

---

## ZAHRADA

---

### POLYMERNÍ TERAPEUTIKA U NÁS A VE SVĚTĚ

MICHAL PECHAR a KAREL ULBRICH

*Ústav makromolekulární chemie, v. v. i., Akademie věd  
České republiky, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6  
pechar@imc.cas.cz*

Došlo 21.4.08, přijato 2.7.08.

---

**Klíčová slova:** polymerní léčiva, hydrofilní polymery, kancerostatika, cílená doprava léčiv, řízené uvolňování léčiv, genová terapie

---

#### Obsah

1. Úvod
2. Stručný pohled do historie
3. Výhody polymerních terapeutik ve světle dnešních poznatků
4. Příklady polymerních terapeutik, jejich členění a využití
  - 4.1. Kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu
  - 4.2. Deriváty poly(ethylenglykolu)
5. Polymery pro genovou terapii
6. Vyhledky do budoucnosti

#### 1. Úvod

Současná medicína má k dispozici celou řadu léčiv, většinou látek nízkomolekulárních s relativní molekulovou hmotností pod 1000. Jejich vlastnosti zpravidla plně vyhovují požadavkům kladeným na jejich vysokou terapeutickou účinnost. Použití těchto léčiv je v praxi spojeno pouze s menším komfortem při jejich užívání, neboť vyžadují opakované podávání v určitých časových intervalech. U celé řady dalších léčiv je jejich použití spojeno s jistými riziky, projevujícími se v menší či větší míře jejich nežádoucími vedlejšími účinky, které mohou v některých případech vést i k částečnému poškození zdravých orgánů nebo částí organismu (kancerostatika, imunosupresiva). Konečně existují i takové nemoci, proti nimž současná medicína žádná účinná léčiva nemá.

Ve všech těchto případech se otevírají možnosti pro použití makromolekulárních látek, které ve spojení s dosud užívanými léčivy mohou odstranit řadu jejich nevýhodných vlastností, nebo dát léčivům vlastnosti zcela nové.

Na rozhraní makromolekulární chemie, farmakologie, biologie a medicíny se začal rozvíjet nový obor, který se zabývá vývojem systémů a lékových forem, umožňujících řízené uvolňování a cílený transport léčiv (v anglosaské literatuře „controlled drug release“ nebo „targeted drug delivery systems“). Většina těchto systémů je založena na využití makromolekulárních látek, buď přírodních, anebo, a to častěji, na míru připravených syntetických polymerů.

#### 2. Stručný pohled do historie

Již v roce 1906 formuloval všestranně talentovaný německý lékař a nositel Nobelovy ceny za fyziologii Paul Ehrlich svou koncepci ideálního léčiva<sup>1</sup>. Nazývá ho „magickou střelou“, která je specificky směřována pouze do místa požadovaného účinku (např. do nádoru) a zanechává zdravé části organismu zcela bez poškození. Pokud vyjdeme z této základní představy, můžeme formulovat požadavky na ideálně působící léčivo. Takové léčivo musí být zcela neaktivní při podání a v průběhu transportu organismem musí být specificky dopraveno do místa požadovaného účinku a teprve zde musí dojít k jeho aktivaci, která zajistí jeho působení pouze po dobu nezbytnou pro dosažení maximálního účinku. V konečné fázi pak musí být zbytky léčiva či jeho komponenty vyloučeny z organismu. Běžně používaná léčiva jsou tomuto ideálu značně vzdálena, neboť nezůstávají v místě působení po celou potřebnou dobu, rychle se vylučují a navíc podstatná část účinné látky se dostane i do těch částí organismu, kde její přítomnost není žádoucí, nebo je dokonce škodlivá.

Mnoho let po Ehrlichovi, v roce 1975, přišel další německý badatel, chemik Helmut Ringsdorf, s myšlenkou použít pro cílený transport léčiv syntetické polymery<sup>2</sup>. Navrhl obecný model polymerního systému umožňujícího cílený transport a řízené uvolňování léčiv. Tento model se skládal ze syntetického polymeru, na který byly kovalentně vázány molekuly účinné látky prostřednictvím spojky štěpitelné v cílové tkáni. Dále byly k polymernímu nosiči připojeny tzv. solubilizační skupiny (zajišťující dobrou rozpustnost systému ve vodě) a směřující jednotky zodpovědné za účinné cílení do místa požadovaného terapeutického působení.

Na základě této koncepce byly v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR (ÚMCH) v laboratoři biolékařských polymerů (vedené dříve Jindřichem Kopečkem a dnes Karlem Ulbrichem) od konce 70. let připravovány a průběžně zdokonalovány polymerní nosiče léčiv, jejichž struktura vycházela z Ringsdorffovy koncepce. Jeho obecné představy o funkci jednotlivých komponent systému však již byly u těchto nosičů řešeny zcela konkrétně. Páteř polymerního systému byla tvořena velmi dobře rozpustnými kopolymery *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA)<sup>3-10</sup>, takže

odpadla nutnost použití výše zmíněných solubilizačních jednotek.

Volba HPMA jakožto základního monomeru pro syntézu vodorozpuštěných nosičů léčiv nebyla náhodná. Kromě toho, že z tohoto monomeru připravené polymery splňují nutné požadavky na dokonalou snášenlivost organismem, je monomer snadno připravitelný v krystalické podobě, což zásadním způsobem usnadňuje jeho čištění před polymerizací. Stojí za zmínku, že 2-hydroxyethylmethakrylát, monomer pro přípravu jednoho z nejvýznamnějších polymerů používaného v biolékařských aplikacích, navržený a připravený na počátku 60. let Drahoslavem Límem a Otto Wichterlem<sup>11</sup>, a dodnes používaný pro výrobu některých typů hydrogelových kontaktních čoček, je kapalný. V důsledku toho je velmi obtížné zbavit ho příměsí síťujícího ethylendimethakrylátu a získat polymeraci čisté lineární polymer.

Studium kopolymerů HPMA pro různé medicínské aplikace představuje v současné době stále jeden z hlavních směrů výzkumu v naší laboratoři i ve světě. Další významnou skupinou polymerů, kterými se zabýváme, jsou vodorozpuštěné biodegradovatelné deriváty poly(ethylenglykolu)<sup>12–14</sup>. Oba typy polymerů jsou využívány jako nosiče kancerostatik (např. doxorubicinu), pro modifikaci terapeuticky významných proteinů (např. enzymu ribonukleasy či protilátek) a v posledních letech také pro přípravu nových systémů pro přenos genů, tzv. vektorů pro genovou terapii. Příklady konkrétních struktur budou uvedeny v následujícím textu.

### 3. Výhody polymerních terapeutik ve světle dnešních poznatků

Mezi badateli pracujícími v oblasti studia systémů pro řízené uvolňování a cílený transport léčiv panuje v současnosti již poměrně dobrá shoda v odpovědi na otázku, jaké výhody přináší modifikace různých typů farmakosyntetickými polymery<sup>15–17</sup>.

V případě terapeuticky významných proteinů jsou to zejména prodloužená doba cirkulace v krevním řečišti, zvýšení odolnosti vůči proteolýze a výrazně snížená imunogenita. Další, zřejmě nejvýznamnější skupinu léčiv, u nichž kovalentní (ale i nekovalentní) vazba na polymerní nosič může přinést dramatické zlepšení jejich farmakologických vlastností, představují kancerostatika. Bylo mnohokrát potvrzeno, že polymerní konjugáty protinádorových léčiv mají daleko nižší nespecifickou toxicitu, tj. mnohem méně poškozují zdravé části organismu, zejména imunitní systém, srdce, játra a ledviny.

Zvláště v případě použití cytotoxických látek, jakými jsou kancerostatika, je důležité zacílení jejich aktivity přednostně na nádorovou tkáň nebo dokonce na jednotlivé nádorové buňky. Při použití polymerních kancerostatik pro terapii pevných nádorů se velmi výrazně uplatňuje směřování do nádorové tkáně, k němuž dochází díky tzv. EPR

efektu<sup>18,19</sup> (z anglického „Enhanced Permeability and Retention“, zvýšená propustnost a zadrž). Za účelem zásobení rostoucího nádoru kyslíkem a živinami dochází v nádorové tkáni k překotné tvorbě nových cév – angiogenezi. Tato nově vznikající vaskulatura poměrně snadno propouští makromolekuly skrz dosud nedokonale utvořené cévní stěny do okolní nádorové tkáně. Zároveň v nádorech zpravidla chybí lymfatický systém, který by odváděl nahromaděné makromolekulární látky z nádoru pryč. V důsledku EPR efektu tudíž dochází ke zvýšené akumulaci makromolekulárních látek (s dostatečně vysokou relativní molekulovou hmotností) v nádorové tkáni. Tento jev se někdy nazývá pasivní směřování makromolekulárních látek do pevných nádorů a je mnohými autory považován za nejdůležitější příčinu lepších farmakologických vlastností polymerních terapeutik ve srovnání s jejich nízkomolekulárními analogy.

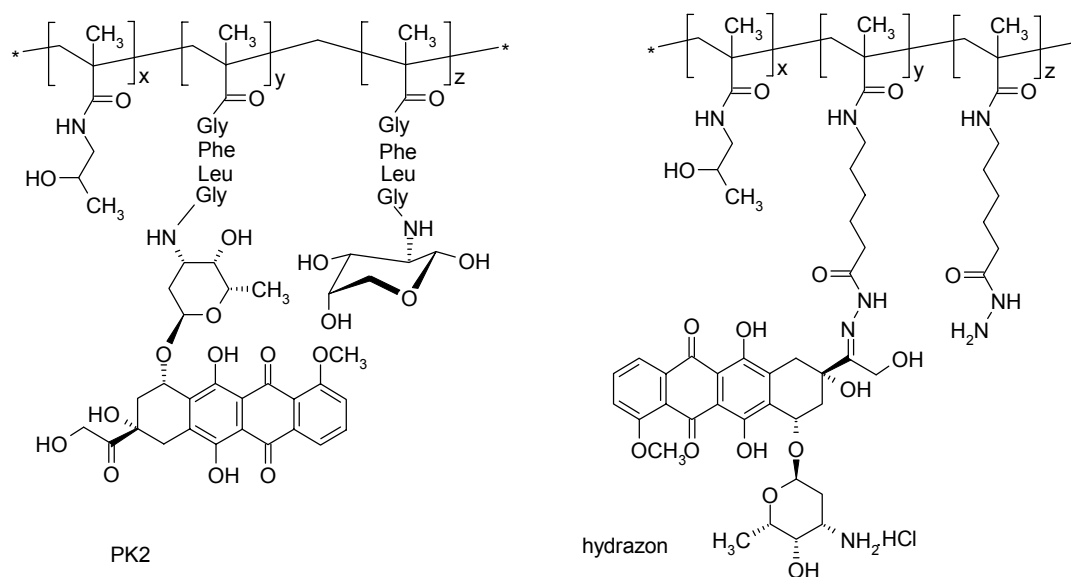
Vhodně zvolená struktura polymerního nosiče však umožňuje i navázání směřující jednotky, schopné více či méně specifické interakce s receptory, které se ve zvýšené míře vyskytují na povrchu cílových buněk, např. nádorových, a k těmto buňkám celé polymerní léčivo zavést. V takovém případě hovoříme o směřování aktivním. Jako směřující jednotky byly popsány a s různými úspěchy použity např. protilátky<sup>10,20</sup> nebo jejich fragmenty<sup>21</sup>, lektiny<sup>22</sup>, růstové faktory<sup>23</sup>, cytokiny<sup>24</sup>, oligopeptidy<sup>25,26</sup>, hormony<sup>27</sup>, cukry<sup>28</sup>, deriváty kyseliny listové<sup>29</sup> aj.

### 4. Příklady polymerních terapeutik, jejich členění a využití

Polymery pro lékařské aplikace lze z hlediska jejich použití rozdělit do mnoha skupin. Jak přírodní, tak syntetické polymery se běžně používají např. jako materiály pro různé tělní náhrady, kontaktní čočky, podložky pro kultivaci a následnou transplantaci buněk, materiály pro šití a krytí ran, součástí lékařské přístrojové techniky a v neposlední řadě i jako pomocné látky (tzv. excipienty) v tradičních lékových formách. V nedávné době se objevily poměrně sofistikované polymerní implantáty pro řízené uvolňování léčiv, např. hormonů či kancerostatik, z polymerní matrice, v níž je účinná látka zachycena nekovalentně.

Další skupinou, vývojově nejmladší, jsou polymerní terapeutika, na něž je zaměřen tento článek. Ta někteří autoři dále rozdělují podle složení na polymerní konjugáty léčiv, polymerní konjugáty proteinů, polymerní micely s kovalentně vázaným léčivem a polymerní komplexy DNA<sup>15</sup>.

Úplný a vyčerpávající přehled všech typů polymerních terapeutik by mnohonásobně přesahoval rámec a smysl tohoto článku. V následujících dvou kapitolách jsou proto podrobněji popsány jen kopolymery *N*-(2-hydroxypropyl)-methakrylamidu (HPMA) a deriváty poly(ethylenglykolu) (PEG), které jsou intenzivně studovány v naší v laboratoři.



Obr. 1. Příklady struktur polymerních konjugátů doxorubicinu vyvinutých v ÚMCH; aktivně směřovaný konjugát s enzymově štěpitelnou vazbou (PK2) a nesměřovaný konjugát s acidolabilní vazbou (Hydrazon)

#### 4.1. Kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu

Dnes již takřka klasickým polymerním léčivem vyvinutým v naší laboratoři je statistický kopolymer *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) s *N*-methakryloylovaným tetrapeptidem Gly-Phe-Leu-Gly (Ma-GFLG) nesoucím tetracyklinové antibiotikum doxorubicin (Dox). Toto polymerní protinádorové léčivo (označované jako polymerní konjugát PK1) bylo původně připraveno radikálovou srážecí kopolymerací HPMA se 4-nitrofenylovým esterem Ma-GFLG a následnou polymeranalogickou reakcí 4-nitrofenylových skupin s primární aminokupinou Dox<sup>30,31</sup>. Tetrapeptidová spojka mezi Dox a polymerním nosičem je během transportu v krevním řečišti stálá, avšak v přítomnosti intracelulárních enzymů, lysosomálních proteas, může v buňce dojít k odštěpení volného Dox<sup>32</sup>. Detailní mechanismus účinku a intracelulární osud PK1 je stále předmětem intenzivního zkoumání<sup>33</sup>. Ve světle nejnovějších studií se zdá pravděpodobné, že intracelulární odštěpení Dox z polymeru nemusí být nutnou podmínkou cytotoxické aktivity PK1<sup>34</sup>.

Vylepšenou verzí tohoto polymerního konjugátu Dox je směřovaný polymerní léčivo PK2, obsahující navíc jako cílicí jednotku 2-aminogalaktosu, která je zodpovědná za akumulaci polymerního konjugátu v játrech díky interakci cukerné jednotky s asialoglykoproteinovými receptory hepatocytů<sup>35,36</sup>.

Oba popsané polymerní konjugáty byly prvními polymerními kancerostatiky na světě, které prošly první (PK2)<sup>37,38</sup> a druhou (PK1)<sup>30,39</sup> fází klinických zkoušek ve Velké Británii.

Dalšího výrazného vylepšení protinádorové aktivity kopolymerů na bázi HPMA a Dox vázaného přes GFLG sekvenci bylo dosaženo kovalentním navázáním směřujících protilátek<sup>40–45</sup>. Bylo totiž zjištěno, že po modifikaci polymerem sice ztrácí protilátky část své vazebné aktivity na antigen (v závislosti na způsobu a rozsahu provedené modifikace), ale zároveň jsou chráněny polymerem vůči proteolytické degradaci, mají sníženou imunogenicitu a svou vysokou molekulovou hmotností (cca 150 000) přispívají k EPR efektu a tím ke zvýšené akumulaci polymerního terapeutika v nádoru. Polymerní konjugáty směřované monoklonálními protilátkami vykazovaly při léčbě myši nesoucích různé typy nádorů vysokou protinádorovou aktivitu a často až stoprocentní úspěšnost léčby. Velký potenciál polymerních konjugátů Dox s protilátkami (Intraglobin, Endobulin) byl ověřen i klinicky u menší skupiny pacientek s generalizovaným nádorem prsu<sup>46,47</sup>.

Kromě Dox byla u nás i v zahraničí použita pro navázání na kopolymery HPMA i další léčiva, z nichž mnohá postoupila až do různých fází klinických zkoušek. Jsou to např. melphalan<sup>48</sup>, cyklosporin<sup>49</sup>, paclitaxel<sup>50</sup>, camptothecin<sup>51,52</sup>, komplexy platiny<sup>53,54</sup> nebo methotrexat<sup>55</sup>.

Navázání léčiva na polymerní nosič přes enzymově štěpitelnou spojku, jako je tomu např. u polymerního konjugátu PK1, není pochopitelně jediný způsob, jak zajistit odštěpení účinné látky z polymeru v nádorových buňkách, případně v jejich bezprostřední blízkosti uvnitř nádorové tkáně. V posledních letech je intenzivně studován kopolymer HPMA s hydrazidem *N*-methakryloyl-6-aminohexanové kyseliny, na který je hydrazonovou vazbou navázán Dox (obr. 1). Hydrazonová vazba mezi léčivem a polymerním nosičem je hydrolyticky poměrně stálá při pH 7,4

(odpovídajícím pH v krevním řečišti), ale v mírně kyselém prostředí endosomů uvnitř buněk (cca pH 5), dochází k rychlé hydrolyze hydrazonové vazby a uvolnění Dox<sup>56–58</sup>.

Výsledky biologického testování kopolymerů s Dox v Mikrobiologickém ústavu AV ČR ukazují, že způsob připojení kancerostatika k polymernímu nosiči má zcela zásadní význam pro cytostatickou aktivitu konjugátů *in vitro* i jejich protinádorovou účinnost na myších nádorových modelech *in vivo*. Polymerní hydrazon má o několik řádů vyšší cytotoxicitu *in vitro* než PK1, je však méně toxický v *in vivo* podmínkách a může být tedy podáván při léčbě nádorů u myši ve vyšších dávkách. Léčba několika typů myších nádorů hydrazonovými polymery vedla k vyléčení všech pokusných zvířat i v případě, kdy bylo léčivo podáno v terapeutickém režimu jen v jedné dávce. Z hlediska možného budoucího klinického použití těchto polymerních léčiv je důležité, že kromě účinku cytotoxického vykazovala i výrazné efekty imunostimulační<sup>59,60</sup>.

Sledování intracelulárního osudu obou typů polymerních konjugátů Dox fluorescenční mikroskopií také naznačuje odlišný mechanismus jejich účinku<sup>34</sup>. Tento mechanismus je v současné době předmětem podrobného zkoumání, neboť jeho detailní poznání může mít zásadní význam při návrhu struktur nových polymerních terapeutik s ještě lepším terapeutickým účinkem.

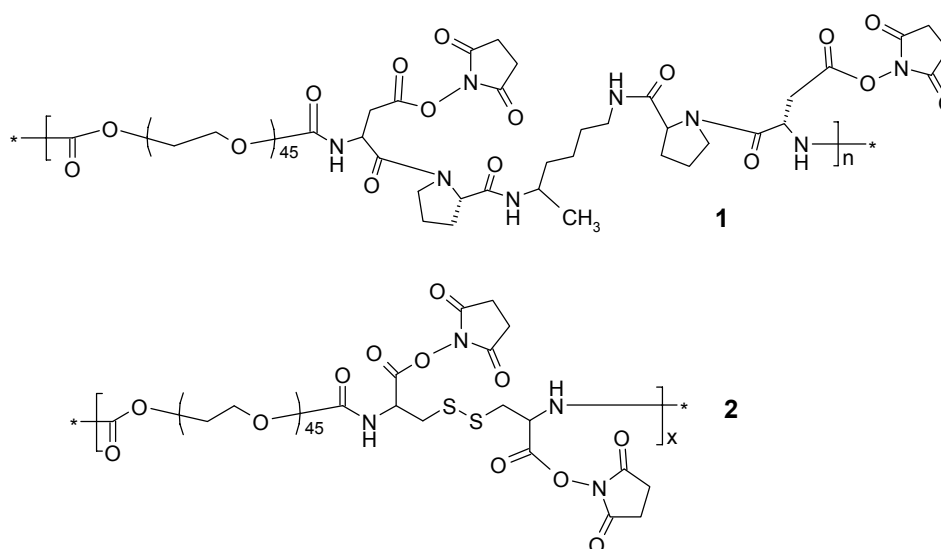
Kromě polymerních konjugátů s Dox lze HPMA kopolymeru využít (podobně jako PEG) i pro modifikaci terapeuticky důležitých proteinů. Příkladem může být např. polymerní konjugát hovězí semenné RNasy s kopolymeru na bázi HPMA, nesoucími reaktivní skupiny na polymerním řetězci. Zatímco nemodifikovaná RNasa vykazovala protinádorovou aktivitu pouze po intratumorální injekci a byla zcela neúčinná po intravenózní aplikaci (i.v.), polymerní konjugát byl účinný i při systémovém

podání i.v.<sup>61–64</sup>. Lze se domnívat, že příčinou účinnosti polymerního proteinového konjugátu i při i.v. aplikaci je zřejmě stabilizace enzymu polymerem vůči proteolýze, prodloužená doba cirkulace v krevním řečišti a snížená imunogenita, jak již bylo uvedeno dříve.

#### 4.2. Deriváty poly(ethylenglykolu)

Pravděpodobně nejrozšířenějším syntetickým polymerem používaným pro přípravu polymerních terapeutik je poly(ethylenglykol) (PEG) a jeho deriváty<sup>65–68</sup>. Specifické biologické vlastnosti PEG jsou hlavním důvodem pro jeho využití v medicíně. Mezi tyto vlastnosti patří biokompatibilita, nízká imunogenita a, není-li molekulová váha polymeru nad prahem renální filtrace, i snadné vylučování z organismu. Nejčastěji je PEG používán pro modifikace různých terapeuticky významných proteinů. Výhodami této modifikace, tzv. PEGylace proteinů (např. enzymů, hormonů, cytokinů), jsou zvýšená odolnost jejich produktů vůči proteolýze, snížení imunogenicity (neboli imunitní reakce organismu), prodloužení doby cirkulace a tím snížení četnosti dávek oproti nemodifikované bílkovině. Například konjugáty PEG s adenosindeaminasou<sup>69</sup>, aspariginasou<sup>70</sup> či s interferonem alfa<sup>71</sup> se staly již prvními kliniky schválenými a komerčně dostupnými polymerními terapeutiky. Další „PEGylované“ proteiny jsou v různých stádiích klinických zkoušek<sup>15,72</sup> a na trh bylo uvedeno i kancerostatikum na bázi PEGylovaného liposomu (DOXIL)<sup>73</sup>.

Skutečnost, že molekula PEG obsahuje maximálně dvě koncové OH skupiny vhodné pro další derivatizaci, je sice výhodou při modifikaci proteinů, ale při přípravě polymerních konjugátů např. nízkomolekulárního kancerostatika je vhodnější navázat na polymerní nosič více mole-



Obr. 2. Reaktivní blokové polymery na bázi PEG vyvinuté v ÚMCH jako polymery vhodné pro navázání léčiva, modifikaci proteinů nebo povrchu vektorů pro dopravu DNA; enzymolyticky degradovatelný polymer 1 a redukčně štěpitelný polymer 2

kul léčiva. Rovněž je výhodné, když je molekulová hmotnost nosiče dostatečně vysoká, takže se může uplatnit EPR efekt a zvýšená akumulace léčiva v pevných nádorech. Proto byly navrženy a připraveny různé multiblokové polymery skládající se z bloků PEG vzájemně propojených enzymově či hydrolyticky štěpitelnými bifunkčními spojkami, nesoucími alespoň jednu volnou funkční skupinu, umožňující kovalentní navázání biologicky aktivních molekul do postranního řetězce. Při konstrukci biodegradovatelné spojky (štěpitelné *in vivo*) možná propojení jednotlivých bloků PEG byly použity např. deriváty kyseliny glutamové, asparagové nebo cysteinu (obr. 2). Mechanismus jejich degradace byl v prvním případě enzymová hydrolýza<sup>12,13</sup>, ve druhém případě redukce disulfidových vazeb mezi cysteinovými zbytky kombinovaná s chemickou hydrolýzou<sup>74</sup>.

Zavedení štěpitelné spojky do struktury vysokomolekulárního multiblokového nosiče umožní pasivní směřování do pevných nádorů a zároveň zajistí hladké odstranění nízemolekulárních degradačních produktů močí. Připojení Dox jako účinné látky k těmto multiblokovým PEG polymerům bylo provedeno podobně jako u HPMA konjugátů, buď amidickou vazbou prostřednictvím enzymově odbouratelné peptidové GFLG sekvence<sup>12,13</sup> nebo acidolabilní hydrazonovou vazbou<sup>14,75</sup>.

Oba zmíněné typy polymerních konjugátů vykazovaly při testování *in vivo* na myších srovnatelnou nebo vyšší protinádorovou aktivitu než analogické konjugáty na bázi HPMA.

## 5. Polymery pro genovou terapii

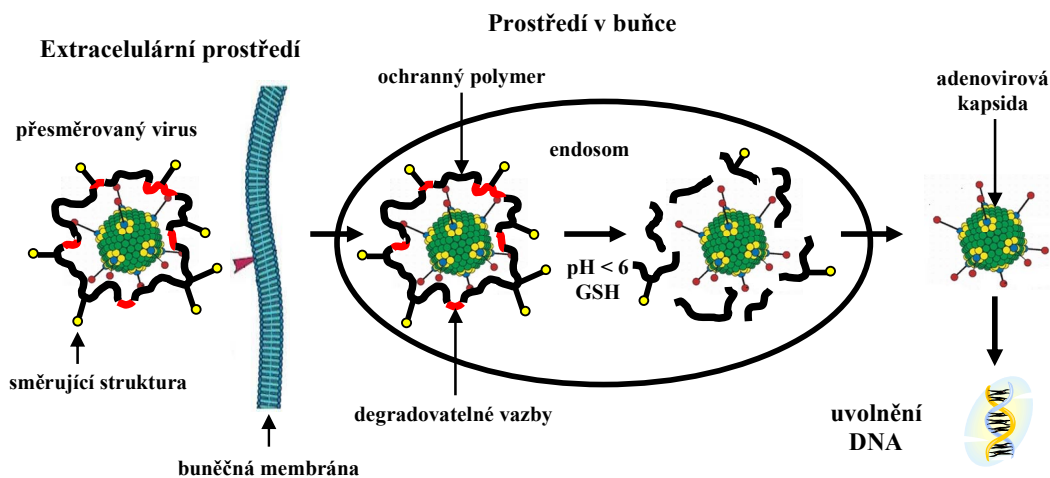
Jako poslední velmi významnou skupinu polymerních terapeutik, též studovanou v ÚMCH, uvádíme polymerní vektory pro genovou terapii. Vektorem pro genovou terapii se zde rozumí jakýkoliv transportní systém pro dopravu genetické informace (DNA, RNA) do cílové buňky. Vektory se podle svého původu rozdělují na syntetické a virové. Obě skupiny pak lze dělit do mnoha dalších podskupin, jejichž detailní popis by dalekosáhle překročil rozsah tohoto článku. Při přípravě jak syntetických, tak virových vektorů pro *in vivo* aplikace nalézají syntetické hydrofilní polymery, např. deriváty HPMA či PEG, nezastupitelné uplatnění.

Syntetické vektory mohou být přímo založeny na polymerech schopných vhodné interakce s nukleovou kyselinou. Typickým příkladem jsou polyelektrolytové komplexy (PEK) DNA a polykationtu<sup>76–78</sup>. Polyaniontový řetězec nukleové kyseliny a polykationtový polymer, např. poly(L-lysin) nebo poly(ethylenimin), vytvoří díky mnohačetným elektrostatickým interakcím poměrně pevný a dostatečně malý komplex, ve kterém je DNA chráněna zejména během intracelulárního transportu do jádra cílové buňky. Samotné PEK vykazují sice jistou účinnost transgenní exprese *in vitro*, avšak jsou prakticky neúčinné *in vivo*<sup>79</sup>. Důvodem je mimo jiné nadbytek kladného náboje na povrchu PEK (nutný pro zachování rozpustnosti

komplexu), který vede k nežádoucím interakcím se složkami krve a rychlému odstranění PEK z oběhu. Doba cirkulace PEK je tudíž příliš krátká na to, aby mohlo dojít k průniku vektoru do cílových buněk (např. nádorových). Výrazného zlepšení farmakokinetiky lze docílit po kovalentní modifikaci povrchu PEK hydrofilním polymerem<sup>80,81</sup>, podobným jako byl výše popsán pro reakci s RNAsou. Pro reakci s polymerem jsou využity ty primární aminoskupiny poly(L-lysinu) či poly(ethyleniminu), které nejsou vázány interakcí s fosfátovými skupinami DNA. Polymerem modifikovaný PEK je alespoň zčásti odstíněn od nežádoucích interakcí během transportu v krvi. Podobného efektu bylo docíleno i po modifikaci PEK multiblokovým polymerem na bázi PEG, který byl již dříve studován jako nosič Dox. Takto modifikovaný polymer byl navíc směřován kyselinou listovou k buňkám nesoucím folátové receptory<sup>79</sup>.

Ačkoliv jsou syntetické vektory v některých ohledech výhodnější než vektory virové (přijatelnější pro klinické schválení, méně imunogenní), vykazují doposud výrazně nižší účinnost přenosu genů než virové nosiče. Právě vysoká míra transgenní exprese (měřená zpravidla jako exprese genu nějakého vhodného fluorescenčního proteinu) je důvodem, proč mnoho badatelů dává přednost virovým vektorům. Bohužel, tato exprese není příliš specifická, neboť viry pronikají i do jiných než vybraných cílových buněk. To nastoluje opět otázku vhodného směřování. Navíc, podobně jako u PEK, doba cirkulace nemodifikovaných virů *in vivo* je příliš krátká, aby bylo možné dosáhnout dostatečně vysoké exprese bez nutnosti obrovského zvyšování dávky, aby alespoň část vektoru pronikla do cílových buněk. Vysoká dávka nemodifikovaného viru je podobně jako u proteinů spojena se silnou imunitní reakcí organismu.

Při řešení výše uvedených problémů hrají opět významnou roli reaktivní syntetické hydrofilní polymery. Ve spolupráci s kolegy na univerzitě v Oxfordu jsme zjistili, že modifikace povrchu viru multivalentním kopolymerem na bázi HPMA vede k výraznému prodloužení doby cirkulace (díky odstínění nežádoucích interakcí se složkami krve), ke snížení imunogenicity, ale i k dramatickému snížení infekivity viru, t.j. jeho schopnosti pronikat do buněk. Aby byla infekivita polymerem modifikovaného viru obnovena, je možné na modifikující polymer zavést směřující ligandy, které se specificky vážou k cílovým buňkám<sup>82–84</sup>. Při směřování HPMA polymerem modifikovaného adenoviru pomocí epidermálního růstového faktoru (EGF) v EGF pozitivních buňkách *in vitro* bylo dosaženo úrovně transgenní exprese srovnatelné nebo i vyšší než byla exprese dosažená s nemodifikovaným adenovirem<sup>85</sup>. Oproti tomu, v kontrolních buňkách, EGF negativních, byla tato exprese o několik řádů nižší než s nemodifikovaným virem. Jiná skupina dosáhla velmi podobného výsledku použitím PEGylovaného adenoviru, též směřovaného pomocí EGF<sup>86</sup>. Naše poslední práce<sup>87–89</sup>, zabývající se pasivním i aktivním směřováním polymerem povrchově upravených adenovirů pomocí transferinu, FGF a vybraných oligopeptidů, ukazují na značnou perspektivu



Obr. 3. **Osud polymerem modifikovaného viru v cílové buňce;** díky směřujícím strukturám se polymerem modifikovaný (chráněný) virus dostává k cílové buňce, proniká do ní endocytózou a zde pak vlivem změny pH nebo reduktivního prostředí dochází k odštěpení ochranné polymerní vrstvy a uvolnění dopravované DNA nebo specifického plasmidu

takovýchto virálních vektorů (obr. 3).

Hlavní výhodou genové terapie ve srovnání např. s chemoterapií je skutečnost, že ke zničení nádorové buňky stačí pouze jediná kopie vhodně zvoleného genu vneseného do genomu cílové buňky. Aby tato výhoda mohla být plně využita, je třeba překonat výše zmíněné potíže s transportem DNA v organismu jak na systémové (v krevním oběhu a při extravazaci), tak i na intracelulární úrovni.

Výzkum genové terapie (nejen pro onkologická onemocnění) představuje směr, kterým se ubírá stále více badatelů z oborů na pomezí medicíny, biologie a chemie. Na základě dosud dosažených výsledků se zdá, že úspěšné zvládnutí genové terapie je reálné a navzdory některým počátečním neúspěchům virových vektorů v klinických zkouškách se tato metoda stane v dohledné době běžnou součástí lékařské praxe.

## 6. Vyhledky do budoucnosti

Oblast výzkumu a vývoje nových polymerních terapeutik v posledních dvaceti letech roste exponenciálně, alespoň měřeno počtem prací v odborných časopisech. Schválení ke klinickému použití se dočkalo několik PEGylovaných proteinů a zatím jediný polymerní konjugát s protinádorovým léčivem, kopolymer styrenu a maleinové kyseliny nesoucí kancerostatikum neocarzinostatin (SMANCS)<sup>90</sup>. Počet polymerních konjugátů kancerostatik, které se dostávají do různých fází klinického testování, velmi rychle roste.

Od zahájení prvních klinických zkoušek polymerních kancerostatik uběhla poměrně dlouhá doba, aniž by tyto zkoušky vyústily ve schválení nového léčiva. V současné době bylo zveřejněno zahájení klinického zkoušení již minimálně 12 typů polymerních konjugátů kancerostatik.

Tak jako vždy při zavádění zcela nových principů a postupů do praxe se i zde projevuje jistá nezkušenost jak farmaceutických firem, tak i schvalujících institucí. Testování polymerních léčiv vyžaduje nejen nové výrobní postupy a způsoby charakterizace produktů, ale i nové metody jejich hodnocení. Bohužel, v řadě případů má na dlouhou dobu klinického testování negativní vliv také politika těchto firem, které se zdráhají investovat do velmi nákladného vývoje nových léčiv s nejistým výsledkem, mají-li monopolní postavení v příslušné oblasti, např. ve výrobě určitého typu klasických protinádorových léčiv.

Spolupráce několika vědních disciplín, zejména makromolekulární chemie, molekulární biologie a medicíny, vedla v poslední době k návrhu poměrně sofistikovaných struktur, jako jsou např. polymerem modifikované směrované virové vektory pro přenos genů, nebo protilátkami směrovaná polymerní léčiva. Na základě stále se zrychlujícího vývoje v této oblasti je možné předpokládat, že během několika let bude vývoj polymerních léčiv nejen předmětem základního výzkumu, ale i součástí klinického vývoje a snad i použití v klinické praxi. Je potěšitelné, že se Česká republika na tomto vývoji podílí významnou měrou.

*Práce vznikla za podpory grantů Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy (IM4635608802), Evropské unie (LSHB-CT-2004-512087) a Akademie věd ČR (KAN 200200651).*

## LITERATURA

1. Ehrlich P.: *Studies in Immunity*. Wiley, New York 1906.
2. Ringsdorf H.: *J. Polym. Sci., Part C: Polym. Symp.* 1975, 135.
3. Kopeček J., Bažilová H.: *Eur. Polym. J.* 9, 7 (1973).

4. Kopeček J.: *Polym. Med.* 7, 191 (1977).
5. Kopeček J., v knize: *Synthesis of Tailor-Made Soluble Polymeric Drug Carriers* (Anderson J. M., Kim S. W., ed.), str. 41. Plenum Press, New York 1984.
6. Kopeček J., Rejmanová P., Duncan R., Lloyd J. B.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446, 93 (1985).
7. Kopeček J., Duncan R.: *J. Controlled Release* 6, 315 (1987).
8. Ulbrich K.: *J. Bioactiv. Compat. Polym.* 6, 348 (1991).
9. Ulbrich K., Šubr V., Pechar M., Strohalm J., Jelínková M., Říhová B.: *Macromol. Symp.* 152, 151 (2000).
10. Ulbrich K., Etrych T., Chytil P., Jelínková M., Říhová B.: *J. Drug Targeting* 12, 477 (2004).
11. Wichterle O., Lím D.: *Nature* 185, 117 (1960).
12. Pechar M., Ulbrich K., Šubr V., Seymour L. W., Schacht E. H.: *Bioconjugate Chem.* 11, 131 (2000).
13. Pechar M., Ulbrich K., Jelínková M., Říhová B.: *Macromol. Biosci.* 3, 364 (2003).
14. Pechar M., Braunová A., Ulbrich K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 70, 327 (2005).
15. Greco F., Vicent M. J.: *Front. Biosci.* 13, 2744 (2008).
16. Pasut G., Veronese F. M.: *Prog. Polym. Sci.* 32, 933 (2007).
17. Duncan R., Ringsdorf H., Satchi-Fainaro R.: *Adv. Polym. Sci.* 192, 1 (2006).
18. Maeda H., Matsumura Y.: *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6, 193 (1989).
19. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K.: *J. Controlled Release* 65, 271 (2000).
20. Kovář M., Strohalm J., Etrych T., Ulbrich K., Říhová B.: *Bioconjugate Chem.* 13, 206 (2002).
21. Lu Z. R., Shiah J. G., Kopečková P., Kopeček J.: *Stp Pharma Sci.* 13, 69 (2003).
22. Říhová B., Jelínková M., Strohalm J., Šťastný M., Hovorka O., Plocová D., Kovář M., Dráberová L., Ulbrich K.: *Bioconjugate Chem.* 11, 664 (2000).
23. Morrison J., Briggs S. S., Green N., Fisher K., Šubr V., Ulbrich K., Kehoe S., Seymour L. W.: *Mol. Ther.* 16, 244 (2008).
24. Clark J. I., Mehrabi J., Sosman J. A., Logan T. F., Margolin K. A., Dutcher J. P., Urba W. J., Ernstoff M. S., McDermott D. F., Lau A. M., Atkins M. B.: *J. Immunother.* 30, 839 (2007).
25. Mitra A., Coleman T., Borgman M., Nan A., Ghandehari H., Line B. R.: *J. Controlled Release* 114, 175 (2006).
26. Pola R., Pechar M., Ulbrich K., Fabra A.: *J. Bioactiv. Compat. Polym.* 22, 602 (2007).
27. O'Hare K. B., Duncan R., Strohalm J., Ulbrich K., Kopečková P.: *J. Drug Targeting* 1, 217 (1993).
28. David A., Kopečková P., Minko T., Rubinstein A., Kopeček J.: *Eur. J. Cancer* 40, 148 (2004).
29. Ward C. M., Pechar M., Oupický D., Ulbrich K.: *J. Gene Med.* 4, 536 (2002).
30. Vasey P. A., Duncan R., Kaye S. B., Cassidy J.: *Eur. J. Cancer* 31A, 929 (1995).
31. Duncan R., Hume I. C., Kopečková P., Ulbrich K., Strohalm J., Kopeček J.: *J. Controlled Release* 10, 51 (1989).
32. Šubr V., Strohalm J., Ulbrich K., Duncan R., Hume I. C.: *J. Controlled Release* 18, 123 (1992).
33. Malugin A., Kopečková P., Kopeček J.: *J. Controlled Release* 124, 6 (2007).
34. Hovorka O., Etrych T., Šubr V., Strohalm J., Ulbrich K., Říhová B.: *J. Drug Targeting* 14, 391 (2006).
35. Duncan R., Kopeček J., Rejmanová P., Lloyd J. B.: *Biochim. Biophys. Acta* 755, 518 (1983).
36. Seymour L. W., Ulbrich K., Wedge S. R., Hume I. C., Strohalm J., Duncan R.: *Br. J. Cancer* 63, 859 (1991).
37. Ferry D. R., Seymour L. W., Anderson D., Hesselwood S., Julyan P., Boivin C., Poyner R., Guest P., Doran J., Kerr D. J.: *Br. J. Cancer* 80, 21 (1999).
38. Seymour L. W., Ferry D. R., Anderson D., Hesselwood S., Julyan P. J., Poyner R., Doran J., Young A. M., Burtles S., Kerr D. J.: *J. Clin. Oncol.* 20, 1668 (2002).
39. Vasey P. A., Kaye S. B., Morrison R., Twelves C., Wilson P., Duncan R., Thomson A. H., Murray L. S., Hilditch T. E., Murray T., Burtles S., Fraier D., Frigerio E., Cassidy J.: *Clin. Cancer Res.* 5, 83 (1999).
40. Říhová B., Kopeček J.: *J. Controlled Release* 2, 289 (1985).
41. Flanagan P. A., Říhová B., Šubr V., Ulbrich K., Duncan R.: *Br. J. Cancer* 60, 485 (1989).
42. Seymour L. W., Flanagan P. A., Alshamkhani A., Šubr V., Ulbrich K., Cassidy J., Duncan R.: *Select. Cancer Ther.* 7, 59 (1991).
43. Ulbrich K., Strohalm J., Šubr V., Plocová D., Duncan R., Říhová B.: *Macromol. Symp.* 103, 177 (1996).
44. Ulbrich K., Šubr V., Strohalm J., Plocová D., Jelínková M., Říhová B.: *J. Controlled Release* 64, 63 (2000).
45. Kovář M., Mrkvan T., Strohalm J., Etrych T., Ulbrich K., Šťastný M., Říhová B.: *J. Controlled Release* 92, 315 (2003).
46. Říhová B., Strohalm J., Prausová J., Kubáčková K., Jelínková M., Rozprimová L., Šírová M., Plocová D., Etrych T., Šubr V., Mrkvan T., Kovář M., Ulbrich K.: *J. Controlled Release* 91, 1 (2003).
47. Říhová B., Strohalm J., Kovář M., Mrkvan T., Šubr V., Hovorka O., Šírová M., Rozprimová L., Kubáčková K., Ulbrich K.: *Scand. J. Immunol.* 62, 100 (2005).
48. Duncan R., Hume I. C., Yardley H. J., Flanagan P. A., Ulbrich K., Šubr V., Strohalm J.: *J. Controlled Release* 16, 121 (1991).
49. Šťastný M., Ulbrich K., Strohalm J., Rossmann P., Říhová B.: *Transplantation* 63, 1818 (1997).
50. Terwogt J. M. M., Huinink W. W. T., Schellens J. H. M., Schot M., Mandjes I. A. M., Zurlo M. G., Rocchetti M., Rosing H., Koopman F. J., Beijnen J. H.: *Anti-Cancer Drugs* 12, 315 (2001).
51. Caiolfà V. R., Zamai M., Fiorino A., Frigerio E., Pellizzoni C., d'Argy R., Ghiglieri A., Castelli M. G., Farao M., Pesenti E., Gigli M., Angelucci F., Suarato A.: *J. Controlled Release* 65, 105 (2000).
52. Wachtors F. M., Groen H. J. M., Maring J. G., Gietsma J. A., Porro M., Dumez H., de Vries E. G. E., van

- Oosterom A. T.: *Br. J. Cancer* 90, 2261 (2004).
53. Gianasi E., Buckley R. G., Latigo J., Wasil M., Duncan R.: *J. Drug Targeting* 10, 549 (2002).
  54. Rademaker-Lakhai J. M., Terret C., Howell S. B., Baud C. M., de Boer R. F., Pluim D., Beijnen J. H., Schellens J. H. M., Droz J. P.: *Clin. Cancer Res.* 10, 3386 (2004).
  55. Šubr V., Strohalm J., Hirano T., Ito Y., Ulbrich K.: *J. Controlled Release* 49, 123 (1997).
  56. Etrych T., Jelínková M., Říhová B., Ulbrich K.: *J. Controlled Release* 73, 89 (2001).
  57. Etrych T., Chytil P., Jelínková M., Říhová B., Ulbrich K.: *Macromol. Biosci.* 2, 43 (2002).
  58. Etrych T., Mrkvan T., Říhová B., Ulbrich K.: *J. Controlled Release* 122, 31 (2007).
  59. Mrkvan T., Šírová M., Etrych T., Chytil P., Strohalm J., Plocová D., Ulbrich K., Říhová B.: *J. Controlled Release* 110, 119 (2005).
  60. Šírová M., Strohalm J., Šubr V., Plocová D., Mrkvan T., Ulbrich K., Říhová B.: *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 35 (2007).
  61. Poučková P., Zadinová M., Hloušková D., Strohalm J., Plocová D., Špunda M., Olejár T., Zitko M., Matoušek J., Ulbrich K., Souček J.: *J. Controlled Release* 95, 83 (2004).
  62. Souček J., Poučková P., Zadinová M., Hloušková D., Plocová D., Strohalm J., Hrkal Z., Olejár T., Ulbrich K.: *Neoplasma* 48, 127 (2001).
  63. Souček J., Poučková P., Strohalm J., Plocová D., Hloušková D., Zadinová M., Ulbrich K.: *J. Drug Targeting* 10, 175 (2002).
  64. Ulbrich K., Strohalm J., Plocová D., Oupický D., Šubr V., Souček J., Poučková P., Matoušek J.: *J. Bioactiv. Compat. Polym.* 15, 4 (2000).
  65. Gaberc-Porekar V., Zore I., Podobnik B., Menart V.: *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* 11, 242 (2008).
  66. Pasut G., Veronese F. M.: *Prog. Polym. Sci.* 32, 933 (2007).
  67. Pasut G., Veronese F. M.: *Adv. Polym. Sci.* 192, 95 (2006).
  68. Greenwald R. B.: *J. Controlled Release* 74, 159 (2001).
  69. Davis F. F.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 519, 51 (2003).
  70. Fu C. H., Sakamoto K. M.: *Expert Opin. Pharmacother.* 8, 1977 (2007).
  71. Akimov S., Adeyemi O. M.: *Future Virol.* 1, 689 (2006).
  72. Kratz F., Abu Ajaj K., Warnecke A.: *Expert Opin. Invest. Drugs* 16, 1037 (2007).
  73. Gabizon A., Goren D., Horowitz A. T., Tzemach D., Lossos A., Siegal T.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 24, 337 (1997).
  74. Braunová A., Pechar M., Laga R., Ulbrich K.: *Macromol. Chem. Phys.* 208, 2642 (2007).
  75. Pechar M., Braunová A., Ulbrich K., Jelínková M., Říhová B.: *J. Bioactiv. Compat. Polym.* 20, 319 (2005).
  76. Wong S. Y., Pelet J. M., Putnam D.: *Prog. Polym. Sci.* 32, 799 (2007).
  77. Park T. G., Jeong J. H., Kim S. W.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 58, 467 (2006).
  78. Eliyahu H., Barenholz Y., Domb A. J.: *Molecules* 10, 34 (2005).
  79. Read M. L., Logan A., Seymour L. W.: *Adv. Genet.* 53, 19 (2005).
  80. Carlisle R. C., Etrych T., Briggs S. S., Preece J. A., Ulbrich K., Seymour L. W.: *J. Gene Med.* 6, 337 (2004).
  81. Merdan T., Kunath K., Petersen H., Bakowsky U., Voigt K. H., Kopeček J., Kissel T.: *Bioconjugate Chem.* 16, 785 (2005).
  82. Fisher K. D., Stallwood Y., Green N. K., Ulbrich K., Mautner V., Seymour L. W.: *Gene Ther.* 8, 341 (2001).
  83. Seymour L. W.: *Toxicology* 194, 213 (2004).
  84. Fisher K. D., Green N. K., Hale A., Subr V., Ulbrich K., Seymour L. W.: *J. Drug Targeting* 15, 546 (2007).
  85. Morrison J., Briggs S. S., Green N., Fisher K., Subr V., Ulbrich K., Kehoe S., Seymour L. W.: *Mol. Ther.* 16, 244 (2008).
  86. Park J. W., Mok H., Park T. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 769 (2008).
  87. Carlisle R. C., Benjamin R., Briggs S. S., Summer-Jones S., Gill D., Hyde S., Nathwani A., Fisher K. D., Šubr V., Ulbrich K., Seymour L. W.: *J. Gene Med.* 10, 400 (2008).
  88. Fisher K. D., Green N. K., Morrison J., Briggs S. S., Stevenson M., Ulbrich K., Seymour L. W.: *J. Gene Med.* 9, 528 (2007).
  89. Green N. K., Morrison G. J., Hale S., Briggs S. S., Stevenson M., Šubr V., Ulbrich K., Chandler L., Mautner V., Seymour L. W., Fisher K. D.: *J. Gene Med.* 10, 280 (2008).
  90. Maeda H.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 46, 169 (2001).

**M. Pechar and K. Ulbrich** (*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Polymer Therapeutics**

Polymer therapeutics including polymer-drug conjugates, polymer-protein conjugates and polymer-modified gene delivery vectors are addressed in this review. Brief history of the polymer therapeutics is described with a focus on the pioneering work accomplished at the Institute of Macromolecular Chemistry in Prague. The advantages of polymer therapeutics compared with low-molecular-weight drugs are outlined. Polymer cancerostatics, polymer-protein conjugates with anti-cancer activity and polymer-modified viruses based on *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers and biodegradable multiblock poly(ethylene glycol) polymers are chosen as examples. The current status of clinical evaluation of the polymer therapeutics is also mentioned.