychle metabolizováno a vyloučeno z organismu.

Naproti tomu oxoderivát ASA (OFAB), syntetizovaný s využitím 4-(4-hydroxyfenyl)-2-butanonu, se z polymerního konjugátu uvolňuje v prostředí o pH 5,0

poměrně rychle (za 5 hodin uvolněno až 25 %, za 24 hodin více než 50 %), závislost zobrazuje *Graf 2*, str. 49. V pH 7,4 byla stanovena významně vyšší stabilita (za 24 hodin uvolněno 17 %). V případě OFAB se podařilo kvantifikovat deacetylovaný produkt a bylo možné detekovat i malá množství ASA a SA. Uvedený rozklad OFAB na deacetylovaný produkt je zodpovědný za pokles křivky znázorňující jeho uvolňování v prostředí o pH 7,4 (viz *Graf 2*, str. 49). Při sečtení ploch píků všech uvolněných složek by byl trend křivky i nadále vzestupný (jak demonstruje křivka součtu uvolněného derivátu a vedlejších produktů), v důsledku rozkladu však došlo k poklesu množství uvolněného derivátu v čase 24 hodin oproti množství v čase 18 hodin. Je zajímavé, že vazbou OFAB na polymer, případně pouhou přítomností polymeru ve směsi, byla ovlivněna stabilita derivátu OFAB. Zatímco při sledování stability samotného derivátu OFAB došlo ke vzniku pouze 7 % deacetylovaného produktu za 24 hodin v pH 7,4 a v pH 5,0 rozklad téměř nebyl pozorován (kap. 7.4 a 8.2.1), při uvolňování OFAB z polymeru P-OFAB bylo po extrakci do DCM fáze za 24 hodin v pH 7,4 kvantifikováno až 19 % deacetylovaného produktu, v pH 5,0 to bylo 10 %. Je však možné konstatovat, že navzdory pozorovanému rozkladu, je polymerní konjugát P-OFAB vhodný pro cílenou dopravu léčiva, jelikož během cirkulace v krevním řečišti by podle tohoto modelu došlo k uvolnění malého množství léčiva z konjugátu a k významnému zrychlení uvolňování by došlo až po vstupu do zánětlivého ložiska s nižším pH.

Rozdílná pH labilita hydrazonových vazeb tvořených jednotlivými oxospojkami se odvíjí zejména od přítomnosti konjugovaného systému dvojných vazeb v blízkosti hydrazonové vazby a potenciální možnosti zapojení hydrazonu do tohoto systému. Významnou roli hraje také faktor sterického bránění okolních skupin [52]. V nedávné době byla provedena studie zabývající se vlivem substituentů přítomných v okolí hydrazonové vazby na její stabilitu v různých pH podmínkách [53]. Z této studie vyplývá, že obecně lze za stabilnější považovat hydrazonovou vazbu vzniklou reakcí z ketonu než z aldehydu (pravděpodobně souvisí s faktorem sterického bránění, přičemž platí trend, že skupiny méně stericky náročné odstupují snadněji), nicméně nejpomalejšími spojkami se ukazují být hydrazony vzniklé derivatizací z aromatických aldehydů (vlivem zapojení $-C=N$ -hydrazonové vazby do konjugovaného systému dvojných vazeb aromatického benzenového jádra). Přestože se jednotlivé spojky mohou výrazně lišit rychlostí své degradace, nelze žádnou spojku obecně označit za ideální, jelikož volba spojky se odvíjí od konkrétní biologické aplikace. Oxospojky použité v rámci této práce se chovají dle zmíněných očekávání. U derivátu ASA tvořeného 4-hydroxybenzaldehydem došlo k zapojení hydrazonu do konjugovaného systému aromatického jádra, a tato spojka se tak vyznačuje extrémní stabilitou. U derivátu ASA tvořeného 4-(4-hydroxyfenyl)-2-butanonem je na rozdíl od derivátu s 4-hydroxybenzaldehydem poloha aromatického jádra posunuta o 2 uhlíky vzhledem k hydrazonové vazbě, a nemůže tak docházet k zapojení hydrazonu do konjugovaného systému dvojných vazeb, a spojka je tak více hydrolyticky labilní.

8.3 Biologické testování

Stanovení toxicity na úrovni nekrózy bylo provedeno s ASA, SA a syntetizovanými deriváty pomocí LDH testu. Metoda je založena na uvolňování LDH narušenou membránou poškozených (nekrotických) buněk. Laktátdehydrogenasa oxiduje laktát na pyruvát za současné redukce NAD^+ na $\text{NADH} + \text{H}^+$. Následně dochází k přenosu H^+ k tetrazoliové soli iodonitrotetrazoliu (INT) a za reoxidace NADH za vzniku NAD^+ dochází současně k formaci červeně zbarveného formazanu, který je kolorimetricky detekován při vlnové délce 490 nm. Významná toxicita na úrovni nekrotického působení nebyla potvrzena u žádné ze sloučenin. Přestože byl u všech oxoderivátů pozorován nárůst (0,2-4,2 %) produkce LDH oproti negativní kontrole, je tento nárůst statisticky neprůkazný (hodnoty nejsou signifikantní oproti negativní kontrole, pouze u hodnoty SA jsou vysoce signifikantní, avšak ve smyslu snížení produkce LDH), lze považovat sloučeniny za netoxické z hlediska toxicity na nekrotické úrovni. Všechny uvedené sloučeniny by tedy mohly být využitelné pro biologické aplikace, nicméně pro úplné ověření bezpečnosti sloučenin by bylo nezbytné provést podrobnější testy uvažující i další možnosti cytotoxického působení.

V dalším kroku byla COX-1 inhibičním kitem stanovena inhibiční aktivita zmíněných sloučenin a hydrazidu salicylové kyseliny při inhibici COX-1 a ze získaných dat byly vyhodnoceny hodnoty IC_{50} pro ASA, hydrazid SA a OAB. V případě SA se nepodařilo prokázat její inhibiční aktivitu, přestože podle literatury je hodnota její IC_{50} $490 \pm 120 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [54]. Není znám důvod tohoto výsledku, mohlo dojít k chybě i na straně výrobce komerčně dostupné látky nebo mohla být látka jinak poškozená. Všechny kontroly testu (včetně kontroly inhibice enzymu, tj. inhibitor COX-1 dodávaný v rámci kitu) byly plně funkční a provedení experimentu bylo dodrženo ve všech třech opakováních experimentu přesně dle doporučení výrobce. U FAB a OFAB nebyla stanovena hodnota IC_{50} , nicméně bylo pozorováno snížení intenzity fluorescence odrážející koncentraci PGG_2 se zvyšující se koncentrací vzorku (viz *Grafy 3, 4 a 5*, str. 50). U všech testovaných sloučenin kromě SA tedy byla potvrzena inhibiční aktivita COX-1 (u OFAB pouze v nepatrné míře, nelze přesvědčivě určit kvůli zkreslení výsledků v důsledku vysrážení, viz dále). Komerčně dostupné sloučeniny ASA a hydrazid SA měly hodnoty IC_{50} nižší v porovnání se syntetizovaným derivátem OAB a jsou tedy při inhibici COX-1 účinnější (u syntetizovaných derivátů byla zablokována COOH skupina, důležitá pro inhibiční úlohu sloučeniny). Inhibiční aktivita FAB a OFAB je vzhledem k tomu, že IC_{50} nešla stanovit, rozhodně nižší než v případě komerčně dostupných ASA a hydrazidu SA, inhibiční aktivitu přesto vykazují (u OFAB se jedná spíše o hypotézu). Získané hodnoty pro ASA se liší od výsledků nalezených v literatuře. V publikacích [54, 55] byla nalezena hodnota IC_{50} $20 \pm 11 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $21,5 \pm 6,4 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tyto hodnoty nalezené v literatuře se liší od hodnot naměřených pomocí COX-1 zkoušky (pro ASA jsou hodnoty získané pomocí COX-1 inhibice až $14 \times$ vyšší než hodnoty dostupné v literatuře). Důvodem mohla být jiná metodika experimentů, COX-1 zkouška je bezbuněčná, kdežto v literatuře nalezené hodnoty byly

vyhodnocovány pomocí produkce PGE₂ mikrosomálními buňkami a produkce TXA₂ krevními destičkami. Nejúčinnějším inhibítozem COX-1 ze zmíněných sloučenin se ukázal být hydrazid SA. Hydrazid SA by tak mohl být využit pro konstrukci jednoduchého systému dopravujícího léčivo po jeho připojení na polymer s oxoskupinami. Vzhledem k nižší aktivitě syntetizovaných oxoderivátů v porovnání s komerčně dostupnými látkami by je pro vyvolání stejného efektu bylo potřeba dávkovat ve vyšším množství. Nicméně vazba sloučenin na polymer by mohla umožnit jejich cílený transport přímo do poškozené tkáně, tím zvýšit celkovou bilanci dopravované sloučeniny a mít vliv na konečné dávkování polymerních systémů. Vliv na výsledky FAB a OFAB mohla mít mimo jiné jejich špatná rozpustnost v PBS ve vysokých koncentracích, pro účely testu musely být pipetovány v podobě mléčné suspenze. Tuto vlastnost je možné pozorovat na závislosti intenzity fluorescence na koncentraci OFAB (*Graf 5*, str. 50), kde si lze povšimnout zvýšené fluorescence v důsledku vysrážení. Vazba na polymer by však problémy s rozpustností měla odstranit. Případný rozklad derivátů mohl mít dopad na ovlivnění výsledků. COX-1 test byl změřen v časovém rozmezí dvou hodin, z nichž pouze 30 minut byly deriváty rozpuštěny v PBS, i v této krátké době však např. u OAB, jehož stabilita je velmi nízká, mohlo dojít k rozkladu na ASA a SA.

Další možností, jak využít připravené polymerní systémy je ovlivnění COX-2 a role těchto polymerních systémů v indukci syntézy resolvinů v zánětem postižené tkáni. V tomto případě by doprava derivátů ASA mohla sloužit k vytvoření prostředí v rámci zánětlivého ložiska, které je svým složením protizánětlivé a umožňuje tzv. vyřešení zánětu, z angl. „resolution of inflammation“, které je způsobeno právě produkcí resolvinů v rámci zánětu. V tomto případě by pro vyvolání přímého protizánětlivého efektu mohlo být využito protizánětlivé léčivo jiné než ASA, účinné již při nižších dávkách.

9. ZÁVĚR

Polymerní léčiva jakožto systémy pro cílenou dopravu léčiv jsou dnes jedním z důležitých témat výzkumu léčiv nové generace. Klíčovým prvkem pro jejich úspěšnou syntézu je vhodná derivatizace zvoleného léčiva v případě, že léčivo nemá vhodné funkční skupiny pro vazbu na polymer. Zavedením vhodné funkční skupiny na dopravované léčivo lze modifikovat rychlost jeho uvolňování z polymerního nosiče v různých buněčných kompartmentech a tělních orgánech.

Cílem této práce bylo syntetizovat deriváty ASA s rozdílnou labilitou jejich pH senzitivní spojky po navázání na vhodný polymerní nosič. Takto vzniklé polymerní konjugáty by měly v ideálním případě vykazovat dostatečnou stabilitu v prostředí o pH=7,4 (pH krevní plazmy) a naopak v prostředí o pH nižším (v této práci experiment proveden v podmínkách o pH 5, pH lysozomu) by se vazba mezi polymerním nosičem a nízkomolekulárním derivátem měla vyznačovat vyšší mírou lability a rychleji podléhat hydrolyze.

Celkem byly úspěšně syntetizovány tři oxoderiváty ASA (OAB, FAB, OFAB), které se následně úspěšně podařilo navázat na polymerní nosič (jako polymerní nosič byl syntetizován kopolymer poly(HPMA-*co*-Ma-AhX-NHNH₂)) a vyhodnotit rychlost uvolňování ASA derivátů z nosiče v prostředí o různých pH. Oxoderivát OAB vykázal vysokou nestabilitu a je tedy nevhodný pro další využití v protizánětlivé terapii, s polymerním konjugátem P-OAB nebyly provedeny další testy. Polymerní konjugát P-FAB se vyznačoval přílišnou mírou stability hydrazonové vazby pro využití k cílené dopravě léčiv, a mohl by být využit buď jako dlouhodobě cirkulující depo uvolňující derivát, potažmo ASA (vzhledem k nestabilitě esterové vazby derivátu FAB). Polymerní konjugát P-OFAB podléhal poměrně rychlé hydrolyze v prostředí o pH 5 a naopak v prostředí o pH 7,4 byl významně stabilnější, navíc se derivát OFAB jevil jako nejstabilnější z derivátů ASA. Konjugát P-OFAB tedy představuje nejslibnější variantu pro požadované aplikace, navíc by v důsledku zvýšené lability esterové vazby mohl být využit pro dvojkrokovou dopravu ASA do cílové tkáně, kdy by v prvním kroku došlo k uvolnění derivátu ASA v zánětlivé tkáni, kde by se následně derivát rozpadl na samotnou ASA. Biologické testování ASA, SA a jejich derivátů, neprokázalo toxicitu na nekrotické úrovni ani jedné ze studovaných sloučenin. Zároveň se všechny tři deriváty vyznačovaly inhibiční aktivitou COX-1 (OFAB pravděpodobně, bylo by potřeba provést další testy), avšak pouze u OAB se podařilo stanovit IC₅₀, tato hodnota byla zhruba desetkrát vyšší než hodnota IC₅₀ ASA. Je možné konstatovat, že všechny naplánované dílčí cíle byly úspěšně splněny.

Acetylsalicylová kyselina představuje levné a dostupné léčivo s širokým spektrem uplatnění. Mezi její hlavní benefity se řadí mimo jiné i její protizánětlivé účinky. Velkou nevýhodou je ale vysoké dávkování spojené s nepříjemnými a život pacienta ohrožujícími účinky. Vazbou ASA či jejích syntetizovaných derivátů na polymerní nosič by však bylo možné významně prodloužit dobu setrvání ASA v organismu po podání, umožnit její dopravu

a uvolnění v zánětlivé tkáni a vysoké dávky potřebné pro léčebný účinek snížit a tím omezit také míru nežádoucích účinků.

Acetylsalicylová kyselina se na rozdíl od ostatních léčiv ze skupiny nesteroidních antiflogistik vyznačuje schopností indukovat syntézu resolvinů, protizánětlivých mediátorů obnovujících normální buněčnou funkci v zánětem postižené tkáni. Resolviny je obtížné syntetizovat uměle a jejich syntéza je nákladná. Acetylsalicylová kyselina by tak mohla představovat poměrně levnou a účinnou cestu, jak syntézu těchto mediátorů v rámci postižené tkáně indukovat. Dalším možným způsobem aplikace by pak bylo podat ASA připojenou na polymerním nosiči s cílem indukovat syntézu resolvinů v kombinaci s dalším (v nižších koncentracích účinným) protizánětlivým léčivem.

Tato práce se z biologického hlediska zaměřuje spíše na ověření protizánětlivých účinků syntetizovaných derivátů ASA sledováním inhibice COX-1 a obecně se věnuje syntéze a charakterizaci derivátů a polymerních konjugátů. Cílem dalšího výzkumu by tak mohla být interakce syntetizovaných sloučenin s COX-2, inducibilní formou cyklooxygenázy, klíčovou právě pro syntézu resolvinů.

Použitá literatura

- [1] PAHWA, Roma a Ishwarlal JIALAL. *Chronic Inflammation - StatPearls - NCBI Bookshelf*. 2019
- [2] SCHRÖR, Karsten. *Acetylsalicylic Acid*, 2009. doi:10.1002/9783527625994
- [3] KOPEČEK, Jindřich a Jiyuan YANG. Polymer nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **156**:1, 40–64 (2020). doi:10.1016/j.addr.2020.07.020
- [4] RINGSDORF, Helmut. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J Polym Sci Polym Symp* [online]. **51**:1, 135–153 (1975). doi:10.1002/polc.5070510111
- [5] KHANDARE, Jayant a Tamara MINKO. Polymer–drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs. *Progress in Polymer Science*. **31**:4, 359–397 (2006). doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.09.004
- [6] ULBRICH, Karel, Kateřina HOLÁ, Vladimír ŠUBR, Aristides BAKANDRITSOS, Jiří TUČEK a Radek ZBOŘIL. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chemical Reviews*. **116**:9, 5338–5431 (2016). doi:10.1021/acs.chemrev.5b00589
- [7] ETRYCH, Tomáš, Vladimír ŠUBR, Jiří STROHALM, Milada ŠÍROVÁ, Blanka ŘÍHOVÁ a Karel ULBRICH. HPMa copolymer-doxorubicin conjugates: The effects of molecular weight and architecture on biodistribution and in vivo activity. *Journal of Controlled Release*. **164**:3, 346–354 (2012). doi:10.1016/J.JCONREL.2012.06.029
- [8] BRAUNOVÁ, Alena, Michal PECHAR, Richard LAGA a Karel ULBRICH. Hydrolytically and reductively degradable high-molecular-weight poly(ethylene glycol)s. *Macromolecular Chemistry and Physics*. **208**:24, 2642–2653 (2007). Dostupné z: doi:10.1002/macp.200700315
- [9] KOZIOLOVÁ, Eva, Libor KOSTKA, Lenka KOTRCHOVÁ, Vladimír ŠUBR, Rafal KONEFAL, Benjamin NOTTELET a Tomáš ETRYCH. N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide-Based Linear, Diblock, and Starlike Polymer Drug Carriers: Advanced Process for Their Simple Production. *Biomacromolecules*. **19**:10, 4003–4013 (2018). doi:10.1021/acs.biomac.8b00973
- [10] BRAUNOVÁ, Alena, Martin KAŇA, Júlia KUDLÁČOVÁ, Libor KOSTKA, Jan BOUČEK, Jan BETKA, Milada ŠÍROVÁ a Tomáš ETRYCH. Micelle-forming block copolymers tailored for inhibition of P-gp-mediated multidrug resistance: structure to activity relationship. *Pharmaceutics*. **11**:11, 579 (2019). doi:10.3390/pharmaceutics11110579
- [11] KOPEČEK, J. a H. BAŽILOVÁ. Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-I. Radical polymerization and copolymerization. *European Polymer Journal*. **9**:1, 7–14 (1973). doi:10.1016/0014-3057(73)90063-3
- [12] KOZIOLOVÁ, E., D. MACHOVÁ, R. POLA, O. JANOUŠKOVÁ, P. CHYTIL, R. LAGA, S. K. FILIPPOV, V. ŠUBR, T. ETRYCH a M. PECHAR. Micelle-forming HPMa copolymer conjugates of ritonavir bound: Via a pH-sensitive spacer with improved cellular uptake designed for enhanced tumor accumulation. *Journal of Materials Chemistry B*. **4**, 7620–7629 (2016). doi:10.1039/c6tb02225a
- [13] BŮHMOVÁ, Eliška, Robert POLA, Michal PECHAR, Jozef PARNICA, Daniela MACHOVÁ, Olga JANOUŠKOVÁ a Tomáš ETRYCH. Polymer cancerostatics containing cell-penetrating peptides: Internalization efficacy depends on peptide type and spacer length. *Pharmaceutics*. **12**:59 (2020).

doi:10.3390/pharmaceutics12010059

- [14] PAN, Huaizhong, Jiyuan YANG, Pavla KOPEČKOVÁ a Jindřich KOPEČEK. Backbone degradable multiblock N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugates via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization and thiol-ene coupling reaction. *Biomacromolecules*. **12**:1, 247–252 (2011). doi:10.1021/bm101254e
- [15] MOAD, Graeme, Ezio RIZZARDO a San H. THANG. Living radical polymerization by the RAFT process. *Australian Journal of Chemistry*. **58**, 379–410 (2005). doi:10.1071/CH05072
- [16] CHIEFARI, John, Y. K. CHONG, Frances ERCOLE, Julia KRSTINA, Justine JEFFERY, Tam P.T. LE, Roshan T.A. MAYADUNNE, Gordon F. MEIJS, Catherine L. MOAD, Graeme MOAD, Ezio RIZZARDO a San H. THANG. Living free-radical polymerization by reversible addition - Fragmentation chain transfer: The RAFT process. *Macromolecules*. **31**:16, 5559–5562 (1998). doi:10.1021/ma9804951
- [17] MAEDA, H., J. WU, T. SAWA, Y. MATSUMURA a K. HORI. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000, **65**:2, 271–284 (2000). doi:10.1016/S0168-3659(99)00248-5
- [18] YUAN, Fang, Ling dong QUAN, Liao CUI, Steven R. GOLDRING a Dong WANG. Development of macromolecular prodrug for rheumatoid arthritis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **64**:12, 1205–1219 (2012). doi:10.1016/j.addr.2012.03.006
- [19] ESPINOSA-CANO, Eva, María Rosa AGUILAR, Blanca VÁZQUEZ a Julio SAN ROMÁN. Inflammation-Responsive Polymers. In: *Smart Polymers and their Applications*. 219-254 (2019). doi:10.1016/b978-0-08-102416-4.00007-7
- [20] YOO, Jihye, Changhee PARK, Gawon YI, Donghyun LEE a Heebeom KOO. Active targeting strategies using biological ligands for nanoparticle drug delivery systems. *Cancers*. **11**:5, 640 (2019). doi:10.3390/cancers11050640
- [21] DUNCAN, Ruth. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2**, 347-360 (2003). doi:10.1038/nrd1088
- [22] WATSON, Peter, Arwyn T. JONES a David J. STEPHENS. Intracellular trafficking pathways and drug delivery: Fluorescence imaging of living and fixed cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **57**:1, 43–61 (2005). doi:10.1016/j.addr.2004.05.003
- [23] SHEN, Wei Chiang a Hugues J.P. RYSER. Cis-aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers: A model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **102**:3, 1048-1054 (1981). doi:10.1016/0006-291X(81)91644-2
- [24] ANDRÉ, Mathieu, Sébastien TARRIT, Marie Joelle COURET, Marie Joséphe GALMIER, Eric DÉBITON, Jean Michel CHEZAL a Emmanuelle MOUNETOU. Spacer optimization of new conjugates for a melanoma-selective delivery approach. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **11**:37, 6372-6384 (2013). doi:10.1039/c3ob41428k
- [25] ORBÁN, Erika, Gábor MEZO, Pascal SCHLAGE, Gabriella CSÍK, Žarko KULIĆ, Philipp ANSORGE, Erzsébet FELLINGER, Heiko Michael MÖLLER a Marilena MANEA. In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding

- properties of daunorubicin-amino acid metabolites. *Amino Acids*. **41**:2, 469-483(2011).
doi:10.1007/s00726-010-0766-1
- [26] ULBRICH, K., T. ETRYCH, P. CHYTIL, M. JELÍNKOVÁ a B. ŘÍHOVÁ. HEMA copolymers with pH-controlled release of doxorubicin: In vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity. *Journal of Controlled Release*. **87**:3, 33–47 (2003). doi:10.1016/S0168-3659(02)00348-6
- [27] ABDULKHALEQ, L.A., ASSI, M.A., ABDULLAH, R., ZAMRI-SAAD, M., TAUFIQ-YAP, Y.H., HERZMEE, M.N.M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet world*. **11**:5, 627-635 (2018). doi:10.14202/vetworld.2018.627-635
- [28] FLEIT, H. B. Chronic Inflammation. In: *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. 300-314. doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.01808-6
- [29] KOZIOLOVÁ, E., K. VENCLÍKOVÁ a T. ETRYCH. Polymer-drug conjugates in inflammation treatment. *Physiological Research*. **67**:2, 281–292 (2018). doi:10.33549/physiolres.933977
- [30] XIE, Qiao Wen, Yuki KASHIWABARA a Carl NATHAN. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:7, 4705-4708 (1994).
doi:10.1016/s0021-9258(17)37600-7
- [31] YAMAMOTO, Kei, Toshiya ARAKAWA, Natsuo UEDA a Shozo YAMAMOTO. Transcriptional roles of nuclear factor κ B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor α -dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *Journal of Biological Chemistry*. **270**:52, 31315-31320 (1995).
doi:10.1074/jbc.270.52.31315
- [32] BARNES, Peter J. a Michael KARIN. Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *New England Journal of Medicine*. **336**:15, 1066-1071 (1997).
doi:10.1056/nejm199704103361506
- [33] DIDONATO, J, F MERCURIO, C ROSETTE, J WU-LI, H SUYANG, S GHOSH a M KARIN. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Molecular and Cellular Biology*. **16**:4, 1295-1304 (1996). doi:10.1128/mcb.16.4.1295
- [34] MCINNES, Iain B. a Georg SCHETT. Mechanism of Disease The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*. **365**:23, 2205-2219 (2011). doi: 10.1056/NEJMra1004965.
- [35] BRENNAN, Fionula M. a Iain B. MCINNES. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation*. **118**:11, 3537-3545 (2008). doi:10.1172/JCI36389
- [36] CASCÃO, R., H. S. ROSÁRIO, M. M. SOUTO-CARNEIRO a J. E. FONSECA. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews*. **9**:8, 531-535 (2010).
doi:10.1016/j.autrev.2009.12.013
- [37] PANAYI, Gabriel S. Even though T-cell-directed trials have been of limited success, is there reason for optimism? *Nature Clinical Practice Rheumatology*. **2**:2, 58-59 (2006). doi:10.1038/ncprheum0094
- [38] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2007.
- [39] SMITH, W. L., D. L. DEWITT a R. M. GARAVITO. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*. **69**, 145–182 (2000).
doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145
- [40] SKIBINSKI, Robert a Lukasz KOMSTA. The stability and degradation kinetics of acetylsalicylic acid in

- different organic solutions revisited - An UHPLC-ESI-QTOF spectrometry study. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. **29**:1, 39–41 (2016). doi:10.1515/cipms-2016-0009
- [41] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2018.
- [42] MORO, Kazuki, Masayuki NAGAHASHI, Rajesh RAMANATHAN, Kazuaki TAKABE a Toshifumi WAKAI. Resolvins and omega three polyunsaturated fatty acids: Clinical implications in inflammatory diseases and cancer. *World Journal of Clinical Cases*. **4**:7, 155–164 (2016). doi:10.12998/wjcc.v4.i7.155
- [43] TACCONELLI, Stefania, Annalisa CONTURSI, Lorenza FALCONE, Matteo MUCCI, Ilaria D'AGOSTINO, Rosa FULLONE, Angela SACCO, Mirco ZUCHELLI, Annalisa BRUNO, Patrizia BALLERINI, Melania DOVIZIO a Paola PATRIGNANI. Characterization of cyclooxygenase-2 acetylation and prostanoid inhibition by aspirin in cellular systems. *Biochemical Pharmacology*. **178**, 114094 (2020). doi:10.1016/j.bcp.2020.114094
- [44] MICIACCIA, Morena, Benny Danilo BELVISO, Mariaclara IASELLI, Gino CINGOLANI, Savina FERORELLI, Marianna CAPPELLARI, Paola LOGUERCIO POLOSA, Maria Grazia PERRONE, Rocco CALIANDRO a Antonio SCILIMATI. Three-dimensional structure of human cyclooxygenase (hCOX)-1. *Scientific Reports*. **11**:1 (2021). doi:10.1038/s41598-021-83438-z
- [45] VANE, J. R., Y. S. BAKHLE a R. M. BOTTING. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1998, **38**:1, 97–120 (1998). doi:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97
- [46] DANNHARDT, Gerd a Werner KIEFER. Cyclooxygenase inhibitors - Current status and future prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **36**:2, 109–126 (2001). doi:10.1016/S0223-5234(01)01197-7
- [47] ULBRICH, K, T ETRYCH, P CHYTIL, M JELÍNKOVÁ a B ŘÍHOVÁ. Antibody-targeted polymer-doxorubicin conjugates with pH-controlled activation. *Journal of Drug Targeting*. **12**:8, 477–489 (2004). doi:10.1080/10611860400011869
- [48] CHYTIL, Petr, Tomáš ETRYCH, Jaroslav KRÍŽ, Vladimír ŠUBR a Karel ULBRICH. N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide-based polymer conjugates with pH-controlled activation of doxorubicin for cell-specific or passive tumour targeting. Synthesis by RAFT polymerisation and physicochemical characterisation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **41**:3–4, 473–482 (2010). doi:10.1016/j.ejps.2010.08.003
- [49] ISHITAKE, Kenji, Kotaro SATOH, Masami KAMIGAITO a Yoshio OKAMOTO. Stereogradient Polymers Formed by Controlled/Living Radical Polymerization of Bulky Methacrylate Monomers. *Angewandte Chemie*. **121**:11, 2025–2028 (2009). doi:10.1002/ange.200805168
- [50] CHANG-XIAO, S. U., Jean Francois MOUSCADET, Chih Chia CHIANG, Hou Jen TSAI a Ling Yih HSU. HIV-1 integrase inhibition of biscoumarin analogues. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **54**:5, 682–686 (2006). doi:10.1248/cpb.54.682
- [51] PARK, Sunhwa, Jiyun LEE, Kye Jung SHIN a Jae Hong SEO. Aspirination of α -aminoalcohol (sarpogrelate M1). *Molecules*. **21**:9, 1126 (2016). doi:10.3390/molecules21091126
- [52] SEDLÁČEK, Ondřej, Martin HRUBÝ, Martin STUDENOVSKÝ, David VĚTVIČKA, Jan SVOBODA, Dana KAŇKOVÁ, Jan KOVÁŘ a Karel ULBRICH. Polymer conjugates of acridine-type anticancer drugs with pH-controlled activation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **20**:13, 4056–4063 (2012).

doi:10.1016/j.bmc.2012.05.007

- [53] KALE, Amit A. a Vladimir P. TORCHILIN. Design, synthesis, and characterization of pH-sensitive PEG-PE conjugates for stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers: The effect of substitutes at the hydrazone linkage on the pH stability of PEG-PE conjugates. *Bioconjugate Chemistry*. **2**:18, 363–370 (2007). doi:10.1021/bc060228x
- [54] RIENDEAU, Denis, Stella CHARLESON, Wanda CROMLISH, Joseph A. MANCINI, Elizabeth WONG a Jocelyne GUAY. Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **75**:9, 1088–1095 (1997). doi:10.1139/y97-130
- [55] NURTJAHJA-TJENDRAPUTRA, Effie, Alaina J. AMMIT, Basil D. ROUFOGALIS, Van H. TRAN a Colin C. DUKE. Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger. *Thrombosis Research*. **111**:4–5, 259–265 (2011). doi:10.1016/j.thromres.2003.09.009