

Disertační práce

Vývoj vhodné modifikace hydrofobizované kyseliny hyaluronové pro přípravu teranostik

**Development of modified hydrophobized hyaluronic acid useful
for theranostics preparation**

Autor: **Ing. Eva Achbergerová**

Studijní program: Chemie a technologie materiálů (P2808)

Studijní obor: Chemie a technologie materiálů (2808V009)

Školitel: doc. Mgr. Robert Vícha, Ph.D.

Konzultant: Ing. Daniela Šmejkalová, Ph.D.

Zlín, červenec 2018

© Eva Achbergerová

Klíčová slova: hyaluronan, nosičové systémy léčiv, teranostika, NIR fluorescenční látky, chemická modifikace hyaluronanu, polymerní micely, SPION, neinvazivní zobrazování, dermální penetrace, *in vivo* biodistribuce

Key words: hyaluronan, drug delivery systems, theranostics, NIR fluorescence dyes, chemical modification of hyaluronan, polymeric micelles, SPION, non-invasive imaging, dermal penetration, *in vivo* biodistribution

Práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat firmě Contipro a.s. za možnost vypracování mé doktorské práce v této české farmaceutické firmě. Děkuji zejména své konzultance Daniele Šmejkalové, Ph.D. a dále také Glorii Huerta-Angeles, Ph.D. za odborné vedení během studia. Dizertační práce by nevznikla bez spolupráce se skupinou Nosiče, také s Martinou Hermannovou, Ph.D. a její skupinou analytiků a Kristinou Nešporovou, Ph.D. s její skupinou biologů. Děkuji i všem ostatním kolegům z Contipra za příjemně strávené roky v podhůří Orlických hor. Za spolupráci a biologické testování připravených látek patří poděkování Karlu Součkovi z AV ČR v Brně. Nemalé díky patří také mému školiteli doc. Víchovi za cenné rady, a to nejen při sepisování disertační práce. Jako poslední chci poděkovat všem mým blízkým za podporu a velkou trpělivost...

ABSTRAKT

Nosičové systémy bioaktivních látek nabývají ve zdravotnictví, farmaceutickém, ale také kosmetickém, průmyslu stále většího významu. Absence informací o chování, interakcích a působení nosičových systémů na živé organismy může znesnadňovat jejich bezpečné použití. Některé nedostatky lze eliminovat využitím teranostik, což jsou nosiče nejen terapeutik, ale také látek pro diagnostiku. Předložená doktorská práce je zaměřena na syntézu a charakterizaci originálních derivátů hyaluronanu vhodných pro přípravu nosičových systémů detekovatelných optickými zobrazovacími metodami. S ohledem na předpokládané aplikace v biologických systémech a dostupné technické zázemí byla připravena série derivátů hyaluronanu modifikovaných fluorescenčními látkami cypate a nilská modř, absorbujícími a emitujícími záření v blízké infračervené, v případě druhého jmenovaného barviva v červené oblasti. Dalším typem připravovaných látek byly superparamagnetické nanočástice železa (SPION) obalené kyselinou olejovou, potencionálně vhodné pro terapii nádoru nebo diagnostiku.

Navázání fluorescenčních látek na polymerní řetězce hyaluronanu umožnilo detekovat deriváty hyaluronanu a z nich připravené polymerní micely v biologických systémech pomocí optických metod. Při *in vitro* experimentech byl prokázán vstup nosičových systémů a doručované modelové účinné látky do fibroblastů. U hydrofobizovaného hyaluronanu byla také prokázána schopnost dermální penetrace. V případě *in vivo* testů na myších Balb/c s 4T1 luc nádorovými buňkami byla pozorována efektivní akumulace derivátů HA, respektive nosičů, v nádorové tkáni. Rovněž bylo dosaženo protinádorového účinku SPION a doxorubicinu enkapsulovaných a doručných polymerními micelami.

Z předložené práce je zřejmé, že hyaluronan se jeví jako vhodný biopolymer pro přípravu funkčních nosičových systémů léčiv efektivně detekovatelných optickými metodami jak *in vitro*, tak *in vivo*.

ABSTRACT

Drug delivery systems have become more important in pharmaceutical, medical, and even cosmetic industry. However, limited knowledge about their behavior, interactions and fate in biological systems entail substantial difficulties within their applications. Above mentioned disadvantages could be overcome using smart nanocarriers – theranostics, which provide combination of therapy and diagnosis. This work is focused on synthesis and characterization of original hyaluronan derivatives suitable for formation of polymeric micelles, which are detectable using optical imaging. With respect to applications in biological systems and considering available technical facilities, fluorescent dyes cyprine and Nile blue were chosen as contrast agents for hyaluronan labeling. The second aim of this work was to prepare superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) coated with oleic acid as potential therapeutic or diagnostic agents.

Fluorescent labeling enabled effective and relatively easy detection of hyaluronan derivatives, i.e. polymeric micelles, in biological systems. Within *in vitro* experiments, it was found that hyaluronan polymeric micelles were able to enter and deliver loaded drug into fibroblasts. Furthermore, it was observed that hydrophobized hyaluronan could penetrate the skin. Using non-invasive preclinical optical imaging, effective tumor accumulation of fluorescently labeled hyaluronan derivative was detected in BALB/C mice *in vivo*. Doxorubicin and SPION delivered by hyaluronan polymeric micelles exhibited anticancer effect.

This work demonstrates the potential of hyaluronan for preparation of drug delivery systems, which are detectable in biological systems both *in vitro* and *in vivo*.

OBSAH

Abstrakt	4
Abastract.....	5
Úvod.....	11
Cíle práce.....	14
TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1 Multifunkční nosičové systémy a teranostika	16
1.1 Základní typy a morfologie nosičů léčiv	17
1.2 Polymerní konjugáty.....	18
1.3 Dendrimery	18
1.4 Polymerní micely.....	19
1.5 Polymerzomy	21
1.6 Ostatní typy nosičů	22
2 Cílení.....	22
2.1 Pasivní cílení.....	23
2.2 Aktivní cílení	23
3 Metody a kontrastní látky používané pro zobrazování	24
3.1 Fluorescenční zobrazování	25
3.2 Organické syntetické fluorofory vhodné pro neinvazivní diagnostiku.....	26
3.2.1 Polymethinová cyaninová barviva	27
3.2.2 Ftalocyaniny	28
3.2.3 BODIPY	29
3.2.4 Squarainové deriváty.....	30
3.2.5 Anorganické fluorescenční nanočástice	30
3.3 Bioluminiscenční zobrazení.....	31
3.4 Zobrazování magnetickou rezonancí.....	32
3.4.1 T1 diagnostické látky	32
3.4.2 T2 diagnostické látky	32
3.4.3 Zobrazování pomocí radionuklidů	34
3.5 Kombinace zobrazovacích metod.....	35
4 Hyaluronan.....	35
4.1 Chemické modifikace hylauronanu	37
4.1.1 Modifikace karboxylové funkční skupiny.....	38

4.1.2	Modifikace hydroxylových skupin	41
4.1.3	Příprava dalších funkčních skupin na HA řetězci	42
4.1.4	Síťování HA	43
5	Teranostické nosičové systémy připravené z derivátů hyaluronanu	44
6	Nosičové systémy pro topické aplikace	51
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	53
7.	Přístrojové vybavení a použité metody	53
	Stanovení výtěžku reakcí	54
	Hmotnostní spektrometrie	54
	Infračervená spektroskopie	55
	UV/Vis spektroskopie	55
	Fluorescenční spektroskopie	55
	Stanovení velikosti polymerních micel	55
	Prvková analýza	55
	Termogravimetrie	56
	Elektronová mikroskopie	56
	ICP OES	56
	Metoda stanovení průměrné molekulové hmotnosti hyaluronanu	56
	Stanovení množství inkorporovaného kurkuminu v polymerních micelách	58
	Stanovení množství inkorporovaného doxorubicinu v HA-cypate-C18:1	58
8.	Syntéza požadovaných látek	59
	8.1 Syntéza NIR fluorescenční látky Cypate	59
	8.1.1 Syntéza 1,1,2-trimethyl-3-(2-karboxyethan-1-yl)-[1H]-benzo[e]indolium- bromidu (1)	59
	8.1.2 Syntéza cypate (3)	60
	8.2 Příprava výchozích forem hyaluronanu	61
	8.2.1 Konverze hyaluronanu sodného na kyselinu hyaluronovou (HAH)	61
	8.2.2 Příprava oxidované formy hyaluronanu (HA-OX)	62
	8.3 Příprava fluorescenčně značeného hyaluronanu	63
	8.3.1 Obecný postup syntézy hyaluronanu s vázaným cypate (HA-cypate)	63
	8.3.2 Příprava hyaluronanu značeného nilskou modří (HA-NM)	65
	8.4 Modifikace fluorescenčně značeného hyaluronanu mastnými kyselinami	66
	8.4.1 Příprava hyaluronanu značeného nilskou modří s různým stupněm substituce uhlíkovými řetězci kyseliny kapronové (HA-NM-C6)	66

8.4.2	Příprava hyaluronanu modifikovaného cypate HA s různým stupněm substituce řetězci kyseliny olejové (HA-cypate-C18:1)	67
8.4.3	Syntéza hyaluronanu modifikovaného nilskou modří a řetězci kyselin olejové (HA-NM-C18:1)	69
8.5	Syntéza derivátů hyaluronanu modifikovaných poly(ethylenglykolem).....	70
8.5.1	Syntéza hyaluronanu s vázaným poly(ethylenglykolem) (HA-PEG)	70
8.5.2	Modifikace hyaluronanu s vázaným poly(ethylenglykolem) zbytky kyseliny olejové (HA-C18:1-PEG)	71
8.5.3	Konverze hyaluronanu modifikovaného poly(ethylenglykolem) řetězci kyseliny olejové na derivát kyseliny hyaluronové (HAH- C18:1-PEG)	72
8.5.4	Značení hyaluronanu modifikovaného poly(ethylenglykolem) a řetězci kyseliny olejové fluorescenční látkou cypate (HA-cypate-C18:1-PEG).....	73
8.5.5	Konverze hyaluronanu modifikovaného poly(ethylenglykolem) na derivát kyseliny hyaluronové (HAH-PEG).....	74
8.5.1	Značení hyaluronanu modifikovaného poly(ethylenglykolem) fluorescenční látkou cypate (HA-cypate-PEG).....	75
8.5.2	Modifikace hyaluronanu s vázaným poly(ethylenglykolem) a cypate zbytky kyseliny olejové (HA-cypate-C18:1-PEG).....	76
8.6	Syntéza superparamagnetických nanočástic oxidů železa.....	77
8.6.1	Příprava oleátu železitého	77
8.6.2	Obecný postup pro syntézu nanočástic	77
9.	Příprava nosičových systémů pro <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> experimenty.....	80
9.1	Inkorporace doxorubicinu do nosičového systému na bázi hyaluronanu hydrofobizovaného zbytky kyseliny olejové a značeného cypate.....	80
9.2	Inkorporace doxorubicinu a SPION do nosičového systému na bázi hyaluronanu hydrofobizovaného zbytky kyseliny olejové a značeného cypate.....	80
9.3	Enkapsulace kurkuminu do hyaluronanu modifikovaného nilskou modří a zbytky kyselin olejové nebo kapronové	81
10.	<i>In vitro</i> experimenty	81
10.1	Testy cytotoxicity hyaluronanu modifikovaného cypate nebo cypate a řetězci kyseliny olejové.....	81
10.2	<i>In vitro</i> testování vstupu nosičových systémů s inkorporovaným kurkuminem do buněk	82
10.3	<i>In vitro</i> testování penetrace hyaluronanu modifikovaného nilskou modří a zbytky kyseliny olejové kůži	82
11.	<i>In vivo</i> experimenty	83

11.1	Biodistribuce hyaluronanu modifikovaného cypate a řetězci kyseliny olejové ve zdravých modelových myších	83
11.2	Testování biodistribuce a protinádorového účinku derivátu hyaluronanu modifikovaného cypate a řetězci kyseliny olejové a nosičových systémů z něj připravených v modelových zvířatech s nehmátným prsním nádorem.	83
	VÝSLEDKY A DISKUZE	85
12.	Syntéza derivátů hyaluronanu.....	86
12.1	Fluorescenční značení hyaluronanu	86
12.1.1	Syntéza fluorescenční cypate	86
12.1.2	Modifikace hyaluronanu látkou cypate	88
12.2	Příprava derivátu HA modifikovaného nilskou modří	99
12.2.1	Příprava oxidované formy hyaluronanu	100
12.2.2	Syntéza hyaluronanu značeného nilskou modří	101
12.3	Hydrofobizace fluorescenčních derivátů hyaluronanu	104
12.3.1	Hydrofobizace hyaluronanu kyselinou kapronovou	104
12.3.2	Hydrofobizace hyaluronanu kyselinou olejovou.	106
12.4	Příprava série derivátů hyaluronanu modifikovaných poly(ethylenglykolem).113	
12.4.1	Syntéza hyaluronanu s vázaným poly(ethylenglykolem).....	114
12.5	Hydrofobizace hyaluronanu s vázaným poly(ethylenglykolem) řetězci kyseliny olejové	118
12.6	Značení hydrofobizovaného hyaluronanu s vázaným poly(ethylenglykolem) látkou cypate.....	120
12.7	Fluorescenční značení hyaluronanu s vázaným poly(ethylenglykolem) látkou cypate	123
12.8	Hydrofobizace hyaluronanu s vázaným cypate a PEG řetězci kyseliny olejové....	125
13.	Příprava a charakterizace superparamagnetických nanočástic oxidů železa	128
13.1	Syntéza oleátu železitého	128
13.2	Syntéza nanočástic na povrchu modifikovaných kyselinou olejovou	131
13.2.1	Stanovení množství vázané kyseliny olejové pomocí TG	133
14.	Biologické testování derivátů hylauronanu značeného cypate	135
14.1	Cytotoxicita hyaluronanu modifikovaného cypate nebo cypate a řetězci kyseliny olejové	135
14.2	<i>In vivo</i> testy.....	136
14.2.1	<i>In vivo</i> biodistribuce HA-Cypate-C18:1 ve zdravých myších	136

14.2.2	<i>In vivo</i> biodistribuce HA-cypate-C18:1 v myších s nádorem.....	139
14.2.3	Protinádorový účinek nosičových systémů na bázi HA-cypate-C18:1	141
15.	Testování derivátů hylauronanu značeného niiskou modří <i>in vitro</i>	143
15.1	Penetrace derivátů hyaluronanu kůží	143
15.2	Vstup látek do buněk.....	145
ZÁVĚR.....		148
Seznam použité literatury		152
Seznam použitých symbolů a zkratk		170
Přílohy		172
Publikační aktivity autora.....		174
Odborný životopis autora		176

ÚVOD

Nosičové systémy léčiv na bázi polymerů jsou v současnosti rozsáhle studovanou oblastí a jeví se jako velice slibná platforma pro terapii mnoha závažných nemocí, obzvláště různých typů nádorů. Na počátku 21. století se v odborné literatuře začaly objevovat studie zabývající se jedním z typů multifunkčních nosičových systémů, tzv. teranostik (z angl. therapy a diagnosis). Obecně nosičové systémy slouží k efektivnějšímu, cílenému doručení léčiv nebo mohou například zlepšit omezenou rozpustnost léčiv ve vodném prostředí. Stejně tak je tomu v případě teranostik, ale jakousi přidanou hodnotou tohoto typu nosičových systému je možnost kombinace terapie a diagnostiky díky přítomnosti kontrastní látky. Co se týče možného využití teranostik, je do nich vkládán potenciál v oblasti personalizované medicíny.

Návrh a design účelového teranostika lze chápat jako multidisciplinární problematiku. Pro přípravu nosiče je obecně velmi důležitá volba materiálu, jenž by se měl vzhledem k předpokládané *in vivo* aplikaci vyznačovat nízkou toxicitou, být neimunogenní nebo by neměl být zdrojem nebezpečných degradačních produktů. V případě chemické modifikace výchozího materiálu přichází na řadu dále znalosti a dovednosti z oblasti chemických syntéz a výběr vhodných látek pro účelnou úpravu použitého materiálu. Důležitá je taktéž volba vhodné diagnostické a terapeutické látky. V neposlední řadě je nutno zohlednit rozdíly ve stavbě normální a patologické tkáně, popřípadě přítomnost buněčných receptorů.

Vzhledem k přírodnímu původu, biodegradabilitě a také relativně dobré možnosti chemické modifikace se jako velmi vhodná pro přípravu nosičových systémů jeví kyselina hyaluronová, respektive sodná sůl hyaluronan (HA). V současné době bylo popsáno několik derivátů HA, vhodných pro přípravu teranostických nosičových systémů. Převážná většina z těchto popsaných látek

však byla připravena modifikací karboxylové funkce HA, což bývá označováno jako nevýhodné z důvodu ztráty přirozeného polyaniontového charakteru HA a zejména při rozpoznávání hyaluronanu buněčnými receptory. V rámci této doktorské práce byla tedy na základě znalostí z odborné literatury a zvážení dostupnosti technického zázemí připravena série derivátů HA bez modifikace karboxylové skupiny HA. Tyto deriváty poté posloužily jako základ fluorescenčně značeného nosičového systému léčiv detekovatelného v biologických systémech pomocí optických zobrazovacích metod. Dále byly provedeny pokusy o syntézu superparamagnetických nanočástic železa na povrchu modifikovaných kyselinou olejovou.

Pro nastínění problematiky teranostik je v teoretické části této disertační práce nejprve objasněn význam a potenciál nosičových systémů v oblasti doručování léčiv a také jejich nejběžnější morfologie. Vzhledem k zaměření doktorského studia se celá třetí kapitola zabývá kontrastními látkami a metodami využívanými pro neinvazivní zobrazování a diagnostiku. Rozsáhlá kapitola je věnována hyaluronanu a v literatuře popsáním způsobům modifikace tohoto polysacharidu. Jako poslední je uvedena literární rešerše se zvláštním důrazem na fluorescenčně značený hyaluronan.

V experimentální části disertace je popsáno přístrojové vybavení, techniky měření, postupy syntéz a biologického testování. V navazující části jsou uvedeny a diskutovány výsledky syntéz intermediátů i cílových fluorescenčně značených hydrofobizovaných derivátů hyaluronanu, včetně série derivátů modifikovaných poly(ethylenglykolem). Stručnější podkapitola je věnována přípravě SPION. Velmi zajímavé jsou potom výsledky z testování vybraných derivátů hyaluronanu v biologických systémech *in vitro* a *in vivo* (například v myších s prsním nádorem).

V závěru je zhodnoceno naplnění cílů, přínos získaných informací v dané problematice a perspektivy do budoucna. Předložená práce byla vypracována v laboratořích české farmaceutické firmy Contipro na základě jejich požadavků strategických cílů.

Cíle práce

Předložená doktorská práce je zaměřena na syntézu a charakterizaci derivátů hyaluronanu vhodných zejména pro přípravu teranostických nosičových systémů. Část doktorského studia byla věnována taktéž přípravě superparamagnetických nanočástic železa obalených kyselinou olejovou. Ve spolupráci s biology byly vybrané látky testovány v biologických systémech *in vitro* a *in vivo*. Hlavní cíle práce lze rozdělit do následujících bodů:

- provést literární a patentovou rešerši známých derivátů HA využitých pro přípravu multifunkčních nosičových systémů – teranostik;
- na základě rešerše navrhnout a připravit originální fluorescenčně značené deriváty HA, jejichž výroba by mohla být pod patentovou ochranou;
- syntetizovat deriváty hyaluronanu aplikovatelné pro přípravu nosičových systémů, zejména teranostik:
 - modifikovat hyaluronan vhodnými fluorescenčními látkami za účelem detekce derivátů v biologických systémech;
 - hydrofobizovat polymerní řetězec hyaluronanu (například zbytky mastných kyselin) pro potřeby tvorby polymerních micel ve vodném prostředí;
 - navázat poly(ethylenglykol) na řetězce HA;
- syntetizovat superparamagnetické nanočástice oxidů železa obalených kyselinou olejovou;
- charakterizovat připravené látky pomocí dostupných analytických a spektrálních metod (NMR, GPC, ESI-MS, FTIR, fluorimetrie, TG, TEM aj.);
- připravit nosičové systémy – polymerní micely ze syntetizovaných derivátů hyaluronanu;
- ve spolupráci s biology testovat syntetizované látky, respektive nosičové systémy z nich připravené (prázdné nebo s enkapsulovanými aktivními

látkami, například doxorubicin, SPION) v biologických systémech pomocí optických zobrazovacích metod následujícím způsobem:

- *in vitro*: vstup nosičových systémů a modelového léčiva do buněk;
- *in vitro*: schopnost dermální penetrace derivátů HA;
- *in vivo*: monitorování biodistribuce a protinádorového účinku derivátů hyaluronanu a nosičových systémů z nich připravených;
- vybrané výsledky vědecko-výzkumné činnosti patentovat, publikovat v mezinárodních impaktovaných časopisech a prezentovat na mezinárodních konferencích.

TEORETICKÁ ČÁST

1 MULTIFUNKČNÍ NOSIČOVÉ SYSTÉMY

A TERANOSTIKA

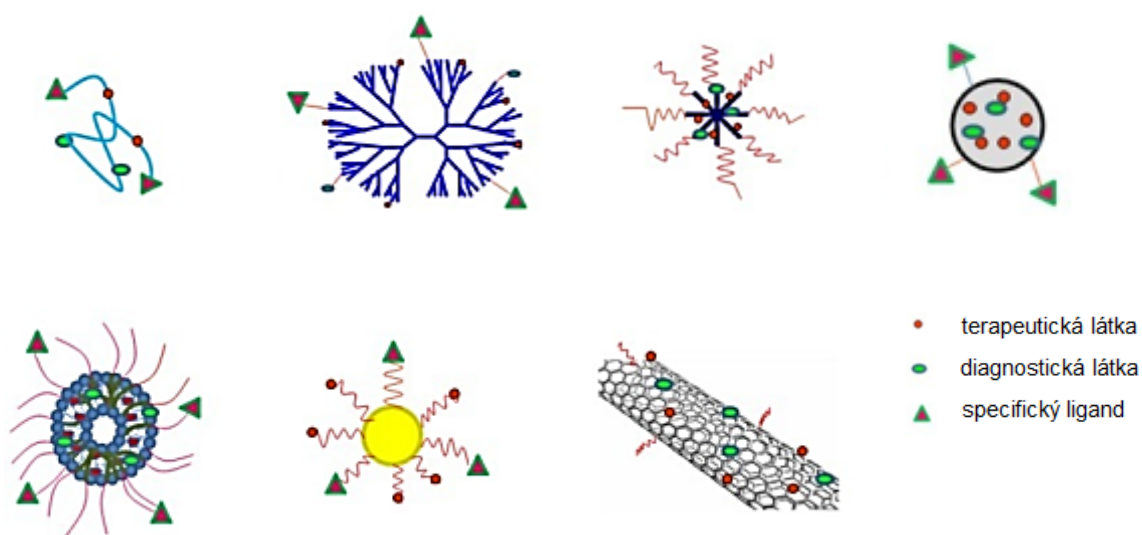
Léčiva jsou všeobecně chápána jako látky vpravované do těla za účelem terapie nemoci, její prevence, léčby zranění nebo řešení různých psychických obtíží. Schopnost terapeutických látek dosáhnout požadovaného efektu závisí na mnoha okolnostech, jako jsou způsob podání léčiva, biodistribuce a mechanismus účinku látky v těle nebo také jejich následný metabolismus.¹ U některých terapeutik může být nevýhodou jejich omezená rozpustnost ve vodném prostředí, čímž je snížena dostupnost léčiv v biologických tkáních. Z důvodu krátké doby cirkulace podaných nízkomolekulárních terapeutických látek v krevním řečišti je také mnohdy nutné jejich opakované dávkování. Velmi často taktéž není dosaženo dostatečného cílení a akumulace léčiva v požadovaných místech, s čímž někdy souvisí nežádoucí systémová toxicita a vedlejší účinky terapie. Přibližně od 70. let 20. století se začaly v literatuře objevovat studie, týkající se nosičových systémů pro doručování léčiv s cílem eliminovat nebo překonat výše uvedené problémy při doručování samostatných „klasických léčiv“.² Předmětem zájmu tohoto vědeckého odvětví je vytvořit systém pro doručování léčiv, jenž zvyšuje rozpustnost léčiva a jeho stabilitu ve fyziologickém prostředí, dále prodlužuje cirkulaci transportovaných látek v krevním řečišti, zvyšuje biologickou dostupnost a akumulaci léku v cílovém orgánu nebo místě působení, případně zprostředkovává dlouhodobé řízené uvolňování léčiva.^{3,4}

Za významný pokrok v oblasti nosičových struktur může být považována kombinace terapie a diagnostiky, jež přinesla další generaci nosičů tzv. teranostika (z angl. „therapy“ a „diagnosis“). Zmíněné multifunkční nosičové systémy představují slibný nástroj pro terapii a zároveň kontrolu cílení nebo

monitorování léčby v reálném čase, dále také možnost včasné detekce, lokalizace a zobrazení cílových míst (například nádor, záněť) v organismu díky přítomnosti diagnostické látky.⁵ Do teranostik je taktéž vkládán velký potenciál v oblasti usnadnění a realizace personalizované medicíny, kdy je nejprve u pacienta testována možná reakce na novou terapii a na základě těchto výsledků je mu speciálně předepsána individuální léčba.^{6,7}

1.1 Základní typy a morfologie nosičů léčiv

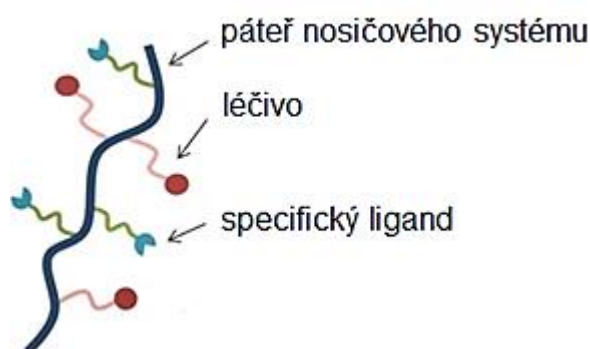
Z hlediska morfologie jsou nosičové systémy velmi rozmanitá skupina nano- a mikrostruktur, tvořených převážně organickými ale i anorganickými materiály. Přestože se jedná strukturně o velmi různorodé systémy (Obrázek 1), společným rysem nosičových systémů je možnost kovalentního nebo nekovalentního navázání léčiv a v případě teranostik také kontrastních látek, jež jsou detailněji popsány v kapitole 3. V některých případech mohou nosiče navíc disponovat ligandem specifickým pro určitý receptor.^{1,8}



Obrázek 1: Schématické znázornění teranostických nosičových systémů: nahoře (zleva) polymerní konjugát, dendrimer; polymerní micela, polymerzom; dole (zleva): liposom, zlatá nanočástice, uhlíkatá nanotrubička.⁸

1.2 Polymerní konjugáty

V roce 1975 byl Helmutem Ringsdorfem představen první model farmakologicky aktivního polymeru.⁹ Základem navrženého konceptu (Obrázek 2) byly tři hlavní komponenty: a) „páteř“ nosičového systému – polymer, zaručující hydrofilitu a rozpustnost ve vodě, b) vázané léčivo a c) specifický ligand, jenž napomáhá aktivnímu transportu nosiče do požadovaného místa.¹⁰ V případě polymerního konjugátu ve smyslu teranostika (Obrázek 1) je tento model doplněn o kontrastní látku (viz kapitola 3).



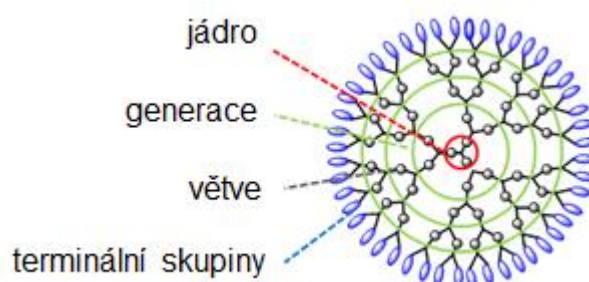
Obrázek 2: Koncept polymerního konjugátu.¹⁰

Podstatou přípravy polymerních konjugátů jsou chemické reakce mezi funkčními skupinami jednotlivých komponent vedoucí k vytvoření kovalentních vazeb mezi jednotlivými složkami. Na tyto látky může být potom nahlíženo jako na nové chemické entity, někdy nazývané polymerní terapeutika.^{1,11,12}

1.3 Dendrimery

Dendrimery lze označit jako unikátní skupinu syntetických polymerních nosičových systémů s dobře definovatelnou topografickou strukturou, jež připomíná tvar koruny stromu (z řeckého „dendro“ neboli strom). V ideálním případě jsou dendrimery dokonalé monodisperzní makromolekuly s pravidelnou a vysoce větvenou trojrozměrnou architekturou.¹³ Typický dendrimer (Obrázek 3) se skládá ze tří základních částí, a to z multifunkčního centrálního jádra, na

které navazují jednotlivé větve (v generacích), zakončené vnějšími koncovými skupinami.¹⁴



Obrázek 3: Schematické znázornění stavby dendrimeru.¹⁵

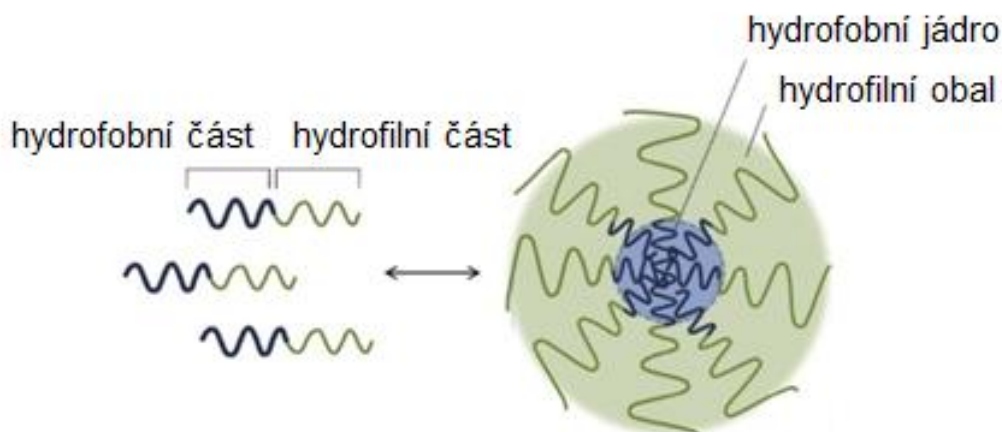
Příprava dendrimerů obvykle vyžaduje mnohostupňovou syntézu, kdy jsou k základní struktuře postupně připojovány další opakující se podjednotky, organizované ve vrstvách tzv. „generacích“. Existují dva způsoby přípravy, první je divergentní, kdy dochází k nárůstu dendronů od jádra. Pokud je směr tvorby konečné struktury opačný, dochází k nárůstu větví směrem od periferie k jádru, jedná se o způsob konvergentní. Ve srovnání se syntézou některých jiných nosičových systémů je výhodou přípravy dendrimerů možnost vytvářet monodispersní struktury s kontrolovanou makromolekulární architekturou, které se vyznačují přesně definovanou molekulovou hmotností a nízkou polydispersitou.^{13,16}

1.4 Polymerní micely

Jedny z nejvíce studovaných subjektů v nanotechnologiích jsou supramolekulární struktury, jež mohou vznikat agregací amfifilních molekul v důsledku hydrofobních interakcí, ale také elektrostatických sil, vodíkových můstků a dalších slabých interakcí.^{17,18}

Amfifilní, blokové nebo roubované (graftované), kopolymery mohou agregovat za vzniku struktur tvořených jádrem a obalem – polymerních micel schematicky znázorněných na Obrázku 4. Pokud amfifilní látky dosáhnou

ve vhodném prostředí, například ve vodě, určité kritické tzv. micelární (někdy označované agregační) koncentrace, začnou se spontánně samosekupovat, přičemž dochází ke zmenšení mezifázové energie systému a ke tvorbě agregátů.¹⁹



Obrázek 4: Stavba polymerní micely.¹⁹

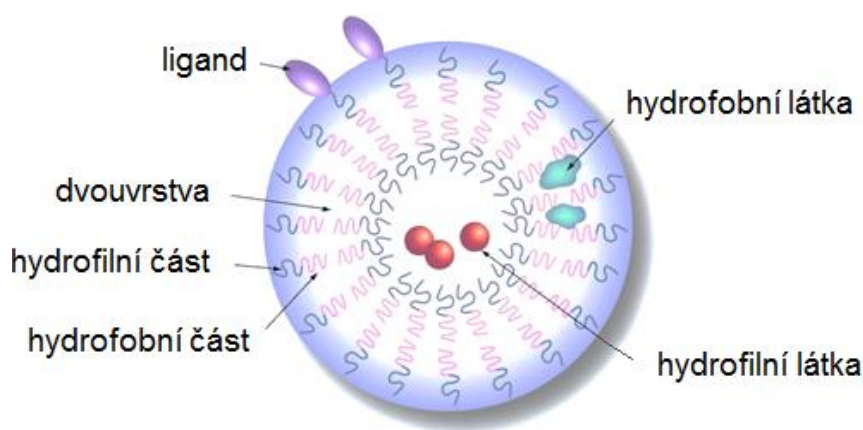
Většina polymerních micel pro medicínské aplikace představuje tedy agregované koloidní struktury s hydrofobním jádrem a hydrofilním obalem.^{20,21} Jádro polymerní micely může sloužit jako rezervoár pro ve vodě špatně rozpustné láky (například léčiva, kontrastní látky), kdy enkapsulace je z převážné většiny zprostředkována termodynamicky řízenými hydrofobními interakcemi. Enkapsulace látek může být dále provedena na základě elektrostatických interakcí nebo také existuje možnost chelatace iontů kovů do jádra micely. Naopak svrchní část – obal představuje hydrofilní část polymerní micely, zvyšující rozpustnost a stabilitu daného systému ve vodném prostředí.²²

Stabilita polymerních micel je velmi důležitá pro klinické použití. Kritická micelární koncentrace (cmc) je základním parametrem termodynamické stability.¹⁹ Polymerní micely s nízkou cmc jsou většinou charakterizovány vyšší stabilitou v roztoku, avšak cmc často neurčuje to, jak budou micely stabilní

v prostředí krevního řečiště (například v přítomnosti albuminu) a také jejich rozpad v čase.²³ Pro účely medicínských aplikací by měly být polymerní micely, ale obecně i ostatní typy nosičů, stabilními monodisperzními systémy s odolností vůči rozpadu v přítomnosti sérových proteinů. Co se týče požadovaných vlastností, doposud studované systémy se vyznačují nedostatečnou stabilitou v biologických systémech *in vitro* a zejména *in vivo*.²⁴

1.5 Polymerzomy

Stejně jako polymerní micely i polymerzomy (Obrázek 5) jsou nosičové systémy připravené z amfifilních polymerů, které se na rozdíl od polymerních micel většinou sestávají ze dvou vrstev diblokového kopolymeru typu AB nebo jedné vrstvy triblokového kopolymeru typu ABA.²⁵ Svou stavbou lze polymerzomy přirovnat k duté skořápce, kdy ve většině případů je vnější a vnitřní svrchní vrstva hydrofilní, zatímco prostřední vrstva má hydrofobní charakter, což znamená, že tyto útvary mohou mít inkorporované hydrofilní látky (například léčivo, kontrastní látka) v jádře nebo lipofilní sloučeniny (například léčivo, kontrastní látka) v obalu.^{26,27}



Obrázek 5: Struktura polymerzomu a různé možnosti integrace hydrofobních i hydrofilních látek.²⁸

Vzhledem ke své morfologii a podobnosti s lipozomy, resp. jejich fosfolipidové dvojvrstvě (viz kapitola 1.6), představují polymerzomy vysoce slibný nástroj pro napodobení biologických membrán.²⁹

1.6 Ostatní typy nosičů

Pro kompletnost problematiky nosičových systémů je nutno ve stručnosti zmínit některé z dalších významných typů, jež však nemusí být typicky připravovány z polymerů.

Prvním z nich jsou lipozomy – uzavřené sférické vezikly, tvořené fosfolipidovou dvouvrstvou agregující ve vodném prostředí. Tento typ nosičových systémů byl vůbec poprvé použit v klinické praxi.¹ Dalšími zástupci jsou například nanosféry, nanokapsule,³⁰ uhlíkaté nanotrubky nebo fullereny³¹ a emulze.³² Mezi nosičové systémy patří také různé anorganické částice, jako jsou zlaté nanončástice (Obrázek 1),³³ kvantové tečky (viz kapitola 3.2.5) nebo superparamagnetické nanočástice železa, jež budou stručně popsány v kapitole 3.4.2.

2 CÍLENÍ

Vzhledem k vysoké společenské závažnosti nádorových onemocnění je příprava výše popsaných nosičových systémů velmi často zaměřena na doručování kancerostatik (například doxorubicin, paklitaxel). Jak již bylo zmíněno, všeobecným problémem těchto malých organických molekul je jejich nedostatečně dlouhá cirkulace v krevním řečišti a nízká akumulace v cílové tkáni, s čímž dále souvisí vysoké dávky těchto cytotoxických látek nutné pro dosažení terapeutického efektu, avšak také často nežádoucích vedlejších účinků.² V oblasti nosičových systémů léčiv byly vytvořeny dvě základní teorie a strategie pro cílené doručování léčiv, tzv. „aktivní“ a „pasivní“ cílení, jejichž základní rysy budou popsány v následujících kapitolách.

2.1 Pasivní cílení

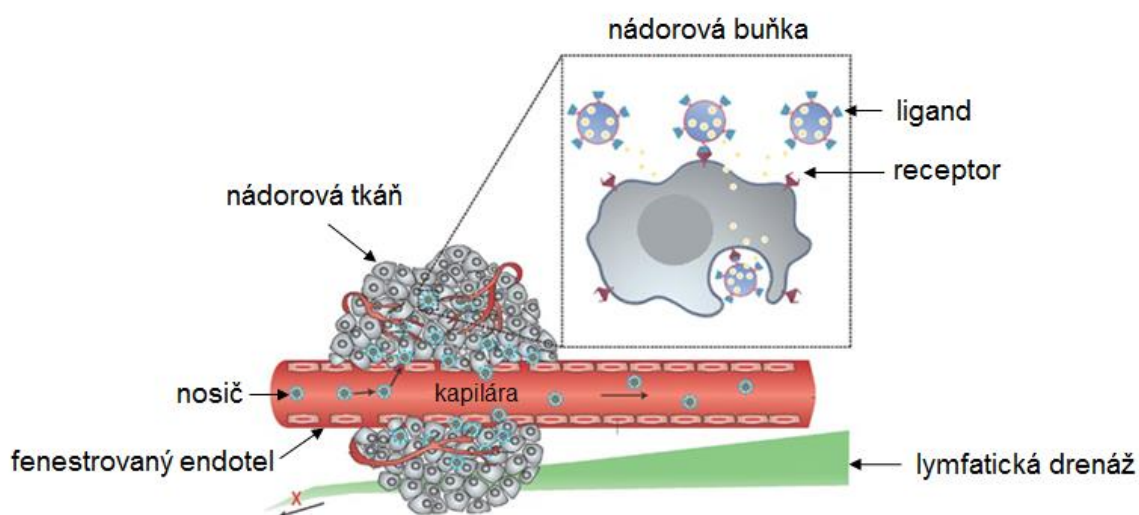
Odlišnosti ve struktuře a fyziologii patologických tkání (například nádorové nebo zánětlivé) hrají významnou roli ve strategii doručování a cílení léčiv. Kupříkladu nádorová tkáň se obecně liší od normální zdravé tkáně v látkovém složení extracelulární matrix, stavbě cév, výskytem buněk s abnormálním fenotypem (například specifické makrofágy) nebo buněk exprimujících ve větším množství určité receptory.³⁴

Mikroprostředí patologické tkáně se vyznačuje především fenestrovaným endotelem a mnohem větší prostupností cévního systému nádorové tkáně pro rozměrné molekuly nebo částice. Současně se vyskytující nedostatečný nebo často i úplně chybějící odtok lymfy pak způsobuje retenci a hromadění vysokomolekulárních látek v nádorové tkáni (Obrázek 6). Tato abnormalita, označovaná jako efekt zvýšené permeability a retence (EPR efekt), byla poprvé popsána v 80. letech 20. století kolektivem autorů Matsumura a Maeda.³⁵ Naproti tomu, nízkomolekulární látky relativně volně difundují do nádorové tkáně, ale ovšem také zpět do krevního řečiště, což znamená, že se sice do cílového místa dostanou, avšak akumulace zde není dostatečná. Při návrhu nosičových systémů je využíváno zejména toho, že EPR efekt je dosti univerzální pro mnoho nádorů a zvyšuje akumulaci nosičových systémů, avšak ne více než s dvacetinásobnou selektivitou oproti normální tkáni. Tímto způsobem dochází k cílení do intersticiálního prostoru tkáně, nikoliv dovnitř buněk, tudíž je doporučeno pasivní cílení kombinovat s aktivním cílením.^{36,37}

2.2 Aktivní cílení

Nádorové buňky na svém povrchu velmi často ve větší míře exprimují specifické receptory pro určité ligandy nebo antigeny (Obrázek 6). Pokud je k nosičovému systému navázán vhodný ligand (například RDG peptid, protilátky, kyselina listová a jiné)³⁸ komplementární k danému receptoru

na povrchu buňky, může dojít ke specifické interakci a zachycení nosiče léčiva nádorovou buňkou, následné akumulaci a nejlépe také k receptorově zprostředkované endocytóze.³⁹ Ačkoliv potenciální výhoda aktivního cílení je zřejmá, tato metoda se doposud zcela neosvědčila v praxi. To je jeden z důvodů, proč je zatím stále preferováno pasivní cílení.^{11,40}



Obrázek 6: Schématické znázornění pasivního a aktivního cílení nosičů do nádorové tkáně.⁴¹

3 METODY A KONTRASTNÍ LÁTKY POUŽÍVANÉ PRO ZOBRAZOVÁNÍ

Jak již bylo v úvodu zmíněno, teranostické nosičové systémy jsou charakteristické přítomností diagnostických nebo kontrastních látek, jež, stejně jako léčiva, mohou být vázány k matici nosiče chemickou vazbou, ale také pouze fyzikálními interakcemi. Využití kontrastních látek je významným nástrojem pro výzkumné účely, ale také v klinické praxi pro anatomické, morfologické i molekulární zobrazování a diagnostiku.

Mezi nejznámější techniky pro neinvazivní vizualizaci patří nukleární magnetická resonance (MRI), rentgenová radiografie a počítačová tomografie

(CT), ale také optické metody, jako jsou fluorescence a bioluminiscence. Velmi využívané, zejména v klinické praxi, jsou dále techniky založené na sledování aktivity radionuklidů – pozitronová emisní tomografie (PET) nebo jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT).^{42,43} Vybrané zobrazovací metody budou stručně komentovány v následujících podkapitolách.

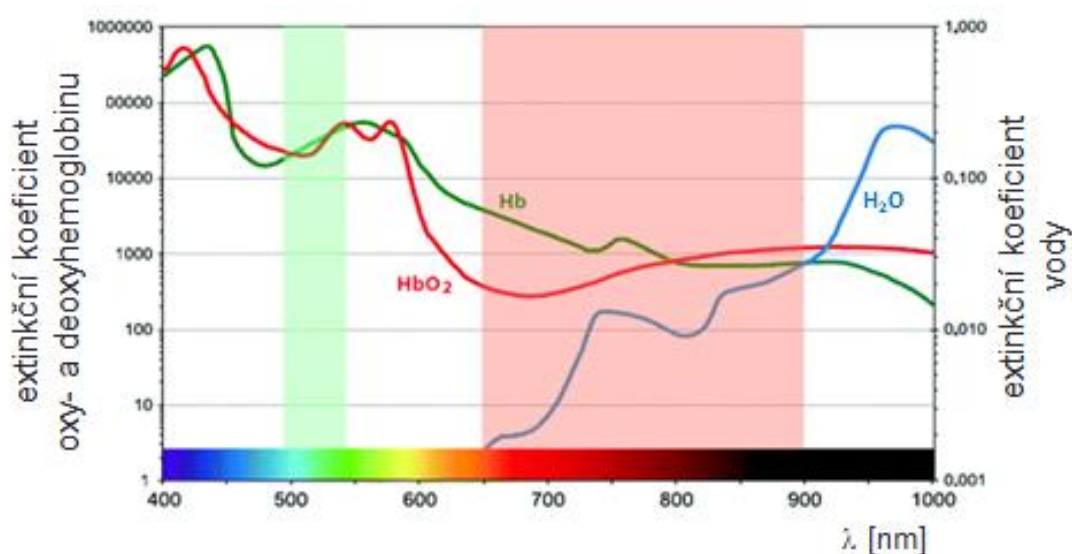
3.1 Fluorescenční zobrazování

Fluorescenční zobrazování se jeví jako slibná metoda pro neinvazivní zobrazování, především díky její relativně vysoké citlivosti, specifitě a zisku obrazu v reálném čase. Výhodou fluorescenčního zobrazování jsou také poměrně nízké náklady, nenáročnost, neinvazivnost a na rozdíl od PET a SPECT také absence potenciálně nebezpečného ionizujícího záření.⁴⁴ Vzhledem k nedostatečné hloubce penetrace excitačního i emitovaného záření tkáněmi a nutnosti zisku komplexních informací je vhodné optické zobrazování kombinovat s ostatními metodami, jako jsou PET, SPECT nebo MRI.⁴⁵

Při výběru vhodné látky pro optické zobrazování se musí brát v úvahu absorpce a rozptyl světla okolními tkáněmi, nežádoucí autofluorescence endogenních fluoroforů a s tím související vhodná vlnová délka excitačního a emisního záření, resp. také Stokesův posun u chromoforu, jeho jas, bio- a fotostabilita ale také farmakokinetické vlastnosti a biokompatibilita.⁴⁶

Co se týče vlnové délky, v případě použití excitačního záření z modré a zelené oblasti viditelného záření nedochází většinou k dostatečné penetraci tohoto záření do tkání, excitaci fluoroforu a následné emisi fotonů. Z těchto důvodů bývá záření o kratších vlnových délkách využíváno pouze pro vizualizaci povrchových struktur. Pro *in vivo* diagnostiku nejsou také příliš vhodné látky excitovatelné žlutým nebo červeným zářením (o vlnových délkách kratších než 650 nm). Vzhledem k absorpci tohoto záření přirozeně se vyskytujícími endogenními fluorofory (kupříkladu hemoglobinem) dochází ke

vzniku nežádoucí autofluorescence a s tím souvisejícího nízkého kontrastu fluoroforu vůči okolním tkáním. S ohledem na existenci tzv. absorpčního či optického“ okna^{42,47}, to jest oblast záření charakteristické vlnovými délkami v rozmezí 650–900 nm, kde nedochází k významné absorpci a emisi záření endogenními fluorofory (Obrázek 7), jsou pro neinvazivní *in vivo* diagnostiku preferovány fluorescenční látky absorbující a emitující záření v blízké infračervené oblasti (NIR). Mezi NIR fluorofory patří látky organického i anorganického původu.⁴⁸



Obrázek 7: Extinkční koeficient vody, oxy- (HbO_2) a deoxyhemoglobinu (Hb) v oblasti vlnových délek viditelného a blízkého infračerveného záření (červeně vyznačená plocha odpovídá tzv. „absorpčnímu oknu“).⁴²

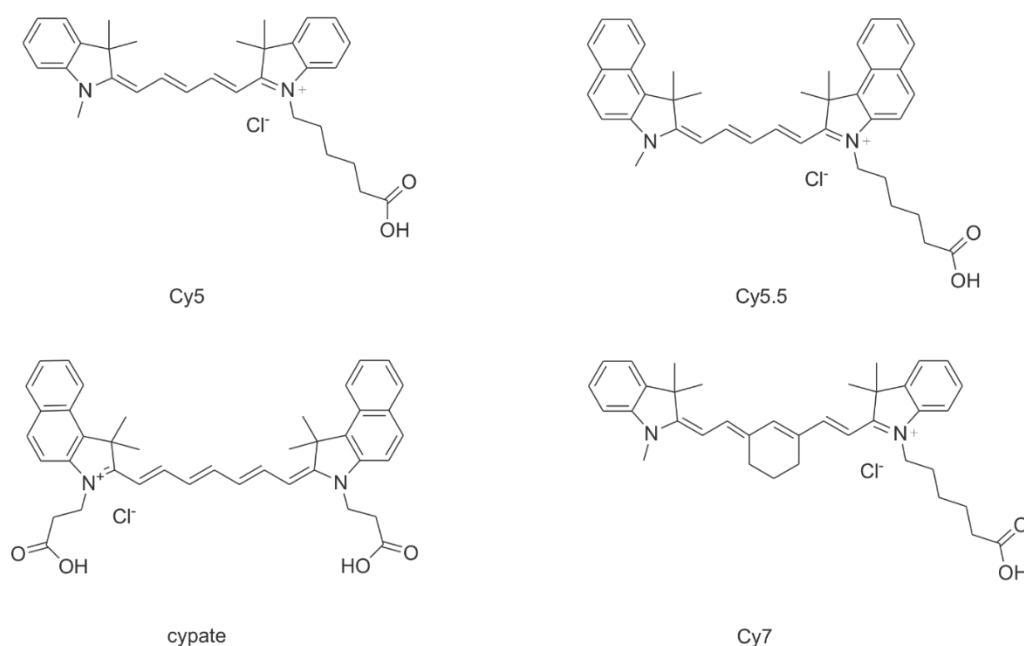
3.2 Organické syntetické fluorofory vhodné pro neinvazivní diagnostiku

Organické syntetické fluorofory představují rozsáhlou skupinu mnoha velmi strukturně rozmanitých látek, přičemž pro použití v humánní medicíně je organizací U.S. Food and Drug Administration schváleno pouze několik vybraných fluorescenčních látek – indocyaninová zeleň (ICG)

nebo methylenová modř a fluorescein, který však nespadá do kategorie NIR fluorescenčních látek.^{49,50}

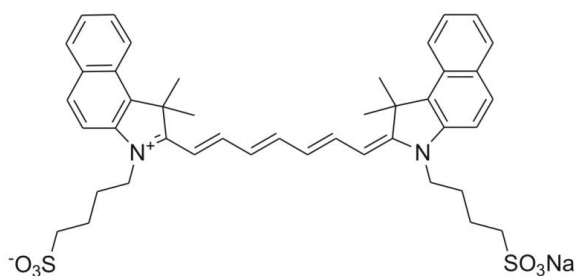
3.2.1 Polymethinová cyaninová barviva

Jako první ze zástupců organických látek budou v této podkapitole zmíněna cyaninová barviva, jež lze definovat jako nízkomolekulární sloučeniny tvořené aromatickými a heterocyklickými dusíkatými cykly spojenými methinovým můstkem. Monomethinové a trimethinové cyaninové deriváty jsou charakteristické absorpcí a emisí záření o vlnových délkách v rozmezí 400–500 nm. Prodloužení polymethineového řetězce dále o jednu jednotku vinylenu způsobuje bathochromní posun okolo 100 nm, přičemž pentamethinové deriváty (například Cy5, Cy5.5; Obrázek 8) dosahují absorpce a emise záření už v blízké infračervené oblasti. Látky z heptamethinové řady například Cy7, cypate (Obrázek 8) nebo ICG (Obrázek 8) potom absorbují a emitují záření s vlnovými délkami až okolo 800 nm. Penta a heptamethinové cyaninové deriváty bývají řazeny mezi NIR fluorescenční barviva a obecně se vyznačují relativně vysokým absorpčním molárním koeficientem a dobrým kvantovým výtěžkem.^{51,52}



Obrázek 8: Významné penta- a heptamethinové cyaninové deriváty.

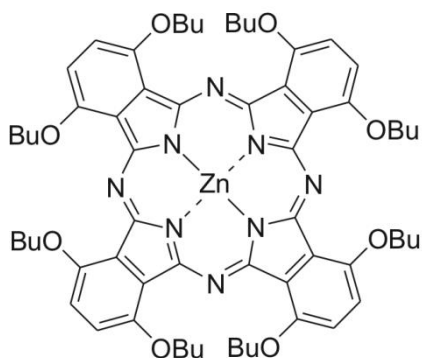
Na začátku této podkapitoly bylo uvedeno, že v současné době je z výše komentované skupiny látek povolena v humánní medicíně indocyaninová zeleň (Obrázek 9). ICG byla kupříkladu úspěšně použita pro neinvazivní diagnostiku karcinomu prsu v lidském těle.⁵³ Přestože je tedy ICG schválená pro klinické použití a prokazatelně efektivní jako diagnostická látka, nevýhodou může být vazba k plasmatickým proteinům⁵⁴ (například albuminu), rychlé odstranění ICG z krevního oběhu⁵⁴ nebo mírná cytotoxicita.⁵⁵



Obrázek 9: Indocyaninová zeleň.

3.2.2 Ftalocyaniny

Ftalocyaniny se svou strukturou řadí mezi heteromakrocyclické sloučeniny. Základní skelet těchto látek tvoří pyrrolové podjednotky (Obrázek 10), jež mohou být dále různě modifikovány nebo tvořit koordinační sloučeniny s některými ionty kovů (například Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}). Ftalocyaniny jsou charakteristické rozsáhlým konjugovaným π -elektronovým systémem, s čímž souvisí schopnost intenzivní absorpce a emise elektromagnetického záření taktéž v NIR oblasti.^{52,56}

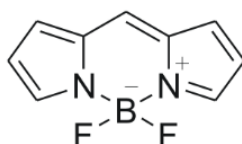


Obrázek 10: Zástupce fthalocyaninu vhodného pro *in vivo* neinvazivní zobrazování.⁵⁷

Kromě funkce diagnostických látek jsou cyaninové deriváty a zejména ftalocyaniny v literatuře popisovány rovněž v souvislosti s fotodynamickou terapií. Zmíněné fluorescenční látky jsou po expozici vhodným excitačním zářením schopné generovat pro buňky vysoce cytotoxický sigletový kyslík.^{58,59}

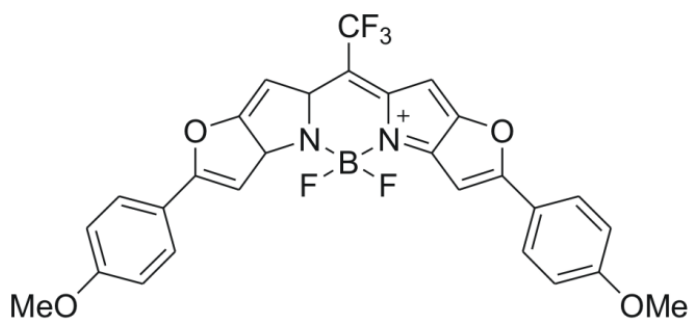
3.2.3 BODIPY

Další ze skupiny organických fluoroforů jsou tzv. BODIPY – sloučeniny, jejichž základní strukturu tvoří 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen, uvedený na Obrázku 11.⁵²



Obrázek 11: Základní struktura BODIPY

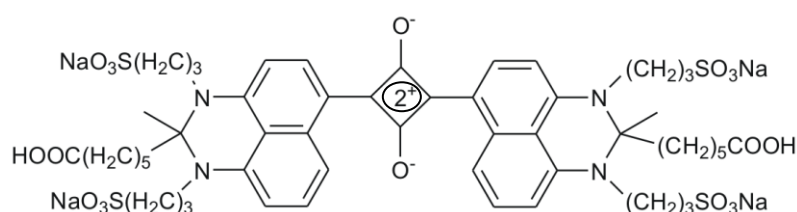
Jedny z prvních připravených derivátů BODIPY nebyly z hlediska neinvazivní diagnostiky vlastností příliš výhodné, jelikož většina z těchto látek emitovala záření o vlnových délkách kratších než 600 nm.⁶⁰ Při dalším vývoji uvedených látek bylo využito skutečnosti, že už i malá změna ve struktuře BODIPY umožňuje upravit jejich fluorescenční charakteristiku a v posledních letech se podařilo připravit sloučeniny, jejichž emisní spektrum je posunuto k blízké infračervené oblasti (Obrázek 12).⁶¹



Obrázek 12: Derivát BODIPY emitující záření v NIR oblasti.⁵²

3.2.4 Squarainové deriváty

Jako poslední příklad syntetických organických fluoroforů jsou uvedeny deriváty odvozené od squarinu (Obrázek 13), jejichž molekuly obsahují oxocyklobutenolátové jádro, 1,3-disubstituované aromatickým nebo heterocyklickým kruhem.⁶² Zmíněné fluorescenční látky se vyznačují velmi intenzivními absorpčními a emisními pásy s vysokým molárním absorpčním koeficientem. Ačkoliv nejsou tak frekventovaně využívány pro *in vivo* studie jako cyaniny, bývají označovány jako potenciálně slibné látky pro neinvazivní diagnostiku.⁵²



Obrázek 13: Derivát squarinu absorbující a emitující záření v NIR oblasti.⁵²

3.2.5 Anorganické fluorescenční nanočástice

Druhým typem materiálu, využívaným pro fluorescenční zobrazování, jsou anorganické sloučeniny a z nich připravené nanočástice. Významnými zástupci jsou kvantové tečky (QD), charakterizované jako polovodivé nanokrystaly o průměrném rozměru několik jednotek nanometrů (1–8 nm).⁴³ Základní struktura kvantových teček je tvořena dvěma typy polovodičových materiálů, kdy jeden z nich formuje jádro, na němž je naneseno několik vrstev jiného polovodiče – obal. Mezi látky, které tvoří QD patří například CdSe, CdTe, CdS, ZnS a dále také méně toxické materiály jako jsou InP a ZnS.^{63,64}

Kvantové tečky jsou charakteristické vysokou absorpcí záření, úzkými emisními pásy a odolností vůči ztrátě fluorescence. Na rozdíl od organických fluoroforů nejsou excitační a emisní spektra závislá pouze na chemickém

složení, ale také na rozměru kvantových teček (Obrázek 14). Zajímavostí také je, že tyto částice mohou být excitovány jednou vlnovou délkou a emitovat záření o různých vlnových délkách, přičemž Stokesův posun může být až stovky nanometrů.⁶⁵



Obrázek 14: Vliv rozměru kvantových teček na emisi v uvedené oblasti viditelného záření.⁶⁵

Kvantové tečky bývají, stejně jako organické fluorofory, používány pro fluorescenční značení různých molekul nebo polymerů. Avšak z farmakokinetického hlediska se někdy jeví jako nevýhoda nejen jejich velikost, průměrně dosahující jednotek až desítek nm, ale také obsah toxických prvků, jako jsou například Cd, Pb, Hg.^{66,67}

3.3 Bioluminiscenční zobrazení

V oblasti optických diagnostických metod, zejména ve výzkumných laboratořích, je využíváno taktéž zobrazování za využití bioluminiscence. Tato metoda je založena na ATP a O₂ závislé enzymatické přeměně luciferinu na oxyluciferin enzymem luciferázou, nacházející se uvnitř živých buněk. Výsledkem reakce jsou vyzářené fotony, jež mohou být při *in vivo* aplikacích detekovány speciální kamerou, přičemž je umožněna například kvantitativní diagnostika nádoru nebo monitoring efektivity terapie.⁶⁸

3.4 Zobrazování magnetickou rezonancí

Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) se řadí mezi neionizační techniky a je založeno na rozdílu v longitudiálních T1 (podélná relaxace, spin-mřížka relaxace) a transverzálních T2 (příčná relaxace, spin-spin relaxace) relaxačních časech protonů vody v různých tkáních. V závislosti na typu ovlivněné relaxace, respektive poskytovaného kontrastu v klinické praxi, lze rozlišovat T1 a T2 diagnostické látky.

3.4.1 T1 diagnostické látky

Mezi T1 kontrastní látky patří paramagnetické kovové prvky ze skupiny lanthanoidů a jejich chelátové komplexy. Zmíněné látky ovlivňují, obvykle zvyšují, podélné (T1) relaxační doby protonů vody, čímž je dosaženo zisku pozitivního kontrastu. Vzhledem k tomu, že samotné klinicky použitelné cheláty Gd-DTPA nebo Gd-DOTA a jejich deriváty mají velmi krátký retenční čas v krevním oběhu a nelze pomocí nich efektivně rozlišit nemocnou od zdravé tkáně, bývají tyto látky většinou vázány k různým nosičovým systémům za účelem eliminace uvedených nežádoucích farmakokinetických vlastností.⁶⁹ Třebaže se jeví tento typ kontrastních látek v preklinických studiích jako velmi vhodný pro zobrazování nádorových tkání, klinické použití je limitováno potencionální toxicitou. Příkladem mohou být ionty gadolinia, jež mohou způsobit poškození ledvin a zhoršení renální funkce.⁷⁰

3.4.2 T2 diagnostické látky

Na rozdíl o výše uvedeného, T2 kontrastní látky zkracují příčné relaxační časy protonů vody, přičemž je dosaženo negativního kontrastu v obrazu. Mezi významné zástupce patří superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPION). Jak již název napovídá, SPION mají jádro tvořeno oxidy železa – Fe_3O_4 a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.⁷¹

Magnetické nanočástice lze většinou syntetizovat pomocí několik metod, jako je tepelný rozklad – dekompozice organického prekursoru obsahujícího železo (například oleátu železitého ve vysoko vroucím rozpouštědle),⁷² dále koprecipitací,⁷³ mikroemulzními technikami⁷⁴ nebo hydrotermální syntézou⁷⁵. Obecně je cílem všech typů syntéz získat produkt monodisperzního charakteru (tj. s úzkou distribucí velikostí částic) a to nejlépe tak, že volbou reakčních podmínek je řízena velikost a morfologie částic. Vzhledem k náplni doktorského studia je SPION věnováno v disertační práci více prostoru.

Pro aplikace v medicíně bývá velmi častá modifikace nebo funkcionalizace povrchu SPION^{76,77} (například hyaluronanem^{78,79}, kyselinou olejovou⁸⁰, poly(ethylenglykolem)⁸¹, poly(vinylalkoholem)⁸² a jiné.). Důvodem je například zabránění reakce nanočástic oxidů železa s krevní plasmou nebo omezení agregace SPION, vylepšení koloidní stability a aktivního cílení

Jak již bylo zmíněno, SPION mohou být použity jako kontrastní látky pro zobrazování magnetickou resonancí. Co se týče dalších medicínských aplikací, bylo zjištěno, že SPION mohou pozitivně ovlivnit terapii rakoviny jako hypertermická činidla, kdy je lokálně ale i systémově využívána teplota v rozmezí 42–45 °C, indukovaná působením externího střídavého magnetického pole na SPION.⁸³ Někteří autoři uvádějí, že magnetické nanočástice mohou fungovat také jako imunoterapeutika v případě autoimunitních onemocnění.⁸⁴ Ve studii Šmejkalové⁸⁵ bylo dále zjištěno, že SPION inkorporované v polymerních micelách vykazují cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám HT-29. Přestože jsou SPION přisuzovány terapeutické účinky, tyto magnetické nanočástice mohou samy o sobě sloužit jako nosiče léčiv.⁸⁶ V případě aplikace SPION je potencionální výhodou využití magnetických vlastností pro jejich cílené doručování a kontrolovanou akumulaci působením externího magnetického pole.⁸⁷

Obecně technika MRI nabízí vysoké prostorové a časové rozlišení, stejně jako výhodnou kombinaci anatomického a molekulárního zobrazení, přičemž lze získat třídimenzionální obraz měkkých tkání s vysokým kontrastem.¹ V současné době existuje již mnoho registrovaných komerčně dostupných diagnostických látek pro MRI. Mezi vybrané zástupce patří například Magnevist® a Omniscan® (T1 kontrastní látky), dále Resovist® nebo Sinerem® (T2 kontrastní látky).⁸⁸

3.4.3 Zobrazování pomocí radionuklidů

Jako poslední možnost neinvazivního zobrazování v případě teranostik budou v této části stručně komentovány radionuklidové metody, zahrnující jednofotonovou emisní počítačovou tomografii (SPECT) a pozitronovou emisní tomografii (PET). Jedná se techniky s vysokou citlivostí, využívané pro funkční vyšetřování (například farmakologické, biologické), ale také se vyznačující dostatečnou citlivostí pro potřeby vizualizace například interakcí mezi ligandem a receptorem.⁸⁹

Při použití těchto metod je nutno brát v úvahu, že jako kontrastní látky jsou používány radioaktivní nuklidy. V případě PET jsou to izotopy prvků, nacházející se v živém organismu, například ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O nebo velmi často ^{18}F .⁹⁰ Pro SPECT se používají izotopy prvků těžších kovů, jako jsou $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{125}I nebo ^{111}In .⁹¹ Radioizotopy se vyznačují krátkými poločasy rozpadu a vystavují pacienta i obsluhu přístroje ionizující radiaci. Zmíněné diagnostické metody a látky jsou navíc regulovány mnoha přísnými bezpečnostními předpisy, jež také omezují jejich opakované použití.⁴² Při volbě zobrazovací metody je také nutno brát v úvahu někdy omezenou dostupnost těchto velmi pokročilých technologií a jejich vysokou cenu (zejména PET).

3.5 Kombinace zobrazovacích metod

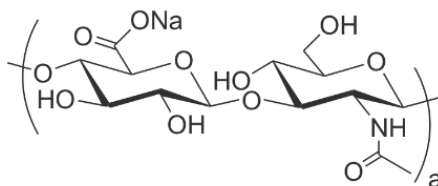
Třebaže se jedná ve všech výše zmíněných případech o relativně velmi sofistikované a vyspělé techniky, žádná z dostupných metod pro *in vivo* diagnostiku není ideální a dostačující k získání všech potřebných informací v prostoru a čase. Kombinace některých zobrazovacích metod mohou nabídnout synergické výhody, avšak návrh konkrétní kombinace závisí především na cíli studie.⁹²

4 Hyaluronan

Volba vhodného materiálu představuje často nejdůležitější krok pro návrh nosičového systému v závislosti na jeho aplikaci. Pokud se zaměříme na polymerní látky, pro přípravu nosičových systémů bývají využívány polymery přírodního původu (například dextran, chitosan, kyselina hyaluronová, kolagen), ale také biodegradabilní (například poly(laktát), poly(kaprolakton)) i nebiodegradabilní syntetické polymery (například poly(ethylenglykol) PEG, poly(vinylpyrrolidon)).⁹³ Důležité jsou nejen chemicko-fyzikální vlastnosti daného polymeru, ale také výsledky specifických preklinických testů, prokazujících bezpečnost materiálů, které by měly být netoxické a neimunogenní. Ať už se jedná o syntetické, či modifikované přírodní polymery, ve všech případech je nutno zvážit všechna rizika použití, zejména potom nejistotu v bezpečnosti jejich degradačních produktů. Vzhledem k tomu, že degradace má často za následek štěpení na fragmenty o různé velikosti, je poměrně náročné určit toxicitu experimentálně. V ideálním případě, by se měly polymery rozkládat na fragmenty, které jsou netoxické a dostatečně malé pro jejich přirozené odbourání v těle.^{1,94}

Jak již bylo zmíněno, pro přípravu nosičových systémů lze využít přírodní polymery, mezi něž nesporně patří kyselina hyaluronová, jež se sestává z

kyseliny D-glukuronové a *N*-acetyl-D-glukosaminu spojených $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidickou vazbou, přičemž opakující se disacharidové jednotky jsou spojené $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou. Je však nutno zmínit, že spíše než ve formě kyseliny se tento biopolymer vyskytuje, zejména ve fyziologickém prostředí, převážně ve formě své soli, označované jako hyaluronát nebo hylauronan (HA, Obrázek 15) například sodný, draselný apod.^{95,96}



Obrázek 15: Strukturní vzorec hyaluronanu.

U obratlovců se HA vyskytuje prakticky ve všech orgánech, tělních tekutinách a extracelulární matrix měkkých pojivových tkání. Lidské tělo obsahuje průměrně až 15 g HA, přičemž hladina hyaluronanu během dne kolísá a uvádí se, že až polovina množství se obnovuje každý den.⁹⁷ Ve větší míře se HA nachází v kůži, a to epidermis i dermis (přibližně třetina z celkového množství), sklivci, nebo synoviální tekutině kloubů obratlovců.³

Vzhledem k vysoké molekulové hmotnosti a značné kapacitě pro zadržování vody je primární význam této makromolekuly hydratační a strukturální. V lidském organismu má HA několik podstatných funkcí. Je nepostradatelnou součástí extracelulární matrix, kde slouží jako „páteř“ pro distribuci a organizaci důležitých komponentů jako jsou například proteoglykany, fibrin, fibronectin, kolagen, elastin. Podílí se mimo jiné také na buněčné signalizaci, proliferaci, diferenciaci, migraci a adhezi buněk. Bylo popsáno, že fragmenty HA s vysokou molekulovou hmotností mají anti-angionegezní a proti zánětlivé vlastnosti, naopak fragmenty HA o nižší molekulové hmotnosti ($<100\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) se vyznačují zcela opačnou biologickou aktivitu, jsou stimulatory imunity, zánětlivých reakcí a angiogeneze.^{3,98}

Pro využití v kosmetických nebo farmaceutických aplikacích byl hyaluronan nejprve izolován ze sklivce skotu, později z kohoutích hřebínků a pupeční šňůry. Pokročilejší biotechnologie vedly k vývoji geneticky modifikovaných bakterií produkujících HA ve vysokém výtěžku. V průmyslovém měřítku se HA získává činností například mikroorganismů z kmene *Streptococcus* nebo rekombinantního *Bacillus subtilis*.⁹⁹

Díky přirozené biokompatibilitě, biodegradabilitě, vstřebatelnosti nebo možné chemické funkcionalizaci představuje HA jeden z nejatraktivnějších polymerů pro tvorbu moderních biomateriálů využitelných ve farmaceutických či medicínských odvětvích.³ Vzhledem k unikátním vlastnostem našel HA mnoho využití ve zdravotnictví, kdy jsou například injekčně kompenzovány ztráty HA v důsledku stárnutí, nemocí a chirurgických zásahů. Hyaluronan se dále využívá pro dermální výplně či jako součást očních chirurgických pomůcek, přičemž bývá díky biokompatibilitě HA vyvolávána minimální reakce na cizí těleso. Byla popsána také podpůrná funkce HA při hojení ran, terapii nádorů a mnoho dalších aplikací.⁹⁸

4.1 Chemické modifikace hylauronanu

Samotný polymerní řetězec hyaluronanu není pro přípravu nosičových systémů zcela vhodný a pro dosažení požadovaných vlastností je často prováděna jeho chemická modifikace. Ze struktury HA je zřejmé, že primárně lze chemickou modifikaci provést na dvou typech funkčních skupin – karboxylových a hydroxylových. Sekundárně je možno připravit funkční aminoskupinu deacetylací *N*-acetylu nebo například také oxoskupinu selektivní oxidací C6—OH. Většina chemických modifikací probíhá ve vodném prostředí. V případě velmi hydrofobního substituentu nebo nebezpečí hydrolýzy, kdy je nutno použít organická rozpouštědla jako jsou DMSO nebo DMF, je rozpustnost HA v těchto aprotických polárních rozpouštědlech zajištěna konverzí

hyaluronanu sodného, popř. draselného do H^+ protonované formy (kyseliny hyaluronové) nebo konverzi na tetrabutylamoniovou sůl (TBA).^{100,101} V následujících kapitolách je uveden přehled činidel, které se využívají k modifikaci nebo navázání požadovaného substituentu na HA a k přípravě sekundárních funkčních skupin na řetězci tohoto polysacharidu.

4.1.1 Modifikace karboxylové funkční skupiny

Příprava amidů

Reakce karboxylové skupiny s aminoskupinou za přítomnosti karbodiimidů ve vodném prostředí je jednou z nejpoužívanějších metod modifikace hyaluronanu.¹⁰² Nejběžnějším činidlem z řady karbodiimidů je *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDC), který byl poprvé úspěšně použit pro modifikaci HA v 70. letech 20. století,¹⁰³ přičemž reakční mechanismus byl detailně studován až přibližně o 20 let později.¹⁰⁴ Jako nevýhody využití EDC pro modifikaci HA mohou být chápány vysoká citlivost reakce vůči pH (je vyžadováno slabě kyselé prostředí) a také možný vznik nežádoucího nereaktivního derivátu močoviny (Schéma 1). Vývojem dané metody syntézy bylo zjištěno, že formaci nereaktivního derivátu močoviny je možno eliminovat přidáním *N*-hydroxysukcinimidu (NHS) nebo 1-hydroxybenzotriazolu (HOBT) (Schéma 2).¹⁰⁵

Schéma 1

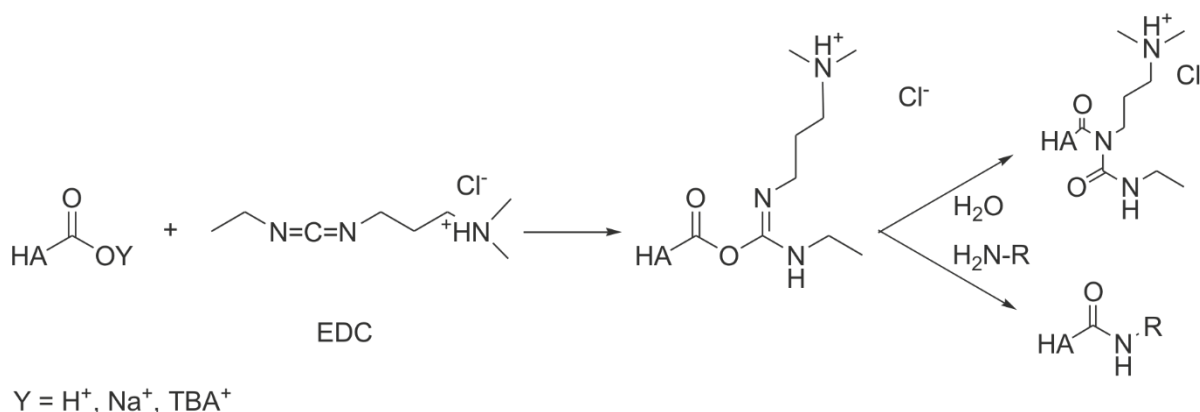
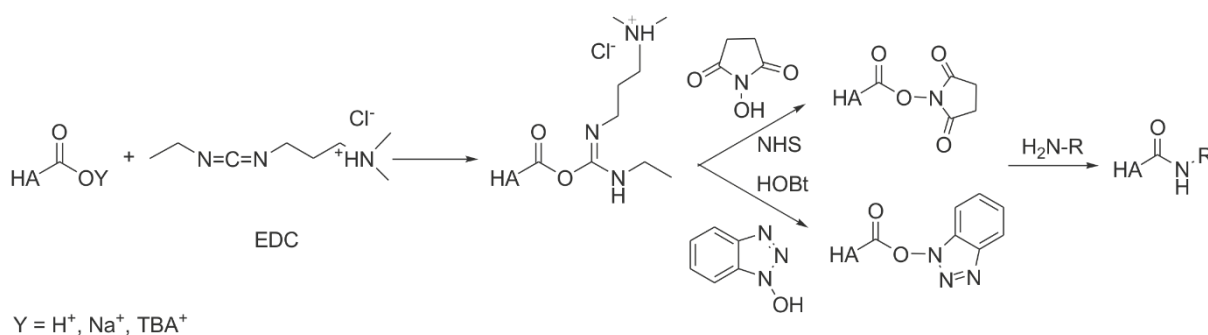
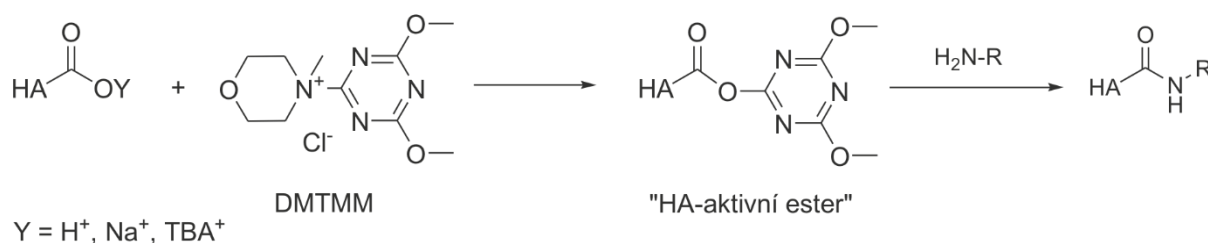


Schéma 2



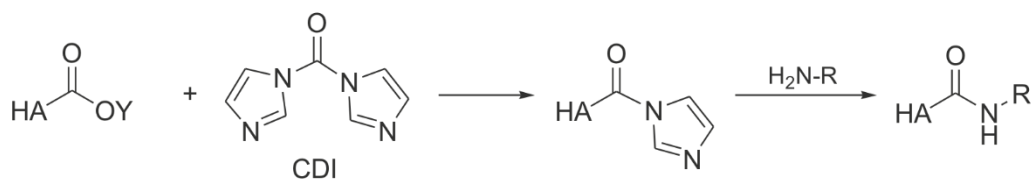
Možnosti amidace bez nutnosti speciální úpravy pH vodného prostředí byla zkoumána kolektivem autora D'Este,¹⁰⁶ jenž použil pro aktivaci karboxylové skupiny HA 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-*N*-methylmorfolinium-chlorid (DMTMM, Schéma 3). Bylo popsáno, že reakcí DMTMM s karboxylovou skupinou HA dochází k uvolnění *N*-methylmorfolinu a ke vzniku tzv. HA-aktivního esteru, který dále velmi ochotně reaguje s vhodnou aminoskupinou za vzniku amidické vazby.

Schéma 3



Jiný způsob aktivace karboxylové skupiny spočívá v reakci HA karboxylové skupiny s *N,N'*-karbonyldiimidazolem (CDI) v aprotickém polárním rozpouštědlem, jež může být v přítomnosti vhodného aminu následovaná vznikem amidu (Schéma 4). Jedná se o velmi elegantní metodu, nevyžadující přídavky dalších reaktantů. Rovněž v tomto případě nevznikají nežádoucí toxické sloučeniny. Jedinými doprovodnými produkty jsou imidazol a CO₂.¹⁰⁷

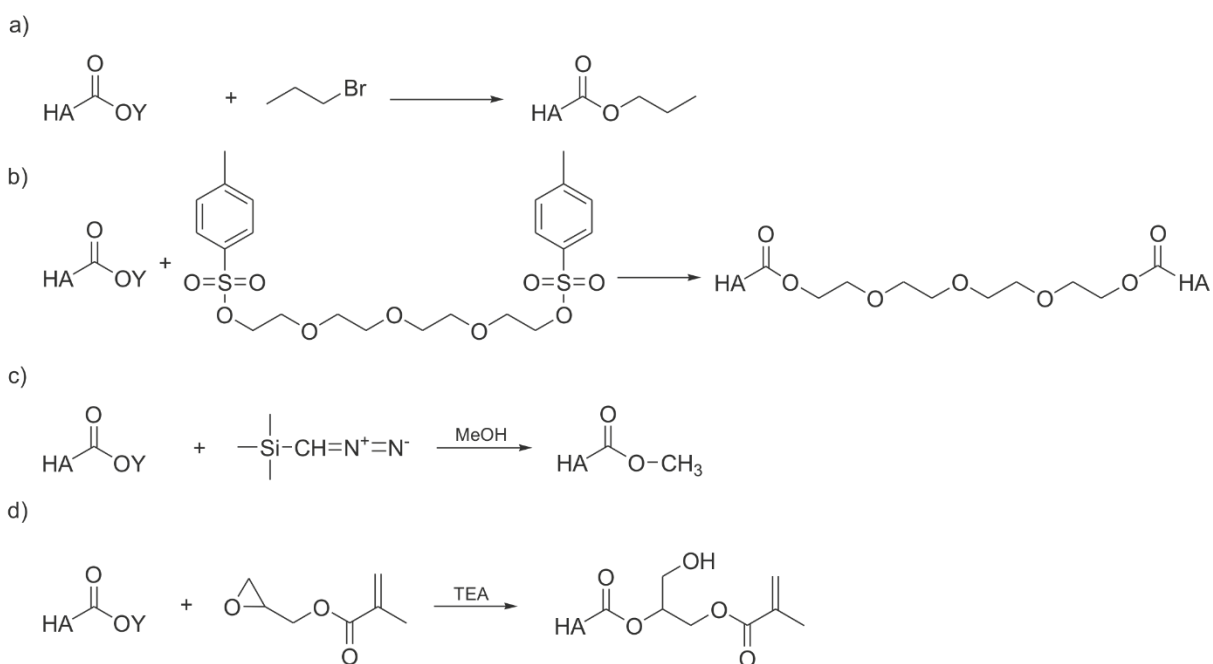
Schéma 4



Příprava esterů

Druhým často používaným způsobem modifikace karboxylové skupiny HA jsou reakce za vzniku esterové vazby. Bylo popsáno několik reakcí, kdy docházelo k tvorbě esterové vazby za použití alkylhalogenidů (Schéma 5a),¹⁰⁸ dále tosylátů (Schéma 5b),¹⁰⁹ derivátu diazomethanu (Schéma 5c)¹¹⁰ nebo oxiranů (Schéma 5d).¹¹¹

Schéma 5



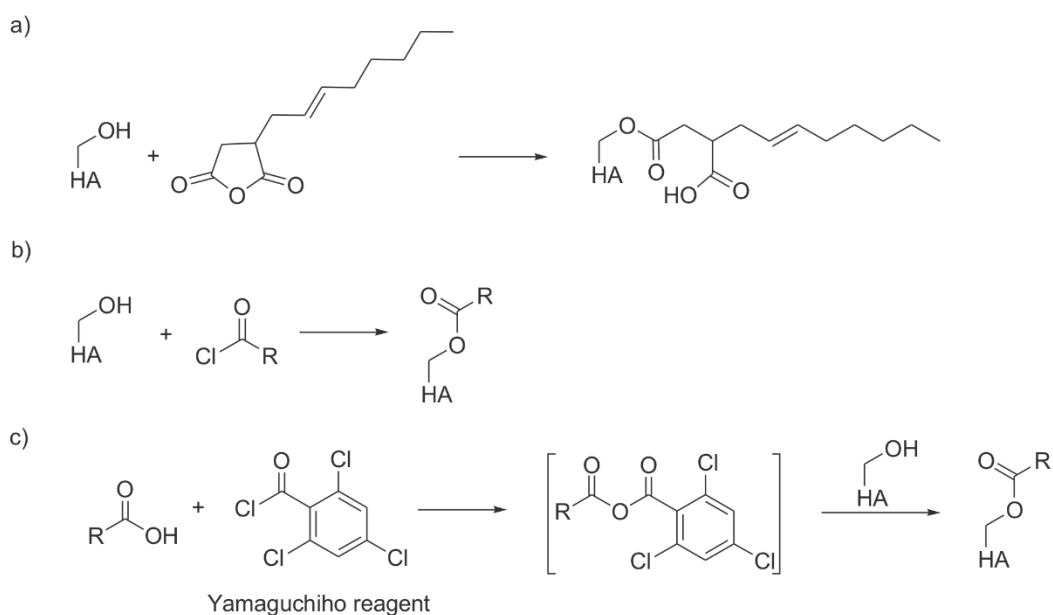
4.1.2 Modifikace hydroxylových skupin

Dosud není zcela jasné, které z hydroxylových skupin přítomných na sacharidových jednotkách HA podléhají modifikačním reakcím. Avšak ze sterického hlediska lze usuzovat, že náchylnější k reakcím je nejspíše primární hydroxylová skupina na C6 *N*-acetylglukosaminu oproti všem ostatním sekundárním OH skupinám.^{3,98}

Příprava esterů

Mezi významné modifikace hydroxylových skupin patří zejména jejich esterifikace. Kolektiv autora Tømmeraas¹¹² patentoval v roce 2007 přípravu esterů HA za pomoci alkylsukcinanhydridů, schematicky znázorněné na Schématu 6a. Formace esterů byla popsána také za použití acylchloridů (Schéma 6b).¹¹³ Jako poslední příklad přípravy esterů HA je uvedena reakce za využití *in situ* generovaného směsného anhydridu (Schéma 6c), kdy byl Yamaguchiho reagent (2,4,6-trichlorbenzoylchlorid) použit kolektivem Huerta-Angeles, pro modifikaci HA mastnými kyselinami (Schéma 6c).¹¹⁴

Schéma 6



R = substituent

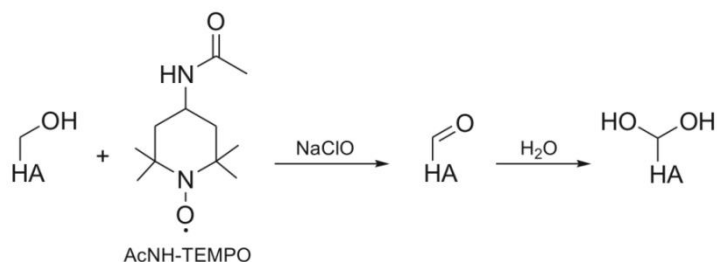
4.1.3 Příprava dalších funkčních skupin na HA řetězci

V odborné literatuře je popsáno také několik způsobů, jak na skeletu HA připravit nové funkční skupiny (například NH_2 , $=\text{O}$).

Příprava oxo skupin

Jednou z možností jak transformovat karboxylovou funkci glukuronové jednotky je mírná redukce pomocí 9-borabicyklo[3.3.1]nonanu¹¹⁵ nebo NaIO_4 ¹¹⁶. Naopak mírnou oxidací lze připravit aldehyd z hydroxylové skupiny na C6 *N*-acetyl-D-glukosaminu. K tomuto účelu se používá například oxidační systém AcNH-TEMPO/ NaClO (Schéma 7), čímž je dosaženo oxidace přibližně 10 % hydroxylových skupin. Zisku vyššího počtu aldehydických skupin v produktu lze dosáhnout účinkem Dessova-Martina oxidačního činidla.¹¹⁷

Schéma 7



Deacetylace

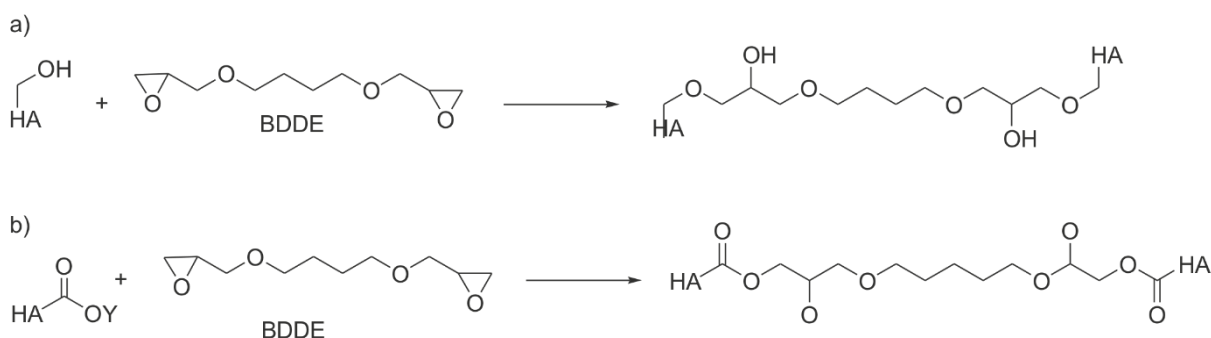
Deacetylací *N*-acetylglukosaminové jednotky HA lze připravit primární aminoskupinu. Nevýhodou je, že deacetylace se většinou provádí působením toxického síranu hydrazinu po dobu několik dnů při teplotách okolo 60 °C, což vede mimo jiné k fragmentaci řetězce HA.¹¹⁸

4.1.4 Síťování HA

Pro kompletnost problematiky modifikace HA je nutno uvést, že vedle modifikace funkčních skupin HA existuje i druhý přístup, spočívající v síťování řetězců HA, přičemž dochází ke vzniku 3D polymerní struktury za pomoci kovalentních vazeb mezi jednotlivými řetězci. Takto připravené materiály na bázi HA jsou většinou dostatečně robustní a mohou například dobře sloužit jako oporné struktury pro pěstování buněk (scaffolds), v tkáňovém inženýrství nebo jako suroviny pro přípravu hydrogelů.

Možným způsobem přípravy síťovaného HA je použití 2-((4-((oxiran-2-yl)methoxy)butoxy)methyl)oxiran (BDDE).¹¹⁹ Výhodou uvedeného činidla je, že jej lze využít jak pro reakci s karboxylovými (Schéma 8a), ale také hydroxylovými skupinami HA (Schéma 8b).

Schéma 8



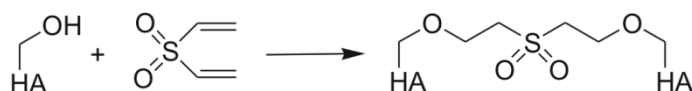
Y = H⁺, Na⁺, TBA⁺

Dalším činidlem pro spojování řetězců HA reakcí karboxylových skupin jsou zástupci karbodiimidů, jako je například EDC, popsány v kapitole 4.1.1, jež se pro účel tvorby HA polymerní sítě využívá často ve spojení s dihydrazidem kyseliny adipové.¹²⁰

V případě využití hydroxylových skupin bylo patentováno Balazs a kol.¹²¹ síťování HA pomocí divinyl sulfonu (Schéma 9). Tato reakce bývá prováděna

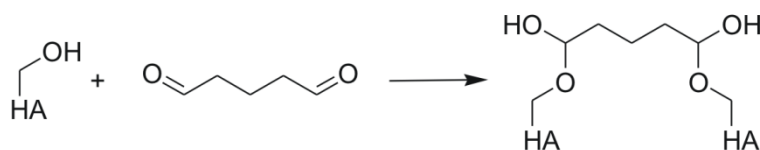
v zásaditém prostředí a mívá relativně rychlý průběh (1 h) již při laboratorní teplotě, preferované vzhledem k možné nežádoucí degradaci HA řetězce při vyšších teplotách.

Schéma 9



V neposlední řadě stojí za zmínku síťování HA užitím glutaraldehydu (Schéma 10). Přestože byl glutaraldehyd několika autory^{122,123} úspěšně využit pro přípravu síťované HA, nevýhodou tohoto činidla může být jeho toxicita a nutnost aktivace ve vysoce kyselém prostředí (pH 2), což může vést ke zpětné hydrolýze vznikajícího hemiacetalu.⁹⁸

Schéma 10



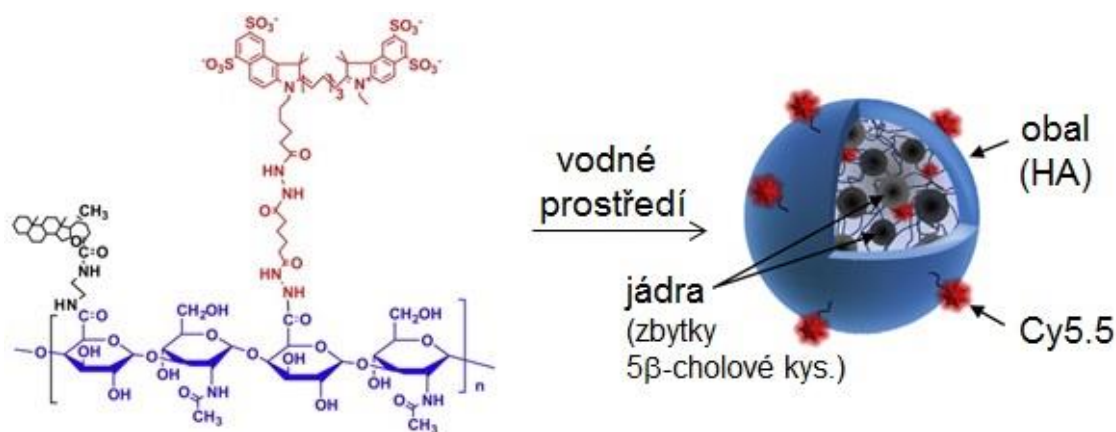
5 TERANOSTICKÉ NOSIČOVÉ SYSTÉMY PŘIPRAVENÉ Z DERIVÁTŮ HYALURONANU

Kyselině hyaluronové, respektive hyaluronanu a jeho derivátům, je věnována velká pozornost v oblasti tvorby nosičových systému pro léčiva. Jak již bylo zmíněno, nosičové systémy ve smyslu teranostik představují ve většině případů multifunkční nanočástice s terapeutickou a diagnostickou funkcí. V některých případech je na těchto částicích také přítomen i ligand pro specifické cílení na buněčné receptory. Využití HA pro konstrukci teranostik s sebou přináší nezanedbatelnou výhodou pro aktivní cílení z důvodu přítomnosti specifických receptorů pro HA na povrchu buněk živočišných a lidských tkání. Z nejznámějších je to například receptor CD44, velmi často také exprimovaný

některými nádorovými buňkami, jenž usnadňuje endocytózu HA do buněk.^{124, 125} Následující text je věnován známým NIR fluorescenčně značeným derivátům HA a nosičovým systémům, publikovaným v současné odborné literatuře.

Prvním příkladem je opticky detekovatelný systém pro doručování léčiv, tvořený fluorescenčním amfifilním derivátem HA. Strukturně se jedná o HA modifikovaný steroidním motivem kyseliny 5 β -cholové a pentamethinovým cyaninovým barvivem, komerčně značeným Cy5.5.^{126,127} Bylo zjištěno, že ve fyziologických podmínkách (PBS, pH = 7,4; 37 °C) dochází k autoagregaci tohoto derivátu prostřednictvím hydrofobních interakcí a tvorbě sférických nanočástic o rozměrech přibližně 350–400 nm v závislosti na stupni modifikace HA (Obrázek 16).

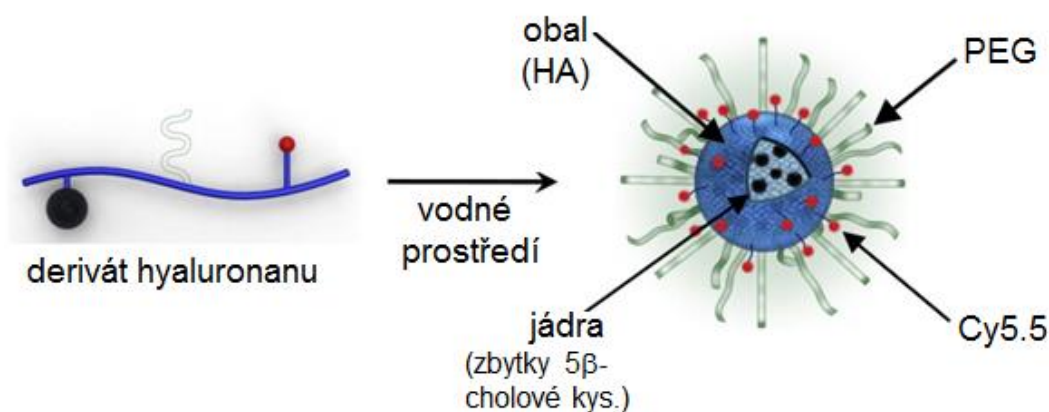
Při *in vivo* testování těchto nanočástic byla pozorována významná akumulace připravených agregátů v nádorové tkáni (SCC7 buňky), ale zároveň také jejich nežádoucí akumulace v játrech.



Obrázek 16: Fluorescenčně značený a hydrofobizovaný derivát HA a jeho agregace ve vodném prostředí.¹²⁶

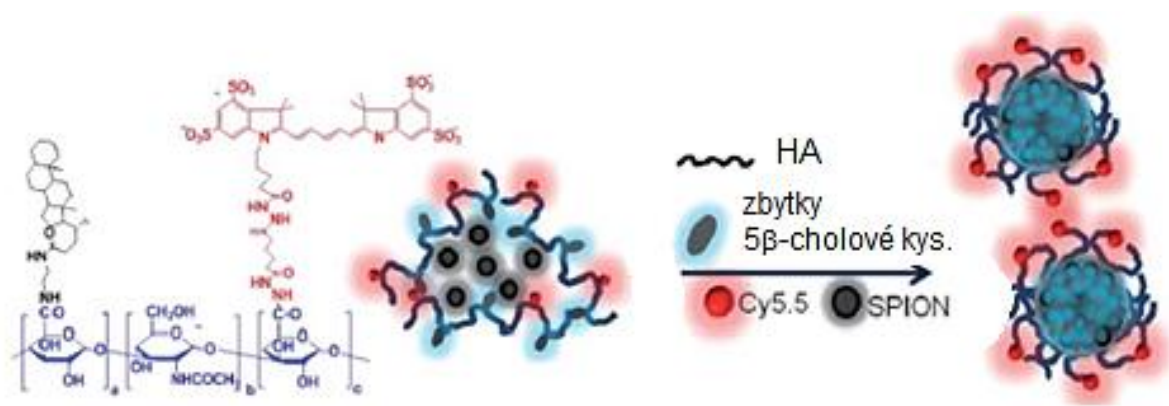
Za účelem snížení akumulace v játrech a prodloužení cirkulace nosičového systému v krevním řečišti, byl k výše uvedenému fluorescenčnímu amfifilnímu HA derivátu konjugován PEG (Obrázek 17). Dle autorů může PEG efektivně

snižovat rozpoznání nosičů retikuloendoteliálním systémem a jejich následnou akumulaci v játrech, čímž je prodloužena cirkulace nosičů v krevním řečišti a zvýšena možnost cílené akumulace systému v místě nádoru. *In vivo* experimenty bylo zjištěno, že tento nosičový systém s PEG se oproti nosiči bez PEG akumuloval 1,6× efektivněji v nádorové tkáni.¹²⁸



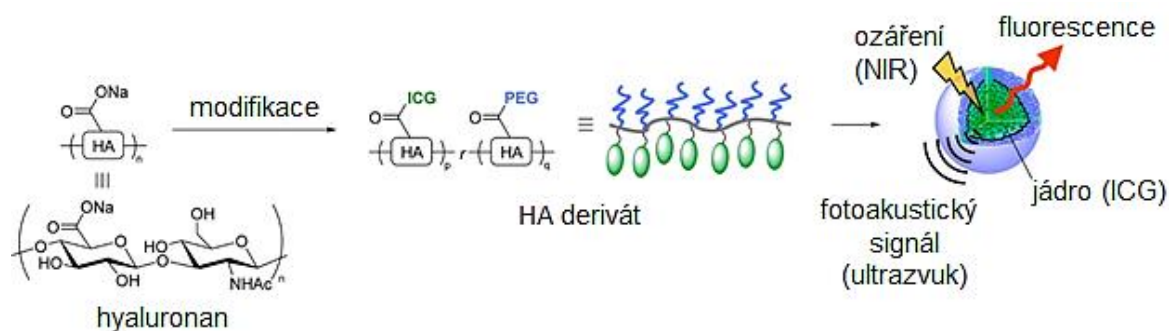
Obrázek 17: Tvorba nosičových systémů na bázi konjugátů hyaluronanu s kyselinou cholovou a PEG.¹²⁸

Poslední studie, v níž byl využit výše popsany derivát HA s kovalentně navázaným fluorescenčním barvivem Cy5.5 (Obrázek 18), byla provedena kolektivem autora Lee.¹²⁹ Jednalo se o přípravu fluorescenčně značeného, enzymaticky citlivého nosičového systému s enkapsulovanými SPION, umožňujícího duální zobrazení pomocí fluorescence a MRI. Experimentálně bylo zjištěno, že v přítomnosti hyaluronidázy, která způsobila pravděpodobně degradaci nosiče, došlo k několikanásobnému vzrůstu emise fluorescence v závislosti na koncentraci enzymu. Touto studií byl zkoumán a ověřen předpoklad, že fluorescence Cy5.5 je zčásti zhasena v přítomnosti SPION.



Obrázek 18: Struktura fluorescenčního derivátu HA tvořícího nosičové systémy pro SPION.¹²⁹

Jako příklad konjugace heptamethinových cyaninových fluorescenčních látek k hyaluronanu je uvedena práce Miki a jeho kolektivu.¹³⁰ Autoři připravili derivát HA s vázaným PEG, dále značený barvivem indocyaninovou zelení. Získaný amfifilní derivát HA byl schopen agregace ve vodném prostředí, kdy hydrofobní jádra vzniklých agregátů byla formována ICG (Obrázek 19). Experimentálně bylo zjištěno, že připravené částice mají schopnost efektivní akumulace v nádorové tkáni, kde jsou dále duálně neinvazivně detekovatelné, a to pomocí optického a fotoakustického zobrazování.

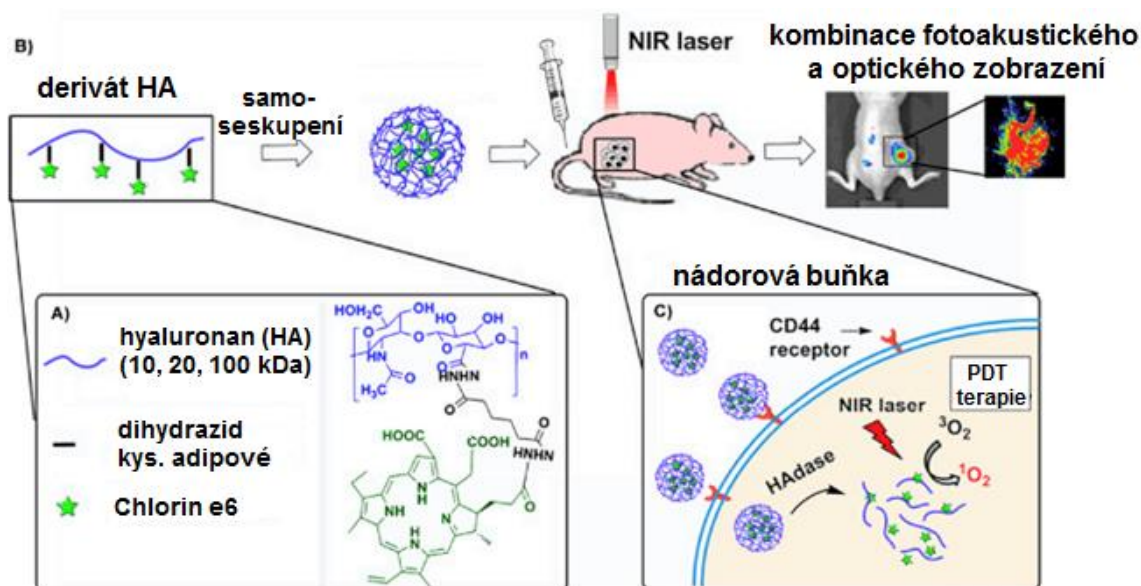


Obrázek 19: Agregáty ICG- a PEG-modifikovaného HA s možností optické a fotoakustické detekce.¹³⁰

Mezi další autory, kteří se zabývali deriváty hyaluronanu modifikovanými fluorescenčními látkami, patří Kelkar.¹³¹ Ve své studii představil derivát HA

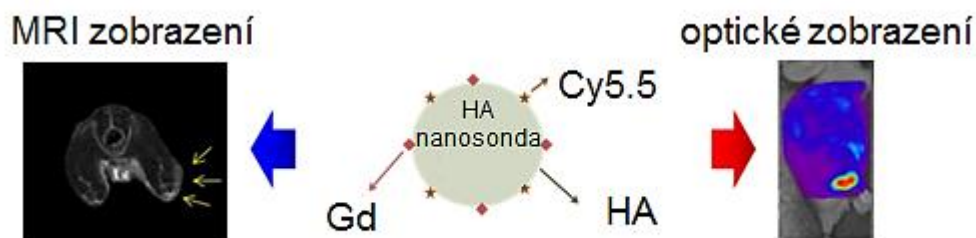
s kovalentně vázaným heptamethinovým barvivem Cy7.5 a motivem kyseliny 5 β -cholové, jež opět tvořil agregáty ve vodném prostředí. Na rozdíl od předchozích uvedených prací, je v této publikaci popsáno pouze testování cytotoxicity a vstupu látek do nádorových buněk prostaty *in vitro*. Derivát HA značený Cy7.5 byl použit *in vivo* až v další práci kolektivu autora Hill, přičemž byl úspěšně aplikován jako kontrastní látka napomáhající při chirurgických operacích nádorů modelových myší.¹³² Jako poslední typ heptamethinové cyaninové látky je zde zmíněna fluorescenční látka IR808, jež byla navázána na modifikovanou karboxylovou skupinu HA. Bylo zjištěno, že připravený derivát hyaluronanu, schopný agregace ve vodném prostředí, lze využít nejen pro fototermální terapii, ale navíc má také funkci diagnostické látky pro fotoakustické a optické zobrazení nádorů.¹³³

Příkladem ze současné odborné literatury jsou také nosičové systémy, autory¹³⁴ označované jako teranostické micely, připravené pro účely duálního neinvazivního zobrazování a fotodynamické terapie. Základem pro tvorbu těchto micel byl HA s kovalentně vázanou látkou z řad ftalocyaninů – Chlorin C6, uvedeno na Obrázku 20a. Studované nosičové systémy vykazovaly efektivní akumulaci v tumoru, respektive nádorových buňkách plicního epitelu, zejména díky interakcím se zde exprimovaným HA receptorem CD44 a také díky pasivnímu cílení. Dále po vstupu nosiče do nádorových buněk docházelo v přítomnosti hyaluronidázy k degradaci micel (Obrázek 20c), kdy excitací NIR zářením byl produkován singletový kyslík, jenž je základním činidlem fotodynamické terapie. Micely prokázaly také schopnost vysoce citlivého NIR fluorescenčního a fotoakustického zobrazení nádoru (Obrázek 20b).



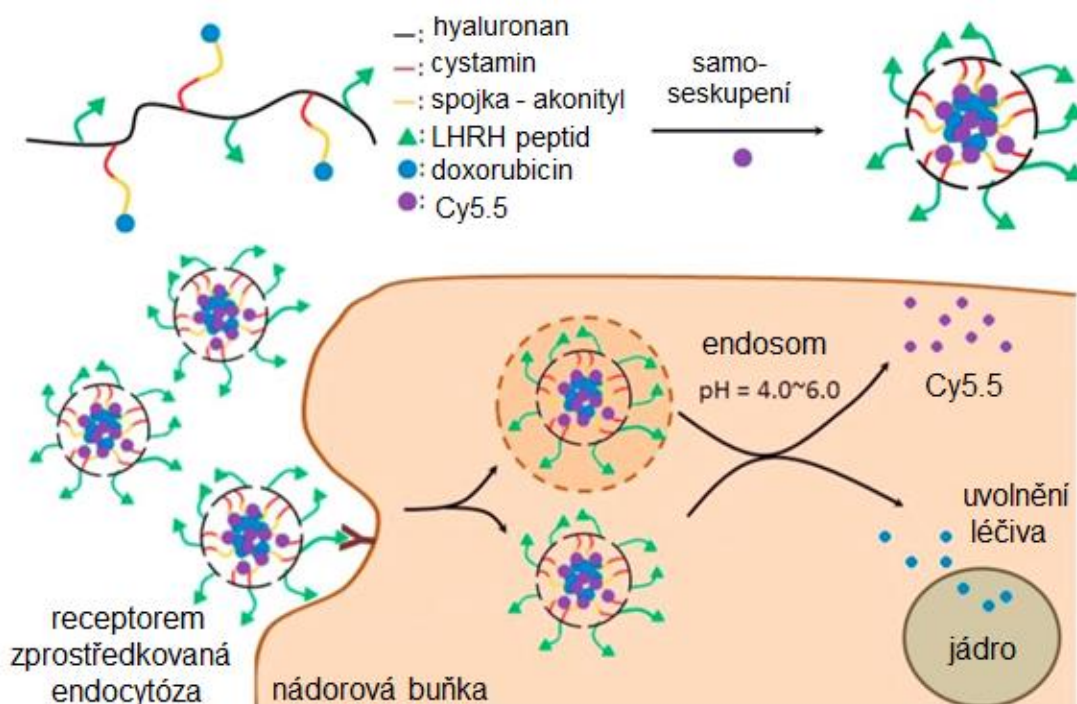
Obrázek 20: a) struktura derivátu HA; b) aplikace a detekce micel v myši s nádorem; c) vstup micel do nádorové buňky s CD44 receptorem.¹³⁴

Pro potřeby kombinace fluorescenční a MRI diagnostiky vyvinuli Cho a kolektiv¹³⁵ „nanosonda“, jejíž schématické znázornění je uvedeno na Obrázku 21. Hyaluronan byl postupně modifikován ceramidem 3B (CE), dále bylo konjugováno chelatační činidlo DTPA pro ionty gadolinia a také fluorescenční barvivo Cy5.5. Připravený HA derivát byl díky přítomnosti receptoru CD44 efektivně vychytáván nádorovými buňkami SCC7 a sloužil taktéž jako velmi dobrý nástroj pro duální *in vivo* diagnostiku kombinací MRI a fluorescence.



Obrázek 21: Nanosonda pro duální MRI a optickou diagnostiku.¹³⁵

Poslední zde uvedená publikace¹³⁶ popisuje nosičový systém, vytvořený konjugací protinádorového léčiva doxorubicinu na HA za pomoci anhydridu kyseliny akonitové a disulfidového linkeru. Specifické vychytávání nosiče nádorovými buňkami bylo dále zajištěno přítomností specifického ligandu – LHRH peptidu, vázaného k řetězci HA řetězci. Připravený derivát byl schopen agregace ve vodném prostředí, kdy do vzniklého nosiče bylo enkapsulováno NIR fluorescenční barvivo Cy5.5 (Obrázek 22). Testováním nosiče byla zjištěna schopnost jeho efektivní akumulace v ovariální nádorové tkáni a následná endocytóza buňkami. Uvnitř buněk pak byla pozorována degradace systému a uvolnění Cy5.5. Přítomnost linkerů mezi HA a doxorubicinem umožňovala navíc uvolňování léčiva v závislosti na rozdílném pH a redoxním potenciálu prostředí normální a nádorové tkáně, přičemž byl prokázán protinádorový účinek po dobu 20 dnů po jednom podání.



Obrázek 22: Modifikovaný HA a mechanismus jeho působení.¹³⁶

6 NOSIČOVÉ SYSTÉMY PRO TOPICKÉ APLIKACE

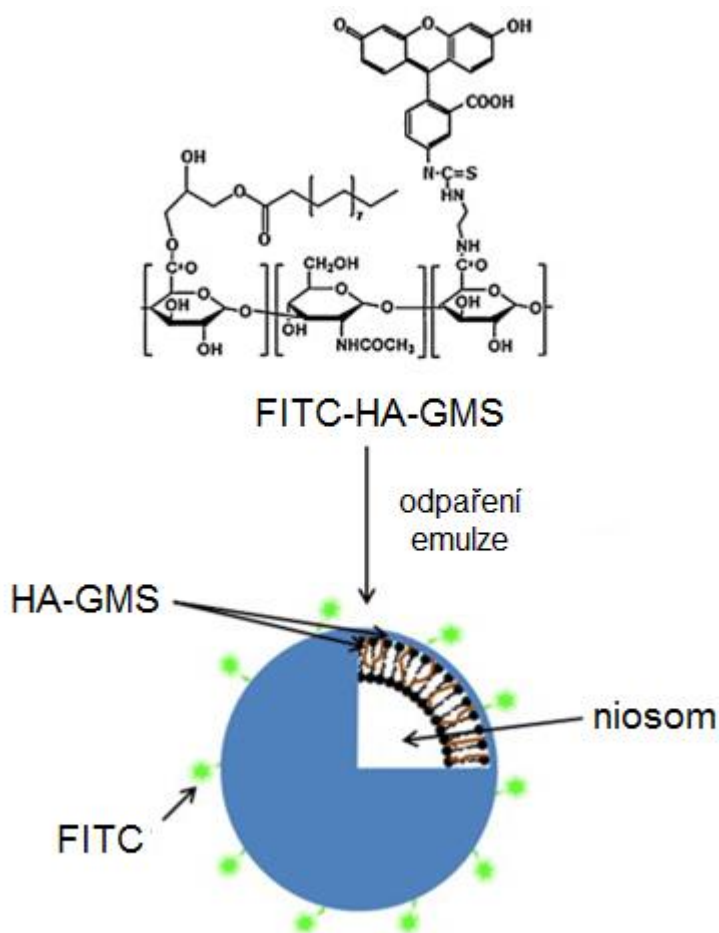
Vzhledem k náplni doktorského studia je poslední menší kapitola věnována nosičovým systémům pro topické aplikace. Micely, liposomy, emulze a různé další typy nosičů bývají popisovány v souvislosti se zvýšením schopnosti penetrace léčiv kůží a právě z těchto důvodů se jeví jako velmi atraktivní pro topické podávání jak kosmetických, tak farmaceuticky zajímavých sloučenin.^{137–}

140

V současné době je ovšem nedostatek údajů umožňujících dostatečné porozumění interakcím nosičů s pokožkou nebo ukládání materiálů a léčiv v kůži po aplikaci daného systému. Mezi významné patří taktéž informace o hloubce penetrace nosičového systému kůží a možnosti vstupu do krevního systému.¹⁴¹ Znalosti o chování nosičových systémů, jejich biodistribuci a stabilitě v biologických systémech by mohlo být nápomocné k posouzení zdravotního rizika zejména v případě dlouhodobé expozice nosičového systému.

Z důvodu minimalizace rizika akumulace cizorodých látek v těle, je hlavní oblast výzkumu nosičů léčiv na bázi polymerů zaměřena na konstrukci biologicky rozložitelných polymerních systémů. Stejně jako v případě teranostik se hyaluronan jeví jako zajímavý materiál pro přípravu nosičových systémů aplikovatelných na kůži. HA je přirozenou součástí epidermis i dermis a tvoří také významnou část extracelulární matrice kůže. Kůže obsahuje průměrně 1,7 g HA, což je přibližně jedna třetina celkového množství HA v celém lidském těle.¹⁴² Přestože stále existuje mnoho otázek týkajících se mechanismu zvýšené penetrace léčiva, bylo v případě hyaluronanu doposud zjištěno, že při podávání hydrofilních léčiv je pro jejich zvýšenou penetraci účinnější nízkomolekulární HA.¹⁴³¹⁴⁴

Příkladem derivátu hyaluronanu značeného fluorescenční látkou a studia jeho schopnosti doručování léčiv dermální cestou může být práce kolektivu Kong.¹⁴⁵ Autoři připravili hyaluronan modifikovaný řetězcí kyseliny stearové (GMS) a fluorescein-isothiokyanátem (FITC), jež byl dále schopný agregovat a tvořit nosičový systém, tzv. niosom (Obrázek 23). Dle autorů se jednalo o sférické částice o velikosti přibližně 40 nm. Nejprve *in vitro* experimenty prokázaly, že niosomy vstupovaly do 4T1 nádorových buněk endocytózou efektivněji než analogické nosiče z chitosanu. Dále bylo také zjištěno *in vitro* ale také *in vivo*, že niosomy jsou schopné penetrovat kůži. Výsledky studií naznačují, že nosiče připravené z derivátu HA by mohly být slibným nástrojem pro léčbu nádorů cestou topického podání a dermální penetrace.



Obrázek 23: Příprava niosomu.¹⁴⁵

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A POUŽITÉ METODY

Nukleární magnetická resonance

Veškerá NMR spektra byla naměřena na přístroji BRUKER AVANCE™ III 500 při frekvenci 500,25 MHz pro ^1H . Pro zpracování experimentálních dat byl použit software TOPSPIN (Bruker). Chemické posuny byly vztaženy k internímu standardu sodné soli kyseliny(trimethylsilyl)propanové ($(\text{CH}_3)_3\text{SiCD}_2\text{CD}_2\text{CO}_2\text{Na}=0,00$ ppm) nebo reziduálnímu DMSO ($\text{DMSO-}d_5=2,50$ ppm). Pro interpretaci NMR spekter byly použity zkratky: s (singlet), d (dublet), t (triplet), m (multiplet).

DOSY spektra byla získána využitím stimulované echo pulsní sekvence s bipolárním gradientem (2,5 ms) a supresí vody (watergate) 3-9-19 pulsní gradientovou sekvencí, difuzní časy byly 0,8 s a 2,0 ms, sinové pulzy s $32,030 \text{ G}\cdot\text{cm}^{-1}$.

^1H - ^{13}C HSQC NMR spektra byla získána pomocí editované gradientové pulzní sekvence s 1k datových bodů, 3 kHz spektrální šířkou v F2, 80 skeny v inkrementu, 256 inkrementů, a heteronukleárním skalárním C-H kaplingem nastaveným na 145 Hz.

Stupeň substituce (SS) v molárních procentech byl stanoven pomocí normalizovaných integrálních intenzit signálů v ^1H NMR spektrech. SS (%) odpovídá molárnímu množství navázaného substituentu vztaženému k molárnímu množství všech dimerů polysacharidu. Pro určení SS byly využity signály anomerních protonů HA v oblasti $\delta = 4,4\text{--}4,6$ ppm ve vztahu k následujícím uvedeným signálům: terminální methylové skupiny (CH_3) mastných kyselin při $\delta = 0,9$ ppm, CH_2 skupina cypate při $\delta = 3,0$ nebo $2,7$ ppm a $\delta = 8,1$ ppm pro CH benzoylu. (rozpuštědlem byla v těchto případech D_2O). V případě derivátů, u nichž dochází k substituci kyslíkového atomu na primární

hydroxylové skupině *N*-acetylglukosaminu za dusíkový atom byly pro výpočet SS použity signály při $\delta = 2,8$ ppm a 3,1 ppm (CH_2NH), jež se objevují v ^1H spektru derivátů (naměřeno v 0,05% NaOD). Stupeň oxidace (SO) byl vypočítán stejným způsobem jako SS, a to využitím signálu při 5,3 ppm odpovídající $\text{CH}(\text{OH})_2$ *N*-acetylglukosaminu (rozpouštědlo D_2O).

Stanovení výtěžku reakcí

Výtěžek reakcí byl stanoven dle již dříve popsané rovnice:¹⁴⁶

$$\text{výtěžek reakce} = 100 \frac{m_{\text{prod.}}}{\left[1 + \left(\frac{SS \times M_{\text{subst.}}}{M_{\text{HAvých.}}} \right) \right] \times m_{\text{HAvých.}}} [\%]$$

$m_{\text{HAvých.}}$ = hmotnost výchozího HA nebo derivátu HA

$m_{\text{prod.}}$ = hmotnost purifikovaného produktu derivátu HA

$M_{\text{HAvých.}}$ = molekulová hmotnost výchozího HA nebo derivátu HA

$M_{\text{subst.}}$ = molekulová hmotnost substituované/vázané látky

SS = stupeň substituce HA stanovený z ^1H NMR spekter

Hmotnostní spektrometrie

ESI-IT-MS analýzy cypate a jeho prekurzoru byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics) vybaveném elektrosprejovým ionizačním zdrojem. Veškerá měření byla provedena v pozitivním a/nebo negativním skenovacím módu. Do iontového zdroje byly vzorky přiváděny kovovou kapilárou při konstantním průtoku $4 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$. Parametry měření: napětí na kapiláře: $\pm 4,2$ kV; napětí na konci kapiláry ± 140 V; teplota sušícího plynu 220 °C; průtok sušícího plynu $6 \text{ dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$; tlak

rozprašovacího plynu 55,16 kPa. Jako sušící, respektive rozprašovací plyn byl použit N₂.

Infračervená spektroskopie

Infračervená spektra v oblasti vlnočtů 400–4000 cm⁻¹ byla naměřena pomocí spektrometru FT-IR8400S Shimadzu a za použití ATR nádstavce s diamantovým krystalem. Dále byly vzorky měřeny také ve formě KBr tablet. Symboly použité při výpisu spekter odpovídají intenzitě daného absorpčního pásu: w = slabá, m = střední, s = silná, případně jeho šířce: b = široký pás. Spektra byla zpracována programem OmnicTM.

UV/Vis spektroskopie

Pro naměření UV/Vis spekter v rozmezí vlnových délek 190 – 800 nm byl použit UV/Vis spektrofotometr Varian Cary 100.

Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektra byla zaznamenána na přístroji PTI Quantamaster 400 v demineralizované vodě nebo 0,1 M roztoku fosfátového pufru (PBS; pH = 7,4). Koncentrace měřených roztoků látek byla 1 mg·cm⁻³. Čas integrace 1 s, šířka štěrbin 4 nm. Data byla vyhodnocena pomocí software FelixGX 4.2.2.

Stanovení velikosti polymerních micel

Hydrodynamická velikost polymerních micel byla zjištěna na přístroji Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instrument) s He-Ne laserem a detektorem dynamického rozptylu světla.

Prvková analýza

Prvková analýza látky cypate v MeOH ($c = 2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ a $4 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ pro stanovení halogenů) byla provedena pomocí simultánního energiově-disperzního

rentgenového fluorescenčního analyzátoru SPECTRO iQ II (SPECTRO Analytical Instruments, Kleve, SRN, 2008).

Termogravimetrie

Pro termogravimetrickou (TG) analýzu oleátu železitého a množství kyseliny olejové vázané ke SPION byl použit přístroj TG Q500 (TA Instruments). V případě oleátu železa byly vzorky analyzovány v dusíkové atmosféře v rozpětí teplot 10–400 °C. Pro SPION byly použity teploty 10–600 °C v atmosféře inertního dusíku, následované 600–910 °C, kdy bylo inertní prostředí vyměněno za syntetický vzduch.

Elektronová mikroskopie

Velikost syntetizovaných SPION byla stanovena pomocí fotografií z elektronového mikroskopu Magellan 400 po nanesení vzorku SPION na měděné mřížky potažené uhlíkem. Velikost SPION byla stanovena jako průměr vypočítaný vždy ze 100 nanočástic ze třech různých fotografií.

ICP OES

Stanovení železa, respektive množství navázaných SPION v polymerních micelách bylo stanoveno ICP OES po mineralizaci působením 6M HCl spolu s 5% HNO₃ a mikrovlnného záření.

Veškeré následující analýzy byly prováděny ve spolupráci s R&D skupinou Farmakokinetika (Contipro).

Metoda stanovení průměrné molekulové hmotnosti hyaluronanu

Průměrná molekulová hmotnost výchozího hyaluronanu byla stanovena metodou SEC-MALLS. Chromatografický systém sestával z odplyňovače Agilent Model G 1379A, pumpy Agilent Model G 1379A, manuálního injektoru Rheodyne Model 7125i, dvou kolon Ultrahydrogel Linear columns Waters

(300×7,8 mm), dále byly sériově připojeny detektor rozptylu světla DAWN EOS, diferenciální viskozimetr ViscoStar on-line a diferenční difraktometr Optilab rEX (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA). Mobilní fází byl roztok 50 mM fosfátového pufru a 0,02% azidu sodného, rychlost průtoku $0,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Nárůst indexu lomu světla o $0,155 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ byl využit pro výpočet hmotnostně (M_w) a číselně (M_n) střední molekulové hmotnosti a polydisperzity (M_w/M_n) HA podle dříve popsané metody.¹⁴⁷ Měření byla třikrát nezávisle opakována. Pro analýzu fluorescenčně značených derivátů byl k tomuto systému dále připojen UV/Vis detektor Waters 2489, přičemž absorpce vlnových délek byla nastavena na 665 nm v případě cypate a 635 nm v případě nilské modři. Data byla zpracována použitím programu Wyatt Technology Corporation ASTRA software, verze 5.3.1.4. Měření byla provedena pouze u výchozího hyaluronanu, kyseliny hyaluronové a oxidovaného hyaluronanu.

Stanovení struktury hyaluronan oligosacharidu s navázaným cypate

Struktura konjugátu HA-cypate byla potvrzena po jeho enzymatickém štěpení ve vodném prostředí ($c = 1,0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) enzymem hyaluronan lyázou (přídavek $0,020 \text{ cm}^3$ enzymu na 1 cm^3 roztoku HA-cypate, 8 h, $37 \text{ }^\circ\text{C}$). Enzymatický hydrolyzát byl naředěn vodou v HPLC kvalitě na finální koncentraci $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Směs oligosacharidů byla separována pomocí UPLC chromatografického systému (Class I, Waters, Manchester, UK), kdy detektorem byl hmotnostní spektrometr Synapt G2-Si (Waters, Manchester, UK). Separace byla provedena pomocí kolony Kinetex F5 column ($1,7 \text{ } \mu\text{m}$, $100 \text{ } \text{Å}$, $150 \times 2,1 \text{ mm}$, Phenomenex) při $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Jako mobilní fáze byla použita 0,1% kyselina mravenčí ve vodě a acetonitrilu. Rychlost eluce byla nastavena na $0,25 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ s následujícím

gradientem acetonitrilu 0–10 min 40 %, 10–12 min 95 %, 12 min 95 %, 12–12,5 min 95–40 %. Objem nástřiku byl 0,005 cm³.

Hmotnostní spektrometr byl vybaven ionizací elektrosprejem a iontovou mobilitou. Měření byla prováděna v negativním módu. Získaná data byla zpracována programem MassLynx 4.1 software (Waters, Milford, MA, USA).

Stanovení množství inkorporovaného kurkuminu v polymerních micelách

Množství kurkuminu bylo stanoveno pomocí UPLC Waters Acquity a kolony Atlantis dC18 5 μm (250×46 mm) ve vzorku rozpuštěném ve směsi rozpouštědel voda/iPrOH (20/80, v/v; c = 1 mg·cm⁻³). Jako mobilní fáze byly použity 10 mM HCOOH a acetonitril. Rychlost průtoku byla nastavena na 1 cm³·min⁻¹ s následujícím gradientem acetonitrilu 0,0–6,5 min 60 %, 6,5–11,0 min 60–100 %, 11,0–12,0 min 100 %, 12,0–13,0 min 110–60 %. Objem nástřiku byl 0,01 cm³. Detektorem byl přístroj UV/Vis Waters 2489 pracující při vlnové délce 425 nm.

Stanovení množství inkorporovaného doxorubicinu v HA-cypate-C18:1.

Množství doxorubicinu ve vzorku (c = 1 mg·cm⁻³ ve voda/acetonitril, 1/4, v/v) bylo stanoveno superkritickou kapalinovou chromatografií UPLC Waters Acquity a kolony Kinetex 5u XB C18 (250×46 mm).

Jako mobilní fáze byly použity 0,1% CH₃COOH (pH = 5) a acetonitril. Rychlost průtoku byla nastavena na 1 cm³·min⁻¹ s následujícím gradientem acetonitrilu 0,0–5,0 min 25–45 %, 5,0–6,0 min 45 %, 6,0–8,0 min 45–80 %, 8,0–11,0 min 80 %, 11,0–13,0 min 80–25 %, 13,0–17,0 min 25%. Objem

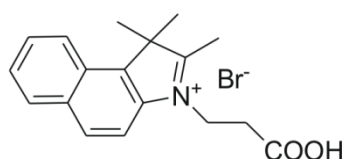
nástřiku byl 0,01 cm³. Detektorem byl přístroj UV/Vis Waters 2489 pracující při vlnové délce 480 nm.

8. SYNTÉZA POŽADOVANÝCH LÁTEK

Veškeré použité chemikálie, zakoupené z komerčních zdrojů, byly v analytické kvalitě a byly použity bez dalšího čištění či úprav.

8.1 Syntéza NIR fluorescenční látky Cypate

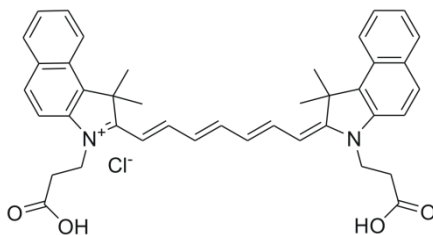
8.1.1 Syntéza 1,1,2-trimethyl-3-(2-karboxyethan-1-yl)-[1H]-benzo[e]indolium-bromidu (1)



1,1,2-Trimethyl-[1H]-benzindol (2,0 g; 9,6 mmol) a 3-brompropanová kyselina (2,2 g; 14,3 mmol) byly rozpuštěny v dichlormethanu (DCM, 10 cm³) a za stálého míchání byla reakční směs zahřívána na teplotu 115 °C po dobu 16 h. Vzniklá sraženina byla přenesena na fritu a promyta DCM (10 × 50 cm³). Purifikovaný produkt byl dále sušen pod vakuem na RVO a požadovaná látka **1** byla získána ve formě světle šedého krystalického prášku ve výtěžku 2,2 g (64 %).

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 12,7 (široký s, COOH); 8,4 (d, *J* = 8,35 Hz, 1H_{arom}); 8,3 (d, *J* = 9,00 Hz, 1H_{arom}); 8,2 (d, *J* = 8,35 Hz, 1H_{arom}); 8,2 (d, *J* = 9,00 Hz, 1H_{arom}); 7,8–7,7 (m, 2H_{arom}); 4,8 (t, *J* = 6,95 Hz, 2H, CH₂); 3,1 (t, *J* = 6,95 Hz, 2H, CH₂); 2,9 (s, 3H, CH₃); 1,8 (s, 6H, CH₃) ppm. ESI-MS (poz.) *m/z* (%): 282,3 [M]⁺ (100).

8.1.2 Syntéza cypate (3)

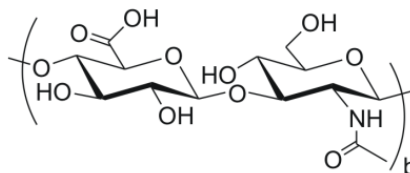


N-((1*E*,3*E*,5*E*)-5-(fenylimino)penta-1,3-dienyl)benzenamonium-chlorid (0,8 g; 2,8 mmol) byl rozpuštěn v DCM (8 cm³) a roztok byl ochlazen na 0–5 °C. K výchozí látce byl postupně přidáván po kapkách anhydrid kyseliny octové (0,52 cm³; 5,5 mmol) a *N,N*-diisopropylaethylamin (DIPEA; 0,48 cm³; 2,8 mmol) v malém množství DCM (0,5 cm³). Tato první reakční směs byla míchána za stálého chlazení po dobu 3 h. Mezitím byla druhá reakční směs, obsahující 1,1,2-trimethyl-3-(2-karboxyethan-1-yl)-[1*H*]-benzo[*e*]indolium-bromid (2,00 g; 5,5 mmol) a octan sodný (0,90 g; 11,0 mmol) ve směsi rozpouštědel acetonitril/voda (95/5; v/v; 15 cm³) přivedena k varu (82 °C) a do vzniklého roztoku byla pomalu přidávána první reakční směs. Reakce probíhala 16 h za stálého míchání a varu ve tmě. Po ukončení reakce byla vzniklá sraženina promyta ethyl-acetátem (400 cm³) a 1M HCl (400 cm³), produkt byl zfiltrován a sušen na RVO. Výsledný produkt byl získán ve formě tmavě zeleného krystalického prášku ve výtěžku 1,62 g (88 %).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ: 12,5 (široký s, COOH); 8,3 (d, *J* = 8,75 Hz, 2H); 8,1–7,9 (m, 6H); 7,8 (t, *J* = 12,65 Hz, 1H); 7,7 (d, *J* = 8,75 Hz, 2H); 7,7–7,6 (m, 2H); 7,5 (m, 2H); 6,6 (t, *J* = 12,65 Hz, 2H); 6,5 (d, *J* = 13,75 Hz, 2H); 4,4 (bt, 4H, CH₂); 2,8 (t, *J* = 6,9, 4H, CH₂); 1,9 (s, 12H, CH₃) ppm. ESI-MS(poz.) *m/z* (%): 625,4 [M]⁺ (100). ESI-MS (neg.) *m/z* (%): 623,3 [M-2H]⁻ (100). UV/Vis: λ_{abs,max} = 782 nm (MeOH). Prvková analýza (C₄₁H₄₁ClN₂O₄): vypočítáno: C 74,47 %; H 6,25 %; Cl 5,36 %; N 4,24; nalezeno: C 70,49 %; H 6,24 %; Cl 4,95 %; N 3,86; Br 0,17.

8.2 Příprava výchozích forem hyaluronanu

8.2.1 Konverze hyaluronanu sodného na kyselinu hyaluronovou (HAH)



Konverze hyaluronanu sodného o různých molekulových hmotnostech v rozpětí 6 500–188 000 g·mol⁻¹ (viz Tabulka 1) na kyselinu hyaluronovou byla provedena za použití komerčně dostupného iontoměníče katexu Tulsion T46H. U většiny z šarží molekulových hmotností hyaluronanu sodného byly výchozím množstvím 2 g (5 mmol; vypočteno na disacharidovou jednotku), jež byly rozpuštěny v demineralizované vodě (80 cm³). Ke vzniklému 2,5% roztoku byl následně přisypán katex (8,52 g). Výměna kationtů probíhala 8 hodin za občasného míchání při 0–5 °C. Katex byl následně z roztoku odstraněn filtrací, filtrát zamražen na –20 °C a lyofilizován. Kyselina hyaluronová byla získána ve formě lyofilizátu. Pouze u hyaluronanu o výchozí molekulové hmotnosti 15 000 g·mol⁻¹ se pracovalo s větším množstvím biopolymeru, a to s 10 g (25 mmol) za použití 42,6 g katexu pro konverzi.

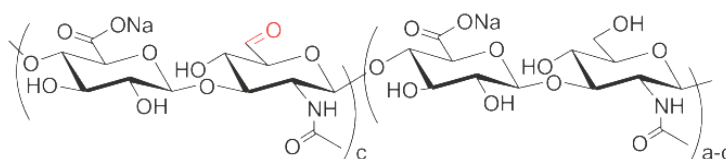
Typické NMR spektrum HAH: ¹H NMR (D₂O; HAH 15 000 g·mol⁻¹) δ: 4,7–4,4 (2H, anomerní, CH); 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH); 2,0 (3H, CH₃) ppm.

Tabulka 1: Konverze hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech.

M_w HA [g·mol ⁻¹]	polydisperzita	M_w HAH [g·mol ⁻¹]	polydisperzita	výtěžek m [g]	výtěžek [%]
6 500	1,4	6 000	1,2	1,77	94
15 000	1,3	15 000	1,4	9,09	98
26 000	1,6	25 500	1,3	1,87	99
42 000	*	39 000	1,4	1,82	95
65 000	*	56 000	1,5	1,85	98
84 000	1,6	66 500	1,5	1,75	92
188 000	1,3	105 000	1,5	1,74	92

*Data o polydisperzitě nebyla dostupná

8.2.2 Příprava oxidované formy hyaluronanu (HA-OX)



Do 2% vodného roztoku HA (10 g; 25 mmol; 1 ekv.) o různých molekulových hmotnostech (viz Tabulka 2) byl nejprve přidán NaBr (1,28 g; 12,50 mmol; 0,5 ekv.), NaHPO₄·12H₂O (19,42 g; 54,25 mmol; 2,17 ekv.) a následně AcNH-TEMPO (0,05 g; 0,25 mmol; 0,01 ekv.) a NaClO s obsahem Cl₂ přibližně 11 % (3,40 cm³; 12,5 mmol, 0,5 ekv.). Reakce probíhala při 0–5 °C po dobu 15–30 min (viz Tabulka 2) a následně byla ukončena přidávkem 18 cm³ 5% Na₂S₂O₄. Reakční směs byla dále zředěna 600 cm³ demineralizované vody a přenesena do mikroultrafiltru (kazety s propustností 5000 g·mol⁻¹, Merck-Millipore). Výsledný roztok byl zamražen na teplotu –20 °C a lyofilizován. Produktem reakcí byl oxidovaný hyaluronan **HA-OX** s různým stupněm oxidace (SO) a výtěžky reakcí, uvedenými v Tabulka 2.

Typické NMR spektrum HA-OX: ^1H NMR (D_2O , HA-OX $16\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
 δ : 5,3 (1H, $\text{CH}(\text{OH})_2$); 4,7–4,4 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,3 (2H, HA skeletální, CH); 2,0 (3H, CH_3) ppm.

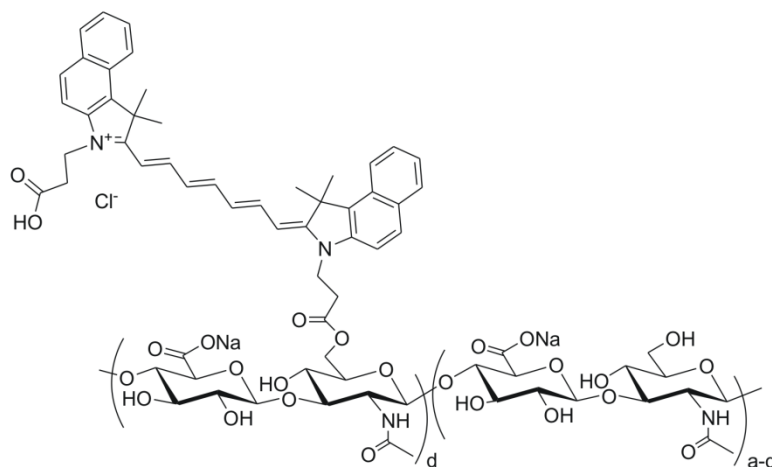
Tabulka 2: Oxidace hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech.

M_w HA [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	polydisperzita	t [min]	M_w HA-OX [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	polydisperzita	výtěžek [%]	SO [%]
18 000	*	15	16 000	1,6	87	5,5
26 000	1,6	15	21 500	1,6	91	6,5
26 000	1,6	30	22 500	1,5	90	7,6

*Data o polydisperzitě nebyla dostupná

8.3 Příprava fluorescenčně značeného hyaluronanu

8.3.1 Obecný postup syntézy hyaluronanu s vázaným cypate (HA-cypate)



Cypate (87 mg; 0,13 mmol; 0,5 ekv.) byl rozpuštěn v DMSO (2 cm^3), do vzniklého roztoku byl přidán *N,N*-karbonyldiimidazol (CDI; 21, 45 mg; 0,13 mmol; 0,5 ekv.) a směs byla za stálého míchání ponechána 2 h při laboratorní teplotě. Mezitím byla rozpuštěna kyselina hyaluronová (100 mg; 0,27 mmol; 1 ekv.) o různých molekulových hmotnostech (viz Tabulka 3) v DMSO (5 cm^3) při $60\text{ }^\circ\text{C}$. K rozpuštěné HAH v DMSO byla postupně přidána vybraná báze (viz Tabulka 3) a celá první reakční směs s aktivovaným cypate. Reakce

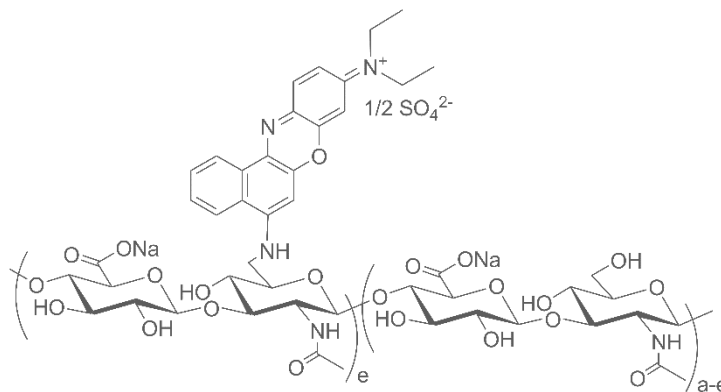
probíhala za stálého míchání ve tmě při 60 °C po dobu 24 nebo 48 h (viz Tabulka 3). Reakce byla ukončena přidáním desetinásobku iPrOH (vzhledem k původnímu objemu reakční směsi) a nasyceného roztoku NaCl (1 cm³), kdy došlo k vysrážení požadovaného produktu. Surový produkt byl purifikován iPrOH (5×100 cm³), rozpuštěn v demineralizované vodě (50 cm³) a dialyzován dva dny oproti vodnému roztoku solí 0,5% NaCl a 0,5% NaHCO₃, dále tři dny oproti demineralizované vodě. Obsah střeva byl zamražen na teplotu -20 °C a následně lyofilizován. Pro ostatní HAH o M_w = 6 000–105 000 g·mol⁻¹ (Tabulka 3) byl použit stejný postup jako pro HAH o M_w = 15 000 g·mol⁻¹, a to za podmínek: aktivace cypate 2 h, použitá báze imidazol nebo *N*-methylmorfolin (0,5 ekv.) a reakční čas 24 h. Výsledný produkt **HA-cypate** byl ve všech případech získán jako zelený lyofilizát o průměrném výtěžku okolo 90 % a SS_{cypate} < 1%.

Tabulka 3: Proměnné reakční podmínky přípravy **HA-cypate**.

čas aktivace cypate [h]	báze		reakční čas [h]	SS [%]
	látka	ekv.		
2	imidazol	3	24 h	0,3
2	imidazol	0,5	24 h	0,7
1,5	imidazol	0,5	24 h	0,1
2	<i>N</i> -methylmorfolin	3	24 h	0,3
2	<i>N</i> -methylmorfolin	0,5	24 h	0,8
2	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin	3	24 h	0,2
2	triethylamin	3	24 h	0,2
2	<i>N</i> -methylmorfolin	0,5	48 h	0,6
2	bez báze	0	24 h	0,1

¹H NMR (D₂O) δ: 8,6–6,9 (široké, překryté signály, cypate); 4,4–4,6 (2H, HA anomerní, CH), 3,4–3,9 (10H, HA skeletální, CH), 3,0 (CH₂, cypate), 2,0 (3H, NHCOCH₃) ppm. **ESI-MS** (neg.) m/z (%): 984,4 [M-H]⁻ (100). **Fluorimetr**: λ_{em,max} = 699 nm při λ_{exc.} = 665 nm.

8.3.2 Příprava hyaluronanu značeného nilskou modří (HA-NM)



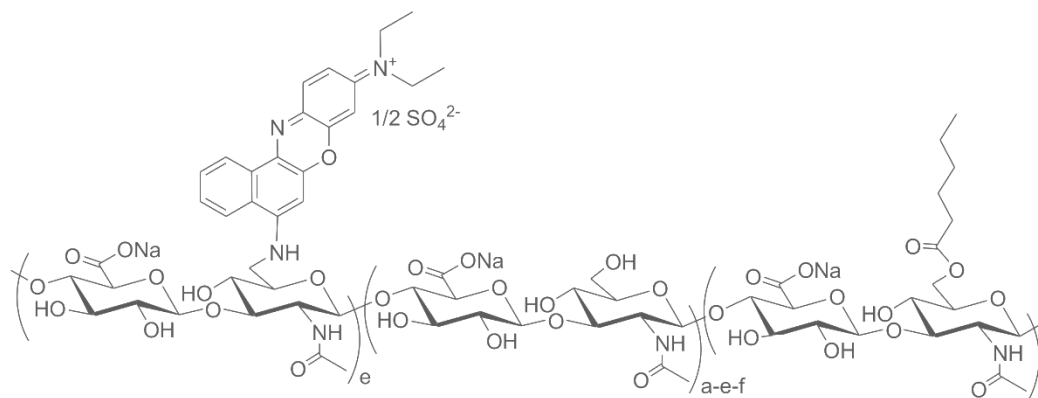
HA-OX (500 mg; 1,25 mmol; 1 ekv.; $M_w = 16\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, SS = 5,5%) byl rozpuštěn v demineralizované vodě (25 cm³). Do tohoto roztoku byla dále přidána nilská modř (NM, 88 mg; 0,12 mmol; 0,1 ekv.) v DMSO (10 cm³) a směs byla ponechána míchat při laboratorní teplotě po dobu 5 h. Po uplynutí dané doby byl do roztoku přidán NaBH₃CN (78 mg; 1,25 mmol; 1 ekv.) a směs byla míchána dalších 24 h při 25 °C. Produkt byl získán precipitací z roztoku za použití iPrOH (250 cm³) spolu s nasyceným roztokem NaCl (5 cm³) a promyt iPrOH (10×50 cm³). Získaná sraženina byla rozpuštěna v demineralizované vodě a vzniklý roztok dialyzován dva dny oproti vodnému roztoku solí 0,5% NaCl a 0,5% NaHCO₃, dále tři dny oproti demineralizované vodě. Produkt **HA-NM** byl získán ve formě modrého lyofilizátu ve výtěžku 280 mg (56 %), SS_{NM} = 0,9 %.

¹H NMR (0,05% NaOD): δ : 4,7–4,4 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH); 3,1 (CH₂HN); 2,8 (CH₂HN); 2,0 (3H, NHCOCH₃) ppm.

Fluorimetr: $\lambda_{em,max} = 675\text{ nm}$ při $\lambda_{exc.} = 635\text{ nm}$.

8.4 Modifikace fluorescenčně značeného hyaluronanu mastnými kyselinami

8.4.1 Příprava hyaluronanu značeného nilskou modří s různým stupněm substituce uhlíkovými řetězci kyseliny kapronové (HA-NM-C6)



HA-NM (300 mg; 0,75 mmol; 1 ekv.; výchozí HA-OX $M_w = 16\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) byl rozpuštěn v demineralizované vodě (5,5 cm³), a do vzniklého roztoku byl postupně přidán iPrOH (6 cm³), TEA (viz Tabulka 4) a 4-(dimethylamino)pyridin (DMAP; 5 mg; 0,04 mmol; 0,05 ekv.) v 0,5 cm³ demineralizované vody. Posledním reagentem byl anhydrid kyseliny hexanové (množství viz Tabulka 5), kdy po jeho přidavku reakce probíhala ve tmě při laboratorní teplotě po dobu uvedenou v Tabulka 4.

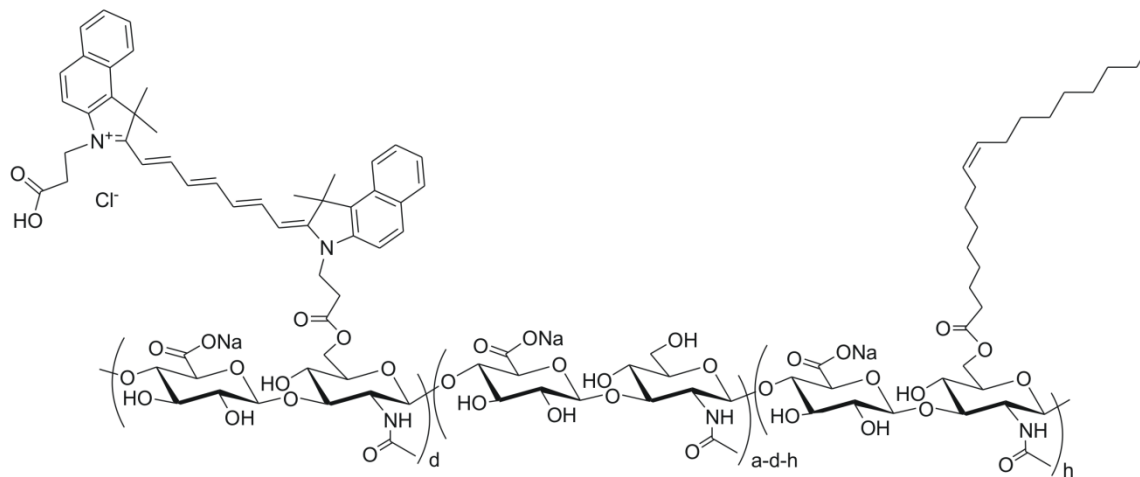
Vysrážení surového produktu z roztoku bylo provedeno přidavkem nasyceného roztoku NaCl (1 cm³) a iPrOH (100 cm³). Vzniklá sraženina byla promyta iPrOH (2×50 cm³) a iPrOH/H₂O (9/1; v/v; 3×50 cm³), následně rozpuštěna v demineralizované vodě a roztok byl dialyzován dva dny oproti vodnému roztoku solí 0,5% NaCl a 0,5% NaHCO₃, nakonec tři dny oproti demineralizované vodě. Požadovaná látka byla získána ve formě modrého lyofilizátu.

Tabulka 4: Syntéza HA-NM-C6 za použití různých ekvivalentů reaktantů.

anhydrid hexanové kys.		TEA		doba reakce	výtěžek	výtěžek	SS _{C6}
ekv.	V [cm ³]	ekv.	V [cm ³]	[h]	m [mg]	[%]	[%]
2,5	0,433	3,5	0,366	3	261	78	42
3,2	0,554	3,5	0,366	3	272	79	52
4	0,643	3	0,306	2	249	84	46

Typické NMR spektrum HA-NM-C6: ¹H NMR (D₂O; HA-NM-C6 SS 52 %) δ: 4,6–4,3 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH); 2,4–2,2 (m, 2H, CH₂COO); 2,0 (3H, NHCOCH₃); 1,6–1,5(2H, CH₂CH₂COO); 1,3 (4H, CH₂CH₃); 0,8 (m, 3H, CH₃) ppm. **Fluorimetr:** λ_{em.max}= 670 nm při λ_{exc.} = 635 nm.

8.4.2 Příprava hyaluronanu modifikovaného cypate HA s různým stupněm substituce řetězci kyseliny olejové (HA-cypate-C18:1)



HA-cypate (0,30 g; 0,73 mmol; 1 ekv.) byl rozpuštěn v demineralizované vodě (15 cm³) a iPrOH (13 cm³), následně byl přidán TEA (0,31 cm³; 2,20 mmol; 3 ekv.) a DMAP (4,5 mg; 0,04 mmol; 0,05 ekv.). Mezitím byla v druhé reakční baňce rozpuštěna kyselina *cis*-oktadec-9-enová (viz Tabulka 5) v malém množství iPrOH (0,5 cm³), do roztoku byl přidán TEA (viz Tabulka 5), jako poslední benzoylchlorid (viz Tabulka 5) a směs byla ponechána reagovat

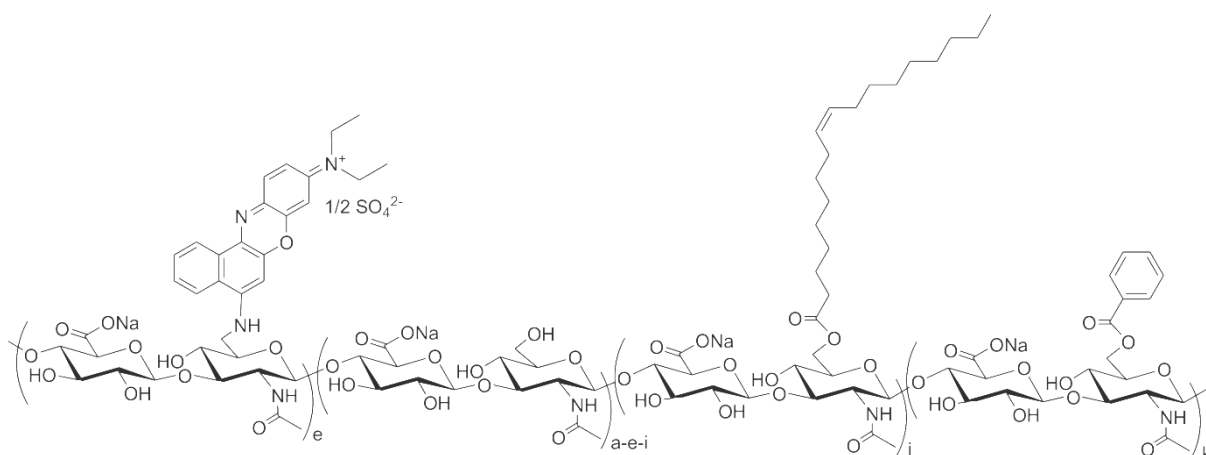
za stálého míchání 30 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí dané doby byla celá směs kvantitativně přenesena k první reakční směsi s roztokem derivátu hyaluronanu. Příprava požadované látky následně probíhala po dobu 2 h při 25 °C. Reakce byla ukončena přidáním nadbytku iPrOH (200 cm³) a nasyceného roztoku NaCl, přičemž došlo k vysrážení produktu. Surový produkt byl promyt iPrOH (4×200 cm³), dále rozpuštěn v demineralizované vodě a dialyzován dva dny oproti vodnému roztoku solí 0,5% NaCl a 0,5% NaHCO₃, dále tři dny oproti demineralizované vodě. Produkty reakce byly získány lyofilizací zamraženého obsahu dialyzačního střeva ve výtěžku uvedeném v Tabulka 5.

Tabulka 5: Příprava **HA-cypate-C18:1** za použití různých ekvivalentů reaktantů.

C18:1		TEA		benzoyl chlorid		výtěžek	výtěžek	SS _{C18:1}
ekv.	V [cm ³]	ekv.	V [cm ³]	ekv.	V [cm ³]	m [mg]	[%]	[%]
0,2	0,046	0,6	0,061	0,2	0,017	168	55	4
0,4	0,092	1,2	0,122	0,4	0,034	210	68	5
0,6	0,138	1,8	0,184	0,6	0,051	230	73	8
0,8	0,185	2,4	0,245	0,8	0,068	210	65	8–10
1	0,231	3	0,306	1	0,085	226	70	10–13

Typické NMR spektrum HA-cypate-C18:1: ¹H NMR (D₂O; HA-Cypate-C18:1 SS = 10 %) δ: 8,6–7,0 (široké, překryté signály, cypate); 5,5–5,3 (2H, C18:1 CH=CH); 4,6–4,3 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,0 (10H, HA skeletální, CH); 2,7 (2H, CH₂, cypate); 2,5–2,3 (4H, C18:1 CH₂); 2,0 (3H, HANHCOCH₃ + 4H, C18:1 CH₂+ 2H C18:1 CH₂CO); 1,5 (2H, C18:1 CH₂CH₂CO); 1,1–1,4 (20H, C18:1 CH₂); 0,8 (3H, C18:1 CH₃) ppm. **Fluorimetr:** λ_{em.max}= 693 nm při λ_{exc.} = 665 nm.

8.4.3 Syntéza hyaluronanu modifikovaného nilskou modří a řetězci kyselin olejové (HA-NM-C18:1)



HA-NM (300 mg; 0,70 mmol; 1 ekv.) byl rozpuštěn ve směsi iPrOH/H₂O (1/1; v/v; 20 cm³), dále byl postupně přidán TEA (0,31 cm³; 2,25 mmol; 3 ekv.) a DMAP (5,00 mg; 0,038 mmol; 0,05 ekv.). Mezitím byl ve druhé reakční baňce ke kyselině olejové (0,24 cm³; 0,75 mmol; 1 ekv.) v iPrOH (0,5 cm³) přidán TEA (0,31 cm³; 2,25 mmol; 3 ekv.) a benzoylchlorid (0,27 cm³; 1,87 mmol; 3 ekv.) a směs byla ponechána reagovat 30 min při laboratorní teplotě. Reakční směs s kyselinou olejovou byla poté přenesena do první baňky k roztoku derivátu hyaluronanu. Po smísení reakce probíhala další 3 h při 25 °C. Produkt byl získán precipitací z roztoku přidávkem iPrOH (100 cm³) a 2 g NaCl. Sraženina byla promyta směsí iPrOH/H₂O (v/v; 4×50 cm³), rozpuštěna v demineralizované vodě. Roztok byl dialyzován dva dny oproti vodnému roztoku solí 0,5% NaCl a 0,5% NaHCO₃, dále tři dny oproti demineralizované vodě a po zamrazení na teplotu -20 °C lyofilizován. Produkt **HA-NM-C18:1** byl získán ve formě modrého lyofilizátu (230 mg; 56 %), SS_{C18:1} = 10 %, SS_{benzoyl} = 0,4 %.

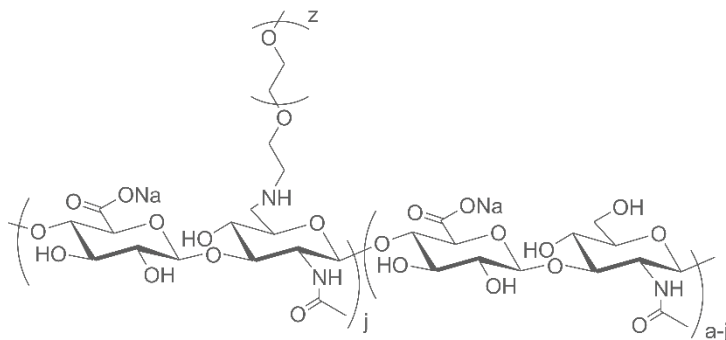
¹H NMR (0,05% NaOD) δ: 8,1 (2H, benzoyl, CH); 7,7 (H, benzoyl, CH); 7,6 (2H, benzoyl, CH); 5,3 (2H, C18:1 CH=CH); 4,7–4,4 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH); 3,1 (1H, HA CH₂HN); 2,8 (1H, HA

CH₂HN); 2,2 (4H, C18:1 CH₂); 2,0 (3H, HA NHCOCH₃ + 2H,C18:1CH₂CO); 1,5 (2H, CH₂CH₂CO); 1,4–1,1 (20H, (CH₂)₁₀); 0,8 (3H, C18:1 CH₃) ppm.

Fluorimetr: $\lambda_{em,max} = 665$ nm při $\lambda_{exc.} = 635$ nm.

8.5 Syntéza derivátů hyaluronanu modifikovaných poly(ethylen glykolem)

8.5.1 Syntéza hyaluronanu s vázaným poly(ethylen glykolem) (HA-PEG)



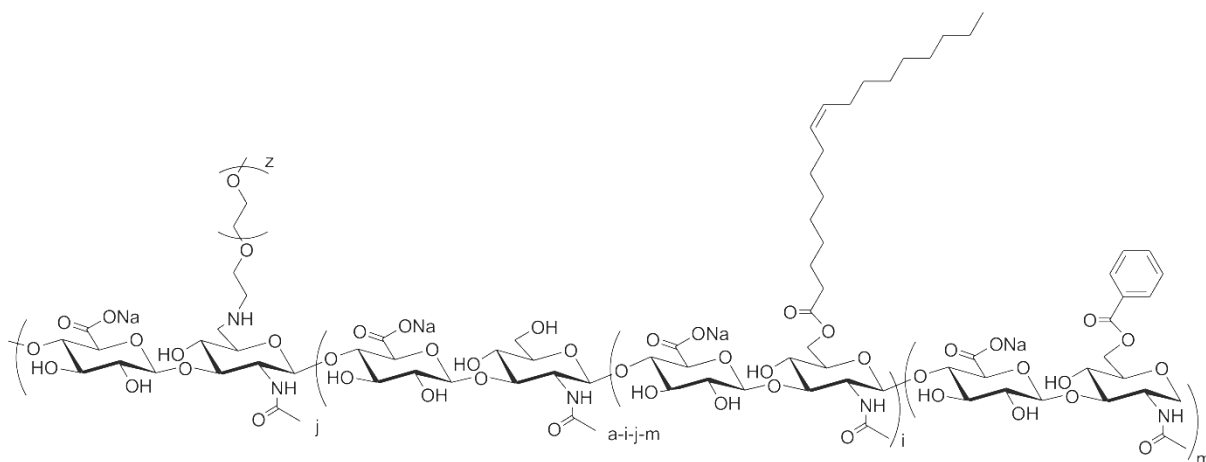
HA-OX (1,26 g; 3,10 mmol; 21 500 g·mol⁻¹; SS = 7,6 %) nebo také HA-OX (100 mg, 0,25 mmol; 19 000 g·mol⁻¹; SS = 43 %; získaný z laboratorních zásob) byl rozpouštěn po dobu 1 h při 25 °C v demineralizované vodě za zisku 2% vodného roztoku. Do vzniklého roztoku byl přidán methoxy-poly(ethylen glykol)amin ($M_w = 1000$ g·mol⁻¹) v množství uvedeném v Tabulka 6 a směs byla ponechána homogenizovat za stálého míchání po dobu 5 h. Následně byl přidán pikolin-boran komplex (viz Tabulka 6). Reakce dále probíhala 24 h při 25 °C. Produkt **HA-PEG** byl získán precipitací z reakční směsi přidavkem nasyceného roztoku NaCl (4 cm³) a iPrOH (650 cm³). Precipitát byl promyt iPrOH/H₂O (85/15; v/v; 4×150 cm³) a iPrOH (4×150 cm³), po čemž vždy následovala centrifugace a dekantace. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 40 °C.

Tabulka 6: Příprava **HA-PEG** s různým stupněm substituce PEG.

HA-OX		PEG		α -pikolin·BH ₃		výtěžek	SS _{PEG}
M _w [g·mol ⁻¹]	SS[%]	ekv.	m [mg]	ekv.	m [mg]	m [g]	[%]
22 500	7,5	0,1	313	0,1	33	1,0	6,5
22 500	7,5	0,1	313	0,1	33	1,3	6
22 500	7,5	0,15	469	0,15	50	1,1	7
19 000	43	0,45	113	0,45	12	0,1	20

Typické NMR spektrum HA-PEG: ¹H NMR (D₂O; HA-PEG 19 000 g·mol⁻¹, SS = 20 %) δ : 4,7–4,4 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH + 6H, PEG CH₂O + 2H, PEG CH₂NH); 3,7 (3H, PEG CH₃); 2,8 (2H, HA CH₂NH); 2,0 (3H, HA NHCOCH₃) ppm.

8.5.2 Modifikace hyaluronanu s vázaným poly(ethylen glykolem) zbytky kyseliny olejové (HA-C18:1-PEG)

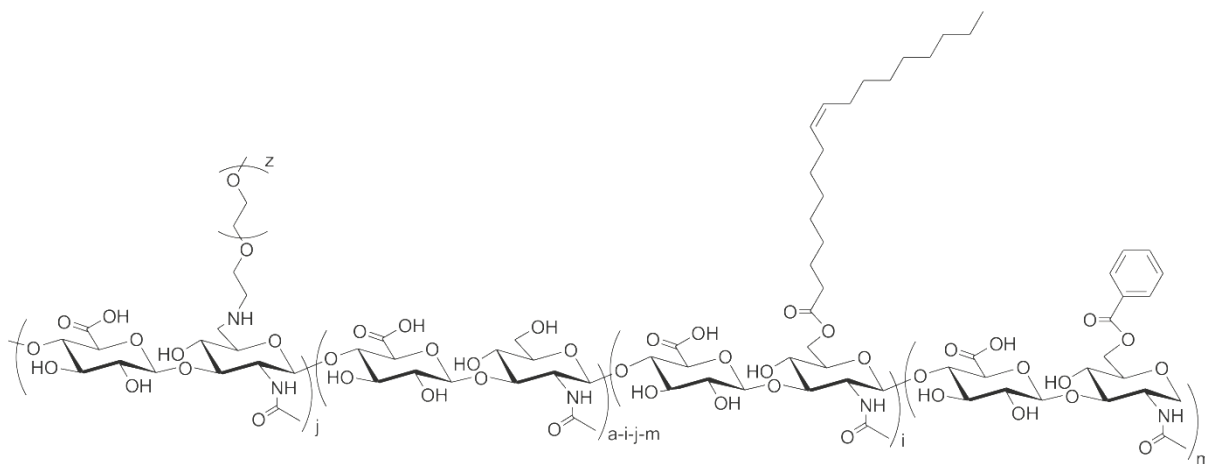


HA-PEG (200 mg; 0,43 mmol; 1 ekv., 22 500 g·mol⁻¹, SS = 6,5 %) byl rozpuštěn ve směsi demineralizované vody (8 cm³) a iPrOH (6 cm³). Následně byl k roztoku postupně přidán TEA (0,18 cm³; 1,29 mmol; 3 ekv.) a DMAP (2,62 mg; 0,21 mmol; 0,05 ekv.). Mezitím byl v druhé reakční baňce ke kyselině olejové (0,14 cm³; 0,43 mmol; 1 ekv.) v iPrOH (1 cm³) přidán TEA (0,18 cm³; 1,29 mmol; 3 ekv.) a benzoylchlorid (0,05 cm³; 0,43 mmol; 1 ekv.). Reakce probíhala při laboratorní teplotě a za stálého míchání po dobu 30 min. Druhá

reakční směs byla, bez předchozí izolace, přidána k prvnímu roztoku, obsahujícímu **HA-PEG**, TEA a DMAP, a takto vzniklá reakční směs byla míchána při 25 °C po dobu 2 h. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku NaCl (1 cm³) a iPrOH (150 cm³) za vzniku sraženiny, jež byla promyta iPrOH (3×150 cm³), po čemž vždy následovala centrifugace a dekantace. Produkt **HA- C18:1-PEG** byl sušen po dobu 24 h při 40 °C a získán ve výtěžku 152 g (72 %), SS_{C18:1} = 9 %.

¹H NMR (D₂O) δ: 8,1 (2H, benzoyl, CH); 7,7 (H, benzoyl, CH); 7,6 (2H, benzoyl, CH); 5,4 (2H, C18:1 CH=CH); 4,7–4,4 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH + 6H, PEG CH₂O + 2H, PEG CH₂NH); 3,3 (3H, PEG, CH₃); 2,8 (2H, HA CH₂HN); 2,4 (2H, C18:1 CH₂CO); 2,0 (3H, HANHCOCH₃+2H, C18:1 CH₂CO); 1,7–1,5 (2H, C18:1 CH₂CH₂CO); 1,4–1,2 (24 H, C18:1 CH₂); 0,9–0,7 (3H, C18:1 CH₃) ppm.

8.5.3 Konverze hyaluronanu modifikovaného poly(ethylenglykolem) řetězci kyseliny olejové na derivát kyseliny hyaluronové (HAH- C18:1-PEG)

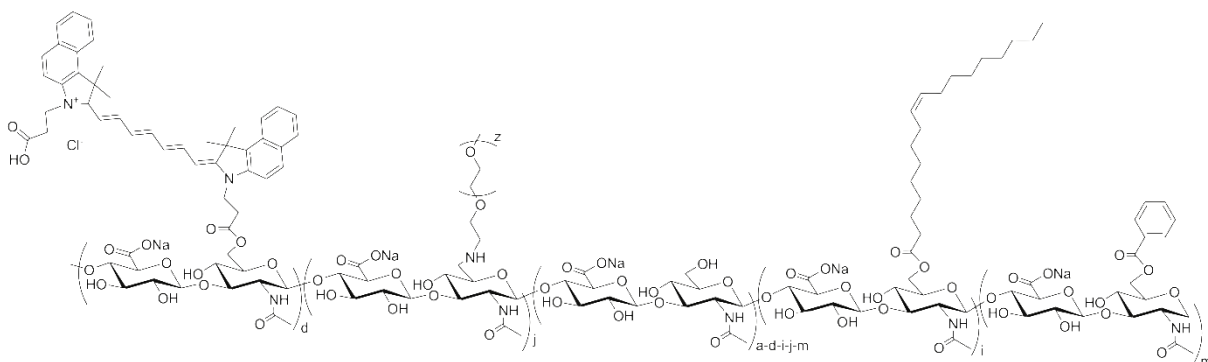


HA-C18:1-PEG (300 mg; 0,68 mmol) byl rozpuštěn v demineralizované vodě (12 cm³) a k vzniklému roztoku byl přidán katex Tulsion T46H (0,03g). Výměna aniontů probíhala po dobu 8 h při 0–5 °C za občasného míchání.

Následně byl katex odfiltrován, filtrát zamrazen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lyofilizován. Byl získán produkt o hmotnosti 282 mg (88 %). $\text{SS}_{\text{C18:1}} = 9\%$, $\text{SS}_{\text{benzoyl}} = 0,5\%$.

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 8,1 (2H, benzoyl, CH); 7,7 (H, benzoyl, CH); 7,6 (2H, benzoyl, CH); 5,4 (2H, C18:1 CH=CH); 4,7–4,4 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH + 6H, PEG CH_2O + 2H, PEG CH_2NH); 3,3 (3H, PEG, CH_3); 2,4 (2H, C18:1 CH_2CO); 2,0 (3H, HA NHCOCH_3 + 2H, C18:1 CH_2CO); 1,68–1,54 (2H, C18:1 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 1,4–1,2 (24 H, C18:1 CH_2); 0,8 (3H, C18:1 CH_3) ppm.

8.5.4 Značení hyaluronanu modifikovaného poly(ethylenglykolem) a řetězci kyseliny olejové fluorescenční látkou cypate (HA-cypate-C18:1-PEG)

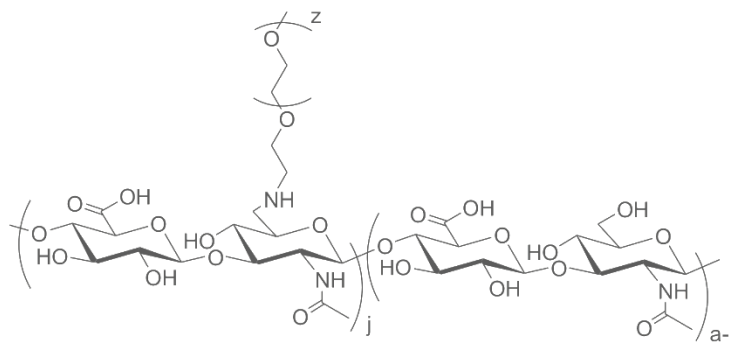


HAH-C18:1-PEG (100 mg; 0,24 mmol; 1 ekv.) byl nejprve rozpuštěn v DMSO (5 cm^3) při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. V druhé reakční baňce byl cypate (80 mg; 0,12 mmol; 0,5 ekv.) taktéž rozpuštěn v DMSO (1 cm^3). Do vzniklého roztoku byl dále přidán CDI (19,5 mg; 0,12 mmol; 0,5 ekv.) a směs byla ponechána aktivovat 1 h při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakční směs z druhé baňky byla přidána k roztoku derivátu hyaluronanu a vše bylo mícháno po dobu 24 h při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve tmě. Produkt byl získán precipitací z roztoku přidávkem nasyceného roztoku NaCl ($0,5\text{ cm}^3$) spolu s iPrOH (100 cm^3). Sraženina byla promyta iPrOH ($3 \times 50\text{ cm}^3$), dále rozpuštěna v demineralizované vodě a vzniklý roztok byl dialyzován dva dny oproti vodnému roztoku solí 0,5% NaCl a 0,5% NaHCO_3 , dále tři dny oproti

demineralizované vodě. Purifikovaný produkt **HA-cypate-C18:1-PEG** byl získán ve formě lyofilizátu ve výtěžku 89 mg (84 %), $SS_{\text{cypate}} = 0,6 \%$.

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 8,6–7,4 (široké, překryté signály, cypate + benzoyl); 5,4 (2H, C18:1 CH=CH); 4,7–4,4 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH + 6H, PEG CH₂O + 2H, PEG CH₂NH); 3,3 (3H, PEG, CH₃); 2,7 (2H, CH₂, cypate); 2,4 (2H, C18:1 CH₂CO); 2,0 (3H, HA NHCOCH₃+2H,C18:1CH₂CO); 1,7–1,5 (2H, C18:1 CH₂CH₂CO); 1,4–1,2 (24H, C18:1 CH₂); 0,91–0,68 (3H, C18:1 CH₃) ppm. **Fluorimetr**: $\lambda_{\text{em.max}} = 695 \text{ nm}$ při $\lambda_{\text{exc.}} = 665 \text{ nm}$).

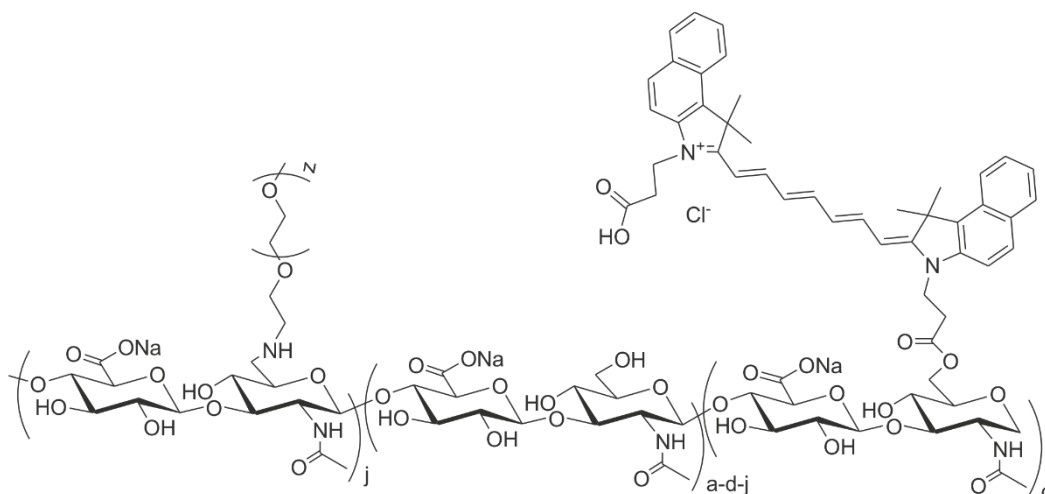
8.5.5 Konverze hyaluronanu modifikovaného poly(ethylen glykolem) na derivát kyseliny hyaluronové (HAH-PEG)



HA-PEG (500 mg, 1,30 mmol) byl rozpuštěn v demineralizované vodě (25 cm³), k vzniklému roztoku byl přidán katex Tulsion T46H (0,05 g) a směs byla ponechána v lednici při 0–5 °C za občasného míchání po dobu 8 h. Po odfiltrování iontoměniče byl filtrát zamražen na –20 °C, lyofilizován a produkt **HAH-PEG** byl získán v množství 436 mg (91 %).

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 5,4 (2H, C18:1 CH=CH); 4,7–4,4 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH + 6H, PEG CH₂O + 2H, PEG CH₂NH); 3,3 (3H, PEG, CH₃); 2,8 (2H, HA CH₂HN); 2,4 (2H, C18:1 CH₂CO); 2,0 (3H, HA NHCOCH₃+2H,C18:1CH₂CO); 1,7–1,5 (2H, C18:1 CH₂CH₂CO); 1,4–1,2 (24 H, C18:1 CH₂); 0,9–0,7 (3H, C18:1 CH₃) ppm.

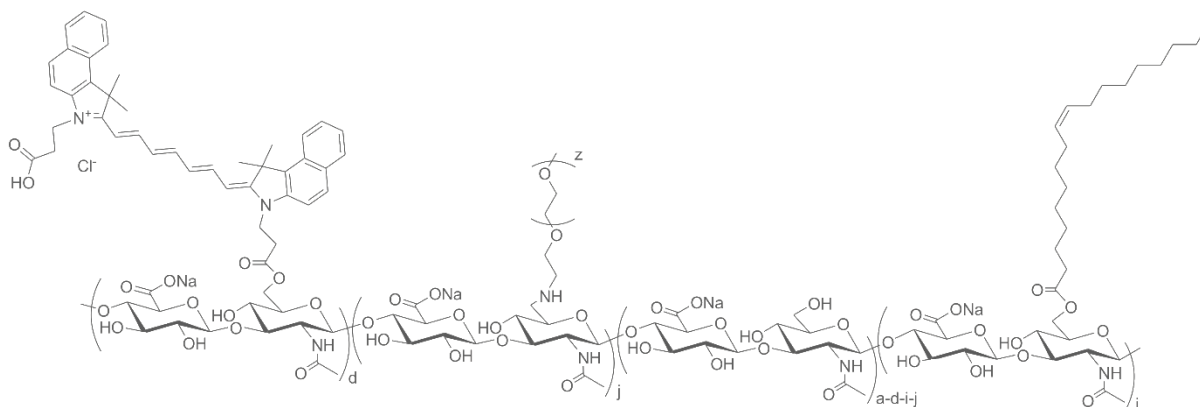
8.5.1 Značení hyaluronanu modifikovaného poly(ethylenglykolem) fluorescenční látkou cypate (HA-cypate-PEG)



Cypate (304 mg; 0,46 mmol; 1 ekv.) byl rozpuštěn v DMSO (3 cm³), do vzniklého roztoku byl přidán CDI (75 mg; 46 mmol; 0,5 ekv.) a reakční směs byla ponechána reagovat po dobu 2 h při 25 °C. Následně byla reakční směs přidána do druhé baňky k **HAH-PEG** (0,4 g; 0,92 mmol; 2 ekv.) rozpuštěného v DMSO (20 cm³), reakce probíhala po dobu 24 h při 60 °C a ve tmě. Reakce byla ukončena přidáním iPrOH (100 cm³) a nasyceného roztoku NaCl (0,5 cm³), přičemž došlo k vysrážení produktu z roztoku. Surový produkt byl promyt iPrOH (2×50 cm³) a iPrOH/H₂O (90/10; v/v; 2×50 cm³), rozpuštěn v demineralizované vodě a dialyzován dva dny oproti vodnému roztoku soli 0,5% NaCl a 0,5% NaHCO₃, dále tři dny oproti demineralizované vodě. Produkt **HA-cypate-PEG** byl získán ve formě zeleného lyofilizátu ve výtěžku 368 mg (87 %), SS_{cypate} = 0,5 %.

¹H NMR (D₂O) δ: 8,4–7,7 (široké, překryté signály, cypate); 4,7–4,4 (2H, HA anomerní, CH), 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH + 6H, PEG CH₂O + 2H, PEG CH₂NH); 3,3 (3H, PEG, CH₃); 3,0 (2H, CH₂, cypate); 2,0 (3H, HA NHCOCH₃) ppm. **Fluorimetr:** λ_{em,max} = 692 nm při λ_{exc.} = 665 nm.

8.5.2 Modifikace hyaluronanu s vázaným poly(ethylen glykolem) a cypate zbytky kyseliny olejové (HA-cypate-C18:1-PEG)

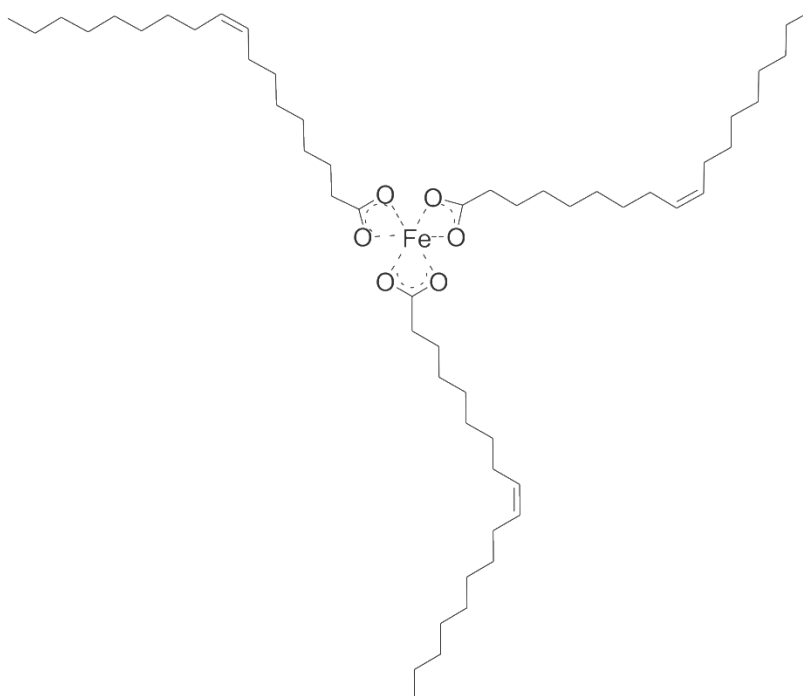


K roztoku kyseliny *cis*-oktadec-9-enové (0,03 cm³; 0,11 mmol; 1 ekv.) v iPrOH (1 cm³) byl nejprve napipetován TEA (0,05 cm³; 0,32 mmol; 3 ekv.) a následně benzoylchlorid (0,01 cm³; 0,11 mmol; 1 ekv.). Reakční směs byla míchána po dobu 30 min a teplotě 25 °C. Poté byla reakční směs přidána k 2% vodnému roztoku **HA-cypate-PEG** (50 mg; 0,11 mmol; 1 ekv.), TEA (0,05 cm³; 0,32 mmol; 3 ekv.) a DMAP (0,66 mg; 0,005 mmol, 0,05 ekv.). Reakce probíhala 2 h při laboratorní teplotě. Surový produkt byl získán z roztoku přidavkem 0,5 cm³ nasyceného roztoku NaCl a iPrOH (50 cm³) a následně promyt iPrOH (3×50 cm³). Precipitát byl dále rozpuštěn v demineralizované vodě, dialyzován dva dny oproti vodnému roztoku solí 0,5% NaCl a 0,5% NaHCO₃, dále tři dny oproti demineralizované vodě, zamražen na -20 °C a lyofilizován. Produkt **HA-cypate-C18:1-PEG** byl získán ve formě zeleného lyofilizátu ve výtěžku 45 mg (42 %), SS_{C18:1}= 6 %.

¹H NMR (D₂O) δ: 8,6–6,9 (široké, překryté signály, cypate); 5,4 (2H, C18:1 CH=CH); 4,7–4,4 (2H, HA anomerní, CH); 4,1–3,3 (10H, HA skeletální, CH + 6H, PEG CH₂O + 2H, PEG CH₂NH); 3,3 (3H, PEG, CH₃); 2,7 (2H, CH₂, cypate); 2,4 (2H, C18:1 CH₂CO); 2,0 (3H, HA NHCOCH₃+2H,C18:1CH₂CO); 1,7–1,5 (2H, C18:1 CH₂CH₂CO); 1,4–1,2 (24 H, C18:1 CH₂); 0,9–0,7 (3H, C18:1 CH₃) ppm. **Fluorimetr:** λ_{em.max}= 695 nm při λ_{exc.} = 665 nm.

8.6 Syntéza superparamagnetických nanočástic oxidů železa

8.6.1 Příprava oleátu železitého



Do 250 cm³ baňky byl navážen FeCl₃·6H₂O (5,40 g; 19,98 mmol), přidán EtOH (40 cm³) a po rozpuštění veškerého FeCl₃ ještě demineralizovaná voda (30 cm³). Následně byl přidán oleát sodný (18,25 g; 59,95 mmol) a jako poslední byl přidán *n*-hexan (70 cm³). Reakce probíhala při 70 °C po dobu 4 h. Reakční směs byla v děličce promyta demineralizovanou vodou (3×30 cm³) a organická fáze poté odpařena na RVO. Produktem byla vysoce viskózní kapalina, jež byla pro přípravu SPION uchována pod argonem a ve tmě. Výtěžek nebyl stanoven.

FT-IR (cm⁻¹): 3300 – 2500 (bw), 3004 (w), 2920 (s), 2852 (s), 1709 (s), 1583 (s), 1524 (m), 1410 (s).

8.6.2 Obecný postup pro syntézu nanočástic

Do trojhrdlé baňky bylo naváženo 1,8 g (2,0 mmol) čerstvě připraveného oleátu železitého, dále 10 g rozpouštědla (oktadec-1-en nebo oktadec-1-

en/dokosan 2/3; viz Tabulka 7) a kyselina olejová (0,35 cm³; 1,10 mmol). Reakční směs byla nejprve odplyněna pod vakuem po dobu 30 min. Následně byla baňka s reakční směsí v inertní atmosféře nebo probublávána inertním plynem (viz Tabulka 7) vložena do topného hnízda, nastavena rychlost ohřevu a reakční doba u jednotlivých reakcí dle údajů v Tabulka 7.

Čištění reakční směsi probíhalo několikanásobným promytím směsí rozpouštědel hexan/acetone v poměru 1/5–2 (v/v; 4×30 cm³). Produkt byl uchován v hexanu (1 cm³).

Tabulka 7: Reakční podmínky jednotlivých syntéz SPION.

$V_{\text{ohřev}}$ [°C·min ⁻¹]	rozpouštědlo	argon	t [°C]	t [min]	produkt [mg·cm ⁻³]
8	oktadec-1-en	bubl.	280	60	100/0,13
8	oktadec-1-en	bubl.	280	60	197/0,13
8	oktadec-1-en	bubl.	280	60	156/0,13
5	oktadec-1-en	atm.	340	60	×
5	oktadec-1-en	atm.	340	25	×
5	oktadec-1-en	atm.	340	20	×
5	oktadec-1-en	atm.	340	40	×
5	oktadec-1-en	atm.	340	60	×
5	oktadec-1-en	atm.	340	120	×
5	oktadec-1-en	bubl.	340	20	×
5	oktadec-1-en	bubl.	340	40	×
5	oktadec-1-en	bubl.	340	60	×
5	oktadec-1-en	bubl.	340	120	×
5	oktadec-1-en/ dokosan	bubl.	360	20	×
5	oktadec-1-en/ dokosan	bubl.	360	40	×
5	oktadec-1-en/ dokosan	bubl.	360	60	×
5	oktadec-1-en/ dokosan	bubl.	360	120	×
2	oktadec-1-en	bubl.	340	20	×
2	oktadec-1-en	bubl.	340	40	×
2	oktadec-1-en	bubl.	340	60	×
2	oktadec-1-en	bubl.	340	120	×
2	oktadec-1-en	bubl.	340	60	×
2	oktadec-1-en	bubl.	320	120	165/0,3
2	oktadec-1-en	bubl.	340	120	×

bubl. = reakční směs byla probublávána argonem

atm. = reakce probíhala pouze pod argonovou atmosférou

9. PŘÍPRAVA NOSIČOVÝCH SYSTÉMŮ PRO *IN VITRO* A *IN VIVO* EXPERIMENTY

9.1 Inkorporace doxorubicinu do nosičového systému na bázi hyaluronanu hydrofobizovaného zbytky kyseliny olejové a značeného cypate

HA-cypate-C18:1 (150 mg; výchozí $M_w = 15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $SS_{\text{cypate}} = 0,7\%$; $SS_{\text{C18:1}} = 10\%$) byl za stálého míchání rozpouštěn v demineralizované vodě (15 cm³) po dobu 1 h. Do roztoku byl dále přidán doxorubicin (15 mg) rozpuštěný v chloroformu (2 cm³). Výsledná směs byla nejprve sonikována (pulsní sonikace, 15 min, 200 W, amplituda 65 %, cyklus 0,5 s) do dosažení homogenní směsi, poté odpařena na RVO do podoby tenkého filmu, který byl rehydratován demineralizovanou vodou (15 cm³). Neinkorporovaný doxorubicin byl odstraněn filtrací přes 1,0 µm skleněný filtr. Filtrát byl zamražen na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ a lyofilizován. Hydrodynamická velikost PM byla 103,9 nm s polydisperzitou 0,5. Množství inkorporovaného doxorubicinu bylo stanoveno 7,5 hm. %.

9.2 Inkorporace doxorubicinu a SPION do nosičového systému na bázi hyaluronanu hydrofobizovaného zbytky kyseliny olejové a značeného cypate

HA-cypate-C18:1 (150 mg; výchozí $M_w = 15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $SS_{\text{cypate}} = 0,7\%$; $SS_{\text{C18:1}} = 10\%$) byl nejprve rozpouštěn v demineralizované vodě (15 cm³), do roztoku byly poté postupně přidány SPION obalených kyselinu olejovou (zakoupeno u Sigma-Aldrich) o průměrné velikosti 5 nm (2 mg) a doxorubicin (20 mg) v chloroformu (5 cm³). Výsledná směs byla nejprve sonikována (pulsní sonikace, 15 min, 200 W, amplituda 65 %, cyklus 0,5 s) do dosažení homogenní směsi a poté odpařena (RVO) do sucha a následně rehydratována demineralizovanou vodou (15 cm³). Neinkorporované látky byly odstraněny

filtrací přes 1,0 μm skleněný filtr a výsledný roztok byl zamražen a lyofilizován. Hydrodynamická velikost PM byla 104,6 nm s polydisperzitou 0,2. Množství enkapsulovaného doxorubicinu bylo stanoveno 6,5 hm. % a SPION 2 hm. %.

9.3 Enkapsulace kurkuminu do hyaluronanu modifikovaného nilskou modří a zbytky kyselin olejové nebo kapronové

HA-NM-C18:1 (100 mg, výchozí $M_w = 16\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, SS = 10 %), nebo **HA-NM-C6** (100 mg, výchozí $M_w = 16\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, SS = 52 %) byl nejprve rozpuštěn v demineralizované vodě (10 cm^3), poté přidán kurkumin (4 mg) v iPrOH (4 cm^3) a vše ponecháno míchat. Vzniklý roztok byl dále pomalu odpařen na RVO do podoby tenkého filmu, následně hydratován demineralizovanou vodou (5 cm^3) a nerozpustný neinkorporovaný kurkumin byl odstraněn filtrací směsi přes skleněný filtr (1,0 μm). Posledním krokem byla lyofilizace zamraženého roztoku. Hydrodynamická velikost nebyla stanovena. Množství enkapsulovaného kurkuminu v **HA-NM-C18:1** bylo stanoveno 0,62 hm. %, v případě **HA-NM-C6** 0,45 hm. %.

10. IN VITRO EXPERIMENTS

In vitro experimenty byly provedeny ve spolupráci s výzkumnou skupinou Fyziologie buňky Contipro a.s.

10.1 Testy cytotoxicity hyaluronanu modifikovaného cypate nebo cypate a řetězci kyseliny olejové

Buněčná linie myších fibroblastů Swiss 3T3 byla kultivována v Dulbeccoem modifikovaném Eaglovu médiu (DMEM) doplněném 10% fetálním bovinním sérem v atmosféře 5% CO_2 , při 37 °C. Po dosažení 80% konfluence byly buňky pasážovány a naočkovány do 96-jamkových destiček při hustotě 3×10^3 buněk/jamka a ponechány růst přes noc. Následně bylo odstraněno kultivační médium a buňky byly ošetřeny 0,20 cm^3 média obsahujícím 500, 250, 100 nebo 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ **HA-cypate** ($M_w = 15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{SS}_{\text{cypate}} = 0,7\%$) nebo **HA-**

cypate-C18:1 ($M_w = 15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $SS_{\text{cypate}} = 0,7\%$; $SS_{\text{C18:1}} = 10\%$). Po inkubační době 24, 48 a 72 h byl do každé jamky přidán 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid ($0,02\text{ cm}^3$, $c = 5\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$) a buňky byly inkubovány další 2,5 h. Poté byla provedena lýze fibroblastů za pomoci iPrOH/DMSO (1/1, v/v; $0,22\text{ cm}^3$) a Triton X-100 (10% roztok ve vodě). Absorbance byla měřena čtečkou mikroděstiček (VersaMax) při referenční vlnové délce 570 nm a zkušební vlnové délce 590 nm.

10.2 *In vitro* testování vstupu nosičových systémů s inkorporovaným kurkuminem do buněk

Lidské dermální fibroblasty (NHDF) byly nejprve kultivovány v séru doplněném DMEM. NHDF buňky byly následně inkubovány s roztoky nosičových systémů s inkorporovaným kurkuminem na bázi **HA-NM-C18:1** ($c = 250\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) nebo **HA-NM-C6** ($300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) při $37\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 min. Koncentrace roztoků nosičových systémů byly vztaženy na obsah kurkuminu. Vstup nosičových systémů do buněk byl pozorován prostřednictvím konfokálního mikroskopu TCS SP8 X Leica Microsystems GmbH při excitaci kurkuminu zářením o vlnové délce 405 nm (UV laser), v případě nilské modři zářením o vlnové délce 620 nm (bílý laser) a za použití emisních filtrů v rozsahu vlnových délek 415–485 nm pro kurkumin a nilskou modř 645–720 nm.

10.3 *In vitro* testování penetrace hyaluronanu modifikovaného nilskou modří a zbytky kyseliny olejové kůží

In vitro experimenty s kůží byly provedeny podle pokynů OECD ve Francových celách s použitím prasečí kůže z ušních boltců o tloušťce přibližně 1 mm. Receptor byl vždy naplněn 0,1M PBS (pH 7,4) udržovaným při $37\text{ }^\circ\text{C}$, vzorek kůže byl upnut mezi donorem a receptorem, přičemž *stratum corneum* (nejsvrchnější vrstva pokožky) směřovalo nahoru a představovalo difúzní plochu 1 cm^2 . Po 30 minutové ekvilibraci byly jednotlivé donory naplněny roztoky **HA-NM-C18:1** ($0,5\text{ cm}^3$) o různých koncentracích (0,25; 0,5; 1,0 a $5,0\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$).

Po 20 hodinách aplikace byly Francovy cely demontovány, kůže byla promyta PBS, zamrazena a nařezána pro další mikroskopické vyšetření. Penetrace látky kůží byla pozorována prostřednictvím konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 X při excitaci nilské modří zářením o vlnové délce 620 nm (bílý laser) a za použití emisních filtrů v rozsahu vlnových délek pro nilskou modř 645–720 nm.

11. *IN VIVO* EXPERIMENTY

Veškeré pokusy na zvířatech byly provedeny ve spolupráci s Ústavem biofyziky AV ČR/FNUSA-ICRC Brno v souladu s jejich pokyny a etickými zásadami.

11.1 Biodistribuce hyaluronanu modifikovaného cypate a řetězci kyseliny olejové ve zdravých modelových myších

Biodistribuce derivátu **HA-cypate-C18:1** ($SS_{\text{cypate}} = 0,7 \%$; $SS_{\text{C18:1}} = 10 \%$; výchozí HA $M_w = 15,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) byla testována na modelových myších typu Balb/C. **HA-cypate-C18:1** (3,6 mg) byl nejprve rozpuštěn v 1 cm^3 0,1M fosfátového pufru a roztok sterilizován filtrací (0,22 μm). Připravený roztok (0,1 cm^3) byl aplikován intravenózně dvěma modelovým myším Balb/C (pod narkózou) a byla pozorována jeho fluorescence *in vivo* po dobu 15 dnů.

11.2 Testování biodistribuce a protinádorového účinku derivátu hyaluronanu modifikovaného cypate a řetězci kyseliny olejové a nosičových systémů z něj připravených v modelových zvířatech s nehmátným prsním nádorem.

Samičkám myši Balb/C byly ortotopicky podány 4T1 luc buňky a prsní nádor byl ponechán růst po dobu dvou týdnů. Po uplynutí dané doby byly myši rozděleny do třech skupin (1 skupina = 3 zvířata). Jednotlivým skupinám myši byl 14., 21. a 28. den růstu nádoru intravenózně podán 1 mg vybrané látky nebo nosičového systému v $0,1 \text{ cm}^3$ 0,1M PBS (sterilizace provedena filtrací 0,22 μm) následovně: **HA-cypate-C18:1** (1. skupina), **HA-cypate-C18:1**

s inkorporovaným doxorubinem (2. skupina) a jako poslední **HA-cypate-C18:1** s inkorporovaným doxorubinem a SPION (3. skupina). Po dobu 35 dní byla vyhodnocována radiance záření *in vivo*, poté byly myši utraceny a byla porovnána hmotnost nádoru a sleziny v jednotlivých skupinách.

Ve všech případech myši s nádorem (4T1 luc buňky) bylo podání fluorescenčně značených polymerních micel po 15 minutách následováno intraperitoneální injekcí luciferinu (3 mg v 0,200 cm³ 0,1M PBS/zvíře) pro účely detekce a kontroly nádorů pomocí luminiscence.

Veškeré *in vivo* neinvazivní zobrazovací analýzy byly provedeny na přístroji IVIS Lumina XR Series III za použití excitačního záření o $\lambda = 640, 675, 710$ a 745 nm. Emise záření byla detekována pomocí ICG filtru.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Na začátku diskuzní části je nutno zmínit, že náplň disertační práce byla stanovena v souladu se strategickými cíli české farmaceutické firmy Contipro. Hlavním náplní předložené práce bylo nalézt vhodný způsob modifikace hyaluronanu pro přípravu teranostik. Syntéza derivátů HA byla provedena, aby chování a biodistribuci HA derivátů a dále nosičových systémů z nich připravených bylo možné monitorovat v biologických systémech (*in vitro* a zejména *in vivo*) za využití optických zobrazovacích metod. Převážná většina syntéz, kromě přípravy SPION, byla provedena způsobem spadajícím pod patentovou ochranu firmy Contipro, nebo bylo přípravu látek možné nově patentovat.

Vzhledem k rozmanitosti náplně disertační práce se nabízelo přistupovat ke členění kapitol několika způsoby. Po zvážení byl zvolen přístup k členění textu zohledňující postup od přípravy materiálu (zejména modifikovaného HA), dále *in vitro* testování připravených látek a v rámci problematiky teranostik jsou také popsány *in vivo* experimenty. Rozdělení kapitol dle potenciální aplikace připravených látek pro účely přípravy teranostik, dále nosičových systémů a studia jejich dermální penetrace nebo vstupu do buněk by nutně vedlo k nešťastnému opakování některých pasáží, například popisu syntéz.

První kapitola se zabývá modifikací hyaluronanu, zejména přípravou fluorescenčních a hydrofobizovaných derivátů HA. Samostatnou částí je syntéza a charakterizace SPION na povrchu modifikovaných kyselinou olejovou. V poslední kapitole jsou stručně komentovány výsledky biologického testování.

12. SYNTÉZA DERIVÁTŮ HYALURONANU

S ohledem na uvažované aplikace HA derivátů v biologických systémech byl ve všech případech zvolen přístup k modifikaci HA prostřednictvím hydroxylových skupin, tedy bez funkcionalizace karboxylových skupin HA tak, aby byl zachován polyaniontový charakter biopolymeru a dále schopnost receptorového rozpoznání (receptor CD44) hyaluronanu v biologických systémech. Možné nevýhody modifikace karboxylové funkce HA jsou podrobněji diskutovány v teoretické části (kapitola 4.1). Z důvodu komplikovaného systematického názvosloví derivátů hyaluronanu jsou v tomto textu pro názvy látek použity zkratky (viz seznam zkratek) korespondující s modifikací polysacharidu určitou látkou (například označení pro hyaluronan HA modifikovaný fluorescenční látkou cypate je HA-cypate; hyaluronan modifikovaný cypate a řetězci kyseliny olejové HA-cypate-C18:1).

12.1 Fluorescenční značení hyaluronanu

Mezi vhodné kontrastní látky využívané pro přípravu teranostik, tedy nosičových systémů s terapeutickou a diagnostickou funkcí, patří fluorescenční látky. V případě teranostik se jedná zejména o barviva absorbující a emitující záření v blízké infračervené oblasti (NIR), jež je charakteristické hlubší penetrací tkáněmi oproti záření o kratších vlnových délkách. Navázání fluorescenční látky k polymernímu řetězci HA je poté jednou z možností, jak studovat chování hyaluronanu a jeho derivátů v biologických systémech *in vitro* nebo neinvazivně *in vivo* pomocí optických přístrojů (konfokální mikroskop, preklinické optické zobrazovací přístroje a jiné).

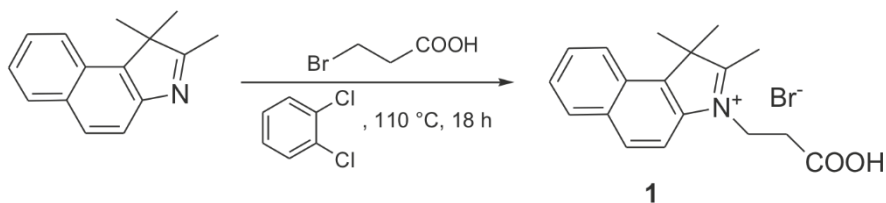
12.1.1 Syntéza fluorescenční cypate

Pro přípravu teranostik, jejichž základem je polysacharidový řetězec HA, byla vybrána NIR fluorescenční látka cypate. Z důvodu všeobecně vysoké ceny NIR fluorescenčních látek, popřípadě komerční nedostupnosti látek, bylo nutno

vybrané heptamethinové cyaninové barvivo cypate nejprve připravit dle postupu popsaného v literatuře.¹⁴⁸

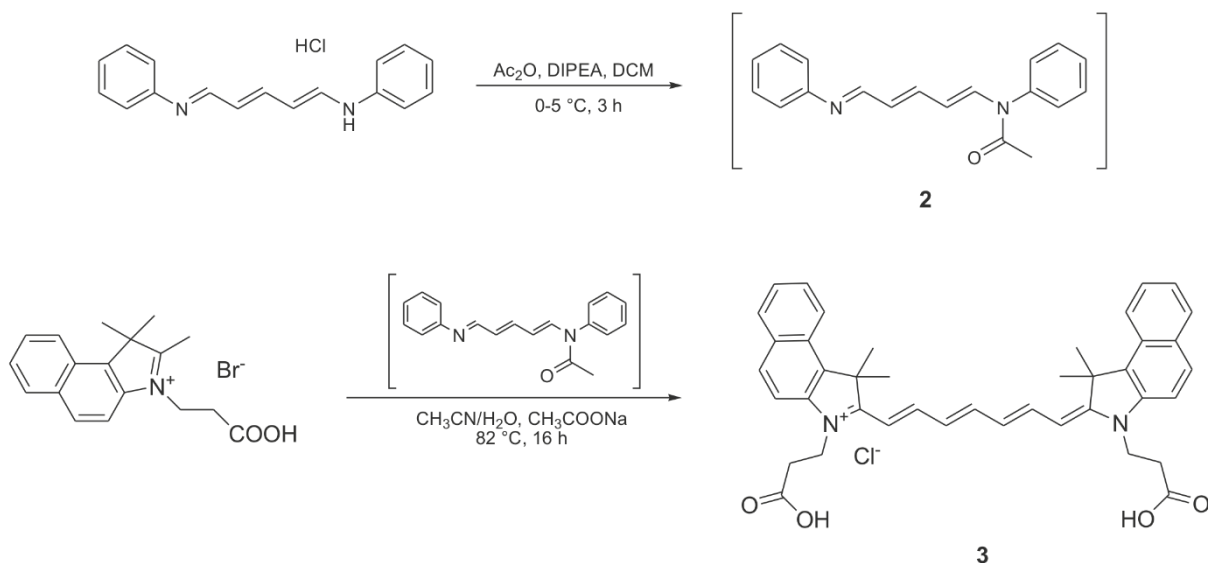
Prvním krokem přípravy byla kvarternizace 1,1,2-trimethylbenz[*e*]indolu kyselinou 3-brompropanovou, jak je uvedeno na Schéma 11.

Schéma 11

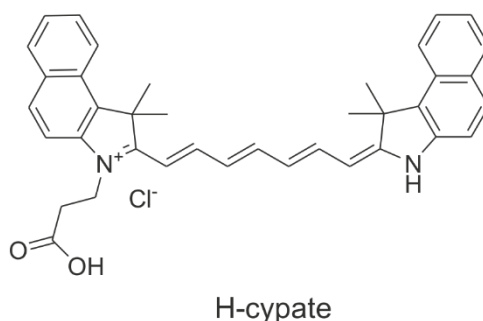


Ve druhém kroku syntézy cypate byl jako prekurzor pentatrienové spojky použit *N*-((1*E*,3*E*,5*E*)-5-(fenylimino)penta-1,3-dienyl)benzenamonium-chlorid, který byl nejprve acetylován za vzniku intermediátu **2**, a poté reagoval za podmínek uvedených na Schéma 12 s 1,1,2-trimethyl-3-(2-karboxyethan-1-yl)-[1*H*]-benzo[*e*]indolium-bromidem (**1**), kdy produktem reakce byla požadovaná látka cypate (**3**).

Schéma 12



Byly taktéž provedeny pokusy o přípravu tzv. H-cypate,¹⁴⁹ jež obsahuje ve své struktuře pouze jednu karboxylovou skupinu (Obrázek 24). Využití H-cypate pro modifikaci HA by bylo výhodnější z důvodu zamezení síťování řetězců HA reakcí dvou karboxylových skupin HA s jednou molekulou látky cypate. H-cypate byl syntetizován stejným způsobem jako cypate, avšak za použití polovičního množství látky **1** v reakční směsi tak, jak bylo uvedeno v publikovaném literárním postupu. Produktem reakce byla však v několika opakovaných pokusech vždy pouze látka cypate (**3**), jejíž vznik byl potvrzen za pomoci NMR a ESI-MS.



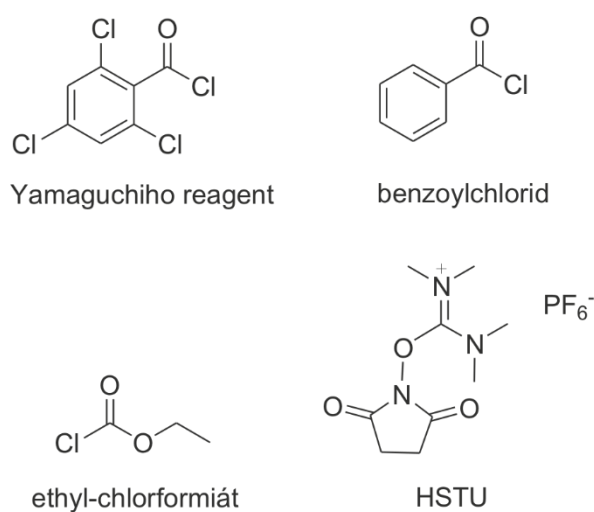
Obrázek 24: Strukturální vzorce barviv cypate a H-cypate.

12.1.2 Modifikace hyaluronanu látkou cypate

Dalším krokem byla příprava hyaluronanu s chemicky vázaným cypate (**HA-cypate**). Cypate obsahuje ve své struktuře dvě karboxylové skupiny, jež jsou vhodné pro navázání k polymernímu řetězci HA prostřednictvím esterové vazby. Jedním z omezení modifikace HA je však nemožnost použití silných, zejména anorganických kyselin i zásad, a to z důvodu nežádoucího štěpení polymerního řetězce HA na menší fragmenty, což vede k výraznému snižování molekulové hmotnosti. Proto bylo přistoupeno k modifikaci hydroxylových skupin HA různými reaktivními funkčními deriváty karboxylových kyselin, připravenými z tzv. aktivačního činidla a karboxylové skupiny.

Jako první byla vyzkoušena metoda patentována firmou Contipro, jejíž podstatou je využití Yamaguchiho reagentu (2,4,6-trichlorbenzoylchloridu),¹⁵⁰

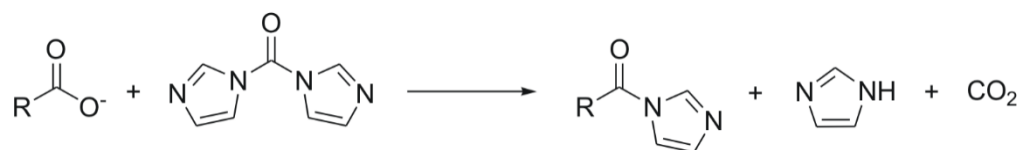
nebo dále také jeho levnějšího analogu benzoylchloridu.^{114,161} Bylo popsáno, že působením zmíněných aktivačních činidel v přítomnosti báze (TEA, DIPEA) a katalyzátoru DMAP na karboxylovou skupinu dochází ke vzniku směsného anhydridu, který je možno dále použít pro navázání zbytku karboxylové kyseliny na řetězec HA. Mezi další vyzkoušená aktivační činidla (Obrázek 25) patří ethyl-chlorformiát, nebo *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(*N*-sukcinimidyl)uronium-hexafluorofosfát (HSTU). Použití ani jednoho ze čtyř zmíněných aktivačních činidel nevedlo ke vzniku derivátu látky cypate a jeho navázání k HA.



Obrázek 25: Aktivační činidla karboxylových skupin.

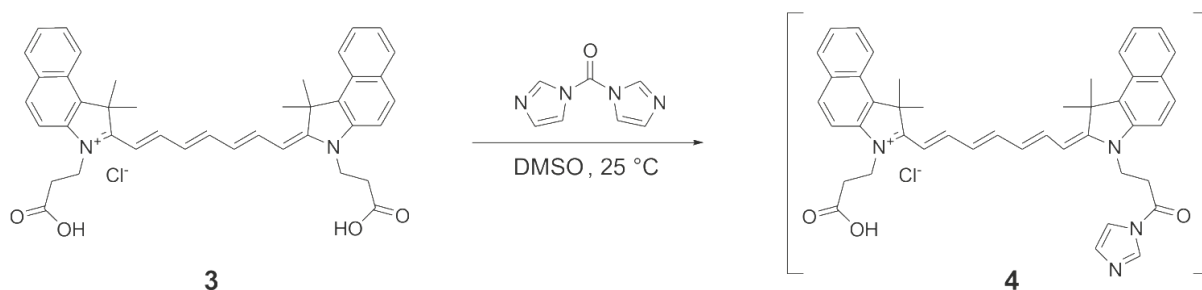
HA-cypate se podařilo připravit až za použití *N,N*-karbonyldiimidazolu (CDI, systematicky di-(1*H*-imidazol-1-yl)methanon). CDI se řadí mezi velmi reaktivní aktivační činidla, jež reaguje s karboxylovými skupinami v bezvodém prostředí za vzniku velmi reaktivního intermediátu *N*-acylimidazolu.⁶⁵ Při reakci uvedené na Schématu 13 *Schéma 13* dále dochází k odštěpení jedné molekuly imidazolu a CO_2 . *N*-acylimidazol může být dále atakován různými nukleofily. Příkladem takových nukleofilů mohou být aminy, kdy již při laboratorní teplotě dochází ke vzniku amidické vazby, čehož lze využít pro syntézu peptidů.^{65,151,152} CDI může být také použit pro přípravu esterů.^{153,154}

Schéma 13



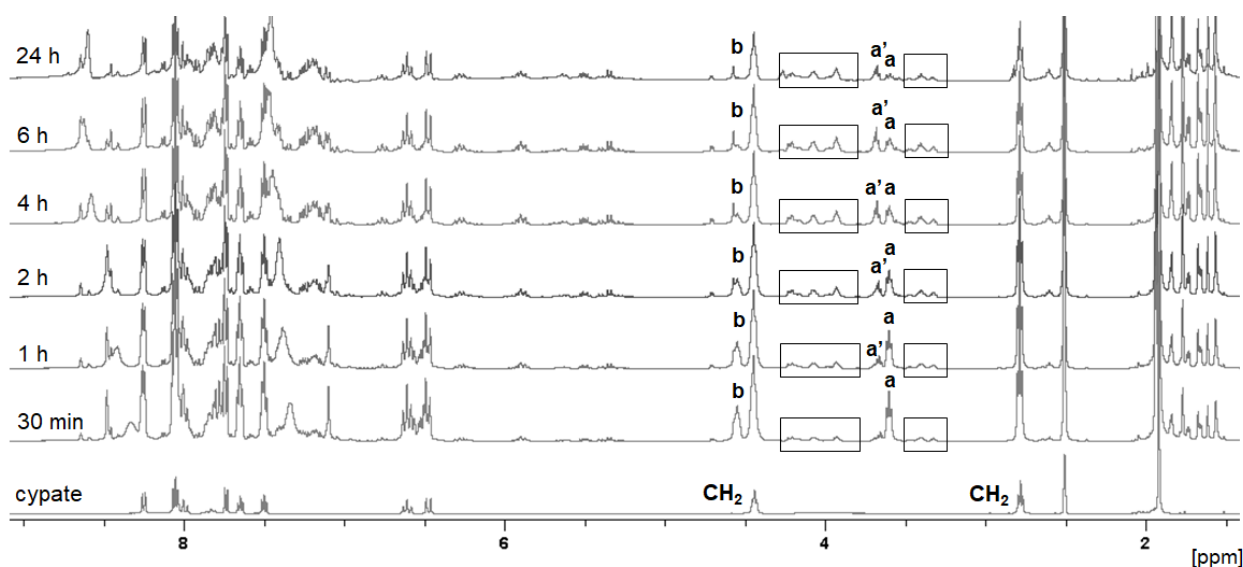
Úspěšná aktivace karboxylové skupiny cypate tedy byla provedena jeho reakcí s CDI. V ideálním případě dochází ke vzniku aktivního intermediátu **4** s aktivovanou pouze jednou karboxylovou skupinou (Schéma 14). V případě aktivace obou COOH skupin by pak obě mohly reagovat s HA a mohlo by docházet k nežádoucímu síťování polymerních řetězců. Za účelem zamezení nežádoucí aktivace obou karboxylových skupin v molekule cypate byla pro reakci použita pouze polovina ekvivalentu CDI (tedy jeden ekvivalent ve vztahu k jedné COOH skupině), což statisticky snižuje možnost aktivace obou karboxylových skupin látky cypate.

Schéma 14



Pro potvrzení vzniku cypate s aktivovanou karboxylovou skupinou byly provedeny pokusy o izolaci meziprojektu **4** za využití sloupcové chromatografie. Tímto způsobem však došlo k izolaci pouze výchozí látky cypate. Neúspěch izolace může být způsoben nejspíše rychlým rozkladem látky **4** na koloně. Rovněž je možné, že intermediátu ve směsi vznikalo velmi malé množství. Z těchto důvodů bylo sledování vzniku aktivovaného derivátu cypate provedeno pomocí přímého měření NMR spekter reakční směsi. Do NMR kyvety byl napipetován cypate rozpuštěný v deuterovaném DMSO a následně

CDI. Po 0,5, 1, 2, 4, 6 a 24 h od přidavku CDI byla změřena ^1H NMR spektra. Jednotlivá spektra měření v čase jsou uvedena na Obrázku 26. V porovnání s původním spektrem látky cypate, ve kterém můžeme pozorovat signály methylenových skupin při $\delta = 2,8$ a $4,5$ ppm, se v této oblasti ve spektru reakční směsi objevily dva nové intenzivní signály při $\delta = 3,6$ (**a**) a $4,6$ (**b**). Dále byly ve spektru reakční směsi pozorovány široké signály s nízkou intenzitou v oblastech $\delta = 3,7$ (**a'**) a $3,3\text{--}3,5$ a $4,2\text{--}3,9$ ppm. Intenzita těchto signálů se zvyšovala v čase na úkor signálů při $\delta = 3,6$ a $4,6$ ppm. Tyto pozorované změny v NMR spektrech mohou indikovat vznik požadovaného derivátu cypate (**4**) přes několik meziproductů reakce.^{153,154} Pro přiřazení signálů ke struktuře meziproductů bylo provedeno taktéž měření COSY NMR spekter, která však výrazně nenapomohla k identifikaci látek v reakční směsi. Dle ^1H NMR spekter se jako vhodný čas aktivace karboxylové skupiny cypate jeví 2 h. Po 2 h nedocházelo již ke vzniku nových signálů nebo výraznému nárůstu intenzity pozorovaných signálů.

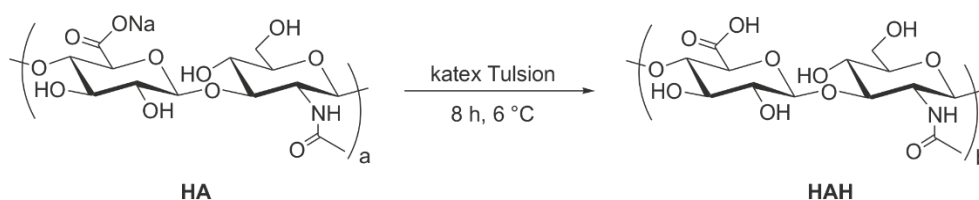


Obrázek 26: Monitorování reakce **cypate** a CDI v čase pomocí NMR.

Stejná měření byla provedena u reakčních směsí, kdy k cypate byla přidány Yamaguchiho reagent, benzoylchlorid nebo HSTU. V těchto ostatních případech nebyly v NMR spektrech pozorovány nově vznikající signály, což vysvětlilo neúspěšnost přípravy **HA-cypate** s těmito aktivačními činidly.

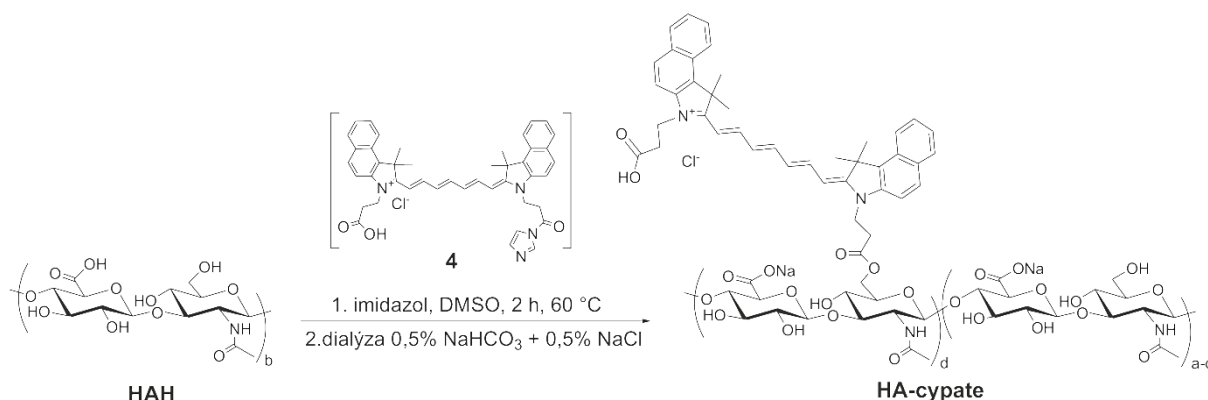
První pokusy o přípravu hyaluronanu chemicky modifikovaného látkou cypate (**HA-cypate**) za účasti CDI byly provedeny tak, že reakční směs s cypate a CDI v DMSO byla přidána k roztoku hyaluronanu ve vodě. Konečným produktem reakce byl bezbarvý lyofilizát, přičemž byl očekáván vznik zeleného produktu. Na základě tohoto výsledku bylo usouzeno, že se jedná pouze o nemodifikovaný výchozí hyaluronan, což bylo následně potvrzeno ^1H NMR spektroskopii. Z důvodu nezdařilé syntézy bylo vodné reakční prostředí změněno na DMSO. Pro docílení požadované rozpustnosti HA v DMSO byl nejprve hyaluronan sodný převeden na kyselinu hyaluronovou (**HAH**) výměnou Na^+ iontů za H^+ pomocí komerčně dostupného katexu (Schéma 15).

Schéma 15

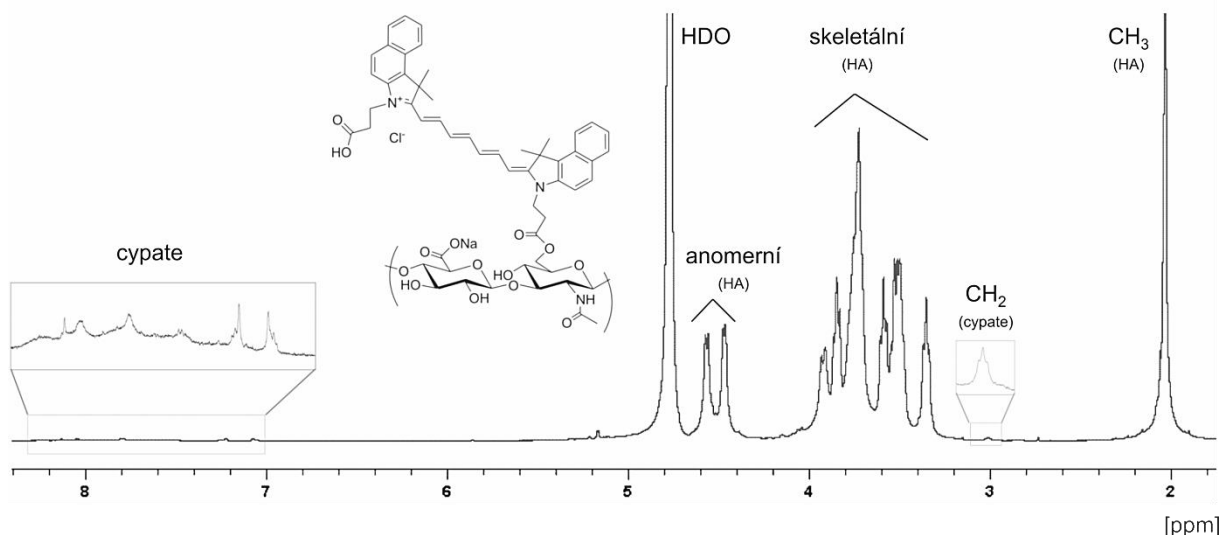


K takto připravené **HAH** rozpuštěné v DMSO byla v další reakci přidána reakční směs cypate a CDI v DMSO (Schéma 16). Reakce byla prováděna při $60 \text{ }^\circ\text{C}$ z důvodu lepší rozpustnosti HAH o různých molekulových hmotnostech ($M_w = 6\ 000\text{--}105\ 000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) v DMSO. Pro zpětný zisk polymeru ve formě soli hyaluronanu byl produkt při purifikaci dialyzován proti roztoku soli NaHCO_3 . Jako nepřímý důkaz zisku HA ve formě sodné soli byla testována rozpustnost získaného produktu v DMSO. Na rozdíl od výchozí kyseliny hyaluronové, nebyl tento produkt v DMSO rozpustný, z čehož bylo usouzeno, že se jedná o sodnou sůl HA.

Schéma 16



Charakterizace produktu byla nejprve provedena pomocí NMR technik. Typické ¹H NMR spektrum **HA-cypate** je znázorněno na Obrázku 27. Vzhledem k nízké intenzitě signálu v oblasti 7,0–8,4 ppm nebylo možné jednoznačně přiřadit signály aromatických vodíků cypate. Nedostatečné rozlišení signálů v aromatické oblasti mohlo být způsobeno nízkým stupněm substituce HA látkou cypate a nejspíše také mírně různým chemickým okolím cypate v závislosti na tom, ve které části řetězce je látka navázána, což mohlo způsobit rozšíření signálů. Nicméně, signál jedné z methylenových skupin cypate byl nalezen při 3,0 ppm a porovnáním integrální intenzity se signály při $\delta = 4,6\text{--}4,4$ HA (2H, HA anomerní) byl vypočítán stupeň substituce 0,7 %. U ostatních signálů, pocházejících z vodíků methylových a methylenových skupin je předpokládán jejich překryv signály HA.

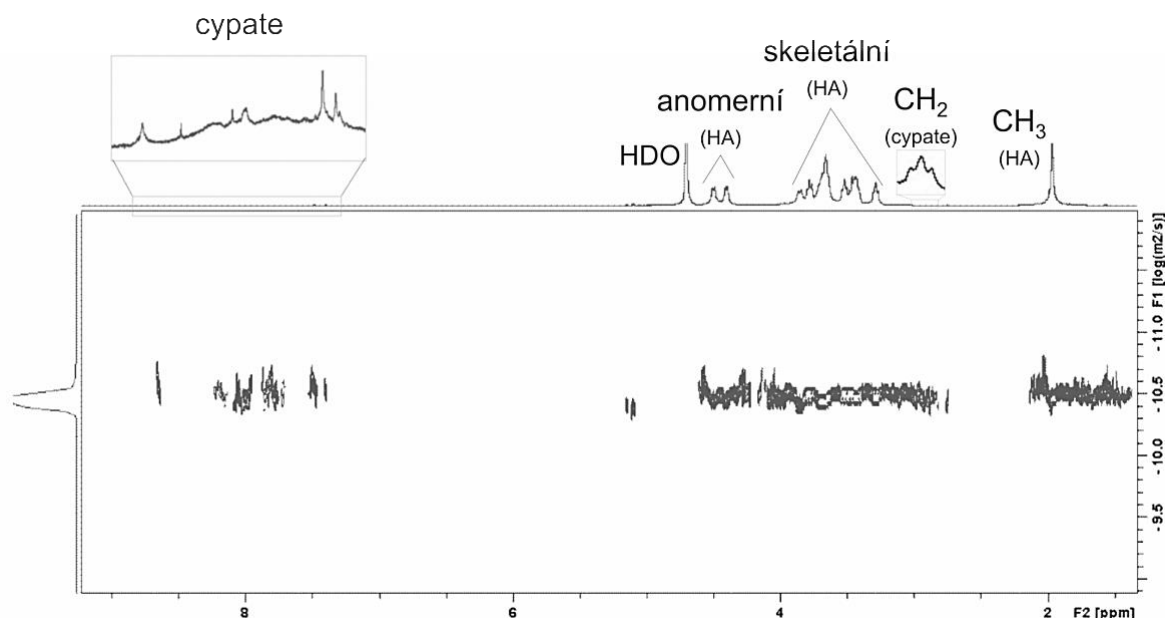


Obrázek 27: ^1H NMR spektrum **HA-cypate** (D_2O).

Pro dosažení vyššího stupně substituce látkou cypate byly zkoumány různé podmínky reakce, a to v přítomnosti několika organických bází jako je TEA, DIPEA nebo *N*-methylmorfolin. Ve všech případech došlo ke vzniku produktu, avšak přítomnost báze, případně také změna reakčního času nikdy výrazně nezvýšila stupeň substituce HA látkou cypate (viz Tabulka 3). Pro interní potřeby firmy byly pro přípravu modifikovaného produktu kromě HA s $M_w = 15\,000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ využity i **HAH** o M_w v rozmezí $M_w = 6\,000\text{--}105\,000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ v množství 0,1–1,5 g. Ve všech těchto případech bylo dosaženo stupně substituce pod 1 %.

Jelikož ^1H NMR spektrum nepotvrdilo jednoznačně kovalentní vazbu mezi cypate a HA, byl způsob navázání cypate na HA dále zkoumán pomocí DOSY NMR (Obrázek 28). Vzhledem k výraznému rozdílu mezi difúzními koeficienty nízkomolekulárních organických sloučenin a polymerů s vysokou molekulovou hmotností, jako je hyaluronan, může DOSY spektrum snadno odhalit přítomnost nízkomolekulárních složek, které nejsou kovalentně vázány na HA. DOSY experimenty ovšem ukázaly podobné difúzní chování všech signálů v oblasti mezi $\delta = 1,0$ a $9,0$ ppm. Toto pozorování silně podporuje hypotézu, že všechny

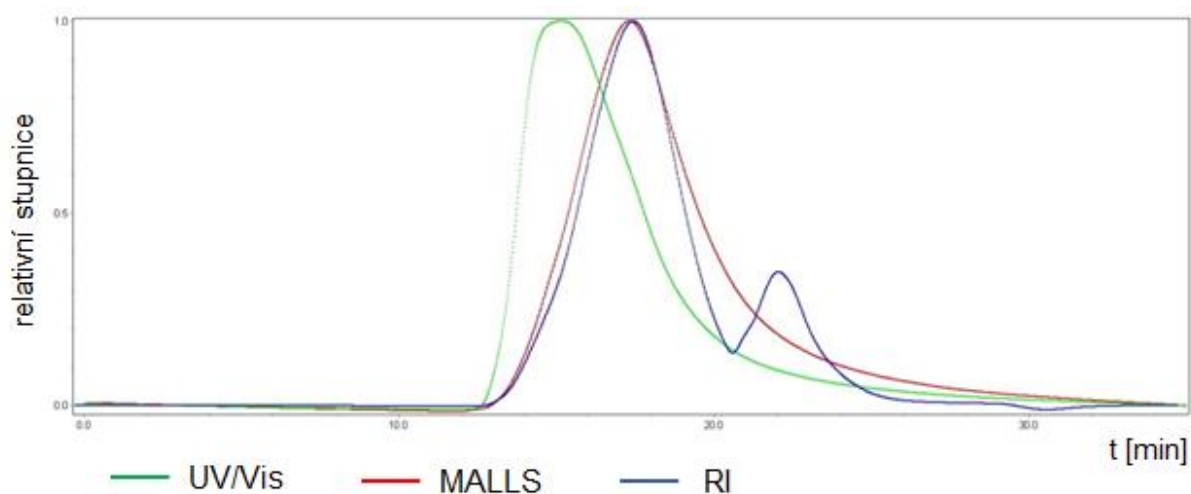
protonové signály v této oblasti patří k jednomu strukturnímu komplexu. Zdá se tedy, že mezi cypate a HA existuje velmi pevná, pravděpodobně kovalentní vazba.



Obrázek 28: DOSY spektrum **HA-cypate** (D₂O).

Jako další bylo po modifikaci HA látkou cypate bylo při excitaci 665 nm naměřeno maximum emise **HA-cypate** při 699 nm (spektrum je uvedeno jako Příloha 1). Měření v oblasti delších vlnových délek nebylo možno z důvodu omezení rozsahu měřitelné emise záření přístrojem do 800 nm. Následně byla provedena nezávislá analýza za použití gelové permeační chromatografie. Byly použity tři detektory, fotometr pro měření víceúhlového rozptylu světla (MALLS), diferenciální refraktometr (RI) a UV/Vis detektor s nastavením $\lambda = 665$ nm pro absorpci záření látkou cypate. V uvedeném výřezu chromatogramu (Obrázek 29) lze pozorovat záznamy ze všech tří detektorů. Z tvaru křivek lze usoudit, že dochází k eluci pouze jedné látky. Mírný posun maxim křivek je způsobem postupným průchodem vzorku detektory, jež jsou zapojeny sériově. Vzhledem k velmi rozdílným molekulovým hmotnostem HA ($15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) a látky cypate ($624\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) by v případě přítomnosti pouhé fyzikální směsi těchto dvou látek nedošlo k eluci pouze jedné látky, což by se

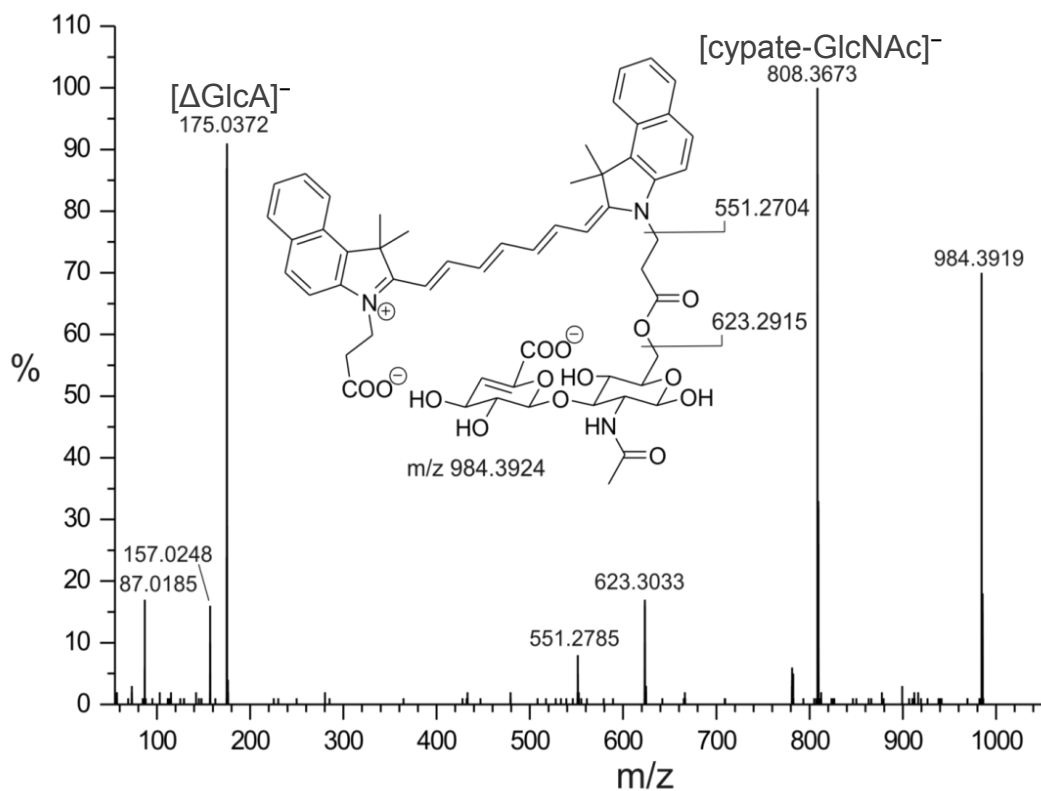
projevilo dvěma maximy na pozorovaných křivkách. Rovněž by nedošlo k synchronní detekci eluované látky UV/Vis detektorem při $\lambda = 635$ nm, který měří absorpci chromoforu cypate (samotný HA neabsorbuje záření při této vlnové délce) a ostatními detektory. Pro získání nepřímého důkazu vazby mezi HA a cypate by bylo zajímavé také porovnat výše popsané výsledky s měřením pouhé fyzikální směsi HA a cypate. Avšak zmíněnou směs nebylo možné ve vodném prostředí připravit, jelikož cypate je nerozpustný ve vodě.



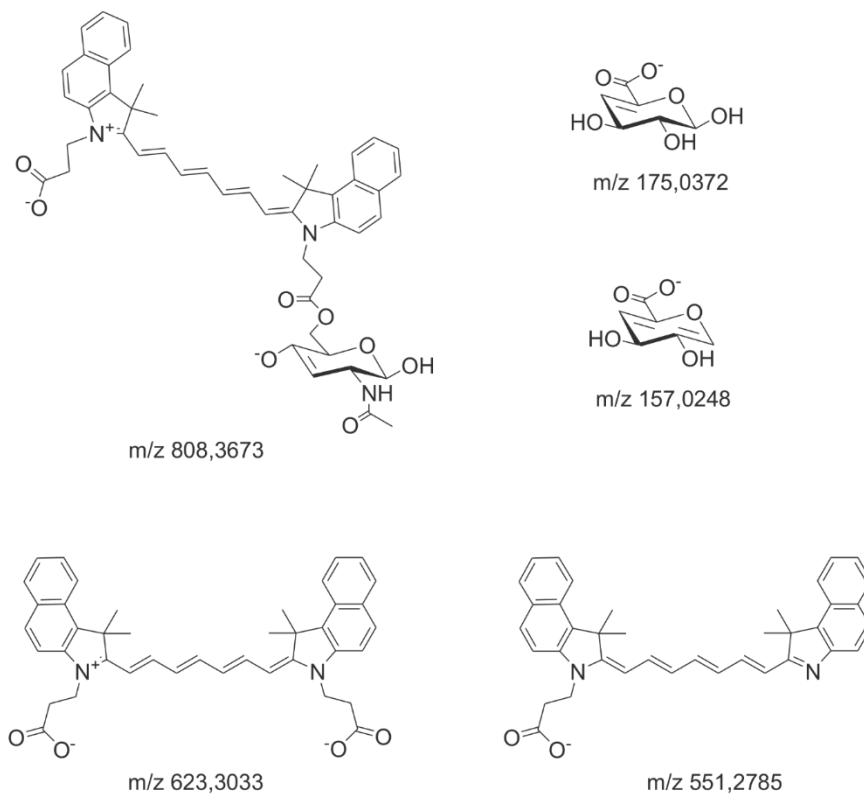
Obrázek 29: Výřez záznamu chromatogramu z GPC; MALLS červená křivka, RI modrá křivka, UV/Vis zelená křivka.

Nejsilnější důkaz kovalentní vazby cypate na HA polymer byl získán za využití UPLC-MS techniky. **HA-cypate** byl nejprve štěpen bakteriální hyaluronidázou SpHyl po dobu 8 h. Jedná se o enzym, který se řadí mezi lyázy a štěpí vazbu $\beta(1\rightarrow4)$ v hyaluronanu, což vede k tvorbě nenasycených disacharidů hyaluronanu (HA) s kyselinou glukuronovou na neredukujícím konci. Enzym byl také schopen štěpit **HA-cypate** ($M_w = 15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Vzniklý produkt enzymatické degradace byl separován pomocí UPLC a modifikace hyaluronanu látkou cypate byla potvrzena nalezením fragmentu (eluční doba 4,52 min) s přesnou hmotností odpovídající očekávanému produktu enzymatického rozkladu modifikované HA, tedy disacharidové jednotce nesoucí

skupinu cypate (Δ HA2-cypate; $C_{55}H_{59}N_3O_{14}$; m/z (vypočítáno) = 984,3919; m/z (naměřeno) = 984,3951; chyba = 3,25 ppm). Tandemová spektra nenasyceného cypate-modifikovaného disacharidu hyaluronanu (Obrázek 30) potvrdila přítomnost cypate modifikace na *N*-acetyl-D-glukosaminové jednotce. Nejintenzivnější signály v MS/MS spektru (Obrázek 30) v negativním modu lze přiřadit Δ HA2-cypate bez nenasycené glukuronové jednotky (cypate-GlcNAc, m/z (vypočítáno) = 808,3603; (naměřeno) = 808,4622) a mononenasycené kyselině glukuronové (Δ GlcA, m/z (vypočítáno) = 175,0248; m/z (naměřeno) = 175,0585). Navíc dva fragmenty mohou být vysvětleny jako rezidua látky cypate (m/z (vypočítáno) = 623,2915, m/z (naměřeno) = 623, 3033 a (m/z (vypočítáno) = 551,2704; m/z (naměřeno) 551,2785). Poslední fragment pravděpodobně odpovídá dvojnásobně nenasycené kyselině glukuronové (m/z (vypočítáno) = 157,0142; m/z (naměřeno) = 157,0248). Na Obrázku 31 jsou znázorněny všechny předpokládané struktury vzniklé fragmentací Δ HA2-cypate ($m/z = 984,3919$). Na základě naměřených dat lze tedy oprávněně uvažovat o přítomnosti cypate-modifikovaných disacharidových fragmentů hyaluronanu v produktu enzymatického štěpení vzorku derivátu **HA-cypate**. S největší pravděpodobností to rovněž svědčí o kovalentní vazbě mezi chromoforem cypate a HA polymerem modifikovaném produktu připraveném reakcí za využití CDI.



Obrázek 30: ESI-MS spektrum fragmentace disacharidu HA s vázanou látkou cypate.



Obrázek 31: Předpokládané struktury vzniklé fragmentací ΔHA2-cypate.

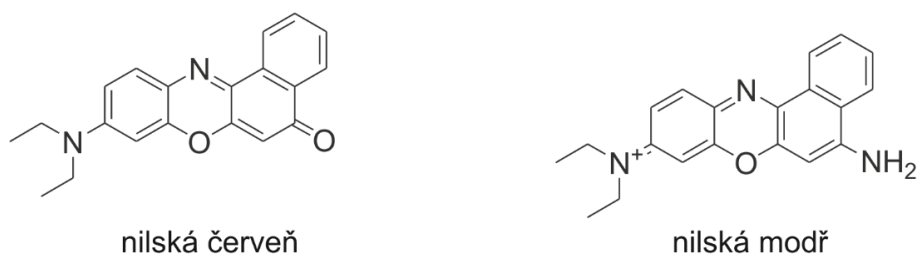
Z výsledků všech provedených analýz lze usuzovat, že došlo k navázání cypate pomocí esterové vazby s hydroxylovými skupinami HA. Doposud nebylo úplně potvrzeno, které hydroxylové skupiny HA podléhají modifikaci. Z výše komentovaného rozboru MS spektra hydrolyzátu modifikované HA je však patrné, že k modifikaci dochází na glukosaminové jednotce. Z důvodů sterického bránění pak lze předpokládat, že dochází převážně k vazbě na primární hydroxylové skupiny na uhlíku C6, což rovněž naznačuje racionální interpretace fragmentu o m/z 808,3673 (tento fragment může vzniknout pouze za předpokladu přítomnosti intaktní C3—OH skupiny HA).

Co se týče doposud v literatuře popsanych NIR fluorescenčně značených HA derivátů, v případě HA značené Cy5.5^{126,127} a Cy7.5¹³¹ byl vznik požadované látky autory dokládán například pouze pomocí UV/Vis spektroskopie. I když se jedná o články publikované v renomovaných časopisech s velmi vysokým impaktovým faktorem, absence charakterizace derivátu hyaluronanu pomocí metod instrumentální strukturní analýzy, jako je například NMR, může vést k pochybnostem o vzniku požadovaných látek.

12.2 Příprava derivátu HA modifikovaného nilskou modří

Pro účely studia derivátů HA v biologických systémech *in vitro* (primárně pro studium dermální penetrace, nebo dále vstupu nosičových systémů do buněk) byl připraven hyaluronan s kovalentně vázanou nilskou modří (**HA-NM**). Volba dané fluorescenční látky nebyla náhodná. Jedná se o analog barviva nilská červeň, která je v literatuře popsána v souvislosti s *in vitro* testováním penetrace nosičových systémů kůží.^{155,156} Obě dvě fluorescenční látky patří mezi deriváty benzofenoxazinu (Obrázek 32) a jsou často využívány taktéž v molekulární biologii.^{157,158} Využití nilské červeně pro modifikaci HA je velmi obtížné, jelikož uvedené barvivo ve své chemické struktuře neobsahuje vhodnou funkční skupinu, snadno využitelnou pro navázání k biopolymeru. Oproti tomu nilská modř nabízí ve své struktuře primární aminoskupinu. Primární aminoskupinu

nilské modři lze využít například k modifikaci karboxylové funkce HA za vzniku amidové vazby. To je ovšem s ohledem na požadované zachování volných karboxylových skupin nežádoucí. Z těchto důvodů byla zvolena metoda reduktivní aminace oxidované formy HA dle postupu patentovaného a publikovaného v odborných časopisech firmou Contipro.^{117,159,160}

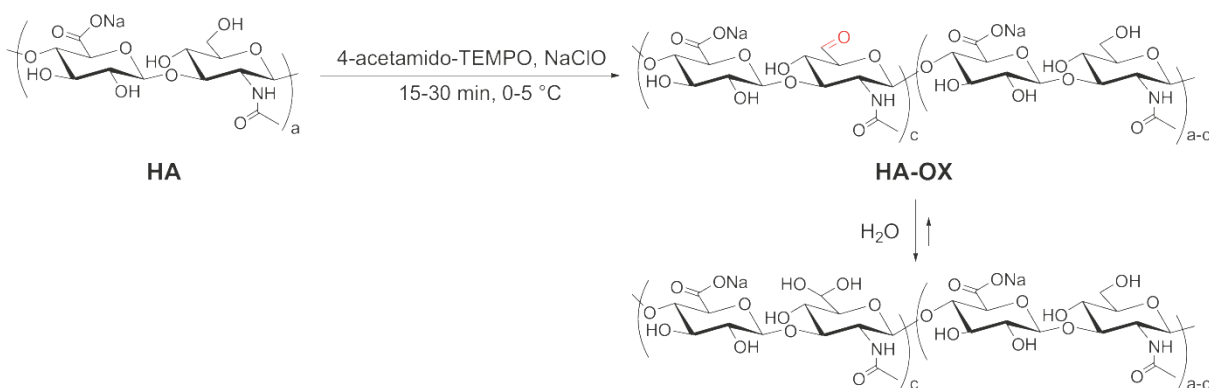


Obrázek 32: Strukturální vzorce nilské červeňi a nilské modři.

12.2.1 Příprava oxidované formy hyaluronanu

Prvním krokem přípravy hyaluronanu modifikovaného nilskou modří (**HA-NM**) byla syntéza oxidované formy HA (**HA-OX**) dle mírně modifikovaného postupu, kdy byla primární hydroxylová skupina na C6 *N*-acetylglukosaminu převedena na oxo skupinu, přičemž se dle autorů oxidovaný hyaluronan nachází ve vodném prostředí spíše ve formě polyaldehydu (Schéma 17).^{117,159,160}

Schéma 17



Příprava **HA-OX** byla provedena u dvou šarží HA s různými molekulovými hmotnostmi (viz Tabulka 8). Reakce byly prováděny za stejných podmínek,

vyjma doby reakce, kdy prodloužením reakčního času o 15 min bylo dosaženo vyššího stupně oxidace (SO) v případě HA o $M_w = 26\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabulka 8: Příprava **HA-OX** o různých molekulových hmotnostech.

M_w HA [g·mol ⁻¹]	polydisperzita	t [min]	M_w HA-OX [g·mol ⁻¹]	polydisperzita	SO [%]
18 000	*	15	16 000	1,6	5,5
26 000	1,6	15	21 500	1,6	6,5
26 000	1,6	30	22 500	1,5	7,6

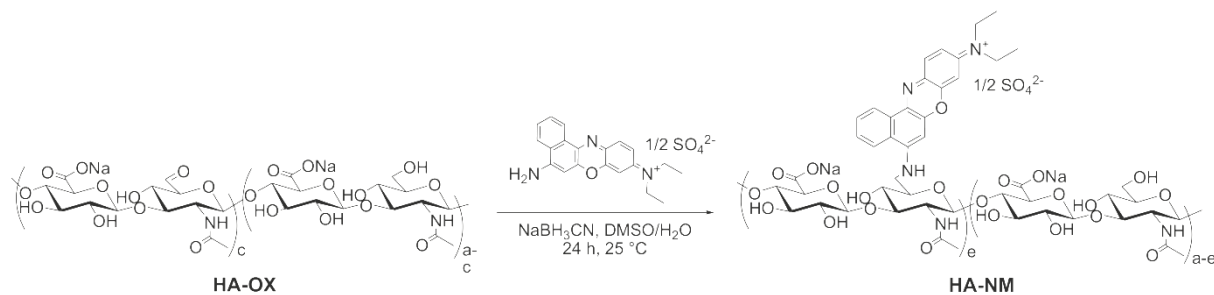
*Data o polydisperzitě nebyla dostupná.

Pro přípravu hyaluronanu značeného nilskou modří (**HA-NM**, kapitola 8.3.2) byla vybrána **HA-OX** ($16\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, SO = 5,5 %). Další šarže **HA-OX** byly poté využity pro syntézu HA modifikovaného poly(ethylenglykolem) (**HA-PEG**, kapitola 8.5.1).

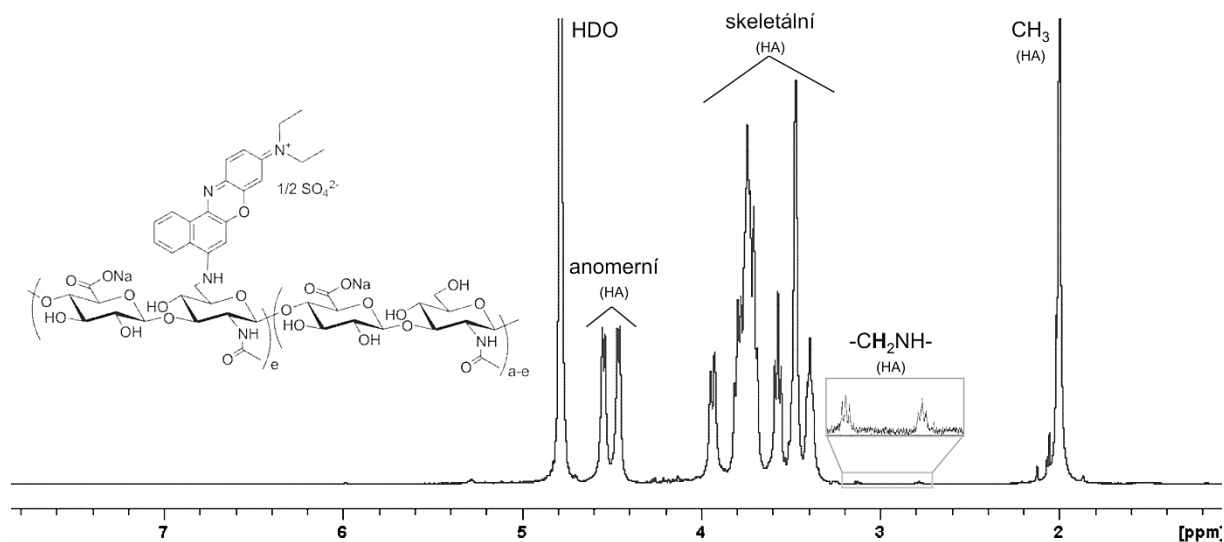
12.2.2 Syntéza hyaluronanu značeného nilskou modří

Druhým krokem syntézy hyaluronanu s vázanou nilskou modří (**HA-NM**) bylo již samotné navázání nilské modří na oxidovanou formu HA reduktivní aminací (Schéma 18).^{117,159,160} Při tomto typu reakce mohou aldehydy a ketony reagovat s primární aminoskupinou za vzniku nestabilního iminu – Shiffovy báze, který reakcí s redukčním činidlem poskytuje sekundární amin. Pro přípravu požadované látky byla vyzkoušena dvě redukční činidla. Tím prvním byl NaBH_3CN a druhým méně toxická alternativa redukčního činidla – komplex boranu s 2-methylpyridinem. V tomto případě se jako účinnější redukční činidlo se osvědčil NaBH_3CN . Po reakci za využití komplexu boranu s 2-methylpyridinem došlo ke vzniku modré nerozpustné gelovité sraženiny, kdy pokusy o její purifikaci (například promytí $i\text{PrOH}$, dialýza) nebo analýzu selhaly.

Schéma 18

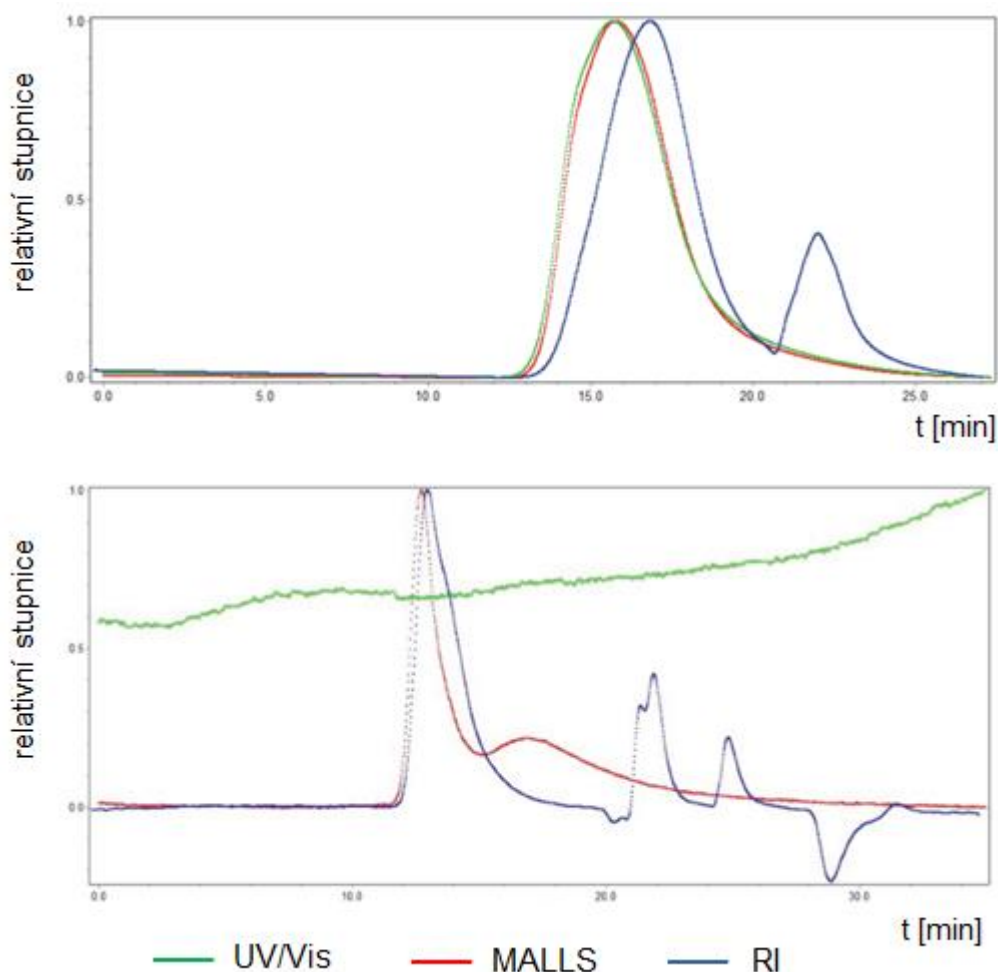


Charakterizace fluorescenčního HA derivátu byla provedena NMR analýzou. Ačkoliv barva konečného produktu byla po jeho purifikaci jednoznačně modrá, nebyly v ^1H NMR spektru pozorovány žádné očekávané signály odpovídající vodíkům aromatického skeletu ani vodíkům ethylů vázaných na atomy dusíku. Nicméně je známo, že signály odpovídající diastereotopickým methylenovým protonům v poloze C6 části HA glukosaminu jsou velmi citlivé na elektronegativitu sousedního atomu. Pokud je kyslíkový atom na C6 nahrazen atomem dusíku s menší elektronegativitou, signály, jež byly původně okolo hodnot $\delta = 3,8$ a $3,9$ ppm, se posunou k $\delta = 2,8$ a $3,1$ ppm.¹⁶⁰ Na Obrázek 33 je uveden typický příklad ^1H NMR spektra pro **HA-NM**, kde byly pozorovány signály diastereotopických methylenových protonů při výrazně nižších hodnotách než u samotné HA, což naznačuje úspěšnou tvorbu požadovaného derivátu. Integrací signálů při $\delta = 2,8$ a $3,1$ ppm byl stanoven stupeň substituce 0,9 %.



Obrázek 33: ¹H NMR spektrum **HA-NM** (NaOD).

Jako další charakterizace bylo u **HA-NM** při excitaci 635 nm naměřeno maximum emise záření při 675 nm (spektrum je uvedeno jako Příloha 2). Stejně jako v případě **HA-Cypate** byla za účelem získání nezávislého důkazu, indikujícího tvorbu požadované **HA-NM**, použita technika GPC se třemi detektory (MALLS, RI a UV/Vis $\lambda = 635$ nm). Na Obrázku 34 jsou srovnány dva chromatogramy produktu. Horní záznam je z analýzy derivátu **HA-NM** a dolní odpovídá fyzikální směsi **HA-OX** a nilské modři. Při srovnání průběhu zelených křivek, což jsou záznamy z UV/Vis detektoru, lze uvažovat o tom, že reduktivní aminací došlo k navázání nilské modři k polysacharidovému řetězci. V případě pouhé fyzikální směsi není zaznamenána absorpce světla při $\lambda = 635$ nm a zelená křivka nekoresponduje se záznamy z RI a MALLS detektorů, což nasvědčuje eluci samotného **HA-OX**, jež neabsorbuje záření o uvedené vlnové délce.



Obrázek 34: Záznam chromatogramu **HA-NM** (nahore) a HA a nilská modř fyzikální směsi (dole).

12.3 Hydrofobizace fluorescenčních derivátů hyaluronanu

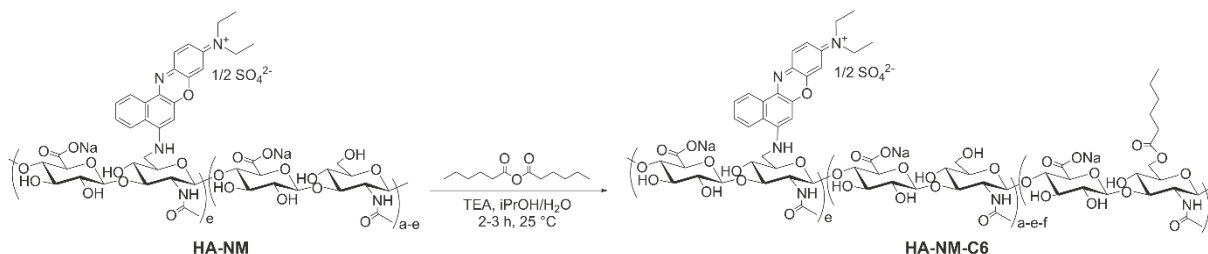
Pro účely přípravy amfifilních derivátů, schopných agregovat ve vodném prostředí a tvořit fluorescenčně značené nosičové systémy – polymerní micely (PM), byly **HA-cypate** a **HA-NM** dále modifikovány různými typy řetězců mastných kyselin. Řazení následujících kapitol koresponduje s narůstající délkou alifatického řetězce kyseliny, která byla použita k modifikaci, a to bez ohledu na typ použité fluorescenční látky pro značení HA.

12.3.1 Hydrofobizace hyaluronanu kyselinou kapronovou

V tomto případě byly připraveny (Schéma 19) hydrofobizované deriváty pouze **HA-NM** za pomoci komerčně dostupného symetrického anhydridu

kyseliny kapronové (hexanové). Ze strany firmy Contipro nebyl požadavek na přípravu **HA-cypate** modifikovaného řetězci kyseliny kapronové.

Schéma 19



Z Tabulky 9 lze vyčíst závislost stupně substituce (výpočet je uveden v experimentální části) HA acylovým řetězcem kyseliny hexanové na použití různých ekvivalentů symetrického anhydridu vůči 1 ekvivalentu hyaluronanu a také době reakce. Použitím ekvivalentu anhydridu na 3,2 a prodloužení reakční doby ze 2 na 3 hodiny bylo dosaženo nejvyššího $SS = 52\%$. Důkazem vzniku **HA-NM-C6** je uvedeno spektrum DOSY jako Příloha 3.

Tabulka 9: Příprava **HA-NM-C6** za použití různých ekvivalentů reaktantů.

anhydrid kyseliny hexanové ekv.	doba reakce [h]	SS_{C6} [%]
2,5	3	42
3,2	3	52
4,0	2	46

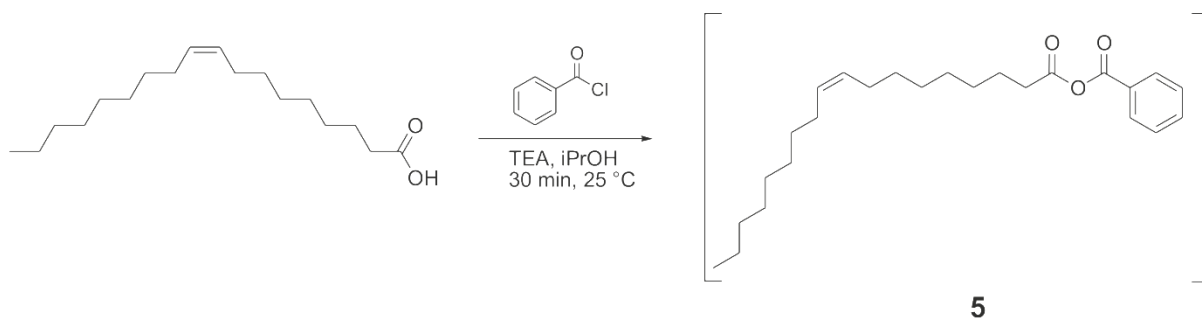
Derivát **HA-NM-C6** se $SS = 52\%$ byl dále použit pro přípravu polymerních micel s inkorporovaným kurkuminem. Ve spolupráci s biology z firmy Contipro byl studován transport těchto nosičových systémů s modelovou fluorescenční látkou do vybraných buněk (viz kapitola 15.2).

12.3.2 Hydrofobizace hyaluronanu kyselinou olejovou.

Druhou volbou modifikačního činidla pro přípravu polymerních micel na bázi fluorescenčně značeného hyaluronanu byla kyselina olejová (*cis*-oktadec-9-enová). V tomto případě byl modifikován **HA-cypate** i **HA-NM**. Volba dané kyseliny vycházela z faktu, že hyaluronan modifikovaný kyselinou olejovou byl v literatuře již dříve popsán jako velmi vhodný derivát pro přípravu polymerních micel.^{114,150}

Obě dvě látky **HA-cypate** i **HA-NM** byly hydrofobizovány řetězcí kyseliny olejové dle upravené metody, kdy původně bylo jako aktivační činidlo využíván Yamaguchiho reagent (2,4,6-trichlorbenzoylchlorid), avšak z důvodu jeho vysoké ceny, se začal používat ve firmě Contipro levnější analog benzoylchlorid.^{114,150,161} Prvním společným krokem modifikace **HA-cypate** i **HA-NM** byla reakce mezi kyselinou olejovou a benzoylchloridem za vzniku směsného anhydridu **5** (Schéma 20).

Schéma 20

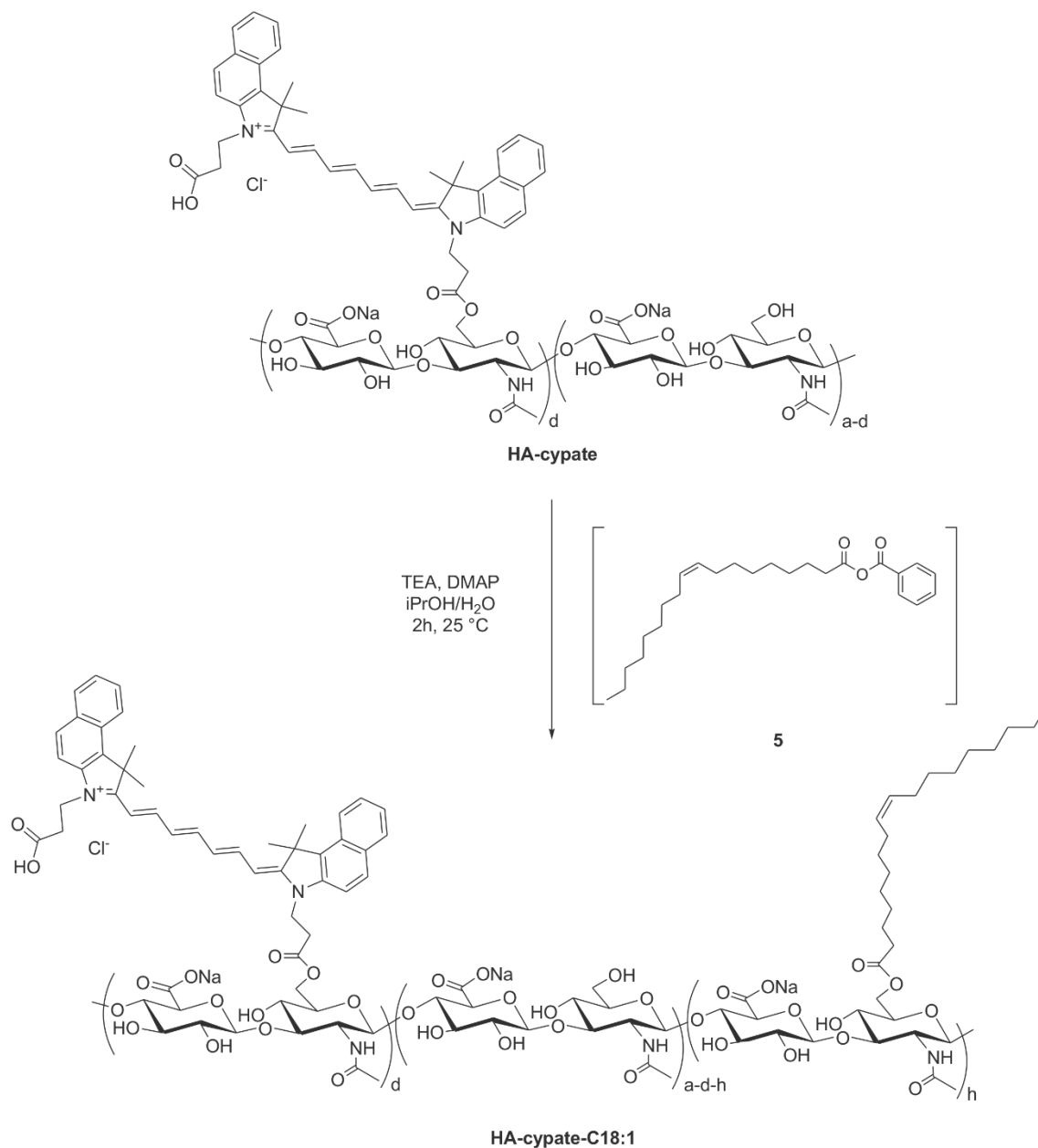


Využití benzoylchloridu je velmi efektivní metodou pro aktivaci karboxylové funkce a následnou acylaci HA. Nevýhodou, jak lze předpokládat ze struktury směsného anhydridu, je možnost navázání kteréhokoliv zbytku kyseliny na řetězec HA. Vzhledem k tomu, že hlavním smyslem této modifikace HA je zavést do struktury polymeru dlouhé lipofilní řetězce, nejeví se navázání konkurenčního benzoylového zbytku na HA jako vhodné. Tato nežádoucí reakce byla skutečně pomocí ¹H NMR spekter prokázána díky pozorování signálů

vodíků náležejících benzenovému kruhu benzoylu.¹⁶¹ Nicméně, stupeň substituce benzoylem se pohyboval do 1 %. Přestože je tato míra modifikace nežádoucím aromatickým zbytkem z chemického hlediska nepříliš významná, z obavy z možných nežádoucích vlivů na živý organismus, byla již dříve testována toxicita HA oligomerů modifikovaných benzoylem. Těmi to experimenty bylo prokázáno, že benzoylovaný HA není cytotoxický, a proto jej lze považovat za potenciálně vodný pro medicínské, kosmetické a další podobné aplikace.¹⁶¹

In situ připravený směsný anhydrid byl dále použit pro hydrofobizaci **HA-cypate** (výchozí $M_w = 15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $SS = 0,7\%$) ve vodném prostředí za použití různého stechiometrického poměru (viz Tabulka 5) kyseliny olejové, TEA a v přítomnosti katalyzátoru DMAP (Schéma 22). Hodnoty stupně substituce, uvedené v Tabulce 10 vypovídají o tom, že se zvyšujícím se poměrem kyseliny olejové (vztaženo na 1 ekvivalent disacharidu HA) v reakci bylo dosaženo vyššího stupně substituce.

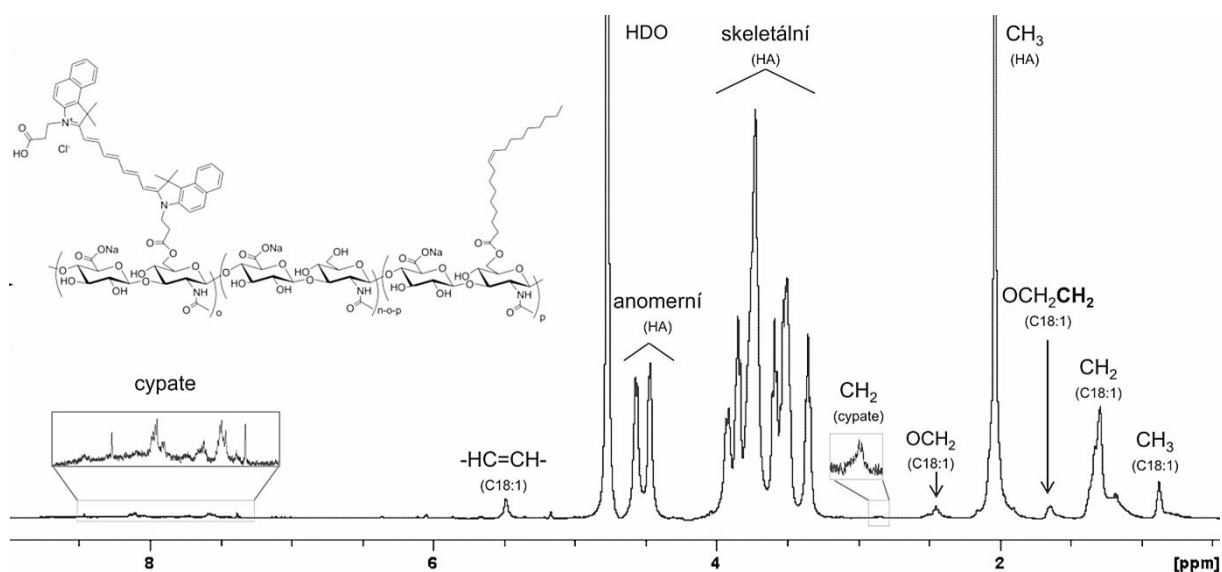
Schéma 21



Tabulka 10: Příprava **HA-cypate-C18:1** s různým stupněm substituce C18:1.

kyselina olejová ekv.	SS _{C18:1} [%]
0,2	4
0,4	5
0,6	8
0,8	8–10
1,0	10–13

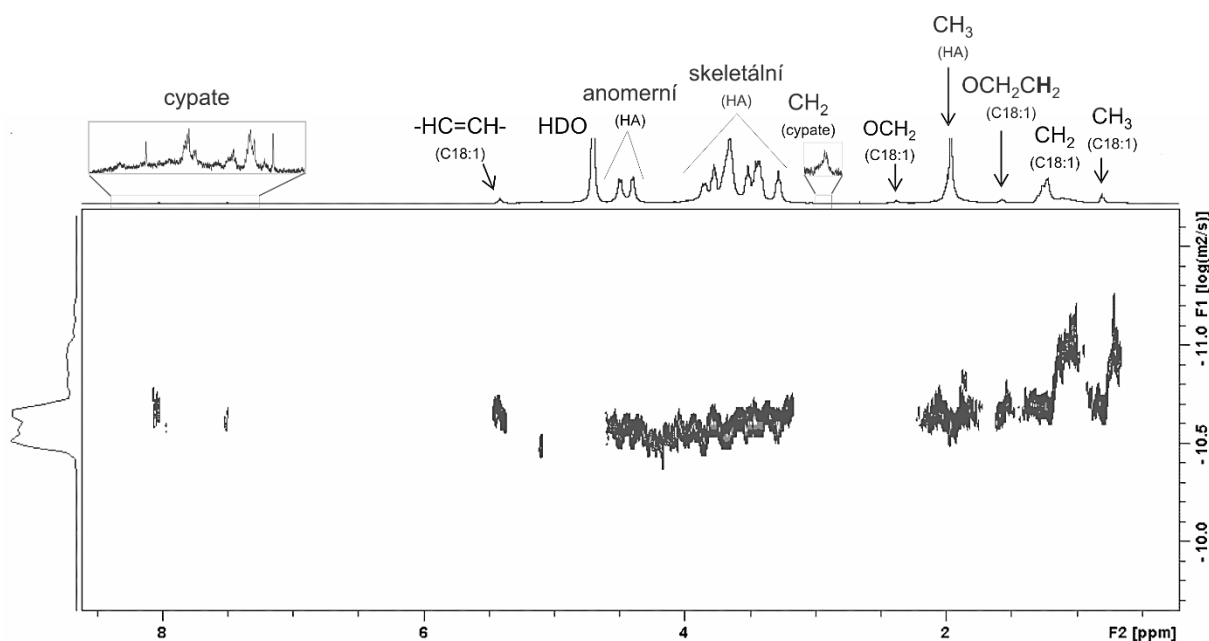
Vznik požadovaného derivátu byl potvrzen pomocí ^1H NMR spektra (Obrázek 35) a techniky DOSY (Obrázek 36). V ^1H NMR spektru (Obrázek 35) byly kromě signálů pro cypate nově pozorovány signály v oblasti $\delta = 5,5\text{--}5,3$ ppm ($\text{CH}=\text{CH}$); $2,4\text{--}2,3$; $1,5$ a $1,4\text{--}1,1$ ppm (CH_2) a $0,8$ ppm (CH_3), přiřazené uhlovodíkovému řetězci kyseliny olejové. Chemické posuny signálů v ^1H NMR spektru pro acylový řetězec zbytku kyseliny olejové v případě nově připraveného HA derivátu se shodovaly s chemickým posunem signálů v referenční literatuře.^{114,150} Jak již bylo zmíněno, nevýhodou přípravy esterové vazby za použití směsného anhydridu je, že kromě navázání požadovaného zbytku mastné kyseliny, v malé míře dochází k navázání benzoylu.¹⁶¹ V případě látky **HA-cypate-C18:1** lze velmi špatně identifikovat signály pocházející z benzoylu, a to z důvodu jejich důvodu překryvu signály cypate. Nelze tedy jednoznačně potvrdit navázání benzoylu, ani případně stanovit jeho stupeň substituce.



Obrázek 35: ^1H NMR spektrum **HA-cypate-C18:1** (D_2O).

Jako další charakterizace **HA-cypate-C18:1** je uvedeno DOSY (Obrázek 36), v němž byly pozorovány signály s přibližně stejným difúzním koeficientem v oblasti chemického posunu $8,5\text{--}1,6$ ppm. Překvapující může být však poloha

signálů příslušících řetězcům kyseliny olejové v oblasti chemického posunu 1,6–0,8 ppm, které se nachází v oblasti s mírně vyššími hodnotami difúzního koeficientu. Tento fenomén bývá přičítán agregaci řetězců kyseliny olejové ve vodném prostředí, což vede k jejich snížené mobilitě. Pokud by šlo o nízkomolekulární látku, jež nejsou vázány k řetězci HA, typické signály se většinou nachází v oblasti s mnohem nižšími hodnotami difúzního koeficientu, než má HA.¹⁶² U všech dalších derivátů HA modifikovaných řetězci kyseliny olejové byl v DOSY spektru pozorován stejný jev v oblasti chemického posunu 1,6–0,8 ppm.



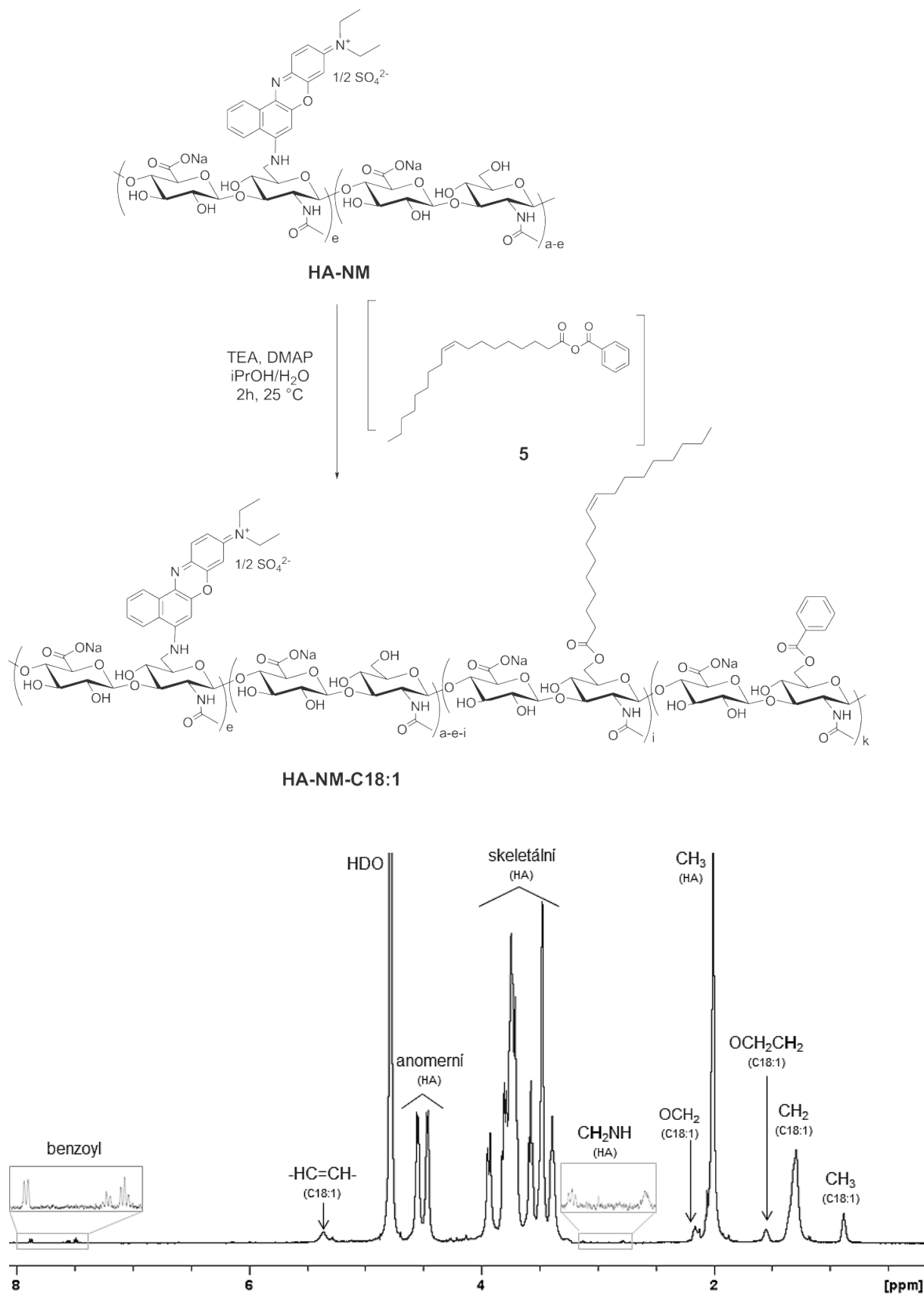
Obrázek 36: DOSY spektrum **HA-cypate-C18:1** (D₂O).

Po modifikaci HA-cypate řetězci kyseliny olejové bylo zjištěno, že nedošlo ke změně fluorescenčních vlastností a při excitaci zářením o vlnové délce 665 nm bylo naměřeno maximum emise při 693 nm. Pro tvorbu polymerních micel s inkorporovaným doxorubicinem nebo doxorubicinem a SPION byl vybrán jako vhodný derivát **HA-cypate-C18:1** se $SS_{\text{cypate}} = 0,7 \%$ a $SS_{\text{C18:1}} = 10 \%$. U tohoto derivátu **HA-cypate-C18:1** a rovněž u nosičových systémů z něj připravených byla sledována biodistribuce a *in vivo* protinádorový účinek

na modelových myších. Výsledky biologického testování jsou stručně komentovány v kapitole 14.

HA-NM-C18:1 byl připraven opět použitím benzoylchloridu za stejných reakčních podmínek jako **HA-cypate-C18:1** (Schéma 22). Vznik **HA-NM-C18:1** byl potvrzen pomocí NMR techniky, kdy v ^1H NMR spektru (Obrázek 37) byly, kromě signálů modifikovaného *N*-actetylglukosaminu, pozorovány taktéž signály přiřazené acylovému řetězci kyseliny olejové, stejně jako v případě **HA-cypate-C18:1** a referenční literatury.^{114,150} Za použití jednoho ekvivalentu kyseliny olejové ku jednomu ekvivalentu HA (vztaženo na disacharid) bylo dosaženo stupně substituce 10 %. Reakce s jiným poměrem ekvivalentů reaktantů nebyla provedena. V případě modifikace **HA-NM** směsným anhydridem **5** došlo taktéž k navázání benzoylu se $\text{SS} = 0,4 \%$. U připraveného derivátu **HA-NM-C18:1** (výchozí $M_{\text{wHA-OX}} = 16\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{SS}_{\text{NM}} = 0,9 \%$, $\text{SS}_{\text{C18:1}} = 10\%$) byla pomocí fluorescenčního a konfokálního mikroskopu následně testována jeho schopnost dermální penetrace. Z této látky byly taktéž připraveny polymerní micely s enkapsulovaným kurkuminem, u nichž byl zkoumán vstup a schopnost doručení modelového léčiva do vybraných buněk. Uvedené *in vitro* experimenty jsou komentovány v kapitole 15.

Schéma 22



Obrázek 37: ¹H NMR spektrum **HA-NM-C18:1** (NaOD).

12.4 Příprava série derivátů hyaluronanu modifikovaných poly(ethylenglykolem).

Fluorescenčně značené nosičové systémy na bázi hyaluronanu, popsané v současných odborných publikacích, většinou vykazují velmi efektivní *in vivo* akumulaci v nádorové tkáni. Během biodistribuce těchto nosičů však taktéž většinou nastává jejich nežádoucí nahromadění v játrech, což může například snižovat účinky cílené léčby nebo v některých případech vést až k intoxikaci jater.^{126,127,129}

Poly(ethylenglykol) (PEG, systematicky poly(ethylenoxid), poly(oxyethylen)), jako jeden z mnoha syntetických polymerů, je významným předmětem výzkumu v oblasti nosičových systémů. Uvádí se, že připojením PEG ke struktuře nosičového systému dochází ke snížené akumulaci nosičových systémů v játrech a naopak k jejich zvýšené akumulaci v nádoru.¹²⁸ Jedním z vysvětlení je snížená opsonizace nosiče, čímž se tento systém stává méně rozeznatelným pro retikuloendoteliální systém a je znesnadněno jeho odbourání v játrech.^{163,164,165,166} Jiným pravděpodobnějším vysvětlením může být fakt, že PEG ve struktuře polymerních micel napomáhá jejich stabilitě v krevním řečišti, zejména v přítomnosti albuminu, a to z důvodu zvýšeného sterického bránění celého supramolekulárního útvaru.²⁴

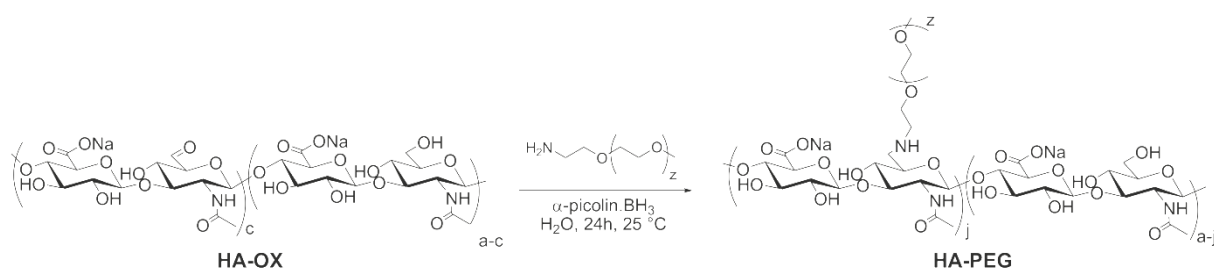
Nežádoucí akumulace v játrech při biologickém testování *in vivo* (viz kapitola 9) byla taktéž pozorována u nosičových systémů na bázi nově připraveného derivátu **HA-cypate-C18:1**. Dalším cílem doktorské práce tedy logicky bylo nalezení způsobu přípravy NIR fluorescenčně značeného hydrofobizovaného hyaluronanu, konkrétně **HA-cypate-C18:1**, který má navíc ve své struktuře navázaný PEG.

12.4.1 Syntéza hyaluronanu s vázaným poly(ethylenglykolem)

Pro přípravu hyaluronanu s vázaným poly(ethylenglykolem) (**HA-PEG**) byl vybrán jako modifikační činidlo methoxy-poly(ethylenglykol)amin ($M_w = 1\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Výchozí látkou byl hyaluronan oxidovaný na C6 glukosaminové jednotce HA, který byl připraven dvěma způsoby. Tím prvním je **HA-OX** získaný oxidací za využití systému AcNH-TEMPO/NaClO. Tato metoda, jež je komentována v kapitole 8.2.2, však neumožňuje získat více jak 10 % oxidovaných monomerních jednotek HA. Pro získání stejného typu oxidovaného hyaluronanu, avšak s vyšším stupněm oxidace, lze použít Dessovo-Martinovo činidlo.¹¹⁷ Takto připravený **HA-OX** se stupněm oxidace 43 % byl pro další reakci získána z laboratorních zásob.

Syntéza titulní látky byla, stejně jako v případě hyaluronanu značeného nilskou modří, provedena reductivní aminací oxidované formy HA (Schéma 23). Jako účinné redukční činidlo byl v tomto případě zvolen komplex boranu s 2-methylpyridinem. Vzhledem k zamýšleným aplikacím v biologických systémech je výhodou použitého redukčního činidla jeho nižší toxicita ve srovnání například s NaBH_3CN .

Schéma 23



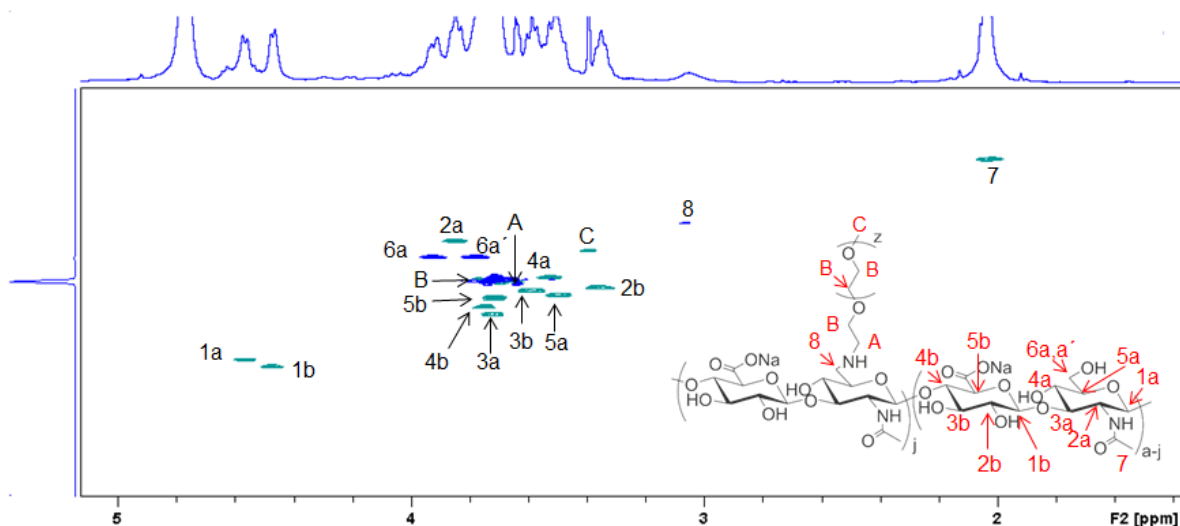
Pro přípravu **HA-PEG** tímto způsobem bylo vyzkoušeno použití 0,1–0,15 ekvivalentu PEG a redukčního činidla ku jednomu ekvivalentu oxidovaného hyaluronanu ($22\,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; SO = 7,5 %) za vzniku **HA-PEG** se $SS_{\text{PEG}} = 6,0$ – $7,0$. Výsledná hodnota SS poté závisela na množství použitých ekvivalentů PEG a redukčního činidla, přičemž se zvyšujícím množstvím reaktantů bylo dosaženo

vyšší míry modifikace HA (viz Tabulka 11). V případě výchozího **HA-OX** se $SO = 43\%$ a při reakci s 0,45 ekv. PEG a redukčního činidla byl získán produkt se $SS_{PEG} = 20\%$. Stupeň substituce HA řetězci PEG byl stanoven porovnáním normalizovaných integrálních intenzit signálů anomerních vodíku při $\delta = 4,6\text{--}4,3$ ppm a signálu při $\delta = 3,1$ a 2,8 ppm v ^1H NMR spektru (rozpouštědlo 0,05% NaOD).

Tabulka 11: Příprava **HA-PEG** s různým stupněm substituce PEG.

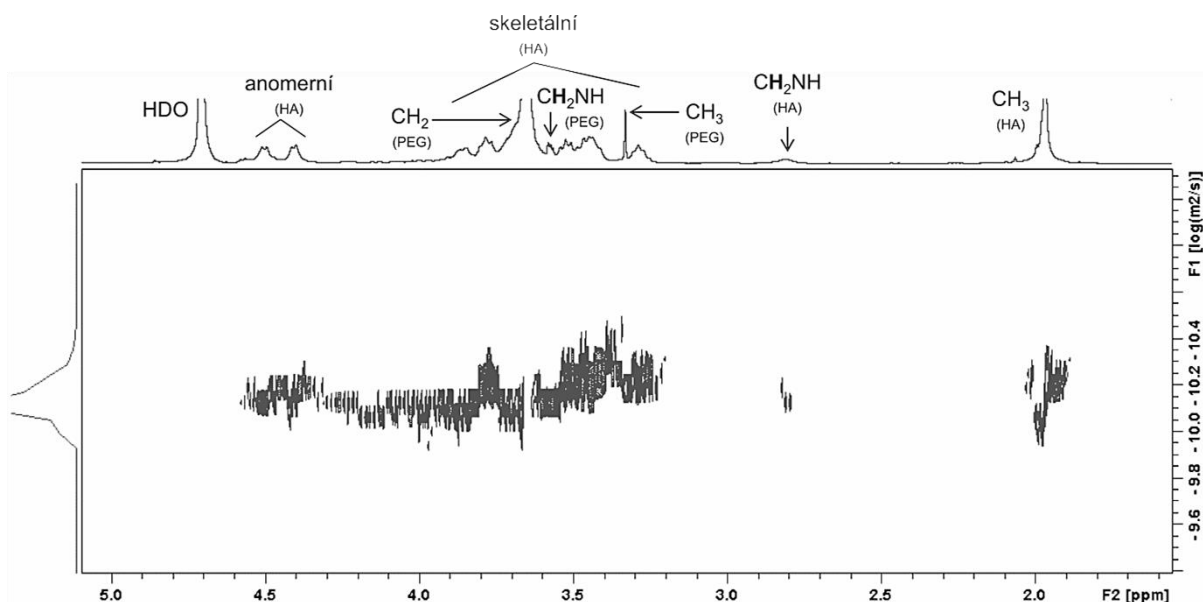
HA-OX		PEG	α-pikolin.BH₃	HA-PEG
M_w [g·mol⁻¹]	SO [%]	ekv.	ekv.	SS [%]
22 500	7,5	0,1	0,1	6,5
22 500	7,5	0,1	0,1	6
22 500	7,5	0,15	0,15	7
19 000	43	0,45	0,45	20

Vznik požadovaného derivátu **HA-PEG** byl potvrzen pomocí NMR spektroskopie. Ve fázově editovaném HSQC spektru (Obrázek 38) byl pozorován signál při $\delta = 2,8$ ppm náležící dvěma vodíkovým atomům na C6 modifikovaného *N*-acetylglukosaminu. Je nutno podotknout, že signál při $\delta = 2,8$ ppm lze pozorovat v ^1H NMR spektru v D_2O pouze v případě vyšších substitucí hyaluronanu požadovanou látkou. V případech nižšího SS (pod 10 %) je nutno derivát HA analyzovat v 0,05 % NaOD. Ve spektru se kromě typických signálů pro hyaluronan vyskytují dále signály pro PEG, označeny velkými písmeny A–C, kdy A odpovídá NHCH_2 ($\delta = 3,6$ ppm), B vodíkovým protonům sousedícím s kyslíkem CH_2O ($\delta = 3,7\text{--}3,6$ ppm) a konečně signál C přísluší koncovému methylu PEG ($\delta = 3,7$). Signály PEG byly přiřazeny dle ^1H NMR spektra výchozího PEG v D_2O .



Obrázek 38: Typické fázově editované HSQC spektrum látky **HA-PEG** (D_2O ; SS = 20%).

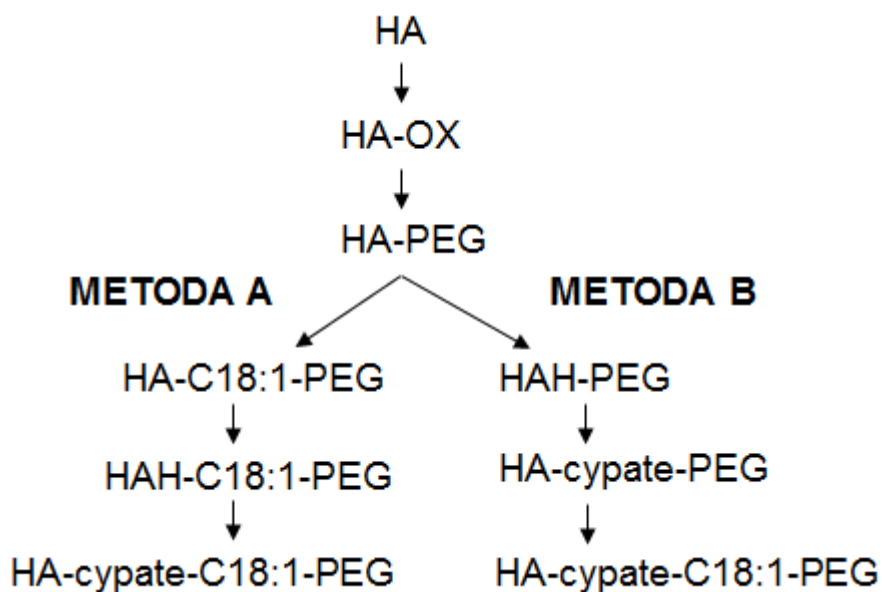
Dalším důkazem vzniku požadovaného **HA-PEG** bylo DOSY spektrum (Obrázek 39), v němž byly pozorovány signály pro HA i PEG se stejným difúzním koeficientem. Z polohy všech signálů v jedné ose lze předpokládat, že došlo k pevnému navázání PEG řetězců na HA. I když se jedná v obou případech o polymery, výrazně se liší svou molekulovou hmotností – HA 22 500, resp. 19 000 $g \cdot mol^{-1}$, zatímco PEG 1 000 $g \cdot mol^{-1}$. Pokud by se tedy jednalo o pouhou směs těchto dvou polymerů, v DOSY spektru by se daly předpokládat dvě sady signálů s různým difúzním koeficientem.



Obrázek 39: DOSY spektrum derivátu **HA-PEG** (D_2O ; SS = 20 %).

Pro přípravu zamýšleného finálního produktu **HA-cypate-C18:1-PEG** byly dále navrženy dvě cesty A a B (Schéma 24), kdy v obou případech byl výchozí látkou **HA-PEG** (SS = 6,5 %, $22\,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Schéma 24



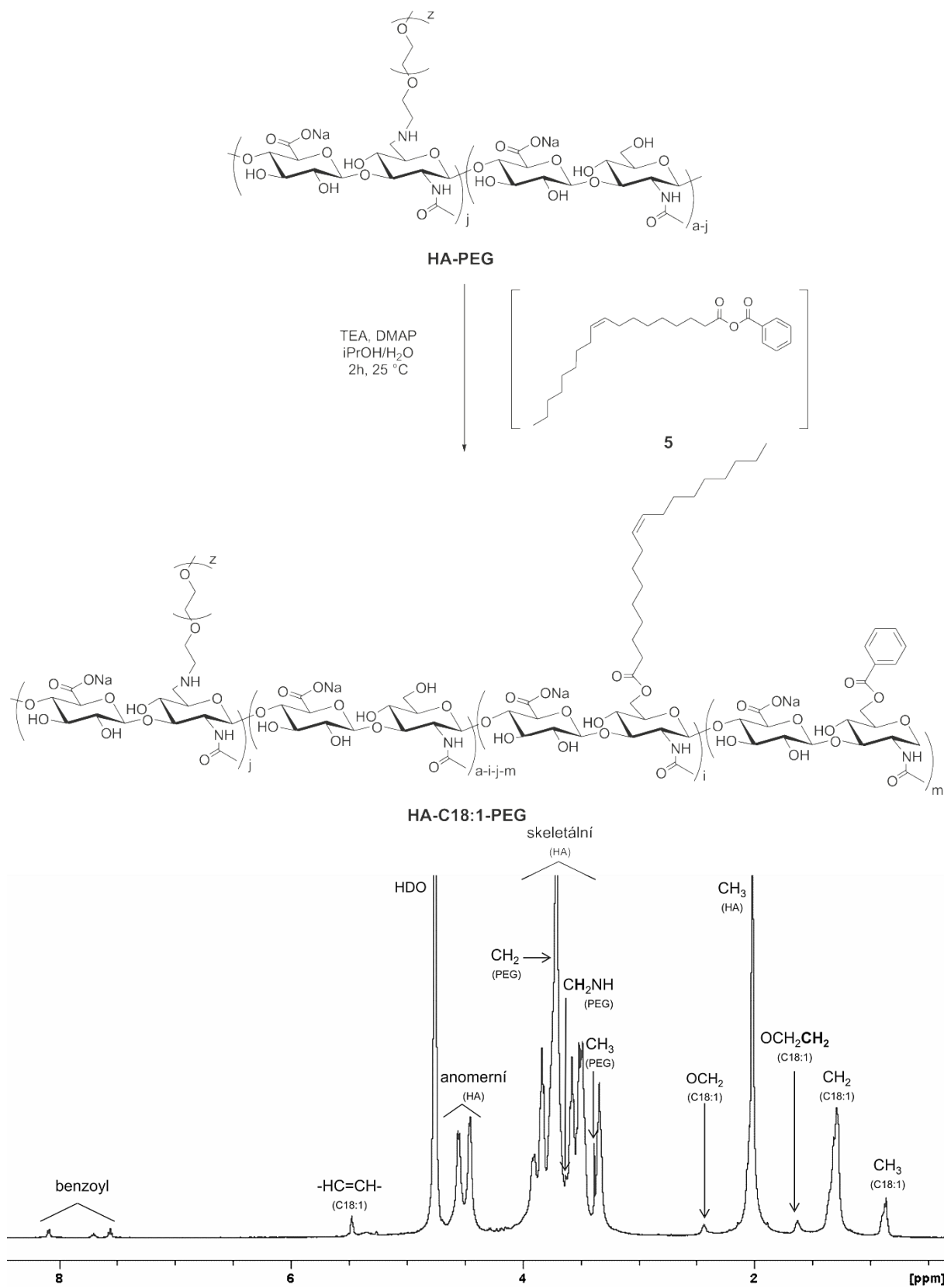
Metoda A

Jako „Metoda A“ je označen postup, kdy byl **HA-PEG** nejprve hydrofobizován řetězcí kyseliny olejové (**HA-C18:1-PEG**). Hydrofobizovaný derivát byl dále pomocí katexy převeden na formu kyseliny hyaluronové a v posledním kroku bylo provedeno fluorescenční značení látkou cypate (**HA-cypate-C18:1-PEG**).

12.5 Hydrofobizace hyaluronanu s vázaným poly(ethylen glykolem) řetězcí kyseliny olejové

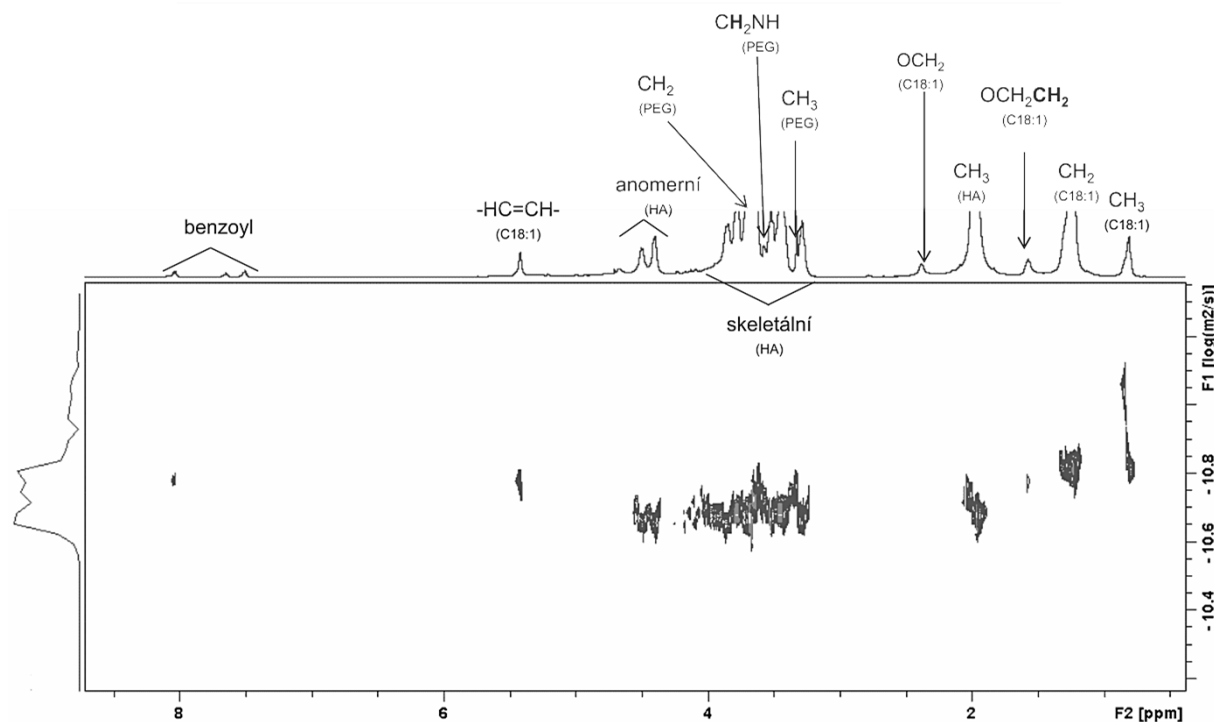
Stejně jako v případě fluorescenčně značeného hyaluronanu **HA-cypate** nebo **HA-NM**, byla pro hydrofobizaci **HA-PEG** (výchozí SS = 6,5 %) kyselinou olejovou využita metoda směsného anhydridu (**5**), připraveného *in situ* reakcí mezi kyselinou olejovou a benzoylchloridem (viz kapitola 8.4.2) v přítomnosti TEA a katalyzátoru DMAP (Schéma 25). Ve srovnání s modifikací **HA-cypate** bylo reakcí s jedním ekvivalentem C18:1 ku jednomu ekvivalentu HA a za stejných podmínek u **HA-PEG** dosaženo mírně nižšího stupně substituce, a to 9 % C18:1, oproti 10–13 % u **HA-cypate-C18:1** (Tabulka 5). Tento jev může být způsoben statisticky nižší dostupností OH skupin polymerního řetězce HA, z nichž některé jsou již modifikované PEG. Výsledkem syntézy bylo taktéž navázání benzoylu na řetězec HA se SS = 0,5 %.

Schéma 25



Obrázek 40: ¹H NMR látky **HA-PEG-C18:1** (D₂O).

V DOSY spektru **HA-C18:1-PEG** (Obrázek 41) byly pozorovány signály pocházející z HA, PEG, C18:1 i benzoylu. Stejně jako v případě **HA-cypate-C18:1** byla poloha signálů příslušících řetězcům kyseliny olejové v oblasti chemického posunu 1,6–0,8 ppm v oblasti s mírně vyššími hodnotami difúzního koeficientu, což je opět přičítán agregaci řetězců kyseliny olejové.



Obrázek 41: DOSY látky **HA-C18:1-PEG** (D_2O).

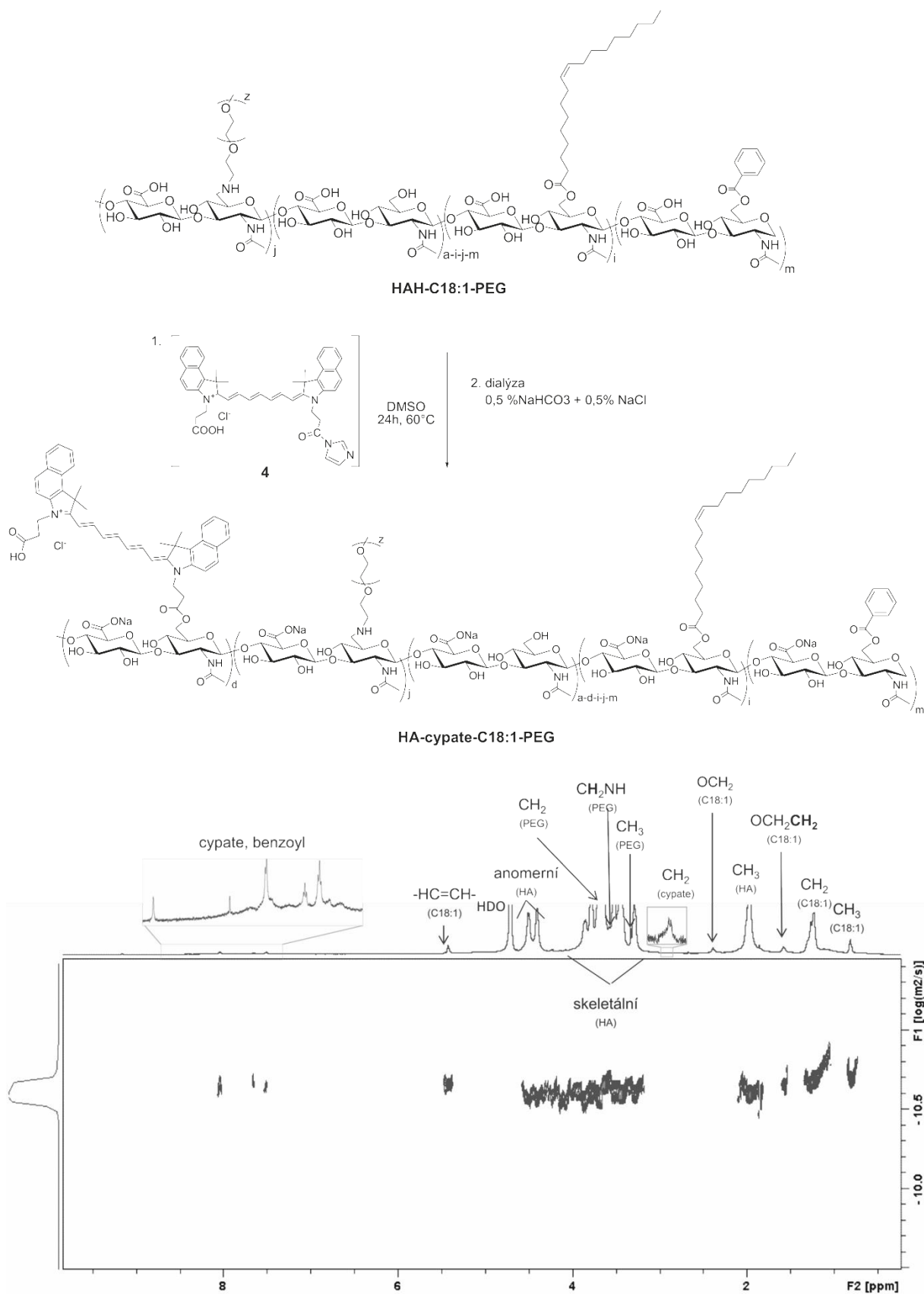
12.6 Značení hydrofobizovaného hyaluronanu s vázaným poly(ethylen glykolem) látkou cypate.

Fluorescenční látka cypate byla navázána k polysacharidovému řetězci **HA-C18:1-PEG** opět reakcí za využití CDI (viz kapitola 8.3.1). Před samotným navázáním cypate na strukturu **HA-C18:1-PEG** bylo nutné tento výchozí derivát hyaluronanu převést pomocí katexu na derivát kyseliny hyaluronové **HAH-C18:1-PEG**, jelikož jen tato forma je rozpustná v reakčním prostředí, tedy v DMSO. Produktem reakce **HA-C18:1-PEG** s aktivovanou látkou cypate (**4**) (Schéma 26) byl fluorescenčně značený derivát hyaluronanu **HA-cypate-C18:1-PEG** se stupněm substituce cypate $SS = 0,5 \%$ a maximem emise záření

při $\lambda = 695$ nm. Je nutno podotknout, že hydrofobizace HA řetězci kyseliny olejové klesla ze SS = 9 % na SS = 6 %, což může být způsobeno citlivostí esterické vazby na mírně bazické prostředí reakce, způsobující zánik této vazby a odštěpení vázaných řetězců C18:1.

Jako důkaz vzniku požadovaného derivátu **HA-cypate-C18:1-PEG** mohou sloužit ^1H NMR spektra a DOSY experimenty. V protonovém NMR spektru byly pozorovány charakteristické píky pro cypate, respektive také benzoyl, v aromatické oblasti $\delta = 8,9\text{--}7,4$ ppm. V typickém DOSY spektru, uvedeném na Obrázek 42, se signály pro cypate a HA nacházejí v oblasti stejného difúzního koeficientu, což vypovídá o navázání fluorescenční látky k **HA-C18:1-PEG**. Výjimkou jsou signály pocházející ze zbytků mastných kyselin při $\delta = 1,6\text{--}0,8$ ppm, které se stejně jako v případě **HA-C18:1-PEG** nacházejí v oblasti s mírně vyššími hodnotami difúzního koeficientu. Poloha těchto signálů naznačuje, že nejspíše opět dochází k agregaci řetězců a tvorbě polymerních micel.

Schéma 26



Obrázek 42: DOSY derivátu **HA-cypate-C18:1-PEG** (D₂O).

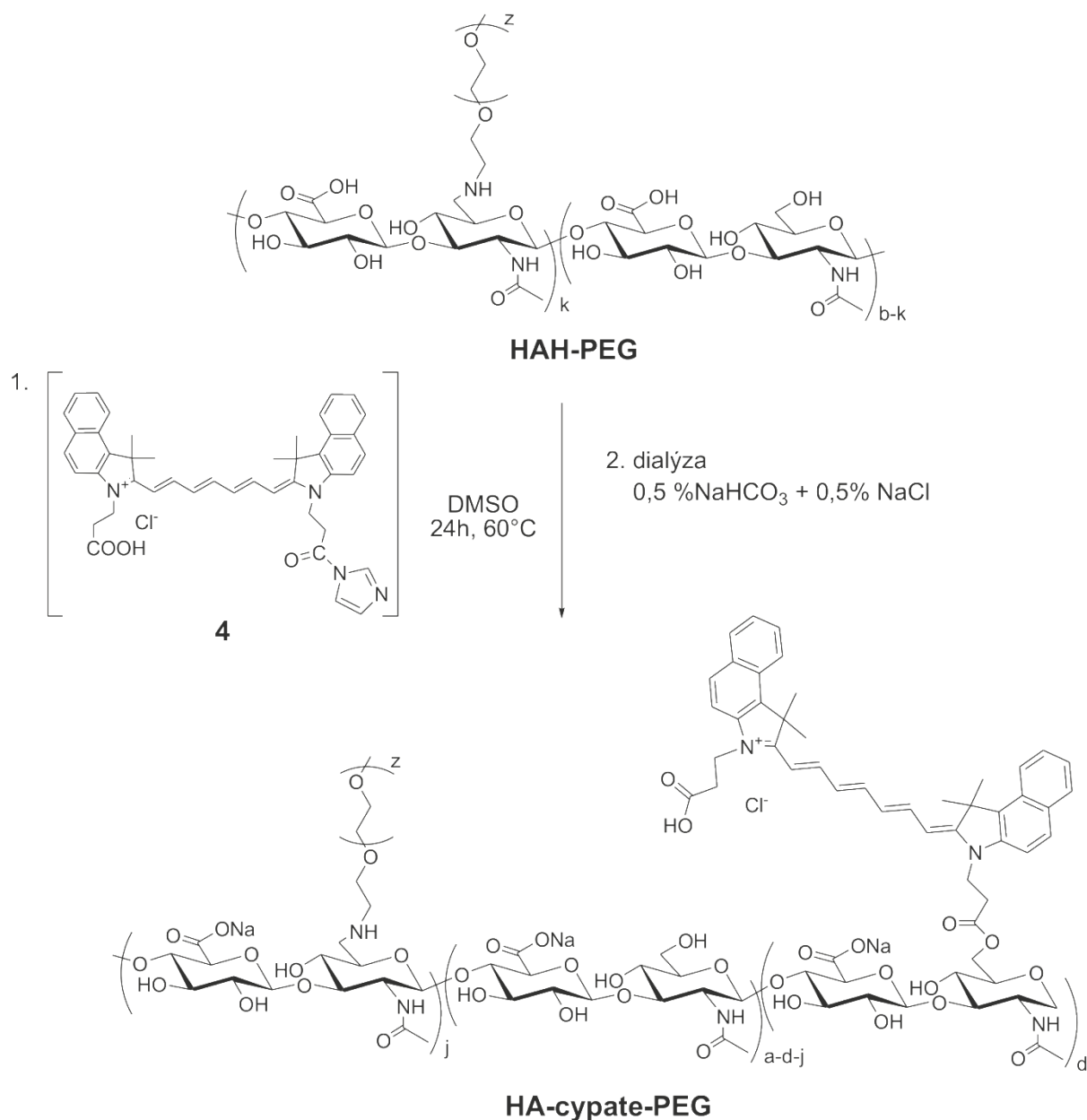
Metoda B

Pro nalezení potenciálně nejvýhodnější možnosti přípravy požadované látky byla vyzkoušena taktéž alternativní cesta, kdy byly kroky vedoucí k finálnímu derivátu provedeny v opačném pořadí. Prvním krokem navazujícím na modifikaci HA pomocí PEG bylo fluorescenční značení **HA-PEG** chromoforem cypate a následně byla provedena hydrofobizace řetězci kyseliny olejové.

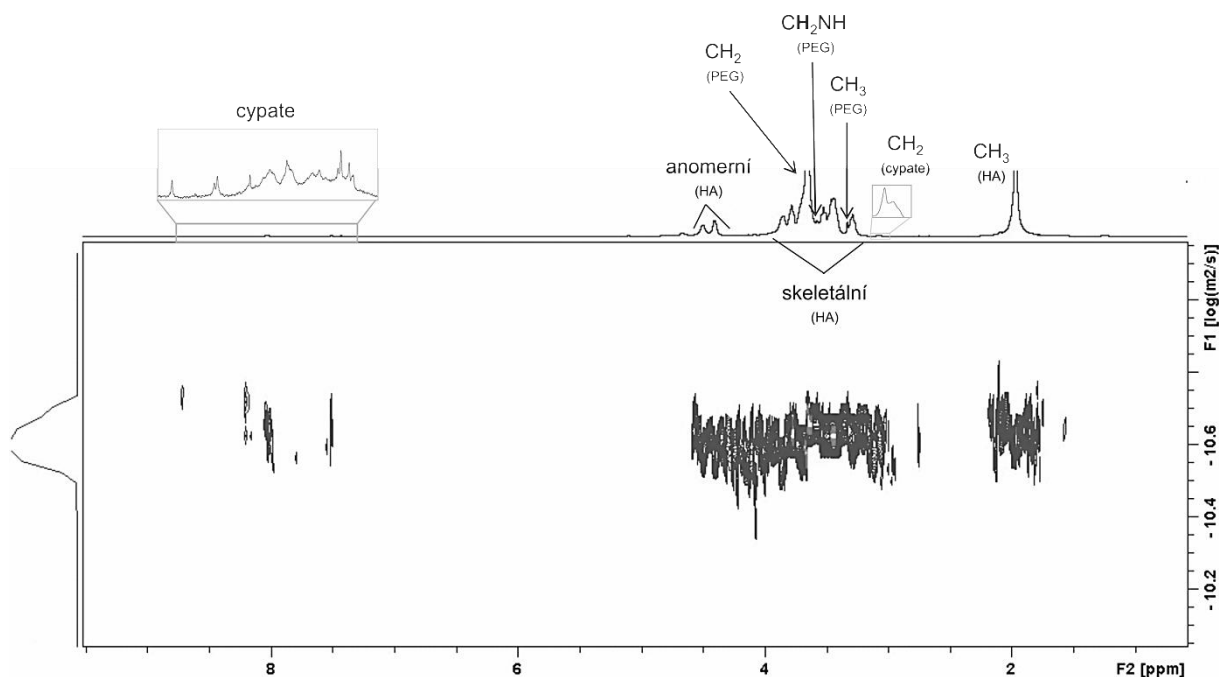
12.7 Fluorescenční značení hyaluronanu s vázaným poly(ethylenglykolem) látkou cypate

Stejně jako v předchozích syntézách, kdy bylo cílem navázání cypate ke skeletu hyaluronanu reakcí s CDI, bylo i v tomto případě nutno provést konverzi derivátu hyaluronanu **HA-PEG** na derivát kyseliny hyaluronové **HAH-PEG** z důvodu dosažení potřebné rozpustnosti v DMSO. Reakce, uvedená na Schématu 27, probíhala obdobným způsobem jako modifikace samotné HAH látkou cypate. I v tomto případě se podařilo připravit **HA-PEG** modifikovaný látkou cypate se SS = 0,6 %. Z výsledku reakce plyne, že PEG vázaný na řetězci HA významně neovlivňuje průběh reakce s aktivovaným cypate **4** ani výslednou emisi záření, jehož maximum bylo zjištěno při $\lambda = 692$ nm.

Schéma 27



Analýzou produktu pomocí NMR spektroskopie bylo získáno ^1H a DOSY spektrum, vypovídající o vzniku **HA-cypate-PEG**. Při srovnání s výchozím **HA-PEG** byly v ^1H NMR spektru kromě signálů pro HA i PEG nově pozorovány píky pro cypate v aromatické oblasti $\delta = 8,4\text{--}7,7$ ppm a při 3,0 ppm pro CH_2 . Z polohy signálů protonů skeletu cypate v DOSY spektru (Obrázek 43), které vykazují stejný difúzní koeficient jako signály polymeru HA i PEG, lze usoudit na vznik požadovaného derivátu **HA-cypate-PEG**.



Obrázek 43: DOSY spektrum **HA-PEG-Cypate** (D₂O).

12.8 Hydrofobizace hyaluronanu s vázaným cypate a PEG řetězci kyseliny olejové

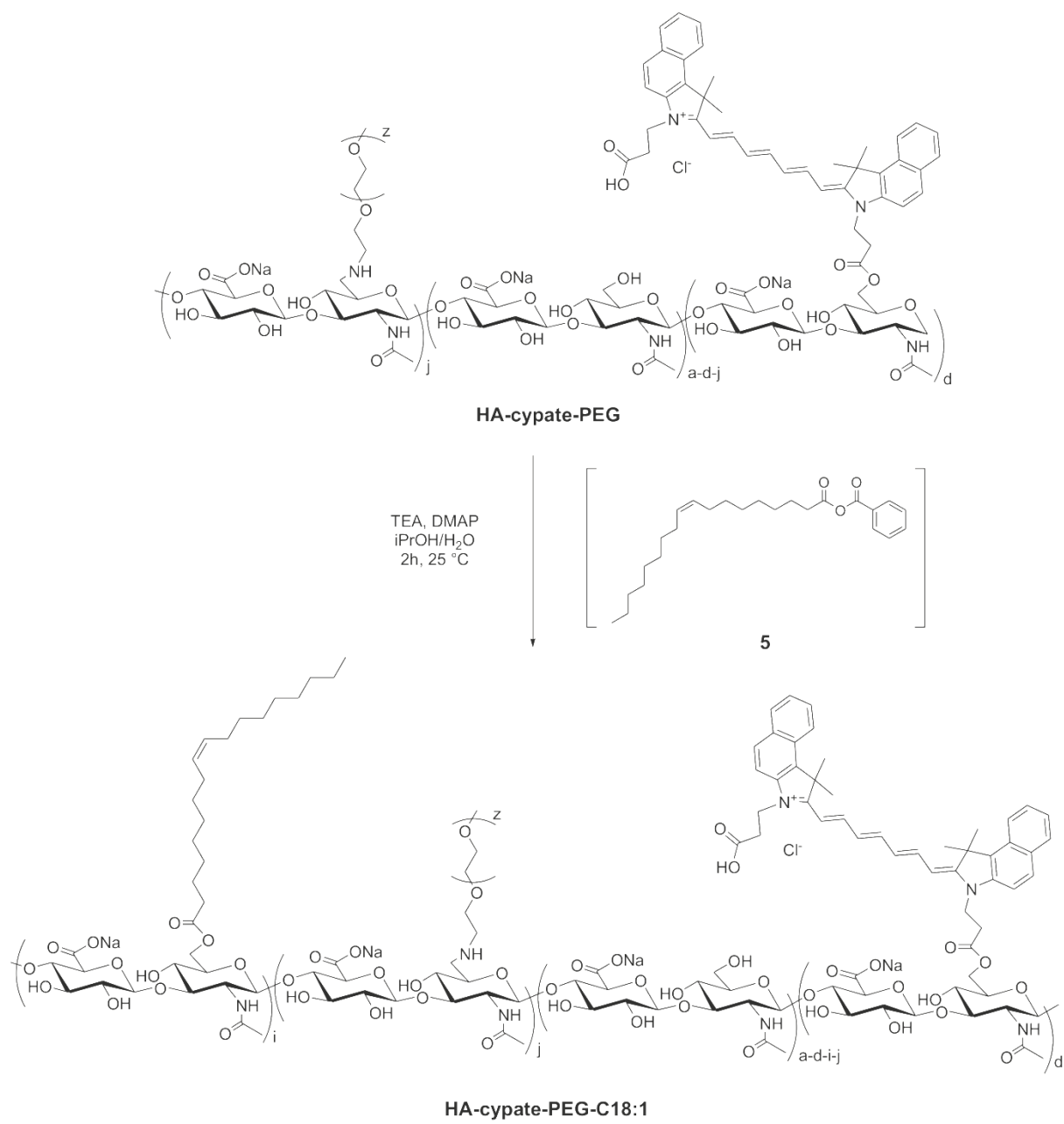
Posledním krokem „cesty B“ byla hydrofobizace **HA-cypate-PEG** kyselinou olejovou (Schéma 28). Tato reakce byla opět provedena za použití *in situ* připraveného směsného anhydridu (**5**) kyseliny olejové a benzoylchloridu (viz kapitola 0). Vznik požadované látky **HA-cypate-C18:1-PEG** byl potvrzen využitím NMR spektroskopie, DOSY spektrum je uvedeno jako Příloha 4. Při použití jednoho ekvivalentu kyseliny olejové v reakční směsi a za stejných podmínek jako v případě syntézy **HA-cypate-C18:1** nebo **HA-C18:1-PEG** bylo dosaženo nižšího stupně substituce acylovými řetězci C18:1, a to pouhých 6 % ve srovnání s 10 – 13 % pro **HA-cypate-C18:1** a 9 % u **HA-C18:1-PEG**. Obecně snižující se množství navázaných řetězců kyseliny olejové je přibližně úměrné narůstající obsazenosti hydroxylových skupin HA, respektive jejich modifikací cypate a PEG. Dále integrací signálů v ¹H NMR spektru pocházejících z cypate a PEG bylo zjištěno, že množství těchto látek navázaných na HA zůstalo po reakci přibližně stejné. Předpokládanou

benzoylaci nebylo možné potvrdit z důvodu překryvu signálů pro cypate a benzoylu v aromatické oblasti ^1H NMR spektra. Stejně jako u všech ostatních derivátů HA s vázanou látkou cypate, i v případě **HA-cypate-C18:1-PEG** bylo naměřeno maximum emise záření při $\lambda = 695$ nm, což je výhodné pro potenciální aplikaci neinvazivního zobrazení *in vivo*.

Závěrem této kapitoly lze konstatovat, že požadovaný hyaluronan značený látkou cypate, hydrofobizovaný řetězci kyseliny olejové a s vázanými PEG lze připravit oběma výše diskutovanými cestami. Jinými slovy, lze zaměnit pořadí kroků, ve kterých je na strukturu **HA-PEG** postupně zavedena fluorescenční značka cypate a lipofilní zbytky kyseliny olejové.

V rámci předložené disertační práce již nedošlo k hlubšímu zkoumání fyzikálně-chemických vlastností těchto připravených derivátů. Prozatím nebylo provedeno ani biologické testování těchto látek. Zajímavé by bezesporu bylo porovnání biodistribuce finálních látek s **HA-cypate-C18:1** a popsání vlivu a významu modifikace fluorescenčně značeného hydrofobizovaného HA pomocí postranních PEG řetězců. *In vivo* studie na modelových myších by dále mohly přinést poznatky o schopnostech PEG redukovat nežádoucí akumulaci nosičových systémů na bázi hyaluronanu v játrech.

Schéma 28



13. PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE SUPERPARAMAGNETICKÝCH NANOČÁSTIC OXIDŮ ŽELEZA

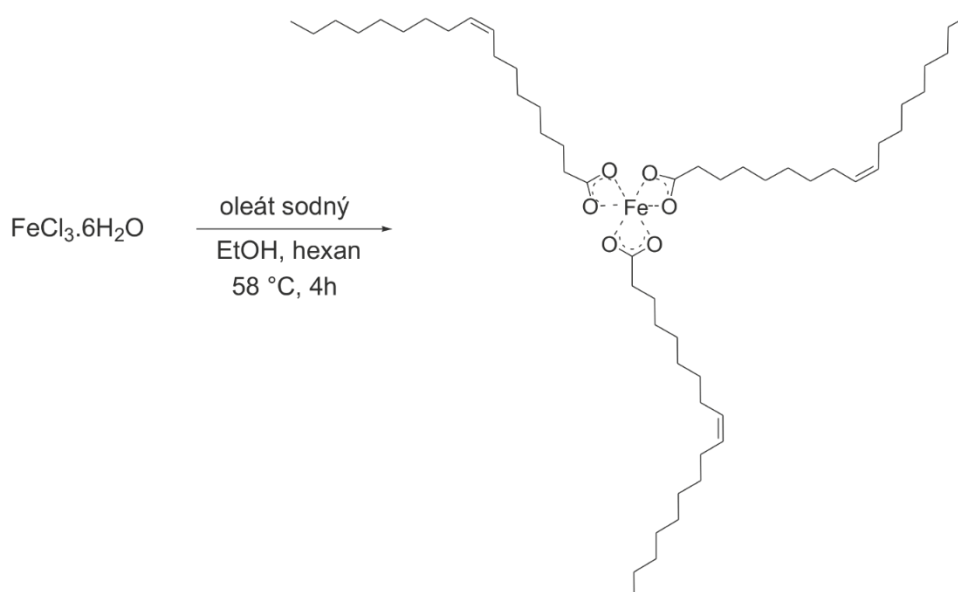
Příprava a aplikace superparamagnetických nanočástic oxidů železa (SPION) se staly v posledních letech předmětem výzkumu s interdisciplinárním přesahem, přičemž SPION našly své uplatnění jako kontrastní látky pro MRI, terapeutické látky nebo nosiče léčiv. Pro medicínské aplikace bývá často přistupováno k povrchové modifikaci SPION různými organickými látkami a polymery za účelem zvýšení biokompatibility nebo koloidní stability SPION. Předpokladem aplikace těchto nanočástic je jejich uniformní velikost, tvar, termální a chemická stabilita (kapitola 3.4.2).

Část této disertační práce byla věnována přípravě SPION na obalených kyselinou olejovou. Cílem byl získání terapeutické látky, již je možno inkorporovat do PM na bázi hydrofobizovaného hyaluronanu s vázaným cypate. Jednou z potenciálních výhod takových micel by mohla být taktéž možnost duálního zobrazování teranostických nosičových systémů pomocí fluorescence a MRI.

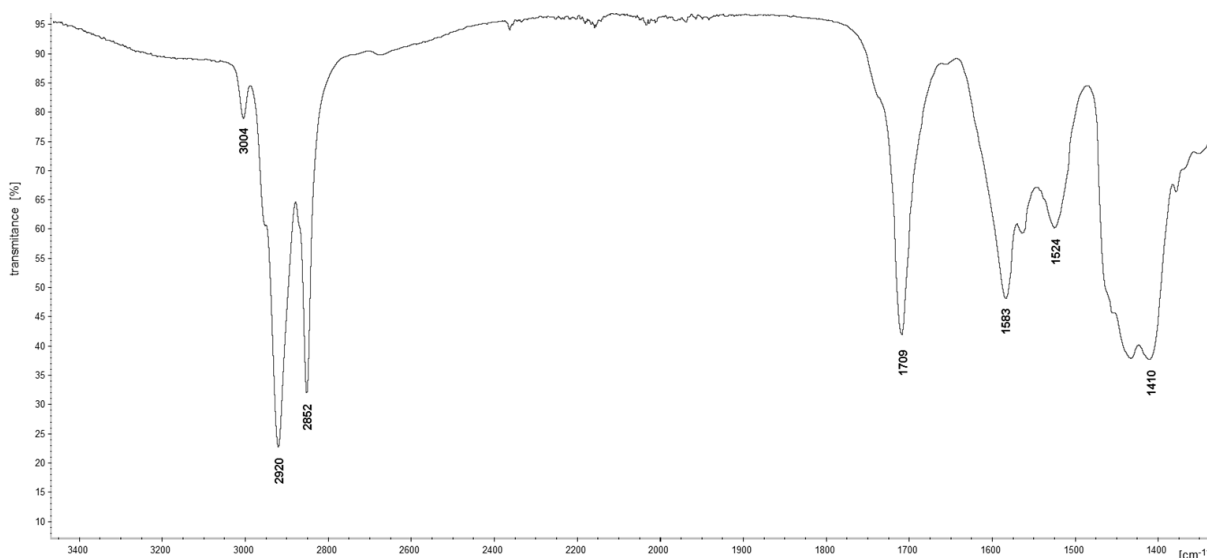
13.1 Syntéza oleátu železitého

Pro přípravu SPION na obalených kyselinou olejovou se jako vhodný prekurzor často využívá oleát železitý.¹⁶⁷ Z důvodu toho, že se jedná o komerčně nedostupnou látku, bylo nejprve nutno oleát železitý připravit. K tomu byla využita relativně jednoduchá reakce $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ s oleátem sodným provedená dle dříve popsaného literárního postupu (Schéma 29).¹⁶⁸

Schéma 29

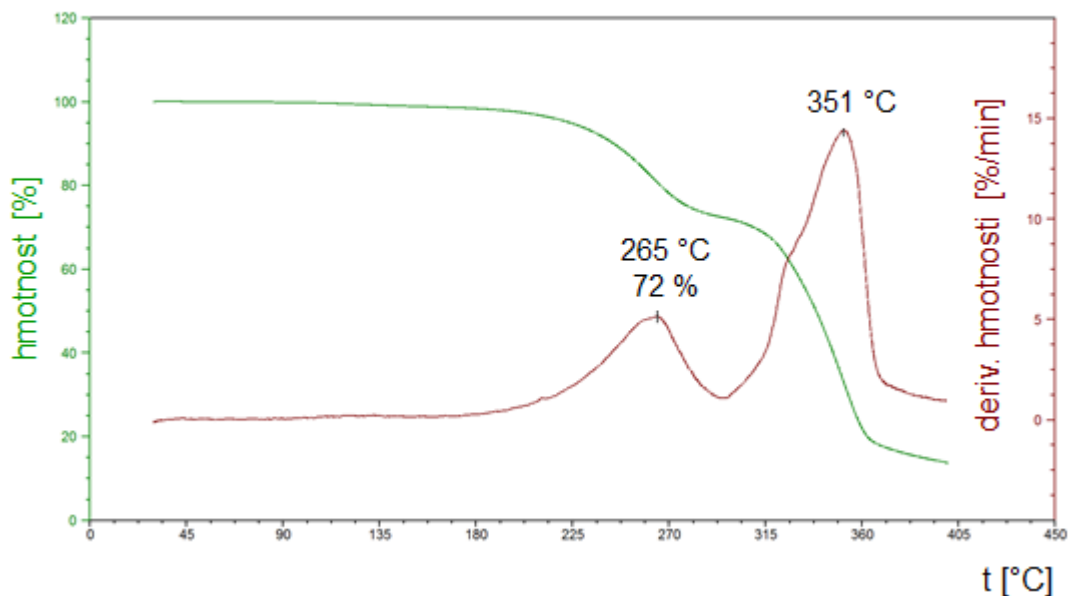


Na Obrázku 44 je uvedeno typické FTIR spektrum oleátu železitého. Široké absorpční pásy s nízkou intenzitou v oblasti $3300\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ náleží $\nu(\text{OH})$. Další charakteristické absorpční pásy (zleva) byly přiřazeny 3004 cm^{-1} $\nu(=\text{CH})$, dva ostré intenzivní pásy 2920 cm^{-1} $\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$ a 2852 cm^{-1} $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$. Mezi poslední tři významné signály oleátu železitého patří pásy s maximy při 1583 a 1524 cm^{-1} $\nu_{\text{asym}}(\text{COO})$ a jako poslední 1410 cm^{-1} $\nu_{\text{asym}}(\text{COO})$. Ostrý absorpční pás s maximem při 1709 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})$ značí přítomnost volné kyseliny olejové.^{167,169}



Obrázek 44: Typické FTIR spektrum oleátu železitého.

Kvantitativní analýza připravené látky byla provedena pomocí termogravimetrie (TG). V záznamu teplotního rozkladu (Obrázek 45) byla pozorovány dvě hlavní maxima. Vrchol prvního maxima při 264 °C s procentuální ztrátou hmotnosti 28 % je typický pro rozklad volné, či velmi slabě vázané kyseliny olejové k iontům železa. Charakteristické teploty rozkladu volné kyseliny olejové se pohybují mezi 200 a 300 °C. Touto analýzou byla potvrzena přítomnost volné kyseliny v připraveném oleátu železitém předpokládaná již na základě FTIR měření. Druhá oblast křivky v rozmezí 300–400 °C s maximem při 351 °C pravděpodobně indikuje rozklad oleátu železitého.¹⁶⁷ Na základě FTIR a TG analýzy bylo potvrzeno, že se jedná o požadovanou směs dvou látek, a to volné kyseliny olejové a oleátu železitého, jež se běžně využívá pro přípravu SPION obalených kyselinou olejovou.



Obrázek 45: TG analýza oleátu železitého.

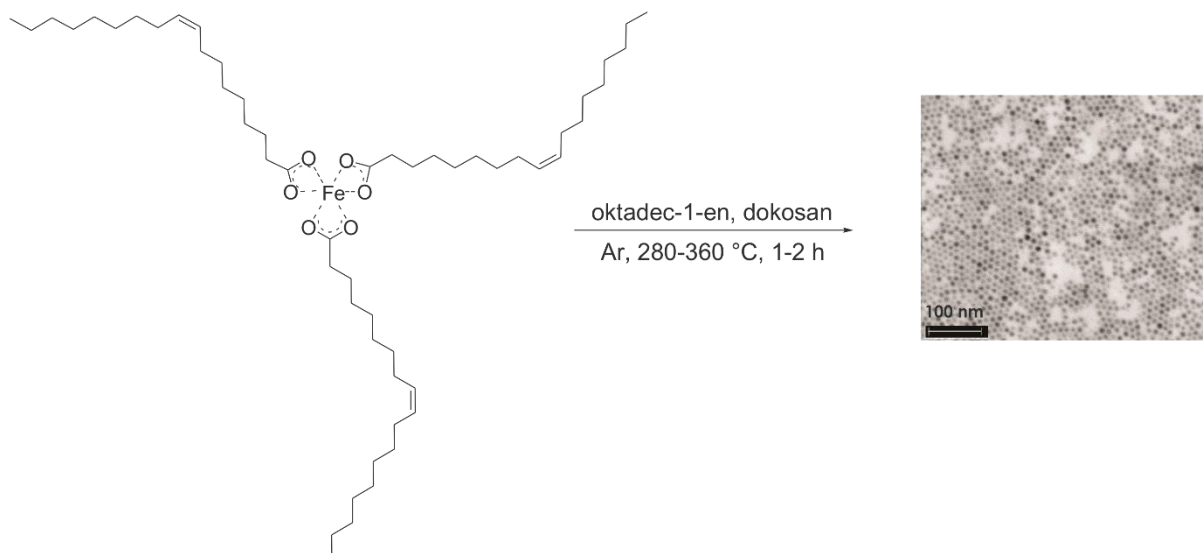
13.2 Syntéza nanočástic na povrchu modifikovaných kyselinou olejovou

Nanočástice oxidů železa mohou být syntetizovány mnoha způsoby – například termální rozklad, koprecipitace, hydrotermální syntéza a další. V tomto případě byl pro přípravu série SPION zvolen velmi často využívaný způsob termálního rozkladu prekurzoru oleátu železitého. V literatuře bývá termální dekompozice prekurzoru popisována jako velmi efektivní příprava SPION s možností kontroly tvaru a disperzity nanočástic během syntézy.^{72,170}

Několik šarží SPION o různé velikosti částic bylo připraveno mírně modifikovanou metodou¹⁷¹ za podmínek uvedených na Schématu 30 a v experimentální části v Tabulce 7. Byly provedeny pokusy o přípravu monodisperzních SPION v rozmezí velikostí částic 5–20 nm tím, že byly měněny parametry reakce, jako je rychlost ohřevu, doba reakce a teplota, dále použité rozpouštědlo, přičemž množství a poměr reaktantů byly vždy stejné. Během syntézy SPION byla reakční směs ve většině případů navíc probublávána argonem. Předpokladem bylo, že bublinky plynu reakční směs ochladí, a proto

bude docházet k tvorbě většího počtu krystalizačních jader na úkor zvětšování již existujících. Takto by mělo být dosaženo nízké polydisperzity produktu.¹⁷¹

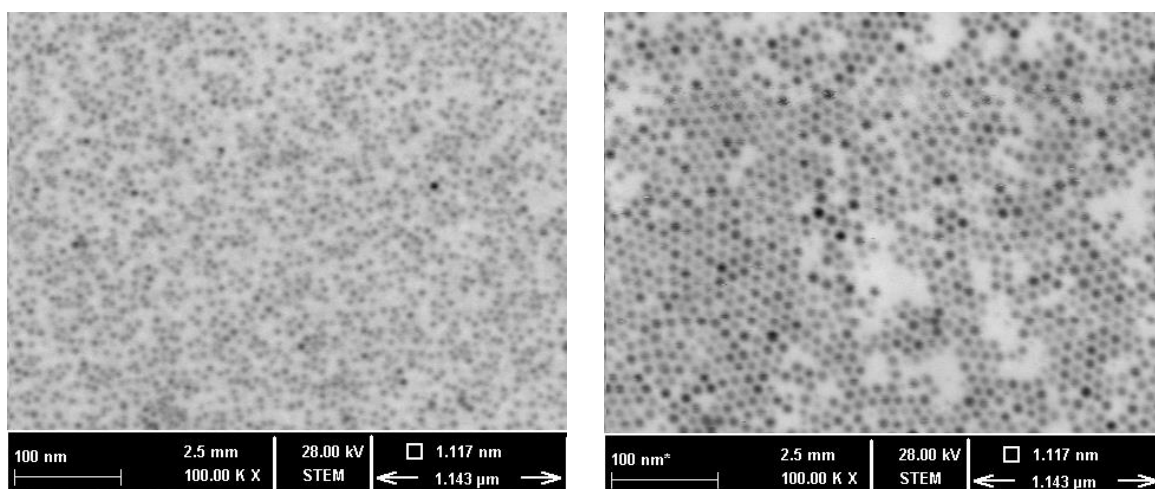
Schéma 30



Zvolený postup syntéz vedl k zisku pouze čtyř šarží SPION o velikosti 5 nebo 12 nm s polydisperzitou do 10 % (Obrázek 46). Nejprve se podařilo připravit, za podmínek uvedených v Tabulce 12, tři šarže SPION o průměrné velikosti 5 nm. Zvýšením teploty z 280 °C na 320 °C, snížením rychlosti ohřevu z 8 na 2 °C·min⁻¹ a prodloužením doby reakce na 2 h, vůči syntéze 5 nm SPION, byly připraveny SPION o průměrné velikosti 12 nm. Další úpravy podmínek reakce (Tabulka 7 v experimentální části), a to zejména zvýšení teploty reakce nebo změna rychlosti ohřevu reakční směsi, sice vedly k tvorbě požadovaných nanočástic, avšak nevýhodou byla jejich vysoká polydisperzita nad 10 %, což bylo nevyhovující požadavkům ze strany firmy Contipro.

Tabulka 12: Podmínky přípravy SPION.

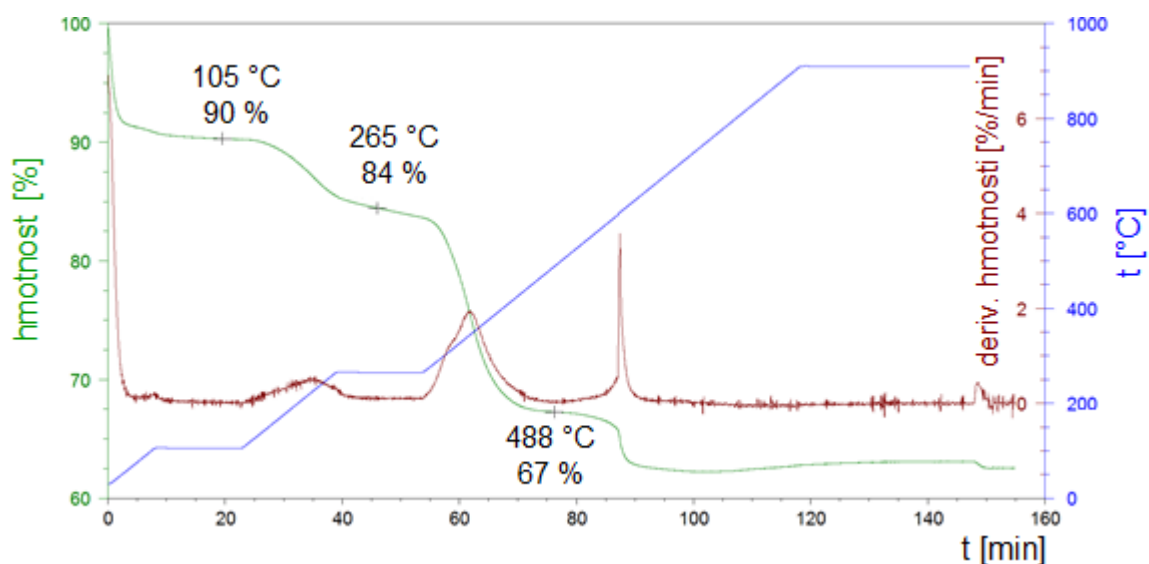
$V_{\text{ohřev}}$ [°C·min ⁻¹]	rozpouštědlo	argon	t [°C]	t [min]	výtěžek [mg·cm ⁻³]	SPION [nm]
8	oktadec-1-en	bubl.	280	60	100/0,13	5,3±0,4
8	oktadec-1-en	bubl.	280	60	197/0,13	5,6±0,4
8	oktadec-1-en	bubl.	280	60	156/0,13	4,9±0,5
2	oktadec-1-en	bubl.	320	120	165/0,3	12,1±0,8



Obrázek 47: SPION 5,3±0,4 nm (vlevo) a 12,1±0,8 (vpravo), zvětšení v obou případech 100 000×.

13.2.1 Stanovení množství vázané kyseliny olejové pomocí TG

U vyhovujících šarží SPION s nízkou polydisperzitou do 10 % o přibližně průměrných velikostech 5 a 12 nm bylo dále stanoveno množství vázané a volné kyseliny olejové pomocí TG. Na Obrázku 48 je uveden záznam TG analýzy SPION na povrchu modifikovaných kyselinou olejovou o velikosti 5,6±0,4 nm. V záznamu tepelného rozkladu je možno vidět vrchol prvního maxima při 265 °C s procentuální ztrátou hmotnosti 6 %, typický pro degradaci volné, či velmi slabě vázané kyseliny olejové. Charakteristická teplota rozkladu vázané kyseliny olejové byla naměřena při 488 °C (procentuální ztráta hmotnosti 17 %).⁸⁰ Vlhkost vzorku byla 10 %.



Obrázek 48: Charakteristická TG analýza SPION ($5,61 \pm 0,39$) na povrchu modifikovaných kyselinou olejovou.

V Tabulce 13 jsou uvedeny výsledky charakterizace připravených SPION. V případě prvních dvou šarží SPION o přibližných průměrných velikostech 5 nm bylo stanoveno množství vázané kyseliny olejové v rozmezí 15–18 %. Poslední šarže 5 nm obsahovala téměř dvojnásobné množství kyseliny olejové, a to 35 %. V případě SPION o 12 nm bylo pomocí TG bylo stanoven hmotnostní podíl vázané kyseliny olejové dokonce 83 %.

Tabulka 13: Stanovení volné a vázané kyseliny olejové.

SPION [nm]	volná C18:1 [%]	vázaná C18:1 [%]	vlhkost [%]
$5,28 \pm 0,40$	7	15	2
$5,61 \pm 0,39$	6	17	10
$4,93 \pm 0,52$	21	35	3
$12,12 \pm 0,80$	5	83	11

Přestože se v publikovaných odborných člancích uvádí, že se jedná o metodu vhodnou pro přípravu uniformních SPION, v rámci doktorského studia se

nepodařilo uspokojivě reprodukovat syntézy nebo najít vhodné podmínky, které by opakovaně vedly k přípravě velikostně uniformních SPION na povrchu modifikovaných stejným množstvím kyseliny olejové.

14. BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ DERIVÁTŮ HYLAURONANU ZNAČENÉHO CYPATE

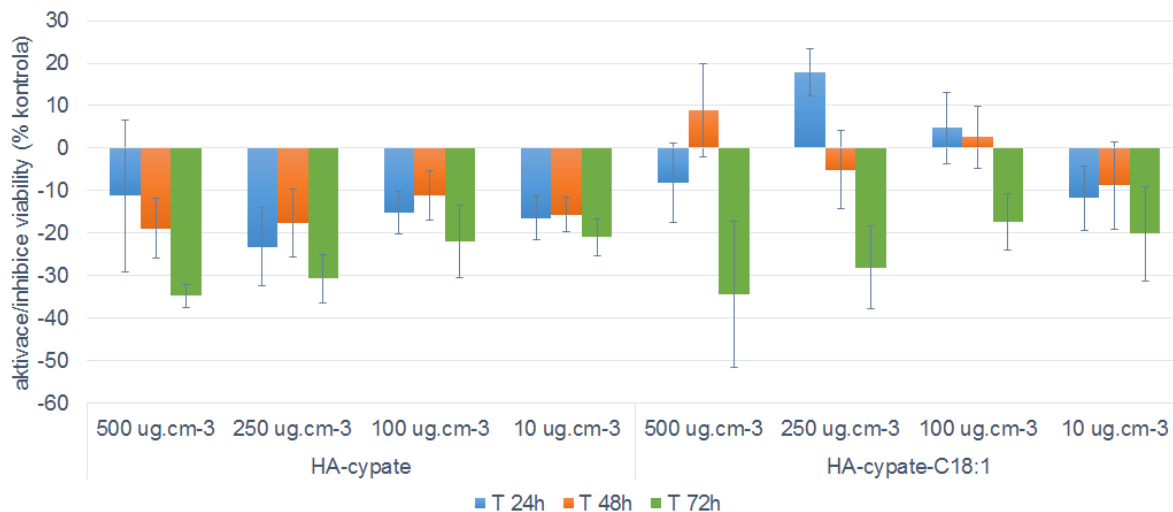
Jako první je v této práci uvedeno biologické testování hyaluronanu, jež je modifikován NIR fluorescenční látkou cypate, vhodnou pro neinvazivní diagnostiku pomocí optických zobrazovacích metod.

14.1 Cytotoxicita hyaluronanu modifikovaného cypate nebo cypate a řetězci kyseliny olejové

Obecným předpokladem aplikace různých látek *in vivo* je jejich nízká cytotoxicita. Z důvodu zamýšleného testování vybraných derivátů HA na modelových myších byla ve spolupráci s biology z Contipra ověřena cytotoxicita **HA-cypate** a **HA-cypate-C18:1** na myších fibroblastech (NIH-3T3) prostřednictvím MTT testů. NIH-3T3 bývají velmi často používány jako kontrolní buněčné linie pro stanovení efektu derivátů HA, ale i jiných látek, na životaschopnost biologických systémů a zároveň získávají vysoké kvalitní dat o cytotoxicitě látek. Na základě těchto informací je pak možno předpovídat *in vivo* efekt testovaných látek nebo molekulárních systémů.^{172,173}

Na Obrázku 49 jsou předloženy výsledky viabilit, respektive aktivace/inhibice růstu buněk, získané testováním derivátů **HA-cypate** ($M_w = 15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, SS = 0,7 %, koncentrace 10–500 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) a **HA-cypate-C18:1** ($M_w = 15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, SS = 10 %, koncentrace 10–500 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Z výsledků je zřejmé, že inhibice růstu NIH-3T3 buněk je závislá na koncentraci látek a také délce expozice. V časech 24 h a 48 h nedocházelo u obou látek při žádné zvolené koncentraci k ovlivnění viability většímu než 20 %, z čehož lze usoudit, že látky o daných koncentracích, působících po dobu 48 h, nejsou cytotoxické. Inhibice

růstu buněk NIH-3T3 ve větší míře nastala po 72 h ve všech koncentracích derivátu **HA-cypate**, v případě **HA-cypate-C18:1** pouze v koncentraci 250 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. V tomto případě lze označit testované látky jako slabě cytotoxické.



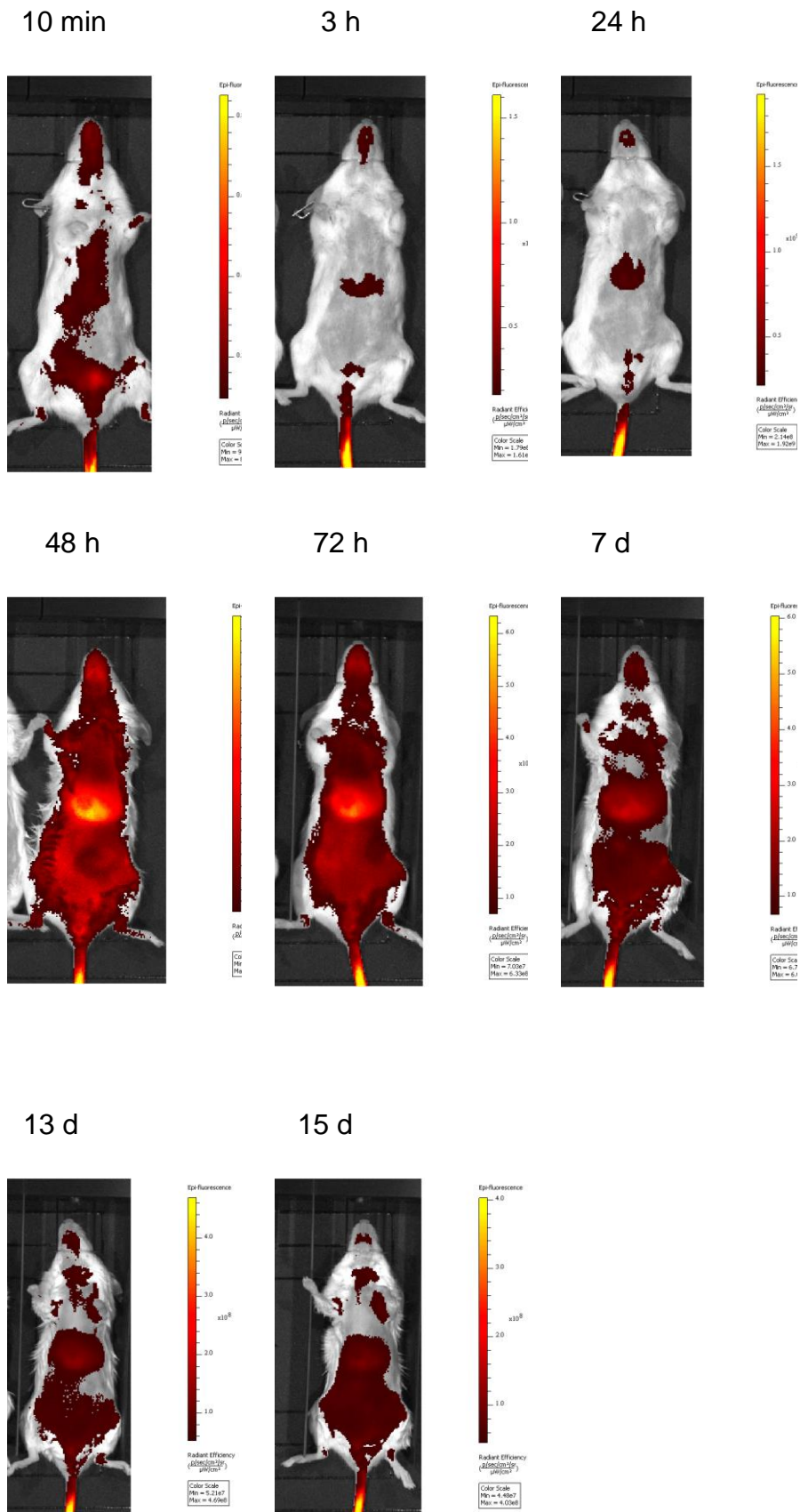
Obrázek 49: Vliv **HA-cypate** a **HA-cypate-C18:1** na životaschopnost buněk v různých časech a koncentracích.

14.2 *In vivo* testy

14.2.1 *In vivo* biodistribuce HA-Cypate-C18:1 ve zdravých myších

Prvotní *in vivo* experimenty s NIR fluorescenčně značeným hydrofobizovaným hyaluronanem **HA-cypate-C18:1** byly provedeny zejména s cílem zjistit možnosti neinvazivní *in vivo* detekce tohoto derivátu. Rovněž bylo zajímavé sledovat biodistribuci aplikované látky ve zdravých myších. Roztok **HA-cypate-C18:1** ($M_w = 15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $SS_{\text{cypate}} = 0,7\%$; $SS_{\text{C18:1}} = 10\%$) ve fosfátovém pufru byl intravenózně aplikován modelovým myším typu Balb/c (pod narkózou). Následně byla pozorována jeho fluorescence *in vivo* po dobu 2 týdnů. Obrázek 50 ukazuje, že **HA-cypate-C18:1** je distribuován po intravenózním podání u zdravé myši zejména do jater. Rovněž je patrné, že $SS_{\text{cypate}} = 0,7\%$ je dostatečný pro *in vivo* zobrazování. Z intenzity pozorovaného záření lze usuzovat, že k maximální akumulaci látky v játrech došlo po 48 h.

V neposlední řadě se prokázalo, že testovaný systém je velmi stabilní, přičemž po jednom podání lze zobrazení provádět po dobu až 2 týdnů.



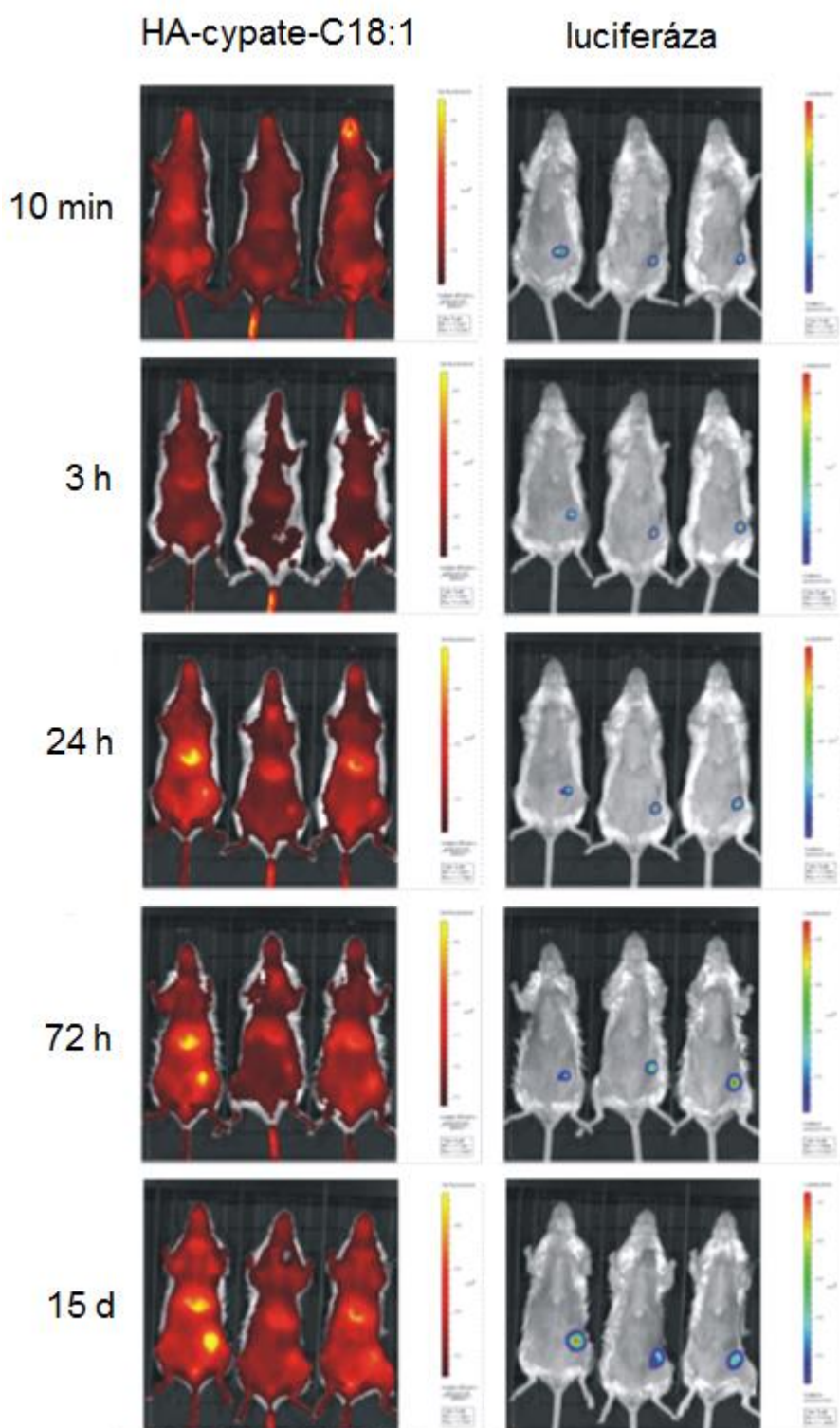
Obrázek 50: Biodistribuce **HA-cypate-C18:1** ve zdravé myši v čase.

Látka cypate byla původně syntetizován jako analog ICG a NIR fluorescenční kontrastní látky, jež je schopna se taktéž akumulovat v nádoru. Nicméně samostatná látka cypate je nerozpustná ve vodném prostředí, charakteristická velmi krátkým poločasem rozpadu v krevním oběhu ($\tau < 60$ s) a rychlou ztrátou fluorescence.¹⁷⁴ Z *in vivo* studie bylo zřejmé, že konjugace cypate k hyaluronanu HA zlepšila rozpustnost barviva ve vodě, významně prodloužila cirkulaci tohoto chromoforu krevním oběhem, a to bez ztráty fotochemických vlastností.

14.2.2 *In vivo* biodistribuce HA-cypate-C18:1 v myších s nádorem

Jedním z klíčových *in vivo* experimentů celém této disertační práce byla studie biodistribuce **HA-cypate-C18:1** ($M_w = 15\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $SS_{\text{cypate}} = 0,7\ \%$; $SS_{\text{C18:1}} = 10\ \%$) v myších Balb/C s prsním nádorem (4T1 luc buňky). Na Obrázku 51 jsou uvedeny reálné snímky získávané po dobu 2 týdnů po intravenózním podání **HA-cypate-C18:1** v PBS. Fluorescenční signál v místě nádoru byl detekován 24 hodin po intravenózní aplikaci a růst nádoru bylo možno monitorovat nejméně po dobu 2 týdnů bez nutnosti dalšího podání HA derivátu. Akumulace **HA-cypate-C18:1** v nádoru byla potvrzena kolokalizací s bioluminiscenčními signály. Tato práce potvrdila předchozí studii, kdy bylo zjištěno, že nosičové systémy na bázi hyaluronyl-oleátu (HA-C18:1) se můžou akumulovat v nádorových tkáních.⁸⁵ Přínosem předložené práce tedy bylo, že navázáním látky cypate k HA-C18:1 bylo možno sledovat biodistribuci těchto nosičových systémů neinvazivně *in vivo* pomocí preklinické optické zobrazovací metody. Na základě předešlých studií lze předpokládat, že efektivní nádorové cílení HA polymerních micel může být způsobeno kombinací tzv. pasivního cílení (EPR efekt),¹⁷⁵ stejně tak jako cílením aktivním za účasti specifického receptoru CD44,¹⁷⁶ jež je ve větší míře exprimován na povrchu nádorových buněk. Jak je dále zřejmé z Obrázku 51, velká část **HA-cypate-C18:1** byla detekována taktéž v játrech, což může být způsobeno aktivním vychytáváním

látky jaterními sinusoidálními endotelovými buňkami za spoluúčasti HARE receptoru a přirozeným odbouráváním derivátu hyaluronanu v těle.^{177,178}

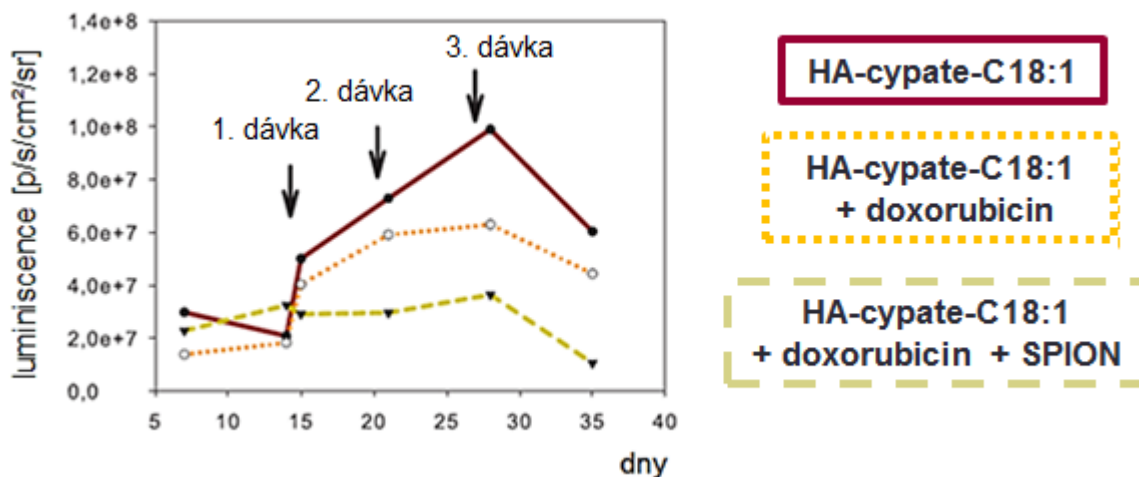


Obrázek 51: Biodistribuce **HA-Cypate-C18:1** v myších s nádorem v čase.

14.2.3 Protinádorový účinek nosičových systémů na bázi HA-cypate-C18:1

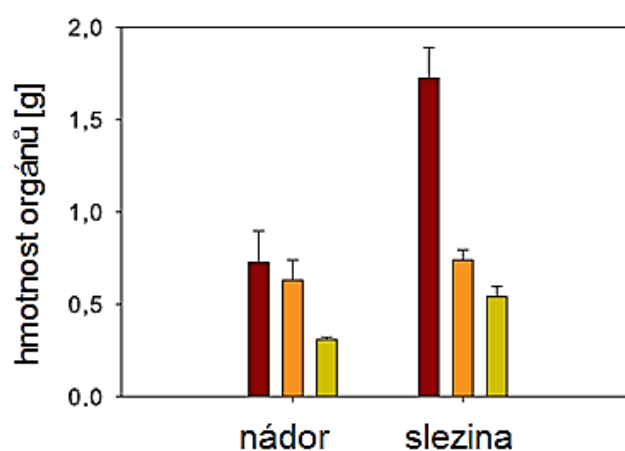
Předcházející dva *in vivo* experimenty prokázaly, že hyaluronan modifikovaný cypate lze neinvazivně detekovat pomocí fluorescence a navíc, že dochází k akumulaci **HA-cypate-C18:1** v místě nádoru. Tento úspěch vedl k vyzkoušení možnosti využít modifikovaný HA jako nosič protinádorového léčiva.

Z připraveného **HA-cypate-C18:1** byly připraveny tři typy polymerních micel. Prvním typem PM byl HA-cypate-C18:1 bez léčiva, druhý typ PM byl HA-cypate-C18:1 s enkapsulovaným doxorubicinem a třetí typ byly PM s enkapsulovaným doxorubicinem spolu se SPION. Roztoky jednotlivých typů polymerních micel byly intravenózně aplikovány třem skupinám myší Balb/C s prsním nádorem ve třech dávkách (každé skupině myší pouze jeden typ PM). Luminiscence, vycházející z nádoru (4T1 luc buňky), byla vyhodnocována po dobu 35 dnů. Výsledky na Obrázek 52 50 demonstrují, že k největšímu růst nádoru došlo ve skupině myší, které byl podán pouze HA-cypate-C18:1 bez léčiva. Oproti tomu pomalejší růst byl zaznamenán u léčených skupin HA-cypate-C18:1 s doxorubicinem a HA-cypate-C18:1 s enkapsulovaným doxorubicinem a zároveň SPION. Nádor rostl nejméně po podání HA-cypate-C18:1 s enkapsulovaným doxorubicinem a zároveň SPION.



Obrázek 52: Růst nádorů po léčbě různými nosičovými systémy.

Pro kontrolu neinvazivního vyhodnocení progresu nemoci byly po ukončení léčby myši usmrceny a proběhlo vynětí orgánů. **Obrázek 53** ukazuje, že první (neléčená) skupina měla největší hmotnost sleziny a nádoru. V daném modelu je zvětšená slezina indikací progresu nemoci.¹⁷⁹ Druhá (léčená) a třetí (léčená) skupina měla slezinu a taktéž nádor výrazně menší oproti první skupině. Nejmenší nález nádoru byl zjištěn u třetí skupiny myší, jimž byl podán HA-cypate-C18-1 s enkapsulovaným doxorubicinem a SPION. Z provedených experimentů vyplývá, že testované nosičové systémy mohou tedy nejen sloužit pro diagnostiku, ale taktéž léčit nádor a plní funkci teranostika.



Obrázek 53: Hmotnost nádoru a sleziny po terapii různými nosičovými systémy.

15. TESTOVÁNÍ DERIVÁTŮ HYLAURONANU ZNAČENÉHO NILSKOU MODŘÍ *IN VITRO*

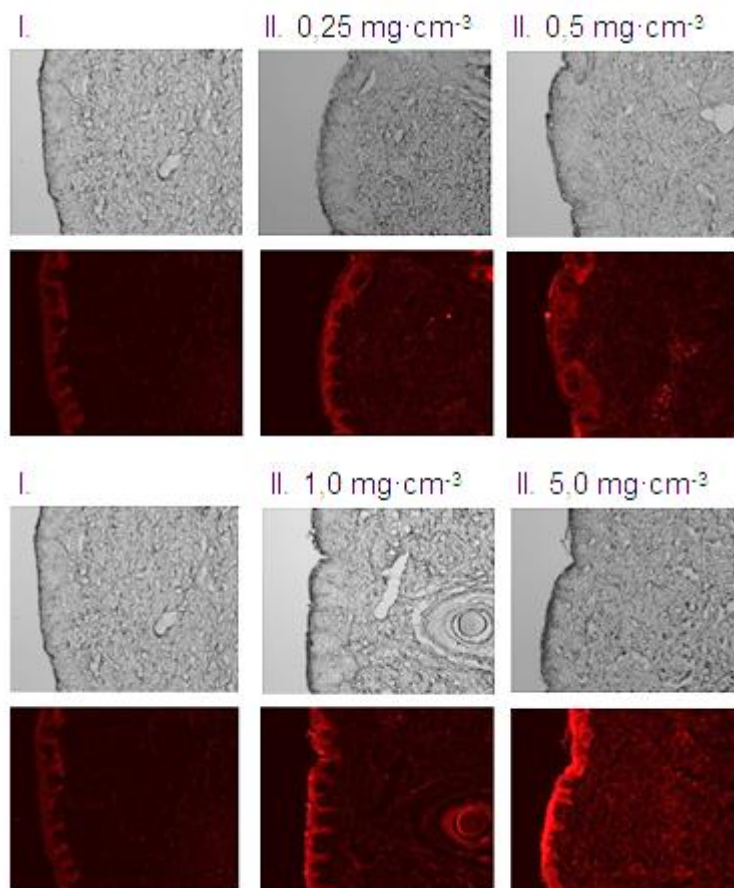
V neposlední řadě byla věnována pozornost testování interakce derivátů hyaluronanu modifikovaného nilskou modří s biologickými systémy *in vitro*. Nejprve byla testována schopnost **HA-NM-C18:1** penetrace kůží. Následně byly nosičové systémy, připravené z **HA-NM-C18:1** a **HA-NM-C6**, zkoumány taktéž v souvislosti s jejich schopností vstupu a doručení léčiva do buněk.

15.1 Penetrace derivátů hyaluronanu kůží

Nosičové systémy, jako jsou například lipozomy, micely, dendrimery, nanoemulze a jiné jsou v odborné literatuře popisovány v souvislosti s efektivnějším topickým podáváním léčiv, jelikož uvedené systémy mohou usnadňovat penetraci nesených látek přes kůži, respektive vrchní rohovou vrstvu.^{137,138,139,140} Jak již bylo zmíněno v teoretickém úvodu (viz kapitola 6), hydrofobizovaný hyaluronan se jeví jako slibný materiál, který může být základem nosičových systémů pro topické aplikace biologicky aktivních látek na kůži.^{142,143}

Ve spolupráci s kolegy z oddělení nosiče a fyziologie buňky firmy Contipro bylo dalším dílčím cílem u derivátu **HA-NM-C18:1** ($M_{wHA-OX} = 18\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $SS_{NM} = 0,9\%$, $SS_{C18:1} = 10\%$) studovat *in vitro* jeho schopnost penetrace prasečí kůží, pocházející z ušních boltečů. **HA-NM-C18:1** o různých koncentracích nebo roztok PBS, jako kontrolní vzorek, byly aplikovány ve Francových celách na prasečí kůži po dobu 20 h. Na Obrázku 54 jsou uvedeny výsledky z experimentu, získané fluorescenčním mikroskopem. Číslem I je označen referenční vzorek po aplikaci roztoku PBS, sada snímků s označením II přísluší roztokům **HA-NM-C18:1** o různých koncentracích ($0,25\text{--}5\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$). V horní části jsou snímky pořízené bez filtru, dole jsou obrázky pořízené za použití TRITC filtru, tj. záznam emise záření nilskou modří. Po 20 h aplikaci testovaných roztoků lze na snímcích průřezu prasečí kůží pozorovat fluorescenci

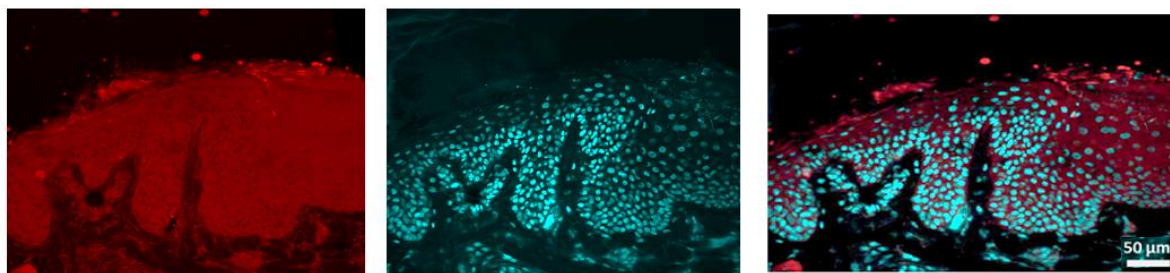
nilské modři nejen v epidermis, ale taktěž i v hlubších vrstvách kůže. Dále je také ze série obrázků zřejmé, že se zvyšující se koncentrací testovaného derivátu je pozorovaná emise záření, pocházející z nilské modři, intenzivnější.



Obrázek 54: Snímky histologických řezů prasečí kůže po ošetření pomocí PBS (I) a HA-NM-C18:1 (II).

Za účelem zisku podrobnější informací o penetraci derivátu hyaluronanu kůži byly pořízeny snímky konfokálním mikroskopem, jenž ve srovnání s dostupným fluorescenčním mikroskopem poskytoval detailnější snímky s vysokým rozlišením obrazu. Pro detailnější rozlišení buněčných struktur byla v tomto případě navíc jádra obarvena Hoechstovou modří. Vlevo na Obrázku 55 je snímek, zachycující emisi červeného záření **HA-NM-C18:1**, uprostřed jsou pozorovatelná jádra s emisí modrého záření. Ze snímku napravo, vzniklého superpozicí fluorescence nilské modři (HA derivát) a Hoechstovy modři (jádra

buněk), lze pozorovat přítomnost HA derivátu v cytoplazmě, obklopující jádra buněk jak v epidermálních, tak v dermálních vrstvách kůže.



Obrázek 55: Snímky průřezů prasečí kůže: vlevo fluorescence – **HA-NM-C18:1**; uprostřed – fluorescence obarvených jader, vpravo – překryv obrázků.

Výsledky experimentů pozorované pomocí fluorescenčního, tak i konfokálního mikroskopu naznačují, že fluorescenčně značený derivát HA hydrofobizovaný kyselinou olejovou je pravděpodobně schopen proniknout skrz *stratum corneum* do hlubších vrstev pokožky. Z pozorování konfokálním mikroskopem lze dále usoudit, že fluorescenčně značený derivát HA je schopný penetrovat transcelulární cestou – skrze těla buněk rohové vrstvy (korneocytů) a buněk zbývajících vrstev pokožky (keratinocytů).

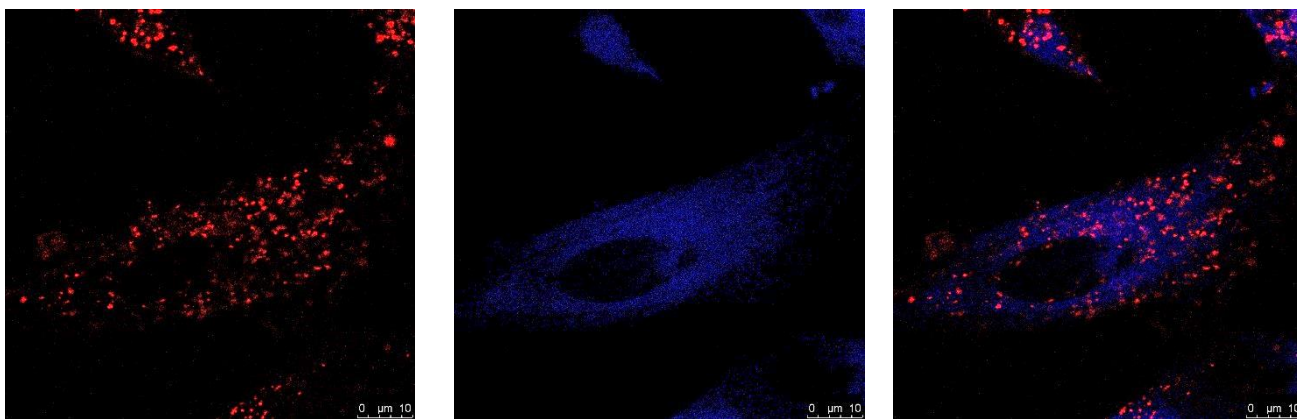
15.2 Vstup látek do buněk

Jako poslední byla získána informace o chování nosičových systémů na bázi hylauronanu modifikovaného mastnými řetězci po interakci s buňkami, zejména schopnost vstupu a doručení modelové látky do buňky. Z látek **HA-NM-C18:1** a **HA-NM-C6** byly připraveny nosičové systémy s enkapsulovaným kurkuminem. Testovanými typem buněk byly fibroblasty, a to zejména z toho důvodu, že na svém povrchu dokážou exprimovat receptor, důležitý pro rozpoznání a vstup hyaluronanu do buněk.¹⁸⁰

Inkubace kolonií buněk v přítomnosti PM probíhaly po dobu 20 min a následně byla konfokálním mikroskopem zaznamenána fluorescence za použití dvou různých emisních filtrů. Na Obrázku 56 je uvedena nejprve série snímků

z experimentu s nosičovým systémem vytvořeným z **HA-NM-C18:1**. Na snímku vlevo je záznam červeného záření, pocházejícího z nilské modři, respektive nosičového systému. Snímek uprostřed je poté emise modrého záření, emitovaného kurkuminem. Pro vyhodnocení experimentu bylo využito zejména rozdílné vlnové délky záření obou fluoroforů – nilské modři a kurkuminu, kdy na snímku vlevo je znázorněn překryv předchozích obrazů fluorescenčního záření nosičových systémů a inkorporovaného modelového léčiva. Modelové léčivo kurkumin bylo pozorováno ve stejných oblastech jako fluorescenční značky nosičového systému, což demonstruje kolokalizaci kurkuminu a nosičových systémů v buňce. Stejný experiment byl taktéž realizován s nosičovým systémem kurkuminu, připraveným z **HA-NM-C6**. Snímky z experimentu jsou ve stejném pořadí, jako v případě **HA-NM-C18:1**, znázorněny na Obrázku 57. Závěry z pozorování překryvu emise záření nilské modři a kurkuminu jsou stejné jako v předchozím případě, kdy se opět jedná o kolokalizaci nosiče a modelového léčiva ve fibroblastu.

Na základě výsledků těchto experimentů lze testované polymerní micely, připravené z **HA-NM-C6** a **HA-NM-C18:1**, považovat za vyhovující nosičové systémy, jež dokážou vstoupit a doručit modelovou látku dovnitř fibroblastu.

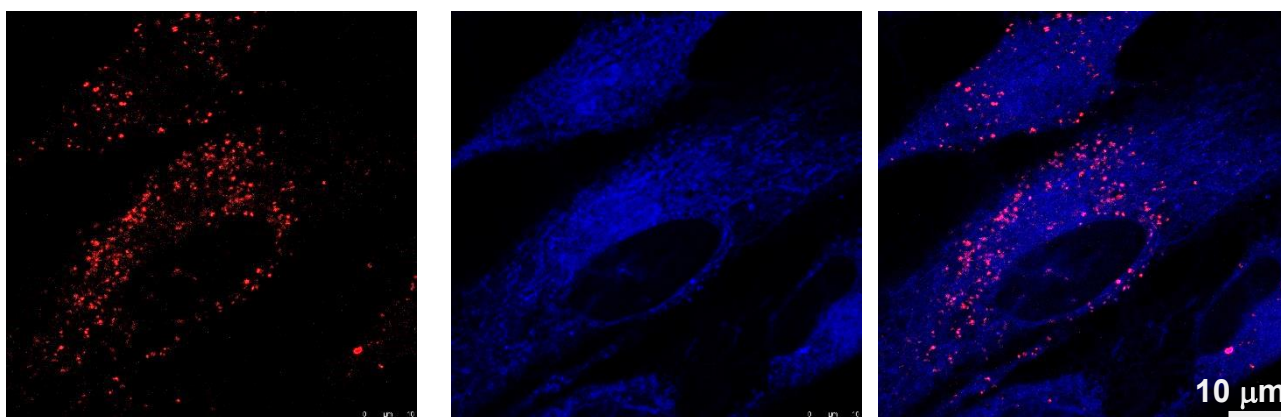


emise záření nilské modří

emise záření kurkuminu

překryv snímků

Obrázek 56: Snímky vybraného fibroblastu inkubovaného s PM na bázi **HA-NM-C18:1**.



emise záření nilské modří

emise záření kurkuminu

překryv obrazů

Obrázek 57: Snímky vybraného fibroblastu inkubovaného s PM, připraveného z **HA-NM-C6**.

ZÁVĚR

Předložená disertační práce, vypracovaná ve spolupráci s českou farmaceutickou firmou Contipro, je zaměřena na vývoj vhodně modifikovaného hyaluronanu (HA) pro přípravu nosičových systémů terapeutických látek detekovatelných v biologických systémech, především teranostik. Hlavním cílem bylo nalézt způsob zavedení vybraných fluorescenčních barviv do struktury hydrofobizovaného hyaluronanu tak, aby deriváty HA, respektive polymerní micely (PM) z nich připravené, byly detekovatelné *in vitro* a zejména *in vivo*. Veškeré syntézy derivátů HA byly záměrně prováděny bez modifikace karboxylové skupiny HA. Kratší část doktorského studia byla věnována syntéze superparamagnetických nanočástic oxidů železa obalených kyselinou olejovou (SPION). Završení celého výzkumu představovalo testování vybraných látek a nosičových systémů *in vitro* a *in vivo*, za účelem porozumění chování nosičových systémů v živých buňkách a tkáních. Závěry doktorské práce lze tematicky rozdělit do čtyř částí:

První dílčí část představovala syntéza derivátu hyaluronanu pro přípravu nosičových systémů s terapeutickou i diagnostickou funkcí – teranostik. Jako kontrastní látka bylo vybráno NIR fluorescenční barvivo cypate. Příprava derivátu HA-cypate pak spočívala v nalezení efektivního způsobu chemického navázání této NIR fluorescenční látky k řetězci nízkomolekulárního hyaluronanu. Jako účinné činidlo se osvědčil *N,N'*-karbonyldiimidazol zprostředkávající vznik esterové vazby mezi karboxylovými skupinami cypate a hydroxylovými skupinami HA. Přestože je obecně strukturní analýza derivátů hyaluronanu obtížná, v případě HA-cypate se jeho vznik podařilo potvrdit nejen pomocí NMR spektroskopie, ale především také hmotnostní spektrometrií. Druhým krokem byla hydrofobizace HA-cypate řetězci kyseliny olejové. K tomuto účelu byla použita metoda směsného anhydridu připraveného *in situ* reakcí kyseliny olejové a benzoylchloridu. Navázání cypate k HA dále

umožnilo neinvazivní *in vivo* studium chování vybraných derivátů a polymerních micel z nich připravených. Jako modelová zvířata byly použity zdravé imunitně kompetentní myši BALB/c, nebo tytéž myši s nehmátným prsním nádorem (buňky 4T1 luc). V úvodních *in vivo* experimentech se zdravou skupinou myší byla pozorována dostatečná emise záření derivátu HA-cypate-C18:1, přičemž bylo možno neinvazivně detekovat jeho biodistribuci. Po intravenózním podání bylo možné, pomocí preklinické optické zobrazovací metody, pozorovat hromadění sledovaných látek zejména v játrech modelových zvířat. Následně byly provedeny experimenty se třemi typy polymerních micel na bázi HA-cypate-C18:1, a to bez léčiva, s enkapsulovaným doxorubicinem nebo doxorubicinem a SPION, jež byly podány myším s prsním nádorem. Ve všech třech případech docházelo k efektivnímu nahromadění micel v nádoru, přičemž kontrola pozice nádorové tkáně, respektive kolokalizace fluorescence, byla provedena pomocí bioluminiscence, pocházející z nádorových buněk. Významná akumulace micel však přirozeně probíhala i v játrech. Za významné zjištění lze považovat, že cílové místo, zejména nádor, bylo možno vizualizovat po dobu až dvou týdnů po jednom podání nosičů na bázi HA-cypate-C18:1. Největší protinádorový účinek byl pozorován u micel s doxorubicinem a SPION, menší pak u micel s doxorubicinem. V případě prázdného nosičového systému nebyly pozorovány žádné terapeutické účinky.

Ve snaze potlačit nežádoucí akumulaci nosičů, připravených z HA-cypate-C18:1, v játrech bylo přistoupeno k modifikaci tohoto derivátu poly(ethylenglykolem) (PEG). Jako výchozí derivát pro modifikaci hyaluronanu reduktivní aminací za využití NaBH_3CN sloužil oxidovaný hyaluronan. Dále bylo postupně navázáno fluorescenční barvivo cypate a kyselina olejová. Rovněž byl testován postup s obráceným pořadím posledních dvou kroků. Oběma vyzkoušenými postupy se podařilo připravit finální derivát HA-cypate-

C18:1-PEG s přibližně stejnými vlastnostmi. Doposud nebyla testována biodistribuce HA-cypate-C18:1-PEG v modelových zvířatech, tudíž nelze zhodnotit, zda navázání PEG přispělo k eliminaci akumulace daného derivátu nebo nosičového systému z něj připraveného v játrech.

Druhou fluorescenční látkou použitou pro modifikaci hyaluronanu byla nilská modř. Stejně jako v případě PEG byl výchozí látkou pro navázání nilské modři oxidovaný hyaluronan a modifikace byla provedena pomocí redukční aminace, a to za využití komplexu boranu s pikolinem. Hyaluronan značený nilskou modří byl následně hydrofobizován řetězcí kyseliny kapronové nebo olejové. V případě derivátu HA-NM-C18:1 bylo pomocí fluorescenčního a konfokálního mikroskopu prokázáno *in vitro*, že tato látka je schopna penetrace *stratum corneum* až do hlubších vrstev kůže – epidermis i dermis. Ze syntetizovaných látek HA-NM-C18:1 a HA-NM-C6 byly dále připraveny kurkumin nesoucí polymerní micely a byla testována jejich schopnost vstupu a doručení modelového léčiva do fibroblastů. Kolokalizace fluorescence kurkuminu a nilské modři, tedy modelového léčiva a nosičového systému, v buňce ukázala, že připravené polymerní micely dokážou vstoupit a zároveň doručit kurkumin dovnitř buňky.

V návaznosti na zde popsané výsledky by bylo v budoucnu zajímavé například biologické testování a porovnání chování derivátů hyaluronanu s modifikovanými pouze karboxylovými nebo hydroxylovými skupinami a dále také derivátů hyaluronanu modifikovaných a nemodifikovaných PEG.

Posledním cílem práce byla příprava superparamagnetických nanočástic oxidů železa obalených kyselinou olejovou s požadovanou velikostí částic v rozmezí 5–20 nm a nízkou polydisperzitou. Termálním rozkladem oleátu železitého byly získány nanočástice požadovaných vlastností (nízká polydisperzita) pouze v případě SPION s průměrem 5 a 12 nm. V době

vyhrazené pro doktorské studium se bohužel nepodařilo najít vhodné podmínky syntézy, které by opakovaně vedly k přípravě uniformních SPION obalených stejným množstvím kyseliny olejové.

Závěrem lze shrnout, že byly navrženy a připraveny fluorescenčně značené hydrofobizované deriváty HA vhodné pro přípravu nosičových systémů, jež se cíleně akumulovaly v požadovaných místech, například buňkách nebo nádorové tkáni. Tyto látky a nosičové systémy byly navíc efektivně detekovatelné *in vitro* a rovněž neinvazivně *in vivo* pomocí optických zobrazovacích metod. Z připravených derivátů HA bylo taktéž možno připravit nosičové systémy terapeutik, u nichž byl prokázán protinádorový účinek. Modifikovaný hyaluronan se tedy jeví jako vhodný materiál pro přípravu teranostik.

Předložená disertační práce je součástí komplexního aplikovaného výzkumu dlouhodobě realizovaného ve firmě Contipro. Celkově lze však konstatovat, že získané výsledky představují velmi cenné informace o chování nosičových systémů léčiv v biologických systémech.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ WILLIAMS, D. *Essential Biomaterials Science*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. ISBN 978-0521899086.
- ² MARTÍN DEL VALLE, Eva M.; GALAN, Miguel A.; CARBONELL, Ruben G. Drug delivery technologies: the way forward in the new decade. *Industrial & engineering chemistry research*, 2009, 48.5: 2475-2486. ISSN 0888-5885. DOI 10.1021/ie800886m.
- ³ EENSCHOOTEN, Corinne, et al. Preparation and structural characterisation of novel and versatile amphiphilic octenyl succinic anhydride–modified hyaluronic acid derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79.3: 597-605. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2009.09.011.
- ⁴ KRAL, V., et al. Nanomedicína – současný stav a perspektivy: velký potenciál, nebo jen módní slogan? *Chemické Listy*, 2006, 100.1: 4-9.
- ⁵ JANIB, Siti M.; MOSES, Ara S.; MACKAY, J. Andrew. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 2010, 62.11: 1052-1063. ISSN 0169409X. DOI 10.1016/j.addr.2010.08.004.
- ⁶ SVENSON, Sonke. Theranostics: are we there yet? *Molecular pharmaceuticals*, 2013, 10.3: 848-856. ISSN 1543-8384. DOI 10.1021/mp300644n.
- ⁷ LIM, Eun-Kyung, et al. Nanomaterials for theranostics: recent advances and future challenges. *Chemical reviews*, 2014, 115.1: 327-394. ISSN 0009-2665. DOI 10.1021/cr300213b.
- ⁸ MUTHU, M. S., LEONG, D. T., MEI, L., FENG, S. S. Nanotheranostics - Application and Further Development of Nanomedicine Strategies for Advanced Theranostics. *Theranostics*, 2014, 4.6: 660–677. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno.8698.
- ⁹ RINGSDORF, Helmut. Structure and properties of pharmacologically active polymers. In: *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 1975. p. 135-153. ISSN 03608905. DOI 10.1002/polc.5070510111.
- ¹⁰ LARSON, Nate; GHANDEHARI, Hamidreza. Polymeric conjugates for drug delivery. *Chemistry of Materials*, 2012, 24.5: 840-853. ISSN 0897-4756. DOI 10.1021/cm2031569.
- ¹¹ LAMMERS, Twan; ULBRICH, Karel. HEMA copolymers: 30 years of advances. *Advanced Drug Delivery Review*, 2010, 62.2: 119-121. ISSN

- 0169-409X. DOI 10.1016/J.ADDR.2009.12.004.
- ¹² DUNCAN, Ruth. Polymer therapeutics as nanomedicines: new perspectives. *Current opinion in biotechnology*, 2011, 22.4: 492-501. ISSN 09581669. DOI 10.1016/j.copbio.2011.05.507.
- ¹³ BOSMAN, AW; JANSSEN, H. M.; MEIJER, E. W. About dendrimers: structure, physical properties, and applications. *Chemical reviews*, 1999, 99.7: 1665-1688. DOI 10.1021/CR970069Y.
- ¹⁴ OLIVEIRA, Joaquim Miguel, et al. Dendrimers and derivatives as a potential therapeutic tool in regenerative medicine strategies—a review. *Progress in Polymer Science*, 2010, 35.9: 1163-1194. ISSN 0079-6700. DOI 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2010.04.006.
- ¹⁵ Dendrimer Expert AB. What is a “dendrimer”?. <http://dendrimerexpert.com/home-2/what-is-dendrimer/#> (accessed Jan 04, 2017).
- ¹⁶ SVENSON, Sönke; TOMALIA, Donald A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Advanced drug delivery reviews*, 2012, 64: 102-115. ISSN 0169-409X. DOI 10.1016/J.ADDR.2012.09.030.
- ¹⁷ MOURYA, V. K., et al. Polymeric micelles: general considerations and their applications. *Ind J Pharm Edu Res*, 2011, 45.2: 128-38.
- ¹⁸ DING, Jianxun, et al. Noncovalent interaction-assisted polymeric micelles for controlled drug delivery. *Chemical Communications*, 2014, 50.77: 11274-11290. ISSN 1359-7345. DOI 10.1039/C4CC03153A.
- ¹⁹ OWEN, Shawn C.; CHAN, Dianna PY; SHOICHET, Molly S. Polymeric micelle stability. *Nano Today*, 2012, 7.1: 53-65. ISSN 1748-0132. DOI 10.1016/J.NANTOD.2012.01.002.
- ²⁰ AW, Moom Sinn; KURIAN, Mima; LOSIC, Dusan. Polymeric micelles for multidrug delivery and combination therapy. *Chemistry-A European Journal*, 2013, 19.38: 12586-12601. ISSN 09476539. DOI 10.1002/chem.201302097.
- ²¹ HUSSEINI, Ghaleb A.; PITT, William G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 2008, 60.10: 1137-1152. ISSN 0169409X. DOI 10.1016/j.addr.2008.03.008.
- ²² LU, Ying; PARK, Kinam. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *International journal of pharmaceuticals*, 2013, 453.1: 198-214. ISSN 03785173. DOI 10.1016/j.ijpharm.2012.08.042.
- ²³ LU, Jiao; OWEN, Shawn C.; SHOICHET, Molly S. Stability of self-

- assembled polymeric micelles in serum. *Macromolecules*, 2011, 44.15: 6002-6008. ISSN 0024-9297. DOI 10.1021/ma200675w.
- ²⁴ LOGIE, Jennifer, et al. PEG-graft density controls polymeric nanoparticle micelle stability. *Chemistry of Materials*, 2014, 26.9: 2847-2855. ISSN 0897-4756. DOI 10.1021/cm500448x.
- ²⁵ VAN DONGEN, Stijn FM, et al. Biohybrid polymer capsules. *Chemical reviews*, 2009, 109.11: 6212-6274. ISSN 0009-2665. DOI 10.1021/cr900072y.
- ²⁶ SINGH, Rajesh; LILLARD JR, James W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 2009, 86.3: 215-223. ISSN 10.1016/j.yexmp.2008.12.004. DOI 10.1016/j.yexmp.2008.12.004
- ²⁷ AHMED, Fariyal, et al. Shrinkage of a rapidly growing tumor by drug-loaded polymersomes: pH-triggered release through copolymer degradation. *Molecular pharmaceutics*, 2006, 3.3: 340-350. DOI 10.1021/MP050103U.
- ²⁸ BEI, Di; MENG, Jianing; YOUAN, Bi-Botti C. Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises. *Nanomedicine*, 2010, 5.9: 1385-1399. ISSN 1748-6963. DOI 10.2217/nnm.10.117.
- ²⁹ SINGH, Rajesh; LILLARD JR, James W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 2009, 86.3: 215-223. ISSN 0014-4800. DOI 10.1016/J.YEXMP.2008.12.004.
- ³⁰ PARVEEN, Suphiya; MISRA, Ranjita; SAHOO, Sanjeeb K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2012, 8.2: 147-166. ISSN 1549-9634 DOI 10.1016/J.NANO.2011.05.016.
- ³¹ CHEN, Zhiyun, et al. Applications of functionalized fullerenes in tumor theranostics. *Theranostics*, 2012, 2.3: 238-250. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno.3509.
- ³² WADHWA, Jyoti; NAIR, Anroop; KUMRIA, Rachna. Emulsion forming drug delivery system for lipophilic drugs. *Acta Pol Pharm*, 2012, 69.2: 179-191. ISSN 0001-6837.
- ³³ DREADEN, Erik C., et al. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Therapeutic delivery*, 2012, 3.4: 457-478. ISSN 2041-5990.
- ³⁴ STEICHEN, Stephanie D.; CALDORERA-MOORE, Mary; PEPPAS,

- Nicholas A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 48.3: 416-427. ISSN 09280987. DOI 10.1016/j.ejps.2012.12.006.
- ³⁵ MATSUMURA, Yasuhiro; MAEDA, Hiroshi. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*, 1986, 46.12 Part 1: 6387-6392. ISSN 0008-5472.
- ³⁶ KOSTARELOS, Kostas, et al. Binding and interstitial penetration of liposomes within avascular tumor spheroids. *International journal of cancer*, 2004, 112.4: 713-721. ISSN 0020-7136. DOI 10.1002/ijc.20457.
- ³⁷ NISHIYAMA, Nobuhiro, et al. Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer research*, 2003, 63.24: 8977-8983. ISSN 0008-5472.
- ³⁸ BAZAK, Remon, et al. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 2015, 141.5: 769-784. ISSN 0171-5216. DOI 10.1007/s00432-014-1767-3.
- ³⁹ KAMALY, Nazila, et al. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41.7: 2971-3010. ISSN 0306-0012. DOI 10.1039/c2cs15344k.
- ⁴⁰ MATSUMURA, Yasuhiro; KATAOKA, Kazunori. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer science*, 2009, 100.4: 572-579. ISSN 13479032. DOI 10.1111/j.1349-7006.2009.01103.x.
- ⁴¹ PEER, Dan, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2007, 2.12: 751-760. ISSN 1748-3387. DOI 10.1038/nnano.2007.387.
- ⁴² KOBAYASHI, Hisataka, et al. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chemical reviews*, 2009, 110.5: 2620-2640. ISSN 0009-2665. DOI 10.1021/cr900263j.
- ⁴³ ZHANG, Fan, et al. Multimodality Imaging of Tumor Response to Doxil. *Theranostics*, 2011; 1:302-309. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno/v01p0302.
- ⁴⁴ HAMA, Yukihiro, et al. A target cell-specific activatable fluorescence probe for in vivo molecular imaging of cancer based on a self-quenched

- avidin-rhodamine conjugate. *Cancer Research*, 2007, 67.6: 2791-2799. ISSN 0008-5472. DOI 10.1158/0008-5472.can-06-3315.
- ⁴⁵ YE, Yunpeng, CHEN, Xiaoyuan. Integrin Targeting for Tumor Optical Imaging. *Theranostics*, 2011; 1:102-126. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno/v01p0102.
- ⁴⁶ HAMA, Yukihiro, et al. In vivo spectral fluorescence imaging of submillimeter peritoneal cancer implants using a lectin-targeted optical agent. *Neoplasia*, 2006, 8.7: 607-612. ISSN 1476-5586. DOI 10.1593/NEO.06268.
- ⁴⁷ ULRICH, Gilles, et al. Chemistry at boron: synthesis and properties of red to near-IR fluorescent dyes based on boron-substituted diisindolomethene frameworks. *The Journal of organic chemistry*, 2011, 76.11: 4489-4505. ISSN 0022-3263. DOI 10.1021/jo200246q.
- ⁴⁸ RAO, Jianghong; DRAGULESCU-ANDRASI, Anca; YAO, Hequan. Fluorescence imaging in vivo: recent advances. *Current opinion in biotechnology*, 2007, 18.1: 17-25. ISSN 09581669. DOI 10.1016/j.copbio.2007.01.003.
- ⁴⁹ ASHITATE, Yoshitomo, et al. Simultaneous assessment of luminal integrity and vascular perfusion of the gastrointestinal tract using dual-channel near-infrared fluorescence. *Molecular imaging*, 2012, 11.4: 301-308. ISSN 1536-0121.
- ⁵⁰ HAMA, Yukihiro, et al. Targeted optical imaging of cancer cells using lectin-binding BODIPY conjugated avidin. *Biochemical and biophysical research communications*, 2006, 348.3: 807-813. ISSN 0006-291X. DOI 10.1016/J.BBRC.2006.07.169.
- ⁵¹ MISHRA, Amaresh, et al. Cyanines during the 1990s: a review. *Chemical Reviews*, 2000, 100.6: 1973-2012. DOI 10.1021/CR990402T.
- ⁵² LUO, Shenglin, et al. A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials*, 2011, 32.29: 7127-7138. ISSN 01429612. DOI 10.1016/j.biomaterials.2011.06.024.
- ⁵³ NTZIACHRISTOS, Vasilis, et al. Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97.6: 2767-2772. DOI 10.1073/pnas.040570597.
- ⁵⁴ CHERRICK, Gilbert R., et al. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *The Journal of clinical investigation*, 1960, 39.4: 592-600. ISSN 0021-9738. DOI

- 10.1172/JCI104072.
- ⁵⁵ PAULI, Jutta, et al. An in vitro characterization study of new near infrared dyes for molecular imaging. *European journal of medicinal chemistry*, 2009, 44.9: 3496-3503. ISSN 0223-5234. DOI 10.1016/J.EJMECH.2009.01.019.
- ⁵⁶ DE LA TORRE, Gema; CLAESSENS, Christian G.; TORRES, Tomás. Phthalocyanines: old dyes, new materials. Putting color in nanotechnology. *Chemical communications*, 2007, 20: 2000-2015. ISSN 1359-7345. DOI 10.1039/B614234F.
- ⁵⁷ LOBO, Ana CS, et al. Phthalocyanine labels for near-infrared fluorescence imaging of solid tumors. *Journal of medicinal chemistry*, 2016, 59.10: 4688-4696. ISSN 0022-2623. DOI 10.1021/acs.jmedchem.6b00054.
- ⁵⁸ IQBAL, Zafar, et al. Phthalocyanine-Biomolecule Conjugated Photosensitizers for Targeted Photodynamic Therapy and Imaging. *Current drug metabolism*, 2015, 16.9: 816-832. ISSN 13892002. DOI 10.2174/1389200217666151120165404.
- ⁵⁹ SHI, Ch., WU, Jason, B., PAN, D. Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting, and photodynamic therapy. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21.5: 05090. ISSN 1083-3668. DOI 10.1117/1.JBO.21.5.050901.
- ⁶⁰ LOUDET, Aurore; BURGESS, Kevin. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chemical Review*, 2007, 107.11: 4891–4932. DOI 10.1021/CR078381N.
- ⁶¹ DONURU, Venkat R., et al. Near-infrared emissive BODIPY polymeric and copolymeric dyes. *Polymer*, 2010, 51.23: 5359-5368. ISSN 0032-3861. DOI 10.1016/J.POLYMER.2010.09.029.
- ⁶² VOLKOVA, Kateryna D., et al. Spectroscopic study of squaraines as protein-sensitive fluorescent dyes. *Dyes and Pigments*, 2007, 72.3: 285-292. ISSN 0143-7208. DOI 10.1016/J.DYEPIG.2005.09.007.
- ⁶³ HLAVÁČEK, A.; SKLADAL, Petr. The Application of Quantum Dots in Bioanalytical Chemistry. *Chemické listy*, 2011, 105.8:611-615. ISSN 1213-7103.
- ⁶⁴ DABBOUSI, Bashir O., et al. (CdSe) ZnS core– shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1997, 101.46: 9463-9475. DOI 10.1021/JP971091Y.
- ⁶⁵ HERMANSON, G. T. *Bioconjugate techniques*. 2008th ed. 2. Academic

Press: USA. ISBN 978-0-12-370501-3.

- ⁶⁶ HARDMAN, Ron. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environmental health perspectives*, 2006, 114.2: 165-172. ISSN 0091-6765. DOI 10.1289/EHP.8284.
- ⁶⁷ DERFUS, Austin M.; CHAN, Warren CW; BHATIA, Sangeeta N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano letters*, 2004, 4.1: 11-18. DOI 10.1021/NL0347334.
- ⁶⁸ CONTAG, Christopher H.; ROSS, Brian D. It's not just about anatomy: in vivo bioluminescence imaging as an eyepiece into biology. *Journal of magnetic resonance imaging*, 2002, 16.4: 378-387. ISSN 1053-1807. DOI 10.1002/jmri.10178.
- ⁶⁹ NA, Hyon Bin; HYEON, Taeghwan. Nanostructured T1 MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19.35: 6267-6273. ISSN 0959-9428. DOI 10.1039/b902685a.
- ⁷⁰ PERAZELLA, Mark A. Gadolinium-contrast toxicity in patients with kidney disease: nephrotoxicity and nephrogenic systemic fibrosis. *Current drug safety*, 2008, 3.1: 67-75. ISSN 15748863. DOI 10.2174/157488608783333989.
- ⁷¹ GUPTA, Ajay Kumar; GUPTA, Mona. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 2005, 26.18: 3995-4021. ISSN 01429612. DOI 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012.
- ⁷² PARK, J., et al. One-Nanometer-Scale Size-Controlled Synthesis of Monodisperse Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Angewante Chemie*, 2005, 44.19: 2872-2877. ISSN 1433-7851. DOI 10.1002/anie.200461665.
- ⁷³ LEFEBURE, Sandrine, et al. Monodisperse magnetic nanoparticles: preparation and dispersion in water and oils. *Journal Of materials research*, 1998, 13.10: 2975-2981. ISSN 0884-2914. DOI 10.1557/JMR.1998
- ⁷⁴ VESTAL, Christy R.; ZHANG, Z. John. Synthesis of CoCrFeO₄ nanoparticles using microemulsion methods and size-dependent studies of their magnetic properties. *Chemistry of materials*, 2002, 14.9: 3817-3822. DOI 10.1021/CM020112K.
- ⁷⁵ GE, Song, et al. Facile hydrothermal synthesis of iron oxide nanoparticles with tunable magnetic properties. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113.31: 13593-13599. ISSN 1932-7447. DOI 10.1021/jp902953t.

- ⁷⁶ WU, Wei; HE, Quanguo; JIANG, Changzhong. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale research letters*, 2008, 3.11: 397-415. ISSN 1931-7573. DOI 10.1007/s11671-008-9174-9.
- ⁷⁷ COLOMBO, Miriam, et al. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41.11: 4306-4334. ISSN 0306-0012. DOI 10.1039/c2cs15337h.
- ⁷⁸ EL-DAKDOUKI, Mohammad H., et al. A simple method for the synthesis of hyaluronic acid coated magnetic nanoparticles for highly efficient cell labelling and in vivo imaging. *RSC advances*, 2011, 1.8: 1449-1452. ISSN 2046-2069. DOI 10.1039/c1ra00737h.
- ⁷⁹ PAN, Jinbin, et al. Facile preparation of hyaluronic acid and transferrin co-modified Fe₃O₄ nanoparticles with inherent biocompatibility for dual-targeting magnetic resonance imaging of tumors in vivo. *Dalton Transactions*, 2015, 44.46: 19836-19843. ISSN 1477-9226. DOI 10.1039/C5DT02486B.
- ⁸⁰ JADHAV, Neena V., et al. Synthesis of oleic acid functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 108: 158-168. ISSN 09277765. DOI 10.1016/j.colsurfb.2013.02.035.
- ⁸¹ MONDINI, Sara, et al. One-step synthesis and functionalization of hydroxyl-decorated magnetite nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 2008, 322.1: 173-179. ISSN 0021-9797. DOI 10.1016/J.JCIS.2008.03.008.
- ⁸² CHASTELLAIN, M.; PETRI, A.; HOFMANN, H. Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 2004, 278.2: 353-360. ISSN 0021-9797. DOI 10.1016/J.JCIS.2004.06.025.
- ⁸³ YOO, Dongwon, et al. Theranostic magnetic nanoparticles. *Accounts of chemical research*, 2011, 44.10: 863-874. ISSN 0001-4842. DOI 10.1021/ar200085c.
- ⁸⁴ CLEMENTE-CASARES, Xavier; SANTAMARIA, Pere. Nanomedicine in autoimmunity. *Immunology letters*, 2014, 158.1-2: 167-174. ISSN 0165-2478. DOI 10.1016/J.IMLET.2013.12.018.
- ⁸⁵ ŠMEJKALOVÁ, Daniela, et al. Selective in vitro anticancer effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles loaded in hyaluronan

- polymeric micelles. *Biomacromolecules*, 2014, 15.11: 4012-4020. ISSN 1525-7797. DOI 10.1021/bm501065q.
- ⁸⁶ MOK, Hyejung; ZHANG, Miqin. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-based delivery systems for biotherapeutics. *Expert opinion on drug delivery*, 2013, 10.1: 73-87. ISSN 1742-5247. DOI 10.1517/17425247.2013.747507.
- ⁸⁷ LYER, Stefan, et al. Visualisation of tumour regression after local chemotherapy with magnetic nanoparticles—a pilot study. *Anticancer research*, 2010, 30.5: 1553-1557. ISSN 1791-7530.
- ⁸⁸ LI, L., et al. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI contrast agents for Non-invasive Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics*, 2013, 3.8: p. 595–615. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno.5366.
- ⁸⁹ SHI, Jiyun, et al. Evaluation of ¹¹¹In-labeled cyclic RGD peptides: effects of peptide and linker multiplicity on their tumor uptake, excretion kinetics and metabolic stability. *Theranostics*, 2011, 1: 322-340. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno/v01p0322.
- ⁹⁰ ZAIDI, Habib. *Molecular imaging of small animals*. New York, NY, USA: Springer, 2014. Zaidi, H. *Molecular imaging of small animals. Instrumentation and applications.*; Springer: New York, 2014. ISBN 978-1-4939-0894-3.
- ⁹¹ RÖSCH, Frank; BAUM, Richard P. Generator-based PET radiopharmaceuticals for molecular imaging of tumours: on the way to THERANOSTICS. *Dalton transactions*, 2011, 40.23: 6104-6111. ISSN 1477-9226. DOI 10.1039/c0dt01504k.
- ⁹² ZHANG, Y., YANG, Y., CAI W Multimodality Imaging of Integrin $\alpha\beta 3$ Expression. *Theranostics*, 2011, 1: 135-148. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno/v01p0135.
- ⁹³ PILLAI, Omathanu; PANCHAGNULA, Ramesh. Polymers in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*, 2001, 5.4: 447-451. DOI 1367-5931.
- ⁹⁴ SCHMALJOHANN, Dirk. Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 2006, 58.15: 1655-1670. ISSN 0169409X. DOI 10.1016/j.addr.2006.09.020.
- ⁹⁵ WEISSMANN, Bernard; MEYER, Karl. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical Cord1, 2. *Journal of the american chemical society*, 1954, 76.7: 1753-1757. ISSN 0002-7863. DOI 10.1021/ja01636a010.

- ⁹⁶ LAPČÍK, Lubomír, et al. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chemical reviews*, 1998, 98.8: 2663-2684. ISSN 1520-6890.
- ⁹⁷ TØMMERAAS, Kristoffer, et al. New amphiphilic hyaluronan derivatives based on modification with alkenyl and aryl succinic anhydrides. *Carbohydrate polymers*, 2011, 85.1: 173-179. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2011.02.011.
- ⁹⁸ SCHANTÉ, Carole E., et al. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 2011, 85.3: 469-489. ISSN 10.1016/J.CARBPOL.2011.03.019. DOI 0144-8617.
- ⁹⁹ IZAWA, Naoki, et al. Streptococcus thermophilus produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2009, 107.2: 119-123. ISSN 1389-1723. DOI 10.1016/J.JBIOOSC.2008.11.007.
- ¹⁰⁰ BERGMAN, Kristoffer, et al. Hyaluronic acid derivatives prepared in aqueous media by triazine-activated amidation. *Biomacromolecules*, 2007, 8.7: 2190-2195. ISSN 1525-7797. DOI 10.1021/bm0701604.
- ¹⁰¹ PELLETIER, S., et al. Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate: synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 43.4: 343-349. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/S0144-8617(00)00188-0.
- ¹⁰² OH, Eun Ju, et al. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *Journal of Controlled Release*, 2010, 141.1: 2-12. ISSN 0168-3659. DOI 10.1016/J.JCONREL.2009.09.010.
- ¹⁰³ DANISHEFSKY, I. Conversion of carboxyl groups of mucopolysaccharides into amides of amino acid esters. *Carbohydr Res*, 1971, 16: 199-205. ISSN DOI 0008-6215. 10.1016/S0008-6215(00)86114-5.
- ¹⁰⁴ NAKAJIMA, Naoki; IKADA, Yoshito. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate chemistry*, 1995, 6.1: 123-130. ISSN 1043-1802. DOI 10.1021/bc00031a015.
- ¹⁰⁵ BULPITT, Paul; AESCHLIMANN, Daniel. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *Journal*

- of biomedical materials research*, 1999, 47.2: 152-169. ISSN 0021-9304. DOI 10.1002/(SICI)1097-4636(199911)47:2<152::AID-JBM5>3.0.CO;2-I.
- ¹⁰⁶ D'ESTE, Matteo; EGLIN, David; ALINI, Mauro. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to hyaluronan in water. *Carbohydrate polymers*, 2014, 108: 239-246. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2014.02.070.
- ¹⁰⁷ BELLINI, D; TOPAI, A. *Amides of hyaluronic acid and the derivatives thereof and a process for their preparation*. Patentová přihláška, WO2000001733A1. 2001-01-13.
- ¹⁰⁸ FIDIA FARMACEUTICI SPA. *Esters of hyaluronic acid*. Patent US4851521A. 1985-07-08.
- ¹⁰⁹ HUIN-AMARGIER, Cécile, et al. New physically and chemically crosslinked hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2006, 76.2: 416-424. ISSN 1549-3296. DOI 10.1002/jbm.a.30536.
- ¹¹⁰ HIRANO, Kana, et al. Preparation of the methyl ester of hyaluronan and its enzymatic degradation. *Carbohydrate research*, 2005, 340.14: 2297-2304. ISSN 0008-6215. DOI 10.1016/j.carres.2005.07.016.
- ¹¹¹ BENCHERIF, Sidi A., et al. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials*, 2008, 29.12: 1739-1749. ISSN 01429612. DOI 10.1016/j.biomaterials.2007.11.047.
- ¹¹² TØMMERAAS, Kristoffer; EENSCHOOTEN, Corinne. *Aryl/alkyl succinic anhydride hyaluronan derivatives*. U.S. Patent Application No 13/554,190, 2012.
- ¹¹³ PRAVATA, Laurent, et al. New amphiphilic lactic acid oligomer-hyaluronan conjugates: synthesis and physicochemical characterization. *Biomacromolecules*, 2007, 9.1: 340-348. ISSN 1525-7797. DOI 10.1021/bm700843m.
- ¹¹⁴ HUERTA-ANGELES, Gloria, et al. Novel synthetic method for the preparation of amphiphilic hyaluronan by means of aliphatic aromatic anhydrides. *Carbohydrate polymers*, 2014, 111: 883-891. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2014.05.
- ¹¹⁵ AESCHLIMANN, Daniel; BULPITT, Paul. *Functionalized derivatives of*

- hyaluronic acid, formation of hydrogels in situ using same, and methods for making and using same.* U.S. Patent No 7,196,180, 2007.
- ¹¹⁶ KUO, J. W. *Practical aspects of hyaluronan based medical products.* CRC Press, 2005. ISBN 9780849333248.
- ¹¹⁷ ŠEDOVIÁ, Petra, et al. Preparation of hyaluronan polyaldehyde—a precursor of biopolymer conjugates. *Carbohydrate research*, 2013, 371: 8-15. ISSN 0008-6215. DOI 10.1016/J.CARRES.2013.01.025.
- ¹¹⁸ CRESCENZI, Vittorio, et al. New cross-linked and sulfated derivatives of partially deacetylated hyaluronan: Synthesis and preliminary characterization. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 2002, 64.2: 86-94. ISSN 0006-3525. DOI 10.1002/bip.10131.
- ¹¹⁹ SALL, Ibrahima; FÉRARD, Georges. Comparison of the sensitivity of 11 crosslinked hyaluronic acid gels to bovine testis hyaluronidase. *Polymer degradation and stability*, 2007, 92.5: 915-919. ISSN 0141-3910. DOI 10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2006.11.020.
- ¹²⁰ POUYANI, Tara; PRESTWICH, Glenn D. Functionalized derivatives of hyaluronic acid oligosaccharides: drug carriers and novel biomaterials. *Bioconjugate chemistry*, 1994, 5.4: 339-347. ISSN 1043-1802. DOI 10.1021/bc00028a010.
- ¹²¹ BALAZS, Endre A.; LESHCHINER, Adolf. *Cross-linked gels of hyaluronic acid and products containing such gels.* U.S. Patent No 4,582,865, 1986.
- ¹²² TOMIHATA, Kenji; IKADA, Yoshito. Crosslinking of hyaluronic acid with glutaraldehyde. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 1997, 35.16: 3553-3559. ISSN 0887-624X. DOI 10.1002/(SICI)1099-0518(19971130)35:16<3553::AID-POLA22>3.0.CO;2-D.
- ¹²³ CRESCENZI, Vittorio, et al. NMR structural study of hydrogels based on partially deacetylated hyaluronan. *Macromolecular bioscience*, 2002, 2.6: 272-279. ISSN 16165187. DOI 10.1002/1616-5195(200208)2:6<272::AID-MABI272>3.0.CO;2-V.
- ¹²⁴ PLATT, Virginia M.; SZOKA JR, Francis C. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Molecular pharmaceuticals*, 2008, 5.4: 474-486. ISSN 1543-8384. DOI 10.1021/mp800024g.
- ¹²⁵ QIU, Lipeng, et al. Mechanisms of cellular uptake with hyaluronic acid—octadecylamine micelles as drug delivery nanocarriers. *RSC Advances*,

2016, 6.46: 39896-39902. ISSN 2046-2069. DOI 10.1039/C5RA27532F.

- ¹²⁶ CHOI, Ki Young, et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution. *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19.24: 4102-4107. ISSN 0959-9428. DOI 10.1039/b900456d.
- ¹²⁷ CHOI, Ki Young, et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials*, 2010, 31.1: 106-114. ISSN 01429612. DOI 10.1016/j.biomaterials.2009.09.030.
- ¹²⁸ CHOI, Ki Young, et al. PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo. *Biomaterials*, 2011, 32.7: 1880-1889. ISSN 01429612. DOI 10.1016/j.biomaterials.2010.11.010.
- ¹²⁹ LEE, Dong-Eun, et al. Amphiphilic hyaluronic acid-based nanoparticles for tumor-specific optical/MR dual imaging. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22.21: 10444-10447. ISSN 0959-9428. DOI 10.1039/c2jm31406a.
- ¹³⁰ MIKI, Koji, et al. Near-infrared dye-conjugated amphiphilic hyaluronic acid derivatives as a dual contrast agent for in vivo optical and photoacoustic tumor imaging. *Biomacromolecules*, 2014, 16.1: 219-227. ISSN 1525-7797. DOI 10.1021/bm501438e.
- ¹³¹ KELKAR, Sneha S., et al. Near infrared fluorescent nanoparticles based on hyaluronic acid: self-assembly, optical properties, and cell interaction. *Acta biomaterialia*, 2016, 36: 112-121. ISSN 1742-7061. DOI 10.1016/J.ACTBIO.2016.03.024.
- ¹³² HILL, Tanner K., et al. Near infrared fluorescent nanoparticles derived from hyaluronic acid improve tumor contrast for image-guided surgery. *Theranostics*, 2016, 6.13: 2314. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno.16514.
- ¹³³ LI, Sanpeng, et al. Dual-modal imaging-guided highly efficient photothermal therapy using heptamethine cyanine-conjugated hyaluronic acid micelles. *Biomaterials science*, 2017, 5.6: 1122-1129. ISSN 2047-4849. DOI 10.1039/c7bm00230k.
- ¹³⁴ LI, Wenjun, et al. Smart hyaluronidase-activated theranostic micelles for dual-modal imaging guided photodynamic therapy. *Biomaterials*, 2016, 101: 10-19. ISSN 01429612. DOI 10.1016/j.biomaterials.2016.05.019.
- ¹³⁵ CHO, Hyun-Jong, et al. Hyaluronic acid-ceramide-based optical/MR dual imaging nanoprobe for cancer diagnosis. *Journal of controlled release*, 2012, 162.1: 111-118. ISSN 1873-4995. DOI

- 10.1016/j.jconrel.2012.06.01.
- ¹³⁶ LIN, Chun-Jui, et al. Integrated self-assembling drug delivery system possessing dual responsive and active targeting for orthotopic ovarian cancer theranostics. *Biomaterials*, 2016, 90: 12-26. ISSN 01429612. DOI 10.1016/j.biomaterials.2016.03.005.
- ¹³⁷ KARANDE, Pankaj; MITRAGOTRI, Samir. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2009, 1788.11: 2362-2373. ISSN DOI 0005-2736. 10.1016/J.BBAMEM.2009.08.015.
- ¹³⁸ KONG, Ming, et al. Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 86.2: 837-843. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2011.05.027.
- ¹³⁹ LAPTEVA, Maria, et al. Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: a targeted approach for the treatment of psoriasis. *Molecular pharmaceuticals*, 2014, 11.9: 2989-3001. ISSN 1543-8384. DOI 10.1021/mp400639e.
- ¹⁴⁰ YANG, Yang; BUGNO, Jason; HONG, Seungpyo. Nanoscale polymeric penetration enhancers in topical drug delivery. *Polymer Chemistry*, 2013, 4.9: 2651-2657. ISSN 1759-9954. DOI 10.1039/c3py00049d.
- ¹⁴¹ WU, Xiao; PRICE, Gareth J.; GUY, Richard H. Disposition of nanoparticles and an associated lipophilic permeant following topical application to the skin. *Molecular pharmaceuticals*, 2009, 6.5: 1441-1448. ISSN 1543-8384. DOI 10.1021/mp9001188.
- ¹⁴² BROWN, Marc B.; JONES, Stuart A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2005, 19.3: 308-318. ISSN 0926-9959. DOI 10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x.
- ¹⁴³ PAPAKONSTANTINO, Eleni; ROTH, Michael; KARAKIULAKIS, George. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-endocrinology*, 2012, 4.3: 253-258. ISSN 1938-1980. DOI 10.4161/derm.21923.
- ¹⁴⁴ CILURZO, Francesco, et al. The role of the conformational profile of polysaccharides on skin penetration: the case of hyaluronan and its sulfates. *Chemistry & biodiversity*, 2014, 11.4: 551-561. ISSN 16121872. DOI 10.1002/cbdv.201300130.
- ¹⁴⁵ KONG, Ming, et al. Construction of hyaluronic acid noisome as functional

- transdermal nanocarrier for tumor therapy. *Carbohydrate polymers*, 2013, 94.1: 634-641. ISSN 01448617. DOI 10.1016/j.carbpol.2013.01.091.
- ¹⁴⁶ MOURA NETO, Érico de, et al. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2011, 22.10: 1953-1960. ISSN 0103-5053. DOI 10.1590/S0103-50532011001000017.
- ¹⁴⁷ PODZIMEK, Stepan, et al. Solution properties of hyaluronic acid and comparison of SEC-MALS-VIS data with off-line capillary viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 116.5: 3013-3020. ISSN 10.1002/app.31834. DOI 00218995.
- ¹⁴⁸ YE, Yunpeng, et al. Multivalent carbocyanine molecular probes: synthesis and applications. *Bioconjugate chemistry*, 2005, 16.1: 51-61. DOI 10.1021/BC049790I.
- ¹⁴⁹ ZHANG, Zongren; ACHILEFU, Samuel. Design, synthesis and evaluation of near-infrared fluorescent pH indicators in a physiologically relevant range. *Chemical Communications*, 2005, 47: 5887-5889. ISSN 1359-7345. DOI 10.1039/b512315a.
- ¹⁵⁰ SMEJKALOVA, Daniela, et al. *C6-C18-Acylated Derivative of Hyaluronic Acid, Method of Preparation Thereof, Nanomicellar Composition on its Basis, Method of Preparation Thereof and Method of Preparation Stabilized Nanomicellar Composition, and Use Thereof*. U.S. Patent Application No 14/647,626, 2015.
- ¹⁵¹ PAUL, Rolf; ANDERSON, George W. N, N'-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent1. *Journal of the American Chemical Society*, 1960, 82.17: 4596-4600. ISSN 0002-7863. DOI 10.1021/ja01502a038.
- ¹⁵² MONTALBETTI, Christian AGN; FALQUE, Virginie. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005, 61.46: 10827-10852. DOI 10.1016/j.tet.2005.08.031.
- ¹⁵³ XIONG, Biquan, et al. CDI-promoted direct esterification of P (O)-OH compounds with phenols. *Tetrahedron Letters*, 2017, 58.25: 2482-2486. ISSN 0040-4039. DOI 10.1016/J.TETLET.2017.05.036.
- ¹⁵⁴ HUSSAIN, Muhammad Ajaz; LIEBERT, Tim; HEINZE, Thomas. Acylation of Cellulose with N, N'-Carbonyldiimidazole-Activated Acids in the Novel Solvent Dimethyl Sulfoxide/Tetrabutylammonium Fluoride. *Macromolecular rapid communications*, 2004, 25.9: 916-920. ISSN 1022-1336. DOI 10.1002/marc.200300308.
- ¹⁵⁵ BORGIA, S. Lombardi, et al. Lipid nanoparticles for skin penetration

- enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and piezoelectric spectroscopy. *Journal of Controlled Release*, 2005, 110.1: 151-163. ISSN 01683659. DOI 10.1016/j.jconrel.2005.09.045.
- ¹⁵⁶ VIDLÁŘOVÁ, Lucie, et al. Effect of lipid nanoparticle formulations on skin delivery of a lipophilic substance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 108: 289-296. ISSN 09396411. DOI 10.1016/j.ejpb.2016.07.016.
- ¹⁵⁷ JOSE, Jiney; BURGESS, Kevin. Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules. *Tetrahedron*, 2006, 62.48: 11021-11037. ISSN 0040-4020. DOI 10.1016/j.tet.2006.08.056.
- ¹⁵⁸ MARTINEZ, Vincent; HENARY, Maged. Nile Red and Nile Blue: applications and syntheses of structural analogues. *Chemistry-A European Journal*, 2016, 22.39: 13764-13782. ISSN 09476539. DOI 10.1002/chem.201601570.
- ¹⁵⁹ BUFFA, Radovan, et al. *Oxidized derivative of hyaluronic acid, a method of preparation thereof and a method of modification thereof*. U.S. Patent No 9,403,918, 2016.
- ¹⁶⁰ HUERTA-ANGELES, Gloria, et al. Reductive alkylation of hyaluronic acid for the synthesis of biocompatible hydrogels by click chemistry. *Carbohydrate polymers*, 2012, 90.4: 1704-1711. ISSN 01448617. DOI 10.1016/j.carbpol.2012.07.054.
- ¹⁶¹ HUERTA-ANGELES, Gloria, et al. Synthesis of photo-crosslinkable hyaluronan with tailored degree of substitution suitable for production of water resistant nanofibers. *Carbohydrate polymers*, 2016, 137: 255-263. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2015.10.077.
- ¹⁶² HUERTA-ANGELES, Gloria, et al. Linolenic acid grafted hyaluronan: Process development, structural characterization, biological assessing, and stability studies. *Carbohydrate polymers*, 2016, 152: 815-824. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2016.07.030.
- ¹⁶³ KLIBANOV, Aleksander L., et al. Activity of amphipathic poly (ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1991, 1062.2: 142-148. ISSN 0006-3002.
- ¹⁶⁴ MOGHIMI, S. Moein; HUNTER, A. Christy; MURRAY, J. Clifford. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to

- practice. *Pharmacological reviews*, 2001, 53.2: 283-318. ISSN 0031-6997.
- ¹⁶⁵ MOGHIMI, S. Moein; SZEBENI, Janos. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in lipid research*, 2003, 42.6: 463-478. ISSN 0163-7827.
- ¹⁶⁶ CHOI, Hak Soo, et al. Tissue-and organ-selective biodistribution of NIR fluorescent quantum dots. *Nano letters*, 2009, 9.6: 2354-2359. ISSN 1530-6984. DOI 10.1021/nl900872r.
- ¹⁶⁷ OZEL, Fatmahan, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: effect of iron oleate precursors obtained with a simple way. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 2013, 24.8: 3073-3080. ISSN 0957-4522. DOI 10.1007/s10854-013-1213-3.
- ¹⁶⁸ ROCA, A. G.; MORALES, M. P.; SERNA, C. J. Synthesis of monodispersed magnetite particles from different organometallic precursors. *IEEE Transactions on Magnetics*, 2006, 42.10: 3025-3029. ISSN 0018-9464. DOI 10.1109/TMAG.2006.88011.
- ¹⁶⁹ BRONSTEIN, Lyudmila M., et al. Influence of iron oleate complex structure on iron oxide nanoparticle formation. *Chemistry of materials*, 2007, 19.15: 3624-3632. DOI 10.1021/CM062948J.
- ¹⁷⁰ WILLIAM, W. Yu, et al. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chemical Communications*, 2004, 20: 2306-2307. ISSN 1359-7345. DOI 10.1039/b409601k.
- ¹⁷¹ LYNCH, Jared, et al. Gas-bubble effects on the formation of colloidal iron oxide nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133.32: 12664-12674. ISSN 0002-7863. DOI 10.1021/ja2032597.
- ¹⁷² BARUI, Ananya, et al. Ex vivo bio-compatibility of honey-alginate fibrous matrix for HaCaT and 3T3 with prime molecular expressions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2014, 25.12: 2659-2667. ISSN 0957-4530. DOI 10.1007/s10856-011-4456-7.
- ¹⁷³ XIA, Menghang, et al. Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environmental health perspectives*, 2008, 116.3: 284. ISSN 0091-6765. DOI 10.1289/ehp.10727.
- ¹⁷⁴ ACHILEFU, Samuel, et al. Novel receptor-targeted fluorescent contrast agents for in vivo tumor imaging. *Investigative radiology*, 2000, 35.8: 479-485. ISSN 0020-9996.
- ¹⁷⁵ MAEDA, Hiroshi, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect

- in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release*, 2000, 65.1-2: 271-284. ISSN 0168-3659.
- ¹⁷⁶ JIANG, Wen, et al. WNT5A inhibits metastasis and alters splicing of CD44 in breast cancer cells. *PloS one*, 2013, 8.3: e58329. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0058329.
- ¹⁷⁷ ZHOU, Bin, et al. Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275.48: 37733-37741. ISSN 0021-9258. DOI 10.1074/jbc.M003030200.
- ¹⁷⁸ JARACZ, Stanislav, et al. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2005, 13.17: 5043-5054. ISSN 0968-0896. DOI 10.1016/J.BMC.2005.04.084.
- ¹⁷⁹ HUNTER JR, Kenneth W., et al. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Experimental and molecular pathology*, 2007, 82.1: 12-24. ISSN 0014-4800. DOI 10.1016/J.YEXMP.2006.06.007.
- ¹⁸⁰ RAJARAJAN, Abirami, et al. Variant CD44 expression by human fibroblasts. *Biomarkers*, 2008, 13.3: 307-318. ISSN 1354-750X. DOI 10.1080/13547500701800056.

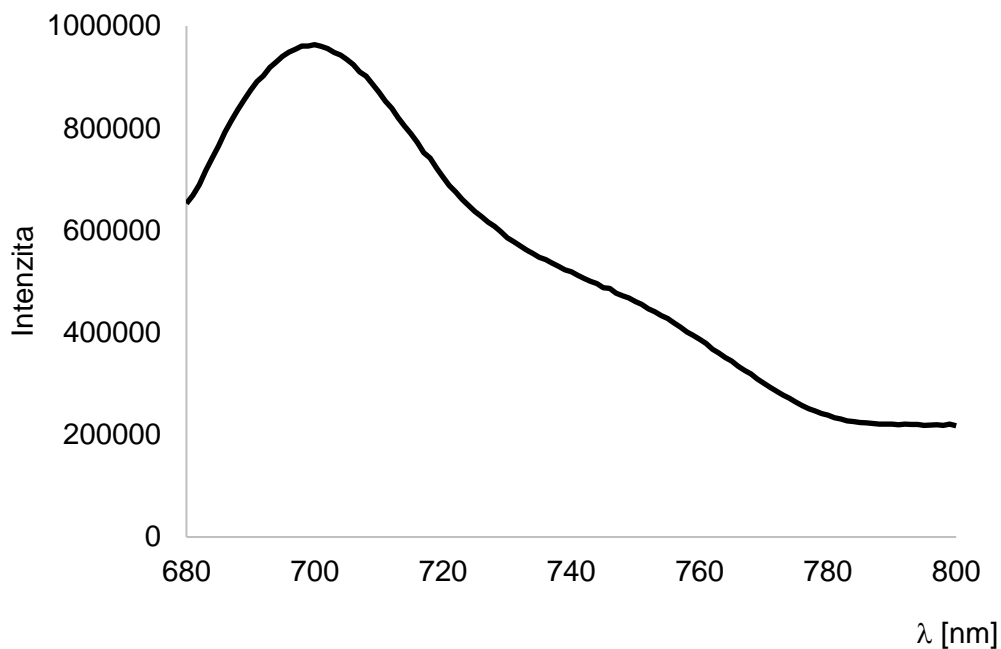
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AcNM-TEMPO	4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl, volný radikál
C18:1	oleyl
C6	hexyl
CDI	<i>N,N</i> -karbonyldiimidazol, systematicky di-(1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)methanon)
CT	počítačová tomografie
cmc	kritická micelární koncentrace
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylaethylamin
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMEM	Dulbeccoem modifikované Eaglovo médium
DMTMM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4- <i>N</i> -methylmorfolinium-chlorid
EDC	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
ekv.	ekvivalent
EPR	efekt zvýšené permeability a retence
HA	hyaluronan
HA-C6	hyaluronan modifikovaný řetězci kyseliny hexanové
HA-C18:1	hyaluronan modifikovaný řetězci kyseliny olejové
HA-cypate	hyaluronan modifikovaný cypate
HA-NM	hyaluronan modifikovaný nilskou modří
HA-PEG	hyaluronan modifikovaný poly(ethylenglykolem)
HAH	kyselina hyaluronová
HoBt	1-hydroxybenzotriazolu
HSTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -sukcinimidyl)uronium-hexafluorfosfát
iPrOH	propan-2-ol

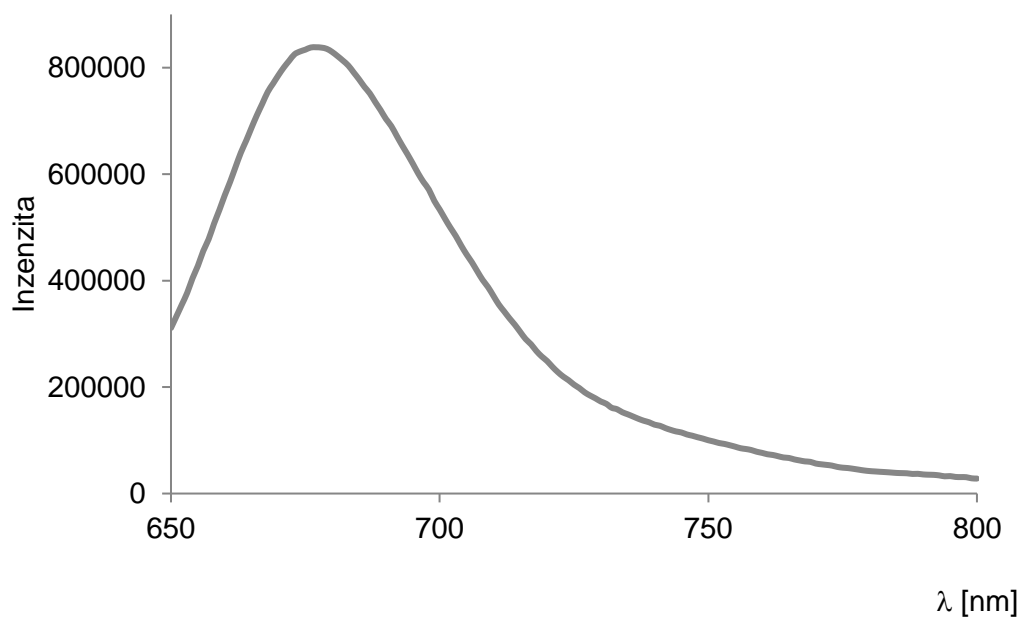
ICG	indocyaninová zeleň
MRI	zobrazování magnetickou resonancí
NIR	blízká infračervená oblast
NHDF	lidské dermální fibroblasty
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NIH-3T3	myší fibroblasty
NM	nilská modř
PBS	roztok fosfátového pufru
PEG	poly(ethylen glykol), systematicky poly(oxyethylen), poly(ethylenoxid)
PET	pozitronová emisní tomografie
PM	polymerní micely
PVA	poly(vinylalkohol)
QD	kvantové tečky
RVO	rotační vakuová odparka
SO	stupeň oxidace
SPION	superparamagnetické nanočástice oxidů železa
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie
SS	stupeň substituce
TBA	tetrabutylamonium
TEA	triethylamin
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TG	termogravimetrie

PŘÍLOHY

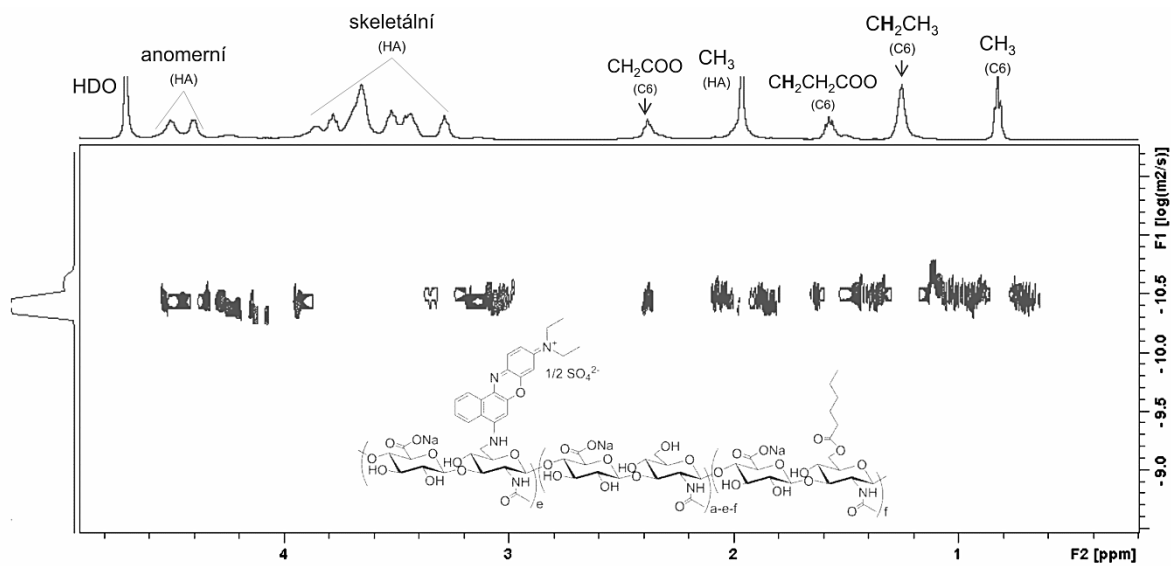
Příloha 1: Emise záření **HA-cypate** s maximem při $\lambda = 699$ nm, (excitace $\lambda = 665$ nm), měřeno v oblasti 680–800 nm.



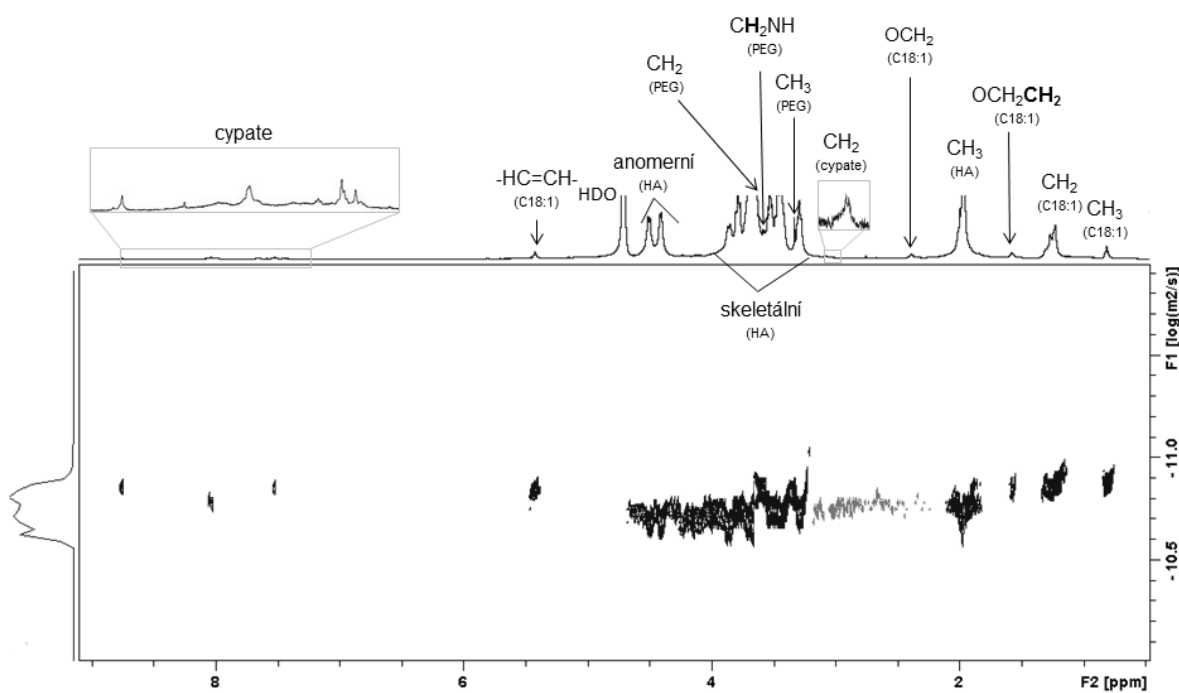
Příloha 2: Emise záření **HA-NM** s maximem při $\lambda = 675$ nm, (excitace $\lambda = 635$ nm), měřeno v oblasti 650–800 nm.



Příloha 3: DOSY spektrum látky **HA-NM-C6** (D_2O).



Příloha 4: DOSY spektrum látky **HA-cypate-C18:1-PEG** (Metoda B).



PUBLIKAČNÍ AKTIVITY AUTORA

Publikace v odborných impaktovaných časopisech

ACHBERGEROVÁ, E., ŠMEJKALOVÁ, D., HUERTA-ANGELES, G., SOUČEK, K., HERMANNOVÁ, M., VÁGNEROVÁ, H., VÍCHA, R., VELEBNÝ, V. In vivo monitoring of tumor distribution of hyaluronan polymeric micelles labeled or loaded with near-infrared fluorescence dye. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 198: 339-347. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2018.06.082.

ŠMEJKALOVÁ, D., MUTHNÝ, T., NEŠPOROVÁ, K., HERMANNOVÁ, M., ACHBERGEROVÁ, E., HUERTA-ANGELES, G., SVOBODA, M., ČEPA, M., MACHALOVÁ, V., LUPTÁKOVÁ, D., VELEBNÝ, V. Hyaluronan polymeric micelles for topical drug delivery. *Carbohydrate polymers*, 2017, 156: 86-96. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2016.09.013.

Patentové přihlášky

ACHBERGEROVÁ, E., ŠMEJKALOVÁ, D., HUERTA-ANGELES, G., HERMANNOVÁ, M., SOUČEK, K., VELEBNÝ, V. Fluorescenční konjugát kyseliny hyaluronové nebo jeho sůl, hydrofobizovaný konjugát, způsoby jejich přípravy a použití. Spis PV 2015-P36 ze dne 23. 12. 2015 (v řízení).

ACHBERGEROVÁ, E., ŠMEJKALOVÁ, D., HUERTA-ANGELES, G., HERMANNOVÁ, M., SOUČEK, K., VELEBNÝ, V. *Fluorescent cypate conjugate of hyaluronic acid or salt thereof, hydrophobized conjugate, methods of preparation and use thereof* (patentová přihláška) WO2017108015A1.

Příspěvek ve sborníku

ACHBERGEROVÁ, E., ŠMEJKALOVÁ, D., HUERTA-ANGELES, G., NEŠPOROVÁ, K., ČEPA, M., VELEBNÝ, V. Fluorescently labelled nanocarriers based on hyaluronic acid: synthesis and *in vitro* studies. *12th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience*, Prague, Czech Republic, 2016

Příspěvky na konferencích

ŠMEJKALOVÁ, D., ACHBERGEROVÁ, E., HUERTA-ANGELES, G., SOUČEK, K., HERMANNOVÁ, M., ŠIMEK, M., ČEPA, M., VELEBNÝ, V. Non invasive *in vivo* tumor imaging by NIR labeled Amphiphilic Hyaluronan, *11th International Conference on Hyaluronan*, Cleveland, OH, USA, 2017. (poster)

ACHBERGEROVÁ, E., ŠMEJKALOVÁ, D., HUERTA-ANGELES, G., NEŠPOROVÁ, K., ČEPA, M., ŠOGÓRKOVÁ, J., VELEBNÝ, V. Fluorescently labelled nanocarriers based on hyaluronic acid: synthesis and *in vitro* studies. *12th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience*, Prague, Czech Republic, 2016 (prezentace)

ŠMEJKALOVÁ, D., NEŠPOROVÁ, K., ČEPA, M., HUERTA-ANGELES, G., HERMANNOVÁ, M., ACHBERGEROVÁ, E., MUTHNÝ, T., VELEBNÝ, V. Topical drug delivery by hyaluronan polymeric micelles. *10th World Biomaterials Congress*, Montréal, Canada, 2016 (prezentace)

ŠMEJKALOVÁ, D., MUTHNÝ, T., KULHÁNEK, J., HERMANNOVÁ, M., NEŠPOROVÁ, K., ACHBERGEROVÁ, E., HUERTA-ANGELES, G., SVOBODA, M., VELEBNÝ, V. Hyaluronan polymeric micelles as a topical drug delivery. *10th International conference on Hyaluronan*, Florence, Italy, 2015 (poster)

ODBORNÝ ŽIVOTOPIS AUTORA

Jméno a příjmení Eva Achbergerová
Datum a místo narození 13. 5. 1988 v Přerově
Kontakt evaachbergerova@seznam.cz

Pracovní zkušenosti

12/2017 – doposud CEBIA-Tech, Zlín
6/2017 – 9/2017 KU Leuven Belgium, Faculty of Science, Department of
Chemistry – pracovní stáž
9/2015 – 12/2016 Contipro a.s., Dolní Dobrouč
R&D Nosičové systémy
09/2013 – 2/2015 Contipro Pharma a.s., Dolní Dobrouč
R&D Nosičové systémy

Vzdělání:

9/2013 – doposud Ph.D. doktorské studium; UTB ve Zlíně
Chemie a technologie materiálů
Ústav chemie (Vývoj vhodné modifikace
hydrofobizované kyseliny hyaluronové pro
přípravu teranostik.)
9/2011 – 6/2013 Magisterský stupeň (Ing.); UTB ve Zlíně,
Chemie potravin a bioaktivních látek
Ústav chemie (Sulfonované azosloučeniny
substituované 1-adamantylem: syntéza a studium
komplexace s cyklodextriny.)
9/2008 – 6/2011 Bakalářský stupeň (Bc.); UTB ve Zlíně
Chemie a technologie potravin
Ústav chemie (Syntéza a spektrální vlastnosti
sulfonovaných azobarviv substituovaných 1-
adamantylem.)
9/1999 – 6/2007 Gymnázium Svatopluka Čecha Kojetín (všeobecné)

Eva Achbergerová

**Vývoj vhodné modifikace hydrofobizované kyseliny hyaluronové
pro přípravu teranostik**

Development of modified hydrophobized hyaluronic acid useful for theranostics
preparation

Disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Eva Achbergerová

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2018