

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Ústav organické chemie a technologie

**Syntéza a charakterizace konjugátu isoniazidu
s poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinem)**

Bc. Ludmila Grusová

Diplomová práce

2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ludmila Grusová**
Osobní číslo: **C10987**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Technologie organických specialit**
Název tématu: **Syntéza a charakterizace konjugátu isoniazidu
s poly(ethylenglykol)-b-poly(L-lysinem)**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Popís významu proféčiv pro syntetická léčiva se zaměřením na proféčiva PEGu.
2. Literární rešerše cílených derivátů PEGu s antimikrobiálně účinnými léčivy.
3. Proféčiva antímykobakteriálně účinných molekul.
4. Provést syntézu, izolaci a charakterizaci blokového kopolymeru mPEG-b-PLL s různým počtem navázaných jednotek lysinu.
5. Provést syntézu, izolaci a charakterizaci cíleného konjugátů INH a blokového kopolymeru mPEG-b-PLL.
6. Zjistit stabilitu těchto konjugátů ve vodných prostředí s různým pH.
7. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce: **24. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce: **25. května 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 24. února 2012

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 5. 2012

Ludmila Grusová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu práce Ing. Alešovi Imramovskému, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, Ing. Vladimíru Pejchalovi za provedení reakčních kroků s fosgenem a všem ostatním kolegům z laboratoře za utváření příjemné atmosféry. Velké díky patří také mému manželovi Davidovi a rodičům za veškerou podporu a pomoc při studiu.

Souhrn

Předkládaná diplomová práce se věnuje syntéze nového pH senzitivního konjugátu antituberkulotika isoniazidu s blokovým kopolymerem α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinem). V literární rešerši popisuje význam proléčiv se zaměřením na polymerní proléčiva poly(ethylenglykolu), zvláště pak α -methoxy- ω -amino-poly(ethylenglykolu) a jeho blokových kopolymerů s aminokyselinami (L-lysinem, L-asparagovou kyselinou). Klade důraz na antimykobakteriální léčiva a současné trendy při přípravě nových antituberkulotik. Byla navržena a provedena celková syntéza konjugátu isoniazidu s α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinem). Konjugát i veškeré intermediáty byly izolovány a charakterizovány pomocí elementární analýzy, infračervené spektroskopie, ^1H a ^{13}C nukleární magnetické resonace, gelové permeační chromatografie a práškové rentgenové difrakce. Stabilita připraveného konjugátu byla testována metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Klíčová slova

polymerní proléčivo, isoniazid, poly(ethylenglykol), kopolymer poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinem).

Title

Synthesis and characterization of isoniazid poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) conjugate.

Summary

This diploma thesis deals with the synthesis of a new pH's sensitive conjugate antituberculosics isoniazid with block copolymer poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine). Literature search describes the importance of prodrugs, focusing on polymeric prodrugs of poly(ethylene glycol), especially α -methoxy- ω -aminopoly(ethylene glycol) and its block copolymers with amino acids (L-lysine, L-aspartic acid). It focuses on antimycobacterial drugs and current trends in the preparation of new antituberculosics. The total synthesis of isoniazid α -methoxy-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) conjugate was designed and carried out. New conjugate and all intermediates were isolated and characterized by elemental analysis, infrared spectroscopy, ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance, gel permeation chromatography and X-ray powders diffraction. Stability of the conjugate was tested by high-performance liquid chromatography.

Keywords

polymeric prodrugs, isoniazid, poly(ethylene glycol), copolymer poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine).

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Teoretická část	11
2.1	Polymerní proléčivo	11
2.2	Poly(ethylenglykol).....	13
2.2.1	Vlastnosti poly(ethylenglykolu)	13
2.2.2	Poly(ethylenglykol) jako nosič léčiv	15
2.2.3	Funkcionalizace PEGu.....	15
2.3	Vlastnosti a příprava PEG-NH ₂	20
2.3.1	Charakterizace PEG-NH ₂	21
2.4	Polymerní proléčiva antimikrobiálních léčiv	24
2.4.1	Konjugace antimikrobiálních léčiv s PEG-NH ₂	24
2.4.2	<i>Ring-opening</i> polymerace (ROP).....	28
2.4.3	Příklady využití ROP v přípravě blokových kopolymerů s PEG-NH ₂	30
2.5	Antimykobakteriální léčiva.....	31
2.5.1	Antimykobakteriální léčiva a PEG	35
2.5.2	Další polymerní proléčiva antimykobakteriálních léčiv	36
2.5.3	Nová „nepolymerní“ proléčiva	39
2.6	Nový konjugát isoniazidu s α -methoxy-poly(ethylenglykol)- <i>b</i> -poly(L-lysinem) ([mPEG- <i>b</i> -PLL]-INH).....	41
2.7	Návrh syntetické cesty konjugátu [mPEG- <i>b</i> -PLL]-INH.....	44
2.7.1	Příprava mPEG-NH ₂ (2)	44
2.7.2	Příprava L-Lys(Z)-NCA (4) a následná syntéza mPEG- <i>b</i> -PLL(Z) (5).....	45
2.7.3	Deprotekce mPEG- <i>b</i> -PLL(Z) (5).....	46
2.7.4	Syntéza konjugátu [mPEG- <i>b</i> -PLL]-INH (7).....	47
3	Cíle práce	49
4	Experimentální část.....	50
4.1	Celkové reakční schéma přípravy konjugátu [mPEG- <i>b</i> -PLL]-INH.....	50
4.2	Metody a materiál	51
4.2.1	NMR spektroskopie	51
4.2.2	Gelová permeační chromatografie.....	51
4.2.3	Rentgenová prášková difrakce.....	51
4.2.4	Ostatní analýzy	52
4.2.5	Měření stability konjugátu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie..	52
4.3	Jednotlivé stupně syntézy.....	53

4.3.1	Třístupňová syntéza α -methoxy- ω -amino-poly(ethylenglykolu) (2) ³¹	53
4.3.2	Příprava N^{ϵ} -benzyloxykarbonyl-L-lysin N -karboxyanhydridu (4)	56
4.3.3	Příprava α -methoxy-poly(ethylenglykol)- b -poly[N^{ϵ} -benzyloxykarbonyl]-L-lysinu] (5)	58
4.3.4	Příprava α -methoxy-poly(ethylenglykol)- b -poly(L-lysinu) (6)	60
4.3.5	Příprava konjugátu isoniazidu s α -methoxy-poly(ethylenglykol)- b -poly(L-lysinem) (7)	62
5	Výsledky a diskuze	64
6	Závěr	77
7	Seznam použitých zkratk	78
8	Literatura	79
	Přílohy	85

1 Úvod

Využití konjugátů polymerů s biologicky aktivními látkami je jedním z rychle se vyvíjejících směrů farmaceutické chemie. Polymery jako nosiče nejrůznějších reaktivních molekul jsou vhodné zejména díky své dlouhé době setrvání v krevním řečišti kvůli pomalému vylučování a díky možnosti cíleného působení léčiv v těle.

Proléčiva (synonyma: profarmaka, prodrugs) jsou neúčinné prekurzory, ze kterých vznikají účinné látky teprve metabolickými pochody v organismu.¹ Tyto makromolekulární konjugáty kovalentně vázaného léčiva, nebo více molekul léčiva na polymer bývají proto označovány také jako biokonjugát.² Výraz proléčivo je častěji spojován s modifikací nízkomolekulárního léčiva, např. acylací, esterifikací. Využití takových biokonjugátů ve farmaceutické chemii je výhodné zejména kvůli ochraně molekul léčiv proti chemické nebo enzymatické degradaci, snížení nebo potlačení případného antigenního účinku konjugovaného léčiva, zvýšení rozpustnosti léčiva ve vodě, zlepšení jeho farmakokinetických vlastností, snížení imunogenicity, snížení rychlosti vylučování ledvinami a tím zvýšení doby cirkulace aktivní substance v krevním řečišti.

Polymerní nosiče musí být obecně netoxické, neimunogenní, hydrofilní, ve vodě rozpustné a musí být schopny eliminace z organismu. Vazba léčivo-polymer musí být enzymaticky nebo hydrolyticky degradabilní. Můžeme je rozdělit na monofunkční – s jednou funkční skupinou, např. α -methoxy-poly(ethylenglykol) (mPEG) a vícefunkční, např. poly(ethylenglykol) (PEG), pentaerythritol poly(ethylenglykol) (star-PEG, sPEG). Nejčastějšími funkčními skupinami polymerů reagujícími s daným léčivem jsou karboxylová, amino- a hydroxy-skupina. Tyto skupiny musí být vhodně aktivovány, aby mohly žadaným způsobem reagovat s nízkomolekulárním léčivem, nebo naopak můžeme nejprve aktivovat léčivo a poté navázat na polymerní molekulu. Oba dva přístupy jsou možné a také se oba dva využívají.³

Tuberkulóza (TBC) je jednou z nejrozšířenějších infekčních chorob na světě. Předpokládá se, že třetina světové populace je infikována bakterií *Mycobacterium tuberculosis* a zhruba každou vteřinu je infikován nový člověk.⁴ Velkým problémem v této oblasti je resistance *M. tuberculosis* k dnes běžně využívaným léčivům. Vzhledem k těmto okolnostem je výzkum a vývoj v oblasti antituberkulotik zaměřen zejména na přípravu

nových modifikací a proléčiv současných léčiv a syntézu zcela nových účinných látek.

V této práci byla spojena problematika vybraného polymerního nosiče s novými trendy ve vývoji antituberkulotik. K oběma zaměření má naše pracoviště blízko, a proto je příhodné spojit obě zaměření dohromady.

2 Teoretická část

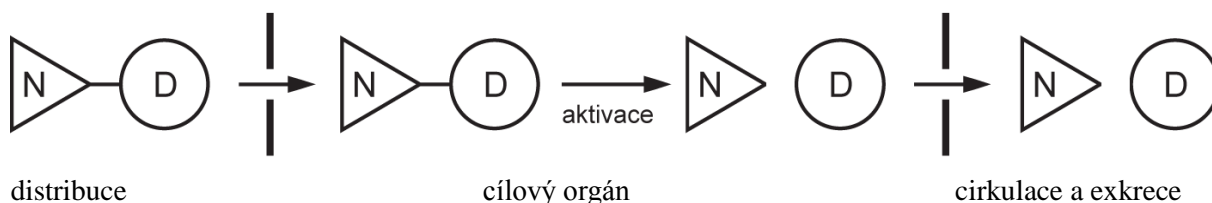
2.1 Polymerní proléčivo

Polymerní proléčivo je forma léčivé látky, která zůstává neaktivní, dokud není doručena na místo účinku, kde je aktivována pro dané místo specifickými podmínkami.⁵ Proléčivo lze také vyjádřit jinými slovy jako neaktivní prekursor léčiva. Ve většině případů je k uvolnění vazby mezi polymerem a reaktivní molekulou, a tedy přeměnou proléčiva na volné léčivo, využito specifických buněčných enzymů, které jsou součástí přirozených metabolických procesů.

Hlavním důvodem přípravy proléčiv je odstranění nebo alespoň potlačení některých nevhodných vlastností léčiv. Nejčastěji se jedná o příliš nízkou, či naopak příliš vysokou rozpustnost léčiva v tělních tekutinách a z ní vyplývající omezenou dostupnost pro cílové tkáně, či o nespecifický účinek. Proléčiva však řeší i problémy vyplývající z dalších nežádoucích vlastností léčiv, jako jsou nízká stabilita, dráždivost, nepříjemná chuť či zápach apod.¹ Tvorbou polymerních proléčiv zvyšujeme terapeutický index léčivé látky, a to tak, že dochází buď ke změně fyzikálně-chemických vlastností, např. rozpustnosti, stability, biologické dostupnosti *in vivo* a jiných farmakokinetických vlastností, nebo ke změně farmakodynamického profilu tak, aby byla zvýšena doba trvání farmakologického účinku reaktivní molekuly.

Dnes se pozornost zaměřuje zejména na polymerní nosiče na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA), poly(ethylenglykolu) (PEGu), přírodního polysacharidu dextranu, syntetických poly(α -aminokyselin) (PAA), nejčastěji poly(L-lysinu) (PLL) a poly(asparagové kyseliny) (PAsp), poly(vinylalkoholu), poly(akrylátů), poly(*N*-vinyl pyrrolidinu), poly(2-hydroxyethyl)-L-glutaminu, styren-maleinanhydridu nebo poly(divinylethermalenanhydridu) (DIVEMA), zvaného také pyran kopolymer a jejich kopolymerů.^{6,7,8,9,10}

Účinnost reaktivní molekuly v proléčivu (D) je navázáním na inaktivní nosič (N) snížena na minimum. Jakmile je léčivo podáno a enzymatickými a chemickými pochody uvolněno z nosiče, stává se opět aktivním. Proléčivo je oproti volnému léčivu doručováno na místo účinku lépe. Podstatnou veličinou je rychlost uvolňování reaktivní molekuly. Rychlý rozpad proléčiva může vést k případné toxicitě a naopak příliš pomalá rychlost může snížit účinnost léčiva (**Obrázek 1**).¹¹



Obrázek 1 Princip uvolňování reaktivní molekuly z proléčiva¹¹

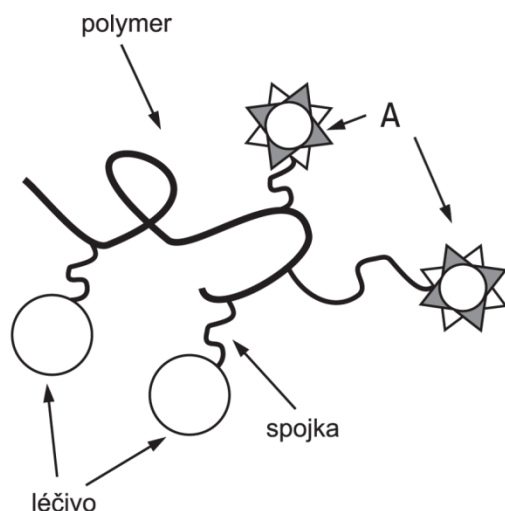
(N- polymerní nosič, D-aktivní molekula, ■-bariéra)

Při stavbě ideálního konjugátu polymer-léčivo je nutné optimalizovat podmínky syntézy tak, aby nedocházelo ke snížení stability polymeru, redukcí hmotnosti štěpením řetězce, což je ale často těžké detekovat. C-C vazby by měli být štěpeny v těle jen vzácně. Je nutné umožnit zpřístupnění léčiva k receptoru a zvolit vhodnou metodu k charakterizaci všech komponent.

V současnosti jsou využívány tři hlavní modely polymerních proléčiv.⁵ Proléčiva prvního typu uvolňují uvnitř buněk přímo aktivní molekulu. Druhý typ proléčiv obsahuje ve své struktuře více komponent, které za specifických nitrobuněčných podmínek spolu reagují, a tak formují výslednou reaktivní molekulu. Třetí typ polymerního proléčiva obvykle zahrnuje tři komponenty: reaktivní molekulu, nosič a jednotku, která zacílí konjugát na místo účinku.

Jedním z obecných modelů popisujících strukturu polymerních proléčiv je tzv. Ringsdorfův model¹². Celý skelet je kombinací několika základních jednotek. První část, polymerní kostra, kontroluje správné fyzikálně-chemické vlastnosti makromolekuly, což zahrnuje především rovnováhu mezi hydrofilitou a lipofilitou, elektrický náboj a rozpustnost systému. Druhou částí je léčivo, které musí být k polymeru vázáno kovalentně, a to buď přímo, nebo přes spojku (*spacer*), až do doby, kdy se dostane na místo účinku. Volba spojky mezi aktivním léčivem a nosičem je rozhodující, protože otevírá možnost řízení místa a míry

uvolňování aktivní substance z konjugátu hydrolytickou nebo enzymatickou degradací. Další část je označována jako *homing device* nebo *targeting moiety*, na **Obrázku 2** označena písmenem **A**, a má za úkol navést polymerní konjugát k cílové tkáni (**Obrázek 2**).⁵

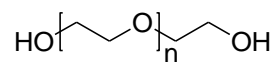


Obrázek 2 Ringsdorfův model polymerního proléčiva¹²

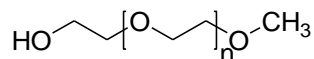
2.2 Poly(ethylenglykol)

2.2.1 Vlastnosti poly(ethylenglykolu)

Nejčastěji používanými lineárními poly(ethylenglykoly) jsou bifunkční poly(ethylenglykol) (PEG) a monofunkční α -methoxy-poly(ethylenglykol) (mPEG) (**Obrázek 3**). Na trh byl uveden firmou U. S. Pharmacopoeia v roce 1950. Oba se připravují polymerizací oxiranu katalyzovanou hydroxidovým nebo methanolátovým aniontem (**Obrázek 4**).

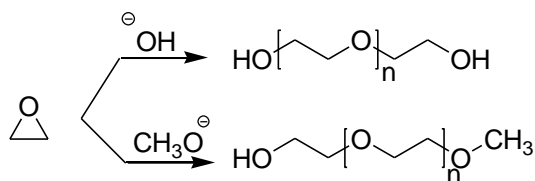


poly(ethylenglykol)



α -methoxy-poly(ethylenglykol)

Obrázek 3 Základní typy poly(ethylenglykolu)



Obrázek 4 Příprava poly(ethylen glykolu) a α -methoxy-poly(ethylen glykolu)

Dnes je PEG běžně komerčně dostupný s molekulovou hmotností od 200 do 35 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (mPEG 400 – 20 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), a to v čistotě odpovídající pro farmaceutické či biomedicínální použití, nebo také jako analytický standard pro analýzy gelové permeační chromatografie (GPC). PEGy s molekulovou hmotností mezi 200 a 600 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ jsou viskózní kapaliny, nad 1 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ vosky a od 5 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ jsou práškové, ve formě destiček, vloček, chipsů nebo i v krystalické formě, protože díky šroubovicovité struktuře dobře krystalizují z některých rozpouštědel. PEG s molární hmotností nad 20 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ je obvykle označován jako poly(ethylenoxid) (PEO), poly(oxyethylen) (POE), nebo polyoxiran (PO).

Nástup chemie PEGu přišel ve chvíli, kdy Abuchowski A.¹³ objevil fakt, že kovalentním napojením hovězího sérového albuminu (BSA = bovine serum albumine) na PEG dojde ke změně jeho imunologických vlastností. V další práci bylo publikováno, že vazbou PEGu na protirakovinný enzym L-asparginázu bakterie *Escherichia coli* vzniká PEG–L-aspargináza nevykazující oproti původnímu imunogenicitu. Dnes je tato látka prodávána společností Enzon pod obchodním názvem Oncaspar®.¹⁴

PEGy jsou dobře definované, snadno syntetizovatelné polymery s jedinečnými vlastnostmi, které umožňují jejich použití v širokém spektru aplikací jak v základním výzkumu, tak pro speciální účely. PEGy a jejich deriváty jsou rychle se rozvíjející oblastí v chemických, biomedicínálních a biotechnologických aplikacích, nejen díky jejich nízké ceně, ale i mnoha výhodným vlastnostem.

Nízkomolekulární PEG je využíván jako rozpouštědlo nebo jako levná náhrada crown etherů. Vysokomolekulární je díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem čím dál více využíván ve farmacii jako nosič léčiv, emulgátor v potravinářství či kosmetice a bývá obsažen v zubních pastách. Užívá se v přípravě na kolonoskopii (čištění střeva), event. i jako laxativum (Movicol). Povrchy některých lékařských nástrojů přicházející do styku s krví bývají pokryty polyethylen glykolovou vrstvou. U pokusných zvířat je vysokomolekulární PEG 8000 perorálně účinný v prevenci karcinomů tlustého střeva a PEG 2000 vykazuje

urychlení reparace po úrazech míchy.¹⁵

PEGy jsou schopny tvorby komplexů s širokou paletou kovů podobných těm, jaké tvoří crown ethery.¹⁶ Jsou biologicky dobře snášenlivé a snadno chemicky modifikovatelné nejrůznějšími reaktivními skupinami pomocí rutinních chemických postupů.¹⁷ Jsou dobře rozpustné v polárních i nepolárních rozpouštědlech, tedy ve vodě a většině organických rozpouštědel. Nerozpustné jsou jen v několika rozpouštědlech, jako je diethylether, diisopropylether, petrolether a ethylenglykol. Lineární PEGy vykazují vysokou schopnost eliminace látky z organismu, farmakology vyjádřenou pomocí veličiny nazývané *clearance*. Fyzikální význam *clearance* je objem, obvykle krevní plazmy, „očištěný“ od sledované látky za jednotku času.¹⁸ Organizací FDA (U.S. Food and Drug Administration) byly PEGy schváleny pro širokou škálu biomedicínálních aplikací. Hydrofilní charakter zajišťuje dobrou rozpustnost na něj vázaným hydrofobním molekulám.

2.2.2 Poly(ethylenglykol) jako nosič léčiv

PEG je nad molekulovou hmotnost $M = 400$ netoxický, neantigenní a resistantní k rozpoznávání imunitním systémem v organismu. Základní kostra PEGu s mnohonásobně vyšší molekulovou hmotností, než je léčivo na něj vázané, obecně předurčuje vlastnosti celého konjugátu. Původně špatně rozpustné aktivní látky jsou převedeny na látky rozpustné v mnoha rozpouštědlech, včetně vody. Následné reakce tak mohou být prováděny v homogenních systémech, což vede ke zkrácení reakční doby, zvýšení konverze a výtěžku.

Jedním z důležitých důvodů pro aplikaci PEGu jako modifikátoru biologicky aktivních látek je jeho strukturní jednoduchost. PEG má chemicky inertní páteř a dvě, nebo v případě mPEG jednu funkční reaktivní koncovou skupinu. Strukturou je limitován počet míst pro vazbu reaktivních molekul. Tyto slabá místa byla překonána tvorbou blokových kopolymerů alternujících segmentů PEGu a různých aminokyselin (Lys, Asp, Glu a další).

2.2.3 Funkcionalizace PEGu

Aby reagovala reaktivní molekula s PEGem, musí využít jeho koncovou -OH skupinu. Sama tedy musí obsahovat vhodnou funkční skupinu. Například v případě karboxylové

skupiny by mohla reagovat způsobem esterifikace. Je ovšem možné konjugovat i s látkami obsahujícími jiné funkční skupiny. V tom případě je ovšem nutné využít jinak funkcionalizovaný PEG. Koncová hydroxylová skupina PEGu může být na jinou reaktivnější skupinu přeměněna velmi snadno pomocí běžných reakcí organické chemie.

Většina PEGů s jednoduchými funkčními skupinami nebo skupinami připravenými speciálně pro nejrůznější účely, je dnes již komerčně dostupná. Jedná se o deriváty jak bifunkčního PEGu (PEG-X), tak monofunkčního mPEGu (mPEG-X). Vznikají mono- nebo di-substituované deriváty PEGu. Příkladem komerčně dostupných funkcionalizovaných PEGů, a to v různých velikostech, jsou deriváty, kde je X = -O-*p*-toluensulfonyl (-OTs), -O-methansulfonyl (-OMs), -brom (-Br), -acetylid (-C≡CH), -amin (-NH₂), -thiol (-CH₂CH₂SH), -azid (-N₃), -karboxylová kyselina (-COOH) a další.

V následujícím přehledu funkcionalizací PEGu je pro zjednodušení uváděna pouze varianta bifunkčního PEGu. Všechny deriváty jsou však možné připravit i v případě monofunkčního mPEGu.

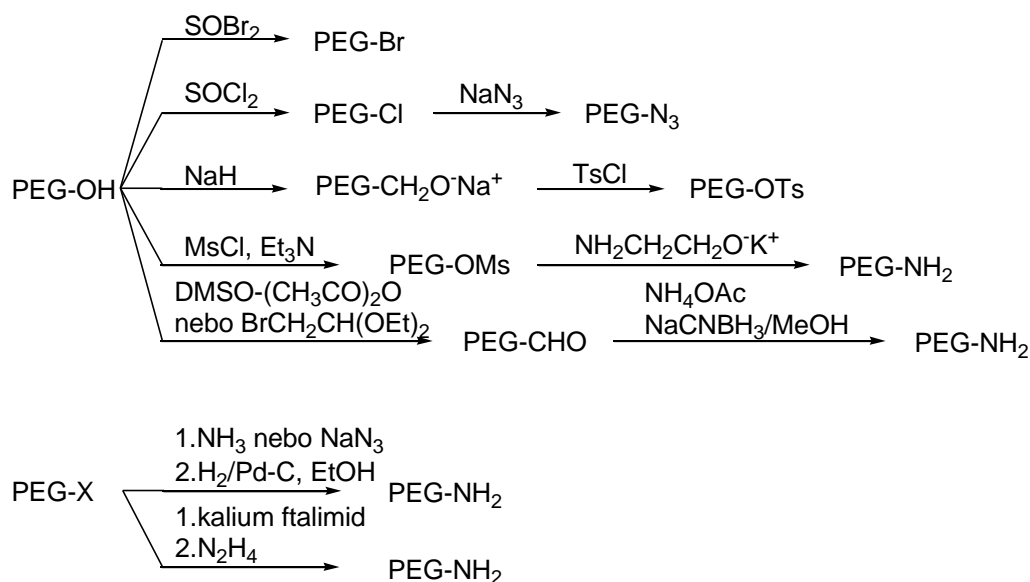
Reakcí s thionylchloridem nebo thionylbromidem v toluenu získáme stálý chlor- nebo brom-derivát. Přidáváním pyridinu¹⁹ nebo triethylaminu¹⁷ je možné zabránit štěpení etherové vazby v polyethylenovém řetězci. Tato situace ovšem nenastává například při reakci PEGu s tosylchloridem v pyridinu, kde i přesto k výrazné degradaci lineárního řetězce dochází.¹⁶ Pro přípravu tosylderivátu využijeme reakce PEGu s hydridem sodným, kdy získáme PEG-alkoxid a následně necháme zreagovat s *p*-toluensulfonylchloridem. Tímto postupem připravený PEG-OTs je výrazně méně náchylný k degradačním procesům polyethylenglykolového řetězce. Reakcí s methansulfonylchloridem v triethylaminu získáme bez zjevného štěpení PEG-OMs.

Funkcionalizované PEG-OTs a PEG-OMs obsahují dobrou odstupující skupinu a snadno se transformují na aminoderivát reakcí s amoniakem nebo azidem sodným (příprava PEG-N₃) a následnou redukcí pomocí Pd/C v ethanolu.¹⁹ Další možností je reakce PEG-OMs s kalium ftalimidem, který je následně hydrazinolýzou převeden na PEG-NH₂. Aminoderivát může být připraven také reduktivní aminací PEGu s aldehydickou funkční skupinou (PEG-CHO) kyanborohydridem sodným nebo reakcí PEG-OMs s 2-aminoethanolátem draselným. Připravený PEG-NH₂ je za vhodných podmínek možno využít k tzv. pegylaci molekul s volnou karboxylovou funkcí.

Zmiňovaný PEG-CHO připravíme oxidací PEGu systémem DMSO-acetanhydrid,

nebo substitucí $\text{BrCH}_2\text{CH}_2(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ s přidavkem *t*-butoxidu draselného¹⁶. PEG-CHO je klíčovým intermediátem pro vznik mnoha dalších modifikací využitím univerzální reaktivní aminace. S koncovými aminoskupinami tvoří PEG-CHO po redukci kyanborohydridem stabilní Schiffovy báze. Ke konjugaci molekul s koncovými aminoskupinami lze využít také PEG-tresylchlorid, epoxy-PEG nebo níže zmiňovaný PEG-COOH a jeho obměny. Jako další zajímavé funkcionalizované PEGy zmiňované v práci¹⁶ jsou deriváty fosforu, rhodia, zajímavé crown deriváty a mnoho dalších.

Snadná a poměrně rychlá (reakční doba 2 hodiny) reakce je příprava PEG- N_3 . Přípravuje se reakcí PEG-Cl s azidem sodným. Redukcí, jak již bylo zmíněno výše, poskytne PEG- NH_2 . Postup přípravy všech dosud zmiňovaných funkcionalizací PEGu je znázorněn na **Obrázku 5**.

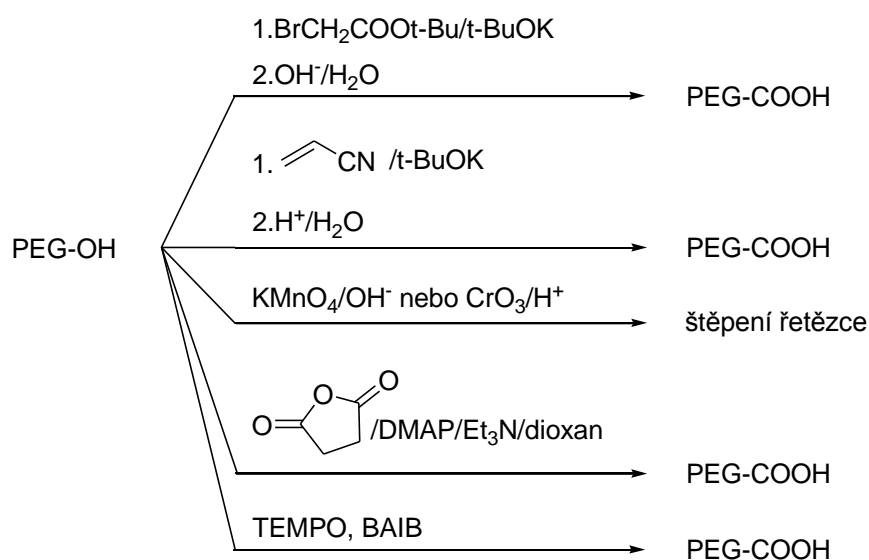


Obrázek 5 Postup přípravy funkcionalizovaných poly(ethylenglykolů)

Při výčtu různých funkcionalizací PEGu, by neměl chybět derivát s karboxylovou funkcí na konci lineárního řetězce (PEG-COOH). Způsobů přípravy karboxylové funkce je v literatuře popisováno velké množství (**Obrázek 6**).^{19,20,21} Často využívanou přípravou je reakce PEGu s estery chlor- nebo brom-octové kyseliny v alkalickém prostředí, kdy požadovaný derivát s karboxylovou funkcí získáme následnou hydrolyzou. Jinou možností je využít reakce akrylonitrilu v alkalickém prostředí a následné hydrolyzy nitril skupiny na

karboxylovou. Nejsnazší cestou by se zdála být přímá oxidace s využitím manganistanu draselného nebo oxidu chromového²⁰ v kyselém prostředí. Tento způsob je však spojován s výrazným štěpením lineárního řetězce polymeru. S. Zalipsky popisuje také reakci PEGu se sukcinanhydridem v toluenu nebo v dioxanu s přidavkem 4-dimethylaminopyridinu (DMAP) a triethylaminu.¹⁹ Zajímavou oxidaci hydroxyskupiny PEGu využitou pro přípravu PEG-COOH nebo PEG-CHO popisuje ve své práci Ch. Masson.²¹ K oxidaci využívá katalytického množství 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylu (TEMPO) a stechiometrického množství [bis(acetoxy)-jodo]benzenu (BAIB). Oxidace probíhá za mírných podmínek a byla využita k oxidaci primárních alkoholů již dříve.²²

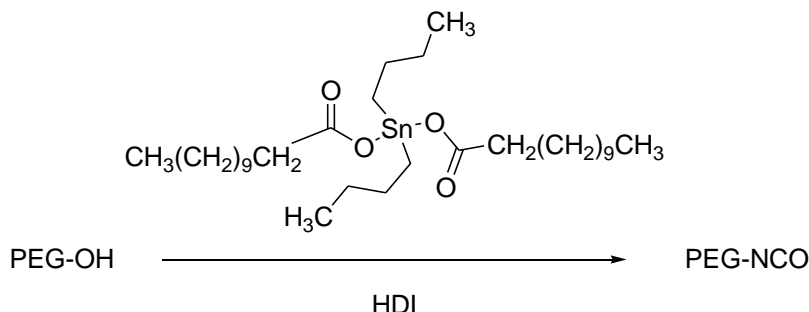
PEG-COOH je významný pro tvorbu konjugátů s reaktivními molekulami, které se nejčastěji vážou esterovou nebo amidickou vazbou. Zvýšení konverze následných reakcí můžeme docílit přípravou derivátu PEGu s koncovou hydrofobní aromatickou složkou.²³ Karboxylová skupina tak není vázána přímo na $-OCH_2CH_2-$ v řetězci PEGu, ale na substituovaném benzenovém jádře. Výhodou je jednodušší a rychlejší sledování konverze pomocí signálů aromatických vodíků v 1H NMR spektru. Při této reakci se využije reakce PEG-OMs s 4-methoxykarbonylfenoxidem. Tato reakce je popisována i pro jiné využití s jinými substituenty.^{24,25,26,27}



Obrázek 6 Postup přípravy PEG-COOH

Jako poslední z funkcionalizací, která zde bude uvedena, je PEG-isokyanát (PEG-NCO) vhodný ke konjugaci s molekulami s hydroxylovou funkcí poskytující stabilní

urethanovou vazbu. Kromě toho je PEG-NCO vysoce reaktivní s aminy. Reakce (**Obrázek 7**) vychází z PEGu, který je za bezvodých podmínek přikapáván ke směsi hexamethylen diisokyanátu (HDI) a dibutyltin dilaurátu.¹⁹

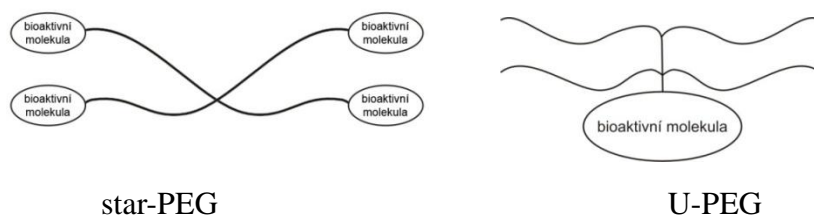


Obrázek 7 Postup přípravy PEG-NCO

F. M. Veronese²⁸ ve své práci popisuje tuto problematiku z hlediska, které funkcionalizované PEGu jsou vhodné k pegylaci s konkrétními funkčními skupinami na reaktivních molekulách, například i se skupinou –SH, která se vyskytuje zřídka. Jing Li and W. John Kao²⁹ se zabývali přípravou derivátů symetricky i nesymetricky disubstituovaných, resp. monosubstituovaných derivátů PEGu, resp. mPEGu a připravili širokou škálu modifikací.

Obecně můžeme říct, že reakce vedoucí k přípravě funkcionalizovaných PEGů mají dlouhou reakční dobu (několik hodin až dní) a probíhají za mírných podmínek. Nejčastější metodou izolace je srážení změnou rozpouštědla, a to obvykle PEG-X rozpuštěný v dichlormethanu, chloroformu nebo jiném rozpouštědle srážíme vysušeným diethyletherem. Další krystalizace je častá z propan-2-olu nebo ethanolu a v mnoha přípravách se osvědčila.

Na závěr za zmínku stojí ještě rozvětvené deriváty PEGu, pentaerythritol poly(ethylenglykol), zkráceně star-PEG, (sPEG) a tzv. „umbrella-like“-PEG, (U-PEG)³⁰. Star-PEG ve své struktuře obsahuje čtyři lineární řetězce PEGu, přičemž má čtyři volné koncové skupiny. U-PEG je naproti tomu tvořen více lineárními řetězci polymeru, přičemž reaktivní molekula má k navázání pouze jedno místo. Reaktivní molekula je jakoby vázána uprostřed lineárního řetězce PEGu (**Obrázek 8**).

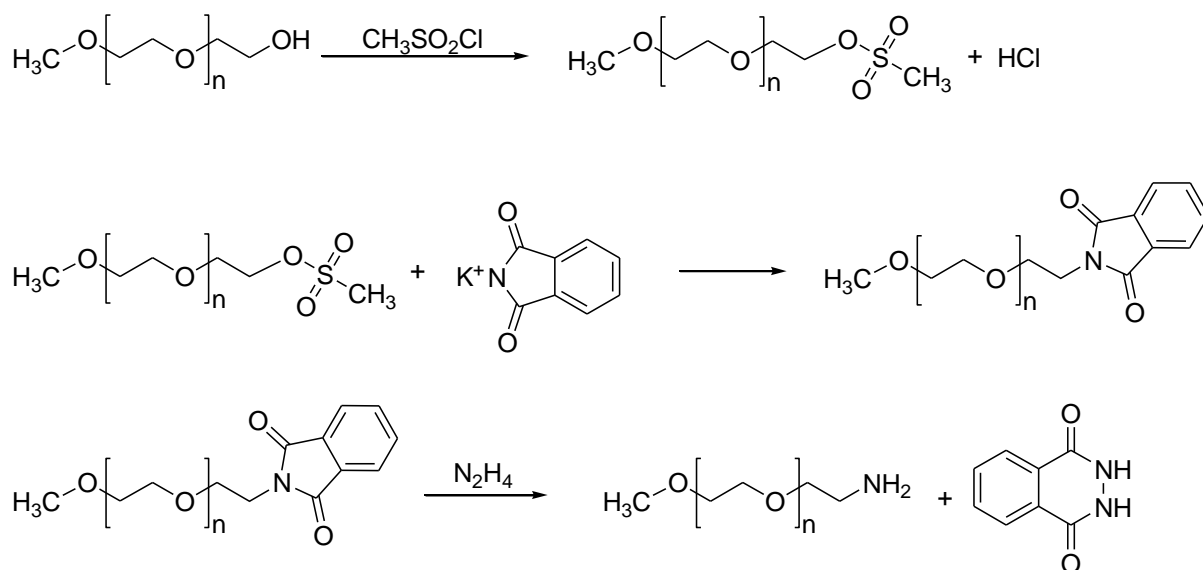


Obrázek 8 Strukturní schéma star-PEG a U-PEG s navázanou bioaktivní molekulou

2.3 Vlastnosti a příprava PEG-NH₂

Výhodou zvýšené reaktivity PEG-NH₂ ve srovnání s hydroxyderivátem je relativně snadné spojení s reaktivními molekulami prostřednictvím reakcí, jejichž výsledkem je vznik amidů, sekundárních aminů, karbamátů, derivátů močoviny a thiomčoviny, z nichž všechny jsou stabilní *in vivo*.

PEG-NH₂ je komerčně dostupný v různých velikostech od 400 – 40 000 jako bifunkční i jako monofunkční derivát. Jeho pořizovací cena je poměrně vysoká, je výhodné ho proto připravit, a to nejčastěji třístupňovou syntézou z výchozího PEG-OH, resp. methoxy-PEG-OH.³¹ Hydroxylová skupina je nejprve převedena na methansulfonovou (PEG-OMs, resp. mPEG-OMs) reakcí s methansulfonylchloridem. PEG-OMs, resp. mPEG-OMs je dále převeden reakcí s kalium-ftalimidem na poly(ethylenglykol)ylftalimid, (PEG-NHPhtal, resp. mPEG-NHPhtal), ze kterého je následnou hydrazinolýzou získán žádaný PEG-NH₂, resp. mPEG-NH₂. Příprava mPEG-NH₂ je uvedena na **Obrázku 9**.



Obrázek 9 Příprava α -methoxy- ω -amino-poly(ethylenglykolu)³¹

Zalipsky S.¹⁹ popisuje i jiný postup. Vychází z mPEG-OH (M = 1900). Nejprve byla provedena chlorace použitím thionylchloridu, následně byl chlorid převeden na azid azidem sodným a ten redukován na aminoderivát palladiem na uhlíku.

Koncová aminoskupina je vůči acylačním činidlům mnohem reaktivnější než hydroxylová. S karboxylovými skupinami poskytuje amidickou vazbu. Tento postup je úspěšný pouze tehdy, nejsou-li ve sloučenině interagující s PEG-NH₂ karboxylovou skupinou přítomny další volné aminoskupiny, protože tehdy může docházet k zesíťování.²⁸ V případě proteinových léčiv je téměř nemožné se těmito procesům vyhnout. Pro takové konjugace bylo využito reakce karboxylové skupiny léčiva s PEG-hydrazidem.³²

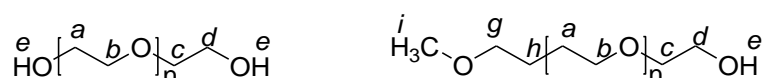
2.3.1 Charakterizace PEG-NH₂

Charakterizace produktů probíhá dnes již rutinními analytickými metodami jako ¹H NMR, ¹³C NMR spektroskopie, FT-IR, MS-MALDI-TOF, GPC, HPLC a další.

NMR (nuclear magnetic resonance) spektroskopie je dnes již běžně využívanou metodou pro charakterizaci polymerů. Role NMR spektroskopie při určování složení polymerů a struktury je bezkonkurenční, zvláště vzhledem k jejímu neustálému rozšiřování. Naopak její potenciál pro stanovení molekulové hmotnosti se mnohdy podceňuje. Interpretace NMR spekter se může zdát v porovnání se spektry nízkomolekulárních látek na

první pohled komplikovanější, zvláště potom u složitějších konjugátů nebo blokových kopolymerů.

^1H NMR spektrum samotného PEGu, případně mPEGu obsahuje charakteristický signál vodíků *a* a *b* (viz **Obrázek 10**) při 3,51 ppm, případně malé signály $\delta(c)$ 3,57 ppm, $\delta(d)$ 3,66 ppm, $\delta(g)$ 3,38 ppm, $\delta(h)$ 3,44 ppm. V případě mPEG je charakteristickým signálem signál vodíků methoxyskupiny $\delta(i)$ 3,24 ppm. Vodíky hydroxyskupin (*e*) jsou tzv. kyselé protony a jedná se často o rozšířené signály s širokým rozmezím chemického posunu.



Obrázek 10 Struktura poly(ethylenglykolu) a α -methoxy-poly(ethylenglykolu)

Integrací plochy signálu vodíků *a* a *b* dostaneme vysokou hodnotu integrální intenzity *I*. Tento signál je často brán za základní a integrujeme ho na hodnoty odpovídající velikosti použitého PEGu (např. PEG 5000, δ 3,51 ppm, $I = 450,00$). Že stanovená integrální hodnota plochy pod křivkou odpovídá velikosti měřeného PEGu, vyplývá z jednoduchého výpočtu. Tento velký shluk signálů zastupuje čtyři vodíky skupiny $-\underline{\text{CH}_2}\underline{\text{CH}_2}\text{O}-$ ($M_w(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-) = 44,05$). Proto potom $I = 5000/44,05 \cdot 4 = 450,00$. Obdobným výpočtem získáme přibližný počet jednotek *n* v řetězci polymeru $[-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-]_n$. Pro PEG 5000 a $I = 450,00$ je $n = I/4 \approx 112$.

Při vyhodnocování ^1H NMR spekter blokových kopolymerů PEGu s polyaminokyselinami (PEG-*b*-PAA), které budou zmiňovány dále, a dalších konjugátů lze způsobem obdobným výše uvedenému dopočítávat počty jednotek aminokyselin v řetězci a určit tak teoretické molekulové hmotnosti (MW) celých makromolekul.

Při syntéze polymerů zpravidla vznikají makromolekuly o nejednotném polymeračním stupni, tudíž i s nestejnou relativní molekulovou hmotností. Zastoupení jednotlivých makromolekul je charakterizováno distribuční křivkou. Relativní molekulová hmotnost polymeru je potom definována jako průměrná hodnota jejich relativních molekulových hmotností. V praxi se nejčastěji používají dva různé průměry molekulových hmotností, a to číselný (početní) střed (M_n), který vychází z počtu makromolekul v jednotlivých frakcích a hmotnostní střed (M_w), který je vztažen k hmotnosti makromolekul v jednotlivých frakcích. Střední molekulovou hmotnost polymeru nelze jednoduše vypočítat a zjišťuje se

experimentálně. Pro účely získání distribučních křivek je využívána gelová permeační chromatografie (GPC).

Číselně je střední relativní molekulová hmotnost \overline{M}_n aritmetický průměr hmotností všech molekul. Je definována jako poměr součtu hmotností M_i všech molekul i k počtu všech molekul N_i a platí tedy tento vztah

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}.$$

Pro hmotnostně střední relativní molekulovou hmotnost \overline{M}_w platí vztah

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}.$$

Z podstaty výpočtu je zřejmé, že oba dva průměry budou mít stejnou hodnotu pro tzv. monodisperzní systémy s jednotnou velikostí molekul nebo extrémně úzkou distribuční křivkou. Je zřejmé, že čím bude distribuční křivka molekulových hmotností širší, tím bude poměr hmotnostního k číselnému průměru vyšší. Tento poměr je označován jako index polydisperzity PD a je definován vztahem

$$PD = \overline{M}_w / \overline{M}_n.$$

Výstupem analýzy GPC je kromě výše zmíněných hodnot M_n , M_w a PD , také M_v (viskozitní střed), M_z (střed velikostí) a hodnota M_p , která se na distribuční křivce relativních molekulových hmotností rovná vrcholu píku.

V průmyslové výrobě je upřednostňována polymerace PEGu aniontová. Anionická centra jsou aktivní po dlouhou dobu ve srovnání s dobou polymeračního procesu (což je zásadní rozdíl oproti radikálové polymeraci, kde životnost radikálu je velmi krátká). Znamená to, že při takovéto aniontové polymeraci je snadno dosaženo úplné konverze monomeru, distribuce molekulových hmotností je velmi úzká a je získán polymer s nízkou hodnotou polydisperzity ($PD \leq 1,2$).³³

2.4 Polymerní proléčiva antimikrobiálních léčiv

2.4.1 Konjugace antimikrobiálních léčiv s PEG-NH₂

Velká oblast zabývající se PEGem jako možným biodegradabilním nosičem zlepšujícím vlastnosti a chování léčiv v organismu je oblast protirakovinných léčiv. Spousta z nich je již ve fázi klinického testování, např. PEG-paclitaxel, PEG-camptothecin (**Obrázek 11**), jiné už byli schváleny a uvedeny na trh.⁵



Obrázek 11 Příklady léčiv ve fázi klinického testování s poly(ethylenglykolem) jako nosičem

S PEGem ve smyslu polymerních proléčiv je spojováno spousta jmen a léčiv (např. amfotericin B³⁴, doxorubicin, daunomycin³⁵, camptothecin, paclitaxel³⁶, curcumin, saquinavir³⁷). Některé z nich jsou uvedeny v následujícím přehledu a struktury konjugátů pak také na **Obrázcích 12 - 15**.

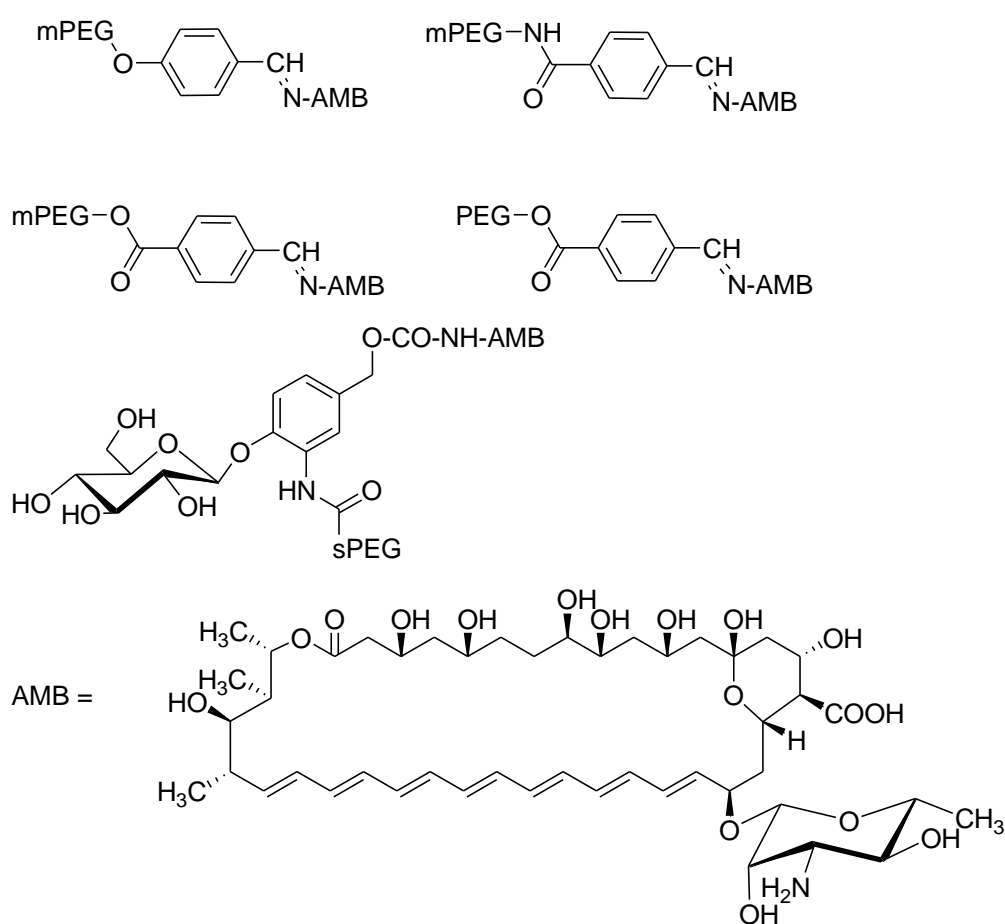
I. Konjugace PEG-NH₂ s amfotericinem B

V literatuře diskutovaným léčivem ve spojitosti s amino-PEGem je polyenové makrocyclické antimykotikum amfotericin B (AMB). Pracovní skupina kolem M. Sedláka^{38,34,39,40} se zabývala přípravou kovalentních i nekovalentních konjugátů AMB s různými formami PEGu a dalších nosičů. Je popisována syntéza konjugátu pro intravenózní aplikaci, ve kterém je 50 %mol AMB vázáno kovalentní karbamátovou vazbou k mPEG a 50 %mol nekovalentní vazbou. Nejpravděpodobněji se jedná o π - π interakci nebo vodíkovou vazbu mezi kovalentně vázaným AMB a jeho volnými jednotkami. R. B. Greenwald prezentoval ve své práci⁴¹ navázání AMB na PEG pomocí labilní karbamátové vazby. Tento typ konjugace se však zdá být nevhodný kvůli relativně rychlému uvolňování AMB z nosiče 1,6-benzyl eliminací do krevního řečiště. Dochází ke zvyšování jeho koncentrace v ledvinách, což je nežádoucí zejména kvůli jeho nefrotoxicitě.

Zmiňovány jsou i jiné způsoby navázání AMB. PEG-OMs, PEG-OH nebo PEG-NH₂

(resp. stejné deriváty mPEG) je modifikován reakcí s příslušným derivátem benzoové kyseliny nesoucí na benzenovém jádře aldehydickou skupinu za vzniku etherové, esterové nebo amidické vazby a AMB je poté navázán pH-senzitivní iminovou vazbou ve smyslu Schiffovy báze. Popisované struktury jsou znázorněny na **Obrázku 12**. Byly navrženy takové konjugáty, které AMB uvolňují selektivně pouze v místě očekávaného výskytu fungálních patogenů, to znamená v místě se snižující se hodnotou pH. K cílenému uvolňování AMB z nosiče dochází prostřednictvím kyselé hydrolyzy iminovazby.³⁹

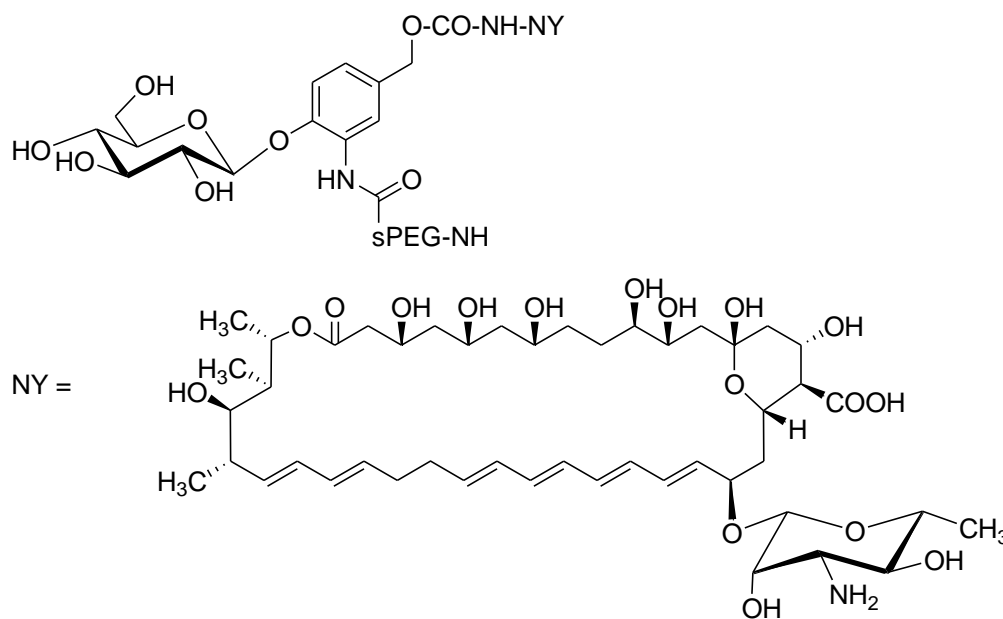
Vzhledem k faktu, že mnoho parazitických patogenních plísní (*Aspergillus*, *Candida* nebo *Trichosporon*) vlastní specifický enzym hydrolázu β -glukosidázu, bylo přistoupeno i k vývoji nového typu konjugátu AMB₄-sPEG (**Obrázek 12**) obsahující glykosidickou vazbu k molekule glukózy.^{40,34} Léčivo je tedy uvolňováno pouze v místě zasaženém patogenními organismy.



Obrázek 12 Struktura konjugátů mPEG, resp. PEG s amfotericinem B a β -glukosidáza sensitivního konjugátu AMB₄-sPEG^{39,40}

II. Konjugace PEG-NH₂ s nystatinem

Nystatin (NY), amfotericinu B podobné léčivo, bylo izolováno ze *Streptomyces noursei* a stejně tak působí proti plísním kmenů *Aspergillus*, *Candida*, *Trichosporon* a další. Navíc působí i tam, kde AMB selhává. Mechanismus jeho účinku je přednostně založen na vyvazování ergosterolu z buněčných membrán, čímž způsobí jejich smrt. Byly připraveny deriváty nystatinu, které uvolňují NY pouze v místě zasaženého orgánu.⁴² Struktura konjugátu NY₄-sPEG byla vyvinuta analogicky k AMB₄-sPEG s ohledem na to, že patogenní kmeny plísní vlastní enzym hydrolázu β-glukosidázu, která není ve zdravém lidském těle obsažena. Základní strukturální jednotka NY₄-sPEG je vázána β-glykosidickou vazbou k molekule fenyl-β-D-glukopyranosu (**Obrázek 13**). Oproti AMB₄-sPEG, kde byly jednotlivé strukturální jednotky vázány karbamátovými vazbami, zde se jedná vlastně o substituovanou močovinu.



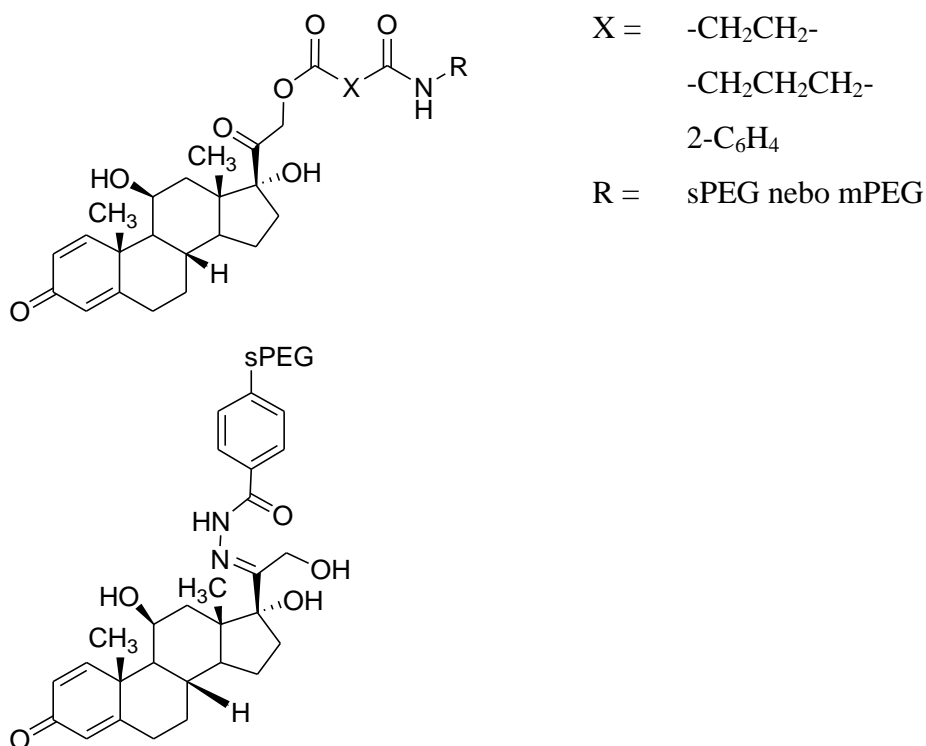
Obrázek 13 Struktura β-glukosidáza sensitivního konjugátu NY₄-sPEG⁴²

III. Konjugace PEG-NH₂ s prednisolonem

Prednisolon (PS), patří do skupiny glukokortikoidů s vysokým protizánětlivým účinkem, proto je užíváno zvláště při prevenci odmítnutí orgánu při transplantacích. Nicméně má velké množství nežádoucích účinků. Je proto snaha tyto nepříznivé účinky minimalizovat novými farmaceutickými formulacemi.

Byly připraveny konjugáty, jejichž struktura je založena na spojení mezi PS a PEG pomocí různých spojek z dikarboxylových kyselin (jantarová, glutarová, adipová a jiné).⁴³ PS je vázán k jedné karboxylové skupině esterovou funkcí a k druhé karboxylové skupině je amidickou vazbou vázán PEG-NH₂ (**Obrázek 14**). PS je uvolňován z konjugátu působením karboxyesterázy, která je přítomna v transplantovaných játrech. Rychlost celkového vylučování PS z organismu byla dále snížena zavedením do struktury cyklodextrinové jednotky (polypseudorotaxany).⁴³

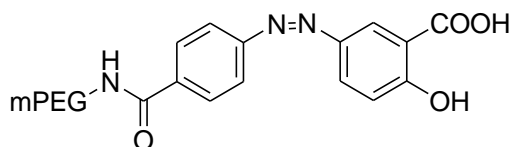
E. Bílková⁴⁴ připravila také pH senzitivní konjugát hydrazid-hydrazonového typu (-CONH-N=C-) reakcí PS s hydrazonhydrátem a následnou konjugací vzniklého hydrazonu se sPEG-COOH (M=20 000), viz **Obrázek 14**. Opět se prokázalo výrazné snížení celkového uvolňování PS z organismu přípravou polypseudorotaxanů. Porovnáním s obecným konjugátem, je u konjugátu chráněného α -cyklodextrinem 3,5krát snížena kyselá katalyzovaná hydrolýza.



Obrázek 14 Struktura konjugátů sPEG, příp. mPEG s prednisolonem a pH senzitivní konjugát hydrazid-hydrazonového typu PS₄-sPEG^{43,44}

IV. Konjugáty PEG-NH₂ s mesalazinem

Pro léčbu nespecifických zánětů střev se využívá široká škála léčiv. Jednou ze skupin jsou deriváty kyseliny aminosalicylové. Příkladem je mesalazin (5-aminosalicylová kyselina). Toto léčivo samo o sobě je nespecifické a velmi rychle se vstřebává sliznicí horní části gastrointestinálního traktu, což brání dobré dostupnosti v tlustém střevě a může tak způsobit nefrotický syndrom jako vedlejší efekt. Ke zvýšení specifičnosti a zároveň snížení toxicity mesalazinu bylo využito přítomnosti enzymu azoreduktázy v tlustém střevě. Byla použita azospojka mezi mesalazinem a PEG-NH₂ a vytvořeno tak nové polymerní proléčivo s odlišnými příznivějšími vlastnostmi⁴⁵ (**Obrázek 15**).



Obrázek 15 Struktura konjugátu mPEG-NH₂ s mesalazinem⁴⁵

Většina uvedených konjugátů je připravena k dalšímu testování na zvířecích modelech nebo do fáze klinického testování.

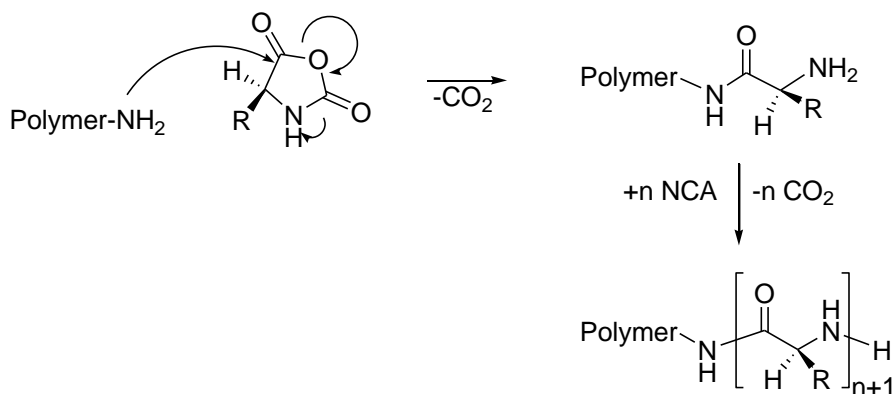
2.4.2 *Ring-opening* polymerace (ROP)

PEG jako bifunkční, resp. mPEG jako monofunkční obsahuje na konci řetězce dvě, resp. jednu funkční skupinu schopnou konjugace s vhodnou reaktivní molekulou. V případě sPEGu jsou to čtyři skupiny. Tato možná nevýhoda v případech, kdy by bylo třeba na nosič zachytit více molekul léčiva najednou a zvýšit tak jeho distribuci v organismu, byla překonána přípravou blokových kopolymerů s aminokyselinami.

Blokové kopolymery jsou složeny ze dvou nebo více kovalentně vázaných polymerních bloků s odlišnými chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Chování takových vícefázových systémů můžeme řídit změnou poměru délek jednotlivých bloků, distribucí molekulových hmotností a volbou typu jednotlivých polymerních bloků.

Nejčastěji využívaná cesta v syntéze kopolymerů syntetického polymeru a polypeptidového segmentu je *ring-opening* polymerace *N*-karboxyanhydridu (NCA)

aminokyseliny iniciované polymerem s koncovou aminoskupinou⁴⁶ (viz **Obrázek 16**).



Obrázek 16 Příprava blokového kopolymeru *ring-opening* polymerací *N*-karboxyanhydridu⁴⁶

Ve většině případů je polypeptidový blok tvořen γ -benzyl-L-glutamovou kyselinou, β -benzyl-L-asparagovou kyselinou nebo *N*^ε-benzyloxykarbonyl-L-lysinem. Polymerace NCA od těchto aminokyselin patří mezi nejlépe kontrolovatelné, využívají se ovšem i další.

Postranní řetězec α -aminokyseliny, který může zasahovat do průběhu syntézy NCA, nebo do samotné polymerace musí být chráněn vhodnou chránicí skupinou, která je odstraněna až po kompletní polymerizaci. L-Lysin, který je velmi často využíván k přípravě polypeptidových řetězců má ϵ -aminoskupinu chráněnou obvykle benzyloxykarbonylovou skupinou (Z). Po reakci je tato skupina odstraněna hydrogenací nebo za silně kyselých podmínek pomocí například HBr/AcOH nebo kyselinou trifluoroctovou (TFA). Tyto podmínky deblokace mohou v mnoha případech představovat určité omezení ve výběru nebiologického segmentu kopolymeru. Hernández, J. R. a Klok na příkladu L-lysinu využívají jako chránicí skupiny trifluoracetamid (TFAA), *t*-butylkarbamát (BOC), 9-fluorenylmethylkarbamát (Fmoc) a 6-nitroveratryl karbamát (Nvoc) jako chránicí skupiny, které lze odstranit za daleko mírnějších podmínek.⁴⁷

Chemická povaha polymerního bloku kopolymeru může být obměňována v daleko větší míře. Typickými příklady hydrofobních polymerů jsou polystyren, polybutadien, polyisopren, polymethylmethakrylát, polypropylenoxid, polydimethylsiloxan. Ve vodě rozpustné polymery zahrnují polyethylenoxid, poly(vinylalkohol) a poly(2-methyloxazolin).⁴⁶

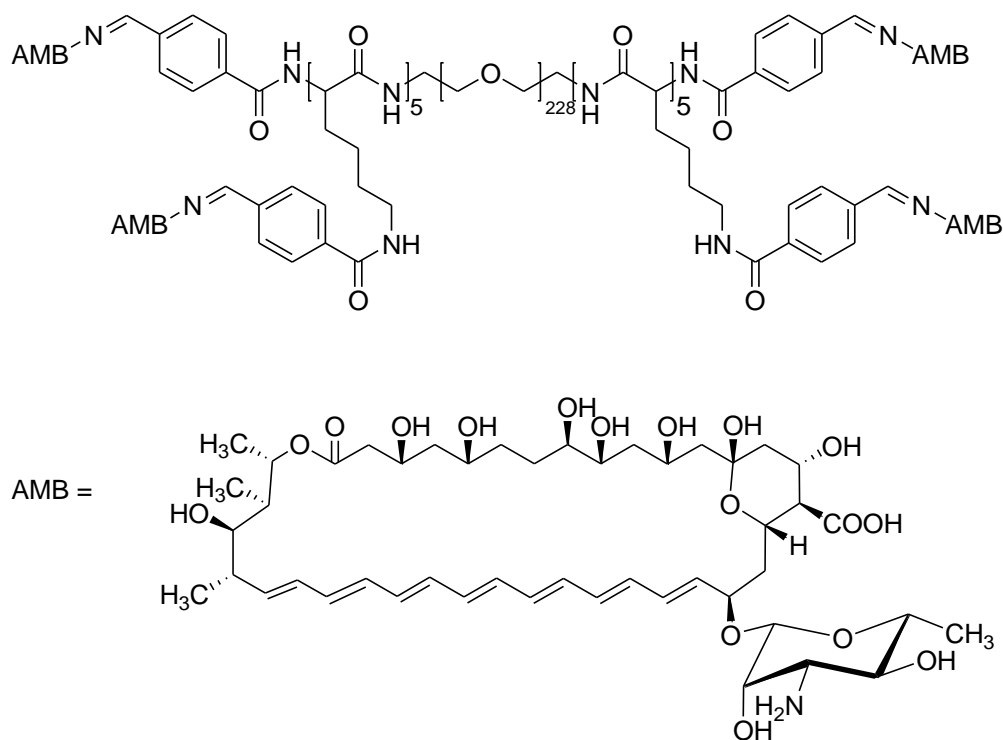
Ring-opening polymerací iniciovanou monofunkčním polymerem s jednou primární koncovou aminoskupinou syntetizujeme lineární kopolymer s dvěma bloky (polymer-polypeptid). Použijeme-li α - ω -bifunkční polymer, dostaneme kopolymer s vnitřním centrálním polymerním řetězcem a dvěma vnějšími polypeptidovými bloky (polypeptid-

polymer-polypeptid). K tvorbě víceramenných kopolymerů je možno využít větvených polymerů (např. sPEG).

2.4.3 Příklady využití ROP v přípravě blokových kopolymerů s PEG-NH₂

Z výše zmiňovaných polyaminokyselin je ROP *N*^ε-benzyloxykarbonyl L-lysinu NCA (L-Lys(Z)-NCA) jedna z nejlépe kontrolovatelných.⁹ PEG a PLL byly kovalentně spojovány do dibloků, tribloků a nejrůznějších makromolekulárních uspořádání. Některá z nich byla dále konjugována s dalšími molekulami, jako např. vitaminy⁴⁸, kyseliny⁴⁹, cukry⁵⁰, léčiva¹⁰. Mohou být formovány do polyiontových komplexů, do kterých lze zavádět další ligandy a studovat tak chování komplikovaných polymerních micelárních struktur.⁵¹ Ať už se jedná o problematiku léčiv⁵² nebo genů⁵³ a jejich cíleného transportu.

ROP připravený blokový kopolymer poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysin) (PEG-*b*-PLL) byl využit pro přípravu nového typu konjugátu léčiva AMB. Mohlo tak být iminovou vazbou na polymerní nosič navázáno více molekul AMB (poly(ethylenglykol)-[*b*-poly(L-lysin)₅]₂(AMB)₁₂)¹⁰ (**Obrázek 17**).

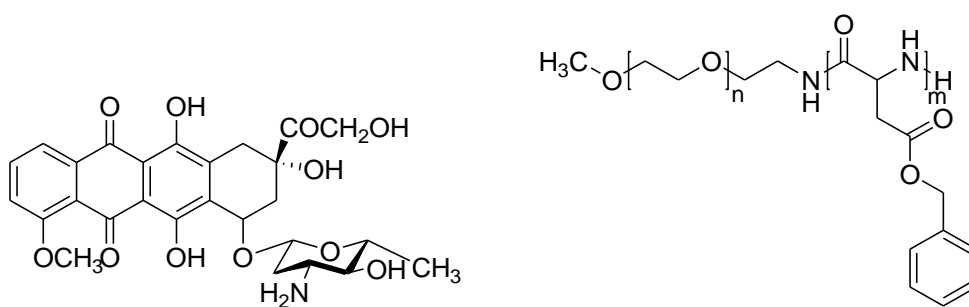


Obrázek 17 Struktura konjugátu poly(ethylenglykol)-[*b*-poly(L-lysin)₅]₂(AMB)₁₂¹⁰

Jiný případ je využití blokových kopolymerů PEG-*b*-PLL a PEG-*b*-PAsp k vytvoření nabitého komplexu shlukujícího se ve vodném prostředí do micel prostřednictvím elektrostatických interakcí. PLL zaujímá funkci kladně nabitě částice (polykation) a poly(asparagová kyselina) (PAsp) záporně (polyanion). Dvojice opačně nabitých segmentů blokových kopolymerů s PEGem přináší novou možnost využití jako nosiče pro nabitě molekuly v oblasti cílené distribuce léčiv.⁵⁴ Na obdobném principu byla postavena i příprava komplexů s kyselinou retinovou.⁴⁸

Lineární polymery jsou používány jako možné nosiče pro komplexy gadolinia. V medicíně se sloučeniny gadolinia používají jako kontrastní látky při vyšetření pacienta metodou magnetické rezonance. Injekčně aplikované soli gadolinia slouží ke zvýraznění odezvy vyšetřované tkáně. Pro tento účel byl studován blokový kopolymer α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysin) (mPEG-*b*-PLL), na který bylo amidickou vazbou navázáno chelační činidlo, do něhož byly chelační potom zavedeny ionty gadolinia.⁵⁵

Cytostatikum doxorubicin, DOX (**Obrázek 18**) bylo díky nízké rozpustnosti kopolymeru ve vodě vázáno nevazebnými interakcemi na micely tvořené blokovým kopolymerem poly(ethylenglykol)-*b*-poly(β -benzyl-L-aspartát) (PEG-*b*-PBLA).⁵⁶ Tvorbou DOX-micel bylo dosaženo zlepšení dostupnosti DOX v krevním oběhu. Kopolymer byl připraven ROP *N*-karboxyanhydridu β -benzyl-L-asparagové kyseliny iniciované koncovou aminoskupinou ω -amino- α -methoxy-PEGu.



Obrázek 18 Struktura DOX a PEG-*b*-PBLA⁵⁶

2.5 Antimykobakteriální léčiva

Infekce je proniknutí choroboplodných (patogenních) mikroorganismů (baktérií, virů, plísní, prvoků) nebo cizopasných mnohobuněčných organismů (např. červů) do organismu

a jejich pomnožení, které může vést ke vzniku infekční choroby. K potlačování již vzniklých infekcí se používají látky antibakteriální, antimykotika, nazývaná též antifungální látky, působící proti plísním, chemoterapeutika protivirová, chemoterapeutika antiprotozoární (látky potlačující protozoární infekce) a antibiotika (látky produkované mikroorganismy).⁵⁷

Míru účinku chemoterapeutik charakterizuje antimikrobiální účinnost. Vyjadřuje se pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC), tj. nejnižší koncentrace dané látky, která *in vitro* zastaví růst příslušného mikroorganismu, nebo pomocí minimální baktericidní koncentrace (MBC), tj. nejnižší koncentrace dané látky, která *in vitro* způsobí usmrcení příslušného mikroorganismu. Tyto koncentrace se stanovují zřed'ovacími (dilučními) experimenty.

Mykobakterie způsobují závažná onemocnění. V našich podmínkách je to tuberkulóza (TBC) vyvolávaná kmeny *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. fortuitum* a *M. kansasii*. V subtropických a tropických oblastech se vyskytuje *M. leprae* způsobující lepru.

V roce 2010 bylo do Registru TBC ČR nahlášeno celkem 680 onemocnění TBC všech forem a lokalizací. V předcházejícím roce (2009) to bylo 710 TBC onemocnění (632 TBC dýchacího ústrojí a 78 TBC jiných lokalizací). Za rok tak poklesl počet hlášených v průměru o 4 %. Incidencí TBC nižší než 10/100 000 obyvatel patříme již několik roků mezi evropské země s příznivou situací TBC.⁵⁸

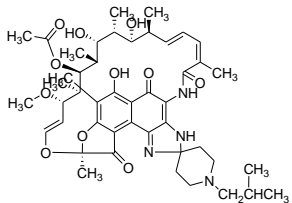
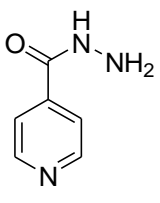
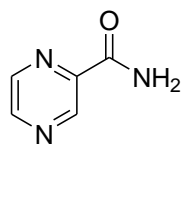
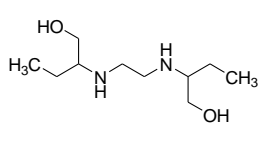
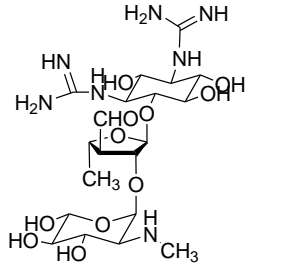
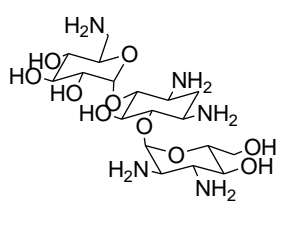
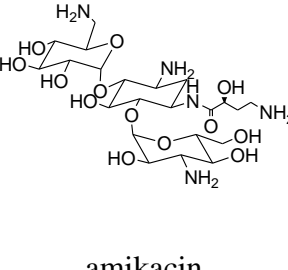
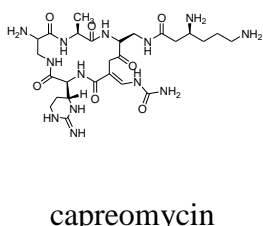
Celosvětově představuje tuberkulóza pro populaci značnou zdravotní hrozbu. Postihuje až třetinu světové populace. Dle World Health Organisation (WHO) v roce 2009 zemřelo na TBC 1,7 milionů lidí, z toho 600 000 žen a 380 000 lidí nakažených virem HIV. Na jeden den tedy připadá průměrně 4 700 úmrtí. V roce 2009 bylo nahlášeno 9,4 milionů nových případů onemocnění. Z dlouhodobého hlediska je zaznamenán pokles úmrtnosti od roku 1990 o 35 %.⁴

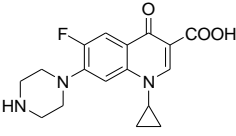
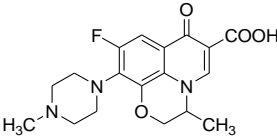
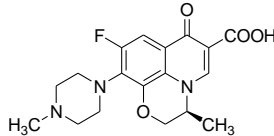
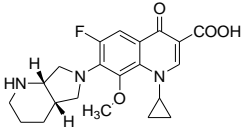
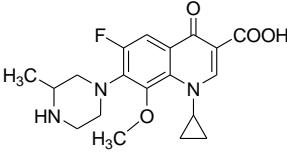
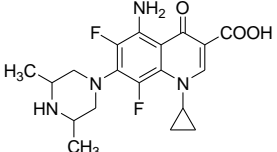
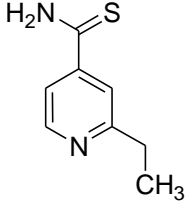
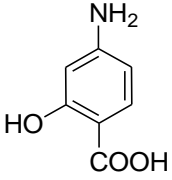
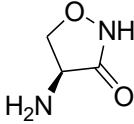
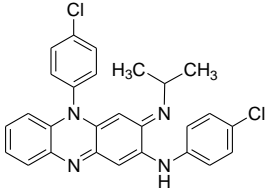
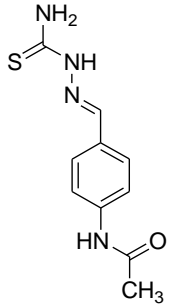
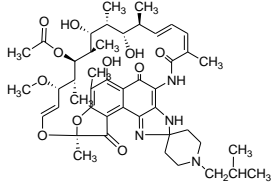
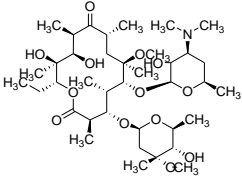
Velkou hrozbou jsou různé kmeny mykobakterií rezistentní vůči antituberkulotikům první volby používaným k léčbě. Multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB) je forma TBC, jejíž léčba je obtížná a nákladná a nereaguje na léčiva první volby – rifampicin a isoniazid. V roce 2008 na tento typ TBC bylo evidováno 440 000 nových případů onemocnění.⁴ Extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TB) je forma TBC, která nastává, když pacient vykazuje odolnost navíc i proti jednomu z aminoglykosidických léčiv. Výskyt XDR-TB je potvrzen již v 58 zemích světa. Nejvíce nebezpečí přináší mykobakterie objevené v roce 2009, které jsou

rezistentní k léčivům první i druhé volby. Tento druh je nazýván totální rezistence (TDR-TB). Příčinou zvyšujícího se výskytu rezistentních kmenů je upadající kvalita léčby (pacienti jsou léčeni pouze jedním nebo dvěma léky), zejména z důvodu finanční náročnosti. Asi 5 % případů multirezistentní tuberkulózy je extenzivně rezistentní. Úspěšnost léčby tohoto typu je pouze 30 %.

Současná strategie terapie, dle doporučení WHO, standardního léčebného režimu se dělí z časového hlediska do dvou léčebných fází: iniciační intenzivní fáze a pokračovací fáze. Léčba se nejčastěji zahajuje kombinací léků rifampicin (RIF), isoniazid (INH), pyrazinamid (PZA) a ethambutol (ETB), 4 – 5 tablet denně po dobu dvou měsíců (kombinovaná tableta RIF/INH/PZA/ETB - 120/60/300/200 mg). Ve druhé fázi se potom užívá nejčastěji kombinovaná tableta RIF/INH další čtyři měsíce.⁵⁹ INH likviduje rychle se množící mykobakterie v prvních dvou týdnech. RIF a PZA hrají důležitou roli ve sterilizaci poškození způsobeném usmrcenými organismy. Tyto dvě léčiva jsou klíčová po celých šest měsíců léčby. Použití této kombinace léčiv k léčbě tuberkulózy snížila dobu terapie z 18 měsíců na šest. Při rezistenci k jednomu nebo více léčivům se léčba přesouvá k léčivům méně efektivním, více toxickým a s více nebezpečnými vedlejšími účinky. Přehled základních dnes používaných léčiv je shrnut v **Tabulce 1**.

Tabulka 1 Přehled dnes nejvíce používaných antimykobakteriálních léčiv⁵⁹

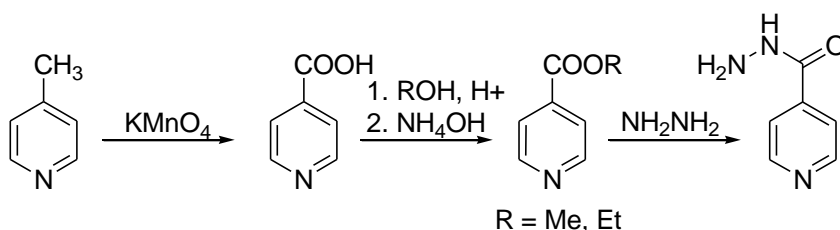
<p>Léčiva 1. volby</p>  <p>rifampicin</p>	 <p>isoniazid</p>	 <p>pyrazinamid</p>	 <p>ethambutol</p>
<p>Aminoglykosidy</p>  <p>streptomycin</p>	 <p>kanamycin</p>	 <p>amikacin</p>	 <p>capreomycin</p>

<p>Fluorochinolony</p>  <p>ciprofloxacin</p>	 <p>ofloxacin</p>	 <p>levofloxacin</p>	 <p>moxifloxacin</p>
 <p>gatifloxacin</p>	 <p>sparfloxacin</p>		
<p>Léčiva 2. volby</p>  <p>ethionamid</p>	 <p><i>p</i>-aminosalicylová k.</p>	 <p>cykloserin</p>	
<p>Ostatní</p>  <p>clofazimin</p>	 <p>thiacetazon</p>	 <p>rifabutin</p>	 <p>clarithromycin</p>

Bez nových a zdokonalených režimů vývoje nových léčiv a léčby tuberkulózy, včetně léčby pro pacienty trpící rezistentní TBC a současně infikovaných HIV/AIDS, nelze vymýcení tohoto onemocnění dosáhnout. Léky používané v terapii tuberkulózy pochází z velké většiny ze 40. – 50. let minulého století. Důraz při vývoji nových antituberkulotik je kladen zejména na zkrácení celkového trvání chemoterapie, redukce celkového počtu dávek, zlepšení léčby rezistentních kmenů a identifikace a zlepšení léčby latentní TBC infekce.

2.5.1 Antimykobakteriální léčiva a PEG

Isoniazid (isonicotinoylhydrazid, INH) je v současnosti léčivem 1. volby v prevenci a léčbě tuberkulózy. Byl objeven v roce 1912 a v roce 1951 byl prokázán jeho účinek proti tuberkulóze. Na rostoucí mykobakterie tuberkulózy působí INH baktericidně inhibicí syntézy mykolových kyselin, které jsou důležité pro formaci lipidů v buněčné stěně. Uvedením isoniazidu na trh (jako první získala v roce 1952 patent společnost Roche na svoji verzi Rimifon®) bylo možné poprvé tuberkulózu přiměřeným způsobem léčit. INH se nikdy neužívá samostatně, protože se k němu vytváří velmi rychle rezistence. Je rozšířen po celém světě, je levný a je obecně dobře snášen. Připravuje se hydrazinolýzou methyl- nebo ethylesteru kyseliny isonikotinové, který je snadno dostupný oxidací γ -pikolinu a následnou esterifikací vzniklé kyseliny (**Obrázek 19**).

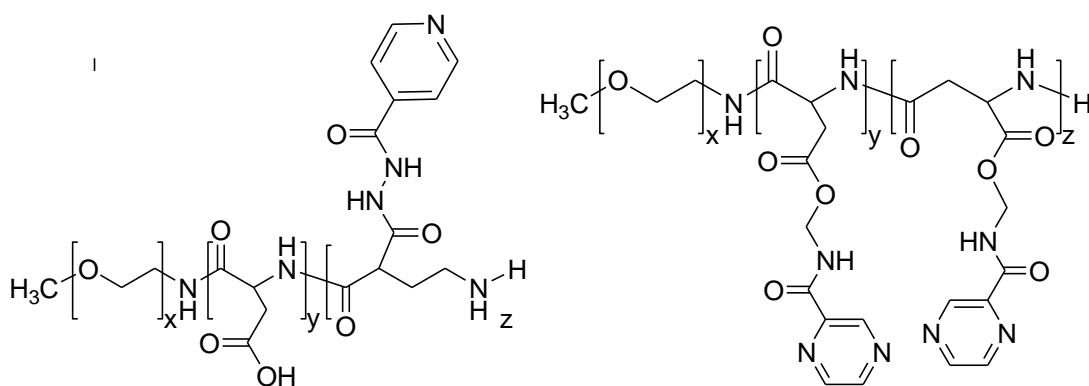


Obrázek 19 Syntéza isoniazidu

Mechanismus jeho účinku není plně objasněn. Isoniazid je sám o sobě proléčivem a musí být aktivován pomocí enzymu katalázy-peroxidázy, který je u *M. tuberculosis* nazýván KatG. Jejím působením vzniká v těle komplex, který se váže na enoyl-acyl nosné bílkoviny, známé jako InhA. Tím blokuje přirozený substrát enoyl-AcpM a tím i syntézu mykolových kyselin. Isoniazid je baktericidní na rychle se dělící mykobakterie, ale bakteriostatický, pokud je *Mycobacterium* pomalu rostoucí. Z nežádoucích účinků stojí za povšimnutí poškození periferních nervů a CNS - obojímu se dá zabránit přívodem vitamínu B₆ (pyridoxinu); dále poškození jater⁶⁰. Právě těmto jeho vedlejším účinkům se snaží výzkum v této oblasti předejít. Celkové snížení toxicity isoniazidu je jedním z cílů tvorby konjugátů s polymerními nosiči.

PEG s antimykobakteriálními léčivy, konkrétně isoniazidem⁶¹ a pyrazinamidem⁶² tvoří hydrofilní micelární struktury, čímž zvyšuje rozpustnost léčiva ve vodě, zvyšuje stabilitu léčiva a zároveň umožňuje transport přes biologické membrány. Pro transport přes biologické membrány je rozhodující velikost micel, která se dá řídit délkou řetězce polymeru.

Byl připraven ROP blokový kopolymer α -methoxy-poly(ethylen glykol)-*b*-poly(asparagová kyselina) (mPEG-*b*-PAsp) a posléze byl na volné karboxylové skupiny jednotek kyseliny asparagové navázán isoniazid reakcí za přítomnosti EDC.⁶¹ Obdobně byl připraven také konjugát kopolymeru mPEG-*b*-PAsp s pyrazinamidem.⁶² Oba popisované konjugáty jsou uvedeny na **Obrázku 20**.

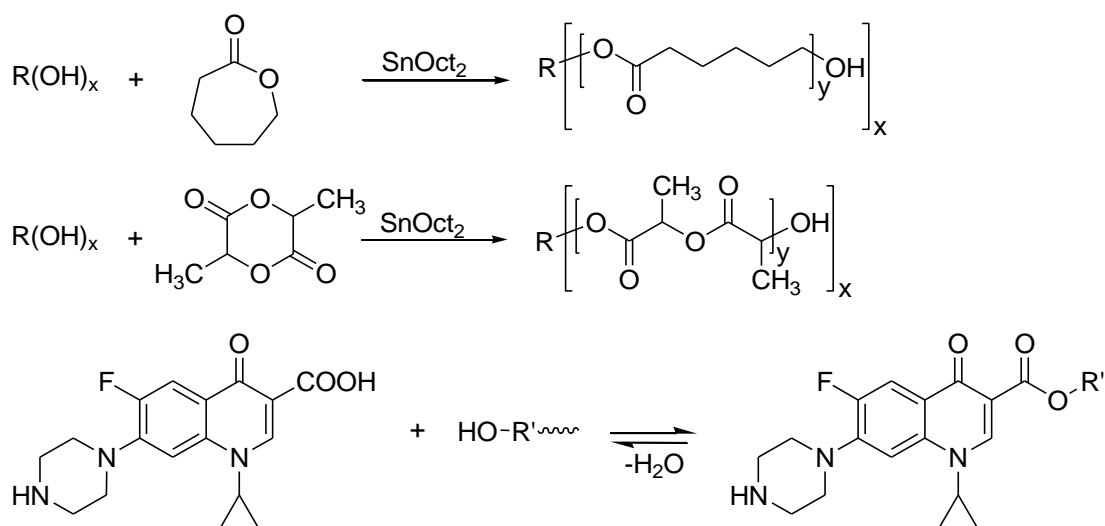


Obrázek 20 Molekula konjugátu isoniazidu s mPEG-*b*-PAsp a pyrazinamidu s mPEG-*b*-PAsp^{61,62}

2.5.2 Další polymerní proléčiva antimykobakteriálních léčiv

Ciprofloxacin (CIP) je typickým zástupcem fluorochinolonových antibiotik. Často se používá jako širokospektrální antibiotikum k léčbě a prevenci infekcí způsobených bakteriemi v těle člověka. Fluorochinolony jsou využívány i při léčbě tuberkulózy zejména v případech, kdy léčiva 1. volby selhávají.

M. Sobczak se ve svých pracích soustřeďuje na využití polyesterů k tvorbě konjugátů právě s fluorochinolonovými antibiotiky.^{63,64} V případě ciprofloxacinu k přípravě využívá ROP, kde cyklické estery jako ϵ -kaprolakton (CL) nebo 3,6-dimethyl-1,4-dioxan-2,5-dion (DLLA) zastupují cyklické monomery. Jako iniciátor reakce je využit PEG, pentaerytrytol (PET), glycerol (GL) nebo dipentaerythritol (DPET). Vznikají tak dvou-, tří-, čtyř- a šesti-ramenné hvězdicové kopolymery. Katalyzátorem této reakce je 2-ethylhexanoát cínatý (SnOct₂). CIP (viz **Tabulka 1**) je na ramena oligomeru vázán esterovou vazbou (**Obrázek 21**).⁶³ Studie vychází již z dříve uvedených experimentů s norfloxacinem,⁶⁴ dalším ze skupiny fluorochinolonových antibiotik.

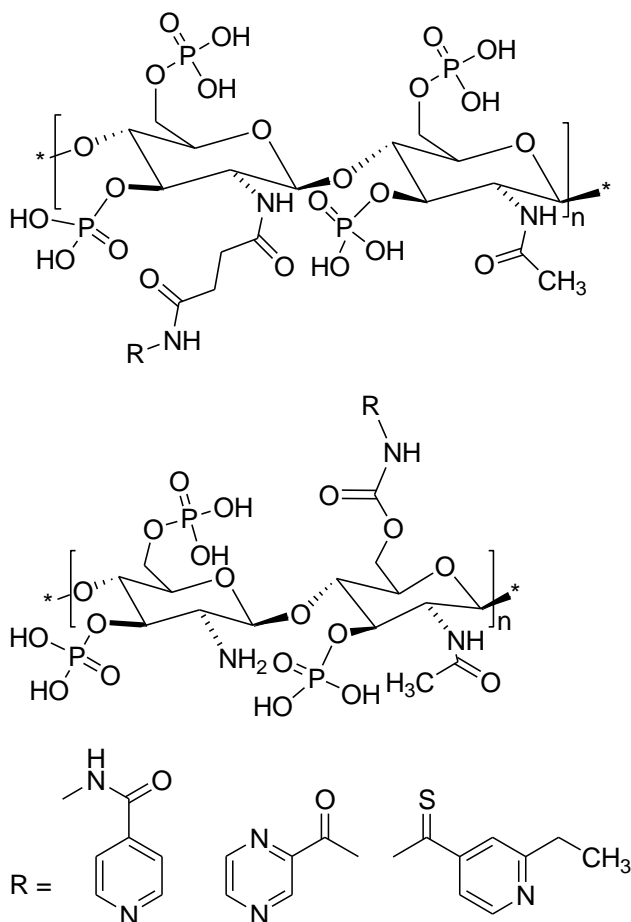


$x = 2$ (pro R=PEG), 3 (pro R=GL), 4 (pro R = PET), 6 (pro R=DPET)

R' - polyester

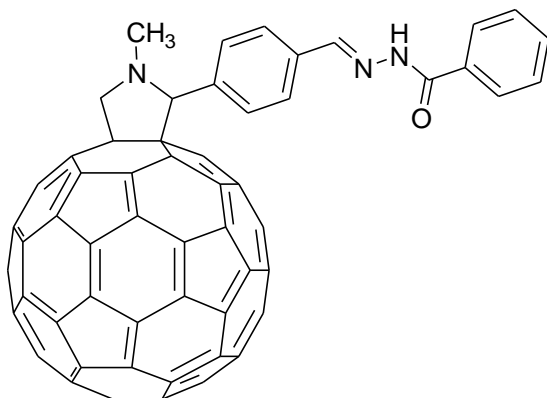
Obrázek 21 Ring-opening polymerizace cyklických esterů a syntéza konjugátů polyesterů s ciprofloxacinem⁶³

Chitosan (poly-D-glukosamin) je přírodní polymer odvozený od chitinu. Je to druhý nejhojněji se vyskytující polysacharid po celulóze. Chitosan se vyrábí alkalickou deacetylací chitinu.⁶⁵ Díky dobré biologické odbouratelnosti, biokompatibilitě, vykazující biologické aktivitě a nízké toxicitě je vhodný pro využití v medicíně a farmaceutické oblasti, mimo jiné také jako nosič léčiv. V různých modifikacích chitosan vykazuje antibakteriální, protinádorové účinky a působí jako antioxidant. Můžeme se s ním setkat i v souvislosti s antimykobakteriálními léčivy.⁶⁶ Na chitosan byla vázána antituberkulotika INH, PZA nebo ethionamid (ETA) prostřednictvím karboxymethylového (*O*-karboxymethylchitosan) nebo sukcinylvého můstku (*N*-sukcinylchitosan). Rozpustnost konjugátů ve vodě byla zvýšena následnou fosforylací volných hydroxylových skupin (**Obrázek 22**). Připravené konjugáty byly úspěšně testovány na antimykobakteriální aktivitu. Konjugáty testovaných antituberkulotik s chitosanem vykazovaly proti kmenům *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. avium* shodně MIC 125 $\mu\text{g/ml}$. Antimykobakteriální aktivita modifikovaného chitosanu bez substituce antituberkulotiky byla prokazatelně nižší MIC 62,5 $\mu\text{g/ml}$ (*M. tuberculosis*, *M. avium*) a 31,25 $\mu\text{g/ml}$ (*M. kansasii*).⁶⁶



Obrázek 22 Konjugáty modifikovaného chitosanu a antituberkulotik INH, PZA a ETA⁶⁶

Jedním zajímavým příkladem, kdy byla také úspěšně snížena toxicita INH, který se ovšem trochu vymyká zde diskutované polymerní chemii, je i konjugace isoniazidu s fullerenem (**Obrázek 23**).⁶⁷

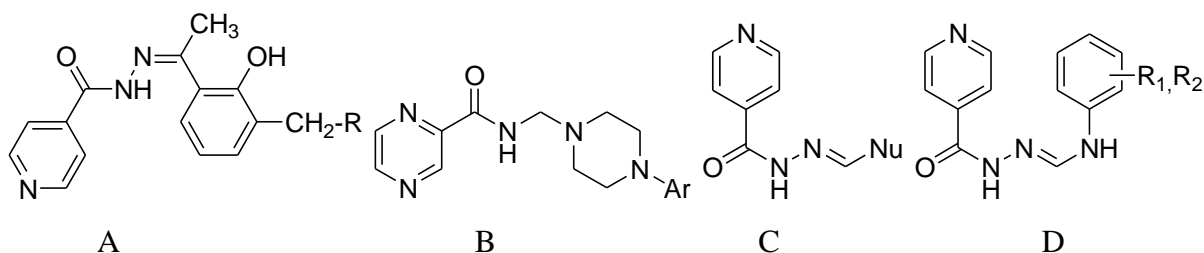


Obrázek 23 Struktura konjugátu fulleren-INH⁶⁷

2.5.3 Nová „nepolymerní“ proléčiva

Situace v oblasti léčby tuberkulózy vyplývající z dat WHO je alarmující. Velké množství lidí je nakaženo latentní formou TBC, rostoucí pandemie HIV nebezpečně zvyšuje pravděpodobnost úmrtí a šíří se případy multirezistentních forem onemocnění. Vývoj nových antituberkulotik je proto nutným postupem ke zlepšení závažné celosvětové situace v této oblasti.

Jedna z oblastí vývoje je zaměřena na modifikaci dnes běžně používaných léčiv (INH⁶⁸, PZA⁶⁹). Byla například použita Mannichova reakce PZA a formaldehydu s piperazinem substituovaným různými arylovými zbytky⁶⁹ nebo jsou to různými cestami připravené hydrazony INH (isonikotinoylhydrazony).^{68,70,71,72} Příklady některých takto nově modifikovaných léčiv jsou uvedeny na **Obrázku 24**. Všechna tato nově vznikající proléčiva byla testována *in vitro* (případně i *in vivo*) na antimykobakteriální aktivitu proti kmenům *Mycobacterium tuberculosis* s větší či menší odezvou.



Obrázek 24 Struktury nových proléčiv INH a PZA;

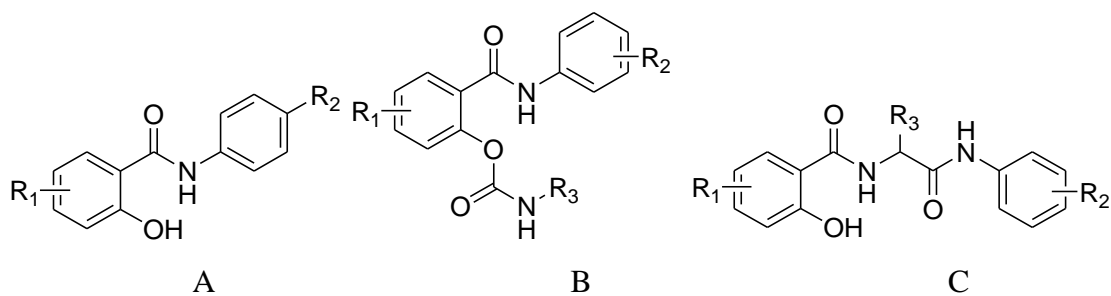
A⁶⁸ – isonikotinoylhydrazon,

B⁶⁹ – Mannichova báze od PZA,

C⁷⁰ – isonikotinoylhydrazon (Nu – dusíkatý nukleofil),

D⁷¹ – hydrazonformamidy (R¹, R² – subst. odčerpávající elektrony z aromatického systému, např. halogeny)

Druhým přístupem je vývoj zcela nových léčiv. Jednou z nově vznikajících skupin látek je skupina salicylanilidů⁷³ (2-hydroxy-*N*-phenylbenzamidů), případně jejich karbamátů⁷⁴ a dalších derivátů⁷⁵, u kterých v řadě případů byla prokázána antimykobakteriální aktivita. Základní struktury některých studovaných molekul jsou znázorněny na **Obrázku 25**.

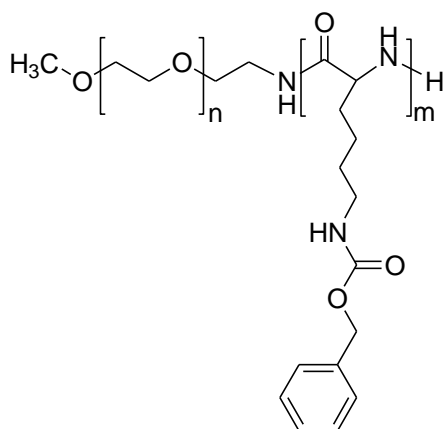


Obrázek 25 Struktury nově se vyvíjejících antimykobakteriálních léčiv;
 A⁷³ - *N*-(4-alkylfenyl)-*n*-alkylsalicylanilid (R^1 - Cl, Br, R^2 - alkyl),
 B⁷⁴ - *n*-chloro-2-(*n*-alkylfenylkarbamoyl)fenyl alkylkarbamát
 (R^1 - Cl, R^2 - alkyl, R^3 - alkyl),
 C⁷⁵ - *n*-chloro-2-hydroxy-*N*-[2-(arylamino)-1-alkyl-2-oxoethyl]benzamid
 (R^1 - Cl, R^2 - Cl, Br, R^3 - alkyl)

2.6 Nový konjugát isoniazidu s α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinem) ([mPEG-*b*-PLL]-INH)

Tato práce navazuje na předchozí výzkum v této oblasti. Bylo využito výše popisovaných vlastností PEGu jako vhodného polymerního nosiče, vyzkoušeného v mnohých i zde zmiňovaných případech polymerních proléčiv.^{5,34-45,61,62} Jako léčivo vázané na polyethylenglykolový nosič byl zvolen výše diskutovaný isoniazid.⁵⁹

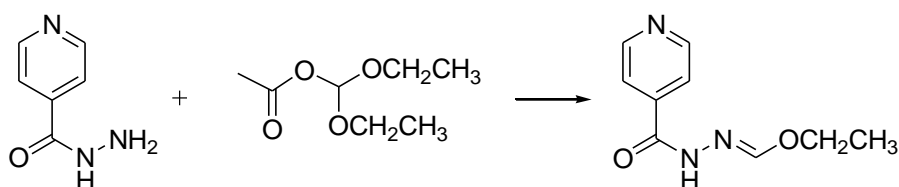
Hydrofilní charakter PEGu zajišťuje dobrou rozpustnost konjugátu s navázaným isoniazidem ve vodě a určuje tak vlastnosti celého konjugátu. K využití blokového kopolymeru α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly[(*N*^ε-benzyloxykarbonyl)-L-lysinu] (mPEG-*b*-PLL(Z)) (**Obrázek 26**) jako polymerního nosiče vedla práce J. U. Izunobi a C. L. Higginbotham⁹, kteří tento kopolymer syntetizovali, charakterizovali a posoudili jeho vhodnost pro použití v biomedicinální oblasti. Vycházelo se také ze zkušeností pracovníků našeho pracoviště, kteří uskutečnili syntézu a charakterizaci konjugátu tohoto blokového kopolymeru PEG-*b*-PLL s amfotericinem B¹⁰ (viz odstavec 1.5.3, **Obrázek 17**).



Obrázek 26 Blokový kopolymer využitý jako polymerní nosič α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly[(*N*^ε-benzyloxykarbonyl)-L-lysin] (mPEG-*b*-PLL(Z))

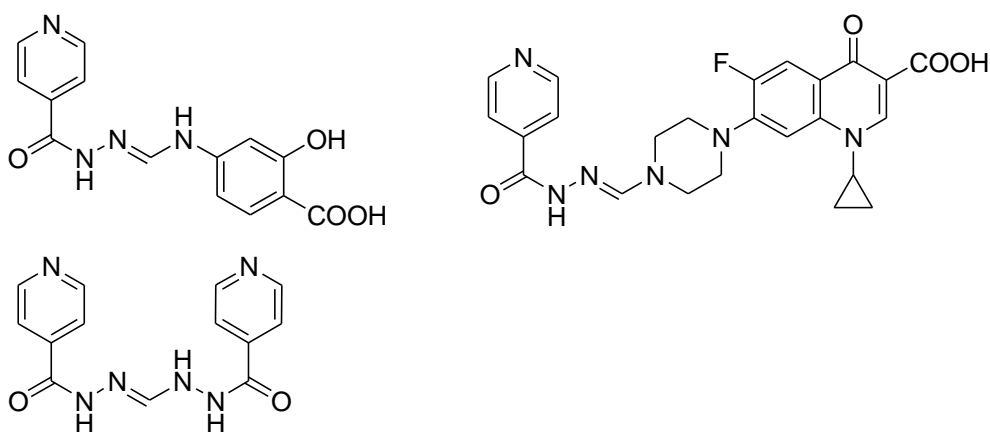
Vlastnosti celého blokového kopolymeru mPEG-*b*-PLL jsou ovlivňovány počtem lysinových jednotek v kopolymeru. Se vzrůstajícím počtem lysinových jednotek v kopolymeru roste nežádoucí peptidický charakter, který je spojován s problémy při zpracování produktu. Bude proto nutné navrhnout ideální počet jednotek lysinu v mPEG-*b*-PLL a přizpůsobit tomu podmínky reakce.

K navázání reaktivní molekuly isoniazidu na volné ϵ -NH₂ skupiny lysinových jednotek biokompatibilního kopolymeru byla zvolena „CH spojka“^{70,71,72} zrealizovaná pomocí diethoxymethylacetátu (DEMA). Schéma syntézy isonikotinoyl hydrazonu snadno dostupného z isoniazidu pomocí DEMA jako dobrého syntonu -CHOEt fragmentu je vyobrazeno na **Obrázku 27**.



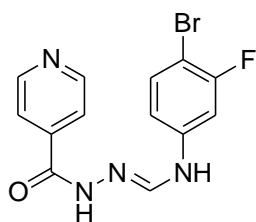
Obrázek 27 Syntéza ethyl isonikotinoylhydrazonoformátu (EINH)⁷⁰

Při syntéze se vycházelo se z prací skupiny okolo A. Imramovského a E. Vavříkové,^{70,71,72} která pomocí této spojky modifikovala a následně otestovala antituberkulotika INH, PZA a další. Na **Obrázku 28** jsou znázorněny struktury takto modifikovaného INH. Jedná se o sloučeniny vzniklé substitucí ethoxyskupiny EINH dusíkatými nukleofily. Na příkladech uvedených na **Obrázku 28** se jedná konkrétně o nukleofily jako je *p*-aminosalicylová kyselina, ciprofloxacín a druhá molekula INH. V takto připravených látkách je INH a dusíkatý nukleofil spojen =CH- skupinou („CH spojka“). Testy byla potvrzena vyšší lipofilita ve srovnání s INH a PZA, což značí efektivnější transport přes buněčné membrány. Uvolnění INH z proléčiv, se uskutečňuje hydrolytickou degradací spojky.



Obrázek 28 Struktury připravených proléčiv INH s využitím „CH spojky“⁷⁰

Stabilita nejvíce aktivní sloučeniny, viz **Obrázek 29**, byla studována pomocí UV/vis spektroskopie při 37 °C a koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na našem pracovišti. Měření byla provedena ve vodných roztocích HCl, KOH a vhodných pufrů v rozsahu pH 2 – 13. Tato sloučenina je stabilní při neutrálním pH, pomalu hydrolyzuje při nižším pH. Vykazuje *in vitro* taktéž stejný inhibiční účinek na *M. tuberculosis* jako standard INH a je více aktivní proti kmenu *M. kansasii* (MIC *M. tuberculosis* $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, *M. avium* $250 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, *M. kansasii* $62,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, klinicky izolovaný kmen přímo od pacienta *M. kansasii* $8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$).⁷¹



Obrázek 29 Nejvíce aktivní sloučenina z řady testovaných proléčiv INH
N-(4-brom-3-fluorphenyl)-*N'*-(pyridin-4-ylkarbonyl)hydrazonoformamid⁷¹

2.7 Návrh syntetické cesty konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH

Konjugát [mPEG-*b*-PLL]-INH bude připraven z mPEG-*b*-PLL a INH. V prvním stupni bude reagovat připravený mPEG-NH₂ s připraveným L-Lys(Z)-NCA. Bude následovat deprotece vzniklého blokového kopolymeru mPEG-*b*-PLL(Z) a navázání INH.

2.7.1 Příprava mPEG-NH₂ (2)

K syntéze konjugátu byl vybrán mPEG-NH₂ M = 5000, který se připraví třístupňovou syntézou z mPEGu. Jeho příprava je popsána v literatuře³¹ (Schéma 1).

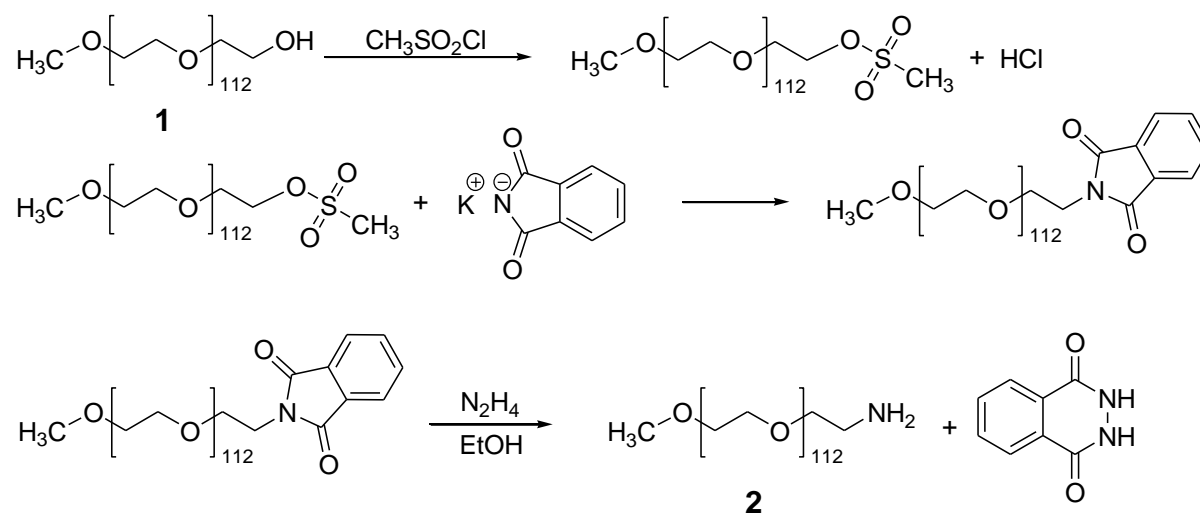


Schéma 1 Třístupňová syntéza α-methoxy-ω-amino-poly(ethylenglykolu) (2) z α-methoxy-poly(ethylenglykolu) (1)

2.7.2 Příprava L-Lys(Z)-NCA (4) a následná syntéza mPEG-*b*-PLL(Z) (5)

Syntéza mPEG-*b*-PLL(Z) je popisována v literatuře^{47,9,49,50}. Byl navržen postup z literatury vycházející a v některých fázích upravený (Schéma 2). Cílem bude optimalizovat přípravu kopolymeru tak, aby bylo možné připravit kopolymer s různým počtem lysinových jednotek (n).

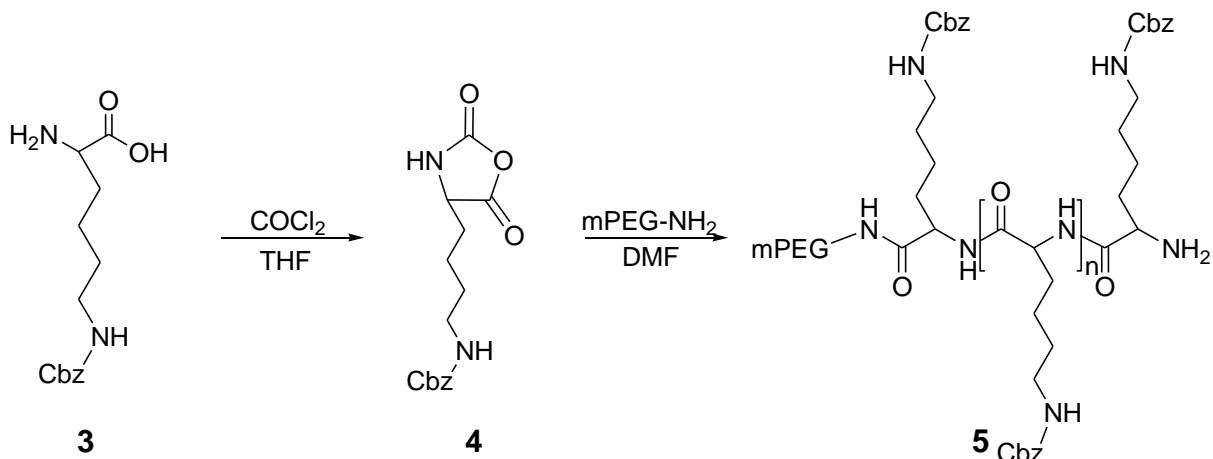


Schéma 2 Syntéza

α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly[(*N*^ε-benzyloxykarbonyl)-L-lysinu] (5)
z *N*^ε-benzyloxykarbonyl-L-lysinu (3) přes *N*^ε-benzyloxykarbonyl-L-lysin
N-karboxyanhydrid (4-(4-benzyloxykarbonylaminobutyl)oxazolidin-2,5-dion)
(4)

Cbz - benzyloxykarbonylová chránící skupina, v textu značená (Z)

2.7.3 Deprotekce mPEG-*b*-PLL(Z) (5)

Jako optimální způsob deprotekce se jeví hydrogenolýza,¹⁰ případně bude navržen vlastní způsob deprotekce ϵ -NH₂ skupiny v mPEG-*b*-PLL(Z) (5) a optimalizovány jeho podmínky (Schéma 3).

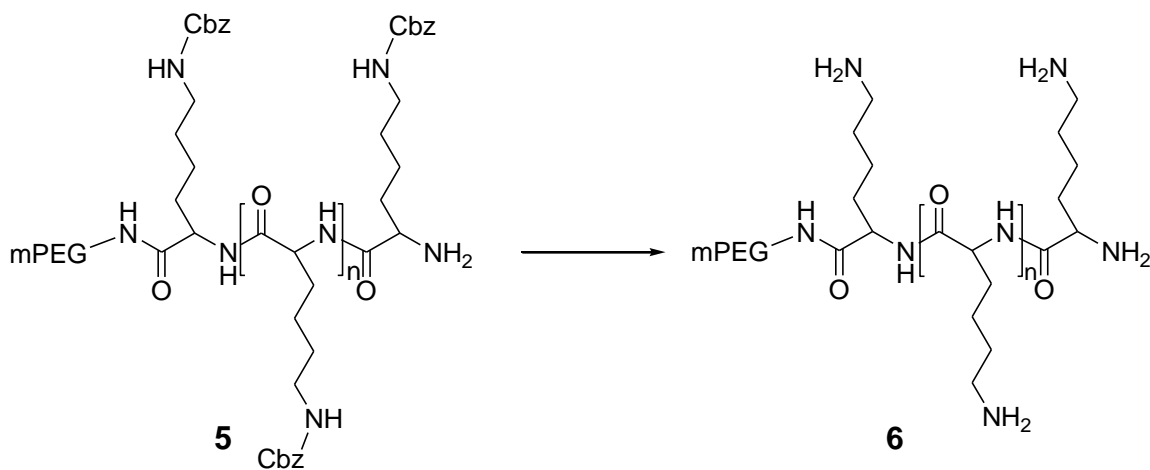


Schéma 3 Deprotekce α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly[(*N* ^{ϵ} -benzyloxykarbonyl)-L-lysinu] (5)
Cbz - benzyloxykarbonylová chránící skupina, v textu značená (Z)

2.7.4 Syntéza konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH (7)

Poslední stupeň syntézy, tvorba samotného konjugátu (7), je inspirován v literatuře popisovanými reakcemi tvorby „CH spojky“^{70,71,72}. Podmínky celé reakce budou optimalizovány pro konkrétní použité reaktanty. Jako dusíkatý nukleofil bude použit blokový kopolymer. Skupina =CH- by tedy měla v ideálním případě spojovat molekulu INH se všemi volnými ϵ -NH₂ skupinami a jednou α -NH₂ skupinou na poslední lysinové jednotce v mPEG-*b*-PLL (6) tak, aby nezbyly žádné volné aminoskupiny, které by mohly výrazně ovlivňovat chování celého konjugátu. Výsledkem by tedy měl být konjugát se všemi jednotkami lysinu obsazenými isoniazidem.

Ke konjugaci INH na mPEG-*b*-PLL bude přistupováno dvěma způsoby. První cestou bude dvoustupňová syntéza, kde je v prvním stupni připraven EINH (Schéma 4) dle postupu uvedeném v literatuře⁷⁰, izolován a charakterizován. V druhém stupni bude uvažována substituce ethoxyskupiny EINH ϵ -NH₂ (příp. α -NH₂) skupinami lysinu (Schéma 5). Reakce bude provedena v acetonitrilu, reakční doba a podmínky reakce budou optimalizovány tak, aby bylo dosaženo plného obsazení volných ϵ -NH₂ skupin INH.

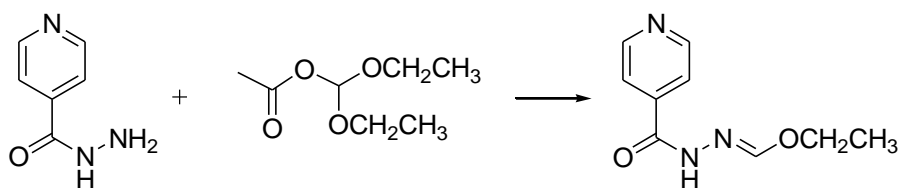


Schéma 4 Syntéza ethyl isonikotinoylhydrazoneformátu (EINH)

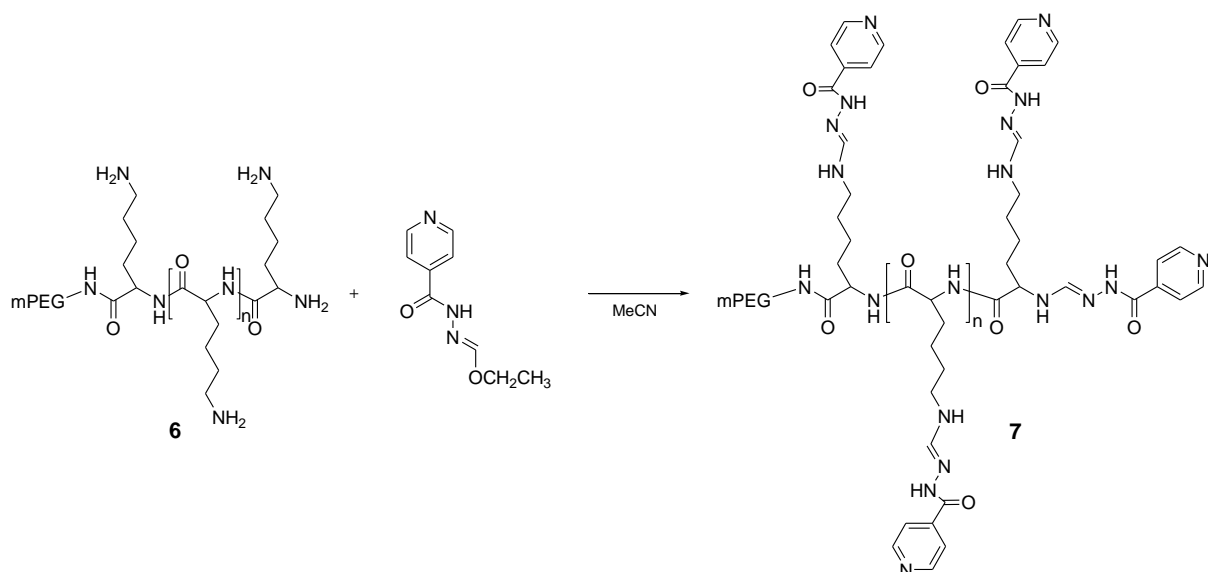


Schéma 5 Syntéza konjugátu isoniazidu s α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinem) (**7**) reakcí α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinu) (**6**) s EINH

Druhou možnou syntetickou cestou je tvorba konjugátu reakcí mPEG-*b*-PLL, DEMA a INH v jedné reakční směsi (**Schéma 6**). Reakce bude provedena v acetonitrilu, reakční doba a podmínky reakce budou optimalizovány tak, aby bylo dosaženo plného obsazení volných ε -NH₂ skupin INH.

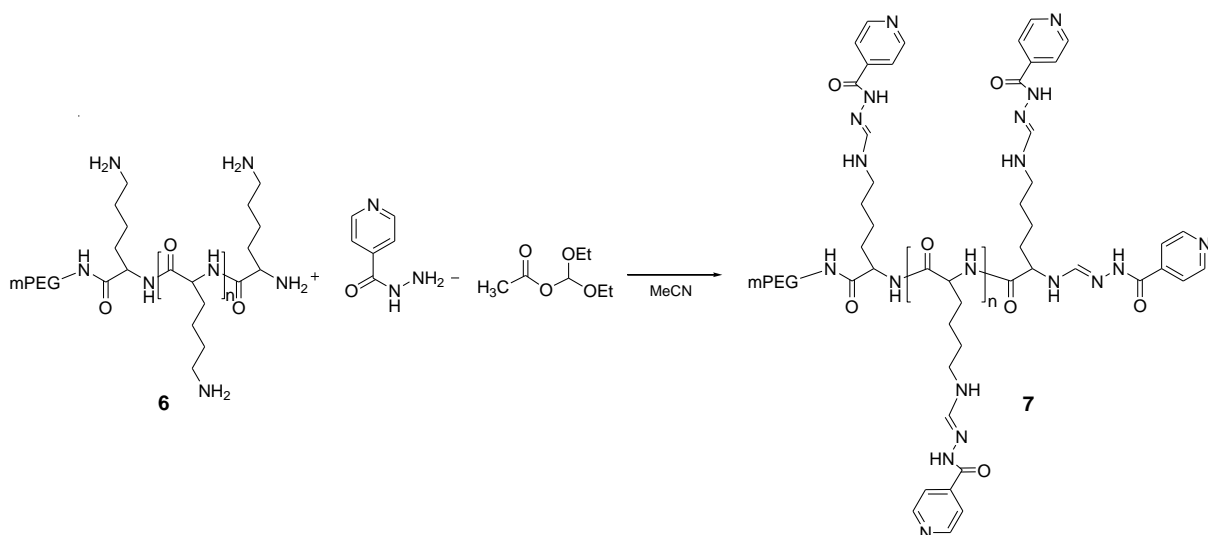


Schéma 6 Syntéza konjugátu isoniazidu s α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinem) (**7**) v jednom kroku (INH – isoniazid, DEMA – diethoxymethylacetát)

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo provést literární rešerši významu polymerních proléčiv se zaměřením na cílené konjugáty poly(ethylenglykolu) s antimikrobiálně účinnými léčivy a proléčiva antimykobakteriálně účinných molekul.

Měla být provedena syntéza, izolace a charakterizace blokového kopolymeru α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly[(N^{ϵ} -benzyloxykarbonyl)-L-lysinu] s různým počtem navázaných jednotek lysinu. Dále bylo úkolem provedení syntézy, izolace a charakterizace cíleného konjugátu proléčiva isoniazidu s připraveným blokovým kopolymerem α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinem). Na závěr měla být zjištěna stabilita těchto konjugátů ve vodných prostředích s různým pH.

4 Experimentální část

4.1 Celkové reakční schéma přípravy konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH

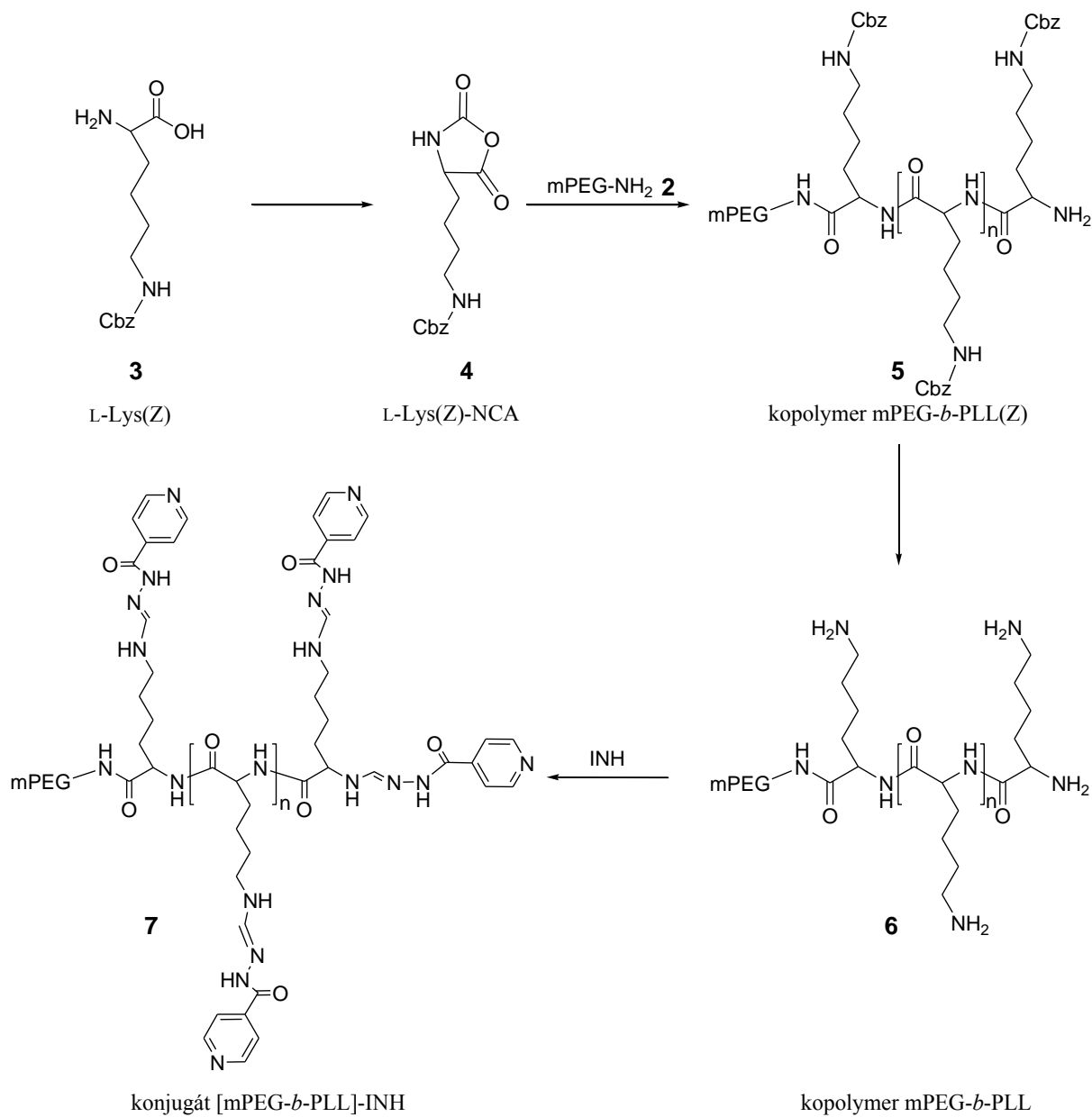


Schéma 7 Celkové reakční schéma čtyřstupňové syntézy konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH
Cbz - benzyloxykarbonylová chránící skupina, v textu značená (Z)

4.2 Metody a materiál

Rozpouštědla, činidla a jiné chemikálie použité k syntézám byly zakoupeny od výrobců Sigma-Aldrich, Merck, AcrosOrganics nebo Lach-Ner CZ. Všechna komerční rozpouštědla byla použita bez další úpravy.

4.2.1 NMR spektroskopie

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker AVANCE 500 při frekvencích 500,13 MHz (^1H) a 125,77 MHz (^{13}C). Protonová spektra byla kalibrována na interní hexamethyldisiloxan ($\delta(^1\text{H}) = 0,05$ ppm) a na středový signál multipletu rozpouštědla. Pro měření byly použity roztoky zkoumaných látek v hexadeuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO- d_6) nebo deuterovaném chloroformu (CDCl_3). Chemické posuny δH a δC byly vztaženy ke středu signálu multipletu rozpouštědla (DMSO- d_6 : $\delta H = 2,50$ ppm; $\delta C = 39,43$ ppm; CDCl_3 : $\delta H = 7,26$ ppm; $\delta C = 77,00$ ppm). ^{13}C NMR spektra byla měřena standardním způsobem s širokopásmovým dekaplinkem protonů a pulzní sekvencí APT.

4.2.2 Gelová permeační chromatografie

Pro určení indexu polydisperzity PD polymerů **5**, **6**, **7** byla použita gelová permeační chromatografie (GPC). Měření bylo provedeno na přístroji Polymer Laboratories model PL-GPC 050 s RI detektorem, s dvěma kolonami PL gel 5 μm MIXED-C, 300 x 7.5 mm (Agilent Technologies). Kolony byly nejprve okalibrovány pomocí polystyrenových standardů. Jako mobilní fáze byl použit THF s průtokem 1 ml·min $^{-1}$. Analýza probíhala při teplotě 25 °C.

4.2.3 Rentgenová prášková difrakce

Pro naměření difraktogramů byl využit difraktometr D8 Advance (Bruker AXS, Německo) pro rentgenovou difrakční analýzu pevných krystalických látek ($\text{Cu K}\alpha$, $\lambda = 1,5418$ Å) s Bragg-Brentano $\theta - \theta$ goniometrem (radius 217,5 mm), který je vybavený grafitovým monochromátorem a Na(Ti)I scintilačním detektorem. Analýza byla provedena při laboratorní teplotě od 2 do 65° (2 θ) v kroku 0,02° s čekací dobou 10 s/krok.

4.2.4 Ostatní analýzy

Elementární analýzy byly provedeny na přístroji EA 1108 CHN firmy Fisons Instruments.

Infračervená spektra (IČ) byla měřena v pevné fázi na přístroji FT-IR-Perkin Elmer Spectrum BX s ATR modulem (ZnSe krystal) v rozsahu 650 – 4000 cm^{-1} .

Body tání byly stanoveny na přístroji Melting Point B-545 (Buchi, Německo).

4.2.5 Měření stability konjugátu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

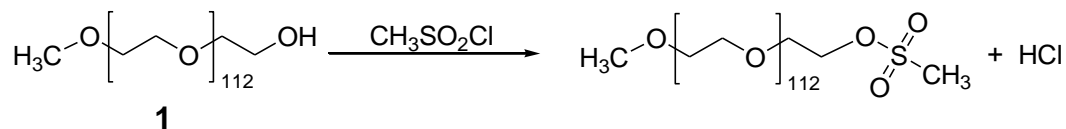
Analýza vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC analýza) nebyla provedena na našem pracovišti. Byla zrealizována na přístroji Shimadzu (Tokio, Japonsko), který se skládá ze dvou vysokotlakých pump LC-10ADVP, odplyňovače mobilní fáze DGU-14A, systémové řídicí jednotky SCL-10AVP a spektrofotometrického UV/vis detektoru s diodovým polem SPD-M10AVP. Vlastní separace probíhala na koloně LiChroCART® 125 x 4 mm s náplní LiChrospher® 100 RP-18e 5 μm , Merck (Darmstadt, Německo), chráněné předkolonkou (4 x 3 mm I.D.) s náplní C18, Phenomenex (Torrance, CA, USA). Sestava byla připojena k datové stanici vybavené programem LabSolutionVer3, Shimadzu (Tokio, Japonsko). Byl použit gradient mobilní fáze acetonitril:voda, průtok 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Vzorky byly temperovány na 37 °C. Detekce byla provedena při vlnové délce 263 nm.

Roztok měřeného konjugátu (40 μl , 23,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) byl nastříknut do roztoku (2 ml) pufru s hodnotou pH 7,4; (fosfátový pufr, $1\cdot 10^{-1}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); pH 4 (acetátový pufr, $2\cdot 10^{-1}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Koncentrace isoniazidu byla zaznamenávána při 37°C průběžně během 20 - 24 hodin.

4.3 Jednotlivé stupně syntézy

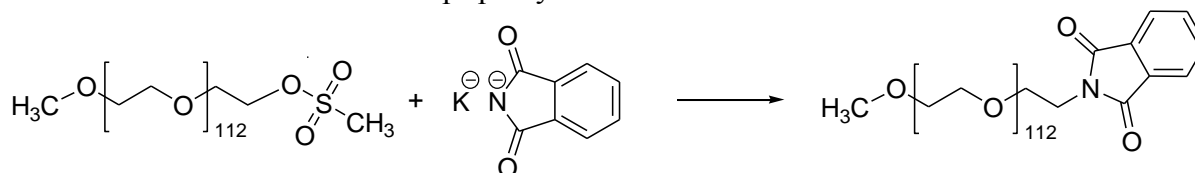
4.3.1 Třístupňová syntéza α -methoxy- ω -amino-poly(ethylenglykolu) (**2**)³¹

I. Reakční schéma a tabulka přípravy mPEG-OMs



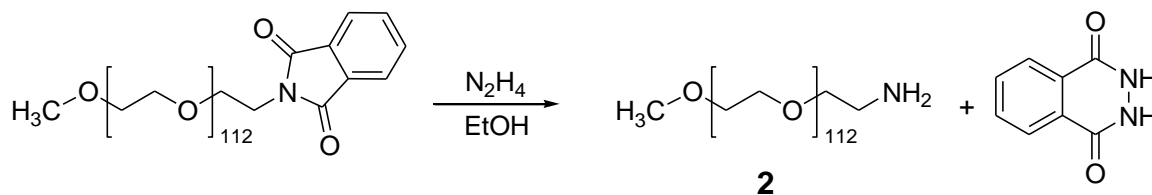
	mPEG-OH	CH ₃ SO ₂ Cl ₂	mPEG-OSO ₂ CH ₃
M [g/mol]	5000	115	5000
n [mmol]	5	435	5
m [g]	25	-	25
V [ml]	-	34	-
ρ [g/cm ³]	-	1,48	-

II. Reakční schéma a tabulka přípravy mPEG-NHPhtal



	mPEG-OSO ₂ CH ₃	ftalimid-K	mPEG-NHPhtal
M [g/mol]	5000	185	5000
n [mmol]	1	32,5	1
m [g]	26	16,0	26

III. Reakční schéma a tabulka přípravy mPEG-NH₂



	mPEG-NHPhtal	N ₂ H ₄	mPEG-NH ₂
M [g/mol]	5000	32	5000
n [mmol]	5	130	5
m [g]	25	-	25
V [ml]	-	4	-
ρ [g/cm ³]	-	1,03	-

Postup:

α -Methoxy-poly(ethylenglykol) (**1**) (25 g; 5 mmol) byl rozpuštěn v toluenu (150 ml) v 500 ml baňce pod stálým nátokem dusíku. Toluén byl oddestilován. Tento postup se opakuje na začátku všech tří kroků syntézy. Do reakční směsi byl přidán methansulfonylchlorid (34 ml; 435 mmol) a vzniklý čirý roztok byl zahříván na 70 °C po dobu 3 dnů. Přebytečný methansulfonylchlorid byl oddestilován a destilace zopakována s toluenem (2 x 50 ml). Obsah baňky byl rozpuštěn v dichlormethanu (30 ml) a vzniklý roztok se rychle vлил za chlazení ledem do diethyletheru (900 ml). Vzniklá sraženina surového produktu se odsaje v digestoři na fritě a promyje diethyletherem (3 × 100 ml). Produkt se krystalizuje z isopropylalkoholu. α -Methoxy- ω -mesyl-poly(ethylenglykol) (26 g; 100 %) byl sušen za vakua při laboratorní teplotě do bílého prášku.

Po oddestilování toluenu byl k α -methoxy- ω -mesyl-poly(ethylenglykolu) (26 g; 1 mmol) přidán kalium-ftalimid (16 g; 32,5 mmol). Bylo přidáno 10 ml DMF pro lepší promíchání reakční směsi a vzniklá směs byla zahřívána na 70 °C po dobu 3 dnů. Poté byla směs ochlazená a naředěna dichlormethanem (390 ml). Vzniklá suspenze byla zfiltrována přes fritu a znovu přes vrstvu celitu (0,5 cm). Filtrát byl odpařen na RVO, rozpuštěn v dichlormethanu (50 ml) a vysrážen přikapáváním diethyletheru (500 ml). Surový produkt zfiltrován a krystalizován z isopropylalkoholu. α -Methoxy-poly(ethylenglykol)- ω -ylftalimid (26 g; 100 %) byl sušen za vakua při laboratorní teplotě do bílého prášku.

α -Methoxy-poly(ethylenglykol)- ω -ylftalimid (14,5 g, 2,9 mmol) se rozpustí v ethanolu (60 ml) a pipetou se opatrně přidá hydrazin-hydrát (4 ml). Směs se refluxuje po dobu 5 hodin, poté se rozpouštědlo a přebytečný hydrazin odpaří na vakuové odparce k suchu. Zbytek se rozpustí v dichlormethanu (300 ml), čímž vznikne jemná suspenze (nerozpustný ftalhydrazid), která se dvakrát zfiltruje přes fritu S3, příp. přes celit (nebo skládaný filtr). Filtrát se odpaří k suchu, surový produkt se rozpustí v dichlormethanu (50 ml) a za chlazení ledem se nalije do diethyletheru (400 ml). Surový produkt byl zfiltrován a krystalizován z isopropylalkoholu. Produkt (**2**) (9,75 g; 67 %) byl sušen za vakua při laboratorní teplotě do bílého prášku.

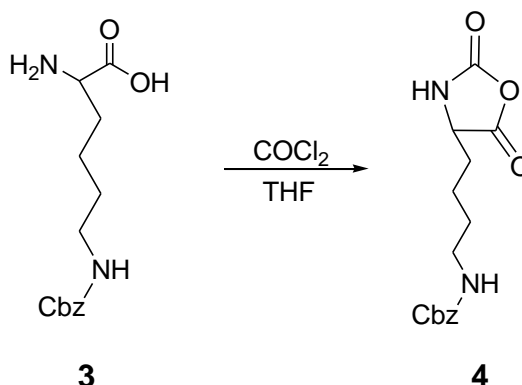
Charakterizace produktu (2):

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3): δ 2,90 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 3,39 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$); 3,65 (s, 448H, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$).

$\text{I}\check{\text{C}}$ (ATR): 2883; 1466; 1359; 1341; 1279; 1240; 1147; 1106; 1060; 961; 947; 841cm^{-1} .

4.3.2 Příprava *N*^ε-benzyloxykarbonyl-L-lysin *N*-karboxyanhydridu (**4**)

Reakční schéma:



	L-Lys(Z)	COCl ₂	L-Lys(Z)-NCA
M [g/mol]	280,3	98,9	306,3
n [mmol]	8,9	80,9	8,9
m [g]	2,5	8,0	teor. 2,7

Postup:

N^ε-benzyloxykarbonyl-L-lysin (**3**) (2,5 g; 8,9 mmol) byl rozpuštěn v předem vysušeném THF (60 ml). Do suspenze bylo za stálého míchání při laboratorní teplotě postupně přidáván fosgen (5 g; 50,5 mmol). Reakční směs se ohřála na 40 - 45 °C. Po hodině a přifouknutí postupně ještě dalšího fosgenu (3 g) se suspenze rozpustila a reakce byla ukončena. Po vychladnutí byla reakční směs asi na ¾ svého objemu odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v předem vychlazeném ethylacetátu (70 ml) a protřepán taktéž předem vychlazeným 5% roztokem hydrogenuhličitanu sodného (40 ml). Organická fáze byla oddělena a vysušena bezvodým síranem sodným. Odpařením rozpouštědla do sucha za sníženého tlaku získáme bílou krystalickou látku (**4**) (2,7 g, 100 %). Získaný produkt byl ihned použit v dalším stupni syntézy.

Charakterizace produktu (4):**bod tání:** 99–101 °C (lit.⁹ 98 – 99 °C)

¹H NMR (400,13 MHz, CDCl₃) δ: 1,27 – 1,54 (m, 4H, >CH-CH₂CH₂-); 1,80 – 1,93 (m, 2H, -CH₂CH₂-NHCO-); 3,20 (m, 2H, -CH₂CH₂-NHCO-); 4,26 (m, 1H, >CH-CH₂-); 5,10 (s, 2H, C₆H₅-CH₂-OCO-); 7,36 (m; 5H, C₆H₅-CH₂-).

¹³C NMR (100.62 MHz, CDCl₃) δ: 21,0; 28,7; 30,5; 39,8; 57,1; 66,5; 127,6; 135,9; 152,2; 156,5; 169,7.

elementární analýza pro C₁₅H₁₈N₂O₅:

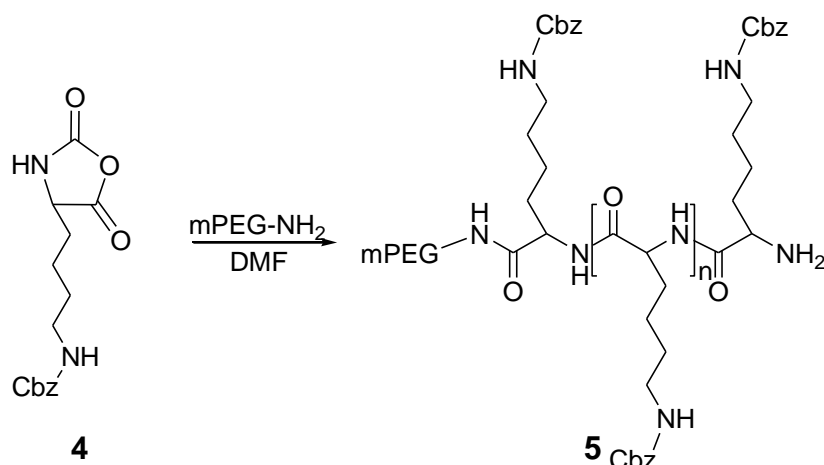
vypočteno C 58,82; H 5,92; N 9,15

nalezeno C 58,88; H 5,93; N 9,17

IČ (ATR): 3339; 2938; 2874; 1855 (O=C-O-C=O); 1808 (O=C-O-C=O); 1773 (O=C-O-C=O); 1744 (O=C-O-C=O); 1686 (NH-CO-O); 1530; 1454; 1370; 1318; 1285; 1259; 1140; 1012; 940; 748; 694 cm⁻¹.

4.3.3 Příprava α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly[(*N*^ε-benzyloxykarbonyl)-L-lysinu] (5)

Reakční schéma:



	L-Lys(Z)-NCA	mPEG-NH ₂	mPEG- <i>b</i> -PLL(Z)
M [g/mol]	306	5000	
n [mmol]	8,9	0,7	8,9
m [g]	2,7	3,4	

Postup:

N^ε-benzyloxykarbonyl-L-lysin *N*-karboxyanhydrid (4-(4-aminobutyl)oxazolidin-2,5-dion) (**4**) (2,7 g; 8,9 mmol) byl rozpuštěn za míchání v DMF (30 ml) pod N₂ atmosférou ve 250 ml baňce. α -Methoxy- ω -amino-poly(ethylenglykol) M_w = 5000 (3,4 g; 0,68 mmol) byl rozpuštěn v dimethylformamidu (DMF) (50 ml) a přidán do reakční směsi. Reakční směs byla míchána 10 minut za laboratorní teploty a poté 17 hodin zahřívána na olejové lázni za stálého míchání pod nátokem N₂ na 40 °C. Reakce byla ukončena a DMF byl odpařen na RVO do žlutého gelu. Surový produkt byl rozpuštěn v CHCl₃ (70 ml) a vysrážen pomalým přikapáváním diethyletheru (210 ml) z děličky za stálého míchání a chlazení v ledové lázni. Sraženina byla poté vymíchávána asi 1,5 hodiny a ponechána 20 hodin v chladu. Surový produkt (**5**) byl následně zfiltrován rychle přes Büchnerovu nálevku, promyt diethyletherem (3 x 20 ml) a sušen za vakua při laboratorní teplotě. Produkt (4,94 g) byl získán ve formě bílých šupinek.

Charakterizace produktu (5):

^1H NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6): δ 1,25 – 1,60 (m, 66H, $>\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$); 2,94 (m, 22H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NHCO}-$); 3,24 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-$); 3,51 (s, 448H, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$); 4,43 (m, 11H, $>\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$); 4,97 (s, 22H, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{OCO}-$); 7,33 (m; 55H, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-$).

^{13}C NMR (100.62 MHz, DMSO- d_6): δ 23,2; 29,8; 36,4; 39,1; 58,7; 65,8; 70,4; 71,9; 73,0; 128,9; 137,9; 156,7; 172,1.

Dle vyhodnocení ^1H NMR spektra byl počet lysinových jednotek stanoven na $n = 11$.

Molekulová hmotnost vypočtena na základě tohoto poznatku je $MW = 7\,889\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

výtěžek 4,94 g; 92 %

elementární analýza pro $\text{C}_{381}\text{H}_{655}\text{N}_{23}\text{O}_{146}$:

vypočteno C 57,97; H 8,36; N 4,08

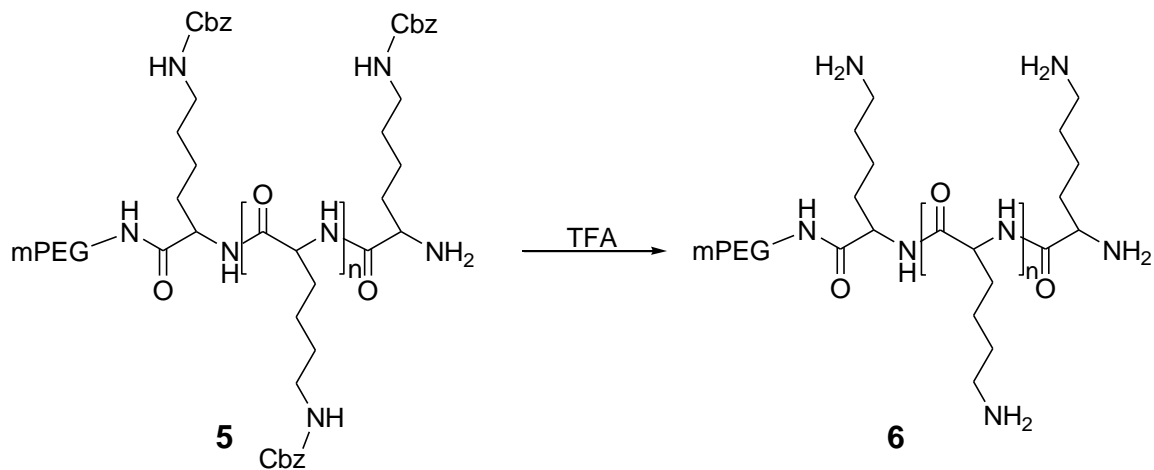
nalezeno C 57,86; H 8,27; N 4,10

IČ (ATR): 2878; 2860; 1689 (NH-CO-O); 1624 (NH-CO-CH); 1540; 1466; 1342; 1278; 1240; 1105; 962; 841; 737; 695 cm^{-1} .

$M_w/M_n = 1,29$.

4.3.4 Příprava α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinu) (6)

Reakční schéma:



	mPEG- <i>b</i> -PLL(Z)	TFA	mPEG- <i>b</i> -PLL
M [g/mol]	7 889	114	
n [mmol]	0,54	0,54	0,54
m [g]	4,3	-	
V [ml]	-	40	-
ρ [g/cm ³]	-	1,54	-

Postup:

α -Methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly[(*N*^ε-benzyloxykarbonyl)-L-lysin] (**5**) (4,3 g; 0,54 mmol) byl rozpuštěn v kyselině trifluoroctové (TFA) (40 ml) a 25 hodin míchán za laboratorní teploty. TFA byla opatrně odpařena na RVO. Vzniklý nažloutlý gel byl třikrát promyt dichlormethanem (60 ml) a znovu odpařen. Surový produkt byl rozpuštěn v chloroformu (30 ml) a za stálého míchání postupným přikapáváním srážen diethyletherem (130 ml). Sraženina byla vymíchávána asi 1,5 hodiny a nechána 20 hodin v chladu. Druhý den byla zfiltrována a promyta diethyletherem (3 x 20 ml). Produkt (**6**) (2,7 g) ve formě bílé pevné látky byl sušen za vakua při laboratorní teplotě.

Charakterizace produktu (6):

$^1\text{H NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6): δ 1,25 – 1,62 (m, 66H, $>\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}\underline{\text{CH}_2}\underline{\text{CH}_2}-$); 2,76 (m, 20H, $-\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}_2$); 2,96 (m, 2H, $-\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}-\text{NHCO}-$); 3,24 (s, 3H, $\underline{\text{CH}_3}\text{O}-$); 3,51 (s, 448H, $-(\text{O}\underline{\text{CH}_2}\underline{\text{CH}_2})_n-$); 4,23 (m, 11H, $>\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$); 5,00 (s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5-\underline{\text{CH}_2}-\text{OCO}-$); 7,34 (m; 5H, $\text{C}_6\underline{\text{H}_5}-\text{CH}_2-$).

$^{13}\text{C NMR}$ (100.62 MHz, DMSO- d_6): δ 22,9; 31,3; 32,0; 52,9; 58,7; 60,9; 70,4; 71,9; 73,0; 172,2.

Dle vyhodnocení $^1\text{H NMR}$ spektra byl počet lysinových jednotek stanoven na $\mathbf{n = 10}$.

Molekulová hmotnost vypočtena na základě tohoto poznatku je $\text{MW} = 6\,415\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

výtěžek 2,7 g; 79 %

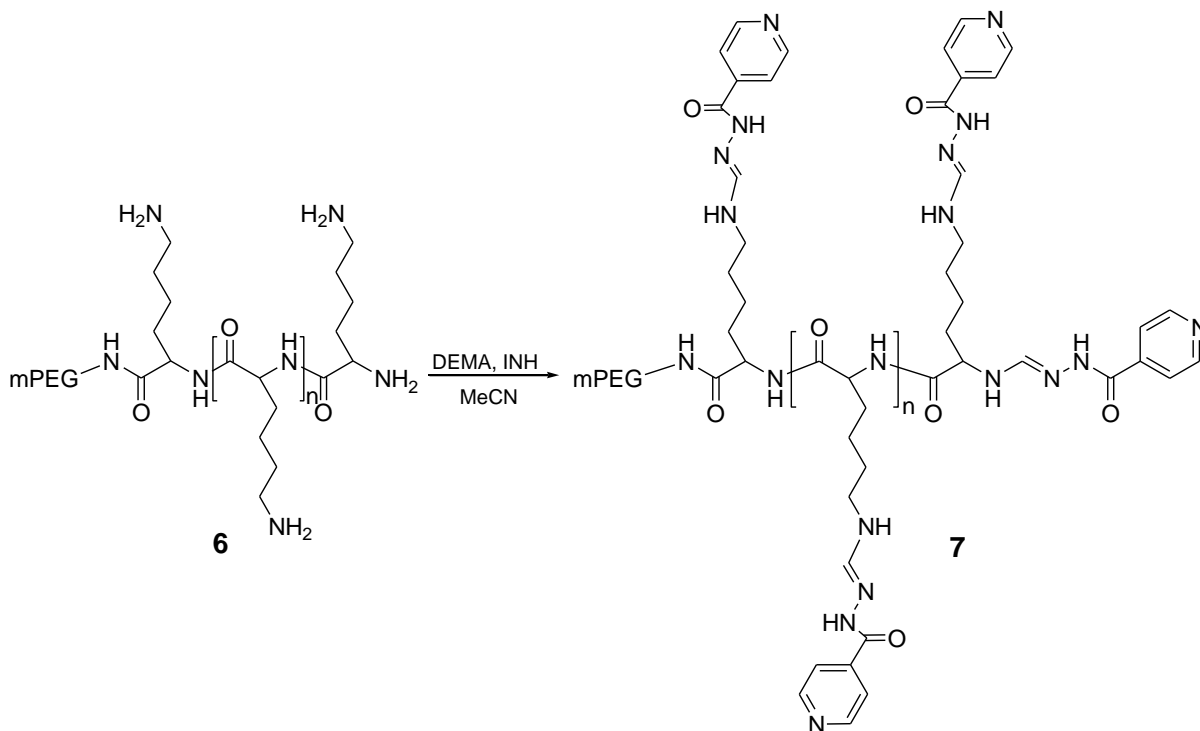
IČ (ATR): 2942; 2934; 2874; 2861; 1696; 1684; 1670; 1654; 1648; 1636; 1624; 1541; 1466; 1341; 1279; 1240; 1106; 961; 841; 720 cm^{-1} .

$\mathbf{M}_w/\mathbf{M}_n = 1,27$.

4.3.5 Příprava konjugátu

isoniazidu s α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinem) (7)

Reakční schéma:



	mPEG- <i>b</i> -PLL	DEMA	INH	[mPEG- <i>b</i> -PLL]-INH
M [g/mol]	6 415	162	137	
n [mmol]	0,08	4,15	4,15	0,08
m [mg]	500	-	570	
V [μ l]	-	675	-	-
ρ [g/cm ³]	-	0,997	-	-

Postup:

α -Methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysin) (6) (0,50 g; 0,083 mmol) byl rozpuštěn v acetonitrilu (30 ml) při teplotě 55 °C a byl přidán DEMA (675 μ l; 4,15 mmol). Po 0,5 hodině byl při stejné teplotě přidán v acetonitrilu (57 ml) rozpuštěný isoniazid (0,57 g; 4,15 mmol). Reakční směs byla míchána 1,5 hodiny při 55 °C a 21 hodin při laboratorní teplotě. Vzniklý zákal v reakční směsi byl po ukončení reakce odstředěn (4,5 min; 4 000 ot/s) a izolován. Čirý žlutý roztok odpařen na RVO do žlutého gelu. Surový produkt rozpuštěn

v CHCl_3 (12 ml) a srážen postupným přidáváním diethyletheru (38 ml) za intenzivního chlazení a míchání. Sraženina byla vymíchávána 1,5 hodiny a nechána přes noc v chladu. Sraženina byla zfiltrována přes fritu pod nátokem N_2 , promyta diethyletherem (3 x 50 ml) a sušena ve vakuu při laboratorní teplotě. Úplně nevysušený surový produkt při kontaktu se vzdušnou vlhkostí gelovatí a lepí. Krystalizace byla provedena z isopropylalkoholu (25 ml). Po důkladném vysušení je produktem (7) bíložlutá pevná látka (0,29 g).

Charakterizace produktu (7):

$^1\text{H NMR}$ (400.13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1,27 - 1,60 (m, 48H, $>\text{CH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$); 2,75 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$); 3,24 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$); 3,51 (s, 448H, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$); 4,21 (m, 8H, $>\text{CH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4,99 (s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{OCO-}$); 7,33 (m; 5H, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-$); 7,86 (m, 10H, $-\text{C}_5\text{H}_2\text{H}_2\text{N}$); 8,76 (m, 10H, $-\text{C}_5\text{H}_2\text{H}_2\text{N}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (100.62 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 23,2; 27,3; 39,5; 58,7; 60,8; 70,4; 71,9; 73,0; 116,3; 119,3; 122,2; 128,5; 150,9; 159,2.

Dle vyhodnocení $^1\text{H NMR}$ spektra byl počet lysinových jednotek stanoven na $n = 6$. INH je navázáno na čtyřech z nich a jeden INH na $\alpha\text{-NH}_2$ skupině. Jedna $\varepsilon\text{-NH}_2$ skupina je stále chráněná a jedna zůstala pravděpodobně volná.

Molekulová hmotnost vypočtena na základě těchto poznatků je $\text{MW} = 6\,648\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

výtěžek 290 mg; 53 %

UV/vis (CH_3OH): λ_{max} (nm) 312.

$\text{M}_w/\text{M}_n = 1,16$.

5 Výsledky a diskuze

Čtyřstupňovou syntézou byl připraven blokový kopolymer mPEG-*b*-PLL (**6**) a volné aminoskupiny lysinových jednotek byly obsazeny molekulami isoniazidu.

V prvním stupni byl připraven mPEG-NH₂ (**2**), jehož struktura byla ověřena pomocí ¹H NMR spektroskopie. V ¹H NMR spektru čistého mPEG-NH₂ se nesmí objevovat signály vodíků ftalimidu δ 7,70 ppm (-N(C=O)₂C₆H₂H₂, 2H) a δ 7,82 ppm (-N(C=O)₂C₆H₂H₂, 2H) z předchozího stupně syntézy.

Byl připraven L-Lys(Z)-NCA (**4**), který byl ihned použit do následujícího stupně. Úspěšnost polymerizace NCA je možno mimo jiné dobře zjistit porovnáním IČ spekter. V IČ spektru mPEG-*b*-PLL(Z) dojde k vymizení výrazných signálů vibračních pásem O=C-O-C=O skupin typických pro L-Lys(Z)-NCA (1855; 1808; 1773; 1744 cm⁻¹).

Samotná příprava blokového kopolymeru mPEG-*b*-PLL(Z) (**5**) byla prováděna v různém molárním poměru výchozích látek L-Lys(Z)-NCA a mPEG-NH₂ (M = 5000). S rostoucím molárním poměrem $n(\text{L-Lys(Z)-NCA})/n(\text{mPEG-NH}_2)$ rostl počet jednotek lysinu v kopolymeru. Z provedených experimentů byl vyhodnocen optimální počet jednotek lysinu v kopolymeru na 6 - 13. Příliš mnoho jednotek v řetězci způsobuje změnu vlastností kopolymeru a způsobuje komplikace při izolaci. Minimum vychází z předpokladu, kolik molekul isoniazidu v konjugátu by optimálně mělo být navázáno. V případě zachování podmínek reakce a použitých výchozích látek lze tuto závislost dobře zobecnit. Tuto skutečnost vyjadřuje **Tabulka 2**, ve které jsou zvýrazněny kopolymery odpovídající uvedeným požadavkům a které byly používány do dalších reakčních kroků.

Počet jednotek u připravených kopolymerů byl odhadován z integrálních intenzit (*I*) charakteristických signálů v ¹H NMR spektrech mPEG-*b*-PLL(Z) integrovaných na signál -(OCH₂CH₂)_n- δ 3,51 ppm s integrální intenzitou *I* = 450,00. Vzorky na NMR analýzy byly připravovány pro všechny látky ve stejné koncentraci (25 mg vzorku v 1 ml DMSO).

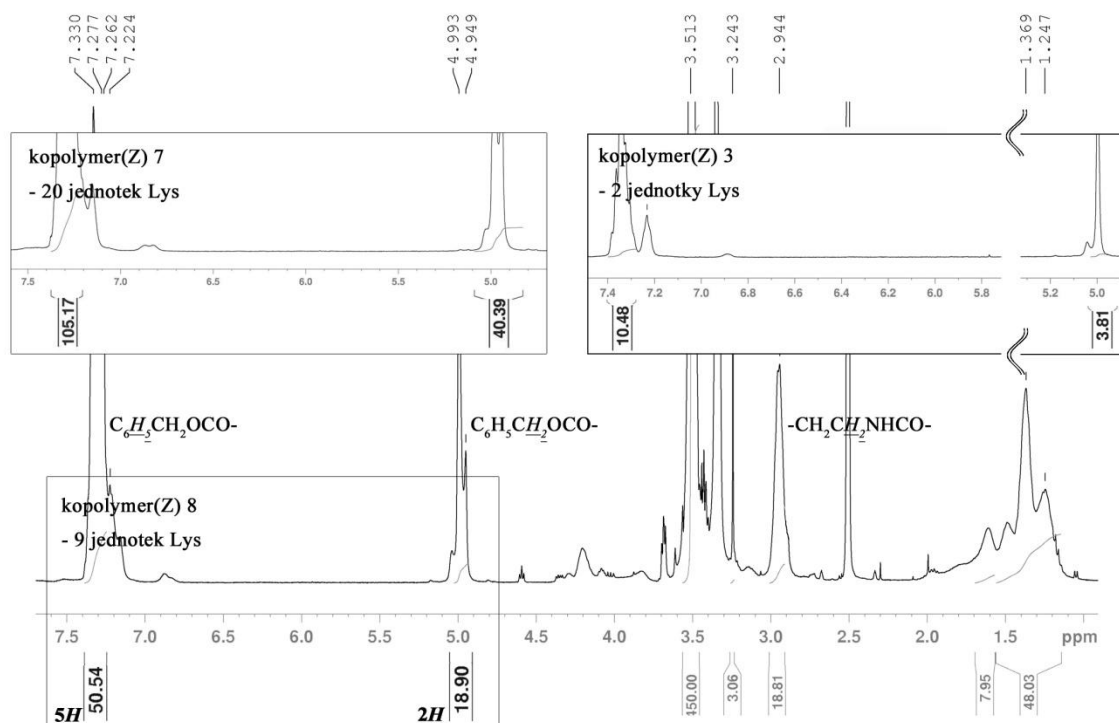
Charakteristickými signály mPEG-*b*-PLL(Z) jsou δ 2,94 ppm (-CH₂CH₂-NHCO-, 2H), 4,95 ppm (C₆H₅-CH₂-OCO, 2H) a 7,33 ppm (C₆H₅-CH₂-, 5H). Podílem integrální intenzity signálu a počtu vodíků, který tento signál tvoří, získáme počet lysinových jednotek v blokovém kopolymeru mPEG-*b*-PLL(Z). Názorně je vše vyjádřeno v **Tabulce 3** a na **Obrázku 30**, kde jsou důležité signály pro výpočet dobře vidět.

Tabulka 2 Závislost počtu lysinových jednotek v mPEG-*b*-PLL(Z) na molárním poměru výchozích látek

č. exp.	$n(\text{L-Lys(Z)-NCA})$ [mmol]	$n(\text{mPEG-NH}_2)$ [mmol]	$n(\text{L-Lys(Z)-NCA})/$ $n(\text{mPEG-NH}_2)$	počet jednotek Lys v mPEG- <i>b</i> -PLL(Z)
1	3,26	0,17	20,0	19
2	1,79	0,17	10,5	11
3	0,34	0,17	2,0	2
4	3,52	0,18	19,6	21
5	1,99	0,18	11,1	13
6	0,33	0,18	1,8	2
7	1,63	0,08	20,0	20
8	11,40	1,14	10,0	9
9	8,89	0,68	13,0	11
10	8,89	0,68	13,0	11

Tabulka 3 Počet lysinových jednotek v mPEG-*b*-PLL(Z) vypočtený z integrálních intenzit (*I*) charakteristických signálů v ¹H NMR spektru

č.exp.	CH ₂ CH ₂ NHCO- (2H)		C ₆ H ₅ -CH ₂ -OCO- (2H)		C ₆ H ₅ -CH ₂ -OCO- (5H)		počet jednotek
	δ [ppm]	I	δ [ppm]	I	δ [ppm]	I	
1	2,94	33,79	4,95	38,15	7,17-7,35	114,24	19
2	2,94	23,79	4,95	23,22	7,26-7,33	65,04	11
3	2,95-2,96	4,79	5,00	3,81	7,23-7,36	10,48	2
4	2,94	43,83	4,95	40,49	7,26-7,31	115,11	21
5	2,94-2,96	31,40	4,95	26,80	7,26-7,33	80,26	13
6	2,96	3,93	5,00	4,47	7,31-7,38	10,35	2
7	2,94	33,81	4,98	40,39	7,25-7,36	105,17	20
8	2,94	18,81	4,97	18,90	7,26-7,33	50,54	9
9	2,94	23,23	4,96	22,89	7,16-7,34	61,82	11
10	2,95	21,3	4,95	21,30	7,26-7,36	55,9	11



Obrázek 30 Ukázky ^1H NMR spekter mPEG-*b*-PLL(Z) s různými počty lysinových jednotek

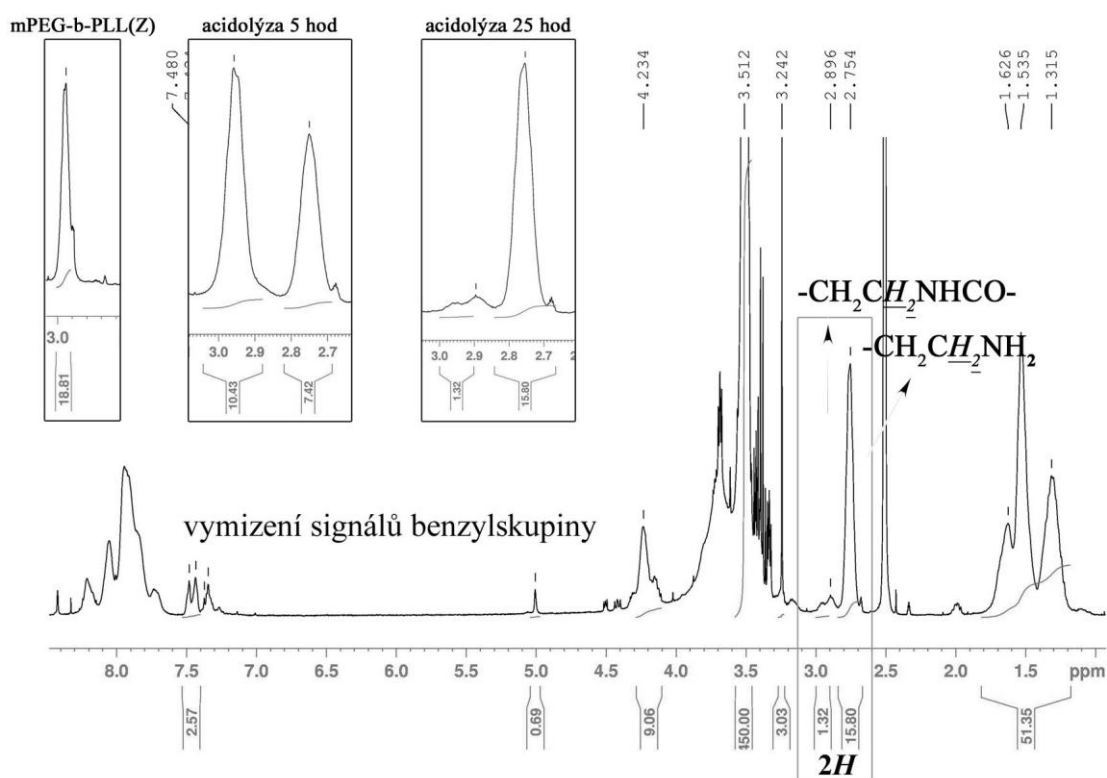
Dalším stupněm syntézy byla deprotektce chráněných $\epsilon\text{-NH}_2$ skupin lysinových jednotek v molekule **5**. Nejprve bylo provedeno množství neúspěšných experimentů hydrogenolytické deblokace, ať už za působení vodíku balonkovou technikou za normálního tlaku a teploty nebo v autoklávu za tlaku 20 bar. Jako katalyzátoru bylo použito palladia na aktivovaném uhlí (Pd-C 5%). Benzyloxykarbonylová chránící skupina (Z) nebyla odstraněna z $\epsilon\text{-NH}_2$ skupin lysinových jednotek v mPEG-*b*-PLL(Z) u žádné, nebo jenom u jedné až dvou skupin. Po neúspěšných experimentech deprotektce hydrogenolýzou bylo k deprotektci využito acidolýzy pomocí TFA. Deprotektce touto metodou vykazovala již po 5 hodinách ztrátu 5 chránících skupin, po 25 hodinách potom nastává deblokace úplná, přičemž nedocházelo ke štěpení polyethylenglykolového řetězce. V některých případech byla jedna chránící skupina zachována.

Zcela odchráněné lysinové jednotky neposkytují v ^1H NMR spektrech signály benzylové skupiny δ 4,95 ppm ($-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}_6\text{H}_5$, 2H) a 7,33 ppm ($-\text{O}-\text{C}\text{H}_2-\text{C}_6\text{H}_5$, 5H). Signál

δ 2,94 ppm ($-\underline{\text{CH}}_2\text{-NH-CO-}$, 2H) je u ochráněných lysinových jednotek nahrazen signálem $-\text{CH}_2-$ skupiny vedle nově vznikající volné aminoskupiny ($-\underline{\text{CH}}_2\text{-NH}_2$, 2H) s chemickým posunem δ 2,75 ppm. Porovnáním integrálních intenzit těchto signálů lze odhadovat počty chráněných a volných jednotek. V **Tabulce 4** a na **Obrázku 31** je názorně ukázán účinek deprotektce.

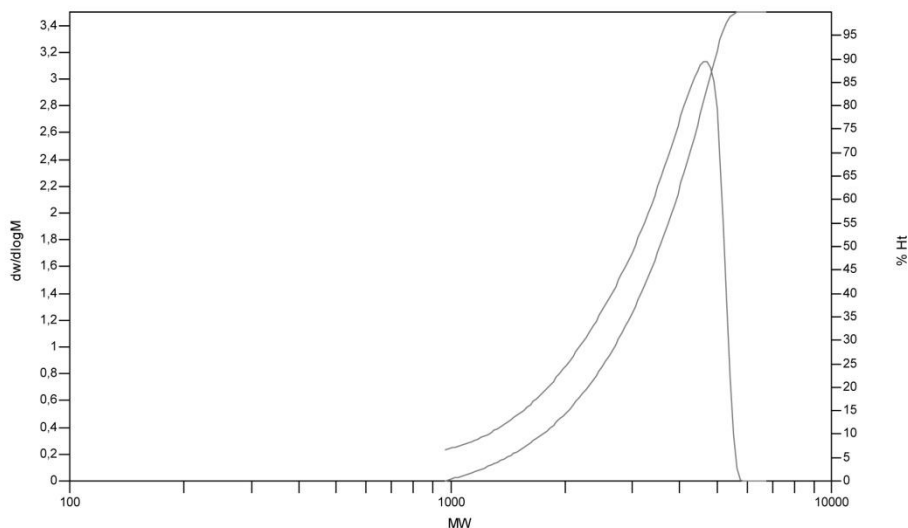
Tabulka 4 Přehled účinku deprotektce u mPEG-*b*-PLL(Z)

	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-OCO-}$ (2H)		$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-OCO-}$ (5H)		$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO-}$ (2H)		$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (2H)		počet jednotek	
	δ	<i>I</i>	δ	<i>I</i>	δ	<i>I</i>	δ	<i>I</i>	chráněných	volných
před deprotektí	4,95	18,54	7,33	51,99	2,94	18,81	-	-	9	0
hydrogenolýza	4,95	18,42	7,33	54,36	2,94	17,95	-	-	9	0
acidolýza 5 hod	4,95	8,86	7,33	29,63	2,94	10,43	2,75	7,42	5	4
acidolýza 25 hod	-	-	-	-	2,94	1,32	2,75	15,80	0-1	8-9



Obrázek 31 Ukázky ^1H NMR spekter mPEG-*b*-PLL(Z) před acidolýzou a mPEG-*b*-PLL po 5 a 25 hodinách reakce

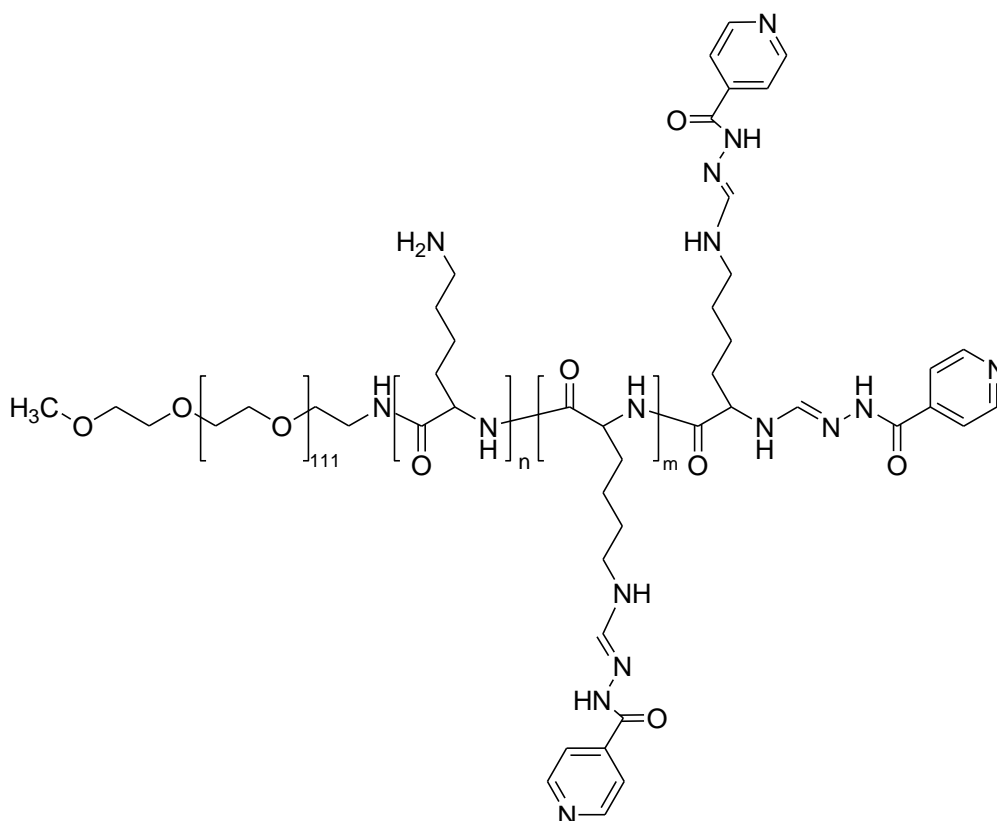
GPC analýza pomohla odhalit distribuci molekulových hmotností blokového kopolymeru **5**, **6** a konjugátu **7**. V chromatogramech chráněného i odchráněného kopolymeru je vidět pouze jeden pík, což nám ukazuje, že polymerizace proběhla a že molekula není nijak štípána ani účinkem kyseliny při deprotekcí (**Obrázek 32**).



Obrázek 32 Distribuční křivka molekulových hmotností pro konjugát [mPEG-*b*-PLL]-INH získaná pomocí GPC

Ke konjugaci INH na mPEG-*b*-PLL byla zvolena reakce mPEG-*b*-PLL, DEMA a INH v jedné reakční směsi. Syntéza cestou reakce kopolymeru s připraveným EINH, která se zdála být elegantnější, nepřinášela požadované výsledky.

Počet obsazených lysinových jednotek INH ($m+2$) byl určen z ^1H NMR spekter. Jak už vyplývá ze struktury molekuly **7** (**Obrázek 33**), je nutné brát v úvahu také volnou koncovou $\alpha\text{-NH}_2$ skupinu lysinu jako další reaktivní místo, kam se molekula INH může vázat. Problematika interpretace NMR spekter ke zjištění počtu navázaných molekul INH se tím ještě více komplikuje.

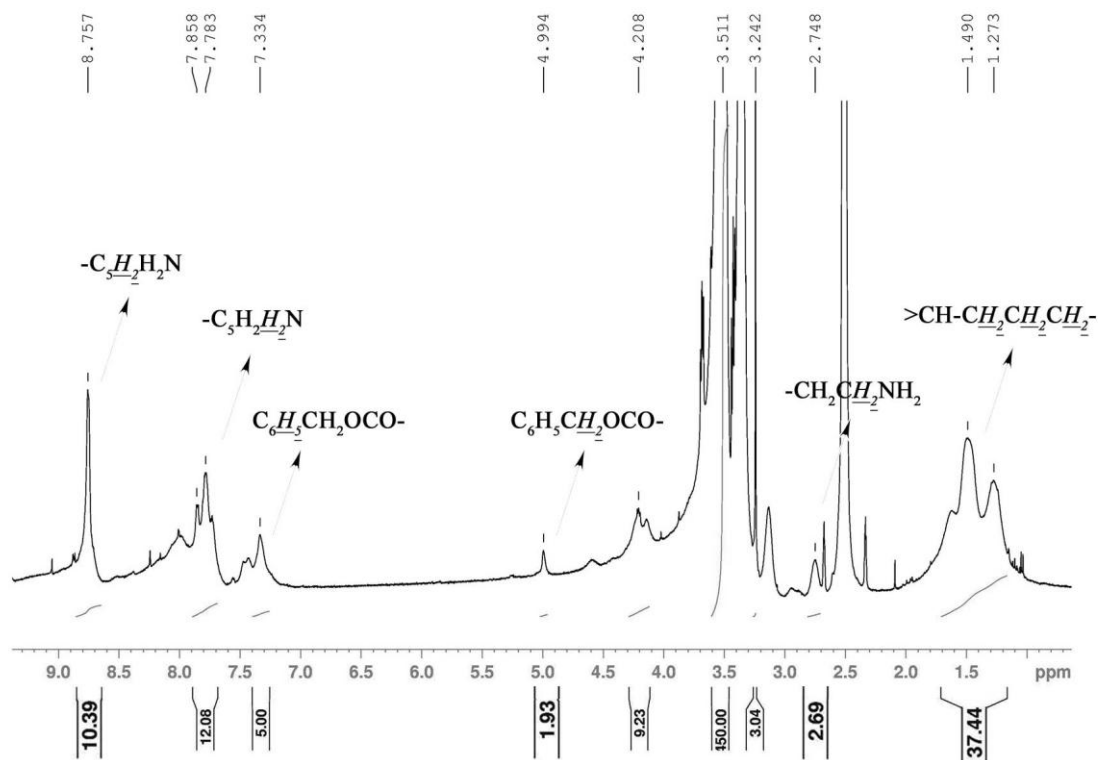


Obrázek 33 Struktura připraveného konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH (7)

Určení počtu lysinových jednotek v konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH (7) a míru obsazení těchto jednotek INH odhadneme z integrálních intenzit (I) signálů v ^1H NMR spektru integrovaných na signál $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ δ 3,51 ppm s integrální intenzitou $I = 450,00$. Počet lysinových jednotek v konjugátu jednoznačně určíme ze signálu δ 1,27 – 1,60 ppm ($>\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $6H$). Musí být bráno v úvahu, že v konjugátu se mohou objevit v různém poměru volné lysinové jednotky s volnou $\epsilon\text{-NH}_2$ skupinou charakterizované signálem δ 2,75 ppm ($-\text{CH}_2\text{-NH}_2$, $2H$) a jednotky s navázanou molekulou INH. Navázání INH na volné jednotky je charakterizováno signály pyridinového kruhu δ 7,86 ppm ($-\text{C}_5\text{H}_2\text{H}_2\text{N}$, $2H$), δ 8,76 ppm ($-\text{C}_5\text{H}_2\text{H}_2\text{N}$, $2H$). Zároveň se s přibývajícím počtem INH v konjugátu snižuje integrální intenzita signálu δ 2,75 ppm ($-\text{CH}_2\text{-NH}_2$, $2H$). Příklady výsledků vyhodnocení u některých připravených konjugátů je uvedeno v **Tabulce 5**. Všechny charakteristické signály ^1H NMR spektra v konjugátu jsou dobře vidět na **Obrázku 34**.

Tabulka 5 Výsledky vyhodnocení ^1H NMR spekter připravených konjugátů

č. exp.	$>\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (6H)		$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (2H)		$-\text{C}_5\text{H}_2\text{H}_2\text{N}$ (2H)	
	integrace	celkový počet jednotek lysinu	integrace	počet volných jednotek lysinu	Integrace	počet navázaných INH
1	19,3	3	3,3	1-2	4,7	2-3
2	35,0	6	4,5	2	9,0	4-5
3	36,4	6	2,7	1	10,4	5



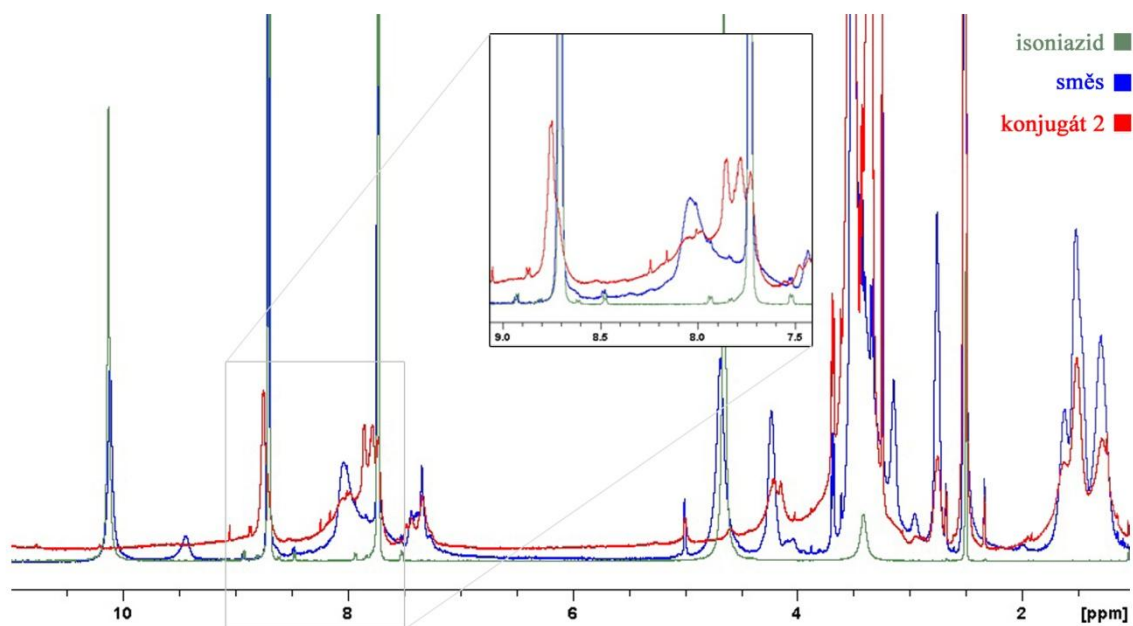
Obrázek 34 ^1H NMR spektrum konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH (*konjugát 3*)

Signál vodíku na uhlíku „CH spojky“, který by interpretaci zjednodušil, se ve spektru nepodařilo jednoznačně určit. Vzhledem k nepřehlednosti spekter se s největší pravděpodobností překrývá s jinými signály. Předpokládaný chemický posun tohoto signálu je v aromatické oblasti δ 7,8 – 9,0 ppm.^{70,71,72}

K posouzení, zda je INH kovalentně vázán na kopolymer, či je s ním pouze volně ve směsi, bylo využito nejprve porovnání ^1H NMR spekter konjugátu a fyzikální směsi mPEG-*b*-PLL a INH použitého v reakci. Zde je patrný rozdíl v chemických posunech signálů pyridinového kruhu (viz **Tabulka 6** a **Obrázek 35**).

Tabulka 6 Porovnání chemických posunů signálů v ^1H NMR spektrech směsi INH s mPEG-*b*-PLL a připraveného konjugátu

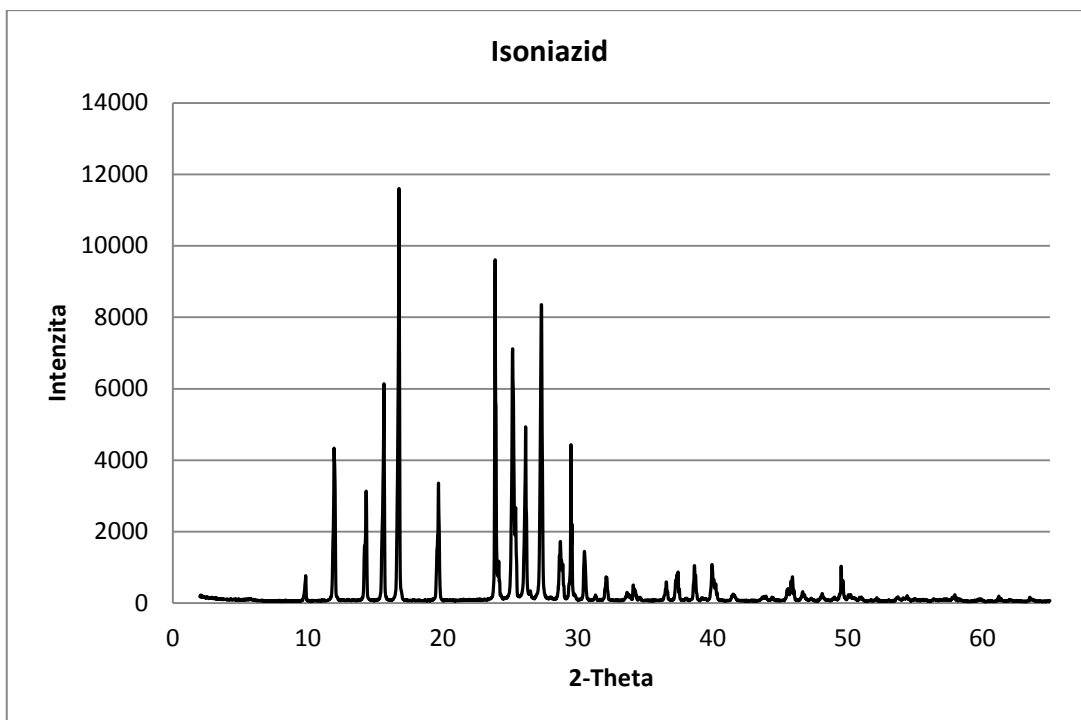
vzorek	$-\text{C}_5\text{H}_2\text{H}_2\text{N}$ (2H)	$-\text{C}_5\text{H}_2\text{H}_2\text{N}$ (2H)
	δ [ppm]	δ [ppm]
<i>konjugát 2</i>	7,86	8,76
fyzikální směs	7,73	8,70



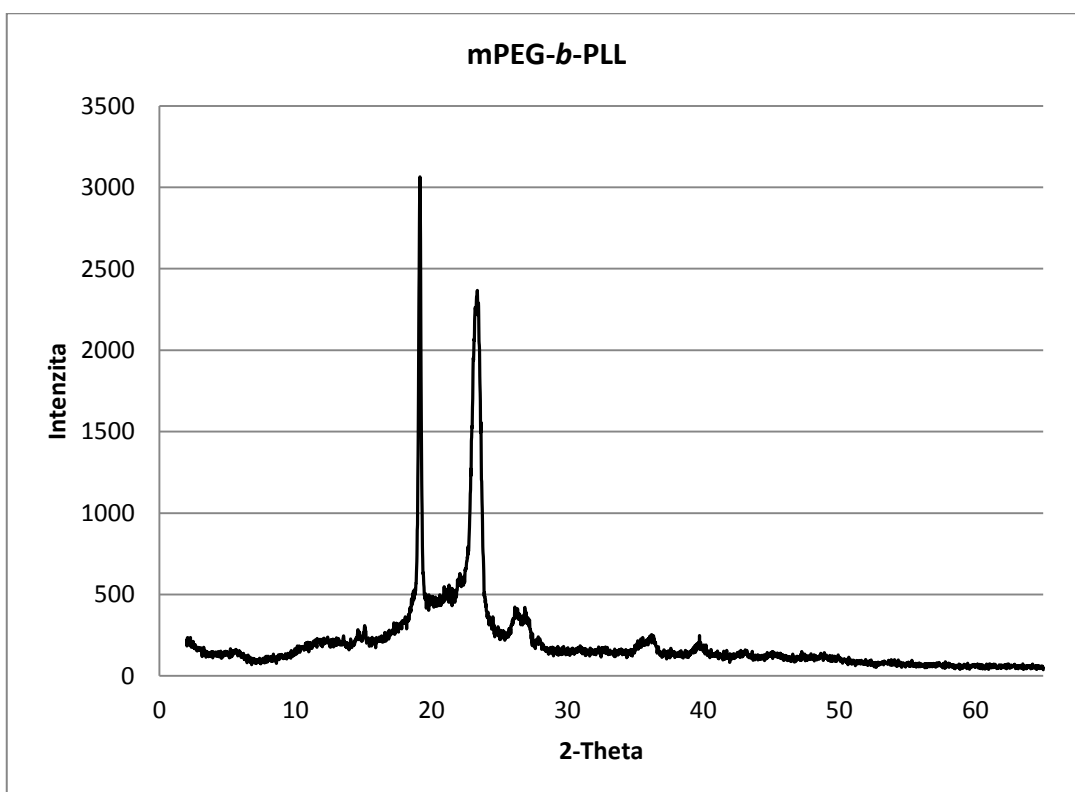
Obrázek 35 Porovnání ^1H NMR spekter fyzikální směsi INH s mPEG-*b*-PLL a připraveného konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH (*konjugát 2*)

Tyto dva vzorky, fyzikální směs a konjugát [mPEG-*b*-PLL]-INH, byly porovnávány i pomocí ^{13}C NMR spektroskopie, což je však metoda nepříliš vhodná. Naměřená spektra vykazují zjevné odlišnosti, na základě této skutečnosti lze ale ovšem pouze konstatovat, že se jedná o dva nestejně vzorky.

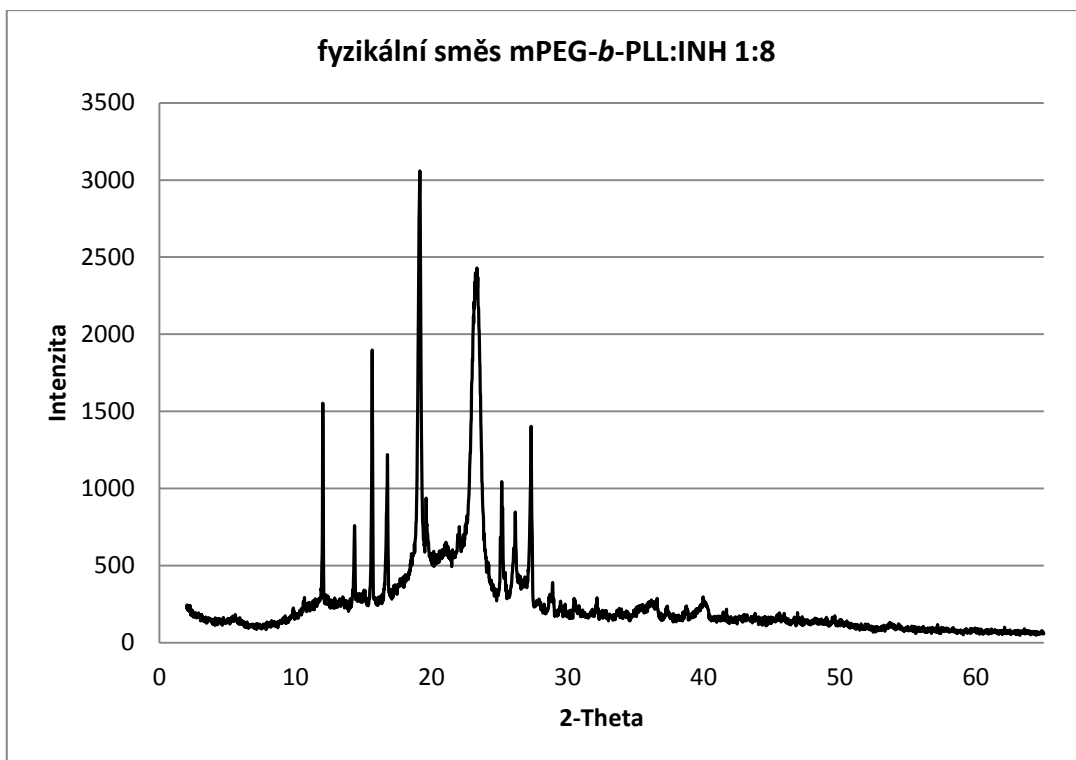
Pomocí rentgenové difrakční analýzy pevných krystalických látek byly naměřeny difraktogramy samotného isoniazidu (**Obrázek 36**), kopolymeru mPEG-*b*-PLL (**Obrázek 37**), fyzikální směsi INH s mPEG-*b*-PLL (**Obrázek 38**) a konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH (**Obrázek 39**).



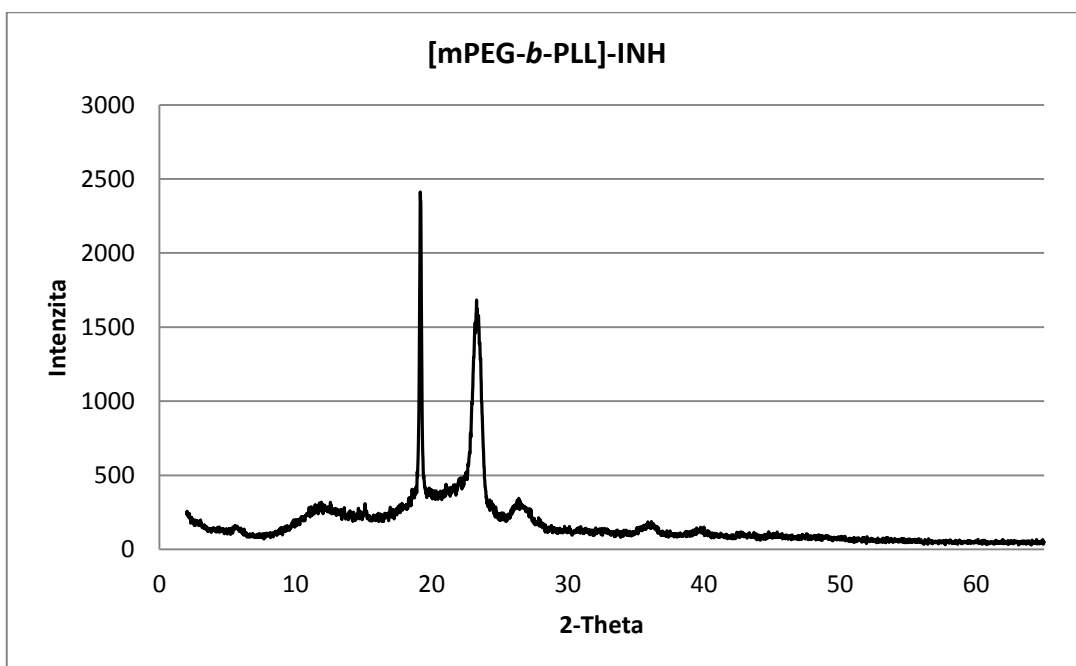
Obrázek 36 Difraktogram INH



Obrázek 37 Difraktogram mPEG-*b*-PLL

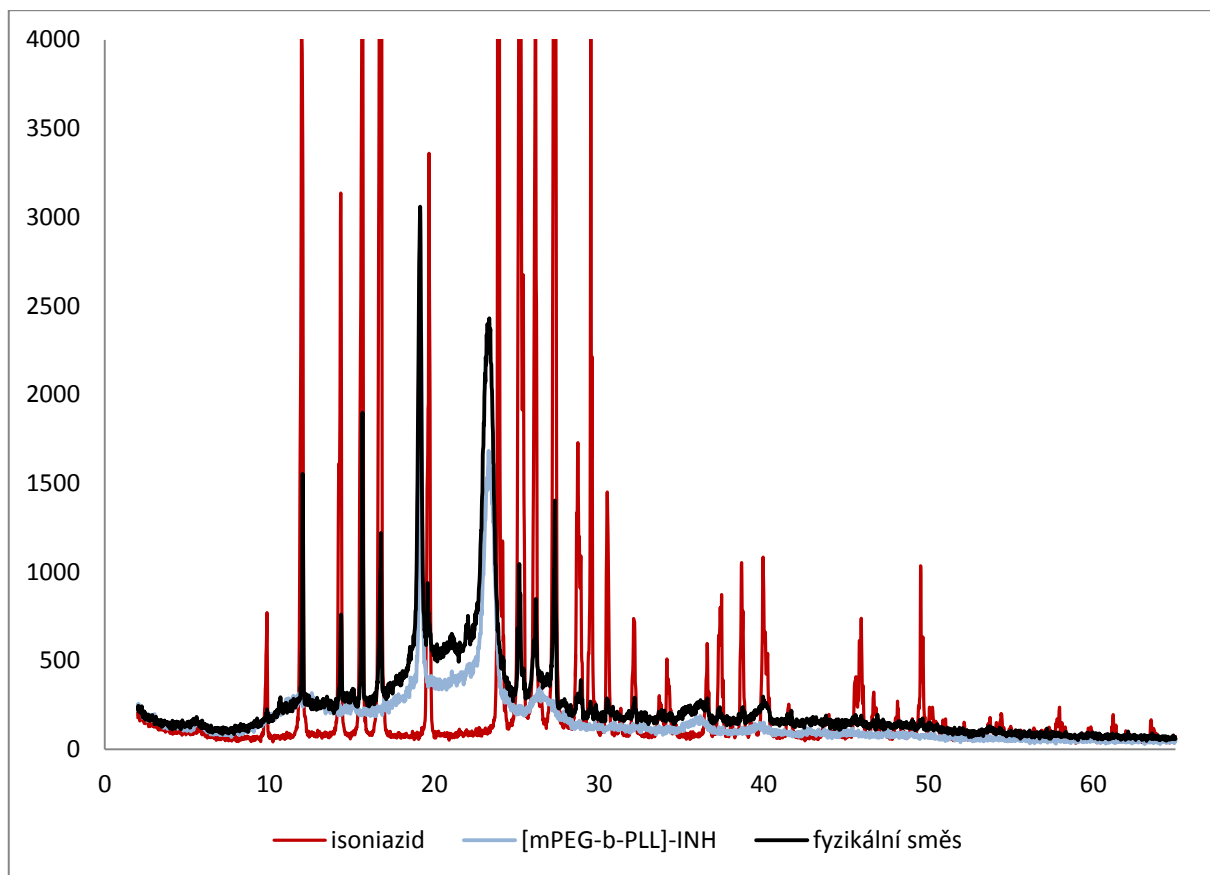


Obrázek 38 Difraktogram fyzikální směsi INH s mPEG-*b*-PLL



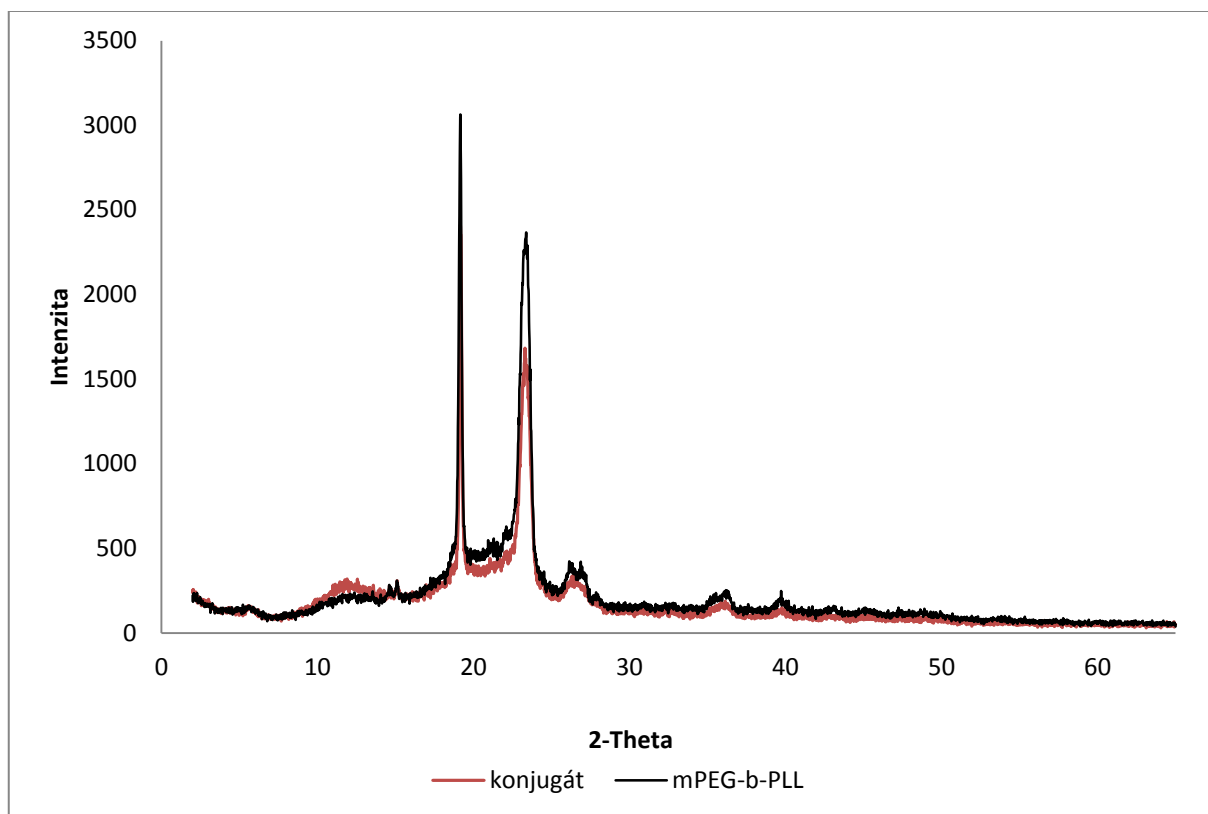
Obrázek 39 Difraktogram konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH

Na **Obrázku 40** je umístěn difraktogram čistého isoniazidu, konjugátu a směsi do jednoho obrázku. Z tohoto porovnání je dobře patrné, že polohy čar (mezirovinné vzdálenosti) ve fyzikální směsi dobře odpovídají samotným komponentám. V difraktogramu konjugátu čáry odpovídající volnému isoniazidu naopak vidět nejsou.



Obrázek 40 Porovnání difraktogramů INH, konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH a fyzikální směsi INH s mPEG-*b*-PLL

Na **Obrázku 41** jsou porovnány difraktogramy kopolymeru mPEG-*b*-PLL a konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH. Je zřejmé, že v konjugátu je zachována struktura kopolymeru a nejsou v nich vidět čáry samotného volného léčiva.



Obrázek 41 Porovnání difraktogramů konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH a mPEG-*b*-PLL

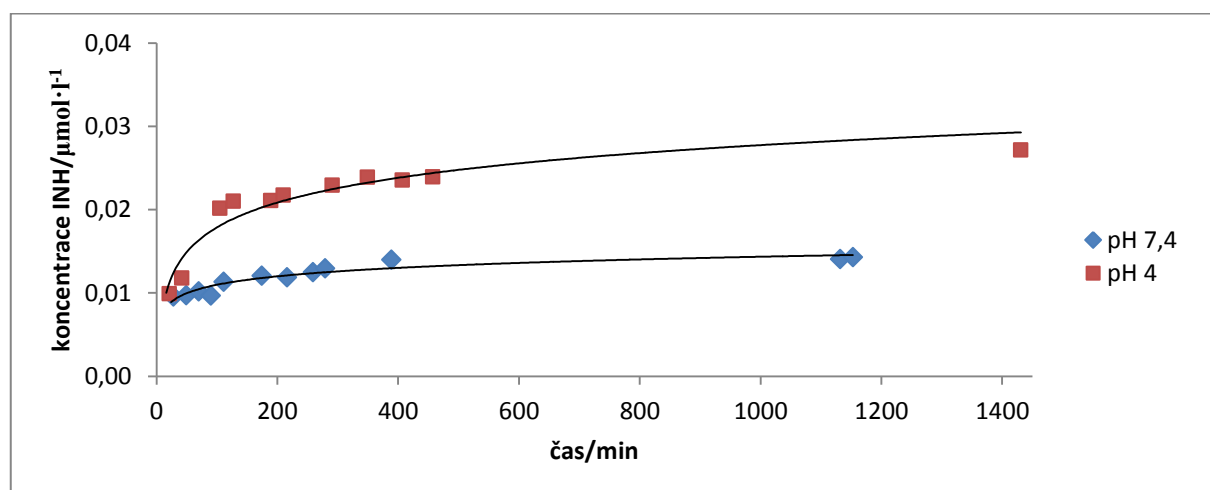
Od sledování kinetiky uvolňování isoniazidu z léčiva pomocí UV/vis spektroskopie bylo upuštěno. Pozorovaná změna absorpance byla velmi malá, proto se přistoupilo k přesnější metodě HPLC.

Stabilita konjugátů byla posuzována pomocí HPLC analýzy. Byla vytvořena nová metoda pro stanovování uvolňování isoniazidu a provedena kalibrace. Stabilita konjugátu byla studována v roztocích fosfátového pufru při hodnotě pH 7,4 a v acetátovém pufru o pH 4 při teplotě 37 °C. Byl sledován přírůstek volného isoniazidu ve vzorku průběžně během 20 - 24 hodin. Měření nebyla prováděna na našem pracovišti. Jednalo se o předběžné *in vitro* testy stability ve vodných prostředích a v těchto testech se nadále pokračuje. Výsledky získané z dodaných dat (**Obrázek 42**) poukazují na nárůst volného INH ve vzorcích sledovaného konjugátu při pH 4, přičemž během prvních sto minut je uvolňování nejrychlejší.

Při pH 7,4 je volného isoniazidu ve 100. minutě cca 9 %, při pH 4 se za stejnou dobu dostaneme na hodnotu cca 17 %. V obou případech dále dochází k postupnému uvolňování. Při nižším sledovaném pH se z konjugátu uvolní během 20 - 24 hodin téměř dvojnásobek INH (**Tabulka 7**). Další studie budou zaměřeny na uvolňování při nižších pH a naopak bude sledováno chování v bazickém prostředí. Bude se sledovat také uvolňování při různých pH během delšího časového období několika dnů.

Tabulka 7 Množství uvolněného INH z konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH **7** (*konjugát 2*) v roztocích pufrů o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); 4,0 (acetátový pufr, $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$).

čas [min]	uvolněný INH z <i>konjugátu 2</i> při daném pH [%]	
	pH 7,4	pH 4
30	8,0	8,2
50	8,1	9,8
100	9,4	16,8
200	10,0	18,1
400	11,6	19,6
1000	11,7	-
1200	11,9	-
1400	-	22,5



Obrázek 42 Graf závislosti koncentrace INH ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na čase (min). Sledování uvolňování INH z konjugátu [mPEG-*b*-PLL]-INH **7** (*konjugát 2*) v roztocích pufrů o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); pH 4 (acetátový pufr, $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Body byly stanoveny experimentálně metodou HPLC při 263 nm.

6 Závěr

V diplomové práci byla navržena a následně provedena syntéza nového pH senzitivního konjugátu antituberkulotika isoniazidu s blokovým kopolymerem α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinem). Jedná se o čtyřstupňovou syntézu, přičemž byly izolovány a charakterizovány všechny intermediáty.

Příprava blokového kopolymeru mPEG-*b*-PLL(Z) byla optimalizována tak, že je možné připravit konjugát s různým počtem navázaných lysinových jednotek v závislosti na molárním poměru výchozích látek. Předpokládaný počet jednotek v kopolymeru byl potvrzen ^1H NMR spektroskopií.

Byla navržena a provedena acidolýza mPEG-*b*-PLL(Z) jako účinný způsob deprotektce chráněné $\varepsilon\text{-NH}_2$ skupiny lysinu.

Podářilo se připravit konjugát isoniazidu s mPEG-*b*-PLL, kde jsou volné lysinové jednotky obsazeny isoniazidem. Syntéza byla provedena tak, že ve většině případů zůstává pouze jedna jednotka neobsazená. Fakt, že je isoniazid na kopolymer vázán kovalentně na kopolymer, bylo potvrzeno pomocí ^1H NMR spektroskopie. Ve spektrech samotného isoniazidu použitého při reakci a konjugátu je patrný rozdíl v chemických posunech vodíků pyridinového kruhu isoniazidu. Pomocí práškové rentgenové difrakce byl také vyloučen obsah volného isoniazidu ve vzorcích.

Bylo provedeno několik testů stability připraveného konjugátu pomocí HPLC analýzy při pH 7,4 a pH 4 při teplotě 37 °C. Při nižším pH se z konjugátu během prvních sto minut uvolní dvakrát více isoniazidu než při pH 7,4. Konjugát se při pH 7,4 jeví jako relativně stabilní. Zvýšené uvolňování isoniazidu při nižším pH je v souladu s principem cíleného uvolňování léčiv, ke kterému bylo směřováno. Isoniazid by se měl uvolňovat v místech se sníženým pH, v místech zasažených mykobakteriemi. Stanovení celkového pH profilu testovaných konjugátů nebylo z časových důvodů provedeno a bude předmětem dalších studií.

Stanovené cíle uložené zadáním diplomové práce byly splněny.

7 Seznam použitých zkratek

AMB	Amfotericin B
BAIB	[bis(acetoxo)-jodo]benzen
BSA	bovine serum albumine (hovězí sérový albumin)
Cbz; (Z)	benzyloxykarbonylová skupina
CIP	ciprofloxacín
CL	ϵ -kaprolakton
DEMA	diethoxymethylacetát
DIVEMA	poly(divinylethermalenanhydrid)
DLLA	3,6-dimethyl-1,4-dioxan-2,5-dion
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DOX	doxorubicin
DPET	dipentaerythritol
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EINH	ethyl isonikotinoylhydrazonoformát
ETA	ethionamid
ETB	ethambutol
FDA	Food and Drug Administration
GPC	gelová permeační chromatografie
GL	glycerol
HDI	hexamethylen diisokyanát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
IČ	infračervená spektroskopie
INH	isoniazid
<i>I</i>	integrální intenzita
L-Lys(Z)	ϵ -benzyloxykarbonyl-L-lysin
L-Lys(Z)-NCA	ϵ -benzyloxykarbonyl-L-lysin <i>N</i> -karboxyanhydrid
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mPEG	α -methoxy-poly(ethylenglykol)
mPEG- <i>b</i> -PLL(Z)	α -methoxy-poly(ethylenglykol)- <i>b</i> -poly(ϵ -benzyloxykarbonyl-L-lysin)
mPEG- <i>b</i> -PLL	α -methoxy-poly(ethylenglykol)- <i>b</i> -poly(L-lysin)
[mPEG- <i>b</i> -PLL]-INH	konjugát isoniazidu s α -methoxy-poly(ethylenglykol)- <i>b</i> -poly(L-lysinem)
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza
NCA	<i>N</i> -karboxyanhydrid
NY	nystatin
PAA	poly(α -aminokyselina)
PAsp	poly(asparagová kyselina)
PEG- <i>b</i> -PBLA	poly(ethylenglykol)- <i>b</i> -poly(β -benzyl-L-aspartát)
PEO	poly(ethylenoxid)
PET	pentaerytrytol
PLL	poly(L-lysin)
PO	polyoxíran
POE	poly(oxyethylen)
PS	prednisolon
PZA	pyrazinamid
RIF	rifampicin
ROP	<i>ring-opening</i> polymerace
RVO	rotační vakuová odparka
sPEG; star-PEG	pentaerythritol poly(ethylenglykol)
TBC	tuberkulóza
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TFA	kyselina trifluoroctová
TDR-TB	totálně rezistentní tuberkulóza
U-PEG	„umbrella-like“-poly(ethylenglykol)
XDR-TB	extenzivně rezistentní tuberkulóza
WHO	World Health Organisation

8 Literatura

-
- ¹ Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie*, 2nd ed.; VŠCHT Praha: Praha, 2007; p 17.
- ² Veronese, F. M.; Morpurgo, M. Bioconjugation in pharmaceutical chemistry. *II Farmaco* **1999**, *54*, 497–516.
- ³ Braunová, A.; Pechar, M.; Ulbrich, K. Degradation behavior of poly(ethylene glycol) diblock and multiblock polymers with hydrolytically degradable ester linkages. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2004**, *69*, 1643–1656.
- ⁴ 2010/2011 TUBERCULOSIS GLOBAL FACTS, 2010. World Health Organisation. http://www.who.int/tb/publications/2010/factsheet_tb_2010_rev21feb11.pdf (accessed April 05, 2012).
- ⁵ Khandare, J.; Minko, T. Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 359–397.
- ⁶ Kopeček, J.; Kopeckova, P. HPMA copolymers: Origins, early developments, present, and future. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62* (2), 122–149.
- ⁷ Ulbrich, K.; Subr, V. Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62* (2), 150–166.
- ⁸ Nicoletti, S.; Seifert, K.; Gilbert, I. H. N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide–amphotericin B (HPMA–AmB) copolymer conjugates as antileishmanial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *33*, 441–448.
- ⁹ Izunobi, J. U.; Higginbotham, C. L. Microstructure characterization and thermal analysis of hybrid block copolymer a-methoxy-poly(ethylene glycol)-block-poly[e-(benzyloxycarbonyl)-L-lysine] for biomedical applications. *J. Mol. Struct.* **2010**, *977*, 153–164.
- ¹⁰ Sedlák, M.; Pravda, M.; Kubicová, L.; Mikulčíková, P.; Ventura, K. Synthesis and characterisation of a new pH-sensitive amphotericin B—poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lysine) conjugate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2554–2557.
- ¹¹ Khan, M. O. F.; Park, K. K.; Lee, H. J. Antedugs: An approach to safer drugs. *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 2227–2239.
- ¹² Ringsdorf, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J. Polym. Sci., Polym. Symp.* **1975**, *51*, 135-153.
- ¹³ Abuchowski, A.; van Es, T.; Palczuk, N. C.; Davis, F. F.: *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3578-3581.

-
- ¹⁴ Müller, H.; Beier, R.; Palma, J. C.; Lanvers, C.; Ahlke, E.; Schutz, V.; Gunkel, M.; Horn, A.; Schrappe, M.; Henze, G.; Kranz, K.; Boos, J. PEG-asparaginase (Oncaspar) 2500 U/m2 BSA in reinduction and relapse treatment in the ALL/NHL-BFM protocols. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, *49*, 149–154.
- ¹⁵ Vokurka, M.; Hugo, J.; et al. *Velký lékařský slovník*, 8th ed.; Maxdorf: Praha, 2009.
- ¹⁶ Harris, J. M.; Struck, E. C.; Case, M. G.; Paley, M. S. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* **1984**, *22*, 341–352.
- ¹⁷ Sedlák, M. Recent advances in chemistry and applications of substituted poly(ethyleneglycol)s. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2005**, *70*, 269–291.
- ¹⁸ Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie*, 2nd ed.; VŠCHT Praha: Praha, 2007; p 32.
- ¹⁹ Zalipsky, S.; Gilon, C.; Zilkha, A. Attachment of drugs to polyethylene glycols. *Eur. Polym. J.* **1983**, *19* (12), 1177–1183.
- ²⁰ Fishman, A.; Acton, A.; Lee-Ruff, E. A simple preparation of PEG-carboxylates by direct oxidation. *Syntetic communication* **2004**, *34* (12), 2309–2312.
- ²¹ Masson, Ch.; Scherman, D.; Bessodes, M. 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyl-oxyl/[bis(acetoxy)-iodo]benzene-mediated oxidation. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2001**, *39*, 4022–4024.
- ²² De Mico, A.; Margarita, R.; Parlanti, L.; Vescovi, A.; Piancatelli, G. Iodine/TEMPO Oxidation of Alcohols to Carbonyls. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (20), 6974–6977.
- ²³ Sedlák, M.; Drabina, P.; Svobodová, M.; Hanusek, J. New and simple synthetic method for carboxylic acid functionalized poly(ethylene glycol). *Synlett* **2008**, (8), 1230–1232.
- ²⁴ Annunziata, R.; Benaglia, M.; Cinquini, M.; Cozzi, F. Soluble-Polymer-Supported Synthesis of b-Lactams on a Modified Poly(ethylene glycol). *Chem. Eur. J.* **2000**, *6* (1), 133–138.
- ²⁵ Benaglia, M.; Annunziata, R.; Cinquini, M.; Cozzi, F.; Ressel, S. Synthesis of New Poly(ethyleneglycol)s with a High Loading Capacity. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (24), 8628–8629.
- ²⁶ Annunziata, R.; Benaglia, M.; Cinquini, M.; Cozzi, F.; Tocco, G. A Poly(ethylene glycol)-Supported Quaternary Ammonium Salt: An Efficient, Recoverable, and Recyclable Phase-Transfer Catalyst. *Org. Lett.* **2000**, *2* (12), 1737–1739.

-
- ²⁷ Benaglia, M.; Cinquini, M.; Cozzi, F.; Tocco, G. Synthesis of a poly(ethylene glycol)-supported tetrakis ammonium salt: a recyclable phase-transfer catalyst of improved catalytic efficiency. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3391–3393.
- ²⁸ Veronese, F. M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* **2001**, *22*, 405–417.
- ²⁹ Jing Li and W. John Kao Synthesis of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives and PEGylated-Peptide Biopolymer Conjugates. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1055-1067.
- ³⁰ Martinez, A.; Pendri, A.; Xia, J.; Greenwald, R. B. Branched poly(ethylene glycol) linkers. *Macromol. Chem. Phys.* **1997**, *198*, 2489–2498.
- ³¹ Mutter, M. Soluble Polymers in Organic Synthesis: Preparation Of Polymer Reagents Using Polyethylene-Glycol With Terminal Amino-groups As Polymeric Component. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *31*, 2839.
- ³² Zalipsky, S.; Menon-Rudolph, S. Hydrazide derivatives of poly(ethylene glycol) and their bioconjugates. Poly(ethylene glycol) chemistry and biological applications.. *ACS Symp. Ser.* **1997**, *41*.
- ³³ Šňupárek, J. *Makromolekulární chemie*, 2nd ed.; Univerzita Pardubice, 2009.
- ³⁴ Sedlák, M. Amphotericin B: From Derivatives to Covalent Targeted Conjugates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2009**, *9* (11), 1306–1316.
- ³⁵ Ulbrich, K.; Šubr, V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1023–1050.
- ³⁶ Greenwald, R. B. PEG drugs: an overview. *J. Controlled Release* **2001**, *74*, 159–171.
- ³⁷ Sanchis, J.; Canal, F.; Lucas, R.; Vicent, M. J. Polymer-drug conjugates for novel molecular targets. *Nanomedicine* **2010**, *5* (6), 915–935.
- ³⁸ Sedlák, M.; Buchta, V.; Kubicová, L.; Šimůnek, P.; Holčápek, M.; Kašparová, P. Synthesis and Characterisation of a New Amphotericin B – Methoxypoly(ethylene Glycol) Conjugate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2833–2835.
- ³⁹ Sedlák, M.; Pravda, M.; Staud, F.; Kubicová, L.; Týčová, K.; Ventura, K. Synthesis of pH-sensitive amphotericin B–poly(ethylene glycol) conjugates and study of their controlled release in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4069–4076.
- ⁴⁰ Sedlák, M.; Drabina, P.; Bílková, E.; Šimůnek, P.; Buchta, V. New targeting system for antimycotic drugs: β -Glucosidase sensitive Amphotericin B–star poly(ethylene glycol) conjugate. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *18*, 2952–2956.

-
- ⁴¹ Greenwald, R. B.; Choe, Y. H.; McGuire, J.; Conover, Ch. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 217–250.
- ⁴² Bílková, E.; Imramovský, A.; Buchta, V.; Sedlák, M. Targeted antifungal delivery system: β -Glucosidase sensitive nystatin–star poly(ethylene glycol) conjugate. *Int. J. Pharm.* **2010**, *386*, 1–5.
- ⁴³ Bílková, E.; Sedlák, M.; Dvořák, B.; Ventura, K.; Knotek, P.; Beneš, L. Prednisolone- α -cyclodextrin-star PEG polypseudorotaxanes with controlled drug delivery properties. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5423–5430.
- ⁴⁴ Bílková, E.; Sedlák, M.; Imramovský, A.; Chárová, P.; Knotek, P.; Beneš, L. Prednisolone- α -cyclodextrin-star poly(ethylene glycol) polypseudorotaxane with delayed pH-sensitivity as a targeted drug delivery system. *Int. J. Pharm.* **2011**, *414*, 42–47.
- ⁴⁵ Canevari, M.; Castagliuolo, I.; Brun, P.; Cardin, M.; Schiavon, M.; Pasut, G.; Veronese, F. M. Poly(ethylene glycol)-mesalazine conjugate for colon specific delivery. *Int. J. Pharm.* **2009**, *368*, 171–177.
- ⁴⁶ Schlaad, H.; Antonietti, M. Molecular chimeras of polypeptides and synthetic polymers. *Eur. Phys. J. E* **2003**, *10*, 17–23.
- ⁴⁷ Hernández, J. R.; Klok, H. Synthesis and Ring-Opening (Co)polymerization of L-Lysine N-Carboxyanhydrides Containing Labile Side-Chain Protective Groups. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 1167–1187.
- ⁴⁸ Thünemann, A. F.; Beyermann, J.; Kukulka, H. Poly(ethylene oxide)-b-poly(L-lysine) Complexes with Retinoic Acid. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5906–5911.
- ⁴⁹ Gu, J.; Cheng, W.; Liu, J.; Lo, S.; Smith, D.; Qu, X.; Yang, Z. pH-Triggered Reversible “Stealth” Polycationic Micelles. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 255–262.
- ⁵⁰ Choi, Y.; Liu, F.; Park, J.; Kim, S. Lactose-Poly(ethylene Glycol)-Grafted Poly-L-Lysine as Hepatoma Cell-Targeted Gene Carrier. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 708–718.
- ⁵¹ Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G. Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 169–190.
- ⁵² Harada, A.; Kataoka, K. Formation of Polyion Complex Micelles in an Aqueous Milieu from a Pair of Oppositely-Charged Block Copolymers with Poly(ethylene glycol) Segments. *Macromolecules* **1995**, *28* (15), 5294–5299.

-
- ⁵³ Hun Choi, Y.; Liu, F.; Kim, J.; Kweon Choi, Y.; Sang Park, J.; Wan Kim, S. Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *J. Controlled Release* **1998**, *54*, 39–48.
- ⁵⁴ Harada, A.; Cammas, S.; Kataoka, K. Stabilized α -Helix Structure of Poly(L-lysine)-block-poly(ethylene glycol) in Aqueous Medium through Supramolecular Assembly. *Macromolecules* **1996**, *29*, 6183–6188.
- ⁵⁵ Shiraishi, K.; Kawano, K.; Minowa, T.; Maitani, Y.; Yokoyama, M. Preparation and in vivo imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents. *J. Controlled Release* **2009**, *136*, 14–20.
- ⁵⁶ Kataoka, K.; Matsumoto, T.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Kwon, G. S. Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(L-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J. Controlled Release* **2000**, *64*, 143–153.
- ⁵⁷ Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie*, 2nd ed.; VŠCHT Praha: Praha, 2007; p 323.
- ⁵⁸ *Výskyt tuberkulózy v České republice v roce 2009* [online]. [Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR](#), 2010-07-09, [cit. 2011-07-03]. [Dostupné online](#).
- ⁵⁹ Claire du Toit, L.; Pillay, V.; Danckwerts, M. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. *Respiratory research* **2006**, *7*, 118–136.
- ⁶⁰ Barevný atlas farmakologie
- ⁶¹ Silva, M.; Lara, A. S.; Leite, C. Q. F.; Ferreira, E. I. Potential Tuberculostatic Agents: Micelle-Forming Copolymer Poly(ethylene glycol)-Poly(aspartic acid) Prodrug with Isoniazid. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2001**, *334*, 189–193.
- ⁶² Silva, M.; Ricelli, N. L.; Seoud, O. E.; Valentim, C. S.; Ferreira, A. G.; Sato, D. N.; Leite, C. Q. F.; Ferreira, E. I. Potential Tuberculostatic Agent: Micelle-forming Pyrazinamide Prodrug. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2006**, *339*, 283–290.
- ⁶³ Sobczak, M. Synthesis and characterization of polyester conjugates of ciprofloxacin. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3844–3849.
- ⁶⁴ Sobczak, M.; Nurzyńska, K.; Kolodziejcki, W. Seeking Polymeric Prodrugs of Norfloxacin. Part 2. Synthesis and Structural Analysis of Polyurethane Conjugates. *Molecules* **2010**, *15*, 842–856.

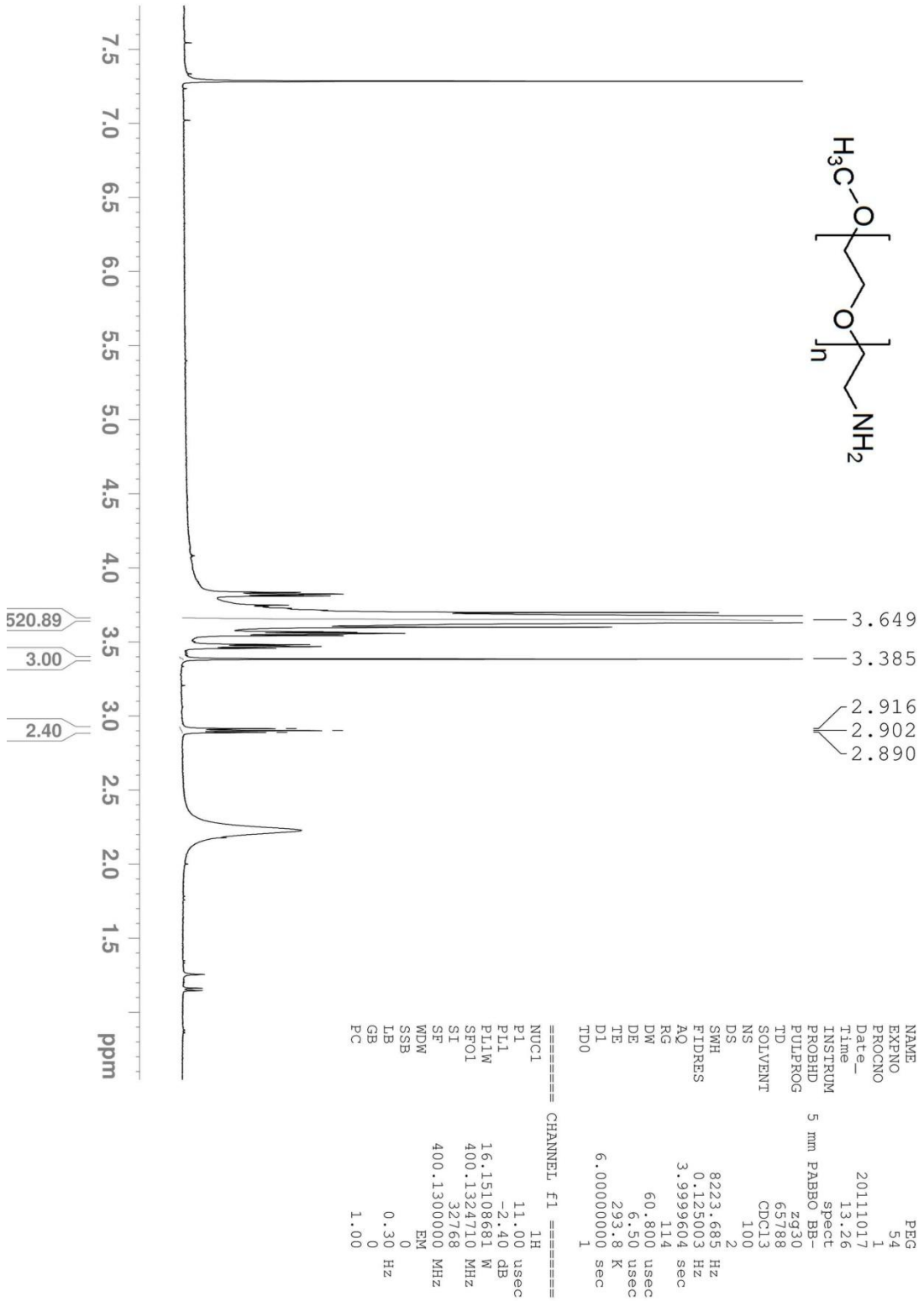
-
- ⁶⁵ Vinsova, J.; Vavrikova, E. Recent Advances in Drugs and Prodrugs Design of Chitosan. *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14*, 1311–1326.
- ⁶⁶ Vavříková, E.; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Horváti, K.; Bösze, S.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Cytotoxicity decreasing effect and antimycobacterial activity of chitosan conjugated with antituberculous drugs. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1901–1907.
- ⁶⁷ Kumar, A.; Patel, G.; Menon, S. K. Fullerene Isoniazid Conjugate – A Tuberculostat with Increased Lipophilicity: Synthesis and Evaluation of Antimycobacterial Activity. *Chemical Biology and Drug Design* **2009**, *73*, 553–557.
- ⁶⁸ Sriram, D.; Yogeewari, P.; Madhu, K. Synthesis and in vitro and in vivo antimycobacterial activity of isonicotinoyl hydrazones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4502–4505.
- ⁶⁹ Sriram, D.; Yogeewari, P.; Reddy, S. P. Synthesis of pyrazinamide Mannich bases and its antitubercular properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2113–2116.
- ⁷⁰ Imramovský, A.; Polanc, S.; Vinšová, J.; Kočevár, M.; Jampílek, J.; Rečková, Z.; Kaustová, J. A new modification of anti-tubercular active molecules. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *15*, 2551–2559.
- ⁷¹ Vavříková, E.; Polanc, S.; Kočevár, M.; Košmrlj, J.; Horváti, K.; Bösze, S.; Stolaříková, J.; Imramovský, A.; Vinšová, J. New series of isoniazid hydrazones linked with electron-withdrawing substituents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5902–5909.
- ⁷² Vavříková, E.; Polanc, S.; Kočevár, M.; Horváti, K.; Szilvia, B.; Stolaříková, J.; Vávrová, K.; Vinšová, J. New fluorine-containing hydrazones active against MDR-tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4937–4945.
- ⁷³ Waisser, K.; Matyk, J.; Divišová, H.; Husáková, P.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Kaustová, J.; Möllmann, U.; Dahse, H.; Miko, M. The Oriented Development of Antituberculous: Salicylanilides. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2006**, *339*, 616–620.
- ⁷⁴ Ferriz, J. M.; Vávrová, K.; Kunc, F.; Imramovský, A.; Stolaříková, J.; Vavříková, E.; Vinšová, J. Salicylanilide carbamates: Antitubercular agents active against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *18*, 1054–1061.
- ⁷⁵ Imramovský, A.; Pesko, M.; Kralova, K.; Vejsova, M.; Stolarikova, J.; Vinsova, J.; Jampílek, J. Investigating Spectrum of Biological Activity of 4- and 5-Chloro-2-hydroxy-N-[2-(arylamino)-1-alkyl-2-oxoethyl]benzamides. *Molecules* **2011**, *16*, 2414–2430.

Přílohy

Příloha I

α -methoxy- ω -amino-poly(ethylenglykol) (2)

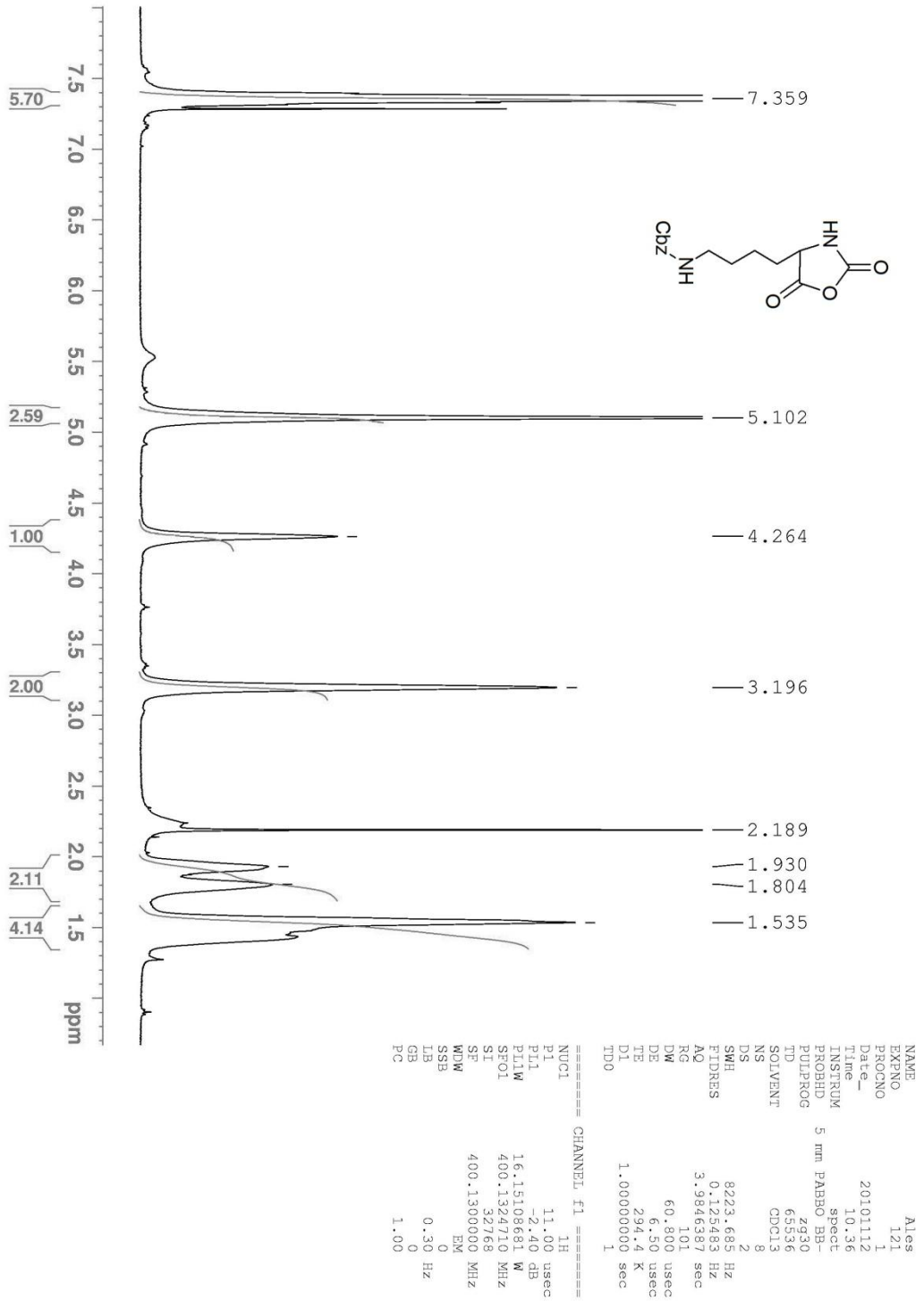
^1H NMR spektrum



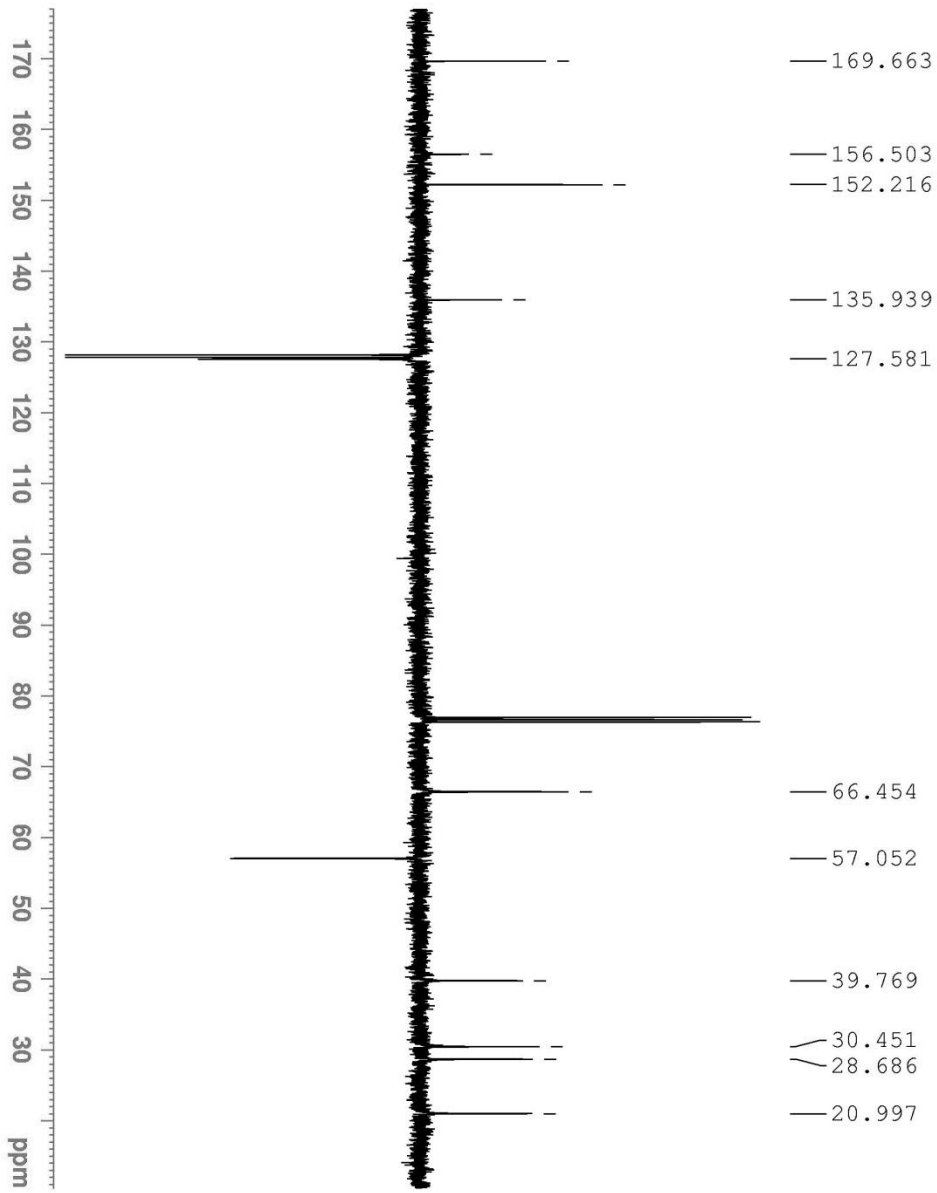
Příloha II

N^ε-benzyloxykarbonyl-L-lysin *N*-karboxyanhydrid (**4**)

¹H NMR spektrum



¹³C NMR spektrum



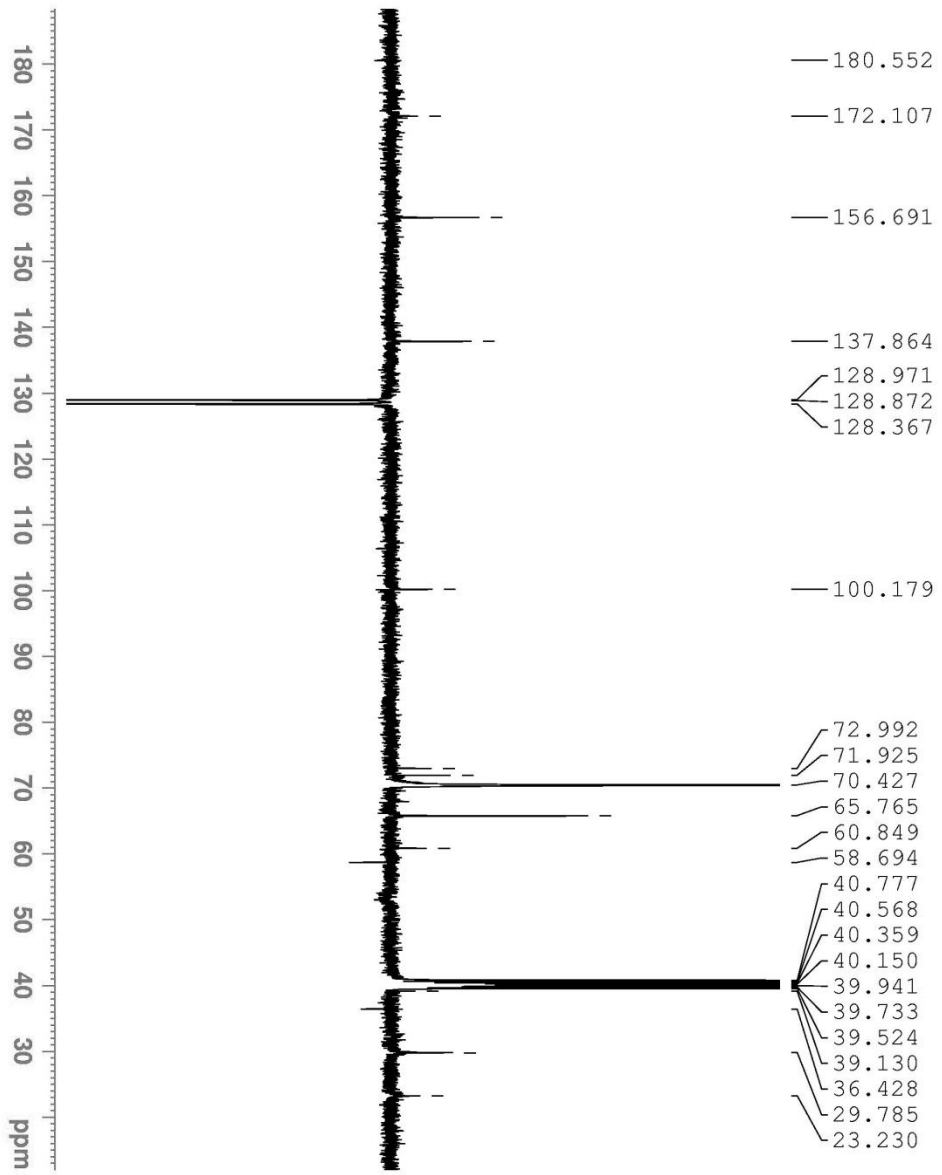
```

NAME Aies
EXPNO 122
PROBHD 5 mm PABBO BB-
Date_ 20101112
Time 10.45
INSTRUM spect
PROBHD BB-
PULPROG _fmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 213
DS 4
SMH 24038.461 Hz
FIDRES 0.366798 Hz
AQ 1.363198 sec
RG 16400
DW 20.800 usec
DE 6.50 usec
TE 295.5 K
CNS1 145.0000000
CNS2 1.0000000
D1 2.0000000 sec
D20 0.00689655 sec
TD0 1

===== CHANNEL F1 =====
NUC1 13C
P1 8.00 usec
P2 16.00 usec
PL1 -3.59 dB
PL1W 63.15280914 W
SFO1 100.62282298 MHz

===== CHANNEL F2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -2.20 dB
PL12 15.03 dB
PL1W 15.42416763 W
SFO2 400.1316005 MHz
SI 32768
SF 100.6128126 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40
    
```


¹³C NMR spektrum



```

NAME          PEG
EXPNO         39
PROCNO        1
Date_         20110523
Time_        16.28
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB-
PULPROG       jmod
TD            65536
SOLVENT       DMSO
NS           14021
DS            4
SWH           24038.461 Hz
FIDRES       0.366798 Hz
AQ           1.3631988 sec
RG           16400
DW           20.800 usec
DE           6.50 usec
TE           294.7 K
CNSST2       145.0000000
CNSST1       1.0000000
D1           2.00000000 sec
D20          0.00689655 sec
TD0          1

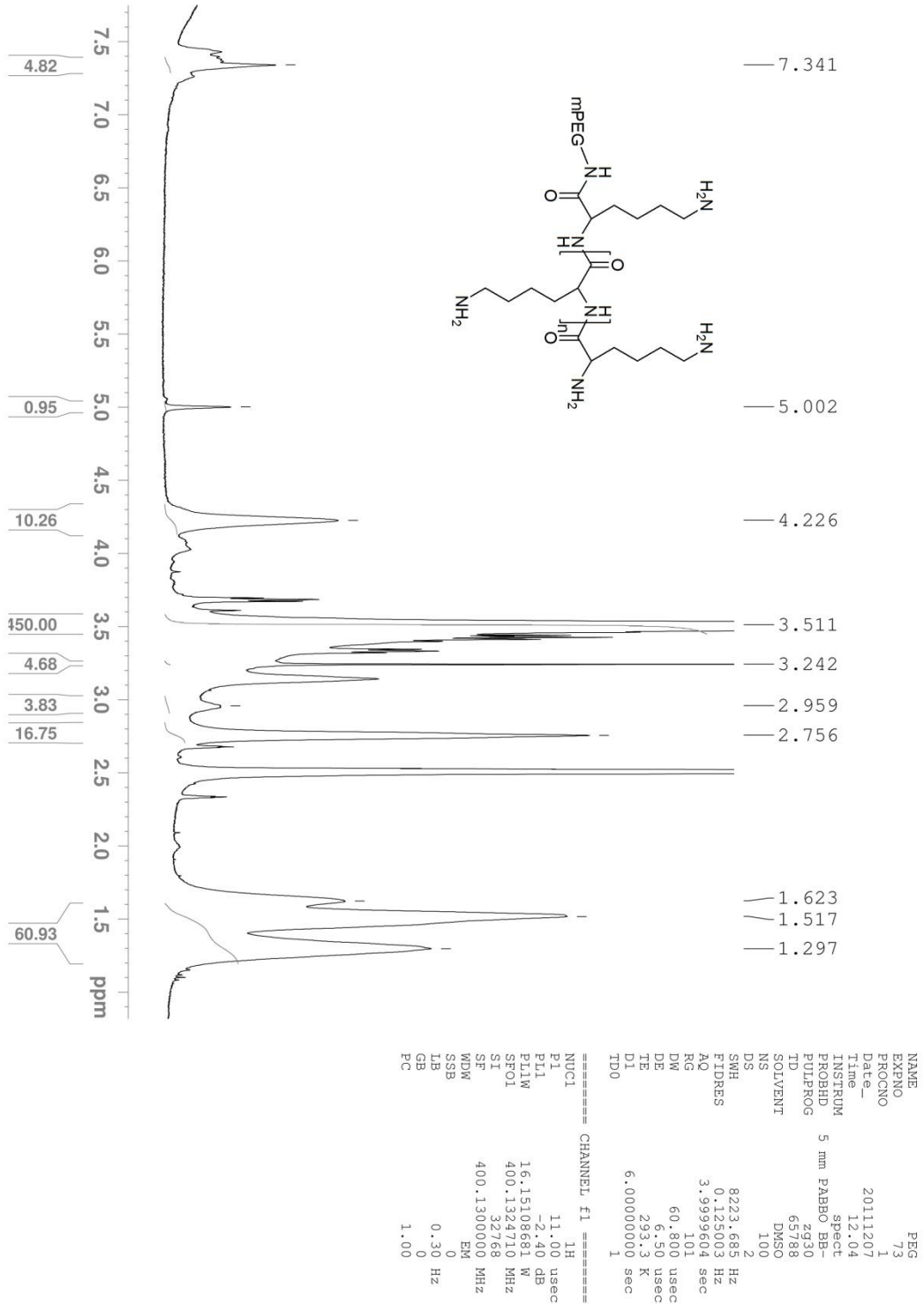
===== CHANNEL f1 =====
NUC1          13C
P1           8.00 usec
P2           16.00 usec
PL1          -3.59 dB
PL12         63.15280914 W
SFO1         100.6228298 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2      waltz16
NUC2          1H
PCPD2        80.00 usec
PT2          -2.20 dB
PL12         15.03 dB
PL12W        15.42416763 W
PL12W        0.29187825 W
SFO2         400.1316005 MHz
SI           32768
SF           100.6127507 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           1.00 Hz
GB           0
PC           1.40
  
```

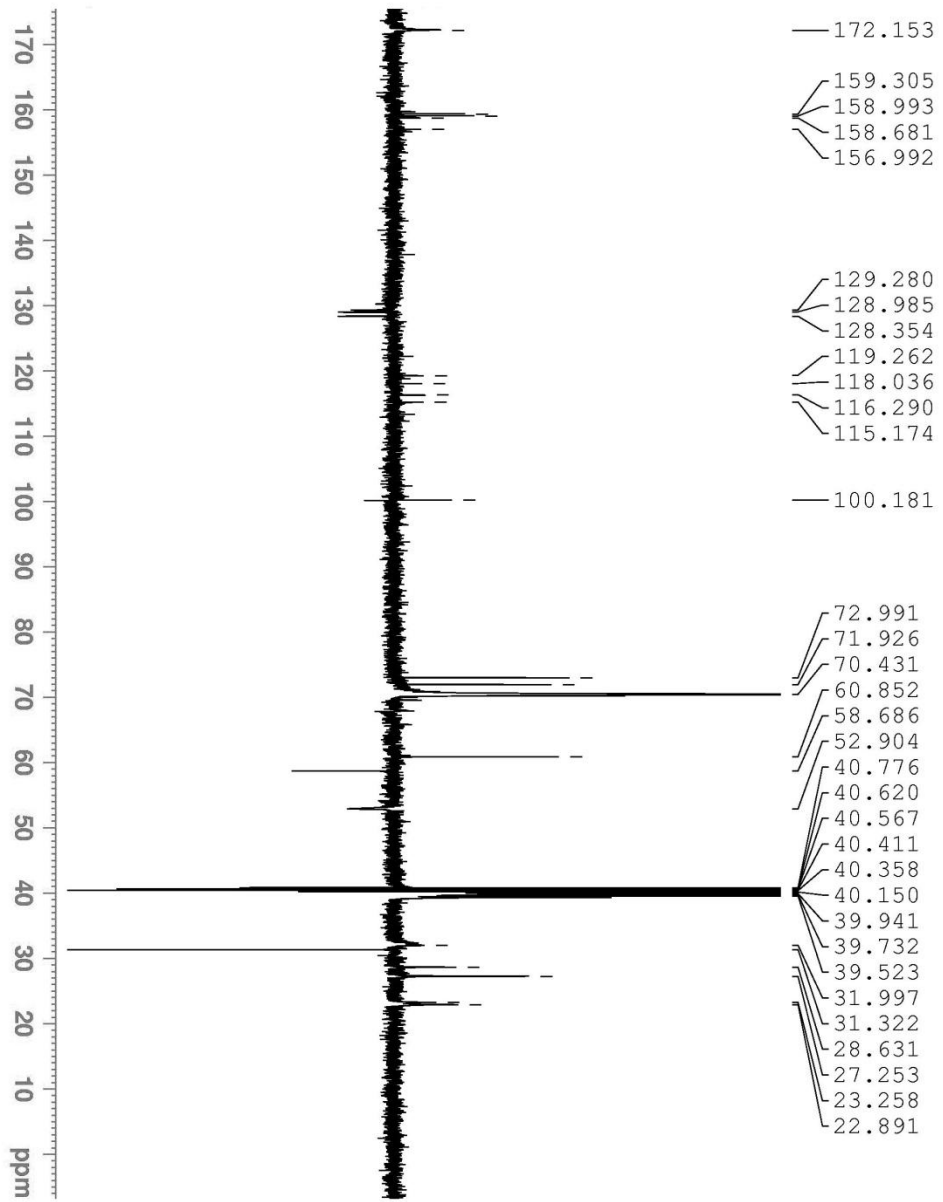
Příloha IV

α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysin) (6)

^1H NMR spektrum



¹³C NMR spektrum



```

NAME          PEG
EXPNO         104
PROCNO        1
Date_         20120321
Time          17.04
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB-
PULPROG       jmod
ID            65336
SOLVENT       DMSO
NS            13506
DS            4
SWH           24038.461 Hz
FIDRES        0.366798 Hz
AQ            1.3631988 sec
RG            16400
DE            20.800 usec
TE            297.3 K
CNST2        145.0000000
CNST11        1.0000000
D1            2.00000000 sec
D20           0.00689655 sec
TD0           1

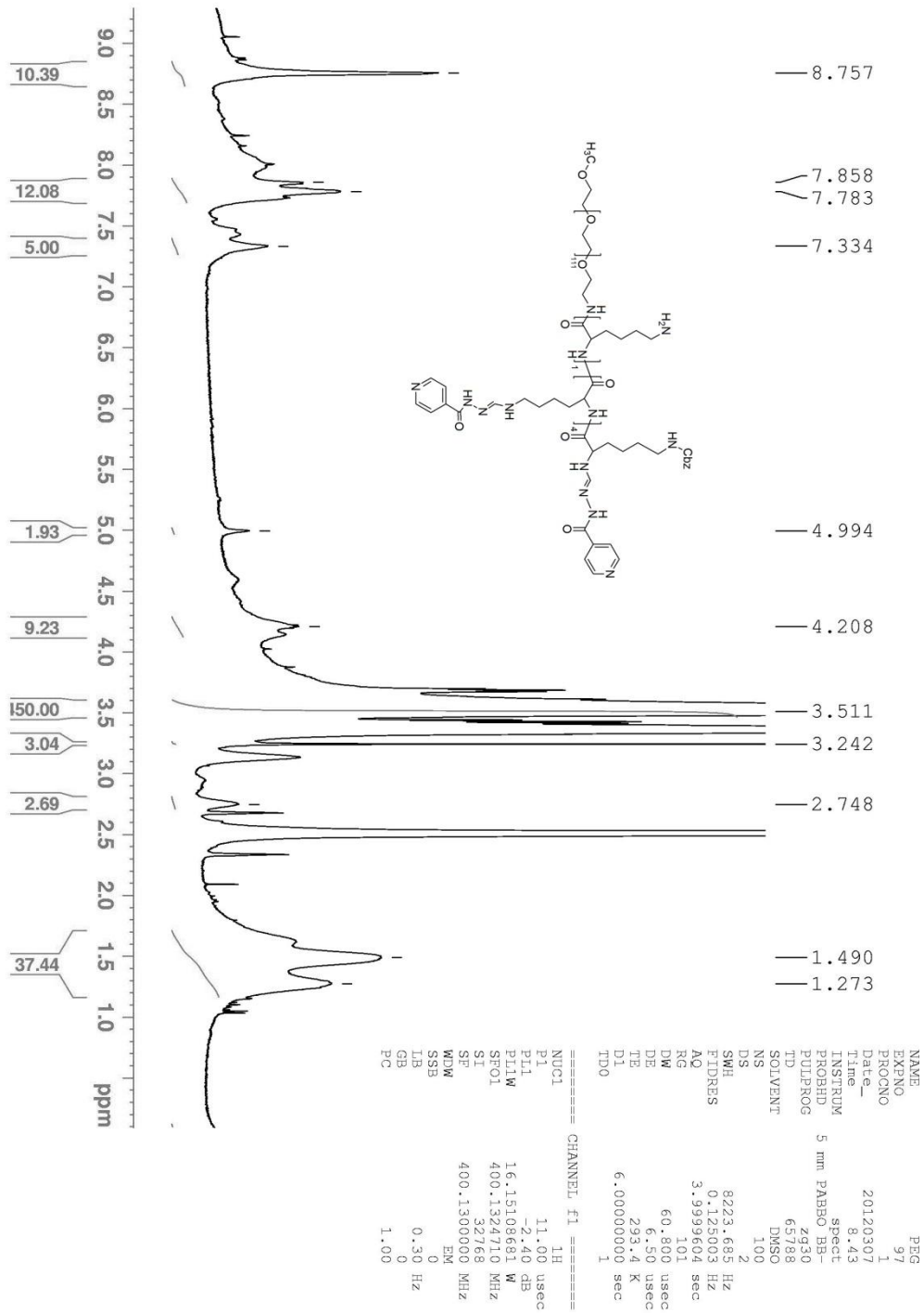
===== CHANNEL F1 =====
NUC1          13C
P1            8.00 usec
P2            16.00 usec
PL1          -3.59 dB
PL1W         63.15280914 W
SFO1         100.6228298 MHz

===== CHANNEL F2 =====
CPDPRG2      waltz16
NUC2          1H
PCPD2        80.00 usec
PL2          -2.20 dB
PL12         15.03 dB
PL1W         15.42416763 W
PL1Z         0.29187823 W
SFO2         400.1316005 MHz
SI           32768
SF           100.6127507 MHz
WDW           EM
SSB           0
GB           1.00 Hz
PC           1.40
  
```

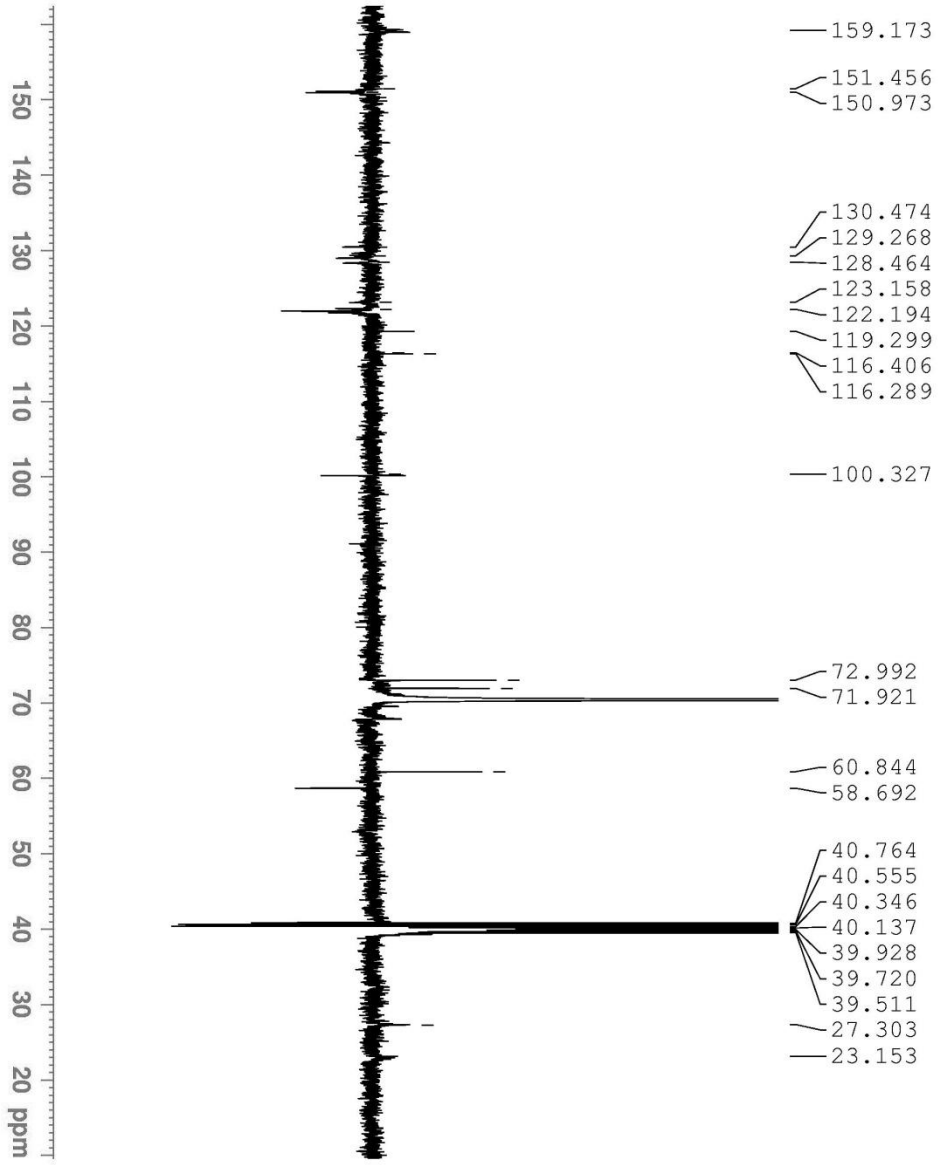
Příloha V

konjugát isoniazidu s α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysin) (**7**)

^1H NMR spektrum



¹³C NMR spektrum



```

NAME          PEG
EXPNO        92
PROCNO       1
Date_        20120119
Time         20.16
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm PABBO BB-
PULPROG      jmod
ID           6S36
SOLVENT      DMSO
NS           10902
DS           4
SWH          24038.461 Hz
FIDRES       0.366798 Hz
AQ           1.3631988 sec
RG           16400
DE           20.800 usec
TE           6.50 usec
CNST2       145.0000000 K
CNST11       1.0000000
D1           2.00000000 sec
D20          0.00689655 sec
TD0          1

===== CHANNEL F1 =====
NUC1         13C
P1           8.00 usec
P2           16.00 usec
PL1         -3.59 dB
PL1W        63.15280914 W
SFO1        100.6228298 MHz

===== CHANNEL F2 =====
CPDPRG2     waltz16
NUC2         1H
PCPD2       80.00 usec
PI2         -2.20 dB
PL12        15.03 dB
PL12W       15.42416763 W
PI12W       0.29187823 W
SFO2        400.1316005 MHz
SI          32768
SF          100.6127507 MHz
WDW         EM
SSB         0
LB          1.00 Hz
GB          0
PC          1.40
    
```