

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKAÚŘAD  
PRŮMYSLVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2019-572  
 (22) Přihlášeno: 09.09.2019  
 (40) Zveřejněno: 17.03.2021  
 (Věstník č. 11/2021)  
 (47) Uděleno: 26.07.2023  
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: 06.09.2023  
 (Věstník č. 36/2023)

C08F 20/60 (2006.01)  
 C08F 20/58 (2006.01)  
 C07H 99/00 (2006.01)  
 A61K 31/74 (2006.01)  
 A61K 31/7042 (2006.01)  
 A61K 47/32 (2006.01)  
 A61P 35/04 (2006.01)

## (56) Relevantní dokumenty:

P. Bojarová et al: "Biocompatible glyconanomaterials based on HPMa-copolymer for specific targeting of galectin-3" J Nanobiotechnology. 2018 Sep 20;16(1):73. doi: 10.1186/s12951-018-0399-1; P. Bojarová et al: "Glycan - decorated HPMa copolymers as high-affinity lectin ligands" Polym. Chem. 8, 2647-2658 (2017); P. Bojarová, V. Křen: "Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives" Biomater. Sci. 4, 1142-1160 (2016); M. Hovorková: "Multivalentní sacharidové ligandy galektinů" UK, Přírodovědecká fakulta, Praha 2018; R. Pola et al: "Click chemistry as a powerful and chemoselective tool for the attachment of targeting ligands to polymer drug carriers" Polym. Chem. 5, 1340-1350 (2014); K. Ulbrich et al: "Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies" Chem. Rev. 2016 May 11;116(9):5338-431. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00589.

## (73) Majitel patentu:

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.,  
 Praha 6, Břevnov, CZ  
 Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4,  
 Krč, CZ

## (72) Původce:

RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D., Praha 6, Střešovice,  
 CZ

Mgr. Tomáš Vašíček, 94911 Nitra, SK

Mgr. Petr Chytil, Ph.D., Kladno, Kročehlavy, CZ

Mgr. Marcela Filipová, Třebechovice pod Orebem,  
 CZ

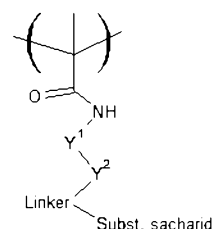
Mgr. Olga Janoušková, Ph.D., Brandýs nad Labem-  
 Stará Boleslav, Brandýs nad Labem, CZ

RNDr. Tomáš Etrych, DSc., Klínek, CZ

M.R. Tavares, Praha 10, Vršovice, CZ

## (74) Zástupce:

HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,  
 170 00 Praha 7, Holešovice



## (54) Název vynálezu:

**Glykopolymer, způsob jeho přípravy a jeho použití jako léčivo**

## (57) Anotace:

Glykopolymer sestávající z HPMa polymerů s obsahem od 0,5 do 25 % mol. strukturních jednotek vzorce I a popřípadě koncových skupin o vzorci -S-sukcinimid-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Linker-Substituovaný sacharid nebo -C(CN)(CH<sub>3</sub>)-(C1-C4 alkyl)-Linker-Substituovaný sacharid, a jeho použití pro léčbu pevných nádorů, lymfomu nebo leukemie.

## Glykopolymer, způsob jeho přípravy a jeho použití jako léčivo

### Oblast techniky

5

Vynález se týká multivalentních vodorozpustných nebo micelárních polymerů, tj. homopolymerů i kopolymerů, se sacharidovými strukturami obsahujícími terminální monosacharid v *galakto*-konfiguraci, které jsou účinné jako inhibitory galektinů. Tyto glykopolyмеры lze využít jako léčiva pro terapii a prevenci rakovinných onemocnění spojených s nadprodukcí galektinů, zvláště lidského galektinu-3 (Gal-3).

10

### Dosavadní stav techniky

V poslední době se vývoj léčiv v protinádorové terapii posouvá od klasických nízkomolekulárních léčiv k hledání nových léčiv nebo lékových forem umožňujících cílené působení aktivní látky především v místě, kde je terapeutický účinek třeba. V současnosti vstupují do klinického využití jako léčiva monoklonální protilátky, které jsou poměrně účinné u různých typů malignit, ovšem často je jejich použití spojené s poměrně silnými toxickými účinky pro pacienta. Vedle protilátek se cíleně působící formy léčiva dají využít především u takových látek, jejichž vedlejší účinky mohou vést až k poškození zdravých částí organismu. Využití polymerních nosičů, především vodorozpustných nebo micelárních polymerů, pro cílenou dopravu léčiv je jednou z významných možností řešení zmíněného problému. Vysoká molární hmotnost polymeru s aktivní složkou zabráňuje rychlému vyloučení z organismu glomerulární filtrací. Tím se významně prodlužuje doba cirkulace v krvi i celkové setrvání v organismu vedoucí ke zvýšení biologické využitelnosti systému. Kromě toho vysoká molární hmotnost polymerního systému vede ke zvýšené akumulaci v pevných nádobách díky EPR (enhanced permeability and retention) efektu.

25

Tohoto efektu lze využít v případě navázání léčiva na makromolekulární nosič pro jeho cílenou akumulaci v nádoru. V minulosti byla vyvinuta celá řada systémů, které jsou založeny na využití EPR efektu pro cílení léčiv, např. polymerní micely, liposomy, nanočástice, nanokapsle nebo vodorozpustné polymerní konjugáty. Polymerní micely jsou na rozdíl od rozpustných polymerních systémů obvykle připravovány samospořádáním amfifilních diblokových kopolymerů do vysokomolekulárních micelárních útvarů tvořících koloidní roztoky. Mezi vodorozpustnými systémy tvoří jednu z nejvýznamnějších skupin polymerních systémů připravených na bázi polymerů obsahujících jednotky *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA polymery). Jediný a hlavní nedostatek omezující využití HPMA polymerů jako nosičů léčiv v humánní medicíně je jejich neštěpitelný uhlíkový řetězec a s tím spojené omezení molárních hmotností použitelných pro přípravu polymerního nosiče na molární hmotnosti menší než 50 000 až 60 000 g/mol (pod vylučovací mezí organismu). Bohužel, polymery nad touto mezí nejsou efektivně a dostatečně účinně z těla vylučovány, a tudíž jejich použití jako léčiva by vedlo k nežádoucí akumulaci polymeru v organismu. Navýšení molární hmotnosti HPMA polymerů, a tedy prodloužení jejich cirkulace v organismu, je možné vmezeřením biodegradovatelných spojek mezi jednotlivé bloky HPMA kopolymerů. Vhodné jsou zvláště spojky enzymově, hydrolyticky nebo reduktivně štěpitelné. Struktury vzniklé spojením bloků k sobě se nazývají multiblokové, roubované nebo hvězdčicovité. Variantou může být též příprava amfifilního HPMA polymeru, který se do nadmolekulární micelární struktury sám složí a po poklesu koncentrace pod kritickou micelární koncentraci se sám rozpadne na krátké kopolyмеры vyloučitelné z organismu.

40

45

Nedávno bylo popsáno, že HPMA polymer může sloužit jako nosič několika scFv řetězců anti-CD20 a díky své multivalenci může způsobovat apoptózu CD20 pozitivních buněk (Kopeček J. Adv. Drug Delivery Rev. 2013, 65, 49-59). Tento koncept byl popsán jako „drug-free therapeutics“ (terapeutika bez léčiv) a v USA nyní probíhají jeho zkoušky. Základem pro účinnost tohoto systému je multivalence polymeru daná již samotnou strukturou použitého polymeru.

55

- Galektin-3 (Gal-3) je lektin patřící do rodiny galektinů – proteinů vážících glykany s terminálním  $\beta$ -galaktosidem. V současné době je tomuto galektinu věnována značná pozornost s ohledem na jeho významný vliv na procesy ovlivňující nádorové bujení, jako je vznik metastáz, překonání imunitní odpovědi organismu, mRNA splicing, genová exprese, apoptóza a vznik zánětu. Gal-3 je exprimován řadou nádorových tkání a buněk, a to jak intracelulárně, tak extracelulárně, kdy je jednak asociován s glykostrukturami na povrchu buněk, jednak je uvolňován do mezibuněčného prostředí. Zvýšená exprese Gal-3 v nádorových tkáních (Thijssen V. L. et al. *Biochim. Biophys. Acta* 2015, 1855, 235-247) vede k zhoršené prognóze vývoje onemocnění a zvýšenému riziku vzniku metastáz. Dále byla prokázána klíčová role extracelulárního Gal-3 produkovaného do nádorového mikroprostředí při potlačení imunitní odpovědi T buněk proti nádorovým buňkám a snížení funkce NK buněk, což následně vede k rozšíření nádorového bujení a vzniku metastáz. Bylo prokázáno, že inhibice extracelulárního Gal-3 vede k ochraně T buněk imunitního systému proti apoptóze vyvolané Gal-3.
- Gal-3 produkovaný nádorovými buňkami může být lokalizován především v jádře, v cytoplasmě a na membráně. Extracelulární Gal-3 je produkován do mikroprostředí nádoru a rovněž krví do celého těla. Zvýšená přítomnost Gal-3 je v přímé korelaci s horší prognózou vývoje nádorového onemocnění, např. v případě nádorů štítné žlázy, některých nádorů tlustého střeva, hlavy a krku nebo nádorů mozku. Jedním z důvodů může být vliv volného Gal-3 na apoptózu protinádorových T lymfocytů. Gal-3 může díky své zvýšené expresi v nádorové tkáni sloužit jako terapeutický marker a současně terapeutický cíl. Také jeho přítomnost v krevním řečišti či mikronádorovém prostředí může být sledována s ohledem na vývoj nádorového onemocnění; ovlivnění hladiny volného Gal-3 může ovlivnit efektivitu protinádorové imunitní odpovědi (Sano H. et al. *J. Immunol.* 2000, 165 (4), 2156-2164, Guha P. *PNAS* 2013, 110 (13), 5052-5057).
- V posledních letech byly intenzivně studovány různé modifikace základních sacharidových ligandů galektinů – galaktosy, laktosy (Gal $\beta$ 4Glc) nebo *N*-acetylglukosaminu (Gal $\beta$ 4GlcNAc) – a vliv těchto modifikací na afinitu připravených glykomimetik k jednotlivým galektinům, zvláště pak biomedicínsky nejvíce studovaným galektin-1 a -3. Vnesení aromatické skupiny na C-3 mateřského galaktosového zbytku bylo demonstrováno jako nejvýhodnější pro zvýšení afinity ke galektinům. Strukturní analogy *N*-acetylglukosaminu a thiodigalaktosidů (TDG; Gal $\beta$ 1-1 $\beta$ Gal) se vyprofilovaly v rozsáhlou skupinu účinných glykomimetických inhibitorů galektinů odolných vůči enzymové degradaci *in vivo*, což je důležitým faktorem pro budoucí klinickou aplikaci. Byla popsána i multivalentní prezentace těchto glykomimetik na hovězím sérovém albuminu jako nosiči.
- Kromě již uvedených sloučenin byla v literatuře popsána řada dalších sacharidů jako ligandů galektinů. Jedná se zvláště o struktury na bázi poly-*N*-acetylglukosaminu. Tyto komplexní oligosacharidové struktury a další, jednodušší sacharidy na bázi laktosy, galaktosy či *N*-acetylglukosaminu bez zmíněných substitucí byly též v minulosti vystaveny v multivalentní prezentaci na řadě nosičů, jako např. na peptidech, polymerech, oligonukleotidech, fullerenech a kalixarenech, i na dendrimerech a nanočásticích. Multivalentní prezentace často výrazně zvýšila nízkou afinitu monovalentního sacharidu. I když byly v některých případech demonstrovány vysoké afinity ke galektinům metodou ELISA, jednalo se vždy pouze o modelový systém, který nelze použít pro *in vivo* aplikace. Žádný z dosud připravených multivalentních nosičů nenabízí unikátní kombinaci vlastností glykopolymerů podle předkládaného vynálezu (konkrétně dobrou definovatelnost a reprodukovatelnost přípravy, biokompatibilitu, stabilitu *in vivo* a výhodnou farmakokinetiku).
- HPMA polymery nesoucí protirakovinné léčivo doxorubicin a kovalentně navázané jednoduché mono- a disacharidy (laktosa, galaktosa, galaktosamin) byly v minulosti studovány (David A. *Pharmaceut. Res.* 2002, 19, 1114-1122; David A. et al. *Eur. J. Cancer* 2004, 40, 148-157) pro možnost aktivního cílení do buněk vybraných rakovinných linií, z nichž některé exprimovaly Gal-3. V popsáných případech nebylo uvažováno o účinku konjugátů na inhibici Gal-3 a korelace získaných výsledků s expresí Gal-3 na buňkách nebyla průkazná. V publikaci autorů tohoto

vynálezu (Bojarová P. et al. J. Nanobiotechnol. 2018, 16, 73) byla syntetizována série HPMa konjugátů s jednoduchým disacharidem LacdiNAc a demonstrován jejich inhibiční účinek ( $IC_{50}$  v řádu  $\mu M$ ) na Gal-3 ve stanovení ELISA. Předkládaný vynález si klade za cíl poskytnout glykopolymery se zlepšeným inhibičním účinkem na Gal-3, a při tom mající vhodné vlastnosti pro přípravu a aplikaci, které jsou nezbytnými podmínkami pro možnost praktického využití.

#### Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je struktura, syntéza a použití nového polymerního léčiva s dobře kontrolovatelným obsahem navázaných substituovaných sacharidů. Obsah navázaných substituovaných sacharidů se reguluje množstvím přidané sacharidové složky k polymernímu nosiči, protože je mu úměrný. Nové léčivo jeví prodlouženou farmakokinetiku a zvýšenou akumulaci v nádoru díky obsahu polymerní složky, a zároveň silnou inhibici galektinů.

Glykopolymery nesoucí substituované sacharidy podle tohoto vynálezu mají nejen vyšší afinitu ke Gal-3 ve vazebných testech typu ELISA, než je tomu u glykopolymerů známých ze stavu techniky, ale především mají prokazatelně silnější účinek v biologických testech, jak je doloženo ve srovnávacím příkladu 26. Oproti nejbližšímu stavu techniky jsou tak jednoznačně účinnější na inhibici Gal-3, která má přímý dopad na protinádorovou imunitní odpověď a migraci nádorových buněk.

Na rozdíl od všech dříve připravených systémů jsou glykopolymery podle vynálezu jediným prostředkem s inhibičním účinkem vůči Gal-3, který lze použít *in vivo* pro terapii nádorového bujení, a to díky odpovídající farmakokinetice zajištěné polymerní složkou, biokompatibilitě, *in vivo* stabilitě, a dobré reprodukovatelnosti přípravy. V rámci tohoto vynálezu byl prokázán silný účinek připravených glykopolymerů nejen na potlačení indukce apoptózy u buněk imunitního systému, ale též dosud nedemonstrováný účinek na potlačení migrace nádorových buněk. Oba tyto účinky mají přímý dopad na léčbu nádorů a potlačení metastatického procesu.

Jedním z důležitých znaků systému podle předkládaného vynálezu jsou polymerní řetězce tvořené inertním, nenabitým, s organizmem neinteragujícím vodorozpustným polymerem na bázi HPMa, který je využit jako multivalentní nosič pro navázání substituovaných sacharidů s cílem dosáhnout zvýšené interakce s lektiny, a též zlepšené farmakokinetiky nesených substituovaných sacharidů. V kombinaci se specifickými substituovanými sacharidy se pak dosahuje zde popsáných účinků.

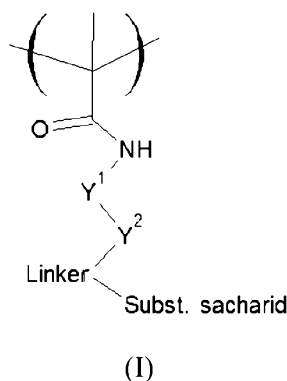
Struktura glykopolymeru podle vynálezu vychází z polymerních nosičů na bázi HPMa polymerů, na které jsou kovalentně navázány substituované sacharidy, jejichž interakce s galektiny má díky polymernímu nosiči multivalentní charakter a dochází k aviditě při vazbě na zmíněné galektiny. Popsaná silná interakce s galektiny vede k samotnému biologickému účinku, který spočívá v několika bodech, a to v protektivním efektu na buňky imunitního systému proti apoptóze indukované Gal-3, dále v inhibici migrace nádorových buněk a s tím spojené inhibici metastatického rozsevu.

Pod pojmem „léčivo“ se zde rozumí látka přímo mající léčebné účinky, nebo adjuvans, nebo imunomodulant.

Termínem „polymer“ jsou zde zahrnuty kopolymery i homopolymery. Zejména termínem „HPMa polymer“ je zahrnut jako HPMa kopolymer, tak HPMa homopolymer.

Předmětem předkládaného vynálezu je tedy glykopolymer obsahující polymerní nosič na bázi HPMa polymerů s obsahem od 0,5 do 25 % mol.

– strukturních jednotek vzorce I:



kde

5

$Y^1$  je vybrán ze skupiny tvořené alkylenem majícím 1 až 8 atomů uhlíku; fenylenem;  $-(CH_2)_q-$   $(C(O)-NH-(CH_2)_r)_p-$ , kde  $p = 1$  až 5, a  $q$  a  $r$  jsou vzájemně nezávisle vybrány z 1, 2 a 3; přičemž  $Y^1$  může být, popřípadě substituován jedním nebo více postranními řetězci přirozené aminokyseliny, přičemž postranní řetězce mohou být stejné nebo různé;  $Y^1$  je s výhodou vybrán ze skupiny zahrnující  $-CH_2-CH_2-$  a  $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ ;

10

$Y^2$  je vybrán ze skupiny zahrnující vazbu, karbamoyl, karbamoyl-(C1-C8-alkylen), a fenylen; přičemž karbamoylem se rozumí skupina  $-C(=O)-NH-$  i skupina  $-NH-C(=O)-$ ;

15

Linker je vybrán ze skupiny zahrnující 1,2,3-triazolylen, (C1-C6 alkyl)-1,2,3-triazolylen;  $-NH-C(=O)-NH-(CH_2)_2-NH-C(=O)-$ ;  $-NH-C(=S)-NH-(CH_2)_2-NH-C(=O)-$ ; nebo k substituentu  $Y^2$  prostřednictvím skupiny  $-C(=O)-$  nebo jen kovalentní vazbou vázaný cyklooktynyl či azacyklooktynyl substituovaný alespoň jedním halogenem, cyklopropanem nebo konjugovaný s alespoň jedním benzenovým kruhem, přičemž tento cyklooktynyl či azacyklooktynyl je dále konjugovaný s triazolylem, (například tvořený 3,4,5,13-tetrazatetracyklo[13.4.0.02,6.07,12]nonadeka-1(15),2(6),3,7(12),8,10,16,18-oktaen-13-karbaldehydovým motivem);

20

25

Subst. sacharid je substituent odvozený od substituovaného sacharidu obecného vzorce III popsaného zde níže reakcí terminální aminové, azidové, alkynylové, aminoethylureidylové nebo aminoethylthioureidylové skupiny, přičemž skupiny vzniklé reakcí uvedených terminálních skupin jsou součástí Linkeru;

a/nebo

30

– koncových skupin řetězce HPMA polymeru majících vzorec  $-S$ -sukcinimid- $(CH_2)_r$ -Linker-Subst. sacharid nebo  $-C(CN)(CH_3)-(C1-C4 \text{ alkylen})$ -Linker-Subst. sacharid; kde  $r$  je vybráno ze skupiny zahrnující 1, 2 a 3, a Linker a Subst. sacharid jsou definovány výše.

35

Přirozenými aminokyselinami jsou zde míněny přirozeně se vyskytující kyseliny: histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan, valin, arginin, cystein, glutamin, glycin, prolin, tyrosin, alanin, asparagová kyselina, asparagin, glutamová kyselina, serin, selenocystein. Postranními řetězci jsou řetězce navázané na alfa-uhlíku aminokyselin.

40

Glykopolymer může kromě poly(HPMA) řetězců obsahovat také větvíci jednotky, například amidoaminové jednotky vhodné pro přípravu dendrimerních (hvězdicovitých) polymerních jader poly(amidoaminu) (PAMAM), nebo 2,2-bis(hydroxymethyl)propionové jednotky vhodné pro tvorbu dendrimerních jader. Například může glykopolymer hvězdicové struktury obsahovat jádro z PAMAM a postranní řetězce z poly(HPMA), obsahující výše uvedené koncové skupiny a/nebo monomerní jednotky vzorce I.

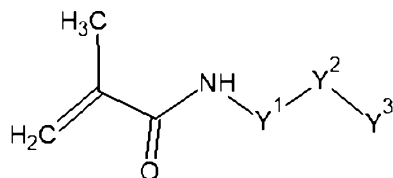
45

Postup přípravy glykopolymerů podle předkládaného vynálezu obsahuje následující kroky:

- a) poskytnutí monomerů polymerního nosiče, a případně větvicích jednotek,
- b) polymeraci monomerů polymerního nosiče,
- c) volitelný krok polymer-analogických reakcí,
- d) navázání substituovaného sacharidu.

Krok poskytnutí monomerů zahrnuje poskytnutí *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) a poskytnutí methakryloyl(aminoacyl) esterů, a popřípadě větvicích jednotek. HPMA je komerčně dostupný a jeho syntéza je publikována (např. Chytil P. et al. Eur. J. Pharm. Sci. 2010, 41 (3-4), 472-482). Komerčně dostupné monomery jsou dále například *N*-aminoethylmethakrylamid, *N*-aminopropylmethakrylamid, nebo jejich *t*Boc chráněné analogy.

Syntézu dalších funkcionalizovaných monomerů odvozených od HPMA lze popsat následovně. Funkcionalizované monomery, methakrylované sloučeniny, lze popsat obecným vzorcem II



(II),

kde

$Y^1$  je vybrán ze skupiny tvořené alkylenem majícím 1 až 8 atomů uhlíku; fenylenem;  $-(CH_2)_q-$   $(C(O)-NH-(CH_2)_r)_p-$ , kde  $p = 1$  až 5, a  $q$  a  $r$  jsou vzájemně nezávisle vybrány z 1, 2 a 3; přičemž  $Y^1$  může být, popřípadě substituován jedním nebo více postranními řetězci přirozené aminokyseliny, přičemž postranní řetězce mohou být stejné nebo různé;

$Y^2$  je vybrán ze skupiny zahrnující vazbu, karbamoyl, karbamoyl-(C1-C8-alkylen), a fenylen; přičemž karbamoylem se rozumí skupina  $-C(=O)-NH-$  i skupina  $-NH-C(=O)-$ ;

$Y^3$  je vybrán ze skupiny zahrnující primární amin ( $NH_2$ ), *t*Boc substituovaný amin, azid, terminální alkynyl mající 2 až 8 atomů uhlíku, fenyln substituovaný alespoň jedním azidem nebo C2-C4 alkynylem; a cyklooktynyl či azacyklooktynyl substituovaný alespoň jedním halogenem, cyklopropanem nebo konjugovaný s alespoň jedním benzenovým kruhem, jako je například (11,12-didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl) nebo (1*R*,8*S*,9*S*)-bicyklo[6.1.0]non-4-yn-9-yl; přičemž tento substituovaný cyklooktynyl či azacyklooktynyl je vázán přes karbonylovou skupinu; -karbonyl-thiazolin-2-thionovou skupinu (TT), -karbonyl-4-nitrofenoxi skupinu, -karbonyl-2,3,4,5,6-pentafluorfenoxi skupinu, -karbonyl-sukcinimidylovou skupinu, a COOH skupinu; přičemž karbonyl je  $-C(=O)-$  skupina.

Větvicí jednotky jsou obvykle komerčně dostupné, v některých případech jsou komerčně dostupná i větvená či hvězdicovitá jádra pro dendrimerní polymery.

Dalším krokem postupu podle vynálezu je krok b), tj. krok syntézy polymerních nosičů polymerací monomerů, popřípadě s větvicími jednotkami. Polymerní nosič obvykle obsahuje statistický polymer obsahující od 0,5 do 25 % mol. monomerních jednotek obecného vzorce II a/nebo

- koncových jednotek hlavního polymerního řetězce popsaných výše, a alespoň 75 % mol. (75 až 99,5 % mol.) jiných jednotek, což zahrnuje monomerní jednotky odvozené od HPMa a popřípadě i větvičky jednotky. Polymerizace typicky probíhá při teplotě v rozmezí od 30 do 100 °C, s výhodou 40 až 80 °C, v rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující vodu, vodné pufrы, dimethylsulfoxid, dimethylacetamid, dimethylformamid, methanol, ethanol, dioxan, *tert*-butylalkohol nebo jejich směsi, za iniciace iniciátorem, s výhodou vybraným ze skupiny zahrnující zejména azoiniciátory 2,2'-azobis(2-methylpropionitril) (AIBN), 4,4'-azobis(4-kyanopentanová kyselina) (ACVA), 2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylpentannitril) (V70), za přítomnosti přenosového činidla, s výhodou vybraného ze skupiny obsahující 2-kyano-2-propylbenzodithioát, 4-kyano-4-(thiobenzoylthio)pentanovou kyselinu, 2-kyano-2-propyldodecyltrithiokarbonát, 2-kyano-2-propylethyltrithiokarbonát a 4-kyano-4-[(dodecylsulfanyltrithiokarbonyl)sulfanyl]pentanovou kyselinu. Molární hmotnost  $M_n$  takto připravených polymerů je v rozmezí od 4000 do 100 000 g/mol, s výhodou 20 000 až 50 000 g/mol.
- Volitelně může být zahrnut i krok odstranění koncových skupin obsahujících síru z polymerů, při jejichž přípravě bylo použito přenosové činidlo, ve kterém jsou tyto polymery reagovány s přebytkem azoiniciátoru ze skupiny iniciátorů polymerace popsaných výše. Polymerní nosič je pak zakončen zbytkem z radikálu vzniklého rozpadem použitého iniciátoru. Reakce typicky probíhá při teplotě v rozmezí od 50 do 100 °C, s výhodou 60 až 80 °C, a v rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující dimethylsulfoxid, dimethylacetamid a dimethylformamid.

Volitelným krokem c) je zavedení azidové či alkylové skupiny (i) reakcí  $Y^3$  skupiny na polymeru, pokud ta je odstupující skupinou (tj. je vybraná z thiazolin-2-thionové skupiny (TT), 4-nitrofenoxы skupiny, 2,3,4,5,6-pentafluorfenoxы skupiny, sukcinimidylové skupiny, a OH skupiny), s aminosloučeninou (např. amino(C1-C8 alkanem)) zakončenou skupinou vybranou z azidu, ethynylu, fenylu substituovaného alespoň jedním azidem, C2-C5 terminálním alkynylem, nebo substituovaným cyklooktynem, s výhodou 3-amino-1-(11,12-didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)propan-1-onem, či *N*-[(1*R*,8*S*,9*S*)-bicyklo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyloxykarbonyl]-1,8-diamino-3,6-dioxaoctanem; nebo (ii) reakcí  $Y^3$  skupiny na polymeru, pokud ta je primární aminoskupinou, s karboxy(C1-C8 alkanem) zakončenou skupinou vybranou z azidu, ethynylu, fenylu substituovaného alespoň jedním azidem, C2-C5 alkynylem, nebo substituovaným cyklooktynem, s výhodou 6-(11,12-didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-6-oxohexanovou kyselinou, či jejím *N*-hydroxysukcinimidyl esterem a (1*R*,8*S*,9*S*)-bicyklo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl *N*-sukcinimidyl karbonátem, nebo funkčními deriváty tohoto karboxyalkanu obsahujícími dobře odstupující skupinu tvořenou s výhodou TT, 4-nitrofenoxы, 2,3,4,5,6-pentafluorfenoxы, nebo sukcinimidylovou skupinou. Tyto polymer-analogické reakce typicky probíhají při pokojové teplotě v rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující dimethylsulfoxid, dimethylacetamid, dimethylformamid, methanol a ethanol.

Jedno výhodné provedení polymerního nosiče je takové, že volitelně může dále obsahovat 0,5 až 12 % mol. dalších strukturních jednotek odvozených od obecného vzorce II, kde  $Y^1$  a  $Y^2$  jsou jak je definováno výše, ale  $Y^3$  je vybrán ze skupiny tvořené karbonyl-hydrazono-(C12-C18 alkanonem), karbonyl-hydrazono-5 $\alpha$ -cholestanonem, karbonyl-hydrazono-cholest-4-en-3-onem, případně jiným substituentem odvozeným od ketoderivátů cholesterolu; nebo je vybrán ze skupiny tvořené karbonyl-(C9-C15 alkoxy), karbonyl-cholesterylu, nebo jiných sloučenin odvozených od cholesterolu, např. 7-dehydrocholesterolu, či vitamínu D; nebo je vybrán ze skupiny tvořené karboxamido-(C10-C18 alkylem) a karbohydrazido-(C10-C18 alkylem), nebo karboxamido-(C10-C18 alkenylem) a karbohydrazido-(C10-C18 alkenylem), obsahujícím aspoň jednu dvojnou vazbu (C=C), s výhodou odvozené od kyseliny olejové, linolové, linoleové.

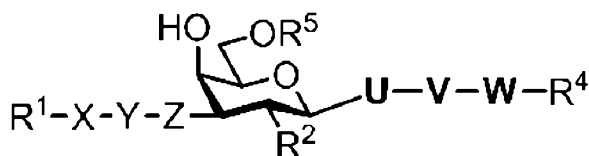
Polymerní nosič může obecně mít lineární, větvenou, nebo síťovanou strukturu.

V případě lineární struktury se obvykle jedná o polymerní nosič obsahující 0,5 až 25 % mol. monomerních jednotek vzorce II a/nebo koncových jednotek popsaných výše, a alespoň 75 % mol. HPMa monomerních jednotek.

V případě větvené nebo síťované struktury je obsaženo alespoň 75 % mol. HPMA monomerních jednotek a větvičích jednotek.

- 5 V některých provedeních polymerního nosiče větvené struktury je jen část funkčních skupin vhodných pro vazbu substituovaných sacharidů rozmístěna podél polymerního řetězce, nebo dokonce nejsou monomery vzorce II obsaženy vůbec. Funkční skupiny vhodné pro vazbu substituovaných sacharidů, nebo alespoň jejich část, mohou mít formu koncových skupin umístěných na jednom konci polymerního řetězce HPMA polymeru, přičemž druhý konec
- 10 polymerního řetězce je navázaný k multivalentní molekule, např. dendrimeru, např. PAMAM dendrimernímu jádru nebo k jádru na bázi 2,2-bis(hydroxymethyl)propionového dendrimeru. Prvním krokem přípravy je v takových provedeních polymerizace HPMA, která typicky probíhá při teplotě v rozmezí od 30 do 100 °C, s výhodou 40 až 80 °C, v rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující vodu, vodné pufrы, dimethylsulfoxid, dimethylacetamid, dimethylformamid,
- 15 methanol, ethanol, dioxan, *terc*-butylalkohol nebo jejich směsi, za iniciace iniciátorem, s výhodou vybraným ze skupiny zahrnující zejména azoiniciátory AIBN, ACVA, V70, za přítomnosti přenosového činidla obsahujícího karboxylovou skupinu nebo její funkční derivát obsahující dobře odstupující skupinu tvořenou s výhodou TT, 4-nitrofenoxы, 2,3,4,5,6-pentafluorofenoxы, nebo sukcinimidyllovou skupinou; přenosové činidlo je s výhodou vybrané ze skupiny obsahující 4-
- 20 kyano-4-(thiobenzoylthio)pentanovou kyselinu, 4-kyano-4-[(dodecylsulfanylthiokarbonyl)sulfanyl]pentanovou kyselinu, 1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl dithiobenzoát, 2-kyano-5-oxo-5-(2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)pentan-2-yl ethylkarbontrithioát. V druhém kroku jsou polymery navázány amidovou vazbou k multivalentní sloučenině nesoucí koncové primární aminoskupiny, s výhodou tvořené
- 25 poly(amidoaminovým) (PAMAM), nebo 2,2-bis(hydroxymethyl)propionovým dendrimerem, přičemž reakce typicky probíhá v rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující dimethylsulfoxid, dimethylacetamid, dimethylformamid, methanol a ethanol. Dendrimer může tvořit až 3 % mol. obsahu výsledného polymerního konjugátu. Následně jsou *in situ* zablokovány zbývající primární aminoskupiny nízkomolekulární aminoreaktivní sloučeninou, s výhodou acetanhydridem. Ve třetím kroku jsou síru obsahující skupiny na druhém konci polymeru buď
- 30 redukovány borohydridem sodným a *in situ* dojde k adici SH skupin na *N*-derivovaný maleimid, s výhodou propynylmaleimid či azido-PEG3-maleimid, přičemž reakce probíhá v rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující vodu, dimethylacetamid, dimethylformamid, methanol a ethanol. Popřípadě jsou síru obsahující skupiny na druhém konci polymeru reagovány s
- 35 přebytkem azoiniciátoru nesoucím karboxylovou skupinu, nebo její funkční derivát obsahující dobře odstupující skupinu tvořenou s výhodou TT, 4-nitrofenoxы, 2,3,4,5,6-pentafluorofenoxы, nebo sukcinimidyllovou skupinou, a to při teplotě v rozmezí od 50 do 100 °C, s výhodou 60 až 80 °C a rozpouštědle s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující dimethylsulfoxid, dimethylacetamid a dimethylformamid. Molární hmotnost  $M_n$  takto připravených polymerů je v
- 40 rozmezí od 60 000 do 1 000 000 g/mol, s výhodou 100 000 až 400 000 g/mol.

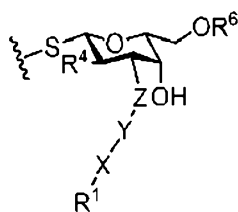
Finálním krokem d) přípravy je vazba substituovaného sacharidu vybraného ze skupiny sestávající ze substituovaných sacharidů obecného vzorce III:



45

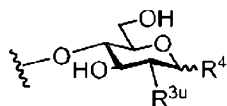
(III),

kde kombinace U, V a W je vybrána z následujících možností IIIa, IIIb, IIIc, IIId, IIIe:



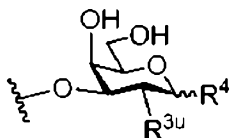
(IIIa),

- 5 IIIa: kde **V** a **W** je jen vazba, a kde **U** je 1-thio-β-D-galaktopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^4$ , na atomu C-3 uskupením -Z-Y-X- $R^1$  a na atomu C-6 skupinou -OR<sup>6</sup>;



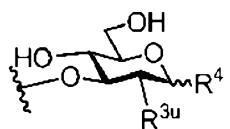
(IIIb)

- 10 IIIb: kde **V** a **W** je jen vazba a kde **U** je 4-O-D-glukopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^{3u}$  a na atomu C-1 skupinou  $R^4$ ;



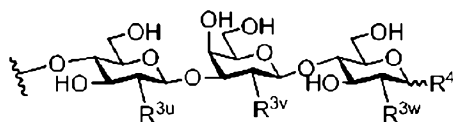
(IIIc)

- 15 IIIc: kde **V** a **W** je jen vazba a kde **U** je 3-O-D-galaktopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^{3u}$  a na atomu C-1 skupinou  $R^4$ ;



(IIIId);

- 20 IIIId: kde **V** a **W** je jen vazba a kde **U** je 3-O-D-glukopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^{3u}$  a na atomu C-1 skupinou  $R^4$ ;



(IIIe)

- 25 IIIe: kde **U** je 4-O-D-glukopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^{3u}$  a na atomu C-1 substituentem **V**, kde **V** je 3-O-D-galaktopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^{3v}$  a na atomu C-1 substituentem **W**, kde **W** je 4-O-D-glukopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^{3w}$  a na atomu C-1 skupinou  $R^4$ ;

30

a kde

$R^1$  je vybrán ze skupiny obsahující vodík, fenyl, fenyl substituovaný alespoň jedním halogenem, fenyl substituovaný alespoň jednou nitroskupinou, fenyl substituovaný alespoň jednou karboxyskupinou, fenyl substituovaný alespoň jednou C1-C5 alkoxykupinou, fenyl substituovaný alespoň jedním C2-C5 alkynylem, fenyl substituovaný alespoň jedním C1-C5 azidoalkylem, fenyl substituovaný alespoň jednou azidoskupinou, fenyl substituovaný alespoň jedním halogenem (C1-C5)alkyltriazolylem, fenyl substituovaný alespoň jednou sulfoskupinou, fenyl substituovaný alespoň jednou kyanoskupinou, fenyl substituovaný alespoň jednou aminoskupinou, fenyl substituovaný alespoň jedním C1-C5 aminoalkylem, fenyl substituovaný alespoň jednou hydroxyskupinou, naftyl, naftyl substituovaný alespoň jedním halogenem, bifenyl, sacharid, C2-C6 heteroaryl obsahující alespoň jeden heteroatom vybraný z O, S, N, sulfoskupinu, kumaryl, benzoyl a C2-C5 alkynyl;

X je [1,2,3]-triazol nebo vazba,

Y je  $CH_2$  nebo vazba,

Z je O nebo [1,2,3]-triazol.

$R^2$ ,  $R^{3u}$ ,  $R^{3v}$ ,  $R^{3w}$  jsou nezávisle vybrány ze skupiny obsahující hydroxyskupinu, acetamid skupinu, C1-C5 acylamid skupinu, 1-*O*- $\alpha$ -L-fukosyl,

$R^4$  je vybrán ze skupiny obsahující hydroxyskupinu, aminoskupinu, C2-C5 alkynyloxyskupinu, azid, C1-C5 azidoalkoxykupinu, aminoethylthioureidyl, aminofenyloxyskupinu a azidofenyloxyskupinu,

$R^5$  a  $R^6$  jsou nezávisle vybrány ze skupiny obsahující vodík, sulfoskupinu, 2-*O*- $\beta$ -sialyl, C1-C5 azidoalkyl, C2-C5 alkynyl a C1-C5 aminoalkyl;

přičemž substituovaný sacharid obecného vzorce III obsahuje vždy právě jednu koncovou aminoskupinu, azidoskupinu nebo C2-C5 alkynyl, a to s výhodou jako součást substituentu vybraného z  $R^1$ ,  $R^5$  nebo  $R^6$ , pokud U je 1-*thio*- $\beta$ -D-galaktopyranosyl, a s výhodou jako součást substituentu  $R^4$  ve všech ostatních kombinacích;

a přičemž substituovaný sacharid obecného vzorce III není laktosa (Gal $\beta$ 4Glc), LacNAc (Gal $\beta$ 4GlcNAc) ani LacdiNAc (GalNAc $\beta$ 4GlcNAc).

Sacharid v substituentu  $R^1$  je s výhodou monosacharid, výhodněji 1-*O*- $\alpha$ -D-galaktopyranosyl nebo 2-*O*- $\alpha$ -sialyl.

Pokud V a W je vazba a U je 1-*thio*- $\beta$ -D-galaktopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^4$ , na atomu C-3 uskupením -Z-Y-X- $R^1$  a na atomu C-6 skupinou -OR<sup>6</sup> (varianta IIIa), s výhodou  $R^2$  je hydroxyskupina a  $R^4$  je také hydroxyskupina.

Pokud V a W je vazba a U je 4-*O*-D-glukopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^{3u}$  a na atomu C-1 skupinou  $R^4$  (varianta IIIb), s výhodou  $R^2$  je vybrán ze skupiny obsahující hydroxyskupinu a acetamid skupinu a  $R^{3u}$  je acetamid skupina.

Pokud V a W je vazba a U je 3-*O*-D-galaktopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^{3u}$  a na atomu C-1 skupinou  $R^4$  (varianta IIIc), s výhodou  $R^2$  je hydroxyskupina a  $R^{3u}$  je acetamid skupina.

Pokud V a W je vazba a U je 3-*O*-D-glukopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou  $R^{3u}$  a na atomu C-1 skupinou  $R^4$  (varianta IIId), s výhodou  $R^2$  je hydroxyskupina a  $R^{3u}$  je acetamid skupina.

Pokud U je 4-*O*-D-glukopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou R<sup>3u</sup> a na atomu C-1 substituentem V, kde V je 3-*O*-D-galaktopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou R<sup>3v</sup> a na atomu C-1 substituentem W, kde W je 4-*O*-D-glukopyranosyl substituovaný na atomu C-2 skupinou R<sup>3w</sup> a na atomu C-1 skupinou R<sup>4</sup> (varianta IIIe), s výhodou R<sup>2</sup>, R<sup>3v</sup> a R<sup>3w</sup> jsou nezávisle vybrány ze skupiny obsahující hydroxyskupinu a acetamidoskupinu a R<sup>3u</sup> je acetamidoskupina.

Substituované sacharidy se k polymernímu nosiči navazují buď amidovou vazbou, nebo azid-alkynovou cykloadicí, tzv. „click“ reakcí (za tvorby Linkeru ze skupiny Y<sup>3</sup> a ze substituentu na substituovaném sacharidu obsahujícího terminální aminové, azidové, alkynylové, nebo aminoethylthioureidylové skupiny, typicky substituentu R<sup>1</sup> nebo R<sup>4</sup> nebo R<sup>5</sup> nebo R<sup>6</sup>). Aminolytická reakce typicky probíhá v aprotickém rozpouštědle, s výhodou vybraném ze skupiny zahrnující dimethylsulfoxid, dimethylacetamid a dimethylformamid. Cykloadiční reakce je s výhodou katalyzovaná, s výhodou měďnými ionty, nebo může být nekatalyzovaná. Reakce typicky probíhá ve vodě, případně ve směsných rozpouštědlech tvořených vodou, vodnými pufrů, alkoholů, aprotickým rozpouštědlem, s výhodou vybraným ze skupiny zahrnující dimethylsulfoxid, dimethylacetamid a dimethylformamid, případně jejich směsí. V případě cykloadiční reakce katalyzované mědí obsahuje reakční směs měďné či měďnaté kationty s výhodou díky přítomnosti CuSO<sub>4</sub> nebo CuBr, a redukční činidlo, s výhodou kyselinu askorbovou nebo askorbát sodný. Ve všech případech je výhodné využít čištění pomocí gelové filtrace na koloně (např. s náplní Sephadex G-25) ve vodě a případně další čištění od kationtů mědi, s výhodou pomocí komplexace s 8-chinolinolem, a následného čištění na koloně (např. Sephadex LH-20) s methanolem jako mobilní fází.

Důležitým přínosem vynálezu je vhodná prezentace substituovaného sacharidu na polymerním nosiči, přičemž jeho obsah v glykopolymeru tvoří 0,5 až 25 % mol., s výhodou 3 až 18 % mol. Multivalentní uspořádání substituovaných sacharidů na polymerech umožňuje multivalentní interakci s Gal-3, a tím významně navyšuje vazebnou aktivitu ke Gal-3 a obecně ke galektinům.

Předmětem vynálezu je dále imunomodulační účinek polymerních konjugátů se substituovanými sacharidy díky vazbě ke Gal-3 výše popsanou multivalentní interakcí. Aplikací polymerních nosičů se sacharidy dochází k vyvázání extracelulárního Gal-3 v nádorové tkáni, a tím k inhibici Gal-3 indukované apoptózy T lymfocytů v nádoru, což umožní navýšení imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám přímo v nádoru. Vazba polymerních nosičů s navázanými substituovanými sacharidy na Gal-3 přímo produkovanými nádorovými buňkami dále vede ke snížení migrace nádorových buněk. Vzhledem k tomu, že Gal-3 v některých typech nádorových buněk zvyšuje pravděpodobnost vzniku metastáz prostřednictvím inhibice vazby buněk k podkladu a buněk vzájemně mezi sebou, vede aplikace polymerních konjugátů se substituovanými sacharidy prostřednictvím vazby na Gal-3 ke snížení možnosti migrace buněk do metastatických ložisek a snížení jejich motility.

Předmětem vynálezu je farmaceutická kompozice, která se vyznačuje tím, že obsahuje glykopolymer podle vynálezu obsahující aktivní substituovaný sacharid a alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku vybranou ze skupiny zahrnující plniva, antiadheziva, pojiva, potahovací látky, barviva, bobtnadla, ochucovadla, maziva, konzervanty, sladidla, sorbenty.

Předmětem vynálezu je glykopolymer podle vynálezu a/nebo jeho farmaceutická kompozice pro použití jako léčivo k léčbě pevných nádorů a/nebo lymfomu a/nebo leukemie, zejména kolorektálního karcinomu, karcinomu prostaty, karcinomu prsu, melanomu, lymfomu, leukemie.

Předmětem vynálezu je rovněž glykopolymer podle vynálezu a/nebo jeho farmaceutická kompozice pro použití jako adjuvancium při protinádorové terapii.

Objasnění výkresů

Obr. 1: Inhibice galektinem-3 indukované apoptózy Jurkat buněk pomocí konjugátu **P11b** (obsah substituovaného sacharidu **20** byl 4,9 % mol.).

Obr. 2: Inhibice galektinem-3 indukované apoptózy Jurkat buněk pomocí konjugátu **P11d** (obsah substituovaného sacharidu **20** byl 9,7 % mol.).

Obr. 3: Inhibice galektinem-3 indukované apoptózy Jurkat buněk pomocí konjugátu **P13a** (obsah substituovaného sacharidu **9** byl 5,1 % mol.).

Obr. 4: Inhibice galektinem-3 indukované apoptózy Jurkat buněk pomocí konjugátu **P13b** (obsah substituovaného sacharidu **9** byl 8,9 % mol.).

Obr. 5: Inhibice galektinem-3 indukované apoptózy Jurkat buněk pomocí konjugátu HPMa s jednoduchým disacharidem LacdiNAc (obsah LacdiNAc byl 12,3 % mol.).

Obr. 6: Inhibice migrace a proliferace myších (4T1, B16-F10) a lidských (DLD-1) nádorových buněk pomocí konjugátů **P11a** a **P11c**.

## Seznam zkratk

ACVA, 4,4'-azobis(4-kyanopentanová kyselina); AIBN, 2'-azobis(2-methylpropionitril); Gal-3, galektin-3; HPMa, *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid; MA-AP-TT, 3-(3-methakrylamidopropanoyl)thiazolidin-2-thion; MA-propynyl, 2-methyl-*N*-(prop-2-yn-1-yl)prop-2-enamid; 3-(3-methakrylamidopropanoyl)thiazolidin-2-thion; MA skupina, *N*-methakryloyl skupina; *t*Boc skupina, *tert*-butoxykarbonylová skupina; TT skupina, thiazolin-2-thionová skupina; TBAB, *tetra*-*n*-butylamoniumbromid; THPTA, *tris*-hydroxypropyltriazolylmethylaminový ligand; V70, 2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylpentannitril); LacdiNAc (GalNAcβ4GlcNAc); LacNAc (Galβ4GlcNAc); laktosa (Galβ4Glc), 4T1 (buněčná linie myšího nádoru prsu); B16-F10 (buněčná linie myšího kožního melanomu); CT26 (buněčná linie myšího kolorektálního karcinomu); DLD-1 (buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu); HEK293 (linie lidských embryonálních buněk z ledvin); HT-29 (buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu); Jurkat (imortalizovaná buněčná linie T lymfocytů); LNCaP (buněčná linie lidského adenokarcinomu prostaty); OVCAR-3 (buněčná linie lidského adenokarcinomu vaječníků); PC3 (buněčná linie lidského adenokarcinomu prostaty); Raji (lidská buněčná linie Burkittova lymfomu); SU-DHL-5 (buněčná linie lidského B-lymfomu); SU-DHL-6 (buněčná linie lidského B-lymfomu);

Příklady uskutečnění vynálezu

## Příklad 1: Syntéza monomerů

*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA)

HPMA byl připraven podle dříve popsaného postupu (Chytil P. et al. Eur. J. Pharm. Sci 2010, 41 (3-4), 473-482). Produkt byl chromatograficky čistý. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 296 K): δ 1,00-1,02 (d, 3H, CHOH-CH<sub>3</sub>), 1,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,00-3,12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,64-3,73 (m, 1H, CH), 4,68-4,70 (d, 1H, OH), 5,30 a 5,66 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=), 7,59 (br, 1H, NH).

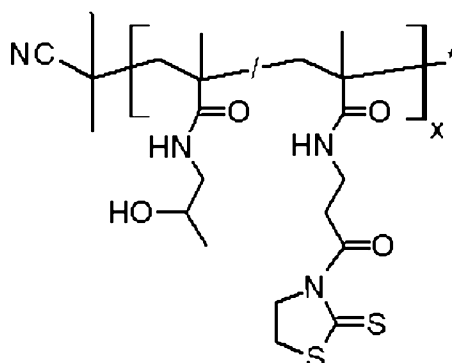
*N*-Methakryloylpropynylamin (MA-propynylamin) byl připraven podle dříve popsaného postupu. (Lynn G.M. et al., Biomacromolecules, 2019, 20 (2), 854-870) Produkt byl chromatograficky čistý.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , 296 K):  $\delta$  1,85 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,05 (s, 1H,  $\equiv\text{CH}$ ), 3,88 (d, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 5,37 a 5,68 (d, 2H,  $=\text{CH}_2$ ), 8,37 (s, 1H, NH).

### 3-(3-Methakrylamidopropanoyl)thiazolidin-2-thion (MA-AP-TT)

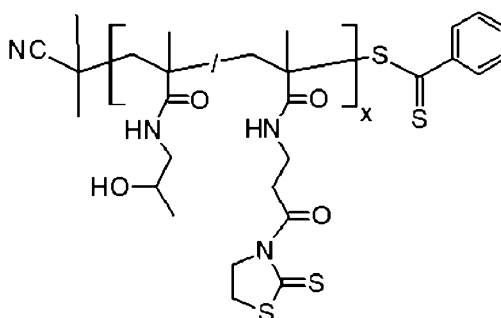
MA-AP-TT byl připraven podle dříve popsaného postupu (Šubr V. et al. Biomacromolecules 2006, 7 (1), 122-130). Produkt byl chromatograficky čistý.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , 295 K):  $\delta$  1,20-1,27 (m, 2H,  $\text{CH}_2-\gamma$ ), 1,40-1,54 (m, 4H,  $\text{CH}_2-\beta$ ,  $\text{CH}_2-\delta$ ), 1,82 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,28 (t, 2H,  $\text{CH}_2-\alpha$ ), 3,04-3,34 (m, 2H,  $\text{CH}_2-\epsilon$ ), 3,57 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5,28 a 5,60 (d, 2H,  $\text{CH}_2=$ ), 7,88 (br, 1H, NH).

### Příklad 2: Syntéza statistického kopolymeru poly(HPMA-co-MA-AP-TT) radikálovou polymerací (P1)



833 mg HPMA (5,82 mmol), 167 mg MA-AP-TT (0,646 mmol) a AIBN (160 mg; 0,974 mmol) byly rozpuštěny v 6,2 ml dimethylsulfoxidu. Polymerační směs byla probublána argonem a zatavena ve skleněné ampuli. Po 6 h ve vodní lázni termostatované na 60 °C byla ampule ochlazená a otevřena. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (150 ml) a přesrážen z methanolu (6 ml) do směsi aceton – diethylether (3:1; 120 ml). Polymer byl získán filtrací a sušením pod vakuem. Výtěžek 850 mg, 85 %; molární hmotnosti  $M_w = 23\,900$  g/mol,  $M_n = 12\,100$  g/mol,  $\bar{D} = 1,98$ .

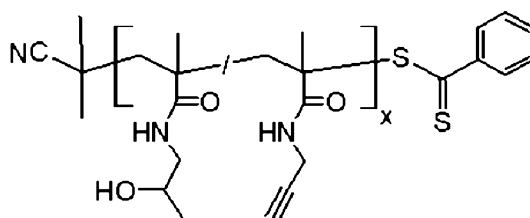
### Příklad 3: Syntéza statistického kopolymeru poly(HPMA-co-MA-AP-TT) řízenou RAFT radikálovou polymerací (P2)



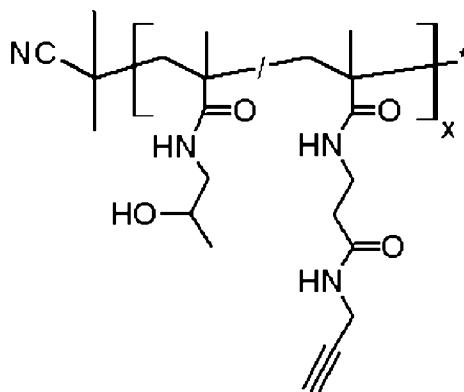
800 mg HPMA (5,59 mmol) bylo rozpuštěno v 5,52 ml *tert*-butylalkoholu a smícháno s roztokem 160 mg MA-AP-TT (0,621 mmol), 4,97 mg AIBN (17,7  $\mu\text{mol}$ ) a 7,84 mg 2-kyanopropan-2-yl dithioátu (35,5  $\mu\text{mol}$ ) v 1,38 ml dimethylsulfoxidu. Polymerační směs byla probublána argonem a zatavena ve skleněné ampuli. Po 16 h ve vodní lázni termostatované na 70 °C byla ampule ochlazená a otevřena. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (150 ml) a přesrážen z methanolu (6 ml) do směsi aceton – diethylether (3:1; 120 ml). Polymer byl získán filtrací a sušením pod vakuem. Výtěžek 730 mg, 76 %; molární hmotnosti  $M_w = 22\,900$  g/mol,  $M_n = 20\,600$  g/mol,  $\bar{D} = 1,11$ .

## Příklad 4: Odstranění koncových skupin na polymeru pocházejících z přenosového činidla

700 mg polymeru **P2** nesoucího koncové dithiobenzoátové skupiny a 70 mg iniciátoru AIBN bylo rozpuštěno v 5 ml dimethylsulfoxidu, probubláno argonem a zataveno ve skleněné ampuli. Po 2 h ve vodní lázni termostatované na 80 °C byla ampule ochlazená a otevřena. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (150 ml) a přesrážen z methanolu (6 ml) do směsi aceton – diethylether (3:1; 120 ml). Polymer byl získán filtrací a sušením pod vakuem. Výtěžek polymeru byl 621 mg.

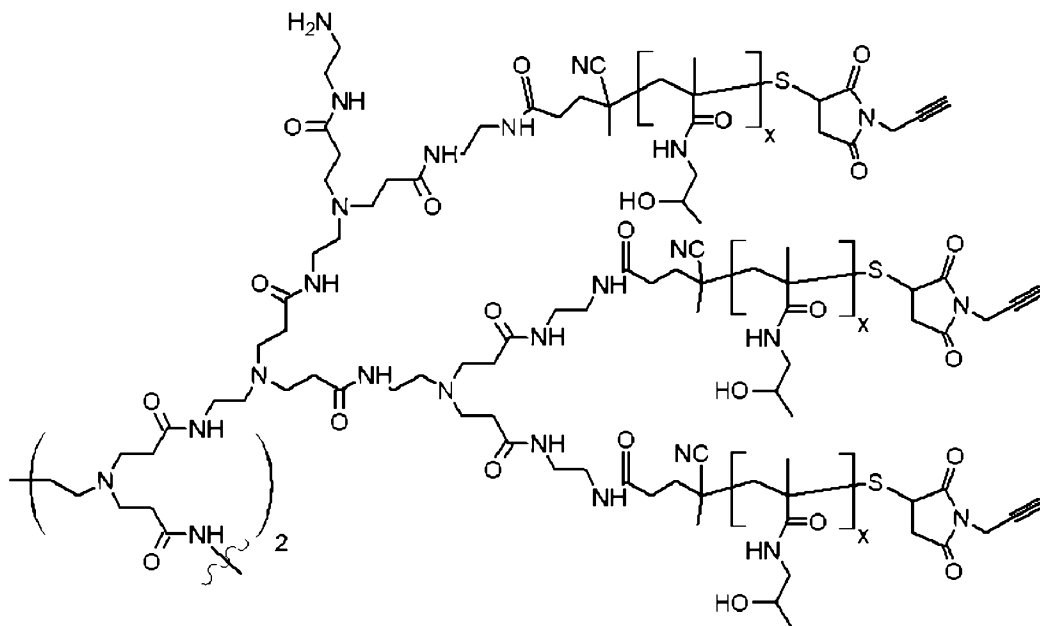
Příklad 5: Syntéza statistického kopolymeru poly(HPMA-co-MA-propynyl) řízenou RAFT radikálovou polymerací (**P3**)

264 mg HPMA (1,84 mmol) a 12 mg *N*-methakryloylpropynylaminu (MA-propynyl) (97,0 μmol) bylo rozpuštěno v 1,3 ml destilované vody a smícháno s roztokem 1,3 mg ACVA (4,7 μmol) a 2,6 mg 4-kyano-4-(thiobenzoylthio)pentanové kyseliny (9,5 μmol) v 0,65 ml dioxanu. Polymerační směs byla probublána argonem a zatavena ve skleněné ampuli. Po 7 h ve vodní lázni termostatované na 70 °C byla ampule ochlazená a otevřena. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (150 ml) a zcentrifugován. Čištění probíhalo gelovou filtrací s použitím kolony s náplní Sephadex LH-20 v methanolu. Polymer byl získán srážením do diethyletheru, filtrací a sušením pod vakuem. Výtěžek 127 mg, 46 %; molární hmotnosti  $M_w = 22\,900$  g/mol,  $M_n = 20\,600$  g/mol,  $\bar{D} = 1,11$ .

Příklad 6: Syntéza statistického kopolymeru poly(HPMA-co-MA-AP-propynyl) konjugací propynylaminu s poly(HPMA-co-MA-AP-TT) (**P4**)

600 mg polymerního prekurzoru (obsahujícího 0,54 mmol TT skupin) bylo rozpuštěno v 6 ml dimethylformamidu a za míchání při pokojové teplotě bylo k roztoku přidáno 40 μl propynylaminu (0,65 mmol) a 108 μl *N*-ethyl-diisopropylaminu (0,65 mmol). Reakce probíhala 16 h při pokojové teplotě. Polymer byl čištěn od nízkomolekulárních příměsí gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (120 ml), filtrací a sušením. Výtěžek: 560 mg; molární hmotnosti:  $M_w = 21\,800$  g/mol,  $M_n = 20\,200$  g/mol,  $\bar{D} = 1,08$ .

Příklad 7: Syntéza hvězdicového kopolymeru obsahující PAMAM dendrimerní jádro a ramena tvořená poly(HPMA)-propynylem (**P5**)



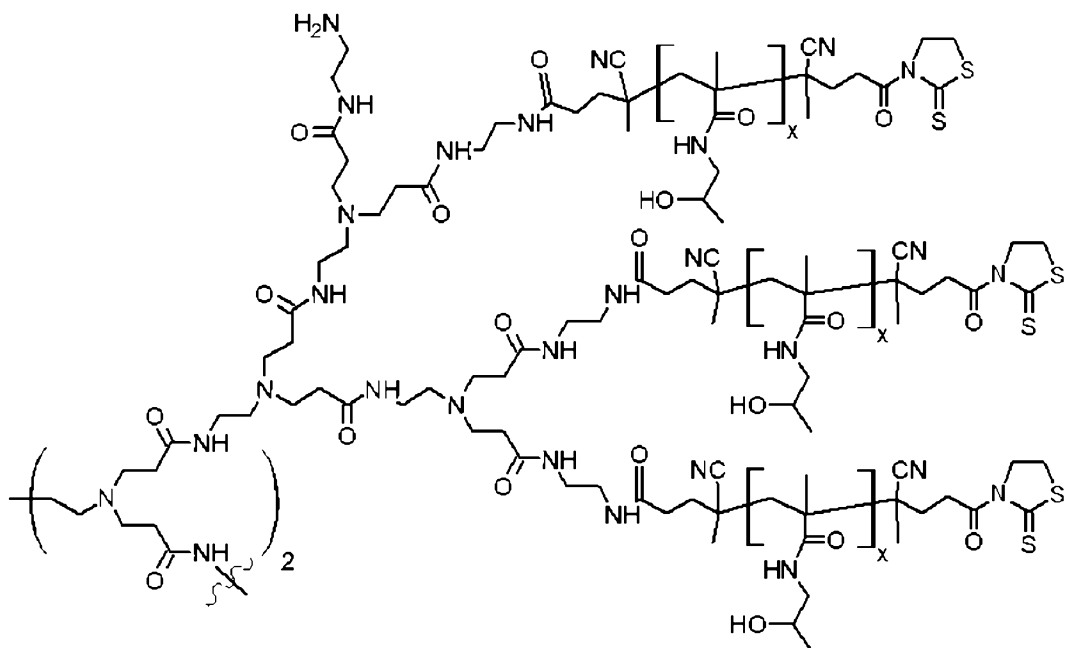
5 500 mg HPMA (3,49 mmol) bylo rozpuštěno v 3,4 ml *tert*-butylalkoholu a smícháno s roztokem 2,8 mg 2-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxo-thiazolidin-3-yl)-butylazo]-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxothiazolidin-3-yl)-pentannitrilu (5,4  $\mu$ mol) a 4,4 mg 1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butylesteru dithiobenzoové kyseliny (10,7  $\mu$ mol) v 0,85 ml dimethylsulfoxidu. Polymerační směs byla probublána argonem a zatavena ve skleněné ampuli. Po 10 6 h ve vodní lázni termostátované na 70 °C byla ampule ochlazená a otevřena. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (120 ml) a přesrážen z methanolu (6 ml) do směsi aceton – diethylether (3:1; 120 ml). Polymer byl získán filtrací a sušením pod vakuem. Výtěžek: 345 mg, 69 %; molární hmotnosti:  $M_w = 29\,800$  g/mol,  $M_n = 27\,100$  g/mol,  $\bar{D} = 1,10$ .

15 340 mg polymerního prekurzoru (obsahujícího 11,2  $\mu$ mol koncových TT skupin) bylo rozpuštěno v 2,2 ml dimethylsulfoxidu a přidáno k 20 % hmotn. methanolovému roztoku 1,5 mg PAMAM dendrimeru (1,4  $\mu$ mol dendrimeru G2 s diaminobutanovým jádrem). Po 1,5 h míchání při pokojové teplotě byla reakce zastavena přidáním 50  $\mu$ l acetanhydridu. Polymer byl vyčištěn od 20 nízkomolekulárních příměsí gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (120 ml), následně filtrací a sušením. Výtěžek konjugací reakce byl 85 % hvězdicového kopolymeru.

25 100 mg hvězdicového polymerního prekurzoru bylo rozpuštěno v 1 ml methanolu. Do míchaného roztoku polymeru bylo přisypáno 10 mg práškového borohydridu sodného. Po 1 h míchání při pokojové teplotě bylo *in situ* přidáno 10 mg propynylmaleimidu rozpuštěného v 0,2 ml methanolu. Po 1 h reakce byl polymer čištěn od nízkomolekulárních příměsí gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (25 ml), následně filtrací a sušením. Molární hmotnosti:  $M_w = 210\,000$  g/mol,  $\bar{D} = 1,19$ . Obdobným 30 způsobem byly připraveny vzorky využívající jako jádro 2,2-bis(hydroxymethyl)propionový dendrimer.

Příklad 8: Syntéza hvězdicového kopolymeru obsahující PAMAM dendrimerní jádro a ramena tvořená poly(HPMA)-TT (**P6**)

35

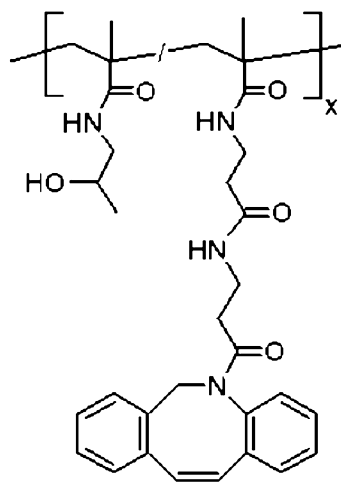


500 mg HPMa (3,49 mmol) bylo rozpuštěno v 3,4 ml *tert*-butylalkoholu a smícháno s roztokem 2,8 mg 2-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxo-thiazolidin-3-yl)-butylazo]-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxothiazolidin-3-yl)-pentannitril (5,4  $\mu$ mol) a 4,4 mg 1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butylesteru dithiobenzoové kyseliny (10,7  $\mu$ mol) v 0,85 ml dimethylsulfoxidu. Polymerační směs byla probublána argonem a zatavena ve skleněné ampuli. Po 6 h ve vodní lázni termostatované na 70 °C byla ampule ochlazená a otevřena. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (120 ml) a přesrážen z methanolu (6 ml) do směsi aceton – diethylether (3:1; 120 ml). Polymer byl získán filtrací a sušením pod vakuem. Výtěžek: 345 mg, 69 %; Molární hmotnosti:  $M_w = 29\,800$  g/mol,  $M_n = 27\,100$  g/mol,  $D = 1,10$ .

340 mg polymerního prekurzoru (obsahujícího 11,2  $\mu$ mol koncových TT skupin) bylo rozpuštěno v 2,2 ml dimethylsulfoxidu a přidáno k 20 % hmotn. methanolového roztoku 1,5 mg PAMAM dendrimera (1,4  $\mu$ mol dendrimer G2 s diaminobutanovým jádrem). Po 1,5 h míchání při pokojové teplotě byla reakce zastavena přidáním 50  $\mu$ l acetanhydridu. Polymer byl čištěn od nízkomolekulárních příměsí gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (120 ml), následován filtrací a sušením. Výtěžek konjugační reakce byl 85 % hvězdicového kopolymeru.

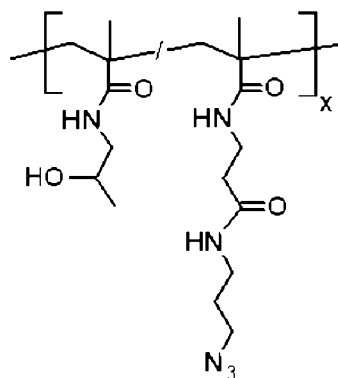
100 mg hvězdicového polymerního prekurzoru a 10 mg 2-[1-kyano-1-methyl-4-oxo-4-(2-thioxo-thiazolidin-3-yl)-butylazo]-2-methyl-5-oxo-5-(2-thioxothiazolidin-3-yl)-pentannitrilu bylo rozpuštěno v 0,7 ml dimethylsulfoxidu, probubláno argonem a zataveno ve skleněné ampuli. Po 3 h ve vodní lázni termostatované na 70 °C byla ampule ochlazená a otevřena. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (25 ml) a přesrážen z methanolu (1 ml) do směsi aceton – diethylether (3:1; 25 ml). Polymer byl získán filtrací a sušením pod vakuem. Molární hmotnosti:  $M_w = 205\,000$  g/mol,  $D = 1,20$ . Obdobným způsobem byly připraveny vzorky využívající jako jádro 2,2-bis(hydroxymethyl)propionový dendrimer.

Příklad 9: Syntéza statistického kopolymeru poly(HPMA-co-MA-AP-azadibenzocyklooktyn) korjugací azadibenzocyklooktynaminu s poly(HPMA-co-MA-AP-TT) (P7)



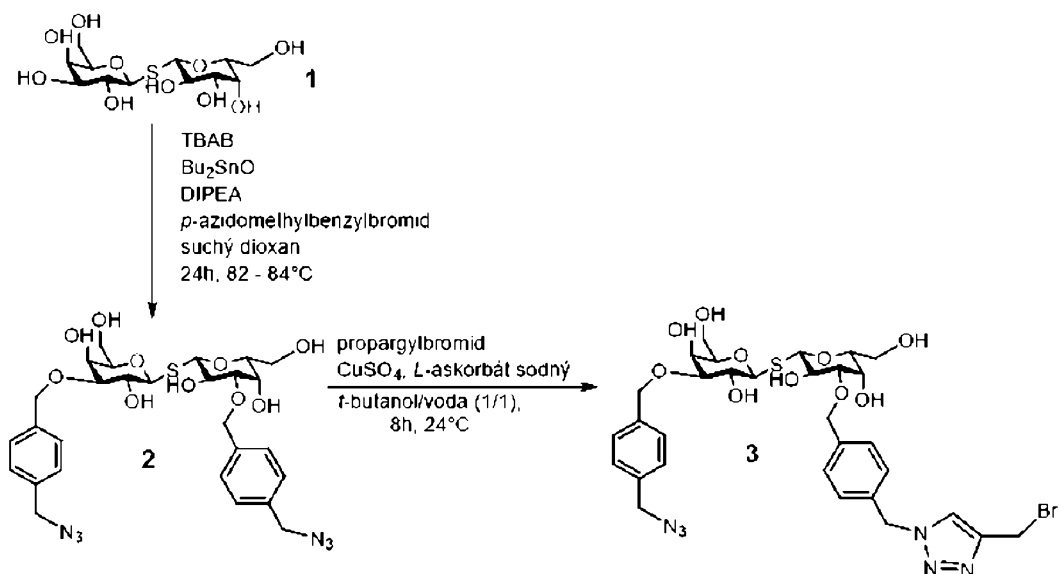
200 mg polymerního prekurzoru (obsahujícího 0,11 mmol TT skupin) bylo rozpuštěno v 2 ml dimethylformamidu a za míchání při pokojové teplotě bylo k roztoku přidáno 32 mg  
 5 azadibenzocycloooktynaminu (0,12 mmol) rozpuštěného v 0,1 ml dimethylformamidu a 22  $\mu$ l *N*-ethyl-diisopropylaminu (0,13 mmol). Reakce probíhala 16 h při pokojové teplotě. Polymer byl čištěn od nízkomolekulárních příměsí gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (50 ml), následován filtrací a sušením. Výtěžek: 184 mg; Molární hmotnosti:  $M_w = 28\,000$  g/mol,  $M_n = 25\,200$  g/mol,  $\bar{D} = 1.11$ .

10 **Příklad 10:** Syntéza statistického kopolymeru poly(HPMA-co-MA-AP-propylazie) korigující 3-azido-1-propylaminu s poly(HPMA-co-MA-AP-T1) (**P8**)



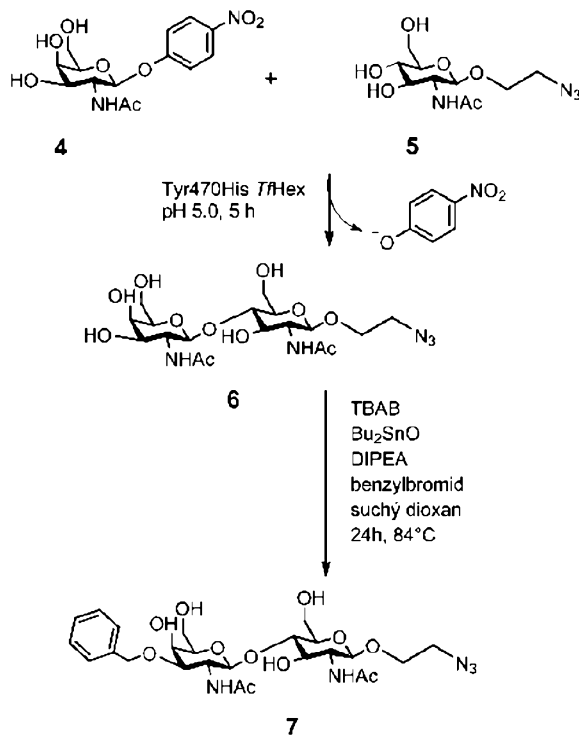
300 mg polymerního prekurzoru **P2** bylo rozpuštěno v 3,5 ml methanolu a za míchání při pokojové teplotě přidáno 40  $\mu$ l 3-azido-1-propylaminu (0,40 mmol). Po 30 min bylo do reakční směsi  
 15 přikapáno pomalu 92  $\mu$ l *N*-ethyl-diisopropylaminu (0,53 mmol). Po 20 h reakce při pokojové teplotě bylo přidáno 40  $\mu$ l 1-aminopropan-2-olu (0,29 mmol) a mícháno dalších 30 min. Polymer byl čištěn od nízkomolekulárních příměsí gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu. Polymer byl izolován srážením do nadbytku acetonu (50 ml), následován filtrací a sušením. Výtěžek: 234 mg; Molární hmotnosti:  $M_w = 23\,700$  g/mol,  $M_n = 21\,100$  g/mol,  $\bar{D} = 1.1$ ; obsah azidových skupin 16,7 % mol.

25 **Příklad 11:** Syntéza 3'-*O*-[4-(azidomethyl)benzyl]- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-3-*O*-(4-{[4-(bromomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}benzyl)-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosidu (**3**)



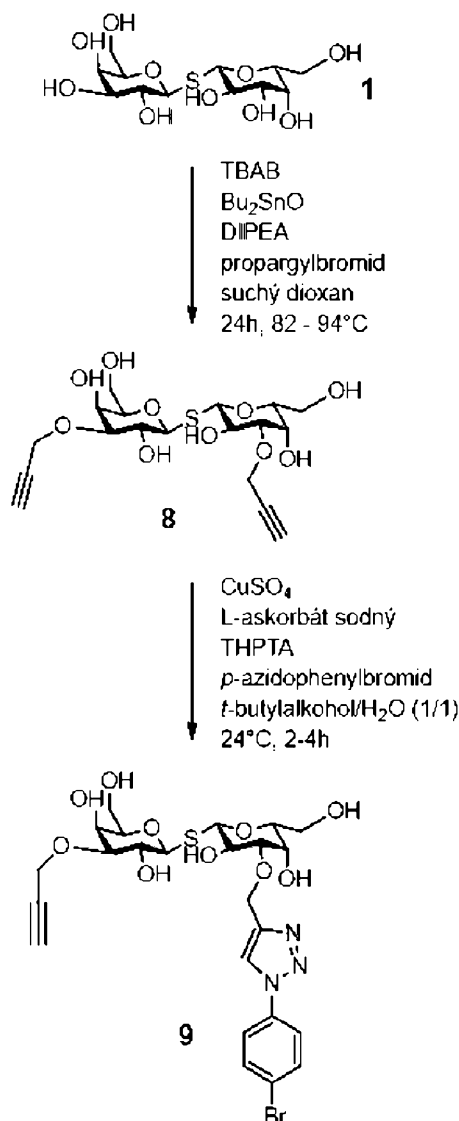
Výchozí látka  $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 1)-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid (**1**) reagovala v přítomnosti dibutylcinoxidu (Bu<sub>2</sub>SnO) s nadbytkem bromidu za vzniku selektivně C-3, C-3' disubstituované sloučeniny **2**. Reakce probíhala v přítomnosti katalyzátoru fázového transferu *tetra*-*n*-butylamoniumbromidu (TBAB) v suchém dioxanu za zvýšené teploty (82 až 84 °C). Následně byla pomocí cykloadiční click reakce terminální azidové funkční skupiny a alkynové skupiny propynylbromidu (0,5 eq.) za katalýzy Cu(I) v přítomnosti *tris*-hydroxypropyltriazolylmethylaminového ligandu (THPTA) připravena sloučenina **3**.

Příklad 12: Syntéza 2-azidoethyl-3-*O*-benzyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosidu (**7**)



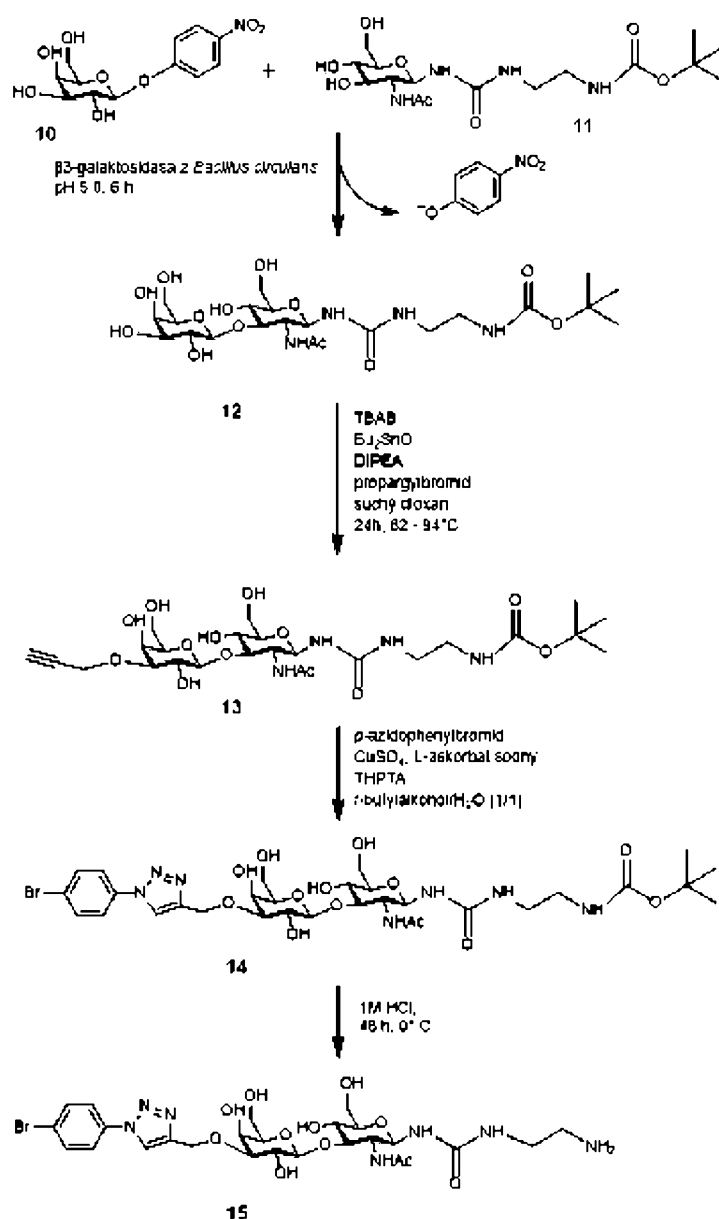
Disacharid **6** byl připraven chemoenzymovou syntézou z akceptoru 2-azidoethyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosidu (**5**) a donoru *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-galaktopyranosidu (**4**) za katalýzy mutantní Tyr470His  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasou z *Talaromyces flavus* (Tyr470His 1/Hex) (Bojarová P. et al. J Nanobiotechnol. 2018, 16, 73). Benzyl byl selektivně vnesen na C'-3 reakcí **6** s benzylbromidem v přítomnosti dibutylcínoksidu ( $\text{Bu}_2\text{SnO}$ ) za vzniku substituovaného sacharidu **7**.

Příklad 13: Syntéza 3-O-propynyl-  $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-3-O-[(4-bromfenyl)-1*H*-(1,2,3-triazol-4-yl)methyl]- $\beta$ -D-galaktopyranosidu (**9**)



Výchozí látka  $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid (**1**) reagovala v přítomnosti cínového komplexu ( $\text{Bu}_2\text{SnO}$ ) s nadbytkem propynylbromidu za vzniku selektivně C-3, C-3' disubstituované sloučeniny **8**. Reakce probíhala v přítomnosti katalyzátoru fázového transferu (TBAB) v suchém dioxanu za zvýšené teploty (82 až 94 °C). Druhý reakční krok založený na Cu(I)-katalyzované azid-alkynové cykloadici 4-bromfenylazidu za katalýzy THPTA byl proveden ve směsi *tert*-butylalkoholu a vody za vzniku sloučeniny **9**.

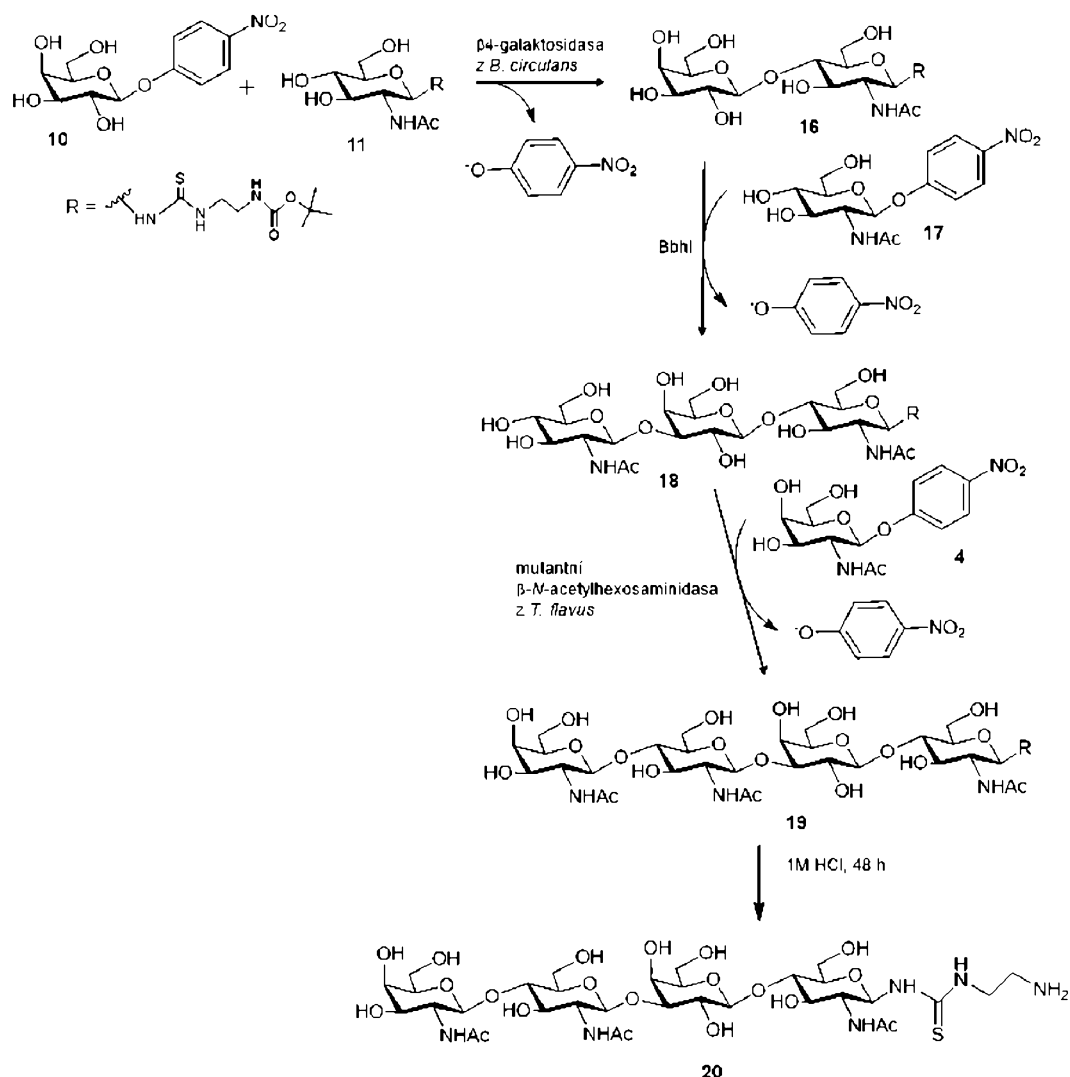
Příklad 14: Syntéza 2-aminoethylthioureidyl-3-O-[(4-bromfenyl)-1*H*-(1,2,3-triazol-4-yl)methyl]- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosidu (**15**)



- Výchozí disacharid **12** byl připraven chemoenzymovou syntézou z akceptoru (*tert*-butoxykarbonylamino)ethylthioureidyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosidu (**11**) (Bojarová P. et al. *Molecules* 2019, 24, 599) a donoru *p*-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosidu (**10**) za katalýzy rekombinantní β3-galaktosidasou z *Bacillus circulans*. Disacharid **12** reagoval v přítomnosti dibutylcínoxidu ( $\text{Bu}_2\text{SnO}$ ) s nadbytkem propynylbromidu za vzniku selektivně C-3' substituované sloučeniny **13**. Reakce probíhala v přítomnosti katalyzátoru fázového transferu (TBAB) v suchém dioxanu za zvýšené teploty (82 až 94 °C). Nasledný reakční krok založený na Cu(I)-katalyzované cykloadici mezi terminálním alkynem **13** a *p*-azidofenylbromidem v přítomnosti THPTA byl proveden ve směsi *tert*-butylalkoholu a vody za vzniku sloučeniny **14**. Následné odchránění aminoskupiny za vzniku sloučeniny **15** proběhlo v 1M HCl při 4 °C po dobu 48 h.

15

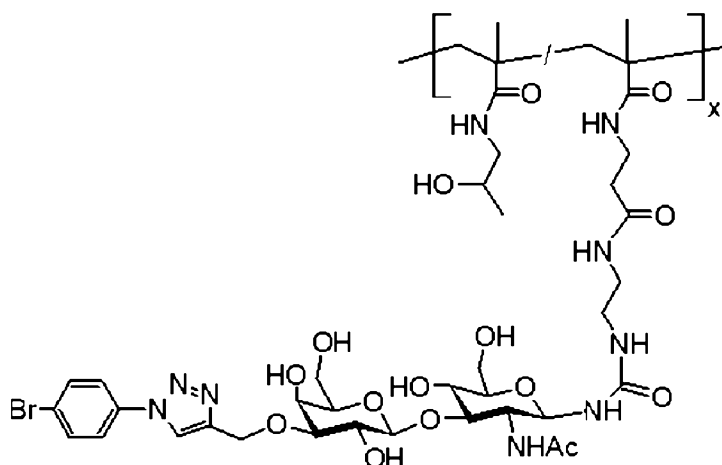
Příklad 15: Syntéza β-D-GalNAc-(1→4)-β-D-GlcNAc-(1→3)-β-D-Gal-(1→4)-β-D-GlcNAc-1-*O*-(2-aminoethylthioureidyl) (LacdiNAc-LacNAc-linker-NH<sub>2</sub>; **20**)



Výchozí disacharid **16** byl připraven chemoenzymovou syntézou z akceptoru (*tert*-butoxykarbonylamino)ethylthioureidyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosidu (**11**) (Bojarová P. et al. *Molecules* 2019, 24, 599) a donoru *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosidu (**10**) za katalýzy rekombinantní  $\beta$ 4-galaktosidasou z *Bacillus circulans*. Disacharid **16** byl použit jako akceptor pro glykosylaci  $\beta$ -D-GlcNAc jednotkou za katalýzy rekombinantní  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasou Bbhl z *B. fidobacterium b. fidum*, selektivní pro tvorbu  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) vazby. Vzniklý trisacharid **18** byl dále použit jako akceptor pro glykosylaci  $\beta$ -D-GalNAc za katalýzy selektivní mutantní  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasou z *Talaromyces flavus* za vzniku tetrasacharidu **19**. Následné odchránění aminoskupiny u tetrasacharidu **19** za vzniku sloučeniny **20** proběhlo v 1M HCl při 4 °C po dobu 48 h. Alternativně je možné tuto sloučeninu připravit pomocí rekombinantních glykosyltransferas dle postupů popsanych v literatuře (Laaf D. et al. *Bioconjug. Chem.* 2017, 28, 2832-2840).

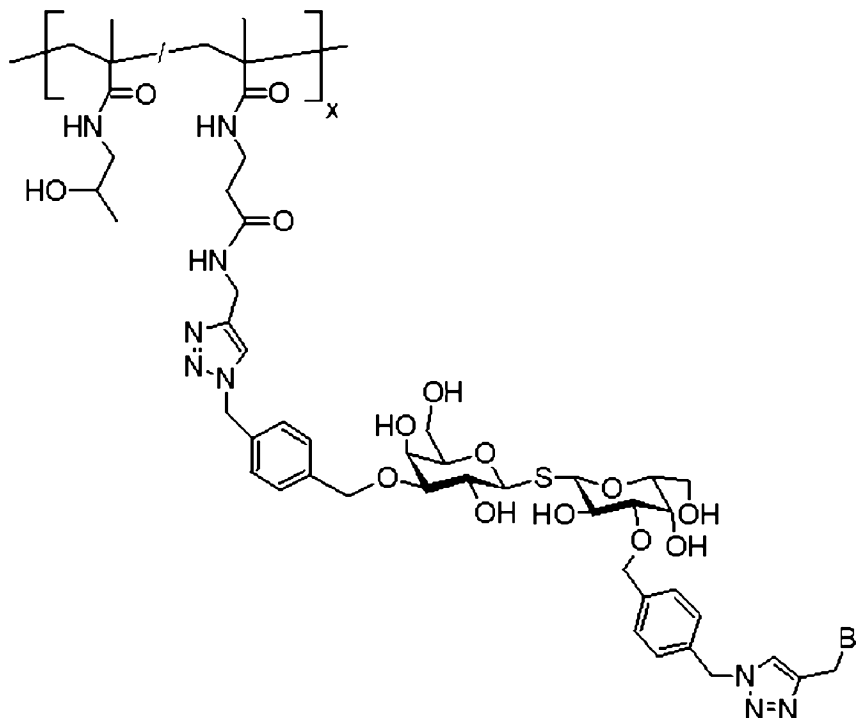
15

Příklad 16: Syntéza konjugátu substituovaného sacharidu **15** s *poly(HPMA-co-MA-AP-TI)* (**P9**)



25 mg polymeru **P2** (obsahujícího 14,6  $\mu\text{mol}$  TT skupin) a 9,2 mg sloučeniny **15** (13,1  $\mu\text{mol}$ ) bylo  
 rozpuštěno v 0,8 ml dimethylacetamidu a probubláno argonem. Po přidavku 2,3  $\mu\text{l}$  *N*-  
 ethyldiisopropylaminu (13,1  $\mu\text{mol}$ ) byla reakční směs míchána 20 h při pokojové teplotě. Poté bylo  
 5 přidáno 1,1  $\mu\text{l}$  1-aminopropan-2-olu (14,6  $\mu\text{mol}$ ) a ponecháno reagovat 1 h. Polymerní konjugát  
 byl čištěn od nízkomolekulárních příměsí gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu.  
 Polymerní frakce byla zbavena methanolu pomocí vakuové destilace a polymerní konjugát byl  
 izolován lyofilizováním. Výtěžek: 25,4 mg; 83,4 %; Molární hmotnosti:  $M_w = 25400 \text{ g/mol}$ ,  $M_n =$   
 10  $23\,600 \text{ g/mol}$ ,  $D = 1,08$ ; Obsah cukerné složky v konjugátu byl 5,0 % mol.

Příklad 17: Syntéza konjugátu substituovaného sacharidu **3** s *poly(HPMA-co-MA-AP-propynyl)em*  
 (**P10**)

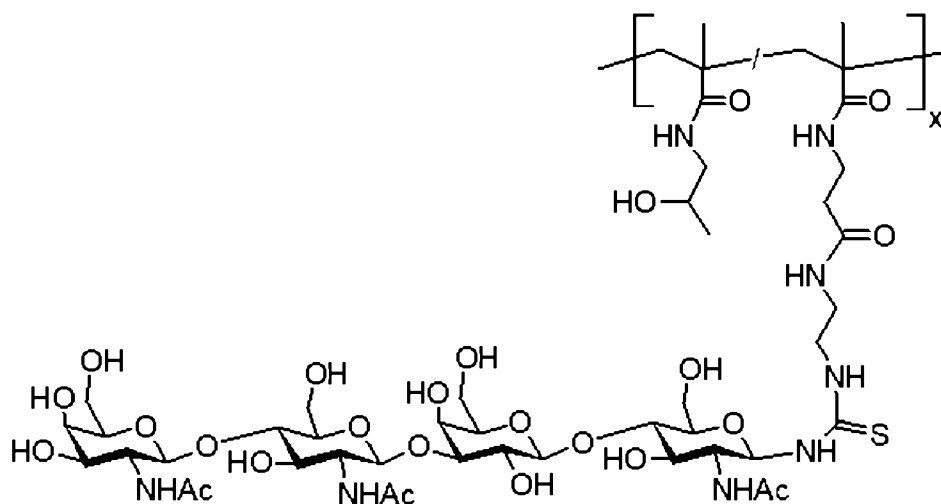


15

Ke 2 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (16  $\mu\text{mol}$ ) rozpuštěným v 25  $\mu\text{l}$  vody bylo přidáno k roztoku 25 mg  
*poly(HPMA-co-MA-AP-propynyl)*, **P4**, (17,4  $\mu\text{mol}$  propynylových skupin), 1,6 mg askorbátu  
 sodného (16,2  $\mu\text{mol}$ ) a 12,9 mg sloučeniny **3** (16,2  $\mu\text{mol}$ ) rozpuštěných v 225  $\mu\text{l}$  vody. Reakční  
 20 směs byla probublána argonem před a po přidavku síranu měďnatého a míchána 1 h při pokojové

teplotě. Poté byl roztok naředěn 1 ml 5% roztoku disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny, polymerní konjugát byl přečištěn gelovou filtrací na koloně Sephadex G-25 ve vodě a lyofilizován. Konjugát byl rozpuštěn ve 2 ml methanolu a přidán nadbytek 8-chinolinolu. Po 20 min byl vzorek  
 5 čištěn od zbytkové mědi gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu. Po odpaření rozpouštědla byl polymer rozpuštěn ve vodě a lyofilizován. Výtěžek: 29,4 mg; 84,0 %; Molární hmotnosti:  $M_w = 27\,500$  g/mol,  $M_n = 25\,200$  g/mol,  $D = 1,09$ ; Obsah cukerné složky v konjugátu byl 9,8 % mol.

Příklad 18: Syntéza konjugátu substituovaného sacharidu **20** s poly(HPMA-co-MA-AP-TT) (**P11**)



Polymerní konjugát **P11** byl připraven s různým obsahem cukerné složky. 20 mg polymeru **P2** (obsahujícího 16,4  $\mu$ mol TT skupin) a 2,7 mg substituovaného sacharidu **20** (3,0  $\mu$ mol) v případě  
 15 přípravy **P11a**, 5,3 mg substituovaného sacharidu **20** (5,9  $\mu$ mol) v případě přípravy **P11b**, 9,1 mg substituovaného sacharidu **20** (10,2  $\mu$ mol) v případě přípravy **P11c**, nebo 10,3 mg substituovaného sacharidu **20** (11,2  $\mu$ mol) v případě přípravy **P11d** bylo rozpuštěno v 1,2 ml směsi dimethylacetamidu se suchým methanolem (3:1) a probubláno argonem. Po přidavku 0,8  $\mu$ l *N*-ethyl-diisopropylaminu (4,8  $\mu$ mol) byla reakční směs míchána 20 h při pokojové teplotě. Poté bylo  
 20 přidáno 1,5  $\mu$ l 1-aminopropan-2-olu (20  $\mu$ mol) a ponecháno reagovat 0,5 h. Polymerní konjugát byl čištěn od nízkomolekulárních příměsí gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu. Polymerní frakce byla zbavena methanolu pomocí vakuové destilace a polymerní konjugát byl izolován lyofilizací. Charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 1.

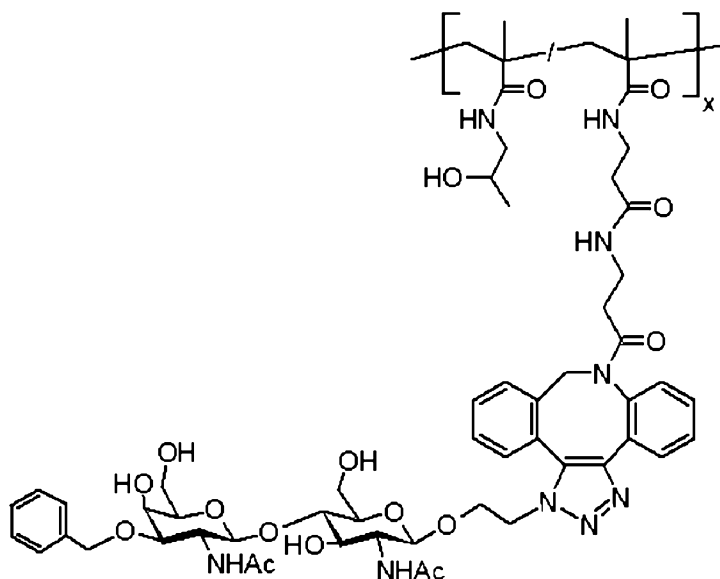
25 Tabulka 1. Charakteristika připravených glykopolymerů nesoucích substituovaný sacharid **20**

| Název konjugátu | Výtěžek reakce (%) | Obsah cukerné složky (% mol.)* | $M_w$ (g/mol) † | $M_n$ (g/mol) † | $D$ † |
|-----------------|--------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|-------|
| <b>P11a</b>     | 88                 | 2,6                            | 22500           | 21700           | 1,04  |
| <b>P11b</b>     | 90                 | 4,9                            | 24500           | 22400           | 1,09  |
| <b>P11c</b>     | 91                 | 7,2                            | 28300           | 27300           | 1,03  |
| <b>P11d</b>     | 90                 | 9,7                            | 28200           | 26300           | 1,07  |

\*Obsah substituovaných sacharidů byl stanoven pomocí  $^1\text{H-NMR}$ .

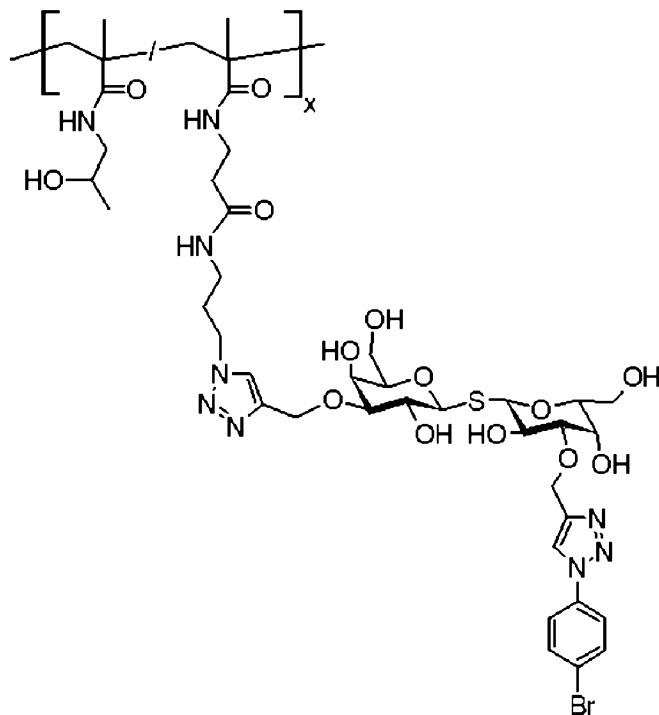
†Molární hmotnosti a disperzita byly stanoveny pomocí GPC, jak je uvedeno v příkladu 21.

30 Příklad 19: Syntéza konjugátu substituovaného sacharidu **7** s poly(HPMA-co-MA-AP-azadibenzocyclooktynem) (**P12**)



25 mg *poly(HPMA-co-MA-AP-azadibenzocyclooctynu)*, **P7**, (8,9  $\mu\text{mol}$  azadibenzocyclooctynových skupin) bylo rozpuštěno v 300  $\mu\text{l}$  methanolu, smícháno s roztokem  
 5 6,3 mg substituovaného sacharidu **7** (11,0  $\mu\text{mol}$ ) v 200  $\mu\text{l}$  methanolu a probubláno argonem. Po 20 h míchání při pokojové teplotě byl polymerní konjugát čištěn gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu. Polymerní frakce byla zakoncentrována na vakuu na 1 ml a polymer byl izolován precipitací do nadbytku ethylacetátu (40 ml) a filtrací následovanou sušením do konstantní hmotnosti. Výtěžek: 24,7 mg; 80,1 %; Molární hmotnosti:  $M_w = 30\,800\text{ g/mol}$ ,  $M_n =$   
 10  $28\,000\text{ g/mol}$ ,  $D = 1,10$ ; Obsah cukerné složky v konjugátu byl 5,1 % mol.

Příklad 20: *Syntéza konjugátu substituovaného sacharidu 9 s poly(HPMA-co-MA-AP-propylazidem) (P13)*



Polymerní konjugát **P13** byl připraven s různým obsahem cukerné složky. 15 mg polymerního prekurzoru **P8** bylo rozpuštěno v 150  $\mu$ l dimethylformamidu a smícháno s 3,54 mg (5,6  $\mu$ mol), nebo 6,3 mg (9,9  $\mu$ mol) substituovaného sacharidu **9** v 300 dimethylformamidu pro přípravu **P13a**, či **P13b**, resp. Poté bylo přidáno 0,88 mg (6,2  $\mu$ mol), nebo 2,42 mg (12,9  $\mu$ mol) CuBr v případě **P13a**, či **P13b**, resp., a mícháno při pokojové teplotě Po 20 h byl přidán nadbytek 8-chinolinolu, roztok byl míchán dalších 30 min a naředěn 2 ml methanolu. Polymerní konjugát byl přečištěn gelovou filtrací na koloně Sephadex LH-20 v methanolu. Frakce obsahující polymer byla odpařena, produkt rozpuštěn ve vodě a lyofilizován. **P13a**: Výtěžek: 15,3 mg; molární hmotnosti:  $M_w = 28\,600$  g/mol,  $M_n = 25\,900$  g/mol,  $\bar{D} = 1,1$ ; obsah cukerné složky v konjugátu byl 4,5 % mol. **P13b**: Výtěžek: 17,4 mg; molární hmotnosti:  $M_w = 30\,600$  g/mol,  $M_n = 28\,100$  g/mol,  $\bar{D} = 1,1$ ; obsah cukerné složky v konjugátu byl 8,9 % mol.

Příklad 21: *Příklad charakterizace polymerních prekurzorů a konjugátů*

Připravené kopolymery, polymerní prekurzory i jejich konjugáty se substituovanými sacharidy byly charakterizovány stanovením váhového i početního průměru molárních hmotností ( $M_w$ ,  $M_n$ ) a příslušného indexu disperzity ( $\bar{D}$ ) pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) na systému vybaveném UV detektorem (Shimadzu, Japan), RI detektorem (Optilab REX, Wyatt Technology Corp., USA) a víceúhlovým detektorem rozptylu světla (DAWN Heleos-II, Wyatt Technology Corp., USA). Pro charakterizaci byla v případě SEC použita kolona TSK 3000 Super SW a jako mobilní fáze směs MeOH (80 %) a 0,3 M octanového pufru o pH 6,5 (20 %). Koncentrace vzorků byla ve všech případech 3 mg/ml.

Obsah TT skupin byl stanoven spektrofotometricky na UV-VIS spektrofotometru Specord 205 (Analytik Jena, Německo) v methanolu ( $\epsilon_{305} = 10\,800$  l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) podle literatury (Šubr V. et al. Biomacromolecules 2006, 7 (1), 122-130).

Obsah trojných vazeb a konjugovaných substituovaných sacharidů byl stanoven pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) na spektrometru Bruker Avance III 600 MHz ve vodě.

Příklad 22: *ELISA*

Afinita Gal-3 k substituovaným sacharidům a jejich konjugátům s polymery byla stanovena za použití kompetitivního ELISA stanovení (Bojarová P. et al. J Nanobiotechnol. 2018, 16, 73; Bumba L. et al. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 372). Toto stanovení dává předběžnou informaci o síle vazby Gal-3 na glykokopolymery, ale je třeba jej brát pouze jako orientační pomůcku a vzít v úvahu zvláště biologický účinek glykopolymerů (viz příklady 25-27). V jamkách mikrotitračních destičkových modulů F16 Maxisorp NUNC-Immuno Modules (Thermo Scientific, Roskilde, Dánsko) byl imobilizován přes noc asialofetuin (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo; 0,1  $\mu$ M v PBS pufru, 50  $\mu$ l, 5 pmol na jamku). Jamky byly následně vyblokovány BSA (2 % w/v) rozpuštěným v PBS (1 h, teplotě místnosti). Posléze byla do jamek přidána směs testované sloučeniny v různých koncentracích a Gal-3 (celkový objem 50  $\mu$ l; 4,5  $\mu$ M finální koncentrace Gal-3) a inkubovány po dobu 2 hodin. Detekce navázaného Gal-3 byla provedena pomocí monoklonální anti-His<sub>6</sub>-IgG1 myši protilátky konjugované s křenovou peroxidasou (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) rozpuštěné v PBS pufru (1:1000, 50  $\mu$ l, 1 h, teplotě místnosti). Substrátový roztok TMB One (Kem-En-Tec, Taastrup, Dánsko) byl použit k zahájení kolorimetrické reakce konjugované peroxidasy. Tato reakce byla zastavena přidávkem 3 M HCl (50  $\mu$ l). Vazebný signál navázaného Gal-3 byl stanoven spektrofotometricky při 450 nm (Spectra Max Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Získané výsledky byly analyzovány za použití softwaru Prism 7.0 (GraphPad, USA) a byly vyhodnoceny jako IC<sub>50</sub>.

Tabulka 2. Inhibiční potenciál vybraných sloučenin a konjugátů (IC<sub>50</sub>) stanovený metodou ELISA

| Název konjugátu                  | Obsah cukerné složky [% mol.]* | IC <sub>50</sub> na glykan [μM] | IC <sub>50</sub> glykopolymeru [μM] |
|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Laktosa                          | -                              | 132                             | -                                   |
| Substituovaný sacharid <b>20</b> | -                              | 7,2 <sup>†</sup>                | -                                   |
| Glykopolymer <b>P11a</b>         | 2,6                            | 0,22                            | 0,066                               |
| Glykopolymer <b>P11b</b>         | 4,9                            | 0,14                            | 0,023                               |
| Glykopolymer <b>P11c</b>         | 7,2                            | 4,8                             | 0,51                                |
| Glykopolymer <b>P11d</b>         | 9,7                            | 4,4                             | 0,40                                |
| Substituovaný sacharid <b>9</b>  | -                              | 16                              | -                                   |
| Glykopolymer <b>P13a</b>         | 4,5                            | 28                              | 4,2                                 |
| Glykopolymer <b>P13b</b>         | 8,9                            | 6,9                             | 0,62                                |

\*Obsah substituovaných sacharidů byl stanoven pomocí <sup>1</sup>H-NMR.

5 <sup>†</sup> Převzato z literatury (Böcker S. et al. Biomolecules 2015, 5, 1671-1696)

**Příklad 23:** *Kvantifikace produkce Gal-3 u vybraných nádorových linií.*

| Buněčná linie   | Detekce Gal-3 s využitím průtokové cytometrie | Exprese Gal-3 detekovaná pomocí metody Western blot |                |
|-----------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
|                 | Lokalizace na membráně                        | Lokalizace na membráně                              | Intracelulární |
| <b>4T1</b>      | Netestováno                                   | +                                                   | ++             |
| <b>B16-F10</b>  | Netestováno                                   | +                                                   | ++             |
| <b>CT26</b>     | Netestováno                                   | -                                                   | ++             |
| <b>DLD-1</b>    | ++                                            | +                                                   | ++             |
| <b>HEK293</b>   | ++                                            | +                                                   | ++             |
| <b>HT-29</b>    | +                                             | Netestováno                                         | Netestováno    |
| <b>Jurkat</b>   | Netestováno                                   | -                                                   | -              |
| <b>LNCaP</b>    | -                                             | -                                                   | -              |
| <b>OVCAR-3</b>  | ++                                            | +                                                   | ++             |
| <b>PC3</b>      | +                                             | +                                                   | ++             |
| <b>Raji</b>     | -                                             | Netestováno                                         | Netestováno    |
| <b>SU-DHL-5</b> | -                                             | -                                                   | -              |
| <b>SU-DHL-6</b> | +                                             | Netestováno                                         | Netestováno    |

Vysvětlivky: Míra exprese Gal-3 – „-“ = nedetekovatelná, „+“ = výrazná, „++“ = silně výrazná.

10

**Příklad 24:** *Inhibice vazby externího galektinu-3 na povrch buněk s expresí galektinu-3 pomocí glykopolymerů*

Schopnost glykopolymerů inhibovat vazbu externího Gal-3 na povrch buněk byla prokázána pomocí inhibičního vazebného testu průtokovou cytometrií. V testu byl použit proteinový konstrukt Gal-3-AVI nesoucí na své N-koncové části aminokyselinovou sekvenci Avi-tag, která umožňuje cílené navázání molekuly biotinu a jeho následnou detekci pomocí fluorescenčně značeného konjugátu streptavidin-fykoerytrin (L. Bumba et al. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 372). Jak bylo zjištěno imunochemickým testem pomocí metody ELISA, vazebné vlastnosti nativního Gal-3 a Gal-3-AVI konstruktů jsou identické. Vazba glykopolymerů na Gal-3 inhibovala vazbu Gal-3 na povrch HEK293 buněk (imortalizovaná buněčná linie lidských zárodečných ledvinových buněk), u nichž byla prokázána silná exprese Gal-3 (viz příklad 23) a zároveň velká kapacita vyvazovat volný Gal-3 z roztoku.

Alikvoty Gal-3-AVI konstruktů (finální koncentrace 10 µg/ml) byly smíchány se zvyšující se koncentrací glykopolymeru **P11b** (3 pM – 100 µM) nebo laktosy (3 nM – 100 mM) jako pozitivní kontroly a inkubovány po dobu 30 minut na ledu v PBS pufru s přidavkem 1% hovězího sérového albuminu (BSA). Tato směs byla přidána k suspenzi HEK293 buněk (10<sup>6</sup> /ml) a pomalu promíchávána na ledu po dobu 30 min. Následně byly buňky promyty PBS puftrem a označeny pomocí streptavidin-fykoerytrinového konjugátu (Biolegend, USA). Síla vazby Gal-3-AVI konstruktů na povrch HEK293 buněk byla analyzována pomocí průtokové cytometrie a kvantifikována jako relativní intenzita fluorescence při 575 nm.

Tabulka 3. Inhibiční potenciál glykopolymeru **P11b** (IC<sub>50</sub>) stanovený v inhibičním vazebném testu s buněčnou linií HEK293 pomocí průtokové cytometrie

| Název konjugátu          | Obsah cukerné složky [% mol.]* | IC <sub>50</sub> glykopolymeru [µM] |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Laktosa                  | -                              | 225                                 |
| Glykopolymer <b>P11b</b> | 4,9                            | 0,057                               |

\*Obsah substituovaných sacharidů byl stanoven pomocí <sup>1</sup>H-NMR.

Příklad 25: *Inhibice galektin-3 indukované apoptózy lidských T buněk pomocí glykopolymerů*

Schopnost glykopolymerů účinně inhibovat apoptózu indukovanou Gal-3 byla prokázána prostřednictvím annexin V/ propidiumjodid apoptotického testu průtokovou cytometrií. Experimenty byly provedeny na imortalizované buněčné lince lidských T lymfocytů Jurkat. Bylo prokázáno, že lidský Gal-3 produkovaný nádorovými buňkami do okolního prostředí indukuje u této linie apoptózu.

V pokusech *in vitro* byly Jurkat buňky preinkubovány s různými koncentracemi glykopolymerů **P11** a **P13** (0,1; 1; 5; 10 a 50 µM) po dobu 5 minut a poté k nim byl přidán 10 µM Gal-3. Glykopolymery vyvazovaly volný Gal-3 z roztoku (okolí buněk), a ten tak nemohl indukovat apoptózu Jurkat buněk. Účinnost inhibice Gal-3 glykopolymerů byla stanovena jako míra apoptózy buněk. Pro kontrolní experiment byl využit čistý HPMA polymer bez substituovaných sacharidů.

Glykopolymery inhibovaly apoptózu indukovanou Gal-3. Maximálního inhibičního efektu bylo dosaženo v koncentraci 5 µM nebo 1 µM v případě testovaného konjugátu **P11b** nebo **P11d** (viz Obr. 1 a 2). Čistý HPMA polymer bez substituovaných sacharidů vykazoval také mírný protektivní účinek, a to v 50 µM koncentraci.

Glykopolymer **P13** také prokázal vysoký inhibiční efekt (viz obr. 3 a 4).

Příklad 26 (srovnávací): *Inhibice galektin-3 indukované apoptózy lidských T buněk (Jurkat) pomocí glykopolymeru nesoucího jednoduchý disacharid LacdiNAc*

Tabulka 4. Charakteristika srovnávacího glykopolymeru nesoucího jednoduchý disacharid LacdiNAc

| Název konjugátu      | Obsah cukerné složky (% mol.)* | $M_w$ (g/mol)† | $M_n$ (g/mol)† | $\overline{D}^\dagger$ | IC <sub>50</sub> na glykan [μM] | IC <sub>50</sub> na glykopolymer [μM] |
|----------------------|--------------------------------|----------------|----------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| <b>LacdiNAc-HPMA</b> | 12,3                           | 30 100         | 28 000         | 1,07                   | 38,5                            | 2,3                                   |

\*Obsah sacharidu byl stanoven pomocí <sup>1</sup>H-NMR.

†Molární hmotnosti a disperzita byly stanoveny pomocí GPC, jak je uvedeno v příkladu 21.

Obr. 5 znázorňuje inhibici galektinem-3 indukované apoptózy Jurkat buněk pomocí konjugátu HPMA polymeru s jednoduchým disacharidem LacdiNAc (obsah LacdiNAc byl 12,3 % mol., viz tabulka 4). S analogickým konjugátem s obsahem 8,4 % mol. LacdiNAc byly dosaženy stejné výsledky. Jedná se o totožný disacharid jako v publikaci (Bojarová P. et al. J. Nanobiotechnol. 2018, 16, 73). Je evidentní, že v buněčných testech vykázal tento konjugát výrazně nižší schopnost inhibovat apoptózu Jurkat buněk než konjugáty se substituovanými disacharidy, které jsou předmětem vynálezu.

#### Příklad 27: *Inhibice migrace lidských i myších nádorových buněk*

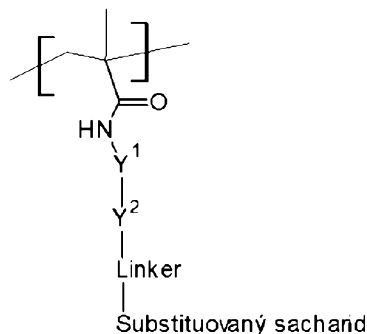
Migrace vybraných nádorových buněk, které exprimují Gal-3, byla studována s využitím tzv. scratch testu. Tento test je založen na nasazení zkoumané buněčné kultury na kultivační misku, při jejím 70 až 80 % nárůstu jsou buňky hrotem 1 ml plastové špičky seškrábnuty z povrchu v délce cca 1 cm a šířce cca 0,5 až 1 mm. Následně je vyměněno médium, v kterém jsou buňky kultivovány, a nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím testované látky. Migrace buněk je poté sledována rychlostí a mírou zarůstání vzniklé mezery.

Inhibiční účinek polymerů **P11a** obsahující 2,6 % mol. a **P11c** obsahujících 7,2 % mol. tetrasacharidu byl sledován po přidání k médiu myších buněk nádoru prsu (4T1), myší melanoblastomové buněčné linie (B16F10) a lidských buněk kolorektálního karcinomu (DLD1). Polymerní konjugáty byly přidány v koncentraci 10 μM nebo 20 μM. Po 24 a 48 h byla měřena oblast, která zůstává buňkami neporostlá, a byl sledován rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou bez přidaného polymerního konjugátu. Obr. 6 ukazuje rozdíly v šířce zarostlé zóny u kontrolního vzorku, ke kterému nebyl přidán žádný polymerní konjugát (kontrola), dále vzorku, ke kterému byl přidán samotný HPMA polymer (pHPMA), a vzorkům s konjugáty. V případě buněk 4T1 a B16F10 oba konjugáty způsobily inhibici migrace oproti kontrole i u vzorku inkubovanému s polymerním nosičem. U buněk DLD1 pouze konjugát s vyšším molárním zastoupením cukerné složky způsobil inhibici migrace odlišnou od kontroly a polymerního nosiče.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Glykopolymer sestávající z HPGA polymerů s obsahem od 0,5 do 25 % mol.

– strukturních jednotek vzorce I:



5

(I)

kde

Y¹ je vybrán ze skupiny tvořené alkylenem majícím 1 až 8 atomů uhlíku;

10

Y² je vybrán ze skupiny zahrnující vazbu, karbamoyl, karbamoyl-(C1-C8-alkylen), přičemž karbamoylem se rozumí skupina  $-C(=O)-NH-$  i skupina  $-NH-C(=O)-$ ;

Linker je vybrán ze skupiny zahrnující 1,2,3-triazolylen, (C1 alkyl)-1,2,3-triazolylen;  $-NH-C(=S)-NH-(CH_2)_2-NH-C(=O)-$ ;

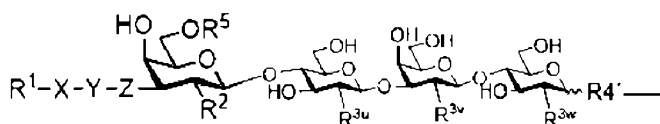
přičemž Substituovaný sacharid je substituovaný sacharid obecného vzorce IIIe;

a popřípadě

15

– koncových skupin o vzorci  $-S-sukcinimid-(CH_2)_r-Linker-Substituovaný\ sacharid$  nebo  $-C(CN)(CH_3)-(C1-C4\ alkylen)-Linker-Substituovaný\ sacharid$ ; kde r je vybráno ze skupiny zahrnující 1, 2 a 3, a Linker a Substituovaný sacharid jsou definovány výše;

přičemž substituovaný sacharid obecného vzorce IIIe je



20

(IIIe)

kde

R¹ je vodík;

X je vazba,

Y je vazba,

Z je O,

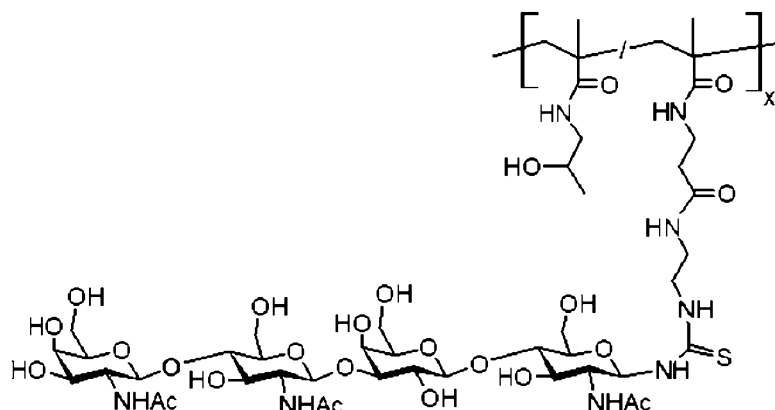
$R^2$ ,  $R^{3u}$ ,  $R^{3v}$ ,  $R^{3w}$  jsou nezávisle vybrány ze skupiny obsahující hydroxyskupinu, acetamidoskupinu,

$R^{4'}$  je vazba k Linkeru,

$R^5$  je vodík;

- 5 přičemž glykopolymer volitelně dále obsahuje větvící jednotky, přičemž větvíci jednotkami jsou amidoaminové jednotky nebo 2,2-bis(hydroxymethyl)propionové jednotky.

2. Glykopolymer podle nároku 1, který má vzorec:

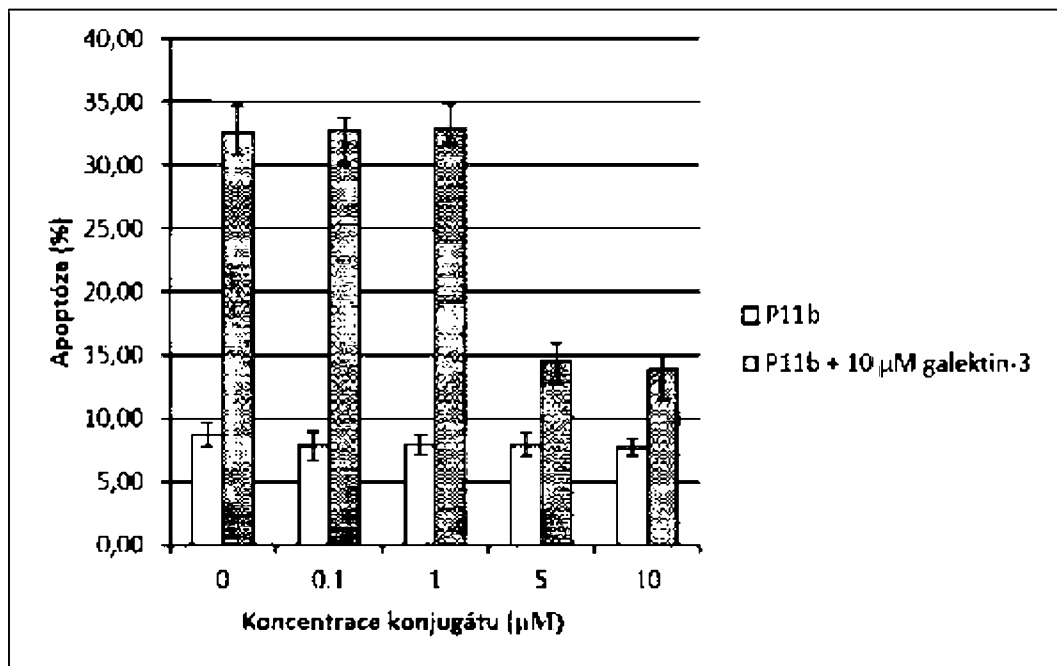


- 10 3. Glykopolymer podle nároku 1 nebo 2 pro použití pro léčbu pevných nádorů, lymfomu nebo leukemie.

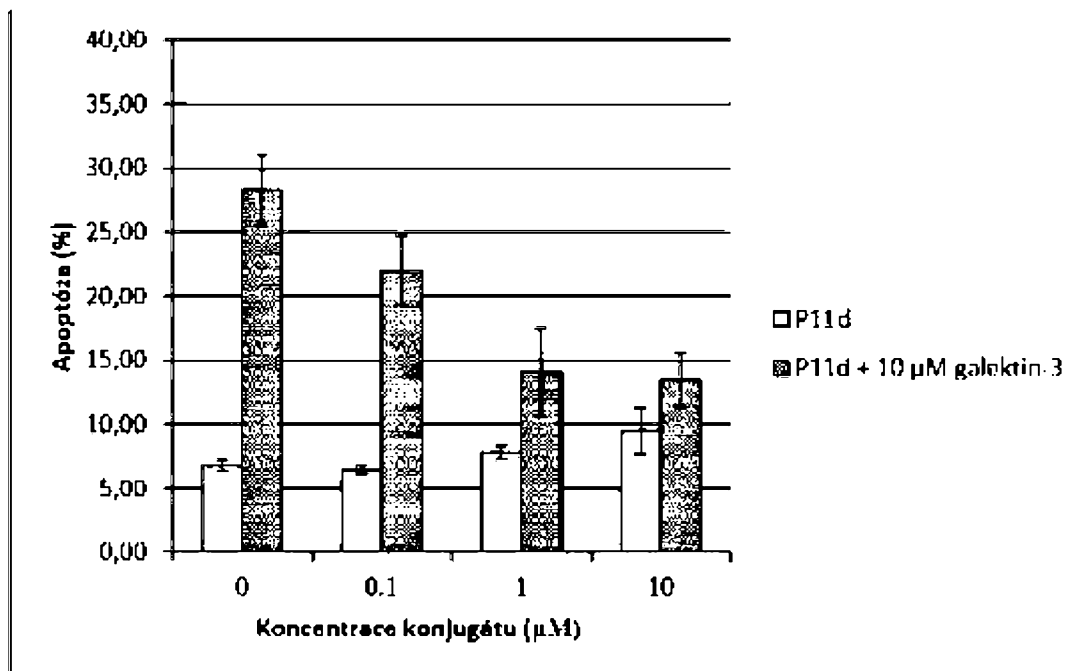
4. Glykopolymer podle nároku 1 nebo 2 pro použití jako adjuvans nebo imunomodulant.

- 15 5. Farmaceutická kompozice, **vyznačená tím**, že obsahuje glykopolymer podle nároku 1 nebo 2 a alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku vybranou ze skupiny zahrnující plniva, antiadheziva, pojiva, potahovací látky, barviva, bobtnadla, ochucovadla, maziva, konzervanty, sladidla, sorbenty.

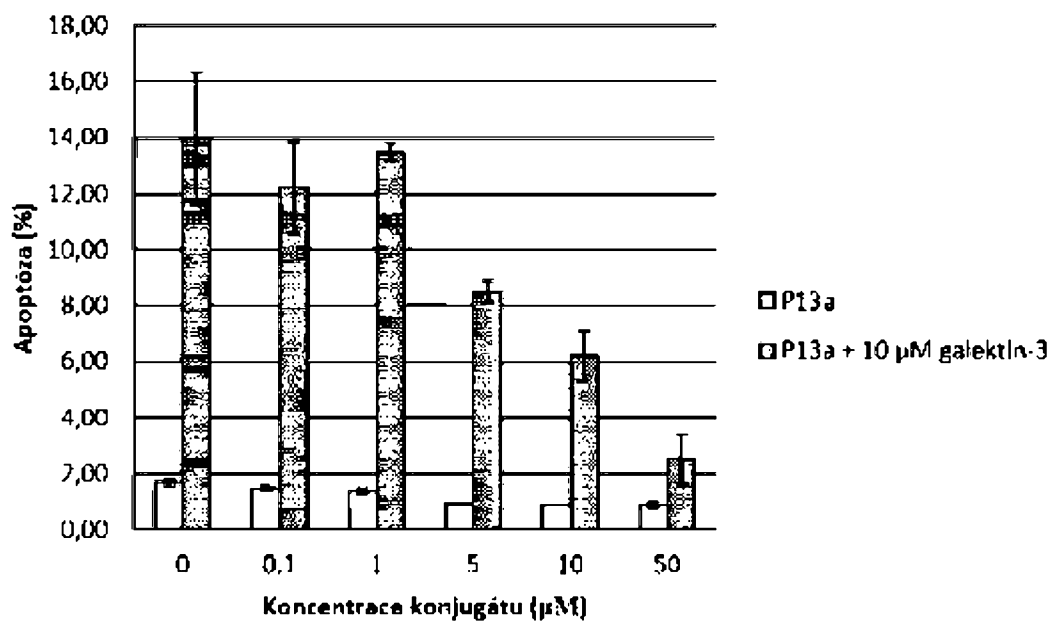
3 výkresy



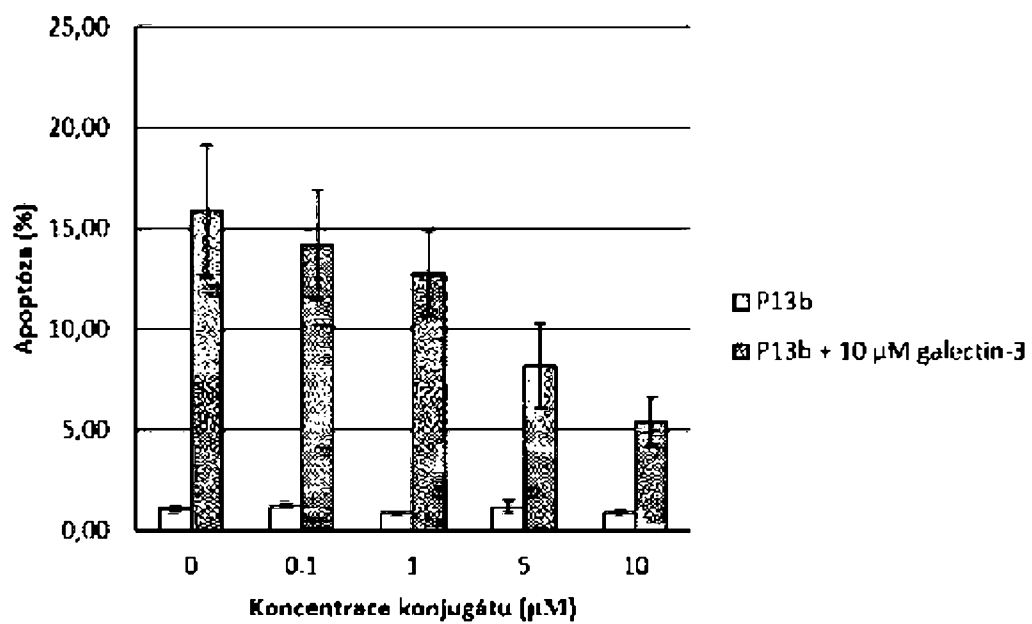
Obr. 1



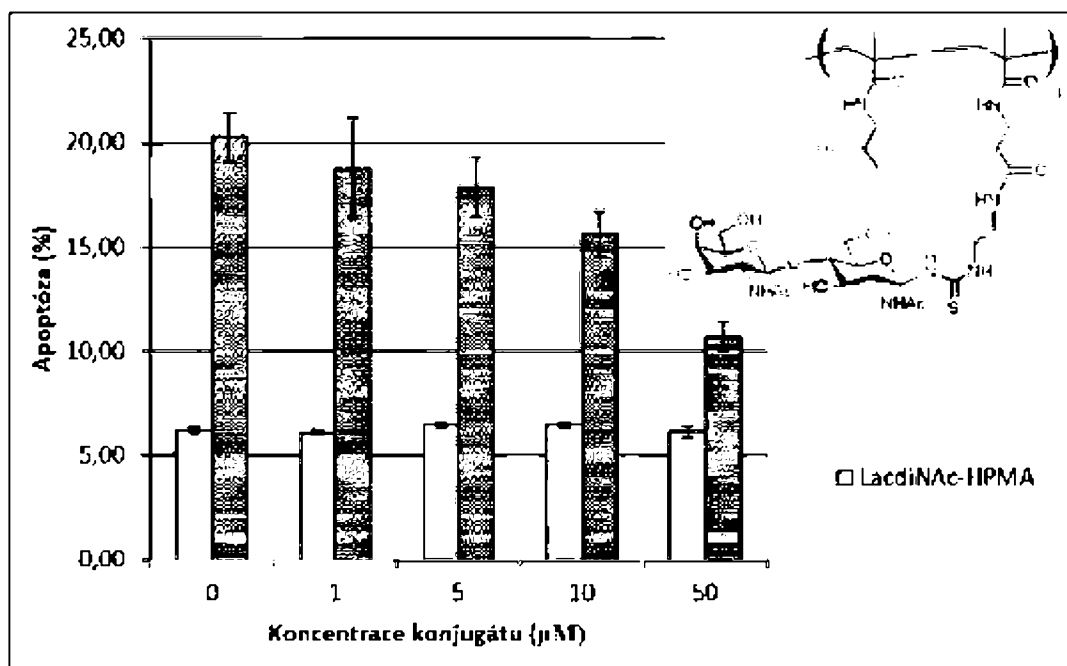
Obr. 2



Obr. 3

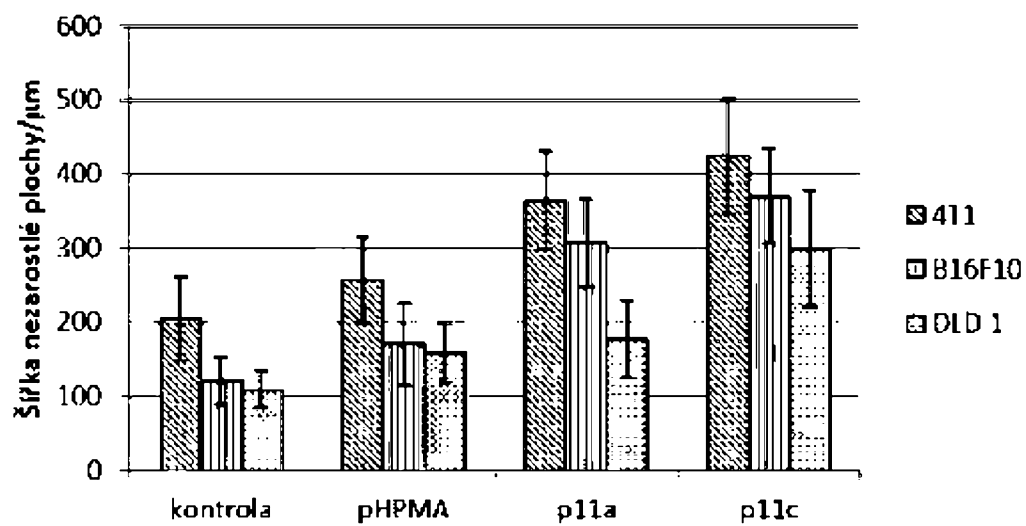


Obr. 4



Obr. 5

## Migrační test



Obr. 6