

Vývoj vhodné modifikace hydrofobizované kyseliny hyaluronové pro přípravu teranostik

Ing. Eva Achbergerová, Ph.D.

Teze disertační práce

Teze 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, Ph.D.

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.

Oponenti: Prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc.

Dr.h.c. prof. Ing. Dušan Bakoš, DrSc.

doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Zlín, říjen 2018

© Eva Achbergerová

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.

Publikace byla vydána v roce 2018

Klíčová slova: 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: 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

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7454-794-2

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 doručených 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..... | 3 |
| Abastract | 4 |
| Úvod..... | 7 |
| Cíle práce | 9 |
| 1. TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1.1 Multifunkční nosičové systémy a teranostika | 11 |
| 1.2 Základní typy a morfologie nosičů léčiv | 12 |
| 1.3 Cílení..... | 13 |
| 1.3.1 Pasivní cílení..... | 13 |
| 1.3.2 Aktivní cílení | 13 |
| 1.4 Metody a kontrastní látky používané pro zobrazování | 13 |
| 1.4.1 Fluorescenční zobrazování | 14 |
| 1.4.2 Zobrazování a kontrastní látky pro magnetickou rezonanci | 14 |
| 1.5 Hyaluronan | 15 |
| 1.6 Chemické modifikace hylauronanu..... | 16 |
| 1.6.1 Modifikace karboxylové funkční skupiny | 16 |
| 1.6.2 Modifikace hydroxylových skupin | 17 |
| 1.6.3 Příprava dalších funkčních skupin na HA řetězci..... | 17 |
| 1.7 Teranostické nosičové systémy připravené z derivátů HA | 18 |
| 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 21 |
| 2.1 Přístrojové vybavení a metody analýz | 21 |
| 2.2 <i>In vitro</i> experimenty | 22 |
| 2.3 <i>In vivo</i> experimenty..... | 22 |
| 3. VÝSLEDKY A DISKUZE | 23 |
| 3.1 Syntéza derivátů hyaluronanu | 23 |
| 3.2 Fluorescenční značení hyaluronanu | 23 |
| 3.2.1 Modifikace hyaluronanu látkou cypate..... | 23 |
| 3.2.2 Syntéza hyaluronanu značeného nilskou modří..... | 25 |
| 3.3 Hydrofobizace fluorescenčních derivátů hyaluronanu..... | 26 |
| 3.3.1 Hydrofobizace hyaluronanu kyselinou kapronovou | 26 |
| 3.3.2 Hydrofobizace hyaluronanu kyselinou olejovou. | 26 |
| 3.4 Příprava série derivátů hyaluronanu modifikovaných poly(ethylenglykolem)..... | 28 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.5 | Příprava a charakterizace superparamagnetických nanočástic oxidů železa..... | 30 |
| 3.5.1 | Syntéza oleátu železitého | 30 |
| 3.5.2 | Syntéza nanočástic na povrchu modifikovaných kyselinou olejovou..... | 30 |
| 3.5.3 | Stanovení množství vázané kyseliny olejové pomocí TG..... | 31 |
| 4. | Biologické testování derivátů hylauronanu značeného cypate..... | 32 |
| 4.1 | <i>In vivo</i> biodistribuce HA-Cypate-C18:1 ve zdravých myších..... | 32 |
| 4.2 | <i>In vivo</i> biodistribuce HA-cypate-C18:1 v myších s nádorem..... | 32 |
| 4.3 | Protinádorový účinek nosičových systémů na bázi HA-cypate-C18:1 | 33 |
| 5. | Testování derivátů hylauronanu značeného nilskou modří <i>in vitro</i> | 33 |
| 5.1 | Penetrace derivátů hyaluronanu kůží..... | 33 |
| 5.2 | Vstup látek do buněk | 34 |
| 6. | ZÁVĚR A PŘÍNOS PRÁCE..... | 35 |
| | Seznam použité literatury | 38 |
| | Seznam použitých symbolů a zkratk | 44 |
| | Publikační aktivity autora..... | 45 |
| | Odborný životopis autora | 47 |

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 systémů 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 nejprve objasněn význam a potenciál nosičových systémů v oblasti doručování léčiv a také jejich nejběžnější morfologie. Vzhledem k zaměření doktorského studia se další kapitola zabývá kontrastními látkami a metodami využívanými pro neinvazivní zobrazování a diagnostiku. Rozsáhlejší 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 je popsáno přístrojové vybavení, techniky měření a biologického testování. V navazující kapitole jsou uvedeny a diskutovány výsledky syntéz 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. 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.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Multifunkční nosičové systémy a teranostika

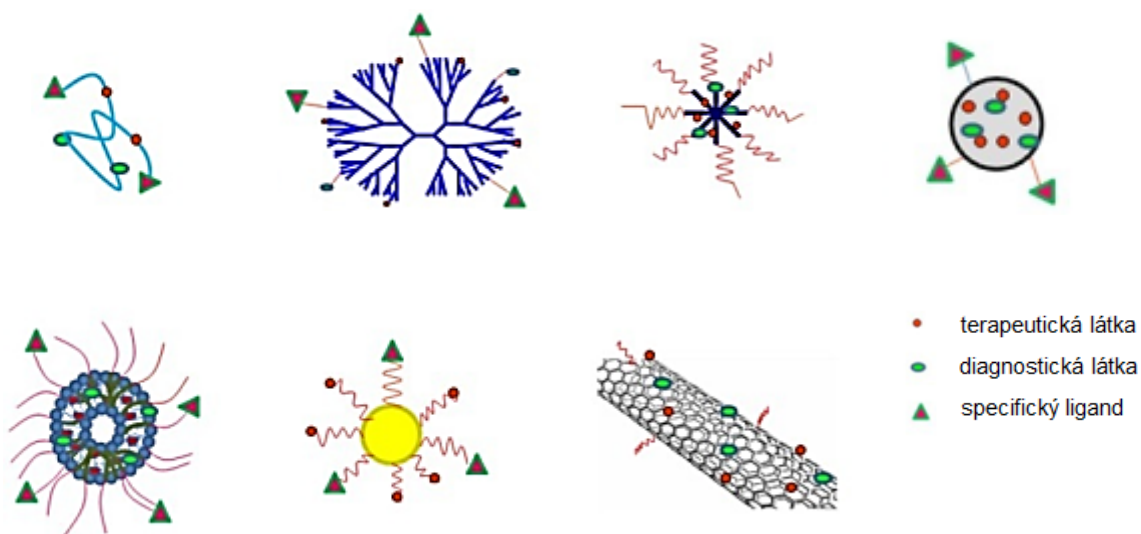
Léčiva jsou všeobecně chápána jako látky vpravované do těla za účelem terapie nemoci, její prevence, léčby zranění nebo řešení různých psychických obtíží. Schopnost terapeutických látek dosáhnout požadovaného efektu závisí na mnoha okolnostech, jako jsou způsob podání léčiva, biodistribuce a mechanismus 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, zánět) 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}

1.2 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. Mezi významné zástupce (Obrázek 1) patří polymerní konjugáty,⁸ dendrimery,⁹ polymerní micely,¹⁰ polymerzomy,¹¹ liposomy,¹ emulze,¹² kovové nanočástice,¹ a jiné. Přestože se jedná strukturně o velmi různorodé systémy, společným rysem nosičových systémů je možnost kovalentního nebo nekovalentního navázání léčiv a v případě teranostik také kontrastních látek, jež jsou částečně popsány v kapitole 1.4. V některých případech mohou nosiče navíc disponovat ligandem specifickým pro určitý receptor (viz kapitola 1.3.2).^{1,13}



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

1.3 Cílení

Odlišnosti ve struktuře a fyziologii patologických tkání (nádorové nebo zánětlivé) hrají významnou roli ve strategii doručování a cílení nosičů léčiv.¹⁴

1.3.1 Pasivní cílení

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 nebo zmíněných nosičů v nádorové tkáni. Tato abnormalita je označovaná jako efekt zvýšené permeability a retence (EPR efekt).^{15,16}

1.3.2 Aktivní cílení

Nádorové buňky na svém povrchu velmi často ve větší míře exprimují specifické receptory pro určité ligandy nebo antigeny. Pokud je k nosičovému systému navázán vhodný ligand (například RDG peptid, protilátka, kyselina listová a jiné)¹⁷ 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.¹⁸

1.4 Metody a kontrastní látky používané pro zobrazování

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).^{19,20}

1.4.1 Fluorescenční zobrazování

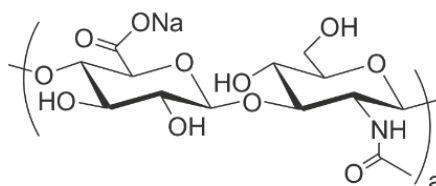
Fluorescenční zobrazování se jeví jako slibná metoda pro neinvazivní diagnostiku, především díky její relativně vysoké citlivosti, specifitě a zisku obrazu v reálném čase. Výhodou fluorescenčního zobrazování jsou také poměrně nízké náklady, nenáročnost, neinvazivnost a na rozdíl od PET a SPECT také absence potenciálně nebezpečného ionizujícího záření.²¹ 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.²² Mezi významné látky využívané pro fluorescenčního zobrazování patří polymethinová cyaninová barviva^{23,24} a ftalocyaniny.²⁵ Další ze skupiny organických fluoroforů jsou tzv. BODIPY – sloučeniny, jejichž základní strukturu tvoří 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen⁵² nebo deriváty odvozené od odvozené od squarinu.²⁶ Z řad anorganických materiálů je pro zmíněnou metodu možno použít kvantové tečky, tvořené například CdSe, CdTe, CdS, ZnS, InP, ZnS aj.^{27,28}

1.4.2 Zobrazování a kontrastní látky pro magnetickou rezonanci

Zobrazování MRI se řadí mezi neionizační techniky a je založeno na rozdílu v longitudinálních T1 (podélná relaxace, spin-mřížka relaxace) a transverzálních T2 (příčná relaxace, spin-spin relaxace) relaxačních časech protonů vody v různých tkáních. Vzhledem k zaměření práce je tato podkapitola věnována zástupcům T2 látek – superparamagnetickým nanočásticím oxidů železa (SPION), mající jádro tvořeno oxidy železa – Fe₃O₄ a γ-Fe₂O₃.²⁹ Je nutno zmínit, že SPION našly uplatnění také jako terapeutické látky^{30,31} a nosiče léčiv.³² Magnetické nanočástice lze syntetizovat kupříkladu dekompozicí organického prekursoru obsahujícího železo,³³ koprecipitací,³⁴ mikroemulzními technikami³⁵ nebo hydrotermální syntézou.³⁶ Pro aplikace SPION v medicíně bývá velmi častá modifikace nebo funkcionalizace povrchu těchto nanočástic.^{37,38}

1.5 Hyaluronan

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 2) například sodný, draselný apod.^{39,40}



Obrázek 2: Strukturní vzorec hyaluronanu.

U obratlovců se HA vyskytuje prakticky ve všech orgánech, tělních tekutinách a extracelulární matrix měkkých pojivových tkání. Ve větší míře se HA nachází v kůži, a to epidermis i dermis (přibližně třetina z celkového množství), sklivci, nebo synoviální tekutině kloubů. Vzhledem k vysoké molekulové hmotnosti a značné kapacitě pro zadržování vody je primární význam této makromolekuly hydratační a strukturální. Dále je nepostradatelnou součástí extracelulární matrix, kde slouží jako „páteř“ pro distribuci a organizaci důležitých komponentů. Podílí se mimo jiné také na mnoha buněčných procesech (signalizaci, proliferaci, aj.).³ Hyaluronan byl nejprve izolován ze sklivce skotu, později z kohoutích hřebínků a pupeční šňůry. V průmyslovém měřítku se v současnosti HA získává činností například mikroorganismů z kmene *Streptococcus* nebo rekombinantního *Bacillus subtilis*.⁴¹ Díky přirozené biokompatibilitě, biodegradabilitě, vstřebatelnosti nebo možné chemické funkcionalizaci představuje HA jeden

z nejatraktivnějších polymerů pro tvorbu moderních biomateriálů využitelných ve farmaceutických, medicínských i kosmetických odvětvích.³

1.6 Chemické modifikace hylauronanu

Ze struktury HA (Obrázek 2) je zřejmé, že primárně lze chemickou modifikaci provést na dvou typech funkčních skupin – karboxylových a hydroxylových. Sekundárně je taktéž možno připravit funkční aminoskupinu nebo oxoskupinu. 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 konverzí na tetrabutylamoniovou sůl (TBA).^{42,43} V následujících podkapitolách 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.

1.6.1 Modifikace karboxylové funkční skupiny

Příprava amidů

Reakce karboxylové skupiny s aminoskupinou za přítomnosti karbodiimidů ve vodném prostředí je jednou z nejpoužívanějších metod modifikace hyaluronanu.⁴⁴ Nejběžnějším činidlem z řady karbodiimidů je *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid,^{45,46} často v kombinaci *N*-hydroxysukcinimidem nebo 1-hydroxybenzotriazolem.⁴⁷ Další možností přípravy amidické vazby je použití 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-*N*-methylmorfolinium-chloridu.⁴⁸ Jiný způsob aktivace karboxylové skupiny spočívá v reakci HA karboxylové skupiny s *N,N'*-karbonyldiimidazolem.⁴⁹

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 alkyhalogenidů,⁵⁰ dále tosylátů,⁵¹ derivátu diazomethanu⁵² nebo oxiranů.⁵³

1.6.2 Modifikace hydroxylových skupin

Příprava esterů

Mezi významné modifikace hydroxylových skupin patří zejména jejich esterifikace. Kolektiv autora Tømmeraas⁵⁴ patentoval v roce 2007 přípravu esterů HA za pomoci alkylsukcinanhydridů. Formace esterů byla popsána také za použití acylchloridů.⁵⁵ Jako poslední příklad přípravy esterů HA je uvedena reakce za využití *in situ* generovaného směsného anhydridu, kdy byl Yamaguchiho reagent (2,4,6-trichlorbenzoylchlorid) použit kolektivem Huerta-Angeles, pro modifikaci HA například řetězci mastných kyselin.⁵⁶

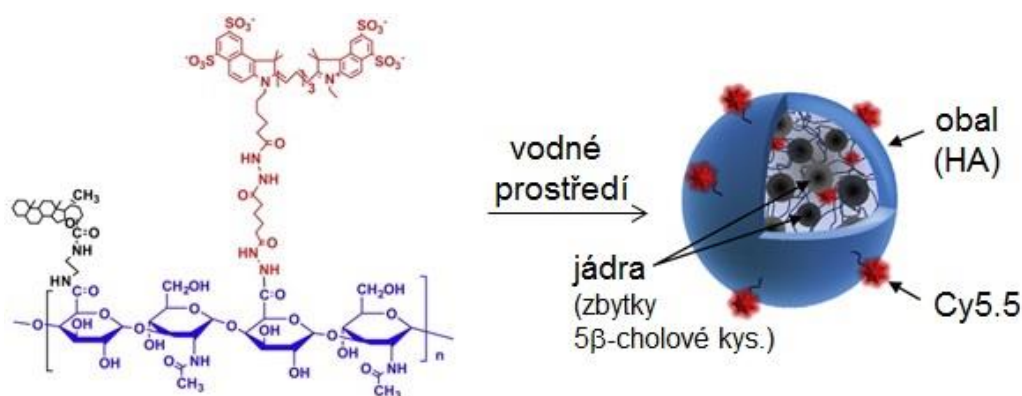
1.6.3 Příprava dalších funkčních skupin na HA řetězci

V odborné literatuře je popsáno také několik způsobů, jak na skeletu HA připravit nové funkční skupiny (například NH₂, =O). Jednou z možností jak transformovat karboxylovou funkci glukuronové jednotky je redukce pomocí 9-borabicyklo[3.3.1]nonanu⁵⁷ nebo NaIO₄.⁵⁸ Naopak oxidací lze připravit aldehyd z hydroxylové skupiny na C6 *N*-acetyl-D-glukosaminu. K tomuto účelu se používá například oxidační systém AcNH-TEMPO/NaClO, čímž je dosaženo oxidace přibližně 10 % hydroxylových skupin. Zisku vyššího počtu aldehydických skupin v produktu lze dosáhnout účinkem Dessova-Martina oxidačního činidla.⁵⁹ Deacetylací *N*-acetylu glukosaminové jednotky HA síranem hydrazinu lze připravit primární aminoskupinu.⁶⁰

1.7 Teranostické nosičové systémy připravené z derivátů HA

Kyselině hyaluronové, respektive hyaluronanu a jeho derivátům, je věnována velká pozornost v oblasti tvorby nosičových systémů pro léčiva. 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 tkáních. Z neznámějších je to například receptor CD44, velmi často také exprimovaný některými nádorovými buňkami, jenž usnadňuje endocytózu HA do buněk.^{61,62} V následujícím textu jsou uvedeny vybrané ukázky teranostických nosičových systémů připravených z derivátů hyaluronanu.

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.^{63,64} Bylo zjištěno, že ve fyziologických podmínkách 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 3). 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 3: Fluorescenčně značený a hydrofobizovaný derivát HA a jeho agregace ve vodném prostředí.⁶³

Za účelem snížení akumulace v játrech a prodloužení cirkulace nosičového systému v krevním řečišti byl k výše uvedenému fluorescenčnímu amfifilnímu HA derivátu konjugován PEG.⁶⁵ Další studií, v níž byl využit výše popsany derivát HA s kovalentně navázaným fluorescenčním barvivem Cy5.5, byla provedena kolektivem autora Lee.⁶⁶ Jednalo se o přípravu fluorescenčně značeného, enzymaticky citlivého nosičového systému s enkapsulovanými SPION, umožňujícího duální zobrazení pomocí fluorescence a MRI. Pro potřeby kombinace fluorescenční a MRI diagnostiky připravili Cho a kolektiv⁶⁷ hyaluronan modifikovaný ceramidem 3B (CE), dále chelatačním činidlem DTPA pro ionty gadolinia a také fluorescenčním barvivem Cy5.5.

V následujícím odstavci jsou dále uvedeny příklady ze současné odborné literatury, kdy byl hyaluronan modifikován heptamethinovými cyaninovými látkami. Miki a jeho kolektiv⁶⁸ připravili derivát HA s vázaným PEG, dále značený barvivem indocyaninovou zelení. Získaný amfifilní derivát HA byl schopen agregace ve vodném prostředí a akumulace v nádorové tkáni, kde jej bylo možno neinvazivně detekovat, a to pomocí optického a fotoakustického zobrazování. Mezi další významné autory patří Kelkar.⁶⁹ Ve své studii představil derivát HA s kovalentně vázaným barvivem Cy7.5 a motivem kyseliny 5 β -cholové, jež opět tvořil agregáty ve vodném prostředí. 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.⁷⁰ 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 lze využít nejen pro cílenou fototermální terapii, ale navíc má také funkci diagnostické látky pro fotoakustické a optické zobrazení nádorů.⁷¹

Příkladem ze současné odborné literatury jsou také nosičové systémy, autory⁷² označované jako teranostické micely. Základem pro tvorbu těchto micel byl HA s kovalentně vázanou látkou z řady ftalocyaninů – Chlorin C6. Micely se osvědčily jako vhodné nejen pro NIR fluorescenční a fotoakustické zobrazení nádoru, ale také jako činidlo pro fotodynamickou terapii.

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.^{73–76} Příkladem derivátu hyaluronanu značeného fluoresceinem a studia jeho schopnosti doručování léčiv dermální cestou může být práce kolektivu Kong.⁷⁷

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístrojové vybavení a metody analýz

Veškerá NMR spektra byla naměřena na přístroji BRUKER AVANCE™ III 500. 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.

Fluorescenční spektra byla zaznamenána na přístroji PTI Quantamaster 400 v demineralizované vodě nebo 0,1 M roztoku fosfátového pufru (PBS; pH = 7,4).

Pro termogravimetrickou (TG) analýzu oleátu železitého a množství kyseliny olejové vázané ke SPION byl použit přístroj TG Q500 (TA Instruments).

Velikost SPION byla stanovena pomocí fotografií z elektronového mikroskopu Magellan 400. Velikost SPION byla stanovena jako průměr vypočítaný vždy ze 100 nanočástic ze třech různých fotografií.

Průměrná molekulová hmotnost hyaluronanu byla stanovena pomocí GPC s různými detektory podle dříve popsané metody.⁷⁸ Struktura HA-cypate byla potvrzena po jeho enzymatickém štěpení hyaluronan lyázou. Směs oligosacharidů byla separována pomocí UPLC chromatografického systému (Class I, Waters, Manchester, UK), kdy detektorem byl hmotnostní spektrometr Synapt G2-Si (Waters, Manchester, UK). Poslední dvě uvedené analýzy byly prováděny ve spolupráci s R&D skupinou Farmakokinetika (Contipro).

Příprava polymerních micel z HA-cypate-C18:1, HA-NM-C18:1 a HA-NM-C6 s enkapsulovaným doxorubicinem nebo kurkuminem byla provedena metodou odpaření rozpouštědla. V případě enkapsulace SPION byl využit ultrazvuk.

Výsledky *in vitro* experimentů byly zaznamenány prostřednictvím konfokálního mikroskopu TCS SP8 X Leica Microsystems GmbH. Veškeré *in vivo* neinvazivní zobrazovací analýzy byly provedeny na přístroji IVIS Lumina XR Series III.

2.2 *In vitro* experimenty

In vitro experimenty byly provedeny ve spolupráci s výzkumnou skupinou Fyziologie buňky Contipro a.s. Pro testování vstupu nosičových systémů (HA-NM-C18:1 a HA-NM-C6) s inkorporovaným kurkuminem do buněk byly použity lidské dermální fibroblasty (NHDF). Experimenty s kůží byly provedeny podle pokynů OECD ve Francových celách. Testovaná látka byla aplikována na prasečí kůži z ušních boltců o tloušťce přibližně 1 mm po dobu 20 h.

2.3 *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. Biodistribuce intravenózně aplikovaného derivátu HA-cypate-C18:1 byla testována na modelových myších typu Balb/C. Testování biodistribuce a protinádorového účinku derivátu HA-cypate-C18:1 a nosičových systémů z něj připravených proběhlo v myších zvířatech s nehmatným prsním nádorem (4T1 luc buňky). Skupinám myší byla 14., 21. a 28. den růstu nádoru intravenózně podána vybraná látka nebo nosičové systémy v 0,1M PBS.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 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. 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).

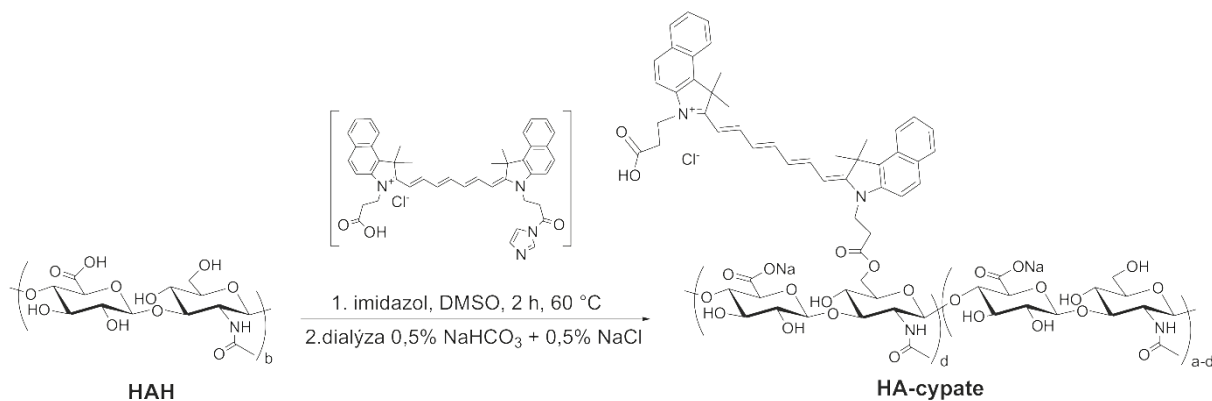
3.2 Fluorescenční značení hyaluronanu

3.2.1 Modifikace hyaluronanu látkou cypate

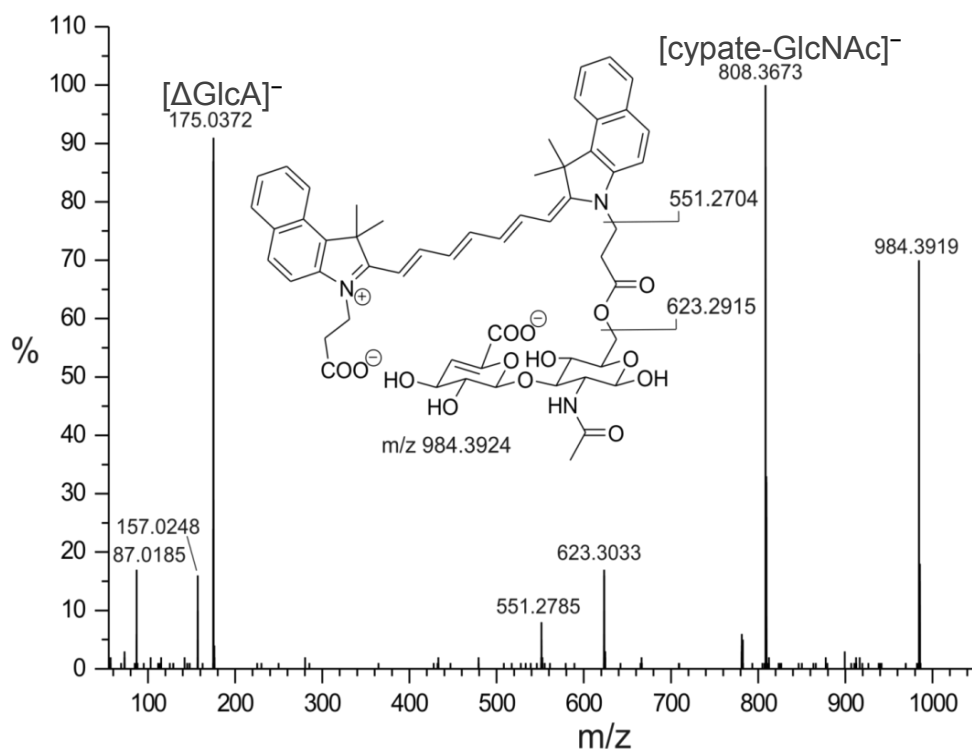
Pro přípravu teranostik, jejichž základem je polysacharidový řetězec HA, byla vybrána NIR fluorescenční látka cypate, jež byla připravena dle již dříve popsané několika krokové syntézy.⁷⁹

Hyaluronan modifikovaný látkou cypate (**HA-cypate**) se podařilo připravit (Schéma 1) reakcí *N,N*-karbonyldiimidazolu (CDI, systematicky di-(1*H*-imidazol-1-yl)methanon) s cypate za předpokladu vzniku intermediátu, který dále reagoval s kyselinou hyaluronovou v 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. Pro interní potřeby firmy byly pro přípravu modifikovaného produktu využity 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 %.

Schéma 1



Charakterizace produktu byla provedena pomocí NMR technik a UPLC-MS. Jako nejsilnější důkaz tvorby požadované látky je na Obrázku 4 uvedeno ESI-MS spektrum fragmentace disacharidu HA-cypate (m/z 984,3924). Po modifikaci HA látkou cypate bylo při excitaci 665 nm naměřeno maximum emise **HA-cypate** při 699 nm.



Obrázek 4: ESI-MS spektrum fragmentace disacharidu HA s vázanou látkou cypate. ΔGlcA = modifikovaná kyselina-D-glukuronová; GlcNAc = *N*-acetyl-D-glukosamin.

3.2.2 Syntéza hyaluronanu značeného 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**).

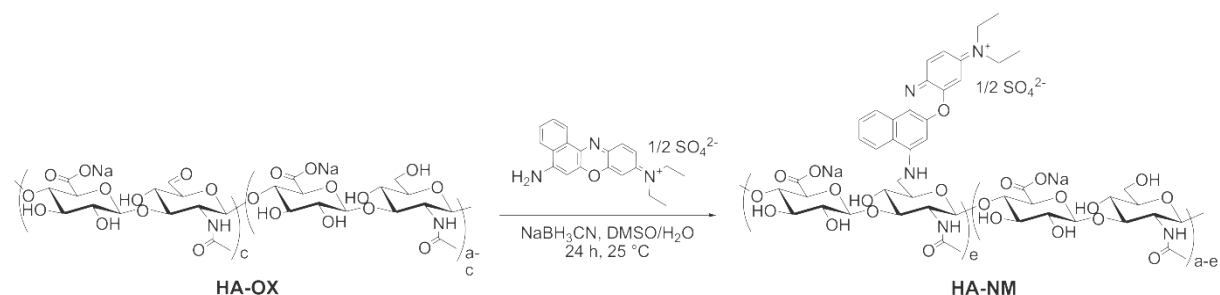
Prvním krokem přípravy hyaluronanu modifikovaného nilskou modří (**HA-NM**) byla syntéza oxidované formy HA (**HA-OX**) dle publikovaného postupu.^{59,80,81} Reakce byly prováděny za stejných podmínek, vyjma doby reakce. Výsledky reakcí jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1: 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.

Druhým krokem syntézy (Schéma 2) hyaluronanu s vázanou nilskou modří (**HA-NM**) bylo již samotné navázání nilské modří na oxidovanou formu HA ($M_w = 16\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, SS = 5,5 %) reaktivní aminací za pomoci NaBH₃CN.



Byl připraven **HA-NM** se $SS_{NM} = 0,9\%$. Při excitaci 635 nm bylo naměřeno maximum emise záření při 675 nm, jež se po hydrofobizaci **HA-NM** významně nezměnilo.

3.3 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.

3.3.1 Hydrofobizace hyaluronanu kyselinou kapronovou

V tomto případě byly připraveny hydrofobizované deriváty pouze **HA-NM** pomocí komerčně dostupného symetrického anhydridu kyseliny kapronové (hexanové) v přítomnosti TEA. Požadovaná látka byla připravena za použití různých ekvivalentů symetrického anhydridu 2,5–4,0 vůči 1 ekvivalentu hyaluronanu, při době reakce (2–3 h) se SS_{C6} od 42–52 %. Derivát **HA-NM-C6** se $SS_{C6} = 52$ % 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 5.2).

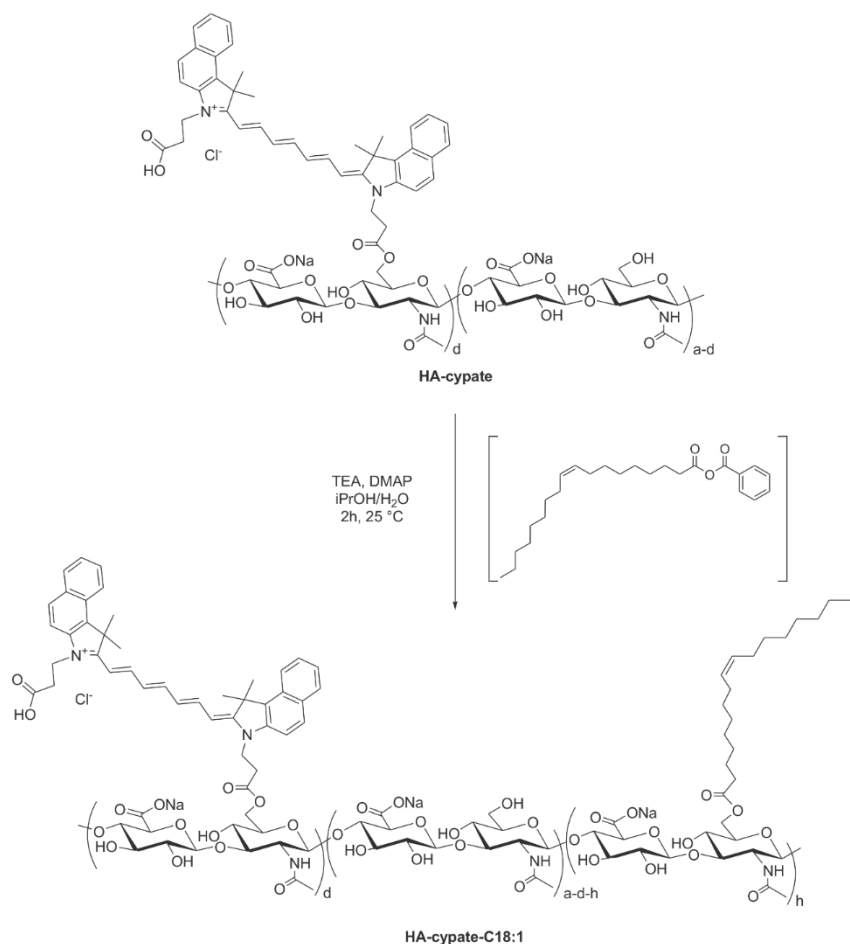
3.3.2 Hydrofobizace hyaluronanu kyselinou olejovou.

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.^{56,82}

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.^{56,82} Prvním společným krokem modifikace **HA-cypate** i **HA-NM** byla reakce mezi

kyselinou olejovou a benzoylchloridem v přítomnosti TEA za vzniku směsného anhydridu. *In situ* připravený směsný anhydrid byl dále použit pro hydrofobizaci (Schéma 3) **HA-cypate** (výchozí $M_w = 15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $SS = 0,7\%$). Použitím různého stechiometrického poměru kyseliny olejové (0,2–1), TEA (0,2–1) a v přítomnosti katalyzátoru DMAP byl **HA-cypate-C18:1** připraven se $SS_{C18:1}$ v rozmezí 2–13 %.

Schéma 2



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 $SS_{C18:1} = 10\%$. U toho

syntetizovaného derivátu **HA-cypate-C18:1** a rovněž u nosičových systémů z něj připravených byla sledována biodistribuce *in vivo* a protinádorový účinek na modelových myších (viz kapitola 4).

HA-NM byl hydrofobizován řetězci kyseliny olejové opět pomocí benzoylchloridu, a to za stejných reakčních podmínek jako **HA-cypate-C18:1**. Byl připraven pouze jeden derivát **HA-NM-C18:1** (výchozí $M_{\text{WHA-OX}} = 16\,000\text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, $SS_{\text{NM}} = 0,9\%$, $SS_{\text{C18:1}} = 10\%$), u něhož 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 stručně komentovány v kapitole 5.

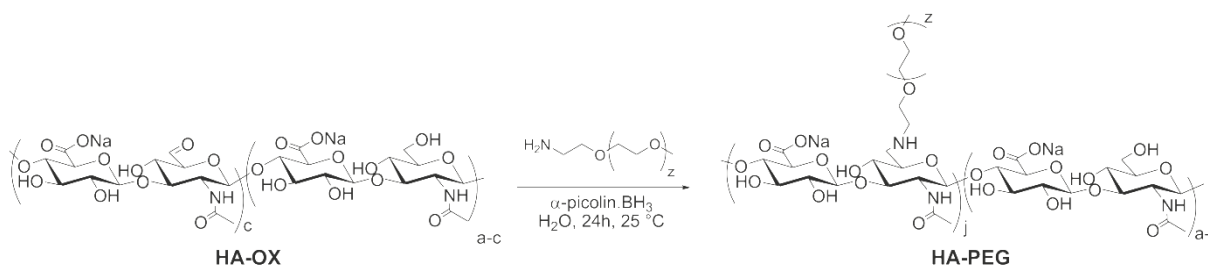
3.4 Příprava série derivátů hyaluronanu modifikovaných poly(ethylenglykolem).

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.^{63,64,66} Nežádoucí akumulace v játrech při biologickém testování *in vivo* (viz kapitola 4) byla taktéž pozorována u nosičových systémů na bázi nově připraveného derivátu **HA-cypate-C18:1**. Uvádí se, že připojením PEG ke struktuře nosičového systému může docházet ke zvýšené akumulaci nosičových systémů v požadovaném místě – nádoru.^{65,83–86}

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 (viz kapitola 3.2.2). Pro získání stejného typu oxidovaného hyaluronanu, avšak s vyšším stupněm oxidace (43 %), lze použít Dessovo-Martinovo činidlo.⁵⁹ Syntéza titulóvní látky byla, stejně jako v případě hyaluronanu značeného nilskou modří, provedena reaktivní aminací oxidované formy HA (Schéma 3). Jako účinné redukční činidlo byl v tomto případě zvolen komplex boranu s 2-methylpyridinem. Výsledky reakcí jsou shrnuty v Tabulce 2.

Schéma 3



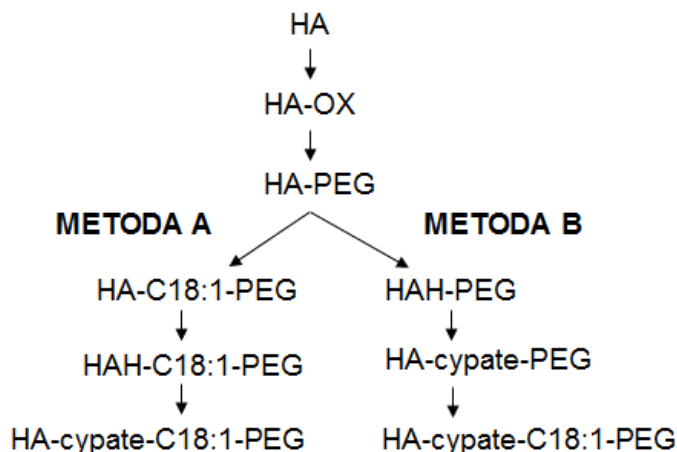
Tabulka 2: Příprava **HA-PEG** s různým stupněm substituce PEG.

| 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 |

Pro nalezení potenciálně nejvýhodnější možnosti přípravy požadované látky **HA-cypate-C18:1-PEG** byly dále navrženy dvě cesty A a B (Schéma 4), kdy v obou případech byl výchozí látkou **HA-PEG** (SS = 6,5 %; 22 500 g·mol⁻¹). Látko cypate byla k HA navázána opět prostřednictvím CDI, řetězce kyseliny olejové pomocí benzoylchloridu. Bylo zjištěno, 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 ani biologickému testování těchto připravených derivátů.

Schéma 4



3.5 Příprava a charakterizace superparamagnetických nanočástic oxidů železa

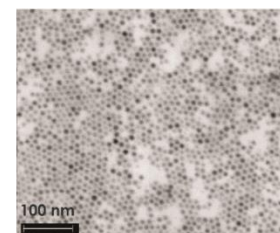
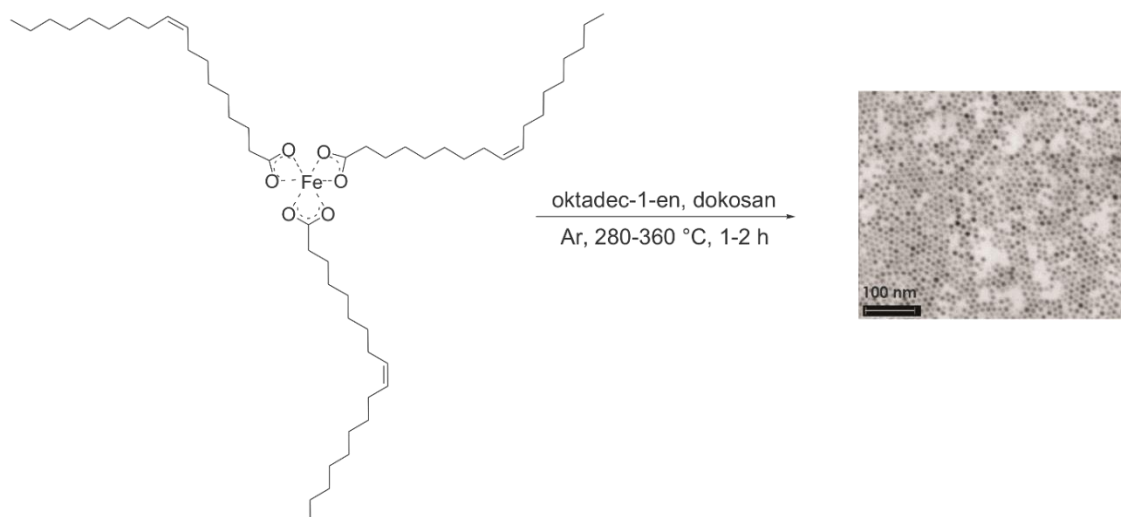
3.5.1 Syntéza oleátu železitého

Pro přípravu SPION obalených kyselinou olejovou se jako vhodný prekurzor často využívá oleát železitý.⁸⁷ 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.⁸⁸

3.5.2 Syntéza nanočástic na povrchu modifikovaných kyselinou olejovou

Pro přípravu série SPION byl zvolen velmi často využívaný způsob termálního rozkladu prekurzoru oleátu železitého.⁸⁹ Byly provedeny pokusy o přípravu (Schéma 5) 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. Zvolený postup syntéz vedl k zisku pouze čtyř šarží SPION o velikosti 5 nebo 12 nm s polydisperzitou do 10 %.

Schéma 5



3.5.3 Stanovení množství vázané kyseliny olejové pomocí TG

V Tabulce 3 je u vyhovujících šarží SPION (5 a 12 nm) uvedeno stanovené množství vázané a volné kyseliny olejové pomocí TG.

Tabulka 3: Stanovení volné a vázané kyseliny olejové.

| SPION [nm] | volná C18:1[%] | vázaná C18:1 [%] | vlhkost [%] |
|------------|----------------|------------------|-------------|
| 5,28±0,40 | 7 | 15 | 2 |
| 5,61±0,39 | 6 | 17 | 10 |
| 4,93±0,52 | 21 | 35 | 3 |
| 12,12±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 modifikovaných stejným množstvím kyseliny olejové.

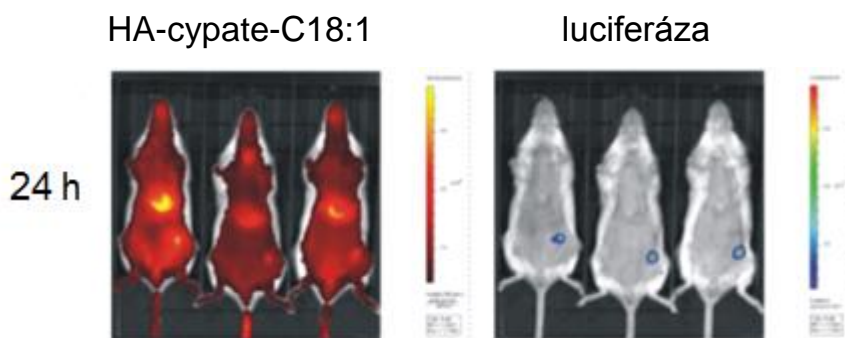
4. BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ DERIVÁTŮ HYLAURONANU ZNAČENÉHO CYPATE

4.1 *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. Ze zaznamenané emise záření bylo zjištěno, že **HA-cypate-C18:1** je detekovatelný *in vivo*, přičemž je po intravenózním podání u zdravé myši distribuován zejména do jater. Po jednom podání bylo možno zobrazení provádět po dobu až 2 týdnů.

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

Jedním z klíčových *in vivo* experimentů celé této 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). V tomto případě byl fluorescenční signál detekovatelný opět v játrech, ale také v místě nádoru, a to 24 hodin po intravenózní aplikaci (Obrázek 5). 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. Na základě předešlých studií lze předpokládat, že efektivní nádorové cílení HA polymerních micel může být způsobeno kombinací tzv. pasivního cílení (EPR efekt),⁹⁰ stejně tak jako cílením aktivním za účasti specifického receptoru CD44.⁹¹



Obrázek 5: Biodistribuce **HA-Cypate-C18:1** v myších s nádorem v čase.

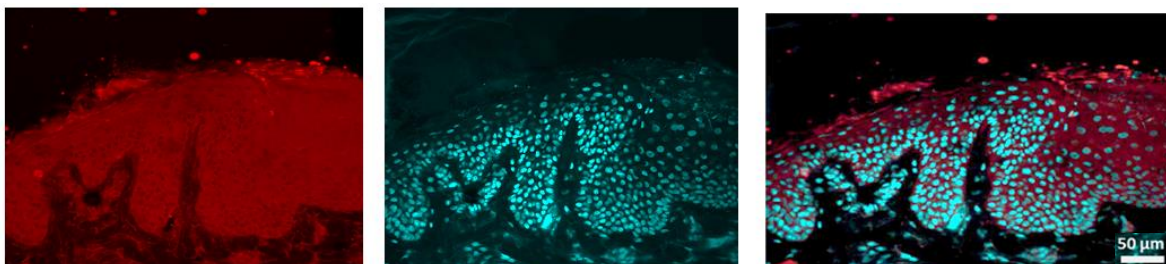
4.3 Protinádorový účinek nosičových systémů na bázi HA-cypate-C18:1

Z připraveného **HA-cypate-C18:1** byly připraveny tři typy polymerních micel. Prvním typem byl HA-cypate-C18:1 bez léčiva, druhý typ PM byl HA-cypate-C18:1 s enkapsulovaným doxorubicinem a třetí typ PM byl HA-cypate-C18:1 s enkapsulovaným doxorubicinem spolu se SPION. Největšímu růst nádoru došlo ve skupině myši, které byl podán pouze HA-cypate-C18:1 bez léčiva. Nádor rostl nejméně po podání HA-cypate-C18:1 s enkapsulovaným doxorubicinem a zároveň SPION. Pro kontrolu neinvazivního vyhodnocení progresu nemoci byly po ukončení léčby myši usmrceny a proběhlo vyloučení orgánů, přičemž třetí skupina (léčená HA-cypate-C18:1 s enkapsulovaným doxorubicinem a zároveň SPION) měla nejmenší hmotnost sleziny a nádoru. V daném modelu je zvětšená slezina indikací progresu nemoci.⁹²

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

5.1 Penetrace derivátů hyaluronanu kůží

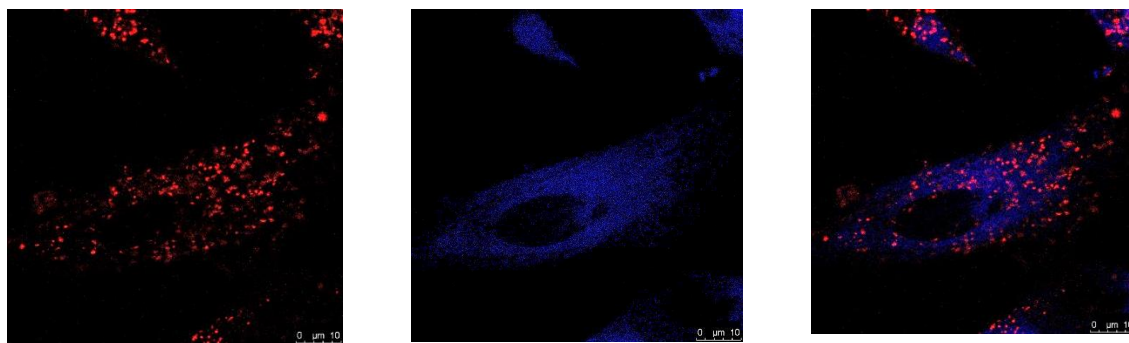
Dalším dílčím cílem bylo u derivátu **HA-NM-C18:1** studovat jeho schopnost penetrace prasečí kůží *in vitro*. Výsledky experimentu (Obrázek 6) naznačují, že fluorescenčně značený derivát HA hydrofobizovaný kyselinou olejovou je pravděpodobně schopen proniknout skrz *stratum corneum* do hlubších vrstev pokožky a je schopný penetrovat nejspíše transcelulární cestou – skrze těla buněk rohové vrstvy (korneocytů) a buněk zbývajících vrstev pokožky (keratinocytů).



Obrázek 6: Snímky průřezů prasečí kůže: vlevo fluorescence – **HA-NM-C18:1**; uprostřed – fluorescence obarvených jader (Hoechstova modř), vpravo – překryv.

5.2 Vstup látek do buněk

Jako poslední byla získána informace o chování nosičových systémů na bázi hylauronanu modifikovaného mastnými řetězci po interakci s buňkami. Z látek **HA-NM-C18:1** a **HA-NM-C6** byly připraveny nosičové systémy s enkapsulovaným kurkuminem. Na Obrázku 7 je uvedena série snímků z experimentu s nosičovým systémem vytvořeným z **HA-NM-C18:1**. Pro vyhodnocení experimentu bylo využito zejména rozdílné vlnové délky záření obou fluoroforů – nilské modři (Obrázek 7 vlevo) a kurkuminu (Obrázek 7 uprostřed), kdy na Obrázku 7 vpravo je znázorněn překryv předchozích obrazů. Modelové léčivo kurkumin bylo pozorováno ve stejných oblastech jako fluorescenční značky nosičového systému, což demonstruje kolokalizaci kurkuminu a nosičových systémů v buňce. Stejných výsledků bylo taktéž dosaženo při experimentu s nosičovým systémem kurkuminu, připraveným z **HA-NM-C6**. Na základě výsledků těchto experimentů lze testované polymerní micely považovat za nosičové systémy, jež dokážou vstoupit a doručit modelovou látku dovnitř fibroblastu.



emise záření nilské modři

emise záření kurkuminu

překryv snímků

Obrázek 7: Snímky vybraného fibroblastu inkubovaného s PM na bázi **HA-NM-C18:1**.

6. ZÁVĚR A PŘÍNOS PRÁCE

Předložená práce 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.

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. Pro přípravu derivátu HA-cypate se jako účinné činidlo osvědčil *N,N'*-karbonyldiimidazol zprostředkovávající vznik esterové vazby mezi karboxylovými skupinami cypate a hydroxylovými skupinami HA. Druhým krokem byla hydrofobizace HA-cypate řetězci kyseliny olejové metodou 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, zejména do jater. 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, ale také opět v játrech. Největší protinádorový účinek byl pozorován u micel s doxorubicinem a SPION.

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 komplexu boranu s pikolinem 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 reduktivní aminace pomocí NaBH_3CN . 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 prokázána jejich schopnost vstupu a doručení modelového léčiva do fibroblastů.

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 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? *Chemicke 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 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.
- ⁹ 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.
- ¹⁰ MOURYA, V. K., et al. Polymeric micelles: general considerations and their applications. *Ind J Pharm Edu Res*, 2011, 45.2: 128-38.
- ¹¹ AHMED, Fariyal, et al. Shrinkage of a rapidly growing tumor by drug-loaded polymersomes: pH-triggered release through copolymer degradation. *Molecular pharmaceuticals*, 2006, 3.3: 340-350. DOI 10.1021/MP050103U.
- ¹² 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.
- ¹³ 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.
- ¹⁴ 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.
- ¹⁵ MATSUMURA, Yasuhiro; MAEDA, Hiroshi. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*, 1986, 46.12 Part 1: 6387-6392. ISSN 0008-5472.

- ¹⁶ 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.
- ¹⁷ 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.
- ¹⁸ 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.
- ¹⁹ 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.
- ²⁰ ZHANG, Fan, et al. Multimodality Imaging of Tumor Response to Doxil. *Theranostics*, 2011; 1:302-309. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno/v01p0302.
- ²¹ 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.
- ²² YE, Yunpeng, CHEN, Xiaoyuan. Integrin Targeting for Tumor Optical Imaging. *Theranostics*, 2011; 1:102-126. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno/v01p0102.
- ²³ MISHRA, Amaresh, et al. Cyanines during the 1990s: a review. *Chemical Reviews*, 2000, 100.6: 1973-2012. DOI 10.1021/CR990402T.
- ²⁴ 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.
- ²⁵ 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.
- ²⁶ 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.
- ²⁷ HLAVÁČEK, A.; SKLADAL, Petr. The Application of Quantum Dots in Bioanalytical Chemistry. *Chemické listy*, 2011, 105.8:611-615. ISSN 1213-7103.
- ²⁸ 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.
- ²⁹ 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.
- ³⁰ YOO, Dongwon, et al. Theranostic magnetic nanoparticles. *Accounts of chemical research*, 2011, 44.10: 863-874. ISSN 0001-4842. DOI 10.1021/ar200085c.
- ³¹ 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.
- ³² 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.

- 33 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.
- 34 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.1998.0407.
- 35 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.
- 36 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.
- 37 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.
- 38 COLOMBO, Miriam, et al. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41.11: 4306-4334. ISSN 0306-0012. DOI 10.1039/c2cs15337h.
- 39 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.
- 40 LAPČÍK, Lubomír, et al. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chemical reviews*, 1998, 98.8: 2663-2684. ISSN 1520-6890.
- 41 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.JBIOSEC.2008.11.007.
- 42 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.
- 43 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.
- 44 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.
- 45 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.
- 46 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.
- 47 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.

- 48 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.
- 49 BELLINI, D; TOPAI, A. *Amides of hyaluronic acid and the derivatives thereof and a process for their preparation*. Patentová přihláška, WO2000001733A1. 2001-01-13.
- 50 FIDIA FARMACEUTICI SPA. *Esters of hyaluronic acid*. Patent US4851521A. 1985-07-08.
- 51 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.
- 52 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.
- 53 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.
- 54 TØMMERAAS, Kristoffer; EENSCHOOTEN, Corinne. *Aryl/alkyl succinic anhydride hyaluronan derivatives*. U.S. Patent Application No 13/554,190, 2012.
- 55 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.
- 56 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.
- 57 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.
- 58 KUO, J. W. *Practical aspects of hyaluronan based medical products*. CRC Press, 2005. ISBN 9780849333248.
- 59 ŠEDOVÁ, 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.
- 60 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.
- 61 PLATT, Virginia M.; SZOKA JR, Francis C. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Molecular pharmaceutics*, 2008, 5.4: 474-486. ISSN 1543-8384. DOI 10.1021/mp800024g.
- 62 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.
- 63 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.
- ⁶⁴ 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.
- ⁶⁵ 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.
- ⁶⁶ 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.
- ⁶⁷ 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.
- ⁶⁸ 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.
- ⁶⁹ 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.
- ⁷⁰ 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.
- ⁷¹ 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.
- ⁷² 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.
- ⁷³ 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. DOI 0005-2736. 10.1016/J.BBAMEM.2009.08.015.
- ⁷⁴ 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.
- ⁷⁵ LAPTEVA, Maria, et al. Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: a targeted approach for the treatment of psoriasis. *Molecular pharmaceutics*, 2014, 11.9: 2989-3001. ISSN 1543-8384. DOI 10.1021/mp400639e.
- ⁷⁶ 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.
- ⁷⁷ 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.
- ⁷⁸ 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.

- ⁷⁹ YE, Yunpeng, et al. Multivalent carbocyanine molecular probes: synthesis and applications. *Bioconjugate chemistry*, 2005, 16.1: 51-61. DOI 10.1021/BC049790I.
- ⁸⁰ 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.
- ⁸¹ 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.
- ⁸² 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.
- ⁸³ 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.
- ⁸⁴ 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.
- ⁸⁵ 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.
- ⁸⁶ 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.
- ⁸⁷ 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.
- ⁸⁸ 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.
- ⁸⁹ 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.
- ⁹⁰ 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.
- ⁹¹ 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.
- ⁹² 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.

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, di-(1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)methanon) |
| DMAP | 4-(dimethylamino)pyridin |
| DMTMM | 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4- <i>N</i> -methylmorfolinium-chlorid |
| 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(ethylen glykolem) |
| HAH | kyselina hyaluronová |
| HoBt | 1-hydroxybenzotriazolu |
| MRI | zobrazování magnetickou resonancí |
| NIR | blízká infračervená oblast |
| NHDF | lidské dermální fibroblasty |
| NM | nilská modř |
| PBS | roztok fosfátového pufru |
| PEG | poly(ethylen glykol), poly(oxyethylen), poly(ethylenoxid) |
| PET | pozitronová emisní tomografie |
| PM | polymerní micely |
| 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 |

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 Belgie, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie – 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

Teze 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

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7454-794-2

